

**PRACA
DOKTORSKA**

Marta Sowińska

**Synteza, struktura i badania biologiczne związków
dendrymerycznych zawierających aminokwasy**

Praca przedstawiona

Radzie Naukowej Instytutu Chemii Organicznej Polskiej Akademii Nauk
celem uzyskania stopnia doktora nauk chemicznych

Promotor:

prof. dr hab. Zofia Urbańczyk – Lipkowska

Warszawa 2013

<http://rcin.org.pl>



B. Org. 350/13

Składam serdeczne podziękowania

Pani prof. dr hab. Zofii Urbańczyk – Lipkowskiej
za wszechstronną pomoc w przygotowaniu
niniejszej pracy

Rodzicom, Braciom i Przyjaciołom za wsparcie i
motywację do pracy

Badania były finansowane przez
Grant MNiSW MN204 239436,
Grant Rozwojowy NCBiR NR13-0153-10/2010,
6FP STREP NORMOLIFE Grant LSHC-CT-2006-037733

oraz

ze środków Europejskiego Funduszu Społecznego
i Budżetu Państwa w ramach Zintegrowanego Programu
Operacyjnego Rozwoju Regionalnego, Działania 2.6
„Regionalne Strategie Innowacyjne i transfer wiedzy” projektu
własnego Województwa Mazowieckiego „Mazowieckie
Stypendium Doktoranckie” (2008)
i
„Potencjał naukowy wsparciem dla gospodarki Mazowsza –
stypendia dla doktorantów” (2011)



ZPORR
Zintegrowany Program
Operacyjny
Rozwoju Regionalnego



KAPITAŁ LUDZKI
NARODOWA STRATEGIA SPÓJNOŚCI

Publikacje:

Publikacje związane z tematyką pracy:

1. Sowińska, M.; Kalicki, P.; Bochyńska, M.; Lipkowski, A.W.; Solecka, J.; Rajnisz, A.; Wieczorek, S.A.; Urbańczyk-Lipkowska, Z. „New dendrimers exploring lysine and 3,5-dihydroxybenzoic acid as branching elements – synthesis and biological evaluation” *Collection Symposium Series, Biologically Active Peptides, Academy of Sciences of the Czech Republic* **2011**, 13, 142-144.
2. Janiszewska, J.; Sowińska, M.; Rajnisz, A.; Solecka, J.; Łącka, I.; Milewski, S.; Urbańczyk-Lipkowska, Z. „Novel dendrimeric lipopeptides with antifungal activity.” *Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters* **2012**, 22, 1388-1393.

Publikacje niezwiązane z tematyką pracy:

3. Sowińska, M.; Leśniak, A.; Lipkowski, A.W.; Urbańczyk-Lipkowska, Z. „Dendrimeric peptides with affinity to opioid receptors – complexation studies.” *Proceedings of the 31st European Peptide Symposium, Michal Lebl, Morten Meldal, Knud J. Jensen, Thomas Hoeg-Jensen (Editors), European Peptide Society* **2010**, 592-593.
4. Urbańczyk-Lipkowska, Z.; Sowińska, M. „Dendrymery domino – wielofunkcyjne, biodegradowalne cząsteczki do zastosowań w terapii onkologicznej.” *Gazeta Farmaceutyczna* **2011**, XIX/01, 32-35.

Wykłady i komunikaty:

1. **International Symposium on Antimicrobial Research, 3-5.11.2010, Valladolid, Hiszpania.**

M. Sowińska, P. Polcyn, P. Zielińska, A. Rajnisz, J. Solecka, Z. Urbańczyk-Lipkowska „Amphiphilic dendrimeric peptides with affinity to bacterial membranes – polyvalency vs. selectivity.” [wykład]

2. **VIII Multidyscyplinarna Konferencja Nauki o Leku, 30.05-3.06.2012, Rawa Mazowiecka, Polska.**

Z. Urbańczyk-Lipkowska, M. Sowińska, P. Zielińska, M. Zimnicka, J. Solecka, A. Rajnisz, T. Lind, M. Cárdenas, „Supramolecular assembly and properties of dendrimeric peptide mimics.” [wykład]

3. **II International Conference on Antimicrobial Research, 21-23.11.2012, Lizbona, Portugalia.**

- M. Sowińska, J. Solecka, A. Rajnisz, Z. Urbańczyk-Lipkowska „Design of novel non-hemolytic amphiphilic dendrimers selective on Gram-negative bacteria.” [komunikat]
- Z. Urbańczyk-Lipkowska, M. Sowińska, P. Zielińska, M. Zimmnicka, J. Solecka, A. Rajnisz, T. Lind, M. Cárdenas, I. Łącka, S. Milewski „The molecular basis for antimicrobial activity of a novel dendrimeric peptides.” [komunikat]

Postery:

1. Bio-Dendrimer - 2008, International Symposium on Biomedical Properties and Application of Dendrimers, 3-5.07.2008, Łódź.

M. Sowińska, J. Solecka, A. Rajnisz, Z. Urbańczyk-Lipkowska „Multi-target amphiphilic dendrimeric peptides as antimicrobial agents and carboxypeptidase inhibitors”.

2. II Workshop „From Endogenous Systems to Medicines”, 6.09.2008, Warszawa.

M. Sowińska, J. Solecka, A. Rajnisz, Z. Urbańczyk-Lipkowska „Multi-target amphiphilic dendrimeric peptides as antimicrobial agents and carboxypeptidase inhibitors.”

3. Baltchem – International Young Chemists’ Conference, 2-5.04.2009, Warszawa.

M. Sowińska, A. Rajnisz, J. Solecka, Z. Urbańczyk-Lipkowska „ β -lactam moiety functionalized ammpiphilic dendrimeric peptides – design of new antibiotics and inhibitory agents.”

4. IDS:6, International Dendrimer Symposium 6, 14-18.06.2009, Sztokholm, Szwecja.

M. Sowińska, A. Rajnisz, J. Solecka, Z. Urbańczyk-Lipkowska: „ β -lactam moiety functionalized ammpiphilic dendrimeric peptides – design of new antibiotics and inhibitory agents.”

5. 20th Polish Peptide Symposium, 6-10.09.2009, Władysławowo.

M. Sowińska, J. Solecka, A. Rajnisz, Z. Urbańczyk-Lipkowska „Low molecular weight amphiphilic dendrimeric peptides functionalized with β -lactam moiety.”

6. VII Multidyscyplinarna Konferencja Nauki o Leku, 10-12.05.2010, Zakopane.

M. Sowińska, A. Leśniak, A.W. Lipkowski, Z. Urbańczyk-Lipkowska „Dendrimeric peptides with affinity to opioid receptors – complexation properties.”

7. 31st European Peptide Symposium, 5-9.09.2010, Kopenhaga, Dania.

M. Sowińska, A. Leśniak, A.W. Lipkowski, Z. Urbańczyk-Lipkowska „Dendrimeric peptides with affinity to opioid receptors – complexation properties.”

8. Biologically Active Peptides, XIIth Conference, 27-29.04.2011, Praga, Czechy.

M. Sowińska, P. Kalicki, M. Bochyńska, A.W. Lipkowski, J. Solecka, A. Rajnisz, S.A. Wieczorek, Z. Urbańczyk-Lipkowska „New dendrimers exploring lysine and 3,5-dihydroxybenzoic acid as branching elements – synthesis and biological evaluation.”

9. 21st Polish Peptide Symposium, 4-8.09.2011, Supraśl.

M. Sowińska, P. Kalicki, M. Bochyńska, A.W. Lipkowski, J. Solecka, A. Rajnisz, S.A. Wieczorek, Z. Urbańczyk-Lipkowska „Synthesis and biological evaluation of new dendrimers based on lysine and 3,5-dihydroxybenzoic acid as branching elements.”

10. VIII Multidyscyplinarna Konferencja Nauki o Leku, 30.05-1.06.2012, Rawa Mazowiecka.

M. Sowińska, J. Solecka, A. Rajnisz, M. Bochyńska, A.W. Lipkowski, Z. Urbańczyk-Lipkowska „Novel amphiphilic dendrimers as antibacterial and antitumor agents.”

11. 3rd International Symposium on Biological Applications of Dendrimers, 5-8.09.2012, Toledo, Hiszpania.

Z. Urbańczyk-Lipkowska, M. Sowińska, P. Zielińska, M. Zimnicka, J. Solecka, A. Rajnisz, T. Lind, M. Cárdenas „Structure and properties of dendrimeric peptide mimics towards understanding antimicrobial activity.”

Rezultaty pracy badawczej będą chronione dwoma zgłoszeniami patentowymi.

SPIS TREŚCI

WYKAZ SKRÓTÓW	1
1. CZĘŚĆ LITERATUROWA.....	3
1.1. DENDRYMERY - POLIMERY XXI WIEKU	3
1.1.1. Budowa i charakterystyka dendrymerów.....	4
1.1.2. Efekty dendrytyczne	6
1.1.3. Ewolucja dendrymerów	8
1.1.4. Synteza dendrymerów.....	10
1.1.4.1. Wprowadzenie	10
1.1.4.2. Podstawowe metody syntezy dendrymerów.....	13
1.1.4.3. Nowe metody syntezy dendrymerów.....	21
1.2. WŁASNOŚCI DENDRYMERÓW W UKŁADACH BIOLOGICZNYCH.....	31
1.3. DENDRYMERY ANTYBAKTERYJNE I ANTYBAKTERYJNE SYSTEMY DENDRYTYCZNE.....	34
1.3.1. Niepeptydowe dendrymery antybakteryjne	36
1.3.2. Antybakteryjne systemy dendrytyczne	44
1.3.3. Peptydowe dendrymery antybakteryjne.....	47
2. ZAŁOŻENIA I CEL PRACY	63
3. BADANIA WŁASNE	67
3.1. SYNTEZA DENDRYMERÓW – PROJEKTOWANIE, PLAN SYNTEZY.....	67
3.2. NOWE RDZENIE O CHARAKTERZE HYDROFOBOWYM.....	73
3.3. SYNTEZA DENDRYMERÓW OPARTYCH NA RDZENIACH HYDROFOBOWYCH.....	78
3.3.1. Synteza dendrymerów z terminalnymi resztami lizynowymi.....	78
3.3.2. Synteza dendrymerów z terminalnymi resztami tryptofanowymi lub pochodnych tryptofanu.....	82
3.3.3. Synteza dendrymerów z terminalnymi resztami PABA	95
3.3.4. Synteza dendrymerów typu Janus.....	97
3.4. NOWE RDZENIE O CHARAKTERZE KATIONOWYM.....	106
3.5. SYNTEZA DENDRYMERÓW OPARTYCH NA RDZENIACH KATIONOWYCH	109
3.5.1. Synteza dendrymerów z terminalnymi resztami lizynowymi.....	109

3.5.2. Synteza dendrymerów z terminalnymi resztami tryptofanowymi lub pochodnych tryptofanu	114
3.6. PODSUMOWANIE CZĘŚCI SYNTETYCZNEJ	121
4. BADANIA AKTYWNOŚCI BIOLOGICZNEJ DENDRYMERÓW.....	123
4.1. AKTYWNOŚĆ PRZECIWBAKTERYJNA	123
4.1.1. Aktywność przeciwbakteryjna dendrymerów wobec szczepów referencyjnych..	124
4.1.2. Aktywność przeciwbakteryjna dendrymerów wobec szczepów klinicznych	129
4.2. AKTYWNOŚĆ PRZECIWNOWOTWOROWA.....	130
4.3. TOKSYCZNOŚĆ (HEMO-, CYTO- I GENOTOKSYCZNOŚĆ).....	133
4.4. PODSUMOWANIE BADAŃ AKTYWNOŚCI BIOLOGICZNEJ.....	138
5. PODSUMOWANIE I WNIOSKI	143
6. CZĘŚĆ EKSPERYMENTALNA	145
6.1. UWAGI OGÓLNE	145
6.2. SYNTETYCZNE PROCEDURY OGÓLNE.....	147
6.3. SYNTEZA SUBSTRATÓW	149
6.3.1. Synteza amidów <i>L</i> -lizyny i związku nieaminokwasowego oraz dipeptydu KW-OMe	149
6.3.2. Synteza symetrycznego i niesymetrycznego elementu rozgałęziającego opartego na kwasie 3,5 – dihydroksybenzoesowym.....	152
6.3.3. Synteza pochodnych kwasu <i>p</i> -aminobenzoesowego i <i>p</i> -aminobenzenosulfonowego	156
6.3.4. Synteza pochodnych tryptofanu.....	157
6.3.5. Synteza elementu rozgałęziającego opartego na dietylenotriaminie	159
6.4. SYNTEZA RDZENI O CHARAKTERZE HYDROFOBOWYM	160
6.4.1. Boc-zabezpieczone rdzenie.....	160
6.4.2. Odbezpieczone rdzenie	166
6.5. SYNTEZA DENDRYMERÓW OPARTYCH NA RDZENIACH HYDROFOBOWYCH	169
6.5.1. Synteza dendrymerów z terminalnymi resztami lizynowymi.....	169
6.5.1.1. Zabezpieczone dendrymery	169
6.5.1.2. Odbezpieczone dendrymery.....	179
6.5.1.2.1. Boc-odbezpieczone dendrymery (<i>tetrachlorowodorki</i>)	180
6.5.1.2.2. Z-odbezpieczone dendrymery – dendrymery pośrednie	186

6.5.2. Synteza dendrymerów z terminalnymi resztami tryptofanowymi lub pochodnych tryptofanu	191
6.5.2.1. Boc-zabezpieczone dendrymery	191
6.5.2.2. Odbezpieczone dendrymery.....	200
6.5.3. Synteza dendrymerów z terminalnymi resztami PABA	209
6.5.3.1. Boc-zabezpieczone dendrymery	209
6.5.3.2. Odbezpieczone dendrymery.....	213
6.5.4. Synteza dendrymerów typu Janus.....	216
6.5.4.1. Synteza „dendronów 2”	216
6.5.4.2. Synteza dendrymerów pośrednich.....	218
6.5.4.2.1. Zabezpieczone dendrymery.....	218
6.5.4.2.2. Odbezpieczone dendrymery	219
6.5.4.3. Synteza dendrymerów finalnych.....	222
6.5.4.3.1. Zabezpieczone dendrymery.....	222
6.5.4.3.2. Odbezpieczone dendrymery	228
6.6. SYNTEZA RDZENI O CHARAKTERZE KATIONOWYM.....	233
6.6.1. Boc-zabezpieczone rdzenie	234
6.6.2. Odbezpieczone rdzenie	236
6.7. SYNTEZA DENDRYMERÓW OPARTYCH NA RDZENIACH KATIONOWYCH	237
6.7.1. Synteza dendrymerów z terminalnymi resztami lizynowymi.....	237
6.7.1.1. Zabezpieczone dendrymery	237
6.7.1.2. Odbezpieczone dendrymery.....	241
6.7.1.2.1. Boc-odbezpieczone dendrymery (heksachlorowodorki).....	242
6.7.1.2.2. Z-odbezpieczone dendrymery – dendrymery pośrednie	245
6.7.2. Synteza dendrymerów z terminalnymi resztami tryptofanowymi lub pochodnych tryptofanu	246
6.7.2.1. Boc-zabezpieczone dendrymery	246
6.7.2.2. Odbezpieczone dendrymery.....	250
7. CYTOWANA LITERATURA	255
8. ZAŁĄCZNIKI (PŁYTA CD).....	264
8.1. NUMERACJA ZWIĄZKÓW	
8.2. WIDMA MS	

WYKAZ SKRÓTÓW

AMP	peptydy przeciwdrobnoustrojowe (<i>ang. Antimicrobial Peptides</i>)
5-AP	reszta 5-(Boc-amino)pentylu lub 5-aminopentylu
Ala, A	<i>L</i> -alanina
Arg, R	<i>L</i> -arginina
Asp, D	<i>L</i> -kwas asparaginowy
ATCC	Amerykańska Kolekcja Hodowli Komórkowych (<i>ang. American Type Culture Collection</i>)
Boc	grupa tert-butoksykarbonylowa
2-Cl-Z	grupa 2-chlorobenzylotoksykarbonylowa
COSY	homojądrowa spektroskopia korelacyjna ^1H - ^1H (<i>ang. Corelation Spectroscopy</i>)
DCC	<i>N,N'</i> -dicykloheksylokarbodiimid
DCU	<i>N,N'</i> -dicykloheksylomocznik
DDA	dodecyloamina
dDDA	didodecyloamina
DEPT	technika NMR niezakłóconego wzmocnienia w wyniku przeniesienia polaryzacji (<i>ang. Distortionless Enhancement by Polarization Transfer</i>)
DHBA	kwas 3,5-dihydroksybenzoesowy
EDA	etylenodiamina
EDC	chlorowodorek 1-etylo-3-(3-dimetyloaminopropyl)karbodiimidu
ekw.	ekwiwalent (równoważnik molowy)
ESI	technika jonizacji poprzez rozpylanie w polu elektrycznym (elektrosprej)
G	generacja dendrymeru
Gln, Q	<i>L</i> -glutamina
Glu, E	<i>L</i> -kwas glutaminowy
Gly, G	<i>L</i> -glicyna
HC ₅₀	stężenie związku powodujące 50% hemolizy
His, H	<i>L</i> -histydyna
HOBt	1-hydroksybenzotriazol
HSQC	heterojądrowa pojedyncza kwantowa korelacja ^1H - ^{13}C (<i>ang. Heteronuclear Single Quantum Coherence</i>)
Ile, I	<i>L</i> -izoleucyna
Leu, L	<i>L</i> -leucyna
Lys, K	<i>L</i> -lizyna
LRMS	niskorozdzielcza spektroskopia mas
Trp, W	<i>L</i> -tryptofan
MALDI	desorpcja laserowa z udziałem matrycy (<i>ang. Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization</i>)
MIC	minimalne stężenie związku całkowicie hamujące wzrost bakterii (<i>ang. Minimal Inhibitory Concentration</i>)
MIC ₅₀	minimalne stężenie związku hamujące wzrost 50% kolonii bakterii
nas.	nasycony

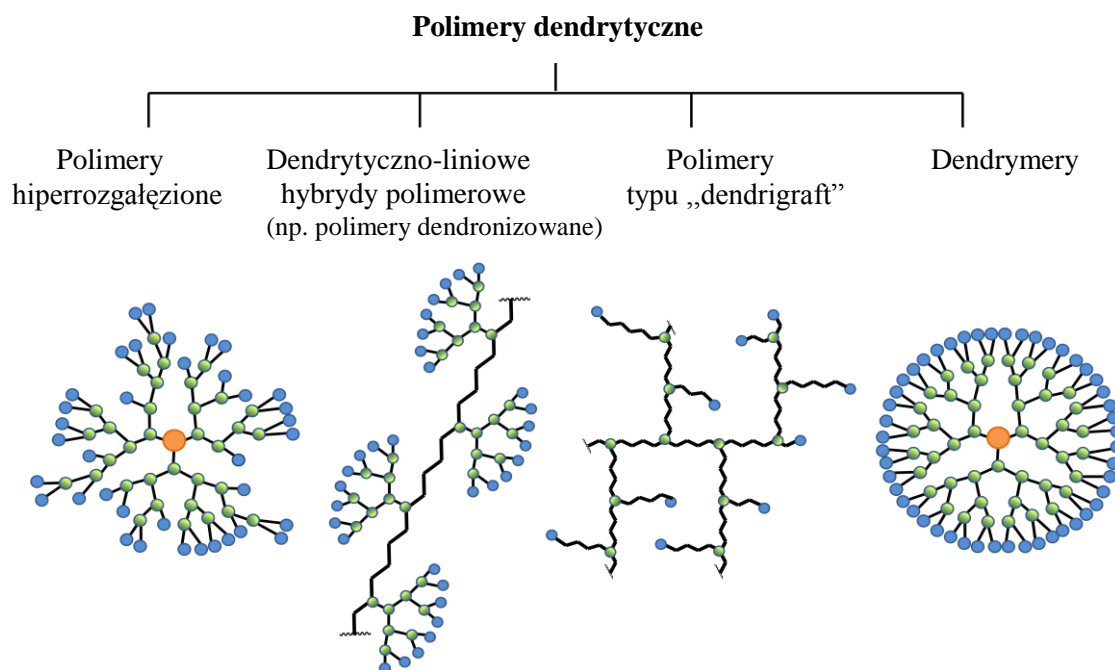
n-Bu	reszta n-butylu
NMR	spektroskopia magnetycznego rezonansu jądrowego
NOON	2,2'-(etylenodioksy)dietyloamina
Orn	<i>L</i> -ornityna
PABA	kwask p-aminobenzoesowy
PAMAM	dendrymer poli(amidoaminowy)
PDI	stopień polidispersyjności
PEA	fenyloetyloamina
PEG	poli(glikol etylenowy)
Phe, F	<i>L</i> -fenyloalanina
PPI	dendrymer poli(propylenoiminowy)
Pro, P	<i>L</i> -prolina
R _f	współczynnik opóźnienia
SA	kwask p-aminobenzenosulfonowy
Ser, S	<i>L</i> -seryna
TA	tryptamina
temp.	temperatura
temp. topn.	temperatura topnienia
TI	indeks terapeutyczny (<i>ang. Therapeutic Index</i>)
TLC	chromatografia cienkowarstwowa
Tyr, Y	<i>L</i> -tyrozyna
Val, V	<i>L</i> -walina
Z	grupa benzyloksykarbonyłowa

1. CZĘŚĆ LITERATUROWA

1.1. DENDRYMERY - POLIMERY XXI WIEKU

Polimery (gr. *polymeres* - wieloczęściowy, złożony z wielu części) to makrocząsteczki zbudowane z powtarzających się jednostek (merów, monomerów).¹ Różne typy połączeń monomerów prowadzą do uzyskania związków o różnych strukturach i w konsekwencji o odmiennych właściwościach. Większa kontrola nad procesem polimeryzacji, jak również wzrost wymagań rynku i konsumentów, przyczynia się do ciągłej ewolucji w chemii polimerów. Podczas gdy pierwsze polimery syntetyczne cechowały się prostymi, polidispersyjnymi strukturami, obecne makrocząsteczki posiadają bardziej złożoną budowę i mniejszy stopień polidispersyjności, lub nawet otrzymywane są w postaci monodispersyjnej. Syntetyczne polimery można podzielić ze względu na ich strukturę na cztery główne klasy, tj. polimery liniowe, usieciowane, rozgałęzione i dendrytyczne.

Polimery dendrytyczne stanowią jak dotychczas najmłodszą grupę polimerów, charakteryzującą się silnie rozgałęzioną i gęsto upakowaną budową. Klasyfikuje się je, w zależności od stopnia kontroli procesu polimeryzacji, do czterech podklas obejmujących polimery hiperrozgałęzione, dendrytyczno-liniowe hybrydy polimerowe, polimery typu „dendrigraft” i dendrymery (Rysunek 1).²



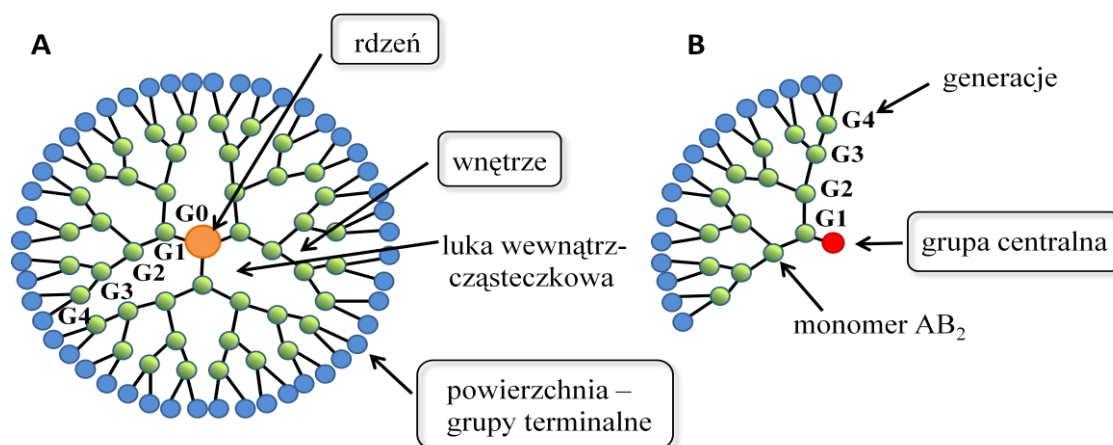
Rysunek 1. Podklasy polimerów dendrytycznych.

Pierwsze dwie podklasy to polimery statystyczne, posiadające stopień polidispersyjności (PDI) w granicach 1.5 – 10. Polimery typu „dendrigraft” są makrocząsteczkami

otrzymywanymi w wyniku procesów częściowo kontrolowanych, w wyniku czego cechują się niższym PDI, wynoszącym 1.1 – 1.5. W przeciwieństwie do wszystkich znanych polimerów, dendrymery z PDI mieszczącym się w granicach 1.0 – 1.05 należą do związków monodispersyjnych. Są one otrzymywane w procesach ściśle kontrolowanych, dzięki czemu można im przypisać dokładną masę cząsteczkową i strukturę. Z racji tej unikalnej cechy w chemii polimerów, dendrymery są grupą perspektywną, mogącą stanowić w przyszłości ważne źródło nie tylko nowych materiałów o przydatności technologicznej, ale przede wszystkim środków farmaceutycznych nowej generacji. Często są one określane mianem polimerów XXI wieku.³

1.1.1. Budowa i charakterystyka dendrymerów

Dendrymery są trójwymiarowymi makrocząsteczkami posiadającymi precyzyjnie zdefiniowaną, regularną strukturę z trzema charakterystycznymi elementami: rdzeniem lub grupą centralną, wnętrzem i powierzchnią (Rysunek 2). Wszystkie trzy elementy pełnią istotne funkcje, wpływając w mniejszym lub w większym stopniu na rozmiar, kształt i właściwości dendrymeru. Rozmiar makrocząsteczki określany jest przez jej generację, czyli liczbę powtarzających się warstw rozgałęzionych monomerów przyłączonych do rdzenia (G1, G2, itd.). Swoista budowa dendrymerów jest przyczyną obecności w ich budowie wolnych przestrzeni, tzw. luk wewnątrzcząsteczkowych.



Rysunek 2. Budowa dendrymeru G4 (A) opartego na trójfunkcyjnym rdzeniu i dendrymeru (dendronu) G4 (B) z grupą centralną zsyntetyzowanych z użyciem monomeru AB_2 .

Rdzeń stanowi centralny element dendrymeru i na ogół nazywany jest generacją zerową (G0). W jego roli może występować dowolna, wielofunkcyjna cząsteczka (B_n , gdzie $n \geq 2$). Jednakże wybór odpowiedniej cząsteczki rdzenia jest krytyczny w projektowaniu dendrymeru, gdyż decyduje ona m.in. o jego wymiarach, kształcie, kierunku rozbudowy czy

wymiarach luk w jego wnętrzu. Istnieją również dendrymery nie zawierające rdzenia, które podczas syntezy rozwijają się tylko w jednym kierunku. Posiadają one w swojej strukturze tzw. **grupę centralną** (*ang. focal group*), będącą zabezpieczoną grupą funkcyjną. Przyjmuje się, że spośród nich struktury niskocząsteczkowe ($G < 4$) to tzw. dendrony (gałęzie dendrymeru).⁴ Bardzo często wykorzystywane są one do syntezy właściwych dendrymerów poprzez aktywację ich grupy centralnej i przyłączenie do rdzenia. W efekcie nawet struktury wysokocząsteczkowe ($G \geq 4$), jeśli poddawane są przyłączeniu do rdzenia, określane są jako dendrony.

Wnętrze składa się z powtarzających się po sobie rozgałęzionych monomerów (AB_n , gdzie $n \geq 2$) tworzących warstwy dendrymeru, tj. generacje, oraz luk wewnątrzcząsteczkowych. W przypadku dendrymerów, w których tworzeniu warstwy towarzyszy zmiana jednego typu grup funkcyjnych na inny, można wyróżnić generacje połówkowe i całkowite. Przykładem są dendrymery poliamidoaminowe (PAMAM), w których generacja powstaje w wyniku dwuetapowej syntezy, tj. przyłączenia akrylanu metylu do grup aminowych, a następnie aminolizy grup estrowych z użyciem etylenodiaminy (Rozdział 1.1.4.2., Schemat 3).

Właściwości wnętrza uwarunkowane są przede wszystkim przez rodzaj monomeru zastosowanego do syntezy dendrymeru. Możliwości zaprojektowania wnętrza posiadającego luki wewnątrzcząsteczkowe o żądanych wymiarach, jak i ściśle określone mikrośrodowisko, pozwalają na enkapsulację rozmaitych związków (dendrytyczne układy gość – gospodarz).⁵

Powierzchnia dendrymeru tworzona jest przez grupy terminalne (peryferyjne), które w głównej mierze odpowiadają za właściwości fizykochemiczne i biologiczne całej makrocząsteczki. Ich ilość (N) zależy od funkcyjności rdzenia (F_r) oraz monomeru (F_m) i rośnie wykładniczo w zależności od generacji (G):⁶

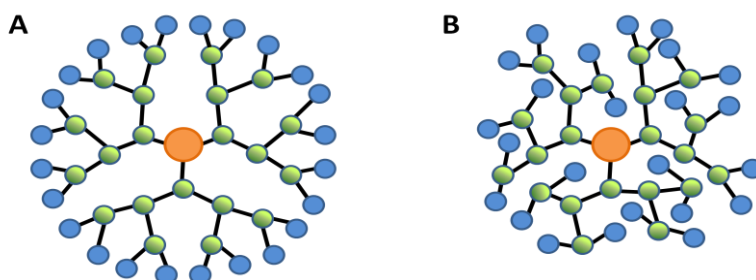
$$N = F_r (F_m - 1)^G$$

W większości przypadków dendrymery posiadają reaktywne grupy terminalne, które mogą być poddawane dalszej modyfikacji. Post-modyfikacja powierzchni makrocząsteczki przeprowadzana jest zarówno w celu zmiany właściwości fizykochemicznych związku, np. rozpuszczalności, jak i wygenerowania określonej aktywności, np. katalitycznej, fluorescencyjnej, antynowotworowej.

Dendrymery są typowo przedstawiane „na papierze” jako makrocząsteczki z rozpostartymi gałęziami (dendronami), w których wszystkie grupy terminalne znajdują się na powierzchni tworząc „zewnątrzny pierścień” wokół rdzenia (Rysunek 3:A). W konsekwencji,

posiadają one niską gęstość upakowania w obszarze rdzenia, która regularnie wzrasta w kierunku powierzchni osiągając tam wartość maksymalną. Ta idealistyczna wizja dendrymeru, zaproponowana przez Maciejewskiego⁷ oraz de Gennes'a i Hervet'a,⁸ znana jest jako model gęsto upakowanej powierzchni (*ang. dense-shell model*).

Natomiast Lescanec i Muthukumar są autorami tzw. modelu gęsto upakowanego rdzenia (*ang. dense-core model*).⁹ Zgodnie z nim gęstość upakowania dendrymeru osiąga maksimum w rejonie pomiędzy rdzeniem a częścią peryferyjną, na którą przypada minimum (Rysunek 3:B). Taki rozkład gęstości w makrocząsteczce wynika z zawijania się niektórych grup terminalnych do jej wnętrza (*ang. backfolding effect*).



Rysunek 3. Modele dendrymeru: model gęsto upakowanej powierzchni (A) i model gęsto upakowanego rdzenia (B).

Liczne badania obliczeniowe oraz doświadczalne wskazują na to, że dendrymery są cząsteczkami giętkimi, o dużej swobodzie konformacyjnej, mogącymi zmieniać dosyć łatwo swój kształt i rozmiar.¹⁰ Przyjmują one różne konformacje, które mogą być bliższe konformacji proponowanej przez model gęsto upakowanej powierzchni, bądź model gęsto upakowanego rdzenia. Badania dowodzą, że grupy terminalne posiadają tendencję do zawijania się do wnętrza struktury dendrytycznej, przy czym stopień tego efektu zależy od generacji dendrymeru i jego budowy, jak również od jego otoczenia, czynników zewnętrznych. Może on występować zarówno w roztworze, jak i w ciele stałym.¹¹

Tendencja grup terminalnych do zawijania się jest zjawiskiem niekorzystnym. Może bowiem poważnie komplikować syntezę dendrymerów oraz ograniczać możliwości ich wykorzystania, ponieważ wiele zastosowań tych makrocząsteczek opiera się na dostępności ich grup peryferyjnych (dla modyfikacji, jako aktywne ligandy, itp.).

1.1.2. Efekty dendrytyczne

Unikalna budowa dendrymerów z regularną siecią rozgałęzień i dużą zawartością grup terminalnych wiąże się z występowaniem tzw. **efektów dendrytycznych** (*ang. dendritic effects*).^{6,12} Termin ten obejmuje wiele różnych chemicznych, fizycznych i biologicznych

zjawisk, których cechą wspólną jest zmiana pewnych właściwości dendrymeru w funkcji jego generacji. Są one określane jako dodatnie lub ujemne efekty dendrytyczne w zależności od tego, czy obserwowana właściwość ulega wzmocnieniu czy osłabieniu ze wzrostem generacji makrocząsteczki.

Ciągły rozwój chemii dendrymerów prowadzi do makrocząsteczek o coraz bardziej wyszukanych, „zaprogramowanych” właściwościach, w rezultacie czego powstają również nowe efekty dendrytyczne. Generalnie wszystkie efekty dendrytyczne mogą być sklasyfikowane jako zjawiska obserwowane dla właściwości inherentnych dendrymeru oraz te dotyczące jego właściwości aplikacyjnych. Przykładami efektów dendrytycznych należących do pierwszej grupy są m.in. zjawiska zmiany kształtu, ilości grup terminalnych, wartości lepkości właściwej, stopnia ekranowania/przesłaniania rdzenia czy właściwości enkapsulacyjnych dendrymeru. Spośród efektów dendrytycznych należących do drugiej grupy można wymienić generacyjnie zależne zjawiska zmiany właściwości biologicznych (np. antybakteryjnych), diagnostycznych, katalitycznych czy fotochemicznych makrocząsteczki. Są one efektami wtórnymi zjawisk z pierwszej grupy powyższego podziału i mogą występować, jeśli zapewnione są ku temu odpowiednie warunki. Np. efekt ekranowania rdzenia przez dendrony (*ang. shielding/blocking effect, site isolation effect*), wzrastający wraz z generacją, może prowadzić do zmiany m.in. właściwości fotochemicznych czy katalitycznych dendrymeru, w którym rolę rdzenia pełni cząsteczka aktywna (chromofor, katalizator). Natomiast wzrost ilości grup terminalnych często prowadzi do synergicznego spotęgowania aktywności makrocząsteczki, jeśli jako grupy terminalne występują reszty aktywnych cząsteczek.

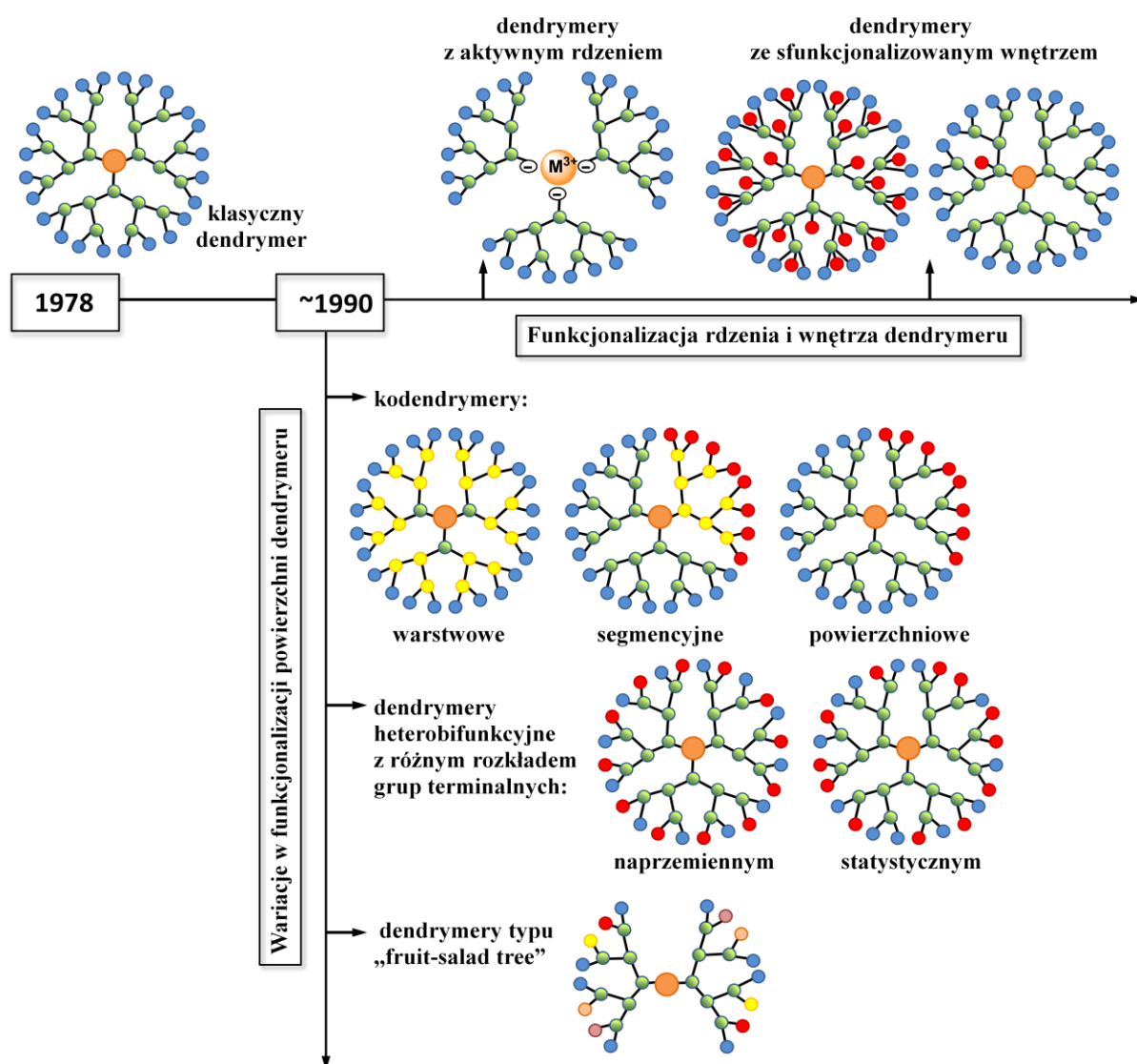
Możliwość wzmocnienia bądź osłabienia teoretycznie dowolnej właściwości związku jest niezwykle użytecznym zjawiskiem. Efekt dendrytyczny czyni z dendrymerów atrakcyjne, potencjalne narzędzie pozwalające na rozwiązywanie problemów związanych np. z niektórymi lekami, których stosowalność jest ograniczona przez ich wysoką toksyczność, słabą rozpuszczalność, niewystarczającą aktywność, itp. Niestety przy projektowaniu dendrymeru trudno jest przewidzieć czy wystąpi w nim pożądaný efekt dendrytyczny, gdyż jest to zależne od wielu parametrów, takich jak: rozmiar, budowa chemiczna, elastyczność, temperatura, rozpuszczalnik, itp. Ze względu na złożoność mechanizmów trudniej jest zaplanować katalityczne czy biologiczne efekty dendrytyczne niż np. elektrochemiczne czy fotochemiczne.

1.1.3. Ewolucja dendrymerów

Idea tworzenia silnie rozgałęzionych związków polimerycznych została opisana przez Flory'ego już w roku 1941.¹³ Niestety, dostępne wtedy metody syntezy i identyfikacji otrzymywanych związków nie były na tyle zaawansowane, by można było pokusić się o syntezę tego typu polimerów. Po raz pierwszy zostały one otrzymane dopiero w roku 1978 przez Vögtle'a, który opracował kaskadową metodę syntezy niskocząsteczkowych dendrymerycznych amin, tj. 1 i 2 generacji. Trzy lata później Denkewalter opatentował pierwsze wysokocząsteczkowe dendrymery polilizynowe, uzyskane metodą rozbieżną do generacji 10. W roku 1985 pojawiły się publikacje Tomalii i Newkome'a¹⁴. Pierwszy z nich zaprezentował syntezę wysokocząsteczkowych dendrymerów PAMAM (G10), podczas gdy drugi opisał syntezę niskocząsteczkowych dendrymerów poli(eterowych) (G3). Wartym wspomnienia jest fakt, że używanie terminu „dendrymer” (z greckiego *dendron* = drzewo, *meros* = część) na określenie tej nowej grupy związków, zostało zaproponowane właśnie przez Tomalię. Kolejny wkład w chemię dendrymerów wnieśli Hawker i Frechet prezentując w roku 1990 syntezę związków poli(aryloeterowych) według nowej metody syntetycznej, tj. strategii zbieżnej, będącej komplementarną do dotychczas stosowanej metody rozbieżnej (Rozdział 1.1.4.2.).

Lata 90-te XX wieku stanowią przełom w rozwoju chemii dendrymerów. Znaczny wzrost zainteresowania tą grupą makrocząsteczek odzwierciedlił się w ilości publikacji i patentów, narastającej gwałtownie z każdym rokiem. Przy czym w pierwszej połowie lat 90-tych prace skoncentrowane były przede wszystkim na opracowaniu nowych, efektywniejszych metod syntezy dendrymerów, umożliwiających otrzymanie produktu w znacznie krótszym czasie oraz w mniejszej ilości etapów (Rozdział 1.1.4.3.). W tym samym czasie zaczęły również powstawać pierwsze nowe dendrymery, różniące się od tych klasycznych, zbudowanych przy użyciu jednego typu monomeru (AB_n , gdzie $n \geq 2$) i posiadających jednakowo sfunkcjonalizowaną powierzchnię (Rysunek 4). Synteza nowych makrocząsteczek, zawierających w swojej strukturze różne bloki budulcowe (monomery, np. AB_n i CD_n , gdzie $n \geq 2$), zwanych dendrymerami blokowymi (*ang. block dendrimers*) lub kodendrymerami (*ang. codendrimers*), została zapoczątkowana w grupie Frechet'a.¹⁵ Ogromna liczba dendrymerów tego typu, z coraz bardziej wyszukaną budową, jest otrzymywana do dnia dzisiejszego. Klasyfikuje się je do trzech głównych grup, tj. kodendrymerów warstwowych, segmencyjnych i powierzchniowych, przy czym dwie ostatnie grupy określane są często jako dendrymery typu „Janus”.¹⁶

Dendrymery z dwoma lub większą liczbą typów grup terminalnych szybko wzbudziły szersze zainteresowanie ze względu na to, że ich heterofunkcyjność pozwala na połączenie kilku różnych właściwości w jednym związku. W efekcie, od drugiej połowy lat 90-tych rozpoczęła się synteza heterobifunkcyjnych dendrymerów z naprzemiennym¹⁷ bądź statystycznym¹⁸ rozkładem grup terminalnych. Od połowy zaś 1-ego 10-lecia XXI wieku zaczęły pojawiać się makrocząsteczki zawierające co najmniej 3 typy grup terminalnych, mogących ulegać ortogonalnej post-modyfikacji, jak np. tzw. „fruit-salad trees”¹⁹ zsyntetyzowane przez Steffensen’a i Simanek’a.



Rysunek 4. Ewolucja dendrymerów.

Odejście od klasycznego postrzegania rdzenia / grupy centralnej czy wnętrza dendrymerów jako nieaktywnych elementów strukturalnych, pozwoliło na dalszą ewolucję tych makrocząsteczek. Polegała ona na wprowadzeniu funkcyjności do wspomnianych części

dendrymeru i rozpoczęła się już w latach 90-tych.²⁰ Pierwsze 10-lecie XXI wieku przyniosło ogromny rozwój zarówno chemii dendrymerów posiadających aktywny rdzeń (np. chromofor, grupę o aktywności katalitycznej, elektrochemicznej), jak i chemii dendrymerów ze sfunkcjonalizowanym wnętrzem, gdzie grupy funkcyjne mogą być zlokalizowane we wszystkich²¹ bądź w konkretnych generacjach.²²

1.1.4. Synteza dendrymerów

1.1.4.1. Wprowadzenie

Dendrymery określane są jako nowe materiały polimerowe, gdyż zarówno pod względem otrzymywania, jak i właściwości znacznie różnią się od klasycznych polimerów. W przeciwieństwie do nich, dendrymery są syntetyzowane w ściśle kontrolowanych warunkach, które prowadzą do związków o dokładnie określonych masach cząsteczkowych (związków monodispersyjnych) i bardzo regularnej strukturze. Istotą struktury tej nowej klasy syntetycznych makrocząsteczek jest dobrze zdefiniowany i powtarzalny schemat rozgałęzień, przypominający gałęzie drzewa. Dzięki wykorzystaniu szerokiej gamy substratów i typów reakcji chemicznych możliwości otrzymywania nowych struktur dendrymerycznych są praktycznie nieograniczone. Poprzez umiejętny dobór rdzenia oraz bloków budulcowych (monomerów) można skonstruować dendrymer o żądanych parametrach strukturalnych, takich jak np. rozmiar, kształt, giętkość czy wielkość wolnych przestrzeni wewnątrzcząsteczkowych. Teoretycznie można również zaplanować właściwości fizyczne i chemiczne dendrymeru w stopniu nieosiągalnym w standardowych procesach polimeryzacji. Co więcej, możliwa jest zmiana tych właściwości w wyniku modyfikacji licznych grup końcowych dendrymeru.

Synteza dendrymerów jest w większości przypadków wielokrotną sekwencją dwóch prostych reakcji chemicznych, podczas której operuje się dwiema bądź trzema różnymi grupami funkcyjnymi. Każda całkowita sekwencja prowadzi do dendrymeru wyższej generacji z podwojoną liczbą grup końcowych i w przybliżeniu podwojoną masą cząsteczkową w porównaniu do generacji poprzedniej. Teoretycznie więc, synteza dendrymeru wydaje się być procesem łatwym do przeprowadzenia, jednakże w rzeczywistości jest ona wyjątkowo żmudna i czasochłonna. Co więcej, końcowa wydajność, pomimo stosowania reakcji wysoce selektywnych, jest na ogół niska. Z pozostałych wad należy wymienić wysokie koszty syntezy, tym wyższe im większa jest makrocząsteczka, oraz ograniczenia dotyczące możliwości uzyskania dendrymerów wyższych generacji bez defektów strukturalnych. Konsekwencją tej sytuacji jest komercyjna dostępność tylko

niewielu klas dendrymerów, tj. dendrymerów poliamidoaminowych (PAMAM[®], Sigma-Aldrich), polipropylenoiminowych (DAB[®], Sigma-Aldrich), fosforowych (PMMH, Sigma-Aldrich) oraz dendrymerów kwasu 2,2-bis(hydroksymetylo)propionowego (bis-MPA, Polymer Factory Sweden).

Głównym czynnikiem implikującym trudność dendrymeryzacji jest czynnik stereochemiczny. To właśnie przestrzenna dostępność grup funkcyjnych na każdym etapie dendrymeryzacji stanowi najważniejszy problem w syntezie dendrymerów. Jednym z powodów ograniczonego dostępu do wszystkich terminalnych grup funkcyjnych makrocząsteczki jest ich tendencja do zawijania się do wnętrza dendrymeru (*ang. backfolding*). Zjawisko to zależy zarówno od czynników zewnętrznych, takich jak np. rodzaj rozpuszczalnika, jak i od wewnętrznej budowy dendrymeru, np. giętkości elementów strukturalnych, możliwości oddziaływań wewnątrzcząsteczkowych pomiędzy sąsiednimi fragmentami. Drugim czynnikiem są zawady steryczne pojawiające się na powierzchni dendrymeru. Liczba reaktywnych grup terminalnych rośnie wykładniczo ze wzrostem generacji, co prowadzi do ich coraz gęstszego upakowania na powierzchni dendrymeru (zatłoczenia przestrzennego), aż dla pewnej generacji osiągnięty jest stan zwany krytyczną gęstością upakowania de Gennes'a (*ang. de Gennes dense packing*) lub efektem starburst (*ang. starburst limit effect*).²³ Przejawia się on niemożnością przyłączenia kolejnej generacji monomerów w sposób ilościowy, tj. poprzez przereagowanie wszystkich terminalnych grup funkcyjnych dendrymeru. Stan ten osiągnięty jest przy różnych wartościach generacji w zależności od takich czynników jak, m.in. rozmiar i funkcyjność rdzenia oraz monomerów. Na przykład dla dendrymerów PAMAM zbudowanych na rdzeniu amoniaku punkt krytyczny (*ang. starburst limited generation*) osiągnięty jest przy generacji dziesiątej. Tak więc przy projektowaniu dendrymeru, zwłaszcza wyższej generacji, należy uważnie rozpatrzyć nie tylko czynniki chemiczne, ale przede wszystkim czynniki stereochemiczne, takie jak długości i kąty wiązań, odległości międzyatomowe, rozmiary atomów rdzenia i bloków budulcowych dendrymeru.

Synteza dendrymerów prowadzona jest przy wykorzystaniu szerokiego asortymentu reakcji i metod zarówno klasycznej, jak i nowoczesnej chemii organicznej. Dzięki temu możliwa jest synteza makrocząsteczek o zróżnicowanej budowie, m.in. opartej na związkach alifatycznych i aromatycznych [np. dendrymery poli(eterowe), poli(estrowe), poli(amidowe), poli(fenyłowe), poli(fenyloacetyłowe)], metaloorganicznych, krzemoorganicznych, fosforoorganicznych,²⁴ aminokwasach,²⁵ porfirynach, itp. Dendrymery są również otrzymywane na drodze reakcji enzymatycznych. Pierwsza taka synteza została opisana w

roku 1998.²⁶ Dendrymer pierwszej generacji na rdzeniu poli(ϵ -kaprolaktonu) (PCL) uzyskano metodą selektywnego acylowania pierwszorzędowych, hydroksylowych grup końcowych łańcuchów PCL z udziałem lipazy B *Candida antarctica*.

W przeciwieństwie do reakcji polimeryzacji, dendrymeryzacja może przebiegać zarówno z utworzeniem wiązań kowalencyjnych, jak i niekowalencyjnych czy też w procesie samoorganizacji (*ang. self-assembly*). Przykładem jest proces otrzymywania dendrymerów metaloorganicznych, w którym po dodaniu soli metalu następuje samoorganizacja dendronów zawierających elementy chelatujące wokół jonu metalu jako rdzenia.²⁷

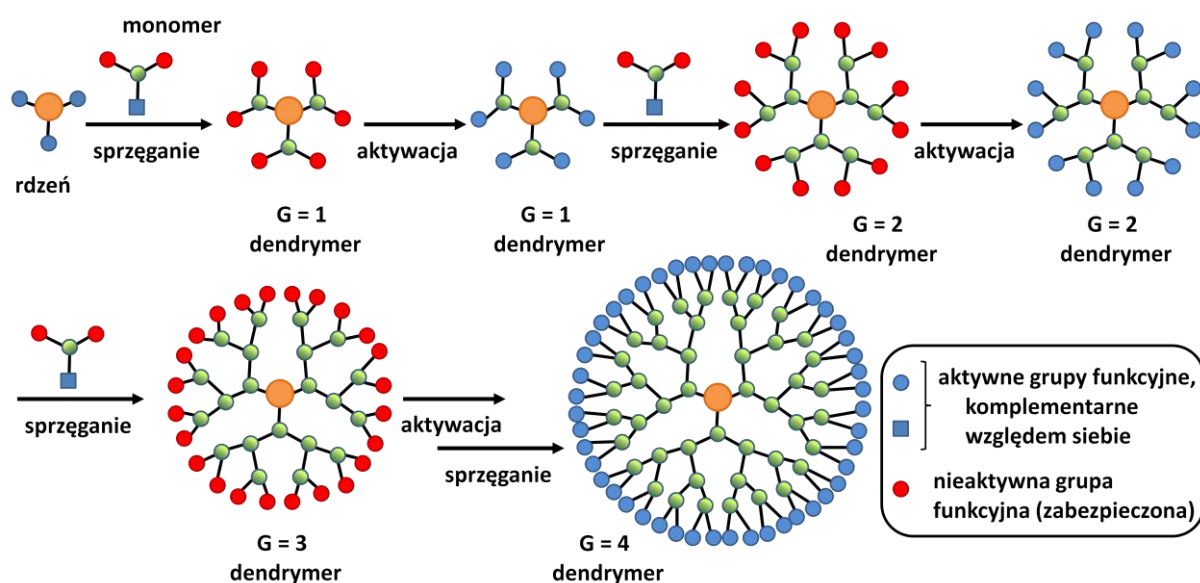
Rozpatrując metodologię syntezy, dendrymery otrzymuje się zarówno poprzez klasyczną syntezę w roztworze, jak i poprzez syntezę na nośniku stałym. Synteza na nośniku stałym jest głównie wykorzystywana do przygotowania dendrymerów peptydowych lub glikopeptydowych.²⁸ Najbardziej znanym przykładem są dendrymery polilizynowe, spośród których podstawowe struktury (tetra- i oktamery) znajdują zastosowanie jako nośniki w tzw. systemach MAP (*ang. Multiple Antigenic Peptide*).²⁹ Dendrony polilizynowe przyłączone do żywicy są dostępne komercyjnie (Novabiochem, Sigma-Aldrich, Bachem). Istnieją również nieliczne przykłady dendrymerów niepeptydowych zsyntetyzowanych na nośniku stałym.³⁰ Między innymi, Bradley'owi i wsp. udało się otrzymać tą metodą dendrymery PAMAM G4 zbudowane na rdzeniu dipropylenotriaminy.³¹

Synteza dendrymerów może być zrealizowana na kilka różnych sposobów, spośród których do podstawowych strategii należą synteza rozbieżna (*ang. divergent, inside out*) oraz synteza zbieżna (*ang. convergent, outside in*). Najbardziej widoczną różnicą między obiema metodami jest kierunek syntezy dendrymeru – w procedurze pierwszej synteza dendrymeru przebiega od rdzenia do jego peryferii, natomiast w procedurze drugiej w kierunku odwrotnym, od peryferii do rdzenia. I tak, pierwsze dendrymery zsyntetyzowane metodą rozbieżną powstały w zespole Vögtle'a już w roku 1978.³²

W celu uproszczenia i przyspieszenia syntezy, a także aby ułatwić oczyszczanie produktu końcowego, opracowano nowe metody syntezy dendrymerów, takie jak: metodę hipermonomeru (*ang. hypermonomer method, branched monomer approach*), metodę hiperrdzenia (*ang. double-stage convergent method, hypercore approach*), metodę podwójnego wzrostu wykładniczego (*ang. double-exponential method*) oraz metodę ortogonalną (*ang. two-step approach, two monomer approach, AB₂-CD₂ approach, the orthogonal coupling method*).

1.1.4.2. Podstawowe metody syntezy dendrymerów

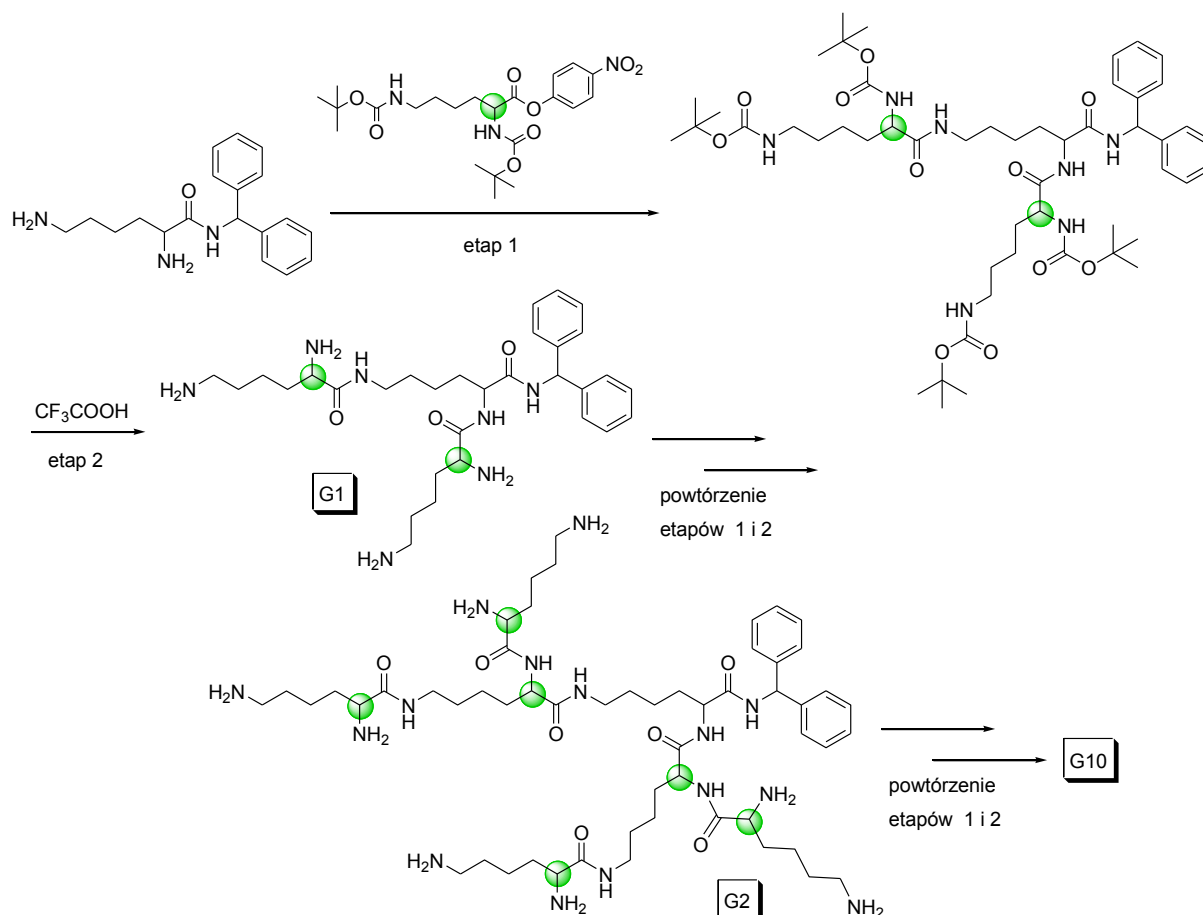
Synteza dendrymeru przy wykorzystaniu **strategii rozbieżnej** rozpoczyna się od wielofunkcyjnej cząsteczki rdzenia B_n ($n \geq 2$), do której dobudowywane są kolejne generacje dendrymeru poprzez sekwencyjne przyłączanie bloków budulcowych, tzw. monomerów (Schemat 1). Wykorzystywane monomery mają struktury typu AB_n ($n \geq 2$), tzn. posiadają dwa różne rodzaje grup funkcyjnych (A i B), które są zdolne do reagowania ze sobą (komplementarne względem siebie). Aby zapewnić kontrolę nad syntezą dendrymeru, grupa A występuje w monomerze w postaci reaktywnej, podczas gdy grupy B – w formie dezaktywowanej / chronionej. Przyłączanie monomerów do cząsteczki substratu (rdzenia lub rosnącego dendrymeru) odbywa się poprzez tworzenie wiązania chemicznego pomiędzy grupą funkcyjną A monomeru a jedną z zaktywowanych grup funkcyjnych B substratu. Aktywacja może być realizowana m.in. przez reakcję deprotekcji czy sprzęgnięcia z inną cząsteczką. Najczęściej wykorzystywane są monomery trójfunkcyjne AB_2 , które po przyłączeniu do rdzenia (na ogół dwu-, trój- lub czterofunkcyjnego) dają pierwszą generację dendrymeru. Następne dwa etapy, polegające na aktywacji grup peryferyjnych B powstałego związku i ich sprzęgnięciu z kolejną porcją takiego samego monomeru, prowadzą do otrzymania dendrymeru drugiej generacji. Poprzez powtarzanie tych dwóch etapów uzyskuje się dendrymer o żądanym rozmiarze.



Schemat 1. Synteza dendrymerów zgodnie ze strategią rozbieżną.

Przykładami dendrymerów zsyntetyzowanych metodą rozbieżną są m.in. dendrymery polilizynowe i poliamidoaminowe (PAMAM). Obydwie rodziny zostały

otrzymane do generacji dziesiątej. Dendrymery polilizynowe, zbudowane na rdzeniu amidu difenylo-metylo-*L*-lizyny, powstały w grupie Denkwalter'a w wyniku sekwencji reakcji sprzężenia z estrami *p*-nitrofenylowymi di-Boc-*L*-lizyny i deprotekcji kwasem trifluorooctowym (Schemat 2). Natomiast dendrymery PAMAM na rdzeniu etylenodiaminy (EDA) zostały zsyntetyzowane przez Tomalię i wsp. poprzez alkilowanie grup aminowych za pomocą akrylanu metylu, a następnie aminolizę terminalnych grup estrowych etylenodiaminą (Schemat 3).³³

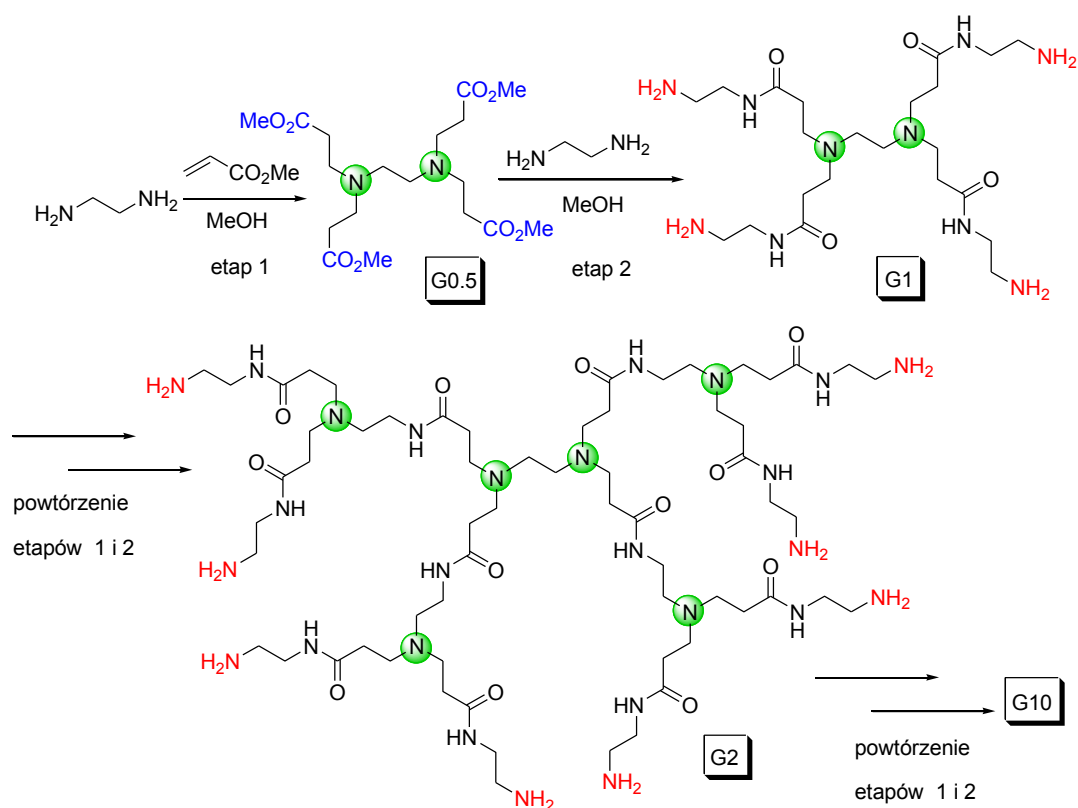


Schemat 2. Synteza dendrymeru polilizynowego metodą rozbieżną. Rozgałęzienia dendrymeru (zaznaczone zielonym kołem) są efektem przyłączenia „rozgałęzionego” monomeru.

W metodzie rozbieżnej, w przeciwieństwie do metody zbieżnej, wykorzystywane są zarówno monomery „rozgałęzione”, tj. posiadające trój- lub czterorozgałęzione centrum, jak również monomery „liniowe”, nie posiadające takiego centrum (Schemat 4). Te ostatnie można określić jako „zamaskowane” monomery typu AB₂, gdyż w etapie sprzężenia występują jako typ AC i dopiero etap aktywacji powoduje transformację funkcyjności C przyłączonego monomeru w funkcyjność B₂. Synteza dendrymeru z udziałem monomerów „liniowych” przebiega z wytworzeniem rozgałęzień w etapie sprzężenia, poprzez

przyłączenie dwóch monomerów do każdej grupy funkcyjnej rdzenia lub rosnącego dendrymeru (Schemat 4:a), bądź w etapie aktywacji (Schemat 4:b). Konsekwencją są dendrymery, które posiadają po etapie sprzężenia terminalne grupy funkcyjne innego typu niż po etapie aktywacji. Nie obserwuje się tego w przypadku dendrymerów syntetyzowanych przy użyciu monomerów „rozgałęzionych”, gdzie rozgałęzienie jest wprowadzane wraz z monomerem przez jego pojedyncze przyłączenie do każdej grupy funkcyjnej substratu (Schemat 4:c). Dendrymery te posiadają ten sam typ terminalnych grup funkcyjnych: w formie chronionej po etapie sprzężenia i odbezpieczonej po etapie aktywacji.

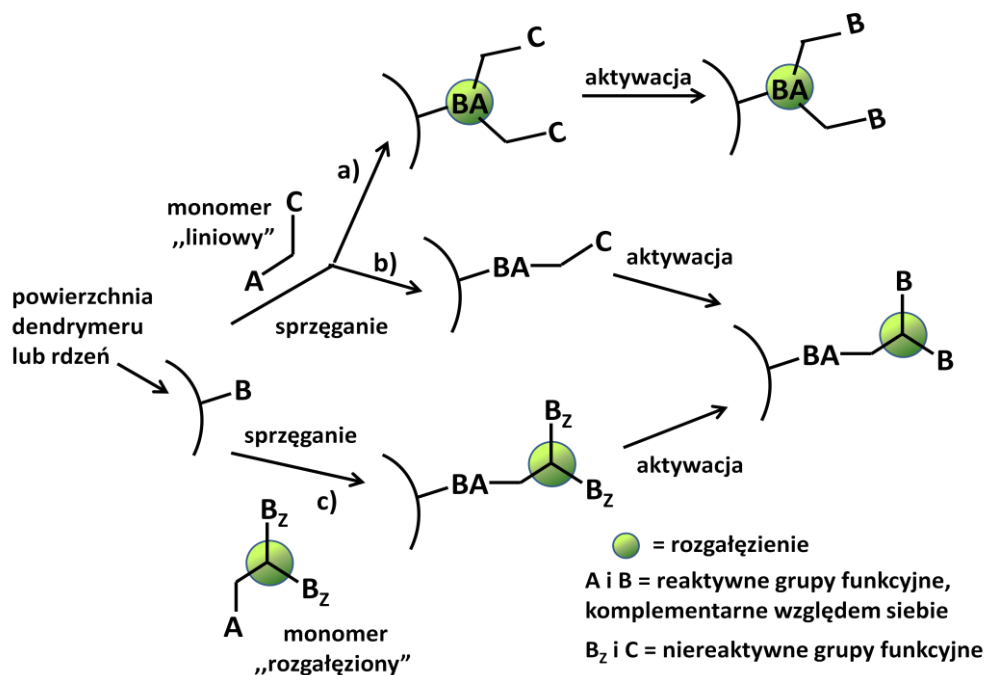
Na ogół synteza z udziałem monomerów „rozgałęzionych” jest łatwiejszym wariantem konstrukcji dendrymerów, zapewniającym większą kontrolę i czystość finalnego produktu.



Schemat 3. Synteza dendrymeru PAMAM (na rdzeniu EDA) metodą rozbieżną. Rozgałęzienia dendrymeru (zaznaczone zielonym kołem) powstają na atomie azotu terminalnych grup aminowych w wyniku reakcji z monomerem „liniowym”.

Przykładami dendrymerów skonstruowanych za pomocą różnych monomerów są wspomniane wcześniej dendrymery polilizynowe i poliamidoaminowe. W obu przypadkach występują rozgałęzienia typu 1→2 wynikające z użycia monomeru AB₂. Jednakże w syntezie dendrymeru polilizynowego rozgałęzienia zostały wprowadzone jako „gotowe” poprzez

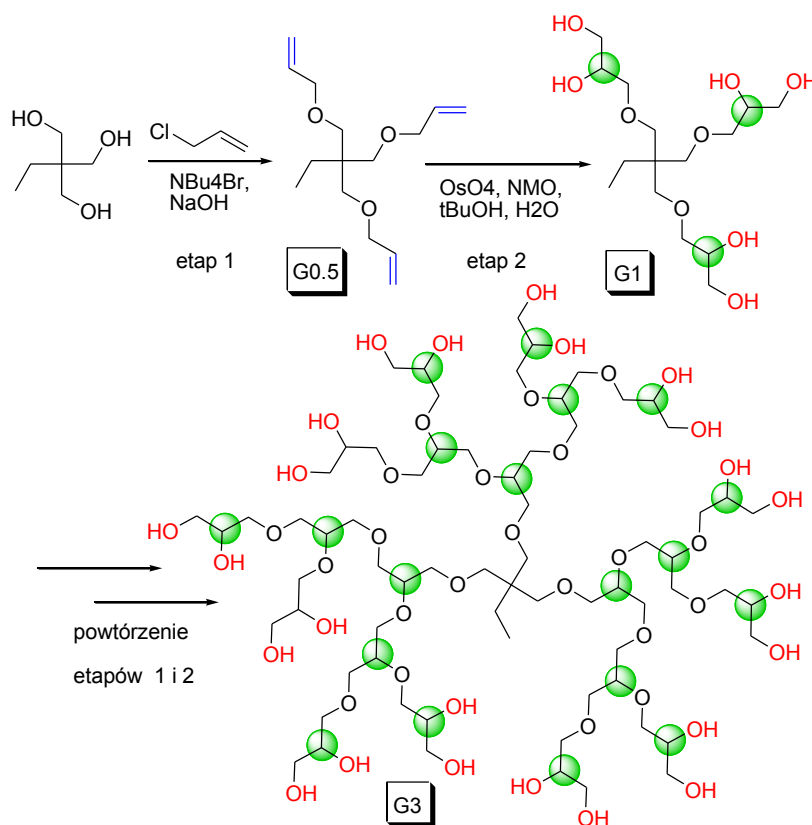
sprzęgnięcie grupy aminowej z estrem p-nitrofenylovym di-Boc-L-lizyny, będącym monomerem „rozgałęzionym” (Schemat 2). Natomiast w dendrymerach PAMAM rozgałęzienia powstały na atomie azotu grupy aminowej w etapie sprzęgania w wyniku jej reakcji z akrylanem metylu, tj. monomerem „liniowym”. Generacje połówkowe tych dendrymerów posiadają estrowe grupy terminalne, zaś generacje całkowite – grupy aminowe (Schemat 3). Natomiast w syntezach m.in. dendrymerów poli(glicerolowych) (PGly) G3³⁴, poli(estroaminowych)³⁵, podobnie jak w syntezie dendrymerów PAMAM, zostały wykorzystane monomery „liniowe”, ale rozgałęzienia powstały w procesie aktywacji. Pierwsza z nich obejmowała reakcję allilowania grup hydroksylovych chlorkiem allilu, a następnie reakcję dihydroksylovania alkenu (Schemat 5), podczas gdy druga polegała na wyjściu od piperazyny jako rdzenia i potraktowaniu jej chlorkiem akrylowym, a następnie reakcji z dietanolaminą. Powtórzenie tej sekwencji reakcji prowadziło do dendrymerów posiadających akrylowe lub hydroksylove grupy terminalne.



Schemat 4. Synteza dendrymeru metodą rozbieżną wykorzystującą monomery „liniowe” (a, b) lub monomery „rozgałęzione” (c).

Strategia rozbieżna posiada istotne wady. Wraz ze wzrostem generacji pogarsza się czystość oczekiwanego produktu, co jest wynikiem wzrastającej liczby reakcji przeprowadzanych na pojedynczej cząsteczce przechodzącej z jednej generacji do następnej. Aby otrzymywany dendrymer był pozbawiony zanieczyszczeń produktami niepełnego podstawienia, reakcje na każdym etapie przyłączania i aktywacji muszą zachodzić całkowicie

dla wszystkich grup funkcyjnych dendrymeru. Jednakże prawdopodobieństwo przeprowadzenia reakcji ze 100%-ową konwersją maleje ze wzrostem dendrymeru, gdyż liczba grup terminalnych rośnie wykładniczo prowadząc do ich gęstego upakowania i związanych z tym zawad sterycznych. Pomimo wydłużania czasu trwania poszczególnych etapów oraz stosowania dużych nadmiarów substratów, wystąpienie statystycznych defektów jest nieuniknione. Ponadto, dendrymery z defektami strukturalnymi bardzo trudno oddzielić przez proste techniki oczyszczania, ze względu na niewielkie różnice w strukturze i właściwościach w porównaniu z dendrymerem właściwym. Między innymi dlatego, pomimo stosowania selektywnych reakcji, synteza dendrymerów jest żmudna i czasochłonna a końcowa wydajność niska. Np. dendrymer poli(propylenoiminowy) piątej generacji (PPI G5), w przypadku którego średnia selektywność reakcji wynosiła 99.5%, został otrzymany z zaledwie 29 % wydajnością.³⁶

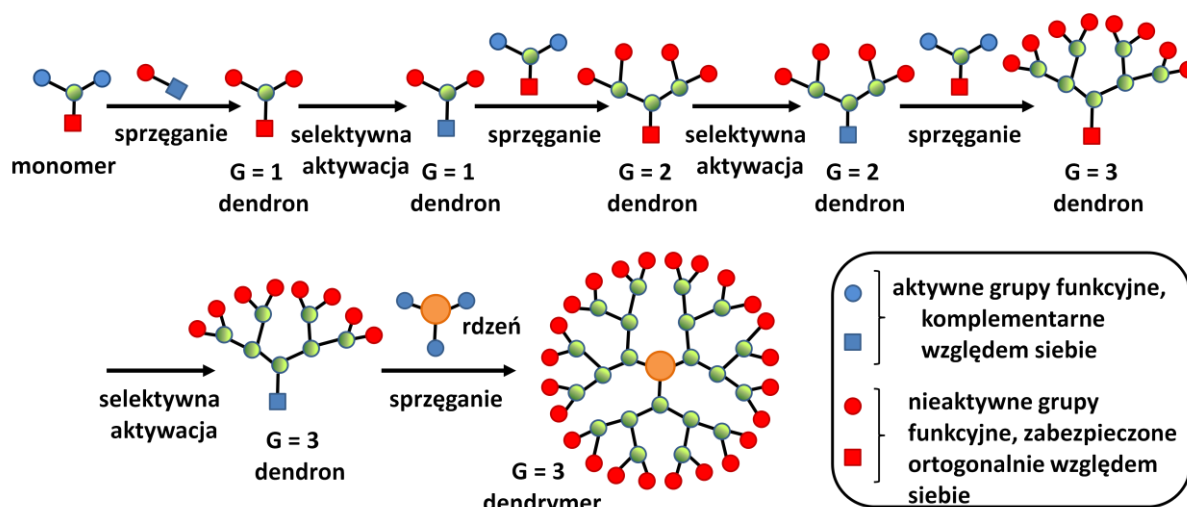


Schemat 5. Synteza dendrymeru poli(glicerolowego) metodą rozbieżną z użyciem monomeru „liniowego”. Rozgałęzienia dendrymeru (zaznaczone zielonym kołem) powstają poprzez etap aktywacji.

Do zalet metody rozbieżnej należy łatwość szybkiego tworzenia biblioteki dendrymerów różnych generacji przez możliwość przerywania reakcji na dowolnym etapie oraz możliwość automatyzacji syntezy. Z tych względów, synteza komercyjnie dostępnych

dendrymerów PAMAM i PPI³⁷ prowadzona jest wciąż według procedury rozbieżnej. Ponadto umożliwia ona syntezę wysokocząsteczkowych dendrymerów chociaż nie jest możliwe otrzymanie strukturalnie idealnych dendrymerów wysokich generacji.

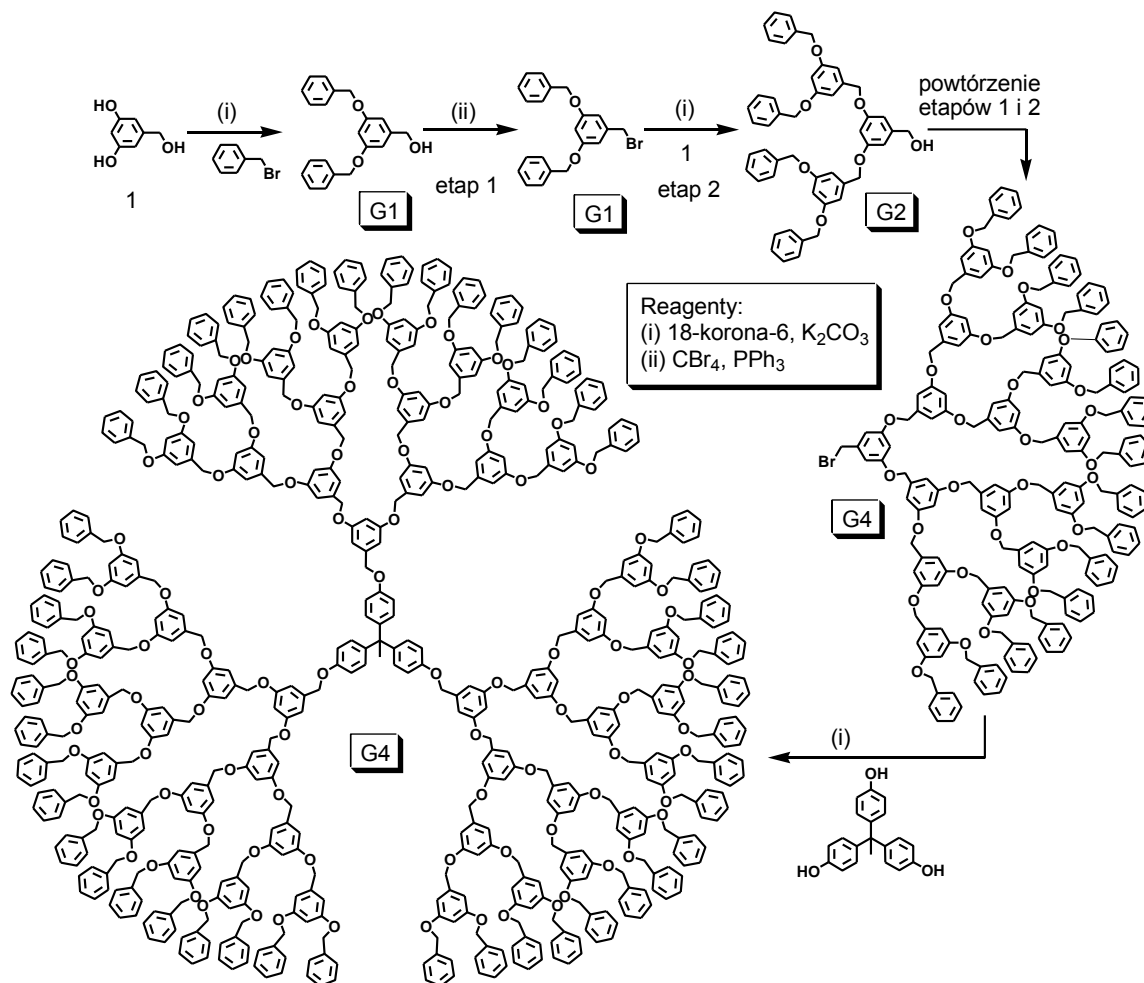
Alternatywną metodą jest **synteza zbieżna** opracowana w latach 1989-1990 przez Hawker'a i Frechet'a.³⁸ W strategii tej najpierw są otrzymywane gałęzie dendrymeru, tzw. dendrony, które następnie łączy się z wielofunkcyjnym rdzeniem (Schemat 6). Synteza dendronu prowadzona jest z użyciem monomeru typu AB₂, który posiada reaktywne grupy funkcyjne B i dezaktywowaną / chronioną grupę A. W pierwszym etapie monomer poddaje się reakcji ze związkim, który stanowić ma grupy peryferyjne finalnego dendrymeru. Najczęściej sprowadza się to do wprowadzenia ochrony na grupy B monomeru. W ten sposób otrzymywany jest dendron G1. Kolejne dwa etapy, tj. aktywacja grupy centralnej dendronu (*ang. focal group*) i sprzęgnięcie jej z monomerem AB₂, prowadzą do dendronu G2. Każde powtórzenie tych dwóch etapów skutkuje wzrostem związku o jedną generację. Dendrymer otrzymuje się w ostatnim etapie syntezy w wyniku sprzęgnięcia aktywowanych dendronów o żądanym rozmiarze z wielofunkcyjnym rdzeniem.



Schemat 6. Synteza dendrymerów zgodnie ze strategią zbieżną.

Przykładem dendrymerów otrzymanych metodą zbieżną są m.in. dendrymery poli(aryloeterowe). Ich syntezę rozpoczęto od konstrukcji elementów peryferyjnych, tj. reakcji alkilowania alkoholu 3,5-dihydroksybenzylowego bromkiem benzylu (Schemat 7). Następnie uzyskany dendron G1 aktywowano poprzez wymianę grupy alkoholowej na bromek i sprzęgnięto z kolejną cząsteczką monomeru. Dwukrotne powtórzenie 2-etapowego

procesu doprowadziło do dendronu G4, który sprzęgnięto w ostatnim etapie z trójfunkcyjnym rdzeniem i otrzymano dendrymer G4.



Schemat 7. Schemat syntezy dendrymerów metodą zbieżną na przykładzie dendrymeru poli(aryloeterowego) G4.

W porównaniu z metodą rozbieżną, metoda zbieżna posiada istotną zaletę. Z powodu ograniczonej liczby reakcji prowadzonych na cząsteczce przechodzącej z jednej generacji do następnej możliwe jest otrzymanie dendrymerów wolnych od defektów strukturalnych. Na każdym etapie propagacji w rosnącym dendronie występuje tylko jedna reaktywna grupa funkcyjna. Każdy etap przyłączania stanowi zatem reakcję dwóch dendronów z jednym monomerem, zaś etap odbezpieczania to zaledwie jedna reakcja na cząsteczkę niezależnie od jej generacji. Konsekwencją tego jest lepsza kontrola procesu, większa czystość tworzonego dendrymeru i mniejsze zużycie odczynników w porównaniu z metodą rozbieżną. W strategii zbieżnej używanie reagentów w ilościach równomolowych bądź w niewielkim nadmiarze jest wystarczające do przeprowadzania reakcji z odpowiednio dużą wydajnością. Ponadto

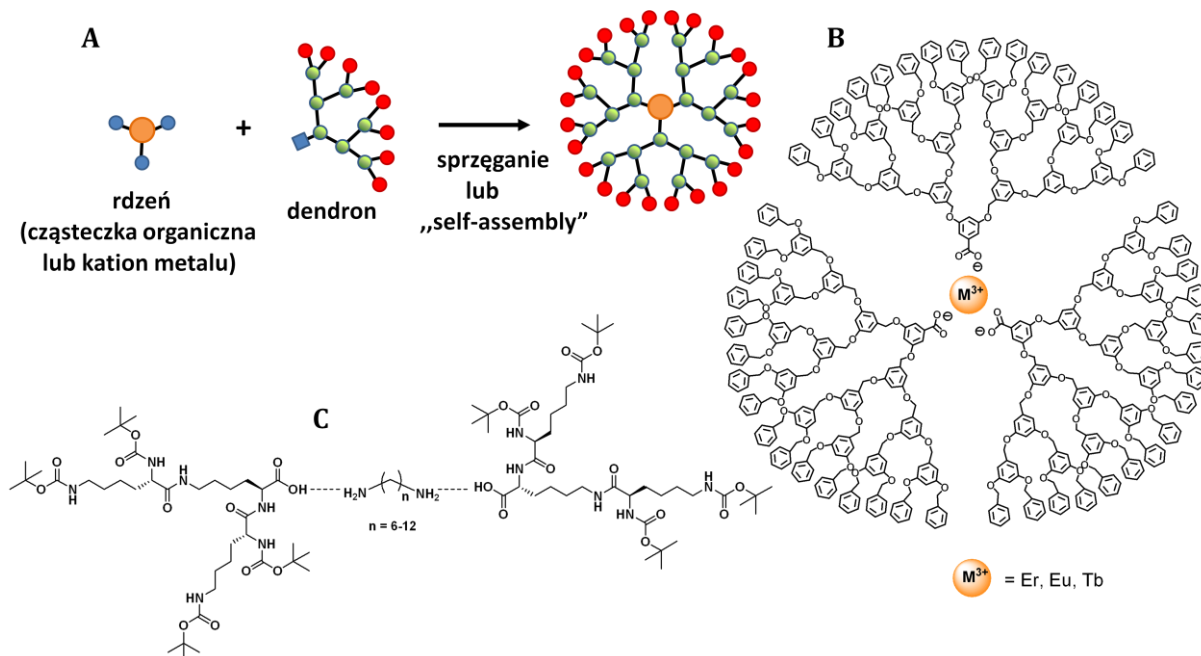
oczyszczanie produktu, np. metodami chromatograficznymi, jest łatwiejsze niż w strategii rozbieżnej, gdyż różnica mas molowych pomiędzy dendronowym substratem a produktem reakcji jest znaczna. Po każdym etapie przyłączenia masa molowa produktu jest ponad 2-krotnie większa od masy substratu. Większe możliwości oddzielenia właściwego produktu od nieprzereagowanych reagentów czy produktów z defektami strukturalnymi, dopuszczają stosowanie w syntezie zbieżnej reakcji mniej wydajnych ($\geq 90\%$). W przeciwieństwie do tego, w syntezie rozbieżnej w celu zminimalizowania wystąpienia produktów z defektami wymagane są reakcje przebiegające z wysoką wydajnością ($> 99\%$).

Wzrost dendronu w metodzie zbieżnej podlega większym ograniczeniom w porównaniu do wzrostu dendrymeru w metodzie rozbieżnej. Ich źródłem są zarówno czynniki chemiczne, jak i stereochemiczne. Wraz ze wzrostem generacji dendronu zmniejsza się bowiem zarówno reaktywność, jak i dostępność grupy centralnej poprzez którą następuje przyłączenie dendronu do kolejnej cząsteczki monomeru AB_2 . Nie jest więc możliwe otrzymanie strukturalnie idealnego dendronu wyższych generacji. Stąd, prowadząc syntezę dendrymeru strategią zbieżną korzysta się z dendronów niskiej generacji, gdyż przyłączenie do rdzenia dendronów wyższej generacji jest procesem trudnym lub wręcz niemożliwym. Co więcej, przestrzennie rozbudowane dendrony mogą powodować zjawisko przesłaniania (maskowania) wielofunkcyjnego rdzenia, prowadzące do jego niecałkowitego podstawienia. W konsekwencji tylko niskocząsteczkowe dendrymery (zwykle generacji < 6) mogą być otrzymywane metodą zbieżną.

Synteza zbieżna jest metodą uniwersalną, pozwalającą na większą swobodę syntetyczną niż synteza rozbieżna. Przyłączając dendrony do różnych rdzeni otrzymuje się całkowicie nowe dendrymery tylko w jednym etapie syntetycznym (Rysunek 5:A). Można więc w szybki sposób utworzyć bibliotekę dendrymerów różniących się cząsteczką rdzenia, która może mieć charakter organiczny bądź nieorganiczny (kationy metali). Dzięki metodzie zbieżnej otrzymuje się różnorodne dendrymery supramolekularne wykorzystując proces samoorganizacji (*ang. self-assembly*) dendronów zawierających elementy chelatujące wokół odpowiedniego rdzenia (Rysunek 5: B, C).

Dodatkowym atutem procedury zbieżnej jest możliwość łączenia ze sobą dendronów różnego rodzaju (otrzymanych w oddzielnych syntezach). W przypadku łączenia trzech i większej liczby dendronów wykorzystuje się wielofunkcyjny rdzeń, natomiast dwa dendrony mogą zostać połączone bez jego udziału, jeśli ich grupy centralne (*ang. focal point*) są komplementarne, tj. zdolne do utworzenia wiązania między sobą. W ten sposób można otrzymać asymetryczne dendrymery posiadające właściwości fizyczne i chemiczne kilku

dendrymerów. Wśród nich największą grupę stanowią dendrymery typu „Janus” (Rozdział 1.1.3., Rysunek 4) utworzone z dwóch różnych dendronów i znane również pod innymi nazwami (*ang. surface-block dendrimers, segment-block dendrimers, diblock dendrimers, co-dendrimers, diblock co-dendrimers, asymmetrical dendrimers, bow-tie dendrimers*).³⁹



Rysunek 5. Synteza zbieżna dendrymerów różniących się rdzeniem (A) oraz przykłady dendrymerów supramolekularnych otrzymywanych tą metodą: zawierające kationy metali (B)²⁷ lub cząsteczkę organiczną (C)⁴⁰ w roli rdzenia.

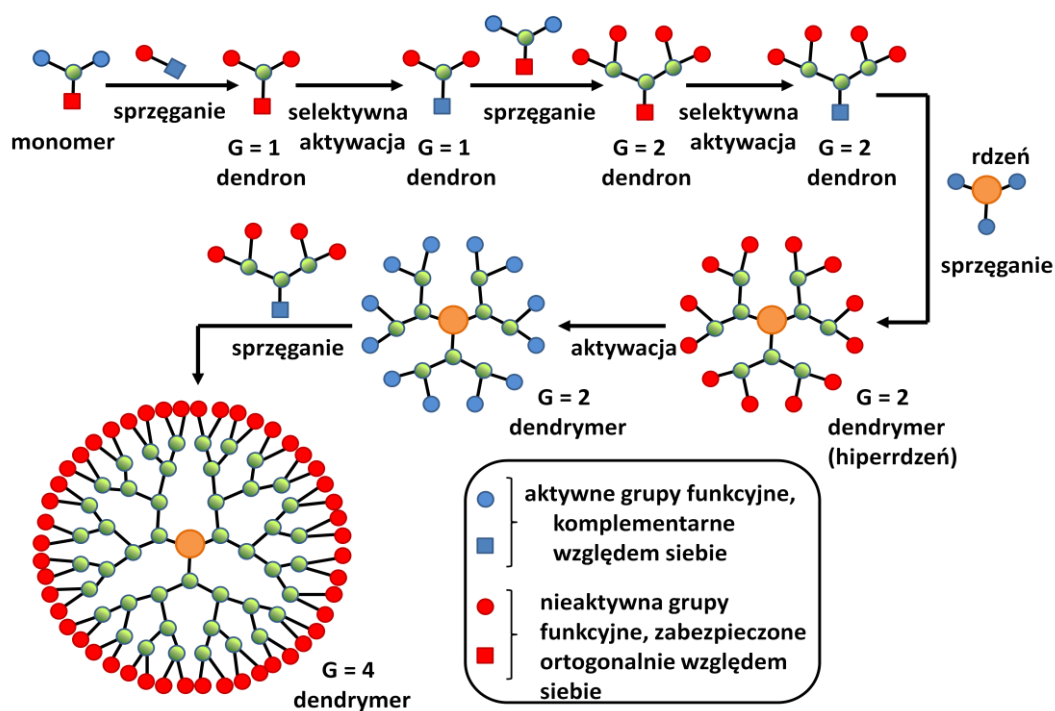
Otrzymane metodą zbieżną dendrony są także wykorzystywane do syntezy dendrytyczno-liniowych hybrydów polimerowych,⁴¹ np. polimerów dendronizowanych⁴² (Rozdział 1.1., Rysunek 1).

Wymienione cechy i możliwości syntezy zbieżnej powodują, że cieszy się ona znacznie większym zainteresowaniem niż synteza rozbieżna.

1.1.4.3. Nowe metody syntezy dendrymerów

A) Metoda hiperrdzenia (*ang. double-stage convergent method, hypercore approach*)

Metoda hiperrdzenia rozpoczyna się od syntezy drogą zbieżną dendronu niskiej generacji posiadającego zabezpieczone grupy terminalne. Sprzęgnięcie go z wielofunkcyjnym rdzeniem prowadzi do otrzymania dendrymeru, tzw. hiperrdzenia. Jest on w ostatnim etapie poddawany aktywacji i sprzęgnięciu z dendronami, które mogą być tymi samymi związkami, które posłużyły do syntezy hiperrdzenia bądź innymi (Schemat 8).

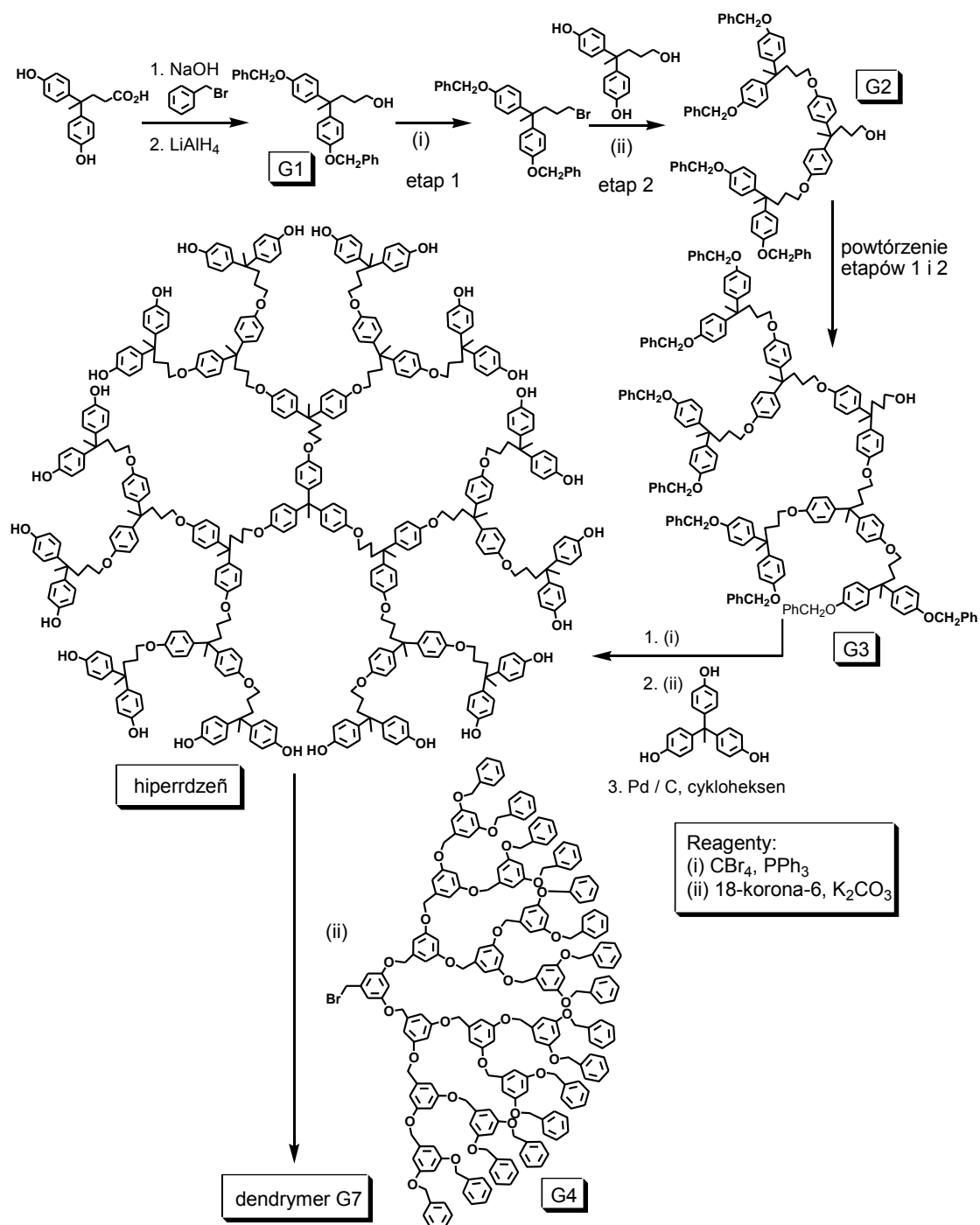


Schemat 8. Synteza dendrymerów zgodnie ze strategią hiperrdzenia.

W porównaniu z klasyczną syntezą zbieżną, metoda hiperrdzenia posiada istotną zaletę. Otóż wykorzystywany w niej hiperrdzeń zmniejsza problemy związane z zawadą steryczną, przez co ułatwia syntezę monodispersyjnych dendrymerów wyższych generacji. Powierzchniowe grupy funkcyjne hiperrdzenia mają mniejszą zawadę steryczną podczas etapu sprzęgnięcia z dendronami, niż grupy niedendrytycznego rdzenia stosowanego w metodzie zbieżnej. Co więcej, metoda hiperrdzenia umożliwia szybkie konstruowanie dendrymerów posiadających dwie różne warstwy: wewnętrzną i zewnętrzną (*ang. layer-block dendrimers*). Realizowane jest to poprzez użycie do syntezy hiperrdzenia i dendronów dwóch różnych monomerów.

Powyższa metoda została wprowadzona przez Frechet'a i wsp.⁴³ Otrzymali oni dendrymery G7 cechujące się giętką warstwą wewnętrzną otoczoną przez sztywną warstwę zewnętrzną. Synteza obejmowała przygotowanie na drodze zbieżnej hiperrdzenia G3 posiadającego 4,4-bis(4'-hydroksyfenylo)pentanol jako blok budulcowy oraz dendronów poli(aryloeterowych) G4 opartych na resztach alkoholu 3,5-dihydroksybenzylowego, a następnie ich wzajemne sprzęgnięcie zachodzące z wydajnością 61% (Schemat 9).

Wadą strategii hiperrdzenia jest czasochłonna synteza hiperrdzenia i dendronów, która realizowana jest przy użyciu podstawowej procedury wzrostu dendrymeru, w związku z czym składa się na nią wiele etapów syntetycznych.

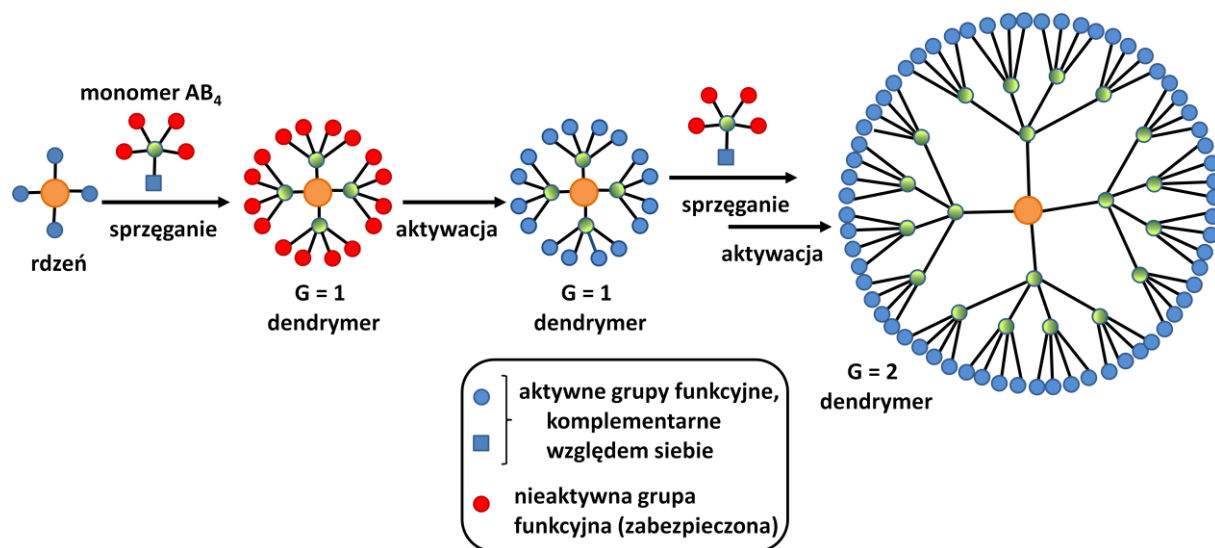


Schemat 9. Synteza dwuwarstwowych dendrymerów G7 metodą hiperrdzenia.

B) Metoda hipermonomeru (*ang. hypermonomer method, branched monomer approach*)

W strategii hipermonomeru wykorzystywane są monomery posiadające większą liczbę grup funkcyjnych niż typowe monomery AB₂ czy AB₃. W wyniku zastosowania tych hipermonomerów (najczęściej typu AB₄ i AB₈) otrzymuje się dendrymery z tą samą lub większą ilością grup terminalnych w mniejszej liczbie etapów. Na przykład, podczas gdy synteza dendrymeru G4, mającego 64 aktywne grupy terminalne, prowadzona z użyciem

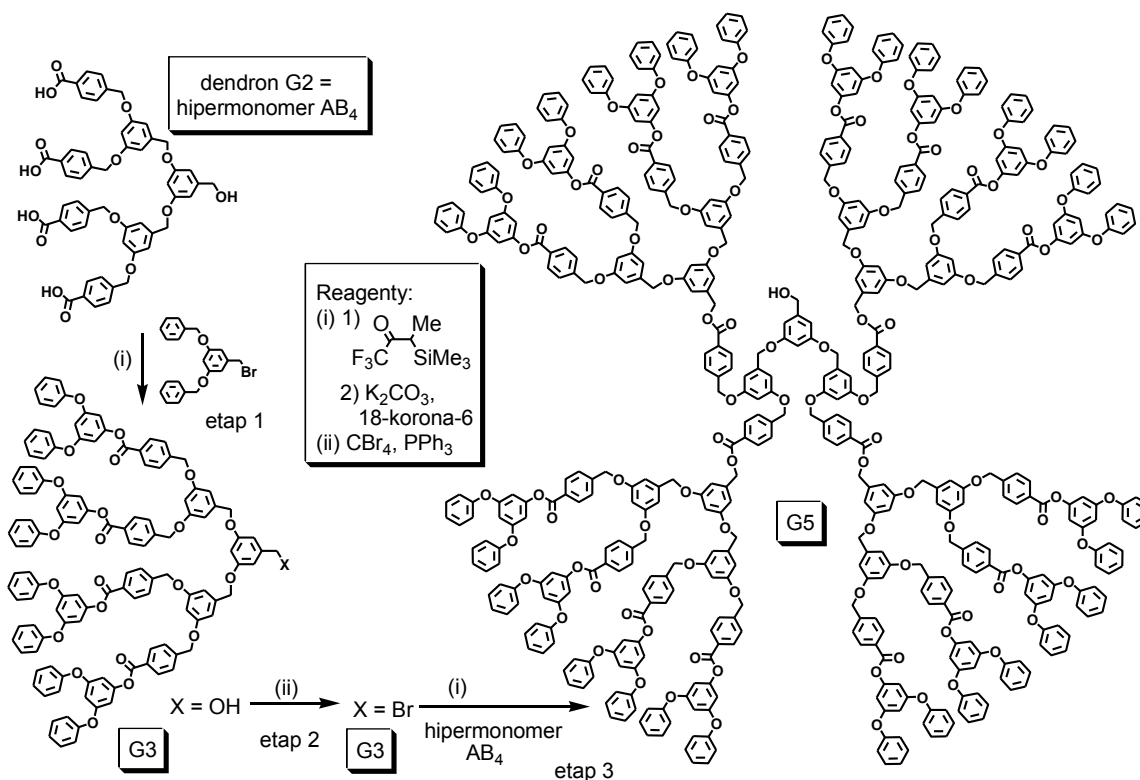
czterofunkcyjnego rdzenia i monomerów AB_2 wymaga 8 etapów syntetycznych, zastosowanie monomerów AB_4 pozwala otrzymać dendrymer z tą samą liczbą grup funkcyjnych w 4 etapach (Schemat 10). Metodą hipermonomeru w grupie Mullen'a zostały zsyntetyzowane dendrymery poli(fenylenowe) G2 na drodze cykloaddycji Diels-Alder'a z użyciem monomeru posiadającego cztery układy dienofilowe i jeden układ dienowy (AB_4).⁴⁴



Schemat 10. Synteza dendrymerów zgodnie ze strategią hipermonomeru.

Jednakże rolę hipermonomerów rzadko pełnią wielofunkcyjne cząsteczki prostych związków, częściej wykorzystywane są w tym celu dendrony niższych generacji. W takim przypadku, metodę hipermonomeru można zdefiniować jako wieloetapowy wzrost samego monomeru, podczas którego w wyniku jednej reakcji sprzężenia można otrzymać produkt różniący się o co najmniej 2 generacje od substratu. Przykładem jest praca Frechet'a i wsp., którzy otrzymali w 3 etapach dendron poli(aryloeterowy) G5 dzięki użyciu w syntezie dendronu G2 w roli hipermonomeru AB_4 (Schemat 11).⁴⁵ Terminalne grupy karboksylowe hipermonomeru posłużyły do szybkiej syntezy dendronu G3, który z kolei po aktywacji jego grupy centralnej został sprzęgnięty z hipermonomerem, w wyniku czego nastąpił wzrost o dwie generacje.

Metoda hipermonomeru nie jest obecnie zbyt często wykorzystywana do otrzymywania dendrymerów, gdyż wiąże się ona z koniecznością przygotowania hipermonomerów na drodze wieloetapowej syntezy.

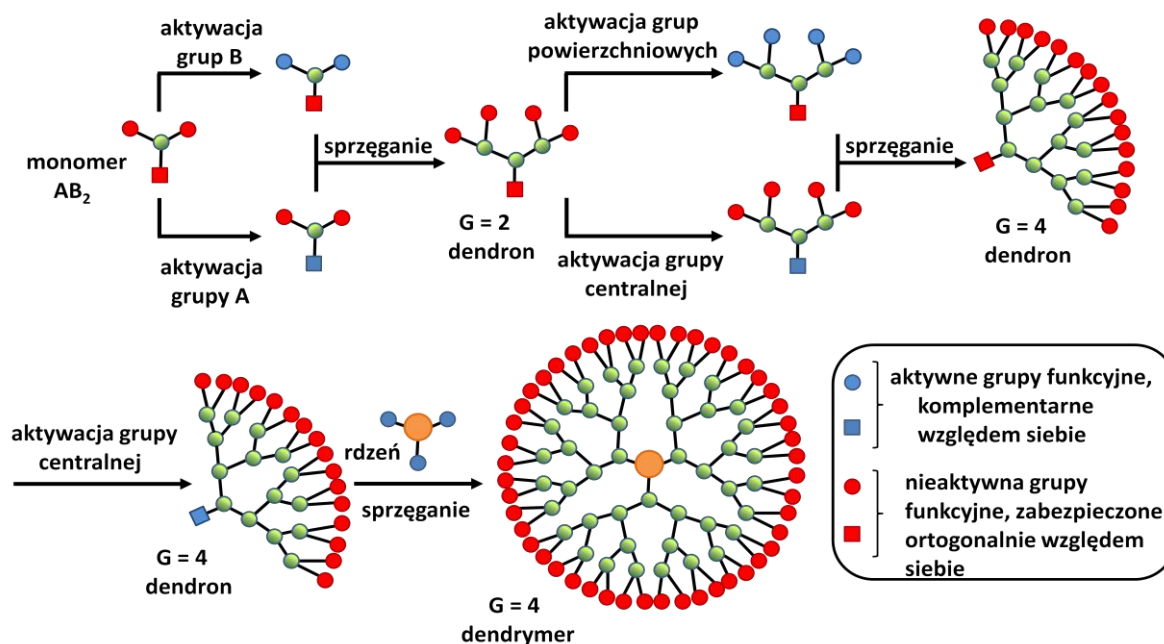


Schemat 11. Synteza dendronu poli(aryloeterowego) G5 metodą hipermonomeru.

C) Metoda podwójnego wzrostu wykładniczego (*ang. double-exponential method*)

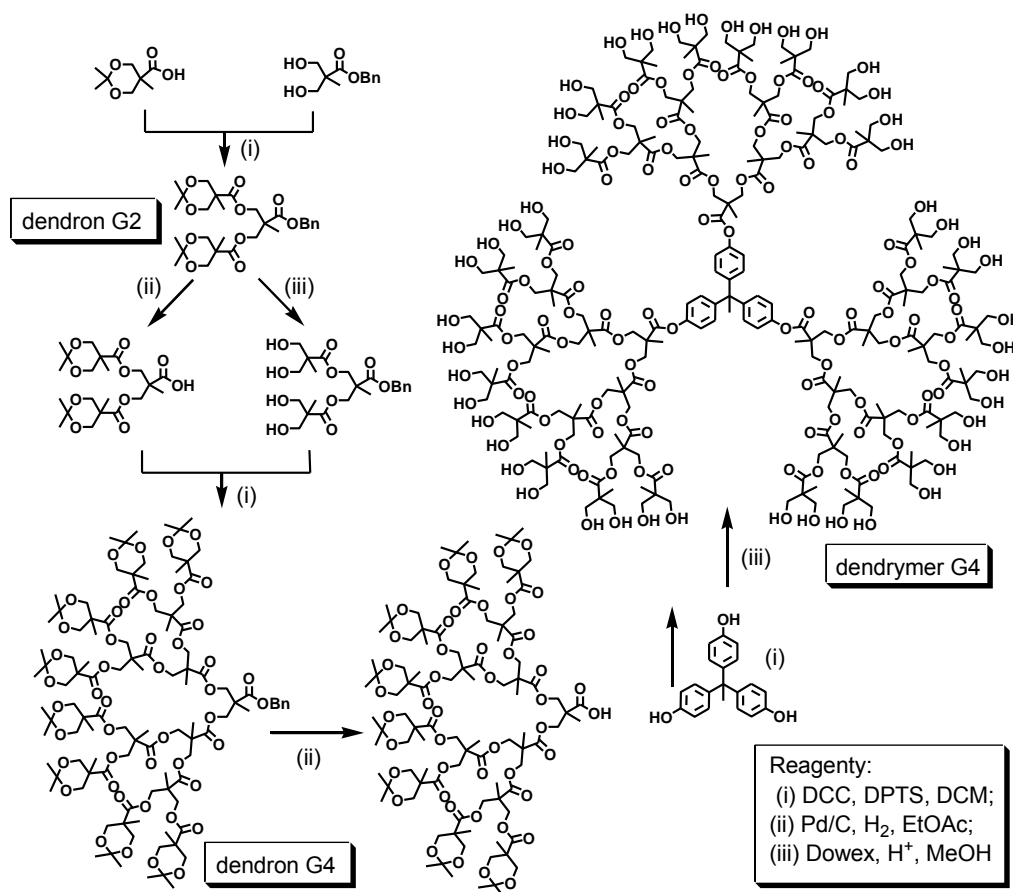
Metoda podwójnego wzrostu wykładniczego wymaga monomeru AB₂ z ortogonalnie chronionymi grupami funkcyjnymi A i B (Schemat 12). Jest on poddawany selektywnej aktywacji, zarówno grupy centralnej A, jak i grup powierzchniowych B, w wyniku czego uzyskuje się dwa różnie aktywowane monomery. Reakcja sprzęgania monomeru posiadającego reaktywne grupy B z dwoma monomerami posiadającymi reaktywną grupę A prowadzi do ortogonalnie chronionego dendronu G2. Powtórzenie procedury na dendronie G2, tj. przeprowadzenie selektywnych deprotekcji i sprzęgnięcie ze sobą aktywowanych dendronów, skutkuje otrzymaniem dendronu G4. Proces wzrostu dendronu zgodnie z tym schematem może być kontynuowany dalej albo też zakończony syntezą dendrymeru poprzez aktywację grupy centralnej dendronu i sprzęgnięcie z wielofunkcyjnym rdzeniem.

W metodzie podwójnego wzrostu wykładniczego efektem powtórzenia każdej sekwencji 3 etapów, tj. 2 reakcji selektywnej aktywacji i reakcji sprzęgania, jest podwojenie generacji dendronu (G1→G2→G4→...). Ten „przeskok generacji” powoduje zmniejszenie liczby etapów syntetycznych. W porównaniu do metody zbieżnej, synteza dendronu G4 ulega skróceniu o 1 etap, podczas gdy dendronu G8 – aż o 9 etapów.



Schemat 12. Synteza dendrymerów zgodnie ze strategią podwójnego wzrostu wykładniczego.

Twórcą powyższej metody jest Moore i wsp., którzy zaprezentowali ją realizując syntezę dendronu poli(feniloacetylenowego) G4.⁴⁶ Stanowi ona jedną z najszybszych procedur syntezy dendrymerów, w związku z czym cieszy się dużym zainteresowaniem. Zgodnie z tą metodą, przeprowadzone zostały syntezy wielu dendrymerów o zróżnicowanej strukturze, m.in. poli(amidowe)⁴⁷, poli(eterouretanowe)⁴⁸ czy poli(estrowe). Spośród nich na uwagę zasługuje przede wszystkim synteza dendrymerów kwasu 2,2-bis(hydroksymetylo)propionowego (bis-MPA). Dendrymery bis-MPA należą do nielicznej grupy dendrymerów dostępnych komercyjnie. Syntezę tych alifatycznych dendrymerów poli(estrowych) metodą podwójnego wzrostu wykładniczego zrealizowali Gitsov i wsp. (Schemat 13).⁴⁹ W pierwszym etapie przeprowadzili reakcję sprzęgnięcia pochodnych kwasu 2,2-bis(hydroksymetylo)propionowego, tj. acetalu z estrem benzylowym. Następnie otrzymany dendron G2 poddali selektywnej deprotekcji: katalitycznej hydrogenacji prowadzącej do dendronu z wolną grupą karboksylową oraz hydrolizie przy użyciu kwasowej żywicy polimerowej prowadzącej do dendronu z wolnymi, terminalnymi grupami hydroksylowymi. W wyniku sprzęgnięcia obu nowych dendronów uzyskali dendron G4, który po etapie aktywacji jego grupy karboksylowej, przyłączyli do trójfunkcyjnego rdzenia z wydajnością 85%. Deprotekcja ochron acetalowych stanowiła ostatni etap w syntezie dendrymeru bis-MPA G4.

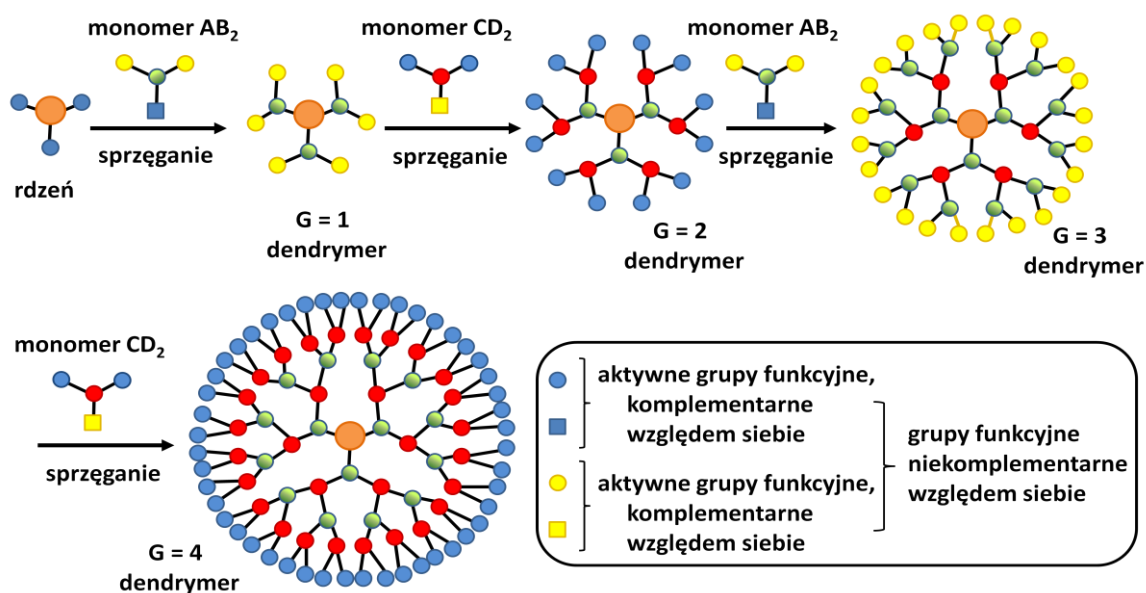


Schemat 13. Synteza dendrymerów bis-MPA metodą podwójnego wzrostu wykładniczego.

Metoda podwójnego wzrostu wykładniczego, podobnie jak metoda zbieżna, należy do procedur uniwersalnych, umożliwiających otrzymanie zarówno prostych, klasycznych dendrymerów, jak również dendrymerów supramolekularnych czy asymetrycznych.

D) Metoda ortogonalna (*ang. two-step approach, two monomer approach, AB₂-CD₂ approach, the orthogonal coupling method*)

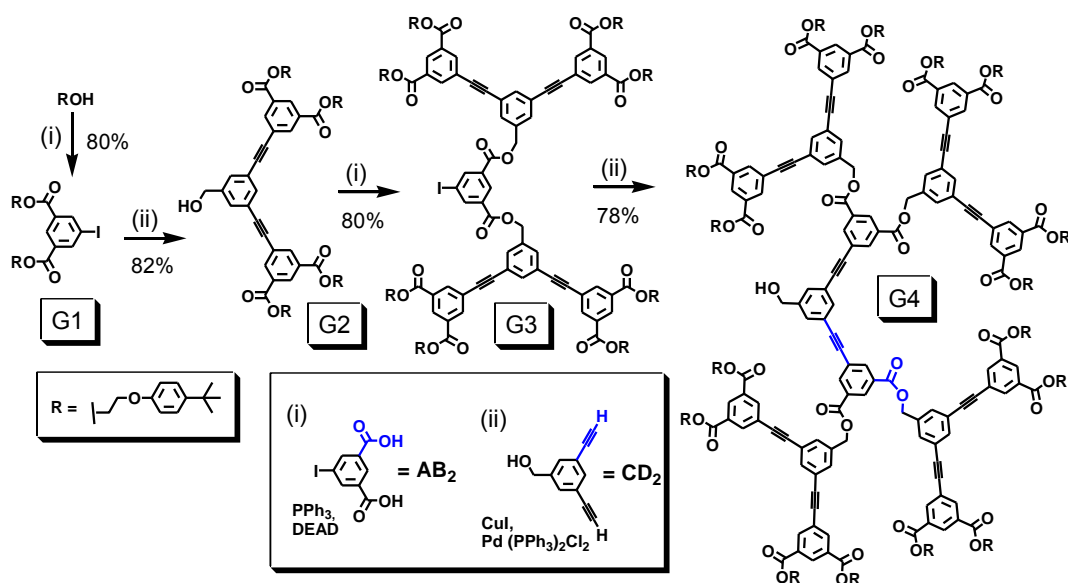
Metoda ortogonalna polega na rozbieżnym lub zbieżnym wzroście dendrymeru przy użyciu dwóch różnych monomerów AB₂ i CD₂ posiadających chemoselektywne grupy funkcyjne (Schemat 14). Monomery AB₂ i CD₂ są dobrane w ten sposób, aby centralna grupa funkcyjna każdego z nich reagowała tylko z powierzchniowymi grupami funkcyjnymi drugiego z monomerów, tj. A z D, B z C. Taka chemoselektywność eliminuje konieczność stosowania w syntezie etapów aktywacji, przez co redukuje liczbę etapów syntetycznych o połowę. Każdy etap w metodzie ortogonalnej powoduje więc wzrost generacji dendronu / dendrymeru.



Schemat 14. Synteza dendrymerów zgodnie ze strategią ortogonalną prowadzoną w sposób rozbieżny.

Konsekwencją korzystania w syntezie z dwóch różnych monomerów są dendrymery często charakteryzujące się strukturą warstwową (*ang. layer-block dendrimers*), zawierającą dwa rodzaje wiązań kowalencyjnych pomiędzy warstwami. Wiąże się z tym również zmiana typu terminalnych grup funkcyjnych dendrymeru przy przejściu od jego generacji parzystej do nieparzystej, jeśli jego synteza przebiega w sposób rozbieżny.

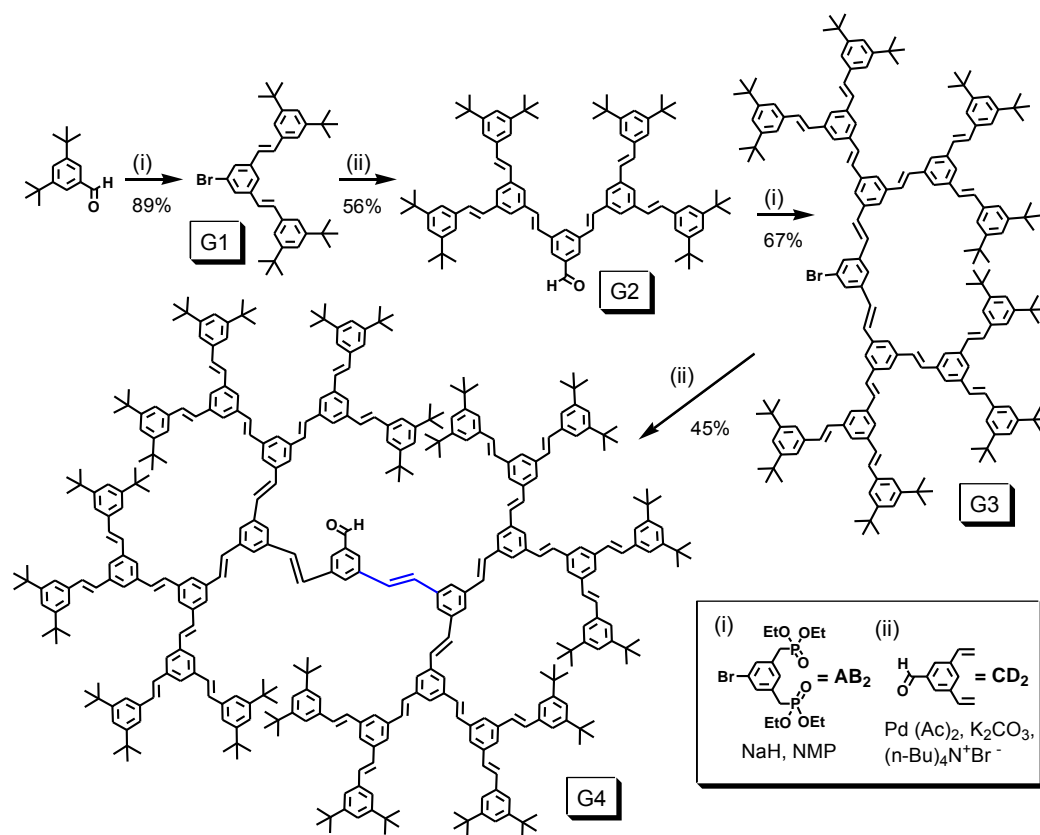
Metoda ortogonalna została wprowadzona przez Spindler'a i Frechet'a, którzy przeprowadzili syntezę „one-pot” dendronu poli(eterouretanowego) G3 z wykorzystaniem chlorku 3,5-diizocyjanobenzylowego i alkoholu 3,5-dihydroksybenzylowego w roli monomerów AB₂ i CD₂.⁵⁰



Schemat 15. Synteza dendronów poli(alkinoestrowych) G4 metodą ortogonalną.

Niestety słaba chemoselektywność eteryfikacji i reakcji tworzenia karbaminianów nie pozwoliła na otrzymanie dendronów wyższej generacji. Udało się to grupie Zimmerman'a, która wykorzystując reakcję estryfikacji Mitsunobu i reakcję sprzężenia Sonogashiry terminalnych alkinów z jodkami aryłowymi, zsyntetyzowała z dobrą wydajnością dendrony poli(alkinoestrowe) G4 (Schemat 15).⁵¹

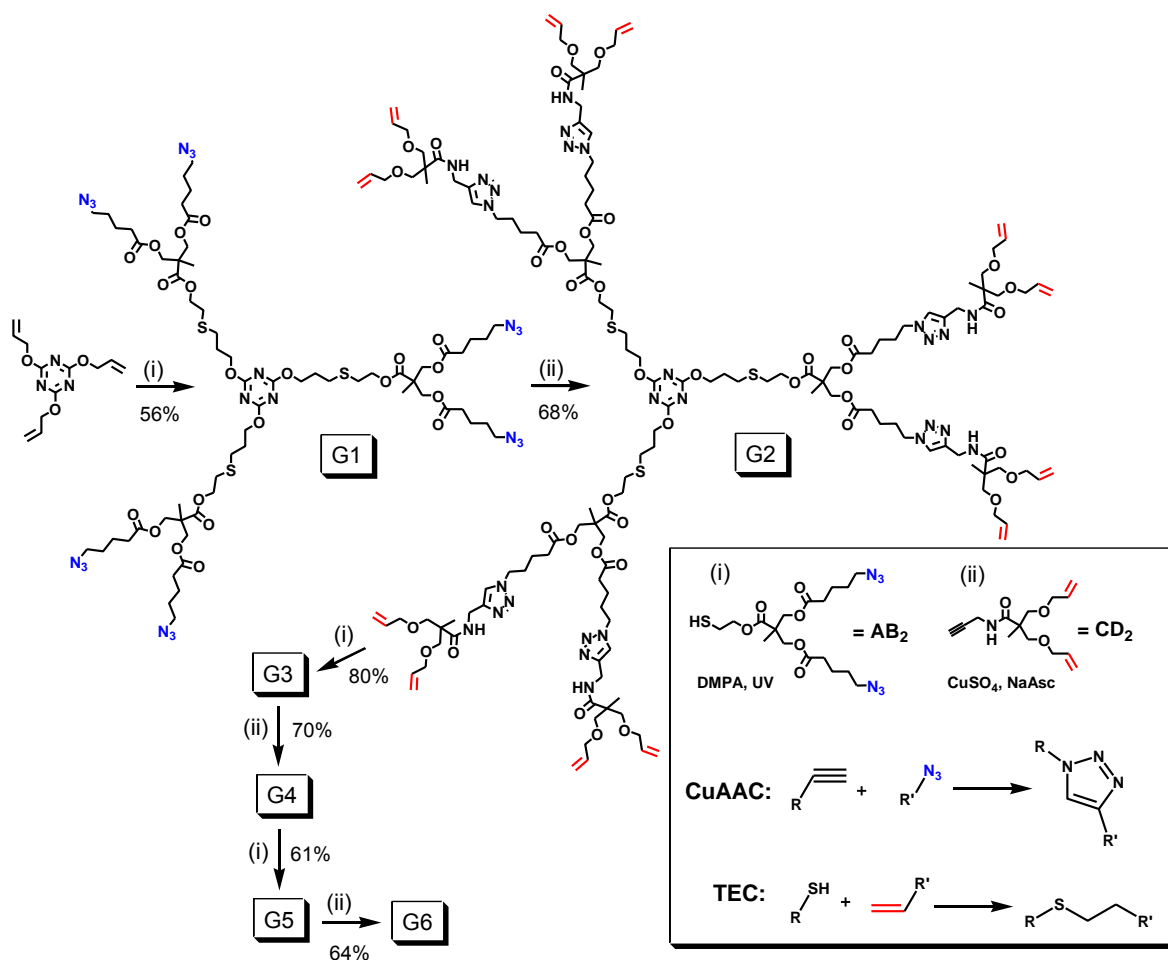
Natomiast Yu i wsp. przedstawili po raz pierwszy syntezę metodą ortogonalną chemicznie homogennych dendronów, tj. zawierających w swojej strukturze jeden typ wiązań (Schemat 16).⁵² Dendrony poli(aryloalkenowe) G4 zostały otrzymane poprzez podwójne powtórzenie sekwencji reakcji Horner-Wadsworth-Emmons'a i reakcji sprzężenia Heck'a.



Schemat 16. Synteza dendronów poli(aryloalkenowych) G4 metodą ortogonalną.

Efektywność metody ortogonalnej jest szczególnie wysoka w przypadku, gdy syntezę dendrymerów przeprowadza się w jednym naczyniu (*ang. one-pot*) lub z wykorzystaniem metodologii „click”. Przykładem jest synteza „one-pot” dendrymerów organofosforowych G4 zrealizowana przez zachodzące na przemian reakcję kondensacji i reakcję Staudinger’a pomiędzy odpowiednimi grupami funkcyjnymi monomerów AB_2 ($\text{A} = \text{NH}_2, \text{B} = \text{PPh}_2$) i CD_2 ($\text{C} = \text{N}_3, \text{D} = \text{CHO}$).⁵³ Z kolei Malkoch i wsp. zaprezentowali szybki dostęp do dendrymerów G4 typu Fréchet’a oraz typu bis-MPA w wyniku połączenia w

metodzie ortogonalnej reakcji click (cykloaddycji 1,3-dipolarnej) z tradycyjnymi reakcjami estryfikacji/eteryfikacji.⁵⁴ W przeciwieństwie do nich, grupa Hawker'a projektując syntezę dendrymerów metodą ortogonalną skoncentrowała się wyłącznie na metodologii „click”, tj. 1,3-dipolarnej cykloaddycji Huisgena katalizowanej miedzią (CuAAC) i fotochemicznym, rodnikowym sprzęganiu tiol-en (TEC).⁵⁵ Efektem połączenia tych dwóch ortogonalnych reakcji było otrzymanie dendrymeru G6 zaledwie w ciągu jednego dnia.



Schemat 17. Synteza dendrymerów G6 metodą ortogonalną z wykorzystaniem chemii click (reakcji CuAAC i TEC).

Synteza została zrealizowana z wykorzystaniem 2,4,6-tris(alliloksy)-1,3,5-triazyny (TAT) jako rdzenia oraz monomerów przygotowanych z kwasu 2,2-bis(hydroksymetylo)propionowego (Schemat 17). Monomer AB₂ posiadał grupę tiolową i dwie grupy azydkowe, zaś monomer CD₂ – grupę alkinową i dwie grupy alkenowe.

Pomimo że metoda ortogonalna umożliwia szybkie otrzymywanie dendrymerów dzięki redukcji etapów reakcyjnych i oczyszczania, niewiele syntez tego typu zostało opisanych w literaturze. Wynika to ze złożoności wymagań metody, tj. konieczności

zastosowania wysoce wydajnych i ortogonalnych reakcji sprzęgania z udziałem dwóch par ortogonalnych grup funkcyjnych. Co więcej, ortogonalność ta narzuca ograniczenie na to, które funkcje mogą być wbudowane w strukturę dendrymeru bez kolidowania z cyklem syntetycznym.

1.2. WŁASNOŚCI DENDRYMERÓW W UKŁADACH BIOLOGICZNYCH

Dendrymery znajdują się w kręgu zainteresowań wielu dziedzin nauki, m.in. medycyny. Są one badane zarówno pod kątem możliwości ich wykorzystania jako leków, jak i nośników substancji leczniczych, materiału genetycznego, antygenów, kontrastów NMR, itp. Aby mogły znaleźć zastosowanie w układach biologicznych muszą być nietoksyczne i nieimmunogenne. Poza tym, powinny charakteryzować się zdolnością do przekraczania błon biologicznych oraz odpowiednim czasem półtrwania we krwi, umożliwiającym osiągnięcie efektu klinicznego. Niestety większość dendrymerów posiada wysoką toksyczność, która wyklucza możliwości ich wykorzystania do celów biomedycznych. Przeważnie obserwuje się silną korelację dodatnią pomiędzy toksycznością dendrymeru a jego charakterem kationowym. Dokładny mechanizm toksyczności dendrymerów kationowych nie został jeszcze w pełni poznany. Przyjmuje się, że proces przebiega przez początkową adhezję związku do ujemnie naładowanej błony komórkowej dzięki oddziaływaniom elektrostatycznym, w wyniku czego dochodzi do endocytozy lub bezpośredniego rozerwania błony i w konsekwencji do rozpadu komórki.⁵⁶

Toksyczność dendrymerów jest właściwością, która może zależeć od bardzo wielu parametrów, takich jak budowa chemiczna wnętrza, rodzaj grup terminalnych, rozmiar (generacja), ładunek, stężenie czy czas.⁵⁷ Liczne prace jednoznacznie wskazują na zasadniczy wpływ rodzaju grup peryferyjnych makrocząsteczki na wykazywaną przez nią toksyczność. Badania przeprowadzone na grupie dendrymerów melaminowych różniących się jedynie grupami terminalnymi, wykazały znacznie wyższą cytotoxycznosc i hemotoksycznosc dendrymerów kationowych (grupy aminowe, guanidynowe) niż ich analogów anionowych (grupy karboksylowe, sulfonianowe, fosfonianowe).⁵⁸ Dendrymery melaminowe z obojętnymi grupami poli(etylenoglikolu) (PEG) cechowały się najniższą toksycznością. Najprawdopodobniej spowodowane jest to brakiem możliwości adhezji makrocząsteczek z ujemnie naładowanymi lub obojętnymi ugrupowaniami powierzchniowymi do ujemnie naładowanych błon komórkowych drobnoustrojów. Podobne wyniki obserwowane są w przypadku innych dendrymerów. Np. dendrymery PAMAM zawierające aminowe grupy

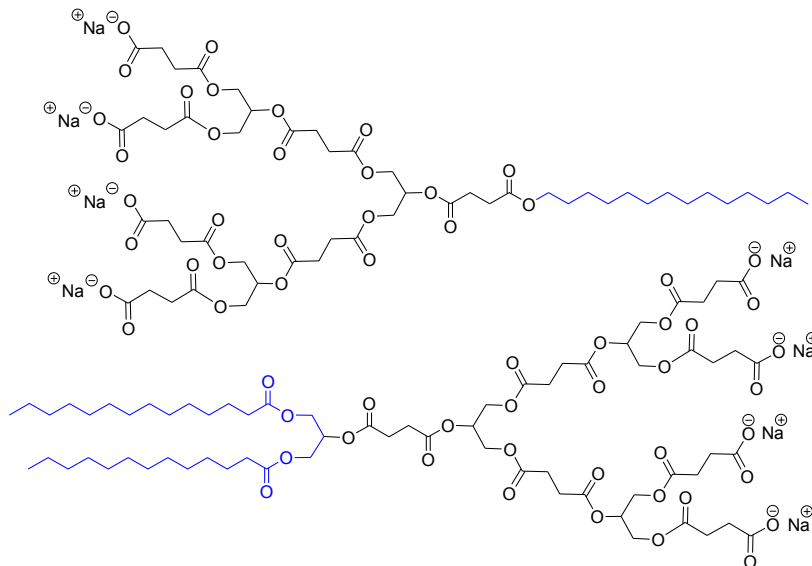
terminalne są dużo bardziej toksyczne od ich odpowiedników z grupami karboksylowymi czy hydroksylowymi.⁵⁹

Toksyczność dendrymerów z aminowymi grupami terminalnymi silnie zależy od rzędowości tych grup. Dendrymery z 1-rzędowymi grupami aminowymi wykazują najbardziej szkodliwe działanie, zaś te z 3-rzędowymi – najmniejsze. Tłumaczy się to tym, że podstawienie atomów wodoru grup aminowych resztami alkilowymi prowadzi do silniejszego osłaniania zasadowych atomów azotu i w rezultacie osłabienia ich oddziaływań elektrostatycznych z błonami komórkowymi. „Wygaszanie” toksycznego działania 1-rzędowych grup aminowych poprzez ich alkilowanie jest jednym ze sposobów otrzymania mniej toksycznych związków. Inherentną toksyczność dendrymerów zakończonych grupami aminowymi zmniejsza się również poprzez ich acetylację, PEGylację czy modyfikację resztami cukrowymi.⁶⁰

Silne właściwości toksyczne wnoszą do makrocząsteczki nie tylko ugrupowania kationowe, ale również apolarne, np. reszty aromatyczne czy alifatyczne, długołańcuchowe reszty kwasów tłuszczowych.⁶¹ Mechanizm toksycznego działania dendrymerów zakończonych takimi niepolarnymi ugrupowaniami sprowadza się do dezorganizacji błony komórkowej w wyniku słabych oddziaływań hydrofobowych pomiędzy dwuwarstwą lipidową a grupami terminalnymi makrocząsteczki. Nie zawsze jednak wprowadzenie reszt hydrofobowych do związku musi wiązać się ze wzrostem jego toksyczności. Np. w przypadku dendrymerów kationowych PAMAM G3 i G4 okazało się, że ich cytotoxyczność uległa redukcji po przyłączeniu sześciu reszt kwasu laurynowego, aczkolwiek większy stopień modyfikacji powierzchni znosił ten efekt.⁶² Również w grupie dendrymerów amfifilowych zaobserwowano spadek cytotoxyczności w wyniku zwiększenia udziału regionu hydrofobowego (Rysunek 6).⁶³

Generacja makrocząsteczki (rozmiar, masa cząsteczkowa) silnie decyduje o jej stopniu szkodliwości. Obserwuje się, że cytotoxyczność i hemotoxyczność dendrymerów zakończonych wolnymi grupami aminowymi (PAMAM⁶⁴, PPI⁶⁵) rośnie wraz z generacją (dodatni efekt dendrytyczny). Wiąże się to ze wzrostem liczby grup aminowych, a więc również ładunku dodatniego. Z tego względu każda modyfikacja dendrymeru skutkująca wprowadzeniem dodatkowych grup kationowych podnosi jego toksyczność. Np. zaobserwowano, że funkcjonalizacja powierzchni dendrymerów PAMAM resztami lizyny lub argininy wzmacnia ich toksyczne działanie.⁶⁶ Natomiast dla dendrymerów posiadających toksyczne wnętrza i nietoksyczne grupy terminalne, toksyczność maleje ze wzrostem generacji (ujemny efekt dendrytyczny). Przykładem są dendrymery alkilosilanowe z grupami

peryferyjnymi podstawionymi resztami poli(etylenoglikolu).⁶⁴ Ten ujemny efekt dendrytyczny tłumaczy się zjawiskiem ekranowania wnętrza przez reszty PEG. Wzrostowi generacji dendrymeru towarzyszy większe upakowanie grup terminalnych, a tym samym skuteczniejsze odizolowanie wnętrza od otoczenia.



Rysunek 6. Dendrymery amfifilowe z pojedynczym (bardziej cytotoksyczny) i podwójnym łańcuchem hydrofobowym.

Elastyczność szkieletu dendrytycznego wydaje się być również ważnym czynnikiem wpływającym na własności toksyczne dendrymeru. Wykazano, że kationowe dendrymery PAMAM są mniej cytotoksyczne w porównaniu z klasycznymi polimerami liniowymi zawierającymi wolne grupy aminowe, np. poli(lizynowymi) (PLL).⁶⁷ Tłumaczy się to słabszą zdolnością adhezji dendrymerów o mniej giętkiej i globularnej strukturze do błony komórkowej.

Dendrymery PAMAM okazały się także mniej hemotoksyczne od dendrymerów PPI posiadających tę samą ilość terminalnych grup aminowych.⁶⁴ Można to wyjaśnić ich niższym stopniem elastyczności z powodu obecnych w ich strukturze sztywnych wiązań amidowych. Ponadto, dendrymery PAMAM cechują się mniej kationowym charakterem wnętrza, złożonego z ugrupowań amidowych i 3-rzędowych amin, w porównaniu do wysoce kationowego wnętrza dendrymerów PPI, opartego wyłącznie na 3-rzędowych grupach aminowych.

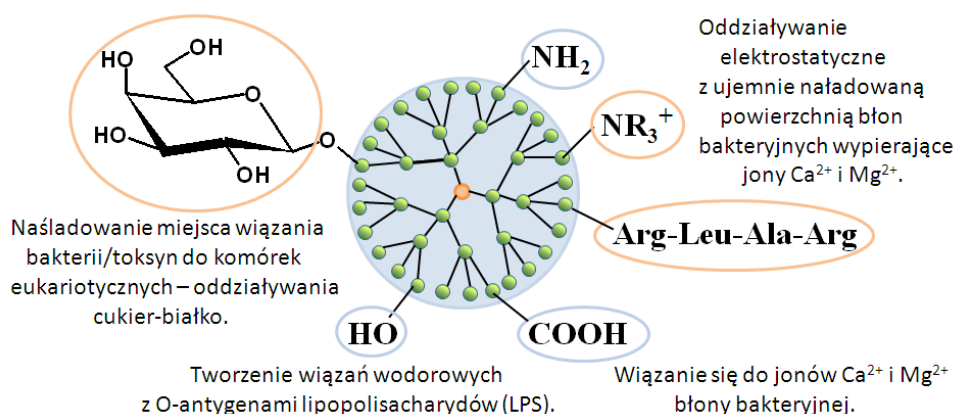
Rodzaj wnętrza makrocząsteczki ma duży wpływ na stopień jej toksyczności. Znacznie mniejszą toksyczność posiadają dendrymery, których blokiem budulcowym są naturalne metabolity, takie jak np. glicerol, aminokwasy, kwasy alifatyczne (np. kwas bursztynowy, cytrynowy, octowy) czy fenolokwasy.⁶⁸ Jednakże, w przypadku dendrymerów

zsyntetyzowanych przy użyciu zasadowych aminokwasów (lizyna, arginina) obserwuje się toksyczne działanie tylko niewiele mniejsze niż dendrymerów PAMAM.⁶⁹

1.3. DENDRYMERY ANTYBAKTERYJNE I ANTYBAKTERYJNE SYSTEMY DENDRYTYCZNE

Dendrymery ze względu na swoją unikalną strukturę i właściwości fizykochemiczne, jak również szeroką możliwość użycia różnych substratów do ich konstrukcji i funkcjonalizacji, są źródłem wielu ciekawych związków / systemów bakteriostatycznych i bakteriobójczych.⁷⁰ Można je podzielić na dendrymery antybakteryjne i antybakteryjne systemy dendrytyczne.

Wśród opisanych w literaturze dendrymerów antybakteryjnych wyróżnia się dendrymery posiadające zmodyfikowane grupy terminalne, np. resztami cukrowymi, ugrupowaniami 4-rzędowych soli amoniowych czy fragmentami peptydowymi pochodzącymi od naturalnych peptydów antybakteryjnych, jak również dendrymery niezmodyfikowane, posiadające „same w sobie” właściwości lecznicze (Rysunek 7).



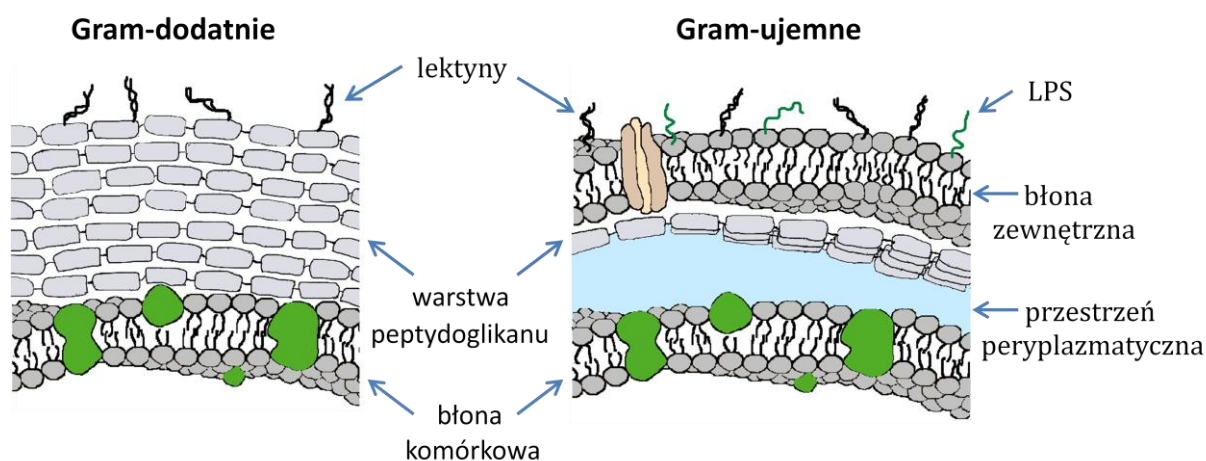
Rysunek 7. Dendrymery zmodyfikowane (pomarańczowa obwódka) i niezmodyfikowane (niebieska obwódka) oraz typy oddziaływań pomiędzy odpowiednimi grupami powierzchniowymi dendrymeru a błoną bakteryjną.

Stanowią one stosunkowo nowy temat zapoczątkowany w roku 1997 przez prace Magnusson'a i wsp.⁷¹ oraz Thompson'a i Schengrund'a.⁷² Obie grupy badawcze, niezależnie od siebie, zsyntetyzowały glikodendrymery, czyli dendrymery sfunkcjonalizowane resztami cukrowymi działające jako inhibitory adhezji bakterii czy toksyn bakteryjnych. Wkrótce i inni naukowcy zauważyli antybakteryjny potencjał dendrymerów, wynikiem czego było otrzymanie dendrymerów działających nie tylko bakteriostatycznie, ale i bakteriobójczo. Wśród nich na uwagę zasługują przede wszystkim dendrymery peptydowe, które po raz

pierwszy zostały otrzymane w roku 2002 przez Tam'a i wsp.⁷³ Należy również zaznaczyć, że aktywność antybakteryjną posiadają dendrymery PAMAM otrzymane już w latach 80-tych, ale zbadane w tym kierunku dopiero w roku 2007.⁷⁴

Mechanizm działania dendrymerów antybakteryjnych zależy przede wszystkim od rodzaju ich terminalnych grup funkcyjnych bądź charakteru ligandów przyłączonych do ich powierzchni i w większości przypadków nie jest w pełni wyjaśniony (Rysunek 7).

Dendrymery antybakteryjne, podobnie jak antybiotyki, posiadają wąskie bądź szerokie spektrum działania, tzn. ich wpływ ogranicza się tylko do jednej grupy lub rodzaju drobnoustrojów bądź działają zarówno na bakterie Gram-dodatnie, jak i Gram-ujemne. Często obserwuje się, że niektóre z nich działają efektywniej lub wyłącznie na bakterie Gram-dodatnie, podczas gdy inne na Gram-ujemne. Przyczyny należy dopatrywać się w różnej budowie ściany komórkowej obu grup drobnoustrojów (Rysunek 8).⁷⁵



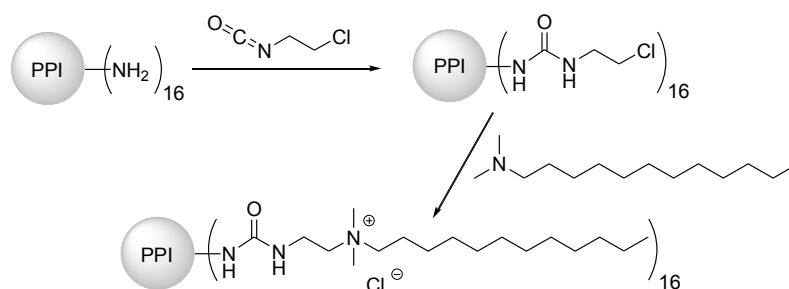
Rysunek 8. Budowa osłony komórkowej bakterii Gram-dodatnich i Gram-ujemnych. *Struktura ściany bakterii Gram-ujemnych jest bardziej złożona. Bezpośrednio przy błonie komórkowej znajduje się przestrzeń peryplazmatyczna, w której m.in. obecne są białka związane z opornością na antybiotyki. Nad nią mieści się pojedyncza warstwa peptydoglikanu, zbudowanego podobnie jak u bakterii Gram-dodatnich. Nad tą warstwą położona jest błona zewnętrzna zbudowana z dwóch warstw lipidów oraz białek, gdzie zewnętrzna warstwa lipidowa to cząsteczki lipopolisacharydu (LPS).*

Poza dendrymerami antybakteryjnymi, znane są również antybakteryjne systemy dendrytyczne, w których dendrymer może pełnić wiele różnych funkcji, m.in. solubilizanta, czynnika zmniejszającego toksyczność, czego przykładem są nanohybrydy dendrymerów i nanorurek węglowych. Jednakże największe zainteresowanie budzą te systemy, w których dendrymer występuje w roli nośnika leku antybakteryjnego, a więc należące do tzw. systemów dostarczania leku (DDS, *ang. drug delivery systems*). Wśród nich można odnaleźć przykłady, gdzie dendrymer jest zarówno nośnikiem, jak i związkiem aktywnym biologicznie (połączenia synergiczne). Twórcami pierwszego antybakteryjnego systemu dendrytycznego

byli McManus i wsp., którzy w roku 2001 opisali dendrymery PAMAM zawierające nanocząsteczki srebra.⁷⁶

1.3.1. Niepeptydowe dendrymery antybakteryjne

Wśród niepeptydowych dendrymerów antybakteryjnych największą grupę stanowią dendrymery polikationowe. Pierwsze związki tego typu powstały w grupie Cooper'a, która przy ich projektowaniu opierała się na informacji dotyczącej antybakteryjnych właściwości czwartorzędowych soli amoniowych, posiadających łańcuch alkilowy z co najmniej ośmioma atomami węgla.⁷⁷ Dendrymery polipropylenoiminowe (PPI) G3 sfunkcjonalizowane grupami dimetylododecyloamoniowymi posiadały aktywność przeciwdrobnoustrojową ponad 160-krotnie wyższą wobec bakterii *E. coli* w porównaniu z chlorkiem n-dodecylotrimetyloamoniowym. (Schemat 18).⁷⁸ Również bakterie Gram-dodatnie *S. aureus* były bardziej podatne na bakteriobójcze działanie dendrymeru.

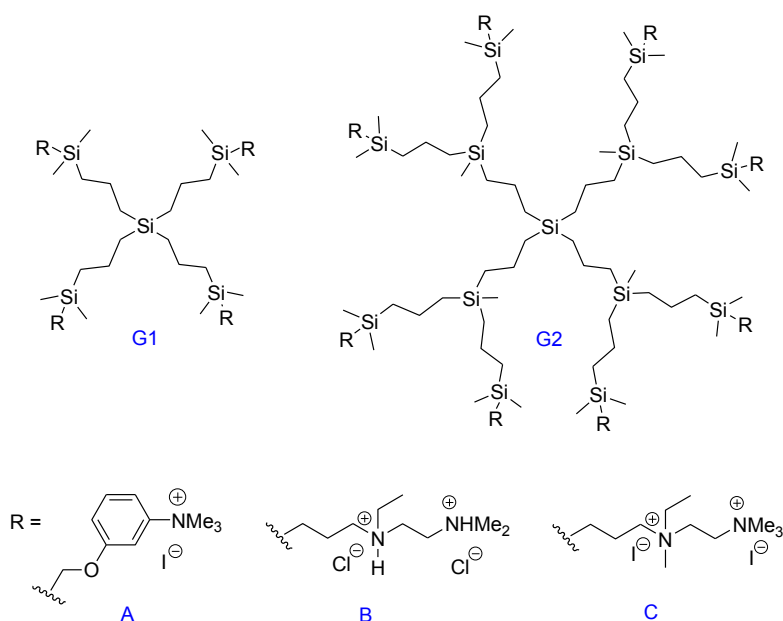


Schemat 18. Funkcjonalizacja dendrymeru PPI G3 grupami dimetylododecyloamoniowymi.

Próby ustalenia zależności pomiędzy strukturą chemiczną sfunkcjonalizowanych dendrymerów PPI a ich aktywnością biologiczną obejmowały zmianę takich parametrów, jak: rozmiar dendrymeru, długość hydrofobowego łańcucha dimetyloalkiloaminy, rodzaj przeciwjonu.⁷⁹ Aktywność przeciwdrobnoustrojowa w zależności od generacji dendrymeru przedstawiała się następująco: $G5 > G4 > G1 > G2 > G3$. Badania nad optymalną długością przyłączanej do PPI dimetyloalkiloaminy wykazały następujący trend: $C_{10} > C_8 > C_{12} > C_{14} \approx C_{16}$. Okazało się również, że zastąpienie anionu chlorkowego przez bromkowy powoduje poprawę aktywności antybakteryjnej dendrymeru. Tak więc aktywność dendrymeru zależy zarówno od ilości grup kationowych, jak i długości łańcucha alkilowego, co sugeruje, że miejsca wiążące na zewnętrznej błonie drobnoustrojów charakteryzują się różną siłą wiązania krótkich i długich ligandów hydrofobowych (*ang. dual binding site theory*). Dalsze badania nad modyfikowanymi dendrymerami PPI wykazały, że głównym mechanizmem ich

antybakteryjnego działania jest adhezja i uszkodzenia anionowej błony bakteryjnej, co w konsekwencji prowadzi do lizy komórkowej i śmierci drobnoustroju.⁸⁰

Właściwości antybakteryjne dendrymerów sfunkcjonalizowanych grupami amoniowymi były również tematem badań grupy de la Mata.⁸¹ Zsyntetyzowane przez nich dendrymery karbosilanowe generacji 1 i 2 sfunkcjonalizowane grupami amoniowymi w wyniku reakcji z 3-dimetyloaminofenolem a następnie czwartorzędowania jodkiem metylu, zostały przebadane na szczepach *E. coli* i *S. aureus* (Rysunek 9: G1-A, G2-A). Dendrymery wykazywały szczególnie dobrą aktywność przeciw bakteriom Gram-dodatnim. Co więcej, dendrymer generacji 1 był efektywniejszy od dendrymeru generacji 2, zwłaszcza w przypadku *E. coli* (MIC = 4 µg/mL dla G1 i 64 µg/mL dla G2).

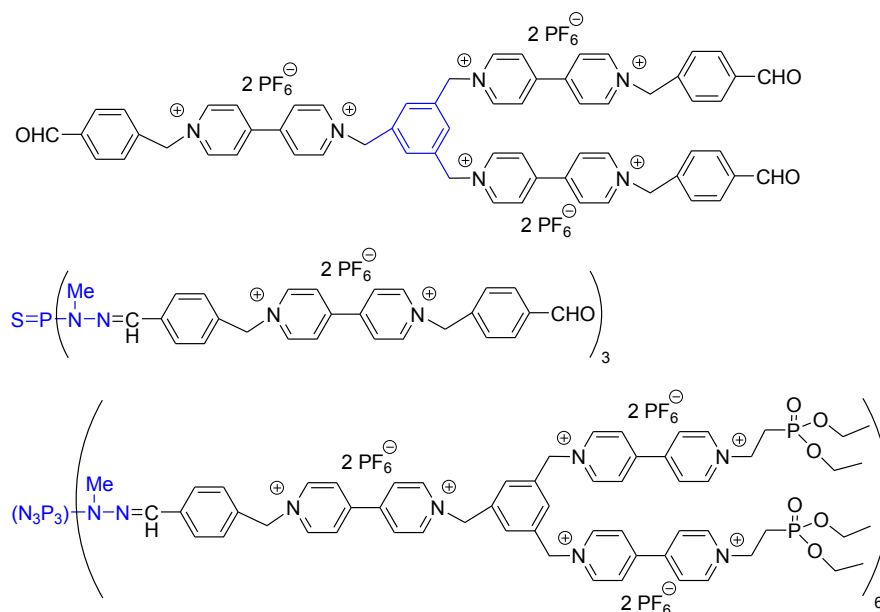


Rysunek 9. Dendrymery karbosilanowe G1 i G2 sfunkcjonalizowane grupami amoniowymi (A, B, C).

Funkcjonalizacja dendrymerów karbosilanowych w wyniku reakcji hydrosililowania z *N,N*-dimetylo-*N'*-allilo-*N'*-etylo-etylenodiaminą, a następnie reakcji z użyciem HCl bądź MeI, doprowadziła do otrzymania dendrymerów rozpuszczalnych i stabilnych w roztworach wodnych (Rysunek 9: G1-B,C, G2-B,C).⁸² Wyniki badań mikrobiologicznych pokazały, że rodzaj soli amoniowej (sól 3-rzędowa vs sól 4-rzędowa) dendrymeru silnie wpływa na jego aktywność. Dendrymer przeprowadzony do postaci soli przy użyciu HCl wykazywał znacznie niższą aktywność antybakteryjną niż jego analog otrzymany przy użyciu MeI. Prawdopodobną przyczyną różnicy w aktywnościach dendrymerów G2-B i G2-C jest bardziej hydrofilowy charakter dendrymeru G2-B. Dodatkowo autorzy sugerują, że za obserwowany efekt może być również odpowiedzialny przeciwjon. Jodki tworzą słabsze pary jonowe z

grupami amoniowymi niż chlorki, co umożliwia silniejsze oddziaływania elektrostatyczne z ujemnie naładowanymi błonami bakteryjnymi.

Ostatnio Majoral i wsp. zsyntetyzowali i przebadali pod kątem ich aktywności antimikrobiologicznej dendrymery: wiologenowy G0 oraz wiologenowo-fosforowe G0 i G1, tj. dendrymery posiadające sole 4,4'-bipirydyniowe jako bloki budulcowe (Rysunek 10).⁸³ Dendrymer wiologenowy został zsyntetyzowany w oparciu o trifunkcyjny rdzeń $C_6H_3(CH_2)_3$, zaś dendrymery wiologenowo-fosforowe – przy wykorzystaniu trifunkcyjnego $P(S)(NCH_3NH_2)_3$ lub heksafunkcyjnego rdzenia $(P_3N_3)(NCH_3NH_2)_6$. Terminalnymi grupami funkcyjnymi dendrymerów były grupy aldehydowe, fosfonianowe bądź PEG. Badania biologiczne zsyntetyzowanych związków wykazały, że ich aktywność antybakteryjna, jak również niespecyficzna toksyczność silnie zależą od takich parametrów, jak generacja dendrymeru, ilość reszt wiologenowych, rodzaj rdzenia i terminalnych grup funkcyjnych. Dendrymery z terminalnymi grupami aldehydowymi posiadały lepszą aktywność antybakteryjną i niższą hemotoksyczność niż ich analogi z grupami fosfonianowymi oraz lepszą aktywność, lecz wyższą hemotoksyczność w porównaniu do dendrymeru z grupami PEG. Najlepszymi właściwościami biologicznymi, tj. działaniem antybakteryjnym, najniższą cyto- i hemotoksycznością, odznaczał się dendrymer wiologenowy zsyntetyzowany na rdzeniu $C_6H_3(CH_2)_3$. Wzrost generacji dendrymerów z G0 do G1, wiążący się ze wzrostem ilości reszt wiologenowych, powodował znaczną poprawę ich działania antybakteryjnego, lecz równocześnie i wzrost hemotoksyczności. Ponadto wszystkie dendrymery oddziaływały silniej na bakterie *S. aureus* niż na *E. coli*.



Rysunek 10. Dendrymer wiologenowy G0 oraz przykłady dendrymerów wiologenowo-fosforowych G0 i G1.

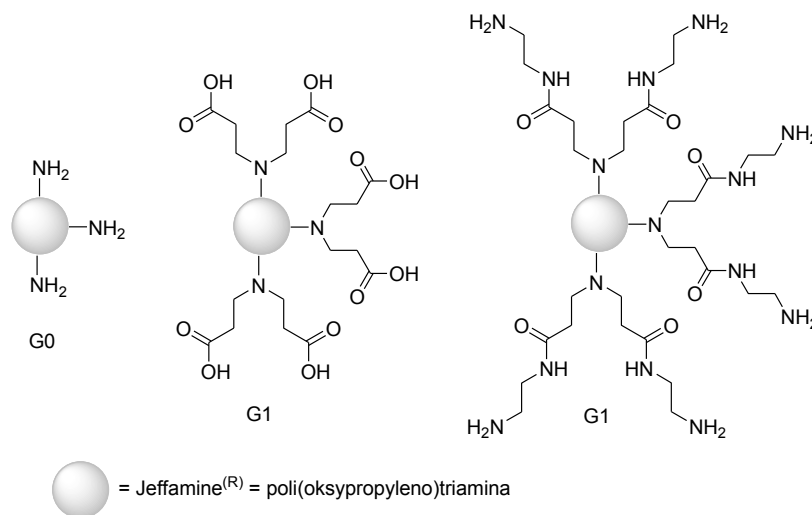
Dendrymery PAMAM, otrzymane przez D. Tomalię w latach 1984-1985, są obiektem wielu badań biologicznych, chemicznych i biochemicznych. Próby wykorzystania ich w medycynie najczęściej sprowadzają się do użycia ich jako nośników substancji aktywnych, w tym leków antybakteryjnych. Jednak niedawno okazało się, że same posiadają właściwości antybakteryjne.⁷⁴ Grupa Cai wykazała aktywność bakteriobójczą dendrymerów PAMAM G3 i G5 wobec *S. aureus* (MIC = 12.5 µg/mL) i *P. aeruginosa* (MIC = 6.3-12.5 µg/mL). Niestety charakteryzowały się one również dużą cytotoksycznością. W celu jej zredukowania autorzy modyfikowali powierzchnię dendrymerów resztami glikolowymi. Proces pegylacji zmniejszał niespecyficzną toksyczność dendrymerów, ale równocześnie, albo znacząco zmniejszał aktywność antymikrobiologiczną (wobec *P. aeruginosa*), albo zupełnie jej pozbawiał (wobec *S. aureus*). Efekt ten wzrastał ze wzrostem stopnia pegylacji dendrymeru. Prawdopodobną przyczyną tego zjawiska było zarówno zmniejszenie liczby protonowanych grup aminowych, jak również ich przesłanianie przez łańcuchy PEG. W konsekwencji dochodziło do zmniejszenia oddziaływań elektrostatycznych dendrymerów z ujemnie naładowaną powierzchnią bakteryjną, a więc ich działania antybakteryjnego.

Ta sama grupa opisała również otrzymywanie przeciwbakteryjnych biomateriałów tytanowych (implantów ortopedycznych) przez immobilizację na ich powierzchni dendrymerów PAMAM G5 zmodyfikowanych resztami glikolowymi i niemodyfikowanych.⁸⁴

Dendrymery z terminalnymi grupami aminowymi bądź amoniowymi przeważnie posiadają silne właściwości toksyczne. Nie mogą więc być rozważane jako potencjalne leki, chociaż wykazują dobrą aktywność antybakteryjną. Porównując właściwości kationowych dendrymerów, np. PAMAM z ich anionowymi odpowiednikami, można zauważyć, że dendrymery zawierające powierzchniowe grupy aminowe (kationowe) wykazują znacznie wyższą toksyczność niż dendrymery anionowe, sfunkcjonalizowane karboksylowymi grupami powierzchniowymi. Obserwacja ta jest przyczyną podejmowanych prób otrzymania efektywnych, antybakteryjnych dendrymerów anionowych.

Potencjał dendrymerów anionowych do działania jako czynniki antybakteryjne po raz pierwszy zbadano w grupie Grinstaff'a.⁶³ Zsyntetyzowano dwa amfifilowe dendrymery z kwasu bursztynowego, glicerolu oraz kwasu mirystynowego, posiadające umiarkowaną aktywność antymikrobiologiczną wobec szczepu *B. subtilis* (Rozdział 1.2.; Rysunek 6). Badania cytotoksyczności wykazały, że dendrymer z pojedynczym łańcuchem hydrofobowym odznacza się toksycznością, podczas gdy dendrymer z podwójnym łańcuchem hydrofobowym jest względnie nietoksyczny. Z kolei Dulger i wsp. otrzymali zarówno dendrymery anionowe,

jak i ich kationowe analogi (Rysunek 11).⁸⁵ Dzięki temu możliwe było porównanie wpływu rodzaju terminalnych grup funkcyjnych dendrymeru na wykazywaną przez niego aktywność antybakteryjną. Zsyntetyzowane dendrymery (G0-3) zawierały rdzeń poli(oksypopyleno)triaminowy i gałęzie dendrytyczne PAMAM z terminalnymi grupami aminowymi lub karboksylowymi (*Jeffamine-cored polyamidoamine dendrimers - JCPDs*). Wszystkie z nich posiadały dobre działanie antybakteryjne wobec bakterii Gram-ujemnych, jak i Gram-dodatnich, aczkolwiek dendrymery kationowe były efektywniejsze od ich analogów anionowych. Najaktywniejszy z nich, tj. dendrymer kationowy G0, posiadał lepsze działanie niż znany antybiotyk – gentamycyna. Ponadto aktywność w grupie dendrymerów kationowych malała ze wzrostem ich generacji (G0>G1>G2), podczas gdy dla dendrymerów anionowych rosła (G3≈G2>G1).



Rysunek 11. Dendrymer kationowy G0 oraz dendrymery G1: anionowy i jego analog kationowy.

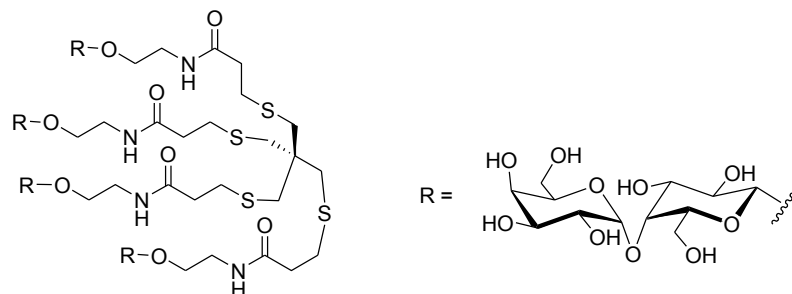
Dendrymery neutralne również mogą posiadać działanie antybakteryjne co zostało zaprezentowane w pracy Kannan'a i wsp.⁸⁶ Badane przez nich dendrymery PAMAM G4 z terminalnymi grupami hydroksylowymi wykazywały aktywność antybakteryjną wobec *E. coli* (MIC₅₀ = 5.4 mg/mL) oraz brak toksyczności w stosunku do ludzkich komórek nabłonka szyjki macicy. Potencjał dendrymerów przetestowano in vivo na ciężarnych świnkach morskich zarażonych szczepem *E. coli* powodującym zapalenie błon płodowych (chorioamnionitis). Okazało się, że zwierzęta leczone dendrymerami PAMAM-OH zostały całkowicie wyleczone bez szkodliwego wpływu na ich płód.

Innym sposobem walki z infekcjami bakteryjnymi jest zapobieganie adhezji komórek bakteryjnych do tkanek gospodarza, od której zaczyna się większość infekcji. Bakterie, jak również wydzielane przez niektóre z nich toksyny, mogą przyłączać się do komórek

eukariotycznych poprzez specyficzne oddziaływania cukier – białko.⁸⁷ Obejmują one głównie wiązania niekowalencyjne pomiędzy białkami powierzchniowymi bakterii / toksynami a węglowodanami występującymi w cząsteczkach glikoprotein lub glikolipidów komórek ludzkich. Blokada tych oddziaływań poprzez wprowadzenie inhibitorów adhezji zmniejsza ryzyko zakażeń.

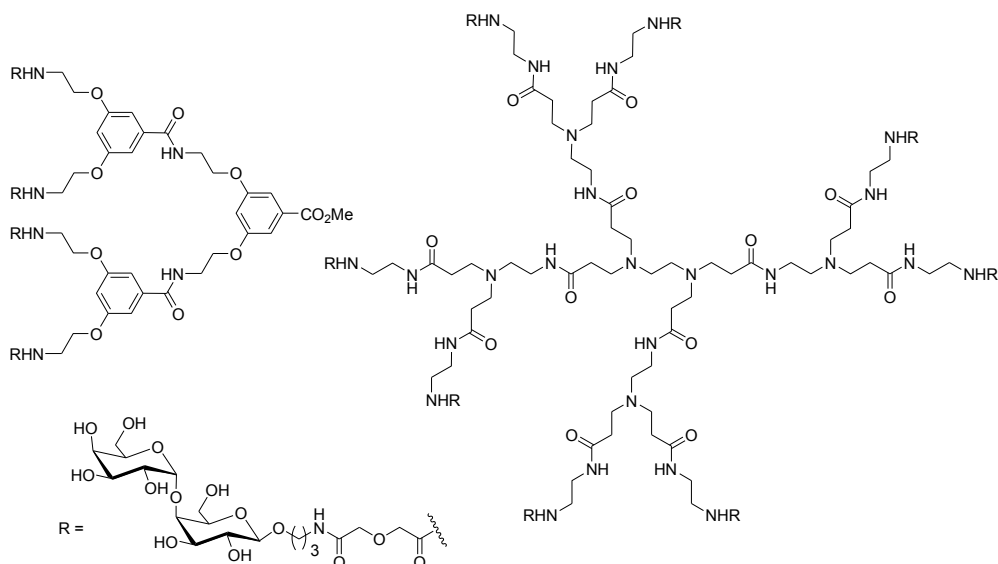
Glikodendrymery, czyli dendrymery posiadające na swojej powierzchni reszty cukrowe naśladujące miejsca wiązania bakterii / toksyn do komórek eukariotycznych, są potencjalnymi czynnikami antybakteryjnymi, otwierającymi nowe możliwości zapobiegania infekcjom we wczesnym stadium.⁸⁸

Pierwsze antybakteryjne glikodendrymery opisali Magnusson i wsp. w roku 1997.⁷¹ Zsyntetyzowali oni dendrymery G1 sfunkcjonalizowane przez 2 do 4 reszt galabiozy (Gal α 1-4Gal β) jako inhibitory adhezji bakterii *S. suis*, posiadających galabiozo-swoiste lektyny. Własności inhibitorowe zostały zbadane na modelu hemaglutynacji (zjawisko zlepiania się erytrocytów w wyniku działania na ich powierzchnię, m.in. bakterii). Najaktywniejszym okazał się glikodendrymer zawierający 4 reszty galabiozy (Rysunek 12). W stężeniu 2-3 nM hamował on całkowicie proces hemaglutynacji powodowany przez szczep *S. suis*, a więc był efektywnym czynnikiem antyadhezyjnym.



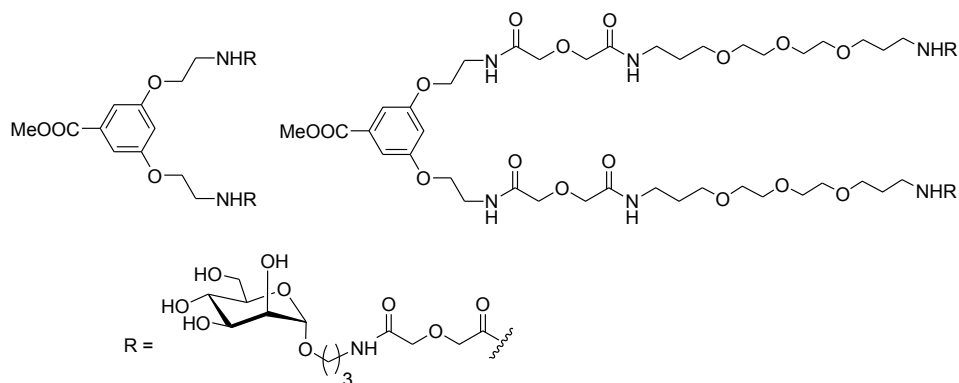
Rysunek 12. Glikodendrymer G1 z resztami galabiozy.

Dalsze prace prowadzone przez Pieters'a i wsp.⁸⁹ doprowadziły do otrzymania nadzwyczaj aktywnych inhibitorów względem *S. suis*: glikodendrymeru G2 strukturalnie opartego na kwasie 3,5-di-(2-aminoetoksy)benzoesowym (MIC = 2 nM) oraz dendrymeru PAMAM G1 (MIC = 0.3 nM) (Rysunek 13), jak również inhibitorów względem *E. coli* z fimbriami P.⁹⁰



Rysunek 13. Glikodendrymery: aromatyczny G2 i PAMAM G1 z resztami galabiozy.

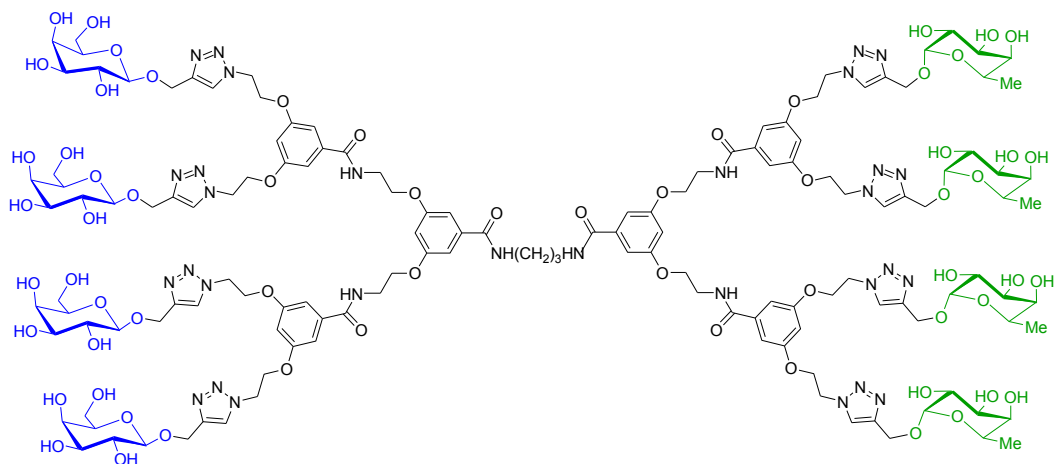
Wartym uwagi jest również fakt, że glikodendrymer aromatyczny G1 w wyniku zastąpienia jego krótszych ramion przez dłuższe, okazał się być lepszym inhibitorem wobec szczepu *E. coli* posiadającego mannozo-swoiste adhezyny, niż jego krótkoramienne analogi aromatyczne G1, G2 i G3 czy nawet glikodendrymer PAMAM G1 (Rysunek 14).⁹¹ Tak więc aktywność glikodendrymerów zależy nie tylko od liczby przenoszonych ligandów cukrowych, ale równie istotna jest struktura dendrymeru oraz rodzaj użytego łącznika.



Rysunek 14. Krótko- i długoramienny glikodendrymer aromatyczny G1 z resztami mannozy.

Oprócz przedstawionych powyżej glikodendrymerowych inhibitorów adhezji szczepu *S. suis* i *E. coli* znane są również inhibitory adhezji szczepu *P. aeruginosy*. Powstały one w grupie Pieters'a w wyniku sfunkcjonalizowania resztą cukrową GalNAc β 1-4Gal dendrymerów G1 i G2 opartych na kwasie 3,5-di-(2-aminoetoksy)benzoesowym.⁹² Ponadto potencjał do działania jako czynnik antyadhezyjny wykazują glikodendrymery Roy'a i wsp.,

posiadające szkielet dendrymeryczny powstały poprzez sprzęgnięcie ze sobą dwóch prostych dendrymerów aromatycznych G2 (Rysunek 15).⁹³



Rysunek 15. Hetero-dwufunkcyjny glikodendrymer z resztami *D*-galaktozy i *L*-fukozy.

Dzięki temu, że zawierają one na swojej powierzchni dwa rodzaje reszt cukrowych: *D*-galaktozę i *L*-fukozę, silnie wiążą się z obydwoma adhezynami *P. aeruginosy*, tj. lektynami LecA i LecB. Te hetero-dwufunkcyjne związki prezentują nowy typ glikodendrymerów mogących utworzyć jednocześnie dwa różne oddziaływania cukier-białko.

W literaturze glikodendrymerów można również odnaleźć kilka prac na temat związków posiadających zdolność neutralizowania toksyn bakteryjnych, takich jak toksyna cholery wydzielana przez *V. cholerae* oraz ciepłochwiejna enterotoksyna (LT, ang. *heat-labile*)⁹⁴ i toksyna Shiga (werotoksyna)⁹⁵ wytwarzane przez szczepy *E. coli*.

Ciekawe podejście do rozwiązania problemu zakażeń bakteryjnych układu moczowego pochodzenia odcewnikowego z użyciem glikodendrymerów, zaprezentowali Cai i wsp.⁹⁶ W celu zapobieżenia tworzenia się biofilmów patogennych bakterii na cewnikach, prowadzących do infekcji, wykorzystali strategię tzw. interferencji bakteryjnej. Polega ona na użyciu biofilmów bakterii probiotycznych jako powłok ochronnych przed kolonizacją patogenów. Jednakże niska adhezencja bakterii probiotycznych do materiałów silikonowych, z których wykonane są cewniki, jak i większość innych urządzeń medycznych, utrudnia bezpośrednie zastosowanie tej strategii. Cai i wsp., dzięki włączeniu glikodendrymerów, udało się stworzyć antybakteryjne materiały urologiczne. Autorzy sfunkcjonalizowali powierzchnię silikonową dendrymerami PAMAM G5, do których przyłączyli reszty pochodnych mannozy. Reszty cukrowe posłużyły do utworzenia stabilnego biofilmu probiotycznego szczepu *E. coli*, posiadającego adhezyny (fimbrie) swoiste dla mannozy.

Badania antybakteryjne udowodniły skuteczność otrzymanego materiału w zapobieganiu adhezji uropatogenicznego szczepu *E. faecalis*.

1.3.2. Antybakteryjne systemy dendrytyczne

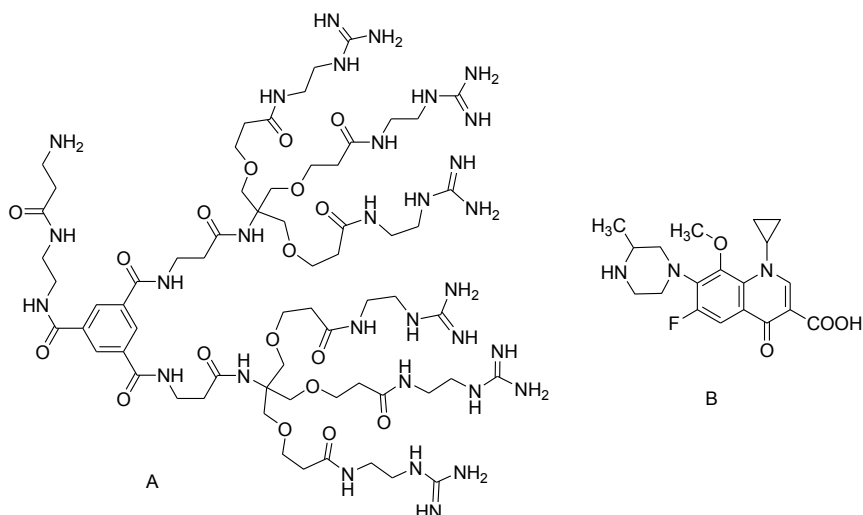
Dendrymery, zwłaszcza typu PAMAM, są szeroko badane jako nośniki leków.⁹⁷ Cząsteczki wykazujące aktywność farmakologiczną mogą być umieszczone na powierzchni dendrymeru poprzez przyłączenie do grup powierzchniowych bądź zainkludowane w jego wnętrzu. Systemy takie projektuje się w celu zwiększenia efektywności dostarczenia, selektywności działania i poprawy właściwości farmakologicznych leków.⁹⁸ Odpowiednio zaprojektowany nośnik daje możliwość kontrolowanego uwalniania leku. Kinetykę uwalniania leku można dostosować do sytuacji wymagającej dostarczenia dużego stężenia leku w krótkim czasie lub osiągnięcia optymalnego stężenia leku na stałym i zrównoważonym poziomie.

Przykładem mogą być koniugaty dendrymeru z penicyliną V opisane przez Yang i Lopina.⁹⁹ Otrzymano je przyłączając kowalencyjnie cząsteczki antybiotyku do powierzchni dendrymeru PAMAM generacji G2.5 lub G3 za pośrednictwem łącznika PEG. Przy czym przyłączenie penicyliny V do PAMAM - PEG zostało zrealizowane poprzez wiązanie amidowe bądź estrowe. Badania antybakteryjne wobec *S. aureus* wykazały brak aktywności koniugatu dendrymer – lek, w którym antybiotyk został związany wiązaniem amidowym. Natomiast drugi koniugat z wiązaniem estrowym pomiędzy penicyliną V a PAMAM - PEG posiadał właściwości antybakteryjne, lecz nie większe niż antybiotyk w postaci wolnej (brak efektu dendrytycznego). Jednakże, połączenie to pozwoliło na powolne, kontrolowane uwalnianie leku, co w efekcie prowadziło do osiągnięcia optymalnego stężenia leku na stałym i zrównoważonym poziomie, a więc do polepszenia jego właściwości leczniczych.

Z kolei grupa Kannan'a przedstawiła efektywne połączenie dendrymeru z azytromycyną do walki z infekcjami bakteryjnymi spowodowanymi przez *Chlamydię trachomatis*.¹⁰⁰ Koniugat dendrymer – lek został otrzymany na drodze kowalencyjnego połączenia dendrymeru PAMAM G4, posiadającego terminalne grupy hydroksylowe, z cząsteczkami antybiotyku za pośrednictwem łącznika, tj. kwasu glutarowego. Wykazywał on znacznie wyższą aktywność antybakteryjną w porównaniu z wolną postacią antybiotyku. Azytromycyna była uwalniana z dendrymeru w 90% w ciągu 16 godzin w wyniku rozpadu hydrolitycznie labilnego wiązania estrowego. Zastosowanie łącznika zmniejszającego zawadę steryczną wiązania estrowego, jak również obecność sąsiadującej 3-rzędowej grupy aminowej, wpływało na przyspieszenie procesu uwalniania leku.

Dostarczanie antybiotyków w wyniku ich enkapsulacji w dendrymerze również zostało zbadane. Wen i wsp. wykazali, że dendrymery mogą wspomóc trudno rozpuszczalny w wodzie sulfametoksazol (SMZ), tj. lek odznaczający się właściwościami antybakteryjnymi przeciwko różnym szczepom bakteryjnym.¹⁰¹ Enkapsulacja SMZ w dendrymerze PAMAM G3 powodowała wzrost jego aktywności antybakteryjnej (4- lub 8-krotny) wobec *E. coli*. Efekt ten nie wynikał z synergizmu pomiędzy aktywnością leku a aktywnością dendrymeru, jako że PAMAM wykazywał działanie antybakteryjne wobec *E. coli* w znacznie wyższym stężeniu (2.5 mg/mL). Zatem, przyczyny wzrostu aktywności antybakteryjnej sulfametoksazolu należy dopatrywać się w spowolnieniu uwalniania leku i poprawie jego rozpuszczalności na skutek enkapsulacji w PAMAM. Podobne wyniki uzyskano w przypadku enkapsulacji w dendrymerach PAMAM innych leków przeciwbakteryjnych takich, jak chinoliny (prulifloksacyna, nadifloksacyna)¹⁰² czy sulfadiazyna.¹⁰³

Inne antybakteryjne systemy dendrytyczne warte uwagi to biodegradowalne hydrożele uwalniające w sposób ciągły zamknięte w ich wnętrzu cząsteczki amoksycyliny, które mogą być zastosowane w leczeniu infekcji bakteryjnych u kobiet w ciąży,¹⁰⁴ jak również systemy uwalniające ze swego wnętrza w przeciągu 20 dni cząsteczki triklosanu i mogące znaleźć zastosowanie jako antybakteryjne powłoki implantów.¹⁰⁵ Natomiast kompleksy dendrymeru poliguanidylowego z gatifloksacyną mogą służyć jako efektywne, przeciwbakteryjne krople do oczu (Rysunek 16).¹⁰⁶

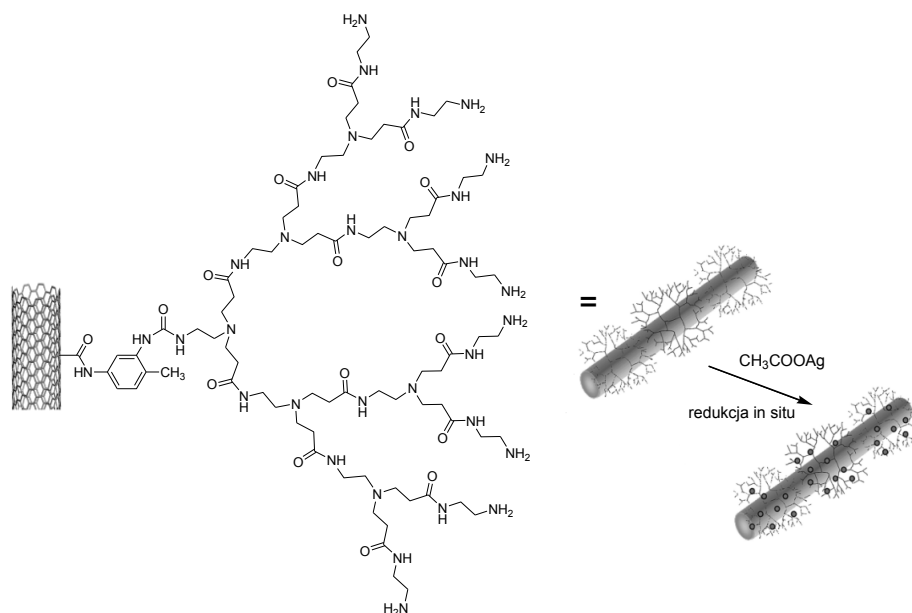


Rysunek 16. Dendrymer poliguanidylowy (A) i gatifloksacyna (B).

Gatifloksacyna to antybiotyk fluorochinolinowy stosowany w leczeniu zapalenia spojówek, spowodowanego przez bakterie Gram-dodatnie i Gram-ujemne. Konieczność bardzo częstej aplikacji leku stanowi dużą niedogodność. Skompleksowanie gatifloksacyny przez dendrymer

poliguanidylowy, realizowane równocześnie za pomocą wiązań jonowych, wodorowych, jak również oddziaływań hydrofobowych, doprowadziło do otrzymania związku o lepszych parametrach terapeutycznych. Kompleks odznaczał się lepszą rozpuszczalnością, przenikalnością i szybszym działaniem antybakteryjnym w porównaniu do antybiotyku występującego samodzielnie. Badania *in vivo* pokazały, że zastosowanie kompleksu umożliwiło osiągnięcie wyższego stężenia leku w miejscu docelowym, utrzymującego się do 24 godzin. Pozytywną konsekwencją tego jest m.in. możliwość przyjmowania leku tylko raz dziennie.

Unikalne właściwości dendrymerów próbuje się również wykorzystać do podniesienia wydajności terapii z zastosowaniem srebra.¹⁰⁷ Pierwsze badania w tym temacie podjęli McManus i wsp.⁷⁶ Zademonstrowali oni, że dendrymery PAMAM z karboksylowymi lub tris(2-hydroksymetylo)amidometanowymi (TRIS) grupami terminalnymi mogą być z powodzeniem wykorzystane do kompleksowania jonów srebra. Kompleksy te pod wpływem światła ulegały bardzo powolnej fotolizie, prowadzącej do otrzymania dendrymerowych koniugatów zawierających nanocząsteczki srebra (AgNPs). Zarówno kompleksy, jak i koniugaty posiadały aktywność antybakteryjną wobec *S. aureus*, *P. aeruginosa* i *E. coli*, która była porównywalna bądź większa niż ta obserwowana dla roztworów azotanu srebra. Ponadto charakteryzowały się stabilnością i dobrą rozpuszczalnością w wodzie.



Rysunek 17. Nanorurka węglowa zmodyfikowana gałęziami PAMAM G3 obsadzonymi nanocząsteczkami srebra.

Obecnie duże zainteresowanie budzi również możliwość wykorzystania jako czynników antybakteryjnych połączeń hybrydowych - dendrymerów i nanorurek węglowych

(CNT). Pierwsze takie antybakteryjne nanohybrydy opisali Chan-Park i wsp.¹⁰⁸ Otrzymali oni wielościenne nanorurki węglowe (MWCNT) zmodyfikowane dendrytycznymi gałęziami PAMAM G3, które dodatkowo zostały obsadzone nanocząsteczkami srebra (AgNPs) (Rysunek 17). Badania antybakteryjne wobec *E. coli*, *P. aeruginosa* i *S. aureus* wykazały ich działanie bakteriobójcze, które było porównywalne lub większe niż to obserwowane dla nanohybryd bez AgNPs oraz znacznie większe od działania wywieranego przez niemodyfikowane nanorurki. Podobne prace przedstawili Neelgund i Oki¹⁰⁹ oraz Murugan i Vimala.¹¹⁰

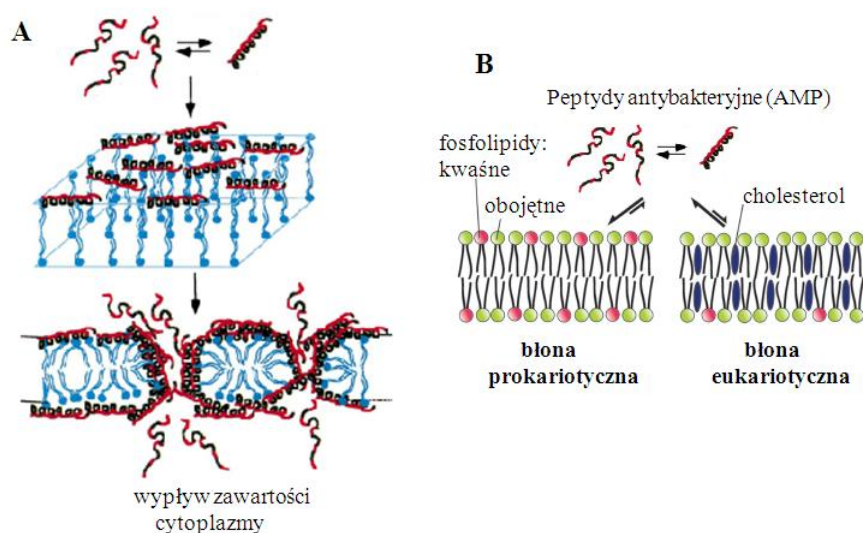
Natomiast Luob i wsp. zsyntetyzowali wielościenne nanorurki węglowe (MWCNT) zmodyfikowane dendrytycznymi gałęziami PAMAM G4, które wykorzystali do enkapsulacji wytworzonych in situ kropek kwantowych CdS lub Ag₂S (QD).¹¹¹ Jednym z celów autorów było obniżenie toksyczności i poprawa biokompatybilności wysoce aktywnych antybakteryjnie nanocząsteczek CdS i Ag₂S. Otrzymane nanohybrydy, rozpuszczalne i stabilne w wodzie, posiadały silniejsze działanie bakteriobójcze niż MWCNT, MWCNT modyfikowane dendrymerami czy QD. Wpływ dendrymerów na zmniejszenie toksyczności i poprawę biokompatybilności nieorganicznych nanocząsteczek (ZnTe) z aktywnością antybakteryjną, w wyniku ich enkapsulacji, został zaprezentowany wcześniej w pracy Saha i wsp.¹¹²

1.3.3. Peptydowe dendrymery antybakteryjne

Dendrymery peptydowe definiuje się jako makrocząsteczki zawierające wiązania peptydowe pomiędzy naturalnymi bądź sztucznymi aminokwasami, które mogą występować w każdym z trzech elementów strukturalnych dendrymeru. Wyróżnia się dwa rodzaje dendrymerów peptydowych: dendrymery złożone wyłącznie z aminokwasów oraz dendrymery mieszane, tj. aminokwasowo - organiczne. Wśród tych ostatnich znajdują się tzw. dendrymery „zaszczepione”, zawierające łańcuchy peptydowe jedynie w warstwie powierzchniowej, glikodendrymery, lipodendrymery oraz dendrymery, w których rdzeń, jak i warstwa powierzchniowa zbudowane są z aminokwasów, natomiast warstwa wewnętrzna (rozgałęziająca) jest pochodzenia nieaminokwasowego.

Początkowo, dendrymery peptydowe o aktywności antybakteryjnej były związkami, w których szkielet dendrymeru służył wyłącznie jako **nośnik elementu aktywnego**, tj. cukru lub peptydu o sekwencji aminokwasowej, której motyw można odnaleźć w naturalnych peptydach przeciwdrobnoustrojowych (AMP, *ang. antimicrobial peptides*).

AMP, będące ważnym składnikiem odporności wrodzonej organizmów wyższych, bądź elementem antagonistycznego oddziaływania mikroorganizmów, stanowią doskonałą matrycę do poszukiwania nowych środków przeciwdrobnoustrojowych. Chemicznie jest to zróżnicowana grupa związków, w większości kationowych (od +2 do +9), zawierających od 12 do 50 reszt aminokwasowych z czego ok. 50% stanowią reszty hydrofobowe, wykazująca szerokie spektrum działania biologicznego.¹¹³ Działanie antybakteryjne AMP, w którym kluczową rolę odgrywa ich amfipatyczność, sprowadza się do niszczenia komórek drobnoustroju głównie przez dezintegrację ich osłon komórkowych. Proces ten może przebiegać według różnych mechanizmów, jednak zawsze zainicjowany jest przez niespecyficzne oddziaływania elektrostatyczne pomiędzy dodatnio naładowanymi fragmentami peptydów a ujemnie naładowanymi fosfolipidami błony komórkowej bakterii (Rysunek 18: A).



Rysunek 18. A: Przykład mechanizmu działania AMP na błony bakteryjne – mechanizm dywanowy. Proces obejmuje 4 główne etapy: 1) preferencyjne wiązanie się dodatnio naładowanych peptydowych monomerów do ujemnie naładowanych fosfolipidów błony; 2) ustawienie się hydrofilowych reszt aminokwasowych w kierunku ujemnie naładowanych grup fosfolipidowych lub cząsteczek wody; 3) rotację molekuł prowadzącą do reorientacji hydrofobowych reszt w kierunku hydrofobowego wnętrza błony; 4) dezintegrację membrany przez niszczące wyginanie się dwuwarstwy lipidowej, prowadzące do micelizacji i wypływu zawartości cytoplazmy.¹¹⁴

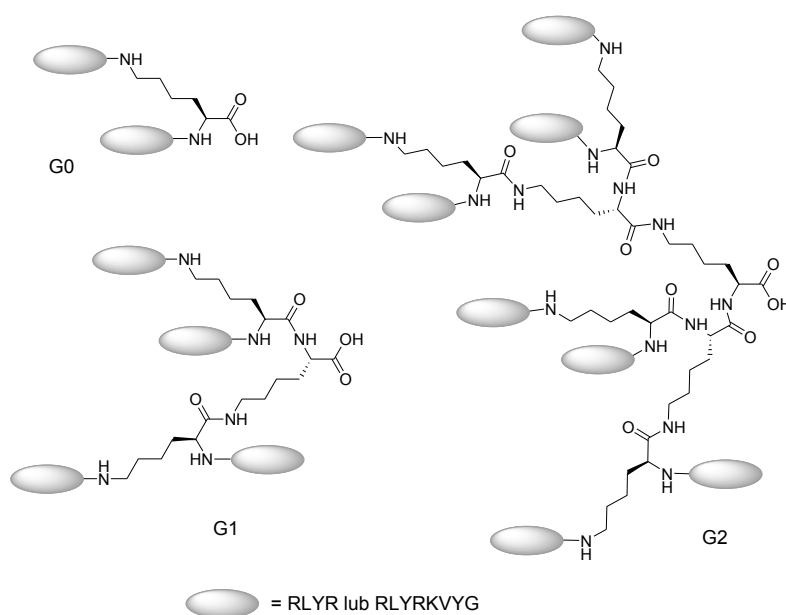
B: Różnice w budowie błon prokariotycznej i eukariotycznej.¹¹⁵

Wytworzenie oporności wśród drobnoustrojów na AMP jest więc niezwykle trudne, gdyż wiąże się ze zmianą struktury czy składu błony bakteryjnej. Selektywne, przeciwdrobnoustrojowe działanie peptydów wynika w głównej mierze z różnic w budowie błon komórek prokariotycznych i eukariotycznych (Rysunek 18: B). Podczas gdy zewnętrzna błona bakterii jest bogata w fosfolipidy posiadające ładunek ujemny, błona organizmów

eukariotycznych ma najczęściej obojętny charakter. Różnicę stanowi również brak cholesterolu w błonach komórkowych bakterii.

Aby AMP mogły być wykorzystane w roli substancji leczniczych należy obejść ich ograniczenia, takie jak toksyczność, wynikającą m.in. z konieczności stosowania wyższych stężeń peptydu, niestabilność wobec degradacji proteolitycznej, wrażliwość na wysokie stężenie soli, wywoływanie odpowiedzi immunologicznej, słaba rozpuszczalność czy wysokie koszty produkcji. Podejmowane w tym celu działania polegają na przeprowadzaniu chemicznych modyfikacji macierzystych peptydów antybakteryjnych bądź przyłączaniu ich aktywnych fragmentów do nośników, np. dendrymerów.

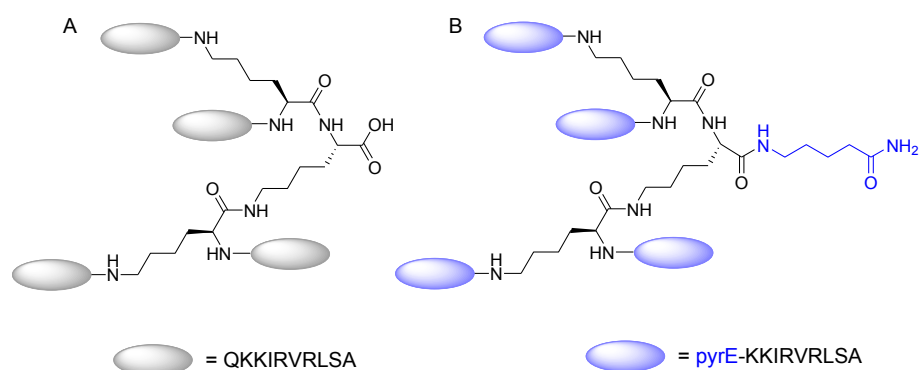
Pionierem ostatniej z wymienionych metod jest Tam i wsp., którzy w roku 2002 opisali antybakteryjne dendrymery otrzymane w wyniku przyłączenia 2 - 8 kopii tetrapeptydu (RLYR), bądź oktapeptydu (RLYRKVYG) do dendrymeru poli(lizynowego) generacji 0, 1 i 2 (Rysunek 19).⁷³



Rysunek 19. Dendrymery peptydowe generacji 0, 1 i 2.

Działy one efektywnie zarówno wobec bakterii Gram-dodatnich, jak i Gram-ujemnych, przy czym najaktywniejszymi były dendrymery czterorozgałęzione. Co ciekawe, porównywalną aktywność wykazywały również liniowe peptydy zsyntetyzowane w wyniku powielania tetrapeptydu RLYR. Jednakże autorzy udowodnili przewagę dendrymerów nad ich liniowymi analogami dotyczącą efektywniejszej syntezy, większej odporności na enzymy proteolityczne i mniejszej toksyczności.

Tematykę rozpoczętą przez grupę Tam'a kontynuowali Pini i wsp., którzy wykorzystali dendrymer lizynowy G1 do przyłączenia 4 kopii 10-peptydu QKKIRVRLSA (Rysunek 20: A).¹¹⁶

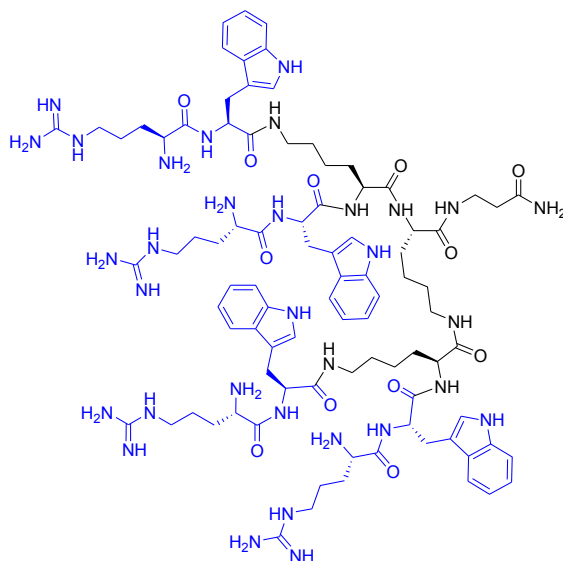


Rysunek 20. Dendrymer lizynowy G1 z resztami 10-peptydu (A) oraz jego zmodyfikowany analog (B).

W wyniku modyfikacji dendrymeru, udało się poprawić jego aktywność wobec bakterii Gram-ujemnych, jak również zwiększyć stabilność w roztworze.¹¹⁷ Zmiany strukturalne obejmowały wprowadzenie lipofilowego łańcucha kwasu aminowalerianowego, w celu zwiększenia powinowactwa dendrymeru do membrany bakteryjnej, oraz zastąpienie *N*-końcowych reszt glutaminowych resztami kwasu piroglutaminowego, służące poprawie stabilności związku poprzez wyeliminowanie procesu cyklizacji (Rysunek 20: B).

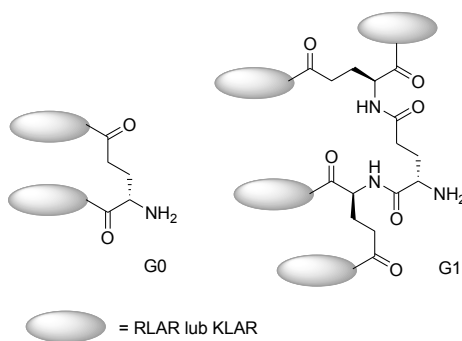
Natomiast Kallenbach i wsp. udowodnili, że przyłączenie do 4-rozgałęzionego dendrymeru lizynowego krótszej sekwencji aminokwasowej, może również prowadzić do otrzymania aktywnego związku (Rysunek 21).¹¹⁸ Zsyntetyzowany przez nich dendrymer lizynowy G1 z 4 kopiami dipeptydu RW wykazywał działanie zarówno wobec ampicyliny- i streptomycyno-opornych szczepów *E. coli* ($MIC_{50} = 4.5 \mu\text{g/mL}$), jak i wieloopornych szczepów *S. aureus* ($MIC_{50} = 16 \mu\text{g/mL}$). Co więcej, dendrymer ten w porównaniu do indolicydyny i polimerów sfunkcjonalizowanych resztami tetrapeptydu RWRW-NH₂ lub RRWW-NH₂, był efektywniejszym związkiem antybakteryjnym i posiadał niższą od nich hemotoksyczność. Dalsze badania, koncentrujące się na biofilmie szczepów *E. coli*, ujawniły, że dendrymer peptydowy posiada zdolność inhibicji tworzenia się biofilmu na powierzchniach polistyrenowych i niszczenia jego dojrzałych form,¹¹⁹ jak również tzw. komórek przetrwałych *E. coli* (*ang. persister cells*), tj. komórek stanowiących małą część populacji biofilmu charakteryzującą się wieloraką opornością na chemioterapeutyki.¹²⁰ Ponadto zaobserwowano synergistyczny efekt pomiędzy dendrymerem a antybiotykiem. W

obecności dendrymeru, komórki przetrwały biofilmu stawały się wysoce czułe na ofloksacynę.



Rysunek 21. Dendrymer lizynowy G1 z resztami dipeptydu RW.

Khrushchev i wsp. opisał jedynie, jak dotychczas, przykład peptydów dendrymerycznych opartych na kwasie glutaminowym (Rysunek 22).¹²¹ Otrzymane związki, przenoszące od 2 do 4 kopii tetrapeptydów (RLAR lub KLAR), przebadali pod kątem ich aktywności wobec *E. coli*. Najaktywniejszy z dendrymerów, tj. G1 z resztami RLAR, posiadał MIC = 29 µg/mL.

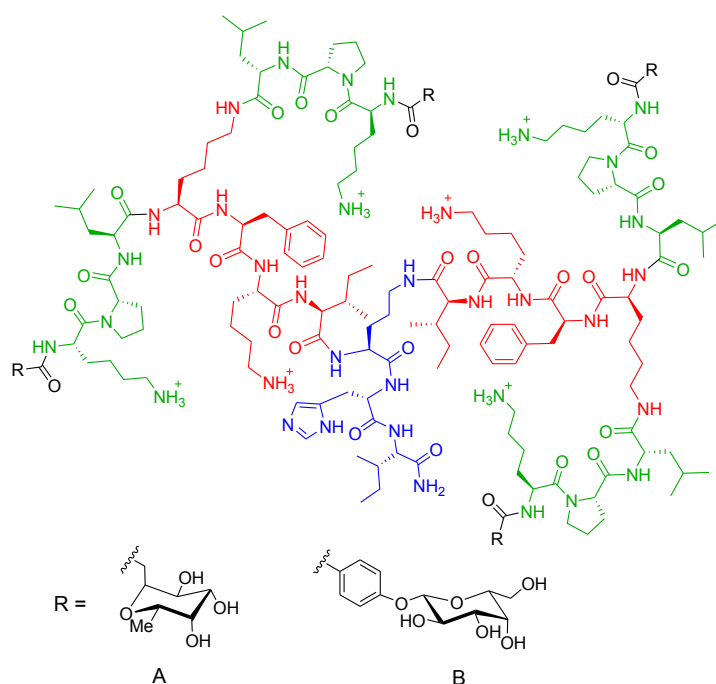


Rysunek 22. Dendrymery peptydowe G0 i G1 z resztami tetrapeptydów.

Nie jest jednak regułą, że przyłączenie peptydu antydrobnoustrojowego (lub odpowiadającego mu farmakoforu) do dendrymeru prowadzi do związku o lepszych właściwościach biologicznych. W grupie Pieters'a przygotowano trzy multimeryczne formy magaininy-2 (23-peptyd), wykorzystując w tym celu dendrymer G1-3 oparty na kwasie 3,5-di-(2-aminoetoksy)benzoesowym (Rysunek 23).¹²² Okazało się, że oddziałują one silniej z

Dwa parametry, tj. ilość jednostek cukrowych przenoszonych przez dendrymer (walencyjność dendrymeru) oraz odległość między nimi, wywierały zasadniczy wpływ na inhibicję. Najlepsze właściwości antyadhezyjne posiadał dendrymer G4 z 16 resztami mannozy (Rysunek 24).

Potencjał antybakteryjny glikodendrymerów peptydowych badał również zespół Reymond'a.¹²⁵ Skoncentrowali się oni nad syntezą związków będących inhibitorami tworzenia biofilmu przez *P. aureginosa* w wyniku blokady działania lektyn. Z tego względu ich dendrymery peptydowe zostały sfunkcjonalizowane na *N*-końcu resztami α -C-fukozy, które posiadają właściwości wiążące lektynę LecB, tj. białko występujące na powierzchni *P. aureginosa* i odpowiedzialne za adhezję tych bakterii do komórek eukariotycznych oraz tworzenie biofilmu.¹²⁶ Z utworzonej biblioteki glikodendrymerów został wyłoniony dendrymer FD2 (CFuc-Lys-Pro-Leu)₄(Lys-Phe-Lys-Ile)₂Lys-His-IleNH₂ wykazujący największe powinowactwo do LecB (Rysunek 25: A).

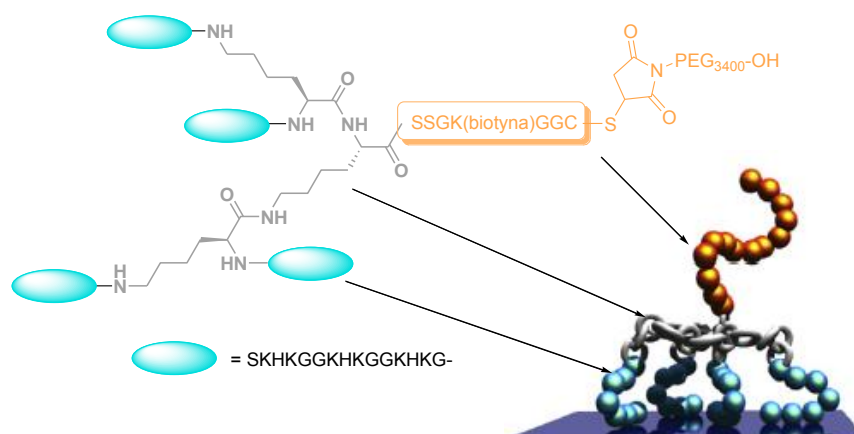


Rysunek 25. Glikodendrymery FD2 (A) i GalAG2 (B).

Powodował on całkowitą inhibicję tworzenia się biofilmu w stężeniu 50 μ M (IC_{50} = 10 μ M) oraz niszczenie już powstałego biofilmu.¹²⁷ Dalsze prace pokazały, że jego 8-walencyjny analog, tj. dendrymer 2G3 (CFuc-Lys-Pro)₈(Lys-Leu-Phe)₄(Lys-Lys-Ile)₂Lys-His-Ile-NH₂, posiada jeszcze lepszą aktywność, wskazując jednoznacznie na kluczową rolę wielowalencyjności dendrymeru w jego wiązaniu się z lektynami.¹²⁸ Natomiast diastereoizomer dendrymeru FD2, otrzymany w wyniku zastąpienia *L*-aminokwasów przez

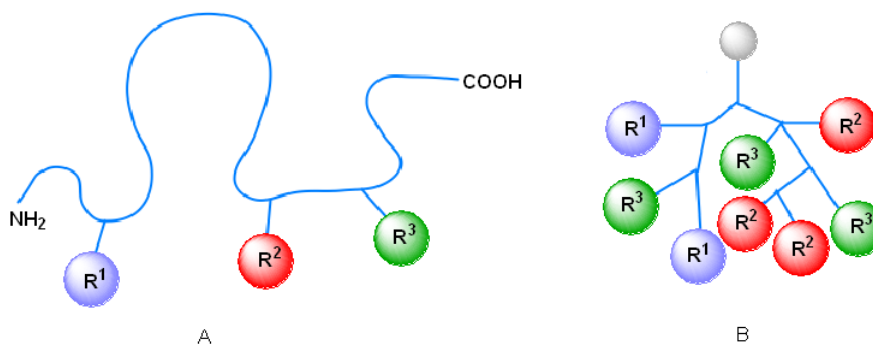
D-aminokwasy, wykazywał mniejszą zdolność inhibicyjną, ale odznaczał się znacznie wyższą stabilnością (odpornością na proteolizę).¹²⁹ Reymond i wsp. zsyntetyzowali również glikodendrymery peptydowe blokujące galaktozo-swoiste lektyny (LecA) *P. aureuginosa*, które podobnie jak fukozy-swoiste lektyny (LecB), silnie pośredniczą w tworzeniu biofilmu.¹³⁰ Najbardziej efektywnym inhibitorem okazał się być dendrymer GalAG2 (GalA-KPL)₄(KFKI)₂KHI, w którym reszty galaktozy przyłączone zostały do dendrymeru peptydowego poprzez aromatyczny łącznik (Rysunek 25: B).

Grupa Grinstaff'a opisała jedyny, jak dotychczas, przykład wykorzystania dendrymerów peptydowych do otrzymania przeciwbakteryjnych biomateriałów implantacyjnych.¹³¹ Zaprojektowali je w oparciu o wyniki swojej wcześniejszej pracy, w której przeciwbakteryjny implant otrzymano poprzez adsorpcję na materiale tytanowym peptydu wykazującego powinowactwo do Ti, oraz posiadającego przyłączony łańcuch glikolowy.¹³² Wykazywał on właściwości inhibicyjne kolonizacji bakterii *S. aureus*, jednakże cechował się słabą stabilnością. Poprzez wykorzystanie 4-rozgałęzionego dendrymeru lizynowego, wbudowanego pomiędzy peptyd a PEG, autorzy otrzymali efektywny przeciwbakteryjny implant tytanowy (Rysunek 26). Posiadał on większą aktywność inhibicyjną kolonizacji bakterii *S. aureus*, jak i niskocząsteczkowych białek oraz większą stabilność w porównaniu do jego mono- czy diwalencyjnego analogu.



Rysunek 26. Dendrymer lizynowy G1 sfunkcjonalizowany PEG i peptydem o powinowactwie do Ti.

Kilka lat temu w naszym zespole powstała koncepcja syntezy małowcząsteczkowych, peptydowych dendrymerów jako **związków odtwarzających pulę struktur aktywnych AMP**, nazwana „koncepcją niesekwencyjnego farmakoforu” (Rysunek 27).¹³³

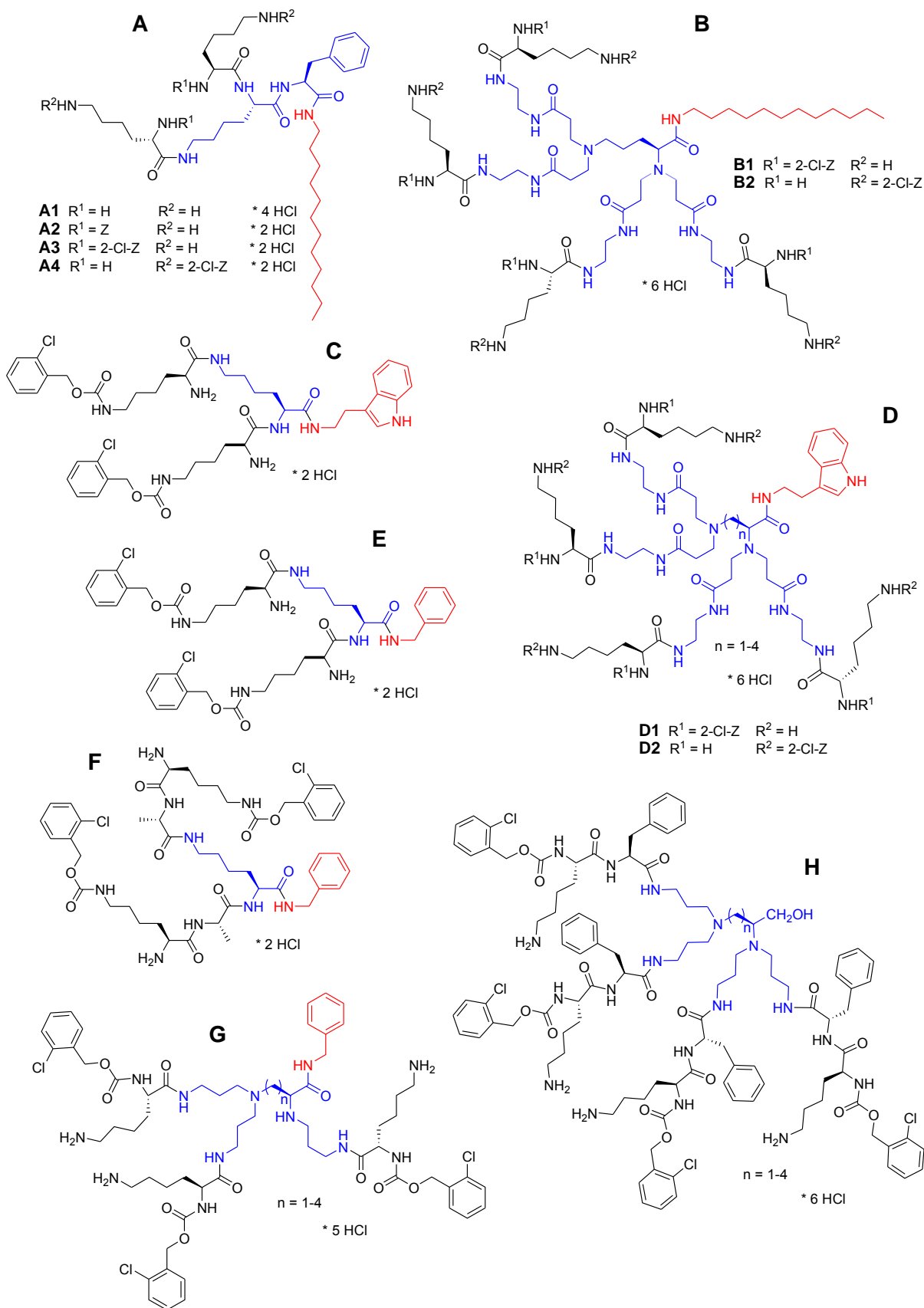


Rysunek 27. Koncepcja niesekwencyjnego farmakoforu: A – układ grup aktywnych R^1 , R^2 , R^3 w naturalnym peptydzie zależny od sekwencji aminokwasów; B – topologicznie równoważne rozłożenie grup aktywnych R^1 , R^2 , R^3 w dendrymerze niezależne od sekwencji.

Jej realizacja doprowadziła do otrzymania związków posiadających aktywność przeciwdrobnoustrojową porównywalną ze stosowanymi antybiotykami peptydowymi. Takie amfifilowe dendrymeryczne peptydy G1 skonstruowane zostały zarówno na prostym trójlizynowym dendronie (Lys)Lys(Lys), jak i na specjalnie zaprojektowanych trój- i czterofunkcyjnych rdzeniach, tj. rdzeniach N,N',N' -tris(3-aminopropyl)aminokwasowych oraz N,N' -tetrakis(3-aminopropyl)diaminoalkoholowych (Rysunek 28).¹³⁴ Najbardziej aktywnymi okazały się dendrymery oparte na rdzeniach N,N' -tetrakis(karbonyloetylo)aminokwasowych (Rysunek 28).¹³⁵ Mechanizm działania amfifilowych dendrymerów peptydowych, podobnie jak ich liniowych analogów (AMP), nie jest stereospecyficzny. Zmiana bowiem chiralności aminokwasów wchodzących w skład dendrymerów nie wpływała w sposób istotny na ich aktywność. Najprawdopodobniej działają one według mechanizmu dywanowego (*ang. carpet mechanism*) (Rysunek 18: A),¹³⁶ chociaż jak stwierdziliśmy ostatnio, dla niektórych z nich asocjacja z membraną jest etapem wstępnym do bardziej specyficznych procesów.¹³⁷

Porównanie wartości MIC, tj. minimalnego stężenia hamującego rozwój bakterii, oznaczonych dla dendrymerów o różnej strukturze (Tabela 1), pozwoliło mi na wyciągnięcie następujących wniosków dotyczących zależności pomiędzy strukturą związku a jego aktywnością antybakteryjną:

1. *Wzrost stopnia rozgałęzienia związku prowadzi na ogół do poprawy jego aktywności* (np. A \rightarrow B, G \rightarrow H). Odstępstwa od tej reguły dotyczą aktywności wobec bakterii Gram-ujemnych (*E. coli*). Np. dla dendrymerów D obserwuje się wzrost aktywności wobec szczepów *S. aureus*, ale spadek wobec *E. coli* w porównaniu z 2-rozgałęzionym dendrymerem C.



Rysunek 28. Przykłady amfifilowych dendrymerów peptydowych G1 skonstruowanych na różnych rdzeniach (zaznaczone kolorem niebieskim i czerwonym, gdzie ten ostatni oznacza element blokujący C-koniec dendrymeru): dwu- (A, C, E, F), trój- (G) i czterofunkcyjnych (B, D, H).

2. *Rodzaj aminy umieszczonej na C-końcu dendrymeru ma istotny wpływ na aktywność.*
 W przypadku dendrymerów 4-rozgałęzionych opartych na rdzeniu N,N' -tetrakis(karbonyloetylo)aminokwasowym (B, D) największą aktywność odnotowuje się, jeśli na C-końcu znajduje się amina hydrofobowa (dodecyloamina, tryptamina). Przy czym związki z tryptaminą (D) działają selektywniej na bakterie Gram-dodatnie (*S. aureus* ATCC 25923) niż na Gram ujemne. Zastąpienie tryptaminy dodecyloaminą osłabia lub znosi selektywność działania dendrymeru ($D1_{(n=4)} \rightarrow B1$, $D2_{(n=4)} \rightarrow B2$) poprzez poprawę aktywności względem *E. coli* i jej pogorszenie wobec *S. aureus*. Wprowadzenie amin hydrofilowych (histamina, 3-aminopirydyna) znacząco osłabia aktywność związków. W przypadku zaś dendrymerów 2-rozgałęzionych z peryferyjnymi lizynami posiadającymi zabezpieczone grupy aminowe ϵ (N^ϵ -2-Cl-Z), wzrost aktywności antybakteryjnej następuje przy zmianie podstawnika na C-końcu w następującej kolejności: amid alaniny < amid fenyloalaniny < metylobenzyloamina (S lub R) \approx benzyloamina < tryptamina (np. E < C).
3. *Rodzaj peryferyjnego elementu rozgałęziającego ma istotny wpływ na aktywność.*
 Na ogół najkorzystniejsze jest wykorzystanie w tej roli lizyny z aromatyczną grupą zabezpieczającą jedną z jej funkcji aminowych (Z, 2-Cl-Z). Dendrymery z innym zasadowym aminokwasem, takim jak ornityna czy arginina, wykazują niższą aktywność antybakteryjną. Obserwuje się, że optymalna struktura pochodnej lizyny, stosowanej jako peryferyjny element rozgałęziający, zależy głównie od typu aminy umieszczonej na C-końcu dendrymeru. Np. dla 2-rozgałęzionych dendrymerów opartych na rdzeniu lizynowym i z amidem alaniny lub fenyloalaniny jako C-końcem, najlepszym wyborem jest lizyna zabezpieczona na funkcji ϵ grupą 2-Cl-Z [Lys(2-Cl-Z)]. Zmiana ochrony z N^ϵ -2-Cl-Z na N^α -Z prowadzi do pogorszenia działania antybakteryjnego. Z kolei dla dendrymeru opartego na rdzeniu N,N' -tetrakis(karbonyloetylo)lizynowym z tryptaminą na C-końcu ($D_{(n=4)}$), aktywność wzrasta przy zmianie rodzaju / rozmieszczenia ochrony grupy aminowej peryferyjnej lizyny w następującej kolejności: N^α -Z < N^ϵ -Z < N^α -2-Br-Z < N^ϵ -2-Cl-Z < N^α -2-Cl-Z (np. $D2_{(n=4)} < D1_{(n=4)}$). Nie zawsze jednak wprowadzenie aromatycznych ochron na funkcję aminową lizyny wiąże się z poprawą aktywności dendrymeru. Przykład stanowią dendrymery z dodecyloaminą jako C-końcem (A1 \rightarrow A4). W ich przypadku obserwuje się wzrost aktywności tylko wobec opornego szczepu *E. coli* po wprowadzeniu ochron N^α -Z bądź N^α -2-Cl-Z (A1 \rightarrow A2, A1 \rightarrow A3).

Tabela 1. Wartości minimalnego stężenia hamującego rozwój bakterii (MIC) oznaczone dla wybranych dendrymerów peptydowych (nb – nie badano).

Związek (Rysunek 1)	Wartości MIC (μM) wobec szczepów:				
	<i>S. aureus</i> ATCC 25923	<i>S. aureus</i> ATCC 43300	<i>E. coli</i> ATCC 25922	<i>E. coli</i> ATCC BAA-198	
A1	8	4	32	64	
A2	15	8	30	8	
A3	32	16	32	32	
A4	28	28	56	64	
B1	1.85	0.46	1.85	nb	
B2	3.7	1.85	7.9	nb	
C	5.1	nb	2.6	nb	
D1	n=1	0.95	8.06	12.3	nb
	n=2	0.94	10.12	12.2	nb
	n=3	1.87	12.1	12.1	nb
	n=4	0.93	5.81	3.71	nb
D2	n=1	0.6	3.32	7.0	nb
	n=2	1.88	32	32	nb
	n=3	0.93	20.4	7.9	nb
	n=4	0.93	10.0	12.0	nb
E	22	nb	22	nb	
F	144	nb	144	nb	
G	n=1	2.8	11.8	11.8	>88
	n=2	11.7	10.3	48	>89
	n=3	10.9	10.9	21.8	10.9
	n=4	21.6	21.6	86	43
H	n=1	1.7	3.4	7.3	6.9
	n=2	1.3	7.3	7.3	6.9
	n=3	27.2	13.6	27.3	13.6
	n=4	3.4	1.7	6.8	3.4

4. Długość aminokwasu zastosowanego do konstrukcji rdzenia dendrymeru ma wpływ na jego aktywność. Spośród przebadanych pod tym kątem aminokwasów $[\text{H}_2\text{N}-(\text{CH}_2)_n-$

CH(NH₂)CO₂H, gdzie n = 1-4] najkorzystniejszymi wydają się być lizyna lub kwas L-2,3-diaminopropionowy (L-DAP).

Dla dendrymerów 2-rozgałęzionych opartych na rdzeniu lizynowym obserwuje się wyższe działanie antybakteryjne niż dla tych opartych na rdzeniu ornitynowym. Natomiast dendrymery 3-rozgałęzione (G) i 4-rozgałęzione szeregu N^ε-2-Cl-Z (D2) posiadają lepsze aktywności, jeśli zsyntetyzowane są na L-DAP (odpowiednio F_(n=1) i D2_(n=1)), zaś 4-rozgałęzione szeregu N^α-2-Cl-Z (D1, H) – na lizynie (D1_(n=4), H_(n=4)).

5. *Wprowadzenie do struktury dendrymeru reszt aminokwasowych nie powodujących wzrostu jego generacji ma wpływ na aktywność antybakteryjną.* Efekt takiej insercji zależy od rodzaju aminokwasu, jak również od miejsca jego ulokowania w strukturze dendrymeru. Dla dendrymerów 2-rozgałęzionych z peryferyjnymi lizynami posiadającymi zabezpieczone grupy aminowe ε (N^ε-2-Cl-Z), obserwuje się spadek aktywności po wbudowaniu reszt Ala, Ser(Bzl) lub Pro, zarówno pomiędzy rdzeń lizynowy a peryferyjne gałęzki lizynowe (E → F), jak i w strukturę rdzenia, tj. pomiędzy jego część rozgałęziającą a element blokujący C-koniec dendrymeru. Przy czym, bardziej niekorzystna jest ingerencja w strukturę ramion dendrymeru niż w strukturę rdzenia. Z kolei wprowadzenie reszt fenyloalaniny przyczynia się do wzrostu działania antybakteryjnego związku. Przykładami są dendrymery A i H, gdzie reszty Phe stanowią odpowiednio element rdzenia i składnik ramion dendrymeru.
6. *Rodzaj struktury rdzenia dendrymeru może decydować o jego selektywności działania antybakteryjnego w kierunku bakterii Gram-dodatnich bądź Gram-ujemnych.* Z porównania wartości MIC dla podstawowych szczepów bakterii Gram-dodatnich i Gram-ujemnych wrażliwych na działanie antybiotyków, tj. *S. aureus* ATCC 25923 i *E. coli* ATCC 25922, wynika, że dendrymery 2-rozgałęzione, tj. oparte na rdzeniu lizynowym, przeważnie posiadają porównywalną aktywność wobec obydwu szczepów. Do wyjątków należy związek A1, który wykazuje większą selektywność wobec *S. aureus*. W przypadku dendrymerów 3-rozgałęzionych (G), jak i 4-rozgałęzionych (D, H) obserwuje się większą preferencję działania wobec Gram-dodatnich szczepów gronkowców. Tendencja ta jest szczególnie silnie zaznaczona dla dendrymerów D, tj. opartych na rdzeniu N,N'-tetrakis(karbonyloetylo)-aminokwasowym z tryptaminą na C-końcu. Jednakże ulega ona osłabieniu przy zmianie tryptaminy na dodecyloaminę (B; Wniosek 2 powyżej). Wzrost selektywności działania dendrymerów względem bakterii Gram-dodatnich może częściowo wynikać

ze wzrostu ładunku dodatniego, którego źródłem są zarówno terminalne grupy aminowe, jak również kationowa struktura 3- i 4-rozgałęzionych rdzeni.

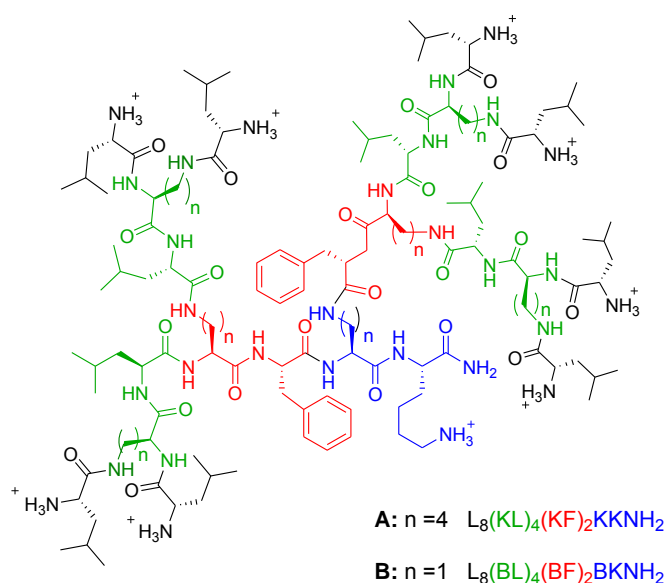
Z porównania zarówno aktywności antybakteryjnej, jak i hemotoksyczności amfifilowych dendrymerów peptydowych wynika, że o możliwości uzyskania dla nich korzystnego profilu przeciwdrobnoustrojowego decyduje przede wszystkim:

- a) *Stopień rozgałęzienia związku.* W przypadku dendrymerów 2-rozgałęzionych obserwuje się silnie dodatnią korelację pomiędzy aktywnością antybakteryjną a aktywnością hemolityczną. Wzrost stopnia rozgałęzienia dendrymeru prowadzi na ogół do korzystniejszego profilu terapeutycznego w tym obszarze.
- b) *Rozmieszczenie dodatnio naładowanych grup w strukturze dendrymeru.* Przykład dendrymerów $D1_{(n=1)}$ i $D2_{(n=1)}$, tj. izomerów różniących się tylko rozmieszczeniem powierzchniowych grup aminowych, bardzo dobrze ukazuje istotność tego czynnika. Dla związku $D2_{(n=1)}$, posiadającego nieco lepszą aktywność antybakteryjną niż jego izomer $D1_{(n=1)}$, odnotowuje się jednocześnie prawie 4-krotnie mniejszą hemolizę (przy stężeniu 400 μM odpowiednio 19% i 77% hemolizy dla $D2_{(n=1)}$ i $D1_{(n=1)}$). Dla dendrymerów $H_{(n=1)}$, $H_{(n=2)}$ i $H_{(n=4)}$, posiadających porównywalną aktywność antybakteryjną, ale inne położenie wewnętrznych ładunków dodatnich, obserwuje się wzrost hemotoksyczności ze wzrostem długości aminokwasu zastosowanego do konstrukcji ich rdzenia, a więc wraz z rozsunieniem ładunków dodatnich. Tendencja ta zostaje nieco zaburzona w przypadku związków D, gdzie dendrymer $D1_{(n=4)}$, cechujący się nieco lepszą aktywnością antybakteryjną niż $D1_{(n=1)}$ i $D1_{(n=2)}$, okazuje się być najmniej hemotoksycznym.
- c) *Rodzaj aminy umieszczonej na C-końcu dendrymeru.* Obserwuje się, że związki z dodecyloaminą na C-końcu posiadają bardzo dobrą aktywność antybakteryjną, ale również i wysoką hemotoksyczność. Zmniejszenie hydrofobowości C-końca poprzez zastąpienie dodecyloaminy tryptaminą skutkuje poprawą profilu terapeutycznego dendrymeru.
- d) *Amfifilowość struktury.* Związki posiadające wielokrotny ładunek dodatni, ale bez hydrofobowej komponenty są na ogół nieaktywne.

Zapoczątkowane w naszym zespole nowe spojrzenie na rolę dendrymeru peptydowego, tj. nie traktowanie go dłużej wyłącznie w kategorii nośnika elementów aktywnych, ale związku posiadającego dzięki odpowiednio zaprojektowanej strukturze

inherentną aktywność biologiczną, obserwuje się w ostatnich pracach na temat antybakteryjnych dendrymerów peptydowych.

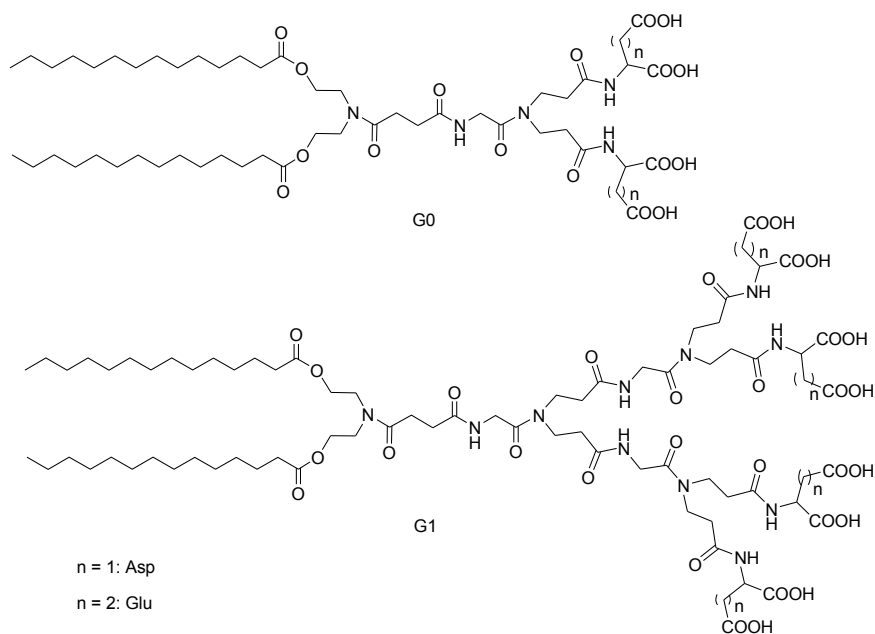
Reymond i wsp. przygotowali bibliotekę kombinatoryczną liczącą 6750 dendrymerów peptydowych G3 o sekwencji szczególnie odpornej na proteolizę: $X^4_8(KX^3)_4(KX^2)_2KX^1$ (gdzie X = różne aminokwasy, K = L-lizyna).¹³⁸ Wyłoniony spośród niej najbardziej aktywny antybakteryjnie dendrymer (X = L-leucyna) poddali dalszym modyfikacjom (Rysunek 29). Analog otrzymany w wyniku zastąpienia elementu rozgałęziającego, tj. L-lizyny przez kwas 2,3-diaminopropionowy, posiadał dobrą aktywność antybakteryjną wobec bakterii *B. subtilis*, *E. coli* i *P. aeruginosa* (odpowiednio MIC = 2.9, 3.9, 18 $\mu\text{g/mL}$) przy niskiej aktywności hemolitycznej.



Rysunek 29. Dendymery peptydowe G3: z L-lizyną (A) lub kwasem 2,3-diaminopropionowym (B) jako elementem rozgałęziającym.

W literaturze znane jest również jedno podejście do otrzymania antybakteryjnych dendrymerów peptydowych typu Janus, które zostało opisane w pracy z 2012 roku. Mianowicie, grupa Zhao zsyntetyzowała amfifilowe dendrymery tego typu, tj. związki składające się z dwóch różnych dendronów – hydrofilowego i hydrofobowego (Rysunek 30).¹³⁹ Dendron hydrofobowy zawierał dwie reszty kwasu mirystynowego, natomiast dendron hydrofilowy posiadał terminalne grupy karboksylowe pochodzące od przyłączonych reszt kwasu asparaginowego (Asp) lub glutaminowego (Glu). Badania antybakteryjne przeprowadzone wobec *E. coli* i trzech szczepów bakterii Gram-dodatnich, tj. *S. aureus*, *MRSA*, *E. faecalis*, wykazały brak aktywności dendrymerów G0 i umiarkowaną aktywność dendrymerów G1. Prawdopodobną przyczyną różnicy w działaniu dendrymerów G0 i G1 był

ich różny stopień amfifilowości (stosunek części hydrofilowej do lipofilowej). Ponadto dendrymer G1 zawierający reszty kwasu asparaginowego działał skuteczniej w porównaniu do jego analogu zawierającego reszty kwasu glutaminowego (MIC = 108 $\mu\text{g/mL}$ wobec *E. coli* i *S. aureus*, 27 $\mu\text{g/mL}$ wobec *MRSA*, 216 $\mu\text{g/mL}$ wobec *E. faecalis*). Żaden z nich nie wykazywał znaczącej cytotoksyczności.



Rysunek 30. Amfifilowe dendrymery peptydowe typu Janus G0 i G1.

2. ZAŁOŻENIA I CEL PRACY

Poszukiwanie skutecznych substancji przeciwdrobnoustrojowych to aktualny, bardzo poważny problem współczesnej chemii medycznej. Szacuje się, że choroby powodowane przez mikroorganizmy powodują rocznie śmierć ponad 11 milionów ludzi na całym świecie.¹⁴⁰ Pojawianie się w gwałtownym tempie szczepów opornych na szeroko stosowane, niegdyś bardzo skuteczne antybiotyki (np. wankomycynę), spowodowało pilną potrzebę poszukiwania nowych klas związków przeciwdrobnoustrojowych o możliwie odmiennym mechanizmie działania. Jedną z takich grup związków o charakterze potencjalnych antybiotyków, intensywnie badaną w tym kierunku, są dendrymery (Rozdział 1.3.). W naszym zespole zsyntetyzowano kilka grup małowcząsteczkowych, amfifilowych dendrymerów wykazujących aktywność przeciwdrobnoustrojową na poziomie aktywności naturalnych peptydów przeciwdrobnoustrojowych (Rozdział 1.3.3.). Jednakże badania toksyczności prowadzone przez nas i inne grupy zajmujące się chemią przeciwdrobnoustrojowych dendrymerów wykazały, że w każdej grupie strukturalnej związki o bardzo dobrym efekcie terapeutycznym są rzadkością. Na chwilę obecną nie rozumiemy czynników strukturalnych determinujących hemo- i cytotoksyczność dendrymerów, chociaż ich wyjaśnienie ma duże znaczenie dla projektowania nowych cząsteczek i ich perspektywicznych zastosowań.

W związku z powyższym, **celem mojej pracy było zaprojektowanie i zsyntetyzowanie nowych amfifilowych dendrymerów peptydowych o potencjalnym działaniu przeciwbakteryjnym przy jednocześnie niskim stopniu toksyczności wobec organizmów eukariotycznych.**

Analiza zależności struktury dendrymerów od ich bioaktywności (Rozdział 1.3.3.) pozwoliła mi na wysunięcie hipotezy, w myśl której **struktura rdzenia bezpośrednio koreluje z toksycznością dendrymeru.** Odpowiedni dobór bloków budulcowych, w szczególności rdzenia, wydaje się być kluczowym czynnikiem do otrzymania związków o dobrej aktywności antybakteryjnej i jednocześnie niskiej toksyczności w stosunku do organizmów eukariotycznych. **Założyłam, że charakter kationowy rdzenia stanowi przeszkodę w osiągnięciu przez związek wybiórczej toksyczności. Uzyskaniu dendrymerów charakteryzujących się selektywnym działaniem na komórki prokariotyczne, powinna więc sprzyjać budowa oparta na rdzeniu hydrofobowym.**

Dokonując przeglądu literatury, dotyczącej peptydów przeciwbakteryjnych, natrafiłam na przesłanki pozwalające sądzić, że planowana przeze mnie strategia, tj. synteza

dendrymerów opartych na hydrofobowym rdzeniu, a więc posiadających odseparowany region hydrofobowy, ma racjonalne przesłanki. Moją uwagę zwróciły przede wszystkim prace Deber'a i wsp., którzy opisali serię syntetycznych peptydów antibakteryjnych posiadających dobry indeks terapeutyczny oraz cechujących się segregacją hydrofobowych i hydrofilowych aminokwasów.¹⁴¹ Zostały one uzyskane w wyniku umieszczenia kationowych reszt aminokwasowych (Lys, Arg) na jednym lub obydwu końcach hydrofobowego, 19- lub 11-peptydu. Najlepszymi właściwościami odznaczały się peptydy o sekwencji KKKKKKAAXAAXAAXAA-NH₂ (gdzie X = F lub W). Warta uwagi jest obserwacja autorów, że dalszy wzrost hydrofobowości wnętrza peptydu, będący rezultatem zastępowania reszt alaniny resztami leucyny, powodował znaczny wzrost hemotoksyczności związku, podobnie jak zmiana reszt lizyny na reszty argininy. Powyższe spostrzeżenie pozostawało w zgodzie z wynikiem uzyskanym przez Shai i wsp. dla 15-peptydu o sekwencji KKKLLLLLLLLLKKK-NH₂, wykazującego bardzo wysoką hemolizę.¹⁴² Z kolei grupa Svendsen'a odnotowała brak wpływu grupowania hydrofobowych i hydrofilowych aminokwasów w peptydzie na jego aktywność antibakteryjną.¹⁴³ Peptydy o sekwencjach RWRWRW-NH₂ i RRRWWW-NH₂ posiadały jednakowe działanie przeciwdrobnoustrojowe. Nieodłączny motyw tryptofanu w części hydrofobowej „segregowanych peptydów” (*ang. segregated peptides*), cechujących się dobrym indeksem terapeutycznym, wskazywał na istotną funkcję tryptofanu w peptydzie. Poszukując wyjaśnienia roli Trp, zwróciłam uwagę na publikacje dotyczące peptydów zawierających na jednym z ich końców ugrupowania tryptofanowe bądź fenyloalaninowe (*ang. W- and F-based end tags*).¹⁴⁴ Strategia przyłączania do N- lub C-końca kationowego peptydu kilku reszt hydrofobowych aminokwasów aromatycznych prowadziła do zwiększenia jego aktywności przeciwbakteryjnej przy niewielkim wzroście toksyczności. Co więcej, nabywał on oporności na wysokie stężenie soli. Wyjaśnieniem powyższych efektów jest powinowactwo reszt tryptofanu i fenyloalaniny do powierzchni międzyfazowej lipid-woda. Umiejscawiają się one w pobliżu polarnych głów błony fosfolipidowej komórek bakterii i działają jako „kotwice” dla peptydu. W konsekwencji prowadzi to do wzrostu aktywności antibakteryjnej peptydu i zniesienia efektu inaktywacji, mającego miejsce w warunkach wysokiej siły jonowej. Insercja tych dużych objętościowo, aromatycznych reszt aminokwasów do błon eukariotycznych jest znacznie mniej uprzywilejowana ze względu na obecność cholesterolu, który zmniejsza płynność błony i w rezultacie jej przepuszczalność.

Dysponując powyższymi informacjami, jak również danymi dotyczącymi toksyczności dendrymerów (Rozdział 1.2.), **postanowiłam zrealizować cel swojej pracy**

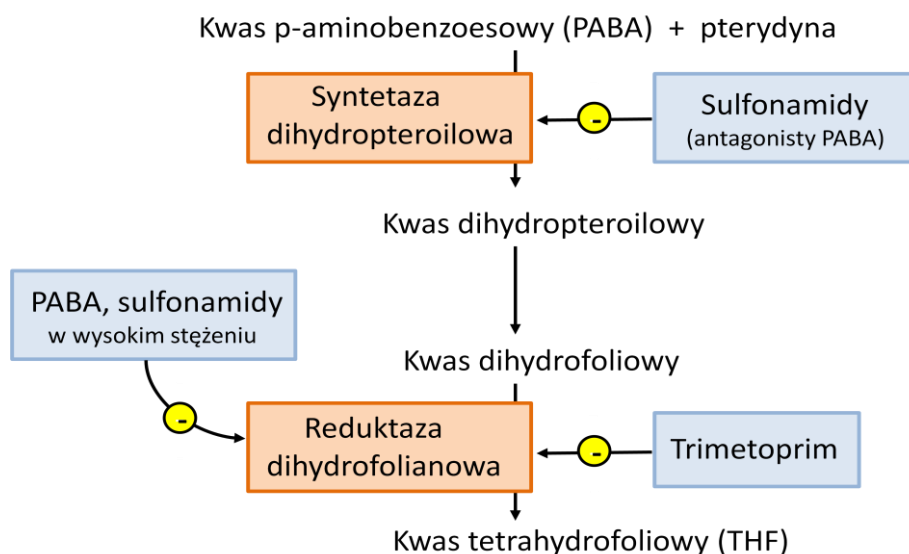
poprzez syntezę 4-rozgałęzionych, amfifilowych dendrymerów peptydowych G1, opartych na hydrofobowym rdzeniu zawierającym reszty aromatyczne. Dodatkowo, postanowiłam zaprojektować i zsyntetyzować grupę analogicznych dendrymerów, ale opartych na rdzeniu o charakterze kationowym.

Otrzymanie dendrymerów obu typów i porównanie ich właściwości biologicznych pozwoli na weryfikację postawionej hipotezy o istotnej roli struktury rdzenia w procesie modulowania toksyczności dendrymeru. Co więcej, porównanie właściwości biologicznych dendrymerów wyłącznie opartych na rdzeniach kationowych – otrzymanych przeze mnie z tymi zsyntetyzowanymi wcześniej w naszym zespole, pozwoli ocenić wpływ innych parametrów strukturalnych rdzenia na aktywność związku, oprócz jego charakteru kationowego bądź hydrofobowego. Postanowiłam zaprojektować rdzenie kationowe, w których ładunek dodatni znajdowałby się w części nieaminokwasowej, w przeciwieństwie do dotychczas zsyntetyzowanych rdzeni, gdzie występuje on na atomach azotu aminokwasu.

Innym sposobem zwiększenia selektywności związków przeciwdrobnoustrojowych może być wprowadzenie ugrupowań, które biorą udział w procesach życiowych istotnych dla drobnoustrojów, ale nie zachodzących w komórkach organizmów wyższych.

Atrakcyjnymi związkami do realizacji zamierzonego celu wydawały się być kwas p-aminobenzoowy (PABA) i jego strukturalne analogi – sulfonamidy. Kwas p-aminobenzoowy, prekursor kwasu foliowego, występuje jako produkt pośredni w szlaku biosyntetycznym związków aromatycznych. Ten szlak metaboliczny jest obecny w wielu roślinach, grzybach i bakteriach, ale nie u zwierząt i ludzi. Stąd, związki zakłócające jego prawidłowy przebieg, poprzez oddziaływanie z uczestniczącymi w nim enzymami, wykazują selektywne działanie wobec drobnoustrojów. Sulfonamidy, będące antagonistami kwasu p-aminobenzoowego, były pierwszymi skutecznymi chemioterapeutykami przeciwbakteryjnymi wprowadzonymi do leczenia jeszcze przed penicyliną. Uniemożliwiają one wykorzystanie PABA do syntezy kwasu foliowego poprzez blokowanie syntetazy dihydropterolowej (Rysunek 31). Obecnie sulfonamidy mają niewielkie znaczenie w leczeniu zakażeń. Wyjątek stanowi kotrimoksazol (SMX + TMP) – lek złożony z sulfametoksazolu (sulfonamid, SMX) i trimetoprimu (TMP). Trimetoprim zaburza syntezę kwasu foliowego będąc inhibitorem reduktazy dihydrofolianowej. Co istotne, chociaż kwas p-aminobenzoowy pełni niezbędną funkcję w szlaku syntezy kwasu foliowego, w wyższym stężeniu wykazuje słabe działanie antybakteryjne (MIC = ok. 1500 µg/mL - 10.9 mmol wobec *E. coli*).¹⁴⁵ Aktywność antybakteryjna PABA, jak również sulfonamidów użytych w wysokim stężeniu, jest przypisywana efektowi blokującemu reduktazę dihydrofolianową (Rysunek

31).¹⁴⁶ Co więcej, PABA przyczynia się do wzrostu aktywności innych czynników antybakteryjnych, takich jak karbenicylina, polimyksyna B, izetionian dibromopropamidyny, ciprofloksacyna (synergiczny efekt antybakteryjny).¹⁴⁷



Rysunek 31 . Część szlaku biosyntetycznego związków aromatycznych, odnoszący się do syntezy kwasu foliowego.

Reasumując, celem mojej pracy było opracowanie metodyki syntezy i scharakteryzowanie metodami spektroskopowymi kilku nowych grup małowcząsteczkowych dendrymerów o strukturze amfifilowej z zastosowaniem nowych bloków budulcowych pochodzenia aminokwasowego i organicznego. Założyłam, że dobór nowych bloków budulcowych będzie służył zwiększeniu powinowactwa syntetyzowanych dendrymerów do fosfolipidowych membran drobnoustrojów (zwiększenie aktywności) oraz / lub zmniejszeniu ich toksyczności, czyli zwiększeniu selektywności. Aby zrealizować cele syntetyczne postawiłam dwie hipotezy badawcze. Pierwsza z nich zakładała, że toksyczność dendrymerów można zmniejszyć projektując dendrymery na bazie nowych hydrofobowych rdzeni zawierających reszty aromatyczne. Hipoteza druga zakładała, że zwiększenie selektywności uzyska się przez wprowadzenie do struktury dendrymeru reszt PABA (lub sulfonamidu), wykorzystywanych przez drobnoustroje, ale nie przez organizmy wyższe podczas biosyntezy kwasu foliowego. Wykonanie szeregu pochodnych w ramach każdej grupy strukturalnej oraz dodatkowo, grupy testowej zawierającej rdzenie kationowe, w których ładunek dodatni znajdowałby się w części nieaminokwasowej, powinno chociaż w ogólnym zarysie pozwolić na racjonalne powiązanie zależności pomiędzy strukturą dendrymeru a profilem jego aktywności biologicznej.

3. BADANIA WŁASNE

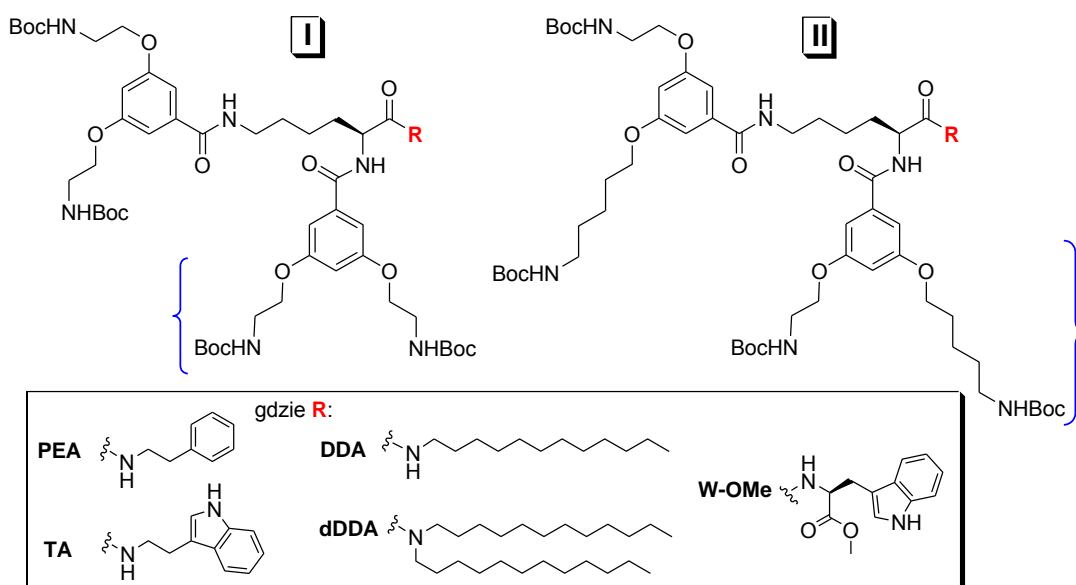
3.1. SYNTEZA DENDRYMERÓW – PROJEKTOWANIE, PLAN SYNTEZY

Rozpatrując możliwości wykorzystania dendrymerów jako substancji leczniczych preferowane są dendrymery niskocząsteczkowe. Dotyczy to zwłaszcza związków z kationowymi grupami terminalnymi. Za wspomnianą preferencją przemawiają m.in. niekorzystne właściwości biologiczne dendrymerów wyższych generacji, takie jak większa toksyczność, immunogeniczność, słaba przenikalność przez błony biologiczne (Rozdział 1.2.). Problemem w przypadku wysokocząsteczkowych dendrymerów jest również ich czystość oraz wysokie koszty syntezy (Rozdział 1.1.4.). Z tych względów zaprojektowane przeze mnie amfifilowe dendrymery peptydowe są związkami niskocząsteczkowymi (G1) o prostej strukturze. Syntetyzowałam je klasyczną metodą w roztworze, co było podyktowane potrzebą uzyskania większej ilości związku (ok. 0.5 – 1 g) do przeprowadzenia m.in. badań biologicznych.

W ramach pracy zaprojektowałam i otrzymałam dwa typy 4-rozgałęzionych rdzeni, tj. posiadające charakter hydrofobowy (Rozdział 3.2.) bądź kationowy (Rozdział 3.4.). Obydwa rodzaje rdzeni charakteryzują się strukturą mieszaną (organiczno - aminokwasową), dzięki czemu oparte na nich dendrymery peptydowe mogą wykazywać większą oporność na działanie enzymów proteolitycznych.

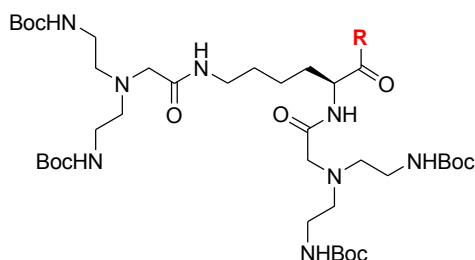
Rdzenie o charakterze hydrofobowym skonstruowałam na cząsteczce lizyny, która jak wykazano w dotychczasowych pracach jest najkorzystniejszym wyborem. Aby zapewnić biokompatybilność finalnego dendrymeru, jako nieaminokwasowy element rozgałęziający, prowadzący do uzyskania 4-rozgałęzionego rdzenia, postanowiłam wykorzystać związek należący do naturalnych metabolitów. Ponieważ wcześniej założyłam, że rdzeń, aby być nietoksycznym, powinien posiadać reszty aromatyczne (Rozdział 2.), dobrym rozwiązaniem wydawało się być zastosowanie kwasu 3,5-dihydroksybenzoesowego (DHBA, kwas α -rezorcylowy) w roli elementu rozgałęziającego. DHBA jest metabolitem wtórnym roślin wyższych, metabolitem alkilorezorcynoli, które wykazują m.in. silną aktywność antybakteryjną, grzybobójczą i cytotoksyczną.¹⁴⁸ Założyłam, że część peryferyjna rdzenia, tj. stanowiąca stronę przyłączania związków z aktywnymi grupami, powinna cechować się giętkością, aby umożliwić swobodne dopasowanie grup aktywnych dendrymeru do miejsca działania (błony bakteryjnej). Z tego względu w roli elementu rozgałęziającego wykorzystałam pochodną kwasu 3,5-dihydroksybenzoesowego, posiadającą dwa łańcuchy

aminoalkilowe – o jednakowej bądź różnej długości. Zróżnicowanie długości obu łańcuchów w pochodnej DHBA wydawało się być interesującym do zbadania pod kątem wpływu na aktywność dendrymeru. W roli związku blokującego C-koniec rdzenia zastosowałam tryptaminę (TA), dodecyloaminę (DDA), didodecyloaminę (dDDA), 2-fenyletyloaminę (PEA) lub ester metylowy tryptofanu (W-OMe). Wybór dwóch pierwszych amin wynikał z dotychczasowych badań w naszym zespole, wykazujących ich korzystny wpływ na właściwości biologiczne dendrymeru (Rozdział 1.3.3.; Wniosek 2, c). Natomiast didodecyloaminę wybrałam ze względu na przesłanki literaturowe⁶³ pozwalające założyć, że wzrost hydrofobowości C-końca może skutkować spadkiem toksyczności dendrymeru (Rozdział 1.2.). 2-Fenyletyloamina została wybrana poprzez analogię do tryptaminy. Obie aminy stanowią produkt dekarboksylacji naturalnych aminokwasów, odpowiednio fenylealaniny i tryptofanu, posiadających wiele korzystnych właściwości, takich jak wspomniane powinowactwo do powierzchni międzyfazowej lipid-woda w błonie bakteryjnej (Rozdział 2.). Z tego względu założyłam, że użycie PEA może okazać się równie korzystne (lub lepsze) jak tryptaminy. Wybór estru metylowego tryptofanu podyktowany był zaplanowaną, dalszą funkcjonalizacją finalnego dendrymeru na C-końcu. Struktury zaprojektowanych rdzeni o charakterze hydrofobowym, skonstruowane z zastosowaniem symetrycznego i niesymetrycznego elementu rozgałęziającego, tj. odpowiednio *N, N'*-bis{3,5-bis[2-(Boc-amino)etoksy]benzoilo}- i *N, N'*-bis{3-[5-(Boc-amino)pentoksy]-5-[2-(Boc-amino)etoksy]benzoilo} amidy *L*-lizyny i związku nieaminokwasowego bądź dipeptydu KW-OMe, przedstawione zostały na Rysunku 32.



Rysunek 32. Rdzenie hydrofobowe skonstruowane z użyciem symetrycznego (I) i niesymetrycznego (II) elementu rozgałęziającego.

Drugi typ rdzeni opartych na cząsteczce lizyny, tj. rdzenie o charakterze kationowym, zsyntetyzowałam wykorzystując jako element rozgałęziający pochodną dietylenotriaminy, tj. kwas 2-{bis[2-(Boc-amino)etylo]amino}octowy (Rysunek 33). Trzeciorzędowy atom azotu elementu rozgałęziającego stanowi centrum kationowe rdzenia. W roli aminy blokującej C-koniec rdzenia zastosowałam tryptaminę (TA), dodecyloaminę (DDA) bądź didodecyloaminę (dDDA).

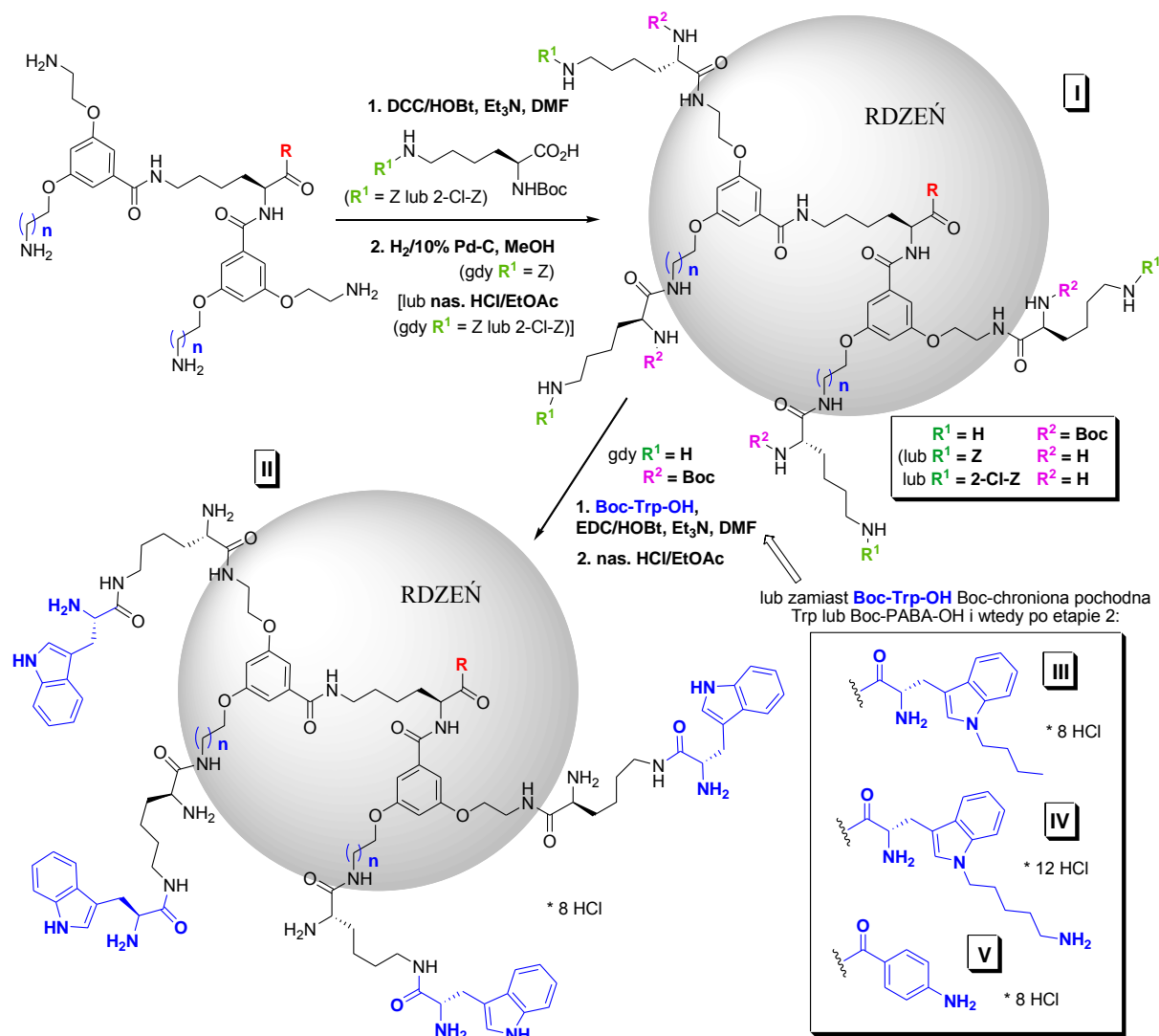


Rysunek 33. Rdzeń o charakterze kationowym - *N, N'*-bis({bis[2-(Boc-amino)etylo]amino}-metylokarbonylo) amidy *L*-lizyny i związku nieaminokwasowego (gdzie **R** = TA, DDA, dDDA).

Oba rodzaje rdzeni, po odbezpieczeniu ich terminalnych grup aminowych, wykorzystałam do syntezy amfifilowych dendrymerów peptydowych. Chronologicznie jako pierwszą grupę zsyntetyzowałam dendrymery oparte na rdzeniu hydrofobowym z terminalnymi resztami lizynowymi (Rozdział 3.3.1.). W tym celu stosowałam reakcję sprzęgania rdzeni z ortogonalnie zabezpieczonymi pochodnymi lizyny: Boc-Lys(Z)-OH lub Boc-Lys(2-Cl-Z)-OH, z użyciem *N, N'*-dicykloheksylokarbodiimidu (DCC) i *N*-hydroksybenzotriazolu (HOBt), a następnie reakcję selektywnej deprotekcji osłon Z za pomocą katalicznego wodorowania (10% Pd-C) lub osłon Boc za pomocą nasyconego roztworu HCl w EtOAc (Schemat 19).

Na podstawie wstępnych wyników badań biologicznych, uzyskanych dla dendrymerów z terminalnymi resztami lizynowymi, postanowiłam przeprowadzić w kolejnym etapie ich funkcjonalizację resztami tryptofanowymi, jak również resztami pochodnych tryptofanu, tj. 1-butylotryptofanowymi oraz 1-(5-aminopentyl)tryptofanowymi (Rozdział 3.3.2.). Odpowiednio sfunkcjonalizowane dendrymery, występujące w postaci chlorowodoroków, otrzymałam na drodze sprzęgania Boc-Trp-OH, *N*-Boc-1-butylotryptofanu lub *N*-Boc-1-[5-(Boc-amino)pentyl]tryptofanu z dendrymerami posiadającymi wolne grupy aminowe ε na terminalnych resztach lizynowych, a następnie usunięcia grup Boc z produktów kondensacji (Schemat 19). Stosowałam technikę sprzęgania z użyciem 1-etylo-3-(3-dimetyloaminopropyl)karbodiimidu (EDC) ze względu na słabe wydajności uzyskiwane dla reakcji prowadzonych z DCC jako czynnikiem sprzęgającym. Natomiast do deprotekcji grup

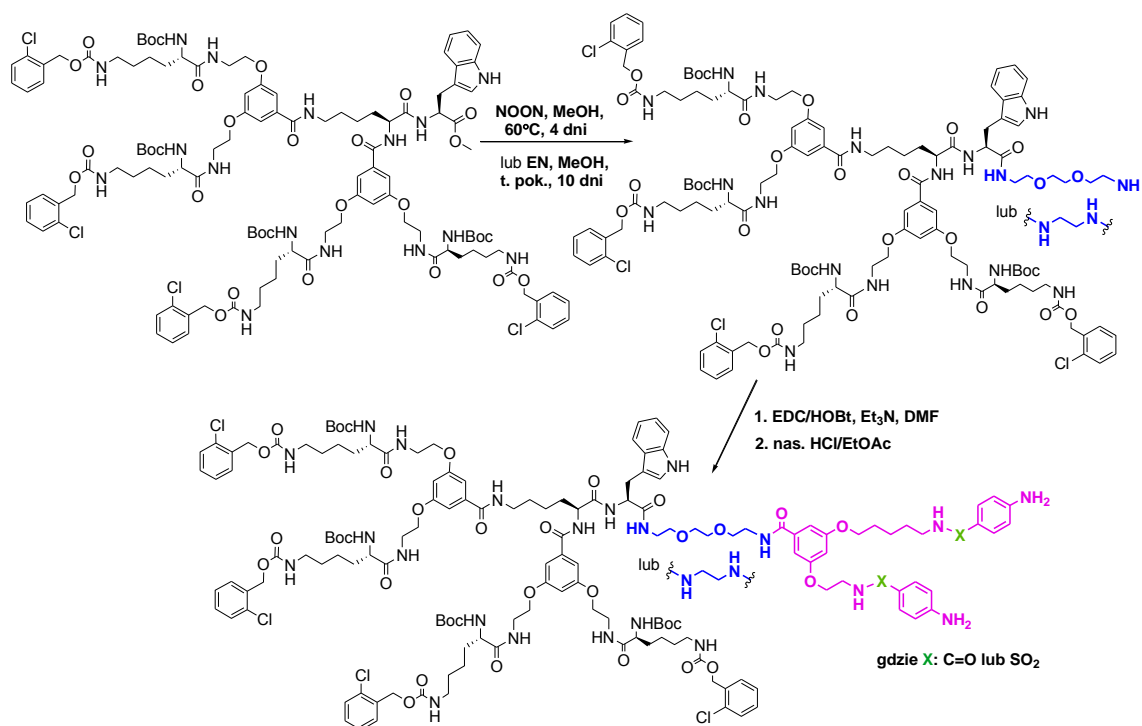
Boc, w celu otrzymania finalnej, amfifilowej struktury dendrymeru, stosowałam nasycony roztwór HCl w EtOAc.



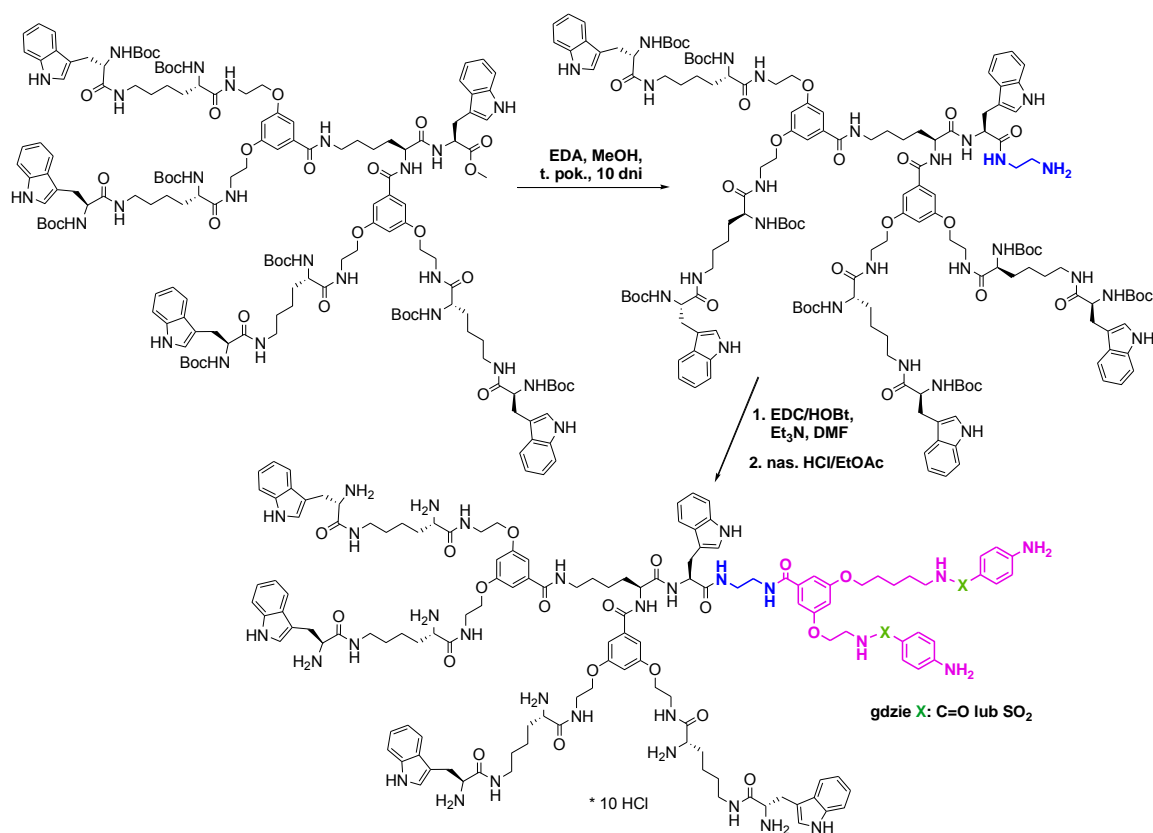
Schemat 19. Synteza dendrymerów peptydowych opartych na rdzeniu hydrofobowym (gdzie R = TA, PEA, DDA, dDDA, W-OMe; n = 1 lub 4): z terminalnymi resztami lizynowymi (I), tryptofanowymi (II), pochodnymi tryptofanu (III, IV) lub resztami PABA (V).

Dendrymery z terminalnymi resztami lizynowymi zmodyfikowałam również resztami kwasu p-aminobenzoowego (Rozdział 3.3.3.). Dendrymery sfunkcjonalizowane resztami PABA otrzymałam w sposób analogiczny do opisanego powyżej, tj. w wyniku sprzęgania dendrymerów z Boc-PABA-OH w warunkach EDC/HOBt i następczej deprotekcji grup Boc za pomocą nasyconego roztworu HCl w EtOAc (Schemat 19).

W dalszej części pracy, w celu weryfikacji założenia o możliwości optymalizacji selektywności i/lub aktywności antybakteryjnej dendrymerów poprzez wprowadzenie na ich C-koniec fragmentu z resztami PABA bądź sulfonamidu, przeprowadziłam syntezę dendrymerów typu Janus (Rozdział 3.3.4.).



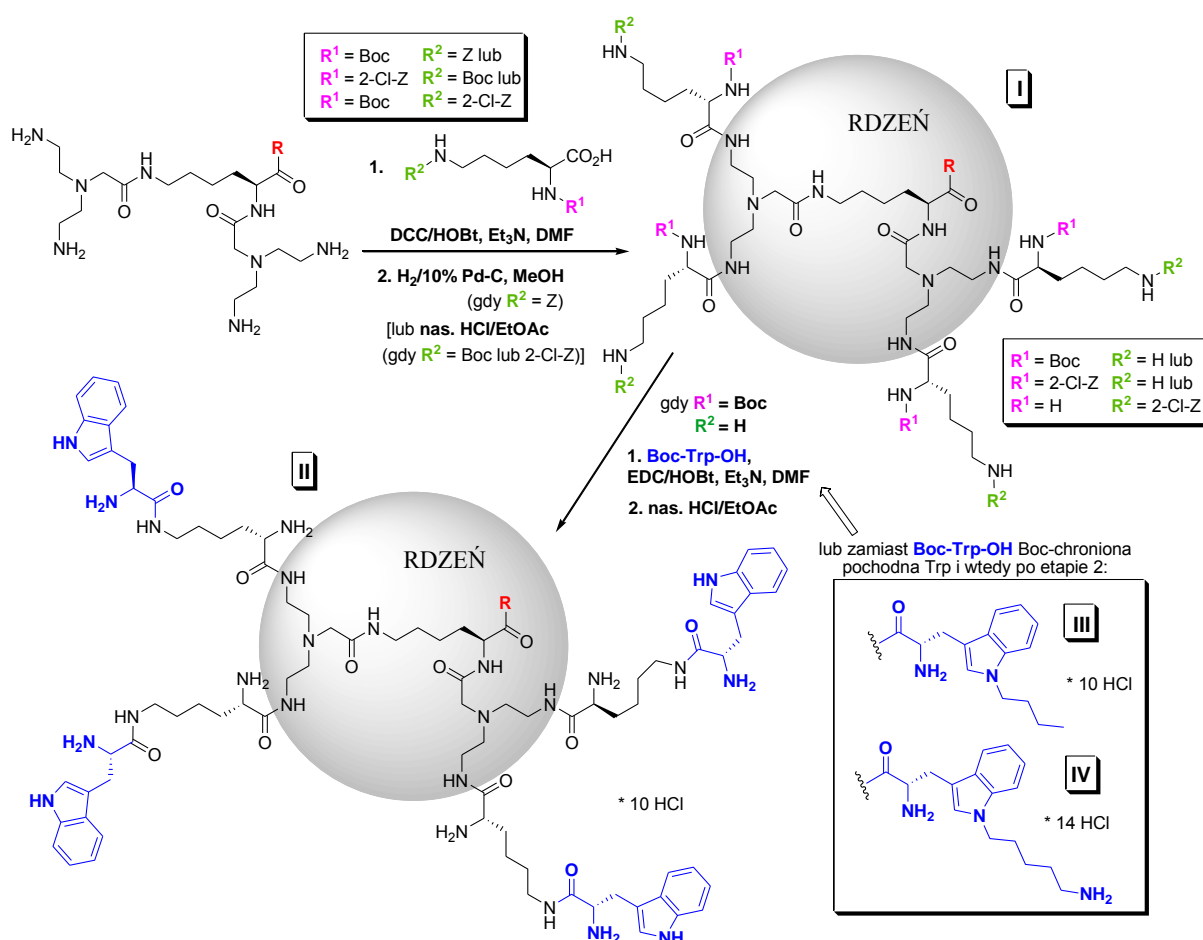
Schemat 20. Synteza dendrymerów typu Janus opartych na dendrymerze z terminalnymi resztami lizynowymi.



Schemat 21. Synteza dendrymerów typu Janus opartych na dendrymerze z terminalnymi resztami tryptanowymi.

Do konstrukcji tego typu dendrymerów posłużyły mi dendrymery zarówno z terminalnymi resztami lizynowymi, jak i tryptofanowymi, posiadające na C-końcu resztę estru metylowego tryptofanu („dendrony 1”) oraz związki otrzymane w wyniku sprzężenia dichlorowodoru 3-(5-aminopentoksy)-5-(2-aminoetoksy)benzoesu metylu z kwasem 4-(Boc-amino)benzoowym lub chlorkiem 4-(Boc-amino)benzenosulfonowym („dendrony 2”). Finalne dendrymery Janus otrzymałam poprzez połączenie ze sobą „dendronów 1” i „dendronów 2” z wykorzystaniem łącznika, tj. etylenodiaminy (EDA) bądź 2,2’-(etylenodioksy)dietyloaminy (NOON), a następnie deprotekcję grup Boc (Schemat 20 i 21).

Ostatnia część pracy obejmowała syntezę dendrymerów peptydowych opartych na rdzeniu kationowym. Otrzymałam trzy grupy dendrymerów, tj. z terminalnymi resztami lizynowymi (Rozdział 3.5.1.), tryptofanowymi i pochodnych tryptofanu (Rozdział 3.5.2.), będące związkami analogicznymi do opisanych wcześniej dendrymerów opartych na rdzeniu hydrofobowym (Schemat 22).



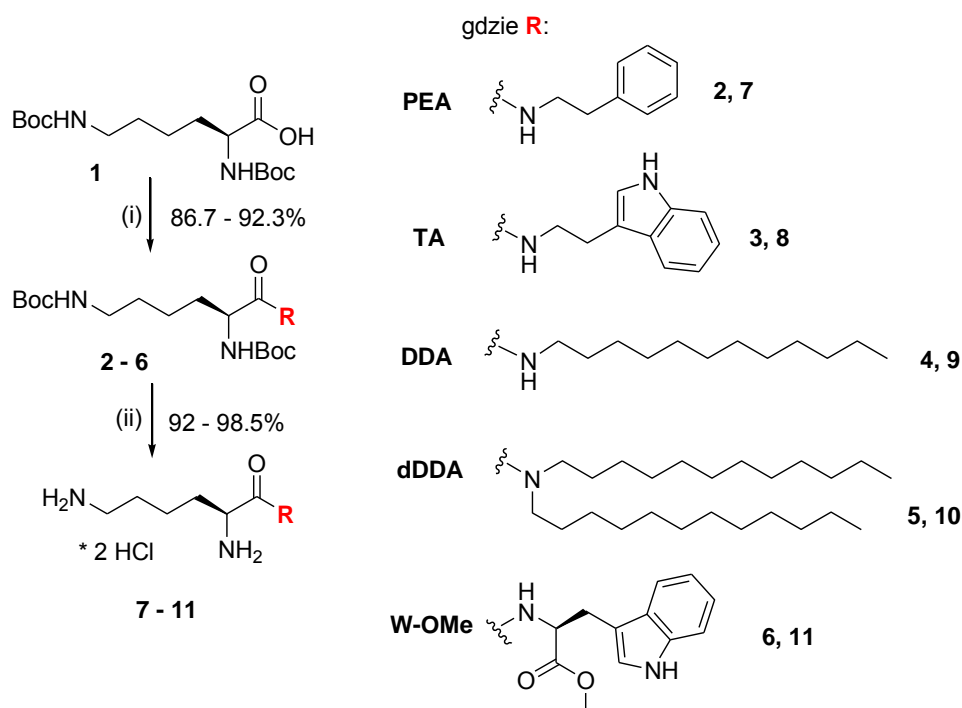
Schemat 22. Synteza dendrymerów peptydowych opartych na rdzeniu kationowym (gdzie R = TA, DDA, dDDA): z terminalnymi resztami lizynowymi (I), tryptofanowymi (II) lub pochodnymi tryptofanu (III, IV).

Wzory i numerację wszystkich zsyntetyzowanych związków, tj. rdzeni, produktów pośrednich oraz dendrymerów, podałam w Załączniku 8.1.

3.2. NOWE RDZENIE O CHARAKTERZE HYDROFOBOWYM

Opracowana przeze mnie metoda syntezy nowych rdzeni o charakterze hydrofobowym opierała się na reakcji sprzężenia odpowiednich amidów *L*-lizyny i związku nieaminokwasowego bądź dipeptydu KW-OMe z symetrycznym bądź niesymetrycznym elementem rozgałęziającym, będącym pochodną kwasu 3,5-dihydroksybenzoesowego. Wymagała ona wcześniejszego przygotowania obu substratów – komponentu aminowego i kwasowego.

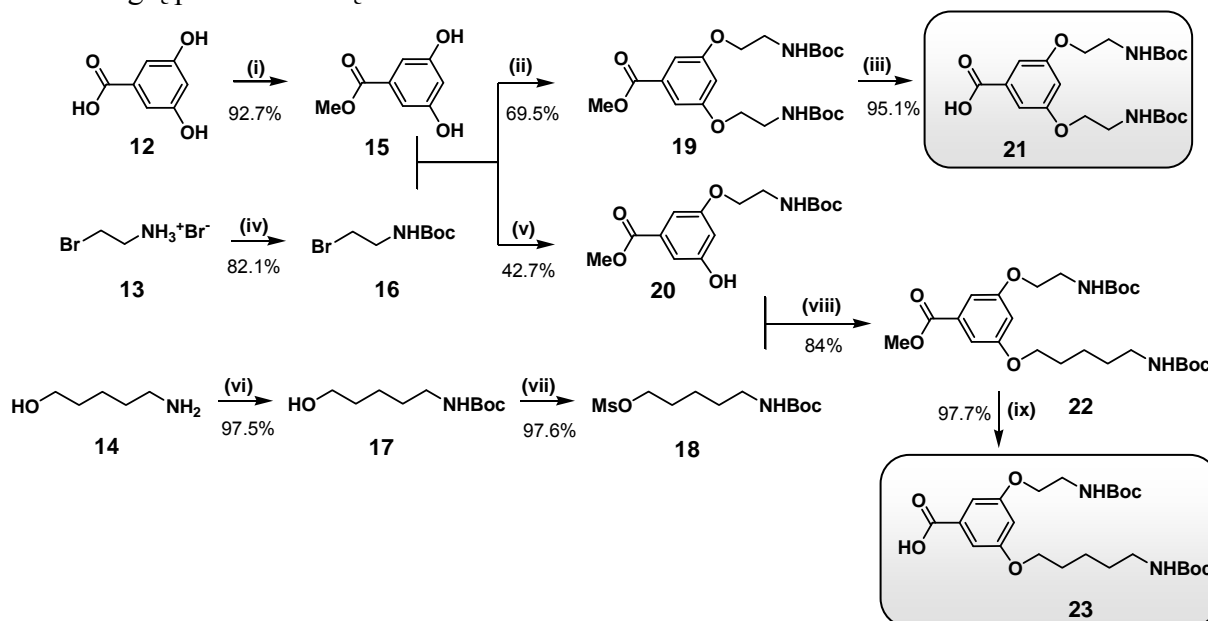
Amidy *L*-lizyny i związku nieaminokwasowego (PEA, TA, DDA, dDDA), jak również dipeptyd KW-OMe, występujące w postaci dichlorowodorków (**7 – 11**) otrzymałam na drodze 2-etapowej syntezy, obejmującej reakcję sprzężenia BocLys(Boc)-OH (**1**) z odpowiednią aminą / aminokwasem przy użyciu *N,N'*-dicykloheksylokarbodiimidu (DCC) i *N*-hydroksybenzotriazolu (HOBT) oraz usunięcie grup Boc ze związków **2 – 6** (Schemat 23).



Schemat 23. Synteza dichlorowodorków amidów *L*-lizyny i związku nieaminokwasowego (**7 - 10**) oraz dipeptydu KW-OMe (**11**). (i) DCC/HOBT, PEA·HCl/Et₃N (TA, DDA, dDDA, W-OMe), DMF/DCM (1:1), 24 - 48 godz.; (ii) nas. HCl/EtOAc.

Syntezę symetrycznego i niesymetrycznego elementu rozgałęziającego, tj. odpowiednio kwasu 3,5-bis[2-(Boc-amino)etoksy]benzoesowego (**21**) i kwasu 3-[5-(Boc-

amino)pentoksy]-5-[2-(Boc-amino)etoksy]benzoesowego (**23**), przeprowadziłam zgodnie z metodologią przedstawioną na Schemacie 24.



Schemat 24. Synteza elementów rozgałęziających: kwasu bis[2-(Boc-amino)etoksy]benzoesowego (**21**) i kwasu 3-[5-(Boc-amino)pentoksy]-5-[2-(Boc-amino)etoksy]benzoesowego (**23**). (i) MeOH, kat. H₂SO₄, t. wrz., 12 godz.; (ii) K₂CO₃, DMF, 60 °C, 48 godz.; (iii) 1M NaOH, 50 °C, 4 godz.; (iv) Boc₂O, Et₃N, CH₂Cl₂, 24 godz.; (v) K₂CO₃, DMF, 40 °C, 48 godz.; (vi) Boc₂O, Et₃N, CH₂Cl₂, 12 godz.; (vii) CH₃SO₂Cl, Et₃N, CH₂Cl₂, 1 godz.; (viii) K₂CO₃, DMF, 60 °C, 48 godz.; (ix) 1M NaOH, 50 °C, 2 godz.

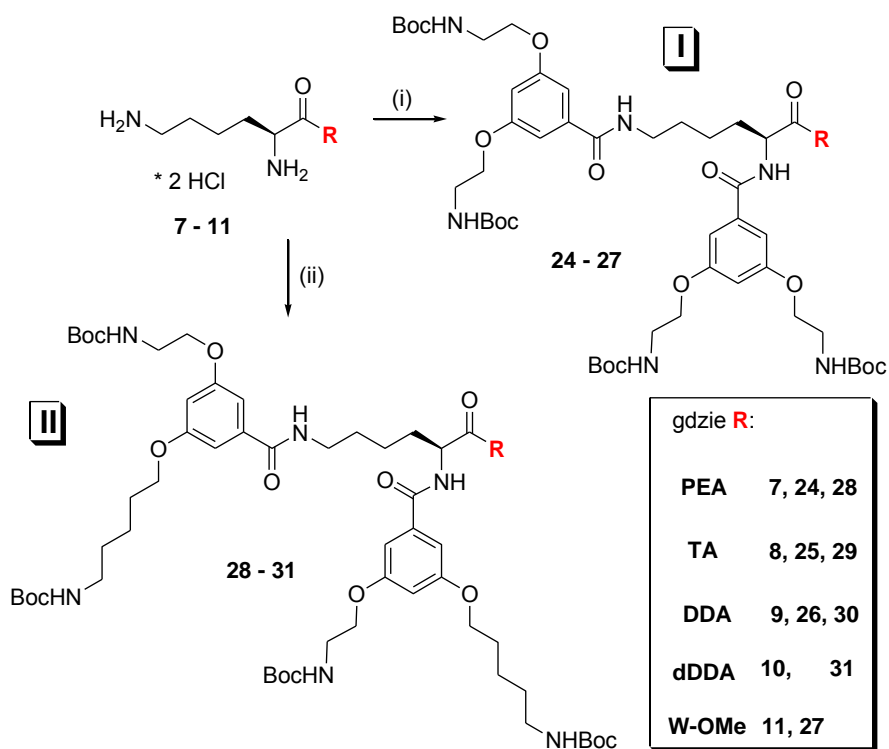
Kwas 3,5-bis[2-(Boc-amino)etoksy]benzoesowy (**21**), w przeciwieństwie do kwasu 3-[5-(Boc-amino)pentoksy]-5-[2-(Boc-amino)etoksy]benzoesowego (**23**), jest związkiem opisanym w literaturze.¹⁴⁹ Postanowiłam go otrzymać korzystając z procedury podanej przez Liskamp'a i wsp.^{149a} W pierwszej kolejności przygotowałam odpowiednie substraty: 3,5-dihydroksybenzoesan metylu (**15**) w wyniku estryfikacji kwasu 3,5-dihydroksybenzoesowego (**12**) oraz bromek 2-(Boc-amino)etylu (**16**) poprzez zabezpieczenie grupy aminowej bromowodoru 2-bromoetyloaminy (**13**). Następnie przeprowadziłam reakcję dialkylowania estru **15** (1 ekw.) z zastosowaniem 2.6 ekw. bromku **16** w obecności 4.5 ekw. K₂CO₃ jako zasady. Reakcja prowadzona była w DMF w temp. 40 °C przez 16 godzin. Niestety krystalizacja z układu EtOAc / heksan dawała obokżądanego produktu, tj. 3,5-bis[2-(Boc-amino)etoksy]benzoesanu metylu (**19**), również produkt uboczny, tj. produkt monoalkilowania **20**. W wyniku oczyszczania mieszaniny na kolumnie chromatograficznej (faza CHCl₃/MeOH 25:1) otrzymałam produkt **19** z wydajnością zaledwie 28.5% (lit. 64% po krystalizacji^{149a}). Z tego względu zoptymalizowałam warunki reakcji poprzez wydłużenie czasu reakcji, zmianę stosunku stechiometrycznego substratów oraz zmianę temperatury

reakcji. Najlepszy wynik odnotowałam prowadząc reakcję w temp. 60 °C przez 2 doby z użyciem 3 ekw. bromku 2-(Boc-amino)etylu (**16**), które dodawałam do mieszaniny reakcyjnej (związek **15** / K₂CO₃ w DMF) po godzinie. Stosując tę metodę i oczyszczanie chromatograficzne uzyskałam produkt **19** z wydajnością 69.5%. Dodatkowo, z myślą o syntezie niesymetrycznego elementu rozgałęziającego **23**, wydzieliłam produkt monoalkilowania **20** z wydajnością 23.6%. Produkt finalny, tj. kwas 3,5-bis[2-(Boc-amino)etoksy]benzoesowy (**21**), otrzymałam w wyniku reakcji hydrolizy grupy estrowej związku **19** w warunkach zasadowych.

Synteza drugiego elementu rozgałęziającego - kwasu 3-[5-(Boc-amino)pentoksy]-5-[2-(Boc-amino)etoksy]benzoesowego (**23**), wiązała się z przygotowaniem mesylanu 5-(Boc-amino)pentylu (**18**) oraz wspomnianego już produktu monoalkilowania **20**. Mesylan **18** otrzymałam wychodząc z 5-amino-1-pentanolu (**14**) w wyniku zabezpieczenia jego funkcji aminowej grupą Boc, a następnie mesylowania grupy hydroksylowej 5-(Boc-amino)-1-pentanolu (**17**). Natomiast 3-hydroksy-5-[2-(Boc-amino)etoksy]benzoesan metylu (**20**), wydzielony przeze mnie wcześniej jako produkt uboczny reakcji dialkilowania, otrzymałam w większej ilości zgodnie z procedurą Brouwer'a i Liskamp'a (wydajność 42.7%).¹⁵⁰ Poddałam go następnie reakcji alkilowania mesylnem **18** (1.5 ekw) prowadzonej w temp. 60 °C przez 48 godzin w obecności K₂CO₃ (2.25 ekw.) jako zasady. Po oczyszczeniu surowego produktu na kolumnie chromatograficznej (faza AcOEt/heksan 3:7) otrzymałam 3-[5-(Boc-amino)pentoksy]-5-[2-(Boc-amino)etoksy]benzoesan metylu (**22**) z wydajnością 64.6%. Zmiana stosunku stechiometrycznego substratów (3 ekw. mesylanu i 4.5 ekw. K₂CO₃) pozwoliła na podwyższenie wydajności reakcji do 84%. Hydroliza zasadowa grupy estrowej związku **22** doprowadziła do produktu finalnego **23**.

Dysponując przygotowanymi substratami przystąpiłam do syntezy rdzeni. Zrealizowałam ją poprzez reakcję sprzęgania dichlorowodorków amidów *L*-lizyny i związku nieaminokwasowego (**7** - **10**) bądź dipeptydu KW-OMe (**11**) z symetrycznym bądź niesymetrycznym elementem rozgałęziającym (odpowiednio **21** i **23**) (Schemat 25). Reakcje prowadziłam klasyczną metodą sprzęgania z użyciem DCC i HOBt w DMF oraz trietyloaminy jako zasady wymaganej do deprotonowania grup aminowych w dichlorowodorkach amidów *L*-lizyny i związku nieaminokwasowego. Podczas początkowych prób sprzęgania, pomimo wydłużania czasu reakcji do kilku dni, test Kaisera wykazywał obecność nieprzereagowanych grup aminowych. Niezbędne okazało się zastosowanie dodatkowej ilości Et₃N, tj. kolejnych 2 ekwiwalentów oprócz tych koniecznych do

zobojętnienia dichlorowodoroków. Reakcje prowadzone z nadmiarem Et₃N zachodziły z pełną konwersją w ciągu 48 godzin. Produkty sprzęgania (**24** - **31**) oczyszczałam na kolumnie silikażelowej (faza: CHCl₃/MeOH 25:1 lub gradient 100:1→25:1) otrzymując związki w postaci białych / jasnożółtych proszków lub jasnożółtych olejów z wydajnościami rzędu 77.6 – 90.5% (Tabela 2). Ich struktury zostały potwierdzone za pomocą widm ESI MS i NMR.



Schemat 25. Synteza *N, N'*-bis{3,5-bis[2-(Boc-amino)etoksy]benzoilo}amidów *L*-lizyny i związku nieaminokwasowego (**24** - **26**), estru metylowego *N, N'*-bis[3,5-bis(2-aminoetoksy)benzoilo]-*L*-lizylo-*L*-tryptofanu (**27**) oraz *N, N'*-bis{3-[5-(Boc-amino)pentoksy]-5-[2-(Boc-amino)etoksy]benzoilo}amidów *L*-lizyny i związku nieaminokwasowego (**28** - **31**). (i) **21**, DCC/HOBt, Et₃N, DMF, 48 godz.; (ii) **23**, DCC/HOBt, Et₃N, DMF, 48 godz.

Otrzymane w powyższy sposób rdzenie o charakterze hydrofobowym można podzielić na dwie podstawowe grupy w zależności od użytego do ich konstrukcji elementu rozgałęziającego:

- I. *N, N'*-bis{3,5-bis[2-(Boc-amino)etoksy]benzoilo} amidy *L*-lizyny i związku nieaminokwasowego (**24** - **26**) lub ester metylowy *N, N'*-bis{3,5-bis[2-(Boc-amino)etoksy]benzoilo}-*L*-lizylo-*L*-tryptofanu (**27**);
- II. *N, N'*-bis{3-[5-(Boc-amino)pentoksy]-5-[2-(Boc-amino)etoksy]benzoilo} amidy *L*-lizyny i związku nieaminokwasowego (**28** - **31**) (Schemat 25).

Rdzeń **27** został zaprojektowany z myślą o syntezie dendrymerów typu Janus (Rozdział 3.3.4.). Grupa estrowa tryptofanu znajdującego się na C-końcu rdzenia daje

możliwość dalszej funkcjonalizacji tej części związku. Z kolei rdzenie **24** - **26** i **28** - **31** miały posłużyć do syntezy „klasycznych” dendrymerów. Synteza dendrymerów opartych na tych rdzeniach umożliwiła zbadanie wpływu rodzaju podstawnika umieszczonego na C-końcu, jak również zróżnicowania długości ramion na aktywność biologiczną.

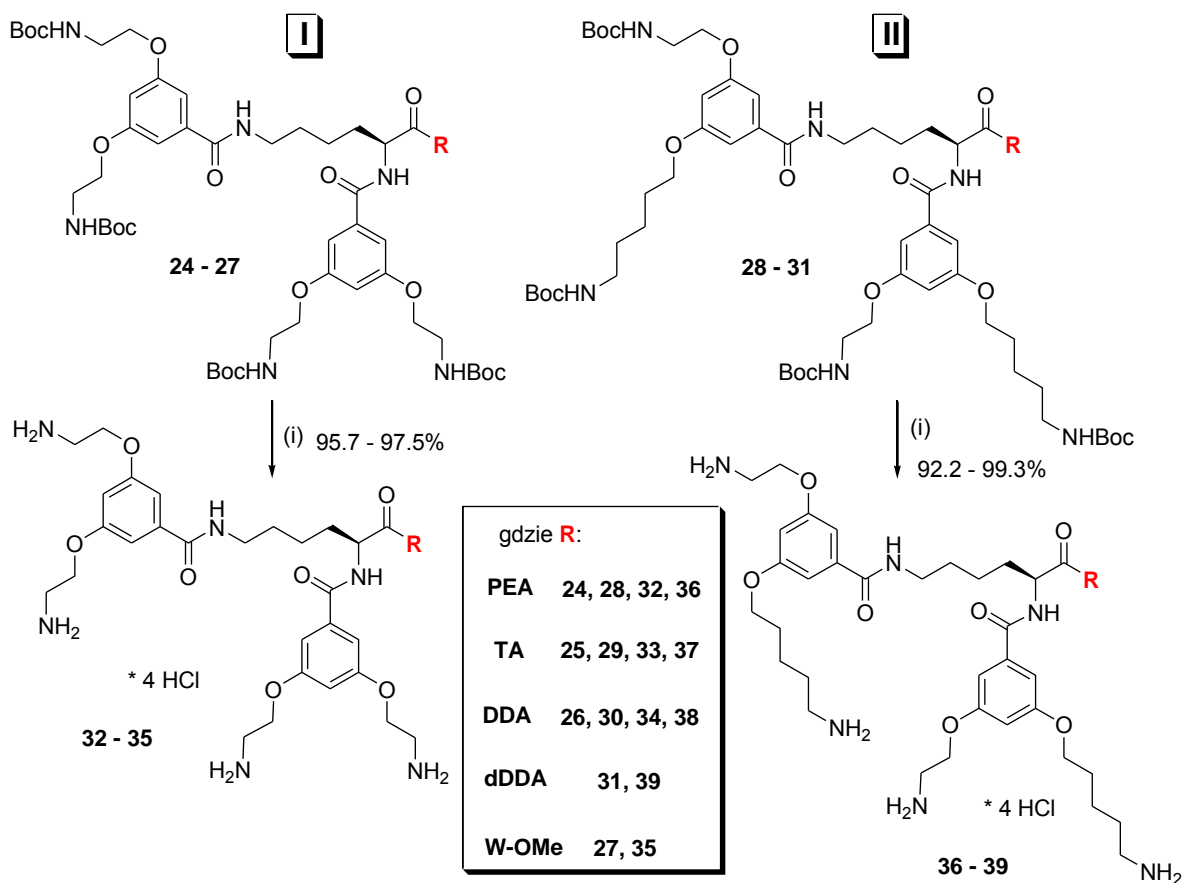
Tabela 2. Dane dotyczące rdzeni o charakterze hydrofobowym (**24** - **31**).

Rdzeń	Wydajność [%]	T. top. [°C]	R _f [CHCl ₃ /MeOH 8:1]	
Fenyletyloamid <i>N, N'</i> -bis{3,5-bis[2-(Boc-amino)etoksy]benzoilo}- <i>L</i> -lizyny	24	87.7 ^a	82-84	0.60
Tryptamid <i>N, N'</i> -bis{3,5-bis[2-(Boc-amino)etoksy]benzoilo}- <i>L</i> -lizyny	25	77.6 ^b	80-83	0.38
Dodecyloamid <i>N, N'</i> -bis{3,5-bis[2-(Boc-amino)etoksy]benzoilo}- <i>L</i> -lizyny	26	78.7 ^a	- ^c	0.48
Ester metylowy <i>N, N'</i> -bis{3,5-bis[2-(Boc-amino)etoksy]benzoilo}- <i>L</i> -lizylo- <i>L</i> -tryptofanu	27	82.4 ^b	101-103.5	0.45
Fenyletyloamid <i>N, N'</i> -bis{3-[5-(Boc-amino)pentoksy]-5-[2-(Boc-amino)etoksy]benzoilo}- <i>L</i> -lizyny	28	89.6 ^a	74-77	0.48
Tryptamid <i>N, N'</i> -bis{3-[5-(Boc-amino)pentoksy]-5-[2-(Boc-amino)etoksy]benzoilo}- <i>L</i> -lizyny	29	78.4 ^b	85-87	0.45
Dodecyloamid <i>N, N'</i> -bis{3-[5-(Boc-amino)pentoksy]-5-[2-(Boc-amino)etoksy]benzoilo}- <i>L</i> -lizyny	30	78.1 ^b	- ^c	0.45
Didodecyloamid <i>N, N'</i> -bis{3-[5-(Boc-amino)pentoksy]-5-[2-(Boc-amino)etoksy]benzoilo}- <i>L</i> -lizyny	31	90.5 ^b	- ^c	0.67

^{a, b} po oczyszczeniu na kolumnie silikażelowej z użyciem fazy CHCl₃/MeOH : ^a 25:1; ^b gradient 100:1→25:1

^c olej

Rdzenie **24** - **31** poddałam reakcji Boc-deprotekcji z użyciem nasyconego roztworu HCl w EtOAc (Schemat 26). Uzyskane w ten sposób odbezpieczone związki **32** - **39**, występujące w postaci tetrachlorowodoroków, mogłam wykorzystać do dalszej syntezy dendrymerów.



Schemat 26. Synteza tetrachlorowodorków *N, N'*-bis[3,5-bis(2-aminoetoksy)benzoilo] amidów *L*-lizyny i związku nieaminokwasowego (**32 - 34**), estru metylowego *N, N'*-bis[3,5-bis(2-aminoetoksy)-benzoilo]-*L*-lizylo-*L*-tryptofanu (**35**) oraz *N, N'*-bis[3-(5-aminopentoksy)-5-(2-aminoetoksy)benzoilo]-amidów *L*-lizyny i związku nieaminokwasowego (**36 - 39**). (i) nas. HCl/EtOAc.

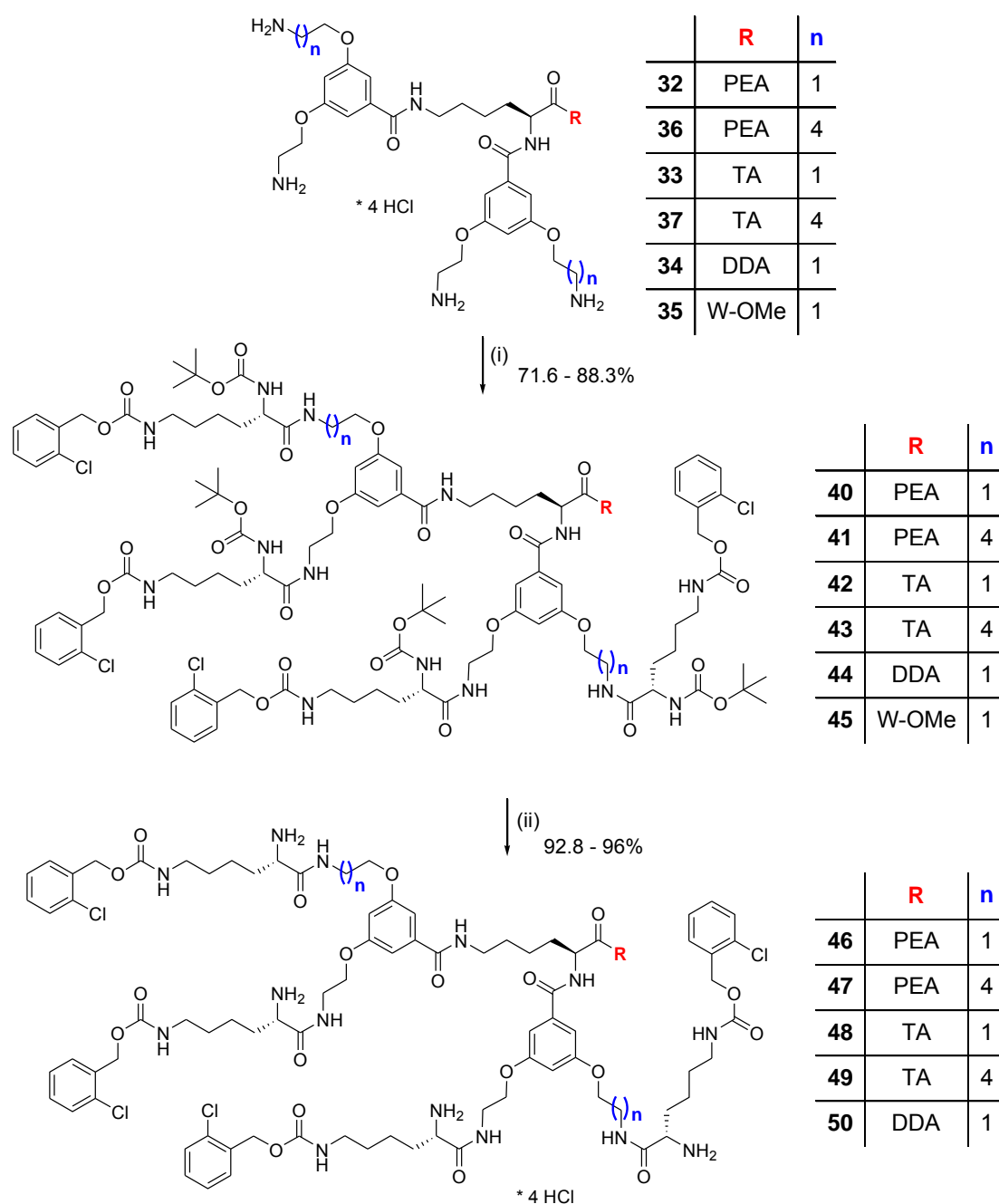
3.3. SYNTEZA DENDRYMERÓW OPARTYCH NA RDZENIACH HYDROFOBOWYCH

3.3.1. Synteza dendrymerów z terminalnymi resztami lizynowymi

Chronologicznie, pierwszą grupę dendrymerów opartą na nowym typie rdzeni o charakterze hydrofobowym otrzymałam wykorzystując w reakcji sprzęgania ortogonalnie zabezpieczone pochodne lizyny. Jak wynikało z analizy zależności struktura – aktywność dendrymeru (Rozdział 1.3.3.), rodzaj peryferyjnego elementu rozgałęziającego ma istotny wpływ na aktywność. Mój wybór podyktowany był dotychczasowymi obserwacjami, wskazującymi na to, że pochodne lizyny z aromatyczną grupą *Z* lub 2-Cl-*Z* zabezpieczającą jedną z jej funkcji aminowych, mają wyższe aktywności antybakteryjne niż Orn czy Arg (Rozdział 1.3.3., Wniosek 3). Co więcej, dane dotyczące naturalnych peptydów antybakteryjnych (AMP) sugerują, że Lys jest lepszym wyborem niż Arg ze względu na niższą toksyczność. Kim i wsp. wykazali bowiem, że grupa aminowa Lys oddziałuje

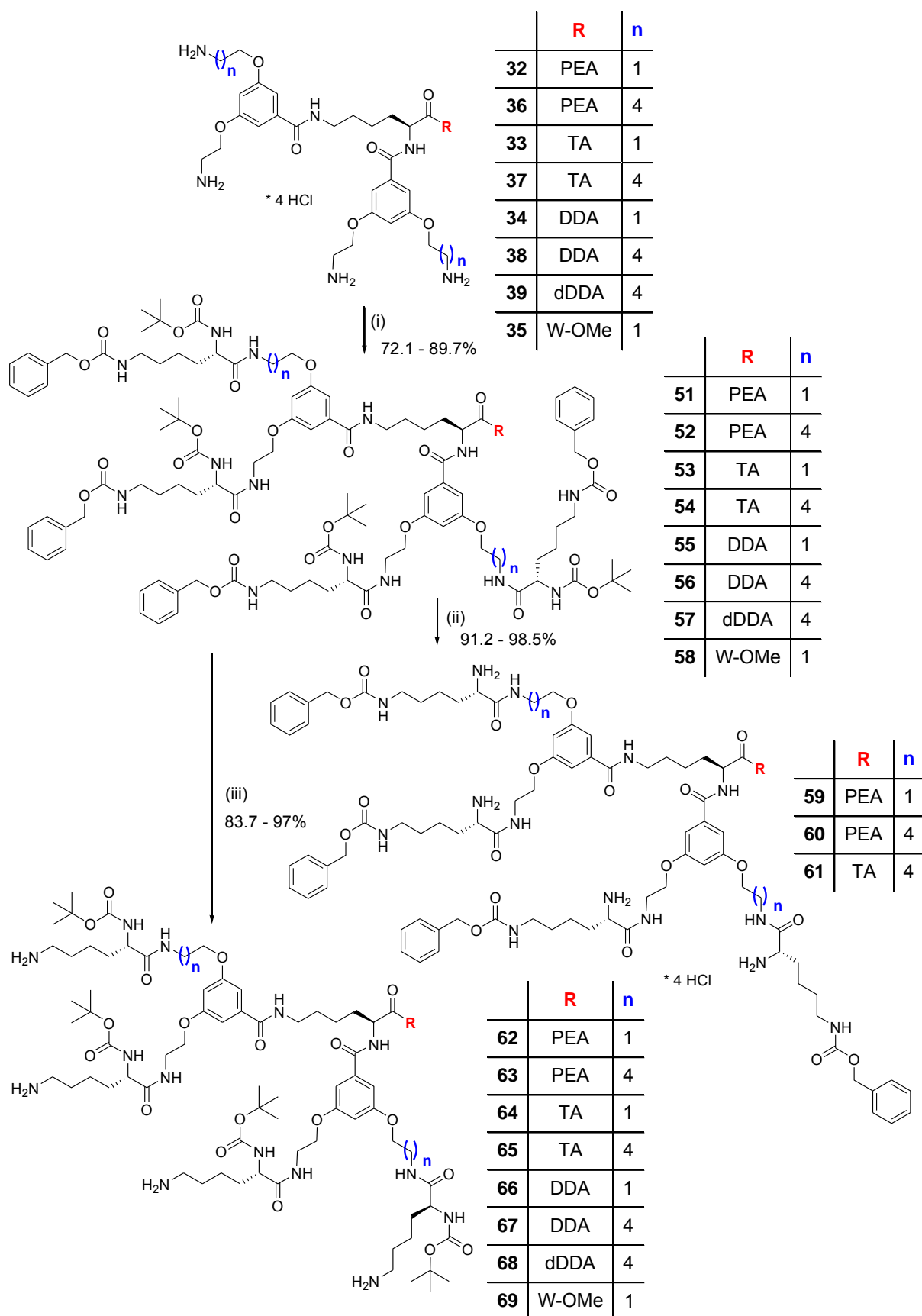
elektrostatycznie słabiej z obojętnymi fosfolipidami niż grupa guanidynowa Arg.¹⁵¹ Oznacza to większą selektywność względem ujemnych fosfolipidów błony bakteryjnej, a tym samym mniejszą toksyczność wobec komórek eukariotycznych.

Otrzymałam dwie grupy dendrymerów peptydowych posiadających grupy zabezpieczające 2-Cl-Z lub Z na azocie N^{ϵ} rozgałęziającej lizyny (Schemat 27 i 28). Zostały one zsyntetyzowane w wyniku reakcji sprzęgania odbezpieczonych rdzeni, tj. tetrachlorowodorków **32** – **39** z ortogonalnie zabezpieczoną lizyną: Boc-Lys(2-Cl-Z)-OH lub Boc-Lys(Z)-OH.



Schemat 27. Synteza dendrymerów z terminalnymi resztami lizynowymi (**40** – **45**, **46** – **50**).

(i) Boc-Lys(2-Cl-Z)-OH, DCC/HOBt, Et₃N, DMF, 48 - 72 godz.; (ii) nas. HCl/EtOAc.



Schemat 28. Synteza dendrymerów z terminalnymi resztami lizynowymi (**51 – 58**, **59 – 61**, **62 – 69**).
 (i) Boc-Lys(Z)-OH, DCC/HOBt, Et₃N, DMF, 48 - 72 godz.; (ii) nas. HCl/EtOAc; (iii) H₂/10% Pd-C,
 MeOH.

Reakcje sprzęgania prowadziłam z użyciem DCC i HOBt w DMF z dodatkiem odpowiedniej ilości Et₃N (koniecznej do przeprowadzenia grup aminowych do postaci niesprotonowanej). Podobnie jak w przypadku syntezy rdzeni, niezbędne okazało się zastosowanie dodatkowej ilości Et₃N (2 ekw.) do całkowitej konwersji grup aminowych. Początkowe próby oczyszczenia surowych dendrymerów za pomocą chromatografii kolumnowej na silikażelu były żmudne i nie prowadziły do satysfakcjonującego wyniku. Idealnym rozwiązaniem okazało się być połączenie wspomnianej chromatografii silikażelowej z sączeniem molekularnym z użyciem kolumny z wypełnieniem Sephadex LH-20. W pierwszym etapie oczyszczania dendrymerów stosowałam sączenie molekularne z MeOH jako fazą ruchomą, a następnie związki doczyszczalam na kolumnie silikażelowej z użyciem fazy CHCl₃/MeOH (gradient 100:1→20:1). W ten sposób otrzymałam czyste dendrymery peptydowe (**40 - 45, 51 - 58**), mające postać bezpostaciowych proszków, z wydajnościami rzędu 71.6 - 89.7%.

Dendrymery **40 - 45** i **51, 52, 54** poddałam następnie reakcji deprotekcji grup Boc rozpuszczając związek w minimalnej ilości MeOH i dodając nasycony roztwór HCl w EtOAc (Schemat 27 i 28). Reakcja zachodziła szybko (1 godz.) i z wysoką wydajnością (91.2 - 98.5% po sączeniu molekularnym). Odbezpieczone dendrymery **46 - 50** i **59 - 61** (tetrachlorowodorki) to bezpostaciowe proszki bez ostrej temperatury topnienia. Po scharakteryzowaniu ich za pomocą technik analitycznych, zostały oddane na badania biologiczne.

Okazało się, że posiadają one umiarkowaną aktywność antybakteryjną, na którą rodzaj pochodnej lizyny (2-Cl-Z lub Z na azocie N^c) zasadniczo nie wywiera wpływu. Decydującą rolę odgrywa rodzaj C-końca dendrymeru. Najsłabsza aktywność odnotowana dla dendrymeru **50**, tj. z dodecyloaminą na C-końcu, sugerowała możliwość poprawy działania antybakteryjnego związków poprzez zwiększenie ich charakteru hydrofilowego, np. przez wprowadzenie większego ładunku dodatniego. W tym celu dendrymery **51 - 58**, posiadające grupy zabezpieczające Z na azocie N^c rozgałęziającej lizyny, poddałam reakcji deprotekcji stosując klasyczną metodę hydrogenacji na katalizatorze palladowym w metanolu (Schemat 28). Jednakże reakcja z 10% Pd/C, zastosowanym w ilości 10% wagowych substratu, przebiegała z niepełną konwersją. Stanowiło to problem, gdyż o ile łatwe jest rozdzielenie od siebie produktu i substratu, to związki z częściowo zdjętymi grupami Z tworzą złożoną mieszaninę praktycznie niemożliwą do odseparowania od produktu. Poprawę konwersji substratu powodował dodatek kwasu octowego. Jednakże najlepsze efekty dało zastosowanie stosunkowo dużego nadmiaru katalizatora (10% wagowych na każdą grupę Z). Reakcja hydrogenacji prowadzona w tych warunkach zachodziła w ciągu 3 - 10 godzin.

Odbezpieczone dendrymery **62 – 69**, otrzymane z wydajnościami rzędu 83.7 – 97%, to białe lub jasnożółte proszki, które stanowiły substrat do dalszej syntezy (Rozdział 3.3.2.). Ważnej informacji, co do kierunku planowanej funkcjonalizacji tych związków, dostarczyły wyniki badania aktywności antybakteryjnej dla dendrymerów **62** i **63**. Okazało się, że deprotekcja grup Z w dendrymerach powoduje utratę ich właściwości antybakteryjnych.

Zgodnie z powyższym założyłam więc, że funkcjonalizacja dendrymerów z terminalnymi resztami lizynowymi powinna prowadzić nie tylko do zwiększenia ich ładunku dodatniego, ale również wprowadzać grupę aromatyczną.

Podstawową metodą analityczną potwierdzającą założoną strukturę dendrymerów z terminalnymi resztami lizynowymi jest spektrometria mas ESI MS. W widmach dendrymerów **40 – 45** i **51 – 58** główne sygnały pochodzą od jonów podwójnie naładowanych typu $[M + 2Na]^{2+}$. Widoczne również sygnały jonów pseudomolekularnych $[M + Na]^+$ są mniej intensywne. Natomiast w widmach dendrymerów odbezpieczonych **46 – 50**, **59 – 61** i **62 – 69** najczęściej jako główne sygnały obserwuje się te pochodzące od jonów wielokrotnie naładowanych typu $[M + 2H]^{2+}$, $[M + 3H]^{3+}$ czy $[M + 4H]^{4+}$.

Widma 1H i ^{13}C NMR dendrymerów **40 – 69** nie przedstawiają większych trudności interpretacyjnych, aczkolwiek pełne przypisanie sygnałów możliwe jest na podstawie widm DEPT oraz korelacyjnych COSY i HSQC.

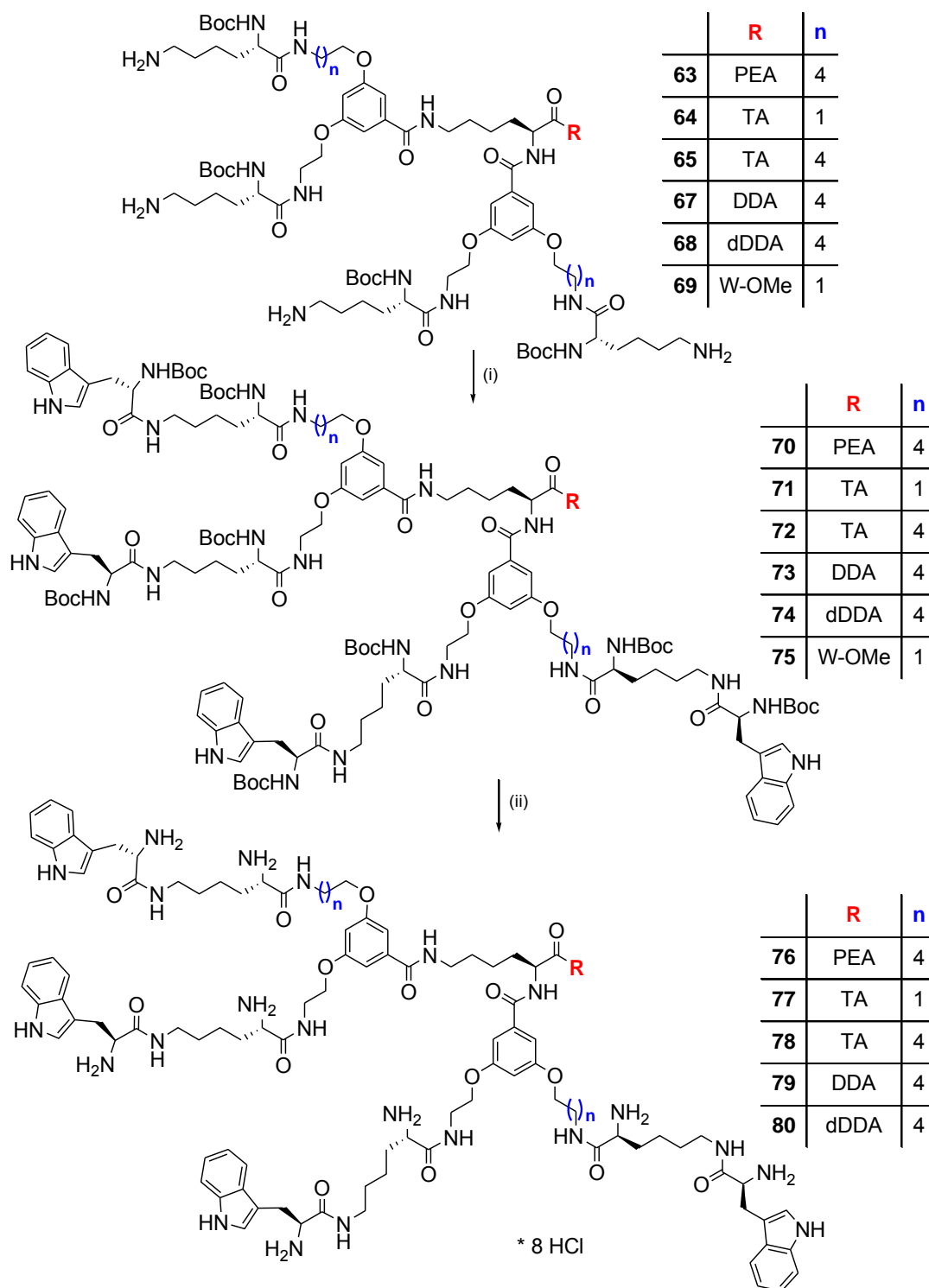
Na pełną Boc-deprotekcję w przypadku dendrymerów **46 – 50** i **59 – 61** wskazuje w widmach NMR całkowity zanik charakterystycznych sygnałów pochodzących od grup Boc, tj. w widmie ^{13}C NMR – sygnałów przy 28.8 ppm $[C(CH_3)_3]$ i 80.6 ppm $[C(CH_3)_3]$, zaś w widmie 1H NMR – intensywnych sygnałów w zakresie 1.36 – 1.41 $[C(CH_3)_3]$.

Z kolei brak sygnału przy 5.03 ppm w widmie 1H NMR, pochodzącego od protonów benzylowych ($Ar-CH_2O$), oraz przy 67.3 ppm w widmie ^{13}C NMR, odpowiadającemu benzyłowemu atomowi węgla ($Ar-CH_2O$), jest dowodem na pełną Z-deprotekcję w przypadku dendrymerów **62 – 69**.

3.3.2. Synteza dendrymerów z terminalnymi resztami tryptofanowymi lub pochodnych tryptofanu

Poprawę aktywności antybakteryjnej dendrymerów postanowiłam osiągnąć poprzez przyłączenie do grup aminowych w łańcuchu bocznym lizyny reszt tryptofanu. Cząsteczka tryptofanu wydawała się odpowiednim wyborem, gdyż spełniała założone przeze mnie kryteria funkcjonalności (Rozdział 3.3.1.), tj. zwiększała ładunek dodatni dendrymeru i

jednocześnie wprowadzała układ aromatyczny. Co więcej, jak wspomniano w Rozdziale 2, reszty tryptofanowe wykazują powinowactwo do bakteryjnej powierzchni międzyfazowej lipid-woda. W związku z tym, dendrymery sfunkcjonalizowane resztami tryptofanu powinny wykazywać nie tylko lepszą aktywność antybakteryjną, ale i oporność na wysokie stężenie soli oraz niską toksyczność wobec komórek eukariotycznych.



Schemat 29. Synteza dendrymerów z terminalnymi resztami tryptofanowymi (**70 – 75**, **76 – 80**).
 (i) Boc-Trp-OH, EDC/HOBt, Et₃N, DMF, 48 - 72 godz.; (ii) nas. HCl/EtOAc.

Syntezę dendrymerów posiadających terminalne reszty tryptofanowe zrealizowałam w wyniku reakcji sprzęgania dendrymerów **63 – 65** i **67 – 69** z Boc-Trp-OH (Schemat 29). Początkowe próby otrzymania dendrymeru **70** w reakcji prowadzonej przy użyciu klasycznej metody DCC/HOBt dawały niską wydajność produktu (~ 47%). Konieczna okazała się zmiana czynnika sprzęgającego z DCC na 1-etylo-3-(3-dimetyloaminopropyl)karbodiimid (EDC). Najlepsze wyniki uzyskałam przy użyciu układu EDC/HOBt w DMF z dodatkową ilością Et₃N (3.6 ekw.), tj. oprócz tej potrzebnej do przeprowadzenia odczynnika sprzęgającego, występującego w postaci chlorowodoru (EDC·HCl), do jego postaci wolnej (4.4 ekw.). Produkty sprzęgania oczyszczałam zgodnie z procedurą stosowaną w przypadku dendrymerów **40 – 45** i **51 – 58**. Najpierw wykonywałam sączenie molekularne na Sephadexie LH-20 z MeOH jako eluentem, a następnie związki doczyszczalam na kolumnie silikażelowej z użyciem fazy CHCl₃/MeOH (gradient 50:1→15:1 lub 100:1→15:1). W ten sposób otrzymałam czyste dendrymery peptydowe **70 – 75**, mające postać białych, kremowych lub jasnożółtych proszków, z wydajnościami rzędu 66.8 – 87.5% (Tabela 3).

Tabela 3. Dane dotyczące dendrymerów **70 - 75** i **76 - 80**.

Dendrymery zabezpieczone					Dendrymery odbezpieczone			
Nr	Wyd. [%]	T. top. [°C]	[α] _D ²⁵ (c 1, MeOH)	R _f [CHCl ₃ /MeOH 8:1]	Nr	Wyd. [%]	T. top. [°C]	[α] _D ²⁵ (c 1, MeOH)
70	78.1	126-131	- 7.3	0.37	76	96.4	195-207	+ 27.5
71	87.5	147-153	- 7.0	0.32	77	96.8	203-212	+ 14.1
72	66.8	135-140	- 5.4	0.49	78	96.8	197-206	+ 28.1
73	69.7	125-129	- 5.3	0.57	79	96	187-195	+ 25.5
74	68.2	117-120	- 5.6	0.45	80	95.2	195-198	+ 25.2
75	86.2	140-143	- 4.5	0.37				

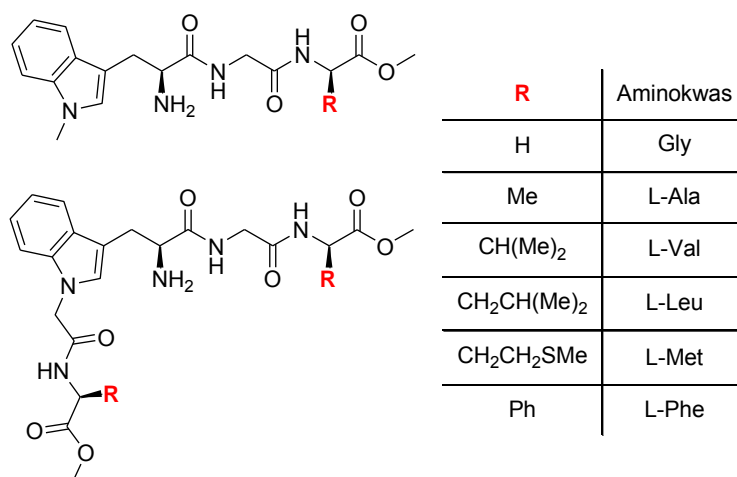
Następnie dendrymery **70 – 74** poddałam reakcji Boc-deprotekcji rozpuszczając związki w minimalnej ilości MeOH i dodając nasycony roztwór HCl w EtOAc (Schemat 29). Odbezpieczone dendrymery **76 – 80**, występujące jako higroskopijne heptachlorowodorki, uzyskałam z wydajnościami rzędu 95.2 – 96.8% (Tabela 3). Po scharakteryzowaniu ich za pomocą technik analitycznych, zostały oddane na badania biologiczne.

Badania aktywności przeciwnowotworowej dendrymerów **76 – 80** ujawniły ich zdolność do ograniczania wzrostu linii komórkowej ludzkiego czerniaka (inhibitory

proliferaacji). Biorąc pod uwagę, że dendrymery te posiadają terminalne reszty tryptofanowe, wydaje się możliwa optymalizacja ich właściwości biologicznych poprzez modyfikację pierścienia indolowego. Poszukując w literaturze prostych pochodnych tryptofanu przejawiających właściwości przeciwnowotworowe, moją uwagę zwróciła praca Cai i wsp.¹⁵² Jej tematem była aktywność cytotoksyczna wobec komórek nowotworowych *N*¹-alkilowych pochodnych tryptofanu, tj. zawierających podstawnik metylowy, etylowy, propylowy, izopropylowy lub butylowy na indolowym atomie azotu. Spośród nich największy potencjał wykazywał 1-butylotryptofan.

Wobec tego, postanowiłam sprawdzić czy zastąpienie terminalnych reszt tryptofanowych w dendrymerze przez reszty 1-butylotryptofanowe wpłynie na wzrost jego aktywności przeciwnowotworowej.

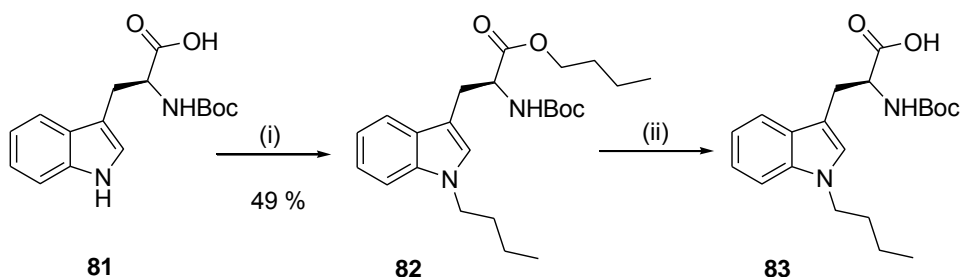
Interesującym wydawał się także wpływ takiej modyfikacji na aktywność przeciwbakteryjną i toksyczność dendrymeru wobec komórek eukariotycznych. W literaturze dendrymerów antybakteryjnych nie odnalazłam prac na temat syntezy i aktywności biologicznej dendrymerów zawierających w swojej strukturze pochodne tryptofanu. Natomiast w przypadku peptydów antybakteryjnych zostało udokumentowane, że wprowadzenie do peptydu pochodnych aminokwasów, charakteryzujących się zawadą przestrzenną i lipofilowością, np. 2,5,7-tri-*tert*-butylotryptofanu (Tbt),¹⁵³ na ogół skutkuje poprawą jego działania antybakteryjnego. Na temat peptydów zawierających *N*¹-podstawiony tryptofan istnieje, jak dotychczas, jedna praca, która wskazuje na ich dobre właściwości przeciwdrobnoustrojowe (Rysunek 34).¹⁵⁴



Rysunek 34. Struktury peptydów zawierających *N*¹-podstawiony tryptofan.

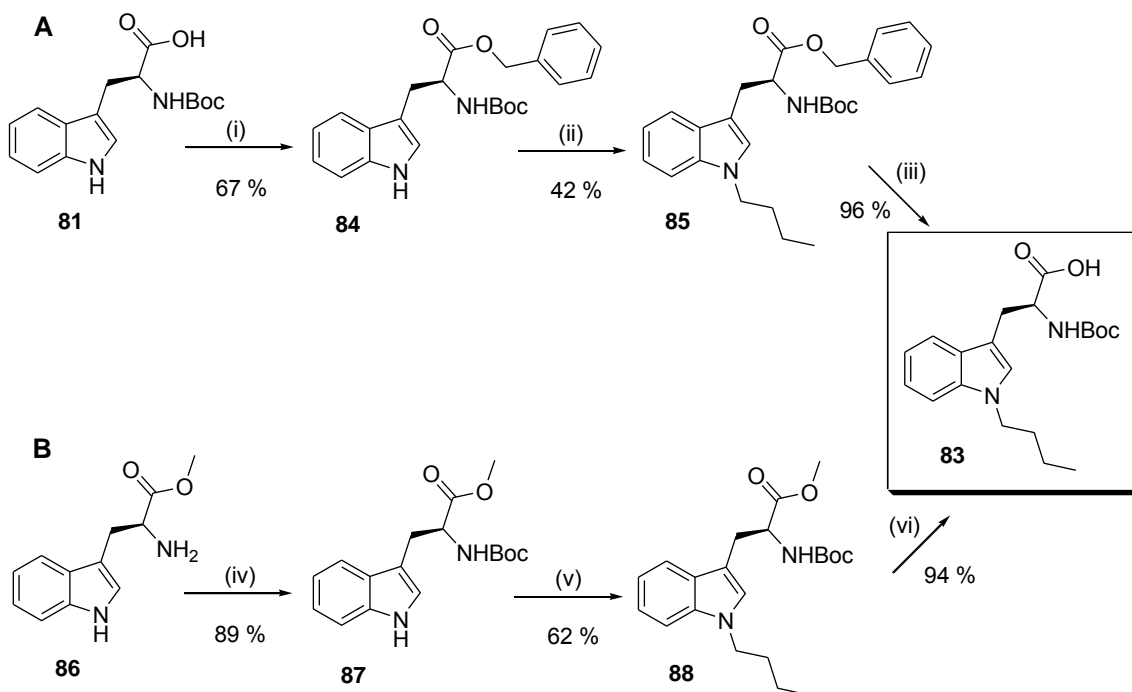
Potrzebny substrat, tj. *N*-Boc-1-butylotryptofan (**83**), próbowałam otrzymać zgodnie z 2-etapową procedurą podaną przez grupę Cai.¹⁵² Polegała ona na przeprowadzeniu w

jednym etapie reakcji estryfikacji i reakcji *N*-alkilowania Boc-Trp-OH (**81**) przy zastosowaniu 3 ekw. bromku *n*-butylu w obecności NaOH (2 ekw.) w DMSO, a następnie reakcji hydrolizy estru **82** w warunkach zasadowych (Schemat 30).



Schemat 30. Synteza *N*-Boc-1-butylotryptofanu (**83**). (i) *n*-BuBr, NaOH, DMSO, 60 °C, 6h; (ii) 1M NaOH, DMSO, t. pok., 30 min.

Jednakże nie udało mi się powtórzyć kluczowego, 1-ego etapu syntezy, tj. otrzymywania estru **82**, z wydajnością osiąganą przez wspomnianą pracę Cai (49%). Na podstawie TLC obserwowałam bardzo niski stopień przereagowania substratu, powstawanie głównie produktu estryfikacji i tylko niewielkie ilości właściwego produktu. W efekcie uzyskałam ester **82** z wydajnością zaledwie 16%. Skłoniło mnie to do przeprowadzenia syntezy *N*-Boc-1-butylotryptofanu (**83**) na drodze powszechnie stosowanej procedury *N*-alkilowania układu indolowego.



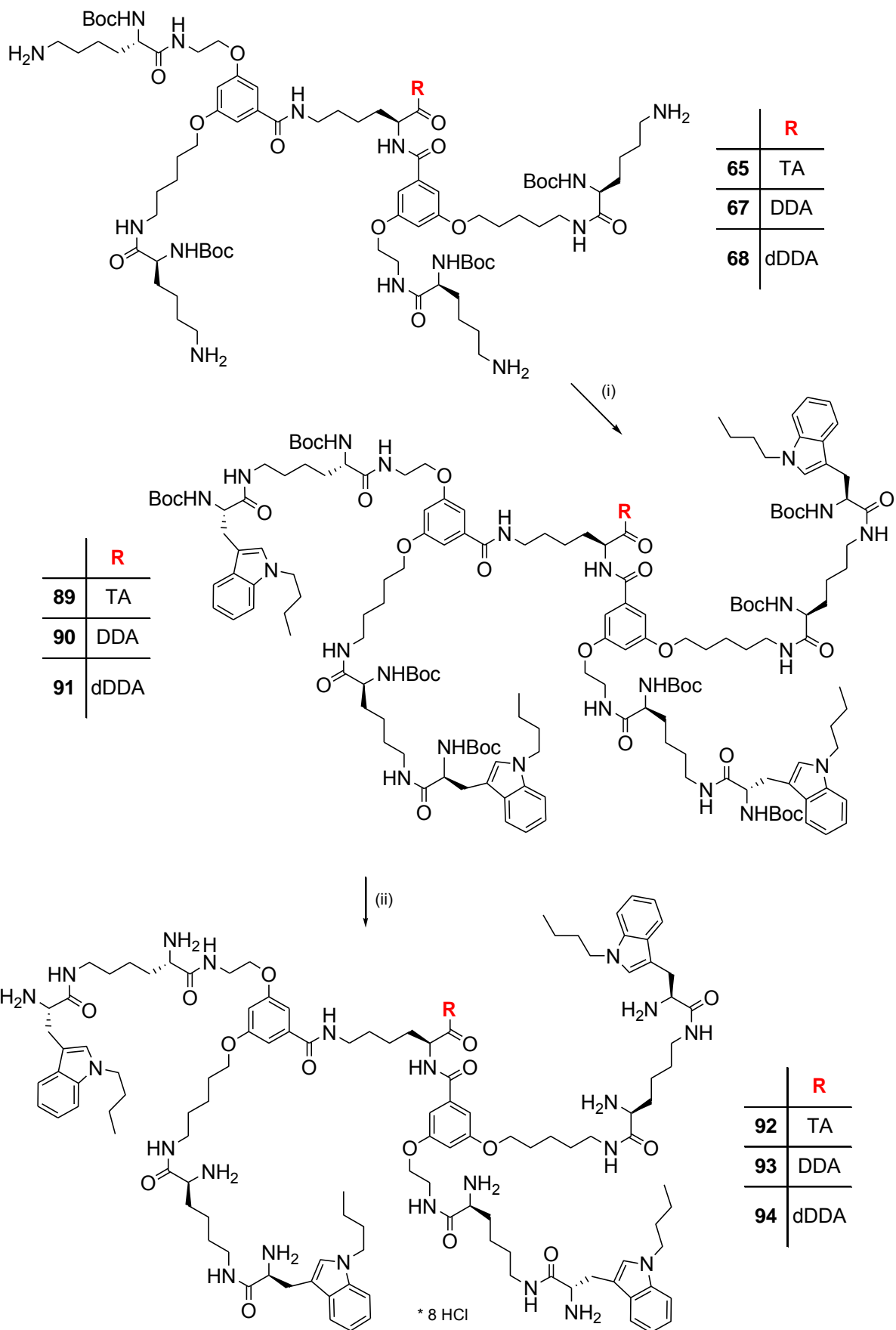
Schemat 31. Synteza *N*-Boc-1-butylotryptofanu (**83**). A – (i) BnBr, Cs₂CO₃, DMF, t. pok., 6 godz.; (ii) *n*-BuBr, NaH, DMF, 0 °C, 1.5 godz.; (iii) H₂/10% Pd-C, MeOH, 3.5 godz.; B – (iv) (Boc)₂O, NaOH, H₂O/dioksan, t. pok., 24 godz.; (v) *n*-BuBr, NaH, DMF, 0 °C, 2.5 godz.; (vi) 1) 1M NaOH, MeOH, 50 °C, 1.5 godz.; 2) 1M HCl.

W tym celu, wychodząc z Boc-Trp-OH (**81**) najpierw zabezpieczyłam jego grupę karboksylową w postaci estru benzyloвого otrzymując Boc-Trp-OBn (**84**) z wydajnością 67% (Schemat 31:A). Działając na związek **84** wodorkiem sodu, a następnie bromkiem *n*-butylu w temperaturze 0 °C uzyskałam produkt *N*-alkilowania **85** z wydajnością 42%. Usunięcie zabezpieczającej grupy benzylowej poprzez hydrogenację katalityczną doprowadziło do finalnego produktu **83**. Widma NMR i MS odpowiadały założonej strukturze. Całkowita wydajność tej trzyetapowej syntezy z Boc-Trp-OH (**81**) wyniosła 68.3%. Lepszy wynik można osiągnąć wychodząc z Trp-OMe (**86**). Sekwencja reakcji: zabezpieczania funkcji aminowej **86** grupą Boc, *N*-alkilowania Boc-Trp-OMe (**87**) i hydrolizy estru metylowego **88**, pozwala na otrzymanie *N*-Boc-1-butylotryptofanu (**83**) z wydajnością 81.7% (Schemat 31:B).

Syntezę dendrymerów posiadających terminalne reszty 1-butylotryptofanowe przeprowadziłam poprzez reakcję sprzęgania dendrymerów **65**, **67** i **68** z *N*-Boc-1-butylotryptofanem (**83**) przy użyciu układu EDC/HOBt w DMF z dodatkową ilością Et₃N (3.6 ekw.) (Schemat 32). Po oczyszczeniu za pomocą sączenia molekularnego na Sephadexie LH-20 z MeOH jako eluentem, a następnie kolumny silikażelowej z użyciem fazy CHCl₃/MeOH (gradient 100:1→15:1) otrzymałam dendrymery **89** – **91** z wydajnościami w zakresie 35.8 – 71.4% (Tabela 4). Są to kremowe (**89**) lub jasnożółte (**90** – **91**), bezpostaciowe proszki dobrze rozpuszczalne w rozpuszczalnikach organicznych (alkohole, DMSO, DMF, CHCl₃, CH₂Cl₂) i nierozpuszczalne w wodzie. Poddałam je reakcji Boc-deprotekcji rozpuszczając związek w minimalnej ilości MeOH i dodając nasycony roztwór HCl w EtOAc (Schemat 32). Odbezpieczone w ten sposób dendrymery **92** – **94** występują w postaci higroskopijnych heptachlorowodoroków. Uzyskałam je z wydajnościami mieszczącymi się w zakresie 89.8 – 97.6% (Tabela 4).

Tabela 4. Dane dotyczące dendrymerów **89** - **94**.

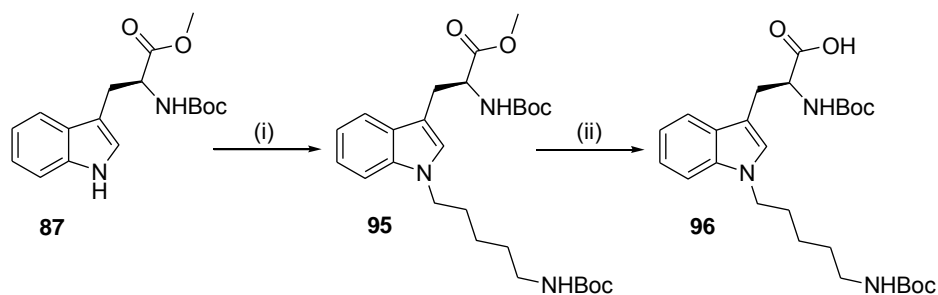
Dendrymery zabezpieczone					Dendrymery odbezpieczone			
Nr	Wyd. [%]	T. top. [°C]	$[\alpha]_D^{25}$ (c 1, MeOH)	R _f [CHCl ₃ /MeOH 8:1]	Nr	Wyd. [%]	T. top. [°C]	$[\alpha]_D^{25}$ (c 1, MeOH)
89	56.6	120-122	- 6.5	0.46	92	97.6	182-184.5	+ 18
90	35.8	102-104.5	- 5.4	0.55	93	89.8	174-177	+ 12.3
91	71.4	94-97	- 7.1	0.60	94	95.8	175-178	+ 8.9



Schemat 32. Synteza dendrymerów z terminalnymi resztami 1-butylotryptofanowymi (**89 - 91**, **92 - 94**). (i) **83**, EDC/HOBt, Et₃N, DMF, 48 - 96 godz.; (ii) nas. HCl/EtOAc.

Zastąpienie w dendrymerze reszty tryptofanowej przez resztę 1-butylotryptofanową wydawało się być dobrym podejściem do poprawy jego aktywności przeciwnowotworowej. Natomiast poprawie aktywności przeciwbakteryjnej powinna bardziej sprzyjać pochodna tryptofanu z dodatkową grupą aminową rozpatrując przyjęte założenie, iż wzrost peryferyjnego ładunku dodatniego dendrymeru może wpływać korzystnie na jego działanie przeciwbakteryjne (Rozdział 3.3.1.). Zgodnie z powyższym postanowiłam zsyntetyzować *N*^l-aminoalkilową pochodną tryptofanu. Tego typu związki nie zostały dotychczas opisane w piśmiennictwie chemicznym. W roli czynnika alkilującego zdecydowałam się wykorzystać mesylan 5-(Boc-amino)pentylu (**18**), który służył mi wcześniej do otrzymania niesymetrycznego elementu rozgałęziającego **23** (Rozdział 3.2.).

Synteze *N*-Boc-1-[5-(Boc-amino)pentyl]tryptofanu (**96**) planowałam zrealizować na drodze 2-etapowej, obejmującej reakcję *N*-alkilowania Boc-Trp-OMe (**87**) z użyciem mesylanu **18** i warunków analogicznych do tych zastosowanych przy efektywnej syntezie *N*-Boc-1-butylotryptofanu (**83**) oraz reakcję hydrolizy grupy estrowej związku **95** (Schemat 33).

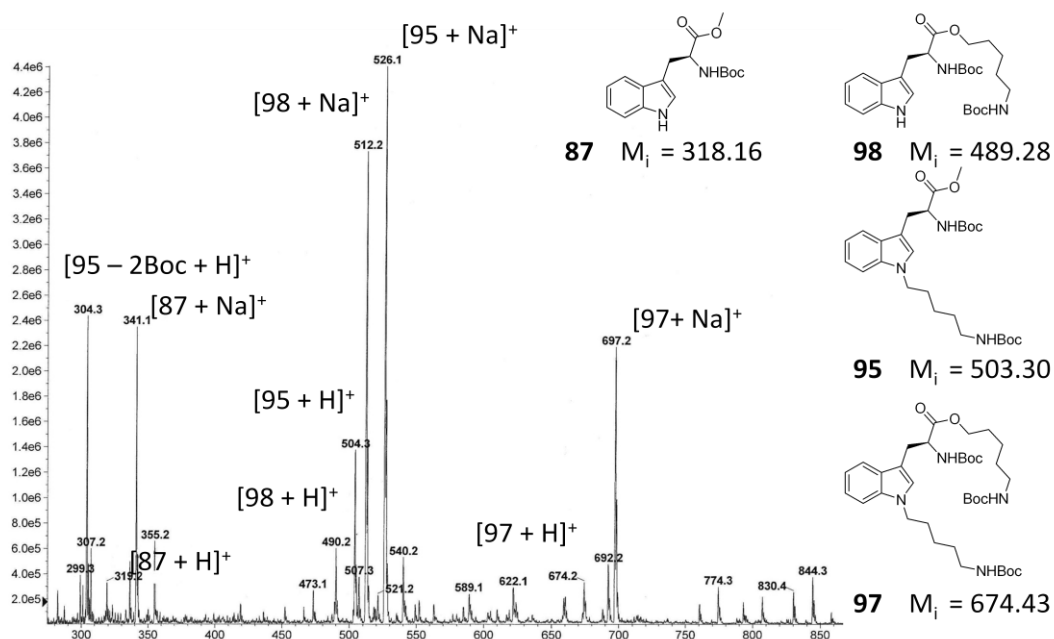


Schemat 33. Planowana synteza *N*-Boc-1-[5-(Boc-amino)pentyl]tryptofanu (**96**). (i) **18**, NaH, DMF, 0 °C; (ii) 1) 1M NaOH, MeOH, 50 °C; 2) 1M HCl.

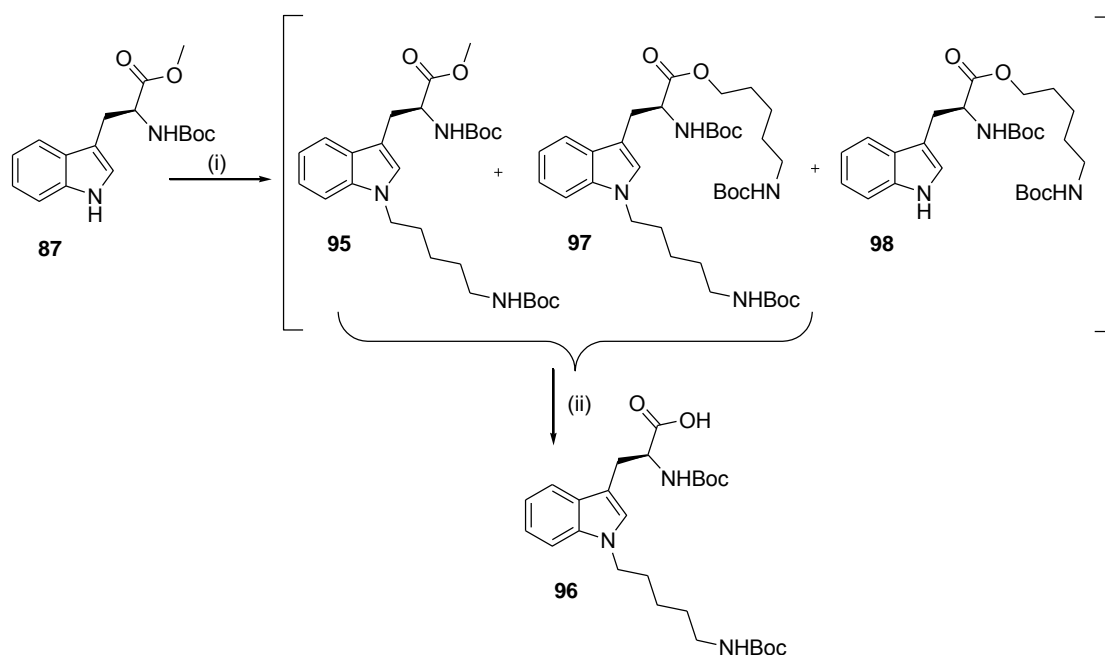
Etap *N*-alkilowania związku **87** okazał się problematyczny. Reakcja zachodziła z bardzo słabą konwersją. Do jej poprawy niezbędne było zarówno podwyższenie temperatury, jak i wydłużenie czasu reakcji. Co więcej, w reakcji powstawała złożona mieszanina trudna do rozdzielania metodami chromatograficznymi (Rysunek 35). Zwłaszcza próby odseparowania produktu właściwego **96** od nieprzereagowanego substratu **87** kończyły się niepowodzeniem. Jednakże, poddanie tej mieszaniny hydrolizie grupy estrowej, prowadziło do uzyskania nowej mieszaniny związków różniących się R_f , co pozwalało na wydzielenie z niej produktu **96** w postaci czystej.

W związku z powyższym syntezę *N*-Boc-1-[5-(Boc-amino)pentyl]tryptofanu (**96**) powtórzyłam stosując zmodyfikowaną procedurę. Reakcję *N*-alkilowania Boc-Trp-OMe (**87**) z użyciem mesylanu **18** i NaH prowadziłam w temperaturze pokojowej przez 24 godziny (Schemat 34). Następnie surowy produkt, uzyskany po ekstrakcji mieszaniny reakcyjnej,

poddałam bezpośrednio hydrolizie prowadzonej w środowisku zasadowym. Czysty produkt **96** otrzymałam z wydajnością 35.8% w wyniku oczyszczania za pomocą chromatografii kolumnowej na silikażelu. *N*-Boc-1-[5-(Boc-amino)pentyl]tryptofan (**96**) występuje w postaci bardzo higroskopijnego, białego proszku o temperaturze topnienia 105.9-108.4°C. Strukturę związku **96** potwierdza analiza widm ESI MS i NMR.

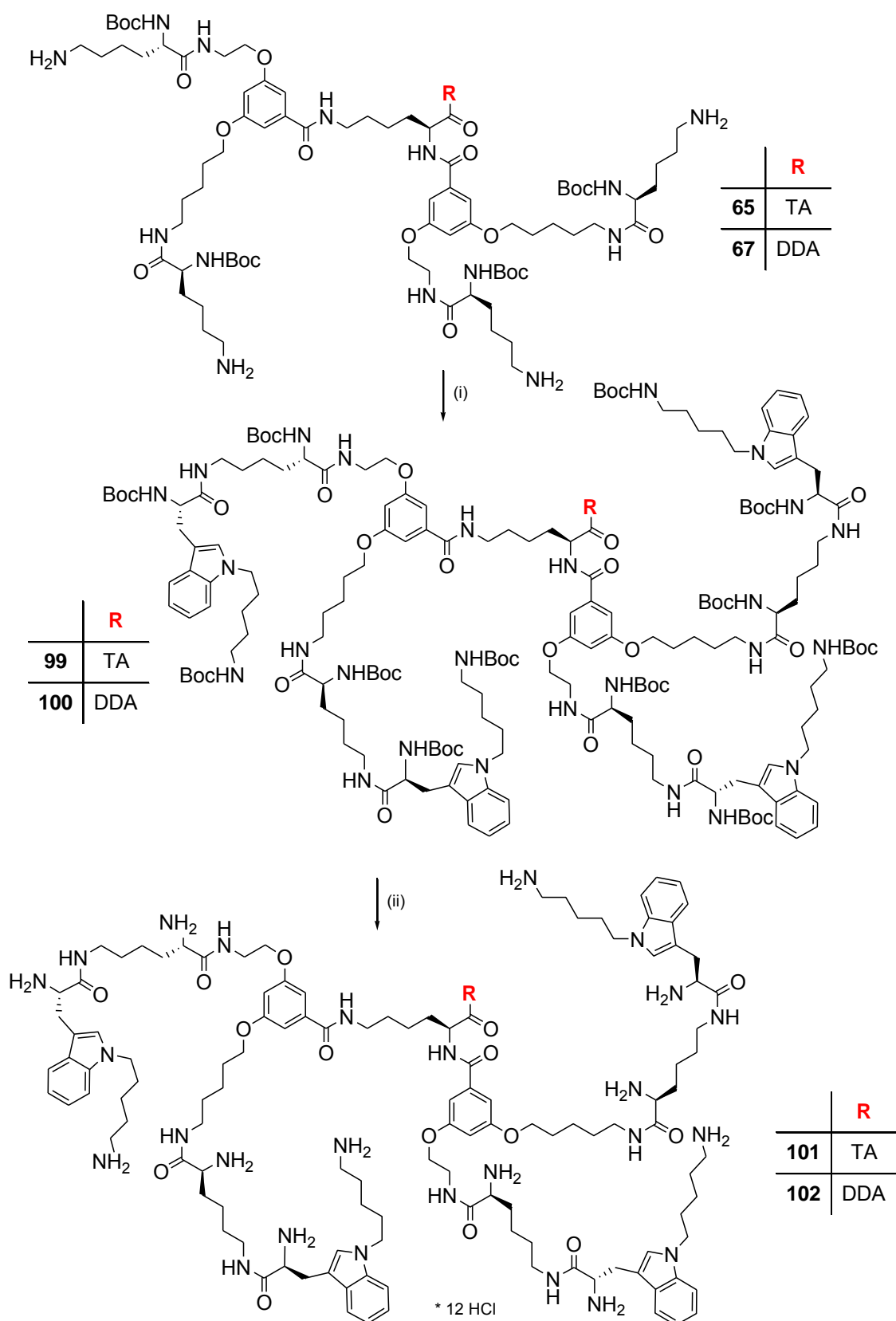


Rysunek 35. Widmo ESI MS (*jony dodatnie*) mieszaniny reakcyjnej po etapie *N*-alkilowania związku **87**.



Schemat 34. Synteza *N*-Boc-1-[5-(Boc-amino)pentyl]tryptofanu (**96**). (i) **18**, NaH, DMF, t. pok., 24 godz.; (ii) 1) 1M NaOH, MeOH, 50 °C, 2 godz.; 2) 1M HCl.

N^1 -aminoalkilową pochodną tryptofanu **96** wykorzystałam do syntezy dendrymerów **99** i **100** (Schemat 35).



Schemat 35. Synteza dendrymerów z terminalnymi resztami 1-(5-aminopentyl)tryptofanowymi (**99** i **100**, **101** i **102**). (i) **96**, EDC/HOBt, Et₃N, DMF, 96 godz.; (ii) nas. HCl/EtOAc.

Synteza, jak i etap oczyszczania, były prowadzone według procedur analogicznych do opisanych dla dendrymerów z terminalnymi resztami tryptofanowymi czy 1-butylotryptofanowymi, przy czym czas reakcji sprzęgania został wydłużony do 96 godzin. Dendrymery **99** i **100**, mające postać kremowych proszków, otrzymałam z wydajnościami odpowiednio 78.9% i 68.2% (Tabela 5). Następnie przeprowadziłam ich Boc-deprotekcję przy użyciu nas. HCl/EtOAc, w wyniku której uzyskałam dendrymery **101** i **102** występujące w postaci higroskopijnych dodekachlorowodorków (Schemat 35 i Tabela 5).

Tabela 5. Dane dotyczące dendrymerów **99** - **102**.

Dendrymer	Wyd. [%]	T. top. [°C]	$[\alpha]_D^{25}$ (c 1, MeOH)	R _f [CHCl ₃ /MeOH 8:1]
99	78.9	117-119.5	- 6.5	0.44
100	68.2	99-102	- 5.7	0.52
101	97.8	189-192	+ 6.3	-
102	89.5	184-187	+ 6.6	-

Strukturę wszystkich otrzymanych dendrymerów z terminalnymi resztami tryptofanowymi (**70** – **80**), 1-butylotryptofanowymi (**89** – **94**) oraz 1-(5-aminopentyl)tryptofanowymi (**99** – **102**) potwierdziłam w oparciu o wyniki analizy widm MS i NMR.

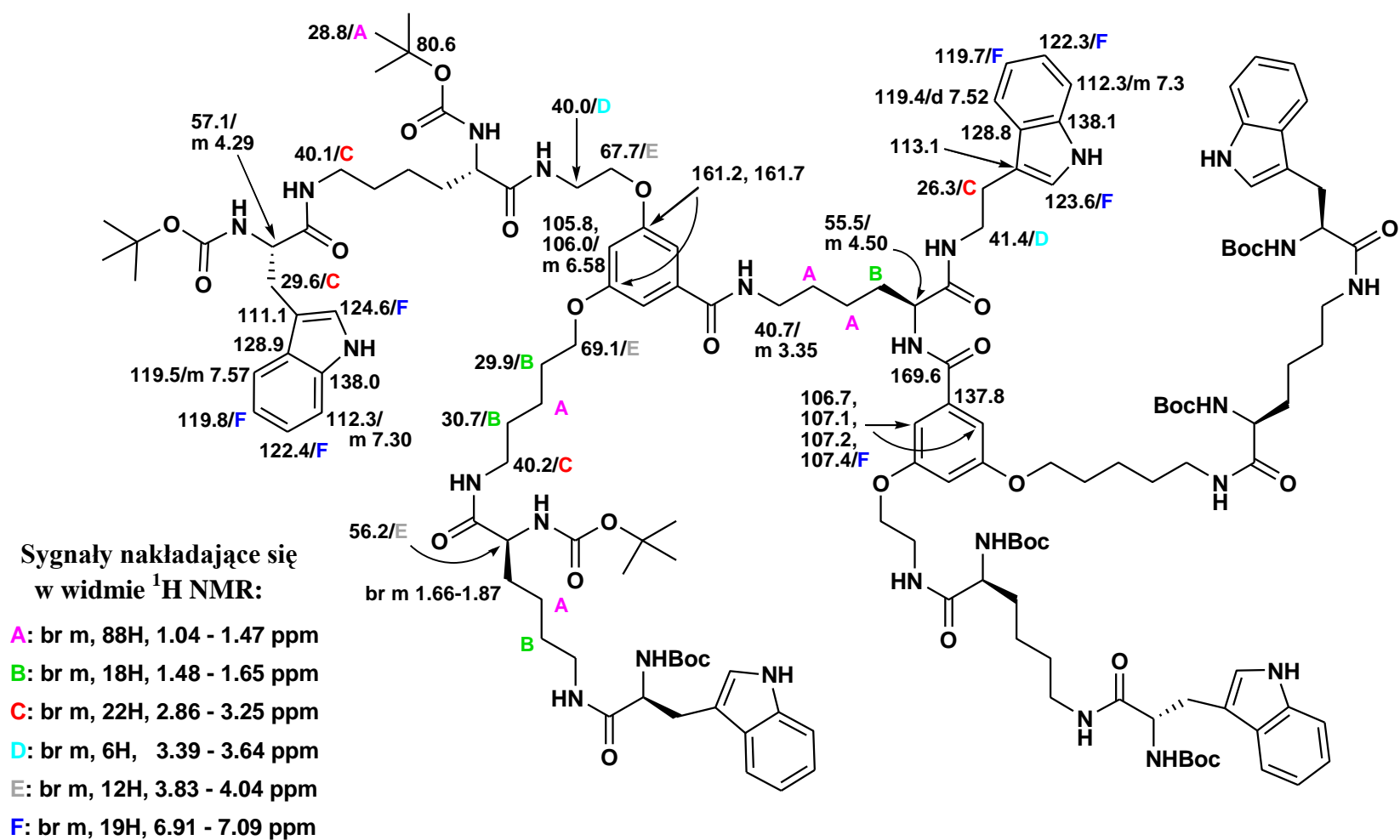
Najważniejszą techniką potwierdzającą założoną strukturę dendrymerów jest spektrometria mas ESI MS. W widmach dendrymerów z terminalnymi resztami tryptofanowymi (**70** - **75**) obserwuje się zarówno sygnały pseudomolekularne typu $[M + Na]^+$, jak i sygnały pochodzące od jonów wielokrotnie naładowanych typu $[M + 2Na]^{2+}$, $[M + H + Na]^{2+}$ czy $[M + 3Na]^{3+}$, przy czym piki odpowiadające $[M + 2Na]^{2+}$ cechują się największą intensywnością. Z kolei w widmach dendrymerów z terminalnymi resztami pochodnych tryptofanu (**89** - **91** i **99** - **100**) obecne są wyłącznie sygnały od jonów 2- i 3-krotnie naładowanych, wśród których piki odpowiadające $[M + 2Na]^{2+}$ lub $[M + 3Na]^{3+}$ posiadają największą intensywność. Widma dendrymerów Boc-odbezpieczonych (**76** – **80**, **92** – **94**, **101** - **102**) posiadają wyłącznie sygnały pochodzące od jonów wielokrotnie naładowanych, gdzie sygnały jonów $[M + 3H]^{3+}$ lub $[M + 4H]^{4+}$ są najbardziej znaczącymi. Zmiana metody jonizacji z ESI na MALDI prowadzi do widma z sygnałami pseudomolekularnymi typu $[M + Na]^+$ i $[M + H]^+$ (wykonane dla dendrymeru **101**).

Widma ^1H NMR dendrymerów są mało diagnostyczne ze względu na znaczne nakładanie się sygnałów, zwłaszcza w zakresie alifatycznym. Spośród sygnałów nie nakładających się z innymi można wyróżnić te pochodzące od protonów αCH rdzenia. Występują one przy ok. 4.5 ppm, z wyjątkiem dendrymerów posiadających na C-końcu didodecyloaminę (~ 5.0 ppm). Widma ^{13}C NMR są zdecydowanie bardziej czytelne. Wykorzystanie widma DEPT oraz widm korelacyjnych $^1\text{H} - ^{13}\text{C}$ (HSQC) i $^1\text{H} - ^1\text{H}$ (COSY) umożliwia przypisanie sygnałów do niemal wszystkich atomów węgla, a stąd i do odpowiednich protonów w cząsteczce (Rysunek 36). Trudność stanowi jednoznaczne przypisanie sygnałów części alifatycznej nie posiadającej sąsiedztwa heteroatomu czy grupy aromatycznej, czyli np. atomom węgla dodecyloaminy lub didodecyloaminy $\text{C}^2\text{-C}^{11}$, jak również zróżnicowanie sygnałów węgli β , γ , δC pochodzących od rdzenia, od tych należących do gałęziak lizynowych.

Do najbardziej charakterystycznych sygnałów w widmie ^{13}C NMR, mogących posłużyć celom diagnostycznym, należą:

- 69.1 ppm [$\text{O-CH}_2\text{-(CH}_2\text{)}_4\text{-NH}$] – sygnał wskazujący na rodzaj rdzenia zastosowanego do konstrukcji dendrymeru; jego brak oznacza rdzeń typu I, tj. oparty na symetrycznym elemencie rozgałęziającym (Rozdział 3.2.);
- 110.5 ppm (C^7) i 128.0 ppm (C^2) [w dendrymerach odbezpieczonych: 110.8 ppm (C^7) i 129.0 ppm (C^2)] oraz ~ 46.8 ppm (C^1 n-Bu lub 5-AP) – sygnały wskazujące na rodzaj terminalnej grupy dendrymeru; brak tych sygnałów oznacza resztę tryptofanową, zaś obecność – pochodną Trp;
- 26.3 ($\text{CH}_2\text{-Ar TA}$) i 41.4 ($\text{CH}_2\text{-NH TA}$); 36.5 ($\text{CH}_2\text{-Ar PEA}$) i 42.0 ($\text{CH}_2\text{-NH PEA}$); 47.7 (C^1 dDDA) – sygnały identyfikujące rodzaj aminy znajdującej się na C-końcu dendrymeru: tryptamina (TA), fenyloetyloamina (PEA), didodecyloamina (dDDA).

Na pełną Boc-deprotekcję w przypadku dendrymerów **76 – 80**, **92 – 94** i **101 – 102** wskazuje w widmach NMR całkowity zanik charakterystycznych sygnałów pochodzących od grup Boc, tj. w widmie ^{13}C NMR – intensywnych sygnałów w zakresie 28.4 – 28.9 ppm [$\text{C}(\text{CH}_3)_3$] i 79.8 – 81.3 ppm [$\text{C}(\text{CH}_3)_3$], zaś w widmie ^1H NMR – intensywnych sygnałów w zakresie 1.34 – 1.41 [$\text{C}(\text{CH}_3)_3$].



Rysunek 36. Przesunięcia chemiczne atomów węgla i wodoru w widmach NMR dendrymeru z terminalnymi resztami tryptofanowymi **78**.

3.3.3. Synteza dendrymerów z terminalnymi resztami PABA

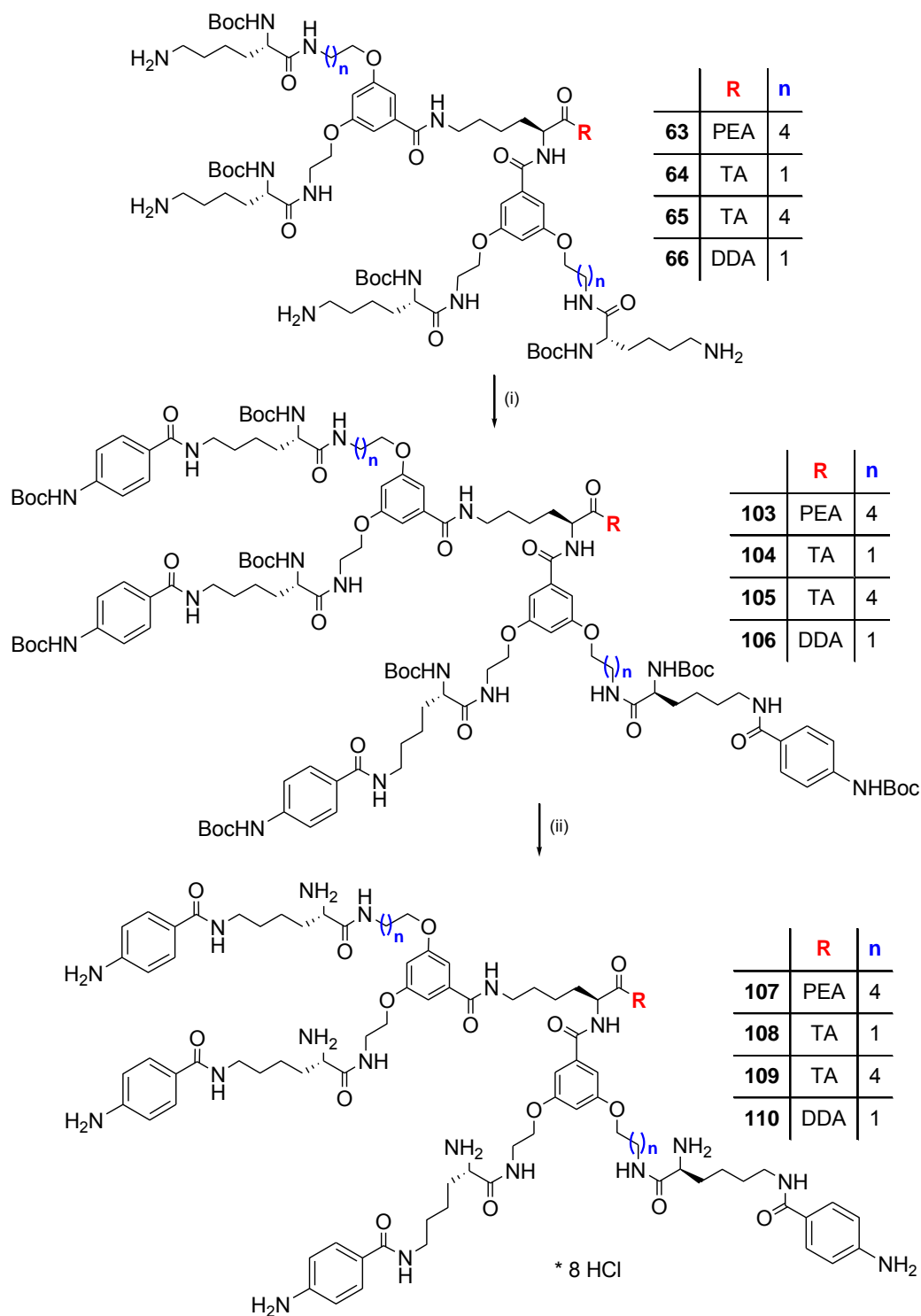
Główne założenie tej części pracy zostało oparte na możliwości zwiększenia selektywności / aktywności dendrymeru poprzez wprowadzenie do jego struktury reszt kwasu p-aminobenzoowego, wykorzystywanego przez drobnoustroje, ale nie przez organizmy wyższe podczas biosyntezy kwasu foliowego. Zrealizowałam je na drodze funkcjonalizacji terminalnych grup aminowych dendrymeru resztami PABA sprzęgając je poprzez ich grupę karboksylową. Dowiedziono bowiem, że wolna grupa aminowa kwasu p-aminobenzoowego jest niezbędna do wykazywania przez niego aktywności antybakteryjnej.

Syntezę dendrymerów posiadających terminalne reszty kwasu p-aminobenzoowego przeprowadziłam w wyniku reakcji sprzęgania dendrymerów **63** - **66** z kwasem 4-(Boc-amino)benzoowym (**114**) przy użyciu układu EDC/HOBt w DMF z dodatkową ilością Et₃N (3.6 ekw.) (Schemat 36). Po oczyszczeniu za pomocą sączenia molekularnego na Sephadexie LH-20 z MeOH jako eluentem, a następnie kolumny silikażelowej z użyciem fazy CHCl₃/MeOH (8:1 lub gradient 50:1→10:1) otrzymałam dendrymery **103** – **106** z wydajnościami w zakresie 39.1 – 60% (Tabela 6). Są to białe, kremowe lub jasnożółte, bezpostaciowe proszki bez ostrej temperatury topnienia. Poddałam je następnie reakcji Boc-deprotekcji rozpuszczając związek w minimalnej ilości MeOH i dodając nasycony roztwór HCl w EtOAc. Odbezpieczone dendrymery **107** – **110** występują w postaci higroskopijnych heptachlorowodoroków. Uzyskałam je z wydajnościami mieszczącymi się w zakresie 91.3 – 97.7% (Tabela 6).

Strukturę dendrymerów **103** – **110** potwierdziłam na podstawie widm ESI MS i NMR. W widmach masowych dendrymerów **103** – **106** główne sygnały pochodzą od jonów podwójnie naładowanych typu $[M + 2Na]^{2+}$. Widoczne również sygnały jonów pseudomolekularnych $[M + Na^+]$ są mniej intensywne. Z kolei w widmach dendrymerów odbezpieczonych **107** – **110** jako główne sygnały obserwuje się te pochodzące od jonów wielokrotnie naładowanych typu $[M + 2H]^{2+}$ i $[M + 3H]^{3+}$.

Widma ¹H i ¹³C NMR dendrymerów **103** – **110** nie przedstawiają większych trudności interpretacyjnych, aczkolwiek pełne przypisanie sygnałów możliwe jest na podstawie widm DEPT oraz korelacyjnych COSY i HSQC. Sygnały pochodzące od aromatycznych atomów węgla i wodoru reszt kwasu 4-(Boc-amino)benzoowego w dendrymerach **103** – **106**, czy reszt kwasu 4-aminobenzoowego w dendrymerach **107** – **110**, są całkowicie czytelne, zróżnicowane od pozostałych sygnałów, dzięki czemu mogą służyć jako sygnały diagnostyczne (Rysunek 37).

Całkowity zanik sygnałów w widmie ^{13}C NMR w zakresie 28.0 – 29.0 ppm [$\text{C}(\text{CH}_3)_3$] i 77.9 – 81.2 ppm [$\text{C}(\text{CH}_3)_3$], zaś w widmie ^1H NMR – intensywnych sygnałów w zakresie 1.35 – 1.50 [$\text{C}(\text{CH}_3)_3$] jest dowodem na pełną Boc-deprotekcję w przypadku dendrymerów **107** – **110**.



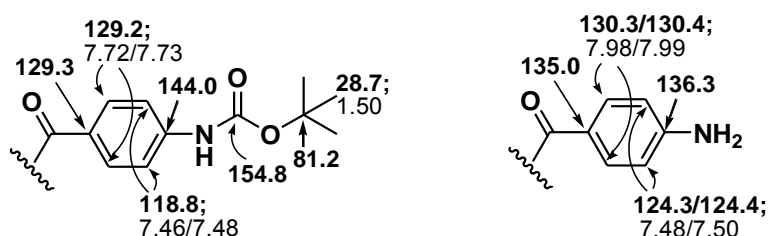
Schemat 36. Synteza dendrymerów z terminalnymi resztami PABA (**103** – **106**, **107** – **110**).

(i) Boc-PABA-OH (**114**), EDC/HOBt, Et_3N , DMF, 48 godz.; (ii) nas. HCl/ EtOAc .

Tabela 6. Dane dotyczące dendrymerów **103** - **110**

Dendrymery zabezpieczone					Dendrymery odbezpieczone			
Nr	Wyd. [%]	T. top. [°C]	$[\alpha]_D^{25}$ (c 1, MeOH)	R_f [CHCl ₃ /MeOH 8:1]	Nr	Wyd. [%]	T. top. [°C]	$[\alpha]_D^{25}$ (c 1, MeOH)
103	60 ^a	144-150	- 12.7	0.38	107	91.3	175-191	- 1.9
104	39.2 ^a	150-160	- 14.7	0.38	108	91.7	200-211	- 5.5
105	50 ^a	149-155	- 9.9	0.44	109	96.8	189-196	+ 0.06
106	39.1 ^b	142-149	- 12.0	0.77	110	97.7	182-199	- 4.7

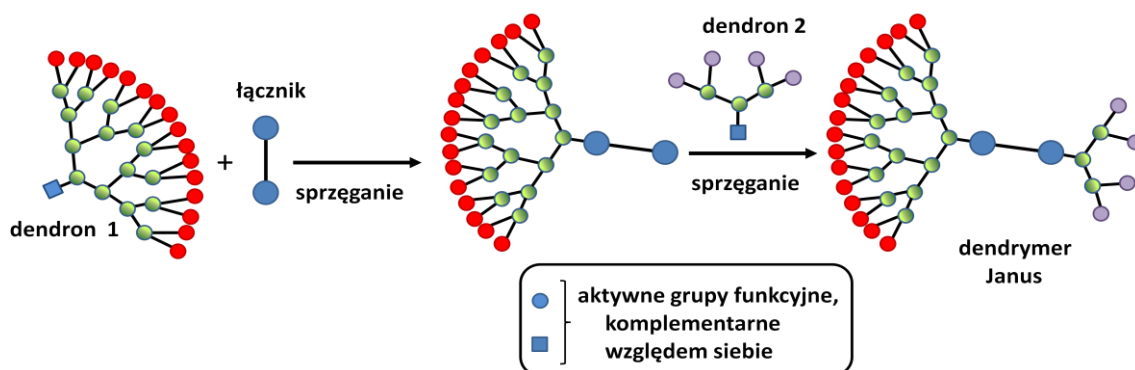
^{a, b} po oczyszczeniu na kolumnie silikażelowej z użyciem fazy CHCl₃/MeOH : ^a 8:1; ^b gradient 50:1→10:1



Rysunek 37. Przesunięcia chemiczne atomów węgla i wodoru reszt kwasu 4-(Boc-amino)-benzoesowego w dendrymerach **103** – **105** oraz reszt kwasu p-aminobenzoowego w dendrymerach **107** – **109** na podstawie widm NMR wykonanych w MeOD (dla dendrymerów **106** i **110** widma zostały zmierzone w DMSO i niektóre wartości δ nieznacznie różnią się od podanych).

3.3.4. Synteza dendrymerów typu Janus

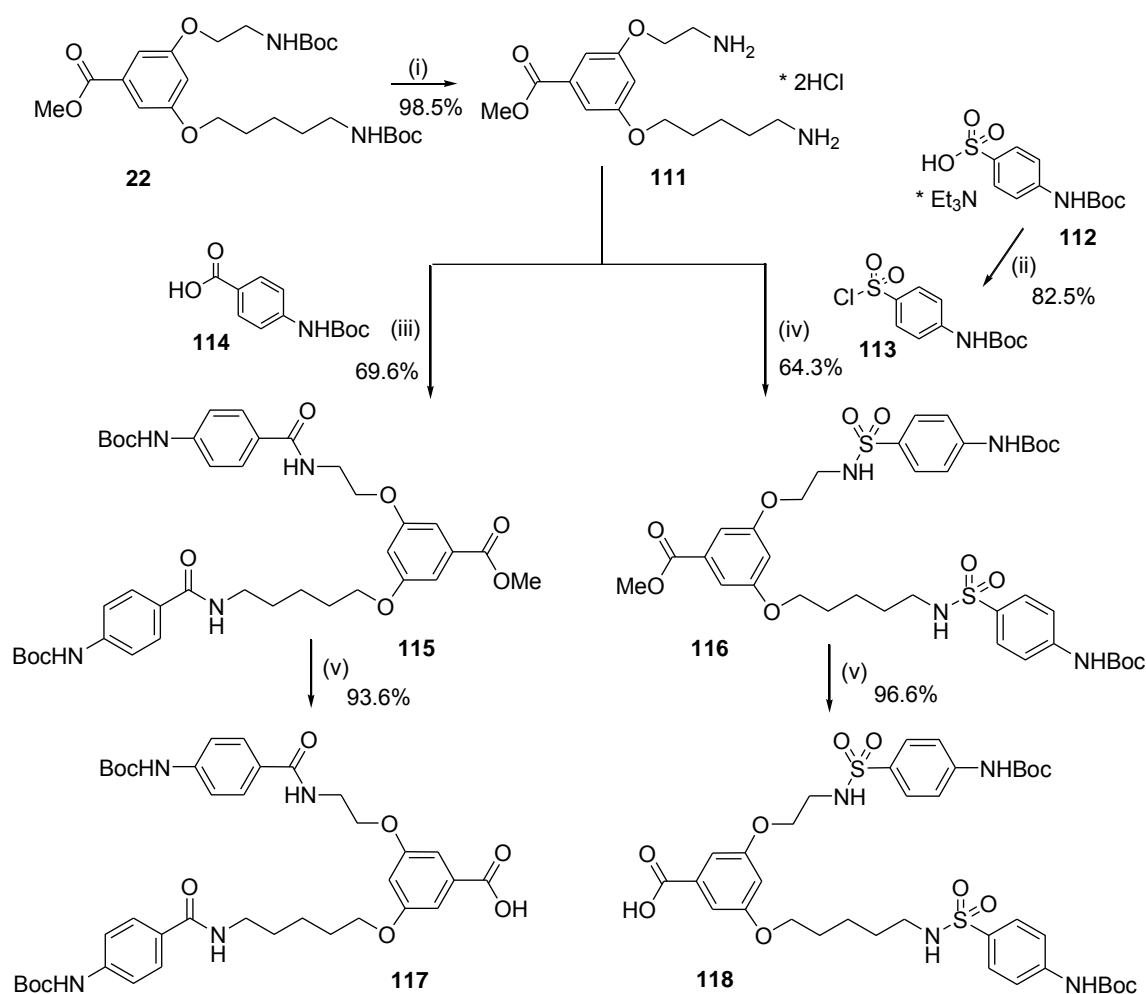
Dendrymery Janus (Rozdział 1.1.3.) cieszą się dużym zainteresowaniem w obszarze biomedycznym. Obecność dwóch różnych funkcyjności w cząsteczce pozwala, np. na realizację tzw. terapii celowanej czy terapii skojarzonej. Jedną z metod syntezy tego typu dendrymerów polega na sprzęgnięciu ze sobą dwóch różnych dendronów („dendron 1”, „dendron 2”) za pomocą łącznika (Schemat 37).



Schemat 37. Synteza dendrymerów typu Janus według jednej z głównych metod.

Powyższą metodę wykorzystałam do syntezy dendrymerów Janus mających z założenia posiadać działanie przeciwbakteryjne przy jednocześnie niskim stopniu toksyczności wobec organizmów eukariotycznych. Otrzymane dendrymery zawierają „dendron 1” odpowiedzialny za działanie przeciwbakteryjne oraz „dendron 2” pełniący funkcję ligandu kierunkowego, tj. posiadającego powinowactwo do komórek bakteryjnych. Rolę „dendronu 1” pełni w nich dendrymer z terminalnymi resztami lizynowymi **45** (Rozdział 3.3.1.) lub dendrymer z terminalnymi resztami tryptofanowymi **75** (Rozdział 3.3.2.). Natomiast „dendron 2” to związek posiadający w swojej strukturze dwie reszty kwasu p-aminobenzoowego (**117**) lub kwasu p-aminobenzenosulfonowego (**118**). W funkcji łącznika występuje etylenodiamina (EDA) bądź 2,2'-(etylenodioksy)dietyloamina (NOON).

„Dendrony 2”, tj. związki **117** i **118**, przygotowałam wychodząc z 3-[5-(Boc-amino)pentoksy]-5-[2-(Boc-amino)etoksy]benzoesu metylu (**22**) (Rozdział 3.2.) zgodnie z procedurą przedstawioną na Schemacie 38.



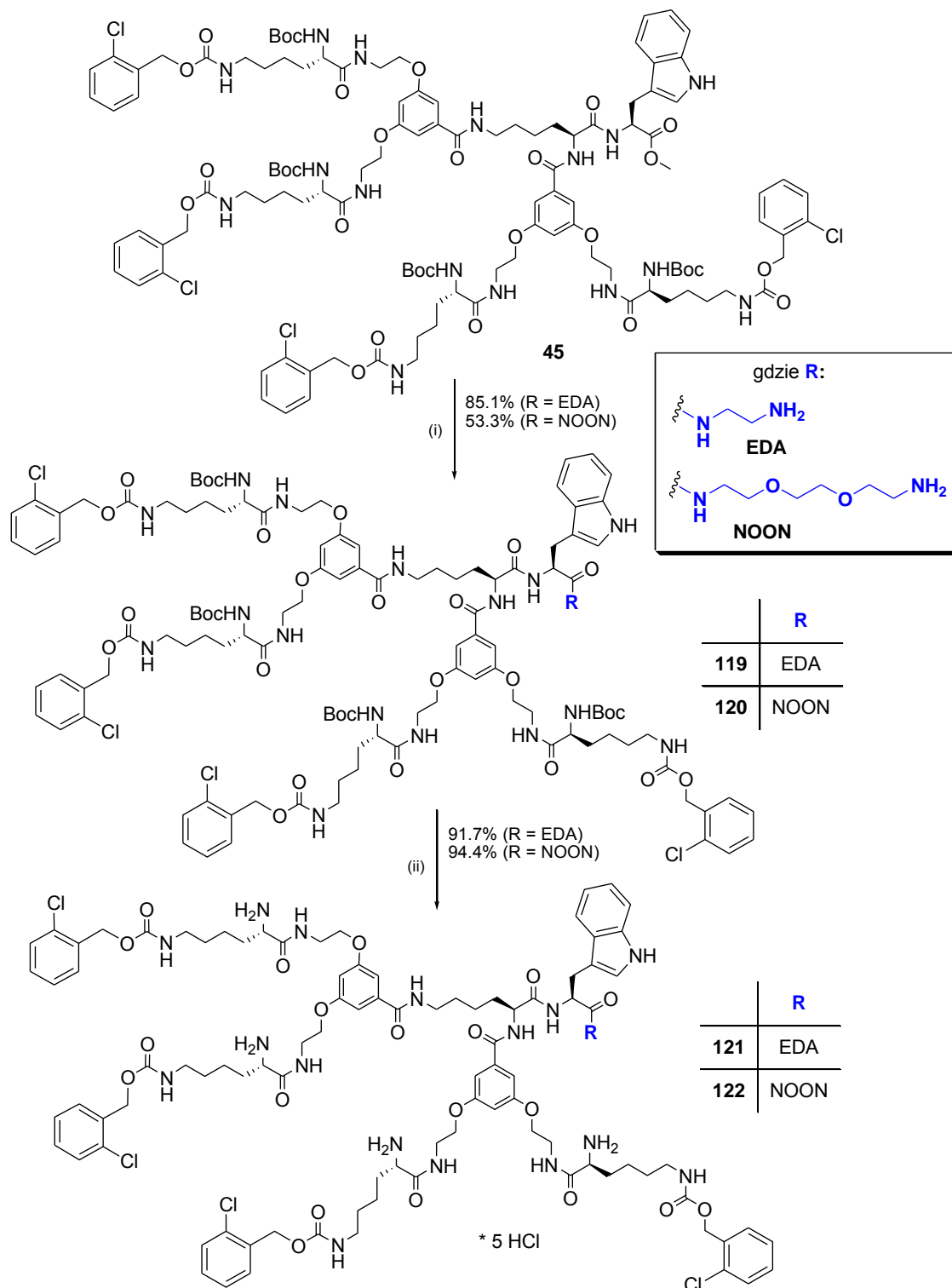
Schemat 38. Synteza „dendronów 2” **117** i **118**. (i) nas. HCl/EtOAc; (ii) chlorek cyjanurowy, Et₃N, aceton, t. wrz., 20 godz.; (iii) EDC/HOBt, Et₃N, DMF, 96 godz.; (iv) Et₃N, CH₂Cl₂/DMF, t. pok.; 48 godz.; (v) 1) 1M NaOH, MeOH, 50 °C; 2) 1M HCl.

W pierwszym etapie przeprowadziłam deprotekcję grup Boc w związku **22** przy użyciu nasyconego roztworu HCl w EtOAc, a następnie sprzęganie otrzymanego związku **111** z kwasem 4-(Boc-amino)benzoesowym (**114**) lub chlorkiem 4-(Boc-amino)benzenosulfonowym (**113**). W pierwszym przypadku reakcja sprzęgania zachodziła z zastosowaniem metody EDC/HOBt z Et₃N w DMF. Produkt tej reakcji, tj. związek **115**, po oczyszczeniu chromatograficznym otrzymałam z wydajnością 69.6% w postaci białego proszku. Natomiast w wyniku reakcji sprzęgania związku **111** z chlorkiem **113**, prowadzonej w obecności Et₃N w układzie CH₂Cl₂/DMF, uzyskiwałam ester **116** w postaci żółtego oleju z wydajnością wynoszącą po etapie oczyszczania chromatograficznego 64.3%. Substrat do powyższej reakcji - chlorek **113**, przygotowałam działając na kwas 4-(Boc-amino)benzenosulfonowy (**112**) 2,4,6-trichloro-1,3,5-triazyną (chlorkiem cyjanurowym) w obecności Et₃N. W ostatnim etapie estry **115** i **116** poddałam zasadowej hydrolizie, która doprowadziła do produktów finalnych, tj. „dendronów 2” **117** i **118**. Oba związki zostały otrzymane jako bezpostaciowe proszki z wydajnością odpowiednio 93.6% i 96.6%.

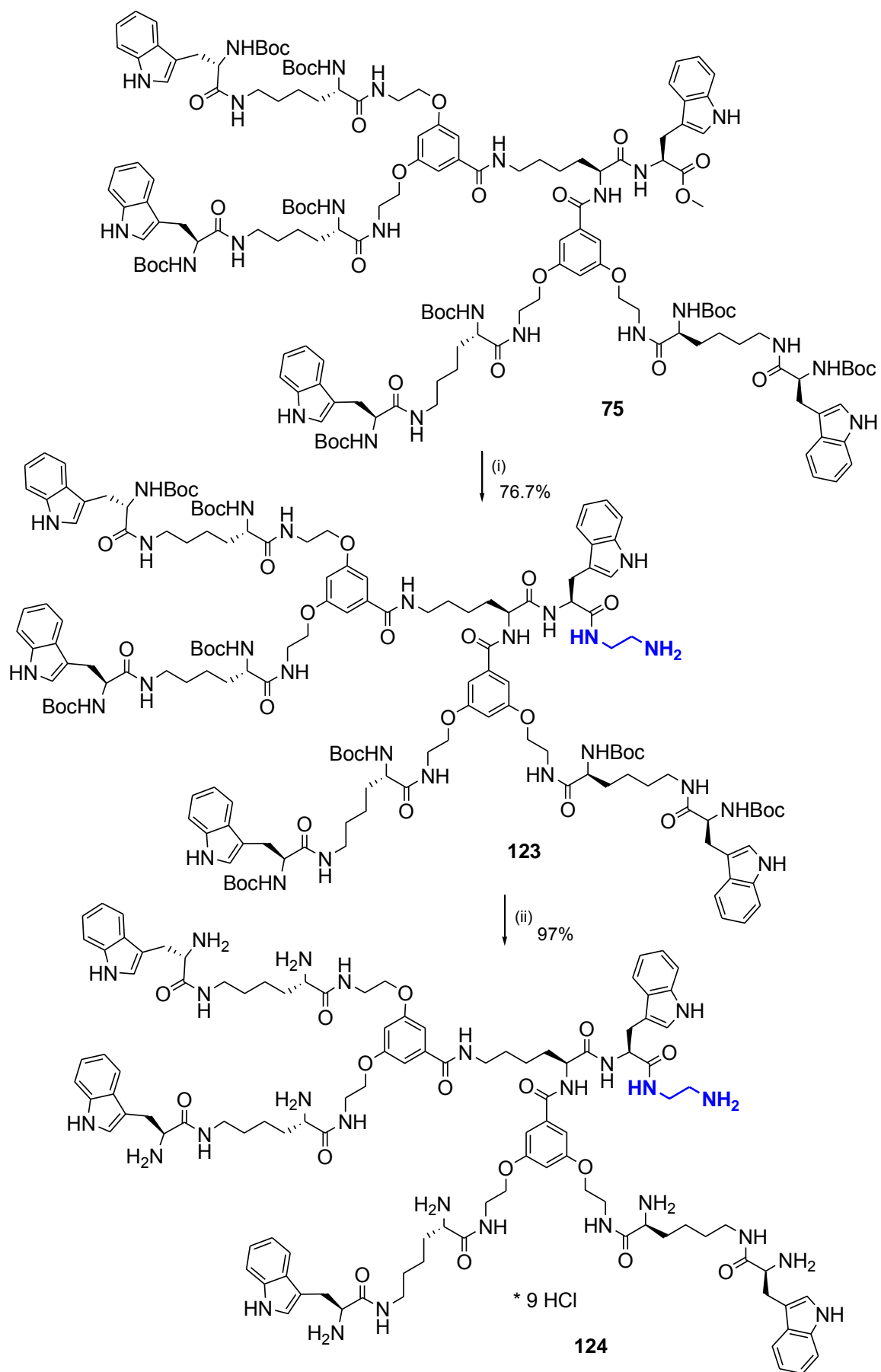
Dysponując przygotowanymi „dendronami” przystąpiłam do syntezy dendrymerów Janus. Pierwszy etap obejmował aminolizę grupy estrowej „dendronów 1”, tj. związków **45** i **75**, z użyciem dużego nadmiaru etylenodiaminy (EDA) lub 2,2'-(etylenodioksy)dietyloaminy (NOON) w metanolu (Schemat 39 i 40). Reakcje przeprowadziłam wkraplając metanolowe roztwory „dendronów 1” do oziębionego do 0 °C roztworu EDA (100-krotny nadmiar molowy) lub NOON (300-krotny nadmiar molowy), a następnie kontynuując mieszanie w temperaturze pokojowej przez 5 dni (dla reakcji z EDA) lub w 60 °C przez 4 dni (dla reakcji z NOON). Po oczyszczeniu chromatograficznym otrzymałam dendrymery pośrednie („dendron 1” + łącznik) **119**, **120** i **123** w postaci białych proszków z wydajnościami odpowiednio 85.1%, 53.3% i 76.7%. Ich strukturę potwierdziłam na podstawie widm ESI MS, w których główne sygnały pochodzą od jonów podwójnie naładowanych typu $[M + H^+ + Na^+]^{2+}$.

Jak zostało zaznaczone w Rozdziale 1.3.3, rodzaj aminy umieszczonej na C-końcu dendrymeru ma istotny wpływ na jego aktywność biologiczną. Efekt wywierany przez etylenodiaminę czy 2,2'-(etylenodioksy)dietyloaminę nie był dotychczas przedmiotem badań. Z tego względu niewielką ilość każdego z dendrymerów pośrednich **119**, **120** i **123** poddałam reakcji Boc-deprotekcji, a następnie odbezpieczone dendrymery **121**, **122** i **124** przekazałam na badania biologiczne. Wspomnianą deprotekcję przeprowadziłam rozpuszczając związek w minimalnej ilości metanolu i dodając nasycony roztwór HCl w EtOAc (Schemat 39 i 40). Odbezpieczone dendrymery **121** i **122**, występujące w postaci pentachlorowodorków, zaś dendrymer **124** jako nonachlorowodorek, uzyskałam z wydajnościami w zakresie 91.7 – 97%.

Scharakteryzowałam je za pomocą widm ESI MS i NMR. Diagnostycznymi sygnałami w widmie ^{13}C NMR, świadczącymi o obecności reszt EDA lub NOON w dendrymerze, są piki przy 38.1 ppm ($\text{NH-CH}_2\text{-CH}_2\text{-NH}_2$) i 40.6 ppm ($\text{NH-CH}_2\text{-CH}_2\text{-NH}_2$) lub piki przy 67.8, 70.3 i 71.3 ppm ($4\times\text{OCH}_2$).



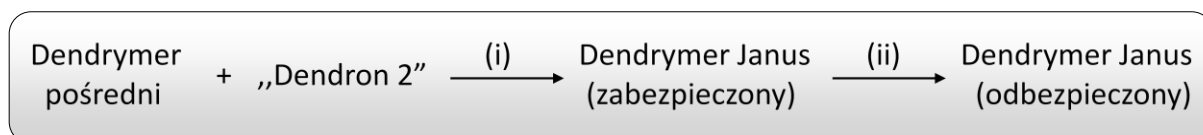
Schemat 39. Synteza dendrymerów pośrednich. (i) EDA, MeOH, t. pok., 10 dni lub NOON, MeOH, 60 °C, 4 dni; (ii) nas. HCl/EtOAc.



Schemat 40. Synteza dendrymerów pośrednich. (i) EDA, MeOH, t. pok., 10 dni; (ii) nas. HCl/EtOAc.

Pozostałą ilość dendrymerów pośrednich **119**, **120** i **123** wykorzystałam w kolejnym etapie syntezy dendrymerów Janus (Tabela 7). Polegał on na sprzęgnięciu ich z „dendronem 2”, tj. ze związkiem **117** lub **118**. Reakcję sprzęgania prowadziłam z zastosowaniem metody EDC/HOBt w DMF z Et₃N. W celu osiągnięcia lepszych wydajności, niezbędne okazało się użycie niewielkiego nadmiaru Et₃N (0.9 ekw.).

Tabela 7. Synteza dendrymerów Janus **125 – 136**.



(i) EDC/HOBt, Et₃N, DMF, 3 – 5 dni; (ii) nas. HCl/EtOAc.

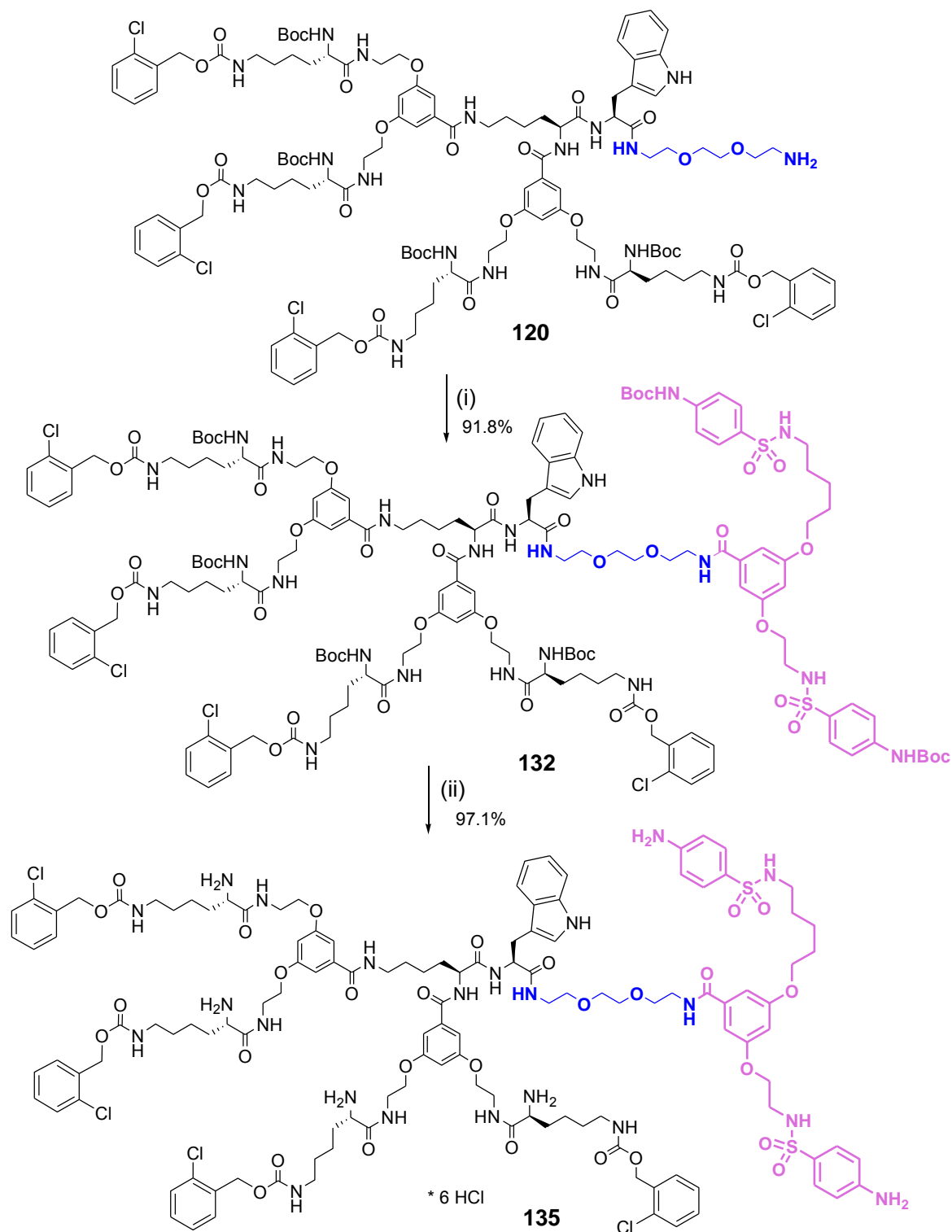
Dendrymer pośredni („dendron 1” + łącznik)	„Dendron 2”	Dendrymer Janus (zabezpieczony)	Dendrymer Janus (odbezpieczony)
119	117	125	128
120		126	129
123		127	130
119	118	131	134
120		132	135
123		133	136

Otrzymane produkty sprzęgania **125 – 127** i **131 – 133**, po oczyszczeniu chromatograficznym obejmującym zarówno sączenie molekularne, jak i chromatografię kolumnową z silikażelem, poddałam Boc-deprotekcji prowadzącej do związków finalnych **128 – 130** i **134 – 136** (Tabela 7). Opisane etapy syntezy dendrymerów Janus z dendrymerów pośrednich przedstawione są na Schemacie 41 na przykładzie związku **135**.

Dendrymery Janus **125 – 127** i **131 – 133**, uzyskane z wydajnościami w zakresie 82.8% - 91.8%, to kremowe lub jasnożółte, bezpostaciowe proszki bez ostrej temperatury topnienia (Tabela 8). Ich odpowiedniki odbezpieczone występują w postaci higroskopijnych heksachlorowodorków (**128**, **129**, **134**, **135**) lub dekachlorowodorków (**130**, **136**).

Podstawową metodą analityczną potwierdzającą strukturę dendrymerów Janus **125 – 136** była spektrometria mas (ESI MS). W widmach dendrymerów zabezpieczonych **125 – 127** i **131 – 133** obserwuje się słabe sygnały od jonów pseudomolekularnych, główne sygnały pochodzą od jonów podwójnie naładowanych typu [M + 2Na]²⁺. Z kolei w widmach

dendrymerów odbezpieczonych **128** – **130** i **134** – **136** obecne są wyłącznie sygnały od jonów wielokrotnie naładowanych, wśród których piki odpowiadające $[M + 3H]^{3+}$ lub $[M + 4H]^{4+}$ posiadają największą intensywność.



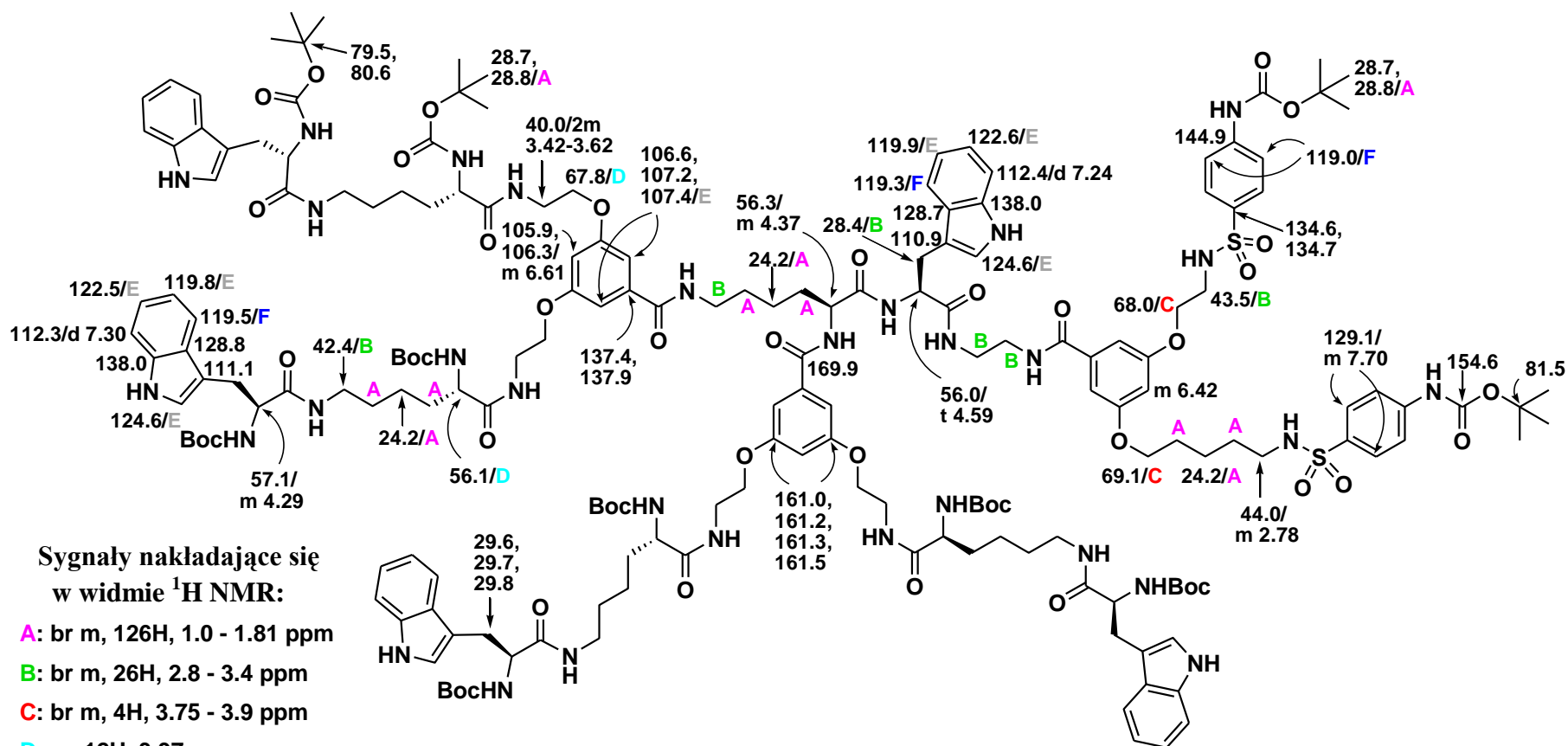
Schemat 41. Synteza dendrymerów Janus na przykładzie dendrymeru **135**. (i) EDC/HOBt, Et₃N, DMF, 3 dni; (ii) nas. HCl/EtOAc.

Tabela 8. Dane dotyczące dendrymerów **125 – 136**.

Dendrymery zabezpieczone					Dendrymery odbezpieczone			
Nr	Wyd. [%]	T. top. [°C]	$[\alpha]_D^{25}$ (c 1, MeOH)	R_f [CHCl ₃ /MeOH 8:1]	Nr	Wyd. [%]	T. top. [°C]	$[\alpha]_D^{25}$ (c 1, MeOH)
125	85.9	119-126	- 13.7	0.37	128	92.3	162-175	- 10
126	82.8	110-119	- 10.5	0.30	129	96.3	149-155	- 5.1
127	89.2	146-151	- 7.0	0.43	130	97.2	209-220	+ 11.2
131	85.5	114-122	- 11.6	0.30	134	96.2	148-162	- 9.6
132	91.8	109-115	- 9.6	0.52	135	97.1	139-147	- 6.3
133	85.7	123-130	- 6.7	0.53	136	89.3	196-204	+ 10.4

Widma ¹H NMR dendrymerów są mało diagnostyczne ze względu na znaczne nakładanie się sygnałów, zwłaszcza w zakresie alifatycznym. Widma ¹³C NMR są zdecydowanie bardziej czytelne. Wykorzystanie widma DEPT oraz widm korelacyjnych HSQC i COSY umożliwia przypisanie sygnałów do niemal wszystkich atomów węgla, a stąd i do odpowiednich protonów w cząsteczce (Rysunek 38).

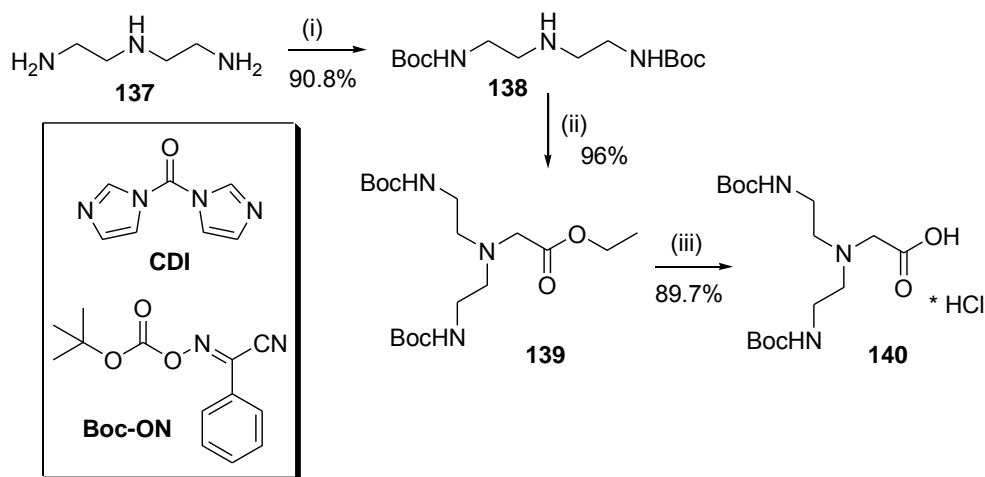
Pełną deprotekcję w przypadku dendrymerów **128 – 130** i **134 – 136** potwierdza w widmach NMR zanik charakterystycznych sygnałów pochodzących od grupy Boc, tj. w widmie ¹H NMR - intensywnych singletów w zakresie 1.33 – 1.50 ppm [C(CH₃)₃], zaś w widmie ¹³C NMR – sygnałów przy 28.7 i 28.8 ppm [C(CH₃)₃] oraz w zakresie 79.5 – 81.5 ppm [C(CH₃)₃].



Rysunek 38. Przesunięcia chemiczne atomów węgla i wodoru w widmach NMR dendrymeru Janus **133**.

3.4. NOWE RDZENIE O CHARAKTERZE KATIONOWYM

Opracowana przeze mnie metoda syntezy nowych rdzeni o charakterze kationowym zakładała przygotowanie w pierwszym etapie elementu rozgałęziającego opartego na dietylenotriaminie, tj. chlorowodoru kwasu 2-{bis[2-(Boc-amino)etylo]amino}octowego (**140**). Zsyntetyzowałam go na drodze 3-etapowej, obejmującej selektywną ochronę pierwszorzędowych grup aminowych dietylenotriaminy (**137**), *N*-alkilowanie związku **138** przy użyciu bromooctanu etylu oraz hydrolizę estru **139** (Schemat 42).

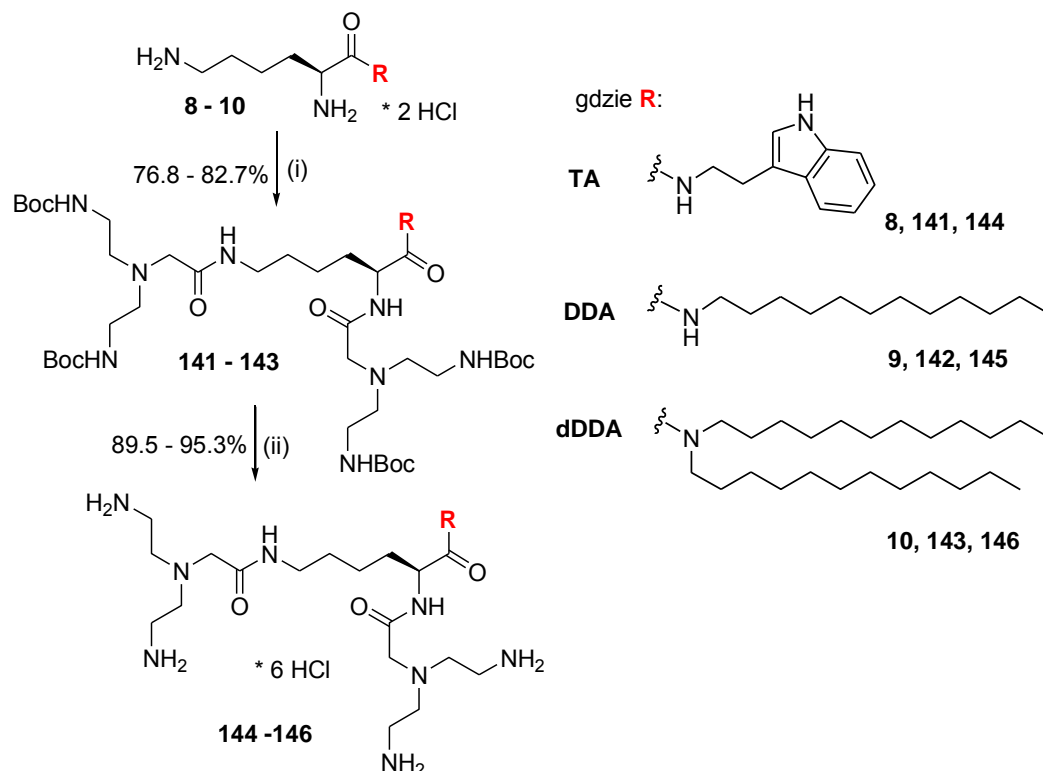


Schemat 42. Synteza chlorowodoru kwasu 2-{bis[2-(Boc-amino)etylo]amino}octowego (**140**).
(i) Boc-ON, Et₃N, THF, 0 °C - 1 godz., t. pok. - 1 godz.; (ii) bromooctan etylu, CH₃CN, DIPEA, t. pok., 30 min.; (iii) 1) 1M NaOH, MeOH, 50 °C; 2) 1M HCl.

Reakcję selektywnego wprowadzenia ochron Boc na 1-rzędowe grupy aminowe dietylenotriaminy (**137**) początkowo przeprowadziłam zgodnie z procedurą podaną przez Rannard'a i Davis'a, tj. za pomocą imidazolokarboksylanu tert-butyłu generowanego *in situ* w reakcji tert-BuOH z 1, 1'-karbonylodiimidazolem (CDI).¹⁵⁵ W jej wyniku otrzymałam bis[2-(Boc-amino)etylo]aminę (**138**) z wydajnością 28.2% (lit. 95.4%¹⁵⁵). Prawdopodobną przyczyną niskiej wydajności reakcji była słaba jakość użytego reagenta – CDI, który mógł ulec w znacznym stopniu hydrolizie w trakcie przechowywania. W związku z tym powtórzyłam reakcję zabezpieczania 1-rzędowych grup aminowych dietylenotriaminy (**137**) stosując alternatywną metodologię przy użyciu 2-(Boc-oksymino)-2-fenylacetonytrylu (Boc-ON).¹⁵⁶ Produkt **138**, po oczyszczeniu za pomocą chromatografii kolumnowej na silikażelu, otrzymałam w postaci bezbarwnego oleju z wydajnością 90.8%. Podałam go reakcji *N*-alkilowania bromooctanem etylu prowadzącej do 2-{bis[2-(Boc-amino)etylo]amino}octanu etylu (**139**), który uzyskałam z wydajnością 96%. W wyniku zasadowej hydrolizy związku

139 otrzymałam produkt finalny **140** mający postać białego proszku. Całkowita wydajność dla trzech etapów syntezy elementu rozgałęziającego **140** wyniosła 92.2% (Schemat 42).

Następnie chlorowodorek kwasu 2-{bis[2-(Boc-amino)etylo]amino}octowego (**140**) wykorzystałam jako komponent kwasowy do syntezy rdzeni. W roli komponentów aminowych użyłam dichlorowodorków amidów *L*-lizyny i związku nieaminokwasowego **8** – **10**, otrzymanych zgodnie z procedurą podaną w Rozdziale 3.2. Reakcje sprzęgania prowadziłam klasyczną metodą z zastosowaniem DCC i HOBt w DMF oraz trietyloaminy jako zasady wymaganej do przeprowadzenia reagentów do ich postaci wolnych (Schemat 43). Otrzymane w ich wyniku surowe rdzenie **141** – **143** oczyszczałam chromatograficznie (silikażel, CHCl₃/MeOH, gradient 100:1→15:1) uzyskując czyste związki w postaci białych proszków (**141**) lub bezbarwnych olejów (**142**, **143**) z wydajnościami rzędu 76.8 – 82.7%.



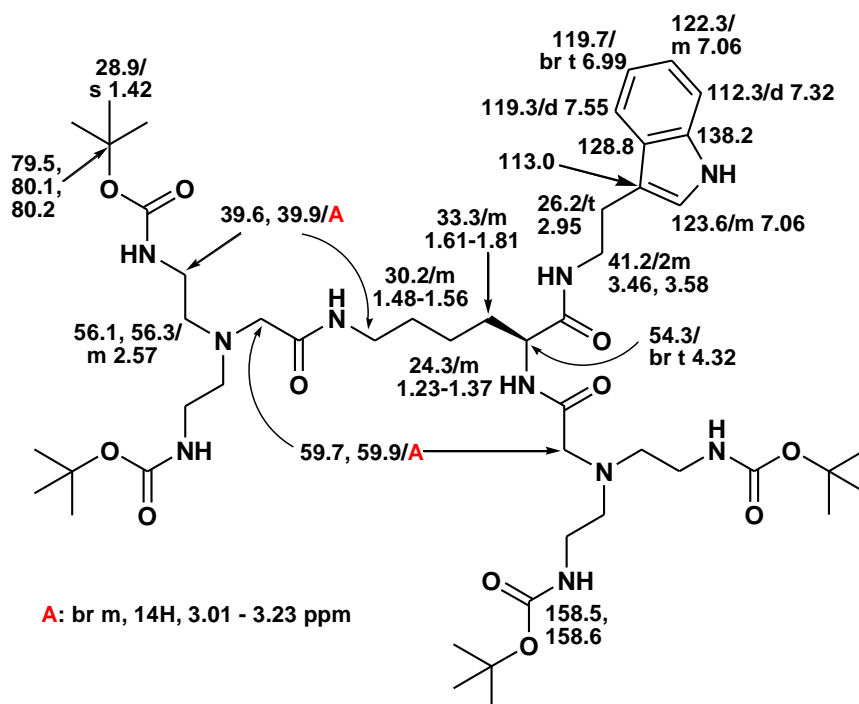
Schemat 43. Synteza rdzeni: heksachlorowodorków *N, N'*-bis{[bis(2-aminoetylo)amino]metylokarbonylo} amidów *L*-lizyny i związku nieaminokwasowego (**144** - **146**). (i) **140**, DCC/HOBt, Et₃N, DMF, 48 godz.; (ii) nas. HCl/EtOAc.

W ostatnim etapie przeprowadziłam deprotekcję osłon grup aminowych rdzeni **141** – **143** za pomocą nasyconego roztworu HCl w EtOAc w celu uzyskania reaktywnych substratów do syntezy dendrymerów (Schemat 43). Odbezpieczone rdzenie **144** – **146**, występujące jako heksachlorowodorki, otrzymałam z wydajnościami rzędu 89.5 – 95.3%.

Synteza dendrymerów opartych na tych strukturach, będących analogami dendrymerów opartych na rdzeniach o charakterze hydrofobowym (Rozdział 3.3.1. i 3.3.2.), umożliwia zbadanie wpływu rodzaju rdzenia na aktywność biologiczną.

Struktury wszystkich rdzeni **141** – **146** zostały potwierdzone na podstawie widm ESI MS. W widmach masowych *N, N'*-bis({bis[2-(Boc-amino)etylo]amino}metylokarbonylo)amidów *L*-lizyny i związku nieaminokwasowego (**141** – **143**) obserwuje się zarówno sygnały pseudomolekularne typu $[M + Na^+]$, $[M + H^+]$, jak i sygnały pochodzące od jonów wielokrotnie naładowanych typu $[M + 2Na]^{2+}$, $[M + H + Na]^{2+}$ czy $[M + 2H]^{2+}$, przy czym piki odpowiadające $[M + Na^+]$ cechują się największą intensywnością. Z kolei w widmach rdzeni odbezpieczonych **144** – **146** występują wyłącznie sygnały pseudomolekularne typu $[M + Na^+]$ i $[M + H^+]$.

Dla rdzeni **141** – **143** wykonano również widma 1H i ^{13}C NMR. W przypadku związku **141**, posiadającego na C-końcu tryptaminę, możliwe jest jednoznaczne przypisanie prawie wszystkich sygnałów (Rysunek 39). Większe trudności interpretacyjne stanowią widma dla rdzeni **142** i **143**, posiadających jako C-koniec odpowiednio dodecyloaminę i didodecyloaminę. W tym przypadku widma 1H NMR są mało czytelne z powodu nakładania się sygnałów pochodzących od DDA lub dDDA na sygnały pochodzące od pozostałej części rdzenia. Pomimo to, dzięki widmom korelacyjnym COSY i HSQC możliwe jest potwierdzenie ich struktury.



Rysunek 39. Przesunięcia chemiczne atomów węgla i wodoru w widmach NMR rdzenia **141**.

Dużą wartość diagnostyczną mają sygnały pochodzące od atomów α lizyny, które pozwalają na szybkie rozróżnienie rdzenia posiadającego na C-końcu dodecyloaminę od rdzenia z didodecyloaminą na C-końcu. Sąsiedztwo dDDA przesuwają położenie zarówno sygnału atomu wodoru (α CH), jak i węgla (α C) w kierunku wyższego pola. W przypadku związku **142** sygnały α CH i α C występują odpowiednio przy 3.50 i 47.6 ppm, podczas gdy dla związku **143** obserwuje się wspomniane sygnały przy 4.36 i 52.6 ppm.

3.5. SYNTEZA DENDRYMERÓW OPARTYCH NA RDZENIACH KATIONOWYCH

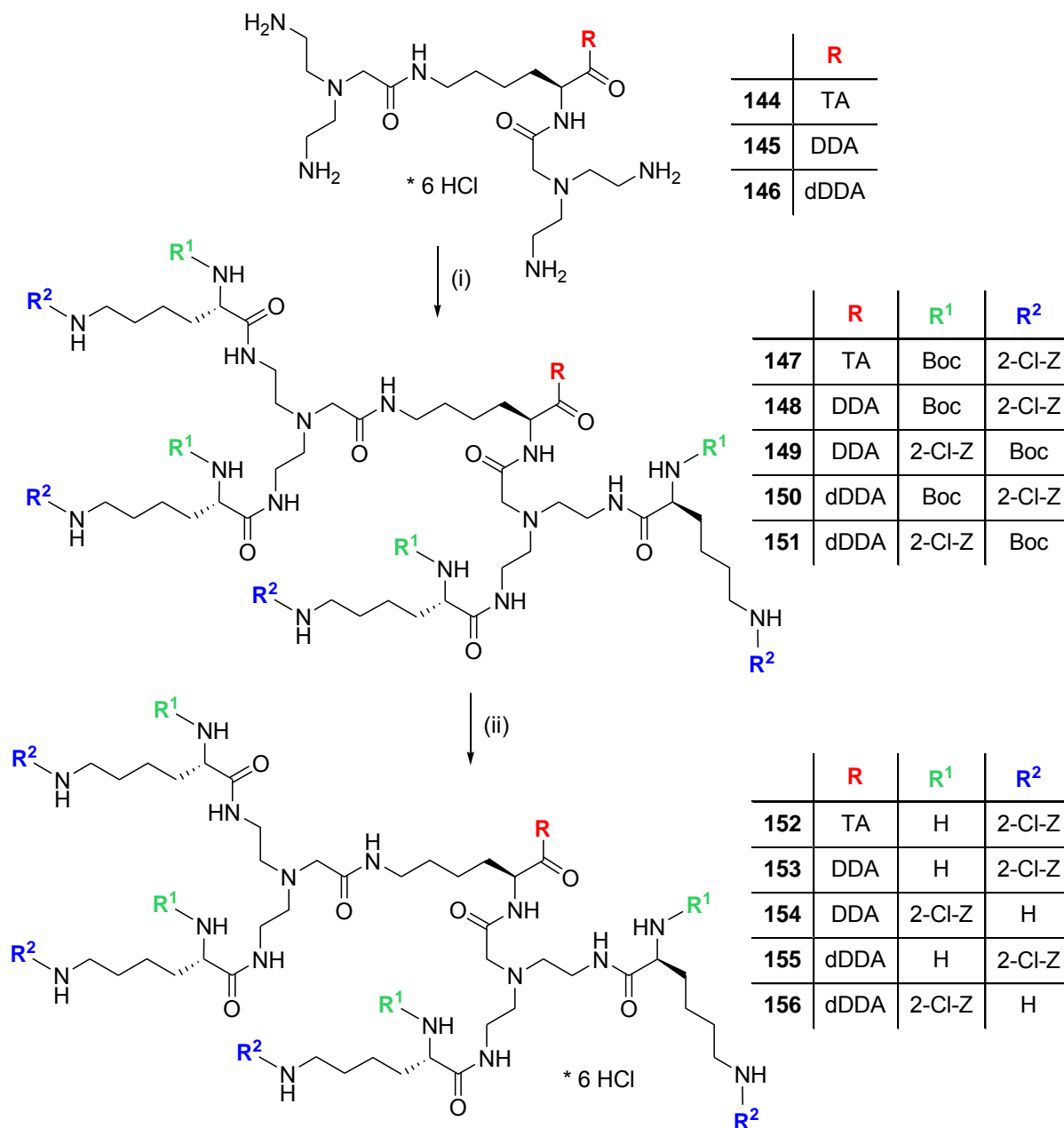
3.5.1. Synteza dendrymerów z terminalnymi resztami lizynowymi

Wykorzystując odbezpieczone rdzenie o charakterze kationowym **144 – 146** zsyntetyzowałam nowe dendrymery z terminalnymi resztami lizynowymi **152 – 156** (Schemat 44). Pozwalają one na prześledzenie wpływu konkretnego elementu strukturalnego na aktywność biologiczną związku, tj.

- rodzaju terminalnego elementu rozgałęziającego – dzięki parze dendrymerów **153 – 154** i **155 – 156**. Są to pary izomerów różniących się tylko rozmieszczeniem aromatycznych grup zabezpieczających na terminalnych resztach lizynowych, tj. dendrymery z grupą zabezpieczającą 2-Cl-Z umieszczoną na atomie N^a lub N^c rozgałęziającej lizyny.
- rodzaju aminy (tryptamina dodecyloamina, didodecyloamina) umieszczonej na C-końcu dendrymeru – dzięki porównaniu aktywności par związków **152 – 153**, **152 – 155**, **153 – 155** i **154 – 156**.
- rodzaju rdzenia (charakter hydrofobowy / kationowy) – dzięki porównaniu aktywności odnotowanych dla dendrymerów zsyntetyzowanych na rdzeniach kationowych i dla dendrymerów opartych na rdzeniach hydrofobowych (Rozdział 3.3.1.), będących ich analogami różniącymi się tylko częścią wewnętrzną, tj. dla par **152 – 48**, **152 – 49** i **153 – 50**.

Dodatkowo, porównanie właściwości biologicznych dendrymerów opartych wyłącznie na rdzeniach kationowych – tych otrzymanych przeze mnie z tymi zsyntetyzowanymi wcześniej w naszym zespole (Rozdział 1.3.3.), np. par **152 – D2_(n=4)**, **153 – B2** i **154 – B1**, pozwala ocenić wpływ innych niż ładunek rdzenia parametrów strukturalnych na aktywność związku.

Synteze wspomnianych powyżej dendrymerów z terminalnymi resztami lizynowymi zrealizowałam w wyniku reakcji sprzęgania rdzeni **144** – **146** z ortogonalnie zabezpieczoną lizyną Boc-Lys(2-Cl-Z)-OH lub (2-Cl-Z)-Lys(Boc)-OH, z użyciem DCC i HOBt w DMF (Schemat 44).



Schemat 44. Synteza dendrymerów z terminalnymi resztami lizynowymi (**147 - 151**, **152 - 156**).
 (i) Boc-Lys(2-Cl-Z)-OH lub (2-Cl-Z)-Lys(Boc)-OH, DCC/HOBt, Et₃N, DMF, 2 - 6 dni; (ii) nas.
 HCl/EtOAc.

Ze względu na własności fizykochemiczne heksachlorowodorków rdzeni, tj. ich bardzo słabą rozpuszczalność w innych niż metanol rozpuszczalnikach organicznych, konieczne było zastosowanie dużego nadmiaru trietyloaminy (22 ekwiwalenty). Dodatkowo, w przypadku

reakcji prowadzonych z rdzeniem **145**, czyli posiadającym na C-końcu dodecyloaminę, niezbędne okazało się wydłużenie czasu reakcji do 6 dni. Produkty sprzęgania **147 – 151** oczyszczałam chromatograficznie, najpierw stosując sączenie molekularne z użyciem kolumny z wypełnieniem Sephadex LH-20 i MeOH jako eluentem, a następnie chromatografię kolumnową z silikażelem i fazą CHCl₃/MeOH (gradient 100:1→25:1). Tym sposobem otrzymałam czyste dendrymery **147 – 151**, mające postać kremowych lub jasnożółtych, bezpostaciowych proszków, z wydajnościami w zakresie 57.9 – 74.6% (Tabela 9). Podałam je następnie reakcji selektywnej Boc-deprotekcji z użyciem nasyconego roztworu HCl w EtOAc. Finalne dendrymery **152 – 156** (heksachlorowodorki), uzyskane z wydajnościami rzędu 92.4 – 97.5%, to higroskopijne, bezpostaciowe proszki. Godne uwagi są różnice w ich właściwościach fizykochemicznych w zależności od rozmieszczenia grup zabezpieczających (2-Cl-Z) na terminalnych resztach lizynowych (Tabela 9). Dendrymery z grupą 2-Cl-Z umieszczoną na atomie N^d rozgałęziającej lizyny (**154, 156**) charakteryzują się ujemnymi wartościami skręcalności właściwej, jak również większą polarnością w porównaniu do ich izomerów posiadających grupę 2-Cl-Z na atomie N^c rozgałęziającej lizyny (**152, 153, 155**) i wykazujących dodatnie wartości skręcalności właściwej.

Tabela 9. Dane dotyczące dendrymerów **147 – 156**.

Dendrymer zabezpieczony	Wyd. [%]	T. top. [°C]	$[\alpha]_D^{25}$ (c 1, MeOH)	R _f
147	74.6	89 – 93.1	- 7.2	0.41 ^a
148	73.6	75.1 – 77.4	- 2.5	0.36 ^a
149	69.8	64.4 – 72.1	- 4.2	0.36 ^a
150	57.9	66.8 – 67.8	- 2.9	0.34 ^a
151	64.2	76.1 – 78.5	+ 0.14	0.34 ^a
D. odbezpieczony				
152	96.1	143 – 147.5	+ 20.3	0.42 ^b
153	92.4	140 – 144.5	+ 20.3	0.44 ^b
154	94.4	142.6 – 144.1	- 6.6	- ^c
155	95.5	140.3 – 143.1	+ 15.6	0.47 ^b
156	97.5	134.2 – 138.1	- 4.9	- ^c

^a CHCl₃/MeOH (8:1); ^b n-BuOH/AcOH/H₂O (3:1:1); ^c związek znajduje się na starcie w układzie n-BuOH/AcOH/H₂O (3:1:1);

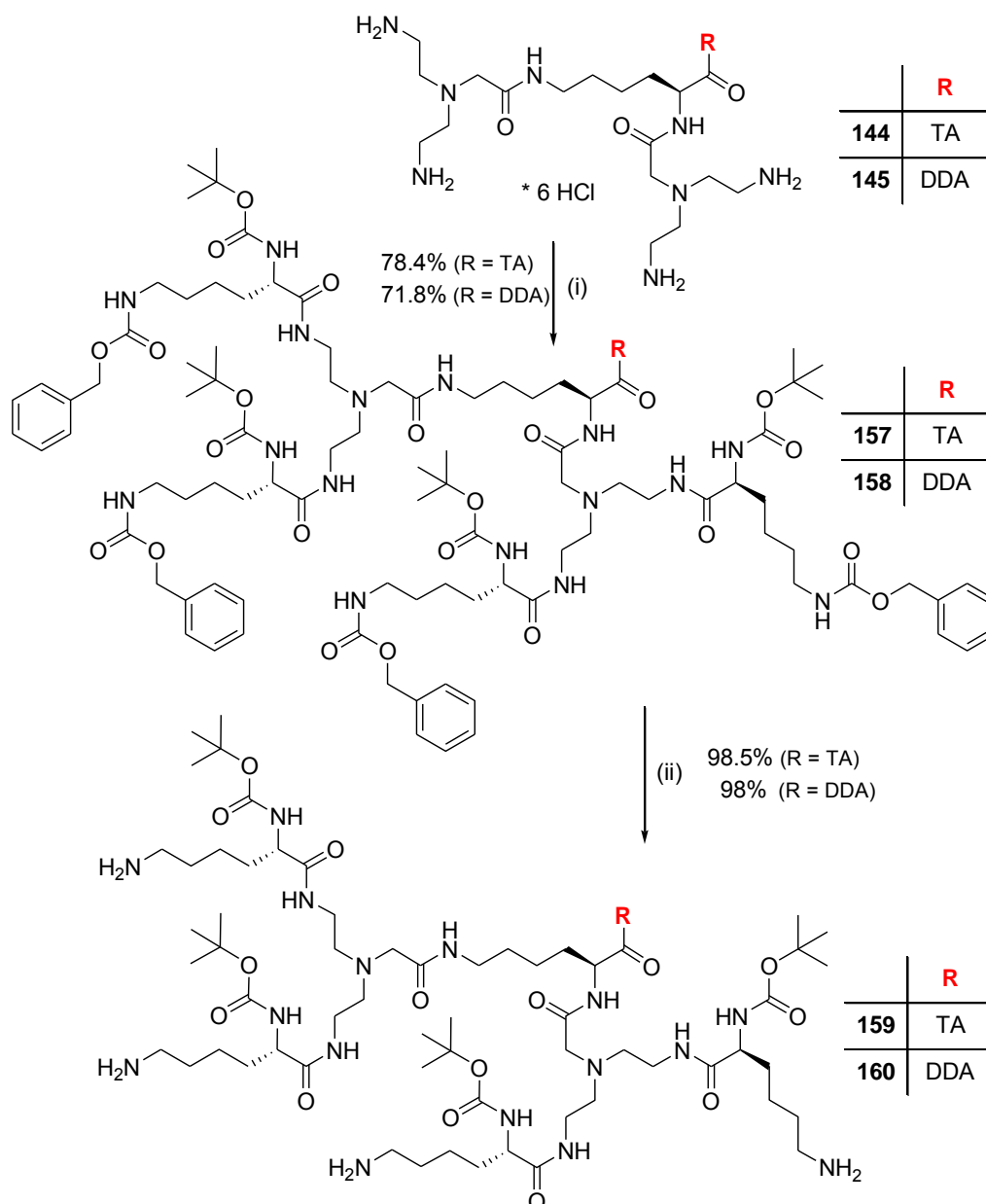
Struktury wszystkich otrzymanych dendrymerów z terminalnymi resztami lizynowymi (**147** – **156**) potwierdziłam w oparciu o wyniki analizy widm MS i NMR.

W widmach ESI MS dendrymerów **147** - **151** sygnałami o największej intensywności są te pochodzące od jonów dwukrotnie naładowanych typu $[M + 2Na]^{2+}$, z kolei piki odpowiadające $[M + 3H]^{3+}$ występują jako główne w widmach dendrymerów odbezpieczonych **152** - **156**.

Widma 1H i ^{13}C NMR dendrymerów **147** – **156**, dzięki wykorzystaniu widm DEPT oraz HSQC i COSY, pozwalają na potwierdzenie ich struktury, chociaż jednoznaczne przypisanie wszystkich sygnałów nie jest możliwe, np. zróżnicowanie sygnałów węgla β , γ , δC pochodzących od rdzenia, od tych należących do gałązek lizynowych. Do najbardziej charakterystycznych sygnałów w widmie ^{13}C NMR należą te pochodzące od aromatycznych grup zabezpieczających (2-Cl-Z). Ich wartości są niezależne od budowy reszty cząsteczki i mieszczą się w wąskich zakresach δ : 134.1 - 134.2 ppm (C_{Ar-Cl}), 135.5 - 136 ppm (C_{Ar-CH_2O}), 64.6 - 65.2 ppm ($Ar-CH_2O$). W widmie 1H NMR charakterystyczne są singlety odpowiadające protonom grup benzytowych osłon 2-Cl-Z, które występują w zakresie 5.07 – 5.29 ppm ($Ar-CH_2O$). Inne ważne cechy diagnostyczne to np. wyraźnie zróżnicowane sygnały od atomów wodoru oraz węgla α (αCH , αC) rdzenia i terminalnych reszt lizynowych. Na uwagę zasługuje to, że sygnały od αCH i αC rdzenia istotnie zależą od rodzaju aminy umieszczonej na C-końcu dendrymeru (zjawisko obserwowane już w przypadku związków **141** – **143**, Rozdział 3.4.). Otóż, obecność didodecyloaminy powoduje ekranowanie sygnałów αCH i αC rdzenia w dendrymerach zabezpieczonych **150** i **151**, zaś w odbezpieczonych **155** i **156** – ekranowanie sygnału αC i odekranowanie sygnału αCH . W przypadku dendrymerów **150** i **151** (dDDA na C-końcu) sygnały αCH i αC występują odpowiednio w zakresie 3.55 – 3.57 i 47.5 ppm (dla związków odbezpieczonych **155** i **156**: 4.72 – 4.75 i 51.6 – 52.0 ppm), podczas gdy dla dendrymerów **147** – **149** (TA lub DDA na C-końcu) obserwuje się wspomniane sygnały w zakresie 4.40 – 4.41 i 54.3 – 54.4 ppm (dla związków odbezpieczonych **152** i **154**: 4.32 – 4.37 i 55.0 – 55.4 ppm).

Na pełną Boc-deprotekcję w przypadku dendrymerów **152** – **156** wskazuje w widmach NMR całkowity zanik charakterystycznych sygnałów pochodzących od grup Boc, tj. w widmie ^{13}C NMR – intensywnych sygnałów przy 28.8 lub 28.9 ppm [$C(CH_3)_3$] i w zakresie 79.8 – 80.6 ppm [$C(CH_3)_3$], zaś w widmie 1H NMR – intensywnych sygnałów przy 1.40 lub 1.41 ppm [$C(CH_3)_3$].

W związku z tym, że *N*-końcowa funkcjonalizacja dendrymerów opartych na rdzeniach hydrofobowych resztami tryptofanu lub pochodnych tryptofanu, tj. resztami 1-butylotryptofanowymi lub 1-(5-aminopentyl)tryptofanowymi (Rozdział 3.3.2.), prowadziła do poprawy ich aktywności biologicznej, postanowiłam prześledzić wpływ analogicznej funkcjonalizacji w przypadku dendrymerów opartych na rdzeniach kationowych. W tym celu zsyntetyzowałam dendrymery pośrednie **159** i **160**, posiadające wolne grupy aminowe w łańcuchu bocznym lizyny, które mogą być poddane dalszej modyfikacji (Schemat 45).



Schemat 45. Synteza dendrymerów pośrednich z terminalnymi resztami lizynowymi (**159** i **160**).
 (i) Boc-Lys(Z)-OH, DCC/HOBt, Et₃N, DMF, 2 – 6 dni; (ii) H₂/10% Pd-C, MeOH.

Synteza obejmowała dwa etapy: reakcję sprzężenia rdzenia **144** lub **145** z ortogonalnie chronioną lizyną Boc-Lys(Z)-OH prowadzoną z użyciem DCC/HOBt w DMF i nadmiar

Et₃N (22 ekw.) oraz następczą reakcją usuwania grup zabezpieczających (Z) w związkach **157** i **158** z wykorzystaniem metody hydrogenacji na katalizatorze palladowym w MeOH. Wydajność syntezy dendrymerów pośrednich **159** i **160**, mających postać białych proszków, liczona po 2 etapach reakcyjnych wyniosła odpowiednio 88.5% i 84.9%.

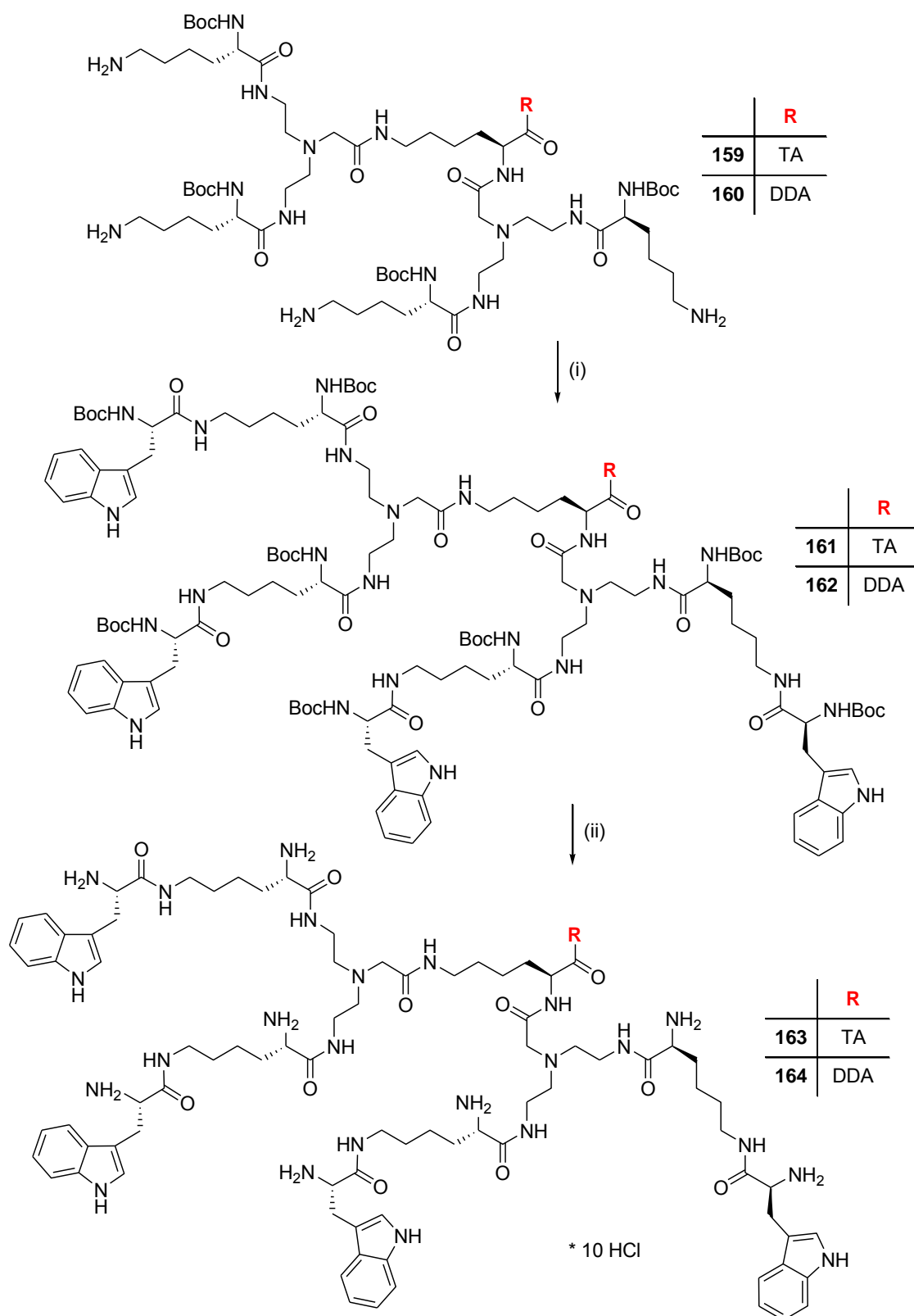
Dendrymery **159** i **160** można było teoretycznie otrzymać w wyniku deprotekcji grup zabezpieczających (2-Cl-Z) w związkach **147** i **148** (Schemat 44). W praktyce okazało się jednak, że grupy 2-Cl-Z są trudniejsze do usunięcia z dendrymeru niż grupy Z w warunkach hydrogenacji na katalizatorze palladowym, nawet przy użyciu nadmiaru katalizatora, tj. 10% wagowych substratu na każdą aromatyczną grupę zabezpieczającą. Z braku możliwości oczyszczenia właściwego produktu z produktów niecałkowitej deprotekcji grup 2-Cl-Z, zdecydowałam się na syntezę dendrymerów **159** i **160** zgodnie z opisaną powyżej procedurą (Schemat 45). Po potwierdzeniu ich struktury za pomocą widm masowych (ESI MS), wykorzystałam je do syntezy dendrymerów sfunkcjonalizowanych resztami tryptofanu lub pochodnych tryptofanu.

3.5.2. Synteza dendrymerów z terminalnymi resztami tryptofanowymi lub pochodnych tryptofanu

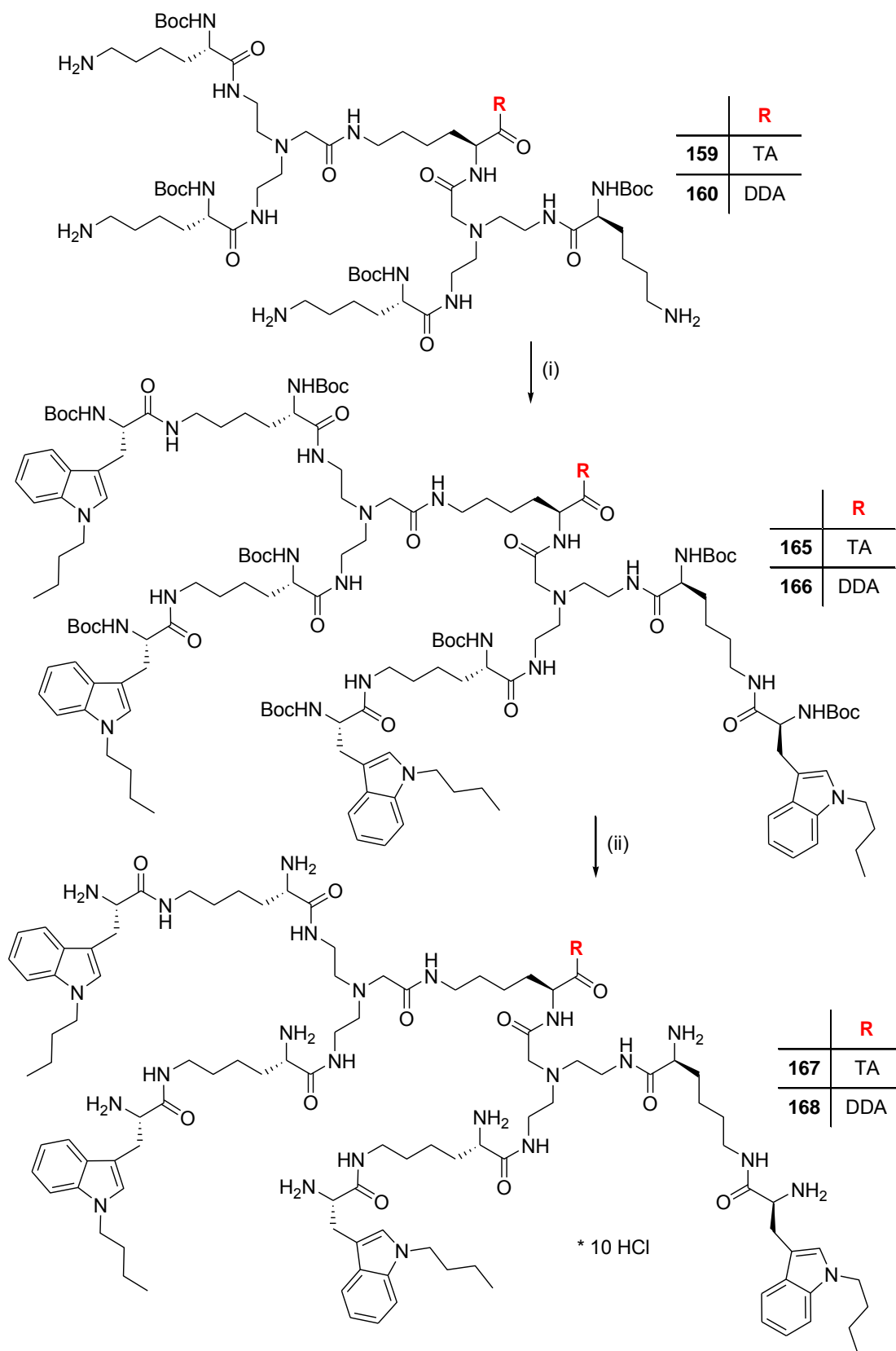
Celem otrzymania dendrymerów z terminalnymi resztami tryptofanowymi lub pochodnych tryptofanu, opartych na rdzeniach kationowych korzystałam z procedur zastosowanych przeze mnie podczas syntezy analogicznych dendrymerów, ale skonstruowanych na rdzeniach hydrofobowych (Rozdział 3.3.2.).

W wyniku reakcji sprzęgania dendrymeru pośredniego **159** lub **160** z Boc-Trp-OH lub z pochodnymi tryptofanu, tj. *N*-Boc-1-butylotryptofanem (**83**), *N*-Boc-1-[5-(Boc-amino)pentyl]tryptofanem (**96**), prowadzonej z użyciem EDC/HOBt i Et₃N (3.6 ekw.) w DMF, otrzymałam pięć dendrymerów (**161**, **162**, **165**, **166**, **169**; Schemat 46, 47 i 48). Oczyszczałam je na drodze sączenia molekularnego na kolumnie z wypełnieniem Sephadex LH-20 i MeOH jako eluentem, a następnie chromatografii kolumnowej z silikażelem w warunkach elucji gradientowej (CHCl₃/MeOH 100:1→15:1). Występują one w postaci jasnożółtych (**161**) lub białych (**162**, **165**, **166**, **169**), bezpostaciowych proszków bez ostrej temperatury topnienia (Tabela 10). W ostatnim etapie poddałam je reakcji Boc-deprotekcji rozpuszczając związek w minimalnej ilości MeOH i dodając nasycony roztwór HCl w EtOAc. Uzyskane w ten sposób finalne dendrymery występują w postaci higroskopijnych

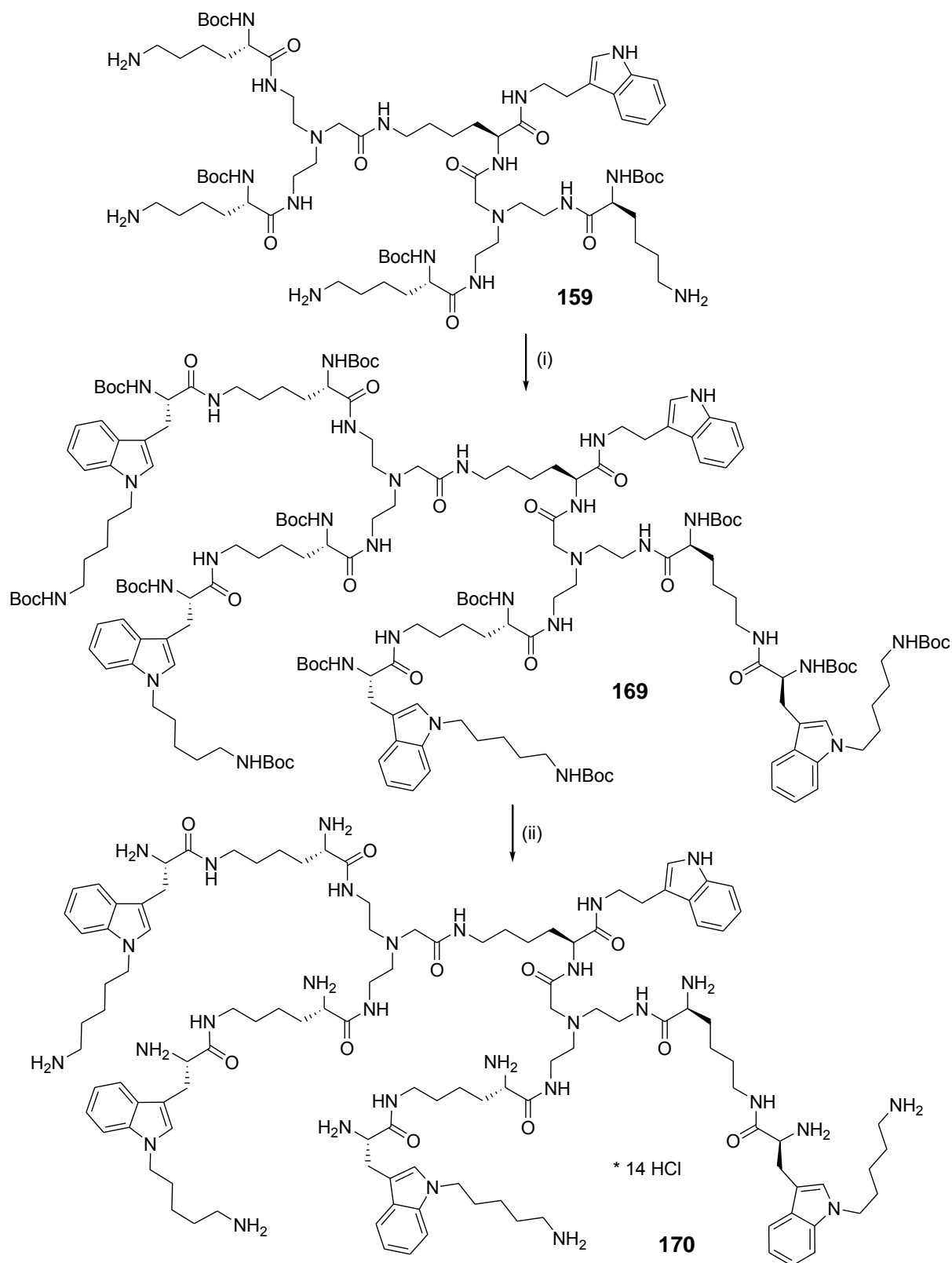
dodekachlorowodorków (**163**, **164**, **167**, **168**) lub tetradekachlorowodorków (**170**).
 Uzyskałam je z wydajnościami mieszczącymi się w zakresie 94 – 98.7 % (Tabela 10).



Schemat 46. Synteza dendrymerów z terminalnymi resztami tryptofanowymi (**161** i **162**, **163** i **164**).
 (i) Boc-Trp-OH, EDC/HOBt, Et₃N, DMF, 48 – 96 godz.; (ii) nas. HCl/EtOAc.



Schemat 47. Synteza dendrymerów z terminalnymi resztami 1-butylotryptofanowymi (**165** i **166**, **167** i **168**). (i) **83**, EDC/HOBt, Et₃N, DMF, 48 – 96 godz.; (ii) nas. HCl/EtOAc.



Schemat 48. Synteza dendrymerów z terminalnymi resztami 1-(5-aminopentyl)tryptofanowymi (**169**, **170**). (i) **96**, EDC/HOBt, Et₃N, DMF, 96 godz.; (ii) nas. HCl/EtOAc.

Tabela 10. Dane dotyczące dendrymerów **161 – 170**

Dendrymer zabezpieczony	Wyd. [%]	T. top. [°C]	$[\alpha]_D^{25}$ (c 1, MeOH)	R_f [CHCl ₃ /MeOH 8:1]
161	51.7	133.1 - 136.6	- 4.5 ^a	0.40
162	59.1	128.1 - 131.4	+ 1.8	0.44
165	60.7	103.2 - 107	+ 0.86	0.47
166	54.6	106.8 - 109.2	+ 11.9 ^b	0.56
169	57.8	110.6 - 115.4	- 1.5	0.48
D. odbezpieczony				
163	94	215.3 - 219.2	+ 43.5	-
164	94.4	195.1 - 202.2	+ 40.7	-
167	98.7	194.3 - 199.3	+ 34.6	-
168	97.1	165.1 - 168.6	+ 25.5	-
170	94.3	208.6 - 211.5	+ 17	-

^a c 0.25; ^b c 0.1;

Struktury dendrymerów z terminalnymi resztami tryptofanowymi (**161 – 164**), 1-butylotryptofanowymi (**165 – 168**) oraz 1-(5-aminopentyl)tryptofanowymi (**169, 170**) potwierdziłam w oparciu o wyniki analizy widm MS i NMR.

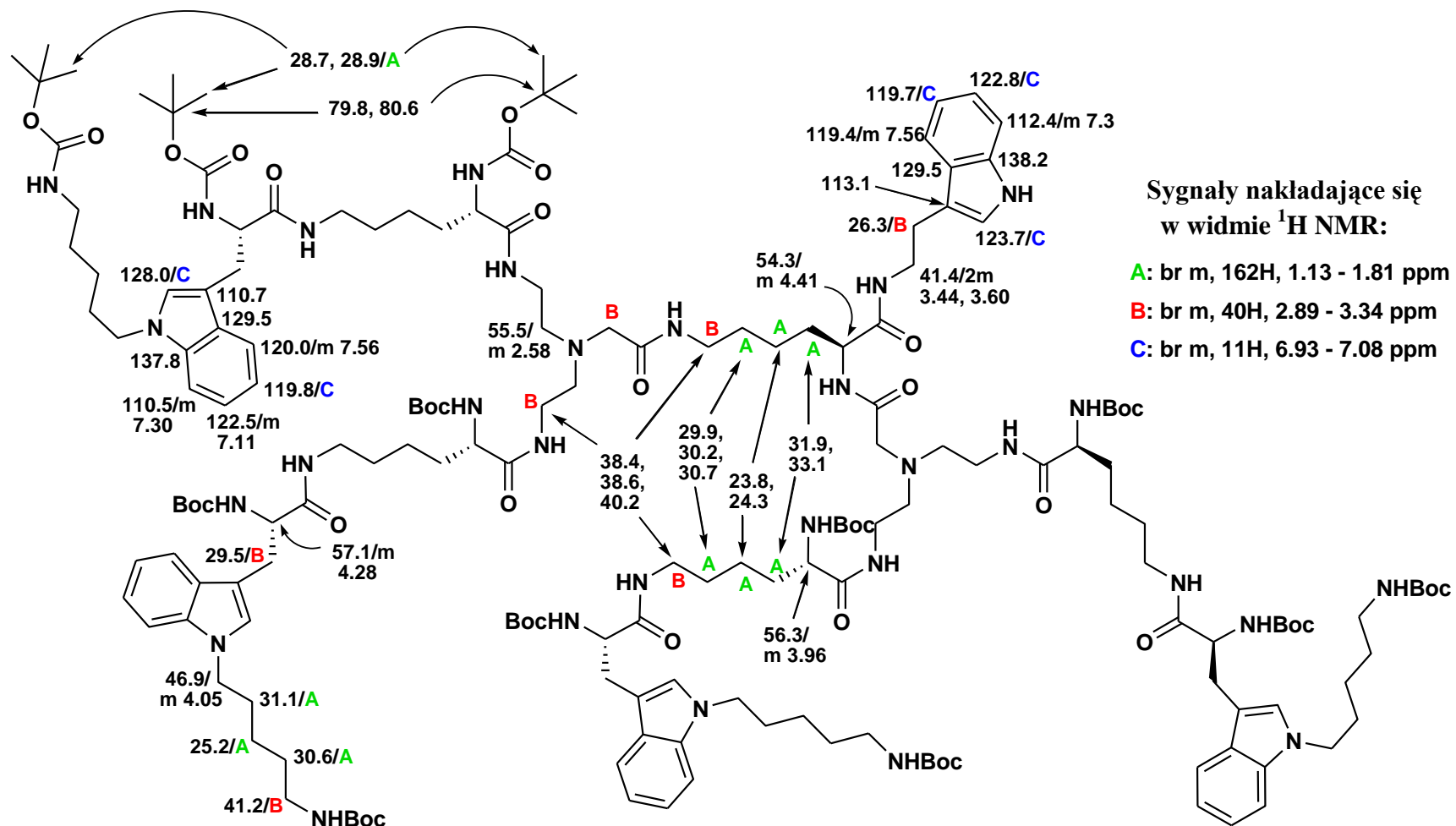
Spektrometria mas ESI MS jest najważniejszą techniką potwierdzającą założoną strukturę dendrymerów **161 - 170**. W ich widmach sygnałami o największej intensywności są te pochodzące od jonów wielokrotnie naładowanych, przy czym dla dendrymerów w pełni zabezpieczonych (**161, 162, 165, 166, 169**) są to piki odpowiadające $[M + 2Na]^{2+}$, zaś dla dendrymerów Boc-odbezpieczonych – piki typu $[M + 3H]^{3+}$ (**163, 164, 170**), $[M + 2H]^{2+}$ (**167**) lub $[M + MeOH + 2H + Na]^{3+}$ (**168**).

Widma ¹H NMR dendrymerów **161 – 170** są mało diagnostyczne ze względu na znaczne nakładanie się sygnałów, zwłaszcza w zakresie alifatycznym. Zdecydowanie bardziej czytelne są widma ¹³C NMR. Wykorzystanie widma DEPT oraz widm korelacyjnych HSQC i COSY umożliwia przypisanie sygnałów do niemal wszystkich atomów węgla, a stąd i do odpowiednich protonów w cząsteczce (Rysunek 40). Trudność stanowi w pełni jednoznaczne przypisanie sygnałów części alifatycznej, głównie nie posiadającej sąsiedztwa heteroatomu czy grupy aromatycznej, czyli np. atomom węgla dodecyloaminy C²-C¹¹, jak również zróżnicowanie sygnałów węgli β, γ, δ, εC pochodzących od rdzenia, od tych należących do gałązek lizynowych. Co więcej, w widmie ¹³C NMR sygnały pochodzące od niektórych

atomów węgla rdzenia, tj. α C, N-CH₂-CONH, N-CH₂-CH₂-NH, N-CH₂-CH₂-NH, są często bardzo słabe lub wręcz nieobecne.

Ważną cechą diagnostyczną stanowi wyraźne zróżnicowanie sygnałów od atomów α rdzenia, gałązek lizynowych oraz terminalnych reszt tryptofanu bądź pochodnych tryptofanu, obserwowane zarówno w widmie ¹H NMR, jak i ¹³C NMR. Dużą wartość diagnostyczną ma również sygnał występujący w widmie ¹³C NMR w zakresie 46.7 – 46.9 ppm (C¹ n-Bu lub 5-AP). Pozwala on na szybkie rozróżnienie rodzaju terminalnej grupy dendrymeru - brak tego sygnału oznacza resztę tryptofanową, zaś obecność – pochodną Trp.

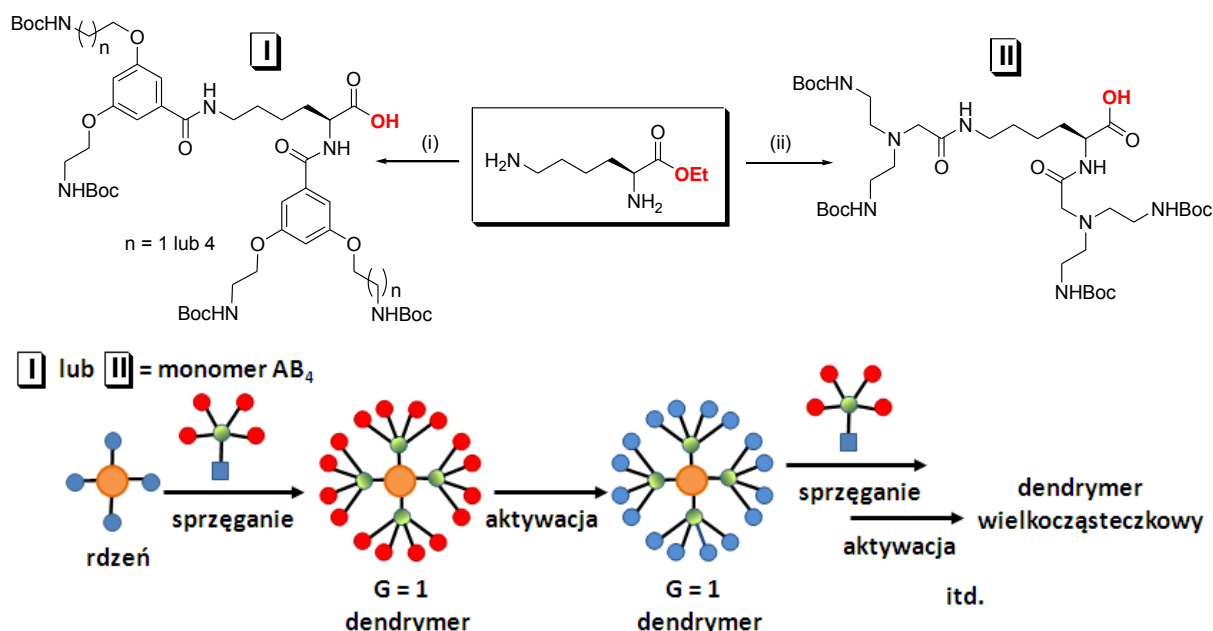
Na pełną Boc-deprotekcję w przypadku dendrymerów **163**, **164**, **167**, **168** i **170** wskazuje w widmach NMR całkowity zanik charakterystycznych sygnałów pochodzących od grup Boc, tj. w widmie ¹³C NMR – sygnałów przy 28.7 lub 28.9 ppm [C(CH₃)₃] i w zakresie 79.8 – 80.6 ppm [C(CH₃)₃], zaś w widmie ¹H NMR – intensywnych sygnałów w zakresie 1.30 – 1.42 ppm [C(CH₃)₃].



Rysunek 40. Przesunięcia chemiczne atomów węgla i wodoru w widmach NMR dendrymeru z terminalnymi resztami *N*-Boc-1-[5-(Boc-amino)pentyl]tryptofanowymi **169**.

3.6. PODSUMOWANIE CZĘŚCI SYNTETYCZNEJ

W ramach niniejszej pracy zsyntetyzowałam dwa nowe rodzaje czterorozgałęzionych rdzeni, tj. o charakterze hydrofobowym i kationowym, które wydają się stanowić wartościową grupę związków, oferującą duże możliwości syntetyczne w chemii dendrymerów. Można je otrzymać w stanie czystym w skali wielogramowej, co jest nierzadko problemem w syntezie dendrymerów. Z metodologicznego punktu widzenia mogą one być rozpatrywane jako hiperrdzenie (Rozdział 1.1.4.3). Związki te, poza zastosowaniem w charakterze rdzeni, można użyć jako hipermonomerów w syntezie klasycznych, wielkocząsteczkowych dendrymerów, jeśli zostaną one otrzymane bez reszty aminowej blokującej ich C-koniec (Schemat 49). Powyższy warunek wiąże się z krótszą procedurą syntetyczną, polegającą na wykorzystaniu w syntezie estru *L*-lizyny zamiast amidu *L*-lizyny i związku nieaminokwasowego.



Schemat 49. Potencjalna synteza związków I i II z wolną grupą karboksylową na C-koncu [(i) 1. **21** lub **23**, DCC/HOBt, DMF; 2. 1M NaOH, MeOH; (ii) 1. **140**, DCC/HOBt, DMF; 2. 1M NaOH, MeOH] oraz ich możliwe wykorzystanie jako hipermonomerów w syntezie dendrymerów wielkocząsteczkowych (na przykładzie metody hipermonomeru).

Wykorzystując otrzymane rdzenie zsyntetyzowałam sześć nowych grup niskocząsteczkowych dendrymerów peptydowych (G1) o strukturze mieszanej (organiczno - aminokwasowej), tj. cztery grupy oparte na rdzeniu o charakterze hydrofobowym:

- 1) dendrymery z terminalnymi resztami lizynowymi,
- 2) dendrymery z terminalnymi resztami tryptofanowymi lub pochodnych tryptofanu,
- 3) dendrymery z terminalnymi resztami PABA,
- 4) dendrymery typu Janus,

oraz dwie grupy oparte na rdzeniu o charakterze kationowym:

- 1) dendrymery z terminalnymi resztami lizynowymi,
- 2) dendrymery z terminalnymi resztami tryptofanowymi lub pochodnych tryptofanu.

Wszystkie dendrymery otrzymałam stosując procedury charakterystyczne dla klasycznej syntezy peptydów metodą w roztworze. Dzięki 2-etapowej procedurze oczyszczania, łączącej kolumnową chromatografię silikażelową z sączeniem molekularnym na kolumnie z wypełnieniem Sephadex LH-20, dendrymery uzyskałam w stanie czystym, bez defektów strukturalnych. Wydajności reakcji sprzęgania rdzeni z ortogonalnie zabezpieczonymi aminokwasami, pochodnymi aminokwasów i PABA były w granicach od umiarkowanych (35.8% dla dendrymeru **90**) do bardzo dobrych (91.8% dla dendrymeru **132**).

Synteza dendrymerów z terminalnymi resztami pochodnych tryptofanu, tj. 1-butylotryptofanowymi i 1-(5-aminopentylotryptofanowymi, wiązała się z przygotowaniem substratów: *N*-Boc-1-butylotryptofanu (**83**) oraz *N*-Boc-1-[5-(Boc-amino)pentylotryptofanu (**96**). Pierwszy z nich jest znany w literaturze, ale został otrzymany przeze mnie zgodnie z inną procedurą i po raz pierwszy scharakteryzowany, natomiast drugi jest związkiem nowym. W piśmiennictwie chemicznym brak jest danych na temat *N*¹-aminoalkilowych pochodnych tryptofanu, w związku z czym otrzymany przeze mnie *N*-Boc-1-[5-(Boc-amino)pentylotryptofan stanowi pierwszy przykład tego typu związków.

Możliwości pełnego scharakteryzowania finalnych dendrymerów przez zastosowanie wielu metod analitycznych i badań strukturalnych okazały się w pewnym stopniu ograniczone przez strukturę dendrymerów (liczne powtórzenia elementów strukturalnych) oraz przez ich właściwości fizykochemiczne (higroskopijne, bezpostaciowe proszki lub oleje). Zdecydowanie najlepszą metodą analizy tych związków okazała się spektrometria mas (metoda ESI). Do potwierdzenia struktur dendrymerów za pomocą widm NMR (¹H i ¹³C), konieczne okazało się stosowanie technik 2D NMR, DEPT ze względu na poszerzenie i nakładanie się różnych sygnałów.

4. BADANIA AKTYWNOŚCI BIOLOGICZNEJ DENDRYMERÓW

Większość zsyntetyzowanych dendrymerów peptydowych została przebadana pod kątem aktywności przeciwbakteryjnej i przeciwnowotworowej. Dla części z nich oznaczono również toksyczność (hemo-, cyto- i genotoksyczność).

Badania biologiczne dendrymerów były wykonywane równolegle z pracą syntetyczną. Korzyścią takiego podejścia była możliwość wyciągania „na bieżąco” wniosków dotyczących zależności struktura – aktywność zsyntetyzowanych związków i dzięki temu sposobność odpowiedniego ukierunkowania dalszych działań syntetycznych, prowadzących do zrealizowania celu pracy. Wyniki badań otrzymywane w kolejnych etapach pracy pozwalały na ocenę słuszności obranego kierunku i na wysuwanie nowych założeń. Takie postępowanie przyczyniło się do rozszerzenia początkowo planowanego zakresu badań biologicznych, m.in. na badania przeciwnowotworowe. Pozwoliło również wskazać potencjalnie korzystne drogi przyszłych modyfikacji strukturalnych, mogących prowadzić do polepszenia właściwości biologicznych zsyntetyzowanych dendrymerów, tj. m.in. modyfikacje układu indolowego tryptofanu.

Badania aktywności przeciwbakteryjnej i hemolitycznej oraz genotoksyczności dendrymerów zostały wykonane w Samodzielnej Pracowni Związków Biologicznie Czynnych NIZP – PZH, kierowanym przez dr J. Solecką (mgr A. Rajnisz, mgr A. Laskowska). Natomiast badania aktywności przeciwnowotworowej i cytotoksyczności zostały zrealizowane w Instytucie Medycyny Doświadczalnej i Klinicznej PAN (prof. A. W. Lipkowski, mgr M. Bochyńska – Czyż).

4.1. AKTYWNOŚĆ PRZECIWBAKTERYJNA

Aktywność przeciwbakteryjną dendrymerów zbadano wobec szczepów referencyjnych zarówno bakterii Gram-dodatnich, jak i Gram-ujemnych. Dodatkowo, wytypowano dwa dendrymery o najlepszych właściwościach – **124** i **152**, należące do dwóch różnych grup strukturalnych, tj. odpowiednio do dendrymerów opartych na rdzeniu hydrofobowym oraz na rdzeniu kationowym, i oznaczono ich aktywność przeciwbakteryjną w obecności osocza krwi ludzkiej, jak również wobec bakteryjnych szczepów klinicznych.

Wyniki badań aktywności przeciwbakteryjnej dendrymerów podano jako minimalne stężenie związku, które całkowicie hamowało wzrost bakterii – MIC (*ang. minimal inhibitory concentration*).

4.1.1. Aktywność przeciwbakteryjna dendrymerów wobec szczepów referencyjnych

W Tabelach 11 – 13 przedstawiono uzyskane wyniki badania aktywności przeciwbakteryjnej dendrymerów opartych na rdzeniach hydrofobowych: **46 – 50, 59, 60** (posiadających terminalne reszty lizynowe), **76 – 80** (posiadających terminalne reszty tryptofanowe), **93 i 94** (posiadających terminalne reszty 1-butylotryptofanowe), **121, 122 i 124** (dendrymerów pośrednich w syntezie dendrymerów typu Janus) oraz **136** (dendrymeru typu Janus). Spośród dendrymerów opartych na rdzeniu kationowym, aktywność przeciwbakteryjną oznaczono tylko w przypadku związku **152** i jedynie wobec bakterii Gram-dodatnich.

Zbadano również aktywność przeciwbakteryjną dendrymerów z terminalnymi resztami kwasu p-aminobenzoowego (**107 - 110**) oraz dendrymerów typu Janus (**128, 129, 133, 134**) wobec szczepów podstawowych, tj. *S. aureus* i *E. coli*. Okazało się, że żaden z nich nie wykazywał zdolności hamowania wzrostu komórek bakteryjnych w stężeniu niższym niż 256 µg/mL.

Na podstawie wyników zebranych w Tabelach 11 – 13 można wyciągnąć wnioski dotyczące zależności struktura – aktywność przeciwbakteryjna dendrymeru. Jednakże niekompletność danych, zwłaszcza brak danych dla dendrymerów opartych na rdzeniach hydrofobowych posiadających terminalne reszty 1-(5-aminopentylotryptofanowe (**101, 102**) oraz dendrymerów opartych na rdzeniach kationowych (**153 – 156, 163, 164, 167, 168, 170**) uniemożliwia przesłedzenie wszystkich założonych przez mnie zależności struktura – aktywność. Badania dotyczące tych dendrymerów zostaną wykonane w późniejszym terminie.

W grupie dendrymerów z terminalnymi resztami lizynowymi (**46 – 50, 59, 60**) decydujący wpływ na aktywność ma rodzaj aminy umieszczonej na C-końcu dendrymeru (Tabela 11). Związki posiadające na C-końcu 2-feniloetyloaminę (**46, 47**) działają lepiej niż ich odpowiedniki z tryptaminą (**48, 49**). Natomiast wprowadzenie silnie hydrofobowej aminy, tj. dodecyloaminy powoduje utratę aktywności przeciwbakteryjnej (**50**). Taki efekt jest odwrotny do dotychczas obserwowanego dla innych dendrymerów zsyntetyzowanych w naszym zespole. Rodzaj pochodnej lizyny (2-Cl-Z lub Z na azocie N^{ϵ}), stosowanej jako peryferyjny element rozgałęziający, zasadniczo nie ma wpływu na aktywność dendrymeru wobec bakterii Gram-dodatnich, ale prowadzi do pojawienia się dostrzegalnych różnic w działaniu dendrymeru wobec bakterii Gram-ujemnych (porównanie par **46 i 59** oraz **47 i 60**). Z kolei zróżnicowanie długości ramion dendrymeru, osiągnięte poprzez wykorzystanie w

syntezie rdzeni skonstruowanych z użyciem niesymetrycznego elementu rozgałęziającego, wywiera korzystny wpływ w przypadku związku z terminalnymi grupami Z (porównanie pary **59** i **60**). Dla dendrymerów z terminalnymi grupami 2-Cl-Z obserwuje się lepsze właściwości przeciwbakteryjne, jeśli oparte są na rdzeniach skonstruowanych z użyciem symetrycznego elementu rozgałęziającego (porównanie par **46** i **47** oraz **48** i **49**).

W grupie omawianych dendrymerów, najlepszą aktywność przeciwbakteryjną z preferencją wobec bakterii Gram-ujemnych, również tych lekoopornych (*E. coli* ATCC BAA-198), posiada dendrymer **60**.

Tabela 11. Wartości minimalnego stężenia hamującego (MIC) oznaczone dla dendrymerów **46 – 49** i **59, 60**.

Badany szczep*	Wartości MIC (μM) dla dendrymeru:						
	46	47	48	49	50	59	60
<i>S. aureus</i> ATCC 29213	15.8	15.2	62	> 119	> 122.4	16.9	16.2
<i>S. aureus</i> ATCC 43300	15.8	15.2	62	> 119	> 122.4	33.9	16.2
<i>S. aureus</i> ATCC 700787	63.2	60.6	62	59.5	nb	33.9	64.9
<i>S. epidermidis</i> ATCC 12228	3.9	7.6	15.5/31	14.9/29.8	nb	8.5	8.1
<i>E. coli</i> ATCC BAA-198	15.8	15.2	15.5	29.8	> 122.4	67.8	8.1
<i>E. coli</i> ATCC 25922	7.9	7.6	15.5/31	29.8/59.5	> 122.4	33.9	8.1
<i>A. baumannii</i> ATCC 19606	63.2	121.3	62	> 119	> 122.4	33.9	32.4
<i>S. enterica</i> ATCC 10708	15.8	30.3	15.5/31	14.9/29.8	nb	16.9	16.2
<i>B. bronchiseptica</i> ATCC 4617	3.9	7.6	15.5/31	14.9/29.8	nb	4.2	4.1
<i>S. maltophilia</i> ATCC 13637	31.6	60.6	15.5	29.8/59.5	nb	16.9	32.4

*Kolor ciemnoczerwony oznacza szczepy bakterii Gram-ujemnych, czarny – bakterii Gram-dodatnich.
Kolorem niebieskim wyróżniono bardzo dobre wartości MIC.
nb – nie badano

Tabela 12. Wartości minimalnego stężenia hamującego (MIC) oznaczone dla dendrymerów **76 – 80 i 93, 94.**

Badany szczep*	Wartości MIC (μM) dla dendrymeru:						
	76	77	78	79	80	93	94
<i>S. aureus</i> ATCC 29213	27.5/55	28	27	6.7	100	12.2/24.5	11.5/23
<i>S. aureus</i> ATCC 43300	27.5	28	27	3.3/6.7	100	12.2/24.5	11.5/23
<i>S. aureus</i> ATCC 700787	13.8/27.5	56.1	6.8/13.5	6.7	100	24.5	11.5
<i>S. epidermidis</i> ATCC 12228	3.4	3.5	3.4	1.7	< 12.5	6.1	11.5
<i>E. coli</i> ATCC BAA-198	1.7	7	3.4	3.3	nb	nb	nb
<i>E. coli</i> ATCC 25922	3.4/6.9	7	6.8	13.4	nb	nb	nb
<i>A. baumannii</i> ATCC 19606	6.9	28	6.8	3.3	nb	nb	nb
<i>S. enterica</i> ATCC10708	3.4	3.5	3.4	3.3	nb	nb	nb
<i>B. bronchiseptica</i> ATCC 4617	1.7	3.5	1.7	1.7	nb	nb	nb
<i>S. maltophilia</i> ATCC 13637	3.4	3.5	3.4	3.3	nb	nb	nb
<i>P. aeruginosa</i> ATCC 27853	55	> 112.2	27	13.4	nb	nb	nb
<i>K. pneumoniae</i> ATCC 13882	55	112.2	54.1	26.8	nb	nb	nb

*Kolor ciemnoczerwony oznacza szczepy bakterii Gram-ujemnych, czarny – bakterii Gram-dodatnich.
Koloriem niebieskim wyróżniono bardzo dobre wartości MIC.
nb – nie badano

Grupa dendrymerów z terminalnymi resztami tryptofanowymi (**76 – 79**; Tabela 12) wykazuje wyraźnie lepsze własności przeciwbakteryjne niż posiadające ten sam rdzeń dendrymery z terminalnymi resztami lizynowymi, (porównanie par **47 i 76**, **60 i 76**, **48 i 77** oraz **49 i 78**). Charakteryzują się one selektywnością działania w kierunku bakterii Gram-ujemnych, z wyjątkiem związku **79**, który posiada szeroki zakres działania, tj. aktywność

zarówno wobec bakterii Gram-dodatnich, jak i Gram-ujemnych. Na aktywność dendrymeru bardzo wpływa rodzaj aminy umieszczonej na jego C-końcu. Najsilniejsze właściwości antibakteryjne obserwuje się dla związku z dodecyloaminą (**79**), zaś najslabsze dla związku z didodecyloaminą (**80**). Dendrymer z 2-feniloetyloaminą (**76**) wykazuje porównywalne działanie jak ten z tryptaminą (**78**). Z porównania wartości MIC dla związków **77** i **78** wynika, że zróżnicowanie długości ramion dendrymeru przekłada się na lepsze własności przeciwbakteryjne.

Zastąpienie w dendrymerze terminalnych reszt tryptofanowych przez reszty 1-butylotryptofanowe (**93**, **94**) daje efekt zależny od rodzaju aminy znajdującej się na jego C-końcu. Taka modyfikacja jest korzystna, jeśli w roli aminy występuje didodecyloamina, zaś niekorzystna w obecności dodecyloaminy (porównanie par **79** i **93** oraz **80** i **94**, Tabela 12).

Na uwagę zasługują wyniki uzyskane dla dendrymerów pośrednich **121**, **122** i **124**, wykorzystanych do syntezy dendrymerów typu Janus (Tabela 13). Posiadają one na C-końcu fragment o charakterze hydrofilowym, tj. resztę tryptofanu sprzęgniętą z cząsteczką etylenodiaminy (**121**, **124**) bądź 2,2'-(etylenodioksy)dietyloaminy (**122**), w której druga z grup aminowych występuje w postaci sprotonowanej. Z dotychczasowych prac naszego zespołu wynikało, że hydrofilowe reszty aminy umieszczone na C-końcu dendrymeru znacząco osłabiają jego aktywność. Tymczasem, z porównania wartości MIC wyznaczonych dla dendrymerów **121**, **122** i **124** z tymi wyznaczonymi dla ich odpowiedników, posiadających na C-końcu tryptaminę, wynika zależność odwrotna (porównanie par **121** i **48**, **121** i **48** oraz **124** i **77**). Wyjątek stanowi aktywność dendrymeru **124** wobec bakterii Gram-dodatnich, która w porównaniu do aktywności związku **77** ulega pogorszeniu. W odniesieniu do wszystkich przebadanych w tej pracy związków, dendrymer **124** wykazuje najlepszą aktywność antibakteryjną wobec Gram-ujemnych szczepów *E. coli*, również tych opornych na liczne antybiotyki. Praktycznie kształtuje się ona na poziomie naturalnych peptydów przeciwbakteryjnych.

Spośród zsyntetyzowanych dendrymerów typu Janus, właściwości antibakteryjne w akceptowalnym zakresie posiada tylko związek **136**, którego prekursorem jest dendrymer pośredni **124** (Tabela 13). Pozostałe dendrymery tego typu, jak wspomniano na początku rozdziału, wykazują wartości MIC ≥ 256 $\mu\text{g/mL}$. Wynika z tego, że przyłączenie do dendrymerów pośrednich **121**, **122** i **124** związków („dendronów 2”) mających z założenia stanowić czynnik wzmacniający selektywność / aktywność antibakteryjną dendrymeru, przy tej strukturze cząsteczek nie daje spodziewanego efektu.

Tabela 13. Wartości minimalnego stężenia hamującego (MIC) oznaczone dla dendrymerów **121**, **122**, **124**, **136** i **152**.

Badany szczep*	Wartości MIC (μM) dla dendrymeru:				
	121	122	124	136	152
<i>S. aureus</i> ATCC 29213	7.3	14.1	53.2	42.4	2.0
<i>S. aureus</i> ATCC 43300	7.3/14.6	28.1	53.2	84.9	4.0
<i>S. aureus</i> ATCC 700787	7.3/14.6	28.1	53.2/106.5	> 84.9	4.0
<i>S. epidermidis</i> ATCC 12228	3.7	7.0	3.3	10.6	2.0/4.0
<i>E. coli</i> ATCC BAA-198	14.6	28.1	1.7	5.3	nb
<i>E. coli</i> ATCC 25922	58.5	56.2	1.7/3.3	5.3/10.6	nb
<i>A. baumannii</i> ATCC 19606	14.6/29.2	28.1	26.6/53.2	21.2	nb
<i>S. enterica</i> ATCC10708	14.6	14.1	6.7	21.2	nb
<i>B. bronchiseptica</i> ATCC 4617	7.3	7.0	1.7	1.3/2.7	nb
<i>S. maltophilia</i> ATCC 13637	3.7/7.3	7.0	3.3	10.6	nb
<i>P. aeruginosa</i> ATCC 27853	58.5/117	> 112.5	> 106.5	> 84.9	nb
<i>K. pneumoniae</i> ATCC 13882	29.2/58.5	56.2	> 106.5	> 84.9	nb

*Kolor ciemnoczerwony oznacza szczepy bakterii Gram-ujemnych, czarny – bakterii Gram-dodatnich.
Koloriem niebieskim wyróżniono bardzo dobre wartości MIC.
nb – nie badano

Z licznej grupy dendrymerów opartych na rdzeniu kationowym, pod kątem aktywności przeciwbakteryjnej wobec szczepów Gram-dodatnich został przebadany tylko dendrymer **152** (Tabela 13). Wykazuje on, w odniesieniu do wszystkich przebadanych w tej pracy związków, najsilniejsze właściwości antybakteryjne względem Gram-dodatnich szczepów gronkowców, także tych opornych na β -laktamy (*S. aureus* ATCC 43300).

W przypadku naturalnych peptydów przeciwbakteryjnych i ich syntetycznych analogów, jak również znanych z literatury przeciwdrobnoustrojowych dendrymerów, czynnikiem ograniczającym ich wykorzystanie praktyczne jest bardzo często podatność na degradację enzymatyczną. Do oceny stabilności zsyntetyzowanych przez mnie dendrymerów peptydowych, zostały wybrane dwa dendrymery o najlepszym profilu aktywności - **124** i **152**. Wykonano dla nich ocenę wartości MIC wobec szczepu *E. coli* i *S. aureus* w obecności osocza krwi ludzkiej. Te same wartości MIC oznaczone dla dendrymerów **124** i **152** w standardowym teście, jak i w obecności osocza dowodzą, że powyższe związki cechują się trwałością wobec enzymów proteolitycznych, co warunkuje ich skuteczne działanie w środowisku fizjologicznym (Tabela 14).

Tabela 14. Wartości minimalnego stężenia hamującego (MIC) oznaczone dla dendrymerów **124** i **152** w obecności i bez obecności osocza krwi ludzkiej.

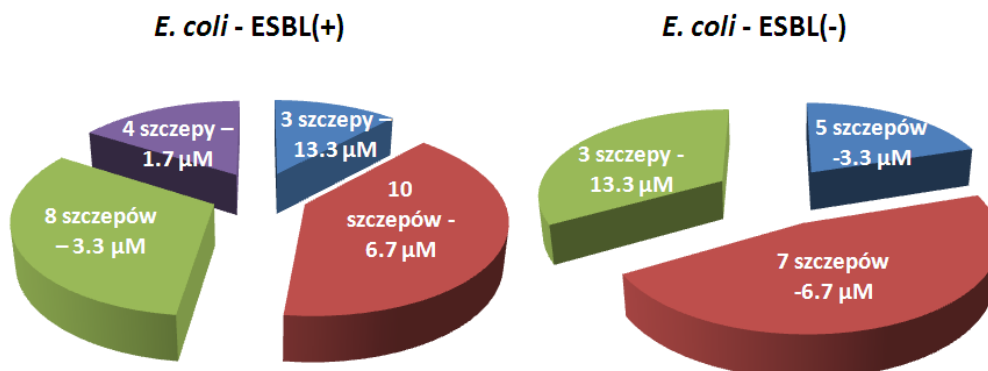
Dendrymer	Szczep bakteryjny	Wartości MIC (μM)	
		z osoczem	bez osocza
124	<i>E. coli</i> ATCC 25922	1.7; 3.3; 3.3	3.3; 3.3; 1.7
152	<i>S. aureus</i> ATCC 29213	2; 2; 4	< 2; 2; 2

4.1.2. Aktywność przeciwbakteryjna dendrymerów wobec szczepów klinicznych

Dendrymery **124** i **152**, wykazujące najlepsze właściwości antybakteryjne wobec szczepów referencyjnych *E. coli* (**124**) i *S. aureus* (**152**), zostały zakwalifikowane do badań na klinicznych izolatach *S. aureus* i *E. coli*, w tym także tych o wysokiej oporności na aktualnie stosowane antybiotyki. Do badań wybrano 5 szczepów *Staphylococcus aureus* opornych na metycylinę (*ang. Methicillin Resistant Staphylococcus aureus*, MRSA), 25 szczepów gronkowca złocistego wrażliwych na metycylinę (*ang. Methicillin Sensitive Staphylococcus aureus*, MSSA), oraz 40 szczepów *Escherichia coli*: w tym 25 wytwarzających beta-laktamazy o rozszerzonym spektrum działania (*ang. Extended Spectrum Betalactamase*, ESBL) oraz 15 nie wytwarzających tych enzymów. Szczepy były izolowane i opracowane w Dziecięcym Szpitalu Klinicznym w Warszawie. Opracowane przez mnie wyniki badań na szpitalnych izolatach podano poniżej:

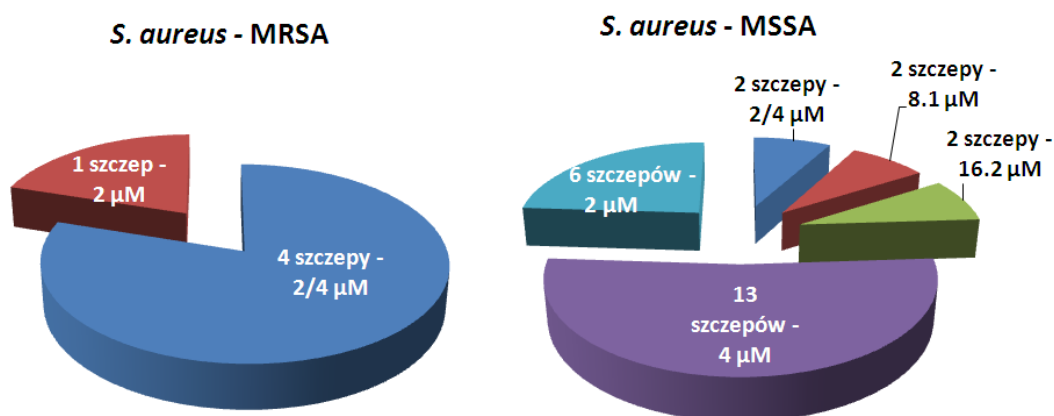
- A) Dla dendrymeru **124** zbadano aktywność przeciwbakteryjną wobec bakterii Gram-ujemnych, tj. *E. coli*. Badanie wykonano na 40 szczepach [25 szczepów ESBL(+) i 15 szczepów ESBL(-)]. Dendrymer wykazuje działanie przeciwbakteryjne w zakresie 1.7

– 13.3 μM (4 – 32 $\mu\text{g/mL}$) w przypadku szczepów ESBL(+) i 3.3 – 13.3 μM (8 – 32 $\mu\text{g/mL}$) w przypadku szczepów ESBL(-) (Rysunek 41).



Rysunek 41. Wrażliwość na związek **124** klinicznych szczepów *E. coli* wytwarzających beta-laktamazę o rozszerzonym spektrum działania [ESBL(+)] i szczepów nie wytwarzających tego enzymu [ESBL(-)].

B) Dla dendrymeru **152** zbadano aktywność przeciwbakteryjną wobec bakterii Gram-dodatnich, tj. *S. aureus*. Badanie wykonano na 30 szczepach (5 szczepów MRSA i 25 szczepów MSSA). Dendrymer wykazuje działanie przeciwbakteryjne w zakresie 2 – 4 μM (4 – 8 $\mu\text{g/mL}$) w przypadku szczepów MRSA i 2 – 16.2 μM (4 – 32 $\mu\text{g/mL}$) w przypadku szczepów MSSA (Rysunek 42).



Rysunek 42. Wrażliwość na związek **152** klinicznych szczepów *S. aureus* wrażliwych na metycylinę (MSSA) i opornych na metycylinę (MRSA).

4.2. AKTYWNOŚĆ PRZECIWNOWOTWOROWA

Rolę stymulującą do rozszerzenia zakresu badań zsyntetyzowanych dendrymerów peptydowych o wstępne testy przeciwnowotworowe stanowiły dane literaturowe o aktywności przeciwnowotworowej peptydów przeciwbakteryjnych (AMP).¹⁵⁷

Właściwości przeciwnowotworowe wybranych dendrymerów peptydowych sprawdzono wobec komórek czerniaka ludzkiego (Mew 155). Badaniu poddano dendrymery oparte na rdzeniu hydrofobowym, tj. dendrymery z terminalnymi resztami tryptofanowymi (**76 - 80**), 1-butylotryptofanowymi (**92 - 94**), 1-(5-aminopentylotryptofanowymi (**101, 102**), kwasu p-aminobenzoowego (**107 - 110**), dendrymer pośredni **124**, dendrymery typu Janus (**130, 135, 136**) oraz dendrymery oparte na rdzeniu kationowym, z terminalnymi resztami tryptofanowymi (**163 - 164**), 1-butylotryptofanowymi (**167 - 168**) i 1-(5-aminopentylotryptofanowymi (**170**) (Tabela 15). Wszystkie z nich w stężeniu 100 μM wykazują 100% - ową zdolność hamowania proliferacji komórek czerniaka ludzkiego.

W grupie dendrymerów opartych na hydrofobowym rdzeniu, posiadających terminalne reszty tryptofanowe lub pochodnych tryptofanu (**76 - 80, 92 - 94, 101, 102**), najlepsze właściwości antyproliferacyjne obserwuje się dla dendrymerów **80, 93** i **102**, które w stężeniu 5 μM niszczą komórki w 100%. Uwidacznia się tu wpływ rodzaju aminy ulokowanej na C-końcu związku. Dendrymery **80, 93** i **102** posiadają w tej roli dodecyloaminę bądź didodecyloaminę. Zastąpienie tych amin 2-fenyletyloaminą czy tryptaminą prowadzi do osłabienia aktywności przeciwnowotworowej dendrymeru (porównanie np. par **76** i **79, 78** i **80, 92** i **93, 101** i **102**). Obserwuje się również wpływ rodzaju terminalnego elementu rozgałęziającego na aktywność. Wymiana terminalnych reszt tryptofanowych dendrymeru na reszty pochodnych tryptofanu [1-butylotryptofanowe bądź 1-(5-aminopentylotryptofanowe] przejawia się wzrostem działania przeciwnowotworowego (porównanie np. par **78** i **92, 79** i **93**). Przy czym silniejszą aktywność posiadają związki z terminalnymi resztami 1-butylotryptofanowymi (porównanie pary **92** i **101**). Wynika z tego, że modyfikacja pierścienia indolowego tryptofanu prowadząca do N^1 -alkilowych pochodnych tryptofanu, tj. zawierających hydrofobowy podstawnik n-butylowy na indolowym atomie azotu, jest korzystniejsza niż ta prowadząca do N^1 -aminoalkilowych pochodnych tryptofanu, tj. zawierających hydrofilowy podstawnik 5-aminopentylowy na indolowym atomie azotu.

Dendrymery z terminalnymi resztami kwasu p-aminobenzoowego (**107 - 110**) posiadają znacznie słabsze działanie antybakteryjne w porównaniu z wyżej omówioną grupą dendrymerów. Najaktywniejszy z nich – związek **110** – przy stężeniu 20 μM hamuje proliferację komórek czerniaka ludzkiego na poziomie ok. 20%. Wpływ na aktywność posiada rodzaj aminy na C-końcu dendrymeru, jak również rodzaj rdzenia. Lepsze właściwości przeciwnowotworowe obserwuje się dla dendrymeru **109**, cechującego się zróżnicowaną długością ramion, tj. opartego na rdzeniu skonstruowanym z użyciem niesymetrycznego elementu rozgałęziającego, w porównaniu z dendrymerem **108**, mającym

jednakową długość ramion. Podobny wpływ rodzaju rdzenia na aktywność związku obserwuje się również w poprzedniej grupie dendrymerów (porównanie pary **77** i **78**).

Tabela 15. Wpływ dendrymerów na proliferację komórek czerniaka ludzkiego Mew 155.

Dendrymer	Stężenie dendrymeru			
	100 μ M	20 μ M	10 μ M	5 μ M
	liczba żywych komórek Mew 155 (%)			
76	0	18.39	155.06	155.06
77	0	26.51	nb	nb
78	0	11.24	nb	nb
79	0	0	65.62	100
80	0	0	0	0
92	0	0	0	98.67
93	0	0	0	0
94	0	0	0	75.97
101	0	0	0	114.67
102	0	0	0	0
107	0	89.96	nb	nb
108	0	103.61	nb	nb
109	0	96.39	nb	nb
110	0	80.32	nb	nb
124	0	117.33	nb	nb
130	0	18	104	nb
135	0	0	33.71	134.83
136	0	30.34	161.8	161.8
163	44.96	113.18	nb	nb
164	0	71.32	nb	nb
167	0	0	0	91.47
168	0	0	0	91.47
170	0	0	73.1	96.12

nb – nie badano

Z danych otrzymanych dla dendrymeru pośredniego **124** i dendrymerów typu Janus (**130**, **135**, **136**) można wyciągnąć wniosek o korzystnym efekcie wprowadzenia do dendrymeru „dendronu 2”, tj. związku z resztami kwasu p-aminobenzoesowego lub kwasu p-aminobenzenosulfonowego (porównanie par **124** i **130**, **124** i **136**). Przy czym dendrymer typu Janus zawierający reszty kwasu p-aminobenzoesowego zamiast kwasu p-aminobenzenosulfonowego posiada lepszą aktywność antybakteryjną (porównanie pary **130** i **136**).

Grupa dendrymerów opartych na rdzeniu kationowym, posiadających terminalne reszty tryptofanowe (**163**, **164**) lub pochodne tryptofanu (**167**, **168**, **170**), wykazuje dobre działanie przeciwnowotworowe, chociaż słabsze niż ich odpowiedniki oparte na rdzeniu hydrofobowym, z wyjątkiem dendrymeru **167** (porównanie par **101** i **170**, **77** i **163**, **78** i **163**, **79** i **164**, **93** i **168**, **92** i **167**). Analogiczny wpływ rodzaju terminalnego elementu rozgałęziającego na aktywność związku, uwidocznił w przypadku dendrymerów opartych na rdzeniu hydrofobowym (**76** – **80**, **92** – **94**, **101**, **102**), obserwowany jest również w przypadku tej grupy dendrymerów.

4.3. TOKSYCZNOŚĆ (HEMO-, CYTO- I GENOTOKSYCZNOŚĆ)

Wadą niemal wszystkich stosowanych w leczeniu antybiotyków peptydowych, jak również większości znanych z literatury i zsyntetyzowanych w naszym zespole dendrymerów, jest ich toksyczność wobec komórek eukariotycznych. Powoduje to, że mogą one być stosowane tylko zewnętrznie lub jedynie w leczeniu szpitalnym (np. polimyksyny). Stopień toksyczności otrzymanych przez mnie dendrymerów został sprawdzony w testach wobec czerwonych krwinek (hemotoksyczność), fibroblastów ludzkich (cytotoksyczność). Wybrane związki przebadano także na możliwość generowania mutacji bakterii o genomie wyjątkowo czułym na otoczenie zewnętrzne (genotoksyczność).

Hemotoksyczność (liza erytrocytów) jest najczęściej stosowanym testem do oszacowania toksyczności związku. Zbadano stopień hemotoksyczności dendrymerów **48**, **49**, **76** – **80**, **93**, **94**, **124** i **152** w stosunku do ludzkich erytrocytów w zależności od stężenia dendrymeru (Tabela 16).

Na podstawie danych przedstawionych w Tabeli 16 wynika, że dendrymery **48**, **49**, **76** – **78** oraz **124** wykazują bardzo niską hemotoksyczność nawet przy stężeniu 200 - 400 μM . Hemolizę na poziomie ok. 40 - 50% przy stężeniu 200 μM posiadają dendrymery **79**, **94** i

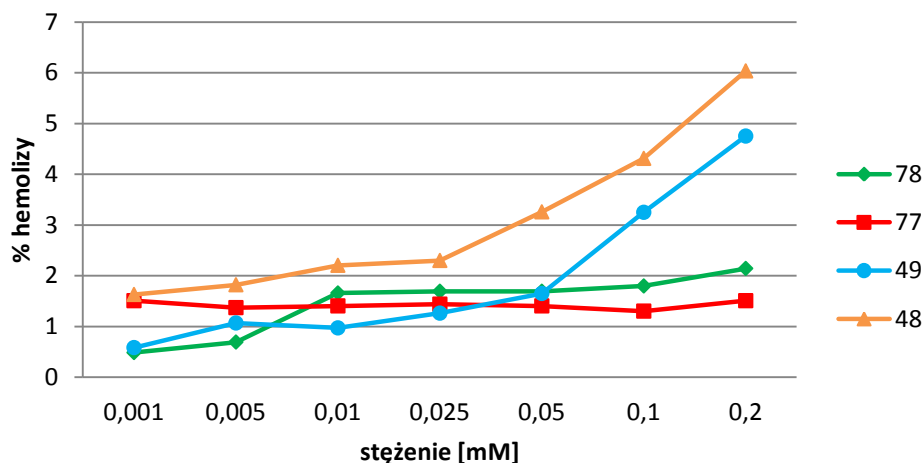
152. Z kolei dendrymery **80** i **93** działają w tym stężeniu silnie toksycznie, osiągając poziom odpowiednio 99% i ok. 81%.

Tabela 16. Aktywność hemolityczna (%)* dendrymerów w zależności od ich stężenia (mM).

Stężenie (mM)	48	49	77	78	76	79	80	93	94	124	152
	% hemolizy										
0.001	1.63	0.58	1.51	0.48	1.16	0.57	0.55	0.60	0.55	2.01	1.19
0.005	1.82	1.07	1.37	0.69	0.75	18.04	6.69	7.29	10.19	0.89	5.30
0.01	2.20	0.97	1.40	1.66	0.89	29.76	16.25	14.62	14.90	1.63	10.87
0.025	2.30	1.26	1.44	1.69	1.33	41.63	43.10	30.51	26.16	2.45	15.91
0.05	3.26	1.65	1.40	1.69	1.36	45.97	71.71	44.49	30.24	1.15	22.97
0.1	4.31	3.25	1.30	1.80	1.29	48.12	93.89	56.62	33.63	1.93	29.04
0.2	6.03	4.75	1.51	2.14	1.29	49.95	99.10	80.92	47.68	1.11	41.70
0.4	nb	nb	nb	nb	1.09	nb	nb	nb	nb	2.74	nb

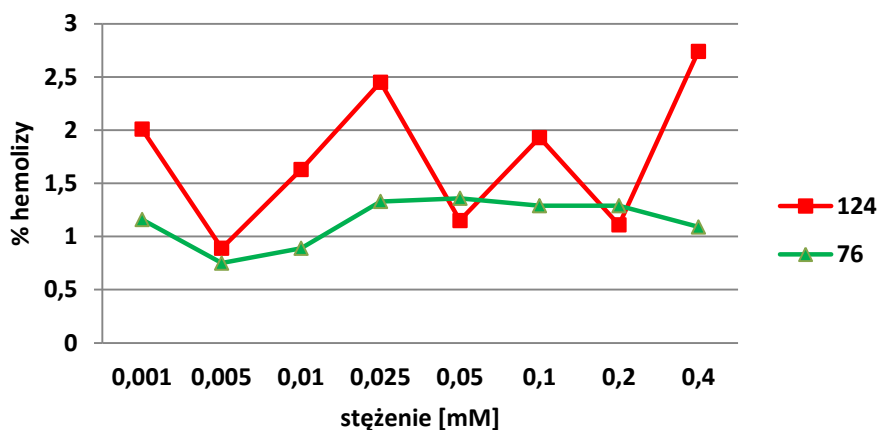
* dane zaokrąglone do dwóch miejsc po przecinku

Rozpatrując zależności struktura – aktywność hemolityczna dendrymeru, interesujący wydaje się fakt, że wzrost ładunku dodatniego nie powoduje wzrostu toksyczności. Taka sytuacja jest wyraźnie widoczna w przypadku dendrymerów z terminalnymi resztami tryptofanowymi o ładunku +8 (**77**, **78**), które charakteryzują się bardzo niską hemotoksycznością, kształtującą się na tym samym poziomie w całym zakresie badanych stężeń związku (Wykres 1). Ich 4-krotnie naładowane odpowiedniki z terminalnymi resztami lizynowymi (**48**, **49**) wykazują większą toksyczność, która ma tendencję wzrostową przy wzroście stężenia dendrymeru.



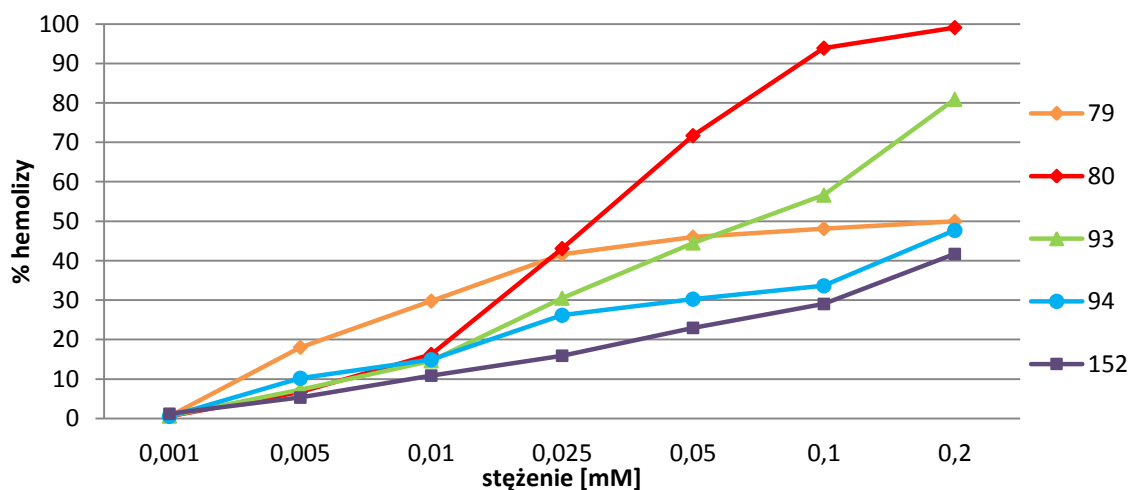
Wykres 1. Aktywność hemolityczna (%) dendrymerów **48**, **49**, **77** i **78** od ich stężenia.

Istotny wpływ na hemotoksyczność dendrymeru wywiera rodzaj aminy umieszczonej na jego C-końcu. W grupie dendrymerów opartych na hydrofobowym rdzeniu i posiadających na C-końcu tryptaminę (dendrymery **48**, **49**, **77** i **78**; Wykres 1), 2-fenyletyloaminę (**76**; Wykres 2) czy etylenodiaminę (**124**; Wykres 2), obserwuje się bardzo niską hemotoksyczność. Najmniejszą toksyczność obserwuje się dla dendrymeru **76**, tj. posiadającego 2-fenyletyloaminę w roli aminy blokującej jego C-koniec, w przypadku którego aktywność hemolityczna wynosi poniżej 1.5 % przy stężeniu 400 μM .



Wykres 2. Aktywność hemolityczna (%) dendrymerów **76** i **124** od ich stężenia.

Natomiast znaczny wzrost toksyczności związku powoduje umieszczenie na C-końcu dendrymeru silnie hydrofobowych amin, takich jak dodecyloamina (**79**, **93**) bądź didodecyloamina (**80**, **94**) (Wykres 3).

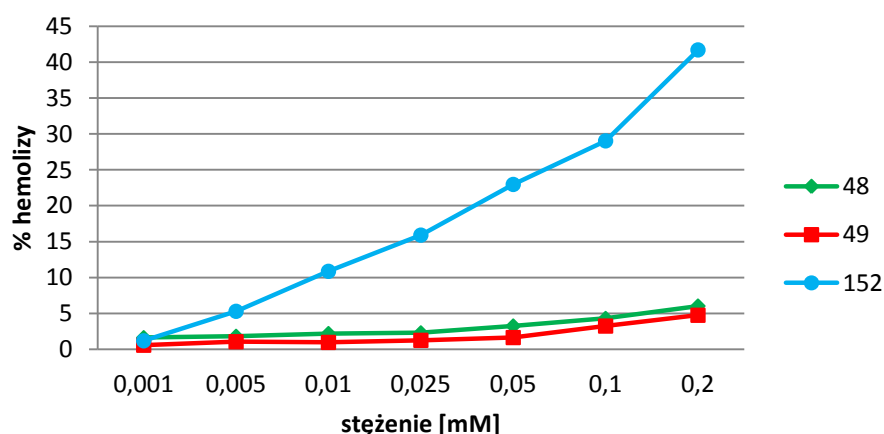


Wykres 3. Aktywność hemolityczna (%) dendrymerów **79**, **80**, **93**, **94** i **152** od ich stężenia.

Z porównania par dendrymerów **79** i **93** oraz **80** i **94**, tj. posiadających taką samą aminę na C-końcu, ale różniących się rodzajem *N*-terminalnych reszt aminokwasowych wynika, że

wpływ wywierany przez dodecyloaminę czy didodecyloaminę na toksyczność związku jest silnie skorelowany z rodzajem *N*-terminalnych reszt aminokwasowych. Dendrymer z terminalnymi resztami tryptofanowymi działa 2-krotnie bardziej toksycznie, jeśli na jego C-końcu znajduje się didodecyloamina (**80**) zamiast dodecyloaminy (**79**). Z kolei dla dendrymerów z terminalnymi resztami 1-butylotryptofanowymi obserwuje się efekt odwrotny, tj. większą toksyczność wykazuje związek **93** posiadający w swojej strukturze dodecyloaminę niż jego odpowiednik **94** z didodecyloaminą na C-końcu.

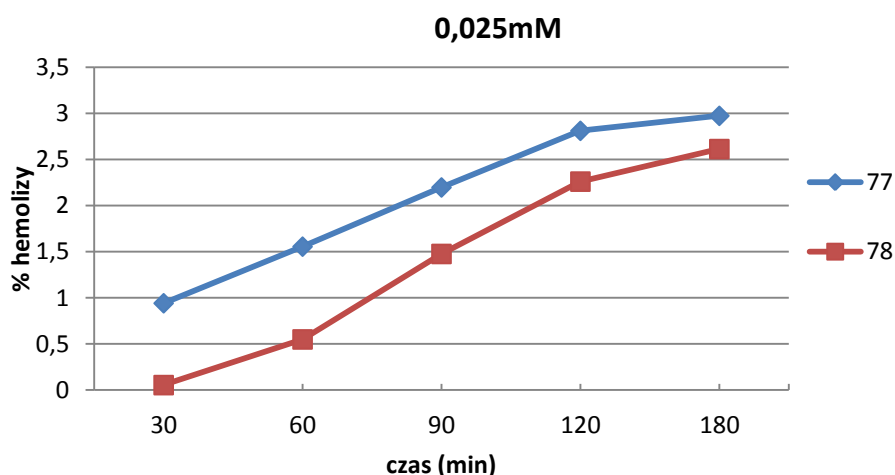
Struktura rdzenia odgrywa decydującą rolę w procesie modulowania toksyczności dendrymeru. Porównanie hemotoksyczności dendrymeru opartego na rdzeniu kationowym (**152**) z hemotoksycznością jego odpowiedników opartych na rdzeniu hydrofobowym (**48**, **49**), wyraźnie pokazuje, że charakter kationowy rdzenia jest źródłem braku selektywności komórkowej dendrymeru (Wykres 4).



Wykres 4. Aktywność hemolityczna (%) dendrymerów **48**, **49** i **152** od ich stężenia.

Dendrymer oparty na rdzeniu kationowym z tryptaminą blokującą jego C-koniec (**152**) posiada stopień toksyczności porównywalny z tymi obserwowanymi dla omówionych powyżej dendrymerów **79** i **94**, tj. opartych na rdzeniu hydrofobowym, ale zawierających dodecyloaminę bądź didodecyloaminę (Wykres 3).

Dodatkowo, dla dendrymerów **77** i **78** oznaczono aktywność hemolityczną w zależności od czasu w warunkach, gdy stężenie związku wynosi 25 μ M. Odczyt wartości hemotoksyczności standardowo wykonuje się po 30 min. Zarejestrowane krzywe pokazują, że badane dendrymery praktycznie nie wykazują wzrostu hemotoksyczności nawet po 3 godzinach (Wykres 5).

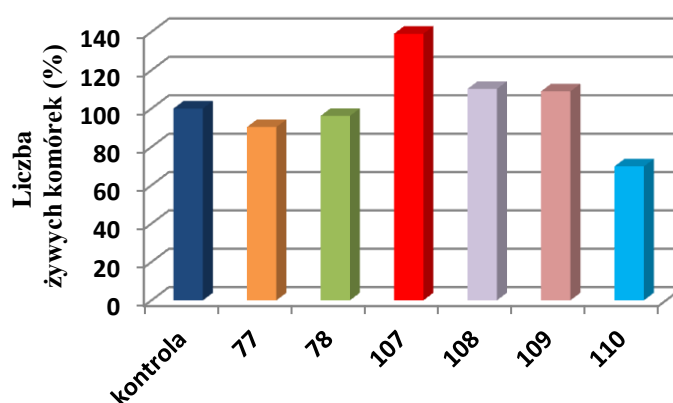


Wykres 5. Aktywność hemolityczna (%) dendrymerów **77** i **78** w stężeniu 0.025 mM od czasu.

Cytotoksyczność wybranych dendrymerów, tj. **77**, **78** oraz **107 – 110**, w stężeniu 20 μM zbadano na liniach komórkowych fibroblastów ludzkich (komórki skóry właściwej). Ocenę proliferacji wykonano 7 dnia po wysianiu. Z danych przedstawionych w Tabeli 17 wynika, że dendrymery z terminalnymi resztami tryptofanowymi (**77**, **78**) wykazują w tym stężeniu słabe działanie toksyczne wobec fibroblastów. Na uwagę zasługuje fakt, że zróżnicowanie długości ramion dendrymeru **78** przekłada się na jego mniejszą toksyczność w porównaniu do dendrymeru **77**, opartego na rdzeniu skonstruowanym z użyciem symetrycznego elementu rozgałęziającego.

Tabela 17. Wpływ dendrymerów w stężeniu 20 μM na proliferację fibroblastów ludzkich.

Dendrymer	% kontroli
77	90.38
78	96.15
107	139
108	110.26
109	108.97
110	69.87



Interesujące wyniki obserwuje się dla dendrymerów z terminalnymi resztami kwasu p-aminobenzoesowego (**107 - 110**). Rodzaj aminy znajdującej się na C-końcu dendrymeru wywiera znaczący wpływ na jego własności wobec fibroblastów. Spośród wspomnianych

związków tylko dendrymer **110**, tj. zawierający dodecyloaminę w roli aminy blokującej jego C-koniec, wykazuje działanie toksyczne. Pozostałe dendrymery, mające 2-feniloetyloaminę (**107**) bądź tryptaminę (**108**, **109**), posiadają wyjątkową zdolność do stymulacji wzrostu fibroblastów skóry ludzkiej. Szczególnie wysoką wartość stymulacji ma związek **107**.

Genotoksyczność (zdolność do wywoływania mutacji w szczepach bakteryjnych o genomie czułym na warunki zewnętrzne) sprawdzono dla dendrymerów **124** i **152**. Oba związki nie były genotoksyczne.

4.4. PODSUMOWANIE BADAŃ AKTYWNOŚCI BIOLOGICZNEJ

Wyniki otrzymane w niniejszej pracy pokazują, iż zsyntetyzowane dendrymery peptydowe mogą stanowić dobrą matrycę i punkt wyjścia do konstrukcji efektywnych oraz bezpiecznych związków o szerokim zastosowaniu biologicznym.

Na podstawie zebranych wyników badań biologicznych przeprowadzonych dla dendrymerów (Rozdział 4.1. – 4.3.) można wyciągnąć następujące wnioski dotyczące zależności aktywności od struktury związku (Rysunek 43):

1. *Wpływ rodzaju rdzenia.*

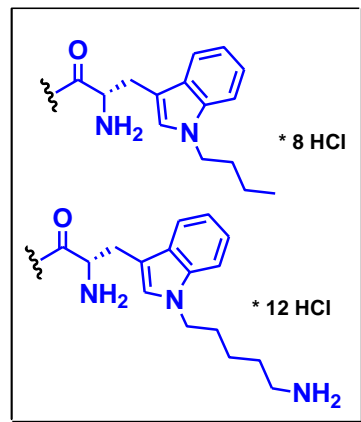
Związki z hydrofobowym, aromatycznym rdzeniem posiadają wysokie aktywności przeciw bakteriom Gram-ujemnym i wykazują bardzo niską toksyczność wobec erytrocytów oraz komórek fibroblastów. Wymiana rdzenia hydrofobowego na rdzeń kationowy znacząco podwyższa hemotoksyczność dendrymeru. Dla dendrymerów z terminalnymi resztami lizynowymi obserwuje się również wzrost aktywności przeciwbakteryjnej (porównanie pary związków **48** lub **49** z **152**).

2. *Wpływ rodzaju podstawnika na C-końcu.*

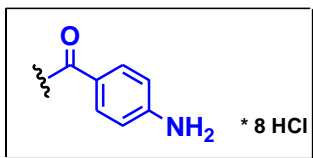
Silnie hydrofobowe i labilne konformacyjnie aminy blokujące C-koniec dendrymerów, takie jak dodecyloamina (DDA) i didodecyloamina (dDDA), prowadzą do zdecydowanego pogorszenia ich profilu toksyczności. Najkorzystniejsze parametry terapeutyczne (niska toksyczność, dobra aktywność przeciwbakteryjna) obserwuje się dla związków zawierających w swojej strukturze 2-feniloetyloaminę (PEA), tryptaminę (TA) bądź amid etylenodiaminotryptofanu (W-EDA).

3. *Wpływ zróżnicowania długości ramion.*

W większości przypadków zróżnicowanie długości ramion dendrymeru ($n = 4$), osiągnięte poprzez wykorzystanie w syntezie rdzeni skonstruowanych z użyciem niesymetrycznego elementu rozgałęziającego, wywiera korzystny wpływ na jego

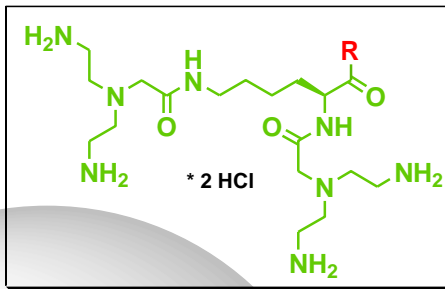


Efekt zastąpienia reszt tryptofanowych przez reszty pochodnych Trp



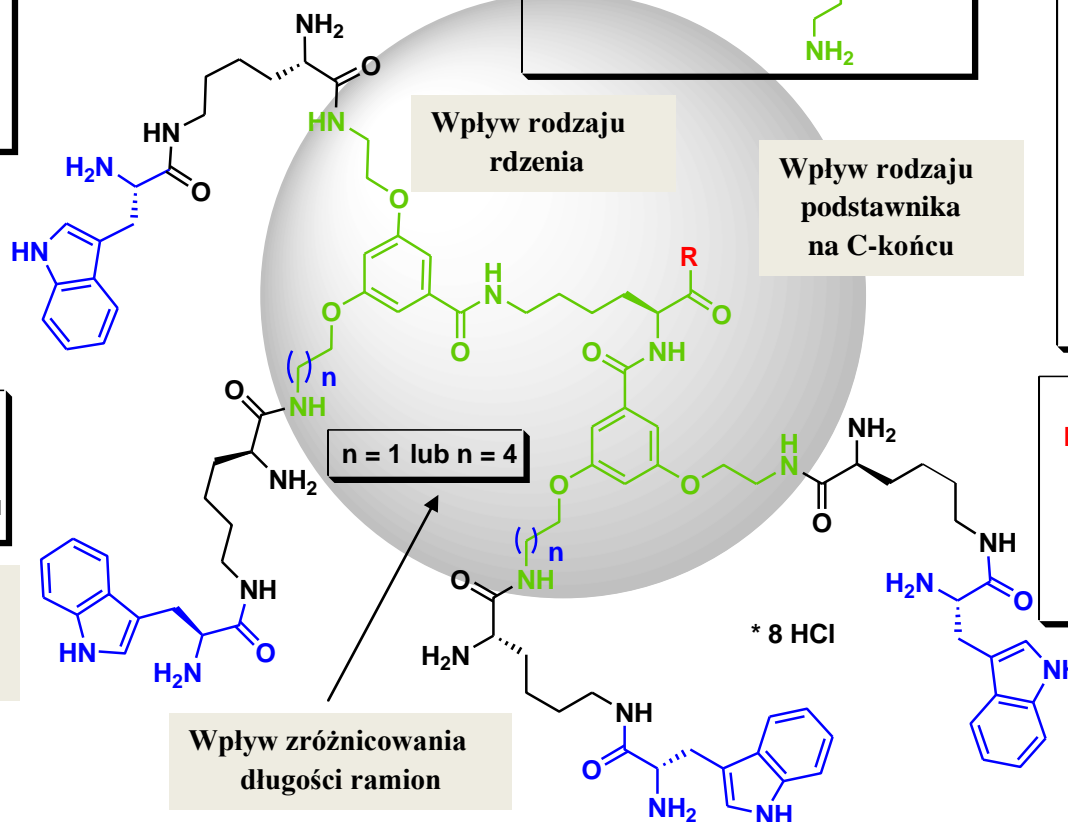
Efekt zastąpienia reszt tryptofanowych przez reszty PABA

Efekt wprowadzenia reszt tryptofanowych



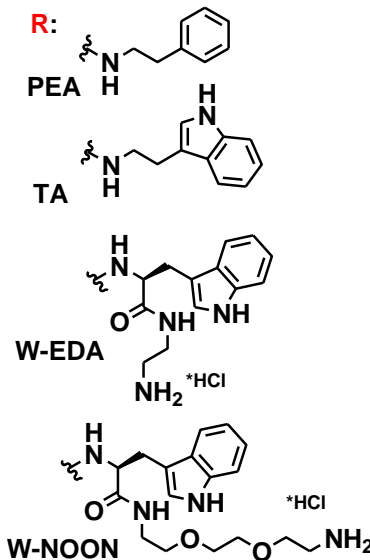
Wpływ rodzaju rdzenia

Wpływ rodzaju podstawnika na C-końcu

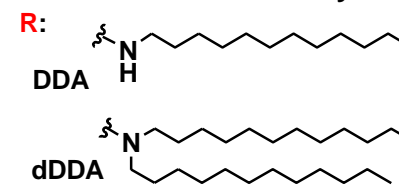


Wpływ zróżnicowania długości ramion

Podstawniki korzystne



Podstawniki niekorzystne



Rysunek 43. Analiza czynników strukturalnych rozpatrywanych pod kątem optymalizacji właściwości biologicznych nowych dendrymerów.

własności biologiczne. Posiada on większą aktywność przeciwbakteryjną lub przeciwnowotworową, jak również niższy stopień toksyczności (hemo- i cytotoxyczości) niż dendrymer mający jednakową długość ramion ($n = 1$).

4. *Efekt wprowadzenia reszt tryptofanowych.*

Dodanie reszt tryptofanowych do dendrymerów z terminalnymi resztami lizynowymi powoduje na ogół wzrost ich aktywności przeciwbakteryjnej, szczególnie w kierunku bakterii Gram-ujemnych, jak również obniżenie toksyczności. Innymi słowy, pozwala ona na otrzymanie grupy dendrymerów selektywnie działających wobec bakterii Gram-ujemnych i cechujących się dobrym indeksem terapeutycznym.

5. *Efekt zastąpienia reszt tryptofanowych przez reszty pochodnych tryptofanu.*

Konsekwencją zastąpienia terminalnych reszt tryptofanowych dendrymeru przez reszty pochodnych tryptofanu [1-butylotryptofanowe bądź 1-(5-aminopentyl)-tryptofanowe] jest poprawa jego właściwości przeciwnowotworowych. Przy czym silniejszą aktywność posiadają związki z terminalnymi resztami 1-butylotryptofanowymi.

6. *Efekt zastąpienia reszt tryptofanowych przez reszty PABA.*

Wymiana terminalnych reszt tryptofanowych dendrymeru na reszty kwasu p-aminobenzoowego prowadzi do utraty jego aktywności przeciwbakteryjnej i pogorszenia aktywności przeciwnowotworowej. Jednakże, dzięki takiej modyfikacji uzyskuje się związki wykazujące zdolność do stymulacji wzrostu fibroblastów skóry ludzkiej. Szczególnie wartościowym związkiem, wartym bardziej szczegółowego przebadania w tym kierunku, jest dendrymer **107**, który odznacza się korzystnym, wyraźnym zróżnicowaniem działania wobec fibroblastów i komórek czerniaka ludzkiego. Mianowicie, powoduje on znaczny wzrost proliferacji fibroblastów i jednocześnie inhibicję proliferacji komórek czerniaka. Może on zatem posłużyć jako struktura wiodąca nowej klasy związków o działaniu m.in. przyspieszającym gojenie ran czy przeciwstarzeniowym.

Porównanie aktywności przeciwbakteryjnej najbardziej aktywnych, zsyntetyzowanych przez mnie dendrymerów peptydowych z antybiotykami peptydowymi obecnie stosowanymi w leczeniu wskazuje, że ich działanie jest porównywalne (Tabela 18). Wartym uwagi jest fakt, że spośród wielu grup antybiotyków to właśnie antybiotyki peptydowe stanowią obecnie „ostatnią broń” w walce z najbardziej opornymi szczepami bakteryjnymi.

Tabela 18. Aktywność przeciwbakteryjna antybiotyków peptydowych stosowanych w leczeniu oraz zsyntetyzowanych przez dendrymery **76 – 79, 124 i 152** względem wybranych szczepów referencyjnych bakterii.

Antybiotyk ¹⁵⁸ / Dendrymer	Badany szczep bakteryjny:*				
	<i>S. aureus</i> ATCC 29213	<i>S. aureus</i> ATCC 43300	<i>E. coli</i> ATCC 25922	<i>E. coli</i> ATCC BAA-198	<i>P. aeruginosa</i> ATCC 27853
	Wartości MIC (µg/mL)				
Indolicydyna	8	-	16	-	64
Wankomycyna	2 - 4	-	op	op	op
Teikoplanina	2 - 4	-	op	op	op
Daptomycyna	1	-	op	op	op
Telewancyna	1	-	op	op	op
Polimyksyna B	64	-	0.5	-	1
Kolistyna	op	op	2	-	4
76	64	64/128	8/16	4	128
77	64	64	16	16	> 256
78	64	64	16	8	64
79	16	8/16	32	8	32
124	128	128	4/8	4	> 256
152	4	8	nb	nb	nb

op – oporny; nb – nie badano; „-” – brak danych;

Wadą niemal wszystkich antybiotyków peptydowych jest ich toksyczność. Jak wynika z Tabeli 19, dendrymery **79** i **152**, posiadające dobrą aktywność przeciwbakteryjną, ale i jednocześnie działanie hemotoksyczne, charakteryzują się lepszym indeksem terapeutycznym (TI) niż indolicydyna czy w przypadku szczepu *S. aureus* - polimyksyna B. Pozostałe dendrymery **76 – 78** i **124**, przejawiające selektywność wobec szczepów Gram-ujemnych, praktycznie nie wywołują hemotoksyczności w badanym zakresie stężeń. Można spodziewać się dla nich bardzo wysokich wartości indeksu terapeutycznego. Pozwala to na dalsze ich badanie w celu potencjalnych zastosowań w farmacji.

Należy dodać, że otrzymane w tej pracy dendrymery peptydowe, poza badaną aktywnością przeciwbakteryjną, przeciwnowotworową i przypadkowo wykrytą zdolnością stymulacji wzrostu fibroblastów, mogą wykazywać inne szerokie, potencjalne działanie biologiczne, np. jako nośniki leków. Wybrany kierunek badań aktywności biologicznej

podyktowany był możliwościami przeprowadzenia testów biologicznych. Można spodziewać się, że część z zsyntetyzowanych dendrymerów posiada również aktywność przeciwrzybiczną czy przeciwwirusową.

Tabela 19. Porównanie indeksów terapeutycznych (TI) wyznaczonych dla antybiotyków peptydowych (indolicydyny i polimyksyny B) oraz zsyntetyzowanych przez mnie dendrymerów **76 – 79, 124 i 152** względem wybranych szczepów referencyjnych bakterii.

Antybiotyk ¹⁵⁸ / Dendrymer	HC ₅₀ * (μM)	MIC (μM)	TI (HC ₅₀ / MIC)	MIC (μM)	TI (HC ₅₀ / MIC)	MIC (μM)	TI (HC ₅₀ / MIC)
		<i>S. aureus</i> ATCC 29213		<i>E. coli</i> ATCC 25922		<i>E. coli</i> ATCC BAA-198	
Indolicydyna	68.2 ¹⁵⁹	4.2	16.2	8.4	8.1	-	-
Polimyksyna B	161.9 ¹⁶⁰	49.2	3.3	0.38	426	-	-
79	200	6.7	29.9	13.4	14.9	3.3	60.6
152	~ 200	2	100	nb	-	nb	-
76	400**	27.5/55	>>14.5/ 7.3	3.4/6.9	>>117.6/ 58	1.7	>>235.3
77	200**	28	>>7.1	7	>>28.6	7	>>28.6
78	200**	27	>>7.4	6.8	>>29.4	3.4	>>58.8
124	400**	53.2	>>7.5	1.7/3.3	>>235.3/ 121.2	1.7	>>235.3

* HC₅₀ – stężenie związku, które powoduje 50% hemolizy;

** podane stężenie nie odpowiada HC₅₀, dendrymer w tym stężeniu wywołuje hemolizę jedynie na poziomie 1.1 – 2.8% (Tabela 16); nb – nie badano; „-” – brak danych.

5. PODSUMOWANIE I WNIOSKI

Przedłożona praca stanowi kontynuację rozpoczętej w naszym zespole koncepcji wykorzystania chemii dendrymerów do syntezy *de novo* amfifilowych związków przeciwbakteryjnych, posiadających strukturę projektowaną w oparciu o przesłanki wynikające z badań naturalnych peptydów przeciwdrobnoustrojowych (AMP).

Cel mojej pracy, którym było zaprojektowanie i zsyntetyzowanie nowych amfifilowych dendrymerów peptydowych o potencjalnym działaniu przeciwbakteryjnym przy jednocześnie niskim stopniu toksyczności wobec organizmów eukariotycznych, został w pełni zrealizowany.

W ramach niniejszej pracy otrzymałam i scharakteryzowałam strukturalnie 38 nowych dendrymerów peptydowych G1, z czego 6 należy do dendrymerów typu Janus. Do ich syntezy wykorzystywałam dwa nowe, wysokorozgałęzione rodzaje rdzeni: o charakterze hydrofobowym i kationowym. Zastosowanie hydrofobowych rdzeni o ramionach różnej długości umożliwiło syntezę nowej grupy dendrymerów o amfifilowej powierzchni, na której w sposób programowany i stechiometryczny zmienia się względne relacje stereochemiczne grup o różnym, chemicznym charakterze. Takie modyfikacje w chemii dendrymerów uzyskiwano albo przez syntezę dendrymerów typu Janus, albo przez niestechiometryczne (statystyczne) podstawienie pewnej ilości grup aminowych w dendrymerach PAMAM. Otrzymanie dendrymerów obu typów, tj. opartych na hydrofobowym rdzeniu zawierającym reszty aromatyczne i na rdzeniu o charakterze kationowym, zawierającym ładunek dodatni w części nieaminokwasowej, oraz porównanie ich właściwości biologicznych pozwoliło mi na weryfikację postawionej hipotezy o istotnej roli struktury rdzenia w procesie modulowania toksyczności dendrymeru.

Okazało się, że właściwe było założenie, że charakter kationowy rdzenia może być źródłem braku selektywności komórkowej. Tak więc, synteza dendrymerów opartych na rdzeniu hydrofobowym pozwoliła uzyskać związki charakteryzujące się selektywnym działaniem na komórki prokariotyczne oraz nietoksyczne wobec czerwonych ciałek krwi i komórek skóry właściwej.

Zsyntetyzowana przeze mnie grupa amfifilowych dendrymerów peptydowych, posiadających rdzeń o charakterze hydrofobowym, cechuje się selektywnym działaniem wobec bakterii Gram-ujemnych i dobrymi parametrami terapeutycznymi (wysoki indeks terapeutyczny oraz odporność na enzymy proteolityczne). W odniesieniu do aktualnego

problemu szybko narastającej oporności bakterii na stosowane antybiotyki, a w szczególności braku nowych, efektywnych leków zwalczających szczepy Gram-ujemne, stanowi ona bardzo wartościowy materiał do dalszych badań, mogący posłużyć jako źródło nowych związków przeciwdrobnoustrojowych o bardzo niskiej toksyczności.

Druga z wysuniętych przeze mnie hipotez zakładająca, że wprowadzenie do struktury dendrymeru reszt PABA lub sulfonamidu zwiększy selektywność dendrymeru w kierunku komórek prokariotycznych i/lub aktywność przeciwbakteryjną, nie potwierdziła się. Tym niemniej, synteza tej grupy dendrymerów była wartościowa pod innym względem. Okazało się, że związki te uzyskały aktywność przeciw komórkom ludzkiej melanomy. Powodem takiej selektywności może być fakt, że komórki nowotworowe posiadają więcej anionowych fosfolipidów niż komórki zdrowe oraz, że jako szybko namnażające się, mają nadekspresję receptorów kwasu foliowego (którego prekursorem jest PABA). Wśród tych pochodnych, szczególnie interesujący jest dendrymer **107** posiadający zdolność do stymulacji wzrostu fibroblastów skóry ludzkiej. Może on posłużyć jako struktura wiodąca nowej klasy związków o działaniu m.in. przyspieszającym gojenie ran czy przeciwstarzeniowym.

Dendrymery z terminalnymi resztami PABA mogą stanowić dobry materiał do dalszych badań biologicznych. Kwas p-aminobenzoesowy wykazuje bowiem różnorodną aktywność biologiczną,¹⁶¹ jak również jest bardzo częstym blokiem budulcowym w strukturze leków o różnym działaniu farmakologicznym.¹⁶²

Wszystkie dendrymery peptydowe, wytypowane do badań w kierunku działania przeciwnowotworowego wobec komórek czerniaka ludzkiego, okazały się aktywne, chociaż w różnym stopniu. Próba poprawy właściwości przeciwnowotworowych dendrymerów z terminalnymi resztami tryptofanowymi na drodze zastąpienia reszt tryptofanowych przez reszty pochodnych tryptofanu, tj. *N*-Boc-1-butylotryptofanu i *N*-Boc-1-[5-(Boc-amino)pentyl]tryptofanu, zakończyła się powodzeniem.

W literaturze dendrymerów brak jest danych na temat związków zawierających w swojej strukturze pochodne tryptofanu. Co więcej, *N*¹-aminoalkilowe pochodne tryptofanu nie zostały dotychczas opisane w piśmiennictwie chemicznym, w związku z czym otrzymany przeze mnie *N*-Boc-1-[5-(Boc-amino)pentyl]tryptofan stanowi pierwszy przykład tego typu związków. Wydają się one atrakcyjne z punktu widzenia chemii medycznej peptydów.

Analiza zależności pomiędzy strukturą a aktywnością biologiczną dendrymerów otrzymanych w niniejszej pracy dała wartościowe informacje o kierunkach przyszłych modyfikacji strukturalnych, mogących prowadzić do polepszenia właściwości biologicznych tej grupy związków.

6. CZĘŚĆ EKSPERYMENTALNA

6.1. UWAGI OGÓLNE

Wszystkie związki organiczne niezbędne do przeprowadzenia reakcji, dostępne handlowo, stosowano bez ich uprzedniego oczyszczania. Rozpuszczalniki organiczne używane w reakcjach oczyszczono według ogólnie przyjętych metod.¹⁶³ Nasycony roztwór HCl w EtOAc (nas. HCl/EtOAc) przygotowano generując chlorowodór w wyniku działania H₂SO₄ na NaCl. Następujące związki zsyntetyzowano na podstawie opublikowanych przepisów i nie zostały opisane w części eksperymentalnej: Boc-Trp-OH (**81**),¹⁶⁴ Boc-Lys(Boc)-OH (**1**),¹⁶⁴ HCl-Trp-OMe (**86**),¹⁶⁵ Boc-Trp-OMe (**87**),^{164,165} (2-Cl-Z)-Lys(Boc)-OH,¹⁶⁶ 3,5-dihydroksybenzoesan metylu (**15**),¹⁶⁷ bromek 2-(Boc-amino)etylu (**16**)¹⁶⁷. W przypadku związków, które są znane w literaturze, ale zostały otrzymane według innej bądź zmodyfikowanej metody, do opisu dołączono odnośnik literaturowy wskazujący na pracę zawierającą odpowiednie dane analityczne.

Przebieg reakcji oraz czystość produktu kontrolowano za pomocą chromatografii cienkowarstwowej na płytkach aluminiowych pokrytych żelem krzemionkowym (Silica Gel 60 F₂₅₄, Merck). Wizualizację chromatogramów prowadzono w świetle lampy UV ($\lambda = 254$ nm), w parach jodu, jak również za pomocą odczynnika cerowego, bądź roztworu ninhydryny w metanolu i ogrzewaniu płytek do temperatur 100-150 °C. W przypadku reakcji sprzęgania, oprócz TLC, wykonywano test Kaisera (odczynnik przygotowano zgodnie ze znaną procedurą¹⁶⁸). Do oczyszczania substancji za pomocą chromatografii kolumnowej stosowano żel krzemionkowy Kieselgel 60 (Merck, 70-230 mesh) oraz wypełnienie Sephadex LH-20 (Sigma-Aldrich).

Struktura i czystość związków została potwierdzona za pomocą widm NMR (1D ¹H i ¹³C, w przypadku związków wysokocząsteczkowych dodatkowo – DEPT, COSY, HSQC), MS i analizy elementarnej. Widma NMR zostały wykonane w temp. pokojowej na aparatach Bruker AMX 500 MHz oraz Varian 500 MHz. Przesunięcia chemiczne sygnałów (δ) rejestrowano w ppm względem wzorca wewnętrznego – tetrametylosilanu (TMS), a stałe sprzężenia (J) w hercach (Hz). Widma spektrometrii mas wykonano metodami: ESI na aparacie MarinerTM oraz MALDI przy użyciu aparatu MaldiSYNAPT G2-S HDMS (Waters). Analizy elementarne zostały wykonane za pomocą aparatu Vario EL III.

Zsyntetyzowane związki scharakteryzowano ponadto poprzez temp. topnienia i skręcalność optyczną. Temperatury topnienia związków stałych oznaczono na aparacie Nikon Eclipse 200

i podano je bez korekty dla warunków pomiaru. Skręcalność właściwą związków optycznie czynnych zmierzono na polarymetrze Jasco P-2000 przy długości fali $\lambda = 589$ nm i używając kuwety o długości 50.00 mm i pojemności 1 mL.

W opisie widm ^1H i ^{13}C NMR posłużono się skrótami. Do scharakteryzowania sygnałów w widmach ^1H użyto następujących skrótów: s – singlet, d – dublet, t – triplet, q – kwartet, m – multiplet, dd – dublet dubletów, br – sygnał poszerzony. W celu dokładnego przypisania przesunięć chemicznych do odpowiednich atomów związku, zarówno w opisie widm ^1H jak i ^{13}C NMR, zastosowano następujące skróty i numerację:

PEA – reszta fenyletyloaminy, $\text{C}_6\text{H}_5\text{-CH}_2\text{-CH}_2\text{-NH-}$,

TA – reszta tryptaminy, $\text{C}_8\text{H}_6\text{N-CH}_2\text{-CH}_2\text{-NH-}$,

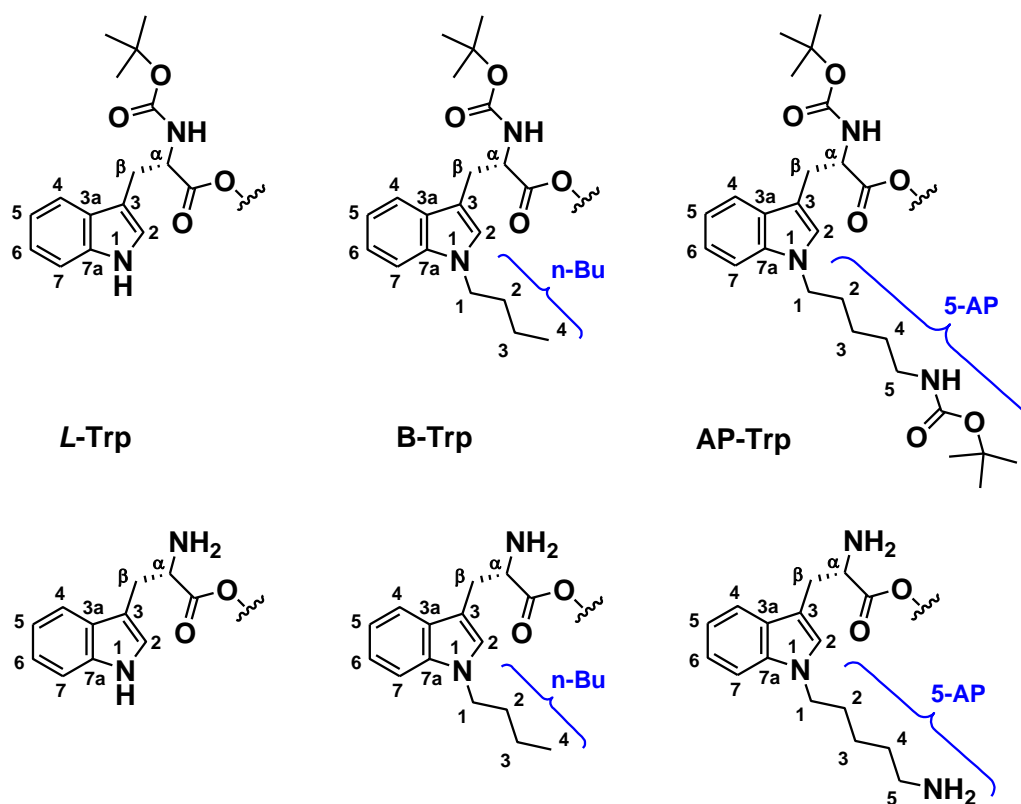
DDA – reszta dodecyloaminy, $\text{C}_{12}\text{H}_{25}\text{NH-}$,

dDDA – reszta didodecyloaminy, $(\text{C}_{12}\text{H}_{25})_2\text{N-}$,

NOON – reszta 2,2'-(etylenodioksy)dietyloaminy, $\text{-HNCH}_2\text{CH}_2(\text{OCH}_2\text{CH}_2)_2\text{NH}_2$,

PABA – reszta kwasu 4-(Boc-amino)benzoesowego lub p-aminobenzoesowego,

SA – reszta kwasu 4-(Boc-amino)benzenosulfonowego lub p-aminobenzenosulfonowego,



Rysunek 44. Numeracja atomów węgla i wodoru reszt tryptofanowych i pochodnych tryptofanu zastosowana w opisie widm ^1H i ^{13}C NMR.

L-Trp – reszta *N*-Boc-*L*-tryptofanu lub *L*-tryptofanu,

B-Trp – reszta *N*-Boc-1-butylotryptofanu lub 1-butylotryptofanu,

AP-Trp – reszta *N*-Boc-1-[5-(Boc-amino)pentyl]tryptofanu lub 1-(5-aminopentyl)-tryptofanu,

n-Bu – reszta *n*-butylu,

5-AP – reszta 5-(Boc-amino)pentylu lub 5-aminopentylu (Rysunek 44),

Ar-CH₂O, ArH (dla ¹H NMR), Ar-CH₂O, CH_{Ar}, C_{Ar}-Cl, C_{Ar}-CH₂O (dla ¹³C NMR) – odnoszą się do grupy 2-Cl-Z lub Z,

Ph – odnosi się do aromatycznej części rozgałęziającej opartej na kwasie 3,5-dihydroksybenzoesowym.

6.2. SYNTETYCZNE PROCEDURY OGÓLNE

PROCEDURA A

Reakcja sprzęgania metodą DCC/HOBt

Do roztworu kwasu (1.1 ekw. *na 1 grupę aminową aminy*) w DMF (lub w mieszaninie DMF/DCM 1:1), ochłodzonego za pomocą łaźni lodowej do temp. 0 °C, dodano HOBt (1.1 ekw. *na 1 grupę aminową aminy*) i DCC (1.1 ekw. *na 1 grupę aminową aminy*). Po wytrąceniu się DCU, do mieszaniny reakcyjnej dodano aminę (1 ekw.)* Kontynuowano mieszanie w temp. 0 °C przez godzinę, a następnie w temp. pokojowej do momentu przereagowania substratów, monitorowanego przez TLC i test Kaisera. Po tym czasie odsączono DCU a rozpuszczalniki odparowano na wyparce próżniowej. Pozostałość rozpuszczono w 100 mL EtOAc i przemyto nasyconym roztworem NaHCO₃ (3 × 20 mL), 2% roztworem kwasu cytrynowego (3 × 20 mL) oraz solanką (20 mL). Następnie warstwę organiczną wysuszono nad MgSO₄, przesączono i odparowano rozpuszczalnik. Surowy produkt oczyszczono poprzez chromatografię kolumnową (z wypełnieniem Sephadex LH-20 i/lub na silikażelu) bądź poprzez krystalizację.

PROCEDURA B

Reakcja sprzęgania metodą EDC/HOBt

Do roztworu kwasu (1.1 ekw. *na 1 grupę aminową aminy*) w DMF dodano HOBt (1.1 ekw. *na 1 grupę aminową aminy*) i mieszano w atmosferze argonu w temp. 0 °C przez 5 minut. Następnie dodano zawiesinę otrzymaną z EDC·HCl (1.1 ekw. *na 1 grupę aminową aminy*) i Et₃N (w ilości potrzebnej do zneutralizowania chlorowodoru) w DMF. Nie zmieniając warunków reakcji, mieszano przez 50 minut. Po tym czasie do mieszaniny

reakcyjnej dodano aminę (1 ekw.)* Kontynuowano mieszanie bez argonu w temp. pokojowej do momentu przereagowania substratów. Postęp reakcji monitorowano przez TLC i test Kaisera. Po odsączeniu osadu i odparowaniu rozpuszczalnika, pozostałość rozpuszczono w 100 mL CHCl_3 i przemyto nasyconym roztworem NaHCO_3 (3×20 mL), 2% roztworem kwasu cytrynowego (3×20 mL) oraz solanką (20 mL). Następnie warstwę organiczną wysuszono nad Na_2SO_4 , przesączono i odparowano rozpuszczalnik. Surowy produkt oczyszczono poprzez chromatografię kolumnową z wypełnieniem Sephadex LH-20 i/lub na silikażelu.

** w przypadku aminy występującej w postaci chlorowodoru, dodano ją do mieszaniny reakcyjnej w formie roztworu z Et_3N (1 ekw. na 1 grupę aminową aminy, czyli w ilości potrzebnej do zneutralizowania chlorowodoru) w DMF; w wielu przypadkach dodawano do mieszaniny reakcyjnej nadmiar Et_3N , co zostało zaznaczone przy syntezie odpowiedniego związku.*

PROCEDURA C

Usunięcie grupy zabezpieczającej Boc za pomocą nas. HCl/EtOAc

WARIANT A**

Związek zabezpieczony grupą Boc rozpuszczono w nasyconym roztworze HCl w EtOAc (nas. HCl/EtOAc). Mieszano w temp. pokojowej do zaniku substratu, kontrolując postęp reakcji za pomocą TLC. Po tym czasie wytrącony produkt oddzielono przez sączenie próżniowe i przemyto Et_2O , a w przypadku produktu niewypadającego z mieszaniny reakcyjnej – odparowano rozpuszczalnik, pozostałość rozpuszczono w minimalnej ilości EtOAc bądź MeOH i wytrącono Et_2O . Czysty produkt w postaci chlorowodoru wysuszono w eksykatorze nad P_2O_5 .

WARIANT B***

Związek zabezpieczony grupą Boc rozpuszczono w minimalnej ilości MeOH, a następnie dodano nasyconego roztworu HCl w EtOAc (nas. HCl/EtOAc). Mieszano w temp. pokojowej do zaniku substratu, kontrolując postęp reakcji za pomocą TLC. Po tym czasie odparowano rozpuszczalniki. Pozostałość rozpuszczono w MeOH i odparowano, powtarzając tę czynność kilkakrotnie do momentu usunięcia nadmiaru kwasu. Następnie oczyszczono przez sączenie molekularne z użyciem kolumny z wypełnieniem Sephadex LH-20 z MeOH jako eluentem. Czysty produkt w postaci chlorowodoru wysuszono w eksykatorze nad P_2O_5 .

*** stosowano do deprotekcji substratów i rdzeni;*

**** stosowano do deprotekcji dendrymerów.*

PROCEDURA D

Usunięcie grupy zabezpieczającej Z za pomocą wodorowania katalitycznego (10% Pd/C)

Związek zabezpieczony grupą Z rozpuszczono w MeOH, przepłukano argonem i dodano 10% Pd/C w ilości 10% wagowych substratu na każdą grupę Z. Mieszano w atmosferze wodoru pod ciśnieniem atmosferycznym do momentu zaniku substratu, monitorowanego za pomocą TLC. Następnie mieszaninę reakcyjną przesączono przez celit, przemyto MeOH i odparowano. Po usunięciu lotnych składników pod zmniejszonym ciśnieniem na wyparce rotacyjnej, otrzymano produkt, który użyto do dalszej reakcji bez oczyszczania.

PROCEDURA E

Hydrolyza grupy estrowej w warunkach zasadowych

Do roztworu estru (1 ekw.) w MeOH dodano 1 M wodny roztwór NaOH (2-6 ekw.) i mieszano w temp. 50 °C do momentu zaniku substratu, kontrolowanego za pomocą TLC. Następnie mieszaninę reakcyjną zatężono, dodano H₂O, zakwaszono 1 M wodnym roztworem HCl do pH = 1.5 i ekstrahowano EtOAc. Połączone ekstrakty organiczne wysuszono nad MgSO₄, przesączono i odparowano. Otrzymany produkt suszono w eksykatorze nad P₂O₅.

6.3. SYNTEZA SUBSTRATÓW

6.3.1. Synteza amidów *L*-lizyny i związku nieaminokwasowego oraz dipeptydu KW-OMe

A) BOC – ZABEZPIECZONE AMIDY

Wykorzystując procedurę ogólną sprzęgania metodą DCC/HOBt (Procedura A, Rozdział 6.2.) zsyntetyzowano cztery Boc-zabezpieczone amidy *L*-lizyny i związku nieaminokwasowego (**2** - **5**) oraz dipeptyd Boc-KW-OMe (**6**).

a) Fenyloetyloamid *N*, *N'*-Boc-*L*-lizyny (**2**)

Do reakcji użyto: Boc-Lys(Boc)-OH (5 g, 14.44 mmol), HOBt (2.21 g, 14.44 mmol), DCC (2.98 g, 14.44 mmol), PEA·HCl (2.07 g, 13.13 mmol), Et₃N (1.82 mL, 13.13 mmol) i DMF/DCM (1:1, 40 mL); czas reakcji – 24 godziny; krystalizacja z układu CHCl₃/heksan; produkt (5.29 g, 89.7%) w postaci białego, drobnokrystalicznego ciała stałego.

C₂₄H₃₉O₅N₃, M = 449.58 g/mol (masa monoizotopowa 449.3).

LRMS (ESI, MeOH): 472.4 [M + Na⁺].

R_f = 0.74 (CHCl₃/MeOH 8:1).

b) Tryptamid *N, N'*-Boc-*L*-lizyny (3)

Do reakcji użyto: Boc-Lys(Boc)-OH (3.23 g, 9.33 mmol), HOBt (1.43 g, 9.33 mmol), DCC (1.93 g, 9.33 mmol), TA (1.36 g, 8.48 mmol) i DMF/DCM (1:1, 20 mL); czas reakcji – 48 godzin; kolumna silikażelowa (CHCl₃/MeOH, 50:1→25:1); produkt (3.59 g, 86.7%) w formie białego proszku.

C₂₆H₄₀O₅N₄, M = 488.62 g/mol (masa monoizotopowa 488.3).

LRMS (ESI, MeOH): 511.4 [M + Na⁺], 489.4 [M + H⁺] - *główny sygnał*.

R_f = 0.56 (CHCl₃/MeOH 8:1).

c) Dodecyloamid *N, N'*-Boc-*L*-lizyny (4)

Do reakcji użyto: Boc-Lys(Boc)-OH (5.77 g, 16.67 mmol), HOBt (2.55 g, 16.67 mmol), DCC (3.44 g, 16.67 mmol), DDA (2.81 g, 15.15 mmol) i DMF/DCM (1:1, 40 mL); czas reakcji – 24 godziny; kolumna silikażelowa (CHCl₃/MeOH, 25:1); produkt (7.11 g, 91.3%) w formie oleju szybko krzepnącego do białego ciała stałego.

C₂₈H₅₅O₅N₃, M = 513.75 g/mol (masa monoizotopowa 513.4).

LRMS (ESI, MeOH): 536.6 [M + Na⁺] - *główny sygnał*, 514.7 [M + H⁺].

R_f = 0.59 (CHCl₃/MeOH 8:1).

d) Didodecyloamid *N, N'*-Boc-*L*-lizyny (5)

Do reakcji użyto: Boc-Lys(Boc)-OH (2.26 g, 6.53 mmol), HOBt (1 g, 6.53 mmol), DCC (1.35 g, 6.53 mmol), dDDA (2.1 g, 5.94 mmol) i DMF/DCM (1:1, 20 mL); czas reakcji – 24 godziny; kolumna silikażelowa (CHCl₃/EtOAc, 9:1); produkt (3.74 g, 92.3%) w postaci bezbarwnego oleju.

C₄₀H₇₉O₅N₃, M = 682.07 g/mol (masa monoizotopowa 681.6).

LRMS (ESI, MeOH): 1386.0 [2M + Na⁺], 704.5 [M + Na⁺] - *główny sygnał*, 682.5 [M + H⁺].

¹H NMR (500 MHz, MeOD): δ = 0.89 (br t, 6H, 2×CH₃ dDDA), 1.25-1.74 (br m, 46H, β, γ, δCH₂, 2×CH₂-2-11 dDDA) nakładający się na 1.43 [2s, 18H, 2×C(CH₃)₃], 3.03 (m, 2H, εCH₂), 3.18 (m, 1H, CH₂-1 dDDA), 3.40 (m, 3H, CH₂-1 dDDA), 4.44 (m, 1H, αCH).

¹³C NMR (500 MHz, MeOD): δ = 14.5 (2×C¹² dDDA), 23.8, 24.1, 27.9, 28.0, 28.6 (γC, 2×C^{3,11} dDDA), 28.8, 28.9 [C(CH₃)₃], 30.3, 30.4, 30.5, 30.7-30.8, 33.1, 33.6 (β, δC, 2×C², 2×C⁴-C¹⁰ dDDA), 41.0 (εC), 47.5, 49.2 (2×C¹ dDDA), 51.8 (αC), 79.8, 80.4 [C(CH₃)₃], 157.7, 158.5 [C=O (Boc)], 174.3 (CONH).

R_f = 0.79 (CHCl₃/MeOH 8:1).

e) Ester metylowy *N, N'*-Boc-*L*-lizylo-*L*-tryptofanu (6)

Do reakcji użyto: Boc-Lys(Boc)-OH (3.74 g, 10.8 mmol), HOBt (1.65 g, 10.8 mmol), DCC (2.23 g, 10.8 mmol), HCl-Trp-OMe (2.5 g, 9.8 mmol), Et₃N (1.36 mL, 9.8 mmol) i DMF (25 mL); czas reakcji – 48 godzin; kolumna silikażelowa (CHCl₃/MeOH, 50:1→25:1); produkt (4.98 g, 92.7%) w postaci białego proszku.

C₂₈H₄₂O₇N₄, M = 546.66 g/mol (masa monoizotopowa 546.3).

LRMS (ESI, MeOH): 585.3 [M + K⁺], 569.4 [M + Na⁺] - *główny sygnał*, 547.3 [M + H⁺].

T. top.: 73-76°C.

B) ODBEZPIECZONE AMIDY

Deprotekcję grup Boc w amidach **2** - **6** za pomocą nasyconego roztworu HCl w EtOAc przeprowadzono wg procedury ogólnej zamieszczonej w Rozdziale 6.2. (Procedura C – wariant A). Do reakcji wzięto 1.5 g związku **2** - **5** i 20 mL nas. HCl/EtOAc (w przypadku związku **6** - 4.33 g i 60 mL). Całkowite zdjęcie ochrony obserwowano po 3 - 4 godzinach. Otrzymano produkty **7** - **11** występujące w postaci dichlorowodorków.

a) Dichlorowodorek fenyloetyloamidu *L*-lizyny (7)

C₁₄H₂₃ON₃×2HCl, M = 322.27 g/mol (masa monoizotopowa nieprotonowanego związku – 249.2); produkt (1.03 g, 95.4%) w formie białego proszku.

LRMS (ESI, MeOH): 250.2 [M + H⁺].

b) Dichlorowodorek tryptamidu *L*-lizyny (8)

C₁₆H₂₄ON₄×2HCl, M = 361.31 g/mol (masa monoizotopowa nieprotonowanego związku – 288.2); produkt (1.09 g, 98.2%) w formie białego proszku.

LRMS (ESI, MeOH): 289.2 [M + H⁺].

c) Dichlorowodorek dodecyloamidu *L*-lizyny (9)

C₁₈H₃₉ON₃×2HCl, M = 386.44 g/mol (masa monoizotopowa nieprotonowanego związku – 313.3); produkt (1.04 g, 92%) w formie białego proszku.

LRMS (ESI, MeOH): 336.4 [M + Na⁺], 314.4 [M + H⁺] - *główny sygnał*, 514.7 [M + H⁺], 297.4 [M + H⁺ - NH₃]⁺.

R_f = 0.53 (nBuOH/AcOH/H₂O 3:1:1).

d) Dichlorowodorek didodecyloamidu *L*-lizyny (10)

$C_{30}H_{63}ON_3 \times 2HCl$, $M = 554.76$ g/mol (masa monoizotopowa nieprotonowanego związku – 481.5); produkt (1.20 g, 98.4%) w formie białego proszku.

LRMS (ESI, MeOH): 986.2 [$2M + Na^+$], 964.3 [$2M + H^+$], 504.7 [$M + Na^+$], 482.7 [$M + H^+$] - *główny sygnał*.

$R_f = 0.61$ (nBuOH/AcOH/H₂O 3:1:1).

e) Dichlorowodorek estru metylowego *L*-lizylo-*L*-tryptofanu (11)

$C_{18}H_{26}O_3N_4 \times 2HCl$, $M = 419.35$ g/mol (masa monoizotopowa nieprotonowanego związku – 346.2); produkt (3.27 g, 98.5%) w formie białego proszku.

LRMS (ESI, MeOH): 369.3 [$M + Na^+$], 347.3 [$M + H^+$] - *główny sygnał*.

$R_f = 0.42$ (nBuOH/AcOH/H₂O 3:1:1).

T. top.: 127-130°C.

6.3.2. Synteza symetrycznego i niesymetrycznego elementu rozgałęziającego opartego na kwasie 3,5 – dihydroksybenzoowym

A) SYMETRYCZNY ELEMENT ROZGAŁĘZIAJĄCY

3,5-bis[2-(Boc-amino)etoksy]benzoesan metylu (19)¹⁶⁷

5.71 g (33.98 mmol, 1 ekw.) 3,5-dihydroksybenzoesanu metylu (**15**) rozpuszczono w 80 mL DMF, dodano 21.13 g (152.91 mmol, 4.5 ekw.) K₂CO₃ i mieszano w temp. 60 °C przez godzinę. Następnie do otrzymanej zawiesiny dodano roztwór bromku 2-(Boc-amino)etylu (**16**, 22.82 g, 101.94 mmol, 3 ekw.) w 20 mL DMF. Po 48 godzinach mieszania w temp. 60 °C ochłodzono do temp. pokojowej, przesączono przez celit i odparowano rozpuszczalnik. Surowy produkt rozpuszczono w 150 mL EtOAc, przemyto H₂O (3 × 30 mL) oraz solanką (30 mL). Warstwę organiczną suszoną nad Na₂SO₄. Odsączono środek suszący i odparowano rozpuszczalnik. W wyniku oczyszczania na kolumnie silikażelowej z użyciem fazy CHCl₃/MeOH 25:1 (2-krotnie), otrzymano czysty produkt w postaci białego proszku z wydajnością 69.5% (10.71 g). Dodatkowo wyizolowano produkt monoalkilowania – 3-hydroksy-5-[2-(Boc-amino)etoksy]benzoesan metylu (**20**) - w formie białego proszku w ilości 3.64 g (23.6%). Oba związki suszone były nad P₂O₅.

$C_{22}H_{34}O_8N_2$, $M = 454.51$ g/mol (masa monoizotopowa 454.2).

LRMS (ESI, MeOH): 477.2 [$M + Na^+$].

¹H NMR (400 MHz, MeOD): δ = 1.44 [s, 18H, 2×C(CH₃)₃], 3.43 (m, 4H, 2×CH₂NH), 3.88 (s, 3H, OCH₃), 4.01 (t, J = 5.5 Hz, 4H, 2×OCH₂), 6.75 (m, 1H, C⁴-H *Ph*), 7.14 (d, J = 2.15 Hz, 2H, C^{2,6}-H *Ph*).

¹³C NMR (400 MHz, MeOD): δ = 28.7 [C(CH₃)₃], 40.9 (CH₂NH), 52.7 (OCH₃), 68.3 (OCH₂), 80.2 [C(CH₃)₃], 107.4 (C⁴ *Ph*), 109.0 (C^{2,6} *Ph*), 133.2 (C¹ *Ph*), 158.5 [C=O (Boc)], 161.4 (C^{3,5} *Ph*), 168.1 (CO₂Me).

R_f = 0.70 (CHCl₃/MeOH 8:1).

Kwas 3,5-bis[2-(Boc-amino)etoksy]benzoesowy (21)

Produkt otrzymano na drodze hydrolizy przeprowadzonej zgodnie z procedurą ogólną (Procedura E, Rozdział 6.2.). Do reakcji, trwającej 4 godziny, użyto 5 g (11 mmol, 1 ekw.) estru **19** rozpuszczonego w 100 mL MeOH i 44 mL (44 mmol, 4 ekw.) 1 M NaOH. Otrzymano produkt w postaci białego proszku z wydajnością 95.1% (4.61 g).

C₂₁H₃₂O₈N₂, M = 440.49 g/mol (masa monoizotopowa 440.2).

LRMS (ESI, MeOH): 463.4 [M + Na⁺] – *główny sygnał*, 485.4 [M - H⁺ + 2Na⁺], 439.3 [M - H⁺, *jony ujemne*] – *główny sygnał*, 485.3 [M + HCOO⁻, *jony ujemne*].

R_f = 0.43 (CHCl₃/MeOH 8:1).

B) NIESYMETRYCZNY ELEMENT ROZGAŁĘZIAJĄCY

3-hydroksy-5-[2-(Boc-amino)etoksy]benzoesan metylu (20)

14.25 g (84.8 mmol, 1 ekw.) 3,5-dihydroksybenzoesanu metylu (**15**) rozpuszczono w 460 mL DMF, dodano 11.72 g (84.8 mmol, 1 ekw.) K₂CO₃ i mieszano w temp. pokojowej przez godzinę. Następnie do otrzymanej zawiesiny dodano roztwór bromku 2-(Boc-amino)etylu (**16**, 9.5 g, 42.4 mmol, 0.5 ekw.) w 40 mL DMF w 4 porcjach. Po każdej dodanej porcji mieszano przez 30 minut. Następnie temperaturę podwyższono do 40 °C i kontynuowano mieszanie przez 48 godzin. Po tym czasie przesączono przez celit, rozpuszczalnik odparowano. Surowy produkt rozpuszczono w EtOAc i przemyto H₂O (2-krotnie) oraz solanką. Warstwę organiczną suszoną nad Na₂SO₄. Odsączono środek suszący i odparowano rozpuszczalnik. Oczyszczano na kolumnie silikażelowej z użyciem fazy 4% aceton/DCM (5-krotnie). Produkt otrzymano w postaci białego proszku (5.64 g, 42.7%).

C₁₅H₂₁O₆N, M = 311.33 g/mol (masa monoizotopowa 311.1).

LRMS (ESI, MeOH): 645.4 [2M + Na⁺], 334.3 [M + Na⁺] - *główny sygnał*.

R_f = 0.51 (CHCl₃/MeOH 8:1).

T. top.: 106-107°C (lit. 107°C¹⁶⁹).

5-(Boc-amino)-1-pentanol (**17**)

10 g (96.9 mmol) 5-amino-1-pentanolu (**14**) rozpuszczono w 50 mL DCM. Po oziębieniu do 0 °C, wkropiono roztwór Boc₂O (21.15 g, 96.9 mmol) w 20 mL DCM. Po 12 godzinach mieszania w temp. pokojowej dodano dodatkowe 50 mL DCM i przemyto H₂O oraz solanką. Suszono nad Na₂SO₄. Odsączono środek suszący i odparowano rozpuszczalnik. Otrzymano produkt w postaci bezbarwnego, zestalającego się oleju z wydajnością 97.5% (19.2 g).

C₁₀H₂₁O₃N, M = 203.28 g/mol (masa monoizotopowa 203.2).

LRMS (ESI, MeOH): 226.4 [M + Na⁺].

R_f = 0.37 (EtOAc/heksan 1:1).

Mesylan 5-(Boc-amino)pentylu (**18**)

Do oziębionego roztworu (lód/H₂O) związku **17** (3 g, 14.76 mmol, 1 ekw.) i chlorku metanosulfonylu (1.26 mL, 16.24 mmol, 1.1 ekw.) w 15 mL DCM dodano powoli Et₃N (2.25 mL, 16.24 mmol, 1.1 ekw.). Po godzinie mieszania w temp. pokojowej mieszaninę zateżono i rozpuszczono w 80 mL EtOAc. Przemyto 1M KHSO₄, H₂O i solanką. Następnie wysuszono nad Na₂SO₄, przesączono i odparowano. Otrzymano mesylan **18** z wydajnością 97.6% (4.05 g) w postaci bezbarwnego oleju zestalającego się do białego ciała stałego. Użyto go bezpośrednio do następnej reakcji bez oczyszczania.

C₁₁H₂₃O₅NS, M = 281.37 g/mol (masa monoizotopowa 281.1).

R_f = 0.49 (EtOAc/heksan 1:1).

3-[5-(Boc-amino)pentoksy]-5-[2-(Boc-amino)etoksy]benzoesan metylu (**22**)

1.72 g (5.52 mmol, 1 ekw.) związku **20** rozpuszczono w 20 mL DMF, dodano 3.43 g (24.84 mmol, 4.5 ekw.) K₂CO₃ i mieszano w temp. 60 °C przez godzinę. Następnie do zawiesiny dodano 3.12 g (11.04 mmol, 2 ekw.) mesylanu 5-(Boc-amino)pentylu (**18**). Kontynuowano mieszanie w temp. 60 °C przez 48 godzin. Po tym czasie doprowadzono do temp. pokojowej, przesączono przez celit i odparowano rozpuszczalnik. Pozostałość rozpuszczono w 100 mL EtOAc, przemyto H₂O (2 × 30 mL) oraz solanką (30 mL). Następnie wysuszono nad Na₂SO₄, przesączono i odparowano. Surowy produkt oczyszczono na kolumnie silikażelowej z użyciem fazy EtOAc/heksan 3:7. Otrzymany produkt w postaci bezbarwnego oleju wysuszono w ekzykatorze nad P₂O₅. Wydajność reakcji wyniosła 84% (2.3 g).

C₂₅H₄₀O₈N₂, M = 496.61 g/mol (masa monoizotopowa 496.6).

LRMS (ESI, MeOH): 519.4 [M + Na⁺] - *główny sygnał*, 497.4 [M + H⁺].

¹H NMR (500 MHz, MeOD): δ = 1.53 [br m, 4H, O-(CH₂)₂-CH₂-CH₂-NH] nakładający się na 1.43, 1.44 [2s, 18H, 2×C(CH₃)₃], 1.79 [m, 2H, O-CH₂-CH₂-(CH₂)₃-NH], 3.06 [t, J = 6.7 Hz, 2H, O-(CH₂)₄-CH₂-NH], 3.43 (t, J = 5.6 Hz, 2H, O-CH₂-CH₂-NH), 3.87 (s, 3H, OCH₃), 3.98 [t, J = 6.35 Hz, 2H, O-CH₂-(CH₂)₄-NH], 4.01 (t, J = 5.6 Hz, 2H, O-CH₂-CH₂-NH), 6.71 (t, J = 2.25 Hz, 1H, C⁴-H *Ph*), 7.12 (m, 2H, C^{2,6}-H *Ph*).

¹³C NMR (500 MHz, MeOD): δ = 24.3 [O-(CH₂)₂-CH₂-(CH₂)₂-N], 28.8 [C(CH₃)₃], 29.9 [O-CH₂-CH₂-(CH₂)₃-NH], 30.7 [O-(CH₂)₃-CH₂-CH₂-NH], 40.9 (O-CH₂-CH₂-NH), 41.2 [O-(CH₂)₄-CH₂-NH], 52.7 (OCH₃), 68.3 (O-CH₂-CH₂-NH), 69.2 [O-CH₂-(CH₂)₄-NH], 79.8, 80.2 [C(CH₃)₃], 107.4 (C⁴ *Ph*), 108.7, 109.0 (C^{2,6} *Ph*), 133.1 (C¹ *Ph*), 158.4, 158.5 [C=O (Boc)], 161.3, 161.6 (C^{3,5} *Ph*), 168.2 (CO₂Me).

R_f = 0.26 (EtOAc/heksan 3:7).

Kwas 3-[5-(Boc-amino)pentoksy]-5-[2-(Boc-amino)etoksy]benzoesowy (23)

Produkt otrzymano w wyniku hydrolizy estru **22** prowadzonej zgodnie z procedurą ogólną (Procedura E, Rozdział 6.2.). Do reakcji, trwającej 2 godziny, użyto 2.22 g (4.47 mmol, 1 ekw.) estru **22** rozpuszczonego w 40 mL MeOH i 18 mL (17.9 mmol, 4 ekw.) 1 M NaOH. Produkt, początkowo otrzymany w postaci bezbarwnego oleju, po wysuszeniu nad P₂O₅, zestalił się do białego ciała stałego z wydajnością 97.7% (2.1 g).

C₂₄H₃₈O₈N₂, M = 482.57 g/mol (masa monoizotopowa 482.3).

LRMS (ESI, MeOH): 505.4 [M + Na⁺].

R_f = 0.54 (CHCl₃/MeOH 8:1).

Dichlorowodorek 3-(5-aminopentoksy)-5-(2-aminoetoksy)benzoesanu metylu (111)

1.76 g (4.77 mmol) związku **19** poddano deprotekcji grup Boc za pomocą 20 mL nas. HCl/EtOAc. Reakcję przeprowadzono wg procedury ogólnej zamieszczonej w Rozdziale 6.2. (Procedura C – wariant A). Otrzymano produkt w postaci dichlorowodoru, w formie białego proszku. Wydajność wysuszonego w eksykatorze nad P₂O₅ produktu wyniosła 98.5% (1.29 g).

C₁₅H₂₄O₄N₂×2HCl, M = 369.28 g/mol (masa monoizotopowa nieprotonowanego związku – 296.2).

LRMS (ESI, MeOH): 297.4 [M + H⁺].

6.3.3. Synteza pochodnych kwasu p-aminobenzoowego i p-aminobenzenosulfonowego

a) Sól trietyloamoniowa kwasu 4-(Boc-amino)benzenosulfonowego (112)

10 g (57.74 mmol, 1 ekw.) kwasu p-aminobenzenosulfonowego rozpuszczono w mieszaninie rozpuszczalników H₂O/dioksan (1:2, 150 mL) i dodano 16 mL (115.5 mmol, 2 ekw.) Et₃N. Następnie mieszaninę reakcyjną ochłodzono za pomocą łaźni lodowej i utrzymując temp. 0 °C wkroplono roztwór Boc₂O (25.21 g, 115.5 mmol, 2 ekw.) w 50 mL dioksanu. Kontynuowano mieszanie w temp. pokojowej przez 48 godzin. Po tym czasie odparowano dioksan, dodano 60 mL H₂O i przemyto EtOAc (3 × 30 mL). Odparowano do suchej masy i wysuszono pod zmniejszonym ciśnieniem. Otrzymano produkt w postaci soli trietyloamoniowej, w formie jasnobrazowego proszku, z wydajnością 91.7% (19.8 g).

C₁₁H₁₅O₅NS×Et₃N, M = 374.5 g/mol (masa monoizotopowa związku w postaci wolnej 273.1).

LRMS (ESI, MeOH): 272.1 [M – H⁻, jony ujemne].

b) Chlorek 4-(Boc-amino)benzenosulfonowy (113)

Do roztworu związku **112** (3.74 g, 10 mmol) i Et₃N (1.4 mL, 10 mmol) w 20 mL acetonu dodano 1.85 g (10 mmol) chlorku cyjanurowego. Następnie mieszano w temp. wrzenia przez 20 godzin. Po ochłodzeniu do temp. pokojowej, mieszaninę reakcyjną przesączono przez celit i odparowano rozpuszczalnik. Surowy produkt oczyszczono za pomocą chromatografii kolumnowej na silikażelu z użyciem fazy CHCl₃/MeOH 100:1. Otrzymano produkt w postaci białego proszku z wydajnością 82.5% (2.4 g).

C₁₁H₁₄O₄NSCl, M = 291.75 g/mol (masa monoizotopowa 291.0).

LRMS (ESI, MeOH): 290.1 [M – H⁻, jony ujemne].

c) Kwas 4-(Boc-amino)benzoowy (114)

Do 5 g (36.5 mmol, 1 ekw.) kwasu p-aminobenzoowego rozpuszczonego w mieszaninie rozpuszczalników H₂O/dioksan (1:1, 100 mL) dodano 10 mL (73 mmol, 2 ekw.) Et₃N. Następnie mieszaninę reakcyjną ochłodzono za pomocą łaźni lodowej i utrzymując temp. 0 °C wkroplono roztwór Boc₂O (15.9 g, 73 mmol, 2 ekw.) w 50 mL dioksanu. Kontynuowano mieszanie w temp. pokojowej przez 24 godziny. Po tym czasie odparowano dioksan, dodano 30 mL H₂O i ekstrahowano EtOAc (2 × 20 mL). Następnie fazę organiczną przeekstrahowano nasyconym roztworem Na₂CO₃ (20 mL). Połączone ekstrakty wodne

zakwaszono 1 M wodnym roztworem HCl do pH = 1. Wytrącony biały osad odsączono, przemyto wodą a przesącz ekstrahowano EtOAc (3 × 20 mL). Warstwy organiczne połączone, wysuszono nad MgSO₄, przesączono i odparowano rozpuszczalnik. Produkt w postaci białego proszku, otrzymany w dwóch rzutach – przez wytrącenie i w wyniku ekstrakcji – połączone i wysuszono na powietrzu. Wydajność reakcji wyniosła 91.1% (7.88 g).

C₁₂H₁₅O₄N, M = 237.26 g/mol (masa monoizotopowa 237.1).

LRMS (ESI, MeOH): 260.2 [M + Na⁺].

R_f = 0.41 (CHCl₃/MeOH 8:1).

T. top.: 193-195°C (lit. 191-192°C¹⁷⁰).

6.3.4. Synteza pochodnych tryptofanu

a) *N*-Boc-1-butylotryptofan (**83**)

Ester metylowy *N*-Boc-1-butylotryptofanu (**88**)

Do ochłodzonego do temp. 0 °C roztworu Boc-Trp-OMe (**87**, 3.27 g, 10.27 mmol, 1 ekw.) w 20 mL DMF dodano NaH (493 mg, 12.32 mmol, 1.2 ekw., 60% zawiesina w oleju mineralnym) i mieszano przez 10 minut. Następnie do zawiesiny dodano 2.05 mL bromku *n*-butylu (19 mmol, 1.85 ekw.) i kontynuowano mieszanie w obniżonej temp. przez 2.5 godziny. Po tym czasie mieszaninę reakcyjną rozcieńczono 100 mL EtOAc i przemyto H₂O (5 × 30 mL). Warstwę organiczną po wysuszeniu nad Na₂SO₄ odparowano. Surowy produkt oczyszczono na kolumnie silikażelowej z użyciem fazy EtOAc/heksan 3:7, otrzymując związek w postaci bezbarwnego oleju. Po wysuszeniu w eksykatorze nad P₂O₅, produkt zestalił się do białego proszku (2.37 g, 61.7%).

C₂₁H₃₀O₄N₂, M = 374.47 g/mol (masa monoizotopowa 374.2).

LRMS (ESI, EtOAc): 771.3 [2M + Na⁺], 397.4 [M + Na⁺] - *główne sygnały*, 375.4 [M + H⁺].

¹H NMR (500 MHz, CDCl₃): δ = 0.93 (t, *J* = 7.4 Hz, 3H, CH₃ *n*-Bu), 1.32 (m, 2H, CH₂-3 *n*-Bu), 1.43 [s, 9H, C(CH₃)₃], 1.78 (m, 2H, CH₂-2 *n*-Bu), 3.27 (br t, 2H, βCH₂), 3.67 (s, 3H, CO₂CH₃), 4.07 (t, *J* = 7.0 Hz, 2H, CH₂-1 *n*-Bu), 4.63 (m, 1H, αCH), 5.05 (d, *J* = 7.81 Hz, 1H, NH), 6.89 (s, 1H, C²-H), 7.09 (t, *J* = 7.36 Hz, 1H, C⁶-H), 7.19 (t, *J* = 7.28 Hz, 1H, C⁵-H), 7.30 (d, *J* = 8.24 Hz, 1H, C⁷-H), 7.53 (d, *J* = 7.90 Hz, 1H, C⁴-H).

¹³C NMR (500 MHz, CDCl₃): δ = 13.7 (C⁴ *n*-Bu), 20.1 (C³ *n*-Bu), 27.9 (βC), 28.3 [C(CH₃)₃], 32.3 (C² *n*-Bu), 46.0 (C¹ *n*-Bu), 52.1 (CO₂CH₃), 54.2 (αC), 79.7 [C(CH₃)₃], 108.5 (C³), 109.4 (C⁷), 118.9 (C⁶), 119.0 (C⁵), 121.5 (C⁴), 126.5 (C²), 128.2 (C^{3a}), 136.1 (C^{7a}), 155.2 [C=O (Boc)], 172.8 (CO₂CH₃).

$[\alpha]_{\text{D}}^{25} = +0.84$ (c 1, MeOH).

$R_{\text{f}} = 0.61$ (EtOAc/heksan 3:7).

T. top.: 93-94.5°C.

N*-Boc-1-butylotryptofan (83)

Produkt otrzymano zgodnie z procedurą ogólną (Procedura E, Rozdział 6.2.). Do hydrolizy, trwającej 1.5 godziny, użyto 2.27 g (6.06 mmol, 1 ekw.) estru **88** rozpuszczonego w 40 mL MeOH i 12 mL (2 ekw.) 1 M NaOH. Otrzymano produkt w postaci bezbarwnego oleju, który po wysuszeniu w eksykatorze nad P₂O₅, zestalił się do białego proszku z wydajnością 94% (2.05 g).

C₂₀H₂₈O₄N₂, M = 360.45 g/mol (masa monoizotopowa 360.2).

LRMS (ESI, EtOAc): 743.4 [2M + Na⁺], 383.3 [M + Na⁺] - *główne sygnały*, 361.5 [M + H⁺], 283.4 [M - Boc + Na⁺], 719.7 [2M - H⁻, *jony ujemne*] - *główny sygnał*, 359.4 [M - H⁻, *jony ujemne*].

$[\alpha]_{\text{D}}^{25} = +7.8$ (c 1, MeOH), -6.8 (c 1, 1 M NaOH).

$R_{\text{f}} = 0.42$ (CHCl₃/MeOH 8:1).

T. top.: 120-122.3°C.

*związek otrzymany przez Cai i wsp.¹⁵², ale nie scharakteryzowany;

b) *N*-Boc-1-[5-(Boc-amino)pentyl]tryptofan (96)

Do zawiesiny NaH (301.6 mg, 7.54 mmol, 1.2 ekw., 60% zawiesina w oleju mineralnym) w 10 mL DMF, ochłodzonej do temp. 0 °C, dodano roztwór Boc-Trp-OMe (**87**, 2 g, 6.28 mmol, 1 ekw.) w 15 mL DMF i mieszano przez 30 minut. Po czym mieszaninę reakcyjną doprowadzono do temp. pokojowej i dodano porcjami roztwór mesylanu 5-(Boc-amino)pentylu (**18**, 3.53 g, 12.56 mmol, 2 ekw.) w 10 mL DMF. Następnie temperaturę podniesiono do 50 °C i kontynuowano mieszanie przez 24 godziny. Po tym czasie mieszaninę reakcyjną przelano do 40 mL zimnej wody i ekstrahowano EtOAc (3 × 30 mL). Fazy organiczne połączono, przemyto H₂O (20 mL) oraz solanką (20 mL) i wysuszono nad MgSO₄. Po odparowaniu rozpuszczalnika otrzymano żółty olej, który rozpuszczono w 100 mL MeOH. Następnie do otrzymanego roztworu dodano 30 mL 1 M wodnego roztworu NaOH i mieszano w temp. 50 °C przez 2 godziny. Po tym czasie mieszaninę reakcyjną zateżono, dodano 40 mL H₂O, zakwaszono 1 M wodnym roztworem HCl do pH = 2 i ekstrahowano EtOAc (3 × 20 mL). Warstwę organiczną wysuszono nad MgSO₄ i odparowano rozpuszczalnik. Surowy produkt oczyszczono poprzez dwie chromatografie kolumnowe na

silikażelu. Pierwszą wykonano z użyciem fazy $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$ (gradient 100:1→15:1), następnie produkt doczyszczono na kolumnie z fazą EtOAc /heksan (gradient 1:9→3:7), z której wymyto go EtOAc . Otrzymano produkt w postaci higroskopijnego, białego proszku, który suszono w eksykatorze nad P_2O_5 (1.1 g, 35.8%).

$\text{C}_{26}\text{H}_{39}\text{O}_6\text{N}_3$, $M = 489.60$ g/mol (masa monoizotopowa 489.3).

LRMS (ESI, MeOH): 544.4 [$\text{M} + \text{MeOH} + \text{Na}^+$], 534.4 [$\text{M} + 2\text{Na}^+ - \text{H}^+$], 528.3 [$\text{M} + \text{K}^+$], 512.5 [$\text{M} + \text{Na}^+$] - *główny sygnał*, 490.4 [$\text{M} + \text{H}^+$].

^1H NMR (500 MHz, MeOD): $\delta = 1.17$ -1.51 [br m, 22H, $2 \times \text{C}(\text{CH}_3)_3$, CH_2 -3,4 5-AP], 1.80 (m, 2H, CH_2 -2 5-AP), 2.98 (br t, 2H, CH_2 -5 5-AP), 3.10 (m, 1H, βCH_2), 3.27 (m, 1H, βCH_2), 4.11 (br t, 2H, CH_2 -1 5-AP), 4.40 (m, 1H, αCH), 7.01 (br t, 1H, C^5 -H), 7.04 (s, 1H, C^2 -H), 7.12 (br t, 1H, C^6 -H), 7.32 (d, $J = 8.18$ Hz, 1H, C^7 -H), 7.56 (d, $J = 7.83$ Hz, 1H, C^4 -H).

^{13}C NMR (500 MHz, MeOD): $\delta = 25.1$ (C^3 5-AP), 28.4 (βC), 28.6, 28.8 [$2 \times \text{C}(\text{CH}_3)_3$], 30.6 (C^4 5-AP), 31.0 (C^2 5-AP), 41.2 (C^5 5-AP), 46.8 (C^1 5-AP), 56.0 (αC), 79.8, 80.5 [$2 \times \text{C}(\text{CH}_3)_3$], 110.5 (C^7), 110.6 (C^3), 119.8 (C^5), 119.9 (C^4), 122.4 (C^6), 127.9 (C^2), 129.6 (C^{3a}), 137.7 (C^{7a}), 157.7, 158.5 [$2 \times \text{C}=\text{O}$ (Boc)], 175.8 (CO_2H).

$[\alpha]_{\text{D}}^{25} = +1.3$ (c 1, MeOH).

$R_f = 0.47$ ($\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$ 8:1).

T. top.: 105.9-108.4°C.

6.3.5. Synteza elementu rozgałęziającego opartego na dietylenotriaminie

Bis[2-(Boc-amino)etylo]amina (138)¹⁵⁶

Do roztworu dietylenotriaminy (2.1 mL, 19.39 mmol, 1 ekw.) i Et_3N (8.06 mL, 58.17 mmol, 3 ekw.) w 100 mL THF, ochłodzonego za pomocą łaźni lodowej, wkroplono roztwór 2-(Boc-oksymino)-2-fenylacetonitrylu (Boc-ON, 9.55 g, 38.78 mmol, 2 ekw.) w 40 mL THF. Mieszano przez godzinę w obniżonej temperaturze, a następnie przez kolejną w temp. pokojowej. Po tym czasie odparowano rozpuszczalnik, pozostałość rozpuszczono w 100 mL DCM i przemyto 5% NaOH. Warstwę organiczną po wysuszeniu nad MgSO_4 odparowano a uzyskany surowy produkt oczyszczono za pomocą chromatografii kolumnowej na silikażelu (DCM/MeOH 9:1 + 1% NH_4OH). Czysty produkt wysuszono w eksykatorze nad P_2O_5 otrzymując 5.34 g (90.8%) związku w postaci bezbarwnego oleju.

$\text{C}_{14}\text{H}_{29}\text{O}_4\text{N}_3$, $M = 303.40$ g/mol (masa monoizotopowa 303.2).

LRMS (ESI, MeOH): 326.2 [$\text{M} + \text{Na}^+$], 304.1 [$\text{M} + \text{H}^+$] - *główny sygnał*.

$R_f = 0.54$ (nBuOH/AcOH/ H_2O 3:1:1).

2-{bis[2-(Boc-amino)etylo]amino}octan etylu (139)

Do roztworu bis[2-(Boc-amino)etylo]aminy (**138**, 5.3 g, 17.47 mmol) w 30 mL CH₃CN dodano bromooctan etylu (1.9 mL, 17.47 mmol), a następnie DIPEA (3.05 mL, 17.47 mmol). Po 30 min. mieszania w temp. pokojowej odparowano rozpuszczalnik. Surowy produkt oczyszczono na kolumnie silikażelowej z użyciem fazy CHCl₃/MeOH 50:1, otrzymując 6.58 g (96%) związku w formie bezbarwnego oleju.

C₁₈H₃₅O₆N₃, M = 389.49 g/mol (masa monoizotopowa 389.3).

LRMS (ESI, MeOH): 412.4 [M + Na⁺] - *główny sygnał*, 390.3 [M + H⁺].

R_f = 0.36 (AcOEt/heksan 3:7).

Chlorowodorek kwasu 2-{bis[2-(Boc-amino)etylo]amino}octowego (140)

6.55 g (16.8 mmol, 1 ekw.) związku **139** rozpuszczono w 100 mL MeOH i dodano 33.6 mL 1 M wodnego roztworu NaOH (33.6 mmol, 2 ekw.). Mieszano w temp. 50 °C przez 3 godziny. Po tym czasie roztwór zatężono, dodano 30 mL H₂O, zakwaszono 1 M wodnym roztworem HCl do pH = 5 i ekstrahowano CHCl₃ (3 × 20 mL) oraz EtOAc (3 × 20 mL). Następnie warstwę wodną nasycono NaCl i ponownie ekstrahowano EtOAc (5 × 20 mL). Połączono wszystkie frakcje organiczne, wysuszono nad MgSO₄ i odparowano. Otrzymano produkt w postaci chlorowodoru jako biały proszek w ilości 6.0 g (89.7%).

C₁₆H₃₁O₆N₃×HCl, M = 397.90 g/mol (masa monoizotopowa nieprotonowanego związku – 361.2).

LRMS (ESI, MeOH): 743.7 [2M + Na⁺ – 2H⁺, *jony ujemne*], 721.8 [2M – H⁺, *jony ujemne*], 360.3 [M – H⁺, *jony ujemne*] - *główny sygnał*.

R_f = 0.57 (nBuOH/AcOH/H₂O 3:1:1).

6.4. SYNTEZA RDZENI O CHARAKTERZE HYDROFOBOWYM

Rdzenie zostały zsyntetyzowane w wyniku reakcji sprzęgania symetrycznego bądź niesymetrycznego elementu rozgałęziającego opartego na kwasie 3,5-dihydroksybenzoesowym, tj. związku **21** lub **23** (Rozdział 6.3.2.), z odbezpieczonymi amidami *L*-lizyny i związku nieaminokwasowego (**7** - **10**) bądź dipeptydem **11** (Rozdział 6.3.1.).

6.4.1. Boc-zabezpieczone rdzenie

Wykorzystując procedurę ogólną sprzęgania metodą DCC/HOBt (Procedura A, Rozdział 6.2.) zsyntetyzowano osiem rdzeni. W celu osiągnięcia lepszych wydajności,

niezbędne okazało się użycie dodatkowej ilości Et₃N (2 ekw.), oprócz tej potrzebnej do przeprowadzenia komponentu aminowego do jego postaci wolnej (2 ekw.). W wyniku reakcji prowadzonych przez 48 godzin, otrzymano produkty **24** – **31** mające postać proszków lub olejów.

a) Fenyloetyloamid *N, N'*-bis{3,5-bis[2-(Boc-amino)etoksy]benzoilo}-*L*-lizyny (24**)**

Do reakcji użyto związku **21** (1.08 g, 2.44 mmol), HOBt (0.37 g, 2.44 mmol), DCC (0.5 g, 2.44 mmol), związku **7** (0.36 g, 1.11 mmol), Et₃N (0.62 mL, 4.44 mmol) i DMF (15 mL). Surowy produkt oczyszczono poprzez chromatografię kolumnową na silikażelu z użyciem fazy CHCl₃/MeOH 25:1. Otrzymano produkt w postaci białego proszku z wydajnością 87.7% (1.07 g).

C₅₆H₈₃O₁₅N₇, M = 1094.30 g/mol (masa monoizotopowa 1093.6).

LRMS (ESI, MeOH): 1116.6 [M + Na⁺].

¹H NMR (600 MHz, MeOD): δ = 1.28-1.36 (m, 2H, γCH₂), 1.43 [s, 36H, 4×C(CH₃)₃], 1.57-1.66 (m, 2H, δCH₂), 1.74-1.87 (m, 2H, βCH₂), 2.77 (br t, 2H, CH₂-Ar *PEA*), 3.36 (m, 2H, εCH₂), 3.41 (m, 8H, 4×O-CH₂-CH₂-NH), 3.48 (m, 2H, CH₂-NH *PEA*), 3.98 (m, 8H, 4×O-CH₂-CH₂-NH), 4.46 (m, 1H, αCH), 6.63, 6.67 (2t, *J* = 2.2 Hz, 2H, C⁴-H *Ph*), 6.92, 6.98 (2m, 4H, C^{2,6}-H *Ph*), 7.16, 7.22 (2m, 5H, C^{2,3,4,5,6}-H *PEA*).

¹³C NMR (600 MHz, MeOD): δ = 24.4 (γC), 28.8 [C(CH₃)₃], 30.1 (δC), 32.7 (βC), 36.5 (CH₂-Ar *PEA*), 40.5 (εC), 40.9 (4×O-CH₂-CH₂-NH), 41.9 (CH₂-NH *PEA*), 55.4 (αC), 68.2, 68.3 (4×O-CH₂-CH₂-NH), 80.2 [C(CH₃)₃], 105.7, 106.0 (C⁴ *Ph*), 107.0, 107.3 (C^{2,6} *Ph*), 127.4, 129.5, 129.9 (C^{2,3,4,5,6} *PEA*), 137.1, 137.7 (C¹ *Ph*), 140.4 (C¹ *PEA*), 158.5 [C=O (Boc)], 161.3 (C^{3,5} *Ph*), 169.7 (CONH *Ph*), 174.4 (CONH).

R_f = 0.60 (CHCl₃/MeOH 8:1).

T. top.: 82-84°C.

b) Tryptamid *N, N'*-bis{3,5-bis[2-(Boc-amino)etoksy]benzoilo}-*L*-lizyny (25**)**

Do reakcji użyto związku **21** (1 g, 2.27 mmol), HOBt (0.35 g, 2.27 mmol), DCC (0.47 g, 2.27 mmol), związku **8** (0.37 g, 1.03 mmol), Et₃N (0.57 mL, 4.12 mmol) i DMF (15 mL). Surowy produkt oczyszczono poprzez chromatografię kolumnową na silikażelu z użyciem fazy CHCl₃/MeOH (gradient 100:1→25:1). Otrzymano produkt w postaci jasnożółtego proszku z wydajnością 77.6% (0.9 g).

C₅₈H₈₄O₁₅N₈, M = 1133.33 g/mol (masa monoizotopowa 1132.6).

LRMS (ESI, MeOH): 1155.8 [M + Na⁺].

¹H NMR (500 MHz, MeOD): δ = 1.27-1.45 (m, 2H, γ CH₂) nakładający się na 1.43 [s, 36H, 4×C(CH₃)₃], 1.61 (m, 2H, δ CH₂), 1.74-1.88 (br m, 2H, β CH₂), 2.93 (t, J = 7.2 Hz, 2H, CH₂-Ar TA), 3.34 (m, 2H, ϵ CH₂), 3.40 (m, 10H, 4×O-CH₂-CH₂-NH, CH₂-NH TA), 3.97 (2t, J = 5.6 Hz, 8H, 4×O-CH₂-CH₂-NH), 4.48 (m, 1H, α CH), 6.61, 6.66 (2t, J = 2.2 Hz, 2H, C⁴-H Ph), 6.91-6.98 (br m, 5H, C^{2,6}-H Ph, C⁵-H TA), 7.04 (m, 2H, C^{2,6}-H TA), 7.30 (d, J = 8.0 Hz, 1H, C⁷-H TA), 7.53 (d, J = 8.0 Hz, 1H, C⁴-H TA).

¹³C NMR (500 MHz, MeOD): δ = 24.3 (γ C), 26.2 (CH₂-Ar TA), 28.8 [C(CH₃)₃], 30.0 (δ C), 32.8 (β C), 40.5 (ϵ C), 40.9 (4×O-CH₂-CH₂-NH), 41.3 (CH₂-NH TA), 55.4 (α C), 68.2, 68.3 (4×O-CH₂-CH₂-NH), 80.2 [C(CH₃)₃], 105.7, 106.1 (C⁴ Ph), 107.0, 107.3 (C^{2,6} Ph), 112.2 (C⁷ TA), 113.0 (C³ TA), 119.3 (C⁴ TA), 119.6 (C⁵ TA), 122.3 (C⁶ TA), 123.6 (C² TA), 128.7 (C^{3a} TA), 137.2, 137.7 (C¹ Ph), 138.1 (C^{7a} TA), 158.4 [C=O (Boc)], 161.3 (C^{3,5} Ph), 169.7 (CONH Ph), 174.3 (CONH).

R_f = 0.38 (CHCl₃/MeOH 8:1).

T. top.: 80-83°C.

c) Dodecyloamid *N*, *N'*-bis{3,5-bis[2-(Boc-amino)etoksy]benzoilo}-*L*-lizyny (26)

Do reakcji użyto związku **21** (2.5 g, 5.68 mmol), HOBt (0.87 g, 5.68 mmol), DCC (1.17 g, 5.68 mmol), związku **9** (1 g, 2.58 mmol), Et₃N (1.43 mL, 10.32 mmol) i DMF (35 mL). Surowy produkt oczyszczono poprzez chromatografię kolumnową na silikażelu z użyciem fazy CHCl₃/MeOH 25:1. Otrzymano produkt w postaci zestalonego żółtego oleju z wydajnością 78.7% (2.36 g).

C₆₀H₉₉O₁₅N₇, M = 1158.47 g/mol (masa monoizotopowa 1157.7).

LRMS (ESI, MeOH): 1180.8 [M + Na⁺].

¹H NMR (500 MHz, MeOD): δ = 0.88 (br t, 3H, CH₃ DDA), 1.23-1.31 (br m, 18H, CH₂-3-11 DDA), 1.44 [s, 36H, 4×C(CH₃)₃], 1.47 (m, 4H, γ CH₂, CH₂-2 DDA), 1.66 (m, 2H, δ CH₂), 1.86 (br m, 2H, β CH₂), 3.17 (m, 2H, CH₂-1 DDA), 3.35 (m, 2H, ϵ CH₂), 3.40 (m, 8H, 4×O-CH₂-CH₂-NH), 3.99 (m, 8H, 4×O-CH₂-CH₂-NH), 4.50 (2t, J = 2.2 Hz, 1H, α CH), 6.65 (m, 2H, C⁴-H Ph), 6.93, 6.99 (2m, 4H, C^{2,6}-H Ph).

¹³C NMR (500 MHz, MeOD): δ = 14.5 (C¹² DDA), 23.7 (C¹¹ DDA), 24.4 (γ C), 28.0 (C³ DDA), 28.8 [C(CH₃)₃], 30.1, 30.3, 30.4, 30.5, 30.7-30.8 (δ C, C², C⁴-C⁹ DDA), 32.8 (C¹⁰ DDA), 33.1 (β C), 40.5 (C¹ DDA), 40.6 (ϵ C), 40.9 (4×O-CH₂-CH₂-NH), 55.4 (α C), 68.3 (4×O-CH₂-CH₂-NH), 80.2 [C(CH₃)₃], 105.8, 106.1 (C⁴ Ph), 107.1, 107.3 (C^{2,6} Ph), 137.2, 137.8 (C¹ Ph), 158.5 [C=O (Boc)], 161.4 (C^{3,5} Ph), 169.7 (CONH Ph), 174.3 (CONH).

R_f = 0.48 (CHCl₃/MeOH 8:1).

d) Fenyloetyloamid *N*, *N'*-bis{3-[5-(Boc-amino)pentoksy]-5-[2-(Boc-amino)etoksy]-benzoilo}-*L*-lizyny (28)

Do reakcji użyto związku **23** (0.96 g, 1.98 mmol), HOBt (0.3 g, 1.98 mmol), DCC (0.41 g, 1.98 mmol), związku **7** (0.29 g, 0.9 mmol), Et₃N (0.5 mL, 3.6 mmol) i DMF (15 mL). Surowy produkt oczyszczono poprzez chromatografię kolumnową na silikażelu z użyciem fazy CHCl₃/MeOH 25:1. Otrzymano produkt w postaci kremowego proszku z wydajnością 89.6% (0.95 g).

C₆₂H₉₅O₁₅N₇, M = 1178.46 g/mol (masa monoizotopowa 1177.7).

LRMS (ESI, MeOH): 1200.8 [M + Na⁺].

¹H NMR (500 MHz, MeOD): δ = 1.41-1.54 [br m, 10H, γCH₂, 2×O-(CH₂)₂-CH₂-CH₂-NH] nakładający się na 1.42, 1.43 [2s, 36H, 4×C(CH₃)₃], 1.63 (m, 2H, δCH₂), 1.76 [m, 6H, βCH₂, 2×O-CH₂-CH₂-(CH₂)₃-NH], 2.77 (t, *J* = 7.2 Hz, 2H, CH₂-Ar *PEA*), 3.05 [br t, 4H, 2×O-(CH₂)₄-CH₂-NH], 3.35 (m, 3H, CH₂-NH *PEA*, εCH₂), 3.41 (m, 4H, O-CH₂-CH₂-NH), 3.47 (m, 1H, CH₂-NH *PEA*), 3.97 (br m, 8H, 4×O-CH₂), 4.46 (m, 1H, αCH), 6.60, 6.64 (2t, *J* = 2.1 Hz, 2H, C⁴-H *Ph*), 6.92, 6.98 (C^{2,6}-H *Ph*), 7.16, 7.21 (2m, 5H, C^{2,3,4,5,6}-H *PEA*).

¹³C NMR (500 MHz, MeOD): δ = 24.4 [γC, 2×O-(CH₂)₂-CH₂-(CH₂)₂-NH], 28.8, 28.9 [C(CH₃)₃], 30.0 [2×O-CH₂-CH₂-(CH₂)₃-NH], 30.1 (δC), 30.7 [2×O-(CH₂)₃-CH₂-CH₂-NH], 32.7 (βC), 36.5 (CH₂-Ar *PEA*), 40.5 (εC), 40.9 (2×O-CH₂-CH₂-NH), 41.3 [2×O-(CH₂)₄-CH₂-NH], 41.9 (CH₂-NH *PEA*), 55.4 (αC), 68.2, 68.3 (2×O-CH₂-CH₂-NH), 69.1, 69.2 [2×O-CH₂-(CH₂)₄-NH], 79.8, 80.2 [C(CH₃)₃], 105.7, 106.0 (C⁴ *Ph*), 106.6, 106.9, 107.1, 107.3 (C^{2,6} *Ph*), 127.3, 129.5, 129.8 (C^{2,3,4,5,6} *PEA*), 137.1, 137.7 (C¹ *Ph*), 140.3 (C¹ *PEA*), 158.4, 158.5 [C=O (Boc)], 161.3, 161.7 (C^{3,5} *Ph*), 169.7, 169.8 (CONH *Ph*), 174.3 (CONH).

R_f = 0.48 (CHCl₃/MeOH 8:1).

T. top.: 74-77°C.

e) Tryptamid *N*, *N'*-bis{3-[5-(Boc-amino)pentoksy]-5-[2-(Boc-amino)etoksy]benzoilo}-*L*-lizyny (29)

Do reakcji użyto związku **23** (2.2 g, 4.56 mmol), HOBt (0.7 g, 4.56 mmol), DCC (0.94 g, 4.56 mmol), związku **8** (0.75 g, 2.07 mmol), Et₃N (1.2 mL, 8.28 mmol) i DMF (30 mL). Surowy produkt oczyszczono poprzez chromatografię kolumnową na silikażelu z użyciem fazy CHCl₃/MeOH (gradient 100:1→25:1). Otrzymano produkt w postaci białego proszku z wydajnością 78.4% (1.96 g).

C₆₄H₉₆O₁₅N₈, M = 1217.49 g/mol (masa monoizotopowa 1216.7).

LRMS (ESI, MeOH): 1239.9 [M + Na⁺] - *główny sygnał*, 1217.9 [M + H⁺], 1117.8 [M - Boc + H⁺].

¹H NMR (500 MHz, MeOD): δ = 1.35-1.45 [br m, 6H, γ CH₂, 2×O-(CH₂)₂-CH₂-(CH₂)₂-NH] nakładający się na 1.42, 1.43 [2s, 36H, 4×C(CH₃)₃], 1.50 [m, 4H, 2×O-(CH₂)₃-CH₂-CH₂-NH], 1.61 (m, 2H, δ CH₂), 1.74 [m, 4H, 2×O-CH₂-CH₂-(CH₂)₃-NH], 1.83 (m, 2H, β CH₂), 2.91 (t, J = 7.2 Hz, 2H, CH₂-Ar TA), 3.05 [m, 4H, 2×O-(CH₂)₄-CH₂-NH], 3.40 (br m, 7H, 2×O-CH₂-CH₂-NH, CH₂-NH TA, ϵ CH₂), 3.55 (m, 1H, CH₂-NH TA), 3.95 (br m, 8H, 4×O-CH₂), 4.48 (m, 1H, α CH), 6.58, 6.63 (2t, J = 2.1 Hz, 2H, C⁴-H Ph), 6.88-6.98 (br m, 5H, C^{2,6}-H Ph, C⁵-H TA), 7.04 (m, 2H, C^{2,6}-H TA), 7.30 (d, J = 8.0 Hz, 1H, C⁷-H TA), 7.52 (d, J = 8.0 Hz, 1H, C⁴-H TA).

¹³C NMR (500 MHz, MeOD): δ = 24.4 [γ C, 2×O-(CH₂)₂-CH₂-(CH₂)₂-NH], 26.2 (CH₂-Ar TA), 28.8 [C(CH₃)₃], 30.0 [2×O-CH₂-CH₂-(CH₂)₃-NH], 30.1 (δ C), 30.7 [2×O-(CH₂)₃-CH₂-CH₂-NH], 32.8 (β C), 40.6 (ϵ C), 40.9 (2×O-CH₂-CH₂-NH), 41.3 [2×O-(CH₂)₄-CH₂-NH, CH₂-NH TA], 55.5 (α C), 68.2, 68.3 (2×O-CH₂-CH₂-NH), 69.1, 69.2 [2×O-CH₂-(CH₂)₄-NH], 79.8, 80.2 [C(CH₃)₃], 105.7, 106.1 (C⁴ Ph), 106.6, 106.9, 107.1, 107.3 (C^{2,6} Ph), 112.2 (C⁷ TA), 113.1 (C³ TA), 119.3 (C⁴ TA), 119.6 (C⁵ TA), 122.3 (C⁶ TA), 123.6 (C² TA), 128.7 (C^{3a} TA), 137.1, 137.7 (C¹ Ph), 138.1 (C^{7a} TA), 158.4, 158.5 [C=O (Boc)], 161.3, 161.7 (C^{3,5} Ph), 169.8, 169.9 (CONH Ph), 174.3 (CONH).

R_f = 0.45 (CHCl₃/MeOH 8:1).

T. top.: 85-87°C.

f) Dodecyloamid *N*, *N'*-bis{3-[5-(Boc-amino)pentoksy]-5-[2-(Boc-amino)etoksy]-benzoilo}-*L*-lizyny (30)

Do reakcji użyto związku **23** (2.74 g, 5.68 mmol), HOBt (0.87 g, 5.68 mmol), DCC (1.17 g, 5.68 mmol), związku **9** (1 g, 2.58 mmol), Et₃N (1.4 mL, 10.32 mmol) i DMF (35 mL). Surowy produkt oczyszczono poprzez chromatografię kolumnową na silikażelu z użyciem fazy CHCl₃/MeOH (gradient 100:1→25:1). Otrzymano produkt w postaci jasnożółtego oleju z wydajnością 78.1% (2.5 g).

C₆₆H₁₁₁O₁₅N₇, M = 1242.63 g/mol (masa monoizotopowa 1241.8).

LRMS (ESI, MeOH): 1265.0 [M + Na⁺] - *główny sygnał*, 1243.1 [M + H⁺].

R_f = 0.45 (CHCl₃/MeOH 8:1).

g) Didodecyloamid *N*, *N'*-bis{3-[5-(Boc-amino)pentoksy]-5-[2-(Boc-amino)etoksy]-benzoilo}-*L*-lizyny (31)

Do reakcji użyto związku **23** (1.65 g, 3.43 mmol), HOBt (0.53 g, 3.43 mmol), DCC (0.71 g, 3.43 mmol), związku **10** (0.87 g, 1.56 mmol), Et₃N (0.9 mL, 6.24 mmol) i DMF (20 mL). Surowy produkt oczyszczono poprzez chromatografię kolumnową na silikażelu z użyciem fazy CHCl₃/MeOH (gradient 100:1→25:1). Otrzymano produkt w postaci żółtego oleju z wydajnością 90.5% (2 g).

C₇₈H₁₃₅O₁₅N₇, M = 1410.95 g/mol (masa monoizotopowa 1410.0).

LRMS (ESI, CHCl₃): 1433.4 [M + Na⁺] - *główny sygnał*, 1411.4 [M + H⁺], 728.4 [M + 2Na⁺]²⁺.

¹H NMR (500 MHz, CDCl₃): δ = 0.88 (br t, 6H, 2×CH₃ *dDDA*), 1.22-1.83 [br m, 58H, β, γ, δCH₂, 2×CH₂-2-11 *dDDA*, 2×O-CH₂-(CH₂)₃-CH₂-NH] nakładający się na 1.44, 1.46 [2s, 36H, 4×C(CH₃)₃], 3.13 [m, 5H, 2×O-(CH₂)₄-CH₂-NH, CH₂-1 *dDDA*], 3.25 (m, 1H, CH₂-1 *dDDA*), 3.35 (m, 1H, CH₂-1 *dDDA*), 3.40-3.58 (br m, 7H, 2×O-CH₂-CH₂-NH, εCH₂, CH₂-1 *dDDA*), 3.94 [br m, 4H, 2×O-CH₂-(CH₂)₄-NH], 4.01 (m, 4H, 2×O-CH₂-CH₂-NH), 4.62 [m, 2H, 2×O-(CH₂)₅-NH], 5.06 [m, 3H, αCH, 2×O-(CH₂)₂-NH], 6.53 (m, 2H, C⁴-H *Ph*), 6.61 (br s, 1H, εCONH), 6.87, 6.96 (2m, 4H, C^{2,6}-H *Ph*), 7.18 (d, *J* = 7.93 Hz, 1H, αCONH).

¹³C NMR (500 MHz, CDCl₃): δ = 14.1 (2×C¹² *dDDA*), 28.4 [C(CH₃)₃], 22.7, 23.3, 24.9, 25.6, 26.9, 27.0, 27.6, 28.6, 28.7, 28.8, 29.2, 29.3, 29.5-29.6, 29.8, 31.9, 33.7, 33.9 [β, γ, δC, 2×C²-C¹¹ *dDDA*, 2×O-CH₂-(CH₂)₃-CH₂-NH], 39.9 (2×O-CH₂-CH₂-NH, εC), 40.4 [2×O-(CH₂)₄-CH₂-NH], 46.1, 47.8 (2×C¹ *dDDA*), 49.0 (αC), 67.3 (2×O-CH₂-CH₂-NH), 68.0 [2×O-CH₂-(CH₂)₄-NH], 79.1, 79.5 [C(CH₃)₃], 104.5, 104.6 (C⁴ *Ph*), 105.3, 105.6, 105.7, 105.9 (C^{2,6} *Ph*), 136.2, 136.8 (C¹ *Ph*), 155.9, 156.0, 159.6, 159.7 [C=O (Boc)], 160.2, 160.3 (C^{3,5} *Ph*), 166.7, 167.3 (CONH *Ph*), 171.3 (CONH).

R_f = 0.67 (CHCl₃/MeOH 8:1).

h) Ester metylowy *N*, *N'*-bis{3,5-bis[2-(Boc-amino)etoksy]benzoilo}-*L*-lizylo-*L*-tryptofanu (27)

Do reakcji użyto związku **21** (7.03 g, 15.95 mmol), HOBt (2.44 g, 15.95 mmol), DCC (3.29 g, 15.95 mmol), związku **11** (3.04 g, 7.25 mmol), Et₃N (4 mL, 29 mmol) i DMF (30 mL). Surowy produkt oczyszczono poprzez chromatografię kolumnową na silikażelu z użyciem fazy CHCl₃/MeOH (gradient 100:1→25:1). Otrzymano produkt w postaci kremowego proszku z wydajnością 82.4% (7.12 g).

C₆₀H₈₆O₁₇N₈, M = 1191.37 g/mol (masa monoizotopowa 1190.6).

LRMS (ESI, MeOH): 1213.5 [M + Na⁺] - *główny sygnał*, 1191.5 [M + H⁺].

¹H NMR (500 MHz, MeOD): δ = 1.43 (m, 2H, γ CH₂) nakładający się na 1.43 [s, 36H, 4×C(CH₃)₃], 1.62 (m, 2H, δ CH₂), 1.78, 1.87 (2m, 2H, β CH₂), 3.20, 3.27 (2m, 2H, β CH₂ *L-Trp*), 3.34 (m, 2H, ϵ CH₂), 3.40 (m, 8H, 4×O-CH₂-CH₂-NH), 3.61 (s, 3H, OCH₃), 3.98 (m, 8H, 4×O-CH₂-CH₂-NH), 4.55 (m, 1H, α CH *L-Lys*), 4.74 (m, 1H, α CH *L-Trp*), 6.65 (m, 2H, C⁴-H *Ph*), 6.90-6.98 (br m, 5H, C^{2,6}-H *Ph*, C⁵-H *L-Trp*), 7.03 (m, 1H, C⁶-H *L-Trp*), 7.08 (s, 1H, C²-H *L-Trp*), 7.28 (d, J = 8.1 Hz, 1H, C⁷-H *L-Trp*), 7.48 (d, J = 7.9 Hz, 1H, C⁴-H *L-Trp*).

¹³C NMR (500 MHz, MeOD): δ = 24.3 (γ C), 28.4 (β C *L-Trp*), 28.8 [C(CH₃)₃], 30.0 (δ C), 32.6 (β C), 40.6, 40.9 (ϵ C, 4×O-CH₂-CH₂-NH), 52.7 (OCH₃), 54.8 (α C *L-Trp*), 55.1 (α C *L-Lys*), 68.3 (4×O-CH₂-CH₂-NH), 80.3 [C(CH₃)₃], 105.8, 106.1 (C⁴ *Ph*), 107.1, 107.3 (C^{2,6} *Ph*), 110.5 (C³ *L-Trp*), 112.3 (C⁷ *L-Trp*), 119.1 (C⁴ *L-Trp*), 119.9 (C⁵ *L-Trp*), 122.4 (C⁶ *L-Trp*), 124.6 (C² *L-Trp*), 128.7 (C^{3a} *L-Trp*), 137.2, 137.8 (C¹ *Ph*), 138.0 (C^{7a} *L-Trp*), 158.5 [C=O (Boc)], 161.3, 161.4 (C^{3,5} *Ph*), 169.8 (CONH *Ph*), 173.8, 174.3 (CONH).

R_f = 0.45 (CHCl₃/MeOH 8:1).

T. top.: 101-103.5°C.

6.4.2. Odbezpieczone rdzenie

Deprotekcję grup Boc w rdzeniach **24** - **31** za pomocą nasyconego roztworu HCl w EtOAc przeprowadzono wg procedury ogólnej zamieszczonej w Rozdziale 6.2. (Procedura C – wariant A). Otrzymano produkty **32** - **39** występujące w postaci tetrachlorowodoroków jako bezpostaciowych, białych, kremowych lub jasnożółtych proszków.

a) Tetrachlorowodorek fenyloetyloamidu *N, N'*-bis[3,5-bis(2-aminoetoksy)benzoilo]-*L*-lizyny (**32**)

Boc-deprotekcji poddano 0.3 g (0.27 mmol) rdzenia **24** w 10 mL nas. HCl/EtOAc. Całkowite zdjęcie ochrony nastąpiło po godzinie. Otrzymano produkt w postaci białego proszku z wydajnością 95.7% (0.22 g).

C₃₆H₅₁O₇N₇×4HCl, M = 839.68 g/mol (masa monoizotopowa nieprotonowanego związku – 693.4).

LRMS (ESI, MeOH): 694.5 [M + H⁺], 347.9 [M + 2H⁺]²⁺ - *główny sygnał*.

b) Tetrachlorowodorek tryptamidu *N, N'*-bis[3,5-bis(2-aminoetoksy)benzoilo]-*L*-lizyny (33)

Boc-deprotekcji poddano 0.34 g (0.3 mmol) rdzenia **25** w 10 mL nas. HCl/EtOAc. Całkowite zdjęcie ochrony nastąpiło po godzinie. Otrzymano produkt w postaci białego proszku z wydajnością 96.2% (0.25 g).

$C_{38}H_{52}O_7N_8 \times 4HCl$, $M = 878.71$ g/mol (masa monoizotopowa nieprotonowanego związku – 732.4).

LRMS (ESI, MeOH): 733.5 $[M + H^+]$, 367.2 $[M + 2H^+]^{2+}$ - *główny sygnał*.

c) Tetrachlorowodorek dodecyloamidu *N, N'*-bis[3,5-bis(2-aminoetoksy)benzoilo]-*L*-lizyny (34)

Boc-deprotekcji poddano 0.32 g (0.28 mmol) rdzenia **26** w 10 mL nas. HCl/EtOAc. Całkowite zdjęcie ochrony nastąpiło po godzinie. Otrzymano produkt w postaci kremowego proszku z wydajnością 96% (0.24 g).

$C_{40}H_{67}O_7N_7 \times 4HCl$, $M = 903.85$ g/mol (masa monoizotopowa nieprotonowanego związku – 757.5).

LRMS (ESI, MeOH): 780.7 $[M + Na^+]$, 758.7 $[M + H^+]$ - *główny sygnał*.

d) Tetrachlorowodorek fenyloetyloamidu *N, N'*-bis[3-(5-aminopentoksy)-5-(2-aminoetoksy)benzoilo]-*L*-lizyny (36)

Boc-deprotekcji poddano 0.33 g (0.28 mmol) rdzenia **28** w 10 mL nas. HCl/EtOAc. Całkowite zdjęcie ochrony nastąpiło po godzinie. Otrzymano produkt w postaci jasnożółtego proszku z wydajnością 96.2% (0.25 g).

$C_{42}H_{63}O_7N_7 \times 4HCl$, $M = 923.84$ g/mol (masa monoizotopowa nieprotonowanego związku – 777.5).

LRMS (ESI, MeOH): 800.6 $[M + Na^+]$, 778.8 $[M + H^+]$ - *główny sygnał*.

e) Tetrachlorowodorek tryptamidu *N, N'*-bis[3-(5-aminopentoksy)-5-(2-aminoetoksy)-benzoilo]-*L*-lizyny (37)

Boc-deprotekcji poddano 1.91 g (1.57 mmol) rdzenia **29** w 25 mL nas. HCl/EtOAc. Całkowite zdjęcie ochrony nastąpiło po 4 godzinach. Otrzymano produkt w postaci kremowego proszku z wydajnością 99.3% (1.5 g).

$C_{44}H_{64}O_7N_8 \times 4HCl$, $M = 962.87$ g/mol (masa monoizotopowa nieprotonowanego związku – 816.5).

LRMS (ESI, MeOH): 817.7 [M + H⁺], 409.4 [M + 2H⁺]²⁺ - *główny sygnał*.

f) Tetrachlorowodorek dodecyloamidu *N, N'*-bis[3-(5-aminopentoksy)-5-(2-aminoetoksy)benzoilo]-*L*-lizyny (38)

Boc-deprotekcji poddano 2 g (1.61 mmol) rdzenia **30** w 25 mL nas. HCl/EtOAc. Całkowite zdjęcie ochrony nastąpiło po 6 godzinach. Otrzymano produkt w postaci białego proszku z wydajnością 95.6% (1.52 g).

C₄₆H₇₉O₇N₇×4HCl, M = 988.01 g/mol (masa monoizotopowa nieprotonowanego związku – 841.6).

LRMS (ESI, MeOH): 842.7 [M + H⁺] - *główny sygnał*, 421.9 [M + 2H⁺]²⁺.

g) Tetrachlorowodorek didodecyloamidu *N, N'*-bis[3-(5-aminopentoksy)-5-(2-aminoetoksy)benzoilo]-*L*-lizyny (39)

Boc-deprotekcji poddano 1.41 g (1 mmol) rdzenia **31** w 20 mL nas. HCl/EtOAc. Całkowite zdjęcie ochrony nastąpiło po 6 godzinach. Otrzymano produkt w postaci jasnożółtego proszku z wydajnością 92.2% (1.07 g).

C₅₈H₁₀₃O₇N₇×4HCl, M = 1156.32 g/mol (masa monoizotopowa nieprotonowanego związku – 1009.8).

LRMS (ESI, MeOH): 1011.1 [M + H⁺] - *główny sygnał*, 1033.2 [M + Na⁺], 506.3 [M + 2H⁺]²⁺.

h) Tetrachlorowodorek estru metylowego *N, N'*-bis[3,5-bis(2-aminoetoksy)benzoilo]-*L*-lizylo-*L*-tryptofanu (35)

Boc-deprotekcji poddano 3 g (2.52 mmol) rdzenia **27** w 50 mL nas. HCl/EtOAc. Całkowite zdjęcie ochrony nastąpiło po 6 godzinach. Otrzymano produkt w postaci jasnożółtego proszku z wydajnością 97.5% (2.3 g).

C₄₀H₅₄O₉N₈×4HCl, M = 936.75 g/mol (masa monoizotopowa nieprotonowanego związku – 790.4).

LRMS (ESI, MeOH): 396.4 [M + 2H⁺]²⁺.

6.5. SYNTEZA DENDRYMERÓW OPARTYCH NA RDZENIACH HYDROFOBOWYCH

6.5.1. Synteza dendrymerów z terminalnymi resztami lizynowymi

Dendrymery zostały zsyntetyzowane w wyniku reakcji sprzęgania odbezpieczonych rdzeni **32** – **39** (Rozdział 6.4.2.) z odpowiednio zabezpieczoną *L*-lizyną [Boc-Lys(2-Cl-Z)-OH, Boc-Lys(Z)-OH].

6.5.1.1. Zabezpieczone dendrymery

Wykorzystując procedurę ogólną sprzęgania metodą DCC/HOBt (Procedura A, Rozdział 6.2.) zsyntetyzowano 14 dendrymerów z terminalnymi resztami lizynowymi. Reakcje sprzęgania prowadzono z 2-krotnym nadmiarem Et₃N, od 48 do 72 godzin. EtOAc zastąpiono przez CHCl₃ a MgSO₄ przez Na₂SO₄. Czyste dendrymery uzyskano w wyniku sączenia molekularnego z użyciem kolumny z wypełnieniem Sephadex LH-20 z MeOH jako eluentem, a następnie doczyszczania na kolumnie silikażelowej z użyciem fazy CHCl₃/MeOH (gradient 100:1→20:1). Produkty **40** – **45** i **51** – **58** otrzymano w postaci proszków.

a) Dendrymer **40** (oparty na rdzeniu **32**)

Do reakcji użyto Boc-Lys(2-Cl-Z)-OH (0.49 g, 1.19 mmol), HOBt (0.18 g, 1.19 mmol), DCC (0.25 g, 1.19 mmol), rdzenia **32** (0.23 g, 0.27 mmol), Et₃N (0.22 mL, 1.62 mmol) i DMF (10 mL). Sprzęganie prowadzono przez 72 godziny. Otrzymano produkt w postaci białego proszku z wydajnością 78.4% (0.49 g).

C₁₁₂H₁₅₁O₂₇N₁₅Cl₄, M = 2281.29 g/mol (masa monoizotopowa 2278.0).

LRMS (ESI, MeOH): 2301.1 [M + Na⁺], 1162.0 [M + 2Na⁺]²⁺ - *główny sygnał*.

¹H NMR (500 MHz, MeOD): δ = 1.33-1.40 (m, 10H, 5×γCH₂ *L*-Lys i rdzenia) nakładający się na 1.39 [s, 36H, 4×C(CH₃)₃], 1.47 (m, 8H, 4×δCH₂ *L*-Lys), 1.60 (m, 6H, δCH₂ rdzenia, 2×βCH₂ *L*-Lys), 1.70 (m, 4H, 2×βCH₂ *L*-Lys), 1.82 (m, 2H, βCH₂ rdzenia), 2.76 (br t, 2H, CH₂-Ar *PEA*), 3.05 (br t, 8H, 4×εCH₂ *L*-Lys), 3.34 (m, 2H, εCH₂ rdzenia), 3.48 (m, 6H, CH₂-NH *PEA*, 2×O-CH₂-CH₂-NH), 3.58 (m, 4H, 2×O-CH₂-CH₂-NH), 4.02 (m, 12H, 4×O-CH₂-CH₂-NH, 4×αCH *L*-Lys), 4.49 (m, 1H, αCH rdzenia), 5.13 (2s, 8H, Ar-CH₂O), 6.63 (m, 2H, C⁴-H *Ph*), 6.93, 7.01 (2m, 4H, C^{2,6}-H *Ph*), 7.15, 7.20 (2m, 5H, C^{2,3,4,5,6}-H *PEA*), 7.26 (m, 8H, ArH), 7.32-7.43 (br m, 8H, ArH).

¹³C NMR (500 MHz, MeOD): δ = 24.0, 24.5 (γC), 28.8 [C(CH₃)₃], 30.1, 30.5 (δC), 32.8, 33.2 (βC), 36.5 (CH₂-Ar *PEA*), 39.9 (4×O-CH₂-CH₂-NH), 40.7 (εC rdzenia), 41.5 (4×εC *L*-Lys),

42.0 (CH₂-NH *PEA*), 55.5 (α C *rdzenia*), 56.0 (4 \times α C *L-Lys*), 64.8 (Ar-CH₂O), 67.7 (4 \times O-CH₂-CH₂-NH), 80.6 [C(CH₃)₃], 105.9, 106.0 (C⁴ *Ph*), 107.2, 107.5 (C^{2,6} *Ph*), 127.4 (C⁴ *PEA*), 128.1 (CH_{Ar}), 129.5, 129.8 (C^{2,3,5,6} *PEA*), 130.4 (CH_{Ar}), 134.1 (C_{Ar}-Cl), 135.9 (C_{Ar}-CH₂O), 137.2, 137.9 (C¹ *Ph*), 140.3 (C¹ *PEA*), 157.8, 158.5 [C=O (Boc, 2-Cl-Z)], 161.2 (C^{3,5} *Ph*), 169.4, 169.5 (CONH *Ph*), 174.3, 175.4 (CONH).

$[\alpha]_D^{25} = -17.4$ (c 1, MeOH).

$R_f = 0.41$ (CHCl₃/MeOH 8:1).

T. top.: 97-102°C.

b) Dendrymer 41 (oparty na rdzeniu 36)

Do reakcji użyto Boc-Lys(2-Cl-Z)-OH (0.42 g, 1.01 mmol), HOBt (0.15 g, 1.01 mmol), DCC (0.21 g, 1.01 mmol), rdzenia **36** (0.212 g, 0.23 mmol), Et₃N (0.19 mL, 1.38 mmol) i DMF (10 mL). Sprzężanie prowadzono przez 48 godzin. Otrzymano produkt w postaci jasnożółtego proszku z wydajnością 74.1% (0.4 g).

C₁₁₈H₁₆₃O₂₇N₁₅Cl₄, M = 2365.45 g/mol (masa monoizotopowa 2362.1).

LRMS (ESI, MeOH): 2385.2 [M + Na⁺], 1204.0 [M + 2Na⁺]²⁺ - *główny sygnał*, 1193.1 [M + H⁺ + Na⁺]²⁺.

¹H NMR (500 MHz, MeOD): $\delta = 1.30-1.41$ (br m, 10H, 5 \times γ CH₂ *L-Lys* i *rdzenia*) nakładający się na 1.38, 1.40 [2s, 36H, 4 \times C(CH₃)₃], 1.43-1.63 [br m, 24H, 5 \times δ CH₂ *L-Lys* i *rdzenia*, 3 \times β CH₂ *L-Lys*, 2 \times O-(CH₂)₂-CH₂-CH₂-NH], 1.72 [br m, 8H, 2 \times β CH₂ *L-Lys* i *rdzenia*, 2 \times O-CH₂-CH₂-(CH₂)₃-NH], 2.75 (t, $J = 7.2$ Hz, 2H, CH₂-Ar *PEA*), 3.02-3.12 (2 br t, 8H, 4 \times ϵ CH₂ *L-Lys*), 3.15, 3.22 [2m, 4H, 2 \times O-(CH₂)₄-CH₂-NH], 3.34 (m, 3H, CH₂-NH *PEA*, ϵ CH₂ *rdzenia*), 3.47 (m, 3H, O-CH₂-CH₂-NH, CH₂-NH *PEA*), 3.60 (m, 2H, O-CH₂-CH₂-NH), 3.91 [m, 4H, 2 \times O-CH₂-(CH₂)₄-NH], 4.01 (m, 8H, 2 \times O-CH₂-CH₂-NH, 4 \times α CH *L-Lys*), 4.47 (m, 1H, α CH *rdzenia*), 5.13 (m, 8H, Ar-CH₂O), 6.59 (m, 2H, C⁴-H *Ph*), 6.91, 6.99 (2m, 4H, C^{2,6}-H *Ph*), 7.10-7.22 (br m, 5H, C^{2,3,4,5,6}-H *PEA*), 7.26 (m, 8H, ArH), 7.32-7.43 (2m, 8H, ArH).

¹³C NMR (500 MHz, MeOD): $\delta = 24.0, 24.1$ (γ C), 24.4 [2 \times O-(CH₂)₂-CH₂-(CH₂)₂-NH], 24.5 (γ C), 28.8 [C(CH₃)₃], 29.9 [2 \times O-CH₂-CH₂-(CH₂)₃-NH], 30.1 (δ C), 30.5 [2 \times O-(CH₂)₃-CH₂-CH₂-NH], 32.8, 33.2 (β C), 36.5 (CH₂-Ar *PEA*), 40.0 (2 \times O-CH₂-CH₂-NH), 40.2 [2 \times O-(CH₂)₄-CH₂-NH], 40.7 (ϵ C *rdzenia*), 41.5 (4 \times ϵ C *L-Lys*), 42.0 (CH₂-NH *PEA*), 55.5 (α C *rdzenia*), 56.1, 56.2 (4 \times α C *L-Lys*), 64.6 (Ar-CH₂O), 67.7 (2 \times O-CH₂-CH₂-NH), 69.2, 69.2 [2 \times O-CH₂-(CH₂)₄-NH], 80.5, 80.6 [C(CH₃)₃], 105.8, 106.1 (C⁴ *Ph*), 106.7, 107.1, 107.2, 107.5 (C^{2,6} *Ph*), 127.4 (C⁴ *PEA*), 128.1 (CH_{Ar}), 129.5, 129.9 (C^{2,3,5,6} *PEA*), 130.4, 130.5 (CH_{Ar}), 134.1 (C_{Ar}-

Cl), 135.9 ($C_{Ar}-CH_2O$), 137.1, 137.8 ($C^1 Ph$), 140.4 ($C^1 PEA$), 157.8, 158.5, 158.6 [$C=O$ (Boc, 2-Cl-Z)], 161.2, 161.3, 161.7 ($C^{3,5} Ph$), 169.6, 169.7 (CONH *Ph*), 174.4, 175.1, 175.5 (CONH).

$[\alpha]_D^{25} = -14.9$ (c 1, MeOH).

$R_f = 0.38$ ($CHCl_3/MeOH$ 8:1).

T. top.: 86-92°C.

c) Dendrymer 42 (oparty na rdzeniu 33)

Do reakcji użyto Boc-Lys(2-Cl-Z)-OH (0.49 g, 1.19 mmol), HOBt (0.18 g, 1.19 mmol), DCC (0.25 g, 1.19 mmol), rdzenia **33** (0.24 g, 0.27 mmol), Et_3N (0.22 mL, 1.62 mmol) i DMF (10 mL). Sprzęganie prowadzono przez 48 godzin. Otrzymano produkt w postaci jasnobrunatnego proszku z wydajnością 88.3% (0.56 g).

$C_{114}H_{152}O_{27}N_{16}Cl_4$, $M = 2320.33$ g/mol (masa monoizotopowa 2317.0).

LRMS (ESI, MeOH): 2342.3 [$M + Na^+$], 1183.2 [$M + 2Na^+$]²⁺ - *główny sygnał*.

1H NMR (500 MHz, MeOD): $\delta = 1.35-1.40$ (m, 10H, $5 \times \gamma CH_2$ *L-Lys* i rdzenia) nakładający się na 1.39 [s, 36H, $4 \times C(CH_3)_3$], 1.46 (m, 8H, $4 \times \delta CH_2$ *L-Lys*), 1.54-1.65 (br m, 6H, δCH_2 rdzenia, $2 \times \beta CH_2$ *L-Lys*), 1.70 (m, 4H, $2 \times \beta CH_2$ *L-Lys*), 1.75-1.89 (br m, 2H, βCH_2 rdzenia), 2.91 (t, $J = 7.3$ Hz, 2H, CH_2-Ar TA), 3.05 (m, 8H, $4 \times \epsilon CH_2$ *L-Lys*), 3.39-3.57 (br m, 12H, ϵCH_2 rdzenia, $4 \times O-CH_2-CH_2-NH$, CH_2-NH TA), 3.95-4.08 (br m, 12H, $4 \times O-CH_2-CH_2-NH$, $4 \times \alpha CH$ *L-Lys*), 4.51 (m, 1H, αCH rdzenia), 5.13 (2s, 8H, $Ar-CH_2O$), 6.61 (m, 2H, C^4-H *Ph*), 6.91-7.06 (br m, 7H, $C^{2,6}-H$ *Ph*, $C^{2,5,6}-H$ TA), 7.25 (m, 8H, ArH), 7.29 (d, $J = 8.12$ Hz, 1H, C^7-H TA), 7.32-7.42 (br m, 8H, ArH), 7.52 (d, $J = 7.90$ Hz, 1H, C^4-H TA).

^{13}C NMR (500 MHz, MeOD): $\delta = 24.0, 24.4$ (γC), 26.3 (CH_2-Ar TA), 28.8 [$C(CH_3)_3$], 30.1, 30.5 (δC), 32.9, 33.2 (βC), 39.9 ($4 \times O-CH_2-CH_2-NH$), 40.7 (ϵC rdzenia), 41.4 (CH_2-NH TA), 41.5 ($4 \times \epsilon C$ *L-Lys*), 55.5 (αC rdzenia), 56.1 ($4 \times \alpha C$ *L-Lys*), 64.6 ($Ar-CH_2O$), 67.7 ($4 \times O-CH_2-CH_2-NH$), 80.6 [$C(CH_3)_3$], 105.8, 106.0 (C^4 *Ph*), 107.2, 107.5 ($C^{2,6}$ *Ph*), 112.3 (C^7 TA), 113.1 (C^3 TA), 119.3 (C^4 TA), 119.7 (C^5 TA), 122.3 (C^6 TA), 123.6 (C^2 TA), 128.1 (CH_{Ar}), 128.7 (C^{3a} TA), 130.4 (CH_{Ar}), 134.1 ($C_{Ar}-Cl$), 135.9 ($C_{Ar}-CH_2O$), 137.3, 137.9 (C^1 *Ph*), 138.1 (C^{7a} TA), 157.8, 158.5 [$C=O$ (Boc, 2-Cl-Z)], 161.2 ($C^{3,5}$ *Ph*), 169.6, 169.7 (CONH *Ph*), 174.3, 175.5 (CONH).

$[\alpha]_D^{25} = -13.9$ (c 1, MeOH).

$R_f = 0.45$ ($CHCl_3/MeOH$ 8:1).

T. top.: 108-111°C.

d) Dendrymer 43 (oparty na rdzeniu 37)

Do reakcji użyto Boc-Lys(2-Cl-Z)-OH (0.47 g, 1.14 mmol), HOBt (0.17 g, 1.14 mmol), DCC (0.24 g, 1.14 mmol), rdzenia **37** (0.25 g, 0.26 mmol), Et₃N (0.22 mL, 1.56 mmol) i DMF (10 mL). Sprzęganie prowadzono przez 72 godziny. Otrzymano produkt w postaci jasnożółtego proszku z wydajnością 80.6% (0.5 g).

C₁₂₀H₁₆₄O₂₇N₁₆Cl₄, M = 2404.49 g/mol (masa monoizotopowa 2401.1).

LRMS (ESI, MeOH): 2424.3 [M + Na⁺].

¹H NMR (500 MHz, MeOD): δ = 1.30-1.39 (br m, 10H, 5×γCH₂ *L-Lys* i rdzenia) nakładający się na 1.36, 1.38 [3s, 36H, 4×C(CH₃)₃], 1.40-1.62 [br m, 22H, 5×δCH₂ *L-Lys* i rdzenia, 2×βCH₂ *L-Lys*, 2×O-(CH₂)₂-CH₂-CH₂-NH], 1.63-1.86 [br m, 10H, 2×βCH₂ *L-Lys* i rdzenia, 2×O-CH₂-CH₂-(CH₂)₃-NH], 2.89 (t, *J* = 7.2 Hz, 2H, CH₂-Ar *TA*), 2.99-3.10 (2 br t, 8H, 4×εCH₂ *L-Lys*), 3.17 [2m, 4H, 2×O-(CH₂)₄-CH₂-NH], 3.29 (m, 2H, εCH₂ rdzenia), 3.37-3.62 (br m, 6H, 2×O-CH₂-CH₂-NH, CH₂-NH *TA*), 3.82-4.05 (br m, 12H, 4×O-CH₂, 4×αCH *L-Lys*), 4.46 (m, 1H, αCH rdzenia), 5.12 (m, 8H, Ar-CH₂O), 6.57 (m, 2H, C⁴-H *Ph*), 6.87-7.05 (br m, 7H, C^{2,6}-H *Ph*, C^{2,5,6}-H *TA*), 7.24 (m, 9H, ArH, C⁷-H *TA*), 7.30-7.41 (2m, 8H, ArH), 7.51 (d, *J* = 7.9 Hz, 1H, C⁴-H *TA*).

¹³C NMR (500 MHz, MeOD): δ = 24.1 (γC), 24.5 [2×O-(CH₂)₂-CH₂-(CH₂)₂-NH], 26.3 (CH₂-Ar *TA*), 28.8 [C(CH₃)₃], 29.9 [2×O-CH₂-CH₂-(CH₂)₃-NH], 30.1, 30.5 [2×O-(CH₂)₃-CH₂-CH₂-NH, δC], 32.9, 33.2 (βC), 40.0 (2×O-CH₂-CH₂-NH), 40.2 [2×O-(CH₂)₄-CH₂-NH], 40.7 (εC rdzenia), 41.4 (CH₂-NH *TA*), 41.5 (4×εC *L-Lys*), 55.5 (αC rdzenia), 56.1, 56.2 (4×αC *L-Lys*), 64.6 (Ar-CH₂O), 67.7 (2×O-CH₂-CH₂-NH), 69.2 [2×O-CH₂-(CH₂)₄-NH], 80.6 [C(CH₃)₃], 105.8, 106.1 (C⁴ *Ph*), 106.7, 107.0, 107.2, 107.4 (C^{2,6} *Ph*), 112.3 (C⁷ *TA*), 113.1 (C³ *TA*), 119.3 (C⁴ *TA*), 119.7 (C⁵ *TA*), 122.4 (C⁶ *TA*), 123.6 (C² *TA*), 128.1 (CH_{Ar}), 128.8 (C^{3a} *TA*), 130.4, 130.7 (CH_{Ar}), 134.1 (C_{Ar}-Cl), 135.9 (C_{Ar}-CH₂O), 137.2, 137.8 (C¹ *Ph*), 138.1 (C^{7a} *TA*), 157.8, 158.6 [C=O (Boc, 2-Cl-Z)], 161.3, 161.7 (C^{3,5} *Ph*), 169.6, 169.8 (CONH *Ph*), 174.3, 175.1, 175.5 (CONH).

[α]_D²⁵ = -13.0 (c 1, MeOH).

R_f = 0.33 (CHCl₃/MeOH 8:1).

T. top.: 96-100°C.

e) Dendrymer 44 (oparty na rdzeniu 34)

Do reakcji użyto Boc-Lys(2-Cl-Z)-OH (0.47 g, 1.14 mmol), HOBt (0.17 g, 1.14 mmol), DCC (0.24 g, 1.14 mmol), rdzenia **34** (0.235 g, 0.26 mmol), Et₃N (0.22 mL, 1.56

mmol) i DMF (10 mL). Sprzężanie prowadzono przez 72 godziny. Otrzymano produkt w postaci kremowego proszku z wydajnością 82% (0.5 g).

$C_{116}H_{167}O_{27}N_{15}Cl_4$, $M = 2345.46$ g/mol (masa monoizotopowa 2342.1).

LRMS (ESI, MeOH): 2365.2 $[M + Na^+]$, 1194.1 $[M + 2Na^+]^{2+}$ - *główny sygnał*, 1183.1 $[M + H^+ + Na^+]^{2+}$.

1H NMR (500 MHz, MeOD): $\delta = 0.88$ (br t, 3H, CH_3 DDA), 1.23-1.40 (br m, 26H, $4 \times \gamma CH_2$ L-Lys, CH_2 -3-11 DDA) nakładający się na 1.39 [s, 36H, $4 \times C(CH_3)_3$], 1.47 (m, 12H, γCH_2 rdzenia, $4 \times \delta CH_2$ L-Lys, CH_2 -2 DDA), 1.60-1.75 (br m, 10H, $4 \times \beta CH_2$ L-Lys, δCH_2 rdzenia), 1.88 (br m, 2H, βCH_2 rdzenia), 3.06 (m, 8H, $4 \times \epsilon CH_2$ L-Lys), 3.17 (m, 2H, CH_2 -1 DDA), 3.35 (m, 2H, ϵCH_2 rdzenia), 3.50, 3.59 (2m, 8H, $4 \times O-CH_2-CH_2-NH$), 4.02 (m, 12H, $4 \times O-CH_2-CH_2-NH$, $4 \times \alpha CH$ L-Lys), 4.53 (m, 1H, αCH rdzenia), 5.14 (s, 8H, Ar- CH_2O), 6.63 (m, 2H, C^4-H Ph), 6.94, 7.01 (2m, 4H, $C^{2,6}-H$ Ph), 7.27 (m, 8H, ArH), 7.34-7.43 (2m, 8H, ArH).

^{13}C NMR (500 MHz, MeOD): $\delta = 14.5$ (C^{12} DDA), 23.7 (C^{11} DDA), 24.1, 24.6 (γC), 28.0 (C^3 DDA), 28.8 [$C(CH_3)_3$], 30.1, 30.4-30.8 (δC , C^2 , C^4-C^{10} DDA), 32.9, 33.1, 33.2 (βC), 39.9 ($4 \times O-CH_2-CH_2-NH$), 40.5 (C^1 DDA), 40.7 (ϵC rdzenia), 41.5 ($4 \times \epsilon C$ L-Lys), 55.5 (αC rdzenia), 56.0 ($4 \times \alpha C$ L-Lys), 64.6 (Ar- CH_2O), 67.7 ($4 \times O-CH_2-CH_2-NH$), 80.6 [$C(CH_3)_3$], 105.9, 106.0 (C^4 Ph), 107.2, 107.5 ($C^{2,6}$ Ph), 128.2, 130.4 (CH_{Ar}), 134.1 (C_{Ar-Cl}), 135.9 (C_{Ar-CH_2O}), 157.8, 158.5 [$C=O$ (Boc, 2-Cl-Z)], 161.2, 161.3 ($C^{3,5}$ Ph), 175.5 (CONH).

$[\alpha]_D^{25} = -14.0$ (c 1, MeOH).

$R_f = 0.54$ ($CHCl_3/MeOH$ 8:1).

T. top.: 88-90°C.

f) Dendrymer 45 (oparty na rdzeniu 35)

Do reakcji użyto Boc-Lys(2-Cl-Z)-OH (4.47 g, 10.78 mmol), HOBt (1.65 g, 10.78 mmol), DCC (2.22 g, 10.78 mmol), rdzenia 35 (2.29 g, 2.45 mmol), Et_3N (2 mL, 14.7 mmol) i DMF (20 mL). Sprzężanie prowadzono przez 72 godziny. Otrzymano produkt w postaci jasnożółtego proszku z wydajnością 71.6% (4.16 g).

$C_{116}H_{154}O_{29}N_{16}Cl_4$, $M = 2378.37$ g/mol (masa monoizotopowa 2375.0).

LRMS (ESI, MeOH): 2397.8 $[M + Na^+]$, 1210.4 $[M + 2Na^+]^{2+}$ - *główny sygnał*.

1H NMR (500 MHz, MeOD): $\delta = 1.25$ -1.40 (br m, 8H, $4 \times \gamma CH_2$ L-Lys) nakładający się na 1.38 [s, 36H, $4 \times C(CH_3)_3$], 1.45 (br m, 10H, γCH_2 rdzenia, $4 \times \delta CH_2$ L-Lys), 1.59 (br m, 6H, δCH_2 rdzenia, $2 \times \beta CH_2$ L-Lys), 1.68 (m, 4H, $2 \times \beta CH_2$ L-Lys), 1.75-1.92 (2m, 2H, βCH_2 rdzenia), 3.04 (m, 8H, $4 \times \epsilon CH_2$ L-Lys), 3.22 (br m, 2H, βCH_2 L-Trp), 3.33 (m, 2H, ϵCH_2 rdzenia), 3.48 (m, 4H, $2 \times O-CH_2-CH_2-NH$), 3.58 (m, 7H, OCH_3 , $2 \times O-CH_2-CH_2-NH$), 4.00 (br

m, 12H, 4×O-CH₂-CH₂-NH, 4×αCH *L*-Lys), 4.58 (m, 1H, αCH *rdzenia*), 4.73 (m, 1H, αCH *L*-Trp), 5.12 (2s, 8H, Ar-CH₂O), 6.62 (m, 2H, C⁴-H *Ph*), 6.94 (m, 5H, C^{2,6}-H *Ph*, C⁵-H *L*-Trp), 7.02 (m, 1H, C⁶-H *L*-Trp), 7.08 (s, 1H, C²-H *L*-Trp), 7.25 (m, 9H, ArH, C⁷-H *L*-Trp), 7.34, 7.39 (2m, 8H, ArH), 7.47 (d, *J* = 7.9 Hz, 1H, C⁴-H *L*-Trp).

¹³C NMR (500 MHz, MeOD): δ = 24.1, 24.4 (γC), 28.5 (βC *L*-Trp), 28.8 [C(CH₃)₃], 30.1, 30.5 (δC), 32.7, 33.2 (βC), 39.9 (4×O-CH₂-CH₂-NH), 40.7 (εC *rdzenia*), 41.5 (4×εC *L*-Lys), 52.8 (OCH₃), 54.9 (αC *L*-Trp), 55.2 (αC *rdzenia*), 56.1 (4×αC *L*-Lys), 64.6 (Ar-CH₂O), 67.7 (4×O-CH₂-CH₂-NH), 80.6 [C(CH₃)₃], 105.9, 106.1 (C⁴ *Ph*), 107.2, 107.5 (C^{2,6} *Ph*), 110.5 (C³ *L*-Trp), 112.4 (C⁷ *L*-Trp), 119.2 (C⁴ *L*-Trp), 119.9 (C⁵ *L*-Trp), 122.5 (C⁶ *L*-Trp), 124.6 (C² *L*-Trp), 128.1 (CH_{Ar}), 128.7 (C^{3a} *L*-Trp), 130.4 (CH_{Ar}), 134.1 (C_{Ar}-Cl), 135.9 (C_{Ar}-CH₂O), 137.3 (C^{7a} *L*-Trp), 138.0 (C¹ *Ph*), 157.8, 158.6 [C=O (Boc, 2-Cl-Z)], 161.2, 161.3 (C^{3,5} *Ph*), 169.6 (CONH *Ph*), 173.8, 174.3, 175.5 (CONH).

R_f = 0.30 (CHCl₃/MeOH 8:1).

T. top.: 104-107°C.

g) Dendrymer 51 (oparty na rdzeniu 32)

Do reakcji użyto Boc-Lys(Z)-OH (1.58 g, 4.14 mmol), HOBt (0.63 g, 4.14 mmol), DCC (0.85 g, 4.14 mmol), rdzenia 32 (0.79 g, 0.94 mmol), Et₃N (0.78 mL, 5.64 mmol) i DMF (20 mL). Sprzęganie prowadzono przez 72 godziny. Otrzymano produkt w postaci jasnobrunatnego proszku z wydajnością 82.7% (1.67 g).

C₁₁₂H₁₅₅O₂₇N₁₅, M = 2143.51 g/mol (masa monoizotopowa 2142.1).

LRMS (ESI, MeOH): 2165.1 [M + Na⁺], 1094.7 [M + 2Na⁺]²⁺ - główny sygnał, 1083.9 [M + H⁺ + Na⁺]²⁺.

¹H NMR (500 MHz, MeOD): δ = 1.30-1.40 (m, 10H, 5×γCH₂ *L*-Lys i *rdzenia*) nakładający się na 1.39 [s, 36H, 4×C(CH₃)₃], 1.45 (m, 8H, 4×δCH₂ *L*-Lys), 1.59 (m, 6H, δCH₂ *rdzenia*, 2×βCH₂ *L*-Lys), 1.69 (m, 4H, 2×βCH₂ *L*-Lys), 1.81 (m, 2H, βCH₂ *rdzenia*), 2.76 (t, *J* = 7.2 Hz, 2H, CH₂-Ar *PEA*), 3.04 (br t, 8H, 4×εCH₂ *L*-Lys), 3.34 (m, 2H, εCH₂ *rdzenia*), 3.48 (m, 6H, CH₂-NH *PEA*, 2×O-CH₂-CH₂-NH), 3.58 (m, 4H, 2×O-CH₂-CH₂-NH), 4.01 (m, 12H, 4×O-CH₂-CH₂-NH, 4×αCH *L*-Lys), 4.49 (m, 1H, αCH *rdzenia*), 5.03 (2s, 8H, Ar-CH₂O), 6.63 (m, 2H, C⁴-H *Ph*), 6.94, 7.01 (2m, 4H, C^{2,6}-H *Ph*), 7.15, 7.20 (2m, 5H, C^{2,3,4,5,6}-H *PEA*), 7.25 (m, 4H, ArH), 7.30 (m, 16H, ArH).

¹³C NMR (500 MHz, MeOD): δ = 24.0, 24.5 (γC), 28.8 [C(CH₃)₃], 30.1, 30.5 (δC), 32.8, 33.2 (βC), 36.5 (CH₂-Ar *PEA*), 39.9 (4×O-CH₂-CH₂-NH), 40.6 (εC *rdzenia*), 41.4 (4×εC *L*-Lys), 42.0 (CH₂-NH *PEA*), 55.5 (αC *rdzenia*), 56.0 (4×αC *L*-Lys), 67.3 (Ar-CH₂O), 67.7 (4×O-

CH₂-CH₂-NH), 80.6 [C(CH₃)₃], 105.9, 106.0 (C⁴ Ph), 107.2, 107.5 (C^{2,6} Ph), 127.4 (C⁴ PEA), 128.7, 128.9, 129.4 (CH_{Ar}), 129.5, 129.9 (C^{2,3,5,6} PEA), 137.2, 137.9 (C¹ Ph), 138.4 (C_{Ar}-CH₂O), 140.4 (C¹ PEA), 157.8, 158.8 [C=O (Boc, Z)], 161.2, 161.3 (C^{3,5} Ph), 169.4 (CONH Ph), 174.3, 175.4 (CONH).

R_f = 0.38 (CHCl₃/MeOH 8:1).

h) Dendrymer 52 (oparty na rdzeniu 36)

Do reakcji użyto Boc-Lys(Z)-OH (0.7 g, 1.85 mmol), HOBt (0.28 g, 1.85 mmol), DCC (0.38 g, 1.85 mmol), rdzenia 36 (0.388 g, 0.42 mmol), Et₃N (0.35 mL, 2.52 mmol) i DMF (15 mL). Sprzęganie prowadzono przez 48 godzin. Otrzymano produkt w postaci jasnożółtego proszku z wydajnością 89.7% (0.84 g).

C₁₁₈H₁₆₇O₂₇N₁₅, M = 2227.67 g/mol (masa monoizotopowa 2226.2).

LRMS (ESI, MeOH): 2249.3 [M + Na⁺], 2227.3 [M + H⁺], 1136.2 [M + 2Na⁺]²⁺ - główny sygnał, 1125.2 [M + H⁺ + Na⁺]²⁺.

¹H NMR (500 MHz, MeOD): δ = 1.30-1.40 (br m, 10H, 5×γCH₂ L-Lys i rdzenia) nakładający się na 1.39, 1.41 [2s, 36H, 4×C(CH₃)₃], 1.47 [m, 10H, 3×δCH₂ L-Lys, 2×O-(CH₂)₂-CH₂-(CH₂)₂-NH], 1.57 (br m, 12H, 2×δCH₂ L-Lys i rdzenia, 2×βCH₂ L-Lys, 2×O-(CH₂)₃-CH₂-CH₂-NH), 1.73 [m, 10H, 3×βCH₂ L-Lys i rdzenia, 2×O-CH₂-CH₂-(CH₂)₃-NH], 2.76 (t, J = 7.2 Hz, 2H, CH₂-Ar PEA), 3.01-3.11 (2 br t, 8H, 4×εCH₂ L-Lys), 3.16, 3.22 [2m, 4H, 2×O-(CH₂)₄-CH₂-NH], 3.34 (m, 3H, CH₂-NH PEA, εCH₂ rdzenia), 3.48 (m, 3H, O-CH₂-CH₂-NH, CH₂-NH PEA), 3.60 (m, 2H, O-CH₂-CH₂-NH), 3.88-4.06 (br m, 12H, 4×O-CH₂, 4×αCH L-Lys), 4.48 (m, 1H, αCH rdzenia), 5.03 (m, 8H, Ar-CH₂O), 6.60 (m, 2H, C⁴-H Ph), 6.93, 7.00 (2m, 4H, C^{2,6}-H Ph), 7.11-7.23 (br m, 5H, C^{2,3,4,5,6}-H PEA), 7.26 (m, 4H, ArH), 7.31 (m, 16H, ArH).

¹³C NMR (500 MHz, MeOD): δ = 24.0, 24.1 (γC), 24.4 [2×O-(CH₂)₂-CH₂-(CH₂)₂-NH], 24.5 (γC), 28.8 [C(CH₃)₃], 29.9 [2×O-CH₂-CH₂-(CH₂)₃-NH], 30.1 (δC), 30.5 [2×O-(CH₂)₃-CH₂-CH₂-NH, δC], 32.8, 33.2 (βC), 36.5 (CH₂-Ar PEA), 40.0 (2×O-CH₂-CH₂-NH), 40.2 [2×O-(CH₂)₄-CH₂-NH], 40.6 (εC rdzenia), 41.4 (4×εC L-Lys), 42.0 (CH₂-NH PEA), 55.5 (αC rdzenia), 56.0, 56.1 (4×αC L-Lys), 67.3 (Ar-CH₂O), 67.7 (2×O-CH₂-CH₂-NH), 69.1, 69.2 [2×O-CH₂-(CH₂)₄-NH], 80.6 [C(CH₃)₃], 105.8, 106.1 (C⁴ Ph), 106.7, 107.0, 107.3, 107.5 (C^{2,6} Ph), 127.4 (C⁴ PEA), 128.7, 128.9, 129.4 (CH_{Ar}), 129.5, 129.9 (C^{2,3,5,6} PEA), 137.1, 137.8 (C¹ Ph), 138.4 (C_{Ar}-CH₂O), 140.4 (C¹ PEA), 157.8, 158.8 [C=O (Boc, Z)], 161.2, 161.7 (C^{3,5} Ph), 169.6, 169.7 (CONH Ph), 174.4, 175.1, 175.4 (CONH).

[α]_D²⁵ = -15.8 (c 1, MeOH).

$R_f = 0.38$ (CHCl₃/MeOH 8:1).

T. top.: 85-89°C.

i) Dendrymer 53 (oparty na rdzeniu 33)

Do reakcji użyto Boc-Lys(Z)-OH (1.41 g, 3.7 mmol), HOBt (0.57 g, 3.7 mmol), DCC (0.76 g, 3.7 mmol), rdzenia **33** (0.74 g, 0.84 mmol), Et₃N (0.7 mL, 5.04 mmol) i DMF (25 mL). Sprzęganie prowadzono przez 72 godziny. Otrzymano produkt w postaci jasnożółtego proszku z wydajnością 72.8% (1.34 g).

C₁₁₄H₁₅₆O₂₇N₁₆, M = 2182.55 g/mol (masa monoizotopowa 2181.1).

LRMS (ESI, MeOH): 2205.5 [M + Na⁺], 1114.3 [M + 2Na⁺]²⁺ - *główny sygnał*.

¹H NMR (500 MHz, MeOD): $\delta = 1.30$ -1.40 (m, 10H, 5 \times γ CH₂ *L-Lys* i rdzenia) nakładający się na 1.39 [s, 36H, 4 \times C(CH₃)₃], 1.45 (m, 8H, 4 \times δ CH₂ *L-Lys*), 1.58 (m, 6H, δ CH₂ rdzenia, 2 \times β CH₂ *L-Lys*), 1.68 (m, 4H, 2 \times β CH₂ *L-Lys*), 1.82 (br m, 2H, β CH₂ rdzenia), 2.92 (t, $J = 7.2$ Hz, 2H, CH₂-Ar TA), 3.03 (m, 8H, 4 \times ϵ CH₂ *L-Lys*), 3.3 (m, 2H, ϵ CH₂ rdzenia), 3.39-3.62 (br m, 10H, 4 \times O-CH₂-CH₂-NH, CH₂-NH TA), 4.00 (br m, 12H, 4 \times O-CH₂-CH₂-NH, 4 \times α CH *L-Lys*), 4.51 (m, 1H, α CH rdzenia), 5.02 (2s, 8H, Ar-CH₂O), 6.61 (m, 2H, C⁴-H *Ph*), 6.94 (m, 3H, C^{2,6}-H *Ph*, C⁵-H TA), 7.02 (m, 4H, C^{2,6}-H *Ph*, C^{2,6}-H TA), 7.25 (m, 4H, ArH), 7.29 (m, 17H, C⁷-H *Ph*, ArH), 7.52 (d, $J = 7.89$ Hz, 1H, C⁴-H *Ph*).

¹³C NMR (500 MHz, MeOD): $\delta = 24.0, 24.4$ (γ C), 26.3 (CH₂-Ar TA), 28.8 [C(CH₃)₃], 30.1, 30.5 (δ C), 32.9, 33.2 (β C), 39.9 (4 \times O-CH₂-CH₂-NH), 40.7 (ϵ C rdzenia), 41.4 (CH₂-NH TA), 41.5 (4 \times ϵ C *L-Lys*), 55.5 (α C rdzenia), 56.1 (4 \times α C *L-Lys*), 67.3 (Ar-CH₂O), 67.7 (4 \times O-CH₂-CH₂-NH), 80.6 [C(CH₃)₃], 105.9, 106.1 (C⁴ *Ph*), 107.2, 107.5 (C^{2,6} *Ph*), 112.3 (C⁷ TA), 113.1 (C³ TA), 119.4 (C⁴ TA), 119.7 (C⁵ TA), 122.4 (C⁶ TA), 123.6 (C² TA), 128.8, 128.9, 129.5 (CH_{Ar}), 137.2, 137.9 (C¹ *Ph*), 138.1 (C^{7a} TA), 138.4 (C_{Ar}-CH₂O), 157.8, 158.8 [C=O (Boc, Z)], 161.2, 161.3 (C^{3,5} *Ph*), 169.4, 169.6 (CONH *Ph*), 174.3, 175.5 (CONH).

$[\alpha]_D^{25} = -17.2$ (c 1, MeOH).

$R_f = 0.33$ (CHCl₃/MeOH 8:1).

T. top.: 99-102°C.

j) Dendrymer 54 (oparty na rdzeniu 37)

Do reakcji użyto Boc-Lys(Z)-OH (2.55 g, 6.69 mmol), HOBt (1.02 g, 6.69 mmol), DCC (1.38 g, 6.69 mmol), rdzenia **37** (1.46 g, 1.52 mmol), Et₃N (1.3 mL, 9.12 mmol) i DMF (30 mL). Sprzęganie prowadzono przez 48 godzin. Otrzymano produkt w postaci żółtego proszku z wydajnością 82.8% (2.85 g).

C₁₂₀H₁₆₈O₂₇N₁₆, M = 2266.71 g/mol (masa monoizotopowa 2265.2).

LRMS (ESI, MeOH): 2293.7 [2M + MeOH + H⁺ + Na⁺]²⁺, 2288.1 [M + Na⁺], 1160.5 [M + MeOH + H⁺ + Na⁺]²⁺ - *główny sygnał*, 1155.5 [M + 2Na⁺]²⁺, 1144.5 [M + H⁺ + Na⁺]²⁺.

¹H NMR (500 MHz, MeOD): δ = 1.30-1.41 (br m, 10H, 5×γCH₂ *L-Lys i rdzenia*) nakładający się na 1.38, 1.40 [2s, 36H, 4×C(CH₃)₃], 1.42-1.61 [br m, 20H, 5×δCH₂ *L-Lys i rdzenia*, βCH₂ *L-Lys*, 2×O-(CH₂)₂-CH₂-CH₂-NH], 1.69 [m, 10H, 3×βCH₂ *L-Lys*, 2×O-CH₂-CH₂-(CH₂)₃-NH], 1.82 (m, 2H, βCH₂ *rdzenia*), 2.91 (t, *J* = 7.2 Hz, 2H, CH₂-Ar *TA*), 3.00-3.10 (2 br t, 10H, 5×εCH₂ *L-Lys i rdzenia*), 3.11-3.25 [2m, 4H, 2×O-(CH₂)₄-CH₂-NH], 3.38-3.63 (2m, 6H, 2×O-CH₂-CH₂-NH, CH₂-NH *TA*), 3.89 [m, 4H, 2×O-CH₂-(CH₂)₄-NH] 3.99 (m, 8H, 4×αCH *L-Lys*, 2×O-CH₂-CH₂-NH), 4.49 (m, 1H, αCH *rdzenia*), 5.02 (m, 8H, Ar-CH₂O), 6.58 (m, 2H, C⁴-H *Ph*), 6.90-7.00 (m, 5H, C^{2,6}-H *Ph*, C⁵-H *TA*), 7.03 (m, 2H, C^{2,6}-H *TA*), 7.22-7.32 (br m, 21H, ArH, C⁷-H *TA*), 7.52 (d, *J* = 7.9 Hz, 1H, C⁴-H *TA*).

¹³C NMR (500 MHz, MeOD): δ = 24.1 (γC), 24.4 [2×O-(CH₂)₂-CH₂-(CH₂)₂-NH], 26.3 (CH₂-Ar *TA*), 28.8 [C(CH₃)₃], 29.9 [2×O-CH₂-CH₂-(CH₂)₃-NH], 30.1, 30.5 [2×O-(CH₂)₃-CH₂-CH₂-NH, δC], 32.9, 33.2 (βC), 40.0 (2×O-CH₂-CH₂-NH), 40.2 [2×O-(CH₂)₄-CH₂-NH], 40.7 (εC *rdzenia*), 41.4 (CH₂-NH *TA*), 41.5 (4×εC *L-Lys*), 55.5 (αC *rdzenia*), 56.1, 56.2 (4×αC *L-Lys*), 67.3 (Ar-CH₂O), 67.7 (2×O-CH₂-CH₂-NH), 69.1, 69.2 [2×O-CH₂-(CH₂)₄-NH], 80.6 [C(CH₃)₃], 105.8, 106.1 (C⁴ *Ph*), 106.7, 107.0, 107.2, 107.4 (C^{2,6} *Ph*), 112.3 (C⁷ *TA*), 113.1 (C³ *TA*), 119.4 (C⁴ *TA*), 119.7 (C⁵ *TA*), 122.4 (C⁶ *TA*), 123.6 (C² *TA*), 128.8 (C^{3a} *TA*, CH_{Ar}), 128.9, 129.5 (CH_{Ar}), 137.2, 137.8 (C¹ *Ph*), 138.1 (C^{7a} *TA*), 138.4 (C_{Ar}-CH₂O), 157.8, 158.9 [C=O (Boc, Z)], 161.2, 161.7 (C^{3,5} *Ph*), 169.6, 169.8 (CONH *Ph*), 174.3, 175.1, 175.5 (CONH).

[α]_D²⁵ = -13.4 (c 1, MeOH).

R_f = 0.45 (CHCl₃/MeOH 8:1).

T. top.: 90-95°C.

k) Dendrymer 55 (oparty na rdzeniu 34)

Do reakcji użyto Boc-Lys(Z)-OH (1.17 g, 3.08 mmol), HOBt (0.47 g, 3.08 mmol), DCC (0.64 g, 3.08 mmol), rdzenia **34** (0.63 g, 0.7 mmol), Et₃N (0.58 mL, 4.2 mmol) i DMF (20 mL). Sprzęganie prowadzono przez 72 godziny. Otrzymano produkt w postaci jasnożółtego proszku z wydajnością 72.1% (1.11 g).

C₁₁₆H₁₇₁O₂₇N₁₅, M = 2207.68 g/mol (masa monoizotopowa 2206.2).

LRMS (ESI, MeOH): 2230.6 [M + H⁺], 1126.8 [M + 2Na⁺]²⁺ - *główny sygnał*, 1065.6 [M - Boc + H⁺ + Na⁺]²⁺.

¹H NMR (500 MHz, MeOD): δ = 0.88 (br t, 3H, CH₃ DDA), 1.23-1.40 (br m, 26H, 4 \times γ CH₂ L-Lys, CH₂-3-11 DDA) nakładający się na 1.39 [s, 36H, 4 \times C(CH₃)₃], 1.47 (m, 12H, γ CH₂ rdzenia, 4 \times δ CH₂ L-Lys, CH₂-2 DDA), 1.54-1.74 (br m, 10H, 4 \times β CH₂ L-Lys, δ CH₂ rdzenia), 1.87 (m, 2H, β CH₂ rdzenia), 3.05 (m, 8H, 4 \times ϵ CH₂ L-Lys), 3.17 (m, 2H, CH₂-1 DDA), 3.30 (m, 2H, ϵ CH₂ rdzenia), 3.50, 3.58 (2m, 8H, 4 \times O-CH₂-CH₂-NH), 4.02 (m, 12H, 4 \times O-CH₂-CH₂-NH, 4 \times α CH L-Lys), 4.52 (m, 1H, α CH rdzenia), 5.03 (s, 8H, Ar-CH₂O), 6.64 (m, 2H, C⁴-H Ph), 6.95, 7.02 (2m, 4H, C^{2,6}-H Ph), 7.25 (m, 4H, ArH), 7.31 (m, 16H, ArH).

¹³C NMR (500 MHz, MeOD): δ = 14.5 (C¹² DDA), 23.7 (C¹¹ DDA), 24.0, 24.5 (γ C), 28.0 (C³ DDA), 28.8 [C(CH₃)₃], 30.1, 30.4-30.8 (δ C, C², C⁴-C¹⁰ DDA), 32.9, 33.1, 33.2 (β C), 39.9 (4 \times O-CH₂-CH₂-NH), 40.5 (C¹ DDA), 40.7 (ϵ C rdzenia), 41.5 (4 \times ϵ C L-Lys), 55.4 (α C rdzenia), 56.1 (4 \times α C L-Lys), 67.3 (Ar-CH₂O), 67.7 (4 \times O-CH₂-CH₂-NH), 80.6 [C(CH₃)₃], 105.9, 106.1 (C⁴ Ph), 107.2, 107.5 (C^{2,6} Ph), 128.8, 128.9, 129.5 (CH_{Ar}), 137.3, 137.9 (C¹ Ph), 138.4 (C_{Ar}-CH₂O), 157.8, 158.8 [C=O (Boc, Z)], 161.2, 161.3 (C^{3,5} Ph), 169.4, 169.6 (CONH Ph), 174.3, 175.5 (CONH).

$[\alpha]_D^{25} = -14.9$ (c 1, MeOH).

$R_f = 0.46$ (CHCl₃/MeOH 8:1).

T. top.: 85-89°C.

l) Dendrymer 56 (oparty na rdzeniu 38)

Do reakcji użyto Boc-Lys(Z)-OH (2.55 g, 6.69 mmol), HOBt (1.02 g, 6.69 mmol), DCC (1.38 g, 6.69 mmol), rdzenia **38** (1.5 g, 1.52 mmol), Et₃N (1.3 mL, 9.12 mmol) i DMF (25 mL). Sprzęganie prowadzono przez 72 godziny. Otrzymano produkt w postaci jasnożółtego proszku z wydajnością 81.3% (2.83 g).

C₁₂₂H₁₈₃O₂₇N₁₅, M = 2291.84 g/mol (masa monoizotopowa 2290.3).

LRMS (ESI, MeOH): 2313.4 [M + Na⁺], 1168.3 [M + 2Na⁺]²⁺ - *główny sygnał*.

$[\alpha]_D^{25} = -12.1$ (c 1, MeOH).

$R_f = 0.49$ (CHCl₃/MeOH 8:1).

T. top.: 76-80°C.

m) Dendrymer 57 (oparty na rdzeniu 39)

Do reakcji użyto Boc-Lys(Z)-OH (1.54 g, 4.05 mmol), HOBt (0.62 g, 4.05 mmol), DCC (0.84 g, 4.05 mmol), rdzenia **39** (1.06 g, 0.92 mmol), Et₃N (0.77 mL, 5.52 mmol) i DMF (20 mL). Sprzęganie prowadzono przez 48 godzin. Otrzymano produkt w postaci oleju, który

po wysuszeniu w eksykatorze nad P₂O₅ przeszedł w formę jasnożółtego proszku z wydajnością 84.5% (1.91 g).

C₁₃₄H₂₀₇O₂₇N₁₅, M = 2460.16 g/mol (masa monoizotopowa 2458.5).

LRMS (ESI, MeOH): 2481.6 [M + Na⁺], 1252.9 [M + 2Na⁺]²⁺ - *główny sygnał*.

¹H NMR (500 MHz, MeOD): δ = 0.88 (m, 6H, 2×CH₃ *dDDA*), 1.21-1.89 [br m, 82H, β, γ, δCH₂, 2×CH₂-2-11 *dDDA*, 2×O-CH₂-(CH₂)₃-CH₂-NH] nakładający się na 1.38, 1.41 [2s, 36H, 4×C(CH₃)₃], 3.03, 3.08 (2 br t, 8H, 4×εCH₂ *L-Lys*), 3.15 [m, 3H, O-(CH₂)₄-CH₂-NH, CH₂-1 *dDDA*], 3.22 [m, 2H, O-(CH₂)₄-CH₂-NH], 3.35 (m, 2H, εCH₂ *rdzenia*), 3.45 (2m, 4H, O-CH₂-CH₂-NH, CH₂-1 *dDDA*), 3.59 (m, 2H, O-CH₂-CH₂-NH), 3.89-4.05 (2m, 12H, 4×O-CH₂, 4×αCH *L-Lys*), 4.93 (m, 1H, αCH *rdzenia*), 5.03 (2s, 8H, Ar-CH₂O), 6.60 (m, 2H, C⁴-H *Ph*), 6.93, 6.99 (2m, 4H, C^{2,6}-H *Ph*), 7.23-7.33 (br m, 20H, ArH).

¹³C NMR (500 MHz, MeOD): δ = 14.5 (2×C¹² *dDDA*), 28.8 [C(CH₃)₃], 23.7, 23.8, 24.1, 24.4, 24.5, 27.9, 28.0, 28.6, 29.9, 30.1, 30.2, 30.3, 30.4-30.5, 30.7-33.1, 33.2 [β, γ, δC, 2×C²-C¹¹ *dDDA*, 2×O-CH₂-(CH₂)₃-CH₂-NH], 39.9 (O-CH₂-CH₂-NH), 40.2 [2×O-(CH₂)₄-CH₂-NH], 40.6 (εC *rdzenia*), 41.5 (4×εC *L-Lys*), 47.6 (2×C¹ *dDDA*), 51.3 (αC *rdzenia*), 56.1, 56.2 (4×αC *L-Lys*), 67.3 (Ar-CH₂O), 67.7 (2×O-CH₂-CH₂-NH), 69.1, 69.2 [2×O-CH₂-(CH₂)₄-NH], 80.6 [C(CH₃)₃], 105.7, 106.1 (C⁴ *Ph*), 106.7, 107.0, 107.2, 107.3 (C^{2,6} *Ph*), 128.8, 128.9, 129.5 (CH_{Ar}), 137.1, 137.8 (C¹ *Ph*), 138.4 (C_{Ar}-CH₂O), 157.8, 158.9 [C=O (Boc, Z)], 161.3, 161.7 (C^{3,5} *Ph*), 169.4, 169.6 (CONH *Ph*), 173.7, 175.1, 175.5 (CONH).

R_f = 0.64 (CHCl₃/MeOH 8:1).

n) Dendrymer 58 (oparty na rdzeniu 35)

Do reakcji użyto Boc-Lys(Z)-OH (1.96 g, 5.15 mmol), HOBt (0.79 g, 5.15 mmol), DCC (1.06 g, 5.15 mmol), rdzenia 35 (1.1 g, 1.17 mmol), Et₃N (0.97 mL, 7.02 mmol) i DMF (15 mL). Sprzężanie prowadzono przez 48 godzin. Otrzymano produkt w postaci jasnożółtego proszku z wydajnością 79.8% (2.1 g).

C₁₁₆H₁₅₈O₂₉N₁₆, M = 2240.59 g/mol (masa monoizotopowa 2239.1).

LRMS (ESI, MeOH): 2262.9 [M + Na⁺], 1142.4 [M + 2Na⁺]²⁺ - *główny sygnał*.

R_f = 0.37 (CHCl₃/MeOH 8:1).

6.5.1.2. Odbezpieczone dendrymery

Dendrymery 40 – 45 i 51 – 58 zawierają terminalne reszty lizyn, w których grupy aminowe α i ε są chronione ortogonalnymi grupami zabezpieczającymi, tj. Boc i Z (lub 2-Cl-Z). Dendrymery te poddano deprotekcji jednej z dwóch wymienionych osłon. W wyniku

usunięcia osłon Boc otrzymano dendrymery **46** – **50** i **59** – **61** traktowane jako związki finalne (Rozdział 6.5.1.2.1.). Deprotekcja osłon Z posłużyła w celu uzyskania substratów (dendrymerów pośrednich) **62** – **69** do przeprowadzenia dalszej funkcjonalizacji (Rozdział 6.5.1.2.2.).

6.5.1.2.1. Boc-odbezpieczone dendrymery (tetrachlorowodorki)

Deprotekcję grup Boc w dendrymerach **40** – **44**, **51**, **52** i **54** za pomocą nasyconego roztworu HCl w AcOEt przeprowadzono wg procedury ogólnej zamieszczonej w Rozdziale 6.2. (Procedura C - wariant B). Reakcji poddawano 100 - 320 mg (0.045 - 0.14 mmol) związku rozpuszczonego w 2 - 5 mL MeOH z 5 - 10 mL nas. HCl/AcOEt. Całkowite zdjęcie grup Boc zachodziło w ciągu godziny. Otrzymano produkty **46** – **50** i **59** – **61** w postaci tetrachlorowodorków.

a) Dendrymer **46** (otrzymany z dendrymeru **40**)

Związek w postaci jasnożółtego proszku otrzymano z wydajnością 94.6% (0.21 g) z 0.25 g (0.11 mmol) dendrymeru **40**.

$C_{92}H_{119}O_{19}N_{15}Cl_4 \cdot 4HCl$, $M = 2026.67$ g/mol (masa monoizotopowa nieprotonowanego dendrymeru - 1877.8), produkt (1.03 g, 95.4%) w formie białego proszku.

LRMS (ESI, MeOH): 1900.8 $[M + Na^+]$ - główny sygnał, 1878.8 $[M + H^+]$, 1710.8 $[M - (2-Cl-Z) + H^+]$, 961.9 $[M + 2Na^+]^{2+}$, 939.9 $[M + 2H^+]^{2+}$, 967.8 $[M + K^+ + NH_4^+]^{2+}$.

1H NMR (500 MHz, MeOD): $\delta = 1.40$ (m, 10H, $5 \times \gamma CH_2$ *L-Lys* i rdzenia), 1.50 (m, 8H, $4 \times \delta CH_2$ *L-Lys*), 1.62 (m, 2H, δCH_2 rdzenia), 1.84 (m, 10H, $5 \times \beta CH_2$ *L-Lys* i rdzenia), 2.77 (br t, 2H, CH_2 -Ar *PEA*), 3.05 (br t, 8H, $4 \times \epsilon CH_2$ *L-Lys*), 3.35 (m, 4H, ϵCH_2 rdzenia, CH_2 -NH *PEA*), 3.55, 3.70 (2m, 8H, $4 \times O-CH_2-CH_2-NH$), 3.89 (m, 4H, $4 \times \alpha CH$ *L-Lys*), 4.10 (m, 8H, $4 \times O-CH_2-CH_2-NH$), 4.47 (m, 1H, αCH rdzenia), 5.13 (2s, 8H, Ar- CH_2O), 6.69 (m, 2H, C^4 -H *Ph*), 7.00, 7.06 (2m, 4H, $C^{2,6}$ -H *Ph*), 7.12-7.23 (br m, 5H, $C^{2,3,4,5,6}$ -H *PEA*), 7.28 (m, 8H, ArH), 7.33-7.44 (br m, 8H, ArH).

^{13}C NMR (500 MHz, MeOD): $\delta = 23.0$ (γC), 30.1, 30.5 (δC), 32.3 (βC), 36.5 (CH_2 -Ar *PEA*), 40.2 ($4 \times O-CH_2-CH_2-NH$), 40.7 (ϵC rdzenia), 41.3 ($4 \times \epsilon C$ *L-Lys*), 42.0 (CH_2 -NH *PEA*), 54.2, 54.4, 54.7 ($4 \times \alpha C$ *L-Lys*), 55.6 (αC rdzenia), 64.6 (Ar- CH_2O), 67.6 ($4 \times O-CH_2-CH_2-NH$), 105.9, 106.0 (C^4 *Ph*), 107.3, 107.6 ($C^{2,6}$ *Ph*), 127.3 (C^4 *PEA*), 128.2 (CH_{Ar}), 129.5, 129.8 ($C^{2,3,5,6}$ *PEA*), 130.4, 130.5 (CH_{Ar}), 134.1 (C_{Ar-Cl}), 135.8 (C_{Ar-CH_2O}), 137.3, 137.9 (C^1 *Ph*), 140.3 (C^1 *PEA*), 158.5 [$C=O$ (2-Cl-Z)], 161.2 ($C^{3,5}$ *Ph*), 169.4, 169.5 (CONH *Ph*), 170.6, 174.3 (CONH).

$[\alpha]_D^{25} = -7.8$ (c 1, MeOH).

T. top.: 144-148°C.

b) Dendrymer 47 (otrzymany z dendrymeru 41)

Związek w postaci jasnożółtego proszku otrzymano z wydajnością 96% (0.24 g) z 0.28 g (0.12 mmol) dendrymeru 41.

$C_{98}H_{131}O_{19}N_{15}Cl_4 \times 4HCl$, $M = 2110.83$ g/mol (masa monoizotopowa nieprotonowanego dendrymeru - 1961.9).

LRMS (ESI, MeOH): 1004.1 $[M + 2Na^+]^{2+}$, 993.0 $[M + H^+ + Na^+]^{2+}$, 982.1 $[M + 2H^+]^{2+}$, 656.2 $[M + 3H^+]^{3+}$ - *główny sygnał*.

1H NMR (500 MHz, MeOD): $\delta = 1.41$ (m, 10H, $5 \times \gamma CH_2$ *L-Lys i rdzenia*), 1.46-1.66 [br m, 18H, $5 \times \delta CH_2$ *L-Lys i rdzenia*, $2 \times O-(CH_2)_2-CH_2-CH_2-CH_2-NH$], 1.73-1.91 [br m, 14H, $5 \times \beta CH_2$ *L-Lys i rdzenia*, $2 \times O-CH_2-CH_2-(CH_2)_3-NH$], 2.77 (t, $J = 7.2$ Hz, 2H, CH_2-Ar *PEA*), 3.04, 3.13 (2 br t, 8H, $4 \times \epsilon CH_2$ *L-Lys*), 3.21, 3.28 [2m, 4H, $2 \times O-(CH_2)_4-CH_2-NH$], 3.34 (m, 3H, CH_2-NH *PEA*, ϵCH_2 *rdzenia*), 3.44-3.57 (br m, 3H, $O-CH_2-CH_2-NH$, CH_2-NH *PEA*), 3.71 (m, 2H, $O-CH_2-CH_2-NH$), 3.86 (2m, 4H, $4 \times \alpha CH$ *L-Lys*), 3.97 [m, 4H, $2 \times O-CH_2-(CH_2)_4-NH$], 4.10 (m, 4H, $2 \times O-CH_2-CH_2-NH$), 4.47 (m, 1H, αCH *rdzenia*), 5.14 (m, 8H, $Ar-CH_2O$), 6.63 (2m, 2H, C^4-H *Ph*), 6.96, 7.02 (2m, 4H, $C^{2,6}-H$ *Ph*), 7.12-7.24 (br m, 5H, $C^{2,3,4,5,6}-H$ *PEA*), 7.28 (m, 8H, ArH), 7.34-7.45 (2m, 8H, ArH).

^{13}C NMR (500 MHz, MeOD): $\delta = 22.9, 23.0, 23.1$ (γC), 24.5, 24.6 [$2 \times O-(CH_2)_2-CH_2-(CH_2)_2-NH$], 29.9 [$2 \times O-CH_2-CH_2-(CH_2)_3-NH$], 30.0, 30.1 (δC), 30.4 [$2 \times O-(CH_2)_3-CH_2-CH_2-NH$], 32.3, 32.9 (βC), 36.5 (CH_2-Ar *PEA*), 40.2 ($2 \times O-CH_2-CH_2-NH$), 40.5 [$2 \times O-(CH_2)_4-CH_2-NH$], 40.7 (ϵC *rdzenia*), 41.3, 41.4 ($4 \times \epsilon C$ *L-Lys*), 42.0 (CH_2-NH *PEA*), 54.4, 54.5 ($4 \times \alpha C$ *L-Lys*), 55.6 (αC *rdzenia*), 64.6 ($Ar-CH_2O$), 67.5, 67.6 ($2 \times O-CH_2-CH_2-NH$), 69.2, 69.3 [$2 \times O-CH_2-(CH_2)_4-NH$], 105.8, 106.1 (C^4 *Ph*), 106.8, 107.0, 107.2, 107.6 ($C^{2,6}$ *Ph*), 127.4 (C^4 *PEA*), 128.2 (CH_{Ar}), 129.5, 129.9 ($C^{2,3,5,6}$ *PEA*), 130.4, 130.5 (CH_{Ar}), 134.1 ($C_{Ar}-Cl$), 135.8 ($C_{Ar}-CH_2O$), 137.2, 137.8 (C^1 *Ph*), 140.4 (C^1 *PEA*), 158.6 [$C=O$ ($2-Cl-Z$)], 161.2, 161.7 ($C^{3,5}$ *Ph*), 169.6, 169.7, 169.9 ($CONH$ *Ph*), 170.4, 174.3 ($CONH$).

$[\alpha]_D^{25} = -1.8$ (c 1, MeOH).

T. top.: 138-141°C.

c) Dendrymer 48 (otrzymany z dendrymeru 42)

Związek w postaci jasnobrunatnego proszku otrzymano z wydajnością 92.8% (0.26 g) z 0.32 g (0.14 mmol) dendrymeru 42.

$C_{94}H_{120}O_{19}N_{16}Cl_4 \times 4HCl$, $M = 2065.71$ g/mol (masa monoizotopowa nieprotonowanego dendrymeru - 1916.8).

LRMS (ESI, MeOH): 1940.0 $[M + Na^+]$, 1918.0 $[M + H^+]$, 970.7 $[M + H^+ + Na^+]^{2+}$, 959.7 $[M + 2H^+]^{2+}$ - *główny sygnał*.

1H NMR (500 MHz, MeOD): $\delta = 1.33-1.53$ (br m, 18H, $5 \times \gamma CH_2$ *L-Lys* i rdzenia, $4 \times \delta CH_2$ *L-Lys*), 1.61 (m, 2H, δCH_2 rdzenia), 1.83 (m, 10H, $5 \times \beta CH_2$ *L-Lys* i rdzenia), 2.92 (t, $J = 7.0$ Hz, 2H, CH_2 -Ar TA), 3.04 (m, 8H, $4 \times \epsilon CH_2$ *L-Lys*), 3.34 (m, 2H, ϵCH_2 rdzenia), 3.44 (m, 2H, CH_2 -NH TA), 3.53, 3.67 (2m, 8H, $4 \times O-CH_2-CH_2-NH$), 3.86 (m, 4H, $4 \times \alpha CH$ *L-Lys*), 4.08 (br m, 8H, $4 \times O-CH_2-CH_2-NH$), 4.48 (m, 1H, αCH rdzenia), 5.12 (2s, 8H, Ar- CH_2O), 6.60-6.71 (m, 2H, C^4 -H *Ph*), 6.94-7.06 (br m, 7H, $C^{2,6}$ -H *Ph*, $C^{2,5,6}$ -H TA), 7.26 (m, 8H, ArH), 7.30-7.43 (br m, 9H, ArH, C^7 -H TA), 7.52 (d, $J = 7.8$ Hz, 1H, C^4 -H TA).

^{13}C NMR (500 MHz, MeOD): $\delta = 22.8, 23.0, 24.5$ (γC), 26.2 (CH_2 -Ar TA), 30.1, 30.4, 30.6 (δC), 32.4, 33.0 (βC), 40.2 ($4 \times O-CH_2-CH_2-NH$), 40.7 (ϵC rdzenia), 41.3 ($4 \times \epsilon C$ *L-Lys*), 41.4 (CH_2 -NH TA), 54.5 ($4 \times \alpha C$ *L-Lys*), 55.6 (αC rdzenia), 64.6 (Ar- CH_2O), 67.6 ($4 \times O-CH_2-CH_2-NH$), 105.9, 106.3 (C^4 *Ph*), 107.3, 107.5 ($C^{2,6}$ *Ph*), 112.3 (C^7 TA), 113.1 (C^3 TA), 119.3 (C^4 TA), 119.6 (C^5 TA), 122.3 (C^6 TA), 123.6 (C^2 TA), 128.1 (CH_{Ar}), 128.7 (C^{3a} TA), 130.4, 130.5 (CH_{Ar}), 134.1 (C_{Ar-Cl}), 135.8 (C_{Ar-CH_2O}), 137.4, 137.9 (C^1 *Ph*), 138.1 (C^{7a} TA), 158.6 [$C=O$ (2-Cl-Z)], 161.2 ($C^{3,5}$ *Ph*), 169.4, 169.5 (CONH *Ph*), 170.8, 174.2 (CONH).

$[\alpha]_D^{25} = -5.7$ (c 1, MeOH).

T. top.: 149-154°C.

d) Dendrymer 49 (otrzymany z dendrymeru 43)

Związek w postaci jasnobrunatnego proszku otrzymano z wydajnością 96% (0.24 g) z 0.28 g (0.116 mmol) dendrymeru 43.

$C_{100}H_{132}O_{19}N_{16}Cl_4 \times 4HCl$, $M = 2149.87$ g/mol (masa monoizotopowa nieprotonowanego dendrymeru - 2000.9).

LRMS (ESI, MeOH): 2002.1 $[M + H^+]$ - *główny sygnał*, 1834.1 $[M - (2-Cl-Z) + H^+]$, 1666.1 $[M - 2(2-Cl-Z) + H^+]$, 1498.0 $[M - 3(2-Cl-Z) + H^+]$.

1H NMR (500 MHz, MeOD): $\delta = 1.33-1.66$ [br m, 28H, $5 \times \gamma$, δCH_2 *L-Lys* i rdzenia, $2 \times O-(CH_2)_2-CH_2-CH_2-CH_2-NH$], 1.70-1.92 [br m, 14H, $5 \times \beta CH_2$ *L-Lys* i rdzenia, $2 \times O-CH_2-CH_2-(CH_2)_3-NH$], 2.93 (t, $J = 7.15$ Hz, 2H, CH_2 -Ar TA), 3.03, 3.13 (2 br t, 8H, $4 \times \epsilon CH_2$ *L-Lys*), 3.21, 3.28 [2m, 4H, $2 \times O-(CH_2)_4-CH_2-NH$], 3.33 (m, 2H, ϵCH_2 rdzenia), 3.40-3.61 (br m, 4H, $O-CH_2-CH_2-NH$, CH_2-NH TA), 3.71 (m, 2H, $O-CH_2-CH_2-NH$), 3.80-4.00 [2m, 8H, $2 \times O-CH_2-(CH_2)_4-NH$, $4 \times \alpha CH$ *L-Lys*], 4.08 (m, 4H, $2 \times O-CH_2-CH_2-NH$), 4.48 (m, 1H, αCH

rdzenia), 5.14 (m, 8H, Ar-CH₂O), 6.62 (m, 2H, C⁴-H *Ph*), 6.96 (m, 3H, C^{2,6}-H *Ph*, C⁵-H *TA*), 7.02 (m, 4H, C^{2,6}-H *Ph*, C^{2,6}-H *TA*), 7.27 (m, 9H, ArH, C⁷-H *TA*), 7.39 (m, 8H, ArH), 7.54 (d, *J* = 7.85 Hz, 1H, C⁴-H *TA*).

¹³C NMR (500 MHz, MeOD): δ = 23.0, 23.1, 24.6 [γC, 2×O-(CH₂)₂-CH₂-(CH₂)₂-NH], 26.2 (CH₂-Ar *TA*), 29.9 [2×O-CH₂-CH₂-(CH₂)₃-NH], 30.0, 30.1, 30.4 [δC, 2×O-(CH₂)₃-CH₂-CH₂-NH], 32.2, 32.3, 32.4 (βC), 40.2 (2×O-CH₂-CH₂-NH), 40.5 [2×O-(CH₂)₄-CH₂-NH], 40.7 (εC *rdzenia*), 41.3 (4×εC *L-Lys*), 41.4 (CH₂-NH *TA*), 54.4, 54.5 (4×αC *L-Lys*), 55.6 (αC *rdzenia*), 64.6 (Ar-CH₂O), 67.5, 67.6 (2×O-CH₂-CH₂-NH), 69.2 [2×O-CH₂-(CH₂)₄-NH], 105.7, 106.1 (C⁴ *Ph*), 106.7, 106.9, 107.2, 107.5 (C^{2,6} *Ph*), 112.3 (C⁷ *TA*), 113.0 (C³ *TA*), 119.3 (C⁴ *TA*), 119.6 (C⁵ *TA*), 122.3 (C⁶ *TA*), 123.6 (C² *TA*), 128.2 (CH_{Ar}), 128.7 (C^{3a} *TA*), 130.4, 130.5 (CH_{Ar}), 134.1 (C_{Ar}-Cl), 135.8 (C_{Ar}-CH₂O), 157.5, 158.5, 158.6 [C=O (2-Cl-Z)], 161.2, 161.7 (C^{3,5} *Ph*), 169.9 (CONH *Ph*), 170.4 (CONH).

[α]_D²⁵ = -0.92 (c 1, MeOH).

T. top.: 139-141 °C.

e) Dendrymer 50 (otrzymany z dendrymeru 44)

Związek w postaci kremowego proszku otrzymano z wydajnością 95.5% (0.17 g) z 0.2 g (0.085 mmol) dendrymeru 44.

C₉₆H₁₃₅O₁₉N₁₅Cl₄×4HCl, M = 2090.84 g/mol (masa monoizotopowa nieprotonowanego dendrymeru - 1941.9).

LRMS (ESI, MeOH): 1945.2 [M + H⁺], 973.2 [M + 2H⁺]²⁺ - *główny sygnał*, 888.8 [M - (2-Cl-Z) + 2H⁺]²⁺, 649.4 [M - 4(2-Cl-Z) + H⁺ + Na⁺]²⁺.

¹H NMR (500 MHz, MeOD): δ = 0.84 (br t, 3H, CH₃ *DDA*), 1.22 (br m, 18H, CH₂-3-11 *DDA*), 1.30-1.51 (br m, 20H, 5×γCH₂ *L-Lys* i *rdzenia*, 4×δCH₂ *L-Lys*, CH₂-2 *DDA*), 1.62 (m, 2H, δCH₂ *rdzenia*), 1.80 (m, 10H, 5×βCH₂ *L-Lys* i *rdzenia*), 3.00 (m, 8H, 4×εCH₂ *L-Lys*), 3.13 (m, 2H, CH₂-1 *DDA*), 3.31 (m, 2H, εCH₂ *rdzenia*), 3.50, 3.67 (2m, 8H, 4×O-CH₂-CH₂-NH), 3.85 (m, 4H, 4×αCH *L-Lys*), 4.07 (m, 8H, 4×O-CH₂-CH₂-NH), 4.42 (m, 1H, αCH *rdzenia*), 5.09 (s, 8H, Ar-CH₂O), 6.65 (m, 2H, C⁴-H *Ph*), 6.96, 7.03 (2m, 4H, C^{2,6}-H *Ph*), 7.24 (m, 8H, ArH), 7.30-7.40 (br m, 8H, ArH).

¹³C NMR (500 MHz, MeOD): δ = 14.4 (C¹² *DDA*), 23.0 (γC), 23.7 (C¹¹ *DDA*), 24.6 (γC), 28.0 (C³ *DDA*), 30.1, 30.3, 30.4, 30.7, 30.5 (δC, C², C⁴-C¹⁰ *DDA*), 32.3, 33.0 (βC), 40.2 (4×O-CH₂-CH₂-NH), 40.5 (C¹ *DDA*), 40.8 (εC *rdzenia*), 41.3 (4×εC *L-Lys*), 54.2, 54.4 (4×αC *L-Lys*), 55.6 (αC *rdzenia*), 64.6 (Ar-CH₂O), 67.6 (4×O-CH₂-CH₂-NH), 105.9, 106.3 (C⁴ *Ph*), 107.3, 107.5 (C^{2,6} *Ph*), 128.2, 130.4, 130.5 (CH_{Ar}), 134.1 (C_{Ar}-Cl), 135.8 (C_{Ar}-CH₂O), 137.4,

137.9 ($C^1 Ph$), 158.6 [$C=O$ (2-Cl-Z)], 161.3 ($C^{3,5} Ph$), 169.4 (CONH Ph), 170.4, 174.3 (CONH).

$[\alpha]_D^{25} = -5.3$ (c 1, MeOH).

T. top.: 139-144°C.

f) Dendrymer 59 (otrzymany z dendrymeru 51)

Związek w postaci kremowego proszku otrzymano z wydajnością 98.5% (0.13 g) z 0.15 g (0.07 mmol) dendrymeru 51.

$C_{92}H_{123}O_{19}N_{15} \times 4HCl$, $M = 1888.89$ g/mol (masa monoizotopowa nieprotonowanego dendrymeru - 1741.9).

LRMS (ESI, MeOH): 1765.1 [$M + Na^+$], 1743.2 [$M + H^+$], 894.6 [$M + 2Na^+$] $^{2+}$, 883.2 [$M + H^+ + Na^+$] $^{2+}$, 872.7 [$M + 2H^+$] $^{2+}$ - *główny sygnał*, 805.7 [$M - Z + 2H^+$] $^{2+}$.

1H NMR (500 MHz, MeOD): $\delta = 1.28-1.46$ (2m, 18H, $5 \times \gamma CH_2$ $L-Lys$ i rdzenia, $4 \times \delta CH_2$ $L-Lys$), 1.51-1.66 (br m, 2H, δCH_2 rdzenia), 1.77 (br m, 10H, $5 \times \beta CH_2$ $L-Lys$ i rdzenia), 2.71 (br t, 2H, CH_2-Ar PEA), 2.97 (m, 8H, $4 \times \epsilon CH_2$ $L-Lys$), 3.27 (m, 2H, ϵCH_2 rdzenia), 3.47 (m, 6H, CH_2-NH PEA, $2 \times O-CH_2-CH_2-NH$), 3.63 (m, 4H, $2 \times O-CH_2-CH_2-NH$), 3.81 (m, 4H, $4 \times \alpha CH$ $L-Lys$), 4.03 (m, 8H, $4 \times O-CH_2-CH_2-NH$), 4.40 (m, 1H, αCH rdzenia), 4.96 (s, 8H, $Ar-CH_2O$), 6.63 (m, 2H, C^4-H Ph), 6.94, 7.01 (2m, 4H, $C^{2,6}-H$ Ph), 7.06-7.17 (br m, 5H, $C^{2,3,4,5,6}-H$ PEA), 7.24 (m, 20H, ArH).

^{13}C NMR (500 MHz, MeOD): $\delta = 23.0, 24.5$ (γC), 30.1, 30.5 (δC), 32.1, 32.3 (βC), 36.5 (CH_2-Ar PEA), 40.2 ($4 \times O-CH_2-CH_2-NH$), 40.7 (ϵC rdzenia), 41.3 ($4 \times \epsilon C$ $L-Lys$), 42.0 (CH_2-NH PEA), 54.2, 54.4 ($4 \times \alpha C$ $L-Lys$), 55.7 (αC rdzenia), 67.4 ($Ar-CH_2O$), 67.6, 67.7 ($4 \times O-CH_2-CH_2-NH$), 105.9, 106.3 (C^4 Ph), 107.3, 107.6, 107.9 ($C^{2,6}$ Ph), 127.4 (C^4 PEA), 128.7, 129.0, 129.3 (CH_{Ar}), 129.5 ($C^{2,3,5,6}$ PEA), 129.7 (CH_{Ar}), 129.9 ($C^{2,3,5,6}$ PEA), 137.4, 138.0 (C^1 Ph), 138.3 ($C_{Ar}-CH_2O$), 140.4 (C^1 PEA), 158.9 [$C=O$ (Z)], 161.3 ($C^{3,5}$ Ph), 169.4, 169.5 (CONH Ph), 170.4, 174.3 (CONH).

$[\alpha]_D^{25} = -20.3$ (c 1, MeOH).

T. top.: 142-150°C.

g) Dendrymer 60 (otrzymany z dendrymeru 52)

Związek w postaci białego proszku otrzymano z wydajnością 95.5% (0.085 g) z 0.1 g (0.045 mmol) dendrymeru 52.

$C_{98}H_{135}O_{19}N_{15} \times 4HCl$, $M = 1973.05$ g/mol (masa monoizotopowa nieprotonowanego dendrymeru - 1826.0).

LRMS (ESI, MeOH): 1827.2 [M + H⁺], 1693.3 [M - Z + H⁺], 1559.3 [M - 2Z + H⁺], 1425.1 [M - 3Z + H⁺], 914.3 [M + 2H⁺]²⁺ - *główny sygnał*, 847.2 [M - Z + 2H⁺]²⁺, 780.7 [M - 2Z + 2H⁺]²⁺.

¹H NMR (500 MHz, MeOD): δ = 1.33-1.55 [br m, 22H, 5 \times γ CH₂ *L-Lys i rdzenia*, 2 \times δ CH₂ *L-Lys*, 2 \times O-(CH₂)₂-CH₂-CH₂-NH], 1.61 (m, 6H, 3 \times δ CH₂ *L-Lys i rdzenia*), 1.71-1.92 [br m, 14H, 5 \times β CH₂ *L-Lys i rdzenia*, 2 \times O-CH₂-CH₂-(CH₂)₃-NH], 2.72 (t, J = 7.2 Hz, 2H, CH₂-Ar *PEA*), 3.03, 3.12 (2t, J = 6.8 Hz, 8H, 4 \times ϵ CH₂ *L-Lys*), 3.21, 3.28 [2m, 4H, 2 \times O-(CH₂)₄-CH₂-NH], 3.31 (m, 3H, CH₂-NH *PEA*, ϵ CH₂ *rdzenia*), 3.51 (m, 3H, O-CH₂-CH₂-NH, CH₂-NH *PEA*), 3.70 (m, 2H, O-CH₂-CH₂-NH), 3.84 (2m, 4H, 4 \times α CH *L-Lys*), 3.97 [m, 4H, 2 \times O-CH₂-(CH₂)₄-NH], 4.09 (m, 4H, 2 \times O-CH₂-CH₂-NH), 4.42 (m, 1H, α CH *rdzenia*), 5.04 (m, 8H, Ar-CH₂O), 6.64 (m, 2H, C⁴-H *Ph*), 6.97, 7.03 (2m, 4H, C^{2,6}-H *Ph*), 7.12-7.23 (br m, 5H, C^{2,3,4,5,6}-H *PEA*), 7.25-7.34 (m, 20H, ArH).

¹³C NMR (500 MHz, MeOD): δ = 23.0, 23.1 (γ C), 24.6 [2 \times O-(CH₂)₂-CH₂-(CH₂)₂-NH], 29.9 [2 \times O-CH₂-CH₂-(CH₂)₃-NH], 30.0, 30.1 (δ C), 30.4 [2 \times O-(CH₂)₃-CH₂-CH₂-NH], 32.3, 32.9 (β C), 36.5 (CH₂-Ar *PEA*), 40.2 (2 \times O-CH₂-CH₂-NH), 40.5 [2 \times O-(CH₂)₄-CH₂-NH], 40.7 (ϵ C *rdzenia*), 41.2 (4 \times ϵ C *L-Lys*), 42.0 (CH₂-NH *PEA*), 54.4, 54.5 (4 \times α C *L-Lys*), 55.6 (α C *rdzenia*), 67.4 (Ar-CH₂O), 67.6 (2 \times O-CH₂-CH₂-NH), 69.2, 69.3 [2 \times O-CH₂-(CH₂)₄-NH], 105.8, 106.1 (C⁴ *Ph*), 106.8, 107.0, 107.2, 107.6 (C^{2,6} *Ph*), 127.4 (C⁴ *PEA*), 128.7, 129.0 (CH_{Ar}), 129.5, 129.9 (C^{2,3,5,6} *PEA*), 137.3, 137.9 (C¹ *Ph*), 138.4 (C_{Ar}-CH₂O), 140.4 (C¹ *PEA*), 158.9, 159.0 [C=O (Z)], 161.2, 161.7 (C^{3,5} *Ph*), 169.6, 169.7 (CONH *Ph*), 170.0, 170.4, 174.3 (CONH).

$[\alpha]_D^{25}$ = -0.86 (c 1, MeOH).

T. top.: 128-132°C.

h) Dendrymer 61 (otrzymany z dendrymeru 54)

Związek w postaci szarego proszku otrzymano z wydajnością 91.2% (0.089 g) z 0.11 g (0.048 mmol) dendrymeru **54**.

C₁₀₀H₁₃₆O₁₉N₁₆ \times 4HCl, M = 2012.09 g/mol (masa monoizotopowa nieprotonowanego dendrymeru - 1865.0).

LRMS (ESI, MeOH): 933.6 [M + 2H⁺]²⁺, 622.8 [M + 3H⁺]³⁺ - *główny sygnał*, 467.5 [M + 4H⁺]⁴⁺.

¹H NMR (500 MHz, MeOD): δ = 1.33-1.66 [br m, 28H, 5 \times γ , δ CH₂ *L-Lys i rdzenia*, 2 \times O-(CH₂)₂-CH₂-CH₂-NH], 1.70-1.91 [br m, 14H, 5 \times β CH₂ *L-Lys i rdzenia*, 2 \times O-CH₂-CH₂-(CH₂)₃-NH], 2.93 (t, J = 7.1 Hz, 2H, CH₂-Ar *TA*), 3.07, 3.11 (2 br t, 8H, 4 \times ϵ CH₂ *L-Lys*), 3.20,

3.28 [2m, 4H, 2×O-(CH₂)₄-CH₂-NH], 3.39 (m, 2H, εCH₂ rdzenia), 3.40-3.61 (br m, 4H, O-CH₂-CH₂-NH, CH₂-NH TA), 3.70 (m, 2H, O-CH₂-CH₂-NH), 3.83 (2m, 4H, 4×αCH L-Lys), 3.95 [2m, 4H, 2×O-CH₂-(CH₂)₄-NH], 4.08 (2m, 4H, 2×O-CH₂-CH₂-NH), 4.43 (m, 1H, αCH rdzenia), 5.03 (m, 8H, Ar-CH₂O), 6.63 (m, 2H, C⁴-H Ph), 6.93-7.08 (br m, 7H, C^{2,6}-H Ph, C^{2,5,6}-H TA), 7.30 (m, 21H, ArH, C⁷-H TA), 7.53 (d, *J* = 7.9 Hz, 1H, C⁴-H TA).

¹³C NMR (500 MHz, MeOD): δ = 23.0, 23.1 (γC), 24.6 [2×O-(CH₂)₂-CH₂-(CH₂)₂-NH], 26.3 (CH₂-Ar TA), 29.9 [2×O-CH₂-CH₂-(CH₂)₃-NH], 30.0, 30.5 [δC, 2×O-(CH₂)₃-CH₂-CH₂-NH], 32.3 (βC), 40.2 (2×O-CH₂-CH₂-NH), 40.5 [2×O-(CH₂)₄-CH₂-NH], 40.7 (εC rdzenia), 41.2 (4×εC L-Lys), 41.4 (CH₂-NH TA), 54.5 (4×αC L-Lys), 55.6 (αC rdzenia), 67.4 (Ar-CH₂O), 67.6 (2×O-CH₂-CH₂-NH), 69.2 [2×O-CH₂-(CH₂)₄-NH], 105.8, 106.1 (C⁴ Ph), 106.8, 107.0, 107.2, 107.5 (C^{2,6} Ph), 112.3 (C⁷ TA), 113.1 (C³ TA), 119.3 (C⁴ TA), 119.6 (C⁵ TA), 122.3 (C⁶ TA), 123.6 (C² TA), 128.7, 129.0 (CH_{Ar}), 129.3 (C^{3a} TA), 129.5, 129.7 (CH_{Ar}), 137.3, 137.8 (C¹ Ph), 138.1 (C^{7a} TA), 138.3 (C_{Ar}-CH₂O), 159.0 [C=O (Z)], 161.2, 161.8 (C^{3,5} Ph), 169.7, 170.0 (CONH Ph), 170.4, 174.3 (CONH).

6.5.1.2.2. Z-odbezpieczone dendrymery – dendrymery pośrednie

Deprotekcję grup Z w dendrymerach **51** - **58** za pomocą wodorowania katalitycznego (10% Pd/C) przeprowadzono wg procedury ogólnej zamieszczonej w Rozdziale 6.2. (Procedura D). Całkowite zdjęcie grup Z zachodziło w ciągu 3 – 10 godzin. Otrzymano produkty **62** – **69** posiadające wolne grupy aminowe w pozycji ε reszt lizynowych.

a) Dendrymer pośredni **62** (otrzymany z dendrymeru **51**)

Związek w postaci białego proszku otrzymano z wydajnością 90.9% (1 g) w wyniku 4-godzinnego wodorowania 1.47 g (0.69 mmol) dendrymeru **51** rozpuszczonego w 25 mL MeOH.

C₈₀H₁₃₁O₁₉N₁₅, M = 1606.99 g/mol (masa monoizotopowa 1606.0).

LRMS (ESI, MeOH): 1607.3 [M + H⁺], 804.8 [M + 2H⁺]²⁺, 604.1 [M - 4Boc + 2H⁺]²⁺, 403.2 [M + 4H⁺]⁴⁺ - główny sygnał.

¹H NMR (500 MHz, MeOD): δ = 1.25-1.50 (br m, 16H, 5×γCH₂ L-Lys i rdzenia, 3×δCH₂ L-Lys) nakładający się na 1.41 [s, 36H, 4×C(CH₃)₃], 1.55-1.75 (br m, 12H, 2×δ-CH₂ L-Lys i rdzenia, 4×βCH₂ L-Lys), 1.83 (br m, 2H, βCH₂ rdzenia), 2.58 (t, *J* = 7.0 Hz, 8H, 4×εCH₂ L-Lys), 2.78 (t, *J* = 7.16 Hz, 2H, CH₂-Ar PEA), 3.36 (m, 2H, εCH₂ rdzenia), 3.51 (m, 6H, CH₂-NH PEA, 2×O-CH₂-CH₂-NH), 3.61 (m, 4H, 2×O-CH₂-CH₂-NH), 4.03 (m, 12H, 4×O-CH₂-

CH₂-NH, 4×αCH *L*-Lys), 4.47 (m, 1H, αCH *rdzenia*), 6.65 (m, 2H, C⁴-H *Ph*), 6.95, 7.02 (2m, 4H, C^{2,6}-H *Ph*), 7.13-7.25 (m, 5H, C^{2,3,4,5,6}-H *PEA*).

¹³C NMR (500 MHz, MeOD): δ = 24.2, 24.5 (γC), 28.7, 28.8 [C(CH₃)₃], 30.1 (δC), 32.8 (βC), 33.0 (δC), 33.3, 33.4 (βC), 36.5 (CH₂-Ar *PEA*), 39.9, 40.0 (4×O-CH₂-CH₂-NH), 40.6 (εC *rdzenia*), 42.0 (CH₂-NH *PEA*), 42.1 (4×εC *L*-Lys), 55.5 (αC *rdzenia*), 56.1 (4×αC *L*-Lys), 67.7, 67.8 (4×O-CH₂-CH₂-NH), 80.6 [C(CH₃)₃], 105.8, 106.1 (C⁴ *Ph*), 107.2, 107.5 (C^{2,6} *Ph*), 127.4 (C⁴ *PEA*), 129.5, 129.9 (C^{2,3,5,6} *PEA*), 137.3, 138.0 (C¹ *Ph*), 140.4 (C¹ *PEA*), 157.8 [C=O (Boc)], 161.3 (C^{3,5} *Ph*), 169.4 (CONH *Ph*), 174.3, 175.5 (CONH).

[α]_D²⁵ = -22.0 (c 1, MeOH).

T. top.: 109-115°C.

b) Dendrymer pośredni 63 (otrzymany z dendrymeru 52)

Związek w postaci kremowego proszku otrzymano z wydajnością 93.8% (0.45 g) w wyniku 3-godzinnego wodorowania 0.63 g (0.28 mmol) dendrymeru **52** rozpuszczonego w 10 mL MeOH.

C₈₆H₁₄₃O₁₉N₁₅, M = 1691.15 g/mol (masa monoizotopowa 1690.1).

LRMS (ESI, MeOH): 1691.2 [M + H⁺], 846.1 [M + 2H⁺]²⁺, 564.4 [M + 3H⁺]³⁺, 423.6 [M + 4H⁺]⁴⁺ - główny sygnał.

¹H NMR (500 MHz, MeOD): δ = 1.30-1.52 [br m, 20H, 5×γCH₂ *L*-Lys i *rdzenia*, 3×δCH₂ *L*-Lys, 2×O-(CH₂)₂-CH₂-(CH₂)₂-NH] nakładający się na 1.40, 1.42 [2s, 36H, 4×C(CH₃)₃], 1.54-1.66 [br m, 12H, 2×δCH₂ *L*-Lys i *rdzenia*, 2×βCH₂ *L*-Lys, 2×O-(CH₂)₃-CH₂-CH₂-NH], 1.67-1.87 [br m, 10H, 3×βCH₂ *L*-Lys i *rdzenia*, 2×O-CH₂-CH₂-(CH₂)₃-NH], 2.58 (2t, *J* = 6.9 Hz, 6H, 3×εCH₂ *L*-Lys), 2.78 (t, *J* = 7.2 Hz, 2H, CH₂-Ar *PEA*), 3.22 [br m, 6H, εCH₂ *L*-Lys, 2×O-(CH₂)₄-CH₂-NH], 3.36 (m, 3H, CH₂-NH *PEA*, εCH₂ *rdzenia*), 3.51 (m, 3H, O-CH₂-CH₂-NH, CH₂-NH *PEA*), 3.62 (m, 2H, O-CH₂-CH₂-NH), 3.85-4.12 (br m, 12H, 4×O-CH₂, 4×αCH *L*-Lys), 4.47 (m, 1H, αCH *rdzenia*), 6.62 (m, 2H, C⁴-H *Ph*), 6.94, 7.01 (2m, 4H, C^{2,6}-H *Ph*), 7.12-7.25 (br m, 5H, C^{2,3,4,5,6}-H *PEA*).

¹³C NMR (500 MHz, MeOD): δ = 24.2, 24.3 (γC), 24.4 [2×O-(CH₂)₂-CH₂-(CH₂)₂-NH], 24.5 (γC), 28.8 [C(CH₃)₃], 29.9, 30.1 [δC, 2×O-CH₂-CH₂-CH₂-CH₂-NH], 32.8, 33.3, 33.4 (βC), 36.5 (CH₂-Ar *PEA*), 39.9 (2×O-CH₂-CH₂-NH), 40.2 [2×O-(CH₂)₄-CH₂-NH], 40.6 (εC *rdzenia*), 42.0 (CH₂-NH *PEA*), 42.2, 42.3 (4×εC *L*-Lys), 55.5 (αC *rdzenia*), 56.2 (4×αC *L*-Lys), 67.7 (2×O-CH₂-CH₂-NH), 69.1, 69.2 [2×O-CH₂-(CH₂)₄-NH], 80.5 [C(CH₃)₃], 105.7, 106.0 (C⁴ *Ph*), 106.6, 107.0, 107.1, 107.4 (C^{2,6} *Ph*), 127.4, 129.5, 129.9 (C^{2,3,4,5,6} *PEA*), 137.2,

137.8 ($C^1 Ph$), 140.4 ($C^1 PEA$), 157.8 [$C=O$ (Boc)], 161.2, 161.3, 161.4, 161.7 ($C^{3,5} Ph$), 169.6, 169.7 (CONH Ph), 174.4, 175.2, 175.5 (CONH).

$[\alpha]_D^{25} = -17.6$ (c 0.75, MeOH).

T. top.: 115-123°C.

c) Dendrymer pośredni 64 (otrzymany z dendrymeru 53)

Związek w postaci jasnożółtego proszku otrzymano z wydajnością 85.3% (0.725 g) w wyniku 10-godzinnego wodorowania 1.13 g (0.52 mmol) dendrymeru 53 rozpuszczonego w 20 mL MeOH.

$C_{82}H_{132}O_{19}N_{16}$, $M = 1646.02$ g/mol (masa monoizotopowa 1645.0).

LRMS (ESI, MeOH): 823.5 [$M + 2H^+$] $^{2+}$, 549.4 [$M + 3H^+$] $^{3+}$ - główny sygnał, 516.2 [$M - Boc + 3H^+$] $^{3+}$, 412.5 [$M + 4H^+$] $^{4+}$.

1H NMR (500 MHz, MeOD): $\delta = 1.30$ -1.47 (br m, 18H, $5 \times \gamma CH_2$ $L-Lys$ i rdzenia, $4 \times \delta CH_2$ $L-Lys$) nakładający się na 1.40 [s, 36H, $4 \times C(CH_3)_3$], 1.52-1.75 (br m, 10H, δCH_2 rdzenia, $4 \times \beta CH_2$ $L-Lys$), 1.77-1.90 (br m, 2H, βCH_2 rdzenia), 2.56 (m, 8H, $4 \times \epsilon CH_2$ $L-Lys$), 2.93 (t, $J = 7.2$ Hz, 2H, CH_2 -Ar TA), 3.3 (m, 2H, ϵCH_2 rdzenia), 3.40-3.65 (br m, 10H, $4 \times O-CH_2-CH_2-NH$, CH_2-NH TA), 4.02 (br m, 12H, $4 \times O-CH_2-CH_2-NH$, $4 \times \alpha CH$ $L-Lys$), 4.50 (m, 1H, αCH rdzenia), 6.64 (m, 2H, C^4-H Ph), 6.92-7.08 (br m, 7H, $C^{2,6}-H$ Ph , $C^{2,5,6}-H$ TA), 7.31 (m, 1H, C^7-H TA), 7.54 (d, $J = 7.9$ Hz, 1H, C^4-H TA).

^{13}C NMR (500 MHz, MeOD): $\delta = 24.2$, 24.4 (γC), 26.3 (CH_2 -Ar TA), 28.8, 29.0 [$C(CH_3)_3$], 30.1 (δC), 32.90 (βC), 33.3, 33.4 (β , δC), 39.9 ($4 \times O-CH_2-CH_2-NH$), 40.7 (ϵC rdzenia), 41.4 (CH_2-NH TA), 42.2 ($4 \times \epsilon C$ $L-Lys$), 55.5 (αC rdzenia), 56.1 ($4 \times \alpha C$ $L-Lys$), 67.8 ($4 \times O-CH_2-CH_2-NH$), 80.6 [$C(CH_3)_3$], 105.8, 106.0 (C^4 Ph), 107.2, 107.5, 107.6 ($C^{2,6}$ Ph), 112.3 (C^7 TA), 113.1 (C^3 TA), 119.3 (C^4 TA), 119.6 (C^5 TA), 122.3 (C^6 TA), 123.6 (C^2 TA), 128.7 (C^{3a} TA), 137.3, 137.9 (C^1 Ph), 138.1 (C^{7a} TA), 157.8 [$C=O$ (Boc)], 161.3 ($C^{3,5}$ Ph), 169.4, 169.6 (CONH Ph), 174.3, 175.5 (CONH).

$[\alpha]_D^{25} = -22.7$ (c 0.65, MeOH).

T. top.: 128-131°C.

d) Dendrymer pośredni 65 (otrzymany z dendrymeru 54)

Związek w postaci białego proszku otrzymano z wydajnością 97% (2.1 g) w wyniku 7-godzinnego wodorowania 2.83 g (1.25 mmol) dendrymeru 54 rozpuszczonego w 50 mL MeOH.

$C_{88}H_{144}O_{19}N_{16}$, $M = 1730.18$ g/mol (masa monoizotopowa 1729.1).

LRMS (ESI, MeOH): 1752.4 [M + Na⁺], 1730.4 [M + H⁺], 865.8 [M + 2H⁺]²⁺ - *główny sygnał*.

¹H NMR (500 MHz, MeOD): δ = 1.30-1.50 (br m, 12H, 5 \times γ , δ CH₂ *L-Lys* i rdzenia, δ CH₂ rdzenia) nakładający się na 1.40, 1.42 [2s, 36H, 4 \times C(CH₃)₃], 1.58 [br m, 20H, 4 \times δ CH₂ *L-Lys*, 2 \times β CH₂, 2 \times O-(CH₂)₂-CH₂-CH₂-NH], 1.75 [br m, 10H, 3 \times β CH₂, 2 \times O-CH₂-CH₂-(CH₂)₃-NH], 2.75 (2m, 8H, 4 \times ϵ CH₂ *L-Lys*), 2.94 (t, J = 7.2 Hz, 2H, CH₂-Ar *TA*), 3.21 [m, 4H, 2 \times O-(CH₂)₄-CH₂-NH], 3.3 (m, 2H, ϵ CH₂ rdzenia), 3.41-3.67 (br m, 6H, 2 \times O-CH₂-CH₂-NH, CH₂-NH *TA*), 3.89-4.09 (br m, 12H, 4 \times O-CH₂, 4 \times α CH *L-Lys*), 4.48 (m, 1H, α CH rdzenia), 6.61 (m, 2H, C⁴-H *Ph*), 6.92-7.08 (br m, 7H, C^{2,6}-H *Ph*, C^{2,5,6}-H *TA*), 7.31 (m, 1H, C⁷-H *TA*), 7.54 (d, J = 7.85 Hz, 1H, C⁴-H *TA*).

¹³C NMR (500 MHz, MeOD): δ = 24.1, 24.4 [γ C, 2 \times O-(CH₂)₂-CH₂-(CH₂)₂-NH], 26.3 (CH₂-Ar *TA*), 28.8 [C(CH₃)₃], 29.9 [2 \times O-CH₂-CH₂-(CH₂)₃-NH], 30.1, 30.4 [δ C, 2 \times O-(CH₂)₃-CH₂-CH₂-NH], 32.9, 33.1 (β C), 39.9 (2 \times O-CH₂-CH₂-NH), 40.2 [2 \times O-(CH₂)₄-CH₂-NH], 40.6 (ϵ C rdzenia), 41.3 (4 \times ϵ C *L-Lys*), 41.4 (CH₂-NH *TA*), 55.6 (α C rdzenia), 56.0, 56.1 (4 \times α C *L-Lys*), 67.8 (2 \times O-CH₂-CH₂-NH), 69.2 [2 \times O-CH₂-(CH₂)₄-NH], 80.7 [C(CH₃)₃], 105.7, 106.1 (C⁴ *Ph*), 106.8, 107.2, 107.4 (C^{2,6} *Ph*), 112.3 (C⁷ *TA*), 113.1 (C³ *TA*), 119.3 (C⁴ *TA*), 119.6 (C⁵ *TA*), 122.3 (C⁶ *TA*), 123.6 (C² *TA*), 128.7 (C^{3a} *TA*), 137.2, 137.8 (C¹ *Ph*), 138.1 (C^{7a} *TA*), 157.8 [C=O (Boc)], 161.3, 161.7 (C^{3,5} *Ph*), 169.7, 169.8 (CONH *Ph*), 170.4, 174.3, 175.0, 175.3 (CONH).

$[\alpha]_D^{25}$ = -17.4 (c 1, MeOH).

T. top.: 123-130°C.

e) Dendrymer pośredni 66 (otrzymany z dendrymeru 55)

Związek w postaci białego, szklistego ciała stałego otrzymano z wydajnością 96.1% (0.74 g) w wyniku 5-godzinnego wodorowania 1.02 g (0.46 mmol) dendrymeru 55 rozpuszczonego w 25 mL MeOH.

C₈₄H₁₄₇O₁₉N₁₅, M = 1671.16 g/mol (masa monoizotopowa 1670.1).

LRMS (ESI, MeOH): 1671.5 [M + H⁺], 836.0 [M + 2H⁺]²⁺ - *główny sygnał*.

f) Dendrymer pośredni 67 (otrzymany z dendrymeru 56)

Związek w postaci białego proszku otrzymano z wydajnością 86.4% (1.72 g) w wyniku 6-godzinnego wodorowania 2.6 g (1.13 mmol) dendrymeru 56 rozpuszczonego w 50 mL MeOH.

C₉₀H₁₅₉O₁₉N₁₅, M = 1755.32 g/mol (masa monoizotopowa 1754.2).

LRMS (ESI, MeOH): 1755.6 [M + H⁺], 878.5 [M + 2H⁺]²⁺ - *główny sygnał*.

¹H NMR (500 MHz, MeOD): δ = 0.88 (br t, 3H, CH₃ DDA), 1.23-1.95 [br m, 62H, 5 \times γ , δ , β CH₂ L-Lys i rdzenia, CH₂-2-11 DDA, 2 \times O-CH₂-(CH₂)₃-CH₂-NH] nakładający się na 1.40, 1.42 [2s, 36H, 4 \times C(CH₃)₃], 2.57, 2.62 (2 br t, 6H, 3 \times ϵ CH₂ L-Lys), 3.10-3.28 [br m, 8H, CH₂-1 DDA, ϵ CH₂ L-Lys, 2 \times O-(CH₂)₄-CH₂-NH], 3.36 (m, 2H, ϵ CH₂ rdzenia), 3.52, 3.62 (2m, 4H, 2 \times O-CH₂-CH₂-NH), 3.92-4.07 (2m, 12H, 4 \times O-CH₂, 4 \times α CH L-Lys), 4.50 (m, 1H, α CH rdzenia), 6.62 (m, 2H, C⁴-H Ph), 6.94, 7.01 (2m, 4H, C^{2,6}-H Ph).

¹³C NMR (500 MHz, MeOD): δ = 14.5 (C¹² DDA), 23.7 (C¹¹ DDA), 24.2, 24.3, 24.4, 24.6 [γ C, 2 \times O-(CH₂)₂-CH₂-(CH₂)₂-NH], 28.0 (C³ DDA), 28.8 [C(CH₃)₃], 29.9, 30.1, 30.3-30.4, 30.5, 30.7, 30.8 [δ C, C², C⁴-C¹⁰ DDA, 2 \times O-CH₂-CH₂-CH₂-CH₂-NH], 32.9, 33.0, 33.1, 33.3 (β C), 39.9 (2 \times O-CH₂-CH₂-NH), 40.2 [2 \times O-(CH₂)₄-CH₂-NH], 40.5 (C¹ DDA), 40.7 (ϵ C rdzenia), 42.1 (4 \times ϵ C L-Lys), 55.5 (α C rdzenia), 56.1, 56.2 (4 \times α C L-Lys), 67.7 (2 \times O-CH₂-CH₂-NH), 69.2 [2 \times O-CH₂-(CH₂)₄-NH], 80.5, 80.6 [C(CH₃)₃], 105.7, 106.0 (C⁴ Ph), 106.7, 107.0, 107.1, 107.3 (C^{2,6} Ph), 137.2, 137.8 (C¹ Ph), 157.8 [C=O (Boc)], 161.2, 161.3, 161.7 (C^{3,5} Ph), 169.6 (CONH Ph), 174.4, 175.2, 175.5 (CONH).

g) Dendrymer pośredni 68 (otrzymany z dendrymeru 57)

Związek w postaci białego proszku otrzymano z wydajnością 83.7% (1.08 g) w wyniku 6-godzinnej wodorowania 1.65 g (0.67 mmol) dendrymeru **57** rozpuszczonego w 25 mL MeOH.

C₁₀₂H₁₈₃O₁₉N₁₅, M = 1923.63 g/mol (masa monoizotopowa 1922.4).

LRMS (ESI, MeOH): 1923.4 [M + H⁺], 962.2 [M + 2H⁺]²⁺, 641.8 [M + 3H⁺]³⁺ - *główny sygnał*, 481.6 [M + 4H⁺]⁴⁺.

h) Dendrymer 69 (otrzymany z dendrymeru 58)

Związek w postaci jasnożółtego proszku otrzymano z wydajnością 85.6% (1.37 g) w wyniku 6-godzinnej wodorowania 2.1 g (0.94 mmol) dendrymeru **58** rozpuszczonego w 50 mL MeOH.

C₈₄H₁₃₄O₂₁N₁₆, M = 1704.06 g/mol (masa monoizotopowa 1703.0).

LRMS (ESI, MeOH): 1704.2 [M + H⁺], 853.1 [M + 2H⁺]²⁺ - *główny sygnał*, 569.1 [M + 3H⁺]³⁺.

T. top.: 124-127°C.

6.5.2. Synteza dendrymerów z terminalnymi resztami tryptofanowymi lub pochodnych tryptofanu

Dendrymery z terminalnymi resztami tryptofanowymi lub pochodnych tryptofanu zostały zsyntetyzowane w wyniku reakcji sprzęgania dendrymerów pośrednich **63** - **65** i **67** - **69** (Rozdział 6.5.1.2.2.) z Boc-Trp-OH lub z pochodnymi tryptofanu, tj. *N*-Boc-1-butylotryptofanem (**83**), *N*-Boc-1-[5-(Boc-amino)pentyl]tryptofanem (**96**) (Rozdział 6.3.4.).

6.5.2.1. Boc-zabezpieczone dendrymery

Wykorzystując procedurę ogólną sprzęgania metodą EDC/HOBt (Procedura B, Rozdział 6.2.) zsyntetyzowano 11 dendrymerów z terminalnymi resztami tryptofanowymi lub pochodnych tryptofanu. W celu osiągnięcia lepszych wydajności, niezbędne okazało się użycie dodatkowej ilości Et₃N (3.6 ekw.), oprócz tej potrzebnej do przeprowadzenia odczynnika sprzęgającego (EDC·HCl) do jego postaci wolnej (4.4 ekw.). Reakcje sprzęgania prowadzono od 48 do 96 godzin. Czyste dendrymery uzyskano w wyniku sączenia molekularnego z użyciem kolumny z wypełnieniem Sephadex LH-20 z MeOH jako eluentem, a następnie doczyszczania na kolumnie silikażelowej z użyciem fazy CHCl₃/MeOH (gradient: 50:1→15:1 dla dendrymerów **70** - **74**, 100:1→15:1 dla **75**, **89** - **91**, **99**, **100**). Produkty **70** - **75**, **89** - **91**, **99** i **100** otrzymano w postaci białych, kremowych lub jasnożółtych proszków.

a) Dendrymer **70** (otrzymany z dendrymeru pośredniego **63**)

Do reakcji użyto Boc-Trp-OH (0.46 g, 1.5 mmol), HOBt (0.23 g, 1.5 mmol), EDC·HCl (0.29 g, 1.5 mmol), dendrymeru pośredniego **63** (0.57 g, 0.34 mmol), Et₃N (0.4 mL, 2.72 mmol) i DMF (15 mL). Sprzęganie prowadzono przez 72 godziny. Otrzymano produkt w postaci kremowego proszku z wydajnością 78.1% (0.75 g).

C₁₅₀H₂₁₅O₃₁N₂₃, M = 2836.45 g/mol (masa monoizotopowa 2834.6).

LRMS (ESI, MeOH): 2857.1 [M + Na⁺], 1440.1 [M + 2Na⁺]²⁺ - *główny sygnał*, 1429.1 [M + H⁺ + Na⁺]²⁺.

¹H NMR (500 MHz, MeOD): δ = 1.05-1.86 [br m, 42H, 5×β, γ, δCH₂ *L*-Lys i rdzenia, 2×O-CH₂-(CH₂)₃-CH₂-NH] nakładający się na 1.35, 1.38, 1.40 [3s, 72H, 8×C(CH₃)₃], 2.74 (t, *J* = 7.2 Hz, 2H, CH₂-Ar *PEA*), 3.00-3.25 [br m, 20H, 4×εCH₂ *L*-Lys, βCH₂ *L*-Trp, 2×O-(CH₂)₄-CH₂-NH], 3.33 (m, 3H, εCH₂ rdzenia, CH₂-NH *PEA*), 3.47 (m, 3H, CH₂-NH *PEA*, O-CH₂-CH₂-NH), 3.59 (m, 2H, O-CH₂-CH₂-NH), 3.85-4.04 (br m, 12H, 4×O-CH₂, 4×αCH *L*-Lys), 4.29 (m, 4H, 4×αCH *L*-Trp), 4.47 (m, 1H, αCH rdzenia), 6.60 (m, 2H, C⁴-H *Ph*), 6.92-7.08

(br m, 16H, C^{2,6}-H *Ph*, C^{2,5,6}-H *L-Trp*), 7.10-7.22 (br m, 5H, C^{2,3,4,5,6}-H *PEA*), 7.31 (d, $J = 7.93$ Hz, 4H, C⁷-H *L-Trp*), 7.56 (m, 4H, C⁴-H *L-Trp*).

¹³C NMR (500 MHz, MeOD): $\delta = 24.2, 24.4, 24.5$ [γ C, 2×O-(CH₂)₂-CH₂-(CH₂)₂-NH], 28.7, 28.8 [C(CH₃)₃], 29.6 (β C *L-Trp*), 29.8, 29.9, 30.1 [δ C, 2×O-CH₂-CH₂-CH₂-CH₂-NH], 32.8, 33.1 (β C), 36.5 (CH₂-Ar *PEA*), 40.0 (2×O-CH₂-CH₂-NH), 40.1 (ϵ C *L-Lys*), 40.2 [2×O-(CH₂)₄-CH₂-NH], 40.7 (ϵ C *rdzenia*), 42.0 (CH₂-NH *PEA*), 55.6 (α C *rdzenia*), 56.2 (4× α C *L-Lys*), 57.1 (4× α C *L-Trp*), 67.8 (2×O-CH₂-CH₂-NH), 69.2 [2×O-CH₂-(CH₂)₄-NH], 80.6 [C(CH₃)₃], 105.8, 106.0 (C⁴ *Ph*), 106.7, 107.1, 107.3, 107.5 (C^{2,6} *Ph*), 111.1 (C³ *L-Trp*), 112.3 (C⁷ *L-Trp*), 119.5 (C⁴ *L-Trp*), 119.8 (C⁵ *L-Trp*), 122.4 (C⁶ *L-Trp*), 124.6 (C² *L-Trp*), 127.4 (C⁴ *PEA*), 128.9 (C^{3a} *L-Trp*), 129.5, 129.9 (C^{2,3,5,6} *PEA*), 137.2, 137.8 (C¹ *Ph*), 138.0 (C^{7a} *L-Trp*), 140.4 (C¹ *PEA*), 157.5, 157.7 [C=O (Boc)], 161.3, 161.7 (C^{3,5} *Ph*), 169.7, 169.8 (CONH *Ph*), 174.4, 174.6, 175.2, 175.5 (CONH).

$[\alpha]_D^{25} = -7.3$ (c 1, MeOH).

$R_f = 0.37$ (CHCl₃/MeOH 8:1).

T. top.: 126-131°C.

b) Dendrymer 71 (otrzymany z dendrymeru pośredniego 64)

Do reakcji użyto Boc-Trp-OH (0.268 g, 0.88 mmol), HOBt (0.79 g, 0.88 mmol), EDC·HCl (0.17 g, 0.88 mmol), dendrymeru pośredniego **64** (0.33 g, 0.2 mmol), Et₃N (0.2 mL, 1.6 mmol) i DMF (15 mL). Sprzęganie prowadzono przez 48 godzin. Otrzymano produkt w postaci jasnożółtego proszku z wydajnością 87.5% (0.49 g).

C₁₄₆H₂₀₄O₃₁N₂₄, M = 2791.33 g/mol (masa monoizotopowa 2789.5).

LRMS (ESI, MeOH): 2813.6 [M + Na⁺], 1418.0 [M + 2Na⁺]²⁺ - *główny sygnał*.

¹H NMR (500 MHz, MeOD): $\delta = 1.04-1.42$ (br m, 14H, 5× γ CH₂ *L-Lys* i *rdzenia*, 2× δ CH₂) nakładający się na 1.34, 1.38 [2s, 72H, 8×C(CH₃)₃], 1.48 (br m, 6H, δ CH₂, 2× β -CH₂ *L-Lys*), 1.60 (br m, 8H, 2× δ CH₂, 2× β CH₂ *L-Lys*), 1.80 (m, 2H, β CH₂ *rdzenia*), 2.91 (m, 6H, CH₂-Ar *TA*, 2× ϵ CH₂ *L-Lys*), 3.05 (m, 8H, 2× ϵ CH₂ *L-Lys*, 2× β CH₂ *L-Trp*), 3.15 (m, 4H, 2× β CH₂ *L-Trp*), 3.3 (m, 2H, ϵ CH₂ *rdzenia*), 3.39-3.63 (2m, 10H, 4×O-CH₂-CH₂-NH, CH₂-NH *TA*), 3.98 (m, 12H, 4×O-CH₂-CH₂-NH, 4× α CH *L-Lys*), 4.29 (m, 4H, 4× α CH *L-Trp*), 4.50 (m, 1H, α CH *rdzenia*), 6.60 (m, 2H, C⁴-H *Ph*), 6.92-7.08 (br m, 19H, C^{2,6}-H *Ph*, C^{2,5,6}-H *L-Trp*, C^{2,5,6}-H *TA*), 7.30 (m, 5H, C⁷-H *L-Trp*, C⁷-H *TA*), 7.51 (d, $J = 7.7$ Hz, 1H, C⁴-H *TA*), 7.56 (d, $J = 7.9$ Hz, 4H, C⁴-H *L-Trp*).

¹³C NMR (500 MHz, MeOD): $\delta = 24.1, 24.5$ (γ C), 26.3 (CH₂-Ar *TA*), 28.8 [C(CH₃)₃], 29.6 (β C *L-Trp*), 29.8, 30.1 (δ C), 32.9, 33.1, 33.2 (β C), 39.9 (4×O-CH₂-CH₂-NH), 40.1 (ϵ C *L-Lys*),

40.7 (ϵ C rdzenia), 41.4 ($\text{CH}_2\text{-NH TA}$), 55.5 (α C rdzenia), 56.1 ($4\times\alpha$ C *L*-Lys), 57.1 ($4\times\alpha$ C *L*-Trp), 67.7 ($4\times\text{O-CH}_2\text{-CH}_2\text{-NH}$), 80.6 [$\text{C}(\text{CH}_3)_3$], 105.8 (C^4 Ph), 107.2, 107.5 ($\text{C}^{2,6}$ Ph), 111.0 (C^3 *L*-Trp), 112.3 (C^7 *L*-Trp, C^7 TA), 113.1 (C^3 TA), 119.4 (C^4 TA), 119.5 (C^4 *L*-Trp), 119.7 (C^5 TA), 119.8 (C^5 *L*-Trp), 122.3 (C^6 TA), 122.4 (C^6 *L*-Trp), 123.6 (C^2 TA), 124.6 (C^2 *L*-Trp), 128.7 (C^{3a} TA), 128.8 (C^{3a} *L*-Trp), 137.3 (C^1 Ph), 138.0 (C^{7a} *L*-Trp), 138.1 (C^{7a} TA), 157.5, 157.7 [$\text{C}=\text{O}$ (Boc)], 161.2 ($\text{C}^{3,5}$ Ph), 169.5, 169.6 (CONH Ph), 174.3, 174.5, 175.5 (CONH). $[\alpha]_{\text{D}}^{25} = -7.0$ (c 1, MeOH).

$R_f = 0.32$ ($\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$ 8:1).

T. top.: 147-153°C.

c) Dendrymer 72 (otrzymany z dendrymeru pośredniego 65)

Do reakcji użyto Boc-Trp-OH (1.57 g, 5.15 mmol), HOBT (0.79 g, 5.15 mmol), EDC·HCl (0.99 g, 5.15 mmol), dendrymeru pośredniego 65 (2.03 g, 1.17 mmol), Et_3N (1.3 mL, 9.36 mmol) i DMF (20 mL). Sprzęganie prowadzono przez 48 godzin. Otrzymano produkt w postaci jasnożółtego proszku z wydajnością 66.8% (2.25 g).

$\text{C}_{152}\text{H}_{216}\text{O}_{31}\text{N}_{24}$, $M = 2875.49$ g/mol (masa monoizotopowa 2873.6).

LRMS (ESI, MeOH): 1460.6 [$\text{M} + 2\text{Na}^+$] $^{2+}$ - główny sygnał, 1449.6 [$\text{M} + \text{H} + \text{Na}^+$] $^{2+}$, 981.4 [$\text{M} + 3\text{Na}^+$] $^{3+}$, 974.0 [$\text{M} + \text{H} + 2\text{Na}^+$] $^{3+}$, 966.8 [$\text{M} + 2\text{H} + \text{Na}^+$] $^{3+}$.

^1H NMR (500 MHz, MeOD): $\delta = 1.04\text{-}1.47$ [br m, 16H, $5\times\gamma\text{CH}_2$ *L*-Lys i rdzenia, δCH_2 , $2\times\text{O-}(\text{CH}_2)_2\text{-CH}_2\text{-(CH}_2)_2\text{-NH}$] nakładający się na 1.35, 1.39, 1.41 [3s, 72H, $8\times\text{C}(\text{CH}_3)_3$], 1.48-1.65 [br m, 18H, $4\times\delta\text{CH}_2$, βCH_2 , $2\times\text{O-CH}_2\text{-CH}_2\text{-CH}_2\text{-CH}_2\text{-NH}$], 1.66-1.87 (br m, 8H, $4\times\beta\text{CH}_2$), 2.86-3.25 [br m, 22H, $\text{CH}_2\text{-Ar TA}$, $4\times\epsilon\text{CH}_2$ *L*-Lys, βCH_2 *L*-Trp, $2\times\text{O-}(\text{CH}_2)_4\text{-CH}_2\text{-NH}$], 3.35 (m, 2H, ϵCH_2 rdzenia), 3.39-3.64 (br m, 6H, $2\times\text{O-CH}_2\text{-CH}_2\text{-NH}$, $\text{CH}_2\text{-NH TA}$), 3.83-4.04 (br m, 12H, $4\times\text{O-CH}_2$, $4\times\alpha\text{CH}$ *L*-Lys), 4.29 (m, 4H, $4\times\alpha\text{CH}$ *L*-Trp), 4.50 (m, αCH rdzenia), 6.58 (m, 2H, $\text{C}^4\text{-H Ph}$), 6.91-7.09 (br m, 19H, $\text{C}^{2,6}\text{-H Ph}$, $\text{C}^{2,5,6}\text{-H L-Trp}$, $\text{C}^{2,5,6}\text{-H TA}$), 7.30 (m, 5H, $\text{C}^7\text{-H L-Trp}$, $\text{C}^7\text{-H TA}$), 7.52 (d, $J = 7.9$ Hz, 1H, $\text{C}^4\text{-H TA}$), 7.57 (m, 4H, $\text{C}^4\text{-H L-Trp}$).

^{13}C NMR (500 MHz, MeOD): $\delta = 24.2, 24.4$ [γC , $2\times\text{O-}(\text{CH}_2)_2\text{-CH}_2\text{-(CH}_2)_2\text{-NH}$], 26.3 ($\text{CH}_2\text{-Ar TA}$), 28.8 [$\text{C}(\text{CH}_3)_3$], 29.6 (βC *L*-Trp), 29.8 (δC), 29.9 [$2\times\text{O-CH}_2\text{-CH}_2\text{-(CH}_2)_3\text{-NH}$], 30.1 (δC), 30.7 [$2\times\text{O-}(\text{CH}_2)_3\text{-CH}_2\text{-CH}_2\text{-NH}$], 32.9, 33.1 (βC), 40.0 ($2\times\text{O-CH}_2\text{-CH}_2\text{-NH}$), 40.1 (ϵC *L*-Lys), 40.2 [$2\times\text{O-}(\text{CH}_2)_4\text{-CH}_2\text{-NH}$], 40.7 (ϵC rdzenia), 41.4 ($\text{CH}_2\text{-NH TA}$), 55.5 (αC rdzenia), 56.2 ($4\times\alpha\text{C}$ *L*-Lys), 57.1 ($4\times\alpha\text{C}$ *L*-Trp), 67.7 ($2\times\text{O-CH}_2\text{-CH}_2\text{-NH}$), 69.1 [$2\times\text{O-CH}_2\text{-(CH}_2)_4\text{-NH}$], 80.6 [$\text{C}(\text{CH}_3)_3$], 105.8, 106.0 (C^4 Ph), 106.7, 107.1, 107.2, 107.4 ($\text{C}^{2,6}$ Ph), 111.1 (C^3 *L*-Trp), 112.3 (C^7 *L*-Trp, C^7 TA), 113.1 (C^3 TA), 119.4 (C^4 TA), 119.5 (C^4 *L*-Trp), 119.7

(C⁵ TA), 119.8 (C⁵ L-Trp), 122.3 (C⁶ TA), 122.4 (C⁶ L-Trp), 123.6 (C² TA), 124.6 (C² L-Trp), 128.8 (C^{3a} TA), 128.9 (C^{3a} L-Trp), 137.8 (C¹ Ph), 138.0 (C^{7a} L-Trp), 138.1 (C^{7a} TA), 157.5, 157.8 [C=O (Boc)], 161.2, 161.7 (C^{3,5} Ph), 169.6 (CONH Ph), 174.3, 174.6, 175.1, 175.5 (CONH).

$[\alpha]_D^{25} = -5.4$ (c 1, MeOH).

$R_f = 0.49$ (CHCl₃/MeOH 8:1).

T. top.: 135-140°C.

d) Dendrymer 73 (otrzymany z dendrymeru pośredniego 67)

Do reakcji użyto Boc-Trp-OH (0.36 g, 1.18 mmol), HOBt (0.18 g, 1.18 mmol), EDC·HCl (0.23 g, 1.18 mmol), dendrymeru pośredniego **67** (0.47 g, 0.268 mmol), Et₃N (0.3 mL, 2.14 mmol) i DMF (15 mL). Sprzęganie prowadzono przez 48 godzin. Otrzymano produkt w postaci kremowego proszku z wydajnością 69.7% (0.53 g).

C₁₅₄H₂₃₁O₃₁N₂₃, M = 2900.62 g/mol (masa monoizotopowa 2898.7).

LRMS (ESI, MeOH): 2921.6 [M + Na⁺], 1472.3 [M + 2Na⁺]²⁺ - *główny sygnał*.

¹H NMR (500 MHz, MeOD): $\delta = 0.85$ (br t, 3H, CH₃ DDA), 1.03-1.93 [br m, 62H, 5× β , γ , δ CH₂ L-Lys i rdzenia, 2×O-CH₂-(CH₂)₃-CH₂-NH, CH₂-2-11 DDA] nakładający się na 1.35, 1.39, 1.41 [3s, 72H, 8×C(CH₃)₃], 2.85-3.26 [br m, 22H, 4× ϵ CH₂ L-Lys, β CH₂ L-Trp, 2×O-(CH₂)₄-CH₂-NH, CH₂-1 DDA], 3.35 (m, 2H, ϵ CH₂ rdzenia), 3.49, 3.60 (2m, 4H, 2×O-CH₂-CH₂-NH), 3.85-4.05 (br m, 12H, 4×O-CH₂, 4× α CH L-Lys), 4.29 (m, 4H, 4× α CH L-Trp), 4.51 (m, 1H, α CH rdzenia), 6.60 (m, 2H, C⁴-H Ph), 6.93 (m, 2H, C^{2,6}-H Ph), 7.00 (m, 6H, C^{2,6}-H Ph, C⁵-H L-Trp), 7.06 (m, 8H, C^{2,6}-H L-Trp), 7.31 (d, $J = 7.91$ Hz, 4H, C⁷-H L-Trp), 7.56 (m, 4H, C⁴-H L-Trp).

¹³C NMR (500 MHz, MeOD): $\delta = 14.5$ (C¹² DDA), 23.7, 24.2, 24.4, 24.6, 28.0, 28.4 [γ C, C^{3,11} DDA, 2×O-(CH₂)₂-CH₂-(CH₂)₂-NH], 28.7, 28.8 [C(CH₃)₃], 29.6 (β C L-Trp), 29.8, 29.9, 30.1, 30.2, 30.3, 30.4, 30.5, 30.7-30.8 [δ C, C², C⁴-C¹⁰ DDA, 2×O-CH₂-CH₂-CH₂-CH₂-CH₂-NH], 32.9, 33.1 (β C), 40.0 (2×O-CH₂-CH₂-NH), 40.1 (ϵ C L-Lys), 40.2 [2×O-(CH₂)₄-CH₂-NH], 40.5 (C¹ DDA), 40.7 (ϵ C rdzenia), 55.5 (α C rdzenia), 56.1, 56.2 (4× α C L-Lys), 57.1 (4× α C L-Trp), 67.7 (2×O-CH₂-CH₂-NH), 69.1 [2×O-CH₂-(CH₂)₄-NH], 80.6 [C(CH₃)₃], 105.7, 106.0 (C⁴ Ph), 106.7, 107.1, 107.2, 107.4 (C^{2,6} Ph), 111.0 (C³ L-Trp), 112.3 (C⁷ L-Trp), 119.5 (C⁴ L-Trp), 119.8 (C⁵ L-Trp), 122.4 (C⁶ L-Trp), 124.6 (C² L-Trp), 128.9 (C^{3a} L-Trp), 137.2, 137.8 (C¹ Ph), 138.0 (C^{7a} L-Trp), 157.5, 157.8 [C=O (Boc)], 161.3, 161.7 (C^{3,5} Ph), 169.7 (CONH Ph), 174.4, 174.6, 175.2, 175.5 (CONH).

$[\alpha]_D^{25} = -5.3$ (c 1, MeOH).

$R_f = 0.57$ (CHCl₃/MeOH 8:1).

T. top.: 125-129°C.

e) Dendrymer 74 (otrzymany z dendrymeru pośredniego 68)

Do reakcji użyto Boc-Trp-OH (0.48 g, 1.58 mmol), HOBt (0.24 g, 1.58 mmol), EDC·HCl (0.3 g, 1.58 mmol), dendrymeru pośredniego **68** (0.69 g, 0.36 mmol), Et₃N (0.4 mL, 2.88 mmol) i DMF (15 mL). Sprzęganie prowadzono przez 48 godzin. Otrzymano produkt w postaci białego proszku z wydajnością 68.2% (0.75 g).

C₁₆₆H₂₅₅O₃₁N₂₃, M = 3068.94 g/mol (masa monoizotopowa 3066.9).

LRMS (ESI, MeOH): 1556.3 [M + 2Na⁺]²⁺ - główny sygnał, 1045.3 [M + 3Na⁺]³⁺.

¹H NMR (500 MHz, MeOD): $\delta = 0.87$ (br t, 6H, 2×CH₃ *dDDA*), 1.05-1.90 [br m, 82H, 5× β , γ , δ CH₂ *L-Lys* i *rdzenia*, 2×O-CH₂-(CH₂)₃-CH₂-NH, 2×CH₂-2-11 *dDDA*] nakładający się na 1.35, 1.39, 1.41 [3s, 72H, 8×C(CH₃)₃], 2.85-3.26 [br m, 22H, 4× ϵ CH₂ *L-Lys*, β CH₂ *L-Trp*, 2×O-(CH₂)₄-CH₂-NH, CH₂-1 *dDDA*], 3.33-3.53 (br m, 6H, ϵ CH₂ *rdzenia*, O-CH₂-CH₂-NH, CH₂-1 *dDDA*), 3.60 (m, 2H, O-CH₂-CH₂-NH), 3.86-4.09 (br m, 12H, 4×O-CH₂, 4× α CH *L-Lys*), 4.29 (m, 4H, 4× α CH *L-Trp*), 4.97 (m, 1H, α CH *rdzenia*), 6.60 (m, 2H, C⁴-H *Ph*), 6.92-7.09 (br m, 16H, C^{2,6}-H *Ph*, C^{2,5,6}-H *L-Trp*), 7.31 (d, $J = 8.0$ Hz, 4H, C⁷-H *L-Trp*), 7.57 (m, 4H, C⁴-H *L-Trp*).

¹³C NMR (500 MHz, MeOD): $\delta = 14.5$ (2×C¹² *dDDA*), 23.8, 24.1, 24.2, 24.4, 28.0, 28.4, 28.6 [γ C, 2×C^{3,11} *dDDA*, 2×O-(CH₂)₂-CH₂-(CH₂)₂-NH], 28.7, 28.8 [C(CH₃)₃], 29.6 (β C *L-Trp*), 29.8, 30.0, 30.1, 30.2, 30.4-30.5, 30.7-30.8 [δ C, 2×C², 2×C⁴-C¹⁰ *dDDA*, 2×O-CH₂-CH₂-CH₂-CH₂-CH₂-NH], 33.1 (β C), 40.0 (2×O-CH₂-CH₂-NH), 40.1 (ϵ C *L-Lys*), 40.2 [2×O-(CH₂)₄-CH₂-NH], 40.6 (ϵ C *rdzenia*), 47.7 (2×C¹ *dDDA*), 51.4 (α C *rdzenia*), 56.1, 56.2 (4× α C *L-Lys*), 57.1 (4× α C *L-Trp*), 67.7 (2×O-CH₂-CH₂-NH), 69.2 [2×O-CH₂-(CH₂)₄-NH], 80.6 [C(CH₃)₃], 105.7, 106.0 (C⁴ *Ph*), 106.7, 107.2, 107.3 (C^{2,6} *Ph*), 111.1 (C³ *L-Trp*), 112.3 (C⁷ *L-Trp*), 119.5 (C⁴ *L-Trp*), 119.8 (C⁵ *L-Trp*), 122.4 (C⁶ *L-Trp*), 124.6 (C² *L-Trp*), 128.9 (C^{3a} *L-Trp*), 137.1, 137.8 (C¹ *Ph*), 138.0 (C^{7a} *L-Trp*), 157.5, 157.8 [C=O (Boc)], 161.3, 161.7 (C^{3,5} *Ph*), 169.5, 169.7 (CONH *Ph*), 173.7, 174.6, 175.2, 175.5 (CONH).

[α]_D²⁵ = -5.6 (c 1, MeOH).

$R_f = 0.45$ (CHCl₃/MeOH 8:1).

T. top.: 117-120°C.

f) Dendrymer 75 (otrzymany z dendrymeru pośredniego 69)

Do reakcji, prowadzonej przez 48 godzin, wzięto Boc-Trp-OH (1.02 g, 3.34 mmol), HOBt (0.51 g, 3.34 mmol), EDC·HCl (0.64 g, 3.34 mmol), dendrymeru pośredniego **69** (1.3 g, 0.76 mmol), Et₃N (0.84 mL, 6.08 mmol) i DMF (15 mL). Otrzymano produkt w postaci jasnożółtego proszku z wydajnością 86.2% (1.87 g).

C₁₄₈H₂₀₆O₃₃N₂₄, M = 2849.36 g/mol (masa monoizotopowa 2847.5).

LRMS (ESI, MeOH): 2872.5 [M + Na⁺], 1446.8 [M + 2Na⁺]²⁺ - *główny sygnał*.

[α]_D²⁵ = -4.5 (c 1, MeOH).

R_f = 0.37 (CHCl₃/MeOH 8:1).

T. top.: 140-143°C.

g) Dendrymer 89 (otrzymany z dendrymeru pośredniego 65)

Do reakcji użyto związku **83** (0.73 g, 2.02 mmol), HOBt (0.31 g, 2.02 mmol), EDC·HCl (0.39 g, 2.02 mmol), dendrymeru pośredniego **65** (0.8 g, 0.46 mmol), Et₃N (0.5 mL, 3.68 mmol) i DMF (15 mL). Sprzęganie prowadzono przez 48 godzin. Otrzymano produkt w postaci kremowego proszku z wydajnością 56.6% (0.81 g).

C₁₆₈H₂₄₈O₃₁N₂₄, M = 3099.91 g/mol (masa monoizotopowa 3097.9).

LRMS (ESI, MeOH): 1571.8 [M + 2Na⁺]²⁺, 1055.6 [M + 3Na⁺]³⁺ - *główny sygnał*, 1048.9 [M + 2Na⁺ + H⁺]³⁺.

¹H NMR (500 MHz, MeOD): δ = 0.88 (m, 12H, 4×CH₃ *n*-Bu), 1.12-1.76 [br m, 58H, 5×β, γ, δCH₂ *L*-Lys i rdzenia, 2×O-CH₂-(CH₂)₃-CH₂-NH, 4×CH₂-2,3 *n*-Bu] nakładający się na 1.34, 1.38, 1.39 [3s, 72H, 8×C(CH₃)₃], 2.87-3.24 [br m, 22H, 4×εCH₂ *L*-Lys, βCH₂ *B*-Trp, 2×O-(CH₂)₄-CH₂-NH, CH₂-Ar TA], 3.34 (m, 2H, εCH₂ rdzenia), 3.37-3.65 (br m, 6H, 2×O-CH₂-CH₂-NH, CH₂-NH TA), 3.83-4.08 (br m, 20H, 4×O-CH₂, 4×αCH *L*-Lys, 4×CH₂-1 *n*-Bu), 4.28 (m, 4H, 4×αCH *B*-Trp), 4.50 (m, 1H, αCH rdzenia), 6.58 (m, 2H, C⁴-H Ph), 6.90-7.13 (br m, 19H, C^{2,6}-H Ph, C^{2,5,6}-H *B*-Trp, C^{2,5,6}-H TA), 7.28 (m, 5H, C⁷-H *B*-Trp, C⁷-H TA), 7.52 (d, J = 7.84 Hz, 1H, C⁴-H TA), 7.57 (m, 4H, C⁴-H *B*-Trp).

¹³C NMR (500 MHz, MeOD): δ = 14.2 (C⁴ *n*-Bu), 21.1 (C³ *n*-Bu), 24.1, 24.2, 24.4, 24.5 [γC, 2×O-(CH₂)₂-CH₂-(CH₂)₂-NH], 26.3 (CH₂-Ar TA), 28.4, 28.7, 28.8 [C(CH₃)₃], 29.4 (βC *B*-Trp), 29.9, 30.1 [δC, 2×O-CH₂-CH₂-CH₂-CH₂-NH], 32.9, 33.1, 33.6 (βC, C² *n*-Bu), 40.0 (2×O-CH₂-CH₂-NH), 40.1 (εC *L*-Lys), 40.2 [2×O-(CH₂)₄-CH₂-NH], 40.7 (εC rdzenia), 41.4 (CH₂-NH TA), 46.7 (C¹ *n*-Bu), 55.6 (αC rdzenia), 56.1, 56.2 (4×αC *L*-Lys), 57.1 (4×αC *B*-Trp), 67.7 (2×O-CH₂-CH₂-NH), 69.1 [2×O-CH₂-(CH₂)₄-NH], 80.6, 81.3 [C(CH₃)₃], 105.7, 105.9 (C⁴ Ph), 106.7, 107.2, 107.4 (C^{2,6} Ph), 110.5 (C⁷ *B*-Trp), 112.3 (C⁷ TA), 113.1 (C³ TA),

119.4 (C⁴ TA), 119.7 (C⁵ TA), 119.8 (C⁵ B-Trp), 119.9 (C⁴ B-Trp), 122.3 (C⁶ TA), 122.4 (C⁶ B-Trp), 123.6 (C² TA), 128.0 (C² B-Trp), 128.8 (C^{3a} TA), 129.4 (C^{3a} B-Trp), 137.8 (C¹ Ph, C^{7a} B-Trp), 138.1 (C^{7a} TA), 157.5, 157.7 [C=O (Boc)], 161.3, 161.7 (C^{3,5} Ph), 169.6, 169.7 (CONH Ph), 174.4, 174.6, 175.1, 175.5 (CONH).

$[\alpha]_D^{25} = -6.5$ (c 1, MeOH).

$R_f = 0.46$ (CHCl₃/MeOH 8:1).

T. top.: 120-122°C.

h) Dendrymer 90 (otrzymany z dendrymeru pośredniego 67)

Do reakcji użyto związku **83** (0.425 g, 1.18 mmol), HOBt (0.18 g, 1.18 mmol), EDC·HCl (0.23 g, 1.18 mmol), dendrymeru pośredniego **67** (0.47 g, 0.268 mmol), Et₃N (0.3 mL, 2.14 mmol) i DMF (10 mL). Sprzęganie prowadzono przez 96 godzin. Otrzymano produkt w postaci jasnożółtego proszku z wydajnością 35.8% (0.3 g).

C₁₇₀H₂₆₃O₃₁N₂₃, M = 3125.04 g/mol (masa monoizotopowa 3123.0).

LRMS (ESI, MeOH): 1584.3 [M + 2Na⁺]²⁺ - główny sygnał, 1064.6 [M + 3Na⁺]³⁺.

¹H NMR (500 MHz, MeOD): $\delta = 0.89$ (br m, 15H, CH₃ DDA, 4×CH₃ n-Bu), 1.14-1.92 [br m, 78H, 5× β , γ , δ CH₂ L-Lys i rdzenia, 2×O-CH₂-(CH₂)₃-CH₂-NH, 4×CH₂-2,3 n-Bu, CH₂-2-11 DDA] nakładający się na 1.35, 1.39, 1.41 [3s, 72H, 8×C(CH₃)₃], 2.90-3.37 [br m, 24H, 5× ϵ CH₂ L-Lys i rdzenia, β CH₂ B-Trp, 2×O-(CH₂)₄-CH₂-NH, CH₂-1 DDA], 3.49, 3.60 (2m, 4H, 2×O-CH₂-CH₂-NH), 3.88-4.10 (br m, 20H, 4×O-CH₂, 4× α CH L-Lys, 4×CH₂-1 n-Bu), 4.28 (m, 4H, 4× α CH B-Trp), 4.51 (m, 1H, α CH rdzenia), 6.61 (m, 2H, C⁴-H Ph), 6.94 (m, 2H, C^{2,6}-H Ph), 7.01 (m, 10H, C^{2,6}-H Ph, C^{2,5}-H B-Trp), 7.11 (m, 4H, C⁶-H B-Trp), 7.29 (m, 4H, C⁷-H B-Trp), 7.57 (m, 4H, C⁴-H B-Trp).

¹³C NMR (500 MHz, MeOD): $\delta = 14.2$ (C⁴ n-Bu), 14.5 (C¹² DDA), 21.1 (C³ n-Bu), 23.8 (C¹¹ DDA), 24.2, 24.4, 24.6 5 [γ C, 2×O-(CH₂)₂-CH₂-(CH₂)₂-NH], 28.0 (C³ DDA), 28.4, 28.7, 28.8 [C(CH₃)₃], 29.5 (β C B-Trp), 29.9, 30.1, 30.4, 30.5, 30.7-30.8 [δ C, 2×O-CH₂-CH₂-CH₂-CH₂-CH₂-NH, C², C⁴-C¹⁰ DDA], 32.9, 33.1, 33.6 (β C, C² n-Bu), 40.0 (2×O-CH₂-CH₂-NH), 40.1 (ϵ C L-Lys), 40.2 [2×O-(CH₂)₄-CH₂-NH], 40.5 (C¹ DDA), 40.7 (ϵ C rdzenia), 46.7 (C¹ n-Bu), 55.5 (α C rdzenia), 56.1, 56.2 (4× α C L-Lys), 57.1 (4× α C B-Trp), 67.7 (2×O-CH₂-CH₂-NH), 69.2 [2×O-CH₂-(CH₂)₄-NH], 80.6 [C(CH₃)₃], 105.7, 106.0 (C⁴ Ph), 106.7, 107.1, 107.2, 107.4 (C^{2,6} Ph), 110.5 (C⁷ B-Trp), 119.8 (C⁵ B-Trp), 119.9 (C⁴ B-Trp), 122.4 (C⁶ B-Trp), 128.0 (C² B-Trp), 129.5 (C^{3a} B-Trp), 137.8 (C¹ Ph, C^{7a} B-Trp), 157.5, 157.7 [C=O (Boc)], 161.3, 161.7 (C^{3,5} Ph), 169.7 (CONH Ph), 174.4, 174.6, 175.1, 175.5 (CONH).

$[\alpha]_D^{25} = -5.4$ (c 1, MeOH).

$R_f = 0.55$ (CHCl₃/MeOH 8:1).

T. top.: 102-104.5°C.

i) Dendrymer 91 (otrzymany z dendrymeru pośredniego 68)

Do reakcji użyto związku **83** (0.75 g, 2.07 mmol), HOBt (0.32 g, 2.07 mmol), EDC·HCl (0.4 g, 2.07 mmol), dendrymeru pośredniego **68** (0.9 g, 0.47 mmol), Et₃N (0.5 mL, 3.76 mmol) i DMF (10 mL). Sprzęganie prowadzono przez 48 godzin. Otrzymano produkt w postaci jasnożółtego proszku z wydajnością 71.4% (1.1 g).

C₁₈₂H₂₈₇O₃₁N₂₃, M = 3293.36 g/mol (masa monoizotopowa 3291.2).

LRMS (ESI, MeOH): 3314.2 [M + Na⁺], 1668.5 [M + 2Na⁺]²⁺ - *główny sygnał*, 1120.0 [M + 3Na⁺]³⁺.

¹H NMR (500 MHz, MeOD): $\delta = 0.89$ (br m, 18H, 2×CH₃ *dDDA*, 4×CH₃ *n-Bu*), 1.15-1.78 [br m, 98H, 5× β , γ , δ CH₂ *L-Lys* i *rdzenia*, 2×O-CH₂-(CH₂)₃-CH₂-NH, 4×CH₂-2,3 *n-Bu*, 2×CH₂-2-11 *dDDA*] nakładający się na 1.34, 1.39, 1.41 [3s, 72H, 8×C(CH₃)₃], 2.88-3.25 (br m, 22H, 4× ϵ CH₂ *L-Lys*, β -CH₂ *B-Trp*, 2×O-(CH₂)₄-CH₂-NH, CH₂-1 *dDDA*), 3.33-3.53 (br m, 6H, ϵ CH₂ *rdzenia*, O-CH₂-CH₂-NH, CH₂-1 *dDDA*), 3.60 (m, 2H, O-CH₂-CH₂-NH), 3.88-4.10 (br m, 20H, 4×O-CH₂, 4× α CH *L-Lys*, 4×CH₂-1 *n-Bu*), 4.28 (m, 4H, 4× α CH *B-Trp*), 4.98 (m, 1H, α CH *rdzenia*), 6.60 (m, 2H, C⁴-H *Ph*), 6.94 (m, 2H, C^{2,6}-H *Ph*), 7.01 (m, 10H, C^{2,6}-H *Ph*, C^{2,5}-H *B-Trp*), 7.11 (m, 4H, C⁶-H *B-Trp*), 7.29 (m, 4H, C⁷-H *B-Trp*), 7.57 (m, 4H, C⁴-H *B-Trp*).

¹³C NMR (500 MHz, MeOD): $\delta = 14.2$ (C⁴ *n-Bu*), 14.5, 14.6 (2×C¹² *dDDA*), 21.1 (C³ *n-Bu*), 23.8 (2×C¹¹ *dDDA*), 24.1, 24.2, 24.4, 24.6 [γ C, 2×O-(CH₂)₂-CH₂-(CH₂)₂-NH], 27.9, 28.0 (2×C³ *dDDA*), 28.4, 28.7, 28.8 [C(CH₃)₃], 29.5 (β C *B-Trp*), 29.9, 30.0, 30.1, 30.2, 30.4-30.5, 30.7-30.8 [δ C, 2×O-CH₂-CH₂-CH₂-CH₂-NH, 2×C², 2×C⁴-C¹⁰ *dDDA*], 33.1, 33.5, 33.6 (β C, C² *n-Bu*), 40.0 (2×O-CH₂-CH₂-NH), 40.1 (ϵ C *L-Lys*), 40.2 [2×O-(CH₂)₄-CH₂-NH], 40.6 (ϵ C *rdzenia*), 46.7 (C¹ *n-Bu*), 47.7 (2×C¹ *dDDA*), 51.4 (α C *rdzenia*), 56.1, 56.2 (4× α C *L-Lys*), 57.1 (4× α C *B-Trp*), 67.7 (2×O-CH₂-CH₂-NH), 69.1 [2×O-CH₂-(CH₂)₄-NH], 80.5 [C(CH₃)₃], 105.7, 105.9 (C⁴ *Ph*), 106.7, 107.2, 107.4 (C^{2,6} *Ph*), 110.5 (C⁷ *B-Trp*), 119.8 (C⁵ *B-Trp*), 120.0 (C⁴ *B-Trp*), 122.4 (C⁶ *B-Trp*), 128.0 (C² *B-Trp*), 129.5 (C^{3a} *B-Trp*), 137.1 (C¹ *Ph*), 137.8 (C^{7a} *B-Trp*), 157.5, 157.7 [C=O (Boc)], 161.3, 161.7 (C^{3,5} *Ph*), 169.3, 169.7 (CONH *Ph*), 173.7, 174.6, 175.1, 175.5 (CONH).

$[\alpha]_D^{25} = -7.1$ (c 1, MeOH).

$R_f = 0.60$ (CHCl₃/MeOH 8:1).

T. top.: 94-97°C.

j) Dendrymer 99 (otrzymany z dendrymeru pośredniego 65)

Do reakcji użyto związku **96** (0.58 g, 1.19 mmol), HOBt (0.18 g, 1.19 mmol), EDC·HCl (0.23 g, 1.19 mmol), dendrymeru pośredniego **65** (0.467 g, 0.27 mmol), Et₃N (0.3 mL, 2.16 mmol) i DMF (10 mL). Sprzężanie prowadzono przez 96 godzin. Otrzymano produkt w postaci kremowego proszku z wydajnością 78.9% (0.77 g).

C₁₉₂H₂₉₂O₃₉N₂₈, M = 3616.54 g/mol (masa monoizotopowa 3614.2).

LRMS (ESI, MeOH): 1830.1 [M + 2Na⁺]²⁺, 1819.0 [M + H⁺ + Na⁺]²⁺, 1227.7 [M + 3Na⁺]³⁺ - główny sygnał, 1220.4 [M + H⁺ + 2Na⁺]³⁺, 1213.0 [M + 2H⁺ + Na⁺]³⁺.

¹H NMR (500 MHz, MeOD): δ = 1.10-1.85 [br m, 66H, 5×β, γ, δCH₂ *L-Lys* i rdzenia, 2×O-CH₂-(CH₂)₃-CH₂-NH, 4×CH₂-2,3,4 *5-AP*] nakładający się na 1.34, 1.40 [2br s, 108H, 12×C(CH₃)₃], 2.87-3.24 [br m, 30H, 4×εCH₂ *L-Lys*, βCH₂ *AP-Trp*, 2×O-(CH₂)₄-CH₂-NH, CH₂-Ar *TA*, 4×CH₂-5 *5-AP*], 3.34 (m, 2H, εCH₂ rdzenia), 3.37-3.64 (br m, 6H, 2×O-CH₂-CH₂-NH, CH₂-NH *TA*), 3.83-4.09 (br m, 20H, 4×O-CH₂, 4×αCH *L-Lys*, 4×CH₂-1 *5-AP*), 4.28 (m, 4H, 4×αCH *AP-Trp*), 4.50 (m, 1H, αCH rdzenia), 6.59 (m, 2H, C⁴-H *Ph*), 6.91-7.06 (br m, 15H, C^{2,6}-H *Ph*, C^{2,5}-H *AP-Trp*, C^{2,5,6}-H *TA*), 7.10 (m, 4H, C⁶-H *AP-Trp*), 7.29 (m, 5H, C⁷-H *AP-Trp*, C⁷-H *TA*), 7.56 (m, 5H, C⁴-H *AP-Trp*, C⁴-H *TA*).

¹³C NMR (500 MHz, MeOD): δ = 24.2 (γC), 24.5 [2×O-(CH₂)₂-CH₂-(CH₂)₂-NH], 25.2 (C³ *5-AP*), 26.3 (CH₂-Ar *TA*), 28.8, 28.9 [C(CH₃)₃], 29.5 (βC *AP-Trp*), 29.9, 30.1 [δC, 2×O-CH₂-CH₂-CH₂-CH₂-NH], 30.6 (C⁴ *5-AP*), 31.1 (C² *5-AP*), 33.1 (βC), 40.0 (2×O-CH₂-CH₂-NH), 40.1 (εC *L-Lys*), 40.2 [2×O-(CH₂)₄-CH₂-NH], 41.2 (C⁵ *5-AP*), 41.4 (CH₂-NH *TA*), 46.9 (C¹ *5-AP*), 55.5 (αC rdzenia), 56.1, 56.2 (4×αC *L-Lys*), 57.2 (4×αC *AP-Trp*), 67.7 (2×O-CH₂-CH₂-NH), 69.2 [2×O-CH₂-(CH₂)₄-NH], 79.8, 80.6 [C(CH₃)₃], 105.7, 106.7 (C⁴ *Ph*), 107.2, 107.4 (C^{2,6} *Ph*), 110.5 (C⁷ *AP-Trp*), 112.3 (C⁷ *TA*), 113.1 (C³ *TA*), 119.4 (C⁴ *TA*), 119.7 (C⁵ *TA*), 119.8 (C⁵ *AP-Trp*), 120.0 (C⁴ *AP-Trp*), 122.4 (C⁶ *TA*), 122.5 (C⁶ *AP-Trp*), 123.6 (C² *TA*), 128.0 (C² *AP-Trp*), 129.5 (C^{3a} *AP-Trp*, C^{3a} *TA*), 137.8 (C¹ *Ph*, C^{7a} *AP-Trp*), 138.1 (C^{7a} *TA*), 157.5, 157.8, 158.5 [C=O (Boc)], 161.3, 161.7 (C^{3,5} *Ph*), 174.6, 175.1, 175.5 (CONH).

[α]_D²⁵ = -6.5 (c 1, MeOH).

R_f = 0.44 (CHCl₃/MeOH 8:1).

T. top.: 117-119.5°C.

k) Dendrymer 100 (otrzymany z dendrymeru pośredniego 67)

Do reakcji użyto związku **96** (0.39 g, 0.79 mmol), HOBt (0.12 g, 0.79 mmol), EDC·HCl (0.15 g, 0.79 mmol), dendrymeru pośredniego **67** (0.32 g, 0.18 mmol), Et₃N (0.2

mL, 1.44 mmol) i DMF (10 mL). Sprzężanie prowadzono przez 96 godzin. Otrzymano produkt w postaci kremowego proszku z wydajnością 68.2% (0.45 g).

$C_{194}H_{307}O_{39}N_{27}$, $M = 3641.67$ g/mol (masa monoizotopowa 3639.3).

LRMS (ESI, MeOH): 1842.6 $[M + 2Na^+]^{2+}$ - główny sygnał, 1840.1 $[M + NH_4^+ + Na^+]^{2+}$, 1831.6 $[M + H^+ + Na^+]^{2+}$, 1540.9 $[M - 6Boc + H^+ + K^+]^{2+}$, 1236.1 $[M + 3Na^+]^{3+}$, 1228.7 $[M + H^+ + 2Na^+]^{3+}$, 1221.4 $[M + 2H^+ + Na^+]^{3+}$.

1H NMR (500 MHz, MeOD): $\delta = 0.88$ (m, 3H, CH_3 DDA), 1.18-1.81 [br m, 86H, $5 \times \beta, \gamma, \delta CH_2$ L-Lys i rdzenia, $2 \times O-CH_2-(CH_2)_3-CH_2-NH$, $4 \times CH_2-2,3,4$ 5-AP, CH_2-2-11 DDA] nakładający się na 1.35, 1.40 [2br s, 108H, $12 \times C(CH_3)_3$], 2.97-3.25 [br m, 30H, $4 \times \epsilon CH_2$ L-Lys, βCH_2 AP-Trp, $2 \times O-(CH_2)_4-CH_2-NH$, $4 \times CH_2-5$ 5-AP, CH_2-1 DDA], 3.33 (m, 2H, ϵCH_2 rdzenia), 3.43-3.65 (br m, 4H, $2 \times O-CH_2-CH_2-NH$), 3.87-4.11 (br m, 20H, $4 \times O-CH_2$, $4 \times \alpha CH$ L-Lys, $4 \times CH_2-1$ 5-AP), 4.28 (m, 4H, $4 \times \alpha CH$ AP-Trp), 4.51 (m, 1H, αCH rdzenia), 6.61 (m, 2H, C^4-H Ph), 6.94 (m, 2H, $C^{2,6}-H$ Ph), 7.01 (m, 10H, $C^{2,6}-H$ Ph, $C^{2,5}-H$ AP-Trp), 7.11 (m, 4H, C^6-H AP-Trp), 7.30 (m, 4H, C^7-H AP-Trp), 7.56 (m, 4H, C^4-H AP-Trp).

^{13}C NMR (500 MHz, MeOD): $\delta = 14.5$ (C^{12} DDA), 23.8 (C^{11} DDA), 24.2 (γC), 24.4 [$2 \times O-(CH_2)_2-CH_2-(CH_2)_2-NH$], 25.2 (C^3 5-AP), 28.0 (C^3 DDA), 28.8, 28.9 [$C(CH_3)_3$], 29.5 (βC AP-Trp), 29.9, 30.1, 30.4, 30.5, 30.7-30.8 [δC , $2 \times O-CH_2-CH_2-CH_2-CH_2-CH_2-NH$, C^2 , C^4-C^{10} DDA], 30.6 (C^4 5-AP), 31.1 (C^2 5-AP), 32.9, 33.1 (βC), 40.0 ($2 \times O-CH_2-CH_2-NH$), 40.1 (ϵC L-Lys), 40.2 [$2 \times O-(CH_2)_4-CH_2-NH$], 40.5 (C^1 DDA), 40.7 (ϵC rdzenia), 41.2 (C^5 5-AP), 46.9 (C^1 5-AP), 55.5 (αC rdzenia), 56.2 ($4 \times \alpha C$ L-Lys), 57.2 ($4 \times \alpha C$ AP-Trp), 67.8 ($2 \times O-CH_2-CH_2-NH$), 69.2 [$2 \times O-CH_2-(CH_2)_4-NH$], 79.8, 80.6 [$C(CH_3)_3$], 105.7, 106.7 (C^4 Ph), 107.2, 107.5 ($C^{2,6}$ Ph), 110.5 (C^7 AP-Trp), 119.8 (C^5 AP-Trp), 120.0 (C^4 AP-Trp), 122.5 (C^6 AP-Trp), 128.0 (C^2 AP-Trp), 129.5 (C^{3a} AP-Trp), 137.8 (C^1 Ph, C^{7a} AP-Trp), 157.5, 157.7, 158.5 [$C=O$ (Boc)], 161.3, 161.7 ($C^{3,5}$ Ph), 174.6, 175.5 (CONH).

$[\alpha]_D^{25} = -5.7$ (c 1, MeOH).

$R_f = 0.52$ ($CHCl_3/MeOH$ 8:1).

T. top.: 99-102°C.

6.5.2.2. Odbezpieczone dendrymery

Deprotekcję grup Boc w dendrymerach **70 – 74, 89 – 91, 99, 100** za pomocą nasyconego roztworu HCl w AcOEt przeprowadzono wg procedury ogólnej zamieszczonej w Rozdziale 6.2. (Procedura C - wariant B). Reakcji poddawano 0.2 - 0.63 g (0.064 - 0.205 mmol) związku rozpuszczonego w 1 - 2 mL MeOH z 5 - 15 mL nas. HCl/AcOEt. Całkowite zdjęcie grup Boc obserwowano w ciągu 1 - 2 godzin. Odbezpieczone dendrymery występują

w postaci heptachlorowodorków (**76** – **80**, **92** – **94**) lub dodekachlorowodorków (**101**, **102**). Są to higroskopijne, bezpostaciowe proszki barwy kremowej, jasnożółtej bądź jasnoszarej.

a) Dendrymer 76 (otrzymany z dendrymeru 70)

Związek w postaci kremowego proszku otrzymano z wydajnością 96.4% (0.27 g) z 0.34 g (0.12 mmol) dendrymeru **70**.

$C_{110}H_{151}O_{15}N_{23} \times 8HCl$, $M = 2327.21$ g/mol (masa monoizotopowa nieprotonowanego dendrymeru - 2034.2).

LRMS (ESI, MeOH): 1044.9 $[M + MeOH + H^+ + Na^+]^{2+}$, 1017.9 $[M + 2H^+]^{2+}$, 679.0 $[M + 3H^+]^{3+}$, 696.9 $[M + MeOH + 2H^+ + Na^+]^{3+}$ - *główny sygnał*, 536.4 $[M + 4Na^+]^{4+}$, 523.0 $[M + MeOH + 3H^+ + Na^+]^{4+}$.

1H NMR (500 MHz, MeOD): $\delta = 1.25-1.87$ [br m, 42H, $5 \times \beta, \gamma, \delta CH_2$ *L-Lys* i rdzenia, $2 \times O-CH_2-(CH_2)_3-CH_2-NH$], 2.75 (t, $J = 7.2$ Hz, 2H, CH_2-Ar PEA), 2.98-3.40 [br m, 23H, $5 \times \epsilon CH_2$ *L-Lys* i rdzenia, βCH_2 *L-Trp*, CH_2-NH PEA, $2 \times O-(CH_2)_4-CH_2-NH$], 3.44 (m, 1H, CH_2-NH PEA), 3.54, 3.68 (2m, 4H, $2 \times O-CH_2-CH_2-NH$), 3.81-3.96 [br m, 8H, $2 \times O-CH_2-(CH_2)_4-NH$, $4 \times \alpha CH$ *L-Lys*], 4.08 (br m, 8H, $2 \times O-CH_2-CH_2-NH$, $4 \times \alpha CH$ *L-Trp*), 4.46 (m, 1H, αCH rdzenia), 6.60, 6.65 (2m, 2H, C^4-H Ph), 6.96 (m, 2H, $C^{2,6}-H$ Ph), 7.03 (m, 6H, $C^{2,6}-H$ Ph, C^5-H *L-Trp*), 7.12 (m, 9H, C^6-H *L-Trp*, $C^{2,3,4,5,6}-H$ PEA), 7.21 (m, 4H, C^2-H *L-Trp*), 7.37 (m, 4H, C^7-H *L-Trp*), 7.55 (m, 4H, C^4-H *L-Trp*).

^{13}C NMR (500 MHz, MeOD): $\delta = 23.1, 23.2$ (γC), 24.6 [$2 \times O-(CH_2)_2-CH_2-(CH_2)_2-NH$], 28.9, 29.0 (βC *L-Trp*), 29.5, 29.9, 30.0, 30.1 [δC , $2 \times O-CH_2-CH_2-CH_2-CH_2-CH_2-NH$], 32.2, 32.3, 32.8 (βC), 36.5 (CH_2-Ar PEA), 40.1 (ϵC *L-Lys*), 40.2 ($2 \times O-CH_2-CH_2-NH$), 40.6 [$2 \times O-(CH_2)_4-CH_2-NH$], 40.7 (ϵC rdzenia), 42.0 (CH_2-NH PEA), 54.4 ($4 \times \alpha C$ *L-Lys*), 55.2 ($4 \times \alpha C$ *L-Trp*), 55.8 (αC rdzenia), 67.6, 67.7 ($2 \times O-CH_2-CH_2-NH$), 69.2, 69.3 [$2 \times O-CH_2-(CH_2)_4-NH$], 105.7, 106.0 (C^4 Ph), 106.8, 107.1, 107.2, 107.6 ($C^{2,6}$ Ph), 108.1 (C^3 *L-Trp*), 112.6 (C^7 *L-Trp*), 119.4 (C^4 *L-Trp*), 120.2 (C^5 *L-Trp*), 122.9 (C^6 *L-Trp*), 125.6 (C^2 *L-Trp*), 127.4 (C^4 PEA), 128.4 (C^{3a} *L-Trp*), 129.5, 129.9 ($C^{2,3,5,6}$ PEA), 137.2, 137.8 (C^1 Ph), 138.2 (C^{7a} *L-Trp*), 140.4 (C^1 PEA), 161.2, 161.7 ($C^{3,5}$ Ph), 169.8 (CONH Ph), 170.0, 170.1, 170.4, 174.5 (CONH) $[\alpha]_D^{25} = +27.5$ (c 1, MeOH).

T. top.: 195-207°C.

b) Dendrymer 77 (otrzymany z dendrymeru 71)

Związek w postaci jasnożółtego proszku otrzymano z wydajnością 96.8% (0.3 g) z 0.38 g (0.136 mmol) dendrymeru **71**.

$C_{106}H_{140}O_{15}N_{24} \times 8HCl$, $M = 2282.08$ g/mol (masa monoizotopowa nieprotonowanego dendrymeru - 1989.1).

LRMS (ESI, MeOH): 995.6 $[M + 2H^+]^{2+}$, 664.5 $[M + 3H^+]^{3+}$ - *główny sygnał*, 498.6 $[M + 4H^+]^{4+}$.

1H NMR (500 MHz, MeOD): $\delta = 1.30$ (br m, 14H, $4 \times \gamma CH_2$ *L-Lys*, $3 \times \delta CH_2$ *L-Lys*), 1.35-1.50 (br m, 4H, δCH_2 *L-Lys*, γCH_2 *rdzenia*), 1.62 (br m, 2H, δCH_2 *rdzenia*), 1.67-1.86 (br m, 10H, $5 \times \beta CH_2$ *L-Lys* i *rdzenia*), 2.91 (t, $J = 7.2$ Hz, 2H, CH_2 -Ar *TA*), 2.95-3.09 (br m, 8H, $4 \times \epsilon CH_2$ *L-Lys*), 3.20 (m, 4H, $2 \times \beta CH_2$ *L-Trp*), 3.34 (m, 6H, $2 \times \beta CH_2$ *L-Trp*, ϵCH_2 *rdzenia*), 3.42 (m, 1H, CH_2 -NH *TA*), 3.52 (m, 5H, $2 \times O-CH_2-CH_2-NH$, CH_2 -NH *TA*), 3.65 (m, 4H, $2 \times O-CH_2-CH_2-NH$), 3.78 (m, 4H, $4 \times \alpha CH$ *L-Lys*), 3.99-4.10 (br m, 12H, $4 \times O-CH_2$, $4 \times \alpha CH$ *L-Trp*), 4.47 (m, 1H, αCH *rdzenia*), 6.63, 6.69 (2m, 2H, C^4 -H *Ph*), 6.94 (m, 1H, C^5 -H *TA*), 6.97-7.06 (br m, 10H, $C^{2,6}$ -H *Ph*, C^5 -H *L-Trp*, $C^{2,6}$ -H *TA*), 7.09 (m, 4H, C^6 -H *L-Trp*), 7.19 (m, 4H, C^2 -H *L-Trp*), 7.31 (d, $J = 8.04$ Hz, 1H, C^7 -H *TA*), 7.36 (d, $J = 8.11$ Hz, 4H, C^7 -H *L-Trp*), 7.51 (d, $J = 7.75$ Hz, 1H, C^4 -H *TA*), 7.63 (m, 4H, C^4 -H *L-Trp*).

^{13}C NMR (500 MHz, MeOD): $\delta = 23.2, 24.5$ (γC), 26.2 (CH_2 -Ar *TA*), 29.3 (δC), 29.6 (δC , βC *L-Trp*), 30.1 (δC), 32.7, 32.9 (βC), 40.1 (ϵC *L-Lys*), 40.2 ($4 \times O-CH_2-CH_2-NH$), 40.7 (ϵC *rdzenia*), 41.4 (CH_2 -NH *TA*), 54.6 ($4 \times \alpha C$ *L-Lys*), 55.5 ($4 \times \alpha C$ *L-Trp*), 55.8 (αC *rdzenia*), 67.7, 67.8 ($4 \times O-CH_2-CH_2-NH$), 105.8, 106.2 (C^4 *Ph*), 107.3, 107.6 ($C^{2,6}$ *Ph*), 108.5 (C^3 *L-Trp*), 112.3 (C^7 *TA*), 112.6 (C^7 *L-Trp*), 113.1 (C^3 *TA*), 119.3 (C^4 *TA*), 119.4 (C^4 *L-Trp*), 119.6 (C^5 *TA*), 120.2 (C^5 *L-Trp*), 122.3 (C^6 *TA*), 122.8 (C^6 *L-Trp*), 123.6 (C^2 *TA*), 125.5 (C^2 *L-Trp*), 128.5 (C^{3a} *L-Trp*), 128.7 (C^{3a} *TA*), 137.4 (C^1 *Ph*), 137.9 (C^{7a} *L-Trp*), 138.2 (C^{7a} *TA*), 161.3 ($C^{3,5}$ *Ph*), 169.6 (CONH *Ph*), 170.8, 170.9, 171.4, 174.3 (CONH).

$[\alpha]_D^{25} = +14.1$ (c 1, MeOH).

T. top.: 203-212°C.

c) Dendrymer 78 (otrzymany z dendrymeru 72)

Związek w postaci jasnoszarego proszku otrzymano z wydajnością 96.8% (0.3 g) z 0.38 g (0.13 mmol) dendrymeru 72.

$C_{112}H_{152}O_{15}N_{24} \times 8HCl$, $M = 2366.24$ g/mol (masa monoizotopowa nieprotonowanego dendrymeru - 2073.2).

LRMS (ESI, MeOH): 1037.6 $[M + 2H^+]^{2+}$, 692.1 $[M + 3H^+]^{3+}$, 519.3 $[M + 4H^+]^{4+}$ - *główny sygnał*.

1H NMR (500 MHz, MeOD): $\delta = 1.25$ -1.50 [br m, 20H, $5 \times \gamma CH_2$ *L-Lys* i *rdzenia*, δCH_2 *rdzenia*, $2 \times O-(CH_2)_2-CH_2-CH_2-NH$], 1.53-1.65 (br m, 8H, $4 \times \delta CH_2$ *L-Lys*), 1.66-1.89 [br

m, 14H, 5×βCH₂ *L*-Lys i rdzenia, 2×O-CH₂-CH₂-(CH₂)₃-NH], 2.92 (t, *J* = 7.2 Hz, 2H, CH₂-Ar TA), 3.04 [m, 4H, 2×O-(CH₂)₄-CH₂-NH], 3.14 (m, 4H, 2×εCH₂ *L*-Lys), 3.23 (m, 8H, 2×βCH₂ *L*-Trp, 2×εCH₂ *L*-Lys), 3.34 (m, 6H, 2×βCH₂ *L*-Trp, εCH₂ rdzenia), 3.43 (m, 1H, CH₂-NH TA), 3.53 (m, 3H, O-CH₂-CH₂-NH, CH₂-NH TA), 3.67 (br m, 2H, O-CH₂-CH₂-NH), 3.81-3.96 [br m, 8H, 2×O-CH₂-(CH₂)₄-NH, 4×αCH *L*-Lys], 4.08 (br m, 8H, 2×O-CH₂-CH₂-NH, 4×αCH *L*-Trp), 4.47 (m, 1H, αCH rdzenia), 6.59, 6.64 (2m, 2H, C⁴-H *Ph*), 6.96 (m, 4H, C^{2,6}-H *Ph*), 7.02 (m, 7H, C⁵-H *L*-Trp, C^{2,5,6}-H TA), 7.10 (m, 4H, C⁶-H *L*-Trp), 7.21 (m, 4H, C²-H *L*-Trp), 7.30 (m, 1H, C⁷-H TA), 7.37 (m, 4H, C⁷-H *L*-Trp), 7.51 (d, *J* = 7.86 Hz, H, C⁴-H TA), 7.64 (m, 4H, C⁴-H *L*-Trp).

¹³C NMR (500 MHz, MeOD): δ = 23.2 (γC), 24.5, 24.6 [2×O-(CH₂)₂-CH₂-(CH₂)₂-NH], 26.2 (CH₂-Ar TA), 28.9, 29.0 (βC *L*-Trp), 29.5, 29.9, 30.0 [δC, 2×O-CH₂-CH₂-CH₂-CH₂-NH], 32.2, 32.3, 32.9 (βC), 40.1 (εC *L*-Lys), 40.2 (2×O-CH₂-CH₂-NH), 40.6 [2×O-(CH₂)₄-CH₂-NH], 40.7 (εC rdzenia), 41.4 (CH₂-NH TA), 54.4 (4×αC *L*-Lys), 54.5 (4×αC *L*-Trp), 55.3 (αC rdzenia), 67.6, 67.7 (2×O-CH₂-CH₂-NH), 69.2 [2×O-CH₂-(CH₂)₄-NH], 105.7, 106.0 (C⁴ *Ph*), 106.9, 107.2, 107.5 (C^{2,6} *Ph*), 108.1 (C³ *L*-Trp), 112.3 (C⁷ TA), 112.6 (C⁷ *L*-Trp), 113.1 (C³ TA), 119.3 (C⁴ *L*-Trp, C⁴ TA), 119.6 (C⁵ TA), 120.2 (C⁵ *L*-Trp), 122.3 (C⁶ TA), 122.9 (C⁶ *L*-Trp), 123.6 (C² TA), 125.6 (C² *L*-Trp), 128.4 (C^{3a} *L*-Trp), 128.7 (C^{3a} TA), 137.8 (C¹ *Ph*), 138.1 (C^{7a} *L*-Trp), 138.2 (C^{7a} TA), 161.2, 161.8 (C^{3,5} *Ph*), 169.8 (CONH *Ph*), 170.0, 170.1, 170.4 (CONH).

[α]_D²⁵ = +28.1 (c 1, MeOH).

T. top.: 197-206°C.

d) Dendrymer 79 (otrzymany z dendrymeru 73)

Związek w postaci jasnożółtego proszku otrzymano z wydajnością 96% (0.24 g) z 0.3 g (0.1 mmol) dendrymeru 73.

C₁₁₄H₁₆₇O₁₅N₂₃×8HCl, M = 2391.37 g/mol (masa monoizotopowa nieprotonowanego dendrymeru - 2098.3).

LRMS (ESI, MeOH): 700.9 [M + 3H⁺]³⁺ - główny sygnał, 526.1 [M + 4H⁺]⁴⁺.

¹H NMR (500 MHz, MeOD): δ = 0.87 (br t, 3H, CH₃ DDA), 1.20-1.94 [br m, 62H, 5×β, γ, δCH₂ *L*-Lys i rdzenia, 2×O-CH₂-(CH₂)₃-CH₂-NH, CH₂-2-11 DDA], 2.95-3.26 [br m, 18H, 4×εCH₂ *L*-Lys, 2×βCH₂ *L*-Trp, 2×O-(CH₂)₄-CH₂-NH, CH₂-1 DDA], 3.35 (m, 6H, 2×βCH₂ *L*-Trp, εCH₂ rdzenia), 3.55, 3.67 (2m, 4H, 2×O-CH₂-CH₂-NH), 3.85 (m, 4H, 4×αCH *L*-Lys), 3.93 [m, 4H, 2×O-CH₂-(CH₂)₄-NH], 4.09 (m, 8H, 2×O-CH₂-CH₂-NH, 4×αCH *L*-Trp), 4.49 (m, 1H, αCH rdzenia), 6.63 (m, 2H, C⁴-H *Ph*), 6.96 (m, 2H, C^{2,6}-H *Ph*), 7.03 (m, 6H, C^{2,6}-H

Ph, C⁵-H *L-Trp*), 7.10 (m, 4H, C⁶-H *L-Trp*), 7.21 (m, 4H, C²-H *L-Trp*), 7.37 (m, 4H, C⁷-H *L-Trp*), 7.65 (m, 4H, C⁴-H *L-Trp*).

¹³C NMR (500 MHz, MeOD): δ = 14.5 (C¹² *DDA*), 23.1, 23.2, 23.7, 24.6 [γC, C¹¹ *DDA*, 2×O-(CH₂)₂-CH₂-(CH₂)₂-NH], 28.0 (C³ *DDA*), 28.9, 29.0 (βC *L-Trp*), 29.5, 29.9, 30.0, 30.1, 30.4-30.8 [δC, C², C⁴-C¹⁰ *DDA*, 2×O-CH₂-CH₂-CH₂-CH₂-CH₂-NH], 32.2, 32.3, 32.9, 33.1 (βC), 40.1 (εC *L-Lys*), 40.2 (2×O-CH₂-CH₂-NH), 40.6 [2×O-(CH₂)₄-CH₂-NH, C¹ *DDA*], 40.8 (εC *rdzenia*), 54.4 (4×αC *L-Lys*), 55.2 (4×αC *L-Trp*), 55.8 (αC *rdzenia*), 67.6 (2×O-CH₂-CH₂-NH), 69.2 [2×O-CH₂-(CH₂)₄-NH], 105.7, 106.0 (C⁴ *Ph*), 106.8, 107.1, 107.2 (C^{2,6} *Ph*), 108.1 (C³ *L-Trp*), 112.6 (C⁷ *L-Trp*), 119.4 (C⁴ *L-Trp*), 120.2 (C⁵ *L-Trp*), 122.9 (C⁶ *L-Trp*), 125.6 (C² *L-Trp*), 128.4 (C^{3a} *L-Trp*), 137.2, 137.8 (C¹ *Ph*), 138.2 (C^{7a} *L-Trp*), 161.2, 161.8 (C^{3,5} *Ph*), 169.7 (CONH *Ph*), 170.0, 170.1, 170.5, 174.4 (CONH).

[α]_D²⁵ = +25.5 (c 1, MeOH).

T. top.: 187-195°C.

e) Dendrymer 80 (otrzymany z dendrymeru 74)

Związek w postaci jasnożółtego proszku otrzymano z wydajnością 95.2% (0.5 g) z 0.63 g (0.205 mmol) dendrymeru 74.

C₁₂₆H₁₉₁O₁₅N₂₃×8HCl, M = 2559.69 g/mol (masa monoizotopowa nieprotonowanego dendrymeru - 2266.5).

LRMS (ESI, MeOH): 1134.2 [M + 2H⁺]²⁺, 1161.2 [M + MeOH + H⁺ + Na⁺]²⁺, 774.5 [M + MeOH + 2H⁺ + Na⁺]³⁺, 756.5 [M + 3H⁺]³⁺, 581.1 [M + MeOH + 3H⁺ + Na⁺]⁴⁺, 567.6 [M + 4H⁺]⁴⁺ - główny sygnał.

¹H NMR (500 MHz, MeOD): δ = 0.87 (m, 6H, 2×CH₃ *dDDA*), 1.15-1.87 [br m, 82H, 5×β, γ, δCH₂ *L-Lys* i *rdzenia*, 2×O-CH₂-(CH₂)₃-CH₂-NH, 2×CH₂-2-11 *dDDA*], 3.0-3.41 [br m, 26H, 5×εCH₂ *L-Lys* i *rdzenia*, 4×βCH₂ *L-Trp*, 2×O-(CH₂)₄-CH₂-NH, 2×CH₂-1 *dDDA*], 3.50-3.73 (2m, 4H, 2×O-CH₂-CH₂-NH), 3.80-3.96 [br m, 8H, 2×O-CH₂-(CH₂)₄-NH, 4×αCH *L-Lys*], 4.09 (m, 8H, 4×αCH *L-Trp*, 2×O-CH₂-CH₂-NH), 4.96 (m, 1H, αCH *rdzenia*), 6.63 (m, 2H, C⁴-H *Ph*), 6.97 (m, 2H, C^{2,6}-H *Ph*), 7.02 (m, 6H, C^{2,6}-H *Ph*, C⁵-H *L-Trp*), 7.11 (m, 4H, C⁶-H *L-Trp*), 7.22 (m, 4H, C²-H *L-Trp*), 7.37 (m, 4H, C⁷-H *L-Trp*), 7.65 (m, 4H, C⁴-H *L-Trp*).

¹³C NMR (500 MHz, MeOD): δ = 14.5 (2×C¹² *dDDA*), 23.1, 23.2, 23.7, 23.8, 24.6, 27.9, 28.0, 28.6 [γC, 2×C^{3,11} *dDDA*, 2×O-(CH₂)₂-CH₂-(CH₂)₂-NH], 28.9, 29.0 (βC *L-Trp*), 29.5-29.9, 30.0, 30.2, 30.4-30.8 [δC, 2×C², 2×C⁴-C¹⁰ *dDDA*, 2×O-CH₂-CH₂-CH₂-CH₂-CH₂-NH], 32.3, 33.1 (βC), 40.1 (εC *L-Lys*), 40.2 (2×O-CH₂-CH₂-NH), 40.6 [2×O-(CH₂)₄-CH₂-NH], 40.7 (εC *rdzenia*), 47.7 (2×C¹ *dDDA*), 51.5 (αC *rdzenia*), 54.4 (4×αC *L-Lys*), 55.2 (4×αC *L-*

Trp), 67.6 (2×O-CH₂-CH₂-NH), 69.2 [2×O-CH₂-(CH₂)₄-NH], 105.7, 106.0 (C⁴ Ph), 106.8, 106.9, 107.2, 107.5 (C^{2,6} Ph), 108.1 (C³ L-Trp), 112.6 (C⁷ L-Trp), 119.4 (C⁴ L-Trp), 120.2 (C⁵ L-Trp), 122.9 (C⁶ L-Trp), 125.6 (C² L-Trp), 128.4 (C^{3a} L-Trp), 137.2, 137.7 (C¹ Ph), 138.2 (C^{7a} L-Trp), 161.2, 161.8 (C^{3,5} Ph), 169.6, 169.7 (CONH Ph), 170.0, 170.1, 170.5, 173.7 (CONH).

[α]_D²⁵ = +25.2 (c 1, MeOH).

T. top.: 195-198°C.

f) Dendrymer 92 (otrzymany z dendrymeru 89)

Związek w postaci kremowego proszku otrzymano z wydajnością 97.6% (0.41 g) z 0.5 g (0.16 mmol) dendrymeru 89.

C₁₂₈H₁₈₄O₁₅N₂₄×8HCl, M = 2590.67 g/mol (masa monoizotopowa nieprotonowanego dendrymeru - 2297.4).

LRMS (ESI, MeOH): 1149.8 [M + 2H⁺]²⁺, 766.9 [M + 3H⁺]³⁺, 575.4 [M + 4H⁺]⁴⁺ - główny sygnał.

¹H NMR (500 MHz, MeOD): δ = 0.91 (m, 12H, 4×CH₃ *n*-Bu), 1.24-1.86 [br m, 58H, 5×β, γ, δCH₂ *L*-Lys i rdzenia, 2×O-CH₂-(CH₂)₃-CH₂-NH, 4×CH₂-2,3 *n*-Bu], 2.91 (t, *J* = 7.25 Hz, 2H, CH₂-Ar TA), 3.03 [m, 4H, 2×O-(CH₂)₄-CH₂-NH], 3.13 (m, 4H, 2×εCH₂ *L*-Lys), 3.19-3.40 (br m, 14H, 3×εCH₂ *L*-Lys i rdzenia, βCH₂ *B*-Trp), 3.42 (m, 1H, CH₂-NH TA), 3.53 (m, 3H, O-CH₂-CH₂-NH, CH₂-NH TA), 3.67 (m, 2H, O-CH₂-CH₂-NH), 3.81-3.98 [br m, 8H, 2×O-CH₂-(CH₂)₄-NH, 4×αCH *L*-Lys], 4.02-4.15 (br m, 16H, 4×αCH *B*-Trp, 2×O-CH₂-CH₂-NH, 4×CH₂-1 *n*-Bu), 4.48 (m, 1H, αCH rdzenia), 6.59, 6.65 (2m, 2H, C⁴-H Ph), 6.91-7.08 (br m, 11H, C^{2,6}-H Ph, C⁵-H *B*-Trp, C^{2,5,6}-H TA), 7.17 (m, 8H, C^{2,6}-H *B*-Trp), 7.34 (m, 5H, C⁷-H *B*-Trp, C⁷-H TA), 7.51 (d, *J* = 6.85 Hz, 1H, C⁴-H TA), 7.65 (m, 4H, C⁴-H *B*-Trp).

¹³C NMR (500 MHz, MeOD): δ = 14.1 (C⁴ *n*-Bu), 21.1 (C³ *n*-Bu), 23.1, 23.2, 24.6 [γC, 2×O-(CH₂)₂-CH₂-(CH₂)₂-NH], 26.3 (CH₂-Ar TA), 28.8, 28.9 (βC *B*-Trp), 29.5, 29.9, 30.0, 30.1 [δC, 2×O-CH₂-CH₂-CH₂-CH₂-CH₂-NH], 32.3, 33.5 (βC, C² *n*-Bu), 40.1 (εC *L*-Lys), 40.2 (2×O-CH₂-CH₂-NH), 40.6 [2×O-(CH₂)₄-CH₂-NH], 40.7 (εC rdzenia), 41.4 (CH₂-NH TA), 46.9 (C¹ *n*-Bu), 54.4 (4×αC *L*-Lys), 55.2 (4×αC *B*-Trp), 55.8 (αC rdzenia), 67.6, 67.7 (2×O-CH₂-CH₂-NH), 69.2 [2×O-CH₂-(CH₂)₄-NH], 105.7, 106.0 (C⁴ Ph), 106.8, 107.1, 107.5 (C^{2,6} Ph), 110.8 (C⁷ *B*-Trp), 112.3 (C⁷ TA), 113.0 (C³ TA), 119.3 (C⁴ TA), 119.6 (C⁴ *B*-Trp), 119.8 (C⁵ TA), 120.2 (C⁵ *B*-Trp), 122.3 (C⁶ TA), 122.9 (C⁶ *B*-Trp), 123.6 (C² TA), 128.7 (C^{3a} *B*-Trp), 129.0 (C² *B*-Trp), 138.0 (C^{7a} *B*-Trp), 138.1 (C^{7a} TA), 161.2, 161.8 (C^{3,5} Ph), 170.0, 170.1, 170.5 (CONH).

$[\alpha]_D^{25} = +18.0$ (c 1, MeOH).

T. top.: 182-184.5°C.

g) Dendrymer 93 (otrzymany z dendrymeru 90)

Związek w postaci jasnożółtego proszku otrzymano z wydajnością 89.8% (0.15 g) z 0.2 g (0.064 mmol) dendrymeru 90.

$C_{130}H_{199}O_{15}N_{23} \times 8HCl$, $M = 2615.80$ g/mol (masa monoizotopowa nieprotonowanego dendrymeru - 2322.6).

LRMS (ESI, MeOH): 1184.9 $[M + 2Na^+]^{2+}$, 775.4 $[M + 3H^+]^{3+}$, 581.7 $[M + 4H^+]^{4+}$ - *główny sygnał*.

1H NMR (500 MHz, MeOD): $\delta = 0.85-0.95$ (2m, 15H, CH_3 DDA, $4 \times CH_3$ *n-Bu*), 1.20-1.93 [br m, 78H, $5 \times \beta, \gamma, \delta CH_2$ *L-Lys* i rdzenia, $2 \times O-CH_2-(CH_2)_3-CH_2-NH$, $4 \times CH_2-2,3$ *n-Bu*, CH_2-2-11 DDA], 3.00-3.34 [br m, 24H, $5 \times \epsilon CH_2$ *L-Lys* i rdzenia, βCH_2 *B-Trp*, $2 \times O-(CH_2)_4-CH_2-NH$, CH_2-1 DDA], 3.56, 3.67 (2m, 4H, $2 \times O-CH_2-CH_2-NH$), 3.85 (m, 4H, $4 \times \alpha CH$ *L-Lys*), 3.95 [m, 4H, $2 \times O-CH_2-(CH_2)_4-NH$], 4.12 (m, 16H, $4 \times \alpha CH$ *B-Trp*, $2 \times O-CH_2-CH_2-NH$, $4 \times CH_2-1$ *n-Bu*), 4.50 (m, 1H, αCH rdzenia), 6.64 (m, 2H, C^4-H *Ph*), 6.98 (m, 2H, $C^{2,6}-H$ *Ph*), 7.04 (m, 6H, $C^{2,6}-H$ *Ph*, C^5-H *B-Trp*), 7.17 (m, 8H, $C^{2,6}-H$ *B-Trp*), 7.36 (m, 4H, C^7-H *B-Trp*), 7.65 (m, 4H, C^4-H *B-Trp*).

^{13}C NMR (500 MHz, MeOD): $\delta = 14.1$ (C^4 *n-Bu*), 14.5 (C^{12} DDA), 21.1 (C^3 *n-Bu*), 23.1, 23.2, 23.7, 24.6 [γC , C^{11} DDA, $2 \times O-(CH_2)_2-CH_2-(CH_2)_2-NH$], 28.0 (C^3 DDA), 28.8, 28.9 (βC *B-Trp*), 29.5, 29.9, 30.1, 30.4-30.8 [δC , C^2 , C^4-C^{10} DDA, $2 \times O-CH_2-CH_2-CH_2-CH_2-CH_2-NH$], 32.3, 32.9, 33.1, 33.5 (βC , C^2 *n-Bu*), 40.1 (ϵC *L-Lys*), 40.2 ($2 \times O-CH_2-CH_2-NH$), 40.6 [$2 \times O-(CH_2)_4-CH_2-NH$, C^1 DDA], 40.8 (ϵC rdzenia), 46.9 (CH_2-1 of *n-Bu*), 54.4 ($4 \times \alpha C$ *L-Lys*), 55.2 ($4 \times \alpha C$ *B-Trp*), 55.7 (αC rdzenia), 67.6 ($2 \times O-CH_2-CH_2-NH$), 69.2 [$2 \times O-CH_2-(CH_2)_4-NH$], 105.7, 106.0 (C^4 *Ph*), 106.8, 107.2, 107.5 ($C^{2,6}$ *Ph*), 110.8 (C^7 *B-Trp*), 119.8 (C^4 *B-Trp*), 120.2 (C^5 *B-Trp*), 122.9 (C^6 *B-Trp*), 129.0 (C^2 *B-Trp*), 137.8 (C^1 *Ph*), 138.0 (C^{7a} *B-Trp*), 161.2, 161.8 ($C^{3,5}$ *Ph*), 169.6 (CONH *Ph*), 170.0, 170.5, 174.4 (CONH).

$[\alpha]_D^{25} = +12.3$ (c 1, MeOH).

T. top.: 174-177°C.

h) Dendrymer 94 (otrzymany z dendrymeru 91)

Związek w postaci jasnożółtego proszku otrzymano z wydajnością 95.8% (0.34 g) z 0.42 g (0.127 mmol) dendrymeru 91.

$C_{142}H_{223}O_{15}N_{23} \times 8HCl$, $M = 2784.12$ g/mol (masa monoizotopowa nieprotonowanego dendrymeru - 2490.7).

LRMS (ESI, MeOH): 1246.4 $[M + 2H^+]^{2+}$, 831.2 $[M + 3H^+]^{3+}$ - *główny sygnał*, 623.7 $[M + 4H^+]^{4+}$.

1H NMR (500 MHz, MeOD): $\delta = 0.88$ (m, 6H, $2 \times CH_3$ *dDDA*), 0.93 (m, 12H, $4 \times CH_3$ *n-Bu*), 1.20-1.90 [br m, 98H, $5 \times \beta, \gamma, \delta CH_2$ *L-Lys i rdzenia*, $2 \times O-CH_2-(CH_2)_3-CH_2-NH$, $4 \times CH_2-2,3$ *n-Bu*, $2 \times CH_2-2-11$ *dDDA*], 3.00-3.49 [br m, 26H, $5 \times \epsilon CH_2$ *L-Lys i rdzenia*, βCH_2 *B-Trp*, $2 \times O-(CH_2)_4-CH_2-NH$, $2 \times CH_2-1$ *dDDA*], 3.56, 3.67 (2m, 4H, $2 \times O-CH_2-CH_2-NH$), 3.86 (m, 4H, $4 \times \alpha CH$ *L-Lys*), 3.94 [m, 4H, $2 \times O-CH_2-(CH_2)_4-NH$], 4.11 [m, 16H, $4 \times \alpha CH$ *B-Trp*, $2 \times O-CH_2-CH_2-NH$, $4 \times CH_2-1$ *n-Bu*], 4.97 (m, 1H, αCH *rdzenia*), 6.65 (m, 2H, C^4-H *Ph*), 6.95-7.08 (br m, 8H, $C^{2,6}-H$ *Ph*, C^5-H *B-Trp*), 7.17 (m, 8H, $C^{2,6}-H$ *B-Trp*), 7.36 (m, 4H, C^7-H *B-Trp*), 7.65 (m, 4H, C^4-H *B-Trp*).

^{13}C NMR (500 MHz, MeOD): $\delta = 14.2$ (C^4 *n-Bu*), 14.5 ($2 \times C^{12}$ *dDDA*), 21.2 (C^3 *n-Bu*), 23.1, 23.2, 23.7, 23.8, 24.6 [γC , $2 \times C^{11}$ *dDDA*, $2 \times O-(CH_2)_2-CH_2-(CH_2)_2-NH$], 27.9, 28.0 ($2 \times C^3$ *dDDA*), 28.6, 28.8 (βC *B-Trp*), 29.5, 30.0, 30.1, 30.2, 30.4, 30.5-30.8 [δC , $2 \times C^2$, $2 \times C^4-C^{10}$ *dDDA*, $2 \times O-CH_2-CH_2-CH_2-CH_2-CH_2-NH$], 32.3, 33.1, 33.6 (βC , C^2 *n-Bu*), 40.1 (ϵC *L-Lys*), 40.2 ($2 \times O-CH_2-CH_2-NH$), 40.6 [$2 \times O-(CH_2)_4-CH_2-NH$], 40.7 (ϵC *rdzenia*), 46.9 (C^1 *n-Bu*), 47.7 ($2 \times C^1$ *dDDA*), 51.4 (αC *rdzenia*), 54.4 ($4 \times \alpha C$ *L-Lys*), 55.2 ($4 \times \alpha C$ *B-Trp*), 67.7 ($2 \times O-CH_2-CH_2-NH$), 69.2 [$2 \times O-CH_2-(CH_2)_4-NH$], 105.8, 106.0 (C^4 *Ph*), 106.8, 107.2, 107.5 ($C^{2,6}$ *Ph*), 110.8 (C^7 *B-Trp*), 119.8 (C^4 *B-Trp*), 120.3 (C^5 *B-Trp*), 122.9 (C^6 *B-Trp*), 129.0 (C^2 *B-Trp*), 137.7 (C^1 *Ph*), 138.0 (C^{7a} *B-Trp*), 161.2, 161.8 ($C^{3,5}$ *Ph*), 169.5 (CONH *Ph*), 170.0, 170.5, 173.7 (CONH).

$[\alpha]_D^{25} = +8.9$ (c 1, MeOH).

T. top.: 175-178°C.

i) Dendrymer 101 (otrzymany z dendrymeru 99)

Związek w postaci kremowego proszku otrzymano z wydajnością 97.8% (0.27 g) z 0.35 g (0.097 mmol) dendrymeru 99.

$C_{132}H_{196}O_{15}N_{28} \times 12HCl$, $M = 2852.68$ g/mol (masa monoizotopowa nieprotonowanego dendrymeru - 2413.5).

LRMS (ESI, MeOH): 617.9 $[M + MeOH + 3H^+ + Na^+]^{4+}$, 604.4 $[M + 4H^+]^{4+}$ - *główny sygnał*; (MALDI): 2436.54 $[M + Na^+]$, 2414.57 $[M + H^+]$ - *główny sygnał*.

1H NMR (500 MHz, MeOD): $\delta = 1.24-1.89$ [br m, 66H, $5 \times \beta, \gamma, \delta CH_2$ *L-Lys i rdzenia*, $2 \times O-CH_2-(CH_2)_3-CH_2-NH$, $4 \times CH_2-2,3,4$ *5-AP*], 2.87 (m, 10H, CH_2-Ar *TA*, $4 \times CH_2-5$ *5-AP*), 2.99-

3.40 [br m, 22H, 5×εCH₂ *L-Lys i rdzenia*, βCH₂ *AP-Trp*, 2×O-(CH₂)₄-CH₂-NH], 3.40-3.76 (br m, 6H, 2×O-CH₂-CH₂-NH, CH₂-NH *TA*), 3.80-3.99 [br m, 8H, 2×O-CH₂-(CH₂)₄-NH, 4×αCH *L-Lys*], 4.02-4.20 (br m, 16H, 2×O-CH₂-CH₂-NH, 4×CH₂-1 *5-AP*, 4×αCH *AP-Trp*), 4.48 (m, 1H, αCH *rdzenia*), 6.62 (m, 2H, C⁴-H *Ph*), 6.92-7.07 (br m, 11H, C^{2,6}-H *Ph*, C⁵-H *AP-Trp*, C^{2,5,6}-H *TA*), 7.15 (m, 4H, C⁶-H *AP-Trp*), 7.24 (m, 4H, C²-H *AP-Trp*), 7.32 (d, *J* = 8.08 Hz, 1H, C⁷-H *TA*), 7.37 (m, 4H, C⁷-H *AP-Trp*), 7.51 (d, *J* = 7.84 Hz, 1H, C⁴-H *TA*), 7.65 (m, 4H, C⁴-H *AP-Trp*).

¹³C NMR (500 MHz, MeOD): δ = 23.3, 23.7, 24.6 [γC, 2×O-(CH₂)₂-CH₂-(CH₂)₂-NH], 24.8 (C³ *5-AP*), 26.3 (CH₂-Ar *TA*), 28.2 (δC), 28.9 (βC *AP-Trp*), 29.6, 29.9-30.9 [δC, C^{2,4} *5-AP*, 2×O-CH₂-CH₂-CH₂-CH₂-CH₂-NH], 32.4, 32.8 (βC), 40.1-40.6 [2×O-CH₂-CH₂-NH, 2×O-(CH₂)₄-CH₂-NH, εC, C⁵ *5-AP*], 41.5 (CH₂-NH *TA*), 46.8 (C¹ *5-AP*), 54.4 (4×αC *L-Lys*), 55.3 (4×αC *AP-Trp*), 55.8 (αC *rdzenia*), 67.6 (2×O-CH₂-CH₂-NH), 69.3 [2×O-CH₂-(CH₂)₄-NH], 105.7, 106.0 (C⁴ *Ph*), 106.9, 107.2, 107.53, 107.8 (C^{2,6} *Ph*), 110.8 (C⁷ *AP-Trp*), 112.3 (C⁷ *TA*), 113.1 (C³ *TA*), 119.3 (C⁴ *TA*), 119.6 (C⁵ *TA*), 119.9 (C⁴ *AP-Trp*), 120.3 (C⁵ *AP-Trp*), 122.3 (C⁶ *TA*), 122.9 (C⁶ *AP-Trp*), 123.6 (C² *TA*), 128.7 (C^{3a} *AP-Trp*, C^{3a} *TA*), 129.1 (C² *AP-Trp*), 137.3, 137.8 (C¹ *Ph*), 137.9 (C^{7a} *AP-Trp*), 138.1 (C^{7a} *TA*), 161.2, 161.8 (C^{3,5} *Ph*), 169.7 (CONH *Ph*), 170.2, 170.7, 174.4 (CONH).

[α]_D²⁵ = +6.3 (c 1, MeOH).

T. top.: 189-192°C.

j) Dendrymer 102 (otrzymany z dendrymeru 100)

Związek w postaci jasnożółtego proszku otrzymano z wydajnością 89.5% (0.17 g) z 0.24 g (0.066 mmol) dendrymeru **100**.

C₁₃₄H₂₁₁O₁₅N₂₇×12HCl, M = 2877.81 g/mol (masa monoizotopowa nieprotonowanego dendrymeru - 2438.7).

LRMS (ESI, MeOH): 610.7 [M + 4H⁺]⁴⁺.

¹H NMR (500 MHz, MeOD): δ = 0.88 (br t, 3H, CH₃ *DDA*), 1.20-1.93 (br m, 86H, 5×γ, δ, βCH₂ *L-Lys i rdzenia*, CH₂-2-11 *DDA*, 2×O-CH₂-(CH₂)₃-CH₂-NH, 4×CH₂-2,3,4 *5-AP*), 2.89 (br t, 8H, 4×CH₂-5 *5-AP*), 2.90-3.40 [br m, 24H, 5×εCH₂ *L-Lys i rdzenia*, βCH₂ *AP-Trp*, 2×O-(CH₂)₄-CH₂-NH, CH₂-1 *DDA*], 3.58, 3.66 (2m, 4H, 2×O-CH₂-CH₂-NH), 3.87 (m, 4H, 4×αCH *L-Lys*), 3.97 [m, 4H, 2×O-CH₂-(CH₂)₄-NH], 4.07-4.22 (br m, 16H, 2×O-CH₂-CH₂-NH, 4×CH₂-1 *5-AP*, 4×αCH *AP-Trp*), 4.50 (m, 1H, αCH *rdzenia*), 6.65 (m, 2H, C⁴-H *Ph*), 6.98 (m, 2H, C^{2,6}-H *Ph*), 7.05 (m, 6H, C^{2,6}-H *Ph*, C⁵-H *AP-Trp*), 7.16 (m, 4H, C⁶-H *AP-Trp*), 7.25 (m, 4H, C²-H *AP-Trp*), 7.39 (m, 4H, C⁷-H *AP-Trp*), 7.66 (m, 4H, C⁴-H *AP-Trp*).

¹³C NMR (500 MHz, MeOD): δ = 14.5 (C¹² DDA), 23.1, 23.3, 23.7, 24.6 [γ C, 2 \times O-(CH₂)₂-CH₂-(CH₂)₂-NH, C¹¹ DDA], 24.9 (C³ 5-AP), 28.0 (C³ DDA), 28.2 (δ C), 28.8 (β C AP-Trp), 29.5, 30.1-30.9 [δ C, C^{2,4} 5-AP, 2 \times O-CH₂-CH₂-CH₂-CH₂-NH, C², C⁴-C¹⁰ DDA], 32.3, 33.1 (β C), 40.1-40.6 [2 \times O-CH₂-CH₂-NH, 2 \times O-(CH₂)₄-CH₂-NH, ϵ C, C⁵ 5-AP, C¹ DDA], 46.8 (C¹ 5-AP), 54.4 (4 \times α C L-Lys), 55.3 (4 \times α C AP-Trp), 55.8 (α C rdzenia), 67.7 (2 \times O-CH₂-CH₂-NH), 69.3 [2 \times O-CH₂-(CH₂)₄-NH], 105.7, 106.0 (C⁴ Ph), 106.8, 107.1, 107.5, 107.7 (C^{2,6} Ph), 110.8 (C⁷ AP-Trp), 119.8 (C⁴ AP-Trp), 120.3 (C⁵ AP-Trp), 122.9 (C⁶ AP-Trp), 129.1 (C² AP-Trp), 137.9 (C^{7a} AP-Trp), 161.2, 161.8 (C^{3,5} Ph), 170.0, 170.5 (CONH).

[α]_D²⁵ = +6.6 (c 1, MeOH).

T. top.: 184-187°C.

6.5.3. Synteza dendrymerów z terminalnymi resztami PABA

Dendrymery sfunkcjonalizowane na *N*-końcu resztami PABA zostały zsyntetyzowane w wyniku reakcji sprzęgania dendrymerów pośrednich **63** – **66** (Rozdział 6.5.1.2.2.) z kwasem 4-(Boc-amino)benzoesowym (**114**, Rozdział 6.3.3.).

6.5.3.1. Boc-zabezpieczone dendrymery

Wykorzystując procedurę ogólną sprzęgania metodą EDC/HOBt (Procedura B, Rozdział 6.2.) zsyntetyzowano 4 dendrymery sfunkcjonalizowane na *N* – końcu resztami PABA. Reakcje sprzęgania prowadzono z 3.6-krotnym nadmiarem Et₃N przez 48 godzin. Czyste dendrymery **103** – **106** uzyskano w wyniku sączenia molekularnego z użyciem kolumny z wypełnieniem Sephadex LH-20 z MeOH jako eluentem, a następnie doczyszczania na kolumnie silikażelowej z użyciem fazy CHCl₃/MeOH 8:1 (dla dendrymeru **106** gradient: 50:1→10:1). Produkty otrzymano w postaci białych, kremowych lub jasnożółtych proszków.

a) Dendrymer 103 (otrzymany z dendrymeru pośredniego 63)

Do reakcji użyto związku **114** (0.247 g, 1.04 mmol), HOBt (0.159 g, 1.04 mmol), EDC·HCl (0.2 g, 1.04 mmol), dendrymeru pośredniego **63** (0.4 g, 0.237 mmol), Et₃N (0.26 mL, 1.9 mmol) i DMF (10 mL). Otrzymano produkt w postaci kremowego proszku z wydajnością 60% (0.36 g).

C₁₃₄H₁₉₅O₃₁N₁₉, M = 2568.09 g/mol (masa monoizotopowa 2566.4).

LRMS (ESI, MeOH): 2589.8 [M + Na⁺], 1306.3 [M + 2Na⁺]²⁺ - główny sygnał, 1295.3 [M + H⁺ + Na⁺]²⁺, 1311.3 [M + MeOH + H⁺ + Na⁺]²⁺.

¹H NMR (500 MHz, MeOD): $\delta = 1.33-1.51$ [br m, 16H, $5 \times \gamma\text{CH}_2$ *L-Lys* i *rdzenia*, δCH_2 *rdzenia*, $2 \times \text{O}-(\text{CH}_2)_2-\text{CH}_2-(\text{CH}_2)_2-\text{NH}$] nakładający się na 1.38, 1.40 [2s, 36H, $4 \times \text{C}(\text{CH}_3)_3$ *L-Lys*] i 1.50 [2s, 36H, $4 \times \text{C}(\text{CH}_3)_3$ *PABA*], 1.61 [m, 16H, $4 \times \delta\text{CH}_2$ *L-Lys*, $2 \times \beta\text{-CH}_2$, $2 \times \text{O}-(\text{CH}_2)_3-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{NH}$], 1.72 [br m, 10H, $3 \times \beta\text{-CH}_2$, $2 \times \text{O}-\text{CH}_2-\text{CH}_2-(\text{CH}_2)_3-\text{NH}$], 2.75 (t, $J = 7.16$ Hz, 2H, $\text{CH}_2\text{-Ar}$ *PEA*), 3.09-3.25 [2m, 6H, εCH_2 *rdzenia*, $2 \times \text{O}-(\text{CH}_2)_4-\text{CH}_2-\text{NH}$], 3.34 (m, 9H, $\text{CH}_2\text{-NH}$ *PEA*, $4 \times \varepsilon\text{CH}_2$ *L-Lys*), 3.48 (m, 3H, $\text{O}-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{NH}$, $\text{CH}_2\text{-NH}$ *PEA*), 3.60 (m, 2H, $\text{O}-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{NH}$), 3.91 [m, 4H, $2 \times \text{O}-\text{CH}_2-(\text{CH}_2)_4-\text{NH}$], 4.02 (m, 8H, $2 \times \text{O}-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{NH}$, $4 \times \alpha\text{CH}$ *L-Lys*), 4.47 (m, 1H, αCH *rdzenia*), 6.60 (m, 2H, $\text{C}^4\text{-H}$ *Ph*), 6.92, 6.99 (2m, 4H, $\text{C}^{2,6}\text{-H}$ *Ph*), 7.10-7.23 (br m, 5H, $\text{C}^{2,3,4,5,6}\text{-H}$ *PEA*), 7.48 (m, 8H, $\text{C}^{3,5}\text{-H}$ *PABA*), 7.73 (m, 8H, $\text{C}^{2,6}\text{-H}$ *PABA*).

¹³C NMR (500 MHz, MeOD): $\delta = 24.3$ (γC), 24.4 [$2 \times \text{O}-(\text{CH}_2)_2-\text{CH}_2-(\text{CH}_2)_2-\text{NH}$], 24.5 (γC), 28.7 [$\text{C}(\text{CH}_3)_3$ *PABA*], 28.8 [$\text{C}(\text{CH}_3)_3$ *L-Lys*], 29.9 [$2 \times \text{O}-\text{CH}_2-\text{CH}_2-(\text{CH}_2)_3-\text{NH}$], 30.1, 30.2 [δC , $2 \times \text{O}-(\text{CH}_2)_3-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{NH}$], 32.8, 33.2 (βC), 36.5 ($\text{CH}_2\text{-Ar}$ *PEA*), 40.0 ($2 \times \text{O}-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{NH}$), 40.2 [$2 \times \text{O}-(\text{CH}_2)_4-\text{CH}_2-\text{NH}$] 40.5, 40.6 (εC), 42.0 ($\text{CH}_2\text{-NH}$ *PEA*), 55.6 (αC *rdzenia*), 56.1, 56.2 ($4 \times \alpha\text{C}$ *L-Lys*), 67.7 ($2 \times \text{O}-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{NH}$), 69.2 [$2 \times \text{O}-\text{CH}_2-(\text{CH}_2)_4-\text{NH}$], 80.6 [$\text{C}(\text{CH}_3)_3$ *L-Lys*], 81.2 [$\text{C}(\text{CH}_3)_3$ *PABA*], 105.8, 106.1 (C^4 *Ph*), 106.7, 107.0, 107.2, 107.5 ($\text{C}^{2,6}$ *Ph*), 118.8 ($\text{C}^{3,5}$ *PABA*), 127.4 (C^4 *PEA*), 129.2 ($\text{C}^{2,6}$ *PABA*), 129.3 (C^1 *PABA*), 129.5, 129.9 ($\text{C}^{2,3,5,6}$ *PEA*), 137.2, 137.8 (C^1 *Ph*), 140.4 (C^1 *PEA*), 144.0 (C^4 *PABA*), 154.8 [$\text{C}=\text{O}$ (*Boc*) *PABA*], 157.8 [$\text{C}=\text{O}$ (*Boc*) *L-Lys*], 161.2, 161.7 ($\text{C}^{3,5}$ *Ph*), 169.6, 169.7 (CONH *Ph*), 169.8 (CONH *PABA*), 174.4, 175.1, 175.5 (CONH).

$[\alpha]_{\text{D}}^{25} = -12.7$ (c 1, MeOH).

$R_f = 0.38$ ($\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$ 8:1).

T. top.: 144-150°C.

b) Dendrymer 104 (otrzymany z dendrymeru pośredniego 64)

Do reakcji użyto związku **114** (0.218 g, 0.92 mmol), HOBt (0.141 g, 0.92 mmol), EDC·HCl (0.176 g, 0.92 mmol), dendrymeru pośredniego **64** (0.35 g, 0.21 mmol), Et_3N (0.23 mL, 1.68 mmol) i DMF (10 mL). Otrzymano produkt w postaci jasnożółtego proszku z wydajnością 39.2% (0.21 g).

$\text{C}_{130}\text{H}_{184}\text{O}_{31}\text{N}_{20}$, $M = 2522.97$ g/mol (masa monoizotopowa 2521.3).

LRMS (ESI, MeOH): 2545.8 [$M + \text{Na}^+$], 1284.0 [$M + 2\text{Na}^+$]²⁺ - główny sygnał.

¹H NMR (500 MHz, MeOD): $\delta = 1.34-1.43$ (m, 10H, $5 \times \gamma\text{CH}_2$ *L-Lys* i *rdzenia*) nakładający się na 1.38 [s, 36H, $4 \times \text{C}(\text{CH}_3)_3$ *L-Lys*], 1.53-1.66 (br m, 14H, $5 \times \delta\text{CH}_2$ *L-Lys* i *rdzenia*, $2 \times \beta\text{CH}_2$ *L-Lys*) nakładający się na 1.50 [s, 36H, $4 \times \text{C}(\text{CH}_3)_3$ *PABA*], 1.68-1.86 (br m, 6H,

$3 \times \beta\text{CH}_2$ *L*-Lys i rdzenia), 2.91 (t, $J = 7.1$ Hz, 2H, $\text{CH}_2\text{-Ar TA}$), 3.24 (m, 10H, $5 \times \epsilon\text{CH}_2$ *L*-Lys i rdzenia), 3.38-3.63 (br m, 10H, $4 \times \text{O-CH}_2\text{-CH}_2\text{-NH}$, $\text{CH}_2\text{-NH TA}$), 4.00 (br m, 12H, $4 \times \text{O-CH}_2\text{-CH}_2\text{-NH}$, $4 \times \alpha\text{CH L-Lys}$), 4.48 (m, 1H, $\alpha\text{CH rdzenia}$), 6.61 (m, 2H, $\text{C}^4\text{-H Ph}$), 6.91-7.06 (br m, 7H, $\text{C}^{2,6}\text{-H Ph}$, $\text{C}^{2,5,6}\text{-H TA}$), 7.29 (d, $J = 8.1$ Hz, 1H, $\text{C}^7\text{-H TA}$), 7.46 (dd, $J = 8.8, 2.4$ Hz, 8H, $\text{C}^{3,5}\text{-H PABA}$), 7.51 (d, $J = 7.9$ Hz, 1H, $\text{C}^4\text{-H TA}$), 7.72 (dd, $J = 8.8, 2.4$ Hz, 8H, $\text{C}^{2,6}\text{-H PABA}$).

$^{13}\text{C NMR}$ (500 MHz, MeOD): $\delta = 24.2$ (γC), 26.2 ($\text{CH}_2\text{-Ar TA}$), 28.7 [$\text{C}(\text{CH}_3)_3$ PABA], 28.8 [$\text{C}(\text{CH}_3)_3$ *L*-Lys], 30.1, 30.2 (δC), 32.9, 33.2 (βC), 39.9 ($4 \times \text{O-CH}_2\text{-CH}_2\text{-NH}$), 40.5, 40.6 (ϵC), 41.4 ($\text{CH}_2\text{-NH TA}$), 55.6 ($\alpha\text{C rdzenia}$), 56.1 ($4 \times \alpha\text{C L-Lys}$), 67.7 ($4 \times \text{O-CH}_2\text{-CH}_2\text{-NH}$), 80.6 [$\text{C}(\text{CH}_3)_3$ *L*-Lys], 81.2 [$\text{C}(\text{CH}_3)_3$ PABA], 105.8, 106.1 (C^4 Ph), 107.2, 107.5 ($\text{C}^{2,6}$ Ph), 112.3 (C^7 TA), 113.4 (C^3 TA), 118.8 ($\text{C}^{3,5}$ PABA), 119.3 (C^4 TA), 119.7 (C^5 TA), 122.3 (C^6 TA), 123.6 (C^2 TA), 128.7 (C^{3a} TA), 129.2 ($\text{C}^{2,6}$ PABA), 129.3 (C^1 PABA), 137.3, 137.9 (C^1 Ph), 138.1 (C^{7a} TA), 144.0 (C^4 PABA), 154.8 [$\text{C}=\text{O}$ (Boc) PABA], 157.8 [$\text{C}=\text{O}$ (Boc) *L*-Lys], 161.2 ($\text{C}^{3,5}$ Ph), 169.7 (CONH Ph), 174.3, 175.5 (CONH).

$[\alpha]_{\text{D}}^{25} = -14.7$ (c 1, MeOH).

$R_f = 0.38$ ($\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$ 8:1).

T. top.: 150-160°C.

c) Dendrymer 105 (otrzymany z dendrymeru pośredniego 65)

Do reakcji użyto związku **114** (0.24 g, 1.01 mmol), HOBt (0.155 g, 1.01 mmol), EDC·HCl (0.194 g, 1.01 mmol), dendrymeru pośredniego **65** (0.4 g, 0.23 mmol), Et_3N (0.26 mL, 1.84 mmol) i DMF (10 mL). Otrzymano produkt w postaci jasnożółtego proszku z wydajnością 50% (0.3 g).

$\text{C}_{136}\text{H}_{196}\text{O}_{31}\text{N}_{20}$, $M = 2607.13$ g/mol (masa monoizotopowa 2605.4).

LRMS (ESI, MeOH): 2628.5 [$\text{M} + \text{Na}^+$], 1325.8 [$\text{M} + 2\text{Na}^+$] $^{2+}$ - główny sygnał.

$^1\text{H NMR}$ (500 MHz, MeOD): $\delta = 1.33\text{-}1.51$ [br m, 16H, $5 \times \gamma\text{CH}_2$ *L*-Lys i rdzenia, δCH_2 rdzenia, $2 \times \text{O-(CH}_2)_2\text{-CH}_2\text{-(CH}_2)_2\text{-NH}$] nakładający się na 1.38, 1.39 [2s, 36H, $4 \times \text{C}(\text{CH}_3)_3$ *L*-Lys] i 1.50 [2s, 36H, $4 \times \text{C}(\text{CH}_3)_3$ PABA], 1.54-1.87 [br m, 26H, $4 \times \delta\text{CH}_2$ *L*-Lys, $5 \times \beta\text{CH}_2$ *L*-Lys i rdzenia, $2 \times \text{O-CH}_2\text{-CH}_2\text{-CH}_2\text{-CH}_2\text{-NH}$], 2.91 (t, $J = 7.1$ Hz, 2H, $\text{CH}_2\text{-Ar TA}$), 3.09-3.24 [2m, 4H, $2 \times \text{O-(CH}_2)_4\text{-CH}_2\text{-NH}$], 3.31 (m, 10H, $5 \times \epsilon\text{CH}_2$ *L*-Lys i rdzenia), 3.39-3.64 (2br m, 6H, $2 \times \text{O-CH}_2\text{-CH}_2\text{-NH}$, $\text{CH}_2\text{-NH TA}$), 3.88 [m, 4H, $2 \times \text{O-CH}_2\text{-(CH}_2)_4\text{-NH}$], 4.00 (br m, 8H, $2 \times \text{O-CH}_2\text{-CH}_2\text{-NH}$, $4 \times \alpha\text{CH L-Lys}$), 4.49 (m, 1H, $\alpha\text{CH rdzenia}$), 6.57 (m, 2H, C^4 Ph), 6.88-7.07 (br m, 7H, $\text{C}^{2,6}$ Ph, $\text{C}^{2,5,6}\text{-H TA}$), 7.29 (d, $J = 8.1$ Hz, 1H, $\text{C}^7\text{-H TA}$), 7.48 (m, 8H, $\text{C}^{3,5}\text{-H PABA}$), 7.51 (d, $J = 8.0$ Hz, 1H, $\text{C}^4\text{-H TA}$), 7.72 (m, 8H, $\text{C}^{2,6}\text{-H PABA}$).

^{13}C NMR (500 MHz, MeOD): δ = 24.2, 24.3 (γC), 24.4 [$2\times\text{O}-(\text{CH}_2)_2-\text{CH}_2-(\text{CH}_2)_2-\text{NH}$], 26.2 (CH_2-Ar TA), 28.7 [$\text{C}(\text{CH}_3)_3$ PABA], 28.8, 29.0 [$\text{C}(\text{CH}_3)_3$ L-Lys], 29.9 [$2\times\text{O}-\text{CH}_2-\text{CH}_2-(\text{CH}_2)_3-\text{NH}$], 30.1, 30.2 [$2\times\text{O}-(\text{CH}_2)_3-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{NH}$, δC], 32.9, 33.2 (βC), 40.0 ($2\times\text{O}-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{NH}$), 40.2 [$2\times\text{O}-(\text{CH}_2)_4-\text{CH}_2-\text{NH}$], 40.5, 40.7 (ϵC), 41.4 (CH_2-NH TA), 55.6 (αC rdzenia), 56.1, 56.2 ($4\times\alpha\text{C}$ L-Lys), 67.7 ($2\times\text{O}-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{NH}$), 69.2 [$2\times\text{O}-\text{CH}_2-(\text{CH}_2)_4-\text{NH}$], 80.6 [$\text{C}(\text{CH}_3)_3$ L-Lys], 81.2 [$\text{C}(\text{CH}_3)_3$ PABA], 105.8, 106.1 (C^4 Ph), 106.7, 107.0, 107.2, 107.4 ($\text{C}^{2,6}$ Ph), 112.3 (C^7 TA), 113.1 (C^3 TA), 118.8 ($\text{C}^{3,5}$ PABA), 119.3 (C^4 TA), 119.7 (C^5 TA), 122.3 (C^6 TA), 123.6 (C^2 TA), 128.7 (C^{3a} TA), 129.2 ($\text{C}^{2,6}$ PABA), 129.3 (C^1 PABA), 137.8 (C^1 Ph), 138.1 (C^{7a} TA), 144.0 (C^4 PABA), 154.8 [$\text{C}=\text{O}$ (Boc) PABA], 157.8 [$\text{C}=\text{O}$ (Boc) L-Lys], 161.2, 161.7 ($\text{C}^{3,5}$ Ph), 169.7 (CONH Ph), 169.8 (CONH PABA), 174.3, 175.1, 175.5 (CONH).

$[\alpha]_{\text{D}}^{25} = -9.9$ (c 1, MeOH).

$R_f = 0.44$ ($\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$ 8:1).

T. top.: 149-155°C.

d) Dendrymer 106 (otrzymany z dendrymeru pośredniego 66)

Do reakcji użyto związku **114** (0.427 g, 1.8 mmol), HOBt (0.276 g, 1.8 mmol), EDC·HCl (0.345 g, 1.8 mmol), dendrymeru pośredniego **66** (0.69 g, 0.41 mmol), Et_3N (0.45 mL, 3.28 mmol) i DMF (15 mL). Otrzymano produkt w postaci białego proszku z wydajnością 39.1% (0.41 g).

$\text{C}_{132}\text{H}_{199}\text{O}_{31}\text{N}_{19}$, $M = 2548.10$ g/mol (masa monoizotopowa 2546.5).

LRMS (ESI, MeOH): 2569.6 [$M + \text{Na}^+$], 1296.3 [$M + 2\text{Na}^+$] $^{2+}$ - główny sygnał.

^1H NMR (500 MHz, DMSO): δ = 0.83 (br t, 3H, CH_3 DDA), 1.18-1.50 (br m, 44H, $5\times\gamma$, δCH_2 L-Lys i rdzenia, $2\times\beta\text{CH}_2$, CH_2-2-11 DDA) nakładający się na 1.35 [s, 36H, $4\times\text{C}(\text{CH}_3)_3$ L-Lys] i 1.48 [s, 36H, $4\times\text{C}(\text{CH}_3)_3$ PABA], 1.55-1.78 (br m, 6H, $3\times\beta\text{CH}_2$), 2.56-3.09 (m, 2H, ϵCH_2), 3.19 (m, 10H, $4\times\epsilon\text{CH}_2$, CH_2-1 DDA), 3.30-3.48 (br m, 8H, $4\times\text{O}-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{NH}$), 3.89 (m, 4H, $4\times\alpha\text{CH}$ L-Lys), 4.00 (m, 8H, $4\times\text{O}-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{NH}$), 4.37 (m, 1H, αCH rdzenia), 6.62 (m, 2H, C^4-H Ph), 6.77 (m, 4H, $4\times\alpha\text{CH}-\text{NH}$ L-Lys), 7.00, 7.07 (2m, 4H, $\text{C}^{2,6}-\text{H}$ Ph), 7.50 (d, $J = 8.7$ Hz, 8H, $\text{C}^{3,5}-\text{H}$ PABA), 7.74 (d, $J = 8.7$ Hz, 8H, $\text{C}^{2,6}-\text{H}$ PABA), 7.86 (m, 1H, $\epsilon\text{CH}_2-\text{NH}$ rdzenia), 7.98 (m, 4H, $4\times\text{O}-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{NH}$), 8.24 (m, 4H, $4\times\epsilon\text{CH}_2-\text{NH}$ L-Lys), 8.36 (2m, 2H, NHCH_2-1 DDA, $\alpha\text{CH}-\text{NH}$ rdzenia), 9.55 (br s, 4H, $4\times\text{C}^4-\text{NH}$ PABA).

^{13}C NMR (500 MHz, DMSO): δ = 13.9 (C^{12} DDA), 22.0, 23.0, 23.3 (γC , C^{11} DDA), 26.2 (C^3 DDA), 28.0, 28.1 [$\text{C}(\text{CH}_3)_3$], 28.6, 28.9-29.0 (δC , C^2 , C^4-C^9 DDA), 31.2, 31.5, 31.7 (βC , C^{10} DDA), 38.1 ($4\times\text{O}-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{NH}$), 38.4, 39.2 (ϵC , C^1 DDA), 53.5 (αC rdzenia), 54.3 ($4\times\alpha\text{C}$ L-

Lys), 66.4, 66.5 (4×O-CH₂-CH₂-NH), 77.9 [C(CH₃)₃ *L-Lys*], 79.2, 79.3 [C(CH₃)₃ *PABA*], 103.7, 104.0 (C⁴ *Ph*), 105.9, 106.3 (C^{2,6} *Ph*), 117.0, 117.3 (C^{3,5} *PABA*), 127.8 (C^{2,6} *PABA*), 128.0 (C¹ *PABA*), 136.2, 136.7 (C¹ *Ph*), 142.0 (C⁴ *PABA*), 152.5, 152.6 [C=O (Boc) *PABA*], 155.3 [C=O (Boc) *L-Lys*], 159.3 (C^{3,5} *Ph*), 165.3, 165.6 (CONH *Ph*), 171.4, 172.5 (CONH).

$[\alpha]_D^{25} = -12.0$ (c 1, MeOH).

$R_f = 0.77$ (CHCl₃/MeOH 8:1).

T. top.: 142-149°C.

6.5.3.2. Odbezpieczone dendrymery

Deprotekcję grup Boc w dendrymerach **103** – **106** za pomocą nasyconego roztworu HCl w AcOEt przeprowadzono wg procedury ogólnej zamieszczonej w Rozdziale 6.2. (Procedura C - wariant B). Reakcji poddawano 0.15 - 0.32 g (0.059 – 0.126 mmol) związku rozpuszczonego w 1 mL MeOH z 5 - 10 mL nas. HCl/AcOEt. Całkowite zdjęcie grup Boc obserwowano w ciągu 1 godziny. Odbezpieczone dendrymery **107** – **110** występują w postaci heptachlorowodorków.

a) Dendrymer **107** (otrzymany z dendrymeru **103**)

Wychodząc z 0.26 g (0.101 mmol) dendrymeru **103** otrzymano produkt w postaci jasnożółtego proszku z wydajnością 91.3% (0.19 g).

C₉₄H₁₃₁O₁₅N₁₉×8HCl, M = 2058.85 g/mol (masa monoizotopowa nieprotonowanego dendrymeru - 1766.0).

LRMS (ESI, MeOH): 884.1 [M + 2H⁺]²⁺, 589.7 [M + 3H⁺]³⁺ - główny sygnał.

¹H NMR (500 MHz, MeOD): δ = 1.47 [br m, 16H, 5×γCH₂ *L-Lys* i rdzenia, δCH₂ rdzenia, 2×O-(CH₂)₂-CH₂-(CH₂)₂-NH], 1.54-1.78 [br m, 16H, 4×δCH₂ *L-Lys*, 2×O-CH₂-CH₂-CH₂-CH₂-NH], 1.80-1.97 (br m, 10H, 5×βCH₂ *L-Lys* i rdzenia), 2.76 (t, J = 7.2 Hz, 2H, CH₂-Ar *PEA*), 3.21 [br m, 4H, 2×O-(CH₂)₄-CH₂-NH], 3.34 (m, 5H, CH₂-NH *PEA*, 2×εCH₂), 3.39 (t, J = 6.9 Hz, 6H, 3×εCH₂), 3.46 (m, 1H, CH₂-NH *PEA*), 3.54, 3.69 (2m, 4H, 2×O-CH₂-CH₂-NH), 3.85-4.00 [br m, 8H, 4×αCH *L-Lys*, 2×O-CH₂-(CH₂)₄-NH], 4.09 (m, 4H, 2×O-CH₂-CH₂-NH), 4.45 (m, 1H, αCH rdzenia), 6.64 (m, 2H, C⁴-H *Ph*), 6.96, 7.02 (2m, 4H, C^{2,6}-H *Ph*), 7.09-7.23 (br m, 5H, C^{2,3,4,5,6}-H *PEA*), 7.50 (m, 8H, C^{3,5}-H *PABA*), 7.99 (m, 8H, C^{2,6}-H *PABA*).

¹³C NMR (500 MHz, MeOD): δ = 23.2, 23.4, 24.6 [γC, 2×O-(CH₂)₂-CH₂-(CH₂)₂-NH], 29.9-30.0, 30.1 [δC, 2×O-CH₂-CH₂-CH₂-CH₂-CH₂-NH], 32.3, 32.4, 32.8 (βC), 36.5 (CH₂-Ar *PEA*), 40.2 (2×O-CH₂-CH₂-NH), 40.5 [εC, 2×O-(CH₂)₄-CH₂-NH], 40.7 (εC), 42.0 (CH₂-NH

PEA), 54.5 (4× α C *L*-Lys), 55.8 (α C *rdzenia*), 67.6, 67.7 (2×O-CH₂-CH₂-NH), 69.3 [2×O-CH₂-(CH₂)₄-NH], 105.8, 106.2 (C⁴ *Ph*), 106.8, 107.0, 107.3, 107.7 (C^{2,6} *Ph*), 124.4 (C^{3,5} PABA), 127.4 (C⁴ PEA), 129.5, 129.9 (C^{2,3,5,6} PEA), 130.4 (C^{2,6} PABA), 135.0 (C¹ PABA), 136.3 (C⁴ PABA), 137.2, 137.8 (C¹ *Ph*), 140.4 (C¹ PEA), 161.2, 161.8 (C^{3,5} *Ph*), 168.4-168.5 (CONH PABA), 169.8 (CONH *Ph*), 170.0, 170.5, 174.5 (CONH).

$[\alpha]_D^{25} = -1.9$ (c 1, MeOH).

T. top.: 175-191°C.

b) Dendrymer 108 (otrzymany z dendrymeru 104)

Wychodząc z 0.15 g (0.059 mmol) dendrymeru **104** otrzymano produkt w postaci jasnoszarego proszku z wydajnością 91.7% (0.11 g).

C₉₀H₁₂₀O₁₅N₂₀×8HCl, M = 2013.73 g/mol (masa monoizotopowa nieprotonowanego dendrymeru - 1720.9).

LRMS (ESI, MeOH): 1721.8 [M + H⁺], 888.4 [M + MeOH + H⁺ + Na⁺]²⁺, 861.4 [M + 2H⁺]²⁺ - *główny sygnał*, 592.6 [M + MeOH + 2H⁺ + Na⁺]³⁺, 574.6 [M + 3H⁺]³⁺.

¹H NMR (500 MHz, MeOD): $\delta = 1.45$ (m, 10H, 5× γ CH₂ *L*-Lys i *rdzenia*), 1.62 (m, 10H, 5× δ CH₂ *L*-Lys i *rdzenia*), 1.71-1.96 (br m, 10H, 5× β CH₂ *L*-Lys i *rdzenia*), 2.92 (m, 2H, CH₂-Ar TA), 3.34 (m, 8H, 4× ϵ CH₂ *L*-Lys), 3.44 (m, 3H, ϵ CH₂ *rdzenia*, CH₂-NH TA), 3.52 (m, 5H, 2×O-CH₂-CH₂-NH, CH₂-NH TA), 3.68 (m, 4H, 2×O-CH₂-CH₂-NH), 3.92 (m, 4H, 4× α CH *L*-Lys), 4.08 (br m, 8H, 4×O-CH₂-CH₂-NH), 4.45 (m, 1H, α CH *rdzenia*), 6.67 (2m, 2H, C⁴-H *Ph*), 6.97-7.07 (br m, 7H, C^{2,6}-H *Ph*, C^{2,5,6}-H TA), 7.31 (d, $J = 8.04$ Hz, 1H, C⁷-H TA), 7.48 (m, 9H, C⁴-H TA, C^{3,5}-H PABA), 7.98 (m, 8H, C^{2,6}-H PABA).

¹³C NMR (500 MHz, MeOD): $\delta = 23.2, 24.6$ (γ C), 26.2 (CH₂-Ar TA), 30.0, 30.1 (δ C), 32.3, 32.8 (β C), 40.2 (4×O-CH₂-CH₂-NH), 40.5, 40.7 (ϵ C), 41.4 (CH₂-NH TA), 54.5 (4× α C *L*-Lys), 55.9 (α C *rdzenia*), 67.6, 67.7 (4×O-CH₂-CH₂-NH), 105.9, 106.3 (C⁴ *Ph*), 107.3, 107.6 (C^{2,6} *Ph*), 112.3 (C⁷ TA), 113.1 (C³ TA), 119.3 (C⁴ TA), 119.6 (C⁵ TA), 122.3 (C⁶ TA), 123.6 (C² TA), 124.3, 124.4 (C^{3,5} PABA), 128.7 (C^{3a} TA), 130.4 (C^{2,6} PABA), 135.0 (C¹ PABA), 136.3 (C⁴ PABA), 137.4 (C¹ *Ph*), 138.1 (C^{7a} TA), 161.2, 161.3 (C^{3,5} *Ph*), 168.5 (CONH PABA), 169.6 (CONH *Ph*), 170.5, 174.4 (CONH).

$[\alpha]_D^{25} = -5.5$ (c 1, MeOH).

T. top.: 200-211°C.

c) Dendrymer 109 (otrzymany z dendrymeru 105)

Wychodząc z 0.27 g (0.104 mmol) dendrymeru **105** otrzymano produkt w postaci jasnożółtego proszku z wydajnością 96.8% (0.21 g).

$C_{96}H_{132}O_{15}N_{20} \times 8HCl$, $M = 2097.89$ g/mol (masa monoizotopowa nieprotonowanego dendrymeru - 1805.0).

LRMS (ESI, MeOH): 930.4 $[M + MeOH + H^+ + Na^+]^{2+}$, 925.4 $[M + 2Na^+]^{2+}$, 903.4 $[M + 2H^+]^{2+}$ - główny sygnał, 620.6 $[M + MeOH + 2H^+ + Na^+]^{3+}$, 602.6 $[M + 3H^+]^{3+}$.

1H NMR (500 MHz, MeOD): $\delta = 1.46$ [br m, 14H, $5 \times \gamma CH_2$ *L-Lys i rdzenia*, $2 \times O-(CH_2)_3-CH_2-CH_2-NH$], 1.53-1.78 [br m, 18H, $5 \times \delta CH_2$ *L-Lys i rdzenia*, $2 \times O-CH_2-(CH_2)_2-(CH_2)_2-NH$], 1.88 (m, 10H, $5 \times \beta CH_2$ *L-Lys i rdzenia*), 2.92 (t, $J = 7.1$ Hz, 2H, CH_2-Ar TA), 3.20 [m, 4H, $2 \times O-(CH_2)_4-CH_2-NH$], 3.34 (m, 4H, $2 \times \epsilon CH_2$), 3.39 (m, 7H, $3 \times \epsilon CH_2$, CH_2-NH TA), 3.52 (m, 3H, $O-CH_2-CH_2-NH$, CH_2-NH TA), 3.68 (m, 2H, $2 \times O-CH_2-CH_2-NH$), 3.85-3.99 [br m, 8H, $4 \times \alpha CH$ *L-Lys*, $2 \times O-CH_2-(CH_2)_4-NH$], 4.07 (m, 4H, $2 \times O-CH_2-CH_2-NH$), 4.46 (m, 1H, αCH *rdzenia*), 6.60, 6.65 (2m, 2H, C^4-H Ph), 6.91-7.07 (br m, 7H, $C^{2,6}-H$ Ph, $C^{2,5,6}-H$ TA), 7.31 (d, $J = 8.1$ Hz, 1H, C^7-H TA), 7.50 (m, 9H, C^4-H TA, $C^{3,5}-H$ PABA), 7.98 (m, 8H, $C^{2,6}-H$ PABA).

^{13}C NMR (500 MHz, MeOD): $\delta = 23.2, 23.3, 24.5$ [γC , $2 \times O-(CH_2)_2-CH_2-(CH_2)_2-NH$], 26.2 (CH_2-Ar TA), 29.9, 30.0, 30.1 [δC , $2 \times O-CH_2-CH_2-CH_2-CH_2-CH_2-NH$], 32.3, 32.4, 32.9 (βC), 40.2 ($2 \times O-CH_2-CH_2-NH$), 40.5 [ϵC , $2 \times O-(CH_2)_4-CH_2-NH$], 40.7 (ϵC), 41.4 (CH_2-NH TA), 54.4, 54.5 ($4 \times \alpha C$ *L-Lys*), 55.8 (αC *rdzenia*), 67.6 ($2 \times O-CH_2-CH_2-NH$), 69.2, 69.3 [$2 \times O-CH_2-(CH_2)_4-NH$], 105.8, 106.2 (C^4 Ph), 106.8, 107.0, 107.3, 107.6 ($C^{2,6}$ Ph), 112.3 (C^7 TA), 113.1 (C^3 TA), 119.3 (C^4 TA), 119.6 (C^5 TA), 122.3 (C^6 TA), 123.6 (C^2 TA), 124.3 ($C^{3,5}$ PABA), 128.7 (C^{3a} TA), 130.3 ($C^{2,6}$ PABA), 135.0 (C^1 PABA), 136.3 (C^4 PABA), 137.2, 137.8 (C^1 Ph), 138.1 (C^{7a} TA), 161.2, 161.8 ($C^{3,5}$ Ph), 168.5 (CONH PABA), 169.8 (CONH Ph), 170.0, 170.5, 174.4 (CONH).

$[\alpha]_D^{25} = +0.06$ (c 1, MeOH).

T. top.: 189-196°C.

d) Dendrymer 110 (otrzymany z dendrymeru 106)

Wychodząc z 0.32 g (0.126 mmol) dendrymeru **106** otrzymano produkt w postaci kremowego proszku z wydajnością 97.7% (0.25 g).

$C_{92}H_{135}O_{15}N_{19} \times 8HCl$, $M = 2038.86$ g/mol (masa monoizotopowa nieprotonowanego dendrymeru - 1746.0).

LRMS (ESI, MeOH): 874.1 $[M + 2H^+]^{2+}$ - główny sygnał, 583.0 $[M + 3H^+]^{3+}$.

¹H NMR (500 MHz, DMSO): δ = 0.87 (br t, 3H, CH₃ DDA), 1.22-1.33 (br m, 18H, CH₂-3-11 DDA), 1.47 (m, 12H, 5 \times γ CH₂ L-Lys i rdzenia, CH₂-2 DDA), 1.63 (m, 10H, 5 \times δ CH₂ L-Lys i rdzenia), 1.89 (m, 10H, 5 \times β CH₂ L-Lys i rdzenia), 3.16 (m, 2H, CH₂-1 DDA), 3.33 (m, 8H, 4 \times ϵ CH₂ L-Lys), 3.46 (m, 2H, ϵ CH₂ rdzenia), 3.54, 3.68 (2m, 8H, 4 \times O-CH₂-CH₂-NH), 3.93 (m, 4H, 4 \times α CH L-Lys), 4.10 (m, 8H, 4 \times O-CH₂-CH₂-NH), 4.47 (m, 1H, α CH rdzenia), 6.68 (m, 2H, C⁴-H Ph), 6.99, 7.05 (2m, 4H, C^{2,6}-H Ph), 7.50 (dd, J = 8.5, 2.65 Hz, 8H, C^{3,5}-H PABA), 7.99 (m, 8H, C^{2,6}-H PABA).

¹³C NMR (500 MHz, DMSO): δ = 14.4 (C¹² DDA), 23.2, 23.7, 24.7 (γ C, C¹¹ DDA), 28.0 (C³ DDA), 29.9, 30.1 (δ C, C² DDA), 30.4-30.8 (C⁴-C⁹ DDA), 32.3, 32.9 (β C), 33.0 (C¹⁰ DDA), 40.2 (4 \times O-CH₂-CH₂-NH), 40.5 (ϵ C rdzenia, C¹ DDA), 40.8 (4 \times ϵ C L-Lys), 54.5 (4 \times α C L-Lys), 55.9 (α C rdzenia), 67.7 (4 \times O-CH₂-CH₂-NH), 106.0, 106.3 (C⁴ Ph), 107.3, 107.6 (C^{2,6} Ph), 124.4, 124.7 (C^{3,5} PABA), 129.9, 130.4 (C^{2,6} PABA), 134.9 (C¹ PABA), 136.3 (C⁴ PABA), 137.3, 137.9 (C¹ Ph), 161.2, 161.3 (C^{3,5} Ph), 168.5 (CONH PABA), 169.6 (CONH Ph), 170.5, 174.4 (CONH).

$[\alpha]_D^{25}$ = -4.7 (c 1, MeOH).

T. top.: 182-199°C.

6.5.4. Synteza dendrymerów typu Janus

Synteza tytułowych dendrymerów obejmowała przygotowanie dendrymerów **45** (Rozdział 6.5.1.1.) i **75** (Rozdział 6.5.2.1.), tj. „dendronów 1”, oraz **117**, **118** („dendrony 2”, Rozdział 6.5.4.1.) a następnie przyłączenie etylenodiaminy lub 2,2’-(etylenodioksy)dietyloaminy do „dendronów 1” (dendrymery pośrednie **119**, **120**, **123**, Rozdział 6.5.4.2.) oraz reakcję sprzęgania dendrymerów **119**, **120**, **123** z „dendronami 2” (Rozdział 6.5.4.3.).

6.5.4.1. Synteza „dendronów 2”

A) ZABEZPIECZONE

a) 3-{5-[4-(Boc-amino)benzoiloamino]pentoksy}-5-{2-[4-(Boc-amino)benzoiloamino]-etoksy}benzoesan metylu (**115**)

Tytułowy związek zsyntetyzowano wykorzystując procedurę ogólną sprzęgania metodą EDC/HOBt (Procedura B, Rozdział 6.2). Do reakcji użyto kwasu 4-(Boc-amino)benzoowego (**114**, 0.82 g, 3.45 mmol, 2.2 ekw.), HOBt (0.53 g, 3.45 mmol, 2.2.ekw.), EDC·HCl (0.66 g, 3.45 mmol, 2.2 ekw.) z Et₃N (0.48 mL, 3.45 mmol, 2.2 ekw.), związku **111** (0.58 g, 1.57 mmol, 1 ekw.) z Et₃N (0.44 mL, 3.14 mmol, 2 ekw.) i DMF (15

mL). Reakcję zakończono po 4 dobach. Surowy produkt oczyszczono poprzez chromatografię kolumnową na silikażelu z użyciem fazy $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$ (gradient 100:1→10:1). Otrzymano produkt w postaci białego proszku z wydajnością 69.6% (0.8 g).

$\text{C}_{39}\text{H}_{50}\text{O}_{10}\text{N}_4$, $M = 734.84$ g/mol (masa monoizotopowa 734.4).

LRMS (ESI, $\text{MeOH}/\text{CHCl}_3$): 757.4 $[\text{M} + \text{Na}^+]$, 735.5 $[\text{M} + \text{H}^+]$.

$R_f = 0.49$ ($\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$ 8:1).

T. top.: 108.4-111°C.

b) 3-{5-[4-(Boc-amino)benzenosulfonyloamino]pentoksy}-5-{2-[4-(Boc-amino)benzenosulfonyloamino]etoksy}benzoesan metylu (116)

1.11 g (3.8 mmol, 2.2 ekw.) chlorku 4-(Boc-amino)benzenosulfonowego (**113**) rozpuszczono w 5 mL DCM, po czym dodano go do ochłodzonego do temp. 0 °C roztworu związku **111** (0.64 g, 1.73 mmol, 1 ekw.) i Et_3N (2.2 mL, 15.6 mmol, 9 ekw.) w 10 mL DMF. Odstawiono łaźnię chłodzącą i kontynuowano mieszanie w temp. pokojowej do zaniku wolnych grup aminowych, monitorowanego za pomocą testu Kaisera (48 godzin). Po tym czasie odsączono osad i odparowano rozpuszczalniki. Pozostałość rozpuszczono w 80 mL CHCl_3 i przemyto nasyconym roztworem NaHCO_3 (3×20 mL), 10% roztworem kwasu cytrynowego (3×20 mL) oraz solanką (20 mL). Następnie warstwę organiczną wysuszono nad MgSO_4 , przesączono i odparowano rozpuszczalnik. Surowy produkt oczyszczono poprzez chromatografię kolumnową na silikażelu z użyciem fazy $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$ (gradient 100:1→25:1). Otrzymano produkt w postaci żółtego oleju z wydajnością 64.3% (0.9 g).

$\text{C}_{37}\text{H}_{50}\text{O}_{12}\text{N}_4\text{S}_2$, $M = 806.95$ g/mol (masa monoizotopowa 806.3).

LRMS (ESI, MeOH): 829.5 $[\text{M} + \text{Na}^+]$.

$R_f = 0.48$ ($\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$ 8:1).

B) ODBEZPIECZONE

a) Kwas 3-{5-[4-(Boc-amino)benzoiloamino]pentoksy}-5-{2-[4-(Boc-amino)benzoiloamino]etoksy}benzoesowy (117)

Produkt otrzymano zgodnie z procedurą ogólną (Procedura E, rozdział 6.2.). Do hydrolizy wzięto 0.73 g (0.994 mmol, 1 ekw.) związku **115** zawieszony w 30 mL MeOH i 6 mL (5.96 mmol, 6 ekw.) 1 M NaOH . Mieszanina reakcyjna klarowniej po 30 minutach, a po 4 godzinach następuje całkowite przereagowanie substratu. Otrzymano produkt w postaci białego proszku z wydajnością 93.6% (0.67 g).

$\text{C}_{38}\text{H}_{48}\text{O}_{10}\text{N}_4$, $M = 720.81$ g/mol (masa monoizotopowa 720.3).

$R_f = 0.27$ (CHCl₃/MeOH 8:1).

T. top.: 199-200°C.

b) Kwas 3-{5-[4-(Boc-amino)benzenosulfonylamino]pentoksy}-5-{2-[4-(Boc-amino)benzenosulfonylamino]etoksy}benzoesowy (118)

Produkt otrzymano w wyniku hydrolizy związku **116** prowadzonej zgodnie z procedurą ogólną (Procedura E, rozdział 6.2.). Do reakcji, trwającej 6 godzin, użyto 0.9 g (1.12 mmol, 1 ekw.) estru rozpuszczonego w 35 mL MeOH i 6.7 mL (6.7 mmol, 6 ekw.) 1 M NaOH. Otrzymano produkt w postaci kremowego proszku z wydajnością 96.6% (0.85 g).

C₃₆H₄₈O₁₂N₄S₂, M = 792.92 g/mol (masa monoizotopowa 792.3).

LRMS (ESI, MeOH): 815.5 [M + Na⁺].

$R_f = 0.35$ (CHCl₃/MeOH 8:1).

T. top.: 99-101°C.

6.5.4.2. Synteza dendrymerów pośrednich

6.5.4.2.1. Zabezpieczone dendrymery

a) Dendrymer pośredni 119

1 g (0.42 mmol) dendrymeru **45** rozpuszczono w 25 mL MeOH i powoli wkropiono do oziębionego do temp 0 °C roztworu etylenodiaminy (2.8 mL, 42 mmol) w 10 mL MeOH. Następnie mieszano w temp. pokojowej przez 10 dni, po czym odparowano rozpuszczalnik i nadmiar etylenodiaminy. Surowy produkt oczyszczono za pomocą sączenia molekularnego (Sephadex LH-20, MeOH), a następnie kolumny silikażelowej z użyciem fazy CHCl₃/MeOH 5:1. Otrzymano produkt w postaci białego proszku z wydajnością 85.1% (0.86 g).

C₁₁₇H₁₅₈O₂₈N₁₈Cl₄, M = 2406.42 g/mol (masa monoizotopowa 2403.0).

LRMS (ESI, MeOH): 2407.4 [M + H⁺], 1213.2 [M + Na⁺ + H⁺]²⁺ - *główny sygnał*.

$[\alpha]_D^{25} = -15.0$ (c 1, MeOH).

$R_f = 0.65$ (CHCl₃/MeOH 8:2).

T. top.: 108-115°C.

b) Dendrymer pośredni 120

1 g (0.42 mmol) dendrymeru **45** rozpuszczono w 25 mL MeOH i powoli wkropiono do oziębionego do temp 0 °C roztworu 2,2'-(etylenodioksy)dietyloaminy (1.85 mL, 12.6 mmol) w 10 mL MeOH. Następnie mieszano w temp. 60 °C przez 4 dni, po czym odparowano rozpuszczalnik. Surowy produkt oczyszczono poprzez chromatografię

kolumnową na silikażelu z użyciem fazy $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$ (gradient 20:1→5:1). Otrzymano produkt w postaci białego proszku z wydajnością 53.3% (0.56 g).

$\text{C}_{121}\text{H}_{166}\text{O}_{30}\text{N}_{18}\text{Cl}_4$, $M = 2494.53$ g/mol (masa monoizotopowa 2491.1).

LRMS (ESI, MeOH): 2492.3 $[\text{M} + \text{H}^+]$, 1268.5 $[\text{M} + 2\text{Na}^+]^{2+}$, 1257.6 $[\text{M} + \text{Na}^+ + \text{H}^+]^{2+}$ - główny sygnał, 1246.6 $[\text{M} + 2\text{H}^+]^{2+}$.

$R_f = 0.67$ ($\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$ 8:2).

c) Dendrymer pośredni 123

W wyniku reakcji z użyciem 0.85 g (0.3 mmol) dendrymeru **75** i 2 mL (30 mmol) dietylenoaminy, wg analogicznej procedury zastosowanej do syntezy dendrymeru **119**, otrzymano 0.66 g (76.7%) produktu w postaci białego proszku.

$\text{C}_{149}\text{H}_{210}\text{O}_{32}\text{N}_{26}$, $M = 2877.42$ g/mol (masa monoizotopowa 2875.6).

LRMS (ESI, MeOH): 2876.4 $[\text{M} + \text{H}^+]$, 1438.8 $[\text{M} + 2\text{H}^+]^{2+}$, 1449.8 $[\text{M} + \text{H}^+ + \text{Na}^+]^{2+}$ - główny sygnał, 1460.8 $[\text{M} + 2\text{Na}^+]^{2+}$, 966.8 $[\text{M} + 2\text{H}^+ + \text{Na}^+]^{3+}$, 974.2 $[\text{M} + \text{H}^+ + 2\text{Na}^+]^{3+}$, 972.2 $[\text{M} + 2\text{H}^+ + \text{K}^+]^{3+}$.

$R_f = 0.26$ ($\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$ 8:2).

6.5.4.2.2. Odbezpieczone dendrymery

Deprotekcję grup Boc w dendrymerach pośrednich **119**, **120** i **123** za pomocą nasyconego roztworu HCl w AcOEt przeprowadzono wg procedury ogólnej zamieszczonej w Rozdziale 6.2. (Procedura C - wariant B). Reakcji, zachodzącej w ciągu 1 godziny, poddawano związki rozpuszczone w 1 mL MeOH z 5 mL nas. HCl/AcOEt. Odbezpieczone dendrymery występują w postaci pentachlorowodorków (**121**, **122**) lub nonachlorowodorku (**124**).

a) Dendrymer pośredni 121

Wychodząc z 0.13 g (0.05 mmol) dendrymeru **119** otrzymano produkt w postaci jasnożółtego proszku z wydajnością 91.7% (0.11 g).

$\text{C}_{97}\text{H}_{126}\text{O}_{20}\text{N}_{18}\text{Cl}_4 \times 5\text{HCl}$, $M = 2188.26$ g/mol (masa monoizotopowa nieprotonowanego związku – 2002.8).

LRMS (ESI, MeOH): 1014.0 $[\text{M} + \text{H}^+ + \text{Na}^+]^{2+}$, 1002.7 $[\text{M} + 2\text{H}^+]^{2+}$, 919.1 $[\text{M} - 2\text{ClZ} + 2\text{H}^+]^{2+}$, 669.5 $[\text{M} + 3\text{H}^+]^{3+}$ - główny sygnał, 613.5 $[\text{M} - 2\text{ClZ} + 3\text{H}^+]^{3+}$.

^1H NMR (500 MHz, MeOD): $\delta = 1.39$ (m, 10H, $5 \times \gamma\text{CH}_2$ *L-Lys* i rdzenia), 1.49 (m, 8H, $4 \times \delta\text{CH}_2$ *L-Lys*), 1.59 (m, 2H, δCH_2 rdzenia), 1.83 (br m, $5 \times \beta\text{CH}_2$ *L-Lys* i rdzenia), 2.90 (m,

2H, NH-CH₂-CH₂-NH₂), 3.04 (m, 8H, 4×εCH₂ *L-Lys*), 3.23 (m, 2H, βCH₂ *L-Trp*), 3.3 (m, 3H, εCH₂ *rdzenia*, NH-CH₂-CH₂-NH₂), 3.40 (m, 1H, NH-CH₂-CH₂-NH₂), 3.54, 3.70 (2m, 8H, 4×O-CH₂-CH₂-NH), 3.88 (m, 4H, 4×αCH *L-Lys*), 4.10 (m, 8H, 4×O-CH₂-CH₂-NH), 4.40 (m, 1H, αCH *rdzenia*), 4.54 (m, 1H, αCH *L-Trp*), 5.12 (2s, 8H, Ar-CH₂O), 6.67, 6.72 (2m, 2H, C⁴-H *Ph*), 6.92 (m, 1H, C⁵-H *L-Trp*), 6.99-7.06 (br m, 5H, C^{2,6}-H *Ph*, C⁶-H *L-Trp*), 7.12 (s, 1H, C²-H *L-Trp*), 7.26 (m, 9H, ArH, C⁷-H *L-Trp*), 7.35, 7.40 (2m, 8H, ArH), 7.54 (d, *J* = 7.9 Hz, 4H, C⁴-H *L-Trp*).

¹³C NMR (500 MHz, MeOD): δ = 23.0, 24.5 (γC), 28.3 (βC *L-Trp*), 30.1, 30.5 (δC), 32.1, 32.3 (βC), 38.1 (NH-CH₂-CH₂-NH₂), 40.2 (4×O-CH₂-CH₂-NH), 40.6 (NH-CH₂-CH₂-NH₂), 40.8 (εC *rdzenia*), 41.3 (4×εC *L-Lys*), 54.4 (4×αC *L-Lys*), 56.3 (αC *rdzenia*, αC *L-Trp*), 64.7 (Ar-CH₂O), 67.7 (4×O-CH₂-CH₂-NH), 105.9, 106.4 (C⁴ *Ph*), 107.3, 107.6 (C^{2,6} *Ph*), 110.7 (C³ *L-Trp*), 112.5 (C⁷ *L-Trp*), 119.3 (C⁴ *L-Trp*), 119.9 (C⁵ *L-Trp*), 122.6 (C⁶ *L-Trp*), 124.8 (C² *L-Trp*), 128.2 (CH_{Ar}), 128.7 (C^{3a} *L-Trp*), 130.4, 130.5 (CH_{Ar}), 134.1 (C_{Ar}-Cl), 135.8 (C_{Ar}-CH₂O), 137.1 (C¹ *Ph*), 138.0 (C^{7a} *L-Trp*), 158.6 [C=O (2-Cl-Z)], 161.3 (C^{3,5} *Ph*), 170.4, 170.4, 174.7, 174.9 (CONH).

[α]_D²⁵ = -11.1 (c 1, MeOH).

T. top.: 148-160°C.

b) Dendrymer pośredni 122

Wychodząc z 0.1 g (0.04 mmol) dendrymeru **120** otrzymano produkt w postaci jasnożółtego proszku z wydajnością 94.4% (0.085 g).

C₁₀₁H₁₃₄O₂₂N₁₈Cl₄×5HCl, M = 2276.37 g/mol (masa monoizotopowa nieprotonowanego związku – 2090.9).

LRMS (ESI, MeOH): 1046.4 [M + 2H⁺]²⁺ - główny sygnał, 715.9 [M + MeOH + Na⁺ + 2H⁺]³⁺, 697.9 [M + 3H⁺]³⁺.

¹H NMR (500 MHz, MeOD): δ = 1.25-1.65 (br m, 20H, 5×γ, δCH₂ *L-Lys* i *rdzenia*), 1.84 (m, 10H, 5×βCH₂ *L-Lys* i *rdzenia*), 3.04 (m, 10H, 4×εCH₂ *L-Lys*, CH₂NH₂ *NOON*), 3.13-3.40 (br m, 6H, βCH₂ *L-Trp*, εCH₂ *rdzenia*, CH₂NH *NOON*), 3.43-3.75 (br m, 16H, 4×O-CH₂-CH₂-NH, 4×OCH₂ *NOON*), 3.88 (m, 4H, 4×αCH *L-Lys*), 4.09 (m, 8H, 4×O-CH₂-CH₂-NH), 4.43 (m, 1H, αCH *rdzenia*), 4.62 (m, 1H, αCH *L-Trp*), 5.12 (2s, 8H, Ar-CH₂O), 6.69 (m, 2H, C⁴-H *Ph*), 6.93-7.07 (br m, 6H, C^{2,6}-H *Ph*, C^{5,6}-H *L-Trp*), 7.11 (s, 1H, C²-H *L-Trp*), 7.26 (m, 9H, ArH, C⁷-H *L-Trp*), 7.37 (m, 8H, ArH), 7.55 (d, *J* = 7.9 Hz, 4H, C⁴-H *L-Trp*).

¹³C NMR (500 MHz, MeOD): δ = 23.0 (γC), 28.9 (βC *L-Trp*), 30.1, 30.5, 30.7 (δC), 32.3 (βC), 40.2 (4×O-CH₂-CH₂-NH), 40.3, 40.7 (εC *rdzenia*, CH₂NH i CH₂NH₂ *NOON*), 41.3

(4×εC *L-Lys*), 54.5 (4×αC *L-Lys*), 55.8 (αC *L-Trp*), 56.2 (αC *rdzenia*), 64.7 (Ar-CH₂O), 67.7 (4×O-CH₂-CH₂-NH), 67.8, 70.3, 71.3 (4×OCH₂ *NOON*), 105.9, 106.4 (C⁴ *Ph*), 107.3, 107.6 (C^{2,6} *Ph*), 110.8 (C³ *L-Trp*), 112.4 (C⁷ *L-Trp*), 119.4 (C⁴ *L-Trp*), 119.9 (C⁵ *L-Trp*), 122.5 (C⁶ *L-Trp*), 124.8 (C² *L-Trp*), 128.2 (CH_{Ar}), 128.8 (C^{3a} *L-Trp*), 130.4, 130.5 (CH_{Ar}), 134.1 (C_{Ar}-Cl), 135.8 (C_{Ar}-CH₂O), 138.0 (C^{7a} *L-Trp*), 158.6 [C=O (2-Cl-Z)], 161.3 (C^{3,5} *Ph*), 170.4, 173.8 (CONH).

[α]_D²⁵ = -7.3 (c 1, MeOH).

c) Dendrymer pośredni 124

Wychodząc z 0.16 g (0.056 mmol) dendrymeru **123** otrzymano produkt w postaci kremowego proszku z wydajnością 97% (0.13 g).

C₁₀₉H₁₄₆O₁₆N₂₆×9HCl, M = 2404.64 g/mol (masa monoizotopowa nieprotonowanego związku – 2075.1).

LRMS (ESI, MeOH): 1065.5 [M + MeOH + H⁺ + Na⁺]²⁺, 1038.5 [M + 2H⁺]²⁺, 692.7 [M + 3H⁺]³⁺ - główny sygnał, 519.7 [M + 4H⁺]⁴⁺.

¹H NMR (500 MHz, MeOD): δ = 1.31 (m, 18H, 5×γCH₂ *L-Lys* i *rdzenia*, 4×δCH₂ *L-Lys*), 1.59 (m, 2H, δCH₂ *rdzenia*), 1.78 (m, 10H, 5×βCH₂ *L-Lys* i *rdzenia*), 2.88 (m, 2H, NH-CH₂-CH₂-NH₂), 2.95-3.20 (br m, 8H, 4×εCH₂ *L-Lys*), 3.20-3.40 (br m, 14H, 5×βCH₂ *L-Trp*, εCH₂ *rdzenia*, NH-CH₂-CH₂-NH₂), 3.55, 3.66 (2m, 8H, 4×O-CH₂-CH₂-NH), 3.89 (m, 4H, 4×αCH *L-Lys*), 4.09 (m, 12H, 4×O-CH₂-CH₂-NH, 4×αCH *L-Trp*), 4.42 (m, 1H, αCH *rdzenia*), 4.54 (m, 1H, αCH *L-Trp*), 6.69 (m, 2H, C⁴-H *Ph*), 6.98-7.14 (br m, 15H, C^{2,6}-H *Ph*, C^{2,5,6}-H *L-Trp*), 7.22 (s, 4H, C²-H *L-Trp*), 7.31 (d, *J* = 8.15 Hz, 1H, C⁷-H *L-Trp*), 7.37 (d, *J* = 8.08 Hz, 4H, C⁷-H *L-Trp*), 7.50 (d, *J* = 7.69 Hz, 1H, C⁴-H *L-Trp*), 7.65 (d, *J* = 7.8 Hz, 4H, C⁴-H *L-Trp*).

¹³C NMR (500 MHz, MeOD): δ = 23.2, 24.5 (γC), 28.3 (βC *L-Trp*), 28.9 (4×βC *L-Trp*), 29.5, 30.1 (δC), 32.2 (βC), 38.1 (NH-CH₂-CH₂-NH₂), 40.1 (4×εC *L-Lys*), 40.2 (4×O-CH₂-CH₂-NH), 40.6 (NH-CH₂-CH₂-NH₂), 40.8 (εC *rdzenia*), 54.4 (4×αC *L-Lys*), 55.2 (4×αC *L-Trp*), 56.2, 56.3 (αC *rdzenia*, αC *L-Trp*), 67.7, 67.9 (4×O-CH₂-CH₂-NH), 105.8, 106.3 (C⁴ *Ph*), 107.3, 107.7, 108.1 (C^{2,6} *Ph*), 110.6 (C³ *L-Trp*), 112.5, 112.6 (C⁷ *L-Trp*), 119.3, 119.4 (C⁴ *L-Trp*), 119.9, 120.2 (C⁵ *L-Trp*), 122.5, 122.9 (C⁶ *L-Trp*), 124.9, 125.7 (C² *L-Trp*), 128.4, 128.6 (C^{3a} *L-Trp*), 137.0, 137.9 (C¹ *Ph*), 138.0, 138.2 (C^{7a} *L-Trp*), 161.2, 161.3 (C^{3,5} *Ph*), 169.6 (CONH *Ph*), 170.0, 170.1, 170.5, 174.7, 174.9 (CONH).

[α]_D²⁵ = +20.2 (c 1, MeOH).

T. top.: 200-210°C.

6.5.4.3. Synteza dendrymerów finalnych

6.5.4.3.1. Zabezpieczone dendrymery

Wykorzystując procedurę ogólną sprzęgania metodą EDC/HOBt (Procedura B, Rozdział 6.2.) zsyntetyzowano 6 dendrymerów typu Janus. W celu osiągnięcia lepszych wydajności, niezbędne okazało się użycie dodatkowej ilości Et₃N (0.9 ekw.), oprócz tej potrzebnej do przeprowadzenia odczynnika sprzęgającego (EDC·HCl) do jego postaci wolnej (1.1 ekw.). Reakcje sprzęgania prowadzono przez 3-5 dni. Mieszaninę reakcyjną po odparowaniu DMF rozpuszczono w MeOH i poddano sączeniu molekularnemu z użyciem kolumny z wypełnieniem Sephadex LH-20 z MeOH jako eluentem. Następnie doczyszczano na kolumnie silikażelowej z użyciem fazy CHCl₃/MeOH (25:1 dla dendrymerów **125**, **126**; 15:1 dla **131**, **132**; gradient 100:1→10:1 dla **127**, **133**). Produkty otrzymano w postaci kremowych lub jasnożółtych proszków.

a) Dendrymer 125

Do reakcji użyto związku **117** (0.25 g, 0.35 mmol), HOBt (0.054 g, 0.35 mmol), EDC·HCl (0.067 g, 0.35 mmol), dendrymeru pośredniego **119** (0.77 g, 0.32 mmol), Et₃N (0.09 mL, 0.64 mmol) i DMF (15 mL). Sprzęganie prowadzono przez 4 dni. Otrzymano produkt w postaci kremowego proszku z wydajnością 85.9% (0.85 g).

C₁₅₅H₂₀₄O₃₇N₂₂Cl₄, M = 3109.22 g/mol (masa monoizotopowa 3105.4).

LRMS (ESI, MeOH): 3132.1 [M + Na⁺], 1576.1 [M + 2Na⁺]²⁺ - *główny sygnał*.

¹H NMR (500 MHz, MeOD): δ = 1.20-1.39 [br m, 10H, 4×γCH₂ *L-Lys*, O-(CH₂)₂-CH₂-(CH₂)₂-NH] nakładający się na 1.37 [s, 36H, 4×C(CH₃)₃ *L-Lys*], 1.41-1.51 [br m, 12H, 4×δCH₂ *L-Lys*, γCH₂ *rdzenia*, O-(CH₂)₃-CH₂-CH₂-NH] nakładający się na 1.49, 1.50 [2s, 18H, 2×C(CH₃)₃ *PABA*], 1.53-1.76 [br m, 14H, 5×βCH₂ *L-Lys* i *rdzenia*, δCH₂ *rdzenia*, O-CH₂-CH₂-(CH₂)₃-NH], 3.03 (m, 8H, 4×εCH₂ *L-Lys*), 3.14 (m, 1H, βCH₂ *L-Trp*), 3.25 [m, 5H, βCH₂ *L-Trp*, εCH₂ *rdzenia*, O-(CH₂)₄-CH₂-NH], 3.34 (m, 4H, NH-CH₂-CH₂-NH), 3.42-3.60 (br m, 8H, 4×O-CH₂-CH₂-NH), 3.68 (m, 2H, O-CH₂-CH₂-NH), 3.84-4.12 (br m, 16H, 6×O-CH₂, 4×αCH *L-Lys*), 4.35 (m, 1H, αCH *rdzenia*), 4.58 (m, 1H, αCH *L-Trp*), 5.11 (2s, 8H, Ar-CH₂O), 6.59 (m, 3H, C⁴-H *Ph*), 6.87-7.04 (br m, 9H, C^{2,6}-H *Ph*, C^{2,5,6}-H *L-Trp*), 7.23 (m, 9H, ArH, C⁷-H *L-Trp*), 7.29-7.40 (2m, 8H, ArH), 7.46 (m, 5H, C⁴-H *L-Trp*, C^{3,5}-H *PABA*), 7.71 (m, 4H, C^{2,6}-H *PABA*).

¹³C NMR (500 MHz, MeOD): δ = 24.1 [γC, O-(CH₂)₂-CH₂-(CH₂)₂-NH], 28.3 (βC *L-Trp*), 28.7, 28.8 [C(CH₃)₃], 30.0, 30.5 [δC, O-CH₂-CH₂-CH₂-CH₂-CH₂-NH], 33.2 (βC), 39.9, 40.6 (6×CH₂NH, NH-CH₂-CH₂-NH), 40.7 (εC *rdzenia*), 41.5 (4×εC *L-Lys*), 54.9 (αC *L-Trp*), 56.1

(4× α C *L-Lys*), 56.3 (α C *rdzenia*), 64.6 (Ar-CH₂O), 67.7 (5×O-CH₂-CH₂-NH), 69.2 [O-CH₂-(CH₂)₄-NH], 80.7, 81.2 [C(CH₃)₃], 105.9, 106.0 (C⁴ *Ph*), 106.9, 107.3, 107.5 (C^{2,6} *Ph*), 112.4 (C⁷ *L-Trp*), 118.8 (C^{3,5} *PABA*), 119.3 (C⁴ *L-Trp*), 119.9 (C⁵ *L-Trp*), 122.6 (C⁶ *L-Trp*), 124.5 (C² *L-Trp*), 128.1 (CH_{Ar}), 129.2 (C^{2,6} *PABA*), 129.3 (C^{3a} *L-Trp*), 130.4 (CH_{Ar}), 134.1 (C_{Ar}-Cl), 135.9 (C_{Ar}-CH₂O), 144.0 (C⁴ *PABA*), 158.56 [C=O (Boc, 2-Cl-Z)], 161.3 (C^{3,5} *Ph*), 175.5 (CONH).

$[\alpha]_D^{25} = -13.7$ (c 1, MeOH).

$R_f = 0.37$ (CHCl₃/MeOH 8:1).

T. top.: 119-126°C.

b) Dendrymer 126

Do reakcji użyto związku **117** (0.158 g, 0.22 mmol), HOBt (0.034 g, 0.22 mmol), EDC·HCl (0.042 g, 0.22 mmol), dendrymeru pośredniego **120** (0.5 g, 0.2 mmol), Et₃N (0.06 mL, 0.4 mmol) i DMF (15 mL). Sprzężanie prowadzono przez 5 dni. Otrzymano produkt w postaci jasnożółtego proszku z wydajnością 82.8% (0.53 g).

C₁₅₉H₂₁₂O₃₉N₂₂Cl₄, M = 3197.32 g/mol (masa monoizotopowa 3193.4).

LRMS (ESI, MeOH): 3220.3 [M + Na⁺], 1620.0 [M + 2Na⁺]²⁺ - *główny sygnał*.

¹H NMR (500 MHz, MeOD): $\delta = 1.27-1.77$ [br m, 36H, 5× β , γ , δ CH₂ *L-Lys* i *rdzenia*, O-CH₂-(CH₂)₃-CH₂-NH] nakładający się na 1.37, 1.49 [3s, 54H, 6×C(CH₃)₃], 3.04 (m, 8H, 4× ϵ CH₂ *L-Lys*), 3.10-3.40 [br m, 10H, β CH₂ *L-Trp*, ϵ CH₂ *rdzenia*, O-(CH₂)₄-CH₂-NH, 2×CH₂NH *NOON*], 3.43-3.61 (br m, 16H, 4×O-CH₂-CH₂-NH, 4×OCH₂ *NOON*), 3.71 (m, 2H, O-CH₂-CH₂-NH), 3.89 [m, 2H, O-CH₂-(CH₂)₄-NH], 4.00 (br m, 12H, 4× α CH *L-Lys*, 4×O-CH₂-CH₂-NH), 4.11 (m, 2H, O-CH₂-CH₂-NH), 4.45 (m, 1H, α CH *rdzenia*), 4.62 (m, 1H, α CH *L-Trp*), 5.11 (2s, 8H, Ar-CH₂O), 6.60 (m, 3H, C⁴-H *Ph*), 6.89-7.02 (br m, 8H, C^{2,6}-H *Ph*, C^{5,6}-H *L-Trp*), 7.05 (s, 1H, C²-H *L-Trp*), 7.24 (m, 9H, ArH, C⁷-H *L-Trp*), 7.35 (2m, 8H, ArH), 7.47 (d, $J = 8.62$ Hz, 4H, C^{3,5}-H *PABA*), 7.51 (d, $J = 7.94$ Hz, 1H, C⁴-H *L-Trp*), 7.73 (m, 4H, C^{2,6}-H *PABA*).

¹³C NMR (500 MHz, MeOD): $\delta = 24.1, 24.4, 24.6$ [γ C, O-(CH₂)₂-CH₂-(CH₂)₂-NH], 28.7, 28.8 [C(CH₃)₃], 29.0 (β C *L-Trp*), 29.9, 30.1, 30.3, 30.5, 30.7 [δ C, O-CH₂-CH₂-CH₂-CH₂-CH₂-NH], 32.4, 33.0, 33.2 (β C), 39.9 (4×O-CH₂-CH₂-NH), 40.4, 40.6, 40.7, 40.9, 41.0 [ϵ C *rdzenia*, O-(CH₂)₄-CH₂-NH, O-CH₂-CH₂-NH, 2×CH₂NH *NOON*], 41.5 (4× ϵ C *L-Lys*), 55.8 (α C *rdzenia*, α C *L-Trp*), 56.1 (4× α C *L-Lys*), 64.6 (Ar-CH₂O), 67.7, 67.8 (5×O-CH₂-CH₂-NH), 69.1 [O-CH₂-(CH₂)₄-NH], 70.3, 70.5, 71.2, 71.3 (4×OCH₂ *NOON*), 80.6, 81.3 [C(CH₃)₃], 105.7, 105.8, 106.1 (C⁴ *Ph*), 107.0, 107.2, 107.3, 107.5 (C^{2,6} *Ph*), 110.8 (C³ *L-Trp*), 112.4 (C⁷

L-Trp), 118.8 (C^{3,5} PABA), 119.5 (C⁴ *L-Trp*), 119.9 (C⁵ *L-Trp*), 122.5 (C⁶ *L-Trp*), 124.7 (C² *L-Trp*), 128.1 (CH_{Ar}), 128.8 (C^{3a} *L-Trp*), 128.9 (C¹ PABA), 129.2, 129.3 (C^{2,6} PABA), 130.4 (CH_{Ar}), 134.1 (C_{Ar}-Cl), 135.9 (C_{Ar}-CH₂O), 137.1, 137.6 (C¹ *Ph*), 137.9 (C^{7a} *L-Trp*), 143.9, 144.1 (C⁴ PABA), 154.8, 157.8, 158.5 [C=O (Boc, 2-Cl-Z)], 161.2, 161.4, 161.7 (C^{3,5} *Ph*), 169.6, 169.7, 169.8, 169.9 (CONH *Ph*), 173.6, 174.1, 175.5 (CONH).

[α]_D²⁵ = -10.5 (c 1, MeOH).

R_f = 0.30 (CHCl₃/MeOH 8:1).

T. top.: 110-119°C.

c) Dendrymer 127

Do reakcji użyto związku **117** (0.22 g, 0.31 mmol), HOBt (0.047 g, 0.31 mmol), EDC·HCl (0.059 g, 0.31 mmol), dendrymeru pośredniego **123** (0.82 g, 0.28 mmol), Et₃N (0.08 mL, 0.56 mmol) i DMF (15 mL). Sprzężanie prowadzono przez 5 dni. Otrzymano produkt w postaci kremowego proszku z wydajnością 89.2% (0.91 g).

C₁₈₇H₂₅₆O₄₁N₃₀, M = 3580.21 g/mol (masa monoizotopowa 3577.9).

LRMS (ESI, MeOH): 1812.5 [M + 2Na⁺]²⁺, 1816.9 [M + MeOH + H⁺ + Na⁺]²⁺ - główny sygnał.

¹H NMR (500 MHz, MeOD): δ = 1.0-1.77 [br m, 36H, 5×β, γ, δCH₂ *L-Lys* i rdzenia, O-CH₂-(CH₂)₃-CH₂-NH] nakładający się na 1.33, 1.37, 1.49, 1.50 [4s, 90H, 10×C(CH₃)₃], 2.8-3.4 [br m, 26H, 5×εCH₂ *L-Lys* i rdzenia, 5×βCH₂ *L-Trp*, O-(CH₂)₄-CH₂-NH, NH-CH₂-CH₂-NH], 3.47, 3.56 (2m, 8H, 4×O-CH₂-CH₂-NH), 3.68 (m, 2H, O-CH₂-CH₂-NH), 3.85 [m, 2H, O-CH₂-(CH₂)₄-NH], 3.95 (m, 12H, 4×O-CH₂-CH₂-NH, 4×αCH *L-Lys*), 4.08 (m, 2H, O-CH₂-CH₂-NH), 4.28 (m, 4H, 4×αCH *L-Trp*), 4.37 (m, 1H, αCH rdzenia), 4.58 (m, 1H, αCH *L-Trp*), 6.59 (m, 3H, C⁴-H *Ph*), 6.88-7.07 (br m, 21H, C^{2,6}-H *Ph*, C^{2,5,6}-H *L-Trp*), 7.22 (d, J = 8.03 Hz, 1H, C⁷-H *L-Trp*), 7.29 (m, 4H, C⁷-H *L-Trp*), 7.47 (m, 5H, C⁴-H *L-Trp*, C^{3,5}-H PABA), 7.54 (m, 4H, C⁴-H *L-Trp*), 7.72 (m, 4H, C^{2,6}-H PABA).

¹³C NMR (500 MHz, MeOD): δ = 24.2, 24.4, 24.6 [γC, O-(CH₂)₂-CH₂-(CH₂)₂-NH], 28.4 (βC *L-Trp*), 28.7, 28.8 [C(CH₃)₃], 29.6, 29.8, 29.9 (4×βC *L-Trp*), 30.1, 30.3, 30.7 [δC, 2×O-CH₂-CH₂-CH₂-CH₂-NH], 32.1, 33.1, 33.2 (βC), 40.0, 40.1, 40.4, 40.6, 40.7, 40.9 (εC, 6×CH₂NH, NH-CH₂-CH₂-NH), 56.0 (αC *L-Trp*, αC rdzenia), 56.1 (4×αC *L-Lys*), 57.1 (4×αC *L-Trp*), 67.7 (5×O-CH₂-CH₂-NH), 69.1 [O-CH₂-(CH₂)₄-NH], 80.6, 81.3 [C(CH₃)₃], 105.8, 105.9, 106.2 (C⁴ *Ph*), 106.8, 107.2, 107.4 (C^{2,6} *Ph*), 110.9, 111.1 (C³ *L-Trp*), 112.3, 112.4 (C⁷ *L-Trp*), 118.8 (C^{3,5} PABA), 119.3, 119.5 (C⁴ *L-Trp*), 119.8, 119.9 (C⁵ *L-Trp*), 122.4, 122.6 (C⁶ *L-Trp*), 124.6 (C² *L-Trp*), 128.7, 128.8 (C^{3a} *L-Trp*), 128.9 (C¹ PABA), 129.2, 129.4 (C^{2,6}

PABA), 137.5, 137.9 (C¹ Ph), 138.0 (C^{7a} L-Trp), 143.9, 144.1 (C⁴ PABA), 154.8, 157.5, 157.8 [C=O (Boc)], 161.2, 161.3, 161.7 (C^{3,5} Ph), 169.7, 169.9 (CONH Ph), 170.1, 174.3, 174.5, 174.6, 175.5 (CONH).

$[\alpha]_D^{25} = -7.0$ (c 1, MeOH).

$R_f = 0.43$ (CHCl₃/MeOH 8:1).

T. top.: 146-151 °C.

d) Dendrymer 131

Do reakcji użyto związku **118** (0.23 g, 0.29 mmol), HOBt (0.044 g, 0.29 mmol), EDC·HCl (0.056 g, 0.29 mmol), dendrymeru pośredniego **119** (0.63 g, 0.26 mmol), Et₃N (0.07 mL, 0.52 mmol) i DMF (15 mL). Sprzęganie prowadzono przez 5 dni. Otrzymano produkt w postaci kremowego proszku z wydajnością 85.5% (0.71 g).

C₁₅₃H₂₀₄O₃₉N₂₂Cl₄S₂, M = 3181.32 g/mol (masa monoizotopowa 3177.3).

LRMS (ESI, MeOH): 3205.2 [M + Na⁺], 1611.6 [M + 2Na⁺]²⁺ - główny sygnał.

¹H NMR (500 MHz, MeOD): $\delta = 1.20$ -1.51 [br m, 22H, 5 \times γ CH₂ L-Lys i rdzenia, 4 \times δ CH₂ L-Lys, O-(CH₂)₂-CH₂-CH₂-CH₂-NH] nakładający się na 1.37 [s, 36H, 4 \times C(CH₃)₃ L-Lys] i 1.49 [s, 18H, 2 \times C(CH₃)₃ SA], 1.58 [br m, 8H, 2 \times β CH₂, δ CH₂ rdzenia, O-CH₂-CH₂-(CH₂)₃-NH], 1.64-1.83 (br m, 6H, 3 \times β CH₂), 2.79 (br t, 2H, O-(CH₂)₄-CH₂-NH], 3.03 (m, 8H, 4 \times ϵ CH₂ L-Lys), 3.17 (m, 3H, β CH₂ L-Trp, O-CH₂-CH₂-NHSO₂), 3.25 (m, 3H, β CH₂ L-Trp, ϵ CH₂ rdzenia), 3.34 (m, 4H, NH-CH₂-CH₂-NH), 3.42-3.62 (br m, 8H, 4 \times O-CH₂-CH₂-NH), 3.80 [m, 2H, O-CH₂-(CH₂)₄-NH], 3.88-4.07 (br m, 14H, 5 \times O-CH₂-CH₂-NH, 4 \times α CH L-Lys), 4.36 (m, 1H, α CH rdzenia), 4.59 (m, 1H, α CH L-Trp), 5.12 (2s, 8H, Ar-CH₂O), 6.42 (m, 1H, C⁴-H Ph), 6.62 (m, 2H, C⁴-H Ph), 6.84-7.01 (br m, 8H, C^{2,6}-H Ph, C^{5,6}-H L-Trp), 7.04 (s, 1H, C²-H L-Trp), 7.24 (m, 9H, ArH, C⁷-H L-Trp), 7.30-7.41 (2m, 8H, ArH), 7.48-7.60 (br m, 5H, C⁴-H L-Trp, C^{3,5}-H SA), 7.70 (m, 4H, C^{2,6}-H SA).

¹³C NMR (500 MHz, MeOD): $\delta = 24.1$, 24.2 [γ C, O-(CH₂)₂-CH₂-(CH₂)₂-NH], 28.3 (β C L-Trp), 28.7, 28.8 [C(CH₃)₃], 29.8, 30.1, 30.3, 30.5 [δ C, O-CH₂-CH₂-CH₂-CH₂-NH], 33.2 (β C), 39.9 (4 \times O-CH₂-CH₂-NH), 40.4, 40.7, 40.8 (ϵ C rdzenia, NH-CH₂-CH₂-NH), 41.5 (4 \times ϵ C L-Lys), 43.5 (O-CH₂-CH₂-NHSO₂), 44.0 [O-(CH₂)₄-CH₂-NH], 56.0 (α C L-Trp), 56.1 (4 \times α C L-Lys), 56.3 (α C rdzenia), 64.6 (Ar-CH₂O), 67.8 (4 \times O-CH₂-CH₂-NH), 68.1 (O-CH₂-CH₂-NHSO₂), 69.1 [O-CH₂-(CH₂)₄-NH], 80.7, 81.5 [C(CH₃)₃], 105.9, 106.4, 106.7 (C⁴ Ph), 107.3, 107.5 (C^{2,6} Ph), 110.9 (C³ L-Trp), 112.5 (C⁷ L-Trp), 119.0 (C^{3,5} SA), 119.3 (C⁴ L-Trp), 119.9 (C⁵ L-Trp), 122.6 (C⁶ L-Trp), 124.6 (C² L-Trp), 128.1 (CH_{Ar}), 128.7 (C^{3a} L-Trp), 129.1 (C^{2,6} SA), 130.4, 130.5 (CH_{Ar}), 134.1 (C_{Ar}-Cl), 134.7 (C¹ SA), 135.9 (C_{Ar}-CH₂O), 137.4, 137.9 (C¹

Ph), 138.0 (C^{7a} *L-Trp*), 144.9 (C⁴ *SA*), 154.6, 157.8, 158.5 [C=O (Boc, 2-Cl-Z)], 161.2, 161.3, 161.5 (C^{3,5} *Ph*), 169.9 (CONH *Ph*), 174.3, 174.4, 175.5 (CONH).

$[\alpha]_D^{25} = -11.6$ (c 1, MeOH).

$R_f = 0.30$ (CHCl₃/MeOH 8:1).

T. top.: 114-122°C.

e) Dendrymer 132

Do reakcji użyto związku **118** (0.23 g, 0.29 mmol), HOBt (0.044 g, 0.29 mmol), EDC·HCl (0.056 g, 0.29 mmol), dendrymeru pośredniego **120** (0.65 g, 0.26 mmol), Et₃N (0.07 mL, 0.52 mmol) i DMF (15 mL). Sprzężanie prowadzono przez 3 dni. Otrzymano produkt w postaci kremowego proszku z wydajnością 91.8% (0.78 g).

C₁₅₇H₂₁₂O₄₁N₂₂Cl₄S₂, M = 3269.43 g/mol (masa monoizotopowa 3265.3).

LRMS (ESI, MeOH): 3288.6 [M + Na⁺], 1655.2 [M + 2Na⁺]²⁺ - *główny sygnał*.

¹H NMR (500 MHz, MeOD): $\delta = 1.28-1.75$ [br m, 36H, 5 \times β , γ , δ CH₂ *L-Lys* i rdzenia, O-CH₂-(CH₂)₃-CH₂-NH] nakładający się na 1.37, 1.39 [3s, 54H, 6 \times C(CH₃)₃], 2.81 [m, 2H, O-(CH₂)₄-CH₂-NH], 3.04 (m, 8H, 4 \times ϵ CH₂ *L-Lys*), 3.10-3.35 (br m, 10H, β CH₂ *L-Trp*, ϵ CH₂ rdzenia, O-CH₂-CH₂-NHSO₂, 2 \times CH₂NH *NOON*), 3.40-3.62 (br m, 16H, 4 \times O-CH₂-CH₂-NH, 4 \times OCH₂ *NOON*), 3.82 [m, 2H, O-CH₂-(CH₂)₄-NH], 3.92 (m, 2H, O-CH₂-CH₂-NHSO₂), 4.00 (br m, 12H, 4 \times O-CH₂-CH₂-NH, 4 \times α CH *L-Lys*), 4.48 (m, 1H, α CH rdzenia), 4.61 (m, 1H, α CH *L-Trp*), 5.12 (2s, 8H, Ar-CH₂O), 6.42 (m, 1H, C⁴-H *Ph*), 6.62 (m, 2H, C⁴-H *Ph*), 6.82-6.98 (br m, 8H, C^{2,6}-H *Ph*, C^{5,6}-H *L-Trp*), 7.06 (s, 1H, C²-H *L-Trp*), 7.24 (m, 9H, ArH, C⁷-H *L-Trp*), 7.36 (2m, 8H, ArH), 7.55 (m, 5H, C⁴-H *L-Trp*, C^{3,5}-H *SA*), 7.71 (m, 4H, C^{2,6}-H *SA*).

¹³C NMR (500 MHz, MeOD): $\delta = 24.1, 24.2$ [γ C, O-(CH₂)₂-CH₂-(CH₂)₂-NH], 28.7, 28.8 [C(CH₃)₃], 29.0 (β C *L-Trp*), 29.8, 30.1, 30.3, 30.5 [δ C, O-CH₂-CH₂-CH₂-CH₂-NH], 32.4, 33.2 (β C), 40.0 (4 \times O-CH₂-CH₂-NH), 40.5, 40.7, 41.0 (ϵ C rdzenia, 2 \times CH₂NH *NOON*), 41.5 (4 \times ϵ C *L-Lys*), 43.5 (O-CH₂-CH₂-NHSO₂), 44.0 [O-(CH₂)₄-CH₂-NH], 55.8 (α C *L-Trp*, α C rdzenia), 56.1 (4 \times α C *L-Lys*), 64.6 (Ar-CH₂O), 67.8 (4 \times O-CH₂-CH₂-NH), 68.0 (O-CH₂-CH₂-NHSO₂), 69.1 [O-CH₂-(CH₂)₄-NH], 70.3, 70.5, 71.3 (4 \times OCH₂ *NOON*), 80.6, 81.5 [C(CH₃)₃], 105.6, 105.9, 106.2 (C⁴ *Ph*), 106.7, 107.2, 107.5 (C^{2,6} *Ph*), 110.8 (C³ *L-Trp*), 112.4 (C⁷ *L-Trp*), 119.0 (C^{3,5} *SA*), 119.5 (C⁴ *L-Trp*), 119.9 (C⁵ *L-Trp*), 122.5 (C⁶ *L-Trp*), 124.8 (C² *L-Trp*), 128.2 (CH_{Ar}), 128.8 (C^{3a} *L-Trp*), 129.1 (C^{2,6} *SA*), 130.4, 130.5 (CH_{Ar}), 134.1 (C_{Ar}-Cl), 134.7, 134.8 (C¹ *SA*), 135.9 (C_{Ar}-CH₂O), 137.5 (C¹ *Ph*), 137.9 (C^{7a} *L-Trp*), 144.9 (C⁴ *SA*), 154.6, 157.8, 158.5 [C=O (Boc, 2-Cl-Z)], 161.0, 161.2, 161.3, 161.6 (C^{3,5} *Ph*), 169.8 (CONH *Ph*), 173.7, 174.1, 175.5 (CONH).

$[\alpha]_D^{25} = -9.6$ (c 1, MeOH).

$R_f = 0.52$ (CHCl₃/MeOH 8:1).

T. top.: 109-115°C.

f) Dendrymer 133

Do reakcji użyto związku **118** (0.15 g, 0.19 mmol), HOBt (0.029 g, 0.19 mmol), EDC·HCl (0.036 g, 0.19 mmol), dendrymeru pośredniego **123** (0.5 g, 0.17 mmol), Et₃N (0.05 mL, 0.34 mmol) i DMF (10 mL). Sprzęganie prowadzono przez 5 dni. Otrzymano produkt w postaci kremowego proszku z wydajnością 85.7% (0.54 g).

C₁₈₅H₂₅₆O₄₃N₃₀S₂, M = 3652.32 g/mol (masa monoizotopowa 3649.8).

LRMS (ESI, MeOH): 3677.1 [M + Na⁺], 1848.0 [M + 2Na⁺]²⁺ - *główny sygnał*, 1239.6 [M + 3Na⁺]³⁺.

¹H NMR (500 MHz, MeOD): $\delta = 1.0$ -1.81 [br m, 36H, 5 \times β , γ , δ CH₂ *L-Lys* i rdzenia, O-CH₂-(CH₂)₃-CH₂-NH] nakładający się na 1.34, 1.38, 1.49 [3s, 90H, 10 \times C(CH₃)₃], 2.78 [m, 2H, O-(CH₂)₄-CH₂-NH], 2.8-3.4 (br m, 26H, 5 \times ϵ CH₂ *L-Lys* i rdzenia, 5 \times β CH₂ *L-Trp*, NH-CH₂-CH₂-NH, O-CH₂-CH₂-NHSO₂), 3.42-3.62 (2m, 8H, 4 \times O-CH₂-CH₂-NH), 3.75-3.90 [br m, 4H, O-CH₂-(CH₂)₄-NH, O-CH₂-CH₂-NHSO₂], 3.97 (m, 12H, 4 \times α CH *L-Lys*, 4 \times O-CH₂-CH₂-NH), 4.29 (m, 4H, 4 \times α CH *L-Trp*), 4.37 (m, 1H, α CH rdzenia), 4.59 (t, 1H, α CH *L-Trp*), 6.42 (m, 1H, C⁴-H *Ph*), 6.61 (m, 2H, C⁴-H *Ph*), 6.80-7.08 (br m, 21H, C^{2,6}-H *Ph*, C^{2,5,6}-H *L-Trp*), 7.24 (d, $J = 8.1$ Hz, 1H, C⁷-H *L-Trp*), 7.30 (d, $J = 7.7$ Hz, 4H, C⁷-H *L-Trp*), 7.47-7.60 (br m, 9H, C⁴-H *L-Trp*, C^{3,5}-H SA), 7.70 (m, 4H, C^{2,6}-H SA).

¹³C NMR (500 MHz, MeOD): $\delta = 24.2$ [γ C, 2 \times O-(CH₂)₂-CH₂-(CH₂)₂-NH], 28.4 (β C *L-Trp*), 28.7, 28.8 [C(CH₃)₃], 29.6, 29.7, 29.8 (4 \times β C *L-Trp*), 30.1, 30.2, 30.3, 30.5, 30.7 [δ C, 2 \times O-CH₂-CH₂-CH₂-CH₂-CH₂-NH], 33.1, 33.2 (β C), 40.0 (4 \times O-CH₂-CH₂-NH), 40.1, 40.4, 40.7 (ϵ C rdzenia, NH-CH₂-CH₂-NH), 42.4 (4 \times ϵ C *L-Lys*), 43.5 (O-CH₂-CH₂-NHSO₂), 44.0 [O-(CH₂)₄-CH₂-NH], 56.0 (α C *L-Trp*), 56.1 (4 \times α C *L-Lys*), 56.3 (α C rdzenia), 57.1 (4 \times α C *L-Trp*), 67.8 (4 \times O-CH₂-CH₂-NH), 68.0 (O-CH₂-CH₂-NHSO₂), 69.1 [O-CH₂-(CH₂)₄-NH], 79.5, 80.6, 81.5 [C(CH₃)₃], 105.9, 106.3 (C⁴ *Ph*), 106.6, 107.2, 107.4 (C^{2,6} *Ph*), 110.9, 111.1 (C³ *L-Trp*), 112.3, 112.4 (C⁷ *L-Trp*), 119.0 (C^{3,5} SA), 119.3, 119.5 (C⁴ *L-Trp*), 119.8, 119.9 (C⁵ *L-Trp*), 122.5, 122.6 (C⁶ *L-Trp*), 124.6 (C² *L-Trp*), 128.7, 128.8 (C^{3a} *L-Trp*), 129.1 (C^{2,6} SA), 134.6, 134.7 (C¹ SA), 137.4, 137.9 (C¹ *Ph*), 138.0 (C^{7a} *L-Trp*), 144.9 (C⁴ SA), 154.6, 157.5, 157.8 [C=O (Boc)], 161.0, 161.2, 161.3, 161.5 (C^{3,5} *Ph*), 169.9 (CONH *Ph*), 170.1, 174.4, 174.6, 175.5 (CONH).

$[\alpha]_D^{25} = -6.7$ (c 1, MeOH).

$R_f = 0.53$ (CHCl₃/MeOH 8:1).

T. top.: 123-130°C.

6.5.4.3.2. Odbezpieczone dendrymery

Deprotekcję grup Boc w dendrymerach **125 – 127, 131 – 133** za pomocą nasyconego roztworu HCl w AcOEt przeprowadzono wg procedury ogólnej zamieszczonej w Rozdziale 6.2. (Procedura C - wariant B). Reakcji poddawano 0.3 – 0.4 g (0.08 - 0.122 mmol) związku rozpuszczonego w 1 lub 2 mL MeOH z 15 mL nas. HCl/AcOEt. Całkowite zdjęcie grup Boc zachodziło w ciągu 2 godzin. Otrzymano produkty w postaci heksachlorowodorków (**128, 129, 134, 135**) lub dekahlorowodorków (**130, 136**). Są to higroskopijne, bezpostaciowe proszki barwy kremowej lub jasnożółtej.

a) Dendrymer **128**

Związek w postaci jasnożółtego proszku otrzymano z wydajnością 92.3% (0.24 g) z 0.3 g (0.096 mmol) dendrymeru **125**.

C₁₂₅H₁₅₆O₂₅N₂₂Cl₄×6HCl, M = 2727.28 g/mol (masa monoizotopowa nieprotonowanego związku – 2505.0).

LRMS (ESI, MeOH): 1280.5 [M + MeOH + H⁺ + Na⁺]²⁺, 1253.6 [M + 2H⁺]²⁺, 1169.6 [M – 2ClZ + 2H⁺]²⁺, 853.7 [M + MeOH + 2H⁺ + Na⁺]³⁺, 836.1 [M + 3H⁺]³⁺ - *główny sygnał*, 798.0 [M – 2ClZ + MeOH + 2H⁺ + Na⁺]³⁺, 780.0 [M – 2ClZ + 3H⁺]³⁺.

¹H NMR (500 MHz, MeOD): δ = 1.30-1.90 [br m, 36H, 5×β, γ, δCH₂ *L-Lys* i rdzenia, O-CH₂-(CH₂)₃-CH₂-NH], 2.85 (m, 2H, εCH₂ rdzenia), 3.04 (m, 8H, 4×εCH₂ *L-Lys*), 3.12-3.4 [br m, 8H, βCH₂ *L-Trp*, O-(CH₂)₄-CH₂-NH, NH-CH₂-CH₂-NH], 3.53 (m, 4H, 2×O-CH₂-CH₂-NH), 3.70 (m, 6H, 3×O-CH₂-CH₂-NH), 3.91 [m, 6H, O-CH₂-(CH₂)₄-NH, 4×αCH *L-Lys*], 4.08 (m, 8H, 4×O-CH₂-CH₂-NH), 4.16 (m, 2H, O-CH₂-CH₂-NH), 4.35 (m, 1H, αCH rdzenia), 4.59 (m, 1H, αCH *L-Trp*), 5.11 (2s, 8H, Ar-CH₂O), 6.60-6.71 (br m, 3H, C⁴-H *Ph*), 6.90-7.05 (br m, 8H, C^{2,6}-H *Ph*, C^{5,6}-H *L-Trp*), 7.13 (m, 1H, C²-H *L-Trp*), 7.25 (m, 9H, ArH, C⁷-H *L-Trp*), 7.36 (m, 8H, ArH), 7.47 (m, 5H, C⁴-H *L-Trp*, C^{3,5}-H *PABA*), 7.94 (d, *J* = 8.14 Hz, 4H, C^{2,6}-H *PABA*).

¹³C NMR (500 MHz, MeOD): δ = 23.0, 24.5 [γC, 2×O-(CH₂)₂-CH₂-(CH₂)₂-NH], 28.1 (βC *L-Trp*), 29.9, 30.1, 30.5 [δC, 2×O-CH₂-CH₂-CH₂-CH₂-NH], 32.1, 32.3 (βC), 40.2, 40.3, 40.7, 41.0 (εC rdzenia, 6×CH₂-NH, NH-CH₂-CH₂-NH), 41.3 (4×εC *L-Lys*), 54.2, 54.5 (4×αC *L-Lys*), 56.0 (αC *L-Trp*), 56.5 (αC rdzenia), 64.7 (Ar-CH₂O), 67.7 (5×O-CH₂-CH₂-NH), 69.2 [O-CH₂-(CH₂)₄-NH], 105.9, 106.0 (C⁴ *Ph*), 106.5, 106.8, 107.3, 107.6 (C^{2,6} *Ph*), 112.4 (C⁷ *L-*

Trp), 119.3 (C^4 *L-Trp*), 119.9 (C^5 *L-Trp*), 122.5 (C^6 *L-Trp*), 124.1, 124.2 ($C^{3,5}$ *PABA*), 124.6 (C^2 *L-Trp*), 128.2 (CH_{Ar}), 128.7 (C^{3a} *L-Trp*), 130.3 ($C^{2,6}$ *PABA*), 130.4, 130.5 (CH_{Ar}), 132.3 (C^1 *PABA*), 134.1 (C_{Ar-Cl}), 135.8 (C_{Ar-CH_2O}), 136.4 (C^4 *PABA*), 137.5 (C^1 *Ph*), 138.0 (C^{7a} *L-Trp*), 158.6 [$C=O$ (2-*Cl-Z*)], 161.2, 161.3, 161.7 ($C^{3,5}$ *Ph*), 168.9 ($CONH$ *Ph*), 170.3, 170.4 ($CONH$).

$[\alpha]_D^{25} = -10.0$ (c 1, MeOH).

T. top.: 162-175°C.

b) Dendrymer 129

Związek w postaci jasnożółtego proszku otrzymano z wydajnością 96.3% (0.26 g) z 0.31 g (0.097 mmol) dendrymeru **126**.

$C_{129}H_{164}O_{27}N_{22}Cl_4 \times 6HCl$, $M = 2815.39$ g/mol (masa monoizotopowa nieprotonowanego związku – 2593.1).

LRMS (ESI, MeOH): 2594.2 [$M + H^+$], 1297.4 [$M + 2H^+$]²⁺, 1324.9 [$M + MeOH + H^+ + Na^+$]²⁺, 651.3 [$M + 4H^+$]⁴⁺ - główny sygnał.

¹H NMR (500 MHz, MeOD): $\delta = 1.30-1.92$ [br m, 36H, $5 \times \beta, \gamma, \delta CH_2$ *L-Lys* i rdzenia, $O-CH_2-(CH_2)_3-CH_2-NH$], 2.85 (m, 2H, ϵCH_2 rdzenia), 3.03 (m, 8H, $4 \times \epsilon CH_2$ *L-Lys*), 3.10-3.60 [br m, 20H, βCH_2 *L-Trp*, $O-(CH_2)_4-CH_2-NH$, $2 \times O-CH_2-CH_2-NH$, $2 \times CH_2NH$ *NOON*, $4 \times OCH_2$ *NOON*], 3.70 (br m, 6H, $3 \times O-CH_2-CH_2-NH$), 3.91 [m, 6H, $O-CH_2-(CH_2)_4-NH$, $4 \times \alpha CH$ *L-Lys*], 4.08 (m, 8H, $4 \times O-CH_2-CH_2-NH$), 4.16 (m, 2H, $O-CH_2-CH_2-NH$), 4.34 (m, 1H, αCH rdzenia), 4.59 (m, 1H, αCH *L-Trp*), 5.11 (2s, 8H, $Ar-CH_2O$), 6.60-6.71 (br m, 3H, C^4-H *Ph*), 6.89-7.04 (br m, 8H, $C^{2,6}-H$ *Ph*, $C^{5,6}-H$ *L-Trp*), 7.07 (s, 1H, C^2-H *L-Trp*), 7.25 (m, 9H, ArH , C^7-H *L-Trp*), 7.36 (m, 8H, ArH), 7.47 (m, 5H, C^4-H *L-Trp*, $C^{3,5}-H$ *PABA*), 7.94 (d, $J = 8.14$ Hz, 4H, $C^{2,6}-H$ *PABA*).

¹³C NMR (500 MHz, MeOD): $\delta = 23.0, 24.5$ [γC , $2 \times O-(CH_2)_2-CH_2-(CH_2)_2-NH$], 29.0 (βC *L-Trp*), 29.9, 30.1, 30.2, 30.5 [δC , $2 \times O-CH_2-CH_2-CH_2-CH_2-CH_2-NH$], 32.3, 32.5 (βC), 40.2 ($4 \times O-CH_2-CH_2-NH$), 40.4, 40.6, 40.8, 40.9 [ϵC rdzenia, $O-(CH_2)_4-CH_2-NH$, $O-CH_2-CH_2-NH$, $2 \times CH_2NH$ *NOON*], 41.3 ($4 \times \epsilon C$ *L-Lys*), 54.2, 54.4 ($4 \times \alpha C$ *L-Lys*), 55.8 (αC *L-Trp*), 56.0 (αC rdzenia), 64.7 ($Ar-CH_2O$), 67.6, 67.8 ($5 \times O-CH_2-CH_2-NH$), 69.1 [$O-CH_2-(CH_2)_4-NH$], 70.3, 70.5, 71.2 ($4 \times OCH_2$ *NOON*), 105.6, 105.8, 106.2 (C^4 *Ph*), 106.9, 107.3, 107.5 ($C^{2,6}$ *Ph*), 110.8 (C^3 *L-Trp*), 112.4 (C^7 *L-Trp*), 119.2 (C^4 *L-Trp*), 119.9 (C^5 *L-Trp*), 122.5 (C^6 *L-Trp*), 124.1, 124.2 ($C^{3,5}$ *PABA*), 124.8 (C^2 *L-Trp*), 128.2 (CH_{Ar}), 128.8 (C^{3a} *L-Trp*), 130.1, 130.2 ($C^{2,6}$ *PABA*), 130.4, 130.5 (CH_{Ar}), 134.1 (C_{Ar-Cl}), 135.8 (C_{Ar-CH_2O}), 137.2, 137.5 (C^1 *Ph*), 137.9

(C^{7a} *L-Trp*), 158.6 [C=O (2-Cl-Z)], 161.2, 161.4, 161.7 (C^{3,5} *Ph*), 169.4, 169.5, 169.8, 169.9 (CONH *Ph*), 170.4, 173.7, 174.1 (CONH).

$[\alpha]_D^{25} = -5.1$ (c 1, MeOH).

T. top.: 149-155°C.

c) Dendrymer 130

Wychodząc z 0.3 g (0.08 mmol) dendrymeru **127** otrzymano produkt w postaci jasnożółtego proszku z wydajnością 97.2% (0.24 g).

C₁₃₇H₁₇₆O₂₁N₃₀×10HCl, M = 2943.66 g/mol (masa monoizotopowa nieprotonowanego związku – 2577.4).

LRMS (ESI, MeOH): 1289.7 [M + 2H⁺]²⁺, 860.2 [M + 3H⁺]³⁺ - główny sygnał, 645.4 [M + 4H⁺]⁴⁺.

¹H NMR (500 MHz, MeOD): δ = 1.25-1.81 [br m, 36H, 5×β, γ, δCH₂ *L-Lys* i rdzenia, O-CH₂-(CH₂)₃-CH₂-NH], 2.92-3.40 [br m, 26H, 5×εCH₂ *L-Lys* i rdzenia, 5×βCH₂ *L-Trp*, O-(CH₂)₄-CH₂-NH, NH-CH₂-CH₂-NH], 3.54 (m, 4H, 2×O-CH₂-CH₂-NH), 3.60-3.74 (br m, 6H, 3×O-CH₂-CH₂-NH), 3.89 [m, 6H, O-CH₂-(CH₂)₄-NH, 4×αCH *L-Lys*], 4.01-4.16 (br m, 14H, 5×O-CH₂-CH₂-NH, 4×αCH *L-Trp*), 4.37 (m, 1H, αCH rdzenia), 4.58 (m, 1H, αCH *L-Trp*), 6.59-6.69 (m, 3H, C⁴-H *Ph*), 6.88-7.12 (br m, 17H, C^{2,6}-H *Ph*, C^{2,5,6}-H *L-Trp*), 7.20 (s, 4H, C²-H *L-Trp*), 7.25 (d, J = 8.09 Hz, 1H, C⁷-H *L-Trp*), 7.36 (d, J = 8.07 Hz, 4H, C⁷-H *L-Trp*), 7.47 (m, 5H, C⁴-H *L-Trp*, C^{3,5}-H *PABA*), 7.64 (m, 4H, C⁴-H *L-Trp*), 7.94 (m, 4H, C^{2,6}-H *PABA*).

¹³C NMR (500 MHz, MeOD): δ = 23.2, 24.5 [γC, 2×O-(CH₂)₂-CH₂-(CH₂)₂-NH], 28.9 (βC *L-Trp*), 29.6, 29.9, 30.1 [δC, 2×O-CH₂-CH₂-CH₂-CH₂-NH], 32.3 (βC), 40.1, 40.2, 40.7, 41.0 (εC, 6×CH₂-NH, NH-CH₂-CH₂-NH), 54.4 (4×αC *L-Lys*), 55.2 (4×αC *L-Trp*), 56.0 (αC *L-Trp*), 56.1 (αC rdzenia), 67.7 (5×O-CH₂-CH₂-NH), 69.2 [O-CH₂-(CH₂)₄-NH], 105.8, 106.0 (C⁴ *Ph*), 106.3, 106.7, 107.3, 107.6 (C^{2,6} *Ph*), 108.1, 110.9 (C³ *L-Trp*), 112.4, 112.6 (C⁷ *L-Trp*), 119.4 (C⁴ *L-Trp*), 119.9, 120.2 (C⁵ *L-Trp*), 122.5, 122.9 (C⁶ *L-Trp*), 124.2, 124.3 (C^{3,5} *PABA*), 125.7 (C² *L-Trp*), 128.4 (C^{3a} *L-Trp*), 130.3, 130.4 (C^{2,6} *PABA*), 135.9 (C¹ *PABA*), 136.4, 136.9 (C⁴ *PABA*), 137.4, 137.9 (C¹ *Ph*), 138.2 (C^{7a} *L-Trp*), 161.2, 161.3, 161.8 (C^{3,5} *Ph*), 168.6, 168.9, 169.6 (CONH *Ph*), 170.0, 170.1, 170.5 (CONH).

$[\alpha]_D^{25} = +11.2$ (c 1, MeOH).

T. top.: 209-220°C.

d) Dendrymer 134

Związek w postaci jasnożółtego proszku otrzymano z wydajnością 96.2% (0.25 g) z 0.3 g (0.094 mmol) dendrymeru **131**.

$C_{123}H_{156}O_{27}N_{22}Cl_4S_2 \times 6HCl$, $M = 2799.39$ g/mol (masa monoizotopowa nieprotonowanego związku – 2577.0).

LRMS (ESI, MeOH): 1316.5 $[M + MeOH + Na^+ + H^+]^{2+}$, 1289.6 $[M + 2H^+]^{2+}$, 1205.6 $[M - 2ClZ + 2H^+]^{2+}$, 878.3 $[M + MeOH + Na^+ + 2H^+]^{3+}$, 860.0 $[M + 3H^+]^{3+}$ - *główny sygnał*, 804.0 $[M - 2ClZ + 3H^+]^{3+}$.

1H NMR (500 MHz, MeOD): $\delta = 1.34-1.72$ [br m, 26H, $5 \times \gamma$, δCH_2 *L-Lys* i rdzenia, O- CH_2 -(CH_2)₃- CH_2 -NH], 1.84 (br m, 10H, $5 \times \beta CH_2$ *L-Lys* i rdzenia), 2.84 [m, 4H, O-(CH_2)₄- CH_2 -NH, ϵCH_2 rdzenia], 3.04 (m, 8H, $4 \times \epsilon CH_2$ *L-Lys*), 3.15-3.45 (br m, 8H, βCH_2 *L-Trp*, O- CH_2 - CH_2 -NHSO₂, NH- CH_2 - CH_2 -NH), 3.53, 3.68 (2m, 8H, $4 \times O-CH_2-CH_2-NH$), 3.90 [br m, 8H, O- CH_2 -(CH_2)₄-NH, O- CH_2 - CH_2 -NHSO₂, $4 \times \alpha CH$ *L-Lys*], 4.08 (m, 8H, $4 \times O-CH_2-CH_2-NH$), 4.33 (m, 1H, αCH rdzenia), 4.59 (m, 1H, αCH *L-Trp*), 5.11 (2s, 8H, Ar- CH_2O), 6.51 (m, 1H, C⁴-H *Ph*), 6.63-6.78 (br m, 3H, C⁴-H *Ph*, C^{2,6}-H *Ph*), 6.93 (m, 2H, C^{2,6}-H *Ph*, C⁵-H *L-Trp*), 7.01 (m, 5H, C^{2,6}-H *Ph*, C⁶-H *L-Trp*), 7.10 (s, 1H, C²-H *L-Trp*), 7.26 (m, 9H, ArH, C⁷-H *L-Trp*), 7.30-7.55 (br m, 13H, ArH, C⁴-H *L-Trp*, C^{3,5}-H SA), 7.91 (m, 4H, C^{2,6}-H SA).

^{13}C NMR (500 MHz, MeOD): $\delta = 23.0, 24.2, 24.4$ [γC , $2 \times O-(CH_2)_2-CH_2-(CH_2)_2-NH$], 28.1 (βC *L-Trp*), 29.7, 30.1, 30.3, 30.4 [δC , $2 \times O-CH_2-CH_2-CH_2-CH_2-CH_2-NH$], 32.0, 32.1, 32.3 (βC), 40.2, 40.3, 40.8 (ϵC rdzenia, $4 \times O-CH_2-CH_2-NH$, NH- CH_2-CH_2-NH), 41.3 ($4 \times \epsilon C$ *L-Lys*), 43.5 (O- $CH_2-CH_2-NHSO_2$), 44.0 [O-(CH_2)₄- CH_2-NH], 54.3, 54.5 ($4 \times \alpha C$ *L-Lys*), 56.0 (αC *L-Trp*), 56.6 (αC rdzenia), 64.7 (Ar- CH_2O), 67.7 ($4 \times O-CH_2-CH_2-NH$), 68.1 (O- $CH_2-CH_2-NHSO_2$), 69.2 [O- CH_2 -(CH_2)₄-NH], 105.8, 106.0, 106.5 (C⁴ *Ph*), 107.1, 107.3, 107.6 (C^{2,6} *Ph*), 110.9 (C³ *L-Trp*), 112.5 (C⁷ *L-Trp*), 119.3 (C⁴ *L-Trp*), 119.9 (C⁵ *L-Trp*), 122.5 (C⁶ *L-Trp*), 123.5, 123.6 (C^{3,5} SA), 124.7 (C² *L-Trp*), 128.2 (CH_{Ar}), 128.7 (C^{3a} *L-Trp*), 130.0 (C^{2,6} SA), 130.4, 130.5 (CH_{Ar}), 134.1 (C_{Ar}-Cl), 135.8 (C_{Ar}- CH_2O), 136.9 (C¹ SA), 137.4 (C¹ *Ph*), 138.0 (C^{7a} *L-Trp*), 140.5 (C⁴ SA), 158.6 [C=O (2-Cl-Z)], 161.0, 161.2, 161.3, 161.6 (C^{3,5} *Ph*), 170.0, 170.4, 174.4 (CONH).

$[\alpha]_D^{25} = -9.6$ (c 1, MeOH).

T. top.: 148-162°C.

e) Dendrymer 135

Związek w postaci kremowego proszku otrzymano z wydajnością 97.1% (0.34 g) z 0.4 g (0.122 mmol) dendrymeru **132**.

$C_{127}H_{164}O_{29}N_{22}Cl_4S_2 \times 6HCl$, $M = 2887.50$ g/mol (masa monoizotopowa nieprotonowanego związku – 2665.0).

LRMS (ESI, MeOH): 1344.6 $[M + H^+ + Na^+]^{2+}$, 1333.6 $[M + 2H^+]^{2+}$, 1249.6 $[M - (2-Cl-Z) + 2H^+]^{2+}$, 889.4 $[M + 3H^+]^{3+}$ - główny sygnał, 833.4 $[M - (2-Cl-Z) + 3H^+]^{3+}$.

1H NMR (500 MHz, MeOD): $\delta = 1.30-1.90$ [br m, 36H, $5 \times \beta, \gamma, \delta CH_2$ *L-Lys* i rdzenia, $O-CH_2-(CH_2)_3-CH_2-NH$], 2.85 [m, 4H, $O-(CH_2)_4-CH_2-NH, \epsilon CH_2$ rdzenia], 3.03 (m, 8H, $4 \times \epsilon CH_2$ *L-Lys*), 3.10-3.36 (br m, 8H, βCH_2 *L-Trp*, $O-CH_2-CH_2-NHSO_2, 2 \times CH_2NH$ *NOON*), 3.40-3.74 (br m, 16H, $4 \times O-CH_2-CH_2-NH, 4 \times OCH_2$ *NOON*), 3.88 [m, 6H, $O-CH_2-(CH_2)_4-NH, 4 \times \alpha CH$ *L-Lys*], 3.94 (m, 2H, $O-CH_2-CH_2-NHSO_2$), 4.08 (br m, 8H, $4 \times O-CH_2-CH_2-NH$), 4.46 (m, 1H, αCH rdzenia), 4.61 (m, 1H, αCH *L-Trp*), 5.12 (2s, 8H, $Ar-CH_2O$), 6.52 (m, 1H, C^4-H *Ph*), 6.67 (m, 2H, C^4-H *Ph*), 6.75 (m, 1H, $C^{2,6}-H$ *Ph*), 6.92 (m, 2H, $C^{2,6}-H$ *Ph, C^5-H* *L-Trp*), 7.02 (m, 5H, $C^{2,6}-H$ *Ph, C^6-H* *L-Trp*), 7.10 (s, 1H, C^2-H *L-Trp*), 7.26 (m, 9H, ArH, C^7-H *L-Trp*), 7.33-7.44 (br m, 12H, $ArH, C^{3,5}-H$ *SA*), 7.52 (d, $J = 7.93$ Hz, 1H, C^4-H *L-Trp*), 7.90 (m, 4H, $C^{2,6}-H$ *SA*).

^{13}C NMR (500 MHz, MeOD): $\delta = 23.0, 24.2, 24.6$ [$\gamma C, 2 \times O-(CH_2)_2-CH_2-(CH_2)_2-NH$], 29.0 (βC *L-Trp*), 29.7, 30.1, 30.4, 30.5 [$\delta C, 2 \times O-CH_2-CH_2-CH_2-CH_2-NH$], 32.3 (βC), 40.2 ($4 \times O-CH_2-CH_2-NH$), 40.4, 40.8, 41.0 (ϵC rdzenia, $2 \times CH_2NH$ *NOON*), 41.3 ($4 \times \epsilon C$ *L-Lys*), 43.5 ($O-CH_2-CH_2-NHSO_2$), 44.0 [$O-(CH_2)_4-CH_2-NH$], 54.4 ($4 \times \alpha C$ *L-Lys*), 55.8 (αC *L-Trp*), 56.0 (αC rdzenia), 64.7 ($Ar-CH_2O$), 67.6 ($4 \times O-CH_2-CH_2-NH$), 68.1 ($O-CH_2-CH_2-NHSO_2$), 69.1 [$O-CH_2-(CH_2)_4-NH$], 70.3, 70.5, 71.2 ($4 \times OCH_2$ *NOON*), 105.5, 105.8, 106.3 (C^4 *Ph*), 107.0, 107.1, 107.3, 107.5 ($C^{2,6}$ *Ph*), 110.7 (C^3 *L-Trp*), 112.4 (C^7 *L-Trp*), 119.4 (C^4 *L-Trp*), 119.9 (C^5 *L-Trp*), 122.5 (C^6 *L-Trp*), 122.9, 123.1 ($C^{3,5}$ *SA*), 124.8 (C^2 *L-Trp*), 128.2 (CH_{Ar}), 128.8 (C^{3a} *L-Trp*), 130.0 ($C^{2,6}$ *SA*), 130.4, 130.5 (CH_{Ar}), 134.1 (C_{Ar-Cl}), 135.8 (C_{Ar-CH_2O}), 137.2, 137.5 (C^1 *Ph*), 137.9 (C^{7a} *L-Trp*), 158.6 [$C=O$ (2-Cl-Z)], 161.0, 161.2, 161.3, 161.7 ($C^{3,5}$ *Ph*), 169.5 ($CONH$ *Ph*), 170.0, 170.4, 173.7, 174.1 ($CONH$).

$[\alpha]_D^{25} = -6.3$ (c 1, MeOH).

T. top.: 139-147°C.

f) Dendrymer 136

Wychodząc z 0.34 g (0.09 mmol) dendrymeru **133** otrzymano produkt w postaci kremowego proszku z wydajnością 89.3% (0.25 g).

$C_{135}H_{176}O_{23}N_{30}S_2 \times 10HCl$, $M = 3015.77$ g/mol (masa monoizotopowa nieprotonowanego związku – 2649.3).

LRMS (ESI, MeOH): 1352.7 [M + MeOH + H⁺ + Na⁺]²⁺, 1325.7 [M + 2H⁺]²⁺, 902.1 [M + MeOH + 2H⁺ + Na⁺]³⁺, 884.1 [M + 3H⁺]³⁺ - *główny sygnał*, 690.3 [M + 2MeOH + 2H⁺ + 2Na⁺]⁴⁺, 676.8 [M + MeOH + 3H⁺ + Na⁺]⁴⁺, 663.3 [M + 4H⁺]⁴⁺.

¹H NMR (500 MHz, MeOD): δ = 1.25-1.65 [br m, 26H, 5 \times γ , δ CH₂ *L-Lys* i rdzenia, O-CH₂-(CH₂)₃-CH₂-NH], 1.78 (m, 10H, 5 \times β CH₂ *L-Lys* i rdzenia), 2.81 [m, 4H, O-(CH₂)₄-CH₂-NH], 3.04 (m, 8H, 4 \times ϵ CH₂ *L-Lys*), 3.18-3.42 (br m, 18H, ϵ CH₂ rdzenia, 5 \times β CH₂ *L-Trp*, O-CH₂-CH₂-NHSO₂, NH-CH₂-CH₂-NH), 3.54, 3.65 (2m, 8H, 4 \times O-CH₂-CH₂-NH), 3.81-3.94 [br m, 8H, O-CH₂-(CH₂)₄-NH, O-CH₂-CH₂-NHSO₂, 4 \times α CH *L-Lys*], 4.02-4.14 (br m, 12H, 4 \times O-CH₂-CH₂-NH, 4 \times α CH *L-Trp*), 4.35 (m, 1H, α CH rdzenia), 4.59 (m, 1H, α CH *L-Trp*), 6.50 (m, 1H, C⁴-H *Ph*), 6.67 (m, 2H, C⁴-H *Ph*), 6.77 (m, 1H, C^{2,6}-H *Ph*), 6.92 (m, 2H, C^{2,6}-H *Ph*), 7.01 (m, 8H, C^{2,6}-H *Ph*, C⁵-H *L-Trp*), 7.10 (m, 6H, C^{2,6}-H *L-Trp*), 7.21 (s, 4H, C²-H *L-Trp*), 7.27 (d, J = 8.12 Hz, 1H, C⁷-H *L-Trp*), 7.34-7.45 (br m, 8H, C⁷-H *L-Trp*, C^{3,5}-H *SA*), 7.52 (d, J = 7.78 Hz, 1H, C⁴-H *L-Trp*), 7.64 (m, 4H, C⁴-H *L-Trp*), 7.88 (d, J = 7.95 Hz, 4H, C^{2,6}-H *SA*).

¹³C NMR (500 MHz, MeOD): δ = 23.2, 24.2, 24.4 [γ C, 2 \times O-(CH₂)₂-CH₂-(CH₂)₂-NH], 28.3, 28.5, 28.9 (β C *L-Trp*), 29.5, 29.7, 30.0, 30.3 [δ C, 2 \times O-CH₂-CH₂-CH₂-CH₂-NH], 32.0, 32.2 (β C), 37.8, 40.1, 40.2, 40.6, 40.8 (ϵ C, 4 \times O-CH₂-CH₂-NH, NH-CH₂-CH₂-NH), 43.5 (O-CH₂-CH₂-NHSO₂), 43.9 [O-(CH₂)₄-CH₂-NH], 54.4 (4 \times α C *L-Lys*), 55.2 (4 \times α C *L-Trp*), 56.1 (α C *L-Trp*), 56.4 (α C rdzenia), 67.7 (4 \times O-CH₂-CH₂-NH), 68.1 (O-CH₂-CH₂-NHSO₂), 69.2 [O-CH₂-(CH₂)₄-NH], 105.8, 106.4 (C⁴ *Ph*), 107.0, 107.1, 107.3, 107.6 (C^{2,6} *Ph*), 108.1, 110.9 (C³ *L-Trp*), 112.5, 112.6 (C⁷ *L-Trp*), 119.4 (C⁴ *L-Trp*), 119.9, 120.2 (C⁵ *L-Trp*), 122.5 (C⁶ *L-Trp*), 122.9, 123.1 (C^{3,5} *SA*), 124.8, 125.7 (C² *L-Trp*), 128.4, 128.6 (C^{3a} *L-Trp*), 130.0 (C^{2,6} *SA*), 136.8 (C¹ *SA*), 137.3, 137.9 (C¹ *Ph*), 138.1, 138.2 (C^{7a} *L-Trp*), 161.0, 161.2, 161.3, 161.6 (C^{3,5} *Ph*), 169.5 (CONH *Ph*), 170.0, 170.5, 174.5 (CONH).

$[\alpha]_D^{25}$ = +10.4 (c 1, MeOH).

T. top.: 196-204°C.

6.6. SYNTEZA RDZENI O CHARAKTERZE KATIONOWYM

Rdzenie zostały zsyntetyzowane w wyniku reakcji sprzęgania elementu rozgałęziającego opartego na dietylenotriaminie, tj. chlorowodoru kwasu 2-{bis[2-(Boc-amino)etylo]amino}octowego (**140**, Rozdział 6.3.5.), z odbezpieczonymi amidami *L*-lizyny i związku nieaminokwasowego (**8 - 10**, Rozdział 6.3.1.).

6.6.1. Boc-zabezpieczone rdzenie

Zsyntetyzowano trzy rdzenie wykorzystując procedurę ogólną sprzęgania metodą DCC/HOBt (Procedura A, Rozdział 6.2.). Przy czym do komponentu kwasowego rozpuszczonego w DMF dodano dodatkowo Et₃N w ilości potrzebnej do zneutralizowania chlorowodoru. Reakcje sprzęgania prowadzono przez 48 godzin, a surowe produkty oczyszczono poprzez chromatografię kolumnową na silikażelu z użyciem fazy CHCl₃/MeOH (gradient 100:1→15:1). Otrzymano produkty **141** – **143** mające postać białego proszku lub bezbarwnych olejów.

a) Tryptamid *N, N'*-bis({bis[2-(Boc-amino)etylo]amino}metylokarbonylo)-*L*-lizyny (**141**)

Do reakcji użyto związku **140** (1.45 g, 3.65 mmol) z Et₃N (0.51 mL, 3.65 mmol), HOBt (0.56 g, 3.65 mmol), DCC (0.75 g, 3.65 mmol), związku **8** (0.6 g, 1.66 mmol) z Et₃N (0.46 mL, 3.32 mmol) i DMF (20 mL). Otrzymano produkt w postaci białego proszku z wydajnością 82.7% (1.34 g).

C₄₈H₈₂O₁₁N₁₀, M = 975.23 g/mol (masa monoizotopowa 974.6).

LRMS (ESI, MeOH): 998.0 [M + Na⁺] - *główny sygnał*, 975.9 [M + H⁺], 510.6 [M + 2Na⁺]²⁺.

¹H NMR (500 MHz, MeOD): δ = 1.23-1.37 (m, 2H, γCH₂), 1.42 [s, 36H, 4×C(CH₃)₃], 1.48-1.56 (m, 2H, δCH₂), 1.61-1.81 (2m, 2H, βCH₂), 2.57 (m, 8H, 4×N-CH₂-CH₂-NHBoc), 2.95 (t, *J* = 7.0 Hz, 2H, CH₂-Ar *TA*), 3.01-3.23 (br m, 14H, εCH₂, 4×N-CH₂-CH₂-NHBoc, 2×N-CH₂-CONH), 3.46, 3.58 (2m, 2H, CH₂-NH *TA*), 4.32 (br t, 1H, αCH), 6.99 (br t, 1H, C⁵-H *TA*), 7.06 (m, 2H, C^{2,6}-H *TA*), 7.32 (d, *J* = 8.11 Hz, 1H, C⁷-H *TA*), 7.55 (d, *J* = 7.88 Hz, 1H, C⁴-H *TA*).

¹³C NMR (500 MHz, MeOD): δ = 24.3 (γC), 26.2 (CH₂-Ar *TA*), 28.9 [C(CH₃)₃], 30.2 (δC), 33.3 (βC), 39.6, 39.9 (εC, 4×N-CH₂-CH₂-NHBoc), 41.2 (CH₂-NH *TA*), 54.3 (αC), 56.1, 56.3 (4×N-CH₂-CH₂-NHBoc), 59.7, 59.9 (2×N-CH₂-CONH), 79.5, 80.1, 80.2 [C(CH₃)₃], 112.3 (C⁷ *TA*), 113.0 (C³ *TA*), 119.3 (C⁴ *TA*), 119.7 (C⁵ *TA*), 122.3 (C⁶ *TA*), 123.6 (C² *TA*), 128.8 (C^{3a} *TA*), 138.2 (C^{7a} *TA*), 158.5, 158.6 [C=O (Boc)], 173.8, 174.0 (CONH).

R_f = 0.61 (CHCl₃/MeOH 8:1).

b) Dodecyloamid *N, N'*-bis({bis[2-(Boc-amino)etylo]amino}metylokarbonylo)-*L*-lizyny (**142**)

Do reakcji użyto związku **140** (1.36 g, 3.41 mmol) z Et₃N (0.47 mL, 3.41 mmol), HOBt (0.52 g, 3.41 mmol), DCC (0.7 g, 3.41 mmol), związku **9** (0.6 g, 1.55 mmol) z Et₃N

(0.43 mL, 3.1 mmol) i DMF (20 mL). Otrzymano produkt w postaci bezbarwnego oleju z wydajnością 76.8% (1.19 g).

$C_{50}H_{97}O_{11}N_9$, $M = 1000.36$ g/mol (masa monoizotopowa 999.73).

LRMS (ESI, $CHCl_3$): 1022.8 $[M + Na^+]$ - *główny sygnał*, 1000.8 $[M + H^+]$, 622.5 $[M - 4Boc + Na^+]$, 322.8 $[M - 4Boc + 2Na^+]^{2+}$, 311.9 $[M - 4Boc + H + Na^+]^{2+}$.

1H NMR (500 MHz, $CDCl_3$): $\delta = 0.88$ (br t, 3H, CH_3 DDA), 1.23-2.20 (br m, 26H, β , γ , δCH_2 , CH_2 -2-11 DDA) nakładający się na 1.45 [2s, 36H, $4 \times C(CH_3)_3$], 2.60 (m, 8H, $4 \times N-CH_2-CH_2-NHBoc$), 3.00-3.42 (br m, 16H, CH_2 -1 DDA, ϵCH_2 , $4 \times N-CH_2-CH_2-NHBoc$, $2 \times N-CH_2-CONH$), 4.36 (m, 1H, αCH), 5.76-5.96 (br m, 4H, $4 \times N-CH_2-CH_2-NHBoc$), 6.73, 7.42 (2br s, 2H, ϵCH_2-NH , $NHCH_2$ -1 DDA), 7.67 (br s, 1H, $\alpha CH-NH$).

^{13}C NMR (500 MHz, $CDCl_3$): $\delta = 14.1$ (C^{12} DDA), 22.7, 26.9 (γC , $C^{3,11}$ DDA), 28.5 [$C(CH_3)_3$], 29.3-31.4 (δC , C^2 , C^4-C^{10} DDA), 31.9 (βC), 38.0, 38.6, 39.7 (ϵC , $4 \times N-CH_2-CH_2-NHBoc$, C^1 DDA), 52.6 (αC), 54.9, 55.6, 56.0 ($4 \times N-CH_2-CH_2-NHBoc$), 58.8, 59.1 ($2 \times N-CH_2-CONH$), 79.1, 79.3 [$C(CH_3)_3$], 156.6 [$C=O$ (Boc)], 171.4, 172.1 (CONH).

$R_f = 0.53$ ($CHCl_3/MeOH$ 8:1).

c) Didodecyloamid *N*, *N'*-bis({bis[2-(Boc-amino)etylo]amino}metylokarbonylo)-*L*-lizyny (143)

Do reakcji użyto związku **140** (1.26 g, 3.17 mmol) z Et_3N (0.44 mL, 3.17 mmol), HOBt (0.485 g, 3.17 mmol), DCC (0.654 g, 3.17 mmol), związku **10** (0.8 g, 1.44 mmol) z Et_3N (0.4 mL, 2.88 mmol) i DMF (20 mL). Otrzymano produkt w postaci bezbarwnego oleju z wydajnością 80.7% (1.36 g).

$C_{62}H_{121}O_{11}N_9$, $M = 1168.68$ g/mol (masa monoizotopowa 1167.9).

LRMS (ESI, MeOH): 1191.0 $[M + Na^+]$ - *główny sygnał*, 1169.0 $[M + H^+]$, 607.0 $[M + 2Na^+]^{2+}$, 596.1 $[M + Na^+ + H^+]^{2+}$, 585.0 $[M + 2H^+]^{2+}$.

1H NMR (500 MHz, MeOD): $\delta = 0.89$ (br t, 6H, $2 \times CH_3$ dDDA), 1.25-1.79 (br m, 46H, β , γ , δCH_2 , $2 \times CH_2$ -2-11 dDDA) nakładający się na 1.44 [2s, 36H, $4 \times C(CH_3)_3$], 2.55-2.71 (br m, $4 \times N-CH_2-CH_2-NHBoc$), 3.05-3.40 (br m, 18H, $2 \times CH_2$ -1 dDDA, ϵCH_2 , $4 \times N-CH_2-CH_2-NHBoc$, $2 \times N-CH_2-CONH$), 3.50 (m, 1H, αCH).

^{13}C NMR (500 MHz, MeOD): $\delta = 14.5$ ($2 \times C^{12}$ dDDA), 23.8, 24.4, 27.9, 28.0, 28.6 (γC , $2 \times C^{3,11}$ dDDA), 28.7, 28.9 [$C(CH_3)_3$], 30.2-33.4 (β , δC , $2 \times C^2$, $2 \times C^4-C^{10}$ dDDA), 39.5, 39.9 (ϵC , $4 \times N-CH_2-CH_2-NHBoc$, $2 \times C^1$ dDDA), 47.6 (αC), 56.1, 56.4 ($4 \times N-CH_2-CH_2-NHBoc$), 59.5, 59.9 ($2 \times N-CH_2-CONH$), 80.2 [$C(CH_3)_3$], 158.5, 158.6 [$C=O$ (Boc)], 173.5 (CONH).

$R_f = 0.55$ ($CHCl_3/MeOH$ 8:1).

6.6.2. Odbezpieczone rdzenie

Deprotekcję grup Boc w rdzeniach **141** - **143** za pomocą nasyconego roztworu HCl w EtOAc przeprowadzono wg procedury ogólnej zamieszczonej w Rozdziale 6.2. (Procedura C – wariant A). Otrzymano produkty **144** - **146** występujące w postaci higroskopijnych heksachlorowodorków, które suszono w eksykatorze nad P₂O₅.

a) Heksachlorowodorek tryptamidu *N*, *N'*-bis{[bis(2-aminoetylo)amino]metylokarbonylo}-*L*-lizyny (**144**)

Boc-deprotekcji poddano 1.3 g (1.33 mmol) rdzenia **141** w 20 mL nas. HCl/EtOAc. Całkowite zdjęcie ochrony nastąpiło po 6 godzinach. Otrzymano produkt w postaci kremowego proszku z wydajnością 94.4% (1.02 g).

C₂₈H₅₀O₃N₁₀×6HCl, M = 793.53 g/mol (masa monoizotopowa nieprotonowanego związku – 574.4).

LRMS (ESI, MeOH): 597.4 [M + Na⁺] - *główny sygnał*, 575.4 [M + H⁺].

b) Heksachlorowodorek dodecyloamidu *N*, *N'*-bis{[bis(2-aminoetylo)amino]metylokarbonylo}-*L*-lizyny (**145**)

Boc-deprotekcji poddano 1.05 g (1.05 mmol) rdzenia **142** w 20 mL nas. HCl/EtOAc. Całkowite zdjęcie ochrony nastąpiło po 6 godzinach. Otrzymano produkt w postaci kremowego proszku z wydajnością 95.3% (0.82 g).

C₃₀H₆₅O₃N₉×6HCl, M = 818.66 g/mol (masa monoizotopowa nieprotonowanego związku – 599.5).

LRMS (ESI, MeOH): 622.7 [M + Na⁺], 600.5 [M + H⁺] - *główny sygnał*.

c) Heksachlorowodorek didodecyloamidu *N*, *N'*-bis{[bis(2-aminoetylo)amino]metylokarbonylo}-*L*-lizyny (**146**)

Boc-deprotekcji poddano 1.25 g (1.07 mmol) rdzenia **143** w 20 mL nas. HCl/EtOAc. Całkowite zdjęcie ochrony nastąpiło po 6 godzinach. Otrzymano produkt w postaci jasnożółtego proszku z wydajnością 89.5% (0.94 g).

C₄₂H₈₉O₃N₉×6HCl, M = 987.22 g/mol (masa monoizotopowa nieprotonowanego związku – 767.7).

LRMS (ESI, MeOH): 791.0 [M + Na⁺], 768.8 [M + H⁺] - *główny sygnał*.

6.7. SYNTEZA DENDRYMERÓW OPARTYCH NA RDZENIACH KATIONOWYCH

6.7.1. Synteza dendrymerów z terminalnymi resztami lizynowymi

Dendrymery z terminalnymi resztami lizynowymi zostały zsyntetyzowane w wyniku reakcji sprzęgania odbezpieczonych rdzeni **144** - **146** (Rozdział 6.6.2.) z ortogonalnie zabezpieczoną *L*-lizyną [Boc-Lys(2-Cl-Z)-OH, Boc-Lys(Z)-OH].

6.7.1.1. Zabezpieczone dendrymery

Wykorzystując procedurę ogólną sprzęgania metodą DCC/HOBt (Procedura A, Rozdział 6.2.) zsyntetyzowano 7 dendrymerów z terminalnymi resztami lizynowymi. Do efektywnego przeprowadzenia reakcji niezbędne okazało się użycie dużego nadmiaru Et₃N (16-krotnego). Włącznie z ilością zastosowaną do zneutralizowania komponentu aminowego, występującego w postaci heksachlorowodoru, reakcje prowadzono z 22 ekw. Et₃N. Całkowite przereagowanie wolnych grup aminowych następowało w ciągu 48 godzin (dla dendrymerów **147** i **157**), 72 godzin (dla dendrymerów **150** i **151**) lub 6 dni (dla dendrymerów **148**, **149** i **158**). EtOAc zastąpiono przez CHCl₃ a MgSO₄ przez Na₂SO₄. Czyste dendrymery uzyskano w wyniku sączenia molekularnego z użyciem kolumny z wypełnieniem Sephadex LH-20 z MeOH jako eluentem, a następnie doczyszczania na kolumnie silikażelowej z użyciem fazy CHCl₃/MeOH (gradient 100:1→25:1). Produkty otrzymano w postaci białych, kremowych lub jasnożółtych proszków.

a) Dendrymer **147** (otrzymany z rdzenia **144**)

Do reakcji użyto Boc-Lys(2-Cl-Z)-OH (1.12 g, 2.71 mmol), HOBt (0.41 g, 2.71 mmol), DCC (0.56 g, 2.71 mmol), rdzenia **144** (0.49 g, 0.617 mmol), Et₃N (1.9 mL, 13.57 mmol) i DMF (25 mL). Sprzęganie prowadzono przez 48 godzin. Otrzymano produkt w postaci jasnożółtego proszku z wydajnością 74.6% (1 g).

C₁₀₄H₁₅₀O₂₃N₁₈Cl₄, M = 2162.22 g/mol (masa monoizotopowa 2159.0).

LRMS (ESI, MeOH): 2181.9 [M + Na⁺], 2160.4 [M + H⁺], 1102.9 [M + 2Na⁺]²⁺ - *główny sygnał*, 1091.6 [M + H⁺ + Na⁺]²⁺.

¹H NMR (500 MHz, MeOD): δ = 1.25-1.55 (br m, 20H, γ, δCH₂) nakładający się na 1.40 [2s, 36H, 4×C(CH₃)₃], 1.60, 1.72 (2m, 10H, βCH₂), 2.60 (m, 8H, 4×N-CH₂-CH₂-NH), 2.95 (t, J = 7.0 Hz, 2H, CH₂-Ar TA), 3.05-3.34 (br m, 22H, εCH₂, 4×N-CH₂-CH₂-NH, 2×N-CH₂-CONH), 3.47, 3.60 (2m, 2H, CH₂-NH TA), 4.02 (m, 4H, 4×αCH *L*-Lys), 4.40 (m, 1H, αCH rdzenia),

5.13, 5.14 (2s, 8H, Ar-CH₂O), 6.97 (br t, 1H, C⁵-H TA), 7.05 (m, 2H, C^{2,6}-H TA), 7.27 (m, 9H, C⁷-H TA, ArH), 7.39 (2br m, 8H, ArH), 7.53 (d, *J* = 7.87 Hz, 1H, C⁴-H TA).

¹³C NMR (500 MHz, MeOD): δ = 24.2, 24.6 (γC), 26.3 (CH₂-Ar TA), 28.8, 28.9 [C(CH₃)₃], 30.2, 30.5, 30.8 (δC), 33.2, 33.5 (βC), 38.4, 38.7, 40.0 (εC, 4×N-CH₂-CH₂-NH), 41.3, 41.5 (εC, CH₂-NH TA), 54.3 (αC rdzenia), 55.2, 55.6 (4×N-CH₂-CH₂-NH), 56.3 (4×αC L-Lys), 59.3, 59.7 (2×N-CH₂-CONH), 64.6 (Ar-CH₂O), 80.5, 80.6 [C(CH₃)₃], 112.3 (C⁷ TA), 113.1 (C³ TA), 119.4 (C⁴ TA), 119.7 (C⁵ TA), 122.4 (C⁶ TA), 123.7 (C² TA), 128.2 (CH_{Ar}), 128.8 (C^{3a} TA), 130.4, 130.5 (CH_{Ar}), 134.2 (C_{Ar}-Cl), 135.9 (C_{Ar}-CH₂O), 138.1 (C^{7a} TA), 157.7, 157.9, 158.5, 158.6 [C=O (Boc, 2-Cl-Z)], 173.8, 174.4, 175.5, 175.6 (CONH).

[α]_D²⁵ = -7.2 (c 0.38, MeOH).

R_f = 0.41 (CHCl₃/MeOH 8:1).

T. top.: 89-93.1 °C.

b) Dendrymer 148 (otrzymany z rdzenia 145)

Do reakcji użyto Boc-Lys(2-Cl-Z)-OH (0.444 g, 1.07 mmol), HOBt (0.164 g, 1.07 mmol), DCC (0.221 g, 1.07 mmol), rdzenia 145 (0.2 g, 0.244 mmol), Et₃N (0.75 mL, 5.37 mmol) i DMF (15 mL). Sprzęganie prowadzono przez 6 dni. Otrzymano produkt w postaci kremowego proszku z wydajnością 73.6% (0.39 g).

C₁₀₆H₁₆₅O₂₃N₁₇Cl₄, M = 2187.36 g/mol (masa monoizotopowa 2184.1).

LRMS (ESI, MeOH): 2207.1 [M + Na⁺], 2185.1 [M + H⁺], 1115.3 [M + 2Na⁺]²⁺ - główny sygnał, 1093.7 [M + 2H⁺]²⁺, 1104.0 [M + H⁺ + Na⁺]²⁺.

¹H NMR (500 MHz, MeOD): δ = 0.88 (br t, 3H, CH₃ DDA), 1.24-1.83 (br m, 50H, β, γ, δCH₂, CH₂-2-11 DDA) nakładający się na 1.41 [s, 36H, 4×C(CH₃)₃], 2.61 (m, 8H, 4×N-CH₂-CH₂-NH), 3.09-3.39 (br m, 24H, CH₂-1 DDA, εCH₂, 4×N-CH₂-CH₂-NH, 2×N-CH₂-CONH), 4.02 (m, 4H, 4×αCH L-Lys), 4.41 (m, 1H, αCH rdzenia), 5.15, 5.19 (2s, 8H, Ar-CH₂O), 7.29 (m, 8H, ArH), 7.38, 7.44 (m, 4H, ArH), 7.44 (m, 4H, ArH).

¹³C NMR (500 MHz, MeOD): δ = 14.5 (C¹² DDA), 23.8, 24.2, 24.7 (γC, C¹¹ DDA), 28.1 (C³ DDA), 28.9 [C(CH₃)₃], 30.2-30.8 (δC, C², C⁴-C¹⁰ DDA), 33.1, 33.2, 33.5 (βC), 38.5, 38.7, 40.1, 40.6, 41.5, 41.6 (εC, 4×N-CH₂-CH₂-NH, C¹ DDA), 54.3 (αC rdzenia), 55.2, 55.6 (4×N-CH₂-CH₂-NH), 56.3 (4×αC L-Lys), 59.3, 59.7 (2×N-CH₂-CONH), 64.6 (Ar-CH₂O), 80.5, 80.6 [C(CH₃)₃], 128.2, 130.5 (CH_{Ar}), 134.1 (C_{Ar}-Cl), 136.0 (C_{Ar}-CH₂O), 157.7, 157.8, 158.5, 158.6 [C=O (Boc, 2-Cl-Z)], 173.7, 175.5, 175.6 (CONH).

[α]_D²⁵ = -2.5 (c 0.33, MeOH).

R_f = 0.36 (CHCl₃/MeOH 8:1).

T. top.: 75.1-77.4°C.

c) Dendrymer 149 (otrzymany z rdzenia 145)

Do reakcji użyto (2-Cl-Z)-Lys(Boc)-OH (0.444 g, 1.07 mmol), HOBt (0.164 g, 1.07 mmol), DCC (0.221 g, 1.07 mmol), rdzenia **145** (0.2 g, 0.244 mmol), Et₃N (0.75 mL, 5.37 mmol) i DMF (15 mL). Sprzęganie prowadzono przez 6 dni. Otrzymano produkt w postaci kremowego proszku z wydajnością 69.8% (0.37 g).

C₁₀₆H₁₆₅O₂₃N₁₇Cl₄, M = 2187.36 g/mol (masa monoizotopowa 2184.1).

LRMS (ESI, MeOH): 2207.1 [M + Na⁺], 2185.1 [M + H⁺], 1115.3 [M + 2Na⁺]²⁺ - *główny sygnał*, 1093.3 [M + 2H⁺]²⁺, 1104.0 [M + H⁺ + Na⁺]²⁺.

¹H NMR (500 MHz, MeOD): δ = 0.88 (br t, 3H, CH₃ DDA), 1.23-1.81 (br m, 50H, β, γ, δCH₂, CH₂-2-11 DDA) nakładający się na 1.40 [s, 36H, 4×C(CH₃)₃], 2.50-2.67 (br m, 8H, 4×N-CH₂-CH₂-NH), 3.00 (m, 8H, εCH₂), 3.07-3.40 (br m, 16H, CH₂-1 DDA, ε-CH₂, 4×N-CH₂-CH₂-NH, 2×N-CH₂-CONH), 4.08 (m, 4H, 4×αCH L-Lys), 4.40 (m, 1H, αCH rdzenia), 5.07-5.23 (4s, 8H, Ar-CH₂O), 7.27 (m, 8H, ArH), 7.36 (m, 4H, ArH), 7.44 (m, 4H, ArH).

¹³C NMR (500 MHz, MeOD): δ = 14.5 (C¹² DDA), 23.8, 24.3, 24.7 (γC, C¹¹ DDA), 28.1 (C³ DDA), 28.9 [C(CH₃)₃], 30.2-30.8 (δC, C², C⁴-C¹⁰ DDA), 33.0, 33.1, 33.4 (βC), 38.6, 38.7, 40.1, 40.6 (εC, 4×N-CH₂-CH₂-NH, C¹ DDA), 41.1 (εC), 54.4 (αC rdzenia), 55.4, 55.6 (4×N-CH₂-CH₂-NH), 56.8 (4×αC L-Lys), 59.4, 59.7 (2×N-CH₂-CONH), 65.0 (Ar-CH₂O), 79.8 [C(CH₃)₃], 128.2, 130.5, 130.6 (CH_{Ar}), 134.2 (C_{Ar}-Cl), 135.7 (C_{Ar}-CH₂O), 158.0, 158.1, 158.5 [C=O (Boc, 2-Cl-Z)], 173.7, 173.9, 175.1, 175.2 (CONH).

[α]_D²⁵ = -4.2 (c 0.27, MeOH).

R_f = 0.36 (CHCl₃/MeOH 8:1).

T. top.: 64.4-72.1°C.

d) Dendrymer 150 (otrzymany z rdzenia 146)

Do reakcji użyto Boc-Lys(2-Cl-Z)-OH (0.739 g, 1.78 mmol), HOBt (0.273 g, 1.78 mmol), DCC (0.367 g, 1.78 mmol), rdzenia **146** (0.4 g, 0.405 mmol), Et₃N (1.24 mL, 8.98 mmol) i DMF (15 mL). Sprzęganie prowadzono przez 72 godziny. Otrzymano produkt w postaci kremowego proszku z wydajnością 57.9% (0.55 g).

C₁₁₈H₁₈₉O₂₃N₁₇Cl₄, M = 2355.68 g/mol (masa monoizotopowa 2352.3).

LRMS (ESI, MeOH): 2355.3 [M + Na⁺], 1199.9 [M + 2Na⁺]²⁺, 1188.4 [M + Na⁺ + H⁺]²⁺ - *główny sygnał*, 1177.7 [M + 2H⁺]²⁺, 808.0 [M + 3Na⁺]³⁺.

¹H NMR (500 MHz, MeOD): δ = 0.88 (m, 6H, 2×CH₃ *dDDA*), 1.23-1.81 (br m, 70H, β , γ , δ CH₂, 2×CH₂-2-11 *dDDA*) nakładający się na 1.41 [s, 36H, 4×C(CH₃)₃], 2.62 (m, 8H, 4×N-CH₂-CH₂-NH), 3.06-3.50 (br m, 26H, 2×CH₂-1 *dDDA*, ϵ CH₂, 4×N-CH₂-CH₂-NH, 2×N-CH₂-CONH), 3.57 (m, 1H, α CH *rdzenia*), 3.99-4.11 (br m, 4H, 4× α CH *L-Lys*), 5.15, 5.18 (2s, 8H, Ar-CH₂O), 7.29 (m, 8H, ArH), 7.38 (m, 4H, ArH), 7.44 (m, 4H, ArH).

¹³C NMR (500 MHz, MeOD): δ = 14.5 (2×C¹² *dDDA*), 23.8, 24.2, 28.0, 28.1, 28.7 (γ C, 2×C^{3,11} *dDDA*), 28.9 [C(CH₃)₃], 30.2-30.8 (δ C, 2×C², 2×C⁴-C¹⁰ *dDDA*), 33.1, 33.2 (β C), 38.5, 38.6, 40.0, 41.5, 41.6 (ϵ C, 4×N-CH₂-CH₂-NH, 2×C¹ *dDDA*), 47.5 (α C *rdzenia*), 55.1, 55.5 (4×N-CH₂-CH₂-NH), 56.1, 56.2 (4× α C *L-Lys*), 59.6 (2×N-CH₂-CONH), 64.6 (Ar-CH₂O), 80.5 [C(CH₃)₃], 128.2, 130.5 (CH_{Ar}), 134.2 (C_{Ar}-Cl), 136.0 (C_{Ar}-CH₂O), 157.7, 157.8, 158.5, 158.6 [C=O (Boc, 2-Cl-Z)], 175.4, 175.5 (CONH).

$[\alpha]_D^{25}$ = -2.9 (c 1, MeOH).

R_f = 0.34 (CHCl₃/MeOH 8:1).

T. top.: 66.8-67.8°C.

e) Dendrymer 151 (otrzymany z rdzenia 146)

Do reakcji użyto (2-Cl-Z)-Lys(Boc)-OH (0.739 g, 1.78 mmol), HOBt (0.273 g, 1.78 mmol), DCC (0.367 g, 1.78 mmol), rdzenia **146** (0.4 g, 0.405 mmol), Et₃N (1.24 mL, 8.98 mmol) i DMF (15 mL). Sprzęganie prowadzono przez 72 godziny. Otrzymano produkt w postaci białego proszku z wydajnością 64.2% (0.61 g).

C₁₁₈H₁₈₉O₂₃N₁₇Cl₄, M = 2355.68 g/mol (masa monoizotopowa 2352.3).

LRMS (ESI, MeOH): 1199.0 [M + 2Na⁺]²⁺ - główny sygnał, 1188.0 [M + Na⁺ + H⁺]²⁺, 1178.1 [M + 2H⁺]²⁺.

¹H NMR (500 MHz, MeOD): δ = 0.88 (m, 6H, 2×CH₃ *dDDA*), 1.22-1.83 (br m, 70H, β , γ , δ CH₂, 2×CH₂-2-11 *dDDA*) nakładający się na 1.40 [s, 36H, 4×C(CH₃)₃], 2.54-2.70 (m, 8H, 4×N-CH₂-CH₂-NH), 2.96-3.47 (br m, 26H, 2×CH₂-1 *dDDA*, ϵ CH₂, 4×N-CH₂-CH₂-NH, 2×N-CH₂-CONH), 3.55 (m, 1H, α CH *rdzenia*), 4.05-4.18 (br m, 4H, 4× α CH *L-Lys*), 5.08-5.23 (4s, 8H, Ar-CH₂O), 7.28 (m, 8H, ArH), 7.36 (m, 4H, ArH), 7.44 (m, 4H, ArH).

¹³C NMR (500 MHz, MeOD): δ = 14.5 (2×C¹² *dDDA*), 23.7, 23.8, 24.3, 24.6, 27.9, 28.0, 28.7 (γ C, 2×C^{3,11} *dDDA*), 28.9 [C(CH₃)₃], 30.2-30.8 (δ C, 2×C², 2×C⁴-C¹⁰ *dDDA*), 32.8, 33.0, 33.1, 33.3 (β C), 38.7, 40.0, 41.0, 41.1 (ϵ C, 4×N-CH₂-CH₂-NH, 2×C¹ *dDDA*), 47.5 (α C *rdzenia*), 55.4, 55.6 (4×N-CH₂-CH₂-NH), 56.6, 56.8 (4× α C *L-Lys*), 59.7 (2×N-CH₂-CONH), 64.9 (Ar-CH₂O), 79.8 [C(CH₃)₃], 128.2, 130.5, 130.6 (CH_{Ar}), 134.1, 134.2 (C_{Ar}-Cl), 135.7 (C_{Ar}-CH₂O), 158.0, 158.1, 158.5 [C=O (Boc, 2-Cl-Z)], 173.6, 175.0, 175.2 (CONH).

$[\alpha]_D^{25} = +0.14$ (c 1, MeOH).

$R_f = 0.34$ (CHCl₃/MeOH 8:1).

T. top.: 76.1-78.5°C.

f) Dendrymer 157 (otrzymany z rdzenia 144)

Do reakcji użyto Boc-Lys(Z)-OH (1.03 g, 2.71 mmol), HOBt (0.41 g, 2.71 mmol), DCC (0.56 g, 2.71 mmol), rdzenia **144** (0.49 g, 0.617 mmol), Et₃N (1.9 mL, 13.57 mmol) i DMF (25 mL). Sprzęganie prowadzono przez 48 godzin. Otrzymano produkt w postaci jasnożółtego proszku z wydajnością 78.4% (0.98 g).

C₁₀₄H₁₅₄O₂₃N₁₈, M = 2024.44 g/mol (masa monoizotopowa 2023.1).

LRMS (ESI, MeOH): 2046.4 [M + Na⁺], 2024.4 [M + H⁺], 1035.2 [M + 2Na⁺]²⁺ - *główny sygnał*, 1024.2 [M + H + Na⁺]²⁺, 1013.1 [M + 2H⁺]²⁺.

$[\alpha]_D^{25} = -5.2$ (c 0.60, MeOH).

$R_f = 0.32$ (CHCl₃/MeOH 8:1).

T. top.: 80.4-84.2°C.

g) Dendrymer 158 (otrzymany z rdzenia 145)

Do reakcji użyto Boc-Lys(Z)-OH (0.695 g, 1.826 mmol), HOBt (0.28 g, 1.826 mmol), DCC (0.377 g, 1.826 mmol), rdzenia **145** (0.34 g, 0.415 mmol), Et₃N (1.27 mL, 9.13 mmol) i DMF (20 mL). Sprzęganie prowadzono przez 6 dni. Otrzymano produkt w postaci białego proszku z wydajnością 71.8% (0.61 g).

C₁₀₆H₁₆₉O₂₃N₁₇, M = 2049.58 g/mol (masa monoizotopowa 2048.3).

LRMS (ESI, MeOH): 2071.0 [M + Na⁺], 1047.8 [M + 2Na⁺]²⁺ - *główny sygnał*, 1036.3 [M + H⁺ + Na⁺]²⁺.

6.7.1.2. Odbezpieczone dendrymery

Dendrymery **147 – 151**, **157**, **158** zawierają reszty lizyn, w których grupy aminowe α i ε są chronione ortogonalnymi grupami zabezpieczającymi, tj. Boc i Z (lub 2-Cl-Z). Dendrymery te poddano deprotekcji jednej z dwóch wymienionych osłon. W wyniku usunięcia osłon Boc otrzymano dendrymery **152 – 156** traktowane jako związki finalne (Rozdział 6.7.1.2.1.). Deprotekcja osłon Z posłużyła w celu uzyskania substratów (dendrymerów pośrednich) **159** i **160** do przeprowadzenia dalszej funkcjonalizacji (Rozdział 6.7.1.2.2.).

6.7.1.2.1. Boc-odbezpieczone dendrymery (heksachlorowodorki)

Deprotekcję grup Boc w dendrymerach **147** – **151** za pomocą nasyconego roztworu HCl w AcOEt przeprowadzono wg procedury ogólnej zamieszczonej w Rozdziale 6.2. (Procedura C - wariant B). Reakcji poddawano 0.2 – 0.3 g (0.091 – 0.127 mmol) związku rozpuszczonego w 1 mL MeOH z 5 mL nas. HCl/AcOEt. Całkowite zdjęcie grup Boc zachodziło w ciągu 1.5 – 2 godzin. Otrzymano produkty **152** – **156** w postaci higroskopijnych heksachlorowodorków.

a) Dendrymer **152** (otrzymany z dendrymeru **147**)

Wychodząc z 0.25 g (0.116 mmol) dendrymeru **147** otrzymano produkt w postaci jasnoszarego proszku z wydajnością 96.1% (0.22 g).

$C_{84}H_{118}O_{15}N_{18}Cl_4 \times 6HCl$, $M = 1980.52$ g/mol (masa monoizotopowa nieprotonowanego dendrymeru - 1758.8).

LRMS (ESI, MeOH): 1782.3 [M + Na⁺], 1760.2 [M + H⁺], 1252.8 [M – (2-Cl-Z) + H⁺], 902.5 [M + 2Na⁺]²⁺, 891.6 [M + H + Na⁺]²⁺, 880.6 [M + 2H⁺]²⁺, 796.6 [M – (2-Cl-Z) + 2H⁺]²⁺, 587.9 [M + 3H⁺]³⁺ - *główny sygnał*, 440.7 [M + 4H⁺]⁴⁺.

¹H NMR (500 MHz, MeOD): $\delta = 1.30$ - 1.60 (br m, 20H, γ , δ CH₂), 1.69, 1.90 (2br m, 10H, β CH₂), 2.95 (t, 2H, $J = 7.1$ Hz, CH₂-Ar TA), 3.10-3.27 (br m, 10H, ϵ CH₂), 3.43-3.65 (br m, 14H, CH₂-NH TA, 2×N-CH₂-CH₂-NH, 4×N-CH₂-CH₂-NH), 3.77 (m, 4H, 2×N-CH₂-CH₂-NH), 3.98 (m, 4H, 4× α CH L-Lys), 4.21 (s, 2H, N-CH₂-CONH), 4.33 (m, 3H, α CH rdzenia, N-CH₂-CONH), 5.14, 5.15 (2s, 8H, Ar-CH₂O), 6.98 (br t, 1H, C⁵-H TA), 7.07 (m, 2H, C^{2,6}-H TA), 7.28 (m, 9H, C⁷-H TA, ArH), 7.40 (2br m, 8H, ArH), 7.55 (d, $J = 7.85$ Hz, 1H, C⁴-H TA).

¹³C NMR (500 MHz, MeOD): $\delta = 23.2$, 23.9 (γ C), 26.2 (CH₂-Ar TA), 29.7, 30.1, 30.5 (δ C), 31.9, 32.8 (β C), 36.0 (4×N-CH₂-CH₂-NH), 40.2, 41.3, 41.4 (ϵ C, CH₂-NH TA), 54.6 (4× α C L-Lys), 55.4 (α C rdzenia), 55.9, 56.2 (2×N-CH₂-CONH, 4×N-CH₂-CH₂-NH), 64.7 (Ar-CH₂O), 112.4 (C⁷ TA), 113.0 (C³ TA), 119.3 (C⁴ TA), 119.7 (C⁵ TA), 122.4 (C⁶ TA), 123.6 (C² TA), 128.2 (CH_{Ar}), 128.8 (C^{3a} TA), 130.5, 130.6, 130.8 (CH_{Ar}), 134.1 (C_{Ar}-Cl), 135.8 (C_{Ar}-CH₂O), 138.1 (C^{7a} TA), 158.7 [C=O (2-Cl-Z)], 165.5, 171.8, 173.7 (CONH).

Analiza elementarna: obliczona dla $C_{84}H_{118}O_{15}N_{18}Cl_4 \times 6HCl + 3H_2O$: C, 49.59; H, 6.44; N, 12.39; Cl, 17.43. Znaleziono: C, 49.55; H, 6.43; N, 12.32; Cl, 17.5.

$[\alpha]_D^{25} = +20.3$ (c 1, MeOH).

$R_f = 0.42$ (nBuOH/AcOH/H₂O 3:1:1).

T. top.: 143-147.5°C.

b) Dendrymer 153 (otrzymany z dendrymeru 148)

Wychodząc z 0.26 g (0.119 mmol) dendrymeru **148** otrzymano produkt w postaci jasnożółtego proszku z wydajnością 92.4% (0.22 g).

$C_{86}H_{133}O_{15}N_{17}Cl_4 \times 6HCl$, $M = 2005.66$ g/mol (masa monoizotopowa nieprotonowanego dendrymeru - 1783.9).

LRMS (ESI, MeOH): 1785.0 $[M + H^+]$, 894.1 $[M + 2H^+]^{2+}$, 809.9 $[M - (2-Cl-Z) + 2H^+]^{2+}$, 596.7 $[M + 3H^+]^{3+}$ - *główny sygnał*.

1H NMR (500 MHz, MeOD): $\delta = 0.88$ (br t, 3H, CH_3 DDA), 1.23-2.00 (br m, 50H, β , γ , δCH_2 , CH_2 -2-11 DDA), 3.15 (m, 10H, ϵ - CH_2), 3.20-3.41 (br m, 10H, CH_2 -1 DDA, $4 \times N-CH_2-CH_2-NH$), 3.45-3.72 (2m, 8H, $4 \times N-CH_2-CH_2-NH$), 3.99 (br m, 8H, $4 \times \alpha C$ L-Lys, $2 \times N-CH_2-CONH$), 4.37 (m, 1H, αCH rdzenia), 5.16 (s, 8H, Ar- CH_2O), 7.30 (m, 8H, ArH), 7.39 (m, 4H, ArH), 7.44 (m, 4H, ArH).

^{13}C NMR (500 MHz, MeOD): $\delta = 14.5$ (C^{12} DDA), 23.2, 23.7, 24.2 (γC , C^{11} DDA), 28.1 (C^3 DDA), 29.9-30.8 (δC , C^2 , C^4-C^{10} DDA), 32.1, 33.1 (βC), 36.9, 37.0 ($4 \times N-CH_2-CH_2-NH$), 40.2, 40.6, 41.3 (ϵC , C^1 DDA), 54.6 ($4 \times \alpha C$ L-Lys), 55.0 (αC rdzenia), 55.8, 56.1 ($4 \times N-CH_2-CH_2-NH$, $2 \times N-CH_2-CONH$), 64.7 (Ar- CH_2O), 128.2, 130.4, 130.5, 130.6 (CH_{Ar}), 134.1 (C_{Ar-Cl}), 135.9 (C_{Ar-CH_2O}), 158.7 [$C=O$ (2-Cl-Z)], 171.4, 174.0 (CONH).

$[\alpha]_D^{25} = +20.3$ (c 1, MeOH).

$R_f = 0.44$ (nBuOH/AcOH/H₂O 3:1:1).

T. top.: 140-144.5°C.

c) Dendrymer 154 (otrzymany z dendrymeru 149)

Wychodząc z 0.2 g (0.091 mmol) dendrymeru **149** otrzymano produkt w postaci kremowego proszku z wydajnością 94.4% (0.17 g).

$C_{86}H_{133}O_{15}N_{17}Cl_4 \times 6HCl$, $M = 2005.66$ g/mol (masa monoizotopowa nieprotonowanego dendrymeru - 1783.9).

LRMS (ESI, MeOH): 1786.1 $[M + H^+]$, 893.1 $[M + 2H^+]^{2+}$, 809.9 $[M - (2-Cl-Z) + 2H^+]^{2+}$, 596.7 $[M + 3H^+]^{3+}$ - *główny sygnał*, 540.3 $[M - (2-Cl-Z) + 3H^+]^{3+}$, 447.6 $[M + 4H^+]^{4+}$.

1H NMR (500 MHz, MeOD): $\delta = 0.88$ (br t, 3H, CH_3 DDA), 1.24-1.91 (br m, 50H, β , γ , δCH_2 , CH_2 -2-11 DDA), 2.93 (m, 8H, ϵCH_2), 3.13-3.46 (br m, 12H, CH_2 -1 DDA, ϵCH_2 , $4 \times N-CH_2-CH_2-NH$), 3.54-3.69 (br m, 8H, $4 \times N-CH_2-CH_2-NH$), 4.05-4.20 (br m, 8H, $4 \times \alpha C$ L-Lys, $2 \times N-CH_2-CONH$), 4.32 (m, 1H, αCH rdzenia), 5.10-5.26 (4s, 8H, Ar- CH_2O), 7.30 (m, 8H, ArH), 7.38 (m, 4H, ArH), 7.48 (m, 4H, ArH).

^{13}C NMR (500 MHz, MeOD): $\delta = 14.5$ (C^{12} DDA), 23.7, 23.9, 24.3 (γC , C^{11} DDA), 28.1 (C^3 DDA), 28.1-30.8 (δC , C^2 , C^4 - C^{10} DDA), 32.3, 33.0, 33.1 (βC), 36.2, 36.3 ($4\times\text{N-CH}_2\text{-CH}_2\text{-NH}$), 40.4, 40.5, 40.6 (ϵC , C^1 DDA), 55.3 (αC rdzenia), 56.4 ($4\times\text{N-CH}_2\text{-CH}_2\text{-NH}$, $2\times\text{N-CH}_2\text{-CONH}$), 56.6 ($4\times\alpha\text{C}$ L-Lys), 65.1 ($\text{Ar-CH}_2\text{O}$), 128.3, 130.5, 130.7 (CH_{Ar}), 134.2 ($\text{C}_{\text{Ar-Cl}}$), 135.5 ($\text{C}_{\text{Ar-CH}_2\text{O}}$), 158.4 [$\text{C}=\text{O}$ (2-Cl-Z)], 173.6, 176.3 (CONH).

$[\alpha]_{\text{D}}^{25} = -6.6$ (c 1, MeOH).

T. top.: 142.6-144.1 °C.

d) Dendrymer 155 (otrzymany z dendrymeru 150)

Wychodząc z 0.24 g (0.102 mmol) dendrymeru **150** otrzymano produkt w postaci kremowego proszku z wydajnością 95.5% (0.21 g).

$\text{C}_{98}\text{H}_{157}\text{O}_{15}\text{N}_{17}\text{Cl}_4\times 6\text{HCl}$, $M = 2173.98$ g/mol (masa monoizotopowa nieprotonowanego dendrymeru - 1952.1).

LRMS (ESI, MeOH): 977.1 [$\text{M} + 2\text{H}^+$] $^{2+}$ - główny sygnał, 651.8 [$\text{M} + 3\text{H}^+$] $^{3+}$.

^1H NMR (500 MHz, MeOD): $\delta = 0.88$ (m, 6H, $2\times\text{CH}_3$ dDDA), 1.22-1.77 (br m, 62H, β , γ , δCH_2 , $2\times\text{CH}_2$ -2-11 dDDA), 1.82-2.03 (br m, 8H, βCH_2), 3.15 (m, 10H, ϵCH_2), 3.34 (m, 4H, $2\times\text{CH}_2$ -1 dDDA), 3.45-3.68 (br m, 12H, $4\times\text{N-CH}_2\text{-CH}_2\text{-NH}$, $2\times\text{N-CH}_2\text{-CH}_2\text{-NH}$), 3.77 (br m, 4H, $2\times\text{N-CH}_2\text{-CH}_2\text{-NH}$), 3.99 (br m, 4H, $4\times\alpha\text{CH}$ L-Lys), 4.17-4.38 (br m, 4H, $2\times\text{N-CH}_2\text{-CONH}$), 4.72 (m, 1H, αCH rdzenia), 5.16 (s, 8H, $\text{Ar-CH}_2\text{O}$), 7.30 (m, 8H, ArH), 7.39 (m, 4H, ArH), 7.45 (m, 4H, ArH).

^{13}C NMR (500 MHz, MeOD): $\delta = 14.5$ ($2\times\text{C}^{12}$ dDDA), 23.2, 23.7, 24.1, 27.9, 28.1, 28.7 (γC , $2\times\text{C}^{3,11}$ dDDA), 29.9-30.8 (δC , $2\times\text{C}^2$, $2\times\text{C}^4$ - C^{10} dDDA), 32.0, 32.6, 33.1 (βC), 36.0 ($4\times\text{N-CH}_2\text{-CH}_2\text{-NH}$), 40.2 ($2\times\text{C}^1$ dDDA), 41.3 (ϵC), 52.0 (αC rdzenia), 54.6 ($4\times\alpha\text{C}$ L-Lys), 55.9, 56.2 ($4\times\text{N-CH}_2\text{-CH}_2\text{-NH}$, $2\times\text{N-CH}_2\text{-CONH}$), 64.7 ($\text{Ar-CH}_2\text{O}$), 128.2, 130.4, 130.5, 130.6 (CH_{Ar}), 134.1 ($\text{C}_{\text{Ar-Cl}}$), 135.9 ($\text{C}_{\text{Ar-CH}_2\text{O}}$), 158.6 [$\text{C}=\text{O}$ (2-Cl-Z)], 171.8, 173.1 (CONH).

$[\alpha]_{\text{D}}^{25} = +15.6$ (c 1, MeOH).

R_f = 0.47 (nBuOH/AcOH/H₂O 3:1:1).

T. top.: 140.3-143.1 °C.

e) Dendrymer 156 (otrzymany z dendrymeru 151)

Wychodząc z 0.3 g (0.127 mmol) dendrymeru **151** otrzymano produkt w postaci białego proszku z wydajnością 97.5% (0.27 g).

$\text{C}_{98}\text{H}_{157}\text{O}_{15}\text{N}_{17}\text{Cl}_4\times 6\text{HCl}$, $M = 2173.98$ g/mol (masa monoizotopowa nieprotonowanego dendrymeru - 1952.1).

LRMS (ESI, MeOH): 977.1 $[M + 2H^+]^{2+}$, 651.8 $[M + 3H^+]^{3+}$ - *główny sygnał*.

1H NMR (500 MHz, MeOD): $\delta = 0.89$ (br t, 6H, $2 \times CH_3$ *dDDA*), 1.24-1.91 (br m, 70H, β , γ , δCH_2 , $2 \times CH_2$ -2-11 *dDDA*), 2.93 (m, 8H, ϵCH_2), 3.08-3.37 (br m, 6H, ϵCH_2 , $2 \times CH_2$ -1 *dDDA*), 3.40-3.75 (br m, 16H, $4 \times N-CH_2-CH_2-NH$, $4 \times N-CH_2-CH_2-NH$), 4.10-4.35 (br m, 8H, $4 \times \alpha C$ *L-Lys*, $2 \times N-CH_2-CONH$), 4.75 (m, 1H, αCH *rdzenia*), 5.11-5.29 (br m, 8H, *Ar-CH₂O*), 7.32 (m, 8H, *ArH*), 7.39 (m, 4H, *ArH*), 7.50 (m, 4H, *ArH*).

^{13}C NMR (500 MHz, MeOD): $\delta = 14.5$ ($2 \times C^{12}$ *dDDA*), 23.7, 23.9, 24.0, 24.2, 27.9, 28.0, 28.1, 28.6 (γC , $2 \times C^{3,11}$ *dDDA*), 29.9-30.8 (δC , $2 \times C^2$, $2 \times C^4-C^{10}$ *dDDA*), 32.3, 33.0, 33.1 (βC), 36.1 ($4 \times N-CH_2-CH_2-NH$), 40.4, 40.5, 40.6 (ϵC , $2 \times C^1$ *dDDA*), 51.6 (αC *rdzenia*), 56.3 ($4 \times N-CH_2-CH_2-NH$, $2 \times N-CH_2-CONH$), 56.5 ($4 \times \alpha C$ *L-Lys*), 65.2 (*Ar-CH₂O*), 128.3, 130.5, 130.6, 130.7 (CH_{Ar}), 134.1 (C_{Ar-Cl}), 135.5 (C_{Ar-CH_2O}), 158.4 [$C=O$ (*2-Cl-Z*)], 165.5, 172.8, 176.1 (*CONH*).

$[\alpha]_D^{25} = -4.9$ (c 1, MeOH).

T. top.: 134.2-138.1°C.

6.7.1.2.2. *Z-odbezpieczone dendrymery – dendrymery pośrednie*

Deprotekcję grup *Z* w dendrymerach **157** i **158** za pomocą wodorowania katalitycznego (10% Pd/C) przeprowadzono wg procedury ogólnej zamieszczonej w Rozdziale 6.2. (Procedura D). Całkowite zdjęcie grup *Z* zachodziło w ciągu 6 godzin. Otrzymano produkty **159** i **160** posiadające wolne grupy aminowe w pozycji ϵ reszt lizynowych.

a) **Dendrymer pośredni 159 (otrzymany z dendrymeru 157)**

Związek w postaci białego proszku otrzymano z wydajnością 98.5% (0.65 g) z 0.9 g (0.445 mmol) dendrymeru **157** rozpuszczonego w 20 mL MeOH.

$C_{72}H_{130}O_{15}N_{18}$, $M = 1487.92$ g/mol (masa monoizotopowa 1487.0).

LRMS (ESI, MeOH): 1510.2 $[M + Na^+]$, 1488.1 $[M + H^+]$, 766.7 $[M + 2Na^+]^{2+}$ - *główny sygnał*, 745.4 $[M + 2H^+]^{2+}$, 499.4 $[M + 3H^+]^{3+}$, 372.3 $[M + 4H^+]^{4+}$.

b) **Dendrymer pośredni 160 (otrzymany z dendrymeru 158)**

Związek w postaci białego proszku otrzymano z wydajnością 98% (0.5 g) z 0.69 g (0.337 mmol) dendrymeru **158** rozpuszczonego w 20 mL MeOH.

$C_{74}H_{145}O_{15}N_{17}$, $M = 1513.05$ g/mol (masa monoizotopowa 1512.1).

LRMS (ESI, MeOH): 757.3 [M + 2H⁺]²⁺, 505.3 [M + 3H⁺]³⁺ - *główny sygnał*, 379.3 [M + 4H⁺]⁴⁺.

6.7.2. Synteza dendrymerów z terminalnymi resztami tryptofanowymi lub pochodnych tryptofanu

Dendrymery z terminalnymi resztami tryptofanowymi lub pochodnych tryptofanu zostały zsyntetyzowane w wyniku reakcji sprzęgania dendrymerów pośrednich **159** i **160** (Rozdział 6.7.1.2.2.) z Boc-Trp-OH bądź pochodnymi tryptofanu, tj. *N*-Boc-1-butylotryptofanem (**83**) lub *N*-Boc-1-[5-(Boc-amino)pentyl]tryptofanem (**96**) (Rozdział 6.3.4.).

6.7.2.1. Boc-zabezpieczone dendrymery

Wykorzystując procedurę ogólną sprzęgania metodą EDC/HOBt (Procedura B, Rozdział 6.2.) zsyntetyzowano 5 dendrymerów. Reakcje sprzęgania prowadzono z dodatkiem Et₃N (3.6 ekw.) od 48 do 96 godzin. Czyste dendrymery **161**, **162**, **165**, **166** i **169** uzyskano w wyniku sączenia molekularnego z użyciem kolumny z wypełnieniem Sephadex LH-20 z MeOH jako eluentem, a następnie doczyszczania na kolumnie silikażelowej z użyciem fazy CHCl₃/MeOH (gradient 100:1→15:1). Produkty otrzymano w postaci białych lub jasnożółtych, bezpostaciowych proszków.

a) Dendrymer 161 (otrzymany z dendrymeru pośredniego 159)

Do reakcji użyto Boc-Trp-OH (0.148 g, 0.488 mmol), HOBt (0.075 g, 0.488 mmol), EDC·HCl (0.094 g, 0.488 mmol), dendrymeru pośredniego **159** (0.165 g, 0.111 mmol), Et₃N (0.12 mL, 0.888 mmol) i DMF (8 mL). Sprzęganie prowadzono przez 48 godzin. Otrzymano produkt w postaci jasnożółtego proszku z wydajnością 51.7% (0.151 g).

C₁₃₆H₂₀₂O₂₇N₂₆, M = 2633.22 g/mol (masa monoizotopowa 2631.5).

LRMS (ESI, MeOH): 2654.5 [M + Na⁺], 2632.6 [M + H⁺], 1343.7 [M + MeOH + H⁺ + Na⁺]²⁺, 1338.7 [M + 2Na⁺]²⁺ - *główny sygnał*, 1327.7 [M + H + Na⁺]²⁺, 1316.8 [M + 2H⁺]²⁺.

¹H NMR (500 MHz, MeOD): δ = 1.15-1.77 (br m, 30H, β, γ, δCH₂) nakładający się na 1.35, 1.40, 1.41 [3s, 72H, 8×C(CH₃)₃], 2.50-2.63 (br m, 8H, 4×N-CH₂-CH₂-NH), 2.89-3.30 (br m, 32H, CH₂-Ar TA, εCH₂, 4×N-CH₂-CH₂-NH, 2×N-CH₂-CONH, βCH₂ *L-Trp*), 3.45, 3.59 (2m, 2H, CH₂-NH TA), 3.96 (m, 4H, 4×αCH *L-Lys*), 4.29 (m, 4H, 4×αCH *L-Trp*), 4.40 (m, 1H,

α CH rdzenia), 6.98 (m, 5H, C⁵-H *L-Trp*, C⁵-H *TA*), 7.06 (m, 10H, C^{2,6}-H *L-Trp*, C^{2,6}-H *TA*), 7.31 (m, 5H, C⁷-H *L-Trp*, C⁷-H *TA*), 7.51-7.60 (br m, 5H, C⁴-H *L-Trp*, C⁴-H *TA*).

¹³C NMR (500 MHz, MeOD): δ = 24.3 (γ C), 26.3 (CH₂-Ar *TA*), 28.7, 28.9 [C(CH₃)₃], 29.6, 29.9 (β C *L-Trp*), 30.5 (δ C), 33.2 (β C), 38.6, 40.1 (ϵ C, 4×N-CH₂-CH₂-NH), 41.3 (CH₂-NH *TA*), 54.3 (α C rdzenia), 55.5 (4×N-CH₂-CH₂-NH), 56.3 (4× α C *L-Lys*), 57.1 (4× α C *L-Trp*), 59.7 (2×N-CH₂-CONH), 80.5, 80.6 [C(CH₃)₃], 111.1 (C³ *L-Trp*), 112.3 (C⁷ *L-Trp*, C⁷ *TA*), 113.1 (C³ *TA*), 119.4 (C⁴ *TA*), 119.5 (C⁴ *L-Trp*), 119.7 (C⁵ *TA*), 119.8 (C⁵ *L-Trp*), 122.4 (C⁶ *L-Trp*, C⁶ *TA*), 123.7 (C² *TA*), 124.6 (C² *L-Trp*), 128.9 (C^{3a} *L-Trp*, C^{3a} *TA*), 138.0 (C^{7a} *L-Trp*), 138.1 (C^{7a} *TA*), 157.8, 158.1 [C=O (Boc)], 175.6 (CONH). Sygnały w ¹³C NMR od: α C rdzenia, 4×N-CH₂-CH₂-NH, 2×N-CH₂-CONH – słabe.

$[\alpha]_D^{25}$ = -4.5 (c 0.25, MeOH).

R_f = 0.40 (CHCl₃/MeOH 8:1).

T. top.: 133.1-136.6°C.

b) Dendrymer 162 (otrzymany z dendrymeru pośredniego 160)

Do reakcji użyto Boc-Trp-OH (0.22 g, 0.726 mmol), HOBt (0.11 g, 0.726 mmol), EDC·HCl (0.14 g, 0.726 mmol), dendrymeru pośredniego **160** (0.25 g, 0.165 mmol), Et₃N (0.18 mL, 1.32 mmol) i DMF (10 mL). Sprzęganie prowadzono przez 96 godzin. Otrzymano produkt w postaci białego proszku z wydajnością 59.1% (0.26 g).

C₁₃₈H₂₁₇O₂₇N₂₅, M = 2658.35 g/mol (masa monoizotopowa 2656.6).

LRMS (ESI, MeOH): 2681.6 [M + Na⁺], 1352.0 [M + 2Na⁺]²⁺ - główny sygnał, 909.0 [M + 3Na⁺]³⁺.

¹H NMR (500 MHz, MeOD): δ = 0.88 (m, 3H, CH₃ *DDA*), 1.15-1.85 (br m, 50H, β , γ , δ CH₂, CH₂-2-11 *DDA*) nakładający się na 1.36, 1.42 [2s, 72H, 8×C(CH₃)₃], 2.50-2.76 (br m, 8H, 4×N-CH₂-CH₂-NH), 2.94-3.30 (br m, 32H, CH₂-1 *DDA*, ϵ CH₂, 4×N-CH₂-CH₂-NH, 2×N-CH₂-CONH, β CH₂ *L-Trp*), 3.98 (m, 4H, 4× α CH *L-Lys*), 4.29 (m, 4H, 4× α CH *L-Trp*), 4.40 (m, 1H, α CH rdzenia), 6.96-7.10 (br m, 12H, C^{2,5,6}-H *L-Trp*), 7.32 (m, 4H, C⁷-H *L-Trp*), 7.57 (m, 4H, C⁴-H *L-Trp*).

¹³C NMR (500 MHz, MeOD): δ = 14.5 (C¹² *DDA*), 23.8, 24.3, 28.1, 28.4 (γ C, C^{3,11} *DDA*), 28.7, 28.9 [C(CH₃)₃], 29.6, 29.9 (β C *L-Trp*), 30.1-30.8 (δ C, C², C⁴-C¹⁰ *DDA*), 33.1 (β C), 40.1, 40.6 (ϵ C, 4×N-CH₂-CH₂-NH, C¹ *DDA*), 56.3 (4× α C *L-Lys*), 57.1 (4× α C *L-Trp*), 80.6 [C(CH₃)₃], 111.1 (C³ *L-Trp*), 112.3 (C⁷ *L-Trp*), 119.5 (C⁴ *L-Trp*), 119.8 (C⁵ *L-Trp*), 122.4 (C⁶ *L-Trp*), 124.6 (C² *L-Trp*), 128.9 (C^{3a} *L-Trp*), 138.0 (C^{7a} *L-Trp*), 157.5, 157.8 [C=O (Boc)],

174.6 (CONH). Sygnały w ^{13}C NMR od: αC rdzenia, $4\times\text{N-CH}_2\text{-CH}_2\text{-NH}$, $2\times\text{N-CH}_2\text{-CONH}$ – niewidoczne.

$[\alpha]_{\text{D}}^{25} = +1.8$ (c 1, MeOH).

$R_f = 0.44$ ($\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$ 8:1).

T. top.: 128.1-131.4°C.

c) Dendrymer 165 (otrzymany z dendrymeru pośredniego 159)

Do reakcji użyto związku **83** (0.21 g, 0.59 mmol), HOBt (0.09 g, 0.59 mmol), EDC·HCl (0.113 g, 0.59 mmol), dendrymeru pośredniego **159** (0.2 g, 0.134 mmol), Et_3N (0.15 mL, 1.072 mmol) i DMF (10 mL). Sprzężanie prowadzono przez 48 godzin. Otrzymano produkt w postaci białego proszku z wydajnością 60.7% (0.233 g).

$\text{C}_{152}\text{H}_{234}\text{O}_{27}\text{N}_{26}$, $M = 2857.64$ g/mol (masa monoizotopowa 2855.8).

LRMS (ESI, MeOH): 2879.1 $[\text{M} + \text{Na}^+]$, 1450.9 $[\text{M} + 2\text{Na}^+]^{2+}$ - główny sygnał, 1439.9 $[\text{M} + \text{H}^+ + \text{Na}^+]^{2+}$.

^1H NMR (500 MHz, MeOD): $\delta = 0.89$ (m, 12H, $4\times\text{CH}_3$ *n-Bu*), 1.14-1.78 (br m, 46H, β , γ , δCH_2 , $4\times\text{CH}_2\text{-}2,3$ *n-Bu*) nakładający się na 1.34, 1.40 [3s, 72H, $8\times\text{C}(\text{CH}_3)_3$], 2.58 (m, 8H, $4\times\text{N-CH}_2\text{-CH}_2\text{-NH}$), 2.91-3.30 (br m, 32H, $\text{CH}_2\text{-Ar TA}$, ϵCH_2 , $4\times\text{N-CH}_2\text{-CH}_2\text{-NH}$, $2\times\text{N-CH}_2\text{-CONH}$, βCH_2 *B-Trp*), 3.45, 3.60 (2m, 2H, $\text{CH}_2\text{-NH TA}$), 3.97 (m, 4H, $4\times\alpha\text{CH L-Lys}$), 4.06 (m, 8H, $4\times\text{CH}_2\text{-}1$ *n-Bu*), 4.29 (m, 4H, $4\times\alpha\text{CH B-Trp}$), 4.40 (m, 1H, αCH rdzenia), 7.00 (m, 9H, $\text{C}^{2,5}\text{-H B-Trp}$, $\text{C}^5\text{-H TA}$), 7.05 (m, 2H, $\text{C}^{2,6}\text{-H TA}$), 7.11 (m, 4H, $\text{C}^6\text{-H B-Trp}$), 7.30 (m, 5H, $\text{C}^7\text{-H B-Trp}$, $\text{C}^7\text{-H TA}$), 7.57 (m, 5H, $\text{C}^4\text{-H B-Trp}$, $\text{C}^4\text{-H TA}$).

^{13}C NMR (500 MHz, MeOD): $\delta = 14.2$ (C^4 *n-Bu*), 21.1 (C^3 *n-Bu*), 23.7, 24.2, 24.3 (γC), 26.3 ($\text{CH}_2\text{-Ar TA}$), 28.7, 28.9 [$\text{C}(\text{CH}_3)_3$], 29.5 ($\beta\text{C B-Trp}$), 29.9, 30.2, 30.7 (δC), 31.9, 33.1, 33.6 (βC , C^2 *n-Bu*), 38.4, 38.6, 40.1 (ϵC , $4\times\text{N-CH}_2\text{-CH}_2\text{-NH}$), 41.3 ($\text{CH}_2\text{-NH TA}$), 46.7 (C^1 *n-Bu*), 54.3 (αC rdzenia), 55.1, 55.5 ($4\times\text{N-CH}_2\text{-CH}_2\text{-NH}$), 56.3 ($4\times\alpha\text{C L-Lys}$), 57.1 ($4\times\alpha\text{C B-Trp}$), 59.7 ($2\times\text{N-CH}_2\text{-CONH}$), 80.5, 80.6 [$\text{C}(\text{CH}_3)_3$], 110.5 (C^7 *B-Trp*), 112.4 (C^7 *TA*), 113.1 (C^3 *TA*), 119.4 (C^4 *TA*), 119.7 (C^5 *TA*), 119.8 (C^5 *B-Trp*), 120.0 (C^4 *B-Trp*), 122.4 (C^6 *TA*), 122.4 (C^6 *B-Trp*), 123.7 (C^2 *TA*), 128.0 (C^2 *B-Trp*), 128.8 (C^{3a} *TA*), 129.5 (C^{3a} *B-Trp*), 137.8 (C^{7a} *B-Trp*), 138.1 (C^{7a} *TA*), 157.5, 157.7, 157.8 [$\text{C}=\text{O}$ (Boc)], 173.7, 174.6, 175.4, 175.5 (CONH). Sygnały w ^{13}C NMR od: αC rdzenia, $2\times\text{N-CH}_2\text{-CONH}$ – słabe.

$[\alpha]_{\text{D}}^{25} = +0.86$ (c 1, MeOH).

$R_f = 0.47$ ($\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$ 8:1).

T. top.: 103.2-107°C.

d) Dendrymer 166 (otrzymany z dendrymeru pośredniego 160)

Do reakcji użyto związku **83** (0.26 g, 0.726 mmol), HOBt (0.11 g, 0.726 mmol), EDC·HCl (0.14 g, 0.726 mmol), dendrymeru pośredniego **160** (0.25 g, 0.165 mmol), Et₃N (0.18 mL, 1.32 mmol) i DMF (10 mL). Sprzęganie prowadzono przez 96 godzin. Otrzymano produkt w postaci białego proszku z wydajnością 54.6% (0.26 g).

C₁₅₄H₂₄₉O₂₇N₂₅, M = 2882.78 g/mol (masa monoizotopowa 2880.9).

LRMS (ESI, MeOH): 1464.5 [M + 2Na⁺]²⁺ - *główny sygnał*, 1453.6 [M + H⁺ + Na⁺]²⁺, 984.1 [M + 3Na⁺]³⁺, 976.8 [M + H⁺ + 2Na⁺]³⁺, 585.8 [M + 3H⁺ + 2Na⁺]⁵⁺.

¹H NMR (500 MHz, MeOD): δ = 0.85-0.94 (br m, 15H, CH₃ DDA, 4×CH₃ *n*-Bu), 1.14-1.82 (br m, 66H, β, γ, δCH₂, CH₂-2-11 DDA, 4×CH₂-2,3 *n*-Bu) nakładający się na 1.35, 1.41 [3s, 72H, 8×C(CH₃)₃], 2.97-3.30 (br m, 32H, CH₂-1 DDA, ε-CH₂, 4×N-CH₂-CH₂-NH, 2×N-CH₂-CONH, β-CH₂ *B*-Trp), 3.97 (m, 4H, 4×αCH *L*-Lys), 4.09 (m, 8H, 4×CH₂-1 *n*-Bu), 4.29 (m, 4H, 4×αCH *B*-Trp), 4.39 (m, 1H, αCH rdzenia), 7.02 (m, 8H, C^{2,5}-H *B*-Trp), 7.12 (m, 4H, C⁶-H *B*-Trp), 7.31 (m, 4H, C⁷-H *B*-Trp), 7.57 (m, 4H, C⁴-H *B*-Trp). *Sygnał w ¹H NMR od: 4×N-CH₂-CH₂-NH – niewidoczny.*

¹³C NMR (500 MHz, MeOD): δ = 14.2 (C⁴ *n*-Bu), 14.5 (C¹² DDA), 21.1 (C³ *n*-Bu), 23.8, 24.3, 28.1, 28.4 (γC, C^{3,11} DDA), 28.7, 28.9 [C(CH₃)₃], 29.5 (βC *B*-Trp), 30.0-30.8 (δC, C², C⁴-C¹⁰ DDA), 33.1, 33.6 (βC, C² *n*-Bu), 40.1 (εC, 4×N-CH₂-CH₂-NH, C¹ DDA), 46.7 (C¹ *n*-Bu), 56.3 (4×αC *L*-Lys), 57.1 (4×αC *B*-Trp), 80.6 [C(CH₃)₃], 110.5 (C⁷ *B*-Trp), 110.6 (C³ *B*-Trp), 119.8 (C⁵ *B*-Trp), 119.9 (C⁴ *B*-Trp), 122.4 (C⁶ *B*-Trp), 128.0 (C² *B*-Trp), 129.5 (C^{3a} *B*-Trp), 137.8 (C^{7a} *B*-Trp), 157.5 [C=O (Boc)], 174.7 (CONH). *Sygnały w ¹³C NMR od: αC rdzenia, 4×N-CH₂-CH₂-NH, 2×N-CH₂-CONH – niewidoczne.*

[α]_D²⁵ = +11.9 (c 0.1, MeOH).

R_f = 0.56 (CHCl₃/MeOH 8:1).

T. top.: 106.8-109.2°C.

e) Dendrymer 169 (otrzymany z dendrymeru pośredniego 159)

Do reakcji użyto związku **96** (0.29 g, 0.59 mmol), HOBt (0.09 g, 0.59 mmol), EDC·HCl (0.113 g, 0.59 mmol), dendrymeru pośredniego **159** (0.2 g, 0.134 mmol), Et₃N (0.15 mL, 1.072 mmol) i DMF (10 mL). Sprzęganie prowadzono przez 96 godzin. Otrzymano produkt w postaci białego proszku z wydajnością 57.8% (0.26 g).

C₁₇₆H₂₇₈O₃₅N₃₀, M = 3374.27 g/mol (masa monoizotopowa 3372.1).

LRMS (ESI, MeOH): 1709.0 [M + 2Na⁺]²⁺ - *główny sygnał*, 1698.2 [M + H⁺ + Na⁺]²⁺, 1147.9 [M + 3Na⁺]³⁺.

¹H NMR (500 MHz, MeOD): $\delta = 1.13-1.81$ (br m, 54H, β , γ , δ CH₂, 4×CH₂-2,3,4 5-AP) nakładający się na 1.30, 1.35, 1.40 [3s, 108H, 12×C(CH₃)₃], 2.58 (m, 8H, 4×N-CH₂-CH₂-NH), 2.89-3.34 (br m, 40H, CH₂-Ar TA, ϵ CH₂, 4×N-CH₂-CH₂-NH, 2×N-CH₂-CONH, β CH₂ AP-Trp, 4×CH₂-5 5-AP), 3.44, 3.60 (2m, 2H, CH₂-NH TA), 3.96 (m, 4H, 4× α CH L-Lys), 4.05 (m, 8H, 4×CH₂-1 5-AP), 4.28 (m, 4H, 4× α CH AP-Trp), 4.41 (m, 1H, α CH rdzenia), 6.93-7.08 (br m, 11H, C^{2,5}-H AP-Trp, C^{2,5,6}-H TA), 7.11 (m, 4H, C⁶-H AP-Trp), 7.30 (m, 5H, C⁷-H AP-Trp, C⁷-H TA), 7.56 (m, 5H, C⁴-H AP-Trp, C⁴-H TA).

¹³C NMR (500 MHz, MeOD): $\delta = 23.8, 24.3$ (γ C), 25.2 (C³ 5-AP), 26.3 (CH₂-Ar TA), 28.7, 28.9 [C(CH₃)₃], 29.5 (β C AP-Trp), 29.9, 30.2, 30.7 (δ C), 30.6 (C⁴ 5-AP), 31.1 (C² 5-AP), 31.9, 33.1 (β C), 38.4, 38.6, 40.2 (ϵ C, 4×N-CH₂-CH₂-NH), 41.2 (C⁵ 5-AP), 41.4 (CH₂-NH TA), 46.9 (C¹ 5-AP), 54.3 (α C rdzenia), 55.5 (4×N-CH₂-CH₂-NH), 56.3 (4× α C L-Lys), 57.1 (4× α C AP-Trp), 79.8, 80.6 [C(CH₃)₃], 110.5 (C⁷ AP-Trp), 110.7 (C³ AP-Trp), 112.4 (C⁷ TA), 113.1 (C³ TA), 119.4 (C⁴ TA), 119.7 (C⁵ TA), 119.8 (C⁵ AP-Trp), 120.0 (C⁴ AP-Trp), 122.8 (C⁶ TA), 122.5 (C⁶ AP-Trp), 123.7 (C² TA), 128.0 (C² AP-Trp), 129.5 (C^{3a} AP-Trp, C^{3a} TA), 137.8 (C^{7a} AP-Trp), 138.2 (C^{7a} TA), 157.5, 157.8, 158.5 [C=O (Boc)], 173.7, 174.5, 175.4 (CONH). Sygnały w ¹³C NMR od: α C rdzenia – słaby; 2×N-CH₂-CONH – niewidoczny.

$[\alpha]_D^{25} = -1.5$ (c 1, MeOH).

$R_f = 0.48$ (CHCl₃/MeOH 8:1).

T. top.: 110.6-115.4°C.

6.7.2.2. Odbezpieczone dendrymery

Deprotekcję grup Boc w dendrymerach **161**, **162**, **165**, **166** i **169** za pomocą nasyconego roztworu HCl w AcOEt przeprowadzono wg procedury ogólnej zamieszczonej w Rozdziale 6.2. (Procedura C - wariant B). Reakcji poddawano 0.14 - 0.22 g (0.053 – 0.083 mmol) związku rozpuszczonego w 1 mL MeOH z 5 mL nas. HCl/AcOEt. Całkowite zdjęcie grup Boc obserwowano w ciągu 2 godzin. Odbezpieczone dendrymery występują w postaci dodekachlorowodorków (**163**, **164**, **167**, **168**) lub tetradekachlorowodorku (**170**). Są to higroskopijne, bezpostaciowe proszki.

a) Dendrymer **163** (otrzymany z dendrymeru **161**)

Związek w postaci jasnożółtego proszku otrzymano z wydajnością 94% (0.11 g) z 0.14 g (0.053 mmol) dendrymeru **161**.

C₉₆H₁₃₈O₁₁N₂₆×10HCl, M = 2196.89 g/mol (masa monoizotopowa nieprotonowanego dendrymeru - 1831.1).

LRMS (ESI, MeOH): 943.6 [M + MeOH + H⁺ + Na⁺]²⁺, 916.6 [M + 2H⁺]²⁺, 629.4 [M + MeOH + 2H⁺ + Na⁺]³⁺, 611.4 [M + 3H⁺]³⁺ - *główny sygnał*, 458.7 [M + 4H⁺]⁴⁺.

¹H NMR (500 MHz, MeOD): δ = 1.26-1.55 (br m, 20H, γ , δ CH₂), 1.69 (m, 2H, β CH₂), 1.84 (m, 8H, β CH₂), 2.95 (br t, 2H, CH₂-Ar TA), 3.08-3.20 (br m, 12H, 4 \times ϵ CH₂, 2 \times N-CH₂-CH₂-NH), 3.21-3.40 (br m, 18H, ϵ CH₂, 2 \times N-CH₂-CH₂-NH, 2 \times N-CH₂-CH₂-NH, β CH₂ L-Trp), 3.41-3.70 (br m, 10H, 2 \times N-CH₂-CH₂-NH, 2 \times N-CH₂-CONH, CH₂-NH TA), 3.97 (m, 4H, 4 \times α CH L-Lys), 4.12 (m, 4H, 4 \times α CH L-Trp), 4.34 (m, 1H, α CH rdzenia), 6.98 (br t, 1H, C⁵-H TA), 7.04 (m, 6H, C⁵-H L-Trp, C^{2,6}-H TA), 7.12 (br t, 4H, C⁶-H L-Trp), 7.23 (s, 4H, C²-H L-Trp), 7.33 (d, J = 8.0 Hz, 1H, C⁷-H TA), 7.38 (d, J = 8.05 Hz, 4H, C⁷-H L-Trp), 7.54 (d, J = 7.81 Hz, 1H, C⁴-H TA), 7.67 (d, J = 7.48 Hz, 4H, C⁴-H L-Trp).

¹³C NMR (500 MHz, MeOD): δ = 23.3 (γ C), 26.2 (CH₂-Ar TA), 29.0 (β C L-Trp), 29.5 (δ C), 32.0 (β C), 40.1 (ϵ C), 41.4 (CH₂-NH TA), 54.6 (4 \times α C L-Lys), 55.0 (α C rdzenia), 55.2 (4 \times α C L-Trp), 108.1 (C³ L-Trp), 112.4 (C⁷ TA), 112.6 (C⁷ L-Trp), 113.0 (C³ TA), 119.4 (C⁴ L-Trp, C⁴ TA), 119.7 (C⁵ TA), 120.3 (C⁵ L-Trp), 122.4 (C⁶ TA), 122.9 (C⁶ L-Trp), 123.7 (C² TA), 125.7 (C² L-Trp), 128.4 (C^{3a} L-Trp), 128.8 (C^{3a} TA), 138.2 (C^{7a} L-Trp, C^{7a} TA), 170.1 (CONH).
Sygnaly w ¹³C NMR od: α C rdzenia – słaby; 4 \times N-CH₂-CH₂-NH, 4 \times N-CH₂-CH₂-NH, 2 \times N-CH₂-CONH – niewidoczne.

$[\alpha]_D^{25}$ = +43.5 (c 1, MeOH).

T. top.: 215.3-219.2°C.

b) Dendrymer 164 (otrzymany z dendrymeru 162)

Związek w postaci kremowego proszku otrzymano z wydajnością 94.4% (0.17 g) z 0.22 g (0.083 mmol) dendrymeru **162**.

C₉₈H₁₅₃O₁₁N₂₅ \times 10HCl, M = 2222.03 g/mol (masa monoizotopowa nieprotonowanego dendrymeru - 1856.2).

LRMS (ESI, MeOH): 929.2 [M + 2H⁺]²⁺, 619.8 [M + 3H⁺]³⁺ - *główny sygnał*, 465.4 [M + 4H⁺]⁴⁺.

¹H NMR (500 MHz, MeOD): δ = 0.88 (m, 3H, CH₃ DDA), 1.15-1.62 (br m, 40H, γ , δ CH₂, CH₂-2-11 DDA), 1.70-1.93 (br m, 10H, β CH₂), 3.16 (m, 10H, ϵ CH₂), 3.21-3.42 (br m, 22H, CH₂-1 DDA, 4 \times N-CH₂-CH₂-NH, 2 \times N-CH₂-CH₂-NH, β CH₂ L-Trp), 3.48 (m, 4H, 2 \times N-CH₂-CH₂-NH), 3.64 (m, 4H, 2 \times N-CH₂-CONH), 3.98 (m, 4H, 4 \times α CH L-Lys), 4.13 (m, 4H, 4 \times α CH L-Trp), 4.37 (m, 1H, α CH rdzenia), 7.05 (br t, 4H, C⁵-H L-Trp), 7.12 (br t, 4H, C⁶-H L-Trp), 7.24 (s, 4H, C²-H L-Trp), 7.39 (d, J = 8.04 Hz, 4H, C⁷-H L-Trp), 7.67 (d, J = 7.78 Hz, 4H, C⁴-H L-Trp).

^{13}C NMR (500 MHz, MeOD): $\delta = 14.5$ (C^{12} DDA), 23.3, 23.7, 24.3, 28.1 (γC , $\text{C}^{3,11}$ DDA), 29.0 (βC L-Trp), 29.5-30.8 (δC , C^2 , C^4 - C^{10} DDA), 32.0, 33.0, 33.1 (βC), 40.1, 40.7 (ϵC , C^1 DDA), 54.6 ($4\times\alpha\text{C}$ L-Lys), 55.0 (αC rdzenia), 55.2 ($4\times\alpha\text{C}$ L-Trp), 108.1 (C^3 L-Trp), 112.6 (C^7 L-Trp), 119.4 (C^4 L-Trp), 120.3 (C^5 L-Trp), 122.9 (C^6 L-Trp), 125.7 (C^2 L-Trp), 128.4 (C^{3a} L-Trp), 138.2 (C^{7a} L-Trp), 170.1 (CONH). Sygnały w ^{13}C NMR od: αC rdzenia – słaby; $4\times\text{N-CH}_2\text{-CH}_2\text{-NH}$, $4\times\text{N-CH}_2\text{-CH}_2\text{-NH}$, $2\times\text{N-CH}_2\text{-CONH}$ – niewidoczne.

$[\alpha]_{\text{D}}^{25} = +40.7$ (c 1, MeOH).

T. top.: 195.1-202.2°C.

c) Dendrymer 167 (otrzymany z dendrymeru 166)

Związek w postaci kremowego proszku otrzymano z wydajnością 98.7% (0.15 g) z 0.18 g (0.063 mmol) dendrymeru 166.

$\text{C}_{112}\text{H}_{170}\text{O}_{11}\text{N}_{26}\times 10\text{HCl}$, $M = 2421.32$ g/mol (masa monoizotopowa nieprotonowanego dendrymeru - 2055.4).

LRMS (ESI, MeOH): 2079.0 [$\text{M} + \text{Na}^+$], 2056.8 [$\text{M} + \text{H}^+$], 1056.3 [$\text{M} + \text{K}^+ + \text{NH}_4^{+2+}$], 1051.8 [$\text{M} + 2\text{Na}^{+2+}$], 1040.6 [$\text{M} + \text{H}^+ + \text{Na}^{+2+}$], 1029.3 [$\text{M} + 2\text{H}^{+2+}$] - główny sygnał, 686.6 [$\text{M} + 3\text{H}^{+3+}$], 515.3 [$\text{M} + 4\text{H}^{+4+}$].

^1H NMR (500 MHz, MeOD): $\delta = 0.93$ (m, 12H, $4\times\text{CH}_3$ n-Bu), 1.25-1.95 (br m, 46H, β , γ , δCH_2 , $4\times\text{CH}_2$ -2,3 n-Bu), 2.95 (m, 2H, CH_2 -Ar TA), 3.06-3.40 (br m, 18H, ϵCH_2 , βCH_2 B-Trp), 3.43-3.61 (br m, 14H, $4\times\text{N-CH}_2\text{-CH}_2\text{-NH}$, $2\times\text{N-CH}_2\text{-CH}_2\text{-NH}$, $\text{CH}_2\text{-NH}$ TA), 3.78 (m, 4H, $2\times\text{N-CH}_2\text{-CH}_2\text{-NH}$), 3.98 (m, 4H, $4\times\alpha\text{CH}$ L-Lys), 4.08-4.21 (br m, 16H, $4\times\alpha\text{CH}$ B-Trp, $4\times\text{CH}_2$ -1 n-Bu, $2\times\text{N-CH}_2\text{-CONH}$), 4.32 (m, 1H, αCH rdzenia), 6.98 (m, 1H, C^5 -H TA), 7.07 (m, 6H, C^5 -H B-Trp, $\text{C}^{2,6}$ -H TA), 7.18 (m, 8H, $\text{C}^{2,6}$ -H B-Trp), 7.36 (m, 5H, C^7 -H B-Trp, C^7 -H TA), 7.55 (d, $J = 7.93$ Hz, 1H, C^4 -H TA), 7.68 (m, 4H, C^4 -H B-Trp).

^{13}C NMR (500 MHz, MeOD): $\delta = 14.1$ (C^4 n-Bu), 21.1 (C^3 n-Bu), 23.4, 24.0 (γC), 26.3 (CH_2 -Ar TA), 28.8 (βC B-Trp), 29.6, 29.7, 30.7 (δC), 31.9, 32.1, 33.1, 33.5 (βC , C^2 n-Bu), 36.2 ($4\times\text{N-CH}_2\text{-CH}_2\text{-NH}$), 40.0, 40.1, 40.2 (ϵC), 41.4 ($\text{CH}_2\text{-NH}$ TA), 46.9 (C^1 n-Bu), 54.6 ($4\times\alpha\text{C}$ L-Lys), 55.2 ($4\times\alpha\text{C}$ B-Trp), 107.5 (C^3 B-Trp), 110.8 (C^7 B-Trp), 112.4 (C^7 TA), 113.0 (C^3 TA), 119.3 (C^4 TA), 119.7 (C^4 B-Trp), 119.8 (C^5 TA), 120.3 (C^5 B-Trp), 122.4 (C^6 TA), 122.9 (C^6 B-Trp), 123.7 (C^2 TA), 128.8 (C^{3a} B-Trp), 129.0 (C^2 B-Trp), 138.0 (C^{7a} B-Trp), 138.1 (C^{7a} TA), 170.1, 171.6 (CONH). Sygnały w ^{13}C NMR od: $2\times\text{N-CH}_2\text{-CONH}$, $4\times\alpha\text{C}$ rdzenia, $4\times\text{N-CH}_2\text{-CH}_2\text{-NH}$ – niewidoczne; $4\times\text{N-CH}_2\text{-CH}_2\text{-NH}$ – słaby.

Analiza elementarna: obliczona dla $\text{C}_{112}\text{H}_{170}\text{O}_{11}\text{N}_{26}\times 10\text{HCl} + 6\text{H}_2\text{O}$: C, 53.18; H, 7.65; N, 14.40; Cl, 14.02. Znaleziono: C, 53.22; H, 7.65; N, 13.61; Cl, 13.48.

$[\alpha]_D^{25} = +34.6$ (c 1, MeOH).

T. top.: 194.3-199.3°C.

d) Dendrymer 168 (otrzymany z dendrymeru 166)

Związek w postaci białego proszku otrzymano z wydajnością 97.1% (0.165 g) z 0.2 g (0.069 mmol) dendrymeru 166.

$C_{114}H_{185}O_{11}N_{25} \times 10HCl$, $M = 2446.46$ g/mol (masa monoizotopowa nieprotonowanego dendrymeru - 2080.5).

LRMS (ESI, MeOH): 1068.3 $[M + MeOH + H^+ + Na^+]^{2+}$, 1041.3 $[M + 2H^+]^{2+}$, 712.5 $[M + MeOH + 2H^+ + Na^+]^{3+}$ - *główny sygnał*, 694.5 $[M + 3H^+]^{3+}$.

1H NMR (500 MHz, MeOD): $\delta = 0.88$ (m, 3H, CH_3 DDA), 0.94 (m, 12H, $4 \times CH_3$ *n-Bu*), 1.23-1.61 (br m, 48H, γ , δCH_2 , CH_2 -2-11 DDA, $4 \times CH_2$ -3 *n-Bu*), 1.76-2.00 (m, 18H, βCH_2 , $4 \times CH_2$ -2 *n-Bu*), 3.08-3.41 (br m, 20H, CH_2 -1 DDA, ϵCH_2 , βCH_2 *B-Trp*), 3.44-3.62 (br m, 12H, $4 \times N-CH_2-CH_2-NH$, $2 \times N-CH_2-CH_2-NH$), 3.78 (m, 4H, $2 \times N-CH_2-CH_2-NH$), 3.99 (m, 4H, $4 \times \alpha CH$ *L-Lys*), 4.09-4.21 (br m, 16H, $4 \times \alpha CH$ *B-Trp*, $4 \times CH_2$ -1 *n-Bu*, $2 \times N-CH_2-CONH$), 4.35 (m, 1H, αCH *rdzenia*), 7.07 (t, $J = 7.4$, 4H, C^5-H *B-Trp*), 7.18 (m, 8H, $C^{2,6}-H$ *B-Trp*), 7.38 (d, $J = 8.22$ Hz, 4H, C^7-H *B-Trp*), 7.68 (d, $J = 7.60$ Hz, 4H, C^4-H *B-Trp*).

^{13}C NMR (500 MHz, MeOD): $\delta = 14.1$ (C^4 *n-Bu*), 14.5 (C^{12} DDA), 21.2 (C^3 *n-Bu*), 23.4, 23.7, 24.2, 28.1 (γC , $C^{3,11}$ DDA), 28.9 (βC *B-Trp*), 29.6-30.8 (δC , C^2 , C^4-C^{10} DDA), 31.9, 33.0, 33.1, 33.6 (βC , C^2 *n-Bu*), 36.0 ($4 \times N-CH_2-CH_2-NH$), 40.1, 40.3, 40.6 (ϵC , C^1 DDA), 46.9 (C^1 *n-Bu*), 54.6 ($4 \times \alpha C$ *L-Lys*), 54.8 (αC *rdzenia*), 55.2 ($4 \times \alpha C$ *B-Trp*), 56.1 ($4 \times N-CH_2-CH_2-NH$), 107.5 (C^3 *B-Trp*), 110.8 (C^7 *B-Trp*), 119.8 (C^4 *B-Trp*), 120.3 (C^5 *B-Trp*), 122.9 (C^6 *B-Trp*), 128.9 (C^{3a} *B-Trp*), 129.0 (C^2 *B-Trp*), 138.0 (C^{7a} *B-Trp*), 170.1, 171.6, 171.7, 173.7 ($CONH$). *Sygnaly w ^{13}C NMR od: $2 \times N-CH_2-CONH$ – niewidoczny; $4 \times \alpha C$ *rdzenia*, $4 \times N-CH_2-CH_2-NH$, $4 \times N-CH_2-CH_2-NH$ – słabe.*

$[\alpha]_D^{25} = +25.5$ (c 1, MeOH).

T. top.: 165.1-168.6°C.

e) Dendrymer 170 (otrzymany z dendrymeru 169)

Związek w postaci jasnoróżowego proszku otrzymano z wydajnością 94.3% (0.15 g) z 0.2 g (0.059 mmol) dendrymeru 169.

$C_{116}H_{182}O_{11}N_{30} \times 14HCl$, $M = 2683.33$ g/mol (masa monoizotopowa nieprotonowanego dendrymeru - 2171.5).

LRMS (ESI, MeOH): 1086.7 $[M + 2H^+]^{2+}$, 1097.7 $[M + H^+ + Na^+]^{2+}$, 724.8 $[M + 3H^+]^{3+}$ -
główny sygnał, 543.8 $[M + 4H^+]^{4+}$.

1H NMR (500 MHz, MeOD): $\delta = 1.25-1.95$ (4br m, 54H, β , γ , δCH_2 , $4 \times CH_2-2,3,4$ 5-AP),
2.88 (m, 8H, $4 \times CH_2-5$ 5-AP), 2.95 (m, 2H, CH_2-Ar TA), 3.05-3.41 (br m, 18H, ϵCH_2 , βCH_2
AP-Trp), 3.47-3.63 (m, 14H, CH_2-NH TA, $4 \times N-CH_2-CH_2-NH$, $2 \times N-CH_2-CH_2-NH$), 3.79 (m,
4H, $2 \times N-CH_2-CH_2-NH$), 3.99 (m, 4H, $4 \times \alpha CH$ L-Lys), 4.17 (m, 14H, $4 \times CH_2-1$ 5-AP, $4 \times \alpha CH$
AP-Trp, $N-CH_2-CONH$), 4.33 (m, 3H, αCH rdzenia, $N-CH_2-CONH$), 6.98 (m, 1H, C^5-H TA),
7.07 (m, 6H, C^5-H AP-Trp, $C^{2,6}-H$ TA), 7.17 (m, 4H, C^6-H AP-Trp), 7.26 (m, 4H, C^2-H AP-
Trp), 7.35 (d, $J = 8.07$ Hz, 1H, C^7-H TA), 7.40 (d, $J = 8.13$ Hz, 4H, C^7-H AP-Trp), 7.56 (d, $J =$
7.94 Hz, 1H, C^4-H TA), 7.68 (d, $J = 7.72$ Hz, 4H, C^4-H AP-Trp).

^{13}C NMR (500 MHz, MeOD): $\delta = 23.4$, 23.7 (γC), 24.8 (C^3 5-AP), 26.2 (CH_2-Ar TA), 28.2
(δC), 28.8 (βC AP-Trp), 29.6, 30.1, 30.5, 30.6, 30.7, 30.9 (δC , $C^{2,4}$ 5-AP), 31.9, 32.1, 33.1
(βC), 36.0 ($4 \times N-CH_2-CH_2-NH$), 40.1, 40.3, 40.6 (ϵC , C^5 5-AP), 41.4 (CH_2-NH TA), 46.8 (C^1
5-AP), 54.6 ($4 \times \alpha C$ L-Lys), 55.2 ($4 \times \alpha C$ AP-Trp), 55.4 (αC rdzenia), 56.2 ($4 \times N-CH_2-CH_2-NH$),
107.6 (C^3 AP-Trp), 110.8 (C^7 AP-Trp), 112.4 (C^7 TA), 113.0 (C^3 TA), 119.4 (C^4 TA), 119.7
(C^5 TA), 119.9 (C^4 AP-Trp), 120.3 (C^5 AP-Trp), 122.4 (C^6 TA), 123.0 (C^6 AP-Trp), 123.7 (C^2
TA), 129.1 (C^{3a} AP-Trp, C^{3a} TA), 129.2 (C^2 AP-Trp), 138.0 (C^{7a} AP-Trp, C^{7a} TA), 170.0,
171.7, 173.7 (CONH). Sygnały w ^{13}C NMR od: $2 \times N-CH_2-CONH$ – niewidoczny; $4 \times N-CH_2-$
 CH_2-NH , αC rdzenia, $4 \times N-CH_2-CH_2-NH$ – słabe.

$[\alpha]_D^{25} = +17.0$ (c 1, MeOH).

T. top.: 208.6-211.5°C.

7. CYTOWANA LITERATURA

- ¹ Bortel, E. *Wprowadzenie do chemii polimerów*, Wydawnictwo UJ, Kraków **1994**.
- ² Carlmark, A.; Hawker, C.; Hult, A.; Malkoch, M. *Chem. Soc. Rev.* **2009**, 38, 352-362.
- ³ Basavaraj, B.V.; Furtado, S.; Bharath, S.; Deveswaran, R.; Abharam, S.; Madhavan, V. *J. Pharmacy Research* **2009**, 2, 970-974.
- ⁴ Frechet, J.M.J.; Tomalia, D.A. *Dendrimers and Other Dendritic Polymers*, John Wiley & Sons, Chichester, **2001**.
- ⁵ Baars, M.W.P.L. *Dendritic Macromolecules Host-Guest Chemistry and Self-Assembly by Design*, Eindhoven: Technische Universiteit Eindhoven, **2000**.
- ⁶ Vogtle, F.; Richardt, G.; Werner, N. *Dendrimer Chemistry: Concepts, Syntheses, Properties, Applications*, WILEY-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim, **2009**.
- ⁷ Maciejewski, M. *J. Macromol. Sci. Chem.* **1982**, A17, 689-703.
- ⁸ de Gennes, P.-G.; Hervet, H. *J. Phys. Lett. Fr.* **1983**, 44, L351-L361.
- ⁹ Lescanec, L.; Muthukumar, M. *Macromolecules* **1990**, 23, 2280-2288.
- ¹⁰ a) Naylor, A.M.; Goddard III, W.A.; Kiefer, G.E.; Tomalia, D.A. *J. Am. Chem. Soc.* **1989**, 111, 2339-2341; b) Mansfield, M.L.; Klushin, L.I. *Macromolecules* **1993**, 26, 4262-4268; c) Naidoo, K.J.; Hugues, S.J.; Moss, J.R. *Macromolecules* **1999**, 32, 331-341; d) Bauer, R.E.; Grimsdale, A.C.; Mullen, K. *Top. Curr. Chem.* **2005**, 245, 253-286; e) Chai, M.; Niu, Y.; Youngs, W.J.; Rinaldi, P.L. *J. Am. Chem. Soc.* **2001**, 123, 4670-4678; f) Lee, I.; Athey, B.D.; Wetzal, A.W.; Meixner, W.; Baker, J.R., Jr. *Macromolecules* **2002**, 35, 4510-4520.
- ¹¹ a) Mourey, T.H.; Turner, S.R.; Rubinstein, M.; Frechet, J.M.J.; Hawker, C.J.; Wooley, K.L. *Macromolecules* **1992**, 25, 2401-2406; b) Wooley, K.L.; Klug, C.A.; Tasaki, K.; Schaefer, J. *J. Am. Chem. Soc.* **1997**, 119, 53-58.
- ¹² a) Tomalia, D.A. *New J. Chem.* **2012**, 36, 264-281; b) Chow, H.-F.; Leung, C.-F.; Wang, G.-X.; Yang, Y.-Y. *C. R. Chimie* **2003**, 6, 735-745.
- ¹³ Flory, P.J. *J. Am. Chem. Soc.* **1941**, 63, 3091-3096; **1952**, 74, 2718-2723.
- ¹⁴ Newkome, G.R.; Zhong-qi, Y.; Baker, G.R.; Gupta, V.K. *J. Org. Chem.* **1985**, 50, 2003-2004.
- ¹⁵ a) Wooley, K.L.; Hawker, C.J.; Frechet, J.M.J. *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 1* **1991**, 1059-1076; b) Hawker, C.J.; Frechet, J.M.J. *J. Am. Chem. Soc.* **1992**, 114, 8405-8413; c) Wooley, K.L.; Hawker, C.J.; Frechet, J.M.J. *J. Am. Chem. Soc.* **1993**, 115, 11496-11505.
- ¹⁶ a) Maraval, V.; Laurent, R.; Donnadiou, B.; Mauzac, M.; Caminade, A.-M.; Majoral, J.-P. *J. Am. Chem. Soc.* **2000**, 122, 2499-2511; b) Caminade, A.-M.; Laurent, R.; Delavaux-Nicot, B.; Majoral, J.-P. *New J. Chem.* **2012**, 36, 217-226.
- ¹⁷ a) James, T.D.; Shinmori, H.; Takeuchi, M.; Shinkai, S. *Chem. Commun.* **1996**, 705-706; b) Goodwin, A.P.; Lam, S.S.; Frechet, J.M.J. *J. Am. Chem. Soc.* **2007**, 129, 6994-6995.
- ¹⁸ a) Newkome, G.R.; Weis, C.D.; Moorefield, C.N.; Baker, G.R.; Childs, B.J.; Epperson, J. *Angew. Chem. Int. Ed.* **1998**, 37, 307-310; b) Tsuda, K.; Dol, G.C.; Gensch, T.; Hofkens, J.; Latterini, L.; Weener, J.W.; Meijer, E.W.; De Schryver, F.C. *J. Am. Chem. Soc.* **2000**, 122, 3445-3452.
- ¹⁹ Steffensen, M.B.; Simanek, E.E. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2004**, 43, 5178-5180.

- ²⁰ a) Vogtle, F.; Gestermann, S.; Hesse, R.; Schwierz, H.; Windisch, B. *Prog. Polym. Sci.* **2000**, *25*, 987-1041; b) Hecht, S. *J. Polymer Science: Part A: Polymer Chemistry* **2003**, *41*, 1047-1058.
- ²¹ Kang, T.; Amir, R.J.; Khan, A.; Ohshimizu, K.; Hunt, J.N.; Sivanandan, K.; Montanez, M.I.; Malkoch, M.; Ueda, M.; Hawker, C.J. *Chem. Commun.* **2010**, *46*, 1556-1558.
- ²² Bo, Z.; Schafer, A.; Franke, P.; Schluter, A.D. *Org. Lett.* **2000**, *2*, 1645-1648.
- ²³ De Gennes, P.-G.; Hervet, H. *J. Phys. Lett. Fr.* **1983**, *44*, 351-361.
- ²⁴ Caminade, A.-M.; Laurent, R.; Zablocka, M.; Majoral, J.-P. *Molecules* **2012**, *17*, 13605-13621.
- ²⁵ Denkewalter, R.G.; Kolc, J.; Lukasavage, W.J. **1981**, US Patent 4289872 A 19810915.
- ²⁶ Cordova, A.; Hult, A.; Hult, K.; Ihre, H. *J. Am. Chem. Soc.* **1998**, *120*, 13521-13522.
- ²⁷ Kawa, M.; Frechet, J.M.J. *Chem. Mater.* **1998**, *10*, 286-296.
- ²⁸ a) Veprek, P.; Jezek, J. *J. Peptide Sci.* **1999**, *5*, 5-23; b) Jezek, J.; Velek, J.; Veprek, P.; Velkova, V.; Trnka, T.; Pecka, J.; Ledvina, M.; Vondrasek, J.; Pisacka, M. *J. Peptide Sci.* **1999**, *5*, 46-55; c) Esposito, A.; Delort, E.; Lagnoux, D.; Djojo, F.; Reymond, J.-L. *Angew. Chem.* **2003**, *115*, 1419-1421; d) Clouet, A.; Darbre, T.; Reymond, J.-L. *Angew. Chem.* **2004**, *116*, 4712-4715; e) Sanclimens, G.; Crespo, L.; Giralt, E.; Royo, M.; Albericio, F. *Peptide Sci.* **2004**, *76*, 283-297.
- ²⁹ a) Posnett, D.N.; McGrath, H.; Tam, J.P. *J. Biol. Chem.* **1988**, *263*, 1719-1725; b) Tam, J.P. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1988**, *85*, 5409-5413; c) Sadler, K.; Tam, J.P. *Rev. Mol. Biotechnol.* **2002**, *90*, 195-229.
- ³⁰ Uhrich, K.E.; Boegemann, S.; Frechet, J.M.J.; Turner, S.R. *Polym. Bull.* **1991**, *25*, 551-558.
- ³¹ a) Swali, V.; Wels, N.J.; Langley, M.; Bradley, J. *J. Org. Chem.* **1997**, *62*, 4902-4903; b) Wells, N.J.; Basso, A.; Bradley, M. *Peptide Sci.* **1999**, *47*, 381-396.
- ³² Buhleier, E.; Wehner, W.; Vögtle, F. *Synthesis* **1978**, *2*, 155-158.
- ³³ Tomalia, D.A.; Baker, H.; Dewald, J.; Hall, M.; Kallos, G.; Martin, S.; Roeck, J.; Ryder, J.; Smith, P. *Polymer J.* **1985**, *17*, 117-132.
- ³⁴ Haag, R.; Sunder, A.; Stumbe, J.F. *J. Am. Chem. Soc.* **2000**, *122*, 2954-2955.
- ³⁵ Sha, Y.; Shen, L.; Hong, X. *Tetrahedron Lett.* **2002**, *43*, 9417-9419.
- ³⁶ Bosman, A.W.; Janssen, H.M.; Meijer, E.W. *Chem. Rev.* **1999**, *99*, 1665-1688.
- ³⁷ a) De Brabander van den Berg, E.M.M.; Meijer, E.W. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1993**, *32*, 1308-1311; b) Wörner, C.; Mülhaupt, R. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1993**, *32*, 1306-1308.
- ³⁸ Hawker, C.J.; Frechet, J.M.J. *J. Am. Chem. Soc.* **1990**, *112*, 7638-7647.
- ³⁹ Caminade, A.-M.; Laurent, R.; Delavaux-Nicot, B.; Majoral, J.-P. *New J. Chem.* **2012**, *36*, 217-226.
- ⁴⁰ a) Hirst, A.R.; Smith, D.K.; Feiters, M.C.; Geurts, H.P.M. *Chem. Eur. J.* **2004**, *10*, 5901-5910; b) Hirst, A.R.; Smith, D.K.; Harrington, J.P. *Chem. Eur. J.* **2005**, *11*, 6552-6559; c) Partridge, K.S.; Smith, D.K.; Dykes, G.M.; McGrail, P.T. *Chem. Commun.* **2001**, 319-320; d) Hirst, A.R.; Smith, D.K.; Feiters, M.C.; Geurts, H.P.M. *Langmuir* **2004**, *20*, 7070-7077; e) Hirst, A.R.; Smith, D.K. *Org. Biomol. Chem.* **2004**, *2*, 2965-2971; f) Hirst, A.R.; Smith, D.K. *Langmuir* **2004**, *20*, 10851-10857; g) Hirst, A.R.; Smith, D.K.; Feiters, M.C.; Geurts, H.P.M.; Wright, A.C. *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, *125*, 9010-9011.

- ⁴¹ Gitsov, I. *J. Polym. Sci. Part A: Polym. Chem.* **2008**, 46, 5295-5314.
- ⁴² a) Karakaya, B.; Claussen, W.; Gessler, K.; Saenger, W.; Schluter, A.D. *J. Am. Chem. Soc.* **1997**, 119, 3296-3301; b) Shu, L.; Schafer, A.; Schluter, A. *Macromolecules* **2000**, 33, 4321-4328.
- ⁴³ Wooley, K.L.; Hawker, C.J.; Frechet, J.M.J. *J. Am. Chem. Soc.* **1991**, 113, 4252-4261.
- ⁴⁴ Morgenroth, F.; Berresheim, A.J.; Wagner, M.; Mullen, K. *Chem. Commun.* **1998**, 1139-1140.
- ⁴⁵ Wooley, K.L.; Hawker, C.J.; Frechet, J.M.J. *Angew. Chem. Int. Ed.* **1994**, 33, 82-85.
- ⁴⁶ Kawaguchi, T.; Walker, K.L.; Wilkins, C.L.; Moore, J.S. *J. Am. Chem. Soc.* **1995**, 117, 2159-2165.
- ⁴⁷ a) Zanini, D.; Roy, R. *J. Org. Chem.* **1996**, 61, 7348-7354; b) Ashton, P.R.; Anderson, D.W.; Brown, C.L.; Shipway, A.N.; Stoddart, J.F.; Tolley, M.S. *Chem. Eur. J.* **1998**, 4, 781-795; c) Ishida, Y.; Jikei, M.; Kakimoto, M. *Macromolecules* **2000**, 33, 3202-3211.
- ⁴⁸ Klopsch, R.; Franke, P.; Schluter, A.D. *Chem. Eur. J.* **1996**, 2, 1330-1334.
- ⁴⁹ Ihre, H.; Hult, A.; Frechet, J.M.J.; Gitsov, I. *Macromolecules* **1998**, 31, 4061-4068.
- ⁵⁰ Spindler, R.; Frechet, J.M.J. *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 1* **1993**, 913-918.
- ⁵¹ Zeng, F.; Zimmerman, S.C. *J. Am. Chem. Soc.* **1996**, 118, 5326-5327.
- ⁵² Deb, S.K.; Maddux, T.M.; Yu, L. *J. Am. Chem. Soc.* **1997**, 119, 9079-9080.
- ⁵³ a) Maraval, V.; Laurent, R.; Marchand, P.; Caminade, A.-M.; Majoral, J.-P. *Journal of Organometallic Chemistry* **2005**, 690, 2458-2471; b) Brauge, L.; Magro, G.; Caminade, A.-M.; Majoral, J.-P. *J. Am. Chem. Soc.* **2001**, 123, 6698-6699.
- ⁵⁴ Antoni, P.; Nystrom, D.; Hawker, C.J.; Hulta, A.; Malkoch, M. *Chem. Commun.* **2007**, 2249-2251.
- ⁵⁵ Antoni, P.; Robb, M.J.; Campos, L.; Montanez, M.; Hult, A.; Malmstrom, E.; Malkoch, M.; Hawker, C.J. *Macromolecules* **2010**, 43, 6625-6631.
- ⁵⁶ Hong, S.; Bielinska, A.U.; Mecke, A.; Keszler, B.; Beals, J.L.; Shi, X.; Balogh, L.; Orr, B.G.; Baker Jr., J.R.; Banaszak Holl, M.M. *Bioconjugate Chem.* **2004**, 15, 774-782.
- ⁵⁷ Ziembra, B.; Matuszko, G.; Bryszewska, M.; Klajnert, B. *Cellular and Molecular Biology Letters* **2012**, 17, 21-35.
- ⁵⁸ Chen, H.-T.; Neerman, M.F.; Parrish, A.R.; Simanek, E.E. *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, 126, 10044-10048.
- ⁵⁹ Jevprasesphant, R.; Penny, J.; Attwood, D.; McKeown, N.B.; D'Emanuele, A. *Pharmaceutical Research* **2003**, 20, 1543-1550.
- ⁶⁰ a) Fant, K.; Esbjorner, E.K.; Jenkins, A.; Gossel, M.C.; Lincoln, P.; Norden, B. *Mol. Pharm.* **2010**, 7, 1734-1746; b) Klajnert, B.; Appelhans, D.; Komber, H.; Morgner, N.; Schwarz, S.; Richter, S.; Brutschy, B.; Ionov, M.; Tonkikh, A.K.; Bryszewska, M.; Voit, B. *Chem. Eur. J.* **2008**, 14, 7030-7041.
- ⁶¹ Hamilton, P.D.; Jacobs, D.Z.; Rapp, B.; Ravi, N. *Materials* **2009**, 2, 883-902.
- ⁶² Jevprasesphant, R.; Penny, J.; Jalal, R.; Attwood, D.; McKeown, N.B.; D'Emanuele, A. *International J. Pharm.* **2003**, 252, 263-266.
- ⁶³ Meyers, S.R.; Juhn, F.S.; Griset, A.P.; Luman, N.R.; Grinstaff, M.W. *J. Am. Chem. Soc.* **2008**, 130, 14444-14445.

- ⁶⁴ Malik, N.; Wiwattanapatapee, R.; Klopsch, R.; Lorenz, K.; Frey, H.; Weener, J.W.; Meijer, E.W.; Paulus, W.; Duncan, R. *J. Controlled Release* **2000**, *65*, 133-148.
- ⁶⁵ Zinslemeyer, B.H.; Macka, S.P.; Schatzlein, A.G.; Uchegbu, I.F. *Pharmacol. Res.* **2002**, *19*, 960-967.
- ⁶⁶ Choi, J.S.; Nam, K.; Park, J.-Y.; Kim, J.-B.; Lee, J.-K.; Park, J.-S. *J. Controlled Release* **2004**, *99*, 445-456.
- ⁶⁷ Fischera, D.; Lib, Y.; Ahlemeyerc, B.; Krieglsteinc, J.; Kissel, T. *Biomaterials* **2003**, *24*, 1121-1131.
- ⁶⁸ Jain, K.; Kesharwani, P.; Gupta, U.; Jain, N.K. *International J. Pharm.* **2010**, *394*, 122-142.
- ⁶⁹ Cheng, Y.; Zhao, L.; Li, Y.; Xu, T. *Chem. Soc. Rev.* **2011**, *40*, 2673-2703.
- ⁷⁰ a) Mintzer, M.A.; Dane, E.L.; O'Toole, G.A.; Grinstaff, M.W. *Mol. Pharmaceutics* **2012**, *9*, 342-354; b) Lazniewska, J.; Milowska, K.; Gabryelak, T. *WIREs Nanomed. Nanobiotechnol.* **2012**, *4*, 469-491; c) Castonguay, A.; Ladd, E.; van de Ven, T.G.M.; Kakkar, A. *New J. Chem.* **2012**, *36*, 199-204.
- ⁷¹ Hansen, H.C.; Haataja, S.; Finne, J.; Magnusson, G. *J. Am. Chem. Soc.* **1997**, *119*, 6974-6979.
- ⁷² Thompson, J.P.; Schengrund, C.-L. *Glycoconjugate Journal* **1997**, *14*, 837-845.
- ⁷³ Tam, J.P.; Lu, Y.-A.; Yang, J.-L. *Eur. J. Biochem.* **2002**, *269*, 923-932.
- ⁷⁴ a) Calabretta, M.K.; Kumar, A.; McDermott, A.M.; Cai, C. *Biomacromolecules*, **2007**, *8*, 1807-1811; b) Lopez, A.I.; Reins, R.Y.; McDermott, A.M.; Trautner, B.W.; Cai, C. *Mol.BioSyst.* **2009**, *5*, 1148-1156.
- ⁷⁵ Baj, J.; Markiewicz, Z. (red. naukowa) *Biologia molekularna bakterii* Wydawnictwo Naukowe PWN, Warszawa **2007**.
- ⁷⁶ Balogh, L.; Swanson, D.R.; Tomalia, D.A.; Hagnauer, G.L.; McManus, A.T. *Nano Letters* **2001**, *1*, 18-21.
- ⁷⁷ Obląg, E.; Gamian, A. *Postępy Hig. Med. Dośw.* **2010**, *64*, 201-211.
- ⁷⁸ Chen, C.Z.; Beck Tan, N.C.; Cooper, S.L. *Chem. Commun.* **1999**, *16*, 1585-1586.
- ⁷⁹ Chen, C.Z.; Beck-Tan, N.C.; Dhurjati, P.; van Dyk, T.K.; LaRossa, R.A.; Cooper, S.L. *Biomacromolecules* **2000**, *1*, 473-480.
- ⁸⁰ Chen, C.Z.; Cooper, S.L. *Biomaterials* **2002**, *23*, 3359-3368.
- ⁸¹ Ortega, P.; Copa-Patino, J.L.; Munoz-Fernandez, M.A.; Soliveri, J.; Gomez, R.; de la Mata, F.J. *Org. Biomol. Chem.* **2008**, *6*, 3264-3269.
- ⁸² Rasines, B.; Hernandez-Ros, J.M.; de las Cuevas, N.; Copa-Patino, J.L.; Soliveri, J.; Munoz-Fernandez, M.A.; Gomez, R.; de la Mata, F.J. *Dalton Trans.* **2009**, *40*, 8704-8713.
- ⁸³ Ciepluch, K.; Katir, N.; Kadib, A.E.; Felczak, A.; Zawadzka, K.; Weber, M.; Klajnert, B.; Lisowska, K.; Caminade, A.-M.; Bousmina, M.; Bryszewska, M.; Majoral, J.P. *Mol. Pharmaceutics* **2012**, *9*, 448-457.
- ⁸⁴ Wang, L.; Erasquin, U.J.; Zhao, M.; Ren, L.; Zhang, M.Y.; Cheng, G.J.; Wang, Y.; Cai, C. *ACS Appl. Mater. Interfaces* **2011**, *3*, 2885-2894.
- ⁸⁵ Tulu, M.; Aghatabay, N.M.; Senel, M.; Dizman, C.; Parali, T.; Dulger, B. *European Journal of Medicinal Chemistry* **2009**, *44*, 1093-1099.
- ⁸⁶ Wang, B.; Navath, R.S.; Menjoge, A.R.; Balakrishnan, B.; Bellair, R.; Dai, H.; Romero, R.; Kannan, S.; Kannan, R.M. *Int J Pharm.* **2010**, *16*, 298-308.

-
- ⁸⁷ Remaut, H.; Waksman, G. *Curr. Opin. Struct. Biol.* **2004**, 14, 161-170.
- ⁸⁸ a) Rojo, J.; Delgado, R. *Anti-Infect. Agents Med. Chem.* **2007**, 6, 151-174; b) Imberty, A.; Chabre, Y. M.; Roy, R. *Chem. Eur. J.* **2008**, 14, 7490-7499.
- ⁸⁹ Joosten, J.A.F.; Loimaranta, V.; Appeldoorn, C.C.M.; Haataja, S.; Maate, F.A.E.; Liskamp, R.M.J.; Finne, J.; Pieters, R.J. *J. Med. Chem.* **2004**, 47, 6499-6508.
- ⁹⁰ Salminen, A.; Loimaranta, V.; Joosten, J.A.F.; Khan, A.S.; Hacker, J.; Pieters, R.J.; Finne, J. *J. Antimicrob. Chemother.* **2007**, 60, 495-501.
- ⁹¹ Appeldoorn, C.C.M.; Joosten, J.A.F.; el Maate, F.A.; Dobrindt, U.; Hacker, J.; Liskamp, R.M.J.; Khan, A.S.; Pieters, R.J. *Tetrahedron: Asymmetry* **2005**, 16, 361-372.
- ⁹² Autar, R.; Khan, A.S.; Schad, M.; Hacker, J.; Liskamp, R.M.J.; Pieters, R.J. *ChemBioChem* **2003**, 4, 1317-1325.
- ⁹³ Deguise, I.; Lagnoux, D.; Roy, R. *New J. Chem.* **2007**, 31, 1321-1331.
- ⁹⁴ a) Thompson, J.P.; Schengrund, C.-L. *Biochemical Pharmacology* **1998**, 56, 591-597; b) Pukin, A.V.; Branderhorst, H.M.; Sisu, C.; Weijers, C.A.G.M.; Gilbert, M.; Liskamp, R.M.J.; Visser, G.M.; Zuilhof, H.; Pieters, R.J.; *ChemBioChem* **2007**, 8, 1500-1503; c) Vrasidas, I.; de Mol, N.J.; Liskamp, R.M.J.; Pieters, R.J. *Eur. J. Org. Chem.* **2001**, 24, 4685-4692; d) Arosio, D.; Vrasidas, I.; Valentini, P.; Liskamp, R.M.J.; Pieters, R.J.; Bernardi, A. *Org. Biomol. Chem.* **2004**, 2, 2113-2124; e) Branderhorst, H.M.; Liskamp, R.M.J.; Visser, G.M.; Pieters, R.J. *Chem. Commun.* **2007**, 5043-5045.
- ⁹⁵ a) Nishikawa, K.; Matsuoka, K.; Kita, E.; Okabe, N.; Mizuguchi, M.; Hino, K.; Miyazawa, S.; Yamasaki, C.; Aoki, J.; Takashima, S.; Yamakawa, Y.; Nishijima, M.; Terunuma, D.; Kuzuhara, H.; Natori, Y. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **2002**, 99, 7669-7674; b) Nishikawa, K.; Matsuoka, K.; Watanabe, M.; Igai, K.; Hino, K.; Hatano, K.; Yamada, A.; Abe, N.; Terunuma, D.; Kuzuhara, H.; Natori, Y. *J. Infect. Dis.* **2005**, 191, 2097-2105; c) Yamada, A.; Hatano, K.; Matsuoka, K.; Koyama, T.; Esumi, Y.; Koshino, H.; Hino, K.; Nishikawa, K.; Natori, Y.; Terunuma, D. *Tetrahedron* **2006**, 62, 5074-5083.
- ⁹⁶ Lopez, A.I.; Kumar, A.; Planas, M.R.; Li, Y.; Nguyen, T.V.; Cai, C. *Biomaterials* **2011**, 32, 4336-4346.
- ⁹⁷ D'Emanuele, A.; Attwood, D. *Advanced Drug Delivery Reviews* **2005**, 57, 2147-2162.
- ⁹⁸ Yang, H.; Kao, W.J. *Encyclopedia of Biomaterials and Biomedical Engineering* **2006**, 1-10.
- ⁹⁹ Yang, H.; Lopina, S.T. *J. Biomater. Sci. Polymer Edn* **2003**, 14, 1043-1056.
- ¹⁰⁰ Mishra, M.K.; Kotta, K.; Hali, M.; Wykes, S.; Gerard, H.C.; Hudson, A.P.; Whittum-Hudson, J.A.; Kannan, R.M. *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology, and Medicine* **2011**, 7, 935-944.
- ¹⁰¹ Ma, M.; Cheng, Y.; Xu, Z.; Xu, P.; Qu, H.; Fang, Y.; Xu, T.; Wen, L. *Eur. J. Med. Chem.* **2007**, 42, 93-98.
- ¹⁰² Cheng, Y.Y.; Qu, H.O.; Ma, M.L.; Xu, Z.H.; Xu, P.; Fang, Y.J.; Xu, T.W. *Eur. J. Med. Chem.* **2007**, 42, 1032-1038.
- ¹⁰³ Prieto, M.J.; Bacigalupe, D.; Pardini, O.; Amalvyc, J.I.; Venturini, C.; Morilla, M.J.; Romero, E.L. *Int. J. Pharm.* **2006**, 326, 160-168.
- ¹⁰⁴ Navath, R.S.; Menjoge, A.R.; Dai, H.; Romero, R.; Kannan, S.; Kannan, R.M. *Mol. Pharmaceutics* **2011**, 8, 1209-1223.

- ¹⁰⁵ Nguyen, P.M.; Zacharia, N.S.; Verploegen, E.; Hammond, P.T. *Chem. Mater.* **2007**, *19*, 5524-5530.
- ¹⁰⁶ Durairaj, C.; Kadam, R.S.; Chandler, J.W.; Hutcherson, S.L.; Kompella, U.B. *Investigative Ophthalmology and Visual Science* **2010**, *51*, 5804-5816.
- ¹⁰⁷ Strydom, S.J.; Rose, W.E.; Otto, D.P.; Liebenberg, W.; de Villiers, M.M. *Nanomed. Nanotech. Biol. Med.* **2013**, *9*, 85-93.
- ¹⁰⁸ Yuan, W.; Jiang, G.; Che, J.; Qi, X.; Xu, R.; Chang, M.W.; Chen, Y.; Lim, S.Y.; Dai, J.; Chan-Park, M.B. *J. Phys. Chem. C* **2008**, *112*, 18754-18759.
- ¹⁰⁹ Neelgund, G.M.; Oki, A. *J. Nanosci. Nanotechnol.* **2011**, *11*, 3621-3629.
- ¹¹⁰ Murugan, E.; Vimala, G. *J. Colloid Interface Sci.* **2011**, *357*, 354-365.
- ¹¹¹ Neelgunda, G.M.; Oki, A.; Luob, Z. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* **2012**, *100*, 215-221.
- ¹¹² Ghosh, S.; Ghosh, D.; Bag, P.K.; Bhattacharya, S.C.; Saha, A. *Nanoscale* **2011**, *3*, 1139-1148.
- ¹¹³ Giuliani, A.; Pirri, G.; Nicoletto, S.F. *Central European Journal of Biology* **2007**, *2*, 1-33.
- ¹¹⁴ Shai, Y. *Biochimica et Biophysica Acta* **1999**, *1462*, 55-70.
- ¹¹⁵ Brender, J.R.; McHenry, A.J.; Ramamoorthy, A. *Front. Immunol.* **2012**, *3*, 195-199.
- ¹¹⁶ Pini, A.; Giuliani, A.; Falciani, C.; Runci, Y.; Ricci, C.; Lelli, B.; Malossi, M.; Neri, P.; Rossolini, G.M.; Bracci, L. *Antimicrob. Agents Chemother.* **2005**, *49*, 2665-2672.
- ¹¹⁷ Bruschi, M.; Pirri, G.; Giuliani, A.; Nicoletto, S.F.; Baster, I.; Scorciapino, M.A.; Casu, M.; Rinaldi, A.C. *Peptides* **2010**, *31*, 1459-1467.
- ¹¹⁸ a) Liu, Z.; Young, A.W.; Hu, P.; Rice, A.J.; Zhou, C.; Zhang, Y.; Kallenbach, N.R. *ChemBioChem* **2007**, *8*, 2063-2065; b) Liu, Z.; Deshazer, H.; Rice, A.J.; Chen, K.; Zhou, C.; Kallenbach, N.R. *J. Med. Chem.* **2006**, *49*, 3436-3439; c) Young, A.W.; Liu, Z.; Zhou, C.; Totsingan, F.; Jiwrjka, N.; Shi, Z.; Kallenbach, N.R. *MedChemComm* **2011**, *2*, 308-314.
- ¹¹⁹ Hou, S.; Zhou, C.; Liu, Z.; Young, A.W.; Shi, Z.; Ren, D.; Kallenbach, N.R. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2009**, *19*, 5478-5481.
- ¹²⁰ Chen, X.; Zhang, M.; Zhou, C.; Kallenbach, N.R.; Ren, D. *Appl. Environ. Microbiol.* **2011**, *77*, 4878-4885.
- ¹²¹ Khrushchev, A.Y.; Kashparov, I.A.; Klimenko, L.V.; Mitin, Y.V. *Russ. J. Bioorg. Chem.* **2007**, *33*, 544-548.
- ¹²² Arnusch, C.J.; Branderhorst, H.M.; de Kruijff, B.; Liskamp, R.M.J.; Breukink, E.; Pieters, R.J. *Biochemistry* **2007**, *46*, 13437-13442.
- ¹²³ Pieters, R.J.; Arnusch, C.J.; Breukink, E. *Protein Pept Lett.* **2009**, *16*, 736-742.
- ¹²⁴ Nagahori, N.; Lee, R.T.; Nishimura, S.I.; Page, D.; Roy, R.; Lee, Y.C. *ChemBioChem.* **2002**, *3*, 836-844.
- ¹²⁵ Reymond, J.-L.; Darbre, T. *Org. Biomol. Chem.* **2012**, *10*, 1483-1492.
- ¹²⁶ a) Johansson, E.M.V.; Kolomiets, E.; Rosenau, F.; Jaeger, K.-E.; Darbrea, T.; Reymond, J.-L. *New J. Chem.* **2007**, *31*, 1291-1299; b) Kolomiets, E.; Johansson, E.M.V.; Renaudet, O.; Darbre, T.; Reymond, J.-L. *Org. Lett.* **2007**, *9*, 1465-1468.
- ¹²⁷ Johansson, E.M.V.; Crusz, S.A.; Kolomiets, E.; Buts, L.; Kadam, R.U.; Cacciarini, M.; Bartels, K.-M.; Diggle, S.P.; Camara, M.; Paul Williams, P.; Loris, R.; Cristina Nativi, C.; Rosenau, F.; Jaeger, K.-E.; Darbre, T.; Reymond, J.-L. *Chem. Biol.* **2008**, *15*, 1249-1257.

- ¹²⁸ Kolomiets, E.; Swiderska, M.A.; Kadam, R.U.; Johansson, E.M.V.; Jaeger, K.-E.; Darbre, T.; Reymond, J.-L. *ChemMedChem* **2009**, 4, 562-569.
- ¹²⁹ Johansson, E.M.V.; Kadam, R.U.; Rispoli, G.; Crusz, S.A.; Bartels, K.-M.; Diggle, S.P.; Camara, M.; Williams, P.; Jaeger, K.-E.; Darbre, T.; Reymond, J.-L. *Med. Chem. Commun.* **2011**, 2, 418-420.
- ¹³⁰ Kadam, R.U.; Bergmann, M.; Hurley, M.; Garg, D.; Cacciarini, M.; Swiderska, M.A.; Nativi, C.; Sattler, M.; Smyth, A.R.; Williams, P.; Camara, M.; Stocker, A.; Darbre, T.; Reymond, J.-L. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2011**, 50, 10631-10635.
- ¹³¹ Khoo, X.; O'Toole, G.A.; Nair, S.A.; Snyder, B.D.; Kenan, D.J.; Grinstaff, M.W. *Biomaterials* **2010**, 31, 9285-9292.
- ¹³² Khoo, X.; Hamilton, P.; O'Toole, G.A.; Snyder, B.D.; Kenan, D.J.; Grinstaff, M.W. *J. Am. Chem. Soc.* **2009**, 131, 10992-10997.
- ¹³³ a) Janiszewska, J.; Swieton, J.; Lipkowski, A.W.; Urbańczyk-Lipkowska, Z. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2003**, 13, 3711-3713; b) Janiszewska, J.; Urbańczyk-Lipkowska, Z. *J. Mol. Microbiol. Biotechnol.* **2007**, 13, 220-225; c) Janiszewska, J.; Urbańczyk-Lipkowska, Z. *Acta Biochimica Polonica* **2006**, 53, 77-82; d) Klajnert, B.; Janiszewska, J.; Urbańczyk-Lipkowska, Z.; Bryszewska, M.; Shcharbin, D.; Labieniec, M. *Int. J. Pharm.* **2006**, 309, 208-217.
- ¹³⁴ Polcyn, P.; Jurczak, M.; Rajnisz, A.; Solecka, J.; Urbańczyk-Lipkowska, Z. *Molecules* **2009**, 14, 3881-3905.
- ¹³⁵ a) Polcyn, P. *Praca doktorska* **2008**; b) Lipkowska, Z.; Polcyn, P. *Patent WO 2010/033043*, **2010**.
- ¹³⁶ Klajnert, B.; Janiszewska, J.; Urbańczyk-Lipkowska, Z.; Bryszewska, M.; Epan, R.M. *Int. J. Pharm.* **2006**, 327, 145-152.
- ¹³⁷ Janiszewska, J.; Sowińska, M.; Rajnisz, A.; Solecka, J.; Łącka, I.; Milewski, S.; Urbańczyk-Lipkowska, Z. *Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters* **2012**, 22, 1388-1393.
- ¹³⁸ a) Stach, M.; Maillard, N.; Kadam, R.U.; Kalbermatter, D.; Meury, M.; Page, M.G.P.; Fotiadis, D.; Darbre, T.; Reymond, J.-L. *Med. Chem. Commun.*, **2012**, 3, 86-89; b) Sommer, P.; Fluxa, V.S.; Darbre, T.; Reymond, J.-L. *ChemBioChem* **2009**, 10, 1527-1536.
- ¹³⁹ Pan, J.; Guo, L.; Ouyang, L.; Yin, D.; Zhao, Y. *Synlett* **2012**, 23, 1937-1940.
- ¹⁴⁰ World Health Organization (WHO); World Health Statistics **2012**.
- ¹⁴¹ a) Stark, M.; Liu, L.-P.; Deber, C.M. *Antimicrob. Agents Chemother.* **2002**, 46, 3585-3590; b) Glukhov, E.; Stark, M.; Burrows, L.L.; Deber, C.M. *J. Biol. Chem.* **2005**, 280, 33960-33967; c) Glukhov, E.; Burrows, L.L.; Deber, C.M. *Biopolymers* **2008**, 89, 360-371.
- ¹⁴² Papo, N.; Oren, Z.; Pag, U.; Sahl, H.-G.; Shai, Y. *J. Biol. Chem.* **2002**, 277, 33913-33921.
- ¹⁴³ Strom, M.B.; Haug, B.E.; Skar, M.L.; Stensen, W.; Stiberg, T.; Svendsen, J.S. *J. Med. Chem.* **2003**, 46, 1567-1570.
- ¹⁴⁴ a) Schmidtchen, A.; Pasupuleti, M.; Mörgelin, M.; Davoudi, M.; Alenfall, J.; Chalupka, A.; Malmsten, M. *J. Biol. Chem.* **2009**, 284, 17584-17594; b) Malmsten, M.; Kasetty, G.; Pasupuleti, M.; Alenfall, J.; Schmidtchen, A. *PLoS One* **2011**, 6, 6400-6413; c) Strömstedt, A.A.; Pasupuleti, M.; Schmidtchen, A.; Malmsten, M. *Biochimica et Biophysica Acta* **2009**, 1788, 1916-1923.

- ¹⁴⁵ a) Bernard, D.; Davis, M.D. *J. Exp. Med.* **1951**, 94, 243-254; b) Richards, R.M.E.; Xing, D.K.L. *Int. J. Pharm.* **1992**, 87, 195-201.
- ¹⁴⁶ a) Richards, R.M.E.; Taylor, R.B.; Zhu, Z.Y. *J. Pharm. Pharmacol.* **1996**, 48, 981-984; b) Richards, R.M.E.; Xing, D.K.L.; King, T.P. *J. Applied Biochemistry* **1995**, 78, 209-215.
- ¹⁴⁷ a) Richards, R.M.E.; Xing, D.K.L. *Int. J. Pharm.* **1992**, 82, 107-115; b) Richards, R.M.E.; Xing, D.K.L. *J. Pharm. Pharmacol.* **1993**, 45, 171-175.
- ¹⁴⁸ Kozubek, A.; Tyman, J.H.P. *Chem. Reviews* **1999**, 99, 1-26.
- ¹⁴⁹ a) Brouwer, A.J.; Mulders, S.J.E.; Liskamp, R.M.J. *Eur. J. Org. Chem.* **2001**, 10, 1903-1915; b) Khimich, G.N.; Tennikova, T.B. *Russian Journal of Applied Chemistry* **2005**, 78, 623-627.
- ¹⁵⁰ Brouwer, A.J.; Liskamp, R.M.J. *Eur. J. Org. Chem.* **2005**, 3, 487-495.
- ¹⁵¹ Yang, S.-T.; Shin, S.Y.; Lee, C.W.; Kim, Y.-C.; Hahm, K.-S.; Kim, J.I. *FEBS Lett.* **2003**, 540, 229-233.
- ¹⁵² Sun, T.; Li, Z.-L.; Tian, H.; Wang, S.-C.; Cai, J. *Molecules* **2009**, 14, 5339-5348.
- ¹⁵³ Haug, B.E.; Stensen, W.; Stiberg, T.; Svendsen, J.S. *J. Med. Chem.* **2004**, 47, 4159-4162.
- ¹⁵⁴ Abdel-Rahman, A.A.-H.; Abdel-Megied, A.E.-S.; Abdel-Bary, H.M.; Abdel-Alem, A.-A.H.; Morcy, E.M.I.; Shabaan, M.T. *Monatsh Chem.* **2009**, 140, 559-564.
- ¹⁵⁵ Rannard, S.P.; Davis, N.J. *Organic Lett.* **2000**, 2, 2117-2120.
- ¹⁵⁶ Umali, A.P.; Crampton, H.L.; Simanek, E.E. *J. Org. Chem.* **2007**, 72, 9866-9874.
- ¹⁵⁷ a) Hoskin, D.W.; Ramamoorthy, A. *Biochimica et Biophysica Acta* **2008**, 1778, 357-375; b) Smolarczyk, R.; Cichoń, T.; Szala, S. *Postępy Hig. Med. Dośw.* **2009**, 63, 360-368.
- ¹⁵⁸ a) *Europejski Komitet ds. Oznaczania Lekowrażliwości (EUCAST)* **2012**; b) *KnowledgeBase The Antimicrobial Index* <http://antibiotics.toku-e.com/>.
- ¹⁵⁹ Yang, S.-T.; Shin, S.Y.; Kim, Y.-C.; Kim, Y.; Hahm, K.-S.; Kim, J. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **2002**, 296, 1044-1050.
- ¹⁶⁰ Ruden, S.; Hilpert, K.; Berditsch, M.; Wadhvani, P.; Ulrich, A.S. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **2009**, 53, 3538-3540.
- ¹⁶¹ a) Akberova, S.I. *Izv. Akad. Nauk, Ser. Biol.* **2002**, 4, 477-481; b) Brooks, P.C.; Morais, D.; Rodriguez, D. *Patent No.: US 7,691,905 B2*, **2010**; c) Brooks, P.C.; Liebes, L.; Kramer, E.; Ng, B.; Morais, D. *Patent No.: US 7,705,049 B2*, **2010**.
- ¹⁶² a) Kluczyk, A.; Popek, T.; Kiyota, T.; de Macedo, P.; Stefanowicz, P.; Lazar, C.; Konishi, Y. *Curr. Med. Chem.* **2002**, 9, 1871-1892; b) Lazar, C.; Kluczyk, A.; Kiyota, T.; Konishi, Y. *J. Med. Chem.* **2004**, 47, 6973-6982.
- ¹⁶³ Armarego, W.L.F.; Perrin, D.D. *Purification of Laboratory Chemicals*, 4th ed.; Elsevier: Oxford, **2000**.
- ¹⁶⁴ Keller, O.; Keller, W.E.; van Look, G.; Wersin, G. *Organic Syntheses* **1990**, 7, 70-77.
- ¹⁶⁵ Zhou, Y.; Zhao M.; Wub Y.; Li C.; Wub J.; Zheng M.; Peng L.; Peng S. *Bioorg. Med. Chem.* **2010**, 18, 2165-2172.
- ¹⁶⁶ Wiejak, S.; Masiukiewicz, E.; Rzeszotarska, B. *Chem. Pharm. Bull.* **1999**, 47, 1489-1490.
- ¹⁶⁷ Brouwer, A.J.; Mulders, S.J.E.; Liskamp, R.M.J. *Eur. J. Org. Chem.* **2001**, 10, 1903-1915.
- ¹⁶⁸ Papadopoulos, A.; Shiao, T.C.; Roy, R. *Mol. Pharmaceutics* **2012**, 9, 394-403.
- ¹⁶⁹ Brouwer, A.J.; Liskamp, R.M.J. *Eur. J. Org. Chem.* **2005**, 3, 487-495.

¹⁷⁰ Mu, F.; Coffing, S.L.; Riese II, D.J.; Geahlen, R.L.; Verdier-Pinard, P.; Hamel, E.; Johnson, J.; Cushman, M. *J. Med. Chem.* **2001**, *44*, 441-452.

B. 019. 350/13



8. ZAŁĄCZNIKI (PŁYTA CD)

8.1. NUMERACJA ZWIĄZKÓW

8.2. WIDMA MS

