

Univerzita Karlova
Farmaceutická fakulta v Hradci Králové
Katedra farmaceutické technologie



**Vliv koncentrace polyamidoaminodendrimerů
s ethylendiaminovým jádrem a aminoskupinami na periferii
na (trans)dermální podání 5-fluorouracilu**

Diplomová práce

Pavλίna Chladová

Hradec Králové 2020

Vedoucí práce: Dr. Georgios Paraskevopoulos, Ph.D.

Konzultant: Mgr. Anna Nováčková

Prohlašuji, že tato práce je mým původním autorským dílem, které jsem vypracovala samostatně pod vedením svého školitele. Veškerá literatura a další zdroje, z nichž jsem při zpracování čerpala, jsou uvedeny v seznamu použité literatury a v práci řádně citovány. Práce nebyla využita k získání jiného nebo stejného titulu.

V Hradci Králové 2020

Pavčina Chladová

Zde bych ráda poděkovala svému školiteli Dr. Georgiosi Paraskevopoulosovi, Ph.D., za odborné vedení, cenné rady a ochotu. Dále konzultantce Mgr. Anně Nováčkové za věcné připomínky a poznámky při psaní této práce.

Za finanční podporu děkuji Univerzitě Karlově (GAUK 184217, SVV 260547) a Grantové agentuře České republiky (19-09600S).

ABSTRAKT

Dendrimery jsou syntetické, symetricky větvené molekuly složené z opakujících se podjednotek (monomerů). Mají vysokou molekulární hmotnost a velké množství povrchových funkčních skupin. V roztoku mají sférický tvar a vyznačují se monodisperzitou. Jejich struktura a velikost jsou během přípravy dobře kontrolovatelné.

V biomedicíně mají široké možnosti využití. Díky volnému prostoru v molekule mohou enkapsulovat léčivo. Pomocí velkého množství povrchových skupin mohou vázat i větší molekuly. Zlepšují prostupnost a ukládání látek do kůže nebo skrz. Můžeme je tedy řadit mezi akceleranty (trans)dermální permeace.

Vhodné vlastnosti pro (trans)dermální podání byly prokázány u dendrimerů, v jejichž struktuře se nachází monomery s aminovými skupinami a spojuje je amidová vazba. Cílem této práce bylo takové dendrimery připravit a stanovit vliv koncentrace dendrimerů na propustnost léčiva lidskou kůží.

Byly izolovány a charakterizovány čtyři generace polyamidoaminodendrimerů s ethylendiaminovým jádrem a aminoskupinami na periférii. Následně byly provedeny *ex vivo* permeační pokusy pomocí Franzových difuzních cel. Jako léčivo byl vybrán 5-fluorouracil (5-FU). Z výsledků plyne, že formulace s dendrimery G2-HCl a G3-HCl o koncentraci 5 mg/ml a 10 mg/ml zvyšují ukládání léčiva v epidermis a zároveň dochází k minimální depozici 5-FU v akceptorové fázi. Mohlo by se tedy jednat o bezpečnou a účinnou formu topické aplikace 5-FU pro klinickou praxi.

ABSTRACT

Dendrimers are synthetic, symmetrically tree-like branched molecules. They are composed of repeating units (monomers). They have high density of surface functional groups and spherical shape in solution. Since their molecular weight is highly controllable, they are characterized by monodispersity and this is their main difference from classical polymers.

Dendrimers have a wide spectrum of applications in biomedicine. Due to the empty space between the branches of the molecule, they can encapsulate drugs, and by conjugation and complexation to the surface groups, they are able to carry even larger drug molecules. Thus, dendrimers can be used as drug delivery systems. In addition, they have been used for skin application of several active molecules, either as topical or transdermal delivery.

Suitable properties for (trans)dermal application have been demonstrated for dendrimers which consist of monomers with amine groups and are connected with amide bonds. The goal of this thesis was the preparation of dendrimers with these characteristics and the evaluation of their concentration influence to the permeability of 5-Fluorouracil (5-FU) to human skin.

Four generations of polyamidoaminodendrimers with ethylenediamine core and peripheric amino groups have been isolated and described in this thesis. Subsequently, *ex vivo* permeation experiments were performed using Franz diffusion cells. The results show that formulations of dendrimers with concentration 5 mg/ml G3-HCl and 10 mg/ml G2-HCl increase the deposition of 5-FU in epidermis while the concentration in the acceptor phase is minimal. Thus, the use of dendrimers can be suggested as a harmless and effective way of dermal 5-FU application.

OBSAH

1. SEZNAM ZKRATEK	7
2. ÚVOD A CÍL PRÁCE	9
3. TEORETICKÁ ČÁST	10
3.1 Stavba a význam kůže	10
3.2 Kožní bariéra	11
3.3 Prostup látek lidskou kůží	12
3.3.1 Výhody a limity transdermální aplikace	13
3.3.2 Výhody a limity topické a dermální aplikace	14
3.3.3 Možnosti (trans)dermální aplikace	14
3.4 Akceleranty (trans)dermání permeace	14
3.4.1 Mechanismus účinku	15
3.5 Dendrimery	16
3.5.1 Dendrimery pro kožní podání	18
3.5.2 Příklady kožního podání léčivých látek s dendrimery	20
3.5.3 Syntéza dendrimerů	21
4 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST	23
4.3 Syntéza	23
4.3.2 Chemikálie, přístroje, pomůcky	23
4.3.3 Syntéza monomeru	24
3.3.2 Syntéza jádra	26
4.3.6 Obecný postup deprotektce	27
4.3.7 Obecný postup přípravy další generace	27
4.3.8 Chlorid nulté generace, G0-HCl	28
4.3.9 G1-Boc a G1-HCl	28
4.3.7 G2-Boc a G2-HCl	30
4.3.8 G3-Boc a G3-HCl	32

4.4	Permeace	34
4.4.1	Franzovy difuzní cely	34
4.4.2	Kůže	35
4.4.3	Průběh experimentu	35
4.4.4	Analýza experimentu	36
5.	VÝSLEDKY A DISKUZE	37
6.	ZÁVĚR	46
7.	LITERATURA	47

1. SEZNAM ZKRATEK

5-FU	5-flourouracil
ACN	acetonitril
Boc	<i>tert</i> -butyloxykarbonyl
CHCl ₃	chloroform
CH ₂ Cl ₂	dichlormethan
DIPEA	<i>N, N</i> -diisopropylethylamin
DMF	dimethylformamid
DMSO	dimethylsulfoxid
EtOAc	ethylacetát
G0	nultá generace dendrimery
G1	první generace dendrimery
G2	druhá generace dendrimery
G3	třetí generace dendrimery
G4	čtvrtá generace dendrimery
HBTU	<i>N, N, N', N'</i> -tetramethyl-O-(1H-benzotriazol-1-yl)uronium hexafluorofosfát
HCl	kyselina chlorovodíková
HOBt	1-hydroxybenzotriazol
HPLC	vysokoúčinná kapalinová chromatografie
IR	infračervená spektroskopie
MeOH	methanol
MS	hmotnostní spektrometrie
Mp	teplota tání
Na ₂ SO ₄	síran sodný
NMR	spektroskopie nukleární magnetické rezonance
PAMAM	polyamidoamin
PG	propylenglykol
R _f	retenční faktor

SC	stratum corneum
TFA	trifluoroctová kyselina
TLC	tenkovrstvá chromatografie

2. ÚVOD A CÍL PRÁCE

Podání léčiv přes kůži s sebou nese mnoho výhod. Pro pacienta se jedná o příjemnější cestu podání a zároveň se léčivo vyhne gastrointestinálnímu traktu a játrům. Navíc je možné léčbu snadno přerušit.

Pro většinu léčiv je však nemožné překonat kožní bariéru v dostatečném množství, proto využíváme akceleranty (trans)dermální permeace, které dočasně umožní překonat *stratum corneum*. Mezi takové látky patří i dendrimery. Jedná se o skupinu syntetických polymerů s přesně definovanou strukturou. Velikostí odpovídají nanočásticím. Jsou striktně monodisperzní a mohou být výborně rozpustné ve vodě díky periferním funkčním skupinám.

Cílem práce bylo připravit několik generací těchto molekul a poté stanovit vliv koncentrace G2-HCl a G3-HCl na permeabilitu lidské kůže *ex vivo* pro léčivo 5-fluorouracil.

3. TEORETICKÁ ČÁST

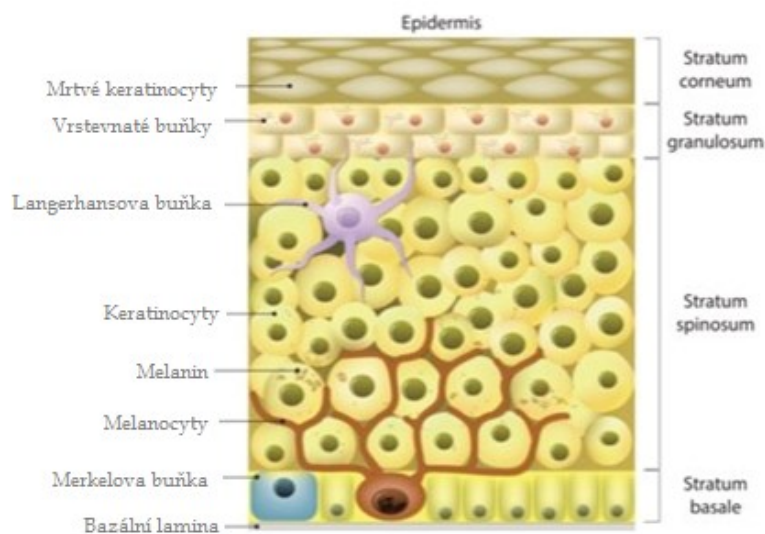
3.1 Stavba a význam kůže

Kůže (latinsky *cutis*, řecky *derma*) je největším orgánem lidského těla. Zajišťuje mnoho důležitých funkcí. Především se jedná o funkci ochrannou. Pomáhá udržet teplotní homeostázu, chrání tělo před vnějšími vlivy a poskytuje vjemové informace o okolí. Jako nejdostupnější orgán snadno podléhá infekcím, nemocem a zraněním. Přestože je polohou snadno zranitelná, přístupná UV záření, mikrobům a škodlivým látkám v prostředí, jejím znakem je schopnost odvracet možná poškození.^{1,2}

Kůže se skládá ze dvou hlavních vrstev, vnější epidermis (pokožka) a vnitřní dermis (škára). Pod dermis se nachází podkožní vazivo neboli hypodermis. Vazivo v některých místech slouží k uchycení ke kostem či svalům, nachází se zde tukové buňky sloužící jako zásobárna energie a zároveň plní izolační funkci.¹⁻³

Dermis tvoří kolagenní a elastická vlákna, díky kterým je zároveň pevná i pružná. Je bohatě prokrvena a inervována. Kromě hlavní termoregulační funkce má význam i jako výživa epidermis.²⁻⁴

Epidermis neboli pokožka (Obrázek 1) je charakterizována jako stratifikovaný epitel, který je na povrchu zrohovatělý.⁵ Je tvořen čtyřmi typy buněk: nejvíce zastoupenými keratinocyty, dále melanocyty, které produkují pigment melanin, Langerhansovými buňkami, které se účastní imunitní odpovědi, a Merkelovými buňkami, které figurují v dotykových vjemech. Ve většině oblastí lidského těla je rozdělen na čtyři vrstvy, a to na *stratum basale*, *stratum spinosum*, *stratum granulosum* a tenké *stratum corneum* (SC). V místech, kde pokožka podléhá většímu tření, je navíc *stratum lucidum*. SC tvoří silnější vrstvu v oblastech jako špičky prstů, dlaně a chodidla.^{1,3} V jednotlivých vrstvách epidermis se buňky liší, protože podléhají jinému stádiu diferenciaci. Buňky jsou tvořené v bazální vrstvě, tedy na hranici s dermis. Putují na úplný povrch pokožky a podléhají apoptóze. Cestou ztrácí živiny a kyslík, zplošťují se a zvyšuje se podíl keratinu. Tento proces, zvaný keratinizace, zabere asi čtyři týdny a jeho výsledkem je kožní bariéra.^{1,6}



Obrázek 1: Struktura epidermis⁷

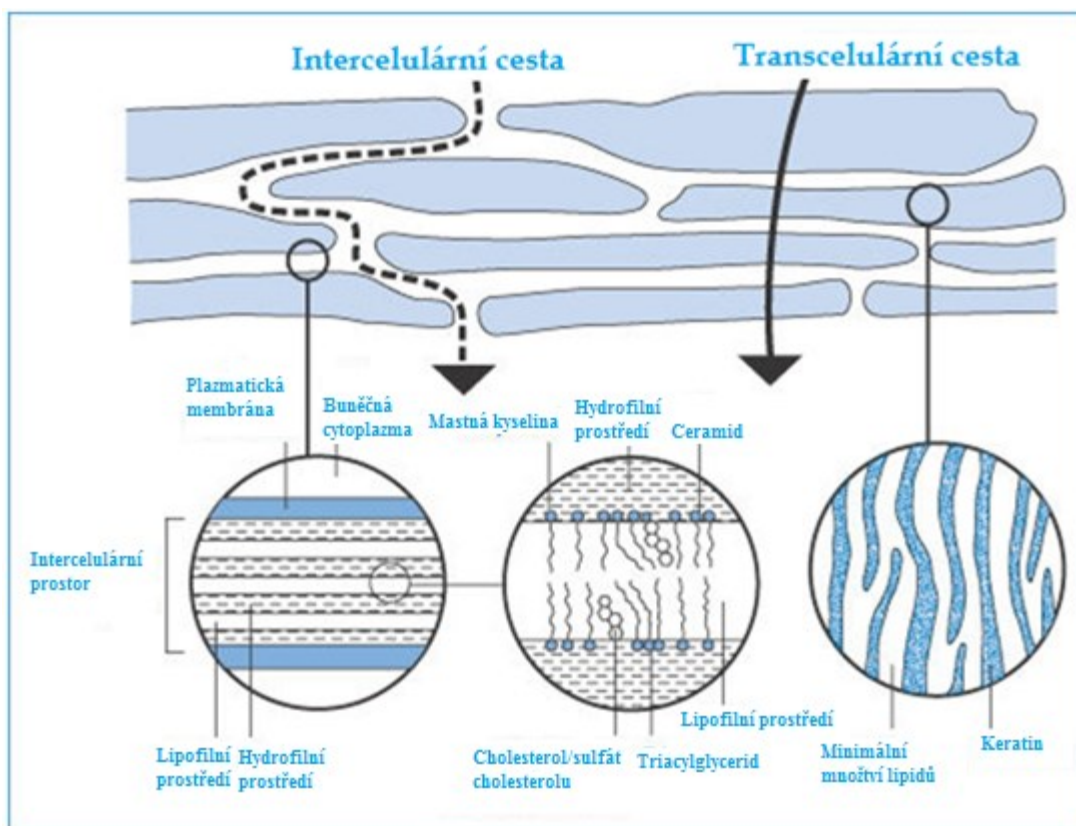
3.2 Kožní bariéra

Funkci kožní bariéry plní několik složek: SC, těsné spoje, mikrobiom, chemická a imunologická bariéra. Z hlediska (trans)dermálního podání léčiv a kožní absorpce hraje hlavní roli mechanická bariéra, tedy SC a těsné spoje.⁸

SC je složeno z 10–20 vrstev plochých, k sobě přilehlých mrtvých buněk, které jsou vyplněné keratinem (korneocyty). Buňky mají nepropustnou obálku a jsou obklopené lipidovou matrix, která je velmi hydrofobní. Tato stavba je vysoce odolná vůči průniku látek, často bývá připodobňována k „cihlám a maltě“.^{3,9} Mezibuněčné lipidy zabírají kolem 20 % objemu SC, tvoří je cholesterol (27 %), ceramidy (41 %), volné mastné kyseliny (9 %) a v menší míře estery a sulfáty cholesterolu. Lipidy jsou uspořádány do lamel, jejichž struktura je vysoce organizovaná a stabilní. Složení a stavba mezibuněčné lipidové matrix je velmi efektivní bariérou vůči chemické penetraci či permeaci.¹⁰

3.3 Prostup látek lidskou kůží

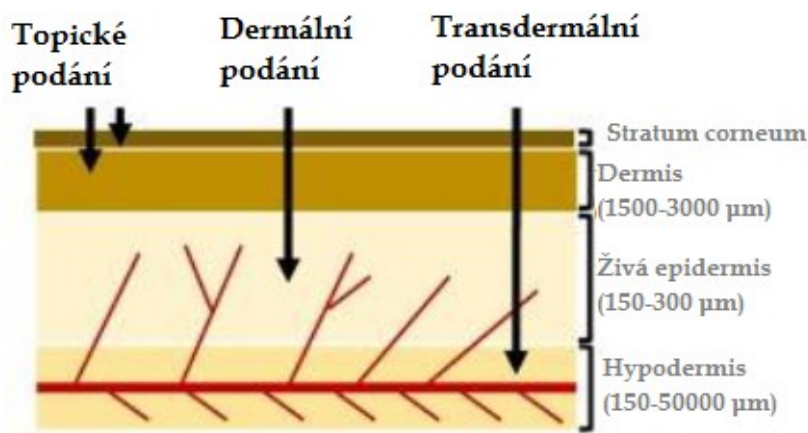
Kvůli povaze SC mohou do spodnějších vrstev kůže pronikat pouze látky, které mají relativně lipofilní povahu. Způsobem transportu je převážně pasivní difuze.¹¹ Lze rozlišit transcelulární a intercelulární prostup (Obrázek 2). Transcelulární cestou musí látka překonat jak hydrofilní prostředí korneocytů vyplněných keratinem, tak lipofilní mezibuněčné prostory. Proto převažuje intercelulární prostup mezibuněčnou lipidovou matrix. Další potenciální cesty, jak proniknout kožní bariérou, jsou skrze vlasové folikuly, mazové žlázy a přes potní žlázy.¹²



Obrázek 2: Transcelulární a intercelulární cesta prostupu látek kůží¹³

Dle hloubky prostupu lze rozlišit transdermální, dermální a topické podání (Obrázek 3). Při transdermálním podání permeant difunduje několika vrstvami kůže, dostává se do krevního řečiště a má systémový účinek. Oproti tomu při dermálním (intradermálním) podání se permeant do krevního oběhu nedostane a jeho působení je

lokální v epidermis a dermis. Při topickém podání nemusí dojít k překonání kožní bariéry, místo působení je hlavně v SC nebo na ní.^{11,14}



Obrázek 3: Hloubka permeace¹⁴

3.3.1 Výhody a limity transdermální aplikace

Pokud je porovnávána transdermální a perorální léková forma, lze najít několik výhod podání léčiva přes kůži. Léčivo se vyhne first-pass efektu jater, takže je možné snížit jeho dávku. Neprochází gastrointestinálním traktem, tím nedochází k možným nežádoucím účinkům a interakcím s potravou. Dále se jedná o velmi snadno aplikovatelnou lékovou formu, díky tomu je i compliance pacientů vyšší a lze látku aplikovat i pacientům, kteří nemohou polykat z důvodu zvracení či bezvědomí. Terapie se dá lehce přerušit a plazmatická hladina je stabilně udržitelná, proto je nižší riziko předávkování.¹¹

Kromě toho, že látky aplikované na pokožku mohou vyvolat dráždivé reakce, je největším limitem fakt, že většina látek není schopna kožní bariéru překonat. Aby bylo léčivo schopné prostoupit SC, musí splňovat určitá kritéria, kterými jsou dle Barryho¹² nízká molekulová hmotnost (ideálně nižší než 600 Da), přiměřená rozpustnost ve vodě a oleji ($\log P_{o/w}$ v rozmezí 1–3)¹¹, nízký bod tání korelující s dobrou rozpustností a optimální rozdělovací koeficient. Rozdělovací koeficient musí být dostatečně vysoký, ale příliš vysoký by zabránil clearance z živých tkání ($\log K_{o/w}$ v rozsahu -3 až -6)¹⁰.

3.3.2 Výhody a limity topické a dermální aplikace

U mnohých onemocnění lokalizovaných v kůži (např. ekzém, mikrobiální infekce či rakovina kůže) je výhodné léčbu aplikovat způsobem, kterým se nezatíží organismus systémově. Léčivo nedosáhne krevní cirkulace, tím dochází k poklesu nežádoucích účinků. Přesto je potřeba, aby podaná látka měla vhodné fyzikálně-chemické vlastnosti pro prostup alespoň primární bariérou kůže. Většina kandidátů léčiv využitelných v klinické praxi takové vlastnosti nemá.¹¹

3.3.3 Možnosti (trans)dermální aplikace

Existují metody, které usnadňují prostup látek do kůže. Dělí se na aktivní, mechanické a pasivní. Aktivní metody jsou iontoforéza, elektroporace a ultrazvuk. Mezi mechanické patří mikrožehla, intradermální injekce, pistole a genová elektroinjekce. K pasivním metodám se řadí transdermální terapeutické systémy a akceleranty transdermální permeace.⁷

3.4 Akceleranty (trans)dermální permeace

Jedná se o sloučeniny, které ovlivňují složky kůže a podporují prostup léčivých látek kožní bariérou. Takové vlastnosti má sice velké množství látek, ale není u nich znám přesný mechanismus účinku, proto je jejich využití omezené. Ideální permeační akcelerant by měl mít následující vlastnosti:

- netoxický, nedráždivý, nezpůsobující alergie, bez farmakologického účinku (neváže se na receptor),
- rychlý nástup účinku, který by měl být jednosměrný (umožní léčivu proniknout do kůže, ale zabraňuje ztrátám endogenních látek),
- jeho aktivita a doba účinku by měly být předvídatelné a reprodukovatelné,
- po jeho odebrání by se měla rychle a plně obnovit bariérová funkce kůže,
- měl by být vhodný pro topické lékové formy, kompatibilní jak s léčivem, tak pomocnými látkami,
- jeho kosmetické vlastnosti by měly být příjemné pro podání na pokožku,
- cenově přijatelný.^{15,16}

Není překvapivé, že žádný takový materiál, který by byl ideální, ještě nebyl objeven. Pokusy o zvýšení (trans)dermální permeace nutně vedou ke kompromisu mezi bezpečností a vysokou účinností látek. Je lepší zvolit takovou molekulu, která nevede k nevratnému porušení kožní bariéry.^{16,17}

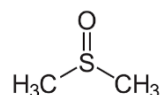
3.4.1 Mechanismus účinku

Mechanismus působení akcelerantů na kůži je podle Kanikkannana možné rozdělovat dle tří různých cest: polární, nepolární a obojí.¹⁸ Akceleranty působící polární cestou mění konformaci proteinů SC, tedy intracelulárního keratinu v korneocytech či proteiny v desmozomech. Většina akcelerantů působí nepolární cestou. Jedná se o interakci s intercelulárními lipidy SC, kdy narušují jejich uspořádání a zapříčiňují fluidizaci lamelární struktury. Některé akceleranty mohou působit polární i nepolární cestou a způsobují jak denaturaci proteinů, tak rozpouštění kožních lipidů.^{15,17,18}

Akceleranty zvyšují (trans)dermální permeaci tím, že ovlivňují pronikání nebo rozpustnost léčiva nebo obojí. Rovnice (1) znázorňující transport léčiva kůží (J) je výsledkem permeability kůže (P) a nasycené koncentrace léčiva v kůži (C), za předpokladu, že je zajištěno nadbytečné množství léčiva v transportním systému.

$$(1) J = P.C$$

Permeabilita může být zvýšena pozměněním kožní struktury (modifikací difuzního koeficientu). Příkladem je rozpouštědlo dimethylsulfoxid (DMSO) (Obrázek 4), který zvyšuje propustnost SC tím, že rozpouští kožní lipidy a denaturuje proteiny. Na druhou stranu existují akceleranty, které nenaruší celistvost kožní membrány, jen pozmění rozpouštěcí parametry léčiva (rozdělovací koeficient, permeační koeficient).¹⁸



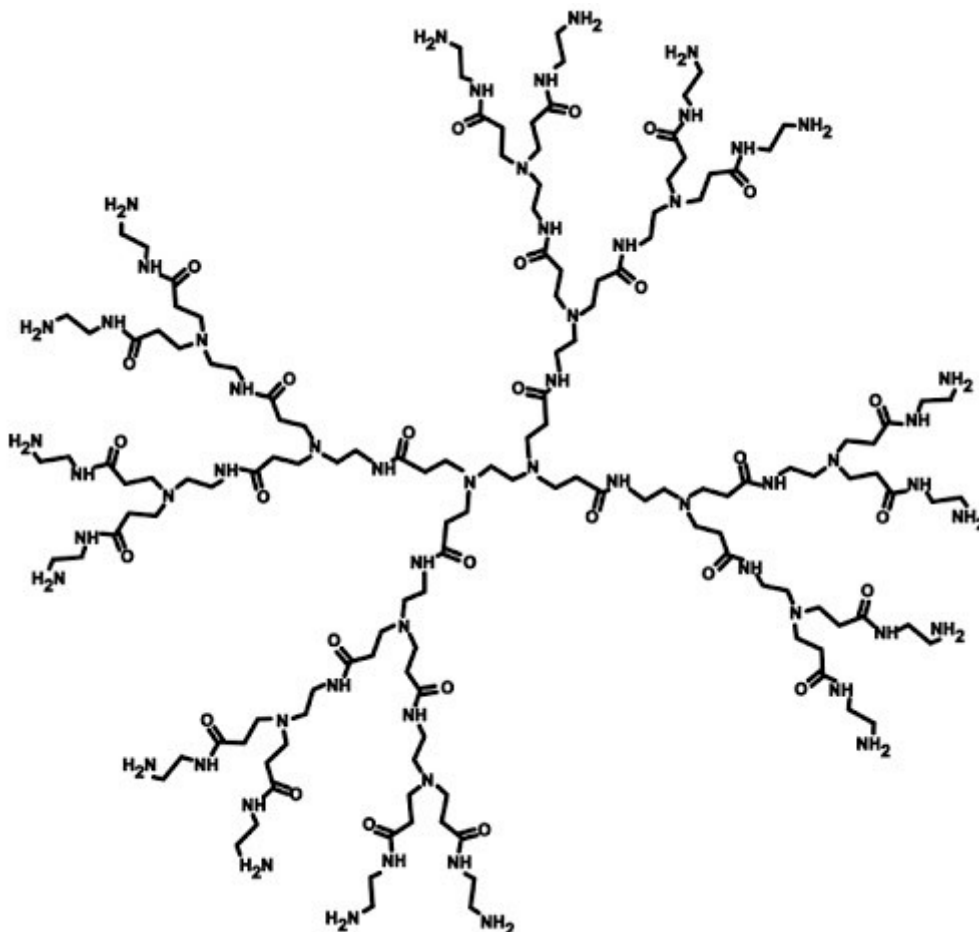
Obrázek 4: Vzorec dimethylsulfoxidu

Látky s relativně nízkou molekulární hmotností mohou samy proniknout kožní bariérou a tím způsobit nežádoucí vedlejší účinky. Polymerní akceleranty jsou v tomto

ohledu velmi nadějně.^{19,20} Mezi vysoce větvené polymerní systémy řadíme i symetricky větvené polymery, dendrimery.²¹

3.5 Dendrimery

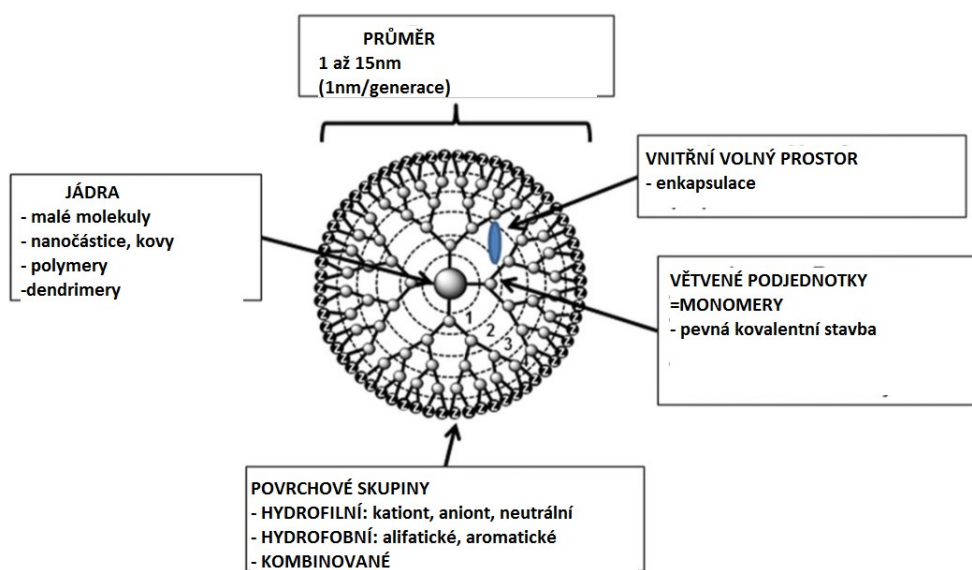
Dendrimery jsou syntetické molekuly ze symetricky větvených podjednotek, které tvoří polokruhový či kruhový tvar. Přestože se jedná o velké molekuly, mají přesně definovanou strukturu a v porovnání s jinými polymery jsou monodisperzní. Název pochází z kombinace řeckých slov „*dendro*“, které znamená strom a „*meros*“ neboli část.²² Tento termín byl poprvé použit skupinou D. A. Tomalia v 80. letech 20. století, kdy byla detailně popsána příprava poly(amidoamin)ových dendrimerů (PAMAM) (Obrázek 5). Navazovala na práci skupiny F. Vögtleho, která syntetizovala dendritické struktury polymerů zvané „kaskádovité molekuly“.^{23,24}



Obrázek 5: Struktura PAMAM dendrimeru (G2)²⁵

Strukturou se jedná o radiálně symetrické molekuly. Charakteristické vrstvy se označují jako generace (G). Jsou tvořeny z podjednotek neboli monomerů, které se

koncentricky váží na jádro (Obrázek 6). Počáteční jádro ovlivňuje výsledný tvar dendrimery, může se jednat například o malé molekuly, nanočástice, kovy či polymery. Monomery se kovalentně váží na jádro a tvoří pevnou konstrukci. Mezi nimi vzniká volný prostor, který je důležitý pro enkapsulaci molekul. Významný vliv na vlastnosti dendrimery má povrch, na němž se nachází značné množství potenciálně reaktivních míst.^{24,26} Funkční skupiny na povrchu dendrimery mají rozdílné interakce s kožními buňkami a tím se liší schopnosti jejich permeace.²⁷

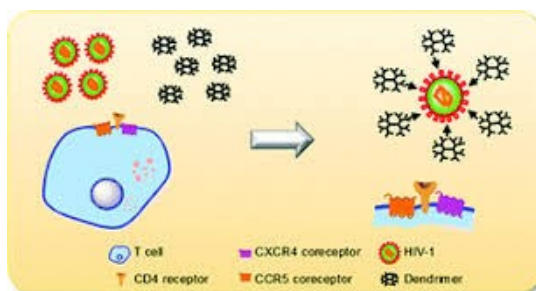


Obrázek 6: Schéma dendrimery (G-4)²⁸

Dendrimery mohou být hojně využívány v biomedicině, protože mají nízkou toxicitu a nejsou imunogenní. Jejich *in vitro* měřená cytotoxicita byla pozorována u pozitivně nabitých makromolekul, stejně tomu bylo u lipozomů a micel, kdy dochází k destabilizaci buněčných membrán a lýze buněk.²⁹ Také bylo zjištěno, že cytotoxicita roste se zvyšující se generací dendrimery.^{30,31}

Aktivní výzkum se zaměřuje na využití dendrimery jako nosičů DNA a malých organických molekul, zejména v oblasti terapie rakoviny.²⁹ Příkladem může být enkapsulace cisplatinu do PAMAM dendrimery. Vzniklé konjugáty umožňují pozvolné uvolňování léčiva, jeho zvýšené hromadění v oblasti solidního tumoru a nižší toxicitu v porovnání s volnou cisplatinou.³² Bylo zjištěno, že v genové terapii zvyšují účinnost transfekce DNA do různých druhů savčích buněk.³³ Další široce zkoumanou oblastí jsou paramagnetické kovové cheláty pro magnetickou rezonanci,

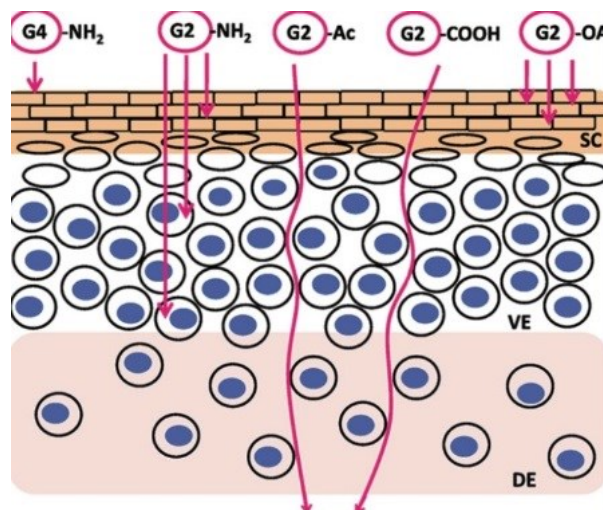
kdy dendrimerové kontrastní látky zlepšují citlivost zobrazení srdce, cév a dalších orgánů.³⁴ Dendrimery jsou využívány i jako léčiva. Polylysinový dendrimer proti *herpes simplex* viru³⁵ a podobný konjugát ve formě gelu zabraňují viru HIV se vázat na CD4 lymfocyty (Obrázek 7), a tím chrání ženy před sexuálně nakažlivým onemocněním.²⁹ Antibakteriální účinek dendrimerů spočívá ve vazbě na záporně nabitou bakteriální membránu a následnou lýzu bakterie.³⁶ Dendrimery mohou zvyšovat biologickou dostupnost léčiv při (trans)dermální aplikaci, proto se řadí mezi akceleranty (trans)dermální permeace.



Obrázek 7: Dendrimery zabraňující virové částici ve vazbě na hostitelskou buňku³⁷

3.5.1 Dendrimery pro kožní podání

Bylo zjištěno, že na schopnost permeace do kůže má vliv mnoho vlastností dendrimeru. Je zřejmé, že malé molekuly pronikají snáz než velké.¹² To potvrdila studie skupiny Y. Yanga²⁷, která porovnává PAMAM dendrimery G2 a G4. Proto byla použita G2 pro testování vlivu povrchových funkčních skupin na průnik kožní bariérou. Bylo zjištěno, že povrchová modifikace má vliv jak na schopnost dendrimerů kůži pronikat, tak na určení cesty průniku (Obrázek 8). G2-NH₂ více interagují s jednotlivými buňkami epidermální a dermální vrstvy. Oproti tomu acetylované i karboxylované G2 dendrimery neinteragovaly s kožními buňkami a pravděpodobně pronikaly intercelulární cestou. G2 dendrimery byly použity rovněž ke změření průniku hydrofobně modifikovaných funkčních skupin. Konjugát olejové kyseliny s G2 se v kůži hromadil ve vysokém množství.



Obrázek 8: Schéma interakcí různě modifikovaných dendrimerů s kůží²⁷

Velikost a povrchové vlastnosti dendrimerů jsou klíčové pro vliv na vstup kožní bariérou. Dále jsou významné interakce s molekulou léčiva, protože dochází ke změně fyzikálně-chemických vlastností dendrimeru i léčiva. Malé molekuly mohou být zachyceny ve volném prostoru mezi rozvětvenými útvary dendrimeru. Případně jsou navázané na povrchu dendrimeru, kde se vážou i makromolekuly (např. polymery, proteiny a nukleové kyseliny). U těchto komplexů dochází ke zvýšení rozpustnosti špatně rozpustných léčiv.²¹ Příkladem mohou být vybraná nesteroidní antiflogistika (viz kapitola 3.5.2). Zvýšení rozpustnosti souvisí se zlepšením permeace do kůže. Pokud je zlepšena rozpustnost léčiva v nosiči, dochází ke zvýšení koncentrace látky na nejsvrchnějších vrstvách SC, tím se zvětší gradient mezi horní a spodní vrstvou bariéry, což vede k vyššímu průniku.³⁸

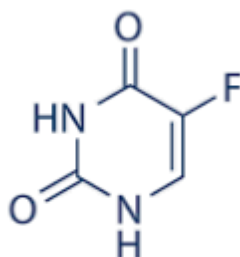
Z většiny studií zabývajících se dendrimery jako akceleranty kožní permeace vyplývá hypotéza, že sférické nanomolekuly dendrimerů s násobným povrchovým nábojem interagují s kožními lipidy a zlepšují propustnost; nabitě dendrimery denaturují keratin, a tím zvyšují transcelulární transport molekul; dendrimery o velikosti nanočástic jsou schopny prostoupit pomocí pórů v SC.²¹

3.5.2 Příklady kožního podání léčivých látek s dendrimery

PAMAM dendrimery jsou často používány pro testování akceleračních schopností. Mezi zkoumané účinné látky patří nesteroidní antiflogistika jako ketoprofen, diflunisal a indometacin. Bylo potvrzeno, že dendrimery zlepšují (trans)dermální biodostupnost těchto látek.^{39,40} Propustnost kožní bariéry se v těchto případech až zčtyřnásobí.²⁷

Další látkou, na které byla potvrzena schopnost PAMAM dendrimerů zlepšovat průnik kožní bariérou, je 8-methoxypsoralen, který se v kombinaci s UVA světlem využívá k léčbě kožních onemocnění, jako je lupénka. Poloviční generace (G2.5 a G3.5) jsou ještě efektivnějšími akceleranty tohoto léčiva než G3 a G4.^{41,42}

Pro léčbu lupénky, premaligních a maligních onemocnění kůže se využívá 5-flourouracil (5-FU) (Obrázek 9). Jako hydrofilní léčivo špatně proniká kožní bariérou. PAMAM dendrimery s aminovými skupinami na povrchu zvyšují permeaci tohoto léčiva.⁴³ Skupina S. Mutalika syntetizovala peptidové dendrimery, které následně testovala s 5-FU na lidské kůži a potvrdila jejich značný účinek na zlepšení permeace.⁴⁴

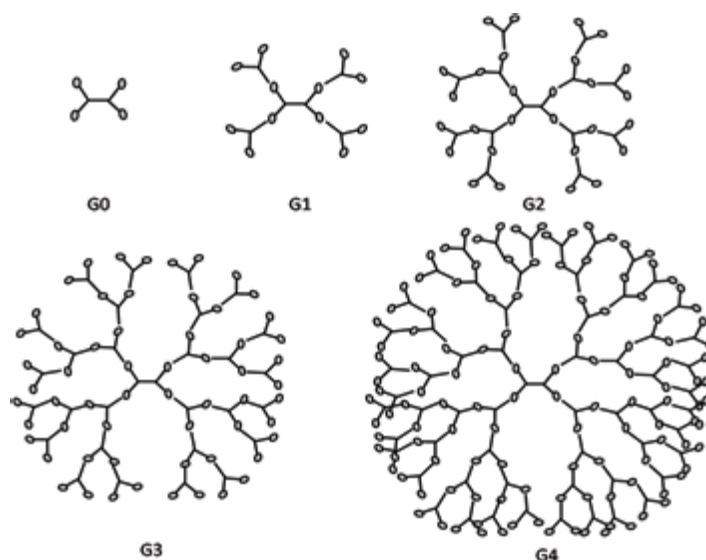


Obrázek 9: Vzorec 5-FU

3.5.3 Syntéza dendrimerů

Metody přípravy dendrimerů se od klasických polymerů liší, přestože se jedná o růst opakovaným přidáváním monomeru. Dendrimery jsou monodisperzní molekuly. Aby bylo dosaženo přesné molekulární hmotnosti s pravidelně větvenou strukturou, vyžaduje robustní, efektivní a přísně kontrolovanou reakci.⁴⁵

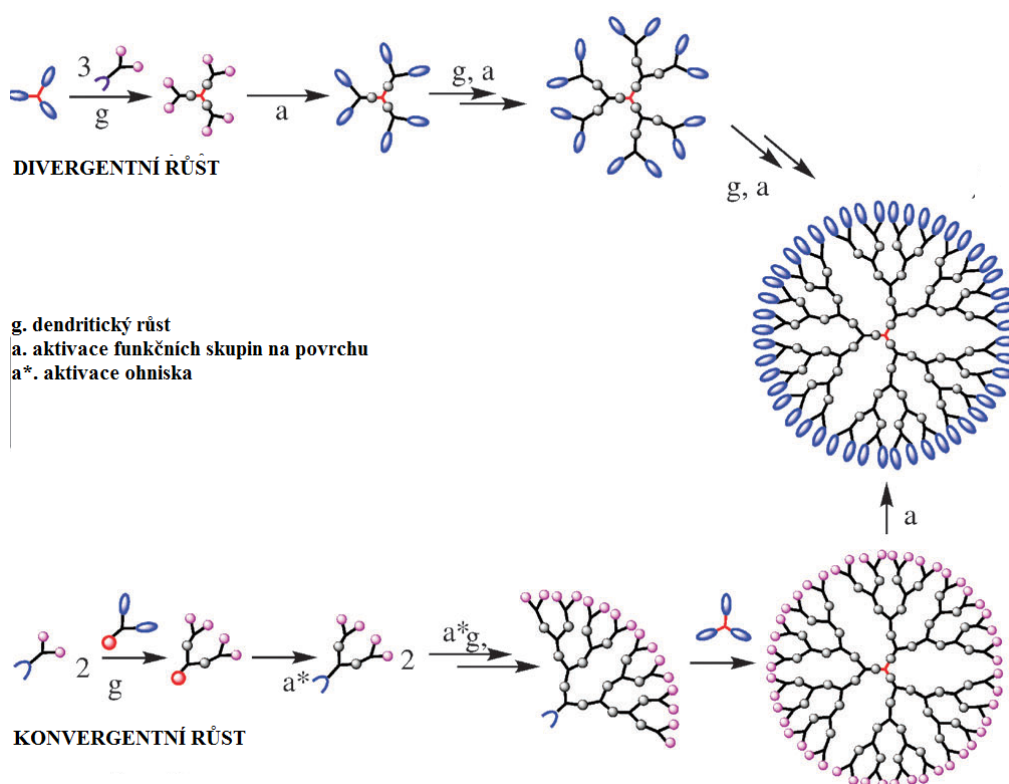
Obvyklý růst spočívá ve dvou krocích, navázání monomerní jednotky a následná aktivace. Tyto kroky se stále opakují a vznikají tak vyšší generace dendrimerů (Obrázek 10). Může se tedy zdát, že se jedná o jednoduchý proces, ve skutečnosti je ale pracný, časově náročný a výsledné výtěžky jsou často nízké. Není snadné získat dendrimer vysoké generace (G4 a vyšší), který nemá konstrukční vadu.^{45,46} Důvodem jsou sterické faktory, které ovlivňují přístup k povrchovým funkčním skupinám. Může například docházet k otočení koncové skupiny dovnitř molekuly. Vliv na tyto nepříznivé účinky má struktura dendrimeru, ale i pH, polarita a iontová síla rozpouštědla, které tvoří chemické prostředí.⁴⁷ S exponenciálním nárůstem koncových funkčních skupin s každou novou generací dochází ke zvyšování jejich hustoty na povrchu molekuly. To pravděpodobně způsobuje, že povrch přestává být kompletně dokončený.⁴⁸



Obrázek 10: Schéma pěti generací dendrimerů²¹

Syntézy může být dosaženo různými způsoby. Mezi základní patří divergentní a konvergentní metoda (Obrázek 11). Nejjasnější rozdíl mezi těmito alternativami

spočívá ve směru růstu molekuly. U divergentní metody dochází k přidávání monomerů od jádra k periférii a při konvergentní metodě roste dendrimer z vnějšku směrem k jádru.⁴⁵ Je potvrzeno, že konvergentní metoda poskytuje lepší celkovou strukturální kontrolu. Částečně díky vyššímu potenciálu pro čištění v mezistupních syntézy a částečně díky schopnosti zavést funkční jednotky na okraj molekuly⁴⁹ má nižší riziko defektu ve výsledné struktuře, jako je neúplné navázání všech monomerů z jedné generace, což se během divergentní metody objevuje.⁵⁰ Ta je přesto vhodnější metodou pro syntézu vyšších generací dendrimerů, protože umožňuje syntézu ve větším měřítku.⁴⁹



Obrázek 11: Divergentní a konvergentní metoda syntézy.⁴⁶ (Upraveno.)

4 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

4.3 Syntéza

4.3.2 Chemikálie, přístroje, pomůcky

Výchozí látky, rozpouštědla a ostatní chemikálie a materiály byly dodány z firem: Sigma-Aldrich (Schnelldorf, Německo), Merck (Darmstadt, Německo), Lach-Ner (Neratovice, Česká republika), PENTA (Praha, Česká republika) a VWR (Stříbrná Skalice, Česká republika).

Na TLC (tenkovrstvou chromatografií) byly použity desky Silica gel 60 F254 (Merck, Darmstadt, Německo). Na detekci TLC desek byla použita směs KMnO_4 (1,5 g), K_2CO_3 (10 g) a 10% NaOH (1,25 ml) a voda (200 ml). Následovalo mírné zahřívání a vyhodnocení probíhalo pomocí UV lampy ENF-280C.

K charakterizování látek pomocí NMR byly použity přístroje Varian Mercury-Vx BB 300 (^1H při 300 MHz a ^{13}C při 75,5 MHz) nebo Varian VNMR S500 (^1H při 300 MHz a ^{13}C při 125 MHz). Spektra byla měřena v deuterovaných rozpouštědlech za laboratorní teploty. Jako vnitřní standard byl použit tetramethylsilan, k němuž jsou udávány chemické posuny δ v ppm. NMR spektra byla vyhodnocena pomocí počítačového programu MestReC.

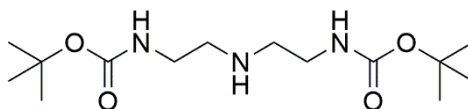
Hmotnostní spektra (MS) byla měřena metodou Agilent Tech 500 Iontrap s ESI. Infračervená spektra (IR) byla měřena na spektrometru Nicolet 6700 FT-IR v rozmezí $400\text{--}4000\text{ cm}^{-1}$. Teploty tání byly stanoveny pomocí přístroje Buchi Melting Point B540 v otevřených kapilárách. Uvedené hodnoty nejsou korigované.

Vysokoúčinná kapalinová chromatografie (HPLC) byla prováděna přístrojem Shimadzu Prominence.

Chemické vzorce a schémata chemických reakcí byla vytvořena pomocí programu ChemDraw Professional. Statistická analýza byla vyhodnocena v programu GraphPad Prism.

4.3.3 Syntéza monomeru

N, N''-Bis(*tert*-butyloxykarbonyl)diethylentriamin

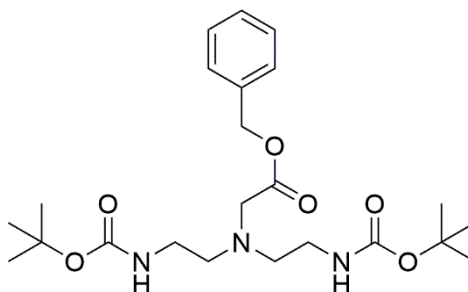


6 g imidazolu (88 mmol, 2,0 ekv.) se rozpustí v 60 ml dichlormethanu (CH_2Cl_2). Za stálého míchání se během 1 h přidá 20 g Boc_2O (93 mmol, 2,1 ekv.). Směs se nechá míchat po dobu 1 h, poté se CH_2Cl_2 odpaří na vakuové odparce a vysuší za sníženého tlaku pod olejovou pumpou. Přidá se roztok 4,75 ml diethylentriaminu (44 mmol, 1,0 ekv.) ve 20 ml toluenu. Reakce se nechá míchat přes noc při 60 °C. Poté se zchladí na laboratorní teplotu a přidá se 125 ml CH_2Cl_2 , extrahuje se 3x250 ml H_2O . Organická fáze se vysuší bezvodým Na_2SO_4 , zfiltruje se a odpaří se přebytečné rozpouštědlo pomocí vakuové odparky.

Výsledná směs se vyčistí pomocí sloupcové chromatografie. Vhodnou mobilní fází je směs $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$ 100/1, které se během eluce změní na 50/1 a následně na 30/1.

Bylo izolováno 10,7 g produktu (výtěžek 61 %). $R_f = 0,14$ v $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$ (50/1). Mp 72 °C. ESI-MS (m/z): 304.3 (M+H)⁺. ¹H NMR (CDCl_3 , 500 MHz), δ /ppm: 4.97 (br, 1H), 3.20 (q, 4H, J=5.5 Hz), 2.73 (t, 4H, J=6.0 Hz), 1.45 (s, 18H) ¹³C NMR (CDCl_3 , 125 MHz) δ 155.9, 79.2, 48.8, 40.3, 28.4. IR (ATR) 3323, 2973, 2934, 2819, 1672, 1540, 1281, 1164 cm^{-1} .

N, N''-Bis(*tert*-butyloxykarbonyl)diethylentriaminyl-*N'*-[glycin-benzyl ester]



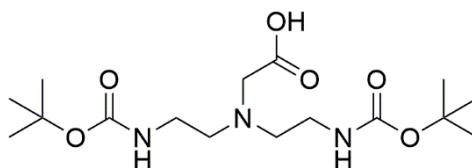
10,73 g *N, N''*-Bis(*tert*-butyloxykarbonyl)diethylentriaminu (35 mmol, 1,0 ekv.) se rozpustí ve 120 ml dimethylformamidu (DMF). Přidá se 5,67 ml

benzylbromoacetátu (35 mmol, 1,0 ekv.) a 5,98 ml triethylaminu (43 mmol, 1,2 ekv.). Reakce probíhá přes noc za laboratorní teploty. Přidá se 400 ml EtOAc a provede se extrakce 2x300 ml NaCl a 2x200 ml NaHCO₃. Organická fáze se vysuší bezvodým Na₂SO₄, zfiltruje se a odpaří se přebytečné rozpouštědlo pomocí vakuové odparky.

Výsledná směs se vyčistí pomocí sloupcové chromatografie. Vhodnou mobilní fází je směs CHCl₃/MeOH 100/1.

Bylo izolováno 2,0 g produktu (výtěžek 13 %). R_f = 0,35 v CHCl₃/MeOH (50/1). Mp: 54 °C. ESI-MS (m/z): 374.4 (M+Na)⁺. ¹H NMR (CDCl₃, 500MHz), δ/ppm: 7.33 (m, 5H), 5.15 (s, 2H), 3.45 (s, 2H), 3.12 (q, 4H, J=5.0 Hz), 2.74 (t, 4H, J=5.5 Hz), 1.44 (s, 18H) ¹³C NMR (CDCl₃, 125 MHz) δ 172.0, 156.2, 135.7, 129.1, 128.4, 128.4, 78.7, 62.4, 55.8, 54.2, 39.1, 28.4. IR (ATR) 3368, 2974, 1745, 1696, 1564, 1526, 1506, 1163, 1145 cm⁻¹.⁵¹

***N, N''*-Bis(*tert*-butyloxykarbonyl)diethylentriaminyl-*N'*-glycin**

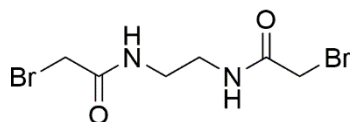


Do 1,5 g směsi Pd/C v 10 ml toluenu se přidá roztok 7,04 g *N, N''*-Bis(*tert*-butyloxykarbonyl)diethylentriaminyl-*N'*-[glycin-benzyl ester]u ve 100 ml MeOH. Reakce se opatrně míchá. K baňce se připevní balonek s H₂ a reakce probíhá 4 h za laboratorní teploty. Poté se filtruje přes trojitý a dvojitý filtrační papír, přebytečné rozpouštědlo se odpaří na vakuové odparce a výsledná směs se vysuší na olejové pumpě.

Bylo izolováno 5,1 g produktu (výtěžek 94 %). R_f = 0,66 v MeOH. Mp: 164-165 °C. ESI-MS (m/z): 384.3 (M+Na)⁺. ¹H NMR (DMSO-d₆, 500MHz), δ/ppm: 3.84 (s, 2H), 3.19 (bs, 4H), 3.11 (bs, 4H), 1.37 (s, 18H) ¹³C NMR (DMSO-d₆, 125 MHz) δ 155.5, 77.8, 53.5, 53.1, 36.0, 28.2. IR (ATR) 3349, 2977, 2922, 1748, 1693, 1629, 1522, 1379, 1367, 1293, 1250, 1169 cm⁻¹.⁵¹

3.3.2 Syntéza jádra

1,2 – Bis(bromoacetylamino)ethan

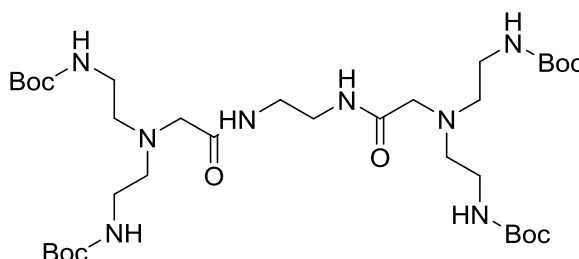


Se 100 ml CH₂Cl₂ se smísí 6,68 ml ethylendiaminu (0,1 mol, 1,0 ekv.). Současně se přikapává roztok 33 g K₂CO₃ (0,24 mol, 2,4 ekv.) ve 120 ml H₂O a roztok 26 ml bromoacetyl bromidu (0,26 mmol, 2,6 ekv.) ve 120 ml CHCl₃. Po dokapání běží reakce 12 h při laboratorní teplotě.

Vznikají dvě fáze, produkt se nachází v organické (spodní) fázi. Vodná fáze se extrahuje ethylacetátem. Spolu s organickou fází CHCl₃ se vysuší bezvodým Na₂SO₄, zfiltruje se a odpaří se rozpouštědlo. Následně se produkt rekrystalizuje ethanolem.

Bylo izolováno 28 g produktu (výtěžek 90 %). R_f = 0,18 v CHCl₃/MeOH (50/1). Mp: 150-151 °C. ESI-MS (m/z): 302.9 (M+H)⁺. ¹H NMR (CDCl₃, 500MHz), δ/ppm: 6.84 (bs, 2H), 3.67 (s, 4H), 3.04 (m, 4H) ¹³C NMR (CDCl₃, 125 MHz) δ 165.9, 40.1, 29.4. IR (ATR) 3296, 2938, 2861, 1645, 1542, 1479 cm⁻¹.^{52,53}

N, N''-Bis[(bis{2-[(*tert*-butoxykarbonyl)amino]ethyl}amino)acetyl]-1,2-diaminoethan, G0-Boc



5,2 g *N, N''*-bis(*tert*-butoxykarbonyl)diethylenetriaminu (17 mmol, 2,0 ekv.) se rozpustí ve 100 ml EtOAc. Přidá se 2,6 g 1,2-bis(bromoacetylamino)ethanu (8,5 mmol, 1,0 ekv.) a 3,55 g K₂CO₃ (25,5 mmol, 3,0 ekv.) ve 25 ml vody. Reakce probíhá 14 h za laboratorní teploty. Poté se extrahuje 2x100 ml H₂O, vysuší se bezvodým Na₂SO₄, zfiltruje se a odpaří se přebytečné rozpouštědlo pomocí vakuové odparky.

Výsledná směs se vyčistí pomocí sloupcové chromatografie. Vhodnou mobilní fází je směs CHCl₃/MeOH 20/1.

Bylo izolováno 4,6 g produktu (výtěžek 71 %). $R_f = 0,54$ v CHCl₃/MeOH (10/1). Mp: 149-151 °C. ESI-MS (m/z): 769.7 (M+Na)⁺. ¹H NMR (CDCl₃, 500MHz), δ/ppm: 7.44, (bs, 2H), 6.52 (bs, 4H), 3.51 (s, 4H), 3.14 (m, 8H), 2.92 (s, 4H), 2.44 (m, 8H), 1.57 (s, 36H) ¹³C NMR (CDCl₃, 125 MHz) δ 171.6, 156.7, 79.0, 58.5, 55.0, 38.7, 38.3, 28.5. IR (ATR) 3368, 3285, 2979, 2943, 2827, 1685, 1654, 1564, 1521, 1277, 1212, 1174 cm⁻¹.

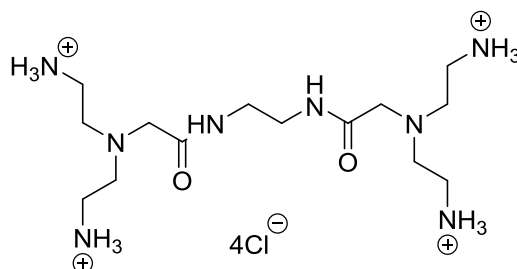
4.3.6 Obecný postup deprotektce

Periferní aminová skupina je vždy chráněna *terc*-butyloxykarbonylem (Boc). Pro odstranění této skupiny byl používán roztok 4M HCl v dioxanu. Reakce je míchána za laboratorní teploty. Po proběhnutí reakce se odpaří rozpouštědlo a produkt se vysuší na olejové pumpě.

4.3.7 Obecný postup přípravy další generace

Chloridová sůl dendrimera se rozpustí v DMF. Pro zlepšení rozpustnosti se použije DMSO. Roztok se zchladí na 0 °C. Přidá se *N, N*-diisopropylethylamin (DIPEA) a směs se míchá při 0 °C po dobu 15 minut. Poté se přidá *N, N''*-bis(*terc*-butyloxykarbonyl)diethylenetriaminyl-*N'*-glycin (monomer), *N, N, N', N'*-tetramethyl-O-(1H-benzotriazol-1-yl)uronium hexafluorofosfát (HBTU) a 1-hydroxybenzotriazol (HOBt hydrát). Reakce probíhá za laboratorní teploty. Poté se přidá chloroform (CHCl₃), provede se extrakce H₂O a nasyceným roztokem NaHCO₃. Organická fáze se vysuší bezvodým Na₂SO₄, zfiltruje se a odpaří se přebytečné rozpouštědlo pomocí vakuové odparky. Výsledná směs se vyčistí pomocí sloupcové chromatografie. Vhodnou mobilní fází je směs CHCl₃/MeOH v daném poměru, případně je využita gradientová eluce.

4.3.8 Chlorid nulté generace, G0-HCl

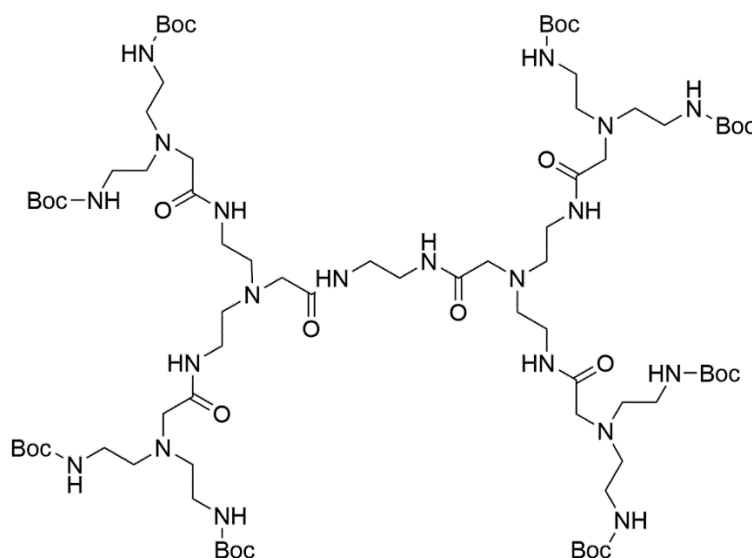


Reakce dle obecného postupu (4.3.6). 1,84 g G0-Boc (1,1 mmol, 1,0 ekv.), 90 ml 4M HCl v dioxanu (360 mmol, 300,0 ekv.), reakční čas byl 20 h.

Bylo izolováno 1,2 g produktu (výtěžek 98 %). Mp: 150-152 °C, ¹H NMR (D₂O, 500 MHz), δ/ppm: 3.73 (s, 4H), 3.27 (s, 4H), 3.24 (t, 8H, J=6.0 Hz), 3.23 (t, 8H, J=6.0 Hz), 2,40 (s, 12H) ¹³C NMR (D₂O, 125 MHz) δ 170.2, 56.1, 52.3, 38.6, 36.3, 30.3 IR (ATR) 3352, 3104, 1658, 1549, 1210, 1182, 1141 cm⁻¹.

4.3.9 G1-Boc a G1-HCl

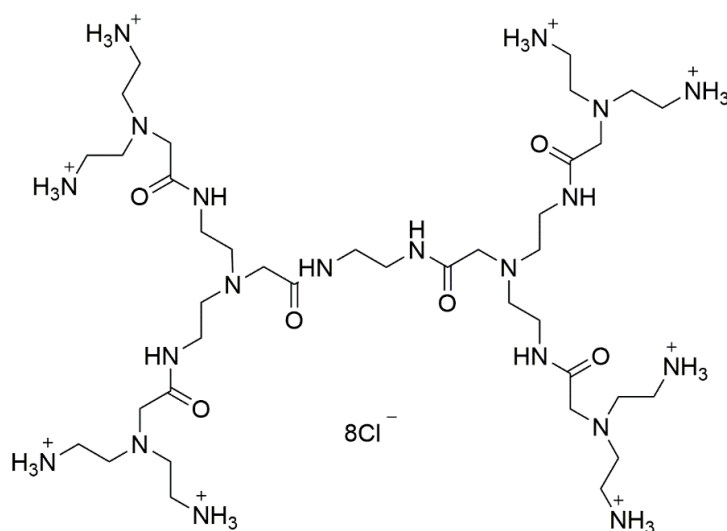
Boc-chráněná první generace, G1-Boc



Reakce dle obecného postupu (4.3.7). 103 mg G0-HCl soli (0,2 mmol, 1,0 ekv.), 4,8 ml DMF a 4 ml DMSO. 0,4 ml DIPEA (2,0 mmol, 10,0 ekv.), 0,363 g monomeru (1,0 mmol, 5,0 ekv.), 0,381 g HBTU (1,0 mmol, 5,0 ekv.) a 0,175 g HOBt hydrátu (1,0 mmol, 5,0 ekv.). Reakční čas byl 14 h a vhodnou mobilní fází směs CHCl₃/MeOH 20/1, která se během eluce změnila na 10/1.

Bylo izolováno 0,3 g (výtěžek 90 %). $R_f = 0,37$ v $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$ (10/1). Mp: 90-91 °C. ESI-MS (m/z): 882.7 ($\text{M}+2\text{Na}$)²⁺, 1742.1 ($\text{M}+\text{Na}$)⁺. ¹H NMR (CDCl_3 , 500MHz), δ/ppm : 7.68, (bs, 2H), 6.31 (bs, 4H), 6.02 (bs, 8H), 3.43 (s, 4H), 3.32 (q, 8H, $J=6$ Hz), 3.21 (bs, 4H), 3.18 (m, 16H), 3.34 (bs, 8H), 3.00 (bs, 8H), 2.68 (bs, 16H), 1.41 (s, 72H) ¹³C NMR (CDCl_3 , 125 MHz) δ 172.9, 157.0, 78.7, 58.8, 55.6, 55.1, 40.1, 39.2, 38.8, 38.0, 28.4. IR (ATR) 3319, 2975, 2934, 1691, 1658, 1526, 1276, 1249, 1172 cm^{-1} .

Chlorid první generace, G1-HCl

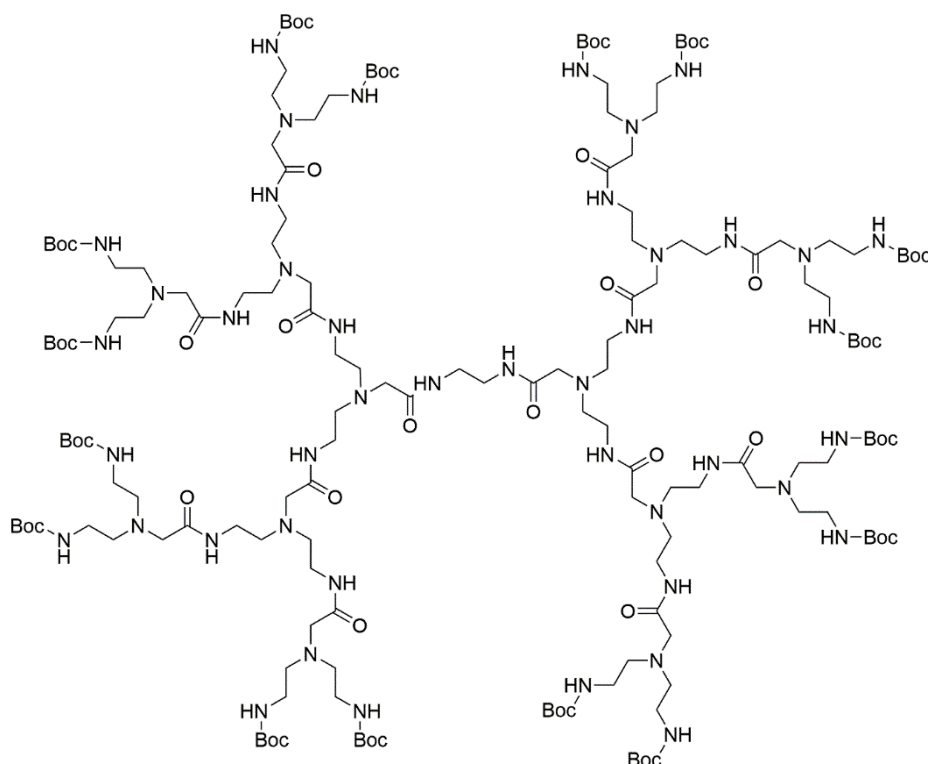


Reakce dle obecného postupu (4.3.6). 3,77 g G1-Boc (2,2 mmol, 1,0 ekv.), 60 ml 4M HCl v dioxanu (220 mmol, 100,0 ekv.). Reakční čas byl 14 h.

Bylo izolováno 3,05 g produktu (výtěžek 99 %). Mp: 156-157 °C, ¹H NMR (D_2O , 500 MHz), δ/ppm : 4.34 (s, 4H), 3.68 (t, 8H, $J=6.0$ Hz), 3.48 (t, 8H, $J=6.0$ Hz), 3.48 (s, 8H), 3.22 (s, 4H), 3.20 (t, 16H, $J=6.5$ Hz), 3.18 (t, 16H, $J=6.5$ Hz) ¹³C NMR (D_2O , 125 MHz) δ 176.2, 166.6, 57.0, 55.1, 55.2, 52.4, 40.0, 37.2, 35.2, 30.4, IR (ATR) 3072, 1680, 1542, 1213, 1132 cm^{-1} .

4.3.7 G2-Boc a G2-HCl

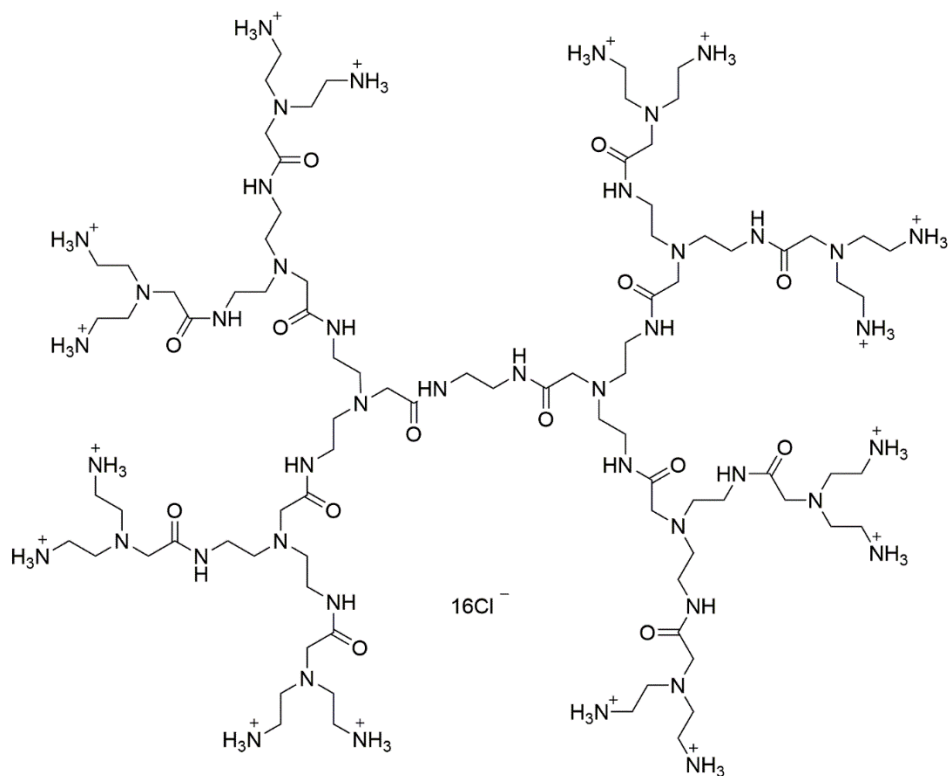
Boc-chráněná druhá generace, G2-Boc



Reakce dle obecného postupu (4.3.7). 2,8 g G1-HCl soli (2,3 mmol, 1,0 ekv.), 65 ml DMSO, 7,8 ml DIPEA (44,8 mmol, 20,0 ekv.), 8,1 g monomeru (23 mmol, 10,0 ekv.), 8,2 g HBTU (23 mmol, 10,0 ekv.) a 3,9 g HOBt hydrátu (23 mmol, 10,0 ekv.). Reakční čas byl 14 h a vhodnou mobilní fází směs $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$ 10/1.

Bylo izolováno 3,4 g produktu (výtěžek 40 %). $R_f = 0,3$ v $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$ (7/1). Mp: 125-126 °C. ESI-MS (m/z): 1244.9 ($\text{M}+3\text{Na}$)³⁺, 1855.7 ($\text{M}+2\text{Na}$)²⁺, ¹H NMR (CDCl_3 , 500MHz), δ /ppm: 3.28 (m, 40H), 3.19 (bs, 16H), 3.12 (s, 16H), 2.72 (m, 24H), 2.58 (s, 32H), 1.50 (s, 144H) ¹³C NMR (CDCl_3 , 125 MHz) δ 171.8, 156.6, 79.1, 59.0, 55.5, 39.6, 38.5, 37.8, 28.8. IR (ATR) 3306, 2977, 2943, 1687, 1654, 1525, 1273, 1248, 1169 cm^{-1} .

Chlorid druhé generace, G2-HCl

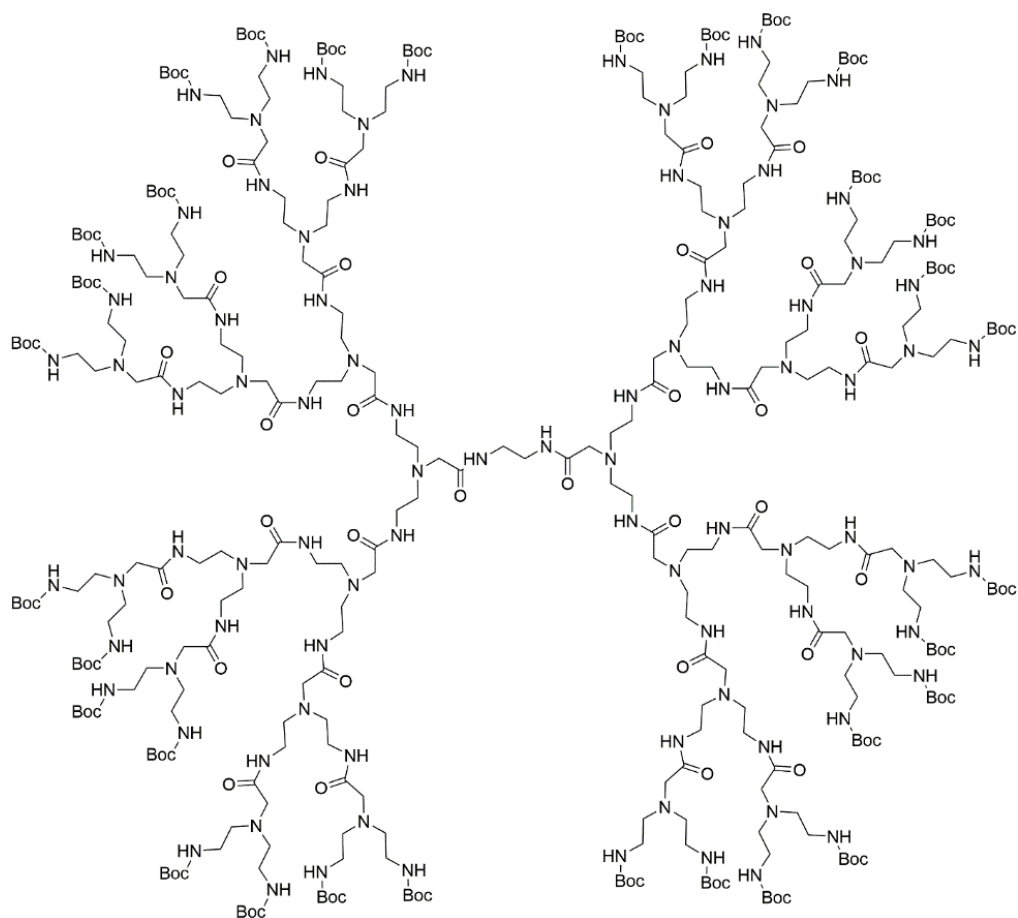


Reakce dle obecného postupu (4.3.6). 2,4 g G2-Boc (0,65 mmol, 1,0 ekv.), 50 ml 4M HCl v dioxanu (200 mmol, 300,0 ekv.). Reakční čas byl 14 h.

Bylo izolováno 1,7 g produktu (výtěžek 99 %). Mp: 182-183 °C, ¹H NMR (D₂O, 500 MHz), δ/ppm: 4.29 (s, 8H), 4.35 (s, 4H), 3.74 (s, 16H), 3.68 (t, 16H, J=6.0 Hz), 3.60 (s, 16H), 3.56 (m, 24H), 3.53 (s, 4H), 3.33 (t, 32H, J=6.5 Hz), 3.08 (t, 32H, J=6.5 Hz), 2.22 (s, 48H) ¹³C NMR (D₂O, 125 MHz) δ 174.4, 166.8, 165.6, 67.3, 55.9, 55.6, 54.9, 54.2, 52.6, 36.4, 35.0, 30.7, IR (ATR) 2992, 1670, 1542, 1203, 1132 cm⁻¹.

4.3.8 G3-Boc a G3-HCl

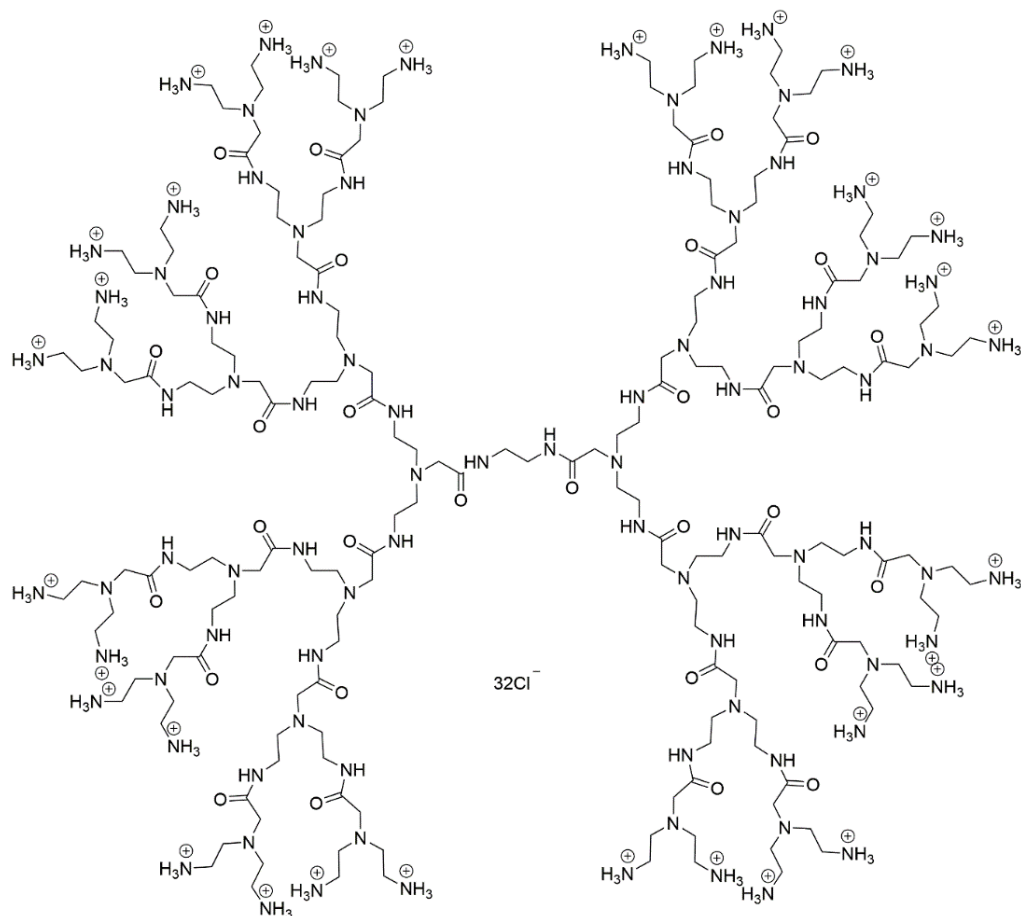
Boc-chráněná třetí generace, G3-Boc



Reakce dle obecného postupu (4.3.7). 1,8 g G2-HCl soli (0,68 mmol, 1,0 ekv.), 45 ml DMSO, 4,81 ml DIPEA (27,6 mmol, 40,0 ekv.). 4,8 g monomeru (14 mmol, 20,0 ekv.), 5,0 g HBTU (14 mmol, 20,0 ekv.) a 2,3 g HOBt hydrátu (14 mmol, 20,0 ekv.). Reakční čas byl 26 h a vhodnou mobilní fází CHCl₃/MeOH 10/1, která se během eluce změní až na 2/1.

Bylo izolováno 1,7 g G3-Boc (výtěžek 32 %). $R_f = 0,1$ v CHCl₃/MeOH (5/1). Mp: 120-121 °C. ESI-MS (m/z): 706.2 (M+9Na+2H)¹¹⁺. ¹H NMR (CDCl₃, 500MHz), δ /ppm: 3.32-3.08 (m, 184H), 2.66 (m, 56H), 2.62 (s, 64H), 1.41 (s, 288H) ¹³C NMR (CDCl₃, 125 MHz) δ 171.8, 156.6, 78.9, 58.9, 55.3, 54.8, 39.5, 38.6, 37.8, 37.6, 28.4 IR (ATR) 3309, 2967, 2929, 1692, 1659, 1526, 1280, 1252, 1168 cm⁻¹.

Chlorid třetí generace, G3-HCl



Reakce dle obecného postupu (4.3.6). 1,6 g G3-Boc (0,2 mmol, 1,0 ekv.), 100 ml 4M HCl v dioxanu (400 mmol, 2000,0 ekv.). Reakční čas byl 24 h.

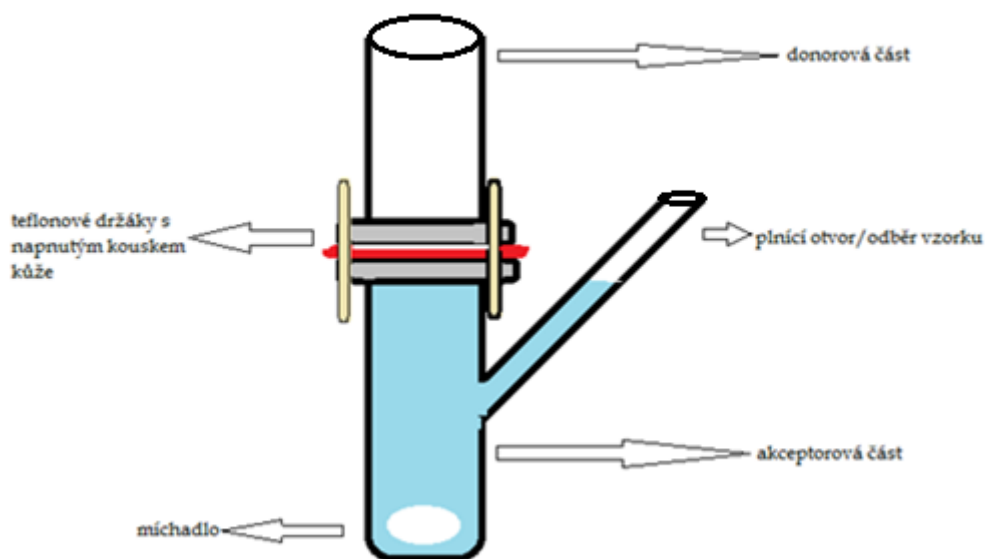
Bylo izolováno 1,2 g produktu (výtěžek 99 %). Mp: 207-209 °C ^1H NMR (D_2O , 600 MHz), δ /ppm: 3.80 – 3,68 (m, 84H), 3.61 - 3.58 (m, 92H), 3.32 (t, 64H, $J=6.0$ Hz), 3.12 (t, 64H, $J=6.0$ Hz) ^{13}C NMR (D_2O , 200 MHz) δ 174.2, 166.3, 166,1, 165.7, 72.1, 71.5, 66.9, 63.1, 60.7, 57.3, 55.6, 55.0, 54.1, 53.1, 43.9, 37.2, 35.0, 30.4 IR (ATR) 3061, 1667, 1540, 1205, 1132 cm^{-1} .

4.4 Permeace

Po nasyntetizování dendrimerů se provedly *ex-vivo* permeační pokusy. K testování se používaly chloridové soli dendrimerů druhé a třetí generace (G2-HCl, G3-HCl) a léčivo 5-FU. Experiment probíhal ve Franzových difuzních celách a membránu tvořila lidská kůže.

4.4.1 Franzovy difuzní cely

Cely se skládají ze dvou částí – horní (donorové) a spodní (akceptorové). Jsou tvořeny inertním materiálem, jako je sklo a teflon. Ze spodní části cely vede raménko, které slouží jako plnicí otvor nebo je používáno pro odběr vzorků. Ve spodní části se nachází míchadlo, které zajišťuje homogenitu akceptorové fáze. Kůže je mezi horní a spodní část připevněna pomocí držáků, na které je fixována silikonovou vazelínou a zajištěna pomocí gumiček. Držáky v sobě mají otvory, které vymezují permeační plochu. Dermis směřuje do akceptorové fáze.⁵⁴



Obrázek 12: Schéma Franzovy difuzní cely

4.4.2 Kůže

Lidská kůže pro permeační pokusy pocházela z abdominoplastik provedených v Prvním privátním chirurgickém centru s.r.o. Sanus v Hradci Králové. Veškerý proces odběru kůže probíhal v souladu s pravidly schválenými Etickou komisí při Prvním privátním chirurgickém centru s.r.o. Sanus, Hradec Králové a dle principů Helsinské deklarace. Po transportu byl z kůže odstraněn podkožní tuk a po omytí a osušení byla kůže skladována při -20 °C.

4.4.3 Průběh experimentu

V den experimentu se kůže rozmrazí, nařeže na čtverečky o rozměru přibližně 2×2 cm. Tyto kousky se napnou mezi dva teflonové držáky Franzových difuzních cel s aplikační plochou 1 cm² a zafixují silikonovou vazelínou. Držáky s kousky kůže se upevní mezi donorovou a akceptorovou část cel pomocí gumiček. Akceptorová část cel se naplní fosfátovým pufrům (10 mM, pH 7,4), ten simuluje fyziologické prostředí, s přidávkem gentamicinu (0,005 %), který se využívá kvůli protimikrobní stabilitě. Nesmí dojít k tvorbě vzduchových bublinek. Přípravené Franzovy cely se umístí na magnetický plát do lázně s destilovanou vodou. Lázeň je temperována tak, aby teplota kůže byla 32 °C, což teplota odpovídající povrchu lidské kůže.⁵⁵ Takto se ponechají po dobu 10 h, tedy do nanesení vzorku.

Testování 5-FU s dendrimery probíhalo na 24 celách, přičemž na 6 se testoval G2-HCl o koncentraci 5 mg/ml, na dalších 6 celách G2-HCl 10 mg/ml. Druhá polovina byla pro G3-HCl rozdělena opět dle dvou různých koncentrací 5 mg/ml a 10 mg/ml. Jako vehikulum byl použit 60% propylenglykol (PG). Šest kontrolních cel obsahovalo 5-FU v 60% PG. Všechny roztoky obsahovaly 5-FU o koncentraci 4,75 mg/ml.

Od každého vzorku bylo nanášeno 100 µl na povrch terčíku kůže a ponecháno na 24 h při stálé teplotě 32 °C. Následně bylo odebráno 0,5 ml akceptorové fáze. Po rozebrání cel se z použitých kousků kůže vysekla permeační plocha. Epidermis a dermis byly od sebe odděleny tepelně (80 °C) za pomoci pinzet. Obě vrstvy kůže byly zváženy a následovala extrakce do acetonitrilu (ACN). V případě epidermis byly použity 2 ml ACN a v případě dermis 5 ml ACN. Po 24 h vytřepávání se provedla filtrace extrakčního činidla přes vatou a poté proběhla analýza HPLC.

4.4.4 Analýza experimentu

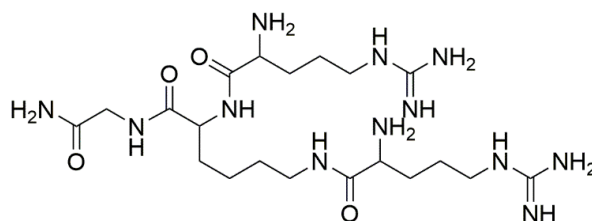
K analýze epidermis a dermis byla využita kolona ZIC-HILIC, 5 μm , 200 \AA , 150 \times 4,6 mm, teplota 45 $^{\circ}\text{C}$, mobilní fáze aceton: acetátový pufr 95:5 (2,5 mM, pH 4), průtok 0,75 ml/min. Nástřik činil 50 μl . Doba analýzy byla 15 min u epidermis a 30 min u dermis. UV detekce probíhala při 264 nm s retenčním časem 5-FU 5,3 min. Rozsah kalibrační křivky byl 0,01-5 $\mu\text{g/ml}$ ($R^2=0,9999855$).

K analýze akceptorové fáze byla použita kolona Lichrospher 250 \times 4 mm, 5 μm , teplota 35 $^{\circ}\text{C}$, mobilní fáze 5% MeOH v H₂O, průtok 1 ml/min. Nástřik činil 50 μl . Doba analýzy byla 30 min. UV detekce probíhala při 265 nm s retenčním časem 5-FU 3,6 min. Rozsah kalibrační křivky byl 0,05-50 $\mu\text{g/ml}$ ($R^2= 0,9999895$).

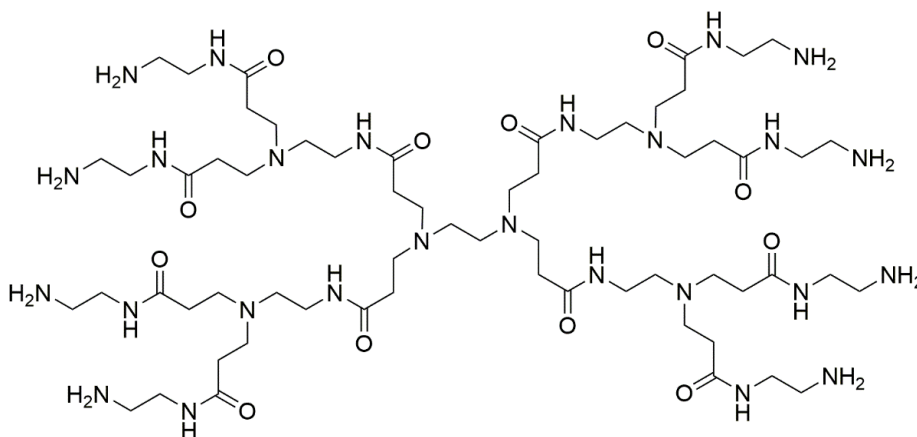
5. VÝSLEDKY A DISKUZE

Dendrimery jsou látky vhodné pro transport léčivých látek přes kůži nebo do ní, jak bylo již dříve zmíněno (viz 3.5.1). Jako akceleranty (trans)dermální permeace byly hojně studovány převážně peptidické (Obrázek 13) a PAMAM (Obrázek 14) dendrimery. Právě od jejich struktur byly během předešlé práce odvozené nové dendritické molekuly (Obrázek 15).⁵⁶ Mezi jejich společné specifické charakteristiky, které jsou klíčové pro (trans)dermální permeaci, patří:

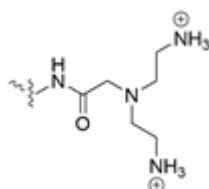
- Amidové vazby mezi jednotlivými generacemi dendrimerů
- Krátké alifatické řetězce spojující funkční skupiny
- Amin skupiny na periferním konci molekul



Obrázek 13: Peptidický dendrimer (Gly-Lys-(Arg)₂)

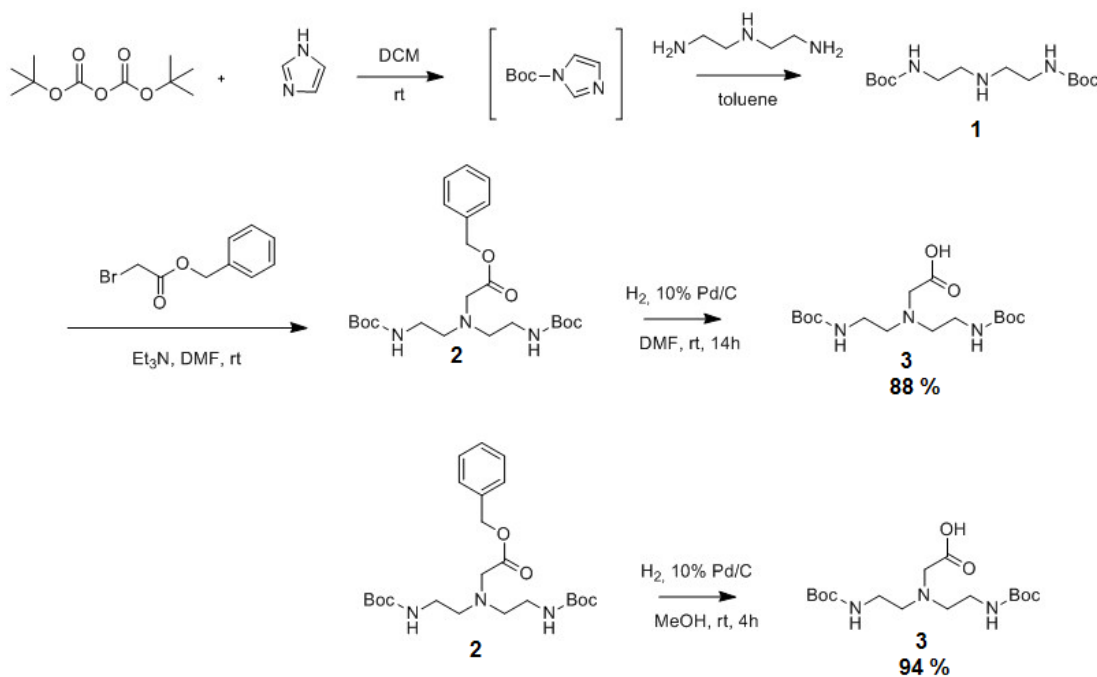


Obrázek 14: PAMAM dendrimer (G1)



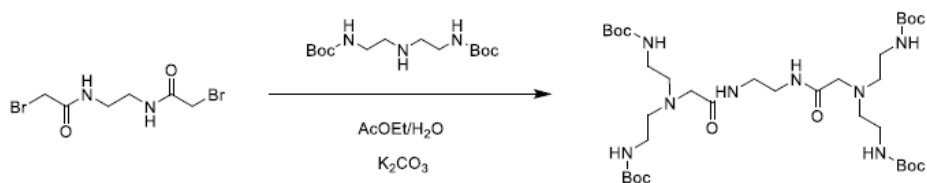
Obrázek 15: Strukturální charakteristika nových dendrimerů

K přípravě těchto nových dendrimerů byla navržena syntéza monomeru, kterým je bis(2-((*tert*-butoxykarbonyl)amino)ethyl)glycin (Obrázek 16, struktura 3). Nejenže zachovává strukturu aminokyselin (karboxyskupinu a aminoskupinu), ale také obsahuje dusík v místě větvení. Syntéza takového monomeru se skládala ze tří kroků. Během této práce byla použita stejná struktura monomeru. Jeho příprava se lišila pouze v posledním kroku, kdy bylo rozpouštědlo DMF nahrazeno MeOH. Tím se podařilo zkrátit reakční čas na 4 h (z původních 14 h) a zároveň došlo ke zvýšení výtěžku na 94 % (z původních 88 %). Tento pozitivní efekt byl nejspíš zapříčiněn vyšší rozpustností H₂ v tomto rozpouštědle.⁵⁷ Je ale nutné zmínit, že MeOH je vysoce hořlavým rozpouštědlem a podmínky při provádění dané reakce musí být přísně inertní.



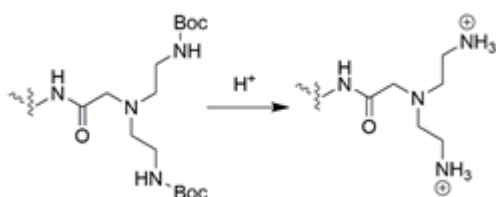
Obrázek 16: Schéma syntézy monomeru (znázorňuje odlišný poslední krok syntézy)

Při přípravě G0-Boc (Obrázek 17) došlo k navázání *N*, *N'*-Bis(*tert*-butoxykarbonyl)diethylentriaminu (Obrázek 16, struktura 1) na 1,2-bis(bromoacetyl)amino)ethan. Tato reakce probíhala ve dvoufázovém systému EtOAc/H₂O za přítomnosti K₂CO₃ jako báze.



Obrázek 17: Schéma syntézy G0-Boc

Pro přípravu další generace dendrimera je vždy nutné nejprve „odchránit“ funkční skupinu (aminoskupinu). Pro odstranění Boc-skupiny je zapotřebí silné kyseliny (Obrázek 18).



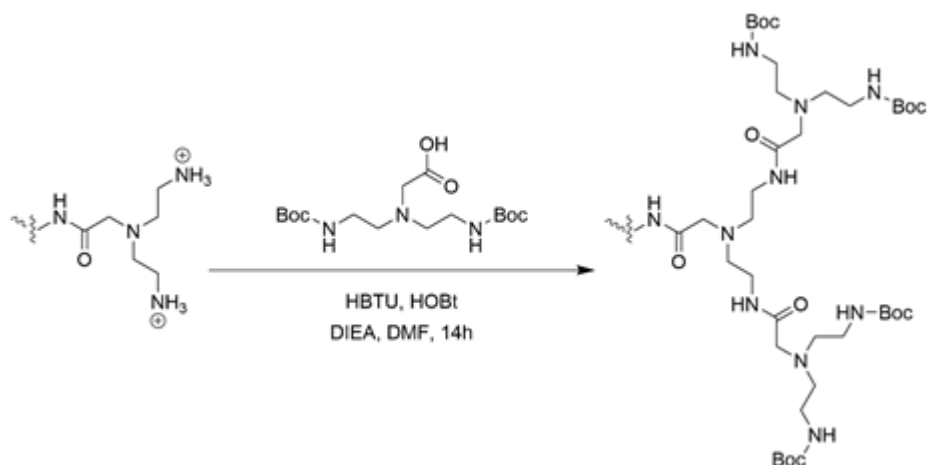
Obrázek 18: Deprotekce funkční skupiny dendrimera

Dříve se využívala kyselina trifluoroctová (TFA). Dendrimery byly ve formě solí GX-TFA použity pro testování permeace. Kvůli důkazům o možné cytotoxicitě soli TFA⁵⁸ a také případné interakci a změně konformace proteinů a peptidů, způsobené snížením pH⁵⁹⁻⁶¹, jsou navrhovány alternativní anionty.⁶² Mezi možné anionty, které jsou dostatečně biokompatibilní, patří chloridy (Cl⁻). Boc-deprotektce byla tedy provedena pomocí kyseliny chlorovodíkové (4M HCl v dioxanu) za vzniku chloridů dendrimerů. Použití tohoto reakčního činidla dokonce způsobilo zvýšení výtěžnosti reakcí, jak je uvedeno v tabulce číslo 1.

Sloučenina	Výtěžek (%)	Sloučenina	Výtěžek (%)
G0-TFA	87	G0-HCl	98
G1-Boc	48	G1-Boc	90
G1-TFA	91	G1-HCl	99
G2-Boc	37	G2-Boc	40
G2-TFA	87	G2-HCl	99
G3-Boc	25	G3-Boc	32
G3-TFA	95	G3-HCl	99

Tabulka 1: Porovnání výtěžků při použití minulého a současného postupu deprotektce

Po deprotekcii dendrimeru je možné navázat aktivovaný monomer (Obrázek 16, struktura 3) a vytvořit další generaci. Dochází ke tvorbě amidové vazby mezi monomerem a amonnou solí dendrimeru (Obrázek 19). Tato generace je opět na periferii chráněna Boc-skupinou. Ta může být následně odstraněna již zmíněným způsobem, čímž vzniká sůl dendrimeru další generace.



Obrázek 19: Tvorba další generace dendrimeru

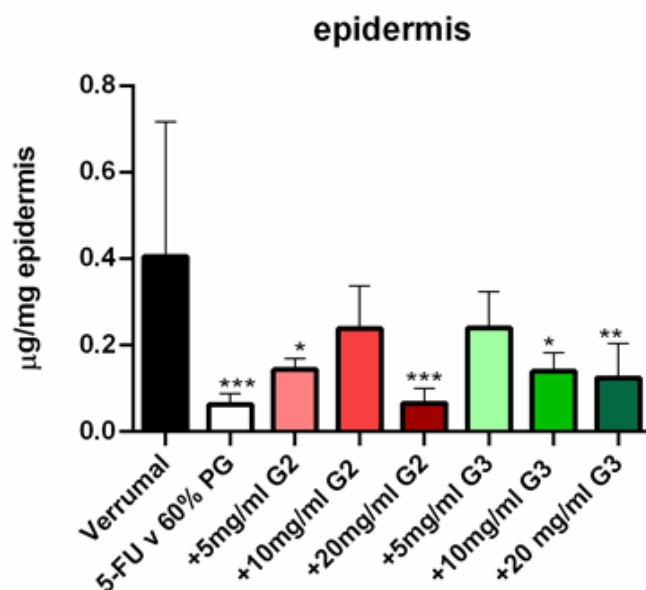
Tímto způsobem se podařilo nasyntetizovat čtyři generace dendrimerů (G0-HCl, G1-HCl, G2-HCl, G3-HCl). Proběhl pokus připravit stejným způsobem i dendrimer čtvrté generace (G4-HCl). Jedná se o molekulu s výrazně větším množstvím periferních aminoskupin, a proto se reakce nechala probíhat 72 h. Přesto se dle spektroskopických výsledků nepodařilo sloučeninu izolovat. Případně by bylo možné zvýšit teplotu reakce nebo jiným způsobem upravit podmínky. Reakce nebyla opakována, neboť se nejednalo o cíl této práce.

Jedním z cílů této práce bylo provést permeační pokus s G2-HCl a G3-HCl v různých koncentracích. Výběr těchto dvou generací dendrimerů vycházel z předešlého experimentu, který zkoumal všechny čtyři zmíněné generace pouze v koncentraci 20 mg/ml.⁶³ Z tohoto výzkumu je patrné, že právě druhá a třetí generace jsou schopny dodat do epidermis větší množství účinné látky než generace nižší. Vyvstala hypotéza, že zvolená koncentrace dendrimerů nebyla optimální pro transport dostatečného množství léčiva. Dle dostupné literatury není stanovena specifická koncentrace dendrimeru pro zlepšení výsledků.

Experiment probíhal ve dvou různých koncentracích – 5 mg/ml a 10 mg/ml. Jako rozpouštědlo a zároveň nosič byl zvolen 60% vodný roztok PG. Jedná se o často využívanou složku farmaceutických přípravků, která zlepšuje rozpustnost látek se špatnou rozpustností, a dokonce působí jako akcelerant permeace při topickém podání.⁶⁴ Není však jasné, jakým konkrétním mechanismem PG působí.⁶⁵ Jako kontrola sloužily vzorky obsahující léčivo 5-FU v 60% PG. Ve všech formulacích byla použita koncentrace 5-FU 4,75 mg/ml. Jedná se o koncentraci odpovídající komerčně dostupnému léčivému přípravku Verrumal. Tento přípravek byl rovněž použit pro porovnání výsledků permeačního experimentu.

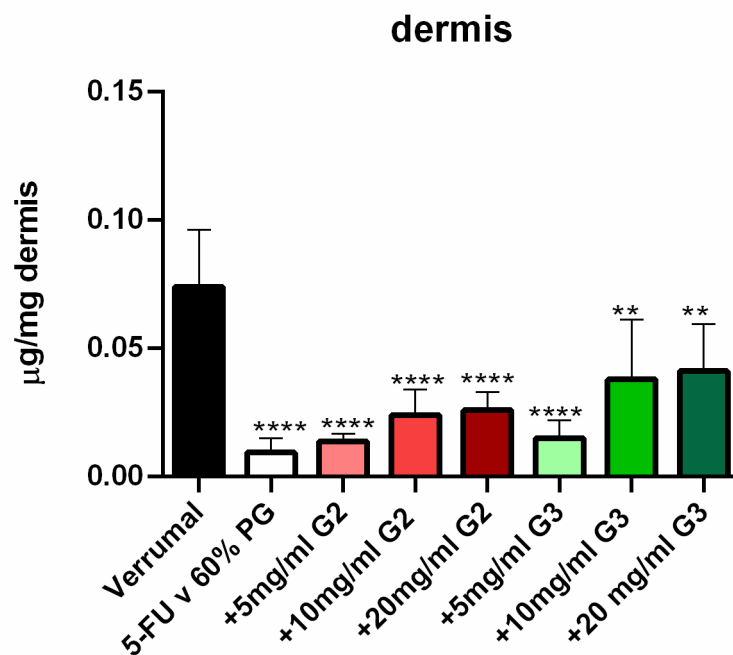
Topické podání léčiva 5-FU se používá k léčbě několika kožních onemocnění způsobených hyperproliferační keratinocytů.⁶⁶ Tato porucha je lokalizována v epidermis. Vhodná formulace by měla selektivně cílit převážně na tuto vrstvu kůže. Měla by zvýšit hladiny léčivé látky v epidermis a nedeponovat léčivo v dermis či dokonce jej doručit až do krevního oběhu.

Následující grafy znázorňují výsledky permeačního experimentu, tedy prostupu léčivé látky do epidermis, dermis i akceptorové fáze. Na grafech můžeme vidět tři různé koncentrace u obou generací dendrimerů. Hodnoty u koncentrace 20 mg/ml a Verrumalu jsou ze zmiňovaného dřívějšího pokusu a v grafu jsou využity pro zlepšení přehlednosti.



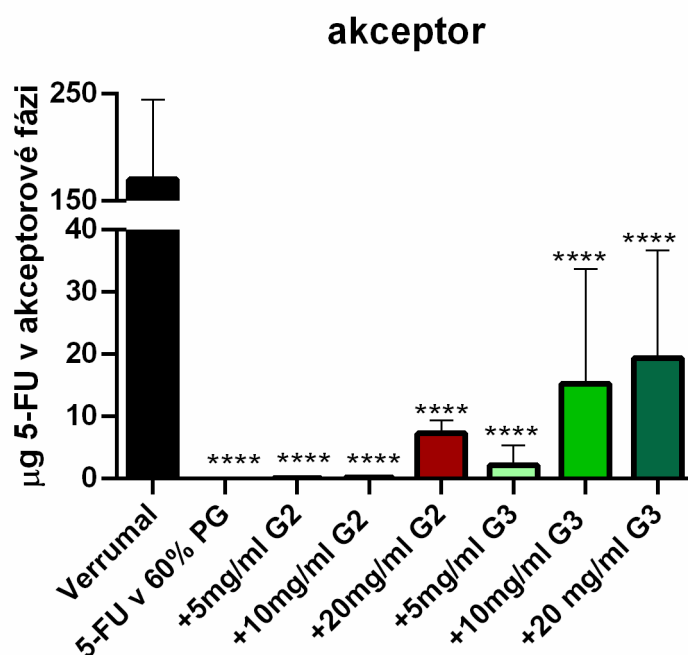
Obrázek 20: Množství 5-FU v epidermis

Epidermis je vrstvou kůže, na kterou je vhodné cílit léčivo 5-FU. Formulace obsahující 5 mg/ml a 10 mg/ml G2-HCl doručily do epidermis $0,143 \pm 0,012 \mu\text{g}$ a $0,239 \pm 0,049 \mu\text{g}$ 5-FU na 1 mg tkáň. Tyto hodnoty jsou významně vyšší než množství 5-FU, které bylo doručeno pomocí formulace obsahující 20 mg/ml G2-HCl ($0,066 \pm 0,014 \mu\text{g}$) a kontrolním roztokem ($0,062 \pm 0,011 \mu\text{g}$). Dokonce formulace obsahující 10 mg/ml G2-HCl je do epidermis pravděpodobně schopna doručit množství 5-FU srovnatelné s komerčně dostupným Verrumalem ($0,405 \pm 0,128 \mu\text{g}$), neboť mezi naměřenými hodnotami těchto dvou formulací není statisticky významný rozdíl. Formulace obsahující 5 mg/ml a 10 mg/ml G3-HCl doručily $0,240 \pm 0,037 \mu\text{g}$ a $0,139 \pm 0,025 \mu\text{g}$ 5-FU na 1 mg epidermis. Podobně jako u formulace s 10 mg/ml G2-HCl jsou hodnoty formulace s 5 mg/ml G3-HCl srovnatelné s množstvím účinné látky doručené Verrumalem, tedy bez statisticky významného rozdílu. Na druhou stranu je množství 5-FU doručeno do tkáň formulací s 10 mg/ml G3-HCl statisticky porovnatelné s množstvím doručeno formulací s 20 mg/ml G3-HCl ($0,125 \pm 0,032 \mu\text{g}$) a kontrolním roztokem 5-FU v 60% PG ($0,062 \pm 0,011 \mu\text{g}$).



Obrázek 21: Množství 5-FU v dermis

Další zkoumanou vrstvou kůže byla dermis. Jak je patrné z grafu na Obrázku 21, vzrůstající trend ukládání účinné látky 5-FU zde závisí jak na generaci dendrimery, tak na koncentraci dendrimery v přípravku. Hladiny 5-FU přípravků s G2-HCl (5 mg/ml, 10 mg/ml a 20 mg/ml) dosahují $0,014 \pm 0,001 \mu\text{g}$, $0,024 \pm 0,005 \mu\text{g}$ a $0,026 \pm 0,003 \mu\text{g}$ na 1 mg dermis. Přípravky obsahující G3-HCl (5 mg/ml, 10 mg/ml a 20 mg/ml) doručily $0,015 \pm 0,003 \mu\text{g}$, $0,038 \pm 0,010 \mu\text{g}$ a $0,041 \pm 0,007 \mu\text{g}$ léčiva na 1 mg tkáně. Nejvyšších hladin dosahoval roztok Verrumal $0,074 \pm 0,009 \mu\text{g}$ a nejnižších kontrolní roztok 5-FU v 60% PG $0,009 \pm 0,002 \mu\text{g/mg}$ dermis. Z výsledků plyne, že všechny formulace s dendrimery, nehledě na generaci či koncentraci dendrimerů, doručily do dermis významně nižší množství účinné látky 5-FU než komerčně dostupný přípravek.



Obrázek 22: Množství 5-FU v akceptorové fázi

Depozice léčiva 5-FU v akceptorové fázi je zobrazena na grafu Obrázku 22. Hladiny 5-FU po aplikaci přípravku Verrumal jsou opět nejvyšší ($170,0 \pm 30,5 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ kůže). Množství léčiva doručeného kontrolním vzorkem 5-FU v 60% roztoku PG bylo nedetekovatelné. Podobně tomu bylo v případě formulace 5 mg/ml G2-HCl a 10mg/ml G2-HCl (hodnoty na hranici detekovatelnosti). Tyto výsledky jsou výhodnější než hodnota 5-FU v akceptorové fázi při použití formulace s 20 mg/ml G2-HCl ($7,309 \pm 0,840 \mu\text{g}$). Množství 5-FU, které prošlo do akceptorové fáze za přítomnosti 5 mg/ml G3-HCl a 10 mg/ml G3-HCl bylo $2,19 \pm 1,4 \mu\text{g}$ a $15,27 \pm 8,25 \mu\text{g}$. Nebyl nalezen statisticky významný rozdíl mezi těmito formulacemi a formulací s 20 mg/ml G3-HCl ($19,360 \pm 7,010 \mu\text{g}$). Ve všech případech aplikace dendrimerů je množství účinné látky v akceptorové fázi výrazně nižší než v případě aplikace přípravku Verrumal.

Z výsledků toho experimentu lze vyhodnotit, že přípravky obsahující dendrimery G2-HCl v koncentraci 5 mg/ml a G3-HCl v koncentraci 10 mg/ml jsou výhodné pro topickou aplikaci 5-FU. Ukládají do pokožky srovnatelné množství léčivé látky jako komerčně dostupný léčivý přípravek Verrumal, zároveň bylo detekováno výrazně nižší množství 5-FU v dermis a v akceptorové fázi.

Výsledky potvrzují původní hypotézu, že kromě zvolené generace dendrimerů je i volba koncentrace dendrimerů stěžejní a že vyšší koncentrace nutně neznamená doručení většího množství účinné látky do různých vrstev kůže.

Předmětem dalšího studia polyamidoaminodendrimerů s ethylendiaminovým jádrem a aminoskupinami na periferii bude provedení permeačního pokusu se všemi třemi zvolenými koncentracemi formulací během jednoho experimentu. Tím by byla prokázána reprodukovatelnost těchto výsledků.

6. ZÁVĚR

Byly připraveny a definovány čtyři generace dendrimerů s ethylendiaminovým jádrem a periferními aminoskupinami odvozené od struktury peptidických a PAMAM dendrimerů. Nové molekuly zachovávají funkční aminoskupiny na periférii, amidové vazby mezi jednotlivými generacemi a jsou spojené krátkými alifatickými řetězci. U těchto dendritických molekul ve formě chloridových solí se předpokládá snížení toxicity při kožním podání oproti dříve testovaným solím trifluoroctové kyseliny.

Permeační experiment s léčivem 5-fluorouracilem prokázal, že se jedná o akceleranty (trans)dermálního podání, které jsou, v závislosti na koncentraci dendrimeru, schopny poměrně selektivně ukládat účinnou látku do epidermis a pravděpodobně tak snížit systémové nežádoucí účinky tohoto léčiva oproti komerčně dostupnému přípravku.

Jako nejvhodnější se jeví formulace o koncentraci 10 mg/ml G2-HCl a 5 mg/ml G3-HCl v 60% vodném roztoku propylenglykolu, u kterých je patrný největší rozdíl v transportu léčivé látky do epidermis, dermis a akceptorové fáze.

V budoucnu by bylo vhodné provést permeační pokus G2-HCl a G3-HCl dendrimerů v koncentraci 5 mg/ml, 10 mg/ml i 20 mg/ml během jednoho experimentu za účelem potvrdit reprodukovatelnost výsledků.

7. LITERATURA

1. TORTORA, G. J. AND DERRICKSON, B. Principles Of Anatomy And Physiology. Hoboken: Wiley, 2009, 149-174. 12th Ed. ISBN 978-0470084717.
2. KITTNAR, O. Lékařská fyziologie. Praha: Grada, 2011, 473-476. ISBN 978-80-247-3068-4.
3. VÁVROVÁ, K., HRABÁLEK, A. Role ceramidů v kůži. Praktické lékařství. 2006, **2**(2), 55-58.
4. HRABÁLEK, A., VÁVROVÁ, K. Lze překonat kožní bariéru? Praktické lékařství. 2005, **1**(1), 8-11.
5. ZÁHEJSKÝ, J. Zevní dermatologická terapie a kosmetika: pohledy klinické, fyziologické a biologické. Praha: Grada, 2006, 13-15. ISBN 80-247-1551-1.
6. BARONI, A., BUOMMINO, E., DE GREGORIO, V., RUOCCO, E., RUOCCO, V., & WOLF, R., Structure and function of the epidermis related to barrier properties. Clinics in Dermatology. 2012, **30**(3), 257-262. doi: 10.1016/j.clindermatol.2011.08.007
7. HILLERY, A. M., PARK, K. Drug Delivery: Fundamentals and Applications. 2nd Ed. Boca Raton: CRC Press. 2017, 215-228. ISBN: 978-1482217711
8. BÄSLER, K., BERGMANN, S., HEISIG, M., NAEGEL, A., ZORN-KRUPPA, M., & BRANDNER, J. M. The role of tight junctions in skin barrier function and dermal absorption. Journal of Controlled Release. 2016, **242**, 105–118. doi: 10.1016/j.jconrel.2016.08.007
9. MATSUI, T., & AMAGAI, M. Dissecting the formation, structure and barrier function of the stratum corneum. International Immunology. 2015, **27**(6), 269–280. doi:10.1093/intimm/dxv013
10. SWARBRICK, J. Encyclopedia of pharmaceutical technology. 3rd ed. New York: Informa Healthcare. 2007, 1311-1325. ISBN 9780849393990.
11. BROWN, M. B., MARTIN, G. P., JONES, S. A., & AKOMEAH, F. K. Dermal and Transdermal Drug Delivery Systems: Current and Future Prospects. Drug Delivery, 2006, **13**(3), 175–187. doi:10.1080/10717540500455975
12. BARRY, B. W. Novel mechanisms and devices to enable successful transdermal drug delivery. European Journal of Pharmaceutical Sciences, 2001, **14**(2), 101–114. doi:10.1016/s0928-0987(01)00167-1
13. Upraveno z Moghimi HR et al. A lamellar matrix model for stratum corneum intercellular lipids II. Effect of geometry of the stratum corneum on permeation of model drugs 5-fluorouracil and oestradiol. Int J Pharm 1996; **131**:117. Copyright Elsevier 1996. Dostupné z <https://basicmedicalkey.com/parenteral-routes-of-drug-administration/#c9-fig8>, [cit. 2020-01-11]

14. RAI, V. K., MISHRA, N., YADAV, K. S., & YADAV, N. P. Nanoemulsion as pharmaceutical carrier for dermal and transdermal drug delivery: Formulation development, stability issues, basic considerations and applications. *Journal of Controlled Release*, 2018, 270, 203–225. doi: 10.1016/j.jconrel.2017.11.049
15. WILLIAMS, A. C., & BARRY, B. W. Penetration enhancers. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 2004, 56(5), 603–618. doi: 10.1016/j.addr.2003.10.025
16. FINNIN, B. C.; MORGAN, T. M. Transdermal penetration enhancers: applications, limitations, and potential. *J. Pharm. Sci.* 1999, 88(10), 955–958.
17. THONG, H.-Y., ZHAI, H., & MAIBACH, H. I. Percutaneous Penetration Enhancers: An Overview. *Skin Pharmacology and Physiology*, 2007, 20(6), 272–282. doi:10.1159/000107575
18. KANIKKANNAN N., KANDIMALLA K., LAMBA S. S., SINGH M.: Structure-activity relationship of chemical penetration enhancers in transdermal drug delivery. *Curr Med Chem.* 2000; 7: 593–608. doi: 10.2174/0929867003374840
19. SUGIBAYASHI, K., MORIMOTO, Y. Polymers for transdermal drug delivery systems. *Journal of Controlled Release*, 1994, 29(1-2), 177–185. doi:10.1016/0168-3659(94)90134-1
20. AKIMOTO, T., & NAGASE, Y. Novel transdermal drug penetration enhancer: synthesis and enhancing effect of alkyldisiloxane compounds containing glucopyranosyl group. *Journal of Controlled Release*, 2003, 88(2), 243–252. doi:10.1016/s0168-3659(03)00006-3
21. DAVE, K., KRISHNA VENUGANTI, V. V. Dendritic polymers for dermal drug delivery. *Therapeutic Delivery*, 2017, 8(12), 1077–1096. doi:10.4155/tde-2017-0091
22. BOAS, U., HEEGAARD, P. M. H. Dendrimers in drug research. *Chemical Society Reviews*, 2004, 33(1), 43. doi:10.1039/b309043b
23. TOMALIA, D. A.; FRÉCHET, J. M. J. Discovery of Dendrimers and Dendritic Polymers: A Brief Historical Perspective. *J. Polym. Sci. Part Polym. Chem.* 2002, 40(16), 2719–2728.
24. TOMALIA, D. A., BAKER, H., DEWALD, J., HALL, M., KALLOS, G., MARTIN, S., RAECK, J., RYDER, J., SMITH, P. Dendritic macromolecules: synthesis of starburst dendrimers. *Macromolecules*, 1986, 19(9), 2466–2468. doi:10.1021/ma00163a029
25. Obrázek: Generation 2 PAMAM Dendrimer Dostupné z: <http://www.dendritech.com/pamam.html> [cit. 2020-08-10]
26. CHAUHAN, A. Dendrimers for Drug Delivery. *Molecules*, 2018, 23(4), 938. doi:10.3390/molecules23040938

27. YANG, Y., SUNOQROT, S., STOWELL C., JI, J., LEE C., KIM J. K., KHAN S. A., HONG, S. Effect of Size, Surface Charge, and Hydrophobicity of Poly(amidoamine) Dendrimers on Their Skin Penetration. *Biomacromolecules*. 2012, **13**(7), 2154-2162 doi: 10.1021/bm300545b
28. Upraveno z CHAUHAN, A. S. Dendrimer nanotechnology for enhanced formulation and controlled delivery of resveratrol. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 2015, **1348**(1), 134–140. doi:10.1111/nyas.12816
29. SVENSON, S., TOMALIA, D. Dendrimers in biomedical applications—reflections on the field. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 2005, **57**(15), 2106–2129. doi: 10.1016/j.addr.2005.09.018
30. JEVPRASESPHANT, R., PENNY, J., JALAL, R., ATTWOOD, D., MCKEOWN, N. B, D'EMANUELE, A. The influence of surface modification on the cytotoxicity of PAMAM dendrimers. *Int. J. Pharm*, 2003, **252** (1-2), 263–266. doi:10.1016/s0378-5173(02)00623-3
31. FISCHER, D., LI, Y., AHLEMEYER, B., KRIEGLSTEIN, J., KISSEL, T. In vitro cytotoxicity testing of polycations: influence of polymer structure on cell viability and hemolysis. *Biomaterials*, 2003, **24**(7), 1121–1131. doi:10.1016/s0142-9612(02)00445-3
32. MALIK, N., EVAGOROU, E. G., DUNCAN, R. Dendrimer-platinate: a novel approach to cancer chemotherapy. *Anticancer Drugs*, 1999, **10**(8), 767-76.
33. LIU, M., FRÉCHET, J. M. J. Designing dendrimers for drug delivery. *Pharmaceutical Science & Technology Today*, 1999, **2**(10), 393–401. doi:10.1016/s1461-5347(99)00203-5
34. WIENER, E., BRECHBIEL, M. W., BROTHERS, H., MAGIN, R. L., GANSOW, O. A., TOMALIA, D. A., LAUTERBUR, P. C. Dendrimer-based metal chelates: A new class of magnetic resonance imaging contrast agents. *Magnetic Resonance in Medicine*, 1994, **31**(1), 1–8. doi:10.1002/mrm.1910310102
35. BOURNE, N., STANBERRY, L. R., KERN, E. R., HOLAN, G., MATTHEWS, B., BERNSTEIN, D. I. Dendrimers, a New Class of Candidate Topical Microbicides with Activity against Herpes Simplex Virus Infection. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 2000, **44**(9), 2471–2474. doi:10.1128/aac.44.9.2471-2474.2000
36. CHEN, C. Z., COOPER, S. L. Interactions between dendrimer biocides and bacterial membranes. *Biomaterials*, 2002, **23**(16), 3359–3368. doi:10.1016/s0142-9612(02)00036-4
37. MACIEL, D., GUERRERO-BELTRÁN, C., CEÑA-DIEZ, R., TOMÁS, H., MUÑOZ-FERNÁNDEZ, M. Á., & RODRIGUES, J. M. New anionic poly(alkylidenamine) dendrimers as microbicide agents against HIV-1 infection. *Nanoscale*, 2019, **11**, 9679-9690. doi:10.1039/c9nr00303g

38. SLOAN K. B., WASDO S. C., RAUTIO J. Design for optimized topical delivery: prodrugs and a paradigm change. *Pharm. Res.*, 2006, **23**(12), 2729–2747. doi: 10.1007/s11095-006-9108-0
39. YIYUN, C., NA, M., TONGWEN, X., RONGQIANG, F., XUEYUAN, W., XIAOMIN, W., LONGPING, W. Transdermal Delivery of Nonsteroidal Anti-Inflammatory Drugs Mediated by Polyamidoamine (PAMAM) Dendrimers. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 2007, **96**(3), 595–602. doi:10.1002/jps.20745
40. CHAUHAN, A. S., SRIDEVI, S., CHALASANI, K. B., JAIN, A. K., JAIN, S. K., JAIN, N., DIWAN, P. V. Dendrimer-mediated transdermal delivery: enhanced bioavailability of indomethacin. *Journal of Controlled Release*, 2003, **90**(3), 335–343. doi:10.1016/s0168-3659(03)00200-1
41. BOROWSKA, K., WOŁOWIEC, S., RUBAJ, A., GŁOWNIAK, K., SIENIAWSKA, E., RADEJ, S. Effect of polyamidoamine dendrimer G3 and G4 on skin permeation of 8-methoxypsoralene—In vivo study. *International Journal of Pharmaceutics*, 2012, **426**(1-2), 280–283. doi: 10.1016/j.ijpharm.2012.01.041
42. BOROWSKA, K., WOŁOWIEC, S., GŁOWNIAK, K., SIENIAWSKA, E., RADEJ, S. Transdermal delivery of 8-methoxypsoralene mediated by polyamidoamine dendrimer G2.5 and G3.5—In vitro and in vivo study. *International Journal of Pharmaceutics*, 2012, **436**(1-2), 764–770. doi: 10.1016/j.ijpharm.2012.07.067
43. VENUGANTI, V. V. K., PERUMAL, O. P. Effect of poly(amidoamine) (PAMAM) dendrimer on skin permeation of 5-fluorouracil. *International Journal of Pharmaceutics*, 2008, **361**(1-2), 230–238. doi: 10.1016/j.ijpharm.2008.05.034
44. MUTALIK, S., SHETTY, P. K., KUMAR, A., KALRA, R., PAREKH, H. S. Enhancement in deposition and permeation of 5-fluorouracil through human epidermis assisted by peptide dendrimers. *Drug Delivery*, 2013, **21**(1), 44–54. doi:10.3109/10717544.2013.845861
45. SOWINSKA, M., URBANCZYK-LIPKOWSKA, Z. Advances in the chemistry of dendrimers. *New Journal of Chemistry*, 2014, **38**(6), 2168. doi:10.1039/c3nj01239e
46. WALTER, M. V., MALKOCH, M. Simplifying the synthesis of dendrimers: accelerated approaches. *Chemical Society Reviews*, 2012, **41**(13), 4593. doi:10.1039/c2cs35062a
47. BOAS, U., CHRISTENSEN, J. B., HEEGAARD, P. M. H. Dendrimers: design, synthesis and chemical properties. *Journal of Materials Chemistry*, 2006, **16**(38), 3785. doi:10.1039/b611813p
48. DE GENNES, P. G., HERVET, H. Statistics of « starburst » polymers. *Journal de Physique Lettres*, 1983, **44**(9), 351–360. doi:10.1051/jphyslet:01983004409035100

49. IHRE, H., PADILLA DE JESÚS, O. L., FRÉCHET, J. M. J. Fast and Convenient Divergent Synthesis of Aliphatic Ester Dendrimers by Anhydride Coupling. *Journal of the American Chemical Society*, 2001, **123**(25), 5908–5917. doi:10.1021/ja010524e
50. DUNCAN, R., IZZO, L. Dendrimer biocompatibility and toxicity. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 2005, **57**(15), 2215–2237. doi: 10.1016/j.addr.2005.09.019
51. NDINGURI, M., FRONCZEK, F., MARZILLI, P., CROWE, W., HAMMER R., MARZILLI, L. Exploring water-soluble Pt(II) complexes of diethylenetriamine derivatives functionalized at the central nitrogen. Synthesis, characterization, and reaction with 5'-GMP. *Inorganica Chimica Acta – INORG CHIM ACTA*. 2010, **363**, 1796–1804. doi: 10.1016/j.ica.2010.02.027
52. HAHN, F., SCHRÖDER, H., PAPE, T. Halido-Bridged Dinuclear Nickel and Zinc Complexes with a Bis(tripodal) Octaamine Ligand – Unusual Coordination Mode of an ortho Phenylenediamine. *European Journal of Inorganic Chemistry – EUR J INORG CHEM*. 2009, 4373–4377. doi:10.1002/ejic.200900656
53. HAHN, F. E., SCHRÖDER, H., PAPE, T., HUPKA, F. Zinc(II), Copper(II), and Nickel(II) Complexes of Bis(tripodal) Diamide Ligands – Reversible Switching of the Amide Coordination Mode upon Deprotonation. *European Journal of Inorganic Chemistry*. 2010, 2010(6), 909–917. doi:10.1002/ejic.200901145
54. FRANZ, T. J. Percutaneous Absorption. On the Relevance of in Vitro Data. *Journal of Investigative Dermatology*. 1975, **64**(3), 190–195. doi:10.1111/1523-1747.ep12533356
55. Environmental Health Criteria 235 – Dermal Absorption. Světová zdravotnická organizace. Geneva 2006. Dostupné z <http://www.inchem.org/documents/ehc/ehc/ehc235.pdf> [cit. 2020-07-08]
56. LANGEROVÁ, M. Nové polyamidoaminodendrimery s ethylendiaminovým jádrem a aminoskupinami na periférii: Syntéza a potenciální využití při (trans)dermálním přenosu léčiv. 2018. Hradec Králové. Diplomová práce. Univerzita Karlova. Farmaceutická fakulta.
57. DYSON, J. P., JESSOP, P. G. Solvent effects in catalysis: rational improvements of catalysts via manipulation of solvent interactions. *Catalysis Science & Technology*. 2016, **6**(10), 3302–3316. doi:10.1039/C5CY02197A
58. CORNISH, J., CALLON, K. E., LIN, C. Q., XIAO, C. L., MULVEY, T. B., COOPER, G. J, REID, I. R. Trifluoroacetate, a contaminant in purified proteins, inhibits proliferation of osteoblasts and chondrocytes. *The American Journal of Physiology*. 1999, **277**(5), E779-783. doi:10.1152/ajpendo.1999.277.5.E77
59. WADA, K., MIZUNO, T., OKU J.-I., TANAKA T. pH-induced conformational change in an alpha-helical coiled-coil is controlled by His residues in the hydrophobic

core. *Protein and Peptide Letters*. 2003, **10**(1), 27–33. doi:10.2174/0929866033408354

60. PACE, C. N., TREVIÑO S., PRABHAKARAN E., SCHOLTZ M. J. Protein structure, stability and solubility in water and other solvents. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological Sciences*. 2004, **359**(1448), 1225–1234; discussion 1234-1235. doi:10.1098/rstb.2004.1500

61. SHEN, C. L., FITZGERALD M. C., MURPHY R. M. Effect of acid predissolution on fibril size and fibril flexibility of synthetic beta-amyloid peptide. *Biophysical Journal*. 1994, **67**(3), 1238–1246. doi:10.1016/S0006-3495(94)80593-4

62. PINI, A., LOZZI L., BERNINI A., BRUNETTI, J., FALCIANI, SCALI S., BINDI, S., DI MAGGIO, T., ROSSOLINI, G. M., NICCOLAI, N., BRACCI, L. Efficacy and toxicity of the antimicrobial peptide M33 produced with different counter-ions. *Amino Acids*. 2012, **43**(1), 467–473. doi:10.1007/s00726-011-1103-z

63. HOUŠKOVÁ, D. Vliv generace polyamidoaminodendrimerů s ethylendiaminovým jádrem a aminoskupinami na periférii na (trans)dermální podání 5-fluorouracilu. 2020. Hradec Králové. Diplomová práce. Univerzita Karlova. Farmaceutická fakulta.

64. MCGOWAN, M. A., SCHEMAN, A., JACOB, S. E. Propylene Glycol in Contact Dermatitis. *Dermatitis*, 2018, **29**(1), 6–12. doi: 10.1097/der.0000000000000307

65. LANE, M. E. Skin penetration enhancers. *International Journal of Pharmaceutics*. 2013, **447**(1), 12–21. doi: 10.1016/j.ijpharm.2013.02.040

66. YEN MOORE, A. Clinical applications for topical 5-fluorouracil in the treatment of dermatological disorders. *Journal of Dermatological Treatment*, 2009, **20**(6), 328–335. doi: 10.3109/09546630902789326