



Uniwersytet Łódzki
Wydział Chemii
Katedra Chemii Fizycznej
Zakład Chemii Biofizycznej

Małgorzata Malinowska

**Badania oddziaływań dendrymeru PPI G4 z wybranymi
lekami i aminokwasami w środowisku wodnym**

Praca doktorska wykonana pod kierunkiem
prof. dr. hab. Bartłomieja Palecza
dr. Adama Buczkowskiego

Łódź 2023

Promotorowi niniejszej pracy
Panu prof. dr. hab. Bartłomiejowi Pałeczowi
dziękuję serdecznie za wsparcie, wybór tematyki badawczej,
pomoc merytoryczną oraz wyrozumiałość.
Wyrazy wdzięczności za opiekę naukową,
które przyczyniły się do powstania mojej pracy dyplomowej.

Promotorowi pomocniczemu
dr. Adamowi Buczkowskiemu
dziękuję za nieocenioną pomoc podczas pracy eksperymentalnej.
Dziękuję za cenne dyskusje i wskazówki,
życzliwość i poświęcony mi czas.

Panu dr. Pawłowi Urbaniakowi dziękuję za pomoc i opiekę merytoryczną podczas
wykonywania pomiarów spektroskopowych ^1H NMR.

Wszystkim Pracownikom Katedry Chemii Fizycznej
dziękuję za miłą atmosferę oraz pouczające dyskusje.

W szczególności dziękuję moim Rodzicom i Siostrom
za wsparcie, obecność i bezwarunkową miłość.

Spis treści

1. Wstęp	6
2. Część teoretyczna	8
2.1. Struktura ciekłej wody	8
2.2. Dendrymery	14
2.2.1. Ogólna charakterystyka dendrymerów	14
2.2.2. Budowa, synteza i właściwości fizykochemiczne dendrymerów PPI	18
2.2.3 Dendrymery jako nośniki molekularne	36
2.2.4. Oddziaływanie dendrymerów PPI z antybiotykami	37
2.2.5. Oddziaływanie dendrymerów z lekami onkologicznymi	38
2.3. Właściwości biologiczne dendrymerów PPI	46
2.3.1. Oddziaływanie dendrymerów PPI z błonami fosfolipidowymi	46
2.3.2. Toksyczność dendrymerów PPI i ich pochodnych	47
2.3.3. Dendrymery jako niewirusowe nośniki materiału genetycznego	54
2.3.4. Wybrane przykłady zastosowań dendrymerów PPI w przemyśle	56
2.4. Badane substancje	57
2.4.1. 5-Fluorouracyl	57
2.4.2. 5-Jodouracyl	58
2.4.3. Tegafur	60
2.4.4. Azydotymidyna	61
2.4.5. Monofosforan fludarabiny	62
2.4.6. L- α -Tyrozyna	64
2.4.7. L- α -Tryptofan	65
3. Część eksperymentalna	67
3.1. Źródło pochodzenia badanych substancji	67
3.2. Przygotowanie substancji do badań	67
3.3. Spektroskopia UV-VIS	68
3.4. Badania rozpuszczalności	68
3.5. Metoda separacyjna	70
3.5.1 Ogólna charakterystyka techniki dializy równowagowej	70
3.5.2. Wyznaczanie stechiometrii i stałej wiązania kompleksu receptor – ligand techniką dializy	73
3.6. Kalorymetria izotermiczna	76
3.6.1. Kalorymetr izotermiczny	76
3.6.2. Analiza efektów	78
3.6.3. Model jednego rodzaju miejsc aktywnych	80

3.6.4. Entalpia swobodna i entropia tworzenia kompleksu ligand- miejsce aktywne makromolekuly	82
3.7. Spektroskopia ^1H NMR.....	83
3.8. Zeta potencjal	84
4. Wyniki pomiarów i ich interpretacja	86
4.1. Pomiary pH-metryczne wodnych roztworów dendrymeru PPI G4.....	86
4.2. Pomiary rozpuszczalności	86
4.2.1. Badania oddziaływań dendrymeru PPI G4 z 5-fluorouracylem	86
4.2.2. Badania rozpuszczalności 5-jodouraculu.....	88
4.2.3. Badania rozpuszczalności tegafuru	90
4.2.4. Badania rozpuszczalności azydotymidyny.....	92
4.2.5. Badania rozpuszczalności monofosforanu fludarabiny.....	94
4.2.6. Badania rozpuszczalności L- α -tyrozyny	96
4.2.7. Badania rozpuszczalności L- α -tryptofanu	98
4.3. Dializa równowagowa	100
4.3.1. Wyniki badań techniką dializy równowagowej wodnych mieszanin dendrymeru PPI G4 i 5-fluorouracylu.....	101
4.3.2. Wyniki badań techniką dializy równowagowej wodnych mieszanin dendrymeru PPI G4 i 5-jodouracylu.....	105
4.3.3. Wyniki badań techniką dializy równowagowej wodnych mieszanin dendrymeru PPI G4 i tegafuru	108
4.3.4. Wyniki badań techniką dializy równowagowej wodnych mieszanin dendrymeru PPI G4 i azydotymidyny	111
4.3.5. Wyniki badań techniką dializy równowagowej wodnych mieszanin dendrymeru PPI G4 i monofosforanu fludarabiny	114
4.3.6. Wyniki badań techniką dializy równowagowej wodnych mieszanin dendrymeru PPI G4 i L- α -tryptofanu.....	117
4.4. Miareczkowanie kalorymetryczne w warunkach izotermicznych (ITC).....	121
4.4.1. Wyniki pomiarów kalorymetrycznych ITC dendrymeru PPI G4 z 5-fluorouracylem	121
4.4.2. Wyniki pomiarów kalorymetrycznych ITC dendrymeru PPI G4 z 5-jodouracylem	123
4.4.3. Wyniki pomiarów kalorymetrycznych ITC dendrymeru PPI G4 z tegafurem	125
4.4.4. Wyniki pomiarów kalorymetrycznych ITC dendrymeru PPI G4 z azydotymidyną	127
4.4.5. Wyniki pomiarów kalorymetrycznych ITC dendrymeru PPI G4 z monofosforanem fludarabiny	129
4.4.6. Wyniki pomiarów kalorymetrycznych ITC dendrymeru PPI G4 z L- α -tryptofanem	131
4.5. Spektroskopia ^1H NMR.....	133
4.5.1. Badania techniką ^1H NMR oddziaływań 5-fluorouracylu z dendrymerem PPI G4	134

4.5.2. Badania techniką ^1H NMR oddziaływań 5-jodouracylu z dendrymerem PPI G4	136
4.5.3. Badania techniką ^1H NMR oddziaływań tegafuru z dendrymerem PPI G4	138
4.5.4. Badania techniką ^1H NMR oddziaływań azydotymidyny z dendrymerem PPI G4 ...	141
4.5.5. Badania techniką ^1H NMR oddziaływań monofosforanu fludarabiny z dendrymerem PPI G4	143
4.5.6. Badania techniką ^1H NMR oddziaływań L- α -tyrozyny z dendrymerem PPI G4	145
4.5.7. Badania techniką ^1H NMR oddziaływań L- α -tryptofanu z dendrymerem PPI G4 ...	146
4.6. Pomiary Zeta potencjału mieszanin dendrymeru PPI G4 i 5-fluorouracylu (5-FU) ..	148
5. Podsumowanie.....	150
6. Streszczenie	161
7. Abstrakt	164
8. Abstract	165
9. Bibliografia.....	167
10. Załączniki.....	179

1. Wstęp

Jednym z głównych zadań współczesnej terapii przeciwnowotworowej jest dobór odpowiednich nanocząstek jako nośników związków terapeutycznych. Związki te powinny wpływać zarówno na wzrost rozpuszczalności leków, jak również powodować wzrost biodostępności oraz gromadzenia się ich w bezpośrednim sąsiedztwie guzów nowotworowych. Ponadto zainkludowane związki terapeutyczne powinny być dostarczane w określonych dawkach i uwalniane w sposób sukcesywny, zwiększając skuteczność stosowanej terapii. Nanoprzenośniki modyfikowane specyficznymi grupami funkcyjnymi czy przeciwciałami mogą służyć również do terapii celowej.

Rolę takich nanokontenerów molekularnych transportujących farmaceutyki mogą pełnić dendrymery PPI czy PAMAM, związki o charakterystycznej, symetrycznie rozgałęzionej budowie. W centrum makrocząsteczki typowego dendrymeru znajduje się wielofunkcyjny rdzeń, od którego odchodzą gałęzie (dendrony) zbudowane z warstw merów kolejnych generacji. Dendrymery zbudowane z grup propylenoiminowych nazywane są dendrymerami polipropylenoiminowymi (PPI). Przedstawicielem tej grupy związków jest wybrany do badań dendrymer PPI zbudowany z czterech warstw merów, czyli dendrymer PPI generacji czwartej (G4). W literaturze można znaleźć doniesienia opisujące dendrymery PPI, w tym PPI G4 jako nośniki antybiotyków, leków przeciwnowotworowych, witamin oraz jako niewirusowe nośniki materiału genetycznego. Jednak w literaturze brak jest niektórych danych termodynamicznych opisujących proces tworzenia oraz trwałość kompleksów supramolekularnych dendrymerów z cząsteczkami leków. Charakterystyczna budowa makrocząsteczki dendrymeru PPI G4 pozwala na przyłączenie wielu cząsteczek liganda zarówno przez jego powierzchniowe grupy aminowe jak i wewnętrzne warstwy. Skompleksowany z dendrymerem lek może być wówczas powoli i selektywnie uwalniany w organizmie, co wydłuża działanie jednorazowo podanej dawki.

Wybrane do badań leki: 5-fluorouracyl, 5-jodouracyl, tegafur oraz monofosoran fludarabiny wykazują silne działanie przeciwnowotworowe, podczas gdy azydetymidyna jest wykorzystywana pomocniczo w leczeniu onkologicznym. Leki te powodują jednak często wiele działań niepożądanych, które utrudniają ich wykorzystywanie w terapii przeciwnowotworowej. Przyłączenie cząsteczek leków przeciwnowotworowych do makrocząsteczki dendrymeru PPI G4 daje nadzieję na zmniejszenie ich toksyczności własnej oraz poprawę działania terapeutycznego. Dendrymery wprowadzone do organizmu mogą oddziaływać z wieloma związkami znajdującymi się w płynach ustrojowych, między innymi

z naturalnymi aminokwasami, w tym L- α -tyroziną oraz L- α -tryptofanem. Badania oddziaływań dendrymeru PPI G4 z naturalnymi L- α -aminokwasami pozwalają wnioskować dodatkowo o konkurencyjnym względem wiązania leków wiązaniu cząsteczek aminokwasów przez makrocząsteczki PPI w organizmie.

Celem badań była zatem analiza termodynamiczna oddziaływań dendrymeru PPI G4 z wybranymi ligandami o znaczeniu biochemicznym:

- lekami onkologicznymi: 5-fluorouracylem, 5-jodouracylem, tegafurem, monofosoranem fludarabiny oraz azydotymidyną stosowaną pomocniczo w leczeniu przeciwnowotworowym
- naturalnymi aminokwasami: L- α -tyroziną oraz L- α -tryptofanem

w środowisku wodnym.

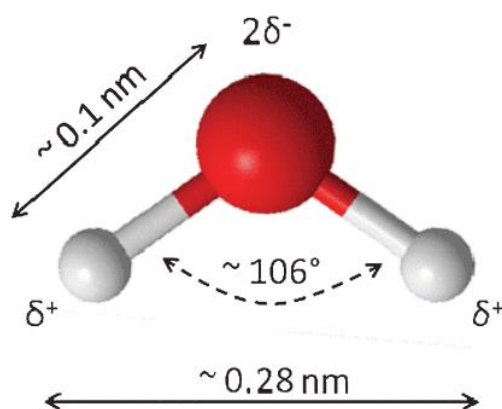
Wybrane do badań ligandy absorbują promieniowanie UV i mogą być oznaczane spektrofotometrycznie. Do badań oddziaływań dendrymeru PPI G4 z wybranymi ligandami wykorzystano:

- pomiary wzrostu rozpuszczalności badanych ligandów w wodzie w obecności dendrymeru PPI G4;
- dializę równowagową, w celu wyznaczenia liczby aktywnych miejsc w makrocząsteczce dendrymeru PPI G4 wiążących cząsteczki liganda, jak również stałe wiązania ligand-miejsca aktywne makrocząsteczki receptora;
- izotermiczne miareczkowania kalorymetryczne ITC, które pozwoliły wyznaczyć liczbę miejsc aktywnych w makrocząsteczce dendrymeru PPI G4 o powinowactwie do cząsteczek liganda oraz standardowe funkcje termodynamiczne: entalpię ΔH , entropię ΔS oraz entalpię swobodą ΔG wiązania badanych ligandów z makrocząsteczką receptora, charakteryzujące tworzone kompleksy dendrymeru PPI G4 z badanymi ligandami;
- miareczkowanie ^1H NMR dendrymeru PPI G4 z wybranymi ligandami, co umożliwiło określenie grup funkcyjnych makrocząsteczki PPI G4 tworzących wiązania receptor – ligand.

2. Część teoretyczna

2.1. Struktura ciekłej wody

Woda w warunkach standardowych występuje w ciekłym stanie skupienia [1, 2]. W centrum tetraedrycznej cząsteczki wody znajduje się atom tlenu, połączony wiązaniami kowalencyjnymi z dwoma atomami wodoru. Atomy tlenu i wodoru oddalone są od siebie o około 0,1 nm, natomiast kąt H-O-H wynosi w przybliżeniu 106° (Rys. 1) [3, 4].

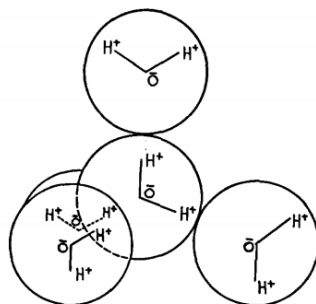


Rys. 1. Struktura cząsteczki wody.

Polarny charakter cząsteczki wody ($\mu=1,84 \text{ D}$) wynika z różnicy elektrojemności pomiędzy częściowo ujemnie naładowanym atomem tlenu oraz dwoma częściowo dodatnimi atomami wodoru. Cząsteczki wody mogą oddziaływać między sobą poprzez wiązania wodorowe, których energia wynosi około 23 kJ/mol . Woda w ciekłym stanie skupienia w zależności od temperatury zmienia swoje właściwości fizyczne. Po stopnieniu lodu gęstość wody wzrasta wraz ze wzrostem temperatury do 4°C , w której osiąga maksymalną gęstość [5]. Cząsteczki wody posiadają zdolność do tworzenia dużych aglomeratów, przez co woda wykazuje wysoką temperaturę wrzenia i topnienia [6, 7, 8].

Pierwsze publikacje opisujące przypuszczalną strukturę wody pojawiły się już w drugiej połowie XIX wieku. W 1884 roku Whiting zaproponował tzw. klastrowy model ciekłej wody, w którym zakładał, że woda jest mieszaniną lodopodobnych klasterów o niskiej i wysokiej gęstości [9]. Zgodnie z „mieszanym modelem” ciekłej wody zaproponowanym przez Röntgen’a [10] ciecz ta składa się z dwóch lokalnie mniej i bardziej gęstych struktur. Według przedstawionego modelu istnieje równowaga pomiędzy małymi kryształkami lodu zawieszonymi w cieczy z niezwiązanymi pojedynczymi cząsteczkami wody. W 1933 roku

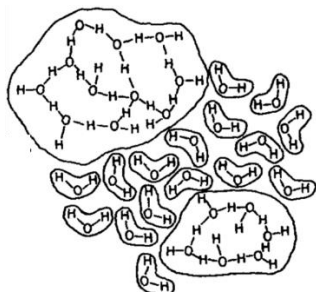
Bernal i Fowler zaproponowali model przypominający strukturę lodu, w którym jedna cząsteczka wody otoczona jest przez 4 inne cząsteczki, ułożone tetraedrycznie [11].



Rys. 2. Struktura wody zaproponowana przez Bernal'a oraz Fowler'a [11].

W 1951 roku Pople zaproponował, tzw. model „zniekształconego wiązania”, w którym zakłada się, że ciekła woda to ciągła sieć cząsteczek połączonych wiązaniami wodorowymi. Podczas przejścia fazowego z wody w stanie stałym do fazy ciekłej wiązania wodorowe nie ulegają rozerwaniu, ale zniekształceniu spowodowanym wzrostem ich elastyczności [12].

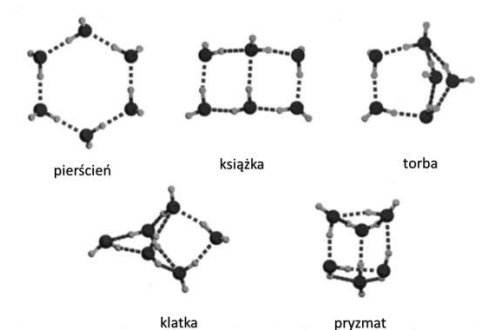
Frank i Wen [13] w 1957 roku opisali model „zmiennych grup cząsteczek”, w którym klastry wody, o różnych kształtach i rozmiarach są w równowadze z wolnymi „niezwiązanymi” cząsteczkami wody. Stwierdzili również, że tworzenie i zrywanie wiązań wodorowych między cząsteczkami wody odbywa się w sposób kooperatywny.



Rys. 3. Schemat modelu struktury ciekłej wody zaproponowany przez Frank'a i Wen'a [14].

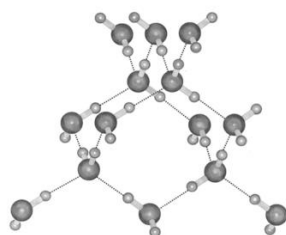
Pauling [15] w 1959 zaproponował model, który złożony był z dwóch rodzajów struktur przestrzennych tzw. klatratów, o różnych gęstościach, tworzonych przez: klatki nieobsadzone o niższej gęstości oraz z klatek o wyższej gęstości obsadzonych przez cząsteczki wody. Zdaniem autora wnętrza klatratu jest dwunastościenna, a w jej narożach może znajdować się 20 cząsteczek wody. Klatraty mogą tworzyć między sobą wiązania wodorowe oraz łączyć się przez wspólne ściany boczne. W „losowym” modelu sieci wody zaproponowanym w 1975 przez Boutron'a i Alben'a [16] wyróżnić można klastry zbudowane z 4-, 5-, 6-, 7- i 8-członowych pierścieni.

Rozwój chemii teoretycznej oraz technik obliczeniowych umożliwił symulowanie struktur składających się z coraz większej liczby cząsteczek wody. Opracowane modele struktury wody na przełomie XIX oraz XX wieku miały charakter koncepcyjny. W 1998 roku Kim wraz z zespołem [17] przeprowadzili badania pięciu struktur heksamerów wody (struktura: pierścienia, książki, torby, klatki oraz pryzmatu) (Rys. 4) z wykorzystaniem obliczeń *ab initio*.



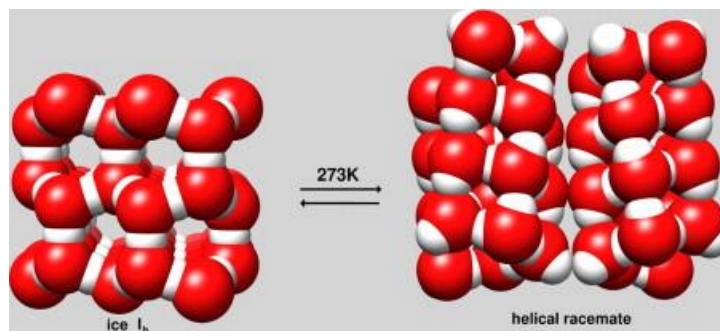
Rys. 4. Pięć najniższych energetycznie struktur heksameru wody [17].

Przedstawione wyniki badań pokazują niemal izoenergetyczny charakter przedstawionych heksamerów wody. Świadczy to o silnym wpływie środowiska chemicznego oraz fizycznego na strukturę wody. Według Chaplina [18] fluktuująca sieć ciekłej wody związana jest ze strukturą jednostek tworzących klastry, które zbudowane są z 280 jednostek połączonych wiązaniami wodorowymi. Każda jednostka zbudowana jest z 14 cząsteczek wody (Rys. 5), które mogą zmieniać swe pozycje (centra) w trzech wymiarach i wzajemnie przekształcać się w formy o odpowiednio niższej i wyższej gęstości.



Rys. 5. Układ 14 cząsteczek wody tworzących klastry [18].

W 2015 roku Marek Lozynski [19] zaproponował helikalną strukturę wody. Model ten zakłada, że tetragonalna sieć krystaliczna cząsteczek wody może ulec przekształcaniu do spiralnej formy w wyniku podwyższenia temperatury (Rys. 6).



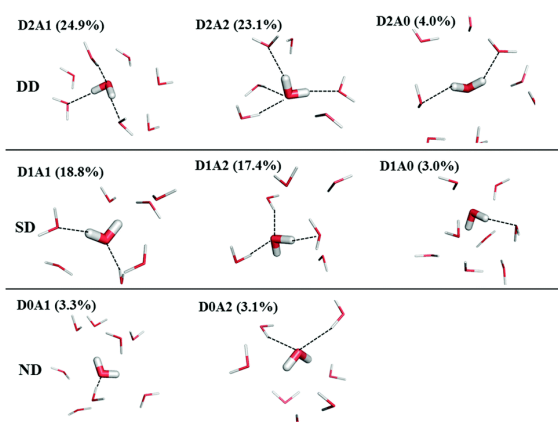
Rys. 6. Struktura wody opisana przez Lozynskiego [19].

W 2017 roku Liu, He i Zhang [20] opisali strukturę niewielkich klasterów ciekłej wody. Do badań wykorzystano obliczenia metodą dynamiki molekularnej. Cząsteczki wody zostały podzielone na grupy w zależności od ilości wiązań wodorowych, w których cząsteczka wody uczestniczy jako donor D_n lub akceptor A_m protonu względem sąsiadującej cząsteczki. Połączone cząsteczki wody oznaczano jako podjednostki D_nA_m , gdzie:

n - ilość wiązań wodorowych tworzonych przez rozpatrywaną cząsteczkę jako donora protonu,

m - ilość wiązań wodorowych tworzonych przez rozpatrywaną cząsteczkę jako akceptora protonu.

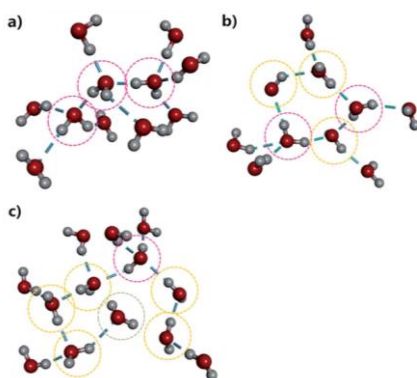
Przedstawione wyniki wskazują, że cząsteczki wody najchętniej tworzą dwa wiązania donorowe i jedno akceptorowe D_2A_1 oraz dwa donorowe i dwa akceptorowe D_2A_2 , których udział procentowy wynosi odpowiednio 24,9% oraz 23,1%. W mieszaninie mogą występować również struktury typu D_1A_1 o procentowej zawartości 18,8 % oraz D_1A_2 (17,4 %) Dodatkowo w mieszaninie można wyróżnić inne podjednostki D_nA_m , których udział procentowy w mieszaninie jest mniejszy od 4%.



Rys.7. Struktura wiązań wodorowych i ich wkład procentowy w całość mieszaniny [20].

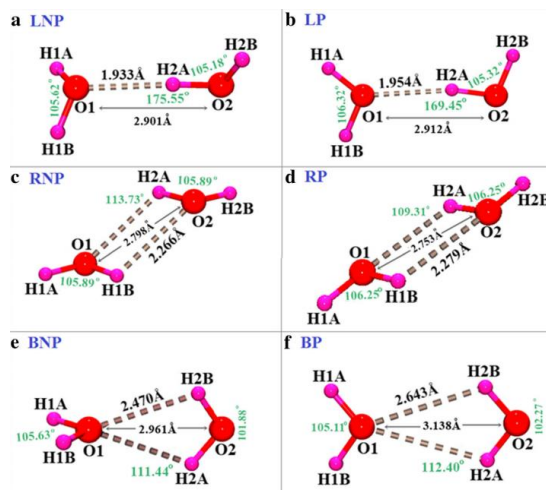
W 2018 roku Liu wraz z zespołem [21] wykorzystując metodę symulacji komputerowych opisali rodzaje wiązań wodorowych występujących pomiędzy cząsteczkami wody. W pracy zaprezentowano trzy rodzaje struktur wody, w których cząsteczki połączone są różnymi rodzajami wiązań (Rys. 8):

1. Struktura, w której występują dwa wiązania akceptorowe oraz dwa wiązania donorowe (struktura czworościenna).
2. Struktura, w której występuje pojedyncze donorowe wiązanie wodorowe (SD) oraz podwójne donorowe wiązanie wodorowe (DD) (struktura pierścienia).
3. Struktura, w której centralna cząsteczka wody nie przekazuje wiązania wodorowego (ND) (struktura otwartego pierścienia).



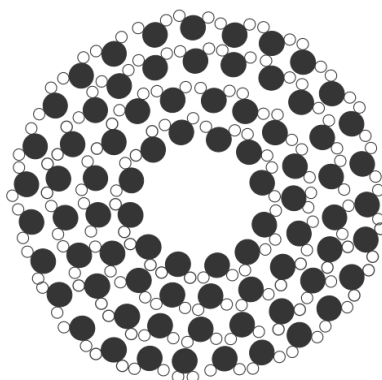
Rys. 8. Struktury cząsteczek wody przedstawione przez Liu a) struktura czworościenna b) struktura pierścienia c) struktura otwartego pierścienia. Kolorem różowym, żółtym oraz szarym zaznaczono odpowiednio konfigurację wiązań wodorowych (DD), (SD) oraz (ND) [21].

W 2020 roku Ghosh oraz współpracownicy [22] wykorzystując teorie funkcjonału gęstości DFT zbadali energetyczną oraz elektronową strukturę wybranych dimerów wody. Celem badań było wyznaczenie energii oraz wyjaśnienie ich wpływu na dynamikę sieci wiązań wodorowych cząsteczek wody. Do badań wybrano 6 izomerów (Rys. 9), które zostały podzielone na dwie grupy - planarną i nieplanarną. W grupach tych wyróżniono 3 topologie dimerów: liniową, pierścieniową oraz rozwidloną. W dimerach grupy planarnej wszystkie atomy (dwa atomy tlenu oraz cztery atomu wodoru) leżą w tej samej płaszczyźnie.



Rys. 9. Struktury wybranych sześciu izomerów: a- liniowy nieplanarny, b- liniowy planarny, c- pierścieniowy nieplanarny, d- pierścieniowy planarny, e- rozwidlony nieplanarny, f- rozwidlony planarny [22]

Wyniki badań pokazują, że nieplanarny liniowy (LNP) dimer wody wykazuje najniższą energię, która jest nieznacznie niższa od energii pozostałych 5 dimerów. Wskazuje to na duży wpływ wahań temperatury oraz zmian środowiska na reorganizację cząsteczek wody w dimerze. Wzajemna konwersja różnych izomerów dimeru wody pomiędzy sobą wyjaśnia dynamiczną naturę sieci wiązań wodorowych. W 2020 roku Shu z współpracownikami [23] przedstawił strukturę klastrów wody w oparciu o zdjęcia mikroskopowe. W zaproponowanym modelu klastr ciekłej wody składa się z około 10^{16} cząsteczek ciekłej wody, w których atomy wodoru skierowane są na zewnątrz klastra, natomiast atomy tlenu do wewnątrz, a wszystkie atomy wykazują dynamiczny charakter.



Rys. 10. Schemat klastra wody przedstawionego przez Shu [23]

Gao i współpracownicy [24] w 2021 roku opisali strukturę klastrów wody wykorzystując hierarchiczną metodę grupowania. W pracy opisano wiązania wodorowe, struktury pierścieniowe oraz tzw. fragmenty odpowiednio jako struktury pierwszego, drugiego oraz

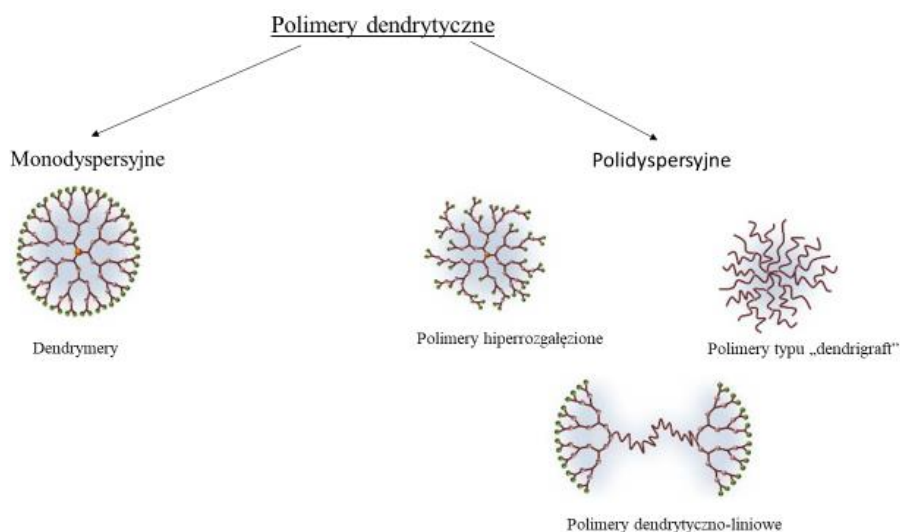
trzeciego poziomu. 25% klastrów piątego poziomu zbudowanych jest nie więcej niż z 20 cząsteczek wody, natomiast maksymalny klaster tej klasy, w niskich temperaturach zawiera 100 cząsteczek wody. Wykazano również, że 60% wszystkich klastrów pozostaje niezmiennych, a około 10-15% jest łączona w inne klastry lub dzielona na części. W strukturze wody częściej występują klastry o małych rozmiarach. Wewnątrz warstwa klastra składa się z 6-członowych pierścieni, natomiast pierścienie cztero- oraz pięcioczłonowe znajdują się w warstwie zewnętrznej, z większym uprzywilejowaniem tych drugich. W trakcie podwyższania temperatury zarówno powierzchnia oraz wnętrze klastra zajmują pierścienie 4-, 5-członowe.

Mimo wielu prac teoretycznych opisujących strukturę ciekłej wody, tematyka ta nieustannie wzbudza zainteresowanie naukowców. Ciągłe badania świadczą o unikalnych właściwościach ciekłej wody, która do tej pory, pomimo zastosowań coraz bardziej wyrafinowanych technik obliczeniowych nie jest w pełni wyjaśniona.

2.2. Dendrymery

2.2.1. Ogólna charakterystyka dendrymerów

Polimery dendrytyczne to grupa makrocząsteczek, które w swojej strukturze posiadają centralny rdzeń, od którego odchodzą liczne rozgałęzienia. Tę klasę polimerów można podzielić na polimery monodispersyjne, do których należą dendrymery oraz polimery polidispersyjne: polimery hiperrozgałęzione, dendrytyczno-liniowe oraz polimery typu „dendrigraft” (Rys. 11) [25].

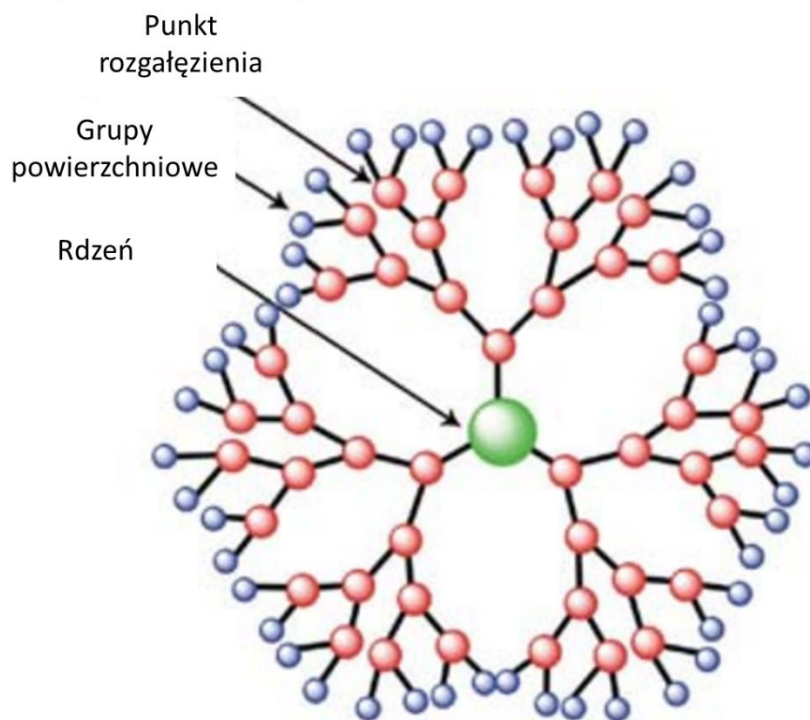


Rys. 11. Główne klasy polimerów dendrytycznych.

Dendrymery są makrocząsteczkami o trójwymiarowej, dobrze zdefiniowanej budowie. Dendrymery swoją wewnętrzną strukturą przypominają drzewo, stąd ich nazwa od greckiego *dendron*- drzewo oraz *meros*-część. Ze względu na specyficzną budowę, tj. wysoką monodispersyjność, zwarty i regularny kształt, wyróżniają się spośród innych makrocząsteczek dendrytycznych (hiperrozgałęzionych polimerów) oraz polimerów liniowych [26, 27].

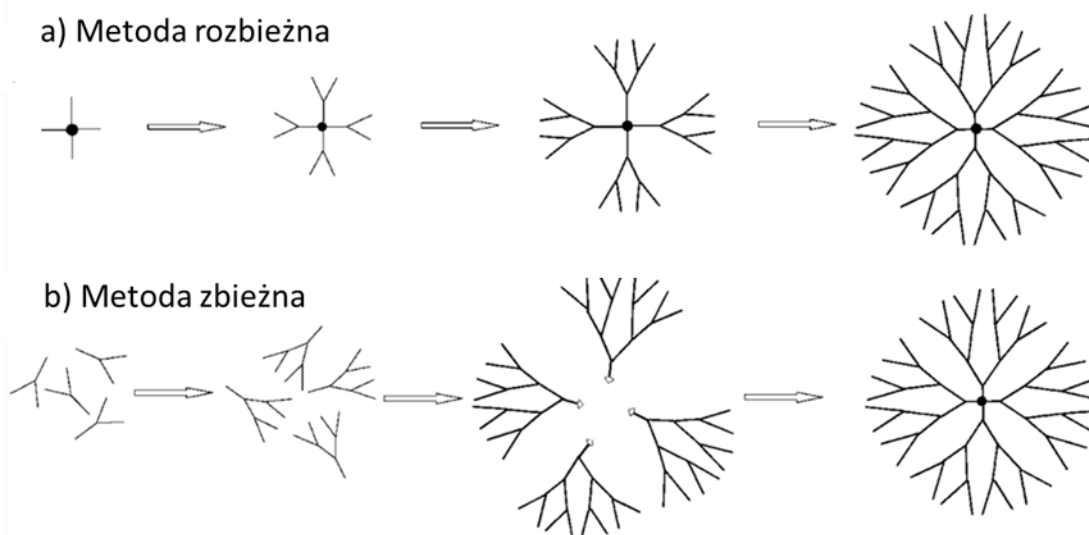
Pierwsze publikacje o rozgałęzionych polimerach pojawiły się w drugiej połowie XX wieku. W 1974 r. Fritz Voglt wraz ze współpracownikami [28] opisał rozgałęzione cząsteczki, które swoją budową przypominały ośmiornice (ang. *octopus molecules*). W 1978 roku ten sam zespół badawczy [29] opisał syntezę związków kaskadowych. W 1985 roku Newkome i współpracownicy opisali syntezę rozgałęzionych cząsteczek nazywając je „arborolami” od łacińskiego słowa *arbor*, oznaczającego drzewo [30]. Dendrymery określano również jako polimery „wybuchającej gwiazdy” oraz polimery XXI wieku [31]. Pierwszy raz nazwy „dendrymer” użył Donald Tamalia [32] w 1985 roku. Użycie tej nazwy zostało upowszechnione i zastąpiło wcześniejsze określenia regularnie rozgałęzionych cząsteczek.

Makrocząsteczka typowego dendrymeru ma kształt zbliżony do kulistego, w którego centrum znajduje się wielofunkcyjny rdzeń. Od rdzenia odchodzą gałęzie (dendrony) zbudowane z warstw merów. Liczba tych warstw określa generację dendrymeru. Dendrymery zakończone są grupami końcowymi (terminalnymi), które stanowią powłokę makrocząsteczki.



Rys. 12. Ogólna budowa dendrymeru [33].

Przyłączenie kolejnych warstw monomerów powoduje wzrost liczby generacji, tym samym zwiększenie średnicy makrocząsteczki i ilości grup terminalnych [34, 35]. Podstawowymi technikami otrzymywania dendrymerów jest synteza zbieżna i rozbieżna [36, 37] (Rys. 13).

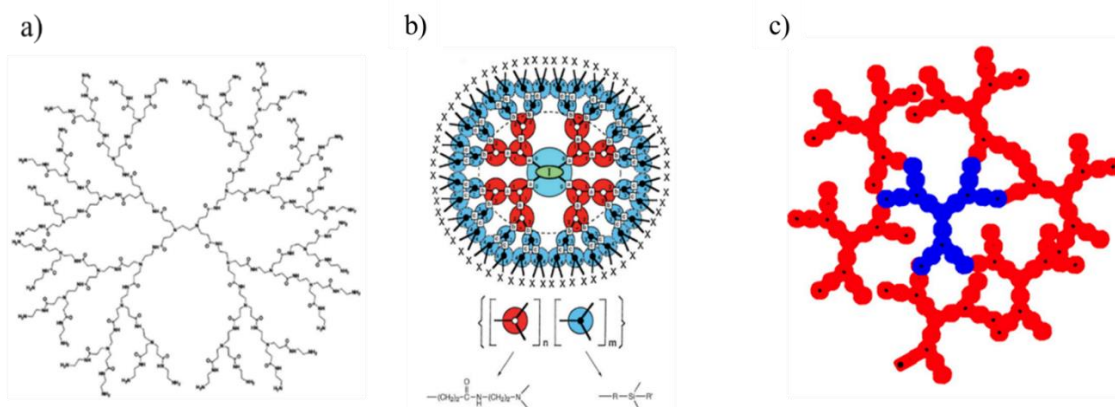


Rys. 13. Metody syntezy dendrymerów: a) rozbieżna b) zbieżna [38].

W metodzie rozbieżnej [39, 40] zwanej inaczej podejściem od wewnątrz (ang. *inside-out*) wzrost makrocząsteczki dendrymeru jest inicjowany z wielofunkcyjnego rdzenia, B_n , gdzie n to ilość grup funkcyjnych w cząsteczce rdzeniowej ($n \geq 2$). Do syntezy stosowany jest monomer typu AB_n ($n \geq 2$), gdzie A jest grupą aktywną, natomiast B jest grupą dezaktywowaną, która umożliwia kontrolowany wzrost cząsteczki. Aktywne grupy funkcyjne B rdzenia reagują z nadmiarem grup funkcyjnych monomeru AB_n tworząc pierwszą warstwę dendronów. W celu kontynuacji wzrostu grupy funkcyjne B pierwszej warstwy są aktywowane (odbezpieczane) w wyniku czego powstaje reaktywny dendrymer pierwszej generacji. Do cząsteczki można dołączyć kolejną warstwę monomerów, co spowoduje powstanie dendrymeru następnej generacji. Powtarzanie opisanych etapów wzrostu i aktywacji pozwala otrzymywać makrocząsteczki dendrymerów kolejnych generacji o coraz wyższym stopniu rozgałęzienia ramion. Zaletą tej metody jest szybkość polimeryzacji oraz możliwość wprowadzania zmian w grupach powierzchniowych. Istnieją jednak ograniczenia związane z reakcjami ubocznymi oraz niecałkowitym stopniem przereagowania grup końcowych, które prowadzą do defektów strukturalnych makrocząsteczki dendrymeru. Inną wadą metody rozbieżnej syntezy dendrymerów jest obniżenie wydajności syntezy wyższych generacji ze względu na ograniczenie reaktywności terminalnych grup funkcyjnych.

Metoda zbieżna, zwana syntezą zewnętrzną (ang. *outside-in*) [39, 40] została wprowadzona w celu przezwyciężenia wad, które występowały w metodzie rozbieżnej. W pierwszym etapie syntezy metodą zbieżną produkowane są bardzo czyste dendrony, które następnie przyłączane są do wielofunkcyjnego rdzenia. W metodzie tej można uniknąć defektów strukturalnych podczas syntezy. Możliwa jest również synteza dendrymerów zbudowanych z różnego rodzaju monomerów [41]. Podobna jak podczas syntezy rozbieżnej, także podczas syntezy zbieżnej istnieje trudność w syntezie dendrymerów wyższych generacji związana ze wzrostem zawady sterycznej dendronów wyższych generacji podczas ich wiązania z cząsteczką rdzeniową.

W literaturze [42-47] opisanych jest wiele rodzajów dendrymerów, między innymi dendrymery typu PAMAM (Rys. 14a), typu PAMAMOS (Rys. 14b) oraz dendrymery typu Tecto (Rys. 14c).

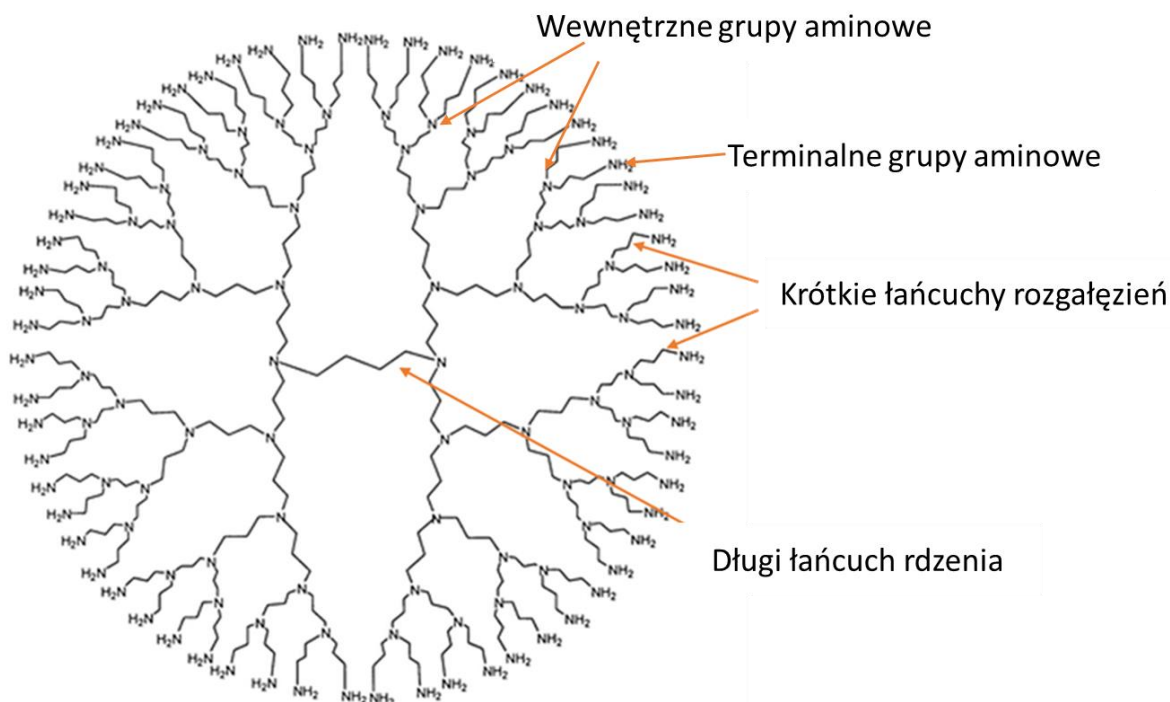


Rys. 14. Struktury dendrymerów typu a) PAMAM, b) PAMAMOS c) Tecto.

Szczególnie interesującym rodzajem dendrymerów są dendrymery polipropylenoiminowe (PPI), które są przedstawione w następnym podrozdziale.

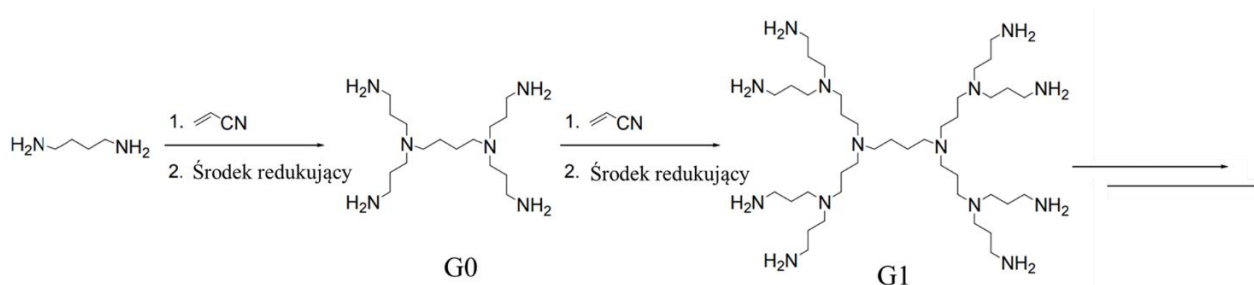
2.2.2. Budowa, synteza i właściwości fizykochemiczne dendrymerów PPI

Jednymi z najczęściej wykorzystywanych dendrymerów są dendrymery polipropylenoiminowe (PPI) [34, 48]. Dendrymery te w porównaniu z PAMAM są prostsze w syntezie i odporniejsze na działanie podwyższonej temperatury [49, 50]. W ich regularnie rozgałęzionej strukturze występują grupy aminowe połączone łańcuchami propylenowymi (PPI). Struktura dendrymeru PPI generacji czwartej została przedstawiona na rysunku 15.



Rys. 15. Dendrymer PPI G4 z zaznaczonym długim łańcuchem rdzenia oraz krótkimi łańcuchami rozgałęzień.

Komercyjnie dostępne dendrymery PPI syntezowane są metodą rozbieżną [51, 52]. Synteza rozpoczyna się od addycji Michaela czterech cząsteczek akrylonitrylu do cząsteczki rdzeniowej 1,4-diaminobutanu, stanowiącego rdzeń makrocząsteczki. W wyniku reakcji powstaje połówkowa (-0,5) generacja dendrymeru z czterema nitrylowymi grupami powierzchniowymi. W następnym etapie następuje redukcja grup nitrylowych z użyciem odpowiedniego środka redukującego, np. NaBH_4 [53], LiAlH_4 , $\text{BH}_3 \cdot \text{THF}$ [54]. Reakcja ta prowadzi do syntezy dendrymeru PPI G0 z czterema powierzchniowymi grupami aminowymi. Powtarzanie opisanych sekwencji prowadzi do syntezy dendrymerów kolejnych generacji (Rys. 16).



Rys. 16. Synteza dendrymerów PPI z rdzeniem diaminobutanowym (DAB) [54].

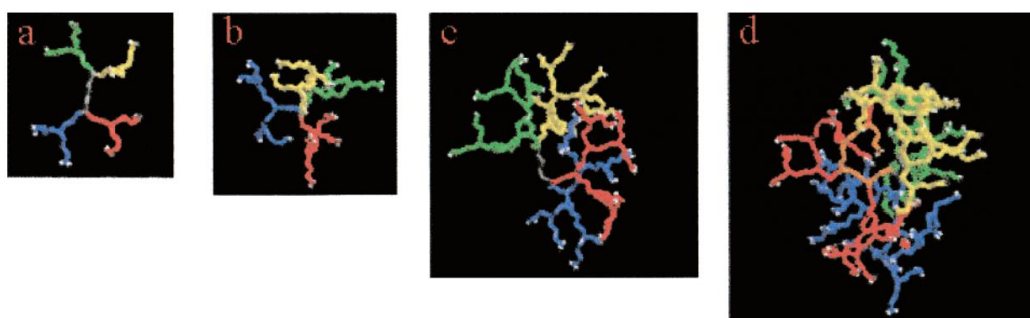
W strukturze dendrymerów PPI (Rys. 15) wyróżnia się pierwszo- oraz trzeciorzędowe grupy aminowe. Wraz ze wzrostem generacji rośnie zarówno liczba wewnętrznych oraz

zewnątrznych grup aminowych (Tabela 1). Dendrymery PPI mogą mieć również różne rdzenie. Najczęściej funkcję rdzenia pełni poliamina, np. etylenodiamina (EDA) lub diaminobutan (DAB). Dla badanego w pracy dendrymeru PPI rdzeń DAB zbudowany jest z czterech atomów węgla (łańcuch długi), natomiast w ramionach odchodzących od rdzenia występują krótsze łańcuchy alkilowe zbudowane z trzech atomów węgla (Rys. 16) [55].

Tabela 1. Liczba grup aminowych w makrocząsteczkach dendrymerów PPI kolejnych generacji.

Generacja PPI	Liczba terminalnych (pierwszorzędowych) grup aminowych	Liczba wewnętrznych (trzeciorzędowych) grup aminowych
0	4	2
1	8	6
2	16	14
3	32	30
4	64	62

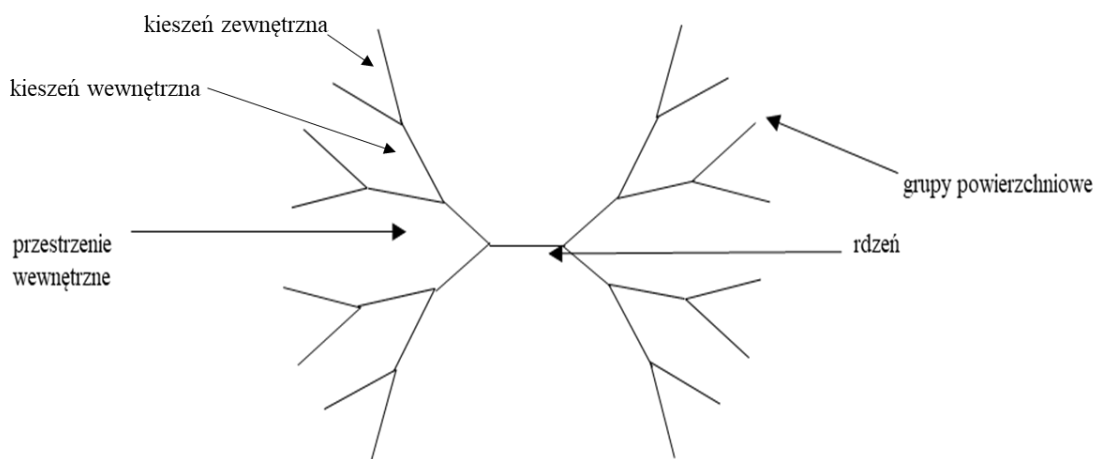
Makrocząsteczki dendrymerów PPI niższych generacji mają konformację wydłużoną. Wraz ze wzrostem liczby generacji dendrony są silniej sfłoczone i mogą układać się do wewnątrz makrocząsteczki [56]. Dlatego wraz ze wzrostem generacji dendrymeru struktura makrocząsteczki staje się bardziej zwarta.



Rys. 17. Konformacje dendrymerów PPI generacji a) G0, b) G1, c) G2, d) G3. Kolorami zaznaczono poszczególne dendrony makrocząsteczki [56].

W strukturze dendrymeru wyróżnia się powłokę zewnętrzną (ang. *outer shell*), czyli przestrzeń pomiędzy ostatnim zewnętrznym punktem rozgałęzienia i powierzchnią oraz powłoki wewnętrzne (ang. *inner shells*) położone we wnętrzu makrocząsteczki. Pomiędzy dendronami znajdują się również liczne przestrzenie wewnętrzne tzw. jamy [57]. Ze względu

na obecność kolejnych punktów rozgałęzień w budowie makrocząsteczek dendrymerów wyróżnia się również tzw. „kieszenie” zewnętrzne (ang. *outer pockets*), które znajdują się pomiędzy powierzchniowymi grupami makrocząsteczki oraz „kieszenie” wewnętrzne (ang. *inner pocket*) [58].



Rys. 18. Charakterystyczne elementy budowy makrocząsteczki dendrymeru o czterowartościowym rdzeniu.

Liczba merów w kolejnych warstwach wzrasta wykładniczo. Wzrost liczby grup terminalnych wraz ze wzrostem generacji makrocząsteczki można opisać równaniem (Równanie 1) [59]:

$$Z = n_c * n_m^G \quad (1)$$

gdzie

n_c - krotność rdzenia,

n_m -krotność rozgałęzienia określająca liczbę podgałęzi, na które rozdziela się dana podgałąź w punkcie rozgałęzienia,

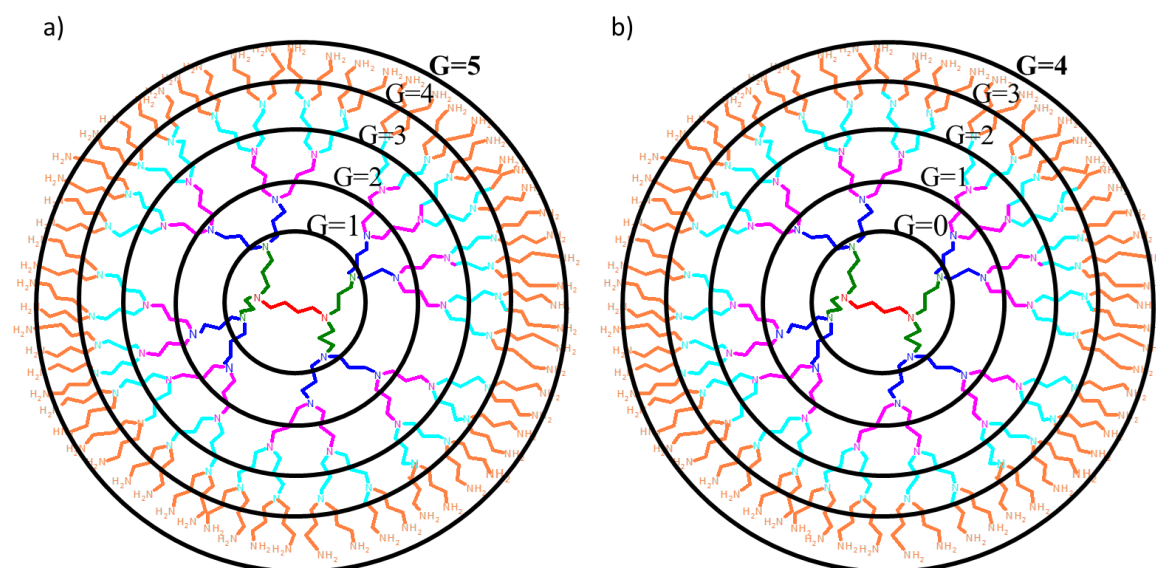
G -generacja dendrymeru.

Przykładowo dla dendrymeru PPI G4 z rdzeniem diaminobutanowym ($n_c=4$; $n_m=2$) generacji czwartej ($G=4$) liczba powierzchniowych grup funkcyjnych wynosi $Z=64$.

Rozbudowa makrocząsteczek dendrymerów o kolejne warstwy merów nie może być prowadzona w nieskończoność. Synteza dendrymerów wyższych generacji jest możliwa do momentu, gdy zatłoczenie steryczne uniemożliwia rozbudowę makrocząsteczki o kolejną warstwę merów z zachowaniem charakterystycznej dla dendrymerów regularnej struktury [60]. Po osiągnięciu tego krytycznego stanu zwanego generacją graniczną de Gennesa [61]. brak możliwości dalszego wzrostu określa się jako efekt „starburst” [62].

Istnieją różne konwencje nazywania dendrymerów klasy PPI (Tabela 2) i określania ich generacji. Zgodnie z dawniej stosowaną konwencją w strukturze PPI nie wyróżnia się generacji zerowej, rozpoczynając numerację od generacji pierwszej (Rys. 19a). Wówczas dendrymer PPI o rdzeniu DAB, którego makrocząsteczka ma 64 powierzchniowe grupy powierzchniowe jest oznaczany jako dendrymer generacji piątej (G5). Według nowszej konwencji, numerację warstw merów dendrymeru PPI (podobnie jak dla PAMAM) rozpoczyna się od generacji zerowej (Rys. 19b). Wówczas dendrymer PPI o rdzeniu DAB, którego makrocząsteczka ma 64 grupy powierzchniowe jest oznaczany jako dendrymer generacji czwartej (G4). Nowsza konwencja numerowania generacji dendrymerów zalecana jest przez Tomalię i Rookmakera [63] i jest zastosowana także w niniejszej pracy. Użycie nowej konwencji nazewnictwa ułatwia porównywanie dendrymerów różnych typów, gdyż wówczas makrocząsteczki PPI i PAMAM tej samej generacji i o tej samej wartościowości rdzenia mają jednakową liczbę reszt terminalnych.

Ponieważ komercyjnie dostępne dendrymery PPI syntezowane są z diaminobutanu (DAB) jako cząsteczki rdzeniowej, dlatego określane są również jako dendrymery DAB ze wskazaniem liczby aminowych reszt terminalnych (Am). Przykładowo DAB-Am-64 oznacza dendrymer PPI o rdzeniu diaminobutanowym (DAB) zawierający 64 terminalne grupy aminowe. Użycie tego sposobu oznaczania jest szczególnie wygodne w handlu i obrocie dendrymerami PPI.

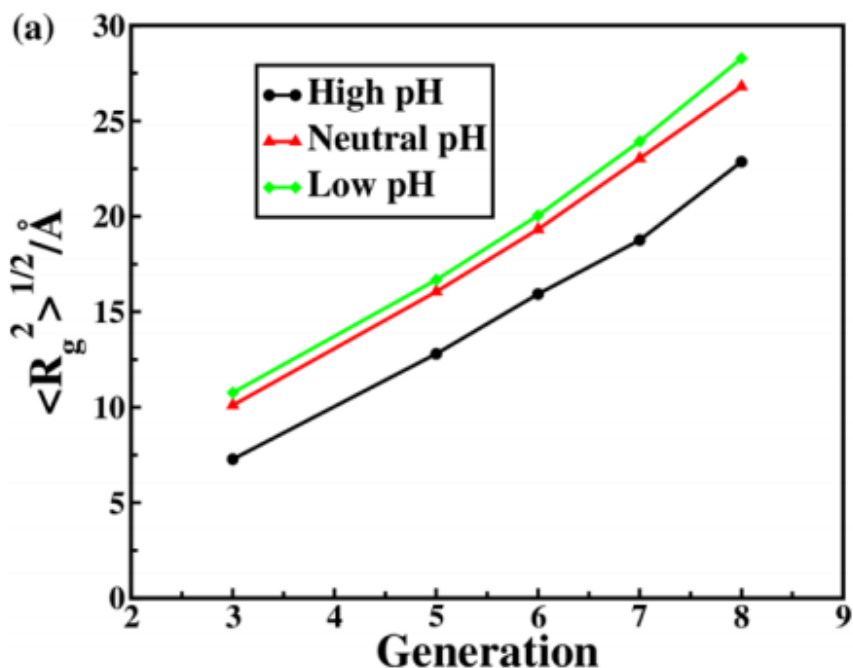


Rys. 19. Struktura dendrymeru PPI o rdzeniu diaminobutanowym (DAB) z zaznaczonymi warstwami merów kolejnych generacji według: a) starej konwencji numeracji b) nowszej konwencji numeracji.

Tabela 2. Podstawowe parametry makrocząsteczek dendrymerów PPI o rdzeniu diaminobutanowym (DAB) [34].

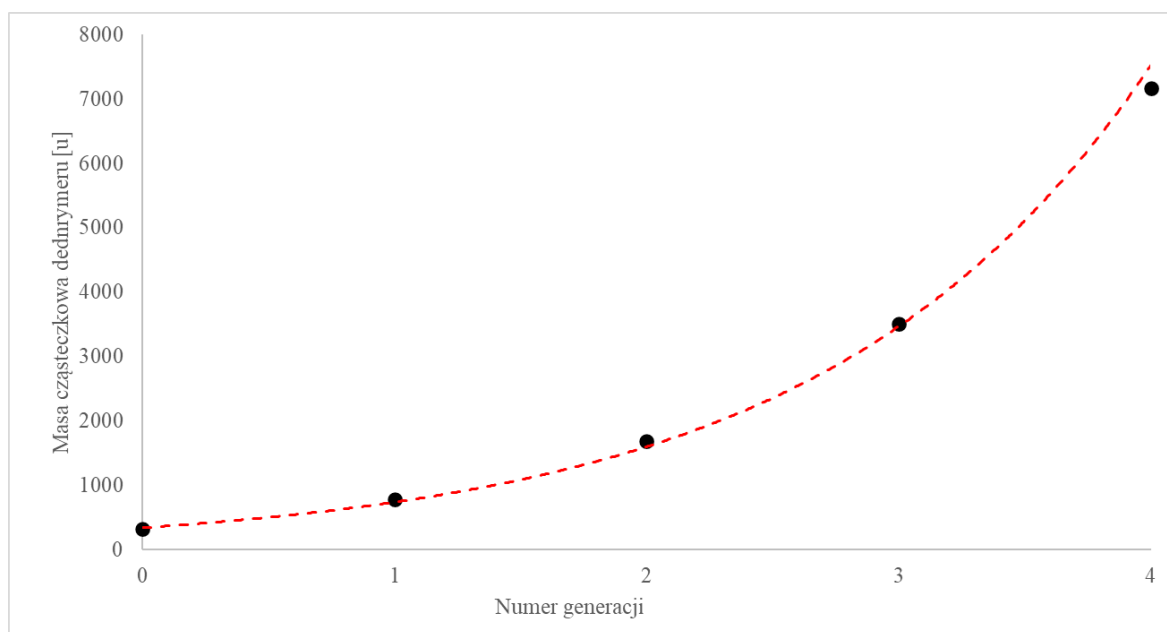
Generacja (stara nomenklatura)	Generacja (nowa nomenklatura)	Liczba terminalnych grup aminowych	Masa molowa [g/mol]	Średnica [nm]
1	0	4	316,5	0,9
2	1	8	777,3	1,4
3	2	16	1686,8	1,9
4	3	32	3513,9	2,4
5	4	64	7168,1	2,8

Dendrymery PPI posiadają duży potencjał aplikacyjny, dlatego ważne jest dokładne zbadanie struktury tych cząsteczek w różnych warunkach. Liczne symulacje komputerowe miały na celu określenie wpływu środowiska na kształt i rozmiar dendrymerów klasy PPI. Symulacje komputerowe wykonane przez Gupta i współpracowników [64] pozwoliły obliczyć rozmiar makrocząsteczek dendrymerów PPI oraz ich promień bezwładności R_g dla generacji od G3 do G8 odpowiednio w środowisku kwaśnym ($\text{pH} < 3$), obojętnym ($\text{pH} \sim 7$) oraz zasadowym ($\text{pH} > 12$). Analiza otrzymanych wyników wskazuje na monotoniczny wzrost promienia bezwładności badanych dendrymerów wraz ze wzrostem generacji (Rys. 20).



Rys. 20. Zależność promienia bezwładności dendrymerów PPI w zależności od pH środowiska [64].

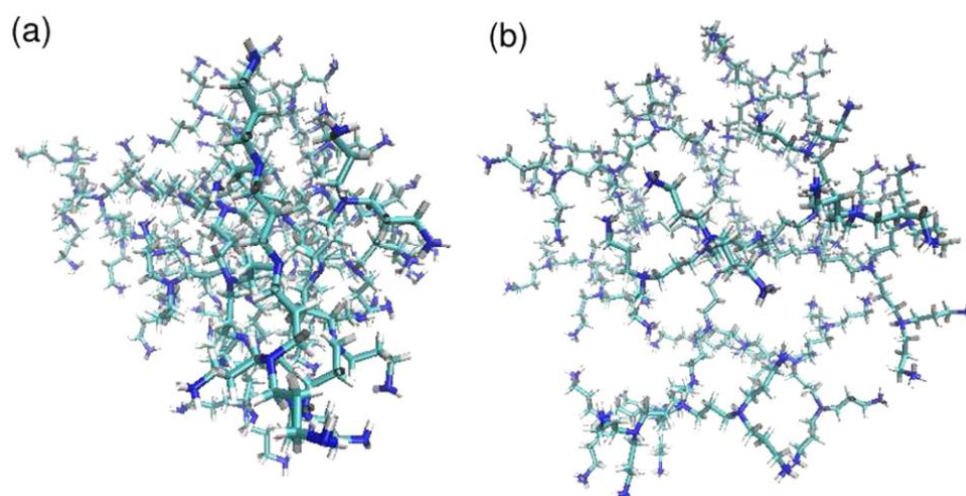
Liniowy wzrost promienia bezwładności obserwuje się dla dendrymerów niższych pokoleń, natomiast niewielkie odchylenie od liniowości obserwuje się w przypadku dendrymerów generacji wyższych. Odchylenie to może być spowodowane mniejszym przyrostem dostępnej przestrzeni dla grup powierzchniowych wyższych generacji. Objętość dendrymerów wzrasta jak sześcian generacji makrocząsteczki $V \sim G^3$, natomiast masa cząsteczkowa rośnie wykładniczo $M \sim (f-1)^G$, gdzie f - funkcjonalność (wartościowość) punktu rozgałęzienia dendrymeru, który dla dendrymeru PPI wynosi $f = 3$ (Rys. 21) [65].



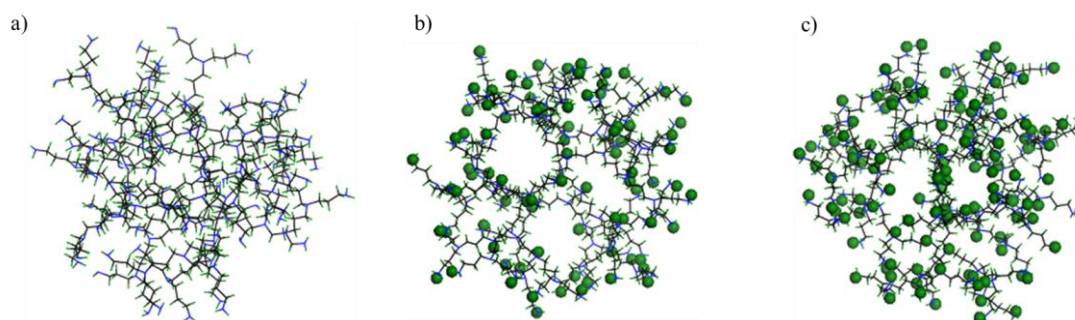
Rys. 21. Zależność masy cząsteczkowej dendrymerów PPI z rdzeniem diaminobutanowym (DAB) od generacji makrocząsteczki. Dane do wykresu zaczerpnięto z pracy Mendesa i współpracowników [34].

Wyniki badań pokazują, że duży wpływ na strukturę dendrymerów ma zmiana pH roztworu, w którym zawieszono makrocząsteczki tych polimerów. W środowisku zasadowym grupy aminowe nie ulegają protonowaniu, a konformacja makrocząsteczki ulega złożeniu (Rys. 22). W wyniku obniżenia pH roztworu z zasadowego do kwaśnego protonowaniu ulega coraz więcej grup aminowych w makrocząsteczce dendrymeru (Rys. 23). Obliczone wartości promienia bezwładności dendrymerów PPI w roztworach o różnym pH pokazują, że wraz z obniżeniem pH środowiska rozmiar makrocząsteczek dendrymerów wzrasta, co jest spowodowane odpychaniem elektrostatycznym między sprotonowanymi grupami aminowymi dendrymeru [64-66]. Dendrymery PPI przy niskim pH wykazują zatem wysoce uporządkowaną strukturę oraz rozłożoną konformację ze względu na odpychanie elektrostatyczne między dodatnio naładowanymi grupami amoniowymi (Rys. 22) [65].

Przykładowo obniżenie pH z 12 do 3 powoduje wzrost promienia makrocząsteczki PPI G4 z 10 Å do 14 Å.



Rys. 22. Konformacja dendrymeru PPI G4 w środowisku: a) zasadowym b) kwasowym [65].



Rys. 23. Struktura dendrymeru PPI G4 z rdzeniem diaminobutanowym DAB w środowisku o pH odpowiednio: (a) zasadowym, (b) neutralnym, (c) kwaśnym. Protonowane atomy wodoru przedstawiono jako zielone kule [66].

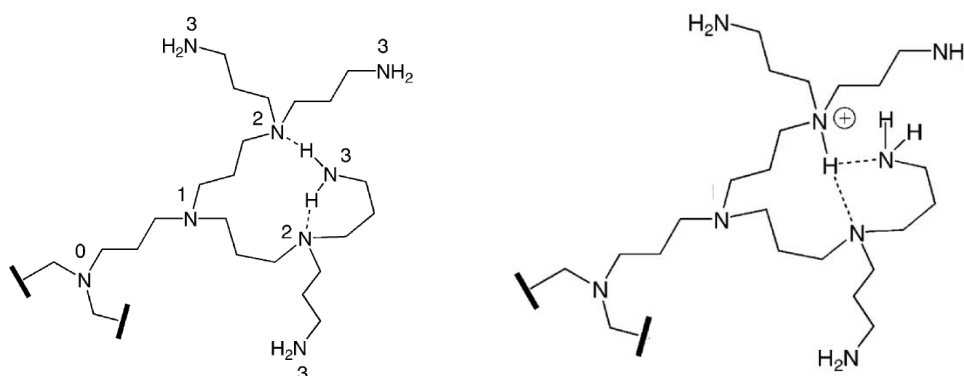
Miarą odchylenia kształtu makrocząsteczki od idealnej kuli jest tzw. parametr asferyczności. Obliczone wartości tego parametru dla dendrymerów PPI generacji G3, G5-G8 uwzględniające różne wartości pH środowiska zostały zebrane w Tabeli 3.

Tabela 3. Wartości parametru asferyczności dla dendrymerów PPI wybranych generacji [65].

Wartość parametru asferyczności (Δ)			
Generacja	pH zasadowe	pH obojętne	pH kwaśne
3	0,017 \pm 0,013	0,031 \pm 0,016	0,031 \pm 0,011
5	0,031 \pm 0,018	0,011 \pm 0,003	0,007 \pm 0,002
6	0,03 \pm 0,01	0,005 \pm 0,001	0,002 \pm 0,001
7	0,007 \pm 0,001	0,003 \pm 0,001	0,002 \pm 0,001
8	0,007 \pm 0,002	0,005 \pm 0,001	0,002 \pm 0,001

Zebrane wartości (Tabela 3) wskazują, że niezależnie od kwasowości środowiska wartości parametru asferyczności dla dendrymerów wyższych generacji są bliskie zeru. Świadczy to o małym odchyleniu strukturalnym od symetrii sferycznej oraz wskazuje na coraz bardziej kulistą strukturę dendrymerów PPI wraz ze wzrostem generacji.

Badania metodą spektrometrii mas [67] sugerują, że dla makromolekuł PPI przenoszonych do fazy gazowej z polarnych protycznych rozpuszczalników możliwe jest złożenie zewnętrznych fragmentów dendronów do wnętrza struktury. Złożenie to następuje poprzez tworzenie wewnątrzcząsteczkowego wiązania wodorowego pomiędzy pierwszorzędowymi i trzeciorzędowymi grupami aminowymi (Rys. 24), co dodatkowo stabilizuje strukturę makrocząsteczki.

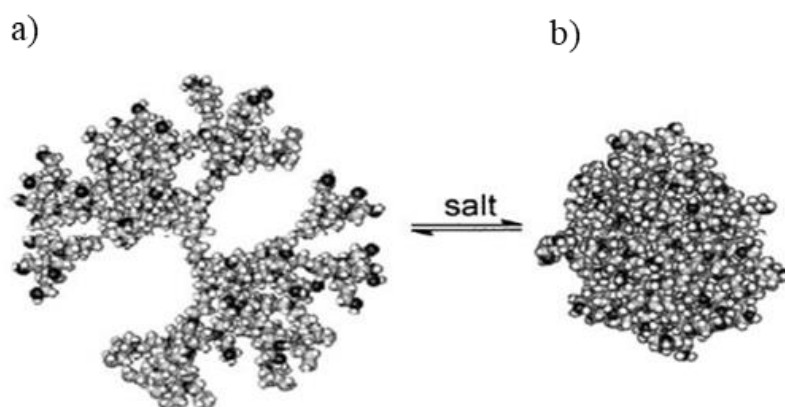


Rys. 24. Struktura dendrymeru PPI G2 z wewnątrzcząsteczkowym wiązaniem wodorowym w ramieniu: a) nieprotonowanym, b) protonowanym [67].

Duży wpływ na strukturę cząsteczek dendrymerów ma rodzaj rozpuszczalnika, w którym rozpuszczone (zawieszone) zostały makrocząsteczki dendrymerów PPI. Obliczenia techniką

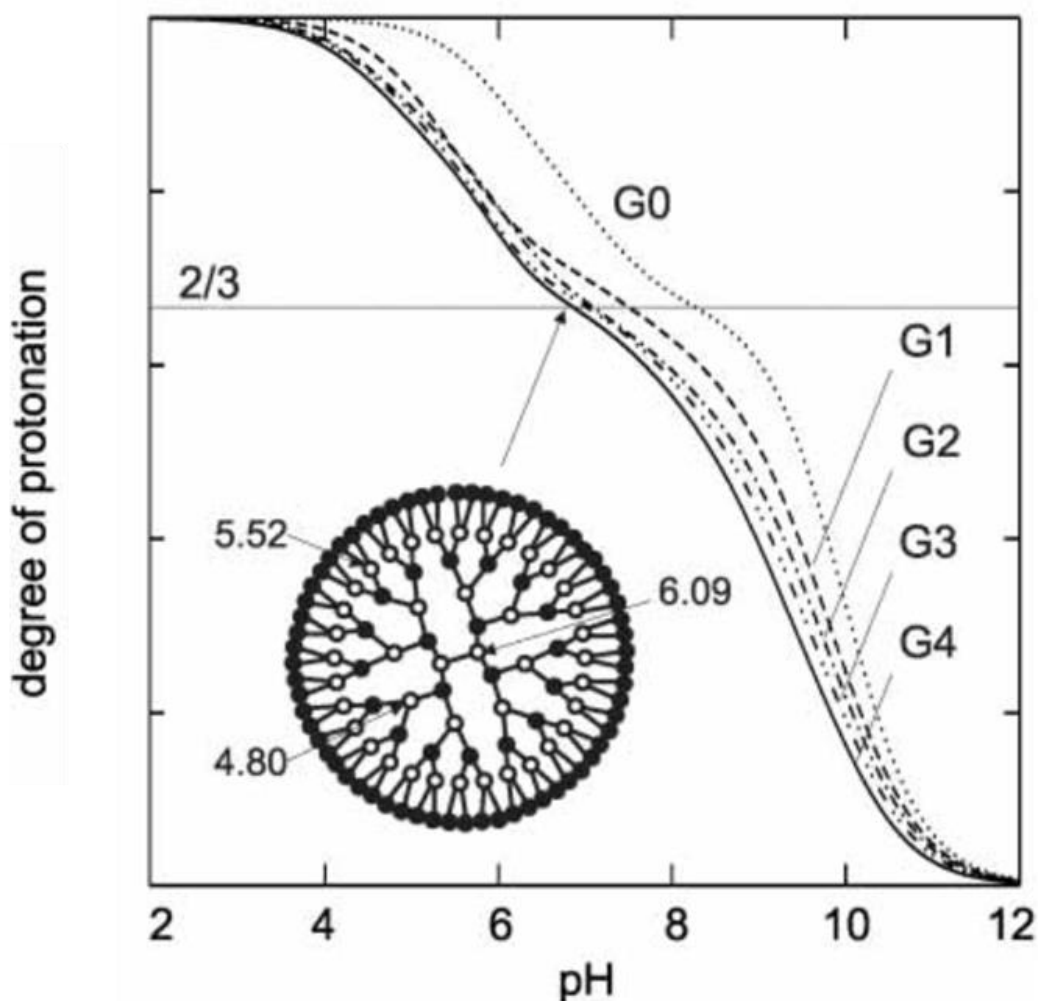
dynamiki molekularnej wskazują, że dendrymery PPI wszystkich generacji różnią się konformacją w zależności od rodzaju użytego rozpuszczalnika [60]. Badania NMR makrocząsteczek dendrymerów PPI wykazały, że rozpuszczalniki niepolarne w małym stopniu solwatuja dendrony, co sprzyja interakcjom między wewnętrznymi grupami makrocząsteczki. Inaczej jest w przypadku kwaśnych rozpuszczalników, które działają jako donor wodoru do zasadowych grup aminowych makrocząsteczki dendrymeru. Protonowanie tych grup prowadzi do rozłożenia konformacyjnego makrocząsteczki. Polarne cząsteczki rozpuszczalników mogą tworzyć wiązania wodorowe z trzeciorzędowymi wewnętrznymi grupami aminowymi, co również powoduje rozłożenie konformacyjne makrocząsteczki [68]. Badania teoretyczne oraz eksperymentalne pokazują, że dendrymery PPI z aminowymi grupami terminalnymi oddziałując z aprotycznymi rozpuszczalnikami apolarnymi wykazują większą gęstość cząsteczkową w pobliżu rdzenia makrocząsteczki, co świadczy o złożeniu konformacyjnym struktury. W przypadku rozpuszczalników polarnych wyższa gęstość cząsteczkowa występuje na powierzchni makrocząsteczek, co spowodowane jest solwatacją ramion dendrymeru.

Symulacje komputerowe pokazują, że konformacja protonowanych makrocząsteczek dendrymerów PPI zmienia się także wraz z obecnością soli w roztworze. W warunkach wysokich stężeń jonów elektrolitu dendrymery wykazują tendencję do zwijania swej konformacji w mniejszą, bardziej zwartą strukturę o dużej gęstości w pobliżu rdzenia (ang. *dense-core model*). Przy niskim stężeniu soli w roztworze siły odpychające między naładowanymi dendronami powodują przyjęcie przez makrocząsteczki PPI konformacji rozłożonych o dużej gęstości w pobliżu powierzchni (ang. *dense-shell model*). Przyjęcie przez makrocząsteczkę PPI rozłożonej konformacji zmniejsza siły odpychania centrów ładunku dodatniego (Rys. 25) [69].



Rys. 25. Trójwymiarowa struktura dendrymerów PPI w roztworach o: a) małym stężeniu soli b) wysokim stężeniu soli [60].

Obecne w strukturze dendrymerów PPI grupy aminowe w roztworze wodnym uczestniczą w równowagach kwasowo-zasadowych, przez co nadają makromolekule charakter wieloprotonowej zasady Brönsteda. Przebieg krzywych protonowania dendrymerów PPI generacji G0-G4 przedstawiono na rysunku 15.

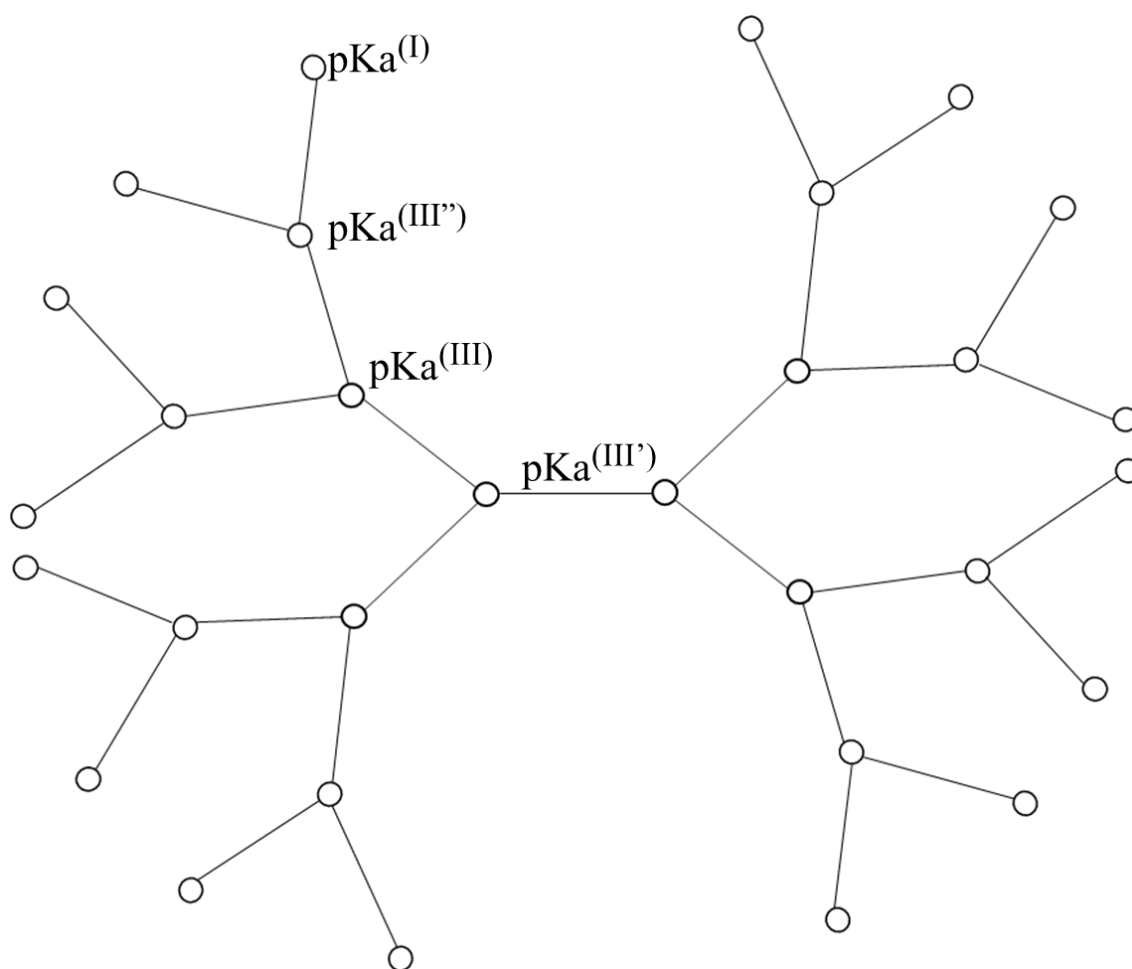


Rys. 26. Zależność stopnia protonowania dendrymerów PPI generacji G0-G4 od pH roztworu [55].

Dla dendrymerów PPI opracowano mechanizm protonowania [55] poszczególnych rodzajów grup aminowych w zależności od pH roztworu. Protonowanie dendrymerów PPI zachodzi w sposób powłokowy (ang. *shell-wise*), czyli protonowaniu ulegają grupy aminowe zlokalizowane w poszczególnych warstwach. Podczas zmiany pH roztworu, makromolekuły PPI przechodzą przez wiele mikrostanów różniących się stopniem sprotonowania grup aminowych. Dla dendrymerów PPI wyróżnia się cztery rodzaje ugrupowań aminowych w zależności od ich położenia (Rys. 27) w strukturze PPI:

- a) Pierwszorzędowe terminalne grupy aminowe o stałej deprotonowania sprzężonego kwasu oznaczonej $pK_a^{(I)}$
- b) Trzeciorzędowe grupy aminowe o stałej deprotonowania sprzężonego kwasu oznaczonej $pK_a^{(III'')}$, które są zlokalizowane tuż pod powierzchnią grup terminalnych
- c) Wewnętrzne trzeciorzędowe grupy aminowe o stałej deprotonowania sprzężonego kwasu $pK_a^{(III)}$, które są zlokalizowane między zewnętrznymi trzeciorzędowymi grupami aminowymi i rdzeniem
- d) Trzeciorzędowe grupy aminowe rdzenia o stałej deprotonowania sprzężonego kwasu $pK_a^{(III')}$

Wyniki badań NMR wskazują, że generacja ma wpływ na stałe deprotonowania sprzężonych kwasów poszczególnych rodzajów grup aminowych w strukturach badanych dendrymerów PPI generacji G0-G4. Wartości pK_a dla dendrymerów PPI generacji G0-G4 zostały zebrane w Tabeli 4.



Rys. 27. Struktura dendrymeru PPI G2 z oznaczeniem stałych pK_a dla poszczególnych rodzajów grup aminowych. [55].

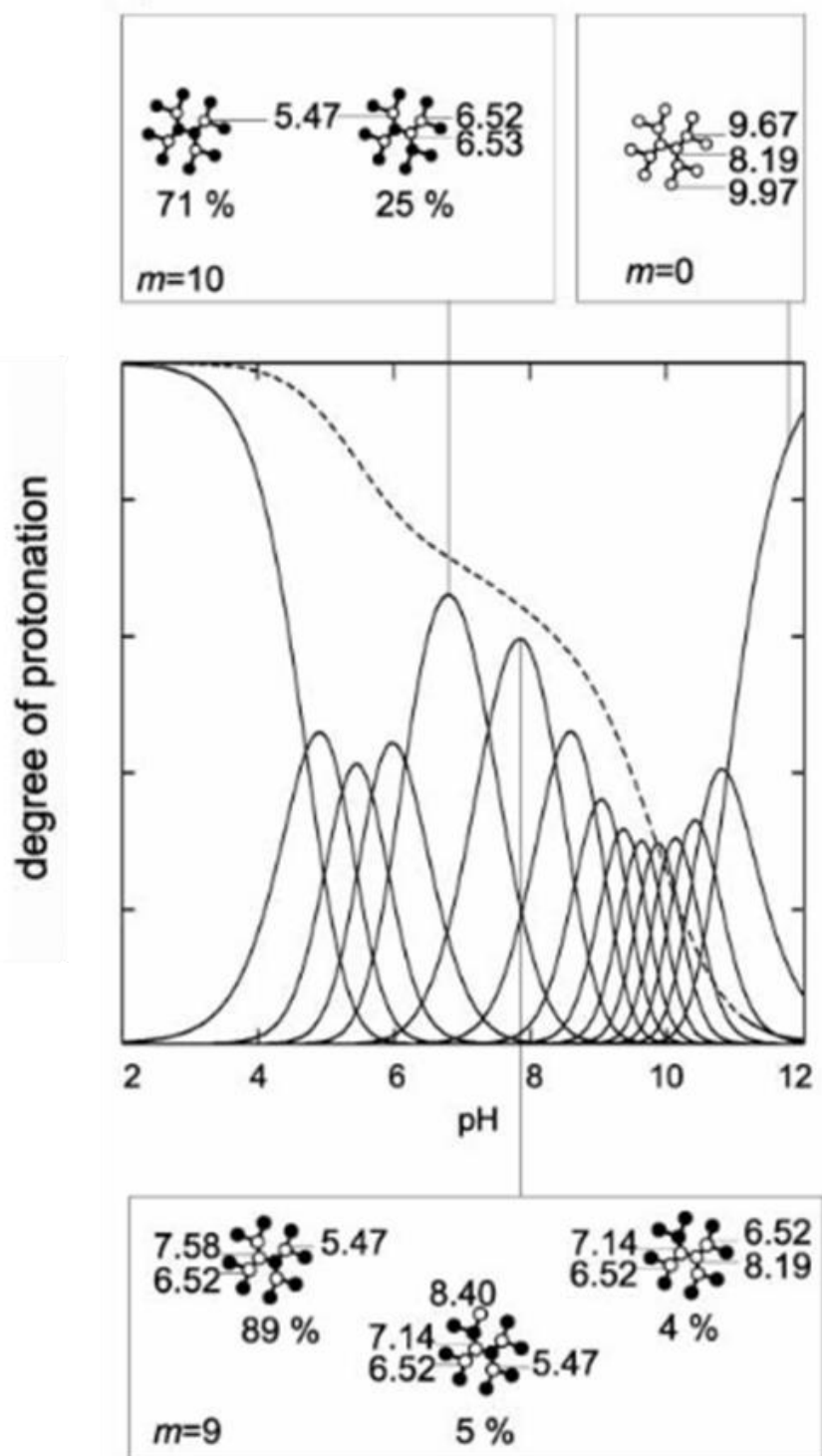
Tabela 4. Wartości pKa grup aminowych w makrocząsteczkach dendrymerów generacji G0-G4 [55]. Oznaczenie stałych pKa poszczególnych grup jest zgodne ze schematem przedstawionym na rysunku 27.

Generacja	pKa ^(I)		pKa ^(III)		pKa ^(III')	pKa ^(III'')
0	9,97 ^a	9,85 ^b	-	6,0 ^b	9,02 ^a	-
1	9,85 ^a	9,8 ^b	-	6,0 ^b	8,19 ^a	9,66 ^a
2	9,79 ^a	9,8 ^b	7,99 ^a	6,1 ^b	8,19 ^a	9,72 ^a
3	9,70 ^a	9,75 ^b	8,03 ^a	-	8,19 ^a	9,71 ^a
4	9,56^a	9,75^c	7,95^c	6,1^c	8,19^a	9,66^a

Literatura: ^a[55], ^b[70], ^c[71]

Dla dendrymerów generacji G1-G4 wartości pKa terminalnych grup aminowych (I) i trzeciorzędowych grup aminowych przy powierzchni (III'') maleją wraz ze wzrostem generacji. Świadczy to o wzroście charakteru kwasowego tych grup wraz ze wzrostem generacji.

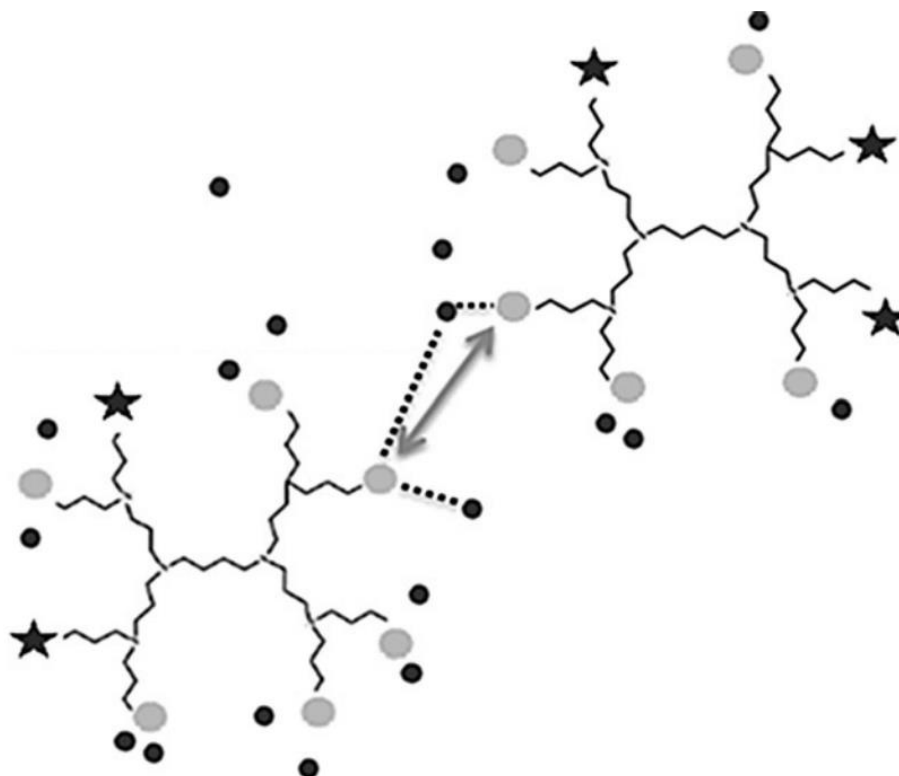
Dendrymery PPI protonują się w sposób warstwowy (ang. *onion-like*) w zależności od położenia warstw merów względem powierzchni. Oznacza to, że podczas zakwaszania roztworu najpierw protonują się grupy aminowe warstw nieparzystych, a następnie grupy aminowe warstw parzystych. Podczas obniżania pH roztworu grupy aminowe znajdujące się na nieparzystych powłokach, licząc od najbardziej zewnętrznej, protonują się w pierwszym etapie już przy pH około 9. Dla dendrymerów PPI wyższych generacji stosunek sprotonowanych grup aminowych znajdujących się na nieparzystych powłokach do całkowitej liczby miejsc ulegającym sprotonowaniu wynosi 2/3. Pozostała część (1/3) protonuje się w drugim etapie przy pH około 4,5. Przykładowo makrocząsteczka PPI G1 (Rys. 28) zawieszona w roztworze o silnie zasadowym pH ma niesprotonowane wszystkie grupy aminowe. Podczas zakwaszania roztworu dendrymeru PPI G1 protonowaniu ulegają najpierw pierwszorzędowe terminalne grupy aminowe, następnie trzeciorzędowe grupy aminowe znajdujące się w rdzeniu.



Rys. 28. Mechanizm protonowania dendrymeru PPI generacji G1. Wykres przedstawia makroskopowe prawdopodobieństwo stanu (w %), w którym przyłączonych jest m protonów w funkcji pH środowiska. Schematy przedstawiają położenie miejsc obsadzonych przez protony (oznaczone ●) w odrębnie poszczególnych stanów oraz miejsca niesprotonowane (oznaczone ○) z przypisanymi im wartościami pKa.

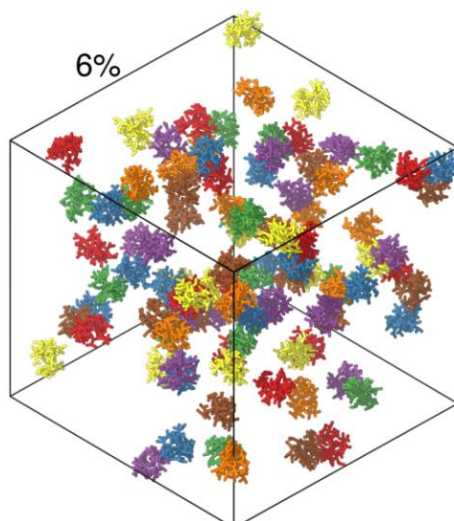
Eghtesadi i współpracownicy [72] wykonywali badania pH-metryczne dendrymeru PPI G1. W makrocząsteczce PPI G1 w roztworze o pH~10 protonowaniu ulegają trzy lub cztery z ośmiu aminowych grup terminalnych. Ze względu na kationowy charakter sprotonowanych

grup aminowych, makrocząsteczki dendrymeru PPI G1 występowały jako pojedyncze makrojonny w wodnym roztworze (Rys.29).



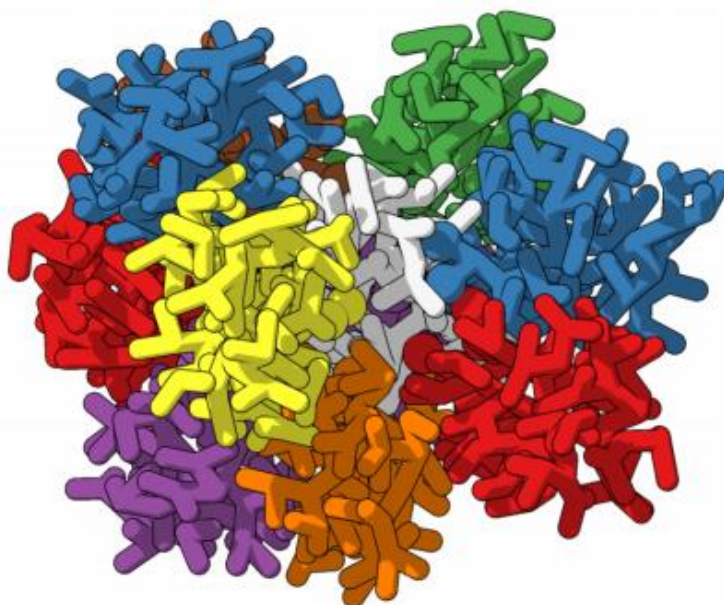
Rys. 29. Schemat oddziaływań dwóch makrojonów dendrymeru PPI G1 z zaznaczonym odpowiednio: odpychaniem (\leftrightarrow), przyciągnięciem (\cdots) elektrostatycznym, jonami chlorkowymi (czarne kółka), protonowanymi grupami aminowymi (szare kółka) oraz obojętymi grupami aminowymi (gwiazdki).

Smeijers i współpracownicy [73] wykonali symulacje metodą dynamiki molekularnej zachowania wodnych roztworów dendrymerów PPI G3 oraz G4 (Rys. 30). Uzyskane wyniki wskazują, że w warunkach wysokich stężeń ($\geq 6\%$), czyli gdy odległości pomiędzy poszczególnymi makrocząsteczkami są niewielkie, makrocząsteczki mogą agregować poprzez wnikanie (interpenetrację, ang. *interpenetration*) dendronów jednej makrocząsteczki do wewnętrznych jam w strukturze drugiej makrocząsteczki.



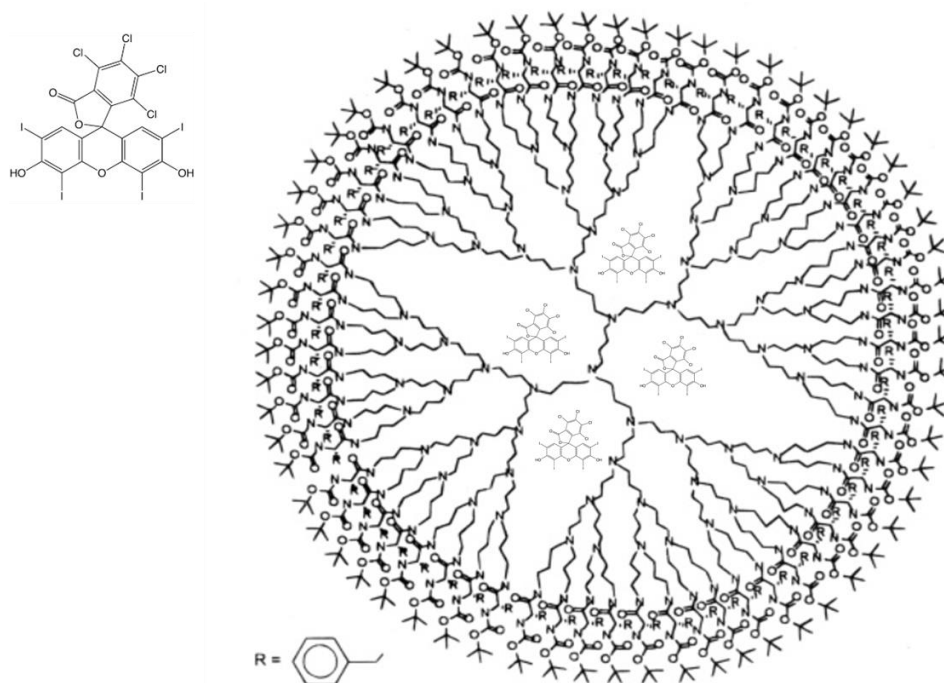
Rys. 30. Wymodelowane techniką dynamiki molekularnej agregaty PPI G4 w roztworze o stężeniu 6%, utworzone wskutek interpenetracji makrocząsteczek [73].

Przy niskich stężeniach dendrymeru PPI G4, w stanie równowagi symulowanego roztworu, obserwuje się zderzenia między makrocząsteczkami, chociaż nie udało się zaobserwować zjawiska interpenetracji makromolekuł. W silnie stężonych roztworach zaobserwowano natomiast tworzenie agregatów (Rys. 31), zawierających większą liczbę cząsteczek niż w roztworze o stężeniu 6%. Obliczenia komputerowe Zacharopoulou i Economou'a [56] dla silnie stężonych roztworów również wskazują na wzajemne przenikanie się makrocząsteczek dendrymerów PPI.



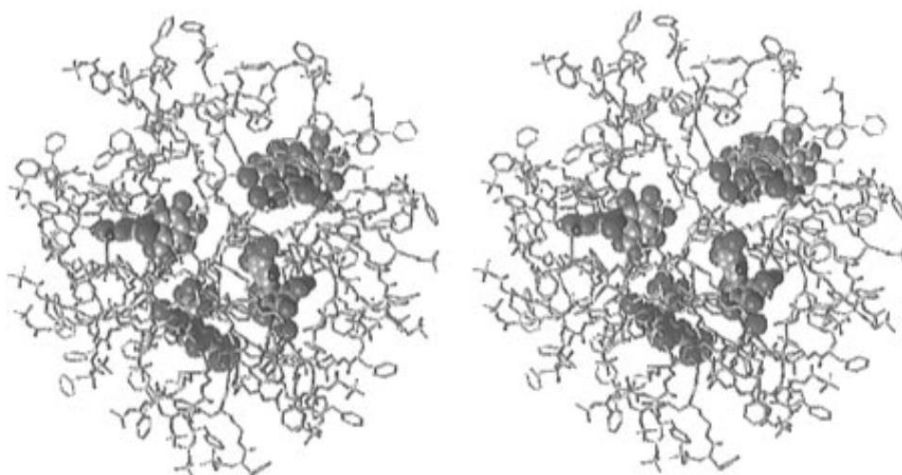
Rys. 31. Kilkucząsteczkowy agregat dendrymeru PPI G4.

Jednym z potencjalnych zastosowań dendrymerów jest selektywne zamykanie (enkapsulacja, ang. *encapsulation*) mniejszych cząsteczek, czyli ligandów w ich wewnętrznych jamach, a następnie uwalnianie ich w innym (odmiennym) środowisku. Dendrymery posiadają zdolność do tworzenia kompleksów supramolekularnych typu gość-gospodarz, w których dendrymer pełni rolę gospodarza. Istnieją również kompleksy, w których dendrymer pełni funkcję gościa dla większej od niego makrocząsteczki białka. Są to tzw. dendripleksy [74]. Jednym z pierwszych badań jednoznacznie udowadniających możliwość enkapsulacji liganda pomiędzy dendronami makrocząsteczki PPI był eksperyment Mejera [75-78] z użyciem PPI G4 w charakterze „pudełka dendrymerowego” (ang. *dendribox*) [76]. W eksperymencie tym mieszano dendrymer PPI G4 w różnych stosunkach molowych z cząsteczkami gościa. Następnie do makrocząsteczki przyłączono sterycznie rozbudowane reszty fenyloalaniny blokowanej grupami tert-butylokarbonylowymi (tBOC) (Rys. 32). Uszczelnienie struktury powierzchni dendrymeru zabezpieczyło zamknięte we wnętrzu makromolekuły cząsteczki gościa przed uwolnieniem. Usunięcie blokujących reszt tBOC z powierzchni makrocząsteczki PPI pozwalało uwolnić zawartość. We wnętrzu dendrymerowego pudełka PPI G4 można enkapsulować odpowiednio do czterech cząsteczek różu bengalskiego oraz do ośmiu cząsteczek kwasu p-nitrobenzoesowego (Rys. 32).



Rys. 32. Pudełko dendrymerowe z zamkniętymi (enkapsulowanymi) czterema cząsteczkami różu bengalskiego.

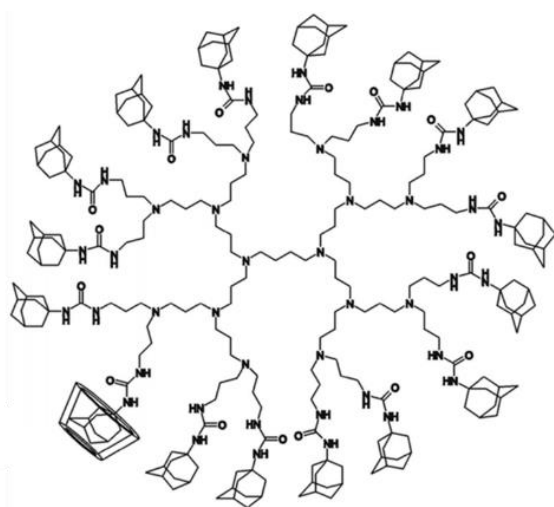
Miklis wraz ze współpracownikami [79] przeprowadził symulacje komputerowe metodą dynamiki molekularnej. Wymodelowana struktura dendrymeru PPI z 64 resztami tBOC-L-Phe wraz z zamkniętymi cząsteczkami rózu bengalskiego potwierdza wyniki badań eksperymentalnych grupy Mejera (Rys. 33).



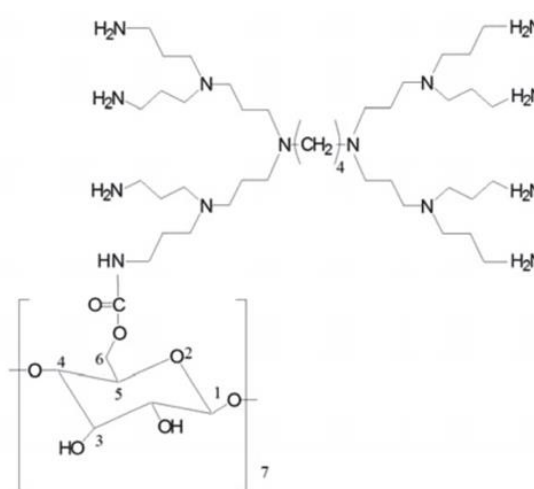
Rys. 33. Stereogram dendrymeru PPI G4 z enkapsulowanymi cząsteczkami rózu bengalskiego [79].

Dendrymery PPI to dogodne nanorusztowania do budowy bardziej złożonych układów. Przykładowo otrzymano dendrymer PPI z terminalnymi resztami adamantylowymi, który doskonale wiązał β -cyklodekstrynę (Rys. 34a). Otrzymano również dendrymer PPI G1 modyfikowany powierzchniowo resztami β -cyklodekstryny (Rys. 34b), który wykazywał dużą zdolność wiązania DNA i był mniej toksyczny w porównaniu z niezmodyfikowanym dendrymerem PPI G1 [80, 81].

a)



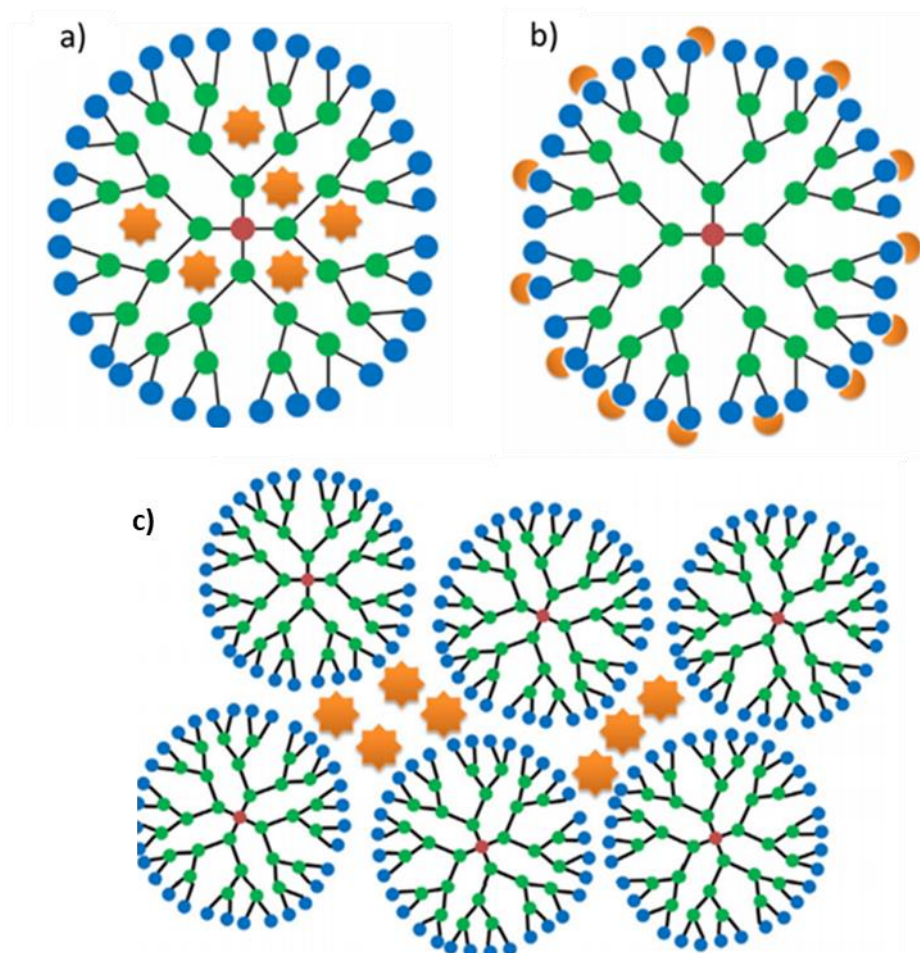
b)



Rys. 34. Przykłady modyfikacji dendrymerów PPI: a) z resztami adamantylowymi i przyłączoną β -cyklodekstryną b) z związaną kowalencyjnie β -cyklodekstryną.

2.2.3 Dendrymery jako nośniki molekularne

Charakterystyczna budowa makrocząsteczek dendrymerów (liczne terminalne grupy funkcyjne oraz przestrzenie wewnętrzne) umożliwia im oddziaływania z mniejszymi cząsteczkami lub ich grupami funkcyjnymi. Oddziaływania te mogą zachodzić w sposób niekowalencyjny lub poprzez wiązania chemiczne [82, 83].



Rys. 35. Schemat niekowalencyjnych oddziaływań makrocząsteczek dendrymerów z cząsteczkami ligandów poprzez: a) enkapsulację, b) oddziaływania elektrostatyczne, c) wbudowanie w sieć agregatów dendrymeru [84].

Zamknięcie (enkapsulacja) cząsteczek liganda w wewnętrznych jamach makrocząsteczek dendrymerów PPI najczęściej jest wynikiem słabo wiążących oddziaływań niekowalencyjnych cząsteczki liganda z niepolarnymi grupami metylenowymi i polarnymi trzeciorzędowymi grupami aminowymi obecnymi we wnętrzu makrocząsteczki. Słabo rozpuszczalne w wodzie ligandy mogą więc oddziaływać hydrofobowo z niepolarnymi grupami metylenowymi, co powoduje wzrost rozpuszczalności liganda w wodnym roztworze

dendrymeru. (Rys. 35a). Dendrymery PPI w swojej strukturze posiadają hydrofobowe wnętrze oraz zbudowaną z grup aminowych powłokę, co nadaje powierzchni makrocząsteczki hydrofilowy charakter. Przenoszenie niepolarnych ligandów lub ligandów posiadających niepolarne reszty, w hydrofobowych wnękach makromolekuł dendrymeru o hydrofilowej powierzchni, przypomina klasyczne układy micelarne. Stąd dendrymery wykazujące takie zachowanie określa się jako jednocząsteczkowe micide (ang. *unimolecular micelles*). Ponieważ fragmenty hydrofobowe w dendrymerach PPI są kowalencyjnie wbudowane w strukturę, więc jednocząsteczkowa micela jest stabilna w pełnym zakresie stężenia jej roztworu [85].

Obecne w strukturze makrocząsteczek dendrymerów PPI trzeciorzędowe grupy aminowe mogą wiązać ligand we wnętrzu makrocząsteczki poprzez wiązania wodorowe [85], a po sprotonowaniu także oddziałują elektrostatycznie z ligandami o charakterze anionowym. Ze względu na zdolność dendrymerów do enkapsulacji ligandów, mogą być one wykorzystywane jako m.in. pudełka dendrymerowe [79] dla hydrofobowych lub polarnych ligandów oraz jednocząsteczkowe micide dendrytyczne dla ligandów hydrofobowych.

Aminowe grupy powierzchniowe w makrocząsteczkach dendrymerów PPI w środowisku wodnym wykazują zasadowy charakter Brönsteda, przez co mogą oddziaływać nie tylko poprzez wiązania wodorowe, lecz po sprotonowaniu również elektrostatycznie (Rys. 35b) z anionowymi (kwasowymi) lub spolaryzowanymi grupami funkcyjnymi w cząsteczkach ligandów [82]. Zdolność dendrymerów do agregacji pozwala również na stabilizację cząsteczek liganda pomiędzy skupionymi makrocząsteczkami dendrymerów (Rys. 35c) [86, 87]. Przyłączenie cząsteczek liganda do powierzchni makrocząsteczki może odbywać się również poprzez wiązania kowalencyjne.

W literaturze istnieje wiele doniesień opisujących dendrymery PPI zarówno z etylenodiaminowym (EDA) rdzeniem jak również diaminobutanowym (DAB) jako nośniki różnego rodzaju ligandów.

2.2.4. Oddziaływanie dendrymerów PPI z antybiotykami

Zbyt częste stosowanie antybiotyków spowodowało wzrost odporności mikroorganizmów na ich działanie. W celu poprawy działania substancji czynnych biologicznie możliwe jest stosowanie ich wraz z innym związkiem bakteriobójczym. Zespół po kierunku Wrońskiej [88] badał aktywność przeciwbakteryjną cyprofloksacyny związanej z dendrymerem PPI G3 w celu obniżenia skutecznej terapeutycznie dawki tego medykamentu. Stwierdzono, że

dodatek dendrymeru PPI G3 wzmacnia działanie przeciwbakteryjne cyprofloksacyny wobec obu badanych szczepów bakterii *Staphylococcus aureus* oraz *Escherichia coli*. Wraz ze wzrostem stężenia dendrymeru wzrasta aktywność bakteriobójcza leku zarówno wobec bakterii Gram dodatnich jak i Gram ujemnych. Użycie dendrymeru jako uzupełniającego czynnika biobójczego pozwoliło zwiększyć aktywność antybiotyku o 30% dla bakterii *S. aureus* oraz 25% dla bakterii *E. coli* w porównaniu do aktywności leku bez dodatku dendrymeru. Aktywność przeciwbakteryjna spowodowana jest prawdopodobnie destabilizującym wpływem kationowego ładunku zlokalizowanego na powierzchni dendrymeru PPI G3 na anionowe błony badanych szczepów bakterii.

Felczak i współpracownicy [89] przeprowadzili badania nad aktywnością bakteriobójczą niezmodyfikowanego dendrymeru PPI G3 oraz jego pochodnych, w których 25 % oraz 100% powierzchniowych grup aminowych podstawiono maltotriozę. Stwierdzono, że makromolekuły dendrymeru PPI zmodyfikowanego w 25% wykazywały selektywne właściwości bakteriobójcze przeciwko bakteriom gronkowca złocistego, nie wpływając na linię komórek eukariotycznych.

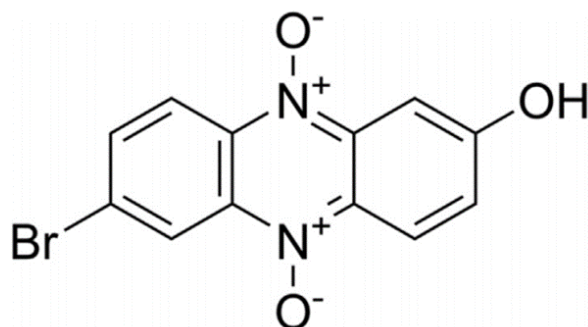
Podobnie Jabelli i współpracownicy [90] analizowali działanie bakteriobójcze dendrymeru polipropylenoiminowego PPI G1 na bakterie występujące w wodzie pitnej czerpanej z obszarów wiejskich w Iranie. Wyniki ich badań wskazują, że dendrymer PPI G1 wywołuje większą aktywność bakteriobójczą wobec bakterii Gram-dodatnich niż Gram-ujemnych.

Wrońska i współpracownicy [91] przeprowadzili badania dendrymeru PPI G2 z amoksycyliną. Jest to jeden z najczęściej stosowanych antybiotyków. Celem ich pracy było porównanie działania bakteriobójczego amoksycykliny przeciwko bakteriom Gram-ujemnych oraz w obecności niezmodyfikowanego oraz zmodyfikowanego resztami maltozy dendrymeru PPI G2. Wyniki badań pokazują, że zarówno niepodstawiony dendrymer PPI G2, jak również glikodendrymer z resztami maltozy wzmacnia działanie antybakteryjne amoksycykliny.

2.2.5. Oddziaływanie dendrymerów z lekami onkologicznymi

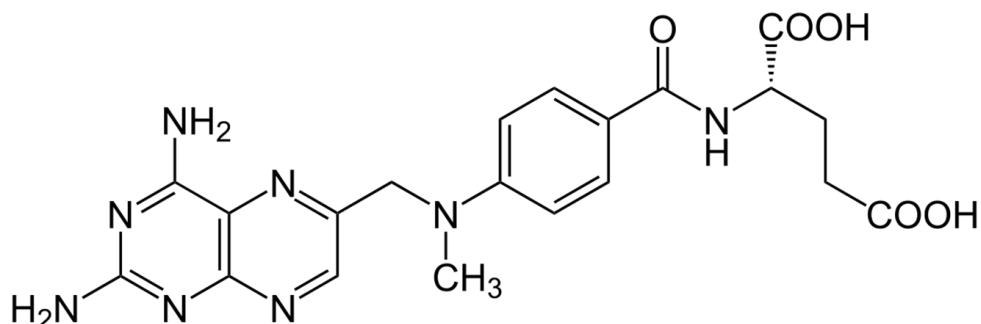
Fenazyne jest związkiem organicznym, który w badaniach *in vitro* wykazuje aktywność przeciwnowotworową. Jednak zbyt mała jej rozpuszczalność w wodzie ogranicza jej biodostępność oraz skuteczność jako leku onkologicznego w warunkach *in vivo*. Prace Dib i współpracowników [92] miały na celu badania oddziaływań dendrymeru PPI G3 z fenazyzną (Rys. 36). Analiza otrzymanych przez autorów wyników [92] pokazuje, że fenazyne może

oddziaływać z dendrymerem PPI G3 poprzez oddziaływania elektrostatyczne, powodując, że przyłączenie fenazyny do dendrymeru zwiększa rozpuszczalność leku 9-krotnie.



Rys. 36. Struktura fenazyny [92].

Kaur i współpracownicy [93] przeprowadzili badania oddziaływań modyfikowanego powierzchniowo resztami kwasu foliowego dendrymeru PPI G4 o rdzeniu etylenodiaminowym (EDA) z metotreksatem (Rys. 37). Kwas foliowy jest wychwytywany przez komórki nowotworowe jako niezbędny związek odżywczy. Dlatego przyłączenie go do powierzchniowych grup dendrymeru pozwala skierować metotreksat bezpośrednio do ludzkich komórek raka piersi *in vitro*, wykazujących znacznie zwiększony wychwyt wewnątrzkomórkowy omawianego nanotransportera z cytostatykiem, zwiększając jego działanie na komórki nowotworowe.

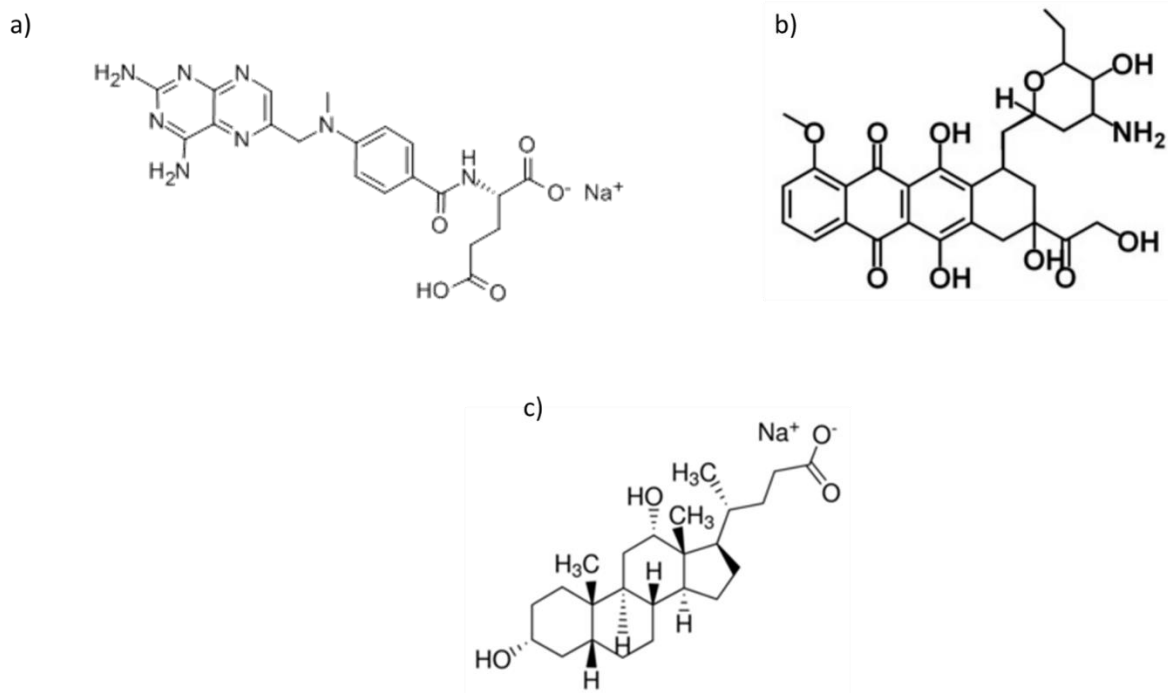


Rys. 37. Struktura metotreksatu.

Przeprowadzone badania biologiczne pokazują prawie 40-krotny wzrost stężenia metotreksatu w wątrobie szczura Wistar po 24 godzinach, jeśli lek podany jest w formie skompleksowanej przez zmodyfikowany resztami kwasu foliowego dendrymer w porównaniu z wolnym (nieskompleksowanym) metotreksatem.

Zespół badawczy pod kierunkiem Wang [94] badał zdolność oddziaływania dendrymeru PPI G3 z dwoma lekami onkologicznymi: metotreksatem sodu (Rys. 38 a), dokсорubicyną

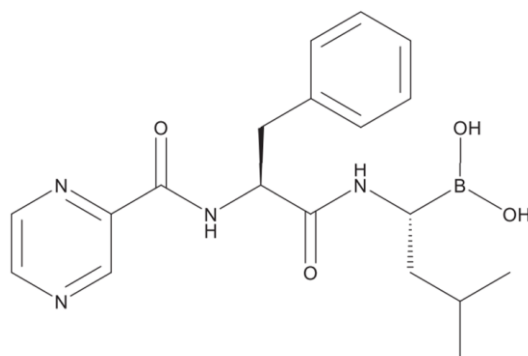
(Rys. 38b) oraz wykorzystywanym w preparatach redukujących tkankę tłuszczową deoksychohanem sodu (Rys. 38c).



Rys. 38. Struktura: a) metotrexatu sodu, b) doxorubicyny, c) deoksychohanu sodu.

Badane leki są związkami amfifilowymi, w strukturze których występują hydrofobowe ugrupowania. Dendrymer PPI G3 zmodyfikowany poprzez acetylację w ponad 84,3% efektywnie wiązał cząsteczki badanych leków. Daje to nadzieję na ograniczenie skutków ubocznych poprzez spowolnione uwalnianie leków w organizmie. Cytotoksyczności obu badanych leków były znacznie niższe, gdy używano leku i acetylowanego dendrymeru PPI G3 zamiast leku bez dodatku tego dendrymeru.

Celem badań przeprowadzonych przez Chaudhary'ego i współpracowników [95] była analiza działania przeciwnowotworowego bortezomibu (Rys. 39) przyłączonego do dendrymeru PPI G4 z rdzeniem etylenodiaminowym.

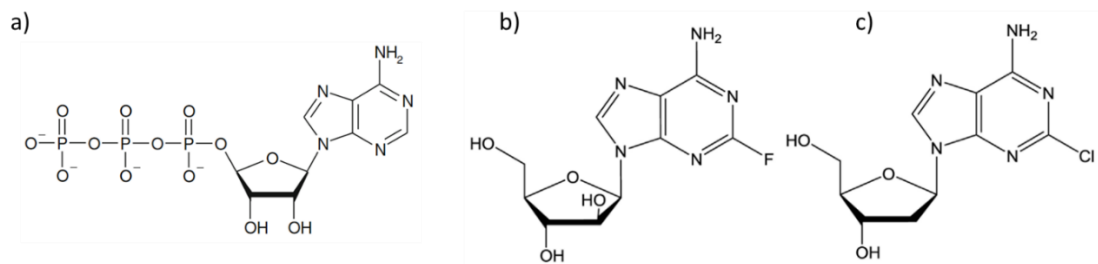


Rys. 39. Struktura bortezomibu [95].

Jednak niska rozpuszczalność tego leku w wodzie ogranicza jego skuteczność terapeutyczną. Przyłączenie bortezomibu do makrocząsteczki dendrymeru PPI G4 powoduje wzrost rozpuszczalności tego leku, zwłaszcza w roztworze o pH=10. Zdaniem autorów obserwowany wzrost rozpuszczalności przy pH=10 może wynikać z oddziaływań hydrofilowych pomiędzy grupą hydroksylową niezjonizowanej cząsteczki leku oraz niesprotonowanymi grupami aminowymi makrocząsteczki dendrymeru PPI G4. W roztworze o pH=7,4 obserwowano niewielki wzrost rozpuszczalności, pomimo protonowania powierzchniowych i części wewnętrznych grup aminowych, gdyż lek był w 86% niezjonizowany. W środowisku kwaśnym (pH=4) obserwuje się silniejszy wzrost rozpuszczalności leku niż w przypadku roztworu o pH=7,4, lecz słabszy niż przy pH=10. Wynika to z oddziaływań jonowych pomiędzy całkowicie sprotonowanymi pierwszo- oraz trzeciorzędowymi grupami aminowymi w makrocząsteczce dendrymeru PPI G4 oraz zjonizowanymi w 60% cząsteczkami leku. Proces kompleksowania PPI G4 przez bortezomib dla założonej stechiometrii oddziaływania 1:1 jest samorzutny ($\Delta G < 0$). Przyłączanie cząsteczek leku do makrocząsteczki PPI G4 jest procesem endotermicznym ($\Delta H > 0$) i zachodzi dzięki korzystnej entropii wiązania ($\Delta S > 0$). Symulacje metodą dokowania molekularnego wskazują na brak wiązań wodorowych pomiędzy makrocząsteczką dendrymeru PPI G4 a cząsteczką bortezomibu. Duże wartości entropii (ΔS) świadczą jednak o oddziaływaniach hydrofobowych oraz hydrofilowych pomiędzy badanymi cząsteczkami.

Gorzkievicz i współautorzy [96] badali oddziaływanie dendrymeru PPI G4 zmodyfikowanego maltozą z cząsteczkami ATP (Rys. 40 a) jako modelową cząsteczką podobną strukturalnie do fludarabiny (Rys. 40 b) oraz kladrybiny (Rys. 40 c). Oba te związki wykazują aktywność przeciwnowotworową. Do badań wykorzystano dendrymer niezmodyfikowany, jak również z częściowo zmodyfikowaną powierzchnią, do której

przyłączono kowalencyjnie 43 reszty maltozy (PPI-Mal G4) lub 45 reszt maltotriozy (PPI-Mal III G4).



Rys. 40. Struktura: a) ATP b) fludarabiny c) kladrybiny [97, 98].

Wyniki badań ITC oraz potencjału Zeta pokazują, że podstawione resztami cukrowymi makrocząsteczki dendrymeru przyłączają samorzutnie mniej cząsteczek ATP niż ich niezmodyfikowane odpowiedniki. Niezmodyfikowany dendrymer wiąże cząsteczki liganda silniej niż zmodyfikowana makromolekuła. Wynika to z mniejszej ilości spotonowanych grup aminowych w podstawionych resztami cukrowymi makrocząsteczkach, które przyłączają elektrostacyjnie anionowe cząsteczki ATP. Egzotermiczna entalpia wiązania ($\Delta H < 0$) wskazuje na przewagę efektów bezpośrednich oddziaływań cząsteczek ATP z makrocząsteczką dendrymeru nad efektami ich częściowej dehydratacji. Efekt ten obserwowany jest zarówno dla niezmodyfikowanego jak i zmodyfikowanego dendrymeru PPI G4. Niekorzystny efekt entropowy ($\Delta S < 0$) wiązania ATP przez niezmodyfikowane jak i zmodyfikowane resztami cukrowymi makrocząsteczki PPI wskazują na uporządkowanie cząsteczek leku przyłączonych do powierzchniowych grup makrocząsteczek PPI.

Szczególnie opornym do leczenia nowotworem jest guz mózgu, co jest spowodowane trudnością leków przeciwnowotworowych do przekraczania bariery krew-mózg. Celem badań Patel'a i współpracowników [99] było opracowanie systemu dostarczania paklitakselu (PTX) wykorzystując częściowo podstawiony resztami tiaminy (witaminy B₁) dendrymer PPI G4 z rdzeniem etylenodiaminowym. Tak zmodyfikowane makrocząsteczki dendrymeru PPI G4 przyłączały więcej cząsteczek paklitakselu w porównaniu z niezmodyfikowanymi cząsteczkami dendrymeru. Badania biodystrybucji pokazują, że paklitaksel przyłączony do zmodyfikowanych tiaminą makrocząsteczek PPI G4 wykazuje zdolność do przekraczania bariery krew-mózg.

Soni i współpracownicy [100] badali oddziaływania zmodyfikowanego resztami mannozy dendrymeru PPI G4 z rdzeniem etylenodiaminowym z chlorowodorkiem gemcytabiny. Związek ten jest powszechnie wykorzystywany głównie w leczeniu raka płuc.

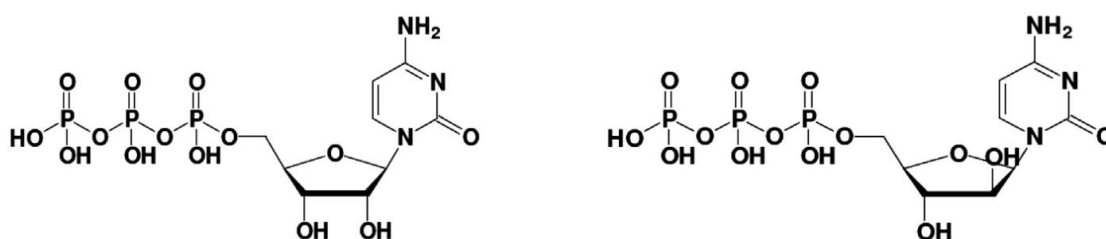
Poprawa biodostępności leku spowodowana była zarówno wydłużeniem okresu jego półtrwania jak również zwiększeniem jego rozpuszczalności. Stwierdzono, że przyłączanie mannozy do powierzchniowych grup w makrocząsteczce dendrymeru PPI G4 powoduje zwiększenie liczby związanych cząsteczek chlorowodoru gemcytabiny. Użycie zmodyfikowanego resztami mannozy dendrymeru PPI G4 powodowało wzrost liczby przyłączonych cząsteczek gemcytabiny w porównaniu z użyciem dendrymeru niezmodyfikowanego. Zdaniem autorów efekt ten wynika z rozszerzenia struktury dendrymeru poprzez przyłączenie cząsteczek mannozy, co tworzy przestrzeń, w której mogą ulec związaniu dodatkowe cząsteczki leku. Zmodyfikowany mannozą dendrymer lepiej stabilizował gemcytabinę niż jego niezmodyfikowany odpowiednik. Stwierdzono, że przyłączona do zmodyfikowanego dendrymeru gemcytabina wykazuje także wyższe powinowactwo do komórek raka płuc przy jednoczesnej niższej toksyczności wobec ludzkich komórek krwi. Czas półtrwania w organizmie gemcytabiny nieskompleksowanej wynosi 1,38 godziny. Przyłączenie leku do niezmodyfikowanego dendrymeru wydłuża czas półtrwania gemcytabiny do 2,36 godziny, natomiast użycie zmodyfikowanego dendrymeru PPI G4 pozwala wydłużyć okres półtrwania do 4,15 godziny.

Baecker i współpracownicy [101] przeprowadzili badania nad aktywnością przeciwnowotworową dendrymerów, w tym dendrymeru PPI G2. Badania przeprowadzone były na komórkach raka piersi. Stwierdzono, że dendrymer PPI G2 wykazuje zależną od stężenia aktywność przeciwko badanym komórkom. Wzrost stężenia dendrymeru PPI G2 powoduje obniżenie aktywności metabolicznej komórek raka piersi.

Celem pracy Szulc i współautorów [97] były badania zmodyfikowanego dendrymeru PPI generacji G4 jako potencjalnego nośnika leków onkologicznych. Powierzchniowe grupy aminowe dendrymeru podstawione były w 50% maltozą (PPI-m G4). Jako modelowe cząsteczki do badań wybrano adenozyno 5'-fosforany (AMP, ADP, ATP). Związki te są analogami fludarabiny, która wykorzystywana jest jako lek przeciwnowotworowy. Stwierdzono, że zmodyfikowany dendrymer PPI G4 efektywnie wiąże cząsteczki ATP, a otrzymany kompleks jest trwały przez przynajmniej 48 godzin. Zdolność do oddziaływania zmodyfikowanych makrocząsteczek dendrymeru PPI G4 z cząsteczkami ATP zależy od stopnia protonowania grup aminowych w cząsteczce makromolekuły. Badania procesu przyłączenia cząsteczek ATP do makrocząsteczek podstawionego resztami maltozy dendrymeru PPI-m G4 przeprowadzono w roztworze o pH kwaśnym, obojętnym oraz zasadowym. Wraz ze wzrostem pH roztworu, w makrocząsteczkach dendrymeru coraz mniej grup aminowych ulega protonowaniu. Skutkuje to mniejszą liczbą przyłączanych cząsteczek

ATP do dendrymeru PPI-m G4. Liczba przyłączonych cząsteczek ATP do makromolekuły PPI-m G4 w dużym stopniu zależy również od obecności jonów sodowych i chlorkowych obecnych w roztworze. Wzrost stężenia soli NaCl osłabia zdolność dendrymeru PPI-m G4 do wiązania cząsteczek ATP. Jony Cl⁻ oraz Na⁺ oddziałują z powierzchniowymi grupami dendrymeru oraz resztami maltozy silniej niż cząsteczki ATP.

Szulc i współpracownicy [102] prowadzili badania zmodyfikowanych powierzchniowo dendrymerów PPI G3 oraz PPI G4 z 5'-fosforanem cytydyny (CTP) (Rys. 41a). Związek ten został wybrany jako modelowa cząsteczka strukturalnie podobna do cytarabiny (Rys. 41 b), która wykorzystywana jest jako lek w leczeniu białaczki. Wybrane do badań dendrymery zostały zmodyfikowane powierzchniowo maltozą (PPI-m) w 30% oraz 100%. Badania techniką izotermicznego miareczkowania kalorymetrycznego (ITC) przeprowadzono w wodzie oraz w 10 mM buforze fosforanowym o pH=7,4 zawierającym dodatkowo 137 mM NaCl oraz 2,7 mM KCl.



Rys. 41. Struktura: a) 5'-fosforanu cytydyny b) cytarabiny [102].

Tabela 5. Stechiometria oraz wielkości termodynamiczne otrzymane techniką ITC dla wybranych dendrymerów oraz 5'-fosforanu cytydyny.

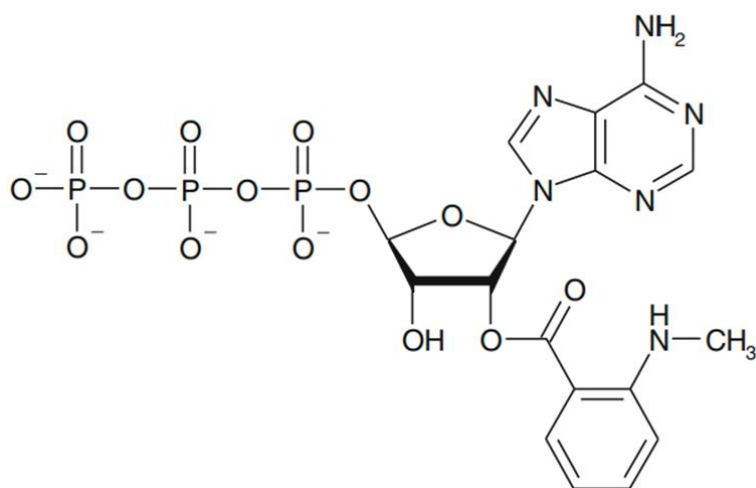
Rozpuszczalnik	Dendrymer	n	K M ⁻¹	ΔH kJ/mol	TΔS kJ/mol	ΔG kJ/mol
Woda	PPI G3	10	19500	-41	-15,51	-24,49
	PPI G4	32	13500	-52	-28,43	-23,57
	PPI-m G4 30%	15	13900	-30	-6,35	-23,65
	PPI-m G4 100%	12	14400	-20	3,73	-23,73
PBS	PPI G4	32*	2400	-45	-25,71	-19,29
	PPI-m G4 30%	32*	1500	-46	-27,87	-18,13
	PPI-m G4 100%	32*	930	-26	-9,06	-16,94

*-założona wartość parametru stechiometrycznego n.

Badania ITC przeprowadzone w wodzie jako rozpuszczalniku (Tabela 5) wskazują, że dendrymer PPI G3 wiąże około 10 cząsteczek 5'-fosforanu cytydyny (CTP). Dendrymer PPI G4 wiąże natomiast około 32 cząsteczek CTP, gdyż w porównaniu z PPI G3 ma więcej grup aminowych. Przyłączenie reszt maltozy do powierzchniowych grup aminowych dendrymerów

PPI obniża zdolność makrocząsteczki do przyłączania cząsteczek CTP, ponieważ zmniejsza ilość kationowych grup aminowych dendrymeru uczestniczących w wiązaniu cząsteczek CTP. Proces kompleksowania zarówno przez niezmodyfikowane jak i zmodyfikowane makrocząsteczki dendrymerów PPI G4 jest samorzutny ($K > 1$) i egzotermiczny. Ujemne wartości entropii wiązania CTP przez niezmodyfikowane dendrymery PPI G3 oraz PPI G4 jak również zmodyfikowany w 30% resztami maltozy dendrymer PPI G4, świadczą o wzroście uporządkowania ulegających przemianie reagentów, co sugeruje powierzchniowe wiązanie cząsteczek liganda (CTP) z makrocząsteczką PPI. Badania ITC przeprowadzone w roztworze buforowym jako rozpuszczalniku pokazują, że zarówno podstawione maltozą jak i niezmodyfikowane dendrymery PPI G4 oddziałują z cząsteczkami CTP stosunkowo słabiej niż w czystej wodzie. Świadczy to o oddziaływaniu jonów mieszaniny buforowej z powierzchniowymi grupami aminowymi badanych dendrymerów. Jednak nawet w środowisku 10 mM buforu fosforanowego (zawierającego 137 mM NaCl i 2,7 mM KCl) dendrymery wiążą CTP samorzutnie ($\Delta G < 0$) pomimo często niekorzystnej entropii wiązania ($\Delta S < 0$).

Szulc i współpracownicy [103] badali również techniką fluorymetryczną oddziaływania dendrymerów PPI G3 i G4, posiadającymi niezmodyfikowane oraz częściowo zmodyfikowane maltozą grupy powierzchniowe z 2'-/3'-O-(N'-metyloantraniolo)-ATP (MANT-ATP) jako modelową cząsteczką wielu leków onkologicznych (Rys. 42).



Rys. 42. Struktura MANT-ATP.

Analiza otrzymanych danych fluorymetrycznych (Tabela 6) wskazuje, że niezmodyfikowane dendrymery PPI G3 i G4 w zasadowym środowisku wiążą cząsteczki MANT-ATP poprzez przyłączenie ich do grup powierzchniowych oraz poprzez enkapsulację

w wewnętrzne jamy. W przypadku zarówno dendrymeru PPI G3 oraz PPI G4 liczba przyłączonych cząsteczek MANT-ATP do powierzchniowych grup aminowych jest większa niż liczba cząsteczek MANT-ATP ulegających enkapsulacji. Dendrymer PPI G4 wiąże więcej cząsteczek MANT-ATP w porównaniu z dendrymerem PPI G3, co związane jest z obecnością większej liczby grup w makrocząsteczce mogących oddziaływać z cząsteczkami liganda. Dendrymery w kwaśnym środowisku przyłączają więcej cząsteczek MANT-ATP niż w roztworze o pH=7,4. W roztworze o pH=4 rośnie liczba sprotonowanych grup aminowych, które mogą elektrostatycznie wiązać anionową cząsteczkę MANT-ATP. Zdaniem autorów zmodyfikowana resztami maltozy makrocząsteczka dendrymeru PPI G3 może przyłączać cząsteczki liganda MANT-ATP powierzchniowo jak i w wewnętrznych jamach, natomiast zmodyfikowany dendrymer PPI G4 może oddziaływać z cząsteczkami tego liganda tylko powierzchniowo ze względu na zbyt gęstą strukturę powierzchni makrocząsteczki, by ligand mógł ulec enkapsulacji.

Tabela 6. Wyznaczone techniką fluorymetryczną parametry wiązania kompleksów PPI G3 oraz PPI G4 z MANT-ATP [k].

rodzaj dendrymeru; pH buforu	PPI G3				PPI G4			
	enkapsulacja		grupy powierzchniowe		enkapsulacja		grupy powierzchniowe	
	n	K [l/mol]	n	K [l/mol]	n	K [l/mol]	n	K [l/mol]
pH 7,4	1,4	$5,95 \cdot 10^5$	10,1	$1,5 \cdot 10^5$	4,4	$1,46 \cdot 10^6$	11,9	$2,66 \cdot 10^5$
pH 5,8	-	-	11,9	$3,39 \cdot 10^5$	-	-	18,6	$4,44 \cdot 10^5$
PPI-m; pH 7,4	1,4	$3,45 \cdot 10^6$	13	$1,1 \cdot 10^5$	-	-	19,1	$2,08 \cdot 10^5$

2.3. Właściwości biologiczne dendrymerów PPI

2.3.1. Oddziaływanie dendrymerów PPI z błonami fosfolipidowymi

Wyniki badań Wróbel i współautorów [104] wskazują, że w środowisku buforu HEPES (pH=7,4) zarówno niepodstawione jak i podstawione maltozą dendrymery PPI G4 oddziałują z obojętnymi liposomami. Dendrymery te oddziałują również z podobnymi ze względu na

ładunek do błon biologicznych, anionowymi liposomami. Wzrost stopnia podstawienia powierzchni dendrymeru PPI G4 resztami maltozy (z 40% do 90%) powoduje silniejsze zaburzenie struktury badanych liposomów ze względu na usztywnienie podstawionej w 90% resztami maltozy makrocząsteczki PPI i jej większy rozmiar oraz ze względu na możliwość tworzenia wiązań wodorowych pomiędzy resztami maltozy i cząsteczkami fosfolipidów. Modyfikowany resztami maltozy dendrymer PPI może oddziaływać z liposomami poprzez wiązania wodorowe niezależnie od ładunku powierzchniowego makrocząsteczki. Obecność dodatkowego elektrolitu (150 mM NaCl) osłabia oddziaływanie makrocząsteczek dendrymerów PPI G4 z badanymi liposomami, co zapewne wynika ze spowodowanego przez sól usztywnienia struktury membrany fosfolipidowej.

2.3.2. Toksyczność dendrymerów PPI i ich pochodnych

Makrocząsteczki dendrymerów wykazują pewną toksyczność własną, którą można obniżać przez podstawienie terminalnych reszt aminowych innymi grupami terminalnymi [105]. Dlatego wiele badań toksyczności tych nanoprzenośników przeprowadzono z użyciem podstawionych dendrymerów PPI. Do oceny toksycznego wpływu związków na układy biologiczne wykorzystuje się między innymi następujące parametry:

- IC_{50} – stężenie hamujące (ang. *inhibitory concentration*), które opisuje średnie stężenie inhibitora (np. dendrymeru) hamujące w 50% funkcje biologiczne i biochemiczne organizmów [106].
- EC_{50} – stężenie efektywne (ang. *effective concentration*), które określa średnie stężenie, indukujące określony efekt (np. działanie hamujące lub stymulujące procesy fizjologiczne) u 50% organizmów doświadczalnych w danych warunkach [106].
- CC_{50} - stężenie cytotoksyczne (ang. *cytotoxic concentration*) - definiowane jako stężenie związku np. wyrażone w $\mu\text{g/ml}$, potrzebne do zmniejszenia żywotności komórek o 50% [107].

Somani i współpracownicy [108] badali wpływ niepodstawionych oraz częściowo podstawionych dendrymerów PPI G2, G3 oraz G4 łańcuchami polietylenoglikolu (PEG) o różnej długości na cytotoksyczność tych makromolekuł oraz ich zdolność do kondensacji nici DNA. Badania *in vivo* przeprowadzone na linii komórkowej nowotworu płuc B16f10-luc pokazują, że przyłączenie łańcuchów PEG do powierzchniowych grup makrocząsteczek dendrymerów PPI G2, G3 oraz G4 powoduje wzrost współczynnika IC_{50} (Tabela 7), czyli

obniża cytotoksyczność tak zmodyfikowanych makromolekuł. Przyłączenie coraz dłuższych łańcuchów PEG (o masie molekularnej od 2 kD do 10 kD) do powierzchni dendrymerów utrudnia kondensację DNA, zwłaszcza przy niższych stosunkach wagowych dendrymeru do DNA.

Tabela 7. Wartości stężenia IC₅₀ dendrymerów PPI oraz ich pochodnych wyznaczone dla linii B16F10-luc [108].

IC ₅₀ [µg/ml]				
Dendrymer	Niezmodyfikowany	PEG-2K	PEG-5K	PEG-10K
PPI G2	33,84 ± 2,13	>180	>180	>180
PPI G3	16,34 ± 0,51	55 ± 1,70	40,96 ± 1,18	>60
PPI G4	6,04 ± 0,21	22,97 ± 0,67	21,65 ± 0,41	55,05 ± 2,39

Agashe i współpracownicy [109] badali toksyczność pochodnych dendrymeru PPI G4 z rdzeniem etylenodiaminowym, którego powierzchniowe grupy aminowe zostały podstawione odpowiednio glicyną (DBG), fenyloalaniną (DBPA), mannozą (M-PPI) oraz laktozą (L-PPI). Badania cytotoksyczności przeprowadzone były na liniach komórkowych nerki małpy zielonej (COS-7) oraz ludzkich komórkach raka wątroby (HepG2). Wyznaczone wartości stężenia cytotoksycznego CC₅₀ dla niezmodyfikowanego dendrymeru PPI G4 oraz jego zmodyfikowanych odpowiedników przedstawiono w Tabeli 8.

Tabela 8. Wartości stężenia CC₅₀ dendrymerów PPI i ich pochodnych wyznaczone dla wybranych typów linii komórkowych [109].

CC ₅₀ [µg/ml]					
Linie komórkowe	PPI G4	DBG	DBPA	M-PPI	L-PPI
HepG2	0,58	55,53	61,5	23,5	61,9
COS-7	0,62	57,4	72,1	24,6	58,9

Cytotoksyczność i hemolityczność dendrymeru PPI G4 wynika z obecności powierzchniowych, dodatnio naładowanych grup aminowych. Zarówno wzrost stężenia tego dendrymeru (z 0,001 mg/ml do 1 mg/ml) jak i wydłużenie czasu inkubacji (z 24 h do 72 h) powoduje zmniejszenie przeżywalności małych komórek nerki (COS-7) i ludzkich komórek raka wątroby (HepG2) [109]. Cytotoksyczność zmodyfikowanych powierzchniowo

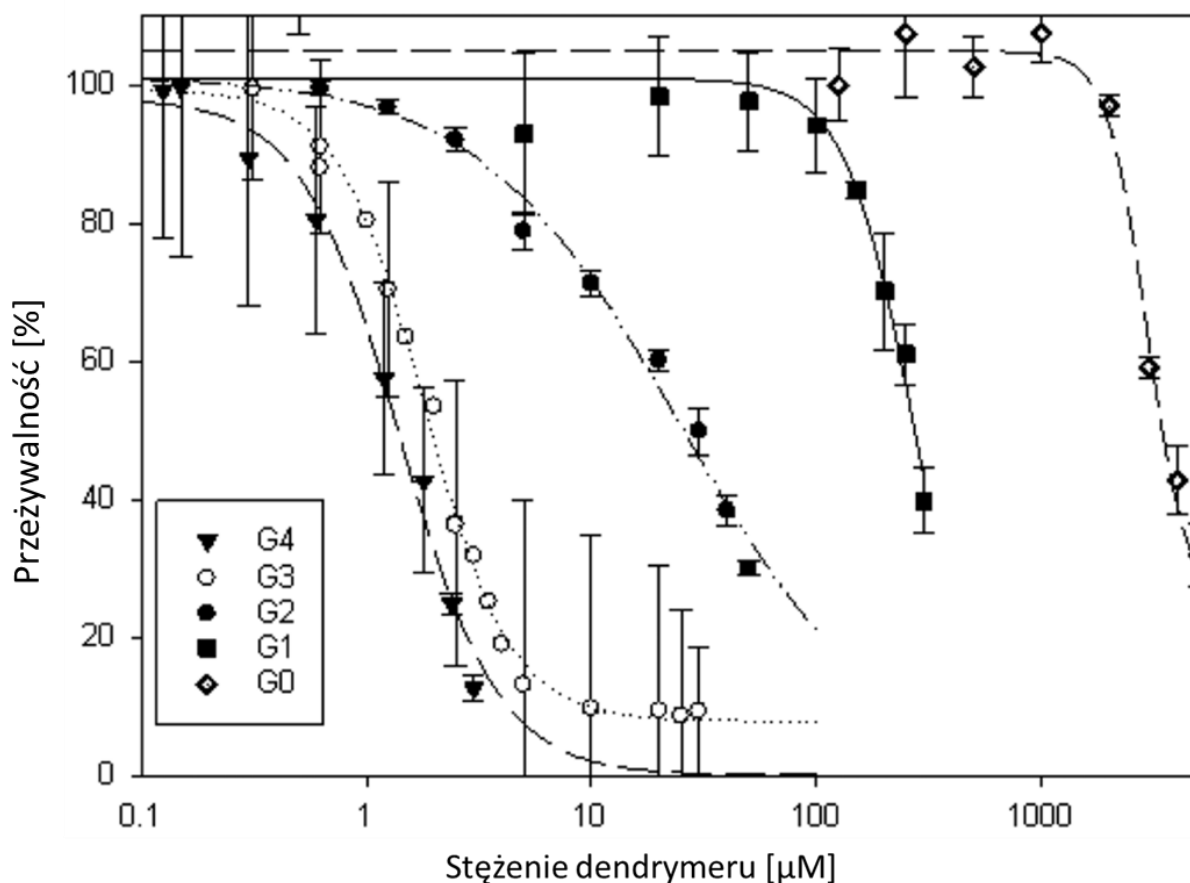
dendrymerów PPI G4 nie zmieniała się w granicach niepewności pomiarowych przy wzroście stężenia dendrymeru i zwiększeniu czasu inkubacji, co świadczy o wzroście biokompatybilności modyfikowanych pochodnych dendrymeru PPI G4 w porównaniu z niezmodyfikowanym dendrymerem PPI G4.

Janaszewska i współautorzy [110] przeprowadzili badania cytotoksyczności niezmodyfikowanego dendrymeru PPI G3 oraz pochodnych, w których 25 % (PPI-25%*m3G3*) oraz 100% (PPI-100%*m3G3*) powierzchniowych grup aminowych zostało podstawionych maltotriozą. Badania przeprowadzono na liniach komórkowych jajnika ludzkiego (SKOV3) oraz jajnika chomika chińskiego (CHO). Stwierdzono, że niepodstawiony dendrymer PPI G3 wykazuje większą cytotoksyczność niż jego podstawione powierzchniowo odpowiedniki (Tabela 9). Efekt ten przypisano mniejszej liczbie kationowych grup w podstawionych resztami maltotriozy makrocząsteczkach PPI G3. Dendrymer PPI G3 może przyczyniać się do wewnątrzkomórkowej produkcji reaktywnej formy tlenu (ROS), co pobudza komórkę do apoptozy. Modyfikacja dendrymeru PPI G3 obniża produkcję ROS w komórkach linii CHO i SKVO3. Stwierdzono również, że niezmodyfikowany dendrymer PPI G3 obniża potencjał membrany mitochondrium, co sprzyja produkcji reaktywnej formy tlenu.

Tabela 9. Wartości stężenia IC₅₀ niezmodyfikowanego dendrymeru oraz jego pochodnych wyznaczone dla wybranych linii komórkowych [110].

IC ₅₀ [μM]		
Dendrymer	CHO	SKVO3
PPI G3	7,79	14,70
PPI-25% <i>m3G3</i>	>300	100,00
PPI-100% <i>m3G3</i>	>300	144,60

Badania toksyczności dendrymerów PPI G0-G4 na ludzkich komórkach keratynocytów (HaCaT) przeprowadzone przez zespół pod kierunkiem Khalida [111] wskazują, że wraz ze wzrostem generacji dendrymeru PPI maleje stężenie efektywne EC₅₀, czyli wzrasta cytotoksyczność dendrymeru (Rys. 43, Tabela 10).



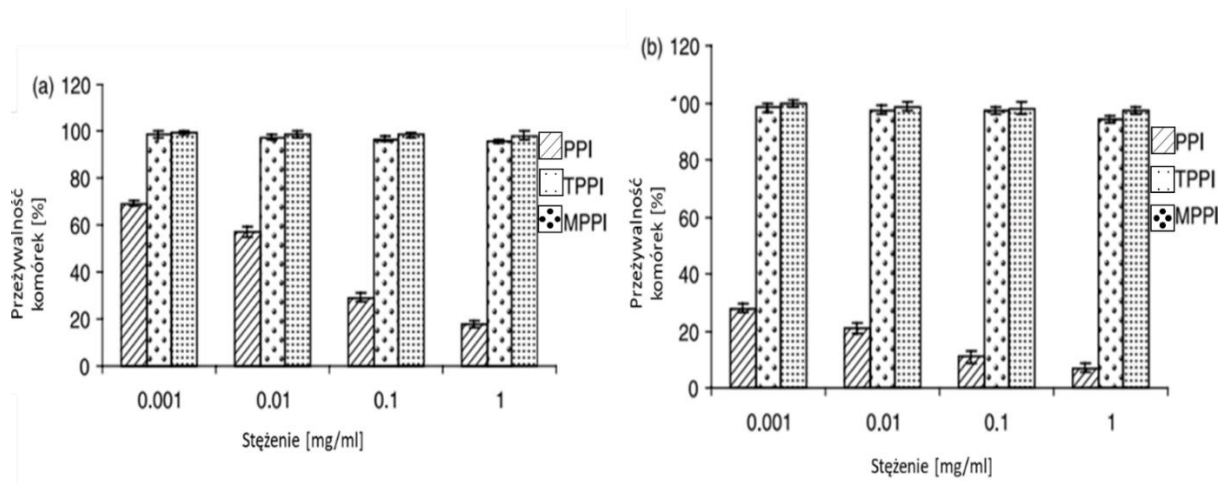
Rys. 43. Zależność przeżywalności linii komórkowych HaCaT od stężenia dendrymeru [111].

Dla wyznaczonych stężeń efektywnych EC_{50} poszczególnych dendrymerów przeprowadzono testy stresu oksydacyjnego (Tabela 4). Stwierdzono, że im wyższa generacja dendrymeru PPI oraz czym dłuższy czas inkubacji, tym intensywniejsza produkcja reaktywnej formy tlenu w komórkach linii HaCaT.

Tabela 10. Wartości stężenie efektywnego EC_{50} dendrymerów PPI G0-G4 wyznaczone dla linii HaCaT [111].

Dendrymer PPI	EC_{50} [μM]
G0	2939,72
G1	271,04
G2	24,8
G3	1,81
G4	1,41

Zespół pod kierunkiem Dutt'ego [112] badał wpływ dendrymeru PPI G4 z rdzeniem etylenodiaminowym na wiązanie stosowanego w terapii AIDS leku, efawirenzenu z ludzkimi monocytami i makrofagami (Mo/Mac). Monocyty i makrofagi są to specyficzne komórki układu fagocytarnego, które w czasie choroby wchłaniają (do swojego wnętrza) cząsteczki m.in. wirusa niedoboru odporności HIV. Do badań wybrano dendrymer PPI G4 oraz jego dwie pochodne, w których grupy aminowe zostały postawione resztami t-Boc glicyny (TPPI G4) oraz mannozy (MPPI G4). Badania cytotoksyczności wykonane na ludzkich liniach komórkowych wątroby HepG2 wskazują, że zmodyfikowane makrocząsteczki dendrymeru PPI G4 wykazywały znacznie niższą cytotoksyczność w porównaniu z niezmodyfikowanym dendrymerem PPI G4. Cytotoksyczność niezmodyfikowanego dendrymeru PPI G4 rosła, zarówno wraz ze wzrostem jego stężenia, jak i podczas wydłużeniu czasu inkubacji (Rys. 44). Zależność ta nie była obserwowana dla zmodyfikowanych dendrymerów TPPI G4 oraz MPPI G4.



Rys. 44. Cytotoksyczność dendrymerów PPI G4, TPPI G4 oraz MPPI G4 dla linii HepG2 wyznaczona po a) 24 godzinach, b) 48 godzinach [112].

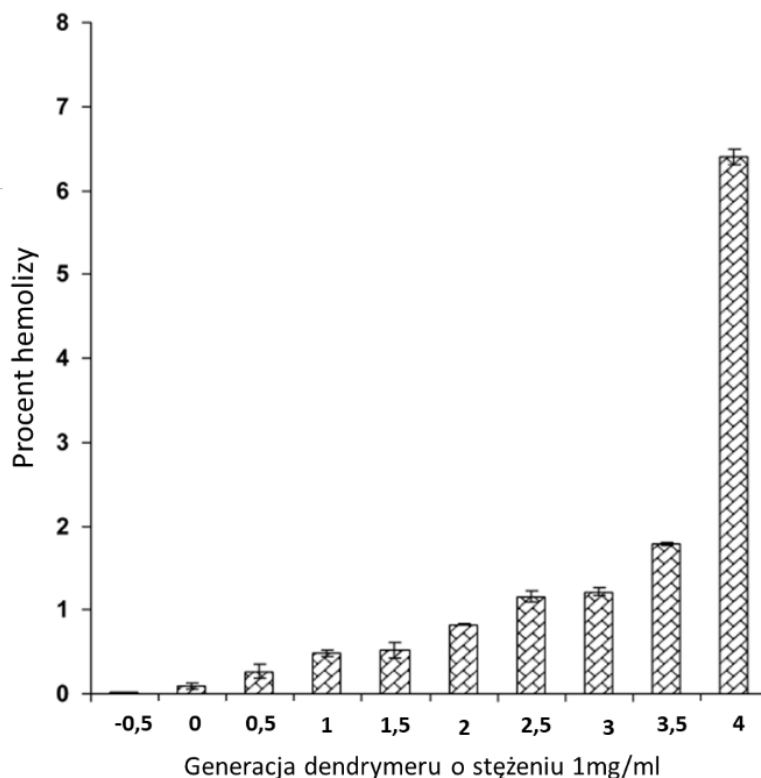
Cytotoksyczność niepodstawionych dendrymerów PPI zarówno z rdzeniem etylenodiaminowym (EDA) jak i diaminobutanowym (DAB) zależy od generacji badanych makrocząsteczek oraz od użytych do badań linii komórkowych. Wyrażone w jednostkach stężenia molowego wartości różnych parametrów opisujących toksyczność niepodstawionych dendrymerów PPI względem wybranych linii komórkowych zebrano w Tabeli 11.

Tabela 11. Parametry opisujące toksyczność niepodstawionych dendrymerów PPI wyznaczone dla wybranych linii komórkowych.

Parametr	IC ₅₀ [μM]				CC ₅₀ [μM]		EC ₅₀ [μM]	
	B16F10-luc	CHO	SKVO3	A431	HepG2	COS-7	HaCaT	Chlamydomonas reinhardtii
PPI G0 (DAB)	-	-	-	695,10 ^c	-	-	2939,72 ^e	
PPI G1 (DAB)	-	-	-	452,85 ^c	-	-	271,04 ^e	0,590 ^f
PPI G2 (DAB)	20,06 ^a	-	-	23,12 ^c	-	-	24,8 ^e	
PPI G3 (DAB)	4,65 ^a	7,79 ^b	14,70 ^b	1,62 ^c	-	-	1,81 ^e	0,208 ^f
PPI G4 (DAB)	0,84^a	-	-	0,70^c	-	-	1,41^e	0,167^f
PPI G4 (EDA)	-				0,081 ^d	0,087 ^d	-	

Literatura: ^a[108], ^b[110], ^c[113], ^d[109], ^e[111], ^f[114].

Mishra i Jain [115] przeprowadzili badania toksykologiczne odpowiednio niepodstawionych dendrymerów PPI generacji ułamkowych, czyli zakończonymi grupami nitrylowymi (-CN) oraz generacji całkowitych, czyli zakończonych grupami aminowymi (-NH₂). Zbadano wpływ makrocząsteczek PPI generacji od -0,5 do 4 na ludzkie erytrocyty, które poddane były działaniu dendrymerów PPI o stałym stężeniu 1 mg/ml. Wyniki badań pokazują, że wraz ze wzrostem generacji dendrymerów PPI erytrocyty ulegały silniejszemu odkształceniu w porównaniu z erytrocytami niepoddanymi działaniu dendrymeru. Wyniki badań (Rys. 45) wskazują, że wraz ze wzrostem generacji dendrymeru rozłożeniu (hemolizie) ulega coraz więcej czerwonych krwinek.



Rys. 45. Procent hemolizy wywołanej roztworami dendrymerów PPI o stałym stężeniu 1mg/ml [115].

Ziomba i współautorzy [116] badali wpływ dendrymeru PPI G3 oraz jego pochodnych na krwinki czerwone oraz limfocyty. Do badań wybrano niezmodyfikowaną makrocząsteczkę dendrymeru PPI G3 oraz jej dwie pochodne, w których aminowe grupy powierzchniowe zostały podstawione w 35% (PPI-G3-OS) oraz 90% (PPI-G3-DS) maltotriozą. Stwierdzono, że zarówno niezmodyfikowany dendrymer PPI G3 oraz jego pochodne wywołują rozpad czerwonych krwinek. Jednak efekt hemolityczny jest mniejszy dla zmodyfikowanego maltotriożą dendrymeru PPI G3 w porównaniu z niezmodyfikowanym dendrymerem PPI G3. Stopień hemolizy rośnie wraz ze wzrostem stężenia dendrymerów oraz przy wydłużeniu czasu inkubacji. Badania wykazały również, że niezmodyfikowany dendrymer PPI G3 hamował proliferację limfocytów w całym zakresie badanych stężeń (od 0,008 mg/ml do 1 mg/ml). Modyfikowane maltotriożą dendrymery PPI nie wywierały wpływu na proliferację limfocytów, z wyjątkiem dendrymeru PPI G3-OS o najwyższym badanym stężeniu 1 mg/ml. Zmodyfikowanie makrocząsteczki dendrymeru PPI G3 poprzez przyłączenie reszt maltotriozy powoduje zmniejszenie działań niepożądanych, wywoływanych przez niezmodyfikowaną makrocząsteczkę.

Kumar i współpracownicy [117] badali toksyczość hemolityczną kompleksu modyfikowanego dendrymeru PPI G4 z rdzeniem etylenodiaminowym i rifampicyny (RIF). Rifampicyna jest lekiem stosowanym w leczeniu gruźlicy. Do badań zsyntezowano dendrymer PPI G4, w którym 31 powierzchniowych grup aminowych zostało podstawionych resztami mannozy. Podstawiony mannozą dendrymer PPI G4 wykazywał niższą aktywność hemolityczną, równą $2,2 \pm 0,8\%$, w porównaniu z niepodstawionym dendrymerem PPI G4, którego aktywność hemolityczna wynosiła $15,6 \pm 3,7\%$. Rifampicyna również wpływa toksycznie na komórki krwi ze stopniem hemolizy równym $9,8 \pm 1,2 \%$. Przyłączenie cząsteczek rifampicyny do powierzchniowych grup modyfikowanego mannozą dendrymeru PPI G4 dodatkowo obniża stopień hemolizy tak związanego leku do $6,5 \pm 1,5 \%$.

2.3.3. Dendrymery jako niewirusowe nośniki materiału genetycznego

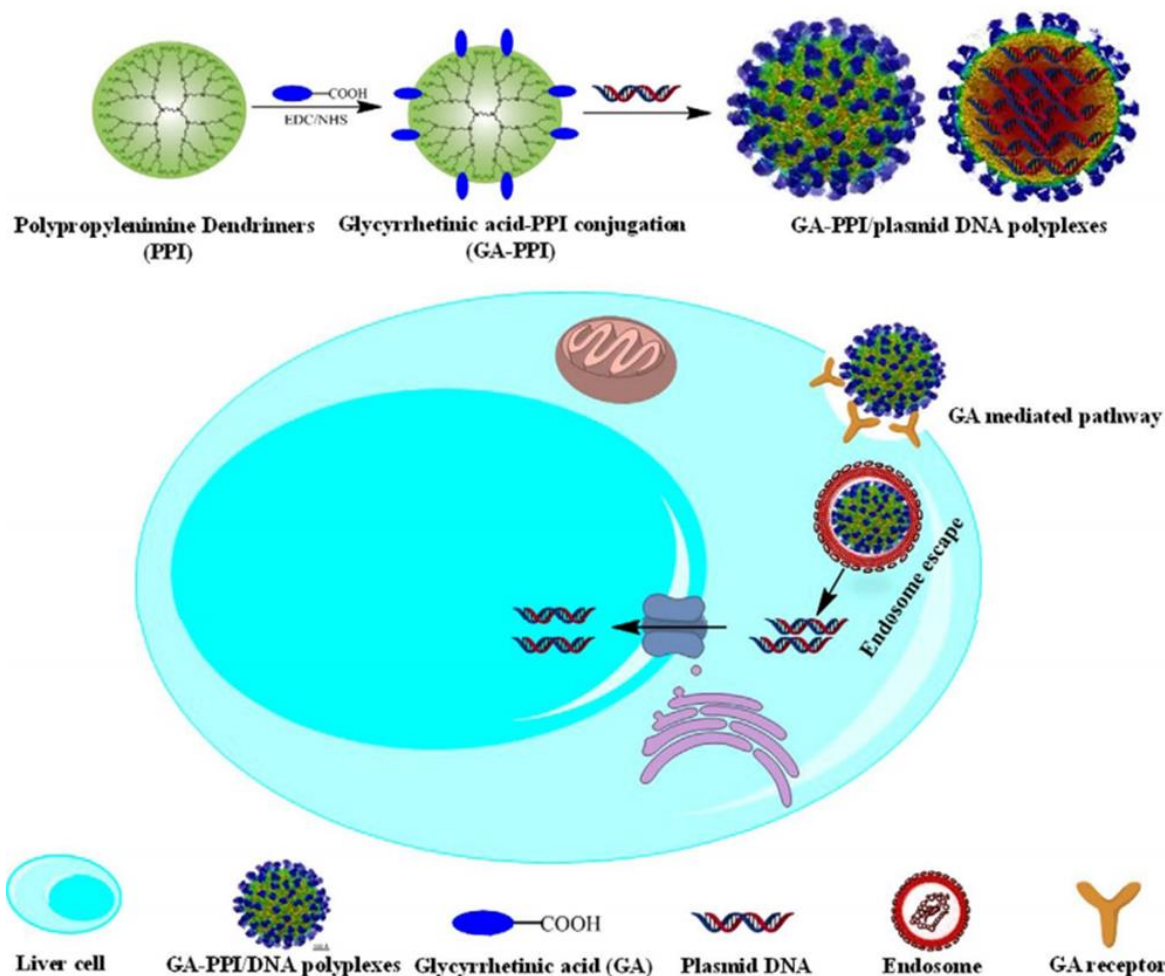
Parametrami wykazującymi silny wpływ na zdolność makrocząsteczek PPI do wiązania kwasów nukleinowych jest zarówno ich ładunek powierzchniowy jak i rozmiar. Dodatkowo naładowane grupy aminowe makrocząsteczek dendrymerów PPI w roztworach wodnych mogą oddziaływać elektrostatycznie z ujemnie naładowaną membraną komórkową oraz resztami fosforanowymi kwasów nukleinowych. Jednak zbyt wysoki dodatni ładunek na powierzchni makrocząsteczek dendrymerów wywołuje silny efekt cytotoksyczny. Podstawienie niektórych powierzchniowych grup aminowych w makrocząsteczce dendrymeru PPI pozwala obniżyć ich cytotoksyczość z jednoczesnym zachowaniem zdolności do oddziaływania z ujemnie naładowaną błoną komórkową i nicią kwasu nukleinowego.

Malaekheh-Nikouei i współpracownicy [118] badali aktywność zmodyfikowanych deksametazonem w 5%, 10% oraz 20% dendrymerów PPI G3 oraz PPI G4 jako niewirusowych nośników materiału genetycznego. Przyłączenie cząsteczek deksametazonu do 5-20% powierzchniowych grup dendrymerów PPI G3 oraz G4 nie wpływa znacząco na ich rozmiar oraz ładunek powierzchniowy. Ocenę skuteczności transfekcji przeprowadzono dla kompleksów wybranych dendrymerów z przenoszonym plazmowym DNA (pDNA). Wzrost stosunku masowego modyfikowanego dendrymeru do pDNA obniżał zdolność cząsteczek dendrymeru PPI G3 do przenoszenia nici pDNA. Niezmodyfikowany dendrymer PPI G4 wykazywał lepszą zdolność do transfekcji w porównaniu z jego podstawionym deksametazonem odpowiednikiem.

Celem badań Liu i współautorów [119] była analiza wpływu fluorowania powierzchni dendrymerów na ich skuteczność do transfekcji. Do badań wybrano zarówno

niezmodyfikowane jak i zmodyfikowane kwasem heptafluoromasłowym (F₇) dendrymery PPI G2-G4. Wyniki badań elektroforetycznych pokazują, że niezmodyfikowane oraz fluorowane dendrymery G3-F₇₉, G3-F₇₁₆ oraz G5-F₇₂₆ wykazują podobną zdolność do kondensacji nici DNA. Do badań *in vitro* nad skutecznością transfekcji zmodyfikowanych dendrymerów PPI wybrano ludzkie linie komórek embrionalnych nerki (HEK-293) oraz raka szyjki macicy (HeLa). Modyfikowane dendrymery G3-F₇₉, G4-F₇₁₆, G4-F₇₂₀, G5-F₇₂₆ oraz G5-F₃₅ wykazywały lepszą skuteczność transfekcji względem linii HEK-293 w porównaniu z niepodstawionymi makrocząsteczkami PPI. Skuteczność transfekcji poprzez użycie zmodyfikowanych dendrymerów PPI wzrosła do ponad 80% w porównaniu z niezmodyfikowanymi makrocząsteczkami PPI, których zdolność do przenoszenia nici DNA była niższa niż 5%. Pochodne dendrymerów PPI G2, G3 oraz G4 powodowały wzrost skurczoności przenoszonej nici DNA. Spośród badanych makrocząsteczek największą poprawę transfekcji (wzrost wydajności do 78,5 %) dla linii komórkowych HeLa wykazywał zmodyfikowany dendrymer PPI G3, którego 20 powierzchniowych grup aminowych zostało podstawione kwasem heptafluoromasłowym. Badania cytotoksyczności fluorowanych dendrymerów pokazują, że po transfekcji przetrwało około 90% komórek, co świadczy o wysokiej skuteczności użytych fluorowanych dendrymerów do przenoszenia materiału genetycznego oraz znikomym wpływie na przeżywalność transfekowanych komórek.

Cong i współpracownicy [120] badali podstawiony (od 0,9 do 32%) kwasem glicyretynowym (GA) dendrymer PPI G3 jako nośnik materiału genetycznego. Przyłączenie kwasu GA do makrocząsteczki dendrymeru pomaga skierować przyłączoną nić DNA bezpośrednio do komórek wątroby. Jednak zbyt wysoki poziom podstawienia powierzchniowych grup aminowych dendrymerów PPI może osłabić ich zdolność oddziaływania z ujemnie naładowaną membraną komórkową. Przyłączenie reszt kwasu GA do makrocząsteczek dendrymeru (GA-PPI G3) ułatwia skierowanie kompleksu dendrymer-DNA w zmienione nowotworowo komórki wątroby (Rys. 46). Wyniki badań pokazują, że dendrymerem najstabilniej kompleksującym nici DNA oraz dodatkowo wykazującym najlepszą rozpuszczalność jest dendrymer PPI G3 podstawiony w 6,31% resztami kwasu glicyretynowego.



Rys. 46. Schemat przenoszenia nici DNA do wnętrza komórki wątroby poprzez użycie modyfikowanego dendrymeru GA-PPI G3 [120].

2.3.4. Wybrane przykłady zastosowań dendrymerów PPI w przemyśle

Mehrparvar i współpracownicy [121] zsyntezowali hybrydę chitosanu i dendrymeru PPI G1 z rdzeniem etylenodiaminowym (biomordant) jako środek ułatwiający farbowanie wełny koszeliną. Połączenie to było badane między innymi pod względem intensywności barwienia oraz trwałości koloru. Chitosan jest związkiem wykazującym wysoką zdolność barwienia, aktywność przeciwdrobnoustrojową oraz uodparnia tekstylia przed kurczliwością. Wyniki badań wchłaniania barwnika wskazują na większą zdolność wchłaniania kwasu karminowego – głównego barwnika koszeliny pod wpływem chitosanu przyłączonego do makrocząsteczki dendrymeru PPI G2. Związane jest to zapewne ze wzrostem liczby grup aminowych na powierzchni wełny, które umożliwiają przyłączenie większej liczby cząsteczek koszeliny. Zastosowanie hybrydy chitosanu i dendrymeru PPI G2 zwiększa również oddziaływanie

barwnika z łańcuchami białkowymi wełny poprzez tworzenie dodatkowych par (mostków) jonowych oraz wiązań wodorowych, co poprawia właściwości barwienia.

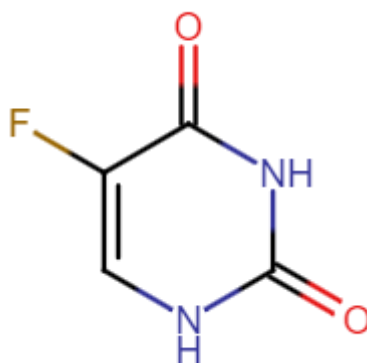
Abkenar i współpracownicy [122] badali zdolność tkanin bawełnianych modyfikowanych dendrymerami PPI G1 oraz G4 do adsorbowania barwników z roztworów wodnych. Jako modelowe cząsteczki barwników użyto Direct Red 80 (DR80), Disperse Yellow 42 (DY42) oraz Basic Blue 9 (BB9) o odpowiednio anionowym, obojętnym oraz kationowym charakterze. Stwierdzono, że bawełna z przyłączonymi dendrymerami PPI G4 oraz PPI G1 posiada lepszą zdolność do adsorbowania cząsteczek barwnika w porównaniu z niemodyfikowaną bawełną.

Hayati i współpracownicy [123] badali zdolność dendrymeru PPI G1 do usuwania barwników Direct Red 80 (DR80) oraz Acid Green 25 (AG25) z roztworów wodnych. Oba związki są stosowane do bezpośredniego barwienia bawełny, jednak stwierdzono, że są one mutagenne i rakotwórcze. Z tego względu tak ważne jest znalezienie odpowiedniego sposobu szybkiego usuwania ich między innymi z wód ściekowych. Największą zdolność do przyłączania obu cząsteczek barwników posiada dendrymer PPI G1 w roztworach o niskim pH. Związane jest to z oddziaływaniem elektrostatycznym pomiędzy sprotonowanymi grupami aminowymi na powierzchni dendrymeru oraz anionowymi cząsteczkami wiązanych barwników. Dendrymer PPI G1 może zostać użyty jako adsorbent do usuwania barwników, np. z pofabrycznych ścieków.

2.4. Badane substancje

2.4.1. 5-Fluorouracyl

5-Fluorouracyl (5-FU) (Rys. 47, Tabela 12) pod względem chemicznym jest to pochodna uracylu, w której grupa metylenowa w pozycji 5 została podstawiona atomem fluoru [124]. Związek ten będący antymetabolitem pirymidyny znalazł zastosowanie jako lek przeciwnowotworowy [125, 126] Wykorzystywany jest głównie w leczeniu raka jelita grubego, skóry, piersi oraz szyi i głowy [127-132]. Tylko od 1 % do 3% dawki podanego 5-fluorouracylu uczestniczy w działaniu cytotoksycznym na komórki nowotworowe, hamując syntezę nici DNA oraz przetwarzanie i prawidłowe funkcjonowanie RNA [133].



Rys. 47. Struktura 5-fluorouracylu.

Tabela 12. Wybrane właściwości fizykochemiczne 5-fluorouracylu.

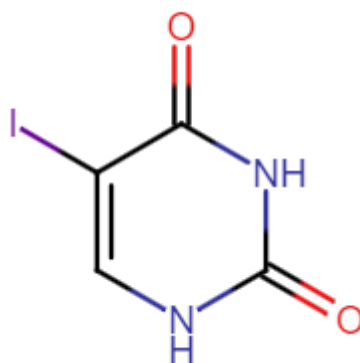
Wzór sumaryczny	C ₄ H ₃ FN ₂ O ₂
Masa molowa [g mol ⁻¹]	130,08
λ _{max} [nm]	266 ^{ab}
ε _{max} [M ⁻¹ cm ⁻¹]	6920 ^a
LogP	-0,66 ^c
pKa	7,76 ^c
Polaryzowalność Å ³	9,46 ^c

Literatura: ^a[134], ^b[135], ^c[136].

5-Fluorouracyl może jednak powodować wiele działań niepożądanych, np. biegunkę, zapalenie błon śluzowych, ból i zawroty głowy oraz drgawki [132, 137, 138]. Cząsteczka 5-fluorouracylu jest polarna i wykazuje kwasowy charakter (Tabela 12).

2.4.2. 5-Jodouracyl

Pod względem chemicznym cząsteczka 5-jodouracylu (5-IU) (Rys. 48, Tabela 13) jest pochodną uracylu, w której grupa metylenowa w pozycji 5 została podstawiona atomem jodu. Halogenowe analogi uracylu stanowią klasę związków, które znalazły wiele zastosowań biologicznych, między innymi jako leki przeciwnowotworowe, przeciwwirusowe oraz przeciwbakteryjne [139-141]. 5-Jodouracyl (5-IU) jest jednym z ważniejszych półproduktów stosowanych do produkcji leków przeciwnowotworowych. Właściwości przeciwnowotworowe 5-jodouracylu można zwiększyć kompleksując go jonami metali. Badania in vivo przeprowadzone na myszach wskazują na aktywność przeciwnowotworową kompleksu 5-IU z chromem (III) lub żelazem (III) [142].



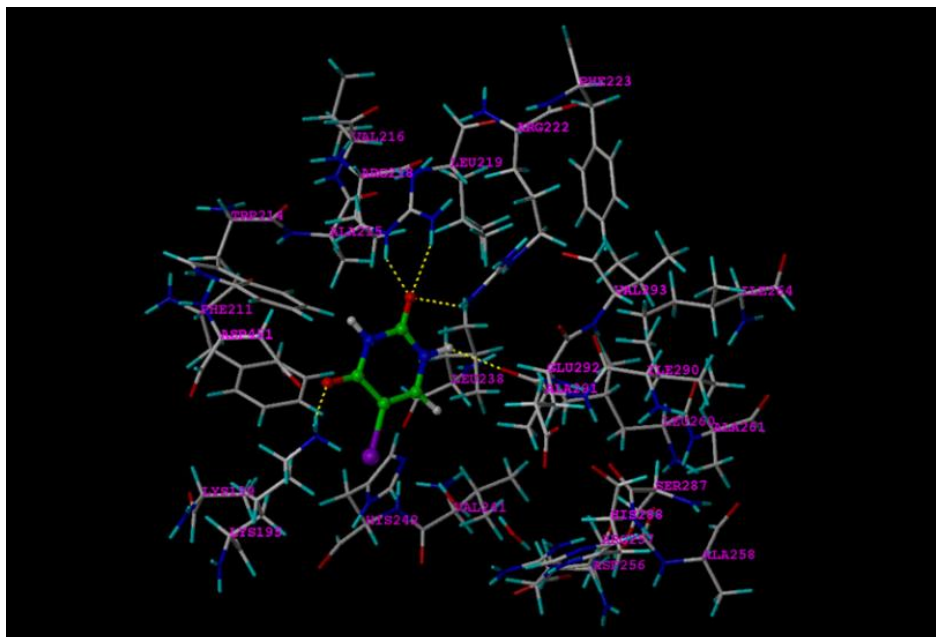
Rys. 48. Struktura 5-jodouracylu.

Tabela 13. Wybrane właściwości fizykochemiczne 5-jodouracylu.

Wzór sumaryczny	C ₄ H ₃ IN ₂ O ₂
Masa molowa [g mol ⁻¹]	237,98
λ _{max} [nm]	283 ^a
ε _{max} [M ⁻¹ cm ⁻¹]	6368, 6070 ^a
LogP	0,13 ^b
pKa	8,14 ^b
Polaryzowalność Å ³	14,65 ^b

Literatura: ^a[143], ^b[136]

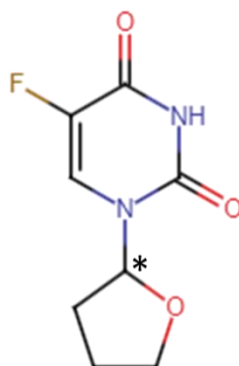
Związek ten działa również owodobójczo na *Drosophila melanogaster* poprzez hamowanie składania jaj przez owada. Dodatkowo wykazuje działanie mutagenne względem bakteriofaga typu T4 [144, 145]. Badania fluorescencyjne i obliczenia metodą modelowania molekularnego wskazują na termodynamicznie samorzutne ($\Delta G^\circ < 0$) tworzenie wiązań wodorowych 5-jodouracylu z albuminą (Rys. 49) w buforowanym (pH 7,4) środowisku wodnym [146].



Rys. 49. Obliczona technika modelowania molekularnego struktura 5-jodouracylu związanego przez miejsce aktywne w makromolekule albuminy [146].

2.4.3. Tegafur

Tegafur (Ftorafur, 5-Fluoro-1-(tetrahydro-2-furyl)uracyl) pod względem chemicznym jest pochodną 5-fluorouracylu, w którym w pozycji N1 podstawiony jest alifatyczny pierścień tetrahydrofuranu (Rys. 50, Tabela 14). Bioaktywacja tegafuru do 5-fluorouracylu zachodzi głównie w wątrobie za pośrednictwem cytochromu P-450. Tegafur ulega hydroksylacji w pozycji 5' pierścienia furanowego do 5'-hydroksytegafuru. Otrzymany związek jest niestabilny i ulega samorzutnemu przekształceniu do 5-fluorouracylu (Rys. 51) [147].

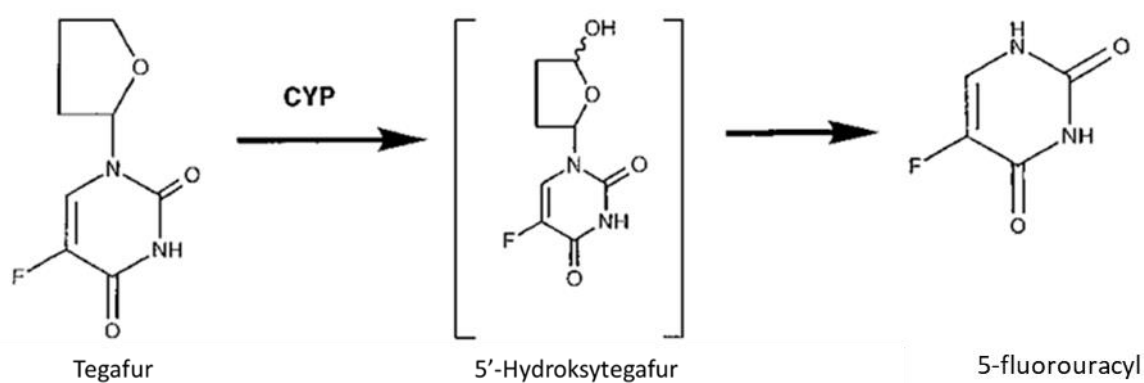


Rys. 50. Struktura tegafuru. Asymetryczny atom węgla oznaczono symbolem *.

Tabela 14. Właściwości fizykochemiczne tegafuru

Wzór sumaryczny	C ₈ H ₉ FN ₂ O ₃
Masa molowa [g mol ⁻¹]	200.17
λ _{max} [nm]	272 ^a , 271 ^b
ε _{max} [M ⁻¹ cm ⁻¹]	8500
LogP	0,024 ^c
pKa	8,08 ^c
Polaryzowalność Å ³	17.52 ^c

Literatura: ^a[148], ^b[149], ^c[136]

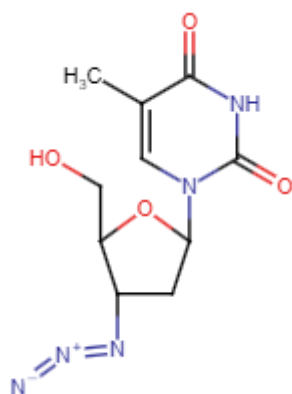


Rys. 51. Bioaktywacja tegafuru do 5-fluorouracylu [147].

Tegafur w swojej strukturze posiada asymetryczny atom węgla w pozycji 2' w pierścieniu tetrahydrofuranu. W medycynie tegafur wykorzystywany jest w postaci mieszaniny racemicznej dwóch enancjomerów (R- oraz S-) [150, 151]. Tegafur jest lekiem przeciwnowotworowym stosowanym w leczeniu raka żołądka, szyi, jelita grubego oraz raka szyjki macicy [152-157]. W porównaniu do 5-fluorouracylu tegafur jest związkiem bardziej hydrofobowym, co spowodowane jest obecnością podstawnika tetrahydrofuranu [158]. Podobnie jak 5-fluorouracyl tegafur wykazuje słabe właściwości kwasowe (Tabela 14).

2.4.4. Azydotymidyna

Azydotymidyna (3-azydo-3-deoksytymidyna, zydowudyna) jest pochodną tymidyny, w której grupa hydroksylowa w pozycji 3' w pierścieniu deoksyrybozy została podstawiona grupą azydową [159] (Rys. 52, Tabela 15).



Rys. 52. Struktura azydotymidyny.

Tabela 15. Wybrane właściwości fizykochemiczne azydotymidyny.

Wzór sumaryczny	C ₁₀ H ₁₃ N ₅ O ₄
Masa molowa [g mol ⁻¹]	267,24
λ _{max} [nm]	267 ^a
ε _{max} [M ⁻¹ cm ⁻¹]	4600
LogP	-0,3 ^b
pKa	9,96 ^b
Polaryzowalność Å ³	24,93 ^b

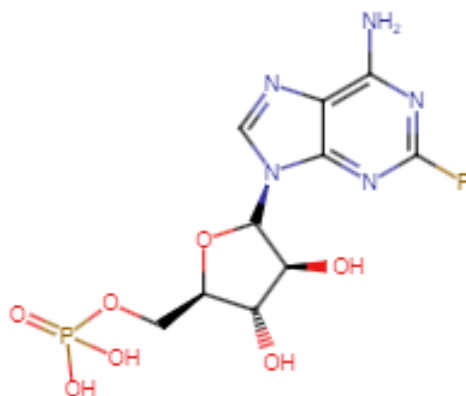
Literatura: ^a[160], ^b[136]

Azydotymidyna jest prolekiem, który w organizmie ulega fosforylacji do trójfosforanu (AZT-TP) i w takiej postaci przyłączana jest do wirusowego DNA działając jako bloker wydłużania łańcucha DNA. Działanie takie wynika z braku grupy hydroksylowej 3', co uniemożliwia tworzenie wiązań fosfodiesterowych niezbędnych do replikacji DNA. Skutkuje to zatem zakończeniem łańcucha [161-163]. Azydotymidyna wykorzystywana jest głównie w leczeniu zakażeń wirusem HIV [164, 165]. W połączeniu z innymi lekami może być wykorzystywana pomocniczo w leczeniu różnego rodzaju nowotworów, np. nowotworu trzustki [166, 167].

2.4.5. Monofosforan fludarabiny

Monofosforan fludarabiny (f-ara-AMP) pod względem chemicznym jest fluorowaną pochodną adenozyliny i arabinozy (Rys. 53, Tabela 16) [168]. Związek ten, podobnie jak inne pochodne puryn wykazuje działanie przeciwnowotworowe. Obecność reszt fosforanowych

nadaje mu wyraźny charakter kwasowy. Monofosforan fludarabiny podany dożylnie w osoczu ulega defosforylacji (f-ara-a) i w tej formie jest następnie transportowany do komórki. Związek f-ara-a w formie nukleotydu w cytoplazmie ulega sekwencyjnej fosforylacji do aktywnego trifosforanu fludarabiny (f-ara-ATP), który hamuje syntezę DNA i RNA [169, 170]. Monofosforan fludarabiny jako samodzielny lek wykorzystywany jest w leczeniu nowotworów limfoidalnych, w szczególności przewlekłej białaczki limfocytowej [171]. Związek ten wykazuje również działanie immunosupresyjne [172]. Ograniczenia w stosowaniu monofosforanu fludarabiny jako leku przeciwnowotworowego związane są z występującymi skórnymi reakcjami alergicznymi, między innymi wysypką, rumieniem oraz występowaniem pęcherzy [173]. Lek ten może również powodować anemię oraz obniżenie odporności [174].



Rys. 53. Struktura monofosforanu fludarabiny

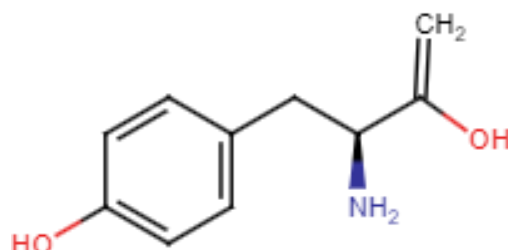
Tabela 16. Wybrane właściwości fizykochemiczne monofosforanu fludarabiny.

Wzór sumaryczny	C ₁₀ H ₁₃ FN ₅ O ₇ P
Masa molowa [g mol ⁻¹]	365,21
λ _{max} [nm]	262 ^a
ε _{max} [M ⁻¹ cm ⁻¹]	15076
LogP	-2 ^b
pKa	1,35 ^b
Polaryzowalność Å ³	30,03 ^b

Literatura: ^a[175], ^b[136]

2.4.6. L- α -Tyrozyna

L- α -Tyrozyna (Rys. 54, Tabela 17) jest najslabiej rozpuszczalnym spośród puli standardowych L- α -aminokwasów, co wynika ze stabilizującego wpływu grupy hydroksylowej na sieć krystaliczną tego związku.

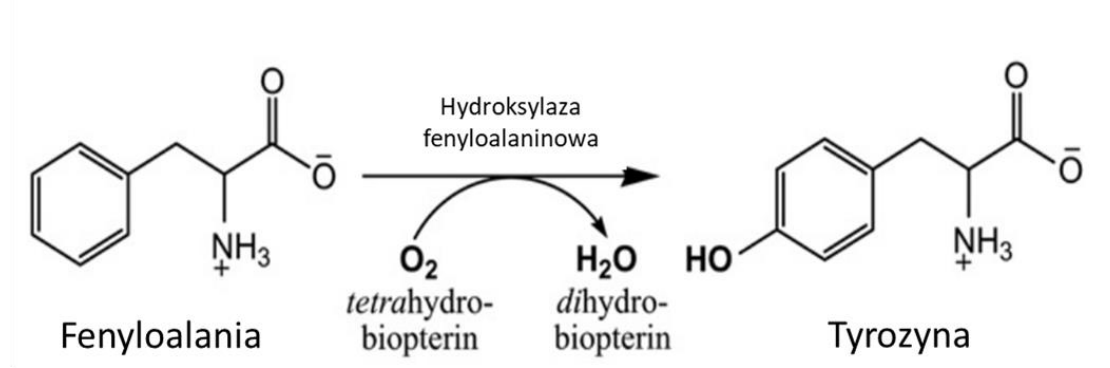


Rys. 54. Struktura L- α -tyrozyny.

Tabela 17. Właściwości fizykochemiczne L- α -tyrozyny.

Wzór sumaryczny	C ₉ H ₁₁ NO ₃
Masa molowa [g mol ⁻¹]	181.19
λ_{\max} [nm]	275 ^{ab}
ϵ_{\max} [M ⁻¹ cm ⁻¹]	1400 ^c , 1370 ^b
LogP	-1,5 ^d
pKa	2 ^d
Polaryzowalność Å ³	18,12 ^d
Punkt izoelektryczny	5,64 ^e

Literatura: ^a[176], ^b[177], ^c[178], ^d[136], ^e[179]

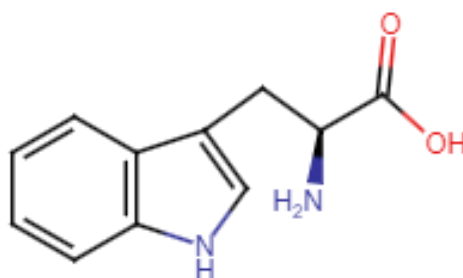


Rys. 55. Konwersja fenylalaniny do tyrozyny [188].

L- α -tyrozyna jest aminokwasem endogennym. Jest ona prekursorem neuroprzekaźników katecholaminowych (CA): dopaminy, norepinefryny oraz epinefryny [180]. L- α -tyrozyna podawana doustnie przekracza barierę krew mózg. L- α -tyrozyna zwiększa stężenie dopaminy w płynie mózgowo-rdzeniowym, co poprawia funkcje kontroli poznawczej, m. in. pamięć roboczą [181]. Mimo braku doniesień potwierdzających brak skutków ubocznych długotrwałego stosowania tyrozyny, jest ona obiecującym środkiem suplementacyjnym mogącym poprawiać nastrój u zdrowych osób poddanych działaniu stresu [182]. L- α -tyrozyna ma potencjalne zastosowanie jako środek pomocniczy w leczeniu jadłowstrętu psychicznego [183, 184]. Aminokwas ten wbudowany w łańcuch polipeptydowy wpływa również na drugorzędową strukturę białka [185]. Obecność zarówno hydrofobowych oraz hydrofilowych grup funkcyjnych w podstawniku bocznym tyrozyny powoduje, że w strukturze polipeptydu może ona być umiejscowiona zarówno na zewnątrz jak i wewnątrz globuły białka. L- α -tyrozyna (Tyr) (Rys. 54, Tabela 17) jest aromatycznym aminokwasem o właściwościach hydrofobowych [186]. Syntezowana jest w organizmie głównie w wątrobie oraz mózgu poprzez hydroksylację fenyloalaniny (Rys. 55) [187, 188].

2.4.7. L- α -Tryptofan

L- α -tryptofan pod względem chemicznym jest aromatycznym i hydrofobowym aminokwasem (Rys. 56, Tabela 18). W białkach L- α -tryptofan pełni rolę kotwiczącą oraz stymulującą, a jego reszty są preferencyjnie lokowane na granicy lipid-woda [189, 190]. L- α -tryptofan jest jednym z ośmiu egzogennych aminokwasów, które muszą być dostarczane do organizmu wraz z pokarmem.



Rys. 56. Struktura L- α -tryptofanu.

Tabela 18. Właściwości fizykochemiczne L- α -tryptofanu

Wzór sumaryczny	C ₁₁ H ₁₂ N ₂ O ₂
Masa molowa [g mol ⁻¹]	204.23
λ_{max} [nm]	280 ^a
ϵ_{max} [M ⁻¹ cm ⁻¹]	5240 ^b , 3400 ^c , 5690 ^d
LogP	-1,1 ^e
pKa	2,54 ^e
Polaryzowalność Å ³	21,05 ^e
Punkt izoelektryczny	5,89 ^f

Literatura: ^a[185], ^b[177], ^c[178], ^d[191], ^e[136], ^f[179]

Tak jak inne aminokwasy tylko izomer L tryptofanu (L- α -tryptofan) jest używany do syntezy białek i może przenikać przez barierę krew-mózg. Stężenie L- α -tryptofanu w organizmie jest najmniejsze spośród wszystkich aminokwasów. Jednak nawet niewielkie jego ilości są niezbędne do prawidłowego funkcjonowania organizmu, między innymi układu odpornościowego, centralnego układu nerwowego, przewodu pokarmowego oraz mikroflory jelitowej [192-195]. L- α -tryptofan jest prekursorem serotoniny przez co wykorzystywany jest również w celach terapeutycznych przy leczeniu stanów depresyjnych i pokrewnych zaburzeń [196, 197].

3. Część eksperymentalna

3.1. Źródło pochodzenia badanych substancji

Dendrymer: PPI G4 o rdzeniu diaminobutanowym (DAB), cz. $\geq 97\%$ (SyMO-Chem)

Leki:

1. 5-fluorouracyl (cz. $\geq 99\%$, Sigma Aldrich)
2. 5-jodouracyl (cz. $>99,0\%$, TCI)
3. tegafur (cz. $> 98,0\%$, TCI)
4. azydotymidyna (cz. $>98,0\%$, TCI)
5. monofosforan fludarabiny (cz. 99% , Alfa Aesar)

Aminokwasy:

1. L- α -tyrozyna (cz. $\geq 99,0\%$, Fluka Biochemica)
2. L- α -tryptofan (cz. $>98,5\%$, TCI)

Rozpuszczalniki:

1. woda potrójnie destylowana odgazowana (K. Ch. F. UŁ)
2. ciężka woda (Sigma Aldrich, cz. $\geq 99,9\%$)

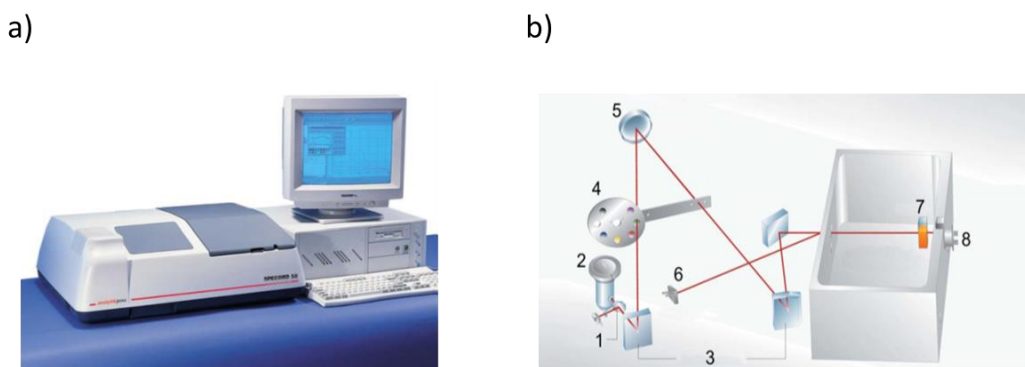
Membrany dializacyjne: benzoilowana membrana celulozowa o molekularnej granicy rozdziału 2 kDa (Sigma Aldrich)

3.2. Przygotowanie substancji do badań

Wyjściowy 1 mM roztwór dendrymeru PPI G4 przygotowywano poprzez rozpuszczenie oleistej cieczy tego związku w wodzie trójrotnie destylowanej, dejonizowanej i odgazowanej. Wodne roztwory o określonym stężeniu molowym przygotowywano poprzez rozcieńczanie wyjściowego roztworu dendrymeru w wodzie 24 godziny przed wykonywanym pomiarem. Badane substancje oraz ich roztwory przechowywano w lodówce. Membrana dializacyjna była wielokrotnie przepłukiwana wodą, a następnie przechowywana w wodzie destylowanej w lodówce. Substancje odważane były na wadze analitycznej Mettler AE 240 z dokładnością 0,00002 g. Objętości roztworów oraz wody destylowanej odmierzano pipetami automatycznymi.

3.3. Spektroskopia UV-VIS

Wodne roztwory badanych związków podczas badań rozpuszczalności oraz dializ równowagowych oznaczano spektrofotometrycznie w zakresie UV. Do badań wykorzystano jednowiązkowy spektrofotometr Specord 50 Analytik Jena (Rys. 57).

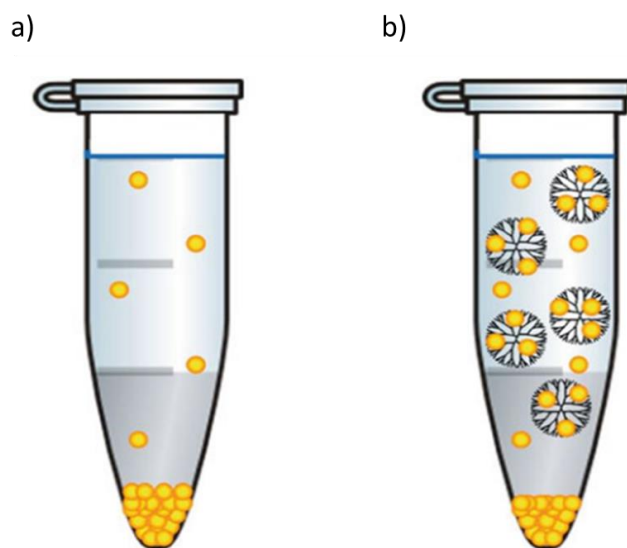


Rys. 57. a) Spektrofotometr Specord 50 Analytik Jena b) schemat budowy spektrofotometru 1. Lampa halogenowa, 2. Lampa deuterowa, 3. Lustra, 4. Filtr promieniowania, 5. Siatka dyfrakcyjna, 6. Detektor wiązki odniesienia, 7. Kuweta z próbką badaną, 8. Detektor

Podczas analizy roztworów wykorzystywano sygnał z dwóch detektorów: wzorcowego oraz badanej próbki. Procedura ta pozwala kompensować różnice wydajności źródła promieniowania, które są spowodowane zmianą temperatury otoczenia oraz rozgrzewaniem źródła promieniowania. Spektrofotometr wyposażony jest w dwa rodzaje lamp: deuterową, która jest źródłem promieniowania fal w zakresie UV oraz halogenową, która jest źródłem fal z zakresu widzialnego (VIS). Na początku pomiarów spektroskopowych rejestrowano widmo wzorca (powietrze), które było następnie automatycznie odejmowane od każdego kolejnego widma pomiarowego.

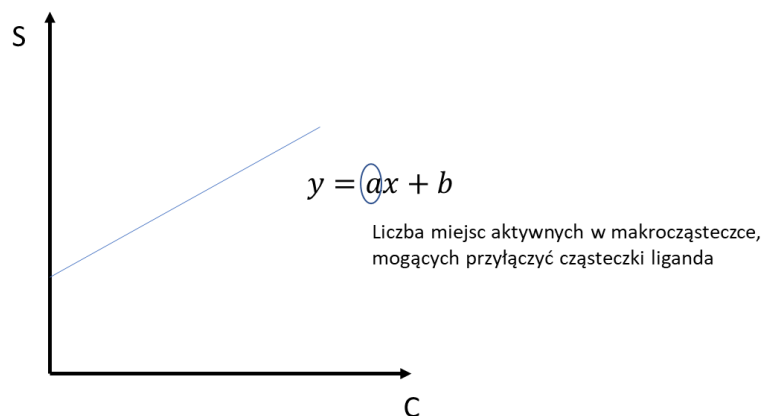
3.4. Badania rozpuszczalności

Badania rozpuszczalności ligandów w obecności makrocząsteczki dendrymeru PPI G4 przeprowadzono z wykorzystaniem spektrofotometru Specord 50, Analytik Jena w zakresie fal UV. Badane ligandy (leki i aminokwasy) umieszczano w probówkach typu eppendorf (Rys. 58) w nadmiarze w wodnych roztworach dendrymeru PPI G4 o wzrastającym stężeniu. Po nasyceniu ligandem roztworów badanych część krystalicznego osadu liganda pozostawała nierozpuszczona na dnie probówki eppendorf.



Rys. 58. Schemat układu do badań rozpuszczalności liganda. Nasycony roztwór: a) liganda, b) liganda w obecności makrocząsteczki dendrymeru [198].

Pozostawione na tydzień w warunkach zaciemnienia mieszaniny odwirowywano, a następnie pobierano roztwór i analizowano spektrofotometrycznie stężenie rozpuszczonego liganda. Otrzymane wyniki przedstawiono w formie wykresu zależności rozpuszczalności liganda (wyrażonej w jednostkach stężenia molowego) od zastosowanego stężenia dendrymeru. Wiązaniu liganda przez makrocząsteczki dendrymeru (receptora) towarzyszy wzrost rozpuszczalności liganda. Wykres zależności rozpuszczalności liganda od stężenia dendrymeru ma charakter w przybliżeniu prostoliniowy. Współczynnik kierunkowy otrzymanej zależności opisuje maksymalną liczbę cząsteczek liganda, która może być przyłączona do makrocząsteczki dendrymeru, natomiast wyraz wolny opisuje rozpuszczalność liganda w czystym rozpuszczalniku (Rys. 59).



Rys. 59. Typowy wykres zależności rozpuszczalności liganda od stężenia receptora, którego makrocząsteczki wiążą ligand.

3.5. Metoda separacyjna

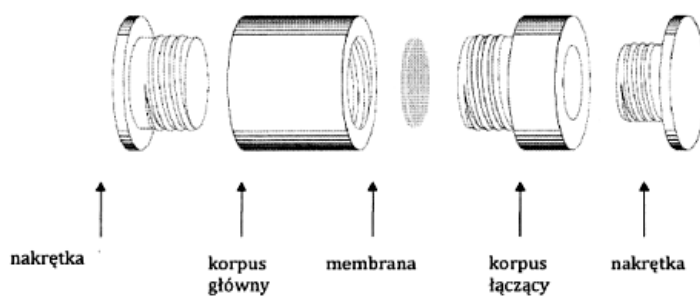
3.5.1 Ogólna charakterystyka techniki dializy równowagowej

Technikę dializy równowagowej wykorzystano w celu określenia oddziaływań makrocząsteczki dendrymeru PPI G4 z cząsteczkami liganda. Jako pomocniczą technikę do oznaczania stężenia liganda w badanych mieszaninach użyto spektroskopię UV-VIS. Metoda dializy równowagowej pozwala na oznaczenie rozkładu stężenia roztworu liganda w rozdzielonych membraną półprzepuszczalną dwóch fazach: fazie wodnej i fazie zawierającej makrocząsteczki dendrymeru PPI G4 o danym stężeniu. Do badań wykorzystywano dializery Harvard Apparatus (Rys. 60) wykonane z teflonu.



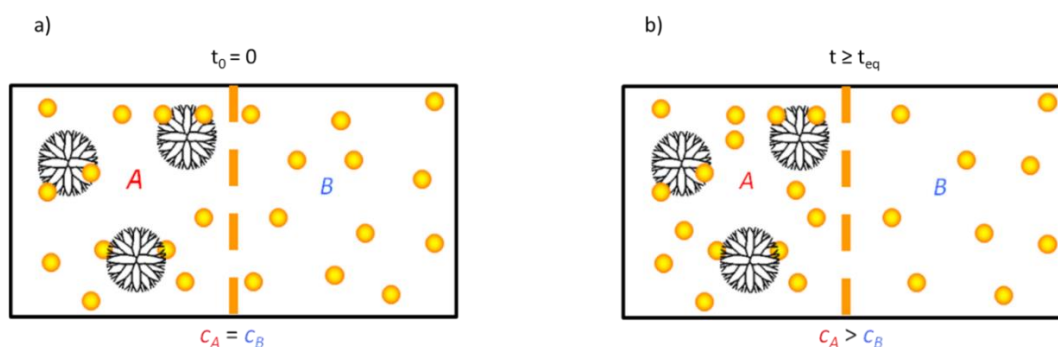
Rys. 60. Dializery Fast Micro-Equilibrium, Harvard Apparatus.

Ze względu na obojętny charakter materiału, z którego wykonane są dializery, nie oddziałują one z substancjami użytymi podczas badań. Dializer zbudowany jest z: dwóch nakrętek, korpusu głównego i łączącego, pomiędzy którymi znajduje się półprzepuszczalna błona dializacyjna. Gwintowania w każdym z elementów umożliwiają szczelne ich połączenie ze sobą. Po złożeniu dializer posiada dwie komory, każda o objętości 500 μl oraz średnicy 1 cm (Rys. 61).



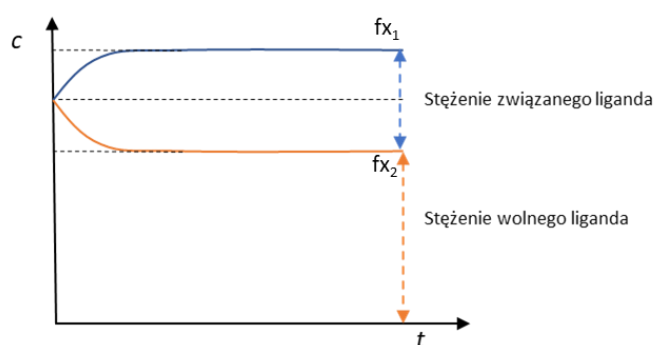
Rys. 61. Schemat dializera Fast Micro-Equilibrium, Harvard Apparatus.

Podczas badań wykonywanych metodą dializy równowagowej w jednej z komór o objętości 500 μl znajdowała się wodna mieszanina liganda (leku, aminokwasu) i receptora (dendrymeru). W drugiej komorze dializera (również o objętości 500 μl) znajdował się wodny roztwór liganda o takim samym początkowym stężeniu, co w pierwszej celi. Oba roztwory oddzielone były błoną półprzepuszczalną, której molekularna granica rozdziału pozwalała na swobodne przemieszczanie się cząsteczek liganda oraz rozpuszczalnika pomiędzy dwie badane, rozdzielone fazy. Makromolekuły są zbyt duże by przenikać przez błonę półprzepuszczalną, dlatego stężenie dendrymeru w trakcie trwania dializy pozostaje niezmienione. Proces transportu cząsteczek liganda zachodzi poprzez zjawisko dyfuzji oraz osmozy do momentu, aż zostanie osiągnięty stan równowagi pomiędzy roztworami znajdującymi się w komorach dializera (Rys. 62).



Rys. 62. Schemat przebiegu dializy: a) na początku, gdy stężenia liganda w obu komorach są identyczne, b) po osiągnięciu stanu równowagi [198].

Podczas trwania dializy makrocząsteczka dendrymeru wiąże cząsteczki liganda, przez co maleje stężenie wolnego (nieskompleksowanego) liganda w porównaniu z jego stężeniem w celi przeciwnej. Obniżenie stężenia niezwiązanych cząsteczek liganda w roztworze zawierającym makrocząsteczki dendrymeru powoduje obniżenie potencjału chemicznego wolnego liganda, co wymusza transport cząsteczek liganda z fazy wodnej do fazy zmieszanej, w celu wyrównania wartości potencjału chemicznego w roztworach po obu stronach błony. Stan równowagi dializowanych roztworów zostaje osiągnięty, gdy stężenie wolnego (niezwiązanego) liganda będzie takie samo w obu fazach (Rys. 63). W trakcie dializy stężenie liganda w fazie wodnej maleje, natomiast całkowite stężenie liganda (zarówno wolnego oraz związanego z makrocząsteczką) po stronie przeciwnej rośnie.



Rys. 63. Zmiany analitycznych stężeń liganda podczas dializy roztworu makrocząsteczki z ligandem i roztworu liganda.

Po osiągnięciu stanu równowagi pobierano próbki roztworów z obu komór, a następnie oznaczano spektrofotometrycznie zawartość liganda w obu fazach. Stężenie niezwiązanego z makromolekułą liganda równe było stężeniu liganda w celi z fazą wodną. Stężenie związanego liganda obliczano jako różnicę stężenia liganda w celi z makromolekułą i stężenia liganda w fazie wodnej [199]. W trakcie jednego pomiaru otrzymujemy wartość stężenia

liganda związanego z makromolekułą oraz stężenie wolnego liganda. Wartości te wykorzystywane są do dalszych obliczeń.

3.5.2. Wyznaczanie stechiometrii i stałej wiązania kompleksu receptor – ligand techniką dializy

W komorze, w której znajduje się makromolekuła M o stężeniu r obecny jest zarówno ligand z nią związany o stężeniu (c) oraz ligand wolny o stężeniu ($f x_2$). Parametry wiązania liganda z makromolekułą posiadającą n miejsc aktywnych można oznaczyć wykorzystując metodę Scatcharda-Klotza. Zgodnie z prawem działania mas Guldberga-Waagego, gdy makromolekuła (receptor) posiada n jednakowych miejsc aktywnych, z których każde może przyłączyć tylko jedną cząsteczkę liganda, stałą równowagi tworzenia kompleksu ligand- miejsce aktywne opisuje się następująco [200, 201]:

$$K = \frac{c}{f x_2 (nr - c)} \quad (2)$$

gdzie:

K- stała równowagi tworzenia kompleksu ligand-miejsce aktywne,

c- stężenie kompleksu równe stężeniu związanego liganda,

$f x_2$ - stężenie niezwiązanego (wolnego) liganda,

r- całkowite stężenie makrocząsteczek receptora (dendrymeru)

n- liczba miejsc aktywnych makrocząsteczki,

nr- stężenie miejsc aktywnych receptora,

(nr-c)- stężenie wolnych miejsc aktywnych receptora.

Stężenie niezwiązanego liganda $f x_2$ w mieszaninie z receptorem jest równe różnicy analitycznego stężenia liganda $f x_1$ i liganda związanego c:

$$f x_2 = f x_1 - c \quad (3)$$

Po podzieleniu licznika i mianownika równania (2) przez stężenie receptora r oraz wprowadzeniu oznaczenia:

$$b \equiv \frac{c}{r} \quad (4)$$

gdzie: b - tzw. natężenie wiązania, czyli liczba moli cząsteczek liganda (c) związana przez mol receptora, otrzymujemy zależność:

$$K = \frac{b}{fx_2(n - b)} \quad (5)$$

Zależność między liczbą moli cząsteczek liganda związanego przez mol receptora b oraz stężeniem wolnego liganda fx_2 , ma charakter hiperboliczny:

$$b = \frac{Knfx_2}{1 + Kfx_2} \quad (6)$$

Zależność $b(fx_2)$ dąży do zera przy $fx_2 \rightarrow 0$:

$$\lim_{fx_2 \rightarrow 0} b(fx_2) = 0 \quad (7)$$

ponieważ gdy brak liganda miejsca aktywne receptora nie są nim wysycane.

Przy $fx_2 \rightarrow +\infty$, zależność $b(fx_2)$ dąży do liczby miejsc aktywnych n :

$$\lim_{fx_2 \rightarrow \infty} b(fx_2) = n \quad (8)$$

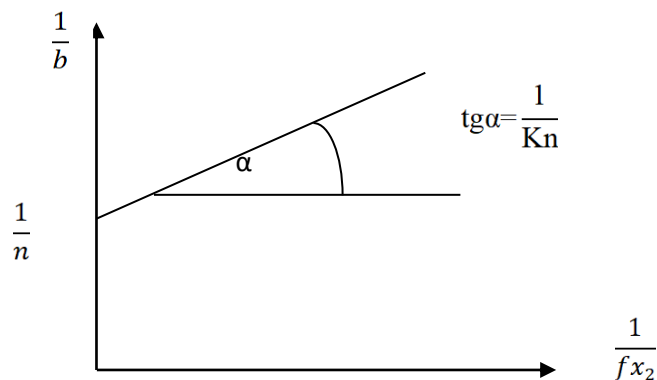
Zgodnie z równaniem 8. wszystkie miejsca aktywne n makrocząsteczki o skończonej stałej wiązania K ulegną wysyceniu przy nieskończonym nadmiarze liganda względem receptora.

Równania (6) można zlinearyzować w układzie podwójnie odwrotnie proporcjonalnym do postaci zwanej równaniem Scatcharda-Klotza [200, 201].

$$\frac{1}{b} = \frac{1}{Kn} \times \frac{1}{fx_2} + \frac{1}{n} \quad (9)$$

Równanie (9) Scatcharda-Klotza, pozwala w sposób graficzny wyznaczyć liczbę miejsc aktywnych w makromolekule n wykorzystując wyraz wolny A wykresu prostej $\frac{1}{b} \left(\frac{1}{fx_2} \right)$

(Rys. 64, równanie 10).



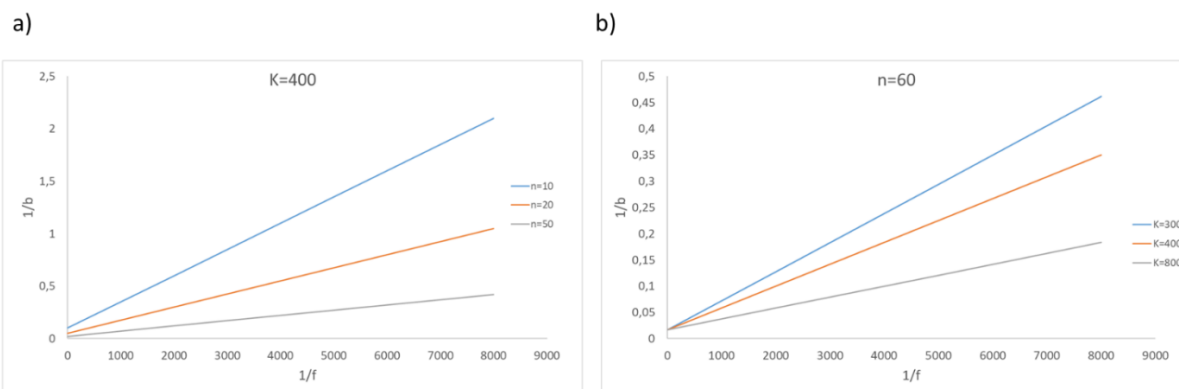
Rys. 64. Wykres równania Scatcharda-Klotza

$$n = \frac{1}{A} \quad (10)$$

Stałą równowagi tworzenia kompleksu K można wyznaczyć wykorzystując współczynnik nachylenia $\text{tg}\alpha$ liniowej zależności Scatcharda-Klotza oraz liczbę miejsc aktywnych n , korzystając z równania:

$$K = \frac{1}{n \text{tg}\alpha} \quad (11)$$

Wartość zarówno stałej tworzenia K oraz liczby miejsc aktywnych w makrocząsteczce n wpływają na nachylenie prostej będącej wykresem równania Scatcharda-Klotza. Dla ustalonej wartości K i wzrastającej wartości parametru n , wykres Scatcharda-Klotza jest prostą, w której zarówno nachylenie jak i wartość wyrazu wolnego maleje (Rys. 65a). Przy ustalonej wartości n i wzrastającej wartości stałej tworzenia kompleksu K wykres Scatcharda-Klotza jest prostą o stałej wartości wyrazu wolnego i malejącym nachyleniu prostej (Rys. 65b).

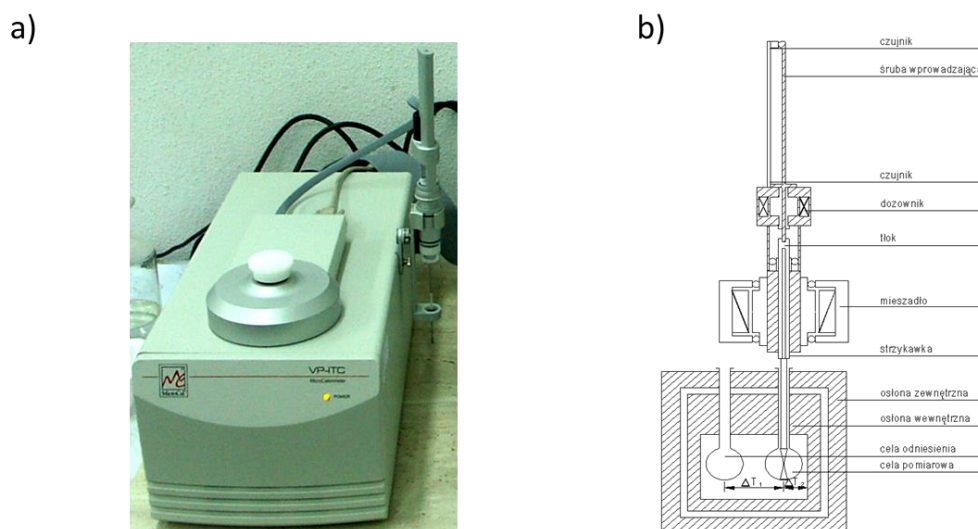


Rys. 65. Przykładowy przebieg zależności Scatcharda-Klotza opisujący iloraz stężenia makrocząsteczki i przyłączonego liganda ($1/b$) od odwrotności stężenia wolnego liganda ($1/f_{x2}$): a) dla różnych wartości liczby przyłączonych cząsteczek liganda n , przy ustalonej wartości stałej tworzenia $K=400$, b) dla różnych wartości stałej tworzenia kompleksu K , przy ustalonej wartości liczby miejsc aktywnych w cząsteczce liganda $n=60$.

3.6. Kalorymetria izotermiczna

3.6.1. Kalorymetr izotermiczny

Bezpośrednie efekty energetyczne oddziaływań makrocząsteczki dendrymeru PPI G4 z cząsteczkami liganda wyznaczono wykorzystując kalorymetr do miareczkowań MicroCal VP-ITC (ang. *isothermal titration calorimetry*) (Rys. 66).



Rys. 66. Kalorymetr miareczkujący MicroCal VP-ITC: a) pokrój zewnętrzny, b) budowa wewnętrzna.

Podczas pomiarów do roztworu makrocząsteczki dendrymeru znajdującego się w celi pomiarowej dodawano porcjami roztwór badanego liganda ze strzykawki automatycznej.

Rejestrowana moc cieplna (wyrażona w $\mu\text{cal s}^{-1}$) wymieniona wskutek kolejnych wstrzyknięć roztworu titranta do roztworu receptora w celi pomiarowej rejestrowana była w funkcji czasu. Dołączone do urządzenia oprogramowanie MicroCal VP-ITC całkowało otrzymaną zależność.

Dla wszystkich badanych układów makrocząsteczka-ligand przeprowadzono trzy miareczkowania:

1. Miareczkowanie roztworu makrocząsteczki roztworem liganda
2. Rozcieńczanie roztworu liganda w rozpuszczalniku
3. Rozcieńczanie rozpuszczalnikiem roztworu makrocząsteczki.

Wykonanie trzech opisanych miareczkowań pozwala na wyznaczenie bezpośrednich efektów cieplnych oddziaływań dendrymeru PPI G4 z cząsteczkami liganda. W tym celu od efektów cieplnych miareczkowania roztworu dendrymeru PPI G4 roztworem liganda odejmuje się efekty rozcieńczania liganda i makrocząsteczki. Procedura miareczkowania obejmuje następujące parametry: temperaturę, stężenia roztworu makrocząsteczki oraz liganda, objętość i szybkość mieszania miareczkowanego roztworu, objętość nastrzyknięć, czas trwania nastrzyknięć oraz czas pomiędzy kolejnymi nastrzykami.

Możliwy zakres wyboru temperatury pomiarowej w kalorymetrze MicroCal VP-ITC wynosi od 2°C do 80°C . Układ pomiarowy składa się z kalorymetru MicroCal VP-ITC oraz komputera PC, który pełni rolę jednostki sterującej. Kalorymetr zbudowany jest z dwóch identycznych cel (celi pomiarowej oraz celi odniesienia), które swoim kształtem przypominają monety. W obu celach panują warunki stałego ciśnienia. Cella pomiarowa posiada objętość roboczą równą 1,4275 ml. Podczas pomiarów cella odniesienia napełniona była wodą trójкратно destylowaną. Roztwory oraz wodę do cel wprowadzano poprzez igłę ze strzykawki typu Hamilton.

Automatyczna biureta titrująca ITC o objętości 287,37 μl używana jest do wprowadzania kolejnych porcji titranta do celi pomiarowej. Przed przystąpieniem do pomiarów ustawiano szybkość obrotów strzykawki (416 rpm). Sterowany komputerowo tłok strzykawki umożliwia nastrzyknięcie ściśle określonej objętości roztworu titranta w zaprogramowanych odstępach czasu.

Podczas pomiaru układ termoelektryczny mierzy różnicę temperatur (wyrażoną w jednostkach mocy) pomiędzy celami, a płaszczem kalorymetru. Wielkością, która stanowi podstawę do dalszych obliczeń jest różnica mocy pomiędzy celą pomiarową i celą odniesienia. Podczas pomiaru układ chłodząco-ogrzewający utrzymuje taką samą różnicę temperatur pomiędzy celą odniesienia a celą pomiarową. Moc, która jest niezbędna do

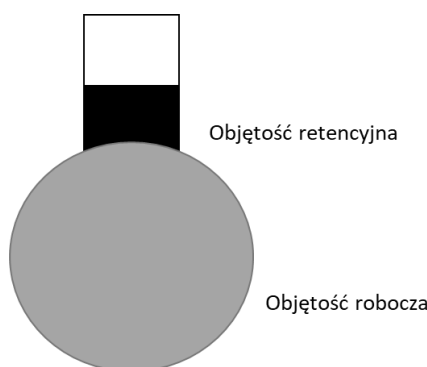
utrzymania tej samej różnicy temperatur pomiędzy celą odniesienia a celą pomiarową jest rejestrowana i przeliczana na efekt cieplny danego procesu. Kalorymetr MicroCal VP-ITC umożliwia pomiar efektu cieplnego nastrzyku z dokładnością do około 0,1 μcal niepewności [202].

3.6.2. Analiza efektów

Podczas pomiaru kalorymetrycznego w warunkach izotermicznych w celi pomiarowej przed dodaniem titranta X znajduje się roztwór makrocząsteczki M o początkowym stężeniu M_t^0 [mol l^{-1}]. Kolejne porcje titranta mają objętość ΔV_i i są kolejno dodawane do roztworu makromolekuły w celi pomiarowej o objętości roboczej V_0 . Całkowita objętość dodanego liganda ΔV jest obliczona jako suma objętości składowych (Równanie 12).

$$\Delta V = \sum \Delta V_i \quad (12)$$

Pomiarowi kalorymetrycznemu podlega tylko ta część roztworu, która znajduje się w celi pomiarowej V_0 . Po dodaniu do celi pomiarowej kolejnych porcji titranta do roztworu makrocząsteczki pewna jego ilość wypływa poza celę do przestrzeni retencyjnej (Rys. 67). Część roztworu makrocząsteczki nie mieszcząca się w objętości roboczej celi nie bierze zatem udziału w pomiarze kalorymetrycznym (Rys. 67).



Rys. 67. Cella pomiarowa kalorymetru miareczkującego MicroCal VP-ITC

Zmiany stężeń podczas miareczkowania są uwzględniane przez program komputerowy. Zmierzone efekty cieplne wyrażone w kaloriach obliczane są przez dołączony do kalorymetru program komputerowy MicroCal VP-ITC.

Dodawanie kolejnych porcji titranta do celi powoduje zmniejszenie stężenia makromolekuły, ponieważ początkowa liczba moli zawarta jest w większej objętości $V_0 + \Delta V$. Całkowita liczbę moli makrocząsteczki biorącej udział w pomiarze kalorymetrycznym można zbilansować jako [202]:

$$M_t^0 V_0 = M_t V_0 + \frac{1}{2} (M_t + M_t^0) \Delta V \quad (13)$$

gdzie:

M_t^0 – początkowe stężenie makromolekuły (przed rozpoczęciem miareczkowania)

M_t – stężenie roztworu makromolekuły w objętości roboczej celi po dodaniu roztworu titranta.

Przekształcając równanie 13 otrzymujemy wyrażenie na stężenie makromolekuły M_t w celi pomiarowej podczas miareczkowania:

$$M_t = M_t^0 \left(\frac{1 - \frac{\Delta V}{2V_0}}{1 + \frac{\Delta V}{2V_0}} \right) \quad (14)$$

Podobnie hipotetyczne stężenie titranta X_t^0 w sytuacji, gdy całkowita nastrzykiwana porcja titranta pozostałaby w roboczej objętości celi musi być skorygowane w związku z wypchnięciem części roztworu do przestrzeni retencyjnej [202]. Skorygowane stężenie liganda X_t w objętości roboczej celi V_0 spełnia równanie:

$$X_t^0 V_0 = X_t V_0 + \frac{1}{2} X_t \Delta V \quad (15)$$

Przekształcając równanie 15 otrzymujemy:

$$X_t = \frac{X_t^0}{1 + \frac{\Delta V}{2V_0}} \quad (16)$$

Równania 14 oraz 16 opisują stężenia makrocząsteczki M_t oraz titranta X_t w objętości roboczej celi V_0 podczas miareczkowania, gdy pewna część roztworu ulega wypchnięciu z celi pomiarowej do przestrzeni retencyjnej.

Dla każdego nastrzyknięcia titranta do efektu cieplnego wyprowadzona jest poprawka na wypchniętą objętość towarzyszącą nastrzyknięciu o objętości ΔV_i . Przy założeniu, że kinetyka reakcji oraz mieszanie są szybkie, poprawka ta uwzględnia fakt, że część płynu po

$(i - 1)$ -wszym nastrzyknięciu zostaje wypchnięta z objętości roboczej celi po i -tym nastrzyknięciu, co wpływa na zmierzony efekt cieplny.

Pierwszy nieskończenie mały element objętości i -tego nastrzyku nie wpływa na efekt cieplny, ponieważ wypchnięta część roztworu jest w stanie równowagi po $(i - 1)$ -wszym nastrzyknięciu. Ostatni nieskończenie mały element objętości i -tego nastrzyku wnosi wkład do efektu cieplnego równy efektowi, który wnosi ciecz pozostająca w objętości roboczej celi. Przy założeniu liniowych zmian tego efektu, w granicy niewielkich przyrostów ΔV_i , wypchnięta ciecz wymienia ciepło w połowie taka skutecznie jak ciecz pozostająca w objętości roboczej. Poprawione wyrażenie na ciepło podczas i -tego nastrzyku jest wyrażone jako [202]:

$$\Delta Q'(i) = Q(i) + \frac{\Delta V_i}{V_0} \left[\frac{Q(i) - Q(i - 1)}{2} \right] - Q(i - 1) \quad (17)$$

Opisane poprawki (równanie 14, 16 oraz 17) uwzględniane są automatycznie przez oprogramowanie dołączone do kalorymetru.

3.6.3. Model jednego rodzaju miejsc aktywnych

Podczas wyznaczania parametrów wiązania liganda z miejscami aktywnymi w makrocząsteczce efekty ciepłe bezpośrednich oddziaływań liganda z makromolekułą uzyskane w trakcie miareczkowania izotermicznego opisuje się równaniami matematycznymi, w których parametry wiązania (stała równowagi, stechiometria oraz entalpia wiązania) są parametrami dobieralnymi. Wartości liczbowe parametrów podlegają procedurze uzbieźniania, tak by odpowiadająca im krzywa opisywała dane eksperymentalne.

Gdy makromolekuła posiada n identycznych miejsc aktywnych, z których każde może przyłączyć tylko jedną cząsteczkę liganda, wówczas stałą równowagi K wiązania liganda X z miejscem aktywnym makrocząsteczki można przedstawić jako [202]:

$$K = \frac{\theta}{(1 - \theta)[X]} \quad (18)$$

gdzie:

$[X]$ -stężenie wolnego liganda X w stanie równowagi,

Θ - ułamek miejsc w makromolekule zajętych przez ligand X.

Sumaryczne stężenie liganda znajdującego się w objętości roboczej celi, w której aktualne stężenie makromolekuły wynosi M_t , można przedstawić jako [202]:

$$X_t = [X] + n\Theta M_t \quad (19)$$

Podstawiając równanie 19 do równania 18 otrzymujemy równanie kwadratowe względem ułamka miejsc zajętych Θ [202]:

$$\Theta^2 - \Theta \left[1 + \frac{X_t}{nM_t} + \frac{1}{nKM_t} \right] + \frac{X_t}{nM_t} = 0 \quad (20)$$

którego pierwiastkiem posiadającym sens fizyczny jest [202]:

$$\Theta = \frac{1}{2} \left[1 + \frac{X_t}{nM_t} + \frac{1}{nKM_t} - \sqrt{\left(1 + \frac{X_t}{nM_t} + \frac{1}{nKM_t} \right)^2 - \frac{4X_t}{nM_t}} \right] \quad (21)$$

Całkowite ciepło Q wymienione przez miareczkowany roztwór znajdujący się w objętości roboczej V_0 , przy stopniu obsadzenia miejsc Θ jest równe [202]:

$$Q = n\Theta M_t \Delta H^\circ V_0 \quad (22)$$

gdzie:

ΔH° -standardowe molowe ciepło wiązania liganda z miejscem aktywnym makrocząsteczki.

Podstawiając równanie 21 do równania 22 otrzymujemy zależność efektu ciepłego Q w funkcji składu miareczkowanej mieszaniny [202]:

$$Q = \frac{nM_t \Delta H^\circ V_0}{2} \left[1 + \frac{X_t}{nM_t} + \frac{1}{nKM_t} - \sqrt{\left(1 + \frac{X_t}{nM_t} + \frac{1}{nKM_t} \right)^2 - \frac{4X_t}{nM_t}} \right] \quad (23)$$

Wartość ciepła Q (Równanie 23) może być obliczona po zakończeniu każdego i -tego nastrzyknięcia $Q(i)$, dla ustalonych wartości parametrów n , K , ΔH° i przeliczona na efekty poszczególnych nastrzyków. W celu wyznaczenia wartości parametrów wiązania obliczone

tak efekty poszczególnych nastrzyków porównuje się z danymi eksperymentalnymi, obliczając sumy kwadratów odchyłeń. Parametry wiązania są następnie optymalizowane (uzbieżniane) w programie MicroCal Origin 7.0, tak aby zminimalizować sumy kwadratów odchyłeń między obliczonymi i zarejestrowanymi efektami cieplnymi.

Obliczenia prowadzi się do momentu, gdy wartości parametrów dobieralnych nie będą zmieniać się, mimo prowadzenia kolejnych obliczeń. Wartości parametrów wiązania liganda z miejscem aktywnym makromolekuły n , K , ΔH° są zatem udokładniane metodą Marquardta najmniejszych kwadratów.

3.6.4. Entalpia swobodna i entropia tworzenia kompleksu ligand- miejsce aktywne makromolekuły

Wyznaczoną wartość stałej tworzenia kompleksu liganda z miejscem aktywnym makromolekuły można przeliczyć na standardową entalpię swobodną reakcji wiązania ΔG° :

$$\Delta G^\circ = -RT \ln K \quad (24)$$

gdzie:

R -stała gazowa (8,314 J K mol⁻¹)

T -temperatura bezwzględna

Wykorzystując wyznaczone wartości standardowej entalpii swobodnej ΔG° oraz standardowej entalpii ΔH° reakcji wiązania liganda z miejscem aktywnym makrocząsteczki możliwe jest obliczenie standardowej entropii ΔS° tego procesu (Równanie 25):

$$\Delta G^\circ = \Delta H^\circ - T \Delta S^\circ \quad (25)$$

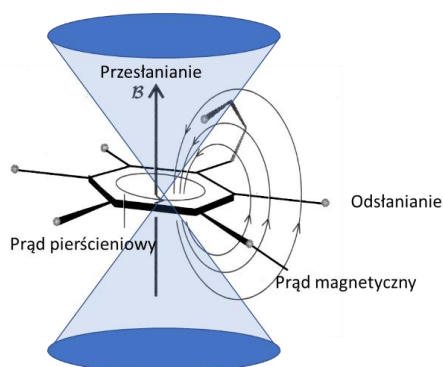
Wykorzystując wyniki pomiarów kalorymetrycznych możliwe jest zatem wyznaczenie w warunkach izotermiczno-izobarycznych wartości parametrów wiązania: liczby miejsc aktywnych w makrocząsteczce n , które przyłączają cząsteczki liganda ze stałą wiązania K , jak również standardowe molowe funkcje termodynamiczne: entalpię ΔH° , entropię ΔS° oraz entalpię swobodną ΔG° opisujące wiązanie liganda przez miejsce aktywne makromolekuły. Uzyskane standardowe funkcje termodynamiczne pozwalają wnioskować o energetyce i samorzutności badanej przemiany.

3.7. Spektroskopia ^1H NMR

Postawą techniki jądrowego rezonansu magnetycznego jest absorpcja promieniowania o częstotliwości radiowej przez jądra atomów umieszczone w polu magnetycznym. W technice protonowego rezonansu magnetycznego bada się zjawisko absorpcji promieniowania przez jądra atomów wodoru (protony). Gęstość elektronowa wokół danego protonu w związku chemicznym zmienia się w zależności od otoczenia chemicznego, w jakim się znajduje. Towarzyszy temu zmiana położenia i/lub kształtu piku opisującego dany proton (na rejestrowanym widmie NMR). Przesunięciem chemicznym δ nazywa się różnicę w położeniu pasma absorpcji określonego protonu w odniesieniu do położeniu pasma protonu wzorca, np. trimetylosilanu (TMS). Jest to wielkość bezwymiarowa wyrażona w ppm (ang. *part per milion*). W technice ^1H NMR wyróżnia się dwa rodzaje zmiany chemicznych sygnałów grup protonów, którym towarzyszy zmiana położenia piku [203-205]:

1. Odsłanianie, któremu towarzyszy zmiana położenia piku w kierunku większych wartości ppm. Zachodzi, gdy podstawniki elektronoakceptorowe znajdują się blisko danego atomu
2. Przesłanianie, czyli przesunięcie pików w kierunku niższych wartości skali ppm. Spowodowane jest przez związki elektronodonorowe znajdujące się w sąsiedztwie danego atomu.

W związkach aromatycznych, gdy przyłożone pole ma kierunek prostopadły do płaszczyzny pierścienia aromatycznego, przyłożone pole indukuje prąd pierścieniowy, czyli cyrkulację elektronów wokół pierścienia. Protony leżące nad i pod płaszczyznę pierścienia aromatycznego ulegają przesłanianiu, natomiast te, leżące w płaszczyźnie pierścienia aromatycznego ulegają odsłanianiu (Rys. 68).

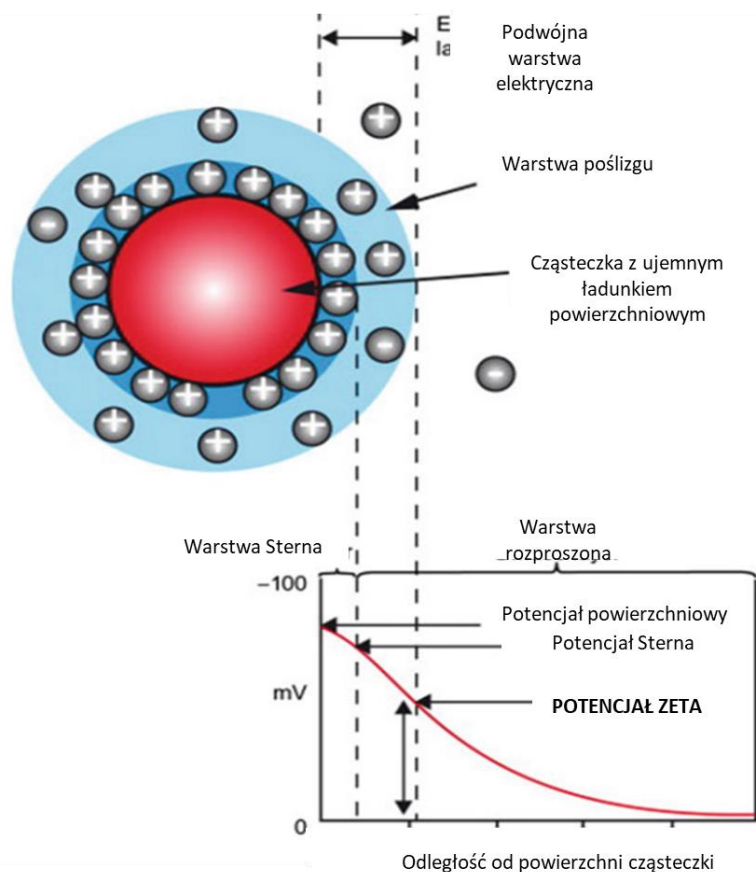


Rys. 68. Efekt przesłaniania i odsłaniania prądu aromatycznego w benzenie przez indukowane pole magnetyczne [206].

Pomiary ^1H NMR wykonano wykorzystując spektrometr Bruker Avance III, 600 MHz. Podczas badań NMR do analizy przygotowano serię roztworów o stałym stężeniu makrocząsteczki dendrymeru PPI G4 oraz wzrastającym stężeniu liganda. Do przygotowania badanych roztworów użyto ciężkiej wody jako rozpuszczalnika. W celu określenia oddziaływań makrocząsteczki z ligandem analizowano zmiany położenia sygnałów grup protonów badanych związków. Pozwala to na identyfikację fragmentów struktury makrocząsteczki i jej liganda zaangażowanych w tworzenie supramolekularnych kompleksów.

3.8. Zeta potencjał

Technikę Zeta potencjału (ζ potencjału) można użyć do wyznaczenia stechiometrii kompleksu dendrymeru i liganda, gdy związanie liganda wpływa na ładunek elektryczny na powierzchni makromolekuły. Ładunek makrocząsteczki rozpuszczonej w roztworze wpływa na rozkład jonów znajdujących się w jej najbliższym otoczeniu wskutek asocjacji przeciwjonów na jej powierzchni. Przy powierzchni makrocząsteczki tworzy się wówczas podwójna warstwa elektryczna. Pierwsza warstwa, zwana warstwą Sterna, zbudowana jest z przeciwjonów, które silnie oddziałują z rozpuszczoną makrocząsteczką, natomiast wokół niej powstaje zewnętrzna warstwa utworzona przez rozproszone jony. Obie warstwy oddzielone są między sobą płaszczyzną poślizgu (Rys. 69). Historycznie potencjał Zeta wykorzystywany był głównie do analizy naładowanych ujemnie koloidów, dlatego w literaturze omawiającej zjawisko Zeta potencjału rozważana jest cząstka o ujemnym ładunku powierzchniowym, z którą asocjują kationy (Rys. 69). Zawieszony w wodzie dendrymer PPI G4 ma charakter kationowy i otaczany jest warstwą anionów.



Rys. 69. Rozkład jonów wokół rozpuszczonej makrocząsteczki o powierzchniowym ładunku ujemnym [198].

Potencjał Zeta to potencjał elektrostatyczny w podwójnej warstwie elektrycznej otaczającej cząsteczkę, mierzony względem głębi roztworu. Mierząc Zeta potencjał makrocząsteczek receptora przy wzrastającym stężeniu jego liganda można wyznaczyć stechiometrię kompleksu jako punkt przecięcia dwóch prostoliniowych fragmentów zależności Zeta potencjału badanych makrocząsteczek w funkcji składu miareczkowanego roztworu.

4. Wyniki pomiarów i ich interpretacja

4.1. Pomiary pH-metryczne wodnych roztworów dendrymeru PPI G4

W celu określenia stopnia sprotonowania powierzchniowych grup aminowych w makrocząsteczce dendrymeru PPI G4 wykonano serię pomiarów pH-metrycznych (pH METER CPC-505) wodnych roztworów tego dendrymeru w zakresie od 10 μM do 160 μM w temperaturze pokojowej. Zależność pH roztworu dendrymeru PPI G4 od jego stężenia przedstawiono na wykresie (Rys. Z1).

W roztworze wodnym grupy aminowe makrocząsteczki PPI G4 przyłączają protony nadając środowisku odczyn zasadowy. Wartość pH roztworu dendrymeru PPI G4 pozwala określić stopień protonowania makrocząsteczki PPI G4 [55]:

- w 10 μM roztworze PPI G4 stopień protonowania makrocząsteczki wynosi ~40% (około 26 z 64 powierzchniowych grup aminowych)
- w 20 μM roztworze PPI G4 stopień protonowania makrocząsteczki wynosi ~20% (około 13 z 64 powierzchniowych grup aminowych)
- w 40-140 μM roztworze PPI G4 stopień protonowania makrocząsteczki wynosi ~10% (około 6 z 64 powierzchniowych grup aminowych)

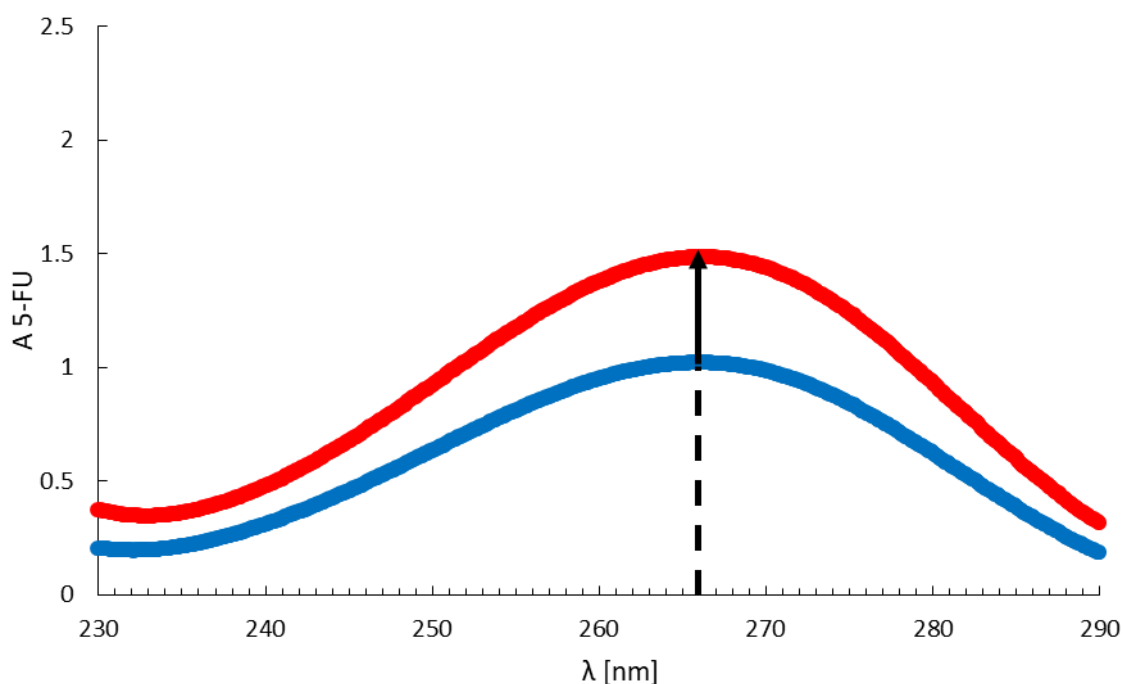
4.2. Pomiary rozpuszczalności

4.2.1. Badania oddziaływań dendrymeru PPI G4 z 5-fluorouracylem

Wzrost rozpuszczalności 5-fluorouracylu w roztworach wodnych dendrymeru PPI G4 badano spektrofotometrycznie (Specord 50, Analytic Jena). Pomiary rozpuszczalności leku wykonano dla wodnych roztworów dendrymeru PPI G4 o stężeniach od 100 μM do 1000 μM . Roztwory przygotowano rozcieńczając wodą destylowaną macierzysty roztwór dendrymeru PPI G4 o stężeniu 1000 μM . W probówkach typu eppendorf wodne roztwory dendrymeru PPI G4 nasycano krystalicznym 5-fluorouracylem. Roztwory termostatowano przez 7 dni.

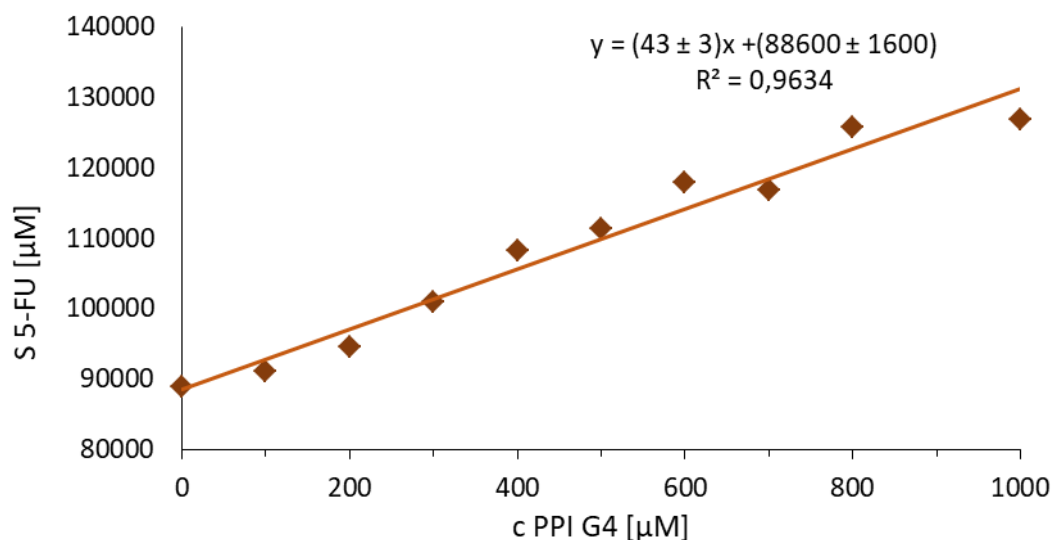
Nasycone roztwory wodne dendrymeru PPI G4 5-fluorouracylem przed pomiarem odwirowano. Próbkę klarownych roztworów rozcieńczano 500-krotnie. Stężenie 5-fluorouracylu w rozcieńczonych roztworach wyznaczono spektrofotometrycznie dla długości fali $\lambda_{\text{max}}=266$ nm, wykorzystując literaturową wartość molowego współczynnika absorpcji $\epsilon_{\text{max}}=6920$ $\text{M}^{-1} \text{cm}^{-1}$ [134]. Absorbancję leku obliczono odejmując od absorbancji

leku w wodnym roztworze dendrymeru PPI G4 absorbancję wodnego roztworu dendrymeru o danym stężeniu. Tę różnicę następnie przeliczono na stężenie leku w badanych roztworach. Widma UV 5-fluorouracylu w 500-krotnie rozcieńczonych roztworach dendrymeru PPI G4 o stężeniach 100 μM oraz 1000 μM przedstawiono na wykresie (Rys. 70).



Rys. 70. Widma UV 500-krotnie rozcieńczonych nasyconych 5-fluorouracylem roztworów dendrymeru PPI G4 o stężeniu 100 μM (kolor niebieski) oraz 1000 μM (kolor czerwony).

Pomiary rozpuszczalności 5-fluorouracylu w wodzie oraz w wodnych roztworach dendrymeru PPI G4 wskazują na liniowy wzrost rozpuszczalności tego leku wraz ze wzrostem stężenia makrocząsteczki PPI G4. Uzyskane wyniki pomiarów rozpuszczalności 5-fluorouracylu w roztworach dendrymeru o wzrastającym stężeniu nanotransportera PPI G4 (Tabela Z1) opisano (Rys. 71) równaniem linii prostej $y = (43 \pm 3)x + (88600 \pm 1600)$, $R^2 = 0,9634$. Wyraz wolny przedstawionej prostej odpowiada rozpuszczalności 5-fluorouracylu w wodzie ($86,6 \pm 1,6 \text{ mM}$). Współczynnik kierunkowy ($n = 43 \pm 3$) określa liczbę związanych cząsteczek 5-fluorouracylu, a tym samym średnią liczbę miejsc aktywnych w makrocząsteczce PPI G4.

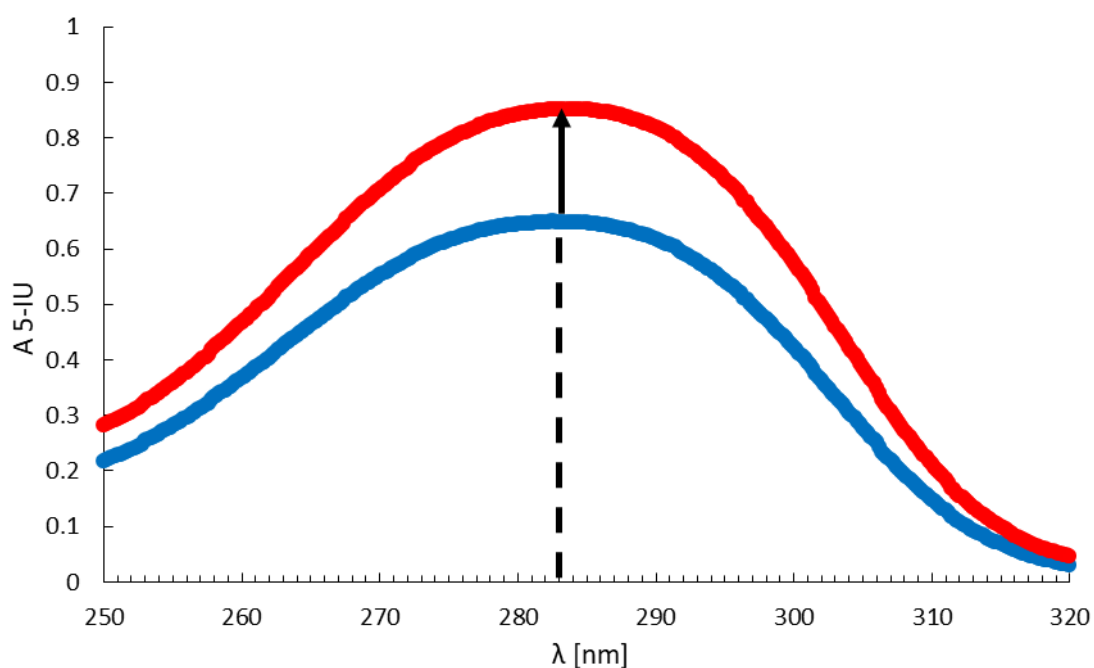


Rys. 71. Zależność rozpuszczalności 5- fluorouracylu od stężenia wodnych roztworów dendrymeru PPI G4.

Dla badanych nasyconych lekiem mieszanin stosunek molowy 5-fluorouracylu do dendrymeru PPI G4 wynosił od około 120:1 do 1600:1, czyli analizowany był zakres składu mieszanin o dużym nadmiarze liganda (leku) wobec makrocząsteczek receptora. Pewne odchylenia od liniowości przebiegu punktów na wykresie rozpuszczalności 5-fluorouracylu od stężenia badanego dendrymeru (Rys. 71) spowodowane są znacznym (500-krotnym) rozcieńczeniem oznaczanych spektrofotometrycznie próbek badanych roztworów.

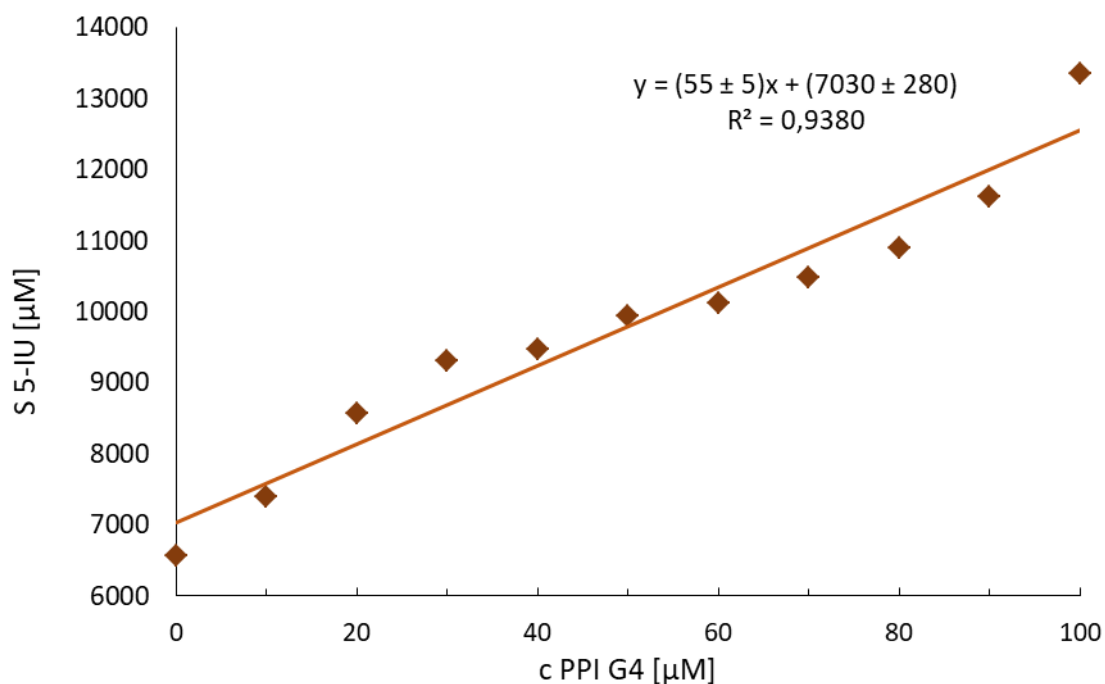
4.2.2. Badania rozpuszczalności 5-jodouraculu

Badania spektroskopowe UV-VIS rozpuszczalności 5-jodouracylu w roztworach dendrymeru PPI G4 przeprowadzono w zakresie stężeń dendrymeru PPI G4 od 10 µM do 100 µM wykorzystując identyczną procedurę pomiarową jak w przypadku 5-fluorouracylu. 5-Jodouracyl oznaczono w zakresie UV przy długości fali $\lambda_{\max} = 283$ nm. Do obliczeń zmian stężenia 5-jodouracylu wykorzystano molowy współczynnik absorpcji $\epsilon_{\max} = 6370 \pm 10 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ wyznaczony dla serii wodnych roztworów 5-jodouracylu w zakresie stężeń od 10 µM do 350 µM (Tabela Z2, Rys. Z2). Wyznaczona wartość molowego współczynnika absorpcji $\epsilon_{\max} = 6370 \pm 10 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ jest bliska wartości literaturowej równej $6079 \pm 20 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ [143] Wszystkie roztwory pobrane do badań UV zostały odwirowane i rozcieńczone 100-krotnie. Przykładowe widma 100-krotnie rozcieńczonych roztworów 5-jodouraculu nasyconych lekiem w 10 µM oraz 100 µM roztworze dendrymeru PPI G4 przedstawiono na wykresie (Rys. 72).



Rys. 72. Widma UV 100-krotnie rozcieńczonych, nasyconych 5-jodouracylem roztworów PPI G4 o stężeniu 10 μM (kolor niebieski) oraz 100 μM (kolor czerwony) roztworze dendrymeru PPI G4.

Wszystkie wyznaczone absorbancje dla badanych leków otrzymano jako różnicę absorbancji roztworów mieszanin badanego leku z dendrymerem PPI G4 oraz wodnego roztworu dendrymeru (Rys. Z2). Pomiary rozpuszczalności 5-jodouracylu w wodnych roztworach dendrymeru PPI G4 o stężeniach w zakresie od 10 μM od 100 μM (Tabela Z3) wskazują na w przybliżeniu liniowy (Rys. 73) wzrost rozpuszczalności leku wraz ze wzrostem stężenia PPI G4 w mieszaninie.



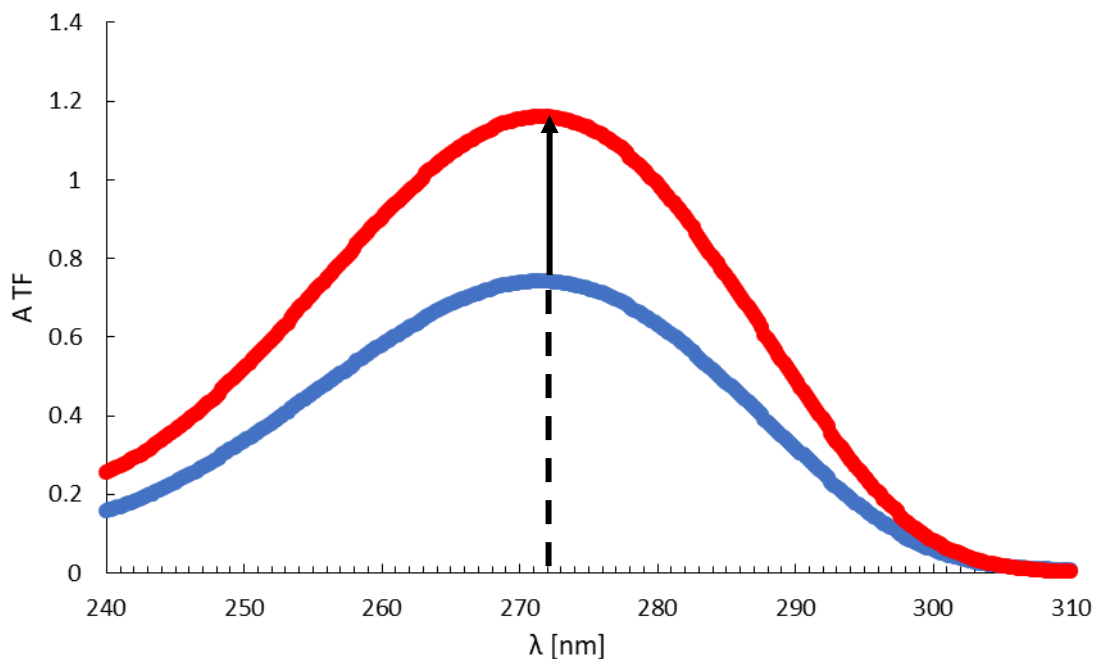
Rys. 73. Zależność rozpuszczalności 5-jodouracylu od stężenia wodnych roztworów dendrymeru PPI G4.

Zależność rozpuszczalności 5-jodouracylu od stężenia wodnego roztworu dendrymeru PPI G4 opisano równaniem linii prostej $y = (55 \pm 5)x + (7030 \pm 280)$ $R^2 = 0,9380$. Współczynnik kierunkowy ($n = 55 \pm 5$) określa średnią liczbę miejsc aktywnych w makrocząsteczce dendrymeru PPI G4, które wiążą cząsteczki 5-jodouracylu. Wyznaczona wartość wyrazu wolnego opisuje rozpuszczalność 5-jodouracylu w wodzie ($7,03 \pm 0,28$ mM). W badanych mieszaninach stosunek molowy 5-jodouracylu do dendrymeru PPI G4 wynosił od około 420:1 do 4200:1.

4.2.3. Badania rozpuszczalności tegafuru

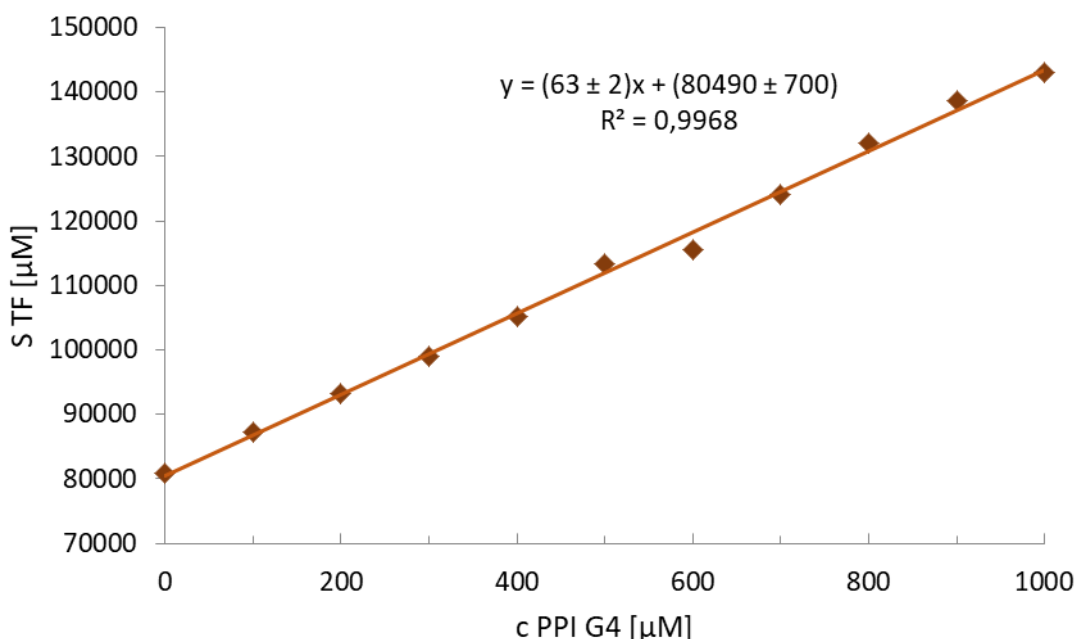
Rozpuszczalność tegafuru oznaczano spektrofotometrycznie, analogicznie jak w przypadku pochodnych uracylu. Badano wodne roztwory dendrymeru PPI G4 w zakresie stężeń od 100 µM do 1000 µM. Przygotowane mieszaniny wodne trzymano przez 7 dni w zaciemnionym miejscu nad nadmiarem krystalicznego lekařstwa. Do obliczeń stężenia tegafuru wykorzystano prostą kalibracyjną wyznaczoną dla długości fali $\lambda_{\max} = 272$ nm w zakresie jej liniowości, czyli dla stężeń tegafuru od 5 µM do 320 µM (Tabela Z4, Rys. Z3). Wyznaczoną prostą opisano równaniem $y = (8500 \pm 50)x$. Współczynnik kierunkowy prostej jest równy molowemu współczynnikowi absorpcji $\epsilon_{\max} = 8500 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$. Przykładowe widma

tegafuru w wodnym roztworze dendrymeru o stężeniu 100 μM oraz 1000 μM przedstawiono na wykresie (Rys. 74).



Rys. 74. Widma UV 1000-krotnie rozcieńczonych, nasyconych tegafurem roztworów dendrymeru PPI G4 o stężeniu 100 μM (kolor niebieski) oraz 1000 μM (kolor czerwony).

Przed przystąpieniem do pomiarów spektroskopowych nasycone tegafurem roztwory wodne rozcieńczano od 500 do 1000 razy tak, by oznaczana absorbancja mieściła się w zakresie stężeń prostej kalibracyjnej. Stężenie tegafuru w rozcieńczonych roztworach obliczono, poprzez odjęcie od absorbancji wodnej mieszaniny leku (TF) z dendrymerem PPI G4 absorbancji wodnego roztworu dendrymeru PPI G4 o tym samym stężeniu. Stężenie leku w nasyconych roztworach obliczono mnożąc oznaczone stężenie w roztworach rozcieńczonych przez krotność rozcieńczenia. Wartości rozpuszczalności tegafuru w obecności wodnych roztworów dendrymeru o wzrastającym stężeniu w zakresie od 100 μM do 1000 μM przedstawiono na wykresie (Tabela Z5, Rys. 75).



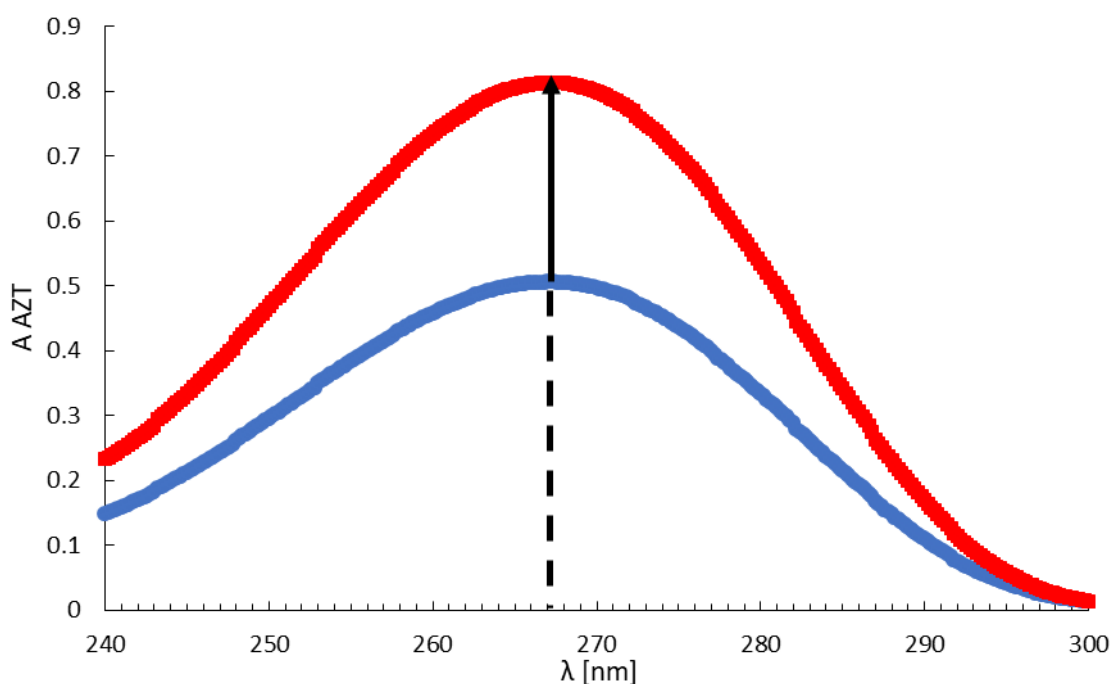
Rys. 75. Zależność rozpuszczalności tegafuru od stężenia wodnych roztworów dendrymeru PPI G4.

Otrzymaną zależność rozpuszczalności tegafuru od stężenia dendrymeru PPI opisano równaniem linii prostej $y = (63 \pm 2)x + (80490 \pm 700)$, $R^2 = 0,9968$ (Rys. 75). Współczynnik kierunkowy otrzymanego równania można interpretować jako średnią liczbę cząsteczek tegafuru przyłączonych do makrocząsteczki dendrymeru PPI G4 ($n = 63 \pm 2$). Wyraz wolny (~ 80 mM) przedstawia rozpuszczalność tegafuru w wodzie. Stosunek molowy liganda do dendrymeru PPI G4 w badanych mieszaninach wynosił od około 150:1 do 1500:1. Odstępstwa punktów od prostoliniowego przebiegu wykresu rozpuszczalności leku od stężenia dendrymeru (Rys. 75) wynikają z wielokrotnego rozcieńczania nasyconych roztworów tegafuru pobranych do pomiarów spektroskopowych UV.

4.2.4. Badania rozpuszczalności azydetymidyny

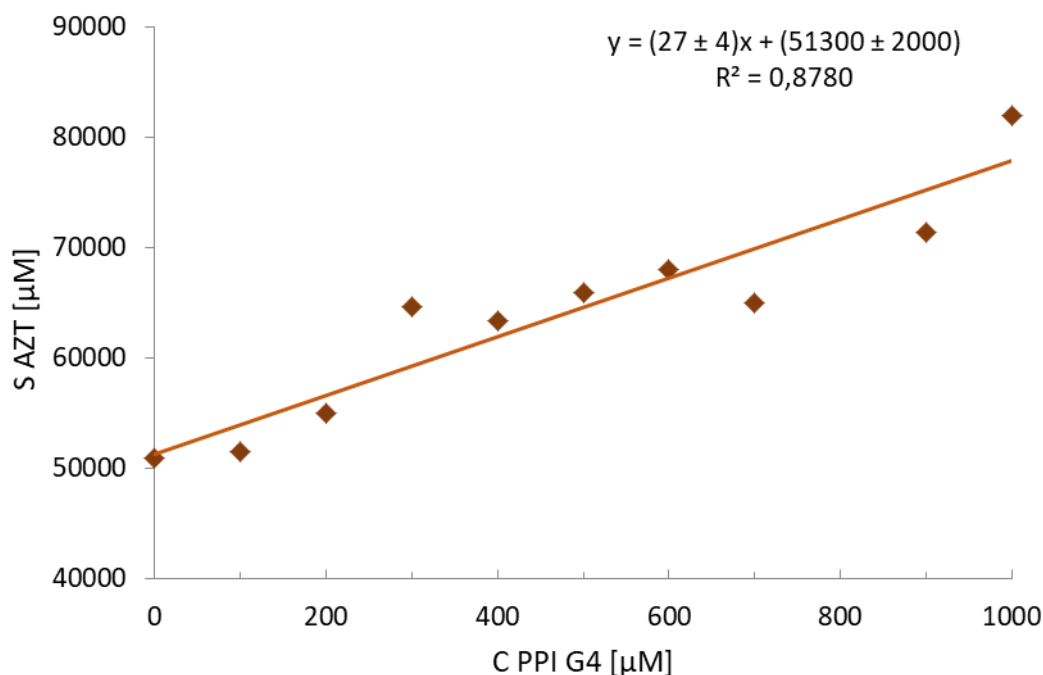
Badania rozpuszczalności azydetymidyny w wodnym roztworze dendrymeru PPI G4 w zakresie stężeń od 100 μM do 1000 μM przeprowadzono wykorzystując spektrofotometr UV-VIS. Zastosowano analogiczną procedurę pomiarową jak podczas pomiarów rozpuszczalności wcześniej opisanych leków. Przed przystąpieniem do pomiarów wyznaczono krzywą kalibracyjną dla wodnych roztworów azydetymidyny w zakresie stężeń od 5 μM do 300 μM. Otrzymaną zależność opisano równaniem linii prostej $y = (9930 \pm 35)x$ (Tabela Z6, Rys. Z4), której współczynnik kierunkowy opisuje molowy współczynnik

absorbancji tego leku $\epsilon_{\max} = 9930 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$. Przed pomiarami wszystkie nasycone azydetymidyną roztwory dendrymeru PPI G4 odwirowano i pobrane z nad osadu nierozpuszczonego leku próbki roztworów rozcieńczono 1000-krotnie. Przykładowe widma rozcieńczonych, nasyconych azydetymidyną roztworów PPI G4 o stężeniu dendrymeru $100 \mu\text{M}$ oraz $1000 \mu\text{M}$ przedstawiono na wykresie (Rys. 76).



Rys. 76. Widma UV 1000-krotnie rozcieńczonych, nasyconych azydetymidyną roztworów dendrymeru PPI G4 o stężeniu $100 \mu\text{M}$ (kolor niebieski) oraz $1000 \mu\text{M}$ (kolor czerwony).

Rozpuszczalność azydetymidyny w wodnych roztworach dendrymeru PPI G4 przedstawiono w funkcji stężenia polimeru (Rys. 77, Tabela Z7). Absorbancję azydetymidyny obliczono odejmując od absorbancji wodnego roztworu azydetymidyny z dendrymerem szczątkową absorbancję wodnego roztworu dendrymeru PPI G4 o identycznym stężeniu. Przetworzoną zależność opisano równaniem linii prostej $y = (27 \pm 4)x + (51300 \pm 2000)$, $R^2 = 0,8780$ gdzie współczynnik ($n = 27 \pm 4$) oznacza liczbę miejsc aktywnych w makrocząsteczce dendrymeru PPI G4, które mogą przyłączyć cząsteczki azydetymidyny. Wyraz wolny opisanej zależności przedstawia rozpuszczalność azydetymidyny w wodzie ($51,3 \pm 2,0 \text{ mM}$). W badanych mieszaninach leku i dendrymeru PPI G4 stosunek molowy azydetymidyny do dendrymeru PPI G4 wynosił w przybliżeniu od około 124:1 do 1240:1.

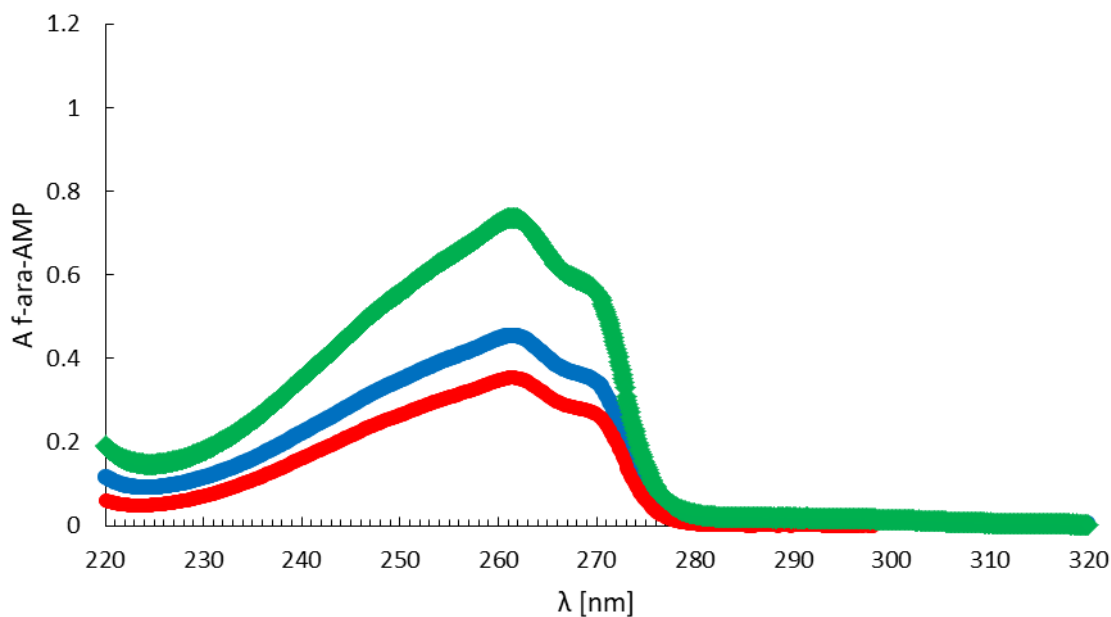


Rys. 77. Zależność rozpuszczalności azydotymidyny od stężenia wodnych roztworów dendrymeru PPI G4.

4.2.5. Badania rozpuszczalności monofosforanu fludarabiny

Rozpuszczalności fludarabiny oznaczono spektrofotometrycznie w zakresie UV przy długości fali $\lambda_{\max} = 262$ nm (zastosowano identyczną procedurę pomiarową jak w przypadku wcześniej badanych substancji). Molowy współczynnik absorpcji tego leku obliczono wykorzystując prostą kalibracyjną wyznaczoną dla wodnych roztworów monofosforanu fludarabiny o stężeniach w zakresie od 10 μM do 220 μM (Tabela Z8, Rys. Z5). Wyznaczoną prostą opisano równaniem $y = (15080 \pm 160)x$, $R^2 = 0,9955$. Współczynnik kierunkowy opisanej prostej jest równy molowemu współczynnikowi absorpcji $\epsilon_{\max} = 15080 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$.

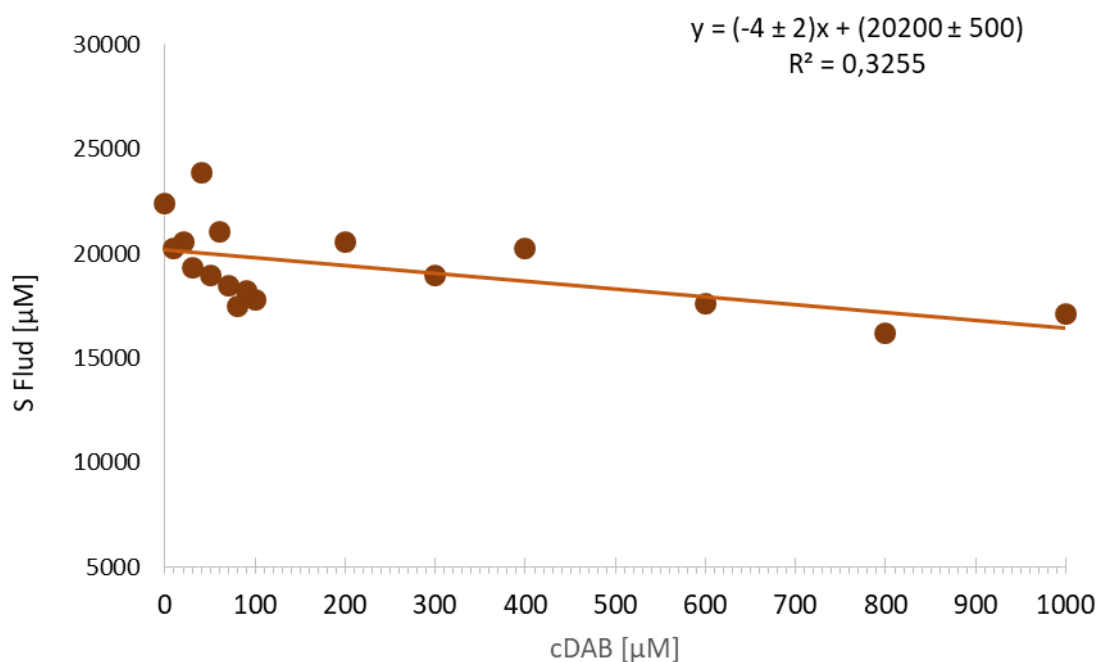
Badania rozpuszczalności monofosforanu fludarabiny w roztworach dendrymeru PPI G4 przeprowadzono w zakresie stężeń polimeru od 10 μM do 1000 μM . Badane nasycone lekiem roztwory dendrymeru PPI G4 odwirowano i pobrane z nad osadu próbki roztworów rozcieńczono 200-krotnie. Przykładowe widma 200-krotnie rozcieńczonych, nasyconych monofosforanem fludarabiny roztworów dendrymeru PPI G4 o stężeniu 100 μM , 200 μM oraz 1000 μM -przedstawiono na wykresie (Rys. 78).



Rys. 78. Widma UV 200-krotnie rozcieńczonych nasyconych monofosforanem fludarabiny roztworów dendrymeru PPI G4 o stężeniu 100 μM (kolor niebieski), 200 μM (kolor zielony) oraz 1000 μM (kolor czerwony).

Ze względu na mętnienie roztworu dendrymeru PPI G4 nasyconego monofosforanem fludarabiny nad osadem wykonano dodatkowe pomiary w niższym zakresie stężeń dendrymeru PPI G4 od 10 μM do 100 μM . Wyliczony stosunek molowy monofosforanu fludarabiny do dendrymeru PPI G4 w badanym zakresie stężeń (10 μM – 1000 μM) wynosi od około 55:1 do 5500:1. Rozpuszczalność monofosforanu fludarabiny w badanych roztworach (Rys. 79, Tabela Z9) nie wykazuje istotnych statystycznie zmian. Potwierdza to niski współczynnik korelacji prostej ($R^2 = 0,3255$) opisującej zależność rozpuszczalności tego leku od stężenia polimeru

$$y = (-4 \pm 2)x + (20200 \pm 500).$$

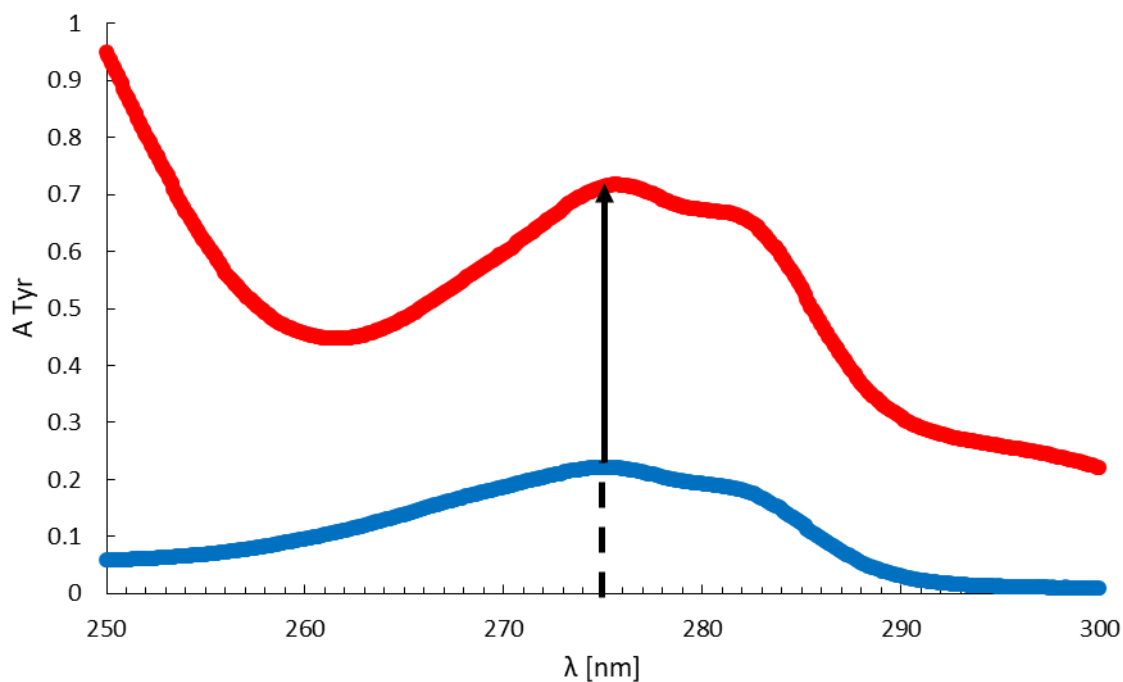


Rys. 79. Zależność rozpuszczalności monofosforanu fludarabiny od stężenia wodnych roztworów dendrymeru PPI G4.

Wyraz wolny tej prostej (20200 ± 500) opisuje rozpuszczalność monofosforanu fludarabiny w wodzie. Ujemna wartość współczynnika kierunkowego (-4 ± 2) i jego duży błąd względny, mogą wskazywać na wytrącanie kompleksu dendrymer-lek.

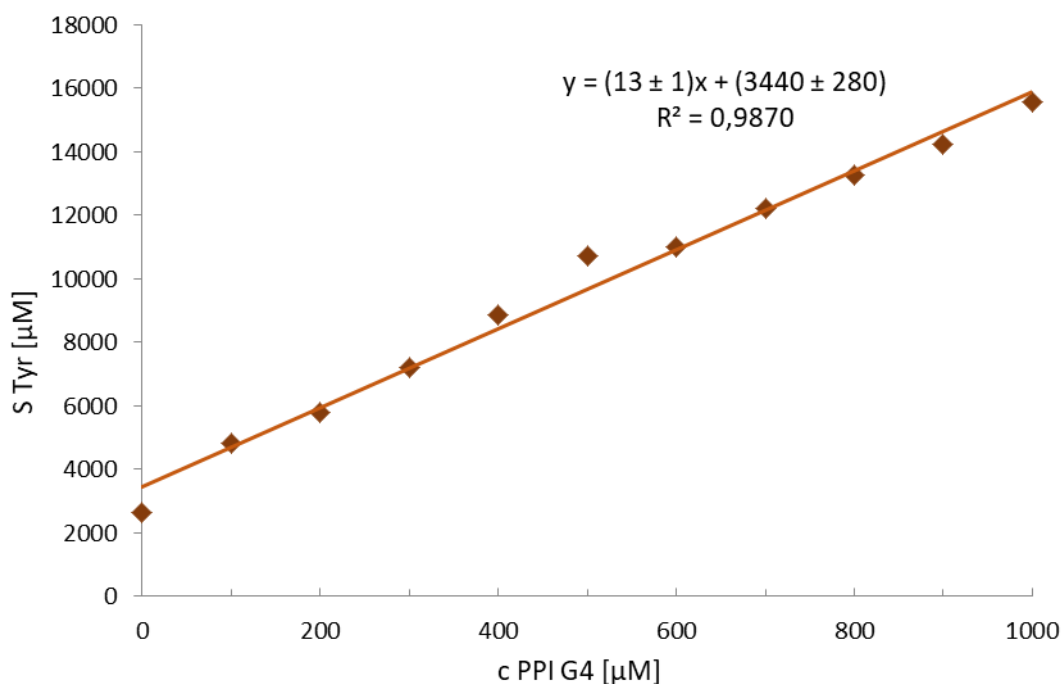
4.2.6. Badania rozpuszczalności L- α -tyrozyny

Rozpuszczalność L- α -tyrozyny w wodnych roztworach dendrymeru PPI G4 o wzrastającym stężeniu polimeru od 100 μM do 1000 μM oznaczono spektrofotometrycznie w zakresie UV. Roztwory L- α -tyrozyny pobrane z osadu nierozpuszczonego aminokwasu odwirowano, rozcieńczano 30 razy i oznaczano spektrofotometrycznie w zakresie UV przy długości fali $\lambda_{\text{max}} = 275$ nm wykorzystując molowy współczynnik $\varepsilon_{\text{max}} = 1370 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ [177]. Przykładowe widma tyrozyny rozpuszczonej w 100 μM oraz w 1000 μM roztworze dendrymeru PPI G4 przedstawiono na wykresie (Rys. 80).



Rys. 80. Widma UV 30-krotnie rozcieńczonych, nasyconych L- α -tyroziną roztworów dendrymeru PPI G4 o stężeniu 100 μ M (kolor niebieski) oraz 1000 μ M (kolor czerwony).

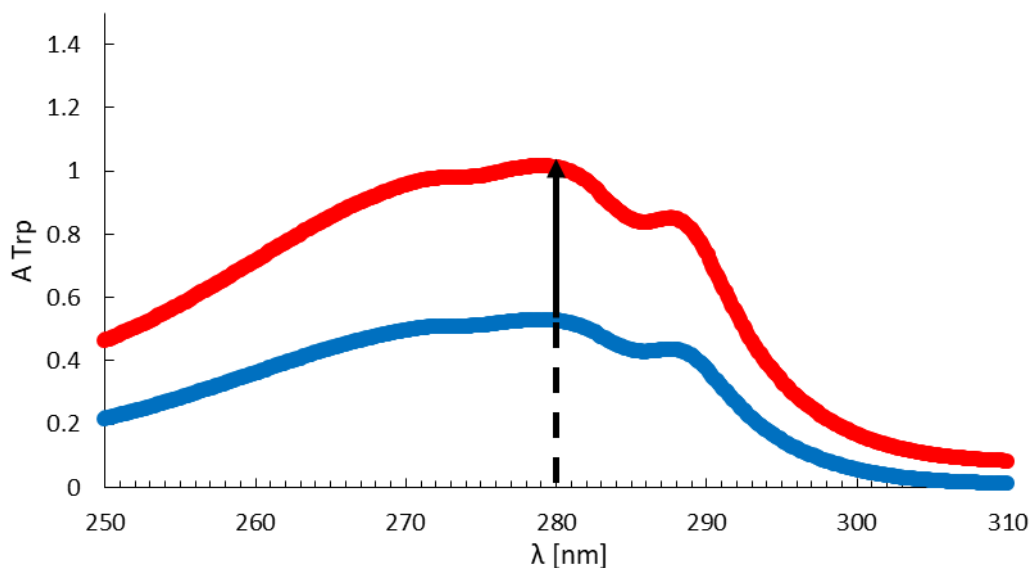
Absorbancję L- α -tyrozyny obliczono odejmując od absorbancji nasyconego L- α -tyroziną roztworu dendrymeru PPI G4 o danym stężeniu, absorbancję roztworu dendrymeru o identycznym stężeniu. Wyznaczone wartości rozpuszczalności tyrozyny w roztworach dendrymeru PPI G4 przedstawiono w funkcji stężenia polimeru (Rys. 81, Tabela Z10). Zaobserwowano w przybliżeniu liniowy wzrost rozpuszczalności L- α -tyrozyny. Otrzymaną zależność opisano równaniem linii prostej $y = (13 \pm 1)x + (3440 \pm 280)$, $R^2 = 0,9870$ (Rys. 81). Współczynnik kierunkowy tej prostej ($n=13 \pm 1$) opisuje liczbę miejsc aktywnych w makrocząsteczce dendrymeru PPI G4, do których są przyłączone cząsteczki tyrozyny. Wyraz wolny ($3,44 \pm 0,28$ mM) jest w przybliżeniu równy rozpuszczalności tyrozyny w wodzie. W badanych mieszaninach stosunek molowy L- α -tyrozyny do dendrymeru PPI G4 wynosił od około 50:1 do 500:1.



Rys. 81. Rozpuszczalność L- α -tyrozyny w wodnych roztworach dendrymeru PPI G4 o wzrastającym stężeniu.

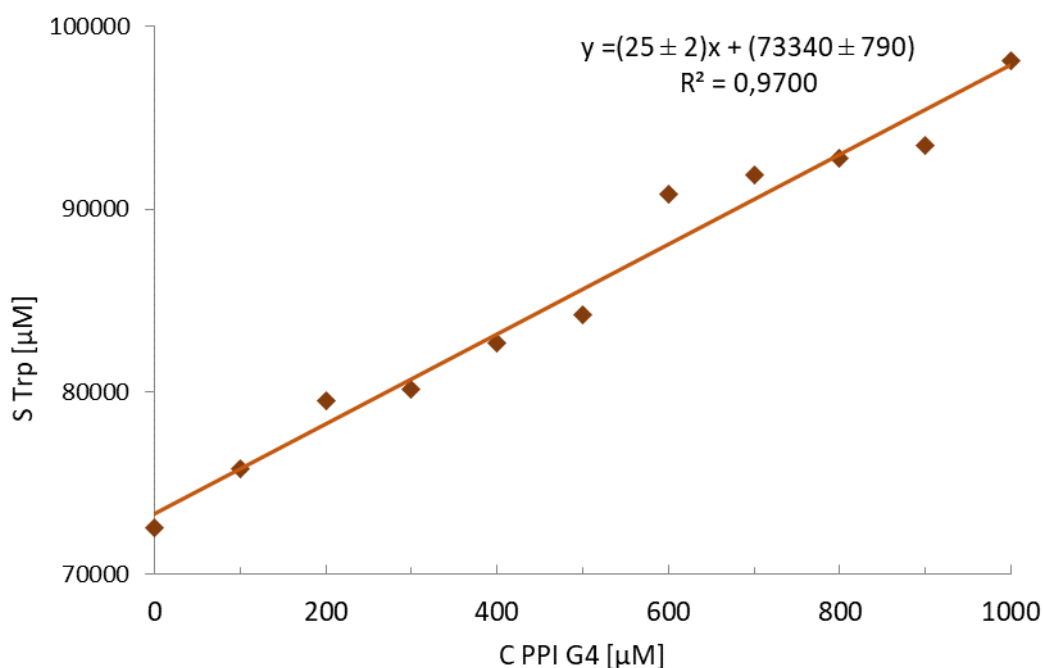
4.2.7. Badania rozpuszczalności L- α -tryptofanu

W celu określenia zmian stężenia L- α -tryptofanu rozpuszczonego w wodnych roztworach dendrymeru PPI G4 w zakresie stężeń polimeru od 100 μM do 1000 μM wykorzystano współczynnik absorpcji $\epsilon_{\text{max}} = 5240 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ wyznaczony przy długości fali $\lambda_{\text{max}} = 280 \text{ nm}$ [177]. Procedura pomiarowa była identyczna jak we wcześniejszych oznaczeniach. Pobrane z nad osadu aminokwasu (Trp) roztwory wodne rozcieńczano 500 razy przed pomiarem spektrofotometrycznym. Przykładowe widma nasyconych L- α -tryptofanem wodnych roztworów dendrymeru PPI G4 o stężeniu 100 μM oraz 1000 μM przedstawiono na wykresie (Rys. 82).



Rys. 82. Widma UV 500-krotnie rozcieńczonych, nasyconych L- α -tryptofanem roztworów dendrymeru PPI G4 o stężeniu 100 μM (niebieski) oraz 1000 μM (kolor czerwony).

Absorbancję L- α -tryptofanu wyznaczono odejmując od absorbancji roztworu tego aminokwasu (Trp) rozpuszczonego w wodnym roztworze dendrymeru PPI G4 o danym stężeniu absorbancję roztworu dendrymeru o identycznym stężeniu. Wyznaczone wartości rozpuszczalności tryptofanu w wodnych roztworach dendrymeru o wzrastającym stężeniu polimeru od 100 μM do 1000 μM przedstawiono na wykresie (Rys. 83, Tabela Z11).



Rys. 83. Rozpuszczalność L- α -tryptofanu w funkcji stężenia dendrymeru PPI G4.

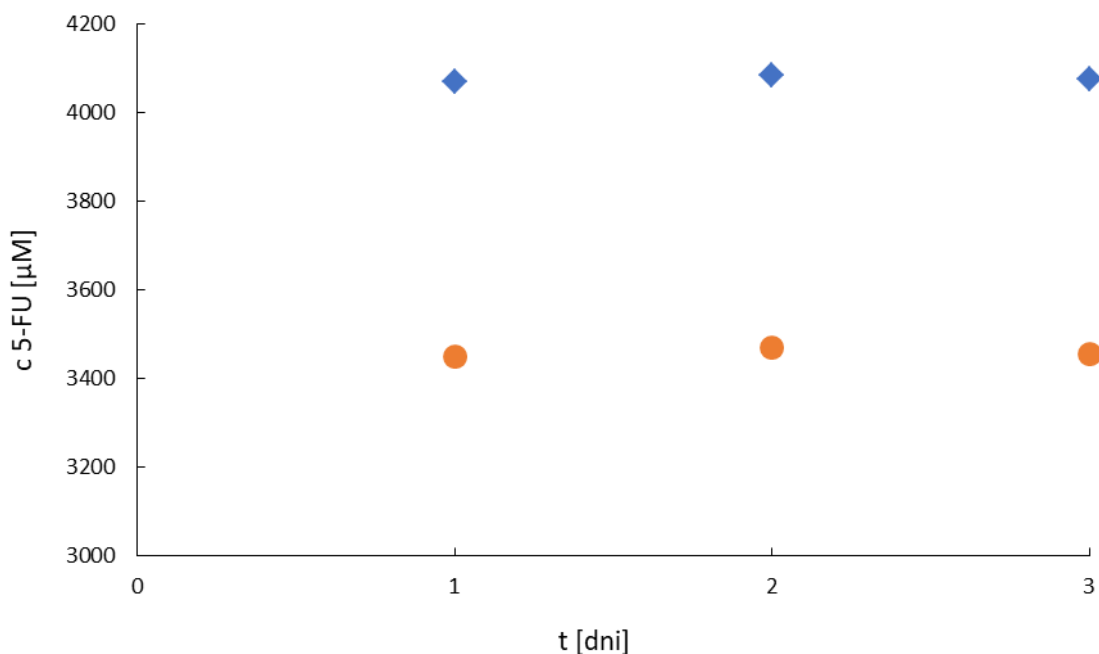
Zależność rozpuszczalności L- α -tryptofanu w roztworach dendrymeru PPI G4 o wzrastającym stężeniu ma przebieg prostoliniowy (Rys. 83, Tabela 15) i została opisana równaniem linii prostej $y = (25 \pm 2)x + (73340 \pm 790)$, $R^2 = 0,9700$. Współczynnik kierunkowy ($n = 25 \pm 2$) otrzymanej prostej wskazuje liczbę cząsteczek tryptofanu, które są wiązane przez makrocząsteczkę dendrymeru PPI G4. Wyraz wolny wyznaczonej prostej ($\sim 73,3$ mM) przedstawia rozpuszczalność L- α -tryptofanu w wodzie. Stosunek molowy L- α -tryptofanu do dendrymeru PPI G4 w przeprowadzonym eksperymencie wynosił od około 100:1 do 1000:1.

4.3. Dializa równowagowa

Dla wszystkich badanych układów dendrymer-ligand (np. lek lub aminokwas) dializę równowagową przeprowadzono w dializerach dwukomorowych (Harvard Apparatus, USA), w których komory rozdzielone były półprzepuszczalną membraną o molekularnej granicy rozdziału 2 kDa (Sigma Aldrich). W pierwszej komorze znajdowała się wodna mieszanina dendrymeru PPI G4 oraz liganda, natomiast w drugiej komorze był wodny roztwór liganda o początkowym stężeniu identycznym jak w komorze pierwszej. Dializy prowadzono do momentu, gdy układ osiągnął stan równowagi. Roztwory pobrane z komór rozcieńczano wodą destylowaną i analizowano spektrofotometrycznie. Badania dializy równowagowej przeprowadzane były w temperaturze pokojowej. Wyniki eksperymentalne opracowano korzystając z modelu jednego rodzaju miejsc aktywnych. Wykorzystując równanie Scatcharda-Klotza (Rów. 11) wyznaczono parametry wiązania (receptor- ligand), tj. liczbę miejsc aktywnych n w makrocząsteczce dendrymeru PPI G4, które przyłączają cząsteczki liganda oraz stałą równowagi tworzenia kompleksu ligand – miejsce aktywne K . Przyłączenie cząsteczek liganda do makromolekuły powoduje zmniejszenie liczby niezwiązanych cząsteczek liganda w pierwszej komorze. W trakcie trwania dializ stężenie niezwiązanego liganda w obu komorach wyrównuje się, na skutek migracji przez błonę cząsteczek liganda z drugiej komory. Skutkuje to większym stężeniem liganda w komorze z dendrymerem PPI G4 w porównaniu do stężenia liganda w drugiej komorze. W układzie zostanie osiągnięty stan równowagi, gdy oznaczane stężenia liganda w obu komorach dializera nie ulegają dalszym zmianom.

4.3.1. Wyniki badań techniką dializy równowagowej wodnych mieszanin dendrymeru PPI G4 i 5-fluorouracylu

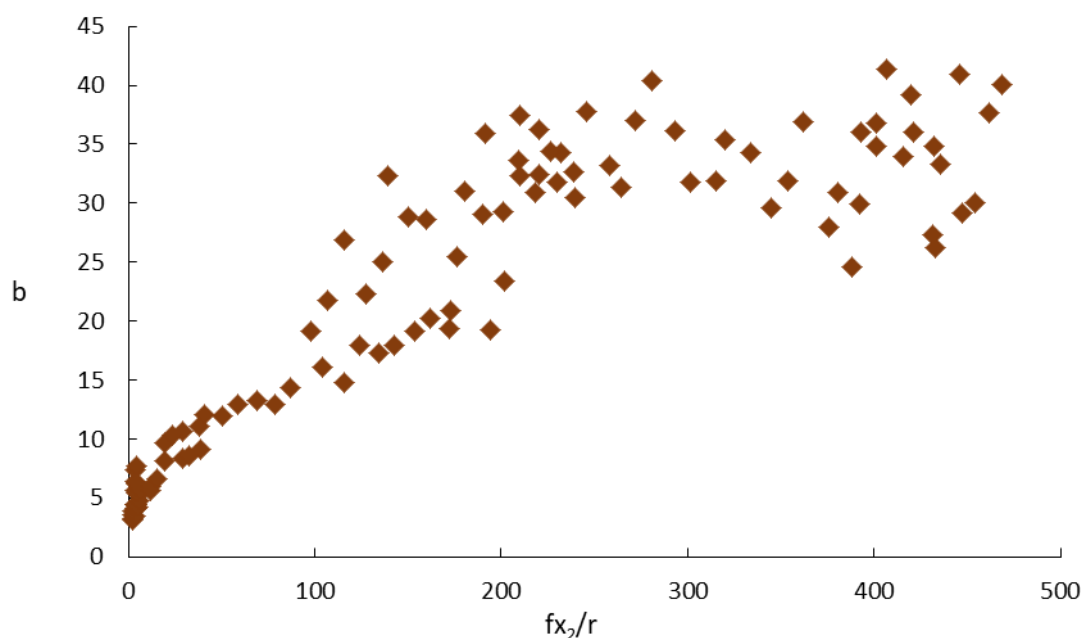
W celu wyznaczenia czasu po jakim ustala się stan równowagi w badanym układzie, wykonano serię dializ w temperaturze pokojowej przy stałym stosunku molowym leku do dendrymeru równym 100:1, gdy stężenie dendrymeru PPI G4 wynosiło $40 \mu\text{M}$, a początkowe stężenie 5-fluorouracylu wynosiło $4000 \mu\text{M}$. Badane roztwory z obu komór pobierano, rozcieńczano i analizowano spektrofotometrycznie. Z uzyskanych danych obliczono stężenie 5-fluorouracylu znajdującego się w komorze z dendrymerem i w komorze bez dendrymeru. Stwierdzono, że po jednym, dwóch i trzech dniach wartość stężenia 5-fluorouracylu w obu komorach jest identyczna (Rys. 84, Tabela Z12), co świadczy, że badany układ osiągnął stan równowagi już po jednym dniu trwania dializy. Wzrost stężenia 5-fluorouracylu (liganda) w komorze z dendrymerem (receptorem) i jego zmniejszenie w komorze po przeciwnej stronie błony dializacyjnej potwierdza tworzenie się kompleksu.



Rys. 84. Rozkład stężenia 5-fluorouracylu w funkcji czasu pomiędzy badane roztwory: dla roztworu z dendrymerem PPI G4(♦) oraz bez dendrymeru PPI G4 (●).

Następnie wykonano serię dializ o stałym ($40 \mu\text{M}$) stężeniu dendrymeru PPI G4 i wzrastającym początkowym stężeniu leka od $160 \mu\text{M}$ do $19600 \mu\text{M}$ w temperaturze pokojowej. W pierwszej komorze dializera znajdowała się mieszanina $40 \mu\text{M}$ dendrymeru PPI G4 oraz 5-fluorouracylu, natomiast w drugiej komorze wodny roztwór 5-fluorouracylu

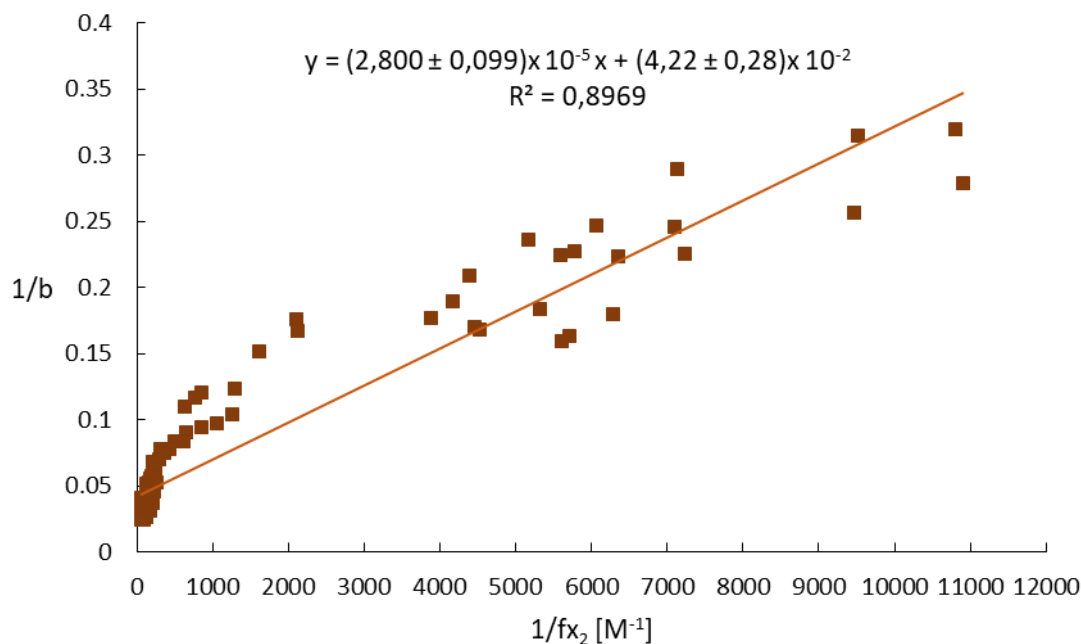
o identycznym początkowym stężeniu (f_0) jak w komorze pierwszej. Stosunek molowy 5-fluorouracylu do dendrymeru PPI G4 w badanych mieszaninach wynosił od 4:1 do 490:1. Wszystkie dializy w serii przerywano po jednym dniu i oznaczano spektrofotometrycznie stężenie 5-fluorouracylu (fx_1) w roztworze 40 μ M dendrymeru (r) PPI G4 i stężenie tego leku (fx_2) w roztworze nie zawierającym dendrymeru. Stężenie leku c związanego przez dendrymer obliczono odejmując od stężenia leku w roztworze dendrymeru (fx_1) stężenie leku w roztworze po przeciwnej stronie (bez dendrymeru) i przeliczono na liczbę moli związanego leku przez mol dendrymeru PPI G4 ($b = c/r$). Zależność liczby moli związanego leku b od stosunku stężenia niezwiązanego liganda do stężenia dendrymeru (fx_2/r) (Rys. 85, Tabela Z13) silnie wzrasta do wartości fx_2/r równej około 200/1.



Rys. 85. Zależność liczby moli związanego 5-fluorouracylu (b) przypadającej na mol dendrymeru PPI G4 od stosunku stężenia wolnego liganda do stężenia dendrymeru (fx_2/r).

W celu wyznaczenia liczby miejsc aktywnych w makromolekule PPI G4 oraz stałej tworzenia kompleksu dendrymer-lek w środowisku wodnym, wykorzystano równanie Scatcharda-Klotza (Rów. 11). Wyznaczono zależność stosunku stężenia dendrymeru i związanego 5-fluorouracylu ($1/b$) od odwrotności stężenia wolnego 5-fluorouracylu ($1/fx_2$) dla poszczególnych badanych składów (Rys. 86). Zależność tę

(Rys. 86, Tabela Z13) opisano równaniem linii prostej zgodnie z modelem jednego rodzaju miejsc aktywnych.



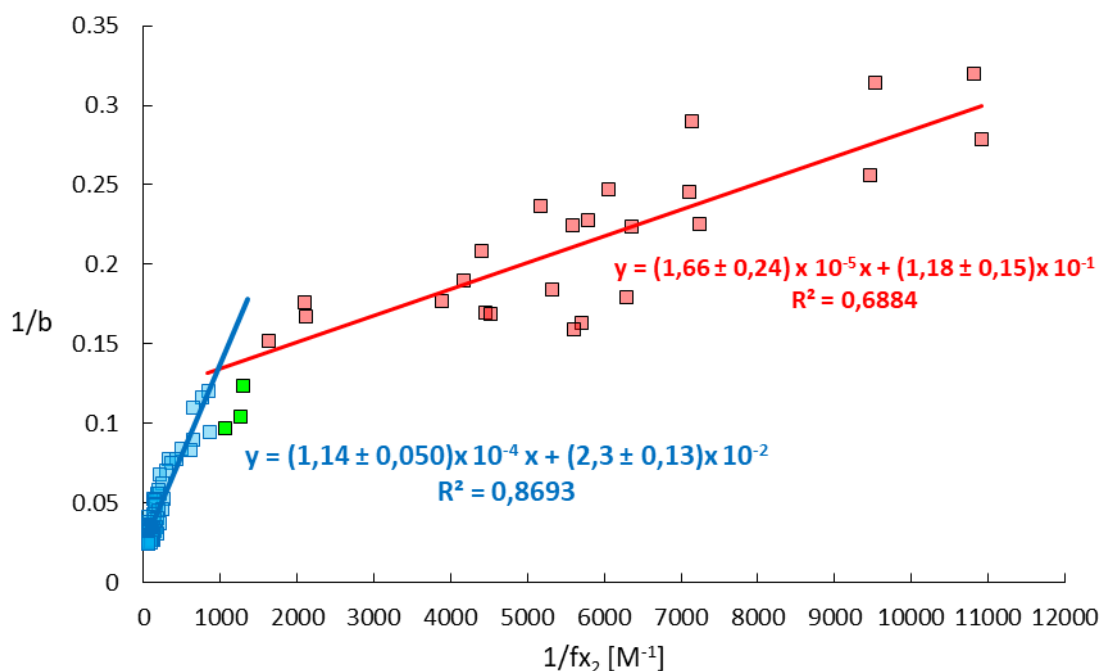
Rys. 86. Zależność stosunku stężenia 40 μ M dendrymeru PPI G4 i związanego 5-fluorouracylu ($1/b$) od odwrotności stężenia wolnego 5-fluorouracylu ($1/fx_2$).

Liczba miejsc aktywnych w makrocząsteczce dendrymeru PPI G4 wyliczona z równania Scatchatda – Klotza oraz stała równowagi tworzenia kompleksu polimeru i 5-fluorouracylu wynoszą:

$$n = 24 \pm 2$$

$$K = 1510 \pm 150$$

Uzyskane rozwiązania mają charakter przybliżony, ponieważ zależność $1/b$ od $1/fx_2$ wykazują odstępstwo od prostoliniowego przebiegu w zakresie niskich wartości $1/f$. Wskazuje to, że makrocząsteczka PPI G4 posiada dwa rodzaje miejsc aktywnych [201] wiążących ten ligand. Dlatego nieliniowe fragmenty zależności $\frac{1}{b} \left(\frac{1}{fx_2} \right)$ odpowiednio w zakresie niskich (Rys. 87, punkty niebieskie) i wysokich (Rys. 87, punkty czerwone) wartości $\frac{1}{fx_2}$ opisano dwiema prostymi, w celu wyznaczenia liczby miejsc aktywnych o dużym i małym powinowactwie do makrocząsteczki dendrymeru PPI G4.



Rys. 87. Zależność stosunku stężenia 40 μM dendrymeru PPI G4 i związanego 5-fluorouracylu ($1/b$) od odwrotności stężenia wolnego 5-fluorouracylu ($1/fx_2$). Punkty niebieskie odpowiadają składom o dużym stosunku molowym 5-fluorouracylu do dendrymeru, punkty czerwone odpowiadają składom o niskim stosunku molowym 5-fluorouracylu do dendrymeru PPI G4. Punkty nieprzyporządkowane do dwóch poprzednich zakresów zaznaczono na zielono.

Wyznaczone metodą Scatcharda-Klotza (Rów. 11) parametry wiązania dla obu prostoliniowych zakresów odwrotności stężenia wolnego liganda $\frac{1}{fx_2}$ wynoszą odpowiednio

$$n_1 = 9 \pm 2$$

$$K_1 = 7100 \pm 1900 \text{ (dla wysokich wartości } \frac{1}{f})$$

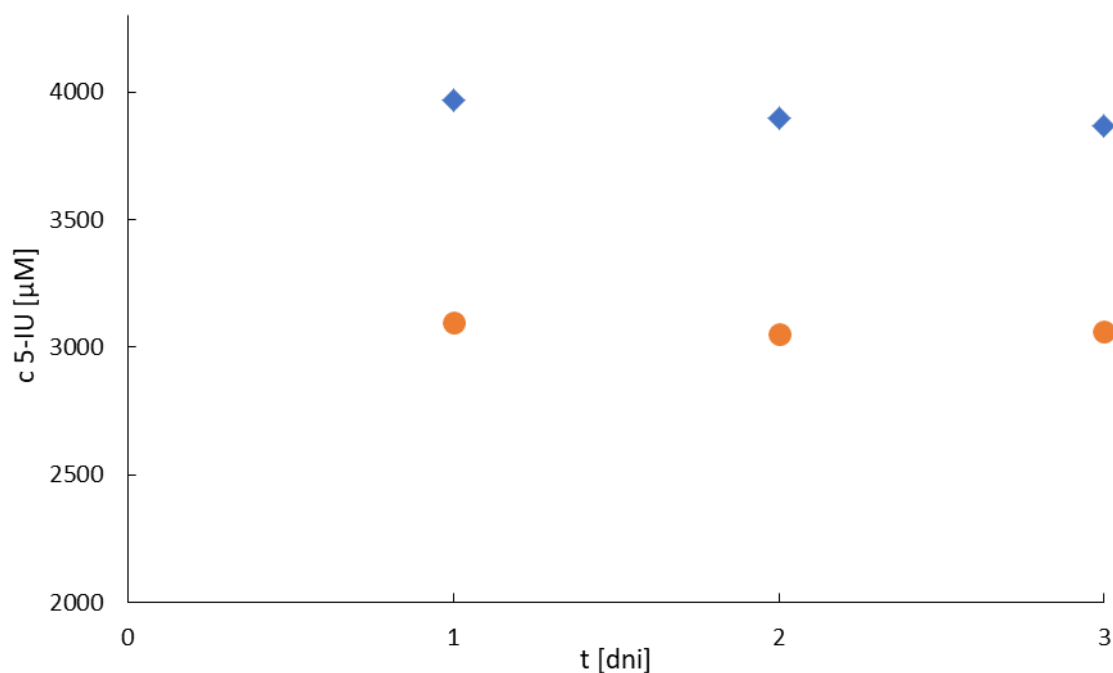
$$n_2 = 44 \pm 3$$

$$K_2 = 200 \pm 20 \text{ (dla niskich wartości } \frac{1}{f})$$

Obliczone wartości parametrów wiązania wskazują, że makrocząsteczka dendrymeru PPI G4 ma około $n_1 = 9 \pm 2$ miejsc aktywnych o dużym powinowactwie, które wiążą 5-fluorouracyl ze stałą tworzenia $K_1 = 7100 \pm 1900$. W makrocząsteczce dendrymeru PPI G4 obecne są również $n_2 = 44 \pm 3$ miejsca aktywne o mniejszym powinowactwie, które przyłączają 5-fluorouracyl ze stałą tworzenia $K_2 = 200 \pm 20$. Uzyskane stałe wiązania 5-fluorouracylu z miejscami aktywnymi dendrymeru PPI G4 o wyższym i niższym powinowactwie do tego leku są bliskie opublikowanym wartościom obliczonym metodą sprzężonych regresji dwuparametrowych [207].

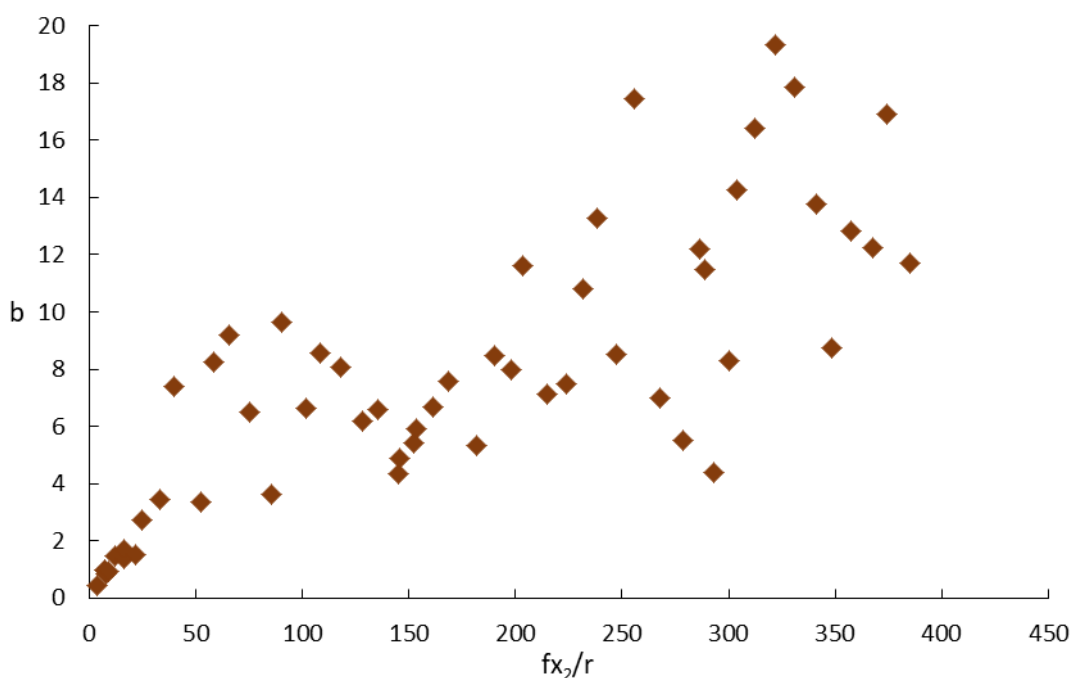
4.3.2. Wyniki badań techniką dializy równowagowej wodnych mieszanin dendrymeru PPI G4 i 5-jodouracylu

Badania techniką dializy równowagowej dendrymeru PPI G4 z 5-jodouracylem (5-IU) przeprowadzono w temperaturze pokojowej. Ze względu na małą rozpuszczalność 5-jodouracylu w wodzie do badań wykorzystano 10 μM dendrymer PPI G4. Mniejsze stężenie dendrymeru pozwoliło zbadać mieszaniny w szerszym zakresie składu aż do stosunku molowego leku do dendrymeru 450/1. Początkowo przeprowadzono serię dializ przy stałym stosunku molowym 5-jodouracylu do makrocząsteczki PPI G4 równym 100:1, w celu wyznaczenia czasu po jakim w badanym układzie ustala się stan równowagi. W pierwszej celi dializera znajdowała mieszanina 10 μM dendrymeru PPI G4 oraz 1000 μM 5-jodouracylu. W drugiej komorze, oddzielonej błoną półprzepuszczalną o molekularnej granicy rozdziału 2 kDa, znajdował się tylko roztwór 1000 μM 5-jodouracylu. Dializę przerywano po jednym, dwóch i trzech dniach. Roztwory z obu komór pobierano, rozcieńczano i analizowano spektrofotometrycznie. Z uzyskanych danych obliczono stężenie 5-jodouracylu w obu komorach. Rozkład stężenia liganda pomiędzy fazę z dendrymerem PPI G4 i fazę wodną nie ulega zmianie po jednym, dwóch i trzech dniach dializ (Rys. 88, Tabela Z14), co wskazuje, że badany układ osiągnął stan równowagi po jednym dniu trwania dializy. Większa zawartość liganda w roztworze zawierającym dendrymer PPI G4 niż w roztworze wodnym wskazuje, że makrocząsteczki dendrymeru PPI G4 przyłączają pewną liczbę cząsteczek leku (5-IU).



Rys. 88. Rozkład stężenia 5-jodouracylu (5-IU) w funkcji czasu trwania dializy w obu celach pomiarowych: zawierających dendrymer PPI G4 (♦) oraz bez dendrymeru PPI G4 (•).

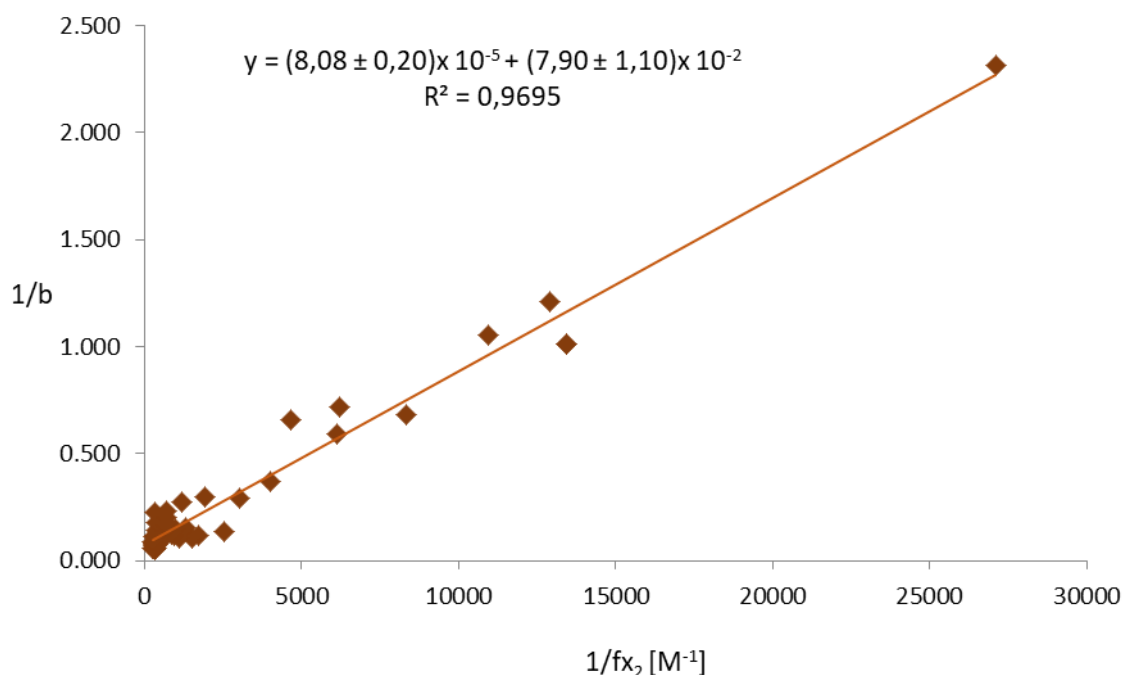
W kolejnym etapie badań przeprowadzono serię dializ, gdzie w pierwszej komorze dializera znajdował się 10 μM dendrymer PPI G4 oraz 5-jodouracyl o wzrastającym stężeniu od 40 μM do 4500 μM . W drugiej celi dializera znajdował się tylko wodny roztwór 5-jodouracylu o identycznym stężeniu początkowym f_0 jak w celi pierwszej. Stosunek molowy 5-jodouracylu do dendrymeru PPI G4 w badanym zakresie stężeń wynosił od 4:1 do 450:1. Dializę przeprowadzono przez 24 godziny. Roztwory z obu komór pobierano, rozcieńczano i analizowano spektrofotometrycznie. Z otrzymanych danych obliczono stężenie (c) 5-jodouracylu związanego z dendrymerem PPI G4, poprzez odjęcie od stężenia 5-jodouracylu w mieszaninie z dendrymerem (f_{x1}), stężenie 5-jodouracylu z komory bez dendrymeru (f_{x1}). Obliczoną różnicę stężeń następnie przeliczono na liczbę moli związanego liganda przez mol makrocząsteczki PPI G4 ($b=c/r$), gdzie r - stężenie dendrymeru PPI G4 w pierwszej komorze (10 μM). Otrzymaną wartość (Rys. 89, Tabela Z15) przedstawiono w funkcji stosunku stężenia związanego liganda i stężenia dendrymeru ($b=c/r$) od stosunku stężenia niezwiązanego leku i stężenia dendrymeru PPI G4 (f_{x2}/r).



Rys. 89. Zależność liczby moli związanego 5-jodouracylu (b) przypadającej na mol dendrymeru PPI G4 od stosunku stężenia wolnego liganda i stężenia dendrymeru (fx_2/r).

Zależność liczby moli 5-IU przypadającej na mol dendrymeru PPI G4 od stosunku stężenia niezwiązanego liganda do stężenia makromolekuły PPI G4 rośnie gwałtownie do wartości fx_2/r równej około 75/1.

Wykorzystując równanie Scatcharda-Klotza (Rów. 11) obliczono liczbę miejsc aktywnych w makrocząsteczce dendrymeru PPI G4, które mają zdolność do przyłączania cząsteczek 5-jodouracylu w wodnym środowisku oraz stałą tworzenia kompleksu dendrymer-lek. Wyznaczoną zależność (Rys. 90, Tabela Z15) stosunku stężenia dendrymeru PPI G4 i związanego 5-jodouracylu ($1/b$) od odwrotności stężenia wolnego 5-jodouracylu ($1/fx_2$) opisano równaniem linii prostej zgodnie z modelem jednego rodzaju miejsc aktywnych.



Rys. 90. Zależność stosunku stężenia 10 μM dendrymeru PPI G4 i związanego 5-jodouracylu ($1/b$) od odwrotności stężenia wolnego 5-jodouracylu ($1/fx_2$).

Liczbę miejsc aktywnych w makrocząsteczce dendrymeru PPI G4 oraz stałą równowagi tworzenia kompleksu dendrymer PPI G4 - lek obliczone z równania Scatcharda- Klotza (Rów. 11) wynoszą:

$$n = 13 \pm 2$$

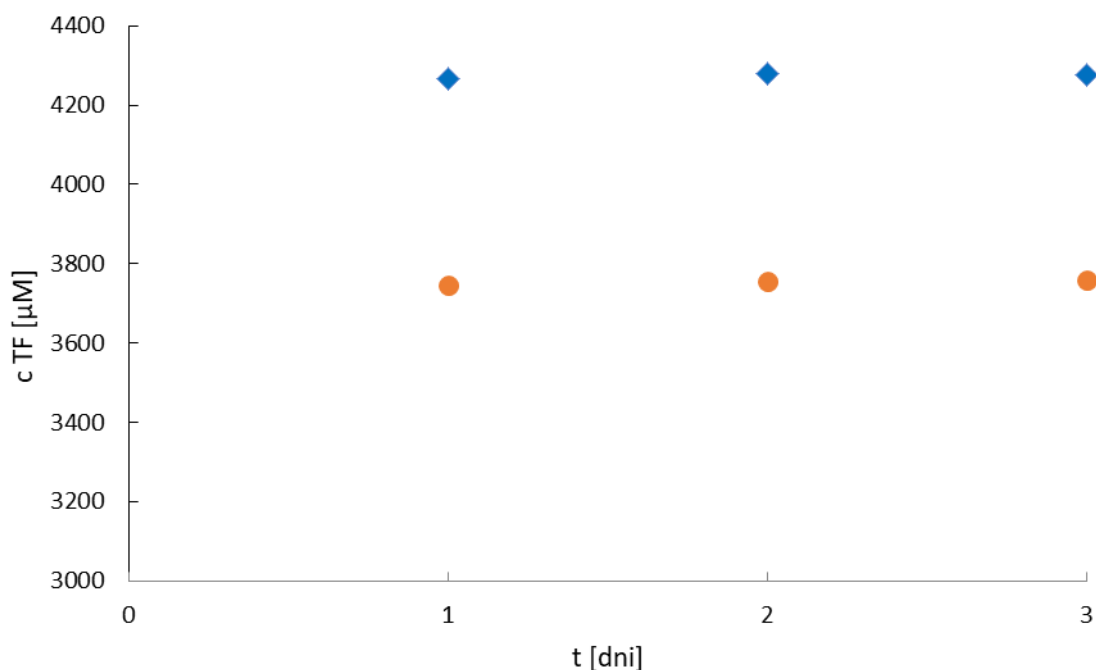
$$K = 1000 \pm 200$$

Dendrymer PPI G4 może samorzutnie przyłączyć około 13 cząsteczek 5-jodouracylu w temperaturze pokojowej w środowisku wodnym.

4.3.3. Wyniki badań techniką dializy równowagowej wodnych mieszanin dendrymeru PPI G4 i tegafuru

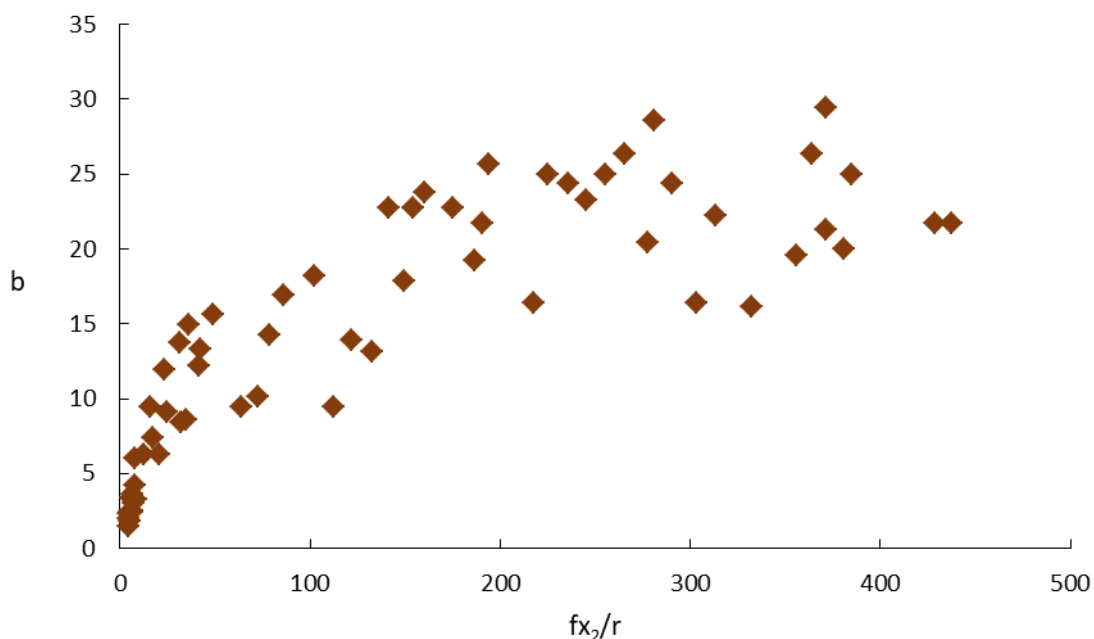
W pierwszym etapie badań dializy równowagowej analogicznie jak w przypadku 5-fluorouracylu, wyznaczono czas po jakim ustala się stan równowagi w badanym układzie. Wykonano serię pomiarów, gdzie w pierwszej komorze dializera znajdowała się mieszanina 40 μM dendrymeru PPI G4 oraz 4000 μM tegafuru, natomiast w drugiej komorze znajdował się roztwór 4000 μM tegafuru. Początkowy stosunek molowy leku do polimeru w całej serii był stały i wynosił 100:1. Dializy przerywano odpowiednio po jednym, dwóch oraz trzech dniach. Badane roztwory z obu komór pobierano, rozcieńczano i oznaczano

spektrofotometrycznie. Rozkład stężenia tegafuru pomiędzy fazę wodną i fazę z dendrymerem PPI G4 ustala się po jednym dniu trwania dializy (Rys. 91, Tabela Z16).



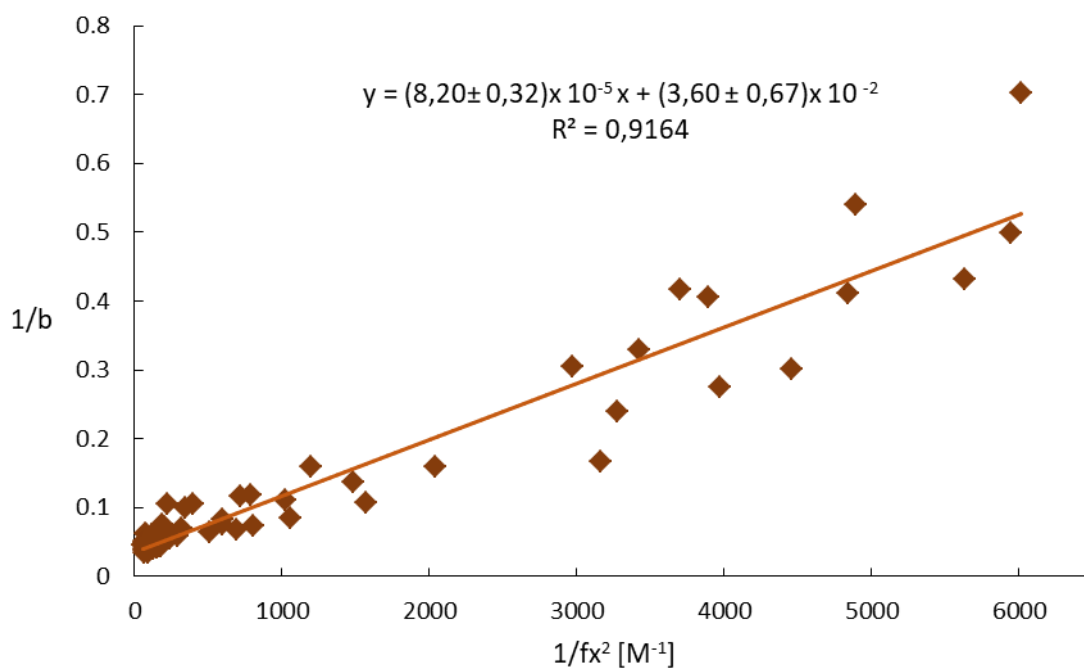
Rys. 91. Rozkład stężenia tegafuru w funkcji czasu pomiędzy badane roztwory: dla roztworu z dendrymerem PPI G4 (♦) oraz bez dendrymeru PPI G4 (●).

Następnie pomiary dializy równowagowej wykonywane były w temperaturze pokojowej dla różnych stężeń początkowych leku przy ustalonym stężeniu ($40 \mu\text{M}$) dendrymeru PPI G4. W pierwszej celi dializera znajdowała się mieszanina wodnego roztworu polimeru oraz wodnego roztworu tegafuru o początkowym stężeniu od $160 \mu\text{M}$ do $16800 \mu\text{M}$. W przeciwceli dializera znajdował się wodny roztwór tegafuru o identycznym stężeniu jak w celi pierwszej. Dla badanych składów stosunek stężeń leku do dendrymeru był równy od 4:1 do 420:1. Dializy przerywano po jednym dniu. Roztwory z obu komór pobierano, rozcieńczano i analizowano spektrofotometrycznie. Stosując identyczną procedurę obliczeniową, jak w przypadku 5-fluorouracylu wyznaczono (Rys. 92, Tabela Z17) zależność liczby moli tegafuru (b) przypadającej na mol polimeru PPI G4 od stosunku stężenia niezwiązanego liganda do stałego stężenia dendrymeru ($f x_2/r$). Zależność ta silnie wzrasta do stosunku $f x_2/r$ równego około 150/1.



Rys. 92. Zależność liczba moli związanego tegafuru (b) przypadającej na 1 mol dendrymeru PPI G4 od stosunku stężenia wolnego liganda do całkowitego stężenia dendrymeru ($f x_2/r$).

W celu wyznaczenia parametrów wiązania dendrymeru PPI G4 z tegafurem wykres zależności stosunku stężenia dendrymeru i związanego tegafuru ($1/b$) od odwrotności stężenia wolnego tegafuru ($1/f x_2$) analizowano modelem jednego rodzaju miejsc aktywnych.

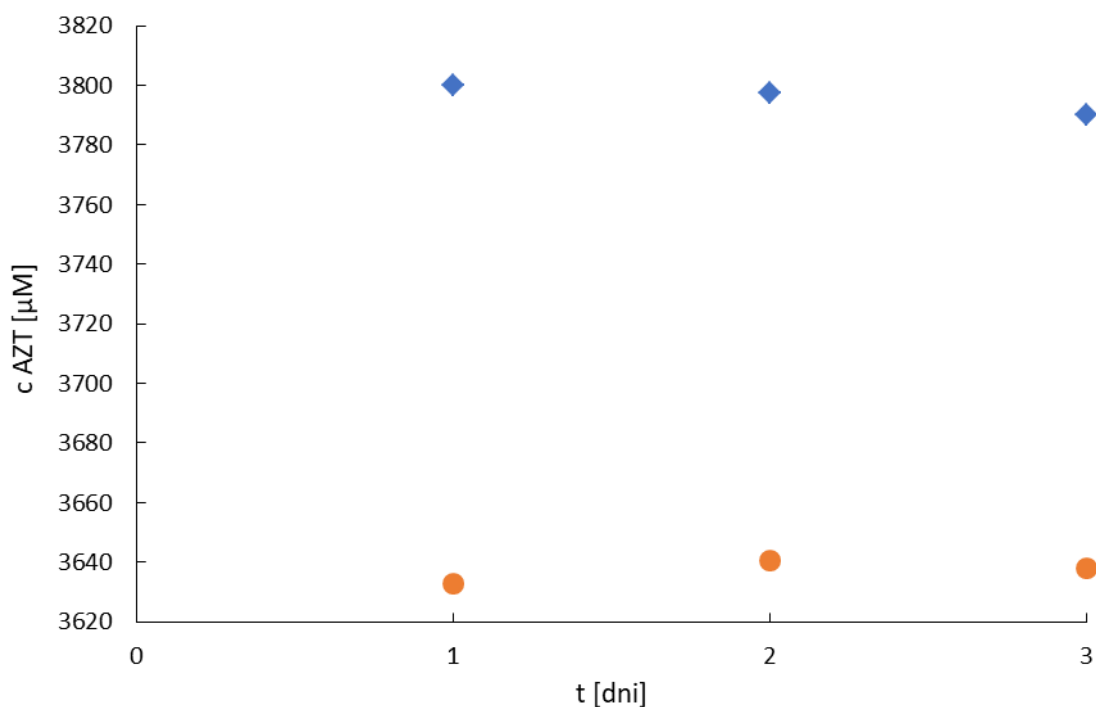


Rys. 93. Zależność stosunku stężenia 40 μM dendrymeru PPI G4 i związanego tegafuru ($1/b$) od odwrotności stężenia wolnego tegafuru ($1/f x_2$).

Otrzymaną zależność opisano równaniem linii prostej (Rys. 93, Tabela Z17). Wykorzystując równanie Scatcharda-Klotza (Rów. 11) wyznaczono liczbę miejsc aktywnych w makrocząsteczce dendrymeru PPI G4. Uzyskane wyniki wskazują, że makrocząsteczka badanego dendrymeru przyłącza $n = 28 \pm 5$ cząsteczek tegafuru ze stałą równowagi $K = 440 \pm 100$. Otrzymane parametry wiązania są zgodne z opublikowanymi parametrami [208] obliczonymi metodą regresji dwuparametrowej.

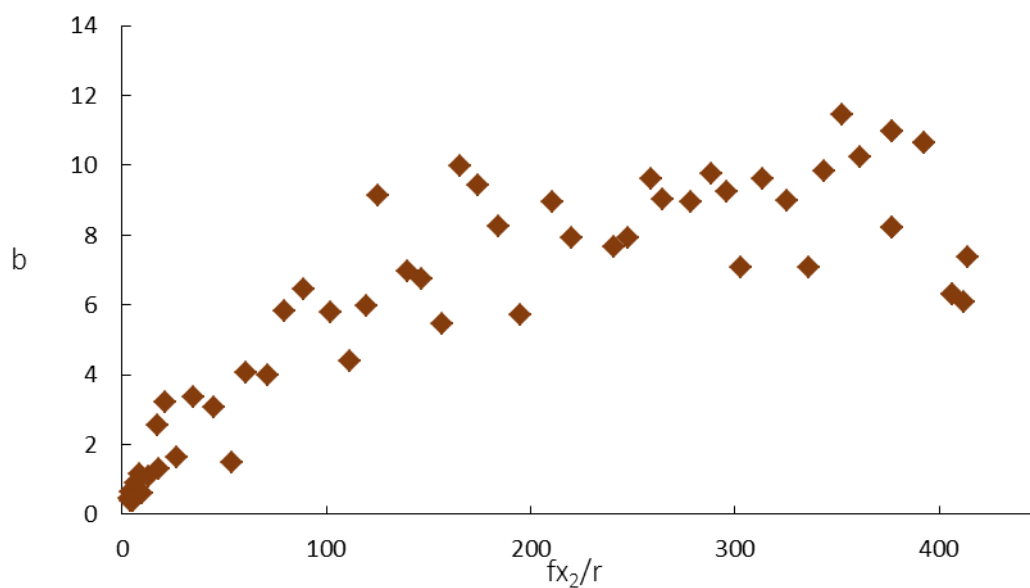
4.3.4. Wyniki badań techniką dializy równowagowej wodnych mieszanin dendrymeru PPI G4 i azydotymidyny

Pomiary dializy równowagowej azydotymidyny przeprowadzono w wodnym roztworze 40 μM dendrymeru PPI G4 w temperaturze pokojowej w środowisku wodnym. Podobnie jak w przypadku 5-jodouracylu wyznaczono czas, po jakim w badanym układzie ustala się stan równowagi. W pierwszej celi dializera znajdowała się wodna mieszanina 40 μM dendrymeru PPI G4 oraz 4000 μM azydotymidyny. W drugiej komorze (oddzielonej błoną półprzepuszczalną) znajdował się tylko wodny roztwór azydotymidyny o początkowym stężeniu f_0 identycznym jak w komorze pierwszej. Wybrane stężenia odpowiadają stosunkowi molowemu liganda do dendrymeru PPI G4 równemu 100:1. Dializę przerywano po jednym, dwóch oraz trzech dniach. Roztwory z obu komór pobierano, rozcieńczano i analizowano spektrofotometrycznie. Z uzyskanych danych obliczono stężenie azydotymidyny w roztworze wodnym zawierającym dendrymer oraz w roztworze bez dendrymeru. Wyniki przedstawiono w formie wykresu stężenia azydotymidyny w funkcji czasu trwania dializ (Rys. 94, Tabela Z18). Stan równowagi w badanym układzie ustala się po jednym dniu trwania dializy.



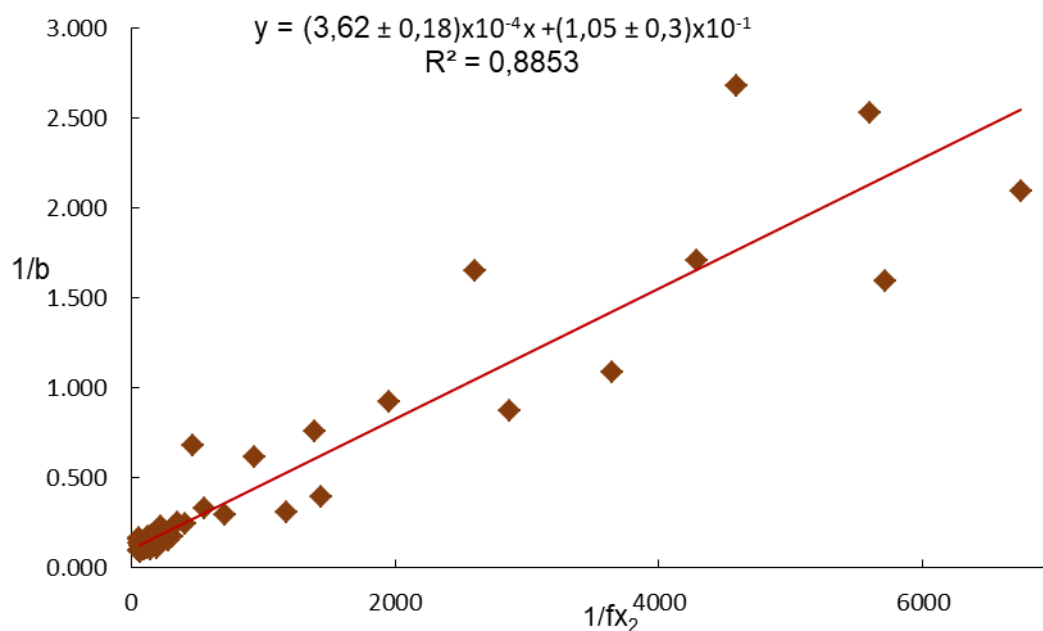
Rys. 94. Rozkład stężenia azydotymidyny w funkcji czasu trwania dializy w obu celach pomiarowych: zawierających dendrymer PPI G4 (♦) oraz bez dendrymeru PPI G4 (●).

Następnie przeprowadzono serię dializ o stałym stężeniu dendrymeru $r = 40 \mu\text{M}$ oraz wzrastającym początkowym f_0 stężeniu azydotymidyny. W pierwszej komorze dializera znajdowała się wodna mieszanina dendrymeru PPI G4 oraz azydotymidyna o stężeniu w zakresie od $160 \mu\text{M}$ do $18400 \mu\text{M}$. W drugiej celi dializera znajdowała się tylko azydotymidyna o takim samym stężeniu początkowym od $160 \mu\text{M}$ do $18400 \mu\text{M}$. Badany stosunek molowy azydotymidyny do dendrymeru PPI G4 wynosił od 4:1 do 460:1. Dializa trwała jeden dzień. Roztwory z obu komór pobierano, rozcieńczano i analizowano spektrofotometrycznie. Stężenie związanej azydotymidyny (c) obliczono odejmując od stężenia leku z fazy zawierającej dendrymer fx_1 stężenie niezwiązanego leku w fazie wodnej fx_2 . Następnie stężenie to przeliczono na liczbę moli przypadających na mol dendrymeru PPI G4 ($b = c/r$) i przedstawiono w funkcji stosunku stężenia niezwiązanego leku do stężenia dendrymeru (fx_2/r). Otrzymana zależność (Rys. 95, Tabela Z19) silnie wzrasta do stosunku molowego niezwiązanego leku do dendrymeru PPI G4 równego około 150/1.



Rys. 95. Zależność liczby moli związanej azydetymidyny (b) przypadającej na mol dendrymeru PPI G4 od stosunku stężenia wolnego liganda i stężenia dendrymeru (fx_2/r).

Do wyznaczenia parametrów wiązania, tj. liczby miejsc aktywnych (n) w makrocząsteczce dendrymeru PPI G4, do których mogą przyłączyć się cząsteczki azydetymidyny oraz stałą tworzenia kompleksu (K) dendrymer-AZT wykorzystano równanie Scatcharda-Klotza (Rów. 11). Zależność (Rys. 96, Tabela Z19) stosunku stężenia dendrymeru i związanej azydetymidyny ($1/b$) od odwrotności stężenia wolnego (niezwiązanego) leku ($1/fx_2$) opisano równaniem linii prostej zgodnie z modelem jednego rodzaju miejsc aktywnych.



Rys. 96. Zależność stosunku stężenia 10 μM dendrymeru PPI G4 i związanej azydotymidyny ($1/b$) od odwrotności stężenia wolnego leku ($1/fx_2$).

Wyliczone z równania Scatcharda-Klotza (Rów. 11) parametry wiązania azydotymidyny przez makrocząsteczkę dendrymeru PPI G4 wynoszą:

$$n = 10 \pm 3$$

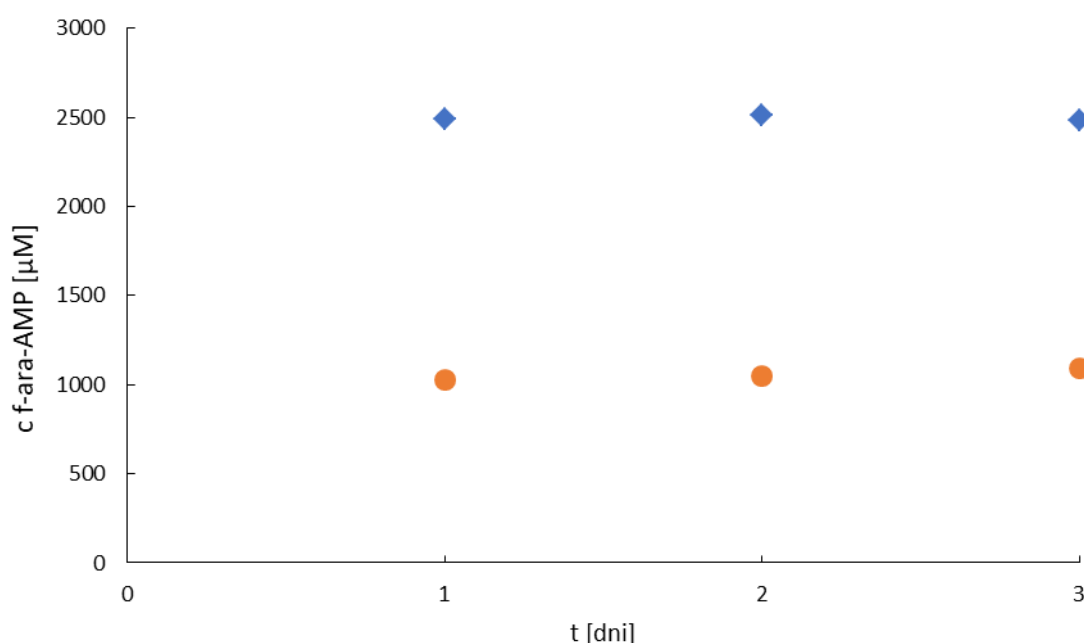
$$K = 290 \pm 100$$

Wyniki wyznaczone techniką dializy równowagowej wskazują na samorzutne przyłączanie do około 13 cząsteczek azydotymidyny przez makrocząsteczki dendrymeru PPI G4 w środowisku wodnym w temperaturze pokojowej.

4.3.5. Wyniki badań techniką dializy równowagowej wodnych mieszanin dendrymeru PPI G4 i monofosforanu fludarabiny

Pomiary dializy równowagowej monofosforanu fludarabiny ze względu na niską rozpuszczalność leku przeprowadzono z 20 μM dendrymerem PPI G4 w środowisku wodnym w temperaturze pokojowej. Mniejsze stężenie dendrymeru pozwoliło zbadać mieszaniny w szerszym zakresie składu aż do stosunku molowego leku do dendrymeru 470/1. Na początku pomiarów przeprowadzono serię dializ o stałym stosunku molowym fludarabiny do dendrymeru PPI G4 równym 100:1. W pierwszej celi dializera znajdowała się wodna mieszanina 20 μM dendrymeru PPI G4 oraz 2000 μM fludarabiny. W drugiej celi znajdował

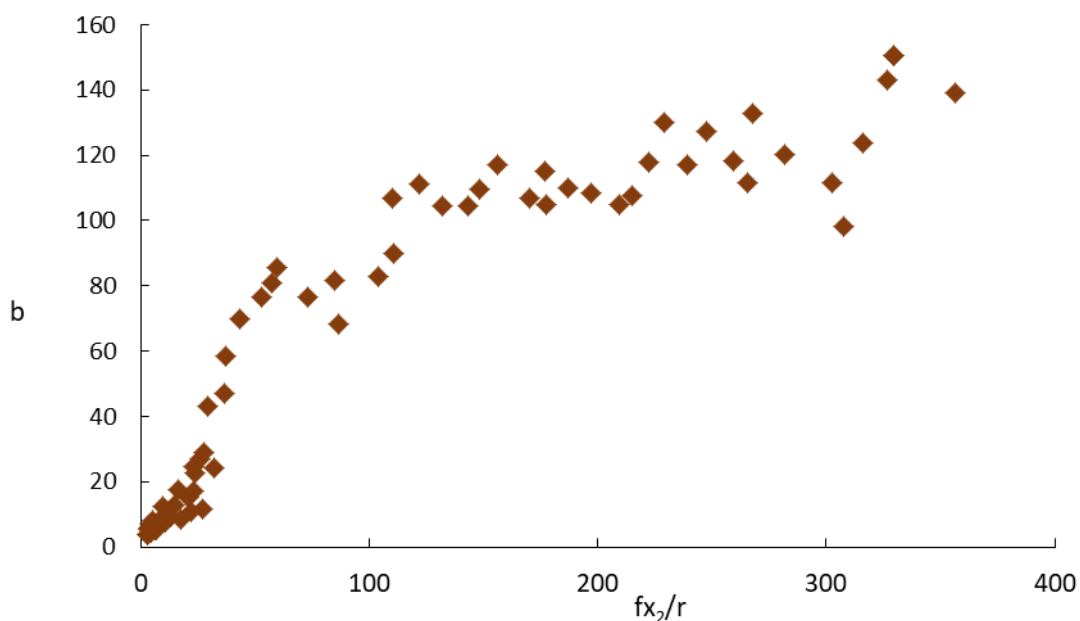
się tylko wodny roztwór leku o początkowym stężeniu f_0 identycznym jak w celi pierwszej. W celu wyznaczenia czasu po jakim ustala się stan równowagi w badanym układzie dializę przerywano po jednym, dwóch oraz trzech dniach. Badane roztwory pobierano z obu komór, rozcieńczano i analizowano spektrofotometrycznie. Z uzyskanych danych obliczono stężenie monofosforanu fludarabiny w wodnym roztworze dendrymeru PPI G4 fx_1 oraz stężenie (niezwiązanego) leku w fazie wodnej fx_2 . Wzrost stężenia fludarabiny w komorze pierwszej względem roztworu w komorze drugiej świadczy o przyłączeniu jej cząsteczek do makrocząsteczki dendrymeru PPI G4 (Rys. 97, Tabela Z20). Rozkład stężenia fludarabiny pomiędzy dwie fazy w dializerze jest identyczny po pierwszym dniu, podobnie jak po drugim i trzecim (Rys. 97).



Rys. 97. Rozkład stężenia monofosforanu fludarabiny w funkcji czasu trwania dializy pomiędzy badane wodne roztwory: zawierające dendrymer PPI G4 (♦) oraz bez dendrymeru PPI G4 (●).

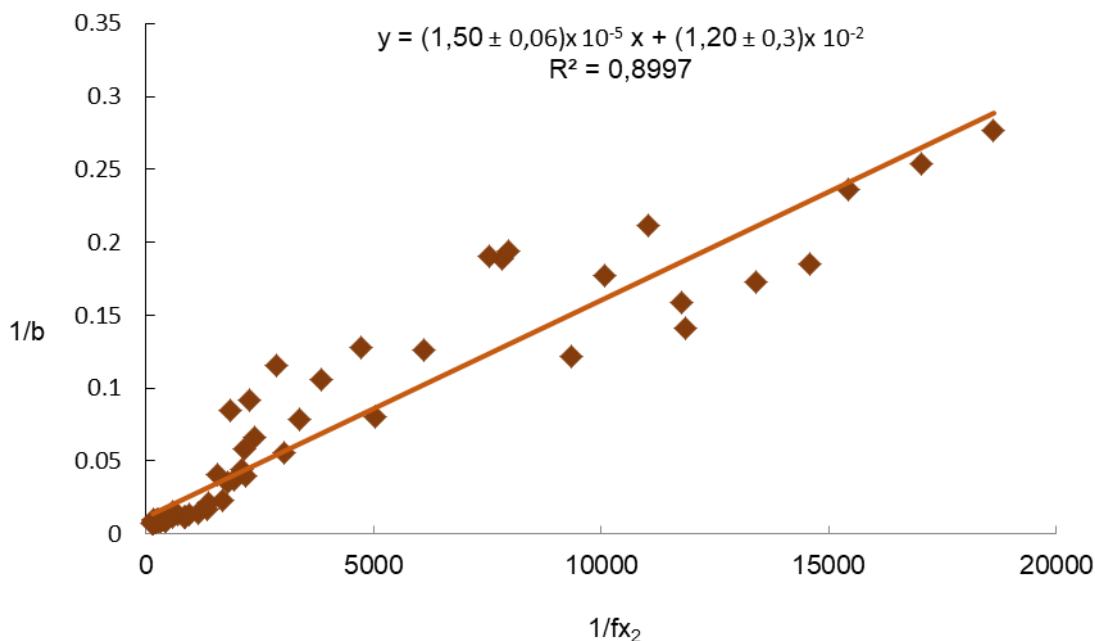
W następnym etapie pomiarów przeprowadzono serię dializ o stałym stężeniu dendrymeru PPI G4 $r=20 \mu\text{M}$ oraz wzrastającym stężeniu monofosforanu fludarabiny od $100 \mu\text{M}$ do $9400 \mu\text{M}$. Stosunek molowy leku do dendrymeru PPI G4 w badanym zakresie stężeń wynosił od 5:1 do 470:1. Dializy przerywano po jednym dniu, roztwory pobierano, rozcieńczano i analizowano spektrofotometrycznie. Z uzyskanych danych obliczono stężenie związanego (c) monofosforanu fludarabiny z makrocząsteczkami polimeru PPI G4, które przeliczono na liczbę moli leku ($b = c/r$) związanych z dendrymerem PPI G4 (Rys. 98,

Tabela Z20). Obliczone wartości b przedstawiono (Rys. 98, Tabela Z21) w funkcji stosunku stężenia niezwiązanego leku do stężenia dendrymeru (fx_2/r).



Rys. 98. Zależność liczby moli związanego monofosforanu fludarabiny (b) przypadającej na mol dendrymeru PPI G4 od stosunku stężenia wolnego liganda i stężenia dendrymeru (fx_2/r).

Zależność liczby stosunku moli związanej fludarabiny przez dendrymer ($b = c/r$) od stosunku stężenia wolnego (niezwiązanego) leku i stężenia dendrymeru PPI G4 (fx_2/r) silnie wzrasta do wartości równej około 100/1. Z uzyskanych danych eksperymentalnych sporządzono również wykres zależności stosunku stężeń dendrymeru do związanego leku ($1/b$) od odwrotności stężenia niezwiązanego leku ($1/fx_2$). Otrzymaną zależność (Rys. 99, Tabela Z21) opisano równaniem linii prostej.



Rys. 99. Zależność stosunku stężenia 20 μM dendrymeru PPI G4 i związanej fludarabiny ($1/b$) od odwrotności stężenia wolnego leku ($1/fx_2$).

Wykorzystując równanie Scatcharda-Klotza (Rów. 11) obliczono parametry wiązania kompleksu dendrymer PPI G4- fludarabina:

$$n = 84 \pm 25$$

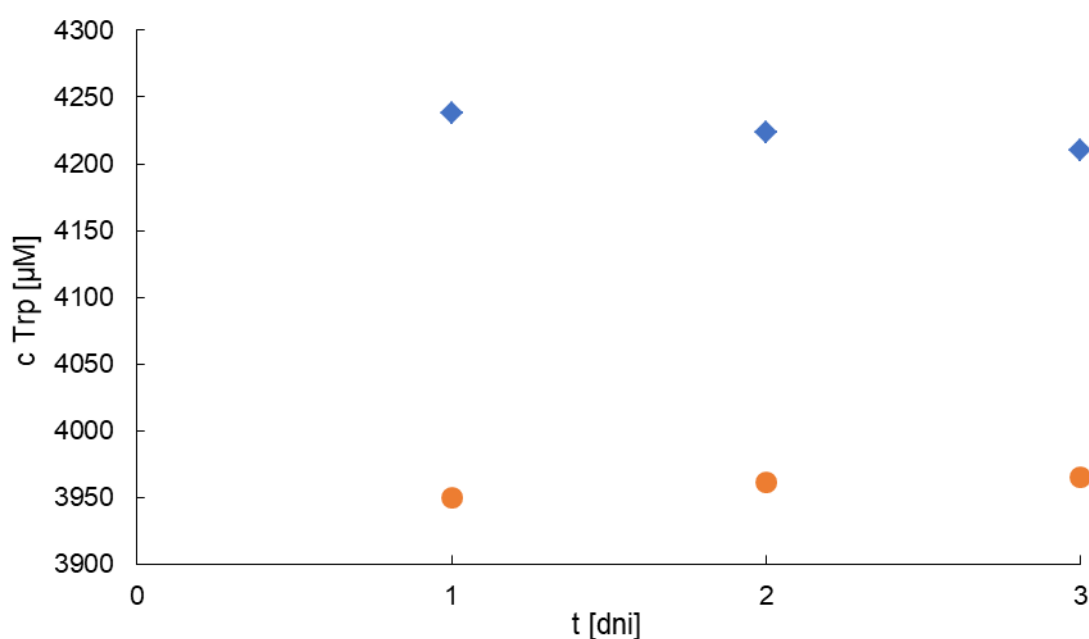
$$K = 800 \pm 260$$

Wyniki pomiarów wykonanych techniką dializy równowagowej wskazują, że dendrymer PPI G4 przyłącza $n = 84 \pm 25$ cząsteczek monofosforanu fludarabiny ze stałą tworzenia $K = 800 \pm 260$. Proces tworzenia kompleksu jest samorzutny w środowisku wodnym w temperaturze pokojowej.

4.3.6. Wyniki badań techniką dializy równowagowej wodnych mieszanin dendrymeru PPI G4 i L- α -tryptofanu

Pomiary oddziaływań dendrymeru PPI G4 z L- α -tryptofanem (aminokwasem) rozpoczęto od wykonania serii dializ trwających jeden, dwa oraz trzy dni. W pierwszej celi dializera znajdował się 40 μM roztwór dendrymeru PPI G4 oraz 4000 μM roztwór L- α -tryptofanu, natomiast w drugiej komorze znajdował się tylko 4000 μM roztwór

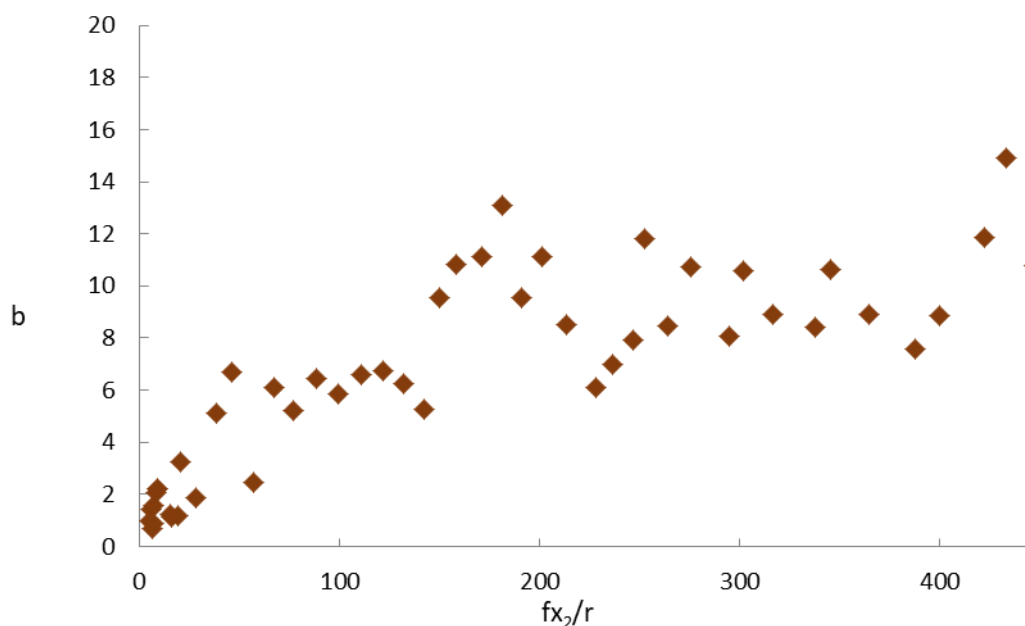
tryptofanu. Pomiary wykonywano w temperaturze pokojowej w środowisku wodnym. Badane roztwory z obu komór pobierano, rozcieńczano i analizowano spektrofotometrycznie. Następnie z otrzymanych danych eksperymentalnych wyliczono stężenie tryptofanu zarówno w komorze z dendrymerem PPI G4 jak i w fazie wodnej. Otrzymane dane przedstawiono na wykresie (Rys. 100, Tabela Z22). Wzrost stężenia tryptofanu w pierwszej komorze (z dendrymerem PPI G4) świadczy o przyłączaniu cząsteczek tego aminokwasu do makrocząsteczki PPI G4. Stan równowagi w badanym układzie ustalał się po jednym dniu trwania dializy.



Rys. 100. Rozkład stężenia L- α -tryptofanu w funkcji czasu trwania dializy pomiędzy badane wodne roztwory: zawierające dendrymer PPI G4 (\blacklozenge) oraz bez dendrymeru PPI G4 (\bullet).

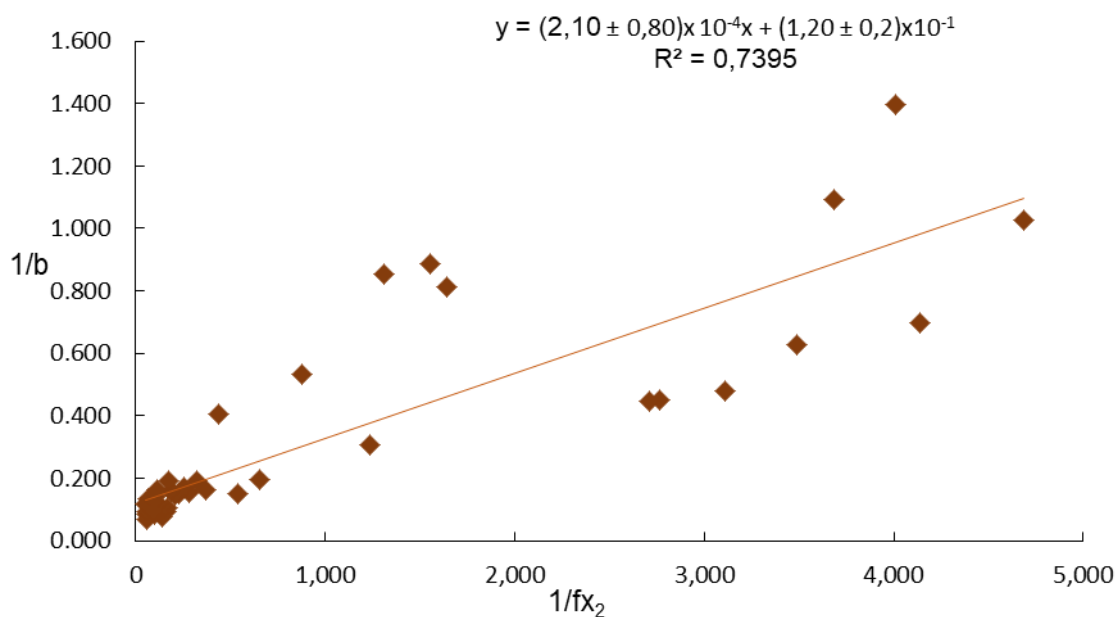
Następnie przeprowadzono dializy, w których w pierwszej komorze znajdowała się mieszanina 40 μM dendrymeru PPI G4 oraz L- α -tryptofanu o wzrastającym stężeniu od 200 μM do 18000 μM . W drugiej komorze znajdował się tylko wodny roztwór aminokwasu o początkowym stężeniu f_0 identycznym jak w komorze pierwszej. Dla badanego układu dializy wykonywane były w zakresie stosunku stężenia molowego tryptofanu do dendrymeru PPI G4 od 5:1 do 450:1. Wszystkie dializy prowadzono przez 24 godziny. Roztwory z obu komór pobierano, rozcieńczano i oznaczano spektrofotometrycznie. Z otrzymanych danych obliczono stężenie związanego tryptofanu c z makrocząsteczką PPI G4 odejmując od stężenia

$f x_1$ tryptofanu w komorze z dendrymerem PPI G4 stężenie wolnego (niezwiązanego) aminokwasu $f x_2$ z drugiej komory (bez dendrymeru PPI G4). Następnie wartość tej różnicy stężeń przeliczono na liczbę moli tryptofanu przyłączonych przez mol dendrymeru ($b = c/r$) i przedstawiono (Rys.101, Tabela Z23) w funkcji stosunku stężenia niezwiązanego tryptofanu do stężenia dendrymeru ($f x_2/r$). Otrzymana zależność wzrasta silnie do wartości $f x_2/r$ równej około 70/1, a następnie obserwujemy powolny jej wzrost (Rys. 101).



Rys. 101. Zależność liczby moli związanego L- α -tryptofanu (b) przypadającej na mol dendrymeru PPI G4 od stosunku stężenia liganda i stężenia dendrymeru ($f x_2/r$).

Z otrzymanych danych sporządzono wykres (Rys. 102, Tabela Z23) zależności stosunku stężenia dendrymeru PPI G4 i stężenia związanego tryptofanu ($1/b$) od odwrotności stężenia niezwiązanego aminokwasu ($1/f x_2$). Wyznaczoną zależność opisano równaniem linii prostej zgodnie z modelem jednego rodzaju miejsc aktywnych (Rys. 102).



Rys. 102. Zależność stosunku stężenia 40 μ M dendrymeru PPI G4 i związanego tryptofanu ($1/b$) od odwrotności stężenia wolnego aminokwasu ($1/fx_2$).

Wykorzystując równanie Scatcharda-Klotza (Rów. 11) wyznaczono parametry wiązania kompleksu dendrymer PPI G4 -tryptofan, liczbę miejsc aktywnych (n) w makrocząsteczce PPI G4, które mogą przyłączać cząsteczki aminokwasu oraz stałą tworzenia kompleksu supramolekularnego (K). Parametry te wynoszą odpowiednio:

$$n = 9 \pm 2$$

$$K = 600 \pm 200$$

Wyniki badań wykonanych techniką dializy równowagowej pokazują, że dendrymer PPI G4 w środowisku wodnym przyłącza około 9 cząsteczek L- α -tryptofanu ze stałą tworzenia $K = 600 \pm 200$ w temperaturze pokojowej.

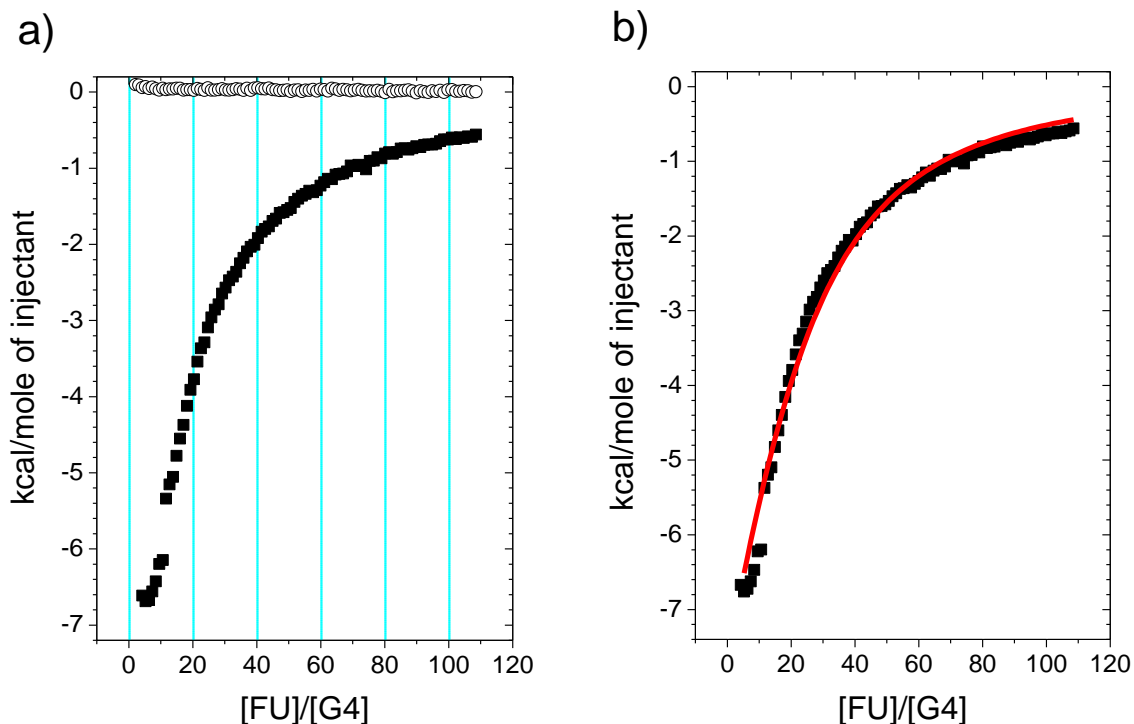
4.4. Miareczkowanie kalorymetryczne w warunkach izotermicznych (ITC)

4.4.1. Wyniki pomiarów kalorymetrycznych ITC dendrymeru PPI G4 z 5-fluorouracylem

Miareczkowanie kalorymetryczne w warunkach izotermicznych (25°C) przeprowadzono z wykorzystaniem kalorymetru (VP-ITC MicroCal, USA). Podczas wszystkich pomiarów miareczkowania w celi odniesienia znajdowała się woda. Dla układu dendrymer PPI G4 i 5-fluorouracyl wykonano dwa niezależne pomiary:

1. Miareczkowanie 40 μ M roztworu dendrymeru PPI G4 (znajdującego się w celi pomiarowej o objętości 1427 μ l) 20 mM wodnym roztworem 5-fluorouracylu ze strzykawki o objętości 287 μ l.
2. Rozcieńczanie w wodzie (znajdującej się w celi) 20 mM roztworu 5-fluorouracylu ze strzykawki.

Podczas każdego z miareczkowań wykonano 90 nastrzygów po 3 μ l każdy. Jeden nastrzyk trwał 15 sekund, odstęp pomiędzy nastrzykami wynosił 600 sekund, a szybkość mieszania wynosiła 416 rpm. W celu wyznaczenia bezpośrednich efektów cieplnych oddziaływania pomiędzy dendrymerem PPI G4 i 5-fluorouracylem odjęto od efektów miareczkowania roztworu PPI G4 5-fluorouracylem, efekty rozcieńczania 5-fluorouracylu w wodzie. Efekty rozcieńczania dendrymeru PPI G4 wodą były zaniedbywalne (Rys. Z6), dlatego nie uwzględniono ich przy obliczaniu bezpośrednich efektów oddziaływań dendrymeru PPI G4 z 5-fluorouracylem. Efekty cieplne opisujące bezpośrednie oddziaływania dendrymer–lek analizowano metodą nieliniowej regresji wieloparametrowej (Origin MicroCal) stosując model jednego rodzaju miejsc aktywnych (Rys. 103, Tabela Z24).



Rys. 103. a) Zależności efektów cieplnych: miareczkowania kalorymetrycznego 40 μM roztworu dendrymeru PPI G4 20 mM roztworem 5-fluorouracylu (■) oraz rozcieńczenia 20 mM roztworu leku w wodzie (○), b) Bezpośredni efekt cieplny oddziaływania dendrymeru PPI G4 z 5-fluorouracylem, który opisany został modelem jednego rodzaju miejsc aktywnych.

Wyznaczone parametry wiązania: liczba cząsteczek liganda n , stała wiązania K oraz funkcje termodynamiczne towarzyszące efektom cieplnym oddziaływań dendrymeru PPI G4 z 5-fluorouracylem zostały zebrane w Tabeli 19.

Tabela 19. Parametry wiązania oraz funkcje termodynamiczne opisujące tworzenie kompleksu dendrymer PPI G4-5-FU.

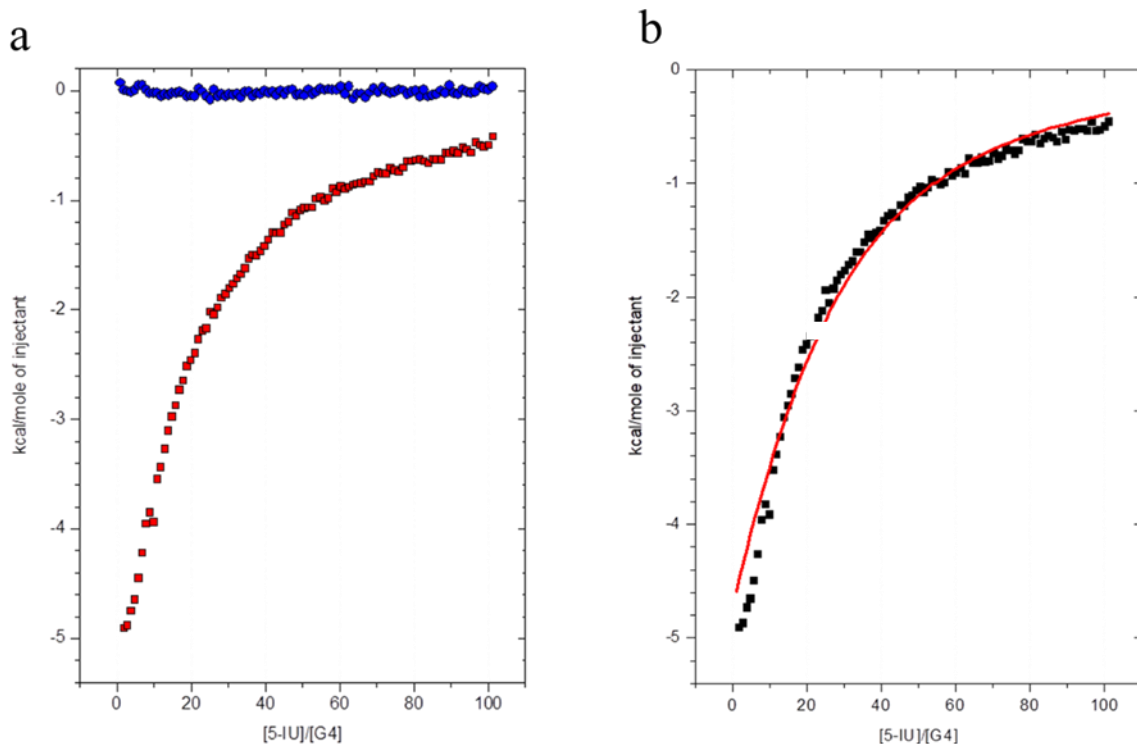
Kompleks dendrymer PPI G4-5-FU	
n	18 ± 2
K	1120 ± 120
ΔH [kcal mol ⁻¹]	-17050 ± 2200
ΔS [cal K ⁻¹ mol ⁻¹]	-43
ΔG [cal mol ⁻¹]	-4200

Do makrocząsteczki dendrymeru PPI G4 przyłącza się $n = 18 \pm 2$ cząsteczek 5-fluorouracylu ze stałą wiązania $K = 1120 \pm 120$. Wyznaczone dane wskazują, że proces wysycania miejsc aktywnych dendrymeru PPI G4 jest samorzutny ($\Delta G < 0$), egzotermiczny ($\Delta H < 0$) i towarzyszy mu wzrost stopnia uporządkowania reagentów ($\Delta S < 0$). Świadczy to, że wiązanie 5-fluorouracylu zachodzi przede wszystkim z powierzchniowymi grupami aminowymi oraz w mniejszym stopniu z miejscami aktywnymi znajdującymi się we wnękach makrocząsteczki receptora.

4.4.2. Wyniki pomiarów kalorymetrycznych ITC dendrymeru PPI G4 z 5-jodouracylem

Stosując identyczną procedurę pomiarową jak w przypadku wcześniej opisanych leków, pomiary miareczkowania kalorymetrycznego (VP-ITC MicroCal, USA) układu dendrymeru PPI G4 z 5-jodouracylem przeprowadzono w warunkach izotermicznych, w temperaturze 25°C. Podczas miareczkowania wykonano 90 nastrzyknięć po 3 μ l titranta. Każdy z nastrzyków trwał 15 sekund, czas pomiędzy kolejnymi nastrzykami wynosił 600 sekund, szybkość mieszania wynosiła 416 rpm. Podczas badania ITC wykonano dwa niezależne miareczkowania:

1. Miareczkowanie wodnego 15 μ M roztworu dendrymeru PPI G4 znajdującego się w celi pomiarowej 7 mM wodnym roztworem 5-jodouracylu.
2. Rozcieńczanie w wodzie (cela pomiarowa) wodnego roztworu 5-jodouracylu (5-IU). Efekty cieplne bezpośrednich oddziaływań dendrymeru PPI G4 z 5-jodouracylem obliczono odejmując od efektów cieplnych miareczkowania dendrymeru PPI G4 roztworem 5-jodouracylu efekty cieplne rozcieńczania leku. Efekty rozcieńczania 15 μ M dendrymeru PPI G4 były zaniedbywalnie małe, dlatego nie uwzględniono ich przy obliczaniu bezpośrednich efektów cieplnych oddziaływania dendrymeru PPI G4 z 5-jodouracylem. Entalpogram opisujący bezpośrednie oddziaływanie opisano następnie modelem jednego rodzaju miejsc aktywnych, wykorzystując program Origin MicroCal 7.0 (Rys. 104, Tabela Z25).



Rys. 104. a) Zależności efektów cieplnych: miareczkowania kalometrycznego wodnego 15 μM roztworu dendrymeru PPI G4 7 mM wodnym roztworem 5-jodouracylu (■) oraz rozcieńczania 7 mM roztworu leku w wodzie (●) w temperaturze 25°C, b) Bezpośredni efekt cieplny oddziaływania dendrymeru PPI G4 z 5-jodouracylem, który opisany został modelem jednego rodzaju miejsc aktywnych.

Wyznaczone parametry wiązania n , określającą liczbę podstawionych cząsteczek leku oraz stała wiązania K jak również funkcje termodynamiczne towarzyszące efektom cieplnym oddziaływań dendrymeru PPI G4 z 5-jodouracylem zestawiono w Tabeli 20.

Tabela 20. Parametry wiązania oraz funkcje termodynamiczne opisujące tworzenie kompleksu dendrymer PPI G4-5-IU

Kompleks dendrymer PPI G4-5-IU	
n	18 ± 5
K	2400 ± 600
ΔH [cal mol ⁻¹]	-11900 ± 3800
ΔS [cal K ⁻¹ mol ⁻¹]	-25
ΔG [cal mol ⁻¹]	-4610

Wyniki izotermicznego miareczkowania kalorymetrycznego pokazują, że do makrocząsteczki dendrymeru PPI G4 przyłącza się około $n = 18 \pm 5$ cząsteczek 5-jodouracylu ze stałą tworzenia $K = 2400 \pm 600$. Tworzenie kompleksu dendrymer PPI G4- 5-jodouracyl jest procesem samorzutnym ($\Delta G < 0$), egzotermicznym ($\Delta H < 0$) i towarzyszy mu wzrost uporządkowania reagentów ($\Delta S < 0$). Świadczy to o oddziaływaniu cząsteczek 5-jodouracylu głównie z powierzchniowymi grupami makrocząsteczki dendrymeru PPI G4.

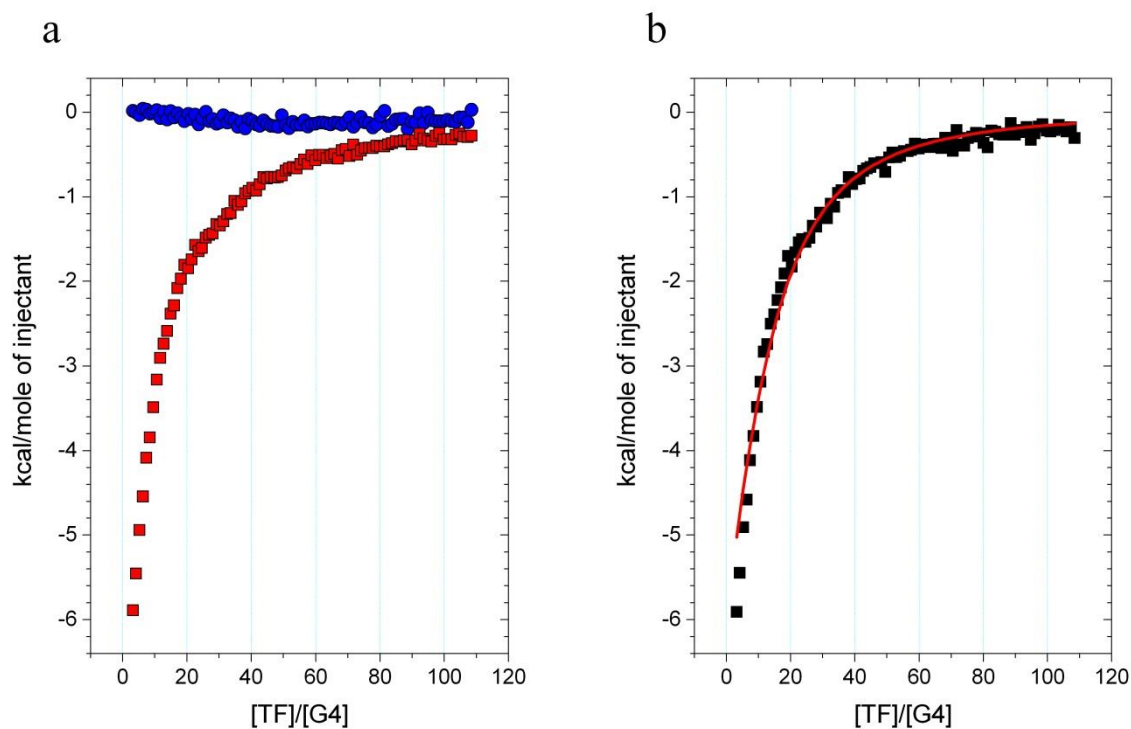
4.4.3. Wyniki pomiarów kalorymetrycznych ITC dendrymeru PPI G4 z tegafurem

Pomiary (analogicznie jak w przypadku 5-fluorouracylu) oddziaływania tegafuru (TF) z dendrymerem PPI G4 przeprowadzono wykorzystując technikę miareczkowania kalorymetrycznego (VP-ITC MicroCal, USA) w warunkach izotermicznych, w temperaturze 25°C. W celu wyznaczenia bezpośrednich efektów cieplnych oddziaływań dendrymeru PPI G4 z tegafurem wykonano dwa niezależne pomiary:

1. Miareczkowanie wodnego roztworu 10 μM dendrymeru PPI G4 znajdującego się w celi pomiarowej 5 mM wodnym roztworem tegafuru ze strzykawki o objętości 287 μl .
2. Rozcieńczanie w wodzie 5 mM wodnego roztworu tegafuru.

Każde z miareczkowań wykonano nastrzykując 90 porcji po 3 μl titranta. Każdy z nastrzyków trwał 15 sekund. Czas pomiędzy kolejnymi nastrzykami wynosił 800 sekund. Szybkość mieszania wynosiła 416 rpm.

Efekt cieplny bezpośredniego oddziaływania PPI G4 z tegafurem wyznaczono odejmując od efektu miareczkowania wodnego roztworu dendrymeru roztworem leku, efekt cieplny rozcieńczania wodnego roztworu tegafuru w wodzie. Efekt cieplny rozcieńczania wodą 10 μM roztworu PPI G4 był zanedbywalnie mały wobec pozostałych mierzonych efektów. Obliczone tak efekty cieplne opisujące bezpośrednie oddziaływania dendrymer–lek opisano metodą nieliniowej regresji wieloparametrowej wykorzystując model jednego rodzaju miejsc aktywnych z pomocą dołączonego do kalorymetru oprogramowania Origin MicroCal (Rys. 105, Tabela Z26).



Rys. 105. a) Zależności efektów cieplnych: miareczkowania kalorymetrycznego 10 μM roztworu dendrymeru PPI G4 5 mM roztworem tegafuru (■) oraz rozcieńczania 5 mM roztworu leku w wodzie (●) w temperaturze 25°C, b) Bezpośredni efekt cieplny oddziaływania dendrymeru PPI G4 z tegafurem, który opisany został modelem jednego rodzaju miejsc aktywnych.

Wyznaczony parametr stechiometryczny n (świadczący o liczbie przyłączonych cząsteczek leku), stała wiązania K oraz funkcje termodynamiczne towarzyszące efektom cieplnym oddziaływań dendrymeru PPI G4 z tegafurem zebrano w Tabeli 21.

Tabela 21. Parametry wiązania oraz funkcje termodynamiczne opisujące tworzenie kompleksu dendrymer PPI G4-TF.

Kompleks dendrymer PPI G4-TF	
n	10 ± 2
K	7300 ± 1200
ΔH [cal mol ⁻¹]	-14200 ± 3500
ΔS [cal K ⁻¹ mol ⁻¹]	-30
ΔG [cal mol ⁻¹]	-5300

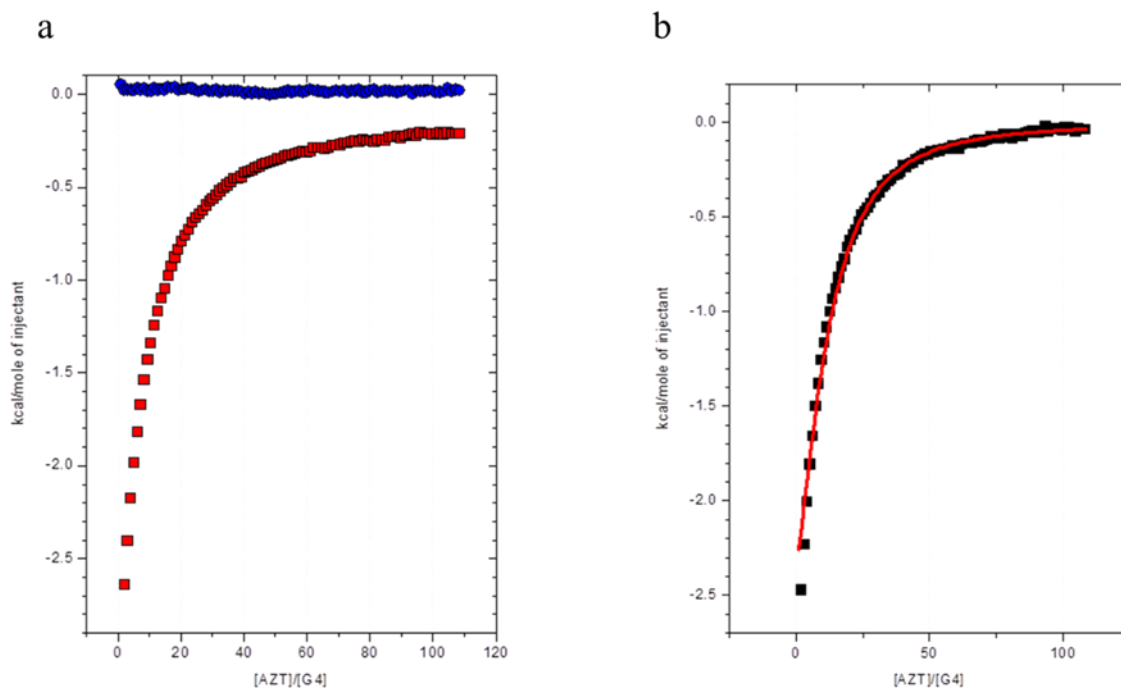
Wyniki izotermicznego miareczkowania kalorymetrycznego pokazują, że do makrocząsteczki dendrymeru PPI G4 przyłącza się około $n = 10 \pm 2$ cząsteczek tegafuru ze stałą tworzenia $K = 7300 \pm 1200$. Tworzenie kompleksu dendrymer PPI G4-tegafur jest procesem samorzutnym ($\Delta G < 0$), przy czym siłą napędową kompleksowania jest egzotermiczny czynnik entalpowy ($\Delta H < 0$). Czynnikiem entalpowy wskazuje na przewagę egzotermicznych efektów energetycznych bezpośrednich oddziaływań grup funkcyjnych leku i dendrymeru nad endotermicznymi efektami częściowej dehydratacji tych oddziałujących grup, poprzedzających ich bezpośrednie oddziaływanie w środowisku wodnym. Ujemna wartość entropii wiązania ($\Delta S < 0$) świadczy o wzroście uporządkowania układu i tym samym o dużym powinowactwie tegafuru do powierzchniowych grup makrocząsteczki dendrymeru PPI G4.

4.4.4. Wyniki pomiarów kalorymetrycznych ITC dendrymeru PPI G4 z azydotymidyną

Kalorymetryczne badania dendrymeru PPI G4 z azydotymidyną przeprowadzono analogicznie jak w przypadku wcześniej opisanych leków w temperaturze 25°C wykorzystując aparat VP-ITC MicroCal, USA. Do pomiarów użyto wodny 40 μM roztwór dendrymeru PPI G4 oraz wodny 20 mM roztwór azydotymidyny. Podczas miareczkowania wykonano 90 nastrzyknięć titranta o objętości 3 μl . Pojedynczy nastrzyk trwał 15 sekund. Czas pomiędzy kolejnymi nastrzykami wynosił 600 sekund. Szybkość mieszania wynosiła 416 rpm. Podczas pomiarów wykonano dwa niezależne miareczkowania:

1. Miareczkowanie 40 μM wodnego roztworu dendrymeru PPI G4 wodnym 20 mM roztworem azydotymidyny.
2. Rozcieńczanie w wodzie (znajdującej się w celi) 20 mM wodnego roztworu azydotymidyny.

Bezpośrednie efekty cieplne oddziaływań dendrymeru PPI G4 i azydotymidyny otrzymano odejmując od efektów cieplnych miareczkowania 40 μM wodnego roztworu dendrymeru PPI G4 wodnym 20 mM roztworem azydotymidyny efekty cieplne rozcieńczania tego leku. Efekty cieplne rozcieńczania 40 μM wodnego roztworu dendrymeru PPI G4 wodą są zaniedbywalnie małe. Efekty cieplne opisano modelem jednego rodzaju miejsc aktywnych, wykorzystując dołączony do kalorymetru program Origin MicroCal 7.0 (Rys. 106, Tabela Z27).



Rys. 106. a) Zależności efektów cieplnych: miareczkowania kalometrycznego 40 μM roztworu dendrymeru PPI G4 20 mM roztworem azydotymidyny (■) oraz rozcieńczenia 20 mM roztworu leku w wodzie (●) w temperaturze 25°C, b) Bezpośredni efekt cieplny oddziaływania dendrymeru PPI G4 z azydotymidyną, który opisany został modelem jednego rodzaju miejsc aktywnych.

Dla badanego układu obliczono parametry wiązania: liczbę miejsc aktywnych n w makrocząsteczce dendrymeru PPI G4, które mogą przyłączyć cząsteczki leku ze stałą tworzenia kompleksu K . Dodatkowo obliczono funkcje termodynamiczne opisujące proces tworzenia kompleksu supramolekularnego dendrymer PPI G4-azydotymidyna. Obliczone wartości zebrano w Tabeli 22.

Tabela 22. Parametry wiązania oraz funkcje termodynamiczne opisujące tworzenie kompleksu dendrymer PPI G4 z azydotymidyną.

Kompleks dendrymer PPI G4-AZT	
n	9 ± 2
K	2500 ± 300
ΔH [cal mol ⁻¹]	-4800 ± 600
ΔS [cal K ⁻¹ mol ⁻¹]	-0,5
ΔG [cal mol ⁻¹]	-4630

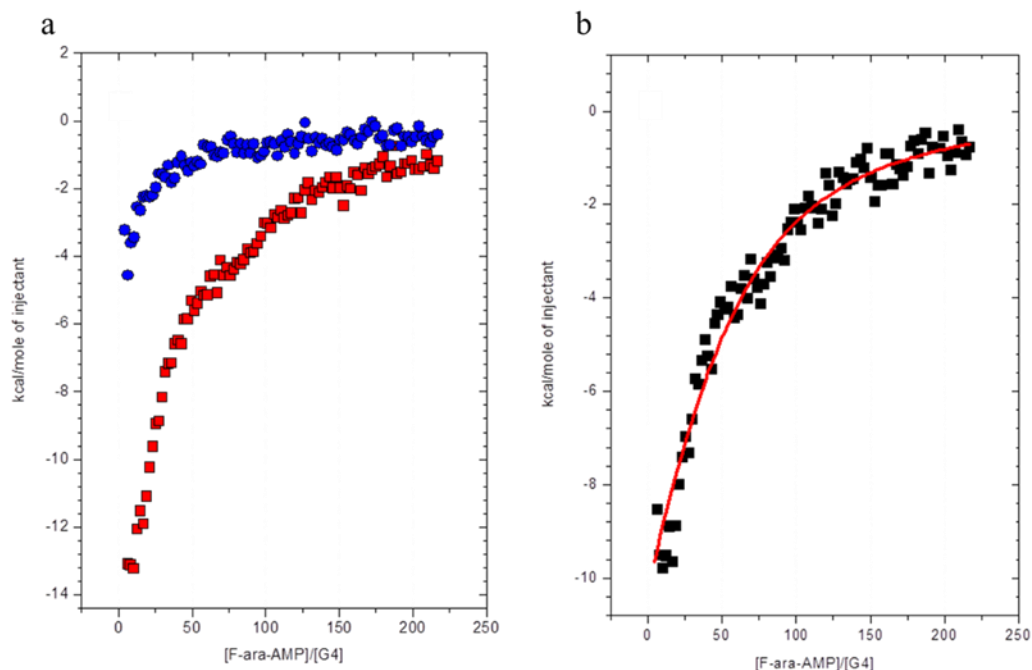
Wyniki miareczkowania kalorymetrycznego pokazują, że w środowisku wodnym w temperaturze 25°C dendrymer PPI G4 przyłącza $n = 9 \pm 2$ cząsteczek azydotymidyny ze stałą tworzenia $K = 2500 \pm 300$. Proces wiązania leku z dendrymerem PPI G4 jest samorzutny ($\Delta G < 0$) i egzotermiczny ($\Delta H < 0$). Bliska zeru wartość entropii ($\Delta S \cong 0$) pośrednio wskazuje na wiązanie cząsteczek azydotymidyny nie tylko z powierzchniowymi grupami dendrymeru PPI G4, ale również z położonymi w pobliżu powierzchni grupami funkcyjnymi dendrymeru.

4.4.5. Wyniki pomiarów kalorymetrycznych ITC dendrymeru PPI G4 z monofosforanem fludarabiny

Izotermiczne miareczkowanie kalorymetryczne (VP-ITC MicroCal, USA) dendrymeru PPI G4 z monofosforanem fludarabiny przeprowadzono w temperaturze 25°C. Pomiarów wykonano analogicznie jak w przypadku wcześniej opisanych leków. Ze względu na znaczne efekty oddziaływania obu związków do badań wykorzystano 1 μM roztwór dendrymeru PPI G4 oraz 1 mM roztwór monofosforanu fludarabiny. Podczas miareczkowania wykonano 90 nastrzyknięć titranta w porcjach o objętości 3 μl co 600 sekund. Jeden nastrzyk trwał 15 sekund. Podczas pomiarów wykonano dwa niezależne miareczkowania:

1. Miareczkowanie 1 μM wodnego roztworu dendrymeru PPI G4 1 mM wodnym roztworem monofosforanu fludarabiny.
2. Rozcieńczanie w wodzie 1 mM roztworu monofosforanu fludarabiny.

Odejmując od efektów cieplnych miareczkowania 1 μM roztworu dendrymeru PPI G4 1 mM roztworem monofosforanu fludarabiny efekty rozcieńczania 1 mM wodnego roztworu leku otrzymano bezpośrednie efekty oddziaływania dendrymeru PPI G4 i monofosforanu fludarabiny. W obliczeniach pominięto efekty energetyczne rozcieńczania 1 μM dendrymeru PPI G4. Wykorzystując program Origin MicroCal 7.0 otrzymany entalpogram opisano modelem jednego rodzaju miejsc aktywnych (Rys. 107, Tabela Z28).



Rys. 107. a) Zależności efektów cieplnych: miareczkowania kalorymetrycznego 1 μM roztworu dendrymeru PPI G4 1 mM roztworem monofosforanu fludarabiny (■) oraz rozcieńczenia 1 mM roztworu leku w wodzie (●) w temperaturze 25°C, b) Bezpośredni efekt cieplny oddziaływania dendrymeru PPI G4 z fludarabiną, który opisany został modelem jednego rodzaju miejsc aktywnych.

Obliczone parametry wiązania oraz funkcje termodynamiczne opisujące proces tworzenia kompleksu dendrymer PPI G4-fludarabina zebrano w Tabeli 23.

Tabela 23. Parametry wiązania oraz funkcje termodynamiczne opisujące tworzenie kompleksu dendrymer PPI G4-monofosforan fludarabiny w środowisku wodnym w temperaturze 25°C.

Kompleks dendrymer PPI G4-F-ara-AMP	
n	40 ± 7
K	20400 ± 3400
ΔH [cal mol ⁻¹]	-22400 ± 2500
ΔS [cal K ⁻¹ mol ⁻¹]	-56
ΔG [cal mol ⁻¹]	-5840

Analiza otrzymanych danych (Tabela 23) pokazuje, że dendrymer PPI G4 posiada $n = 40 \pm 7$ miejsc aktywnych, do których przyłączają się cząsteczki monofosforanu fludarabiny ze stałą wiązania $K = 20400 \pm 3400$. Proces tworzenia kompleksu jest samorzutny

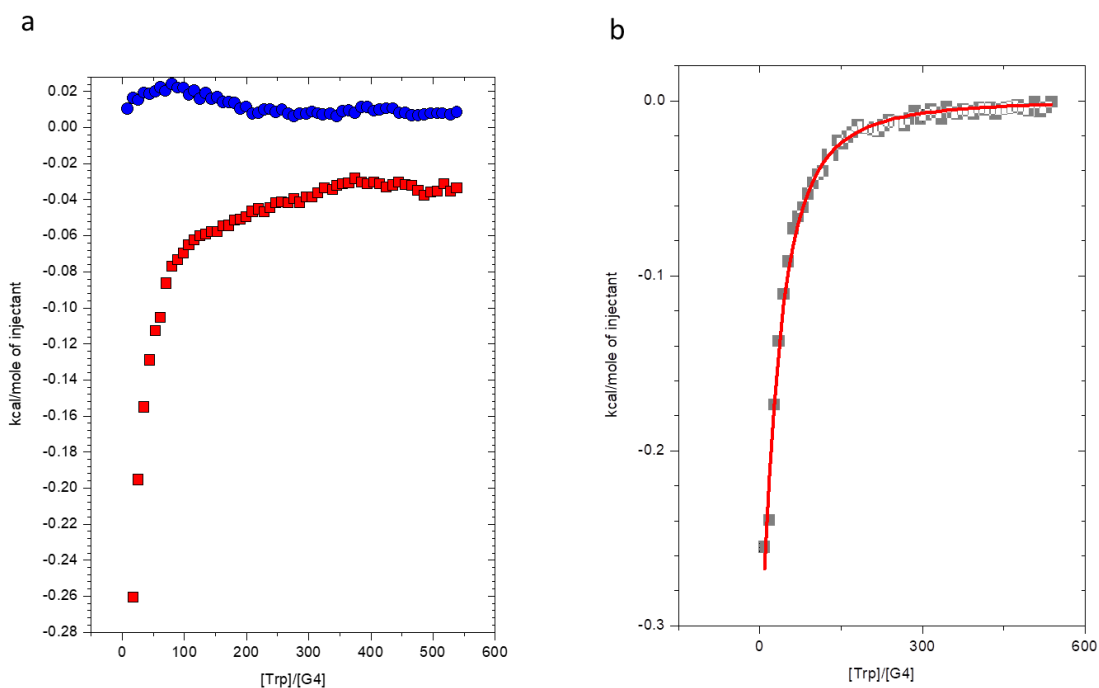
($\Delta G < 0$). Czynniki entalpowy ($\Delta H < 0$) wskazuje na przewagę egzotermicznych efektów energetycznych bezpośrednich oddziaływań grup funkcyjnych leku i dendrymeru nad endotermicznymi efektami częściowej dehydratacji tych oddziałujących grup poprzedzających bezpośrednio ich oddziaływanie w środowisku wodnym. Ujemna wartość entropii wiązania ($\Delta S < 0$) wskazują na wzrost uporządkowania reagentów na powierzchni dendrymeru PPI G4. Świadczy to o większym powinowactwie fluadarbiny do terminalnych grup makrocząsteczki PPI G4 w porównaniu do jej wewnętrznych grup.

4.4.6. Wyniki pomiarów kalorymetrycznych ITC dendrymeru PPI G4 z L- α -tryptofanem

Badania izotermicznego miareczkowania kalorymetrycznego (VP-ITC MicroCal, USA) dendrymeru PPI G4 z L- α -tryptofanem przeprowadzono w temperaturze 25°C stosując identyczną procedurę jak w przypadku leków. Do pomiarów wykorzystano wodny 20 μ M roztwór dendrymeru PPI G4 oraz wodny 50 mM roztwór L- α -tryptofanu. Podczas pomiarów wykonano 54 nastrzyków po 5 μ l. Odstęp pomiędzy kolejnymi nastrzykami wynosił 800 sekund. Szybkość obrotów mieszadła wynosiła 416 rpm. Podczas pomiarów wykonano dwa niezależne miareczkowania:

1. Miareczkowanie 20 μ M wodnego roztworu dendrymeru PPI G4 50 mM wodnym roztworem L- α -tryptofanu ze strzykawki.
2. Rozcieńczanie w wodzie (cela pomiarowa) wodnego 1 mM roztworu L- α -tryptofanu.

Bezpośrednie efekty oddziaływania dendrymeru PPI G4 z L- α -tryptofanem obliczono odejmując od efektów miareczkowania wodnego roztworu dendrymeru PPI G4 wodnym roztworem L- α -tryptofanu efekty energetyczne rozcieńczania roztworu aminokwasu. Obliczone efekty opisano modelem jednego rodzaju miejsc aktywnych za pomocą programu Origin MicroCal 7.0 (Rys. 108, Tabela Z29).



Rys. 108. a) Zależności efektów cieplnych: miareczkowania kalometrycznego 20 μM roztworu dendrymeru PPI G4 50 mM roztworem L- α -tryptofanu (■) oraz rozcieńczania 1 mM roztworu leku w wodzie (●) w temperaturze 25°C, b) Bezpośredni efekt cieplny oddziaływania dendrymeru PPI G4 z L- α -tryptofanem, który opisany został modelem jednego rodzaju miejsc aktywnych.

Obliczone parametry wiązania: liczba miejsc aktywnych n w makrocząsteczce dendrymeru PPI G4, które mogą przyłączyć cząsteczki aminokwasu (Trp) oraz stałą K tworzenia kompleksu ligand-miejsce aktywne oraz obliczone funkcje termodynamiczne opisujące proces tworzenia kompleksu supramolekularnego dendrymer PPI G4-L- α -tryptofan zostały stabelaryzowane (Tabela 24).

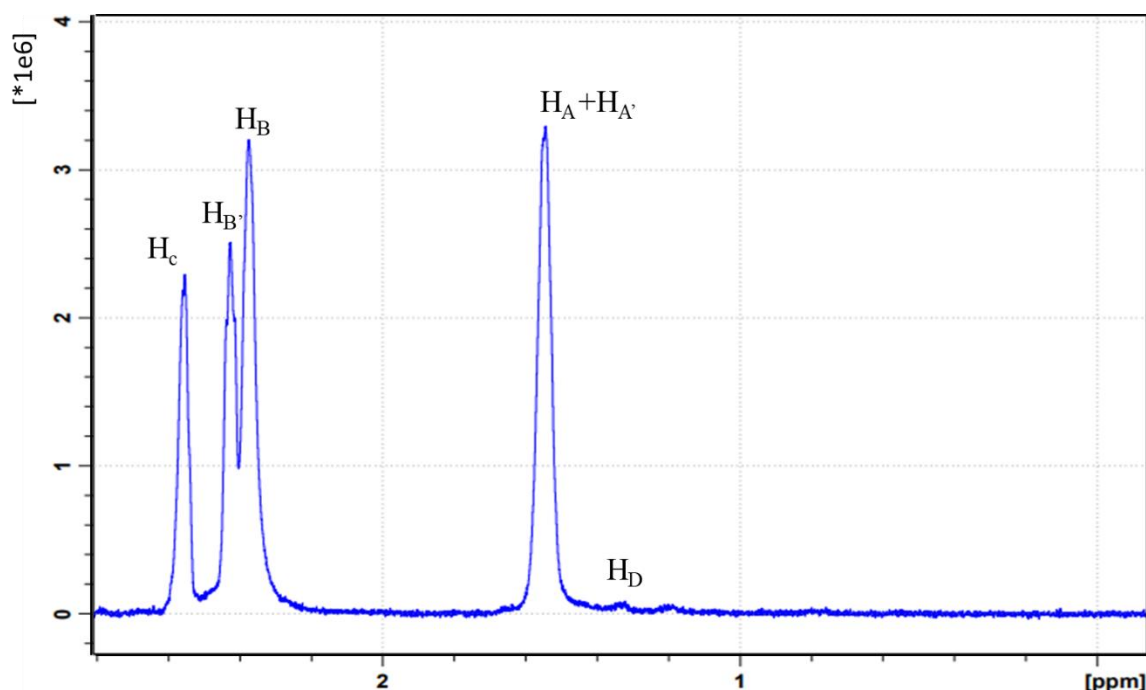
Tabela 24. Parametry wiązania oraz funkcje termodynamiczne opisujące tworzenie kompleksu dendrymer PPI G4-L- α -tryptofan.

Kompleks dendrymer PPI G4-L-α-tryptofan	
n	14 ± 4
K	1000 ± 100
ΔH [cal mol ⁻¹]	-1200 ± 400
ΔS [cal K ⁻¹ mol ⁻¹]	+9,7
ΔG [cal mol ⁻¹]	-4100

Wyniki izotermicznego miareczkowania kalorymetrycznego pokazują, że dendrymer PPI G4 przyłącza $n = 14 \pm 4$ cząsteczki L- α -tryptofanu ze stałą tworzenia kompleksu $K = 1000 \pm 100$. Proces wiązania L- α -tryptofanu przez dendrymer jest samorzutny ($\Delta G < 0$) i egzotermiczny ($\Delta H < 0$). Związaniu L- α -tryptofanu przez makrocząsteczkę PPI G4 towarzyszy wzrost stopnia nieuporządkowania ($\Delta S > 0$), co wskazuje na możliwość oddziaływania tego aminokwasu nie tylko z powierzchnią dendrymeru PPI G4, lecz również z położonymi w pobliżu powierzchni grupami funkcyjnymi.

4.5. Spektroskopia ^1H NMR

Pomiary ^1H NMR rozpoczęto od zarejestrowania widma 140 μM dendrymeru PPI G4 w środowisku ciężkiej wody w temperaturze pokojowej. Widma rejestrowano wykorzystując spektrometr Bruker Avance III. Widmo 140 μM roztworu jest średnią ze 128 skanów danej próbki. Przesunięcia chemiczne wybranych pasm na widmie (Rys. 109) odczytywano przy użyciu programu TOPSPIN.



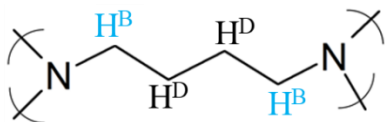
Rys.109. Widmo ^1H NMR 140 μM roztworu dendrymeru PPI G4 w ciężkiej wodzie, w temperaturze pokojowej.

Dla poszczególnych pików (Rys. 109) na widmie dendrymeru PPI G4 przyporządkowano grupy protonów [207-212], które przedstawiono na schemacie (Rys. 110).

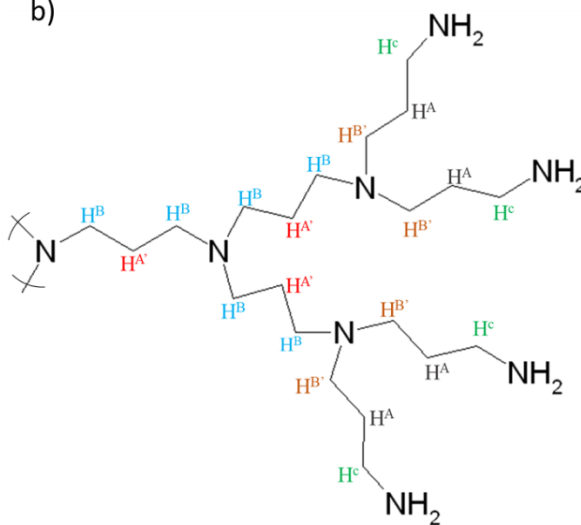
W makrocząsteczce PPI G4 sygnały grup protonów kolejnych grup metylenowych -CH₂- licząc od powierzchni do rdzenia to:

- a) Protony grup metylenowych w powierzchniowej warstwie merów makrocząsteczki PPI:
 - H^C przy $\delta \sim 2,55$ ppm
 - H^A $\delta \sim 1,54$ ppm
 - H^{B'} $\delta \sim 2,43$ ppm
- b) Protony grup metylenowych w głębszych warstwach merów makrocząsteczki dendrymeru PPI:
 - H^B $\delta \sim 2,37$ ppm
 - H^{A'} $\delta \sim 1,54$ ppm
- c) Protony grup metylenowych w rdzeniu makrocząsteczki dendrymeru PPI
 - H^D $\delta \sim 1,32$ ppm [209-212].

a)



b)

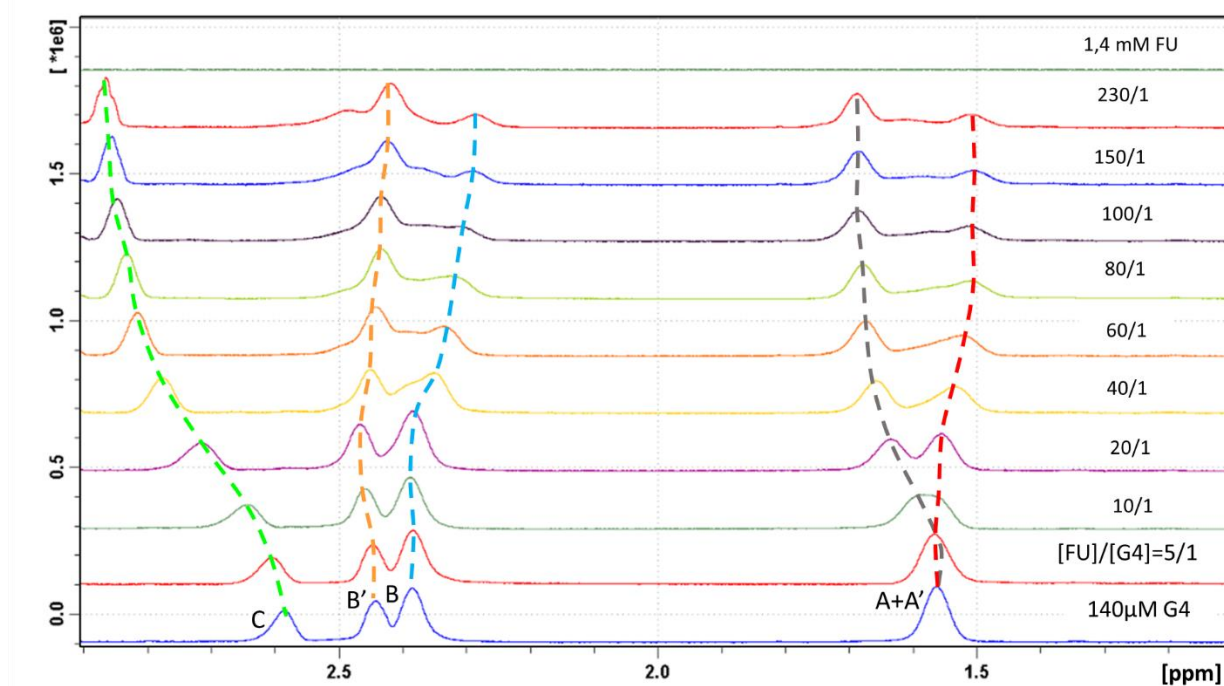


Rys.110. Oznaczenie grup protonów w strukturze dendrymeru PPI G4: a) rdzeń b) fragment dendronu.

4.5.1. Badania techniką ¹H NMR oddziaływań 5-fluorouracylu z dendrymerem PPI G4

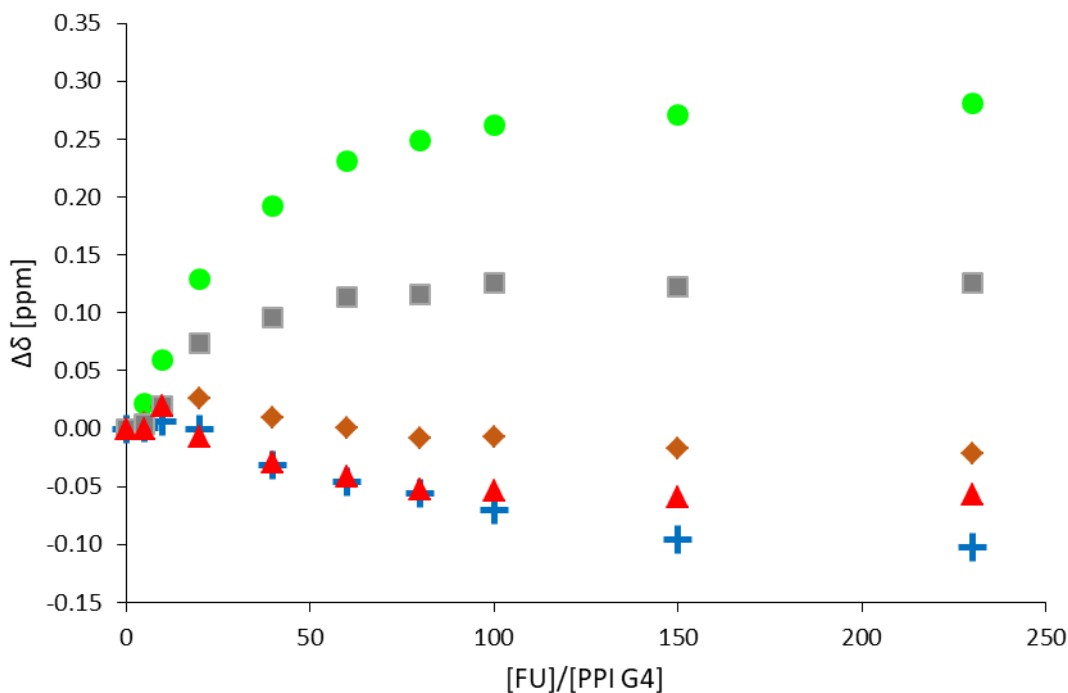
Badania ¹H NMR wykonano rejestrując widma w D₂O w temperaturze pokojowej mieszanin zawierających stałe (140 μM) stężenie dendrymeru PPI G4 i wzrastające stężenie 5-fluorouracylu w zakresie stosunku stężenia molowego leku do dendrymeru PPI G4 od 5/1

do 230/1 (Rys. 111, Tabela Z30). Każde rejestrowane widmo jest średnią ze 128 skanów danej próbki. Dodatkowo zarejestrowano widmo 1,4 mM roztworu 5-fluorouracylu.



Rys. 111. Widma ^1H NMR 140 μM roztworu dendrymeru PPI G4, mieszanin 5-fluorouracylu z dendrymerem PPI G4 w zakresie stosunku molowego leku do makrocząsteczki od 5/1 do 230/1 oraz 1,4 mM roztworu 5-fluorouracylu.

W zakresie występowania sygnałów protonów makrocząsteczki PPI G4 (od 2,9 ppm do 1,1 ppm) pasma protonów 5-fluorouracylu nie występują. Zmiany przesunięć chemicznych ($\Delta\delta$) grup protonów dendrymeru w mieszaninie z lekiem obliczono odejmując od przesunięcia chemicznego danej grupy protonów w mieszaninie przesunięcie chemiczne protonów tych grup w roztworze samego dendrymeru PPI G4 (bez leku). Zależność zmiany przesunięć chemicznych ($\Delta\delta$) grup protonów makrocząsteczek PPI G4 w funkcji stosunku molowego leku do dendrymeru PPI G4 przedstawiono na rysunku 112. Dodatnie wartości zmian $\Delta\delta$ wskazują na odsłanianie danej grupy protonów, natomiast ujemne wartości $\Delta\delta$ wskazują na jej przesłanianie. Zmiany te wskazują na oddziaływania makrocząsteczki PPI G4 z 5-fluorouracylem w ciężkiej wodzie (D_2O) w temperaturze pokojowej. W wiązaniu cząsteczek leku uczestniczą terminalne grupy aminowe makrocząsteczki PPI G4.

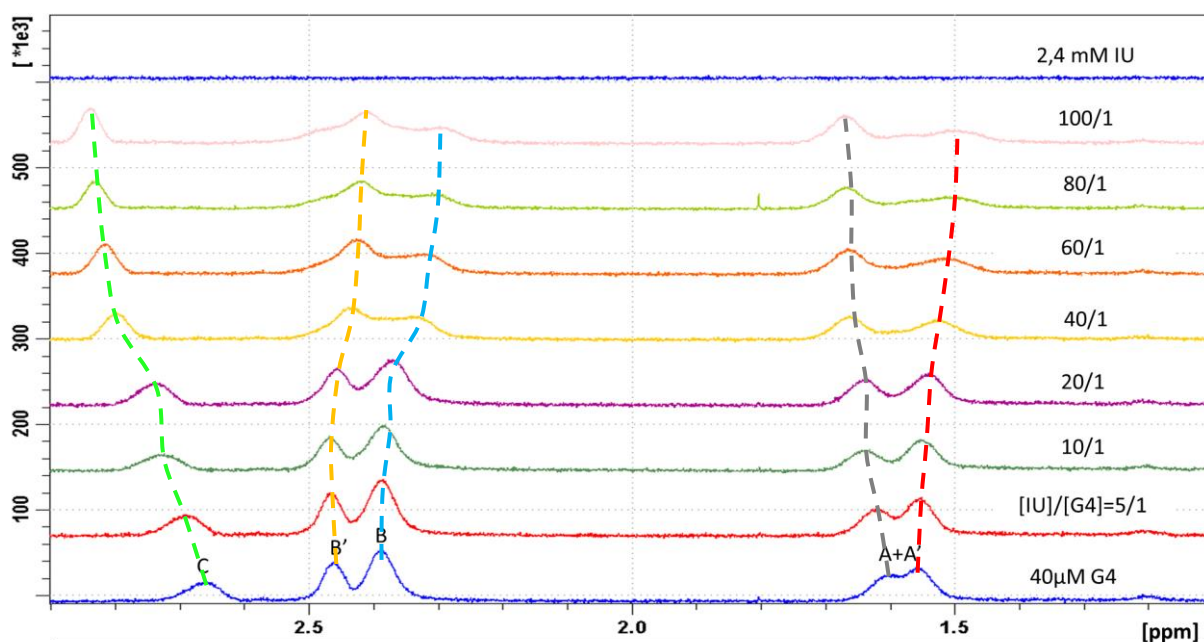


Rys. 112. Zależność zmiany położenia pików ^1H NMR protonów grup metylenowych od składu mieszaniny o wzrastającym stężeniu 5-fluorouracylu: (●) H^{C} ; (■) H^{A} ; (◆) H^{B} ; (▲) H^{A} ; (+) H^{B} .

Analiza uzyskanych widm wskazuje, że najsilniej odsłaniane są protony H^{C} grup metylenowych położonych przy terminalnych grupach aminowych makrocząsteczki PPI G4. Odsłanianiu (choć w mniejszym stopniu) ulegają też protony H^{A} grup metylenowych sąsiadujących z grupami H^{C} . Odsłanianie protonów H^{C} i H^{A} wskazuje, że powierzchniowe grupy makrocząsteczki PPI G4 wiążą cząsteczki 5-fluorouracylu w środowisku wodnym (D_2O) w temperaturze pokojowej.

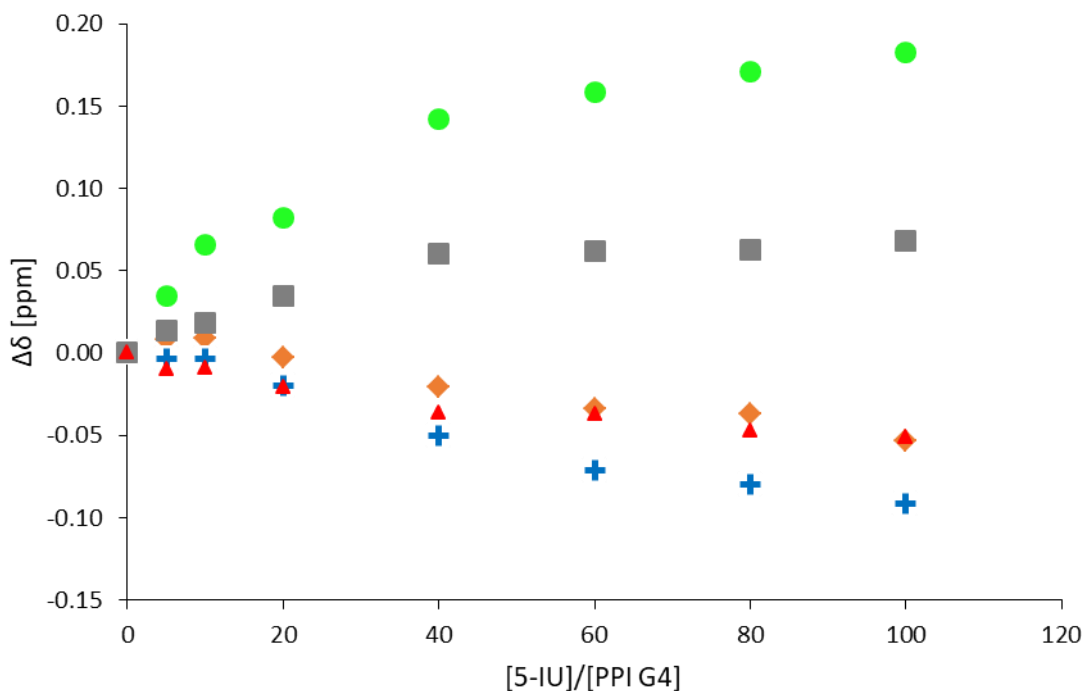
4.5.2. Badania techniką ^1H NMR oddziaływań 5-jodouracylu z dendrymerem PPI G4

Pomiary ^1H NMR (Bruker Avance III, 600 MHz) dla układu dendrymer PPI G4 z 5-jodouracylem wykonano w ciężkiej wodzie w temperaturze pokojowej. Zarejestrowano widma 40 μM roztworu dendrymeru PPI G4 oraz jego wodnych mieszanin z 5-jodouracylem w zakresie stosunku stężeń molowych leku do dendrymeru od 5/1 do 100/1. Użycie niższego stężenia dendrymeru PPI G4 (40 μM) wynika ze stosunkowo niskiej rozpuszczalności 5-jodouracylu w ciężkiej wodzie. Dodatkowo zarejestrowano widmo 2,4 mM roztworu 5-jodouracylu (Rysunek 113, Tabela Z31). Każde widmo jest średnią ze 128 skanów danej próbki.



Rys. 113. Widma ^1H NMR w D_2O $40\ \mu\text{M}$ roztworu dendrymeru PPI G4, mieszanin 5-jodouracylu z dendrymerem PPI G4 w zakresie stosunku molowego leku do makrocząsteczki od 5/1 do 100/1 oraz $2,4\ \text{mM}$ roztworu 5-jodouracylu.

W zakresie występowania sygnałów protonów dendrymeru PPI G4 ($2,9\ \text{ppm}$ - $1,1\ \text{ppm}$) nie występują piki pochodzące od protonów 5-jodouracylu. Zmiany przesunięć chemicznych ($\Delta\delta$) grup protonów dendrymeru w mieszaninie z 5-jodouracylem obliczono odejmując od przesunięcia chemicznego danej grupy protonów w mieszaninie przesunięcie chemiczne protonów tych grup w roztworze samego dendrymeru PPI G4. Zależność zmiany przesunięć chemicznych ($\Delta\delta$) grup protonów makrocząsteczek PPI G4 w funkcji stosunku molowego leku do dendrymeru PPI G4 przedstawiono na rysunku 114.

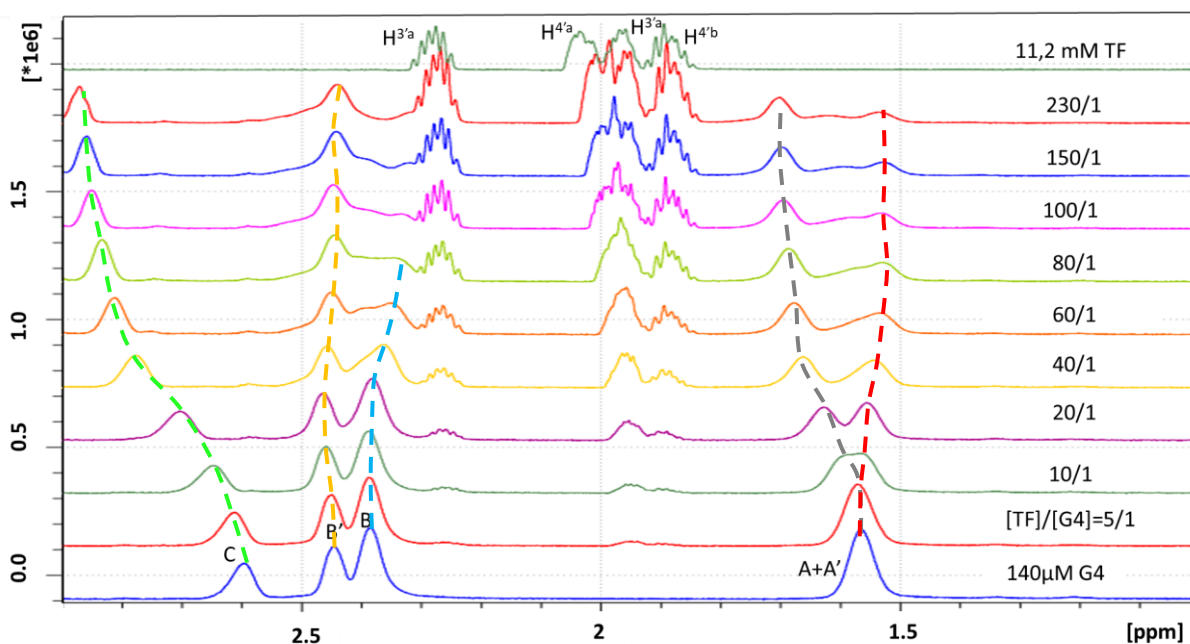


Rys. 114. Zależność zmiany położenia pików ^1H NMR protonów grup metylenowych dendrymeru PPI G4 od składu mieszaniny o wzrastającym stężeniu 5-jodouracylu: (●) H^{C} ; (■) H^{A} ; (◆) H^{B} ; (▲) $\text{H}^{\text{A}'}$; (+) H^{B} .

Analiza otrzymanych widm wskazuje, że najsilniejszemu odsłanianiu ($\Delta\delta = 0,182$ ppm) ulegają protony H^{C} powierzchniowych grup aminowych. Wskazuje to, że powierzchniowe grupy makrocząsteczki PPI G4 wiążą cząsteczki 5-jodouracylu w środowisku wodnym (D_2O) w temperaturze pokojowej.

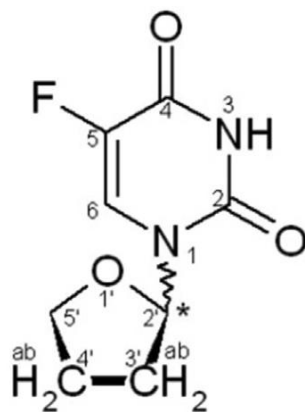
4.5.3. Badania techniką ^1H NMR oddziaływań tegafuru z dendrymerem PPI G4

Oddziaływania dendrymeru PPI G4 z tegafurem zbadano techniką ^1H NMR (Bruker Avance III, 600 MHz) w ciężkiej wodzie jako rozpuszczalniku w temperaturze pokojowej (20°C). Zarejestrowano widma mieszanin o stałym stężeniu dendrymeru PPI G4 ($140 \mu\text{M}$) i wzrastającym stężeniu leku. Stosunek molowy tegafuru do dendrymeru wynosił od 5/1 do 230/1 (Rys. 115, Tabela Z32). Dodatkowo zarejestrowano widmo 11,2 mM tegafuru. Każde zarejestrowane widmo jest średnią ze 128 skanów danej próbki.



Rys. 115. Widma ^1H NMR 140 μM roztworu dendrymeru PPI G4, mieszanin tegafuru z dendrymerem PPI G4 w zakresie stosunku molowego leku do makrocząsteczki od 5/1 do 230/1 oraz 11,2 mM roztworu tegafuru.

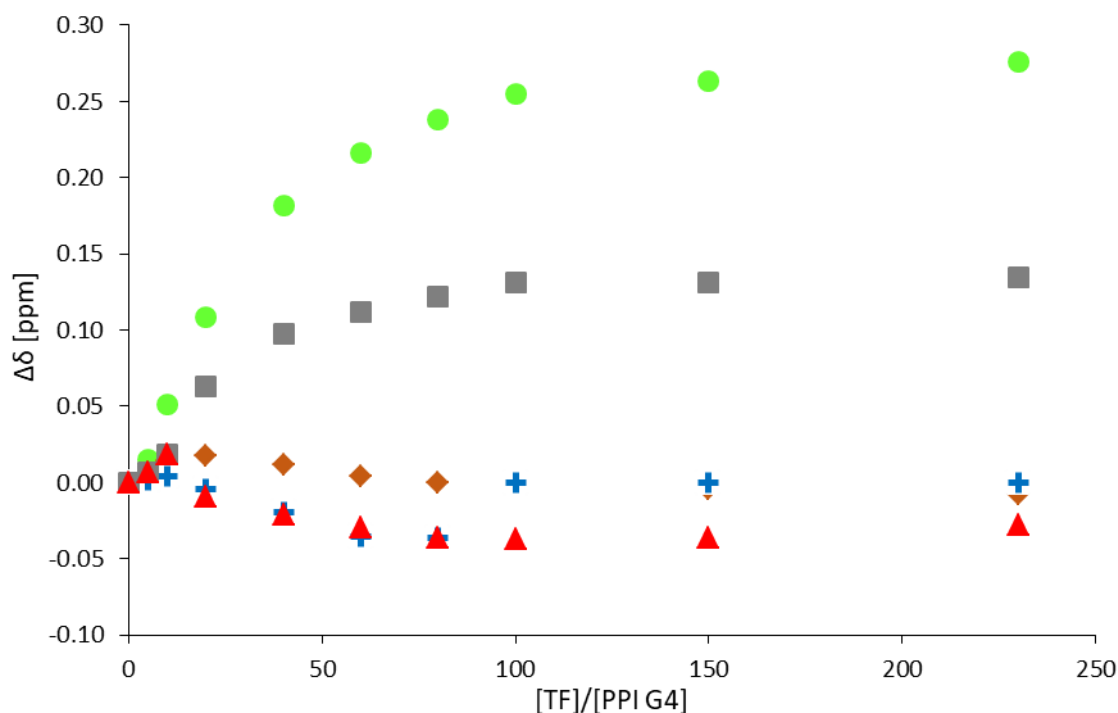
W zakresie występowania sygnałów protonów dendrymeru PPI G4 widoczne są (Rys. 116) również cztery częściowo nakładające się multiplety alifatycznych protonów tegafuru ($\text{H}^{3'a}$, $\text{H}^{3'b}$, $\text{H}^{4'a}$, $\text{H}^{4'b}$) z grup metylenowych (pozycje C3' i C4') pierścienia tetrahydrofuranu [213].



Rys. 116. Struktura tegafuru pokazująca numerację charakterystycznych pozycji w cząsteczce tego związku.

Zmiany przesunięć chemicznych ($\Delta\delta$) grup protonów dendrymeru w mieszaninie z tegafurem obliczono odejmując od przesunięcia chemicznego danej grupy protonów w mieszaninie przesunięcie chemiczne protonów tych grup w roztworze samego dendrymeru PPI G4 (bez leku). Zależność zmiany przesunięć chemicznych ($\Delta\delta$) grup protonów

makrocząsteczek PPI G4 w funkcji stosunku molowego leku do dendrymeru PPI G4 przedstawiono na rysunku 117.

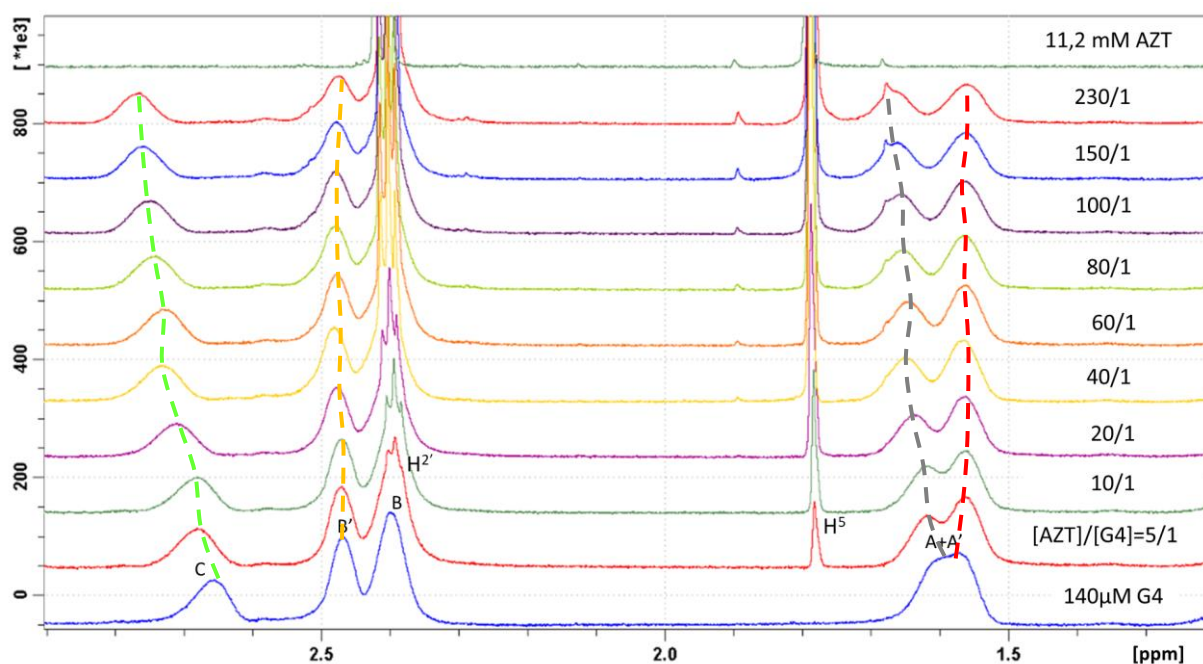


Rys. 117. Zależność zmiany położenia pików ^1H NMR protonów grup metylenowych dendrymeru PPI G4 od składu mieszaniny o wzrastającym stężeniu tegafuru: (●) H^{C} ; (■) H^{A} ; (◆) H^{B} ; (▲) $\text{H}^{\text{A}'}$; (+) H^{B} .

Dodatknie wartości zmian $\Delta\delta$ wskazują na odsłanianie danej grupy protonów, natomiast ujemne wartości $\Delta\delta$ wskazują na jej przesłanianie. Zmiany te wskazują na oddziaływania makrocząsteczki PPI G4 z tegafurem w ciężkiej wodzie (D_2O) w temperaturze pokojowej. W mieszaninach obu badanych związków o stałym stężeniu dendrymeru PPI G4 ($140 \mu\text{M}$) i wzrastającym stosunku stężeń tegafuru i PPI G4 od 5/1 do 230/1 obserwuje się najsilniejsze odsłanianie sygnału protonów H^{C} ($\Delta\delta \text{H}^{\text{C}} = 0.28 \text{ ppm}$ dla skrajnych składów) oraz H^{A} ($\Delta\delta \text{H}^{\text{A}} = 0.14 \text{ ppm}$ dla skrajnych składów). Wskazuje to głównie na oddziaływania cząsteczek tegafuru z powierzchniowymi grupami makrocząsteczki PPI G4 w ciężkiej wodzie, w temperaturze pokojowej.

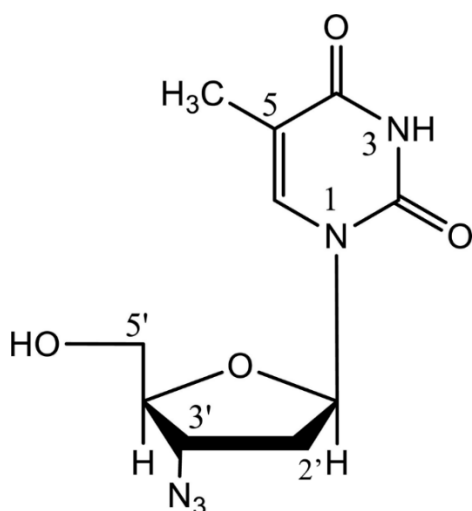
4.5.4. Badania techniką ^1H NMR oddziaływań azydotymidyny z dendrymerem PPI G4

Badania oddziaływań dendrymeru PPI G4 z azydotymidyną (AZT) przeprowadzono metodą ^1H NMR (Bruker Avance III, 600 MHz) w ciężkiej wodzie jako rozpuszczalniku w temperaturze pokojowej (20°C). Zarejestrowano widma mieszanin (Rys. 118, Tabela Z33) o stałym stężeniu dendrymeru PPI G4 ($140\ \mu\text{M}$) i wzrastającym stężeniu leku. Stosunek molowy azydotymidyny do dendrymeru wynosił od 5/1 do 230/1. Dodatkowo zarejestrowano widmo $11,2\ \text{mM}$ wodnego (D_2O) roztworu azydotymidyny. Każde zarejestrowane widmo jest średnią ze 128 skanów danej próbki.



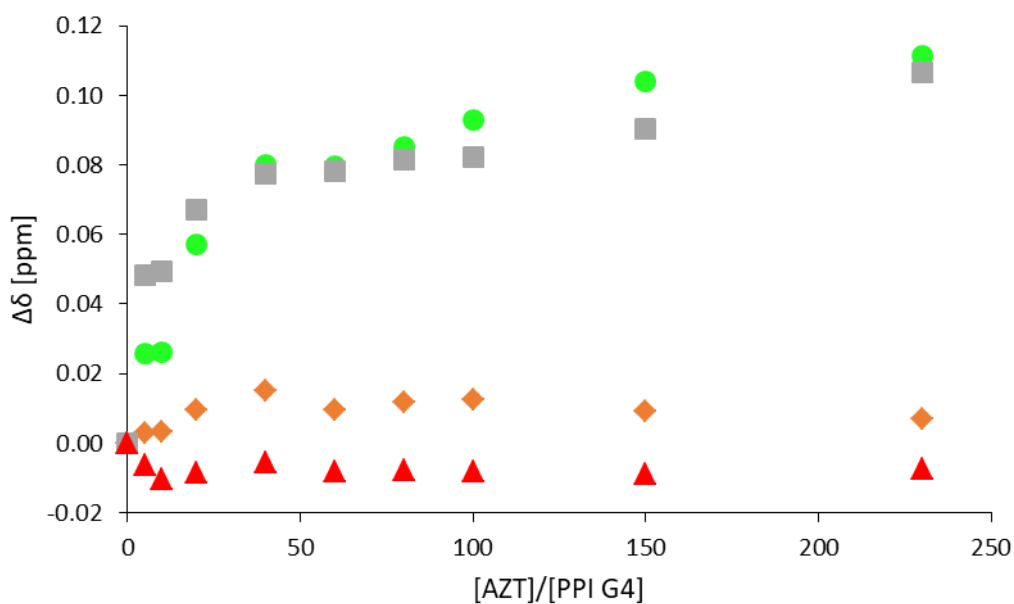
Rys. 118. Widma ^1H NMR w D_2O $140\ \mu\text{M}$ roztworu dendrymeru PPI G4, mieszanin azydotymidyny (AZT) z dendrymerem PPI G4 w zakresie stosunku molowego leku do makrocząsteczki od 5/1 do 230/1 oraz $11,2\ \text{mM}$ roztworu azydotymidyny.

W zakresie (od $2,9\ \text{ppm}$ do $1,2\ \text{ppm}$), w którym występują sygnały protonów dendrymeru PPI G4 widoczne są (Rysunek 118) również sygnały protonów [214, 215] azydotymidyny: protony $\text{H}^{2'}$ pochodzący od pierścienia furanozowego oraz protony H^5 z grupy metylowej pierścienia tyminy (Rysunek 119).



Rys. 119. Struktura azydotymidyny (AZT) pokazująca numerację charakterystycznych pozycji związku. [214].

Odejmując od przesunięcia chemicznego danej grupy protonów w mieszaninie przesunięcie chemiczne protonów tych grup w roztworze dendrymeru PPI G4 bez leku, obliczono zmiany przesunięć chemicznych ($\Delta\delta$) protonów grup metylenowych dendrymeru w mieszaninie z azydotymidyną. Zależność zmiany przesunięć chemicznych ($\Delta\delta$) protonów grup metylenowych makrocząsteczek PPI G4 w funkcji stosunku molowego leku do dendrymeru PPI G4 przedstawiono na rysunku 120.

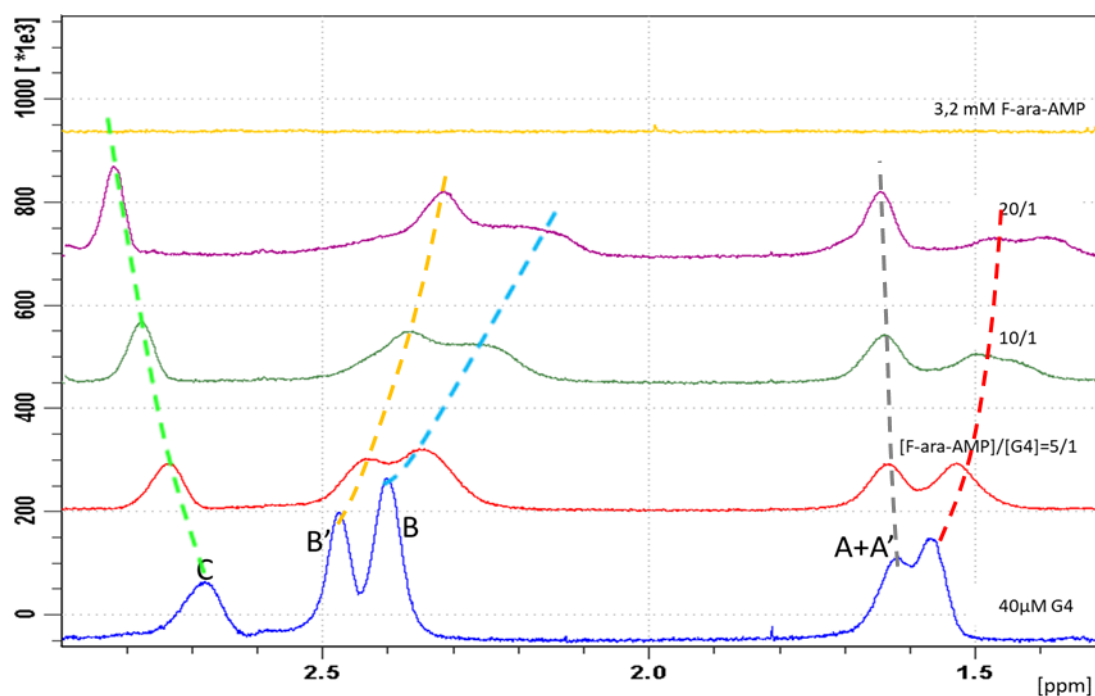


Rys. 120. Zależność zmiany położenia pików ¹H NMR protonów grup metylenowych od składu mieszaniny o wzrastającym stężeniu azydotymidyny: H^C (●); H^A (■); H^{B'} (◆); H^{A'} (▲); H^B (+).

Podobnie jak w pozostałych badanych układach dodatnie wartości zmian $\Delta\delta$ wskazują na odsłanianie danej grupy protonów, natomiast ujemne wartości $\Delta\delta$ wskazują na jej przesłanianie. Zmiany te świadczą o oddziaływaniu dendrymeru PPI G4 z azydotypidyną. Największemu odsłanianiu ulegają protony znajdujące się najbliżej powierzchniowych grup aminowych H^C ($\Delta\delta$ 0,111 ppm) oraz H^A ($\Delta\delta$ 0,107). Zmiany te świadczą o głównie powierzchniowym wiązaniu cząsteczek azydotypidyny z makrocząsteczką dendrymeru PPI G4 w środowisku D_2O , w temperaturze pokojowej.

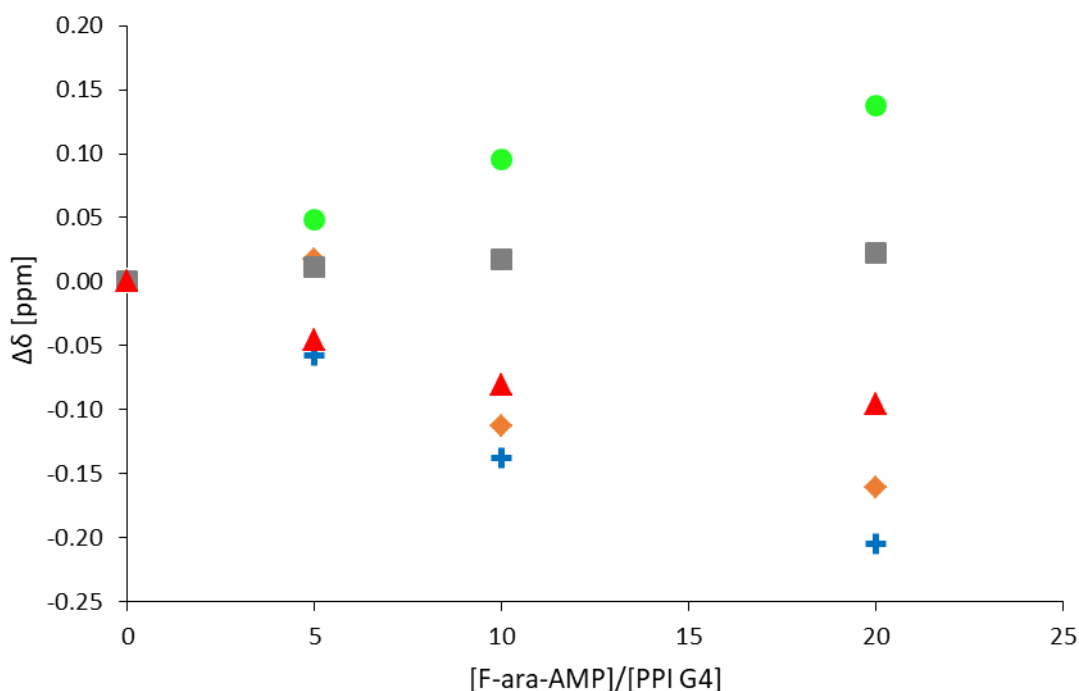
4.5.5. Badania techniką 1H NMR oddziaływań monofosforanu fludarabiny z dendrymerem PPI G4

Badania 1H NMR wykonano rejestrując widma w D_2O w temperaturze pokojowej mieszanin zawierających stałe ($40 \mu M$) stężenie dendrymeru PPI G4 i wzrastające stężenie monofosforanu fludarabiny w zakresie stosunku stężenia molowego leku do dendrymeru PPI G4 od 5/1 do 20/1 (Rysunek 121, Tabela Z34). Mieszanki o stosunku molowym leku do dendrymeru PPI G4 wyższym niż 20/1 wykazywały zmętnienie, które utrudniało pomiar widma 1H NMR. Każde zarejestrowane widmo jest średnią ze 128 skanów danej próbki. Dodatkowo zarejestrowano widmo 3,2 mM roztworu monofosforanu fludarabiny.



Rys. 121. Widma 1H NMR w D_2O 40 μM roztworu dendrymeru PPI G4, mieszanin monofosforanu fludarabiny z dendrymerem PPI G4 w zakresie stosunku molowego leku do makrocząsteczki od 5/1 do 20/1 oraz 3,2 mM roztworu monofosforanu fludarabiny.

W badanym zakresie występowania sygnałów protonów dendrymeru PPI G4 (2,9 ppm- 1,3 ppm) nie występują piki pochodzące od protonów obecnych w cząsteczce fludarabiny (Rys. 121). Zmiany przesunięć chemicznych ($\Delta\delta$) protonów grup metylenowych dendrymeru w mieszaninie z monofosforanem fludarabiny obliczono odejmując od przesunięcia chemicznego danej grupy protonów w mieszaninie przesunięcie chemiczne protonów tych grup w roztworze dendrymeru PPI G4 bez leku. Zależność zmiany przesunięć chemicznych ($\Delta\delta$) protonów grup metylenowych makrocząsteczek PPI G4 w funkcji stosunku molowego leku do dendrymeru PPI G4 przedstawiono na rysunku 122.

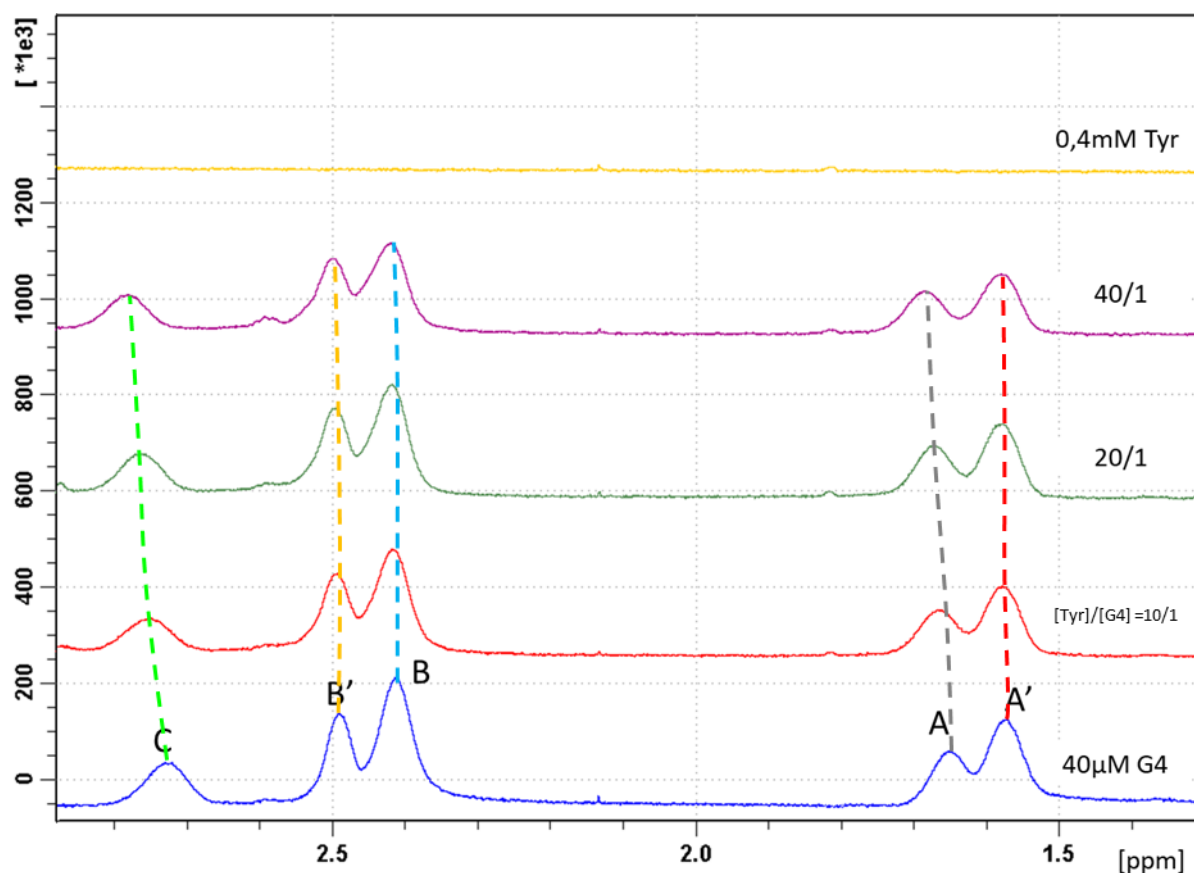


Rys. 122. Zależność zmiany położenia pików ^1H NMR protonów grup metylenowych od składu mieszaniny o wzrastającym stężeniu monofosforanu fludarabiny: (●) H^C; (■) H^A; (◆) H^{B'}; (▲) H^{A'}; (+) H^B.

Podobnie jak w pozostałych badanych układach, dodatnie wartości zmian $\Delta\delta$ wskazują na odsłanianie danej grupy protonów, natomiast ujemne wartości $\Delta\delta$ wskazują na jej przesłanianie. Zmiany te wskazują na oddziaływania makrocząsteczki PPI G4 z fludarabiną w ciężkiej wodzie (D_2O) w temperaturze pokojowej. Analiza otrzymanych widm wskazuje, że największe odsłanianie występuje dla grup protonów H^C ($\Delta\delta = 0,137$ ppm), natomiast przesłanianiu ulegają protony H^{B'} (-0,161 ppm) oraz H^B (-0,204 ppm). Wskazuje to, że cząsteczki monofosforanu fludarabiny oddziałują zarówno z powierzchniowymi, jak i wewnętrznymi grupami aminowymi makrocząsteczki dendrymeru PPI G4.

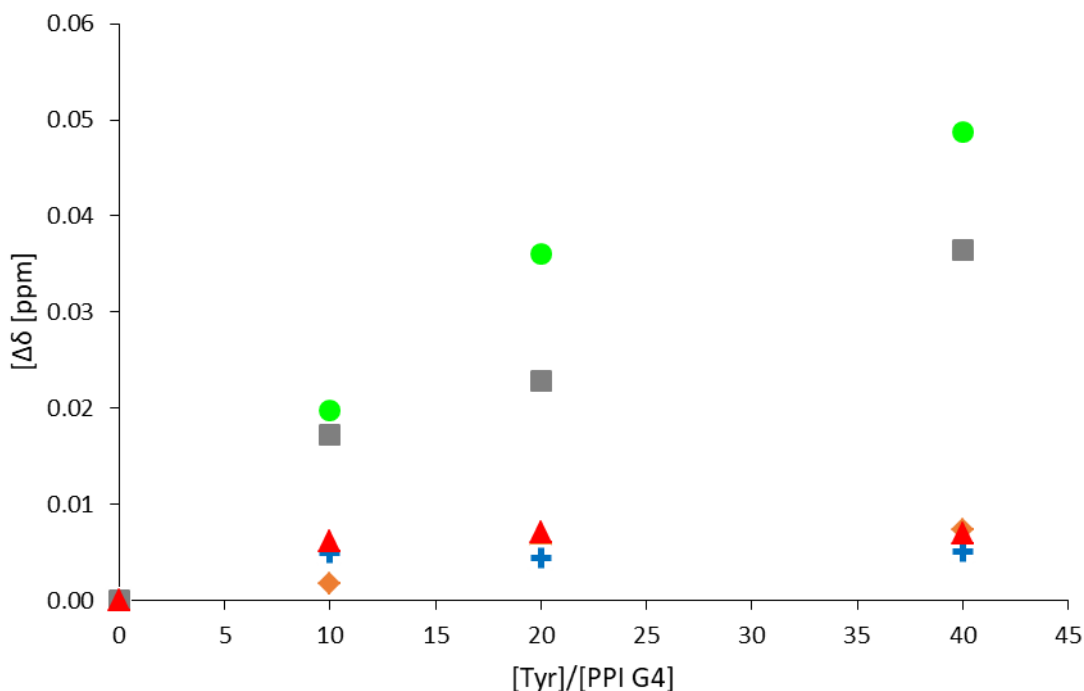
4.5.6. Badania techniką ^1H NMR oddziaływań L- α -tyrozyny z dendrymerem PPI G4

Oddziaływania dendrymeru PPI G4 z L- α -tyrozyną (Tyr) badano techniką ^1H NMR (Bruker Avance III, 600 MHz) w ciężkiej wodzie w temperaturze pokojowej (20° C). Ze względu na niską rozpuszczalność L- α -tyrozyny do pomiarów użyto 40 μM roztworu dendrymeru PPI G4. Pozwoliło to uzyskać mieszaniny o stosunku molowym L- α -tyrozyny do dendrymeru od 10/1 do 40/1. Dodatkowo zarejestrowano widmo 0,4 mM aminokwasu (Rysunek 123). Każde zarejestrowane widmo jest średnią za 128 skanów danej próbki.



Rys. 123. Widma ^1H NMR w D_2O 40 μM roztworu dendrymeru PPI G4, mieszanin L- α -tyrozyny (Tyr) z dendrymerem PPI G4 w zakresie stosunku molowego aminokwasu do makrocząsteczki od 10/1 do 40/1 oraz 0,4 mM roztworu L- α -tyrozyny.

W zakresie (od 2,9 ppm do 1,3 ppm), w którym występują sygnały protonów dendrymeru PPI G4 nie ma sygnałów protonów L- α -tyrozyny (Rys. 123, Tabela Z35). Zależność zmiany przesunięć chemicznych ($\Delta\delta$) grup protonów makrocząsteczek PPI G4 w funkcji stosunku molowego aminokwasu i dendrymeru PPI G4 (Rys. 124) świadczą o oddziaływaniu makrocząsteczki PPI G4 z L- α -tyrozyną w ciężkiej wodzie (D_2O) w temperaturze pokojowej.

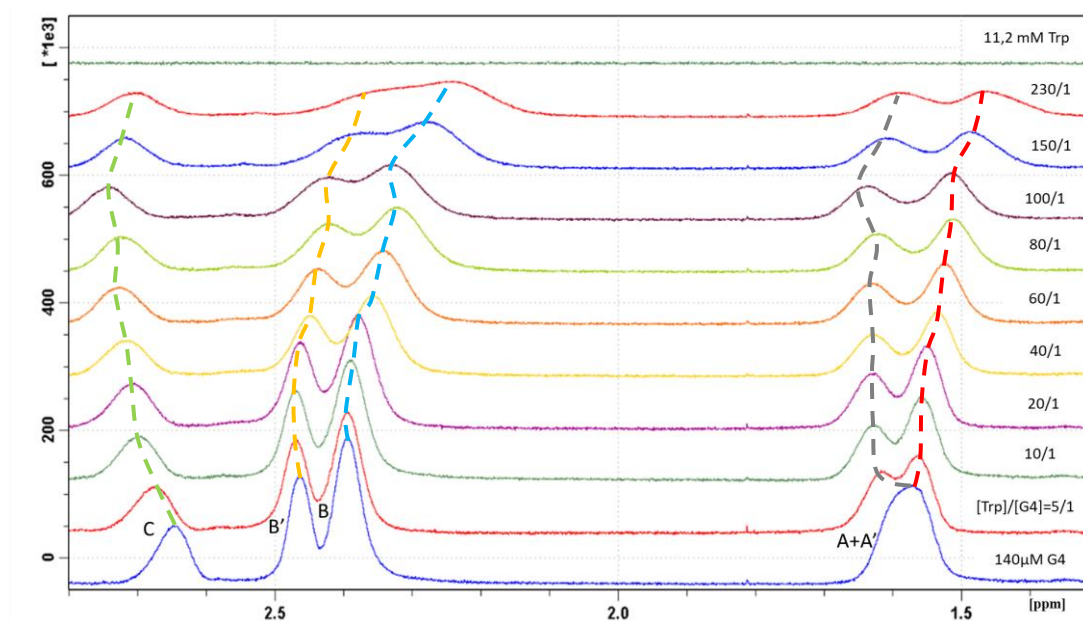


Rys. 124. Zależność zmiany położenia pików ^1H NMR protonów grup metylenowych od składu mieszaniny o wzrastającym stężeniu L- α -tyrozyny: H^C (●); H^A (■); H^{B'} (◆); H^{A'} (▲); H^B (+).

Największemu odsłanianiu ulegają protony H^C ($\Delta\delta=0,049$ ppm) oraz H^A ($\Delta\delta=0,037$ ppm) zlokalizowane blisko powierzchni makrocząsteczki PPI G4. Wskazuje to, że cząsteczki L- α -tyrozyny przełączają się przede wszystkim do powierzchniowych grup aminowych dendrymeru PPI G4 w środowisku D₂O w temperaturze pokojowej.

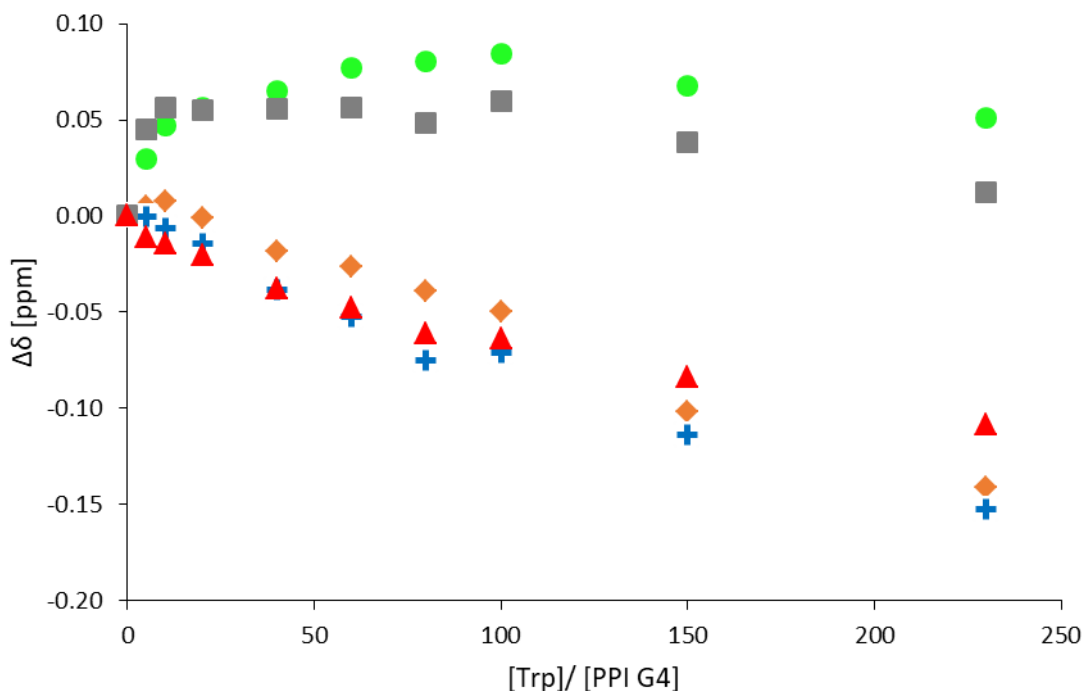
4.5.7. Badania techniką ^1H NMR oddziaływań L- α -tryptofanu z dendrymerem PPI G4

Oddziaływania dendrymeru PPI G4 z L- α -tryptofanem (Trp), analogicznie jak w przypadku leków i L- α -tyrozyny, zbadano techniką ^1H NMR (Bruker Avance III, 600 MHz) w ciężkiej wodzie jako rozpuszczalniku w temperaturze pokojowej (20°C). Zarejestrowano widma (Rys. 125, Tabela Z36) mieszanin o stałym stężeniu dendrymeru PPI G4 (140 μM) i wzrastającym stężeniu aminokwasu. Stosunek molowy L- α -tryptofanu do dendrymeru wynosił od 5/1 do 230/1. Dodatkowo zarejestrowano widmo 11,2 mM aminokwasu. Każde zarejestrowane widmo jest średnią ze 128 skanów danej próbki.



Rys. 125. Widma ^1H NMR w D_2O $140 \mu\text{M}$ roztworu dendrymeru PPI G4, mieszanin L- α -tryptofanu (Trp) z dendrymerem PPI G4 w zakresie stosunku molowego aminokwasu do makrocząsteczki od 5/1 do 230/1 oraz 11,2 mM roztworu L- α -tryptofanu.

W badanym zakresie występowania sygnałów protonów dendrymeru PPI G4 (2,8 ppm- 1,3 ppm) nie występują piki pochodzące od protonów cząsteczki L- α -tryptofanu (Rys. 125). Odejmując od przesunięcia chemicznego danej grupy protonów dendrymeru w mieszaninie z aminokwasem przesunięcie chemiczne protonów tych grup w roztworze dendrymeru PPI G4 bez aminokwasu obliczono zmiany przesunięć chemicznych ($\Delta\delta$) protonów grup metylenowych dendrymeru wywołanych wzrastającym stężeniem L- α -tryptofanu. Zależność zmiany przesunięć chemicznych ($\Delta\delta$) protonów grup metylenowych makrocząsteczek PPI G4 w funkcji stosunku molowego L- α -tryptofanu do dendrymeru PPI G4 przedstawiono na rysunku 126.



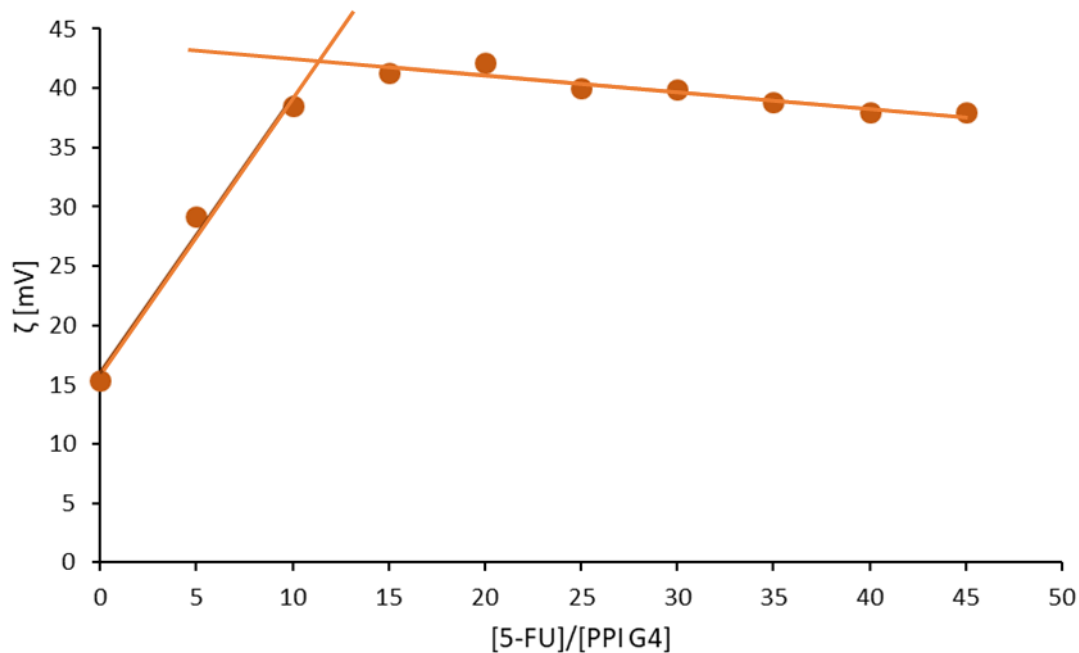
Rys. 126. Zależność zmiany położenia pików ^1H NMR protonów grup metylenowych od składu mieszaniny o wzrastającym stężeniu L- α -tryptofanu: H^C (●); H^A (■); H^{B'} (◆); H^{A'} (▲); H^B (+).

Zmiany przesunięć chemicznych protonów dendrymeru PPI G4 spowodowane obecnością w mieszaninie L- α -tryptofanu, świadczą o oddziaływaniu obu związków. Wzrost stężenia L- α -tryptofanu w mieszaninie powoduje odsłanianie sygnałów protonów metylenowych przy powierzchni makrocząsteczki oraz silne przesłanianie protonów w wewnętrznych warstwach dendrymeru: H^{B'}, H^B oraz H^{A'}. Świadczy to o wiązaniu cząsteczek L- α -tryptofanu zarówno z powierzchnią jak i z wnętrzem makrocząsteczki dendrymeru PPI G4 w środowisku wodnym w temperaturze pokojowej.

4.6. Pomiary Zeta potencjału mieszanin dendrymeru PPI G4 i 5-fluorouracylu (5-FU)

Stechiometrię wiązania kompleksu dendrymeru PPI G4 z 5-FU wyznaczono techniką Zeta potencjału (Anton Paar, Litesizer 500) w 20°C. Napięcie użyte do badań wynosiło 100 V. Miareczkowano wodny 10 μM roztwór dendrymeru PPI G4 o objętości 350 μl dodając porcjami titrant, wodny 35 mM roztwór 5-fluorouracylu. Przed punktem końcowym (PK) miareczkowania dodawano po 0.5 μl titranta, natomiast po PK po 5 μl titranta. Każdy punkt był średnią z pięciu pomiarów. Miareczkowanie zakończono przy stosunku molowym 5-fluorouracylu do dendrymeru PPI G4 równym 45/1. Uzyskane wyniki (Rys. 127, Tabela

Z37) wskazują, że wzrost stężenia 5-fluorouracylu w mieszaninie powoduje gwałtowny wzrost potencjału ζ makrocząsteczki PPI G4 do punktu końcowego PK równego 12 ± 1 , a następnie mierzony potencjał ζ stabilizuje się. Wskazuje to, że makrocząsteczka PPI G4 przyłącza około 12 cząsteczek 5-fluorouracylu. Procesowi temu towarzyszy protonowanie grup aminowych PPI, zachodzące podczas przyłączenia cząsteczek 5-fluorouracylu (o charakterze słabego kwasu).



Rys.127. Potencjał ζ makrocząsteczek PPI G4 podczas miareczkowania wodnego $10\ \mu\text{M}$ roztworu PPI G4 wodnym $35\ \text{mM}$ roztworem 5-fluorouracylu w temperaturze 20°C .

5. Podsumowanie

Tematyka pracy doktorskiej dotyczyła analizy oddziaływań dendrymeru PPI G4 z wybranymi lekami onkologicznymi: 5-fluorouracylem, 5-jodouracylem, tegafurem, azydetymidyną oraz monofosforanem fludarabiny, jak również wybranych aminokwasów: L- α -tyrozyny oraz L- α -tryptofanu w środowisku wodnym. Pomiary wykonano z wykorzystaniem następujących metod: oznaczeń rozpuszczalności, dializy równowagowej, spektroskopii ^1H NMR, miareczkowania kalorymetrycznego (ITC). Dla wodnych roztworów dendrymeru PPI G4 wykonano również pomiary pH-metryczne, natomiast dla mieszanin 5-fluorouracylu i dendrymeru PPI G4 dodatkowo wykonano pomiary potencjału Zeta.

Uzyskane rezultaty badań wyżej wymienionymi metodami laboratoryjnymi jednoznacznie wskazują, że badany dendrymer PPI G4 wiążąc ligand, powoduje wzrost rozpuszczalności badanych leków onkologicznych (z wyjątkiem monofosforanu fludarabiny). Tym samym powoduje wzrost biodostępności, a podstawione znacznikami makrocząsteczki dendrymeru mogą gromadzić się między innymi w bezpośrednim sąsiedztwie guzów nowotworowych, przenosząc określony cytostatyk (lek onkologiczny).

Pomiary pH-metryczne pozwoliły wyznaczyć stopień sprotonowania powierzchniowych grup aminowych w makrocząsteczce dendrymeru PPI G4. Dendrymer PPI G4 w zależności od stężenia ulega protonowaniu w różnym stopniu:

- w 10 μM roztworze PPI G4 stopień protonowania makrocząsteczki wynosi $\sim 40\%$
- w 20 μM roztworze PPI G4 stopień protonowania makrocząsteczki wynosi $\sim 20\%$
- w 40-140 μM roztworze PPI G4 stopień protonowania makrocząsteczki wynosi $\sim 10\%$.

Zwiększenie rozpuszczalności ligandów w roztworach dendrymeru PPI G4 o wzrastającym stężeniu obserwowano dla leków: 5-fluorouracylu, 5-jodouracylu, tegafuru i azydetymidyny, jak również dla badanych aminokwasów: L- α -tyrozyny i L- α -tryptofanu. Podczas pomiarów rozpuszczalności monofosforanu fludarabiny w wodnych roztworach dendrymeru PPI G4 obserwowano zmętnienie mieszaniny utrudniające jej ilościowe oznaczenie. Wykorzystując oznaczoną rozpuszczalność badanych leków i aminokwasów w wodnych roztworach dendrymeru PPI G4 o wzrastającym stężeniu wyznaczono liczbę miejsc aktywnych n w makrocząsteczce PPI G4 mogących przyłączyć cząsteczki liganda (Tabela 25). Podczas badań rozpuszczalności użyto duży nadmiar liganda w stosunku do (receptora) dendrymeru PPI G4:

- od ~120:1 do ~1600:1 dla 5-fluorouracylu
- od ~ 420:1 do ~ 4200:1 dla 5-jodouracylu
- od ~ 150:1 do 1500:1 dla tegafuru
- od ~ 124:1 do ~ 1240:1 dla azydotymidyny
- od ~50:1 do ~ 500:1 dla L- α -tyrozyny
- od ~100:1 do ~ 1000:1 dla L- α -tryptofanu

Roztwory dendrymeru PPI G4 nasycano ligandem przez 7 dni. Duży nadmiar liganda względem makromolekuły i długi czas oddziaływania obu związków powoduje, że wyznaczone tą metodą liczby miejsc aktywnych w makrocząsteczce dendrymeru mogą być wyższe niż w mieszaninach o mniejszej zawartości liganda. Dzieje się tak, ponieważ ligand może zapewne również oddziaływać z głębiej położonymi w strukturze makrocząsteczki miejscami aktywnymi o mniejszym powinowactwie.

Wyniki oznaczeń rozpuszczalności wskazują, że makrocząsteczki dendrymeru PPI G4 przyłączają w środowisku wodnym w temperaturze pokojowej kilkadziesiąt cząsteczek badanych leków (Tabela 25): od 27 cząsteczek azydotymidyny do 63 cząsteczek tegafuru. Makrocząsteczka dendrymeru PPI G4 przyłącza 13 cząsteczek L- α -tyrozyny oraz 25 cząsteczek L- α -tryptofanu (Tabela 25). Uzyskane wyniki wskazują, że makrocząsteczki dendrymeru PPI G4 wiążą w granicy niepewności pomiarowej zbliżoną liczbę cząsteczek 5-jodouracylu ($n = 55 \pm 5$) i tegafuru ($n = 63 \pm 2$). Związana liczba cząsteczek 5-jodouracylu i tegafuru przez makrocząsteczki PPI G4 jest wyższa niż liczba wiązanych cząsteczek 5-fluorouracylu ($n = 43 \pm 3$). Dendrymer PPI G4 wiąże też więcej cząsteczek L- α -tryptofanu ($n = 25 \pm 2$) niż L- α -tyrozyny ($n = 13 \pm 1$). Jako miarę hydrofobowości-hydrofilowości badanych związków można przyjąć współczynnik podziału oktanol-woda $\log P$ (Tabela 25). Uzyskane wyniki pomiarów rozpuszczalności wskazują wówczas, że makrocząsteczki PPI G4 wiążą w środowisku wodnym więcej podobnych strukturalnie cząsteczek liganda o silniejszych właściwościach hydrofobowych (tzn. wyższej wartości współczynnika $\log P$) w porównaniu z ligandami o silniejszych właściwościach hydrofilowych (niższej wartości współczynnika $\log P$):

$$n_{TF} \approx n_{5-IU} > n_{5-FU}$$

$$n_{Trp} > n_{Tyr}$$

Tabela 25. Maksymalna liczba cząsteczek liganda n związanych z makrocząsteczką dendrymeru PPI G4 wyznaczona metodą pomiaru rozpuszczalności. Dla porównania w tabeli został również podany współczynnik podziału oktanol/woda (LogP) badanych leków i aminokwasów.

Ligand	LogP	n
5-Fluorouracyl (5-FU)	-0,66	43 ± 3
5-Jodouracyl (5-IU)	0,13	55 ± 5
Tegafur (TF)	0,024	63 ± 2
Azydotymidyna (AZT)	-0,3	27 ± 4
L- α -tyrozyna (Tyr)	-1,5	13 ± 1
L- α -tryptofan (Trp)	-1,1	25 ± 2

Wyznaczone techniką dializy izotermi wiązania 5-jodouracylu, tegafuru, azydotymidyny, L- α -tryptofanu i monofosforanu fludarabiny przez dendrymer PPI G4 wykazują prostoliniowy przebieg w całym badanym zakresie składu, natomiast izoterma wiązania 5-fluorouracylu ma przebieg tylko w przybliżeniu prostoliniowy. Opisując przebieg izoterm w układzie Scatcharda-Klotza modelem jednego rodzaju miejsc wyznaczono liczbę miejsc aktywnych w cząsteczce dendrymeru (n), które przyłączają cząsteczki liganda ze stałą równowagi kompleksowania (K). Pomiar dializy równowagowej dla L- α -tyrozyny nie były prowadzone ze względu na zbyt niską rozpuszczalność tego aminokwasu w wodzie. Ze względu na krótszy czas oddziaływania cząsteczek liganda i dendrymeru PPI G4 podczas dializy (24 godziny) i mniejszy nadmiar cząsteczek liganda w stosunku do dendrymeru PPI G4:

- od 4:1 do 490:1 dla 5-fluorouracylu
- od 4:1 do 450:1 dla 5-jodouracylu
- od 4:1 do 420:1 dla tegafuru
- od 4:1 do 460:1 dla azydotymidyny
- od 5:1 do 470:1 dla monofosforanu fludarabiny
- od 5:1 do 450:1 dla L- α -tryptofanu

wyznaczona metodą dializy równowagowej liczba cząsteczek liganda związanego z makrocząsteczką PPI G4 jest mniejsza w porównaniu z wynikami pomiarów rozpuszczalności (Tabela 26).

Tabela 26. Wyznaczone techniką dializy równowagowej parametry wiązania badanych ligandów przez makrocząsteczki dendrymeru PPI G4 w środowisku wodnym w temperaturze pokojowej.

Model jednego rodzaju miejsc aktywnych				
Ligand	n		K	
5-Fluorouracyl (5-FU)	24	± 2	1510	± 150
5-Jodouracyl (5-IU)	13	± 2	1000	± 200
Tegafur (TF)	28	± 5	440	± 100
Azydotymidyna (AZT)	10	± 3	290	± 100
Monofosforan fludarabiny (F-ara-AMP)	84	± 25	800	± 260
L- α -tryptofan (Trp)	9	± 2	600	± 200
Model dwóch rodzajów miejsc				
Ligand	n ₁	K ₁	n ₂	K ₂
5-Fluorouracyl	9 ± 2	7100 ± 1900	44 ± 3	200 ± 20

Uzyskane techniką dializy równowagowej (Tabela 26) wykorzystując model jednego rodzaju miejsc aktywnych parametry wiązania wskazują, że makrocząsteczki dendrymeru PPI G4 wiążą w środowisku wodnym od 10 do 30 polarnych cząsteczek o charakterze obojętnym: azydotymidyny ($n = 10 \pm 3$), 5-jodouracylu ($n = 13 \pm 2$), 5-fluorouracylu ($n = 24 \pm 2$) oraz tegafuru ($n = 28 \pm 5$). Dendrymer PPI G4 wiąże $n = 9 \pm 2$ zwitterionowych cząsteczek L- α -tryptofanu. Liczba wiązanych przez makrocząsteczkę PPI G4 cząsteczek monofosforanu fludarabiny jest wyższa ($n = 84 \pm 25$) niż dla pozostałych badanych ligandów, co wynika z anionowego charakteru tego leku. Anion monofosforanu fludarabiny silnie oddziałuje elektrostatycznie ze sprotonowanymi grupami aminowymi makrocząsteczek dendrymeru PPI G4.

Oznaczona techniką dializy równowagowej stała wiązania K ligandów przez miejsca aktywne makrocząsteczki PPI G4 wynosi od 300 do 1000, odpowiednio dla azydotymidyny ($K = 290 \pm 100$), tegafuru ($K = 440 \pm 100$), L- α -tryptofanu ($K = 600 \pm 200$), monofosforanu fludarabiny ($K = 800 \pm 260$) oraz 5-jodouracylu ($K = 1000 \pm 200$). Stała wiązania 5-fluorouracylu przez makrocząsteczkę PPI G4 jest wyższa ($K = 1510 \pm 150$) niż dla pozostałych badanych ligandów, co wynika zapewne ze zróżnicowania miejsc aktywnych

w makrocząsteczce PPI G4 wiążących ten lek. Izoterma wiązania 5-fluorouracylu przez PPI G4 w układzie Scatcharda-Klotza wykazuje odstępstwo od prostoliniowego przebiegu w pobliżu początku układu współrzędnych (Rys.64). Umożliwia to obliczanie parametrów wiązania 5-fluorouracylu przez dendrymer PPI G4 modelem dwóch rodzajów miejsc aktywnych (Tabela 26), zgodnie z którym makrocząsteczka PPI G4 ma $n_1 = 9 \pm 2$ miejsc aktywnych o wysokim powinowactwie ($K_1 = 7100 \pm 1900$) i $n_2 = 44 \pm 3$ miejsca o niższym powinowactwie ($K_2 = 200 \pm 20$). Wysoka wartość stałej K wiązania 5-fluorouracylu wyliczona na podstawie modelu jednego rodzaju miejsc aktywnych jest wyższa niż dla pozostałych badanych ligandów ze względu na duży wkład miejsc n_1 o wysokim powinowactwie (stałej równowagi K_1) w obliczoną przy założeniu braku różnicowania miejsc aktywnych wartość stałej K . Ze względu na wysokie powinowactwo cząsteczek 5-fluorouracylu do makrocząsteczek PPI G4, 5-fluorouracyl szczególnie dobrze różnicuje oddziaływania z protonowanymi i nieprotonowanymi grupami aminowymi dendrymeru PPI G4 w środowisku wodnym w temperaturze pokojowej.

Oddziaływanie makrocząsteczki PPI G4 z wybranymi ligandami w roztworach wodnych w temperaturze 25°C zostały również zbadane techniką izotermicznego miareczkowania kalorymetrycznego. Ze względu na dynamiczny charakter miareczkowania kalorymetrycznego uzyskane tą techniką parametry wiązania liganda z dendrymerem mogą różnić się od wartości oznaczonych technikami spektroskopowymi [216-218]. Opisując wyznaczone techniką ITC izotermy bezpośrednich oddziaływań makrocząsteczek PPI G4 z cząsteczkami wybranych ligandów modelem jednego rodzaju miejsc aktywnych (One set of identical sites) wyznaczono: liczbę miejsc aktywnych n w makrocząsteczce dendrymeru PPI G4, które wiążą cząsteczki liganda, stałą wiązania K kompleksu ligand-miejsce aktywne oraz standardową entalpię (ΔH), entropię (ΔS) i entalpię swobodną (ΔG) wiązania liganda z miejscem aktywnym makrocząsteczki dendrymeru PPI G4 (Tabela 27).

Uzyskane wyniki ITC (Tabela 27) wskazują, że w granicy niepewności pomiarowej do makrocząsteczki PPI G4 przyłącza się od około 10 do 20 cząsteczek 5-fluorouracylu, 5-jodouracylu, tegafuru, azydetymidyny oraz L- α -tryptofanu. Miareczkowanie techniką potencjału Zeta również wskazuje, że do makrocząsteczki dendrymeru PPI G4 przyłącza się $n=12 \pm 1$ cząsteczek 5-fluorouracylu. Makrocząsteczka dendrymeru PPI G4 przyłącza $n=40 \pm 7$ cząsteczek monofosforanu fludarabiny. Duża liczba cząsteczek monofosforanu fludarabiny przyłączonych do makrocząsteczki PPI G4 zapewne wynika z silnych oddziaływań elektrostatycznych anionów tego leku ze sprotonowanymi powierzchniowymi grupami

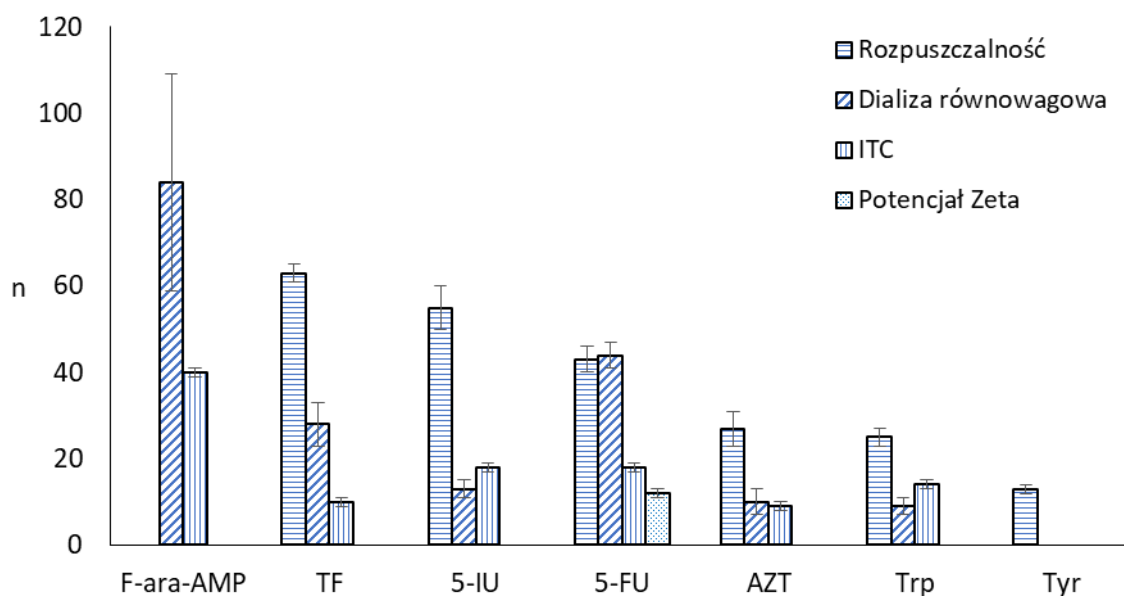
aminowymi dendrymeru PPI G4. Monofosforan fludarabiny oddziałuje z makrocząsteczką PPI G4 najsilniej $K = 20400 \pm 3400$ spośród wszystkich badanych w tej pracy ligandów. Cząsteczki tegafuru wiązane są przez makrocząsteczkę PPI G4 ze stałą wiązania $K = 7300 \pm 1200$. Cząsteczki 5-fluorouracylu, 5-jodouracylu, azydotymidyny oraz L- α -tryptofanu wiązane są przez makrocząsteczkę PPI G4 ze stałą równowagi K od około 1000 do 2500. Wyznaczone ujemne wartości standardowej entalpii swobodnej ($\Delta G < 0$) wiązania badanych ligandów z miejscami aktywnymi makrocząsteczki PPI G4 świadczą, że proces ich wiązania z makrocząsteczką PPI G4 jest termodynamicznie samorzutny.

Entalpia wiązania badanych ligandów z miejscami aktywnymi makrocząsteczki PPI G4 jest egzotermiczna, co wskazuje na przewagę egzotermicznych efektów oddziaływań badanych ligandów z makrocząsteczką PPI G4 nad endotermicznymi efektami częściowej dehydratacji grup funkcyjnych liganda i miejsc aktywnych makrocząsteczek dendrymeru. Najsilniej egzotermiczny efekt wiązania liganda przez makrocząsteczkę dendrymeru PPI G4 spośród badanych związków obserwuje się dla monofosforanu fludarabiny ($\Delta H = -22400 \pm 2500 \text{ cal mol}^{-1}$). Wyznaczona standardowa entalpia tworzenia kompleksu dendrymeru PPI G4 z 5-fluorouracylem, 5-jodouraculem, tegafurem oraz azydotymidyną w granicach niepewności pomiarowej jest zbliżona i wynosi od $\Delta H = -4800 \text{ cal mol}^{-1}$ do $-17050 \text{ cal mol}^{-1}$. Standardowa entalpia wiązania L- α -tryptofanu z miejscami aktywnymi makrocząsteczki PPI G4 ($\Delta H = -1200 \pm 400 \text{ cal mol}^{-1}$) jest najsłabiej egzotermiczna spośród badanych ligandów. Otrzymane ujemne wartości standardowej entropii wiązania 5-fluorouracylu, 5-jodouracylu, tegafuru, azydotymidyny oraz monofosforanu fludarabiny z miejscami aktywnymi makrocząsteczki PPI G4 pozwalają wnioskować o wzroście uporządkowania reagentów w wyniku wiązania cząsteczek leku zapewne na powierzchni makrocząsteczki PPI G4. Najsilniejszy efekt porządkowania składników badanego układu występuje dla wiązania monofosforanu fludarabiny $\Delta S = -56 \text{ cal K}^{-1} \text{ mol}^{-1}$, co można interpretować jako wynik oddziaływania elektrostatycznego anionowej cząsteczki tego leku ze sprotonowanymi powierzchniowymi grupami aminowymi makrocząsteczki PPI G4. Wiązaniu cząsteczek L- α -tryptofanu ($\Delta S = 9,7 \text{ cal K}^{-1} \text{ mol}^{-1}$) przez makrocząsteczkę PPI G4 towarzyszy wzrost stopnia nieuporządkowania układu, co sugeruje wiązanie cząsteczek tego aminokwasu z miejscami aktywnymi pod powierzchnią makrocząsteczki dendrymeru PPI G4.

Tabela 27. Parametry wiązania oraz standardowe funkcje termodynamiczne wiązania ligand-miejsce aktywne wyznaczone metodą miareczkowania kalorymetrycznego ITC w roztworach wodnych w temperaturze 25°C. Oznaczenia poszczególnych ligandów są takie same jak w tabelach 25 i 26.

Ligand	n	logK	ΔH [cal mol ⁻¹]	ΔS [cal K ⁻¹ mol ⁻¹]	ΔG [cal mol ⁻¹]
F-ara-AMP	40 ± 7	4,31 ± 0,07	-22400 ± 2500	-56	-5840
5-FU	18 ± 2	3,05 ± 0,05	-17050 ± 2200	-43	-4200
5-IU	18 ± 5	3,38 ± 0,11	-11900 ± 3800	-25	-4610
TF	10 ± 2	3,86 ± 0,07	-14200 ± 3500	-30	-5300
AZT	9 ± 2	3,40 ± 0,05	-4800 ± 600	-0,4	-4630
Trp	14 ± 4	3,00 ± 0,04	-1200 ± 400	9,7	-4100

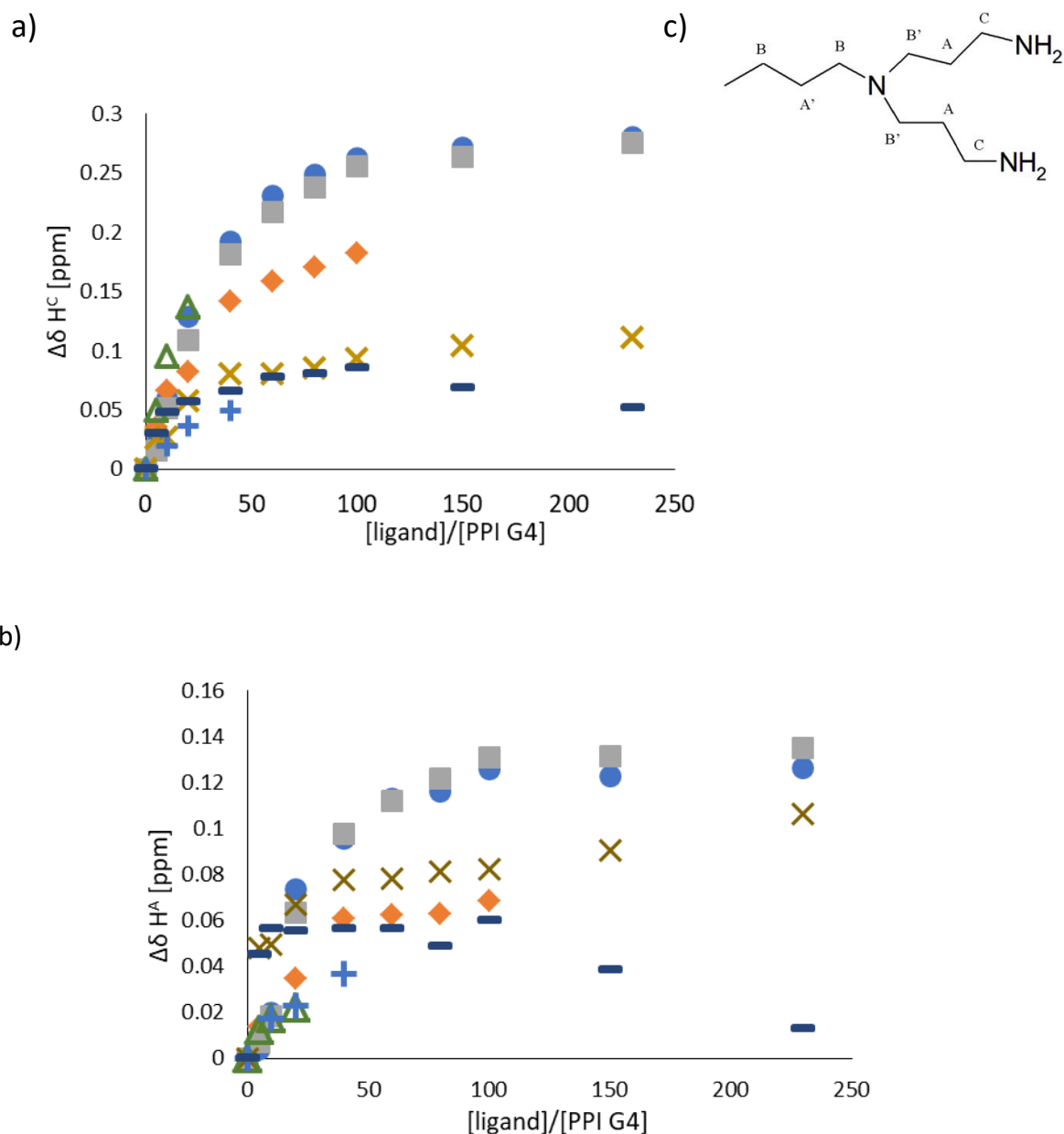
Wyznaczone wartości parametrów tworzenia kompleksu dendrymeru PPI G4 z badanymi ligandami różnią się w zależności od charakteru użytej metody badawczej. Liczba miejsc aktywnych n w makrocząsteczce dendrymeru PPI G4, które przyłączają cząsteczki liganda wyznaczona metodą rozpuszczalności i dializy równowagowej jest większa niż w przypadku oznaczeń techniką miareczkowania kalorymetrycznego ITC oraz miareczkowania techniką potencjału Zeta (Rys. 128). W metodach statycznych czas potrzebny na ustalenie się stanu równowagi w układzie (m.in. 24 godziny dla dializy równowagowej oraz 7 dni dla pomiarów rozpuszczalności) jest znacznie dłuższy niż w przypadku dynamicznych metod miareczkowania kalorymetrycznego oraz miareczkowania techniką potencjału Zeta (około 10 minut między kolejnymi dodawanymi porcjami titranta). W pomiarach rozpuszczalności oraz dializy równowagowej stosuje się ponadto duży nadmiar liganda względem dendrymeru PPI G4, co powoduje, że cząsteczki liganda mogą oddziaływać z miejscami aktywnymi położonymi w głębszych warstwach dendrymeru.



Rys. 128. Liczby miejsc aktywnych w makrocząsteczce dendrymeru PPI G4 wiążących cząsteczki liganda wyznaczone metodą: pomiaru rozpuszczalności, dializy równowagowej, miareczkowania kalorymetrycznego ITC oraz miareczkowania techniką Zeta potencjału.

Stałe wiązania K wyznaczone dynamiczną metodą miareczkowania kalorymetrycznego (ITC) są większe niż wyznaczone statyczną techniką dializy równowagowej. Podczas pomiarów kalorymetrycznych ITC stałe tworzenia K opisują oddziaływanie cząsteczek liganda przede wszystkim z najłatwiej dostępnymi powierzchniowymi miejscami aktywnymi makrocząsteczki dendrymeru o dużym powinowactwie do liganda. Stałe tworzenia wyznaczone techniką dializy równowagowej opisują wiązanie cząsteczek liganda zarówno z powierzchniowymi grupami aminowymi jak również z położonymi w głębszych warstwach makrocząsteczki PPI G4, których wysycenie ligandem wymaga dłuższego czasu oddziaływania obu reagentów.

Wykonano również pomiary ^1H NMR wodnych (D_2O) mieszanin o stałym stężeniu dendrymeru PPI G4 i wzrastającym stężeniu badanych ligandów w temperaturze pokojowej. Zmiany położenia sygnałów ^1H NMR pozwalają wnioskować, które z grup makrocząsteczki PPI G4 uczestniczą w tworzeniu kompleksu z badanym ligandem. Zależności zmiany położenia sygnałów ^1H NMR protonów (H^{C} oraz H^{A}) grup metylenowych dendrymeru PPI G4 położonych przy powierzchni makrocząsteczki od składu mieszaniny zostały zbiorczo przedstawione dla badanych ligandów na wykresie (Rys. 129).



Rys. 129. Zależność zmiany położenia sygnałów ¹H NMR protonów grup metylenowych położonych przy powierzchni makrocząsteczki dendrymeru PPI G4 w mieszaninie o wzrastającym stężeniu molowym liganda: 5-fluorouracyl (●), 5-jodouracyl (◆), tegafur (■), azydetymidyna (×), monofosforan fludarabiny (△), L-α-tyrozyna (+), L-α-tryptofan (–) dla: a) protonów H^C b) protonów H^A. Oznaczenie protonów grup metylenowych makrocząsteczki PPI G4 jest podane na schemacie (c).

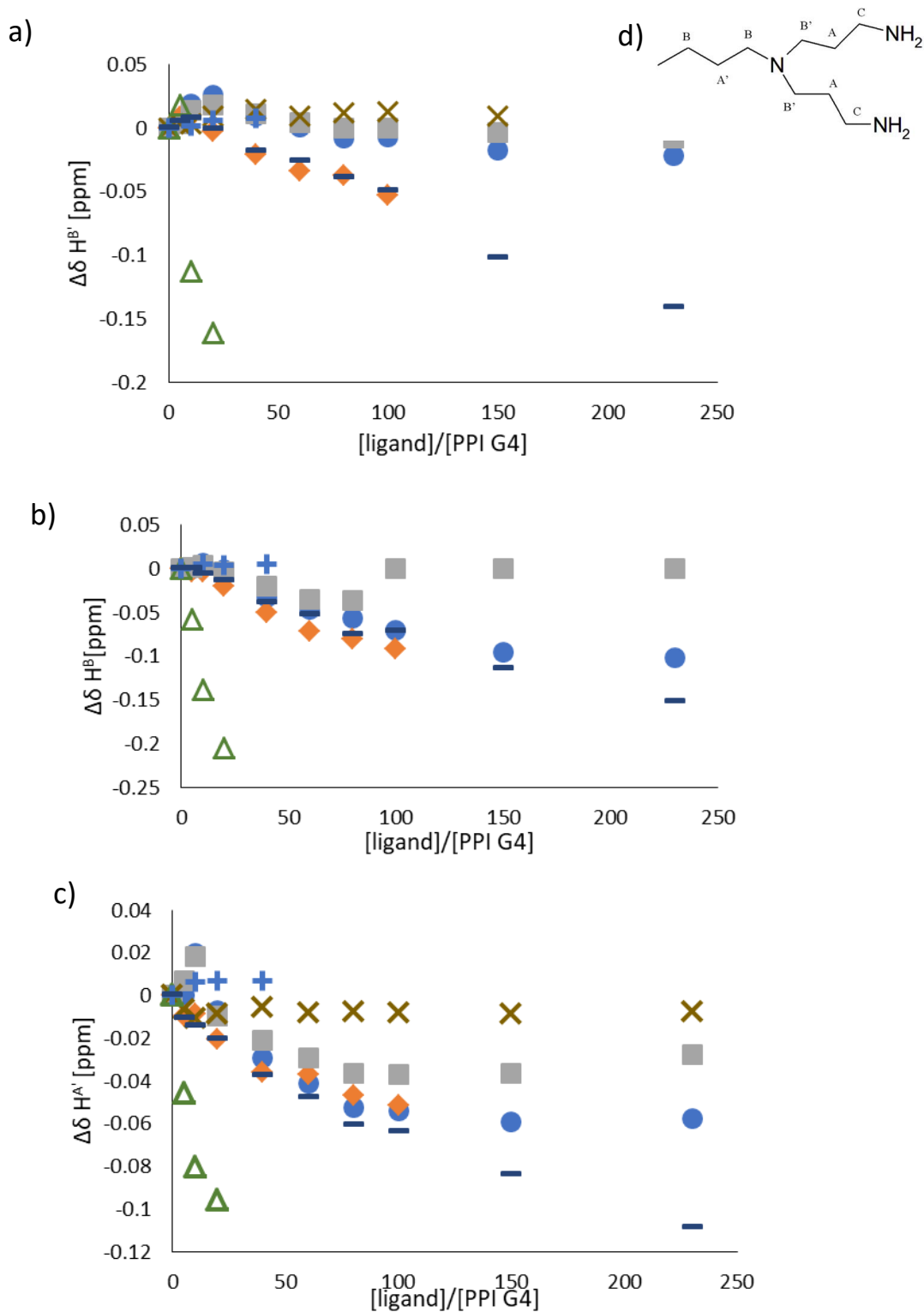
Wyniki pomiarów ¹H NMR (Rys. 129) wskazują, że protony H^C grup metylenowych położonych najbliżej powierzchni makrocząsteczki PPI G4 są najsilniej odsłanianie przez monofosforan fludarabiny (w zakresie stosunku stężeń molowych leku do dendrymeru PPI G4 równego od 5/1 do 20/1) oraz 5-fluorouracylu i tegafuru (w zakresie [ligand]/[PPI G4] od 5/1 do 230/1). Słabszy efekt odsłaniania protonów H^C makrocząsteczki PPI G4 obserwowano w wyniku oddziaływania z azydetymidyną, L-α-tryptofanem oraz L-α-tyrozyną. Wskazuje to,

że monofosforan fludarabiny, 5-fluorouracyl oraz tegafur silniej oddziałują z powierzchniowymi grupami makrocząsteczki dendrymeru PPI G4 niż azydotymidyna, L- α -tryptofan oraz L- α -tyrozyna. Silne wiązanie monofosforanu fludarabiny przez dendrymer PPI G4 zapewne wynika z anionowego charakteru cząsteczki tego leku, która oddziałuje elektrostatycznie z dodatnio naładowanymi terminalnymi grupami aminowymi makrocząsteczki dendrymeru PPI G4. Podobnie silne odsłanianie protonów H^A dendrymeru PPI G4 wywołane wzrastającym stężeniem 5-fluorouracylu oraz tegafuru wskazuje na oddziaływanie obu leków z grupami metylenowymi położonymi blisko powierzchni makrocząsteczki dendrymeru PPI G4.

Wykresy zależności zmiany położenia sygnałów ¹H NMR protonów (H^{B'}, H^B oraz H^{A'}) grup metylenowych dendrymeru PPI G4 położonych w głębszych warstwach merów w makrocząsteczce PPI G4 od składu mieszaniny (Rys. 130) wskazują na silne przesłanianie tych grup protonów makrocząsteczki wywołane wzrastającym stężeniem monofosforanu fludarabiny oraz L- α -tryptofanu. Wskazuje to na oddziaływanie cząsteczek tych ligandów z grupami metylenowymi położonymi w głębszych warstwach makrocząsteczki dendrymeru PPI G4. Silny efekt przesłaniania protonów H^{B'}, H^B oraz H^{A'} grup metylenowych makrocząsteczki PPI G4 występuje dla ligandów zawierających sprzężony układ dwóch pierścieni aromatycznych (monofosforan fludarabiny i L- α -tryptofan).

Wyniki ¹H NMR potwierdzają:

- silne odsłanianie grup metylenowych przy powierzchni oraz silne przesłanianie grup metylenowych położonych w głębszych warstwach makrocząsteczki dendrymeru PPI G4 wywołane oddziaływaniem z monofosforanem fludarabiny.
- silne odsłanianie grup metylenowych przy powierzchni makrocząsteczki PPI G4 wywołane oddziaływaniem z 5-fluorouracylem i tegafurem.
- silne przesłanianie grup metylenowych położonych w głębszych warstwach makrocząsteczki dendrymeru PPI G4 wywołane oddziaływaniem z L- α -tryptofanem.



Rys. 130. Zależność zmiany położenia sygnałów ^1H NMR protonów grup metylenowych dendrymeru PPI G4 w mieszaninie o wzrastającym stężeniu molowym liganda: 5-fluorouracyl (\bullet), 5-jodouracyl (\blacklozenge), tegafur (\blacksquare), azydotymidyna (\times), monofosforan fludarabiny (\triangle), L- α -tyrozyna ($+$), L- α -tryptofan ($-$) dla: a) protonów H^{B} b) protonów H^{B} c) protonów H^{A} . Ze względu na nakładanie się pasm H^{B} pochodzących od azydotymidyny na pasmo protonu H^{B} dendrymeru PPI G4 na wykresie nie przedstawiono zmian przesunięć protonu H^{B} spowodowanych wzrastającym stężeniem azydotymidyny. Oznaczenie protonów grup metylenowych makrocząsteczki PPI G4 jest podane na schemacie (d).

6. Streszczenie

Pomiary pH-metryczne:

- Wykonano pomiary pH wodnych roztworów dendrymeru PPI G4 w zakresie stężeń dendrymeru PPI G4 od 10 μM do 160 μM (pH-METER CPC-505).
- Określono stopień protonowania powierzchniowych pierwszorzędowych grup aminowych makrocząsteczki PPI G4 wykorzystując zależności opisane przez Cakara [55].

Pomiary rozpuszczalności:

- Wyznaczono w wodzie molowy współczynnik absorpcji ϵ dla wybranych leków: 5-jodouracylu, tegafuru, azydotymidyny, monofosforanu fludarabiny.
- Wykonano pomiary rozpuszczalności: 5-fluorouracylu, 5-jodouracylu, tegafuru, azydotymidyny, monofosforanu fludarabiny, L- α -tryptofanu oraz L- α -tyrozyny w wodnych roztworach dendrymeru PPI G4 o wzrastającym stężeniu w temperaturze pokojowej.
- Wyznaczono liczbę miejsc aktywnych w makrocząsteczce dendrymeru PPI G4 wiążących cząsteczki liganda w środowisku wodnym.
- Wyniki badań rozpuszczalności wskazują, że makrocząsteczka PPI G4 przyłącza więcej cząsteczek tegafuru i 5-jodouracylu o silniejszych właściwościach hydrofobowych niż 5-fluorouracylu.

Dializa równowagowa:

- Wyznaczono równowagowy rozkład liganda (5-fluorouracylu, 5-jodouracylu, tegafuru, azydotymidyny, monofosforanu fludarabiny, L- α -tryptofanu) pomiędzy fazę wodną i fazę z dendrymerem PPI G4 w temperaturze pokojowej.
- Wykorzystując równanie Scatcharda-Klotza dla jednego rodzaju miejsc aktywnych obliczono liczbę miejsc aktywnych n w makrocząsteczce dendrymeru PPI G4 wiążących cząsteczki liganda oraz stałą wiązania K ligand-miejsce aktywne w makrocząsteczce dla: 5-fluorouracylu, 5-jodouracylu, tegafuru, azydotymidyny, monofosforanu fludarabiny oraz L- α -tryptofanu.
- Wyniki dializy równowagowej wskazują, że makrocząsteczka dendrymeru PPI G4 przyłącza najwięcej cząsteczek monofosforanu fludarabiny spośród badanych ligandów.

- Liczba przyłączonych cząsteczek (n) 5-fluorouracylu, 5-jodouracylu, tegafuru, azydotymidyny oraz L- α -tryptofanu do makrocząsteczki dendrymeru PPI G4 w granicach niepewności pomiarowej wynosi od około 10 do 30 cząsteczek liganda.
- Stałe wiązania ligand-receptor K dendrymeru PPI G4 dla 5-jodouracylu, tegafuru, azydotymidyny, monofosforanu fludarabiny oraz L- α -tryptofanu w granicach niepewności pomiarowej mieszczą się w zakresie od około 300 do 1000.
- Zaobserwowano, że stała równowagi wiązania 5-fluorouracylu z miejscem aktywnym dendrymeru PPI G4 ma największą wartość spośród badanych ligandów.
- Obliczono parametry wiązania 5-fluorouracylu z dwoma rodzajami miejsc aktywnych w makrocząsteczce dendrymeru PPI G4, opisując prostoliniowe fragmenty izoterm wiązania równaniem Scatcharda-Klotza zgodnie z metodą zaproponowaną przez Klajnert, Shcharbina i Bryszewską [219], które potwierdzają wysokie powinowactwo tego leku do makrocząsteczki PPI G4.

Miareczkowanie kalorymetryczne ITC:

- Wyznaczono efekty cieplne miareczkowania wodnego roztworu dendrymeru PPI G4 wodnymi roztworami leków (5-fluorouracylu, 5-jodouracylu, tegafuru, azydotymidyny, monofosforanu fludarabiny) oraz roztworem L- α -tryptofanu w temperaturze 25°C.
- Wyznaczono efekty cieplne rozcieńczania wodnych roztworów leków 5-fluorouracylu, 5-jodouracylu, tegafuru, azydotymidyny, monofosforanu fludarabiny oraz L- α -tryptofanu w wodzie w temperaturze 25°C.
- Wyznaczono efekty cieplne (ΔH , ΔS , ΔG) bezpośrednich oddziaływań dendrymeru PPI G4 z 5-fluorouracylem, 5-jodouracylem, tegafurem, azydotymidyną, monofosforanem fludarabiny oraz z L- α -tryptofanem.
- Wyznaczono parametry wiązania: liczbę miejsc aktywnych n w makrocząsteczce dendrymeru PPI G4 wiążących cząsteczki liganda, stałą wiązania K ligand-miejsce aktywne w makrocząsteczce dendrymeru PPI G4, standardową entalpię (ΔH), standardową entropię (ΔS) oraz standardową entalpię swobodną (ΔG).
- Badania kalorymetryczne ITC wskazują, że makrocząsteczka PPI G4 wiąże około 40 cząsteczek monofosforanu fludarabiny z powinowactwem wyższym niż pozostałe badane ligandy.

- Najbardziej egzotermiczny efekt oddziaływań liganda z miejscem aktywnym makrocząsteczki PPI G4 obserwuje się dla monofosforanu fludarabiny, natomiast najmniej egzotermiczny efekt obserwuje się dla L- α -tryptofanu.
- Wyznaczone standardowe entalpie swobodne ($\Delta G < 0$) oddziaływań wszystkich ligandów z miejscami aktywnymi makrocząsteczki PPI G4 wskazują, że proces tworzenia kompleksu jest termodynamicznie samorzutny.
- Wiązaniu przez makrocząsteczkę PPI G4 cząsteczek 5-fluorouracylu, tegafuru, 5-jodouracylu, azydotymidyny oraz monofosforanu fludarabiny towarzyszy wzrost stopnia uporządkowania reagentów, natomiast wiązaniu L- α -tryptofanu towarzyszy wzrost stopnia nieuporządkowania układu.
- Uzyskane dynamiczną metodą miareczkowania kalorymetrycznego ITC liczby cząsteczek liganda przyłączonych do makrocząsteczki PPI G4 są niższe niż uzyskane statycznymi metodami pomiaru rozpuszczalności oraz dializy równowagowej.
- Wartości stałej wiązania K ligand-miejsce aktywne w makrocząsteczce dendrymeru PPI G4 wyznaczone dynamiczną metodą miareczkowania kalorymetrycznego są wyższe niż wyznaczone metodami statycznymi (dializy równowagowej oraz pomiarami rozpuszczalności).

Spektroskopia ^1H NMR:

- Zarejestrowano widmo ^1H NMR 140 μM dendrymeru PPI G4 w ciężkiej wodzie w temperaturze pokojowej.
- Zarejestrowano serię widm ^1H NMR wodnych mieszanin (D_2O) dendrymeru PPI G4 o wzrastającym stężeniu 5-fluorouracylu, 5-jodouracylu, tegafuru, azydotymidyny, monofosforanu fludarabiny, L- α -tryptofanu i L- α -tyrozyny.
- Na podstawie zmian położenia pików na widmach ^1H NMR wskazano grupy funkcyjne dendrymeru PPI G4 zaangażowane w wiązanie cząsteczek: 5-fluorouracylu, 5-jodouracylu, tegafuru, azydotymidyny, monofosforanu fludarabiny, L- α -tryptofanu i L- α -tyrozyny.
- Wyniki miareczkowania ^1H NMR wskazują, że monofosforan fludarabiny silnie oddziałuje zarówno z grupami funkcyjnymi położonymi przy powierzchni makrocząsteczki PPI G4, jak również z grupami funkcyjnymi położonymi w jej głębszych warstwach. Cząsteczki 5-fluorouracylu oraz tegafuru wiązane są najsilniej przez powierzchniowe grupy metylenowe dendrymeru PPI G4. Wyniki miareczkowania ^1H NMR wskazują, że L- α -tryptofan oddziałuje głównie

z grupami funkcyjnymi położonymi w głębszych warstwach makrocząsteczki PPI G4.

Pomiary potencjału Zeta:

- Zmierzono potencjał Zeta dendrymeru PPI G4 w wodnym roztworze 5-fluorouracylu o wzrastającym stężeniu.
- Wyznaczono liczbę miejsc aktywnych w cząsteczce dendrymeru PPI G4 wiążących cząsteczki 5-fluorouracylu jako punkt przecięcia prostoliniowych fragmentów zależności potencjału Zeta mieszaniny od jej składu.

7. Abstrakt

Celem pracy było zbadanie oddziaływań wybranych leków stosowanych w terapii przeciwnowotworowej: 5-fluorouracylu (5-FU), 5-jodouracylu (5-IU), tegafuru (TF), azydotymidyny (AZT), monofosforanu fludarabiny (F-ara-AMP) oraz dwóch aminokwasów aromatycznych: L- α -tyrozyny (Tyr) i L- α -tryptofanu (Trp) z dendrymerem PPI G4 w środowisku wodnym. Spektroskopowe wyniki badań wymienionych leków onkologicznych oraz aminokwasów wskazują na wzrost rozpuszczalności tych ligandów w wodzie w obecności dendrymeru PPI G4. Jedynym wyjątkiem jest dobrze rozpuszczalny w wodzie monofosforan fludarabiny. Wzrost rozpuszczalności cząsteczek gościa (liganda) w roztworze z receptorem, tłumaczyć można tworzeniem kompleksów supramolekularnych ligand – receptor. W warunkach dużego nadmiaru liganda względem dendrymeru PPI G4, hydrofobowość (logP) liganda wpływa na wzrost liczby jego cząsteczek (n) przyłączonych przez makrocząsteczki PPI G4, co szczególnie widoczne jest przy porównaniu strukturalnie podobnych ligandów: $n_{TF} \approx n_{5-IU} > n_{5-FU}$ oraz $n_{Trp} > n_{Tyr}$.

Badania wykonane techniką dializy równowagowej wskazują, że makrocząsteczki PPI G4 wiążą od 10 do 30 cząsteczek liganda o słabych właściwościach kwasowych (tegafuru, 5-fluorouracylu, 5-jodouracylu i azydotymidyny) lub zwitterionowych cząsteczek L- α -tryptofanu. W przypadku monofosforanu fludarabiny o silnych właściwościach kwasowych liczba przyłączonych przez makrocząsteczkę PPI G4 cząsteczek tego leku jest wyższa ($n = 80$), w porównaniu z ligandami o słabych właściwościach kwasowych ($n=10-30$). Związane jest to z silnym oddziaływaniem elektrostatycznym pomiędzy dodatnio

naładowanymi powierzchniowymi grupami aminowymi dendrymeru PPI G4 z ujemnie naładowanymi resztami fosforanowymi tego leku. Oznaczone techniką dializy stałe wiązania K ligand - miejsce aktywne makrocząsteczki PPI G4 wskazują, że spośród badanych ligandów najsilniej z dendrymerem PPI G4 oddziałuje 5-fluorouracyl, którego cząsteczki wiązane są przez dwa typy miejsc aktywnych w makrocząsteczce PPI G4 o różnym powinowactwie do tego leku.

Wyniki pomiarów techniką izotermicznego miareczkowania kalorymetrycznego w temperaturze 25°C wskazują, że proces wiązania przez makrocząsteczki PPI G4 cząsteczek: monofosforanu fludarabiny, tegafuru, 5-fluorouracylu, 5-jodouracylu, azidotymidyny oraz L- α -tryptofanu jest termodynamicznie samorzutny w środowisku wodnym w temperaturze 25°C (wyliczone wartości swobodnych entalpii dla wszystkich badanych ligandów mają wartości ujemne ($\Delta G < 0$)). Najsilniej w porównaniu z pozostałymi badanymi ligandami wiązany jest monofosforan fludarabiny przez dendrymer PPI G4. Trwałość powstałego połączenia potwierdza silny egzotermiczny efekt kompleksowania oraz wysoka stała wiązania tego leku. Najmniej egzotermiczny efekt oddziaływań makrocząsteczki PPI G4 stwierdzono natomiast dla L- α -tryptofanu. Wartości standardowych entropii wiązania badanych leków przez dendrymer PPI G4 wskazują na wzrost stopnia uporządkowania układu ($\Delta S < 0$), co świadczyć może o przyłączaniu cząsteczek liganda głównie na powierzchni makrocząsteczki PPI G4. Dodatnia wartość standardowej entropii towarzysząca wiązaniu L- α -tryptofanu przez dendrymer PPI G4 wskazuje na wzrost nieuporządkowania układu podczas kompleksowania.

Wyniki miareczkowań ^1H NMR dendrymeru PPI G4 wybranymi ligandami w środowisku ciężkiej wody wskazują, że monofosforan fludarabiny oddziałuje silnie zarówno z powierzchniowymi grupami jak i położonymi w głębszych warstwach grupami funkcyjnymi dendrymeru PPI G4. Badania ^1H NMR wskazują, że 5-fluorouracyl i tegafur oddziałują z powierzchnią makrocząsteczki dendrymeru PPI G4 silniej niż z jego wewnętrznymi grupami funkcyjnymi, podczas gdy cząsteczka L- α -tryptofanu oddziałuje głównie z grupami funkcyjnymi dendrymeru zlokalizowanymi pod powierzchnią makrocząsteczki.

8. Abstract

The aim of the study was to investigate the effects of selected drugs used in anticancer therapy: 5-fluorouracil (5-FU), 5-iodouracil (5-IU), tegafur (TF), azidothymidine (AZT), fludarabine monophosphate (F-ara-AMP) and two aromatic amino acids: L- α -tyrosine (Tyr)

and L- α -tryptophan (Trp) with PPI G4 dendrimer in an aqueous medium. The spectroscopic results of the studies on the above-mentioned oncological drugs and amino acids indicate an increase in solubility of these ligands in water in the presence of the PPI G4 dendrimer. The only exception in this trend is observed for the highly water-soluble fludarabine monophosphate. The increase in the solubility of guest molecules in solution with the increase of receptor concentration can be explained by the formation of ligand-receptor supramolecular complexes. Under conditions of the large excess of ligand to the PPI G4 dendrimer, the hydrophobicity (logP) of the ligand affects the increase of the number of its molecules bound with the PPI G4 macromolecules, which is especially evident when comparing structurally similar ligands: $n_{TF} \approx n_{5-IU} > n_{5-FU}$ and $n_{Trp} > n_{Tyr}$.

Studies performed using equilibrium dialysis indicate that the PPI G4 macromolecule binds from 10 to 30 ligand molecules with weak acidic properties (tegafur, 5-fluorouracil, 5-iodouracil and azidothymidine) or zwitterionic L- α -tryptophan molecules. For fludarabine monophosphate with strong acidic properties, the number of molecules bound with the PPI G4 macromolecule is higher ($n = 80$) compared to ligands with weaker acidic properties ($n = 10-30$). This is due to the strong electrostatic interaction between the positively charged surface amino groups of the PPI G4 dendrimer and the negatively charged phosphate residues of this drug. The ligand-active site binding constants K of the PPI G4 macromolecule determined for studied ligands by dialysis indicate that the ligand which interacts the strongest with the PPI G4 dendrimer is 5-fluorouracil, whose molecules are bound with the PPI G4 macromolecule by two types of active sites with different affinity for this drug.

The results of the isothermal calorimetric titrations at 25⁰C indicate that the binding process by PPI G4 macromolecules of the following ligand molecules: fludarabine monophosphate, tegafur, 5-fluorouracil, 5-iodouracil, azidothymidine and L- α -tryptophan is thermodynamically spontaneous at 25⁰C in an aqueous environment (the calculated values of Gibbs free energy for all tested ligands are negative ($\Delta G < 0$)). Fludarabine monophosphate is the strongest bound to the PPI G4 dendrimer as compared to the other ligands tested. The stability of the resulting complexes is confirmed by the strong exothermic complexing effect and the high binding constant of this drug. The least exothermic effect of the interactions of PPI G4 macromolecules was found for L- α -tryptophan. Standard values of the binding entropies for the studied drugs by the PPI G4 dendrimer indicate an increase in the order of the system ($\Delta S < 0$), which may indicate the attachment of ligand molecules mainly to the surface of the PPI G4 macromolecule. A positive standard entropy value accompanying the

binding of L- α -tryptophan by the G4 PPI dendrimer indicates an increase in system disorder during complexation.

The results of ^1H NMR titrations of the PPI G4 dendrimer with selected ligands in a heavy water environment indicate that fludarabine monophosphate interacts strongly with both the surface groups and the other functional groups of the PPI G4 dendrimer. ^1H NMR studies indicate that 5-fluorouracil and tegafur interact with the surface of the PPI G4 dendrimer macromolecule stronger than with its internal functional groups. L- α -Tryptophan is bound to the dendrimer functional groups located under the surface of the dendrimer macromolecule.

9. Bibliografia

1. Kędryna T., *Chemia ogólna z elementami biochemii*, WZK, Kraków, 2001.
2. Sienko M.J., Plane R.A., *Chemia postawy i zastosowania*, WNT, Warszawa, 1980.
3. Menga F., Swyngedouw E., *Water Technology and the Nation-State*, Routledge, London, 2018.
4. Loftsson T., *Pharmazie*, 67 (2012) 363.
5. Malenkov G. G., *Phys. Wave Phenom.*, 28 (2020) 160.
6. Sanderson R.T., *Podstawy chemii fizycznej*, PWN, Warszawa, 2002.
7. Atkins P.W., *Podstawy chemii fizycznej*, PWN, Warszawa 2002.
8. Pajdowski L., *Chemia ogólna*, PWN, Warszawa, 1999.
9. Whiting H., *Proc. Am. Acad. Arts Sci.* 19 (1884) 353.
10. Ludwig, R., *Angew. Chem.*, 40 (2001) 1808.
11. Bernal J. D., Fowler R. H., *J. Chem. Phys.*, 1 (1933) 515.
12. Pople J. A., *Proc. R. Soc. London, Ser. A.*, 205 (1951) 163.
13. Frank, H. S., Wen W.-Y., *Discuss. Faraday Soc.*, 24 (1957) 133.
14. Némethy G., Scheraga H. A., *J. Chem. Phys.*, 36 (1962) 3382.
15. Pauling L., *The structure of water*, Pergamon Press Ltd, London, 1959.
16. Boutron P., Alben R., *J. Chem. Phys.*, 62 (1975) 4848.
17. Kim J., Kim K. S., *J. Chem. Phys.*, 109 (1998) 5886.
18. Chaplin M. F., *Biophys. Chem.*, 83 (1999) 211.
19. Lozynski M., *Chem. Phys.*, 455 (2015) 1.

20. Liu J., He X., Zhang J. Z. H., *Phys. Chem. Chem. Phys.*, 19 (2017) 11931.
21. Liu J., He X., Zhang J. Z. H., Qi L., *Chem. Sci.*, 9 (2018) 2065.
22. Ghosh S.R., Debnath B., Jana A.D., *J. Mol. Model.*, 26 (2020) 20.
23. Shu L., Jegatheesan L., Jegatheesan V., Li C. Q., *Fluid. Phase. Equilib.*, 511 (2020) 112514.
24. Gao Y., Fang H. Ni K., *Sci. Rep.*, 11 (2021) 9542.
25. Soleymana R., Adeli M., *Polym. Chem.*, 6 (2015) 10.
26. Fréchet J., Hawker C., Gitsov I., Leon J., *J. Macromol. Sci. A.*, 33 (1996) 1399.
27. Yi C., Xu Z., Ford W. T., *China. Particuology.*, 2 (2004) 222.
28. Vögtle F., Weber E., *Angew. Chem. Int. Ed.*, 13 (1974) 814.
29. Buhleier E., Wehner W., Vögtle F., *Synthesis.*, 2 (1978) 155.
30. Newkome G.R., Yao Z., Baker G.R., Gupta V.K., *J. Org. Chem.*, 50 (1985) 2003.
31. Basavaraj B.V., Sharon F., Bharath S., Deveswaran R., Sindhu A., Madhavan V., *J. Pharm. Res.*, 2 (2009) 970.
32. Tomalia D.A., Baker H., Dewald J., Hall M., Kallos G., Martin S., Roeck J., Ryder J., Smith P., *Polym. J.*, 17 (1985) 117.
33. Calderón M., Strumia M., *Rev. Latin. Am. Metal. Mat.*, 33 (2013) 2.
34. Mendes L. P., Pan J., Torchilin V. P., *Molecules.*, 22 (2017) 1401.
35. Gupta S., Biswas P., *J. Phys. Chem. B.*, 14 (2020) 4193.
36. Sowinska M., Urbanczyk-Lipkowska Z., *New J. Chem.*, 38 (2014) 2168.
37. Šebestík, J., Reiniš, M., Ježek, J., *Synthesis of Dendrimers: Convergent and Divergent Approaches. w: Biomedical Applications of Peptide-, Glyco- and Glycopeptide Dendrimers, and Analogous Dendrimeric Structures.* Springer, Wien, 2012.
38. Cheng Y., Xu Z., Ma M., Xu T., *J. Pharm. Sci.*, 97 (2008) 123.
39. Malkoch M., García-Gallego S., CHAPTER 1:Introduction to Dendrimers and Other Dendritic Polymers w *Dendrimer Chemistry: Synthetic Approaches Towards Complex Architectures*, 2020.
40. Walter M.V., Malkoch M., *Chem. Soc. Rev.*, 41 (2012) 4593.
41. Kubiak M. *CHEMIK.*, 68 (2014) 141.
42. Welch P. M., Welch C. F., *Macromolecules.*, 42 (2009) 7571.
43. Araújo R.V., Santos S. D. S., Igne Ferreira E., Giarolla J., *Molecules.*, 23 (2018) 2849.

44. Mekuria S. L., Song C., Ouyang Z., Shen M., Janaszewska A., Klajnert-Maculewicz B., Shi Xi., *Bioconjugate Chem.*, 32 (2021) 225.
45. Wang J., Li D., Fan Yu., Shi M., Yang Y., Wang L., Peng Y., Shen M., Shi X., *Nanoscale.*, 11 (2019) 22343.
46. Abedi-Gaballu F., Dehghan G., Ghaffari M., Yekta R., Abbaspour-Ravasjani S., Baradaran B., Dolatabadi J. E. N., Hamblin M. R., *Appl. Mater. Today.*, 12 (2018) 177.
47. Dvornic P. R., *J. Polym. Sci. A Polym. Chem.*, 4 (2006) 2755.
48. Sorokina S. A., Krasnova I. Yu., *INEOS OPEN.*, 1 (2018) 85.
49. Soltani, F., Ramezani M., Farzad S.A., Mokhtarzadeh A., Hashemi M., *Artif. Cells. Nanomed. Biotechnol.*, 45 (2016) 1356.
50. Gupta, U., Agashe H. B., Jain N. K., *J. Pharm. Pharm. Sci.*, 10 (2007) 358.
51. Weener J.W., J. van Dongen J. L., Meijer E. W., *J. Am. Chem. Soc.* 121 (1999) 10346.
52. Berg E. V. D., Meijer E., *Angew. Chem.*, 32 (1993) 1308.
53. Maleki B., Sheikh S., *RSC Adv.*, 5 (2015) 42997.
54. García-Gallego S., Franci G., Falanga A., Gomez R., Folliero V., Galdiero S., de la Mata FJ., Galdiero M., *Molecules.*, 22 (2017) 1581.
55. Cakara D., Borkovec M., *Croat. Chem. Acta.*, 80 (2007) 421.
56. Zacharopoulos N., Economou I. G., *Macromolecules.*, 35 (2002) 1814.
57. Gohel M. C., Parikh R. K., Bariya S. H., Nagori S. A., Gandhi A., Patel V., Patel T., Pandya R., Kharadi S., Patel P., Bhagat N., Shroff M., Poptani S., Gandh Ch., *Pharm. Rev.*, 7 (2009) 3.
58. Tarazona-Vasquez F., Balbuena P. B., *J. Phys. Chem. B.*, 112 (2008) 4182-93.
59. Ulaszewska M. M, Dolores Hernando M., Uclés A., Rosal R., Rodríguez A., Garcia-Calvo E., Fernández-Alba A. R., Chapter 6 - Chemical and Ecotoxicological Assessment of Dendrimers w the Aquatic Environment, *Comprehensive Analytical Chemistry*, Elsevier, 2012.
60. Gupta A., Dubey S., Mishra M., *J. drug deliv. ther.*, 8 (2018) 328.
61. de Gennes P. G., Hervet H., *J. Phys. Lett.*, 44Phys. Lett., 44 (1983) 351.
62. Sękowski S., Miłowska, K., Gabryelak T, *Postepy. Hig. Med. Dosw.* 62 (2008) 725.
63. Tomalia, D.A., Rookmaker, M., *Polymer Data Handboo.*, Oxford University Press, New York, 2009.

64. Gupta S., Biswas P., *Soft Matter*, 16 (2020) 8400.
65. Gupta S., Biswas P., *J. Phys. Chem. B.*, 122 (2018) 9250.
66. Wu Ch., *Mol Simul.*, 36 (2010) 1164.
67. Adhiya A., Wesdemiotis Ch., *Int. J. Mass Spectrom.*, 214 (2002) 75.
68. Chai M., Niu Y., Youngs W. J., *J. Am. Chem. Soc.*, 123 (2001) 4670.
69. Ramzi A., Scherrenberg R., Joosten J., Lemstra P., Mortensen K., *Macromolecules* 35 (2002) 827.
70. Kabanov V. A., *Macromolecules.*, 31(1998) 5142.
71. Jain V., Maingi V., Maiti P. K., Bharatam P. V., *Soft Matter.*, 9 (2013) 6482.
72. Eghtesadi S. A., Haso F., Kashfipour M. A., Lillard R. S., Liu T., *Chemistry.*, 21 (2015) 18623.
73. Smeijers A. F., Markvoort A. J., Pieterse K., Hilbers P. A. J., *J. Chem. Phys.*, 144, (2016) 074903.
74. Vogl F., Ritchard G., Werner N., *Dendrimer chemistry*, WILEY-VCH Verlag GmbH & Co. KGa, Weinheim, 2009.
75. Jansen J. F. G. A., Meijer E. W., de Brabander-van den Berg E. M. M., *J. Am. Chem. Soc.*, 117 (1995) 4417.
76. Jansen J. F. G. A., de Brabander-van den Berg E. M. M., Meijer E. W., *Science.*, 266 (1994) 1226.
77. Jansen J. F. G. A., Meijer E. W., *Macromol. Symp.*, 102 (1996) 27.
78. Jansen J. F. G. A., Peerlings H. W. I., van Hest J. C. M., Meijer E. W., de Brabander-van den Berg E. M. M., w: *Modular chemistry*, Michl, J., red Kluwer Academic Publisher, Netherlands, 1997, s. 371-384.
79. Miklis P., Cagin T., Goddard W. A., *J. Am. Chem. Soc.*, 119 (1997) 7458.
80. Michels J. J., Huskens J., Reinhoudt D. N., *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 2.*, 2002 (2002) 102.
81. Zhang W., Chen Z., Song X., Si J., Tang G., *Technol. Cancer Res. Treat.*, 7 (2008) 103.
82. Madaan K., Kumar S., Poonia N., Lather V., Pandita D., *J. Pharm. Bioallied. Sci.*, 6 (2014) 139.
83. Choudhary S., Gupta L., Rani S., Dave K., Gupta U., *Front. Pharmacol.*, 8 (2017) 261.
84. Sepulveda-Crespo D., Jimenez J. L., Gomez R., De La Mata F. J., Majano P. L., Munoz-Fernandez M. A., Gastaminza P., *Nanomedicine.*, 13 (2017) 49.

85. Tripathy S., Das M. K., *J. Appl. Pharm. Sci.*, 3 (2013) 142.
86. Caminade A.-M., Turrinab C.-O., *J. Mater. Chem. B.*, 2 (2014) 4055.
87. Tomalia D. A., Nixon L. S., Hedstrand D. M., *Biomolecules* 10 (2020) 642.
88. Wrońska N., Felczak A., Zawadzka K., Janaszewska A., Klajnert B., Bryszewska M., Lisowska K., *New J. Chem.*, 38 (2014) 2987.
89. Felczak A., Wrońska N., Janaszewska A., Klajnert B., Bryszewska M., Appelhans D., Voit B., Różalska S., Lisowska K., *New J. Chem.*, 36 (2012) 2215.
90. Jebelli M. A., Kalantar E., Maleki A., Izanloo H., Gharibi F., Daraei H., Hayati B., Ghasemi E., Azari A., *Nat. Pharm. Prod.*, 10 (2015) e20621.
91. Wrońska N., Felczak A., Zawadzka K., Poszepczyńska M., Różalska S., Bryszewska M., Appelhans D., Lisowska K., *Molecules.*, 20 (2015) 19330.
92. Dib N., Fernandez L., Santo M., Otero L., Alustiza F., Liaudat A. C., Bosch P, Lavaggi M.L., Cerecetto H., González M., *Heliyon.*, 5 (2019) e01528.
93. Kaur A., Jain K., Mehra N. K, Jain N. K., *Artif. Cells. Nanomed. Biotechnol.*, 45 (2017) 414.
94. Wang F., Cai X., Su Y., Hu J., Wu Q., Zhang H., Xiao J., Cheng Y., *Acta. Biomater.*, 8 (2012) 4304.
95. Chaudhary S., Gothwal A., Khan I., Srivastava S., Malik R., Gupta U., *Mater. Sci. Eng. C. Mater Biol. Appl.*, 72 (2017) 611.
96. Gorzkiewicz M., Buczkowski A., Appelhans D., Voit B., Pułaski Ł., Pałecz B., Klajnert-Maculewicz B., *Int. J. Pharm.*, 544 (2018) 83.
97. Szulc A., Appelhans D., Voit B., Bryszewska M., Klajnert B., *New. J. Chem.*, 36 (2012) 1610.
98. Puy J.-Y., Jordheim L. P., Cros-Perrial E., Dumontet Ch., Peyrottes S., Lefebvre-Tournier I., *J. Chromatogr. B. Analyt. Technol. Biomed. Life. Sci.*, 1053 (2017) 101.
99. Patel S. K., Gajbhiye V., Jain N. K., *J. Drug Target.*, 20 (2012) 841.
100. Soni N., Jain K., Gupta U., *J. Nanopart. Res.*, 17 (2015) 458.
101. Baecker D., Kapp T., Schumacher P., Gust R., Kircher B., *Archiv. der Pharmazie.* 353 (2020) e2000209.
102. Szulc A., Signorelli M., Schiraldi A., Appelhans D., Voit B., Bryszewska M., Klajnert-Maculewicz B., Fessas D., *Int. J. Pharm.*, 495 (2015) 940.
103. Szulc A., Appelhans D., Voit B., Bryszewska M., Klajnert B., *J. Fluoresc.*, 23 (2013) 349.

104. Wrobel D.,Appelhans D., Signorelli M., Wiesner B., Fessas D., Scheler U., Voit B., Maly J., *Biochim. Biophys. Acta. Biomembr.*, 1848 (2015) 1490.
105. Jain K., Kesharwani P., Gupta U., Jain N.K., *Int. J. Pharm.*, 394 (2010) 122.
106. Traczewska T. M., *Biologiczne metody oceny skażenia środowiska*, Oficyna Wydawnicza Politechniki Wrocławskiej, Wrocław, 2011.
107. Van der Ben N., Abid S., Rouis Z., Aouni M., Lassoued M. A., Sfar S., *J. Appl. Pharm. Sci.*, 2 (2012) 74.
108. Somani S., Laskar P., Altwajry N., Kewcharoenvong P., Irving C., Robb G., Pickard B. S., Duf C., *Sci. Rep.*, 8 (2018) 9410.
109. Agashe H.B., Dutta T., Garg M., Jain N.K., *J. Pharm. Pharmacol.*, 58 (2006) 1491.
110. Janaszewska A., Mączyńska K., Matuszko G., Appelhans D., Voit B.,Klajnert B., Bryszewska M., *New. J. Chem.*, 36 (2012) 428.
111. Khalid H., Mukherjee S.P., O'Neill L., Byrne H.J., *J. Appl. Toxicol.*, 36 (2016) 464-73.
112. Dutta T, Agashe H. B., Garg M., Balakrishnan P., Kabra M., Jain N. K., *J. Drug. Target.*, 15 (2007) 89.
113. Zinselmeyer B. H., Mackay S. P., Schatzlein A. G., Uchegbu I. F., *Pharm. Res.*, 19 (2002) 960.
114. Suarez I.J., Rosal R., Rodriguez A., Ucles A., Fernandez-Alba A. R., Hernando M. D., Garcia-Calvo E., *Trends. Analyt. Chem.*, 30 (2011) 492.
115. Mishra V., Gupta U., Jain N. K., *Pharmazie.*, 65 (2010) 891.
116. Ziembra B., Halets I., Shcharbin D., Appelhans D., Voit B., Pieszynski I., Bryszewska M., Klajnert B., 100A (2012) 2870.
117. Kumar P. V., Asthana A., Dutta T., Jain N. K., *J. Drug. Target.*, 14(2006) 546.
118. Malaekheh-Nikouei B., Rezaee M., Gholami L., Sanjar Mousavi N., Kazemi Oskuee R., *Pharm. Biol.*, 56 (2018) 519.
119. Liu H., Wang Y., Wang M., Xiao J., Cheng Y., 35 (2014) 5407.
120. Cong Y., Shi B., Lu Y., Wen S. Chung R., Jin D., *Sci. Rep.*, 6 (2016) 21891.
121. Mehrparvar L., Safapour S., Sadeghi-Kiakhani M., Gharanjig K., *Environ. Chem. Lett.*, 14 (2016) 533.
122. Abkenar S. S., Malek R. M. A., Mazaheri F., *J. Environ. Manage.*, 163 (2015) 53.

123. Hayatia B., Aramib M., Malekia A., Pajootanb E., *Desalination. Water. Treat.*, 56 (2015) 97.
124. Al-Thawabeia R. A., Hodali H. A., *J. Chem.*, 2015 (2015) 403597.
125. Ma C. J., Huang C. W., Chang T. K., Tsai H. L., Su W. C., Yeh Y. S., Chen P. J., Wang J.Y., *Transl. Oncol.*, 12 (2019) 502.
126. Park J. H., Im S. A., Byun J. M., Kim K. H., Kim J. S., Choi I. S., Kim H. J., Lee K. H., Kim T. Y., Han S. W., Oh D. Y., Kim T. Y., *J. Breast. Cancer.*, 20 (2017) 347.
127. Cutsem E. V., Köhne C. H., Láng I., Folprecht G., Nowacki M. P., Cascinu S., Shchepotin I., Maurel J., Cunningham D., Tejpar S., Schlichting M., Zubeil A., Celik I., Rougier P., Ciardiello F., *J. Clin. Oncol.*, 29 (2011) 2011.
128. Wang Z., Dai W. P., Zang Y. S., *Onco. Targets. Ther.*, 12 (2019) 443.
129. Oktay S., Alemdar N., *J. Appl. Polym. Sci.*, 136 (2018) e46914.
130. Prince G. T., Cameron M. C., Fathi R., Alkousakis T., *Int. J. Dermatol.*, 57 (2018) 1259.
131. Cameron D. A., Gabra H., Leonard R. C., *J. Cancer.*, 70 (1994) 120.
132. Latchman J., Guastella A., Tofthagen C., *Clin. J. Oncol. Nurs.*, 18 (2014) 581.
133. Miura K., Kinouchi M., Ishida K., Fujibuchi W., Naitoh T., Ogawa H., Ando T., Yazaki N., Watanabe K., Haneda S., Shibata C., Sasaki I., *Cancers.*, 2 (2010) 1717.
134. Buczkowski A., Sekowski S., Grala A., Palecz D., Milowska K., Urbaniak P., Gabryelak T., Piekarski H., Palecz B., *Int. J. Pharm.*, 408 (2011) 266.
135. Camacho C., Tomas H., Rodrigues J., *Molecules.*, 26 (2021) 2924.
136. go.drugbank.com
137. Garg M. B., Lincz. L. F., Adler K., Scorgie F. E., Ackland S. P., Sakoff J. A., *Br. J. Cancer.*, 107 (2012) 1525.
138. Karthikeyan K., Babu C. M., Shaji S., Ashok A. M., Madhu C. S., *J. Oncol. Pharm. Pract.*, 27 (2021) 1016.
139. Prachayasittikul S., Worachartcheewan A., Pingaew R., Suksrichavalit T., Isarankura-Na-Ayudhya Ch., Ruchirawat S., Prachayasittikul V., *Lett. Drug. Des. Discov.*, 9 (2012) 282.
140. Rzepiela K., Buczek A., Kupka T., Broda M. A., *Molecules.* 25 (2020) 3931.
141. Gupta O. D., Twamley B., Kirchmeier R. L., Shreeve J. M., *J. Fluor. Chem.* 106 (2000) 199.

142. Singh V. P., Singh S., Narang K. K., Bhattacharya D., *J. Enzyme. Inhib. Med. Chem.*, 24 (2009) 105.
143. Szterner P., *J. Chem. Eng.*, 53 (2008) 1738.
144. Patra A., Harp J., Pallan P. S., Zhao L., Abramov M., Herdewijn P., Egli M., *Nucleic. Acids. Res.*, 41 (2013) 2689.
145. Byrd D. M., Prusoff W.H., *Antimicrob. Agents. Chemother.* 11 (1977) 312.
146. Cui F., Zhang Q., Yao X., Luo H., Yang Y., Qin L., Qu G., Lu Y., *Pestic. Biochem. Phys.*, 90 (2008) 126.
147. Ikeda K., Yoshisue K., Matsushima E., Nagayama S., Kobayashi K., Tyson C. A., Chiba K., Kawaguchi Y., *Clin. Cancer. Res.*, 6 (2000) 4409.
148. Hu Qd., Fan H., Lou Wj., Wang Qq., Tang Gp., *J. Zhejiang. Univ. Sci. B.*, 12 (2011) 720.
149. Leonova E., Shvirksts K., Grube M., Ignatovich L., Chen C. Y., Sjakste T., Sjakste N., *Toxicol. Environ. Chem.*, 99 (2017) 601.
150. Damle B. D., Narasimhan N. I., Kaul S., *Biopharm. Drug. Dispos.*, 22 (2001) 45.
151. Yamamiya I., Yoshisue K., Ishii Y., Yamada H., Yoshida K.-I., *J. Pharm. Pharmacol.*, 66 (2014) 1686.
152. Shahabi M., Raissi H., *J. Biomol. Struct. Dyn.* 36 (2018) 2517.
153. Zhang S.-C., Yu M.-Y., Xi L., Zhang J.-X., *J. Clin. Cases* 7 (2019) 89.
154. Shiokawa R., Lee X.-P., Yamada M., Fujishiro M., Sakamaki H., Hasegawa Ch., Ishida H., Ikeda K., Fujita K.-I., Iwabuchi S., Onda H., Kumazawa T., Sasaki Y., Sato K., Matsuyama T., *Rapid. Commun. Mass. Spectrom.*, 33 (2019) 1906.
155. Kuriki R., Hata T., Nakayama K., Ito Y., Misawa K., Ito S., Tatematsu M., Kaneda N., *Nagoya. J. Med. Sci.*, 81 (2019) 415.
156. Kosugi C., Koda K., Takiguchi N., Takaishi S., Miyauchi H., Hirayama N., Nomura Y., Kondo E., Kawasaki Y., Ozawa Y., Matsubara H., *Int. J. Colorectal. Dis.* 36 (2021) 1739.
157. Sakaguchi I., Motohara T., Saito F., Takaishi K., Fukumatsu Y., Tohya T., Shibata S., Mimori H, Tashiro H., Katabuchi H., *J. Gynecol. Oncol.*, 26 (2015) 193.
158. Wishart D. S, Knox C., Guo A. C., Shrivastava S., Hassanali M., Stothard P., Chang Z., Woolsey J., *Nucleic Acids Res.*, 34 (2006) D668.
159. Chiu D. T., Duesberg P. H., *Genetica.*, 95 (1995) 103.
160. Peepliwal A., Vyawahare S. D., Bonde C. G., *Anal. Methods.* 2 (2010) 1756.
161. Wang H., Zhou J., He Q., Dong Y., Liu Y., *Mol. Med. Rep.*, 15 (2017) 4055.

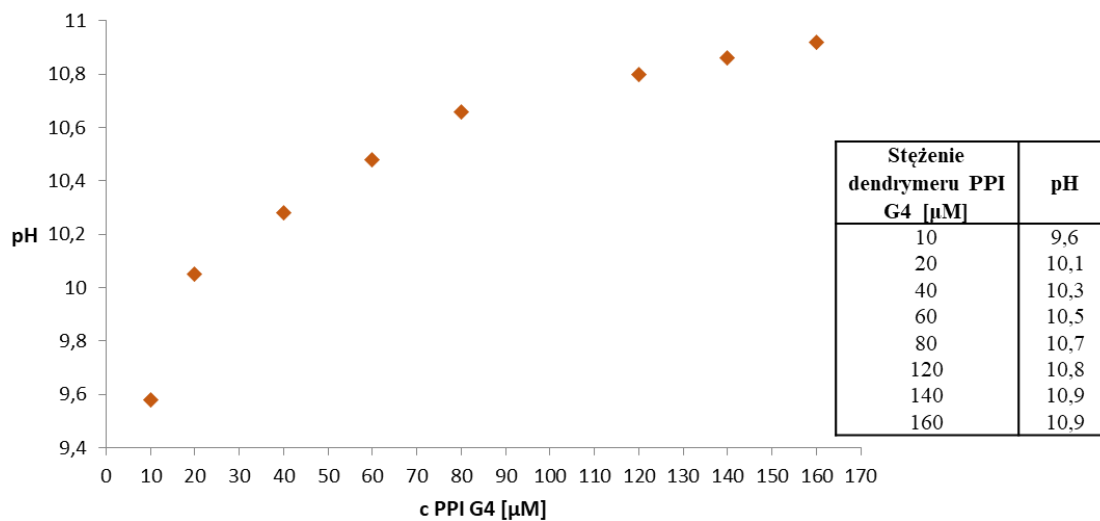
162. Papadopulos-eleopulos E., Turner V. F., Papadimitriou J. M., Causer D., Alphonso H., Miller T., *Curr. Med. Res. Opin.*, 15 (1999) S1.
163. Ghodke Y., Anderson P. L., Sangkuhl K., Lamba J., Altman R. B., Klein T.E., *Pharmacogenet. Genomics.*, 22 (2012) 891.
164. Broder S., *Antiviral. Res.*, 85(2010) 1.
165. A.M., Bernstein L., J., Shibata D., Mahterian S.B., Nathwani B.N., *Blood.*, 86 (1995) 4612.
166. Namba T., Kodama R., Moritomo S., Hoshino T., Mizushima T., *Cell. Death. Dis.*, 6 (2015) e1795.
167. Danesi R., Falcone A., Conte P. F., Del Tacca M., *Clin. Pharmacokinet.*, 34(1998) 173.
168. Zinzani P. L., Lauria F., Rondelli D., Benfenati D., Raspadori D., Bocchia M., Bendandi M., Gozzetti A., Zaja F., Fanin R. Russo D., Galieni P., Tura S., *Ann. Oncol.*, 4 (1993) 575.
169. Ivaturi V., Dvorak C. C., Chan D., Liu T., Cowan M. J., Wahlstrom J., Stricherz M., Jennissen C., Orchard P. J., Tolar J., Pai S. Y., Huang L., Aweeka F., Long-Boyle J., *Biol Blood Marrow Transplant.*, 23 (2017) 1701.
170. Schmitt B., Wendtner C. M., Bergmann M., Busch R., Franke A., Pasold R., Schlag R., Hopfinger G., Hiddemann W., Emmerich B., Hallek M., *Clin. Lymphoma.*, 3 (2002) 26.
171. Rodriguez G., *Invest. New. Drugs.*, 12 (1994) 75.
172. Or R., Weiss L., Amir G., Tejman S., Polliack A., Bone. Marrow. Transplant., 25 (2000) 263.
173. Granel B., Serratrice J., Ene N., Rojat-Habib M. C., Bouabdallah R., Disdier P., Weiller P-J., *Eur. J. Intern. Med.*, 14 (2003) 134.
174. Annaloro C., Costa A., Fracchiolla N. S., Mometto G., Artuso, S., Saporiti G., Tagliaferri E., Grifoni F., Onida F., Cortelezz A., *Clin. Case. Rep.*, 3 (2015) 650.
175. pubchem.ncbi.nlm.nih.gov
176. Silva D. T., Smaniotto F. A., Costa I. F., Baranzelli J., Muller A., Somacal S., Monteiro C. S., Vizzotto M., Rodrigues E., Barcia M. T., Emanuelli T., *Food Chem.*, 364 (2015) 130370.
177. Buczkowski A., Urbaniak P., Belica S., Sekowski S., Bryszewska M., Palecz B., *Spectrochim. Acta. A. Mol. Biomol. Spectrosc.*, 128 (2014) 647.

178. Berg J. M., Tymoczko J. L. Stryer L. (sixth ed.), *W.H. Freeman and Company*, New York, 2006.
179. Tlili N., Bonnin C., Lazrag M., Weber M. Muhr L., *Sep. Sci. Technol.*, 49 (2014) 2182.
180. Dollins A. B., Krock L. P., Storm W. F., Wurtman R. J. Lieberman H. R., *Physiol. Behav.*, 57 (1995) 223.
181. Bloemendaal M., Froböse M. I., Wegman J., Zandbelt B. B., van de Rest O., Cools R., Aarts E., *eNeuro.*, 5 (2018) e0035.
182. Jongkees B. J., Hommel B., Kühn S., Colzato L. S., *J. Psychiatr. Res.*, 70 (2015) 50.
183. Hart M., Wilcken B., Williams L. T., Sibbritt D., Nunn K. P., *Theory. Res. Pract.*, 1 (2013) 161.
184. Hart M., Sibbritt D., Williams L. T., Nunn K. P., Wilcken B., *J. Eat. Disord.*, 9 (2021) 86.
185. Hazra C., Samanta T., Mahalingam V., *J. Mater. Chem. C.*, 2 (2014) 10157.
186. Ishibashi N., Sadamori K., Yamamoto O., Kanehisa H., Kouge K., Kikuchi E., Okai H., Fukui S., *Agric. Biol. Chem.*, 51 (1987) 3309.
187. Attipoe S., Zeno S. A., Lee C., Crawford C., Khorsan R., Walter A. R., Deuster P. A., *Mil. Med.*, 180 (2015) 754.
188. Matthews D. E., *J. Nutr.*, 137 (2007) 1549S-1555S.
189. Makwana K. M., Mahalakshmi R., *Protein Sci.*, 24 (2015) 1920.
190. de Jesus A. J, Allen T.W., *Biochim. Biophys. Acta.*, 1828 (2013) 864.
191. Balakrishnan S., Zondlo N. J., *J. Am. Chem. Soc.*, 128 (2006) 5590.
192. Höglund E., Overli O., Winberg S., *Front. Endocrinol.* 10 (2019) 158.
193. Parker G., Brotchie H., *Acta. Psychiatr. Scand.*, 124 (2011) 417.
194. Opitz C. A., Somarribas Patterson L. F., Mohapatra S. R., Dewi D. L., Sadik A., Platten M., Trump S., *Br. J. Cancer.* 122 (2020) 30.
195. Zhang, H., Zhang A., Miao, J., Sun H., Yan G., Wu F., Wang X., *RSC Adv.*, 9 (2019) 3072.
196. Jenkins T. A., Nguyen J. C. D., Polglaze K. E. Bertrand P. P., *Nutrients.*, 8 (2016) 56.
197. Waclawikova B., El Aidy S., *Pharmaceuticals.*, 11 (2018) 63.
198. Gorzkiewicz M., Buczkowski A., Pałecz B., Klajnert-Maculewicz B., (2019). *PAMAM and PPI Dendrimers in Biophysical and Thermodynamic Studies on the*

- Delivery of Therapeutic Nucleotides, Nucleosides and Nucleobase Derivatives for Anticancer Applications. In: Demetzos, C., Pippa, N. (eds) Thermodynamics and Biophysics of Biomedical Nanosystems. Series in BioEngineering. Springer, Singapore, 2019.*
199. Cooper A., Chemia biofizyczna, PWN, Warszawa, 2010.
 200. G. Scatchard, Ann. N. Y. Acad. Sci. 51 (1949) 660.
 201. Bobrovník S.A., J. Biochem. Biophys. Methods. 52 (2002) 135.
 202. *VP-ITC MicroCalorimeter User's manual*, Micro Cal, Northampton. 2004.
 203. Silverstein R. M., Bassler G.C., *Spektroskopowe metody identyfikacji związków organicznych*, PWN, Warszawa, 1969.
 204. Zieliński W., Rajca A., Mazurkiewicz R., Salwińska E., Skibiński A., Suwiński J., *Metody spektroskopowe i ich zastosowanie do identyfikacji związków organicznych*, WNT, Warszawa, 2000.
 205. Sadej J., *Spektroskopia molekularna*, WNT, Warszawa, 2002.
 206. Atkins P. W., Chemia fizyczna, PWN, Warszawa, 2001.
 207. Buczkowski A., **Malinowska-Michalak M.**, Erdenebayar B., Palecz B., *J. Mol. Liq.*, 313(2020) 113534.
 208. Buczkowski A., **Malinowska-Michalak M.**, Stepniak A., Tokarz P., Urbaniak P., Palecz B., *J. Mol. Liq.*, 334 (2021) 116118.
 209. Hu J., Xu T., Cheng Y., *Chem. Rev.*, 112 (2012) 3856.
 210. Li T., Shao N., Liu Y., Hu J., Wang Y., Zhang L., Wang H., Chen D., Cheng Y., *J. Phys. Chem. B.*, 118 (2014) 3074.
 211. Wang M., Gong X., Hu J., Yu Y., Chen Q., Cheng Y., *J. Phys. Chem. B* 115 (2011) 12728.
 212. Zhao C., Wang Y., Su Y., Zhang H., Ding L., Yan X., Zhao D., Shao N., Ye X., Cheng Y., *Int. J. Pharm.*, 421 (2011) 301.
 213. Zasada A., Mironiuk-Puchalska E., Koszytkowska-Stawin´ska M., *Org. Process Res. Dev.*, 21 (2017) 885.
 214. Noor Ul Amin M., Matloob A., Muhammad I., *J. Chil. Chem. Soc.*, 64 (2019) 3.
 215. Li W., Wu J., Zhan P., Chang Y., Pannecouque C., De Clercq E., Liu X., *Int. J. Biol. Macromol.*, 50 (2012) 974.
 216. Buczkowski A., Urbaniak P., Palecz B., *Int J Pharm.*, 428 (2012) 178.
 217. Buczkowski A., Urbaniak P., Piekarski H., Palecz B., *Spectrochim Acta A Mol Biomol Spectrosc.* 15 (2017) 401-405.

218. Buczkowski A., Waliszewski D., Urbaniak P., Palecz B., *Int J Pharm.*, 505 (2016) 1.
219. Klajnert B., Pastucha A., Shcharbin D., Bryszewska M., *J. Appl. Polym. Sci.*, 103 (2007) 2036.

10. Załączniki



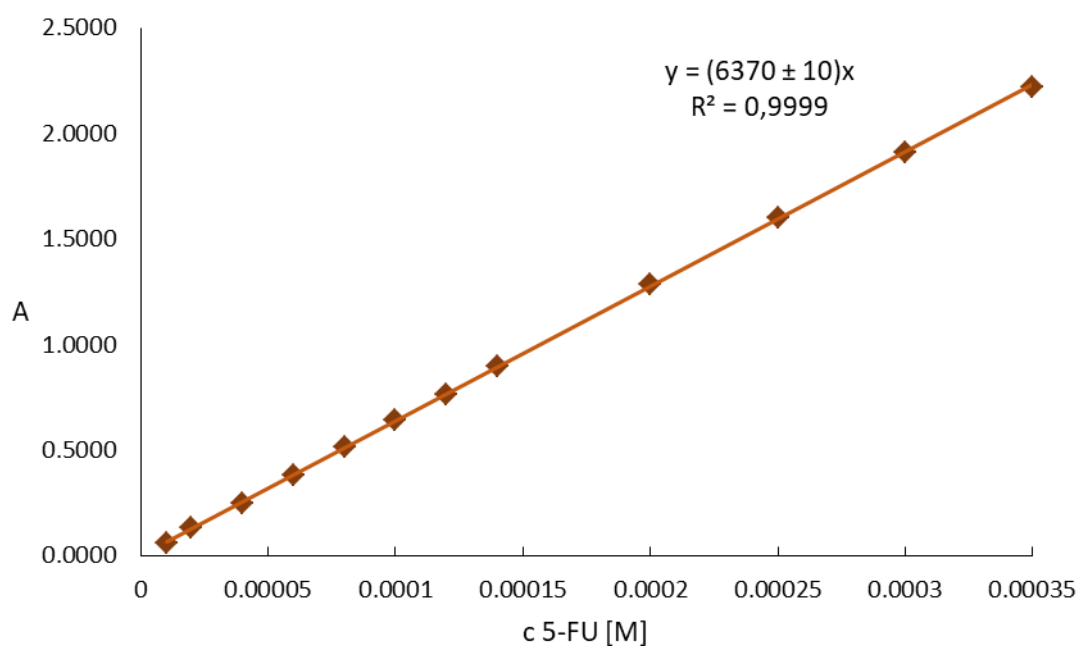
Rys. Z1. Zależność zmiany pH od stężenia wodnych roztworów dendrymeru PPI G4.

Tabela Z1. Rozpuszczalność 5-fluorouracylu w wodnych roztworach dendrymeru PPI G4 o wzrastającym stężeniu, N=5.

c PPI G4 [μM]	S 5-FU [μM]
0	88829
100	91086
200	94498
300	100928
400	108175
500	111294
600	117872
700	116723
800	125648
1000	126804

Tabela Z2. Wartości absorbancji 5-jodouracylu (względem wody) wyznaczone dla długości fali $\lambda_{\max} = 283 \text{ nm}$.

c 5-IU [μM]	A
10	0,0616
20	0,1289
40	0,2496
60	0,3797
80	0,5123
100	0,6397
120	0,7650
140	0,8937
200	1,2824
250	1,6029
300	1,9080
350	2,2168



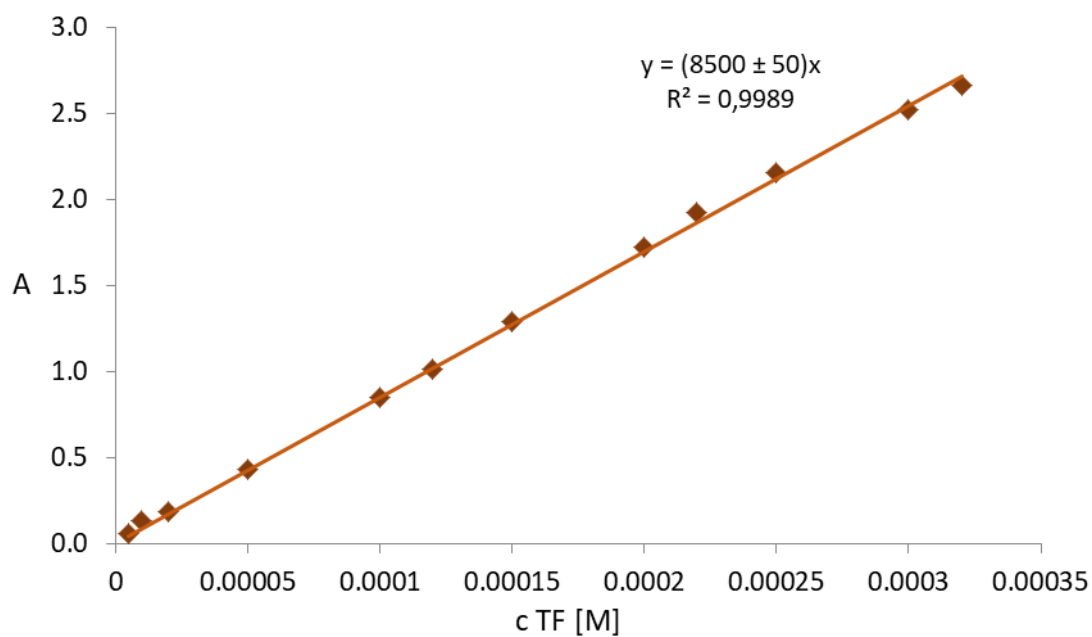
Rys. Z2. Prosta kalibracyjna 5-jodouracylu wyznaczone dla długości fali $\lambda_{\max} = 283 \text{ nm}$.

Tabela Z3. Rozpuszczalność 5-jodouracylu w wodnych roztworach dendrymeru PPI G4 o wzrastającym stężeniu, N=5.

c PPI G4 [μM]	S 5-IU [μM]
0	6570
10	7399
20	8572
30	9302
40	9478
50	9935
60	10114
70	10485
80	10898
90	11610
100	13357

Tabela Z4. Wartości absorbancji tegafuru (względem wody) wyznaczone dla długości fali $\lambda_{\max} = 272$ nm.

c TF [μM]	A
5	0,0558
10	0,1339
20	0,1867
50	0,4322
100	0,8521
120	1,0120
150	1,2879
200	1,7248
220	1,9206
250	2,1519
300	2,5246
320	2,6613



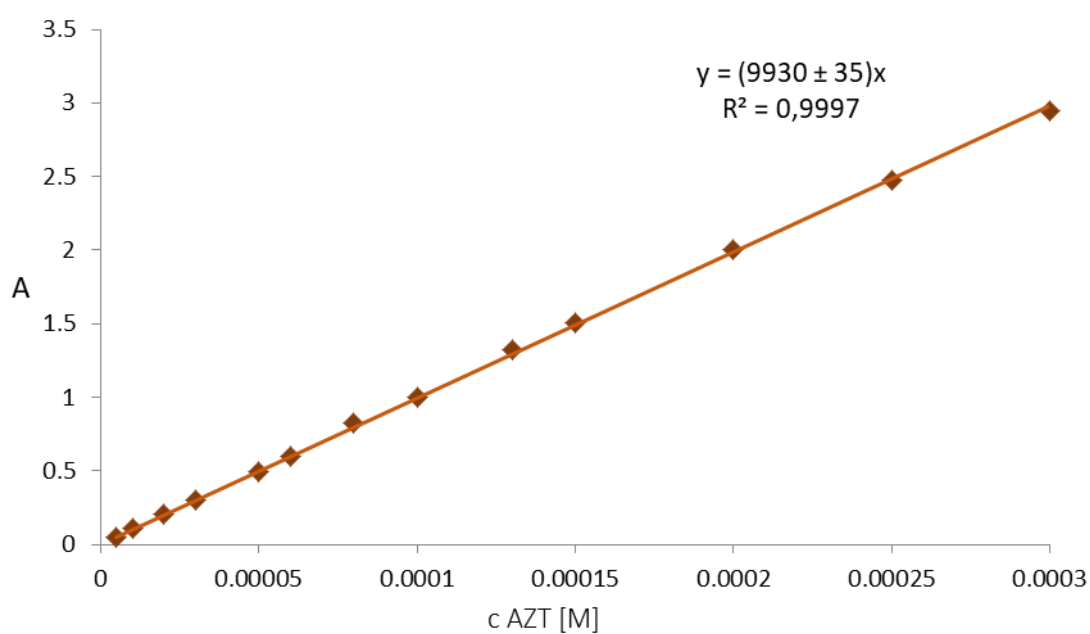
Rys. Z3. Prosta kalibracyjna tegafuru wyznaczona dla długości fali $\lambda_{\max} = 272$ nm.

Tabela Z5. Rozpuszczalność tegafuru w wodnych roztworach dendrymeru PPI G4 o wzrastającym stężeniu, N=5.

c PPI G4 [μ M]	S TF [μ M]
0	80876
100	87172
200	93280
300	98941
400	105155
500	113277
600	115551
700	123997
800	132047
900	138625
1000	142972

Tabela Z6. Wartości absorbancji azydodotymidyny (względem wody) wyznaczone dla długości fali $\lambda_{\max} = 267$ nm.

c AZT [μ M]	A
5	0,0521
10	0,1056
20	0,2068
30	0,3013
50	0,4953
60	0,5946
80	0,8218
100	1,0033
130	1,3208
150	1,5017
200	2,0001
250	2,4740
300	2,9420



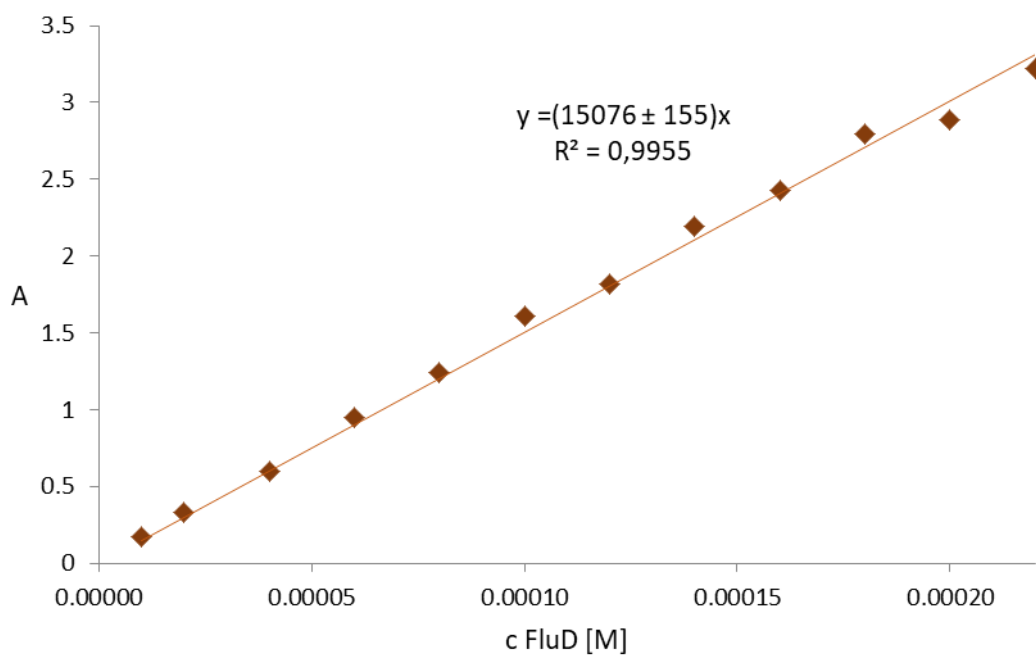
Rys. Z4. Prosta kalibracyjna azydodotymidyny wyznaczona dla długości fali $\lambda_{\max} = 267$ nm.

Tabela. Z7. Rozpuszczalność azydotymidyny wyznaczona dla roztworów dendrymeru PPI G4 o wzrastającym stężeniu.

c PPI G4 [μM]	S AZT [μM]
0	50932
100	51486
200	55032
300	64604
400	63435
500	65994
600	68050
700	64967
900	71365
1000	81944

Tabela. Z8. Wartości absorbancji monofosforanu fludarabiny (względem wody) wyznaczone dla długości fali $\lambda_{\text{max}} = 262 \text{ nm}$.

c f-ara-AMP [μM]	A
10	0,1763
20	0,3280
40	0,6023
60	0,9502
80	1,2436
100	1,6051
120	1,8183
140	2,1952
160	2,4318
180	2,7935
200	2,8887
220	3,2198



Rys. Z5. Prosta kalibracyjna monofosforanu fludarabiny wyznaczona dla długości fali $\lambda_{\max} = 262$ nm.

Tabela Z9. Rozpuszczalność monofosforanu fludarabiny w wodnych roztworach dendrymeru PPI G4 o wzrastającym stężeniu, N = 5.

C PPI G4 [μ M]	S f-ara-AMP [μ M]
0	22410
10	20216
20	20565
30	19290
40	23891
50	18921
60	21016
70	18431
80	17481
90	18216
100	17751
200	20561
300	18944
400	20210
600	17592
800	16182
1000	17126

Tabela Z10. Rozpuszczalność L- α -tyrozyny wyznaczona dla roztworów dendrymeru PPI G4 o wzrastającym stężeniu, N=5.

c PPI G4 [μ M]	S Tyr [μ M]
0	2645
100	4831
200	5788
300	7211
400	8851
500	10717
600	11015
700	12201
800	13253
900	14251
1000	15593

Tabela Z11. Rozpuszczalność L- α -tryptofanu w wodnych roztworach dendrymeru PPI G4, N=5.

c PPI G4 [μ M]	S Trp [μ M]
0	72538
100	75744
200	79504
300	80139
400	82672
500	84237
600	90792
700	91861
800	92767
900	93494
1000	98111

Tabela Z12. Stężenie 5-fluorouracylu w komorze z oraz bez dendrymeru PPI G4 podczas dializ przerywanych po 1, 2 oraz 3 dniach.

t [dni]	fx ₁ 5-FU [μ M] (z PPI G4)	fx ₂ 5-FU [μ M]
1	4070	3450
2	4086	3470
3	4075	3454

Tabela Z13. Równowagowy rozkład stężenia 5-fluorouracylu (5-FU) w roztworze z dendrymerem PPI G4 o stężeniu $r = 40 \mu\text{M}$ oraz w roztworze wodnym leku po przeciwnej stronie błony w temperaturze pokojowej. Kolorem czerwonym zaznaczono składy o niskim stosunku molowym 5-fluorouracylu do dendrymeru PPI G4, natomiast kolorem niebieskim zaznaczono składy o dużym stosunku molowym 5-fluorouracylu do dendrymeru. Zaznaczone kolorami dane zostały użyte do wyliczenia parametrów wiązania leku przez miejsca aktywne makrocząsteczki dendrymeru PPI G4 o dużym i małym powinowactwie do tego leku (Podrozdział 4.3.1, Rys. 87)

[5-FU]/[PPI G4]	fx ₁ 5-FU [μM]	fx ₂ 5-FU [μM]	c [μM]	fx ₂ [M]	b			
początkowy stosunek molowy	po stronie PPI	po przeciwnej stronie	stężenie związanego 5-FU	stężenie niezwiązanego 5-FU	c/r	fx ₂ /r	1/fx ₂ [M ⁻¹]	1/b
4	218	92	125	9,25E-05	3,13	2,31	10810,0	0,320
4	235	92	143	9,16E-05	3,58	2,29	10910,0	0,279
4	232	105	127	1,05E-04	3,18	2,62	9525,0	0,314
5	262	106	156	1,06E-04	3,90	2,64	9466,0	0,256
5	278	140	138	1,40E-04	3,45	3,50	7134,0	0,290
6	304	141	163	1,41E-04	4,08	3,52	7101,0	0,245
6	316	138	178	1,38E-04	4,44	3,46	7235,0	0,225
6	327	165	162	1,65E-04	4,05	4,13	6057,0	0,247
6	336	158	179	1,58E-04	4,47	3,94	6349,0	0,224
7	349	173	176	1,73E-04	4,40	4,32	5781,0	0,227
7	357	179	178	1,79E-04	4,46	4,48	5585,0	0,224
7	382	159	223	1,59E-04	5,58	3,98	6288,0	0,179
7	362	193	169	1,93E-04	4,23	4,83	5172,0	0,237
7	405	188	217	1,88E-04	5,44	4,69	5325,0	0,184
7	421	175	246	1,75E-04	6,14	4,38	5703,0	0,163
8	430	178	252	1,78E-04	6,29	4,46	5608,0	0,159
8	419	227	192	2,27E-04	4,79	5,68	4398,0	0,209
8	459	221	237	2,21E-04	5,94	5,53	4521,0	0,169
9	460	225	236	2,25E-04	5,89	5,62	4452,0	0,170
9	451	240	211	2,40E-04	5,27	6,00	4164,0	0,190
9	484	258	226	2,58E-04	5,65	6,44	3881,0	0,177
15	703	476	227	4,76E-04	5,67	11,91	2100,0	0,176
15	711	471	240	4,71E-04	5,99	11,78	2122,0	0,167
19	881	617	264	6,17E-04	6,60	15,42	1621,0	0,152
23	1096	772	325	7,72E-04	8,12	19,29	1296,0	0,123
25	1175	791	385	7,91E-04	9,62	19,77	764,1	0,116
29	1356	943	412	9,43E-04	10,31	23,58	640,4	0,110
34	1513	1180	333	1,18E-03	8,31	29,50	1265,0	0,104
34	1584	1160	424	1,16E-03	10,60	29,00	860,7	0,094

Tabela Z 13. cd

[5-FU]/[PPI G4]	fx ₁ 5-FU [μM]	fx ₂ 5-FU [μM]	c [μM]	fx ₂ [M]	b			
początkowy stosunek molowy	po stronie PPI	po przeciwnej stronie	stężenie związanego 5-FU	stężenie niezwiązanego 5-FU	c/r	fx ₂ /r	1/fx ₂ [M ⁻¹]	1/b
37	1654	1310	344	1,31E-03	8,60	32,75	1060,0	0,097
44	1923	1560	363	1,56E-03	9,08	39,00	848,2	0,120
44	1985	1540	445	1,54E-03	11,12	38,50	650,4	0,090
47	2120	1640	480	1,64E-03	12,01	41,00	607,9	0,083
56	2498	2020	478	2,02E-03	11,94	50,50	493,9	0,084
65	2876	2360	516	2,36E-03	12,91	59,00	424,6	0,077
78	3488	2760	728	2,76E-03	18,20	69,00	361,8	0,075
88	3943	3130	813	3,13E-03	20,32	78,25	319,0	0,078
95	4123	3490	633	3,49E-03	15,83	87,25	286,7	0,070
108	4687	3920	767	3,92E-03	19,18	98,00	255,0	0,052
112	4813	4170	643	4,17E-03	16,08	104,25	240,1	0,062
117	5130	4260	870	4,26E-03	21,74	106,50	234,6	0,046
126	5461	4640	821	4,64E-03	20,52	116,00	215,4	0,068
129	5713	4640	1073	4,64E-03	26,82	116,00	215,6	0,037
133	5689	4970	719	4,97E-03	17,97	124,25	201,2	0,056
139	5990	5100	890	5,10E-03	22,25	127,50	196,2	0,045
143	6074	5380	694	5,38E-03	17,34	134,50	185,8	0,058
149	6449	5450	999	5,45E-03	24,98	136,25	183,6	0,040
151	6410	5690	720	5,69E-03	17,99	142,25	175,6	0,056
155	6854	5560	1294	5,56E-03	32,36	139,00	180,0	0,031
163	6906	6140	766	6,14E-03	19,16	153,50	163,0	0,052
164	7153	6000	1153	6,00E-03	28,83	150,00	166,7	0,035
172	7289	6480	809	6,48E-03	20,22	162,00	154,3	0,049
174	7536	6390	1146	6,39E-03	28,64	159,75	156,5	0,035
182	7653	6880	773	6,88E-03	19,34	172,00	145,3	0,052
183	7754	6920	834	6,92E-03	20,85	173,00	144,5	0,048
190	8090	7070	1020	7,07E-03	25,51	176,75	141,5	0,039
196	8459	7220	1239	7,22E-03	30,97	180,50	138,6	0,032
205	8772	7610	1162	7,61E-03	29,05	190,25	131,4	0,034
207	8782	7770	1012	7,77E-03	25,30	194,25	128,7	0,052
209	9079	7640	1439	7,64E-03	35,97	191,00	130,8	0,028
214	9014	8080	934	8,08E-03	23,34	202,00	123,7	0,043
216	9213	8040	1173	8,04E-03	29,32	201,00	124,4	0,034
226	9717	8370	1347	8,37E-03	33,67	209,25	119,5	0,030
226	9695	8400	1295	8,40E-03	32,37	210,00	119,0	0,031
229	9907	8410	1497	8,41E-03	37,43	210,25	118,9	0,027
234	9975	8740	1235	8,74E-03	30,87	218,50	114,4	0,032
236	10096	8800	1296	8,80E-03	32,41	220,00	113,6	0,031

Tabela Z13. cd.

[5-FU]/[PPI G4]	fx ₁ 5-FU [μM]	fx ₂ 5-FU [μM]	c [μM]	fx ₂ [M]	b			
początkowy stosunek molowy	po stronie PPI	po przeciwnej stronie	stężenie związanego 5-FU	stężenie niezwiązanego 5-FU	c/r	fx ₂ /r	1/fx ₂ [M ⁻¹]	1/b
238	10251	8800	1451	8,80E-03	36,27	220,00	113,6	0,028
244	10444	9070	1374	9,07E-03	34,36	226,75	110,3	0,029
246	10472	9200	1272	9,20E-03	31,79	230,00	108,7	0,031
249	10651	9280	1371	9,28E-03	34,27	232,00	107,8	0,029
255	10810	9590	1220	9,59E-03	30,51	239,75	104,3	0,033
256	10874	9570	1304	9,57E-03	32,60	239,25	104,5	0,031
264	11332	9820	1512	9,82E-03	37,80	245,50	101,8	0,026
275	11656	10330	1326	1,03E-02	33,14	258,25	96,8	0,030
280	11845	10590	1255	1,06E-02	31,39	264,75	94,5	0,032
290	12341	10860	1481	1,09E-02	37,02	271,50	92,1	0,027
301	12847	11230	1617	1,12E-02	40,44	280,75	89,0	0,025
312	13183	11740	1443	1,17E-02	36,09	293,50	85,2	0,028
318	13343	12070	1273	1,21E-02	31,81	301,75	82,9	0,031
331	13876	12600	1276	1,26E-02	31,89	315,00	79,4	0,031
338	14217	12800	1417	1,28E-02	35,43	320,00	78,1	0,028
351	14711	13340	1371	1,33E-02	34,28	333,50	75,0	0,029
360	14985	13800	1185	1,38E-02	29,62	345,00	72,5	0,034
370	15436	14160	1276	1,42E-02	31,91	354,00	70,6	0,031
380	15945	14470	1475	1,45E-02	36,88	361,75	69,1	0,027
390	16149	15030	1119	1,50E-02	27,98	375,75	66,5	0,036
396	16464	15230	1234	1,52E-02	30,86	380,75	65,7	0,032
401	16513	15530	983	1,55E-02	24,58	388,25	64,4	0,041
407	16879	15680	1199	1,57E-02	29,98	392,00	63,8	0,033
411	17172	15730	1442	1,57E-02	36,06	393,25	63,6	0,028
419	17442	16050	1392	1,61E-02	34,79	401,25	62,3	0,029
419	17514	16040	1474	1,60E-02	36,84	401,00	62,3	0,027
427	17913	16260	1653	1,63E-02	41,33	406,50	61,5	0,024
432	17978	16620	1358	1,66E-02	33,95	415,50	60,2	0,029
439	18347	16780	1567	1,68E-02	39,18	419,50	59,6	0,026
440	18302	16860	1442	1,69E-02	36,06	421,50	59,3	0,028
445	18352	17260	1092	1,73E-02	27,31	431,50	58,0	0,037
446	18359	17310	1049	1,73E-02	26,23	432,75	57,8	0,038
450	18682	17290	1392	1,73E-02	34,79	432,25	57,9	0,029
452	18762	17430	1332	1,74E-02	33,31	435,75	57,4	0,030
462	19045	17880	1165	1,79E-02	29,12	447,00	55,9	0,034
466	19457	17820	1637	1,78E-02	40,93	445,50	56,1	0,024
469	19361	18160	1201	1,82E-02	30,02	454,00	55,1	0,033
480	19969	18460	1509	1,85E-02	37,72	461,50	54,2	0,027
488	20333	18730	1603	1,87E-02	40,07	468,25	53,4	0,025

Tabela Z14. Stężenie 5-jodouracylu w wodnych roztworach w celi pomiarowej zawierającej dendrymer PPI G4 oraz celi odnośnikowej bez dendrymeru podczas dializ 1, 2, i 3-dniowych.

t [dni]	fx ₁ 5-IU [μM] (z PPI G4)	fx ₂ 5-IU [μM]
1	3971	3100
2	3899	3050
3	3870	3060

Tabela Z15. Równowagowy rozkład stężenia 5-jodouracylu (5-IU) w roztworze z dendrymerem PPI G4 o stężeniu r = 10 μM oraz w wodnym roztworze leku (po przeciwnej stronie błony) w temperaturze pokojowej.

[5-IU]/[DAB 64]	fx ₁ 5-IU [μM]	fx ₂ 5-IU [μM]	c [μM]	fx ₂ [M]	b			
początkowy stosunek molowy	po stronie PPI	po przeciwnej stronie	stężenie związanego 5-IU	stężenie niezwiązanego 5-IU	c/r	fx ₂ /r	1/fx ₂ [M ⁻¹]	1/b
5	41	37	4	3,69E-05	0,43	3,69	27097,9	2,316
8	84	75	10	7,45E-05	0,99	7,45	13420,4	1,011
8	84	75	10	7,45E-05	0,99	7,45	13420,4	1,011
9	86	77	8	7,74E-05	0,82	7,74	12916,8	1,213
10	101	92	10	9,16E-05	0,95	9,16	10922,8	1,053
15	135	120	15	1,20E-04	1,46	12,01	8329,6	0,685
20	175	161	14	1,61E-04	1,40	16,10	6209,7	0,716
20	180	163	17	1,63E-04	1,69	16,28	6143,8	0,592
25	230	215	15	2,15E-04	1,52	21,51	4649,9	0,656
30	276	249	27	2,49E-04	2,72	24,93	4011,3	0,368
40	366	331	35	3,31E-04	3,45	33,11	3020,2	0,289
50	471	397	74	3,97E-04	7,41	39,71	2518,5	0,135
60	557	523	34	5,23E-04	3,36	52,29	1912,3	0,298
70	664	582	83	5,82E-04	8,25	58,15	1719,7	0,121
80	749	658	92	6,58E-04	9,18	65,77	1520,5	0,109
90	820	755	65	7,55E-04	6,49	75,48	1324,9	0,154
100	891	855	36	8,55E-04	3,64	85,49	1169,7	0,274
110	998	902	96	9,02E-04	9,64	90,17	1109,0	0,104
120	1085	1019	66	1,02E-03	6,63	101,85	981,8	0,151
130	1166	1080	86	1,08E-03	8,57	108,04	925,6	0,117
140	1258	1178	81	1,18E-03	8,07	117,78	849,1	0,124

Tabela Z15. cd.

[5-IU]/[DAB 64]	fx ₁ 5-IU [μM]	fx ₂ 5-IU [μM]	c [μM]	fx ₂ [M]	b	fx ₂ /r	1/fx ₂ [M ⁻¹]	1/b
początkowy stosunek molekowy	po stronie PPI	po przeciwnej stronie	stężenie związanego 5-IU	stężenie niezwiązanego 5-IU	c/r			
150	1341	1279	62	1,28E-03	6,19	127,89	781,9	0,162
160	1419	1353	66	1,35E-03	6,60	135,33	738,9	0,152
170	1492	1449	43	1,45E-03	4,33	144,91	690,1	0,231
170	1507	1458	49	1,46E-03	4,87	145,82	685,8	0,205
180	1574	1519	54	1,52E-03	5,43	151,95	658,1	0,184
180	1594	1535	59	1,53E-03	5,94	153,49	651,5	0,168
190	1682	1615	67	1,62E-03	6,66	161,53	619,1	0,150
200	1760	1684	76	1,68E-03	7,57	168,44	593,7	0,132
210	1871	1818	53	1,82E-03	5,34	181,78	550,1	0,187
220	1984	1899	85	1,90E-03	8,48	189,89	526,6	0,118
230	2061	1981	80	1,98E-03	7,98	198,15	504,7	0,125
240	2150	2034	116	2,03E-03	11,62	203,36	491,7	0,086
250	2218	2147	71	2,15E-03	7,13	214,70	465,8	0,140
260	2314	2239	75	2,24E-03	7,47	223,90	446,6	0,134
270	2422	2314	108	2,31E-03	10,80	231,41	432,1	0,093
280	2519	2386	133	2,39E-03	13,29	238,57	419,2	0,075
290	2557	2472	85	2,47E-03	8,51	247,24	404,5	0,117
300	2733	2559	174	2,56E-03	17,43	255,90	390,8	0,057
310	2747	2677	70	2,68E-03	6,97	267,68	373,6	0,143
320	2841	2786	55	2,79E-03	5,53	278,58	359,0	0,181
330	2977	2933	44	2,93E-03	4,38	293,31	340,9	0,228
330	2984	2862	122	2,86E-03	12,19	286,18	349,4	0,082
340	3004	2889	115	2,89E-03	11,49	288,88	346,2	0,087
350	3084	3001	83	3,00E-03	8,29	300,09	333,2	0,121
360	3181	3039	143	3,04E-03	14,27	303,86	329,1	0,070
370	3289	3125	164	3,13E-03	16,39	312,53	320,0	0,061
380	3415	3221	193	3,22E-03	19,32	322,14	310,4	0,052
390	3487	3308	179	3,31E-03	17,85	330,81	302,3	0,056
400	3551	3413	138	3,41E-03	13,76	341,32	293,0	0,073
410	3573	3486	87	3,49E-03	8,73	348,62	286,8	0,115
420	3700	3572	128	3,57E-03	12,81	357,22	279,9	0,078
430	3802	3679	122	3,68E-03	12,25	367,90	271,8	0,082
440	3913	3744	169	3,74E-03	16,90	374,37	267,1	0,059
450	3965	3848	117	3,85E-03	11,68	384,80	259,9	0,086

Tabela Z16. Stężenie tegafuru w komorze z oraz bez dendrymeru PPI G4 podczas dializ przerywanych po 1, 2 oraz 3 dniach.

t [dni]	fx ₁ TF [μM] (z PPI G4)	fx ₂ TF [μM]
1	4268	3746
2	4280	3755
3	4276	3760

Tabela Z17. Równowagowy rozkład stężenia tegafuru (TF) w roztworze z dendrymerem PPI G4 o stężeniu r =40 μM oraz w roztworze wodnym leku po przeciwnej stronie błony w temperaturze pokojowej.

[TF]/[PPI G4]	fx ₁ TF [μM]	fx ₂ TF [μM]	c [μM]	f x ₂ [M]	b			
początkowy stosunek molowy	po stronie PPI	po przeciwnej stronie	stężenie związanego tegafuru	stężenie niezwiązanego TF	c/r	fx ₂ /r	1/f x ₂ [M ⁻¹]	1/b
4	223	166	57	1,66E-04	1,42	4,15	6 020,0	0,7022
5	248	168	80	1,68E-04	2,00	4,20	5 950,0	0,4997
6	270	178	93	1,78E-04	2,31	4,44	5 630,0	0,4320
6	279	204	74	2,04E-04	1,85	5,11	4 890,0	0,5402
6	304	207	97	2,07E-04	2,43	5,17	4 840,0	0,4110
7	357	224	132	2,24E-04	3,31	5,61	4 460,0	0,3020
8	398	252	146	2,52E-04	3,65	6,30	3 970,0	0,2742
8	356	257	99	2,57E-04	2,47	6,43	3 890,0	0,4049
8	366	270	96	2,70E-04	2,40	6,76	3 700,0	0,4160
9	414	292	121	2,92E-04	3,03	7,31	3 420,0	0,3300
10	472	305	167	3,05E-04	4,18	7,62	3 280,0	0,2391
10	556	316	239	3,16E-04	5,98	7,91	3 160,0	0,1673
10	468	337	132	3,37E-04	3,29	8,42	2 970,0	0,3040
15	742	490	251	4,90E-04	6,29	12,25	2 040,0	0,1591
20	1013	637	376	6,37E-04	9,40	15,92	1 570,0	0,1063
20	969	676	294	6,76E-04	7,35	16,89	1 480,0	0,1361
25	1083	833	250	8,33E-04	6,25	20,83	1 200,0	0,1600
30	1420	943	476	9,43E-04	11,90	23,58	1 060,0	0,0840
30	1344	980	364	9,80E-04	9,09	24,51	1 020,0	0,1100
30	1792	1244	548	1,24E-03	13,70	31,09	804,0	0,0730
35	1605	1269	336	1,27E-03	8,40	31,73	788,0	0,1190
40	1731	1389	342	1,39E-03	8,55	34,72	720,0	0,1170
45	2036	1439	597	1,44E-03	14,93	35,97	695,0	0,0670
50	2154	1667	488	1,67E-03	12,20	41,67	600,0	0,0820
50	2220	1686	533	1,69E-03	13,33	42,16	593,0	0,0750

Tabela Z17. cd.

[TF]/[PPI G4]	fx ₁ TF [μM]	fx ₂ TF [μM]	c [μM]	f x ₂ [M]	b	fx ₂ /r	1/f x ₂ [M ⁻¹]	1/b
początkowy stosunek molowy	po stronie PPI	po przeciwnej stronie	stężenie związanego tegafuru	stężenie niezwiązanego TF	c/r			
60	2582	1957	625	1,96E-03	15,63	48,92	511,0	0,0640
70	2915	2538	377	2,54E-03	9,43	63,45	394,0	0,1060
80	3303	2899	404	2,90E-03	10,10	72,46	345,0	0,0990
90	3726	3155	571	3,15E-03	14,29	78,86	317,0	0,0700
100	4126	3448	678	3,45E-03	16,95	86,21	290,0	0,0590
110	4826	4098	727	4,10E-03	18,18	102,46	244,0	0,0550
120	4882	4505	377	4,50E-03	9,43	112,61	222,0	0,1060
130	5434	4878	556	4,88E-03	13,89	121,95	205,0	0,0720
140	5817	5291	526	5,29E-03	13,16	132,28	189,0	0,0760
150	6559	5650	909	5,65E-03	22,73	141,24	177,0	0,0440
160	6702	5988	714	5,99E-03	17,86	149,70	167,0	0,0560
170	7082	6173	909	6,17E-03	22,73	154,32	162,0	0,0440
180	7363	6410	952	6,41E-03	23,81	160,26	156,0	0,0420
190	7902	6993	909	6,99E-03	22,73	174,83	143,0	0,0440
200	8232	7463	769	7,46E-03	19,23	186,57	134,0	0,0520
210	8503	7634	870	7,63E-03	21,74	190,84	131,0	0,0460
220	8778	7752	1026	7,75E-03	25,64	193,80	129,0	0,0390
230	9351	8696	656	8,70E-03	16,39	217,39	115,0	0,0610
240	10009	9009	1000	9,01E-03	25,00	225,23	111,0	0,0400
250	10410	9434	976	9,43E-03	24,39	235,85	106,0	0,0410
260	10734	9804	930	9,80E-03	23,26	245,10	102,0	0,0430
270	11204	10204	1000	1,02E-02	25,00	255,10	98,0	0,0400
280	11680	10627	1053	1,06E-02	26,32	265,67	94,1	0,0380
290	11927	11111	816	1,11E-02	20,41	277,78	90,0	0,0490
300	12379	11236	1143	1,12E-02	28,57	280,90	89,0	0,0350
310	12590	11614	976	1,16E-02	24,39	290,36	86,1	0,0410
320	12792	12136	656	1,21E-02	16,39	303,40	82,4	0,0610
330	13420	12531	889	1,25E-02	22,22	313,28	79,8	0,0450
340	13925	13280	645	1,33E-02	16,13	332,01	75,3	0,0620
350	15009	14225	784	1,42E-02	19,61	355,62	70,3	0,0510
360	15609	14556	1053	1,46E-02	26,32	363,90	68,7	0,0380
370	15710	14859	851	1,49E-02	21,28	371,47	67,3	0,0470
380	16035	14859	1176	1,49E-02	29,41	371,47	67,3	0,0340
390	16021	15221	800	1,52E-02	20,00	380,52	65,7	0,0500
400	16385	15385	1000	1,54E-02	25,00	384,62	65,0	0,0400
410	18022	17153	870	1,72E-02	21,74	428,82	58,3	0,0460
420	18383	17513	870	1,75E-02	21,74	437,83	57,1	0,0460

Tabela Z18. Stężenie azydotymidyny w wodnych roztworach w przestrzeni pomiarowej zawierającej dendrymer PPI G4 oraz przestrzeni odnośnikowej bez dendrymeru podczas dializ 1, 2, i 3-dniowych.

t [dni]	fx ₁ AZT [μM] z PPI G4	fx ₂ AZT [μM]
1	3800	3633
2	3798	3640
3	3790	3638

Tabela Z19. Równowagowy rozkład stężenia azydotymidyny (AZT) w roztworze z dendrymerem PPI G4 o stężeniu $r = 40 \mu\text{M}$ oraz w wodnym roztworze leku (po przeciwnej stronie błony) w temperaturze pokojowej.

[AZT]/[DAB 64]	fx ₁ AZT [μM]	fx ₂ AZT [μM]	c [μM]	fx ₂ [M]	b			
początkowy stosunek molowy	po stronie PPI	po przeciwnej stronie	stężenie związanego AZT	stężenie niezwiązanego AZT	c/r	fx ₂ /r	1/fx ₂ [M ⁻¹]	1/b
4	167	148	19	1,48E-04	0,48	3,71	6742,5	2,095
5	200	175	25	1,75E-04	0,63	4,38	5712,2	1,598
5	194	179	16	1,79E-04	0,40	4,46	5601,0	2,529
6	233	218	15	2,18E-04	0,37	5,45	4584,3	2,682
7	256	233	23	2,33E-04	0,59	5,82	4291,9	1,708
8	311	274	37	2,74E-04	0,92	6,86	3645,5	1,089
10	408	384	24	3,84E-04	0,60	9,60	2603,6	1,654
10	395	349	46	3,49E-04	1,14	8,73	2865,2	0,876
15	554	511	43	5,11E-04	1,08	12,77	1958,0	0,925
20	772	719	53	7,19E-04	1,31	17,98	1390,4	0,761
20	798	695	102	6,95E-04	2,55	17,39	1438,0	0,392
25	978	850	128	8,50E-04	3,21	21,24	1177,1	0,311
30	1132	1067	65	1,07E-03	1,62	26,68	937,0	0,617
40	1543	1408	134	1,41E-03	3,36	35,21	710,0	0,298
50	1922	1799	123	1,80E-03	3,06	44,99	555,7	0,326
60	2208	2149	59	2,15E-03	1,47	53,72	465,4	0,680
70	2599	2437	163	2,44E-03	4,07	60,92	410,4	0,246
80	3015	2855	160	2,86E-03	4,00	71,38	350,3	0,250
90	3402	3168	234	3,17E-03	5,84	79,20	315,6	0,171
100	3825	3567	259	3,57E-03	6,47	89,17	280,4	0,155
110	4307	4076	231	4,08E-03	5,77	101,91	245,3	0,173
120	4623	4448	175	4,45E-03	4,38	111,20	224,8	0,228
130	5017	4778	239	4,78E-03	5,97	119,46	209,3	0,168
140	5370	5005	365	5,00E-03	9,13	125,12	199,8	0,110
150	5862	5583	279	5,58E-03	6,97	139,57	179,1	0,144

Tabela Z19. cd.

[AZT]/[DAB 64]	fx ₁ AZT [μM]	fx ₂ AZT [μM]	c [μM]	fx ₂ [M]	b			
początkowy stosunek molowy	po stronie PPI	po przeciwnej stronie	stężenie związanego AZT	stężenie niezwiązanego AZT	c/r	fx ₂ /r	1/fx ₂ [M ⁻¹]	1/b
160	6139	5870	269	5,87E-03	6,73	146,74	170,4	0,149
170	6481	6262	218	6,26E-03	5,46	156,55	159,7	0,183
180	7029	6630	399	6,63E-03	9,97	165,74	150,8	0,100
190	7344	6967	377	6,97E-03	9,43	174,17	143,5	0,106
200	7701	7371	330	7,37E-03	8,24	184,28	135,7	0,121
210	8020	7791	229	7,79E-03	5,72	194,79	128,3	0,175
220	15530	15091	439	1,51E-02	10,98	377,28	66,3	0,091
230	8784	8426	358	8,43E-03	8,94	210,65	118,7	0,112
240	9114	8798	316	8,80E-03	7,91	219,95	113,7	0,126
250	16126	15701	425	1,57E-02	10,63	392,52	63,7	0,094
260	9935	9628	306	9,63E-03	7,66	240,71	103,9	0,131
270	10214	9897	316	9,90E-03	7,91	247,43	101,0	0,126
280	10751	10366	385	1,04E-02	9,62	259,14	96,5	0,104
290	10949	10588	361	1,06E-02	9,02	264,71	94,4	0,111
300	11497	11140	358	1,11E-02	8,94	278,49	89,8	0,112
310	11929	11539	391	1,15E-02	9,77	288,46	86,7	0,102
320	12221	11851	370	1,19E-02	9,24	296,27	84,4	0,108
330	12405	12122	283	1,21E-02	7,08	303,05	82,5	0,141
340	12939	12555	384	1,26E-02	9,60	313,88	79,6	0,104
350	13387	13028	360	1,30E-02	8,99	325,69	76,8	0,111
360	13742	13459	283	1,35E-02	7,08	336,47	74,3	0,141
370	14139	13745	394	1,37E-02	9,85	343,63	72,8	0,102
380	14564	14106	458	1,41E-02	11,46	352,64	70,9	0,087
390	14876	14466	409	1,45E-02	10,23	361,66	69,1	0,098
400	15415	15086	328	1,51E-02	8,21	377,15	66,3	0,122
400	15415	15086	328	1,51E-02	8,21	377,15	66,3	0,122
410	15530	15091	439	1,51E-02	10,98	377,28	66,3	0,091
420	16126	15701	425	1,57E-02	10,63	392,52	63,7	0,094
430	16519	16266	253	1,63E-02	6,32	406,65	61,5	0,158
440	16725	16483	243	1,65E-02	6,07	412,07	60,7	0,165
450	16862	16568	294	1,66E-02	7,36	414,21	60,4	0,136
460	16519	16266	253	1,63E-02	6,32	406,65	61,5	0,158

Tabela Z20. Stężenie monofosforanu fludarabiny (f-ara-AMP) w wodnych roztworach w komorze pomiarowej zawierającej dendrymer PPI G4 oraz komorze odnośnikowej bez dendrymeru podczas dializ 1, 2, i 3-dniowych.

t [dni]	fx ₁ f-ara-AMP [μM] z PPI G4	fx ₂ f-ara-AMP [μM]
1	2490	1030
2	2513	1051
3	2487	1090

Tabela Z21. Równowagowy rozkład stężenia monofosforanu fludarabiny (f-ara-AMP) w roztworze z dendrymerem PPI G4 o stężeniu $r = 20 \mu\text{M}$ oraz w wodnym roztworze leku (po przeciwnej stronie błony) w temperaturze pokojowej.

[f-ara-AMP]/[DAB 64]	fx ₁ f-ara-AMP [μM]	fx ₂ f-ara-AMP [μM]	c [μM]	fx ₂ [M]	b			
początkowy stosunek molowy	po stronie PPI	po przeciwnej stronie	stężenie związanej f-ara-AMP	stężenie niezwiązanej f-ara-AMP	c/r	fx ₂ /r	1/fx ₂ [M ⁻¹]	1/b
5	150	65	85	6,49E-05	4,25	3,24	15415,1	0,236
5	126	54	72	5,37E-05	3,62	2,69	18612,3	0,277
6	137	59	79	5,87E-05	3,93	2,93	17044,7	0,254
6	177	69	108	6,85E-05	5,40	3,43	14594,4	0,185
7	185	91	94	9,07E-05	4,71	4,54	11020,5	0,212
8	190	75	115	7,47E-05	5,77	3,73	13389,0	0,173
8	211	85	126	8,51E-05	6,30	4,25	11755,2	0,159
8	226	84	142	8,43E-05	7,10	4,22	11856,9	0,141
9	234	128	106	1,28E-04	5,28	6,40	7815,4	0,189
9	212	99	113	9,92E-05	5,65	4,96	10077,5	0,177
10	238	133	105	1,33E-04	5,26	6,64	7530,5	0,190
10	229	126	103	1,26E-04	5,17	6,28	7962,0	0,194
10	270	107	163	1,07E-04	8,17	5,35	9340,8	0,122
15	369	212	157	2,12E-04	7,83	10,61	4711,3	0,128
15	322	164	159	1,64E-04	7,94	8,19	6107,4	0,126
20	448	260	188	2,60E-04	9,39	12,99	3849,4	0,106
20	450	199	251	1,99E-04	12,56	9,93	5034,6	0,080
25	523	351	172	3,51E-04	8,60	17,54	2850,7	0,116
25	551	296	255	2,96E-04	12,73	14,82	3372,7	0,079
30	658	441	217	4,41E-04	10,86	22,05	2267,1	0,092
30	685	330	354	3,30E-04	17,71	16,52	3027,0	0,056
35	771	537	234	5,37E-04	11,72	26,85	1862,2	0,085

Tabela Z21. cd.

[f-ara-AMP]/[DAB 64]	fx ₁ f-ara-AMP [μM]	fx ₂ f-ara-AMP [μM]	c [μM]	fx ₂ [M]	b			
początkowy stosunek molowy	po stronie PPI	po przeciwnej stronie	stężenie związanej f-ara-AMP	stężenie niezwiązanej f-ara-AMP	c/r	fx ₂ /r	1/fx ₂ [M ⁻¹]	1/b
35	721	420	301	4,20E-04	15,07	21,01	2380,2	0,066
40	933	477	456	4,77E-04	22,81	23,84	2097,1	0,044
40	810	466	344	4,66E-04	17,22	23,29	2147,0	0,058
45	1057	515	542	5,15E-04	27,11	25,75	1942,0	0,037
45	956	459	496	4,59E-04	24,81	22,97	2177,2	0,040
50	1125	637	487	6,37E-04	24,37	31,86	1569,4	0,041
50	1133	554	578	5,54E-04	28,91	27,72	1803,8	0,035
60	1452	591	861	5,91E-04	43,04	29,54	1692,4	0,023
70	1669	732	938	7,32E-04	46,89	36,58	1366,8	0,021
80	1912	743	1169	7,43E-04	58,47	37,13	1346,6	0,017
90	2269	869	1400	8,69E-04	70,01	43,44	1151,0	0,014
100	2589	1059	1530	1,06E-03	76,49	52,96	944,1	0,013
110	2772	1153	1619	1,15E-03	80,96	57,63	867,6	0,012
120	2907	1193	1714	1,19E-03	85,68	59,66	838,0	0,012
130	2986	1456	1530	1,46E-03	76,48	72,82	686,6	0,013
140	3096	1730	1366	1,73E-03	68,31	86,48	578,2	0,015
150	3335	1702	1633	1,70E-03	81,65	85,10	587,5	0,012
170	3737	2077	1660	2,08E-03	82,98	103,87	481,4	0,012
180	4008	2213	1795	2,21E-03	89,75	110,67	451,8	0,011
190	4342	2201	2141	2,20E-03	107,03	110,07	454,3	0,009
200	4660	2436	2223	2,44E-03	111,17	121,82	410,4	0,009
210	4736	2645	2091	2,64E-03	104,54	132,25	378,1	0,010
220	4955	2866	2089	2,87E-03	104,44	143,29	348,9	0,010
230	5151	2962	2189	2,96E-03	109,43	148,12	337,6	0,009
240	5461	3121	2340	3,12E-03	117,02	156,03	320,5	0,009
250	5542	3403	2139	3,40E-03	106,96	170,15	293,9	0,009
260	5844	3541	2303	3,54E-03	115,13	177,07	282,4	0,009
270	5645	3544	2101	3,54E-03	105,05	177,20	282,2	0,010
280	5947	3745	2203	3,74E-03	110,14	187,23	267,0	0,009
290	6111	3941	2169	3,94E-03	108,47	197,06	253,7	0,009
300	6291	4191	2100	4,19E-03	105,01	209,56	238,6	0,010
310	6457	4303	2154	4,30E-03	107,69	215,15	232,4	0,009
320	6807	4448	2359	4,45E-03	117,96	222,41	224,8	0,008
330	7176	4577	2599	4,58E-03	129,96	228,86	218,5	0,008
340	7128	4783	2345	4,78E-03	117,24	239,14	209,1	0,009
350	7496	4951	2545	4,95E-03	127,25	247,55	202,0	0,008
360	7548	5185	2363	5,18E-03	118,14	259,25	192,9	0,008
370	7535	5306	2229	5,31E-03	111,46	265,30	188,5	0,009
380	8014	5361	2653	5,36E-03	132,65	268,07	186,5	0,008
390	8036	5634	2403	5,63E-03	120,14	281,68	177,5	0,008

Tabela Z21. cd.

[f-ara-AMP]/[DAB 64]	fx ₁ f-ara-AMP [μM]	fx ₂ f-ara-AMP [μM]	c [μM]	fx ₂ [M]	b	fx ₂ /r	1/fx ₂ [M ⁻¹]	1/b
początkowy stosunek molowy	po stronie PPI	po przeciwnej stronie	stężenie związanej f-ara-AMP	stężenie niezwiązanej f-ara-AMP	c/r			
400	8111	6149	1962	6,15E-03	98,08	307,47	162,6	0,010
410	8279	6047	2232	6,05E-03	111,60	302,37	165,4	0,009
420	8803	6325	2479	6,32E-03	123,94	316,23	158,1	0,008
440	9395	6538	2858	6,54E-03	142,88	326,88	153,0	0,007
450	9595	6588	3007	6,59E-03	150,37	329,40	151,8	0,007
460	9595	6588	3007	6,59E-03	150,37	329,40	151,8	0,007
470	9914	7130	2784	7,13E-03	139,19	356,49	140,3	0,007

Tabela Z22. Stężenie L-α-tryptofanu w wodnych roztworach w celi pomiarowej zawierającej dendrymer PPI G4 oraz komorze odnośnikowej bez dendrymeru podczas dializ 1, 2, i 3-dniowych.

t [dni]	fx ₁ Trp [μM] z PPI G4	fx ₂ Trp [μM]
1	4238	3950
2	4224	3961
3	4210	3965

Tabela Z23. Równowagowy rozkład stężenia L-α-tryptofanu (Trp) w roztworze z dendrymerem PPI G4 o stężeniu r = 40 μM oraz w wodnym roztworze leku (po przeciwnej stronie błony) w temperaturze pokojowej.

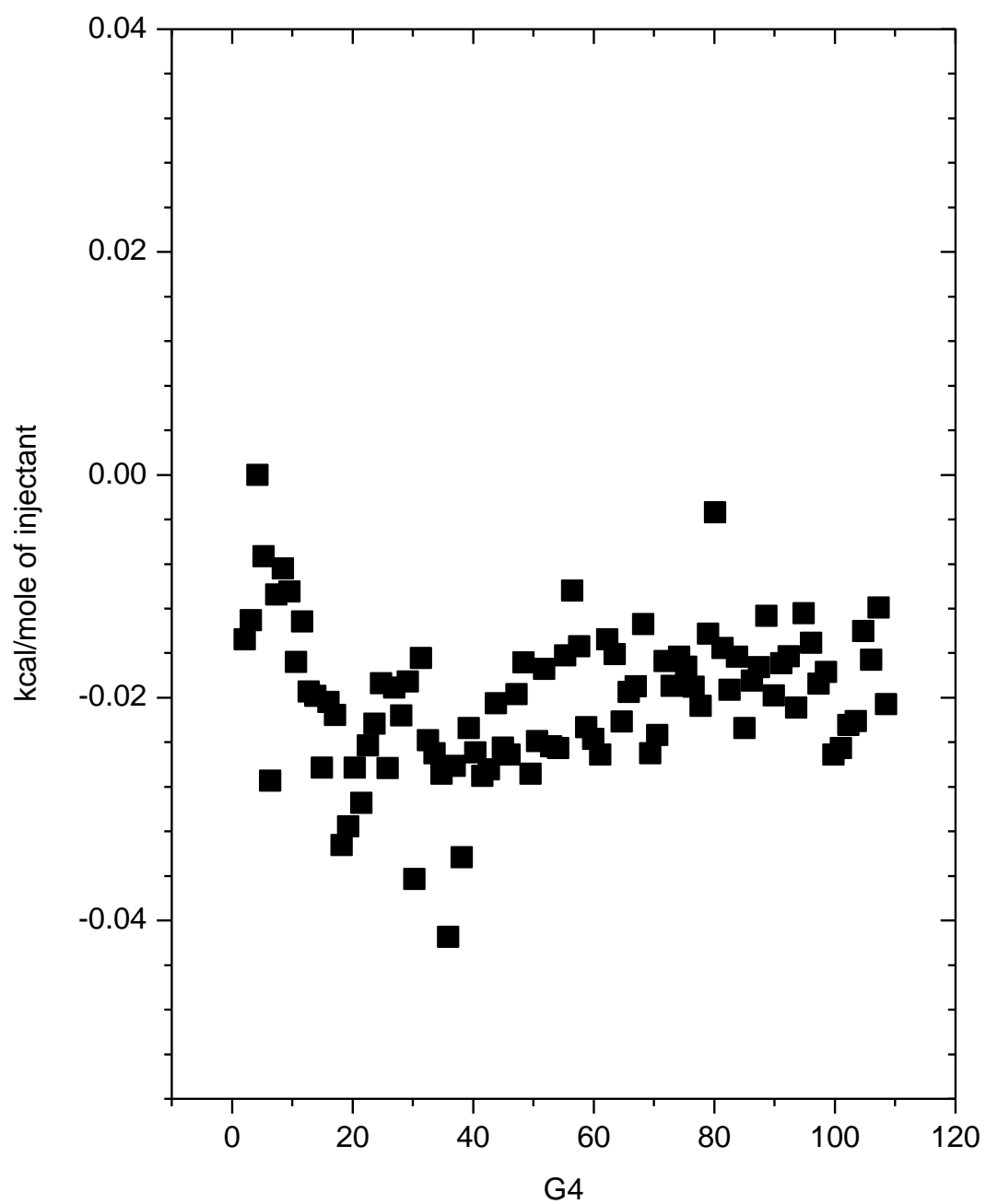
[Trp]/[DAB 64]	fx ₁ Trp [μM]	fx ₂ Trp [μM]	c [μM]	fx ₂ [M]	b	fx ₂ /r	1/fx ₂ [M ⁻¹]	1/b
początkowy stosunek molowy	po stronie PPI	po przeciwnej stronie	stężenie związanego Trp	stężenie niezwiązanego Trp	c/r			
5	252	213	39	2,13E-04	0,97	5,33	4686,9	1,027
5	308	271	37	2,71E-04	0,92	6,78	3685,0	1,092
6	299	242	57	2,42E-04	1,43	6,04	4139,0	0,699
7	350	287	64	2,87E-04	1,59	7,17	3488,7	0,628
8	405	322	83	3,22E-04	2,08	8,04	3107,9	0,481
9	458	369	90	3,69E-04	2,24	9,22	2712,2	0,446
10	450	361	89	3,61E-04	2,21	9,04	2766,6	0,452

Tabela Z23. cd.

[Trp]/[DAB 64]	fx ₁ Trp [μM]	fx ₂ Trp [μM]	c [μM]	fx ₂ [M]	b			
początkowy stosunek molowy	po stronie PPI	po przeciwnej stronie	stężenie związanego Trp	stężenie niezwiązanego Trp	c/r	fx ₂ /r	1/fx ₂ [M ⁻¹]	1/b
10	278	249	29	2,49E-04	0,72	6,23	4012,3	1,397
15	688	643	45	6,43E-04	1,13	16,07	1555,8	0,888
20	810	764	47	7,64E-04	1,17	19,09	1309,7	0,856
20	658	608	49	6,08E-04	1,23	15,21	1643,7	0,812
25	941	811	130	8,11E-04	3,24	20,29	1232,4	0,308
30	1213	1138	75	1,14E-03	1,87	28,45	878,8	0,535
40	1740	1535	205	1,54E-03	5,13	38,38	651,4	0,195
50	2121	1853	268	1,85E-03	6,69	46,34	539,5	0,150
60	2390	2292	99	2,29E-03	2,47	57,29	436,4	0,405
70	2947	2703	244	2,70E-03	6,11	67,57	370,0	0,164
80	3299	3090	210	3,09E-03	5,24	77,24	323,7	0,191
90	3794	3536	258	3,54E-03	6,45	88,40	282,8	0,155
100	4200	3966	234	3,97E-03	5,84	99,15	252,1	0,171
110	4688	4424	264	4,42E-03	6,60	110,60	226,0	0,152
120	5152	4882	270	4,88E-03	6,76	122,05	204,8	0,148
130	5535	5284	251	5,28E-03	6,27	132,11	189,2	0,160
140	5896	5686	210	5,69E-03	5,25	142,14	175,9	0,190
150	6390	6009	381	6,01E-03	9,53	150,21	166,4	0,105
160	6760	6327	434	6,33E-03	10,84	158,17	158,1	0,092
170	7302	6856	445	6,86E-03	11,13	171,41	145,8	0,090
180	7784	7260	524	7,26E-03	13,09	181,51	137,7	0,076
190	8033	7651	382	7,65E-03	9,54	191,28	130,7	0,105
200	8498	8053	444	8,05E-03	11,11	201,34	124,2	0,090
210	8894	8552	341	8,55E-03	8,53	213,81	116,9	0,117
220	9363	9119	244	9,12E-03	6,11	227,97	109,7	0,164
230	9736	9455	281	9,46E-03	7,01	236,38	105,8	0,143
240	10195	9879	317	9,88E-03	7,92	246,97	101,2	0,126
250	10565	10093	473	1,01E-02	11,82	252,31	99,1	0,085
260	10897	10557	339	1,06E-02	8,48	263,94	94,7	0,118
270	11466	11037	429	1,10E-02	10,72	275,93	90,6	0,093
290	12115	11792	323	1,18E-02	8,08	294,79	84,8	0,124

Tabela Z23. cd.

[Trp]/[DAB 64]	fx ₁ Trp [μM]	fx ₂ Trp [μM]	c [μM]	fx ₂ [M]	b			
początkowy stosunek molowy	po stronie PPI	po przeciwnej stronie	stężenie związanego Trp	stężenie niezwiązanego Trp	c/r	fx ₂ /r	1/fx ₂ [M ⁻¹]	1/b
300	12509	12086	423	1,21E-02	10,59	302,14	82,7	0,094
310	13032	12676	356	1,27E-02	8,89	316,91	78,9	0,112
330	13849	13511	337	1,35E-02	8,44	337,79	74,0	0,119
340	14246	13820	426	1,38E-02	10,65	345,50	72,4	0,094
360	14953	14598	356	1,46E-02	8,89	364,94	68,5	0,113
380	15829	15527	302	1,55E-02	7,56	388,17	64,4	0,132
390	16358	16004	354	1,60E-02	8,85	400,10	62,5	0,113
410	17385	16910	475	1,69E-02	11,88	422,76	59,1	0,084
420	17941	17344	597	1,73E-02	14,93	433,59	57,7	0,067
430	18321	17889	431	1,79E-02	10,78	447,23	55,9	0,093
450	18729	18389	340	1,84E-02	8,49	459,73	54,4	0,118



Rys. Z6. Efekty cieplne rozcieńczenia 40 μ M dendrymeru PPI G4 (w celi) wodą (ze strzykawki).

Tabela Z24. Wyniki miareczkowania kalorymetrycznego w 25°C 40 μ M wodnego roztworu dendrymeru PPI G4 20 mM wodnym roztworem 5-fluorouracylu. W tabeli podano odpowiednio X_t - stężenie molowe 5-fluorouracylu w celi pomiarowej, M_t -stężenie molowe PPI G4 w celi pomiarowej, X_t/M_t -stosunek molowy 5-fluorouracylu do dendrymeru PPI G4 w celi pomiarowej, Q_m - efekt cieplny oddziaływań dendrymeru PPI G4 z 5-fluorouracylem skorygowany o efekt cieplny rozcieńczenia 5-fluorouracylu.

Nr	X_t [mM]	M_t [mM]	X_t/M_t	Q [cal/mol]
1	0,1674	0,0397	4,22	-6671,50
2	0,2091	0,0396	5,28	-6760,40
3	0,2506	0,0395	6,34	-6721,89
4	0,2921	0,0394	7,41	-6624,93
5	0,3334	0,0393	8,48	-6469,01
6	0,3747	0,0393	9,55	-6221,79
7	0,4159	0,0392	10,62	-6198,45
8	0,4570	0,0391	11,69	-5373,39
9	0,4980	0,0390	12,77	-5196,29
10	0,5390	0,0389	13,85	-5097,63
11	0,5798	0,0388	14,93	-4826,34
12	0,6205	0,0388	16,01	-4601,99
13	0,6612	0,0387	17,10	-4395,71
14	0,7018	0,0386	18,18	-4153,33
15	0,7423	0,0385	19,27	-3941,62
16	0,7827	0,0384	20,36	-3793,61
17	0,8230	0,0384	21,46	-3585,62
18	0,8632	0,0383	22,55	-3398,62
19	0,9033	0,0382	23,65	-3308,44
20	0,9434	0,0381	24,75	-3147,73
21	0,9833	0,0380	25,85	-2986,14
22	1,0232	0,0380	26,96	-2882,64
23	1,0630	0,0379	28,07	-2817,24
24	1,1027	0,0378	29,18	-2689,55
25	1,1423	0,0377	30,29	-2597,90
26	1,1818	0,0376	31,40	-2498,55
27	1,2212	0,0376	32,52	-2454,98
28	1,2605	0,0375	33,64	-2402,40
29	1,2998	0,0374	34,76	-2286,50
30	1,3389	0,0373	35,88	-2199,91
31	1,3780	0,0372	37,00	-2143,11
32	1,4170	0,0372	38,13	-2054,27
33	1,4559	0,0371	39,26	-2060,96
34	1,4947	0,0370	40,39	-1976,10
35	1,5334	0,0369	41,52	-1876,04
36	1,5721	0,0369	42,66	-1838,58

Tabela Z24. cd.

Nr	Xt [mM]	Mt [mM]	Xt/Mt	Q [cal/mol]
37	1,6106	0,0368	43,80	-1817,76
38	1,6491	0,0367	44,94	-1725,25
39	1,6874	0,0366	46,08	-1689,78
40	1,7257	0,0365	47,23	-1604,43
41	1,7639	0,0365	48,37	-1598,77
42	1,8020	0,0364	49,52	-1577,08
43	1,8400	0,0363	50,67	-1530,01
44	1,8779	0,0362	51,83	-1468,71
45	1,9158	0,0362	52,98	-1428,29
46	1,9535	0,0361	54,14	-1370,40
47	1,9912	0,0360	55,30	-1361,80
48	2,0287	0,0359	56,46	-1319,97
49	2,0662	0,0359	57,63	-1351,82
50	2,1036	0,0358	58,79	-1300,83
51	2,1409	0,0357	59,96	-1266,01
52	2,1781	0,0356	61,13	-1215,46
53	2,2153	0,0356	62,31	-1151,41
54	2,2523	0,0355	63,48	-1193,84
55	2,2893	0,0354	64,66	-1126,83
56	2,3261	0,0353	65,84	-1098,15
57	2,3629	0,0353	67,02	-1105,33
58	2,3996	0,0352	68,21	-1071,74
59	2,4362	0,0351	69,39	-980,91
60	2,4727	0,0350	70,58	-1000,74
61	2,5091	0,0350	71,77	-989,69
62	2,5455	0,0349	72,97	-990,01
63	2,5817	0,0348	74,16	-1030,96
64	2,6179	0,0347	75,36	-921,16
65	2,6539	0,0347	76,56	-915,82
66	2,6899	0,0346	77,76	-879,55
67	2,7258	0,0345	78,97	-882,06
68	2,7616	0,0345	80,17	-802,49
69	2,7973	0,0344	81,38	-824,03
70	2,8329	0,0343	82,59	-814,19
71	2,8685	0,0342	83,80	-805,96
72	2,9039	0,0342	85,02	-759,05
73	2,9393	0,0341	86,24	-762,70
74	2,9746	0,0340	87,46	-784,96
75	3,0098	0,0339	88,68	-753,24
76	3,0449	0,0339	89,90	-700,65
77	3,0799	0,0338	91,13	-738,76
78	3,1148	0,0337	92,36	-699,53

Tabela Z24. cd.

Nr	Xt [mM]	Mt [mM]	Xt/Mt	Q [cal/mol]
79	3,1496	0,0337	93,59	-682,91
80	3,1844	0,0336	94,82	-708,72
81	3,2190	0,0335	96,06	-686,45
82	3,2536	0,0334	97,29	-667,79
83	3,2881	0,0334	98,53	-617,74
84	3,3225	0,0333	99,78	-652,76
85	3,3568	0,0332	101,02	-629,64
86	3,3910	0,0332	102,27	-628,39
87	3,4251	0,0331	103,51	-604,66
88	3,4591	0,0330	104,77	-621,62
89	3,4931	0,0330	106,02	-600,09
90	3,5269	0,0329	107,27	-587,72

Tabela Z25. Wyniki miareczkowania kalorymetrycznego w 25°C 15 µM wodnego roztworu dendrymeru PPI G4 7 mM wodnym roztworem 5-jodouraculu. W tabeli podano odpowiednio X_t- stężenie molowe 5-jodouracylu w celi pomiarowej, M_t-stężenie molowe PPI G4 w celi pomiarowej, X_t/M_t-stosunek molowy 5-jodouracylu do dendrymeru PPI G4 w celi pomiarowej, Q_m- efekt cieplny oddziaływań dendrymeru PPI G4 z 5-jodouracylem skorygowany o efekt cieplny rozcieńczenia 5-jodouracylu.

Nr	Xt [mM]	Mt [mM]	Xt/Mt	Q [cal/mol]
1	0,0294	0,0149	1,97	-4915,60
2	0,0440	0,0149	2,95	-4873,89
3	0,0586	0,0149	3,94	-4735,28
4	0,0732	0,0148	4,93	-4657,43
5	0,0877	0,0148	5,92	-4499,88
6	0,1022	0,0148	6,92	-4269,18
7	0,1167	0,0148	7,91	-3965,13
8	0,1312	0,0147	8,91	-3828,03
9	0,1456	0,0147	9,91	-3917,66
10	0,1600	0,0147	10,91	-3524,19
11	0,1743	0,0146	11,92	-3386,40
12	0,1886	0,0146	12,92	-3235,33
13	0,2029	0,0146	13,93	-3060,56
14	0,2172	0,0145	14,94	-2958,28
15	0,2314	0,0145	15,96	-2857,64

Tabela Z25. cd.

Nr	Xt [mM]	Mt [mM]	Xt/Mt	Q [cal/mol]
16	0,2456	0,0145	16,97	-2718,43
17	0,2598	0,0144	17,99	-2622,87
18	0,2739	0,0144	19,01	-2463,91
19	0,2880	0,0144	20,03	-2419,32
20	0,3021	0,0144	21,05	-2345,87
21	0,3162	0,0143	22,07	-2284,57
22	0,3302	0,0143	23,10	-2186,15
23	0,3442	0,0143	24,13	-2123,93
24	0,3581	0,0142	25,16	-1938,71
25	0,3720	0,0142	26,20	-2052,94
26	0,3859	0,0142	27,23	-1930,32
27	0,3998	0,0141	28,27	-1859,33
28	0,4136	0,0141	29,31	-1805,81
29	0,4274	0,0141	30,35	-1767,20
30	0,4412	0,0141	31,39	-1722,60
31	0,4549	0,0140	32,44	-1687,90
32	0,4686	0,0140	33,49	-1608,87
33	0,4823	0,0140	34,54	-1609,28
34	0,4960	0,0139	35,59	-1525,06
35	0,5096	0,0139	36,64	-1454,74
36	0,5232	0,0139	37,70	-1485,38
37	0,5367	0,0139	38,76	-1434,54
38	0,5502	0,0138	39,82	-1418,01
39	0,5637	0,0138	40,88	-1335,48
40	0,5772	0,0138	41,94	-1289,86
41	0,5906	0,0137	43,01	-1262,07
42	0,6040	0,0137	44,08	-1296,03
43	0,6174	0,0137	45,15	-1195,37
44	0,6307	0,0137	46,22	-1202,61
45	0,6440	0,0136	47,29	-1129,10
46	0,6573	0,0136	48,37	-1108,30
47	0,6705	0,0136	49,45	-1062,56
48	0,6837	0,0135	50,53	-1026,76
49	0,6969	0,0135	51,61	-1077,53
50	0,7101	0,0135	52,70	-1037,47
51	0,7232	0,0135	53,78	-970,65
52	0,7363	0,0134	54,87	-989,93
53	0,7493	0,0134	55,96	-1011,49
54	0,7624	0,0134	57,06	-997,39

Tabela Z25. cd.

Nr	Xt [mM]	Mt [mM]	Xt/Mt	Q [cal/mol]
55	0,7753	0,0133	58,15	-905,66
56	0,7883	0,0133	59,25	-938,47
57	0,8012	0,0133	60,35	-909,72
58	0,8141	0,0133	61,45	-867,77
59	0,8270	0,0132	62,55	-916,40
60	0,8399	0,0132	63,66	-783,61
61	0,8527	0,0132	64,77	-823,11
62	0,8654	0,0131	65,88	-822,36
63	0,8782	0,0131	66,99	-772,42
64	0,8909	0,0131	68,10	-814,84
65	0,9036	0,0131	69,22	-803,56
66	0,9163	0,0130	70,34	-737,37
67	0,9289	0,0130	71,46	-785,28
68	0,9415	0,0130	72,58	-758,92
69	0,9540	0,0129	73,70	-682,88
70	0,9666	0,0129	74,83	-714,70
71	0,9791	0,0129	75,96	-746,24
72	0,9915	0,0129	77,09	-709,42
73	1,0040	0,0128	78,22	-612,30
74	1,0164	0,0128	79,35	-634,54
75	1,0288	0,0128	80,49	-632,30
76	1,0411	0,0128	81,63	-573,62
77	1,0534	0,0127	82,77	-654,97
78	1,0657	0,0127	83,91	-610,14
79	1,0780	0,0127	85,05	-580,00
80	1,0902	0,0127	86,20	-597,88
81	1,1024	0,0126	87,35	-635,07
82	1,1145	0,0126	88,50	-551,40
83	1,1267	0,0126	89,65	-616,13
84	1,1388	0,0125	90,81	-534,50
85	1,1508	0,0125	91,97	-538,13
86	1,1629	0,0125	93,12	-520,36
87	1,1749	0,0125	94,29	-521,82
88	1,1868	0,0124	95,45	-542,54
89	1,1988	0,0124	96,61	-460,30
90	1,2107	0,0124	97,78	-542,76

Tabela Z26. Wyniki miareczkowania kalorymetrycznego w 25°C 10 μ M wodnego roztworu dendrymeru PPI G4 5 mM wodnym roztworem tegafuru. W tabeli podano odpowiednio X_t -stężenie molowe tegafuru w celi pomiarowej, M_t -stężenie molowe PPI G4 w celi pomiarowej, X_t/M_t -stosunek molowy tegafuru do dendrymeru PPI G4 w celi pomiarowej, Q_m - efekt cieplny oddziaływań dendrymeru PPI G4 z tegafurem skorygowany o efekt cieplny rozcieńczenia tegafuru.

Nr	X_t [mM]	M_t [mM]	X_t/M_t	Q [cal/mol]
1	0,0419	0,0099	4,22	-5448,50
2	0,0523	0,0099	5,28	-4910,16
3	0,0627	0,0099	6,34	-4582,77
4	0,0730	0,0099	7,41	-4116,55
5	0,0834	0,0098	8,48	-3830,90
6	0,0937	0,0098	9,55	-3486,35
7	0,1040	0,0098	10,62	-3186,37
8	0,1143	0,0098	11,69	-2834,04
9	0,1245	0,0098	12,77	-2744,21
10	0,1347	0,0097	13,85	-2500,25
11	0,1450	0,0097	14,93	-2393,04
12	0,1551	0,0097	16,01	-2224,08
13	0,1653	0,0097	17,10	-2070,31
14	0,1754	0,0097	18,18	-1908,47
15	0,1856	0,0096	19,27	-1699,92
16	0,1957	0,0096	20,36	-1826,84
17	0,2057	0,0096	21,46	-1659,19
18	0,2158	0,0096	22,55	-1540,63
19	0,2258	0,0096	23,65	-1499,76
20	0,2358	0,0095	24,75	-1532,45
21	0,2458	0,0095	25,85	-1487,50
22	0,2558	0,0095	26,96	-1344,47
23	0,2657	0,0095	28,07	-1352,64
24	0,2757	0,0095	29,18	-1189,18
25	0,2856	0,0094	30,29	-1222,72
26	0,2954	0,0094	31,40	-1253,86
27	0,3053	0,0094	32,52	-1082,39
28	0,3151	0,0094	33,64	-1118,42
29	0,3250	0,0094	34,76	-957,82
30	0,3347	0,0093	35,88	-925,06
31	0,3445	0,0093	37,00	-944,53
32	0,3543	0,0093	38,13	-768,16
33	0,3640	0,0093	39,26	-852,10
34	0,3737	0,0093	40,39	-791,24

Tabela Z26. cd.

Nr	Xt [mM]	Mt [mM]	Xt/Mt	Q [cal/mol]
35	0,3834	0,0092	41,52	-785,43
36	0,3930	0,0092	42,66	-694,65
37	0,4027	0,0092	43,80	-668,33
38	0,4123	0,0092	44,94	-651,30
39	0,4219	0,0092	46,08	-604,06
40	0,4314	0,0091	47,23	-606,52
41	0,4410	0,0091	48,37	-594,49
42	0,4505	0,0091	49,52	-709,24
43	0,4600	0,0091	50,67	-535,04
44	0,4695	0,0091	51,83	-479,45
45	0,4789	0,0090	52,98	-533,53
46	0,4884	0,0090	54,14	-517,31
47	0,4978	0,0090	55,30	-463,01
48	0,5072	0,0090	56,46	-462,51
49	0,5166	0,0090	57,63	-446,07
50	0,5259	0,0089	58,79	-373,07
51	0,5352	0,0089	59,96	-430,74
52	0,5445	0,0089	61,13	-384,13
53	0,5538	0,0089	62,31	-384,25
54	0,5631	0,0089	63,48	-412,29
55	0,5723	0,0089	64,66	-375,51
56	0,5815	0,0088	65,84	-373,12
57	0,5907	0,0088	67,02	-424,08
58	0,5999	0,0088	68,21	-304,63
59	0,6090	0,0088	69,39	-321,07
60	0,6182	0,0088	70,58	-457,80
61	0,6273	0,0087	71,77	-211,48
62	0,6364	0,0087	72,97	-378,85
63	0,6454	0,0087	74,16	-398,67
64	0,6545	0,0087	75,36	-308,67
65	0,6635	0,0087	76,56	-291,66
66	0,6725	0,0087	77,76	-244,49
67	0,6815	0,0086	78,97	-253,43
68	0,6904	0,0086	80,17	-364,46
69	0,6993	0,0086	81,38	-418,78
70	0,7082	0,0086	82,59	-215,76
71	0,7171	0,0086	83,80	-231,75

Tabela Z26. cd.

Nr	Xt [mM]	Mt [mM]	Xt/Mt	Q [cal/mol]
72	0,7260	0,0085	85,02	-260,32
73	0,7348	0,0085	86,24	-264,57
74	0,7436	0,0085	87,46	-254,27
75	0,7524	0,0085	88,68	-132,54
76	0,7612	0,0085	89,90	-265,99
77	0,7700	0,0085	91,13	-211,72
78	0,7787	0,0084	92,36	-237,74
79	0,7874	0,0084	93,59	-177,94
80	0,7961	0,0084	94,82	-328,89
81	0,8048	0,0084	96,06	-251,38
82	0,8134	0,0084	97,29	-171,93
83	0,8220	0,0083	98,53	-144,28
84	0,8306	0,0083	99,78	-216,39
85	0,8392	0,0083	101,02	-229,81
86	0,8477	0,0083	102,27	-213,18
87	0,8563	0,0083	103,51	-153,68
88	0,8648	0,0083	104,77	-192,77
89	0,8733	0,0082	106,02	-230,95
90	0,8817	0,0082	107,27	-178,60

Tabela Z27. Wyniki miareczkowania kalometrycznego 40 μ M wodnego roztworu dendrymeru PPI G4 20 mM wodnym roztworem azydotymidyny w 25°C. W tabeli podano odpowiednio X_t- stężenie molowe azydotymidyny w celi pomiarowej, M_t-stężenie molowe PPI G4 w celi pomiarowej, X_t/M_t-stosunek molowy azydotymidyny do dendrymeru PPI G4 w celi pomiarowej, Q_m- efekt cieplny oddziaływań dendrymeru PPI G4 z azydotymidyną skorygowany o efekt cieplny rozcieńczenia azydotymidyny.

Nr	Xt [mM]	Mt [mM]	Xt/Mt	Q [cal/mol]
1	0,0839	0,0398	2,11	-2472,52
2	0,1257	0,0398	3,16	-2234,07
3	0,1674	0,0397	4,22	-2008,10
4	0,2091	0,0396	5,28	-1807,84
5	0,2506	0,0395	6,34	-1657,26
6	0,2921	0,0394	7,41	-1499,43
7	0,3334	0,0393	8,48	-1381,96
8	0,3747	0,0393	9,55	-1254,75
9	0,4159	0,0392	10,62	-1164,11
10	0,4570	0,0391	11,69	-1084,62
11	0,4980	0,0390	12,77	-1000,19
12	0,5390	0,0389	13,85	-934,05

Tabela Z27. cd.

Nr	Xt [mM]	Mt [mM]	Xt/Mt	Q [cal/mol]
13	0,5798	0,0388	14,93	-879,50
14	0,6205	0,0388	16,01	-821,78
15	0,6612	0,0387	17,10	-762,11
16	0,7018	0,0386	18,18	-724,52
17	0,7423	0,0385	19,27	-662,03
18	0,7827	0,0384	20,36	-624,49
19	0,8230	0,0384	21,46	-593,72
20	0,8632	0,0383	22,55	-569,28
21	0,9033	0,0382	23,65	-526,63
22	0,9434	0,0381	24,75	-490,77
23	0,9833	0,0380	25,85	-469,86
24	1,0232	0,0380	26,96	-452,79
25	1,0630	0,0379	28,07	-430,18
26	1,1027	0,0378	29,18	-398,59
27	1,1423	0,0377	30,29	-389,49
28	1,1818	0,0376	31,40	-375,99
29	1,2212	0,0376	32,52	-339,92
30	1,2605	0,0375	33,64	-331,94
31	1,2998	0,0374	34,76	-311,13
32	1,3389	0,0373	35,88	-300,98
33	1,3780	0,0372	37,00	-280,63
34	1,4170	0,0372	38,13	-277,01
35	1,4559	0,0371	39,26	-264,04
36	1,4947	0,0370	40,39	-231,01
37	1,5334	0,0369	41,52	-237,93
38	1,5721	0,0369	42,66	-220,06
39	1,6106	0,0368	43,80	-214,81
40	1,6491	0,0367	44,94	-199,14
41	1,6874	0,0366	46,08	-194,42
42	1,7257	0,0365	47,23	-179,86
43	1,7639	0,0365	48,37	-170,27
44	1,8020	0,0364	49,52	-169,20
45	1,8400	0,0363	50,67	-156,99
46	1,8779	0,0362	51,83	-159,60
47	1,9158	0,0362	52,98	-150,48
48	1,9535	0,0361	54,14	-154,52
49	1,9912	0,0360	55,30	-143,95
50	2,0287	0,0359	56,46	-143,28
51	2,0662	0,0359	57,63	-139,24
52	2,1036	0,0358	58,79	-128,17
53	2,1409	0,0357	59,96	-137,58

Tabela Z27. cd.

Nr	Xt [mM]	Mt [mM]	Xt/Mt	Q [cal/mol]
54	2,1781	0,0356	61,13	-140,52
55	2,2153	0,0356	62,31	-119,27
56	2,2523	0,0355	63,48	-111,84
57	2,2893	0,0354	64,66	-110,96
58	2,3261	0,0353	65,84	-110,80
59	2,3629	0,0353	67,02	-102,06
60	2,3996	0,0352	68,21	-94,63
61	2,4362	0,0351	69,39	-104,55
62	2,4727	0,0350	70,58	-95,51
63	2,5091	0,0350	71,77	-92,45
64	2,5455	0,0349	72,97	-76,43
65	2,5817	0,0348	74,16	-84,23
66	2,6179	0,0347	75,36	-77,37
67	2,6539	0,0347	76,56	-87,42
68	2,6899	0,0346	77,76	-63,83
69	2,7258	0,0345	78,97	-66,19
70	2,7616	0,0345	80,17	-79,29
71	2,7973	0,0344	81,38	-86,10
72	2,8329	0,0343	82,59	-61,56
73	2,8685	0,0342	83,80	-68,59
74	2,9039	0,0342	85,02	-75,52
75	2,9393	0,0341	86,24	-58,61
76	2,9746	0,0340	87,46	-53,38
77	3,0098	0,0339	88,68	-45,75
78	3,0449	0,0339	89,90	-58,10
79	3,0799	0,0338	91,13	-54,81
80	3,1148	0,0337	92,36	-46,02
81	3,1496	0,0337	93,59	-24,01
82	3,1844	0,0336	94,82	-52,47
83	3,2190	0,0335	96,06	-33,14
84	3,2536	0,0334	97,29	-36,18
85	3,2881	0,0334	98,53	-40,47
86	3,3225	0,0333	99,78	-43,71
87	3,3568	0,0332	101,02	-27,10
88	3,3910	0,0332	102,27	-27,83
89	3,4251	0,0331	103,51	-37,92
90	3,4591	0,0330	104,77	-47,57

Tabela Z28. Wyniki miareczkowania kalorymetrycznego 1 μM wodnego roztworu dendrymeru PPI G4 1 mM wodnym roztworem monofosforanu fludarabiny w 25°C. W tabeli podano odpowiednio X_t - stężenie molowe monofosforanu fludarabiny w celi pomiarowej, M_t -stężenie molowe PPI G4 w celi pomiarowej, X_t/M_t -stosunek molowy monofosforanu fludarabiny do dendrymeru PPI G4 w celi pomiarowej, Q_m - efekt cieplny oddziaływań dendrymeru PPI G4 z monofosforanem fludarabiny skorygowany o efekt cieplny rozcieńczania monofosforanu fludarabiny.

Nr	X_t [mM]	M_t [mM]	X_t/M_t	Q [cal/mol]
1	0,0042	0,0010	4,21	-7222,19
2	0,0063	0,0010	6,32	-8525,11
3	0,0084	0,0010	8,44	-9508,97
4	0,0105	0,0010	10,56	-9785,05
5	0,0125	0,0010	12,69	-9525,70
6	0,0146	0,0010	14,82	-8894,99
7	0,0167	0,0010	16,95	-9657,46
8	0,0187	0,0010	19,09	-8876,92
9	0,0208	0,0010	21,24	-8001,91
10	0,0229	0,0010	23,38	-7425,10
11	0,0249	0,0010	25,54	-6973,56
12	0,0270	0,0010	27,69	-7319,02
13	0,0290	0,0010	29,85	-6613,21
14	0,0310	0,0010	32,02	-5743,66
15	0,0331	0,0010	34,19	-5855,48
16	0,0351	0,0010	36,37	-5334,05
17	0,0371	0,0010	38,54	-4899,29
18	0,0391	0,0010	40,73	-5248,42
19	0,0412	0,0010	42,91	-5534,57
20	0,0432	0,0010	45,11	-4565,33
21	0,0452	0,0010	47,30	-4363,64
22	0,0472	0,0010	49,50	-4098,90
23	0,0492	0,0010	51,71	-4257,40
24	0,0512	0,0009	53,92	-4195,69
25	0,0532	0,0009	56,13	-3753,64
26	0,0551	0,0009	58,35	-4448,28
27	0,0571	0,0009	60,58	-4376,66
28	0,0591	0,0009	62,80	-3815,53
29	0,0611	0,0009	65,03	-3521,71
30	0,0630	0,0009	67,27	-4017,83
31	0,0650	0,0009	69,51	-3183,49
32	0,0670	0,0009	71,76	-3608,63
33	0,0689	0,0009	74,01	-3774,35
34	0,0709	0,0009	76,26	-4125,13

Tabela Z28. cd.

Nr	Xt [mM]	Mt [mM]	Xt/Mt	Q [cal/mol]
35	0,0728	0,0009	78,52	-3719,92
36	0,0747	0,0009	80,78	-3257,33
37	0,0767	0,0009	83,05	-3554,45
38	0,0786	0,0009	85,32	-3147,32
39	0,0805	0,0009	87,60	-3079,46
40	0,0825	0,0009	89,88	-2941,60
41	0,0844	0,0009	92,16	-3194,75
42	0,0863	0,0009	94,45	-2537,99
43	0,0882	0,0009	96,74	-2386,89
44	0,0901	0,0009	99,04	-2103,97
45	0,0920	0,0009	101,35	-2381,88
46	0,0939	0,0009	103,65	-2551,90
47	0,0958	0,0009	105,96	-2082,04
48	0,0977	0,0009	108,28	-1826,72
49	0,0996	0,0009	110,60	-2046,29
50	0,1014	0,0009	112,92	-2095,13
51	0,1033	0,0009	115,25	-2402,00
52	0,1052	0,0009	117,59	-2105,80
53	0,1071	0,0009	119,92	-1347,31
54	0,1089	0,0009	122,27	-1594,63
55	0,1108	0,0009	124,61	-2257,35
56	0,1126	0,0009	126,96	-1990,31
57	0,1145	0,0009	129,32	-1310,63
58	0,1163	0,0009	131,68	-1432,28
59	0,1181	0,0009	134,04	-1577,02
60	0,1200	0,0009	136,41	-1471,52
61	0,1218	0,0009	138,79	-1444,01
62	0,1236	0,0009	141,16	-1097,04
63	0,1255	0,0009	143,55	-1026,28
64	0,1273	0,0009	145,93	-1219,73
65	0,1291	0,0009	148,32	-797,30
66	0,1309	0,0009	150,72	-1437,44
67	0,1327	0,0009	153,12	-1939,73
68	0,1345	0,0009	155,52	-1594,34
69	0,1363	0,0009	157,93	-1600,67
70	0,1381	0,0009	160,34	-922,57
71	0,1399	0,0009	162,76	-924,48
72	0,1417	0,0009	165,18	-1582,16
73	0,1434	0,0009	167,61	-1140,63
74	0,1452	0,0009	170,04	-1240,31

Tabela Z28. cd.

Nr	Xt [mM]	Mt [mM]	Xt/Mt	Q [cal/mol]
75	0,1470	0,0009	172,48	-1376,21
76	0,1487	0,0009	174,91	-1199,79
77	0,1505	0,0008	177,36	-747,58
78	0,1522	0,0008	179,81	-637,76
79	0,1540	0,0008	182,26	-915,77
80	0,1557	0,0008	184,72	-626,93
81	0,1575	0,0008	187,18	-471,71
82	0,1592	0,0008	189,64	-1348,90
83	0,1610	0,0008	192,11	-773,65
84	0,1627	0,0008	194,59	-806,38
85	0,1644	0,0008	197,07	-801,58
86	0,1661	0,0008	199,55	-543,25
87	0,1678	0,0008	202,04	-963,66
88	0,1696	0,0008	204,53	-1275,54
89	0,1713	0,0008	207,03	-894,73
90	0,1730	0,0008	209,53	-404,14

Tabela Z29. Wyniki miareczkowania kalorymetrycznego 20 μ M wodnego roztworu dendrymeru PPI G4 50 mM wodnym roztworem L- α -tryptofanu w 25°C. W tabeli podano odpowiednio X_t- stężenie molowe L- α -tryptofanu w celi pomiarowej, M_t-stężenie molowe PPI G4 w celi pomiarowej, X_t/M_t-stosunek molowy L- α -tryptofanu do dendrymeru PPI G4 w celi pomiarowej, Q_m- efekt cieplny oddziaływań dendrymeru PPI G4 z L- α -tryptofanem skorygowany o efekt cieplny rozcieńczenia L- α -tryptofanu.

Nr	Xt [mM]	Mt [mM]	Xt/Mt	Q [cal/mol]
1	0,35	0,02	17,57	-239,85
2	0,52	0,02	26,41	-173,60
3	0,70	0,02	35,27	-137,41
4	0,87	0,02	44,17	-110,71
5	1,04	0,02	53,09	-91,91
6	1,21	0,02	62,05	-73,14
7	1,38	0,02	71,03	-66,47
8	1,55	0,02	80,05	-61,11
9	1,72	0,02	89,10	-54,13
10	1,89	0,02	98,18	-47,12
11	2,06	0,02	107,29	-42,35
12	2,22	0,02	116,43	-40,25
13	2,39	0,02	125,60	-31,15

Tabela Z29. cd.

Nr	Xt [mM]	Mt [mM]	Xt/Mt	Q [cal/mol]
14	2,56	0,02	134,80	-28,80
15	2,72	0,02	144,03	-26,78
16	2,89	0,02	153,29	-24,93
17	3,05	0,02	162,59	-20,72
18	3,22	0,02	171,91	-18,20
19	3,38	0,02	181,27	-17,86
20	3,54	0,02	190,65	-15,50
21	3,70	0,02	200,07	-15,34
22	3,87	0,02	209,51	-16,68
23	4,03	0,02	218,99	-15,89
24	4,19	0,02	228,50	-14,15
25	4,35	0,02	238,04	-15,00
26	4,50	0,02	247,61	-12,66
27	4,66	0,02	257,21	-12,29
28	4,82	0,02	266,84	-11,79
29	4,98	0,02	276,50	-10,47
30	5,13	0,02	286,19	-7,59
31	5,29	0,02	295,91	-10,30
32	5,45	0,02	305,67	-8,37
33	5,60	0,02	315,83	-6,28
34	5,75	0,02	325,27	-6,84
35	5,91	0,02	335,11	-8,24
36	6,06	0,02	344,99	-5,85
37	6,21	0,02	354,89	-6,95
38	6,36	0,02	364,83	-7,65
39	6,51	0,02	374,80	-5,06
40	6,66	0,02	384,80	-6,02
41	6,81	0,02	394,83	-6,91
42	6,96	0,02	404,89	-4,03
43	7,11	0,02	414,98	-5,26
44	7,26	0,02	425,10	-4,35
45	7,41	0,02	435,25	-5,63
46	7,55	0,02	445,43	-5,07
47	7,70	0,02	456,20	-4,23
48	7,85	0,02	465,89	-3,79
49	7,99	0,02	476,17	-2,88
50	8,13	0,02	486,47	-5,11
51	8,28	0,02	496,81	-4,79
52	8,42	0,02	507,18	-4,06
53	8,56	0,02	517,57	-5,62
54	8,70	0,02	528,00	-4,06

Tabela Z30. Wartości przesunięć chemicznych sygnałów ^1H NMR 140 μM dendrymeru PPI G4 oraz jego mieszanin z 5-fluorouracylem w zakresie stosunku molowego [FU]/[PPI G4] od 5/1 do 230/1 w D_2O w temperaturze pokojowej.

[FU]/[PPI G4]	c PPI G4 [μM]	c FU [μM]	$\delta \text{H}^{\text{C}}$ [ppm]	$\delta \text{H}^{\text{B}'}$ [ppm]	$\delta \text{H}^{\text{B}}$ [ppm]	$\delta \text{H}^{\text{A}}$ [ppm]	$\delta \text{H}^{\text{A}'}$ [ppm]
0	140	0	2,582	2,440	2,382	1,561	1,561
5	140	700	2,604	2,445	2,382	1,565	1,565
10	140	1400	2,642	2,459	2,388	1,581	1,581
20	140	2800	2,711	2,465	2,381	1,635	1,554
40	140	5600	2,774	2,449	2,350	1,657	1,532
60	140	8400	2,814	2,441	2,336	1,674	1,520
80	140	11200	2,831	2,432	2,326	1,677	1,509
100	140	14000	2,845	2,433	2,312	1,687	1,507
150	140	21000	2,854	2,422	2,286	1,684	1,502
230	140	32200	2,863	2,418	2,279	1,687	1,504

Tabela Z31. Wartości przesunięć chemicznych sygnałów ^1H NMR 40 μM dendrymeru PPI G4 oraz jego mieszanin z 5-jodouracylem w zakresie stosunku molowego [5-IU]/[PPI G4] od 5/1 do 100/1 w D_2O w temperaturze pokojowej.

[IU]/[PPI]	c PPI G4 [μM]	c 5-IU [μM]	$\delta \text{H}^{\text{C}}$ [ppm]	$\delta \text{H}^{\text{B}'}$ [ppm]	$\delta \text{H}^{\text{B}}$ [ppm]	$\delta \text{H}^{\text{A}}$ [ppm]	$\delta \text{H}^{\text{A}'}$ [ppm]
0	40	0	2,657	2,459	2,389	1,603	1,560
5	40	200	2,692	2,467	2,385	1,617	1,551
10	40	400	2,723	2,467	2,385	1,621	1,552
20	40	800	2,740	2,456	2,369	1,638	1,540
40	40	1600	2,799	2,438	2,339	1,664	1,524
60	40	2400	2,816	2,425	2,317	1,665	1,524
80	40	3200	2,828	2,422	2,309	1,666	1,514
100	40	4000	2,840	2,406	2,298	1,672	1,509

Tabela Z32. Wartości przesunięć chemicznych sygnałów ^1H NMR 140 μM dendrymeru PPI G4 oraz jego mieszanin z tegafurem w zakresie stosunku molowego [TF]/[PPI G4] od 5/1 do 230/1 w D_2O w temperaturze pokojowej.

[TF]/[PPI G4]	c PPI G4 [μM]	c TF [μM]	$\delta \text{H}^{\text{C}}$ [ppm]	$\delta \text{H}^{\text{B}'}$ [ppm]	$\delta \text{H}^{\text{B}}$ [ppm]	$\delta \text{H}^{\text{A}}$ [ppm]	$\delta \text{H}^{\text{A}'}$ [ppm]
0	140	0	2,595	2,446	2,384	1,565	1,565
5	140	700	2,611	2,449	2,386	1,572	1,572
10	140	1400	2,647	2,460	2,388	1,583	1,583
20	140	2800	2,704	2,464	2,380	1,628	1,555
40	140	5600	2,777	2,458	2,364	1,663	1,544
60	140	8400	2,812	2,450	2,349	1,677	1,536
80	140	11200	2,833	2,446	2,348	1,687	1,529
100	140	14000	2,851	2,446	-	1,696	1,528
150	140	21000	2,859	2,442	-	1,697	1,528
230	140	32200	2,871	2,438	-	1,700	1,537

Tabela Z33. Wartości przesunięć chemicznych sygnałów ^1H NMR 140 μM dendrymeru PPI G4 oraz jego mieszanin z azidotymidyną w zakresie stosunku molowego [AZT]/[PPI G4] od 5/1 do 230/1 w D_2O w temperaturze pokojowej.

[AZT]/[PPI G4]	c PPI G4 [μM]	c AZT [μM]	$\delta \text{H}^{\text{C}}$ [ppm]	$\delta \text{H}^{\text{B}'}$ [ppm]	$\delta \text{H}^{\text{A}}$ [ppm]	$\delta \text{H}^{\text{A}'}$ [ppm]
0	140	0	2,654	2,466	1,570	1,570
5	140	700	2,680	2,469	1,618	1,564
10	140	1400	2,681	2,469	1,619	1,560
20	140	2800	2,711	2,476	1,637	1,562
40	140	5600	2,734	2,481	1,648	1,565
60	140	8400	2,734	2,476	1,648	1,562
80	140	11200	2,740	2,478	1,651	1,562
100	140	14000	2,747	2,479	1,652	1,562
150	140	21000	2,758	2,476	1,660	1,561
230	140	32200	2,766	2,473	1,677	1,562

Tabela Z34. Wartości przesunięć chemicznych sygnałów ^1H NMR 40 μM dendrymeru PPI G4 oraz jego mieszanin z monofosforanem fludarabiny w zakresie stosunku molowego [F-ara-AMP]/[PPI G4] od 5/1 do 20/1 w D_2O w temperaturze pokojowej.

[F-ara-AMP]/[PPI]	c PPI G4 [μM]	c F-ara-AMP [μM]	$\delta \text{H}^{\text{C}}$ [ppm]	$\delta \text{H}^{\text{B}'}$ [ppm]	$\delta \text{H}^{\text{B}}$ [ppm]	$\delta \text{H}^{\text{A}}$ [ppm]	$\delta \text{H}^{\text{A}'}$ [ppm]
0	40	0	2,679	2,472	2,399	1,616	1,568
5	40	200	2,728	2,490	2,341	1,628	1,523
10	40	400	2,774	2,360	2,261	1,634	1,488
20	40	800	2,816	2,312	2,195	1,638	1,472

Tabela Z35. Wartości przesunięć chemicznych sygnałów ^1H NMR 140 μM dendrymeru PPI G4 oraz jego mieszanin z L- α -tryptofanem w zakresie stosunku molowego [Trp]/[PPI G4] od 5/1 do 230/1 w D_2O w temperaturze pokojowej.

[Trp]/[PPI G4]	c PPI G4 [μM]	c Trp [μM]	$\delta \text{H}^{\text{C}}$ [ppm]	$\delta \text{H}^{\text{B}'}$ [ppm]	$\delta \text{H}^{\text{B}}$ [ppm]	$\delta \text{H}^{\text{A}}$ [ppm]	$\delta \text{H}^{\text{A}'}$ [ppm]
0	140	0	2,647	2,463	2,394	1,571	1,571
5	140	700	2,677	2,468	2,393	1,615	1,560
10	140	1400	2,694	2,470	2,388	1,627	1,556
20	140	2800	2,704	2,462	2,380	1,626	1,550
40	140	5600	2,713	2,445	2,355	1,627	1,533
60	140	8400	2,725	2,437	2,341	1,627	1,523
80	140	11200	2,728	2,424	2,319	1,619	1,510
100	140	14000	2,732	2,413	2,323	1,631	1,507
150	140	21000	2,715	2,361	2,280	1,609	1,487
230	140	32200	2,698	2,322	2,242	1,583	1,462

Tabela Z36. Wartości przesunięć chemicznych sygnałów ^1H NMR 40 μM dendrymeru PPI G4 oraz jego mieszanin z L- α -tyrozyną w zakresie stosunku molowego [Tyr]/[PPI G4] od 10/1 do 40/1 w D_2O w temperaturze pokojowej.

[Tyr]/[PPI G4]	c PPI G4 [μM]	c Tyr [μM]	$\delta \text{H}^{\text{C}}$ [ppm]	$\delta \text{H}^{\text{B}'}$ [ppm]	$\delta \text{H}^{\text{B}}$ [ppm]	$\delta \text{H}^{\text{A}}$ [ppm]	$\delta \text{H}^{\text{A}'}$ [ppm]
0	40	0	2,730	2,491	2,414	1,649	1,571
10	40	400	2,750	2,492	2,418	1,666	1,577
20	40	800	2,767	2,496	2,418	1,672	1,578
40	40	1600	2,779	2,498	2,419	1,685	1,578

Tabela Z37. Potencjał ζ makrocząsteczek PPI G4 podczas miareczkowania wodnego 10 μM roztworu PPI G4 wodnym 35 mM roztworem 5-fluorouracylu (5-FU) w temperaturze 20°C.

[5-FU]/[PPI]	Potencjał ζ
0	15,33
5	29,23
10	38,47
15	41,27
20	42,20
25	40,00
30	39,90
35	38,85
40	37,93
45	37,93



Spectroscopic, electrochemical and calorimetric studies on the interactions of poly(propyleneimine) G4 dendrimer with 5-fluorouracil in aqueous solutions

Adam Buczkowski^{*}, Małgorzata Malinowska-Michalak, Bayarmaa Erdenebayar, Bartłomiej Palecz^{*}

Unit of Biophysical Chemistry, Department of Physical Chemistry, Faculty of Chemistry, University of Lodz, Pomorska 165, Lodz 90-236, Poland

ARTICLE INFO

Article history:

Received 30 January 2020

Received in revised form 18 May 2020

Accepted 4 June 2020

Available online 06 June 2020

Keywords:

PPI G4 dendrimer

5-Fluorouracil

ITC

Dialysis

¹H NMR

Zeta-potential

ABSTRACT

Results of zeta potential measurements and of spectroscopic (increased solubility, equilibrium dialysis, ¹H NMR titration) and calorimetric measurements (isothermal ITC titration) indicate that fourth generation poly(propyleneimine) dendrimer (PPI G4) spontaneously binds ($\Delta G < 0$) 5-fluorouracil (FU) molecules in aqueous environments. The poly(propyleneimine) G4 dendrimer binds approximately $n = 42 \pm 3$ drug molecules with an equilibrium constant of $K = 220 \pm 30$. The process of saturation of dendrimer active centres with drug molecules is exothermic ($\Delta H < 0$) and accompanied by increased ordering of reagents ($\Delta S < 0$). Results of equilibrium dialysis indicate that poly(propyleneimine) G4 dendrimer has two sets of active centres comprising: $n_1 = 5 \pm 1$ sites with higher binding constant towards 5-fluorouracil and $n_2 = 39 \pm 3$ sites with lower binding constant towards this particular drug. The obtained results of a study on binding of 5-fluorouracil by the poly(propyleneimine) G4 dendrimer were compared with results for binding of this drug by poly(amidoamine) (PAMAM) G4 dendrimer macromolecules with the same number of surface, primary amine groups.

© 2020 Elsevier B.V. All rights reserved.

1. Introduction

Studies on poly (amine) dendrimers, especially poly (propyleneimine) (PPI) and poly (amidoamine) PAMAM [1–8], as potential transporters of oncologic [9–11], anti-infection [12], anti-inflammatory drugs, painkiller drugs and non-viral vectors of genetic material [13–17] are undertaken by many laboratories. This is the case because of the amplification of the therapeutic effect (*dendritic effect*) [18] through simultaneous transport of many molecules of the drug through one macromolecule of the carrier. Compared to PAMAM, PPI dendrimers are more simple to synthesise and more resistant to elevated temperatures [19,20]. The structure of PPI dendrimers makes them an excellent material for biomedical [21] and technological applications [22]. Thermodynamic analysis of interactions between functional groups of dendrimer macromolecules and cytostatic agents used in therapy is of key importance in terms of understanding the stability of the formed supramolecular complexes in aqueous solutions and of explanation of the mechanism of drug transport and release by the macromolecule inside the body. Thus, we decided to undertake a study on the stoichiometry and thermodynamics of PPI G4 complex

formation with the selected anti-cancer drug, 5-fluorouracil in an aqueous medium.

PPI dendrimers are terminated with terminal amine groups of cationic nature. Thus, they show high affinity towards biological membranes and facilitate drug transport into the cell [23]. PPI dendrimers, similar to other cationic dendrimers, exhibit certain toxicity [24–26], which can be minimised, however, whilst retaining the desired therapeutic effect [24,27], substituting some of terminal amine groups with sugar moieties [28–30] or polyethylene glycol chains (PEG) [24,31] and moreover in the case of active transport [32] also with folic acid residues [33]. However, functional groups of the basic (unmodified) structure of this polymer still act as centres binding the transported drug in less toxic, substituted PPI dendrimers.

We have selected a fourth generation PPI G4 dendrimer (MW = 7168 Da), the diameter of the macromolecule of which is ca. 2.8 nm [34,35] and which is formed by a diaminobutane (DAB) and by four branches (dendrons). The structure of the PPI G4 macromolecule includes 62 tertiary amine groups ($pK_a = 6.10$) and 64 terminal primary amine groups ($pK_a = 9.75$) [36]. These groups can act as active centres for 5-fluorouracil, bound through hydrogen bonds and electrostatic interactions. Results of computer simulations [36–39] confirm that the structure of the PPI G4 dendrimer is partially open, enabling penetration of smaller ligand molecules under the surface of this macromolecule.

The ligand we studied was 5-fluorouracil, pyrimidine antimetabolite used as a highly toxic oncologic drug and an important

^{*} Corresponding authors.

E-mail addresses: adam.buczkowski@chemia.uni.lodz.pl (A. Buczkowski), bartlomiej.palecz@chemia.uni.lodz.pl (B. Palecz).

element of chemotherapy in multi-drug regimens [40,41]. Despite numerous side effects, this drug is used in therapy of large intestine cancer [42,43], skin cancer [44,45], breast cancer [46] and head and neck cancer [47]. 5-Fluorouracil has weak acidic properties ($pK_a = 8.13$ [48]). Polar molecules of 5-fluorouracil (dipole moment $\mu = 3.57$ D [49] and $\log P = -1.78$ [49], $\log P = -0.89$ [48]) are moderately soluble in water ($S = 85.1$ mM at 20 °C [50]). In aqueous solution, this drug displays its absorption maximum at 266 nm, $\epsilon = 6920$ M⁻¹ cm⁻¹ [51,52].

The objective of this work was to use static methods (solubility measurements, dialyses, ¹H NMR spectroscopy) and dynamic methods (zeta potential measurements and calorimetric titration) to determine the number of 5-fluorouracil molecules bound by the PPI G4 dendrimer macromolecule, as well as to determine thermodynamic parameters, such as the equilibrium constant, enthalpy and entropy of PPI G4 - FU complex formation in aqueous solutions. The obtained parameters of FU to PPI G4 binding in aqueous medium were compared to the parameters of the FU with PAMAM G4 bond available in the literature.

2. Materials and methods

2.1. Materials

PPI G4 dendrimer (SyMO-Chem, purity ≥97%) with diaminobutane core and 64 primary amine end groups, 5-fluorouracil (Sigma-Aldrich, ≥99%), benzoylated dialysis tubing (MWCO 2 kDa, Sigma-Aldrich), deuterium oxide (Sigma-Aldrich, ≥99.99%), water distilled three times and degassed. All chemicals were of analytical grade and used without further purification.

In this work the uniform generation nomenclature was used to name the generation of studied PPI dendrimer, in accordance with Tomalia and Rookmaker [53] postulate. This kind of generation nomenclature is especially convenient for the comparison purposes between PPI and PAMAM dendrimers, since for the same core and generation of PPI and PAMAM macromolecules the number of terminal functional groups is the same.

2.2. Zeta potential measurement

Stoichiometry of the bond of the PPI G4 with FU complex was determined using the zeta potential technique (Anton Paar, Litesizer 500) at 20 °C. An applied voltage of 100 V was used. 350 μl 10 μM aqueous solution of PPI G4 was titrated, gradually adding a total of 30 μl of 35 mM aqueous solution of 5-fluorouracil. Portions of 0.5 μl of the titrant were added before the end point (EP) of the titration, and 5 μl titrant portions (FU solution) were added after the EP. A minimum of 5 measurements were made per sample.

2.3. Solubility measurements

Solubility of 5-fluorouracil was determined using spectrophotometry (Specord 50, Analytic Jena) in the UV range ($\lambda_{max} = 266$ nm, $\epsilon_{max} = 6920$ M⁻¹ cm⁻¹), in a series of drug-saturated aqueous solutions of the PPI G4 dendrimer with increasing polymer concentrations, from 100 μM to 1000 μM. Samples, 2 ml each, were prepared by dissolving the drug added in excess to the aqueous solution of the dendrimer. The drug was dissolved over a week, at room temperature (20 °C) under light protection. During this time, samples were kept under the protection of the nitrogen atmosphere.

2.4. Equilibrium dialysis

Using the equilibrium dialysis method described in the literature [54–57] (double-compartment Harvard Apparatus Teflon dialyser, USA, compartment volume 500 μl) the equilibrium distribution of FU concentration between the aqueous phase and the 40 μM PPI G4 dendrimer solution was determined. Both dialysed phases were separated

with a semi-permeable membrane with MWCO 2 kDa. The studied solutions were dialysed for 24 h at room temperature (20 °C). The dialysis studies were performed for mixtures with constant dendrimer concentration (40 μM) and increasing drug concentration, up to the molar ratio drug/dendrimer of 490/1.

Thus determined bond isotherm, similar to previous works [54–57], was described with two-parameter, non-linear regression using one active site type model equation [57–59]:

$$b = \frac{Knf}{1 + Kf} \quad (1)$$

where:

- K – equilibrium constant of the ligand-active site complex,
- n – the number of binding sites of the macromolecule,
- b – number of moles of combined ligand per one mole of macromolecule,
- f – concentration of free ligand.

In order to vary the population of active centres of the PPI G4 dendrimer with higher and lower affinity to FU, the equilibrium dialysis results were also described using the two active site types model [59,60]. This method [52,57] uses strong influence of bond parameters with lower ligand affinity (n_2, K_2) on the shape of the graph of the function $b(f)$ and of bond parameters with higher ligand affinity (n_1, K_1) on the shape of the graph of the function $1/b(1/f)$. Calculations of bond parameters are then performed in a cycle of concerted, two-parameter regressions, using eq. 2 to determine parameters of n_2, K_2 and eq. 3 for parameters of n_1, K_1 [52,57,60]:

$$b = \frac{n_1 K_1 f}{1 + K_1 f} + \frac{n_2 K_2 f}{1 + K_2 f} \quad (2)$$

$$\frac{1}{b} = \frac{\left(\frac{1}{f}\right)^2 + (K_1 + K_2)\left(\frac{1}{f}\right) + K_1 K_2}{(n_1 K_1 + n_2 K_2)\left(\frac{1}{f}\right) + K_1 K_2(n_1 + n_2)} \quad (3)$$

where: n_1 – number of active sites bonding the ligand with higher binding constant K_1 and n_2 – number of active sites bonding the ligand with lower binding constant K_2 .

2.5. ¹H NMR spectroscopy

Spectroscopic measurements were supported with recorded ¹H NMR spectra (Bruker Avance III, 600 MHz) for mixtures of 140 μM of the PPI G4 dendrimer with increasing drug concentration (up to the molar ratio drug/dendrimer of 230/1) in D₂O as a medium, at room temperature (20 °C). The volume of every measured sample was 0.5 ml. Changes of positions of dendrimer proton peaks observed in the spectra were described using non-linear regression with a single active site type model equation, analogous to previous works [54,55,61–63]:

$$\Delta\delta = \frac{\Delta\delta_{max}}{2} \left[\left(1 + \frac{l}{nr} + \frac{1}{Knr} \right) - \sqrt{\left(1 + \frac{l}{nr} + \frac{1}{Knr} \right)^2 - \frac{4l}{nr}} \right] \quad (4)$$

where:

- $\Delta\delta$ – difference in the shift of proton of the macromolecule active site after the addition of ligand,
- $\Delta\delta_{max}$ – maximal difference in the shift of proton of the macromolecule active site after the saturation of the macromolecule with ligand,
- l – total ligand (drug) concentration.

2.6. Calorimetric measurements

Measurements of thermal effects of drug interaction with the PPI G4 dendrimer were performed using calorimetric titration (VP-ITC MicroCal, USA) in isothermic conditions (25 °C). 40 μM aqueous solution of PPI G4 (in a 1427 μl cell) was titrated by injecting 95 samples, 3 μl of 20 mM aqueous solution of 5-fluorouracil (using a 287 μl syringe) each. Every injection lasted 15 s. The interval between injections was 600 s. The thermal effect describing direct dendrimer–drug interactions was determined by subtracting the independently determined thermal effects of drug dissolution in water and dilution of the 40 μM PPI G4 solution with water from the thermal effect of mixing aqueous solutions of both compounds. Thus determined thermal effects of the interaction were described using the single active site type model [64], as was the case in previous works [30,54,56,63,65,66], using the Origin MicroCal software attached to the calorimeter.

3. Results

3.1. Zeta potential measurements

The stoichiometry of drug binding to the PPI G4 dendrimer was determined using the zeta potential (ζ) method. The ζ potential of PPI G4 macromolecules was measured by titrating 10 μM aqueous solution of PPI G4 using 35 mM aqueous solution of FU (Fig. 1) as a function of the molar ratio of both components [FU]/[G4]. The titration was finished at a [FU]/[G4] value of 45/1. We have observed that increasing FU concentration in the mixture results in a sharp increase of the measured ζ potential up to the end point (EP) of 12 ± 1 , and the measured ζ potential stabilises after the EP. This indicates that the PPI G4 macromolecule binds approximately 12 molecules of 5-fluorouracil. This process is accompanied by protonation of the amine groups of PPI by FU molecules acting as weak acid.

3.2. Solubility measurements

Spectroscopic measurements of 5-fluorouracil solubility indicate that drug solubility increases approximately linearly with increasing PPI G4 dendrimer concentration in the mixture (Fig. 2). The slope of this function $n = 46 \pm 1$ describes the maximum number of ligand (drug) molecules [65,67] bound to the PPI G4 macromolecule in highly concentrated (saturated) drug solutions.

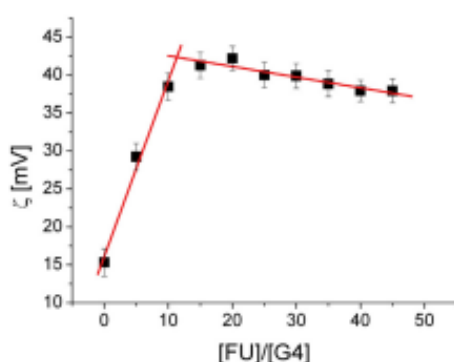


Fig. 1. The ζ potential of PPI G4 macromolecules during titration of 10 μM aqueous solution of PPI G4 using 35 mM aqueous solution of FU at 20 °C. Error bars were expressed as SEM, $N = 5$.

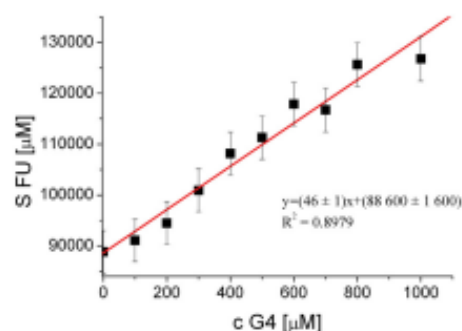


Fig. 2. Solubility of 5-fluorouracil in aqueous solutions of the PPI G4 dendrimer at room temperature. Error bars were expressed as SEM, $N = 5$.

3.3. Equilibrium dialysis

The distribution of FU concentration between water and aqueous 40 μM PPI G4 dendrimer solution determined using the equilibrium dialysis technique was presented as a function of the number of moles of bound drug per one mole of dendrimer macromolecules b and the concentration of free (unbound) drug f (Fig. 3). This isotherm was described using two-parameter, non-linear regression (Eq. 1), calculating (Origin 7.0) the number of active sites in a PPI G4 dendrimer macromolecule $n = 42 \pm 3$ and the binding constant for ligand (FU) binding to the active site $K = 220 \pm 30$ ($R^2 = 0.8819$).

The isotherm describing the results of equilibrium dialyses of FU with PPI G4 was also plotted in a double inversely proportional system [51,52,57] as a function between $1/b$ and $1/f$ (Fig. 4a). The observed deviation from linearity of this function indicates differences between the binding sites of PPI G4, including sites with higher (n_1, K_1) and lower (n_2, K_2) affinity to this drug. Thus, the two active site type model was also used to describe the results of equilibrium dialyses [52,54,57,66]. By performing a cycle of conjugated, two-parameter regressions (Eq. 2 and 3) it was calculated (Origin 7.0), that a PPI G4 macromolecule has $n_1 = 5 \pm 1$ sites strongly binding FU (with a $K_1 = 16,200 \pm 3800$ constant) and $n_2 = 39 \pm 3$ sites with lower affinity to this drug ($K_2 = 130 \pm 20$).

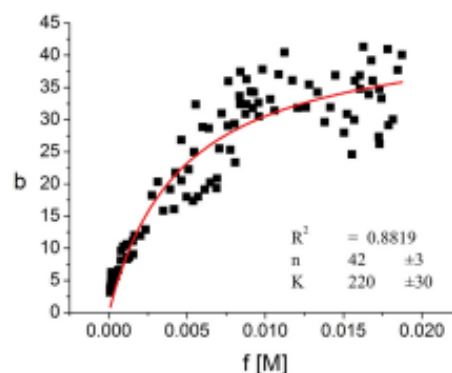


Fig. 3. Isotherm of 5-fluorouracil binding with 40 μM PPI G4 dendrimer in aqueous solution at room temperature, plotted as a function of the (b) parameter describing the molar ratio of bound FU to PPI G4 against free FU concentration (f).

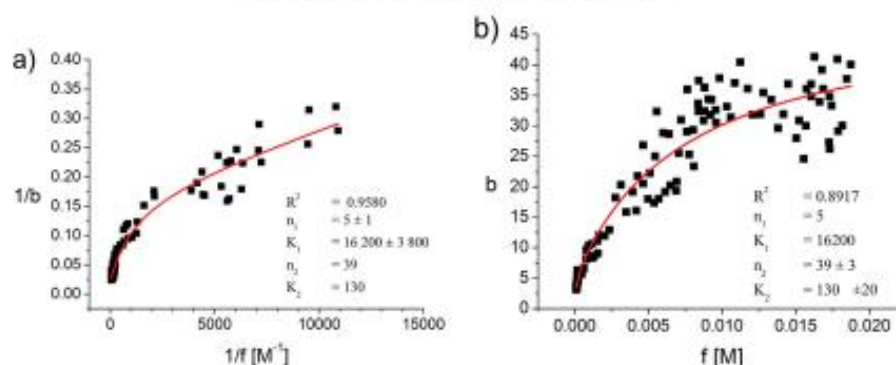


Fig. 4. Isotherm of 5-fluorouracil binding with 40 μM PPI G4 dendrimer in aqueous solution at room temperature, plotted as: A) a function of the $(1/b)$ parameter describing the molar ratio of PPI G4 to bound FU against the inverse concentration of free FU ($1/f$), B) a function of the (b) parameter describing the molar ratio of bound FU to PPI G4 against the free FU concentration (f). Solid lines were calculated using the model of two active site types in a macromolecule and the conjugated, two-parameter regression method.

3.4. ^1H NMR spectroscopy

^1H NMR spectra were recorded (Fig. 5) for the PPI G4 dendrimer at a concentration of 140 μM , as well as for mixtures of PPI G4 (140 μM) with 5-fluorouracil (0.7 mM–32.2 mM) in D_2O . Signals of PPI G4 proton

groups were assigned according to literature values [61,68–70]. Increasing FU concentration in the mixture results in deshielding of H^{C} and H^{A} protons (Fig. 5) present in the close vicinity of surface amine groups. The deshielding effect is more profound for H^{C} protons located closer to the NH_2 group (a 0.28 ppm change) than in the case of further H^{A}

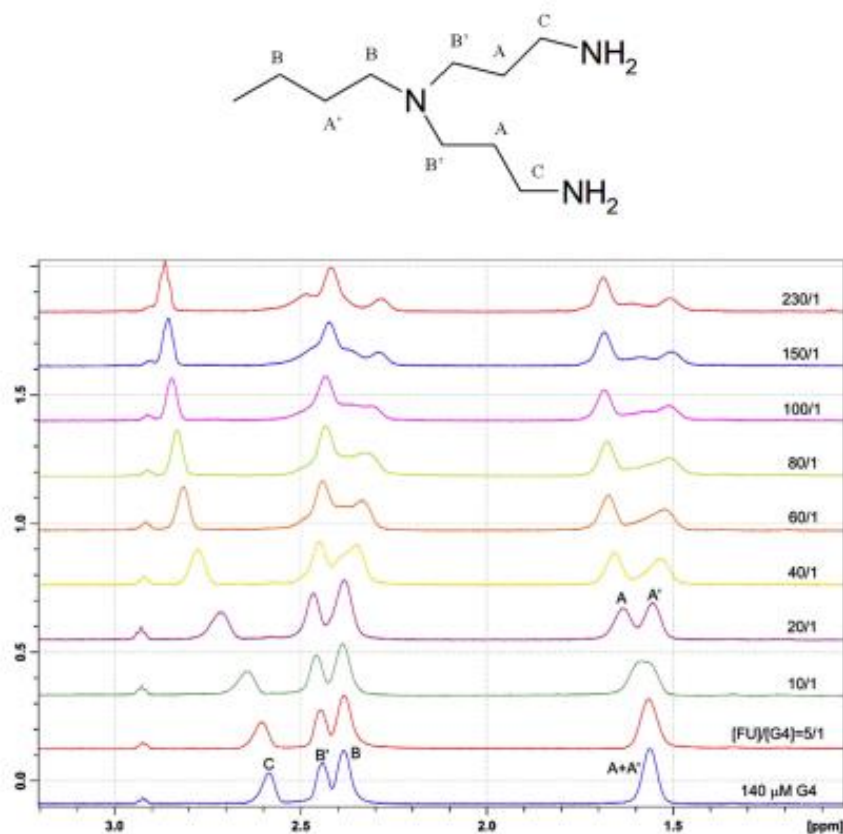


Fig. 5. ^1H NMR spectra of PPI G4 dendrimer (140 μM) and the mixtures of 5-fluorouracil with PPI G4 dendrimer (140 μM) in D_2O within the range of molar ratio $[\text{FU}]/[\text{G4}]$ from 5/1 to 320/1.

protons (0.12 ppm change). This indicates that terminal amine groups of the PPI G4 dendrimer bind FU. The change of chemical shifts of ^1H protons ($\Delta\delta$) as a function of FU concentration in the mixture (I) was described using non-linear regression (Eq. 4), calculating (Origin 7.0) the number of binding sites $n = 35 \pm 5$ and the equilibrium constant $K = 850 \pm 460$ (Fig. 6).

3.5. Calorimetric measurements

The effects of water dilution of the 40 μM PPI G4 solution (in the cell), determined using the isothermal calorimetric titration method are negligibly small within the measurement uncertainty limits (data not shown). Thus, thermal effects describing direct dendrimer–drug interactions were calculated by subtracting independently determined thermal effects of drug dissolution in water from the thermal effect of mixing aqueous solutions of both compounds. Thus calculated thermal effects describing direct dendrimer–drug interactions were described (Origin MicroCal) by multi-parameter, non-linear regression (Fig. 7) using the single active site type model. It was used to calculate the number of active sites $n = 18 \pm 2$, the binding constant $K = 1120 \pm 120$ and enthalpy $\Delta H = -17.0 \pm 2.2 \text{ kcal mol}^{-1}$, entropy $\Delta S = -43 \pm 1 \text{ cal K}^{-1} \text{ mol}^{-1}$ and Gibbs free energy of binding $\Delta G = -4.2 \pm 0.1 \text{ kcal mol}^{-1}$. The results indicate that the process of saturation of PPI G4 dendrimer active centres is spontaneous and accompanied by increased ordering of reagents.

4. Discussion

The parameters of 5-fluorouracil binding to active sites of PPI G4 dendrimer macromolecules determined using spectroscopic, electrochemical and calorimetric methods, as well as binding parameters for PAMAM G4 available in the literature are summarised in Table 1.

The stoichiometric parameter n describing the number of FU molecules bound by the PPI G4 macromolecule determined dynamically by measuring the zeta potential ($n=12$) is lower compared to the value determined statically, by measuring drug solubility ($n=46$). The higher stoichiometry of FU binding to PPI G4 in static conditions compared to dynamic conditions is also confirmed by similar results of equilibrium dialyses ($n = 42$) and ITC titration ($n = 18$). Analogous differences between the methods are also visible in the case of the PAMAM-FU system [63,65,66]. This indicates that in static conditions (longer time of interaction between the components of the studied system) and that at molar excess of the drug in relation to the dendrimer, FU molecules may also be bound by sites with lower affinity towards this drug.

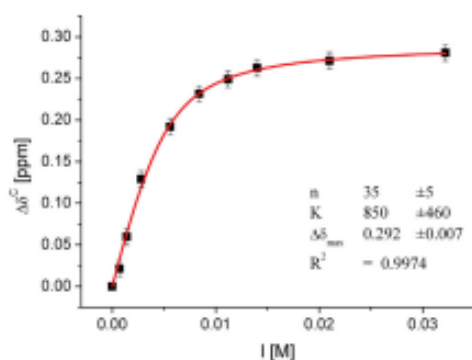


Fig. 6. Dependence of the change in ^1H band shift at -2.6 ppm ($\Delta\delta^C$) on the concentration of 5-fluorouracil (I). Error bars were expressed as SEM, $N = 5$. The solid line was calculated using the single active site type model, using the multi-parameter, non-linear regression method.

The isotherm of FU binding to PPI G4 obtained using the static technique of equilibrium dialyses enables differentiation between the less numerous ($n_1 = 5$) population of dendrimer active sites with higher affinity to this drug ($K_1 = 16,200$), and more numerous active sites ($n_2 = 39$) with weaker binding of this drug ($K_2 = 130$). The studied 40–140 μM aqueous solution of PPI G4 has $\text{pH} = 10.3\text{--}10.9$, at which approximately 10% of the 64 surface amine groups is protonated [71]. Results of ^1H NMR titrations indicate that FU is bound by terminal groups of the PPI G4 dendrimer. The PPI G4 macromolecule most likely binds 5-fluorouracil stronger thanks to electrostatic interactions between protonated, surface amine groups of the dendrimer ($n_1 = 5 \pm 1$) and deprotonated FU molecules of anionic nature. The functional groups of PPI G4 with weaker binding of this drug include unprotonated surface and inner amine groups interacting with neutral FU molecules. Neutral (non-dissociated) FU molecules are bound with PPI G4 internal binding sites by both dipole–dipole and hydrophobic interactions. Binding parameters determined using the ^1H NMR technique ($n = 35 \pm 5$ and $K = 850 \pm 460$), using the change of chemical shifts of protons neighbouring the PPI G4 surface, confirm that also unprotonated, surface amine groups of the dendrimer participate in FU binding. The results of equilibrium dialyses allow a conclusion that the studied PPI G4 dendrimer binds stronger fewer FU molecules ($n_1 = 5$) than the PAMAM G4 dendrimer ($n_1 = 12$), indicating bigger steric hindrance around the active centres of the smaller PPI G4 macromolecule.

Calorimetric measures indicate that the PPI G4 binds 5-fluorouracil spontaneously ($\Delta G < 0$). The constant of FU binding by the PPI G4 dendrimer determined in dynamic conditions (ITC) is higher than that determined in static conditions (equilibrium dialysis), as the longer (several days) interaction time of components of the studied complex under static conditions facilitates full saturation of macromolecules of the studied dendrimer with drug molecules. The binding process is strongly exothermic ($\Delta H < 0$) and accompanied by increased ordering of reagents ($\Delta S < 0$). This confirms that FU binding occurs mainly using the surface amine groups and to a lesser extent with active sites present in niches of the receptor macromolecule. The FU binding entropy differentiates the PPI G4 dendrimer ($\Delta S < 0$) from the PAMAM G4 dendrimer with identical functional groups ($\Delta S > 0$), which is able to bind FU not only on the surface, but also using amide groups present deeper under the surface [52]. Drug binding by the more basic ($\text{p}K_a = 9.75$ [36]) surface amine groups in the simpler structure of PPI G4 determines the >10 times stronger exothermic nature of FU binding compared to PAMAM G4 ($\text{p}K_a = 9\text{--}9.23$ [72,73]). At the same time, the equilibrium constant K of FU binding to PPI G4 calculated according to the single active site type model (for results of dialyses and ITC titration) is lower compared to PAMAM G4 (Table 1), despite the fact that the number of active sites is comparable. This most likely reflects the bigger steric hindrance experienced by the bound FU molecules with smaller PPI G4 macromolecules with diameter 2.8 nm [34,35] compared to the larger PAMAM G4 macromolecules with diameter 4.5–5 nm [74–77]. Another factor decreasing the affinity of PPI G4 to polar FU molecules is the lack of polar amide groups present in the structure of PAMAM class dendrimers.

The impact of phosphate buffer media on ligand binding to PPI G4 macromolecule may be inferred from comparison of determined by ITC technique in the pure aqueous medium thermodynamic binding data of FU to PPI G4 with literature available [78] thermodynamic data for CTP binding with PPI G4 in the phosphate-buffered saline environment (PBS: 10 mM, 137 mM NaCl, 2.7 mM KCl, $\text{pH} 7.4$). Because CTP has negative charge (because of triphosphate group dissociation) its molecule is bound with higher binding constant ($K = 2400$) than FU molecules ($K = 1120$). However, the interaction of CTP with PPI G4 is less exothermic ($\Delta H = -10.8 \text{ kcal mol}^{-1}$ in PBS) than the interactions of FU with PPI G4 dendrimer ($\Delta H = -17.05 \text{ kcal mol}^{-1}$ in pure water). This reduction in exothermic character of CTP compared to FU interactions reflects the buffer counter-ions shielding effect on PPI G4 dendrimer active sites and ligand functional groups.

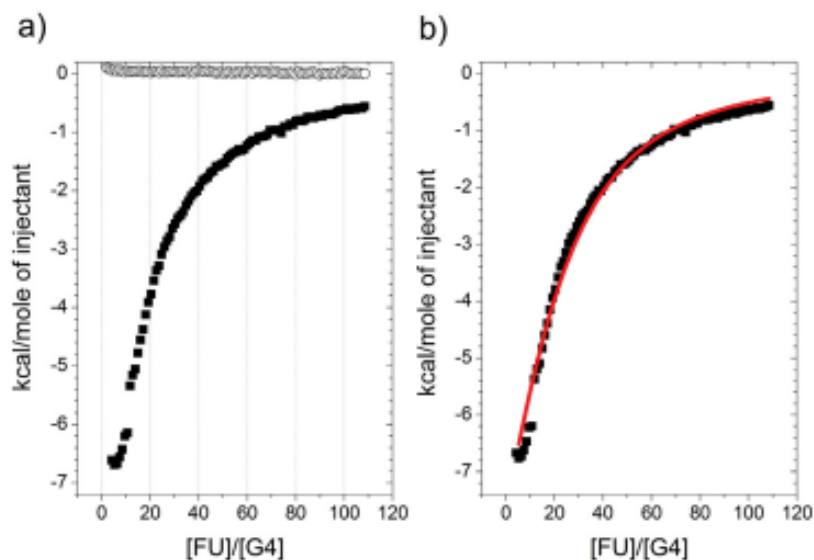


Fig. 7. a) Thermal effect functions: calorimetric titration of 40 μM solution of the PPI G4 dendrimer using 20 mM solution of 5-fluorouracil (■) and dilution of 20 mM drug solution in water (○), b) Direct thermal effect of PPI G4 dendrimer interaction with 5-fluorouracil, described using the single active site type model.

5. Conclusion

Results of measurements performed using dynamic techniques (zeta potential, ITC titration) indicate strong binding of several 5-fluorouracil molecules by PPI G4 macromolecules. Results obtained using static techniques (solubility measurements, equilibrium dialyses) indicate that the PPI G4 dendrimer spontaneously binds ca. 40 FU molecules. The analysis of equilibrium dialysis allows additional differentiation of active sites in PPI G4 macromolecules, binding FU with higher and lower affinity to this drug, respectively. The obtained results

indicate that the studied PPI G4 dendrimer strongly binds $n_1 = 5$ FU molecules (equilibrium dialysis) using terminal amine groups (^1H NMR titration), in accordance with the number of protonated, surface amine groups determined using pH-metry (ca. 6) in PPI G4 macromolecules.

CRediT authorship contribution statement

Adam Buczkowski: Methodology, Software, Writing - original draft, Formal analysis, Writing - review & editing, Conceptualization.

Table 1

Binding parameters of 5-fluorouracil to the active sites of PPI G4 and PAMAM G4 dendrimers determined by various techniques.

						Reference
Zeta potential measurement, $t = 20\text{ }^\circ\text{C}$						
Dendrimer	n					
PPI G4	12 ± 1					
Solubility measurement, $t = 20\text{ }^\circ\text{C}$						
Dendrimer	n					
PPI G4	46 ± 1	(100–1000 μM G4)				[51]
PAMAM G4	75 ± 15	(5–50 μM G4)				
Equilibrium dialysis, $t = 20\text{ }^\circ\text{C}$ (one set of sites)						
Dendrimer	n		K			
PPI G4	42 ± 3		220 ± 30			[66]
PAMAM G4	43 ± 2		420 ± 70			
Equilibrium dialysis, $t = 20\text{ }^\circ\text{C}$ (two sets of sites)						
Dendrimer	n_1	K_1	n_2	K_2		
PPI G4	5 ± 1	$16,200 \pm 3800$	39 ± 3	130 ± 20		[52]
PAMAM G4	12 ± 1	5600 ± 600	37 ± 3	154 ± 37		
^1H NMR spectroscopy, $t = 20\text{ }^\circ\text{C}$						
Dendrimer	n		K			
PPI G4	35 ± 5		850 ± 460			[63]
PAMAM G4	30 ± 10		400 ± 200			
Isothermal titration calorimetry, $t = 25\text{ }^\circ\text{C}$						
Dendrimer	n	K	ΔH [kcal mol $^{-1}$]	ΔS [cal K $^{-1}$ mol $^{-1}$]	ΔG [kcal mol $^{-1}$]	
PPI G4	18 ± 2	1120 ± 120	-17.05 ± 2.2	-43 ± 1	-4.2 ± 0.1	[63]
PAMAM G4	25 ± 3	2800 ± 300	-1.5 ± 0.2	10.7 ± 0.4	-4.7 ± 0.1	

Małgorzata Malinowska-Michalak: Investigation, Validation, Writing - review & editing. **Bayarmaa Erdenebayar:** Visualization. **Bartłomiej Palecz:** Conceptualization, Supervision, Project administration, Writing - review & editing.

Declaration of competing interest

Authors declare no conflict of interest.

Acknowledgments

The authors thank Dr. Paweł Urbaniak for his help in recording and analysis of NMR spectra.

References

- [1] A.P. Dias, S. da Silva Santos, J.V. da Silva, R. Parise-Filho, E. Igne Ferreira, O.E. Seoud, J. Giarolla, Dendrimers in the context of nanomedicine, *Int. J. Pharm.* 573 (2020), e118814, <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2019.118814>.
- [2] D. Kaur, K. Jain, N.K. Mehra, P. Kesharwani, N.K. Jain, A review on comparative study of PPI and PAMAM dendrimers, *J. Nanopart. Res.* 18 (2016) e146, <https://doi.org/10.1007/s11051-016-3423-0>.
- [3] P. Kesharwani, K. Jain, N.K. Jain, Dendrimer as nanocarrier for drug delivery, *Prog. Polym. Sci.* 39 (2014) 268–307, <https://doi.org/10.1016/j.progpolymsci.2013.07.005>.
- [4] M. Ficker, J.F. Petersen, J.S. Hansen, J.B. Christensen, Guest-host chemistry with dendrimers - binding of carboxylates in aqueous solution, *PLoS One* 10 (2015), e0138706, <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0138706>.
- [5] R.V. Araújo, S.D.S. Santos, E. Igne Ferreira, J. Giarolla, New advances in general biomedical applications of PAMAM dendrimers, *Molecules* 23 (2018) e2849, <https://doi.org/10.3390/molecules23112849>.
- [6] K. Tokarczyk, B. Jachimska, Characterization of G4 PAMAM dendrimer complexes with 5-fluorouracil and their interactions with bovine serum albumin, *Colloid. Surface. A* 561 (2019) 357–363, <https://doi.org/10.1016/j.colsurfa.2018.10.080>.
- [7] M. Pawlaczek, G. Schroeder, Adsorption studies of Cu(II) ions on dendrimer-grafted silica-based materials, *J. Mol. Liq.* 281 (2019) 176–185, <https://doi.org/10.1016/j.molliq.2019.02.043>.
- [8] M. Mahalingam, R. Kaliamurthy, A. Kumar, P. Rajakumar, A. Pandurangan, Interfacial charge transport studies and fabrication of high performance DSSC with ethylene grafted unsymmetrical dendrimers as quasi electrolytes, *J. Mol. Liq.* 265 (2018) 717–726, <https://doi.org/10.1016/j.molliq.2018.05.119>.
- [9] R. Tondwal, M. Singh, Effect of increasing alkyl chain of 1st tier dendrimers on binding and release activities of methotrexate drug: an in vitro study, *J. Mol. Liq.* 211 (2015) 466–475, <https://doi.org/10.1016/j.molliq.2015.07.033>.
- [10] B. Palecz, A. Buczkowski, H. Plekarski, Ö. Killincarslan, Thermodynamic interaction between PAMAM G4-NH₂, G4-OH, G3.5-COO₂Na dendrimers and gentamicin in water solutions, *Int. J. Second. Metab.* 3 (2016) 21–26, <https://doi.org/10.21448/ijsm.240699>.
- [11] K. Nagpal, A. Mohanb, S. Thakur, P. Kumar, Dendritic platforms for biomimicry and biotechnological applications, *Artif. Cells. Nanomed. B* 46 (2018) 861–875, <https://doi.org/10.1080/21691401.2018.1438451>.
- [12] D. Maciel, C. Guerrero-Beltrán, R. Ceña-Díez, H. Tomás, M.Á. Muñoz-Fernández, J. Rodrigues, New anionic poly(alkylideneamine) dendrimers as microbicide agents against HIV-1 infection, *Nanoscale* 11 (2019), e9679, <https://doi.org/10.1039/C9NR00303G>.
- [13] F.M. Ariaee, M. Hashemi, S.A. Farzad, K. Abnous, M. Ramezani, Alkyl cross-linked low molecular weight polypropyleneimine dendrimers as efficient gene delivery vectors, *Iran. J. Basic. Med. Sci.* 19 (2016) 1096–1104, <https://doi.org/10.22038/ijbms.2016.7735>.
- [14] O.M. Merkle, M.A. Mintzer, J. Sitterberg, U. Bakowsky, E.E. Simanek, T. Kissel, Triazine dendrimers as nonviral gene delivery systems: effects of molecular structure on biological activity, *Bioconjug. Chem.* 20 (2009) 1799–1806, <https://doi.org/10.1021/bc900243r>.
- [15] X. Liu, P. Rocchi, L. Peng, Dendrimers as non-viral vectors for siRNA delivery, *New J. Chem.* 36 (2012) 256–263, <https://doi.org/10.1039/C1NJ20408D>.
- [16] X. Liu, K. Konob, Functional dendrimer-gold nanoparticle hybrids for biomedical applications, *Polym. Int.* 67 (2018) 840–852, <https://doi.org/10.1002/pi.5583>.
- [17] R. Karthikeyan, P.V. Kumar, O.S. Koushik, Pegylated PPI dendrimer core with ethylene diamine for prolonged release of prednisolone, *J. Nanomed. Nanotechnol.* 7 (2016) e362, <https://doi.org/10.4172/2157-7439.1000362>.
- [18] A.M. Caminade, A. Ouali, R. Laurent, C.O. Turrinah, J.P. Majora, The dendritic effect illustrated with phosphorus dendrimers, *Chem. Soc. Rev.* 44 (2015) 3890–3899, <https://doi.org/10.1039/C4CS00261J>.
- [19] F. Soltani, M. Ramezani, S.A. Farzad, A. Mokhtarzadeh, M. Hashemi, Comparison study of the effect of alkyl-modified and unmodified PAMAM and PPI dendrimers on solubility and antitumor activity of crocetin, *Artif. Cells. Nanomed. Biotechnol.* 45 (2016) 1356–1362, <https://doi.org/10.1080/21691401.2016.1236805>.
- [20] U. Gupta, H.B. Agashe, N.K. Jain, Polypropylene imine dendrimer mediated solubility enhancement: effect of pH and functional groups of hydrophobes, *J. Pharm. Pharm. Sci.* 10 (2007) 358–367 (PMID: 17727799).
- [21] M. Hashemi, S.M. Tabatabai, H. Parhiz, S. Milanizadeh, S.A. Farzad, K. Abnous, M. Ramezani, Gene delivery efficiency and cytotoxicity of heterocyclic amine-modified PAMAM and PPI dendrimers, *Mater. Sci. Eng. C* 61 (2016) 791–800, <https://doi.org/10.1016/j.msec.2016.01.023>.
- [22] L. Qian, X. Yang, Dendrimer films as matrices for electrochemical fabrication of novel gold/palladium bimetallic nanostructures, *Talanta* 74 (2008) 1649–1653, <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2007.10.042>.
- [23] K. Jain, P. Kesharwani, U. Gupta, N.K. Jain, Dendrimer toxicity: let's meet the challenge, *Int. J. Pharm.* 394 (2010) 122–142, <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2010.04.027>.
- [24] S. Somani, P. Laskar, N. Altwajryi, P. Kewcharoenwong, C. Irving, G. Robb, B.S. Pickard, C. Dufès, 2018. PEGylation of polypropyleneimine dendrimers: effects on cytotoxicity, DNA condensation, gene delivery and expression in cancer cells, *Sci. Rep.* 8, e9410, [doi:https://doi.org/10.1038/s41598-018-27400-6](https://doi.org/10.1038/s41598-018-27400-6).
- [25] M. Tamayo-Belda, M. González-Pleiter, G. Pulido-Reyes, K. Martin-Betancor, F. Leganés, R. Rosalb, F. Fernández-Pinas, Mechanism of the toxic action of cationic G5 and G7 PAMAM dendrimers in the cyanobacterium *Anabaena* sp. PCC7120, *Environ. Sci.: Nano* 6 (2019) 863–878, <https://doi.org/10.1039/c8en01409d>.
- [26] M.T. Vu, L.G. Bach, D.C. Nguyen, M.N. Ho, N.H. Nguyen, N.Q. Tran, D.H. Nguyen, K. Nguyen, T.T. Hoang Thi, Modified carboxyl-terminated PAMAM dendrimers as great cytocompatible nano-based drug delivery system, *Int. J. Mol. Sci.* 20 (2019), e2016, <https://doi.org/10.3390/ijms20082016>.
- [27] H.B. Agashe, T. Dutta, M. Garg, N.K. Jain, Investigations on the toxicological profile of functionalized fifth-generation poly(propylene imine) dendrimer, *J. Pharm. Pharmacol.* 58 (2006) 1491–1498, <https://doi.org/10.1211/jpp.58.11.0010>.
- [28] D. Appelhans, B. Klajnert-Maculewicz, A. Janaszewska, J. Lazniewska, B. Voit, Dendritic copolymers based on dendritic polyamine scaffolds: view on their synthetic approaches, characteristics and potential for biomedical applications, *Chem. Soc. Rev.* 44 (2015) 3968–3996, <https://doi.org/10.1039/C4CS00339F>.
- [29] I. Jatzczak-Pawlik, M. Gorzkiewicz, M. Studzian, D. Appelhans, B. Voit, L. Pulaski, B. Klajnert-Maculewicz, Sugar-modified poly(propylene imine) dendrimers stimulate the NF- κ B pathway in a myeloid cell line, *Pharm. Res.* 34 (2017) 136–147, <https://doi.org/10.1007/s11095-016-2049-3>.
- [30] M. Gorzkiewicz, A. Buczkowski, D. Appelhans, B. Voit, L. Pulaski, B. Palecz, B. Klajnert-Maculewicz, Poly(propyleneimine) glycodendrimers non-covalently bind ATP in a pH and salt-dependent manner - model studies for adenosine analogue drug delivery, *Int. J. Pharm.* 544 (2018) 83–90, <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2018.03.063>.
- [31] A. Mahmoudi, M.R. Jaafari, N. Ramezani, L. Gholami, B. Malaekheh-Nikouei, BR2 and CyLoP1 enhance in-vivo SN38 delivery using pegylated PAMAM dendrimers, *Int. J. Pharm.* 564 (2019) 77–89, <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2019.04.037>.
- [32] A. Kaur, K. Jain, N.K. Mehra, N.K. Jain, Development and characterization of surface engineered PPI dendrimers for targeted drug delivery, *Artif. Cells. Nanomed. Biotechnol.* 45 (2017) 414–425, <https://doi.org/10.3109/21691401.2016.1160912>.
- [33] P. Kesharwani, R.K. Tekade, N.K. Jain, Generation dependent safety and efficacy of folic acid conjugated dendrimer based anticancer drug formulations, *Pharm. Res.* 32 (2015) 1438–1450, <https://doi.org/10.1007/s11095-014-1549-2>.
- [34] D.J. Feldheim, C.A. Foss, *Metal Nanoparticles: Synthesis, Characterization, and Applications*, first ed. Marcel Dekker, New York, 2001 (ISBN 9780585404394).
- [35] L.P. Mendes, J. Pan, V.P. Torchilin, Dendrimers as nanocarriers for nucleic acid and drug delivery in cancer therapy, *Molecules* 22 (2017), e1401, <https://doi.org/10.3390/molecules22091401>.
- [36] V. Jain, V. Maiti, P.K. Maiti, P.V. Bharatam, Molecular dynamics simulations of PPI dendrimer-drug complexes, *Soft Matter* 9 (2013) 6482–6496, <https://doi.org/10.1039/C3SM50434D>.
- [37] S. Tripathy, M.K. Das, Dendrimers and their applications as novel drug delivery carriers, *J. Appl. Pharm. Sci.* 3 (2013) 142–149, <https://doi.org/10.7324/JAPS.2013.3924>.
- [38] S. Kavyani, S. Amjad-Iranagh, M. Dadvar, H. Modarres, Hybrid Dendrimers of PPI (core)-PAMAM(shell): a molecular dynamics simulation study, *J. Phys. Chem. B* 120 (2016) 9564–9575, <https://doi.org/10.1021/acs.jpchb.6b05142>.
- [39] S. Choudhary, L. Gupta, S. Rani, K. Dave, U. Gupta, Impact of dendrimers on solubility of hydrophobic drug molecules, *Front. Pharmacol.* 8 (2017) e261, <https://doi.org/10.3389/fphar.2017.00261>.
- [40] C.J. Ma, C.W. Huang, T.K. Chang, H.L. Tsal, W.C. Su, Y.S. Yeh, P.J. Chen, J.Y. Wang, Oncologic outcomes in metastatic colorectal cancer with regorafenib with FOLFOX as a third- or fourth-line setting, *Transl. Oncol.* 12 (2019) 502–512, <https://doi.org/10.1016/j.tranon.2018.12.003>.
- [41] J.H. Park, S.A. Im, J.M. Byun, K.H. Kim, J.S. Kim, I.S. Choi, H.J. Kim, K.H. Lee, T.Y. Kim, S.W. Han, D.Y. Oh, T.Y. Kim, Cyclophosphamide, methotrexate, and 5-fluorouracil as palliative treatment for heavily pretreated patients with metastatic breast cancer: a multicenter retrospective analysis, *J. Breast Cancer* 20 (2017) 347–355, <https://doi.org/10.4048/jbc.2017.20.4.347>.
- [42] E.V. Cutsem, C.H. Köhne, I. Láng, G. Folprecht, M.P. Nowacki, S. Cascinu, I. Shchepotin, J. Maurel, D. Cunningham, S. Tejpar, M. Schlichting, A. Zubeł, I. Celik, P. Rougier, F. Ciardiello, Cetuximab plus irinotecan, fluorouracil, and leucovorin as first-line treatment for metastatic colorectal cancer: updated analysis of overall survival according to tumor KRAS and BRAF mutation status, *J. Clin. Oncol.* 29 (2011) 2011–2019, <https://doi.org/10.1200/JCO.2010.33.5091>.
- [43] Z. Wang, W.P. Dai, Y.S. Zang, Complete response with fluorouracil and irinotecan with a BRAFV600E and EGFR inhibitor in BRAF-mutated metastatic colorectal cancer: a case report, *Oncol. Targets. Ther.* 12 (2019) 443–447, <https://doi.org/10.2147/OTT.S180845>.
- [44] S. Oktay, N. Alemdar, Electrically controlled release of 5-fluorouracil from conductive gelatin methacryloyl-based hydrogels, *J. Appl. Polym. Sci.* 136 (2018), e46914, <https://doi.org/10.1002/app.46914>.

- [45] G.T. Prince, M.C. Cameron, R. Fathi, T. Alkousakis, Topical 5-fluorouracil in dermatologic disease, *Int. J. Dermatol.* 57 (2018) 1259–1264, <https://doi.org/10.1111/ijd.14106>.
- [46] D.A. Cameron, H. Gabra, R.C. Leonard, Continuous 5-fluorouracil in the treatment of breast cancer, *Brit. J. Cancer*, 70 (1994) 120–124, <https://doi.org/10.1038/bjc.1994.259>.
- [47] J. Latchman, A. Guastella, C. Tofthagen, 5-Fluorouracil toxicity and dihydropyrimidine dehydrogenase enzyme: implications for practice, *Clin. J. Oncol. Nurs.* 18 (2014) 581–585, <https://doi.org/10.1188/14.CJON.581-585>.
- [48] B.N. Singh, A quantitative approach to probe the dependence and correlation of food-effect with aqueous solubility, dose/solubility ratio, and partition coefficient (Log P) for orally active drugs administered as immediate-release formulations, *Drug. Develop. Res.* 65 (2005) 55–75, <https://doi.org/10.1002/ddr.20008>.
- [49] D.N. Villanueva-García, N.A. Rangel-Vazquez, J. Kalla, Structural analysis of adsorption processes of 5FU and imiquimod on hydrogels using AMBER/PM3 hybrid model, *Rev. Colomb. Quim.* 47 (2018) 28–35, <https://doi.org/10.15446/rev.colomb.quim.320v47n2.68058>.
- [50] K.B. Sloan, S. Wasdo, U. Ezike-Mkpara, T. Murray, D. Nickels, S. Singh, T. Shanks, J. Tovar, K. Ulmer, R. Waranis, Topical delivery of 5-fluorouracil and 6-mercaptopurine by their alkylcarbonyloxymethyl prodrugs from water: vehicle effects on design of prodrugs, *Pharm. Res.* 20 (2005) 639–645, <https://doi.org/10.1023/A:1023207118209>.
- [51] A. Buczkowski, S. Sekowski, A. Grała, D. Palecz, K. Milowska, P. Urbaniak, T. Gabryelak, H. Plekarski, B. Palecz, Interaction between PAMAM-NH2 G4 dendrimer and 5-fluorouracil in aqueous solution, *Int. J. Pharm.* 408 (2011) 266–270, <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2011.02.014>.
- [52] A. Buczkowski, H. Plekarski, B. Palecz, Stoichiometry and equilibrium constant of the complex of PAMAM-NH2 G4 and 5-fluorouracil, *J. Mol. Liq.* 173 (2012) 8–12, <https://doi.org/10.1016/j.molliq.2012.06.005>.
- [53] D.A. Tomalia, M. Rookmaker, *Polymer Data Handbook*, Oxford University Press, New York, 2009.
- [54] A. Buczkowski, P. Urbaniak, B. Palecz, Interaction between PAMAM-NH2 G4 dendrimer and paracetamol in aqueous solution, *J. Mol. Liq.* 186 (2013) 70–75, <https://doi.org/10.1016/j.molliq.2013.05.021>.
- [55] A. Buczkowski, P. Urbaniak, S. Belica, S. Sekowski, M. Bryszewska, B. Palecz, Formation of complexes between PAMAM-NH2 G4 dendrimer and L- α -tryptophan and L- α -tyrosine in water, *Spectrochim. Acta A* 128 (2014) 647–652, <https://doi.org/10.1016/j.saa.2014.02.174>.
- [56] A. Buczkowski, P. Urbaniak, H. Plekarski, B. Palecz, Spectroscopic and calorimetric studies on the interaction between PAMAM G4-OH and 5-fluorouracil in aqueous solutions, *Spectrochim. Acta A* 171 (2017) 401–405, <https://doi.org/10.1016/j.saa.2016.08.030>.
- [57] M. Gorzkiewicz, A. Buczkowski, B. Palecz, B. Klajnert-Maculewicz, in: C. Demetoz, N. Pippa (Eds.), *Thermodynamics and Biophysics of Biomedical Nanosystems: Applications and Practical Considerations*, Springer Nature, Singapore 2019, pp. 183–243, https://doi.org/10.1007/978-981-13-0889-2_7.
- [58] G. Scatchard, The attractions of proteins for small molecules and ions, *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 51 (1949) 660–672, <https://doi.org/10.1111/j.1749-6632.1949.tb27297.x>.
- [59] L. Soltes, M. Mach, Estimation of drug-protein binding parameters on assuming the validity of thermodynamic equilibrium, *J. Chromatogr. B* 768 (2002) 113–119, [https://doi.org/10.1016/S0378-4347\(01\)00498-4](https://doi.org/10.1016/S0378-4347(01)00498-4).
- [60] S.A. Bobrovnik, Ligand–receptor interaction. Klotz–Hunston problem for two classes of binding sites and its solution, *J. Biochem. Biophys. Meth.* 52 (2002) 135–143, [https://doi.org/10.1016/S0165-022X\(02\)00069-6](https://doi.org/10.1016/S0165-022X(02)00069-6).
- [61] J. Hu, T. Xu, Y. Cheng, NMR insights into dendrimer-based host–guest systems, *Chem. Rev.* 112 (2012) 3856–3891, <https://doi.org/10.1021/cr200333h>.
- [62] L. Fielding, NMR methods for the determination of protein–ligand dissociation constants, *Prog. Nucl. Mag. Res. Sp.* 51 (2007) 219–242, <https://doi.org/10.1016/j.pnmrs.2007.04.001>.
- [63] A. Buczkowski, P. Urbaniak, B. Palecz, Thermochemical and spectroscopic studies on the supramolecular complex of PAMAM-NH2 G4 dendrimer and 5-fluorouracil in aqueous solution, *Int. J. Pharm.* 428 (2012) 178–182, <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2012.03.004>.
- [64] ITC, *Date Analysis in Origin-Tutorial Guide*, MicroCal, Northampton, 2004.
- [65] A. Buczkowski, T. Olesinski, E. Zbicińska, P. Urbaniak, B. Palecz, Spectroscopic and calorimetric studies of formation of the supramolecular complexes of PAMAM G5-NH2 and G5-OH dendrimers with 5-fluorouracil in aqueous solution, *Int. J. Pharm.* 490 (2015) 102–111, <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2015.05.033>.
- [66] A. Buczkowski, D. Waliszewski, P. Urbaniak, B. Palecz, Study of the interactions of PAMAM G3-NH2 and G3-OH dendrimers with 5-fluorouracil in aqueous solutions, *Int. J. Pharm.* 505 (2016) 1–13, <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2016.03.051>.
- [67] W. Yang, Y. Li, Y. Cheng, Q. Wu, L. Wen, T. Xu, Evaluation of phenylbutazone and poly(amidoamine) dendrimers interactions by a combination of solubility, 2D-NOESY NMR, and isothermal titration calorimetry studies, *J. Pharm. Sci.* 98 (2009) 1075–1085, <https://doi.org/10.1002/jps.21519>.
- [68] T. Li, N. Shao, Y. Liu, J. Hu, Y. Wang, L. Zhang, H. Wang, D. Chen, Y. Cheng, Poly(amidoamine) and poly(propyleneimine) dendrimers show distinct binding behaviors with sodium dodecyl sulfate: insights from SAXS and NMR analysis, *J. Phys. Chem. B* 118 (2014) 3074–3084, <https://doi.org/10.1021/jp412680p>.
- [69] M. Wang, X. Gong, J. Hu, Y. Yu, Q. Chen, Y. Cheng, Understanding the binding interactions between dendrimer and 18 common amino acids by NMR techniques, *J. Phys. Chem. B* 115 (2011) 12728–12735, <https://doi.org/10.1021/jp207817f>.
- [70] C. Zhao, Y. Wang, Y. Su, H. Zhang, L. Ding, X. Yan, D. Zhao, N. Shao, X. Ye, Y. Cheng, Inclusion complexes of isoflavones with two commercially available dendrimers: solubility, stability, structures, release behaviors, cytotoxicity, and anti-oxidant activities, *Int. J. Pharm.* 421 (2011) 301–309, <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2011.09.044>.
- [71] D. Cakara, M. Borkovec, Microscopic protonation mechanism of branched polyamines: poly(amidoamine) versus poly(propyleneimine) dendrimers, *Croat. Chem. Acta* 80 (2007) 421–428 (ISSN-0011-1643).
- [72] D. Cakara, J. Kleimann, M. Borkovec, Microscopic protonation equilibria of poly(amidoamine) dendrimers from macroscopic titrations, *Macromolecules* 36 (2003) 4201–4207, <https://doi.org/10.1021/ma300241>.
- [73] Y. Niu, L. Sun, R.M. Crooks, Determination of the intrinsic proton binding constants for poly(amidoamine) dendrimers via potentiometric pH titration, *Macromolecules* 36 (2003) 5725–5731, <https://doi.org/10.1021/ma304276d>.
- [74] J. Li, D. Qin, J.R. Baker, D.A. Tomalia, The characterization of high generation poly(amidoamine) G9 dendrimers by atomic force microscopy, *Macromol. Symp.* 166 (2001) 257–269, [https://doi.org/10.1002/1521-390\(200103\)166:1-257::AID-MASY257-3.0.CO;2-I](https://doi.org/10.1002/1521-390(200103)166:1-257::AID-MASY257-3.0.CO;2-I).
- [75] R.W.J. Scott, D.M. Wilson, R.M. Crooks, Synthesis, characterization and applications of dendrimer-encapsulated nanoparticles, *J. Phys. Chem. B* 109 (2005) 692–704, <https://doi.org/10.1021/jp0469665>.
- [76] Y. Cheng, T. Xu, Solubility of nicotinic acid in polyamidoamine dendrimer solutions, *Eur. J. Med. Chem.* 40 (2005) 1384–1389, <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2005.08.001>.
- [77] M.X. Tang, C.T. Redemann, F.C. Szoka, In vitro gene delivery by degraded polyamidoamine dendrimers, *Bioconjug. Chem.* 7 (1996) 703–714, <https://doi.org/10.1021/bc9600630>.
- [78] A. Szulc, M. Signorelli, A. Schiraldi, D. Appelhans, B. Voit, M. Bryszewska, B. Klajnert-Maculewicz, D. Fessas, Maltose modified poly(propyleneimine) dendrimers as potential carriers of nucleoside analog 5'-triphosphates, *Int. J. Pharm.* 495 (2015) 940–947, <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2015.09.065>.



Calorimetric and spectroscopic studies of interactions of PPI G4 dendrimer with tegafur in aqueous solutions

Adam Buczkowski^{a,*}, Małgorzata Malinowska-Michalak^a, Artur Stepniak^a, Paweł Tokarz^b, Paweł Urbaniak^c, Bartłomiej Palecz^a

^a Unit of Biophysical Chemistry, Department of Physical Chemistry, Faculty of Chemistry, University of Lodz, Pomorska 165, Lodz 90-236, Poland

^b Molecular Spectroscopy Laboratory, Department of Organic Chemistry, Faculty of Chemistry, University of Lodz, Tamka 12, Lodz 91-403, Poland

^c Department of Inorganic and Analytical Chemistry, Faculty of Chemistry, University of Lodz, 12 Tamka St., 91-403 Lodz, Poland

ARTICLE INFO

Article history:

Received 13 October 2020

Revised 30 March 2021

Accepted 5 April 2021

Keywords:

PPI G4 dendrimer
Amino-terminated macromolecule
Tegafur
Isothermal titration calorimetry
Equilibrium dialysis, solubility measurements

ABSTRACT

Tegafur (TF) is a 5-fluorouracil (FU) derivative used in cancer therapy with the hydrogen atom substituted by a tetrahydrofuran ring. The results of solubility measurements, equilibrium dialysis, ¹H NMR titration and isothermal calorimetric titration (ITC) indicate that the surface of a PPI G4 macromolecule binds approximately 30 TF particles with the constant $\log K = 2.7$ in an exothermic and thermodynamically spontaneous fashion in an aqueous environment at room temperature. The comparison of obtained parameters of TF binding by PPI G4 dendrimer with the literature data describing FU binding by PPI G4 dendrimer allowed to draw conclusions regarding the influence of hydrophobic tetrahydrofuran ring in the TF molecule on the stoichiometry, affinity and thermodynamics of the ligand binding by PPI G4 macromolecule in an aqueous medium.

© 2021 Elsevier B.V. All rights reserved.

1. Introduction

Poly(propyleneimine) dendrimers (PPI) are cationic in aqueous solutions and can bind polar and anionic ligands [1–6], including highly toxic anticancer drugs [7–10]. Similarly to other cationic dendrimers, PPI dendrimers also disturb the equilibrium of biological membranes [11,12], which, on one hand, enables the intracellular transport of the drug but, at the same time, is responsible for the intrinsic toxicity of carrier macromolecules.

Numerous functional groups on the surface of PPI dendrimer macromolecules allow for complex modification of the basic PPI layout and for providing it with the desired biological properties [13–15]. The substitution of terminal functional groups of PPI macromolecules with amino acid residues, sugars and PEG polymers reduces the intrinsic toxicity of PPI dendrimers and allows to utilize them as supramolecular drug carriers in the body [16–20]. Additionally, such systems can be substituted with groups actively directing the carrier to its designated target site (diseased tissue) and with groups acting as medical contrasts [21] enabling real-time observation of the drug distribution in the patient's body.

In practice, designing a carrier containing a PPI backbone involves avoiding of substitution of all surface groups in order to preserve the ligand-binding ability of macromolecules and the potential of the carrier to penetrate through biological membranes. Therefore, thermodynamic studies of interactions of model (unsubstituted) PPI macromolecules with their ligands are important to understand the behavior of more complex carrier systems.

For the research purposes we have selected a fourth generation PPI G4 dendrimer with a diaminobutane core (DAB). The ligand-binding capacity of PPI G4 macromolecules (MW = 7168 Da) is confirmed in the literature [22,23], and includes 5-fluorouracil [24]. These macromolecules contain 62 tertiary amine groups ($pK_a = 7.95 - 9.66$ [25], 6.10 [26]) and 64 terminal primary amine groups ($pK_a = 9.56$ [25], 9.75 [26]). These groups can bind polar ligand molecules through hydrogen bonds and electrostatic interactions.

We have selected tegafur (TF, Fig. 1a) as ligand for PPI G4 dendrimer in aqueous solutions. Tegafur (also referred to as ftorafur, 5-fluoro-1-(oxolan-2-yl)pyrimidine-2,4-dione or 5-fluoro-1-(tetrahydro-2-furyl)uracil) may be considered a less toxic 5-fluorouracil derivative (FU, Fig. 1b), in which an aliphatic tetrahydrofuran ring is substituted in N1 position. While FU does not have a chiral center, tegafur contains one asymmetric carbon at the 2' position in the tetrahydrofuran ring and has two enantiomers (R- and S-) [27,28]. However, the treatment of stomach, neck and colorectal

* Corresponding author.

E-mail address: adam.buczkowski@chemia.uni.lodz.pl (A. Buczkowski).

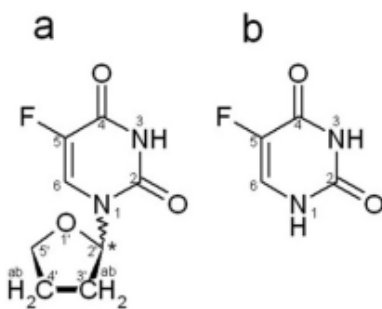


Fig. 1. Structure of: a) tegafur, b) 5-fluorouracil.

cancers involves the use of racemic tegafur, as one of the drugs administered during therapy [29–33]. After administration, the tegafur acts as a prodrug, which is metabolized to 5-fluorouracil. The *n*-octanol/water partition coefficient of tegafur $P = 0.33 \pm 0.01$ [34], 0.54 [35] indicates that in a neutral form this compound is more hydrophobic comparing to 5-fluorouracil ($P = 0.11 \pm 0.01$ [34], 0.13 [35]). In a primary solvate shell of tegafur water molecules interact more strongly with the 5-fluorouracil part than with the tetrahydrofuran substituent [36]. The protonation constant of tegafur $pK_a = 7.6$ [37] 8.08 [38] indicates that this compound is a weak acid, as is 5-fluorouracil ($pK_a = 8.1$ [36], 8.13 [39]). The solubility of tegafur in water ($S = 83.9$ mM [37], 116.4 mM [40]) is comparable to the solubility of 5-fluorouracil ($S = 85.1$ mM [41]). There have also been studies regarding the use of cyclodextrins [42], chitosan [43,44], molecularly imprinted polymers [45,46] and graphene nanosheets [30,47–49], as supramolecular receptors for tegafur molecules.

The motivation of our investigation was to provide thermodynamic characteristic of binding drug with stated anticancer action (tegafur) to macromolecule of PPI G4 dendrimer. The aim of this work was to determine the number of tegafur molecules (in the form of racemate used in therapy) bound by the PPI G4 dendrimer macromolecule, and to establish thermodynamic parameters characterizing the formation of PPI G4 complex with TF in aqueous solutions: equilibrium constant of complex formation K , and enthalpy ΔH and entropy ΔS of ligand binding by the active site of PPI G4 macromolecule. The obtained binding parameters of TF to PPI G4 in aqueous medium were compared with the binding parameters of 5-fluorouracil to PPI G4 dendrimer available in the literature.

2. Materials and methods

2.1. Materials

PPI G4 dendrimer (SyMO-Chem, purity $\geq 97\%$) with diaminobutane core and 64 primary amine end groups, racemic tegafur (TCI, $\geq 98.0\%$), benzoylated dialysis tubing (MWCO 2 kDa, Sigma-Aldrich), deuterium oxide (Sigma-Aldrich, $\geq 99.99\%$), water distilled three times and degassed. All chemicals were of analytical grade and used without further purification.

2.2. Solubility measurements

The solubility of TF was determined spectrophotometrically (Specord 50, Analytic Jena) in the UV range ($\lambda_{\max} = 272$ nm, $\epsilon_{\max} = 8500 \pm 50$ M $^{-1}$ cm $^{-1}$). Excess crystalline tegafur was added to 2 ml eppendorf tubes containing aqueous solutions of PPI G4 dendrimer with increasing concentrations from 100 μ M to 1000 μ M.

The prepared solutions were thermostated for a week in the dark at room temperature (20 °C) in a protective atmosphere (N $_2$). For each composition tested the experiment was repeated ($N = 5$) and the mean value was calculated.

2.3. Equilibrium dialysis

The equilibrium dialysis study of the TF concentration distribution between the aqueous phase and the aqueous 40 μ M PPI G4 dendrimer solution was performed using a teflon dialyzer (Harvard Apparatus, USA) containing two dialysis chambers with a volume of 500 μ l each. The dialyzer chambers were separated by a semi-permeable membrane with a 2 kDa MWCO. The dendrimer concentration (in the first chamber) was constant at 40 μ M for all tested compositions. The initial TF ligand concentration (identical in the first and the second chamber) increased in subsequent test compositions from a TF to PPI G4 molar ratio equal to 4/1 up to 420/1. The dialysis for a given initial composition was carried out for 24 h at room temperature (20 °C). Subsequently, the TF concentration in both phases was determined spectroscopically ($\lambda_{\max} = 272$ nm, $\epsilon_{\max} = 8500$ M $^{-1}$ cm $^{-1}$).

Similarly to previous reports [50–53] the concentration of the bound ligand c was calculated as the equilibrium difference of ligand concentrations in both phases and converted to the binding intensity $b = c/r$, where r – dendrimer concentration. The concentration of unbound ligand f is equal to the concentration of ligand in the aqueous phase (without PPI G4).

The curve of the dependence of b on f in the whole range of test compositions was described by the one type of active site model with a two-parameter non-linear regression using the equation [53–55]:

$$b = \frac{Knf}{1 + Knf} \quad (1)$$

where: K – equilibrium constant of the ligand-active site complex, n – the number of binding sites of the macromolecule, b – number of moles of combined ligand per one mole of macromolecule, f – concentration of free ligand.

The Eq. (1) can be transformed into a form:

$$\frac{1}{b} = \frac{1}{Kn} \cdot \frac{1}{f} + \frac{1}{n} \quad (2)$$

According to Eq. (2), the rectilinear course of the dependence curve of $1/b$ vs. $1/f$ indicates that the macromolecule (in the studied range of compositions) has one type of active sites.

2.4. 1H NMR spectroscopy

The interactions of PPI G4 dendrimer with tegafur have also been studied using 1H NMR (Bruker Avance III, 600 MHz) in heavy water as a solvent at room temperature (20 °C). Spectra of mixtures with constant PPI G4 dendrimer concentration (140 μ M) and increasing TF concentration were recorded. The molar ratio of the drug (TF) to dendrimer ranged from 5/1 to 230/1. For each composition tested the experiment was repeated ($N = 5$) and the mean value was calculated.

Changes in the position of dendrimer proton peaks observed in the spectra are described by a non-linear regression using the equation for the one type of active sites model [50,51,56–59]:

$$\Delta\delta = \frac{\Delta\delta_{\max}}{2} \left[\left(1 + \frac{l}{nr} + \frac{1}{Knr} \right) - \sqrt{\left(1 + \frac{l}{nr} + \frac{1}{Knr} \right)^2 - \frac{4l}{nr}} \right] \quad (3)$$

where: $\Delta\delta$ – difference in the shift of proton of the macromolecule active site after the addition of ligand, $\Delta\delta_{\max}$ – maximal difference in

the shift of proton of the macromolecule active site after the saturation of the macromolecule with ligand, l – total ligand (drug) concentration.

2.5. ^1H – ^1H NOESY spectroscopy

The ^1H – ^1H NOESY spectra of the mixture of 80 μM dendrimer PPI G4 and 3200 μM tegafur was recorded in heavy water. The molar ratio of tegafur to dendrimer was 40/1. NOESY experiments were obtained for dendrimer PPI G4 with tegafur complex solutions at 600.26 MHz with a standard mixing time of 300 ms and 9.40 μs ^1H 90° pulse width. The relaxation delay and acquisition time were set at 2.00 s and 142 ms, respectively. Sixteen transients were averaged for each 256 \times 2048 complex t_1 increments. The data were processed with Lorentz–Gauss window function and zero filling in both dimensions to display data on a 2048 \times 2048 2D matrix. The experiment was carried out at 294.0 K. All data were processed with Bruker Topspin 4.05 software.

2.6. Diffusion NMR

The DOSY ^1H NMR spectrum of 1600 μM tegafur solution as well as the 1600 μM tegafur mixtures with 80 μM PPI G4 dendrimer in heavy water were recorded (Bruker Avance III, 600 MHz) at 294.0 K (VT-regulated) with 8192 time domain points, using the ledbpgp2s pulse program (Bruker Topspin). The molar ratio of tegafur to dendrimer was 20/1. For all recorded spectra the gradient was incremented in 64 steps from 2% to 95%. The DOSY maps were generated by the built-in Topspin routines with linear F1 scale. The values of diffusion coefficient were calculated as the positions of the maxima of the F1 dimension projections or the centers of the DOSY map contours of all distinguishable signals.

2.7. Calorimetric measurements

Calorimetric measurements of the interaction of tegafur (TF) with PPI G4 dendrimer were performed using the calorimetric titration technique (VP-ITC MicroCal, USA) under isothermal conditions (25 °C). A 10 μM aqueous solution of PPI G4 dendrimer (cell volume 1427 μl) was titrated by injecting 95 3- μl portions of 5 mM aqueous solution of tegafur. The duration of each injection was 15 s. The time between successive injections was 800 s.

The thermal effect of a direct PPI G4-TF interaction was calculated by subtracting the independently determined thermal effect of TF dilution in water from the effect of titration of aqueous solutions of both compounds. The thermal effect of diluting 10 μM PPI G4 solution with water was negligibly small comparing to other measured effects. The enthalpogram representing direct interactions of both compounds was then described with the one type of active sites model using Origin MicroCal 7.0 [60].

3. Results

3.1. Solubility measurements

Spectroscopic measurements of tegafur solubility in PPI G4 dendrimer aqueous solutions indicate that the solubility of this drug increases approximately linearly with increasing concentration of PPI G4 in the mixture (Fig. 2). The directional coefficient of this relationship $n = 63 \pm 2$ describes the maximum number of tegafur molecules saturating the PPI G4 macromolecule under conditions of a large (saturated solution) excess of ligand to dendrimer.

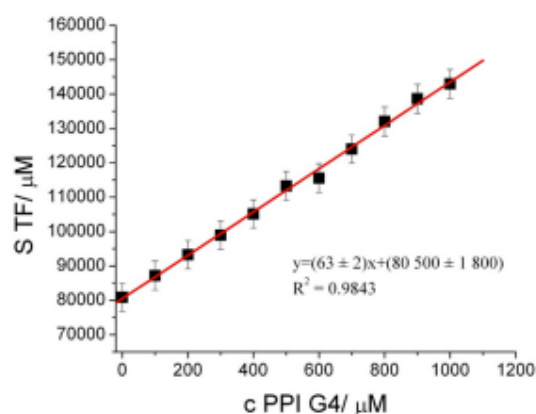


Fig. 2. Solubility of tegafur in aqueous solutions of the PPI G4 dendrimer at room temperature. Error bars were expressed as SEM, $N = 5$.

3.2. Equilibrium dialysis

The isotherm of TF binding between aqueous phase and aqueous 40 μM solution of PPI G4 dendrimer was determined using equilibrium dialysis technique and is presented as the dependence of intensity b on the concentration of free (unbound) drug f (Fig. 3a). This isotherm, also presented in a form of $1/b$ vs. $1/f$ (Fig. 3b), follows a rectilinear course indicating that PPI G4 macromolecule meets the assumptions of the one type of active sites model in the test range of compositions. In order to calculate the parameters of TF binding to the PPI G4 macromolecule, the b vs f isotherm was described by hyperbolic equation (Eq. (1)) of one type of active sites model. The calculations were performed in Origin 7.0 using a two-parameter non-linear regression, determining (Fig. 3a) the number of active sites in the PPI G4 dendrimer macromolecule $n = 27 \pm 3$ and the constant of ligand (TF) binding to the active site $K = 460 \pm 80$ ($R^2 = 0.8608$).

3.3. ^1H NMR spectroscopy

The interactions of PPI G4 macromolecules with tegafur have also been studied using ^1H NMR technique in heavy water at 20 °C. Signals of PPI G4 dendrimer proton groups (Figs. 4 and 5) occur in the range from 1.2 ppm to 2.9 ppm [61,62]. Also visible in this range (1.9–2.3 ppm [17,63]) are four partially overlapping multiplets of aliphatic protons of tegafur (H^{3a} , H^{3b} , H^{4a} , H^{4b}) from methylene groups (positions C3' and C4') of the tetrahydrofuran ring (Fig. 1a).

In mixtures of both test compounds with a constant concentration of the PPI G4 dendrimer (140 μM) and a concentration ratio of tegafur to PPI G4 increasing from 5/1 to 230/1, observed is a stronger downfield change of H^c proton signal ($\Delta\delta \text{H}^c = 0.28$ ppm for threshold compositions) from the dendrimer methylene groups in position α relative to the terminal amine groups, as compared to signal deshielding of H^a protons ($\Delta\delta \text{H}^a = 0.14$ ppm for threshold compositions) from the dendrimer methylene groups in position β relative to the terminal amine groups (Fig. 5). This indicates that TF molecules bind to the surface layer of PPI G4 macromolecule mers in the test range of compositions.

In order to calculate the stoichiometry and the binding constant of TF by PPI G4 the chemical shifts of H^c protons were selected, since they are more strongly deshielded with increasing TF concentration than signals of other proton groups of the dendrimer. The change of chemical shift of H^c protons of PPI G4 dendrimer

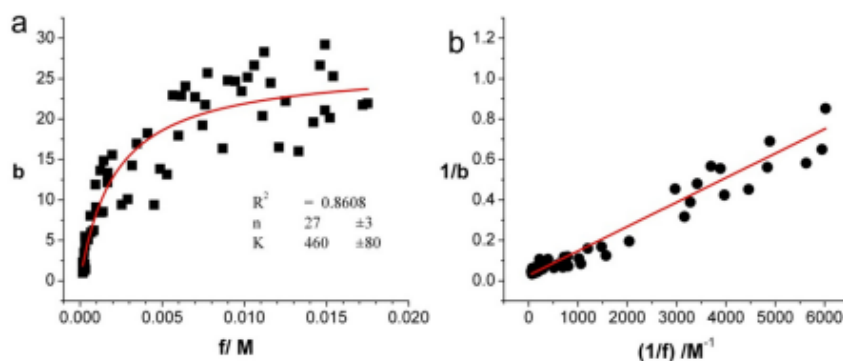


Fig. 3. The binding isotherm of tegafur (TF) with 40 μ M PPI G4 dendrimer in aqueous solution at 20 °C plotted as: a) the dependence of the parameter (b) describing the molar ratio of TF bound to PPI G4 vs. the concentration of free TF (f). b) the dependence of the parameter ($1/b$) describing the molar ratio of PPI G4 bound to TF vs. the inverse concentration of the free TF ($1/f$).

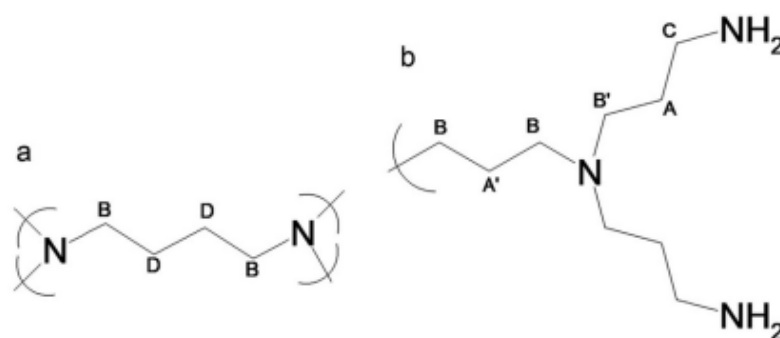


Fig. 4. Proton labelling in the PPI dendrimer structure of: a) core, b) fragment of branch (dendron).

interacting with TF ($\Delta\delta$) was calculated by subtracting the value of shift of this signal in a PPI G4 solution (without TF) from the value of chemical shift of this signal in the mixture with a given composition. The so-calculated $\Delta\delta$ shifts of H^C protons as a function of tegafur concentration (I) in the mixture were described by non-linear regression method (Eq. (3)). The performed calculations (Origin 7.0) indicate that PPI G4 macromolecule binds $n = 30 \pm 8$ TF molecules with the equilibrium constant $K = 940 \pm 470$ (Fig. 6).

3.4. 1H - 1H NOESY spectroscopy

The 1H - 1H NOESY spectrum of PPI G4 dendrimer and tegafur solution recorded in heavy water is shown in Fig. 7. The NOESY experiment allows one to establish correlations between nuclei which are physically close within 5 Å of each other for spatial [64].

Analyzing the spectrum one can notice cross-peaks between tegafur and PPI G4 (Fig. 7) which show that both aromatic 5-fluorouracil ring (correlations: H^6 with $H^{B,C}$) and tetrahydrofuran ring (correlations: H^2 with $H^{B,B'}$ and H^5 with H^A) of tegafur molecule are physically close to PPI G4 dendrimer terminal layer of mers. These cross peaks in NOESY spectrum confirm that tegafur and PPI G4 are engaged in supramolecular interactions.

3.5. Diffusion NMR

To further study the formation of supramolecular complexes between PPI G4 macromolecules and tegafur in heavy water environment, the DOSY 1H NMR spectra of 1600 μ M tegafur solution as

well as the 1600 μ M tegafur mixtures with 80 μ M PPI G4 dendrimer in heavy water were recorded (Fig. 8).

The determined diffusion coefficient of 1600 μ M tegafur in solution with 80 μ M PPI G4 dendrimer ($D = 0.5 \cdot 10^{-9} \text{ m}^2 \text{ s}^{-1}$) is lower than diffusion coefficient of this drug (1600 μ M) in solution without dendrimer ($D = 0.6 \cdot 10^{-9} \text{ m}^2 \text{ s}^{-1}$) which reflects the formation of supramolecular complex between tegafur and PPI G4 dendrimer.

3.6. Calorimetric measurements

The thermal effects of titration of 10 μ M PPI G4 dendrimer solution with 5 mM TF solution were determined using the isothermal calorimetric titration technique. The effects of TF dilution in water were subtracted from the corresponding thermal effects of the titration (Fig. 9a). The obtained enthalpogram (Fig. 9b) showing the effects of direct interaction of both compounds was described with the one type of active sites model using Origin MicroCal 7.0 software to calculate the binding parameters. Apart from analysing the enthalpogram using one set of sites (with three fitting parameters: n , K and ΔH), we also tried to use the model of two sets of sites (with six fitting parameters n_1 , K_1 , ΔH_1 , n_2 , K_2 and ΔH_2). Unfortunately no convergence of fitting parameters was then obtained. So the calculation was performed for the case of the one type of active sites model. The results of calculations using non-linear multi-parameter regression (Fig. 9b) for one type of active sites in PPI G4 macromolecule indicate that under dynamic conditions of calorimetric titration the PPI G4 macromolecule

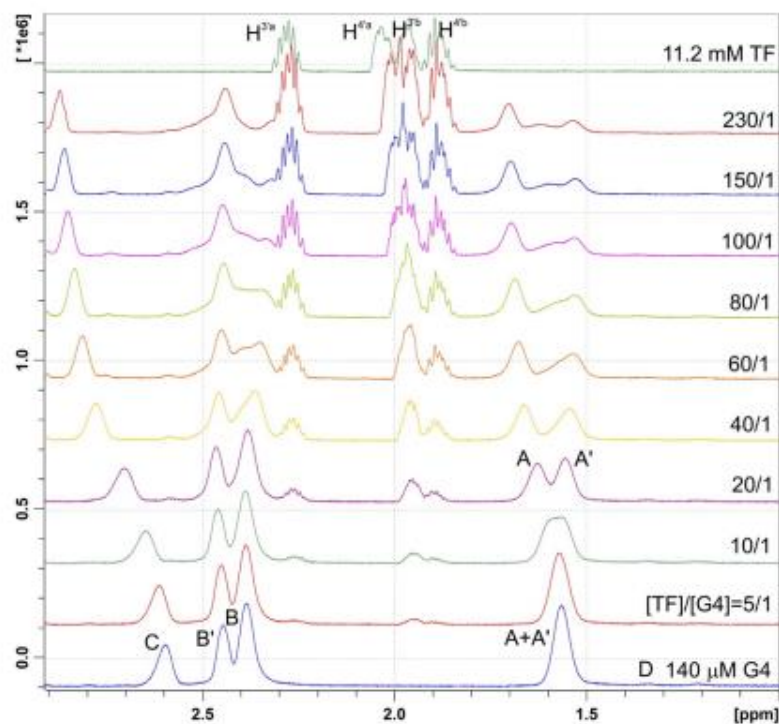


Fig. 5. ^1H NMR spectra in D_2O (from bottom to top) of: PPI G4 dendrimer ($140\ \mu\text{M}$), the mixtures of tegafur with PPI G4 dendrimer ($140\ \mu\text{M}$) within the range of molar ratio $[\text{TF}]/[\text{G4}]$ from 5/1 to 320/1 and tegafur ($11.2\ \text{mM}$).

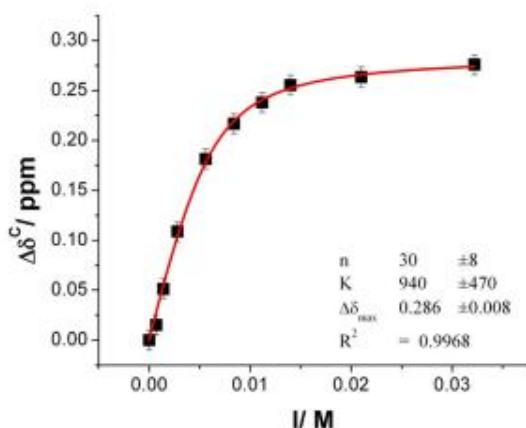


Fig. 6. Dependence of the change in H^c band shift at $\sim 2.6\ \text{ppm}$ ($\Delta\delta^c$) on the concentration of tegafur (I). Error bars were expressed as SEM, $N = 5$. The solid line was calculated using the single active site type model, using the multi-parameter, non-linear regression method.

binds $n = 10 \pm 2$ TF molecules with a binding constant $K = 7300 \pm 1200\ \text{M}^{-1}$. The enthalpy of TF binding to the active site of PPI G4 macromolecule is $\Delta H = -14.2 \pm 1.2\ \text{kcal mol}^{-1}$, the binding entropy is $\Delta S = -30 \pm 2\ \text{cal K}^{-1}\ \text{mol}^{-1}$, while the free energy of binding is $\Delta G = -5.3 \pm 0.1\ \text{kcal mol}^{-1}$. These parameters indicate that the binding process of TF molecules to active sites of PPI G4

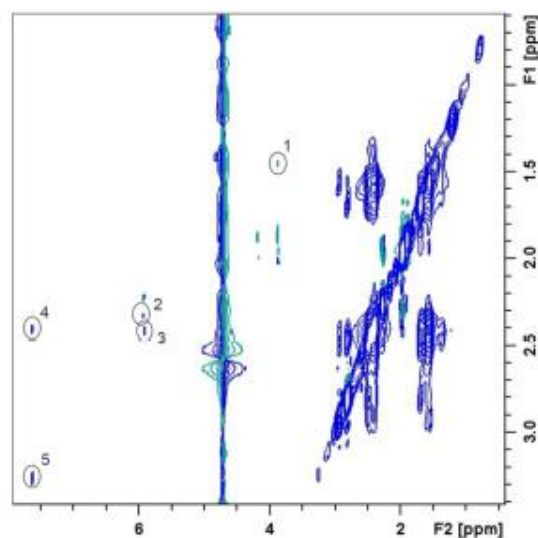


Fig. 7. ^1H - ^1H NOESY spectrum of the mixture of $80\ \mu\text{M}$ PPI G4 dendrimer and $3200\ \mu\text{M}$ tegafur in heavy water. Circles denote tegafur with PPI G4 correlations: (1) $3.8\ \text{ppm} - 1.5\ \text{ppm}$ (H^2, H^8), (2) $5.9\ \text{ppm} - 2.3\ \text{ppm}$ (H^2, H^8), (3) $5.9\ \text{ppm} - 2.4\ \text{ppm}$ (H^2, H^8), (4) $7.6\ \text{ppm} - 2.4\ \text{ppm}$ (H^6, H^8) and (5) $7.6\ \text{ppm} - 3.2\ \text{ppm}$ (H^6, H^c).

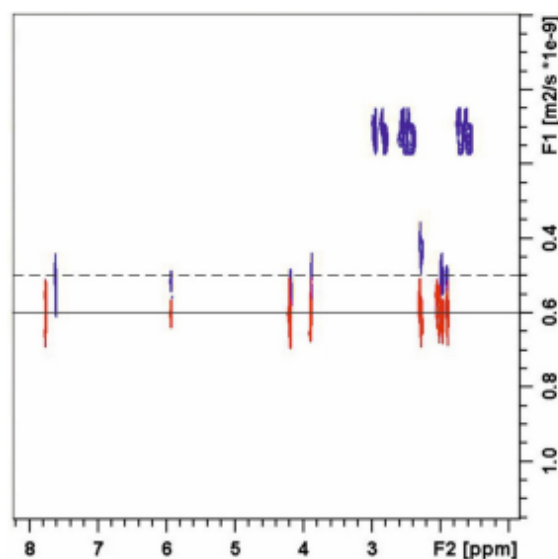


Fig. 8. DOSY ^1H NMR spectra of 1600 μM tegafur and the mixture of 1600 μM tegafur with 80 μM PPI G4 dendrimer in D_2O at 20 $^\circ\text{C}$. Solid line (–) represents tegafur diffusion coefficient in solution without dendrimer whereas dash line (---) represents tegafur diffusion coefficient in solution with PPI G4 dendrimer.

dendrimer is spontaneous, exothermic and is accompanied by an increasing order of reagents.

4. Discussion

The spectroscopically and calorimetrically determined parameters of binding of PPI G4 dendrimer macromolecules to tegafur have been summarized in Table 1. For comparison, this table also includes the parameters of binding of PPI G4 to 5-fluorouracil available in the literature.

The number of tegafur molecules (TF) bound by PPI G4 macromolecules ($n = 63 \pm 2$) determined using solubility measurements is higher comparing to the values determined by other techniques.

Under conditions of large TF excess (saturated solution), as compared to PPI G4, and a long saturation time (one week), the ligand molecules (TF) bind not only to the surface functional groups (active sites) of the carrier macromolecule (PPI G4) in solution. The drug molecules also substitutes intramolecular functional groups (tertiary amino groups acting as active sites and hydrophobically interacting propylene groups) of the PPI G4 dendrimer macromolecule. A steeper increase in TF solubility ($n = 63 \pm 2$), comparing to FU ($n = 46 \pm 1$) indicates, however, that a hydrophobic tetrahydrofuran substituent in a TF molecule favors drug interactions probably through hydrophobic interactions with propylene fragments of the PPI structure.

The stoichiometric parameter n determined by equilibrium dialysis and ^1H NMR titration (Table 1) indicates that PPI G4 macromolecules bind fewer of the large TF molecules, comparing to 5-fluorouracil (FU). This probably reflects the effect of the steric hindrance of larger TF molecules, of which a fewer number can fit on the surface of PPI G4 macromolecules. The surface mechanism of TF binding by PPI G4 is confirmed by ^1H NMR spectra (Fig. 5) of mixtures with a constant concentration of PPI G4 and increasing concentration of TF, in which signals of protons (H^α) located at carbon α relatively to terminal amine groups of dendrimer are strong downfield. The ^1H – ^1H NOESY cross-peaks between PPI G4 dendrimer protons and tegafur protons confirm proximity between the drug molecule and dendrimer terminal layer of mers. Lower value of tegafur diffusion coefficient in solution with PPI G4 dendrimer than in solution without PPI G4 also confirms the binding interaction between tegafur and the PPI G4 macromolecule.

The equilibrium constants K of TF binding to the active site of the PPI G4 macromolecule determined by equilibrium dialysis and ^1H NMR titration techniques (Table 1) are similar within the limits of measurement uncertainty. The binding constants K determined by these techniques consistently indicate a higher affinity of TF molecules to PPI G4 active sites, as compared to FU molecules. The substitution of the hydrogen atom (in position 1) in the FU molecule with the hydrophobic tetrahydrofuran ring allows TF molecules for additional hydrophobic interactions with propylene groups of PPI G4 macromolecules. The possibility of participation of the TF pyrimidine ring in hydrogen bonds and electrostatic interactions with PPI G4 amine groups is then preserved, as in the case of FU binding by this dendrimer.

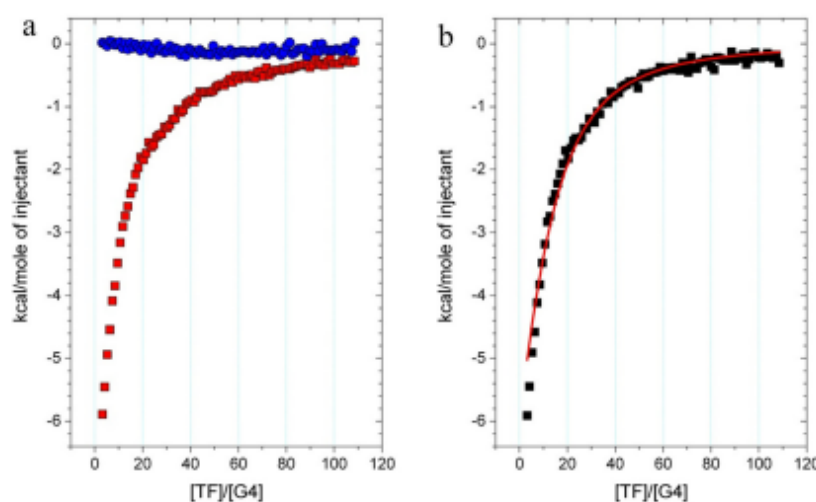


Fig. 9. a) The dependence of thermal effects: calorimetric titration of 10 μM PPI G4 dendrimer solution with 5 mM tegafur solution (■) and dilution of 5 mM drug solution in water (○) at 25 $^\circ\text{C}$, b) Direct thermal effect of interaction of PPI G4 dendrimer with tegafur described by the one type of active site model.

Table 1
Determined by various techniques binding parameters of the active sites of PPI G4 dendrimer to tegafur and (for comparison) 5-fluorouracil.

Solubility measurement, $t = 20\text{ }^{\circ}\text{C}$						Reference
Drug	n					
tegafur	63 ± 2					
5-fluorouracil	46 ± 1					[24]
Equilibrium dialysis, $t = 20\text{ }^{\circ}\text{C}$						
Drug	n	K				
tegafur	27 ± 3	460 ± 80				
5-fluorouracil	42 ± 3	220 ± 30				[24]
^1H NMR spectroscopy, $t = 20\text{ }^{\circ}\text{C}$						
Drug	n	K				
tegafur	30 ± 8	940 ± 470				
5-fluorouracil	35 ± 5	850 ± 460				[24]
Isothermal titration calorimetry, $t = 25\text{ }^{\circ}\text{C}$						
Drug	n	K	$\Delta H[\text{kcal mol}^{-1}]$	$\Delta S[\text{cal K}^{-1} \text{mol}^{-1}]$	$\Delta G[\text{kcal mol}^{-1}]$	
tegafur	10 ± 2	7300 ± 1200	-14.20 ± 3.5	-30 ± 2	-5.3 ± 0.1	
5-fluorouracil	18 ± 2	1120 ± 120	-17.05 ± 2.2	-43 ± 1	-4.2 ± 0.1	[24]

The results of isothermal calorimetric titration confirm the spontaneous binding of TF molecules to active sites of PPI G4 macromolecules ($\Delta G < 0$), with an exothermal enthalpy factor ($\Delta H < 0$) being the driving force of the complexing process. The enthalpy factor indicates the predominance of exothermic energy effects of direct interactions of drug and dendrimer functional groups over the endothermic effects of partial dehydration of these interacting groups, preceding their direct interaction in an aqueous environment. The amount of energy released during binding of TF molecule to the active site of PPI G4 macromolecule is similar within the limits of measurement uncertainty, as in the case of FU binding. This reflects a smaller contribution of interactions of the hydrophobic tetrahydrofuran ring in the TF molecule to the overall energetics of ligand-dendrimer interaction, as compared to the larger contribution of the electrostatic interactions and hydrogen bonds of the pyrimidine ring of both drugs.

During the binding of TF to PPI G4, the test system undergoes ordering ($\Delta S < 0$). The lower absolute value of entropy of PPI G4 binding to TF, comparing to FU, suggests that the incorporation of larger, more sterically developed TF molecules into the complex is accompanied by a certain disturbance of the dendrimer structure (e.g. conformational spreading of dendrons [26,65–67]), increasing the entropy of the process.

The results of ITC titrations indicate that PPI G4 macromolecules bind fewer TF molecules with a higher affinity K , as compared to the values determined by dialysis and ^1H NMR titration techniques. This is due to the dynamic character [50,52,53,59,68,69] of ITC titrations (shorter reagent interaction time), comparing to the static nature of dialysis and ^1H NMR titrations (in which the test mixtures can reach complete equilibrium due to longer (24 h) interaction time before the actual measurement). The constant K of binding PPI G4 macromolecule active sites to TF molecules, determined with the ITC titration technique is higher than the binding constant of FU molecule to this dendrimer, which confirms the results of dialysis and ^1H NMR titrations.

The average numbers of tegafur bound on PPI dendrimer measured by solubility measurement ($n = 63 \pm 2$) is higher than the binding numbers determined by equilibrium dialysis, ^1H NMR titration and ITC due to the large TF excess in its saturated solutions (up to $[\text{TF}]/[\text{G4}] = 870/1$). Since this large excess of TF to PPI G4, the drug molecules may also be bound to dendrimer active sites with much lower affinity to this drug. The binding with this lower affinity sites is not observed in solutions with lower TF excess to PPI G4, like equilibrium dialysis ($n = 27 \pm 3$ in solutions with $[\text{TF}]/[\text{G4}]$ up to 420/1) and ^1H NMR titration ($n = 30 \pm 8$ in

solutions with $[\text{TF}]/[\text{G4}]$ up to 230/1). The time of interactions between TF and PPI G4 is another factor that can have its impact on determined binding numbers. The mixtures of TF and PPI G4 are normally prepared in advance before the measurement, like in solubility study (7 days), equilibrium dialysis (one day) and ^1H NMR titration (one day). Since ITC titration has a dynamic character with limited time (here 800 s) between successive drug solution injections into PPI G4 solution (in the ITC cell), the studied system may not reach the full saturation of macromolecules with TF molecules from kinetic reasons. The time needed to reach the deeper and more sterically shielded dendrimer binding sites (inside its structure) may be longer than the time of ligand interaction with dendrimer surface groups.

5. Conclusion

PPI G4 dendrimer effectively increases the solubility of tegafur in aqueous solutions, which confirms the supramolecular binding of the drug by PPI G4 macromolecules. The analysis of equilibrium dialysis and ^1H NMR titration results indicates that in an aqueous medium, the PPI G4 macromolecule has about 30 active sites binding tegafur molecules with equilibrium constant $\log K = 2.7$ in an aqueous medium. The results of ^1H NMR, ^1H - ^1H NOESY and DOSY measurements indicate that the active sites of PPI G4 involved in binding of the drug are located on the surface layer of macromolecule mers. According to ITC titration results, the process of binding tegafur by PPI G4 is exothermic ($\Delta H < 0$) and spontaneous ($\Delta G < 0$). Entropy of binding ($\Delta S < 0$) indicates the ordering of tegafur molecules as a result of binding to the PPI G4 dendrimer.

TF molecules interact with polar fragments of PPI G4 through a pyrimidine ring (similarly to FU) and with propylene groups of the dendrimer through a hydrophobic tetrahydrofuran ring. The hydrophilic-hydrophobic structure of TF molecules results in a more stable supramolecular complex with PPI G4 dendrimer, as compared to FU molecules. However, the formed supramolecular complex of PPI G4 with TF has lower stoichiometry than the complex of PPI G4 with FU (Table 1), due to a more sterically developed structure of the TF molecule (comparing to FU).

Funding

This research did not receive any specific grant from funding agencies in the public, commercial, or not-for-profit sectors.

CRedit authorship contribution statement

Adam Buczkowski: Conceptualization, Methodology, Software, Writing - original draft, Formal analysis, Writing - review & editing. **Małgorzata Malinowska-Michalak:** Investigation, Validation, Writing - review & editing. **Artur Stepniak:** Validation, Visualization. **Paweł Tokarz:** Investigation. **Paweł Urbaniak:** Investigation. **Bartłomiej Palec:** Supervision, Project administration, Writing - review & editing.

Declaration of Competing Interest

The authors declare that they have no known competing financial interests or personal relationships that could have appeared to influence the work reported in this paper.

References

- [1] V. Gajbhiye, N. Ganesh, J. Barve, N.K. Jain, Synthesis, characterization and targeting potential of zidovudine loaded sialic acid conjugated-mannosylated poly(propyleneimine) dendrimers, *Eur. J. Pharm. Sci.* 48 (2013) 668–679, <https://doi.org/10.1016/j.ejps.2012.12.027>.
- [2] D. Kaur, K. Jain, N.K. Mehra, P. Kesharwani, N.K. Jain, A review on comparative study of PPI and PAMAM dendrimers, *J. Nanopart. Res.* 18 (2016), <https://doi.org/10.1007/s11051-016-3423-0> e146.
- [3] R. Karthikeyan, S. Koushik, O.P.V. Rajkumar, Biodistribution Study of Pegylated Ppi Dendrimer Loaded with Prednisolone for Prolonged Release, *Nano Res. Appl.* 2 (2016) 1–15, <https://doi.org/10.21767/2471-9838.100015>.
- [4] A.K. Parashar, P. Patel, A.K. Gupta, N.K. Jain, B.D. Kurmi, Synthesis, Characterization and in vivo Evaluation of PEGylated PPI Dendrimer for Safe and Prolonged Delivery of Insulin, *Drug. Deliv. Lett.* 9 (2019) 248–263, <https://doi.org/10.2174/2210303109666190401231920>.
- [5] M. Chirag, D.V. Gowda, S. Babu, R.N.K. Fanna, A Comprehensive review on Dendrimers in current advanced Drug delivery, *Int. J. Res. Pharm. Sci.* 11 (2020) 1055–1066, <https://doi.org/10.26452/ijrps.v11i1.1936>.
- [6] A. Santos, F. Veiga, A. Figueiras, Dendrimers as Pharmaceutical Excipients: Synthesis, Properties, Toxicity Biomed. Appl. Mater. 13 (2020) 65, <https://doi.org/10.3390/ma13010065>.
- [7] V. Shah, O. Taratula, O.B. Garbuzenko, O.R. Taratula, L. Rodriguez-Rodriguez, T. Minko, Targeted Nanomedicine for Suppression of CD44 and Simultaneous Cell Death Induction in Ovarian Cancer: An Optimal Delivery of siRNA and Anticancer Drug, *Clin. Cancer Res.* 19 (2013) 6193–6204, <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-13-1536>.
- [8] P. Kesharwani, R.K. Tekade, N.K. Jain, Formulation development and in vitro-in vivo assessment of the fourth-generation PPI dendrimer as a cancer-targeting vector, *Nanomed.* 9 (2014) 2291–2308, <https://doi.org/10.2217/nmm.13.210>.
- [9] K. Nagpala, A. Mohanb, S. Thakur, P. Kumar, Dendritic platforms for biomedicine and biotechnological applications, *Artif. Cells. Nanomed. B.* 46 (2018) 861–875, <https://doi.org/10.1080/21691401.2018.1438451>.
- [10] A.A. Chis, C. Dobre, C. Morgovan, A.M. Arseniu, L.L. Rus, A. Butuca, A.M. Juncan, M. Totan, A.L. Vonica-Tincu, G. Cormos, A.C. Muntean, M.L. Muresan, F. G. Gligor, A. Frum, Applications and Limitations of Dendrimers in Biomedicine, *Molecules* 25 (2020) 3982, <https://doi.org/10.3390/molecules25173982>.
- [11] K. Jain, P. Kesharwani, U. Gupta, N.K. Jain, Dendrimer toxicity: let's meet the challenge, *Int. J. Pharm.* 394 (2010) 122–142, <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2010.04.027>.
- [12] S.S. Gillani, M.A. Munawar, K.M. Khan, J.A. Chaudhary, Synthesis, characterization and applications of poly-aliphatic amine dendrimers and dendrons, *J. Iran. Chem. Soc.* (2020), <https://doi.org/10.1007/s13738-020-01973-4>.
- [13] H. Liu, Y. Wang, M. Wang, J. Xiao, Y. Cheng, Fluorinated poly(propyleneimine) dendrimers as gene vectors, *Biomaterials* 35 (2014) 5407–5413, <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2014.03.040>.
- [14] M. Hashemi, H. Parhiz, A. Mokhtarzadeh, S.M. Tabatabai, S.A. Farzad, H.R. Shirvan, M. Ramezani, Preparation of Effective and Safe Gene Carriers by Grafting Alkyl Chains to Generation 5 Polypropyleneimine, *AAPS Pharm. Sci. Tech.* 16 (2015) 1002–1012, <https://doi.org/10.1208/s12249-015-0284-2>.
- [15] E. Aso, I. Martinsson, D. Appelhans, C. Effenberg, N. Benseny-Cases, J. Cladera, G. Gouras, I. Ferrer, O. Klementieva, Poly(propylene imine) dendrimers with histidine-maltose shell as novel type of nanoparticles for synapse and memory protection, *Nanomedicine* 17 (2019) 198–209, <https://doi.org/10.1016/j.nano.2019.01.010>.
- [16] J. Tiu, W.D. Gray, M.F. Davis, V. Luo, Peptide- and saccharide-conjugated dendrimers for targeted drug delivery: a concise review, *Interface Focus* 2 (2012) 307–324, <https://doi.org/10.1098/rsfs.2012.0009>.
- [17] D. Wrobel, D. Appelhans, M. Signorelli, B. Wiesner, D. Fessas, U. Scheler, B. Voit, J. Malý, Interaction study between maltose-modified PPI dendrimers and lipidic model membranes, *Biochim. Biophys. Acta* 2015 (1848) 1490–1501, <https://doi.org/10.1016/j.bbame.2015.03.033>.
- [18] D. Appelhans, B. Klajnert-Maculewicz, A. Janaszewska, J. Lajniewska, B. Voit, Dendritic glycopolymers based on dendritic polyamine scaffolds: view on their synthetic approaches, characteristics and potential for biomedical applications, *Chem. Soc. Rev.* 44 (2015) 3968–3996, <https://doi.org/10.1039/c4cs00339j>.
- [19] I. Jatzczak-Pawlik, M. Gorzkiewicz, M. Studzian, D. Appelhans, B. Voit, L. Pulaski, B. Klajnert-Maculewicz, Sugar-modified poly(propylene imine) dendrimers stimulate the NF- κ B pathway in a myeloid cell line, *Pharm. Res.* 34 (2017) 136–147, <https://doi.org/10.1007/s11095-016-2049-3>.
- [20] M. Gorzkiewicz, A. Buczkowski, D. Appelhans, B. Voit, L. Pulaski, B. Palec, B. Klajnert-Maculewicz, Poly(propyleneimine) glycodendrimers non-covalently bind ATP in a pH and salt-dependent manner – model studies for adenosine analogue drug delivery, *Int. J. Pharm.* 544 (2018) 83–90, <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2018.03.063>.
- [21] M. Longmire, P.L. Choyke, H. Kobayashi, Dendrimer-Based Contrast Agents for Molecular Imaging, *Curr. Top. Med. Chem.* 8 (2008) 1180–1186, <https://doi.org/10.2174/156802608785849021>.
- [22] A. Szulc, D. Appelhans, B. Voit, M. Bryszewska, B. Klajnert, Studying Complexes Between PPI Dendrimers and Mant-ATP, *J. Fluoresc.* 23 (2013) 349–356, <https://doi.org/10.1007/s10895-012-1153-y>.
- [23] A. Szulc, D. Appelhans, B. Voit, M. Bryszewska, B. Klajnert, Characteristics of complexes between poly(propylene imine) dendrimers and nucleotides, *New. J. Chem.* 36 (2012) 1610–1615, <https://doi.org/10.1039/c2nj40165g>.
- [24] A. Buczkowski, M. Malinowska-Michalak, B. Erdenebayar, B. Palec, Spectroscopic, electrochemical and calorimetric studies on the interactions of poly(propyleneimine) G4 dendrimer with 5-fluorouracil in aqueous solutions, *J. Mol. Liq.* 313 (2020), <https://doi.org/10.1016/j.molliq.2020.113534>.
- [25] D. Cakara, M. Borkovec, Microscopic protonation mechanism of branched polyamines: poly(amidoamine) versus poly(propyleneimine) dendrimers, *Croat. Chem. Acta* 80 (2007) 421–428, ISSN-0011-1643.
- [26] V. Jain, V. Maingi, P.K. Maiti, P.V. Bharatam, Molecular dynamics simulations of PPI dendrimer–drug complexes, *Soft Matter* 9 (2013) 6482–6496, <https://doi.org/10.1039/C3SM50434D>.
- [27] B.D. Damle, N.I. Narasimhan, S. Kaul, Stereoselective metabolism and pharmacokinetics of tegafur, *Biopharm. Drug Dispos.* 22 (2001) 45–52, <https://doi.org/10.1002/bdd.256>.
- [28] I. Yamamiya, K. Yoshisue, Y. Ishii, H. Yamada, K.-I. Yoshida, Species variation in the enantioselective metabolism of tegafur to 5-fluorouracil among rats, dogs and monkeys, *J. Pharm. Pharmacol.* 66 (2014) 1686–1697, <https://doi.org/10.1111/jpph.12304>.
- [29] X. Xu, D. Wang, X. Sun, S. Zeng, L. Li, D. Sun, Thermodynamic and spectrographic studies on the interactions of ct-DNA with 5-fluorouracil and tegafur, *Thermochim. Acta* 493 (2009) 30–36, <https://doi.org/10.1016/j.tca.2009.03.017>.
- [30] M. Shahabi, H. Raissi, Screening of the structural, topological, and electronic properties of the functionalized graphene nanosheets as potential tegafur anticancer drug carriers using DFT method, *J. Biomol. Struct. Dyn.* 36 (2018) 2517–2529, <https://doi.org/10.1080/07391102.2017.1360209>.
- [31] S.-C. Zhang, M.-Y. Yu, L. Xi, J.-X. Zhang, Tegafur deteriorates established cardiovascular atherosclerosis in colon cancer: A case report and review of the literature, *World. J. Clin. Cases* 7 (2019) 89–94, <https://doi.org/10.12998/wjcc.v7i1.89>.
- [32] R. Shiohara, X.-P. Lee, M. Yamada, M. Fujishiro, H. Sakamaki, Ch. Hasegawa, H. Ishida, K. Ikeda, K.-I. Fujita, S. Iwabuchi, H. Onda, T. Kumazawa, Y. Sasaki, K. Sato, T. Matsuyama, High-throughput method to analyze tegafur and 5-fluorouracil in human tears and plasma using hydrophilic interaction liquid chromatography/tandem mass spectrometry, *Rapid. Commun. Mass Spectrom.* 33 (2019) 1906–1914, <https://doi.org/10.1002/rcm.8531>.
- [33] R. Kuriki, T. Hata, K. Nakayama, Y. Ito, K. Misawa, S. Ito, M. Tatematsu, N. Kameda, Tegafur and 5-fluorouracil levels in tears and changes in tear volume in long-term users of the oral anticancer drug S-1, *Nagoya. J. Med. Sci.* 81 (2019) 415–425, <https://doi.org/10.18999/nagjms.81.3.415>.
- [34] S. Sato, Y. Hirota, N. Ogura, E. Sasaki, S. Kitagawa, Enhancing effect of N-dodecyl-2-pyrrolidone on the percutaneous absorption of 5-fluorouracil derivatives, *Chem. Pharm. Bull.* 46 (1998) 831–836, <https://doi.org/10.1248/cpb.46.831>.
- [35] L. Wang, L. Chen, G. Lian, L. Han, Determination of partition and binding properties of solutes to stratum corneum, *Int. J. Pharm.* 398 (2010) 114–122, <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2010.07.035>.
- [36] G.S. Abdrakhimova, M.Y. Ovchinnikov, A.N. Lobov, L.V. Spirikhin, S.P. Ivanov, S.L. Khursan, 5-Fluorouracil solutions: NMR study of acid–base equilibrium in water and DMSO, *J. Phys. Org. Chem.* 27 (2014) 876–883, <https://doi.org/10.1002/poc.3350>.
- [37] A. Ono, T. Tomono, T. Ogihara, K. Terada, K. Sugano, Investigation of biopharmaceutical and physicochemical drug properties suitable for orally disintegrating tablets, *ADMET DMPK* 4 (2016) 335–360, <https://doi.org/10.5599/admet.4.4.338>.
- [38] D.S. Wishart, C. Knox, A.C. Guo, S. Shrivastava, M. Hassanali, P. Stothard, Z. Chang, J. Woolsey, Drugbank: a comprehensive resource for in silico drug discovery and exploration, www.drugbank.ca.
- [39] B.N. Singh, A quantitative approach to probe the dependence and correlation of food-effect with aqueous solubility, dose/solubility ratio, and partition coefficient (Log P) for orally active drugs administered as immediate-release formulations, *Drug. Develop. Res.* 65 (2005) 55–75, <https://doi.org/10.1002/ddr.20008>.

- [40] S. Aitipamula, P.S. Chow, R.B.H. Tan, Crystal engineering of tegafur cocrystals: structural analysis and physicochemical properties, *Cryst. Growth. Des.* 14 (2014) 6557–6569, <https://doi.org/10.1021/cg501469r>.
- [41] K.B. Sloan, S. Wasdo, U. Ezike-Mkparu, T. Murray, D. Nickels, S. Singh, T. Shanks, J. Tovar, K. Ulmer, R. Waranis, Topical delivery of 5-fluorouracil and 6-mercaptopurine by their alkylcarbonyloxymethyl prodrugs from water: vehicle effects on design of prodrugs, *Pharmaceut. Res.* 20 (2005) 639–645, <https://doi.org/10.1023/A:1023207118209>.
- [42] Q.-D. Hu, H. Fan, W.-J. Lou, Q.-Q. Wang, G.-P. Tang, Polyethylenimine-cyclodextrin-tegafur conjugate shows anti-cancer activity and a potential for gene delivery, *J. Zhejiang. Univ. Sci. B.* 12 (2011) 720–729, <https://doi.org/10.1631/jzus.B1000307>.
- [43] C.-Y. Yu, X.-C. Zhang, F.-Z. Zhou, X.-Z. Zhang, S.-X. Cheng, R.-X. Zhuo, Sustained release of antineoplastic drugs from chitosan-reinforcedalginate microparticle drug delivery systems, *Int. J. Pharm.* 357 (2008) 15–21, <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2008.01.030>.
- [44] J.L. Arias, M. López-Viota, V. Gallardo, M.A. Ruiz, Chitosan nanoparticles as a new delivery system for the chemotherapy agent tegafur, *Drug. Dev. Ind. Pharm.* 36 (2010) 744–750, <https://doi.org/10.3109/03639040903517914>.
- [45] J.L. Arias, M. Adolfini, R.V. Gallardo, Á.V. Delgado, Tegafur loading and release properties of magnetite/poly(alkylcyanoacrylate)(core/shell) nanoparticles, *J. Control. Release* 125 (2008) 50–58, <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2007.09.008>.
- [46] P.M.D. Santos, A.J. Hall, P. Manesiotis, Stoichiometric molecularly imprinted polymers for the recognition of anti-cancer pro-drug tegafur, *J. Chromatogr. B.* 1021 (2016) 197–203, <https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2015.12.015>.
- [47] M. Shahabi, H. Raissi, Investigation of the solvent effect, molecular structure, electronic properties and adsorption mechanism of Tegafur anticancer drug on Graphene nanosheet surface as drug delivery system by molecular dynamics simulation and density functional approach, *J. Incl. Phenom. Macrocycl. Chem.* 88 (2017) 159–169, <https://doi.org/10.1007/s10847-017-0713-9>.
- [48] M. Shahabi, H. Raissi, Payload delivery of anticancer drug Tegafur with the assistance of graphene oxide nanosheet during biomembrane penetration: Molecular dynamics simulation survey, *Appl. Surf. Sci.* 517 (2020), <https://doi.org/10.1016/j.apsusc.2020.146186>.
- [49] M. Shahabi, H. Raissi, Theoretical investigation insights into the temperature triggered tegafur anticancer drug release from the surface of graphene oxide nanosheet, *J. Biomol. Struct. Dyn.* 38 (2020) 2287–2295, <https://doi.org/10.1080/07391102.2019.1630004>.
- [50] A. Buczkowski, P. Urbaniak, B. Palecz, Interaction between PAMAM-NH₂ G4 dendrimer and paracetamol in aqueous solution, *J. Mol. Liq.* 186 (2013) 70–75, <https://doi.org/10.1016/j.molliq.2013.05.021>.
- [51] A. Buczkowski, P. Urbaniak, S. Belica, S. Sekowski, M. Bryszewska, B. Palecz, Formation of complexes between PAMAM-NH₂ G4 dendrimer and L- α -tryptophan and L- α -tyrosine in water, *Spectrochim. Acta A* 128 (2014) 647–652, <https://doi.org/10.1016/j.saa.2014.02.174>.
- [52] A. Buczkowski, P. Urbaniak, H. Piekariski, B. Palecz, Spectroscopic and calorimetric studies on the interaction between PAMAM G4-OH and 5-fluorouracil in aqueous solutions, *Spectrochim. Acta A* 171 (2017) 401–405, <https://doi.org/10.1016/j.saa.2016.08.030>.
- [53] M. Gorzkiewicz, A. Buczkowski, B. Palecz, B. Klajner-Maculewicz, PAMAM and PPI dendrimers in biophysical and thermodynamic studies on the delivery of therapeutic nucleotides, nucleosides and nucleobase derivatives for anticancer applications, in: C. Demetozos, N. Pippa (Eds.), *Thermodynamics and biophysics of biomedical nanosystems: Applications and Practical Considerations*, Springer Nature, Singapore Pte, 2019, pp. 183–243.
- [54] G. Scatchard, The attractions of proteins for small molecules and ions, *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 51 (1949) 660–672, <https://doi.org/10.1111/j.1749-6632.1949.tb27297.x>.
- [55] L. Soltes, M. Mach, Estimation of drug-protein binding parameters on assuming the validity of thermodynamic equilibrium, *J. Chromatogr. B* 768 (2002) 113–119, [https://doi.org/10.1016/S0378-4347\(01\)00498-4](https://doi.org/10.1016/S0378-4347(01)00498-4).
- [56] L. Fielding, NMR methods for the determination of protein-ligand dissociation constants, *Prog. Nucl. Mag. Res. Sp.* 51 (2007) 219–242, <https://doi.org/10.2174/1568026033392705>.
- [57] J. Hu, M. Fang, Y. Cheng, J. Zhang, Q. Wu, T. Xu, Host-guest chemistry of dendrimer-drug complexes. 4. An in-depth look into the binding/encapsulation of guanosine monophosphate by dendrimers, *J. Phys. Chem. B.* 114 (2010) 7148–7157, <https://doi.org/10.1021/jp1007889>.
- [58] J. Hu, T. Xu, Y. Cheng, NMR Insights into dendrimer-based host-guest systems, *Chem. Rev.* 112 (2012) 3856–3891, <https://doi.org/10.1021/cr200333h>.
- [59] A. Buczkowski, P. Urbaniak, B. Palecz, Thermochemical and spectroscopic studies on the supramolecular complex of PAMAM-NH₂ G4 dendrimer and 5-fluorouracil in aqueous solution, *Int. J. Pharm.* 428 (2012) 178–182, <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2012.03.004>.
- [60] VP-ITC MicroCalorimeter User's manual, Northampton: MicroCal, 2004.
- [61] N. Shao, Y. Su, J. Hu, J. Zhang, H. Zhang, Y. Cheng, Comparison of generation 3 polyamidoamine dendrimer and generation 4 polypropyleneimine dendrimer on drug loading, complex structure, release behavior, and cytotoxicity, *Int. J. Nanomed.* 6 (2011) 3361–3372, <https://doi.org/10.2147/IJN.S27028>.
- [62] C. Zhao, Y. Wang, Y. Su, H. Zhang, L. Ding, X. Yan, D. Zhao, N. Shao, X. Ye, Y. Cheng, Inclusion complexes of isoflavones with two commercially available dendrimers: Solubility, stability, structures, release behaviors, cytotoxicity, and anti-oxidant activities, *Int. J. Pharm.* 421 (2011) 301–309, <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2011.09.044>.
- [63] A. Zasada, E. Mironiuk-Puchalska, M. Koszytkowska-Stawińska, Synthesis of tegafur by the alkylation of 5-fluorouracil under the Lewis acid and metal salt-free conditions, *Org. Process Res. Dev.* 21 (2017) 885–889, <https://doi.org/10.1021/acs.oprd.7b00103>.
- [64] D.L. Pavia, G.M. Lampman, G.S. Kriz, J.R. Vyvyan, *Introduction to spectroscopy*, Cengage Learning, Belmont, 2009.
- [65] P. Welch, M. Muthukumar, Tuning the density profile of dendritic polyelectrolytes, *Macromolecules* 31 (1998) 5892–5897, <https://doi.org/10.1021/ma980198w>.
- [66] A.W. Bosman, H.M. Janssen, E.W. Meijer, About dendrimers: structure, physical properties and applications, *Chem. Rev.* 99 (1999) 1665–1688, <https://doi.org/10.1021/cr970069y>.
- [67] D.A. Tomalia, L.S. Nixon, D.M. Hedstrand, The Role of Branch Cell Symmetry and Other CriticalNanoscale Design Parameters in the Determinationof Dendrimer Encapsulation Properties, *Biomolecules* 10 (2020) 642, <https://doi.org/10.3390/biom10040642>.
- [68] A. Buczkowski, T. Olesinski, E. Zbicinska, P. Urbaniak, B. Palecz, Spectroscopic and calorimetric studies of formation of the supramolecular complexes of PAMAM G5-NH₂ and G5-OH dendrimers with 5-fluorouracil in aqueous solution, *Int. J. Pharm.* 490 (2015) 102–111, <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2015.05.033>.
- [69] A. Buczkowski, D. Waliszewski, P. Urbaniak, B. Palecz, Study of the interactions of PAMAM G3-NH₂ and G3-OH dendrimers with 5-fluorouracil in aqueous solutions, *Int. J. Pharm.* 505 (2016) 1–13, <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2016.03.061>.

Dorobek naukowy

Artykuły opublikowane w ramach pracy doktorskiej:

- Adam Buczkowski, **Małgorzata Malinowska-Michalak**, Bayarmaa Erdenebayar, Bartłomiej Palecz „Spectroscopic, electrochemical and calorimetric studies on the interactions of poly(propyleneimine) G4 dendrimer with 5-fluorouracil in aqueous solutions” Journal of Molecular Liquids 313 (2020) 113534, doi: 10.1016/j.molliq.2020.113534
- Adam Buczkowski, **Małgorzata Malinowska-Michalak**, Artur Stepniak, Paweł Tokarz, Paweł Urbaniak, Bartłomiej Palecz, „Calorimetric and spectroscopic studies of interactions of PPI G4 dendrimer with tegafur in aqueous solutions” Journal of Molecular Liquids 334 (2021) 116118

Artykuły niezwiązane z pracą doktorską:

- Adam Buczkowski, Michał Gorzkiewicz, Artur Stepniak, **Małgorzata Malinowska-Michalak**, Paweł Tokarz, Paweł Urbaniak, Maksim Ionov, Barbara Klajnert-Maculewicz, Bartłomiej Palecz „Physicochemical and in vitro cytotoxicity studies of inclusion complex between gemcitabine and cucurbit[7]uril host” Bioorganic Chemistry 99 (2020) 10384, doi : 10.1016/j.bioorg.2020.103843
- Bartłomieji Palecz, Artur Stepniak, Bayarmaa Erdenebayar, Marta Bernatska, Adam Buczkowski, **Małgorzata Malinowska**, Lev Zavodnik , Iliya Zavodnik, Interactions of carbendazim and thiabendazole with β -cyclodextrin in aqueous solutions “Vesnik Hrodzenskaha Dziarzhavnaha Universiteta Imia Ianki Kupaly. Seryia 5. Ekanomika. Satsyialohiia. Biialohiia” Vol. 10, No. 1, 2020 ISSN 2221-5336

Liczba doniesień konferencyjnych 24: w tym zaprezentowanych osobiście 10.

Rozdział w monografii VIII Ogólnopolska Konferencja „Nauka i przemysł-lubelskie spotkania studenckie, M. Malinowska-Michalak, A. Buczkowski, B. Pałecz „Badania oddziaływań dendrymeru polipropylenoiminowego G4 z tegafurem w roztworze wodnym. ISBN 978-83-227-9370-1 Wydawnictwo UMCS, Lublin 2020.

Odbyłam 3 miesięczny staż w ramach programu Erasmus + (Uniwersytet Aveiro) 20.09.2018 - 20.12.2018 r.