



**„Zmodyfikowane dendrymery PAMAM jako skuteczne systemy transportu leków
przeciwnowotworowych”**

Konrad Wróbel

Nauki Medyczne

Prof. dr hab. inż. Stanisław Wołowicz

Uniwersytet Rzeszowski

Collegium Medicum

Rzeszów, 2025

Podziękowania

Pragnę złożyć serdeczne podziękowania wszystkim osobom, które przyczyniły się do powstania niniejszej rozprawy doktorskiej.

Pragnę wyrazić głęboką wdzięczność mojemu Promotorowi, za życzliwe wsparcie, cenne wskazówki naukowe oraz inspirujące rozmowy, które miały istotny wpływ na kierunek i jakość prowadzonych badań. Jego zaangażowanie, merytoryczna opieka oraz otwartość na dyskusję stanowiły dla mnie nieocenione źródło motywacji i naukowego rozwoju.

Szczególne podziękowania kieruję do moich Bliskich, którzy okazali mi ogromne zrozumienie, cierpliwość oraz nieustające wsparcie emocjonalne w trakcie całego procesu przygotowywania rozprawy.

Na końcu, lecz nie mniej ważne, pragnę podziękować wszystkim osobom, które w jakikolwiek sposób przyczyniły się do realizacji tego przedsięwzięcia – poprzez rozmowę, życzliwy gest czy zwyczajną obecność w kluczowych momentach tej drogi.

Wszystkim Państwu składam wyrazy głębokiego szacunku i wdzięczności.

Spis treści

1. Wstęp teoretyczny	1
1.1 Definicja i charakterystyka wybranych chorób nowotworowych	1
1.2 Zarys patogenezy nowotworów złośliwych	2
2. Obecny stan wiedzy na temat farmakoterapii wybranych nowotworów złośliwych, podstawowych mechanizmów oporności na chemoterapeutyki oraz systemów transportu leków	8
2.1 Glejak Wielopostaciowy	8
2.2 Rak Kolczystokomórkowy	10
2.3 Rak Piersi	12
2.4 Ostra Białaczka Szpikowa	15
2.5 Przewlekła Białaczka Szpikowa	17
2.6 Niedrobnokomórkowy Rak Płuca	18
2.7 Kluczowe mechanizmy oporności na leki przeciwnowotworowe	20
2.8 Systemy transportu leków ze szczególnym uwzględnieniem roli dendrymerów PAMAM	22
3. Hipoteza i cele badawcze	26
3.1 Hipoteza badawcza	26
3.2 Cele badawcze realizowane w cyklu publikacji	26
4. Opis wkładu, metodologia oraz omówienie publikacji	29
4.1 Opis mojego wkładu w realizację cyklu publikacji	29
4.2 Zarys metodologii badań aktywności biologicznej koniugatów	38
4.3 Omówienie rezultatów uzyskanych w cyklu publikacji	40
5. Podsumowanie i wnioski wyciągnięte z cyklu publikacji	59
Streszczenie	61
Abstract	63
Literatura	65
Publikacje	73
[D1]	73
[D2]	90
[D3]	104
[D4]	128
[D5]	142
Oświadczenia współautorów publikacji na podstawie której oparta jest rozprawa doktorska	160

Wykaz skrótów

- AML – ostra białaczka szpikowa (*acute myeloid leukemia* – ang.)
- Ara-C – cytarabina (*cytarabine* – ang.)
- BC – rak piersi (*breast cancer* – ang.)
- BBB – bariera krew–mózg (*blood–brain barrier* – ang.)
- CAF – fibroblasty związane z nowotworem (*cancer-associated fibroblasts* – ang.)
- CDI – karbonyldiimidazol (*carbonyldiimidazole* – ang.)
- C – celekoksyb (*celecoxib* – ang.)
- CLL – przewlekła białaczka limfocytowa (*chronic lymphocytic leukemia* – ang.)
- CML – przewlekła białaczka szpikowa (*chronic myeloid leukemia* – ang.)
- CP – fosforan cytarabiny (*cytarabine phosphate* – ang.)
- CSCs – komórki macierzyste nowotworu (*cancer stem cells* – ang.)
- DDS – systemy transportu leków (*drug delivery systems* – ang.)
- DLS – technika dynamicznego rozpraszania światła (*dynamic light scattering* – ang.)
- DMAP – 4-(dimetyloamino)pirydyna (*4-(dimethylamino)pyridine* – ang.)
- DOX – doksorubicyna (*doxorubicin* – ang.)
- DP – fosforan deksametazonu (*dexamethasone phosphate* – ang.)
- EMT – przejście nabłonkowo-mezenchymatyczne (*epithelial–mesenchymal transition* – ang.)
- ER – receptor estrogenowy (*estrogen receptor* – ang.)
- F – fulwestrant (*fulvestrant* – ang.)
- FASL – ligand dla receptora FAS (*FAS ligand* – ang.)
- FITC – izotiocyjanian fluoresceiny (*fluorescein isothiocyanate* – ang.)
- FP – fosforan fludarabiny (*fludarabine phosphate* – ang.)
- GBM – glejak wielopostaciowy (*glioblastoma multiforme* – ang.)

gh – α -D-glukoheptono-1,4-lakton (*α -D-glucoheptono-1,4-lactone* – ang.)

HNC – nowotwory złośliwe głowy i szyi (*head and neck cancer* – ang.)

HER2 – receptor naskórkowego ludzkiego czynnika wzrostu 2 (*human epidermal growth factor receptor 2* – ang.)

IC₅₀ – połowa maksymalnego stężenia hamującego (*half maximal inhibitory concentration* – ang.)

L – lapatynib (*lapatinib* – ang.)

LC – rak płuca (*lung cancer* – ang.)

LC₅₀ – połowa maksymalnego stężenia wywołującego śmierć (*lethal concentration 50* – ang.)

MMPs – metaloproteinazy macierzy pozakomórkowej (*matrix metalloproteinases* – ang.)

MTX – metotreksat (*methotrexate* – ang.)

NHL – chłoniak nieziarniczny (*non-Hodgkin lymphoma* – ang.)

NMR – spektroskopia jądrowego rezonansu magnetycznego (*nuclear magnetic resonance* – ang.)

NSCLC – niedrobnokomórkowy rak płuca (*non-small cell lung cancer* – ang.)

OCSCC – rak kolczystokomórkowy jamy ustnej (*oral cavity squamous cell carcinoma* – ang.)

PAMAM – dendrymery poliamidoaminowe (*polyamidoamine dendrimers* – ang.)

PR – receptor dla progesteronu (*progesterone receptor* – ang.)

PTX – paklitaksel (*paclitaxel* – ang.)

RAR- α – receptor kwasu retinowego alfa (*retinoic acid receptor alpha* – ang.)

R-gl – optycznie czysty R-glicydol (*R-glycidol* – ang.)

ROS – reaktywne formy tlenu (*reactive oxygen species* – ang.)

S – symwastatyna (*simvastatin* – ang.)

S-gl – optycznie czysty S-glicydol (*S-glycidol* – ang.)

SLL – chłoniak z małych limfocytów B (*small lymphocytic lymphoma* – ang.)

SSC – rak kolczystokomórkowy (*squamous cell carcinoma* – ang.)

TKI – inhibitory kinaz tyrozynowych (*tyrosine kinase inhibitors* – ang.)

TM – cząsteczki adresujące (*targeting molecules* – ang.)

TMZ – temozolomid (*temozolomide* – ang.)

TNF – czynnik martwicy nowotworu (*tumor necrosis factor* – ang.)

Wykaz publikacji

[D1] *Malinga-Drozd, M.; Uram, Ł.; Wróbel, K.; Wołowiec, S. Chiral Recognition of Homochiral Poly (amidoamine) Dendrimers Substituted with R- and S-Glycidol by Keratinocyte (HaCaT) and Squamous Carcinoma (SCC-15) Cells In Vitro. Polymers 2021, 13, 1049.*]

[D2] *Wróbel K, Wołowiec S, Markowicz J, Wałajtys-Rode E, Uram Ł. Synthesis of Biotinylated PAMAM G3 Dendrimers Substituted with R-Glycidol and Celecoxib/Simvastatin as Repurposed Drugs and Evaluation of Their Increased Additive Cytotoxicity for Cancer Cell Lines. Cancers. 2022; 14(3):714.*

[D3] *Uram Ł, Wróbel K, Walczak M, Szymaszek Ż, Twardowska M, Wołowiec S. Exploring the Potential of Lapatinib, Fulvestrant, and Paclitaxel Conjugated with Glycidylated PAMAM G4 Dendrimers for Cancer and Parasite Treatment. Molecules. 2023; 28(17):6334.*

[D4] *Lewińska A, Wróbel K, Błoniarczyk D, Adamczyk-Grochala J, Wołowiec S, Wnuk M. Lapatinib- and fulvestrant-PAMAM dendrimer conjugates promote apoptosis in chemotherapy-induced senescent breast cancer cells with different receptor status. Biomater Adv. 2022 Sep;140:213047.*

[D5] *Wróbel, K.; Deręgowska, A.; Betlej, G.; Walczak, M.; Wnuk, M.; Lewińska, A.; Wołowiec, S. Cytarabine and dexamethasone-PAMAM dendrimer di-conjugate sensitizes human acute myeloid leukemia cells to apoptotic cell death, Journal of Drug Delivery Science and Technology, Volume 81, 2023,104242*

Wykaz rycin

Rycina 1. Model graficzny dendrymerów PAMAM	24
Rycina 2. Wzory chemiczne pochodnych dendrymerów PAMAM	33
Rycina 3. Schematy reakcji chemicznych prowadzących do otrzymania koniugatów PAMAM - lek	34
Rycina 4. Aktywatory i łączniki wykorzystane w syntezach	35
Rycina 5. Wartości IC₅₀ wolnych leków oraz koniugatów w skali logarytmicznej	47
Rycina 6. Wartości IC₅₀ wyznaczone przy użyciu testu MTT dla kombinacji jednolekowych koniugatów (1nM G4P + wzrastające stężenie G4L).	48
Rycina 7. Schematyczna wizualizacja uwalniania leków z dendrymeru w niskim pH lizosomów.	58

Wykaz tabel

Tabela 1. Średnice cząsteczkowe otrzymanych koniugatów oraz potencjały Zeta	37
Tabela 2. Linie komórkowe (kolumna 1) na jakich liniach komórkowych były prowadzone testy aktywności biologicznej otrzymanych koniugatów w cyklu publikacji (D1-D5)	39
Tabela 3. Odnośniki literaturowe dotyczące dowodów na ekspresję wymienionych receptorów (HER-2, ER) przez linie komórkowe użyte do testów aktywności biologicznej w D3	44
Tabela 4. Linie komórkowe użyte do testów aktywności poszczególnych koniugatów leków antynowotworowych	51

1. Wstęp teoretyczny

1.1 Definicja i charakterystyka wybranych chorób nowotworowych

Nowotwory złośliwe to heterogenna grupa chorób, których wspólnym czynnikiem etiologicznym jest deregulacja procesów apoptozy i proliferacji komórek, prowadząca do przewagi sygnałów stymulujących proliferację. Zachwianie równowagi między apoptozą i proliferacją skutkuje nadmiernymi, niekontrolowanymi podziałami komórek. W nadmiernie proliferujących komórkach nowotworowych powstałe aberracje genetyczne prowadzą do zmiany ich fenotypu. Przykładem są zmiany metabolizmu skutkujące zużyciem znacznie większej ilości glukozy przez komórki nowotworowe w procesie pozyskiwania energii na drodze efektu Warburga, którego produktem ubocznym jest mleczan. Akumulacja tego metabolitu oraz nadmierne zużycie glukozy prowadzą do zaburzenia funkcji tkanek, w obrębie których zachodzi proces rozrostu nowotworu. Kolejną kluczową cechą komórek nowotworowych jest zaburzenie procesu różnicowania komórkowego, skutkujące tym, że komórki nowotworowe swoim fenotypem bardziej przypominają niskozróżnicowane komórki tkanek płodu niż komórki tkanek, z których określony nowotwór się wywodzi. Definicję nowotworu złośliwego uzupełnia posiadanie przez komórki nowotworów złośliwych zdolności do metastazy, czyli powstawania wtórnych guzów nowotworowych, oddalonych od ogniska pierwotnego. Nadmierna proliferacja komórek nowotworowych, których funkcja uległa zaburzeniu na drodze zmian genetycznych, prowadzi do destrukcji i/lub upośledzenia funkcji tkanek oraz narządów, w obrębie których dochodzi do rozrostu złośliwego. Intensywnie zachodzące procesy selekcji i adaptacji nieustannie proliferujących komórek nowotworowych prowadzą do zróżnicowania genetycznego oraz metabolicznego subpopulacji komórek nowotworowych w obrębie tego samego ogniska, co ułatwia progresję choroby a także sprzyja rozwojowi oporności na leczenie. ^[1,2,3,4]

Wśród nowotworów złośliwych wyróżniamy guzy lite, w przypadku których proliferujące komórki tworzą zbitą masę oraz nowotwory, które nie tworzą zwartego utkania – nowotwory hematologiczne (białaczki). Powszechnie stosuje się także podział nowotworów ze względu na ich histologiczne pochodzenie. W myśl tego podziału nowotwory złośliwe wywodzące się z tkanki nabłonkowej określa się mianem raka,

wywodzące się z tkanek miękkich – mięsaka, tkanki glejowej – glejaka, z tkanek układu limfatycznego - chłoniaka etc. Obecnie coraz częściej w klasyfikacji nowotworów złośliwych wykorzystuje się molekularną charakterystykę konkretnego nowotworu. Klasyfikacja ta jest powszechnie wykorzystywana w przypadku raków piersi, które klasyfikuje się w zależności od statusu receptorowego (np. ER – receptor estrogenowy, HER2 – receptor naskórkowego ludzkiego czynnika wzrostu 2) oraz równie powszechnie w przypadku nowotworów hematologicznych, klasyfikowanych według ekspresji charakterystycznych antygenów błonowych (np. CD4, CD19, CD20). Podział ten jest szczególnie użyteczny ze względu na nowe strategie leczenia celowanego wykorzystujące zdefiniowane cele molekularne, które odgrywają istotną rolę w patogenezie nowotworu. Poznanie charakterystyki molekularnej nowotworu otwiera drogę dla opracowania swoistych form terapii. [5,6,7,8]

1.2 Zarys patogenezy nowotworów złośliwych

Wiodąca koncepcja rozwoju nowotworów zakłada traktowanie nowotworzenia (kancerogenezy) jako procesu postępującej akumulacji zmian genetycznych, u podłoża których leżą mutacje genów odpowiedzialnych za stymulowanie proliferacji (protoonkogenów) oraz mutacje inaktywujące geny, których produkty ekspresji uczestniczą w regulowaniu cyklu komórkowego, procesu apoptozy a także naprawie uszkodzonego DNA (tzw. geny supresorowe). Na skutek powstałych zmian w komórce dochodzi do przewagi sygnałów stymulujących proliferację nad sygnałami antyproliferacyjnymi. W efekcie kontrola cyklu komórkowego ulega zaburzeniu. Transformowane nowotworowo komórki nabywają zdolność do nieograniczonych, niekontrolowanych podziałów komórkowych. Istotą powstania nowotworu jest utrata możliwości naprawy powstałych mutacji oraz regulacji kontroli cyklu komórkowego a następnie wymknięcie się supresyjnemu działaniu układu odpornościowego skutkujące rozwojem inwazyjności nowotworu. Transformowane nowotworowo komórki uzyskują przewagę selekcyjną nad komórkami nienowotworowymi w wyniku utraty kontroli nad cyklem komórkowym oraz nad apoptozą, w wyniku czego może dochodzić do dynamicznej ekspansji nowotworu w obrębie tkanek oraz jego rozsiewu. W kontekście progresji nowotworu oraz zwiększania jego inwazyjności równie istotną rolę jak

akumulacja zmian genetycznych odgrywają interakcje proliferujących komórek nowotworowych z ich tkankowym środowiskiem oraz komórkami układu odpornościowego. [9,10,11,12,13]

Wśród dobrze poznanych czynników przyczyniających się do powstawania mutacji skutkujących nowotworzeniem wymienia się: wirusy (np. HPV, HCV, HTLV-1, EBV), niektóre bakterie (*H. pylori*), pasożyty takie jak *C. sinensis*, promieniowanie jonizujące, promieniowanie UV, czynniki środowiskowe takie jak produkty spalania węgla ze szczególnym uwzględnieniem policyklicznych węglowodorów aromatycznych (benzopiren) oraz toksyny zawarte w dymie tytoniowym, niektóre leki - w szczególności te o właściwościach alkilujących (np. chlorambucyl, cyklofosfamid), wolne rodniki, w tym głównie reaktywne formy tlenu (ROS), a także toksyny produkowane przez niektóre grzyby (np. z rodzaju *Aspergillus* produkujące aflatoksynę). W niektórych przypadkach powstawanie mutacji może być także procesem samoistnym, będącym rezultatem błędów powstałych podczas replikacji, rekombinacji lub naprawy DNA. [10]

Zmiany w genomie mogą prowadzić do zmian aktywności produktów zmutowanych genów lub wpływać na poziom ekspresji genów zwielokrotnionych lub translokowanych. Dla przykładu, poprzez translokację może dojść do przeniesienia genu (wraz z fragmentem chromosomu) odpowiedzialnego za regulację cyklu komórkowego na inny chromosom. Zdarzenie takie może prowadzić do utraty aktywności translokowanego genu, nabycia nowej właściwości przez produkt genu fuzyjnego, powstałego na drodze translokacji lub zmiany poziomu ekspresji genu w wyniku przeniesienia go wraz z fragmentem chromosomu w miejsce regulowane przez bardziej aktywny promotor, skutkując min. deregulacją mechanizmów proliferacji i apoptozy. Dobrze poznany przykładem jest powstawanie genu fuzyjnego *BCR/ABL* na drodze translokacji fragmentu chromosomu 9 na chromosom 22, czego rezultatem jest powstanie białka fuzyjnego o aktywności kinazy tyrozynowej. W konsekwencji białko fuzyjne *BCR/ABL* o zmienionej aktywności przyczynia się do nadmiernej stymulacji podziałów komórkowych, stając się głównym czynnikiem etiologicznym przewlekłej białaczki szpikowej (CML – *chronic myeloid leukaemia*). Do najlepiej poznanych protoonkogenów zalicza się: *RAS*, *KRAS*, *ERBB2*, *PI3KCA*, *MYC*, *CCND1*, natomiast wśród genów supresorowych o poznanej roli w kancerogenezie wymienić można m.in. : *TP53*, *RB*, *VHL*, *BRCA*, *ATM*, *NBS*, *CHK2*. [14,15,16]

ErbB2 (HER-2) należy do grupy receptorowych kinaz tyrozynowych (EGFR – *epidermal growth factor receptor*), stymulowanych przez czynniki wzrostu pochodzenia naskórkowego. W wyniku interakcji ligandów (czynników wzrostu) z zewnątrzkomórkową domeną receptora dochodzi do jego aktywacji, w wyniku której następuje dimeryzacja receptora, skutkująca fosforylacją kolejnych białek w szlaku sygnałowym związanym z HER-2. W wyniku tego aktywowane zostają wewnątrzkomórkowe szlaki transdukcji sygnału, wśród których wyróżnić można: RAS/RAF/MEK/ERK oraz PI3K/AKT/mTOR. Wymienione kaskady transdukcji sygnału pełnią istotną rolę w regulacji przeżywalności, proliferacji oraz metabolizmu komórek nowotworowych. Wykazano, że wzmożony poziom ekspresji genu kinazy tyrozynowej HER-2 występuje w przypadku 20-30% złośliwych nowotworów piersi. Nadekspresja HER-2 (wynikająca z amplifikacji proto-onkogenu *ERBB2*) w komórkach rakowych silnie koreluje z gorszym rokowaniem oraz bardziej agresywnym rozwojem choroby. [15,17,18]

Apoptoza jest procesem pozwalającym utrzymać homeostazę organizmów wielokomórkowych. W tym aktywnym procesie dochodzi do programowanej eliminacji starych, uszkodzonych komórek, dlatego zmiany genetyczne prowadzące do deregulacji tego procesu stanowią jeden z głównych mechanizmów kancerogenezy. Wyróżnia się dwie podstawowe ścieżki, na drodze których apoptoza może być inicjowana – ścieżkę zewnętrzną (ang. *extrinsic pathway*) oraz ścieżkę wewnętrzną (ang. *intrinsic pathway*). Inicjowanie apoptozy drogą ścieżki zewnętrznej jest w znacznym stopniu rezultatem aktywności wydzielanych przez komórki układu odpornościowego cząsteczek sygnałowych takich jak TNF (czynnik martwicy nowotworów – ang. tumor necrosis factor) oraz FASL (ligand FAS), oddziałujących na tzw. receptory śmierci komórkowej (ang. death receptors). W przypadku nowotworów do zaburzeń regulacji procesu apoptozy częściej dochodzi w obrębie sygnalizacji związanej ze ścieżką wewnętrzną, w której kluczową rolę odgrywają białka z rodziny BCL-2. Pośród nich wyróżnić można białka wykazujące aktywność antyapoptotyczną (np. BCL-2, BCL-XL, MCL-1) oraz charakteryzujące się antagonistycznymi właściwościami białka proapoptotyczne (BAX, BAK, BAD, BID, NOXA, PUMA). Zasadnicza rola białek z rodziny BCL-2 polega na modulowaniu przepuszczalności błon mitochondriów. Przykładowo aktywacja białek BAX i BAK skutkuje wzrostem przepuszczalności zewnętrznej błony mitochondrialnej, umożliwiając tym samym uwalnianie cytochromu C z mitochondriów do cytoplazmy,

czego konsekwencją jest aktywacja kaspaz inicjatorowych, rozpoczynających kaskadę reakcji, która ostatecznie prowadzi do programowanej śmierci komórki. Do głównych czynników stymulujących szlak wewnętrzny apoptozy zalicza się: hipoksję, uszkodzenia w obrębie DNA a także stres oksydacyjny. Zmiana poziomu ekspresji genów dla wymienionych białek może w znaczący sposób przyczyniać się do zwiększenia ryzyka rozwoju nowotworu. Wykazano, że nadekspresja genu antyapoptotycznego białka BCL-2 dotyczy może nawet co drugiego nowotworu złośliwego u ludzi. Warto zwrócić szczególną uwagę na nowotwory złośliwe układu hematopoetycznego. Wykazano, że wzrost ekspresji genów kodujących antyapoptotyczne białka BCL-2 oraz BCL-XL występuje powszechnie w przypadku niezrnowotworzonych chłoniaków z komórek B (B-NHL – non - Hodgkin B cell lymphoma). Dodatkowo białko BCL-2 może stanowić molekularny cel dla precyzyjnych form leczenia wspomnianych powyżej chłoniaków. Wenetoklaks – selektywny inhibitor BCL-2 jest lekiem zarejestrowanym przez FDA w leczeniu przewlekłej białaczki limfoblastycznej (CLL – chronic lymphocytic leukemia) – układowej formy chłoniaka z małych limfocytów B (SLL – small lymphocytic lymphoma). Trwają badania szczegółowo oceniające efektywność Wenetoklaksu w leczeniu innych B-NHL. Wiele leków antynowotworowych wywiera swój efekt poprzez stymulowanie wewnętrznej lub zewnętrznej ścieżki apoptozy. Z uwagi na zaburzenie sygnalizacji proapoptotycznej w komórkach nowotworowych, zmiana poziomu ekspresji genów dla białek z rodziny BCL-2 może w istotny sposób przyczyniać się do rozwoju oporności na znane formy leczenia. ^[19,20,21]

Większość zgonów (ponad 90%) związanych z chorobą nowotworową spowodowana jest uogólnieniem choroby w procesie tworzenia przerzutów odległych. Dynamika tworzenia przerzutów jest zależna od typu nowotworu, statusu mutacji komórek nowotworu, stopnia zaawansowania choroby, zastosowanego leczenia oraz indywidualnych predyspozycji pacjenta chorującego na nowotwór. Rozsiew choroby nowotworowej drogą tworzenia przerzutów może następować przy udziale układu krwionośnego, limfatycznego lub drogą ciągłości tkanek (np. rozsiew do jamy otrzewnej). Na poziomie molekularnym istotnym mechanizmem zaangażowanym w rozsiew nowotworów złośliwych jest przejście nabłonkowo mezenchymatyczne (ang. EMT – epithelial to mesenchymal transition). W procesie tym następują zmiany polaryzacji oraz adhezji komórkowej, skutkujące wzrostem zdolności do migracji komórek. Adhezja (przyleganie) komórek jest w istotny sposób modulowana przez

aktywność E-kadheryny oraz N-kadheryny. W przypadku wielu nowotworów złośliwych szlak sygnałowy związany z interakcją WNT/ β -kateniny pełni wszechstronną rolę w procesie EMT. Ścieżka transdukcji sygnału zależna od WNT/ β -Kat w istotny sposób wpływa na funkcjonowanie komórek, uczestnicząc w regulacji adhezji komórkowej, migracji komórek, proliferacji, różnicowania oraz przeżywalności. Na aktywność ścieżki sygnałowej WNT/ β -Kat wpływ wywierają białkowe produkty ekspresji onkogenów oraz genów supresorowych. Wśród czynników aktywujących tę ścieżkę wyróżnić można min. TGF- β oraz RAS, natomiast białko P53 pełni rolę inhibitora względem sygnalizacji zależnej od WNT/ β -Kat. Na intensywność sygnalizacji WNT/ β -Kat wpływ wywierają również ncRNA. Mogą one oddziaływać zarówno na poziomie interakcji z bezpośrednimi regulatorami aktywności szlaku sygnalizacyjnego, regulacji ekspresji określonych genów oraz indukując zmianę stabilności samej β -kateniny. Aktywowana β -katenina ulega translokacji do jądra komórkowego, gdzie na drodze interakcji z czynnikami transkrypcyjnymi wywiera wpływ na ekspresję genów, odpowiedzialnych za regulację istotnych z punktu widzenia kancerogenezy procesów komórkowych, które zostały wymienione powyżej. W tworzeniu przerzutów równie istotną rolę odgrywa tworzenie nowych naczyń (neoangiogeneza), mających zapewnić dostęp do substratów dla reakcji metabolicznych intensywnie proliferującym komórkom nowopowstałego ogniska nowotworu. W procesie angiogenezy towarzyszącej progresji choroby nowotworowej zasadniczą rolę odgrywają określone czynniki wzrostu – np. EGF, VEGF, oraz TGF, które mogą być wydzielane przez komórki nowotworu. Stymulując aktywność enzymów MMPs (ang. matrix metalloproteinases – metaloproteinazy macierzy pozakomórkowej), które trawią składniki macierzy pozakomórkowej, czynniki te umożliwiają penetrację nowopowstałych naczyń krwionośnych w głąb tkanek, zapewniając tym samym dostęp do składników odżywczych tworzącemu się ognisku przerzutowemu. Dodatkowo naczynia powstałe w procesie indukowanym przez nowotwór posiadają liczne wady strukturalne, w tym charakterystyczną dla nich zwiększoną przepuszczalność śródbłonna, która ułatwia komórkom nowotworowym rozsiew do odległych miejsc organizmu drogą układu krwionośnego. W miarę inwazji kolejnych tkanek przez komórki nowotworowe ulegające rozsiewowi dochodzi do istotnego zaburzenia homeostazy organizmu. Najczęstszymi lokalizacjami tworzenia przerzutów przez nowotwory złośliwe są: węzły chłonne, kości, wątroba, płuca oraz mózg. Tworzenie ognisk przerzutowych w obrębie wspomnianych narządów może prowadzić do wystąpienia stanów bezpośredniego zagrożenia życia. Pośród nich

wymienić można: zespół lizy guza, hiperkalcemię, nadciśnienie śródczaszkowe, zespół żyły głównej górnej, zaburzenia równowagi kwasowo zasadowej (hiponateremia, hiperkalemia), zespół nadlepkości krwi, niedrożność oraz krwawienia z przewodu pokarmowego. Warto również zwrócić uwagę, że uogólnieniu choroby nowotworowej towarzyszą uciążliwe dla pacjenta objawy, wśród których jako pierwszoplanowe możemy wymienić: ból, utratę apetytu, przewlekłe zmęczenie, nudności, wymioty, osłabienie siły mięśniowej oraz depresję. Obecność wymienionych objawów w istotnym stopniu przyczynia się do rozwoju niedożywienia oraz utraty masy mięśniowej. W konsekwencji pacjenci onkologiczni w stadium rozsiewu choroby bardzo często tracą zdolność do samodzielnego funkcjonowania a poziom jakości ich życia ulega znacznemu pogorszeniu, stanowiąc istotny problem oraz wyzwanie podczas prowadzenia terapii. [22-37]

Choroby nowotworowe oraz ich leczenie stanowią znaczące wyzwanie dla ochrony zdrowia. Skrócenie przewidywanej długości życia jak również pogorszenie jego jakości wśród chorych, z których spora część wciąż znajduje się w wieku produkcyjnym pociąga za sobą istotne konsekwencje ekonomiczne. W dodatku wdrażanie efektywnych, nowoczesnych terapii wymaga olbrzymich nakładów finansowych, przekładając się na dodatkowe obciążenie systemu ochrony zdrowia. Równie ważne, a być może nawet kluczowy jest to, że nowotwór złośliwy stanowi uporczywe źródło cierpienia z perspektywy osoby chorej, a także wśród osób z jego najbliższego otoczenia, istotnie wpływając na standard życia oraz możliwość realizacji życiowych celów przez chorego, a także całe grupy ludzi związane z nim. W obliczu tego poszukiwanie skutecznych i ekonomicznie efektywnych metod terapeutycznych chorób nowotworowych stanowi wciąż istotny cel oraz wyzwanie dla naukowców i lekarzy. [37,38,39,40]

2. Obecny stan wiedzy na temat farmakoterapii wybranych nowotworów złośliwych, podstawowych mechanizmów oporności na chemoterapeutyki oraz systemów transportu leków

W tym rozdziale zostaną opisane nowoczesne metody farmakoterapii nowotworów złośliwych, na których modelach komórkowych badana była aktywność przeciwnowotworowa koniugatów leków z dendrymerami PAMAM różnych generacji (w przedłożonym cyklu publikacji). Dodatkowo przedstawione zostaną najważniejsze z punktu widzenia farmakoterapii mechanizmy oporności na leki przeciwnowotworowe oraz koncepcja stosowania systemów transportu leków (DDS – ang. drug delivery systems) jako narzędzia umożliwiającego poprawę biodostępności leków. Oczekiwanym efektem stosowania tej strategii jest też wzrost wrażliwości komórek nowotworowych na działanie oraz zwiększenie selektywności oddziaływania leków transportowanych przy użyciu DDS. Szczególna uwaga poświęcona zostanie dendrymerom poliamidoaminowym (PAMAM dendrimers – ang. polyamidoamine dendrimers), których skuteczność stosowania jako DDS była badana w cyklu publikacji.

2.1 Glejak Wielopostaciowy (GBM - ang. glioblastoma multiforme) ^[41-43]

GBM jest najczęściej występującym pierwotnym nowotworem złośliwym mózgu. Charakteryzuje się bardzo niekorzystnym rokowaniem z wskaźnikiem 5-letniego przeżycia szacowanym na 7.2%. Standardem terapii jest leczenie chirurgiczne wspierane przez chemioterapię, w której wykorzystuje się Temozolomid (TMZ). Istotną przeszkodę dla farmakoterapii GBM stanowi bariera krew-mózg, która utrudnia penetrację leków do tkanki nowotworowej. Głównym chemoterapeutycznym stosowanym w leczeniu GBM jest TMZ. TMZ podawany jest standardowo po leczeniu chirurgicznym w 6 cyklach w dawce 75mg/m^2 przez 5 dni na każde 28 dni. Głównym skutkiem ubocznym stosowania leku są zaburzenia hematologiczne (trombocytopenia). Wspomagająco względem leczenia chirurgicznego stosuje się także implanty z Karmustyną, jednakże istotną wadą tej metody jest wzrost ryzyka infekcji wewnątrzczaszkowych oraz upośledzenie procesu gojenia po zabiegu operacyjnym. Dodatkowo w przypadku nawrotowego GBM standardowo stosowana jest Lomustyna, która może być stosowana doustnie z uwagi na lipofilność oraz mały rozmiar cząsteczki, ułatwiające przenikanie przez barierę krew-mózg. Kolejną opcję terapeutyczną stanowi przeciwciało monoklonalne hamujące

aktywność VEGF-A (bewacyzumab). Mimo wydłużenia czasu bez progresji podczas stosowania Bewacyzumagu, nie wykazano istotnego wpływu na całkowity czas przeżycia u pacjentów stosujących lek. Prowadzone są badania nad zastosowaniem bewacyzumabu w kombinacji z inhibitorem topoizomerazy I – irynotekaniem. Trwają badania nad nowymi metodami farmakoterapii GBM. Intensywnie testowane są inhibitory szlaków molekularnych, ulegających amplifikacji w rozwoju GBM. Wśród nich warto wymienić inhibitory mTOR, PARP, MCL-1, FGFR, EGFR, VEGFR oraz PDGFR. Cząsteczki te są testowane samodzielnie lub w kombinacji ze standardowymi chemoterapeutykami takimi jak TMZ, co ma na celu uwrażliwienie komórek GBM na działanie standardowych leków oraz potencjalizację ich działania. Testowane są także leki immunologiczne tzw. „inhibitory immunologicznych punktów kontrolnych” (ang. immune checkpoint inhibitors), skierowane przeciw cząsteczką PD-1, PD-L1, CTLA-4. Podejmowane są również próby wykorzystania nanocząstek jako DDS dla leków przeciwnowotworowych stosowanych w leczeniu GBM. Wśród nich wykorzystywane są micele, liposomy, dendrymery oraz nanorurki. Podejście to zakłada wzrost penetracji bariery krew-mózg przez leki transportowane przy użyciu nanocząstek oraz w konsekwencji poprawę biodostępności i efektywności działania chemoterapeutyków. Dodatkową zaletą stosowania niektórych nanocząstek np. dendrymerów jest to, że ich struktura chemiczna pozwala również na przyłączanie cząsteczek adresujących, które swoiście wiążą się z celami molekularnymi ulegającymi amplifikacji w komórkach konkretnych nowotworów. Odkryto, że strategię stosowania nanocząstek jako DDS w GBM może przyczyniać się do wzrostu resekcyjności guza, poprawy efektywności chemioterapii przy jednoczesnym ograniczeniu skutków ubocznych oraz potencjalizacji radioterapii. W celu walki z ograniczeniami biodostępności leków spowodowanych obecnością BBB (blood-brain barrier) testuje się także stosowanie alternatywnych metod podawania leków, wśród których najwięcej uwagi poświęca się podaniu donosowemu oraz podaniu bezpośrednio do (nieresekcyjnego) guza drogą iniekcji. Odkryto także, że u większości ludzkich glejaków zachodzi wzmożona synteza COX-2 (cyklooksygenazy 2) - enzymu pełniącego zasadniczą rolę w rozwoju reakcji zapalnej. Zaobserwowano także związek pomiędzy wzrostem poziomu COX-2 a większą inwazyjnością GBM oraz gorszym rokowaniem. W związku z tym zaczęto testować powszechnie stosowane leki przeciwzapalne (inhibitory COX) pod kątem ich aktywności antyproliferacyjnej względem GBM. W badaniach prowadzonych na modelach komórkowych GMB (U138-MG) zaobserwowano obniżony poziom proliferacji komórek gliomy po zastosowaniu

inhibitorów COX (indometacyna, sulindak). Dodatkowo badania efektywności celekoksybu na COX- dodatnich modelach komórkowych GBM również wykazały hamowanie proliferacji po zastosowaniu leku. Ponadto testy na myszach z xenograftem GBM wykazały wzrost efektywności działania standardowego chemoterapeutyku TMZ przez celekoksyb. Warto dodać, że w badaniach kliniczno – kontrolnych zaobserwowano, że pacjenci regularnie stosujący leki przeciwzapalne z grupy inhibitorów COX mieli istotnie zmniejszone ryzyko zachorowania na GBM. Jednakże badania kliniczne II fazy nad zastosowaniem celekoksybu w kombinacji z temozolomidem oraz kwasem 13-*cis*-retinowym nie przyniosły pożądaných efektów, w związku z czym użyteczność celekoksybu w terapii pacjentów z GBM wymaga dalszych badań.

2.2 Rak Koleczystokomórkowy (SSC – ang. squamous cell carcinoma) [44- 50]

Rak koleczystokomórkowy to grupa heterogennych nowotworów złośliwych wywodzących się z keratynocytów, różniących się pod względem morfologii, dynamiki wzrostu oraz potencjału do tworzenia przerzutów. Skórny rak koleczystokomórkowy jest drugim najczęstszym nowotworem złośliwym skóry u ludzi (pierwszym jest rak podstawnokomórkowy). Natomiast rak koleczystokomórkowy jamy ustnej (OCSCC - ang. oral cavity squamous cell carcinoma) należy do najczęstszych nowotworów złośliwych głowy i szyi (HNC - ang. *head and neck cancers*). Ze względu na wysoką śmiertelność, potencjał do tworzenia przerzutów oraz ryzyko nawrotu, OCSCC stanowi istotne wyzwanie z punktu widzenia zdrowia publicznego w skali światowej. Język, dno jamy ustnej oraz wargę dolną należą do najczęstszych miejsc występowania OCSCC. Standardem terapii OCSCC jest leczenie chirurgiczne wspomagane radioterapią lub chemioterapią, które stosowane mogą być zarówno przed jak i po zabiegu. Niestety zabiegi chirurgiczne oraz radioterapia mogą powodować powstanie deformacji, które przez swoje umiejscowienie w jamie ustnej stanowią nie tylko problem natury kosmetycznej ale niekiedy też upośledzają zdolność chorego do wokalizacji oraz przyjmowania pokarmów, znacząco pogarszając jakość życia. Zastosowanie chemioterapii jako leczenia wspomagającego zabieg chirurgiczny może nieść ze sobą korzyści w postaci ograniczenia ryzyka rozległych okaleczających zabiegów (resekcja żuchwy) oraz zmniejszenie ryzyka rozwoju przerzutów odległych. W leczeniu systemowym (chemioterapii) stosowane są pochodne platyny (*cis*-platyna, karboplatyna),

docetaksel, 5-fluorouracyl, paklitaksel. Leki te stosowane są w skojarzeniu, dlatego wśród powszechnie wykorzystywanych schematów leczenia wymienia się CF (cisplatyna, 5-fluorouracyl) oraz DCF (docetaksel, cisplatyna, 5-fluorouracyl). *Cis*-platyna stosowana jest również w skojarzeniu z radioterapią. Jednakże, istotnymi ograniczeniami chemioterapii są brak wystarczającej selektywności, przyczyniający się do rozwoju uciążliwych systemowych skutków ubocznych (takich jak: neutropenia, zapalenie błon śluzowych, nudności oraz wymioty, oto- oraz nefro-toksyczność). Dodatkowo występuje rozwój oporności na leki w przebiegu terapii. W związku z tym prowadzone są badania nad bardziej precyzyjnymi formami leczenia. Biorąc pod uwagę, że w wyniku specyfiki metabolizmu komórek nowotworowych, otoczenie guzów złośliwych ma najczęściej pH poniżej 7 (standardowe pH nienowotworowych tkanek oscyluje wokół 7.4), trwają próby zastosowania DDS, dla których uwalnianie leków jest indukowane przez niskie pH. W badaniach na modelach komórkowych OCSCC odkryto, że zastosowanie utlenionej formy nanografenu jako DDS dla (niekwalencyjnie przyłączonej) doxorubicyny pozwoliło osiągnąć korzystniejszą dynamikę uwalniania leku oraz wydłużenie jego okresu półtrwania. Obiecujące wyniki w badaniach *in vitro* przyniosło także zastosowanie metforminy w kombinacji z inhibitorem deacetylazy histonów (HDACi). Kombinacja ta hamując przekazywanie sygnału w obrębie ścieżki sygnałowej STAT3/TWIST1 pozwoliła w istotny sposób ograniczyć zdolności migracyjne oraz inwazyjność komórek OCSCC. Dodatkowo zaobserwowano, że kombinacja cetuksymabu i *cis*-platyny dostarczana przy użyciu peg-ylowanych nanocząstek złota może w niskich dawkach skutecznie uwrażliwiać komórki OCSCC odporne na radioterapię względem tej formy leczenia. W badaniach klinicznych obiecującą skuteczność wykazały przeciwciała monoklonalne skierowane przeciw PD-1 – nivolumab oraz camrelizumab w kombinacji z antagonistą VEGFR 2 apatinibem. Pembrolizumab – inny lek z grupy inhibitorów immunologicznych punktów kontrolnych został w czerwcu 2019r. zatwierdzony przez FDA jako leczenie pierwszej linii raka kłoczystokomórkowego głowy i szyi (HNSCC – ang. head and neck squamous cell carcinoma). Ponadto *cis*-platyna dostarczana przy wykorzystaniu PRV111 – systemu do transportu leków przez błonę śluzową opartego na chitozanie, charakteryzowała się zwiększonym profilem bezpieczeństwa, a także wyższą skutecznością u pacjentów z miejscowo zaawansowanym OCSCC. U tych pacjentów zaobserwowano również znacznie większą dystrybucję *cis*-platyny w tkankach nowotworowych przy zanedbywalnym stężeniu tego leku we krwi w porównaniu do rezultatów podania *cis*-platyny w standardowy sposób. Cetuksymab – przeciwciało

monoklonalne skierowane przeciw receptorowi dla naskórkowego czynnika wzrostu (EGFR) został zatwierdzony przez FDA do leczenia OCSCC w 2006. Do tej pory pozostaje on główną formą leczenia ukierunkowanego na cele molekularne (ang. molecular targeted therapy) w terapii OCSCC. Rezultaty te pokazują, że potencjał bardziej precyzyjnych form terapii OCSCC, ze szczególnym uwzględnieniem zastosowania DDS, jest wciąż nie w pełni wykorzystany i wymaga dalszych badań.

2.3 Rak Piersi (BC – ang. Breast Cancer) ^[51-54]

Rak Piersi (BC) stanowi jedną z najczęstszych przyczyn zgonów spowodowanych chorobą nowotworową wśród kobiet. Dotykając w istotnym stopniu stosunkowo młode grupy wiekowe, BC stwarza jedno z priorytetowych wyzwań na polu walki z rakiem. Pod względem molekularnym BC jest zróżnicowaną grupą chorób nowotworowych, różniących się dynamiką, przebiegiem oraz rokowaniem. Wyróżnia się 4 zasadnicze podtypy molekularne BC zdeterminowane statusem amplifikacji określonych receptorów (Luminalny A, Luminalny B, HER2-dodatni oraz potrójnie ujemny). W określaniu molekularnego fenotypu raka piersi bierze się pod uwagę amplifikację receptorów dla estrogenów (ER), progesteronu (PR) oraz ludzkiego naskórkowego czynnika wzrostu (HER2). Kluczową formą terapii BC pozostaje leczenie chirurgiczne. W zależności od stopnia zaawansowania, zajęcia węzłów chłonnych czy obecności przerzutów odległych, specyfiki molekularnej nowotworu, leczenie chirurgiczne może wchodzić w skład leczenia multimodalnego, na które składają się również: radioterapia, chemioterapia, hormonoterapia oraz leczenie skierowane przeciw celom molekularnym. W leczeniu systemowym wykorzystywane są wielolekowe schematy leczenia oparte głównie o leki z grupy taksanów oraz antracyklin. Wśród taksanów preferowane są paklitaksel oraz docetaksel, natomiast stosowanym lekiem z grupy antracyklin jest doxorubicyna. Do schematów leczenia systemowego dołączany jest również cyklofosfamid. Stosowanie leczenia systemowego przedoperacyjnie ma na celu poprawę, a niekiedy nawet umożliwienie resekcyjności guza, natomiast chemioterapia pooperacyjna przyczynia się do redukcji ryzyka tworzenia przerzutów odległych oraz wznowy. U pacjentek z HER2 pozytywnym (HER2+) BC dodatkową opcję terapeutyczną w stosunku do standardowej chemioterapii stanowić może leczenie swoiście skierowane przeciw HER2 lub ścieżki sygnalizacyjnej związanej z tym receptorem. W takiej sytuacji u pacjentek w I stopniu

zaawansowania nowotworu powszechnie stosowana jest kombinacja trastuzumabu – przeciwciała monoklonalnego anty HER2 z paklitakselem. Dodatkowo w 2013 FDA zatwierdziła inne przeciwciało monoklonalne skierowane przeciw HER2 (pertuzumab) do leczenia pacjentek z HER2+ BC w stadium II/III jako dodatek do schematów leczenia opartych o standardowe cytostatyki i trastuzumab (np. trastuzumab + docetaksel). Wśród pacjentek z zaawansowanym lub dającym przerzuty HER2+ BC opcję terapeutyczną stanowi lapatinib – selektywny, odwracalny inhibitor domeny o aktywności kinazy tyrozynowej receptora HER2. Lek ten zarejestrowany jest do stosowania u pacjentek z HER2+ zaawansowanym lub dającym przerzuty BC w kombinacji z kapecytabiną w przypadku udowodnionej progresji pomimo stosowania taxanów, antracyklin oraz trastuzumabu. Kolejne wskazanie do stosowania tego leku w kombinacji z inhibitorami aromatazy stanowi HER2+ ER+ BC u pacjentek będących w wieku postmenopauzalnym, które nie mają wskazań do zastosowania chemioterapii. Leczenie hormonalne jest wykorzystywane w grupie pacjentek z BC wykazującym amplifikację receptorów hormonalnych (ER+, PR+). U kobiet w wieku przedmenopauzalnym stosowane są tamoksyfen, oraz fulvestrant, których mechanizm działania polega na hamowaniu aktywności receptora estrogenowego (ER), natomiast w grupie pacjentek będących w wieku postmenopauzalnym preferuje się inhibitory aromatazy, których działanie polega na hamowaniu aktywności enzymu kluczowego dla syntezy estrogenów. W dodatku inny lek, którego mechanizm działania również wynika z modulowania aktywności ER – raloksyfen, jest wykorzystywany w profilaktyce rozwoju BC u kobiet po menopauzie. Z różnych przyczyn efektywność oraz tolerancja wymienionych metod mogą być znacząco obniżone. Stosowanie standardowych cytostatyków takich jak doxorubicyna może nieść ze sobą zwiększone ryzyko uszkodzenia mięśnia sercowego (obejmującego także niewydolność serca), natomiast leczenie hormonalne z wykorzystaniem tamoksyfenu przyczynia się do wzrostu ryzyka rozwoju raka endometrium. Istotnym aspektem jest także ograniczona biodostępność leków jako rezultat ich metabolizowania w organizmie. W przypadku raloksyfenu metabolizm pierwszego przejścia może się wiązać z redukcją biodostępności tego leku nawet do poziomu 2%. Z kolei biodostępność paklitakselu może być w istotnym stopniu ograniczona z uwagi na jego hydrofobowość. Trwają liczne badania kliniczne oceniające skuteczność oraz bezpieczeństwo nowych leków modulujących aktywność ER. Część z nich została już zatwierdzona przez FDA. Aby poprawić biodostępność jednego z głównych chemioterapeutyków stosowanych w leczeniu BC opracowano nanocząsteczkowy kompleks paklitakselu z albuminą. Strategia

ta okazała się na tyle skuteczna że wspomniany kompleks jest obecnie zatwierdzony przez FDA do leczenia BC oraz innych nowotworów złośliwych (nie drobnokomórkowy rak płuca, rak trzustki). Celem ograniczenia układowych skutków ubocznych terapii BC oraz poprawy skuteczności (redukcja lekooporności) trwają badania nad opracowaniem celowanych metod farmakoterapii, których istota polega na hamowaniu aktywności konkretnego szlaku sygnałowego, w obrębie którego wzrost intensywności przekąźnictwa leży u podstawy patogenezy konkretnego nowotworu. Inhibitory mTOR (ang. mammalian target of rapamycin) są testowane jako celowana forma leczenia HR+ HER2- BC. Jeden z nich – everolimus został już zarejestrowany do stosowania w tym wskazaniu jako element terapii skojarzonej (Everolimus + inhibitor aromatazy). Alpelisib – selektywny inhibitor kinazy PI3K został zatwierdzony przez FDA w 2019r. do leczenia wykazującego mutację genu *PIK3CA* HR+ HER2- BC w skojarzeniu z fulvestrantem. Badania kliniczne nad wykorzystaniem innych inhibitorów kinaz z tej grupy jako monoterapii lub składowej leczenia skojarzonego są powszechnie prowadzone. W zaawansowanej fazie badań klinicznych testowane są również leki hamujące działanie kinazy białkowej b (znanej też jako Akt), która stanowi element wyższego piętra ścieżki sygnałowej wykorzystującej kinazę mTOR. Kolejnymi lekami z grupy inhibitorów kinaz, znajdujących zastosowanie w leczeniu BC są inhibitory CDK4/6 (kinaz zależnych od cyklin). Trzy spośród nich – palbociclib, ribociclib, abemaciclib, uzyskały rejestrację do zastosowania w leczeniu HR+ HER2- BC w skojarzeniu z terapią antyestrogenową. W grupie pacjentek BC posiadających mutację w genie *BRC1* w leczeniu celowanym wykorzystanie znalazły inhibitory PARP (Polimerazy poli-ADP-rybozy) – enzymu odpowiedzialnego za regulację procesów naprawy DNA. Dwa leki z tej grupy – olaparib oraz talazoparib są obecnie zarejestrowane przez FDA do leczenia pacjentek z HER2- BC, u których występuje mutacja w genie *BRC1*. Kolejna koncepcja powszechnie wykorzystywana w ramach terapii celowanej polega na koniugowaniu leków przeciwnowotworowych z przeciwciałami monoklonalnymi skierowanymi przeciw specyficznym dla danego nowotworu receptorom. Mertanzyna – lek hamujący polimeryzację mikrotubul poprzez wiązanie tioeterowe został przyłączony do trastuzumabu. Koniugat ten (trastuzumab – emtansine) uzyskał w 2013r. zatwierdzenie przez FDA do leczenia HER2+ BC. Derukstekan jest inhibitorem topoizomeraży, który został wykorzystany do otrzymania koniugatu z trastuzumabem. Koniugat ten (trastuzumab – deruxtecane; TD) uzyskał rejestrację do stosowania w terapii nieresekcyjnego lub dającego przerzuty HER2+ BC w 2019r. TD wykazuje dużą

skuteczność w leczeniu pacjentek z przerzutami BC do mózgu. Inne przeciwciała monoklonalne - sacytuzumab, skierowane przeciwko antygenowi trofoblastu 2 (Trop-2) zostało skoniugowane z innym inhibitorem topoisomerazy I gowitekanem. Koniugat ten został zatwierdzony jako leczenie III linii u pacjentek z potrójnie ujemnym BC, u których występują przerzuty odległe. Prowadzone są również badania nad zastosowaniem leczenia immunologicznego w terapii BC. Szczególną uwagę poświęca się inhibitorom PD-1/PD-L1. Lek z tej grupy – atezolizumab uzyskał rejestrację do stosowania jako element terapii skojarzonej z Paklitakselem u pacjentek z potrójnie ujemnym BC. Intensywnie badaną strategią mającą na celu poprawę efektów terapii systemowej jest wykorzystanie nanocząstek jako nośników dla leków przeciwnowotworowych. We wcześniejszej części tekstu został przytoczony przykład zastosowania nanocząsteczkowego kompleksu paklitakselu z albuminą (NabP). Obecnie analogiczna strategia jest testowana dla rapamycyny (NabR). Ponadto prowadzone są również badania nad wykorzystaniem liposomów jako DDS dla doksorubicyny oraz docetakselu celem poprawy skuteczności leczenia oraz redukcji działań niepożądanych. W dodatku trwają badania nad oceną użyteczności stosowania tak zwanej chemioterapii metronomicznej, czyli strategii leczenia polegającej na bardzo częstym podawaniu cytostatyków w najmniejszych możliwych dawkach bez dłuższych przerw w leczeniu. Strategia ta ma potencjalnie zapewnić lepszy efekt immunomodulujący oraz antyangiogeny. Powyższe przykłady ukazują, że badania nad nowatorskimi metodami leczenia systemowego BC jest dynamicznie rozwijającą się dziedziną farmakoterapii nowotworów.

2.4 Ostra Białaczka Szpikowa (AML – ang. acute myeloid leukemia) [55-58]

Ostra Białaczka Szpikowa (AML) jest stosunkowo rzadkim nowotworem złośliwym wywodzącym się z komórek linii szpikowej, który obejmuje kilka podtypów. Podtypy AML wyróżnia się na podstawie charakterystyki komórek, z których się wywodzi oraz obecności określonych mutacji genetycznych, które determinują przebieg choroby, rokowanie oraz możliwości terapeutyczne. Pośród nich wyróżnić można Ostrą Białaczkę Promielocytową (APL – ang. acute promyelocytic leukemia), charakteryzującą się obecnością translokacji t(15;17)(q24;q21), której rezultatem jest powstanie zmutowanej wersji receptora dla kwasu retinowego alfa (RAR- α – ang. *retinoic acid receptor alpha*). Inny podtyp stanowią białaczki z grupy CBF (core binding factor), charakteryzujące się

występowaniem następujących aberracji cytogenetycznych: [inv16(p13;q22)] lub t(16;16)(p13;q22)] oraz t(8;21)(q22;q22);. Leczenie AML obejmuje 3 fazy – indukcję, konsolidację oraz leczenie podtrzymujące. Powszechnie stosowanym leczeniem AML jest terapia skojarzona składająca się daunorubicyny oraz cytarabiny (Ara-C). Leki te podawane są w schemacie 3+7 – 3 dni podawania daunorubicyny + 7 dni ara-C (wykorzystywane są w fazie indukcji oraz konsolidacji). Niestety skuteczność tego leczenia mierzona odsetkiem 5-letnich przeżyć jest niezadowalająca. Odsetek ten nie przekracza 35% w populacji pacjentów przed 60r. życia, natomiast w grupie pacjentów powyżej 60r. życia waha się on pomiędzy 10% a 15%. Jednakże wprowadzanych jest coraz więcej celowanych form leczenia, które uwzględniają występowanie konkretnych mutacji determinujących fenotyp określonego podtypu AML. W leczeniu APL z uwagi na mutację RAR- α , zastosowanie znalazł kwas all-*trans* retinowy, umożliwiając znaczną poprawę rokowania. Lek ten jest elementem leczenia skojarzonego z trójtlenkiem arsenu, jednakże w ostatnich latach pojawiają się doniesienia o wyższej skuteczności terapii trójlekowej obejmującej wspomnianą kombinację rozszerzona poprzez dodanie idarubicyny. W przypadku AML z ekspresją antygenu CD33 zastosowanie znajduje gemtuzumab – ozogamicin (GO) – koniugat składający się z przeciwciała monoklonalnego anty CD33 oraz ozogamycyny, leku o właściwościach cytostatycznych. Wykazano, że dodanie tego koniugatu jako kolejnej składowej leczenia skojarzonego obejmującego daunorubicynę oraz ara-C przyczynia się istotnie do poprawy efektów leczenia. Zaobserwowano również znaczną poprawę wyników leczenia AML z grupy CBF (ang. core binding factor) po dodaniu GO do schematu leczenia obejmującego fludarabinę oraz wysokie dawki ara-C. Wychodząc naprzeciw potrzebom personalizacji leczenia w zależności od obecności konkretnych aberracji genetycznych, stosuje się coraz więcej celowanych form leczenia. Wśród nich wymienić można inhibitory: FLT3 (np. midostaurynę), IDH (np. IDH1i – ivosidenib, IDH2i – enasidenib. Istotnym w leczeniu AML lekiem celowanym jest też venetoklaks, będący inhibitorem antyapoptotycznego białka BCL-2, które ulega deregulacji w niektórych podtypach AML. Wysoce skuteczną strategią okazało się też wykorzystanie liposomów zawierających daunorubicynę z cytarabiną w stosunku stechiometrycznym 1:5. Preparat ten – Vyxeos, został już zatwierdzony do leczenia AML przez FDA. Wiele danych wskazuje na to, że istotną rolę w leczeniu AML może odgrywać azacytydyna (głównie jako składowa terapii skojarzonych). Doustna forma tego leku znana jako CC-486 została zarejestrowana do leczenia podtrzymującego AML. Należy dodać, że bardzo istotną rolę w terapii AML

pełni allogeniczny przeszczep komórek macierzystych szpiku. Zaletą tej strategii leczenia jest redukcja ryzyka wznowy oraz poprawa odsetka przeżyć w perspektywie długoterminowej. Niestety jest to procedura obciążona dużym ryzykiem zagrażających życiu działań niepożądanych, w związku z czym nie każdy pacjent może być do niej zakwalifikowany. Pomimo znacznego postępu na polu możliwości terapeutycznych AML oraz poprawy rokowania pod względem odsetka przeżywalności, wciąż istnieją wyzwania terapeutyczne, wymagające poszerzenia badań w tej dziedzinie. Kluczowym problemem jest ograniczenie możliwości leczenia w zależności od kondycji fizycznej pacjenta, determinowane obciążeniem dla organizmu wynikającym z wielolekowej terapii. W związku z tym wielu pacjentów ze znaczną wielochorobowością nie może być zakwalifikowana do leczenia metodą o wysokiej skuteczności. W obliczu tego istotne jest poszukiwanie nowych strategii leczenia pozwalających na redukcję jego toksyczności przy zachowaniu możliwie najwyższej skuteczności, tak aby jak największe grupy pacjentów mogły z takiego leczenia skorzystać.

2.5 Przewlekła Białaczka Szpikowa (CML – ang. chronic myeloid leukemia) ^[59,60]

Przewlekła Białaczka Szpikowa (CML) jest nowotworem złośliwym wywodzącym się z komórek linii szpikowej, którego etiologia zdeterminowana jest przez translokację t(9;22)(q34;q11), skutkującą powstaniem genu fuzyjnego *BCR/ABL*. Produkt tego genu wykazuje aktywność kinazy tyrozynowej, która przyczynia się do nadmiernego stymulowania proliferacji komórek posiadających gen *BCR/ABL*. Opracowanie selektywnych inhibitorów domeny kinazowej białka *BCR/ABL* (TKI – tyrosine kinase inhibitors) przyczyniło się do diametralnej poprawy rokowania pacjentów z CML przy zachowaniu zadowalającej jakości życia. Obecnie przewidywalna długość życia pacjentów odpowiadających na leczenie TKI nie różni się w znaczący sposób od wartości tego parametru dla populacji ludzi zdrowych. TKI stosowane w leczeniu CML podzielić można na 3 generacje. Do pierwszej z nich zalicza się: imatinib, do drugiej: dasatinib, bosutinib oraz nilotinib, natomiast trzecia generacja obejmuje ponatinib oraz asciminib. Wskazaniem do włączenia TKI wyższych generacji jest wystąpienie oporności na imatinib. Istotna jest też obecność mutacji *ABL1-T315*, która wiąże się z opornością na imatinib oraz TKI drugiej generacji. W przypadku pacjentów z CML wykazujących

obecność wspomnianej mutacji dedykowanym lekiem pozostaje ponatinib (TKI trzeciej generacji). W dodatku zmiana jednego TKI na inny (w obrębie tej samej generacji) może być podyktowana indywidualną tolerancją na konkretny lek. Pomimo wysokiej skuteczności oraz korzystnego profilu bezpieczeństwa TKI, w niektórych grupach pacjentów prowadzenie efektywnego leczenia może być ograniczane przez uciążliwe skutki uboczne. U pacjentów nie wykazujących odpowiedzi na leczenie selektywne zastosować można także alternatywne formy leczenia. Wśród młodszych pacjentów zastosowanie znajduje m.in. allogeniczny przeszczep komórek macierzystych szpiku, który stanowi formę leczenia definitywnego, dającego szansę na całkowite wyleczenie. W grupie pacjentów starszych allogeniczny przeszczep szpiku może wiązać się ze zbyt dużym ryzykiem z uwagi na wielochorobowość. Dlatego w tej grupie pacjentów zastosowanie znajduje włączenie kombinacji TKI z innymi lekami takimi jak: azacytydyna, decytabina, hydroksymocznik, cytarabina. Terapia taka ma na celu możliwie jak najlepszą kontrolę progresji choroby. Farmakoterapia CML ukazuje jak duży potencjał leczniczy mogą wносить leki selektywne, które działają na poziomie zdefiniowanego celu molekularnego. Bardzo wysoka skuteczność idąca w parze z wysoką selektywnością (ograniczającą działania niepożądane) daje pacjentom reagującym na leczenie szanse na zachowanie długości oraz stosunkowo wysokiej jakości życia pomimo choroby. Problemem wciąż wymagającym uwagi są rozwijające się w trakcie leczenia oporności na leczenie selektywne, występowanie w niektórych grupach pacjentów uciążliwych działań niepożądanych oraz ograniczenie możliwości leczenia z uwagi na występowanie chorób współistniejących, które wpływają na tolerancję leczenia.

2.6 Niedrobnokomórkowy Rak Płuca (NSCLC – ang. non small cell lung cancer)

[61,62]

Rak płuc (Lung Cancer – LC) stanowi jedną z najczęstszych przyczyn śmierci spowodowanych chorobą nowotworową w skali globalnej. Z uwagi na podstępny, skąpoobjawowy przebieg we wczesnych stadiach choroby, LC rozpoznawany jest najczęściej w momencie gdy choroba ma już inwazyjny charakter (naciekanie miejscowe, zajęcie węzłów chłonnych, przerzuty odległe). Wspomniana charakterystyka przebiegu LC generuje istotne wyzwania diagnostyczno – terapeutyczne z uwagi na to, że w przypadku chorych z rozpoznaniem LC w wysokim stadium zaawansowania skuteczne opcje

terapeutyczne są znacznie ograniczone a szanse na wyleczenie nikłe. Ze względu na charakterystykę histologiczną LC można podzielić na dwa podtypy: SCLC (small cell lung cancer – drobnokomórowy rak płuca) oraz NSCLC (non – small cell lung cancer – nie drobnokomórkowy rak płuca). Dodatkowy podział rozróżnia fenotypy LC pod względem rodzaju tkanki z jakiej się wywodzi. W tym przypadku podział wyróżnia raka pochodzenia nabłonkowego oraz gruczołowego. Większość LC zaklasyfikować można jako NSCLC. W kontekście leczenia NSCLC w niskich stadiach zaawansowania kluczową rolę odgrywa leczenie chirurgiczne – resekcja. Jednakże, w przypadku wyższych stopni zaawansowania potencjalne ryzyko zabiegu przewyższa oczekiwane korzyści. Z tego względu u chorych w zaawansowanym stadium choroby kluczową rolę w leczeniu odgrywa radio- oraz chemioterapia lub skojarzenie obu metod – radiochemioterapia. Do leków wykorzystywanych w chemioterapii NSCLC należą cisplatyna oraz karboplatyna. Leki te stosowane są w połączeniu z gemcytabiną, taksanami lub pemetrexedem. W ostatnich latach pojawia się coraz więcej opcji terapeutycznych wykorzystujących leki immunologiczne oraz leki ukierunkowane na cele molekularne. Leczenie immunologiczne obejmuje m.in. stosowanie inhibitorów immunologicznych punktów kontrolnych takich jak: ipilimumab, pembrolizumab oraz atezolizumab. Istotną rolę w terapii celowanej odgrywa hamowanie aktywności VEGFR. Bewacyzumab – przeciwciało monoklonalne skierowane przeciw VEGFR uzyskał rejestrację FDA do stosowania w leczeniu NSCLC jako element leczenia skojarzonego. Dane pokazują, że skojarzenie bewacyzumabu z leczeniem immunologicznym może nieść ze sobą istotną poprawę rokowania. Jako leczenie ukierunkowane na cele molekularne rejestrację do leczenia NSCLC posiada już kilka inhibitorów EGFR, wśród których wymienić można: gefitinib, erlotinib oraz afatinib (mutacja w genie dla receptora EGFR występuje stosunkowo powszechnie w NSCLC). Inną formę leczenia celowanego stanowi selektywne blokowanie aktywności kinazy ALK. Kilka inhibitorów wspomnianej kinazy uzyskało już rejestrację do leczenia NSCLC wykazującego ekspresję *ALK* (crizotinib, lorlatinib, alectinib, ceritinib, brigatinib). Trwają dalsze badania nad opracowaniem oraz oceną skuteczności leków celowanych oraz zastosowania ich w kombinacji z innymi metodami leczenia. Warto wspomnieć, że istotną rolę w patogenezie NSCLC stanowią mogą mechanizmy molekularne związane z aktywnością niekodującego RNA. Dane wskazują, że lncRNA CCAT1 pełni istotną rolę w procesie rozwoju NSCLC uczestnicząc m.in. w stymulowaniu procesu proliferacji komórek nowotworowych oraz zwiększaniu ich zdolności migracyjnych. Na modelach

komórkowych NSCLC wykazano, że wyciszenie ekspresji CCAT1 może znacząco wpłynąć na ograniczenie rozwoju nowotworu poprzez hamowanie wspomnianych procesów. Opracowanie selektywnych oraz wysoce skutecznych form leczenia NSCLC daje nadzieję na znaczną poprawę rokowania pacjentów z NSCLC.

2.7 Kluczowe mechanizmy oporności na leki przeciwnowotworowe ^[63-66]

Podczas prowadzenia leczenia onkologicznego, komórki nowotworowe podlegają ciągłym procesom adaptacji, które w efekcie przyczyniają się do ograniczenia skuteczności terapii. Szczególną rolę w procesach adaptacji pełnią tzw. „nowotworowe komórki macierzyste” (*Cancer Stem Cells – CSCs*), stanowiące populację komórek nowotworu, którą charakteryzuje zdolność do samoodnowy, potencjał do intensywnej proliferacji, nietypowe różnicowanie oraz duża plastyczność. Cechy te przyczyniają się do generowania dużej heterogenności komórek w obrębie guzów nowotworowych, co ułatwia powstawanie subpopulacji komórek opornych na stosowane leki. Rozwój oporności na leki może być warunkowany przez procesy takie jak: aktywne usuwanie leków z komórki, ograniczony transport do komórki, rozkład enzymatyczny leków, zmiana konformacji punktu uchwytu leku, zmieniony metabolizm komórek nowotworowych, hamowanie apoptozy, amplifikację onkogenów, zmiany epigenetyczne, interferencję RNA, a także interakcję komórek nowotworowych z ich środowiskiem zewnątrzkomórkowym oraz układem immunologicznym. Udowodniono, że oporność na DOX może być rezultatem wzmożonej aktywności transporterów błonowych z rodziny ABC (ang. atp binding cassette), które wykorzystując energię uwolnioną w wyniku hydrolizy ATP aktywnie transportują cząsteczki leku z komórki. W dodatku oporność na DOX może być także rezultatem wywołanej mutacją zmiany konformacji enzymu Topoizomerazy II, którego hamowanie stanowi jeden z mechanizmów przeciwnowotworowego efektu DOX (zmiana konformacji utrudnia wiązanie się leku w miejscu jego działania). Innym przykładem wpływu zmiany konformacji punktu uchwytu na rozwój lekooporności, jest spadek efektywności działania imatinibu w leczeniu CLL jako rezultat mutacji, której efektem jest zmiana konformacyjna fragmentu kinazy BCR/ABL, do którego przyłącza się ten TKI. W przypadku ara-C oporność na leczenie rozwijać może się na drodze regulacji w dół (*downregulation*) enzymu o aktywności fosforylazy (kinaza deoksycytydyny), który jest niezbędny do konwersji tego proleku w

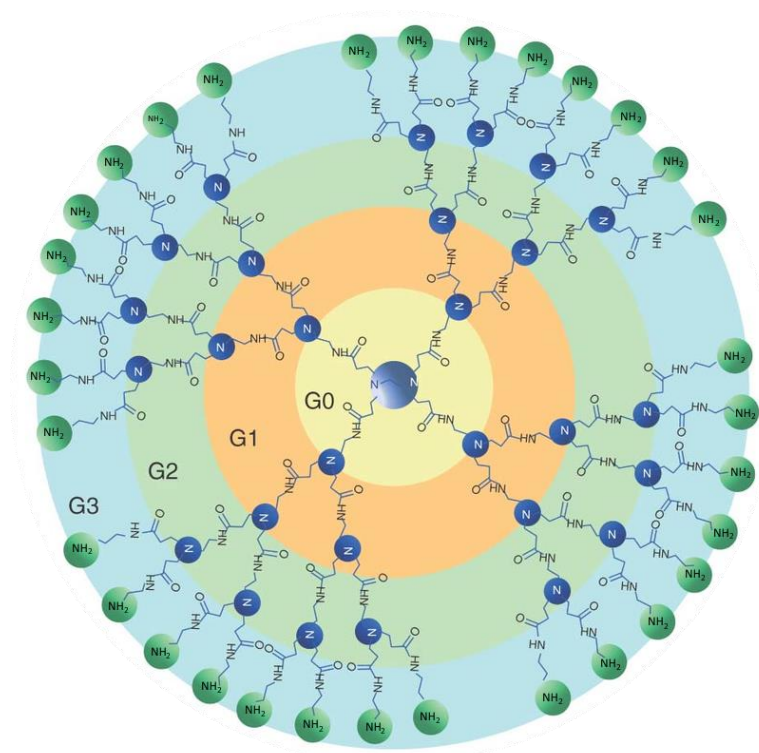
jego aktywną formę. Przykład udziału rozkładu enzymatycznego w rozwoju oporności na leki przeciwnowotworowe stanowić może oporność komórek NSCLC (A549) na paklitaksel. Na tym modelu komórkowym wykazano, że spadek wrażliwości na PTX skorelowany jest ze wzrostem aktywności jednej z izoform enzymu cytochromu CYP450 (CYP1B1). Jedną z głównych funkcji enzymów z tej grupy jest rozkład enzymatyczny leków. Przykładem roli ograniczonego transportu dokomórkowego leków w rozwoju oporności na terapię jest rozwój oporności na metotreksat (MTX) w ALL. Udowodniono, że wzrost oporności na MTX może być uwarunkowany spadkiem aktywności specyficznego transportera dla folianów (hRFC – *reduced folate carrier*). Z drugiej strony, zmniejszona wrażliwość na MTX może być także uwarunkowana amplifikacją genu reduktazy dihydrofolianowej, której MTX jest kompetycyjnym inhibitorem. Funkcja epigenetyki w procesie narastania lekooporności wynika z wpływu modyfikacji epigentycznych na stopień kondensacji chromatyny, determinujący poziom ekspresji genów. Wykazano, że stosowanie azacytydyny – leku o właściwościach hipometylujących, może w istotnym stopniu zwiększać wrażliwość komórek nowotworowych na leki antynowotworowe takie jak: cisplatyna, 5-fluorouracyl oraz winkrystyna. W kontekście roli interakcji komórek nowotworowych z ich otoczeniem komórkowym w rozwoju oporności na leczenie warto zwrócić uwagę na funkcję tzw. „fibroblastów związanych z nowotworem” – (*cancer associated fibroblasts*), które wydzielając czynniki wzrostu (HGF, EGF), IL6 oraz cytokiny mogą w znaczący sposób przyczyniać się do ograniczania odpowiedzi na leczenie. W dodatku sama specyfika metabolizmu komórek nowotworowych może istotnie przyczyniać się do zmiany warunków środowiska zewnątrzkomórkowego, w którym się znajdują. Produkcja przez nie dużych ilości mleczanu przyczynia się do istotnego obniżenia pH środowiska zewnątrzkomórkowego guzów nowotworowych, co stanowić może swego rodzaju barierę fizykochemiczną dla leków przeciwnowotworowych. Wysokie zdolności adaptacyjne komórek nowotworowych oraz wielotorowość rozwoju mechanizmów kompensacyjnych ograniczających efektywność leczenia stanowią jedno z głównych wyzwań leczenia onkologicznego.

2.8 Systemy transportu leków ze szczególnym uwzględnieniem roli dendrymerów PAMAM [67- 70]

Intensywnie badaną koncepcją walki z lekoopornością w terapii nowotworów złośliwych jest zastosowanie nanocząstek w roli systemów transportu leków (DDS). Pośród nich powszechnie testowane są: liposomy, micelle, nanorurki, polimery syntetyczne, nanocząstki złota, nanokompozyty oparte na chitozanie oraz dendrymery. Zalety płynące z zastosowania DDS to m.in.: zmodyfikowany profil uwalniania leków, uwalnianie zależne od pH, ograniczenie rozkładu enzymatycznego, poprawa rozpuszczalności, zwiększona akumulacja w tkankach nowotworowych oraz poprawa transportu dokomórkowego przyłączonych leków. W dodatku DDS mogą być modyfikowane poprzez kowalencyjne przyłączenie cząsteczek będących substratami dla receptorów ulegających amplifikacji w komórkach nowotworowych (tzw. „cząsteczki adresujące” – targeting molecules; TM). Taka strategia ma na celu zwiększenie selektywności transportu leków, tak aby zmniejszyć ich oddziaływanie względem komórek nienowotworowych przy zachowaniu efektu przeciwnowotworowego. Zastosowanie DDS może w znaczący sposób poprawić biodostępność leków, których aktywność biologiczna jest limitowana poprzez słabą rozpuszczalność w środowisku wodnym (taksany). Ponadto przyłączenie kowalencyjne leków do DDS przy użyciu łączników wrażliwych na pH zapewnia ograniczenie degradacji enzymatycznej leków i toksyczności terapii. Lek może wykazywać swoją aktywność po uwolnieniu z DDS przy niskim pH tkanki nowotworowej (kontrolowane uwalnianie). Kolejną potencjalną zaletą stosowania DDS jest ułatwienie pokonywania barier biologicznych (takich jak bariera krew – mózg) poprzez leki transportowane przy użyciu tych systemów. Z uwagi na zmienioną morfologię naczyń krwionośnych zaopatrujących guzy nowotworowe, wzrost zawartości białek macierzy międzykomórkowej oraz ograniczony odpływ płynu międzytkankowego drogą naczyń limfatycznych, leki przyłączone do DDS mogą ulegać intensywniejszej akumulacji w tkankach guzów nowotworowych względem zdrowych tkanek. Efekt ten definiowany jest jako EPR (*enhanced permeability and retention*) i odpowiada on za poprawę skuteczności stosowania dostarczanych terapeutyków przy jednoczesnym obniżeniu toksyczności względem nienowotworowych tkanek. W odróżnieniu od EPR, który jest procesem pasywnym, można również poprawić selektywność dostarczania leków przez DDS na drodze przyłączenia do nich nanocząsteczkowych TM. W tym celu wykorzystywane są ligandy dla receptorów takich

jak: FR – receptor dla folianów, TfR – receptor dla transferyny, EGFR – receptor naskórkowego czynnika wzrostu. Strategia ta ma na celu aktywną intensyfikację wnikanania tak zmodyfikowanych DDS (wraz z lekami) do komórek nowotworowych posiadających określone receptory. Dendrymery PAMAM [Poliamidoaminowe - *poly(amidoamine)*] to grupa rozgałęzionych sferycznych nanocząstek, które charakteryzuje zależna od generacji ilość terminalnych grup aminowych. Protokół syntezy PAMAM został po raz pierwszy opisany przez Tomalię w 1985r. Głównym etapem syntezy tych dendrymerów jest addycja akrylanu metylu do diaminu. Strukturę PAMAM podzielić można na 3 zasadnicze elementy: rdzeń zbudowany z etylenodiaminy, gałęzie powstałe w wyniku łączenia się wiązaniami amidowymi kolejnych cząsteczek etylenodiaminy z akrylanem metylu oraz powierzchniowe grupy aminowe (Ryc.1).

Z uwagi na swój sferyczny kształt oraz znaczną ilość terminalnych grup aminowych, które mogą posłużyć do kowalencyjnego przyłączenia leków, polioli a także TM, PAMAM są obecnie intensywnie testowane jako DDS dla leków przeciwnowotworowych. W roli TM przyłączonych do PAMAM z powodzeniem wykorzystano kwas foliowy oraz biotynę, uzyskując wzrost cytotoksyczności tak zmodyfikowanych koniugatów PAMAM z lekami przeciwnowotworowymi względem modeli komórkowych wybranych nowotworów. Funkcjonalizacja powierzchniowych grup aminowych może służyć również poprawie rozpuszczalności koniugatów w wodzie oraz ograniczeniu toksycznego efektu względem komórek nienowotworowych wynikającego z kationowego charakteru cząsteczek PAMAM. Wykazano, że zmniejszenie toksyczności można osiągnąć poprzez np. PEG-ylację dendrymerów. Jednakże w niektórych okolicznościach kationowy charakter stanowić może zaletę PAMAM. Właściwość tę można np. wykorzystać do elektrostatycznego przyłączenia anionowych cząsteczek kwasów nukleinowych do PAMAM. W ten sposób PAMAM mogą również zostać zastosowane jako systemy transportu dla sekwencji DNA oraz cząsteczek niekodującego RNA (np. siRNA). Udowodniono, że enkapsulacja doxorubicyny w strukturę dendrymeru PAMAM G3 (generacji trzeciej) przyczynia się do istotnego zwiększenia wychwytu oraz akumulacji kompleksu (enkapsulatu) PAMAM-DOX przez komórki nowotworowe z linii Caco-2 (w porównaniu z samym DOX). Postulowanym mechanizmem odpowiedzialnym za ten efekt jest ograniczenie usuwania leku przyłączonego do PAMAM przez transportery z grupy ABC (glikoproteina P – P-gp).^[71]



Ryc. 1. Model graficzny dendrymerów PAMAM

Na modelu komórkowym raka jajnika (OVCAR-3) wykazano potencjalizację wychwytu paklitakselu przyłączonego do biotynylowanego PAMAM przez komórki nowotworowe. Wzrost wychwytu był w tym przypadku istotnie większy dla wspomnianej linii nowotworowej w porównaniu do komórek nienowotworowych z grupy kontrolnej (HEK293T). Dowodzi to większej selektywności efektu cytotoksycznego PTX po przyłączeniu go do tak zmodyfikowanego PAMAM. [72]

Dane z ostatnich lat wskazują, że dendrymery PAMAM mogą odgrywać istotną rolę w leczeniu nowotworów złośliwych z uwagi na ich właściwości umożliwiające poprawę biodostępności oraz selektywności działania chemoterapeutyków. Dodatkowo ich struktura chemiczna umożliwia przyłączanie kombinacji leków oraz wprowadzanie modyfikacji, które mogą zwiększać selektywność wychwytu przez komórki nowotworowe. Zastosowanie PAMAM jako DDS stwarza zatem perspektywę

opracowania efektywnych, niosących mniej toksycznych skutków ubocznych spersonalizowanych metod terapeutycznych do walki z nowotworami złośliwymi.

3. Hipoteza i cele badawcze

3.1 Hipoteza badawcza

Dendrymery PAMAM G2-G4 zmodyfikowane poprzez addycję polioli i/lub biotyny mogą stanowić skuteczne nośniki dla leków przeciwnowotworowych oraz kombinacji wielolekowych, skutkując wzrostem aktywności przeciwnowotworowej otrzymanych przy ich użyciu koniugatów. Koniugaty z dwoma lub więcej lekami o różnych mechanizmach działania mogą wykazywać wzmocniony efekt przeciwnowotworowy poprzez addycję lub synergię.

3.2 Cele badawcze realizowane w cyklu publikacji

Tematem przewodnim cyklu publikacji jest synteza, charakterystyka oraz ocena aktywności biologicznej koniugatów dendrymerów PAMAM G2-G4, które zostały zmodyfikowane poprzez addycję cząsteczek takich jak (*R*-glicydol, biotyna oraz α -D-glukoheptono-1,4-lakton), z lekami oraz kombinacjami leków przeciwnowotworowych.

Pierwsza z publikacji [D1] *Malinga-Drozd, M.; Uram, Ł.; Wróbel, K.; Wołowiec, S. Chiral Recognition of Homochiral Poly (amidoamine) Dendrimers Substituted with R- and S-Glycidol by Keratinocyte (HaCaT) and Squamous Carcinoma (SCC-15) Cells In Vitro. Polymers 2021, 13, 1049.*] dotyczyła oceny wpływu addycji *R*- lub *S*-glicydolu do dendrymerów PAMAM G2 oraz G3 na wychwyt tak zmodyfikowanych koniugatów poprzez komórki nowotworowe (SCC-15) oraz nienowotworowe (HaCaT).

Celem 3 kolejnych publikacji przedstawionych jako dorobek naukowy do oceny [D2, D3, D4]: [*Wróbel K, Wołowiec S, Markowicz J, Wałajtys-Rode E, Uram Ł. Synthesis of Biotinylated PAMAM G3 Dendrimers Substituted with R-Glycidol and Celecoxib/Simvastatin as Repurposed Drugs and Evaluation of Their Increased Additive Cytotoxicity for Cancer Cell Lines. Cancers. 2022; 14(3):714.*] [*Uram Ł, Wróbel K, Walczak M, Szymaszek Ż, Twardowska M, Wołowiec S. Exploring the Potential of Lapatinib, Fulvestrant, and Paclitaxel Conjugated with Glycidylated PAMAM G4 Dendrimers for Cancer and Parasite Treatment. Molecules. 2023; 28(17):6334.*] [*Lewińska A, Wróbel K, Błoniarczyk D, Adamczyk-Grochala J, Wołowiec S, Wnuk M. Lapatinib- and fulvestrant-PAMAM dendrimer conjugates promote apoptosis in chemotherapy-induced senescent breast cancer cells with different receptor status.*

Biomater Adv. 2022 Sep;140:213047.], była synteza koniugatów PAMAM G3 oraz G4 zawierających kombinacje różnych leków przeciwnowotworowych, a następnie ocena ich biologicznej aktywności. Postulowanym efektem biologicznym była synergia i/lub addycja oraz wzrost selektywności zastosowanej kombinacji na modelach komórkowych wybranych nowotworów: glejak wielopostaciowy, rak piersi, nie-drobnokomórkowy rak płuca, rak kolczystokomórkowy. W tym celu porównywano m.in. cytotoksyczność oraz akumulację komórkową wspomnianych koniugatów dla linii komórek nowotworowych względem komórek nienowotworowych.

Założeniem pracy [D5] [*Wróbel, K.; Deręgowska, A.; Betlej, G.; Walczak, M.; Wnuk, M.; Lewińska, A.; Wołowicz, S. Cytarabine and dexamethasone-PAMAM dendrimer di-conjugate sensitizes human acute myeloid leukemia cells to apoptotic cell death, Journal of Drug Delivery Science and Technology, Volume 81, 2023,104242*] było opracowanie innowacyjnej ścieżki syntezy koniugatów fosforanów leków z dendrymerami PAMAM G3 poprzez wiązania fosforamidowe oraz ocena aktywności biologicznej koniugatów na modelach komórkowych ludzkich białaczek.

Cele badawcze realizowane w toku wymienionych powyżej publikacji skoncentrowane były wokół:

- a) Opracowania strategii kowalencyjnego przyłączania leków przeciwnowotworowych do dendrymerów PAMAM G3 i G4 przy użyciu określonych linkerów oraz modyfikacji dendrymerów PAMAM G2-G4 poprzez addycję cząsteczek mających pełnić rolę TM (cząsteczki adresujące) takich jak: *R*-glicydol, biotyna oraz α -D-glukoheptono-1,4-lacton.
- b) Określenie składu cząsteczkowego produktu poprzez zdefiniowanie stechiometrii koniugatów metodą spektrometrii jądrowego rezonansu magnetycznego (NMR) oraz charakterystykę fizykochemiczną otrzymanych koniugatów (określenie średnicy cząsteczkowej, indeksu polidispersji, potencjału zeta).
- c) Zbadanie aktywności biologicznej otrzymanych koniugatów na modelach komórkowych wybranych nowotworów złośliwych w odniesieniu do linii komórek nienowotworowych (grupa kontrolna). Celem badawczym było

określenie wpływu koniugatów na proliferację, przeżywalność, oraz retencję komórkową koniugatów lek/leki-PAMAM.

- d) W przypadku publikacji D4 i D5 celem badawczym była ocena wpływu otrzymanych koniugatów na apoptozę komórek nowotworowych.

Założeniem przedstawionego cyklu publikacji była ocena poprawy biodostępności wybranych leków poprzez przyłączenie ich do PAMAM oraz zbadanie, czy występuje synergia lub addycja w cytotoksyczności względem komórek nowotworowych jako rezultat zastosowania kombinacji leków o różnych mechanizmach działania. Dodatkowym celem było zbadanie, czy addycja wspomnianych TM do nośników opartych o PAMAM, które następnie wykorzystano do syntezy koniugatów lek/leki-PAMAM przyczynia się do poprawy preferencyjności wnikania tak zmodyfikowanych koniugatów do komórek nowotworowych w porównaniu z komórkami nienowotworowymi (uzyskanie większej selektywności).

4. Opis wkładu, metodologia oraz omówienie publikacji

4.1 Opis mojego wkładu w realizację cyklu publikacji

Celem serii syntez przeprowadzonych w cyklu publikacji [D1-D5] było otrzymanie koniugatów dendrymerów PAMAM G2-G4 z lekami lub kombinacjami leków oraz cząsteczkami, których rolą miała być poprawa biodostępności koniugatów. Zsyntezowane związki były następnie wykorzystywane do oceny ich biodostępności oraz aktywności biologicznej względem wybranych linii nowotworowych. Do otrzymania koniugatów dendrymerów PAMAM G2-G4 z lekami, kombinacjami leków, alkoholami polihydroksylowymi oraz związkami pełniącymi rolę cząsteczek adresujących wykorzystano różne strategie syntezy.

W publikacji D1 prowadziłem funkcjonalizację powierzchniowych grup aminowych PAMAM G2 oraz G3 poprzez addycję *R*- oraz *S*- glicydolu. Mój udział w publikacji obejmował syntezę, oczyszczanie oraz charakterystykę otrzymanych koniugatów przy wykorzystaniu spektroskopii NMR. Reakcję addycji przeprowadziłem w metanolu z zastosowaniem nadmiaru stechiometrycznego glicydolu (*R*- lub *S*-) względem dendrymerów oraz fluorescencyjnie wyznakowanych analogów. Po dialitycznym oczyszczeniu produktów reakcji wykonałem przy użyciu spektroskopii NMR serię pomiarów celem scharakteryzowania związków oraz określenia ich składu cząsteczkowego. Wykonane zostały widma jednowymiarowe (^1H NMR, ^{13}C NMR) oraz dwuwymiarowe (COSY, HMBC, HSQC). Na podstawie widm zdefiniowałem skład otrzymanych związków, który był następujący: $\text{G2}^{16\text{RglF}}$, $\text{G2}^{19\text{SglF}}$, $\text{G3}^{19\text{RglF}}$, $\text{G3}^{35\text{SglF}}$, $\text{G2}^{19\text{RglR}}$, $\text{G2}^{30\text{SglR}}$, $\text{G3}^{45\text{RglR}}$, oraz $\text{G3}^{35\text{SglR}}$ [F – izotiocyanian fluoresceiny, R – izotiocyanian rodaminy, Rgl – *R*-glicydol, Sgl – *S*-glicydol]. Opracowane metody syntezy, separacji oraz oczyszczania makrocząsteczkowych produktów zastosowałem również w pozostałych publikacjach [D2-D5].

W publikacji D2 zsyntezowałem, wyizolowałem i scharakteryzowałem strukturalnie otrzymane związki. Dendrymer PAMAM G3 został wykorzystany do przeprowadzenia funkcjonalizacji poprzez addycję NHS-biotyny (N-hydroksyimid kwasu bursztynowego biotyny). Biotynylowany dendrymer wykorzystałem w następnym kroku do przeprowadzenia addycji leków: symwastatyny, celekoksybu oraz kombinacji celekoksyb/symwastatyna. Addycję celekoksybu wykonałem wykorzystując konwersję tego leku do pochodnej bursztynianowej na drodze reakcji z bezwodnikiem kwasu

bursztynowego. Przeprowadzona w ten sposób aktywacja pozwoliła na kowalencyjne przyłączenie celekoksylu do terminalnych grup NH_2 dendrymeru PAMAM G3. Natomiast simwastatyna została przyłączona po aktywacji, do której wykorzystałem karbonylodiimidazol (CDI). Powierzchniowe grupy aminowe, które nie zostały podstawione biotyną ani lekami, zablokowałem *R*-glicydołem. Do oczyszczenia oraz scharakteryzowania otrzymanych związków wykorzystałem metody opisane powyżej. Skład cząsteczkowy zsyntezowanych koniugatów zdefiniowałem jako: $\text{G3}^{2\text{B}6\text{C}8\text{gl}}$, $\text{G3}^{2\text{B}4\text{S}14\text{gl}}$, $\text{G3}^{2\text{B}2\text{C}4\text{S}12\text{gl}}$ [B – Biotyna, C – celekoksyl, S – simwastatyna, gl – *R*-glicydol]. Wybór *R*-glicydolu został podyktowany rezultatami badań biologicznych koniugatów otrzymanych w D1, które zostaną opisane w dalszej części tekstu.

W [D3] *R*-glicydylację zastosowałem ponownie celem poprawy rozpuszczalności koniugatów PAMAM G4 z hydrofobowymi lekami antynowotworowymi. Dokonałem wyboru leków antynowotworowych oraz docelowych modeli komórkowych nowotworów na których testowano aktywność koniugatów. Przeprowadziłem syntezy koniugatów PAMAM G4 z lekami: paklitaksel, lapatinib, fulvestrant oraz potrójna kombinacja – paklitaksel/lapatinib/fulvestrant. Strategia syntezy została szczegółowo opisana w publikacji [73]. Użycie dendrymeru generacji 4 pozwoliło na przyłączenie większej ilości hydrofobowych leków do makrocząsteczkowego nośnika. PTX aktywowałem poprzez konwersję do pochodnej bursztynianowej na drodze reakcji z bezwodnikiem kwasu bursztynowego (w obecności pirydyny). Następnie pochodną bursztynianową PTX przyłączyłem do terminalnych grup PAMAM G4 przy użyciu jodku 2-chloro-1-metylopirydyny w obecności DMAP. Produkt reakcji wyznakowałem fluorescencyjnie przy użyciu FITC. Fulvestrant (F) oraz lapatinib (L) aktywowałem przy użyciu *p*-nitrofenylochloromrówczanu (NPCF) i przyłączyłem do PAMAM G4, uprzednio wyznakowanego fluorescencyjnie FITC. Trójlekowy koniugat (G4PFL) otrzymałem wykorzystując wyznakowany fluorescencyjnie G4P, do którego przyłączyłem aktywowane reszty F i L. Wszystkie koniugaty zostały *R*-glicydylowane. Oczyszczanie oraz charakterystykę przeprowadziłem przy wykorzystaniu metod opisanych uprzednio [73], [D1, D2]. Skład koniugatów określiłem metodą jądrowego rezonansu magnetycznego jako: $\text{G4}^{*4\text{P}109\text{gl}}$, $\text{G4}^{*13\text{F}64\text{gl}}$, $\text{G4}^{*13\text{L}85\text{gl}}$, $\text{G4}^{*4\text{P}11\text{F}11\text{L}74\text{gl}}$ [* - FITC, P – paklitaksel, F – fulvestrant, L – lapatinib, [* - FITC].

Opracowałem koncepcję kowalencyjnego przyłączenia leków antynowotworowych stosowanych w leczeniu raka piersi (BC) do

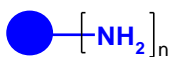
glukoheptoamidowanego PAMAM G3 w D4. W trakcie syntez PAMAM G3 został częściowo podstawiony α -D-glukoheptono-1,4-laktonem (gh) (12 reszt przyłączono kowalencyjnie do 32 grup aminowych). Zsyntezowałem koniugaty jednolekowe zawierające Lapatinib (L) lub Fulvestrant (F) oraz koniugat zawierający kombinację L/F. Zostały zsyntezowane, oczyszczone oraz scharakteryzowane zgodnie z procedurą opisaną w D3. Skład otrzymanych koniugatów zdefiniowałem przy użyciu spektroskopii NMR i był on następujący: $G3^{12gh*}$, $G3^{4L12gh*}$, $G3^{4F12gh*}$ oraz $G3^{3L3F12gh*}$, [gdzie L – lapatinib, F – fulvestrant, gh - α -D-glukoheptono-1,4-lakton, * - FITC]. Podobnie jak w przypadku D3 potencjał zeta oraz średnica cząsteczkowa otrzymanych związków zostały wyznaczone metodą DLS przez współpracowników.

W publikacji D5 moja rola ponownie polegała na syntezach, oczyszczaniu oraz charakterystyce metodą spektroskopii NMR serii biotynyloowanych koniugatów PAMAM G3 z lekami oraz kombinacjami leków aktywnych względem komórek ludzkich białaczek. Tym razem do otrzymania koniugatów zastosowano nową strategię syntezy pozwalającą na przyłączenie leków poprzez wrażliwe na niskie pH wiązanie fosforamidowe. W pierwszym kroku, aby oszacować skuteczność karbonyldiimidazolu (CDI) jako aktywatora umożliwiającego fosforamidowe wiązanie pochodnych fosforanowych leków użyłem fosforany nukleozydów (AMP – adenozydomonofosforanem) oraz deoksynukleotydem (dTMP – deoksytymidyno monofosforanem) z uwagi na ich prostszą budowę chemiczną ułatwiającą charakterystykę otrzymanych związków przy użyciu spektroskopii NMR. Dla porównania w przypadku AMP zastosowałem również znaną strategię syntezy koniugatu wykorzystując EDC (etylenokarbodiimid). Postęp reakcji śledziłem na bieżąco wykorzystując spektroskopię 1H NMR. Po ustaleniu odpowiednich warunków reakcji przystąpiłem do syntezy koniugatów fosforanów leków z PAMAM G3. W pierwszym kroku zsyntezowany oraz scharakteryzowany został koniugat $G3^{7D}$ (D - deksametazon). W następnej serii syntez wykorzystałem G3 sfunkcjonalizowany poprzez przyłączenie jednej cząsteczki biotyny ($G3^B$). Fosforany: cytarabiny (CP), fludarabiny (FP) oraz deksametazonu (DP), a także podwójne kombinacje zostały przyłączone do $G3^B$ przy użyciu CDI (reakcja w wodzie). Oczyszczanie oraz charakterystykę fizyko – chemiczną otrzymanych związków przeprowadziłem zgodnie z procedurami opisanymi w D1-D4. Dodatkowo otrzymane związki chemiczne zostały również zbadane przez współpracowników przy użyciu IR oraz ^{31}P NMR. Skład otrzymanych koniugatów, które

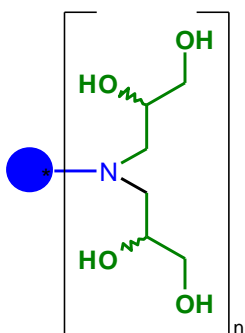
wykorzystano potem do badań biologicznych określiłem jako: $G3^{B7D}$, $G3^{B7F}$, $G3^{B13C}$, $G3^{B5D5F}$, $G3^{B11D10C}$ [B – biotyna, D – fosforan deksametazonu, C – fosforan cytarabiny, F – fosforan fludarabiny]. Wszystkie otrzymane związki zostały wyznakowane fluorescencyjnie. Wykonałem także eksperyment uwalniania fosforanów z koniugatów dendrymerowych w niskim pH. W tym celu roztwory koniugatów $G3^{10A}$ oraz $G3^{7D}$ w workach dializacyjnych umieszczone zostały w 5L 1M buforu octanowego. Worki dializacyjne z roztworami koniugatów utrzymywane były w buforze przez: 1, 2, 4 oraz 8 godzin ($G3^{10A}$); 1, 3, 6 godzin ($G3^{7D}$), a następnie przez 3 dni w środowisku wodnym (bez buforu). Po odparowaniu wody zarejestrowałem widma NMR związków i przeanalizowałem zmianę składu cząsteczkowego.

WZORY CHEMICZNE

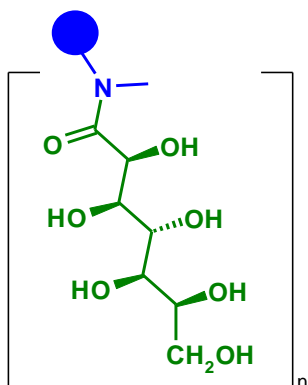
Dendrymery poliamidoaminowe i ich pochodne zastosowane jako makrocząsteczkowe nośniki leków. Kolorem niebieskim zaznaczono część nośnika PAMAM, a podstawniki modyfikujące są wyróżnione kolorem zielonym.



dendrymer poliamidoaminowy (PAMAM) trzeciej generacji, G3; $n = 32$ i czwartej generacji, G4; $n = 64$



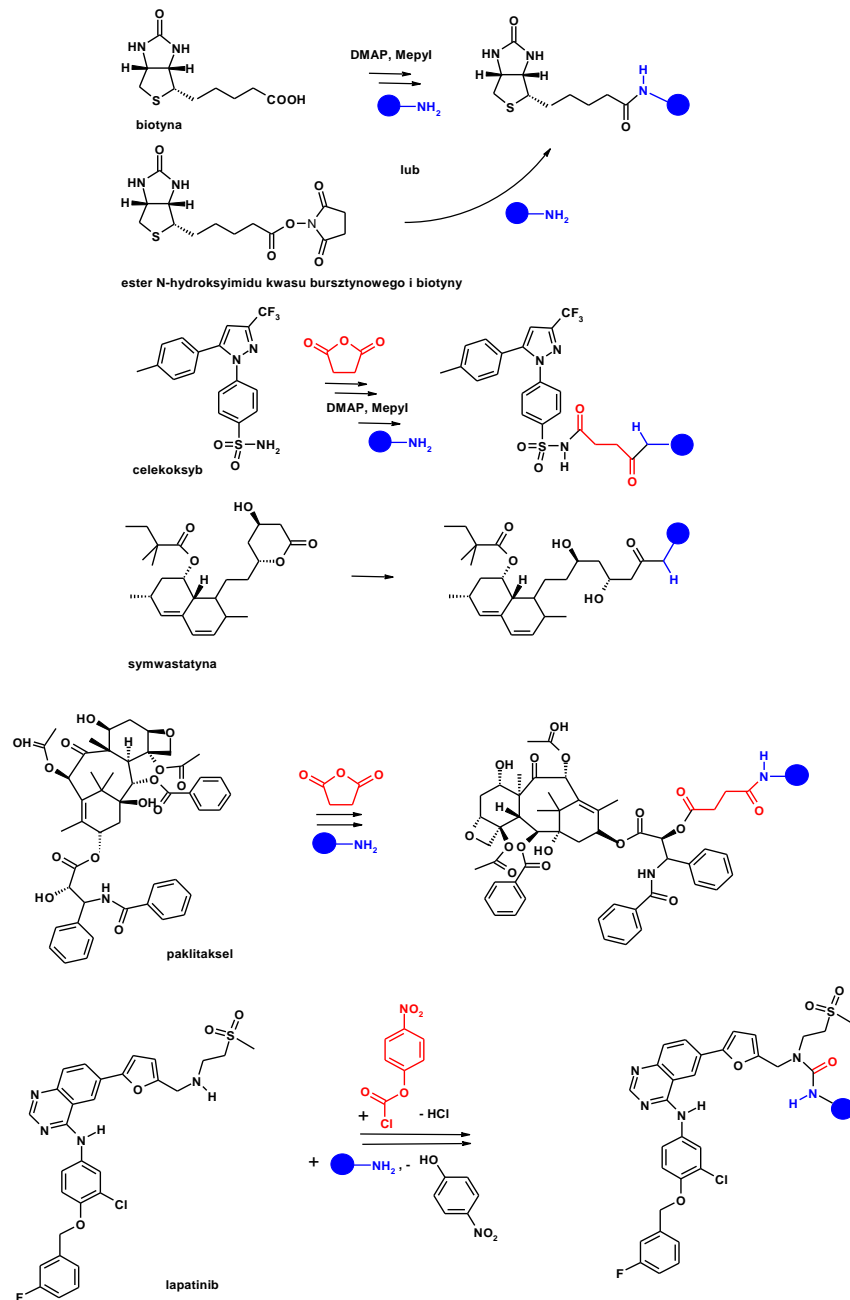
dendrymer PAMAM zmodyfikowany powierzchniowo poprzez addycje R-glicydolu

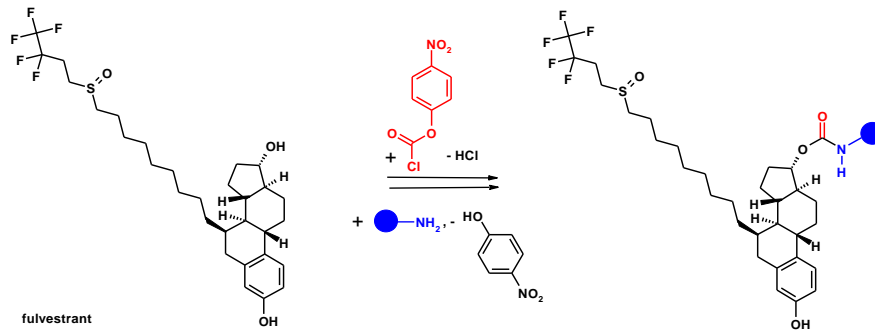


dendrymer PAMAM zmodyfikowany powierzchniowo poprzez addycje α -D-glukoheptono-1,4-laktonu

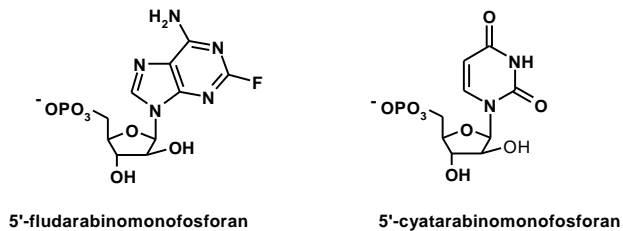
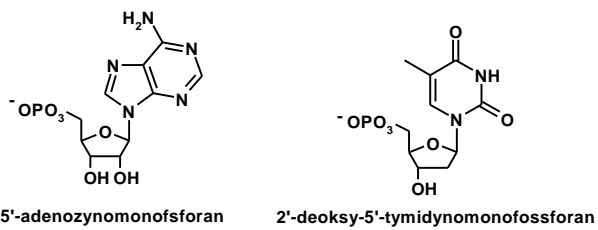
Ryc. 2. Wzory chemiczne pochodnych dendrymerów PAMAM

Wzory testowanych leków oraz drogi ich funkcjonalizacji i/lub syntezy koniugatów z dendrymerami. Dendrymer PAMAM jest w kolorze niebieskim, a linkery w kolorze czerwonym.



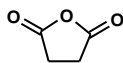


ROPO₃⁻:

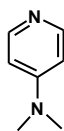


Ryc. 3. Schematy reakcji chemicznych prowadzących do otrzymania koniugatów PAMAM - lek

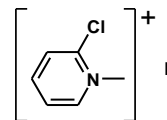
Aktywatory i łączniki



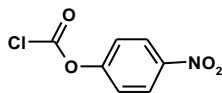
bezwodnik kwasu bursztynowego



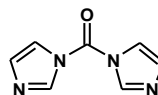
4-dimetyloaminopirydyna, DMAP



chlorok 1-metylo-2-chloropirydyniowy, Mepyl



chloromrówczan 4-nitrofenylu, NPCF



karbonyldiimidazol, CDI

Ryc. 4. Aktywatory i łączniki wykorzystane w syntezach

Średnica cząsteczkowa, indeks polidispersji oraz potencjał zeta został wyznaczony przy wykorzystaniu techniki dynamicznego rozpraszania światła (DLS - *dynamic light scattering*) w innych ośrodkach akademickich, dysponujących odpowiednimi urządzeniami. Wyznaczenie średnicy cząsteczkowej było szczególnie istotne w przypadku koniugatów zawierających leki oraz kombinacje leków wysoce hydrofobowych, pozwalając na identyfikację asocjatów otrzymanych związków. Wyniki pomiarów DLS wszystkich koniugatów, które badano w cyklu publikacji przedstawione zostały zbiorczo w poniższej tabeli (Tabela 1.).

Tabela 1. Średnice cząsteczkowe otrzymanych koniugatów oraz potencjały Zeta

Koniugat	Rozmiar [nm]				Potencjał Zeta [mV]	
	pH 7		pH 5		pH 7	pH 5
	d(V)	d(N)	d(V)	d(N)		
G3*	2.2	1.6	6.9	6.0	12.2	11.7
G3^{2B14gl}	2.1	1.8	5.0	3.3	9.6	7.8
G3^{2B6C8gl}	7.8	5.7	5.8	4.0	18.6	34.6
G3^{2B4S14gl}	10.3	8.6	9.5	6.5	37.7	36.5
G3^{2B2Cel4S12gl}	155	86.7	8.5	6.9	30.3	32.5
G3^{12S}	85.8	57.2	44.2	25.3	42.4	32.9
G3^{4F}	201	135	221	143	52.3	48.4
G3^{4L}	19.8	11.4	27.5	18.5	21.7	29.9
G3^{3L3F}	91.9	60.8	104.3	74.1	54.4	47.5
G3^{5D}	2.02	1.59	4.49	3.62	5.18	5.17
G3^{B7D}	3.15	1.97	3.95	3.20	6.96	13.93
G3^{B7F}	2.13	1.69	3.79	3.03	15.43	22.81
G3^{B5D5F}	2.62	2.00	4.26	3.46	8.59	11.77
G3^{B13C}	2.42	2.31	3.62	3.55	8.36	14.24

G3^{B11D10C}	2.53	2.42	4.50	4.12	6.21	8.08
G4^{*P}	154.73	99.20	156.26	94.62	13.57	33.26
G4^{*L}	162.06	113.13	a)	58.19	40.29	47.70
G4^{*F}	233.83	138.23	b)	155.37	38.02	45.23
G4^{*PL}	147.89	95.20	132.02	89.22	19.92	32.67
G4^{*PF}	174.82	113.41	125.26	81.60	29.29	33.83
G4^{*PFL}	174.38	105.47	165.00	118.78	34.33	35.32

Wyniki wskazujące na (asocjacje) otrzymanych związków zaznaczono kolorem czerwonym. a), b) – znaczna polidispersja ciężaru cząsteczkowego.

4.2 Zarys metodologii badań aktywności biologicznej koniugatów

Scharakteryzowane koniugaty były następnie przekazane w ręce współpracowników z innych ośrodków akademickich, dysponujących odpowiednimi odczynnikami, aparaturą badawczą oraz modelami komórkowymi określonych nowotworów złośliwych. Przeprowadzenie testów biologicznych miało w pierwszej kolejności na celu zbadanie wpływu funkcjonalizacji terminalnych grup NH₂ PAMAM G2-G4 (poprzez alkohole polihydroksylowe oraz biotynę) na biodostępność koniugatów opartych o zmodyfikowane w ten sposób PAMAM. Następnie oceniano w jaki sposób kowalencyjne przyłączanie leków do PAMAM wpływa na cytotoksyczność otrzymanych koniugatów względem komórek nowotworowych. Finalnym celem było określenie, czy przyłączenie kombinacji 2 lub 3 leków o różnym mechanizmie działania prowadzi do wzmocnienia potencjału antynowotworowego wielolekowych koniugatów (zbadanie czy występuje addycja lub synergia).

Aby określić wpływ zastosowanych modyfikacji PAMAM oraz addycji leków lub kombinacji wielolekowych do dendrymerów wykonano serię testów biologicznych oceniających cytotoksyczność, wnikanie koniugatów do komórek, wpływ koniugatów na apoptozę, zmianę aktywności określonych ścieżek sygnałowych, wpływ na sekrecję mediatorów stanu zapalnego oraz senolityczne właściwości wybranych koniugatów. W publikacjach D1-D5 zbadano wpływ koniugatów na przeżywalność komórek

(nienowotworowych vs nowotworowych) oraz w przypadku D3 również na przeżywalność *C. elegans*. Lista linii komórkowych, na których prowadzone były badania w danej publikacji jest podana w Tabeli 2.

	D1	D2	D3	D4	D5
SCC-15	+	+			
HaCaT	+		+		
BJ		+			
U-118 MG		+	+		
A549			+		
SkBr-3				+	
MCF-7				+	
MDA-MB-231				+	
LAMA-84					+
K-562					+
HL-60					+
THP-1					+

Tabela 2. Linie komórkowe (kolumna 1) na jakich liniach komórkowych były prowadzone testy aktywności biologicznej otrzymanych koniugatów w cyklu publikacji (D1-D5)

W celu oceny przeżywalności komórek wykonano testy MTT oraz XTT wykorzystujące różnicę zdolności do redukcji soli tetrazolowych pomiędzy żywymi (aktywnymi metabolicznie) a martwymi (nieaktywnymi metabolicznie) komórkami. Aktywność metaboliczna komórek eksponowanych na działanie leków, dendrymerów oraz koniugatów leków z dendrymerami została również określona w teście NR (Neutral Red assay). Ten test umożliwia ocenę aktywności metabolicznej komórek na podstawie różnicy wychwytu specyficznego barwnika przez żywe i martwe komórki. W publikacji D3 do oceny żywotności osobników organizmu modelowego *C. elegans* wykorzystano mikroskop odwrócony z kontrastem fazowym. W D3 oceniono także wpływ koniugatów oraz wolnych leków na aktywność proliferacyjną badanych komórek wykorzystując pomiar ilościowy DNA. W publikacjach D1-D3 wykorzystano ocenę aktywności biologicznej testami MTT, XTT oraz NR do wyznaczenia wartości IC_{50} dendrymerów, wolnych leków oraz koniugatów jedno- a także wielolekowych.

Wychwyty wyznakowanych fluorescencyjnie koniugatów badano przy użyciu mikroskopii fluorescencyjnej, pomiaru wartości fluorescencji oraz mikroskopii konfokalnej [D1,D4].

W publikacji D5 wychwyty fluorescencyjnie wyznakowanych koniugatów przez badane komórki oceniono wykorzystując obrazową cytometrię przepływową. Obserwacja w mikroskopie konfokalnym komórek poddanych działaniu wyznakowanych koniugatów umożliwiła także ocenę ich dystrybucji w określonych kompartmentach komórkowych [D1]. Wpływ koniugatów na apoptozę komórek nowotworowych oraz cykl komórkowy zbadany został przy użyciu metod cytometrycznych. Wykorzystując cytometrię przepływową wykonano pomiar zawartości DNA (wpływ na cykl komórkowy), przeprowadzono test eksternalizacji fosfatydyloseryny oraz zbadano aktywność kaspaz (wpływ koniugatów na apoptozę). Dodatkowo oszacowano frakcję komórek nekrotycznych z użyciem 7-aminoaktynomycyny D (7-AAD) [D4-D5]. Do oceny wpływu koniugatów na poziom: LC3B, NF- κ B, IL-8, TRDMT1/DNMT2 użyto swoistych przeciwciał pierwotnych oraz wtórnych znakowanych fluorescencyjnie. Obrazy zebrano z wykorzystaniem mikroskopii konfokalnej. Poziom markera integralności lizosomów LAMP1 oraz markera autofagii p62 oceniono przy użyciu metody obrazowania wykorzystującej białko zielonej fluorescencji. Do oceny wewnątrzkomórkowego pH wykorzystano wskaźnik fluorescencyjny wrażliwy na zmianę pH (pHrodo™ Green AM Intracellular pH Indicator). W tej metodzie spadek

poziomu fluorescencji odzwierciedla alkalizację środowiska wewnątrzkomórkowego. Senolityczne właściwości koniugatów oceniono po uprzedniej indukcji procesów starzenia za pomocą DOX według standardowego protokołu opisanego w publikacji D4. Senolityczna aktywność badanych związków związana z apoptozą została oceniona za pomocą testu z Aneksyną V, polegającym na uwalnianiu fosfatydyloseryny z błony komórkowej [D4].

4.3 Omówienie rezultatów uzyskanych w cyklu publikacji

W publikacji D1 wybór glicydolu wynikał z danych literaturowych na temat stereoselektywnej katalizy reakcji estryfikacji pomiędzy *R*-(+)-gl a kwasem *n*-masłowym przez lipazę u gatunku *Rhizopus javanicus*.^[74] Celem badania było określenie, czy poprzez kowalencyjne przyłączenie optycznie czystego glicydolu do powierzchniowych grup NH₂ można zwiększyć wychwyty dendrymerów przez komórki nowotworowe. Brano pod uwagę, że aby transport leków przez DDS w terapii nowotworowej był wysoce efektywny, pożądaną właściwością transportera jest wyższa selektywność transportu. Po przeanalizowaniu danych uzyskanych w trakcie badań aktywności biologicznej otrzymanych w D1 koniugatów stwierdzono, że koniugaty nie wykazywały cech cytotoksyczności w stężeniach poniżej 300 μM zarówno wobec komórek nowotworowych jak i prawidłowych. Ponadto wykazano przy wykorzystaniu pomiarów fluorescencji, że pochodne PAMAM skoniugowane z *R*-gl ulegały wyższej akumulacji w komórkach niż pochodne z *S*-gl. Wszystkie otrzymane koniugaty ulegały wydajniejszej akumulacji w komórkach nowotworowych SCC-15 w porównaniu do komórek prawidłowych keratynocytów HaCaT. Wydajniejszy wychwyty koniugatów przez SCC-15 został potwierdzony przy użyciu mikroskopii fluorescencyjnej, gdzie zobrazowano wyższy poziom fluorescencji w tych komórkach w każdym z rosnących stężeń koniugatów. Dystrybucja komórkowa znakowanych fluorochromem koniugatów została również oceniona przy wykorzystaniu mikroskopii konfokalnej (komórki inkubowano w obecności 100 nM roztworów koniugatów przez 4 godziny). Wykazano, że koniugaty zawierające *R*-gl ulegały silniejszej akumulacji komórkowej niezależnie od zastosowanego fluorochromu. Zaobserwowano również, że koniugaty dendrymerów PAMAM G3 miały większą tendencję do akumulacji w pęcherzykach cytoplazmatycznych natomiast G2 były rozproszone w cytoplazmie. Ponadto koniugaty

dendrymerów PAMAM G3 wykazywały większe powinowactwo do błon komórkowych w porównaniu do koniugatów dendrymerów niższej generacji (G2), szczególnie w odniesieniu do SCC-15. Otrzymane w pracy D1 rezultaty dowiodły, że dendrymery PAMAM pokryte *R*-gl miały większe powinowactwo do białek komórkowych aniżeli analogi zawierające *S*-gl. Dowiedziono, że addycja *R*-gl do dendrymerów może w istotny sposób zwiększyć wychwyty komórkowy tak zmodyfikowanych dendrymerów przez komórki linii nowotworowej (SCC-15) w porównaniu do komórek nienowotworowych (HaCaT). Odkrycie to ma znaczenie z perspektywy opracowywania selektywnych terapii przeciwnowotworowych mających na celu ograniczenie niepożądanego toksyczności względem prawidłowych komórek organizmu. Spowodowało to użycie *R*-gl jako stałego elementu konstrukcyjnego koniugatów z lekami antynowotworowymi w dalszym ciągu badań.

W kolejnej publikacji z cyklu (D2) dendrymery PAMAM G3 zostały wykorzystane jako systemy dostarczania dwóch repozycjonowanych leków o potencjale przeciwnowotworowym względem komórek glejaka wielopostaciowego linii U-118 MG oraz ludzkiego raka płaskonabłonkowego z języka SCC-15. Uwzględniając rezultaty opublikowane w poprzedniej pracy D1 oceniającej wpływ *R*-glicydylacji grup aminowych PAMAM na wychwyty sfunkcjonalizowanych w ten sposób dendrymerów przez komórki rakowe, zdecydowano się na wykorzystanie tej strategii przy opracowaniu DDS dla wspomnianej kombinacji leków. Dodatkowo, chcąc uzyskać większą selektywność transportu leków do komórek nowotworowych, postanowiono do dendrymerów PAMAM G3 dołączyć resztę biotynową. Wybór biotyny podyktowany był literaturowymi danymi, które wskazują na istotną częstość występowania wśród komórek nowotworowych nadekspresji transportera wielowitaminowego, dla którego biotyna jest substratem (SMVT – *sodium multiwitamin transporter*).^[72] Synteza oraz charakterystyka strukturalna koniugatów PAMAM z biotyną została opisana w publikacji EJCEM.^[75] Celekoksylb oraz simwastatyna nie są rutynowo stosowane w terapii nowotworów. Ich użycie do otrzymania koniugatów podyktowane było danymi wskazującymi na ich potencjał przeciwnowotworowy.^[43,76] Dodatkowo wybór tych farmaceutyków stanowił element strategii wykorzystującej tzw. leki repozycjonowane, czyli stosowane do leczenia w innych wskazaniach niż podane podczas rejestracji. Zaletą takiej strategii jest skrócenie ścieżki rejestracji nowego terapeutycznego z uwagi na znany profil działań niepożądanych leków, które są już zarejestrowane.^[77]

Aktywność biologiczną otrzymanych koniugatów zbadano *in vitro* wykorzystując testy oceniające cytotoksyczność (NR oraz XTT). Na podstawie wyników przeżywalności określono IC_{50} dla koniugatów, które porównano z wartościami IC_{50} dla samych leków, kombinacji leków (nieprzyłączonych) oraz samego nośnika $G3^{2B14gl}$. Badania aktywności biologicznej prowadzono na trzech liniach komórkowych – dwóch nowotworowych (SCC-15, U-118 MG) oraz jednej nienowotworowej (BJ).

Testy żywotności wykazały istotny spadek IC_{50} dla pojedynczych leków oraz ich kombinacji przyłączonych do zmodyfikowanego PAMAM G3 względem IC_{50} dla leków nieprzyłączonych oraz ich kombinacji zastosowanej w stosunku stechiometrycznym takim jak w koniugacie mieszanym. Oceniając różnicę IC_{50} uwzględniono liczbę reszt leków wprowadzanych w koniugacie, w określonym stężeniu. Wykazano, że cytotoksyczność koniugatów była od 2 do 8 razy większa niż cytotoksyczność równoważnych stężeń wolnych leków. Natomiast cytotoksyczność koniugatu zawierającego kombinację obu leków była od 35 do 50 razy wyższa od toksyczności kombinacji wolnych leków zastosowanej w odpowiadającym stosunku stechiometrycznym (C:S = 0.5:1). Dla kombinacji wolnych leków zastosowanych w adekwatnym stosunku stechiometrycznym działanie addytywne było obserwowane w teście XTT dla wszystkich badanych linii komórkowych, natomiast w teście NR jedynie w przypadku komórek prawidłowych ludzkich fibroblastów skórnych linii BJ. Otrzymane koniugaty wykazywały najwyższą aktywność wobec komórek prawidłowych linii BJ, co mogło wynikać z najwyższej toksyczności samego nośnika $G3^{2B14gl}$, względem komórek BJ.

Przyłączenie symwastatyny i celekoksybu do rozpuszczalnego w wodzie nośnika $G3^{2B14gl}$ przyczyniło się do istotnego wzrostu cytotoksyczności całego koniugatu. Ponadto w przypadku kombinacji obu leków związanych z nośnikiem występuje efekt addycji – kilkukrotnie niższe wartości IC_{50} dla koniugatu wieloskładnikowego niż w przypadku koniugatów z pojedynczymi lekami. Wysoka toksyczność koniugatów wobec ludzkich fibroblastów linii BJ nie stanowi efektu wykluczającego. Może bowiem przyczyniać się do poprawy skuteczności leczenia na poziomie tkankowym. Ma to związek z rolą interakcji środowiska tkankowego z rozwijającym się nowotworem ze szczególnym uwzględnieniem tzw. „fibroblastów związanych z nowotworem” (CAF – cancer associated fibroblasts), których funkcja w procesie nowotworzenia została opisana we wstępie (podrozdział 2.7 – *Kluczowe mechanizmy oporności na leki*

przeciwnowotworowe). Otrzymane dane wskazują na to, że dendrymer PAMAM G3 jako nośnik dla kombinacji celekoksytu i simwastatyny może być wykorzystany do opracowania skutecznego koniugatu w terapii glejaka wielopostaciowego oraz raka kolczysto-komórkowego jamy ustnej.

W następnej z cyklu publikacji D3 glicydylacja dendrymerów PAMAM została wykorzystana ponownie w celu skonstruowania DDS opartego na dendrymerze PAMAM G4, który został zastosowany jako nośnik leków stosowanych w leczeniu raka piersi. Użycie dendrymeru wyższej generacji umożliwiło przyłączenie większej liczby reszt leków z uwagi na obecność 64, a nie jak wcześniej 32 (PAMAM G3) powierzchniowych grup aminowych dostępnych do funkcjonalizacji. Celem było otrzymanie kombinacji trzech leków o różnym mechanizmie działania kowalencyjnie przyłączonych do nośnika – *R*-glicydylowanego dendrymeru PAMAM G4. Wykorzystano dwa leki selektywne (lapatinib, fulvestrant), których mechanizm działania polega na hamowaniu zdefiniowanych ścieżek sygnałowych ulegających amplifikacji w określonych fenotypach raka piersi oraz jednego leku nieselektywnego (paklitakselu) – stosowanego powszechnie w terapii wielu nowotworów złośliwych w tym raka piersi.

Wszystkie użyte leki mają hydrofobowy charakter przez co są trudno rozpuszczalne w wodzie, co w znaczącym stopniu ogranicza ich biodostępność oraz przyczynia się do zwiększenia uciążliwości leczenia wynikającej z konieczności podania paraneuralnego.^[78,79,80,81] Założeniem addycji hydrofobowych leków do *R*-glicydylowanego PAMAM G4 była poprawa biodostępności tych leków poprzez zwiększenie ich rozpuszczalności w wodzie. Do oceny aktywności biologicznej wybrano trzy linie wykazujące ekspresję receptorów ER oraz HER2 (dwie nowotworowe oraz jedną prawidłową, Tabela 3), będących punktem uchwytu dla fulvestrantu lub lapatinibu.^[63-68 w D3] Z uwagi na udowodnioną ekspresję wymienionych receptorów u *C. elegans* postanowiono zbadać również aktywność koniugatów względem tego nicienia.^[94-96 w D3]

Tabela 3. Odnośniki literaturowe dotyczące dowodów na ekspresję wymienionych receptorów (HER-2, ER) przez linie komórkowe użyte do testów aktywności biologicznej w D3

	A549	U-118 MG	HaCaT	Literatura
ER	+	n.d.*	+	D3: 63,64

HER-2 + +** + D3: 65,66,67,68

- * istnieją dane wskazujące że inny model komórkowy glejaka U-138 MG wykazuje ekspresję, dla U-118 MG – brak danych

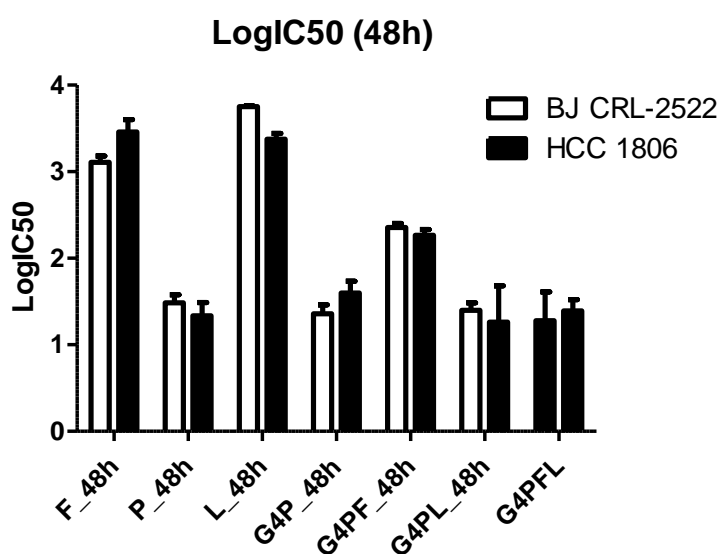
- ** dane literaturowe pokazują, że około 20% komórek U-118 MG charakteryzuje się ekspresją HER-2, natomiast nawet 85% komórek tej linii wykazuje ekspresję dla EGFR

Otrzymane koniugaty ulegały wydajnej i aktywnej internalizacji do badanych komórek w niskich, nanomolowych stężeniach. Pomiar fluorescencji wykazały, że badane koniugaty akumulowały najwydajniej w komórkach HaCaT. Testy na żywotność ujawniły, że koniugat G4L wykazywał kilkukrotnie wyższą toksyczność niż sam L (uwzględniając liczbę reszt leków w koniugacie). Wobec komórek glioblastomy wzrost cytotoxyczności był dwukrotny, natomiast wobec unieśmiertelnionych keratynocytów odnotowano ośmiokrotnie wyższą toksyczność. Koniugat G4P wykazywał niższą toksyczność wobec komórek nowotworowych niż sam lek (dwukrotna redukcja toksyczności wobec U-118 MG oraz 25-krotna względem A549). Koniugat trójlekowy G4PFL wykazywał co prawda wyższą toksyczność niż jednolekowe G4L oraz G4F, niemniej aktywność tego koniugatu była niższa niż G4P. Najsilniejsze działanie antyproliferacyjne odnotowano dla G4P względem komórek HaCaT (redukcja o 80% w stężeniu 1,25 nM). W znacznie mniejszym stopniu badane koniugaty ograniczały proliferację komórek A549. W zakresie użytych stężeń badanych czynników nie odnotowano istotnego zahamowania proliferacji komórek U-118 MG przez G4P ani G4F. G4PFL ograniczał nieznacznie proliferację tych komórek w stężeniu 25 nM, natomiast G4L w stężeniu 1600 nM redukował ją niemal do zera. Addytywny efekt koniugatu trójlekowego zaobserwowano również dla *C. elegans*. Połowa maksymalnego stężenia wywołującego śmierć nicienia (LC_{50} – *half maximal lethal concentration*) była w tym przypadku niemal czterokrotnie niższa dla G4PFL w porównaniu do G4P (LC_{50} 6,75 μ M vs >24,00 μ M). Co więcej, toksyczność G4PFL była względem *C. elegans* około dwukrotnie wyższa od toksyczności G4F (LC_{50} 12,50 μ M) oraz G4L (LC_{50} 14,80 μ M). Toksyczność trójlekowego koniugatu była porównywalna do toksyczności mebendazolu – leku przeciwpasożytniczego dedykowanego w leczeniu pasożytów wywołanych przez nicienie (LC_{50} = 4,0 μ M).

Z przeprowadzonych w D3 badań wywnioskowano, że:

- a) Koniugaty dendrymerów PAMAM G4 z hydrofobowymi lekami były po glicydylacji rozpuszczalne w wodzie.
- b) Duża zawartość cząsteczek hydrofobowych leków przyłączonych do dendrymeru sprzyjała tworzeniu asocjatów pomimo addycji R-glicydolu do pozostałych, wolnych grup aminowych. Średnica asocjatów zmierzona techniką DLS była o co najmniej rząd wielkości wyższa niż w przypadku cząsteczek w monodispersji (wyniki pomiarów DLS zawarte są w publikacji [73] oraz zbiorczo w Tabeli 1).
- c) Pomimo asocjacji koniugaty zachowały biodostępność. Wykazano, że wnikały do komórek *in vitro*.
- d) Na wybranych modelach komórkowych R-glicydylacja nośnika nie poprawiała selektywności działania koniugatów wobec linii nowotworowych.
- e) Koniugaty zawierające L i F były w istotnym stopniu bardziej toksyczne dla keratynocytów (HaCaT) niż wolne leki. Jest to prawdopodobnie związane z poziomem ekspresji ER oraz HER2 w tych komórkach, a także poprawą biodostępności leków po przyłączeniu do nośnika.
- f) Paklitaksel przyłączony do dendrymeru był od 2 do 25 razy mniej toksyczny dla komórek nowotworowych niż wolny lek.
- g) Koniugat trójlekowy nie wykazywał większej toksyczności względem komórek nowotworowych niż G4P.
- h) Przyłączenie L do nośnika dwukrotnie zwiększało jego toksyczność względem komórek glioblastomy. Niestety efekt ten nie był swoisty, ponieważ toksyczność takiego koniugatu była także znacznie wyższa wobec keratynocytów.
- i) Różnice toksyczności zmierzonej przez NR w porównaniu do XTT przemawiają za tym, że toksyczność G4L w większym stopniu wynikała z zaburzenia integralności lizosomów, natomiast efekt G4P był mocniej związany z indukowaniem dysfunkcji mitochondriów.
- j) Toksyczność koniugatów względem A549 oraz HaCaT była silniej związana z hamowaniem proliferacji, natomiast w przypadku glioblastomy dysfunkcja mitochondriów indukowana aktywnością koniugatów odgrywała większą rolę.
- k) Kombinacja trzech leków przyłączonych do G4 wykazywała efekt addytywny względem nicienia *C.elegans* a aktywność G4PFL jest porównywalna do aktywności skutecznego i powszechnie używanego leku przeciwpasożytniczego.

Chcąc określić czy zaobserwowany brak selektywności koniugatów wobec komórek nowotworowych wynika z niewłaściwego stosunku stechiometrycznego leków lub z nieodpowiedniego doboru docelowych modeli komórkowych zawierających właściwe receptory EGFR i HER2, zdecydowano powtórzyć testy toksyczności koniugatów na innych dostępnych liniach komórkowych: prawidłowych ludzkich fibroblastach (BJ) oraz potrójnie ujemnym raku piersi (HCC1806). Wstępne wyniki wykazały brak selektywności, a toksyczność koniugatu wielolekowego (G4PL) nie różniła się istotnie od toksyczności samego PTX (Ryc.5)

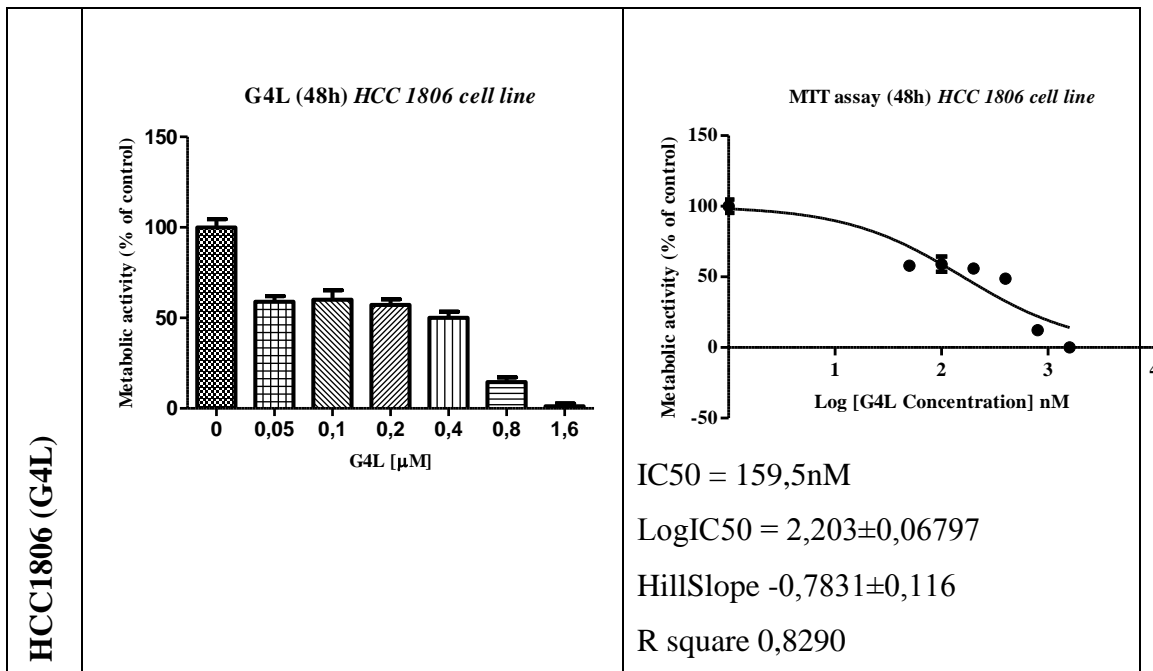


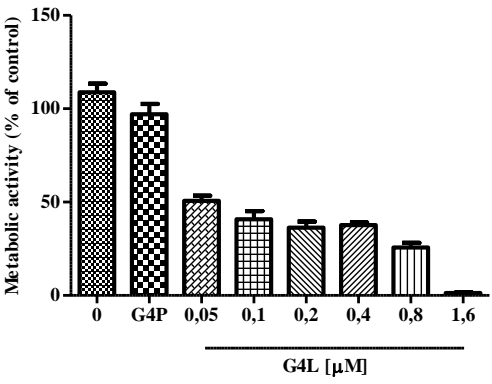
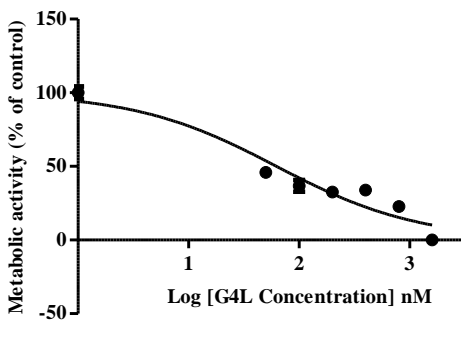
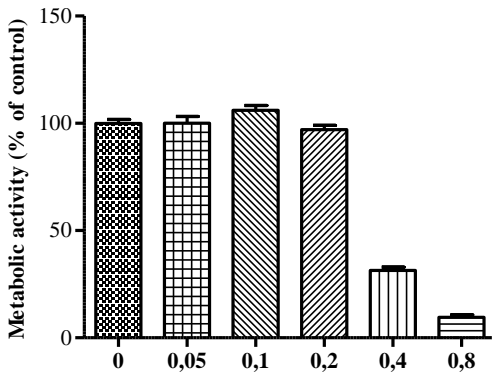
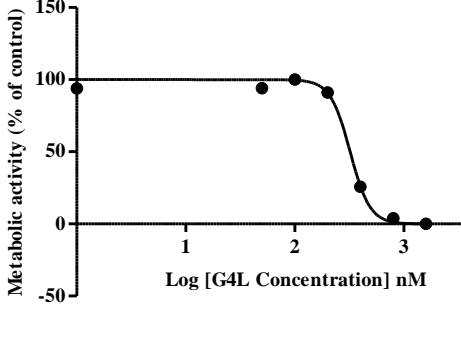
Ryc. 5. Wartości IC₅₀ wolnych leków oraz koniugatów w skali logarytmicznej

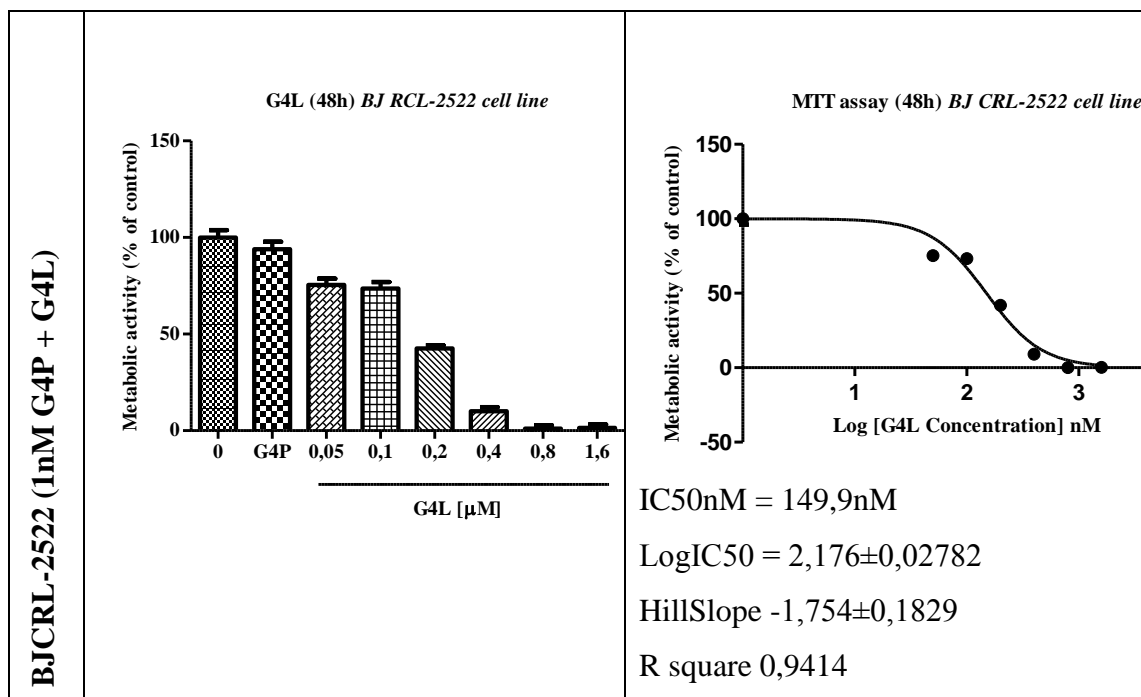
Porównanie wartości IC₅₀ wyrażonych w skali logarytmicznej dla wolnych leków oraz koniugatów względem BJ oraz HCC1806.

W związku z tym zdecydowano się zastosować koniugaty jednolekowe w różnym stosunku stechiometrycznym. W tym celu komórki (HCC1806 oraz BJ) poddano ekspozycji na koniugat G4P w stałym stężeniu 1 nM (stężenie poniżej toksycznego dla badanych komórek – na podstawie poprzednich rezultatów, ryc.5) oraz na G4L we wzrastającym stężeniu. Koniugatu G4F nie badano w tej próbie z uwagi na bardzo niską skuteczność zaobserwowaną we wcześniejszych badaniach). Wykazano addytywne działanie G4P z G4L w 60 nM stężeniu G4L. Dodatkowo w tym stosunku

stechiometrycznym taka mieszanina koniugatów wykazywała selektywność działania wobec linii nowotworowej HCC1806. Toksyczność była prawie trzykrotnie wyższa w przypadku komórek HCC1806 niż BJ ($IC_{50} = 62.6\text{nM}$ i 149.9 nM odpowiednio dla HCC1806 i BJ) – patrz ryc.6. (*Manuskrypt zawierający przytoczone rezultaty jest w trakcie przygotowania do publikacji*).



HCC1806 (1nM G4P + G4L)	<p style="text-align: center;">G4L (48h) HCC 1806 cell line</p>  <p style="text-align: center;">Metabolic activity (% of control)</p> <p style="text-align: center;">G4L [μM]</p>	<p style="text-align: center;">MIT assay (48h) HCC 1806 cell line</p>  <p style="text-align: center;">Metabolic activity (% of control)</p> <p style="text-align: center;">Log [G4L Concentration] nM</p> <p>IC50nM = 62,61nM LogIC50 = 1,797±0,08062 Hillslope -0,6718±0,08231 R square 0,8840</p>
BJCRL-2522 (G4L)	<p style="text-align: center;">G4L (48h) BJ RCL-2522 cell line</p>  <p style="text-align: center;">Metabolic activity (% of control)</p> <p style="text-align: center;">G4L [μM]</p>	<p style="text-align: center;">MIT assay (48h) BJ RCL-2522 cell line</p>  <p style="text-align: center;">Metabolic activity (% of control)</p> <p style="text-align: center;">Log [G4L Concentration] nM</p> <p>IC50nM = 321,9nM LogIC50 = 2,508±0,01208 Hillslope -4,785±0,4734 R square 0,978</p>



Ryc. 6. Wartości IC50 wyznaczone przy użyciu testu MTT dla kombinacji jednolekowych koniugatów (1nM G4P + wzrastające stężenie G4L).

Reasumując, G4L wykazywał istotny potencjał przeciwnowotworowy i może służyć do opracowania skutecznego leczenia tego rodzaju nowotworu złośliwego. Koniugat G4PFL charakteryzował się potencjałem do zastosowania w leczeniu pasożytów wywołanych przez nicienie. Obecność w koniugacie trzech leków o różnych mechanizmach działania może w znacznym stopniu przyczynić się do zapobiegania rozwojowi oporności na leczenie oraz być wykorzystana jako metoda leczenia ratunkowego przypadków lekoopornych. W tym celu konieczne jest określenie profilu toksyczności na modelach zwierzęcych. Wysoka skuteczność oraz selektywność kombinacji G4P+G4L (1 nM G4P + 60 nM G4L) względem HCC1806 implikuje możliwość zastosowania takiej kombinacji jako metody spersonalizowanego leczenia pacjentek z potrójnie ujemnym rakiem piersi. W tabeli 4 zaprezentowano, które związki otrzymane w publikacjach D1-D3 były testowane na wymienionych liniach komórkowych.

Łączenie trzech leków pociąga za sobą nie tylko sumowanie ich potencjalnych skutków terapeutycznych, ale również addycję skutków ubocznych. Znacznie wyższa toksyczność koniugatów względem komórek tkanki nabłonkowej (HaCaT) w porównaniu do komórek nowotworowych (U-118 MG, SCC-15) oraz istotnie mniejsza różnica toksyczności w przypadku komórek tkanki łącznej (BJ) porównywanych z

rakowymi HCC1806 skłania do rozważenia, czy alternatywna droga podania ograniczająca ekspozycję tkanki nabłonkowej (epithelialnej) na działanie koniugatów mogłaby przyczynić się do redukcji toksycznych skutków ubocznych ich zastosowania.

	SCC-15	U-118 MG	HaCaT	BJ	A549
G2 ^{SglF*}	+		+		
G2 ^{RglF}	+		+		
G3 ^{SglF}	+		+		
G3 ^{RglF}	+		+		
G3 ^{2B}	+	+		+	
G3 ^{2B6C8gl}	+	+		+	
G3 ^{2B4S14gl}	+	+		+	
G3 ^{2B2C4S12gl}	+	+		+	
G4 ^{4P109glF}		+	+		+
G4 ^{13Fu64glF**}		+	+		+
G4 ^{13L85glF}		+	+		+
G4 ^{4P11Fu11L74glF}		+	+		+

Tabela 4. Linie komórkowe użyte do testów aktywności poszczególnych koniugatów leków antynowotworowych

Linie komórkowe (kolumny 2-6) użyte do testów aktywności poszczególnych koniugatów leków antynowotworowych (kolumna 1, wiersze 6-13) i TM (kolumna 1, wiersze 1-5). Skróty w nazwach koniugatów oznaczają: * F = izotiocyjanian Fluoresceiny (FITC); ** Fu = Fulvestrant.

W D4 jako modyfikację poprawiającą rozpuszczalność koniugatów zawierających hydrofobowe leki oraz podwójne kombinacje tych leków zastosowano funkcjonalizację części powierzchniowych grup NH_2 PAMAM G3 innym poliolem – α -D-glukoheptono-1,4-laktonem (12 reszt przyłączono kowalencyjnie do 32 grup aminowych). Następnie do terminalnych grup NH_2 zmodyfikowanego w ten sposób nośnika kowalencyjnie przyłączone zostały leki wykorzystywane w terapii raka piersi (BC). Do koniugacji wybrane zostały leki działające selektywnie na ścieżki sygnałowe zaangażowane w rozwój i progresję BC, których biodostępność może być istotnie ograniczona przez słabą rozpuszczalność w wodzie. Postanowiono zsyntezować koniugaty jednolekowe zawierające L lub F oraz koniugat zawierający kombinację obu leków, celem zbadania potencjalnego działania addytywnego. Aktywność biologiczną otrzymanych związków oceniono na trzech liniach komórkowych raka piersi (MCF7 – ER+, MDA-MB-231 – potrójnie ujemna, SK-BR-3 – HER2+). W przebiegu badań aktywności biologicznej koniugatów zbadany został wpływ otrzymanych koniugatów na zdolność indukcji apoptozy w komórkach trzech modeli BC o różnym statusie receptorowym.

Badania DLS wykazały, że koniugaty zawierające F asocjowały. Średnica cząstek tych związków wynosząca około 60 nm była o rząd wielkości wyższa niż dla zakładanej monodispersji. W odróżnieniu od koniugatów zawierających F, średnica cząsteczkowa $\text{G3}^{4\text{L}12\text{gh}}$ wynosiła 11.4 nm.

Najniższe stężenie koniugatów indukujące zmiany metaboliczne komórek określono jako 2.5 μM i takie stężenie stosowano w dalszych badaniach aktywności biologicznej (test MTT). Wolne leki w takim stężeniu wykazywały niższą aktywność. $\text{G3}^{4\text{L}12\text{gh}}$ charakteryzował się największą aktywnością względem MDA-MB-231 (spadek aktywności metabolicznej poniżej 40% w teście 48 godzin) oraz SK-BR-3, natomiast

$G3^{4F12gh*}$ względem MCF-7. Obrazowa cytometria przepływowa wykazała aktywny wychwyty wszystkich koniugatów przez komórki nowotworowe trzech badanych linii. $G3^{4L12gh}$ intensywniej indukował zatrzymanie cyklu komórkowego w fazie G_0/G_1 komórek MDA-MB-231 oraz MCF-7 (w porównaniu do samego L).

Na podstawie oceny aktywności kaspaz oraz uwalniania fosfatydyloseryny zaobserwowano znaczny wzrost populacji komórek martwych oraz w fazie późnej apoptozy w odpowiedzi na działanie $G3^{4L12gh}$ w przypadku linii MDA-MB-231, oraz SK-BR-3. Efekt w przypadku pierwszego typu komórek był najsilniejszy. Aktywność dwulekowego koniugatu $G3^{3L3F12gh}$ względem tych linii komórkowych była na podobnym poziomie w porównaniu do aktywności jednolekowego $G3^{4L12gh}$.

Pomiar markerów autofagii – LC3B oraz p62 wykazał wzrost komórkowej zawartości LC3B przy jednoczesnym spadku p62 po zastosowaniu $G3^{4L12gh}$ w porównaniu do samego L (dla trzech badanych linii). Zarejestrowano również spadek sygnału markera integralności lizosomów LAMP1 w trzech badanych typach komórek po ekspozycji na $G3^{4L12gh}$. W przypadku MCF-7 spadek sygnału LAMP1 korelował z istotnym wzrostem cytoplazmatycznego pH.

Odnotowano również, że $G3^{4L12gh}$ indukował cytoplazmatyczną akumulację NF- κ B w MCF-7 oraz MDA-MB-231 w odróżnieniu od wolnego L. W przypadku SK-BR-3 koniugat ten indukował akumulację NF- κ B w jądrze komórkowym. Zmiana poziomu NF- κ B była skorelowana ze wzrostem poziomu prozapalnej IL-8 jedynie w przypadku MCF-7. Produkcja tej cytokiny była stymulowana przez wolny L w komórkach MCF-7 oraz MDA-MB-231, ale nie była związana ze zmianą poziomu NF- κ B.

Wykazano, że $G3^{3L3F12gh}$ przyczyniał się do wzrostu jądrowej akumulacji TRDMT1 we wszystkich trzech badanych liniach komórkowych. Natomiast $G3^{4L12gh}$ wywoływał taki efekt w MCF-7 oraz SK-BR-3. Zmiana cytoplazmatycznego poziomu tej metylotransferazy po zastosowaniu koniugatów była ograniczona – wzrost odnotowano jedynie w przypadku MCF-7 po zastosowaniu $G3^{4L12gh}$ lub $G3^{3L3F12gh}$. Wyciszenie aktywności genu dla TRDMT1 skutkowało istotnym spadkiem wrażliwości komórek MDA-MB-231 na działanie $G3^{4L12gh}$ oraz $G3^{3L3F12gh}$ przy braku takiej zależności dla $G3^{4F}$.

Odkryto także istotny potencjał $G3^{4L12gh}$ do wywoływania apoptozy w komórkach MDA-MB-231 oraz SK-BR-3 poddanych senescencji indukowanej przez DOX. Koniugat

dwulekowy $G3^{3L3F12gh}$ również bardzo intensywnie stymulował apoptozę w przypadku tych dwóch linii komórkowych BC. W przypadku $G3^{4F}$ wykryto znacznie wyższą aktywność względem wykazującym symptomy starzenia MCF-7 niż dla MCF-7 przed wywołaniem tego efektu.

Przyłączenie hydrofobowych leków L i/lub F do $G3^{12gh}$ podwyższa ich aktywność wobec komórek BC. Koniugatem najsilniej indukującym procesy apoptozy był $G3^{4L12gh}$. Wbrew oczekiwaniom jego aktywność była bardziej widoczna dla linii potrójnie ujemnej MDA-MB-231 niż SK-BR-3 (HER2+), dla której, z uwagi na swój główny mechanizm działania oparty na hamowaniu domeny kinazowej receptora HER2, lek ten jest z założenia dedykowany. Otrzymane rezultaty sugerujące stymulację autofagii, odpowiedzi zapalnej (NF- κ B) oraz akumulacji TRDMT1 przez koniugat $G3^{4L12gh}$ sugerują, że zasadniczy mechanizm działania tego koniugatu nie jest ściśle związany z aktywnością lapatinibu względem HER2. Dodatkowym argumentem na wsparcie tej tezy jest wykazane indukowanie oporności na działanie koniugatów zawierających L poprzez wyciszenie genu dla TRDMT1 w komórkach MDA-MB-231. Nie zaobserwowano, aby w przypadku którejkolwiek z badanych linii BC koniugat dwulekowy charakteryzował się większą aktywnością niż koniugat zawierający tylko L. Natomiast koniugat $G3^{4F}$ miał najmniejszą aktywność spośród badanych koniugatów. Możliwe, że jest to związane z biodostępnością ograniczoną przez asocjację koniugatów zawierających F. Dane dotyczące oceny zdolności do indukcji apoptozy w komórkach z wyindukowanym starzeniem przemawiają za istotnymi właściwościami senolitycznymi otrzymanych koniugatów. Ma to istotne znaczenie z perspektywy leczenia nowotworów złośliwych, ponieważ w ich przypadku proces starzenia może pełnić rolę adaptacji przyczyniającej się do rozwoju oporności na leczenie oraz wznowy nowotworu. [82]

Wyniki uzyskane w D4 wskazują, że aktywność $G3^{4L12gh}$ może zostać wykorzystana do opracowania skutecznej formy leczenia potrójnie-ujemnego raka piersi. Natomiast $G3^{4F12gh}$ może znaleźć zastosowanie jako element leczenia ER+ BC wykorzystującego strategię tzw. Dwustopniowego (one-two punch – ang) opierającej się o wykorzystanie sekwencyjnego stosowania leku o działaniu stymulującym procesy starzenia z następczym zastosowaniem związku o właściwościach senolitycznych. [82]

W publikacji D5 opracowano nową drogę syntezy koniugatów pozwalającą na przyłączenie wiązaniem fosforamidowym fosforanów leków aktywnych względem

ludzkich białaczek. Przyłączanie leków fosforamidowo było szczególnie istotne dla tego badania z powodu potencjalnej wrażliwości tego wiązania na niskie pH, którą również zamierzano zbadać. Istotą pracy było otrzymanie koniugatów uwalniających leki w odpowiedzi na niskie pH. W tym celu do PAMAM G3 przyłączono fosforany: cytarabiny, fludarabiny oraz deksametazonu przez wiązanie fosforoamidowe. Założeniem było również otrzymanie koniugatów wielolekowych zawierających kombinacje wymienionych leków. Aktywność biologiczna otrzymanych koniugatów miała docelowo zostać przebadana na modelach komórkowych ostrej oraz przewlekłej białaczki szpikowej. Zasadniczym celem części biologicznej była ocena wpływu koniugatów na apoptozę komórek nowotworowych w porównaniu z wolnymi lekami. Konwersja hydrofobowych leków do pochodnych fosforanowych stanowi metodę poprawy biodostępności takich leków z uwagi na zwiększenie rozpuszczalności w wodzie.^[83] Linkery wrażliwe na zmianę pH wykorzystywane do przyłączania leków do systemów dostarczania leków przyczyniają się do poprawy kontroli uwalniania leków.^[84] Istotą takiej strategii jest to, aby leki uwalniały się z DDS w kwaśnym środowisku lizosomów (wewnątrzkomórkowo) lub w odpowiedzi na niskie pH środowiska guzów nowotworowych.^[84] W związku z powyższym ostateczny cel badania polegał na ocenie, czy wykorzystanie wrażliwego na pH wiązania do addycji fosforanów leków przeciwnowotworowych do PAMAM G3, spowoduje istotny wzrost skuteczności działania tych leków (przyłączonych do PAMAM) samodzielnie lub w kombinacji wobec ludzkich komórek białaczki. Badania aktywności biologicznej koniugatów prowadzono na czterech liniach białaczki. Linie THP-1 i HL-60 stanowiły model komórkowy AML, dwie pozostałe: K-562, LAMA-84 to modele komórkowe CML. Średnica cząsteczkowa wyznaczona metodą DLS wskazywała na monodispersję otrzymanych koniugatów. Potencjał zeta badanych związków miał lekko dodatnią wartość mieszczącą się w zakresie od 0,23 mV dla PAMAM G3 do 15,43 mV dla G3^{B7F}. Pomiar średnicy cząsteczkowej związków badanych w kwaśnym 0.05 M buforze octanowym (pH = 5) wykazał wzrost średnicy związków w takich warunkach. Zarejestrowano również wzrost potencjału zeta – najbardziej drastyczny w przypadku PAMAM G3 (z 0,23 mV do 21,30 mV).

Proces hydrolizy w kwaśnym środowisku (bufor octanowy) ujawnił istotny spadek intensywności sygnałów rezonansowych dla H-2 oraz H-8 adeniny w widmie ¹H NMR. Oszacowano czas połowicznej hydrolizy koniugatu G3^{10A} wynoszący 4 godziny.

Zaobserwowano również systematyczny wzrost rezonansu pochodzącego od protonów grupy metylowej octanu – wzrost był proporcjonalny do spadku intensywności protonów adeninowych. Rezultaty takiego samego eksperymentu dla $G3^{7D}$ wskazywały na czas połowicznej hydrolizy bliski 3 godziny. Widmo kontrolne NMR otrzymanych związków przechowywanych w wodzie przez dwa miesiące zarejestrowano w D_2O . W widmie tym nie odnotowano istotnych zmian.

Stężenie koniugatów wywołujące istotne zmiany metaboliczne obserwowane w teście MTT wynosiło 10 nM (spadek aktywności metabolicznej HL-60 poniżej 50% w odpowiedzi na 10 nM stężenie $G3^{B7D13C}$ – po 48 godzinach inkubacji). Największą wrażliwością na FP charakteryzowały się komórki LAMA-84 oraz K-562, podczas gdy HL-60 były najbardziej wrażliwe na CP. Natomiast THP-1 nie wykazywały istotnej odpowiedzi metabolicznej nawet w 1 μM stężeniu CP lub FP. Co interesujące w przypadku tej linii komórkowej zmiany metaboliczne były obserwowane już po 24 godzinach inkubacji. DP nie powodował istotnej zmiany metabolizmu żadnej z czterech badanych linii komórkowych po 48 godzinnej inkubacji. W dodatku CP oraz FP w stężeniu 10 nM nie indukowały istotnej odpowiedzi metabolicznej badanych komórek po 48 godzinach. W przeciwieństwie do samego CP w stężeniu 10 nM koniugat $G3^{B13C}$ indukował umiarkowane zmiany metaboliczne komórek K-562. Natomiast $G3^{B7F}$ w stężeniu 10 nM stymulował spadek aktywności metabolicznej komórek THP-1 oraz HL-60 (takiego efektu nie wykazywał wolny FP w tym stężeniu). W przypadku LAMA-84 aktywność $G3^{B7F}$ nie była większa od aktywności FP, natomiast zastosowanie dwulekowego $G3^{B7F7D}$ wykazało znaczne obniżenie aktywności metabolicznej w stężeniu 10 nM. Podobne wzmocnienie aktywności odnotowano dla 10 nM $G3^{B13C7D}$ względem HL-60 (względem 10 nM wolnego CP zaobserwowano 50% spadek aktywności metabolicznej). Ponadto w przeciwieństwie do samego DP, 10 nM $G3^{B7D}$ wywoływał istotne zmiany metaboliczne w THP-1 oraz mniej intensywne w HL-60. W przypadku $G3^B$ nie zaobserwowano istotnego wpływu dendrymeru na badane komórki.

Ze względu na istotną różnicę wrażliwości LAMA-84 oraz K-562 na $G3^{B7D7F}$ porównano wychwyty koniugatu przez te komórki przy użyciu obrazowej cytometrii przepływowej (celem zbadania czy wrażliwość w tych warunkach zależy od wychwyty). Rezultaty testu ujawniły wyższy wychwyty $G3^{B7D7F}$ przez K-562, która wykazywała znacznie mniejszą wrażliwość na ten koniugat niż LAMA-84.

Badanie wpływu koniugatów oraz wolnych leków na apoptozę ujawniło istotny wzrost populacji komórek apoptotycznych (niemal 30% komórek we wczesnej oraz późnej apoptozie po 48 godzinach) linii HL-60 w odpowiedzi na 10 nM $G3^{B7D13C}$. W przypadku pozostałych koniugatów nie zaobserwowano istotnego wpływu na stymulowanie apoptozy dla badanych linii komórkowych. Wpływ 10 nM $G3^{B7D13C}$ na apoptozę HL-60 potwierdziła zwiększona aktywność wykonawczej kaspazy 3. W przypadku pozostałych linii komórkowych oraz koniugatów nie było korelacji pomiędzy hamowaniem metabolizmu komórek a indukcją apoptozy przez koniugaty.

Oceniając wpływ wolnych leków oraz koniugatów na cykl komórkowy zaobserwowano istotny wzrost populacji komórek HL-60 zatrzymanych w fazie G_0/G_1 cyklu w odpowiedzi na 10 nM $G3^{B7D13C}$ oraz w mniejszym stopniu $G3^{B7D7F}$.

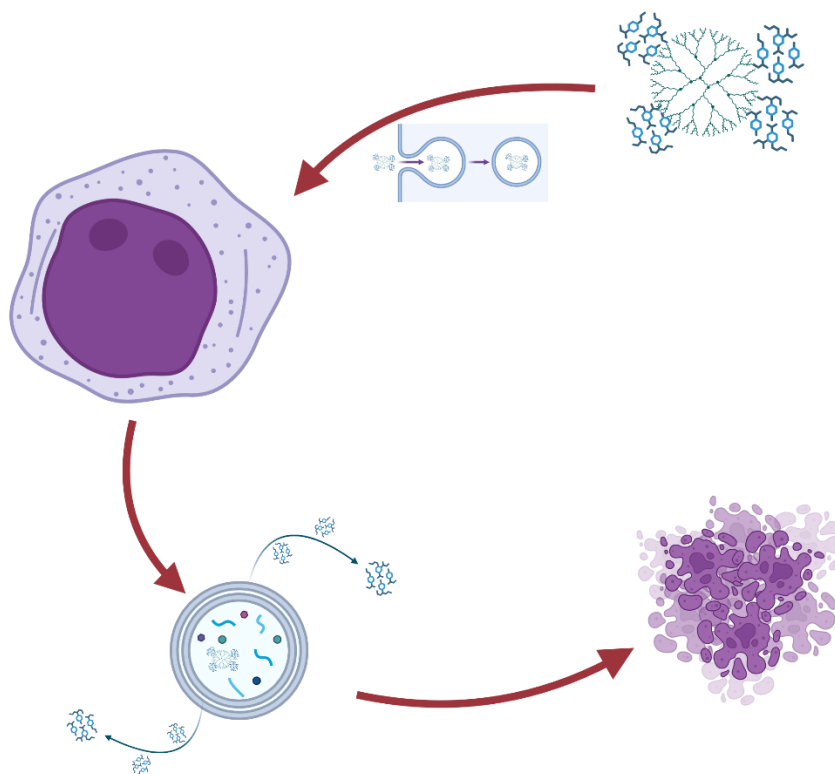
Z uwagi na zawartość deksametazonu – glikokortykosteroidu o silnych właściwościach przeciwzapalnych w składzie koniugatów zdecydowano się zbadać poziom NF- κ B – ważnego czynnika transkrypcyjnego modulującego odpowiedź zapalną. Wykazano, że sam nośnik $G3^B$ stymulował nieznacznie wzrost poziomu NF- κ B w komórkach HL-60. Jedynie w przypadku komórek HL-60 poddanych działaniu 10 nM $G3^{B7D7F}$ zarejestrowano nieznaczny wzrost poziomu NF- κ B.

Wyniki testu na hemolizę sugerowały słabo zaznaczone właściwości hemolityczne koniugatów $G3^{B13C}$ oraz $G3^{B7D13C}$ po 48 godzinnej inkubacji. Pozostałe koniugaty nie wykazywały aktywności hemolitycznej w badanych warunkach.

Otrzymane w D5 wyniki dowodzą, że synteza wykorzystująca CDI jest skuteczną drogą umożliwiającą kowalencyjne przyłączanie fosforanów leków do dendrymerów PAMAM. W dodatku powstałe wiązanie wykazuje wrażliwość na niskie pH (okres połowicznej hydrolizy około 4 godziny). Ma to szczególne znaczenie z perspektywy koncepcji stosowania DDS, w której poszukuje się sposobu na selektywny transport leków do komórek nowotworowych. Właściwości komórek nowotworowych, wpływające na odmienne parametry środowiska guzów nowotworowych w porównaniu do zdrowych tkanek przemawiają za tym, że leki przyłączone do DDS przy wykorzystaniu opisanego w tej publikacji wiązania mogłyby w zdecydowanie większym stopniu być uwalniane w środowisku guzów nowotworowych niż w tkankach prawidłowych. Wrażliwość koniugatu w pH ok. 5, które jest charakterystyczne dla lizosomów pokazuje również, że

intensywność uwalniania leków może być największa w kompartmentcie wewnątrzkomórkowym, co dodatkowo może dodatnio wpłynąć na wzrost efektywności leczenia przy jednoczesnej redukcji ogólnoustrojowych skutków ubocznych (schematycznie zobrazowano – Rycina 7). Wzrost średnicy cząsteczkowej koniugatów oraz potencjału zeta w pH 5 sugeruje, że właściwości fizykochemiczne zastosowanego nośnika mogą ulegać istotnym zmianom w odpowiedzi na protonację wolnych grup NH_2 , spowodowaną niskim pH. Kontrolne widma ^1H NMR wykazały trwałość składu otrzymanych koniugatów w obojętnym środowisku wodnym. Obserwacja ta wspiera argument o potencjale do selektywnego uwalniania leków od tak opracowanego DDS w odpowiedzi na obniżenie pH.

Ocena aktywności biologicznej otrzymanych koniugatów z FP CP DP oraz podwójnych kombinacji z G3^{B} wykazała, że przyłączenie tych fosforanów do nośnika pozwalała zachować aktywność przeciwnowotworową przy zastosowaniu nawet 10-krotnie niższych stężeń koniugatów (w odniesieniu do wolnych leków). W dodatku obecność deksametazonu w koniugacie dwulekowym $\text{G3}^{\text{B7D13C}}$ przyczyniła się do wzmocnienia efektu przeciwnowotworowego na drodze indukowania apoptozy oraz supresji cyklu komórkowego w fazie G_0/G_1 (HL-60). W przypadku pozostałych badanych linii komórkowych oraz koniugatów brak istotnego powiązania wpływu na zmiany metabolizmu komórek z indukcją apoptozy przemawia za tym, że dominującym mechanizmem determinującym ich aktywność był efekt cytostatyczny. Otrzymane w trakcie tego badania wyniki wskazują również na to, że różnice wrażliwości różnych linii komórkowych nie muszą być związane z odmiennym stopniem wychwytu koniugatów przez komórki (G3^{B7D7F} względem LAMA-84 vs K-562). Brak aktywności hemolitycznej G3^{B} oraz nieznaczna indukcja wzrostu poziomu prozapalnego NF- κB jedynie w przypadku jednej z badanych linii komórkowych (w odpowiedzi na sam nośnik) przemawiają za wystarczającą biokompatybilnością takiego systemu dostarczania leków.



Ryc. 7. Schematyczna wizualizacja uwalniania leków z dendrymeru w niskim pH lizosomów

5. Podsumowanie i wnioski wyciągnięte z cyklu publikacji

Stosując przedstawione strategie syntezy z wykorzystaniem różnych aktywatorów otrzymano kilka serii koniugatów dendrymerów PAMAM różnych generacji z kowalencyjnie przyłączonymi lekami o różnej aktywności przeciwnowotworowej. Kowalencyjne przyłączenie leków umożliwiło otrzymanie serii

koniugatów o określonej stechiometrii leków przyłączonych do nośnika. W dodatku koniugaty, w których syntezie użyto wiązanie fosforamidowe wykazywały stałość składu w środowisku wodnym. *Koniugacja leków do PAMAM pozwala osiągnąć kontrolę nad składem otrzymanego terapeutycznego oraz zapewnia bardziej stabilny profil uwalniania leków z DDS.*

W przypadku koniugatów otrzymanych w oparciu o wiązanie fosforoamidowe wykazano zależność uwalniania skoniugowanych leków od pH (wiązanie wrażliwe na niskie pH).

Koniugaty z wiązaniem fosforoamidowym umożliwiają minimalizację skutków ubocznych przy jednoczesnym zachowaniu efektywności otrzymanego w ten sposób DDS.

Dodatnie potencjały zeta oraz niska aktywność hemolityczna koniugatów prowadzą do biokompatybilności koniugatów opartych o dendrymery PAMAM generacji 3 i 4.

Funkcjonalizacja nośnika poprzez przyłączenie polioli umożliwia otrzymanie rozpuszczalnych w wodzie koniugatów zawierających stosunkowo wysoką zawartość hydrofobowych leków

Wysoka rozpuszczalność koniugatów w wodzie umożliwia poprawę biodostępności leków hydrofobowych poprzez zastosowanie PAMAM sfunkcjonalizowanych poprzez addycję wymienionych cząsteczek.

Wysoki stopień podstawienia nośnika hydrofobowymi lekami sprzyja tworzeniu asocjatów. *Może to wpływać negatywnie na biodostępność otrzymanych DDS w związku z czym stosunek stechiometryczny hydrofobowych leków względem nośnika powinien być możliwie jak najniższy.*

Wpływ przyłączenia różnych leków do PAMAM na wzrost ich aktywności jest trudny do przewidzenia.

W związku z tym bardziej optymalną strategią wydaje się synteza koniugatów jednolekowych. Tak otrzymane koniugaty mogą być następnie wykorzystane w kombinacjach zawierających różne stosunki stechiometryczne koniugatów. Może to poprawić efektywność oraz selektywność działania takich kombinacji względem komórek nowotworowych.

Addycja leków do PAMAM pozwala nie tylko na wzmocnienie ich aktywności przeciwnowotworowej, ale także na ujawnienie nowych właściwości (na przykład senolitycznych właściwości G3^{4L12gh} oraz G3^{4F12gh}).

Przylączenie leków o aktywności przeciwnowotworowej do PAMAM może przyczynić się do poszerzenia grupy terapeutyków o właściwościach pożądanych w kontekście terapii nowotworów złośliwych takich jak senolityki.

Przylączenie kombinacji leków przeciwnowotworowych do PAMAM może okazać się skuteczną strategią dla opracowania nowych leków przeciw pasożytniczych.

Strategia kowalencyjnego przylączenia leków do nanonośników opartych o PAMAM może przyczynić się do opracowania nowych metod terapeutycznych charakteryzujących się wysoką skutecznością oraz ograniczonym zakresem działań niepożądanych.

Streszczenie

Nowotwory złośliwe stanowią grupę chorób o zróżnicowanej etiologii, przebiegu oraz rokowaniu. Stanowią one jedną z wiodących przyczyn zgonów w krajach rozwiniętych. Dodatkowo nowotwory złośliwe w zaawansowanych stadiach są źródłem uporczywych dla pacjentów onkologicznych objawów, które w znaczącym stopniu

przyczyniają się do ograniczenia ich aktywności społecznej oraz pogorszenia jakości życia. Z uwagi na różnorodność mechanizmów leżących u podstaw rozwoju nowotworów, przebieg choroby jest często nieprzewidywalny a rezultaty leczenia niesatysfakcjonujące. W dodatku dostępne formy leczenia często niosą ze sobą szereg działań niepożądanych, które wywierają negatywny wpływ na zdrowie oraz samopoczucie pacjenta. Uciążliwe skutki uboczne mogą istotnie wpływać na ograniczenie skuteczności terapii. Wychodząc naprzeciw wyzwaniom terapii nowotworów złośliwych opracowywane są nowoczesne metody terapii, których głównym założeniem jest personalizacja leczenia. Istotą tej koncepcji jest dopasowanie aktywności leku do specyfiki molekularnej danego nowotworu. Można to osiągnąć m.in. poprzez wprowadzanie do leczenia substancji selektywnie hamujących zdefiniowane ścieżki przekazywania sygnału zaangażowane w rozwój nowotworu, łączenie leków z przeciwciałami skierowanymi przeciw specyficznym dla nowotworu antygenom oraz wykorzystaniu nanocząsteczkowych systemów transportu leków. Systemy te mogą być dodatkowo modyfikowane przez przyłączanie do nich ligandów dla receptorów ulegających nadeskpresji w komórkach nowotworów oraz poprzez przyłączanie do nich leków przeciwnowotworowych wiązaniami wrażliwymi na działanie pH. Strategia taka może dodatkowo poprawić selektywność leczenia przyczyniając się do wzrostu jego efektywności przy jednoczesnym ograniczeniu działań niepożądanych.

Celem publikacji wchodzących w przedłożony cykl było zastosowanie dendrymerów poliamidoaminowych (PAMAM) różnych generacji jako systemów transportu leków przeciwnowotworowych oraz kombinacji zawierających kilka leków o różnym mechanizmie działania. Dendrymery były modyfikowane poprzez zablokowanie powierzchniowych grup aminowych przez alkohole polihydroksylowe oraz biotynę. Założeniem była poprawa rozpuszczalności oraz selektywności wnikania nośników wraz z lekami do komórek nowotworowych. Leki do dendrymerów przyłączano kowalencyjnie poprzez wykorzystanie różnych ścieżek syntezy, które zostały opisane w dalszej części. W jednej z publikacji do otrzymania koniugatów zastosowano innowacyjną ścieżkę syntezy pozwalającą na przyłączanie fosforanów leków do PAMAM wiązaniem fosforoamidowym, tak aby uwalnianie leków było zależne od niskiego pH. Otrzymane koniugaty leków/kombinacji leków ze zmodyfikowanymi PAMAM były następnie badane na modelach komórkowych celem określenia ich aktywności biologicznej. W badaniach tych wykazano, że dendrymery zmodyfikowane przez przyłączenie polioli

i/lub biotyny przyczyniają się do wzmocnienia aktywności przeciwnowotworowej przyłączonych do nich leków. Wykazano także, że kombinacje wielolekowe mogą wykazywać addycję aktywności przeciwnowotworowej. Dodatkowo odkryto, że stosowanie mieszaniny koniugatów jednolekowych zawierających różne leki może w określonym stosunku stechiometrycznym wykazywać istotną selektywność efektu względem komórek nowotworu. Wykazano również, że nowa strategia syntezy koniugatów z wykorzystaniem wiązania fosforoamidowego pozwala otrzymać związki wykazujące stałość składu w środowisku wodnym, z których uwalnianie leków zależne jest od niskiego pH.

Wyniki otrzymane w cyklu publikacji mogą stanowić podstawę dla opracowania nowych terapeutyków wykazujących dużą aktywność przeciwnowotworową przy jednocześnie wyższej selektywności.

Abstract

Cancers are a group of diseases which have diverse etiology, course and prognosis. They are one of the leading causes of death in developed countries. In addition cancer progression is the source of burdensome symptoms for oncologic patients resulting in

significant decrease of quality of their life. Considering the plethora of molecular mechanisms leading to cancer development the course of the disease is often difficult to predict and outcomes of treatment are disappointing. Moreover, a dozen of available forms of cancer treatment are associated with significant adverse effects on patients health and general condition. Another important aspect is the limitation of therapy efficacy caused by the side effects. To overcome the crucial limitations of cancer treatment a novel methods of therapy are developed. The main concept of modern forms of treatment is the personalization of therapeutic strategies. The point of such solution is to match the drug of specific mechanism of action to the adequate phenotype of cancer. Mentioned personalization could be acquired by utilizing drugs selectively affecting the molecular pathways crucial for cancer development, drug conjugation with antibodies specific to cancer antigens or by nanoparticle based drug delivery (drug delivery systems – DDS). DDS could be further modified by addition of ligands for specific receptors or transporters overexpressed by cancer cells to obtain enhanced drug activity with simultaneous higher selectivity. Another tested solution to achieve mentioned properties is utilization of pH cleavable bonds for drugs conjugation to DDS.

The aim of articles from the presented series of publications was to utilize modified PAMAM (polyamidoamine) dendrimers as the carriers for anticancer one – drug or multi – drug combinations consisted of drugs of different mechanisms of action. Dendrimers were modified by functionalization of terminal amide groups with polyhydroxyl alcohols and/or biotin. The rationale of such modifications was to increase water solubility of dendrimer – drug conjugates and also to obtain higher selectivity of conjugates uptake by cancer cells. Drugs were covalently attached to dendrimers as a result of different pathways of syntheses which are described in the main part of the text. In one of the articles the novel path of conjugation by pH cleavable phosphoroamide bond was presented. Obtained conjugates were tested on cellular models (in vitro) to determine their biological activity. The results of biological tests indicate that dendrimers functionalized by polyhydroxyl substituents and/or biotin (as DDS) contributed to enhancement of anticancer effect of the conjugated drugs and drugs combinations. It was also proved that conjugation of two drugs of different mechanisms of action to such modified PAMAM lead to addition in their anticancer activity. Moreover, it was shown that the mixture of one drug conjugates (each with different drug) at specific stoichiometry provided selectivity in inhibition of cancer cells proliferation (metabolic activity). Finally the novel

strategy of conjugation using phosphoroamide bond was proved as a tool for obtainment of conjugates which composition is stable in neutral pH while drug release (from conjugates) is induced by acidic environment.

The results obtained in the series of presented articles could provide novel useful solutions for development of efficient and selective therapeutics for cancer treatment.

Literatura:

1. Brown, J. S., S. R. Amend, R. H. Austin, R. A. Gatenby, E. U. Hammarlund, and K. J. Pienta. "Updating the Definition of Cancer." *Molecular Cancer Research: MCR* 21, no. 11 (2023): 1142–1147.

2. Fares, J., M. Y. Fares, H. H. Khachfe, et al. "Molecular Principles of Metastasis: A Hallmark of Cancer Revisited." *Signal Transduction and Targeted Therapy* 5 (2020): 28
3. Black, J. R. M., and N. McGranahan. "Genetic and Non-genetic Clonal Diversity in Cancer Evolution." *Nature Reviews Cancer* 21 (2021): 379–392.
4. Baba, A. I., and C. Câtoi. *Comparative Oncology*. Bucharest (RO): The Publishing House of the Romanian Academy, 2007. Chapter 3, Tumor Cell Morphology.
5. Carbone, A. "Cancer Classification at the Crossroads." *Cancers* 12, no. 4 (2020): 980.
6. Li, W. "Flow Cytometry in the Diagnosis of Leukemias." In *Leukemia*, edited by W. Li. Brisbane (AU): Exon Publications, 2022. Chapter 4.
7. Schilhabel, A., P. J. Walter, P. Cramer, J. von Tresckow, S. Kohlscheen, M. Szczepanowski, A. Laqua, K. Fischer, B. Eichhorst, S. Böttcher, C. Schneider, E. Tausch, M. Brüggemann, M. Kneba, M. Hallek, and M. Ritgen. "CD20 Expression as a Possible Novel Prognostic Marker in CLL: Application of EuroFlow Standardization Technique and Normalization Procedures in Flow Cytometric Expression Analysis." *Cancers* 14, no. 19 (2022): 4917.
8. Tsang, J. Y. S., and G. M. Tse. "Molecular Classification of Breast Cancer." *Advances in Anatomic Pathology* 27, no. 1 (2020): 27–35.
9. Vineis, P., A. Schatzkin, and J. D. Potter. "Models of Carcinogenesis: An Overview." *Carcinogenesis* 31, no. 10 (2010): 1703–1709.
10. Kumari, S., S. Sharma, D. Advani, A. Khosla, P. Kumar, and R. K. Ambasta. "Unboxing the Molecular Modalities of Mutagens in Cancer." *Environmental Science and Pollution Research International* 29, no. 41 (2022): 62111–62159.
11. Abel, E., J. Angel, K. Kiguchi, et al. "Multi-stage Chemical Carcinogenesis in Mouse Skin: Fundamentals and Applications." *Nature Protocols* 4 (2009): 1350–1362.
12. Siddiqui, I. A., V. Sanna, N. Ahmad, M. Sechi, and H. Mukhtar. "Resveratrol Nanoformulation for Cancer Prevention and Therapy." *Annals of the New York Academy of Sciences* 1348, no. 1 (2015): 20–31.
13. Zhang, S., X. Xiao, Y. Yi, et al. "Tumor Initiation and Early Tumorigenesis: Molecular Mechanisms and Interventional Targets." *Signal Transduction and Targeted Therapy* 9 (2024): 149.

14. Helleday, T., S. Eshtad, and S. Nik-Zainal. "Mechanisms Underlying Mutational Signatures in Human Cancers." *Nature Reviews Genetics* 15 (2014): 585–598.
15. Lee, E. Y., and W. J. Muller. "Oncogenes and Tumor Suppressor Genes." *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology* 2, no. 10 (2010): a003236.
16. Ren, R. "Mechanisms of BCR–ABL in the Pathogenesis of Chronic Myelogenous Leukaemia." *Nature Reviews Cancer* 5 (2005): 172–183.
17. Arteaga, C. L., and J. A. Engelman. "ERBB Receptors: From Oncogene Discovery to Basic Science to Mechanism-based Cancer Therapeutics." *Cancer Cell* 25, no. 3 (2014): 282–303.
18. Asati, V., D. K. Mahapatra, and S. K. Bharti. "PI3K/Akt/mTOR and Ras/Raf/MEK/ERK Signaling Pathways Inhibitors as Anticancer Agents: Structural and Pharmacological Perspectives." *European Journal of Medicinal Chemistry* 109 (2016): 314–341.
19. Wong, R. S. "Apoptosis in Cancer: From Pathogenesis to Treatment." *Journal of Experimental & Clinical Cancer Research: CR* 30, no. 1 (2011): 87.
20. Klanova, M., and P. Klener. "BCL-2 Proteins in Pathogenesis and Therapy of B-Cell Non-Hodgkin Lymphomas." *Cancers* 12, no. 4 (2020): 938.
21. Pfeffer, C. M., and A. T. K. Singh. "Apoptosis: A Target for Anticancer Therapy." *International Journal of Molecular Sciences* 19, no. 2 (2018): 448.
22. Liu, J., Q. Xiao, J. Xiao, et al. "Wnt/ β -Catenin Signalling: Function, Biological Mechanisms, and Therapeutic Opportunities." *Signal Transduction and Targeted Therapy* 7 (2022): 3.
23. Zhan, T., N. Rindtorff, and M. Boutros. "Wnt Signaling in Cancer." *Oncogene* 36 (2017): 1461–1473.
24. Xue, W., L. Yang, C. Chen, M. Ashrafizadeh, Y. Tian, and R. Sun. "Wnt/ β -Catenin-driven EMT Regulation in Human Cancers." *Cellular and Molecular Life Sciences: CMLS* 81, no. 1 (2024): 79.
25. Castaneda, M., P. den Hollander, N. A. Kuburich, J. M. Rosen, and S. A. Mani. "Mechanisms of Cancer Metastasis." *Seminars in Cancer Biology* 87 (2022): 17–31.
26. Ji, H., C. Hu, X. Yang, et al. "Lymph Node Metastasis in Cancer Progression: Molecular Mechanisms, Clinical Significance and Therapeutic Interventions." *Signal Transduction and Targeted Therapy* 8 (2023): 367.

27. Roth, L., L. Russo, S. Ulugoel, R. Freire Dos Santos, E. Breuer, A. Gupta, and K. Lehmann. "Peritoneal Metastasis: Current Status and Treatment Options." *Cancers* 14, no. 1 (2021): 60.
28. Leong, S. P., and M. H. Witte. "Cancer Metastasis through the Lymphatic versus Blood Vessels." *Clinical and Experimental Metastasis* 41 (2024): 387–402.
29. Higdon, M. L., C. J. Atkinson, and K. V. Lawrence. "Oncologic Emergencies: Recognition and Initial Management." *American Family Physician* 97, no. 11 (2018): 741–748.
30. Gould Rothberg, B. E., T. E. Quest, S. J. Yeung, L. C. Pelosof, D. E. Gerber, J. A. Seltzer, J. J. Bischof, C. R. Thomas Jr., N. Akhter, M. Mamtani, R. E. Stutman, C. W. Baugh, V. Anantharaman, N. R. Pettit, A. D. Klotz, M. A. Gibbs, and D. N. Kyriacou. "Oncologic Emergencies and Urgencies: A Comprehensive Review." *CA: A Cancer Journal for Clinicians* 72, no. 6 (2022): 570–593.
31. Nguyen, D., and J. Massagué. "Genetic Determinants of Cancer Metastasis." *Nature Reviews Genetics* 8 (2007): 341–352.
32. Ganesh, K., and J. Massagué. "Targeting Metastatic Cancer." *Nature Medicine* 27, no. 1 (2021): 34–44.
33. Riihimäki, M., H. Thomsen, K. Sundquist, J. Sundquist, and K. Hemminki. "Clinical Landscape of Cancer Metastases." *Cancer Medicine* 7, no. 11 (2018): 5534–5542.
34. Nayak, M. G., A. George, M. S. Vidyasagar, S. Mathew, S. Nayak, B. S. Nayak, Y. N. Shashidhara, and A. Kamath. "Quality of Life among Cancer Patients." *Indian Journal of Palliative Care* 23, no. 4 (2017): 445–450.
35. Bossi, P., R. De Luca, O. Ciani, E. D'Angelo, and R. Caccialanza. "Malnutrition Management in Oncology: An Expert View on Controversial Issues and Future Perspectives." *Frontiers in Oncology* 12 (2022): 910770.
36. Anjanappa, M., M. Corden, A. Green, D. Roberts, P. Hoskin, A. McWilliam, and A. Choudhury. "Sarcopenia in Cancer: Risking More than Muscle Loss." *Technical Innovations & Patient Support in Radiation Oncology* 16 (2020): 50–57.
37. Crawford, G. B., T. Dzierżanowski, K. Hauser, P. Larkin, A. I. Luque-Blanco, I. Murphy, C. M. Puchalski, C. I. Ripamonti, and ESMO Guidelines Committee. "Care of the Adult Cancer Patient at the End of Life: ESMO Clinical Practice Guidelines." *ESMO Open* 6, no. 4 (2021): 100225.

38. Fnu, N., W. C. Kuan, Y. C. Kong, R. S. Bustamam, L. P. Wong, S. Subramaniam, G. F. Ho, H. Zaharah, C. H. Yip, and N. Bhoo-Pathy. "Cancer-related Costs, the Resulting Financial Impact and Coping Strategies among Cancer Survivors Living in a Setting with a Pluralistic Health System: A Qualitative Study." *Ecancermedicalscience* 16 (2022): 1449.
39. Hullmann, S. E., S. L. Robb, and K. L. Rand. "Life Goals in Patients with Cancer: A Systematic Review of the Literature." *Psycho-Oncology* 25, no. 4 (2016): 387–399.
40. van Roij, J., L. Brom, M. Youssef-El Soud, L. van de Poll-Franse, and N. J. H. Raijmakers. "Social Consequences of Advanced Cancer in Patients and Their Informal Caregivers: A Qualitative Study." *Supportive Care in Cancer: Official Journal of the Multinational Association of Supportive Care in Cancer* 27, no. 4 (2019): 1187–1195.
41. Wu, W., J. L. Klockow, M. Zhang, F. Lafortune, E. Chang, L. Jin, Y. Wu, and H. E. Daldrop-Link. "Glioblastoma Multiforme (GBM): An Overview of Current Therapies and Mechanisms of Resistance." *Pharmacological Research* 171 (2021): 105780.
42. Weller, M., and E. Le Rhun. "How Did Lomustine Become Standard of Care in Recurrent Glioblastoma?" *Cancer Treatment Reviews* 87 (2020): 102029.
43. Qiu, J., Z. Shi, and J. Jiang. "Cyclooxygenase-2 in Glioblastoma Multiforme." *Drug Discovery Today* 22, no. 1 (2017): 148–156.
44. Imbesi Bellantoni, M., G. Picciolo, I. Pirrotta, N. Irrera, M. Vaccaro, F. Vaccaro, F. Squadrito, and G. Pallio. "Oral Cavity Squamous Cell Carcinoma: An Update of the Pharmacological Treatment." *Biomedicines* 11, no. 4 (2023): 1112.
45. Stanganelli, I., F. Spagnolo, G. Argenziano, P. A. Ascierto, F. Bassetto, P. Bossi, V. Donato, D. Massi, C. Massone, R. Patuzzo, G. Pellacani, P. Quaglino, P. Queirolo, I. Zalaudek, G. Palmieri, and On Behalf of Italian Melanoma Intergroup Imi. "The Multidisciplinary Management of Cutaneous Squamous Cell Carcinoma: A Comprehensive Review and Clinical Recommendations by a Panel of Experts." *Cancers* 14, no. 2 (2022): 377.
46. Abdelmeguid, A. S., N. L. Silver, M. Boonsripitayanon, B. S. Glisson, R. Ferrarotto, G. B. Gunn, J. Phan, A. M. Gillenwater, and E. Y. Hanna. "Role of Induction Chemotherapy for Oral Cavity Squamous Cell Carcinoma." *Cancer* 127, no. 17 (2021): 3107–3112.

47. Mohamad, I., M. D. E. Glaun, K. Prabhash, A. Busheri, S. Y. Lai, V. Noronha, and A. Hosni. "Current Treatment Strategies and Risk Stratification for Oral Carcinoma." *American Society of Clinical Oncology Educational Book. American Society of Clinical Oncology. Annual Meeting* 43 (2023): e389810.
48. Goldberg, M., A. Manzi, A. Birdi, et al. "A Nanoengineered Topical Transmucosal Cisplatin Delivery System Induces Anti-tumor Response in Animal Models and Patients with Oral Cancer." *Nature Communications* 13 (2022): 4829.
49. Chai, A. W. Y., K. P. Lim, and S. C. Cheong. "Translational Genomics and Recent Advances in Oral Squamous Cell Carcinoma." *Seminars in Cancer Biology* 61 (2020): 71–83.
50. U.S. Food and Drug Administration. "FDA Approves Pembrolizumab for First-Line Treatment of Head and Neck Squamous Cell Carcinoma." Accessed April 2025.
51. Moo, T. A., R. Sanford, C. Dang, and M. Morrow. "Overview of Breast Cancer Therapy." *PET Clinics* 13, no. 3 (2018): 339–354.
52. Opdam, F. L., H. J. Guchelaar, J. H. Beijnen, and J. H. Schellens. "Lapatinib for Advanced or Metastatic Breast Cancer." *The Oncologist* 17, no. 4 (2012): 536–542.
53. Cho, N. "Molecular Subtypes and Imaging Phenotypes of Breast Cancer." *Ultrasonography (Seoul, Korea)* 35, no. 4 (2016): 281–288.
54. Iacopetta, D., J. Ceramella, N. Baldino, M. S. Sinicropi, and A. Catalano. "Targeting Breast Cancer: An Overlook on Current Strategies." *International Journal of Molecular Sciences* 24, no. 4 (2023): 3643.
55. Kantarjian, H. M., T. M. Kadia, C. D. DiNardo, M. A. Welch, and F. Ravandi. "Acute Myeloid Leukemia: Treatment and Research Outlook for 2021 and the MD Anderson Approach." *Cancer* 127, no. 8 (2021): 1186–1207.
56. Ashaye, A. O., Z. Khankhel, Y. Xu, K. Fahrbach, R. Mokgokong, M. E. Orme, K. Lang, J. C. Cappelleri, and C. Mamolo. "A Comparative Evaluation of Gemtuzumab Ozogamicin + Daunorubicin-Cytarabine and Other Treatments for Newly Diagnosed Acute Myeloid Leukemia." *Future Oncology (London, England)* 15, no. 6 (2019): 663–681.
57. Yang, S., R. Ma, X. Yuan, L. Jiang, J. Shi, J. Yang, P. Lei, Y. Zang, X. Chen, Y. Zhang, Z. Liu, J. Guo, L. Zhang, X. Zhu, and Z. Zhu. "Improved Outcomes of All-trans-Retinoic Acid and Arsenic Trioxide Plus Idarubicin as a Frontline

- Treatment in Adult Patients with Acute Promyelocytic Leukemia.” *Clinical Lymphoma, Myeloma & Leukemia* 20, no. 7 (2020): e382–e391.
58. Chen, Y. F., J. Li, L. L. Xu, M. A. Găman, and Z. Y. Zou. “Allogeneic Stem Cell Transplantation in the Treatment of Acute Myeloid Leukemia: An Overview of Obstacles and Opportunities.” *World Journal of Clinical Cases* 11, no. 2 (2023): 268–291.
 59. Senapati, J., K. Sasaki, G. C. Issa, et al. “Management of Chronic Myeloid Leukemia in 2023 – Common Ground and Common Sense.” *Blood Cancer Journal* 13 (2023): 58.
 60. Bower, H., M. Björkholm, P. W. Dickman, M. Höglund, P. C. Lambert, and T. M. Andersson. “Life Expectancy of Patients with Chronic Myeloid Leukemia Approaches the Life Expectancy of the General Population.” *Journal of Clinical Oncology: Official Journal of the American Society of Clinical Oncology* 34, no. 24 (2016): 2851–2857.
 61. Guo, Q., L. Liu, Z. Chen, Y. Fan, Y. Zhou, Z. Yuan, and W. Zhang. “Current Treatments for Non-small Cell Lung Cancer.” *Frontiers in Oncology* 12 (2022): 945102.
 62. Wang, J., N. Sun, W. Han, L. Tong, T. Xu, and G. Li. “Long Non-coding RNA CCAT1 Sponges miR-490 to Enhance Cell Proliferation and Migration of Non-small Cell Lung Cancer.” *Thoracic Cancer* 12, no. 3 (2021): 364–371.
 63. Mansoori, B., A. Mohammadi, S. Davudian, S. Shirjang, and B. Baradaran. “The Different Mechanisms of Cancer Drug Resistance: A Brief Review.” *Advanced Pharmaceutical Bulletin* 7, no. 3 (2017): 339–348.
 64. Lei, Z. N., Q. Tian, Q. X. Teng, J. N. D. Wurpel, L. Zeng, Y. Pan, and Z. S. Chen. “Understanding and Targeting Resistance Mechanisms in Cancer.” *MedComm* 4, no. 3 (2023): e265.
 65. Chu, X., W. Tian, J. Ning, et al. “Cancer Stem Cells: Advances in Knowledge and Implications for Cancer Therapy.” *Signal Transduction and Targeted Therapy* 9 (2024): 170.
 66. Khan, S. U., K. Fatima, S. Aisha, et al. “Unveiling the Mechanisms and Challenges of Cancer Drug Resistance.” *Cell Communication and Signaling* 22 (2024): 109.
 67. Hong, L., W. Li, Y. Li, and S. Yin. “Nanoparticle-Based Drug Delivery Systems Targeting Cancer Cell Surfaces.” *RSC Advances* 13, no. 31 (2023): 21365–21382.

68. Elumalai Karthikeyan, Sivaneswari Srinivasan, and Anandakumar Shanmugam. "Review of the Efficacy of Nanoparticle-Based Drug Delivery Systems for Cancer Treatment." *Biomedical Technology* 5 (2024): 109–122.
69. Fana, M., J. Gallien, B. Srinageshwar, G. L. Dunbar, and J. Rossignol. "PAMAM Dendrimer Nanomolecules Utilized as Drug Delivery Systems for Potential Treatment of Glioblastoma: A Systematic Review." *International Journal of Nanomedicine* 15 (2020): 2789–2808.
70. Abedi-Gaballu, F., G. Dehghan, M. Ghaffari, R. Yekta, S. Abbaspour-Ravasjani, B. Baradaran, J. E. N. Dolatabadi, and M. R. Hamblin. "PAMAM Dendrimers as Efficient Drug and Gene Delivery Nanosystems for Cancer Therapy." *Applied Materials Today* 12 (2018): 177–190.
71. Ke, W., Y. Zhao, R. Huang, C. Jiang, and Y. Pei. "Enhanced Oral Bioavailability of Doxorubicin in a Dendrimer Drug Delivery System." *Journal of Pharmaceutical Sciences* 97, no. 6 (2008): 2208–2216.
72. Yao, H., and J. Ma. "Dendrimer-Paclitaxel Complexes for Efficient Treatment in Ovarian Cancer: Study on OVCAR-3 and HEK293T Cells." *Acta Biochimica Polonica* 65, no. 2 (2018): 219–225.
73. Wróbel, K., and S. Wołowiec. "Synthesis and Characterization of Fulvestrant and Paclitaxel Conjugates with Polyamidoamine Dendrimer Fourth Generation." *European Journal of Clinical and Experimental Medicine* (2023).
74. Furukawa Shin-ya, Tsutomu Ono, Hiroyuki Ijima, and Koei Kawakami. "Effect of Imprinting Sol–Gel Immobilized Lipase with Chiral Template Substrates in Esterification of (R)-(+)- and (S)-(-)-Glycidol." *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic* 17, no. 1 (2002): 23–28.
75. Wróbel, K., and S. Wołowiec. "Low Generation Polyamidoamine Dendrimers (PAMAM) and Biotin PAMAM Conjugate – The Detailed Structural Studies by ¹H and ¹³C Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy." *European Journal of Clinical and Experimental Medicine* 18 (2020): 281–285.
76. Duarte, J. A., A. L. B. de Barros, and E. A. Leite. "The Potential Use of Simvastatin for Cancer Treatment: A Review." *Biomedicine & Pharmacotherapy* 141 (2021): 111858.
77. Xia, Y., M. Sun, H. Huang, et al. "Drug Repurposing for Cancer Therapy." *Signal Transduction and Targeted Therapy* 9 (2024): 92.

78. Hamada, H., K. Ishihara, N. Masuoka, K. Mikuni, and N. Nakajima. "Enhancement of Water-Solubility and Bioactivity of Paclitaxel Using Modified Cyclodextrins." *Journal of Bioscience and Bioengineering* 102, no. 4 (2006): 369–371.
79. Gao, H., Y. Wang, C. Chen, J. Chen, Y. Wei, S. Cao, and X. Jiang. "Incorporation of Lapatinib into Core-Shell Nanoparticles Improves Both the Solubility and Anti-Glioma Effects of the Drug." *International Journal of Pharmaceutics* 461, no. 1–2 (2014): 478–488.
80. Kapara, A., K. A. Findlay Paterson, V. G. Brunton, D. Graham, M. Zagnoni, and K. Faulds. "Detection of Estrogen Receptor Alpha and Assessment of Fulvestrant Activity in MCF-7 Tumor Spheroids Using Microfluidics and SERS." *Analytical Chemistry* 93, no. 14 (2021): 5862–5871.
81. Robertson, J. F., and M. Harrison. "Fulvestrant: Pharmacokinetics and Pharmacology." *British Journal of Cancer* 90 Suppl 1 (2004): S7–S10.
82. Wang, L., L. Lankhorst, and R. Bernards. "Exploiting Senescence for the Treatment of Cancer." *Nature Reviews Cancer* 22 (2022): 340–355.
83. Jornada, D. H., G. F. dos Santos Fernandes, D. E. Chiba, T. R. de Melo, J. L. dos Santos, and M. C. Chung. "The Prodrug Approach: A Successful Tool for Improving Drug Solubility." *Molecules (Basel, Switzerland)* 21, no. 1 (2015): 42.
84. Bami Marzieh Sajadi, Mohammad Amin Raeisi Estabragh, Payam Khazaeli, Mandana Ohadi, and Gholamreza Dehghannoudeh. "pH-Responsive Drug Delivery Systems as Intelligent Carriers for Targeted Drug Therapy: Brief History, Properties, Synthesis, Mechanism and Application." *Journal of Drug Delivery Science and Technology* 70 (2022): 102987.

Publikacje

[D1]

Article

Chiral Recognition of Homochiral Poly (amidoamine) Dendrimers Substituted with *R*- and *S*-Glycidol by Keratinocyte (HaCaT) and Squamous Carcinoma (SCC-15) Cells In Vitro

Małgorzata Malinga-Drozd¹, Łukasz Uram² , Konrad Wróbel¹ and Stanisław Wołowicz^{1,*} 

¹ Department of Biochemistry and General Chemistry, Medical College, Rzeszów of University, 1a Warzywna Str., 35-310 Rzeszów, Poland; mmalinga@wp.pl (M.M.-D.); konradwrobel300@gmail.com (K.W.)

² Department of Inorganic and Analytical Chemistry, Faculty of Chemistry, Rzeszów University of Technology, 6 Powstańców Warszawy Ave., 35-959 Rzeszów, Poland; luram@prz.edu.pl

* Correspondence: swolowicz@ur.edu.pl; Tel.: +48-604-505-241



Citation: Malinga-Drozd, M.; Uram, Ł.; Wróbel, K.; Wołowicz, S. Chiral Recognition of Homochiral Poly (amidoamine) Dendrimers Substituted with *R*- and *S*-Glycidol by Keratinocyte (HaCaT) and Squamous Carcinoma (SCC-15) Cells In Vitro. *Polymers* **2021**, *13*, 1049. <https://doi.org/10.3390/polym13071049>

Academic Editor: Rafał Konefal

Received: 2 March 2021

Accepted: 24 March 2021

Published: 27 March 2021

Publisher's Note: MDPI stays neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



Copyright: © 2021 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

Abstract: The generation 2 and 3 poly(amidoamine) dendrimers (PAMAM G2 and G3) were converted into *N*-(2,3-dihydroxy)propyl derivatives by the addition of enantiomerically pure *S*- and *R*-glycidol. The homochiral dendrimers bind to HaCaT and SCC-15 cell membranes with an *R/S* glycidol enantioselectivity ratio of 1.5:1, as was quantitatively determined by fluorescence microscopy and visualized by confocal microscopy. Fully substituted G2 and G3 dendrimers were equipped with 32 and 64 *N*-(2,3-dihydroxy)propyl residues and showed effectively radial symmetry for homochiral derivatives in ¹³C NMR spectrum in contrary to analogs obtained by reaction with *rac*-glycidol. The sub-stoichiometric derivatives of G2 and G3 were also obtained in order to characterize them spectroscopically. The homochiral dendrimers were labeled with two different fluorescent labels, fluorescein, and rhodamine B, using their isothiocyanates to react with G2 and G3 followed by the addition of *S*- and *R*-glycidol. Obtained fluorescent derivatives were deficiently filled with *N*-(2,3-dihydroxy)propyl substituents due to steric hindrance imposed by the attached label. Nevertheless, these derivatives were used to determine their ability to bind to the cell membrane of human keratinocytes (HaCaT) and squamous carcinoma cells (SCC-15). Confocal microscopy images obtained from cells treated with variously labeled conjugates and fluorescence analysis with fluorescence reader allowed us to conclude that *R*-glycidol derivatives were bound and entered the cells preferentially, with higher accumulation in cancer cells. The G3 polyamidoamine (PAMAM)-based dendrimers were taken up more efficiently than G2 derivatives. Moreover, *S*- and *R*-glycidol furnished dendrimers were highly biocompatible with no toxicity up to 300 μM concentrations, in contrast to the amine-terminated PAMAM analogs.

Keywords: homochiral dendrimer; chiral biorecognition; confocal microscopy; glycidol; polyamidoamine dendrimer; toxicity

1. Introduction

Polyamidoamine (PAMAM) dendrimers were synthesized in 1985 by Tomalia et al. [1]. Since that time, PAMAM dendrimers became often explored macromolecular reagents due to their strictly defined molecular weight, radial symmetry, and availability of terminal functional groups on the surface [2]. Full generation PAMAM dendrimers provide amine groups that can be functionalized with various substituents, including drug molecules. Therefore, they are continuously tested, especially dendrimers of generation 3, 4, and 5 (G3, G4, G5), as drug carriers and gene delivery systems [3,4]. The toxicity of PAMAM G2-G6 dendrimers is rather low, while 0.5 μM concentration near cell surface already enables to observe cell internalization of these molecules [5]. Therefore, PAMAM G3, G4, and G5 dendrimers with 32, 64, and 128 amine groups, respectively, were used to covalently bind

anticancer drug molecules such as methotrexate [6], daunorubicin [7], or paclitaxel [8] to obtain highly drug-loaded conjugates. Additionally, the hydrophilic properties of these macromolecular drug carriers can be tuned by terminal amine group acylation or polyhydroxylation with glycidol [7–9] or carbohydrate lactones [6,10,11]. Thus, PAMAM chiral dendrimers can be obtained that are surface-modified with various substituents, derived from D-gluconolactone [10], D-glucoheptono-1,4-lactone [6,12], amino acids [13], and by polyethylene glycol (PEG)ylation [14,15]. Generally, the chirality in dendritic architecture is achievable using chiral core and build-up of dendritic arms (class 1), chiral building blocks (class 2), and encountered above end-group chiral substituents (class 3) [16].

The example of class 1 dendrimers are BINAP-cored and polyphenylether-expanded dendrimers, which were shown to provide catalytic space for hydrogenation of various substrates, i.e., alkenes, such as 2-(4-isobutylphenyl)acrylic acid or acetamidocinnamic acid, and acetophenones, which were reduced into corresponding chiral products with high chemoselectivity and >90% enantiomeric excess (ee) in presence of catalytically active Ru(I) and Rh(II) organometallic complexes [17].

The example of class 2 chiral dendrimers constructed of chiral vicinal diol subunits linked and branched by phenyl groups are polyhydroxylated dendrimers obtained in 2000 by McElhanon and McGrath [18] and PAMAM type dendrimers constructed with optically pure (-)-1,2-diaminopropane instead of ethylenediamine [19]. Benzyl group-protected PAMAM dendrimers of generation 2 were used further to encapsulate Pd and Rh nanoparticles (NPs). The encapsulates of Pd and Rh in PAMAM-32Bn had 1.7 nm diameter and showed a positive Cotton effect in circular dichroism spectrum with maximum red shifted by ca 25 and 50 nm in comparison with Cotton effect of the host (ca. 240 nm). This behavior evidenced the presence of PdNP and RhNP within the voids of dendrimer, not on the surface. This opened a door for Pd(0) catalysis inside chiral dendritic voids for such processes such as C-C cross coupling reactions, which were successfully performed within non-chiral 3.5 nm sized Pd@PAMAM G3 encapsulates [20].

Chiral PAMAM G3 and G4 dendrimers of class 3, modified by amidation of primary amine groups with D-gluconolactone were demonstrated to induce the asymmetric reduction of prochiral ketones into chiral alcohols with NaBH₄ with high yield (>90%) and enantiomeric excess (ee), depending on dendrimer generation and solvent (THF or H₂O) [10].

Another example of chiral PAMAM (G1-G3) dendrimer (class 3) was obtained as multicenter Ti(IV) dendrimer by covalent attachment of (-N-(3,5-di-tert-butylsalicylidene)-N'-[3-tert-butyl-5-chloromethylsalicylidene]-1,2-cyclohexanediamine, chiral salen type ligand via imidazolyl linkers. Dimeric Ti(IV)-(μ-O)₂-Ti(IV) centers cooperatively oxidized methyl R-phenyl sulfide into sulfoxide with 90% chemoselectivity and > 80% ee, where R was variable substituent on phenyl group [21].

Chiral space inside the dendrimer voids is currently exploited for catalytic purposes. As exemplified above, the chiral substituents on the periphery of dendrimers can operate as asymmetry inductors and be recognized by biological membrane receptors, especially if chiral inductors are enantiomerically pure amino acids or specific carbohydrates. The simplest chiral substituent, readily introduced into peripheral amine groups of PAMAM dendrimers is 2, 3-dihydroxypropyl residue, as it was demonstrated earlier [6]. PAMAM dendrimers react with glycidol at ambient temperature. Primary amine groups are thus converted into bis-2,3-dihydroxyalkylamine groups. The products of substitution are easy to purify and can be fully characterized by NMR spectroscopy and other methods. This has been carried out in a complete and elegant way by Shi et al. in 2005 for PAMAM G1 dendrimer [22]. In the study, the racemic glycidol was used and PAMAM G1 substituted with an average of 14 equivalents of glycidol was characterized as an incomplete derivative. Additionally, the C-13 NMR spectra showed a complicated pattern for 2, 3-dihydroxyalkyl resonances, i.e., more than two sets of resonances, suggesting that symmetry-dependent species recognize not only geminal 2-R- or 2-S, 3-dihydroxypropyl substituents, but the next arm of the dendrimer is involved in symmetry recognition.

In our way to construct drug delivery systems (DDS) based on dendrimers, we used PAMAM G3 dendrimer totally covered with racemic glycidol as a central dendrimer to which low generation G0 PAMAM dendrimers were attached covalently. The *rac*-glycidol-covered core G3 was able to bind up to 12 G0, and this megamer was demonstrated as an efficient DDS for nimesulide, the non-steroidal anti-inflammatory drug [23]. In order to improve this DDS, we prepared the PAMAM G3 and G2 totally and partially substituted with optically pure *R*- and *S*-glycidol, studied them by NMR spectroscopy, and finally tested their ability to bind to the cell membrane and enter the cell on two various cell lines—normal keratinocytes (HaCaT) and squamous carcinoma cells (SCC-15). The cell cultures were monitored by fluorescence microscopy and confocal microscopy with two fluorescent labels—fluorescein and rhodamine B isothiocyanates. Surprisingly, we observed some enantiodiscrimination of homochiral dendrimers in cell membrane interaction by both types of cells and generation-dependent internalization.

2. Experimental

2.1. Reagents

Ethylenediamine, methyl acrylate, racemic glycidol (96%), *R*- and *S*-glycidol (both 98% purity), and fluorescein isothiocyanate (isomer I, 90%), and rhodamine B isothiocyanate were purchased from Merck KGaA (Darmstadt, Germany). PAMAM dendrimers were synthesized by alternate addition of methyl acrylate into amine groups, starting from ethylenediamine core, followed by condensation with ethylenediamine, purified intermediates at every step according to the protocol of Tomalia [1], and stored as 20 weight% solutions in methanol.

Human squamous carcinoma cells (SCC-15), penicillin, and streptomycin solutions were obtained from American Type Culture Collection (ATCC, Manassas, VA, USA). Human immortalized keratinocytes (HaCaT) were purchased from Cell Lines Service (Eppelheim, Germany). Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM), Dulbecco's, modified Eagle's medium F12 (DMEM-F12), and fetal bovine serum (FBS) were obtained from Corning (New York NY, USA). Trypsin-EDTA solution, phosphate-buffered saline (PBS) with and without magnesium and calcium ions, neutral red, 0.4% trypan blue solution, sterile syringe filters, 0.22 μm were provided by Sigma-Aldrich (St Louis, MO, USA). The 4',6-diamidino-2-phenylindole, dihydrochloride (DAPI) solution was purchased from Thermo Fischer Scientific (Waltham, MA, USA). Cell culture dishes were from Corning Incorporated (Corning, NY, USA), Greiner (Kremsmünster, Austria), or Nunc (Roskilde, Denmark).

2.2. Syntheses

2.2.1. PAMAM G2 and G3 Substituted with Glycidol

PAMAM G2 and G3 dendrimers were derivatized with 25% molar excess of *rac*-glycidol (gl), *R*-gl, or *S*-gl in relation to twice the number of dendrimer primary amine groups. In a typical procedure, to 120 mg G3 (17.3 μmoles) in 2 mL methanol, neat gl was added dropwise (92 μL , 1.4 mmol) with vigorous stirring. The mixture was stored for eight hours at room temperature, transferred into a cellulose dialytic bag ($MW_{\text{cutoff}} = 1 \text{ kD}$ for G2 and 3.5 kDa for G3), and dialyzed for three days against water ($7 \times 2.5 \text{ L}$). Then, the solvent was removed by vacuum rotary evaporation and the oily residue dried under reduced pressure overnight ($<2 \text{ mbar}$). The products were characterized by ^1H NMR spectroscopy as fully derivatized $\text{G2}^{32\text{Racgl}}$, $\text{G2}^{32\text{Rgl}}$, $\text{G2}^{32\text{Sgl}}$, $\text{G3}^{64\text{Racgl}}$, $\text{G2}^{64\text{Rgl}}$, and $\text{G2}^{32\text{Sgl}}$. The isolated yield was $> 90\%$ in every case.

In a series of synthesis, the deficient amount of *S*-gl and *R*-gl was used to convert G2 into $\text{G2}^{9\text{Sgl}}$, $\text{G2}^{14\text{Rgl}}$, $\text{G2}^{22\text{Sgl}}$, and $\text{G2}^{22\text{Rgl}}$ by using the same protocol as above except the number of gl equivalents in the reaction mixture corresponded to 25% of dendrimer primary amine groups for the first two derivatives and 75% of available amine groups of G2 in two others. The products were purified as before. The partially substituted derivatives were characterized by ^1H , ^{13}C , and 2-D correlations spectroscopy (COSY), heteronuclear single quantum correlation (HSQC), and heteronuclear multiple bond correlation (HMBC)

spectroscopy. Then, the $G2^{9Sgl}$ and $G2^{22Sgl}$ were further reacted with *R*-gl to complete bis-substitution of every G2 amine group with gl residues, while $G2^{22Rgl}$ and $G2^{14Rgl}$ were fully substituted with *S*-gl. In both cases, 20% molar excess of gl in relation to the available number of amine equivalents of the substrate was used. The resulting species were identified by NMR spectroscopy and the mixed-enantiomeric fully substituted $G2^{gl}$ spectra were compared with $G2^{32Racgl}$ spectra.

2.2.2. PAMAM G2 and G3 Single-Labeled with Fluorescein Isothiocyanate and Rhodamine B Isothiocyanate

The G2 and G3 dendrimers were single labeled with fluorescein isothiocyanate (FITC) and rhodamine B isothiocyanate (RBTC) by stepwise addition of one equivalent of 10 mM ethanolic solution of FITC (8 and 4 mL) into 4 or 2 mL of 20 mM methanolic G2 or G3 solution (80 and 40 μ moles, respectively). Labeling with RBTC was performed by addition of solid RBTC into 10 mM solution of G2 or G3 in methanol. Four products ($G2^F$, $G2^R$, $G3^F$, and $G3^R$) were isolated as solids, which were since protected from daylight, dissolved in 6 mL methanol, divided into two equal portions, and further converted by reaction with *S*-gl or *R*-gl used in 25% molar excess. The obtained eight products were not fully substituted with gl residues and identified by 1H NMR spectroscopy as $G2^{16Rgl^F}$, $G2^{19Sgl^F}$, $G3^{19Rgl^F}$, $G3^{35Sgl^F}$, $G2^{19Rgl^R}$, $G2^{30Sgl^R}$, $G3^{45Rgl^R}$, and $G3^{35Sgl^R}$. These fluorescent-labeled compounds were used for biological studies.

2.3. NMR Spectroscopy

The 1-D 1H and ^{13}C NMR spectra and 2-D 1H - 1H correlations spectroscopy (COSY), 1H - ^{13}C heteronuclear single quantum correlation (HSQC), and heteronuclear multiple bond correlation (HMBC) spectra were recorded in deuterated water using Bruker 300 MHz (Rheinstetten, Germany) and worked up with TopSpin 3, 5 software at College of Natural Sciences, University of Rzeszów.

2.4. Biological Methods

2.4.1. Cell Culture

Human immortalized keratinocytes (HaCaT) were grown in DMEM and human squamous carcinoma cells SCC-15 (CRL-1623 ATCC) were cultured in DMEM/F-12 supplemented with hydrocortisone (400 ng/mL). Culture media were supplemented with heat-inactivated 10% FBS and 100 U/mL penicillin and 1% streptomycin solution. Both cell lines were cultured at 37 °C in a humidified atmosphere with 5% CO₂ with media changed every 2–3 days. Cells were passaged at 70–80% confluence after trypsinization with 0.25% trypsin–EDTA in calcium- and magnesium-free PBS. Cell morphology was monitored using Nikon TE2000S Inverted Microscope (Tokyo, Japan) with phase contrast. The number and viability of cells were estimated by the trypan blue exclusion test with Automatic Cell Counter TC20TM (BioRad Laboratories, Hercules, CA, USA). All assays were performed in triplicates in three independent experiments.

2.4.2. Toxicity Assay

HaCaT and SCC-15 cells were seeded in flat-bottom 96-well culture plates in triplicate (100 μ L cell suspension per well) at a density of 1×10^4 cells/well and allowed to attach for 24 h. The stock solution of 3 mM dendrimers was filtered with sterile syringe filters (0.22 μ m) and used to treatment of cells with a range of increasing concentrations from 0 to 300 μ M (100 μ L/well) for 24 h in 37 °C. After that, the neutral red assay was performed as described [24].

2.4.3. Cellular Internalization of Dendrimers

The HaCaT and SCC-15 cells were seeded into, black, 96-well microtiter plates at a density of 4×10^4 cells/well and placed in an incubator for 24 h. Next, cells were incubated with 1 μ M solutions of FITC-labeled dendrimers (dissolved in culture medium)

for 0.1, 0.5, 1, 2, 3, or 4 h. Then, dendrimer solutions were removed and plates were washed three times with PBS to remove unbound dendrimers. Fluorescence was read at 485 nm/530 nm (exc./em.) with Infinite M200 PRO Multimode Microplate Reader (TECAN Group Ltd., Maennedorf, Switzerland). The median of the triplicate sample measurements was calculated after the background values (cells alone) were subtracted. The fluorescence intensity was calibrated using FITC-labeled dendrimers diluted in water.

2.4.4. Visualization with Confocal Microscopy

HaCaT and SCC-15 cells were seeded at a density of 7×10^4 cells/well in microscopic, eight-chamber slides with an ultra-thin bottom (Nunc, Roskilde, Denmark) for 48 h in 400 μ L of complete medium. FITC- or rhodamine B -labeled *S*- and *R*-glycidol furnished dendrimers at 100 nM concentrations were added (300 μ L/well). After four hours of incubation and washing three times with PBS, the cells were fixed with 3.7% formaldehyde for 10 min and stained with 600 nM DAPI solution in PBS (15 min at room temperature). Images were collected with a confocal microscope (Olympus FV10i, Tokyo, Japan) at 488/530 nm for FITC, 556/573 nm for rhodamine B, and 405/461 nm for DAPI. Images were collected using an objective with water immersion, under a magnification of $180\times$ in the Z-axis position at the largest nuclear cross-section area. The pinhole was set for 1 AU (airy unit), and the obtained images had an optical section thickness of approximately 1.02 μ m. The laser power and sensitivity were constant. Raw images were collected and saved in oif format, and the processing was carried out in ImageJ.

To visualize the concentration-dependent accumulation of *S*- and *R*-glycidol furnished dendrimers, HaCaT and SCC-15 cells were seeded in ultra-thin, flat-bottom, 96-black well culture plates (1×10^4 cells/well) and incubated for 24 h. Afterward, working solutions of FITC labeled dendrimers in the range of 0–300 μ M concentration were added, incubated for 24 h, and washed three times with PBS. Samples were observed and the images were collected with Olympus IX-83 fluorescent microscope (Tokyo, Japan) using an objective with $20\times$ magnification. The light intensity and sensitivity were constant.

2.4.5. Statistical Analysis

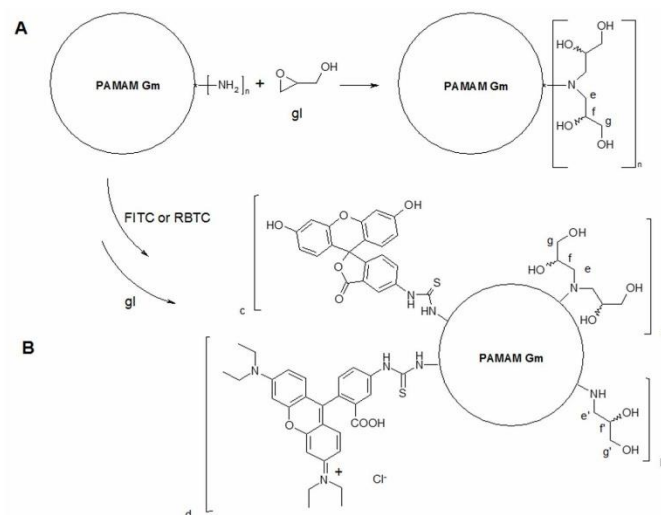
To estimate the differences between treated and non-treated control samples, statistical analysis was performed using the non-parametric Kruskal–Wallis test due to the lack of a normal distribution of data in the studied groups (analysis with Shapiro–Wilk test). Comparisons of *R* and *S* glycidol furnished dendrimers were assessed with Mann–Whitney U test. $p < 0.05$ was considered statistically significant. Calculations were performed using Statistica 13.3 software (StatSoft, Tulsa, OK, USA).

3. Results and Discussion

Polyamidoamine (PAMAM) dendrimers are well soluble in water. They are currently tested in many laboratories as drug carriers. However, high full-generation PAMAMs are hemotoxic [25] due to surface primary amine groups, which make them strongly basic. Therefore, amine groups must be partially derivatized if the drug-PAMAM conjugate is designed. Convenient conversion of amine group maintaining dendrimer water solubility is polyhydroxylation with lactones, which convert dendrimer primary amine into amide groups or with glycidol (gl), which adds in stoichiometry 2:1 to a primary amine. Although racemic gl was often used as an amine blocking group, no detailed studies on optically pure *R*-gl or *S*-gl derivatives of PAMAM dendrimers were reported till now. Since gl covered PAMAM dendrimers are often used as macromolecular anticancer drug carriers, this inspired us to test the interaction of these derivatives with human normal and cancer cells.

The products of the reaction between gl and PAMAM G1 were thoroughly characterized by NMR spectroscopy, polyacrylamide gel electrophoresis, capillary electrophoresis, MALDI-TOF and ESI mass spectrometry, and acid-base potentiometric titration, together with pristine PAMAM G1 and peracetylated derivative in order to detect and quantitatively determine skeletal and substitutional imperfections [22]. We restudied the products of

the reaction between PAMAM G2 and G3 and both enantiomers of gl to simplify the NMR spectral pictures and also to characterize the species with a deficient number of gl substituents. The synthetic routes and average stoichiometry of obtained compounds are presented in Scheme 1, together with atom numbering of atoms for spectral assignment. The NMR spectroscopy was used to identify all products as follows.



Scheme 1. The scheme of synthesis of glycidol-modified polyamidoamine (PAMAM) G3 ($m = 3$) and G2 ($m = 2$) dendrimers (A) and fluorescein or rhodamine B dendrimers substituted by addition of glycidol (B). The isothiocyanates of fluorescein (FITC) and rhodamine B (RBTC) were used to attach one molecule of label by thiourea bond into a dendrimer molecule. The following series of not-labeled and fluorescein-labeled (F) and rhodamine B-labeled (R) derivatives were obtained by stepwise addition of glycidol: $G2^{95gl}$; $G2^{145gl}$; $G2^{225gl}$; $G2^{325gl}$; $G2^{16RglF}$ ($2a + b = 16$, $c = 1$, $d = 0$); $G2^{195glF}$ ($2a + b = 19$, $c = 1$, $d = 0$); $G3^{19RglF}$ ($2a + b = 24$, $c = 1$, $d = 0$); $G3^{355glF}$ ($2a + b = 35$, $c = 1$, $d = 0$); $G2^{19RglR}$ ($2a + b = 19$, $c = 0$, $d = 1$); $G2^{305glR}$ ($2a + b = 30$, $c = 0$, $d = 1$); $G3^{45RglR}$ ($2a + b = 45$, $c = 0$, $d = 1$); $G3^{355glR}$ ($2a + b = 45$, $c = 0$, $d = 1$).

3.1. NMR Spectroscopy Studies

3.1.1. Comparison of the 1H and ^{13}C NMR Spectra of PAMAM G2 and S-Glycidol Covered PAMAM, $G2^{5gl}$

1H NMR spectroscopy enables quantifying the level of PAMAM dendrimer substitution with glycidol. The 1H and ^{13}C NMR spectra of substrate PAMAM G2 and $G2^{5gl}$ are shown in Figures 1 and 2, respectively. Only one proton resonance for all protons b (b_2 , b_1 , and b_0) was observed at 2.42 ppm and used as an internal integral reference of intensity [56H] for G2 and $G2^{5gl}$ (for C and H atoms numbering, see Scheme 1). Both the chemical shift and intensity of the triplet remained unaltered throughout the series of all neat and gl-modified dendrimers. The vicinal protons triplets of $a_2a_1a_0$ at 2.82 also remained unaltered.

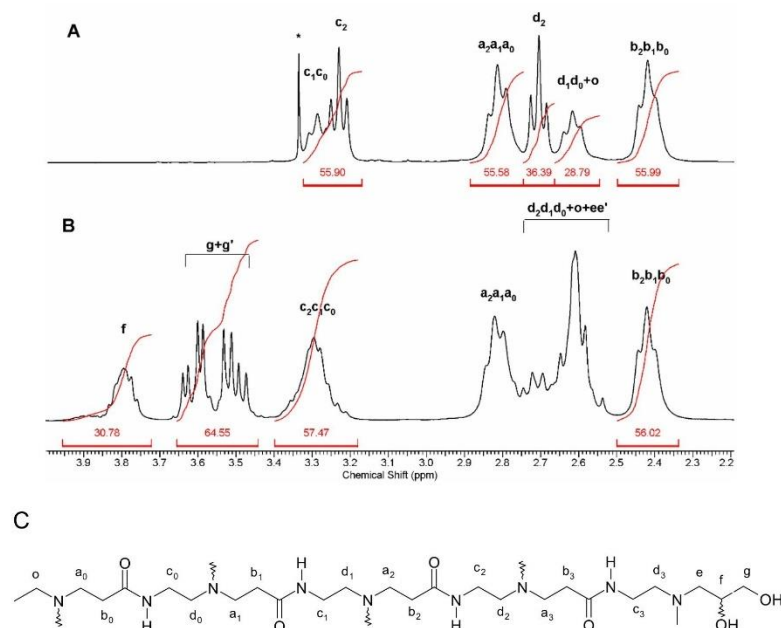


Figure 1. The ¹H NMR spectra of G2 (A) and G2^{Sgl} (B) in D₂O. Atom numbering is given in trace (C). Methanol resonance at 3.43 is labeled with an asterisk.

The triplets of protons c₂ and d₂ localized in outer shell (shell 2 in case of G2) were observed at 3.23 and 2.71 ppm, respectively, with [32H] integral intensity both. Inner sphere c and d resonances showed overlapping triplet from c₁c₀ at 3.29 ppm (intensity [24H]) and d₁d₀ (overlapped with core singlet of intensity [4H], totally [28H]) for G2 (Figure 1A). Upon addition of gl into terminal amine groups, the outer sphere c₂ resonance shifted into 3.3 ppm-centered multiplet and overlapped with c₁c₀ triplets within the 3.32–3.38 region. The total intensity of c₂c₁c₀ resonances corresponds to [56H]. The resonance from d₂ is spread over a broad 2.75–2.57 region and overlapped with d₁, d₀, and o from G2 core and terminal nitrogen-attached methylene group of glycidol. Additionally, resonances from the latter show multiplet structure due to the presence of diastereotopic -CH₂- next to the chiral center at carbon f.

The ¹H S-gl resonances of protons g and f of integral intensity corresponding to [32H] and [64H] are unresolved multiplets and AB-type spectrum of gg' diastereotopic pair, respectively (Figure 1B).

The aliphatic regions of ¹³C NMR spectra of G2 and G2^{Sgl} are shown in Figure 2A,B, respectively. The ¹³C resonances were assigned based upon standard HSQC and HMBC experiments (the combined HSQC and HMBC spectrum of G2^{Sgl} is presented in Figure S1 in Supplementary Materials). Thus, the considerable shift of outer-sphere d₂ (−4.1 ppm) and c₂ (+14.5 ppm) resonances occur upon substitution of terminal NH₂ groups with two S-gl substituents, with d₁d₀ and c₁c₀ resonances almost unaltered. Three ¹³C resonances of S-gl substituents indicate that all terminal amine groups were uniformly substituted with two gl-S each. Analogous ¹H and ¹³C NMR spectra were obtained for G2^{Rgl}. Similar ¹H and ¹³C NMR spectral pattern was obtained for higher generation PAMAM dendrimers, namely, G3, G4, and G5, which were substituted with 64, 128, and 256 enantiomerically

pure *R*- or *S*-gl, respectively. In comparison with the spectra of $G2^{Sgl}$ or $G2^{Rgl}$, the only differences observed were due to the integral intensity of resonances.

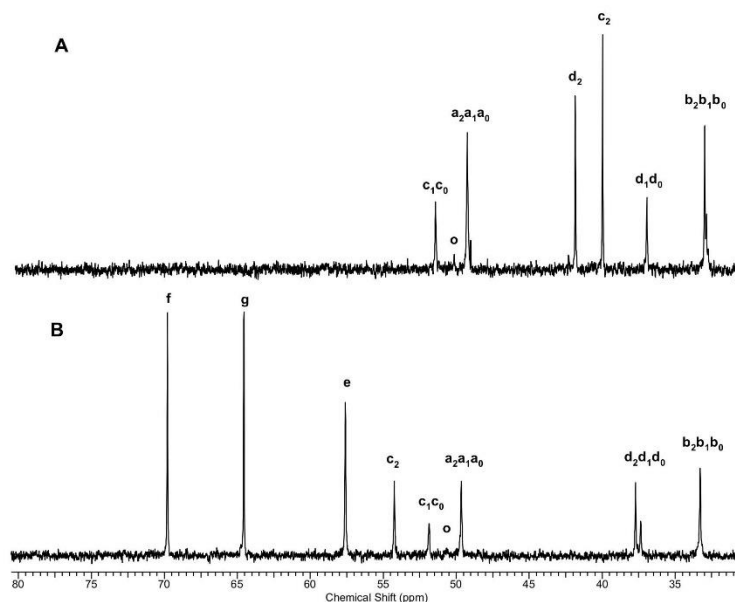


Figure 2. The ^{13}C NMR spectra of G2 (A) and $G2^{Sgl}$ (B) in D_2O . Labeling of resonances according to the scheme shown in Figure 1.

The simplicity of ^{13}C NMR spectra of PAMAM G2 and G3 dendrimers substituted with enantiomerically pure *S*-gl or *R*-gl, which show only one set of gl resonances for $G2^{32Sgl}$ or $G2^{32Rgl}$ and corresponding fully converted G3–G5 (spectra not shown) indicates that enantiomeric purity of *S*-gl is retained in conversion to formally *R*-chiral *n*-2(*R*), 3-dihydroxypropyl substituents. Unfortunately, the chirality checked with CD showed the Cotton effect on the almost background level, as it was observed also for other chiral dendrimers of radial symmetry [16]. In most reactions, the enantiomerically pure glycidols retain the *C*-2 configuration such as, for instance, the esterification with primary and secondary alcohols leading to 1-*O*-alkyl-*sn*-glycerol [26]. However, the pure inversion of configuration has also been observed in conversion of gl with diethylaluminum cyanide leading to 1-cyano-2,3-diols [27].

Although we have no evidence to claim retention or inversion of gl configuration after addition to dendrimer primary amine of G2, the simplicity of NMR spectra of $G2^{Sgl}$ and $G2^{Rgl}$ indicate that homochiral dendrimers were obtained in contrary to quite complex ^{13}C NMR spectra of *rac*-gl derived dendrimers (vide infra).

3.1.2. Deficient Substitution of PAMAM G2 Dendrimer with Optically Pure Glycidol

In the substoichiometric conversion of PAMAM G2 with *S*- or *R*-glycidol, the species with double and single-substituted terminal amine groups were obtained and characterized by NMR spectroscopy. The 1H NMR spectra enabled us to determine the level of terminal amine group substitution with 2,3-dihydroxyalkyl substituents added in the reaction of G2 with enantiomerically pure glycidol (Figure 3).

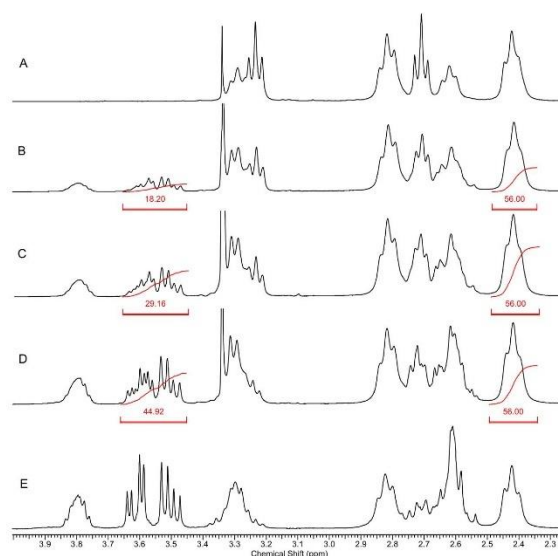


Figure 3. ^1H NMR spectra of G2 (A), $\text{G2}^{9\text{Sgl}}$ (B), $\text{G2}^{14\text{Sgl}}$ (C), $\text{G2}^{22\text{Sgl}}$ (D), and $\text{G2}^{32\text{Sgl}}$ (E) in D_2O .

Stepwise addition of *S*-glycidol resulted in an increase of proton g multiplets intensity (within 3.45–3.65 ppm) region related to internal reference triplet of $a_2a_1a_0$ triplets of overall intensity [56H]. Three $\text{G2}^{n\text{gl}}$ species were obtained, where average Sgl molecules added (n) was 9, 14, and 22 (see Figure 3, spectra B, C, and D). The AB-type spectrum of terminal g protons of 2, 3-dihydroxypropyl substituent in $\text{G2}^{32\text{Sgl}}$ (Figure 3E) is vicinally coupled with proton f. Quartets of g and g' protons are centered at 3.61 and 3.50 ($\delta_{\text{AB}} = 0.11$ ppm) with geminal coupling constant $J_{\text{gem}} = 11.7$ Hz and different vicinal coupling constants $J(\text{gf}) = 4.2$ Hz and $J(\text{g'f}) = 5.9$ Hz.

When an under-stoichiometric amount of *S*-gl was used the $\text{G2}^{9\text{Sgl}}$ was obtained, containing some unsubstituted amine groups, mostly mono-substituted amine groups with 2, 3-dihydroxypropyl, and a minor amount of double substituted amine groups. The AB-type spectrum of gg' protons on single substituted amine groups showed slightly lower magnetic nonequivalence (5.59 and 3.50 ppm, $\delta_{\text{AB}} = 0.11$ ppm), coupled geminally with the same $J_{\text{gem}} = 11.7$ Hz, while vicinal constants were larger than for double-substituted arms, namely, $J(\text{gf}) = 4.6$ Hz and $J(\text{g'f}) = 6.7$ Hz (see Figure 3, trace B). In the series of higher substituted G2, namely $\text{G2}^{14\text{Sgl}}$ and $\text{G2}^{22\text{Sgl}}$ the AB spectra of gg' protons overlapped and no reliable deconvolution of multiplets could be performed in order to quantify the number of unsubstituted, mono- and bis-substituted arms of G2. The additional ^1H NMR changes accompanied a stepwise conversion of G2. Single and double substitution of terminal amine group resulted in transformation of primary amine into secondary and eventually tertiary terminal amine group. The chemical shifts of protons c_2 and d_2 changed due to this transformation. In the case of G2, c_2 proton resonance was initially observed as a triplet at 3.24 ppm (Figure 3, trace A), together with c_1 and c_0 at 3.30 ppm, while the stepwise addition of gl resulted in the decrease of 3.24 ppm triplet, which eventually disappeared in the spectrum of fully substituted $\text{G2}^{32\text{Sgl}}$ (Figure 3, trace E) and was replaced by multiplet centered at 3.30 ppm of intensity [56H], corresponding to all c protons of $\text{G2}^{32\text{Sgl}}$. Similar changes occur in the region of d_2 proton resonances; however, the multiplets of all d protons overlap with e proton resonances of attached glycidol. The detailed changes could

be further monitored using ^{13}C NMR spectra and heteronuclear ^1H - ^{13}C NMR experiments (vide infra).

The aliphatic regions of ^{13}C NMR spectra of $\text{G}2^{\text{ng}15}$ (where $n = 0, 9, 14, 22,$ and 32) are shown in Figure 4. The ^{13}C resonances were assigned based upon standard HSQC and HMBC experiments. We found that PAMAM inner shell resonances remained unaffected upon terminal amine group substitution, while d_2 and c_2 proton resonances shifted from 42.3 and 40.5 in amine-terminated G2 into 39.3 and 48.1 upon mono- and 37.7 and 54.2 ppm upon disubstitution with g15, respectively. The resonances of 5-glycidol-derived 2(R), 3-dihydroxypropyl substituents for single-substituted arms are located at 51.3, 64.7, and 71.0 ppm for e, f, and g carbon nuclei (labeled as $e^S, f^S,$ and g^S in blue color in Figure 4), while the appropriate resonances for double-substituted analogs are observed at 57.6, 64.6, and 69.8 (labeled as $e^{SS}, f^{SS},$ and g^{SS} in red color in Figure 4). Thus, the largest chemical shift differences between single- and double-substituted arms are those in closest e, d, and c carbon nuclei, as one could expect. It should be also noticed that even in the ^{13}C NMR spectrum of $\text{G}2^{225\text{gl}}$ the resonances from non-substituted arms are clearly visible. This corresponds to the average number of six double-substituted arms, 10 mono-substituted, and 16 unsubstituted arms if assume that the intensities of carbon-13 resonances $d_2^{SS}, d_2^S,$ and d_2 are nearly equal.

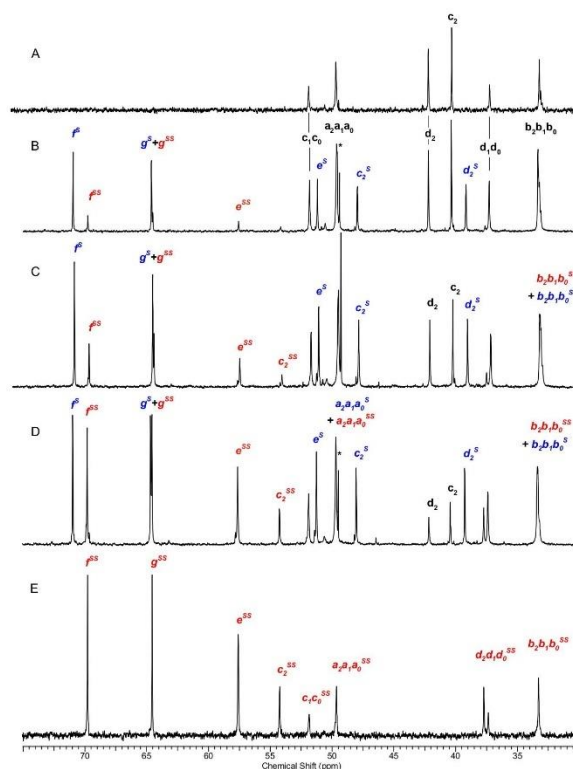


Figure 4. ^{13}C NMR spectra of G2 (A), $\text{G}2^{95\text{gl}}$ (B), $\text{G}2^{145\text{gl}}$ (C), $\text{G}2^{225\text{gl}}$ (D), and $\text{G}2^{325\text{gl}}$ (E). The carbonyl group resonances are omitted for clarity. The sharp resonance of methanol carbon at 44.3 ppm is labeled with an asterisk.

The analogous result was obtained using *R*-gl stepwise addition to G1, G3, and G4 PAMAM dendrimers. The series of three ^1H NMR spectra for $\text{G2}^{15\text{Rgl}}$, $\text{G2}^{22\text{Rgl}}$, and $\text{G2}^{32\text{Rgl}}$ are shown in Figure S2.

3.1.3. Fluorescein and Rhodamine B Single-Labeled Homochiral Dendrimers

The fluorescent labels, FITC and RBTC were carefully attached to G2 and G3 dendrimers. Single-labeled G2^{F} , G2^{R} , G3^{F} , and G2^{R} were then converted into *n*-(2, 3-dihydroxypropyl) derivatives with the same protocol, using 20% molar excess of enantiomerically pure *S*- and *R*-gl in relation to available amine groups (two equivalents per one terminal amine group). Obtained derivatives were not fully substituted. We obtained series of derivatives, namely, $\text{G2}^{16\text{RglF}}$, $\text{G2}^{19\text{SglF}}$, $\text{G3}^{19\text{RglF}}$, $\text{G3}^{35\text{SglF}}$, $\text{G2}^{19\text{RglR}}$, $\text{G2}^{30\text{SglR}}$, $\text{G3}^{45\text{RglR}}$, and $\text{G3}^{35\text{SglR}}$. The average stoichiometry of compounds was determined by ^1H NMR spectroscopy (spectra not shown). These compounds were then tested as single dendrimers and in homochiral pairs labeled with two different fluorescent labels on human cell cultures (vide infra).

3.1.4. Products of Stepwise Addition of Enantiomerically Pure gl into G2 Dendrimer

Fully gl-substituted PAMAM dendrimers require a temperature regime to avoid polyhydroxylation, which starts already at a temperature above 50 °C. When 20% molar excess of gl is used, the number of glycidol residues attached to PAMAM becomes higher than twice the number of terminal amine groups of PAMAM dendrimer as determined by the integral intensity of glycidol-derived multiplets of protons *f*. On the other hand, the substoichiometric amount of gl results in the formation of dendrimers with double- and single-substituted arms. Thus, we could obtain $\text{G2}^{9\text{Sgl}}$ and $\text{G2}^{22\text{Sgl}}$ and characterize them by NMR spectroscopy (vide supra).

These two species were then used to convert remaining free amine groups and mono-substituted ones into bis-substituted ones. Thus, we obtained the average substituted $\text{G2}^{9\text{Sgl}23\text{Rgl}}$ and $\text{G2}^{22\text{Sgl}10\text{Rgl}}$. The corresponding ^1H NMR spectra enabled us to identify these species as fully substituted, although they did not illustrate the symmetry of mixed-isomer derivatives. Therefore, we examined the ^{13}C NMR, which are presented for starting $\text{G2}^{9\text{Sgl}}$ and $\text{G2}^{22\text{Sgl}}$ (Figure 1A,E) and mixed $\text{G2}^{9\text{Sgl}23\text{Rgl}}$ and $\text{G2}^{22\text{Sgl}10\text{Rgl}}$ (traces B and D, respectively). There are essentially two sets of gl resonances observed in the ^{13}C NMR spectra of the products, which were assigned to the chiral arm and *meso* arm. Two sets of carbon *f* resonances can be identified at ca 70 ppm (downfield shifted f^{S} and f^{R} for chiral arm and upfield shifted f^{S} for *meso* arm (Figure S3, traces B and D). However, even in the spectra of compounds $\text{G2}^{9\text{Sgl}23\text{Rgl}}$ and $\text{G2}^{22\text{Sgl}10\text{Rgl}}$, which were obtained under kinetic control, there are some other species of highly distorted symmetry, which show low-intensity *f* carbon resonances shifted downfield and *g* carbon resonance shifted upfield. These signals are much pronounced in the spectrum of $\text{G2}^{32\text{Racgl}}$ (trace C), which is obtained by one portion addition of *rac*-gl into G2 dendrimer. These puzzling symmetry arms might origin from elongated polyhydroxy substituents because on the one hand the intensity of gl ^1H NMR resonances clearly indicates that the number of attached gl residues is 32; on the other hand, in the ^{13}C NMR spectrum, the resonance from the single-substituted arm is still present at ca 51 ppm (Figure S3, trace C). It should be emphasized that this spectral pattern is reproducible for reported $\text{G1}^{16\text{Racgl}}$ [20] and for fully substituted $\text{G3}^{64\text{Racgl}}$, $\text{G4}^{128\text{Racgl}}$, and $\text{G5}^{256\text{Racgl}}$ (not shown here).

3.2. Biological Studies

3.2.1. Dendrimers Toxicity

To perform cytotoxic studies, we chose two human cell lines—immortalized keratinocytes (HaCaT) and squamous carcinoma cells (SCC-15)—both belonging to epithelial tissue. SCC-15 is a model of cancer cells used as a target for the synthesized PAMAM conjugates occurring as a drug delivery system, while HaCaTs comparatively as non-tumorigenic cells. We used immortalized, non-tumorigenic keratinocytes, compared to normal ones, since the latter from skin biopsies indicate high variations between passages,

short culture lifetime, and donor variability [28]. To assess the cytotoxicity, a neutral red assay was performed as one of the most sensitive viability tests [29].

This assay indicated, that G2 and G3 PAMAM dendrimers furnished with enantiomers *S* or *R* glycidol (for simplicity of notation the number of gl residues will be omitted in the abbreviations of homochiral derivatives, which will be further named as $G3^RglF$, $G3^SglF$, $G2^RglF$, and $G2^SglF$) were highly biocompatible and did not indicate cytotoxic action against both immortalized human keratinocytes (HaCaT) and human squamous carcinoma cells (SCC-15) up to 300 μ M concentration (Figure 5).

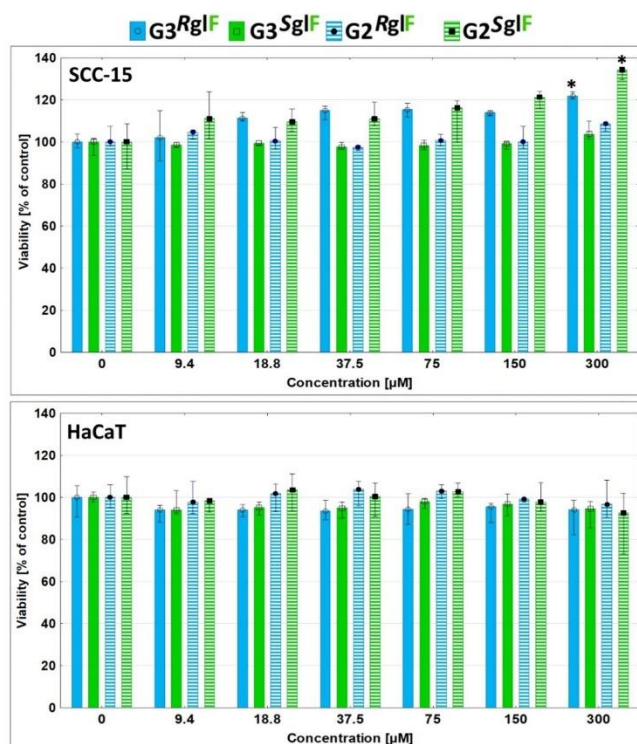


Figure 5. Cytotoxicity of $G3^RglF$, $G3^SglF$, $G2^RglF$, and $G2^SglF$ after 24 h treatment of human squamous carcinoma cells (SCC-15) and human immortalized keratinocytes (HaCaT). Cell viability is presented as medians of a percent against non-treated control (control expressed as 100%). The whiskers are lower (25%) and upper (75%) quartile ranges. * $p \leq 0.05$; Kruskal–Wallis test (against non-treated control).

Only at the highest 300 μ M concentration of $G3^RglF$ and $G2^SglF$ cancer cell viability increased by about 20 and 35%, respectively. Obtained results show the increased biocompatibility of PAMAM dendrimers after coating with glycidol residues. In our earlier studies, we estimated that native G3 PAMAM dendrimers after 24 h incubation evoked significantly higher cytotoxicity against SCC-15 and HaCaT cell from 10 and 50 μ M concentrations, respectively [28,30]. The studied compound had also lower toxicity than dendrimers substituted with hydroxyl groups *D*-glucoheptono-1,4-lactone [12]. Therefore, these compounds meet the requirements for drug carrier, i.e., high biocompatibility and

high water solubility [31]. Compared to other PAMAM dendrimers, PAMAM-pyrrolidone dendrimers, and poly (propylene imine) dendrimers, the result should be considered highly satisfactory [32]. For example, considered to be low-toxic PAMAM G4, pyrrolidone dendrimer was toxic already after two or six hours incubation with 200 μM concentrations against mouse neuroblastoma (N2a) cells (viability lowering for about 40%) [33]. A 25% decrease in viability of mHippoE-18 embryonic mouse hippocampal cells was also detected after 200 μM concentration treatment [34].

3.2.2. Time-Dependent Cellular Accumulation

Another requirement for drug delivery systems (DDS) is targeting specific sites or cell populations [31,35]. In anticancer therapy, selective action, uptake, and accumulation of DDS in cancer cells are very important since they can diminish adverse side effects against normal cells and tissues [36]. Therefore, we tested homochiral dendrimer conjugates interaction with human cancer or non-tumorigenic cell cultures to find whether they can be recognized by cell membrane receptors and selectively accumulated in cancer cells.

It has been observed before, that gel-entrapped lipase from *Rhizopus javanicus* enantioselectively catalyzed esterification of R-(+)-gl with *n*-butyric acid. However, the highest enantioselectivity was achieved after pretreatment of silica gel templated lipase with R-(-)-2-octanol [37].

The enzymes catalyzing water addition to epoxide with concomitant ring-opening show a variety of stereoselectivity of diol products, with retention or inversion of configuration, depending on substituents on gl and enzyme origin [38]. The involvement of lipases and/or epoxidases in the chiral recognition of homochiral dendrimers is inevitable if they reach cell membrane, cytosol, and other organelles.

The 2,3-hydroxypropyl substituents are formed upon food treatment, they covalently attach into Val and were found as N-2, 3-dihydroxypropyl Val residues in hemoglobin. This derivative was considered as a marker in food examination [39]. Neither in this toxicological study nor in other cases [40] the enantiomerically pure gl derivatives were studied separately.

Our fluorimetric studies with fluorescently labeled enantiomers of dendrimers revealed, that in both tested cell lines, R-gl enantiomer-derived G3 dendrimer conjugates (G3^{RglF}) were always significantly stronger accumulated than S-gl enantiomer-derived ones (G3^{SglF}) after 0.1–4 h incubation with 1 μM concentrations. An analogous effect was observed also in the case of G2 dendrimers, but only in cancer cells and from already 1 h incubation (Figure 6A). Additionally, cancer cells accumulated all studied compounds much efficiently than keratinocytes (on average 67%) (Figure 6A).

Obtained data are in accordance with confocal microscopy images (Figure 6B). Regardless of the fluorescent marker used, there is a greater accumulation of R forms of the enantiomers than the S. Conjugates of G3 dendrimer are taken up, transported, and stored mainly in cellular vesicles (mainly lysosomes), while G2 conjugates are much more scattered in the area of the cytoplasm, with visible slightly lower accumulation in intracellular vesicles (Figure 6B). In addition, enantiomers based on G2 dendrimers show a higher degree of penetration into the cell nuclei and the ability to bind to the nucleoli of cells (pointed by yellow arrows). Differences in the distribution of compounds in various areas of cells will significantly affect the possibility of using them as carriers of specific drugs, depending on the destination area [41].

It was also observed that the location of R-gl- and S-gl-covered G3 dendrimers in intracellular space was similar. Colocalization of FITC and rhodamine B labeled enantiomers was high in both cell lines (Figure 6B); therefore, there is no evidence that the intracellular transport of both enantiomers differs significantly. Only a dendrimer generation seems to be a factor influencing the distribution of dendrimers in the cell. It was previously proved, that -OH terminated PAMAM dendrimers are transported mainly via clathrin-dependent pathway and macropinocytosis [41] and through caveolin- and clathrin-independent pathway [42], depending on the type of cells tested.

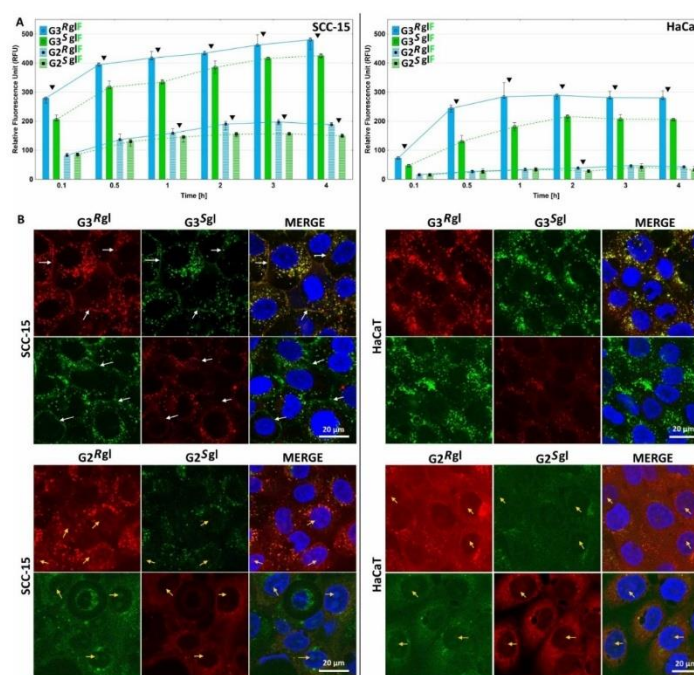


Figure 6. (A): Time-dependent accumulation of G3^Rgl^F, G3^Sgl^F, G2^Rgl^F and G2^Sgl^F in immortalized human keratinocytes (HaCaTs) and squamous carcinoma cells (SCC-15). Cells were incubated with 1 μM working solutions of dendrimers for 0.1–4 h and the fluorescence signal was measured with a fluorescence microplate reader at 485 nm/530 nm (exc./em.). Results are expressed as medians of relative fluorescence units, and the whiskers are lower (25%) and upper (75%) quartile ranges. ▼ $p \leq 0.05$; Mann–Whitney U-test (*S* against *R* enantiomers). (B): Confocal microscopy images of HaCaT and SCC-15 cells incubated for 4 h with 100 nM solutions of dendrimers in the respective pairs (G3^Rgl^F–G3^Sgl^F), (G3^Rgl^F–G2^Sgl^F), (G2^Rgl^F–G2^Sgl^F), (G2^Rgl^F–G3^Sgl^F). White arrows indicate dendrimers bounded with cell membranes. Yellow arrows show the presence of dendrimers in nucleoli.

Figure 6B shows that G3^R dendrimers indicated a high affinity for cell membranes, especially SCC-15 tumor cells, as indicated by white arrows. A similar effect was observed by Albertazzi et al. in HeLa cells after incubation with fluorescently labeled G4 PAMAM dendrimer [41]. The observed phenomenon was weaker in HaCaT cells, and these differences may be connected with variations in transfer efficiency of studied nanoparticles into cells. To visualize concentration-dependent differences in the accumulation of dendrimers in both cell lines, we also performed additional visualization in a fluorescence microscope (Figure 7). Cells were incubated with conjugates G3^Rgl^F, G3^Sgl^F, G2^Rgl^F and G2^Sgl^F in the range of 0–300 μM concentrations for 24 h. Images illustrate that the number of dendrimers in the cells increased with their concentration and regardless of the concentration all compounds were more efficiently taken up and accumulated in SCC-15 tumor cells than in keratinocytes (Figure 7).

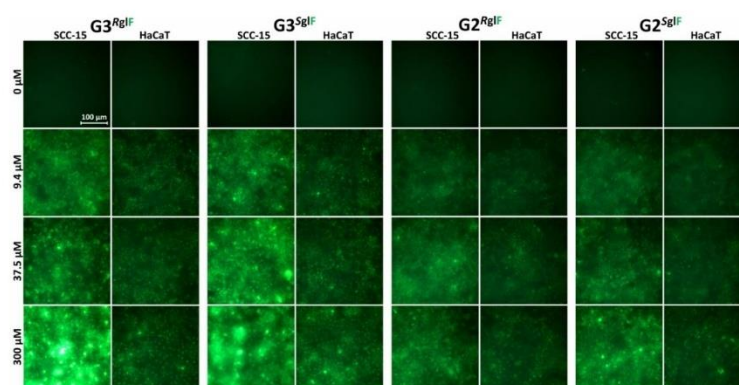


Figure 7. Concentration-dependent cellular accumulation of $G3^{RglF}$, $G3^{SglF}$, $G2^{RglF}$ and $G2^{SglF}$ in HaCaT and SCC-15 cells after 24 h incubation. Images were obtained with an Olympus IX-83 fluorescence microscope.

4. Conclusions

PAMAM G2 and G3 dendrimers were quantitatively converted by the addition of enantiomerically pure *R*-glycidol and *S*-glycidol into primary amine groups to obtain bis-(2, 3-dihydroxypropyl) derivatives. Fully substituted homochiral derivatives had effective radial symmetry, which was illustrated by one set of 2, 3-dihydroxypropyl carbon resonances in ^{13}C NMR spectra. Deficient substitution of G2 or G3 with enantiomerically pure glycidol enabled us to identify the mono-substituted arms of dendrimer along with bis-substituted ones by ^{13}C NMR spectroscopy. The single-fluorescent labeled homochiral G2 and G3 dendrimers were obtained in order to test their ability to bind with the cell membrane and enter into different human cells in vitro.

Biological studies with human non-tumorigenic keratinocytes (HaCaT) and squamous carcinoma cells (SCC-15) indicated that *S*- and *R*-glycidol furnished dendrimers were highly biocompatible with no toxicity up to 300 μM concentrations in contrast to the pristine PAMAM dendrimers, for which significant toxicity was observed already within 10–50 μM concentrations. The *R* and *S* glycidol derivatives of G3 PAMAM dendrimer bind to the cellular membrane and enter into the cells with higher accumulation in cancer cells. The *R* enantiomer conjugate quantity in studied cells was always significantly higher than *S* ones. The $G3^{gl}$ dendrimers were taken up more efficiently than $G2^{gl}$ derivatives; however, $G2^{gl}$ derivatives penetrated also nuclei of studied cells.

Supplementary Materials: The following are available online at <https://www.mdpi.com/article/10.3390/polym13071049/s1>, Figure S1: Combined HSQC and HMBC map for $G2^{32Sgl}$. Spectra were taken in D_2O . One-bond coupling peaks are shown in red, while relevant longer range (two-bond 1H - ^{13}C coupled ^{+13}CH) peaks are drawn in blue.; Figure S2. The 1H NMR spectra of (A): $G2^{14Rgl}$, (B): $G2^{22Rgl}$, and (C): $G2^{32Rgl}$ in D_2O .; Figure S3. The relevant regions of ^{13}C NMR spectra (from top to bottom): (A): $G2^{9Sgl}$, (B): $G2^{9Sgl/23Rgl}$, (C): $G2^{32Racgl}$, (D): $G2^{22Sgl/10Rgl}$, and (E): $G2^{22Sgl}$ in D_2O . For peak labeling see Section 3.1.2.

Author Contributions: Conceptualization, S.W.; methodology, S.W., L.U.; software, S.W., L.U.; validation, L.U., S.W. formal analysis, L.U., S.W.; investigation, M.M.-D., K.W., L.U.; writing—original draft preparation, L.U., S.W.; writing—review and editing, L.U., S.W.; visualization, L.U., S.W.; supervision, S.W.; project administration, S.W. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding: This research received no external funding.

Institutional Review Board Statement: Not applicable.

Informed Consent Statement: Not applicable.

Data Availability Statement: The data presented in this study are available on request from the corresponding author.

Acknowledgments: We gratefully acknowledge Agata Wawrzyniak from Rzeszow University, for kindly enabling us to perform measurements using the confocal microscope. We kindly acknowledge the graphic work by Ewelina Pociask.

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

References

- Tomalia, D.A.; Baker, H.; Dewald, J.; Hall, M.; Kallos, G.; Martin, S.; Roeck, J.; Ryder, J.; Smith, P. A New Class of Polymers: Starburst-Dendritic Macromolecules. *Polym. J.* **1985**, *17*, 117–132. [[CrossRef](#)]
- Tomalia, D.; Huang, B.; Swanson, D.; Brothers, H.; Klimash, J. Structure Control within Poly(Amidoamine) Dendrimers: Size, Shape and Regio-Chemical Mimicry of Globular Proteins. *Tetrahedron* **2003**, *59*, 3799–3813. [[CrossRef](#)]
- Minko, T.; Rodriguez-Rodriguez, L.; Pozharov, V. Nanotechnology Approaches for Personalized Treatment of Multidrug Resistant Cancers. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **2013**, *65*, 1880–1895. [[CrossRef](#)]
- Kim, T.-I.; Seo, H.J.; Choi, J.S.; Jang, H.-S.; Baek, J.-U.; Kim, K.; Park, J.-S. PAMAM-PEG-PAMAM: Novel Triblock Copolymer as a Biocompatible and Efficient Gene Delivery Carrier. *Biomacromolecules* **2004**, *5*, 2487–2492. [[CrossRef](#)]
- Parimi, S.; Barnes, T.J.; Callen, D.F.; Prestidge, C.A. Mechanistic Insight into Cell Growth, Internalization, and Cytotoxicity of PAMAM Dendrimers. *Biomacromolecules* **2010**, *11*, 382–389. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- Zhang, Y.; Thomas, T.; Lee, K.-H.; Li, M.; Zong, H.; Desai, A.; Kotlyar, A.; Huang, B.; Holl, M.; Baker, J. Polyvalent Saccharide-Functionalized Generation 3 Poly (Amidoamine) Dendrimer-Methotrexate Conjugate as a Potential Anticancer Agent. *Bioorg. Med. Chem.* **2011**, *19*, 2557–2564. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- Yue, Y.; Eun, J.S.; Lee, M.-K.; Seo, S.-Y. Synthesis and Characterization of G5 PAMAM Dendrimer Containing Daunorubicin for Targeting Cancer Cells. *Arch. Pharm. Res.* **2012**, *35*, 343–349. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- Teow, H.M.; Zhou, Z.; Najlah, M.; Yusof, S.R.; Abbott, N.J.; D’Emanuele, A. Delivery of Paclitaxel across Cellular Barriers Using a Dendrimer-Based Nanocarrier. *Int. J. Pharm.* **2013**, *441*, 701–711. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- Majoros, I.J.; Thomas, T.P.; Mehta, C.B.; Baker, J.R. Poly(Amidoamine) Dendrimer-Based Multifunctional Engineered Nanodevice for Cancer Therapy. *J. Med. Chem.* **2005**, *48*, 5892–5899. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- Schmitzer, A.R.; Franceschi, S.; Perez, E.; Rico-Lattes, I.; Lattes, A.; Thion, L.; Erard, M.; Vidal, C. Reactivity at the Interface of Chiral Amphiphilic Dendrimers. High Asymmetric Reduction by NaBH₄ of Various Prochiral Ketones. *J. Am. Chem. Soc.* **2001**, *123*, 5956–5961. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- Czerniecka-Kubicka, A.; Tutka, P.; Pyda, M.; Walczak, M.; Uram, L.; Misiorek, M.; Chmiel, E.; Wołowicz, S. Stepwise Glucoheptamidation of Poly(Amidoamine) Dendrimer G3 to Tune Physicochemical Properties of the Potential Drug Carrier: In Vitro Tests for Cytisine Conjugates. *Pharmaceutics* **2020**, *12*, 473. [[CrossRef](#)]
- Uram, L.; Szuster, M.; Filipowicz, A.; Zareba, M.; Walajtys-Rode, E.; Wołowicz, S. Cellular Uptake of Glucoheptamidated Poly(Amidoamine) PAMAM G3 Dendrimer with Amide-Conjugated Biotin, a Potential Carrier of Anticancer Drugs. *Bioorg. Med. Chem.* **2017**, *25*, 706–713. [[CrossRef](#)]
- Huang, J.; Su, P.; Zhou, L.; Yang, Y. Grafting L-Valine on Polyamidoamine Dendrimer-Modified Magnetic Microspheres for Enantioselective Adsorption of Dansyl Amino Acids. *Colloids Surf. Physicochem. Eng. Asp.* **2016**, *490*, 241–249. [[CrossRef](#)]
- Ho, M.N.; Bach, L.G.; Nguyen, D.H.; Nguyen, C.H.; Nguyen, C.K.; Tran, N.Q.; Nguyen, N.V.; Thi, T.T.H. PEGylated PAMAM Dendrimers Loading Oxaliplatin with Prolonged Release and High Payload without Burst Effect. *Biopolymers* **2019**, *110*, e23272. [[CrossRef](#)]
- Kharwade, R.; More, S.; Warokar, A.; Agrawal, P.; Mahajan, N. Starburst Pamam Dendrimers: Synthetic Approaches, Surface Modifications, and Biomedical Applications. *Arab. J. Chem.* **2020**, *13*, 6009–6039. [[CrossRef](#)]
- Peerlings, H.W.I.; Meijer, E.W. Chirality in Dendritic Architectures. *Chem. Eur. J.* **1997**, *3*, 1563–1570. [[CrossRef](#)]
- He, Y.-M.; Feng, Y.; Fan, Q.-H. Asymmetric Hydrogenation in the Core of Dendrimers. *Acc. Chem. Res.* **2014**, *47*, 2894–2906. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- McElhanon, J.R.; McGrath, D.V. Toward Chiral Polyhydroxylated Dendrimers. Preparation and Chiroptical Properties. *J. Org. Chem.* **2000**, *65*, 3525–3529. [[CrossRef](#)]
- Pittelkow, M.; Brock-Nannestad, T.; Moth-Poulsen, K.; Christensen, J.B. Chiral Dendrimer Encapsulated Pd and Rh Nanoparticles. *Chem. Commun.* **2008**, 2358–2360. [[CrossRef](#)]
- Borkowski, T.; Subik, P.; Trzeciak, A.M.; Wołowicz, S. Palladium(0) Deposited on PAMAM Dendrimers as a Catalyst for C-C Cross Coupling Reactions. *Molecules* **2011**, *16*, 427–441. [[CrossRef](#)]
- Chen, Y.; Tan, R.; Zhang, Y.; Zhao, G.; Yin, D. Dendritic Chiral Salen Titanium(IV) Catalysts Enforce the Cooperative Catalysis of Asymmetric Sulfoxidation. *ChemCatChem* **2015**, *7*, 4066–4075. [[CrossRef](#)]

22. Shi, X.; Bányai, I.; Islam, M.T.; Lesniak, W.; Davis, D.Z.; Baker, J.R.; Balogh, L.P. Generational, Skeletal and Substitutional Diversities in Generation One Poly(Amidoamine) Dendrimers. *Polymer* **2005**, *46*, 3022–3034. [[CrossRef](#)]
23. Zareba, M.; Sarelo, P.; Kopaczyńska, M.; Białońska, A.; Uram, L.; Walczak, M.; Aebischer, D.; Wołowicz, S. Mixed-Generation PAMAM G3-G0 Megamer as a Drug Delivery System for Nimesulide: Antitumor Activity of the Conjugate Against Human Squamous Carcinoma and Glioblastoma Cells. *Int. J. Mol. Sci.* **2019**, *20*, 4998. [[CrossRef](#)]
24. Nizioł, J.; Uram, L.; Szuster, M.; Sekula, J.; Ruman, T. Biological Activity of N(4)-Boronated Derivatives of 2'-Deoxycytidine, Potential Agents for Boron-Neutron Capture Therapy. *Bioorg. Med. Chem.* **2015**, *23*, 6297–6304. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
25. Watala, C.; Karolczak, K.; Kassassir, H.; Talar, M.; Przygodzki, T.; Maczynska, K.; Labieniec-Watala, M. How Do the Full-Generation Poly(Amido)Amine (PAMAM) Dendrimers Activate Blood Platelets? Activation of Circulating Platelets and Formation of “Fibrinogen Aggregates” in the Presence of Polycations. *Int. J. Pharm.* **2016**, *503*, 247–261. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
26. Erukulla, R.K.; Byun, H.-S.; Locke, D.C.; Bittman, R. Stereospecific and Regiospecific Ring Opening of Glycidol with Primary and Secondary Alcohols Mediated by Diisobutylaluminium Hydride. *J. Chem. Soc. Perkin Trans.* **1995**, 2199–2200. [[CrossRef](#)]
27. Benedetti, F.; Berti, F.; Norbedo, S. Ring-Opening of Epoxyalcohols by Diethylaluminium Cyanide. Regio- and Stereoselective Synthesis of 1-Cyano-2,3-Diols. *Tetrahedron Lett.* **1999**, *40*, 1041–1044. [[CrossRef](#)]
28. Szuster, M.; Uram, L.S.; Filipowicz-Rachwał, A.; Wołowicz, S.; Wałajtys-Rode, E. Evaluation of the Localization and Biological Effects of PAMAM G3 Dendrimer-Biotin/Pyridoxal Conjugate as HaCaT Keratinocyte Targeted Nanocarrier. *Acta Biochim. Pol.* **2019**, *66*, 191–200. [[CrossRef](#)]
29. Repetto, G.; del Peso, A.; Zurita, J.L. Neutral Red Uptake Assay for the Estimation of Cell Viability/Cytotoxicity. *Nat. Protoc.* **2008**, *3*, 1125–1131. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
30. Uram, L.; Szuster, M.; Gargas, K.; Filipowicz, A.; Wałajtys-Rode, E.; Wołowicz, S. In Vitro Cytotoxicity of the Ternary PAMAM G3-Pyridoxal-Biotin Bioconjugate. *Int. J. Nanomed.* **2013**, *8*, 4707–4720. [[CrossRef](#)]
31. Madaan, K.; Kumar, S.; Poonia, N.; Lather, V.; Pandita, D. Dendrimers in Drug Delivery and Targeting: Drug-Dendrimer Interactions and Toxicity Issues. *J. Pharm. Bioallied Sci.* **2014**, *6*, 139. [[CrossRef](#)]
32. Janaszewska, A.; Lazniewska, J.; Trzepiński, P.; Marcinkowska, M.; Klajnert-Maculewicz, B. Cytotoxicity of Dendrimers. *Biomolecules* **2019**, *9*, 330. [[CrossRef](#)]
33. Ciolkowski, M.; Petersen, J.F.; Ficker, M.; Janaszewska, A.; Christensen, J.B.; Klajnert, B.; Bryszewska, M. Surface Modification of PAMAM Dendrimer Improves Its Biocompatibility. *Nanomedicine* **2012**, *8*, 815–817. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
34. Janaszewska, A.; Ciolkowski, M.; Wróbel, D.; Petersen, J.F.; Ficker, M.; Christensen, J.B.; Bryszewska, M.; Klajnert, B. Modified PAMAM Dendrimer with 4-Carbomethoxypyrrolidone Surface Groups Reveals Negligible Toxicity against Three Rodent Cell-Lines. *Nanomed. Nanotechnol. Biol. Med.* **2013**, *9*, 461–464. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
35. Din, F.U.; Aman, W.; Ullah, I.; Qureshi, O.S.; Mustapha, O.; Shafique, S.; Zeb, A. Effective Use of Nanocarriers as Drug Delivery Systems for the Treatment of Selected Tumors. *Int. J. Nanomed.* **2017**, *12*, 7291–7309. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
36. Senapati, S.; Mahanta, A.K.; Kumar, S.; Maiti, P. Controlled Drug Delivery Vehicles for Cancer Treatment and Their Performance. *Signal Transduct. Target. Ther.* **2018**, *3*, 1–19. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
37. Furukawa, S.; Ono, T.; Ijima, H.; Kawakami, K. Effect of Imprinting Sol–Gel Immobilized Lipase with Chiral Template Substrates in Esterification of (R)-(+)- and (S)-(–)-Glycidol. *J. Mol. Catal. B Enzym.* **2002**, *17*, 23–28. [[CrossRef](#)]
38. Kotik, M.; Archelas, A.; Wohlgemuth, R. Epoxide Hydrolases and Their Application in Organic Synthesis. *Curr. Org. Chem.* **2012**, *16*, 451–482. [[CrossRef](#)]
39. Shimamura, Y.; Inagaki, R.; Honda, H.; Masuda, S. Does External Exposure of Glycidol-Related Chemicals Influence the Forming of the Hemoglobin Adduct, N-(2,3-Dihydroxypropyl)Valine, as a Biomarker of Internal Exposure to Glycidol? *Toxics* **2020**, *8*, 119. [[CrossRef](#)]
40. Jia, W.; Wu, D.; Chen, X.; Mao, L.; Miao, H.; Chen, D.; Ren, Y.; Zhang, Y. Metabolomics-Based Biomarker Analysis of Dihydroxypropyl Mercapturic Acid Isomers from 3-Monochloropropane-1,2-Diol and Glycidol for Evaluation of Toxicokinetics in Rats and Daily Internal Exposure in Humans. *Talanta* **2019**, *204*, 329–336. [[CrossRef](#)]
41. Albertazzi, L.; Serresi, M.; Albanese, A.; Beltram, F. Dendrimer Internalization and Intracellular Trafficking in Living Cells. *Mol. Pharm.* **2010**, *7*, 680–688. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
42. Manzanares, D.; Ceña, V. Endocytosis: The Nanoparticle and Submicron Nanocompounds Gateway into the Cell. *Pharmaceutics* **2020**, *12*, 371. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

Article

Synthesis of Biotinylated PAMAM G3 Dendrimers Substituted with *R*-Glycidol and Celecoxib/Simvastatin as Repurposed Drugs and Evaluation of Their Increased Additive Cytotoxicity for Cancer Cell Lines

Konrad Wróbel ¹, Stanisław Wołowiec ¹, Joanna Markowicz ², Elżbieta Wałajtys-Rode ³ and Łukasz Uram ^{2,*}

¹ Medical College, Rzeszów University, 1a Warzywna Str., 35-310 Rzeszów, Poland;

konradwrobel300@gmail.com (K.W.); swolowiec@ur.edu.pl (S.W.)

² Faculty of Chemistry, Department of Inorganic and Analytical Chemistry, Rzeszów University of Technology, 6 Powstańców Warszawy Ave., 35-959 Rzeszów, Poland; jmarkowicz@stud.prz.edu.pl

³ Faculty of Chemistry, Warsaw University of Technology, 75 Koszykowa Str., 00-664 Warsaw, Poland; ewalajtys@ch.pw.edu.pl

* Correspondence: luram@prz.edu.pl



Citation: Wróbel, K.; Wołowiec, S.; Markowicz, J.; Wałajtys-Rode, E.; Uram, Ł. Synthesis of Biotinylated PAMAM G3 Dendrimers Substituted with *R*-Glycidol and Celecoxib/Simvastatin as Repurposed Drugs and Evaluation of Their Increased Additive Cytotoxicity for Cancer Cell Lines. *Cancers* **2022**, *14*, 714. <https://doi.org/10.3390/cancers14030714>

Academic Editor: David Wong

Received: 24 December 2021

Accepted: 28 January 2022

Published: 29 January 2022

Publisher's Note: MDPI stays neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



Copyright: © 2022 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

Simple Summary: New anti-cancer drugs can be created through the combination of well-known substances acting on different molecular targets. Repurposed drugs selected in this way can then be attached to special carriers that have specific, high affinity for cancer cells. In this study, two anti-glioma drugs, celecoxib and simvastatin, were chosen and linked to the PAMAM G3 dendrimer targeted to cancer cells by attached biotin and *R*-glycidol. In vitro studies performed with human glioblastoma (U-118 MG) and squamous cell carcinoma (SCC-15) cells revealed that dendrimer conjugate containing both celecoxib and simvastatin was 20–50 times more potent than either drug administered alone or in combination. Thus, the obtained combined conjugate can be considered as a potential candidate for a new therapy of malignant glioblastoma.

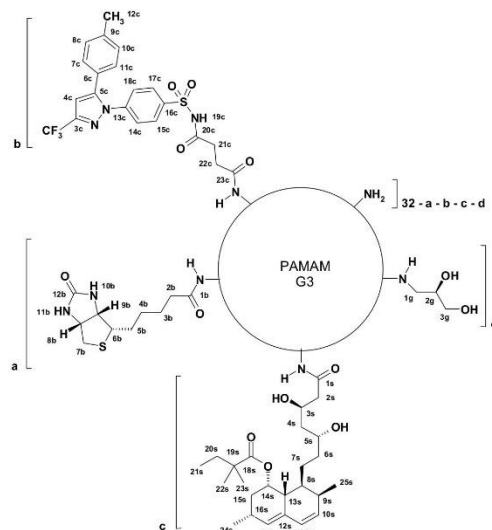
Abstract: Recent achievement in anticancer therapy considers the application of repurposed drugs in optimal combinations with the use of specific carriers for their targeted delivery. As a result, new optimized medications with reduced side effects can be obtained. In this study, two known anticancer drugs, celecoxib and/or simvastatin, were conjugated covalently with PAMAM G3 dendrimer and tested in vitro against human squamous carcinoma (SCC-15-15) and glioblastoma (U-118 MG) cells, as well as normal human fibroblasts (BJ). The obtained conjugates were also substituted with biotin and *R*-glycidol to increase their affinity for cancer cells and were characterized with NMR spectroscopy and dynamic light scattering technique. Conjugates furnished with two celecoxib and four simvastatin residues revealed the very high effectiveness and dramatically decreased the SCC-15 and U-118 MG cell viability at very low concentrations with IC₅₀ equal to about 3 μM. Its action was 20–50-fold stronger than that of either drug alone or as a mixture. Combined conjugate revealed also additive action since it was 2–8-fold more effective than conjugates with either single drug. The combined conjugate revealed rather low specificity since it was also highly cytotoxic for BJ cells. Despite this, it may be concluded that biotinylated and *R*-glycidylated PAMAM G3 dendrimers substituted with both celecoxib and simvastatin can be considered as a new perspective anticancer agent, effective in therapy of malignant, incurable glioblastomas.

Keywords: drug delivery system; biotinylated; *R*-glycidylated PAMAM G3 dendrimers; celecoxib; simvastatin; molecular size; cytotoxicity; human squamous carcinoma (SCC-15-15); human glioblastoma (U-118 MG); normal human fibroblasts (BJ)

1. Introduction

The new approach in the search for effective cancer therapy is the use of repurposed drugs in various combinations together with their targeted delivery for optimization of therapeutic effects with concomitant decrease of side effects. Well-characterized carriers of drugs targeted into cancer, the biotinylated PAMAM G3 dendrimers, were chosen. Their ability for introduction of cargo to cancer cells has been well documented [1]. Among many possible candidates used in clinics in cancer treatment, we selected two well-recognized and characterized drugs, namely, celecoxib and simvastatin. There is a plethora of publications concerning the antineoplastic effects of both substances and their molecular mechanisms of action. Celecoxib (C) as an inhibitor of cyclooxygenase-2 (COX-2) exhibits anti-inflammatory properties reducing the promotion of the cancer-induced microenvironment [2]. The anticancer effect of C attached to the biotinylated PAMAM G3 dendrimers was documented for U-118 MG glioma and squamous carcinoma (SCC-15) cancer cell lines [3–7]. Statins are also well characterized as anticancer agents. Statins upregulate or inhibit diverse signaling pathways, resulting in the cytotoxicity and apoptosis of cancer cells. Affected signaling pathways lead to differentiation of cancer cells; induction of oxidative stress; cell cycle arrest; autophagy; and suppression of cancer stemness, proliferation, metastasis, and angiogenesis [8]. Statins inhibit the 3-hydroxy-3-methyl-glutaryl-CoA (HMG-CoA) reductase that is the rate-limiting enzyme in the cholesterol biosynthesis pathway [9]. They reduce mevalonate synthesis, and, consequently, farnesylation and geranylgeranylation processes are suppressed. As an elevated activity of mevalonate (MVA)/cholesterol biosynthetic pathway is linked to the initiation and progression of many types of cancers, statins have been extensively used in cancer therapy [10]. One of the often applied statins is the lipophilic substance simvastatin (S) [11]. The antitumor effects of S involves overlapping molecular pathways and different subcellular structures. Beyond the inhibitory effect on cholesterol production, S has the pleiotropic effects including anti-proliferation, anti-apoptosis, anti-angiogenesis, and prevention of metastasis due to the activation of certain proteins that interfere with important signaling pathways. It has been documented that S significantly suppresses the expression of the tumor-promoting cytokines and mediators, including the transforming growth factor (TGF)- β 1, vascular endothelial growth factor (VEGF), and interleukins (IL-8 and IL-6), inhibiting ovarian cancer cell growth [12]. In prostate cancer cells, S has been shown to enhance the intrinsic apoptosis by activation of pro-apoptotic and inhibition of anti-apoptotic proteins and simultaneously to stimulate extrinsic apoptosis by increasing of the TNF-alpha, Fas-L, Traf, and caspase 8 [8]. It has to be noticed that during statin monotherapy, patients suffer from many side effects, including liver toxicity, myopathy, proteinuria, or hematuria and increased diabetes risk [9]. However, many investigations in vitro and in vivo documented effects of S against various diseases including cancer [11] and revealed that S can enhance the response to conventional anticancer therapies when administered in combination with other drugs or in combination with various nanostructures. This includes encapsulation S in the poly (lactic-co-glycolic acid) microspheres [13] or G4 PAMAM dendrimers with three different functionalities (NH₂, OH, and PEG) [14,15] (as well as G4 PAMAM-OH dendrimers with glycosylated surface) [16]. Nanoparticles for simvastatin delivery has been recently reviewed [17]. Investigations of S in combination revealed that S and temozolomide used simultaneously significantly increased apoptosis in glioblastoma cells [18]. Studies on the combination of S and C performed by Gehrke et al., 2017 on head and neck squamous cell carcinoma cells (HNSCC) revealed only small additive and no synergistic effect with the combination of 50 μ M S and 40 μ M C [19]. Thus, it was reasonable to construct the targeted carrier that will introduce both S and C into cancer cells, expecting that it will cause significant decrease of cytotoxic concentrations of both drugs and promote elimination of side effects. Therefore the one-macromolecule-two drugs conjugate, based on PAMAM G3 was constructed (Scheme 1) and tested against cancer and normal cell lines in vitro. Additionally the conjugate was equipped with biotin in order to increase the affinity of a conjugate to cancer cell membrane according to formerly determined strategy [20].

Furthermore, the remaining primary amine groups of PAMAM G3 core were substituted with *R*-glycidol. Recently, we have found that G2 and G3 PAMAM dendrimers covered with *R*-glycidol entered cells faster and showed higher toxicity for cancer than normal cells than *S*-glycidol-covered analogues [21].



Scheme 1. Schematic formula of PAMAM G3 (G3) conjugates with biotin (B), celecoxib (C), simvastatin (S), and *R*-glycidol (gl). The following conjugates were tested: G3^{2B6C8gl} (a = 2; b = 6, c = 0, d = 8), G3^{2B4S14gl} (a = 2; b = 0, c = 4, d = 14), G3^{2B2C4S12gl} (a = 2; b = 2, c = 4, d = 12), and G3^{2B14gl} (a = 2; b = 0, c = 0, d = 14).

2. Materials and Methods

2.1. Reagents

Simvastatin, ethylenediamine, methyl acrylate, succinic anhydride, α -D-glucoheptono-1,4-lactone (GHL), carbonyl diimidazole (CDI), 2-chloro-1-methylpyridinium iodide, 4-dimethylaminopyridine (DMAP), triethylamine (TEA), *R*-glycidol, dimethyl sulfoxide (DMSO), and other reagents used in syntheses were obtained from Merck KGaA (Darmstadt, Germany). Celecoxib was purchased from Abcam GmbH (Karlsruhe, Germany), while biotin *N*-hydroxysuccinimide ester (NHS-Biotin) was obtained from AmBeeD (Arlington Hts, IL, USA). Spectra/Por[®] 3 RC dialysis membrane (cellulose, MW_{cutoff}—3.5 kD) was provided by Carl Roth GmbH and Co. KG (Karlsruhe, Germany).

2.2. Biochemical Reagents, Cell Lines and Materials

Human glioblastoma (U-118 MG, ATCC[®] HTB-15), human squamous cell carcinoma (SCC-15, ATCC[®] CRL-1623), and human normal fibroblast (BJ, ATCC[®] CRL-2522) cell lines were purchased from the American Type Culture Collection (ATCC, Manassas, VA, USA). Dulbecco's modified Eagle's media (DMEM and DMEM/F-12), Eagle's minimum essential medium (EMEM), and fetal bovine serum (FBS) were obtained from Corning Inc. (New York, NY, USA). Penicillin and streptomycin solution, phosphate-buffered saline (PBS) with and without magnesium, and calcium ions were provided by Thermo Fisher Scientific Inc. (Waltham, MA, USA). Trypsin-EDTA solution, hydrocortisone, 0.33% neutral red solution (3-amino-N-dimethylamino-2-methyl-phenazine hydrochloride), XTT sodium salt (2,3-bis[2-methoxy-4-nitro-5-sulfo-phenyl]-2H-tetrazolium-5-carboxanilide inner salt), and phenazinemethosulfate (PMS) were purchased from Merck KGaA (Darmstadt, Germany). Cell culture dishes and materials were from Corning Incorporated (Corning, NY, USA), Greiner (Kremsmünster, Austria), or Nunc (Roskilde, Denmark).

2.3. Syntheses

PAMAM G3 dendrimer (G3) was obtained according to the original procedure of Tomalia et al. [22]. G3 was converted into biotin attached conjugate, G3^{2B}, using two equivalents of NHS-biotin in DMSO at 130 μ moles scale and purified by dialysis according to the protocol described before [23,24].

2.3.1. Preparation of G3^{2B6C8gl} Conjugate with Succinyl-Celecoxib

The G3^{2B} conjugate was substituted with celecoxib according to previously published method [25] with some modifications as follows: celecoxib (318.0 mg, 834 μ moles) was converted into succinate-celecoxib (SC) by reaction with succinic anhydride (93.6 mg, 935 μ moles) in acetonitrile (8 mL) in the presence of 1 mL TEA under reflux for 6 h. Then, solvents were evaporated under reduced pressure, a solid residue was dissolved in dimethylsulfoxide (DMSO, 11 mL), and SC in 2 mL of DMSO (151 μ moles) was activated with Mukaiyama reagent. Thus, solid 4-(dimethylamino)pyrimidine (DMAP, 185 mg, 1.51 mmoles) and then 2-chloro-N-methyl pyridinium iodide (193 mg, 755 μ moles) were added, and the mixture was stirred vigorously for 4 h at room temperature and then added into G3^{2B} in 5 mL DMSO (158 mg, 21.5 μ moles). The mixture was heated at 50 °C for 12 h, then transferred into cellulose dialytic bag ($MW_{\text{cutoff}} = 3.5$ kDa) and dialyzed for 3 days against water (7 times 5 L). Water was removed on a rotary evaporator under reduced pressure (20 mbar), the solid residue was dried overnight in vacuo (<2 mbar), and 136 mg of product was obtained and characterized by the ¹H NMR as conjugate of PAMAM G3 with average 2 amide-attached biotin residues and 6 amide-linked SC residues, G3^{2B6C}. Overall yield was 13.4 μ moles (62.3%), considering the theoretical MW equal 10,129 Da. Then, G3^{2B6C} (13.4 μ moles) was dissolved in 3 mL DMSO and 5 mL methanol. To this solution, we added R-glycidol (40 μ L, 44.6 mg, 600 μ moles) stepwise, and the mixture was left at room temperature for 12 h. Afterwards, the mixture was dialyzed against water, and the solid residue was isolated as before. The product was identified as conjugate with additional eight 2(R),3-dihydroxypropyl residues attached to 8 amine groups out of 24 available in G3^{2B6C} substrate. Yield of G3^{2B6C8gl}: 115 mg, 10.7 μ moles, 80% considering the average MW equal 10,722 Da. The stoichiometry of macromolecular product was identified by the ¹H NMR spectroscopy (Figure 1).

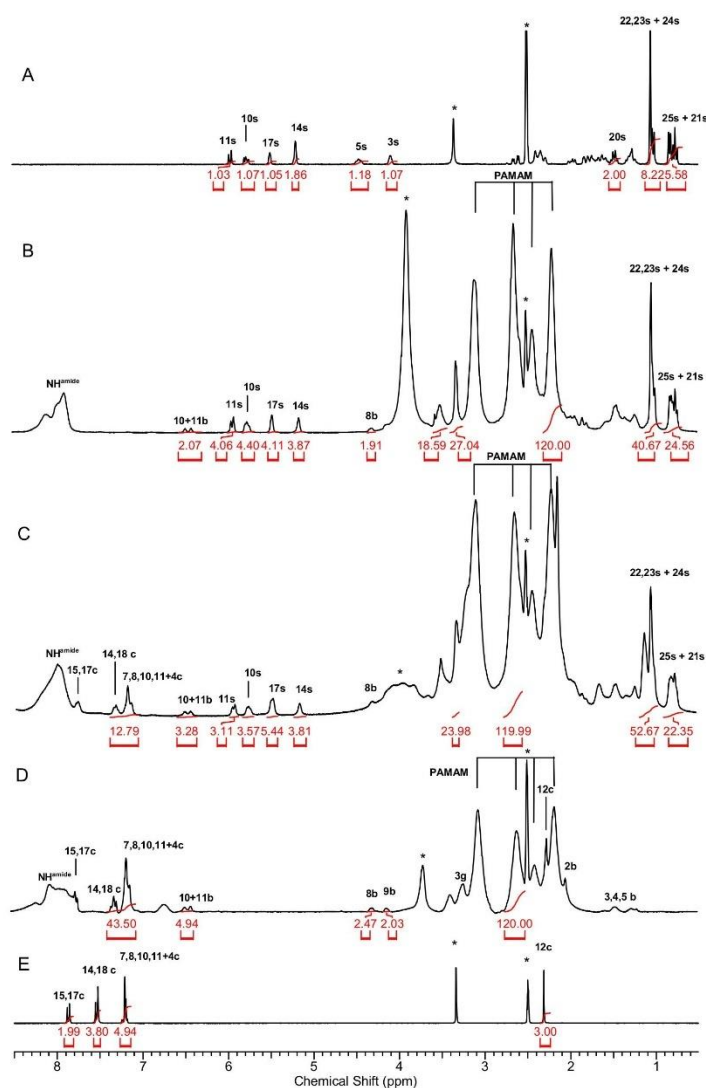


Figure 1. The ¹H NMR spectra of simvastatin (A), G3^{2B4S14gl} (B), G3^{2B2C4S12gl} (C), G3^{2B6C8gl} (D), and celecoxib (E) in DMSO-d₆. Residual HD₂CS(O)CD₃ and HDO peaks are labeled with asterisks *. The PAMAM CH₂ resonances centered at 2.63 ppm or 2.20 were used as internal integration reference (the integral intensity of both resonances corresponds to [120H]).

2.3.2. Conjugation of Simvastatin to G3 PAMAM

Simvastatin (53.5 mg, 128 μmoles) was dissolved in 2 mL methanol. To this solution, we added 38.5 mg of CDI (237 μmoles). The formation of white precipitate was observed, which disappeared within 15 min of stirring at room temperature. Then, the mixture

was heated at 42 °C for 3 h. This solution was then added dropwise into a methanolic solution of G3 containing 69.8 mg (10.1 μ moles). The mixture was heated at 42 °C for 12 h. Afterwards, the mixture was transferred into dialytic bag, dialyzed against water for 3 days, and isolated as described above. Water was removed under reduced pressure, and the solid residue was dried in vacuo. Although the product was well soluble in water, special care was taken at the isolation step due to vast foaming of the aqueous solution of the product, which was isolated at the yield 45.6 mg (38% recalculated for average theoretical MW = 11,931 Da). The product was identified by ^1H NMR spectroscopy as G3^{12S} (for detailed analysis of 1-D ^1H and 2-D ^1H - ^1H COSY spectrum, see Figure S1). The ^1H and ^{13}C resonances were assigned on the basis of HSQC and HMBC spectra and chemical shifts of the resonances are collected in Table S1.

2.3.3. Preparation of G3^{2B4S14gl} Conjugate with Simvastatin

Simvastatin (S, 62.9 mg, 150 μ moles) was dissolved in 3 mL methanol. To this solution 100 μL TEA was added, followed by stepwise addition of carbonyl diimidazole (CDI, 48.5 mg, 300 μ moles), while vigorous stirring and allowed for a reaction for 1 h at room temperature. This solution was added dropwise to G3^{2B} (179.7 mg, 24.4 μ moles) in methanol. The mixture became turbulent, and after 30 min stirring, all materials dissolved. The mixture was kept at room temperature for 4 h, then *R*-glycidol (80 μL , 89 mg, 1200 μ moles) was added dropwise; following this, the mixture was stored for 12 h and then dialyzed against water as before. The solid product was isolated and identified as G3^{2B4S14gl} by the ^1H NMR spectroscopy (Figure 1B). The isolated yield was 107.5 mg, 10.7 μ moles, and 43.8% for theoretical molecular weight equal to 10,001 Da.

2.3.4. Preparation of G3^{2B2C4S12gl} Conjugate with Celecoxib and Simvastatin

The ternary conjugate of G3^{2B} with SC and simvastatin was obtained in the two-step strategy. First, the 75 μ moles SC in 2 mL DMSO was activated with 0.225 mmole of 2-chloro-*N*-methyl pyridinium iodide (57 mg) in the presence of 0.450 mmole DMAP (55 mg). This solution was added into 220 mg G3^{2B} (30 μ moles) in 2 mL DMSO, and the mixture was heated at 50 °C for 12 h. After dialytic purification and removal of solvents, the isolated solid product (207.1 mg, 25 μ moles, 83.3% yield) was identified as G3^{2B2C} by ^1H NMR spectroscopy.

Then, 207.1 mg of G3^{2B2C} (25 μ moles) was dissolved in methanol (7 mL), and to this solution, we dropwise added simvastatin (52.3 mg, 125 μ moles), preliminarily activated with 40.5 mg CDI (250 μ moles in 2 mL methanol and 100 μL TEA). The mixture was kept at 60 °C for 4 h. Then, *R*-glycidol (80 μL , 89 mg, 1200 μ moles) was added dropwise, and the mixture was stored for 12 h at ambient temperature and then dialyzed against water as before. Solvents were removed under reduced pressure and the solid residue analyzed by the ^1H NMR spectroscopy. The average stoichiometry of the product was determined as G3^{2B2C4S12gl} (Figure 1C). Yield: 189 mg, 17.5 μ moles, 70 % calculated for theoretical molecular weight of the product equal to 10,776 Da.

2.3.5. Synthesis of G3^{2B14gl} Conjugate

R-glycidol (12.2 mg; 165 μ moles in 0.5 mL methanol) was added dropwise to 75 mg G3^{2B} (10.2 μ moles) in 1 mL methanol with vigorous stirring and left at ambient temperature for 2 days. Then, the mixture was transferred to dialytic tube and dialyzed against water for 3 days. The product was dried and identified by ^1H NMR spectroscopy as G3^{2B14gl}, as described previously [12]. The molecular size and zeta potential for the carrier and conjugates were determined by DLS (Table 1).

2.4. Methods

2.4.1. NMR Spectroscopy

The 1-D ^1H and ^{13}C NMR spectra and 2-D ^1H - ^1H correlations spectroscopy (COSY), ^1H - ^{13}C heteronuclear single quantum correlation (HSQC), and heteronuclear multiple

bond correlation (HMBC) spectra were recorded in DMSO- d_6 using a Bruker 300 MHz instrument (Rheinstetten, Germany) at College of Natural Sciences, University of Rzeszów.

2.4.2. Conjugate Size and ζ Potential Measurements

Size and ζ potential of G3^{2B14gl}, G3^{12S}, G3^{2B6C8gl}, G3^{2B4S14gl}, and G3^{2B2C4S12gl} conjugates were measured using dynamic light scattering technique at pH 5 (0.05 M acetate buffer) and in water using Zetasizer Nano instrument (Malvern, UK) for 1 mg/mL samples (0.7–1.0 mM solutions). The size of conjugates at pH 7 and 5 and values of zeta potential for conjugates and G3^{2B14gl} are collected in Table 1.

Table 1. Size of conjugates averaged by volume (d(V)) and by number of molecules (d(N)) and zeta potential values \pm standard deviation determined by DLS analysis.

Compound	Size (nm)				Zeta Potential (mV)	
	pH 7		pH 5		pH 7	pH 5
	d(V)	d(N)	d(V)	d(N)		
G3 ^{2B14gl}	2.1 \pm 0.49	1.8 \pm 0.42	5.0 \pm 0.96	3.3 \pm 0.85	9.6 \pm 0.89	7.8 \pm 2.51
G3 ^{2B6C8gl}	7.8 \pm 3.56	5.7 \pm 2.35	5.8 \pm 1.59	4.0 \pm 1.46	18.6 \pm 3.70	34.6 \pm 2.52
G3 ^{2B4S14gl}	10.3 \pm 1.67	8.6 \pm 1.44	9.5 \pm 1.97	6.5 \pm 1.92	37.7 \pm 3.82	36.5 \pm 4.11
G3 ^{2B2C4S12gl}	155 \pm 5.77	86.7 \pm 6.83	8.5 \pm 2.19	6.9 \pm 2.14	30.3 \pm 0.73	32.5 \pm 3.14
G3 ^{12S}	85.8 \pm 1.83	57.2 \pm 2.96	44.2 \pm 1.99	25.3 \pm 7.07	42.4 \pm 1.77	32.9 \pm 2.84

2.4.3. Cell Culture

Human glioblastoma cells U-118 MG (HTB-15, ATCC) were cultured in DMEM, human squamous carcinoma cells SCC-15 (CRL-1623 ATCC) were grown in DMEM/F-12 supplemented with hydrocortisone (400 ng/mL), and normal human skin fibroblasts BJ (CRL-2522 ATCC) were cultured in EMEM. All culture media were supplemented with 10% FBS and 100 U/mL penicillin 100 μ g/mL streptomycin solution. All cell lines were incubated at 37 °C in humidified 95% air/5% CO₂ with media changed every 2–3 days. Cells were passaged at 70–85% confluence after trypsinization with 0.25% trypsin-EDTA in PBS (calcium and magnesium free). Cell morphology was evaluated with Nikon TE2000S Inverted Microscope with phase contrast (Tokyo, Japan). Number and viability of cells were estimated by trypan blue exclusion test using Automatic Cell Counter TC20 (BioRad Laboratories, Hercules, CA, USA) or Neubauer chamber. All assays were performed in triplicate in three independent experiments.

2.4.4. Cytotoxicity Assays

BJ, SCC-15, and U-118 MG cells were seeded in flat-bottom 96-well culture plates in triplicate (100 μ L cell suspension per well) at a density of 1×10^4 cells per well and allowed to attach for 24 h. The stock solution of 200 mM celecoxib and simvastatin or 5.9 mM G3^{2B6C8gl}, 8.1 mM G3^{2B4S14gl}, or 8.9 mM G3^{2B2C4S12gl} in DMSO were used to make working solutions in appropriate media with a range of increasing concentrations: celecoxib and simvastatin from 0 to 200 μ M (100 μ L/well), PAMAM conjugates with drugs from 0 to 12 μ M (100 μ L/well). The 9.7 mM stock solution of dendrimer vehicle G3^{2B14gl} in distilled water was filtered with sterile syringe filters (0.22 μ m) and used to 0–200 μ M working solutions (100 μ L/well). All cell lines were incubated with working solutions for 24 h in 37 °C. After that, the neutral red (NR) and XTT assays were performed as described earlier [26].

2.4.5. Statistical Analysis

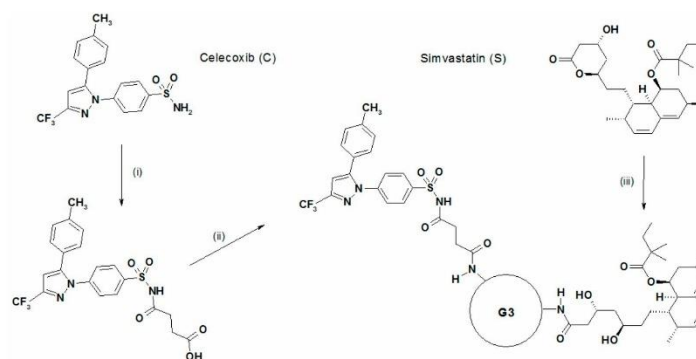
To estimate the differences between treated and non-treated control samples, we performed statistical analysis using the non-parametric Kruskal–Wallis test due to the lack of a normal distribution of data in the studied groups. $p < 0.05$ was considered statistically

significant. Calculations were performed with Statistica 13.3 software (StatSoft, Tulsa, OK, USA).

3. Results and Discussion

3.1. Syntheses and Characterization of Conjugates

Third-generation poly(amidoamine) dendrimer substituted with two equivalents of amide-attached biotin was used as macromolecular substrate ($G3^{2B}$) to obtain celecoxib and simvastatin conjugates (Scheme 1). Celecoxib was converted into succinyl-celecoxib (SC) as it was described in [25] and attached through amide-succinyl linker to $G3^{2B}$ using Mukaiyama reagent [27] to obtain highly substituted ($G3^{2B6C}$) and low-substituted ($G3^{2B2C}$) derivatives as was elaborated previously (Scheme 2) [3,28].



Scheme 2. Functionalization of celecoxib and simvastatin: (i) succinic anhydride in acetonitrile and triethylamine, (ii) 2-chloro-N-methylpyridine iodide in the presence of 4-(dimethylamino)pyridine in DMSO, (iii) carbonyl diimidazole in methanol.

Simvastatin (S) was covalently attached via amide bond to both $G3^{2B}$ and $G3^{2B2C}$ to obtain equally substituted conjugates $G3^{2B4S}$ and $G3^{2B2C4S}$, respectively. This conversion was elaborated from the beginning. Namely, we monitored a reaction between S and ethylenediamine (en) by the ^1H NMR spectroscopy in deuterated methanol (Figure S1). We found that S lactone ring opening occurred within 4 h of refluxing 20 mM S and 23 mM en in methanol with formation of amide linkage between S and amine group of en. The addition of carbonyl diimidazole, which is a known carboxylate group-activating agent [25], sped up the reaction twice. Therefore, we applied this reagent to test the S addition into PAMAM G3 dendrimer (Scheme 1) in methanol. We obtained highly substituted $G3^{12S}$ derivative and characterized it by the ^1H NMR and 2-D ^1H - ^1H COSY spectroscopy in DMSO- d_6 (Figure S1). The most dramatic changes in the ^1H NMR spectra were observed for 3s and 5s protons. These resonances shifted upfield from 4.20 ppm and 4.05 ppm in S (for spectral assignment, see Figure S3 and previously performed assignments [29]) into 3.65 ppm and 4.17 ppm in $G3^{12S}$, respectively. All the ^1H resonances assigned to lactone ring in S (except 5s) shifted upfield in the $G3^{12S}$. Moreover, the ^{13}C NMR resonances of lactone form of S shifted considerably in the ^{13}C NMR spectrum of $G3^{12S}$. The ^{13}C resonances were assigned on the basis of HSQC and HMBC experiments (Table S1).

Using the same reaction conditions, we added four equivalents of S into the $G3^{2B}$ and $G3^{2B2C}$ to obtain $G3^{2B4S}$ and $G3^{2B2C4S}$, which were not isolated from methanol. Further, we blocked the remaining amine groups in $G3^{2B6C}$, $G3^{2B2C4S}$, and $G3^{2B4S}$ by reaction of the conjugates with excess of *R*-glycidol in comparable conditions in methanol. Surprisingly, the remaining free amine groups of the starting conjugates were only partially substituted, as was observed before in the case of G3-fluorescein and G3-rhodamine conjugates [21]. On

the basis of the integral intensity of the 3g resonance centered at around 3.32 ppm related to internal reference PAMAM resonance of [120H] intensity, we found that glycidylated conjugates were: $G_3^{2B_6C_8gl}$, $G_3^{2B_2C_4S_12gl}$, and $G_3^{2B_4S_14gl}$, as determined by the 1H NMR spectra (Figure 1B–D, respectively, Table S1).

The resonances in the 1H NMR spectrum of S (Figure 1A) in DMSO- d_6 were assigned on the basis of COSY experiment (Figure S3). Amide conjugation of S into $G_3^{2B_4S_14gl}$ resulted in a considerable upfield shift of 5s and 3s protons, which are hidden under high-intensity residual HDO resonance (Figures 1B and S4), whereas 10s, 11s, 14s, and 17s remained almost unchanged in the 1H NMR spectrum of $G_3^{2B_4S_14gl}$ related to S. However, the 3s and 5s were undoubtedly identified in the spectrum of G_3^{12S} (Figure S2). The integral intensities of 10s, 11s, 14s, and 17s resonances corresponded to four S substituents in the $G_3^{2B_4S_14gl}$ conjugate in relation to [120H] integral intensity of PAMAM G3 resonance centered at 2.20 ppm (Figure 1B).

Analogously, the positions and intensities of the S resonances in ternary conjugate $G_3^{2B_2C_4S_12gl}$ enabled the determination of the stoichiometry of the conjugate, containing average 4S substituents. In this 1H NMR spectral quantitation, another 1H internal reference, PAMAM resonance, was used, the one centered at 2.60, because the resonance at 2.20 ppm was overlapped with celecoxib-derived methyl 12c resonance (Figure 1C). The 1H NMR spectrum of $G_3^{2B_2C_4S_12gl}$ conjugate showed very broad residual HDO resonance, which precluded a detailed spectrum analysis within 3.5–4.5 ppm region.

Celecoxib (C) resonances in the 1H NMR spectrum in DMSO- d_6 (Figure 1E) were identified on the basis of C resonances integral intensity and COSY spectrum (not shown). All the aromatic proton resonances, except 15c and 17c of C in the 1H NMR spectrum of both $G_3^{2B_6C_8gl}$ and $G_3^{2B_2C_4S_12gl}$, were grouped within 7.3–7.4 ppm. The integration of these resonances originated from seven protons of C enabled to determine the number of C substituents equal to six and two in $G_3^{2B_6C_8gl}$ and $G_3^{2B_2C_4S_12gl}$, respectively (Figure 1D,C, respectively).

In conclusion, we obtained the binary conjugates $G_3^{2B_4S_14gl}$ and $G_3^{2B_6C_8gl}$, as well as the ternary $G_3^{2B_2C_4S_12gl}$ with remaining amine groups mono- or di-substituted with *R*-glycidol or unsubstituted at around 12, 16, and 12, respectively (Scheme 1). Glycidylation of conjugates was performed in order to increase a solubility of the conjugates in water but also to eradicate free amine groups, which are responsible for a systemic toxicity of PAMAM dendrimers, which increases considerably with PAMAM generation and amount of amine groups [30].

Although non-glycidylated analogues are well soluble in DMSO, they precipitate upon dilution with water. Surprisingly, the glycidylated conjugates obtained eventually were found to be better soluble in water and kept their molecular size at the molecular level, as determined by DLS method for 0.1 mM solution (Table 1).

We chose *R*-glycidol to derivatize the binary and ternary conjugates because we noticed more effective internalization of G3 and G2 PAMAM dendrimers covered with *R*-glycidol in comparison with those covered with *S*-glycidol into keratinocyte (HaCaT) and especially squamous carcinoma (SCC-15) cells in vitro [21].

The molecular size of conjugates, $d(N)$, depends on primary amine groups available for protonation, which is achieved already at pH 5. The molecular size of the carrier, $G_3^{2B_14gl}$, was 3.3 nm (Table 1, Figure S5). The binary $G_3^{2B_6C_8gl}$ and $G_3^{2B_4S_14gl}$ sizes were 4.0 and 6.5, respectively, while a diameter of ternary $G_3^{2B_2C_4S_12gl}$ molecule was 6.9 nm at pH 5 measured as $d(N)$ at 0.05 mM concentration. In all cases, the volume-averaged diameter, $d(V)$, was slightly larger than $d(N)$, which is a regular feature of the conjugates. However, the ternary $G_3^{2B_2C_4S_12gl}$ showed substantial association at pH 7, with $d(N)$ 97 nm and $d(V)$ around 150 nm as measured for 0.1 mM solution. The obtained results were important for further biological tests; the solutions used there were 10 times and more diluted. Thus, we assumed that all the conjugates were dispersed into the monomolecular level and the concentrations of all the conjugates were actual. In the case of G_3^{12S} , the

molecules remained associated both in pH 7 and pH 5 with particles sized at least 25 nm (Figure S5, Table 1).

Consistently, the zeta potential values for all conjugates, except G3^{12S}, fell into 8–38 mV, which are the numbers suggesting that high affinity of the conjugate molecules into negatively charged cell membranes is achievable (Figure S6, Table 1).

3.2. Conjugates Cytotoxicity

Dendrimer G3^{2B14gl} revealed rather low cytotoxicity for both cancer lines as estimated with neutral red (NR) assay: IC₅₀ in order of 200 µM and 70 µM in SCC-15 and U-118 MG, respectively, and much higher cytotoxicity in BJ cells with IC₅₀ fourfold lower in both assays (Table 2, Figure S7). This may indicate that under applied conditions, the G3^{2B14gl} penetrated the cell membrane without significant damage, whereas it entered the mitochondria and disrupted their transmembrane potential since the XTT assay indicated significantly lower IC₅₀ values (Table 2, Figure S7).

Table 2. Cytotoxicity of investigated repurposed drugs alone and their conjugates with G3^{2B14gl} estimated for the normal BJ and cancer SCC-15 and U-118 MG cells, expressed as half maximal inhibitory concentration (IC₅₀) in micromolar concentration (medians). Data were estimated with NR and XTT assay after 24 h incubation and calculated with AAT Bioquest IC₅₀ calculator [31]. *a*—concentration of introduced C, *b*—concentration of introduced S.

Assay	Cell Line	Conjugate/Carrier Alone/Drug Alone (IC ₅₀ µM)						
		G3 ^{2B6C8gl}	G3 ^{2B4S14gl}	G3 ^{2B2C4S12gl}	G3 ^{2B14gl}	C	S	C + S 0.5:1 Ratio
NR	BJ	1.90	9.99	1.10	53.60	88.68	90.14	63.40
		11.40 ^a	39.96 ^b	2.20 ^a				
	SCC-15			4.40 ^b				
		6.65	>12.00	6.69	>200.00	47.48	56.54	56.45
XTT	BJ	39.9 ^a	>48.00 ^b	13.38 ^a				
				26.76 ^b				
	U-118 MG	5.86	16.90	2.73	>200.00	65.57	26.19	37.65
		35.16 ^a	67.60 ^b	5.46 ^a				
XTT	BJ			10.92 ^b				
		2.40	8.75	1.28	23.45	100.13	100.86	66.00
		14.40 ^a	35.00 ^b	2.56 ^a				
				5.12 ^b				
	SCC-15	6.98	>12.00	2.98	64.58	97.13	84.38	60.14
		41.88 ^a	>48.00 ^b	5.96 ^a				
				11.92 ^b				
	U-118 MG	6.49	12.27	2.91	62.65	93.74	112.33	70.67
38.94 ^a		49.08 ^b	5.82 ^a					
			11.64 ^b					

The cytotoxicity of investigated repurposed drugs alone evaluated in all investigated cell lines revealed that their activities estimated with XTT assay as being in the order of 100 µM for both drugs and were higher than data published by the others for different cancer cell lines (Table 2). Gehrke et al. estimated the IC₅₀ for C and S in the head and neck squamous carcinoma cell lines PE/CA-PJ 41 and HLaC78 using the MTT assay as 40 µM and 50 µM, respectively [19]. Comparable with those results are our data obtained with NR

assay for C in both investigated cancer lines ($IC_{50} = 48 \mu\text{M}$ for SCC-15) and ($IC_{50} = 60 \mu\text{M}$ for U-118 MG) and with S ($IC_{50} = 57 \mu\text{M}$) in SCC-15 cells. Interestingly, the higher cytotoxicity of S ($IC_{50} = 26 \mu\text{M}$) was observed in glioma U-118MG cells. This may be explained by the observation including the breast (MCF-7 and SKBr-3), prostate (LNCaP and PC-3), colon (Caco-2 and HCT-116), skin (SCC-M7 and SCC-P9), and the lung cancer cell lines (Calu-3 and Calu6) that S inhibited the cell growth more efficiently in less differentiated tumors that spread faster, as in case of glioblastoma. The observed cytotoxicity for investigated cells was measured after treatment with 1 to 20 μM S for a prolonged period of 72 h [32]. The combination of treatment with both drugs by Gehrke et al. decreased tumor cell viability significantly more as compared to C and S alone, wherein a small additive effect and no synergistic effect were observed [19]. Our data revealed a higher additive effect of both drugs with XTT assay, but almost no effect with NR assay (Table 2). This may be explained by the data of Fujiwara et al., who reported that statins promote cell death by increasing the activation of caspases-3/-9, inducing pro-apoptotic protein (Bim) expression, arresting the cell cycle at the G1 phase, and decreasing the mitochondrial membrane potential ($\Delta\psi\text{m}$) [33]. Results obtained with either drug alone or both provided two interesting observations. The first is the higher resistance of fibroblasts to C and S as estimated by both assays as compared to cancer lines. The second is the highest cytotoxicity of S alone and in the combination with C in U-118 MG cells ($IC_{50} = 26 \mu\text{M}$ and $38 \mu\text{M}$, respectively; Figure 2).

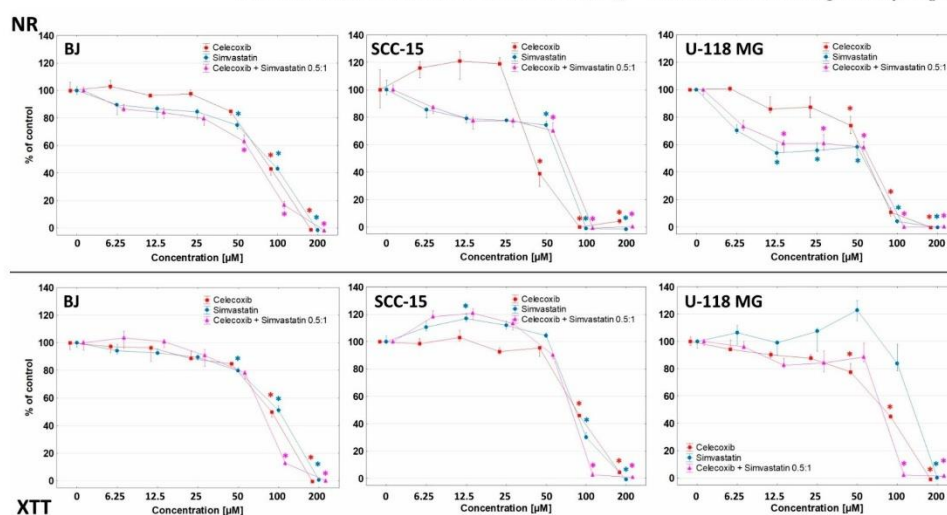


Figure 2. Effect of single drugs celecoxib, simvastatin, and 0.5:1 mixture of celecoxib and simvastatin on normal BJ and cancer SCC-15 and U-118 MG cell viability, estimated with NR and XTT assays after 24 h incubation. Cell viability is presented as medians of a percent against non-treated control (control expressed as 100%). The whiskers are lower (25%) and upper (75%) quartile ranges. * $p \leq 0.05$; Kruskal–Wallis test (against non-treated control).

Menter et al., 2017 [32] observed a time-dependent two-phased response in tumor cells to simvastatin. The first phase within the 6 h to 24 h involved changes in cell morphology, whereas the second phase between 24 and 72 h involved the loss of plasma membrane integrity as an effect of the cholesterol depletion. This is connected with disruption of the lipid rafts and expression of the caveolin-1 responsible for cellular transport and signaling, leading to the induction of apoptosis [32]. Thus, as was mentioned earlier, the NR assay

showed higher sensitivity of U-118 MG to S for disintegration of the cellular membrane than SCC-15 and BJ cells.

Conjugation of the $G3^{2B14gl}$ with either drug alone or both dramatically increased their cytotoxicity as compared with drugs alone with much lower differences depending on used assays and investigated cancer cell lines (Figure 3). Estimated IC_{50} were in the order of 6–12 μM with lower values for $G3^{2B6C8gl}$ in BJ cells (about 2 μM). This result was 10- to 50-fold lower as compared to both drugs alone (Table 2). A comparison of the IC_{50} values of the conjugates and the equivalent of the drugs (calculated concentration of introduced drugs) showed that the toxicity of the conjugates was not as impressively higher than that of the drugs themselves, but still the conjugates showed about 2–8-fold higher activity than the drug equivalents (Table 2). Conjugate with both drugs $G3^{2B2C4S12gl}$ further increased the cytotoxicity of constructs as compared with conjugates of a single drug by 2–8-fold, with IC_{50} in the order of 1 μM for BJ and 3 μM for both cancer cell lines. This amounted to a 35–50-fold increase of cytotoxicity as compared to both drugs alone (Table 2). The negative finding is the lack of selectivity of obtained conjugate that is more toxic (threefold) for normal fibroblasts than for both cancer lines. However, this may have meaning for cancer-associated fibroblasts (CAF) constituting the tumor extracellular matrix (TEM) now recognized as a substantial factor for cancer progression and considered as a potential therapeutic and diagnostic target [34]. The interaction between tumor cells and the TEM plays a crucial role in tumor initiation, progression, metastasis, and response to therapy. The S has been shown to induce metabolic reprogramming in TEM and to target the immune microenvironment through cytokines or chemokines [35].

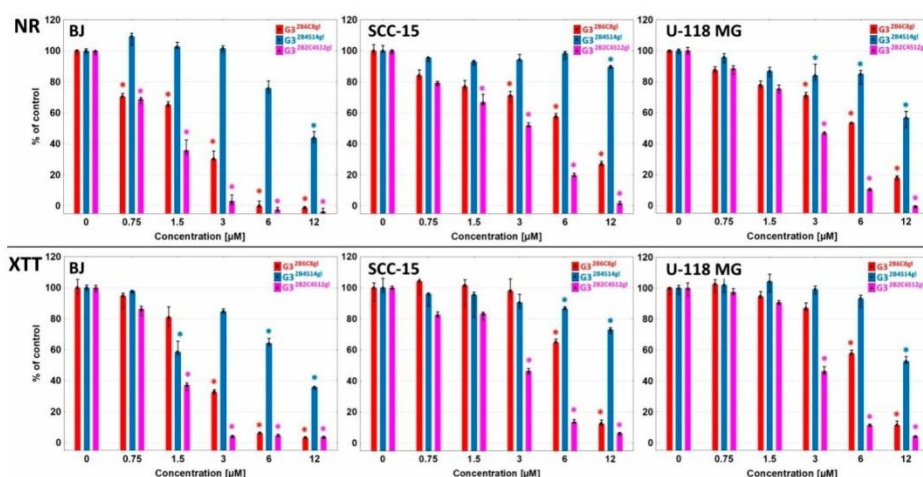


Figure 3. Cytotoxicity of single conjugates $G3^{2B6C8gl}$, $G3^{2B4S14gl}$, and combined conjugate $G3^{2B2C4S12gl}$ for normal (BJ) and cancer (SCC-15) and (U-118 MG) cells after 24 h treatment, estimated with neutral red (NR) or XTT assay. Cell viability is presented as medians of a percent against non-treated control (control expressed as 100%). The whiskers are lower (25%) and upper (75%) quartile ranges. * $p \leq 0.05$; Kruskal–Wallis test (against non-treated control).

4. Conclusions

The presented results documented the very high effectiveness of obtained biotinylated and *R*-glycidylated PAMAM dendrimer conjugated with both C and S ($G3^{2B2C4S12g}$) as dramatically decreasing the squamous carcinoma SCC-15 and glioblastoma U-118 MG cell viability at very low concentrations with IC_{50} equal to about 3 μM . This makes it a

prospective targeted drug carrier in malignant cancer, including glioblastoma therapy with decreased side effects of both drugs observed at concentrations applied in the clinics.

Supplementary Materials: The following supporting information can be downloaded at <https://www.mdpi.com/article/10.3390/cancers14030714/s1>, Figure S1: Progress of reaction between S and en monitored by the ^1H NMR spectroscopy. Figure S2: COSY spectrum of $\text{G3}^{12\text{S}}$ in DMSO-d_6 . Figure S3: COSY spectrum of simvastatin in DMSO-d_6 . Figure S4: COSY spectrum of $\text{G3}^{2\text{B}4\text{S}12\text{gl}}$ in DMSO-d_6 . Figure S5: Size of conjugates by DLS. Figure S6: Zeta potential of conjugates. Figure S7: Cytotoxicity of $\text{G3}^{2\text{B}14\text{gl}}$ carrier for Bf, SCC-15, and U-118 MG cells. Table S1: The ^1H and ^{13}C NMR chemical shifts of simvastatin (S); celecoxib (C); and $\text{G3}^{12\text{S}}$, $\text{G3}^{2\text{B}4\text{S}14\text{gl}}$, $\text{G3}^{2\text{B}2\text{C}4\text{S}12\text{gl}}$, and $\text{G3}^{2\text{B}6\text{C}8\text{gl}}$ conjugates in DMSO-d_6 .

Author Contributions: Conceptualization, E.W.-R., S.W. and L.U.; methodology, E.W.-R., S.W. and L.U.; validation, S.W. and L.U.; formal analysis, L.U., S.W. and J.M.; investigation, K.W., S.W., J.M. and L.U.; resources, S.W. and L.U.; data curation, S.W., J.M. and L.U.; writing—original draft preparation, S.W., E.W.-R. and L.U.; writing—review and editing, S.W., E.W.-R. and L.U.; visualization, S.W., L.U. and J.M.; supervision, E.W.-R.; project administration, S.W. and E.W.-R.; funding acquisition, S.W. and L.U. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding: The biological part of this research was supported by financial resources of the Faculty of Chemistry, Rzeszów University of Technology, grant number PB25.CN.21.001.01.

Institutional Review Board Statement: Not applicable.

Informed Consent Statement: Not applicable.

Data Availability Statement: Data supporting reported results can be provided by authors upon request.

Acknowledgments: We gratefully acknowledge Małgorzata Walczak from Rzeszow University of Technology for kindly enabling us to measure size and zeta potential on Zetasizer Nano instrument.

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

References

1. Abedi-Gaballu, F.; Dehghan, G.; Ghaffari, M.; Yekta, R.; Abbaspour-Ravasjani, S.; Baradaran, B.; Ezzati Nazhad Dolatabadi, J.; Hamblin, M.R. PAMAM Dendrimers as Efficient Drug and Gene Delivery Nanosystems for Cancer Therapy. *Appl. Mater. Today* **2018**, *12*, 177–190. [CrossRef]
2. Toloczko-Iwaniuk, N.; Dziemiarczyk-Pakiela, D.; Nowaszewska, B.K.; Celińska-Janowicz, K.; Milyk, W. Celecoxib in Cancer Therapy and Prevention-Review. *Curr. Drug Targets* **2019**, *20*, 302–315. [CrossRef]
3. Uram, L.; Markowicz, J.; Misiorek, M.; Filipowicz-Rachwał, A.; Wołowicz, S.; Wałajtyś-Rode, E. Celecoxib Substituted Biotinylated Poly(Amidoamine) G3 Dendrimer as Potential Treatment for Temozolomide Resistant Glioma Therapy and Anti-Nematode Agent. *Eur. J. Pharm. Sci.* **2020**, *152*, 105439. [CrossRef]
4. Uram, L.; Filipowicz, A.; Misiorek, M.; Pieńkowska, N.; Markowicz, J.; Wałajtyś-Rode, E.; Wołowicz, S. Biotinylated PAMAM G3 Dendrimer Conjugated with Celecoxib and/or Fmoc-L-Leucine and Its Cytotoxicity for Normal and Cancer Human Cell Lines. *Eur. J. Pharm. Sci.* **2018**, *124*, 1–9. [CrossRef]
5. Hemmer, R.; Hall, A.; Spaulding, R.; Rossow, B.; Hester, M.; Caroway, M.; Haskamp, A.; Wall, S.; Bullen, H.A.; Morris, C.; et al. Analysis of Biotinylated Generation 4 Poly(Amidoamine) (PAMAM) Dendrimer Distribution in the Rat Brain and Toxicity in a Cellular Model of the Blood-Brain Barrier. *Molecules* **2013**, *18*, 11537–11552. [CrossRef]
6. Fana, M.; Gallien, J.; Srinageshwar, B.; Dunbar, G.L.; Rossignol, J. PAMAM Dendrimer Nanomolecules Utilized as Drug Delivery Systems for Potential Treatment of Glioblastoma: A Systematic Review. *Int. J. Nanomed.* **2020**, *15*, 2789–2808. [CrossRef]
7. Hanurry, E.Y.; Mekonnen, T.W.; Andrgie, A.T.; Darge, H.F.; Birhan, Y.S.; Hsu, W.-H.; Chou, H.-Y.; Cheng, C.-C.; Lai, J.-Y.; Tsai, H.-C. Biotin-Decorated PAMAM G4.5 Dendrimer Nanoparticles to Enhance the Delivery, Anti-Proliferative, and Apoptotic Effects of Chemotherapeutic Drug in Cancer Cells. *Pharmaceutics* **2020**, *12*, 443. [CrossRef]
8. Tilija Pun, N.; Jeong, C.-H. Statin as a Potential Chemotherapeutic Agent: Current Updates as a Monotherapy, Combination Therapy, and Treatment for Anti-Cancer Drug Resistance. *Pharmaceutics* **2021**, *14*, 470. [CrossRef]
9. Sirtori, C.R. The Pharmacology of Statins. *Pharm. Res.* **2014**, *88*, 3–11. [CrossRef]
10. Guerra, B.; Recio, C.; Aranda-Tavío, H.; Guerra-Rodríguez, M.; García-Castellano, J.M.; Fernández-Pérez, L. The Mevalonate Pathway, a Metabolic Target in Cancer Therapy. *Front. Oncol.* **2021**, *11*, 626971. [CrossRef]
11. Duarte, J.A.; de Barros, A.L.B.; Leite, E.A. The Potential Use of Simvastatin for Cancer Treatment: A Review. *Biomed. Pharmacother.* **2021**, *141*, 111858. [CrossRef]

12. Göbel, A.; Zinna, V.M.; Dell'Endice, S.; Jaschke, N.; Kuhlmann, J.D.; Wimberger, P.; Rachner, T.D. Anti-Tumor Effects of Mevalonate Pathway Inhibition in Ovarian Cancer. *BMC Cancer* **2020**, *20*, 703. [CrossRef]
13. Nath, S.D.; Linh, N.T.B.; Sadiasa, A.; Lee, B.T. Encapsulation of Simvastatin in PLGA Microspheres Loaded into Hydrogel Loaded BCP Porous Spongy Scaffold as a Controlled Drug Delivery System for Bone Tissue Regeneration. *J. Biomater. Appl.* **2014**, *28*, 1151–1163. [CrossRef]
14. Kulhari, H.; Pooja, D.; Prajapati, S.K.; Chauhan, A.S. Performance Evaluation of PAMAM Dendrimer Based Simvastatin Formulations. *Int. J. Pharm.* **2011**, *405*, 203–209. [CrossRef]
15. Kulhari, H.; Kulhari, D.P.; Prajapati, S.K.; Chauhan, A.S. Pharmacokinetic and Pharmacodynamic Studies of Poly(Amidoamine) Dendrimer Based Simvastatin Oral Formulations for the Treatment of Hypercholesterolemia. *Mol. Pharm.* **2013**, *10*, 2528–2533. [CrossRef]
16. Sharma, R.; Liaw, K.; Sharma, A.; Jimenez, A.; Chang, M.; Salazar, S.; Amlani, I.; Kannan, S.; Kannan, R.M. Glycosylation of PAMAM Dendrimers Significantly Improves Tumor Macrophage Targeting and Specificity in Glioblastoma. *J. Control. Release* **2021**, *337*, 179–192. [CrossRef]
17. Yan, S.; Ren, J.; Jian, Y.; Wang, W.; Yun, W.; Yin, J. Injectable Maltodextrin-Based Micelle/Hydrogel Composites for Simvastatin-Controlled Release. *Biomacromolecules* **2018**, *19*, 4554–4564. [CrossRef]
18. Shojaei, S.; Koleini, N.; Samiei, E.; Aghaei, M.; Cole, L.K.; Alizadeh, J.; Islam, M.I.; Vosoughi, A.-R.; Albokashy, M.; Butterfield, Y.; et al. Simvastatin Increases Temozolomide-Induced Cell Death by Targeting the Fusion of Autophagosomes and Lysosomes. *FEBS J.* **2020**, *287*, 1005–1034. [CrossRef]
19. Gehrke, T.; Scherzad, A.; Hackenberg, S.; Ickrath, P.; Schendzielorz, P.; Hagen, R.; Kleinsasser, N. Additive Antitumor Effects of Celecoxib and Simvastatin on Head and Neck Squamous Cell Carcinoma in Vitro. *Int. J. Oncol.* **2017**, *51*, 931–938. [CrossRef]
20. Uram, L.; Szuster, M.; Filipowicz, A.; Zareba, M.; Walajtys-Rode, E.; Wołowicz, S. Cellular Uptake of Glucoheptaoamidated Poly(Amidoamine) PAMAM G3 Dendrimer with Amide-Conjugated Biotin, a Potential Carrier of Anticancer Drugs. *Bioorg. Med. Chem.* **2017**, *25*, 706–713. [CrossRef]
21. Malinga-Drozd, M.; Uram, L.; Wróbel, K.; Wołowicz, S. Chiral Recognition of Homochiral Poly (Amidoamine) Dendrimers Substituted with R- and S-Glycidol by Keratinocyte (HaCaT) and Squamous Carcinoma (SCC-15) Cells In Vitro. *Polymer* **2021**, *13*, 1049. [CrossRef] [PubMed]
22. Tomalia, D.A.; Baker, H.; Dewald, J.; Hall, M.; Kallos, G.; Martin, S.; Roeck, J.; Ryder, J.; Smith, P. A New Class of Polymers: Starburst-Dendritic Macromolecules. *Polym. J.* **1985**, *17*, 117–132. [CrossRef]
23. Uram, L.; Szuster, M.; Gargas, K.; Filipowicz, A.; Walajtys-Rode, E.; Wołowicz, S. In Vitro Cytotoxicity of the Ternary PAMAM G3-Pyridoxal-Biotin Bioconjugate. *Int. J. Nanomed.* **2013**, *8*, 4707–4720. [CrossRef]
24. Kaczorowska, A.; Malinga-Drozd, M.; Kałas, W.; Kopaczyńska, M.; Wołowicz, S.; Borowska, K. Biotin-Containing Third Generation Glucoheptaoamidated Polyamidoamine Dendrimer for 5-Aminolevulinic Acid Delivery System. *Int. J. Mol. Sci.* **2021**, *22*, 1982. [CrossRef]
25. Lee, Y.; Kim, J.; Kim, H.; Kang, S.; Yoon, J.-H.; Kim, D.-D.; Kim, Y.M.; Jung, Y. N-Succinylaspart-1-Yl Celecoxib Is a Potential Colon-Specific Prodrug of Celecoxib with Improved Therapeutic Properties. *J. Pharm. Sci.* **2012**, *101*, 1831–1842. [CrossRef]
26. Nizioł, J.; Uram, L.; Szuster, M.; Sekula, J.; Ruman, T. Biological Activity of N(4)-Boronated Derivatives of 2'-Deoxycytidine, Potential Agents for Boron-Neutron Capture Therapy. *Bioorganic Med. Chem.* **2015**, *23*, 6297–6304. [CrossRef]
27. Mukaiyama, T. New Synthetic Reactions Based on the Onium Salts of Aza-Arenes [New Synthetic Methods (29)]. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1979**, *18*, 707–721. [CrossRef]
28. Uram, L.; Misiorek, M.; Pichla, M.; Filipowicz-Rachwał, A.; Markowicz, J.; Wołowicz, S.; Walajtys-Rode, E. The Effect of Biotinylated PAMAM G3 Dendrimers Conjugated with COX-2 Inhibitor (Celecoxib) and PPAR γ Agonist (Fmoc-L-Leucine) on Human Normal Fibroblasts, Immortalized Keratinocytes and Glioma Cells in Vitro. *Molecules* **2019**, *24*, 3801. [CrossRef]
29. Brus, J.; Jegorov, A. Through-Bonds and Through-Space Solid-State NMR Correlations at Natural Isotopic Abundance: Signal Assignment and Structural Study of Simvastatin. *J. Phys. Chem. A* **2004**, *108*, 3955–3964. [CrossRef]
30. Mukherjee, S.P.; Davoren, M.; Byrne, H.J. In Vitro Mammalian Cytotoxicological Study of PAMAM Dendrimers-towards Quantitative Structure Activity Relationships. *Toxicol. In Vitro* **2010**, *24*, 169–177. [CrossRef]
31. AAT Bioquest, Inc. Quest Graph™ ANOVA Calculator. Available online: <https://www.aatbio.com/tools/anova-analysis-of-variance-one-two-way-calculator> (accessed on 3 December 2021).
32. Menter, D.G.; Ramsauer, V.P.; Harirforoosh, S.; Chakraborty, K.; Yang, P.; Hsi, L.; Newman, R.A.; Krishnan, K. Differential Effects of Pravastatin and Simvastatin on the Growth of Tumor Cells from Different Organ Sites. *PLoS ONE* **2011**, *6*, e28813. [CrossRef]
33. Fujiwara, D.; Tsubaki, M.; Takeda, T.; Tomonari, Y.; Koumoto, Y.; Sakaguchi, K.; Nishida, S. Statins Induce Apoptosis through Inhibition of Ras Signaling Pathways and Enhancement of Bim and P27 Expression in Human Hematopoietic Tumor Cells. *Tumour Biol.* **2017**, *39*, 1010428317734947. [CrossRef] [PubMed]
34. Belhabib, I.; Zaghdoudi, S.; Lac, C.; Bousquet, C.; Jean, C. Extracellular Matrices and Cancer-Associated Fibroblasts: Targets for Cancer Diagnosis and Therapy? *Cancers* **2021**, *13*, 3466. [CrossRef]
35. Jiang, W.; Hu, J.-W.; He, X.-R.; Jin, W.-L.; He, X.-Y. Statins: A Repurposed Drug to Fight Cancer. *J. Exp. Clin. Cancer Res.* **2021**, *40*, 241. [CrossRef]

Article

Exploring the Potential of Lapatinib, Fulvestrant, and Paclitaxel Conjugated with Glycidylated PAMAM G4 Dendrimers for Cancer and Parasite Treatment

Łukasz Uram ¹, Konrad Wróbel ², Małgorzata Walczak ¹, Żaneta Szymaszek ¹, Magdalena Twardowska ¹ and Stanisław Wołowicz ^{2,*}

¹ Faculty of Chemistry, Rzeszów University of Technology, 6 Powstańców Warszawy Ave., 35-959 Rzeszów, Poland; luram@prz.edu.pl (L.U.); mwalczak@prz.edu.pl (M.W.); 163835@stud.prz.edu.pl (Z.S.); 164811@stud.prz.edu.pl (M.T.)

² Medical College, Rzeszów University, 1a Warzywna Street, 35-310 Rzeszów, Poland; konradwrobel300@gmail.com

* Correspondence: swolowicz@ur.edu.pl

Abstract: Fulvestrant (F), lapatinib (L), and paclitaxel (P) are hydrophobic, anticancer drugs used in the treatment of estrogen receptor (ER) and epidermal growth factor receptor (EGFR)-positive breast cancer. In this study, glycidylated PAMAM G4 dendrimers, substituted with F, L, and/or P and targeting tumor cells, were synthesized and characterized, and their antitumor activity against glioma U-118 MG and non-small cell lung cancer A549 cells was tested comparatively with human non-tumorigenic keratinocytes (HaCaT). All cell lines were ER+ and EGFR+. In addition, the described drugs were tested in the context of antinematode therapy on *C. elegans*. The results show that the water-soluble conjugates of G4P, G4F, G4L, and G4PFL actively entered the tested cells via endocytosis due to the positive zeta potential (between 13.57–40.29 mV) and the nanoparticle diameter of 99–138 nm. The conjugates of G4P and G4PFL at nanomolar concentrations were the most active, and the least active conjugate was G4F. The tested conjugates inhibited the proliferation of HaCaT and A549 cells; in glioma cells, cytotoxicity was associated mainly with cell damage (mitochondria and membrane transport). The toxicity of the conjugates was proportional to the number of drug residues attached, with the exception of G4L; its action was two- and eight-fold stronger against glioma and keratinocytes, respectively, than the equivalent of lapatinib alone. Unfortunately, non-cancer HaCaT cells were the most sensitive to the tested constructs, which forced a change in the approach to the use of ER and EGFR receptors as a goal in cancer therapy. In vivo studies on *C. elegans* have shown that all compounds, most notably G4PFL, may be potentially useful in anthelmintic therapy.

Keywords: paclitaxel; fulvestrant; lapatinib; glycidylated PAMAM G4 dendrimer; U-118 MG glioma; A549 NSCLC; HaCaT keratinocytes; *Caenorhabditis elegans*; proliferation and viability assays; cellular uptake



Citation: Uram, Ł.; Wróbel, K.; Walczak, M.; Szymaszek, Z.; Twardowska, M.; Wołowicz, S. Exploring the Potential of Lapatinib, Fulvestrant, and Paclitaxel Conjugated with Glycidylated PAMAM G4 Dendrimers for Cancer and Parasite Treatment. *Molecules* **2023**, *28*, 6334. <https://doi.org/10.3390/molecules28176334>

Academic Editor: Claudiu T. Supuran

Received: 16 July 2023

Revised: 6 August 2023

Accepted: 22 August 2023

Published: 30 August 2023



Copyright: © 2023 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

1. Introduction

Today, cancer is a very serious problem in the world. According to statistics from the American Cancer Society (ACS), in 2023, lung and bronchus cancer will be the third most frequently diagnosed and the most deadly type of cancer in the USA [1]. Patients with stage I lung cancer have a five-year survival of 68.4%, whereas patients with stage IV lung cancer have a five-year survival of only 5.8%. Standard therapies for stages I–IIIA include surgical resection and then adjuvant systemic therapy, e.g., with cisplatin [2]. Despite the use of post-resection chemotherapy, about half of patients with stage IB cancer and roughly three-quarters of patients with stage IIIA lung cancer suffer from a metastatic disease [3]. Despite the lower incidence, glioblastoma multiforme is also characterized by high mortality. Glioblastoma multiforme (GBM) is a highly aggressive grade IV astrocytoma, according

to the World Health Organization, representing 15 to 20% of all primary intracranial neoplasms in adults [4]. Statistically, patients usually die within 15–16 months of being diagnosed, and treatment with available methods (surgical resection, radiotherapy and chemotherapy) allows 5% of patients to survive for 5 years from diagnosis [5]. Currently, the only widely available chemotherapeutic agent is temozolomide, but its effectiveness is far from satisfactory, with numerous side effects [6]. Therefore, the development of new therapies and drugs against these cancers remains an extremely important issue.

Glioblastoma multiforme is approximately 1.6 times more common in males than females and is therefore suspected to be related to sex hormone levels, particularly 17 β -estradiol (E2) [7]. Moreover, women have a better response to treatment than men, indicating that estrogen could possibly have a protective function [8]. It has been shown that cell proliferation, migration, and invasion are promoted by E2 in human glioma cells, with a concentration-dependent effect [9,10]. Estrogen acts on cells via estrogen receptors (ERs). The type of ER is also important. ER α signaling has been found to be associated with glioma progression, but ER β has anti-cancer effects [11]. Glia cells exhibit lower expression of ER α than that of low-grade gliomas, but high-grade gliomas decrease such expression. On the contrary, the expression of ER β is higher in glia cells than that in gliomas [8].

Some studies have proven that estrogen, interacting with its receptor, can stimulate the proliferation, apoptosis resistance, angiogenesis, migration and metastasis of lung cancer cells. ERs are widely expressed in the lung epithelium [12]. Estrogen causes the overexpression of pro-inflammatory proteins and ligands that promote tumor resistance. It is now recognized that non-small-cell lung cancer (NSCLC) is an ER-positive cancer. Estrogen receptor alpha (ER α) and beta (ER β) have been identified in both NSCLC cell lines and tissues. ER β is the predominant type of ER in NSCLC and is overexpressed in 60–80% of lung cancer tissues. The ER β protein has been presented at higher levels in lung cancer cells than in normal lung tissue from the same patients [13]. Estrogen receptor β might also impact the progression and invasion of NSCLC, although the mechanism still requires elucidation [14]. Therefore, it seems right to investigate the effectiveness of inhibitors of ERs in glioma and non-small-cell lung cancer therapy. One of the candidates for a potential anticancer agent is fulvestrant, which is commonly used in the treatment of metastatic hormone receptor-positive breast cancer. After binding to an ER, it blocks and degrades it and, as a consequence, inhibits estrogen signaling through the ER [15]. About 80% of breast cancers express ERs, with their survival and proliferation driven by estrogen acting as a ligand and binding to the ER, which is then translocated to the cancer cell's nucleus [16]. Unlike other selective estrogen receptor degraders (such as tamoxifen), fulvestrant almost completely inhibits estrogen signaling through the ER [17]. Hamilton et al. proved that fulvestrant reduces the mesenchymal features of lung cancer cells and sensitizes the cells to chemotherapy [18].

Another factor that is specific to many types of cancer, including GBM and NSCLC, is the epidermal growth factor receptor (EGFR). The EGFR is a member of the ERBB family of tyrosine kinase receptors (EGFR/ErbB-1, HER2/ErbB-2, HER3/ErbB-3, and HER4/ErbB-4) and is a trans-membrane glycoprotein, consisting of an extracellular ligand-binding domain and a cytoplasmic tyrosine kinase domain. The EGFR signaling cascade is a key regulating factor in cell proliferation, apoptosis, metastasis and angiogenesis, differentiation, division, survival, and cancer development [19,20]. The over-activation of EGFR is observed in many types of cancers, including head, neck, breast, lung, colorectal, prostate, kidney, pancreas, ovary, and brain cancers [21]. This phenomenon was also described in GBM and NSCLC [22,23]. The therapy of tumors with EGFR overexpression is disappointing; therefore, anti-EGFR agents are recommended in the first-line treatment [20] because EGFR activity may be controlled by binding to the tyrosine kinase domain [24]. EGFR is most amplified in GBM, among all receptor tyrosine kinases (57% of patients) [25]. This leads to overexpression of EGFR protein and increased tumorigenesis and progression of glioma [26]. However, in some cases, overexpression of EGFR was present without EGFR gene amplification [27].

Lapatinib is a reversible, first-generation inhibitor of EGFR type 1 (HER1) and type 2 (HER2), administered orally and approved for the treatment of breast cancer overexpressing HER2 in combination with capecitabine [28]. Some studies indicated that lapatinib enhances 5-aminolevulinic acid-mediated protoporphyrin IX fluorescence and photodynamic therapy response in human glioma cell lines [29]. Moreover, the addition of pulse high-dose lapatinib to standard therapy for newly diagnosed GBM was largely well tolerated and safe [30]. Satisfactory results in glioma therapy were also observed after the conjugation of lapatinib with nanoparticles. Lapatinib-incorporated lipoprotein-like nanoparticles significantly inhibit the growth of glioma U87 xenografts and were effectively taken up by glioma cells. The required cumulative dose of LNPs was only 5% compared to lapatinib alone [31]. Unfortunately, there is a report that lapatinib did not show significant activity in GBM patients in phase II/III clinical trials [32]. Human HER2 has emerged also as a therapeutic target of interest for non-small-cell lung cancer in recent years. HER2 alterations are present in 7–27% of de novo NSCLC and may serve as a resistance mechanism in up to 10% of EGFR-mutated NSCLC [33]. However, lapatinib as a single agent or combined with pemetrexed did not result in a sufficient antitumor response in NSCLC [34], but it is worth mentioning that lapatinib had a similar response rate to pemetrexed monotherapy [35].

Recent studies have shown an interaction between the EGFR pathway and ER signaling in lung adenocarcinoma; therefore, combined therapy with tyrosine kinase inhibitors and antiestrogen therapy is a promising solution. A combination of the ER antagonist and the EGFR tyrosine kinase inhibitor caused a decrease in cell proliferation and lung tumor growth in both in vitro and in vivo studies [36–39]. Thus, it is speculated that a similar effect may be achieved with combined therapy against glioblastoma multiforme since it is known that cells of this malignant tumor manifest changes in the ER and EGFR.

Another drug used in the treatment of NSCLC is paclitaxel, which facilitates microtubule polymerization and disturbs cellular functions, especially normal cell division, and causes cell apoptosis [40]. Paclitaxel is administered alone or with platinum compound in advanced NSCLC [41,42]. Moreover, this drug has clinically relevant activity in heavily pretreated small-cell lung cancer [43]. Low-dose weekly paclitaxel was active and well tolerated as second-line chemotherapy in a non-selected patient population with advanced NSCLC [44]. Furthermore, it is known, that paclitaxel shows anticancer effects against NSCLC by activating apoptosis through enhancing ROS generation, inducing cell cycle arrest, and suppressing EGFR/PI3K/AKT/mTOR signaling pathway [45]. Paclitaxel is also a potential candidate for anti-glioma therapy with 1400-fold lower IC₅₀ than the most used temozolomide in in vitro studies. Several clinical trials evidenced that paclitaxel caused minimal responses in glioma treatment, due to the presence of a protective structure in the brain—the blood–brain barrier (BBB) [46–50]. Moreover, the multidrug resistance limits the clinical applications of paclitaxel drug, due to the presence of P-glycoprotein in NSCLC cell membrane and BBB [40]. One possible approach is to use a vehicle like PAMAM dendrimers that deliver paclitaxel, fulvestrant, and lapatinib across BBB. PAMAM dendrimers are symmetric, hyperbranched, polymeric macromolecules with polyvalent cores and dendritic branches, with well-defined nano-sized globular structures. PAMAMs are promising vehicles for efficient anticancer drug delivery. Due to the high-density surface functionalities, PAMAMs allow for the attachment of suitable ligands for cancer targeting, imaging, and therapy. Moreover, they enhance the solubility and bioavailability of carried drugs. The nano-size and ability of PAMAMs to interact with plasma proteins drive the passive targeting through the enhanced permeability and retention effect (see review [51]). In the case of brain tumors or metastases, anticancer therapeutics often fail, mainly due to the inability to cross the BBB. As a result, cancer cell drug uptake and drug resistance occur [52]. In order to eliminate the toxicity of PAMAM dendrimers and increase their permeability, their amino surface groups are hydroxylated with PEG or glycidol [53,54].

In this study, we used non-toxic, glycidylated fourth-generation (G4) PAMAM dendrimers as the carrier for paclitaxel (P), fulvestrant (F), and/or lapatinib (L). We have synthesized four PAMAM conjugates, G4P, G4F, G4L, and G4PFL, and studied their effi-

ciency in anticancer therapy against ER-positive and EGFR-positive A549 non-small-cell lung cancer and U-118 MG glioma cells, and comparatively with ER-positive and EGFR-positive immortalized, non-cancerous human keratinocytes (HaCaT). We hypothesized that the G4PFL conjugate components would have an additive or even synergistic effect.

Potential anticancer therapeutics require also characterization of toxicity and mutagenicity *in vivo*. The use of vertebrate-based models should be preceded by tests on invertebrate animals. The nematode *Caenorhabditis elegans* is a very attractive animal model to characterize the properties of anticancer therapeutics. The small size, ease of handling, and possibility of genetic modification of *C. elegans* provide a sophisticated *in vivo* platform that combines the technical advantages of a microorganism with the greater biological complexity of a multicellular organism [55,56]. *C. elegans* has been used successfully to test the activity of EGFR tyrosine kinase inhibitors [57], selective estrogen receptor degraders (SERDs) [58], and microtubule-stabilizing drugs [59]; therefore, the biological activity of the synthesized constructs was studied also *in vivo* on *C. elegans*. Additionally, its usefulness as a model for mixture toxicity testing was confirmed [60].

2. Results and Discussion

2.1. Syntheses and Characterization of Dendrimer Conjugates

The conjugates of three anticancer drugs, paclitaxel (P), fulvestrant (F), and lapatinib (L), were obtained by attachment of functionalized drugs by amide bonds into primary amine groups of PAMAM G4 (Figures 1 and S1A–C).

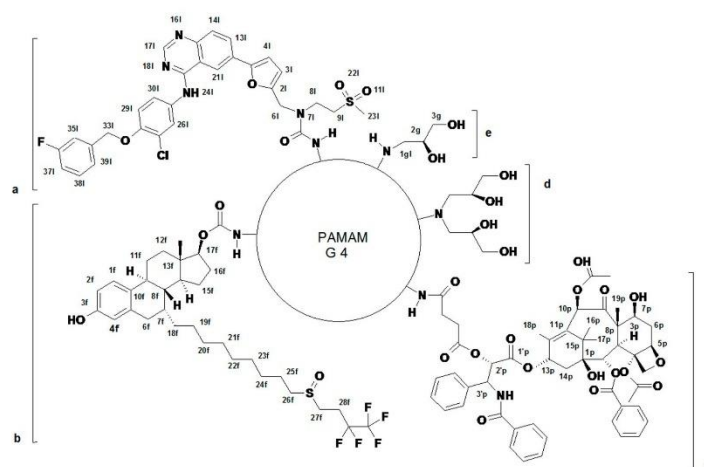


Figure 1. The schematic illustration of FITC single labeled PAMAM G4 conjugates with P (c), F (b), and L (a), covered with *R*-glycidol (d,e). The formula of fluorescein attached to G4 core is omitted for clarity. G4P: a, b = 0; c = 4; d = 50; e = 9; G4F: a = 0; b = 13; c = 0; d = 14; e = 36; G4L: a = 13; b, c = 0; d = 35; e = 15; G4PL: a = 10; b = 0; c = 4; d = 49; e = 0; G4PF: a = 0; b = 10; c = 4; d = 49; e = 0; G4PFL: a = 11; b = 11; c = 4; d = 37; e = 0. For details on synthetic pathways, see also Figure S1A–C.

Thus, P was converted into 2'-O-succinate (P-suc) as described in [61] and the latter was activated with 1-methyl-2-chloropyridin iodide and linked into PAMAM G4 by an amide bond to get G4 substituted with average four P-suc residues (G4^{4P}) as described before [61] (Figure S1A). The conjugate was labeled with one FITC and the remaining primary amine groups were converted by the addition of *R*-glycidol to obtain G4^{4P109gl}. This conjugate was characterized by the ¹H NMR spectroscopy (Figure 2A).

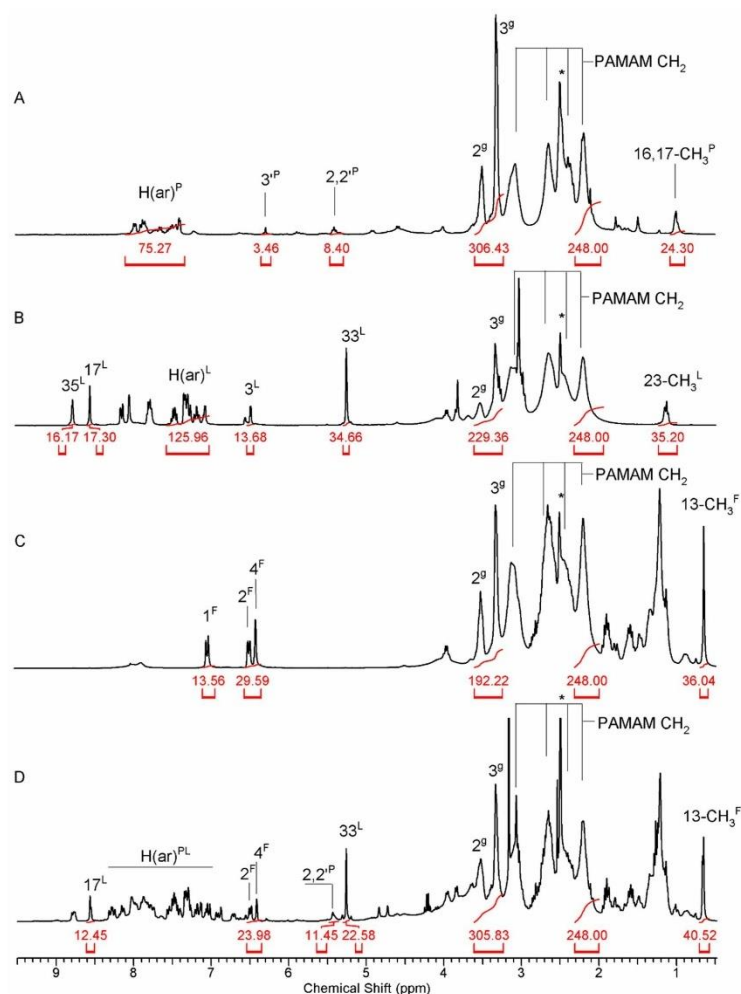


Figure 2. The ^1H NMR spectra of the conjugates in DMSO-d_6 : (A)— $\text{G}_4^*4\text{P}109\text{gl}$, (B)— $\text{G}_4^*13\text{L}85\text{gl}$, (C)— $\text{G}_4^*13\text{F}64\text{gl}$, (D)— $\text{G}_4^*4\text{P}11\text{F}11\text{P}74\text{gl}$. For atom numbering see Figure 1. The residual $\text{CD}_3\text{SOCD}_2\text{H}$ resonance is labeled with asterisk.

The conjugates of L and F with PAMAM G4 were obtained from L-N(7)-(p-nitrophenylcarbonate) and F-O(17)-(p-nitrophenylcarbonate), which were adequate to react quantitatively with primary amine groups of single FITC-labeled PAMAM G4 (G_4^*), as described previously for PAMAM G3 [62] (Figure S1B,C). Thus, high-substituted conjugates were obtained, which were further converted by *R*-glycidylation into $\text{G}_4^*13\text{L}85\text{gl}$ and $\text{G}_4^*13\text{F}64\text{gl}$ derivatives. The stoichiometry of conjugates was determined by the ^1H NMR spectroscopy (Figure 2B,C, respectively) by comparing the intensity of the PAMAM G4 resonance at 2.2 ppm (corresponding to [248H] internal reference) and resonances of 3^{P} -H ([4H]) in the case of $\text{G}_4^*4\text{P}109\text{gl}$, 3^{L} -H ([13H]) in the case of $\text{G}_4^*13\text{L}85\text{gl}$, and 1^{F} -H ([13H]) in the case of $\text{G}_4^*13\text{F}64\text{gl}$. The

number of 2,3-dihydroxypropyl substituents (gl) was determined by the integration of 2^{gl} and 3^{gl} resonances in the 3.3–3.6 ppm region.

The ternary conjugate, containing 4P, 11L, and 11F residues was obtained from $G4^{*4P}$ conjugate by reaction with NPCF-activated equimolar mixture of L and F followed by *R*-glycidylation. The stoichiometry of the product, $G4^{*4P11F11P74gl}$ was determined by the ^1H NMR spectroscopy, while spectral assignment was performed with corresponding ^1H - ^{13}C heteronuclear HMQC and HMBC NMR experiments (Figure 2D and Figure S2D).

For further discussion the abbreviations for primary, secondary, and tertiary conjugates were simplified as follows: $G4P-(G4^{*4P109gl})$, $G4F-(G4^{*13L85gl})$, $G4L-(G4^{*13L85gl})$, $G4PF-(G4^{*4P10F98gl})$, $G4PL-(G4^{*4P10L98gl})$, and $G4PFL-(G4^{*4P11F11P74gl})$ as described in the first column of Table 1.

Table 1. The composition and some properties of the conjugates of PAMAM G4 with lapatinib (L), fulvestrant (F), paclitaxel (P), and glycidol (gl). Solutions in $\text{dms}\text{-d}_6$. * means one equivalent of FITC attached through thiourea bond. Size and zeta potential were determined by DLS method. SD stands for standard deviation.

Conjugate	MW [kDa]	Size (SD) [nm]	Polydispersity Index PDI (SD)	ζ (SD) [mV]
$G4^{*126gl}$ G4	19.1	5.12 (0.25)	0.080 (0.002)	4.35 (0.28)
$G4^{*4P109gl}$ G4P	26.4	99.20 (7.28)	0.134 (0.016)	13.57 (0.43)
$G4^{*13F64gl}$ G4F	27.6	138.23 (6.24)	0.155 (0.022)	38.02 (0.54)
$G4^{*13L85gl}$ G4L	28.8	113.13 (4.64)	0.112 (0.014)	40.29 (0.74)
$G4^{*4P10L98gl}$ G4PL	31.7	95.20 (4.46)	0.125 (0.010)	19.92 (0.53)
$G4^{*4P10F98gl}$ G4PF	32.0	113.41 (5.48)	0.128 (0.015)	29.29 (0.72)
$G4^{*4P11F11L74gl}$ G4PFL	37.5	105.47 (5.39)	0.159 (0.018)	34.33 (0.65)

The primary, secondary, and tertiary conjugates were well soluble in DMSO-d_6 (up to 5 mM concentration). The hydrodynamic diameter of obtained materials was determined for 1 μM aqueous solutions in water and in phosphate buffer pH 5. The diameter of single-FITC labeled perglycidylated carrier ($G4^{*126gl}$, Table 1) without attached hydrophobic drug molecules was found ca 5 nm in water, which is ca 0.5 nm larger than for commercially available PAMAM G4. We found that all conjugates were associated with water (Table 1).

The size of nanoparticles was at least one order of magnitude larger than expected for mono-molecular dispersion (about 5 nm diameter). The number-averaged diameters of conjugates ($d(N)$) are listed in Table 1. The volume-averaged diameters were significantly larger due to relatively high polydispersity ($\text{PDI} > 0.1$) (Table S1). Furthermore, the size of nanoparticles in phosphate-buffered dispersion pH 5 was different, presumably due to the protonation of PAMAM G4 internal tertiary amine groups. Eventually, all associates of conjugates indicated highly positive zeta potential at pH 7 (Tables 1 and S1), which grew even higher at pH 5 (Table S1). The change of nanoparticle size in pH 5 was observed particularly in the case of G4L and G4F, which showed $\text{PDI} > 0.23$ and complicated pattern of $d(V)$ ranging from 40 to 1000 nm particles (Table S1a,b). Generally, $d(V)$ diameters were considerably higher than $d(N)$ diameters for all conjugates (Figure S3). Another parameter showed regular behavior, namely zeta potential, which was considerably higher in acidic (pH 5) conditions than in neutral water (Table S1, Figure S4). This was attributed not only

to the protonation of macromolecules in nanoparticles, but also to different nanoparticle sizes. The size of associates was stable (Figure S5A–C) in water. However, in the case of G4F further association of macromolecules upon pH decrease from 7 to 5 was striking (Figure S5D).

2.2. Cellular Accumulation

Three cell lines were selected as a therapeutic target for the glycidylated PAMAM G4 conjugates with paclitaxel, fulvestrant, and/or lapatinib: A549 non-small-cell lung cancer, U-118 MG glioma cells, and comparatively non-cancerous, immortalized human keratinocytes. It was reported that A549 and HaCaT cells express estrogen receptors: ER α and ER β [63,64]. EGFR is overexpressed in A549 cells [65] and expressed in HaCaTs [66]. Although there is a lack of information concerning ER expression in U-118 MG glioma cells, in cytogenetically similar U-138 MG glioma, ER expression was identified [67]. U-118 MG glioma cells express EGFR (about 85% of cells) and HER2 (about 20% of cells) [68]. Therefore, these cell lines were proper models of cancerous or non-cancerous cells for testing.

One of the most important properties of a drug carrier is its ability to effectively penetrate cells. As we showed earlier, PAMAM dendrimers flanked with *R*-glycidol residues were non-toxic up to 300 μ M concentration and efficiently penetrating carriers, with selectivity to cancer cells (SCC-15) against HaCaTs [53]. Physicochemical properties, such as particle size, shape, and surface charge, play a key role in the cellular uptake of nanoparticles [69]. Fluorescently labeled G4P, G4F, G4L, and G4PFL were taken up and accumulated inside all tested cell lines in the cytoplasmic area, but not in nuclei already at low, nanomolar concentrations (Figures 3 and 4).

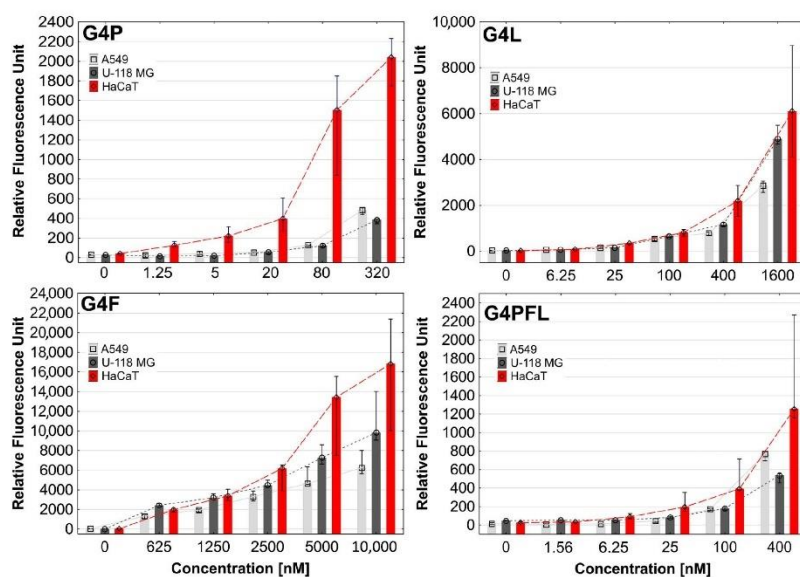


Figure 3. Cellular accumulation of G4P, G4F, G4L, and G4PFL FITC-labeled PAMAM dendrimer conjugates in A549, U-118 MG, and HaCaT cells after 48 h of incubation. Results were expressed as relative fluorescence units for the same number of cells. Bars indicate medians, whiskers first and third quartile.

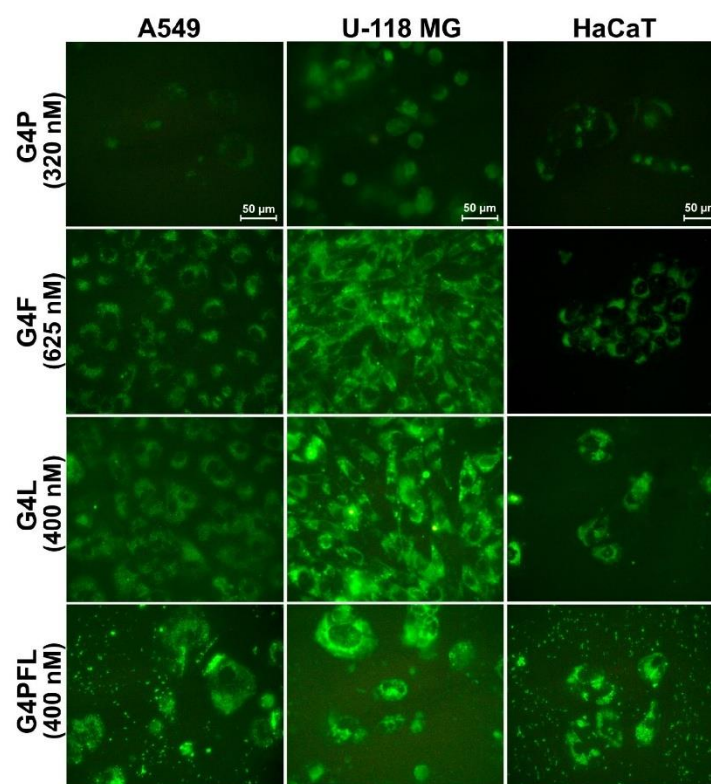


Figure 4. Images from fluorescence microscopy presenting cellular accumulation of fluorescently labeled G4P, G4F, G4L, and G4PFL conjugates after 48 h of incubation with similar values of nanomolar concentrations (described in parentheses). Green signal indicates FITC-labeled conjugates. Scale bar is equal to 50 μm .

An important factor affecting the ability of nanoparticles to penetrate cells is the value of their zeta potential [69]. Nanoparticles should have a positive zeta potential to penetrate the negatively charged cells efficiently [70]. DLS measurements showed that the tested nanoparticles had positive zeta potentials in the range of 13.57–40.29, which is proper for active penetration into the cells. It is worth mentioning that the glycidylated PAMAM G4 dendrimer average diameter is equal to 6.21 nm. All studied conjugates had a diameter in the range of 99.20–138.23 nm; therefore, we concluded that they were associated with water, which was probably a factor limiting their uptake.

Among all cell lines, HaCaT cells showed the highest uptake and accumulation of all conjugates (Figure 3). A slightly weaker degree of absorption was observed in cells from lines A549 (G4P and G4PFL) and U-118 MG (G4F and G4L). Due to the use of different concentrations of drugs, it is difficult to compare the absorption of individual conjugates. However, if we focus on the analysis of the fluorescence intensity of conjugates in the range of 320–625 nM concentrations (about 400 nM) (Figure 3), we can notice some patterns. Keratinocyte cells accumulated similar amounts of all conjugates used. G4F conjugate was stronger absorbed in glioblastoma than G4P and G4PFL, which may be related to

drug resistance and efflux, due to the presence of paclitaxel, since glioma cells express P-glycoprotein responsible for this phenomenon [71,72]. Similarly, non-small-cell lung cancer absorbed mainly G4F and least G4P.

In this study, we have used a glycidylated dendrimer, which was supposed to reduce the uptake of conjugates by HaCaT cells, compared to the tumor cells [53]. Differences in the degree of absorption of individual conjugates are difficult to explain, as they may be related to ER-mediated endocytosis [73] or EGFR-mediated endocytosis (mainly clathrin-mediated endocytosis) [74,75] and the processes of regurgitation by P-glycoprotein, which are present in the tested cell lines [72,76]. The possibility of penetration of the studied nanoparticles by clathrin-mediated endocytosis is confirmed by the fact that it concerns nanoparticles with a diameter of approx. 100–150 nm. This was the diameter of the aggregates of all studied conjugates (Table 1). Additionally, fast endophilin-mediated endocytosis (FEME) was recently discovered, which is a non-constitutive process that is triggered upon activation of specific receptors including EGFR, and the conjugate of paclitaxel to human albumin is internalized by the cells through caveolae-mediated endocytosis [77].

2.3. Cytotoxicity

Cytotoxicity of studied compounds was estimated with two different tests—neutral red assay (NR) and tetrazolium salt assay (XTT). The more sensitive NR assay indicated that among drugs alone the most effective in cell killing was paclitaxel with the IC_{50} equal to 50.35, 55.56, and 2.53 nM for A549, U118 MG, and HaCaT cells, respectively (Figure 5).

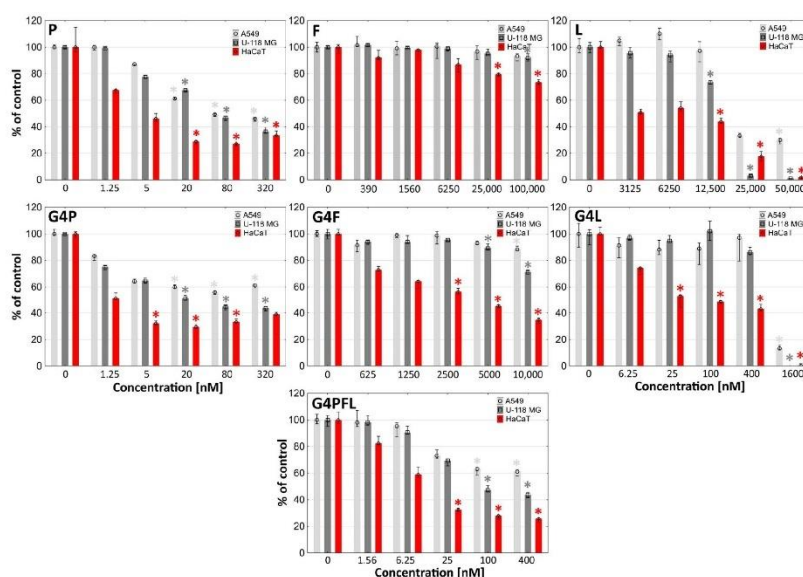


Figure 5. Cytotoxicity of paclitaxel (P), fulvestrant (F), lapatinib (L), and their conjugates with glycidylated PAMAM dendrimers G4P, G4F, G4L, and G4PFL against human cells: non-small-cell lung carcinoma (A549), glioma cells (U-118 MG), and immortalized keratinocytes (HaCaT) after 48 h incubation, estimated with an NR assay. Cell viability is expressed as median of a percent against non-treated control (control expressed as 100%). The whiskers are the lower (25%) and upper (75%) quartile ranges. * $p \leq 0.05$; Kruskal–Wallis test (against non-treated control).

Lapatinib showed a weaker effect with meaningly higher values of IC₅₀ coefficients equal to 1.67, 14.9, and 6.2 μM (Table 2). Fulvestrant was not toxic to any of the tested cell lines up to 100 micromolar concentration, which was described by others for A549 cells [78].

Table 2. The half maximal inhibitory concentration (IC₅₀) values determined following 48 h of treatment of A549, U-118 MG, or HaCaT cells with paclitaxel, fulvestrant, lapatinib, and their conjugates with glycidylated PAMAM G4 dendrimers G4P, G4F, G4L, and G4PFL: *p*—concentration of introduced P; *f*—concentration of introduced F; *l*—concentration of introduced L. The values of IC₅₀ were calculated with AAT Bioquest IC₅₀ calculator [79].

	IC ₅₀ [nM] NR Assay		
	A549	U-118 MG	HaCaT
Paclitaxel	50.35	55.56	2.53
Fulvestrant	≥100,00 *	≥100,000 *	≥100,000 *
Lapatinib	16,701.61	14,878.63	6150.48
G4P	≥320 * ≥1280 * <i>p</i>	25.28 101.12 <i>p</i>	1.63 6.52 <i>p</i>
G4F	≥1000 * ≥130,000 * <i>f</i>	≥10,000 * ≥130,000 * <i>f</i>	2927.15 38,052.97 <i>f</i>
G4L	1324.05 17,212.75 <i>l</i>	54,395 6527.4 <i>l</i>	57.87 765.31 <i>l</i>
G4PFL	≥400 * ≥400 * <i>p</i> ≥4400 * <i>fl</i>	78.70 314.80 <i>p</i> 865.70 <i>fl</i>	9.53 38.12 <i>p</i> 104.83 <i>fl</i>
	IC ₅₀ [nM] XTT Assay		
G4P	≥320 ≥1280 * <i>p</i>	3.14 12.56 <i>p</i>	0.99 3.96
G4F	>20,000 >260,000 <i>f</i>	6062.64 78,814.32 <i>f</i>	1282.15 16,667.95 <i>f</i>
G4L	3885.91 50,516.83 <i>l</i>	1147.86 14,922.18 <i>l</i>	76.90 999.70 <i>l</i>
G4PFL	>1600 >6400 <i>p</i> >17,600 <i>fl</i>	9.45 37.80 <i>p</i> 103.95 <i>fl</i>	2.00 8.00 <i>p</i> 22.00 <i>fl</i>

* cell viability was over 50% in tested range concentration. Lower IC₅₀ values of appropriate conjugates are marked in red (comparison of NR and XTT assay).

Obtained results of toxicity are rather consistent with those reported by others. IC₅₀ of paclitaxel for A549 and U-118 MG cells after 48 h incubation was equal to 11.0 and 21.1 nM, respectively [80,81]. IC₅₀ of fulvestrant for A549 after 48 h incubation was over 10,000 nM [78]. In the case of lapatinib, IC₅₀ was in the range of 5000–10,000 nM for A549 (48 h incubation), 8000 nM for U-118 MG, and 200 nM for HaCaT (72 h incubation) [82–84].

The degree of absorption of the tested conjugates was reflected in the toxicity induced by them in particular cell types. The most sensitive HaCaT cells accumulated the highest level of all dendrimer conjugates. Glioma cells took mainly G4L and G4F conjugates, which caused a stronger effect than in lung cancer. A549 cells were more destroyed than glioma cells due to the highest uptake of G4P and G4PFL conjugates. One of the desired effects of dendrimers is to enhance the action of drugs attached to them. In our study, the binding of 13 residues of F to the glycidylated PAMAM G4 dendrimer resulted in an approximately 2-fold decrease in IC₅₀ values for HaCaT dermal keratinocytes (comparing the concentration of introduced drugs). Such an effect was not observed in the A549 cell line, where a decrease in cell viability under 50% was not noticed. The paclitaxel-containing

conjugate did not induce a decrease in cell viability with increasing concentrations in HaCaT and A549 cells. This phenomenon was described previously as characteristic of paclitaxel [85].

In the case of lapatinib conjugate, its action was 2- and 8-fold stronger against glioma and keratinocyte cells, respectively, than the equivalent of lapatinib alone (Figure 5 and Table 2). Substitution of modified G4 PAMAM dendrimer vehicle with 4 residues of P resulted in about 2-fold lower attenuation of the conjugate effect compared to the drug alone for HaCaT and U-118 MG cell lines, and even 25 fold for A549 cells (Figure 4). In the remaining cases, the effect of conjugates was proportional to the concentration of the introduced drugs.

We also assumed that G4PFL conjugate containing all three tested drugs would enhance the therapeutic effect. The G4PFL compound was more efficient in killing the tested cells than the G4F and G4L conjugates, but less than G4P. It can therefore be presumed that its effectiveness came mainly from the attached paclitaxel residues.

The lower activity of G4PFL than G4P may be caused by the differences in diameter and physico-chemical properties of both conjugates. G4PFL contains as many as 26 molecules of drugs with highly hydrophobic properties on the surface, which significantly cover glycidol residues, which are responsible for the effect of selectivity to cancer cells, and have a high nanoparticle diameter of 105.47 nm. The nanoparticles of G4P are smaller (99.20 nm in diameter) and can penetrate more easily than those of G4PFL. The G4F with the largest diameter (138.23 nm) penetrated weakest. However, the G4L conjugate with a diameter of about 113.13 nm was not more potent than G4PFL. It is therefore necessary to conclude that the activity of the tested conjugates is related to the combined effect of their nanoparticle size and the activity of the drugs attached to them.

The more sensitive NR assay measures lysosomal integrity, which is the indicator of cell health [86]. The second assay used, the reduction of tetrazolium salts (XTT), evaluates the reducing properties of trans-plasma membrane electron transport including the activities of mitochondrial oxidoreductases; therefore, it is a good indicator of the mitochondria condition [87]. The results obtained with the XTT assay revealed a similar toxicity pattern as the NR assay (Figure 6).

Comparing the IC_{50} values, it can be observed that the conjugate with lapatinib (G4L) more strongly disturbed the condition of lysosomes and cell membranes, while the conjugates with paclitaxel and fulvestrant affected the dysfunction of mitochondria mainly by changing the activity of mitochondrial oxidoreductases (Table 2).

2.4. Proliferation

Microscopic observations during NR assay indicated that studied conjugates not only destroyed and killed cells, but also inhibited their proliferation. In order to confirm the anti-proliferative effect of the conjugates used, a proliferation test consisting of measuring the amount of DNA, which is proportional to cell number, was performed [88]. Paclitaxel, fulvestrant, and lapatinib are well-established anti-proliferative agents [45,89,90]. All studied cell lines were incubated for 72 h with G4P, G4F, G4L, and G4PFL solutions to test their anti-proliferative effects, since doubling time of A549, U-118 MG, and HaCaT was equal 20, 35, and 24 h, respectively.

The greatest reduction in proliferation was observed in HaCaT cells, where G4P was most active, causing an 80% decrease in cell number from 1.25 nM concentration compared to the untreated control. The G4PFL and G4L performed lower activity, and G4F was the weakest one (Figure 7).

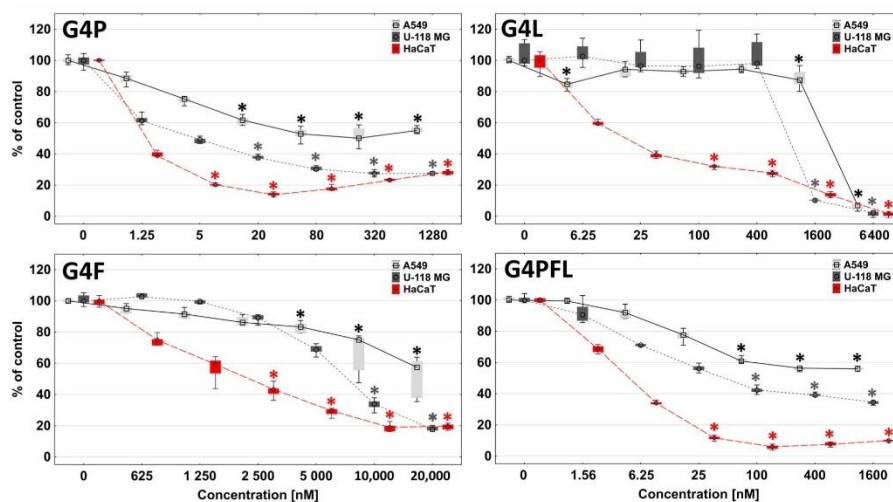


Figure 6. The influence of G4P, G4F, G4L, and G4PFL on A549, U-118 MG, and HaCaT on cell viability after 48 h treatment, estimated with an XTT assay. Cell viability is expressed as medians of a percent against non-treated control (control expressed as 100%). The boxes are the lower (25%) and upper (75%) quartile ranges, whiskers indicate minimum and maximum. * $p < 0.05$; Kruskal–Wallis test (against non-treated control).

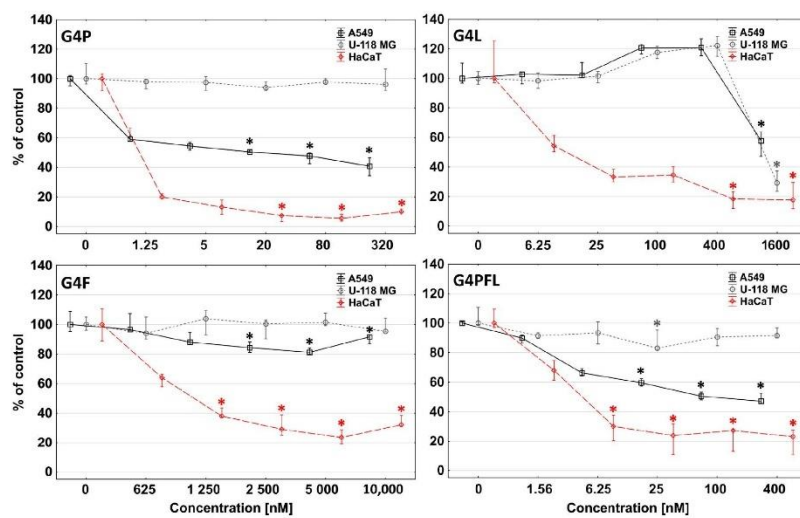


Figure 7. Anti-proliferative action of G4P, G4F, G4L, and G4PFL against A549, U-118 MG, and HaCaT cell lines after 72 h of incubation. Results are presented as medians (percentage of non-treated control). Whiskers indicate the lower (25%) and upper (75%) quartile ranges. * $p < 0.05$, Kruskal–Wallis test (against non-treated control).

Lung adenocarcinoma A549 cells were significantly less inhibited, with G4P showing the highest activity, followed by G4PFL, G4L, and G4F, respectively. The G4L conjugate even increased the proliferation up to 20% at 100 and 400 nM concentrations. The phenomenon of proliferation promotion induced by lapatinib was described before for breast cancer cells [91]. The U-118 MG glioma cells did not respond to either G4P or G4F in the tested concentration range. G4PFL inhibited slight proliferation only at 25 nM concentration by 20%. G4L stopped cell growth to nearly zero already from a high 1600 nM concentration, and a similar pattern of activity to that of A549 cells was seen (Figure 7).

In conclusion, the toxicity profile of all tested conjugates against HaCaT and A549 cells was connected rather with the anti-proliferative action of the studied compound. Meanwhile, in glioblastoma, cytotoxicity was associated with cell damage via impaired mitochondrial activity and ATP levels as demonstrated in the NR and XTT assays. Only the cytotoxic effect of G4L was anti-proliferative (compare Figures 5–7).

2.5. Effect on the Worm Survival

Today, anthelmintic drugs are considered to be potentially repurposed anticancer drugs. For example, it was indicated that flubendazole inhibits tubule polymerization and angiogenesis stimulate apoptosis, ferroptosis, autophagy, and cancer stem-like cell killing and tumor degeneration [92]. The opposite effect is also possible—anticancer drugs (especially those without too strong side effects) may become anthelmintic agents in lower doses. *Caenorhabditis elegans* responds to estrogenic hormones and possess estrogen receptor [93,94]. Also, EGFR receptors were found in *C. elegans* [95,96]. Therefore, it seems that PAMAM G4 conjugates with estrogen receptor degrader (fulvestrant) and epidermal growth factor receptor inhibitor (lapatinib) may potentially be a way to create the anthelmintic drugs.

Caenorhabditis elegans viability was assessed after seven days of incubation with G4P, G4F, G4L, and G4PFL. Results indicated that all used conjugates were highly toxic at studied concentrations. The lower toxic effect was observed after G4P treatment with LC₅₀ over 24 µM concentration (Table 3).

Table 3. The half maximal lethal concentration (LC₅₀) values determined following 7 days treatment of *Caenorhabditis elegans* with G4P, G4F, G4L, and G4PFL. Presented values were calculated with AAT Bioquest LC₅₀ calculator [79].

Compound	LC ₅₀ [µM]
Mebendazole	4.00
G4P	>24.00
G4F	12.50
G4L	14.80
G4PFL	6.75

Seven days of incubation caused a statistical decrease of nematode viability of over 40% at 6 and 12 µM concentrations. The number of viable individuals did not differ drastically between used concentrations of G4P, with the exception of 12 and 6 µM concentrations, where sharp decreases in viability occurring on the second and third day of incubation were observed, respectively (Figure 8).

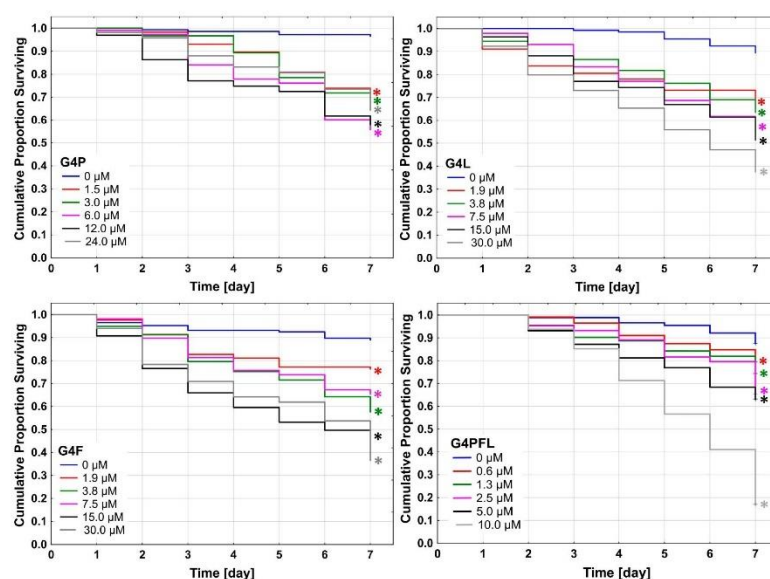


Figure 8. The Kaplan–Meier survival curves of *C. elegans* after 7 days of incubation with G4P, G4F, G4L, and G4PFL. Results are presented as cumulative proportion surviving. Statistically significant differences against DMSO-treated control obtained in Gehan’s Wilcoxon test are marked with asterisks ($p \leq 0.05$) in the colors corresponding to the tested concentrations.

The G4F and G4L decreased the *C. elegans* viability stronger, with LC_{50} equal to 12.50 and 14.80 μM , respectively. The most toxic concentration of fulvestrant was 15 μM during six days of observation, with the highest mortality at 30 μM concentration of G4F on the last day of the experiment. G4L induced lowering of nematode viability with increasing drug concentrations. The highest drug concentration (30 μM) caused a decrease in viability to 37.5% after 7 days of incubation. The G4PFL was the most toxic conjugate with 6.75 μM LC_{50} after seven days of incubation, and its toxicity was only slightly weaker than a common anthelmintic drug, mebendazole ($\text{LC}_{50} = 4.0$ μM). The highest, 10 μM concentration of conjugate containing all three used drugs caused a lowering of the *C. elegans* viability to below 20% (Figure 8). Thus, an additive effect of the drugs attached to the G4PFL multi-component conjugate can be seen.

Morphological and behavioral changes during observation were also noticed in the case of all used conjugates, which were the most visible in the group treated with G4P, and the least for G4F. Most often, the degradation and deformation of internal organs, as well as a reduction of nematode motility sometimes similar to convulsions were observed. In the G4P group, degradation occurred mainly on the side of the head and the nerve ring. In G4F degradation, it was more frequent from the tail side. G4L (at 7.5 μM and 30 μM concentrations) deformed cuticle and internal organs. These changes are visible for the most part throughout the body of the nematodes. In addition, the nematode body seemed to shrink inside the cuticle, and a molting process was also observed (Figure 9).

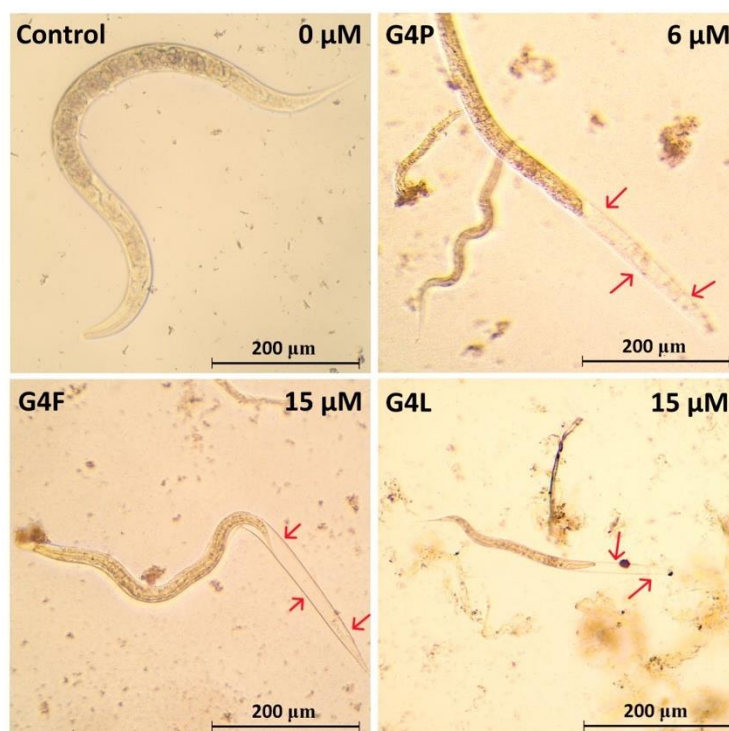


Figure 9. Morphology of *C. elegans* incubated for 7 days with glycidylated G4 PAMAM dendrimers. Red arrows show shrunk and molting individuals (cuticular molt). A decrease in body length of approximately 30% in the conjugate-treated groups in comparison to non-treated control is also visible.

It can also be assumed that shrinking was part of molting. This was proven by observing the same individual for two consecutive days. On the first day, shrinkage was visible, but on the next day, there was no cuticle, which had already separated from the nematode's body. This process should not take place at this stage of a nematode's life and probably was caused by conjugates since adult nematodes do not molt [97].

All studied conjugates caused a significant reduction of nematode length for about 1.3–1.7 fold. The body size of nematodes depends on genetic and environmental factors [98]. Post-larval *C. elegans* size is related to the process of endoreduplication that occurs in the hypodermis [99]. Mature *C. elegans* continues to grow in the absence of cell divisions [100]. It can be concluded that the tested drugs impact the pathway associated with cell growth, by degrading the epidermis and affecting the hypodermis. Nematode cuticles mostly consist of collagen (more than 80%) [101]. It has been shown that epidermal collagen genes can act as positive regulators, dose-dependent regulators, and negative regulators of body size [102]. In connection with the damage to the cuticle, which was observed, disruption of epidermal gene expression may cause inhibition of *C. elegans* growth.

Conclusions: Obtained conjugates efficiently penetrated all tested cells at relatively low concentrations, despite the fact that they formed associates. Due to their properties and presence of glycidol, they have the potential to become drugs in the treatment of

brain tumors, not only such as glioblastoma, but also lung cancer, which has the ability to metastasize to the area of the central nervous system.

The activity of the tested G4P, G4L, and G4PFL conjugates was high already at nanomolar concentrations, but targeting them to the tumors expressing ER or EGFR destroyed not only tumor cells, but also non-tumorigenic ones, showing the presence of these receptors. Therefore, not only the desired effects, but also the side effects of such therapy should be considered.

The most promising seems to be the G4L conjugate, which showed 2- and 8-fold higher toxicity against glioma and HaCaT cells, respectively, than the equivalent of lapatinib alone. The tested conjugates (especially G4PFL) could be also considered for anthelmintic therapy since they caused significant damage and mortality to *C. elegans*—model nematodes for these diseases.

3. Materials and Methods

3.1. Dendrimer Synthesis and Characterization

All the chemicals used during the synthesis of PAMAM G4 dendrimer and its conjugates were purchased from Merck KGaA (Darmstadt, Germany). PAMAM G4 dendrimer was obtained at a 2 millimolar scale according to the procedure published by Tomalia et al. [103] and stored as a 15 mM solution in methanol to obtain conjugates with fulvestrant, paclitaxel, and lapatinib (AmBeeD, Arlington Hts, IL 60004, USA). Further, 4-nitrophenyl chloroformate (NPCF), 2-fluorescein isothiocyanate (FITC), 4-dimethylaminopyridin (DMAP), and 1-methyl-2-chloropyridinium iodide (pyI) were purchased from Merck KGaA (Darmstadt, Germany). Spectra/Por® 3 RC dialysis membrane (cellulose, MW_{cutoff}—3.5 kDa) was provided by Carl Roth GmbH & Co., KG (Karlsruhe, Germany).

3.1.1. Spectroscopy

The ¹H, ¹³C NMR 1D, and 2D spectra (¹H-¹H COSY and ¹H-¹³C HSQC and HMBC) were recorded with Bruker 300 MHz instrument (Rheinstetten, Germany).

3.1.2. Conjugate Size and ζ Potential

Dynamic light scattering (DLS) and ζ potential of PAMAM conjugates were measured at pH 5 (in 0.05 M acetate buffer) and in water using Zetasizer Nano ZS instrument (Malvern, UK) at the concentration of 1 mg/mL (ca 0.05 mM solutions), as previously described [62].

3.2. Syntheses of Conjugates

3.2.1. Conjugates of Paclitaxel (P), Lapatinib (L), and Fulvestrant (F) (Primary Conjugates)

In order to covalently attach P, L, and F the drugs were converted as follows: (a) 68.3 mg P (80 μmoles) was dissolved in 2 mL DMSO followed by the addition of 9.6 mg succinic anhydride (96 μmoles) in 100 μL pyridine. The mixture was heated at 60 °C for 12 h. Then, to this solution, 29.3 mg DMAP (240 μmoles) and 30.6 mg 2-chloro-1-methylpyridinium iodide (120 μmoles) were added while vigorously stirring and left for 4 h in darkness.

Then, activated paclitaxel succinate was added dropwise into 284.3 mg PAMAM G4 in 1 mL methanol. The mixture was left overnight at room temperature, transferred into a dialytic tube (cellulose; MW_{cutoff} = 3.5 kDa), and dialyzed for 3 days against water. The solution from the dialytic bag was transferred into the round bottom flask, water and other volatiles were removed on a rotary evaporator (pressure 10 mbar), and the solid residue was then dried for 12 h under 0.1 mbar pressure and characterized by the ¹H NMR spectroscopy. The macromolecular product was identified as G4 substituted with four P equivalents attached by an amide bond through a succinate linker, G4^{4P}. This product was further labeled with one equivalent of FITC (attached through thiourea bond) in methanol (5 mL) and then the remaining amine groups were reacted with *R*-glycidol (200 μL) at ambient temperature for 36 h. The final product was dialyzed and dried as before. Based on the ¹H NMR spectroscopy, the primary paclitaxel conjugate average stoichiometry corresponded to 4 succinate paclitaxel, 1 fluorescein, and 104 2,3-dihydroxypropyl residues,

G4*^{4P104gl}. The theoretical molecular weight for the G4*^{4P104gl} was 17.47 kDa. Yield: 151.8 mg (8.68 μ moles); 43.4% calculated for starting G4.

PAMAM G4 dendrimer was single labeled with FITC (G4*) at 100 μ molar scale and stored in methanol solution for further syntheses of primary and ternary conjugates.

Lapatinib and fulvestrant were both functionalized by condensation with acid chloride, NPCF, as described elsewhere [56]. Briefly, 116.2 mg L (200 μ moles) was dissolved in 4 mL CHCl₃ and 50 μ L pyridine. After dissolution of L 45.0 mg NPCF was added and the mixture was refluxed for 1 hr. Then, volatiles were removed under reduced pressure and the solid residue was dissolved in 1 mL DMSO. The N-7 functionalized L was added dropwise into 141.9 mg G4* (10 μ moles) in methanol (1 mL). The reaction mixture was left at 45 °C in darkness for 12 h and the product was worked up by dialysis followed by evaporation of volatiles. Then, the conjugate was dissolved in methanol (255.7 mg in 5 mL), 170 μ L of R-glycidol was added and the mixture was left at room temperature for 30 h. After dialytic purification and drying 247.8 mg of solid product was collected and identified as G4*^{13L60gl} by the ¹H NMR spectroscopy. The theoretical molecular weight for the G4*^{13L85gl} is 25.26 kDa. Yield: 247.8 mg (9.8 μ moles); 98% calculated per starting dendrimer.

Fulvestrant (121.4 mg; 200 μ moles) was dissolved in 2 mL CHCl₃ and 50 μ L pyridine; 44.3 mg NPCF (220 μ moles) was added into the solution and refluxed for 1.5 h. Afterward, volatiles were removed and the solid residue dissolved in 1 mL DMSO. This solution was added dropwise into the solution of 252 mg G4* (17 μ moles) and the mixture was left at 45 °C overnight. The conjugate was purified by dialysis, then dried and dissolved in methanol. To this solution, 170 μ L of R-glycidol was added and the mixture was left at room temperature for 30 h. Then, the mixture was dialyzed against water as previously, the solid residue was dried under reduced pressure and the product was characterized by the ¹H NMR spectroscopy as G4*^{13F64gl} (theoretical MW = 30.0 kDa). Yield: 279.2 mg 9.32 μ moles; 54.8%.

3.2.2. Binary and Ternary Conjugates of G4* with Paclitaxel, Lapatinib and Fulvestrant

The G4*^{4P} was a substrate for further syntheses to obtain binary and ternary conjugates with L and F. Other substrates, namely L and F (200 μ moles both; 116.2 mg and 121.3 mg, respectively) were activated with NPCF (20% molar excess) as described above and dissolved in DMSO (20 mM solutions). The binary conjugates were obtained by addition of 2.1 mL solution of activated F (or L) into 70 mg of G4*^{4P} (3.8 μ moles; MW = 18.3 kDa) in 1 mL DMSO, while the ternary conjugate was obtained by addition of 2.1 mL of both F and L into 70 mg of G4*^{4P} in 1 mL DMSO. Three separate mixtures reacted for 24 h at 45 °C, then transferred into dialytic tubes, purified as before, and then dissolved in methanol. Next, 200 μ L of R-glycidol was added to these semi-products, and the mixtures were left for 2 days at room temperature. Further solvents and excess of R-glycidol were evaporated, and solid products dissolved in methanol and dialyzed against water as before. The solid products were isolated and characterized by the ¹H NMR spectroscopy. Thus, the following binary and ternary conjugates were identified as G4*^{4P10L98gl}, G4*^{4P10F98gl}, and G4*^{4P11L11F74gl}. Theoretical molecular weights were 31 713 Da, 31 971 Da, and 37 529 Da, respectively. The products were isolated with the following yields: 88.9 mg G4*^{4P10L98gl} (2.8 μ moles; 73.7%), 95.7 mg G4*^{4P10F98gl} (3.0 μ moles; 78.9%), and G4*^{4P11L11F74gl} (3.1 μ moles; 81.6%).

3.3. Biological Studies

3.3.1. Biochemical Reagents, Cell Lines and Materials

Human cell lines: lung carcinoma epithelial cells (A549) and glioblastoma (U-118 MG) were purchased from the American Type Culture Collection (ATCC, Manassas, VA, USA). Human immortalized keratinocytes (HaCaT) were provided by Cell Lines Service (Eppelheim, Germany). Dulbecco's Modified Eagle's Media (DMEM) and fetal bovine serum (FBS) were purchased from Corning Inc. (New York, NY, USA). Penicillin and streptomycin solution, phosphate-buffered saline (PBS) with and without magnesium and calcium ions, and Hoechst 33342 were provided by Thermo Fisher Scientific Inc.

(Waltham, MA, USA). Trypsin–EDTA solution, hydrocortisone and 0.33% neutral red solution, phenazinemethosulfate (PMS), 0.4% trypan blue solution, dimethylsulfoxide (DMSO) for molecular biology, 5-Fluoro-2'-deoxy-uridine (FUdR), and other chemicals and buffers were purchased from Merck KGaA (Darmstadt, Germany). The XTT sodium salt was provided by Cayman (Ann Arbor, MI, USA). Cell culture dishes and materials were from Nunc (Roskilde, Denmark) or Corning Inc. (New York, NY, USA). Reagents used to culture *C. elegans* nematode were supplied by Sigma-Aldrich (Saint Louis, MO, USA) or Carl Roth GmbH & Co., KG (Karlsruhe, Germany).

3.3.2. Cell Cultures

Three human cell lines: A549 (non-small-cell lung cancer cells), U-118 MG (glioblastoma multiforme, grade IV), and HaCaT (immortalized keratinocytes) were grown in DMEM supplemented with heat-inactivated 10% FBS and 100 U/mL penicillin and 1% streptomycin solution. Cells were cultured at 37 °C in a humidified 95% air, 5% CO₂ with growth media changed every 2–3 days. Cells were passaged at 70–85% confluence with 0.25% trypsin–0.03% EDTA in PBS without calcium and magnesium ions. The morphology of cells was checked under a Nikon TE2000S Inverted Microscope with phase contrast (Tokyo, Japan). The number and viability of cells were estimated by a trypan blue exclusion test using an Automatic Cell Counter TC20 (BioRad Laboratories, Hercules, CA, USA). The working solutions of the synthesized dendrimer conjugates and the drugs alone were prepared in cell culture media with an adjusted concentration of DMSO (not higher than 0.1%). Control samples with non-treated cells in a complete culture medium with adjusted DMSO concentration were included in all biological assays.

3.3.3. Toxicity Assays

Neutral red (NR) and XTT assay, A549, U-118 Mg, and HaCaT cells, were seeded in flat-bottom 96-well culture plates at a density of 1×10^4 cells/well (100 μ L cell suspension per well) and allowed to attach for 24 h. After cell culture removal, the studied conjugates of dendrimers or drugs alone were added in the range of increasing concentrations (100 μ L cell per well) and cells were treated for 48 h at 37 °C. Then, the neutral red assay or XTT assay was performed as described earlier [104].

3.3.4. Proliferation Assay

The impact of studied compounds on cell proliferation was estimated with DAPI staining. The 4×10^3 cells per well were seeded into flat, clear bottom 96-well plates and stored in an incubator for 24 h at 37 °C to attach. After growth media removal, cells were treated with working solutions of studied dendrimer conjugates for 72 h at increasing concentrations. After plate centrifugation (5 min, 700 \times g), the medium was gently removed. The assay was performed as described [88].

3.3.5. Cellular Accumulation of Labeled Conjugates

Dose-dependent cellular accumulation of studied dendrimer conjugates labeled with one molecule of fluorescein isothiocyanate (FITC) was performed using a microplate reader. All the studied cells (A549, U-118 MG, and HaCaT) were cultured as described in the proliferation protocol. Next, FITC-labeled conjugates were diluted in a complete culture medium with 10% FBS. Cells were treated in a range of increasing concentrations of dendrimers for 48 h. After centrifugation and washing with $1 \times$ PBS, cells were fixed in a 3.7% formalin solution, and nuclei were stained with 600 nM 33342 DAPI solution for 1 h. Then, plates were read with the Infinite M200 PRO Multimode Microplate Reader (TECAN Group Ltd., Männedorf, Switzerland) at 485/535 nm (FITC) and 360/460 nm (DAPI) against blank (wells with cells without conjugates). The fluorescence was expressed per the same number of cells by DAPI staining. Additionally, images from a fluorescence microscope (Delta Optical IB-100) were collected.

3.3.6. Toxicity to *Caenorhabditis Elegans*

The *Caenorhabditis elegans* nematode was used to estimate the in vivo activity of the synthesized dendrimer conjugates with paclitaxel, fulvestrant, and/or lapatinib. Nematodes wild-type culture (strain N2, variety Bristol) was maintained at 20 °C on NGM agar plates with *Escherichia coli* OP50 strain as a food source. *C. elegans* culture was synchronized by treatment with hypochlorite. Obtained eggs were left in M9 buffer at 21 °C to hatch until the next day. Then, L1 worms were placed on NGM plates with *E. coli* OP50 and left at 21 °C until reaching the L4 stage (approximately 44 h). L4 worms were transferred to 15 mL falcons by washing NGM plates twice with 5 mL water and centrifuged at 1500 rpm for 4 min. After supernatant aspiration, the pellet was re-suspended with 5 mL of complete S medium [105] followed by centrifugation. Subsequently, the density of nematode suspension was assessed according to Scanlan et al. [106]. Worms were suspended in complete S medium with *E. coli* OP50 (1:1000), 0.08% cholesterol (5 mg/mL in Et-OH), 1% penicillin–streptomycin, 1% nystatin, and 100 mM FUDR (at final concentration 200 µM) to obtain about 20 nematodes in 50 µL. FUDR was added to sterilize nematodes.

After the transfer of nematodes to a 96-well plate (about 20 individuals in 50 µL), the solutions of the studied conjugates in a complete S medium were added (50 µL/well). The maximal DMSO final concentration was equal to 0.5% and had no significant influence on nematode viability. Five replicates were made for each concentration. The plate was incubated at 21 °C for seven days. During this time, live and dead worms were counted under the inverted microscope (Delta Optical IB-100). Microscopic images of some morphological changes were collected and analyzed in ImageJ 1.49v software to estimate nematodes' body length.

3.3.7. Statistical Analysis

For the cell culture assays, to estimate the differences between treated and non-treated control samples, a statistical analysis was performed using the nonparametric Kruskal–Wallis test.

To analyze differences in nematode viability between the control, the non-treated group, and the nematodes incubated with conjugates, the Kaplan–Meier estimator was used. Statistically significant differences between the control and treated groups were determined with Gehan's Wilcoxon test. $p < 0.05$ was considered statistically significant. All analyses and calculations were performed using Statistica 13.3 software (StatSoft, Tulsa, OK, USA).

Supplementary Materials: The following supporting information can be downloaded at: <https://www.mdpi.com/article/10.3390/molecules28176334/s1>, Figure S1A: scheme of synthesis of PAMAM G4–paclitaxel conjugate; Figure S1B: scheme of synthesis of PAMAM G4–lapatinib conjugate; Figure S1C: scheme of synthesis of PAMAM G4–fulvestrant conjugate; Figure S2A: combined HSQC/HMBC map of PAMAM G4*^{4P109gl} in DMSO-d₆; Figure S2B: combined HSQC/HMBC map of PAMAM G4*^{131.85gl} in DMSO-d₆; Figure S2C: combined HSQC/HMBC map of PAMAM G4*^{13F64gl} in DMSO-d₆; Figure S2D: combined HSQC/HMBC map of PAMAM G4*^{4P11F1P74gl} in DMSO-d₆; Table S1: the values of ζ potential and number- and volume-averaged diameter of conjugate molecules ($d(N)$ and $d(V)$), respectively, in water and in 0.05 M acetate buffer pH 5 (measured within 1 h after dissolving); SD, standard deviation; Figure S3: hydrodynamic diameter averaged by volume ($d(V)$) and by number ($d(N)$) of obtained conjugates in water; Figure S4: zeta potential of obtained conjugates measured in water and phosphate buffer pH 5; Figure S5: the raw data of size distribution measurements of conjugates in water and in pH 5.

Author Contributions: Conceptualization, L.U. and K.W.; methodology, L.U. (biological part) and K.W. (chemistry); validation, L.U. and S.W.; formal analysis, L.U. and S.W.; investigation, L.U., K.W., M.W., Z.S. and M.T.; resources, L.U.; data curation, L.U.; writing—original draft preparation, L.U. and S.W.; writing—review and editing, L.U. and S.W.; visualization, L.U., M.W. and S.W.; supervision, L.U. and S.W.; project administration, L.U.; funding acquisition, L.U. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding: The biological part of this research was funded by the budget of the Faculty of Chemistry at Rzeszów University of Technology.

Institutional Review Board Statement: Not applicable.

Informed Consent Statement: Not applicable.

Data Availability Statement: Data available from the authors of the publication.

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

Sample Availability: Samples of the compounds are available from the authors.

References

1. Cancer Facts & Figures 2023. Available online: <https://www.cancer.org/research/cancer-facts-statistics/all-cancer-facts-figures/2023-cancer-facts-figures.html> (accessed on 12 July 2023).
2. Pisters, K.M.; Evans, W.K.; Azzoli, C.G.; Kris, M.G.; Smith, C.A.; Desch, C.E.; Somerfield, M.R.; Brouwers, M.C.; Darling, G.; Ellis, P.M.; et al. Cancer Care Ontario and American Society of Clinical Oncology Adjuvant Chemotherapy and Adjuvant Radiation Therapy for Stages I-III A Resectable Non Small-Cell Lung Cancer Guideline. *J. Clin. Oncol.* **2007**, *25*, 5506–5518. [CrossRef] [PubMed]
3. Pignon, J.-P.; Tribodet, H.; Scagliotti, G.V.; Douillard, J.-Y.; Shepherd, F.A.; Stephens, R.J.; Dunant, A.; Torri, V.; Rosell, R.; Seymour, L.; et al. Lung Adjuvant Cisplatin Evaluation: A Pooled Analysis by the LACE Collaborative Group. *J. Clin. Oncol.* **2008**, *26*, 3552–3559. [CrossRef] [PubMed]
4. Stupp, R.; Tonn, J.-C.; Brada, M.; Pentheroudakis, G.; ESMO Guidelines Working Group. High-Grade Malignant Glioma: ESMO Clinical Practice Guidelines for Diagnosis, Treatment and Follow-Up. *Ann. Oncol.* **2010**, *21* (Suppl. S5), v190–v193. [CrossRef]
5. Oronsky, B.; Reid, T.R.; Oronsky, A.; Sandhu, N.; Knox, S.J. A Review of Newly Diagnosed Glioblastoma. *Front. Oncol.* **2021**, *10*, 574012. [CrossRef] [PubMed]
6. Lee, S.Y. Temozolomide Resistance in Glioblastoma Multiforme. *Genes Dis.* **2016**, *3*, 198–210. [CrossRef] [PubMed]
7. Bello-Alvarez, C.; Camacho-Arroyo, I. Impact of Sex in the Prevalence and Progression of Glioblastomas: The Role of Gonadal Steroid Hormones. *Biol. Sex. Differ.* **2021**, *12*, 28. [CrossRef]
8. González-Mora, A.M.; García-Lopez, P. Estrogen Receptors as Molecular Targets of Endocrine Therapy for Glioblastoma. *Int. J. Mol. Sci.* **2021**, *22*, 12404. [CrossRef]
9. González-Arenas, A.; Hansberg-Pastor, V.; Hernández-Hernández, O.T.; González-García, T.K.; Henderson-Villalpando, J.; Lemus-Hernández, D.; Cruz-Barrios, A.; Rivas-Suárez, M.; Camacho-Arroyo, I. Estradiol Increases Cell Growth in Human Astrocytoma Cell Lines through ER α Activation and Its Interaction with SRC-1 and SRC-3 Coactivators. *Biochim. Biophys. Acta* **2012**, *1823*, 379–386. [CrossRef]
10. Wan, S.; Jiang, J.; Zheng, C.; Wang, N.; Zhai, X.; Fei, X.; Wu, R.; Jiang, X. Estrogen Nuclear Receptors Affect Cell Migration by Altering Sublocalization of AQP2 in Glioma Cell Lines. *Cell Death Discov.* **2018**, *4*, 49. [CrossRef]
11. Peña-Gutiérrez, K.M.; Hernández-Ortega, K.; Bello-Alvarez, C.; Camacho-Arroyo, I. Expression and Estrogen Regulation of G Protein-coupled Estrogen Receptor in Human Glioblastoma Cells. *Oncol. Lett.* **2022**, *24*, 397. [CrossRef]
12. Tam, A.; Morrish, D.; Wadsworth, S.; Dorscheid, D.; Man, S.P.; Sin, D.D. The Role of Female Hormones on Lung Function in Chronic Lung Diseases. *BMC Women's Health* **2011**, *11*, 24. [CrossRef] [PubMed]
13. Rodríguez-Lara, V.; Hernandez-Martinez, J.-M.; Arrieta, O. Influence of Estrogen in Non-Small Cell Lung Cancer and Its Clinical Implications. *J. Thorac. Dis.* **2018**, *10*, 482–497. [CrossRef] [PubMed]
14. Liu, S.; Hu, C.; Li, M.; An, J.; Zhou, W.; Guo, J.; Xiao, Y. Estrogen Receptor Beta Promotes Lung Cancer Invasion via Increasing CXCR4 Expression. *Cell Death Dis.* **2022**, *13*, 70. [CrossRef] [PubMed]
15. Nathan, M.R.; Schmid, P. A Review of Fulvestrant in Breast Cancer. *Oncol. Ther.* **2017**, *5*, 17–29. [CrossRef] [PubMed]
16. Movérare-Skrtec, S.; Börjesson, A.E.; Farman, H.H.; Sjögren, K.; Windahl, S.H.; Lagerquist, M.K.; Andersson, A.; Stubelius, A.; Carlsten, H.; Gustafsson, J.-Å.; et al. The Estrogen Receptor Antagonist ICI 182,780 Can Act Both as an Agonist and an Inverse Agonist When Estrogen Receptor α AF-2 Is Modified. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2014**, *111*, 1180–1185. [CrossRef]
17. Osborne, C.K.; Wakeling, A.; Nicholson, R.I. Fulvestrant: An Oestrogen Receptor Antagonist with a Novel Mechanism of Action. *Br. J. Cancer* **2004**, *90* (Suppl. S1), S2–S6. [CrossRef]
18. Hamilton, D.H.; Griner, L.M.; Keller, J.M.; Hu, X.; Southall, N.; Marugan, J.; David, J.M.; Ferrer, M.; Palena, C. Targeting Estrogen Receptor Signaling with Fulvestrant Enhances Immune and Chemotherapy-Mediated Cytotoxicity of Human Lung Cancer. *Clin. Cancer Res.* **2016**, *22*, 6204–6216. [CrossRef]
19. Sabbah, D.A.; Hajjo, R.; Sweidan, K. Review on Epidermal Growth Factor Receptor (EGFR) Structure, Signaling Pathways, Interactions, and Recent Updates of EGFR Inhibitors. *Curr. Top. Med. Chem.* **2020**, *20*, 815–834. [CrossRef]
20. Ayati, A.; Moghimi, S.; Salarinejad, S.; Safavi, M.; Pouramiri, B.; Foroumadi, A. A Review on Progression of Epidermal Growth Factor Receptor (EGFR) Inhibitors as an Efficient Approach in Cancer Targeted Therapy. *Bioorganic Chem.* **2020**, *99*, 103811. [CrossRef]

21. Rosell, R.; Moran, T.; Queralt, C.; Porta, R.; Cardenal, F.; Camps, C.; Majem, M.; Lopez-Vivanco, G.; Isla, D.; Provencio, M.; et al. Screening for Epidermal Growth Factor Receptor Mutations in Lung Cancer. *N. Engl. J. Med.* **2009**, *361*, 958–967. [[CrossRef](#)]
22. Xu, H.; Zong, H.; Ma, C.; Ming, X.; Shang, M.; Li, K.; He, X.; Du, H.; Cao, L. Epidermal Growth Factor Receptor in Glioblastoma (Review). *Oncol. Lett.* **2017**, *14*, 512–516. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
23. Bethune, G.; Bethune, D.; Ridgway, N.; Xu, Z. Epidermal Growth Factor Receptor (EGFR) in Lung Cancer: An Overview and Update. *J. Thorac. Dis.* **2010**, *2*, 48–51. [[PubMed](#)]
24. Lau, S.C.; Chooback, N.; Ho, C.; Melosky, B. Outcome Differences between First- and Second-Generation EGFR Inhibitors in Advanced EGFR Mutated NSCLC in a Large Population-Based Cohort. *Clin. Lung Cancer* **2019**, *20*, e576–e583. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
25. An, Z.; Aksoy, O.; Zheng, T.; Fan, Q.-W.; Weiss, W.A. Epidermal Growth Factor Receptor and EGFRVIII in Glioblastoma: Signaling Pathways and Targeted Therapies. *Oncogene* **2018**, *37*, 1561–1575. [[CrossRef](#)]
26. Brennan, C.W.; Verhaak, R.G.W.; McKenna, A.; Campos, B.; Nounshmehr, H.; Salama, S.R.; Zheng, S.; Chakravarty, D.; Sanborn, J.Z.; Berman, S.H.; et al. The Somatic Genomic Landscape of Glioblastoma. *Cell* **2013**, *155*, 462–477. [[CrossRef](#)]
27. Watanabe, K.; Tachibana, O.; Sato, K.; Yonekawa, Y.; Kleihues, P.; Ohgaki, H. Overexpression of the EGF Receptor and P53 Mutations Are Mutually Exclusive in the Evolution of Primary and Secondary Glioblastomas. *Brain Pathol.* **1996**, *6*, 217–223. [[CrossRef](#)]
28. Tevaarwerk, A.J.; Kolesar, J.M. Lapatinib: A Small-Molecule Inhibitor of Epidermal Growth Factor Receptor and Human Epidermal Growth Factor Receptor-2 Tyrosine Kinases Used in the Treatment of Breast Cancer. *Clin. Ther.* **2009**, *31 Pt 2*, 2332–2348. [[CrossRef](#)]
29. Mansi, M.; Howley, R.; Chandratre, S.; Chen, B. Inhibition of ABCG2 Transporter by Lapatinib Enhances 5-Aminolevulinic Acid-Mediated Protoporphyrin IX Fluorescence and Photodynamic Therapy Response in Human Glioma Cell Lines. *Biochem. Pharmacol.* **2022**, *200*, 115031. [[CrossRef](#)]
30. Yu, A.; Faiq, N.; Green, S.; Lai, A.; Green, R.; Hu, J.; Cloughesy, T.F.; Mellinghoff, I.; Nghiemphu, P.L. Report of Safety of Pulse Dosing of Lapatinib with Temozolomide and Radiation Therapy for Newly-Diagnosed Glioblastoma in a Pilot Phase II Study. *J. Neurooncol.* **2017**, *134*, 357–362. [[CrossRef](#)]
31. Gao, H.; Yang, Z.; Cao, S.; Xi, Z.; Zhang, S.; Pang, Z.; Jiang, X. Behavior and Anti-Glioma Effect of Lapatinib-Incorporated Lipoprotein-like Nanoparticles. *Nanotechnology* **2012**, *23*, 435101. [[CrossRef](#)]
32. Thiessen, B.; Stewart, C.; Tsao, M.; Kamel-Reid, S.; Schaiquevich, P.; Mason, W.; Easaw, J.; Belanger, K.; Forsyth, P.; McIntosh, L.; et al. A Phase I/II Trial of GW572016 (Lapatinib) in Recurrent Glioblastoma Multiforme: Clinical Outcomes, Pharmacokinetics and Molecular Correlation. *Cancer Chemother. Pharmacol.* **2010**, *65*, 353–361. [[CrossRef](#)]
33. Uy, N.F.; Merkhofer, C.M.; Baik, C.S. HER2 in Non-Small Cell Lung Cancer: A Review of Emerging Therapies. *Cancers* **2022**, *14*, 4155. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
34. Ross, H.J.; Blumenschein, G.R.; Aisner, J.; Damjanov, N.; Dowlati, A.; Garst, J.; Rigas, J.R.; Smylie, M.; Hassani, H.; Allen, K.E.; et al. Randomized Phase II Multicenter Trial of Two Schedules of Lapatinib as First- or Second-Line Monotherapy in Patients with Advanced or Metastatic Non-Small Cell Lung Cancer. *Clin. Cancer Res.* **2010**, *16*, 1938–1949. [[CrossRef](#)]
35. Ramlau, R.; Thomas, M.; Novello, S.; Plummer, R.; Reck, M.; Kaneko, T.; Lau, M.R.; Margetts, J.; Lunec, J.; Nutt, J.; et al. Phase I Study of Lapatinib and Pemetrexed in the Second-Line Treatment of Advanced or Metastatic Non-Small-Cell Lung Cancer with Assessment of Circulating Cell Free Thymidylate Synthase RNA as a Potential Biomarker. *Clin. Lung Cancer* **2015**, *16*, 348–357. [[CrossRef](#)]
36. Nose, N.; Sugio, K.; Oyama, T.; Nozoe, T.; Uramoto, H.; Iwata, T.; Onitsuka, T.; Yasumoto, K. Association between Estrogen Receptor- β Expression and Epidermal Growth Factor Receptor Mutation in the Postoperative Prognosis of Adenocarcinoma of the Lung. *J. Clin. Oncol.* **2009**, *27*, 411–417. [[CrossRef](#)]
37. Márquez-Garbán, D.C.; Chen, H.-W.; Fishbein, M.C.; Goodlick, L.; Pietras, R.J. Estrogen Receptor Signaling Pathways in Human Non-Small Cell Lung Cancer. *Steroids* **2007**, *72*, 135–143. [[CrossRef](#)]
38. Stabile, L.P.; Lyker, J.S.; Gubish, C.T.; Zhang, W.; Grandis, J.R.; Siegfried, J.M. Combined Targeting of the Estrogen Receptor and the Epidermal Growth Factor Receptor in Non-Small Cell Lung Cancer Shows Enhanced Antiproliferative Effects. *Cancer Res.* **2005**, *65*, 1459–1470. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
39. Pietras, R.J.; Márquez, D.C.; Chen, H.-W.; Tsai, E.; Weinberg, O.; Fishbein, M. Estrogen and Growth Factor Receptor Interactions in Human Breast and Non-Small Cell Lung Cancer Cells. *Steroids* **2005**, *70*, 372–381. [[CrossRef](#)]
40. Xie, X.; Shao, X.; Ma, W.; Zhao, D.; Shi, S.; Li, Q.; Lin, Y. Overcoming Drug-Resistant Lung Cancer by Paclitaxel Loaded Tetrahedral DNA Nanostructures. *Nanoscale* **2018**, *10*, 5457–5465. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
41. Ramalingam, S.; Belani, C.P. Paclitaxel for Non-Small Cell Lung Cancer. *Expert Opin. Pharmacother.* **2004**, *5*, 1771–1780. [[CrossRef](#)]
42. Socinski, M.A. Single-Agent Paclitaxel in the Treatment of Advanced Non-Small Cell Lung Cancer. *Oncologist* **1999**, *4*, 408–416. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
43. Von Euff, D.; Bozorgmehr, F.; Chung, I.; Bernhardt, D.; Rieken, S.; Liersch, S.; Muley, T.; Kobinger, S.; Thomas, M.; Christopoulos, P.; et al. Paclitaxel for Treatment of Advanced Small Cell Lung Cancer (SCLC): A Retrospective Study of 185 Patients. *J. Thorac. Dis.* **2020**, *12*, 782–793. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

44. Camps, C.; Caballero, C.; Blasco, A.; Safont, M.J.; Berrocal, A.; Garde, J.; Juarez, A.; Sirera, R.; Bremnes, R.M. Weekly Paclitaxel as Second/Third-Line Treatment in Advanced Non-Small Cell Lung Cancer Patients: Efficacy and Tolerability. *Anticancer. Res.* **2005**, *25*, 4611–4614. [PubMed]
45. Mohiuddin, M.; Kasahara, K. Paclitaxel Impedes EGFR-Mutated PC9 Cell Growth via Reactive Oxygen Species-Mediated DNA Damage and EGFR/PI3K/AKT/MTOR Signaling Pathway Suppression. *Cancer Genom. Proteom.* **2021**, *18*, 645–659. [CrossRef]
46. Chamberlain, M.C.; Kormanik, P. Salvage Chemotherapy with Paclitaxel for Recurrent Primary Brain Tumors. *J. Clin. Oncol.* **1995**, *13*, 2066–2071. [CrossRef]
47. Prados, M.D.; Schold, S.C.; Spence, A.M.; Berger, M.S.; McAllister, L.D.; Mehta, M.P.; Gilbert, M.R.; Fulton, D.; Kuhn, J.; Lamborn, K.; et al. Phase II Study of Paclitaxel in Patients with Recurrent Malignant Glioma. *J. Clin. Oncol.* **1996**, *14*, 2316–2321. [CrossRef]
48. Fetell, M.R.; Grossman, S.A.; Fisher, J.D.; Erlanger, B.; Rowinsky, E.; Stockel, J.; Piantadosi, S. Preirradiation Paclitaxel in Glioblastoma Multiforme: Efficacy, Pharmacology, and Drug Interactions. New Approaches to Brain Tumor Therapy Central Nervous System Consortium. *J. Clin. Oncol.* **1997**, *15*, 3121–3128. [CrossRef]
49. Chang, S.M.; Kuhn, J.G.; Rizzo, J.; Robins, H.I.; Schold, S.C.; Spence, A.M.; Berger, M.S.; Mehta, M.P.; Bozik, M.E.; Pollack, I.; et al. Phase I Study of Paclitaxel in Patients with Recurrent Malignant Glioma: A North American Brain Tumor Consortium Report. *J. Clin. Oncol.* **1998**, *16*, 2188–2194. [CrossRef]
50. Zhang, D.Y.; Dmello, C.; Chen, L.; Arrieta, V.A.; Gonzalez-Buendia, E.; Kane, J.R.; Magnusson, L.P.; Baran, A.; James, C.D.; Horbinski, C.; et al. Ultrasound-Mediated Delivery of Paclitaxel for Glioma: A Comparative Study of Distribution, Toxicity, and Efficacy of Albumin-Bound Versus Cremophor Formulations. *Clin. Cancer Res.* **2020**, *26*, 477–486. [CrossRef]
51. Surekha, B.; Kommana, N.S.; Dubey, S.K.; Kumar, A.V.P.; Shukla, R.; Kesharwani, P. PAMAM Dendrimer as a Talented Multifunctional Biomimetic Nanocarrier for Cancer Diagnosis and Therapy. *Colloids Surf. B Biointerfaces* **2021**, *204*, 111837. [CrossRef]
52. Mishra, V.; Kesharwani, P. Dendrimer Technologies for Brain Tumor. *Drug Discov. Today* **2016**, *21*, 766–778. [CrossRef]
53. Malinga-Drozd, M.; Uram, L.; Wróbel, K.; Wołowicz, S. Chiral Recognition of Homochiral Poly (Amidoamine) Dendrimers Substituted with R- and S-Glycidol by Keratinocyte (HaCaT) and Squamous Carcinoma (SCC-15) Cells In Vitro. *Polymers* **2021**, *13*, 1049. [CrossRef] [PubMed]
54. Luong, D.; Kesharwani, P.; Deshmukh, R.; Mohd Amin, M.C.I.; Gupta, U.; Greish, K.; Iyer, A.K. PEGylated PAMAM Dendrimers: Enhancing Efficacy and Mitigating Toxicity for Effective Anticancer Drug and Gene Delivery. *Acta Biomater.* **2016**, *43*, 14–29. [CrossRef] [PubMed]
55. Hunt, P.R. The *C. elegans* Model in Toxicity Testing. *J. Appl. Toxicol.* **2017**, *37*, 50–59. [CrossRef] [PubMed]
56. Ye, F.B.; Hamza, A.; Singh, T.; Flibotte, S.; Hieter, P.; O’Neil, N.J. A Multimodal Genotoxic Anticancer Drug Characterized by Pharmacogenetic Analysis in *Caenorhabditis elegans*. *Genetics* **2020**, *215*, 609–621. [CrossRef] [PubMed]
57. Bae, Y.-K.; Sung, J.Y.; Kim, Y.-N.; Kim, S.; Hong, K.M.; Kim, H.T.; Choi, M.S.; Kwon, J.Y.; Shim, J. An In Vivo *C. elegans* Model System for Screening EGFR-Inhibiting Anti-Cancer Drugs. *PLoS ONE* **2012**, *7*, e42441. [CrossRef]
58. Diot, C.; García-González, A.P.; Vieira, A.F.; Walker, M.; Honeywell, M.; Doyle, H.; Ponomarova, O.; Rivera, Y.; Na, H.; Zhang, H.; et al. Bacterial Diet Modulates Tamoxifen-Induced Death via Host Fatty Acid Metabolism. *Nat. Commun.* **2022**, *13*, 5595. [CrossRef]
59. Sakaguchi, Y.; Mizukami, M.; Hiroka, Y.; Miyasaka, K.; Niwa, K.; Arizono, K.; Ichikawa, N. Evaluation of Neurotoxicity of Anticancer Drugs Using Nematode *Caenorhabditis elegans* as a Model Organism. *J. Toxicol. Sci.* **2023**, *48*, 311–321. [CrossRef]
60. Wittkowski, P.; Marx-Stoelting, P.; Violet, N.; Fetz, V.; Schwarz, F.; Oelgeschläger, M.; Schönfelder, G.; Vogl, S. *Caenorhabditis elegans* As a Promising Alternative Model for Environmental Chemical Mixture Effect Assessment—A Comparative Study. *Environ. Sci. Technol.* **2019**, *53*, 12725–12733. [CrossRef]
61. Ma, P.; Zhang, X.; Ni, L.; Li, J.; Zhang, F.; Wang, Z.; Lian, S.; Sun, K. Targeted Delivery of Polyamidoamine-Paclitaxel Conjugate Functionalized with Anti-Human Epidermal Growth Factor Receptor 2 Trastuzumab. *Int. J. Nanomed.* **2015**, *10*, 2173–2190. [CrossRef]
62. Lewińska, A.; Wróbel, K.; Bloniarz, D.; Adamczyk-Grochala, J.; Wołowicz, S.; Wnuk, M. Lapatinib- and Fulvestrant-PAMAM Dendrimer Conjugates Promote Apoptosis in Chemotherapy-Induced Senescent Breast Cancer Cells with Different Receptor Status. *Biomater. Adv.* **2022**, *140*, 213047. [CrossRef] [PubMed]
63. Perželová, V.; Sabol, F.; Vasilenko, T.; Novotný, M.; Kováč, I.; Slezák, M.; Ďurkáč, J.; Holly, M.; Pilátová, M.; Szabo, P.; et al. Pharmacological Activation of Estrogen Receptors- α and - β Differentially Modulates Keratinocyte Differentiation with Functional Impact on Wound Healing. *Int. J. Mol. Med.* **2016**, *37*, 21–28. [CrossRef] [PubMed]
64. Ivanova, M.M.; Mazhawidza, W.; Dougherty, S.M.; Klinge, C.M. Sex Differences in Estrogen Receptor Subcellular Location and Activity in Lung Adenocarcinoma Cells. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* **2010**, *42*, 320–330. [CrossRef] [PubMed]
65. Zhou, P.; Hu, J.; Wang, X.; Wang, J.; Zhang, Y.; Wang, C. Epidermal Growth Factor Receptor Expression Affects Proliferation and Apoptosis in Non-Small Cell Lung Cancer Cells via the Extracellular Signal-Regulated Kinase/MicroRNA 200a Signaling Pathway. *Oncol. Lett.* **2018**, *15*, 5201–5207. [CrossRef]
66. Cichocki, M.; Szaefer, H.; Krajka-Kuźniak, V.; Baer-Dubowska, W. The Effect of Resveratrol and Its Methylthio-Derivatives on EGFR and Stat3 Activation in Human HaCaT and A431 Cells. *Mol. Cell Biochem.* **2014**, *396*, 221–228. [CrossRef]
67. Leslie, K.K.; Keefe, D.; Powlll, S.; Naftolin, F. Estrogen Receptors Are Identified in the Glioblastoma Cell Line U138MG. *Reprod. Sci.* **1994**, *1*, 238–244. [CrossRef] [PubMed]

68. Zitron, I.M.; Thakur, A.; Norkina, O.; Barger, G.R.; Lum, L.G.; Mittal, S. Targeting and Killing of Glioblastoma with Activated T Cells Armed with Bispecific Antibodies. *BMC Cancer* **2013**, *13*, 83. [CrossRef]
69. Honary, S.; Zahir, F. Effect of Zeta Potential on the Properties of Nano-Drug Delivery Systems—A Review (Part 1). *Trop. J. Pharm. Res.* **2013**, *12*, 255–264. [CrossRef]
70. Martinho, N.; Florindo, H.; Silva, L.; Brocchini, S.; Zloh, M.; Barata, T. Molecular Modeling to Study Dendrimers for Biomedical Applications. *Molecules* **2014**, *19*, 20424–20467. [CrossRef]
71. De Trizio, I.; Errede, M.; D’Amati, A.; Girolamo, F.; Virgintino, D. Expression of P-Gp in Glioblastoma: What We Can Learn from Brain Development. *Curr. Pharm. Des.* **2020**, *26*, 1428–1437. [CrossRef]
72. Heming, C.P.; Muriithi, W.; Macharia, L.W.; Filho, P.N.; Moura-Neto, V.; Aran, V. P-Glycoprotein and Cancer: What Do We Currently Know? *Heliyon* **2022**, *8*, e11171. [CrossRef]
73. Mamnoon, B.; Feng, L.; Froberg, J.; Choi, Y.; Sathish, V.; Taratula, O.; Taratula, O.; Mallik, S. Targeting Estrogen Receptor-Positive Breast Microtumors with Endoxifen-Conjugated, Hypoxia-Sensitive Polymersomes. *ACS Omega* **2021**, *6*, 27654–27667. [CrossRef]
74. Santos, E.d.S.; Nogueira, K.A.B.; Fernandes, L.C.C.; Martins, J.R.P.; Reis, A.V.F.; Neto, J.d.B.V.; da Silva Júnior, I.J.; Pessoa, C.; Petrilli, R.; Eloy, J.O. EGFR Targeting for Cancer Therapy: Pharmacology and Immunoconjugates with Drugs and Nanoparticles. *Int. J. Pharm.* **2021**, *592*, 120082. [CrossRef] [PubMed]
75. Sigismund, S.; Argenzio, E.; Tosoni, D.; Cavallaro, E.; Polo, S.; Di Fiore, P.P. Clathrin-Mediated Internalization Is Essential for Sustained EGFR Signaling but Dispensable for Degradation. *Dev. Cell* **2008**, *15*, 209–219. [CrossRef] [PubMed]
76. Takano, M.; Higa, S.; Furuichi, Y.; Naka, R.; Yumoto, R. Suppression of P-Glycoprotein by Cigarette Smoke Extract in Human Lung-Derived A549/P-Gp Cells. *Drug Metab. Pharmacokinet.* **2020**, *35*, 214–219. [CrossRef] [PubMed]
77. De Almeida, M.S.; Susnik, E.; Drasler, B.; Taladriz-Blanco, P.; Petri-Fink, A.; Rothen-Rutishauser, B. Understanding Nanoparticle Endocytosis to Improve Targeting Strategies in Nanomedicine. *Chem. Soc. Rev.* **2021**, *50*, 5397–5434. [CrossRef]
78. Garon, E.B.; Pietras, R.J.; Finn, R.S.; Kamranpour, N.; Pitts, S.; Márquez-Garbán, D.C.; Desai, A.J.; Dering, J.; Hosmer, W.; von Euw, E.M.; et al. Antiestrogen Fulvestrant Enhances the Antiproliferative Effects of Epidermal Growth Factor Receptor Inhibitors in Human Non-Small-Cell Lung Cancer. *J. Thorac. Oncol.* **2013**, *8*, 270–278. [CrossRef]
79. Sebaugh, J.L. Guidelines for Accurate EC50/IC50 Estimation. *Pharmaceut. Statist.* **2011**, *10*, 128–134. [CrossRef]
80. Kyakulaga, A.H.; Aqil, F.; Munagala, R.; Gupta, R.C. Synergistic Combinations of Paclitaxel and Withaferin A against Human Non-Small Cell Lung Cancer Cells. *Oncotarget* **2020**, *11*, 1399–1416. [CrossRef]
81. Koziara, J.M.; Lockman, P.R.; Allen, D.D.; Mumper, R.J. Paclitaxel Nanoparticles for the Potential Treatment of Brain Tumors. *J. Control. Release* **2004**, *99*, 259–269. [CrossRef]
82. Olausson, K.A.; Commo, F.; Tailleur, M.; Lacroix, L.; Vitale, I.; Raza, S.Q.; Richon, C.; Dessen, P.; Lazar, V.; Soria, J.-C.; et al. Synergistic Proapoptotic Effects of the Two Tyrosine Kinase Inhibitors Pazopanib and Lapatinib on Multiple Carcinoma Cell Lines. *Oncogene* **2009**, *28*, 4249–4260. [CrossRef] [PubMed]
83. Xiang, Z.; Song, S.; Zhu, Z.; Sun, W.; Gifts, J.E.; Sun, S.; Li, Q.S.; Yu, Y.; Li, K.K. LncRNAs GIHCG and SPINT1-AS1 Are Crucial Factors for Pan-Cancer Cells Sensitivity to Lapatinib. *Front. Genet.* **2019**, *10*, 25. [CrossRef] [PubMed]
84. Morita, M.; IIZUKA, M.; Watanabe, M.; Narita, T.; Kato, C.; Kakibuchi, D.; Kitano, F.; Ouchi, Y.; Sakaguchi, K.; Taguchi, T. Oxidative Stress Induces EGFR Inhibition-Related Skin Cell Death. *J. Clin. Biochem. Nutr.* **2021**, *68*, 235–242. [CrossRef]
85. Liebmann, J.E.; Cook, J.A.; Lipschultz, C.; Teague, D.; Fisher, J.; Mitchell, J.B. Cytotoxic Studies of Paclitaxel (Taxol) in Human Tumour Cell Lines. *Br. J. Cancer* **1993**, *68*, 1104–1109. [CrossRef]
86. Repetto, G.; del Peso, A.; Zurita, J.L. Neutral Red Uptake Assay for the Estimation of Cell Viability/Cytotoxicity. *Nat. Protoc.* **2008**, *3*, 1125–1131. [CrossRef]
87. Mosmann, T. Rapid Colorimetric Assay for Cellular Growth and Survival: Application to Proliferation and Cytotoxicity Assays. *J. Immunol. Methods* **1983**, *65*, 55–63. [CrossRef] [PubMed]
88. Uram, L.; Markowicz, J.; Misiorek, M.; Filipowicz-Rachwał, A.; Wołowicz, S.; Walajtys-Rode, E. Celecoxib Substituted Biotinylated Poly(Amidoamine) G3 Dendrimer as Potential Treatment for Temozolomide Resistant Glioma Therapy and Anti-Nematode Agent. *Eur. J. Pharm. Sci.* **2020**, *152*, 105439. [CrossRef]
89. Nsairat, H.; Al-Sulaibi, M.; Alshaer, W. PEGylated Nanoassemblies Composed of Edelfosine and Fulvestrant Drugs: In Vitro Antiproliferative Effect against Breast Cancer Cells. *J. Drug Deliv. Sci. Technol.* **2023**, *85*, 104612. [CrossRef]
90. Agrawal, A.; Robertson, J.F.R.; Cheung, K.L.; Gutteridge, E.; Ellis, I.O.; Nicholson, R.I.; Gee, J.M.W. Biological Effects of Fulvestrant on Estrogen Receptor Positive Human Breast Cancer: Short, Medium and Long-Term Effects Based on Sequential Biopsies. *Int. J. Cancer* **2016**, *138*, 146–159. [CrossRef]
91. Claus, J.; Patel, G.; Autore, F.; Colomba, A.; Weitsman, G.; Soliman, T.N.; Roberts, S.; Zanetti-Domingues, L.C.; Hirsch, M.; Collu, F.; et al. Inhibitor-Induced HER2-HER3 Heterodimerisation Promotes Proliferation through a Novel Dimer Interface. *eLife* **2018**, *7*, e32271. [CrossRef]
92. Khachigian, L.M. Emerging Insights on Functions of the Anthelmintic Flubendazole as a Repurposed Anticancer Agent. *Cancer Lett.* **2021**, *522*, 57–62. [CrossRef] [PubMed]
93. Mimoto, A.; Fujii, M.; Usami, M.; Shimamura, M.; Hirabayashi, N.; Kaneko, T.; Sasagawa, N.; Ishiura, S. Identification of an Estrogenic Hormone Receptor in *Caenorhabditis elegans*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2007**, *364*, 883–888. [CrossRef]
94. Tomimaga, N.; Ura, K.; Kawakami, M.; Kawaguchi, T.; Kohra, S.; Mitsui, Y.; Iguchi, T.; Arizono, K. *Caenorhabditis elegans* Responses to Specific Steroid Hormones. *J. Health Sci.* **2003**, *49*, 28–33. [CrossRef]

95. Konietzka, J.; Fritz, M.; Spiri, S.; McWhirter, R.; Leha, A.; Palumbos, S.; Costa, W.S.; Oranth, A.; Gottschalk, A.; Miller, D.M.; et al. Epidermal Growth Factor Signaling Promotes Sleep through a Combined Series and Parallel Neural Circuit. *Curr. Biol.* **2020**, *30*, 1–16.e13. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
96. O’Keeffe, C.; Greenwald, I. EGFR Signal Transduction Is Downregulated in *C. elegans* Vulval Precursor Cells during Dauer Diapause. *Development* **2022**, *149*, dev201094. [[CrossRef](#)]
97. Kamal, M.; Tokmakjian, L.; Knox, J.; Mastrangelo, P.; Ji, J.; Cai, H.; Wojciechowski, J.W.; Hughes, M.P.; Takács, K.; Chu, X.; et al. A Spatiotemporal Reconstruction of the *C. elegans* Pharyngeal Cuticle Reveals a Structure Rich in Phase-Separating Proteins. *eLife* **2022**, *11*, e79396. [[CrossRef](#)]
98. So, S.; Miyahara, K.; Ohshima, Y. Control of Body Size in *C. elegans* Dependent on Food and Insulin/IGF-1 Signal. *Genes. Cells* **2011**, *16*, 639–651. [[CrossRef](#)]
99. Soete, G.; Betist, M.C.; Korswagen, H.C. Regulation of *Caenorhabditis elegans* Body Size and Male Tail Development by the Novel Gene Lon-8. *BMC Dev. Biol.* **2007**, *7*, 20. [[CrossRef](#)]
100. Flemming, A.J.; Shen, Z.-Z.; Cunha, A.; Emmons, S.W.; Leroi, A.M. Somatic Polyploidization and Cellular Proliferation Drive Body Size Evolution in Nematodes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2000**, *97*, 5285–5290. [[CrossRef](#)]
101. Page, A.P.; Stepek, G.; Winter, A.D.; Pertab, D. Enzymology of the Nematode Cuticle: A Potential Drug Target? *Int. J. Parasitol. Drugs Drug Resist.* **2014**, *4*, 133–141. [[CrossRef](#)]
102. Madaan, U.; Yzeiraj, E.; Meade, M.; Rushlow, C.A.; Savage-Dunn, C. *Caenorhabditis elegans* BMP Transcriptional Program Implicates Collagen Genes in Body Size Regulation. *bioRxiv* **2017**, 108225. [[CrossRef](#)]
103. Tomalia, D.A.; Baker, H.; Dewald, J.; Hall, M.; Kallos, G.; Martin, S.; Roeck, J.; Ryder, J.; Smith, P. A New Class of Polymers: Starburst-Dendritic Macromolecules. *Polym. J.* **1985**, *17*, 117–132. [[CrossRef](#)]
104. Uram, Ł.; Szuster, M.; Filipowicz, A.; Zareba, M.; Watajts-Rode, E.; Wołowicz, S. Cellular Uptake of Glucoheptoamidated Poly(Amidoamine) PAMAM G3 Dendrimer with Amide-Conjugated Biotin, a Potential Carrier of Anticancer Drugs. *Bioorg. Med. Chem.* **2017**, *25*, 706–713. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
105. Lewis, J.A.; Fleming, J.T. Basic Culture Methods. *Methods Cell Biol.* **1995**, *48*, 3–29. [[PubMed](#)]
106. Scanlan, L.D.; Lund, S.P.; Coskun, S.H.; Hanna, S.K.; Johnson, M.E.; Sims, C.M.; Brignoni, K.; Lapasset, P.; Petersen, E.J.; Elliott, J.T.; et al. Counting *Caenorhabditis elegans*: Protocol Optimization and Applications for Population Growth and Toxicity Studies in Liquid Medium. *Sci. Rep.* **2018**, *8*, 904. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

Disclaimer/Publisher’s Note: The statements, opinions and data contained in all publications are solely those of the individual author(s) and contributor(s) and not of MDPI and/or the editor(s). MDPI and/or the editor(s) disclaim responsibility for any injury to people or property resulting from any ideas, methods, instructions or products referred to in the content.



Contents lists available at ScienceDirect

Biomaterials Advances

journal homepage: www.journals.elsevier.com/materials-science-and-engineering-c

Lapatinib- and fulvestrant-PAMAM dendrimer conjugates promote apoptosis in chemotherapy-induced senescent breast cancer cells with different receptor status

Anna Lewińska^a, Konrad Wróbel^b, Dominika Błoniarz^a, Jagoda Adamczyk-Grochala^a, Stanisław Wołowicz^b, Maciej Wnuk^{a,b,*}

^a Department of Biotechnology, Institute of Biology and Biotechnology, College of Nature Sciences, University of Rzeszow, Rzeszow, Poland

^b Department of Biochemistry and General Chemistry, Medical College, University of Rzeszow, Rzeszow, Poland

ARTICLE INFO

Keywords:
Lapatinib
Fulvestrant
Nano-drugs
Breast cancer
Therapy-induced senescence
Senolysis

ABSTRACT

Lapatinib (L) and fulvestrant (F) are used in targeted anticancer therapies, in particular, against phenotypically different breast cancer cells. L, a dual inhibitor of EGFR and HER2 tyrosine kinases, is active against HER2-positive breast cancer cells, while F, a selective estrogen receptor degrader (SERD), is active against ER-positive breast cancer cells. However, the action of L and F can be limited due to their relatively low water solubility and bioavailability. In the present study, poly(amidoamine) (PAMAM) dendrimer G3 was functionalized with L or F or L and F to compare their effects with free L or F against breast cancer cells with different receptor status (ER-positive MCF-7, triple negative MDA-MB-231 and HER2-positive SK-BR-3 cells). L-PAMAM and F-PAMAM conjugates potentiated cytostatic and cytotoxic action of L and F that was accompanied by elevated levels of autophagy. TRDMT1, RNA methyltransferase, was also involved in this response as judged by TRDMT1 nuclear translocation and nano-drug resistance of *TRDMT1* gene knockout cells. Nano-drugs also promoted elimination of doxorubicin-induced senescent breast cancer cells by apoptosis-mediated senolysis regardless of receptor status. In conclusion, we propose a novel anticancer approach based on L-PAMAM and F-PAMAM nanoplatforms being effective, at least, against breast cancer cells with different phenotypic features.

1. Introduction

Chemotherapy and combination therapy are widely used to treat many types of cancer, however, their anticancer efficiency may be partially limited due to relatively low water solubility and poor stability of a plethora of chemotherapeutic agents, as well as their non-targeted biodistribution *in vivo* and adverse side effects against normal cells and tissues [1,2]. To overcome these obstacles, several nano-based drug delivery systems (DDS) were proposed [2–9]. For example, polymeric, solid lipid and gold nanoparticles, micelles and liposomes, nanotubes, nanocrystals, nanocages, and dendrimers were designed for the delivery and co-delivery of anticancer drugs and/or genes [2–9]. Dendrimers, tree-like structures, are a class of nano-sized, synthetic, highly branched, and radially symmetric polymers with well-defined and easily modifiable surfaces [2,4,10–13]. Dendrimers are considered promising delivery vehicles as they are relatively biocompatible, non-immunogenic,

biodegradable, and unable to bind blood proteins in a non-specific fashion [2]. Unique physicochemical characteristics of dendrimers allow their functionalization, hydrophobic drug encapsulation and/or conjugation that can improve drug therapeutic efficiency and solubility, decrease dose-limiting toxicity, and maintain controlled release profile [2,4,10–13]. Dendrimers are composed of the core, peripheral/end-groups (polyvalent recognition sites), and subunits that link the two molecules [4]. Moreover, in the dendrimer structure, internal voids can be distinguished that are potential sites of complexation [4]. Among the different types of dendrimers such as peptide (PPI), poly(L-lysine), poly(amidoamine) (PAMAM), PAMAM-organosilicon (PAMAMOS) dendrimers, PAMAM dendrimers are the most studied as nanocarriers for efficient delivery of anticancer agents and genetic material [2,10]. The core of PAMAM dendrimer is typically ethylenediamine, to which methyl acrylate and ethylenediamine are systematically added to design and obtain a defined number of generations, such as G0, G1, G2, G3, G4,

* Corresponding author at: Department of Biotechnology, Institute of Biology and Biotechnology, College of Nature Sciences, University of Rzeszow, Rzeszow, Poland.

E-mail address: mwnuk@ur.edu.pl (M. Wnuk).

<https://doi.org/10.1016/j.bioadv.2022.213047>

Received 6 May 2022; Received in revised form 8 July 2022; Accepted 22 July 2022

Available online 26 July 2022

2772-9508/© 2022 The Authors. Published by Elsevier B.V. This is an open access article under the CC BY-NC-ND license (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>).

and more [2,4]. Furthermore, in order to increase the functionality of PAMAM dendrimers, chemical groups such as amine, hydroxy, carbonyl, methoxycarbonyl, *tert*-butyloxycarbonyl, sodium carboxy, and methyl groups can be provided to the peripheral surface of these synthetic polymers [2]. For example, the amine group is used for PAMAM dendrimer-mediated delivery of nucleic acids to host cells [2]. Moreover, different generations of PAMAM dendrimers with attached cancer-specific ligands were successfully used for targeted drug delivery (for example, gemcitabine, paclitaxel, doxorubicin, and methotrexate) to numerous cancer cells [14–19].

Lapatinib (L), a dual inhibitor of epidermal growth factor receptor (EGFR) and human epidermal growth factor receptor 2 (HER2) tyrosine kinases, was approved by the U. S. Food and Drug Administration (FDA) for the treatment of patients with advanced and metastatic breast cancer positive for HER2 with previous history of anthracycline, taxane, and trastuzumab-based therapy [20,21]. Fulvestrant (F), FDA-approved selective estrogen receptor degrader (SERD), is used for the treatment of hormone receptor-positive metastatic breast cancer in postmenopausal women with disease progression after antiestrogen therapy [22,23]. L and F can be also active against triple negative breast cancer cells with no estrogen alpha, progesterone and HER2 receptors by receptor-independent mechanisms [24,25]. However, the clinical use of L and F may be restricted due to their limited bioavailability and water solubility [21–23]. Thus, novel approaches for more efficient administration of L and F are needed.

In the present study, PAMAM dendrimer-based nano-delivery systems for L and F were designed and their usefulness was evaluated for the improvement of the anticancer effects of L and F against three cellular models of breast cancer with different receptor status, namely ER-positive, triple negative and HER2-positive cells [26]. The use of L-PAMAM and F-PAMAM nanoplatfoms potentiated the anticancer effects of free drugs that were mediated by apoptotic cell death and cytotoxic autophagy. Nano-drugs also promoted senolysis, i.e. the elimination of doxorubicin-induced senescent breast cancer cells. Thus, novel nano-senolytics are proposed to be used as a part of a sequential anticancer approach involving pro-senescence therapy followed by senolytic therapy.

2. Materials and methods

2.1. Synthesis, functionalization and characterization of nano-drugs

2.1.1. Chemicals

The chemicals used in the synthesis of poly(amidoamine) PAMAM G3 dendrimer, α -D-glucoheptono-1,4-lactone (GHL), 4-nitrophenyl chloroformate (NPCF), 2-chloro-1-methylpyridinium iodide (Mukaiyama reagent), 4-dimethylaminopyridine (DMAP), fluorescein isothiocyanate (FITC), 6-[fluorescein-5(6)-carboxamido]hexanoic acid (FCH), and fulvestrant were purchased from Merck KGaA (Darmstadt, Germany). Lapatinib was obtained from Ambeed (Arlington Heights, IL, USA). Spectra/Por® 3 RC dialysis membrane (cellulose, molecular weight cut-off, MWCO = 3.5 kDa) was provided by Carl Roth GmbH & Co. KG (Karlsruhe, Germany).

2.1.2. NMR spectroscopy

The NMR spectra were recorded using a Bruker 300 MHz instrument (Rheinstetten, Germany). Spectral assignments were performed based on 2-D ^1H - ^1H COSY and ^1H - ^{13}C HSQC and HMBC experiments.

2.1.3. Conjugate size and ζ potential

Dynamic light scattering (DLS) and ζ potential for glucoheptoamidated G3 conjugates were measured at pH 5 (0.04 M acetate buffer) and in water using the Zetasizer Nano instrument (Malvern, UK) for ca. 1 mg/mL samples (0.1 mM solutions).

2.1.4. Synthesis of conjugates

2.1.4.1. Glucoheptoamidated PAMAM G3. The G3 was substituted with α -D-glucoheptono-1,4-lactone (GHL) by adding solid GHL (343 mg, 1650 μmoles) into 815 mg of G3 (118 μmoles) in 15 mL of DMSO. When GHL was dissolved, the mixture was heated at 50 °C for 24 h. The mixture was then transferred to a dialytic tube (cellulose, MWCO = 3.5 kDa) and dialyzed against water for three days (seven times, 3 L). Water was evaporated under reduced pressure, and product was identified using ^1H NMR spectroscopy as G3 substituted with average twelve glucoheptoamide residues. Yield: 1020 mg (108 μmoles , theoretical MW = 9406 Da), 91 %. 50 mg of isolated glucoheptoamidated G3 (5.3 μmoles) were then dissolved in 1 mL of DMSO and labeled with one equivalent of FITC (1.1 mg, 5.3 μmoles) dissolved in 0.67 mL of ethanol. The product, glucoheptoamidated G3* was purified by extensive dialysis and isolated at 65 % yield (46.6 mg).

2.1.4.2. Lapatinib conjugation with glucoheptoamidated G3. Lapatinib (L, 123.6 mg, 212 μmoles) was dissolved in 5 mL of DMSO- d_6 and 100 μL of pyridine- d_5 . N-(para-nitrophenyl)chloroformate (NPCF) was then added in two portions (in total 54 mg, 268 μmoles). The acylation reaction was monitored using ^1H NMR spectroscopy. The substitution of L with NPCF into 7-N-acyl derivative (L-NPF) was completed within 2 h at room temperature. 41.5 mM activated L was used to attach the drug to primary amine groups of G3 through one-carbon linker as follows: 2.37 mL of activated L solution (100 μmoles of L-NPF) was added dropwise into glucoheptoamidated G3 (157.9 mg, 16.7 μmoles) in 2 mL of DMSO. The mixture was heated at 50 °C for 16 h. Part of the mixture (1.4 mL containing 5.35 μmoles of glucoheptoamidated G3) was taken for labeling with fluorochromes and the rest (11.34 μmoles) was dialyzed as described above. The water was then removed under reduced pressure, the solid dried at 2 mbar pressure for 12 h, and the ^1H NMR spectrum was recorded to characterize the conjugate G3^{6L}. Yield: 116.3 mg (8.9 μmoles ; calculated MW = 13,061 Da), 53.3 %. In addition, the remaining 5.35 μmoles of G3^{6L} in 1.4 mL of DMSO were used for labeling with FCH, namely 5.35 μmoles pre-activated with Mukaiyama reagent: 2-chloro-1-methylpyridine iodide (10 μmoles) in the presence of DMAP (20 μmoles) in DMSO. The product G3^{6L*} was isolated as described above (the yield 56.5 mg (4.3 μmoles); 80 %). In separate synthesis, the G3^{4L} was obtained using 5:1 M ratio of L: glucoheptoamidated G3 at 10 μmole scale according to the procedure described above.

2.1.4.3. Fulvestrant conjugation with glucoheptoamidated G3. Fulvestrant (F, 45.5 mg, 75 μmoles) was dissolved in 5 mL of CDCl_3 and 500 μL of pyridine- d_5 . The mixture was refluxed for 12 h, while the progress of the reaction was monitored using ^1H NMR spectroscopy. The conversion of F into 17-O-(*p*-nitrophenyl)formate (L-NPF) was completed after 8 h reaction. Solvents were removed under reduced pressure, solid residue was dissolved in 0.5 mL of DMSO and added to 141 mg of glucoheptoamidated G3 (15 μmoles) in 1 mL of DMSO. The mixture was heated at 50 °C for 4 h, although immediate release of the *p*-nitrophenol side product of the reaction was already observed within initial 15 min. The product was processed as before to yield 122.4 mg of G3^{4F} and identified using NMR spectroscopy (10.2 μmoles , calculated MW = 11,946 Da); 69 %. 60 mg of isolated G3^{4F} (5 μmoles) were fluorescently labeled with an equivalent of FITC in DMSO. The product G3^{4F*} was isolated after extensive dialytic purification at 45 % yield (32 mg).

2.1.4.4. Lapatinib and fulvestrant conjugation with glucoheptoamidated G3. Fulvestrant (F, 36.4 mg, 60 μmoles) was dissolved in 3 mL of CHCl_3 and 0.1 mL of pyridine- d_5 . 66 μmoles of NPCF were then added and the mixture was refluxed for 3 h. Solvents were removed under reduced pressure and solid residue was dissolved in 1 mL of DMSO. 60 μmoles of lapatinib (L, 34.8 mg) were dissolved in 1.5 mL of DMSO and 0.1 mL of pyridine- d_5 and activated by adding 13.3 mg of NPCF (61 μmoles). The

solutions of L-NPF and F-NPF were then combined and added dropwise into 188.1 mg of glucoheptoamidated G3 (20 μ moles) in 5 mL of DMSO with vigorous stirring. The mixture was heated at 50 °C for 12 h, transferred into dialytic tube and dialyzed for 4 days against water (seven times, 5 L). The water was then evaporated under reduced pressure and solid product was dried overnight at 2 mbar pressure. The product was identified using ^1H NMR spectroscopy as an equally substituted conjugate with the 3 L and 3 F residues $\text{G3}^{3\text{L}3\text{F}}$, isolated at 76.5 % (202 mg; 15.3 μ moles). 50 mg of $\text{G3}^{3\text{L}3\text{F}}$ (3.8 μ moles) were labeled with FHC (3.9 μ moles) and $\text{G3}^{3\text{L}3\text{F}*}$ was isolated as described before at 40 % yield (26 mg).

2.2. Cancer cell lines and treatment with nano-drugs

Three breast cancer cell lines with different receptor status, namely MCF-7 (ER-positive, HTB-22TM), MDA-MB-231 (triple negative, HTB-26TM) and SK-BR-3 (HER2-positive, HTB-30TM) were obtained from ATCC (Manassas, VA, USA) and cultured as comprehensively described elsewhere [27]. Briefly, cell culture conditions were: DMEM medium supplemented with 10 % FBS, 100 U/mL penicillin, 0.1 mg/mL streptomycin, and 0.25 μ g/mL amphotericin B (Corning, Tewksbury, MA, USA), temperature of 37 °C and atmosphere containing 5 % CO_2 . MDA-MB-231 cells with *TRDMT1* gene knockout were obtained using double nickase-based genetic engineering as previously reported (D-NIC cells transfected with *TRDMT1/DNMT2* Double Nickase Plasmids (h, sc-402709-NIC and h2, sc-402709-NIC-2, Santa Cruz Biotechnology, Dallas, TX, USA) [28]. Plasmid-related effects were considered using cells with Control Double Nickase Plasmid (C-NIC cells, sc-437281, Santa Cruz Biotechnology, Dallas, TX, USA). The initial screening for the selection of the tested concentration was performed using the MTT test. The effects of PAMAM dendrimer G3, free drugs, nano-drugs and nano-drugs with attached fluorochromes were analyzed in the concentrations ranging from 0.1 to 10 μM and 24 h and 48 h treatment. The lowest concentration (2.5 μM) that promoted statistically significant differences in metabolic activity of cancer cells treated with free drugs versus nano-drugs for 24 h was selected for further analysis.

2.3. Uptake of nanoplatforms

To analyze the uptake of nano-drugs by breast cancer cells, treatment with nanoplatforms with attached fluorochromes (G3^* , $\text{G3}^{4\text{L}*}$, $\text{G3}^{4\text{F}*}$ and $\text{G3}^{3\text{L}3\text{F}*}$) and imaging flow cytometry (Amnis® FlowSight® imaging flow cytometer and IDEAS software version 6.2.187.0, Luminex Corporation, Austin, TX, USA) were used. Briefly, cells were fixed with 70 % ethanol and 4000 events per sample were considered. G3^* , $\text{G3}^{4\text{L}*}$, $\text{G3}^{4\text{F}*}$ and $\text{G3}^{3\text{L}3\text{F}*}$ -mediated fluorescence (intensity and spot analysis) was assayed and data were compared to the untreated control. Representative microphotographs are also shown.

2.4. Cell cycle analysis

To investigate nanoplatform-mediated changes in the phases of the cell cycle, DNA content-based cell cycle analysis and flow cytometry were considered as previously reported [28]. Briefly, Muse® Cell Analyzer and Muse® Cell Cycle Assay Kit (Luminex Corporation, Austin, TX, USA) were used according to the manufacturer's instructions.

2.5. Apoptotic and necrotic parameters

To study nanoplatform-mediated apoptosis, two biomarkers of apoptotic cell death were considered, namely phosphatidylserine externalization and pan-caspase activity (Muse® Annexin V and Dead Cell Assay Kit and Muse® Multi-caspase Assay Kit, Luminex Corporation, Austin, TX, USA), respectively. Moreover, to discriminate between apoptosis and necrosis, 7-aminoactinomycin (7-AAD) staining was performed. The early and late subpopulations of apoptotic cells were

revealed and analyzed using flow cytometry and dedicated software as described elsewhere [29].

2.6. Immunofluorescence and GFP-based assays

Cells treated with nanoplatforms were fixed and immunostained as previously reported [27]. The following primary and secondary antibodies were used anti-LC3B (1:200, ab51520), anti-NF- κ B (p65) (1:100, PA5-16545), anti-IL-8 (1:500, ab154390), anti-*TRDMT1/DNMT2* (1:500, MA5-16197), and secondary antibodies conjugated to Texas Red (1:1000, T2767) or Alexa Fluor Plus 488 (1:1000, A32723) (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA, Abcam, Cambridge, UK). The nuclei were revealed using Hoechst 33342 staining. Immunosignals were acquired and analyzed using a laser-based confocal imaging and high content analysis (HCA) system IN Cell Analyzer 6500 HS and dedicated IN Carta software (Cytiva, Marlborough, MA, USA). Total protein levels, or if applicable cytosolic (cyto) and nuclear (nuc) pools, are presented as relative fluorescence units (RFU). To analyze the content of LAMP1, a lysosomal marker, and p62, an autophagy marker, GFP-based imaging was considered as described elsewhere [29]. Briefly, CellLight™ Lysosomes-GFP, BacMam 2.0 (C10596, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) and Premo™ Autophagy Sensor GFP-p62 Kit (P36240, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) were used, respectively. GFP-LAMP1 or GFP-p62 signals were investigated using a laser-based confocal imaging system IN Cell Analyzer 6500 HS (Cytiva, Marlborough, MA, USA). Quantitative analysis was performed using dedicated software, and the levels of LAMP1 and p62 are presented as relative fluorescence units (RFU).

2.7. Intracellular pH homeostasis

Fluorescence-based assay for the analysis of intracellular pH was used, namely pHrodo™ Green AM Intracellular pH Indicator (P35373, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) according to the manufacturer's instructions as previously reported [30]. Nanoplatform-mediated changes in intracellular pH are presented as relative fluorescence units (RFU). According to the supplier's protocol, a decrease in RFU reflects intracellular alkalization.

2.8. Senolysis protocol

To activate the chemotherapy-induced senescence program in breast cancer cells, 24 h treatment with 35 nM doxorubicin hydrochloride (DOX, 44583, Merck KGaA, Darmstadt, Germany) was used as previously reported [28]. Cells were cultured for seven days after DOX removal by changing a medium every 48 h and then free L and F and $\text{G}^{4\text{L}}$, $\text{G}^{4\text{F}}$ and $\text{G3}^{3\text{L}3\text{F}}$ at the concentration of 2.5 μM were added for 24 h. Apoptosis-based senolytic activity of drugs and nano-drugs was investigated using Annexin V staining and flow cytometry analysis as described in the subsection about apoptotic and necrotic parameters.

2.9. Statistical analysis

The results are calculated as the mean \pm SD from three biological replicates. If applicable, box and whisker plots with median, lowest, and highest values were also used. Statistically significant differences between untreated controls and treated samples were revealed using one-way ANOVA and Dunnett's multiple comparison test (GraphPad Prism 5), whereas differences between free drug stimulation and nano-drug stimulation were analyzed using one-way ANOVA and Tukey's multiple comparison test (GraphPad Prism 5). *P*-values of <0.05 were assumed as significant.

3. Results and discussion

The efficiency of L- and F-mediated targeted breast cancer therapies

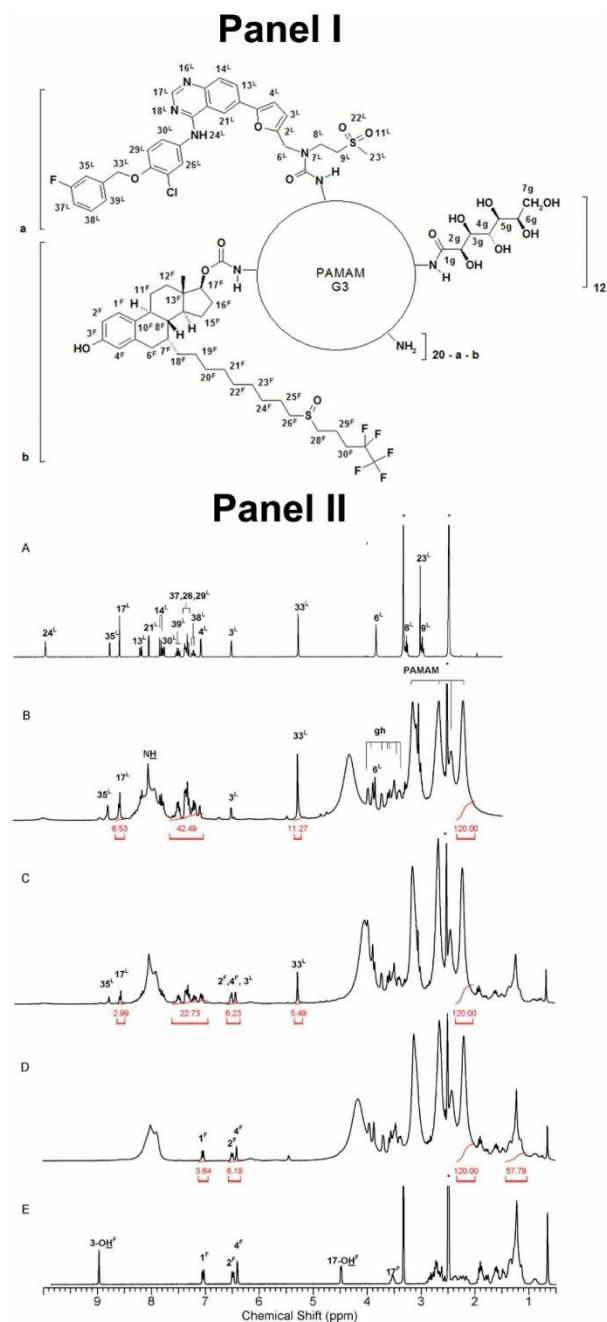


Fig. 1. The molecular scheme of PAMAM dendrimer G3 conjugates with lapatinib (L) and/or fulvestrant (F) attached through a short linker provided by NPCF (panel I). Twelve of initially 32 amine groups were blocked by the amidation with α -D-glucoheptono-1,4-lactone (gh). The averaged formulae of conjugates are as follows: G3^{4L} (a = 4, b = 0); G3^{4F} (a = 0, b = 4); G3^{3L3F} (a = 3, b = 3). G3^{4L} and G3^{3L3F} were also fluorescently labeled with fluorescein-hexanoate attached through ester bond to the gh residues and G3^{4F} was labeled with FITC attached to remaining amine groups through thiourea bond. The drug-free carrier partially glucoheptoamidated G3 was also labeled with an equivalent of FITC as a reference material (named as G3^{*}). (Panel II) The ¹H NMR spectra of: (A) lapatinib (L); (B) G3^{6L}; (C) G3^{3L3F}; (D) G3^{4F}; (E) fulvestrant (F) in DMSO-*d*₆. The residual HD₂S(O)CD₃ resonance is labeled with an asterisk.

can be limited due to poor aqueous solubility and low bioavailability of free drugs [21,23]. Thus, some nano-based drug delivery systems such as nanoparticles, micelles, nanocapsules, nanochannels, and liposomes were proposed [21]. For example, selected polymer-based DDS approaches were tested against breast cancer cells, namely complexation with cyclodextrins, polylactide-co-poly(ethylene glycol) micelle-based co-delivery system for paclitaxel and L and 2,3-dimethylmaleic-anhydride-poly(ethylene glycol)- ϵ -poly-L-lysine-doxorubicin/L polymeric nanoplatform (DMMA-P-DOX/L) [31–33]. As no data were reported on PAMAM dendrimers as delivery vehicles for L and F and their intensifying effects on free drug anticancer action, we designed and tested L-PAMAM and F-PAMAM conjugates using three breast cancer cell lines reflecting three distinct models of breast cancer, namely ER-positive, triple negative and HER2-positive breast cancer [26]. The third generation dendrimer (G3) was selected in order to functionalize it by covalent attachment of L and F, which otherwise are highly hydrophobic and sparingly soluble in water. Low-substituted conjugates were obtained with remaining primary amine groups of G3 converted by the addition of α -D-glucopyranono-1,4-lactone (Fig. 1, panel I). The latter conversion was reported to reduce the cytotoxicity of naked G3 dendrimer [34,35].

3.1. Synthesis and characterization of nano-drug conjugates by NMR spectroscopy

L and F drugs were converted by the addition of 4-nitrophenyl chloroformate (NPCF), which is a convenient reagent to functionalize hydroxyl groups of a substrate [36] and sulfonamide nitrogen atom of nimesulide [37,38]. Therefore, L or F were attached to the partially glucoheptoamidated PAMAM dendrimer G3 by a short linker provided by NPCF (Fig. 1, panel I). The conversion of L into L-NPF was monitored using ^1H NMR spectroscopy (Fig. S1). The resonances of L in DMSO- d_6 were assigned by 2-D COSY (Fig. S2) and heteronuclear ^1H - ^{13}C HSQC and HMBC spectroscopy (Table S1). A substantial shift of H-8 and H-9 triplet and H-6 singlet resonances was observed upon conversion from 3.28, 2.99, and 3.84 for L into 3.73, 3.44 (both overlapped multiplets of two forms) and 4.43 (major) and 4.68 (minor), respectively. The resonances of hydrogen nuclei far from N-7 atom shifted only slightly, although also showed two sets of resonances. We concluded that the attachment of *p*-nitrophenylformate into N-7 occurred. The COSY spectra of L and L-NPF enabled to assign the ^1H resonances (Fig. S2 and Fig. S3). Two sets of resonances were observed in post-reaction mixture due to the presence of *cis-trans* isomers around newly formed amide bond in L-NPF. Similarly, F was converted by reaction with NPCF. The progress of the reaction was monitored using ^1H NMR spectroscopy (Fig. S4). The resonances of F were assigned according to reported studies [39] and 2-D COSY as well as heteronuclear ^1H - ^{13}C spectra (Fig. S5 and Fig. S6). Based on the ^1H NMR spectral changes, i.e. disappearance of 17-OH resonance with concomitant downfield shift of 17-H proton resonance, one can conclude that the derivatization of F into F-17O-(*p*-nitrophenyl)formate was performed. NPCF-activated F and L were used to obtain a number of conjugates with partially glucoheptoamidated PAMAM dendrimer G3. In mild conditions, F-NPF and L-NPF were reacted with glucoheptoamidated G3 in DMSO. During the reaction, a yellow side-product, *p*-nitrophenol was released, which was later removed together with DMSO by extensive dialysis of post-reaction mixture against water. The isolated products were characterized using ^1H NMR spectroscopy (Fig. 1, panel II). The ^1H NMR spectrum of G3^{6L} (Fig. 1, panel II, B) is dominated by PAMAM G3 core methylene resonances of total intensity [484H] within 2.02–3.30 ppm. One of these broad signals (centered at 2.20 ppm) was used as integral intensity internal reference of [120H] intensity. The resonances of gh proton are located downfield, within 3.29–4.00 ppm and a total intensity of [84H] corresponds to 12 gh residues. The resonances of amide-attached L are not shifted considerably in comparison with unconjugated L (Fig. 1, panel II, A), although two sets of L resonances in the conjugate G3^{6L} are present, as well as in the case of L-NPF spectrum (Fig. S1). The integral

intensity of L resonances in G3^{6L} spectrum enabled to conclude that average number of L residues was six. Similar ^1H NMR spectrum was obtained for the less substituted G3^{4L}, except the broad resonance from water and gh hydroxyl groups (at 4.3 ppm), which are separated from lapatinib 33^L resonance at 5.26 ppm, overlapped at the spectrum of G3^{4L} (data not shown). The latter conjugate was further fluorescently labeled and used in biological studies. The ^1H NMR spectrum of G3^{4F} (Fig. 1, panel II, D) compared to the spectrum of F in DMSO- d_6 (Fig. 1, panel II, E) was slightly different. The aromatic proton resonances 1^F, 2^F, and 4^F remained unshifted, while the 17^F resonance was identified by HSQC/HMBC spectra (Fig. S6 and Fig. S7) at 5.32 ppm, overlapped with the gh resonances. The integral intensity of F resonances in comparison with the internal reference led to the identification of four residues of F in the conjugate. The synthesis of the ternary conjugate with both L and F aimed at the equimolar derivative G3^{3L3F}, which was identified by its ^1H NMR spectrum (Fig. 1, panel II, C).

3.2. Molecular size and association of drug conjugates measured by dynamic light scattering (DLS)

The molecular size of the PAMAM dendrimers G3 substituted with increasing numbers of gh residues falls to a diameter of 1.7–2.7 nm in water [34]. Protonation of the primary and tertiary amine groups of G3 at pH 5 resulted in an increase in diameter of 3.6–4.0 nm size (Table S2). The same behavior was observed for partially glucoheptoamidated D3^{*}, which additionally had fluorescein linked via thiourea bond into primary amine group of G3. The molecular diameter averaged by number of D3^{*}, $d(N)$ increased from 1.6 into 6.0 nm upon pH decrease from 7 to 5. The conjugate of L, G3^{4L}, showed considerably larger diameter in water (11.4 nm), which was still in the range of monomolecular dispersion. Both particles of conjugates containing F: the G3^{4F} and G3^{3L3F} had one order of magnitude larger diameter than that for monomolecular dispersion, which was rather expected due to the presence of long polyhydrocarbon chain in F ended with -CF₂CF₃ groups. The prevailing hydrophobic inter-chain association resulted in formation of particles of 60 nm size in the case of G3^{3L3F} and even larger particles in the case of G3^{4F} (Table S2). The effects of G3^{4L}, glucoheptoamidated PAMAM dendrimer G3 conjugated with four L molecules; G3^{4F}, glucoheptoamidated PAMAM dendrimer G3 conjugated with four F molecules and G3^{3L3F}, glucoheptoamidated PAMAM dendrimer conjugated with three L and three F molecules were then studied against three breast cancer cell lines with different receptor status, namely MCF-7 (ER-positive), MDA-MB-231 (triple negative) and SK-BR-3 (HER2-positive) cells.

3.3. L and F conjugation with PAMAM dendrimer G3 potentiates cytostatic and/or cytotoxic effects against breast cancer cells compared to free drugs

For the preliminary screening of anticancer effects of L and F conjugates with 3rd generation PAMAM dendrimer (G3^{4L}, G3^{4F} and G3^{3L3F}), MTT-based changes in metabolic activity of three breast cancer cell lines were considered (Fig. S8). Concentrations ranging from 0.1 to 10 μM and two time points, namely 24 (Fig. S8A) and 48 h (Fig. S8B) stimulation with anticancer drugs and their corresponding conjugates, were used. As expected, limited effects of free drugs were observed (Fig. S8). Except for 2.5 μM F-treated MCF-7 cells for 48 h, the effects of the anticancer drugs were mild to moderate (Fig. S8). Surprisingly, L and F conjugation with PAMAM dendrimer G3, when nanoplatforms were used at the concentration as low as 2.5 μM , intensified anticancer effects compared to free drug action against three breast cancer cell lines (Fig. S8). The most potent action of G3^{4L} was documented in MDA-MB-231 and SK-BR-3 cells, whereas G3^{4F} was more effective against MCF-7 cells (Fig. S8). Time-dependent effects were also observed (Fig. S8). The PAMAM dendrimer G3 alone and conjugates with attached fluorochromes (G3, G3^{4L}, G3^{4F} and G3^{3L3F}) did not affect the metabolic

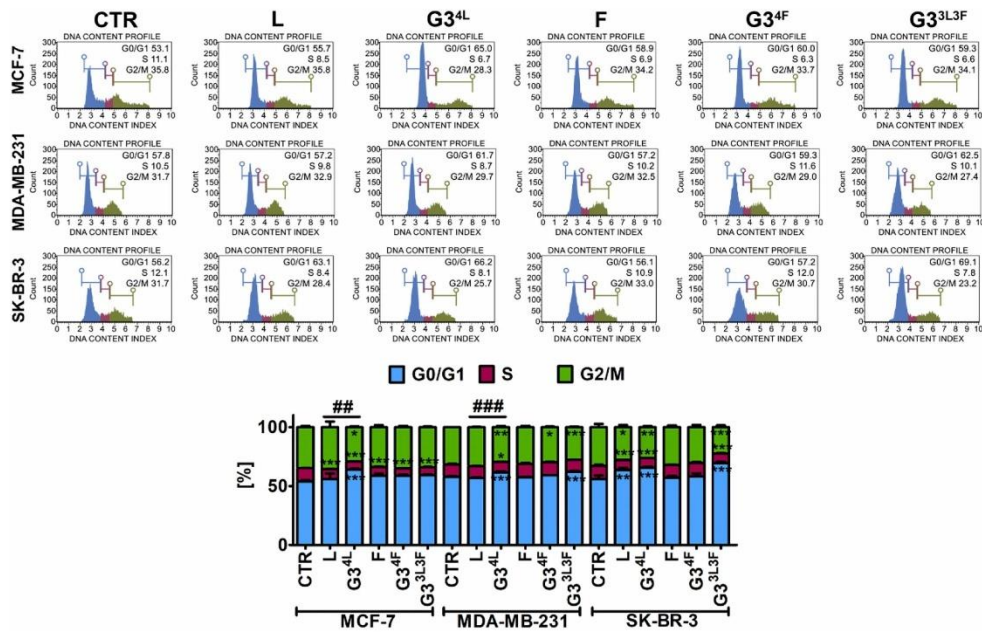
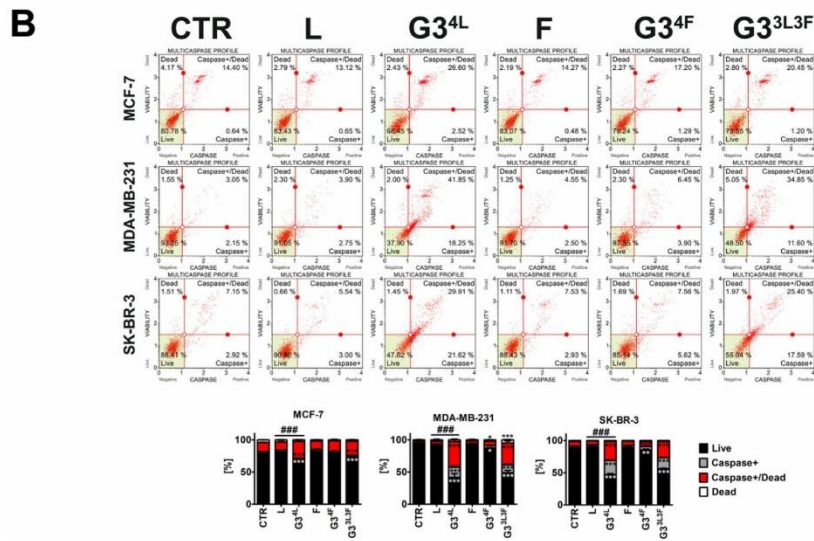
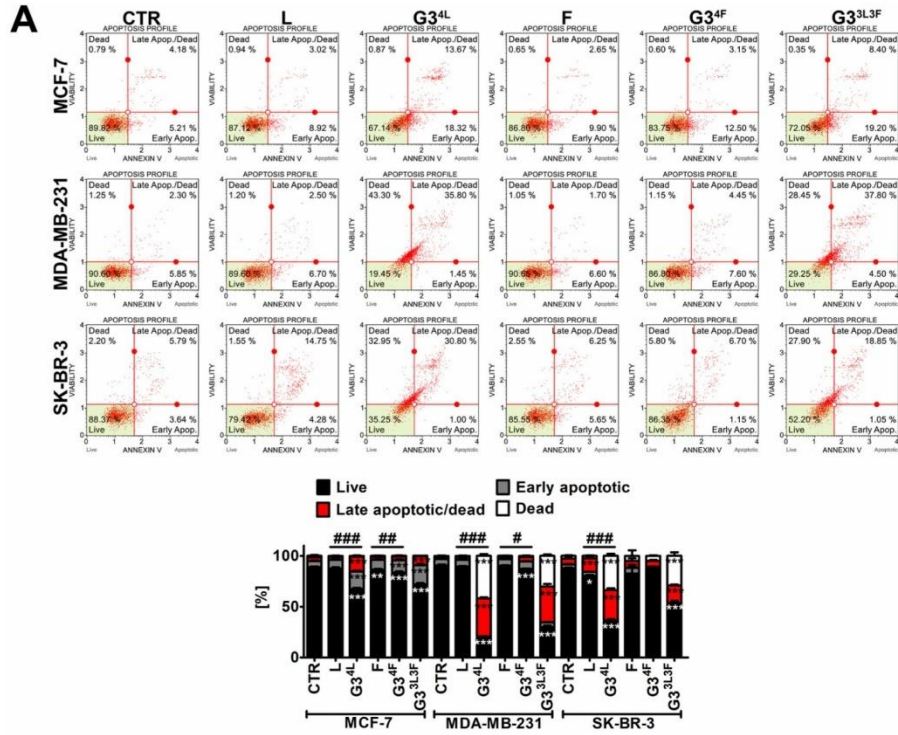


Fig. 2. Nanoplatfrom-mediated changes in the phases of cell cycle of three breast cancer cell lines, namely MCF-7, MDA-MB-231 and SK-BR-3 cells. DNA content-based analysis of cell cycle was performed using flow cytometry. Representative histograms are presented (top). Bars indicate SD, $n = 3$, $***p < 0.001$, $**p < 0.01$, $*p < 0.05$ compared to the untreated control CTR (ANOVA and Dunnett's a posteriori test); $###p < 0.001$, $##p < 0.01$ compared to the treatment with a free drug (ANOVA and Tukey's a posteriori test) (bottom). CTR, untreated control; L, lapatinib treatment; G3⁴L, treatment with lapatinib-PAMAM nanoplatfrom; F, fulvestrant treatment; G3⁴F, treatment with fulvestrant-PAMAM nanoplatfrom; G3³L3F, treatment with lapatinib-PAMAM and fulvestrant PAMAM nanoplatfrom.



(caption on next page)

Fig. 3. Nanoplatfom-induced apoptosis and necrosis in three breast cancer cell lines, namely MCF-7, MDA-MB-231 and SK-BR-3 cells. The modes of cell death were evaluated using flow cytometry and Annexin V staining (A) and pan-caspase activity assay (B). Annexin V-positive cells or pan-caspase activity-positive cells were classified as early apoptotic cells and Annexin V-positive and 7-AAD-positive cells or pan-caspase activity-positive and 7-AAD-positive cells were assessed as late apoptotic cells. Representative dot plots are shown (top). Bars indicate SD, $n = 3$, $***p < 0.001$, $**p < 0.01$, $*p < 0.05$ compared to the untreated control CTR (ANOVA and Dunnett's a posteriori test); $^{###}p < 0.001$, $^{##}p < 0.01$, $^{\#}p < 0.05$ compared to the treatment with a free drug (ANOVA and Tukey's a posteriori test) (bottom). CTR, untreated control; L, lapatinib treatment; $G3^{4L}$, treatment with lapatinib- PAMAM nanoplatfom; F, fulvestrant treatment; $G3^{4F}$, treatment with fulvestrant- PAMAM nanoplatfom; $G3^{3L3F}$, treatment with lapatinib- PAMAM and fulvestrant-PAMAM nanoplatfom.

activity of breast cancer cells compared to untreated cells and cells treated with non-fluorescent conjugates, respectively (Fig. S8). Thus, the lowest concentration of nanoplatfoms (2.5 μM) that potentiated changes in metabolic activity compared to treatment with free drugs in three breast cancer cell lines (Fig. S8, denoted as red bars) was selected for further analysis.

We have then investigated the uptake of nanoplatfoms using L-PAMAM and F-PAMAM conjugates with attached fluorochromes ($G3^{4L}$, $G3^{4F}$ and $G3^{3L3F}$) (Fig. S9). Indeed, nanoplatfoms were efficiently taken up by three breast cancer cells as judged by imaging flow cytometry analysis (Fig. S9). The uptake efficiency of F-based nano-drugs was more pronounced than the uptake efficiency of L-based nano-drugs (Fig. S9).

As, in general, MTT test does not discriminate between cytostatic and cytotoxic effects promoted by test agents, we have then considered selected parameters of cell proliferation and cytotoxicity, here apoptotic and necrotic biomarkers (Fig. 2 and Fig. 3). $G3^{4L}$ but not $G3^{4F}$ potentiated the cell cycle arrest at the G_0/G_1 cell cycle phase compared to free drug treatments in MCF-7 and MDA-MB-231 cells (Fig. 2). Similar trends were also documented in treated SK-BR-3 cells, but differences were insignificant (Fig. 2). As expected, cytotoxic effects of 24 h stimulation with 2.5 μM L and 2.5 μM F were mild to moderate and ER-positive MCF-7 cells were the most susceptible to F-induced apoptotic cell death, whereas F-mediated apoptosis was the most pronounced in HER2-positive SK-BR-3 cells (Fig. 3A). L, a dual tyrosine kinase inhibitor of HER2 and EGFR, is particularly active against HER2-positive breast cancer cells [20] and F, a selective estrogen receptor degrader, is particularly active against ER-positive breast cancer cells [22]. However, there are also reports on anticancer action of L and F against triple negative breast cancer (TNBC) cells [24,25]. L inhibited CIP2A/PP2A/p-Akt signaling and induced significant apoptosis in three TNBC cell lines [24]. However, the most pronounced cytotoxic effects were observed in MDA-MB-231 TNBC cells when L was used at the concentration of 10 μM for 48 h [24] that is four-times higher concentration than used in the present study (Fig. 3A). This was also highlighted by the authors as they stated that higher concentrations of L are needed for L-mediated CIP2A inhibition and apoptosis in TNBC cells [24]. L-mediated cytotoxicity against MDA-MB-231 cells was also evaluated in the other study and the authors claimed that IC_{50} value was 32.5 μM L after 24 h [40]. 1 μM F also inhibited growth of triple negative ER β^+ breast cancers (ER α^- /ER β^+ MDA-MB-231 cells) by up-regulation of ER β [25]. The authors demonstrated that F-mediated inhibition of DNA methyltransferase activity resulted in the elevation in the levels of ER β and its isoforms [25]. However, 1 μM F did not promote apoptotic cell death in ER α^- /ER β^+ MDA-MB-231 cells as judged by the absence of PARP-1 cleavage fragments [25]. $G3^{4L}$ and $G3^{4F}$ potentiated apoptotic (Annexin V staining) and necrotic (7-AAD staining) cell death compared to drug treatment alone (Fig. 3A). $G3^{4L}$ was also more cytotoxic than $G3^{4F}$ against three breast cancer cell lines (Fig. 3). The most sensitive to $G3^{4L}$ treatment were MDA-MB-231 cells (Fig. 3). $G3^{3L3F}$, a dual conjugate of L-PAMAM and F-PAMAM dendrimers, also promoted a massive apoptosis and necrosis in MDA-MB-231 and SK-BR-3 cells, but these cytotoxic effects were probably mediated by L-PAMAM dendrimer partner of the nanoplatfom. When the concentration of F-PAMAM nanoplatfom was increased to 10 μM , a similar pattern of cytotoxicity was revealed, namely free drug effects were limited and MDA-MB-231 cells were the most susceptible to 10 μM $G3^{4F}$ treatment (Fig. S10). We have also considered other biomarker of apoptotic cell death, namely pan-caspase

activity (Fig. 3B). Multi-caspase activity was potentiated upon $G3^{4L}$ treatment compared to L treatment alone in three breast cancer cell lines (Fig. 3B). $G3^{4F}$ also slightly stimulated the pan-caspase activity compared to F action alone, but the effects were not statistically significant (Fig. 3B). The elevation in pan-caspase activity was the most pronounced in MDA-MB-231 cells that is in agreement with $G3^{4L}$ -mediated apoptosis induction in these cells as judged by Annexin V staining (Fig. 3). The magnitude of increase in the pan-caspase activity also correlated with the phosphatidyserine externalization upon $G3^{3L3F}$ stimulation in MDA-MB-231 and SK-BR-3 cells (Fig. 3). Thus, we have indeed confirmed that the conjugation of anticancer drugs with PAMAM dendrimer G3 can sensitize breast cancer cell to apoptotic cell death. Moreover, we have also shown that the phosphatidyserine externalization correlated with the pan-caspase activity in treated MCF-7 cells that are caspase 3 deficient cells [41]. Thus, the lack of caspase 3 activity in MCF-7 cells did not interfere with the pan-caspase activity and this biomarker along with other biomarkers can be used to document nanoplatfom-induced apoptosis (Fig. 3).

3.4. $G3^{4L}$ promotes cytotoxic autophagy in breast cancer cells

As cancer cell response to chemotherapeutic treatment is rather complex [42] and may provoke the induction of autophagy with different implications for cancer therapy [43], we have then studied if also autophagic pathway can be affected upon nanoplatfom treatment (Fig. 4A and B). Two biomarkers of autophagy were considered, namely the levels of LC3B and p62 (Fig. 4A and B). $G3^{4L}$ promoted an increase in the pools of LC3B and decreased the levels of p62 compared to L stimulation that suggested that $G3^{4L}$ -mediated apoptosis is associated with cytotoxic autophagy in three breast cancer cell lines (Fig. 4A and B). As no similar effect was observed in the case of $G3^{4F}$ treatment compared to F treatment (Fig. 4A and B), one can conclude that more pronounced $G3^{4L}$ -mediated cell death compared to $G3^{4F}$ -related effects is due to $G3^{4L}$ -induced cytotoxic autophagy in breast cancer cells (Fig. 4A and B). It was postulated that chemotherapy-associated autophagy may stimulate different cellular responses, for example, protective autophagy may limit drug-induced apoptosis, and cytotoxic autophagy may promote cell death when induced [43]. In our experimental conditions, $G3^{4L}$ -mediated cytotoxic effects were based on $G3^{4L}$ -provoked apoptosis and accompanying cytotoxic autophagy. $G3^{4L}$ also enhanced lysosomal disruption as judged by decreased signals of the lysosomal marker LAMP1 compared to free drug treatment in three breast cancer cell lines (Fig. 4C). This effect was accompanied by disequilibrium in the intracellular pH homeostasis, but only in the case of $G3^{4L}$ -treated MCF-7 cells, statistically significant changes between L and $G3^{4L}$ stimulation were observed (Fig. 4D).

3.5. $G3^{4L}$ modulates pro-inflammatory response in breast cancer cells

We have then asked the question if nano-drugs can affect NF- κ B-mediated immune responses of breast cancer cells stimulating pro-inflammatory conditions (Fig. 4E, F and G). NF- κ B (nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells) is a group of transcription factors that modulate immune responses and inflammation, and promoting inflammation-associated tumorigenesis of many types of cancer [44,45]. The cytosolic and nuclear pools of NF- κ B were analyzed (Fig. 4E and F). In MCF-7 and MDA-MB-231 cells, $G3^{4L}$ treatment resulted in the accumulation of cytosolic NF- κ B compared to L stimulation (Fig. 4E). On

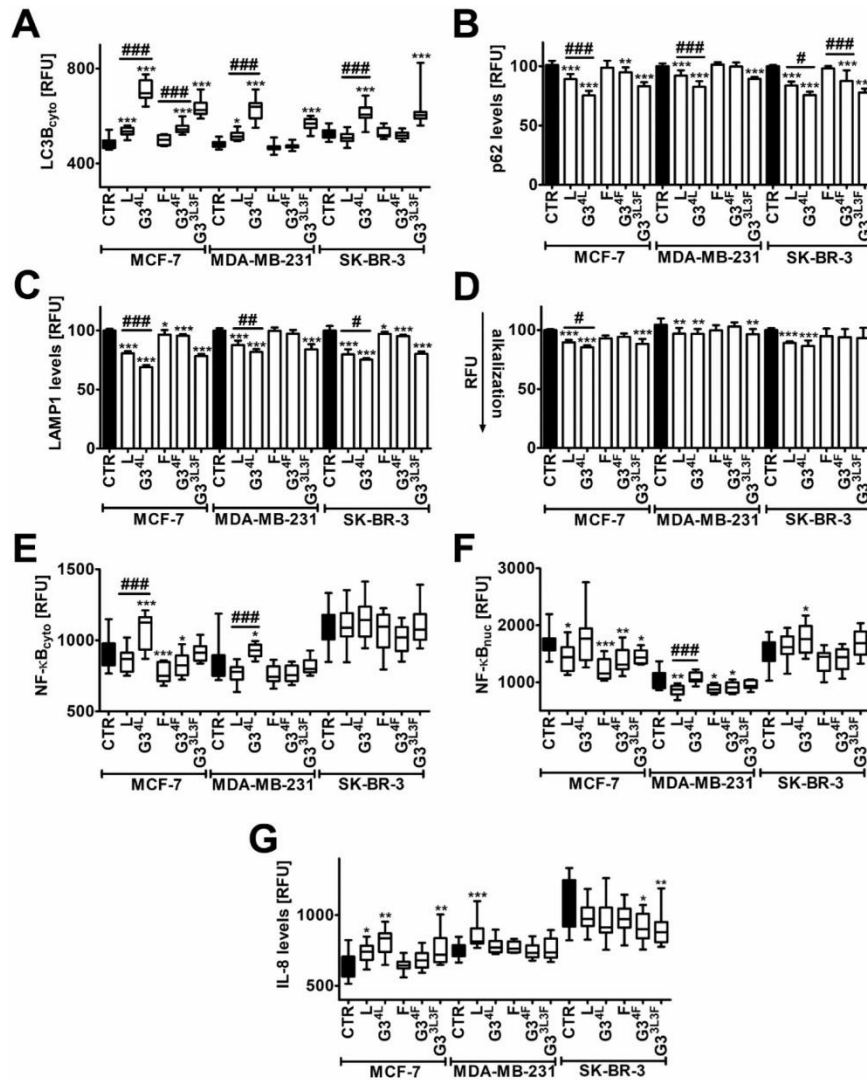


Fig. 4. Nanopatform-mediated changes in autophagic pathway (A, B), lysosome content (C), intracellular pH (D), the levels of NF-κB (E, F) and IL-8 (G) in three breast cancer cell lines, namely MCF-7, MDA-MB-231 and SK-BR-3 cells. To analyze the content and, if applicable, localization of selected proteins, immunofluorescence (A, LC3B; E, F, NF-κB; G, IL-8) or GFP-based imaging (B, p62; C, LAMP1) were considered. Immunofluorescence (A, E, F, G) or GFP-based signals (B, C) were analyzed using a laser-based confocal imaging system. Protein levels are expressed as relative fluorescence units (RFU). (D) Fluorescence-based assay was used to reveal changes in intracellular pH that is presented in relative fluorescence units (RFU). A decrease in RFU is considered as intracellular alkalinization (arrow). Box and whisker plots are shown or bars indicate SD, $n = 3$, $***p < 0.001$, $**p < 0.01$, $*p < 0.05$ compared to the untreated control CTR (ANOVA and Dunnett's a posteriori test); $###p < 0.001$, $##p < 0.01$, $#p < 0.05$ compared to the treatment with a free drug (ANOVA and Tukey's a posteriori test). CTR, untreated control; L, lapatinib treatment; G3^{4L}, treatment with lapatinib-PAMAM nanopatform; F, fulvestrant treatment; G3^{4F}, treatment with fulvestrant-PAMAM nanopatform; G3^{3L3F}, treatment with lapatinib-PAMAM and fulvestrant-PAMAM nanopatform.

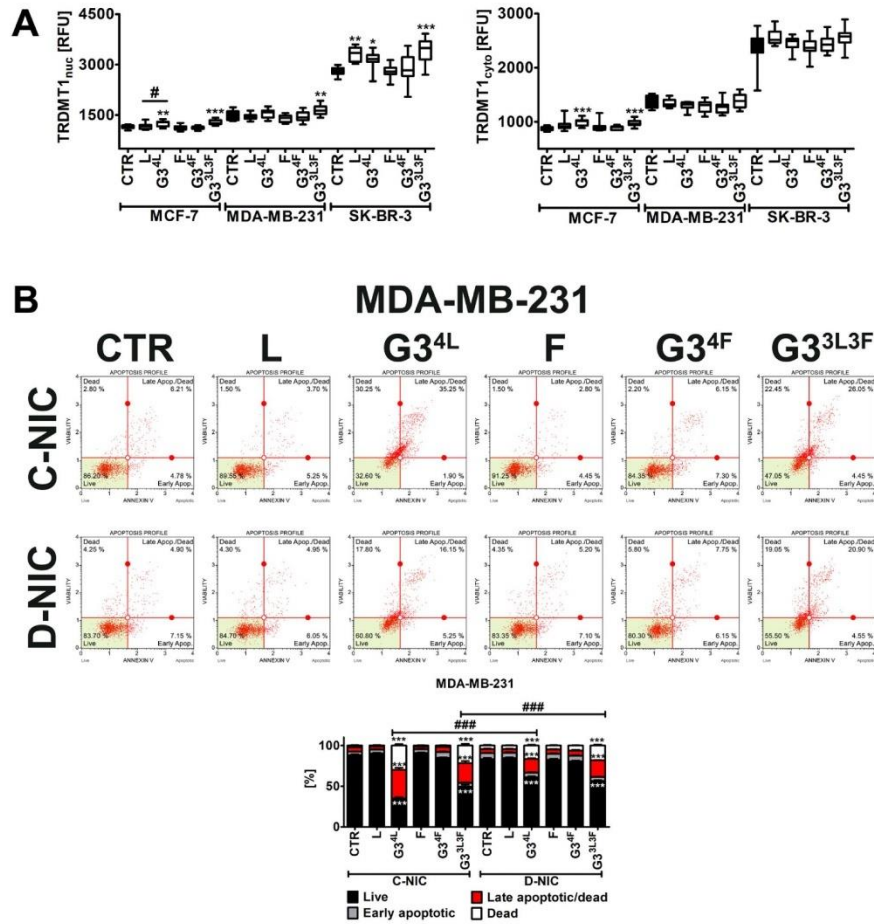
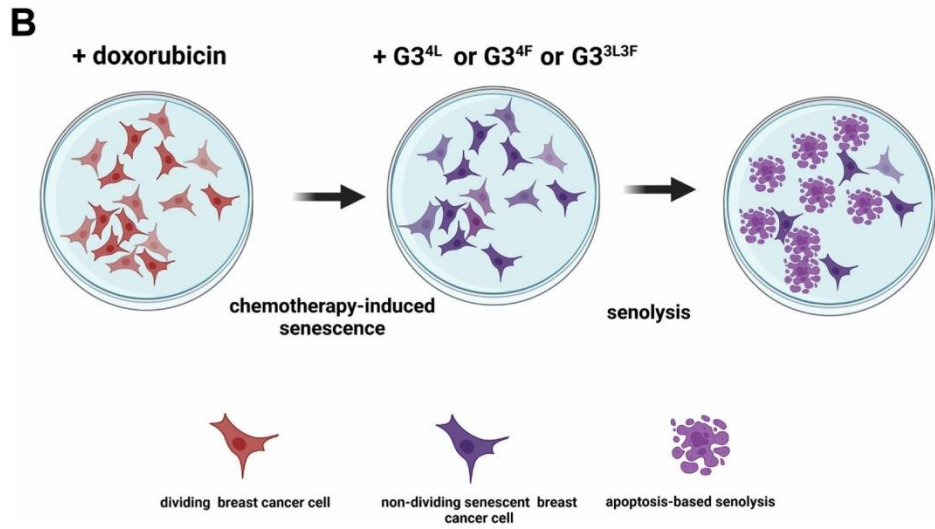
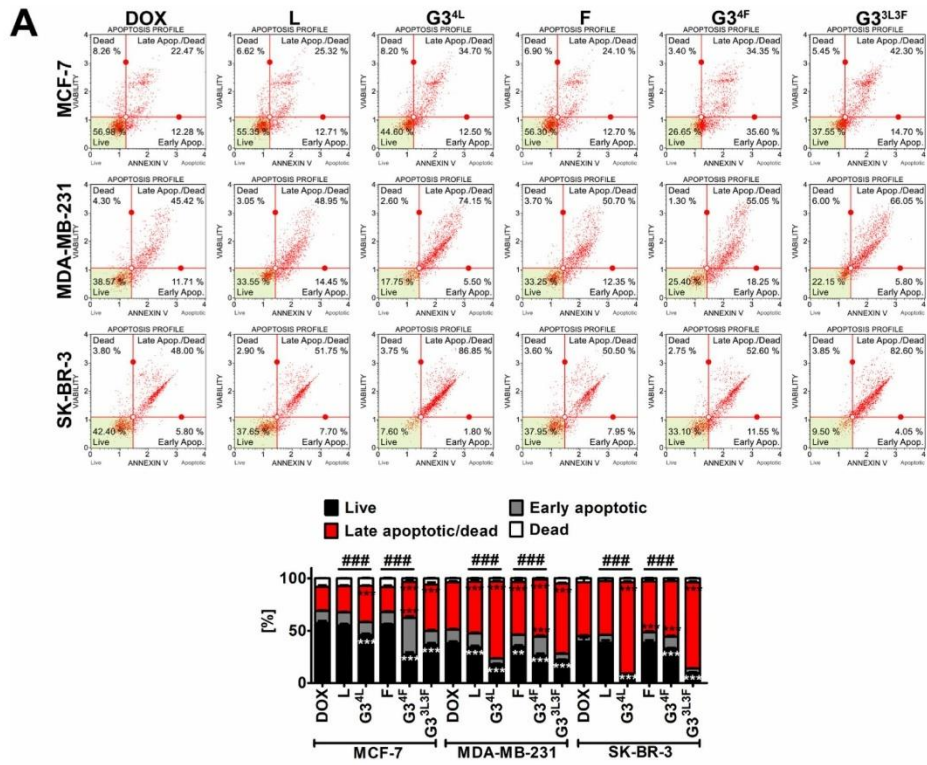


Fig. 5. Nanoplatform-mediated changes in the levels of nuclear and cytosolic fraction of TRDMT1 in three breast cancer cell lines, namely MCF-7, MDA-MB-231 and SK-BR-3 cells (A) and the effect of *TRDMT1* gene knockout on the sensitivity of MDA-MB-231 cells to nano-drug treatment (B). To investigate the nuclear and cytosolic pools of TRDMT1, immunofluorescence was used and TRDMT1 immunosignals were revealed using a laser-based confocal imaging system. TRDMT1 levels in nucleus (nuc) and cytoplasm (cyto) are expressed as relative fluorescence units (RFU). Box and whisker plots are shown, $n = 3$, *** $p < 0.001$, ** $p < 0.01$, * $p < 0.05$ compared to the untreated control CTR (ANOVA and Dunnett's a posteriori test); # $p < 0.05$ compared to the treatment with a free drug (ANOVA and Tukey's a posteriori test). (B) MDA-MB-231 cells with *TRDMT1* gene knockout (D-NIC cells) are more resistant to $G3^{4L}$ - and $G3^{3L3F}$ -mediated apoptosis compared to corresponding control cells with control plasmid (C-NIC cells). Apoptosis was assayed using Annexin V staining and flow cytometry. Representative dot plots are shown (top). Bars indicate SD, $n = 3$, *** $p < 0.001$ compared to the untreated control CTR (ANOVA and Dunnett's a posteriori test); ### $p < 0.001$ compared to treated C-NIC cells (ANOVA and Tukey's a posteriori test) (bottom). CTR, untreated control; L, lapatinib treatment; $G3^{4L}$, treatment with lapatinib-PAMAM nanoplatform; F, fulvestrant treatment; $G3^{4F}$, treatment with fulvestrant-PAMAM nanoplatform; $G3^{3L3F}$, treatment with lapatinib-PAMAM and fulvestrant-PAMAM nanoplatform.

the contrary, elevated levels of nuclear NF- κ B, a sign of NF- κ B activation, were documented in $G3^{4L}$ -treated SK-BR-3 cells compared to the untreated control (Fig. 4F). However, except of $G3^{4L}$ -treated MCF-7 cells, changes in the levels of NF- κ B were not correlated with increased production of proinflammatory cytokine IL-8 (Fig. 4G). Thus, L- and F-PAMAM nanoplatforms did not substantially potentiate the secretory profile of breast cancer cells. In contrast, L, as a free drug, promoted IL-8 production in MCF-7 and MDA-MB-231 cells, but these

effects were not associated with the activation of NF- κ B (Fig. 4F and G). It was reported that L, when used at the concentration of 1 μ M, activated NF- κ B in TNBC cells [46]. The effect was independent of EGFR/HER2 inhibition [46]. The authors concluded that L may potentiate oncogene addiction to NF- κ B and sensitize TNBC cells to proteasome inhibitors [46]. In contrast, L suppressed the activation of NF- κ B in HER2-positive breast cancer cells such as SK-BR-3 cells [47] that was achieved by decreased phosphorylation of I κ B- α via inhibiting the PI3K/Akt pathway



(caption on next page)

Fig. 6. Nanoplastform-mediated senolytic activity in doxorubicin-induced senescent MCF-7, MDA-MB-231 and SK-BR-3 breast cancer cells. (A) The senescence program in breast cancer cells was activated using 24 h treatment with 35 nM doxorubicin and 7 days after doxorubicin removal, senescent cells were subjected to the treatment with nano-drugs. Apoptosis-based senolysis was revealed using Annexin V staining and flow cytometry. Representative dot plots are shown (top). Bars indicate SD, $n = 3$, $***p < 0.001$, $**p < 0.01$ compared to DOX treatment (ANOVA and Dunnett's a posteriori test); $###p < 0.001$ compared to the treatment with a free drug (ANOVA and Tukey's a posteriori test) (bottom). DOX, doxorubicin treatment; L, lapatinib treatment in DOX-induced senescent cells; $G3^{4L}$, treatment with lapatinib-PAMAM nanoplastform in DOX-induced senescent cells; F, fulvestrant treatment; $G3^{4F}$, treatment with fulvestrant-PAMAM nanoplastform in DOX-induced senescent cells; $G3^{3L3F}$, treatment with lapatinib-PAMAM and fulvestrant-PAMAM nanoplastform in DOX-induced senescent cells. (B) A summarizing scheme. A model of chemotherapy-induced senescence in breast cancer cells was used to study apoptosis-based senolysis of lapatinib-PAMAM and fulvestrant-PAMAM nanoplastforms ($G3^{4L}$, $G3^{4F}$ and $G3^{3L3F}$). Doxorubicin was considered as a pro-senescent agent. DOX-induced senescent breast cancer cells are eliminated using the treatment with $G3^{4L}$, $G3^{4F}$ and $G3^{3L3F}$. Nanoplastform-mediated senolysis is based on apoptotic cell death as judged by the analysis of phosphatidyserine externalization. L-PAMAM and F-PAMAM nanoplastforms can be considered as novel nano-senolytics as a part of one-two punch anticancer strategy.

[47]. Diminished NF- κ B activity was also observed in L-resistant SK-BR-3 cells [47]. Thus, L-mediated changes in the activity of NF- κ B may be modulated in breast cancer cells with different receptor status [46,47]. IL-8 is overproduced in breast cancer cells and associated with poor prognosis of breast cancer patients [48,49]. IL-8 secreted by tumor associated macrophages (TAMs) may contribute to L resistance in HER2-positive breast cancer cells by the activation of Src/STAT3/ERK1/2-mediated EGFR cascade [50]. L blocked the mammosphere-promoting effect of IL-8 in both HER2-positive and negative patient-derived cancers [51]. In our experimental conditions, only treatment with $G3^{4F}$ and $G3^{3L3F}$ resulted in a decrease in IL-8 pools in HER2-positive SK-BR-3 cells (Fig. 4G).

3.6. TRDMT1 gene knockout promotes $G3^{4L}$ resistance in MDA-MB-231 cells

RNA methyltransferase TRDMT1/DNMT2 [52] is implicated in cellular stress responses as its levels and localization are affected during a number of treatments [53–56]. TRDMT1 is a regulator of adaptive responses during oxidative stress-induced senescence in normal cells [57] and chemotherapy-induced senescence in cancer cells [28]. TRDMT1, a part of DNA repair machinery, may also confer resistance to anticancer drug treatment [58]. Thus, we have then investigated the cytoplasmic and nuclear pools of TRDMT1 upon stimulation with nano-drugs. $G3^{3L3F}$ treatment resulted in increased fraction of nuclear TRDMT1 in three breast cancer cell lines compared to corresponding untreated controls (Fig. 5A). In $G3^{4L}$ -treated MCF-7 and SK-BR-3 cells, elevated pools of nuclear TRDMT1 were also observed (Fig. 5A). However, the effects of nano-drugs on cytoplasmic fraction of TRDMT1 were limited (Fig. 5A). The levels of cytosolic TRDMT1 were increased only in $G3^{4L}$ - and $G3^{3L3F}$ -treated MCF-7 cells (Fig. 5A). More recently, we have documented that TRDMT1 gene knockout differentially modulated cancer cell responses during chemotherapy-induced senescence in four cellular models of cancer [28]. The lack of active TRDMT1 gene resulted in doxorubicin resistance in osteosarcoma and glioblastoma cells, whereas in cervical and breast cancer cells increased drug sensitivity was noticed [28]. The loss of the TRDMT1 gene also attenuated osteosarcoma resistance to PARP inhibitors *in vitro* and *in vivo* [58]. Thus, we decided then to analyze the effect of TRDMT1 gene knockout in MDA-MB-231 cells that are the most sensitive to $G3^{4L}$ stimulation (Fig. 3). The lack of functional TRDMT1 gene promoted $G3^{4L}$ and $G3^{3L3F}$ resistance in MDA-MB-231 cells, whereas $G3^{4F}$ -based response was unaffected (Fig. 5B and Fig. S11). Therefore, in our experimental settings, TRDMT1 gene knockout promoted adverse effects as judged by limited L-PAMAM nanoplastform-induced cytotoxicity in MDA-MB-231 TNBC cells (Fig. 5B).

3.7. $G3^{4L}$ and $G3^{4F}$ promote the elimination of doxorubicin-induced senescent breast cancer cells

The accumulation of stress-induced senescent normal and cancer cells with affected secretory profiles can be considered as a side-effect of chemotherapy [59–61]. Senescent cells can modulate their microenvironment by the induction of secondary senescence in neighboring cells,

local inflammation, cell proliferation and migration and neo-vascularization [59–61]. Thus, senescent cells, when accumulated, can accelerate tumorigenesis [59–61]. There is a growing body of evidence that the elimination of senescent cells may have beneficial effects during age-related conditions and chemotherapeutic treatment [61,62]. A number of pharmacological agents that can selectively kill senescent cells (senolytics) is now described and available [63–65]. Furthermore, to eradicate drug-resistant cancer cells, one-two punch strategy was proposed [61,66,67]. Cancer cells are forced to activate the senescence program using selected agents with pro-senescent activity and then senescent cancer cells are subjected to senolytics to induce death pathways only in senescent cells (senolysis) [61,67]. As the effectiveness of $G3^{4L}$ and, to a lesser extent, $G3^{4F}$ in the killing of breast cancer cells by the induction of apoptosis and cytotoxic autophagy (this study) was documented, we have then asked a question of whether $G3^{4L}$ and $G3^{4F}$ may also have senolytic activity against senescent breast cancer cells. To do so, a common model of chemotherapy-induced senescence was used [28], namely doxorubicin-induced senescence in three breast cancer cell lines. As previously reported, breast cancer cells were stimulated with 35 nM doxorubicin for 24 h and then the anticancer drug was removed [28]. Cells were allowed to activate the senescence program and 7 days after doxorubicin removal, senescent breast cancer cells were treated with $G3^{4L}$ and $G3^{4F}$ for 24 h. Indeed, $G3^{4L}$ and $G3^{4F}$ potentiated apoptotic cell death in three senescent breast cancer cell lines compared to treatment with L and F, respectively (Fig. 6A). $G3^{4L}$ -based senolytic potential was the most pronounced in doxorubicin-induced senescent SK-BR-3 and MDA-MB-231 cells (Fig. 6A). A massive apoptosis was also observed in $G3^{3L3F}$ -treated senescent SK-BR-3 and MDA-MB-231 cells (Fig. 6A). Surprisingly, senescent breast cancer cells were much more sensitive to $G3^{4F}$ treatment than 'normal' non-senescent breast cancer cells, especially MCF-7 cells (Fig. 3 and Fig. 6A). This suggests that the induction of the senescence program in doxorubicin-treated MCF-7 breast cancer cells may improve the elimination of cancer cells upon stimulation with $G3^{4F}$, a novel senolytic agent. Thus, $G3^{4F}$ may be considered as a part of new one-two punch anticancer strategy, especially against relatively resistant $G3^{4F}$ -treated MCF-7 cells (Fig. 3 and Fig. 6A).

In conclusion, we have shown for the first time that the anticancer action of L and F can be potentiated by conjugation with PAMAM dendrimer G3. $G3^{4L}$ nanoplastform was more effective in the elimination of breast cancer cells with different receptor status compared to $G3^{4F}$ nanoplastform that was based on the induction of apoptosis and cytotoxic autophagy. The RNA methyltransferase TRDMT1 can also be involved in adaptive response to $G3^{4L}$ stimulation, as TRDMT1 gene knockout resulted in resistance to $G3^{4L}$ in MDA-MB-231 cells. Finally, senolytic activity of $G3^{4L}$, $G3^{4F}$ and $G3^{3L3F}$ against doxorubicin-induced senescent breast cancer cells with different receptor status was revealed (Fig. 6B). Therefore, $G3^{4L}$, $G3^{4F}$ and $G3^{3L3F}$ are proposed as novel nano-senolytics to be used as a part of sequential treatment of breast cancer with pro-senescent therapy followed by senolytic therapy (Fig. 6B). However, such assumption needs to be also confirmed using *in vivo* systems in future studies.

CRediT authorship contribution statement

Anna Lewińska: Investigation, Writing – original draft. **Konrad Wróbel:** Investigation. **Dominika Błoniarz:** Investigation. **Jagoda Adamczyk-Grochala:** Investigation. **Stanisław Wołowiec:** Conceptualization, Methodology, Investigation, Writing – original draft. **Maciej Wnuk:** Conceptualization, Methodology, Investigation, Writing – review & editing.

Declaration of competing interest

Maciej Wnuk reports financial support was provided by National Science Centre Poland. Maciej Wnuk reports a relationship with National Science Centre Poland that includes: funding grants.

Acknowledgments

The studies on *TRDM1* gene KO cells were supported by the National Science Centre (Poland); OPUS 13 grant UMO-2017/25/B/NZ2/01983 for M.W.

Data availability statement

Additional data can be found in Supplementary Material.

Appendix A. Supplementary data

Supplementary data to this article can be found online at <https://doi.org/10.1016/j.bioadv.2022.213047>.

References

- [1] T. Iwamoto, Clinical application of drug delivery Systems in Cancer Chemotherapy: review of the efficacy and side effects of approved drugs, *Biol. Pharm. Bull.* 36 (2013) 715–718, <https://doi.org/10.1248/bpb.12-01102>.
- [2] F. Abedi-Gabalu, G. Dehghan, M. Ghaffari, R. Yekta, S. Abbaspour-Ravasjani, B. Baradaran, J. Ezzi Nazhad Dolatabadi, M.R. Hamblin, PAMAM dendrimers as efficient drug and gene delivery nanosystems for cancer therapy, *Appl. Mater. Today* 12 (2018) 177–190, <https://doi.org/10.1016/j.apmt.2018.05.002>.
- [3] A.Z. Wang, R. Langer, O.C. Farokhzad, Nanoparticle delivery of cancer drugs, *Annu. Rev. Med.* 63 (2012) 185–198, <https://doi.org/10.1146/annurev-med-040210-162544>.
- [4] E. Abbasi, S.F. Aval, A. Akbarzadeh, M. Milani, H.T. Nasrabadi, S.W. Joo, Y. Hanifepour, K. Nejati-Koshki, R. Pashaei-Asl, Dendrimers: synthesis, applications, and properties, *Nanoscale Res. Lett.* 9 (2014) 247, <https://doi.org/10.1186/1556-276X-9-247>.
- [5] A.M. Jhaveri, V.P. Torchilin, Multifunctional polymeric micelles for delivery of drugs and siRNA, *Front. Pharmacol.* 5 (2014), <https://doi.org/10.3389/fphar.2014.00907>.
- [6] E. Rostami, S. Kashanian, A.H. Azandaryani, H. Faramarzi, J.E.N. Dolatabadi, K. Omidfar, Drug targeting using solid lipid nanoparticles, *Chem. Phys. Lipids* 181 (2014) 56–61, <https://doi.org/10.1016/j.chemphyslip.2014.03.006>.
- [7] L. Sercombe, T. Veerati, F. Moheimani, S.Y. Wu, A.K. Sood, S. Hua, Advances and challenges of liposome assisted drug delivery, *Front. Pharmacol.* 6 (2015), <https://doi.org/10.3389/fphar.2015.00286>.
- [8] J.K. Patra, G. Das, L.F. Fraceto, E.V.R. Campos, M.del P. Rodriguez-Torres, L. S. Acosta-Torres, L.A. Diaz-Torres, R. Grillo, M.K. Swamy, S. Sharma, S. Habtmariam, H.-S. Shin, Nano based drug delivery systems: recent developments and future prospects, *J. Nanobiotechnology* 16 (2018) 71, <https://doi.org/10.1186/s12951-018-0392-8>.
- [9] M.J. Mitchell, M.M. Billingsley, R.M. Haley, M.E. Wechsler, N.A. Peppas, R. Langer, Engineering precision nanoparticles for drug delivery, *Nat. Rev. Drug Discov.* 20 (2021) 101–124, <https://doi.org/10.1038/s41573-020-0090-8>.
- [10] J. Wolinsky, M. Grinstaff, Therapeutic and diagnostic applications of dendrimers for cancer treatment, *Adv. Drug Deliv. Rev.* 60 (2008) 1037–1055, <https://doi.org/10.1016/j.addr.2008.02.012>.
- [11] A.R. Menjoge, R.M. Kannan, D.A. Tomalia, Dendrimer-based drug and imaging conjugates: design considerations for nanomedical applications, *Drug Discov. Today* 15 (2010) 171–185, <https://doi.org/10.1016/j.drudis.2010.01.009>.
- [12] R.M. Kannan, E. Nance, S. Kannan, D.A. Tomalia, Emerging concepts in dendrimer-based nanomedicine: from design principles to clinical applications, *J. Intern. Med.* 276 (2014) 579–617, <https://doi.org/10.1111/joim.12280>.
- [13] L. Palmerston Mendes, J. Pan, V. Torchilin, Dendrimers as nanocarriers for nucleic acid and drug delivery in cancer therapy, *Molecules* 22 (2017) 1401, <https://doi.org/10.3390/molecules22091401>.
- [14] K. Öztürk, G. Esendağlı, M.U. Gürbüz, M. Tülü, S. Çalı, Effective targeting of gemcitabine to pancreatic cancer through PEG-cored Flt-1 antibody-conjugated dendrimers, *Int. J. Pharm.* 517 (2017) 157–167, <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2016.12.009>.
- [15] L.J. Majoros, A. Myc, T. Thomas, C.B. Mehta, J.R. Baker, PAMAM dendrimer-based multifunctional conjugate for cancer therapy: synthesis, characterization, and functionality, *Biomacromolecules* 7 (2006) 572–579, <https://doi.org/10.1021/bm050614z>.
- [16] L. Zhang, S. Zhu, L. Qian, Y. Pei, Y. Qiu, Y. Jiang, RGD-modified PEG-PAMAM-DOX conjugates: *in vitro* and *in vivo* studies for glioma, *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 79 (2011) 232–240, <https://doi.org/10.1016/j.ejpb.2011.03.025>.
- [17] I. Rostami, Z. Zhao, Z. Wang, W. Zhang, Y. Zhong, Q. Zeng, X. Jia, Z. Hu, Peptide-conjugated PEGylated PAMAM as a highly affinitive nanocarrier towards HER2-overexpressing cancer cells, *RSC Adv.* 6 (2016) 107337–107343, <https://doi.org/10.1039/C6RA19552K>.
- [18] J. Peng, X. Qi, Y. Chen, N. Ma, Z. Zhang, J. Xing, X. Zhu, Z. Li, Z. Wu, Octreotide-conjugated PAMAM for targeted delivery to somatostatin receptors over-expressed tumor cells, *J. Drug Target.* 22 (2014) 428–438, <https://doi.org/10.3109/1061186X.2013.879386>.
- [19] H. Zong, T.P. Thomas, K.-H. Lee, A.M. Desai, M. Li, A. Kotlyar, Y. Zhang, P. R. Leroueil, J.J. Gam, M.M. Banaszak Holl, J.R. Baker, Bifunctional PAMAM dendrimer conjugates of folic acid and methotrexate with defined ratio, *Biomacromolecules* 13 (2012) 982–991, <https://doi.org/10.1021/bm201639c>.
- [20] P. Medina, S. Goodin, Lapatinib: a dual inhibitor of human epidermal growth factor receptor tyrosine kinases, *Clin. Ther.* 30 (2008) 1426–1447, <https://doi.org/10.1016/j.clinthera.2008.08.008>.
- [21] G.V. Bonde, S.K. Yadav, S. Chauhan, P. Mittal, G. Ajmal, S. Thokala, B. Mishra, Lapatinib nano-delivery systems: a promising future for breast cancer treatment, *Expert Opin. Drug Deliv.* 15 (2018) 495–507, <https://doi.org/10.1080/17425247.2018.1449832>.
- [22] P.F. Bress, M.H. Cohen, G.A. Williams, R. Pazdur, FDA drug approval summaries: fulvestrant, *Oncologist* 7 (2002) 477–480, <https://doi.org/10.1634/theoncologist.7.6.477>.
- [23] P. Kabos, V.F. Borges, Fulvestrant: a unique antiendocrine agent for estrogen-sensitive breast cancer, *Expert. Opin. Pharmacother.* 11 (2010) 807–816, <https://doi.org/10.1517/1465561003641982>.
- [24] C.-Y. Liu, M.-H. Hu, C.-J. Hsu, C.-T. Huang, D.-S. Wang, W.-C. Tsai, Y.-T. Chen, C.-H. Lee, P.-Y. Chu, C.-C. Hsu, M.-H. Chen, C.-W. Shiau, L.-M. Tseng, K.-F. Chen, Lapatinib inhibits CIP2A/PP2A/p-Akt signaling and induces apoptosis in triple negative breast cancer cells, *Oncotarget* 7 (2016) 9135–9149, <https://doi.org/10.18632/oncotarget.7035>.
- [25] A.K. Mishra, A. Abrahamsson, C. Dabrosin, Fulvestrant inhibits growth of triple negative breast cancer and synergizes with tamoxifen in ER α positive breast cancer by up-regulation of ER β , *Oncotarget* 7 (2016) 56876–56888, <https://doi.org/10.18632/oncotarget.10871>.
- [26] D.L. Holliday, V. Speirs, Choosing the right cell line for breast cancer research, *Breast Cancer Res.* 13 (2011) 215, <https://doi.org/10.1186/bcr2889>.
- [27] A. Lewińska, D. Bednarz, J. Adamczyk-Grochala, M. Wnuk, Phytochemical-induced nuclear stress results in the inhibition of breast cancer cell proliferation, *Redox Biol.* 12 (2017) 469–482, <https://doi.org/10.1016/j.redox.2017.03.014>.
- [28] D. Błoniarz, J. Adamczyk-Grochala, A. Lewińska, M. Wnuk, The lack of functional *DNMT2/TRDM1* gene modulates cancer cell responses during drug-induced senescence, *Aging* 13 (2021) 15833–15874, <https://doi.org/10.18632/aging.203203>.
- [29] M.A. Antoniak, R. Pazik, U. Bazylińska, K. Wiwatowski, A. Tomaszewska, M. Kulpa-Greszta, J. Adamczyk-Grochala, M. Wnuk, S. Maćkowski, A. Lewińska, M. Nyk, Multimodal polymer encapsulated CdSe/Fe $_3$ O $_4$ nanoplatform with improved biocompatibility for two-photon and temperature stimulated bioapplications, *Mater. Sci. Eng. C* 127 (2021), 112224, <https://doi.org/10.1016/j.msec.2021.112224>.
- [30] A. Lewińska, P. Przybylski, J. Adamczyk-Grochala, D. Błoniarz, G. Litwinienko, M. Wnuk, Senolysis-based elimination of chemotherapy-induced senescent breast cancer cells by quercetin derivative with blocked hydroxy groups, *Cancers* 14 (2022) 605, <https://doi.org/10.3390/cancers14030605>.
- [31] G. Tóth, A. Jánoska, G. Volgyi, Z.-I. Szabó, G. Orgován, A. Mirzahassemi, B. Noszál, Physicochemical characterization and cyclodextrin complexation of the anticancer drug lapatinib, *J. Chem.* 2017 (2017) 1–9, <https://doi.org/10.1155/2017/4537632>.
- [32] A. Zajdel, A. Wilczok, K. Jelonek, M. Musiał-Kulik, A. Forýs, S. Li, J. Kasperczyk, Cytotoxic effect of paclitaxel and lapatinib co-delivered in polylactide-co-poly (ethylene glycol) micelles on HER-2-negative breast cancer cells, *Pharmaceutics* 11 (2019) 169, <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics11040169>.
- [33] Z. Guo, J. Sui, M. Ma, J. Hu, Y. Sun, L. Yang, Y. Fan, X. Zhang, pH-responsive charge switchable PEGylated ϵ -poly-L-lysine polymeric nanoparticles-assisted combination therapy for improving breast cancer treatment, *J. Control. Release* 326 (2020) 350–364, <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2020.07.030>.
- [34] A. Czerniecka-Kubicka, P. Tutka, M. Pyda, M. Walczak, Ł. Uram, M. Misiorek, E. Chmiel, S. Wołowiec, Stepwise glucoheptamidation of poly(amidoamine) dendrimer G3 to tune physicochemical properties of the potential drug carrier: *in vitro* tests for cytosine conjugates, *Pharmaceutics* 12 (2020) 473, <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics12050473>.
- [35] A. Kaczorowska, M. Malinga-Drozd, W. Kalas, M. Kopczyńska, S. Wołowiec, K. Borowska, Biotin-containing third generation glucoheptamidated polyamidoamine dendrimer for 5-aminolevulinic acid delivery system, *Int. J. Mol. Sci.* 22 (2021) 1982, <https://doi.org/10.3390/ijms22041982>.

- [36] Z. Zhou, A. D'Emanuele, K. Lennon, D. Attwood, Synthesis and micellization of linear-dendritic copolymers and their solubilization ability for poorly water-soluble drugs, *Macromolecules* 42 (2009) 7936–7944, <https://doi.org/10.1021/ma901415b>.
- [37] Sarelo Zarcba, Białońska Kopczyńska, Walczak Uram, Wolowicz Aebisher, Mixed-generation PAMAM G3-G0 megamer as a drug delivery system for nimesulide: antitumor activity of the conjugate against human squamous carcinoma and glioblastoma cells, *Int. J. Mol. Sci.* 20 (2019) 4998, <https://doi.org/10.3390/ijms20204998>.
- [38] E. Uram, A. Filipowicz-Rachwał, M. Miśiorek, A. Winiarz, E. Wajajtys-Rode, S. Wolowicz, Synthesis and different effects of biotinylated PAMAM G3 dendrimer substituted with nimesulide in human normal fibroblasts and squamous carcinoma cells, *Biomolecules* 9 (2019) 437, <https://doi.org/10.3390/biom9090437>.
- [39] S.K. Pichandi Mohanraj, R. Tulasi, V. Chidambaram Subramanian, An efficient regioselective preparation of fulvestrant, *Org. Prep. Proced. Int.* 53 (2021) 362–368, <https://doi.org/10.1080/00304948.2021.1908046>.
- [40] M.A.M. Abo-Zeid, M.T. Abo-Elfadi, A.M. Gamal-Eldeen, Evaluation of lapatinib cytotoxicity and genotoxicity on MDA-MB-231 breast cancer cell line, *Environ. Toxicol. Pharmacol.* 71 (2019), 103207, <https://doi.org/10.1016/j.etap.2019.103207>.
- [41] R.U. Jänicke, M.L. Sprengart, M.R. Wati, A.G. Porter, Caspase-3 is required for DNA fragmentation and morphological changes associated with apoptosis, *J. Biol. Chem.* 273 (1998) 9357–9360, <https://doi.org/10.1074/jbc.273.16.9357>.
- [42] N.H. Patel, S. Bloukh, E. Alwoshoh, A. Alhessa, T. Saleh, D.A. Gewirtz, Autophagy and senescence in cancer therapy, *Adv. Cancer Res.* (2021) 1–74, <https://doi.org/10.1016/bs.acr.2021.01.002>. Elsevier.
- [43] D.A. Gewirtz, The four faces of autophagy: implications for cancer therapy, *Cancer Res.* 74 (2014) 647–651, <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CCR-13-2966>.
- [44] E. Pikarsky, R.M. Porat, I. Stein, R. Abramovitch, S. Amit, S. Kasem, E. Goltsovich-Pyest, S. Urieli-Shoval, E. Galun, Y. Ben-Neriah, NF- κ B functions as a tumour promoter in inflammation-associated cancer, *Nature* 431 (2004) 461–466, <https://doi.org/10.1038/nature02924>.
- [45] K. Taniguchi, M. Karin, NF- κ B, inflammation, immunity and cancer: coming of age, *Nat. Rev. Immunol.* 18 (2018) 309–324, <https://doi.org/10.1038/nri.2017.142>.
- [46] Y.-J. Chen, M.-H. Yeh, M.-C. Yu, Y.-L. Wei, W.-S. Chen, J.-Y. Chen, C.-Y. Shih, C.-Y. Tu, C.-H. Chen, T.-C. Hsia, P.-H. Chien, S.-H. Liu, Y.-L. Yu, W.-C. Huang, Lapatinib-induced NF- κ B activation sensitizes triple-negative breast cancer cells to proteasome inhibitors, *Breast Cancer Res.* 15 (2013) R108, <https://doi.org/10.1186/bcr3575>.
- [47] C. Ma, W. Zuo, X. Wang, L. Wei, Q. Guo, X. Song, Lapatinib inhibits the activation of NF- κ B through reducing phosphorylation of I κ B- α in breast cancer cells, *Oncol. Rep.* 29 (2013) 812–818, <https://doi.org/10.3892/or.2012.2159>.
- [48] I.H. Benoy, R. Salgado, P. Van Dam, K. Geboers, E. Van Marck, S. Scharpé, P. B. Vermeulen, L.Y. Dirix, Increased serum interleukin-8 in patients with early and metastatic breast cancer correlates with early dissemination and survival, *Clin. Cancer Res.* 10 (2004) 7157–7162, <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-04-0812>.
- [49] C. Chavey, F. Bibeau, S. Gourougou-Bourgade, S. Burlinthon, F. Boissière, D. Laune, S. Rouges, G. Lazennec, Oestrogen receptor negative breast cancers exhibit high cytokine content, *Breast Cancer Res.* 9 (2007), R15, <https://doi.org/10.1186/bcr1648>.
- [50] S. Ahmed, H.T. Mohamed, N. El-Husseiny, M.M. El Mahdy, G. Safwat, A.A. Diab, A. A. El-Sherif, M. El-Shinawi, M.M. Mohamed, IL-8 secreted by tumor associated macrophages contribute to lapatinib resistance in HER2-positive locally advanced breast cancer via activation of Src/STAT3/ERK1/2-mediated EGFR signaling, *Biochim. Biophys. Acta BBA - Mol. Cell Res.* 1868 (2021), 118995, <https://doi.org/10.1016/j.bbancer.2021.118995>.
- [51] J.K. Singh, G. Farnie, N.J. Bundred, B.M. Simões, A. Shergill, G. Landberg, S. J. Howell, R.B. Clarke, Targeting CXCR1/2 significantly reduces breast cancer stem cell activity and increases the efficacy of inhibiting HER2 via HER2-dependent and -independent mechanisms, *Clin. Cancer Res.* 19 (2013) 643–656, <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-12-1063>.
- [52] M.G. Goll, F. Kirpekar, K.A. Maggert, J.A. Yoder, C.-L. Hsieh, X. Zhang, K.G. Golic, S.E. Jacobsen, T.H. Bestor, Methylation of tRNA^{Asp} by the DNA methyltransferase homolog Dnmt2, *Science* 311 (2006) 395–398, <https://doi.org/10.1126/science.1120976>.
- [53] D. Thiagarajan, R.R. Dev, S. Khosla, The DNA methyltransferase Dnmt2 participates in RNA processing during cellular stress, *Epigenetics* 6 (2011) 103–113, <https://doi.org/10.4161/epi.6.1.13418>.
- [54] J. Mytych, A. Lewińska, A. Bielak-Zmijewska, W. Grabowska, J. Zebrowski, M. Wnuk, Nanodiamond-mediated impairment of nucleolar activity is accompanied by oxidative stress and DNMT2 upregulation in human cervical carcinoma cells, *Chem. Biol. Interact.* 220 (2014) 51–63, <https://doi.org/10.1016/j.cbi.2014.06.004>.
- [55] J. Mytych, J. Zebrowski, A. Lewińska, M. Wnuk, Prolonged effects of silver nanoparticles on p53/p21 pathway-mediated proliferation, DNA damage response, and methylation parameters in HT22 hippocampal neuronal cells, *Mol. Neurobiol.* 54 (2017) 1285–1300, <https://doi.org/10.1007/s12035-016-9688-6>.
- [56] K. Filip, A. Lewińska, J. Adamczyk-Grochala, A. Marino Gammazza, F. Cappello, M. Lauricella, M. Wnuk, 5-azacytidine inhibits the activation of senescence program and promotes cytotoxic autophagy during Trdm1-mediated oxidative stress response in insulinoma β -TC-6 cells, *Cells* 11 (2022) 1213, <https://doi.org/10.3390/cells11071213>.
- [57] A. Lewińska, J. Adamczyk-Grochala, E. Kwasińicz, A. Deregowska, E. Semik, T. Zabek, M. Wnuk, Reduced levels of methyltransferase DNMT2 sensitize human fibroblasts to oxidative stress and DNA damage that is accompanied by changes in proliferation-related miRNA expression, *Redox Biol.* 14 (2018) 20–34, <https://doi.org/10.1016/j.redox.2017.08.012>.
- [58] H. Chen, H. Yang, X. Zhu, T. Yadav, J. Ouyang, S.S. Truesdell, J. Tan, Y. Wang, M. Duan, L. Wei, L. Zou, A.S. Levine, S. Vasudevan, L. Lan, m5C modification of mRNA serves a DNA damage code to promote homologous recombination, *Nat. Commun.* 11 (2020) 2834, <https://doi.org/10.1038/s41467-020-16722-7>.
- [59] R. Di Micco, V. Krizhanovskiy, D. Baker, F. d'Adda di Fagnana, Cellular senescence in ageing: from mechanisms to therapeutic opportunities, *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 22 (2021) 75–95, <https://doi.org/10.1038/s41580-020-00314-w>.
- [60] B. Wang, J. Kohli, M. Demaria, Senescent cells in cancer therapy: friends or foes? *Trends Cancer* 6 (2020) 838–857, <https://doi.org/10.1016/j.trecan.2020.05.004>.
- [61] L. Wang, L. Lankhorst, R. Bernards, Exploiting senescence for the treatment of cancer, *Nat. Rev. Cancer* (2022), <https://doi.org/10.1038/s41568-022-00450-9>.
- [62] T. Baker, T. Wijshak, T. Tchkonina, N.K. LeBrasseur, B.G. Childs, B. van de Sluis, J.L. Kirkland, J.M. van Deursen, Clearance of p16^{INK4a}-positive senescent cells delays ageing-associated disorders, *Nature* 479 (2011) 232–236, <https://doi.org/10.1038/nature10600>.
- [63] Y. Zhu, T. Tchkonina, T. Pirtskhalava, A.C. Gower, H. Ding, N. Giorgadze, A. K. Palmer, Y. Ikeno, G.B. Hubbard, M. Lenburg, S.P. O'Hara, N.F. LaRusso, J. D. Miller, C.M. Roos, G.C. Verzosa, N.K. LeBrasseur, J.D. Wren, J.N. Farr, S. Khosla, M.B. Stout, S.J. McGowan, H. Fuhrmann-Stroissnigg, A.U. Gurkar, J. Zhao, D. Colangelo, A. Dorronsoro, Y.Y. Ling, A.S. Barghouty, D.C. Navarro, T. Sano, P. D. Robbins, L.J. Niedernhofer, J.L. Kirkland, The Achilles' heel of senescent cells: from transcriptome to senolytic drugs, *Aging Cell* 14 (2015) 644–658, <https://doi.org/10.1111/acel.12344>.
- [64] J.L. Kirkland, T. Tchkonina, Senolytic drugs: from discovery to translation, *J. Intern. Med.* 288 (2020) 518–536, <https://doi.org/10.1111/joim.13141>.
- [65] L. Zhang, I.E. Pletcher, V. Prahalad, L.J. Niedernhofer, P.D. Robbins, Recent advances in the discovery of senolytics, *Mech. Ageing Dev.* 200 (2021), 111587, <https://doi.org/10.1016/j.mad.2021.111587>.
- [66] L. Wang, R. Leite de Oliveira, C. Wang, J.M. Fernandes Neto, S. Mainardi, B. Evers, C. Lieftink, B. Morris, F. Jochems, L. Willenssen, R.L. Beijersbergen, R. Bernards, High-throughput functional genetic and compound screens identify targets for senescence induction in cancer, *Cell Rep.* 21 (2017) 773–783, <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2017.09.085>.
- [67] P.G. Prasanna, D.E. Citrin, J. Hildesheim, M.M. Ahmed, S. Venkatachalam, G. Riscuta, D. Xi, G. Zheng, J. van Deursen, J. Goronzy, S.J. Kron, M.S. Anshcher, N. E. Sharpless, J. Campisi, S.L. Brown, L.J. Niedernhofer, A. O'Loghlen, A. G. Georgakilas, F. Paris, D. Gius, D.A. Gewirtz, C.A. Schmitt, M.E. Abazeed, J. L. Kirkland, A. Richmond, P.B. Romesser, S.W. Lowe, J. Gil, M.S. Mendonca, S. Burma, D. Zhou, C.N. Coleman, Therapy-induced senescence: opportunities to improve anticancer therapy, *JNCI J. Natl. Cancer Inst.* 113 (2021) 1285–1298, <https://doi.org/10.1093/jnci/djab064>.



Contents lists available at ScienceDirect

Journal of Drug Delivery Science and Technology

journal homepage: www.elsevier.com/locate/jddst

Cytarabine and dexamethasone-PAMAM dendrimer di-conjugate sensitizes human acute myeloid leukemia cells to apoptotic cell death

Konrad Wróbel^{a,1}, Anna Deregowska^{b,1}, Gabriela Betlej^b, Małgorzata Walczak^c, Maciej Wnuk^b, Anna Lewińska^{b,*}, Stanisław Wołowicz^{b,**}

^a Medical College of University of Rzeszów, 35-310, Rzeszów, Poland

^b Department of Biotechnology, Institute of Biology and Biotechnology, College of Natural Sciences, University of Rzeszów, 35-310, Rzeszów, Poland

^c Rzeszów University of Technology, Faculty of Chemistry, 35-959, Rzeszów, Poland

ARTICLE INFO

Keywords:

PAMAM G3 dendrimer conjugates
Cytarabine
Fludarabine
Dexamethasone
pH-cleavable linker
Leukemia cell apoptosis

ABSTRACT

Polyamidoamine (PAMAM) dendrimers are widely used as a part of drug delivery systems (DDS) to improve anticancer drug bioavailability. In the present study, monophosphates of nucleosides, anti-nucleosides (cytarabine, C and fludarabine, F) and synthetic glucocorticoid dexamethasone (D) were attached to the third generation (G3) PAMAM dendrimer via phosphamide pH-sensitive linker. Conjugates were found to be stable at neutral pH, whereas acid-triggered hydrolysis of phosphamide bond was observed at pH 5. The anticancer action of selected biotinylated mono- and di-conjugates, namely CP-, FP-, DP-CP- and DP-FP-PAMAM dendrimers was then compared to cytotoxic activity of free drugs using four cellular models of leukemia *in vitro*, i.e., K-562, LAMA-84, THP-1 and HL-60 cells. 10 nM DP-CP-conjugate lowered metabolic activity, caused G0/G1 cell cycle arrest and induced apoptotic cell death in HL-60 cells compared to non-cytotoxic and non-cytostatic action of free drugs when used at the same concentration. 10 nM CP-, DP-FP- and FP-conjugates also promoted a decrease in metabolic activity in K-562, LAMA-84, and THP-1 and HL-60 cells, respectively, however, without a sign of cytotoxicity. In conclusion, we show that the anticancer potential of CP and FP in leukemia cells may be enhanced by the conjugation with PAMAM dendrimers, especially in the presence of DP in selected experimental settings.

1. Introduction

Nucleoside analogues, a group of anti-metabolites, are widely used for the treatment of hematological malignancies [1]. For example, cytarabine is used for the treatment of acute myeloid leukemia (AML), acute lymphocytic leukemia (ALL) and lymphomas, whereas fludarabine is active against indolent B-cell malignancies such as B-cell chronic lymphocytic leukemia (B-CLL) [1–5]. As a relapse due to acquired drug resistance is quite common, more studies are needed to optimize treatment protocols (doses, combination therapy) for preventing drug resistance and/or sensitizing resistant leukemia cells to chemotherapy [6]. For example, increased sensitivity to glucocorticoids was reported in cytarabine resistant AML cells [6]. Glucocorticoids are a part of almost all treatment regimens for childhood ALL for decades [7],

however their functions and therapeutic mechanisms are poorly described in AML. Synthetic glucocorticoids with immunomodulatory properties may affect a number of biological processes such as cytokine production, cell cycle, oncogene expression and apoptosis [8,9]. Glucocorticoid-mediated apoptosis in leukemic cells may be executed through the binding to glucocorticoid receptor and subsequently to two major transcription factors NF- κ B and AP-1, thus, affecting their activity [8,9]. However, glucocorticoids such as dexamethasone may exert both synergistic (chemosensitization) and antagonistic (drug resistance and cyto-protection) effects when used with other chemotherapeutics in different types of cancer [10–12]. Thus, the action of dexamethasone in combination therapy may be complex and may depend on cellular context that deserves further elucidation.

Polyamidoamine (PAMAM) dendrimers are widely tested carriers for

* Corresponding author.

** Corresponding author.

E-mail addresses: konradwrobel300@gmail.com (K. Wróbel), aderegowska@ur.edu.pl (A. Deregowska), gbetlej@ur.edu.pl (G. Betlej), mwalczak@prz.edu.pl (M. Walczak), mwnuk@ur.edu.pl (M. Wnuk), alewinska@ur.edu.pl (A. Lewińska), swolowicz@ur.edu.pl (S. Wołowicz).

¹ These authors contributed equally to this work.

<https://doi.org/10.1016/j.jddst.2023.104242>

Received 16 November 2022; Received in revised form 24 January 2023; Accepted 2 February 2023

Available online 3 February 2023

1773-2247/© 2023 Elsevier B.V. All rights reserved.

drug delivery systems (DDS) that is achieved by at least two approaches, namely drug encapsulation and covalent attachment [13–15]. Full generation dendrimers provide convenient terminal (surface) primary amine groups for covalent binding of (pro)drug and targeting molecules. For example, PAMAM-based DDS for paclitaxel (PTX) delivery were recently described in a series of papers in which PTX was either encapsulated in PAMAM G4 modified by PEG-ylation and amide attached vitamin E-succinate and octa-arginine (R8) as addressing molecules or conjugated into G4-PEG-R8 carrier [16,17]. Generally, PAMAM dendrimers can be used to attach covalently carboxyl group containing a drug straightforward *via* amide bond and other drugs after functionalization with succinate linker [18–20]. After amine polyhydroxylation, PAMAM dendrimers can be also attached to drugs *via* ester bonds [21,22]. Both types of linkers can be slowly hydrolyzed and after endosomal internalization, free drugs can be released by the action of hydrolytic enzymes with optimum activity at pH 5 [15,23]. Thus, to improve drug release in biological systems, selected pH-sensitive and cleavable linkers, such as hydrazine or hydrazone bond were considered [24,25]. Furthermore, drugs of hydrophobic nature should be converted into water-soluble form in order to improve an oral or intravenous administration. One such example is glucocorticoid dexamethasone (D) with anti-inflammatory, anti-allergic and immunosuppressive properties, which is used in biomedical applications in a form of dexamethasone monophosphate (DP) with improved water solubility [26,27]. DP bioavailability can be further improved by the encapsulation in water soluble dendrimers as it was demonstrated for DP encapsulated in peracetylated PAMAM G5 dendrimer [28]. This approach was also applied for other phosphates, such as nucleotides entrapped in supramolecular complexes composed of amino- γ -cyclodextrin and

2-anilinonaphthalene-6-sulfonate dye [29] and in maltose-covered poly(ethyleneimine) (PEI) dendrimer [30].

In the present study, we have synthesized a series of PAMAM G3 conjugates with nucleotides (AMP and dTMP), DP, and anti-nucleosides (cytarabine and fludarabine monophosphates, CP and FP, respectively) attached *via* phosphamide pH-sensitive linker that allows for controlled release of a drug at lysosomal compartment at pH 5 (Fig. 1). CP-, FP- and DP-conjugates (both mono- and di-conjugates) were then tested for improved anticancer action compared to the activity of free drugs using four cellular models of leukemia *in vitro*. In selected experimental settings, dendrimer-based DDS allows for lowering the effective concentrations of anticancer drugs of about 10-fold without losing their anticancer potential, especially in the presence of dexamethasone.

2. Materials and methods

2.1. Dendrimer synthesis and characterization

All the chemicals used during the synthesis of PAMAM G3 dendrimer and its conjugates were purchased from Merck KGaA (Darmstadt, Germany). PAMAM G3 dendrimer was obtained at 5 mM scale according to the procedure published by Tomalia et al. [13] and stored as 20.1 mM solution in methanol to obtain conjugates with adenosine-5',2'-deoxythymidine-5', fludarabine-5', cytarabine-5', and dexamethasone-21-monophosphates. Biotin *N*-hydroxysuccinimide ester (NHS-biotin) was obtained from AmBeeD (Arlington Hts, IL, USA). Spectra/Por® 3 RC dialysis membrane (cellulose, MW_{cutoff} – 3.5 kDa) was provided by Carl Roth GmbH & Co. KG (Karlruhe, Germany).

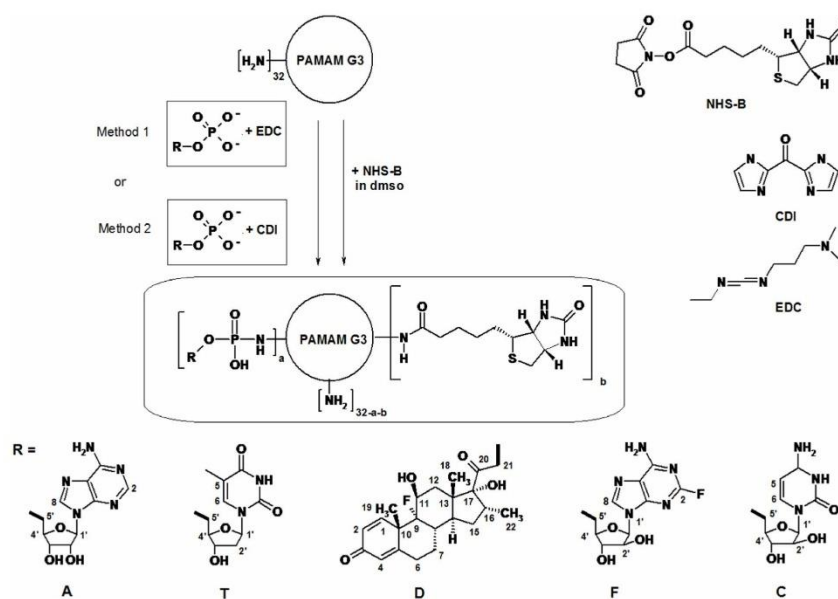


Fig. 1. The synthesis scheme of PAMAM G3 conjugates (general formula is shown in a frame) with covalent attachment of AMP, dTMP, dexamethasone-21-monophosphate, fludarabine-5'-monophosphate, and cytarabine-5'-monophosphate. The following mono- and di-conjugates were synthesized: G3^a (a = 6 (method 1), 5 and 10 (method 2), b = 0), G3^b (a = 6, b = 0), G3^{AD} (a = 12, b = 0), G3^{BD} (a = 5 and 7, b = 0), G3^{BF}, G3^{BD}, G3^{BD5F}, G3^{BD3C}, G3^{BD10C} (b = 1). B, amide-attached biotin; NHS-B, biotin *N*-hydroxysuccinimide ester; CDI, carbonyl diimidazole; EDC, *N*-ethyl-*N'*-(3-dimethylaminopropyl)carbodiimide; A, 5'-adenosyl; T, 2'-deoxythymidyl; D, 21-dexamethasonyl; F, 5'-fludarabiny; and C, 5'-cytarabiny moieties with atom numbering.

2.1.1. Spectroscopy

IR spectra were recorded with ALPHA FT-IR Bruker instrument in ATR mode or in KBr pellets. The ^1H , ^{13}C NMR 1-D and 2-D spectra (^1H - ^1H COSY and ^1H - ^{13}C HSQC and HMBC) were recorded with Bruker 300 MHz instrument, while ^{31}P and ^{19}F NMR spectra were obtained using Bruker UltrashieldTM Plus 500 MHz instrument (Rheinstetten, Germany).

2.1.2. Conjugate size and ζ potential

Dynamic light scattering (DLS) and ζ potential of PAMAM conjugates were measured at pH 5 (in 0.05 M acetate buffer) and in water using Zetasizer Nano ZS instrument (Malvern, UK) at the concentration of 1 mg/ml (ca 0.1 mM solutions) as previously described [31].

2.1.3. AMP and PAMAM G3 conjugates ($G3^{6A}$)

Method 1 (with N-ethyl-N'-(3-dimethylaminopropyl)carbodiimide hydrochloride (EDC) activation, Fig. 1): 49.6 mg of AMP x H₂O (140 μmoles) were dissolved in 1.5 ml of water. 100 μl of triethylamine (TEA) were then added followed by the addition of 54.4 mg of EDC (280 μmoles) and 22.0 mg of imidazole (320 μmoles) and the solution was mixed using magnetic stirring at room temperature for 30 min. The solution was then added stepwise into 1 ml of 20.1 mM solution of PAMAM G3 dendrimer in methanol (20.1 μmoles). After 4 h, the mixture was transferred into dialytic tube (cellulose, $MW_{\text{cutoff}} = 3.5$ kDa) and dialyzed against water for 2 days (5 times, 3 l). Water was evaporated under reduced pressure and products were identified by ^1H NMR spectroscopy as PAMAM G3 dendrimer substituted with average 6 equivalents of AMP per one PAMAM G3 molecule ($a = 6$). Yield: 92.3 mg (10.4 μmoles of conjugate, 62.7 μmoles of AMP; 45% related to AMP substrate). ^{31}P NMR: 4.77 ppm; IR: $\nu(\text{P-N-C}) = 782$ cm^{-1} ; theoretical averaged MW = 8.83 kDa.

Method 2 (with carbonyl diimidazole (CDI) activation, Fig. 1): 50.0 mg of AMP x H₂O (140 μmoles) were dissolved in 2 ml of water with 100 μl TEA. Solid CDI (45 mg, 280 μmoles) was added stepwise with vigorous stirring for 30 min. After ceasing of CO₂ evolution, the mixture was added dropwise into 1 ml of PAMAM G3 dendrimer in methanol (139 mg, 20 μmoles) and the mixture was left at room temperature for 60 min. The mixture was then dialyzed against water as described above (vide supra). Water was evaporated under reduced pressure and products were identified by ^1H NMR spectroscopy as PAMAM G3 dendrimer substituted with average 5 equivalents of AMP per one PAMAM G3 molecule ($a = 5$). Yield: 114.8 mg (13.5 μmoles of conjugate, 67.5 μmoles of AMP; 48% related to AMP substrate). ^{31}P NMR: 4.77 ppm, theoretical averaged MW = 8.51 kDa.

For larger scale synthesis, starting amount of AMP x H₂O was 93.7 mg (263 μmoles), which were dissolved in 8 ml of water and activated by the addition of 84.7 mg of CDI (526 μmoles). The mixture was stirred at 50 °C for 30 min. The mixture was then added into 181 mg of PAMAM G3 dendrimer (26.3 μmoles) in 2 ml of water and reacted for 4 h. Afterwards, the mixture was dialyzed against water (5 \times 2.5 l) for 3 days. Water was evaporated and the solid was dried overnight in vacuum (0.2 mbar). The product was identified by the ^1H NMR spectroscopy as $G3^{10A}$. Yield: 157 mg (15.5 μmoles of conjugate, 155 μmoles of AMP; 59% related to AMP substrate). ^{31}P NMR: 4.77 ppm, IR: $\nu(\text{P-N-C}) = 782$ cm^{-1} ; theoretical averaged MW = 10.1 kDa. This compound was later used for AMP release experiment.

2.1.4. dTMP and PAMAM G3 conjugate ($G3^{6T}$)

2'-Deoxythymidine-5'-monophosphate disodium salt hydrate (dTMP, 100.6 mg, 274 μmoles) was dissolved in 3 ml of water and activated with 58.9 mg of CDI (362 μmoles) at room temperature for 30 min dTMP solution was then added dropwise into 18.1 μmoles of PAMAM G3 dendrimer (125 mg) and allowed to react at ambient temperature for 3 h. The product was worked up by dialysis, isolated as solid and identified by ^1H NMR spectroscopy as PAMAM G3 dendrimer with attached 6 equivalents of dTMP ($a = 6$). Yield: 93.3 mg (10.9 μmoles of

conjugate, 65.4 μmoles of dTMP; 24% related to dTMP substrate). ^{31}P NMR: 4.73 ppm; IR: $\nu(\text{P-N-C}) = 779$ cm^{-1} ; theoretical averaged MW = 8.55 kDa.

2.1.5. AMP, dTMP and PAMAM G3 conjugate ($G3^{6A6T}$)

AMP (64.8 mg, 182 μmoles) and dTMP (66.4 mg, 182 μmoles) substrates were dissolved in 7 ml of water and 728 μmoles of CDI were added (118 mg) stepwise within 3 min. The mixture was left at room temperature for 30 min and afterwards added dropwise into the PAMAM G3 dendrimer (157 mg, 22.7 μmoles) in 2 ml of water. The solution was stirred at room temperature for 4 h and the mixture was then dialyzed against water for 3 days. Water was removed under reduced pressure and solid product was analyzed by the ^1H NMR spectroscopy as averaged $G3^{6A6T}$. Yield: 161.3 mg (18.1 μmoles of conjugate, 109 μmoles of each nucleotide; 60% yield). ^{31}P NMR: 4.72 and 4.77 ppm; $\nu(\text{P-N-C}) = 786$ and 741 cm^{-1} ; theoretical averaged MW = 8.9 kDa.

2.1.6. Dexamethasone-21-monophosphate and PAMAM G3 conjugate ($G3^{6D}$)

Dexamethasone phosphate disodium salt (Na₂DP, 43.5 mg, 84 μmoles) was dissolved in 2 ml of water and 23 mg of CDI (142 μmoles) were added stepwise. After 30 min, this solution was added dropwise into PAMAM G3 dendrimer (69.1 mg, 10 μmoles) in 1 ml of water and the mixture was left at room temperature for 8 h. The product was dialyzed as described above, dried and identified by NMR spectroscopy (^1H , ^{13}C , and ^{31}P) as $G3^{6D}$. Yield: 57.5 mg (6.2 μmoles , 37.6 μmoles of DP, 44.8% yield related to DP). ^{31}P NMR: 4.75 ppm; IR: $\nu(\text{P-N-C}) = 744$ cm^{-1} ; theoretical averaged MW = 9.18 kDa.

For larger scale synthesis, 99.6 mg of Na₂DP (193 μmoles) in 4 ml of water were activated with 62.4 mg of CDI (385 μmoles) for 2 h, and added to 20 μmoles of PAMAM G3 dendrimer. The mixture was left for 12 h, and the product was isolated and identified as described above. The yield of $G3^{7D}$ was 157.2 mg (15.6 μmoles , 77.8% yield, 109 μmoles of DP, 56.5% yield related to DP); theoretical averaged MW = 10.1 kDa. This product was later used for hydrolytic drug release experiment (vide infra).

2.1.7. Biotin-attached PAMAM G3 ($G3^B$)

PAMAM G3 dendrimer was converted into single biotin attached conjugate ($G3^B$) using one equivalent of NHS-biotin in DMSO at 150 μmoles scale and purified by dialysis according to the protocol described previously [32]. $MW(G3^B) = 7135$ Da.

2.1.8. Dexamethasone-21-monophosphate and biotinylated PAMAM G3 conjugate ($G3^{67D}$)

39.4 mg of CDI (243 μmoles) were added stepwise into stirred solution of 78.8 mg of Na₂DP (152 μmoles) in 1 ml of water. After evolution of CO₂ ceased (1 h), activated DP was added dropwise to the stirred solution of $G3^B$ (135 mg, 18.9 μmoles) in 1 ml of water and the mixture was left at 46 °C for 2 h. The mixture was then transferred into cellulose dialytic bag and dialyzed against water for 3 days (7 \times 2.5 l water was used in receiving flask). The remaining solution in the bag was removed, water was distilled off on rotary evaporator under reduced pressure (8 mbars) and the residue was dried overnight under 0.2 mbar pressure. The isolated conjugate contained average 7 equivalents of DP attached to macromolecular carrier as was identified by the ^1H NMR spectroscopy, $G3^{67D}$; $MW(G3^{67D})_{th} = 10.428$ kDa. Yield 96.6 mg (9.3 μmoles ; 49% calculated for the carrier). ^{31}P NMR: 4.72 ppm; ^{19}F NMR: -164.9 ppm (dd); IR: $\nu(\text{P-N-C}) = 782$ cm^{-1} .

2.1.9. Fludarabine-5'-monophosphate and biotinylated PAMAM G3 conjugate ($G3^{67F}$)

Fludarabine monophosphate (FP, 38.7 mg, 106 μmoles) was dissolved in 1 ml of water. 100 μl of TEA were then added followed by the addition of CDI (39.2 mg, 241.2 μmoles) with vigorous stirring for 1 h. The solution of activated FP was added dropwise to 1 ml of aqueous

solution of G3^B (100 mg, 14 μmoles) and the mixture was stored at 46 °C for 4 h. The mixture was worked up as described above and the solid residue was identified by ¹H NMR spectroscopy as G3^{B7F}; MW(G3^{B7F})_{th} = 9,691 kDa. Yield 116.7 mg (12.0 μmoles; 85% calculated for the carrier). ³¹P NMR: 4.71 ppm; ¹⁹F NMR: -53.6 ppm; IR: ν(P-N-C) = 779 cm⁻¹.

2.1.10. Cytarabine-5'-monophosphate and biotinylated PAMAM G3 conjugate (G3^{B13C})

Cytarabine monophosphate (CP, 49.2 mg, 152 μmoles) was dissolved in 1 ml of water and 100 μl TEA. CDI (49.6 mg, 305 μmoles) was added stepwise with vigorous stirring and the solution was stored at ambient temperature for 1 h. The solution was then added dropwise into G3^B (80 mg, 11.2 μmoles) in water, and the mixture was stored at 46 °C for 4 h. The mixture was worked up as described above and the solid residue was identified by ¹H NMR spectroscopy as G3^{B13C}; MW(G3^{B13C})_{th} = 11.103 kDa. Yield 66.9 mg (6.0 μmoles; 54% calculated for the carrier). ³¹P NMR: 4.70 ppm; IR: ν(P-N-C) = 791 cm⁻¹.

2.1.11. Fludarabine-5'-monophosphate, dexamethasone-21-monophosphate and biotinylated PAMAM G3 conjugate (G3^{B5D5F})

FP (39.1 mg, 107 μmoles) and Na₂DP (55.7 mg, 107 μmoles) were dissolved in 1 ml of water and 100 μl TEA. CDI (52.5 mg, 324 μmoles) was then added. After 2 h, the solution was added dropwise into G3^B (151 mg, 21.2 μmoles) in 1 ml of water and the mixture was heated at 46 °C for 4 h. The product was worked up by dialysis, isolated as solid and identified by the ¹H NMR spectroscopy as G3^{B5D5F}; MW(G3^{B5D5F})_{th} = 11.133 kDa. Yield 123.0 mg (11 μmoles; 52% calculated for the carrier). ³¹P NMR: 9.02, 4.67 ppm; ¹⁹F NMR: -165.9 (dd), -53.6 (s); IR: ν(P-N-C) = 780 cm⁻¹.

2.1.12. Cytarabine-5'-monophosphate, dexamethasone-21-monophosphate and biotinylated PAMAM G3 conjugate (G3^{B11D10C})

CP (35 mg, 108 μmoles) and Na₂DP (55.8 mg, 108 μmoles) were dissolved in 1 ml of water and 100 μl TEA. CDI (52.5 mg, 324 μmoles) was then added. After 2 h, the solution was added dropwise into G3^B (128 mg, 18 μmoles) in 1 ml of water and the mixture was heated at 46 °C for 4 h. The product was worked up by dialysis, isolated as solid and identified by the ¹H NMR spectroscopy as G3^{B11D10C}; MW(G3^{B11D10C})_{th} = 15.185 kDa. Yield 96.8 mg; 6.4 μmoles (35.4% calculated for the carrier). ³¹P NMR: 4.72 ppm; ¹⁹F NMR: -165.9 (dd) IR: ν(P-N-C) = 777 cm⁻¹.

2.1.13. Labeling of conjugates with fluorescein isothiocyanate (FITC)

The conjugates (G3^{B7F}, G3^{B7D} and G3^{B5F5D}) were labeled with one equivalent of FITC at the 1 μmolar scale. 10 mM solution of FITC in ethanol was added stepwise into vigorously stirred ethanolic solutions of 1 μmole of G3^{B7D} (10.4 mg), G3^{B7F} (9.7 mg), and G3^{B5D5F} (11.1 mg) and the mixtures were left for 1 h. Ethanol was then evaporated and 1 mM solutions in D₂O of labeled conjugates were examined by the means of ¹H NMR spectra. These stock solutions were then used in biological tests involving leukemia cells. As the conjugates with CP were found to be insoluble in ethanol, labeling of these conjugates with FITC was not considered, because this protocol requires ethanolic environment.

2.1.14. Acid-triggered hydrolysis of G3^{10A} and G3^{7D} conjugates

140 mg of G3^{10A} (15.7 μmoles) were dissolved in 20 ml of water and divided into four dialytic bags in equal number of equivalents. The cellulose dialytic tubes were immersed into 0.1 M acetate buffer (5 l, pH 5) and incubated for 1, 2, 4 and 8 h in buffer and then for 3 days in water. Water was then removed and the remaining conjugates were analyzed by ¹H NMR spectroscopy in order to determine the stoichiometry of remained macromolecules (vide infra).

In drug release experiment involving G3^{7D} conjugate, G3^{7D} (95.7 mg, 9.4 μmoles) was dissolved in 15 ml of water, divided into three dialytic tubes, hydrolyzed in 0.1 M acetate buffer for 1, 3, and 6 h and the

remaining mixture was then dialyzed against water as described above. The macromolecular products of hydrolysis were identified by ¹H NMR spectroscopy (vide infra).

2.2. Cell lines and culture conditions

The following cell lines were used: human chronic myeloid (myelogenous) leukemia cell lines, namely K-562 (ATCC, Manassas, VA, USA) and LAMA-84 cells (DSMZ, Braunschweig, Germany), human acute monocytic leukemia cell line, THP-1 cells (ECACC, Salisbury, United Kingdom) and human acute myeloid leukemia cell line, HL-60 cells (ATCC, Manassas, VA, USA). Cells were cultured in RPMI-1640 medium supplemented with 10% fetal bovine serum (FBS) and antibiotic/antimycotic solution (100 U/ml penicillin, 0.1 mg/ml streptomycin and 0.25 μg/ml amphotericin B) (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA). Cells were maintained at 37 °C in a humidified atmosphere of 5% CO₂. The number of cells was examined using Cell Counter Analyzer TC10™ (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA).

2.3. MTT assay

The effects of drugs/dendrimers/dendrimer conjugates on metabolic activity of the cells were assessed using MTT [3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide] assay, as described elsewhere [33]. Briefly, 10⁴ cells per a well of 96-well plate were incubated with free drugs (DP, FP, CP) at the concentrations of 10, 100 and 1000 nM, and 1, 5, 10 nM concentrations of dendrimers/dendrimer conjugates for 24 h and 48 h, and metabolic activity was then analyzed. Changes in metabolic activity can be considered as an indirect measure of cytotoxic and/or cytostatic activity of tested agents. Metabolic activity at control conditions (non-treated cells) is considered as 100%.

2.4. Flow cytometry-based analysis of cellular uptake of dendrimers and dendrimer conjugates

Cells were treated with 10 nM dendrimers and dendrimer conjugates labeled with FITC for 48 h. Cellular uptake of dendrimers and dendrimer conjugates was then assayed using imaging flow cytometry (Amnis® FlowSight® imaging flow cytometer, Luminex Corporation, Austin, TX, USA) [34]. Briefly, ethanol-fixed cells (10⁶) were stained using 5 μg/ml propidium iodide (PI) solution for 10 min. Fluorescence signals were captured using Amnis® FlowSight® imaging flow cytometer and dedicated software (Luminex Corporation, Austin, TX, USA).

2.5. Cell cycle analysis

After 48 h treatment with drugs/dendrimers/dendrimer conjugates, DNA content-based analysis of the cell cycle was performed using flow cytometry (Muse™ Cell Analyzer and Muse™ Cell Cycle Kit) according to the manufacturer's recommendations (Luminex Corporation, Austin, TX, USA) [34].

2.6. Apoptosis and necrosis analysis

After 48 h treatment with selected drugs/dendrimers/dendrimer conjugates, apoptosis and necrosis modes of death were analyzed. For the evaluation of conjugate-mediated apoptosis, two apoptotic markers were considered, namely phosphatidylserine externalization and the levels of caspase 3. Phosphatidylserine externalization was revealed using flow cytometry and Muse™ Annexin V Assay Kit (Luminex Corporation, Austin, TX, USA) as previously described [34]. As dual staining of Annexin V and 7-AAD was performed, four cell subpopulations were distinguished, namely live cells negative for both staining, early apoptotic cells positive for Annexin V staining, late apoptotic cells positive for Annexin V staining and 7-AAD staining and necrotic cells positive for 7-AAD staining. The levels of caspase 3 were assayed using

anti-caspase 3 primary antibody (1:100, PA5-77887, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA), secondary anti-rabbit antibody conjugated with Alexa Fluor™ 488 (A21206, 1:1000, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) and imaging flow cytometry (Amnis® FlowSight® imaging flow cytometer, Luminex Corporation, Austin, TX, USA).

2.7. The analysis of NF-κB levels using imaging flow cytometry

After 48 h treatment with selected dendrimers/dendrimer conjugates, the levels of NF-κB were analyzed using Amnis® FlowSight® imaging flow cytometer (Luminex Corporation, Austin, TX, USA). Briefly, cells (10^5) were incubated with anti-NF-κB primary antibody (1:100, PA5-16545, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) and secondary anti-rabbit antibody conjugated to Texas Red (T2767, 1:1000, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA). Nuclei were visualized using PI staining. The IDEAS software version 6.2.187.0 (Luminex Corporation, Austin, TX, USA) was used for data acquisition and analysis.

2.8. In vitro hemolysis assay

To determine the biocompatibility (here hemocompatibility) of dendrimers/dendrimer conjugates, hemolytic properties of conjugate-based system were evaluated using hemolysis test. Heparinized human blood from one healthy donor (lab volunteer, 23-year-old non-smoking male) was used. Briefly, 100 μl of whole blood samples were incubated with 10 nM dendrimers/dendrimer conjugates at 37 °C for 24 and 48 h. The supernatants were then collected and diluted 10-times in DPBS and absorbance was measured at 541 nm using a Tecan Infinite®M200 absorbance mode microplate reader. Non-treated sample served as a negative control (NC) and treatment with 37.5 mM KCl was used as a positive control (PC). Hemolytic properties of PC were considered as 100%.

2.9. Statistical analysis

The results were calculated as the mean ± SD from at least three independent experiments. Statistical significance was assessed by one-way ANOVA using GraphPad Prism 5 with the Dunnett's multiple comparison test for comparisons between control conditions (untreated samples) and treated samples, and with Tukey's multiple comparison test for comparisons between the action of free drugs and drugs attached to PAMAM dendrimer. * $P < 0.05$ was considered significant.

3. Results and discussion

3.1. Synthesis and physico-chemical characterization of conjugates

Dendrimer-based drug delivery systems are considered to be a promising strategy to fight cancer [15,35,36]. The easiest way to deliver an anticancer drug is by its encapsulation in a macromolecular carrier, however, the thermodynamic equilibrium between encapsulated drug and free drug molecule may result in the drug exposition to both targeted and non-targeted cells in the human body. In contrast, the covalent bonding of drug into strictly defined macromolecular carrier and the modification of such conjugate may promote drug targeting. One important issue of DDS is controlled drug release in targeted cells that can be achieved by using pH-sensitive and cleavable linkers. More recently, 2-carboxybenzyl phosphoramidates were reported as promising pH-sensitive linkers [37]. Upon pH decrease from 7.4 to 5.5, the hydrolysis half-time was shown to be diminished from one to two order of magnitude for series of 2-carboxybenzyl phosphoramidates [37]. Most of the phosphoramidates were cleaved within 1 h depending on the presence of substituents on carboxybenzyl residue [37]. The results led the authors to conclusion that phosphoramidates of amine-containing

drugs can be used as pH cleavable DDS [37]. Furthermore, phosphamide bond linker was used to synthesize the conjugate of antineoplastic drug monomethyl auristatin E that resulted in the drug release with 1 h half-time at pH 5 [38]. Thus, in the present study, we have considered the formation of phosphamide bond between the phosphate-functionalized nucleosides and synthetic glucocorticoid dexamethasone with amine groups of PAMAM G3 dendrimer (Fig. 1). We have adopted the synthetic path of phosphamide bond formation between oligonucleotides and ethylenediamine [39,40] and optimized the protocol to synthesize the series of PAMAM G3 conjugates with AMP, dTMP, anti-inflammatory agent dexamethasone phosphate (DP) and common anti-nucleoside monophosphates (cytarabine-5'- and fludarabine-5'-monophosphate, CP and FP, respectively) (Fig. 1).

The use of synthesis protocol of conjugates between G3 and AMP with EDC or CDI as activators in dimethylsulfoxide (DMSO) or methanol resulted in the depurination of AMP, although ribose-5'-monophosphate was attached to primary amine groups of G3. Surprisingly, the same procedure when performed in water yielded stable conjugates, which were isolated by dialytic removal of low molecular weight side-products and evaporation of water under reduced pressure. Furthermore, in contrast to original Orgel's procedure, we observed that CDI can be applied alone (without imidazole) to obtain G3^{9A} products (a = 5 and 10). Using optimized protocol, the series of conjugates containing AMP and dTMP were synthesized (Fig. 1). All conjugates were characterized by ¹H, ¹³C, ³¹P NMR spectroscopy using 2-D ¹H-¹³C correlations. The ¹H NMR spectra of the conjugates are presented in Fig. 2.

The average stoichiometry of conjugates was determined based on the integration of adenosine and 2'-deoxythymidine resonances against PAMAM G3 resonances that served as an internal reference of [484H] total intensity (Fig. 2). The chemical shifts of A and T in conjugates related to AMP and dTMP were considerable for H-2, H-8, and H-5' of A and relatively small for T. In the ³¹P spectra, the single resonance of monophosphate shifted from 1.13 for AMP (and dTMP) into 4.77 in G3^{9A} (a = 5 and 10, Fig. S1) and 4.72 in G3^{9T}.

The dexamethasone-21-monophosphate was attached to G3 to obtain G3^{9D} (a = 5 and 7). The ¹H spectroscopy was used to determine the average stoichiometry of the conjugates. The assignment of ¹H, ¹³C and ³¹P NMR signals in corresponding spectra (COSY, HSQC and HMBC maps, Figs. S2A and S2B) was in accordance with previously published results for DP [41] and DP encapsulated in peracetylated PAMAM G5 [28]. In the ¹H NMR spectrum of G3^{9D} conjugate, the largest chemical shift in relation to DP was observed for H-15 (0.07 and 0.09 ppm upfield), H-12 (0.20 ppm downfield), and H-11 (0.09 ppm upfield), while H-21 remained as non-shifted AB-type doublets centered at 4.38 and 4.71 ppm. The same pattern was observed for D in biotin-PAMAM conjugate (Fig. 3C). Neither the ³¹P signal was shifted in phosphamide against DP. Nonetheless, we conclude that in all cases the monophosphates were phosphamide linked into G3 in isolated conjugates. Additionally, the IR spectra showed the medium intensity band characteristic for other phosphamides [42,43] within 740–780 cm⁻¹ and absent in IR spectrum of G3 either in starting monophosphates. To ensure that obtained compounds were indeed conjugates and not encapsulates of AMP, dTMP or DP, we have obtained the encapsulates of AMP and DP containing 5 equivalents of monophosphates and dialyzed them against water for 3 days. The resulting isolated macromolecule was only the PAMAM G3 dendrimer.

Furthermore, we have considered the synthesis of PAMAM G3 conjugates with phosphamide-attached widely used anticancer drugs from an anti-nucleoside group, namely fludarabine- and cytarabine-5'-monophosphates (FP and CP) as mono-conjugates as well as di-conjugates with attached anti-inflammatory and immunosuppressive agent dexamethasone-21-monophosphate (DP) (Fig. 1). In contrast to previous synthesis, biotin was conjugated to PAMAM G3 dendrimer via amide group, because we have previously found that biotin may potentiate the affinity of such conjugates to the cell membranes of cancer cells with commonly overexpressed biotin receptors [44]. The

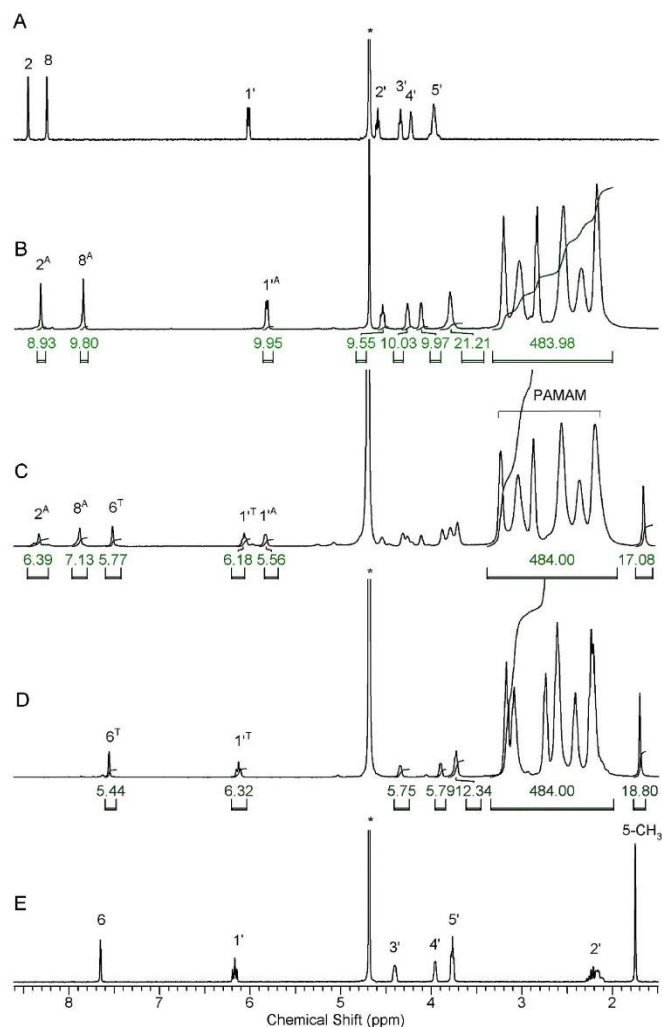


Fig. 2. The ^1H NMR spectra of AMP (A), $\text{G3}^{10\text{A}}$ (B), $\text{G3}^{6\text{A}6\text{T}}$ (C), $\text{G3}^{6\text{T}}$ (D), and dTMP (E) in D_2O . The residual HDO resonance is marked with an asterisk. For atom numbering see Fig. 1.

conjugates of G3^{B} with 7 equivalents of FP, 7 equivalents of DP, 13 equivalents of CP, 5 equivalents of FP plus 5 equivalents of DP and with 11 equivalents of DP plus 10 equivalents of CP were obtained. The ^1H NMR spectra of mono- and di-conjugates are presented in Fig. 3. The average number of equivalents of CP, FP and DP in conjugates was determined by integration of characteristic aromatic resonances of C, F, and D versus internal resonance intensity of G3 core ([484H], traces A and E) or adjusted intensity of PAMAM core and D resonances (within 2.2–3.4 ppm region) in the case of $\text{G3}^{\text{B}7\text{D}}$, $\text{G3}^{\text{B}5\text{D}5\text{F}}$ and $\text{G3}^{\text{B}11\text{D}10\text{C}}$ (traces C, B, and D, respectively). The stock solutions of the conjugates at 5 mM concentration were stable for weeks at room temperature. The ^1H NMR

spectra of all conjugates taken from aqueous solutions and stored for two months at room temperature were identical to the starting ones. Nonetheless, main parts of solutions were stored frozen until the evaluation of potential anticancer activity using cell culture *in vitro* system. The abbreviations of these conjugates were simplified into $\text{G3}^{\text{B}^{\text{F}}}$, $\text{G3}^{\text{B}^{\text{D}^{\text{F}}}}$, $\text{G3}^{\text{B}^{\text{D}}}$, $\text{G3}^{\text{B}^{\text{D}^{\text{C}}}}$ and $\text{G3}^{\text{B}^{\text{C}}}$.

The size and zeta potential for all conjugates were measured by DLS method in water and in 0.05 M acetate buffer (Table 1). Diameter of AMP-attached G3 conjugates increased with the number of substituents. The number-averaged size of AMP conjugates determined in water increased with number of substituents as follows: $\text{G3}^{\text{B}^{\text{A}}}$ (1.47 nm) <

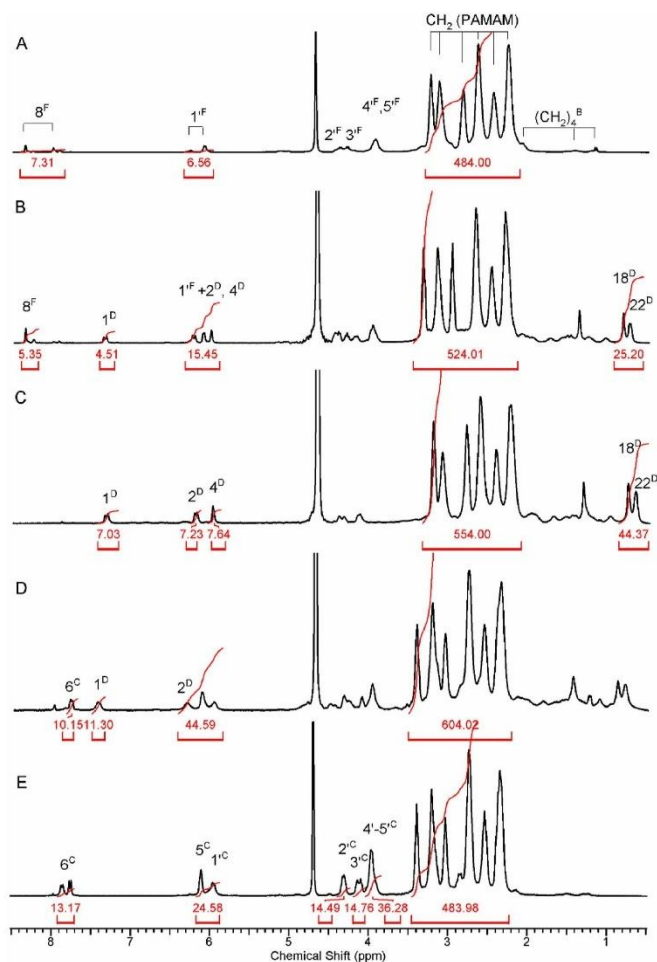


Fig. 3. The ^1H NMR spectra of G_3^{B7F} (A), G_3^{B5DF} (B), G_3^{B7D} (C), $\text{G}_3^{\text{B11D10C}}$ (D) and G_3^{B13C} (E) in D_2O . For atom numbering see Fig. 1.

$\text{G}_3^{6\text{A}}$ (1.50 nm) < $\text{G}_3^{10\text{A}}$ (1.74 nm), and volume-averaged size showed the same trend, i.e.: 1.79 < 1.92 < 2.38 nm, respectively. This indicated that no association of conjugates occurs in 0.1 mM aqueous solutions. The highest substituted $\text{G}_3^{6\text{A}6\text{T}}$ showed $d(\text{N})$ and $d(\text{V})$ equal to 1.74 nm and 2.11 nm, respectively. The size of dexamethasone monophosphate conjugate $\text{G}_3^{5\text{D}}$ was similar to that of $\text{G}_3^{5\text{A}}$ ($d(\text{N}) = 1.59$ nm and $d(\text{V}) = 2.02$ nm). The size of all conjugates increased upon protonation of terminal primary amine groups of G3 (an average $\text{pK}_b = 9.23$ for primary amine groups of G3 dendrimer) and internal tertiary amine groups ($\text{pK}_b \approx 6$, depending on peripheral substituents more than G3 core itself) [45]. The diameter (both $d(\text{N})$ and $d(\text{V})$) increased more than twice for all conjugates upon pH decrease to 5. The protonation of conjugates also resulted in an increase of zeta potential (ζ) from slightly positive in water into high positive values, similar to G3, which in the same conditions was equal to 16.0 mV, while the highest positive value of ζ was

found for $\text{G}_3^{6\text{T}}$ (16.6 mV). Interestingly, for the most hydrophobic derivative $\text{G}_3^{5\text{D}}$, ζ remained constant in both solutions (5.2 mV in pH 7 and pH 5). In case of biotin and DP containing conjugates, namely: G_3^{B7D} , G_3^{B5DF} , and $\text{G}_3^{\text{B11D10C}}$, the diameters measured both in water and at pH 5 were slightly larger than those of AMP and/or dTMP conjugates. The volume-averaged size was slightly higher than the number-averaged ones indicating that limited association of these conjugates took place in 0.1 mM solutions that can be neglected in more diluted ones used further in biological tests. The PDI remained low and it can be concluded that all conjugates are dispersed to monomolecular level and have slightly positive ζ potential. The zeta potential for all conjugates was positive despite exclusion of primary amine groups by substitution and increased upon pH decrease from 7 to 5. The same behavior of highly substituted G4 dendrimers was observed previously for PTX-PAMAM G4 conjugates [16,17,31,34].

Table 1
The values of ζ potential and number- and volume-averaged diameter of conjugate molecules (d(N) and d(V), respectively), in water and in 0.05 M acetate buffer pH 5 (measured within 1 h after pH adjustment). SD - standard deviation; PDI – polydispersity index.

Solution → Species ↓	aqueous				0.05 M acetate buffer pH 5			
	d(N) (SD) [nm]	d(V) (SD) [nm]	PDI	ζ (SD)[mV]	d(N) (SD) [nm]	d(V) (SD) [nm]	PDI	ζ (SD)[mV]
G3 ^A	2.74 (0.16)	3.18 (0.14)	0.21	0.23 (0.05)	3.60 (0.15)	4.15 (0.09)	0.21	21.30 (2.3)
G3 ^B	2.75 (0.15)	3.30 (0.15)	0.22	1.20 (0.06)	3.27 (0.16)	3.27 (0.08)	0.16	16.30 (0.60)
G3 ^{SA}	1.47 (0.25)	1.79 (0.25)	0.44	13.94 (2.14)	3.20 (0.34)	4.02 (0.42)	0.53	15.93 (1.85)
G3 ^{SA}	1.50 (0.09)	1.92 (0.11)	0.32	8.94 (1.56)	3.62 (0.23)	4.28 (0.20)	0.49	9.21 (0.76)
G3 ^{10A}	1.74 (0.15)	2.38 (0.13)	0.32	3.90 (0.86)	4.09 (0.23)	5.06 (0.25)	0.54	14.30 (2.49)
G3 ^{SA6T}	1.79 (0.19)	2.33 (0.19)	0.41	11.89 (1.10)	3.92 (0.15)	4.69 (0.12)	0.56	16.58 (0.67)
G3 ST	1.74 (0.18)	2.11 (0.31)	0.68	8.67 (1.10)	3.69 (0.16)	4.24 (0.16)	0.66	10.83 (0.67)
G3 ^{SD}	1.59 (0.13)	2.02 (0.15)	0.48	5.18 (0.89)	3.62 (0.45)	4.49 (0.49)	0.32	5.17 (1.18)
G3 ^{SD}	1.97 (0.17)	3.15 (0.32)	0.31	6.96 (1.21)	3.20 (0.13)	3.95 (0.12)	0.28	13.93 (2.65)
G3 ^{DF}	1.69 (0.06)	2.13 (0.11)	0.49	15.43 (0.49)	3.03 (0.18)	3.79 (0.12)	0.44	22.81 (3.36)
G3 ^{SDSF}	2.00 (0.11)	2.62 (0.17)	0.37	8.59 (1.78)	3.46 (0.25)	4.26 (0.25)	0.43	11.77 (2.95)
G3 ^{B13C}	2.31 (0.12)	2.42 (0.12)	0.25	8.36 (1.30)	3.55 (0.33)	3.62 (0.22)	0.28	14.24 (2.13)
G3 ^{B11D10C}	2.42 (0.10)	2.53 (0.12)	0.27	6.21 (1.12)	4.12 (0.54)	4.50 (0.42)	0.31	8.08 (2.12)

^a From Ref. [32], presented for comparison.

Isolated conjugates are stable in neutral aqueous solution at least for 2 months as was evidenced by reproducible ¹H NMR spectra of stored solutions in D₂O. After the addition of acid, the hydrolytic cleavage of phosphamide bond occurs. We have performed the hydrolysis of G3^{10A} and G3^{SD} in mild conditions. The conjugates were dissolved in water, placed in dialytic tube and immersed in the reservoir containing 5 l of acetate buffer. G3^{10A} was exposed to pH 5 for 1, 2, 4 and 8 h, then the bag was placed for 3 days in water to recover neutral solvent conditions inside the bag, and then the solvent was removed. The isolated solids were examined by ¹H NMR spectroscopy in D₂O. We found that the intensity of adenine H-2 and H-8 resonances decreased over time (Fig. 4). Estimated hydrolysis half-time for G3^{10A} was about 4 h. Additionally, the acetate anion methyl proton resonance was observed at 1.5 ppm. The number of acetate equivalents corresponded to the number of AMP equivalents released during hydrolysis. The same experiment was conducted for G3^{SD} conjugate. The integration of 18 and 22 methyl group protons versus internal reference signal of PAMAM G3 methylene protons at 2.3 ppm ([120H] intensity) allowed to determine the composition of the products and hydrolysis half-time, which was estimated as 3 h (Fig. 5). In case of B and DC- and DF-containing conjugates, the half lifetime was near 4 h as estimated by the ¹H NMR single measurement after 4 h dialysis of the samples at pH 5. The stability of conjugates in neutral pH would allow reaching target cells *in vitro* and also in case of intravenous delivery. Once the conjugates will enter the cells by endocytosis, they will release drugs CP or FP and DP in early lysosomes in which pH is near 5. In such conditions, the conjugate size is increased (Table 1) and conjugates become more accessible to lysosomal proteinases. The dialytic experiments demonstrated that release is not immediate and takes about 4 h to build up the drug levels in targeted cell corresponding to a cytotoxic dose. Moreover, continuous release for next 12 h should maintain the death-inducing concentration of the drug. To verify these assumptions on drug release in biological systems, selected cellular models *in vitro* were considered (vide infra).

3.2. Comparison between anticancer potential of free drugs and drugs attached to PAMAM dendrimer using four cellular models of leukemia *in vitro*

As anti-nucleosides such as cytarabine and fludarabine are widely used anticancer drugs to treat different types of leukemia [1–5], in the present study, four cellular models of leukemia *in vitro*, namely K-562, LAMA-84, THP-1 and HL-60 cells were considered to investigate anticancer activity of cytarabine and fludarabine-PAMAM dendrimer mono-conjugates compared to the action of free drugs (CP and FP) and in combination with the action of an anti-inflammatory agent DP in the form of a free drug and as an attachment to cytarabine and fludarabine-PAMAM dendrimer mono-conjugates. First, we have

focused on conjugate-mediated changes in metabolic activity as judged by MTT test (Figs. S3A and 24 h treatment and Fig. 6, 48 h treatment, respectively). To select the concentration of mono- and di-conjugates for further analysis, the effects of two anticancer drugs, namely CP and FP were studied using three concentrations of 10, 100 and 1000 nM reflecting low, medium and high concentrations (Fig. S3A and Fig. 6). After 48 h stimulation, chronic myeloid (myelogenous) leukemia (CML) cells, namely LAMA-84 and K-562 cells, were the most sensitive to FP treatment and AML cells, namely HL-60 cells were the most sensitive to CP treatment (Fig. 6). THP-1 cells, acute monocytic leukemia cells, were not susceptible to 48 h treatment with FP and CP even, when high concentration of 1000 nM was used (Fig. 6). However, the metabolic activity of THP-1 cells was affected when shorter time of incubation with anticancer drugs was considered, namely 24 h treatment (Fig. S3A). One can conclude that the effects of FP and CP in THP-1 are transient (Fig. S3A and Fig. 6). Although CP is mainly used against AML and ALL cells and FP is usually applied to treat CLL [1–5], the effects of fludarabine were also analyzed in CML cells, however, in most cases as a combination therapy [46–48]. For example, IC₅₀ of fludarabine was established to be 5.5 and 2.3 μ M for 24 and 48 h treatments in K-562 cells [49]. Fludarabine was also active against mouse lymphocytic leukemia cell line (L1210 cells), however, the authors considered very high concentrations of fludarabine, namely from 5 to 20 μ M [50]. The effects of cytarabine were also previously studied against HL-60 cells [51]. HL-60 cells were insensitive to 0.1 μ M cytarabine treatment that is opposite to our results (this study). These differences may rely on the cell number considered that may affect drug response. The authors used 4-fold higher number of cells than used in the present study [51].

DP at all concentrations used did not affect the metabolic activity of four leukemia cell lines when treated for 48 h (Fig. 6). As 10 nM concentration of FP and CP was ineffective against four leukemia cell lines upon 48 h stimulation (Fig. 6), this concentration and this incubation time were selected for further analysis on the effects of mono- and di-conjugates (Figs. 6–10). Furthermore, lower concentrations of 1 and 5 nM were also tested using MTT assay (Fig. 6). The rationale was to reveal the conditions in which the effects of mono- and di-conjugates would be potentiated compared to the action of free drugs when used at the same concentration. This approach, if successful, would allow to lower the effective concentration of the drug in the form of drug-dendrimer. This is clinically important, because high doses of cytarabine may promote a number of adverse side effects such as clonal selection and drug resistance [52,53].

The effects of biotin-attached dendrimer (G3^B) were limited and, in most cases, observed differences were not statistically significant (Fig. S3A and Fig. 6). This suggest that G3^B can be considered as a safe and biocompatible carrier/vehicle for the delivery of anticancer drugs. 10 nM CP-PAMAM dendrimer conjugate (G3^{BC}) moderately potentiated

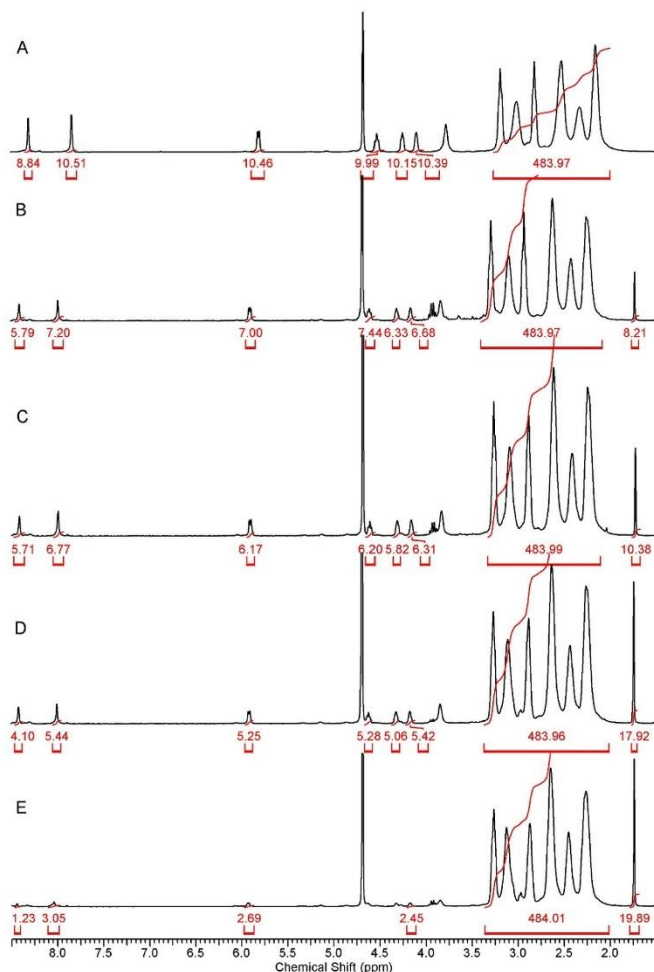


Fig. 4. The ^1H NMR spectra of $\text{G3}^{10\text{A}}$ conjugate at 0 time (A), and after 1 (B), 2 (C), 4 (D), and 6 h (E) of dialysis at pH 5. The resonance assignment was performed using 1-D COSY, HSQC, and HMBC.

the action of free CP in K-562 cells ($p < 0.001$), whereas 10 nM FP-PAMAM dendrimer conjugate (G3^{BF}) promoted a decrease in metabolic activity of THP-1 cells ($p < 0.01$), and to a lesser degree of HL-60 cells ($p < 0.05$), compared to the effect of free FP (Fig. 6). In contrast, in LAMA-84 cells, 10 nM DP-FP-PAMAM dendrimer di-conjugate (G3^{BDF}), but not 10 nM FP-PAMAM dendrimer mono-conjugate (G3^{BF}), potentiated the effect of free FP (Fig. 6, $p < 0.001$) that suggests that DP, an immunomodulator, may exert synergistic anticancer effect during chemotherapeutic treatment in selected experimental settings. Similar synergistic effect, but even more pronounced, was observed in the case of HL-60 cells treated with 10 nM DP-CP-PAMAM dendrimer di-conjugate (G3^{BDC}) compared to the action of free CP (Fig. 6, $p < 0.001$). The inhibitory effect of 10 nM G3^{BDC} was comparable to the

inhibitory effect of 100 nM CP in HL-60 cells (Fig. 6). Thus, DP may act as a chemosensitizer in G3^{BDC} -treated HL-60 cells reducing the therapeutic dose of CP of about 10-fold (Fig. 6). There is limited information on the synthesis and biomedical applications of dendrimer-based systems for anti-nucleoside anticancer drug delivery [30,54–56]. Poly(propyleneimine) dendrimers (PPI, 4th generation) with maltose modified surface were demonstrated to form the complexes with cytarabine (ara-C) and cytarabine-5'-triphosphates (ara-CTP) at the 12–15 nucleotide per PPI, depending on the number of surface primary amine groups that was determined by isothermal titration calorimetry method [30]. The cytotoxic effects of the nucleoside and nucleotide form of cytarabine and the drug in the form of drug-dendrimer complex were tested using 1301 T-cell leukemia cell line and HL-60 cells [54]. 1 μM

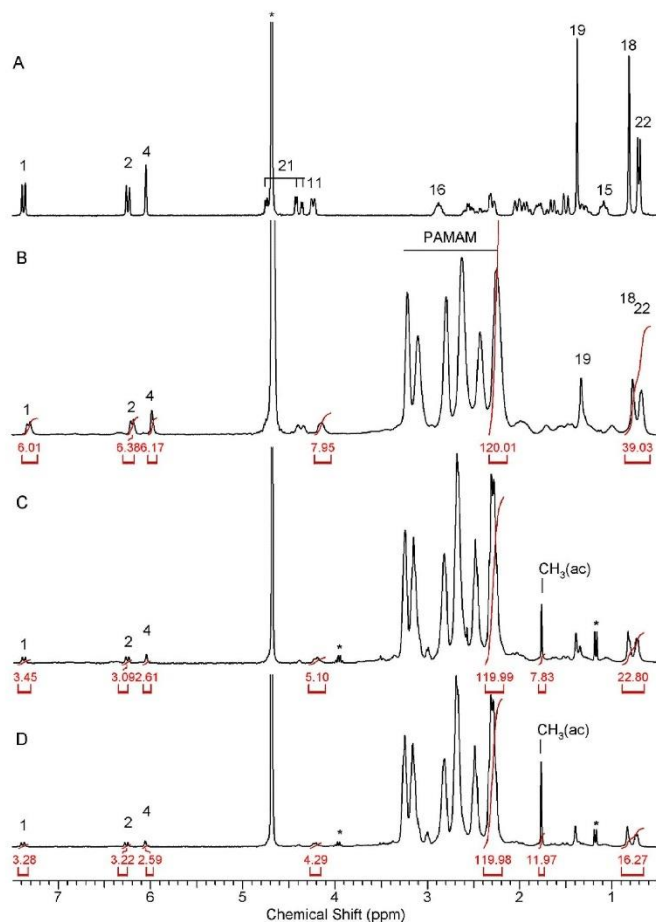


Fig. 5. The ^1H NMR spectra of DP (A), $\text{G3}^{7\text{D}}$ (B), the conjugate after 3 h (C), and 6 h (D) of dialysis at pH 5. The residual H_2O resonance and impurity are marked with an asterisk. The resonance assignment was performed using 1-D COSY, HSQC, and HMBC. The atom numbering of DP was adapted from Ref. [41].

cytarabine-dendrimer complex did not potentiate the cytotoxicity of a free drug when used at the same concentration in HL-60 cells [54]. In contrast, 1301 cells were more susceptible to $1\ \mu\text{M}$ cytarabine-dendrimer complex treatment compared to $1\ \mu\text{M}$ cytarabine treatment [54]. However, for comparative analysis, the authors used 100-fold higher concentration of cytarabine-dendrimer complexes and 2-fold higher number of cells than used in the present study. Cytarabine was also covalently attached via succinate ester bond into PEG-ylated PAMAM G4 dendrimer to obtain conjugate with ten equivalents of C in one nanocarrier molecule [56]. C was released from the conjugate within 14 h in PBS buffer at pH 7.4 and in plasma, half-time of the conjugate was $<5\ \text{h}$ [56]. The conjugate was characterized by four-fold higher efficiency in the growth inhibition of human lung carcinoma epithelial cells (A549 cell line) in comparison with free C after 72 h incubation [56]. Non-covalent complexes of maltose-modified poly(propyleneimine) dendrimer, fludarabine and/or fludarabine

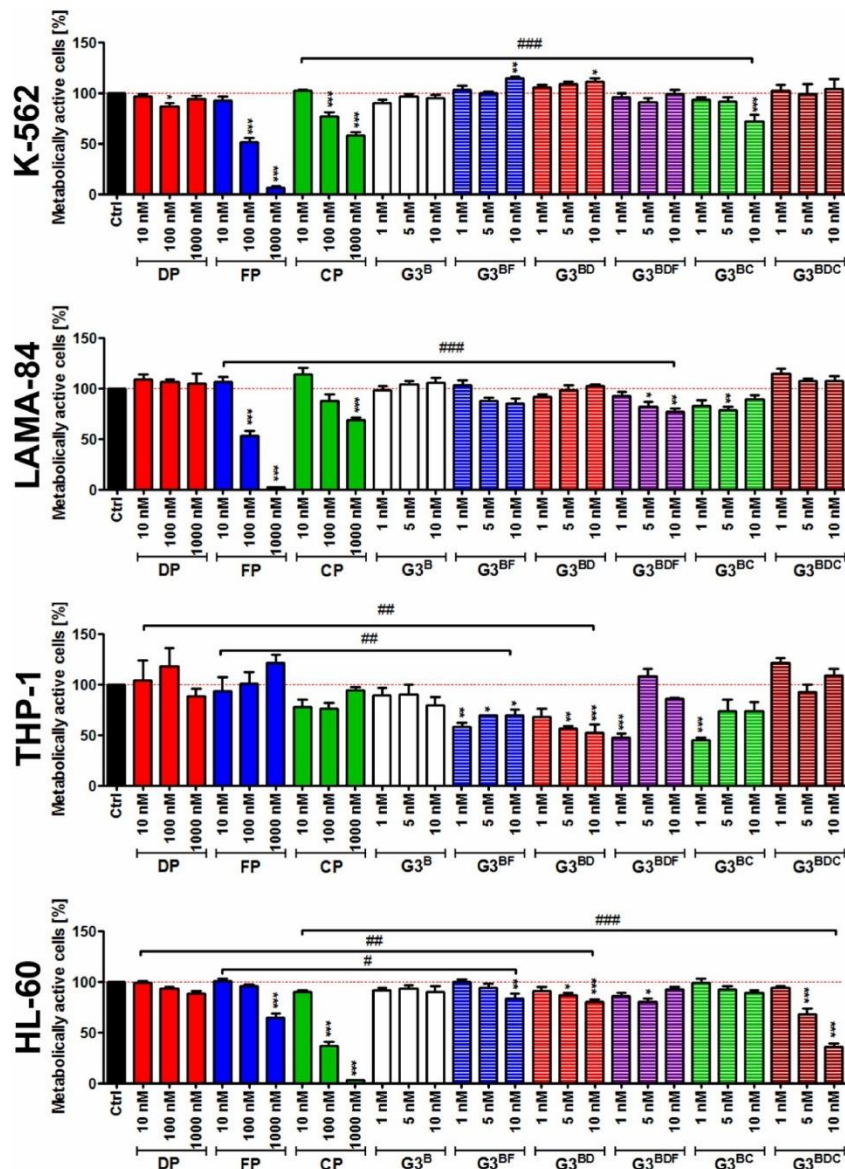
triphosphate were also tested against three leukemia cell lines, namely CCRF, THP-1 and U-937 cells [55]. The action of fludarabine triphosphate was limited compared to fludarabine treatment, however, fludarabine triphosphate complexation with the glycodendrimer significantly potentiated cytotoxic effects in leukemia cells [55]. The authors treated the cells with very high concentrations of free drugs and complexes, namely 5, 10 and $20\ \mu\text{M}$ [55].

Surprisingly, $10\ \text{nM}$ $\text{G3}^{7\text{D}}$ dendrimer conjugate substantially affected the metabolic activity of THP-1 cells, and to a lesser degree of HL-60 cells, compared to the effect of free DP (Fig. 6, $p < 0.01$). In general, diverse responses in AML cells (HL-60 and THP-1 cells) may rely on the differences in cell differentiation. One should remember that HL-60 cell line is a model of promyeloid AML, while THP-1 cell line is a subtype of AML with *MLL* fusion and more differentiated promonocytes and with a tendency to differentiation of monocytes to macrophages *in vitro* [57].

We have then analyzed the uptake of selected conjugates using

imaging flow cytometry (Fig. 7). As LAMA-84 cells were susceptible to the treatment with 10 nM G3^{BDF}, whereas K-562 cells were relatively insensitive (Fig. 6), we decided to correlate the uptake of G3^{BDF} labeled with FITC (G3^{BDF}_F) with its anticancer effects in LAMA-84 and K-562

cells (Fig. 7). Furthermore, as FITC labeling protocol requires ethanolic environment and G3^{BC} is insoluble in ethanol, it was impossible to provide G3^{BC} labeled with FITC for uptake analysis. As we used FITC-based system, one can easily track the uptake of FITC-labeled



(caption on next page)

Fig. 6. Drug- and conjugate-mediated changes in metabolic activity of four leukemia cell lines, namely K-562, LAMA-84, THP-1 and HL-60 cells. Cancer cells were treated with drugs (DP, FP, CP) at the concentrations of 10, 100 and 1000 nM or conjugates ($G3^B$, $G3^{BF}$, $G3^{BD}$, $G3^{BDF}$, $G3^{BC}$, $G3^{BDC}$) at the concentrations of 1, 5 and 10 nM for 48 h. Metabolic activity was assessed using MTT test. Formazan-related absorbance was read using a microplate reader. Metabolic activity of untreated cells cultured in standard growth condition was considered as 100% (Ctrl). To emphasize the action of drugs and conjugates, a red dashed line is provided. Based on MTT results, the concentration of 10 nM of conjugates was selected for further analysis. Bars indicate SD, $n = 6$ $^{***}p < 0.001$, $^{**}p < 0.01$, $^*p < 0.05$ compared to control conditions (Ctrl) (ANOVA and Dunnett's *a posteriori* test); $^{###}p < 0.001$, $^{##}p < 0.01$, $^{\#}p < 0.05$ compared to the treatment with a free drug (ANOVA and Tukey's *a posteriori* test). Ctrl, control untreated conditions; DP, dexamethasone monophosphate; FP, fludarabine monophosphate; CP, cytarabine monophosphate; $G3^B$, biotin attached to PAMAM G3 dendrimer; $G3^{BF}$, fludarabine monophosphate attached to biotinylated PAMAM G3 dendrimer; $G3^{BD}$, dexamethasone monophosphate attached to biotinylated PAMAM G3 dendrimer; $G3^{BDF}$, fludarabine monophosphate and dexamethasone monophosphate attached to biotinylated PAMAM G3 dendrimer; $G3^{BC}$, cytarabine monophosphate attached to biotinylated PAMAM G3 dendrimer; $G3^{BDC}$, cytarabine monophosphate and dexamethasone monophosphate attached to biotinylated PAMAM G3 dendrimer. (For interpretation of the references to colour in this figure legend, the reader is referred to the Web version of this article.)

conjugates (in green, Fig. 7). We have considered two controls, namely untreated cells and cells treated with unlabeled biotin-attached PAMAM dendrimer $G3^B$ (Fig. 7). As expected, treatment with $G3^B$ did not affect intracellular FITC-based signals (Fig. 7). In both CML cell lines, FITC-labeled $G3^{BDF}$ was observed ($p < 0.001$), however, the conjugate uptake was more efficient in K-562 cells (Fig. 7) with limited effects upon $G3^{BDF}$ stimulation (Fig. 6). Thus, one can conclude that $G3^{BDF}$ uptake does not directly correlate with its anticancer action in CML cells (Figs. 6 and 7). No correlation between cytotoxicity and the uptake of antineoplastic drugs such as cytarabine was previously reported in selected leukemia cell lines [51].

As MTT test is not able to discriminate between cytotoxic and cytostatic effects of tested agents, we decided then to evaluate if conjugate-mediated changes in metabolic activity of leukemia cells (Fig. 6) are mediated by apoptotic cell death (Fig. 8). Dual staining was considered, namely Annexin staining and 7-AAD staining to distinguish between early and late apoptotic populations as well as necrotic population (Fig. 8A and Fig. S3B). Only in the case of HL-60 cells treated with 10 nM $G3^{BDC}$, a statistically significant increase in the levels of early and late apoptotic cells was noticed compared to untreated cells (17% increase in the total apoptotic population compared to control conditions) (Fig. 8A, $p < 0.001$) that indicates that indeed $G3^{BDC}$ -mediated changes in metabolic activity (Fig. 6) may reflect $G3^{BDC}$ -induced apoptosis in HL-60 cells. Perhaps in other cases, changes in metabolic activity may be also associated with cytostatic activity of the conjugates. $G3^{BDC}$ -induced apoptosis in HL-60 cells was also confirmed by the analysis of caspase 3 levels, a major executive caspase during apoptotic cell death. The pools of caspase 3 were compared upon $G3^{BDF}$, $G3^{BC}$ and $G3^{BDC}$ stimulations in four leukemia cell lines and only in the case of $G3^{BDC}$ -treated HL-60 cells, elevated levels of caspase 3 were observed (Fig. 8B). It was suggested that glucocorticoids may act as chemosensitizers during antineoplastic-based antileukemic therapy, mainly against ALL [12]. However, cytarabine resistant AML cells were also found to be sensitive to glucocorticoids [6]. Dexamethasone improved the outcome of AML patients receiving intensive chemotherapy [58]. This may be achieved by dexamethasone-mediated modulation of inflammatory chemoresistance pathways [58]. Dexamethasone also enhanced the cytotoxicity of cytarabine in a co-culture system [58]. It was previously reported that dexamethasone may induce apoptotic cell death in AML cell lines such as Kasumi-1 and SKNO-1 cells that was correlated with high expression of glucocorticoid receptor gene [59]. Indeed, glucocorticoid-mediated apoptosis may be executed by the binding to glucocorticoid receptor and then to transcription factors such as NF- κ B and AP-1 thus affecting their activity [8,9]. In contrast, there were no significant changes in growth rate of HEL, HL-60, ML-1, U-937, K-562 and KU-812 cells at concentrations up to 1 μ M dexamethasone [59]. Mechanistically, dexamethasone may sensitize AML cells to cytarabine by upregulating FKBP51 that inhibits AKT pathway and limits cell proliferation [60].

As, except of $G3^{BDC}$ -treated HL-60 cells, decreased metabolic activity (MTT assay, Fig. 6) was not correlated with apoptosis induction (a sign of cytotoxicity) in conjugate-treated leukemia cells (Fig. 8 and Fig. S3B), we have then focused on conjugate-mediated changes in the cell cycle as

a sign of affected cell cycle progression and a cytostatic effect (Fig. 9 and Fig. S3C). However, conjugate-associated cytostatic effects were limited (Fig. 9). None of the treatments affected the phases of cell cycles in the case of K-562 and THP-1 cells (Fig. 9). Except of DP-mediated increase in the S phase of the cell cycle of LAMA-84 cells, in drug- and conjugate-treated LAMA-84 cells ($p < 0.001$), no changes in the phases of the cell cycle were observed (Fig. 9). The most pronounced effects on cell cycle were revealed in $G3^{BDC}$ -treated HL-60 cells and, to a lesser extent, in $G3^{BDF}$ -treated HL-60 cells (Fig. 9). In both cases, conjugate treatment resulted in an increase in the G_0/G_1 phase of the cell cycle compared to untreated control in HL-60 cells (Fig. 9, $p < 0.001$).

As 10 nM $G3^{BDF}$ treatment in LAMA-84 cells resulted in decreased metabolic activity compared to 10 nM FP treatment (Fig. 6, $p < 0.001$), we have then studied if this observation may be a result of limited immunocompatibility. Thus, the levels of NF- κ B, a transcription factor that modulates the expression of genes involved in the regulation of proliferation, apoptotic cell death, and inflammatory responses and promotes inflammation-mediated tumorigenesis [61,62], were analyzed using imaging flow cytometry-based detection of NF- κ B specific immuno-signals (Fig. 10). We have considered two controls, namely untreated cells and cells treated with biotin-attached PAMAM G3 dendrimer $G3^B$ (Fig. 10). As one can observe, except of a very slight increase in the levels of NF- κ B in HL-60 cells, $G3^B$ stimulation did not promote an elevation in the levels of NF- κ B (Fig. 10). Thus, it can be concluded that $G3^B$ is a relatively immunocompatible drug carrier/vehicle. $G3^{BDF}$ -mediated decrease in metabolic activity in LAMA-84 cells was not accompanied by augmented levels of NF- κ B (Fig. 10). Upon $G3^{BDF}$ stimulation in LAMA-84 cells, more cells were NF- κ B-positive, but no changes in fluorescence intensity was noticed (Fig. 10). Thus, the levels of NF- κ B were unaffected and diminished metabolic activity was not due to NF- κ B-based inflammation in $G3^{BDF}$ -treated LAMA-84 cells (Figs. 6 and 10). Only in $G3^{BDF}$ -treated HL-60 cells, a mild increase in the levels of NF- κ B was observed (Fig. 10). Reduced metabolic activity upon stimulation with $G3^{BDF}$ (Fig. 6) was also not mediated by dexamethasone-associated decrease in NF- κ B activity [8,9] as $G3^{BDF}$ did not diminish the levels of NF- κ B in $G3^{BDF}$ -treated LAMA-84 cells (Fig. 10).

To the best of our knowledge, there was no attempt to use dexamethasone-dendrimer conjugate in anti-leukemia mono- and/or combination therapy. However, dexamethasone as a part of dendrimer-based DDS was already considered to lower inflammation in a rat mild alkali burn model [63]. PAMAM-OH dendrimer G4 was used to attach eight molecules of dexamethasone with succinate linker *via* ester bond. This conjugate was further coupled into polymeric hyaluronic acid to obtain a subconjunctival injectable gel [63]. The conjugate was proven to attenuate corneal inflammation more effectively than free dexamethasone by inhibiting macrophage infiltration and pro-inflammatory cytokine expression in inflamed rat cornea [63].

As our study of anticancer action of conjugate-based system is limited to *in vitro* tests using selected leukemia cellular models, we would also like to initially analyze the biocompatibility of dendrimers/dendrimer conjugates. Thus, *in vitro* hemolysis test was considered (Fig. S4). Two time points were used, namely 24 and 48 h treatments

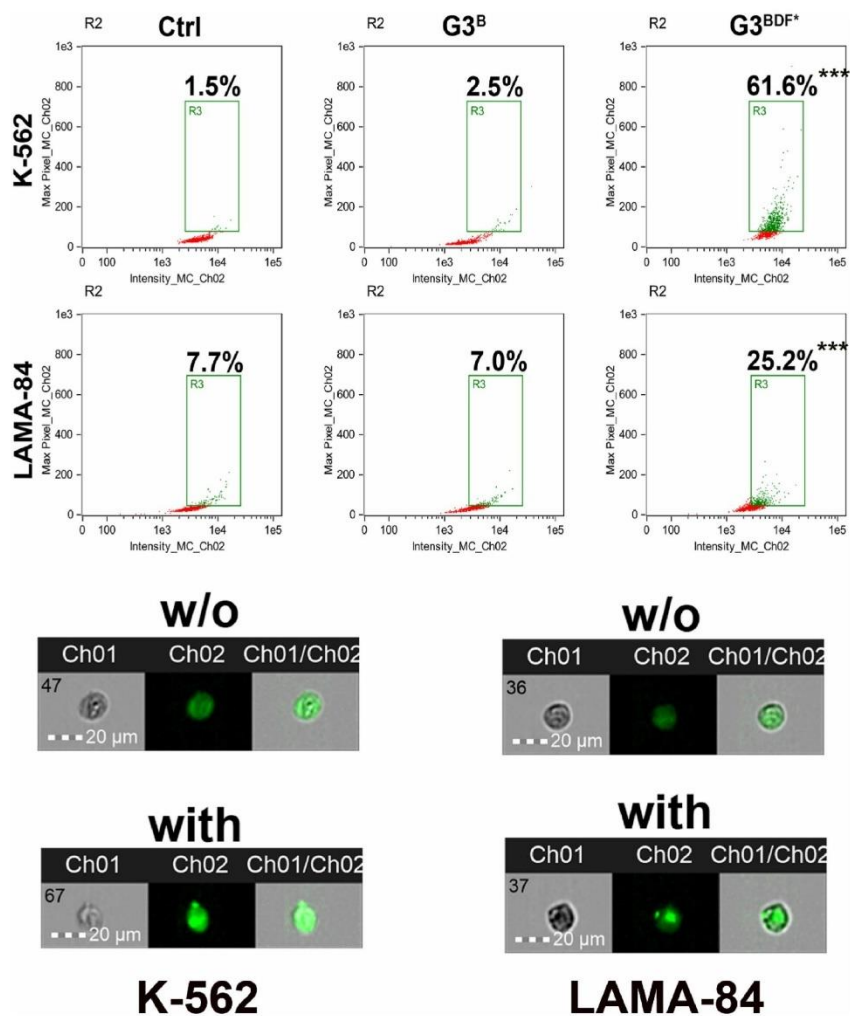
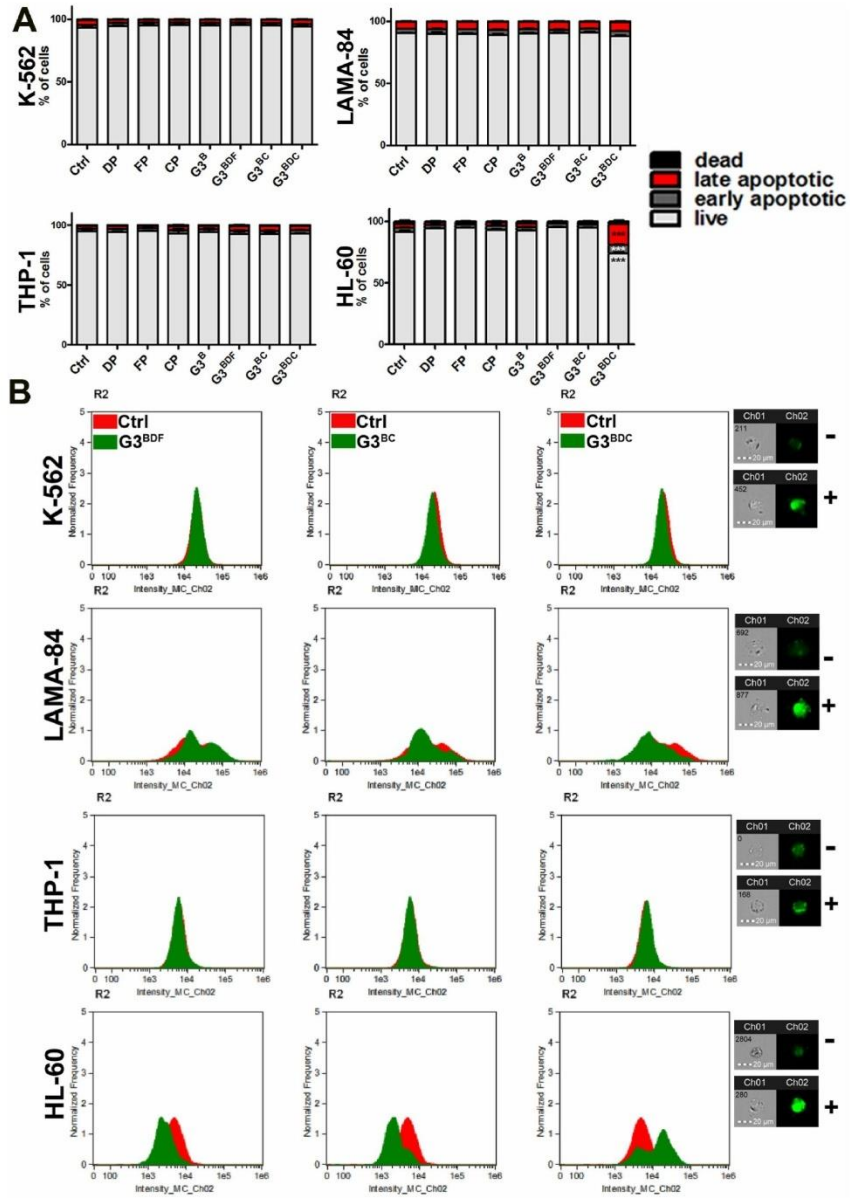


Fig. 7. G3^{BDF*} uptake by K-562 and LAMA-84 cells. Cells were treated with 10 nM G3^{BDF*} conjugate for 48 h. FITC-labeled conjugates were tracked using imaging flow cytometry (Amnis® FlowSight® imaging flow cytometer and IDEAS software using two parameters, namely Max Pixel_MC_Ch02 and Intensity_MC_Ch02). Microphotographs (bottom, Ch01: bright field, Ch02: FITC-based signals, green, Ch01/Ch02: merged signals) and dot plots are presented (top). Green dots indicate FITC-labeled conjugate-positive cell subpopulation (R3), whereas red dots represent FITC-labeled conjugate-negative cell subpopulation. w/o, untreated cells (Ctrl); with, cells treated with G3^{BDF*} conjugate. The uptake of unlabeled G3^B is also presented. *** $p < 0.001$ compared to control conditions (Ctrl) (ANOVA and Dunnett's *a posteriori* test). G3^B, biotin attached to PAMAM G3 dendrimer; G3^{BDF*}, FITC-labeled fludarabine monophosphate and dexamethasone monophosphate attached to biotinylated PAMAM G3 dendrimer. (For interpretation of the references to colour in this figure legend, the reader is referred to the Web version of this article.)



(caption on next page)

Fig. 8. Drug- and conjugate-induced apoptotic cell death in four leukemia cell lines. Cells were treated with 10 nM drugs and conjugates for 48 h. (A) Apoptosis and necrosis were evaluated using flow cytometry (Muse™ Cell Analyzer) and dual staining (Annexin staining and 7-AAD staining using Muse™ Annexin V Assay Kit). Four cell subpopulations were revealed, namely live, early apoptotic, late apoptotic and necrotic cells. Bars indicate SD, $n = 5$; $***p < 0.001$ compared to untreated cells (Ctrl) (ANOVA and Dunnett's *a posteriori* test). (B) The levels of caspase 3, a main executive caspase during apoptosis, were assayed using dedicated anti-caspase 3 primary antibody and imaging flow cytometry (Amnis® FlowSight® imaging flow cytometer and IDEAS software using two parameters, namely Normalized Frequency and Intensity_MC.Ch02). Representative histograms are shown (left). Red histograms indicate caspase 3-positive signals in control cells (Ctrl), whereas green histograms represent caspase 3-positive signals in treated cells. Representative microphotographs are also presented (right, Ch01: bright field, Ch02: Alexa Fluor™ 488 signals, green). Ctrl, control untreated conditions, also denoted as "-" (right); +, cells treated with the conjugates; DP, dexamethasone monophosphate; FP, fludarabine monophosphate; CP, cytarabine monophosphate; G3^B, biotin attached to PAMAM G3 dendrimer; G3^{BDF}, fludarabine monophosphate and dexamethasone monophosphate attached to biotinylated PAMAM G3 dendrimer; G3^{BC}, cytarabine monophosphate attached to biotinylated PAMAM G3 dendrimer; G3^{BDC}, cytarabine monophosphate and dexamethasone monophosphate attached to biotinylated PAMAM G3 dendrimer. (For interpretation of the references to colour in this figure legend, the reader is referred to the Web version of this article.)

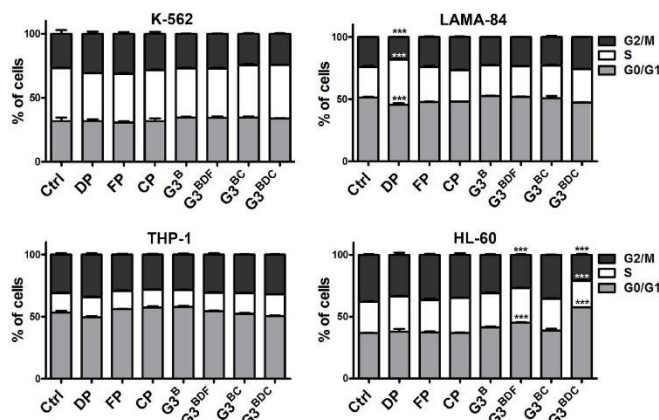


Fig. 9. Drug- and conjugate-mediated changes in the progression of cell cycle in four leukemia cell lines. Cells were treated with 10 nM drugs and conjugates for 48 h. DNA content-based analysis of the phases of cell cycle (G0/G1, S, G2/M) was performed using flow cytometry and dedicated staining (Muse™ Cell Analyzer and Muse™ Cell Cycle Kit). Bars indicate SD, $n = 3$; $***p < 0.001$ compared to untreated control (Ctrl) (ANOVA and Dunnett's *a posteriori* test). Ctrl, control untreated conditions; DP, dexamethasone monophosphate; FP, fludarabine monophosphate; CP, cytarabine monophosphate; G3^B, biotin attached to PAMAM G3 dendrimer; G3^{BDF}, fludarabine monophosphate and dexamethasone monophosphate attached to biotinylated PAMAM G3 dendrimer; G3^{BC}, cytarabine monophosphate attached to biotinylated PAMAM G3 dendrimer; G3^{BDC}, cytarabine monophosphate and dexamethasone monophosphate attached to biotinylated PAMAM G3 dendrimer.

with 10 nM dendrimers/dendrimer conjugates (Fig. S4). KCl-mediated hemolysis (positive control, PC) was assumed as 100% hemolytic activity (Fig. S4). Dendrimers/dendrimer conjugates did not possess hemolytic activity when whole blood samples were treated for 24 h (Fig. S4). Minor hemolytic activity of G3^{BC} and G3^{BDC} was revealed for 48 h treatment (Fig. S4). Thus, one can conclude that dendrimer conjugates are relatively hemocompatible, at least, using *in vitro* hemolysis test and our experimental settings. Dendrimer-mediated hemolysis *in vitro* was previously studied [64]. PAMAM dendrimers (generations 4–6) at the concentrations from 0.5 to 6 mg/ml were used for up to 24 h treatment with erythrocytes *in vitro* [64]. The authors concluded that dendrimer-mediated hemolysis was generation- and concentration-dependent [64]. Human serum albumin, when added to treated erythrocytes, promoted protective effects against dendrimer-induced hemoglobin release [64]. This is in agreement with our findings on limited dendrimer-mediated hemolysis using whole blood samples (Fig. S4) that is more relevant to physiological conditions than using isolated fraction of red blood cells *in vitro*. Indeed, dendrimer-induced hemotoxicity *in vivo* is expected to be lower than is observed *in vitro* [64].

4. Conclusions

The phosphate-containing drugs, here anti-nucleoside anticancer drugs, cytarabine and fludarabine, were used to prepare dendrimer-based DDS by covalent attachment of a drug *via* phosphamide linker, which is cleavable at pH 5 within hour time scale. The conjugation of

cytarabine and fludarabine with PAMAM G3 dendrimer resulted in potentiated anticancer activity in selected experimental settings compared to the action of free drugs using four cellular models of leukemia *in vitro*. Conjugate-mediated anticancer effects may be also further potentiated by the presence of an anti-inflammatory agent dexamethasone. For example, in dexamethasone-cytarabine-PAMAM G3 dendrimer di-conjugate-treated HL-60 acute myeloid leukemia cells, decreased metabolic activity, G0/G1 cell cycle arrest and apoptosis induction were noticed compared to the effects of free drugs. In this case, the use of dendrimer-based DDS and dexamethasone allows for 10-fold decrease in anticancer drug (cytarabine) dose without losing its effectiveness, in this case, from 100 nM to 10 nM. This may have therapeutic implications in the context of anticancer drug-associated side effects and the acquisition of drug resistance.

CRediT authorship contribution statement

Konrad Wróbel: Investigation, Writing – review & editing. **Anna Deręgowska:** Investigation, Data curation, Formal analysis, Writing – review & editing. **Gabriela Betlej:** Investigation. **Małgorzata Walczak:** Investigation, Data curation, Formal analysis. **Maciej Wnuk:** Conceptualization, Methodology, Validation, Investigation, Data curation, Formal analysis, Writing – review & editing, Supervision. **Anna Lewińska:** Investigation, Data curation, Formal analysis, Writing – original draft. **Stanisław Wołowicz:** Conceptualization, Methodology, Validation, Investigation, Data curation, Formal analysis, Writing – original draft, Supervision.

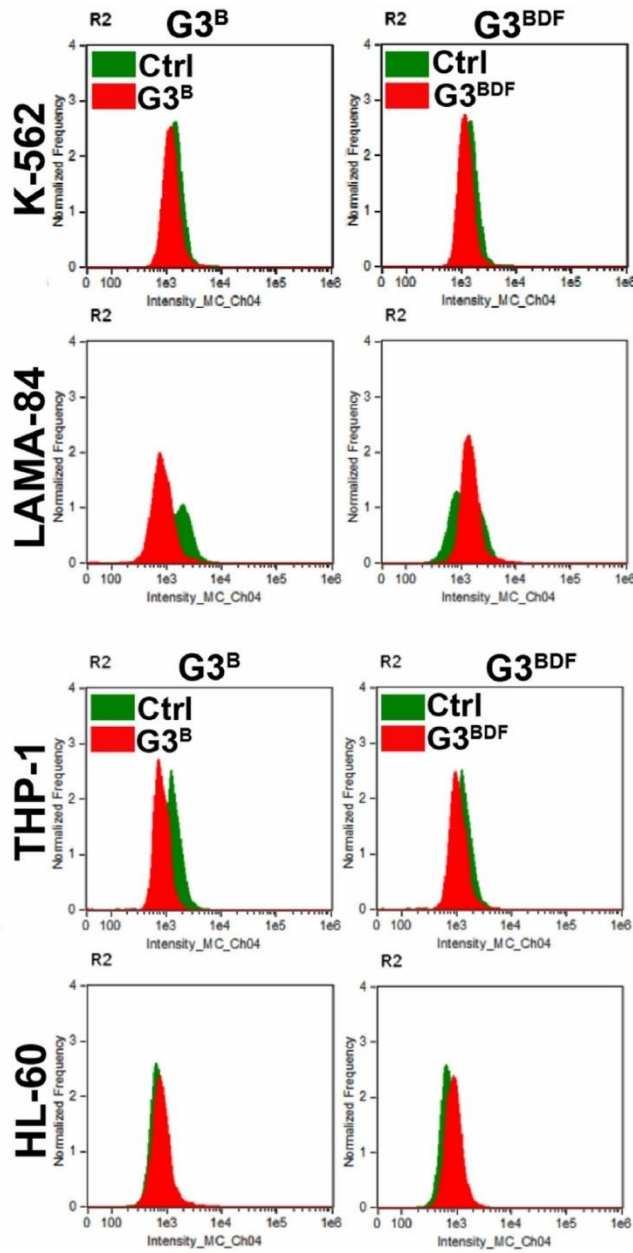


Fig. 10. Conjugate-mediated changes in the levels of a master regulator of immune responses NF-κB in four leukemia cells. Cells were treated with 10 nM G3^B and G3^{BDF} for 48 h. The levels of NF-κB were revealed using a dedicated primary anti-NF-κB antibody and imaging flow cytometry (Amnis® FlowSight® imaging flow cytometer and IDEAS software using two parameters, namely Normalized Frequency and Intensity_MC_Ch04). Representative histograms are presented. Green histograms indicate control conditions (Ctrl), whereas red histograms represent conjugate-treated cells. Ctrl, control untreated conditions; G3^B, biotin attached to PAMAM G3 dendrimer; G3^{BDF}, fludarabine monophosphate and dexamethasone monophosphate attached to biotinylated PAMAM G3 dendrimer. (For interpretation of the references to colour in this figure legend, the reader is referred to the Web version of this article.)

Declaration of competing interest

The authors declare no conflict of interest.

Data availability

Data will be made available on request.

Appendix A. Supplementary data

Supplementary data to this article can be found online at <https://doi.org/10.1016/j.jddst.2023.104242>.

References

- C. Galmarini, J. Mackey, C. Dumontet, Nucleoside analogues: mechanisms of drug resistance and reversal strategies, *Leukemia* 15 (2001) 875–890, <https://doi.org/10.1038/sj.leu.2402114>.
- A. Hamada, T. Kawaguchi, M. Nakano, Clinical pharmacokinetics of cytarabine formulations, *Clin. Pharmacokinet.* 41 (2002) 705–718, <https://doi.org/10.2165/00003088-200241100-00002>.
- B. Ewald, D. Sampath, W. Plunkett, Nucleoside analogs: molecular mechanisms signaling cell death, *Oncogene* 27 (2008) 6522–6537, <https://doi.org/10.1038/onc.2008.316>.
- M. Montillo, Tedeschi Ricci, Fludarabine in the treatment of chronic lymphocytic leukemia: a review, *Therapeut. Clin. Risk Manag.* 187 (2009), <https://doi.org/10.2147/TCRM.S3688>.
- P. Robak, T. Robak, Older and new purine nucleoside analogs for patients with acute leukemias, *Cancer Treat Rev.* 39 (2013) 851–861, <https://doi.org/10.1016/j.ctrv.2013.03.006>.
- D. Malani, A. Murumägi, B. Yadav, M. Kontro, S. Eldfors, A. Kumar, R. Karjalainen, M.M. Majumder, P. Ojames, T. Pemovska, K. Wennerberg, C. Heckman, K. Porkka, M. Wolf, T. Aittokallio, O. Kallioniemi, Enhanced sensitivity to glucocorticoids in cytarabine-resistant AML, *Leukemia* 31 (2017) 1187–1195, <https://doi.org/10.1038/leu.2016.314>.
- P.S. Gaynon, R.H. Lustig, The use of glucocorticoids in acute lymphoblastic leukemia of childhood: molecular, cellular, and clinical considerations, *J. Pediatr. Hematol. Oncol.* 17 (1995) 1–12, <https://doi.org/10.1097/00043426-199502000-00001>.
- S. Greenstein, K. Ghias, N.L. Krett, S.T. Rosen, Mechanisms of glucocorticoid-mediated apoptosis in hematological malignancies, *Clin. Cancer Res. Off. J. Am. Assoc. Cancer Res.* 8 (2002) 1681–1694.
- W.J.E. Tissing, J.P.P. Meijerink, M.L. den Boer, R. Pieters, Molecular determinants of glucocorticoid sensitivity and resistance in acute lymphoblastic leukemia, *Leukemia* 17 (2003) 17–25, <https://doi.org/10.1038/sj.leu.2402733>.
- U. Naumann, S. Durka, M. Weller, Dexamethasone-mediated protection from drug cytotoxicity: association with p21WAF1/CIP1 protein accumulation? *Oncogene* 17 (1998) 1567–1575, <https://doi.org/10.1038/sj.onc.1202071>.
- M. Mariotta, G. Perewusnyk, O.R. Koechli, J.B. Little, M. von Knebel Doeberitz, R. O. Mirmanoff, H.P. Rutz, Dexamethasone-induced enhancement of resistance to ionizing radiation and chemotherapeutic agents in human tumor cells, *Strahlenther. Onkol. Organ Dtsch. Röntgengesellschaft Al.* 175 (1999) 392–396, <https://doi.org/10.1007/s000660050027>.
- E.A. Kalb, P.G. Steinherz, A new multidrug reinduction protocol with topotecan, vinorelbine, thiopeta, dexamethasone, and gemcitabine for relapsed or refractory acute leukemia, *Leukemia* 17 (2003) 1967–1972, <https://doi.org/10.1038/sj.leu.2403097>.
- D.A. Tomalia, H. Baker, J. Dewald, M. Hall, G. Kallos, S. Martin, J. Roeck, J. Ryder, P. Smith, A new class of polymers: starburst-dendritic macromolecules, *Polym. J.* 17 (1985) 117–132, <https://doi.org/10.1295/polymj.17.117>.
- E. Abbasi, S.F. Aval, A. Akbarzadeh, M. Milani, H.T. Nasrabadi, S.W. Joo, Y. Hanifpour, K. Nejati-Koshki, R. Pashaei-Asl, Dendrimers: synthesis, applications, and properties, *Nanoscale Res. Lett.* 9 (2014) 247, <https://doi.org/10.1186/1556-276X-9-247>.
- F. Abedi-Gaballu, G. Dehghan, M. Ghaffari, R. Yekta, S. Abbaspour-Ravajani, B. Baradaran, J. Ezzati Nazhad Dolatabadi, M.R. Hamblin, PAMAM dendrimers as efficient drug and gene delivery nanosystems for cancer therapy, *Appl. Mater. Today* 12 (2018) 177–190, <https://doi.org/10.1016/j.apmt.2018.05.002>.
- H. Bhatt, B. Ghosh, S. Biswas, Cell-penetrating peptide and α -tocopherol-conjugated poly(amidoamine) dendrimers for improved delivery and anticancer activity of loaded paclitaxel, *ACS Appl. Bio Mater.* 3 (2020) 3157–3169, <https://doi.org/10.1021/acsbm.0c00179>.
- S.V.K. Rompicharla, P. Kumari, B. Ghosh, S. Biswas, Octa-arginine modified poly(amidoamine) dendrimers for improved delivery and cytotoxic effect of paclitaxel in cancer, *Artif. Cell Nanomed. Biotechnol.* 46 (2018) 847–859, <https://doi.org/10.1080/21691401.2018.1470527>.
- Y. Zhang, T.P. Thomas, K.H. Lee, M. Li, H. Zong, A.M. Desai, A. Kotlyar, B. Huang, M.M. Banaszak Holl, J.R. Baker, Polyvalent saccharide-functionalized generation 3 poly(amidoamine) dendrimer-methotrexate conjugate as a potential anticancer agent, *Bioorg. Med. Chem.* 19 (2011) 2557–2564, <https://doi.org/10.1016/j.bmc.2011.03.019>.
- I.J. Majoros, T.P. Thomas, C.B. Mehta, J.R. Baker, Poly(amidoamine) dendrimer-based multifunctional engineered nanodevice for cancer therapy, *J. Med. Chem.* 48 (2005) 5892–5899, <https://doi.org/10.1021/jm0401863>.
- H.M. Teow, Z. Zhou, M. Najlah, S.R. Yusof, N.J. Abbott, A. D'Emanuele, Delivery of paclitaxel across cellular barriers using a dendrimer-based nanocarrier, *Int. J. Pharm.* 441 (2013) 701–711, <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2012.10.024>.
- B. Yavuz, S. Bozdag Pehlivan, B. Sümer Bolu, R. Nomak Sanyal, I. Vural, N. Ünlü, Dexamethasone – PAMAM dendrimer conjugates for retinal delivery: preparation, characterization and *in vivo* evaluation, *J. Pharm. Pharmacol.* 68 (2016) 1010–1020, <https://doi.org/10.1111/jphp.12587>.
- J. Czarnik-Kwasniak, K. Kwasniak, K. Tutaj, I. Filiks, I. Uram, M. Stompor, S. Wolowicz, Glucoheptamidoamidated poly(amidoamine) PAMAM G3 dendrimer as a vehicle for succinate linked doxorubicin: enhanced toxicity of DOX against grade IV glioblastoma U-118 MG cells, *J. Drug Deliv. Sci. Technol.* 55 (2020), 101424, <https://doi.org/10.1016/j.jddst.2019.101424>.
- R.M. Pearson, H. Hsu, J. Bugno, S. Hong, Understanding nano-bio interactions to improve nanocarriers for drug delivery, *MRS Bull.* 39 (2014) 227–237, <https://doi.org/10.1557/mrs.2014.9>.
- L. Cheng, Q. Hu, L. Cheng, W. Hu, M. Xu, Y. Zhu, L. Zhang, D. Chen, Construction and evaluation of PAMAM-DOX conjugates with superior tumor recognition and intracellular acid-triggered drug release properties, *Colloids Surf. B Biointerfaces* 136 (2015) 37–45, <https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2015.04.003>.
- J. Huang, F. Gao, X. Tang, J. Yu, D. Wang, S. Liu, Y. Li, Liver-targeting doxorubicin-conjugated polymeric prodrug with pH-triggered drug release profile, *Polym. Int.* 59 (2010) 1390–1396, <https://doi.org/10.1002/pi.2880>.
- A. Maheri, P. Ghanbarpour, E. Rahimpour, W.E. Acree, A. Jouyban, A. F. Azarbayjani, M. Kouhkan, Solubilisation of dexamethasone: experimental data, co-solvency and Polarised Continuum Modelling, *Phys. Chem. Liq.* 59 (2021) 817–826, <https://doi.org/10.1080/00319104.2020.1836640>.
- H. Hao, J. Wang, Y. Wang, Solubility of dexamethasone sodium phosphate in different solvents, *J. Chem. Eng. Data* 49 (2004) 1697–1698, <https://doi.org/10.1021/jp049841z>.
- K. Yang, L. Weng, Y. Cheng, H. Zhang, J. Zhang, Q. Wu, T. Xu, Host–Guest chemistry of Dendrimer–Drug complexes. 6. Fully acetylated dendrimers as biocompatible drug vehicles using dexamethasone 21-phosphate as a model drug, *J. Phys. Chem. B* 115 (2011) 2185–2195, <https://doi.org/10.1021/jp111044k>.
- M. Florea, W.M. Nau, Implementation of anion-receptor macrocycles in supramolecular tandem assays for enzymes involving nucleotides as substrates, products, and cofactors, *Org. Biomol. Chem.* 8 (2010) 1033, <https://doi.org/10.1039/b925192h>.
- A. Szulc, M. Signorelli, A. Schiraldi, D. Appelhans, B. Voit, M. Bryszewska, B. Klajnert-Maculewicz, D. Fessas, Maltose modified poly(propylene imine) 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>.
- A. Czerniecka-Kubicka, P. Tutka, M. Pyda, M. Walczak, I. Uram, M. Misiołek, E. Chmiel, S. Wolowicz, Stepwise glucoheptamidoamidation of poly(amidoamine) dendrimer G3 to tune physicochemical properties of the potential drug carrier: *in vitro* tests for cytosine conjugates, *Pharmaceutics* 12 (2020) 473, <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics12050473>.
- I. Uram, M. Swister, A. Filipowicz, K. Gargasz, S. Wolowicz, E. Walajajs-Rode, Different patterns of nuclear and mitochondrial penetration by the G3 PAMAM dendrimer and its biotin-pyridoxal bioconjugate BG-PAMAM in normal and cancer cells *in vitro*, *Int. J. Nanomed.* (2015) 5647, <https://doi.org/10.2147/IJN.S87307>.
- M.A. Antoniak, R. Pązik, U. Bazylińska, K. Wiatrowski, A. Tomaszewska, M. Kulpa-Greszta, J. Adamczyk-Grochala, M. Wnuk, S. Mackowski, A. Lewińska, M. Nyk, Multimodal polymer encapsulated CdSe/Te₂O₄ nanoplatform with improved biocompatibility for two-photon and temperature stimulated bioapplications, *Mater. Sci. Eng. C* 127 (2021), 112224, <https://doi.org/10.1016/j.msec.2021.112224>.
- A. Lewińska, K. Wróbel, D. Bioniarz, J. Adamczyk-Grochala, S. Wolowicz, M. Wnuk, Lapatimib- and fulvestrant-PAMAM dendrimer conjugates promote apoptosis in chemotherapy-induced senescent breast cancer cells with different receptor status, *Biomater. Adv.* 140 (2022), 213047, <https://doi.org/10.1016/j.bioadv.2022.213047>.
- J. Singh, K. Jain, N.K. Mehra, N.K. Jain, Dendrimers in anticancer drug delivery: mechanism of interaction of drug and dendrimers, *Artif. Cell Nanomed. Biotechnol.* 44 (2016) 1626–1634, <https://doi.org/10.3109/21691401.2015.1129625>.
- J. Wang, B. Li, L. Qiu, X. Qiao, H. Yang, Dendrimer-based drug delivery systems: history, challenges, and latest developments, *J. Biol. Eng.* 16 (2022) 18, <https://doi.org/10.1186/s13036-022-00298-5>.
- B.S. Backer, C.J. Choy, A.L. Davis, Z.S. Browne, C.E. Berkman, Tunable pH-sensitive 2-carboxybenzyl phosphoramidate cleavable linkers, *Tetrahedron Lett.* 61 (2020), 151650, <https://doi.org/10.1016/j.tetlet.2020.151650>.
- F.P. Olatunji, J.W. Herman, B.N. Kesic, D. Olabode, C.E. Berkman, A click-ready pH-triggered phosphoramidate-based linker for controlled release of monomethyl auristatin E, *Tetrahedron Lett.* 61 (2020), 152398, <https://doi.org/10.1016/j.tetlet.2020.152398>.
- B.C.F. Chu, G.M. Wahl, L.E. Orgel, Derivatization of unprotected polynucleotides, *Nucleic Acids Res.* 11 (1983) 6513–6529, <https://doi.org/10.1093/nar/11.18.6513>.
- B.C.F. Chu, L.E. Orgel, Detection of specific DNA sequences with short biotin-labeled probes, *DNA* 4 (1985) 327–331, <https://doi.org/10.1089/dna.1985.4.327>.
- A. Midelfart, A. Dybdahl, N. Müller, B. Sitter, I.S. Gribbestad, J. Krane, Dexamethasone and dexamethasone phosphate detected by ¹H and ¹⁹F NMR spectroscopy in the aqueous humour, *Exp. Eye Res.* 66 (1998) 327–337, <https://doi.org/10.1006/exer.1997.0429>.

- [42] Z.-B. Shao, C. Deng, Y. Tan, M.-J. Chen, L. Chen, Y.-Z. Wang, An efficient mono-component polymeric intumescent flame retardant for polypropylene: preparation and application, *ACS Appl. Mater. Interfaces* 6 (2014) 7363–7370, <https://doi.org/10.1021/am500789g>.
- [43] L. Zhang, Y.-I. Jeong, S. Zheng, D.H. Kang, H. Suh, I. Kim, Crosslinked poly(ethylene glycol) hydrogels with degradable phosphamide linkers used as a drug carrier in cancer therapy, *Macromol. Biosci.* 14 (2014) 401–410, <https://doi.org/10.1002/mabi.201300327>.
- [44] L. Uram, M. Szuster, A. Filipowicz, M. Zaręba, E. Walajjys-Rode, S. Wolowicz, Cellular uptake of glucoheptoamidated poly(amidoamine) PAMAM G3 dendrimer with amide-conjugated biotin, a potential carrier of anticancer drugs, *Bioorg. Med. Chem.* 25 (2017) 706–713, <https://doi.org/10.1016/j.bmc.2016.11.047>.
- [45] 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/ma034276d>.
- [46] Y. Baran, C. Oztekin, E.Y. Bassy, Combination of fludarabine and imatinib induces apoptosis synergistically through loss of mitochondrial membrane potential and increases in caspase-3 enzyme activity in human K562 chronic myeloid leukemia cells, *Cancer Invest.* 28 (2010) 623–628, <https://doi.org/10.3109/07357901003631056>.
- [47] K. Takagi, Y. Kawai, T. Yamauchi, H. Iwasaki, T. Ueda, Synergistic effects of combination with fludarabine and carboplatin depend on fludarabine-mediated inhibition of enhanced nucleotide excision repair in leukemia, *Int. J. Hematol.* 94 (2011) 378–389, <https://doi.org/10.1007/s12185-011-0930-8>.
- [48] M. Copland, D. Slade, G. McIlroy, G. Horne, J.L. Byrne, K. Rothwell, K. Brock, H. De Lavallade, C. Craddock, R.E. Clark, M.L. Smith, R. Fletcher, R. Bishop, D. Milojkovic, C. Yap, Ponatinib with fludarabine, cytarabine, idarubicin, and granulocyte colony-stimulating factor chemotherapy for patients with blast-phase chronic myeloid leukaemia (MATCHPOINT): a single-arm, multicentre, phase 1/2 trial, *Lancet Haematol* 9 (2022) e121–e132, [https://doi.org/10.1016/S2352-3026\(21\)00379-7](https://doi.org/10.1016/S2352-3026(21)00379-7).
- [49] D. Wyczzechowska, K. Fabianowska-Majewska, The effects of cladribine and fludarabine on DNA methylation in K562 cells, *Biochem. Pharmacol.* 65 (2003) 219–225, [https://doi.org/10.1016/S0006-2952\(02\)01486-7](https://doi.org/10.1016/S0006-2952(02)01486-7).
- [50] D. Wyczzechowska, M. Czyn, K. Fabianowska-Majewska, Evidence of inhibition of DNA methylation by fludarabine, in: E. Zoref-Shani, O. Sperling (Eds.), *Purine Pyrimidine Metab.* Man X, Kluwer Academic Publishers, Boston, 2002, pp. 349–353, https://doi.org/10.1007/0-306-46843-3_67.
- [51] S. Kanno, Susceptibility to cytosine arabinoside (Ara-C)-induced cytotoxicity in human leukemia cell lines, *Toxicol. Lett.* (2004), <https://doi.org/10.1016/j.toxlet.2004.04.014>.
- [52] S. Kanno, T. Hiura, T. Ohtake, K. Koiwai, H. Suzuki, M. Ujibe, M. Ishikawa, Characterization of resistance to cytosine arabinoside (Ara-C) in NALM-6 human B leukemia cells, *Clin. Chim. Acta* 377 (2007) 144–149, <https://doi.org/10.1016/j.cca.2006.09.014>.
- [53] B. Löwenberg, T. Pabst, E. Vellenga, W. van Putten, H.C. Schouten, C. Graux, A. Ferrant, P. Sonneveld, B.J. Biemond, A. Gratwohl, G.E. de Greef, L.F. Verdonck, M.R. Schaafsma, M. Gregor, M. Theobald, U. Schanz, J. Maertens, G. J. Ossenkoppele, Cytarabine dose for acute myeloid leukemia, *N. Engl. J. Med.* 364 (2011) 1027–1036, <https://doi.org/10.1056/NEJMoa1010222>.
- [54] A. Szulc, L. Pulaski, D. Appelhans, B. Voit, B. Klajnert-Maculewicz, Sugar-modified poly(propylene imine) dendrimers as drug delivery agents for cytarabine to overcome drug resistance, *Int. J. Pharm.* 513 (2016) 572–583, <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2016.09.063>.
- [55] M. Gorzkiewicz, I. Jatzczak-Pawlik, M. Studzian, L. Pulaski, D. Appelhans, B. Voit, B. Klajnert-Maculewicz, Glycodendrimer nanocarriers for direct delivery of fludarabine triphosphate to leukemic cells: improved pharmacokinetics and pharmacodynamics of fludarabine, *Biomacromolecules* 19 (2018) 531–543, <https://doi.org/10.1021/acs.biomac.7b01650>.
- [56] U.H. Sk, S.P. Kambhampati, M.K. Mishra, W.G. Lesniak, F. Zhang, R.M. Kannan, Enhancing the efficacy of ara-C through conjugation with PAMAM dendrimer and linear PEG: a comparative study, *Biomacromolecules* 14 (2013) 801–810, <https://doi.org/10.1021/bm3018615>.
- [57] N. Noronha, G. Ehx, M. Meunier, J. Laverdure, C. Thériault, C. Perreault, Major multilevel molecular divergence between THP-1 cells from different biorepositories, *Int. J. Cancer* 147 (2020) 2000–2006, <https://doi.org/10.1002/ijc.32967>.
- [58] S. Bertoli, M. Picard, E. Bérard, E. Griessinger, C. Larrue, P.L. Mouchel, F. Vergez, S. Tavittian, E. Yon, J. Ruiz, E. Delabesse, I. Luquet, L.K. Linares, E. Saland, M. Carroll, G. Danet-Desnoyers, A. Sarry, F. Hugué, J.E. Sarry, C. Récher, Dexamethasone in hyperleukocytic acute myeloid leukemia, *Haematologica* 103 (2018) 988–998, <https://doi.org/10.3324/haematol.2017.184267>.
- [59] H. Miyoshi, M. Ohki, T. Nakagawa, Y. Honma, Glucocorticoids induce apoptosis in acute myeloid leukemia cell lines with a t(8;21) chromosome translocation, *Leuk. Res.* 21 (1997) 45–50, [https://doi.org/10.1016/S0145-2126\(96\)00089-6](https://doi.org/10.1016/S0145-2126(96)00089-6).
- [60] H. Sun, X. Liu, L. Wang, B. Cui, W. Mu, Y. Xia, S. Liu, X. Liu, Y. Jiao, Y. Zhao, Dexamethasone sensitizes acute monocytic leukemia cells to ara-C by upregulating FKBP51, *Front. Oncol.* 12 (2022), 888695, <https://doi.org/10.3389/fonc.2022.888695>.
- [61] E. Pikarsky, R.M. Porat, I. Stein, R. Abramovitch, S. Amit, S. Kasem, E. Galkovitch-Pyest, S. Urieli-Shoval, E. Galun, Y. Ben-Neriah, NF- κ B functions as a tumour promoter in inflammation-associated cancer, *Nature* 431 (2004) 461–466, <https://doi.org/10.1038/nature02924>.
- [62] K. Taniguchi, M. Karin, NF- κ B, inflammation, immunity and cancer: coming of age, *Nat. Rev. Immunol.* 18 (2018) 309–324, <https://doi.org/10.1038/nri.2017.142>.
- [63] U. Soiberman, S.P. Kambhampati, T. Wu, M.K. Mishra, Y. Oh, R. Sharma, J. Wang, A.E. Al Towerki, S. Yiu, W.J. Stark, R.M. Kannan, Subconjunctival injectable dendrimer-dexamethasone gel for the treatment of corneal inflammation, *Biomaterials* 125 (2017) 38–53, <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2017.02.016>.
- [64] B. Klajnert, S. Pikala, M. Bryszewska, Haemolytic activity of polyamidoamine dendrimers and the protective role of human serum albumin, *Proc. R. Soc. Math. Phys. Eng. Sci.* 466 (2010) 1527–1534, <https://doi.org/10.1098/rspa.2009.0050>.

Oświadczenia współautorów publikacji na podstawie której oparta jest rozprawa doktorska

Załącznik nr 4. Oświadczenie o merytorycznym wkładzie współautora.

Magdalena Twardowska
(Imię i nazwisko autora)

Rzeszów 04.06.2025
(miejsowość i data)

OŚWIADCZENIE

o merytorycznym wkładzie współautora

Oświadczam, że w pracy *Uram Ł, Wróbel K, Walczak M, Szymaszek Ż, Twardowska M, Wołowicz S, Uram Ł Exploring the Potential of Lapatinib, Fulvestrant, and Paclitaxel Conjugated with Glycidylated PAMAM G4 Dendrimers for Cancer and Parasite Treatment. Molecules. 2023, 28(17), 6334.* (autorzy, rok wydania, tytuł, czasopismo lub wydawca, tom, strony) mój udział polegał na Testy biologiczne: hodowle komórek *Caenorhabditis elegans* (opisać szczegółowo swój własny - a nie doktoranta/habilitanta udział w powstaniu pracy, np. wykonaniu doświadczeń określoną techniką, analizie statystycznej wyników eksperymentów, przygotowaniu tekstu manuskryptu zamieszczonego w rozdziale, kierowaniu projektem naukowym obejmującym badania opisane w tej pracy, itp.)

Magdalena Twardowska
(po podpis osoby składającej oświadczenie)

Załącznik nr 4. Oświadczenie o merytorycznym wkładzie współautora.

Małgorzata Walczak
(Imię i nazwisko autora)

(miejsce i data)

OŚWIADCZENIE
o merytorycznym wkładzie współautora

Oświadczam, że w pracy *Wróbel, K.; Deregowska, A.; Betlej, G.; Walczak, M.; Wnuk, M.; Lewińska, A.; Wołowicz, S. Cytarabine and dexamethasone-PAMAM dendrimer di-conjugate sensitizes human acute myeloid leukemia cells to apoptotic cell death, Journal of Drug Delivery Science and Technology, Volume 81, 2023,104242* (autorzy, rok wydania, tytuł, czasopismo lub wydawca, tom, strony) mój udział polegał na Badania koniugatów techniką Dynamic Light Scattering (opisać szczegółowo swój własny - a nie doktoranta/habilitanta udział w powstaniu pracy, np. wykonaniu doświadczeń określoną techniką, analizie statystycznej wyników eksperymentów, przygotowaniu tekstu manuskryptu zamieszczonego w rozdziale, kierowaniu projektem naukowym obejmującym badania opisane w tej pracy, itp.)

Małgorzata Walczak

(podpis osoby składającej oświadczenie)

Załącznik nr 4. Oświadczenie o merytorycznym wkładzie współautora.

Lukasz Uram
(Imię i nazwisko autora)

Rzeszów, 04.06.2025
(miejsowość i data)

OŚWIADCZENIE

o merytorycznym wkładzie współautora

Oświadczam, że w pracy *Uram Ł, Wróbel K, Walczak M, Szymaszek Ż, Twardowska M, Wołowicz S, Uram Ł. Exploring the Potential of Lapatinib, Fulvestrant, and Paclitaxel Conjugated with Glycidylated PAMAM G4 Dendrimers for Cancer and Parasite Treatment. Molecules. 2023, 28(17), 6334. (autorzy, rok wydania, tytuł, czasopismo lub wydawca, tom, strony)* mój udział polegał na koncepcja badawcza, testy biologiczne, przygotowanie tekstu publikacji, metodologia, korespondencja z recenzentami. (opisać szczegółowo swój własny - a nie doktoranta/habilitanta udział w powstaniu pracy, np. wykonaniu doświadczeń określoną techniką, analizie statystycznej wyników eksperymentów, przygotowaniu tekstu manuskryptu zamieszczonego w rozdziale, kierowaniu projektem naukowym obejmującym badania opisane w tej pracy, itp.)


.....
(podpis osoby składającej oświadczenie)

Załącznik nr 4. Oświadczenie o merytorycznym wkładzie współautora.

Łukasz Uram
(Imię i nazwisko autora)

Przeńcis 04.06.2025
(miejscowość i data)

OŚWIADCZENIE
o merytorycznym wkładzie współautora

Oświadczam, że w pracy *Malinga-Drozd, M.; Uram, Ł.; Wróbel, K.; Wołowicz, S. Chiral Recognition of Homochiral Poly (amidoamine) Dendrimers Substituted with R- and S-Glycidol by Keratinocyte (HaCaT) and Squamous Carcinoma (SCC-15) Cells In Vitro. Polymers 2021, 13, 1049.* (autorzy, rok wydania, tytuł, czasopismo lub wydawca, tom, strony) mój udział polegał na Metodologia, testy biologiczne, przygotowanie tekstu publikacji, korespondencja z recenzentami (opisać szczegółowo swój własny - a nie doktoranta/habilitanta udział w powstaniu pracy, np. wykonaniu doświadczeń określoną techniką, analizie statystycznej wyników eksperymentów, przygotowaniu tekstu manuskryptu zamieszczonego w rozdziale, kierowaniu projektem naukowym obejmującym badania opisane w tej pracy, itp.)

Łukasz Uram
.....
(podpis osoby składającej oświadczenie)

Załącznik nr 4. Oświadczenie o merytorycznym wkładzie współautora.

Łukasz Uram
(Imię i nazwisko autora)

Przewo, 04.08.2023
(miejscowość i data)

OŚWIADCZENIE
o merytorycznym wkładzie współautora

Oświadczam, że w pracy *Wróbel K, Wołowicz S, Markowicz J, Wałajtyś-Rode E, Uram Ł. Synthesis of Biotinylated PAMAM G3 Dendrimers Substituted with R-Glycidol and Celecoxib/Simvastatin as Repurposed Drugs and Evaluation of Their Increased Additive Cytotoxicity for Cancer Cell Lines. Cancers. 2022, 14(3), 714. (autorzy, rok wydania, tytuł, czasopismo lub wydawca, tom, strony)* mój udział polegał na koncepcja badawcza, testy biologiczne, przygotowanie tekstu publikacji, korespondencja z recenzentami, metodologia (opisać szczegółowo swój własny - a nie doktoranta/habilitanta udział w powstaniu pracy, np. wykonaniu doświadczeń określoną techniką, analizie statystycznej wyników eksperymentów, przygotowaniu tekstu manuskryptu zamieszczonego w rozdziale, kierowaniu projektem naukowym obejmującym badania opisane w tej pracy, itp.)

Łukasz Uram
(podpis osoby składającej oświadczenie)

Załącznik nr 4. Oświadczenie o merytorycznym wkładzie współautora.

Żaneta Szymaszek
(Imię i nazwisko autora)

Rezerwa, 04.06.2025
(miejsowość i data)

OŚWIADCZENIE
o merytorycznym wkładzie współautora

Oświadczam, że w pracy *Uram Ł, Wróbel K, Walczak M, Szymaszek Ż, Twardowska M, Wołowicz S, Uram Ł Exploring the Potential of Lapatinib, Fulvestrant, and Paclitaxel Conjugated with Glycidylated PAMAM G4 Dendrimers for Cancer and Parasite Treatment. Molecules. 2023, 28(17), 6334.* (autorzy, rok wydania, tytuł, czasopismo lub wydawca, tom, strony) mój udział polegał na Testy biologiczne: hodowle komórek i *Caenorhabditis elegans* (opisać szczegółowo swój własny - a nie doktoranta/habilitanta udział w powstaniu pracy, np. wykonaniu doświadczeń określoną techniką, analizie statystycznej wyników eksperymentów, przygotowaniu tekstu manuskryptu zamieszczonego w rozdziale, kierowaniu projektem naukowym obejmującym badania opisane w tej pracy, itp.)

Żaneta Szymaszek

.....
(podpis osoby składającej oświadczenie)

Załącznik nr 4. Oświadczenie o merytorycznym wkładzie współautora.

Dominika Błoniarz
(Imię i nazwisko autora)

Warszawa, 18.06.2025
(miejsowość i data)

OŚWIADCZENIE
o merytorycznym wkładzie współautora

Oświadczam, że w pracy *Lewińska A, Wróbel K, Błoniarz D, Adamczyk-Grochala J, Wołowicz S, Wnuk M. Lapatinib- and fulvestrant-PAMAM dendrimer conjugates promote apoptosis in chemotherapy-induced senescent breast cancer cells with different receptor status. Biomater. Adv. 2022, 140, 213047.* (autorzy, rok wydania, tytuł, czasopismo lub wydawca, tom, strony) mój udział polegał na:
Wykonaniu testów biologicznych, analizie wyników.

(opisać szczegółowo swój własny - a nie doktoranta/habilitanta udział w powstaniu pracy, np. wykonaniu doświadczeń określonej techniką, analizie statystycznej wyników eksperymentów, przygotowaniu tekstu manuskryptu zamieszczonego w rozdziale, kierowaniu projektem naukowym obejmującym badania opisane w tej pracy, itp.)

Dominika Błoniarz
(podpis osoby składającej oświadczenie)

Załącznik nr 4. Oświadczenie o merytorycznym wkładzie współautora.

Joanna Drozdowska (Markowicz)
(Imię i nazwisko autora)

Kraków, 23.06.2025
(miejsowość i data)

OŚWIADCZENIE
o merytorycznym wkładzie współautora

Oświadczam, że w pracy *Wróbel K, Wołowicz S, Markowicz J, Wałajtys-Rode E, Uram Ł. Synthesis of Biotinylated PAMAM G3 Dendrimers Substituted with R-Glycidol and Celecoxib/Simvastatin as Repurposed Drugs and Evaluation of Their Increased Additive Cytotoxicity for Cancer Cell Lines. Cancers. 2022, 14(3), 714.* mój udział polegał na przeprowadzeniu eksperymentów biologicznych z wykorzystaniem hodowli ludzkich komórek oraz nicienia *Caenorhabditis elegans*, a także na analizie wyników tychże eksperymentów.

Joanna Drozdowska (Markowicz)
(podpis osoby składającej oświadczenie)

Załącznik nr 4. Oświadczenie o merytorycznym wkładzie współautora.

Gabriela Betlej
(Imię i nazwisko autora)

Warszawa, 18.06.2025
(miejsowość i data)

OŚWIADCZENIE
o merytorycznym wkładzie współautora

Oświadczam, że w pracy Wróbel, K.; Deręgowska, A.; Betlej, G.; Walczak, M.; Wnuk, M.; Lewińska, A.; Wołowicz, S. Cytarabine and dexamethasone-PAMAM dendrimer di-conjugate sensitizes human acute myeloid leukemia cells to apoptotic cell death, *Journal of Drug Delivery Science and Technology*, Volume 81, 2023,104242 (autorzy, rok wydania, tytuł, czasopismo lub wydawca,

tom, strony) mój udział polegał na:

Wykonaniu testów biologicznych, analizie wyników

(opisać szczegółowo swój własny - a nie

doktoranta/habilitanta udział w powstaniu pracy, np. wykonaniu doświadczeń określonej techniką, analizie statystycznej wyników eksperymentów, przygotowaniu tekstu manuskryptu zamieszczonego w rozdziale, kierowaniu projektem naukowym obejmującym badania opisane w tej pracy, itp.)

Gabriela Betlej.....
(podpis osoby składającej oświadczenie)

Załącznik nr 4. Oświadczenie o merytorycznym wkładzie współautora.

Maciej Wnuk
(Imię i nazwisko autora)

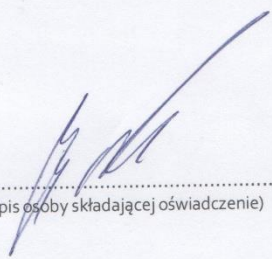
Preszów 17.06.2025
(miejsowość i data)

OŚWIADCZENIE
o merytorycznym wkładzie współautora

Oświadczam, że w pracy Wróbel, K.; Deręgowska, A.; Betlej, G.; Walczak, M.; Wnuk, M.; Lewińska, A.; Wołowicz, S. Cytarabine and dexamethasone-PAMAM dendrimer di-conjugate sensitizes human acute myeloid leukemia cells to apoptotic cell death, *Journal of Drug Delivery Science and Technology*, Volume 81, 2023,104242 (autorzy, rok wydania, tytuł, czasopismo lub wydawca, tom, strony) mój udział polegał na:

Opracowaniu koncepcji badawczej, opracowaniu metodologii (część biologiczna), wykonaniu testów biologicznych, redakcji tekstu publikacji, korespondencji z recenzentami

(opisać szczegółowo swój własny - a nie doktoranta/habilitanta udział w powstaniu pracy, np. wykonaniu doświadczeń określoną techniką, analizie statystycznej wyników eksperymentów, przygotowaniu tekstu manuskryptu zamieszczonego w rozdziale, kierowaniu projektem naukowym obejmującym badania opisane w tej pracy, itp.)


.....
(podpis osoby składającej oświadczenie)

Załącznik nr 4. Oświadczenie o merytorycznym wkładzie współautora.

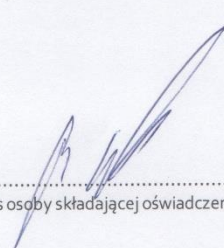
Maciej Wnuk
(Imię i nazwisko autora)

Berlin 17.06.2025
(miejsowość i data)

OŚWIADCZENIE
o merytorycznym wkładzie współautora

Oświadczam, że w pracy *Lewińska A, Wróbel K, Błoniarczyk D, Adamczyk-Grochala J, Wołowicz S, Wnuk M. Lapatinib- and fulvestrant-PAMAM dendrimer conjugates promote apoptosis in chemotherapy-induced senescent breast cancer cells with different receptor status. Biomater. Adv. 2022, 140, 213047.* (autorzy, rok wydania, tytuł, czasopismo lub wydawca, tom, strony) mój udział polegał na:

Opracowaniu koncepcji badawczej, wykonaniu testów biologicznych, redakcji tekstu publikacji, korespondencji z recenzentami, opracowaniu metodologii (część biologiczna) (opisać szczegółowo swój własny - a nie doktoranta/habilitanta udział w powstaniu pracy, np. wykonaniu doświadczeń określoną techniką, analizie statystycznej wyników eksperymentów, przygotowaniu tekstu manuskryptu zamieszczonego w rozdziale, kierowaniu projektem naukowym obejmującym badania opisane w tej pracy, itp.)


.....
(podpis osoby składającej oświadczenie)

Załącznik nr 4. Oświadczenie o merytorycznym wkładzie współautora.

Jagoda Adamczyk-Grochala
(Imię i nazwisko autora)

Przeszło 17/08/2025
(miejsowość i data)

OŚWIADCZENIE
o merytorycznym wkładzie współautora

Oświadczam, że w pracy *Lewińska A, Wróbel K, Błoniarczyk D, Adamczyk-Grochala J, Wołowicz S, Wnuk M. Lapatinib- and fulvestrant-PAMAM dendrimer conjugates promote apoptosis in chemotherapy-induced senescent breast cancer cells with different receptor status. Biomater. Adv. 2022, 140, 213047.* (autorzy, rok wydania, tytuł, czasopismo lub wydawca, tom, strony) mój udział polegał na:

Wykonaniu testów biologicznych, analizie wyników.

(opisać szczegółowo swój własny - a nie

doktoranta/habilitanta udział w powstaniu pracy, np. wykonaniu doświadczeń określonej techniki, analizie statystycznej wyników eksperymentów, przygotowaniu tekstu manuskryptu zamieszczonego w rozdziale, kierowaniu projektem naukowym obejmującym badania opisane w tej pracy, itp.)

Jagoda Adamczyk-Grochala
(podpis osoby składającej oświadczenie)

Załącznik nr 4. Oświadczenie o merytorycznym wkładzie współautora.

Anna Deręgowska
(Imię i nazwisko autora)

Rzeszów, 17/6/2025
(miejscowość i data)

OŚWIADCZENIE

o merytorycznym wkładzie współautora

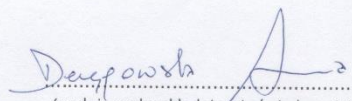
Oświadczam, że w pracy Wróbel, K.; Deręgowska, A.; Betlej, G.; Walczak, M.; Wnuk, M.; Lewińska, A.; Wołowicz, S. Cytarabine and dexamethasone-PAMAM dendrimer di-conjugate sensitizes human acute myeloid leukemia cells to apoptotic cell death, *Journal of Drug Delivery Science and Technology*, Volume 81, 2023,104242 (autorzy, rok wydania, tytuł, czasopismo lub wydawca,

tom, strony) mój udział polegał na:

Wykonaniu testów biologicznych, analizie wyników, redakcji tekstu publikacji (część biologiczna)

(opisać szczegółowo swój własny - a nie

doktoranta/habilitanta udział w powstaniu pracy, np. wykonaniu doświadczeń określonej techniką, analizie statystycznej wyników eksperymentów, przygotowaniu tekstu manuskryptu zamieszczonego w rozdziale, kierowaniu projektem naukowym obejmującym badania opisane w tej pracy, itp.)


(podpis osoby składającej oświadczenie)

Załącznik nr 4. Oświadczenie o merytorycznym wkładzie współautora.

Anna Lewińska
(Imię i nazwisko autora)

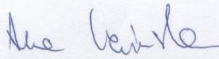
Warsz., 17/06/2015
(miejsowość i data)

OŚWIADCZENIE
o merytorycznym wkładzie współautora

Oświadczam, że w pracy Wróbel, K.; Deregowska, A.; Betlej, G.; Walczak, M.; Wnuk, M.; Lewińska, A.; Wołowicz, S. Cytarabine and dexamethasone-PAMAM dendrimer di-conjugate sensitizes human acute myeloid leukemia cells to apoptotic cell death, *Journal of Drug Delivery Science and Technology*, Volume 81, 2023,104242 (autorzy, rok wydania, tytuł, czasopismo lub wydawca, tom, strony) mój udział polegał na:

Wykonaniu testów biologicznych, przygotowaniu tekstu publikacji (część biologiczna), korespondencji z recenzentami

(opisać szczegółowo swój własny - a nie doktoranta/habilitanta udział w powstaniu pracy, np. wykonaniu doświadczeń określonej techniką, analizie statystycznej wyników eksperymentów, przygotowaniu tekstu manuskryptu zamieszczonego w rozdziale, kierowaniu projektem naukowym obejmującym badania opisane w tej pracy, itp.)


.....
(podpis osoby składającej oświadczenie)

Załącznik nr 4. Oświadczenie o merytorycznym wkładzie współautora.

Anna Lewińska
(Imię i nazwisko autora)

Bezd. 17/06/2025
(miejsowość i data)

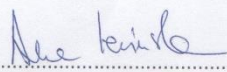
OŚWIADCZENIE
o merytorycznym wkładzie współautora

Oświadczam, że w pracy *Lewińska A, Wróbel K, Błoniarz D, Adamczyk-Grochala J, Wołowicz S, Wnuk M. Lapanib- and fulvestrant-PAMAM dendrimer conjugates promote apoptosis in chemotherapy-induced senescent breast cancer cells with different receptor status. Biomater. Adv. 2022, 140, 213047.* (autorzy, rok wydania, tytuł, czasopismo lub wydawca, tom, strony) mój udział polegał na:

Wykonaniu testów biologicznych, przygotowaniu tekstu publikacji (część biologiczna), korespondencji z recenzentami.

(opisać szczegółowo swój własny - a nie

doktoranta/habilitanta udział w powstaniu pracy, np. wykonaniu doświadczeń określonej techniką, analizie statystycznej wyników eksperymentów, przygotowaniu tekstu manuskryptu zamieszczonego w rozdziale, kierowaniu projektem naukowym obejmującym badania opisane w tej pracy, itp.)


.....
(podpis osoby składającej oświadczenie)

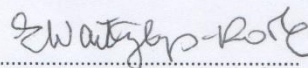
Załącznik nr 4. Oświadczenie o merytorycznym wkładzie współautora.

Elżbieta Wąłajtys - Rode
(Imię i nazwisko autora)

Rzeszów 22.06.2025
(miejscowość i data)

OŚWIADCZENIE
o merytorycznym wkładzie współautora

Oświadczam, że w pracy *Wróbel K, Wołowicz S, Markowicz J, Wąłajtys-Rode E, Uram Ł. Synthesis of Biotinylated PAMAM G3 Dendrimers Substituted with R-Glycidol and Celecoxib/Simvastatin as Repurposed Drugs and Evaluation of Their Increased Additive Cytotoxicity for Cancer Cell Lines. Cancers. 2022, 14(3), 714. (autorzy, rok wydania, tytuł, czasopismo lub wydawca, tom, strony)* mój udział polegał na: Koncepcji badawczej, przygotowaniu tekstu publikacji oraz metodologii (opisać szczegółowo swój własny - a nie doktoranta/habilitanta udział w powstaniu pracy, np. wykonaniu doświadczeń określonej techniki, analizie statystycznej wyników eksperymentów, przygotowaniu tekstu manuskryptu zamieszczonego w rozdziale, kierowaniu projektem naukowym obejmującym badania opisane w tej pracy, itp.)



(podpis osoby składającej oświadczenie)

Załącznik nr 4. Oświadczenie o merytorycznym wkładzie współautora.

Małgorzata Malinga-Drozd
(Imię i nazwisko autora)

Rzeszów 25.06.2025
(miejsowość i data)

OŚWIADCZENIE
o merytorycznym wkładzie współautora

Oświadczam, że w pracy Malinga-Drozd, M.; Uram, Ł.; Wróbel, K.; Wołowicz, S. *Chiral Recognition of Homochiral Poly (amidoamine) Dendrimers Substituted with R- and S- Glycidol by Keratinocyte (HaCaT) and Squamous Carcinoma (SCC-15) Cells In Vitro. Polymers* 2021, 13, 2049. (autorzy, rok wydania, tytuł, czasopismo lub wydawca, tom, strony) mój udział polegał na: Syntezy chemiczne, oczyszczanie produktów, spektroskopia NMR, przygotowanie tekstu publikacji (opisać szczegółowo swój własny - a nie doktoranta/habilitanta udział w powstaniu pracy, np. wykonaniu doświadczeń określoną techniką, analizie statystycznej wyników eksperymentów, przygotowaniu tekstu manuskryptu zamieszczonego w rozdziale, kierowaniu projektem naukowym obejmującym badania opisane w tej pracy, itp.)

Malinga - Drozd
(podpis osoby składającej oświadczenie)

Załącznik nr 4. Oświadczenie o merytorycznym wkładzie współautora.

Stanisław Wołowiec
(Imię i nazwisko autora)

Olesnica, 4.06.2025
(miejscowość i data)

OŚWIADCZENIE
o merytorycznym wkładzie współautora

Oświadczam, że w pracy *Wróbel K, Wołowiec S, Markowicz J, Walajtys-Rode E, Uram Ł. Synthesis of Biotinylated PAMAM G3 Dendrimers Substituted with R-Glycidol and Celecoxib/Simvastatin as Repurposed Drugs and Evaluation of Their Increased Additive Cytotoxicity for Cancer Cell Lines. Cancers. 2022, 14(3), 714.J.* (autorzy, rok wydania, tytuł, czasopismo lub wydawca, tom, strony) mój udział polegał na koncepcja badawcza, strategia syntezy koniugatów, przygotowanie tekstu publikacji, metodologia (opisać szczegółowo swój własny - a nie doktoranta/habilitanta udział w powstaniu pracy, np. wykonaniu doświadczeń określoną techniką, analizie statystycznej wyników eksperymentów, przygotowaniu tekstu manuskryptu zamieszczonego w rozdziale, kierowaniu projektem naukowym obejmującym badania opisane w tej pracy, itp.)

Stanisław Wołowiec
.....
(podpis osoby składającej oświadczenie)

Załącznik nr 4. Oświadczenie o merytorycznym wkładzie współautora.

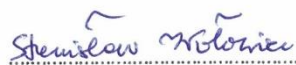
Stanisław Wołowiec
(Imię i nazwisko autora)

Oleśnica, 4.06.2025
(miejscowość i data)

OŚWIADCZENIE

o merytorycznym wkładzie współautora

Oświadczam, że w pracy Malinga-Drozd, M.; Uram, Ł.; Wróbel, K.; Wołowiec, S. *Chiral Recognition of Homochiral Poly (amidoamine) Dendrimers Substituted with R- and S-Glycidol by Keratinocyte (HaCaT) and Squamous Carcinoma (SCC-15) Cells In Vitro*. *Polymers* 2021, 13, 1049. (autorzy, rok wydania, tytuł, czasopismo lub wydawca, tom, strony) mój udział polegał na *Koncepcja badawcza, metodologia, syntezy chemiczne, spektroskopia NMR, przygotowanie tekstu publikacji, korespondencja z recenzentami* (opisać szczegółowo swój własny - a nie doktoranta/habilitanta udział w powstaniu pracy, np. wykonaniu doświadczeń określoną techniką, analizie statystycznej wyników eksperymentów, przygotowaniu tekstu manuskryptu zamieszczonego w rozdziale, kierowaniu projektem naukowym obejmującym badania opisane w tej pracy, itp.)



(podpis osoby składającej oświadczenie)

Załącznik nr 4. Oświadczenie o merytorycznym wkładzie współautora.

Stanisław Wołowiec
(Imię i nazwisko autora)

Oleśnica, 4.06.2025
(miejscowość i data)

OŚWIADCZENIE

o merytorycznym wkładzie współautora

Oświadczam, że w pracy *Wróbel, K.; Deregowska, A.; Betlej, G.; Walczak, M.; Wnuk, M.; Lewińska, A.; Wołowiec, S. Cytarabine and dexamethasone-PAMAM dendrimer di-conjugate sensitizes human acute myeloid leukemia cells to apoptotic cell death, Journal of Drug Delivery Science and Technology, Volume 81, 2023,104242* (autorzy, rok wydania, tytuł, czasopismo lub wydawca, tom, strony) mój udział polegał na koncepcja badawcza, metodologia, strategia syntezy chemicznych, Przygotowanie tekstu publikacji, korespondencja z recenzentami (opisać szczegółowo swój własny - a nie doktoranta/habilitanta udział w powstaniu pracy, np. wykonaniu doświadczeń określoną techniką, analizie statystycznej wyników eksperymentów, przygotowaniu tekstu manuskryptu zamieszczonego w rozdziale, kierowaniu projektem naukowym obejmującym badania opisane w tej pracy, itp.)



(podpis osoby składającej oświadczenie)

Załącznik nr 4. Oświadczenie o merytorycznym wkładzie współautora.

Stanisław Wołowicz
(imię i nazwisko autora)

Oleśnica, 4.06.2025
(miejsowość i data)

OŚWIADCZENIE
o merytorycznym wkładzie współautora

Oświadczam, że w pracy *Lewińska A, Wróbel K, Błoniarz D, Adamczyk-Grochala J, Wołowicz S, Wnuk M. Lapatinib- and fulvestrant-PAMAM dendrimer conjugates promote apoptosis in chemotherapy-induced senescent breast cancer cells with different receptor status. Biomater. Adv. 2022, 140, 213047.* (autorzy, rok wydania, tytuł, czasopismo lub wydawca, tom, strony) mój udział polegał na koncepcja badawcza, przygotowanie tekstu publikacji (część chemiczna), metodologia (opisać szczegółowo swój własny - a nie doktoranta/habilitanta udział w powstaniu pracy, np. wykonaniu doświadczeń określoną techniką, analizie statystycznej wyników eksperymentów, przygotowaniu tekstu manuskryptu zamieszczonego w rozdziale, kierowaniu projektem naukowym obejmującym badania opisane w tej pracy, itp.)


.....
(podpis osoby składającej oświadczenie)


Załącznik nr 4. Oświadczenie o merytorycznym wkładzie współautora.

Stanisław Wołowiec
(Imię i nazwisko autora)

Oleśnica, 4.06.2025
(miejsowość i data)

OŚWIADCZENIE
o merytorycznym wkładzie współautora

Oświadczam, że w pracy *Uram E, Wróbel K, Walczak M, Szymaszek Ż, Twardowska M, Wołowiec S, Uram E Exploring the Potential of Lapatinib, Fulvestrant, and Paclitaxel Conjugated with Glycidylated PAMAM G4 Dendrimers for Cancer and Parasite Treatment. Molecules. 2023, 28(17), 6334.* (autorzy, rok wydania, tytuł, czasopismo lub wydawca, tom, strony) mój udział polegał na Strategia syntezy koniugatów, przygotowanie tekstu publikacji, korespondencja z recenzentami (opisać szczegółowo swój własny - a nie doktoranta/habilitanta udział w powstaniu pracy, np. wykonaniu doświadczeń określoną techniką, analizie statystycznej wyników eksperymentów, przygotowaniu tekstu manuskryptu zamieszczonego w rozdziale, kierowaniu projektem naukowym obejmującym badania opisane w tej pracy, itp.)


(podpis osoby składającej oświadczenie)