

# P O L I M E R Y

MIESIĘCZNIK POŚWIĘCONY CHEMII, TECHNOLOGII I PRZETWÓRSTWU POLIMERÓW

PIOTR POLCYN<sup>1)</sup>, JOLANTA JANISZEWSKA<sup>2)</sup>, ANDRZEJ LIPKOWSKI<sup>2,3)</sup>,  
ZOFIA URBAŃCZYK-LIPKOWSKA<sup>1)\*</sup>

## Synteza, metody identyfikacji i wybrane medyczne zastosowania dendrymerów

**Streszczenie** — Na podstawie przeglądu literatury przedstawiono aktualny stan wiedzy na temat otrzymywania dendrymerów, metod ich charakteryzowania i perspektyw zastosowania w medycynie tej nowej klasy związków polimerycznych.

**Słowa kluczowe:** dendrymery, synteza rozbieżna, synteza zbieżna, nośniki substancji leczniczych, kuracja przeciwnowotworowa, środek kontrastujący w diagnostyce NMR.

SYNTHESES, METHODS OF IDENTIFICATION AND SELECTED MEDICAL APPLICATIONS OF DENDRIMERS

**Summary** — The present state of knowledge about the preparation, methods of characterization and the prospect of medical applications of dendrimers — a new class of polymeric compounds — is presented on the basis of literature review.

**Key words:** dendrimers, divergent synthesis, convergent synthesis, drug delivery carriers, anticancer therapy, NMR contrast reagent.

Dendrymery stanowią nową klasę rozgałęzionych polimerów. Są one zbudowane z centralnego rdzenia, koncentrycznie umieszczonych wokół niego elementów rozgałęziających oraz grup funkcyjnych znajdujących się na powierzchni. Uważa się, że dendrymery w przyszłości będą podstawą chemii nanoskopowej, pozwalającej na projektowanie i syntezę złożonych cząsteczek, które mogą zarówno kształtem, jak i funkcją naśladować układy biologiczne lub być źródłem tak poszukiwanych obecnie nowych materiałów.

Koncepcję syntezy wysokorozgałęzionych związków polimerycznych przedstawili na początku lat 40. Stock-

mayer i Flory [1]. Otrzymanie pierwszych małowymiarowych dendrymerycznych amin było jednak możliwe dopiero w latach 70. XX w. w zespole F. Voegtle [2].

Publikacja ta zainicjowała prace zespołu D. A. Tomalia (Dow Chemical Company) nad syntezą pierwszych wielkocząsteczkowych dendrymerów poli(amidoaminowych) typu PAMAM, wyniki prac opublikowano jednak dopiero w połowie lat osiemdziesiątych [3, 4]. Tomalia zaproponował używanie terminu „dendrymer” na określenie tej nowej grupy związków (z greckiego *dendros* — drzewo, *meros* — część), przyznając zresztą, że nazwa zainspirowana była jego hobby — ogrodnictwem. On również był „ojcem” metody syntezy dendrymerów nazywanej „metodą rozbieżną”, polegającej na dodawaniu kolejnych generacji dendrymeru do wyjściowego wielofunkcyjnego rdzenia. Do połowy lat osiemdziesiątych w Dow Chemicals otrzymano i scharakteryzowano dendrymery typu PAMAM o ciężarach cząs-

<sup>1)</sup> Instytut Chemii Organicznej PAN, ul. Kasprzaka 44, 01-224 Warszawa.

<sup>2)</sup> Instytut Chemii Przemysłowej, ul. Rydygiera 8, 01-793 Warszawa.

<sup>3)</sup> Instytut Medycyny Doświadczalnej i Klinicznej PAN im. M. Mossakowskiego, ul. Pawińskiego 5, 02-106 Warszawa.

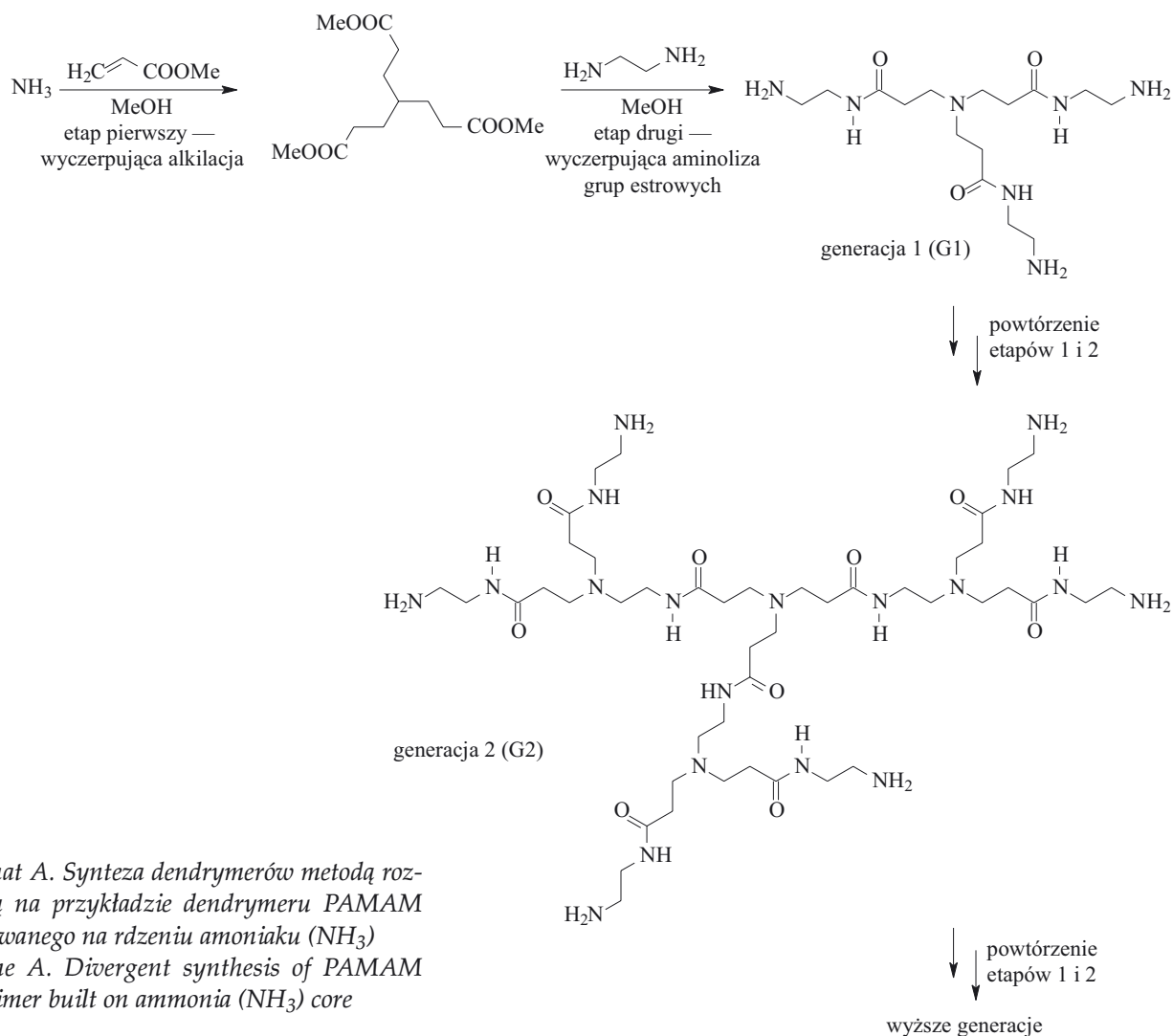
<sup>\*)</sup> Autor do korespondencji; e-mail: ocryst@icho.edu.pl

teczkowych rzędu  $10^2$ — $10^6$  (generacje 1—13). Obecnie są one dostępne w handlu pod nazwą Starburst®.

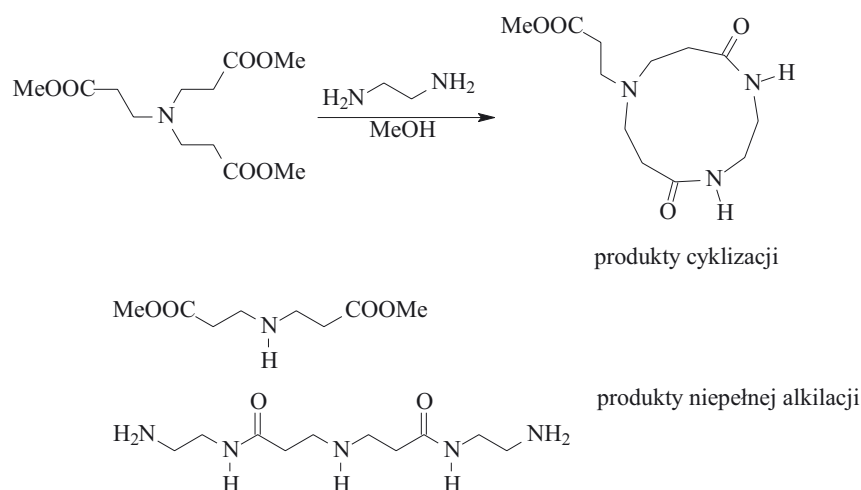
### SYNTEZA

W teorii dendrymeryzacja jest operacją łatwą do przeprowadzenia. Proces zazwyczaj obejmuje dwie bądź trzy reakcje w ramach jednej generacji rozgałęzienia. Wykorzystuje się dwie lub trzy grupy funkcyjne, których charakterystykę i reaktywność można określić już na pierwszych etapach dendrymeryzacji. Teoretycznie istnieje duża swoboda projektowania zarówno wnętrza, jak i obszarów peryferyjnych dendrymeru. Można zaplanować budowę chemiczną oraz cechy fizyczne dendrymeru w stopniu nieosiągalnym w standardowych procesach polimeryzacji. Praktyka jest jednak daleka od doskonałości. Zazwyczaj dochodzi do odstępstw w budowie, zwłaszcza dużych makrocząstek, co jest spowodowane czynnikami zarówno chemicznymi, jak i sterycznymi. Przeprowadzenie kilkunastu reakcji chemicznych ze 100-proc. przekształceniem grup funkcyjnych jest bowiem niezmiernie trudne. Wyzwanie dla chemików zajmujących się syntezą den-

drymerów stanowi końcowa wydajność procesu dendrymeryzacji. Pomimo zrealizowania reakcji wysoko-wydajnych (>99 %), na przykład polipropylenoiminowy dendrymer piątej generacji G5-PPI uzyskano z wydajnością tylko 25 % [5]. Stosuje się oczywiście nadmiary odczynników oraz aktywację bądź dezaktywację pewnych grup funkcyjnych, ale najważniejszym problemem w syntezie dendrymerów pozostaje przestrzenna dostępność grup funkcyjnych na każdym etapie omawianego procesu. Względy steryczne determinują również trójwymiarową strukturę dendrymeru. W tym miejscu należy wspomnieć także o zagadnieniu „czystości” produktów. Choć w celu tworzenia kolejnych generacji dendrymeru przeprowadza się stereoselektywne i wysoko-wydajne reakcje, to ich kilku-kilkunastokrotne powtórzenie daje stosunkowo niewielki udział zaplanowanej struktury w produkcie końcowym. Jak już wspomniano, np. stężenie dendrymeru G5-PPI w surowej mieszaninie końcowej wynosi ok. 25 %. Resztę stanowią związki o różnej zawartości cząsteczek z defektami strukturalnymi (o mniejszych ciężarach cząsteczkowych). Oczyszczenie takiej mieszaniny jest żmudne i nie zawsze możliwe [2]. Wyniki badań zespołu Tomalii [6] nad dendry-



Schemat A. Synteza dendrymerów metodą rozbieżną na przykładzie dendrymeru PAMAM zbudowanego na rdzeniu amoniaku ( $\text{NH}_3$ )  
Scheme A. Divergent synthesis of PAMAM dendrimer built on ammonia ( $\text{NH}_3$ ) core



Schemat B. Rodzaje „zanieczyszczeń” powstających w czasie syntezy dendrymerów — na przykładzie dendrymeru PAMAM zbudowanego na rdzeniu amoniaku ( $\text{NH}_3$ )

Scheme B. Types of „impurities” formed during dendrimers’ syntheses on the example of PAMAM built on ammonia ( $\text{NH}_3$ ) core

merami PAMAM zbudowanymi na rdzeniu z amoniaku, uzyskane metodami ESI-MS (*Electrospray Ionisation — Mass Spectroscopy*) i MALDI-TOF (*Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionisation-Time-of-Flight*) pokazały, że do czwartej generacji wartość obliczona i mierzona ciężaru cząsteczkowego jest prawie zgodna, przy czym obserwuje się stały wzrost ilości zanieczyszczeń, wynoszący przy przejściu z G8 do G9 23 %, a do G12 aż 37,5 %. Dendrymery polieterowe syntetyzowane metodą zbieżną w zespole Frecheta, nie wykazują odchylenia ciężaru cząsteczkowego aż do generacji G6, z gwałtownym jego spadkiem przy G7. Odchylenia od idealnej struktury w przypadku dendrymerów wysokich generacji wynikają także z dużej gęstości upakowania grup końcowych. Zagadnienie to opracowano teoretycznie już w 1982 r. w pionierskich pracach M. Maciejewskiego [7] a później de Gennesa [8]. Punkt krytyczny w przypadku dendrymerów PAMAM (na rdzeniu  $\text{NH}_3$ ) występuje już przy G9—G10. „Zatłoczenie” steryczne powoduje brak reaktywności części grup końcowych i nagromadzenie cząsteczek z defektami struktury, o mniejszych niż założone ciężarach cząsteczkowych. Występowanie generacji krytycznej, z tzw. krytyczną gęstością upakowania de Gennesa, w przypadku której obserwuje się ten negatywny efekt, zależy od wielu czynników, np.: rozmiarów i funkcyjności rdzenia, funkcyjności gałęzi, reaktywności i rozmiarów grup końcowych itp.

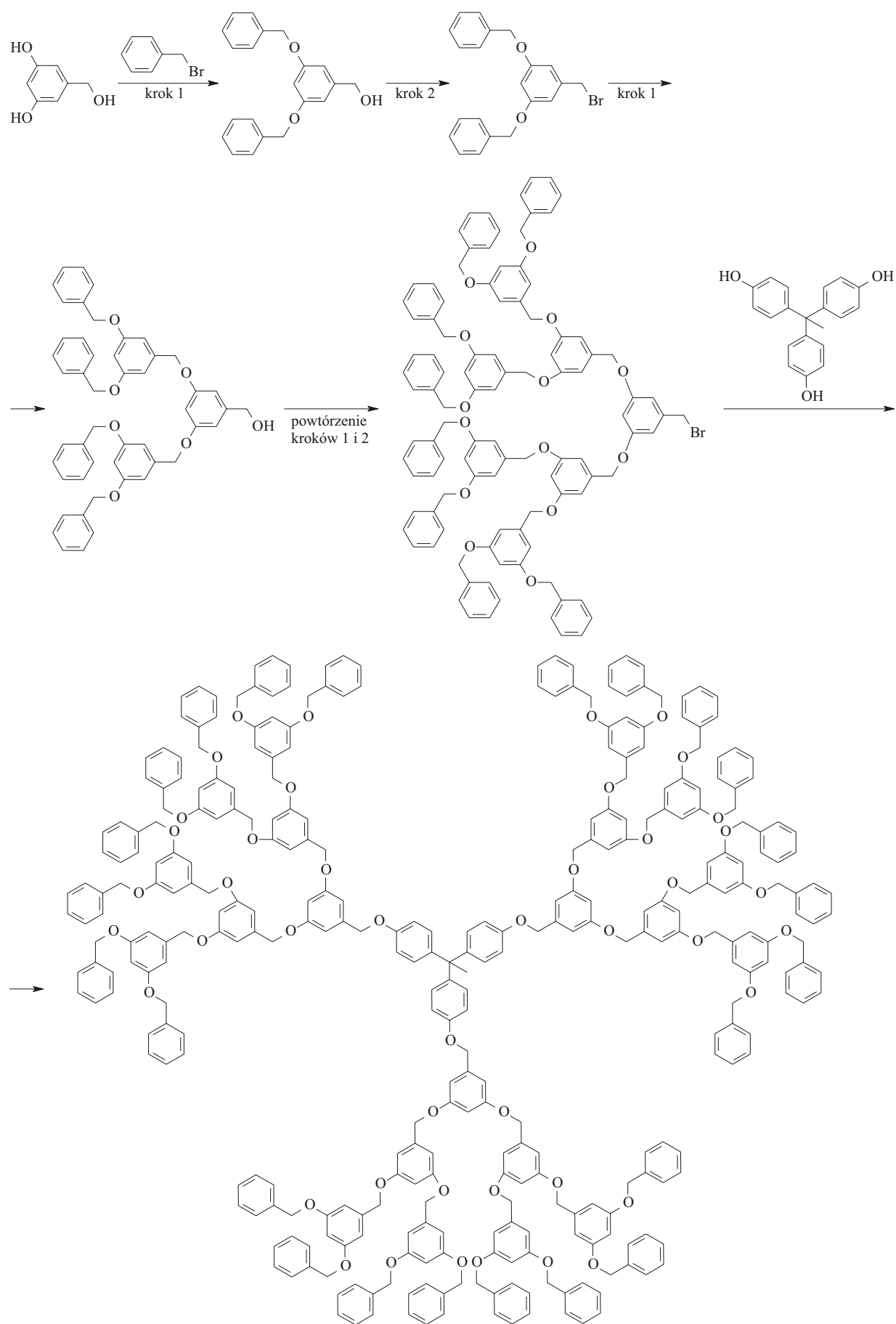
**Synteza rozbieżna** (*divergent*) — nazwę tę zaproponował D. A. Tomalia w swoich pierwszych pracach dotyczących syntezy dendrymerów PAMAM (schemat A). Metoda polega na dobudowywaniu wokół polifunkcyjnej cząsteczki rdzenia (np.:  $\text{NH}_3$ ,  $\text{H}_2\text{N}-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{NH}_2$  itp.) kolejnych generacji dendrymeru (np.: w wyniku alkilowania grup aminowych za pomocą akrylanu metylu i następną aminolizę końcowych grup estrowych etylenodiaminą). Według tej strategii dendrymery można budować realizując wiele wysokowydajnych reakcji chemicznych. W praktyce jednak metoda ta ma istotne ograniczenia. Liczba reaktywnych grup końcowych rośnie wykładniczo ze wzrostem generacji (np.: przy przejściu od G4 do G5 w syntezie dendrymerów PAMAM, jednorazowo z akry-

lanem metylu musi przereagować 32 grup aminowych; przy przejściu od G5 do G6 — już 64 itp.). W związku z tym dendrymer staje się coraz bardziej zanieczyszczony produktami niepełnego podstawienia (schemat B).

**Synteza zbieżna** (*convergent*) — zaproponowana przez zespół Frecheta jako alternatywa procedury rozbieżnej. W metodzie tej najpierw wykonuje się syntezy fragmentu gałęzi posiadającego tylko jedną grupę reaktywną (dendron) reagującą z innymi, identycznie wykonanymi podjednostkami dendrymeru lub rdzeniem (schemat C). Etapem końcowym w syntezie zbieżnej jest sprzęganie otrzymanych dendronów z wielofunkcyjną cząsteczką rdzenia. W porównaniu z metodą rozbieżną sposób postępowania zaproponowany przez Frecheta ma ważną zaletę, mianowicie funkcyjność rozwijanego dendronu wynosi zawsze jeden, co daje możliwość lepszej kontroli procesu, większą czystość dendrymerów i mniejsze zużycie odczynników. Podobnie jak w metodzie rozbieżnej uzyskanie dendrymeru o pożądanej strukturze jest limitowane przede wszystkim przez reaktywność i przestrzenną dostępność rdzenia.

#### METODY CHARAKTERYZOWANIA DENDRYMERÓW

Ogromna strukturalna różnorodność dendrymerów daje możliwości zastosowania do ich charakteryzowania szerokiej gamy metod analitycznych, poczynając od stosowanych w odniesieniu do małych cząsteczek organicznych a kończąc na służących do analizy makromolekuł. Najważniejszą techniką potwierdzającą założony ciężar cząsteczkowy związków dendrymerycznych jest, bez wątpienia, spektrometria mas z metodami łagodnej jonizacji: ESI, MALDI, FAB. Jest to również dobra technika pozwalająca na prześledzenie zawartości produktów ubocznych tj. związków z defektami strukturalnymi [10, 11]. Obecnie stosowane techniki MS-MS umożliwiają potwierdzenie nie tylko ciężaru cząsteczkowego ale również struktury. Widma magnetycznego rezonansu jądrowego (NMR) są w przypadku dendrymerów na ogół mniej przydatne, ze względu na możliwość występowania wielu konformacji tego samego fragmentu struktury



Schemat C. Metoda zbieżna syntezy dendrymerów prowadząca do otrzymania dendrymeru polibenzyloeterowego [9]  
 Scheme C. Convergent synthesis of dendrimer leading to polybenzylether formation [9]

makrocząsteczki i związane z tym nakładanie się pasm sygnałów. Na podstawie widm NMR można jednak monitorować poziom zawartości cząsteczek z defektami, np. podczas syntezy dendrymerów poli(propylenoiminyowych) sygnały  $^{13}\text{C}$  NMR przy  $\delta$  ok. 45 ppm wskazują na obecność niecałkowicie zalkilowanych grup  $\text{NH}_2$  (od  $\text{R-NH-CH}_2\text{-CH}_2\text{-}$ ).

Dendrymery z udziałem heteroatomów można badać wykorzystując techniki rezonansu  $^{19}\text{F}$ -NMR [12],  $^{31}\text{P}$ -NMR [13, 14] lub  $^{29}\text{Si}$ -NMR [15, 16]. Goddard [17] w swoich pracach zastosował także pomiary czasu relaksacji  $^{13}\text{C}$ -*spin-lattice*  $T_1$  cząsteczek „gościa” w celu wykazania istnienia luk wewnątrzcząsteczkowych w dendrymerach typu PAMAM w generacjach G4—G7. Wiele zespołów, m.in. Newkome’a [18], Frecheta [19] i Mejera [20] wykorzystywało spektroskopię fluorescencyjną i UV-Vis do badania zdolności przenoszenia przez dendrymery ukrytych w lukach wewnątrzcząsteczkowych małych cząsteczek gości. Ważnym narzędziem do oceny czystości makrocząsteczek okazały się także techniki używane rutynowo do badań biologicznych makrocząsteczek — białek, polipeptydów oraz kwasów nukleinowych — takie jak elektroforeza żelowa oraz elektroforeza kapilarna [21, 22]. Podstawowych informacji dotyczących czystości, homogeniczności i ciężaru cząsteczkowego dendrymerów dostarcza również chromatografia cienkowarstwowa (TLC), żelowa (GPC, SEC) i, przede wszystkim, wysokosprawna chromatografia cieczowa (HPLC) [23—25]. Interesujące wyniki uzyskano stosując techniki SANS (niskokątowego rozpraszania neutronów), SAXS (niskokątowego rozpraszania promieniowania X) i TEM (transmisyjnej mikroskopii elektronowej). TEM umożliwiła bezpośrednią wizualizację molekuł dendrymerów PAMAM. Użyto jej również do oceny średnicy cząsteczek w zależności od generacji (G5—G10) oraz do badań interakcji międzycząsteczkowych [26]. Pomiary z zastosowaniem technik SANS i SAXS pozwoliły na określenie średnicy dendrymerów PAMAM oraz potwierdziły lokalizację i ułożenie grup końcowych na zewnątrz cząsteczki [27], tak jak przewidywał Maciejewski i de Gennes [7, 8]. Wykazały też, że te dendrymery nie ulegają interpenetracji ani w roztworach rozcieńczonych, ani w stężonych [28].

Powszechnie stosowano także metody typowe dla badań polimerów, takie jak grawimetryczna analiza termiczna (TGA) [29], skaningowa kalorymetria różnicowa (DSC) [30—32] lub pomiary granicznej liczby lepkościowej. Do analizy grup końcowych dendrymerów wykorzystywano także proste miareczkowanie [33].

#### KIERUNKI BADAŃ NAD LEKAMI DENDRYMEROWYMI

##### Dendrymery jako nośniki substancji leczniczych w nowych metodach podawania leków

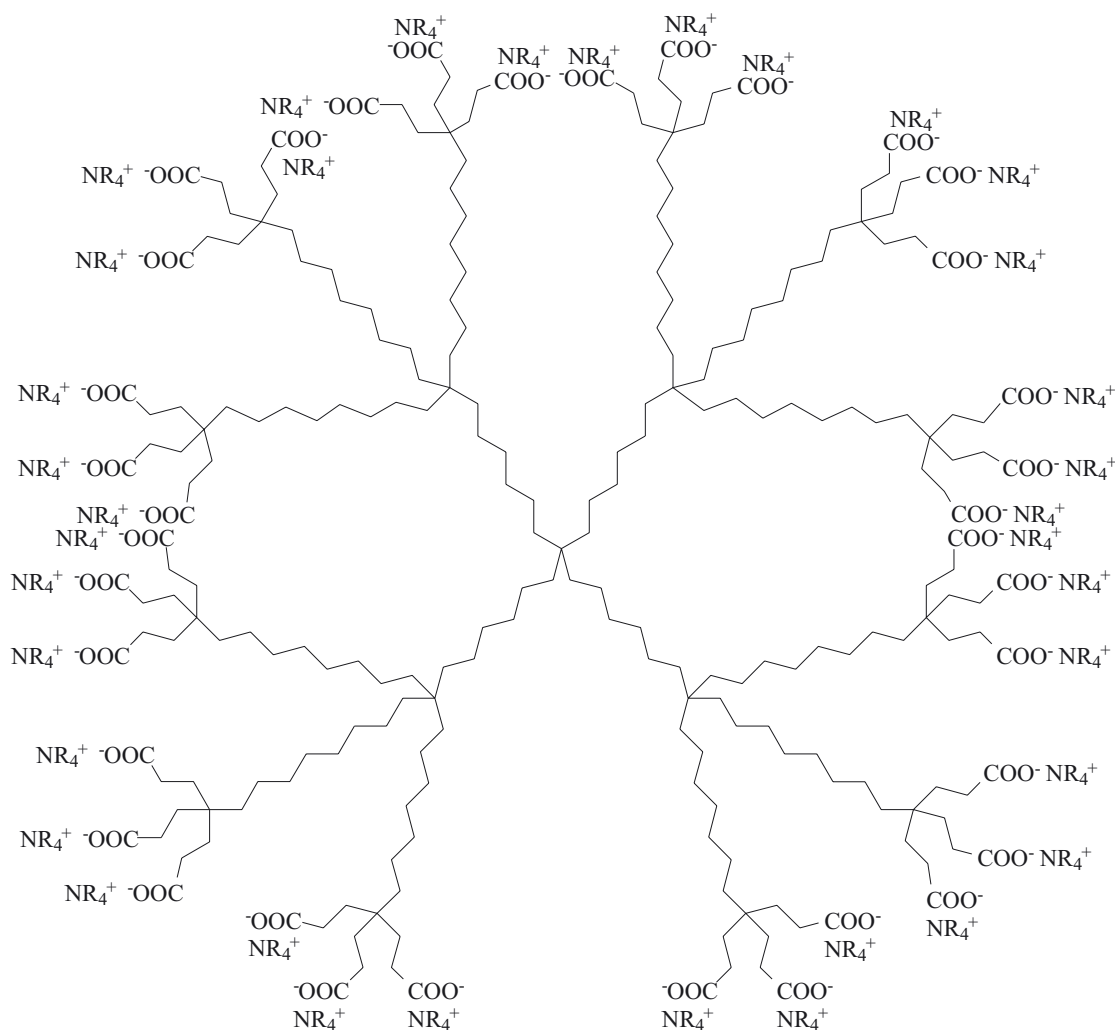
Polimery stanowią obecnie główną grupę materiałów ocenianych pod kątem ich zastosowania do kontro-

lowanego uwalniania leków lub jako prekursorzy nowych leków. Wśród nich dendrymery, ze względu na globularną budowę, wielowarstwowość oraz dobrze zdefiniowany ciężar cząsteczkowy, wydają się bardzo obiecujące. Badania prowadzi się w dwóch kierunkach, mianowicie wykorzystania dendrymerów do transferu słabo rozpuszczalnych lub cytotoksycznych substancji leczniczych wprost do miejsca chorobowo zmienionego oraz do budowy nowych leków o stwarzającej nowe możliwości strukturze dendrymerycznej. Pierwszy kierunek, obecnie częściej realizowany, pozwala na uniknięcie kosztów i ryzyka związanych z wprowadzeniem do klinik nowego leku a także lepszego wykorzystania leku o znanych właściwościach.

Zastosowaniu dendrymerów w charakterze nośników substancji leczniczych sprzyja ich unikatowa budowa przestrzenna. Gdy cząsteczkę biologicznie aktywną wykorzystamy jako rdzeń, wówczas gałęzie i powierzchnia dendrymeru mogą działać osłaniająco i obniżać jej toksyczność. Interesujące możliwości stwarzają także istniejące luki wewnątrzcząsteczkowe, w których mieszczą się niewielkie cząsteczki niekowalencyjnie związane z dendrymerem. W ciągu ubiegłych 20 lat intensywne prace w tym kierunku zaowocowały wieloma publikacjami na temat chemii układów „gość-gospodarz” z udziałem dendrymerów.

Dendrymery z niepolarnym alifatycznym wnętrzem (schemat D) i polarnymi grupami peryferyjnymi, zwane też jednocząsteczkowymi micelami, opisał po raz pierwszy zespół Newkome’a na początku lat dziewięćdziesiątych XX w. [34]. Zamknięcie w alifatycznym wnętrzu cząsteczek hydrofobowych, np.: błękitu fenolowego, naftalenu lub difenylloheksatrienu, zostało potwierdzone metodami UV-Vis i spektroskopii fluorescencyjnej, a duża liczba obdarzonych ładunkiem grup peryferyjnych ( $\text{COO}^-$ ) umożliwiła rozpuszczenie całych układów w roztworach wodnych.

W ostatnich latach nastąpił duży postęp w pracach nad syntezą biokompatybilnych dendrymerów i ich wykorzystaniem w leczeniu nowotworów, zwłaszcza jako nośników toksycznych substancji leczniczych, takich jak *cis*-platyna bądź doxorubicyna. Zastosowanie dendrymerów w charakterze jednocząsteczkowych miceli transportujących niekowalencyjnie związane leki jest utrudnione ze względu na problemy z kontrolowanym uwalnianiem cząsteczek tych substancji. Wprowadzenie do cząsteczek PAMAM w miejsce grup końcowych reszt PEOX [poli(tlenku etylenu)] umożliwiło kontrolowane uwalnianie przy ich użyciu takich leków przeciwnowotworowych jak methotrexat, doxorubicyna [35] lub 5-fluorouracyl [36]. Wykorzystanie dendrymeru PAMAM jako kapsułki zawierającej kamptotecynę (inny związek stosowany w terapii nowotworowej), nie tylko zwiększyło jej rozpuszczalność ale także pozwoliło na osiągnięcie lepszego działania leku na poziomie komórkowym — wyższe stężenie w komórkach nowotworowych, dłuższy czas retencji oraz podwyższoną aktyw-



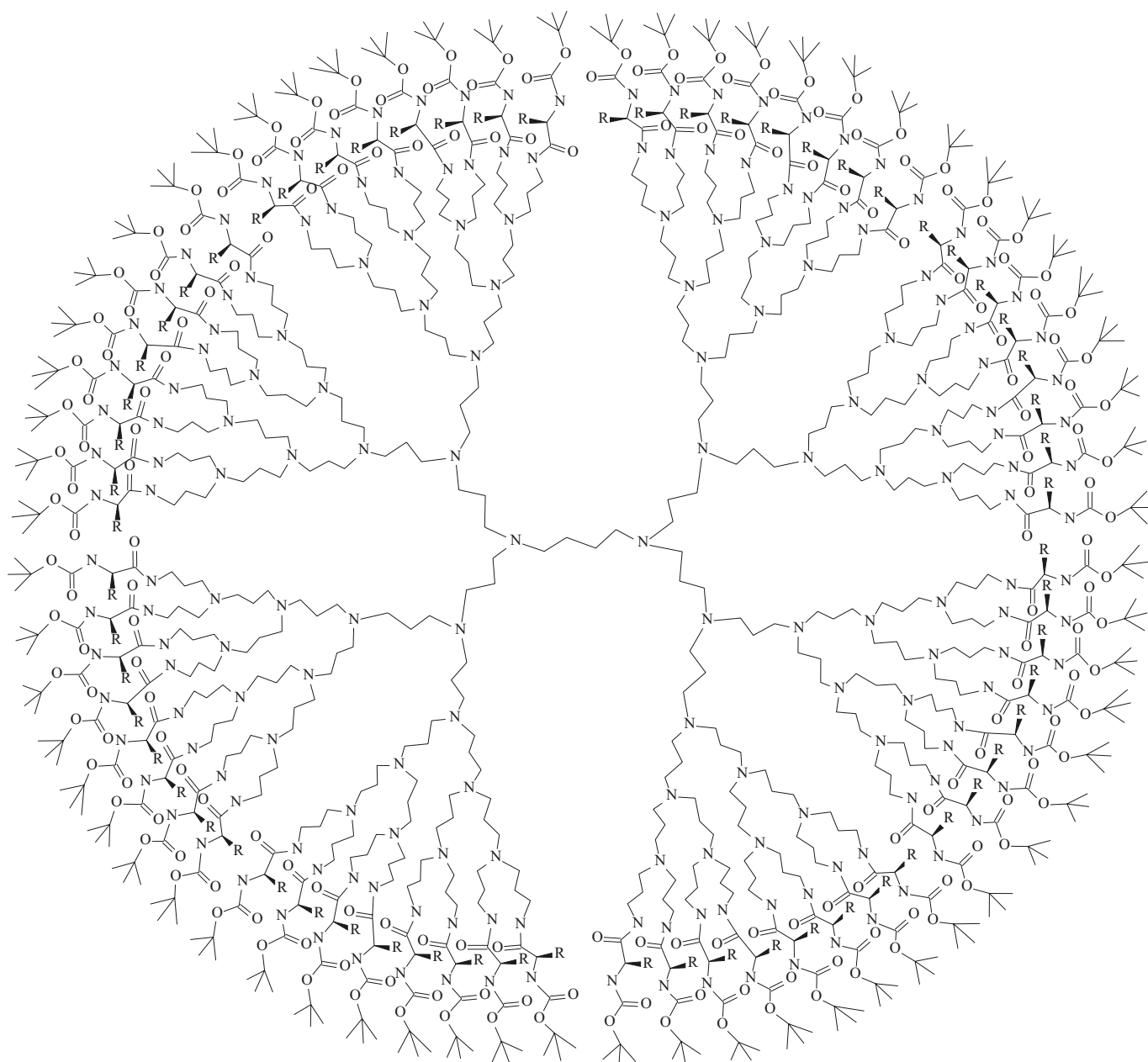
Schemat D. Jednocząsteczkowa micela Newkome'a [18]  
Scheme D. Unimolecular Newkome's micelle [18]

ność przeciwnowotworową *in vitro* [37]. Proponuje się również użycie dendrymerów PAMAM w charakterze czynników selektywnie wyłapujących bądź neutrony w terapii borowo-neutronowej bądź promienie UV w diagnostyce oraz w terapii fotodynamicznej nowotworów skóry.

Cytotoksyczność dostępnych w handlu (najczęściej badanych) dendrymerów zależy od generacji, dlatego też wyniki badań nie zawsze są jednoznaczne. W pierwszej publikacji, opracowanej we współpracy kilku europejskich laboratoriów, na temat biokompatybilności *in vitro* dendrymerów PAMAM i PPI oraz ich różnorodnych pochodnych stwierdzono, że dendrymery kationowe wyższych generacji nie są przydatne w farmakologii ze względu na ich właściwości hemolityczne oraz zmiany wywoływane w morfologii erytrocytów, a także akumulację w tkankach [38]. Mniej toksyczne okazały się dendrymery z końcowymi grupami karboksylowymi, hydroksylowymi bądź eterowymi. Obecnie, w praktyce rzadko bada się dendrymery typu PAMAM i PPI w oryginalnej chemicznej postaci. Najczęściej ich powierzchnię pokrywa się ugrupowaniami generującymi odpowiedź biologiczną dzięki zawartości rozpoznawanych

przez komórki fragmentów ligandów takich jak leki, radioizotopy, kwasy tłuszczowe, lipidy, polimery [np. reszty glikolu poli(oksyetylenowego) — PEG] itp. Problem toksyczności dendrymerów powinien zatem być traktowany indywidualnie w zależności od zamierzonego sposobu wykorzystania [39]. Na przykład, dendrymeryczne związki stosowane do diagnostyki lub do szybkiej interwencji medycznej podaje się jednorazowo, co nie powoduje akumulacji makrocząstek w ustroju, natomiast toksyczność dendrymerycznych substancji stosowanych zewnętrznie ogranicza się do warstw skóry.

Interesujący wydaje się pomysł częściowego pokrywania dodatnio naładowanych powierzchni dendrymerów PAMAM resztami PEG, jednak, osiągniętej dzięki temu lepszej kontroli nad uwalnianiem z kompleksu, np. methotrexatu, towarzyszy utrata strukturalnej jednorodności cząstek dendrymerycznych [40]. Ostatnio stwierdzono również, że częściowe zabezpieczenie za pomocą PEG [41] lub sfunkcjonalizowanie grupami hydroksylowymi [42] dendrymerów PAMAM do generacji G4 pozwala na otrzymanie produktów o minimalnej cytotoksyczności.



Schemat E. „Pudełko dendrytyczne” (dendritic box) Meijera ( $R = C_6H_5$ ) [54]

Scheme E. „Dendritic box” by Meijer ( $R = C_6H_5$ ) [54]

Intensywne badania nad zmniejszeniem cytotoksyczności cząsteczek typu „gospodarz” prowadzono głównie w odniesieniu do dostępnych w handlu dendrymerów PAMAM. Dobrą rozpuszczalność w wodzie oraz niewielką toksyczność uzyskiwano w wyniku umieszczenia na peryferiach dendrymeru grup hydroksylowych, karboksylowych lub reszt glikoli poli(oksyetylenowych). Jako gości używano cząsteczek, np.: barwnika czerwieni Nilu [43], związków przeciwrzybiczych i przeciwbakteryjnych (m.in. tiokonazolu) [44], indometacyny (także w systemach transdermalnych omijających doustną drogę podawania) [45], metotreksatu (leku przeciwnowotworowego — antymetabolitu kwasu foliowego) [46], 10-hydroksykampotecyny [47], pilokarpiny, tropikamid i fluoresceiny (leków używanych ruty-

nowo do diagnostyki w okulistyce) [48] bądź *cis*-platyny (leku przeciwnowotworowego) [49]. Podobnie, w obecności dendrymeru PAMAM uzyskiwano lepszą rozpuszczalność powszechnie używanych niesterydowych środków przeciwzapalnych, takich jak Naproxen, Ketoprofen, Ibuprofen lub Diflunisal [50].

Interesujące jest wykorzystanie kombinacji dwóch dendrymerów, różnych strukturalnie ale tworzących niekowalencyjnie związaną makrocząsteczkę, do spowolnionego uwalniania venlafaksyny (venlafaxine) — nowego środka antydepresyjnego stosowanego zazwyczaj kilkakrotnie w ciągu dnia [51].

Dendrymery, w których reakcje wiązania i uwalniania gościa kontrolowano za pomocą pH opisał Meijer i współpr. [52]. Związki te skonstruowano na szkielecie

polipropylenoiminowym (PPI), a ich peryferyjne grupy aminowe zacylowano resztami długołańcuchowych kwasów tłuszczowych. Takie „odwrócone” jednocząsteczkowe micelle wykazywały zdolność do wiązania we wnętrzu polarnych cząsteczek gościa (rózu bengalskiego i serii barwników anionowych) a następnie przeniesienia (uwalniania) ich do niepolarnych rozpuszczalników organicznych. Stechiometria produktu zależała od wymiarów cząsteczki gościa i generacji dendrymeru, np.: dendrymer piątej generacji na podstawie PPI zamykał w sobie 1–2 cząsteczki fluoresceiny, a w przypadku rózu bengalskiego nawet do 70 cząsteczek. Aromatyczne dendrymery poli(eterowe) syntetyzowane w grupie Frecheta również charakteryzowały się zdolnością do zamykania w sobie aromatycznych cząsteczek gości, co umożliwiała na przykład rozpuszczenie pirenu w roztworach wodnych [53]. Silne oddziaływania  $\pi$ – $\pi$  między pierścieniami aromatycznymi gościa i gospodarza dodatkowo wzmacniały tę zdolność.

We wszystkich badanych przypadkach zaobserwowano, że kompleksowanie cząsteczek gościa z dendrymerem wywiera pozytywny wpływ na jego rozpuszczalność, zmniejsza szybkość uwalniania a więc obniża toksyczność, ogranicza niekorzystne efekty uboczne i poprawia efektywność skoncentrowania zarówno w przypadku zmienionych chorobowo tkanek, jak i w zastosowaniach zewnętrznych (systemy transdermalne, okulistyka).

Inne rozwiązanie niekowalencyjnego wiązania substancji stanowiło skonstruowanie tzw. „pudełek dendrytycznych” (schemat E), gdzie trwale unieruchomiona we wnętrzu dendrymeru cząsteczka gościa była uwalniana dopiero po degradacji blokujących ją elementów peryferyjnych. Pierwsze „pudełko” to dendrymer PPI, w którym po wprowadzeniu gościa aminowe grupy peryferyjne zablokowano resztami Boc-L-feniloalaniny [*N*-(*tert*-butoksykarbonylo)-L-feniloalaniny] [54]. Dendrymer taki mógł jednocześnie zatrzymać do 4 dużych cząsteczek rózu bengalskiego i 8–10 mniejszych, takich jak kwas 4-nitrobenzoesowy. Po „zdjęciu” grup Boc za pomocą kwasu mrówkowego uwalniane były cząsteczki mniejsze, a po hydrolitycznym „zdjęciu” feniloalaniny do roztworu przechodziły także większe cząsteczki gościa.

Nowatorskim pomysłem było zsyntetyzowanie zakończonych grupami hydroksylowymi dendrymerów typu PAMAM zawierających nanocząstki metalicznego srebra, o znanej od dawna aktywności przeciwbakteryjnej, zwłaszcza przeciwko bakteriom Gram-dodatnim [55]. Synteza tego typu układu polegała na dodaniu do roztworu dendrymeru soli srebra(I), a następnie redukcji do srebra metalicznego.

Omawiane do tej pory dendrymery charakteryzowały się niespecyficznym miejscem wiązania małych cząsteczek gości. W grupie Diedericha i współpracowników [56] po raz pierwszy zaproponowano syntezę rodziny dendrymerów opartych na rdzeniu cyklofanu; okazały się one zna-

komitymi nośnikami steroidów, zdolnymi do ich kontrolowanego uwalniania. Na stabilność uzyskanych kompleksów nie wpływał wzrost generacji, miejsce wiązania zaś czyniło uprzywilejowanymi bardziej niepolarne cząsteczki steroidów. Inna odmiana dendrymerów, określona mianem „*dendroclefts*”, zbudowana wokół optycznie czynnego rdzenia 9,9'-spiro-bis[9H-fluorenu] odznaczała się zdolnością do selektywnego wiązania  $\beta$ -D-glukozydów [57]. Diastereo-selektywność procesu rosła wraz z generacją dendrymeru. Autorzy sugerowali także, że tego typu układy mogą być prekursorami syntetycznych enzymów.

### Dendrymery jako nowe generacje leków

Drugim nurtem badań skupiającym się na wykorzystaniu unikatowej rozgałęzionej struktury dendrymerów było poszukiwanie nowych oryginalnych leków. Szeroko diskutowaną kwestię stanowi pytanie czy użycie dendrymeru, np. do otrzymania szczepionek jest tylko nowym sposobem podawania przeciwciał czy też nową formułą farmaceutyczną. Proponowane rozwiązania są faktycznie czymś więcej niż tylko zmultiplikowanym farmakoforem. Dendrymery mogą być bowiem nowego typu wielofunkcyjną nanocząsteczką — koniugatem, zawierającym jednocześnie element „adresowy” umożliwiający selektywne umieszczenie jej w konkretnym miejscu organizmu, wiele cząsteczek leku dającego efekt terapeutyczny oraz biomarker pozwalający na detekcję miejsca komórki/tkanki, gdzie cząsteczka się lokuje i sposobu działania takiego agregatu. Z tego punktu widzenia, dendrymery można traktować jako stabilny chemicznie, dobrze zdefiniowany trójwymiarowy lek przyszłości, konkurencyjny wobec środków leczniczych otrzymywanych na nośnikach białkowych. Występowanie „efektu dendrymerycznego”, czyli wzmocnienia działania farmakologicznego, wykraczające poza proste zsumowanie efektów pojedynczych farmakoforów, uzasadnia stwierdzenie, że związane kowalencyjnie koniugaty stanowią cząsteczki nowych leków. [58].

Najczęściej wykorzystywanym sposobem jest umieszczanie na peryferiach dendrymeru cząsteczek leków związanych z nim labilnymi wiązaniami chemicznymi, np.: hydrolizującymi w warunkach fizjologicznych. Dzięki temu uzyskuje się możliwość stopniowego i długotrwałego uwalniania leku, a zatem ograniczenie toksyczności oraz częstości występowania efektów ubocznych. Nośnikiem są na ogół dendrymery typu PAMAM niskich generacji (G2–G5), dołączanymi zaś substancjami aktywnymi, m.in. 5-fluorouracyl [59], kwas 5-aminosalicylowy [60], hormony steroidowe (np.: metyloprednizolon) [61] lub metotreksat [62].

Zbliżoną koncepcję stanowiła synteza biodegradowalnych małowymiarowych dendrymerów (G1–G3), ulegających w warunkach fizjologicznych całkowitej powolnej hydrolizie do aktywnych cząsteczek leków i łatwo wydalanych z moczem niewielkich cząsteczek po-



chodzących od nośnika. Połączenia takie zsyntetyzowano głównie z udziałem bardzo toksycznych leków przeciwnowotworowych, np.: paklitakselu (Taxol®) [63, 64], doksorubicyny lub kampotecyny [65].

Pomimo intensywnych badań dotyczących zastosowania dendrymerów w medycynie, wykorzystanie tych związków ogranicza poważna bariera jaką są wysokie koszty syntezy i oczyszczania. Dobry przykład stanowią tu, najlepiej poznane i wytwarzane na skalę przemysłową przez firmę Dendritic Nano Technologies w USA, dendrymery typu PAMAM — 300 mg związku 7. generacji kosztuje obecnie ok. 600 USD. Trzeba również zauważyć, że homogeniczność tych produktów pozostawia wiele do życzenia, zwłaszcza z punktu widzenia aplikacji medycznych.

Obecnie trwają wzmożone prace nad kilkoma oryginalnymi projektami doprowadzonymi do etapu badań klinicznych. Dwa najbardziej zaawansowane to Gadomer-17 (Schering AG) oraz preparat antykoncepcyjny o nazwie VivaGel (australijska firma Starpharma), który jednocześnie może być stosowany w prewencji zakażeń wirusem HIV [66]. VivaGel zawiera dendrymer lizynowy 4. generacji sfunkcjonalizowany na powierzchni resztami naftalenodisulfonianowymi. W maju 2008 preparat zakwalifikowano do następnej fazy badań. Deklarowana przez firmę obniżka kosztów produkcji tego leku do 15 USD za jedną porcję terapeutyczną może być jednak trudna do osiągnięcia, na co wskazują ceny, znacznie łatwiejszych w syntezie, dendrymerów typu PAMAM.

Ogromne nadzieje pokłada się również w możliwości wykorzystania związków dendrymerycznych w diagnostyce medycznej. Objęty badaniami klinicznymi drugiej fazy, wspomniany już oryginalny związek o nazwie Gadomer-17, może działać jako czynnik wzmacniający kontrast w obrazowaniu metodami NMR. Gadomer-17 to dendrymer lizynowy sfunkcjonalizowany na powierzchni ugrupowaniami eteru koronowego zawierającego jony Gd(III). Podaje się go do krwi a służy do diagnozowania chorób nerek i układu krążenia. W badaniach na zwierzętach wykazano, że obraz nerki można uzyskać już po kilku minutach od chwili podania preparatu, przy czym jest on następnie szybko wydalany [67]. Wymieniona już firma Dendritic Nano Technologies do podobnych zastosowań planuje wykorzystać dendrymer typu PAMAM z zainkludowanymi w lukach wewnętrznych cząsteczkami — szeroko obecnie używanego w diagnostyce metodami NMR — małą cząsteczkowego kompleksu gadolinu o nazwie Magnevist. Dendrymery również stanowią podstawowy element w produkowanej przez amerykańską firmę Dade Behring aparatury do szybkiego diagnozowania chorób serca. Pozwala ona na potwierdzenie lub wykluczenie w ciągu 15 minut możliwości zawału. Obydwa wymienione wielkocząsteczkowe preparaty charakteryzują się dużymi ciężarami cząsteczkowymi oraz globularnymi kształtami. Taka budowa często jest niekorzystna z pun-

ktu widzenia efektywności oddziaływań ligand–receptor. Możliwości rozwiązań należy zatem szukać na drodze bardziej racjonalnego projektowania dendrymerów *de novo*, o strukturach bliskich np. „strukturalnym” lub znanym makrocząsteczkowym układom receptorowym. Przykładem mogą tu być kationowe, peptydowe dendrymery o ciężarach cząsteczkowych 850—2600, przewidziane do oddziaływania z membranami chorobotwórczych drobnoustrojów. Struktury takich dendrymerów oparto na nowym typie rdzenia, co pozwoliło na lepsze rozłożenie dodatnio naładowanych oraz lipofilowych grup na powierzchni biomembran. W efekcie uzyskano aktywności, również wobec bakterii Gram-ujemnych, na poziomie aktywności związków naturalnych [68, 69].

### PERSPEKTYWY ZASTOSOWAŃ DENDRYMERÓW

Miarą zainteresowania dendrymerami jako nanomateriałami do zastosowań głównie medycznych jest fakt, że w roku 2007 na świecie istniało przeszło 150 firm i ośrodków badawczych zrzeszających ponad 8000 naukowców zajmujących się tą tematyką. Wydali oni więcej niż 10 000 publikacji oraz zgłosili przeszło 3000 patentów. Do początku lat 90-tych liczba artykułów dotyczących dendrymerów była mniejsza niż dwa tuziny, w 1995 roku przekroczyła tysiąc, a od roku 2004 pojawia się już 1000 publikacji i 150 patentów rocznie.

W porównaniu z wiedzą o odkrytych mniej więcej w tym samym czasie co dendrymery nanozwiązkach, takich jak fulereny lub nanorurki (ze względu na swoją budowę uważanych za perspektywiczne nośniki leków nowych generacji), nanochemia dendrymerów jest znacznie bardziej zaawansowana i bliższa zastosowaniom praktycznym. Dendrymery są atrakcyjniejsze dzięki chemicznej różnorodności i możliwości wykorzystania szeregu znanych, wysokowydajnych metod syntezy oraz analizy do ich otrzymywania a następnie charakteryzowania. Interesująca jest także możliwość konstruowania rozgałęzionych nanostruktur w jednej cząsteczce, łączących wiele różnorodnych funkcji i pozwalających na zastosowanie ich w tzw. „terapiach celowanych”.

*Autorzy dziękują za wsparcie finansowe projektu Ministerstwu Nauki i Szkolnictwa Wyższego projekt 3T09B 115 28 oraz funduszm EC, projekt NORMOLIFE (LSHC-CT-2006-037733).*

### LITERATURA

- [1] Flory P. J.: *JACS* 1952, **74**, 2718.
- [2] Buhleier E., Wehner W., Vogtle F.: *Synthesis* 1978, 155.
- [3] Tomalia D. A., Ewald J. R., Hall M. J., Martin S. J., Smith P. B.: „The 1st SPSJ International Polymer Conference”, Japan, Kyoto 20—24 sierpnia 1984, mat. str. 65.
- [4] Tomalia D. A., Baker H., Dewald J., Hall M., Kallos G., Martin S., Roeck J., Ryder J., Smith P.: *Polym. J.* (Tokyo) 1985, **17**, 117.

- [5] Bosman A. W., Janssen H. M., Meijer E. W.: *Chem. Rev.* 1999, **99**, 1665. [6] Tomalia D. A., Esfand R., Piehler L. T., Swanson D. R., Uppuluri S.: *High Perform. Polym.* 2001, **31**, S1. [7] Maciejewski M.: *Macromol. Sci., A* 1982, **17**, 689. [8] de Gennes P. G., Hevret H. J.: *J. Physique-Lett. (Paris)* 1983, **44**, 351. [9] Hawker C. J., Frechet J. M. J.: *J. Am. Chem. Soc.* 1990, **112**, 7638; Hawker C. J., Frechet J. M. J.: *J. Chem. Soc., Chem. Commun.* 1990, 1010. [10] Dvornic P. R., Tomalia D. A.: *Macromol. Symp.* 1995, **98**, 403. [11] Hummelen J. C., van Dongen J. L. J., Meijer E. W.: *Chem. Eur. J.* 1997, **3**, 1489. [12] Miller T. M., Neenan X. T., Kwock E. W., Stein S. M.: *JACS* 1993, **115**, 356. [13] Rengan K., Engel R.: *J. Chem. Soc. Chem. Commun.* 1990, 1084. [14] Rengan K., Engel R.: *J. Chem. Soc. Perkin Trans. 1* 1991, 987. [15] Uchida H., Kabe Y., Yoshino K., Kazamata A., Tsumuraya T., Masamune S.: *JACS* 1990, **112**, 7077. [16] van der Made A. W., van Leeuwen P. W. N. M.: *J. Chem. Soc. Chem. Commun.* 1992, 1400. [17] Naylor A. M., Goddard W. A.: *JACS* 1989, **111**, 2539. [18] Newkome G. R., Moorefield C. N., Baker G. R., Saunders M. J., Grossman S. H.: *Angew. Chem. Int. Edit. Engl.* 1991, **30**, 1178. [19] Hawker C. J., Wooley K. L., Frechet J. M. J.: *J. Chem. Soc. Perkin Trans. 1* 1993, 1287. [20] Stevelmans S., van Hest J. C. M., Jansen J. F. G. A., van Bartel D. A. F. J., de Brabander-van den Berg E. M. M., Meijer E. W.: *JACS* 1996, **118**, 7398. [21] Brothers H. M., Piehler L. T., Tomalia D. A.: *J. Chromat. A* 1998, **814**, 233. [22] *US Pat.* 4 410 688 (1983). [23] Moreno-Bondi M. C., Orellana G., Turro N. J., Tomalia D. A.: *Macromolecules* 1990, **23**, 910. [24] Hawker C. J., Frechet J. M. J.: *Macromolecules* 1990, **23**, 4726. [25] Worner C., Mulhaupt R.: *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* 1993, **32**, 1306. [26] Jackson C. L., Hanzy H. D., Booy F. P., Drake B. J., Tomalia D. A., Bauer B. J., Amis E. J.: *Macromolecules* 1998, **31**, 6259. [27] Topp A., Bauer B. J., Klimash J. W., Spinolla R., Tomalia D. A., Amis L. J.: *Macromolecules* 1999, **32**, 7226. [28] Prosa T. J., Bauer B. J., Topp A., Amis E. J., Scherrenberg R.: *ACS PMSE prepr.* 1998, **79**, 307. [29] Brabander-van den Berg E. M. M., Meijer E. W.: *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* 1993, **32**, 1308. [30] Miller T. M., Neenan T. X., Zayas R., Bair H. E.: *J. Am. Chem. Soc.* 1992, **114**, 1018; Miller T. M., Neenan X. T., Kwock E. W., Stein S. M.: *J. Am. Chem. Soc.* 1993, **115**, 356. [31] Moreno-Bondi M. C., Orellana G., Turro N. J., Tomalia D. A.: *Macromolecules* 1990, **23**, 910. [32] Hawker C., Frechet J. M. J.: *Macromolecules* 1990, **23**, 4726. [33] Worner C., Mulhaupt R.: *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* 1993, **32**, 1306. [34] Newkome G. R., Moorefield C. N., Baker G. R., Johnson A. L., Behera R. K.: *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* 1991, **30**, 1176. [35] Kojima C., Kono K., Maruyama K., Takagishi T.: *Bioconjugate Chem.* 2000, **11**, 910. [36] Bhadra D., Bhadra S., Jain S., Jain N. K.: *Int. J. Pharm.* 2003, **257**, 111. [37] Morgan M. T., Nakanishi Y., Kroll D. J., Griset A. P., Carnahan M. A., Wathier M., Oberlies N. H., Manikumar G., Wani M. C., Grinstaff M. W.: *Cancer Res.* 2006, **66**, 11913. [38] Malik N., Wiwattana-patapee R., Klopsch R., Lorenz K., Frey H., Weener J. W., Meijer E. W., Paulus W., Duncan R.: *J. Controlled Release* 2000, **65**, 133. [39] Duncan R., Izzo L.: *Adv. Drug. Deliv. Rev.* 2005, **57**, 2215. [40] Pan G., Lemmouchi Y., Akala E. O.: *J. Bioact. Compat. Polym.* 2005, **20**, 113. [41] Yang H., Lopina S. T., DiPersio L. P., Schmidt S. P.: *J. Mat. Sci. — Mater. Med.* 2008, **19**, 1991. [42] Winnicka K.: *Farmacja Polska* 2008, **64**, 228. [43] Watkins D. M., Sweet Y. S., Klimash J. W., Turro N. J., Tomalia D. A.: *Langmuir* 1997, **13**, 3136. [44] Twyman L. J., Beezer A. E., Esfand R., Hardy M. J., Mitchell J. C.: *Tetrahedron Lett.* 1999, **40**, 1743. [45] Zhang W., Jiang J., Quin C. H., Perez L. M., Parrish A. R., Safe S. H., Simanek E. E.: *Supramol. Chem.* 2003, **15**, 607. [46] Chen H. T., Neerman M. F., Parrish A. R., Simanek E. E.: *JACS* 2004, **126**, 10 044. [47] Neerman M. F., Zhang W., Parrish A. R., Simanek E. E.: *Int. J. Pharm.* 2004, **281**, 129. [48] Vandamme T. F., Brobeck L.: *J. Controlled Release* 2005, **102**, 23. [49] Malik N., Evagorou E. G., Duncan R.: *Anti-Cancer Drugs* 1999, **10**, 767. [50] Cheng Y. Y., Xu T. W.: *Europ. J. Med. Chem.* 2005, **40**, 1188. [51] Yang H., Lopina S. T.: *J. Biomed. Mat. Res. A*, 2006, **72A**, 107. [52] Baars M. W. P. L., Froehling P. E., Meijer E. W.: *Chem. Commun.* 1997, 1959. [53] Liu M. J., Kono K., Frechet J. M. J.: *J. Controlled Release* 2000, **65**, 121. [54] Jansen J. F. G. A., de Brabander-van den Berg E. M. M., Meijer E. W.: *Science* 1994, **266**, 1226. [55] Balogh L., Swanson D. R., Tomalia D. A., Hagnauer G. L., McManus A. T.: *Nano Lett.* 2001, **1**, 18. [56] Wallimann P., Seiler P., Diederich F.: *Helv. Chim. Acta* 1996, **79**, 779. [57] Smith D. K., Diederich F.: *Chem. Commun.* 1998, 2501. [58] Sisson J. C.: *Thyroid* 1997, **7**, 295. [59] Zhuo R. X., Du B., Lu Z. R.: *J. Controlled Release* 1999, **57**, 249. [60] Wiwattana-patapee R., Lomlim L., Saramunee K.: *J. Controlled Release* 2003, **88**, 1. [61] Khandare J., Kolhe P., Pillai O., Kannan S., Lieh-Lai M., Kannan R. M.: *Bioconjugate Chem.* 2005, **16**, 330. [62] Kono K., Liu M., Frechet J. M. J.: *Bioconjugate Chem.* 1999, **10**, 1115. [63] Amir R. J., Pessah N., Shamis M., Shabat D.: *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* 2003, **42**, 4494. [64] Szalai M. L., Kevitch R. M., McGrath D. V.: *J. Chem. Soc. Perkin Trans. 1* 2003, **125**, 15668. [65] Shamis M., Lode H. N., Shabat D.: *JACS* 2004, **126**, 1726. [66] Rupp R., Rosenthal S. L., Stanberry L. R.: *Int. J. Nanomed.* 2007, **2**, 561. [67] Krombach G. A., Higgins C. B., Chujo M., Saeed M.: *Radiology* 2005, **236**, 510. [68] Janiszewska J., Swieton J., Lipkowski A. W., Urbanczyk-Lipkowska Z.: *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 2003, **13**, 3711. [69] Janiszewska J., Urbanczyk-Lipkowska Z.: *Acta Biochim. Pol.* 2006, **53**, 77.