

Přírodovědecká fakulta University Karlovy

Katedra Biochemie



DIPLOMOVÁ PRÁCE

Příprava dendrimerních derivátů biologicky aktivních látek

Vypracoval:

Petra Bašová

Vedoucí diplomové práce:

Prof. Ing. Vladimír Křen, DrSc

Konzultanti:

Doc. RNDr. Karel Bezouška, CSc

Doc. RNDr. Marie Stiborová, DrSc

Studijní obor:

Biochemie

Praha 2006

Prohlašuji, že jsem tuto diplomovou práci vypracovala samostatně pod vedením svých školitelů Doc. RNDr. Karla Bezoušky, CSc a Prof. Ing. Vladimíra Křena, DrSc a všechny použité prameny jsem řádně citovala.

V Praze dne 2.5.2006

Petra Bašová
podpis

Ráda bych na tomto místě poděkovala svým školitelům Doc. RNDr. Karlu Bezouškovi, CSc a Doc. RNDr. Marii Stiborové, DrSc za zadání zajímavého tématu diplomové práce.

Dále bych chtěla velice poděkovat Prof. Ing. Vladimíru Křenovi, DrSc z MBÚ AV ČR, za vedení diplomové práce, cenné rady a připomínky.

Poděkování patří samozřejmě i celému pracovnímu kolektivu Laboratoře biotransformací MBÚ AV ČR za podporu a pomoc při práci na zadaném úkolu, především pak Ing. K. Křenkovi a Ing. R. Gažákovi za trpělivý přístup, se kterým mě uváděli do tajů organické chemie.

Za měření a interpretaci NMR a MS spekter děkuji Dr. P. Sedmerovi, Ing. M. Kuzmovi a Dr. M. Šulcovi, Ph. D. z MBÚ AV ČR.

Nemohu opomenout poděkovat svým rodičům za jejich neocenitelnou podporu, kterou mi poskytovali po celou dobu mého studia.

1. ÚVOD	1
2. SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK	4
3. TEORETICKÁ ČÁST.....	5
3.1. NÁDOROVÁ ONEMOCNĚNÍ.....	5
3.2. KANCEROGENEZE.....	6
3.2.1. <i>Mechanismus kancerogeneze</i>	6
3.2.2. <i>Chemické kancerogeny</i>	7
3.3. ELLIPTICIN	10
3.3.1. <i>Metabolismus ellipticinu</i>	10
3.3.2. <i>Mechanismy cytostatického působení ellipticinu</i>	11
3.4. TRANSPORTNÍ SYSTÉMY LÉČIV = „DRUG DELIVERY“ SYSTÉMY	13
3.5. DENDRIMERY	14
3.5.1. <i>Typy dendrimerů</i>	16
3.5.2. <i>Struktura dendrimerů</i>	17
3.5.3. <i>Příprava dendrimerů</i>	18
3.5.4. <i>Fyzikální, chemické a biologické vlastnosti dendrimerů</i>	21
3.5.5. <i>Možnosti využití dendrimerů:</i>	21
3.5.6. <i>Rozdíly mezi dendrimery, polymery a rozvětvenými makromolekulami</i>	22
3.6. MULTIVALENTNÍ LÁTKY A PRINCIP MULTIVALENCE	24
3.6.1. <i>Valence</i>	24
3.6.2. <i>Spojka</i>	24
3.6.3. <i>Lešení</i>	27
3.6.4. <i>Hustota ligandů</i>	28
3.6.5. <i>Homo- a heterovalentní molekuly</i>	28
3.7. PRINCIPY POUŽITÝCH REAKCÍ.....	29
3.7.1. <i>Chránění aminoskupiny</i>	29
3.7.2. <i>Michaelova adice</i>	30
3.7.3. <i>Acylace aminů estery karboxylových kyselin (aminolýza esterů)</i>	30
3.7.4. <i>Esterifikace pomocí DCC (N,N'-dicyklohexylkarbodiimid)</i>	31
3.7.5. <i>Esterifikace pomocí CDI (1,1'-karbonyldiimidazol)</i>	32
4. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST.....	34
4.1. CHEMIKÁLIE A MATERIÁLY.....	34
4.1.1. <i>Rozpouštědla</i>	34

4.1.2.	Chemikálie	35
4.1.3.	Přístroje	35
4.2.	METODY A PRACOVNÍ POSTUPY	37
4.2.1.	<i>Analytické metody</i>	37
4.2.1.1.	Tenkvrstvá chromatografie (TLC)	37
4.2.1.2.	Nukleární magnetická rezonance (NMR)	38
4.2.1.3.	Hmotnostní spektrometrie (MS)	38
4.2.2.	<i>Separační metody</i>	40
4.2.2.1.	Sloupcová chromatografie na silikagelu	40
4.2.2.2.	Preparativní tenkovrstvá chromatografie	40
4.2.2.3.	Gelová chromatografie	41
4.3.	PŘÍPRAVA DENDRIMERU	42
4.4.	OPTIMALIZACE TECHNIKY PRO NAVÁZÁNÍ BIOLOGICKY AKTIVNÍ LÁTKY	45
5.	VÝSLEDKY A DISKUSE	53
5.1.	PŘÍPRAVA DENDRIMERŮ	53
5.2.	NAVÁZÁNÍ BIOLOGICKY AKTIVNÍ LÁTKY - PROTINÁDOROVÉ LÉČIVO 9-HYDROXYELLIPTICIN.	57
5.3.	OPTIMALIZACE TECHNIKY PRO NAVÁZÁNÍ BIOLOGICKY AKTIVNÍ LÁTKY	60
5.3.1.	1. syntetický postup	60
5.3.2.	2. syntetický postup	64
5.3.3.	3. syntetický postup	67
6.	GRAFICKÁ PŘÍLOHA	69
7.	ZÁVĚR	70
8.	SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY	76

1. ÚVOD

Ellipticin je cytostatikum, jehož protinádorové účinky jsou známy a využívány. Jeho mechanismus a specifita účinku jsou dnes již z části objasněné a přistupuje se k návržení jeho účinnějších modifikací, mezi které patří např. sloučeniny využívající oligo- a polymerních nosičů ke svázání více jednotek ellipticinu (tzv. “Drug delivery“ systémy). Tyto komplexy jsou v ideálním případě transportovány v organismu do cílového místa.

Tento projekt, jehož součástí je i předkládaná diplomová práce, zahrnuje konjugaci protinádorového léčiva 9-hydroxyellipticinu na multivalentní (dendrimerní) nosič a následné navázání na izolované proteiny. V neposlední řadě zahrnuje testování vazebné a inhibiční aktivity na izolovaných proteinech, protinádorové a imunoaktivační vlastnosti, biodistribuci a toxicitu *in vivo* a možnost připojení na polymerní nosič.

Cílem diplomové práce bylo znásobit účinky biologicky aktivní látky – 9-hydroxyellipticinu, pomocí principu multivalentních interakcí. Prvním krokem bylo připravit dendrimery nesoucí dvě a čtyři funkční skupiny. Druhým krokem bylo optimalizovat techniky pro navázání biologicky aktivní látky. Následně charakterizovat vzniklé produkty.

První část práce je zaměřena na syntézu dendrimerů 1. a 2. generace. Jsou zde rozpracovány základní pracovní postupy a metodiky. Tyto dendrimerní struktury (nosiče) byly použity ke konjugaci se strukturními analogy 9-hydroxyellipticinu – 5-hydroxyindolem a 2-hydroxykarbazolem.

V druhé části se práce zabývá vypracováním vhodných technik obecně použitelných pro navázání protinádorového léčiva 9-hydroxyellipticinu. Z důvodů velmi vysoké ceny 9-hydroxyellipticinu je třeba vyvinout jednoduchou a efektivní metodu pro jeho navázání v preparativním měřítku. Tato část tvoří modelovou studii, ve které jsou rozpracovány syntetické postupy, pomocí kterých by se měly připravit multivalentní deriváty 9-hydroxyellipticinu.

2. SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK

ATP	Adenosintrifosfát
cytP450	Cytochrom P450 (P-pigment, absorbuje v Soretově pásmu při 450 nm)
PAMAM	Polyamidoamin
DMF	<i>N,N</i> -Dimethylformamid
THF	Tetrahydrofuran
BOC	<i>t</i> -Butoxykarbonyl
EtOH	Ethanol
MeOH	Methanol
<i>n</i>-PrOH	<i>n</i> -Propanol
Ph₃P	Trifenylfosfin
HOAc	Kyselina octová
DCC	<i>N,N'</i> -Dicyklohexylkarbodiimid
CDI	1,1'-Karbonyldiimidazol
Z-Cl	Benzyl-chlorformiát
DMAP	4-Dimethylaminopyridin
DBU	Diazabicyklo[5,4,0]undec-7-en
PARABA	Paradimethylaminobenzaldehyd
UV	UltraViolet
TLC	Thin Layer Chromatography (chromatografie na tenké vrstvě)
NMR	Nuclear Magnetic Resonance (nukleární magnetická rezonance)
MS	Mass Spectroscopy (hmotnostní spektrometrie)
ESI-MS	Electron Spray Impact – Mass Spectroscopy
COSY	COleration SpetroscopY (korelační spektroskopie)
HMQC	Heteronuclear Multiple-Quantum Coherence (heteronukleární více kvantová koherence)
HMBC	Heteronuclear Multiple Bond Correlation (heteronukleární korelace přes více vazeb)
NOE	Nuclear Overhauser Effect (nukleární Overhauserův efekt)
IR	InfraRed (infračervený)
lab. t.	Laboratorní teplota

3. TEORETICKÁ ČÁST

3.1. *Nádorová onemocnění*

Nádorová onemocnění jsou v současnosti příčinou úmrtí každého pátého občana ČR a jejich výskyt neustále narůstá. K hledání možnosti účinnějších léčebných postupů je proto třeba věnovat zvláštní pozornost nejen vylepšení léčby, ale i poznání příčin a průběhu vývoje onemocnění (kancerogeneze).¹ V posledních desetiletích bylo výzkumem získáno mnoho poznatků o maligním (zhoubném) bujení, které přispěly k pochopení základních mechanismů vzniku nádorové buňky. Bylo jasně prokázáno, že maligní zvrát je procesem několikasupňovým a zároveň byly nalezeny faktory, které tento proces způsobují nebo se na něm podílejí. Výzkum nádorových onemocnění je interdisciplinární záležitostí, kdy spolupracují nejen lékaři, ale i biologové a chemici.

Za základní podmínku vývoje nádorových procesů je v současnosti považováno vyvolání určitých genetických změn, které porušují regulační procesy a jež následně vedou ke ztrátě diferenciaci buněk, k jejich nekontrolovanému množení a k narušení tkáňové celistvosti. Ve zdravém organismu je za bezchybný ontogenetický vývoj podle programu obsaženého v zygotě a za zachování jeho celistvosti jako eukaryotického mnohobuněčného organismu odpovědná průběžná regulace exprese (projevu) genů v buňkách. Příslušnou regulací jsou buňky tkání organismu udržovány v diferenciovaném stavu.

Poruchy regulace projevu genů mohou vést k tvorbě nádorů. Nádorová buňka se od normální somatické buňky liší tím, že je v ní geneticky podmíněnou změnou narušen regulační mechanismus jejího dělení a diferenciaci. Nádor (tumor, novotvar) je nová abnormální tkáň v mnohobuněčném organismu, jejíž buňky se dělí neregulovaným způsobem. Proces vzniku nádor se nazývá kancerogeneze. Podle schopnosti proniknout do jiné tkáně a proliferovat v ní za tvorby nového nádoru, tedy podle schopnosti metastázovat, jsou nádory označovány za¹:

1. nádory nezhoubné (benigní), které se nešíří metastázou a nepronikají do jiné tkáně
2. nádory zhoubné (maligní), které se naopak šíří metastázou a pronikají do jiné tkáně.

Maligní nádory se od nádorů benigních odlišují především rychlostí progresu, která je určujícím faktorem prognóz pro pacienta. Další významnou odlišností je porucha

diferenciace buněk – procesu přechodu od buňky kmenové k buňce se specializovanou funkcí a vlastnostmi. Maligní buňky se často vyznačují určitým stupněm dediferenciace, tedy ztrátou funkcí a vlastností, které měla původní tkáň, v níž se nádor vyvinul. Stupeň diferenciace nádorových buněk je významným diagnostickým měřítkem. Zásadním průkazem maligního bujení je infiltrace nádorových buněk do normální tkáně a její destrukce. Maligní nádory, které se vyznačují invazivním růstem, mohou vytvářet metastázy (dceřiné nádory). Ty pravděpodobně vznikají z jediné maligní buňky, která se uvolnila do krevního nebo lymfatického oběhu.^{15,2}

3.2. *Kancerogeneze*

3.2.1. *Mechanismus kancerogeneze*

Pro správný vývoj a funkci buněk je nezbytná regulace exprese genů. Mutace související s kancerogenezí nastávají především ve dvou typech genů, a to protoonkogenech a tumor supresorových genech.²

Geny kódující proteiny, které jsou součástí pozitivních regulačních mechanismů, tedy stimulace dělení a růstu buněk (růstové faktory, receptory, proteinkinázy, transkripční faktory), se nazývají *protoonkogeny* – geny potenciálně schopné se změnit na onkogeny. Tato přeměna se označuje jako aktivace protoonkogenu. Dělení buněk se stává neregulované. Proteiny, které jsou produkty těchto genů, jsou označovány jako protoonkoproteiny.¹

Vedle protoonkogenů se na regulaci buněčného cyklu podílí ještě další, a to zcela odlišná skupina genů. Jde o tzv. *antionkogeny*, které jsou také označovány jako *supresorové geny* (tumor supresorové geny). Proteiny, jež kódují, potlačují množení (proliferaci) normálních somatických buněk a udržují je v klidovém stavu. Tyto geny jsou inaktivovány chemickým karcinogenem, dochází ke ztrátě funkce tlumivých genů, a ztrácí se tak přirozená brzda průběhu buněčného cyklu a dochází také k neregulovanému množení buněk.¹

Pokud dojde k mutacím v těchto regulačních genech, může dojít k malignímu zvratu buňky. Obecně rozlišujeme dva druhy mutací: přirozené (chyba při replikaci) a vyvolané vnějšími faktory. Mezi vnější řadíme¹⁵:

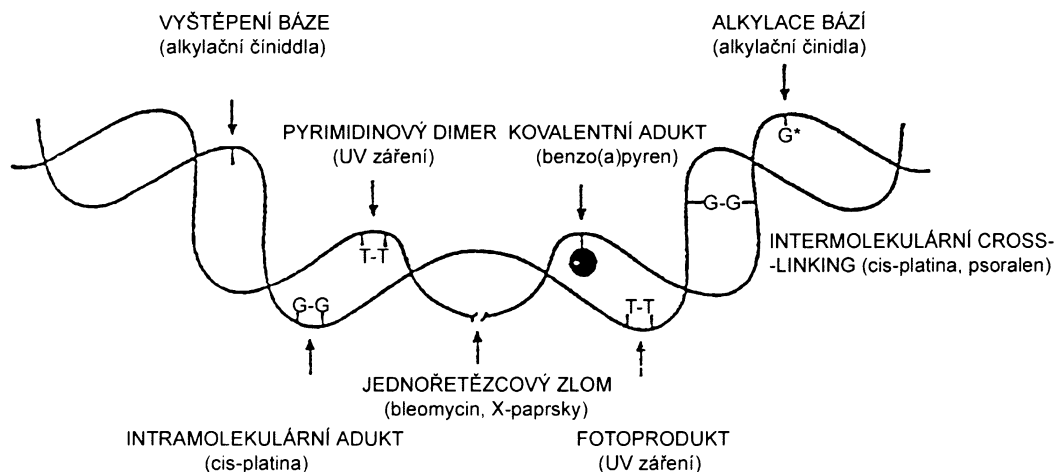
- Biologické kancerogenní faktory – změna genetické výbavy a imunity, až 20 % nádorů je způsobeno onkoviry.

- Fyzikální kancerogenní faktory – zejména různé typy záření (UV, Rentgenovo či radioaktivní) a některé druhy velmi jemných anorganických pevných částic (azbestu→azbestóza, sloučenin berylia, minerálů→mechanické poškození DNA).
- Chemické kancerogenní faktory – jsou velice rozšířené a Mezinárodní organizace pro výzkum rakoviny (International Institute for Research on Cancer-IARC)¹ uvádí více než šedesát chemických kancerogenů vyvolávající nádorová onemocnění u člověka. Můžeme je rozdělit na kancerogeny přímé, které působí po vstupu do buňky na DNA přímo bez další chemické přeměny, a nepřímé – prokancerogeny – které získávají svůj kancerogenní potenciál až metabolickou přeměnou.

3.2.2. Chemické kancerogeny

Do lidského organismu se denně dostává obrovské množství chemických látek, ať je to cestou inhalační, transdermální nebo alimentární.³ V ovzduší se nalézá množství polutantů organické povahy (výfukové plyny, průmyslové zplodiny...), v potravinářství se používají různé chemické látky jako konzervanty nebo barviva a zejména v některých průmyslových odvětvích je člověk vystaven silnému působení různých chemických látek, které lze podle mechanismu jejich působení rozdělit do tří skupin^{1,15}:

1. Genotoxické – tvoří kovalentní adukty s DNA (95 % kancerogenů).
2. Kancerogeny způsobující změny struktury molekul DNA, jako jsou jedno- a dvouřetězcové zlomy (single- and double-strand break), dále změny struktury DNA, které jsou vyvolány bifunkčními činidly způsobujícími tzv. cross-linking (propojení molekul), a to DNA-DNA cross-linking (intra- i intermolekulární) nebo také DNA-protein cross-linking (**Obrázek 1, str. 8**).
3. Epigenetické – modifikují molekuly DNA nekovalentními vazbami. Jde např. o látky označované jako interkaláty, které jsou vmezeřeny ve dvoušroubovicové struktuře DNA.

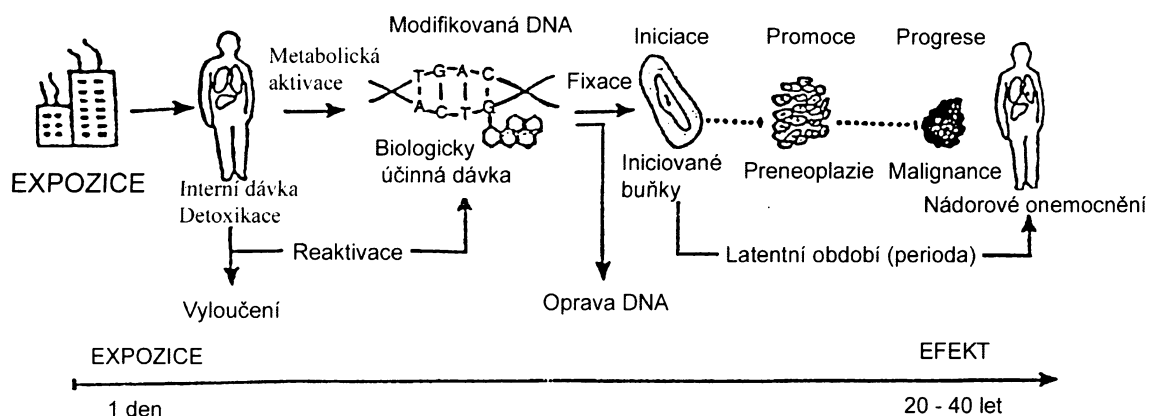


Obrázek 1: Prekarcinogenní změny v DNA vyplývající z různých typů poškození (modifikace) DNA.¹

Modifikace DNA vnějšími faktory (tedy kancerogeny) v místech, která jsou určující pro regulaci a diferenciaci buněk jsou považovány za první nejdůležitější krok vícefázového procesu kancerogeneze. Převážnou většinu modifikací DNA, které vznikají v důsledku přirozené expozice organismu vnějším karcinogenním vlivům, je organismus schopen odstranit díky svým účinným reparačním mechanismům. Proces kancerogeneze má tři fáze: iniciační, promoční a progresní^{1,15} (**Obrázek 2, str. 9**):

1. V iniciační fázi dochází ke změnám genetické informace zdravých buněk, které vedou k tvorbě prekarcinogenní léze. Je třeba zdůraznit roli imunitního systému. Jestliže funguje správným způsobem, pozměněnou buňku rozpozná, zneškodní a proces kancerogeneze se tak přeruší. Je-li však imunitní systém z nějakého důvodu oslaben či poškozen (nemoc, stáří, vrozené snížení imunity), pozměněná buňka se v dalších stádiích vyvíjí až k nádoru.
2. V promoční fázi dochází k velmi rychlé proliferaci primárně pozměněných buněk. Dochází ke vzniku benigní léze, která ještě nemá agresivní vlastnosti nádoru. Nedochází k žádným genotoxickým změnám v DNA a existuje zde ještě určitá míra regulace. Promoční účinky má například expozice cigaretovému kouři nebo nevhodná strava. Nemusí vždy docházet ke vzniku benigního nádoru, promoční fáze může být přeskočena.
3. Poslední fáze kancerogeneze se označuje jako progresse. Látky působící v této fázi jsou progresory, které stejně jako iniciátory mají genotoxické účinky. Zde nastává konečná přeměna do té doby částečně kontrolovaného růstu benigního

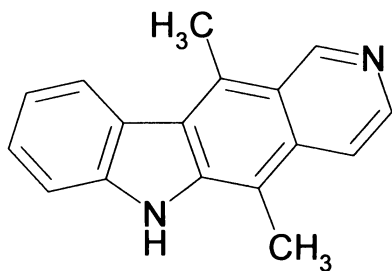
nádoru na růst nekontrolovaný. Vzniká maligní nádor, který prorůstá i do sousedních tkání a ničí je. Po vniknutí do cévního a lymfatického systému se nádorové buňky často zanášejí do vzdálených orgánů organismu a vznikají tak metastáze.



Obrázek 2: Schéma víceetapového procesu kancerogeneze.¹

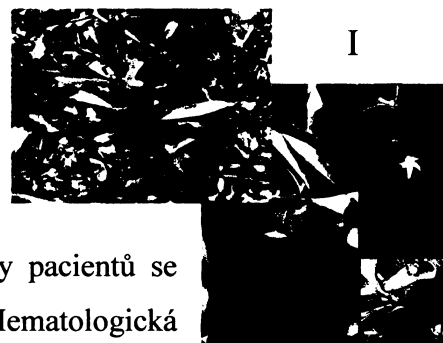
Transformace buňky v nádorovou probíhá stupňovitě a dlouhodobě, přičemž celý proces může trvat 15-30 let (**Obrázek 2**). Díky životnímu stylu se doba latence v poslední době zkracuje. Velmi důležité je, v jaké fázi se onemocnění rozpozná. Proto se klade důraz na prevenci (sledování DNA, stavu p53, onkogenů a orgánů, které jsou na onemocnění náchylnější). Vzhledem k tomu, že právě modifikace molekul DNA jsou považovány za kritický krok kancerogeneze, jsou hledány postupy, jak je detekovat a jak jejich vzniku zabránit.

3.3. *Ellipticin*



Obrázek 3: Struktura ellipticinu izolovány z rostlin čeledi *Apocyanaceae* (*Ochrosia borbonica*, *Ochrosia elliptica*)⁴ (Obrázek 4).

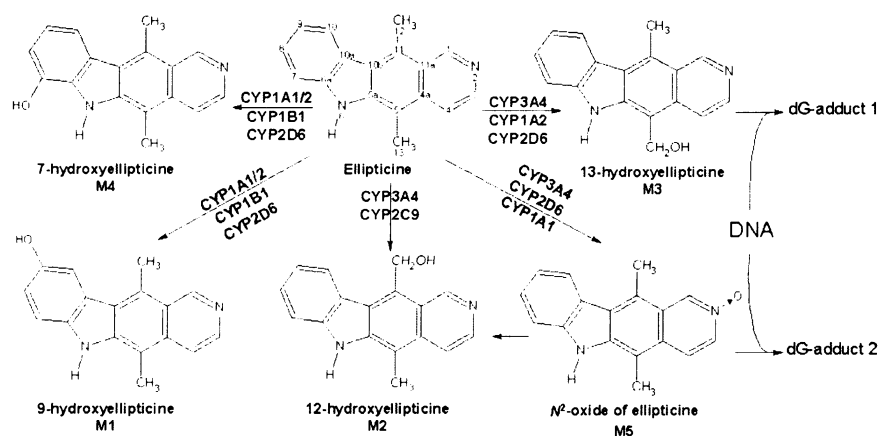
Výhodou ellipticinu je jeho vysoká účinnost a poměrně nízké vedlejší toxické účinky. Jen asi u třetiny pacientů se vedlejší účinky projevují jako nevolnost či zvracení. Hematologická toxicita se projevuje až při dlouhodobém podávání tohoto léčiva a je patrně imunoalergického původu.⁵



**Obrázek 4: Čeleď *Apocyanaceae*,
I – *Ochrosia elliptica*, II – *Ochrosia borbonica***

3.3.1. *Metabolismus ellipticinu*

Ellipticin je protinádorové léčivo jehož přesný mechanismus působení není ještě zcela objasněn. Dochází k enzymatické aktivaci ellipticinu cytochromem P450. Tyto enzymy oxidují ellipticin na pět různých metabolitů: 7-hydroxyellipticin, 9-hydroxyellipticin, 12-hydroxyellipticin, 13-hydroxyellipticin a N²-oxidellipticin (Obrázek 5, str. 11).



Obrázek 5: Metabolismus ellipticinu různými formami cytochromů P450 v lidském organismu.⁶

Hlavním „deaktivačním“ metabolitem ellipticinu je 7-hydroxyellipticin, který je minoritním metabolitem tvořící se v lidských játrech. Tento metabolit vykazuje jen velmi nízkou cytotoxicitu.⁷ Ostatní metabolity mají vyšší cytotoxické účinky než samotný ellipticin. 9-hydroxyellipticin je tvořen v lidských jaterních mikrosomech.^{6,8} 13-hydroxyellipticin a N²-oxidellipticin jsou zodpovědné za tvorbu dvou majoritních DNA aduktů.⁶ Tvorby jednotlivých metabolitů je závislá na aktivitě různých forem cytochromu P450.

Hydroxylace ellipticinu v poloze 7 (reakce detoxikační) respektive 9 (reakce aktivační) je katalyzována především CYP1A1/2. Ostatní aktivační metabolity jsou efektivně tvořeny zejména formou CYP3A4 (Obrázek 5). Jmenované enzymy jsou ve vysoké míře exprimovány v nádorech citlivých na léčbu ellipticinem, například v buňkách nádorů prsu či ledvin.⁹

3.3.2. Mechanizmy cytostatického působení ellipticinu

Protinádorová, mutagení a cytotoxická aktivita ellipticinu je vysvětlována následujícími mechanismy:

- Interkalace do dvojšroubovicové molekuly DNA,^{4,5} která vyplývá z velikosti a tvaru jeho molekuly, je způsobena slabými reverzibilními hydrofobními interakcemi s bázemi DNA. Interakce mezi methylovou

skupinou ellipticinů a thyminem v interkalačním místě je určující pro orientaci této sloučeniny v DNA.^{10,11}

- Inhibice topoizomerázy II⁵ Působením ellipticinů vzniká doposud ne zcela objasněným mechanismem katalyticky inaktivní komplex topoizomerázy II kovalentně navázané na rozštěpenou DNA.^{12,13}
- Selektivní inhibice fosforylace proteinu p53.^{14,166} Protein p53 je produktem tumor-supresorového genu; jeho fyziologickou funkcí je indukce apoptózy, k níž dochází po nahromadění defosforylované formy p53. Mutace tumor-supresorového genu p53 vede ke ztrátě jeho funkce, ustává inhibice proliferace a vznikají často agresivní formy nádorového onemocnění.¹⁵ Ellipticin, pravděpodobně mechanismem inhibice specifické cyklindependentní kinázy¹⁴ nebo aktivací transkripce mutantního p53 je schopen obnovit jeho fyziologickou funkci.^{16,17}
- Inhibice oxidační fosforylace¹⁸ Na základě dat získaných mikrospektrofluorometrickými metodami bylo zjištěno, že ellipticin je akumulován kromě jádra také v mitochondriích,¹⁹ kde inhibicí oxidační fosforylace způsobuje letální snížení obsahu ATP v buňce.

Výše uvedená vysvětlení mechanismu protinádorové aktivity ellipticinů jsou založena zejména na nesespecifickém působení a jsou typická pro daleko slabší kancerostatická agens než jakým je ellipticin. Tato skutečnost však ostře kontrastuje s poměrně úzkou specifitou účinku ellipticinů vůči určitým typům neoplazie. Velmi důležitým aspektem při terapii ellipticinem je individuální variabilita v odpovědi pacientů na podané léčivo.²⁰ Z výsledku dlouhodobého studia této problematiky v laboratoři Doc. M. Stiborové plyne vysvětlení, že specifita chemoterapeutického účinku i selektivní odpovědi na podané léčivo, může být způsobena rozdílnou enzymovou výbavou lidského organismu.²¹ Ellipticin tedy působí jako „pro-léčivo“: je metabolicky aktivován enzymy cílových nádorových tkání – cytochromy P450 a peroxidázami – na biologicky účinnější deriváty. Tyto aktivační metabolity poškozují buňky novotvaru efektivněji, a sice kovalentní modifikací DNA.^{22,23,24,25}

3.4. Transportní systémy léčiv = „drug delivery“ systémy

Klasickou chemoterapii většiny nádorových onemocnění pomocí dostupných a v klinické praxi používaných léčiv doprovází řada nežádoucích toxických účinků. Většina dnes užívaných protinádorových léčiv má totiž nedostatečnou selektivitu pro nádorovou tkáň. To omezuje možnosti účinné léčby použitím vysokých dávek cytotoxického léčiva, které jsou potřebné pro dosažení úplného terapeutického účinku.

Pokroky ve výzkumu pomohly pochopit mnohé patologické mechanismy nádorového bujení a navrhnout nové terapeutické možnosti. Mnoho výzkumných skupin se věnuje vývoji nových léčiv s cílem zaměřit cytotoxický účinek kancerostatika především na nádorovou tkáň, tedy eliminovat toxické účinky léčiva na zdravé tkáně.

Termín „drug delivery“ označuje přívod léčiva do organismu požadovanou rychlostí nebo v požadovaném čase a jeho uvolnění v místě působení.²⁶

„Drug delivery“ systémy – transportní systémy léčiv – jsou obvykle makromolekuly nebo superamolekulární struktury (dendrimery, polymerní micely nebo lipozomy), které fungují jako nosiče. Různým způsobem vážou léčivo, které tak získává zcela jiné vlastnosti než má volná forma léku (obvykle je rozpustnější, zvýší se jeho stabilita, cílení, efekt multivalence-viz. 3.6.). Tyto komplexy jsou v ideálním případě transportovány v organismu do cílového místa.²⁷

Cílem použití „nosičů“ léčiv je zejména:

- Selektivně zaměřit účinek léčiva na cílovou tkáň, buňku nebo dokonce buněčný kompartment. Tím lze často omezit nežádoucí účinky léčiva na zdravé tkáně.
- Zajistit rozpustnost ve vodě nerozpustných léčiv.

Byla vyvinuta celá řada typů nosičů léčiv, založených na rozpustných polymerech, liposomech nebo nanočásticích. V současné době je kladen zvláštní důraz na systémy, které by měly umožnit pokud možno co nejselektivnější dopravu chemoterapeutik a radiofarmak do nádorové tkáně.

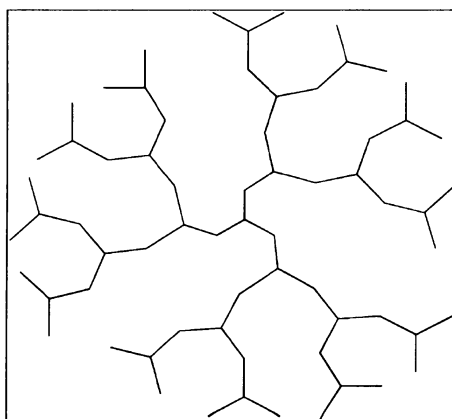
3.5. Dendrimery

Dendrimery jsou jednou ze skupin materiálů užívaných ve výzkumu systémů transportu léčiv. Stále přibývá možností jejich využití ve farmaceutickém, lékařském a biomedicínckém inženýrství.

Dendritické struktury byly objeveny jako nová třída polymerů. Prvně se o nich zmínil Vögtle²⁸ roku 1978 a představil je jako *kaskádní molekuly* (cascade molecules). Vývoj v této oblasti vedl ke vzniku větších dendrimerních struktur. Roku 1985, kdy Newkome²⁹ a Tomalia³⁰ nezávisle publikovali své výsledky o skupině větvených molekul, přejmenovali tyto struktury jako *stromové* (arborols) nebo *dendrimery*. Slovo dendrimer bylo přijato jako název těchto struktur.

Termín „dendrimer“ pochází z řeckého slova *dendron*, znamenající strom nebo větev, a *meros*, znamenající část.^{31,32}

Dendrimery jsou pravidelně se větvící sloučeniny s variabilním složením, strukturou, molekulovou vahou, povrchovými skupinami, mocenstvím, fyzikálně-chemickými vlastnostmi a biologickou aktivitou. Na rozdíl od polymerů se jedná o přesně definované molekuly s unikátní stavbou a přesnou molekulovou hmotností (**Obrázek 6**).



Obrázek 6: Schématický obrázek dendrimerní struktury.

Není zcela jednoduché najít obecnou definici těchto sloučenin, ta často to závisí na specializaci autora.

Význam dendrimerů tkví zejména v unikátních strukturních vlastnostech. Výhody, které dendrimery nabízejí jako základní stavební jednotky lze shrnout v několika bodech:

1. levné a dostupné výchozí látky
2. snadná příprava a izolace, uskutečnitelná i ve velkém měřítku
3. dobře definované silně větvené makromolekuly, které mají v ideálním případě kulovitou strukturou
4. supramolekuly mající tvar stromu, kontrolovanou strukturu a velký počet specifických koncových funkčních skupin³³
5. nanostruktury umožňující multivalentní interakce
6. snadná chemická opracovatelnost základního skeletu molekuly
7. mono-dispersní
8. možnost „řídit“ rozpustnost jak v organických rozpouštědlech tak i ve vodě

Základní biologické vlastnosti dendrimerů jsou:

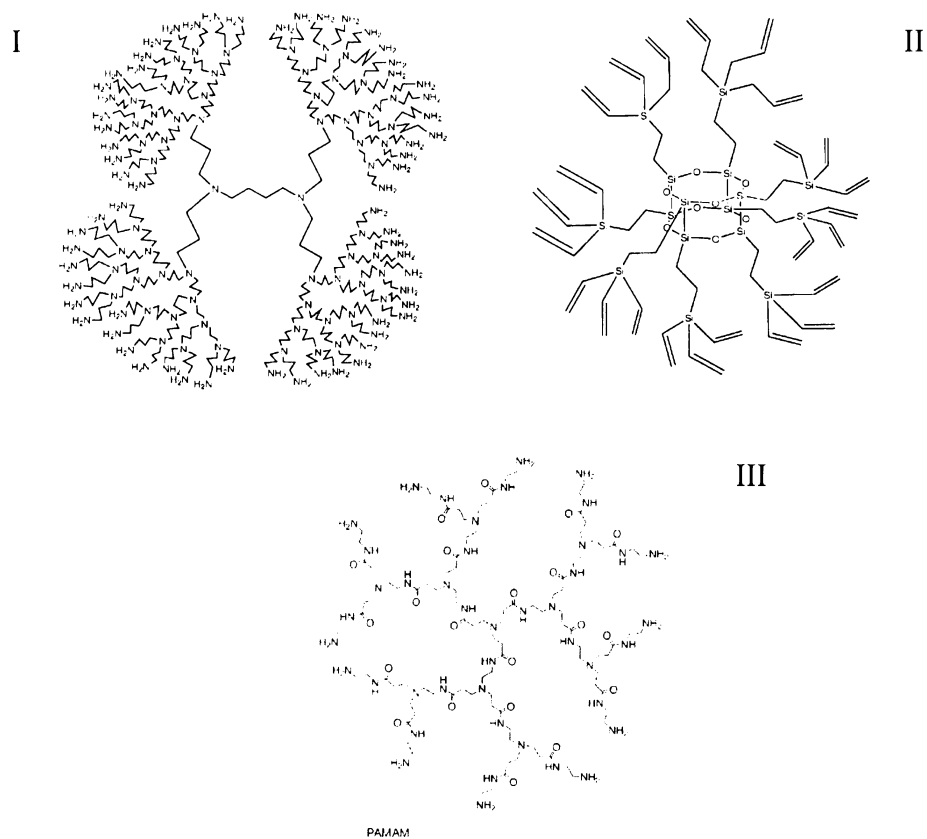
- stabilita
- rozpustnost ve vodě
- biokompatibilita
- neimunogenita
- biodegradabilita
- farmakologická inaktivita³⁴ - chránit celý systém transportu léčiv před rychlou eliminací z organismu (ledviny, játra)

3.5.1. Typy dendrimerů

V závislosti na složení a struktuře jádra, větví a povrchových funkčních skupin a jejich substituci, můžeme rozlišovat několik typů dendrimerů.⁶¹

První kompletní dendrimerní rodina, která byla připravena, charakterizována a komercializována jsou Poly(amidoamin) dendrimery (PAMAM) (Obrázek 7), někdy také zvané *Starburst dendrimery*. Tyto dendrimery představil Tomalia³⁰ roku 1985 a byly připraveny divergentní metodou (viz níže). PAMAM dendrimery jsou biokompatibilní, tolerované imunitním systémem, ve vodě rozpustné a na svých koncích mají rozšiřitelné funkční amino nebo esterové skupiny vhodné pro navázání dalších funkčních skupin nebo molekul.³⁵

Další typy dendrimerů se skládají z opakujících se jednotek: aminů, amidů, karbosilanů, siloxanů, esterů, etherů, acetylenů, amino kyselin a nukleových kyselin a dalších (Obrázek 7). Do dendrimerů mohou být začleněny další funkční jednotky (např. porfyriny, chromofory).⁶¹

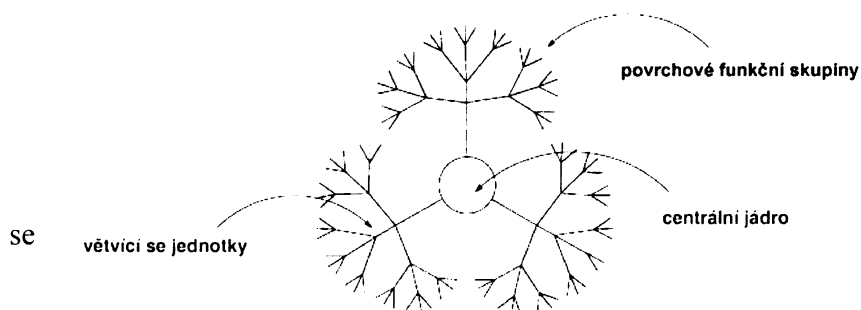


Obrázek 7: Různé struktury dendrimerů: I-poly(propylenimin), II-dendrimer s jádrem na bázi Si, III-poly(amidoamin) dendrimer (PAMAM).⁶¹

3.5.2. Struktura dendrimerů

Struktura dendrimerů se dělí na tři základních části³⁶ (**Obrázek 8**):

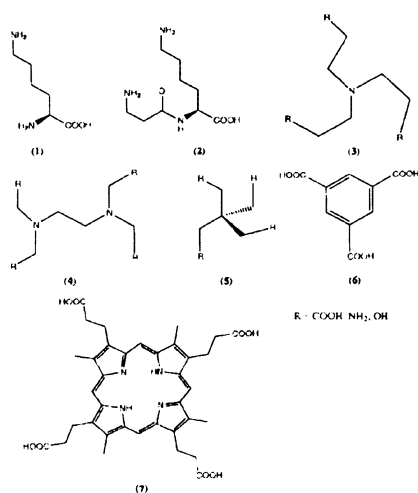
1. Jádro
2. Povrchové funkční skupiny
3. Větvící jednotky



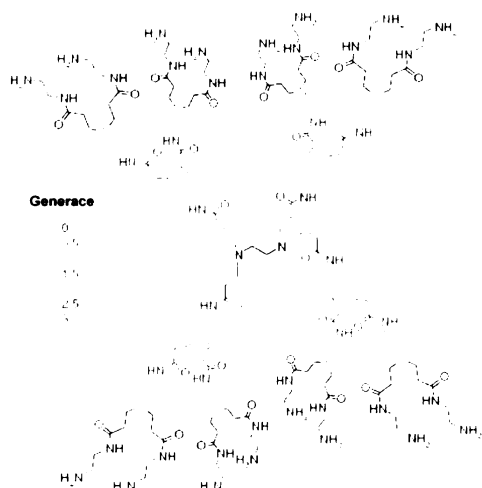
Obrázek 8: Základní struktura dendrimerů.

Jádro je centrální jednotka, ve většině případů symetrická. Nese 2, 3, 4, či více funkčních skupin (amino, hydroxy, karboxy, atd.), na které jsou vázány větve (**Obrázek 9**). Větve jsou složeny ze stavebních bloků s nejméně třemi funkčními jednotkami. První je vázána na jádro nebo předchozí generaci, druhá a další slouží pro větvení do dalších generací.

Opakováním vrstev stavebních bloků ve větvích dochází k vytvoření periodicky větvené struktury dendrimeru. Každé opakování sekvence vytváří další vrstvu větvení, zvanou „generace“. Přesné počítání generací může být zdrojem nedorozumění.³⁷ Boas³² a spol. definovali dendrimerní generaci jako počet ohniskových bodů (kaskádních bodů), směrem od jádra k povrchu; např. generace 5 (G5) dendrimeru má pět kaskádních bodů mezi jádrem a povrchem.³⁸ Jádru je někdy označováno jako generace „nula“, nemá kaskádní body (**Obrázek 10, str. 18**).



Obrázek 9: Příklady různých typů dendrimerních jader: amino, hydroxy, karboxy.⁶¹



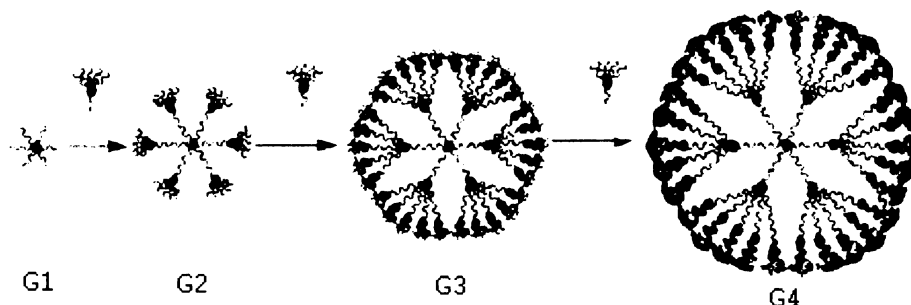
Obrázek 10: Definice generace: poly(amidoamin) dendrimer (G3)⁶¹.

3.5.3. Příprava dendrimerů

Dendrimery jsou budovány více krokovým způsobem.³⁹ Obecně dendrimery vycházejí od jádra a jako strom se rozvětvují s každou následující generací.

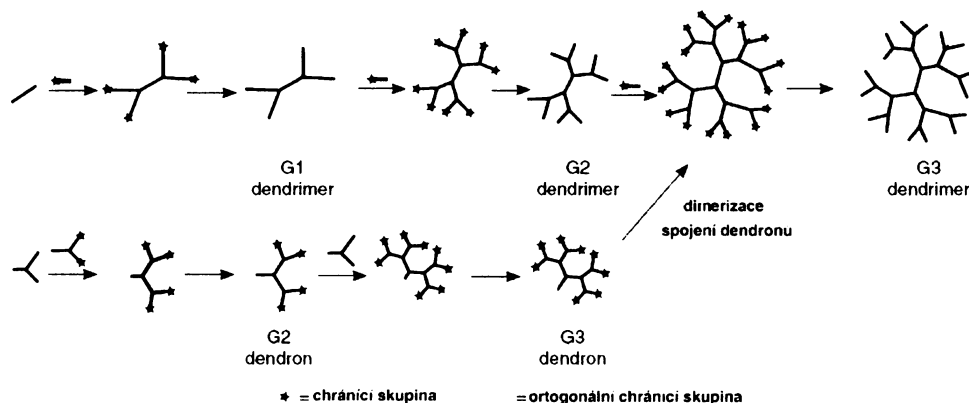
Existují dva hlavní přístupy k syntéze dendrimerů.

1) divergentní (rozbíhavá) metoda²⁸ – start růstu je uvnitř (od jádra) a směřuje směrem ven. Jak už název napovídá, divergentní strategie zahrnuje připevňování opakujících se jednotek okolo jádra během po sobě jdoucích chemických reakcí na okraji rostoucí makromolekuly. Jedná se o dendrimer s jádrem, kde struktura roste do více směrů, závisí to na mocnství jádra a stavebních jednotkách větví (**Obrázek 11**).



Obrázek 11: Divergentní metoda syntézy dendrimeru⁴⁴.

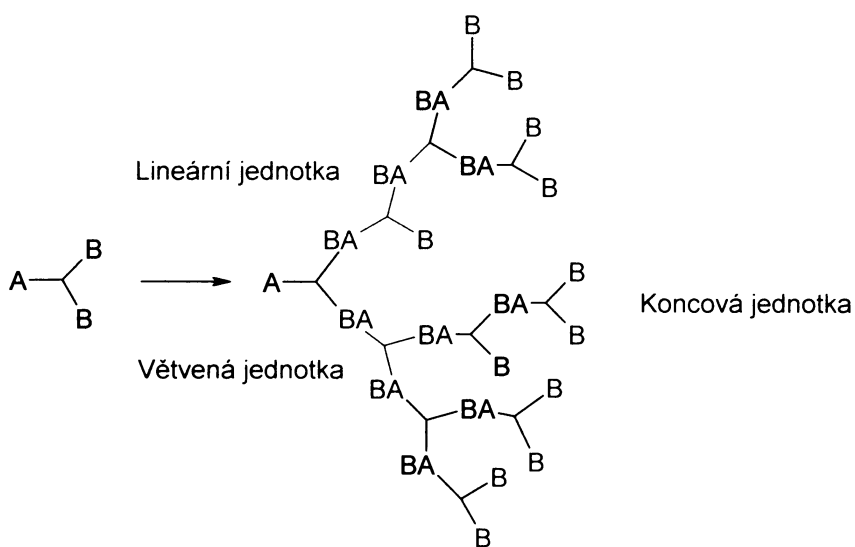
Monomerní jednotka s nejméně dvěma chránicími koncovými skupinami je přidána k základnímu jádru, poté jsou koncové skupiny ochráněny (nebo aktivovány) a druhá vrstva chráněných monomerních jednotek je přidána a vznikne další generace dendrimery. Za použití divergentního přístupu mohou být rychle připraveny poměrně velké dendrimery. Nevýhodou tohoto postupu jsou časté problémy s purifikací a mono-dispersitou.³⁵



Obrázek 12: Divergentní a konvergentní metody syntézy dendrimery.⁶¹

2) konvergentní (sbíhavá) metoda⁴⁰ – má opačný průběh než metoda divergentní (Obrázek 12). Molekula je stavěna postupně, začíná se od koncových skupin směrem k vnitřní části a v koncovém kroku je připevněna k jádru. Dendrimery bez jádra rostou pouze v jednom směru a jsou označovány jako *dendrony*.^{32,36}

AB₂ typ monomer obsahuje jednu A a dvě B skupiny, které za polymerizačních podmínek spolu reagují, za vzniku vysoce větvených polymerních klínů. V ideálním případě zůstává pouze skupina A, která je držena ve středu. Zatímco klín je tvořen počtem rozdílně pospojovaných B skupin, včetně lineárních, větvených a koncových jednotek (Obrázek 13).⁴¹



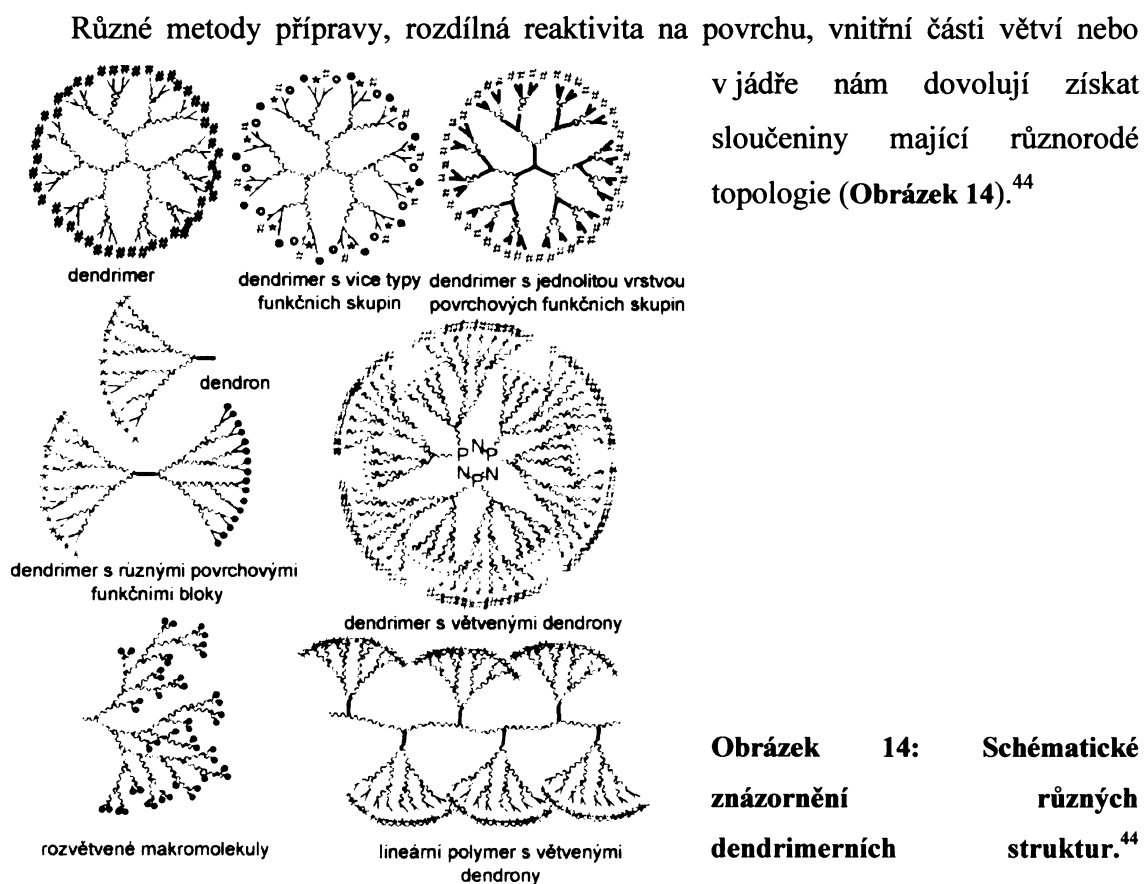
Obrázek 13: Schématické znázornění AB₂ polymeru.

Tento proces zahrnuje připevnění dvou koncových částí k jedné koncové skupině, která má chránicí funkční skupinu, vzniká první generace. Odchráněním a zacházením s polovičním ekvivalentem monomeru vzniká další generace.⁶⁴

U divergentní metody problém nastává při neúplných reakcích koncových funkčních skupin, protože tyto strukturní chyby jsou nahromaděny s dalšími vzniklými generacemi. Protože meziprodukty vykazují stejné fyzikální vlastnosti, chromatografická separace není často možná, či dostatečně účinná. Proto vyšší generace divergentně stavěných dendrimerů často obsahuje nějaké strukturní chyby.⁴²

U konvergentní metody je segment rostoucí s každým reakčním krokem spojen pouze s jednou větví se jednotkou. Tudíž tento přístup napomáhá odstranění nežádoucích meziproduktů. Tato metoda je často omezena jen na dendrimery nižších generací.

Další přístupy přípravy dendrimerů jsou založeny na změnách nebo kombinacích těchto dvou metod. Příkladem je dvoustupňová konvergentní metoda - monodendrony obsahující jednu reaktivní skupinu ve svém středu jsou spojeny divergentním způsobem s okrajem dalšího monodendronu nebo dendrimeru.⁴³



Obrázek 14: Schématické znázornění různých dendrimerních struktur.⁴⁴

3.5.4. Fyzikální, chemické a biologické vlastnosti dendrimerů

Jednoznačnost těchto třírozměrných polymerů napomáhá ke kontrole jejich tvaru, velikosti, molekulové váhy a topologie. Proto je výzkum dendrimerů tak zajímavý a oblast bádání se rychle rozšiřuje.

3.5.5. Možnosti využití dendrimerů:

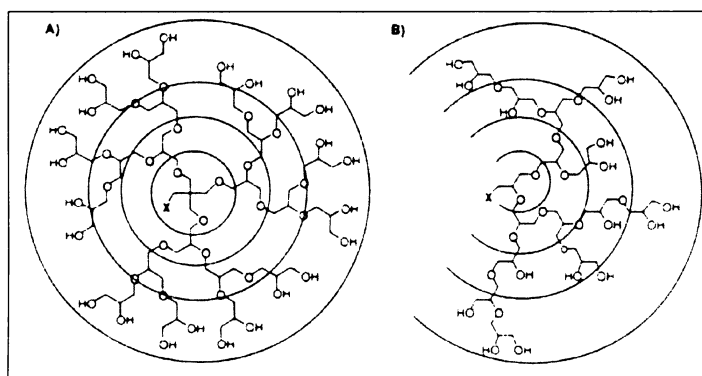
Dendrimery byly použity například pro (chirální) katalýzu,^{45,46,47,48} jako povrchově aktivní činidla, jako materiály pro „host-guest“ (studium interakcí) chemii,^{49,50,51,52} při chemoterapii, v rakovinové imunitní terapii, pro transport léčebných oligonukleotidů nebo léků do nádorů,^{53,54,55} pro dodávání kódujících oligonukleotidů,⁵⁶ jako modelové sloučeniny pro komplexaci DNA,⁵⁷ jako zobrazovací kontrastní činidlo při magnetické rezonanci,^{33,58} pro napodobování membrán, virů a micel, v imunodiagnostice, vakcínová technologie nebo jako nosiče pro léky a geny.^{32,33,36,59,60,61}

3.5.6. Rozdíly mezi dendrimery, polymery a rozvětvenými makromolekulami

V některých odvětvích chemie, se dendrimery stávají stále více důležité jako alternativní makromolekuly klasických polymerů. Takovým příkladem je např. katalýza, kde se dendrimery objevují jako důležité materiály.

Tato nová třída makromolekul, nesoucí některé vlastnosti jak polymerů tak malých molekul, může být rozdělena na dvě rodiny: dendrimery a značně rozvětvené (hyperbranched) makromolekuly. Liší se v jejich větvících se sekvencích (**Obrázek 15**). *Dendrimery* se skládají ze symetricky uspořádaných větví vycházejících z jádra dendrimeru, společně s definovaným počtem koncových skupin, odpovídajících příslušné generaci. Výsledkem je většinou mono-dispersní, kulovitý tvar.

Vysoce rozvětvené molekuly jsou připravovány jedнокrokovými reakcemi, jsou nepravidelně větveny. Lineární a koncové segmenty, jsou mnohem méně homogenní než u dendrimerů.⁶²



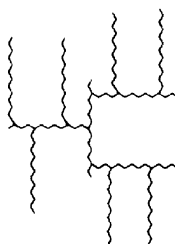
Obrázek 15: Kaskádně větvené polymery. A) Dendrimery, B) Rozvětvené makromolekuly.

Rozvětvené makromolekuly jsou nanoobjekty, které kombinují vlastnosti částí a polymerních molekul. Proměnlivost primárních molekulových struktur a molekulová konformace dělají z rozvětvených polymerů zajímavé stavební jednotky pro nanotechnologie. Mezi nejběžnější struktury patří dendrimery, stromovitě rozvětvené polymery, molekulové kartáčky (brushes), a monodendrony substituované řetězce (**Obrázek 16, str. 23**).⁶³

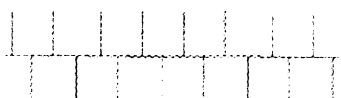
dendrimery



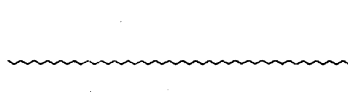
stromovitě rozvětvené polymery



molekulární kartáče



řetězce substituované monodendrony



Obrázek 16: Typy struktur rozvětvených makromolekul.⁶³

Jednou z typických vlastností dendrimerů je jejich dobrá rozpustnost v organických rozpouštědlech. To je důležitou výhodou oproti typickým nerozpustným polymerům s nepravidelným uspořádáním funkčních míst, které si často vážně stericky brání. Takto katalyticky aktivní třídy jsou potenciálně více dostupné v reakčním prostředí s dendrimery než s polymerními katalyzátory. Další výhodou dendrimerních katalyzátorů je jejich dostatečná velikost a možnost oddělení ultrafiltrační technikou. Zatímco polymerní materiály mají často vysokou viskozitu a proto se s nimi těžko zachází. Na druhou stranu, příprava dendrimerů je finančně a časově náročnější než příprava tradičních polymerů (dendrimerní příprava vyžaduje více-krokové procesy, polymerní příprava je jednokrokový proces).⁶⁴

3.6. Multivalentní látky a princip multivalence⁶⁵

3.6.1. Valence

Valence (mocenství)⁶⁶ molekuly nebo její biologické entity jako je buňka, virus nebo bakterie představuje počet oddělených funkčních jednotek stejného nebo podobného typu, které jsou připojeny k molekule nebo entitě. Pokud molekula představuje dvě spojené, identické kopie

vzájemných se základních prvků, jako např. ligand, je klasifikována jako *bivalentní molekula*. Například bivalentní interakce nastane při spojení bivalentního ligandu s bivalentním receptorem.

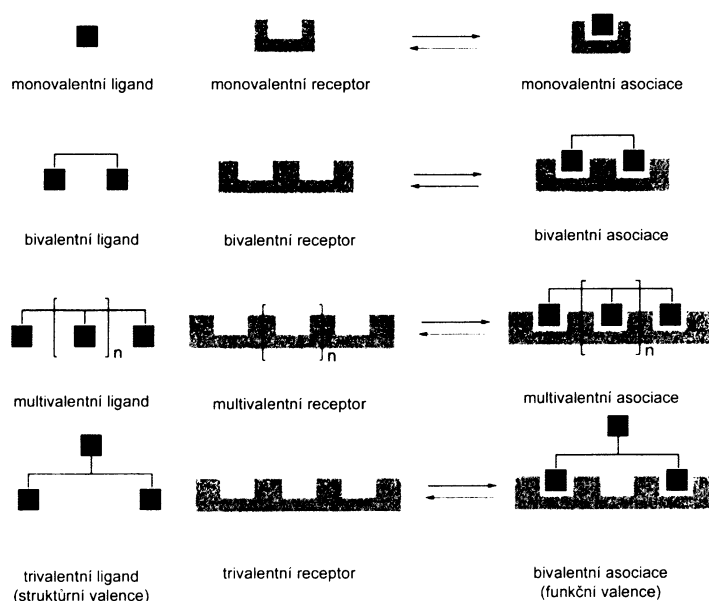
Interakce probíhá mezi dvěma páry receptor-ligand (Obrázek 17). Multivalentní nebo polyvalentní interakce definujeme jako současnou asociaci s více ligandy přítomnými na molekule nebo biologickém povrchu s více

receptory přítomnými na komplementární entitě. Ne všechny ligandy přítomné na multivalentní molekule jsou nutně zapojeny do interakcí s receptory (Obrázek 17). Tato vlastnost se nazývá *funkční valence*.

Multivalentní interakce jsou silnější a selektivnější než obdobné monovalentní interakce. Jsou proto pouze slabě inhibovány většinou monovalentních ligandů, obzvlášť pokud vazebné místo pro monovalentní ligand je mělké (nízkoafinitní).

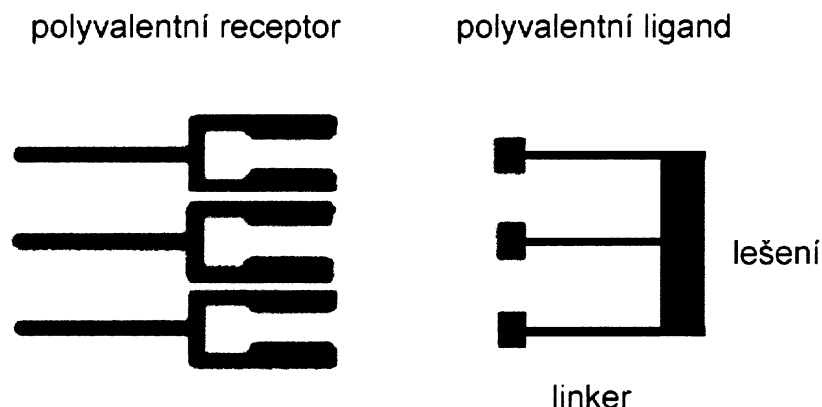
3.6.2. Spojka

Spojka (linker, spacer) – příprava multivalentních molekul je realizována pomocí navázání více molekul ligandu nebo vzájemného se elementu s linkerem. Linker neslouží pouze jako kovalentní spojka, ale také řídí vhodnou vzdálenost mezi navázanými ligandy.



Obrázek 17: Definice strukturní a funkční valence je ilustrovaná na monovalentní, divalentní a multivalentní (polyvalentní) interakci.⁶⁵

Vícenásobný receptor-ligandový pár pak interaguje součinně bez vzájemného překrývání ligandu (**Obrázek 18**).



Obrázek 18: Interakce polyvalentního receptoru s polyvalentním ligandem.⁶⁷

Linker používaný pro multivalentní molekuly by měl být chemicky a biochemicky stabilní. Oproti tomu, linkery používané v biokonjugátech molekul, navržené například jako proléčiva nebo prostředek transportu, musí být chemicky nebo enzymově labilní, aby mohlo dojít k uvolnění monovalentního léčiva v určitém místě v organismu nebo po transportu do cílového místa. Linker musí být přinejmenším neutrální vzhledem k biologické aktivitě, aby negativně nezasahoval do skutečné aktivity vázaného ligandu. V některých případech, může dokonce vazbu potencovat, za předpokladu, že produktivní kontakty jsou tvořeny mezi linkerem a cílovým povrchem (např. allosterické interakce).

Návrh linkeru musí vycházet ze žádané vzdálenosti mezi nosičem a ligandy, konformační vlastnosti (flexibilita, rigidita-konformační stálost) a povaha spojovacích funkčních skupin (amidy, ethery, aminy). Pokud je spacer dost dlouhý, aby poskytl multivalentní obsazení vázaného ligandu v místě receptoru, pak pevný linker přispívá příznivěji k těsnému spojení než flexibilnější linker.

V nenavázaném stavu může linker s ligandy zaujímat velké množství konformací. Po asociaci ligandu s receptorem je molekula ligandu fixována do konformace, která pro volný ligand nemusí být nejideálnější. K tomu to faktu přispívají dva faktory – entalpický (ΔH) a entropický (ΔS).

Monovalentní asociace je spojena se standardními vztahy mezi třemi termodynamickými parametry (ΔG^{mono} - Gibbsova energie, ΔH^{mono} a ΔS^{mono}), které jsou vyjádřeny jako:

$$\Delta G^{\text{mono}} = \Delta H^{\text{mono}} - T\Delta S^{\text{mono}}$$

$$\Delta S^{\text{mono}} \approx \Delta S^{\text{mono}} (\text{translační}) + \Delta S (\text{rotační})$$

Celková změna entropie je v první řadě odvozena ze změn v translačních a rotačních entropiích při asociaci receptor-ligand. Rovnost představuje kvalitativní součet. Předpokládá se, že translační a rotační entropie tvoří největší příspěvek. Další možné příspěvky (konformační, vibrační a solvatační entropie) jsou v podstatě zanedbatelné.

Pro bivalentní interakce je volná Gibbsova energie (ΔG^{di}) vyjádřena podobně, použitím standardní rovnosti popisující termodynamické složky v kvalitativním vztahu:

$$\Delta G^{\text{bi}} = \Delta H^{\text{bi}} - T\Delta S^{\text{bi}}$$

$$\Delta H^{\text{bi}} \approx 2\Delta H^{\text{mono}}$$

$$\Delta S^{\text{bi}} \approx \Delta S^{\text{mono}} (\text{translační}) + \Delta S^{\text{mono}} (\text{rotační}) + \Delta S^{\text{bi}} (\text{konformační, linker})$$

Předpokládá se, že interakce jednotlivého ligandu v bivalentní molekule s každým z bivalentních míst je volným a nezávislým dějem. Bivalentní změna entalpie je rovna dvěma entalpiím monovalentním. Bivalentní změna entropie obsahuje tři složky. První dvě složky jsou rovny translační a rotační entropii z monovalentní asociace. To je založeno na úvaze: translační a rotační entropie bivalentních a monovalentních částí jsou si rovny, protože tyto entropie jsou pouze málo závislé na hmotnosti a velikosti. Třetí složky vyplývá ze změny konformační entropie. Tato část bere v úvahu konformační entropii, kterou přispívá ke změně entropie linker.

Pro jednoduchý náznak termodynamických výhod multivalentních systémů, může být Gibbsova energie srovnána mezi dvěma ideálními systémy. První je multivalentní systém, ve kterém jeden multivalentní receptor s n místy, se váže k jednomu multivalentnímu ligandu, také s n místy, za vzniku jednoho správně spárovaného multivalentního komplexu. Druhý systém je zastoupen n nezávislými páry monovalentních komplexů, složených z n kopií monovalentního ligandu a n kopií monovalentního receptoru. Gibbsova energie pro každý systém je dána:

$$n\Delta G^{\text{mono}} = n\Delta H^{\text{mono}} - nT\Delta S^{\text{mono}}$$

$$\Delta G^{\text{multi}(n)} = \Delta H^{\text{multi}(n)} - T\Delta S^{\text{multi}(n)}$$

$$\approx n\Delta H^{\text{mono}} - T\Delta S^{\text{mono}} - T\Delta S^{\text{multi}(n)} (\text{konformační, linker})$$

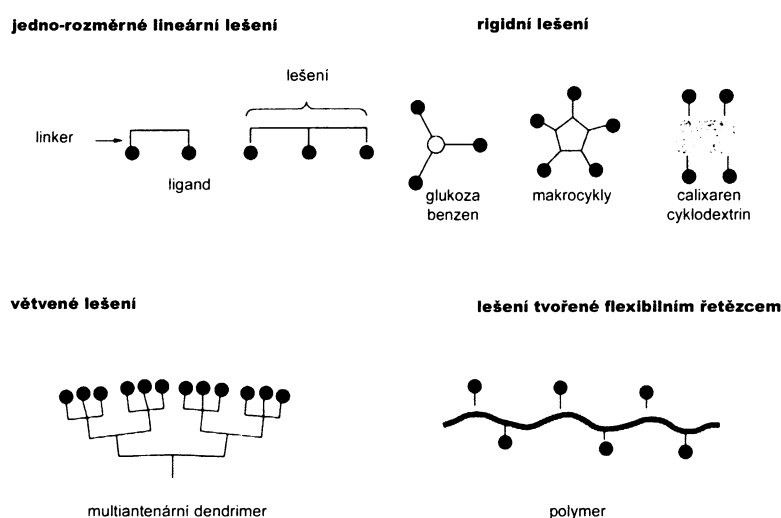
Odečtením těchto dvou rovnic dostaneme rozdíl volných energií mezi oběma systémy:

$$\Delta\Delta G = \Delta G^{\text{multi}(n)} - n\Delta G^{\text{mono}} = (n-1)T\Delta S^{\text{mono}} - T\Delta S^{\text{multi}(n)}$$

Pokud je multivalentní asociace pevnější než monovalentní asociace, což je díky značnému entropickému příspěvku monovalentní vazby ($\Delta S^{\text{mono}} < 0$). Toto srovnání podporuje multivalentní vaznost, protože má relativně malý entropický úbytek.

3.6.3. Lešení

Lešení (scaffold) – slouží jako molekulární fixační systém, na jehož povrchu jsou chemicky reaktivní místa, která lze použít pro připojení rozličných ligandů. Valence a tvar lešení má podstatný vliv na vazebné a funkční vlastnosti multivalentních molekul, které tvoří takováto lešení. Početné třídy nosičů jsou obvykle použity při návrhu multivalentních



Obrázek 19: Tvar a velikost různých lešení použitých v multivalentní prezentaci.⁶⁵

prefabrikovaných vazebných míst, která umožňují dosáhnout správného umístění s připojenými ligandy. Rigidní lešení můžeme nalézt v různých molekulárních systémech, od malých molekul (benzen, glukosa) přes makrocykly až ke sofistikovaným molekulám (cyklodextrin, calix[n]aren).

Povrch s přirozeně se vyskytujícími glykoproteiny poskytuje mnoho typů glykosidického seskupení v di- a triantennární konfiguraci. Takto větvená lešení se podobají struktuře stromu a označují se jako dendrimery. Při srovnání přírodních glykodendrimerů a syntetických dendrimerů, jsou templáty více kompaktní, s hustým větvením. V závislosti

molekul (**Obrázek 19**).

Molekuly s nízkou valencí jsou konstruovány použitím jedno-rozměrné linie nebo větvičích řetězce. Multivalentní molekuly mohou též tvořit rigidní a pre-organizované lešení, které je dobře strukturně, orientačně a konformačně definované. Rigidní systém představuje známý počet

na typu větvení a jádru struktury, některé dendrimery zaujmou rozsáhlou sférickou nebo pseudosférickou strukturu, zatímco jiné pouze její část.

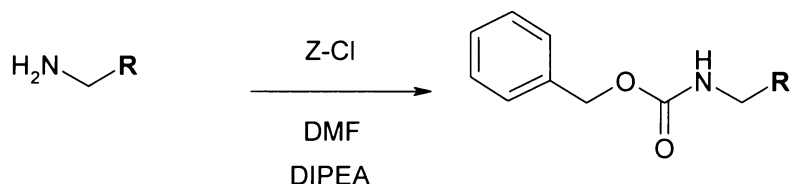
Syntéza multivalentních molekul založených na polymerním řetězci je snadno dosažitelná pomocí polymerizace ligandového monomeru nebo konjugací modifikovaných polymerů s ligandy. Polymerní polyvalentní ligandy jsou často založeny na flexibilní konstrukci, která obsahuje poly(akrylamid).

3.6.4. Hustota ligandů

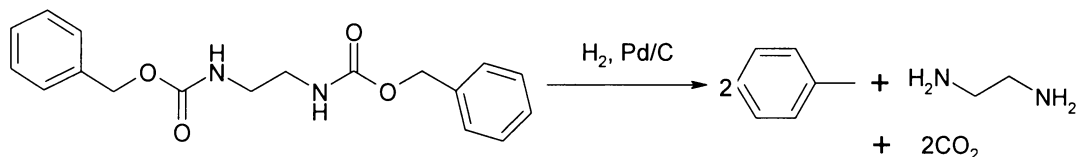
Hustota ligandů (ligand density) – dvě a více různých typů molekul může být přítomno současně v několika exemplářích na postraním řetězci polymeru. Mění se rozměry bioaktivního ligandu a inaktivního zbytku umožňují změnit biologickou aktivitu dané molekuly. Ligandová (povrchová) hustota popisuje vlastnosti daných molekul pro polyvalentní polymery. Definujeme jí jako počet připojených ligandů vzhledem k celkovému počtu postraních řetězců na polymerní molekulu. Ligandová hustota představuje kritický faktor navrhovaných multivalentních molekul, protože široce ovlivní ligandovou distribuci, meziligandovou vzdálenost, tvar a konformaci polymeru. Všechny tyto vlastnosti pomohou modulovat biologickou aktivitu multivalentních molekul.

3.6.5. Homo- a heterovalentní molekuly

Homo- a heterovalentní molekuly – multivalentní interakce se mohou vztahovat k současné asociaci působící mezi identickými páry receptor-ligand – tyto interakce jsou *homovalentní*. Multivalentní interakce, které působí mezi více než jedním druhem receptoru či ligandu jsou *heterovalentní*. Homovalentní interakcí tvořené násobné ligand-receptorové páry mohou přispívat k vzrůstu síly asociace celého komplexu. Heterodimerická molekula se struktúrně úzce podobá bifunkční molekule, je složena z dvou různých ligandů spojených linkerem. Bifunkční molekula je navrhována pro monovalentní vazbu dvou odlišných cílových receptorů separovaných nebo lokalizovaných v rozdílných kompartmentech buňky.

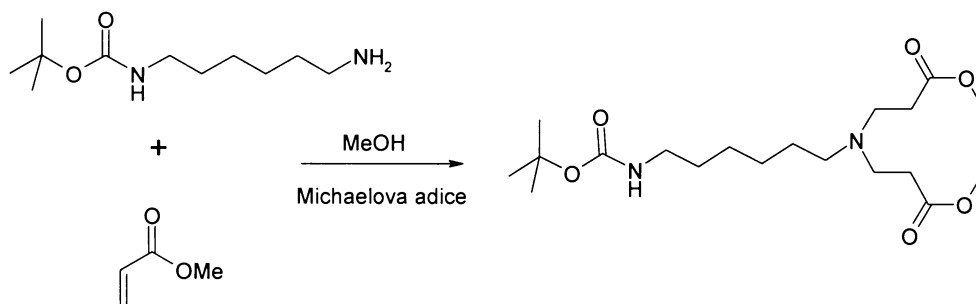


Výhodou benzyloxykarbonylové skupiny je její snadná hydrogenolýza v neutrálním prostředí. Vedle standardní hydrogenolýzy se používá i „trans hydrogenace“ prováděné v přítomnosti cyklohexanu, mravenčanu amonného, resp. dalších zdrojů vodíku.



3.7.2. Michaelova adice⁶⁸

Michaelova adice je adice nukleofilů na terminální dvojnou vazbu. Typickými substráty, které podléhají této nukleofilní adiční reakci jsou např. α , β -nenasycené estery, nitrily, nitrosloúčeniny a sulfony. Nukleofily zahrnují aminy, alkokidy i thioláty. Pokud se nukleofil musí generovat ze své konjugované kyseliny (alkoxid) stačí k jeho přípravě katalytické množství báze, protože hnací silou adiční reakce je přeměna π -vazby na σ -vazbu. Čím větší je (-)-M-efekt (mezomerní efekt) skupiny aktivující terminální dvojnou vazbu, tím snáze tato dvojná vazba podléhá ataku nukleofilem.

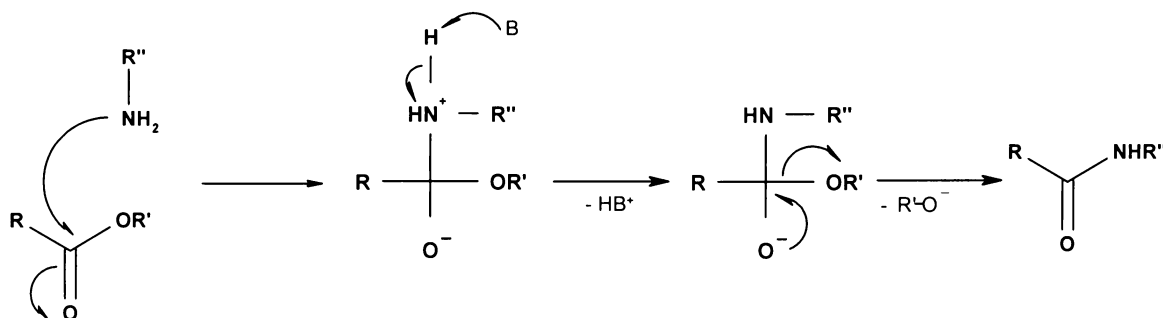


3.7.3. Acylace aminů estery karboxylových kyselin (aminolýza esterů)⁶⁹

Konverze esterů na amidy umožňuje připravit nesubstituované, N-substituované a N, N-disubstituované amidy z příslušných aminů.

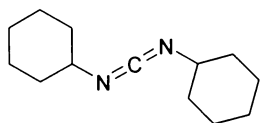
Mechanismus reakce:

Ačkoliv bylo mnoho studií věnováno mechanismu acylace aminů estery karboxylových kyselin než jinými činidly, detaily mechanismu nejsou stále zcela známy.⁷⁰ Jeden z možných mechanismů reakce zachycuje obrázek (**Obrázek 20**). Reakce probíhá v bazickém prostředí (amin, H₂O).



Obrázek 20: Mechanismus acylace aminů estery karboxylových kyselin.

3.7.4. Esterifikace pomocí DCC (*N,N'*-dicyklohexylkarbodiimid)⁷¹



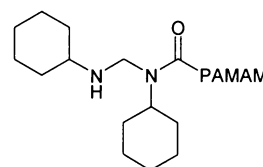
DCC je jedním z nejčastěji používaných spojovacích (couplingových) činidel v organických syntetických aplikacích. DCC je ve vodě rozpustný, ale dobře se s ním pracuje i v celé řadě organických rozpouštědlech (DMF, THF, CH₃CN, DMSO, CH₃Cl).

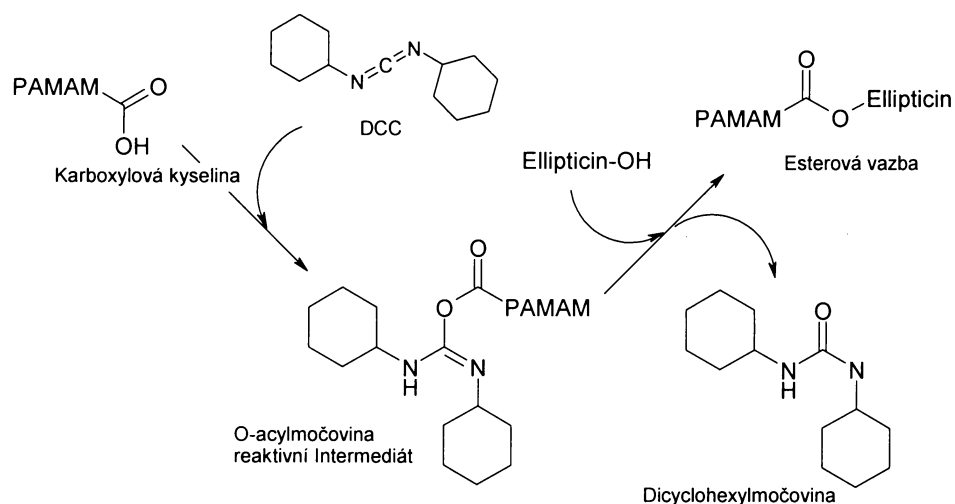
Mechanismus reakce (Obrázek 21, str. 32):

Karboxylová kyselina reaguje s DCC za vzniku reaktivního intermediátu *O*-acylmočoviny. Vzniklý meziprodukt je dále atakován ve smyslu S_N2 substituce za vzniku esterové vazby.

Potenciálně nežádoucím efektem DCC couplingových reakcí je

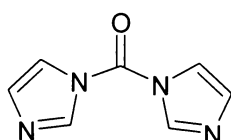
spontánní přesmyk reaktivní *O*-acylmočoviny na inaktivní *N*-acylmočovinu. Míra přesmyku se silně zvyšuje v aprotických rozpouštědlech, jako např. DMF.



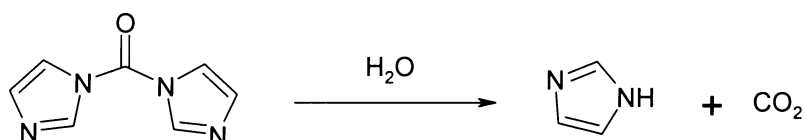


Obrázek 21: Mechanismus esterifikace pomocí *N,N'*-dicyklohexylkarbodiimidu.

3.7.5. Esterifikace pomocí CDI (1,1'-karbonyldiimidazol)⁷¹

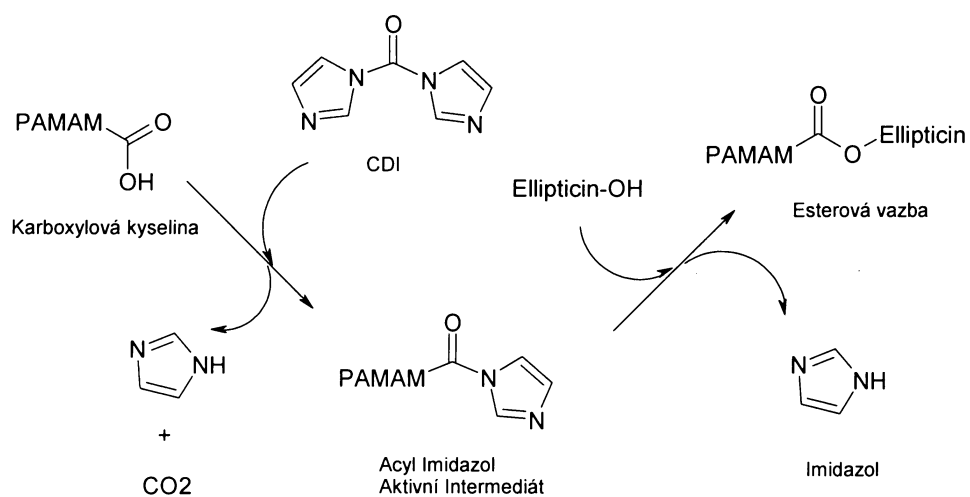


CDI je vysoce aktivní činidlo obsahující dvě acylimidazolové skupiny. Výsledkem je, že CDI může aktivovat karboxylové nebo hydroxylové skupiny pro konjugaci s dalším nukleofilem. Reakce musí být prováděna v bezvodém prostředí, protože CDI rychle hydrolyzuje na CO_2 a imidazol. Proto se používají rozpouštědla s méně než 0,1 % vody. Využívá se suchých organických rozpouštědel jako např. aceton, dioxan, DMSO, THF a DMF.



Mechanismus reakce (Obrázek 22, str. 33):

Karboxylová kyselina reaguje s CDI za tvorby meziproduktu *N*-acylimidazolu o velké reaktivitě. Tento intermediát je dále atakován ve smyslu $\text{S}_{\text{N}}2$ substituce nukleofilem (alkohol) za vzniku esterové vazby.



Obrázek 22: Mechanismus esterifikace pomocí 1,1'-karbonyldiimidazolu .

4. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

4.1. Chemikálie a materiály

4.1.1. Rozpouštědla

Používaná rozpouštědla byla před použitím destilována a pro vybrané reakce sušena následujícími způsoby:

- *N,N-Dimethylformamid* sušen nad P_2O_5 (5 g P_2O_5 na 1 l DMF), destilován z P_2O_5 pod argonem a uchován nad molekulovými síty 4Å.
- *Chloroform* sušen nad CaH_2 (5 g CaH_2 na 1 l $CHCl_3$) a destilován z hydridu vápenatého pod argonem a uchován nad molekulovými síty 4Å.
- *Methanol* byl absolutizován refluxem (3 hodiny) s hořčíkovými hoblinami aktivovanými jódem a následně oddestilován a uchováván nad molekulovými síty 3Å.
- *Dioxan* byl destilován z $LiAlH_4$ a uchováván nad molekulovými síty 4Å.
- *Etylendiamin* byl předsušen NaOH a před použitím byl destilován za přítomnosti sodíku pod dusíkem. Byl uchováván nad molekulovými síty 5Å.
- *Toluen* byl sušen sodíkem (5 g Na na 1 l toluenu) a před použitím byl destilován za přítomnosti sodíku pod argonem.
- *Dichlormethan* byl sušen nad CaH_2 (5 g CaH_2 na 1 l $CHCl_3$) a destilován z hydridu vápenatého pod argonem a uchován nad molekulovými síty 4Å.
- *Tetrahydrofuran* byl předsušen CaH_2 (5 g CaH_2 na 1 l THF) a sušen refluxem sodíkem (5 g sodíku na 1 l THF) a benzofenolem do vzniku intenzivně modrého zbarvení ketylu a poté byl destilován pod argonem.
- *Acetonitril* sušen nad CaH_2 (5 g CaH_2 na 1 l CH_3CN) a destilován z hydridu vápenatého pod argonem a uchován nad molekulovými síty 4Å.
- *Pyridin* byl předsušen NaOH a před použitím byl destilován za přítomnosti BaO.
- *Aceton* byl sušen nad bezvodým $CaCl_2$ (10 g $CaCl_2$ na 1 l acetonu) 12 hodin a bezprostředně před použitím byl destilován z $CaCl_2$.

Při přípravě dendrimeru byla veškerá rozpouštědla zbavena vzdušného kyslíku. *Odplynění* bylo provedeno opakovaným evakuováním rozpouštědla za nízké teploty a napuštěním inertním plynem (argon).

4.1.2. Chemikálie

Chemikálie byly dodány firmami Aldrich, Fluka, Merck, Koch-Light Laboratories v kvalitě p.a..

BOC (*t*-butoxykarbonyl), 1,6-hexandiamin, methyl akrylát, Na₂SO₄, NaHCO₃, NaOH, HCl, 2-hydroxykarbazol, 5-hydroxyindol, DCC (N,N'-dicyklohexylkarbodiimid), CDI (1,1'-karbonyldiimidazol), kyselina jantarová, LiCl, C₂H₅OS, Lewisova kyselina (BF₃·(CH₃)₂O), LiI, LiOH, trifluoroctová kyselina, Z-Cl (benzyl-chlorformiát), 1,6-dibromhexan, K₂CO₃, amoniak, ninhydrin, DMAP (4-dimethylaminopyridin), DBU (diazabicyklo[5,4,0]undec-7-en), PARABA (paradimethylaminobenzaldehyd), LiAlH₄, Celit 545, trifenyl fosfín, tetrabrom methyl,

Ehrlichovo činidlo – 2 g PARABA, 20 ml konc. HCl, 80 ml EtOH

4.1.3. Přístroje

NMR: Varian ^{UNITY}INOVA-400 spektrometr

UV lampa Spectroline ENF-260C/FE, 254/385 nm (Spectronics Corp., USA)

vakuová odparka: BÜCHI, Rotavapor R-114, DE

vodní lázeň: BÜCHI, Watterbath 481, DE

analytické váhy: METTLER, CH

předvážky: METTLER PM480 DeltaRange

magnetická míchačka: Kika Labortechnik, AUT

teploměr: Kika Labortechnik, AUT

lyofilizátor: LAOVAC GT 2 (Leybold-Heraeus), DE

přístroj pro výrobu ledu: eurfrigor , ICE MAKERS

pH-metr:

chromatografické kolony

sběrač frakcí: SuperFrac, Pharmacia Biotech.

^1H a ^{13}C NMR spektra byla měřena na přístroji Varian $^{\text{UNITY}}$ INOVA-400 spektrometr. Chemické posuny δ jsou uvedeny v jednotkách ppm a jsou vztaženy k chemickému posunu tetramethylsilanu, který byl použit jako vnitřní standard. Jako rozpouštědla byly použity CD_3OD , CDCl_3 , $(\text{CD}_3)_2\text{CO}$, $(\text{CD}_3)_2\text{SO}$, D_2O .

Pro sloupcovou chromatografii byl použit silikagel 60 (40-63 μm) Merck, pro analytickou TLC DC-alufolien Kieselgel 60 F_{254} a pro preparativní účely byly použity skleněné desky se silikagelem 60 G s fluorescenčním indikátorem F_{254} (vše od firmy Merck) připraveny v laboratoři. Detekce byla prováděna pomocí UV lampa Spectroline ENF-260C/FE, (Spectronics Corp., USA) s vlnovými rozsahy 254 a 366 nm.

Pro gelovou chromatografii byl použit Sephadex LH-20 gel (Pharmacia) (25-100 μm).

Vzorky pro NMR byly sušeny za laboratorní teploty minimálně 12 hodin v evakuovaném (4 Torr) exikátoru nad P_2O_5 .

4.2. Metody a pracovní postupy

4.2.1. Analytické metody

4.2.1.1. Tenkovrstvá chromatografie (TLC)

Planární chromatografie patří mezi instrumentálně nejjednodušší variantu kapalinové chromatografie s širokým praktickým uplatněním. Tenkovrstvé chromatografie bylo využito k sledování průběhu všech prováděných reakcí a separací. Tato technika je založena na adsorbčním dělicím principu (silikagel SiO_2 , Al_2O_3 , celuosa), sorbent je polární a kolem protéká méně polární rozpouštědlo. Jednotlivé látky v analyzované směsi se rozdělují mezi obě fáze podle svých rozdělovacích konstant; látky s nízkou hodnotou rozdělovací konstanty se zpožďují oproti látkám s vysokou hodnotou. Protože se tu látky neoddělují v čase, ale v rovině, faktor opoždění se vyjadřuje poměrem drah, které vykonala látka a pohyblivá fáze.

$R_f = a / b = \text{vzdálenost středu skvrny od startu} / \text{vzdálenost čela pohyblivé fáze od startu}$

Jako stacionární fáze byly použity fólie DC-alufolien Kieselgel 60 F₂₅₄ (Merck), které mají jako stacionární fázi silikagel. Mobilní fáze byla volena dle polarity separovaných látek (Tabulka 1).

Tabulka 1 - Mobilní fáze pro TLC chromatografii

Označení	Složení směsi	Doba vyvíjení (min)
I	$\text{CH}_2\text{Cl}_2 : \text{MeOH}$ (9 : 1), (8 : 2), (19 : 1)	20
II	$\text{CHCl}_3 : \text{MeOH}$ (30 : 1), (20 : 1), (10 : 1), (8 : 2), (15 : 1), (5 : 1)	20
III	$n\text{-PrOH} : \text{H}_2\text{O} : \text{NH}_3$ (7 : 2 : 1)	120-180
IV	$\text{CHCl}_3 : \text{aceton}$ (1 : 2), (1 : 1), (2 : 1)	30
V	toluen : aceton (1 : 4), (1 : 2)	30

Při dělení dendrimerů 1. a 2. generace (**3**, **5**) (obsahujících amino skupinu) je vhodné do směsi **I** a **II** přidat několik kapek amoniaku, dochází tak k zaostření zón dělených látek. Vytvářející směsi je vhodné připravovat čerstvé, aby nedošlo k odpaření některých rozpouštědel a tudíž ke změně daného poměru.

UV aktivní látky byly detekovány pod UV lampou (254 nm). Látky s amino skupinou (**3**, **5**) byly detekovány ponořením do 0,5% roztoku ninhydrinu v methanolu. Dendrimery v podobě methyl esterů (**2**, **4**) a kyselin (**6**, **7**) byly detekovány v parách jodu. Heteroaromatické sloučeniny byly detekovány postřikem Ehrlichova činidla (viz. 4.1.2.) Dalším způsobem detekce byl postřik TLC fólií 10% H₂SO₄ v ethanolu a zahřátím na 100 °C (mineralizace a následné spálení za vyloučení organického uhlíku).

4.2.1.2. Nukleární magnetická rezonance (NMR)

Při ověřování struktury připravovaných látek bylo využito nukleární magnetické rezonance. NMR spektra byla měřena na spektrometru Varian UNITY INOVA-400 (399,90 MHz pro ¹H, 100,56 MHz pro ¹³C) v CDCl₃ při 30 °C. Jako referenční signál byl v ¹H NMR použit signál zbytkového CHCl₃ (chemický posun 7,23) v CDCl₃, v ¹³C byl použit aceton jako vnější standard (chem. posun: 30,5 ppm). Přiřazení signálů se opírá o standardní jednorozměrné experimenty (¹H NMR a ¹³C NMR), dvojrozměrné NMR experimenty (COSY, HMQC, HMBC) a selektivní experiment (diferenční NOE).

4.2.1.3. Hmotnostní spektrometrie (MS)

Hmotnostní spektrometrie v kombinaci s NMR analýzou poskytuje neocenitelné informace o struktuře a čistotě látek.

Vznik iontů – výběr metody užití ke generaci iontů závisí na dvou faktorech. Prvým z nich je těkavost a druhým je účel měření. Pro interpretaci hmotnostního spektra je totiž důležitá míra fragmentace závisící na množství energie, kterou molekula získá v průběhu ionizace. Účelem měření totiž může být buď určení molekulové hmotnosti (potom na hlubší fragmentaci nemáme zájem), nebo odvození struktury studované látky právě z její charakteristické fragmentace⁷².

Molekulová hmotnost připravených látek byla změřena na LC^QDECA spektrometru (ThermoQuest, San Jose, CA). Ke generování pozitivních iontů byla použita ionizace elektroprayem (ESI) při ionizačním napětí 1,2 kV a napětí čočky 30 V. Vzorke rozpuštěné v 92% MeOH v 0,1% HOAc byly vnášeny do ESI iontového zdroje pomocí lineární pumpy rychlostí 3 μ l/min. Kapilára byla udržována při 175 °C a potenciálu 10 V. Spektra byla získána při m/z rozsahu 150-700 Da.

4.2.2. Separční metody

4.2.2.1. Sloupcová chromatografie na silikagelu

Podstatou dělicího procesu komponent vzorku při chromatografii je opakované ustavování rozdělovacích rovnováh vzorku mezi dvěma fázemi, tzv. mobilní a stacionární fází. Mobilní fáze unáší vzorek prostorem, ve kterém dochází k separaci, stacionární fáze představuje nepohybující se náplň separačního prostoru. Stacionární fáze je polárnější než mobilní fáze. Jako stacionární fáze byl použit Silikagel 60 (40-63 μm , Merck), jako mobilní fáze především směs **I a II** (Tabulka 1, str. 37), za využití gradientu MeOH. Průtok mobilní fáze byl urychlován přetlakem vzduchu 0,01-0,02 MPa. Byly jímány frakce 5-25 ml, dle potřeby.

K separaci byly použity skleněné kolony určené pro vysokotlakou kolonovou sloupcovou chromatografii. Kolony byly voleny podle množství nanášeného vzorku. Na kolony o rozměrech 20 cm x 2 cm bylo nanášeno maximálně 200 mg vzorku, na kolonu 40 cm x 4 cm pak maximálně 600 mg vzorku.

Metoda umožňuje velmi rychlé (60-120 min) rozdělení běžných reakčních směsí organických látek ($M_r < 1000$) podle dělení na TLC (stejná mobilní fáze). Určitou nevýhodou je částečná ireversibilní vazba dělených látek na stacionární fázi způsobující snižování výtěžku separace.

4.2.2.2. Preparativní tenkovrstvá chromatografie

Pro preparativní účely bylo využito tenkovrstvé chromatografie na skleněných deskách. Jako stacionární fáze byl použit silikagelem 60 G (obsahuje sádro) s fluorescenčním indikátorem F₂₅₄ (Merck), jako mobilní fáze především směs **I a II** (Tabulka 1, str. 37).

K separaci byly použity čisté a odmaštěné skleněné desky o velikosti 20 x 20 cm. Směs 20 g silikagelu 60 G a fluorescenčního indikátoru F₂₅₄ (2-5% indikátoru) se nanese ve formě suspenze ve vodě na připravené desky v rovnoměrné vrstvě. Takto připravené desky se nechají alespoň jeden den uschnout. Před použitím se aktivují v sušárně při teplotě 40 °C po dobu 30-120 minut .

Na desky bylo nanášeno maximálně 100 mg vzorku. Deska i se vzorkem byla vložena do vyvíjecí komory. Oddělené vrstvy byly odškrabány se sorbentem. Vzorek od silikagelu oddělen extrakcí polárním rozpouštědlem (MeOH).

4.2.2.3. Gelová chromatografie

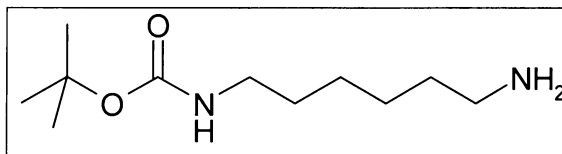
Tato technika je založena na rozdělení látek na základě rozdílu ve velikosti a tvaru molekul. Jde o distribuci látek obsažených v roztoku mezi rozpouštědlem vně částic a rozpouštědlem uvnitř částic gelu. Látky jejichž molekuly jsou větší než velikost pórů gelu, nemohou vstupovat dovnitř a elují se nejrychleji. Nízkomolekulární látky vnikají do částic gelu a tím se jejich rychlost při průchodu zpomalí.

Jako stacionární fáze byl použit gel Sephadex LH-20 (25-100 μm), jako mobilní fáze methanol. Separace byla prováděna na koloně o rozměrech 95 cm x 2,5 cm. Bylo nanášeno 100 mg vzorku v malém množství methanolu. Frakce byly jímány po 2,5 ml při průtokové rychlosti 7 ml/hod. Eluované vzorky byly detekovány pomocí TLC ve vyvíjecí směsi II (Tabulka 1, str. 37).

4.3. Příprava dendrimeru

tert-Butyl ester *N*-(6-aminohex-1-yl) karbamové kyseliny (**1**)⁷³

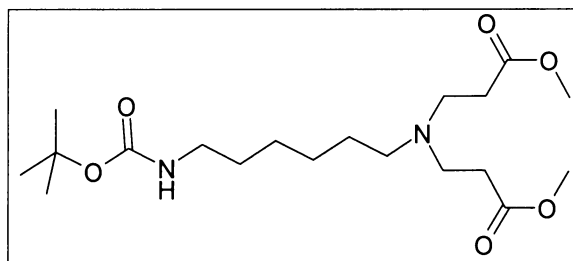
Do litrové baňky opatřené mechanickým míchadlem bylo předloženo 25 g (212 mmol) 1,6-hexandiaminu v 250 ml



dioxanu. 7,68 ml (35,8 mmol) di-*tert*-Butyl dikarbonátu bylo rozpuštěno v 250 ml dioxanu a tento roztok byl přikapáván po dobu 5 hodin do roztoku 1,6-hexandiaminu. Směs byla míchána po dobu 22 hodin. Po odpaření rozpouštědla bylo k odparku přidáno 200 ml vody a vysrážený di-Boc derivát byl odfiltrován na Büchnerově nálevce. Po extrakci dichlormethanem (4 x 80 ml) byly spojené organické vrstvy sušeny nad síranem sodným. Po odfiltrování sušidla a odpaření rozpouštědla byla provedena TLC (dichlormethan/methanol = 9 : 1, detekce: pomocí UV lampy (254 nm) a spálením po mineralizaci 5 % H₂SO₄). Bylo získáno 9,32 g (60 %) produktu **1** jako nažloutlý olej.

tert-Butyl ester *N*-(6-(*N,N*-Bis-2-(methoxykarbonyl)ethyl)amino)hex-1-yl) karbamové kyseliny (**2**)⁷³

V 250 ml baňce opatřené mechanickým míchadlem, pod argonem a v temnu (baňka byla obalená alobalem) bylo v 40 ml suchého methanolu při 0 °C (lázeň voda/led) rozpuštěno 12,8 ml

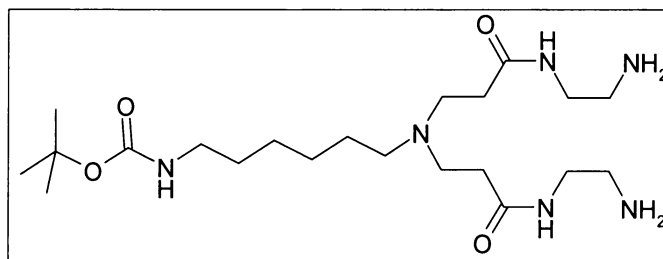


(140 mmol) methyl akrylátu; sloučenina **1** (6,2 g; 28 mmol) byla rozpuštěna v 60 ml suchého methanolu a roztok postupně přikapáván do roztoku methyl akrylátu po dobu 75 minut za stálého míchání. Po další půl hodině míchání byla chladicí lázeň odstraněna a roztok byl míchán po dobu 48 hodin při +4 °C. Po odpaření rozpouštědla byla provedena TLC (dichlormethan/methanol = 9 : 1, detekce: UV lampa (254 nm), jód). Pomocí sloupcové chromatografie na silikagelu 60 (mobilní fáze dichlormethan/methanol = 8 : 2) bylo získáno 9,3 g (85 %) produktu **2** jako žlutooranžový sirup.

***tert*-Butyl ester *N*-(6-(*N,N*-Bis-2-((2-aminoethyl)aminokarbonyl)ethyl)aminohex-1-yl) karbamové kyseliny (3)**

Reakce optimalizovaná byla prováděna dle následujícího postupu:

V 50 ml baňce opatřené mechanickým míchadlem, pod argonem a v temnu byly v 10 ml suchého methanolu při laboratorní teplotě (optimalizace teploty



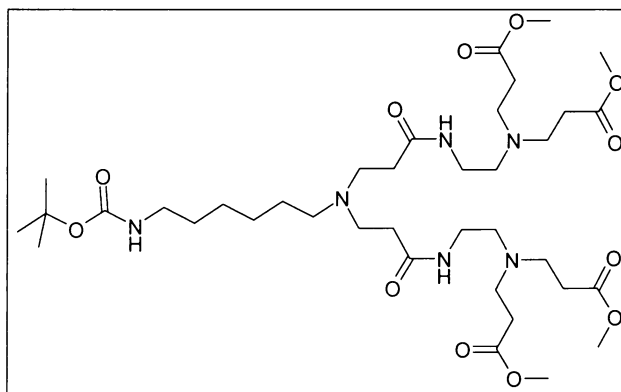
(**Tabulka 2**)) rozpuštěny 4,5 ml (67,4 mmol) etylendiaminu. Látka **2** (2,4 g; 6,74 mmol) byla rozpuštěna v 10 ml suchého methanolu a postupně přikapávána do roztoku etylendiamínu po dobu 30 minut za stálého míchání. Reakční směs byla další 4 dny míchána při laboratorní teplotě. Po odpaření rozpouštědla na rotační vakuové odparce byla třikrát provedena koevaporace methanol/toluen. Byla provedena TLC (dichlormethan/methanol = 8 : 2 + NH₃, detekce: UV lampa (254 nm), jód; ninhydrin). Bylo získáno 2,47 g (82 %) surového produktu **3** jako žlutý sirup. Pomocí sloupcové chromatografie na silikagelu 60 (mobilní fáze dichlormethan/methanol = 8 : 2 + 1% triethylamin) byl izolován čistý produkt **3** 1,097 g (36,7 %) jako nažloutlý sirup.

Tabulka 2 – Příprava látky (3) při různé reakční teplotě.

	Teplota (°C)	Reakční doba (dny)	Výtěžek (%)
I.	0	6	78
II.	24	4	82
III.	37	4	80

terc-Butyl ester N-(6-(N,N-Bis-2-((2-N,N-bis-2-((methoxykarbonyl)ethyl)aminoethyl)aminokarbonyl)ethyl)aminohex-1-yl)karbamové kyseliny (4)⁷³

V 50 ml baňce opatřené mechanickým míchadlem, pod argonem a v temnu bylo ve 4 ml suchého methanolu při 0 °C (lázeň voda/led) rozpuštěno 2 ml (21,9 mmol) methyl akrylátu. Látka **3** (977 mg; 2,19 mmol) byla rozpuštěna v 10 ml suchého methanolu a postupně přikapávána do

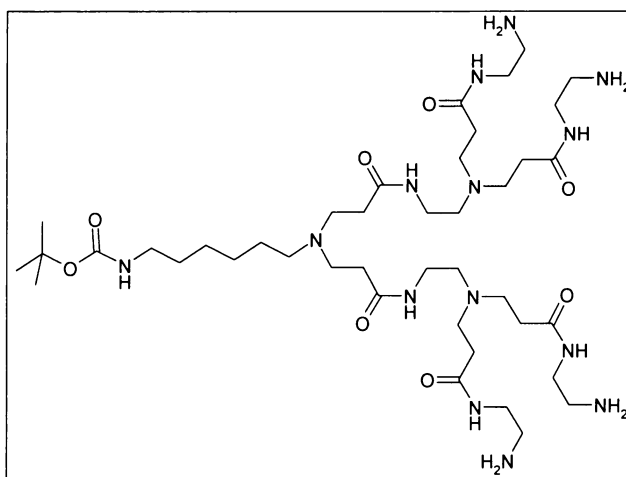


roztoku methyl akrylátu po dobu 20 minut za stálého míchání. Po další půl hodině míchání byla chladicí lázeň odstraněna a roztok byl míchán po dobu 120 hodin při +4 °C v termostatované místnosti. Po odpaření rozpouštědla byla provedena TLC (dichlormethan/methanol = 9 : 1, detekce: UV lampa (254 nm), jód). Získáno bylo 1,13 g (65,7 %) surového produktu **4** jako žlutý sirup. Pomocí sloupcové chromatografie na silikagelu 60 (mobilní fáze chloroform/methanol = 10 : 1) byl izolován čistý produkt **4** 915 mg (53,2 %) jako nažloutlý sirup.

terc-Butyl ester N-(6-(N,N-Bis-2((2-N,N-bis-2-((2-aminoethyl)amino-karbonyl)ethyl)aminokarbonyl)ethyl)amonohex-1-yl) karbamové kyseliny (5)

Reakce optimalizovaná byla prováděna dle následujícího postupu:

V 25 ml baňce opatřené mechanickým míchadlem, pod argonem a v temnu bylo v 0,5 ml suchého methanolu při teplotě 37 °C rozpuštěno 0,16 ml (2,4 mmol) etylendiaminu. Látka **4** (95 mg; 0,12 mmol) byla rozpuštěna v 1 ml suchého methanolu a postupně přikapávána do roztoku etylendiaminu po dobu 10 minut za



stálého míchání. Reakční směs byla dalších 6 dní míchána při teplotě 37 °C. Po odpaření rozpouštědla na rotační vakuové odparce byla třikrát provedena koevaporace methanol/toluen. Byla provedena TLC (dichlormethan/methanol = 9 : 1 + NH₃, detekce:

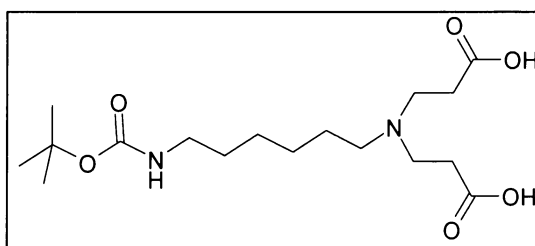
UV lampa (254 nm), jód; ninhydrin) a získáno 104 mg (96 %) surového produktu **5** jako žlutý sirup. Pomocí gelové chromatografie na koloně Sephadexu LH-20 (mobilní fáze methanol) byl získán čistý produkt **5** 62 mg (57,4 %) jako nažloutlý sirup.

4.4. *Optimalizace techniky pro navázání biologicky aktivní látky*

Terc-Butyl ester N-(6-(N,N-Bis-2-(hydroxykarbonyl)ethyl)amino)hex-1-yl) karbamové kyseliny (6)

Reakce optimalizovaná (**Tabulka 3**) byla prováděna dle následujícího postupu:

Do 25 ml baňky opatřené mechanickým míchadlem, byla předložena látka **2** (58 mg; 0,152 mmol). Methylester byl rozpuštěn v 0,3 ml THF a za míchání bylo přikapáváno 0,4 ml (0,445 mmol) 1 M roztok hydroxidu



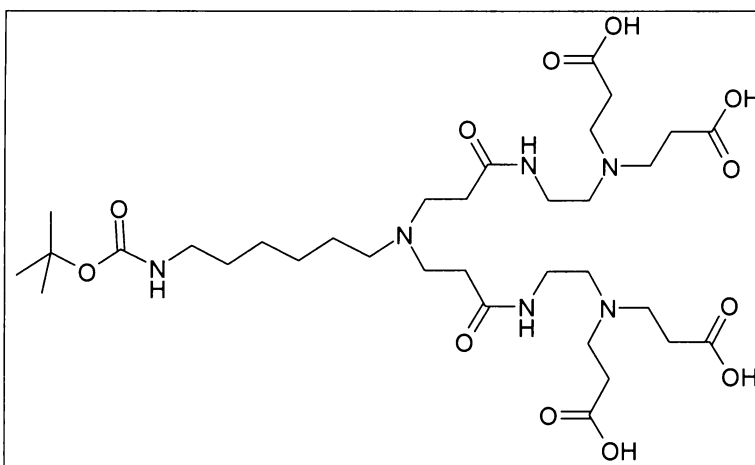
sodného. Reakční směs byla míchána při laboratorní teplotě po dobu 20 hod. Poté byla směs titrována 0,25 M kyselinou chlorovodíkovou do $\text{pH} \approx 7$. Po odpaření rozpouštědla byla provedena TLC (isopropanol/amoniak/voda = 7 : 1 : 2, detekce: UV lampa (254 nm), jód) a získáno 58 mg (99 %) produktu **6** jako bílé látky ve směsi s chloridem sodným, který tam zůstal po hydrolýze.

Tabulka 3 – Optimalizace reakční směsi, teploty a doby pro přípravu látky (6).

	Reakční směs	Teplota (°C)	Reakční doba (hod)	Zpracování	Výtěžek (%)
I.	(2) / 1M NaOH / MeOH	22	1	DOWEX HW 50 H ⁺	51
II.	(2) / LiCl / pyridin	116	4	-	-
III.	(2) / C ₂ H ₅ OS / CH ₂ Cl ₂ / BF ₃ (CH ₃) ₂ O	22	72	-	48
IV.	(2) / LiI / pyridin	116	15	DOWEX HW 50 H ⁺	-
V.	(2) / 2M LiOH	100	24	DOWEX HW 50 H ⁺	26
VI.	(2) / 1M NaOH / THF	22	20	Amberlite IR-120 H ⁺	4
VII.	(2) / 1M NaOH / THF	22	20	titrace 0,25M HCl → pH 7	99

terc-Butyl ester N-(6-(N,N-Bis-2-((2-N,N-bis-2-((hydroxykarbonyl)ethyl)aminoethyl)aminokarbonyl)ethyl))aminoheks-1-yl) karbamové kyseliny (7)

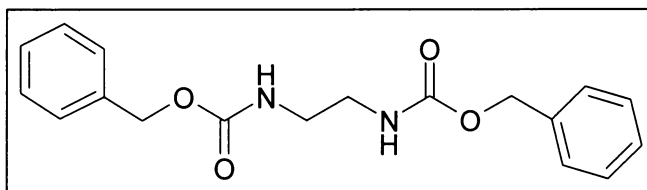
Do 25 ml baňky opatřené mechanickým míchadlem, byla předložena látka **4** (61 mg; 0,0773 mmol). Methylester byl rozpuštěn v 0,3 ml THF a za míchání bylo přikapáváno 0,4 ml (0,386 mmol) 1 M roztok hydroxidu sodného. Reakční



směs byla míchána při laboratorní teplotě po dobu 20 hod. Poté byla směs titrována 0,25 M kyselinou chlorovodíkovou do $\text{pH} \approx 7$. Po odpaření rozpouštědla byla provedena TLC (isopropanol/amoniak/voda = 7 : 1 : 2, detekce: UV lampa (254 nm), jód) a získáno 58 mg (98,8 %) produktu **7** jako bílé látky ve směsi s chloridem sodným, který tam zůstal po hydrolyze.

1,2-bis-((Benzyloxykarbonyl)-amino) ethan (8)

Do 10 ml baňky opatřené mechanickým míchadlem, bylo předloženo 100 μl ethylendiaminu, 3 ml DMF, 200 μl DIPEA a 200 μl

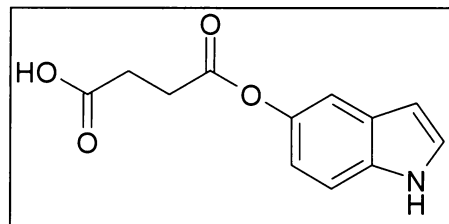


benzyl-chlorformiátu. Došlo k vytvoření bílé sraženiny. Reakční směs byla míchána při laboratorní teplotě po dobu 48 hod. Byla provedena TLC (dichlormethan/methanol = 30 : 1). Po extrakci dichlormethanem (2 x 10 ml) a 10 ml NaHCO_3 byly spojené organické vrstvy sušeny nad síranem sodným. Po odfiltrování sušidla a odpaření rozpouštědla byl vzorek zamražen pomocí tekutého dusíku a ponechán přes noc na lyofilizátoru.

Mono-(1*H*-indol-5-yl) ester kyseliny butan-1,4-diové (9)

Reakce optimalizovaná (Tabulka 4) byla prováděna dle následujícího postupu:

Do 10 ml baňky opatřené mechanickým míchadlem, bylo ve 3 ml suchého DMF při 0 °C (lázeň voda/led) rozpuštěno 10 mg (0,0847 mmol) kyseliny jantarové a 38 mg DCC (0,186 mmol). Reakční směs byla při stejné teplotě míchána po dobu



45 minut. Poté bylo přidáno 32 mg (0,178 mmol) 5-hydroxyindolu. Chladicí lázeň byla odstraněna a směs byla dále míchána při laboratorní teplotě přes noc. Byla provedena TLC (chloroform/methanol = 20 : 1). Reakční směs byla odpařena do sucha a vzniklý odparek rozpuštěn v 5 ml dichlormethanu a přefiltrován na fritě. Po extrakci dichlormethanem (2 x 10 ml) a 10 ml vody byly spojené organické vrstvy sušeny nad síranem sodným. Po odfiltrování sušidla a odpaření rozpouštědla byla provedena TLC (chloroform/methanol = 30 : 1). Získáno bylo 47 mg (85,7%) surového produktu 9 jako nahnědlá látka. Pomocí sloupcové chromatografie na silikagelu 60 (mobilní fáze chloroform/methanol = 20 : 1) byl izolován čistý produkt 9 33 mg (60,2 %) jako bílá látka.

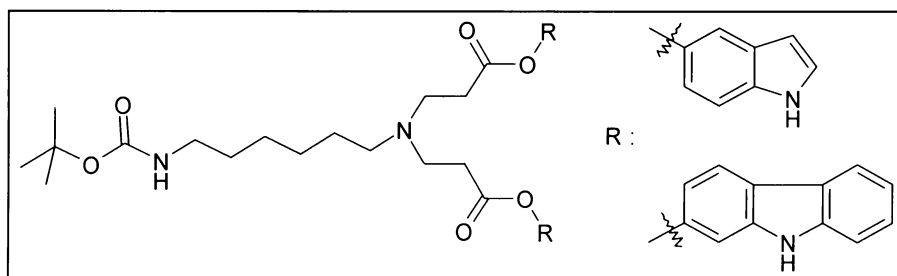
Tabulka 4 - Optimalizace reakční směsi, teploty a doby pro přípravu látky (9).

	Reakční směs	Teplota (°C)	Reakční doba (hod)	Výtěžek Mono-ester (%)	Výtěžek di-ester (%)
I.	Kyseliny jantarové : DCC : DMAP : DMF + 5-hydroxyindol	0	1		
		22	20	-	-
		100	20	+	-
		22	70	73	-
II.	Kyseliny jantarové : DCC : DMF + 5-hydroxyindol	0	1		
		22	20	60,2	-
III.	(9) : DCC : DMF + 5-hydroxyindol + CHCl ₃	0	1		
		22	20		-
		22	20		-

terc-Butyl ester N-(6-(N,N-Bis-2-(hydroxykarbonyl)ethyl)amino)hex-1-yl) karbamové kyseliny (10)

Reakce optimalizovaná (Tabulka 5) byla prováděna dle následujícího postupu:

Do 25 ml
baňky opatřené
mechanickým
míchadlem, byla
v 4 ml suchého



DMF při 0 °C (lázeň voda/led) rozpuštěna látka **6** (38 mg; 0,11 mmol) a 48 mg DCC (0,235 mmol). Reakční směs byla při stejné teplotě míchána po dobu 45 minut. Poté bylo přidáno 31 mg (0,224 mmol) 5-hydroxyindolu. Chladicí lázeň byla odstraněna a roztok byl zahříván pod zpětným chladičem na teplotu 85 °C. Po 20 hodinách byla provedena TLC (chloroform/methanol = 20 : 1). Reakční směs byla zahřívána na 130 °C po dobu 3 hodin. Po ochlazení na laboratorní teplotu byla reakční směs odpařena do sucha a vzniklý odparek rozpuštěn v 5 ml dichlormethanu a přefiltrován na fritě. Po extrakci dichlormethanem (2 x 10 ml) a 10 ml vody byly spojené organické vrstvy sušeny nad Na₂SO₄. Po odfiltrování sušidla a odpaření rozpouštědla byla provedena TLC (chloroform/methanol = 30 : 1). Výsledek reakce byl negativní, došlo ke vzniku směsi neidentifikovatelných produktů.

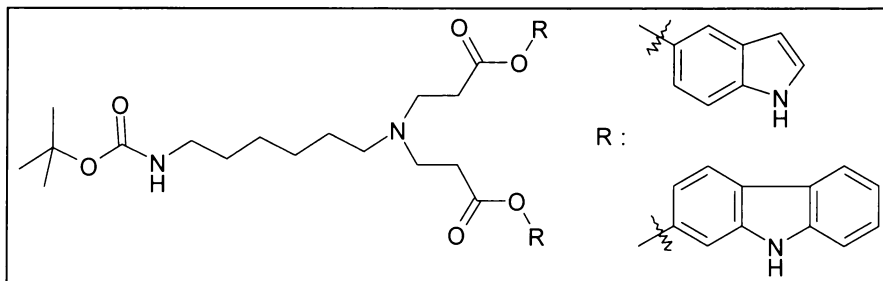
Tabulka 5 - Optimalizace reakční směsi, teploty a doby pro přípravu látky (10).

	Reakční směs	Teplot a (°C)	Reakční doba (hod)	Výtěžek (%)
I.	(6) : 2-hydroxykarbazol : DMAP : CH ₃ CN +	22	72	-
	(10 min)DCC	22	96	-
	+ DCC	92	24	-
	+ DCC			
II.	(6) : DCC : CH ₃ CN + (10 min) 2-hydroxykarbazol	92	20	-
III.	(6) : DCC : CH ₃ CN + 5-hydroxyindol	0	0,5	-
IV.	(6) : DCC : DMSO/MeOH + 5-hydroxyindol	0	0,5	-
V.	(6) : DCC : DMF/MeOH	0	1	
	+ 5-hydroxyindol	85	20	-
		130	3	-

***tert*-Butyl ester *N*-(6-(*N,N*-Bis-2-((1-*H*-indol-5-yl)karbonyl) ethyl) amino)hex-1-yl) karbamové kyseliny (11)**

Reakce optimalizovaná (Tabulka 6) byla prováděna dle následujícího postupu.

Do 25 ml
baňky opatřené
mechanickým
míchadlem, byla
předložena látka 6
(52 mg;



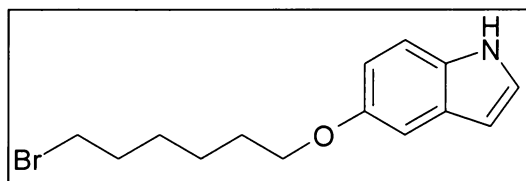
0,136 mmol) a 46 mg CDI (0,2856 mmol). Poté bylo přes septum přidáno 6 ml DMF. Směs byla pod argonem zahřívána na teplotu 55 °C pod zpětným chladičem. Po 60 minutách míchání bylo přes septum přidáno 54 mg (0,2992 mmol) 2-hydroxykarbazolu. Směs byla dále pod argonem zahřívána při 55 °C po dobu 40 hodin. Byla provedena TLC (chloroform/methanol = 20 : 1). Po ochlazení na laboratorní teplotu byla reakční směs odpařena do sucha. Pomocí gelové chromatografie na koloně Sephadexu LH-20 (mobilní fáze methanol) byla snaha o přečištění reakční směsi. Reakční směs se nepodařilo rozdělit, jednalo se o směs neidentifikovatelných produktů.

Tabulka 6 - Optimalizace reakční směsi a doby pro přípravu látky (11).

	Reakční směs	Teplota (°C)	Reakční doba (hod)	Výtěžek (%)
I.	(6) : CDI : DMF (argon)	55	1	
	+ 2-hydroxykarbazol , DBU	55	20	-
II.	(6) : CDI : DMF (argon)	55	1	
	+ 2-hydroxykarbazol	55	40	-

5-(6-Brom-hexyloxy)-1H-indol (12)

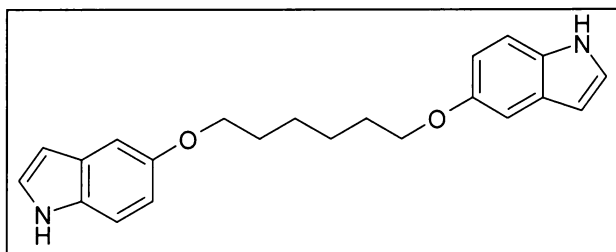
Do 25 ml baňky opatřené mechanickým míchadlem, pod argonem bylo v 8 ml suchého acetonu rozpuštěno 30 mg (0,213 mmol) 5-hydroxyindolu a 88 mg vyžíhaného K_2CO_3



(0,639 mmol). Reakční směs byla zahřívána pod zpětným chladičem na teplotu 40 °C . Po 5 minutách bylo přidáno 163 μ l (1,06 mmol) 1,6-dibromhexanu. Směs byla dále pod argonu zahřívána při 64 °C po dobu 20 hodin. Byla provedena TLC (chloroform/methanol = 30 : 1). Po ochlazení na laboratorní teplotu byla reakční směs extrahována dichlormethanem (2 x 10 ml) a 10 ml vody. Spojené organické vrstvy byly sušeny nad síranem sodným. Po odfiltrování sušidla a odpaření rozpouštědla byla provedena TLC (chloroform/methanol = 30 : 1). Pomocí sloupcové chromatografie na silikagelu 60 (mobilní fáze: petroléter) byl izolován nezreagovaný 1,6-dibromhexan. Změna mobilní fáze na chloroform, izolován čistý produkt 12 41 mg (64 %) jako žlutý olej.

1,6-di-(1H-indol-5-yl-oxy)-hexan (13)

Do 25 ml baňky opatřené mechanickým míchadlem, pod argonem bylo v 1 ml suchého DMF rozpuštěno 50 mg (0,354 mmol) 5-hydroxyindolu a 68 mg vyžíhaného K_2CO_3 (0,483 mmol).

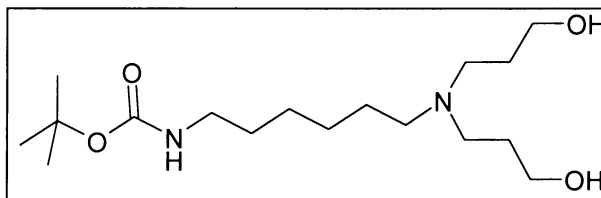


Reakční směs byla při laboratorní teplotě míchána po dobu 5 minut. Bylo přidáno 24 μ l (0,161 mmol) 1,6-dibromhexanu. Směs byla dále pod argonu míchána po dobu 20 hodin. Byla provedena TLC (chloroform/methanol = 30 : 1). K reakční směsi bylo přidáno dalších 44 mg K_2CO_3 a pod argonem mícháno po dobu 20 hodin. Byla provedena TLC (chloroform/methanol = 30 : 1). Směs byla dále pod argonu zahřívána při 55 °C pod zpětným chladičem po dobu 72 hodin. Byla provedena TLC (chloroform/methanol = 30 : 1). Po ochlazení na laboratorní teplotu byla reakční směs rozpuštěna ve 2 násobku množství vody a přefiltrována přes filtrační papír. Nezreagovaný 5-hydroxyindol byl extrahován do vody. Extrakce produktu 13 do dichlormethanu. Po odpaření rozpouštědla byla provedena TLC (chloroform/methanol = 30 : 1). Získáno bylo 30 mg (51,7 %) surového produktu 13 jako nahnědlý prášek. Pomocí sloupcové chromatografie na

silikagelu 60 (mobilní fáze: petroleter/ethylacetát = 3 : 1) byl izolován čistý produkt **13** 19 mg (32,8 %) jako bílý prášek.

***tert*-Butyl ester (6-(bis-(3-hydroxy-propyl)-amino)-hexyl) karbamové kyseliny (14)**

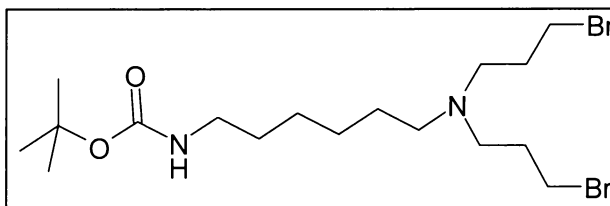
V 250 ml baňce opatřené mechanickým míchadlem, byla v 50 ml suchého THF při 0 °C (lázeň voda/led) rozpuštěna látka **2** (500 mg; 1,287 mmol).



LiAlH₄ (480 mg; 12,87 mmol) byl opatrně po malém množství přidáván k reakční směsi. Po 16 hodinách míchání byla provedena TLC (chloroform/methanol = 9 : 1). Reakční směs byla ochlazena na teplotu 0 °C a následně bylo přikapáno 5 ml ethylacetátu. Směs byla míchána po dobu 1 hodiny. K reakční směsi bylo přidáno malé množství vody až došlo ke změně barvy směsi z tmavě šedé na světle šedou. Na závěr byly přidány dvě malé lžičky celitu (545) k odstranění koloidních nečistot. Al(OH)₃ byl odfiltrován přes filtrační papír. Po odpaření rozpouštědla byla provedena semipreparativní TLC (isopropanol/amoniak/voda = 7 : 1 : 2, detekce: UV lampa (254 nm), jód) a získáno 420 mg (98,1 %) produktu **14** jako nažloutlé látky.

***tert*-Butyl ester (6-(bis-(3-brom-propyl)-amino)-hexyl) karbamové kyseliny (15)**

Do 10 ml baňky opatřené mechanickým míchadlem bylo předloženo 324 mg (1,237 mmol) trifenyl fosfinu a 410 mg (1,237 mmol)

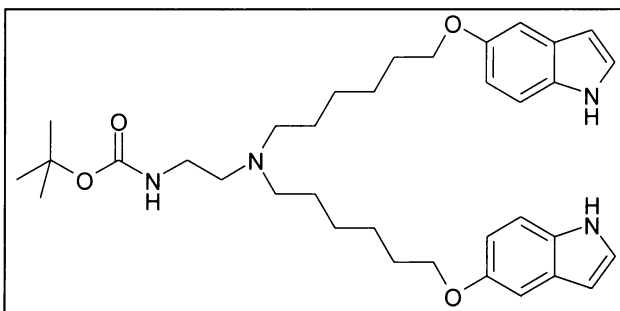


tetrabrom metylu. Směs byla rozpuštěna v 1 ml suchého pyridinu a zahřívána pod zpětným chladičem na teplotu 70 °C. Po 20 minutách byla přidána látka **14** (103 mg, 0,310 mmol). Směs byla dále zahřívána při 50 °C po dobu 48 hodin. Byla provedena TLC (chloroform/methanol = 30 : 1). Po ochlazení na laboratorní teplotu bylo k reakční směsi přidáno 200 µl MeOH a mícháno po dobu 1 hodiny. Poté byla reakční směs extrahována dichlormethanem (4 x 10 ml) a 2 x 10 ml vody. Spojené organické vrstvy byly sušeny stáním nad síranem sodným. Po odfiltrování sušidla a odpaření rozpouštědla byla

provedena TLC (chloroform/methanol = 30 : 1, a isopropanol/amoniak/voda = 7 : 1 : 2, detekce: UV lampa (254 nm), jód). Výsledek reakce byl negativní, došlo ke vzniku směsi neidentifikovatelných produktů.

***tert*-Butyl ester (2-(bis-(6-(1*H*-indol-5-yloxy)-hexyl)-amino)-ethyl) karbamové kyseliny (**16**)**

Do 25 ml baňky opatřené mechanickým míchadlem, pod argonem byla předložena látka **12** (81 mg, 0,275 mmol), 47 mg vyžíhaného K₂CO₃ (0,343 mmol) a 26 mg (0,137 mmol) *tert*-butyl esteru *N*-(2-aminoeth-1-yl)

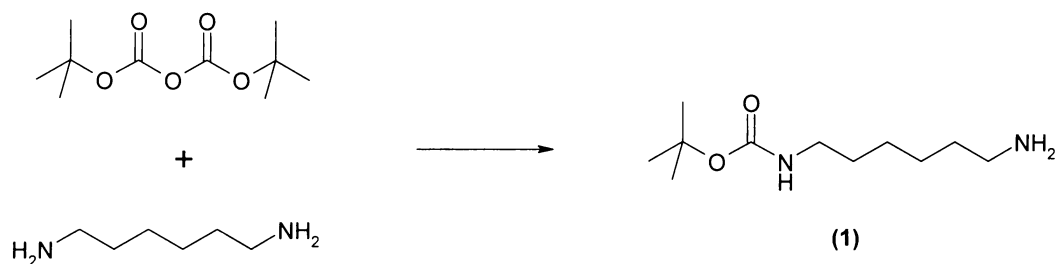


karbamové kyseliny (připravené v laboratoři) v 1 ml suchého MeOH. Reakční směs byla při laboratorní teplotě míchána po dobu 96 hodin. Byla provedena TLC (chloroform/methanol = 30 : 1). Směs byla dále pod argonu zahřívána při 60 °C pod zpětným chladičem po dobu 24 hodin. Byla provedena TLC (chloroform/methanol = 30 : 1). Po ochlazení na laboratorní teplotu byla reakční směs extrahována dichlormethanem (2 x 10 ml) a 10 ml vody. Spojené organické vrstvy byly sušeny stáním nad síranem sodným. Po odfiltrování sušidla a odpaření rozpouštědla byla provedena TLC (chloroform/methanol = 30 : 1). Získáno bylo 47 mg (57,9 %) surového produktu **16** jako nahnědlá látka. Pomocí sloupcové chromatografie na silikagelu 60 (mobilní fáze: 1) chloroform/toluen = 6 : 4, 2) chloroform/methanol = 30 : 1, 3) chloroform/methanol = 9 : 1) byl izolován čistý produkt **16** 13 mg (16 %) jako hnědý olej.

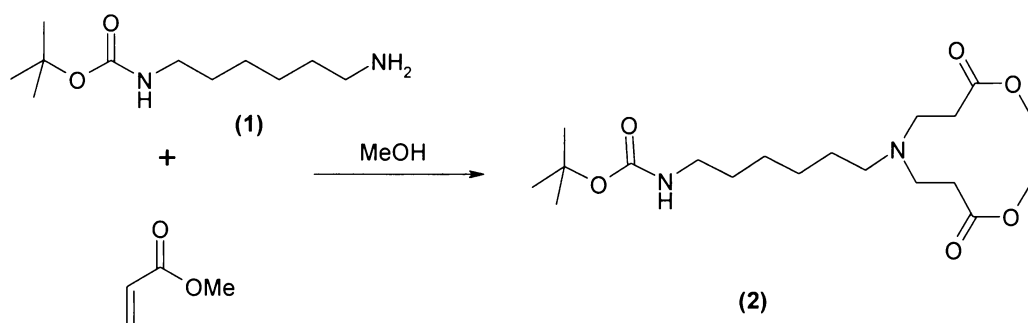
5. VÝSLEDKY A DISKUSE

5.1. Příprava dendrimerů

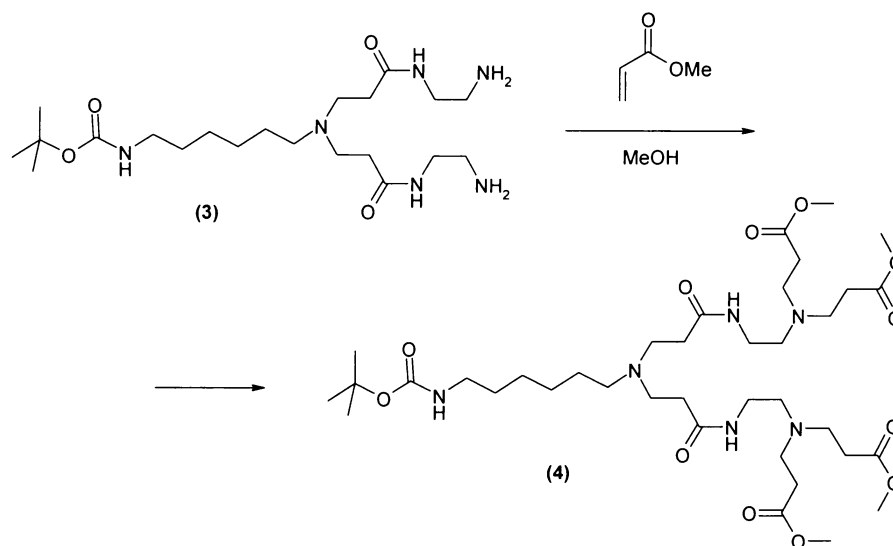
Výchozí *tert*-butyl ester *N*-(6-aminohex-1-yl) karbamové kyseliny (**1**) byl připraven⁷³ reakcí 6 ekvivalentů 1,6-hexandiaminu s di-*tert*-butyl dikarbonátem v suchém dioxanu. Nadbytek 1,6-hexandiaminu podporuje vznik produktu (**1**). Reakční podmínky při 0 °C zpomalují průběh reakce. Po vysrážení malého množství di-Boc derivátu vodou byl získán produkt ve výtěžku 60 % jako nažloutlý olej.



tert-Butyl ester *N*-(6-(*N,N*-Bis-2-(methoxykarbonyl)ethyl)aminohex-1-yl) karbamové kyseliny (**2**) a *tert*-Butyl ester *N*-(6-(*N,N*-Bis-2-((2-*N,N*-bis-2-((methoxykarbonyl)ethyl) aminoethyl)aminokarbonyl)ethyl))aminohex-1-yl)karbamové kyseliny (**4**) byly připraveny Michaelovou adicí⁶⁸. Reakce probíhala v bezvodém prostředí, aby se předešlo hydrolyze Boc skupiny. Pro zamezení degradace amino- skupin a methyl akrylátu byla reakční směs pod argonem a v temnu. Reakcí 5 ekvivalentů methyl akrylátu s látkou (**1**) byl získán produkt (**2**) ve výtěžku 85 % jako žlutooranžový sirup.

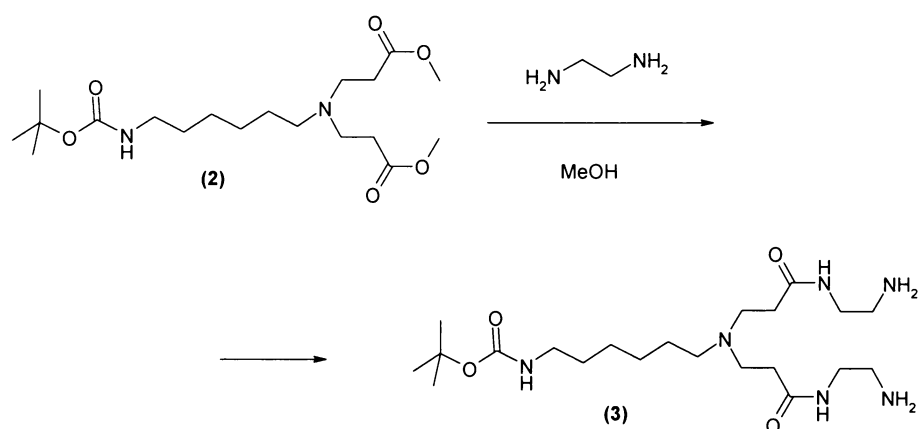


Reakcí 10 ekvivalentů methyl akrylátu s látkou (**3**) byl získán produkt (**4**) ve výtěžku 53 % jako nažloutlý sirup.

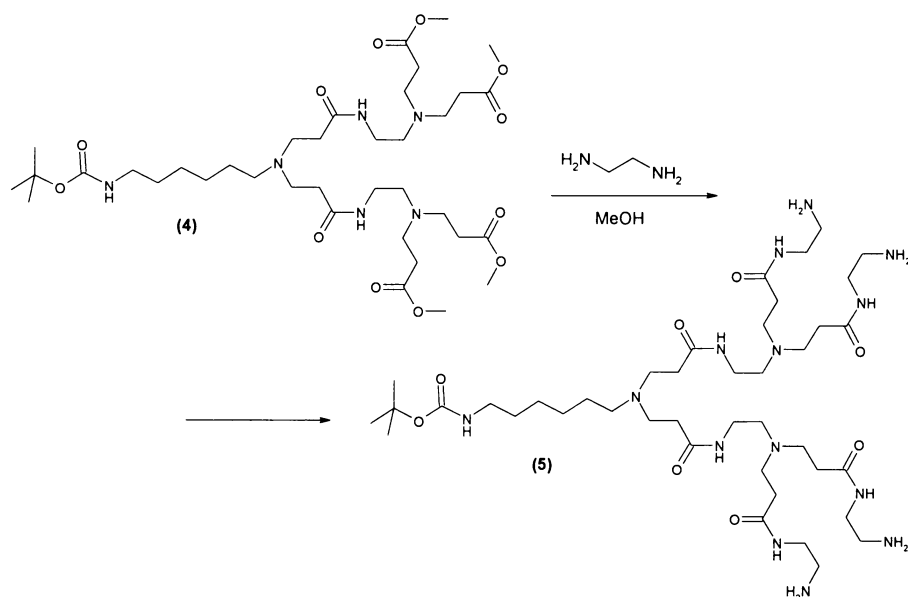


tert-Butyl ester *N*-(6-(*N,N*-Bis-2-((2-aminoethyl)aminokarbonyl)ethyl) aminohex-1-yl) karbamové kyseliny (3) a *tert*-butyl ester *N*-(6-(*N,N*-Bis-2((2-*N,N*-bis-2-((2-aminoethyl)amino-karbonyl)ethyl)aminokarbonyl)ethyl) amonohex-1-yl) karbamové kyseliny (5) byly připraveny acylací aminů estery karboxylových kyselin⁶⁹ (Obrázek 20, str. 31). Reakce probíhala při podobných podmínkách jako předcházející reakce. Bylo zjištěno, že reakce nemusí probíhat za snížené teploty (0 °C) jak je uváděno v literatuře, reakce při nižších teplotách probíhala s menším výtěžkem (Tabulka 2, str. 43). Koevaporace se směsí methanol/toluen je nezbytná k odstranění nezreagovaného ethylendiaminu, který by v následující reakci reagoval s methyl akrylátem.

Reakcí 10 ekvivalentů ethylendiaminu s látkou (2) byl získán produkt (3) ve výtěžku 37 % jako nažloutlý sirup.



Reakcí 20 ekvivalentů ethylendiaminu s látkou (4) byl získán produkt (5) ve výtěžku 57,4 % jako nažloutlý produkt. Detekce byla prováděna roztokem ninhydrinu.



Takto připravené látky byly charakterizovány pomocí NMR (Tabulka 7 a Tabulka 8).

Tabulka 7 - ^1H NMR (CDCl_3 , $30\text{ }^\circ\text{C}$)

	1		2		3		4		5	
$(\text{CH}_3)_3\text{C}$	1,447	s	1,453	s	1,450	s	1,450	s	1,452	s
H-1	3,050	t	3,048	t	3,042	t	3,043	t	3,043	t
H-2	1,54 ^(a,b)	m	1,48 ^(b)	m	1,49 ^(b)	m	1,49 ^(b)	m	1,49 ^(b)	m
H-3	1,50 ^(a,b)	m	1,272	m	1,290	m	1,289	m	1,293	m
H-4	1,287	m	1,389	m	1,400	m	1,404	m	1,401	m
H-5	1,423 ^(a)	m	1,47 ^(b)	m	1,51 ^(b)	m	1,51 ^(b)	m	1,50 ^(b)	m
H-6	2,718	t	2,440	t	2,505	t	2,504	m	2,483	t
H-1'	-	-	2,773	t	2,807	t	2,808	t	2,781	m
H-2'	-	-	2,471	t	2,436	t	2,400	t	2,512	m
O-CH ₃	-	-	3,678	s	-	-	-	-	-	-
H-1''	-	-	-	-	3,405	t	3,275	t	3,280	t
H-2''	-	-	-	-	2,957	t	2,579	t	2,601	t
H-1'''	-	-	-	-	-	-	2,795	t	2,815	t
H-2'''	-	-	-	-	-	-	2,483	t	2,390	t
O-CH ₃	-	-	-	-	-	-	3,690	s	-	-
H-1''''	-	-	-	-	-	-	-	-	3,289	t
H-2''''	-	-	-	-	-	-	-	-	2,774	t

(a) Možnost výměny za protony z rozpouštědla. (b) HMQC odečet.

Tabulka 8 - ^{13}C NMR (CDCl_3 , $30\text{ }^\circ\text{C}$)

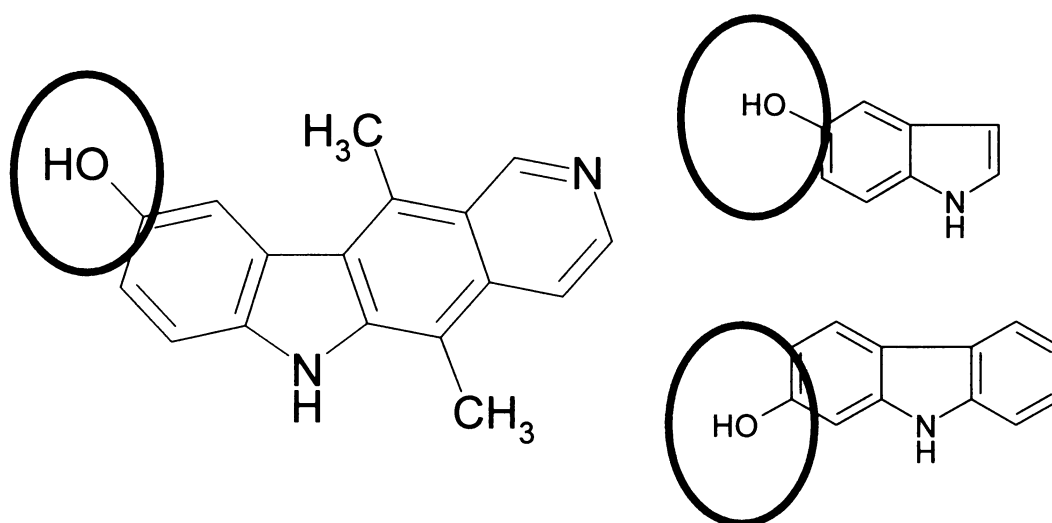
	1		2		3		4		5	
$(\text{CH}_3)_3\text{C}$	29,16	q	29,13	q	29,12	q	29,12	q	29,13	q
$(\text{CH}_3)_3\text{C}$	79,87	s	79,97	s	80,07	s	80,04	s	80,07	s
OCNH	158,43	s	158,69	s	158,81	s	158,74	s	158,80	s
C-1	41,38	t	41,59	t	41,71	t	41,63	t	41,69	t
C-2	27,59 ^(a)	t	31,24	t	31,25	t	31,28	t	31,33	t
C-3	27,65 ^(a)	t	28,34 ^(a)	t	28,04 ^(a)	t	28,10 ^(a)	t	28,16 ^(a)	t
C-4	30,97 ^(a)	t	28,01 ^(a)	t	28,51 ^(a)	t	28,59 ^(a)	t	28,26 ^(a)	t
C-5	32,57 ^(a)	t	28,34 ^(a)	t	27,90	t	28,23	t	28,63 ^(a)	t
C-6	42,14	t	55,03	t	54,81	t	54,78	t	54,78	t
C-1'	-	-	50,66	t	51,07	t	51,16	t	51,20	t
C-2'	-	-	33,50	t	34,58	t	34,69	t	34,77	t
COO	-	-	174,93	s	-	-	-	-	-	-
O-CH ₃	-	-	52,32	q	-	-	-	-	-	-
CONH	-	-	-	-	176,03	s	175,02	s	175,22	s
C-1''	-	-	-	-	40,52	t	38,77	t	38,96	t
C-2''	-	-	-	-	40,71	t	54,11	t	53,87	t
C-1'''	-	-	-	-	-	-	50,82	t	51,52	t
C-2'''	-	-	-	-	-	-	33,91	t	35,15	t
COO	-	-	-	-	-	-	175,02	s	-	-
O-CH ₃	-	-	-	-	-	-	52,43	q	-	-
CONH	-	-	-	-	-	-	-	-	175,57	s
C-1''''	-	-	-	-	-	-	-	-	43,01	t
C-2''''	-	-	-	-	-	-	-	-	42,29	t

(a) Možnost výměny za protony z rozpouštědla.

5.2. Navázání biologicky aktivní látky - protinádorové léčivo 9-hydroxyellipticin.

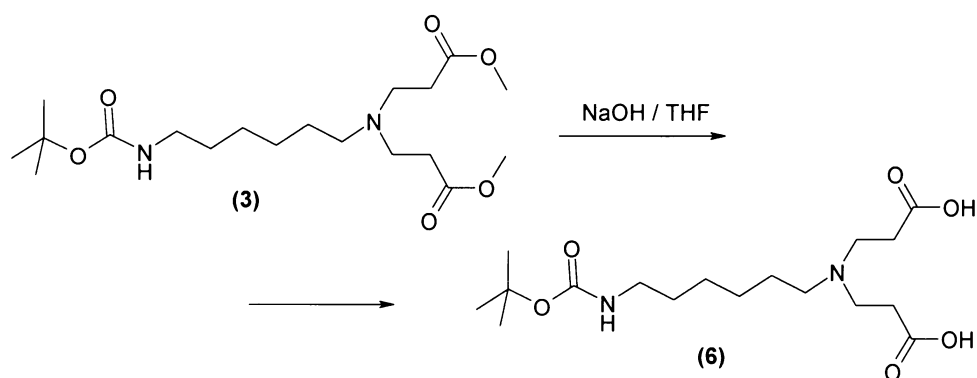
Vzhledem k poměrně vysoké spotřebě 9-hydroxyellipticinu pro celý výzkum a s ohledem na současné velmi vysoké ceny tohoto preparátu (100 mg – 10 000 Kč) je třeba vyvinout jednoduchou metodu pro jeho navázání v preparativním měřítku. K připojení 9-hydroxyellipticinu na PAMAM byla využita jeho OH skupina. Pro optimalizaci syntetických procedur byla použita tato strukturní analoga – 5-hydroxyindol a 2-hydroxykarbazol (Obrázek 23).

Esterifikace pomocí DCC a CDI (Obrázek 21 a 22, str. 32 a 33).



Obrázek 23: Struktury 9-hydroxyellipticinu a jeho strukturních analog 5-hydroxyindolu a 2-hydroxykarbazolu. Zvýrazněná OH skupina je využita ke konjugaci na dendrimerní nosič.

tert-Butyl ester *N*-(6-(*N,N*-Bis-2-(hydroxykarbonyl)ethyl)aminohex-1-yl) karbamové kyseliny (6) byl připraven hydrolýzou látky (2) třemi ekvivalenty NaOH v THF. Po titraci směsí 0,25 M HCl byl získán produkt (6) ve výtěžku 99 %. Produkt reakce je velmi dobře rozpustný v MeOH.



Byla vyzkoušena celá řada reakcí (**Tabulka 3, str. 45**). V prvním kroku vznikala Na⁺ sůl kyseliny. Reaktivní v dalším kroku byla pouze kyselina, ne její sůl.

V kyselém prostředí však docházelo k uvolnění Boc skupiny. Při použití DOWEXU HW 50 H⁺ a Amberlitu IR-120 H⁺ docházelo k výraznému snížení výtěžku. Při titraci 0,25 M HCl na pH=7 nedošlo k uvolnění Boc skupiny a bylo dosaženo velmi vysokého výtěžku.

Látka **(6)** byla charakterizována pomocí NMR:

Provedené experimenty: H, gCOSY, HMQC, HMBC

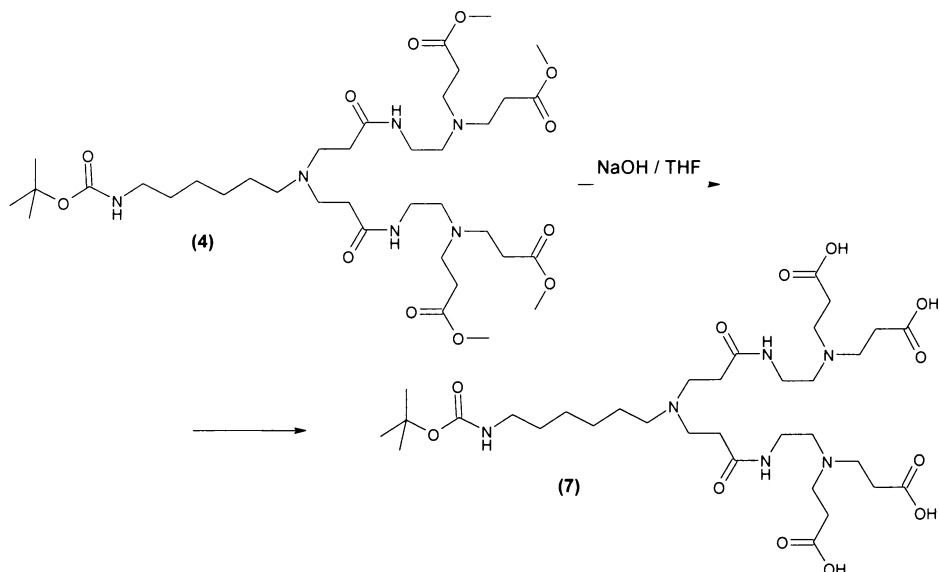
¹H NMR (399.87 MHz, DMSO, 30°C):

1.235 (4H, m, H-3, H-4), 1.337 (2H, m, H-2), 1.366 (9H, s, CH₃^{BOC}), 1.405 (2H, m, H-5), 2.239 (4H, m, H-2'), 2.531 (2H, m, H-6), 2.763 (4H, m, H-1'), 2.886 (2H, dd, *J*=13.0, 6.6 Hz, H-1), 6.746 (1H, m, NH)

¹³C NMR (odečty z HMQC a HMBC):

25.4 (C-5), 26.2 (C-3, C-4), 28.3 (CH₃^{BOC}, C-2), 32.1 (C-2'), 39.9 (C-1), 49.3 (C-1'), 51.8 (C-6), 77.3 (C^{BOC}), 174.0 (CO')

tert-Butyl ester *N*-(6-(*N,N*-Bis-2-((2-*N,N*-bis-2-((hydroxykarbonyl)ethyl)aminoethyl)aminokarbonyl)ethyl))aminohex-1-yl) karbamové kyseliny (7) byl připraven při identických reakčních podmínkách jako látka (6). Produkt byl získán ve 99 % výtěžku.



Látka (7) byla charakterizována pomocí NMR:

Provedené experimenty: H, C, gCOSY, gHSQC, gHMQC

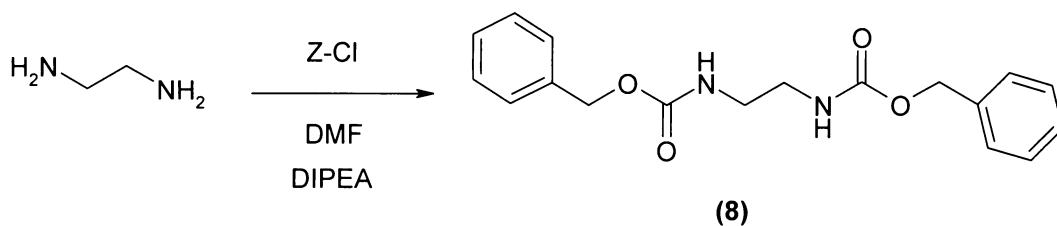
^1H NMR (399.87 MHz, CD_3OD , 30 °C):

1.406 (4H, m, H-3, H-4), 1.449 (9H, s, CH_3^{BOC}), 1.501 (2H, m, H-2), 1.798 (2H, m, H-5), 2.610 (8H, t, $J=6.3$ Hz, H-2'''), 2.829 (4H, t, $J=6.8$ Hz, H-2'), 3.055 (2H, t, $J=6.9$ Hz, H-1), 3.107 (2H, m, H-6), 3.365 (12H, m, H-2'', H-1'''), 3.404 (4H, t, $J=6.8$ Hz, H-1'), 3.682 (4H, t, $J=5.4$ Hz, H-1'')

^{13}C NMR (100.55 MHz, CD_3OD , 30 °C):

25.09 (C-5), 28.01 (C-3), 28.13 (C-4), 29.41 ($3\times\text{CH}_3^{\text{BOC}}$), 31.30 (C-2), 32.15 ($4\times\text{C-2}'''$), 32.34 ($2\times\text{C-2}'$), 36.12 ($2\times\text{C-1}''$), 41.79 (C-1), 50.85 ($2\times\text{C-1}'$), 52.62 ($4\times\text{C-1}'''$), 53.40 ($2\times\text{C-2}''$), 55.71 (C-6), 80.39 (C^{BOC}), 159.13 (CO^{BOC}), 174.11 ($2\times\text{CO}'$), 178.19 ($4\times\text{CO}'''$)

Z důvodů problému s uvolňováním Boc skupiny v kyselém prostředí jsem si vyzkoušela chránění aminoskupiny benzyloxykarbonylovou skupinou (Z) na ethylendiaminu.⁶⁸



Princip reakce byl vyzkoušen na ethylendiaminu s dvěma ekvivalenty Z-Cl. Produkt byl získán s výtěžkem 98 %.

Látka **(8)** byla charakterizována pomocí NMR:

Provedené experimenty: ^1H , gCOSY, HMQC, HMBC.

^1H NMR (CDCl_3 , 30 °C):

3.432 s, 5.095 br s, 5.100 s, 7.312 –7.365 m; poměr signálů 2 : 1 : 2 : 5.

^{13}C NMR (CDCl_3 , 30 °C), HMQC a HMBC odečty: 41.1, 66.7, 127.2, 127.3, 128.6, 136.5, 156.6.

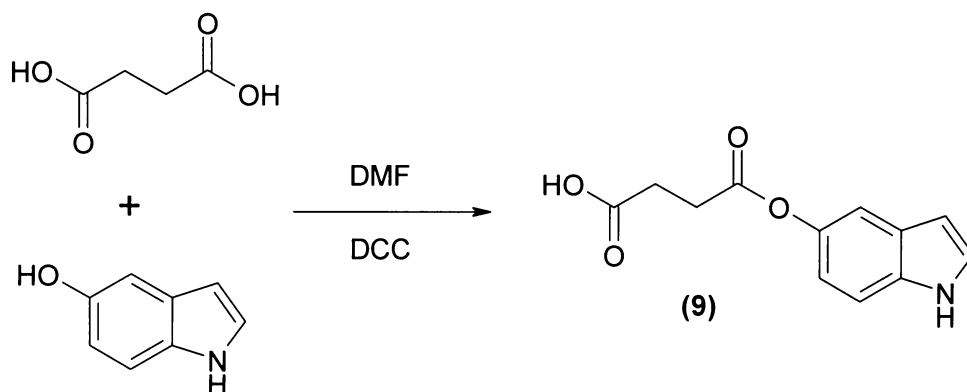
5.3. Optimalizace techniky pro navázání biologicky aktivní látky

5.3.1. 1. syntetický postup

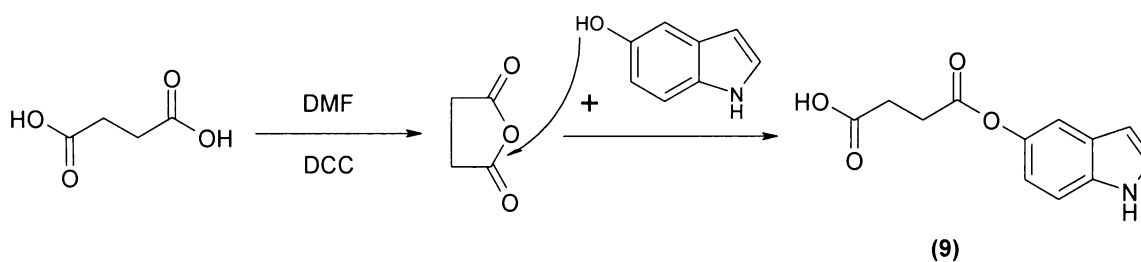
Princip esterifikace pomocí *N,N'*-dicyklohexylkarbodiimidu (DCC)⁷¹

Pro optimalizaci couplingových procedur byla použita strukturní analoga – 5-hydroxyindol, 2-hydroxykarbazol a kyselina butan-1,4-diová.

Mono-(1*H*-indol-5-yl) ester kyseliny butan-1,4-diové (**9**) byl připraven esterifikací kyseliny jantarové s 2,1 ekvivalenty 5-hydroxyindolu, pomocí 2,2 ekvivalenty couplingového činidla DCC. Byl získán produkt (**9**) ve výtěžku 60 % jako bílá látka.



Touto reakcí se podařilo připravit mono ester kyseliny jantarové, ale požadovaný di ester nevznikl. Reakce byla provedena při různé teplotě od 0-100 °C a různé reakční době (Tabulka 4, str. 47). Tento jev by se dal vysvětlit reakcí jantarové kyseliny s DCC za vzniku cyklického anhydridu kyseliny jantarové. Tento anhydrid po reakci s fenolátem poskytuje mono ester.



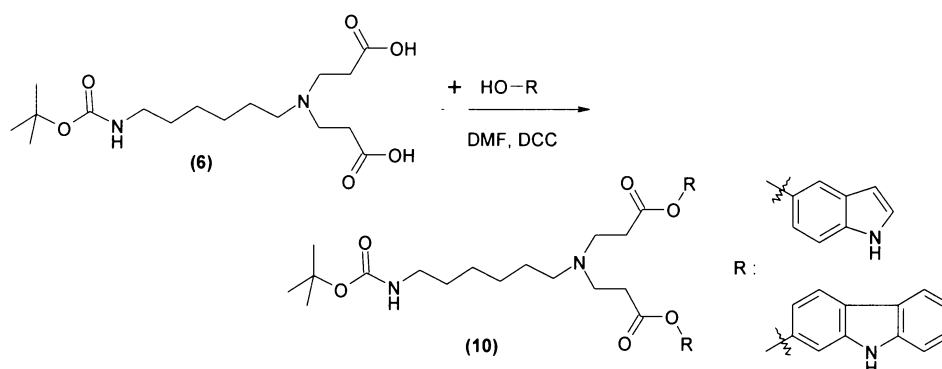
Látka (9) byla charakterizována pomocí NMR:

Provedené experimenty: H, J-resolved, gCOSY

^1H NMR (CDCl_3 , 30°C):

0.79 – 0.80 (m), 1.15 – 1.28 (m), 1.352 (m), 1.605 (m), 1.697 (m), 1.80 (m), 1.937 (m), 2.796 a 3.014 (AA'BB'), 3.490 (m), 3.686 (m), 4.02 – 4.10 (m), 6.530 (ddd, $J=3.2, 2.1, 1.0$ Hz), 6.904 (dd, $J=8.7, 2.3$ Hz), 6.94 (br s), 7.241 (dd, $\Sigma J=5.7$ Hz), 7.326 (d, $J=2.3$ Hz), 7.357 (dm, $J=8.7$ Hz), 8.350 (br s)

Esterifikace pomocí DCC byla provedena za stejných reakčních podmínek u látky (6). Výsledek byl však negativní. Byla provedena optimalizace teploty i reakční doby (Tabulka 5, str. 48). Opět nedocházelo ke vzniku mono- ani di-esteru. Pro navázání byl vyzkoušen 2-hydroxykarbazol, reakce neproběhla dle očekávání.



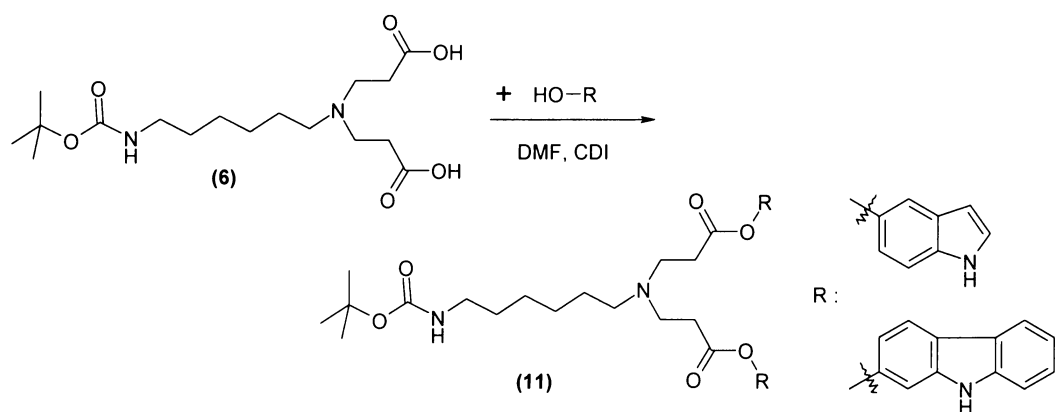
Jedním z problémů byla rozpustnost látky (6). V rozpouštědlech jako např.: DMF, DMSO, THF, CH₃CN, pyridin se produkt (6) nerozpouštěl. Toto zjištění velmi znesnadnilo esterifikaci pomocí DCC, protože DCC s MeOH reaguje za vzniku methylesteru.

Látka (6) byla nejprve rozpuštěna v methanolu, poté bylo ke směsi přidáno DMF. Tyto rozpouštědla se svým bodem varu velmi liší, proto mohl být methanol odpařen na vakuové odparce a látka (6) zůstala rozpuštěna v DMF.

Z důvodu neúspěchu s DCC bylo použito pro esterifikaci jiné činidlo - CDI.

Princip esterifikace pomocí 1,1'-karbonyldiimidazolu (CDI)⁷¹

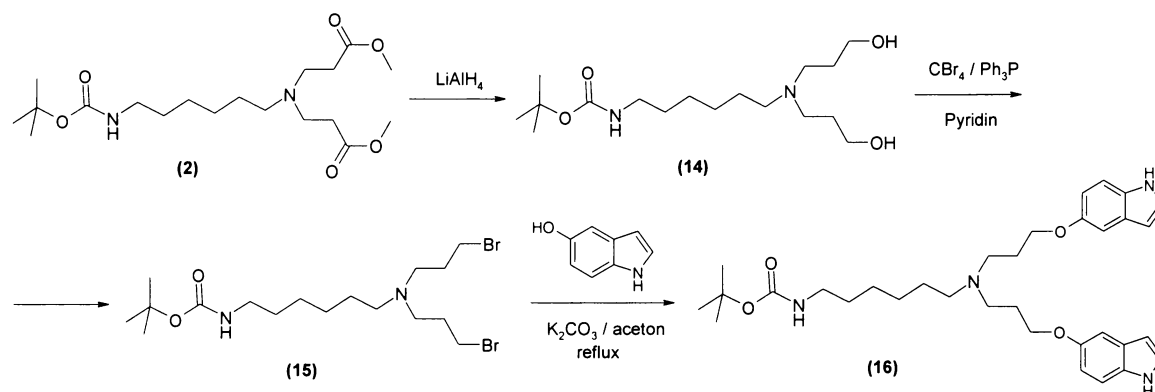
Esterifikace látky (6) s 2,1 ekvivalenty 2-hydroxykarbazolu, pomocí 2,2 ekvivalenty couplingového činidla CDI byla prováděna pod argonem. CDI se velmi snadno hydrolyzuje. Reakce neproběhla dle očekávání. Došlo ke vzniku směsi neidentifikovatelných produktů.



Reakce byla zopakována a k reakční směsi byl přidán nulový nukleofil DBU (diazabicyklo[5,4,0]undec-7-en), pro zvýšení nukleofility konjugované kyseliny. Stále nedocházelo ke vzniku produktu (11).

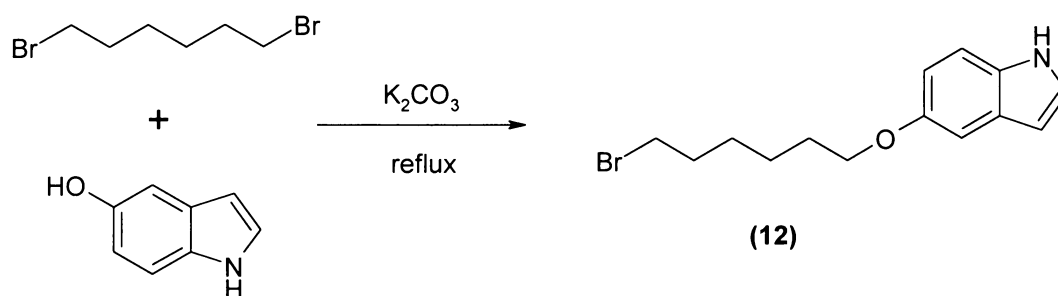
5.3.2. 2. syntetický postup

Z důvodu neúspěšné esterifikace byl navržen alternativní 2. syntetický postup.



Alkylace byla nejprve vyzkoušen na modelové látce – 1,6-dibromhexanu.

5-(6-bromo-hexyloxy)-1*H*-indol (**12**) byl připraven reakcí 5 ekvivalentů 1,6-dibromhexanu s 1 ekvivalentem 5-hydroxyindolu. K reakční směsi byly přidány 3 ekvivalenty vyžihaného K_2CO_3 jako báze.



Reakce probíhala v bezvodém prostředí, aby se předešlo hydrolýze dibromhexanu a pod argonem. Byl získán produkt (**12**) ve výtěžku 64 % jako žlutý olej.

Látka (**12**) byla charakterizována pomocí NMR:

Provedené experimenty: H, C, gCOSY, gHSQC, gHMQC.

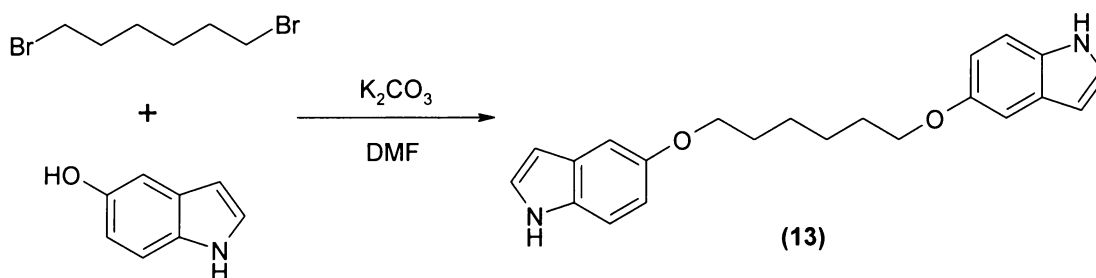
$^1\text{H NMR}$ (399.87 MHz, CDCl_3 , 30°C):

1.537 (4H, m, H-3', H-4'), 1.832 (2H, m, H-2'), 1.915 (2H, m, H-5'), 3.437 (2H, t, $J=6.8$ Hz, H-6'), 4.017 (2H, t, $J=6.4$ Hz, H-1'), 6.480 (1H, ddd, $J=3.2, 2.1, 1.0$ Hz, H-3), 6.871 (1H, dd, $J=8.8, 2.4$ Hz, H-6), 7.115 (1H, d, $J=2.4$ Hz, H-4), 7.179 (1H, dd, $\Sigma J=5.6$ Hz, H-2), 7.278 (1H, dm, $J=8.8$ Hz, H-7), 8.031 (1H, br s, NH)

$^{13}\text{C NMR}$ (100.55 MHz, CDCl_3 , 30°C):

25.39 (C-3'), 27.98 (C-4'), 29.31 (C-2'), 32.75 (C-5'), 33.77 (C-6'), 68.63 (C-1'), 102.41 (C-3), 103.66 (C-4), 111.58 (C-7), 112.95 (C-6), 124.77 (C-2), 128.36 (C-9), 131.04 (C-8), 153.62 (C-5)

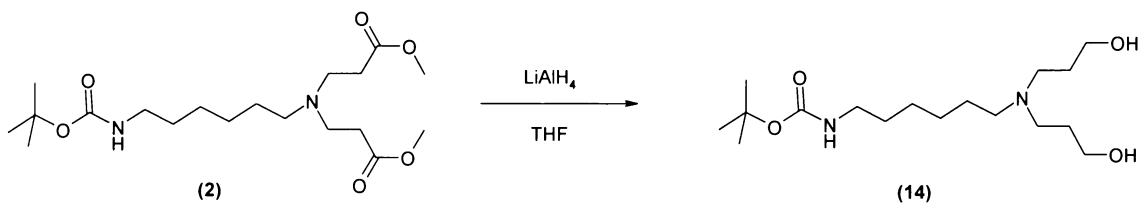
1,6-di-(1*H*-indol-5-yl-oxy)-hexan (**13**) byl připraven reakcí 1,6-dibromhexanu s 2,2 ekvivalenty 5-hydroxyindolu. Reakce opět probíhala v bezvodém prostředí a pod argonem.



Byl získán produkt (**13**) ve výtěžku 33 % jako bílý prášek. Z důvodu nestability produktu nebyla látka (**13**) charakterizována pomocí NMR.

Redukce pomocí LiAlH_4

tert-Butyl ester (6-(bis-(3-hydroxy-propyl)-amino)-hexyl) karbamové kyseliny (**14**) byl připraven reakcí látky (**2**) s 10 ekvivalenty LiAlH_4 . Byl získán produkt (**14**) ve výtěžku 98 % jako nažloutlá látka.



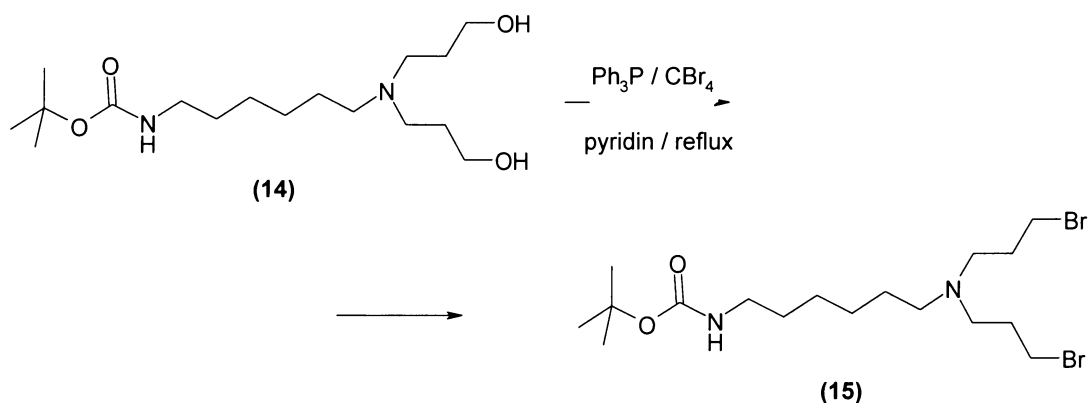
Po ukončení reakce byl k reakční směsi přidán ethylacetat, aby zreagoval zbylý LiAlH_4 .

Látka (14) byla charakterizována pomocí NMR:

Provedené experimenty: ESI-MS. (Viz. grafická příloha, Hmotnostní spektrum (ESI-MS))

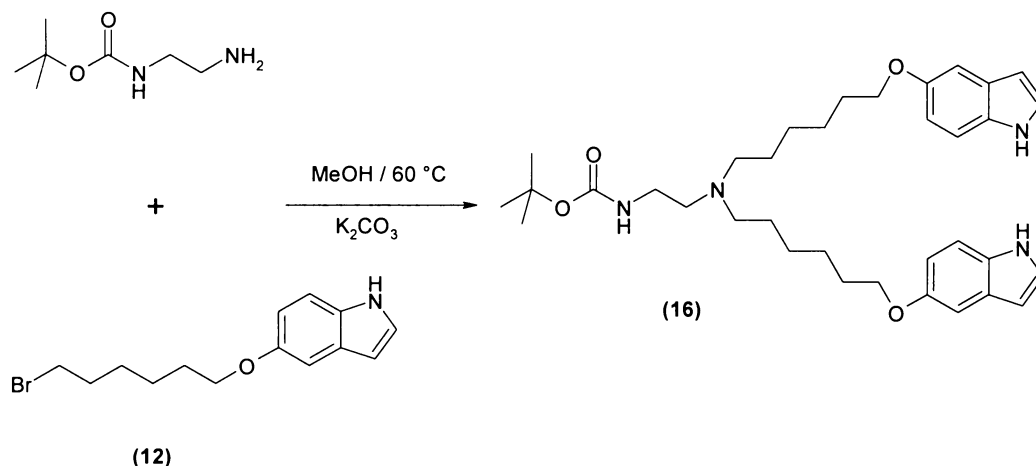
Bromace alkoholu

Bromace látky (14) byla prováděna se 4 ekvivalenty trifenyl fosfinu a se 4 ekvivalenty tetrabrom methyly. Při reakci vzniká HBr, proto byla reakce prováděna v pyridinu, aby nemohlo dojít k uvolnění Boc skupiny. Reakce neproběhla dle očekávání. Došlo ke vzniku směsi neidentifikovatelných produktů. Mohlo dojít k zacyklení.



5.3.3. 3. syntetický postup

Na závěr byl připraven *tert*-butyl ester (2-(Bis-(6-(1H-indol-5-yloxy)-hexyl)-amino)-ethyl) karbamové kyseliny (**16**) reakcí *tert*-butyl esteru *N*-(2-aminoethyl) karbamové kyseliny s 2 ekvivalenty látky (**12**). K reakční směsi byly přidány 2,5 ekvivalenty vyžíhaného K₂CO₃ jako báze.



Pro zamezení degradace amino- skupin probíhala reakce pod argonem. Byl získán produkt (**16**) ve výtěžku 16 % jako hnědý olej.

Látka (**16**) byla charakterizována pomocí NMR:

Provedené experimenty: H, C, gCOSY, gHSQC, gHMQC

¹H NMR (399.87 MHz, CDCl₃, 30°C):

1.360 (4H, m, H-3'), 1.451 (9H, s, CH₃^{BOC}), 1.463 (4H, m, H-2'), 1.500 (4H, m, H-4'), 1.807 (4H, m, H-5'), 2.423 (4H, t, *J*=7.2 Hz, H-1'), 2.511 (2H, t, *J*=5.8 Hz, H-2), 3.162 (2H, m, H-1), 3.998 (4H, t, *J*=6.5 Hz, H-6'), 5.024 (1H, br s, NH), 6.467 (2H, ddd, *J*=3.2, 2.1, 1.0 Hz, H-3''), 6.863 (2H, dd, *J*=8.8, 2.4 Hz, H-6''), 7.104 (2H, d, *J*=2.4 Hz, H-4''), 7.171 (2H, dd, Σ*J*=5.6 Hz, H-2''), 7.268 (2H, dm, *J*=8.8 Hz, H-7''), 8.047 (2H, br s, NH'')

^{13}C NMR (100.55 MHz, CDCl_3 , 30°C):

26.11 (C-4'), 26.98 (C-2'), 27.28 (C-3'), 28.47 (CH_3^{BOC}), 29.50 (C-5'), 38.31 (C-1), 53.30 (C-2), 53.99 (C-1'), 68.77 (C-6'), 79.0^a (C^{BOC}), 102.42 (C-3''), 103.67 (C-4''), 111.57 (C-7''), 113.00 (C-6''), 124.73 (C-2''), 128.37 (C-9''), 131.04 (C-8''), 153.69 (C-5''), 156.14 (CO^{BOC})

^a gHMQC odečet.

Pomocí tohoto syntetického postupu by se mohly připravit multivalentní deriváty 9-hydroxyellipticinu.

9-hydroxyellipticin hydrochlorid (CALBIOCHEM) byl charakterizován pomocí NMR:

^1H NMR (399.87 MHz, 303 K, $\text{DMSO-}d_6$):

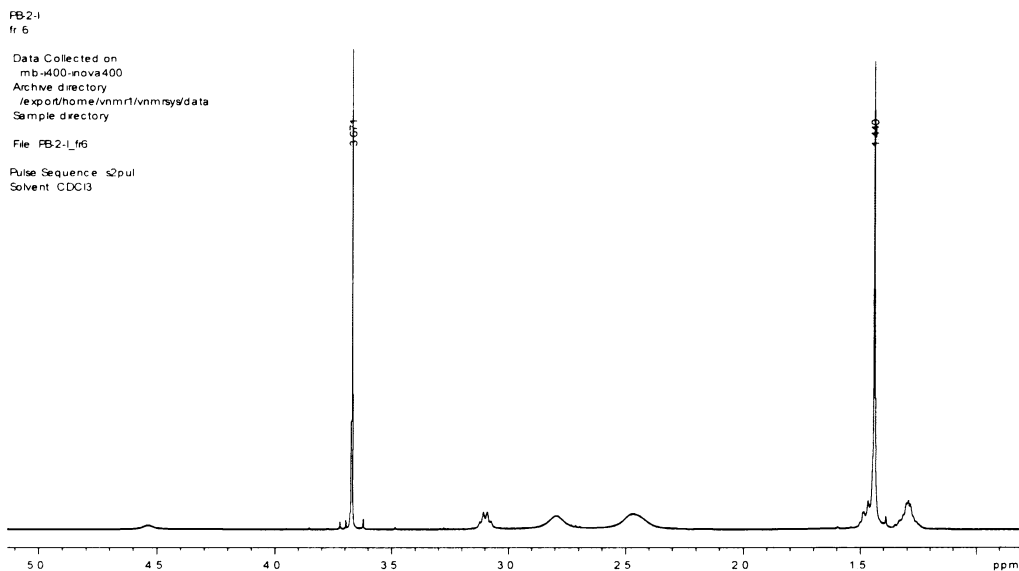
2.822 (3H, s, 5- CH_3), 3.262 (3H, s, 11- CH_3), 7.153 (1H, dd, $J = 2.3, 8.6$ Hz, H-8), 7.506 (1H, d, $J = 8.6$ Hz, H-7), 7.822 (1H, d, $J = 2.3$ Hz, H-10), 8.381 (2H, s, H-3, H-4), 9.432 (1H, br s, 9-OH), 9.888 (1H, s, H-1), 11.970 (1H, s, H-6), 15.280 (1H, br s, HCl).

^{13}C NMR (100.55 MHz, 303 K, $\text{DMSO-}d_6$):

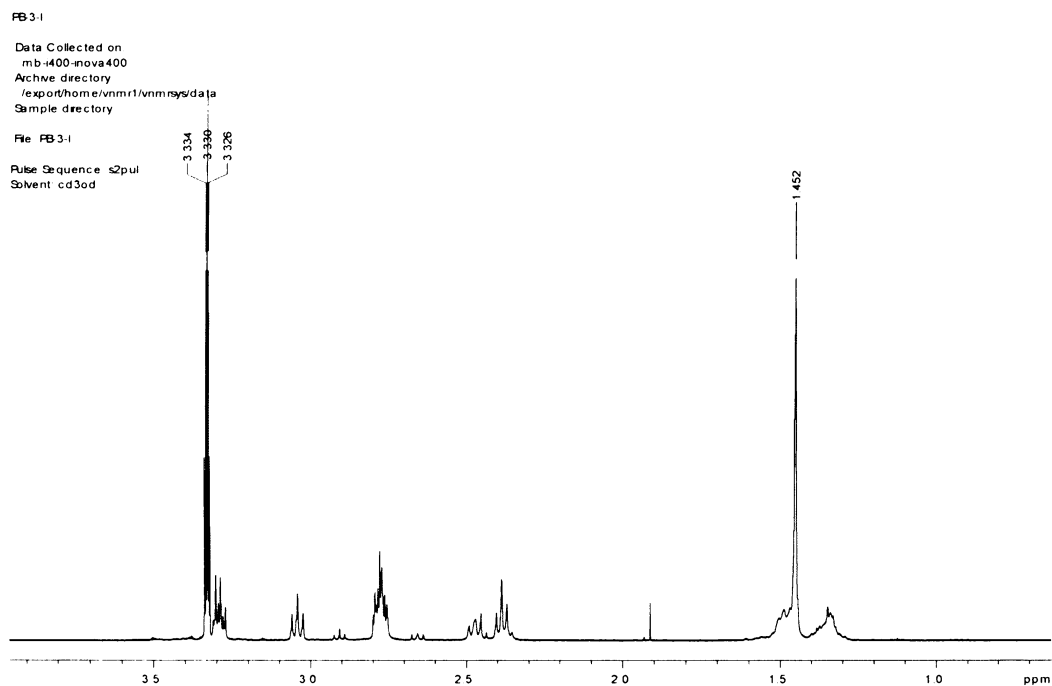
12.06 (q, 5- CH_3), 14.85 (q, 11- CH_3), 109.78 (d, C-10), 109.85 (s, C-4a), 112.13 (d, C-7), 117.46 (d, C-8), 119.37 (d, C-4), 119.49 (s, C-11a), 123.02 (s, C-10a), 125.93 (s, C-10b), 127.51 (d, C-3), 133.55 (2 \times s, C-5, C-11), 136.21 (s, C-6a), 143.79 (d, C-1), 144.87 (s, C-5a), 152.09 (s, C-9).

6. GRAFICKÁ PŘÍLOHA

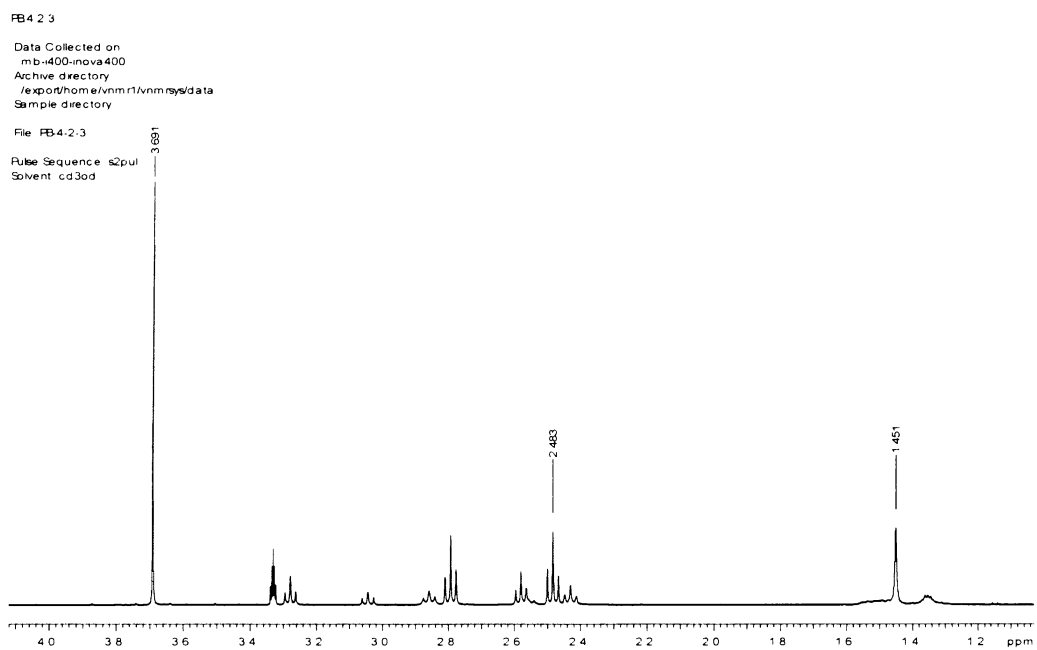
¹H NMR spektrum *tert*-Butyl esteru *N*-(6-(*N,N*-Bis-2-(methoxykarbonyl)ethyl)aminohex-1-yl) karbamové kyseliny (2)



¹H NMR spektrum *tert*-butyl esteru *N*-(6-(*N,N*-Bis-2-((2-aminoethyl)aminokarbonyl)ethyl)aminohex-1-yl) karbamové kyseliny (3)



¹H NMR spektrum terc-butyl esteru *N*-(6-(*N,N*-Bis-2-((2-*N,N*-bis-2-
((methoxykarbonyl)ethyl) aminoethyl)aminokarbonyl)ethyl))aminohex-1-yl)
karbamové kyseliny (**4**)



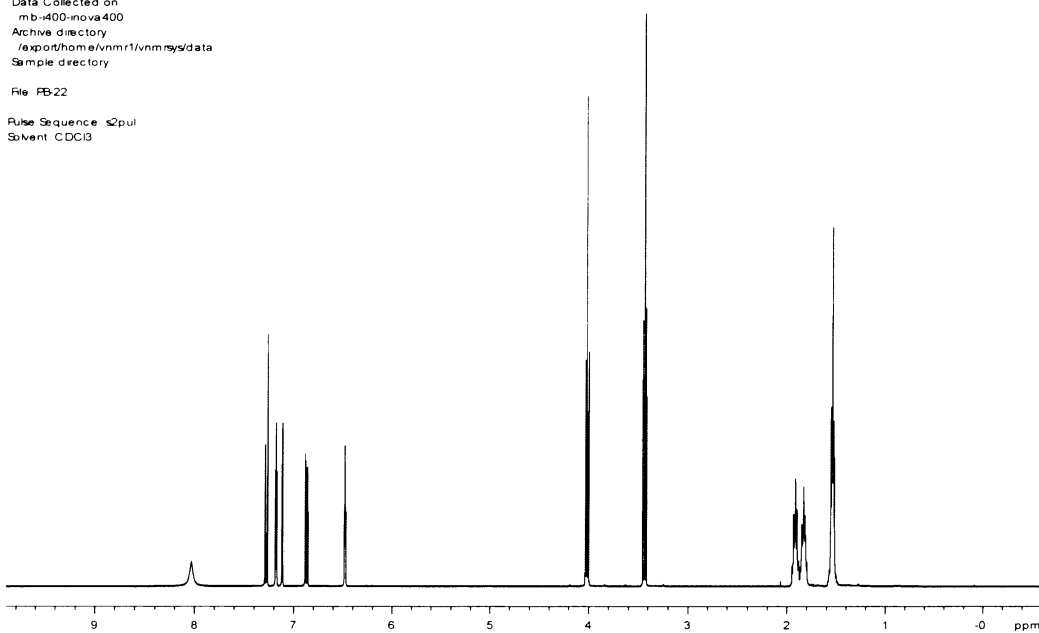
¹H NMR spektrum 5-(6-brom-hexyloxy)-1H-indolu (12)

FB22

Data Collected on
mb-400-nova400
Archive directory
/export/home/vnmr1/vnmrsys/data
Sample directory

File FB22

Pulse Sequence s2pul
Solvent CDCl3



¹H NMR spektrum

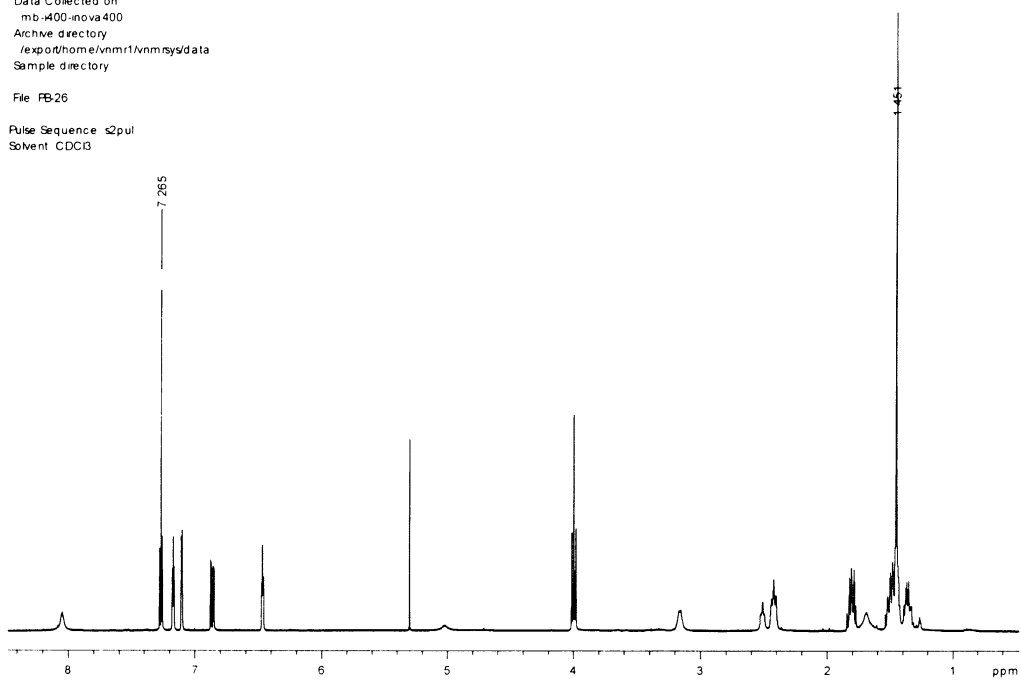
tert-butyl esteru (2-(bis-(6-(1H-indol-5-yloxy)-hexyl)-amino)-ethyl)
karbamové kyseliny (16)

FB26

Data Collected on
mb-400-nova400
Archive directory
/export/home/vnmr1/vnmrsys/data
Sample directory

File FB26

Pulse Sequence s2pul
Solvent CDCl3



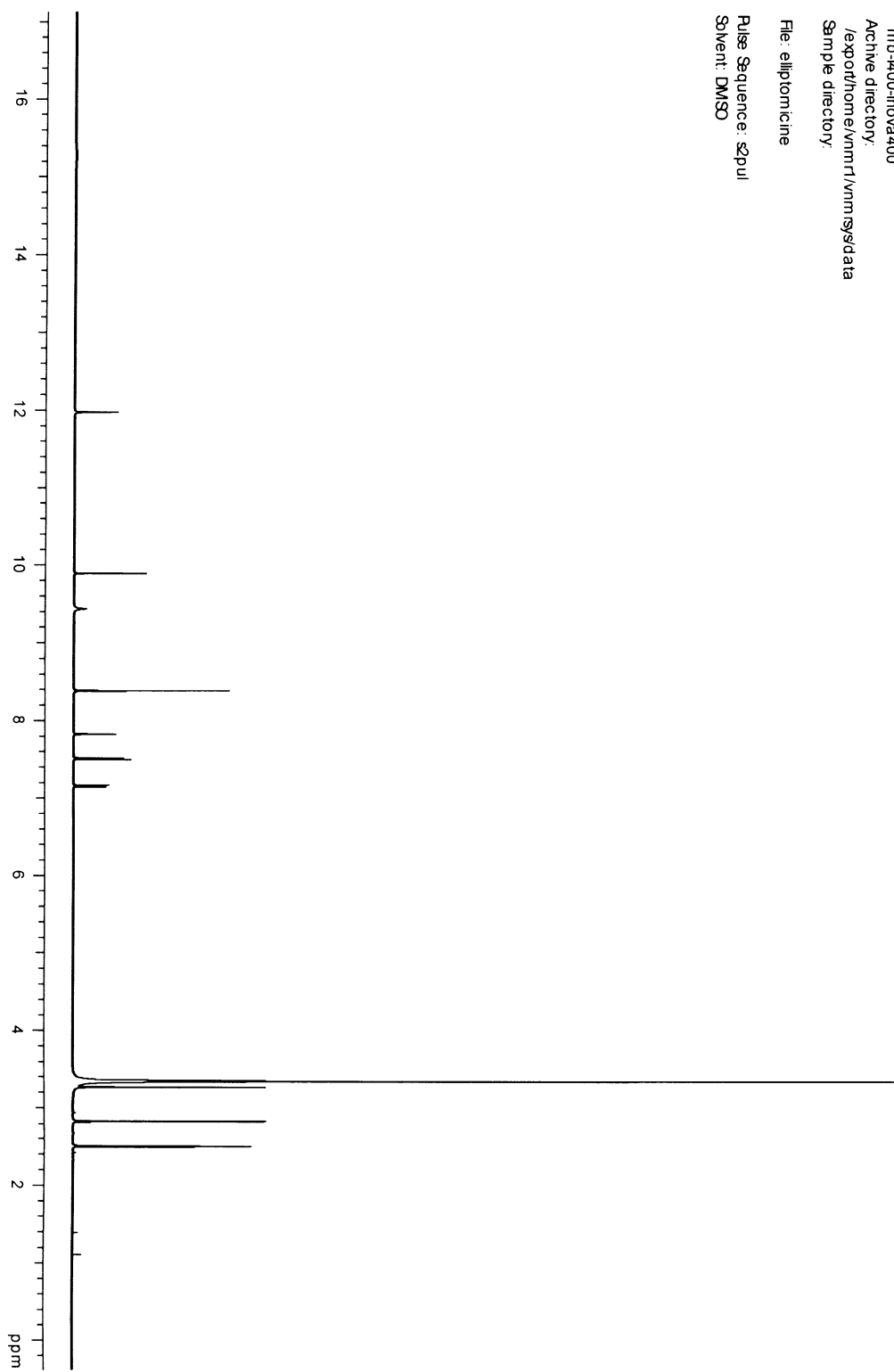
¹H NMR spektrum 9-hydroxyellipticin hydrochlorid

elliptomichine HCl

Data Collected on:
mb-i400-inova400
Archive directory:
/export/home/vnmr1/vnmrj/sd/data
Sample directory:

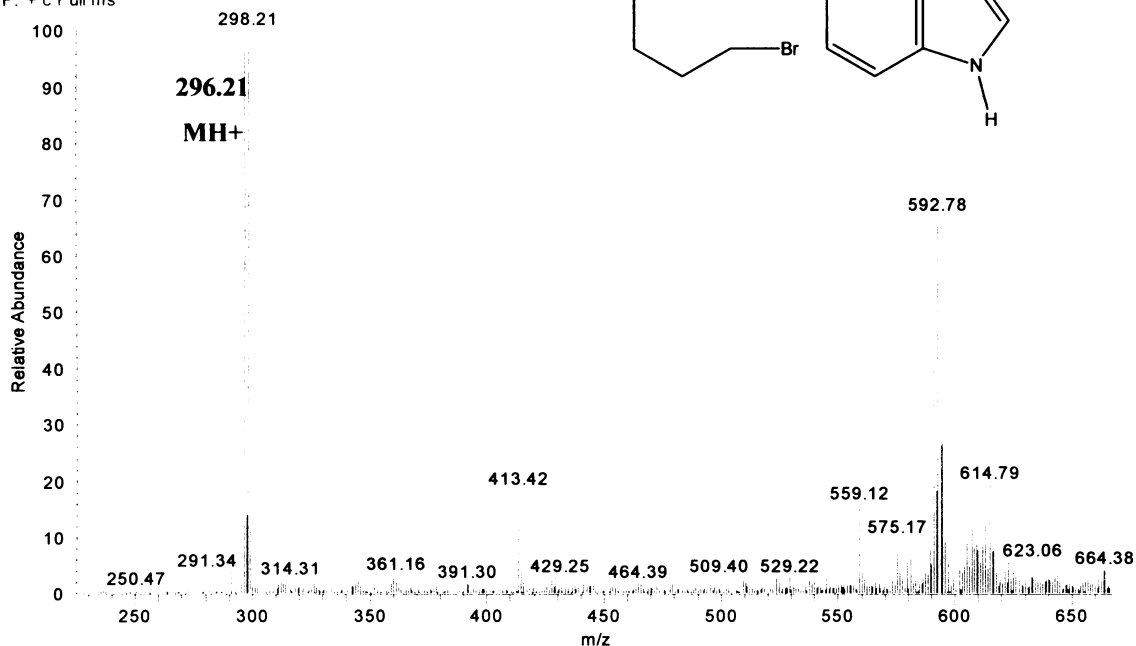
File: elliptomichine

Pulse Sequence: szpul
Solvent: DMSO



Hmotnostní spektrum (ESI-MS) 5-(6-brom-hexyloxy)-1H-indolu (12)

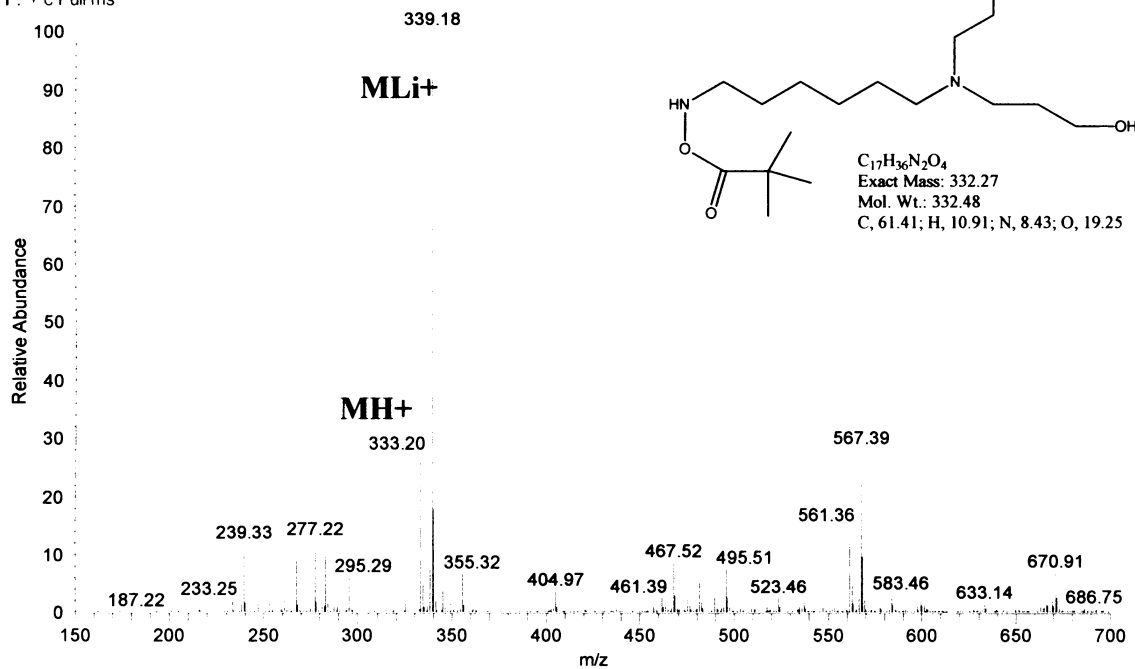
PB_22 #28-39 RT: 0.72-1.00 AV: 12 NL: 8.98E6
F: + c Full ms



Hmotnostní spektrum (ESI-MS)

tert-butyl esteru (6-(bis-(3-hydroxy-propyl)-amino)-hexyl) karbamové kyseliny (14)

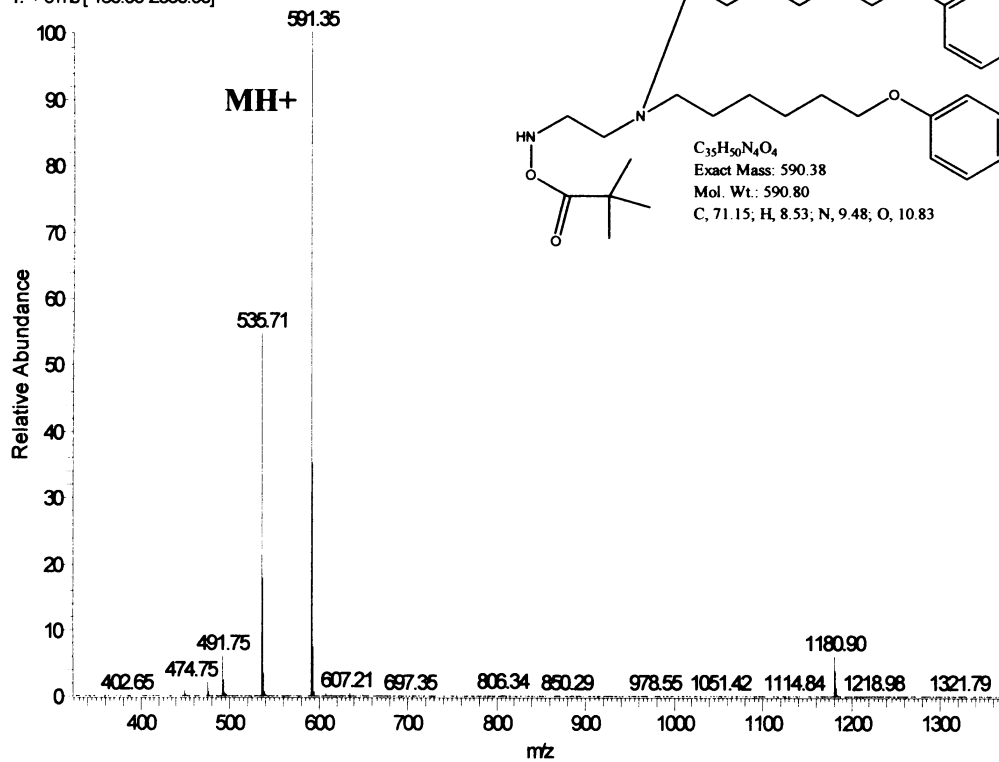
PB_23 #1-83 RT: 0.00-0.86 AV: 83 NL: 4.40E8
F: + c Full ms



Hmotnostní spektrum (ESI-MS)

tert-butyl esteru (2-(bis-(6-(1*H*-indol-5-yloxy)-hexyl)-amino)-ethyl) karbamové kyseliny (**16**)

PE26_2#1-15 RT: 0.02-0.35 AV: 15 NL: 2.96E9
T: +cms [150.00-2000.00]



7. ZÁVĚR

- Byly připraveny dendrimery 1. a 2. generace, po separaci na Silikagelu 60 (40-63 μm , Merck) získány v čisté formě.
- Tyto dendrimerní struktury (nosiče) byly použity ke konjugaci se strukturními analogy 9-hydroxyellipticinu – 5-hydroxyindolem a 2-hydroxykarbazolem.
- Reakcí *terc*-butyl esteru *N*-(2-aminoeth-1-yl) karbamové kyseliny s látkou (12) byl připraven multivalentní derivát 5-hydroxyindolu (16).
- Snaha o přípravu dalších multivalentních derivátů 5-hydroxyindolu a 2-hydroxykarbazolu esterifikací pomocí DCC a CDI nebyla úspěšná.

8. SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

- ¹ Stiborová, M., Mikšanová, M.: *Živa* 4, 146 (1999)
- ² Adam, Z., Vorlíček, J., Koptíková, J.: *Obecná onkologie a podpůrná léčba*, Grada, Praha (2003)
- ³ Tichý, M.: *Toxikologie pro chemiky*, Karolinum, Praha (2003)
- ⁴ Stiborová, M., Bieler, C.A., Wiessler, M., Frei, E.: *Biochem Pharmacol* 62, 1675-84 (2001)
- ⁵ Auclair, C.: *Arch Biochem Biophys* 259, 1-14 (1987)
- ⁶ Stiborová, M., Sejbal, J., Bořek-Dohalská, L., Aimová, D., Poljaková, J., Forsterová, K., Rupertová, M., Wiesner, J., Hudeček, J., Wiessler, M., Frei, E.: *Cancer Res.* 64, 8374-8380 (2004)
- ⁷ Bořek-Dohalská, L., Frei, E., Stiborová, M.: *Collect. Czech. Chem. Commun.* 69, 603-15 (2004)
- ⁸ Lesca, P., Beaune, P., Minsarrat, B.: *Chem-Biol Interact* 36, 299-309 (1981)
- ⁹ Patterson, L.H., Mckeown, S.R., Robson, T., Gallagher, R., Raleigh, S.M., Orr, S.: *Anti-Cancer Drug Design* 14, 473-86 (1999)
- ¹⁰ Chu, Y., Hsu, M.T.: *Nucleic Acid Res.* 20, 4033-8 (1992)
- ¹¹ Singh, M.P., Hill, G.C., Peoch, D., Rayner, B., Imbach, J.L., Lown, J.W.: *Biochemistry* 33, 10271-85 (1994)
- ¹² Monnot, M., Mauffret, O., Simon, V., Lescot, E., Psaume, B., Saucier, J.M., Charra, M., Bělehrádek, J.Jr., Fermadjian, S.: *J. Biol. Chem.* 25, 1820-9 (1991)
- ¹³ Fossé, P., René, B., Charra, M., Paoletti, C., Saucier, J.M.: *Mol Pharmacol* 42, 590-5 (1992)
- ¹⁴ Ohashi, M., Sugikawa, E., Nakanishi, N.: *Jpn. J. Cancer Res.* 86, 819-29 (1995)
- ¹⁵ Stiborová, M.: *Mechanismus chemické kancerogeneze. Přednáška na PFF UK, Praha, katedra biochemie* (2004)
- ¹⁶ Sugikawa, E., Hosoi, T., Yazaki, N., Gamanuma, M., Nakanishi, N., Ohashi, M.: *Anticancer Res.* 19, 3099-108 (1999)
- ¹⁷ Peng, Y., Li, C., Chen, L., Sebt, S., Chen, J.: *Oncogene* 22, 4478-87 (2003)
- ¹⁸ Schwaller, M.A., Allard, B., Lescot, E., Moreau, F.: *J. Biol. Chem.* 270, 22709-13 (1995)
- ¹⁹ Sureau, F., Moreau, F., Millot, J.M., Manfait, M., Allard, B., Aubard, J., Schwaller, M.A.: *Biophys. J.* 65, 1767-1774 (1993)
- ²⁰ Manhartová, Z.: *Diplomová práce PFF UK* (2005)
- ²¹ Stiborová, M., Frei, E.: *Chem. Listy* 95, 549-555 (2001)
- ²² Stiborová, M., Bieler, C.A., Wiessler, M., Frei, E.: *Biochem. Pharmacol.* 62, 1675-1684 (2001)
- ²³ Frei, E., Bieler, C.A., Arlt, V., Wiessler, M., Stiborová, M.: *Biochem. Pharmacol.* 64, 289-295 (2002)
- ²⁴ Stiborová, M., Stiborová-Rupertová, M., Bořek-Dohalská, L., Wiessler, M., Frei, E.: *Chem. Res. Toxicol.* 16, 38-47 (2003)
- ²⁵ Stiborová, M., Breuer, A., Aimová, D., Stiborová-Rupertová, M., Wiessler, M., Frei, E.: *Int. J. Cancer* 107, 885-890 (2003)
- ²⁶ Chalabala, M., Rabišková, M.: *Scripta Medica* 70, 16-18 (1996)

27 Hrubý, M., Koňák, Č., Ulbrich, K.: *J. Appl. Polymer Sci.* 95, 201-211 (2005)
28 Buhleier, E., Wehner, W., Vögtle, F.: *Synthesis* 155-158 (1978)
29 Newkome, G.R., Yao, Z., Baker, G.R., Gupta, V.K.: *J. Org. Chem.* 50, 2003-2004 (1985)
30 Tomalia, D.A., Baker, H., Dewald, J.R., Hall, M., Kallos, G., Martin, S., Roeck, J., Ryder, J., Smith,
P.: *Polym. J.* 17, 117-132 (1985)
31 Dykes, G.M.: *J. Chem. Biotechnol.* 76, 903-918 (2001)
32 Boas, U., Heegaard, P.H.M.: *Chem. Soc. Rev.* 33, 43-63 (2004)
33 Liu, M.J., Fréchet, J.M.J.: *Pharm. Sci. Technol. Today* 2, 393-401 (1999)
34 Ulbrich, K., Šubr, V.: *Adv. Drug Deliv. Rev.* 56, 1023-1050 (2004)
35 Patri, A.K., Majoros, I.J., Baker Jr, J.R.: *Chem. Biology* 6, 466-471 (2002)
36 Sadler, K., Tam, J.P.: *Rev. Mol. Biotechnol.* 90, 195-229 (2002)
37 Supattapone, S., Nguyen, H.O.B., Cohen, F.E., Prusiner, S.B., Scott, M.: *Proc. Natl. Acad. Sci.*
U.S.A. 96, 14529-14534 (1999)
38 Dykes, G.M., Smith, D.K.: *Tetrahedron* 59, 3999-4009 (2003)
39 Feuerbacher, N., Vögtle, F.: *top Curr. Chem.* 197:1
40 Hawker, C.J., Fréchet, J.M.J.: *J. Chem. Soc. Chem. Commun.* 1010-1013 (1990)
41 Flory, P.J.: *J. Am. Chem. Soc.* 74, 2718 (1952)
42 Hummelen, J.C., van Dongen, J.L.J., Meijer, E.W.: *Chem. Eur. J.* 3, 1489-1493 (1997)
43 Wooley, K.L., Hawker, C.J., Fréchet, J.M.J.: *J. Am. Chem. Soc.* 113, 4252 (1991)
44 Caminade, A.M., Maraval, V., Laurent, R., Turrin, C.O.: *C.R.Chimie* 6, 791-801 (2003)
45 Chung, Y.M., Rhee, H.K.: *Korean J. Chem. Eng.* 21, 81-97 (2004)
46 Twyman, L.J., King, A.S.H., Martin I.K.: *Chem. Soc. Rev.* 31, 69-82 (2002)
47 Reek, J.N.H., de Groot, D., Oosterom, G.E., Kamer, P.C.J., van Leeuwen, P.W.N.M.: *Comt. Rend.*
Chim. 6, 1061-1077 (2003)
48 Caminade, A.M., Maraval, V., Laurent, R., Majoral, J.P.: *Curr. Org. Chem.* 6, 739-774 (2002)
49 Ong, W., Gómez-Kaifer, M., Kaifer, E.A.: *Chem. Commun.* 1677-1683 (2004)
50 Vögtle, F., Gestermann, S., Hesse, R., Schwierz, H., Windisch, B.: *Prog. Polym. Sci.* 25, 987-1041
(2000)
51 Schlenk, C., Frey, H.: *Monatsh. Chem.* 130, 3-14 (1999)
52 Zimmerman, S.C., Lawiess, L.J.: *Top. Curr. Chem.* 217, 95-120 (2001)
53 Dass, C.R.: *J.Pharm. Pharmacol.* 54, 3-27 (2002)
54 Dass, C.R., Su, T.: *Drug Delivery* 8, 191-213 (2001)
55 Quintana, A., Raczka, E., Piehler, L., Lee, I., Myc, A., Majoros, I., Patri, A.K., Thomas, T., Mule, J.,
Baker, J.R. Jr.: *Pharm. Res.* 19, 1310-1316 (2002)
56 Lebedeva, I., Benimetskaya, L., Stein, C.A., Vilenchik, M.: *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 50, 101-119
(2000)
57 Herrmann, A., Mihov, G., Vandermeulen, G.W.M., Klok, H.A., Mullen, K.: *Tetrahedron* 59, 3925-
3935 (2003)

- 58 Kim, Y., Zimmerman, S.C.: *Curr. Opin. Chem. Biol.* 2, 733-742 (1998)
- 59 Tomalia, D.A.: *Aldrichimica Acta* 37, 39-57 (2004)
- 60 Han, S., Mahato, R.I., Sung, Y.K., Kim, S.W.: *Mol. Therapy* 2, 302-317 (2000)
- 61 Niederhafner, P., Šebestík, J., Ježek, J.: *J. Peptide Sci.* 9, 1-8 (2003)
- 62 Nummelin, S., Skrifvars, M., Rissanen, K.: *Top. Curr. Chem.* 210 (2000)
- 63 Sheiko, S.S., Möller, M.: *Top. Curr. Chem.* 212 (2001)
- 64 King, A.S.H., Twyman, L.J.: *J. Chem. Soc.* 2209-2218 (2002)
- 65 Choi, Seok-Ki: Nomenclature and definitions, v knize *Synthetic Multivalent Molecules*, (Wiley, J. & Sons, Inc.), 1-9 (2004)
- 66 Mammen, M., Choi, S.K., Whitesides, G.M.: *Angew. Chem. Int. Ed.* 37, 2755 (1998)
- 67 Bezouška, K.: *Rev. Mol. Biotechnol.*, 90, 269-290 (2002)
- 68 Svoboda, J.: *Organická syntéza, skriptum VŠCHT, Praha*, 173-294 (2000)
- 69 Smith, M.B., March, J.: Aliphatic nucleophilic substitution, v knize *March's Advanced Organic Chemistry*, (Wiley, J. & Sons, Inc.), 510-511 (2001)
- 70 Lygo, B., Wainwright, P.G.: *Tetrahedron Lett.* 39, 1599 (1998)
- 71 Hermanson, G.T.: *Biocojugate techniques*, Academic Press, London (1996)
- 72 Böhlm, S., Smrčková-Voltrová, S.: *Strukturální analýza organických sloučenin, skriptum VŠCHT Praha*, str. 58 (1995)
- 73 Krist, P., Vannucci, L., Kuzma, M., Man, P., Sadalpure, K., Patel, A., Bezouška, K., Pospíšil, M., Petruš, L., Lindhorst, K.T., Křen, V.: *ChemBioChem.* 5, 445-452 (2004)

Svoluji k zapůjčení této práce pro studijní účely a prosím, aby byla řádně vedena evidence vypůjčovatelů.

Jméno a příjmení s adresou	Číslo OP	Datum vypůjčení	Poznámka
-------------------------------	----------	-----------------	----------
