

## POVZETEK

V okviru doktorske disertacije smo načrtovali nove sintezne poti in jih nato uporabili za pripravo novih polimerov različnih arhitektur, ki bi bili primerni za potencialno uporabo kot inovativni nosilci zdravilnih učinkovin s poudarkom na visokomolekularnih proteinskih/peptidnih zdravilnih učinkovinah. V prvem delu doktorske disertacije smo uspešno pripravili niz treh kopolimerov s pripajanjem, to je hitosan-graft-poli(L-glutamat) (Chi-g-PGlu) kopolimera z različno dolgimi peptidnimi grafti. Sinteza je vključevala pripravo makroiniciatorja – organosulfonske soli hitosana, ki je topna v polarnem organskem topilu DMSO. Sledila je polimerizacija z odpiranjem obroča monomera *N*-karboksianhidrida  $\gamma$ -benzil L-glutamata (BGlu NCA) in nato odščita tako pripravljenih benzil- zaščitenih graft kopolimerov z različnimi postopki. Najučinkovitejši postopek odščite, pri katerem hitosan najmanj razpada, je uporaba vodne raztopine tetrabutilamonijevega hidroksida. Sintetiziranim graft kopolimerom smo strukturo in molsko maso podrobno opredelili z uporabo različnih tehnik karakterizacije (NMR, SEC-MALS, FTIR). Chi-g-PGlu kopolimere smo nato skupaj s trimetilhitosanom (TMC) uspešno uporabili za pripravo nanodelcev, v katere smo vgradili proteinsko zdravilno učinkovino granulocitne kolonije stimulirajoči faktor (GCSF). Pripravili smo nanodelce z visokim deležem vgrajene zdravilne učinkovine (do 45 %). Nanodelci so imeli povprečni premer med 240 in 320 nm, polidisperznost delcev, določena s tehniko DLS, pa je znašala med 0,15 in 0,26. Raziskali smo vpliv dolžine graftiranih peptidnih verig, delež dodanega GCSF proteina in vpliv količine dodanega TMC na lastnosti nanodelcev. Pokazali smo, da so nanodelci temperaturno (v območju med 25 in 39°C) in časovno obstojni, saj se njihova velikost ni bistveno spreminjala. Pri proučevanju pH stabilnosti nanodelcev smo ugotovili, da so nestabilni pri pH vrednostih nad izoelektrično točko GCSF proteina (6,1), kar je želeno in v skladu s pričakovanji za zasnovani sistem nanodelcev.

V drugem delu disertacije smo pripravili homopolipeptid poli(L-glutamat) (PGlu) in nato njegove stranske karboksilne skupine pod zelo blagimi pogoji v vodnem mediju kontrolirano glikozilirali z uporabo reagenta 4-(4,6-dimetoksi-1,3,5-triazin-2-il)-4-metilmorfolinijev klorid (DMTMM). Reakcijske produkte smo analizirali z 1D in 2D NMR tehnikami ter s SEC-MALS in MALDI-TOF MS ter tako opredelili vrsto stranskih produktov, stopnjo substitucije in molsko maso sintetiziranih produktov.

V tretjem delu disertacije smo zasnovali, sintetizirali in opredelili modelni predstavnik dendroniziranega poliglutamata, P(Glu-D), kjer stopnja polimerizacije ( $DP_n$ ) znaša 46, delež dendroniziranih ponavljajočih enot je 43 %, dendroniziran pa je bil z dendronom druge generacije. Ugotovili smo odlično ujemanje predlagane strukture P(Glu-D) z eksperimentalnimi podatki (NMR, SEC-MALS in MALDI-TOF MS). Sinteza je potekala tako, da smo z DMTMM na PGlu preko amidnih vezi vezali bifunkcionalni gradnik ( $N_3$ -Pr-NH<sub>2</sub>). Poliamidni dendron druge generacije smo sintetizirali po večstopenjski sintezni poti, kjer smo na karboksilno skupino aminokislina L-lizin preko amidne vezi najprej vezali propargilamin, na amski skupini aminokislina pa smo nato vezali zaščiteno 2,2-bis(metilol)propanojsko kislino (bis-MPA). Hidroksilne skupine nastalega dendrona druge generacije smo kvantitativno odščitili pod blago kislimi pogoji. Na azidne skupine modificiranega linearnega kopolipeptida, P(Glu-N<sub>3</sub>), smo nato s tvorbo 1,4-disubstituiranega triazola vezali dendron z acetilensko fokalno skupino pod pogoji s Cu(I) katalizirane azid-alkin cikloadicije. Vezava dendrona na linearni kopolimer P(Glu-N<sub>3</sub>) je potekla kvantitativno v 48 urah v vodnem mediju, kar smo potrdili z <sup>1</sup>H NMR in s FTIR.

V zadnjem delu smo pripravili poliestrski dendrimer druge generacije na osnovi trifunkcionalnega alifatskega jedra in ponavljajoče enote tipa AB<sub>2</sub>, pripravljene iz glikolne kisline in bis-MPA. Karboksilna funkcionalna skupina glikolnega dela AB<sub>2</sub> monomera in dendrona druge generacije je bila zaščitena z benzilnim estrom, ki smo ga kvantitativno odstranili s katalitskim hidrogeniranjem. Hidroksilne skupine bis-MPA delov AB<sub>2</sub> monomera in dendrimera druge generacije smo zaščitili z acetamidno zaščitno skupino, ki smo jo učinkovito odstranili z uporabo kislega ionskega izmenjevalca. Estrske vezi smo sintetizirali v prisotnosti DCC in nevtralnega katalizatorja DPTS, produkte pa smo očistili s kolonsko kromatografijo. Kvantitativno odščitno hidrosilnih skupin, predvsem dendrimerov višjih generacij, je spremljala delna hidroliza estrskih skupin dendrimerov, kar smo ugotovili z <sup>1</sup>H NMR in SEC. Zaradi nepravilnosti v strukturi G2-OH kot posledice delne hidrolize estrskih vezi pri odščiti hidrosilnih skupin nismo izvajali nadaljnje sinteze dendrimerov višjih generacij, saj je iz tega razloga, po tem postopku, nemogoče sintetizirati tovrstne dendrimer z uniformno strukturo in molsko maso.

V okviru doktorske disertacije smo uspešno pripravili kopolimere različnih arhitektur: (i) kopolimere s pripajanjem, (ii) linearne kopolimere, (iii) dendroniziran kopolimer in

(iv) dendrimer. Kopolimere s pripajanjem tipa Chi-*g*-PGlu smo opredelili in uporabili za pripravo nanodelcev z visokim deležem vgrajene proteinske zdravilne učinkovine. Linearne kopolimere z različnimi stopnjami substitucije z glukozaminom smo natančno opredelili. Dendroniziran kopolimer smo uspešno pripravili po večstopenjski sintezni poti in produkte posameznih reakcijskih stopenj podrobno opredelili. Pri pripravi poliestrskega dendrimera smo uspeli sintetizirati drugo generacijo dendrimera, ki pa strukturno ni bil popoln, zato višjih generacij poliestrskega dendrimera nismo pripravili.

**Ključne besede:** hitosan, poli(L-glutamat), polimeri s pripajanjem, dendrimer, dendronizirani polimeri, granulocitne kolonije stimulirajoči faktor (GCSF), nanodelci