

UNIVERZITA PARDUBICE  
FAKULTA CHEMICKO-TECHNOLOGICKÁ  
ÚSTAV ORGANICKÉ CHEMIE A TECHNOLOGIE

Studium interakce mezi  $\alpha$ -cyklodextrinem a konjugátem  
prednisolon – poly(ethylenglykol)

**DIPLOMOVÁ PRÁCE**

AUTOR PRÁCE: Bc. Jan Konečný

VEDOUCÍ PRÁCE: doc. Ing. Pavel Drabina, Ph.D.

2017

UNIVERSITY OF PARDUBICE

FACULTY OF CHEMICAL TECHNOLOGY

INSTITUTE OF ORGANIC CHEMISTRY AND TECHNOLOGY

Study of interaction between  $\alpha$ -cyclodextrin and prednisolone –  
poly(ethylene glycol) conjugate

**THESIS**

AUTHOR: Bc. Jan Konečný

SUPERVISOR: doc. Ing. Pavel Drabina, Ph.D.

2017

Univerzita Pardubice  
Fakulta chemicko-technologická  
Akademický rok: 2016/2017

## ZADÁNÍ DIPLOMOVÉ PRÁCE

(PROJEKTU, UMĚLECKÉHO DÍLA, UMĚLECKÉHO VÝKONU)

Jméno a příjmení: **Bc. Jan Konečný**  
Osobní číslo: **C15514**  
Studijní program: **N2808 Chemie a technologie materiálů**  
Studijní obor: **Technologie organických specialit**  
Název tématu: **Studium interakce mezi  $\alpha$ -cyklodextrinem a konjugátem prednisolon -poly(ethylenglykol)**  
Zadávací katedra: **Ústav organické chemie a technologie**

### Z á s a d y p r o v y p r a c o v á n í :

1. Proveďte literární rešerši týkající se biologických vlastností prednisolonu a přípravy jeho konjugátů.
2. Z poly(ethylenglykolu) ( $M_w \sim 2000$ ) syntetizujte příslušný  $\alpha,\omega$ -diazido-poly(ethylenglykol) a připravte příslušnou inkluzní sloučeninu typu  $\alpha,\omega$ -diazido-poly(ethylenglykol) -  $\alpha$ -cyklodextrin. Připravte (prednisolon-21-yl)-pent-4-ynoát.
3. S využitím Huisgenovy cykloadice připravte konjugát (prednisolon-21-yl)-pent-4-ynoátu s  $\alpha,\omega$ -diazido-poly(ethylenglykolem) a charakterizujte jej pomocí spektroskopických metod.
4. Ověřte možnost vzniku inkluzních sloučenin typu konjugát prednisolonu s  $\alpha,\omega$ -diazido-poly(ethylenglykolem) -  $\alpha$ -cyklodextrin.
5. Pokuste se o přípravu konjugátu (prednisolon-21-yl)-pent-4-ynoátu s inkluzní sloučeninou  $\alpha,\omega$ -diazido-poly(ethylenglykol) -  $\alpha$ -cyklodextrin.
6. Výsledky vyhodnoťte a zpracujte formou závěrečné zprávy.

Rozsah grafických prací:

Rozsah pracovní zprávy:

Forma zpracování diplomové práce: **tištěná**

Seznam odborné literatury:

**Všechna dostupná chemická literatura.**

Vedoucí diplomové práce:

**doc. Ing. Pavel Drabina, Ph.D.**

Ústav organické chemie a technologie

Datum zadání diplomové práce: **28. února 2017**

Termín odevzdání diplomové práce: **10. května 2017**



prof. Ing. Petr Kalenda, CSc.  
děkan

L.S.



prof. Ing. Miloš Sedlák, DrSc.  
vedoucí katedry

V Pardubicích dne 28. února 2017

Prohlašuji:

Tuto práci jsem vypracoval samostatně. Veškeré literární prameny a informace, které jsem v práci využil, jsou uvedeny v seznamu použité literatury.

Byl jsem seznámen s tím, že se na moji práci vztahují práva a povinnosti vyplývající ze zákona č. 121/2000 Sb., autorský zákon, zejména se skutečností, že Univerzita Pardubice má právo na uzavření licenční smlouvy o užití této práce jako školního díla podle § 60 odst. 1 autorského zákona, a s tím, že pokud dojde k užití této práce mnou nebo bude poskytnuta licence o užití jinému subjektu, je Univerzita Pardubice oprávněna ode mne požadovat přiměřený příspěvek na úhradu nákladů, které na vytvoření díla vynaložila, a to podle okolností až do jejich skutečné výše.

Souhlasím s prezenčním zpřístupněním své práce v Univerzitní knihovně.

V Pardubicích dne ..... 2017

Jan Konečný

Poděkování:

Rád bych poděkoval pracovníkům Ústavu organické chemie a technologie za pomoc při tvorbě mé diplomové práce. Rád bych poděkoval doc. Ing. Pavlu Drabinovi, Ph.D. za neocenitelnou pomoc, rady a především za velkou trpělivost při vytváření mé diplomové práce. Také bych rád poděkoval Ing. Evě Horákové a Ing. Gabriele Novákové za pomoc a rady při práci v laboratoři. Rád bych poděkoval Ing. Zuzaně Hlouškové za velkou morální a psychickou pomoc při mém studiu i při finalizaci mé diplomové práce.

## **ANOTACE:**

Byl připraven a charakterizován nový typ konjugátu prednisolonu s poly(ethylenglykolem). Způsob navázání prednisolonu na polymer spočíval v provedení Huisgenovy 1,3-dipolární cykloadice mezi (prednisolon-21-yl)-pent-4-ynoátem a  $\alpha,\omega$ -diazido-poly(ethylenglykolem). Byly podrobně studovány dvě různé metody přípravy inkluzní sloučeniny (polypseudorotaxanu) konjugátu (prednisolon-21-yl)-pent-4-ynoátu s  $\alpha,\omega$ -diazido-poly(ethylenglykolem) a  $\alpha$ -cyklodextrinu. Obě metody však požadovaný polypseudorotaxan neposkytovaly.

## **KLÍČOVÁ SLOVA:**

Prednisolon; Poly(ethylenglykol);  $\alpha$ -Cyklodextrin; Huisgenova cykloadice; Polypseudorotaxan

## **ANNOTATION:**

New type of prednisolone – poly(ethylene glycol) conjugate was prepared and characterised. The formation of this conjugate consisted in Huisgen 1,3-dipolar cycloaddition of prednisolone-21-yl pent-4-ynoate on  $\alpha,\omega$ -diazido-poly(ethylene glycol). Two different methods for formation of polypseudorotaxane derived from prednisolone – poly(ethylene glycol) conjugate and  $\alpha$ -cyclodextrins was studied in detail. Unfortunately, the both methods did not lead to formation of desired polypseudorotaxane.

## **KEYWORDS:**

Prednisolone; Poly(ethylene glycol);  $\alpha$ -Cyclodextrin; Huisgen cycloaddition; Polypseudorotaxane

## Souhrn

V rámci diplomové práce byl připraven a charakterizován nový typ konjugátu prednisolonu s poly(ethylenglykolem) **5**. Navázání prednisolonu na polymer bylo uskutečněno Huisgenovou 1,3-dipolární cykloadicí (prednisolon-21-yl)-pent-4-ynoátu (**4**) s  $\alpha,\omega$ -diazido-poly(ethylenglykolem) (**2**). (Prednisolon-21-yl)-pent-4-ynoát (**4**) byl připraven acylací prednisolonu chloridem kyseliny pent-4-ynové (**3**), který byl připraven působením trifosgenu na příslušnou kyselinu.  $\alpha,\omega$ -Diazido-poly(ethylenglykol) (**2**) byl připraven dvoukrokovou syntézou z poly(ethylenglykolu) o molekulové hmotnosti 2000 g/mol.

Dále byla studována příprava inkluzní sloučeniny (polypseudorotaxanu) konjugátu (prednisolon-21-yl)-pent-4-ynoátu s  $\alpha,\omega$ -diazido-poly(ethylenglykolem) (**5**) a  $\alpha$ -cyklodextrinu dvěma rozdílnými metodami. V případě metody spočívající v navlékání  $\alpha$ -cyklodextrinů na polymerní řetězec konjugátu **5** byl ve všech provedených pokusech izolován polypseudorotaxan **8**, který však dle NMR spektroskopie obsahoval molekulu prednisolonu pouze na jednom konci polymerního řetězce. Druhou metodou, spočívající v Huisgenově 1,3-dipolární adici (prednisolon-21-yl)-pent-4-ynoátu (**4**) na inkluzní sloučeninu  $\alpha,\omega$ -diazido-poly(ethylenglykolu) a  $\alpha$ -cyklodextrinu (**6**) se polypseudorotaxan **7** připravit nepodařilo.

Příčinou neúspěšné přípravy inkluzní sloučeniny konjugátu (prednisolon-21-yl)-pent-4-ynoátu s  $\alpha,\omega$ -diazido-poly(ethylenglykolem) a  $\alpha$ -cyklodextrinu **7** je pravděpodobně velikost molekuly prednisolonu, která zabraňuje navlékání  $\alpha$ -cyklodextrinů na poly(ethylenglykolový) řetězec. Tento závěr je v rozporu s dříve publikovanými studiemi.



## Summary

This thesis describes the preparation and characterisation of new type of prednisolone – poly(ethylene glycol) conjugate **5**. The anchoring of prednisolone on the polymeric carrier was performed by application of Huisgen 1,3-dipolar cycloaddition of prednisolone-21-yl pent-4-ynoate (**4**) on  $\alpha,\omega$ -diazido-poly(ethylene glycol) (**2**). Prednisolone-21-yl pent-4-ynoate (**4**) was prepared by acylation reaction of prednisolone with pent-4-ynoyl chloride (**3**), obtained by the action of triphosgene on the corresponding acid.  $\alpha,\omega$ -Diazido-poly(ethylene glycol) (**2**) was synthesized via two-step synthesis started from poly(ethylene glycol) ( $M = 2000$  g/mol).

Further, the formation of polypseudorotaxane derived from prednisolone – poly(ethylene glycol) conjugate **5** and  $\alpha$ -cyclodextrins by two different methods was studied. In the case of the method based on threading of  $\alpha$ -cyclodextrin molecules onto polymeric chain of conjugate **5**, all of performed attempts afforded polypseudorotaxane **8**. However, it was determined by means of NMR spectroscopy, that the complex **8** includes only one molecule of prednisolone. From this fact follows, that polypseudorotaxane **8** was formed only from the by-product, which contains prednisolone anchored only on one side of polymeric chain. The second method of preparation of compound **7** employing Huisgen 1,3-dipolar cycloaddition of prednisolone-21-yl pent-4-ynoate (**4**) on polypseudorotaxane **6** formed from  $\alpha,\omega$ -diazido-poly(ethylene glycol) (**2**) and  $\alpha$ -cyclodextrins was unsuccessful.

This failure of formation of polypseudorotaxane **7** derived from prednisolone – poly(ethylene glycol) conjugate **5** and  $\alpha$ -cyclodextrins can be probably explained by sterical demand of the prednisolone molecule, which prohibited the threading of  $\alpha$ -cyclodextrin onto poly(ethylene glycol). This finding is in conflict with previously published studies.

## Seznam zkratek:

EDC	1-ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)karbodiimid
CyD	cyklodextrin
DCC	<i>N,N</i> -dicyklohexylkarbodiimid
DMAP	4-dimethylaminopyrrolidin
DMF	<i>N,N</i> -dimethylformamid
DMSO	dimethylsulfoxid
DIC	<i>N,N</i> -diisopropylkarbodiimid
HC	hydrokortison
MPD	methylprednisolon
NHS	<i>N</i> -hydroxysukcinimid
PEG	poly(ethylenglykol)
PD	prednisolon
THF	tetrahydrofuran
Ts	toluensulfonyl
MW	mikrovlnné záření
DBU	1,8-diazabicyklo[5.4.0]undec-7-en
MMA	methylmethakrylát
TBAF	tetra- <i>n</i> -butylamonium fluorid

## Obsah:

1. Úvod a teoretická část.....	13
1.1 Cíle diplomové práce .....	13
1.2 Prednisolon .....	14
1.2.1 Prednisolon – struktura .....	14
1.2.2 Prednisolon – vlastnosti .....	15
1.2.3 Prednisolon – použití .....	15
1.3 Nízkomolekulární konjugáty prednisolonu .....	17
1.3.1 Sodné soli esterů kyseliny sírové.....	17
1.3.2 Estery karboxylových kyselin.....	17
1.3.3 Konjugáty prednisolon-21-hemisukcinátu s cyklodextriny.....	22
1.4 Polymerní konjugáty prednisolonu.....	24
1.5. Huisgenova 1,3-dipolární cykloadice .....	29
1.6 Cyklodextriny .....	31
1.6.1 Inkluzní sloučeniny.....	31
1.6.2 Polypseudorotaxany .....	32
1.6.3. Konjugáty prednisolonu s poly(ethylenglykolem) a jejich inkluzní sloučeniny s $\alpha$ -cyklodextrinem.....	33
2. Experimentální část.....	36
2.1 Příprava $\alpha,\omega$ -bis(methansulfonyl)poly(ethylenglykolu) ( <b>1</b> ) .....	36
2.2 Příprava $\alpha,\omega$ -diazido-poly(ethylenglykolu) ( <b>2</b> ) .....	37
2.3 Příprava chloridu kyseliny pent-4-ynové ( <b>3</b> ) .....	38
2.4 Příprava (prednisolon-21-yl)-pent-4-ynoátu ( <b>4</b> ) .....	39
2.5 Příprava konjugátu (prednisolon-21-yl)-pent-4-ynoátu s $\alpha,\omega$ -diazido-poly(ethylenglykolem) ( <b>5</b> ) .....	40
2.6 Příprava inkluzních sloučenin (polypseudorotaxanů).....	41
2.6.1 Polypseudorotaxan $\alpha$ -cyklodextrin- $\alpha,\omega$ -diazido-poly(ethylenglykol) ( <b>6</b> )....	41
2.6.2 Polypseudorotaxan $\alpha$ -cyklodextrin-konjugát (prednisolon-21-yl)-pent-4-ynoát s $\alpha,\omega$ -diazido-poly(ethylenglykolem) ( <b>7</b> ) .....	42
2.6.3 Polypseudorotaxan $\alpha$ -cyklodextrin- $\alpha,\omega$ -diazido-poly(ethylenglykol)-(prednisolon-21-yl)-pent-4-ynoát .....	45

3. Výsledky a diskuze .....	48
3.1 Zhodnocení přípravy konjugátu (prednisolon-21-yl)-pent-4-ynoátu s $\alpha,\omega$ -diazido-poly(ethylenglykolem) <b>5</b> .....	48
3.1.1 Příprava $\alpha,\omega$ -diazido-poly(ethylenglykolu) <b>2</b> .....	48
3.1.2 Příprava (prednisolon-21-yl)-pent-4-ynoátu <b>4</b> .....	49
3.1.3 Huisgenova 1,3-dipolární cykloadice .....	52
3.2 Zhodnocení přípravy polypseudorotaxanů <b>6 a 7</b> .....	55
3.2.1 Příprava polypseudorotaxanu $\alpha$ -cyklodextrin- $\alpha,\omega$ -diazido-poly(ethylenglykol) <b>6</b> .....	55
3.2.2 Studium přípravy polypseudorotaxanu $\alpha$ -cyklodextrin-konjugát (prednisolon-21-yl)-pent-4-ynoátu s $\alpha,\omega$ -diazido-poly(ethylenglykolem) <b>7</b> .....	56
3.2.3 Studium přípravy polypseudorotaxanu $\alpha$ -cyklodextrin-konjugát (prednisolon-21-yl)-pent-4-ynoátu s $\alpha,\omega$ -diazido-poly(ethylenglykolem) <b>7</b> s využitím 1,3-dipolární cykloadice.....	62
4. Závěr .....	65

## 1. Úvod a teoretická část

### 1.1 Cíle diplomové práce

Cílem této diplomové práce bylo nejprve provést literární rešerši týkající se biologických vlastností prednisolonu a přípravy jeho konjugátů.

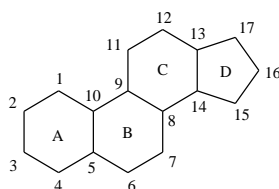
Následně měl být z poly(ethylenglykolu) o molekulové hmotnosti 2000 g/mol a prednisolonu připraven konjugát, ve kterém by spojení prednisolonu s polymerním nosičem bylo uskutečněno pomocí triazolové spojky. Při syntéze konjugátu měla tedy být využita Huisgenova 1,3-dipolární cykloadice. Pro tento účel měly být připraveny příslušné výchozí látky:  $\alpha,\omega$ -diazido-poly(ethylenglykol) a (prednisolon-21-yl)-pent-4-ynoát. Všechny připravené sloučeniny měly být charakterizovány pomocí spektroskopických metod.

Dalším cílem bylo ověření možnosti vzniku inkluzní sloučeniny (polypseudorotaxanu) konjugátu (prednisolon-21-yl)-pent-4-ynoátu s  $\alpha,\omega$ -diazido-poly(ethylenglykolem) a  $\alpha$ -cyklodextrinu, a to dvěma rozdílnými způsoby. První představuje navlékání  $\alpha$ -cyklodextrinů na polymerní řetězec konjugátu, druhý pak využívá Huisgenovu 1,3-dipolární adici (prednisolon-21-yl)-pent-4-ynoátu na inkluzní sloučeninu  $\alpha,\omega$ -diazido-poly(ethylenglykolu) a  $\alpha$ -cyklodextrinu. Výsledky pokusů týkajících se přípravy inkluzní sloučeniny konjugátu (prednisolon-21-yl)-pent-4-ynoátu s  $\alpha,\omega$ -diazido-poly(ethylenglykolem) a  $\alpha$ -cyklodextrinu měly být vyhodnoceny a porovnány s předchozími studii, ve kterých byly popsány analogické inkluzní sloučeniny prednisolonu a poly(ethylenglykolu).<sup>1,2</sup>

## 1.2 Prednisolon

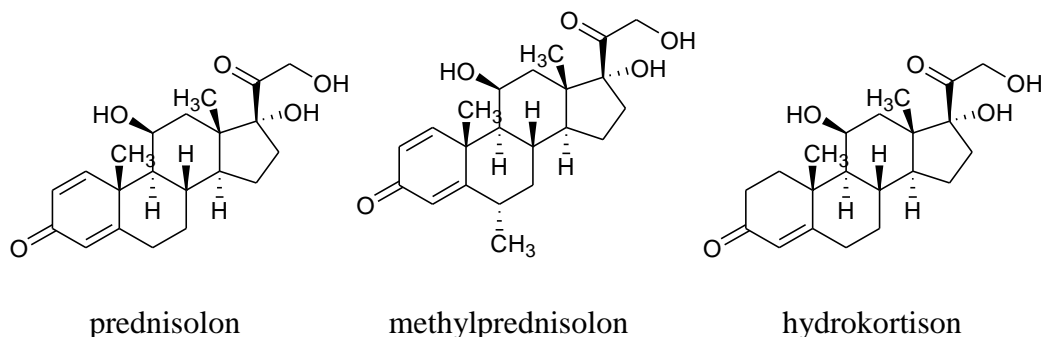
### 1.2.1 Prednisolon – struktura

Prednisolon je látka patřící do skupiny tzv. glukokortikoidů, tedy steroidních hormonů vylučovaných kůrou nadledvin. Struktura prednisolonu je tvořena tetracyklickým systémem, který je společný pro všechny steroidní látky. Jde o tzv. steran (cyklopentanoperhydrofenanthren) (Obrázek 1). Čtyři kruhy tohoto skeletu se značí od levého dolního kruhu jako A, B, C, D. Kruhy se číslují od kruhu A. Šestičlenné kruhy (A, B, C) zaujímají židličkovou konformaci, ale díky vzájemnému spojení kruhů u nich nemůže docházet k inverzi konformace kruhů, jako u cyklohexanu.<sup>3</sup>



Obrázek 1 - Steran

Prednisolon (Obrázek 2) je chemickým názvem (11 $\beta$ )-11,17,21-trihydroxypregna-1,4-dien-3,20-dion. Jeho sumární vzorec je  $C_{21}H_{28}O_5$ , což odpovídá molekulové hmotnosti 360,45 g/mol.<sup>4</sup> Jako možná nečistota bývá často uváděna přítomnost hydrokortisonu (HC). Hydrokortison se od prednisolonu liší přítomností jednoduché vazby místo dvojné mezi uhlíky C1 a C2. Mezi další významné glukokortikoidy patří například 6-methyl derivát – methylprednisolon (MPD). Methylprednisolon má podobné terapeutické účinky jako samotný prednisolon.<sup>5</sup>



Obrázek 2 – Struktura prednisolonu, methylprednisolonu a hydrokortisonu

### 1.2.2 Prednisolon – vlastnosti

Prednisolon je bílý krystalický prášek, který má jisté hygroskopické vlastnosti. Je však téměř nerozpustný ve vodě. Snadno rozpustný je například v ethanolu a methanolu, málo rozpustný pak v acetonu nebo v dichlormethanu.<sup>4</sup> Jeho bod tání je 240-241°C.<sup>4</sup>

### 1.2.3 Prednisolon – použití

Prednisolon patří mezi látky glukokortikoidní povahy, které jsou používány jako léčiva s vysokým terapeutickým potenciálem. Prednisolon je často využíván při léčbě astmatu,<sup>6</sup> ulcerózní kolitidy a Crohnovy choroby,<sup>7</sup> uveitidy (záněty oka), revmatoidní artritidy,<sup>8</sup> Bellovy paralýzy, roztroušené sklerózy,<sup>9</sup> systémového lupusu erythematodes, dermatomyositidy a autoimunitní hepatitidy,<sup>10</sup> Hortonova syndromu (*cluster headaches*, migrenózní neuralgie), vaskulitidy, akutní lymfoblastické leukémie.<sup>11</sup> Prednisolon se vyznačuje společně s ostatními protizánětlivými a imunosupresivními steroidy nežádoucími vedlejšími účinky, mezi které patří například diabetes, glaukom, hypertenze, osteoporóza, obezita a možnost navození psychotických stavů. Tyto nežádoucí účinky se společně označují jako tzv. Cushingův syndrom.<sup>12</sup> Za účelem omezení těchto nežádoucích účinků jsou vyvíjeny nové lékové formy prednisolonu a methylprednisolonu, nejčastěji jejich konjugátů.<sup>13,14</sup> Prednisolon lze podávat orálně nebo intravenózně, popř. lokálně v závislosti na specifickém účelu použití.<sup>15</sup> Prednisolon se v játrech metabolizuje na biologicky inaktivní sloučeniny, které jsou vylučovány převážně ledvinami. Z důvodu nespecifického směřování prednisolonu na místo zánětu jsou k lepšímu zacílení léčiva používány vysoké a časté dávky tak, aby bylo dosaženo žádaného účinku (>7,5 mg/den při každodenní orální aplikaci nebo až 1000 mg každý druhý den při intravenózním podání).<sup>16,17</sup>

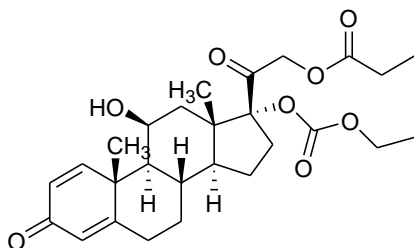
Další účinné látky, které jsou strukturně odvozeny od prednisolonu (dle Českého lékopisu (2009) a European Pharmacopoeia 5.0), jsou jeho čtyři estery (Obrázek 3).<sup>18,19</sup>

prednisolon-17-ethylkarbonát 21-propanoát (*Prednicarbatum*),

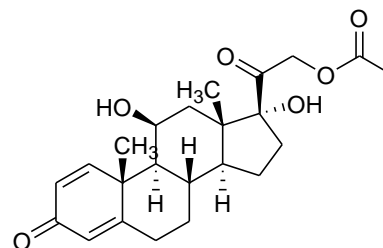
prednisolon-21-acetát (*Prednisoloni acetas*),

prednisolon-21-fosfát sodný (*Prednisoloni natrii phosphas*),

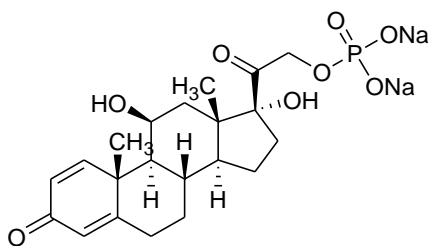
prednisolon-21-pivaloát (*Prednisoloni pivalas*)



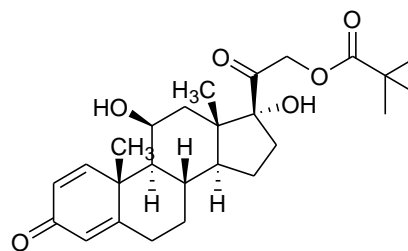
prednisolon-17- ethoxykarbonyl-21-propanoát



prednisolon-21-acetát



prednisolon-21-fosfát sodný



prednisolon-21-pivaloát

**Obrázek 3** – Struktura prednisolon-17-ethoxykarbonyl-21-propanoátu, prednisolon-21-acetátu, prednisolon-21-fosfátu sodného a prednisolon-21-pivaloátu

V současnosti se výzkum derivátů prednisolonu zaměřuje především na vývoj a aplikaci jeho konjugátů, využívajících navázání prednisolonu kovalentní vazbou na různé nosiče. Použitím vhodného nosiče a chemické spojky umožňující navázání molekuly prednisolonu, může být toto léčivo transportováno do cílové oblasti, kde má působit. Tím lze zabránit celosystémovému působení prednisolonu, což má za následek omezení jeho vedlejších nežádoucích účinků. Zároveň lze takto lépe řídit odbourávání léčiva, respektive jeho uvolňování při průchodu organismem.<sup>20</sup>



### 1.3 Nízkomolekulární konjugáty prednisolonu

Konjugáty prednisolonu se mohou ve srovnání se samotným prednisolonem vyznačovat určitými výhodami. Zásadní výhodou bývá zacílení prednisolonu přímo na oblast, kde je požadován jeho účinek. Dále je pro konjugáty typická změna farmakokinetiky, tj. setrvání prednisolonu v organismu, a tedy prodloužení jeho účinku.

#### 1.3.1 Sodné soli esterů kyseliny sírové

Prednisolon 21-sulfát sodný se používá především pro léčbu zánětu tlustého střeva. Obecně se látky glukokortikoidní povahy velmi dobře vstřebávají především v horní části gastrointestinálního traktu, například v žaludku, nebo v tenkém střevě, a proto při orálním podání proniknou až do tlustého střeva jen ve velmi nízkých koncentracích. Dnes je tento problém řešen podáváním vysokých dávek léčiv. To však není z dlouhodobého hlediska vhodné, vzhledem k výše uvedeným nežádoucím účinkům glukokortikoidů.<sup>21</sup>

Při použití sulfátů lze docílit lepšího zacílení léčiva na tlusté střevo (colon specific prodrug). Sulfáty prednisolonu lze relativně snadno připravit (Schéma 1) a jsou chemicky stabilní, hlavně v prostředí žaludku a tenkého střeva. K cílenému uvolňování prednisolonu v tlustém střevě dochází za účinku specifických střevních sulfatáz.<sup>21</sup>

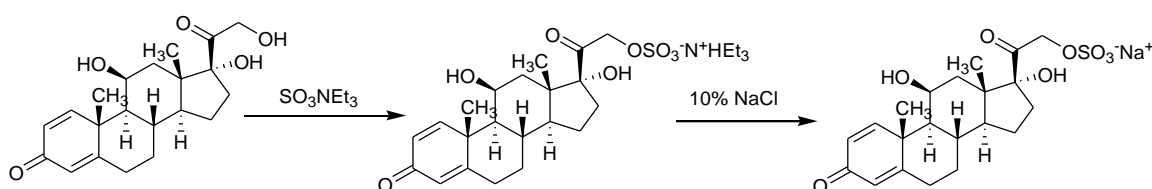
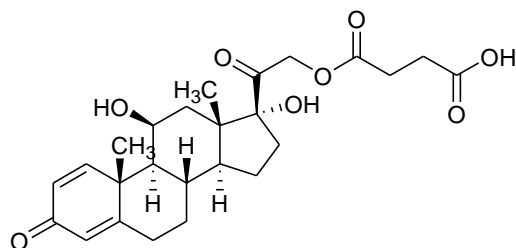


Schéma 1 - Syntéza sodné soli 21-sulfátu prednisolonu

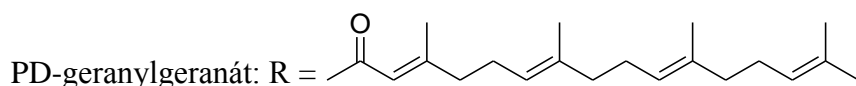
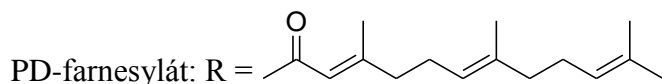
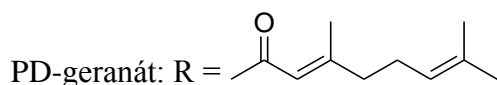
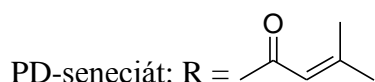
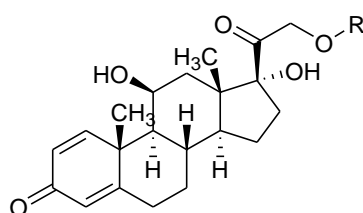
#### 1.3.2 Estery karboxylových kyselin

Estery prednisolonu s karboxylovými kyselinami patří do významné skupiny nízkomolekulárních konjugátů. Uvolňování účinné látky z proléčiva je dosaženo za pomoci specifických enzymů – esteráz. Příkladem může být prednisolon 21-hemisukcinát (Obrázek 4).



Obrázek 4 - Prednisolon 21-hemisukcinát

Dalším příkladem mohou být estery prednisolonu odvozené od série terpenových karboxylových kyselin (Obrázek 5).<sup>23</sup> Tyto deriváty byly připraveny za účelem studia vlivu postranního řetězce na penetraci přes kožní tkáň.<sup>22,23</sup>



Obrázek 5 - Estery prednisolonu odvozené od terpenových kyselin

Jiné konjugáty prednisolonu a hydrokortisonu obsahují ve své struktuře molekuly tripeptidů vázané přes spojku tvořenou esterem kyseliny jantarové v poloze 21 nebo přes hydrazonovou vazbu v poloze 3.<sup>24</sup> Jako tripeptidy byly použity Glu-Asp-Gly-OH, resp. His-Gly-Glu-OH v případě esterových derivátů. Hydrazonové deriváty obsahovaly tripeptid His-Gly-Lys-NHNH<sub>2</sub>. Způsob syntézy těchto látek je uveden ve Schématu 2. Aktivace prednisolon-21-jantarátu *N*-hydroxysukcinimidem (NHS) místo 4-nitrofenolem vedla k vyšším výtěžkům výsledných produktů. Tyto konjugáty se vyznačují imunosupresivními účinky.<sup>24</sup>

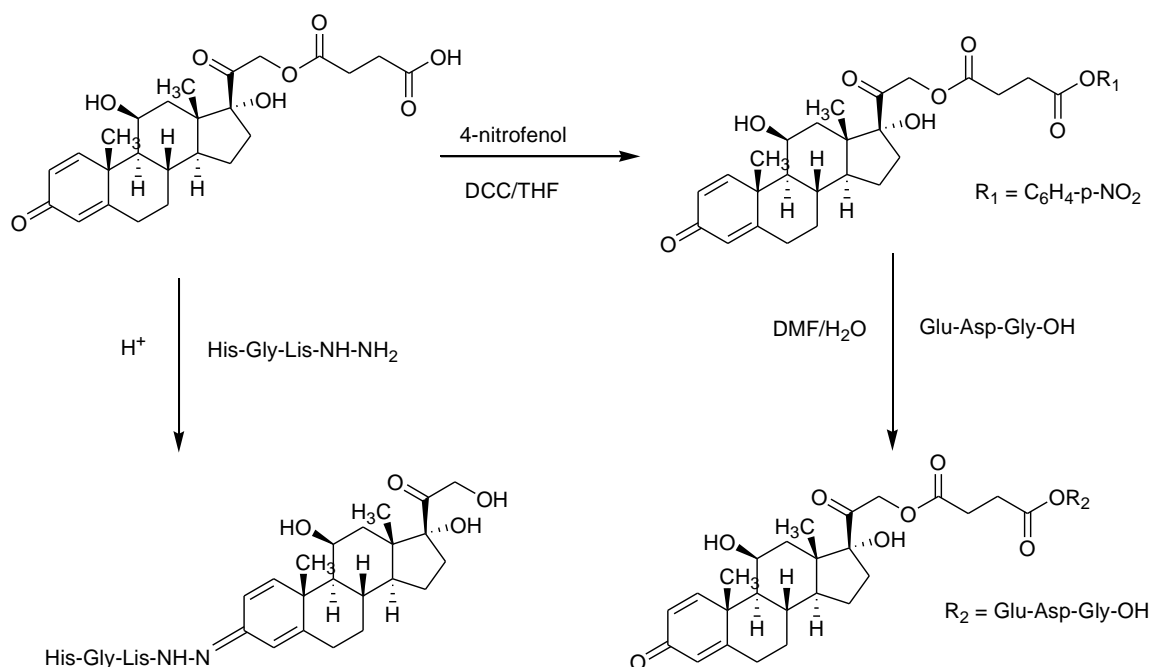
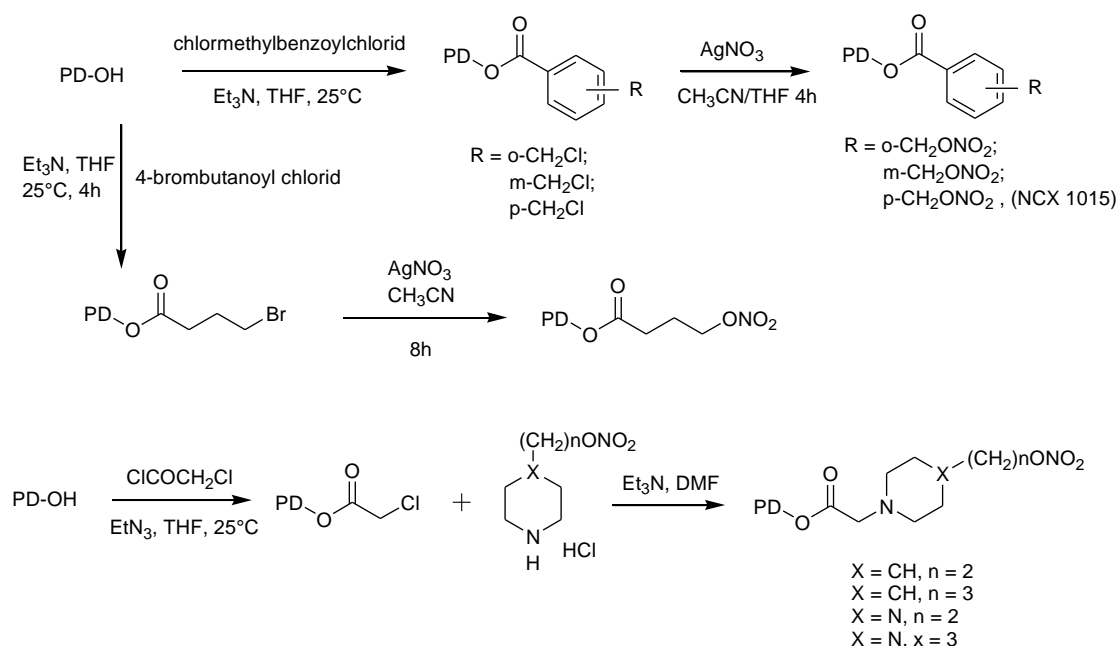


Schéma 2 - Syntéza konjugátů prednisolonu s tripeptidy

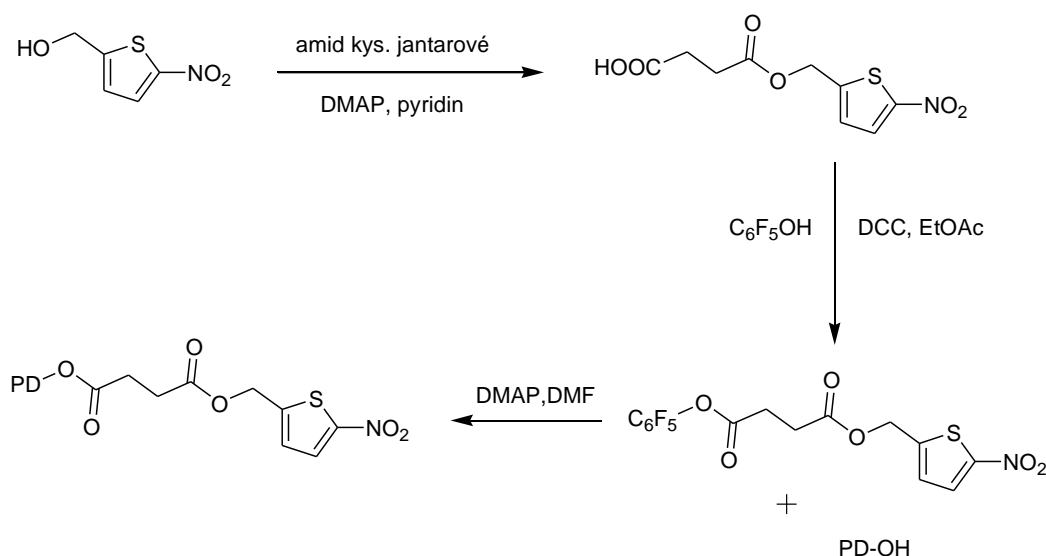
Další zajímavé konjugáty prednisolonu (PD) obsahující esterovou skupinu (např. nitrooxybutyryl-, nitrooxymethylbenzoyl- nebo hydrofilní spojky nitrooxyalkylpiperidinylacetyl, resp. nitrooxyalkylpiperazinylacetyl) jsou uvedeny ve Schématu 3. Ve všech případech je esterifikován hydroxyl na uhlíku 21. Tyto konjugáty se vyznačují tím, že jejich rozpadem v organismu dochází ke vzniku oxidu dusnatého, čímž se zvyšuje protizánětlivý účinek.<sup>25</sup> (Schéma 3) U těchto léčiv bylo rovněž zjištěno, že jejich terapeutická aplikace vede ke snížení nežádoucích vedlejších účinků prednisolonu.



**Schéma 3** – Syntéza konjugátů prednisolonu uvolňujících oxid dusnatý

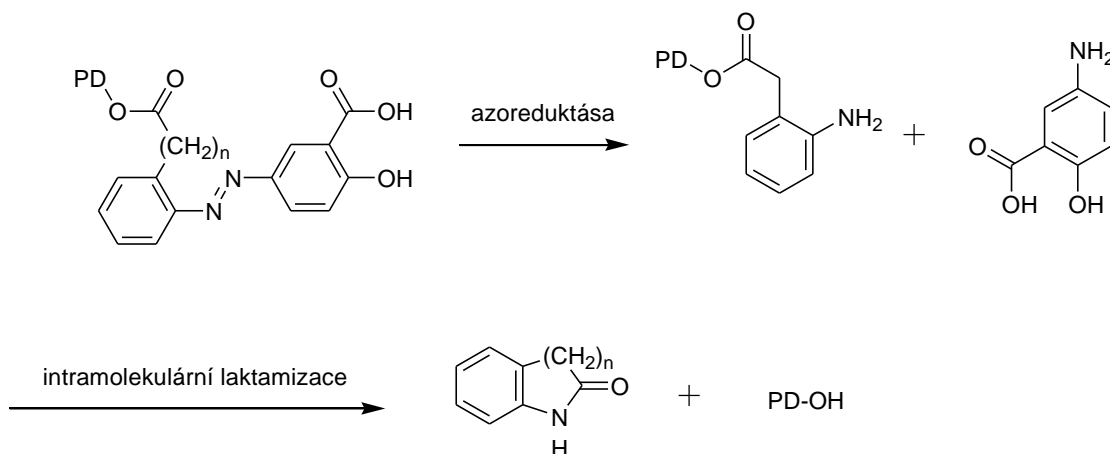
Z výše uvedených derivátů je zajímavá především sloučenina označená kódem NCX 1015. Ta vykazuje nejlepší protizánětlivé vlastnosti a zároveň nižší vedlejší účinky v porovnání se samotným prednisolonem. V současné době je ve fázi preklinického testování.<sup>25,26</sup> Látka NCX 1015 je rovněž testována jako možné léčivo pro obnovu funkcí po poranění míchy. Je známo, že vysoké dávky glukokortikoidů mohou zlepšovat regeneraci funkcí po poranění míchy u zvířat,<sup>27</sup> avšak vzhledem k jejich nežádoucím účinkům je toto použití u lidí omezeno. Sloučenina NCX 1015 vykazuje natolik nízké vedlejší účinky typické pro glukokortikoidní látky, že by její aplikace v této oblasti medicíny mohla být zvažována.<sup>27</sup> Látka NCX 1015 také vykazuje vyšší protialergický potenciál, než samotný prednisolon.<sup>28</sup>

Jiný konjugát prednisolonu představuje sloučenina na bázi prednisolon-21-sukcinátu substituovaného thiofenem s přítomnou nitroskupinou (Schéma 4). Nitroskupina slouží jako jakýsi molekulární spínač citlivý na redukční prostředí. Po redukcí tohoto derivátu dochází k uvolnění vlastního léčiva.<sup>30</sup> Bioredukce bývá dosažena ve stavu hypoxie,<sup>29</sup> tj. stavu s nedostatečnou koncentrací kyslíku ve tkáních. Hypoxie nastává mimo jiné rovněž u různých chorobných stavů, včetně rakoviny a revmatické artritidy.



**Schéma 4** - Syntéza prednisolon hemisukcinátu 5-nitrothiofen-2-ylmethyl esteru

Další konjugát prednisolonu (Schéma 5) byl syntetizován za účelem jeho cíleného uvolňování v tlustém střevě. Cílem bylo vytvořit prekurzor prednisolonu (PD), který umožní jeho vstřebávání především v tlustém střevě místo vstřebávání ve střevě tenkém, nebo v žaludku, podobně jako tomu bylo v případě prednisolon-21-sulfátu. Rozpad konjugátu je popsán ve Schématu 5. Po bioredukci azoskupiny a následné cyklizaci („*cyclisation-activation prodrug strategy*“) dochází k uvolnění samotného prednisolonu. Tento postup se obvykle používá v případech, kdy je potřebné zvýšení pasivní difúze a biologické dostupnosti při orálním podání.<sup>31</sup>

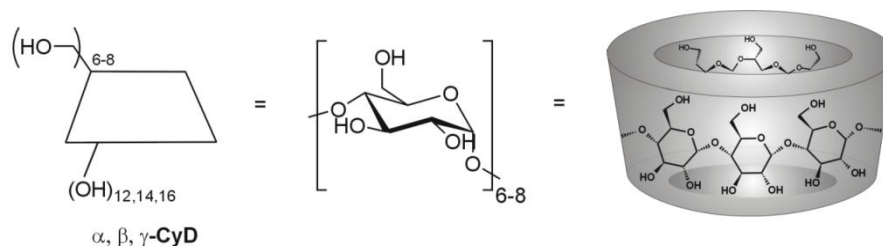


**Schéma 5** – Princip uvolňování prednisolonu z konjugátu prednisolonu s azosloučeninou

Tento konjugát se vyznačuje protizánětlivým účinkem srovnatelným s účinkem samotného prednisolonu, avšak jeho aplikace je spojena s potlačením nežádoucích efektů typických pro prednisolon. Tento derivát má tedy velký potenciál pro cílenou léčbu tlustého střeva perorálním podáním.<sup>31</sup>

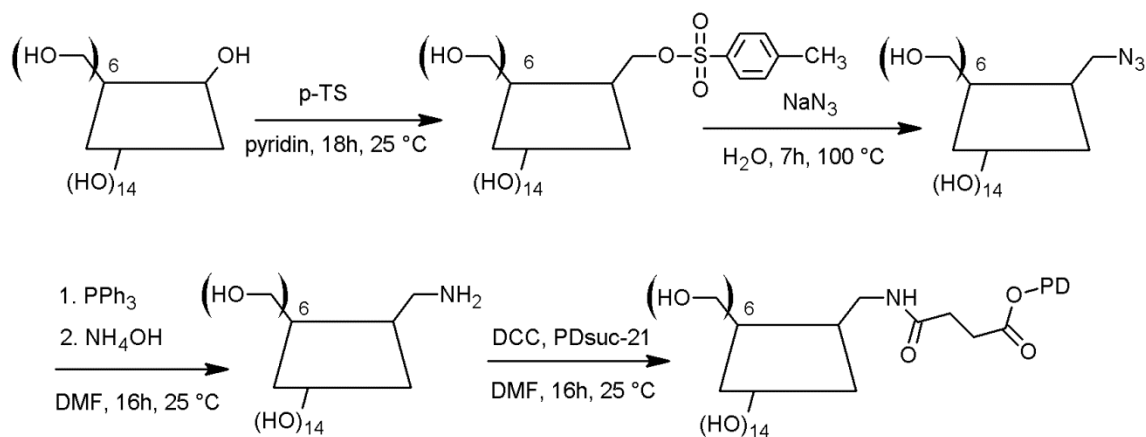
### 1.3.3 Konjugáty prednisolon-21-hemisukcinátu s cyklodextriny

Cyklodextriny (CyD) jsou cyklické oligosacharidy skládající se z 6 až 8 jednotek D-glukosy spojené  $\alpha$ -1,4-glukosidickou vazbou (Obrázek 6). Více o těchto sloučeninách pojednává kapitola 1.6. Cyklodextriny jsou mimo jiné využívány k vylepšení vlastností léčiv, jako je například vyšší rozpustnost, stabilita nebo biokompatibilita. Konjugáty cyklodextrinů a prednisolonu lze dle chemické struktury dělit buď na inkluzní komplexy, které podléhají snadné disociaci v tělních tekutinách, nebo na konjugáty, ve kterých je léčivo spojeno s cyklodextrinem kovalentní vazbou.

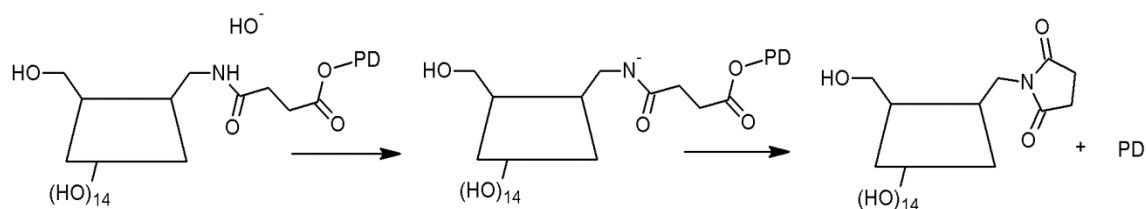


Obrázek 6 – Struktura  $\alpha$ -,  $\beta$ -,  $\gamma$ -cyklodextrinu

Příkladem konjugátu s kovalentně vázaným prednisolonem je derivát, který byl připraven připojením prednisolon-21-hemisukcinátu na aminoskupinu mono(6-deoxy-6-amino)- $\beta$ -cyklodextrinu pomocí amidické vazby (Schéma 6).<sup>32</sup> Způsob chemického uvolnění prednisolonu v organismu je popsán ve Schématu 7.



**Schéma 6** - Syntéza konjugátu na bázi amidu prednisolon-21-hemisukcinátu a amino- $\beta$ -CyD



**Schéma 7** – Uvolňování prednisolonu z konjugátu na bázi amidu prednisolon-21-hemisukcinátu a amino- $\beta$ -CyD

Dalšími konjugáty prednisolonu s kovalentně vázaným cyklodextrinem jsou deriváty, jejichž spojení je uskutečněno esterovou vazbou. Esterové konjugáty byly připraveny ze všech tří typů CyD, a to přímým couplingem mezi prednisolon-21-sukcinátem a CyD za aktivace karbonyldiimidazolem. Bylo zjištěno, že *in vitro* hydrolýza těchto konjugátů je výrazně pomalejší ve srovnání s předchozím amidovým konjugátem. Toho lze využít pro prodloužení účinku látky a také pro cílené uvolňování ve střevě tak, aby byla zajištěna lokálně nízká, ale zároveň konstantní hladina účinné látky v organismu.<sup>33,34,35</sup>

## 1.4 Polymerní konjugáty prednisolonu

Jak již bylo uvedeno dříve, v současné době je věnována velká pozornost přípravě a aplikaci takových konjugátů, ve kterých je prednisolon vázán na rozličné typy polymerního nosiče. Použitím nosičů se může léčivo zacílit přímo na požadovanou oblast, kde má působit a zabránit tak celosystémovému působení prednisolonu, vedoucím ke snížení jeho nežádoucích glukokortikoidních účinků.<sup>12</sup>

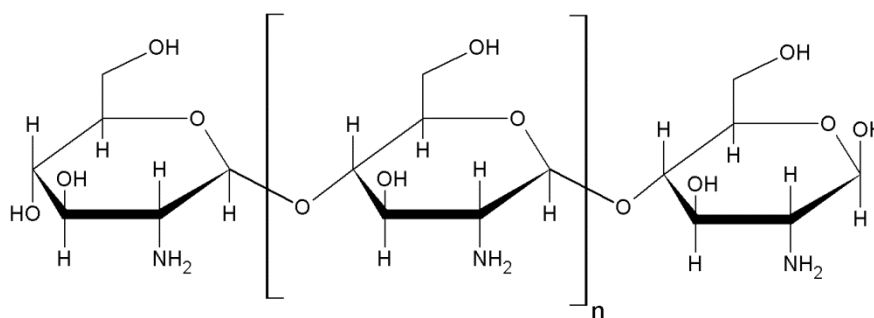
Nízkomolekulární léčiva sama o sobě podléhají relativně rychlému odbourávání a často mají špatnou biologickou dostupnost a nespecifickou distribuci v těle. Při použití vhodného, tj. ve vodě rozpustného polymerního nosiče se může zlepšit transport léčiva v organismu, který je způsoben například změnou jeho lipofility nebo jeho molekulové hmotnosti. Dále pak, pomalejším uvolňováním léčiva z nosiče se může prodlužovat jeho účinek v organismu a také dosáhnout specifického transportu léčiva k cílovým buňkám.

Polymerní nosič by měl splňovat následující kritéria: měl by být snadno biologicky odbouratelný, měl by se vyznačovat nízkou toxicitou, neměl by se kumulovat v organismu a měl by mít potřebné funkční skupiny pro navázání léčiva prostřednictvím vhodné chemické spojky.<sup>36,37</sup>

Polymerní konjugáty se především používají u léčiv proti rakovině. V důsledku zvýšené propustnosti a retence membrán nádorových buněk se v nich hromadí mnohem vyšší koncentrace makromolekulárních látek než v normálních buňkách nebo orgánech. Následně v nich dochází k řízené hydrolýze (hydrolýza řízena především pH) a k uvolnění léčiva z nosičů.<sup>36,37,39</sup>

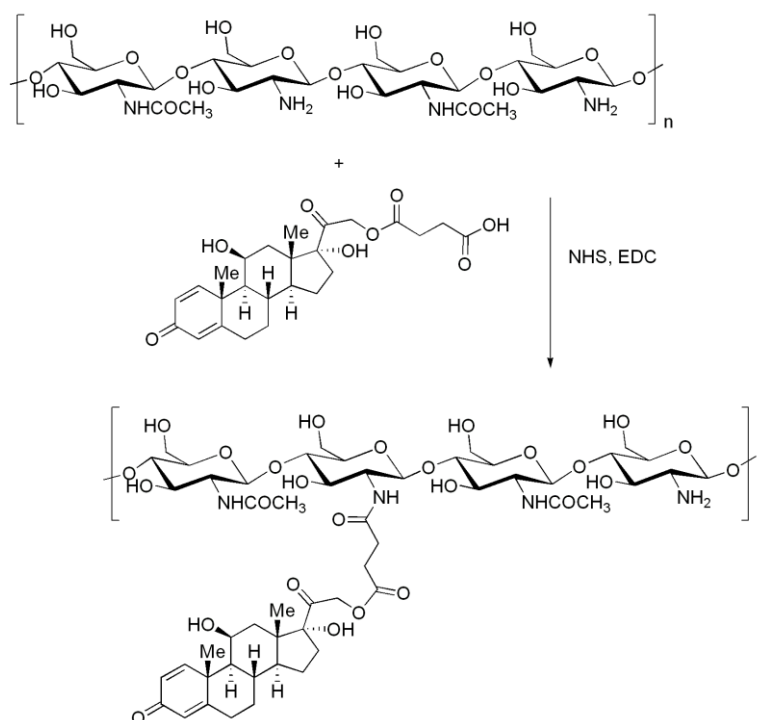
Příkladem polymerního nosiče splňujícího výše uvedené podmínky může být chitosan neboli poly-D-glukosamin (Obrázek 7). Chitosan je přírodní polymer odvozený od chitinu, je to po celulóze druhý nejčastěji se vyskytující polysacharid v přírodě. Chitosan vykazuje velmi dobré biologické vlastnosti, je netoxický, biokompatibilní a dobře biologicky odbouratelný. Pro své zajímavé vlastnosti se používá u různých antimikrobiálních látek, biomedicínských materiálů, kosmetiky, potravinových přísad. Chitosan sám o sobě vykazuje antibakteriální, protirakovinný a antioxidační účinek. To z něj dělá potenciálně velmi zajímavý nosič pro různá léčiva.<sup>40</sup>





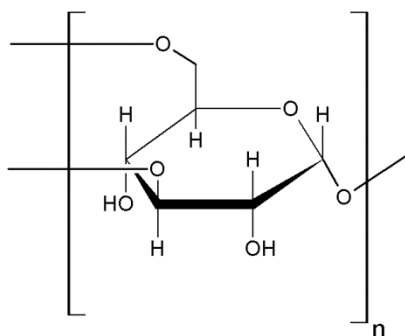
Obrázek 7 - Chitosan

Bylo zjištěno, že náhodně *N*-acetylovaný chitosan (stupeň acetylace 50 %) s nízkou molekulovou hmotností označovaný zkratkou LMWC se selektivně hromadí v ledvinách, a to především v renálních tubulech. Díky této vlastnosti je vhodným nosičem léčiva prednisolon zacílené na léčbu ledvin. Příprava jednoho z možných konjugátů prednisolonu s LMWC jakožto nosičem, je uvedena ve Schématu 8.<sup>41</sup> Koncentrace konjugátu v ledvinách byla po podání 13 krát vyšší, než při podání samotného prednisolonu.<sup>41</sup>



**Schéma 8** – Syntéza konjugátů prednisolonu s 50% *N*-acetylovaným chitosanem s nízkou molekulovou hmotností

Dalším příkladem vhodného polymerního nosiče je dextran (Obrázek 8), což je polymer glukózy o vysoké molekulové hmotnosti. Vzhledem k tomu, že se ve značné míře ukládá v játrech (konkrétně v lysosomech), je vhodným nosičem glukokortikoidů (např. methylprednisolonu) aplikovaných v post-transplantační medicíně (transplantace jater), kdy je nutné zabránit možné rejekci přijatého orgánu.<sup>42,43</sup>



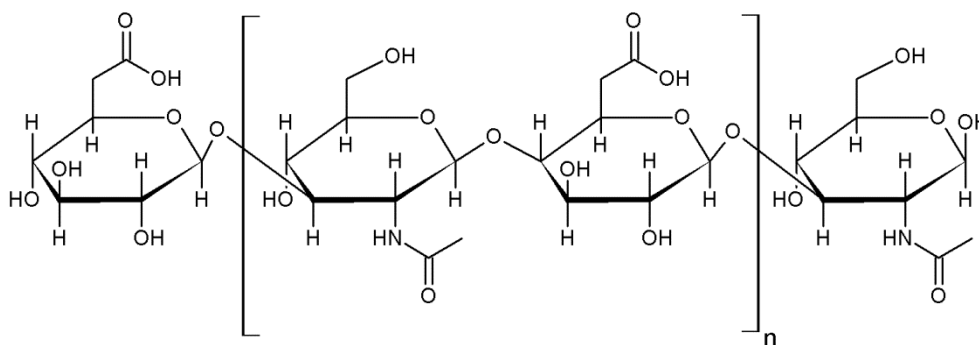
**Obrázek 8** – Dextran

Příkladem polymerních konjugátů dextranu s prednisolonem resp. methylprednisolonem jsou konjugáty, ve kterých je steroid a dextran spojen pomocí dikarboxylové kyseliny. Ve studii popisující jejich přípravu byla rovněž zkoumána možnost cíleného uvolňování methylprednisolonu v játrech, kde dochází k rozpadu tohoto konjugátu přítomnými esterázami. Ve studii bylo zjištěno, že rozpad konjugátu v krvi probíhá velmi pomalu, což zvyšuje distribuci účinné látky do cílových tkání.<sup>42</sup>

Při léčbě zánětlivých nebo degenerativních artritických onemocnění se v některých případech aplikují intraartikulární injekce glukokortikoidů, což však bývá často spojeno s manifestací nežádoucích účinků glukokortikoidů. Důvodem je rychlé pronikání léčiva z kloubní dutiny do krevního oběhu. Proto byl výzkum zaměřen na vývoj vhodného konjugátu prednisolonu vyznačujícího se dostatečnou retencí v kloubní dutině. Jako vhodný se ukázal konjugát vázaný na kyselinu hyaluronovou a její estery jakožto polymerní nosiče.<sup>44</sup> Hyaluronan (Obrázek 9) patří mezi glykosaminoglykany a má významné biologické funkce. Je jednou z hlavních složek extracelulární tekutiny a podílí se na několika důležitých biologických procesech (hojení ran, pohyb buněk, diferenciací buněk).<sup>45</sup> Hyaluronan vykazuje dobré vlastnosti při léčbě artritických onemocnění, díky jeho výborné biokompatibilitě, reologickým vlastnostem a vysoké koncentraci v synoviální tekutině. Intraartikulární injekce hyaluronanu o vysoké

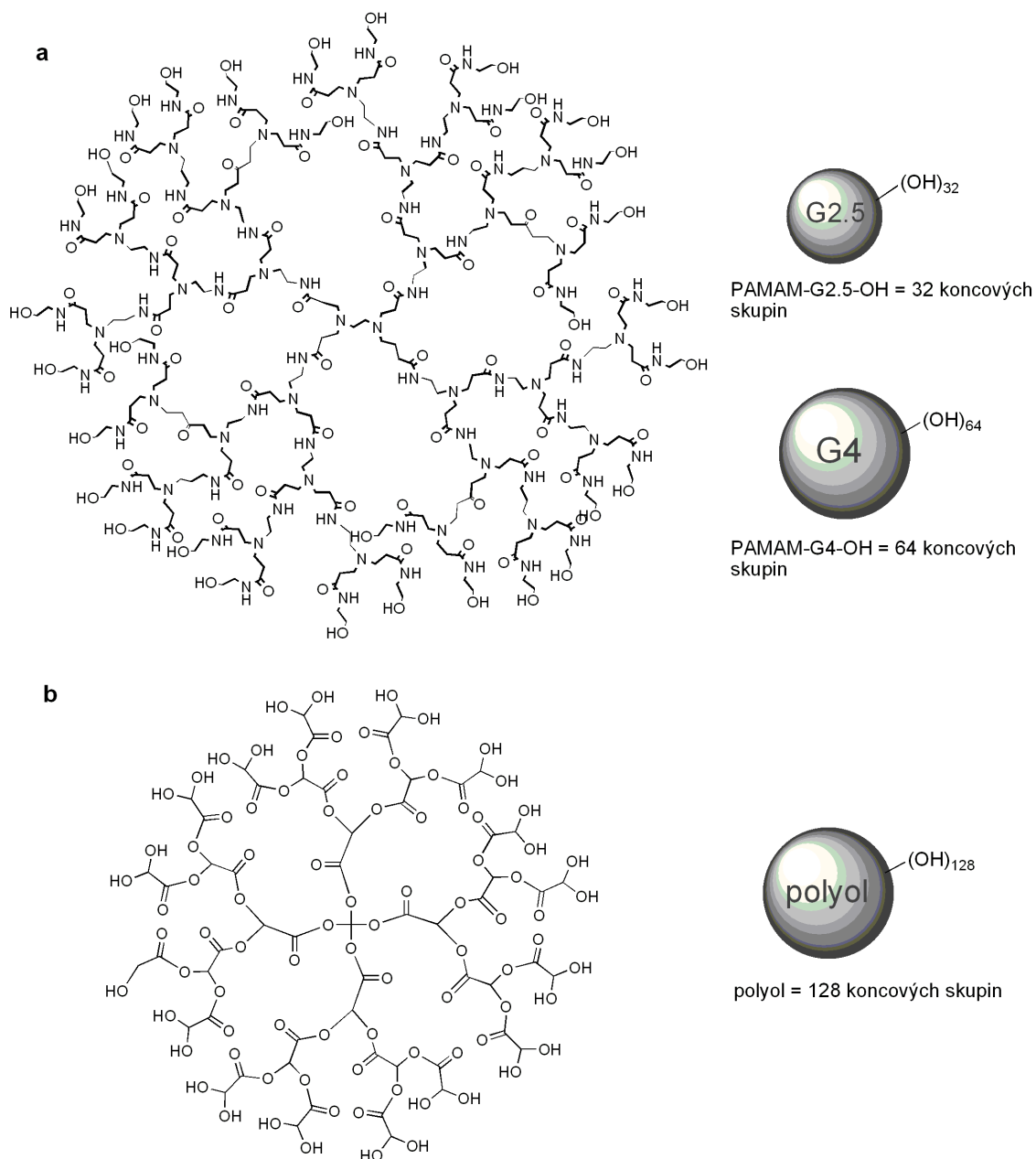
molekulové hmotnosti také mohou ulevovat od bolesti a zlepšovat i pohyblivost kloubů.<sup>44,45,46</sup>

Glukokortikoidem, vázaným na hyaluronan prostřednictvím esterové vazby, byl methylprednisolon. Jeho uvolnění je spojeno s hydrolyzou této esterové skupiny, která je založena na rozdílu mezi pH ve zdravé tkáni a pH ve tkáni s lokalizovaným zánětem. Tento fakt je obecně pro vývoj nosičů citlivých na pH velmi důležitý.<sup>46,47</sup>

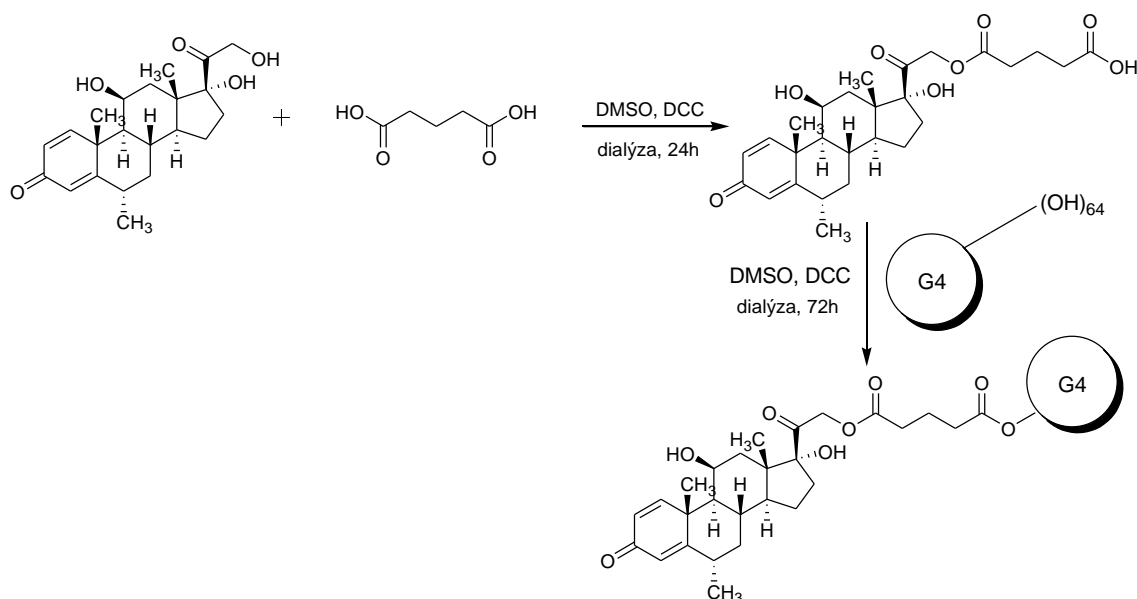


Obrázek 9 - Hyaluronan

Dendrimery (Obrázek 10) jsou vysoce rozvětvené a reaktivní trojrozměrné makromolekuly se všemi vazbami vycházejícími z centrálního jádra. V současnosti jim je věnována pozornost, a to vzhledem k jejich zajímavé struktuře a vlastnostem. V porovnání s tradičními lineárními polymery mají dendrimery mnohem lépe kontrolovatelnou strukturu, globulární tvar a větší počet reaktivních periferních skupin.<sup>39,48</sup> Byl připraven dendritický konjugát methylprednisolonu. Spojkou byla v původní práci kyselina glutarová, v navazující pak kyselina jantarová. Jako nosiče byly postupně testovány komerční polyamidoaminové dendrimery: PAMAM-G2.5-COOH (MW 6 267 Da, 32 koncových skupin) a PAMAM-G4-OH (MW 14 279 Da, 64 koncových skupin) a hypervětvený polyol (MW 15 000 Da, 128 koncových skupin) (Schéma 9). Bylo zjištěno, že konjugát rychle vstupuje do buněk respiračního epitelu a po rozpadu způsobuje vysokou lokální koncentraci léčiva vedoucí k žádanému terapeutickému účinku. Tyto konjugáty tak vykazují vysoký terapeutický potenciál při léčbě plicních zánětů spojených s astmatem.<sup>49,50</sup>



**Obrázek 10** – Struktura dendrimerů: (a) PAMAM-G2.5-OH a PAMAM-G4-OH dendrimery, (b) hypervětvěný polyol



**Schéma 9-** Syntéza konjugátu methylprednisolon-21-glutamátu vázaného na dendrimer PAMAM-G4-OH

### 1.5. Huisgenova 1,3-dipolární cykloadice

Huisgenova cykloadice patří do skupiny tzv. „click chemie“. Reakce jako taková se vyznačuje rychlým průběhem, kvantitativními výtěžky, velmi dobrou tolerancí funkčních skupin, mírnými reakčními podmínkami bez ohledu na polární nebo nepolární prostředí a především možností použití vodných rozpouštědel.<sup>54,55</sup> Při Huisgenově cykloadici dochází k reakci terminálního alkynu s organickým azidem za vytvoření produktu obsahující 1,2,3-triazolový kruh. Reakce bývá nejčastěji katalyzována měďnými ionty,<sup>56</sup> existují však postupy „Catalyst-free“, tedy postupy, při kterých není potřebný žádný katalyzátor.<sup>57</sup> Při katalýze měďnými solemi se často provádí *in situ* redukce solí měďnatých, a to z důvodu nižší ceny a vyšší stability měďnatých solí ve srovnání s měďnými.

K redukci měďnatých solí se používá například kyselina L-askorbová, nebo L-askorbát sodný, pro zlepšení výtěžku se také mohou měďné soli vázat na aktivní uhlí. Příklad použití takto modifikovaného katalyzátoru je uveden ve Schématu 10.<sup>56</sup>

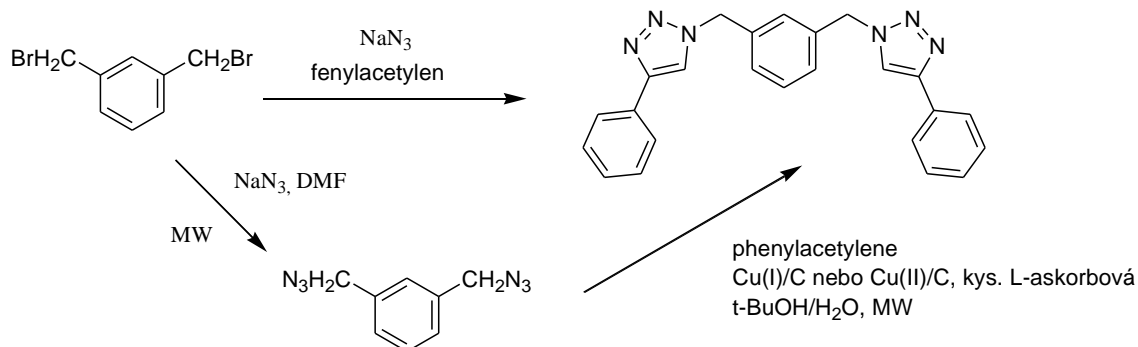


Schéma 10 - Příprava 1,3-Bis[(4-fenyl-1H-1,2,3-triazol-1-yl)methyl]benzenu

Huisgenova 1,3-dipolární cykloadice byla rovněž úspěšně využita pro spojení dvou typů polymerů - poly(methyl-metakrylátu) s poly(ethylenglykolem). (Schéma 11)<sup>58</sup>

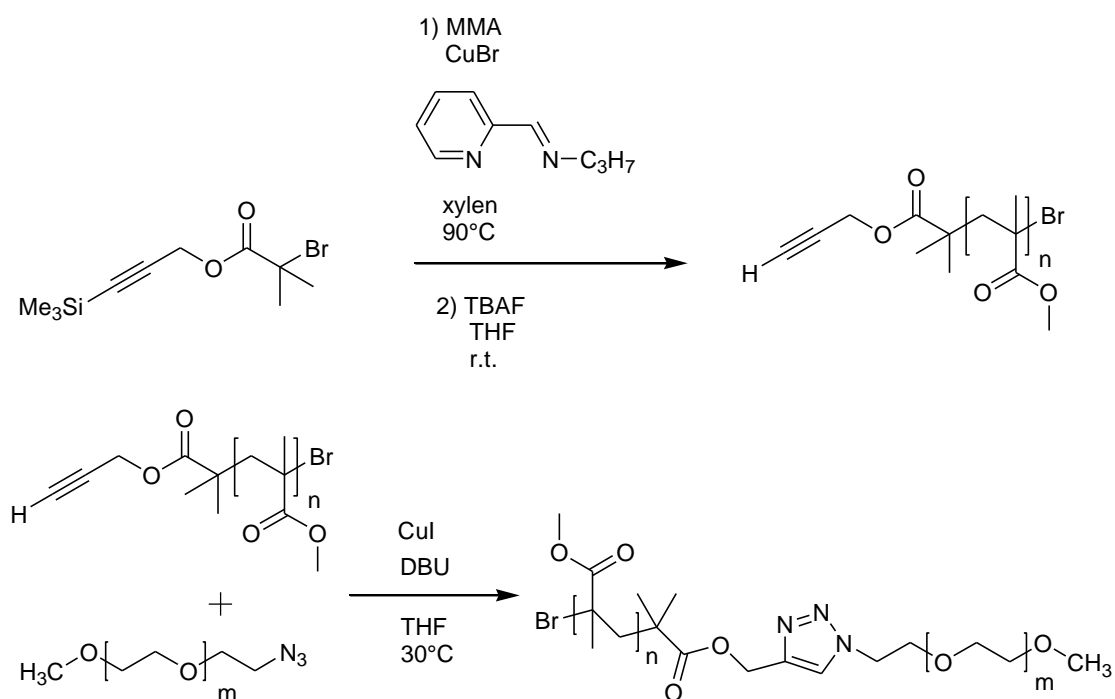


Schéma 11 - PMMA-triazol-PEG

Jiným příkladem Huisgenovy cykloadice, ve které je jednou z výchozích komponent poly(ethylenglykol), může být navázání ligninu na polyethylenglykol prostřednictvím triazolového cyklu. (Schéma 12)<sup>52</sup>

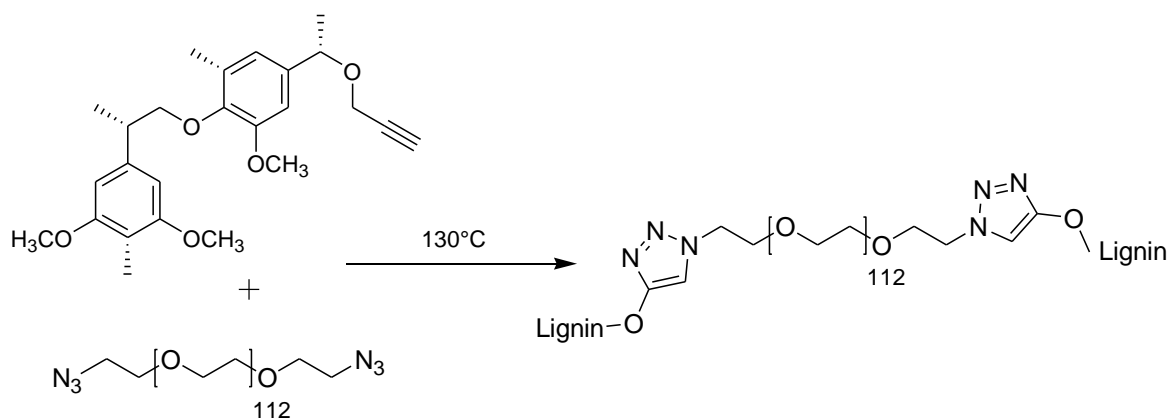
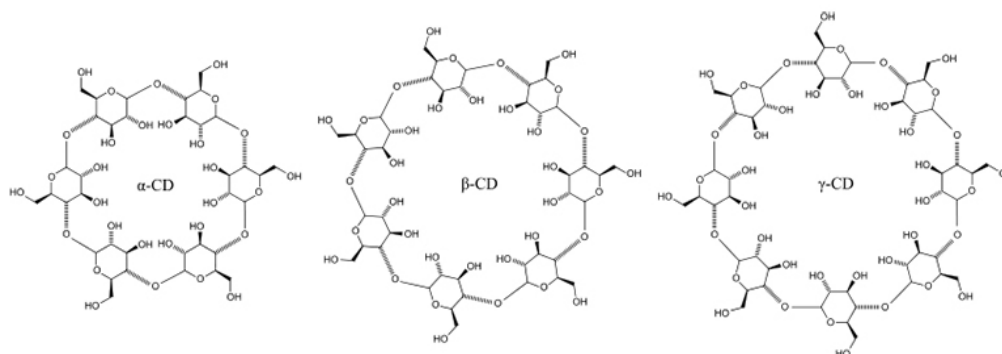


Schéma 12 - Navázání ligninu na polyethylenglykol s využitím Huisgenovy cykloadice

## 1.6 Cyklodextriny

Cyklodextriny jsou cyklické látky, patřící do skupiny oligosacharidů. Skládají se z  $\alpha$ -1,4- spojených D-glukopyranosových jednotek. Nejčastěji se lze setkat se 3 typy cyklodextrinů, a to  $\alpha$ -,  $\beta$ - a  $\gamma$ -.  $\alpha$ -Cyklodextrin se skládá z 6 glukopyranosových jednotek,  $\beta$ -cyklodextrin z 7 jednotek a  $\gamma$ -cyklodextrin z 8 jednotek (Obrázek 11).<sup>59</sup>



Obrázek 11 – Cyklodextriny

### 1.6.1 Inkluzní sloučeniny

Cyklodextriny jsou díky své biadaptabilitě využívány ve farmacii pro tvorbu řady inkluzních sloučenin, a to jak s organickými, tak i s anorganickými látkami.<sup>59</sup> Inkluzní sloučeninou rozumíme inkludování organické, nebo anorganické molekuly do kavity cyklodextrinu. Tvarem připomíná makrocyklus  $\alpha$ -,  $\beta$ - a  $\gamma$ -cyklodextrinů dutý kužel, na jehož vnějším okraji se nacházejí sekundární hydroxylové skupiny a vnitřní

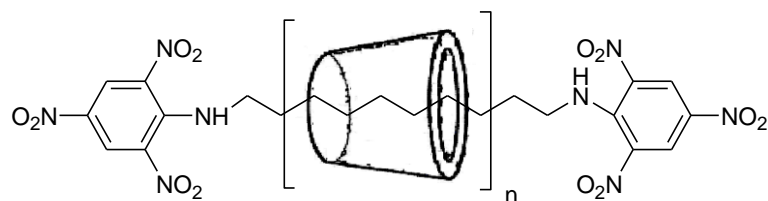
okraj je obklopen primárními hydroxyly. Díky tomu je vnější část kavity hydrofilní, zatímco vnitřní část, kam jsou orientovány etherické kyslíky O4 a vodíky H3, H5 a H6, je lipofilního charakteru.<sup>60</sup> Velikost kavity je různá pro různé typy cyklodextrinů (5,2–5,7 Å pro  $\alpha$ -, 6,4–7,8 Å pro  $\beta$ - a 7,5–9,5 Å pro  $\gamma$ -).<sup>61</sup> Stechiometrie vzniklých komplexů závisí na velikosti kavity a charakteru inkludované látky. Mohou existovat komplexy s různou stechiometrií, které se v roztoku vyskytují v rovnováze. Hnací silou tvorby komplexů je enthalpický zisk. Z literatury je znám hlavně „neklasický“ hydrofobní efekt, který spočívá v uvolnění energie spojené s přechodem nepolární inkludované molekuly z polárního vodného prostředí do méně polární kavity cyklodextrinu. Inkludovaná látka je v makrocyklu stabilizována van der Waalsovými, disperzními nebo vodíkovými vazbami. Orientace inkludované látky v kavitě se dá v roztoku nejčastěji zjistit detekcí dipolárních interakcí pomocí vhodné NMR techniky, např. 2D ROESY.<sup>60</sup> Inkluzní sloučeniny tvořené cyklodextriny a léčivem mají potenciál pronikat přes lipofilní biologické membrány a takto umožňovat pronikání léčiva do buňky.<sup>59,62</sup>  $\alpha$ -Cyklodextrin je možno využít pro vytvoření inkluzních sloučenin konjugátů s poly(ethylenglykolovým) řetězcem, na který se  $\alpha$ -cyklodextrin samovolně navléká. Tím dochází ke vzniku tzv. polypseudorotaxanů, z nichž se může  $\alpha$ -cyklodextrin zase vyvlékat po rozpuštění ve vodě. Poly(ethylenglykol) s navázaným  $\alpha$ -cyklodextrinem lze využít jako nosič pro různé typy léčiv, které jsou samy o sobě ve vodě nerozpustné.<sup>62</sup>

### 1.6.2 Polypseudorotaxany

Jako polyrotaxany jsou označovány takové inkluzní sloučeniny, které se skládají z makrocyklů navlečených nejčastěji na lineární polymer. Ten má na každém konci navázané 2 objemné molekuly, které znemožňují „vyvléčení“ makrocyklu z polymerního řetězce. Polyrotaxan je proto za standardních podmínek stabilní. Polypseudorotaxan se od polyrotaxanu liší v tom, že molekuly navázané na koncích lineárního polymeru jsou dostatečně malé, a proto může docházet k vyvlékání makrocyklů z polymerního řetězce.<sup>63</sup>

Příkladem vzniku polypseudorotaxanu může být například reakce per(2,3,6-tri-*O*-methyl)- $\alpha$ -cyklodextrinu s 1,12-diaminododekanem vedoucí ke vzniku příslušné inkluzní sloučeniny. Její následná reakce se dvěma ekvivalenty 2,4,6-trinitrobenzensulfonátu poskytla stabilní polyrotaxan (Obrázek 12).<sup>63</sup>

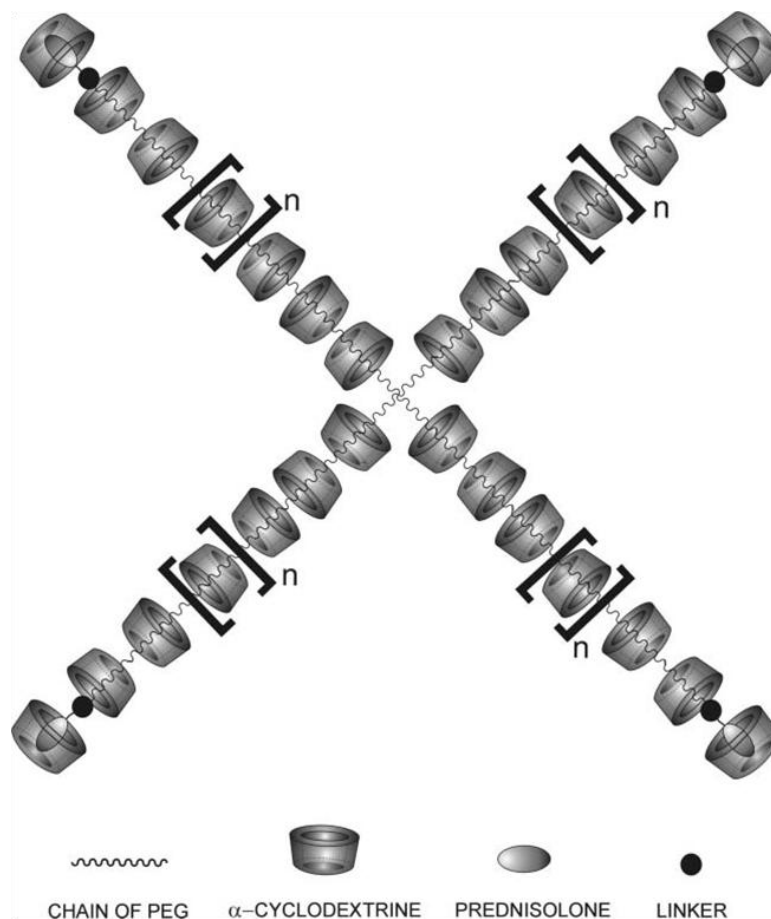




Obrázek 12 – Příklad polyrotaxanu

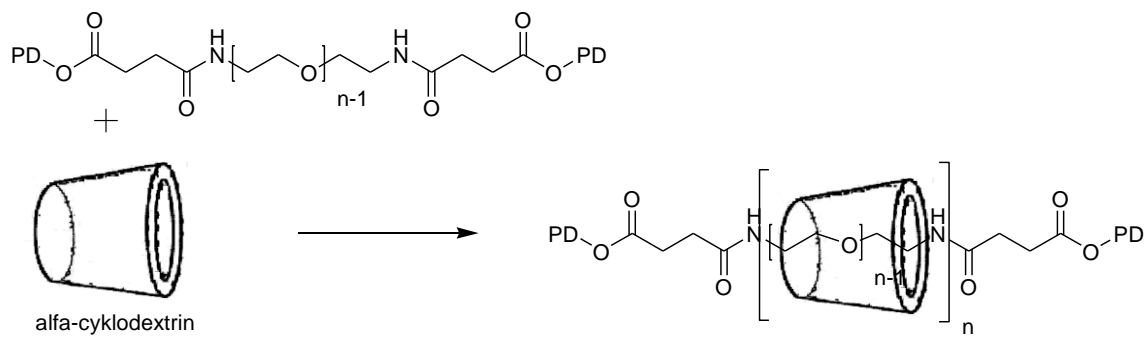
### 1.6.3. Konjugáty prednisolonu s poly(ethylenglykolem) a jejich inkluzní sloučeniny s $\alpha$ -cyklodextrinem

Na Ústavu organické chemie a technologie UPa byly v minulosti studovány konjugáty prednisolonu s poly(ethylenglykolem) a jejich inkluzní sloučeniny.<sup>1,2</sup> První studie se věnovala tvorbě konjugátů prednisolonu vázaného esterovou vazbou na rozvětvený tzv. star poly(ethylenglykol) ( $M = 20\,000\text{ g/mol}$ ) pomocí dikarboxylových kyselin (jantarové, glutarové aj.). Následně byla zkoumána možnost kyselá hydrolyzy vzniklé esterové vazby v závislosti na molekulové hmotnosti poly(ethylenglykolu) a také v závislosti na délce řetězce dikarboxylové kyseliny. Ve studii byly připraveny inkluzní sloučeniny (polypseudorotaxany) příslušných konjugátů s  $\alpha$ -cyklodextrinem a následně byl zkoumán vliv  $\alpha$ -cyklodextrinu na rychlost kyselá katalyzované hydrolyzy esterové vazby mezi prednisolonem a polyethylenglykolem, respektive prednisolonem a dikarboxylovou kyselinou. Připravené polypseudorotaxany byly charakterizovány pomocí spektroskopických metod, jako je 2D NOESY NMR spektroskopie, práškové rentgenové difrakce a také pomocí metody STM mikroskopie. 2D NOESY NMR spektroskopii byla zjištěna ne vazebná interakce mezi molekulami  $\alpha$ -cyklodextrinu a řetězcem poly(ethylenglykolu), což potvrzovalo navázání jednotek  $\alpha$ -cyklodextrinu na poly(ethylenglykovový) řetězec konjugátu, ačkoli byl vlastní polymerní řetězec z každé strany blokován objemnou molekulou prednisolonu. (Obrázek 13)<sup>1</sup>



**Obrázek 13** - Struktura polypseudorotaxanu Prednisolon-linker-poly(ethylenglykol)

Druhá studie provedená v rámci mé bakalářské práce<sup>2</sup> se zabývala možností vázání  $\alpha$ -cyklodextrinu na konjugát tvořený prednisolonem a poly(ethylenglykolem) s nižší molekulovou hmotností (600 g/mol). Nižší molekulová hmotnost použitého poly(ethylenglykolu) vedla k nižšímu počtu navázaných jednotek  $\alpha$ -cyklodextrinu, a tedy vyššímu poměru prednisolon/ $\alpha$ -cyklodextrin v inkluzní sloučenině. Tento poměr tak mohl být pomocí NMR spektroskopie přesněji určen. Vlastní konjugát prednisolonu a poly(ethylenglykolu) obsahoval jantarovou kyselinu jako tzv. linker (Obrázek 14). Z něj připravená inkluzní sloučenina byla charakterizována pomocí NMR spektroskopie, konkrétně 2D NOESY NMR spektroskopie. Nevazebná interakce mezi molekulou  $\alpha$ -cyklodextrinu a poly(ethylenglykolu) nebyla touto metodou zcela jednoznačně prokázána, což však nevylučovalo existenci inkluzní sloučeniny.<sup>2</sup>

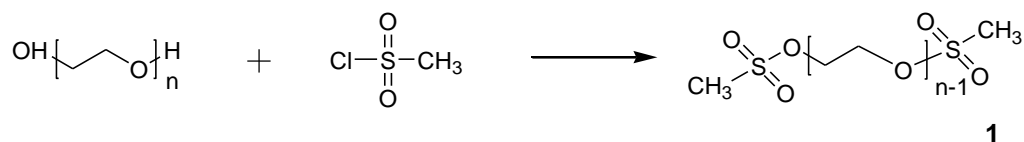


**Obrázek 14** - Schéma přípravy konjugátu poly(ethylenglykol)-amidu jantarové kyseliny-prednisolonu

## 2. Experimentální část

V případě magnetického míchání byla použita magnetická míchačka *Heidolph*. Zahřívání bylo realizováno pomocí nástavce z kovové slitiny tvarované na kulaté destilační baňky *Heidolph DrySyn*, teplota byla nastavována a kontrolována pomocí digitálního teplotního snímače. Pro flash-chromatografii byl využit silikagel 60 (230–400 mesh). Odpařování bylo prováděno rotační vakuovou odparkou *Heidolph Laborata 4000 efficient* s vakuovým systémem *Vacuubrand PC 510*. NMR spektra byla měřena na spektrometru *Bruker Avance 400*, při teplotě 25 °C. Byly použity cca 5% roztoky látek. <sup>1</sup>H NMR spektra byla měřena při 400,13 MHz, jsou kalibrována na střed multipletu signálu rozpouštědel CDCl<sub>3</sub> (δ 7,26 ppm) nebo DMSO-*d*<sub>6</sub> (δ 2,50 ppm), v případě <sup>13</sup>C NMR spektra CDCl<sub>3</sub> (δ 77,23 ppm). Spin-spinové interakční konstanty (*J*) jsou uvedeny v jednotkách hertz (Hz), multiplicity signálů jsou značeny: s (singlet), bs (široký singlet), d (dublet), t (triplet), sp (septet), m (multiplet). Elementární analýza byla stanovena na přístroji *Flash 2000 CHNS Analyzer*. High-resolution hmotnostní spektra byla pořízena na přístroji *Thermo Scientific MALDI LTQ Orbitrap*. Centrifugace byla prováděna na centrifuze Eppendorf Centrifuge 5702. Spektra v infračervené oblasti byla měřena na přístroji FT-IR Nicolet iS50, technikou zeslabené úplné reflektance (ATR) na jednodrazovém diamantovém krystalu, ve střední infračervené oblasti, v rozsahu vlnočtů 4000–400 cm<sup>-1</sup> se spektrálním rozlišením 4 cm<sup>-1</sup>. Oblast absorpce diamantového krystalu (1900–2400 cm<sup>-1</sup>) byla, v případě absence charakteristických pásů v této oblasti, ze spekter odstraněna.

### 2.1 Příprava α,ω-bis(methansulfonyl)poly(ethylenglykolu) (1)

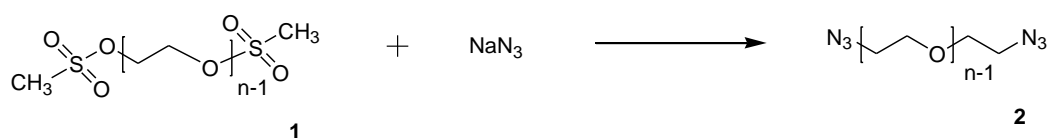


Do 250 ml kulaté baňky opatřené magnetickým míchadlem bylo předloženo 20 g (9,76 mmol) poly(ethylenglykolu) o molekulové hmotnosti 2050 g/mol. Na baňku byl nasazen Mi-So nástavec se 14 NZ zátkou a 100 ml kulatou baňkou jako předlohou a chladič opatřený 29 NZ kohoutem. Poté bylo přes Mi-So nástavec přidáno 100 ml toluenu. Toluenu byl oddestilován, čímž došlo k azeotropickému odstranění vlhkosti

přítomné v poly(ethylenglykolu). Ke zbytku bylo přidáno dalších 50 ml toluenu a destilace se opakovala. Po oddestilování toluenu byla baňka spojena přímo se zpětným chladičem a bylo přidáno 50 ml (74 g; 640 mmol) methansulfonylchloridu. Vzniklý čirý roztok byl zahříván na teplotu 60 °C po dobu 4 dní. Přebytný methansulfonylchlorid byl vakuově oddestilován s použitím Mi-So nástavce (62 °C/16 Torr). Ke zbytku bylo přidáno 30 ml toluenu, který byl opět vakuově oddestilován (došlo k odstranění zbytkového methansulfonylchloridu, který byl poté zlikvidován v digestoři opatrným smícháním s ethanolem a následným přidáním vodného amoniaku). Po odstranění methansulfonylchloridu byla látka převedena do 500 ml etheru, kde došlo k jejímu vysrážení. Následně byla suspenze zfiltrována přes fritu S3, promyta 5× 30 ml etheru a sraženina vysušena ve vakuové sušárně. Bylo získáno 18,6 g sloučeniny **1** jako nažloutlé sraženiny, což odpovídá 86% výtěžku.

**<sup>1</sup>H NMR (CDCl<sub>3</sub>, 400 MHz, ppm):** δ 4,32 (m, 4H, CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>SO<sub>2</sub>Me); 3,71 (m, 4H, CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>SO<sub>2</sub>Me); 3,59 (m, 180H, CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>O); 3,03 (s, 6H, CH<sub>3</sub>SO<sub>2</sub>).

## 2.2 Příprava α,ω-diazido-poly(ethylenglykolu) (2)



Do 250 ml kulaté baňky opatřené magnetickým míchadlem bylo předloženo 18,6 g (8,5 mmol) α,ω-bis(methansulfonyl)poly(ethylenglykolu) (**1**). Na baňku byl nasazen Mi-So nástavec se 14 NZ zátkou a 250 ml kulatou baňkou jako předlohou a chladič opatřený 29 NZ kohoutem. Poté bylo přes Mi-So nástavec přidáno 100 ml toluenu. Toluén byl oddestilován, čímž došlo k azeotropickému odstranění vlhkosti obsažené v α,ω-bis(methansulfonyl)poly(ethylenglykolu). Bylo přidáno 12,08 g (185 mmol) azidu sodného a 40 ml suchého DMF. Reakční směs byla míchána po dobu 2 dní při teplotě 60 °C. Poté byla směs ochlazena na laboratorní teplotu a bylo přidáno 150 ml CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> a směs byla převedena do 250 ml děličky. Ke směsi byl přidán roztok solanky (20 g soli + 100 ml H<sub>2</sub>O). Po oddělení organické fáze byla vodná fáze extrahována 5× 50 ml CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>. Extrakty byly spojeny a vysušeny bezvodým Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>. Organická rozpouštědla byla odstraněna za vakua a k destilačnímu zbytku bylo přidáno 100 ml etheru. Vysrážený produkt byl zfiltrován přes fritu S3 a promyt 5× 30 ml etheru.

Produkt byl vysušen ve vakuové sušárně. Bylo získáno 15,14 g sloučeniny **2** jako bílé pevné látky, což odpovídá 86% výtěžku.

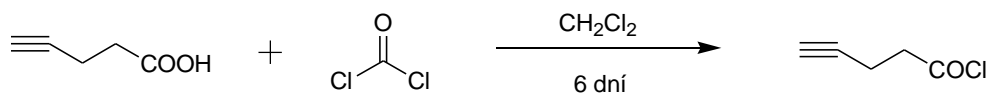
$^1\text{H NMR}$  ( $\text{CDCl}_3$ , 400 MHz, ppm):  $\delta$  3,64 (m, 180H,  $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O}$ ); 3,38 (t,  $^3J = 5,2$  Hz, 4H,  $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{N}_3$ ).

Elementární analýza pro  $\text{C}_{92}\text{H}_{184}\text{N}_6\text{O}_{46}$  (2108 g/mol): C 53,31; H 9,16; N 3,54

**FT-IR** (ATR,  $\text{cm}^{-1}$ ): 841, 946, 1059, 1146, 1239, 1278, 1340, 1359, 1412, 1454, 1466, 1979, 2101, 2740, 2859, 2882

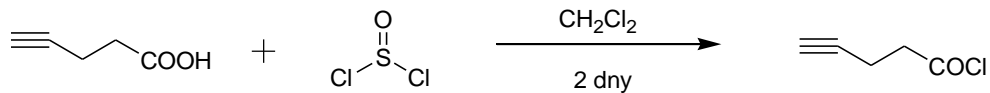
### 2.3 Příprava chloridu kyseliny pent-4-ynové (**3**)

#### Pokus 1



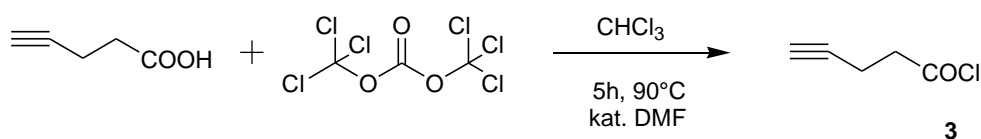
Do 10 ml kulaté baňky opatřené magnetickým míchadlem a chladičem s chlorkalciovou zátkou bylo předloženo 0,5 g (4,3 mmol) kyseliny pent-4-ynové a 5 ml směsi fosgen/ $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  (1/5) (10 mmol). Směs byla refluxována po dobu 6 dní. Poté bylo ke směsi přidáno 3 ml  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ , na baňku byl nasazen Mi-So nástavec se 14 NZ zátkou a rozpouštědlo bylo oddestilováno za atmosférického tlaku. K destilačnímu zbytku bylo přidáno dalších 5 ml  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  a destilace byla opakována. Bylo získáno 0,52 g destilačního zbytku jako krystalické látky s bodem tání 49–50 °C, což odpovídá výchozí kyselině pent-4-ynové, její bod tání je 48,6–50,3 °C

#### Pokus 2



Do 10 ml kulaté baňky opatřené magnetickým míchadlem a chladičem s chlorkalciovou zátkou bylo předloženo 0,5 g (4,3 mmol) kyseliny pent-4-ynové a 1,63 g thionylchloridu (13,7 mmol). Baňka byla umístěna do tmy a směs byla míchána po dobu 2 dnů. Poté byl na baňku nasazen Mi-So nástavec se 14 NZ zátkou a byla provedena destilace za atmosférického tlaku. Díky podobnému bodu varu chloridu kyseliny pent-4-ynové **3** a thionylchloridu došlo k oddestilování chloridu kyseliny pent-4-ynové společně s thionylchloridem.

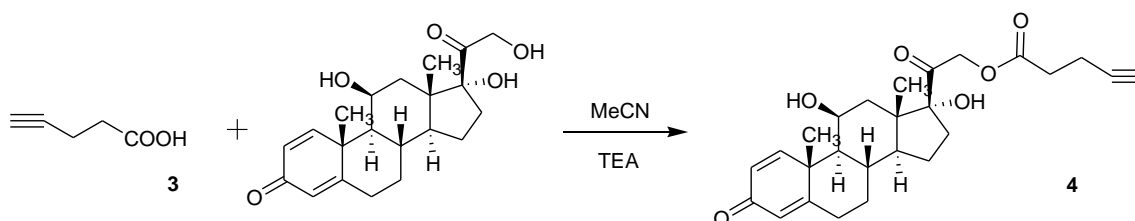
## Pokus 3



Do 50 ml kulaté baňky opatřené magnetickým míchadlem a chladičem s chlorkalciovou zátkou byl předložen 1 g (1 mmol) kyseliny pent-4-ynové, 3 g (1 mmol) trifosgenu, 5 ml suchého  $\text{CHCl}_3$  a jako katalyzátor 3 kapky DMF. Směs byla refluxována po dobu 5 hodin. Poté byly přidány 3 ml suchého etheru, na baňku byl nasazen Mi-So nástavec se 14 NZ zátkou a byla provedena destilace rozpouštědel za atmosferického tlaku. K destilačnímu zbytku bylo přidáno dalších 5 ml suchého etheru a destilace byla opakována. Výtěžek surového produktu **3** byl prakticky kvantitativní a činil 1,19 g.

$^1\text{H NMR}$  ( $\text{CDCl}_3$ , 400 MHz, ppm):  $\delta$  3,13 (t,  $^3J = 7,2$  Hz, 2H,  $\text{CH}_2\text{COCl}$ ); 2,56 (td,  $^3J = 7,2$  Hz,  $^4J = 2,8$  Hz, 2H,  $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{COCl}$ ); 2,04 (t,  $^4J = 2,8$  Hz, 1H, CH).  $^{13}\text{C NMR}$  ( $\text{CDCl}_3$ , 100 MHz, ppm):  $\delta$  172,4; 80,6; 70,5; 45,8; 14,9.

## 2.4 Příprava (prednisolon-21-yl)-pent-4-ynoátu (4)



Do 100 ml tříhrdlé kulaté baňky opatřené magnetickým míchadlem a 14 NZ zátkou bylo předloženo 2 g (5,5 mmol) prednisolonu, 20 ml suchého acetonitrilu a 0,9 ml (6,6 mmol) TEA. Pomocí přikapávací nálevky bylo do baňky přidáno 0,66 g (5,6 mmol) chloridu kyseliny pent-4-ynové (**3**) v 15 ml suchého acetonitrilu. Reakční směs byla poté míchána po dobu 3 dní při laboratorní teplotě. Pak byla směs (hnědá suspenze) převedena do 250 ml baňky a rozpouštědlo odpařeno na vakuové odparce. Destilační zbytek byl rozpuštěn v 20 ml směsi aceton/ethylacetát (1/2) a zfiltrován přes cca 1 cm vrstvu silikagelu na fritě S3. Silikagel byl promyt 500 ml směsi aceton/ethylacetát (1/2). Filtrát byl odpařen k suchu za vakua. Po vysušení bylo získáno 2,34 g žluté krystalické látky **4** což odpovídalo výtěžku 96 %. Sloučeninu **4** lze dle

potřeby čistit pomocí sloupcové chromatografie (silikagel – aceton/AcOEt (1/2)),  $R_f(\mathbf{4}) = 0,6$ .

$^1\text{H NMR}$  ( $\text{CDCl}_3$ , 400 MHz, ppm):  $\delta$  7,26 (d,  $^3J = 10$  Hz, 1H); 6,26 (dd,  $^3J = 10$  Hz,  $^4J = 1,6$  Hz, 1H); 6,00 (s, 1H); 5,03 (d,  $^2J = 17,6$  Hz, 1H); 4,90 (d,  $^2J = 17,6$  Hz, 1H); 4,48 (m, 1H); 2,76–2,68 (m, 3H); 2,58–2,50 (m, 3H); 2,47 (bs, 1H); 2,33 (dd,  $^2J = 12,4$  Hz,  $^3J = 3,2$  Hz, 1H); 2,14–2,06 (m, 3H); 1,99 (t,  $^3J = 2,8$  Hz, 1H); 1,82–1,63 (m, 4H); 1,52–1,42 (m, 5H); 1,18–1,05 (m, 2H); 0,97 (s, 3H).  $^{13}\text{C NMR}$  ( $\text{CDCl}_3$ , 100 MHz, ppm):  $\delta$  204,8; 186,8; 171,8; 170,4; 156,5; 128,0; 122,6; 89,9; 82,5; 70,4; 69,4; 68,3; 55,6; 51,6; 48,1; 44,3; 39,9; 34,9; 34,3; 33,2; 32,2; 31,4; 24,1; 21,3; 17,2; 14,5.

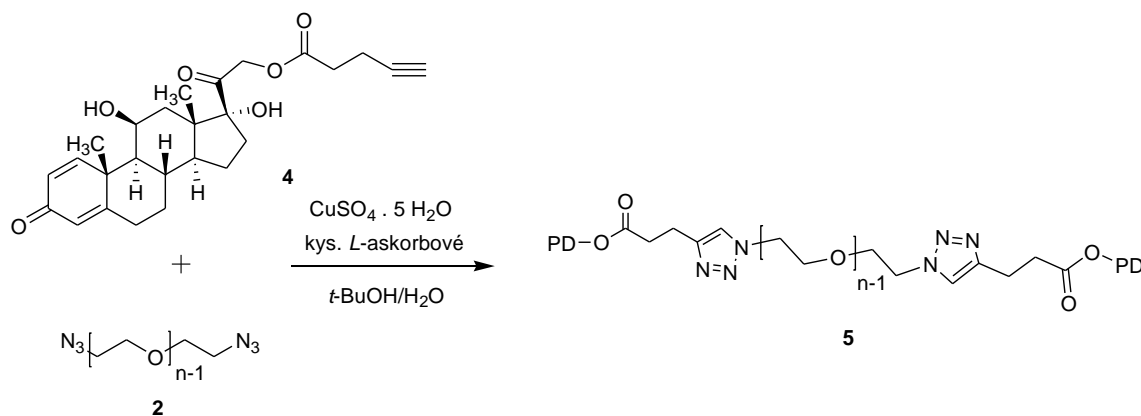
**HRMS (DHB):**  $m/z$  pro  $\text{C}_{26}\text{H}_{32}\text{O}_6\text{Na}$  vypočteno: 463,20911  $[\text{M}+\text{Na}]^+$ ; nalezeno: 463,20975.

Elementární analýza pro  $\text{C}_{26}\text{H}_{32}\text{O}_6$  (440,53 g/mol): C 68,75; H 7,26.

Bod tání: 172,9–177,3 °C.

**FT-IR (ATR,  $\text{cm}^{-1}$ ):** 649, 672, 813, 862, 1110, 1190, 1294, 1369, 1413, 1438, 1455, 1611, 1624, 1707, 1726, 2285, 2323, 2852, 2935, 2935, 2955, 3293, 3453

## 2.5 Příprava konjugátu (prednisolon-21-yl)-pent-4-ynoátu s $\alpha,\omega$ -diazido-poly(ethylenglykolem) (5)



Do 10 ml baňky opatřené magnetickým míchadlem bylo předloženo 423 mg (0,2 mmol)  $\alpha,\omega$ -diazido-poly(ethylenglykolu) (**2**), 220 mg (0,5 mmol) (prednisolon-21-yl)-pent-4-ynoátu (**4**), 19,9 mg (0,08 mmol)  $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$  a 14 mg (0,08 mmol) kyseliny L-askorbové. Jako rozpouštědlo bylo použito 5 ml směsi  $t\text{-BuOH}/\text{H}_2\text{O}$  (1/1). Reakce byla



zahřívána na teplotu 65 °C po dobu 48 hodin. Na začátku reakce měla směs oranžovo žlutou barvu. Po 8 h zahřívání změnila směs barvu na zelenou. Po 8 h bylo přidáno dalších 15 mg (0,08 mmol) kyseliny L-askorbové (změna barvy směsi ze zelené na oranžovou). Další množství kyseliny L-askorbové (2 mg) bylo přidáno do reakční směsi v 20 h intervalech. Po ukončení zahřívání byla směs (žlutá čirá kapalina) ochlazena na laboratorní teplotu, k reakční směsi bylo přidáno 15 ml CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> a 5 ml solanky (1 g NaCl + 5 ml vody) a organická fáze byla oddělena. Vodná fáze pak byla extrahována 6 × 20 ml CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>. Organické fáze byly spojeny a vysušeny bezvodým Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>. Organická rozpouštědla byla odpařena za vakua a k destilačnímu zbytku bylo přidáno 50 ml etheru. Vzniklá sraženina byla zfiltrována přes fritu S3 a surový konjugát byl rekrystalizován z 5 ml isopropylalkoholu. Rekrystalizovaný materiál byl na fritě promyt 5 × 20 ml etheru. Bylo získáno 0,5 g (98 %) žlutě zbarveného konjugátu **5**.

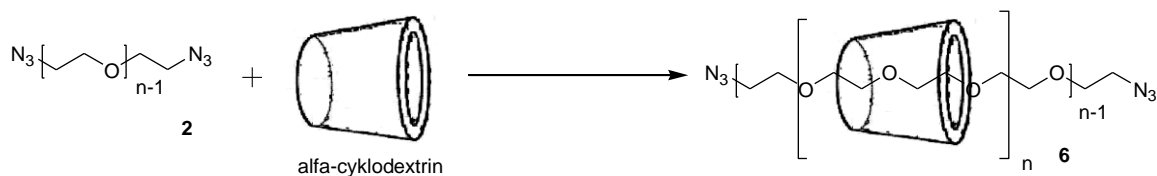
**<sup>1</sup>H NMR (CDCl<sub>3</sub>, 400 MHz, ppm):** δ 7,58 (bs, 2H), 7,26 (d, <sup>3</sup>J = 10,4 Hz, 2H); 6,21 (dd, <sup>3</sup>J = 10,4 Hz, <sup>4</sup>J = 1,6 Hz, 2H); 5,97 (s, 2H); 4,98 (d, <sup>2</sup>J = 17,6 Hz, 2H); 4,86 (d, <sup>2</sup>J = 17,6 Hz, 2H); 4,45 (m, 6H); 3,38–3,76 (m, 4H); 3,60 (m, 180H); 3,05 (m, 4H); 2,82 (m, 4H); 2,67 (m, 4H); 2,54 (m, 2H); 2,30 (m, 2H); 2,12–2,03 (m, 4H); 1,81–1,63 (m, 6H); 1,52–1,38 (m, 10H); 1,15–1,01 (m, 4H); 0,91 (s, 6H).

Elementární analýza pro C<sub>144</sub>H<sub>248</sub>N<sub>6</sub>O<sub>58</sub> (2988 g/mol): C 56,30; H 8,39; N 2,38.

**FT-IR (ATR, cm<sup>-1</sup>):** 841, 887, 960, 1059, 1145, 1240, 1279, 1342, 1411, 1614, 1657, 1722, 1743, 2740, 2881, 3424

## 2.6 Příprava inkluzních sloučenin (polypseudorotaxanů)

### 2.6.1 Polypseudorotaxan α-cyklohextrin-α,ω-diazidopoly(ethylenglykol) (**6**)



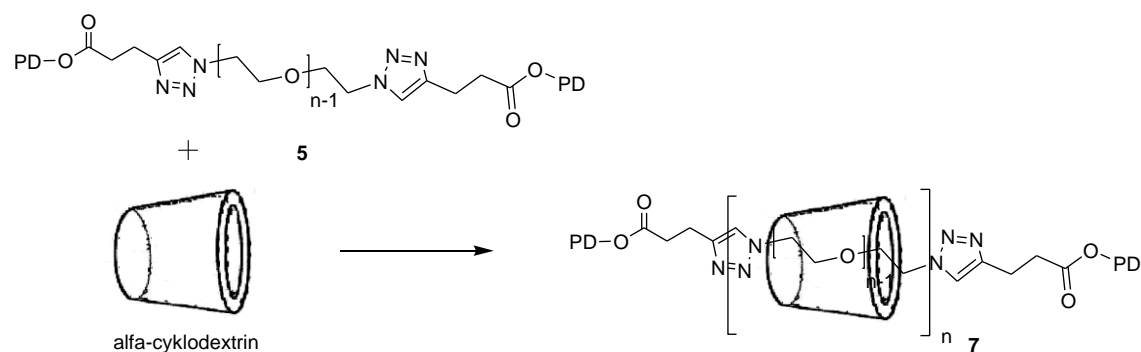
Do 50 ml baňky opatřené magnetickým míchadlem a zátkou bylo předloženo 889 mg (1 mmol) α-cyklohextrinu a 8 ml redestilované vody. Směs byla umístěna na 5 minut do ultrazvukové lázně. K čirému roztoku (jemná opalescence) bylo přidáno

50,2 mg (25  $\mu\text{mol}$ )  $\alpha,\omega$ -diazido-poly(ethylenglykolu) (**2**). Směs byla míchána při laboratorní teplotě po dobu 7 dní. Vzniklá suspenze byla pomocí 10 ml redestilované vody převedena do centrifugační baňky a byla provedena centrifugace při 3400 otáčkách za minutu po dobu 12 minut. Po centrifugaci byla vodná vrstva nad sraženinou odebrána pomocí stříkačky a následně bylo přidáno 10 ml redestilované vody. Byla provedena druhá centrifugace při 3400 otáčkách za minutu po dobu 10 minut. Vodní vrstva byla opět odebrána stříkačkou. Po dalším přidavku 10 ml redestilované vody a centrifugaci za stejných podmínek byla vodná vrstva odebrána a zbytek byl vysušen ve vakuové sušárně. Bylo získáno 0,42 g bílé krystalické látky **6**.

$^1\text{H NMR}$  (DMSO, 400 MHz, ppm):  $\delta$  5,52 (d,  $^3J = 7,2$  Hz, 108H); 5,44 (d,  $^3J = 2,4$  Hz, 108H); 4,79 (d,  $^3J = 3,2$  Hz, 108H); 4,51 (t,  $^3J = 5,6$  Hz, 108H); 3,76 (m, 108H); 3,67–3,59 (m, 324H); 3,59 (s, 180H); 3,38 (m, 108H); 3,26 (m, 108H).

Elementární analýza pro  $\text{C}_{740}\text{H}_{1264}\text{N}_6\text{O}_{586}$  (19604 g/mol): C 42,64; H 6,66; N 0,35.

### 2.6.2 Polypseudorotaxan $\alpha$ -cyklodextrin-konjugát (prednisolon-21-yl)-pent-4-ynoát s $\alpha,\omega$ -diazido-poly(ethylenglykolem) (**7**)



#### Pokus 1

Do 10 ml kulaté baňky opatřené magnetickým míchadlem a zátkou bylo předloženo 388,8 mg (0,4 mmol)  $\alpha$ -cyklodextrinu a 3,5 ml redestilované vody. Směs byla umístěna na 5 minut do ultrazvukové lázně. K čirému roztoku (jemná opalescence) bylo přidáno 30 mg (10  $\mu\text{mol}$ ) konjugátu (prednisolon-21-yl)-pent-4-ynoátu s  $\alpha,\omega$ -diazido-poly(ethylenglykolem) **5**. Reakční směs byla míchána při laboratorní teplotě po dobu 14 dní. Vzniklá bílá sraženina byla převedena pomocí 10 ml redestilované vody

do centrifugační baňky a byla provedena centrifugace při nastavení 3600 otáček za minutu po dobu 15 minut. Po centrifugaci byla vodná vrstva nad sraženinou odebrána pomocí stříkačky, následně bylo přidáno 10 ml redestilované vody a byla provedena druhá centrifugace s nastavením na 3600 otáček za minutu po dobu 12 minut. Po dekantaci a přidání dalších 10 ml redestilované vody byla třetí centrifugace provedena s nastavením 3600 otáček za minutu po dobu 10 minut. Po odebrání vodné vrstvy byla látka vysušena ve vakuové sušárně. Bylo získáno 25 mg nažloutlé krystalické látky **7**.

**<sup>1</sup>H NMR (DMSO, 400 MHz, ppm):**  $\delta$  7,85 (bs, 1H), 7,31 (d,  $^3J = 10,0$  Hz, 1H); 6,16 (d,  $^3J = 10,0$  Hz, 1H); 5,91 (s, 1H); 5,52 (d,  $^2J = 7,0$  Hz, 96H); 5,44 (d,  $^3J = 2,4$  Hz, 96H); 4,79 (d,  $^3J = 3,0$  Hz, 96H); 4,50 (t,  $^3J = 5,6$  Hz, 96H); 3,76 (m, 96H); 3,65–3,56 (m, 288H); 3,50 (s, 180H); 3,44–3,38 (m, 96H); 3,27 (m, 96H); 2,91 (m, 3H); 2,81 (m, 2H); 2,75 (m, 2H); 2,54 (m, 1H); 2,31 (m, 2H); 2,02 (m, 2H); 1,87 (m, 2H); 1,65 (m, 2H); 1,42 (m, 1H); 1,38 (s, 3H); 1,28 (m, 2H); 1,21 (m, 1H); 0,86 (m, 2H); 0,78 (s, 3H).

### Pokus 2

Do 10 ml kulaté baňky opatřené magnetickým míchadlem a zátkou bylo předloženo 388,8 mg (0,4 mmol)  $\alpha$ -cyklodextrinu a 3,5 ml redestilované vody. Směs byla umístěna na 5 minut do ultrazvukové lázně. K čirému roztoku (jemná opalescence) bylo přidáno 30 mg (10  $\mu$ mol) konjugátu (prednisolon-21-yl)-pent-4-ynoátu s  $\alpha,\omega$ -diazido-poly(ethylenglykolem) **5**. Reakční směs byla zahřívána pod vzdušným chladičem na teplotu 70 °C po dobu 14 dní. Vzniklá bílá sraženina byla převedena pomocí 10 ml redestilované vody do centrifugační baňky a byla provedena centrifugace při nastavení 3600 otáček za minutu po dobu 15 minut. Po centrifugaci byla vodná vrstva nad sraženinou odebrána pomocí stříkačky, následně bylo přidáno 10 ml redestilované vody a byla provedena druhá centrifugace s nastavením na 3600 otáček za minutu po dobu 12 minut. Po dekantaci a přidání dalších 10 ml redestilované vody byla třetí centrifugace provedena s nastavením 3600 otáček za minutu po dobu 10 minut. Po odebrání vodné vrstvy byla látka vysušena ve vakuové sušárně. Bylo získáno 23,5 mg nažloutlé krystalické látky **7**.

**<sup>1</sup>H NMR (DMSO, 400 MHz, ppm):**  $\delta$  7,85 (bs, 1H), 7,31 (d,  $^3J = 10,0$  Hz, 1H); 6,15 (d,  $^3J = 10,0$  Hz, 1H); 5,91 (s, 1H); 5,52 (d,  $^2J = 7,0$  Hz, 102H); 5,44 (d,  $^3J = 2,4$  Hz, 102H); 4,79 (d,  $^3J = 3,0$  Hz, 102H); 4,50 (t,  $^3J = 5,5$  Hz, 102H); 3,76 (m, 102H); 3,66–3,56 (m, 306H); 3,50 (s, 180H); 3,42–3,38 (m, 102H); 3,27 (m, 102H); 2,91 (m, 3H); 2,82 (m, 2H); 2,75 (m, 2H); 2,54 (m, 1H); 2,33 (m, 2H); 2,02 (m, 2H); 1,89 (m, 2H);

1,65 (m, 2H); 1,42 (m, 1H); 1,38 (s, 3H); 1,28 (m, 2H); 1,23 (m, 1H); 0,86 (m, 2H); 0,78 (s, 3H).

### Pokus 3

Do 10 ml kulaté baňky opatřené magnetickým míchadlem a zátkou bylo předloženo 388,8 mg (0,4 mmol)  $\alpha$ -cyklodextrinu a 3,5 ml redestilované vody. Směs byla umístěna na 5 minut do ultrazvukové lázně. K čirému roztoku (jemná opalescence) bylo přidáno 30 mg (10  $\mu$ mol) konjugátu (prednisolon-21-yl)-pent-4-ynoátu s  $\alpha,\omega$ -diazido-poly(ethylenglykolem) **5** a 16,9 mg (0,4 mmol) LiCl jako katalyzátoru. Reakční směs byla zahřívána pod vzdušným chladičem na teplotu 70 °C po dobu 14 dní. Vzniklá bílá sraženina byla převedena pomocí 10 ml redestilované vody do centrifugační baňky a byla provedena centrifugace při nastavení 3600 otáček za minutu po dobu 15 minut. Po centrifugaci byla vodná vrstva nad sraženinou odebrána pomocí stříkačky, následně bylo přidáno 10 ml redestilované vody a byla provedena druhá centrifugace s nastavením na 3600 otáček za minutu po dobu 12 minut. Po dekantaci a přidání dalších 10 ml redestilované vody byla třetí centrifugace provedena s nastavením 3600 otáček za minutu po dobu 10 minut. Po odebrání vodné vrstvy byla látka vysušena ve vakuové sušárně. Bylo získáno 160 mg nažloutlé krystalické látky **7**.

**<sup>1</sup>H NMR (DMSO, 400 MHz, ppm):**  $\delta$  7,85 (bs, 1H), 7,31 (dd, <sup>3</sup>J = 10,1 Hz, 1H); 6,15 (d, <sup>3</sup>J = 10,1 Hz, <sup>4</sup>J = 1,6 Hz, 1H); 5,91 (s, 1H); 5,52 (d, <sup>2</sup>J = 7,0 Hz, 114H); 5,44 (d, <sup>3</sup>J = 2,2 Hz, 114H); 4,79 (d, <sup>3</sup>J = 2,8 Hz, 114H); 4,50 (t, <sup>3</sup>J = 5,5 Hz, 114H); 3,76 (m, 114H); 3,66–3,56 (m, 342H); 3,50 (s, 180H); 3,42–3,35 (m, 114H); 3,27 (m, 114H); 2,90 (m, 3H); 2,82 (m, 2H); 2,75 (m, 2H); 2,56 (m, 1H); 2,30 (m, 2H); 2,02 (m, 2H); 1,87 (m, 2H); 1,63 (m, 2H); 1,42 (m, 1H); 1,38 (s, 3H); 1,27 (m, 2H); 1,23 (m, 1H); 0,87 (m, 2H); 0,78 (s, 3H).

Elementární analýza pro C<sub>792</sub>H<sub>1328</sub>N<sub>6</sub>O<sub>598</sub> (20484 g/mol): C 42,76; H 6,76; N 0,26; Cl 1,49.

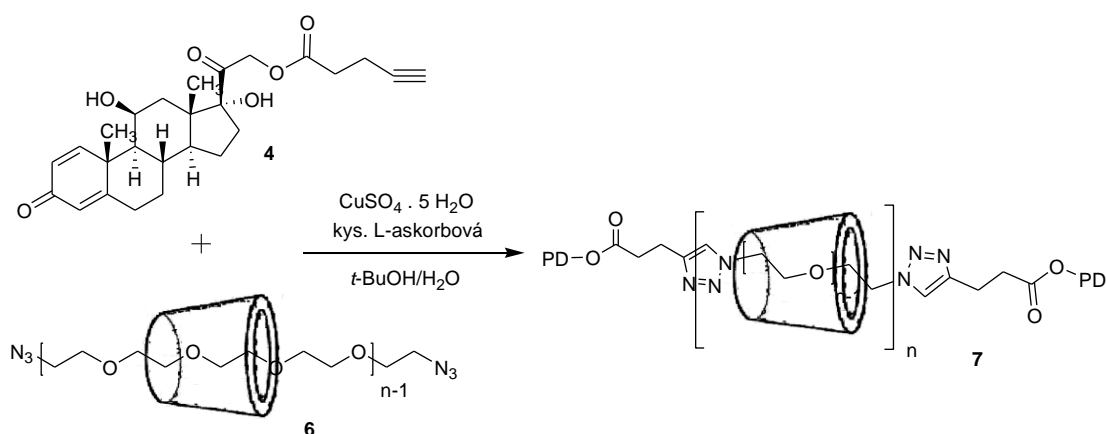
### Pokus 4

Do 10 ml kulaté baňky opatřené magnetickým míchadlem a zátkou bylo předloženo 388,8 mg (0,4 mmol)  $\alpha$ -cyklodextrinu a 3,5 ml redestilované vody. Směs byla umístěna na 5 minut do ultrazvukové lázně. K čirému roztoku (jemná opalescence) bylo přidáno 30 mg (10  $\mu$ mol) konjugátu (prednisolon-21-yl)-pent-4-ynoátu s  $\alpha,\omega$ -

diazido-poly(ethylenglykolem) **5** a 19,44 mg (20  $\mu\text{mol}$ )  $\beta$ -cyklodextrinu jako katalyzátoru. Reakční směs byla zahřívána pod vzdušným chladičem na teplotu 70 °C po dobu 14 dní. Vzniklá bílá sraženina byla převedena pomocí 10 ml redistilované vody do centrifugační baňky a byla provedena centrifugace při nastavení 3600 otáček za minutu po dobu 15 minut. Po centrifugaci byla vodná vrstva nad sraženinou odebrána pomocí stříkačky, následně bylo přidáno 10 ml redistilované vody a byla provedena druhá centrifugace s nastavením na 3600 otáček za minutu po dobu 12 minut. Po dekantaci a přidání dalších 10 ml redistilované vody byla třetí centrifugace provedena s nastavením 3600 otáček za minutu po dobu 10 minut. Po odebrání vodné vrstvy byla látka vysušena ve vakuové sušárně. Bylo získáno 45 mg nažloutlé krystalické látky **7**.

$^1\text{H NMR}$  (DMSO, 400 MHz, ppm):  $\delta$  7,85 (bs, 1H), 7,31 (dd,  $^3J = 10,1$  Hz, 1H); 6,15 (d,  $^3J = 10,1$  Hz,  $^4J = 1,6$  Hz, 1H); 5,91 (s, 1H); 5,52 (d,  $^2J = 7,0$  Hz, 114H); 5,44 (d,  $^3J = 2,2$  Hz, 114H); 4,79 (d,  $^3J = 2,8$  Hz, 114H); 4,50 (t,  $^3J = 5,5$  Hz, 114H); 3,76 (m, 114H); 3,66–3,56 (m, 342H); 3,50 (s, 180H); 3,42–3,35 (m, 114H); 3,27 (m, 114H); 2,90 (m, 3H); 2,82 (m, 2H); 2,75 (m, 2H); 2,56 (m, 1H); 2,30 (m, 2H); 2,02 (m, 2H); 1,87 (m, 2H); 1,63 (m, 2H); 1,42 (m, 1H); 1,38 (s, 3H); 1,27 (m, 2H); 1,23 (m, 1H); 0,87 (m, 2H); 0,78 (s, 3H).

### 2.6.3 Polypseudorotaxan $\alpha$ -cyklodextrin- $\alpha,\omega$ -diazido-poly(ethylenglykol)- (prednisolon-21-yl)-pent-4-ynoát



### Pokus 1

Do 10 ml kulaté baňky opatřené magnetickým míchadlem bylo předloženo 0,5 g (25,5  $\mu\text{mol}$ ) polypseudorotaxanu  $\alpha$ -cyklodextrin- $\alpha,\omega$ -diazido-poly(ethylenglykol) **6** a 5 ml DMSO. Směs byla umístěna na 5 minut do ultrazvukové lázně. K čirému roztoku (jemná opalescence) bylo přidáno 2,55 mg (10  $\mu\text{mol}$ )  $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$  a 2 mg (10  $\mu\text{mol}$ ) kyseliny L-askorbové. Po zahřátí směsi na 70 °C bylo přidáno 44,8 mg (64  $\mu\text{mol}$ ) (prednisolon-21-yl)-pent-4-ynoátu **4**. Reakční směs byla zahřívána pod vzdušným chladičem na teplotu 70 °C po dobu 7 dní. V průběhu reakce byla 2× přidána kyselina L-askorbová (2 mg), a to po 2, resp. 4 dnech. Reakční směs byla poté ochlazena na laboratorní teplotu, vzniklá bílá sraženina byla převedena pomocí 10 ml redestilované vody do centrifugační baňky a byla provedena centrifugace při nastavení 3600 otáček za minutu po dobu 12 minut. Po centrifugaci byla vodná vrstva nad sraženinou odebrána pomocí stříkačky, následně bylo přidáno 10 ml redestilované vody a byla provedena druhá centrifugace s nastavením na 3600 otáček za minutu po dobu 10 minut. Po dekantaci a přidání dalších 10 ml redestilované vody byla třetí centrifugace provedena s nastavením 3600 otáček za minutu po dobu 108 minut. Po odebrání vodné vrstvy byla látka vysušena ve vakuové sušárně. Bylo získáno 15,5 mg bílé krystalické látky, dle  $^1\text{H}$  NMR spektroskopie výchozí sloučeniny **4**.

**$^1\text{H}$  NMR (DMSO, 400 MHz, ppm):**  $\delta$  7,31 (d,  $^3J = 10,0$  Hz, 1H); 6,16 (dd,  $^3J = 10,0$  Hz,  $^4J = 1,6$  Hz, 1H); 5,91 (s, 1H); 5,42 (s, 1H); 5,09 (d,  $^2J = 17,2$  Hz, 1H); 4,77 (d,  $^2J = 17,2$  Hz, 1H); 4,74 (d,  $^3J = 4,0$  Hz, 1H); 4,28 (m, 1H); 2,84 (t,  $^3J = 2,8$  Hz, 1H); 2,61 (t,  $^3J = 7,2$  Hz, 2H); 2,42 (m, 2H); 2,29 (m, 1H); 2,03 (m, 2H); 1,99 (m, 1H); 1,63 (m, 3H); 1,43 (m, 1H); 1,39 (s, 3H); 1,30 (m, 1H); 1,01 (m, 1H); 0,89 (m, 2H); 0,78 (s, 3H).

### Pokus 2

Do 10 ml kulaté baňky opatřené magnetickým míchadlem bylo předloženo 0,5 g (25,5  $\mu\text{mol}$ ) polypseudorotaxanu  $\alpha$ -cyklodextrin- $\alpha,\omega$ -diazido-poly(ethylenglykol) **6** a 5 ml směsi *t*-BuOH/ $\text{H}_2\text{O}$  (1/1). Směs byla umístěna na 5 minut do ultrazvukové lázně. K čirému roztoku (jemná opalescence) bylo přidáno 2,55 mg (10  $\mu\text{mol}$ )  $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$  a 2 mg (10  $\mu\text{mol}$ ) kyseliny L-askorbové. Po zahřátí směsi na 70 °C bylo přidáno 44,8 mg (64  $\mu\text{mol}$ ) (prednisolon-21-yl)-pent-4-ynoátu **4**. Reakční směs byla zahřívána pod vzdušným chladičem na teplotu 70 °C po dobu 7 dní. V průběhu reakce byla 2× přidána kyselina L-askorbová (2 mg), a to po 2, resp. 4 dnech. Reakční směs byla

poté zahuštěna na vakuové odparce, ke zbytku bylo přidáno 5 ml redestilované vody a vzniklá sraženina byla zfiltrována přes fritu S3. Filtrační koláč byl promyt 3× 5 ml redestilované vody a vysušen ve vakuové sušárně. Pak byla sraženina suspendována v 10 ml diethyletheru, zfiltrována přes fritu S3 a promyta 3× 10 ml etheru. Po vysušení ve vakuové sušárně bylo získáno 410 mg bílé krystalické látky. Dle  $^1\text{H}$  NMR spektroskopie fyzikální směs výchozí sloučeniny **4** a  $\alpha$ -cyklodextrinu.

### Pokus 3

Do 10 ml kulaté baňky opatřené magnetickým míchadlem bylo předloženo 0,5 g (25,5  $\mu\text{mol}$ ) polypseudorotaxanu  $\alpha$ -cyklodextrin- $\alpha,\omega$ -diazido-poly(ethylenglykol) **6**, 2,5 ml *t*-BuOH a redestilované vody nasycené  $\alpha$ -cyklodextrinem (cca 0,5 g). Směs byla umístěna na 5 minut do ultrazvukové lázně. K suspenzi bylo přidáno 2,55 mg (10  $\mu\text{mol}$ )  $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$  a 2 mg (10  $\mu\text{mol}$ ) kyseliny L-askorbové. Po zahřátí směsi na 70 °C bylo přidáno 44,8 mg (64  $\mu\text{mol}$ ) (prednisolon-21-yl)-pent-4-ynoátu **4**. Reakční směs byla zahřívána pod vzdušným chladičem na teplotu 70 °C po dobu 7 dní. V průběhu reakce byla 2× přidána kyselina L-askorbová (2 mg), a to po 2 resp. 4 dnech. Reakční směs byla poté zahuštěna na vakuové odparce, ke zbytku bylo přidáno 5 ml redestilované vody a vzniklá sraženina byla zfiltrována přes fritu S3. Filtrační koláč byl promyt 3× 5 ml redestilované vody a vysušen ve vakuové sušárně. Pak byla sraženina suspendována v 10 ml diethyletheru, zfiltrována přes fritu S3 a promyta 3× 10 ml etheru. Po vysušení ve vakuové sušárně bylo získáno 260 mg bílé krystalické látky. Dle  $^1\text{H}$  NMR spektroskopie fyzikální směs inkluzní sloučeniny  $\alpha$ -cyklodextrinu a *t*-BuOH a polypseudorotaxanu **6**.

### 3. Výsledky a diskuze

#### 3.1 Zhodnocení přípravy konjugátu (prednisolon-21-yl)-pent-4-ynoátu s $\alpha,\omega$ -diazido-poly(ethylenglykolem) **5**

Jak již bylo uvedeno v Teoretické části (kap. 1.4), v současnosti je známo několik typů konjugátů prednisolonu s polymerním nosičem umožňujících cílené uvolňování tohoto léčiva.<sup>36-50</sup> V rámci této práce jsem připravil nový typ konjugátu, a to konjugát (prednisolon-21-yl)-pent-4-ynoátu s  $\alpha,\omega$ -diazido-poly(ethylenglykolem) **5**. Jeho příprava je založena na využití Huisgenovy 1,3-dipolární cykloadice mezi jednotlivými komponentami – (prednisolon-21-yl)-pent-4-ynoátem **4** a  $\alpha,\omega$ -diazido-poly(ethylenglykolem) **2** ( $M \sim 2\,000$  g/mol).

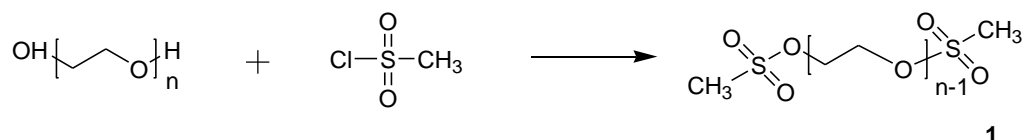
##### 3.1.1 Příprava $\alpha,\omega$ -diazido-poly(ethylenglykolu) **2**

Vlastní  $\alpha,\omega$ -diazido-poly(ethylenglykol) **2** jsem připravil dvoukrokovou syntézou z lineárního poly(ethylenglykolu). Tento polymer je běžně komerčně dostupný. Výběr derivátu o molekulové hmotnosti  $\sim 2\,000$  g/mol (cca 45 monomerních jednotek) spočíval ve faktu, že se jedná o poly(ethylenglykol), který je za laboratorní teploty pevnou látkou (nemá voskovitý charakter). Zároveň polymerní řetězec není příliš dlouhý s ohledem na zamýšlené studium přípravy a charakterizace z něj odvozených polypseudorotaxanů. Tzn. teoretický počet navlečených molekul  $\alpha$ -cyklodextrinu vůči dvěma koncovým molekulám prednisolonu by dosahoval příznivějšího poměru než tomu bylo v případě dříve studovaných polypseudorotaxanů odvozených od poly(ethylenglykolu) s molekulovou hmotností (5 000–20 000 g/mol).<sup>1</sup> To by se mělo projevit v přesnější interpretaci a vyhodnocení NMR spekter polypseudorotaxanů.

V prvním kroku jsem poly(ethylenglykol) převedl působením methansulfonylchloridu na  $\alpha,\omega$ -bis(methansulfonyl)poly(ethylenglykol) (**1**) (Schéma 13). Tento postup pro modifikaci poly(ethylenglykolu) na jeho reaktivní formu **1** je v literatuře dobře zdokumentován a byl využit dříve pro syntézu celé řady různých derivátů, například  $\alpha,\omega$ -diaminopoly(ethylenglykolů)<sup>64</sup> nebo  $\alpha,\omega$ -bis(4-karboxyfenyl)poly(ethylenglykolů).<sup>65</sup> Poly(ethylenglykol) je nutné před vlastní reakcí dobře vysušit, což se obvykle provádí azeotropickou destilací toluenového roztoku.

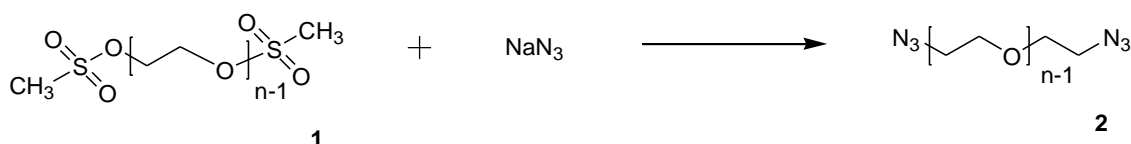


Methansulfonylchlorid jsem použil v přebytku (32 ekv. na každou hydroxylovou skupinu), sloužil tedy v reakční směsi rovněž jako rozpouštědlo. Díky použitému množství činidla došlo k úplné konverzi, což bylo potvrzeno  $^1\text{H}$  NMR spektroskopii surového produktu. Přebytkový methansulfonylchlorid jsem odstranil destilací a následným opakovaným srážením produktu **1** v etheru. Izolovaný výtěžek byl velmi vysoký a činil 86 %.



**Schéma 13** - Příprava  $\alpha,\omega$ -bis(methansulfonyl)poly(ethylenglykolu) (**1**)

Ve druhém kroku jsem provedl nukleofilní substituci koncových methansulfonylových skupin polymeru **1** azidem sodným rozpuštěným v DMF, což je polární aprotické rozpouštědlo, velmi vhodné pro tento typ reakce (Schéma 14). Azid jsem opět použil ve značném přebytku (cca 11 ekv.), aby došlo k úplné konverzi. Produkt **2** jsem izoloval extrakcí do  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  a přečistil jsem jej srážením v etheru. Výtěžek tohoto druhého kroku byl 86 %. Tímto způsobem jsem připravil cca 15 g  $\alpha,\omega$ -diazido-poly(ethylenglykolu) (**2**), což bylo dostatečné množství pro optimalizaci reakčních podmínek přípravy konjugátu **5**.



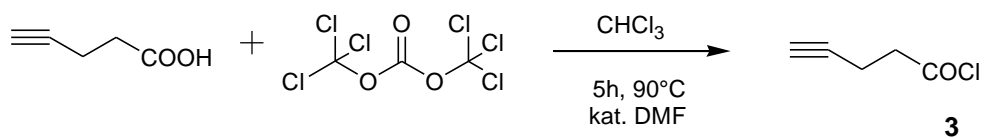
**Schéma 14** - Příprava  $\alpha,\omega$ -diazido-poly(ethylenglykolu) (**2**)

### 3.1.2 Příprava (prednisolon-21-yl)-pent-4-ynoátu **4**

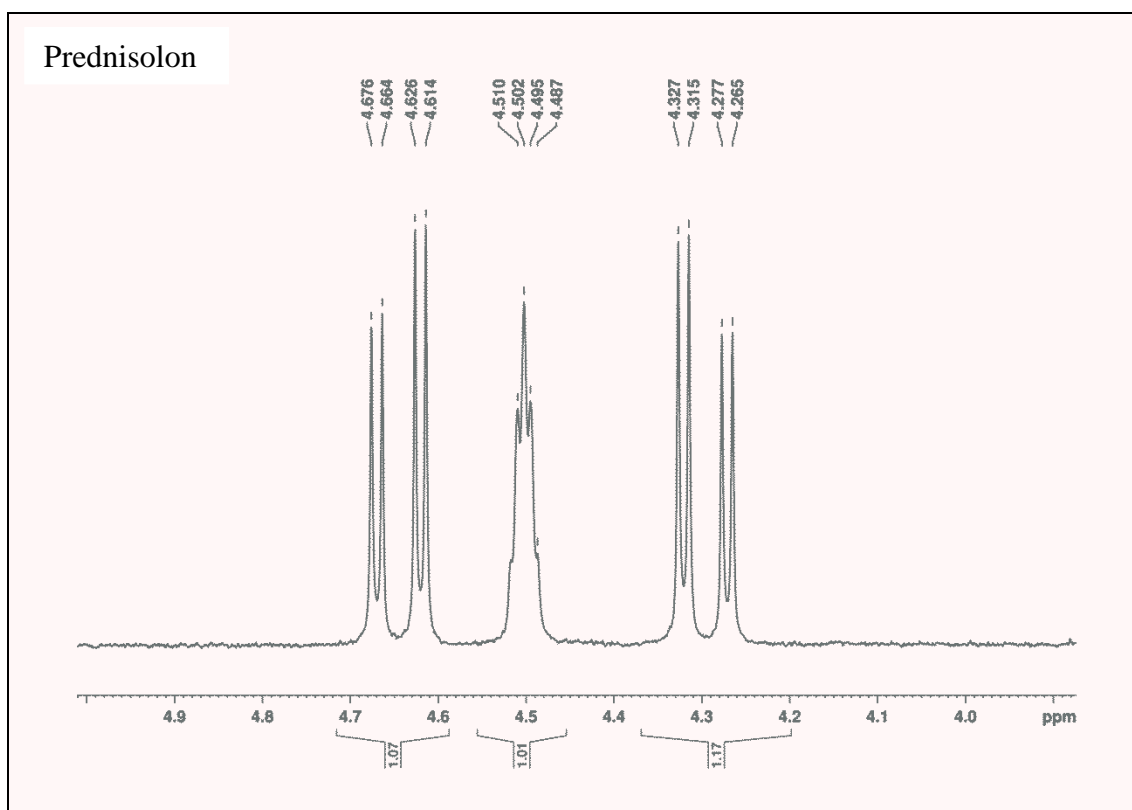
Přípravu (prednisolon-21-yl)-pent-4-ynoátu **4** jsem nejprve zkusil provést acylací prednisolonu komerčně dostupnou kyselinou pent-4-ynovou aktivovanou pomocí *N,N*-diisopropylkarbodiimidu. Tento způsob acylace však vedl ke směsi produktů, ze které se mi sloučeninu **4** nepodařilo izolovat. Rozhodl jsem se proto v dalším výzkumu využít jako acylační činidlo chlorid kyseliny pent-4-ynové **3**. Vlastní přípravu chloridu **3** jsem nejprve provedl působením thionylchloridu na kyselinou pent-4-ynovou. Samotná halogenace proběhla snadno, problém však nastal při separaci

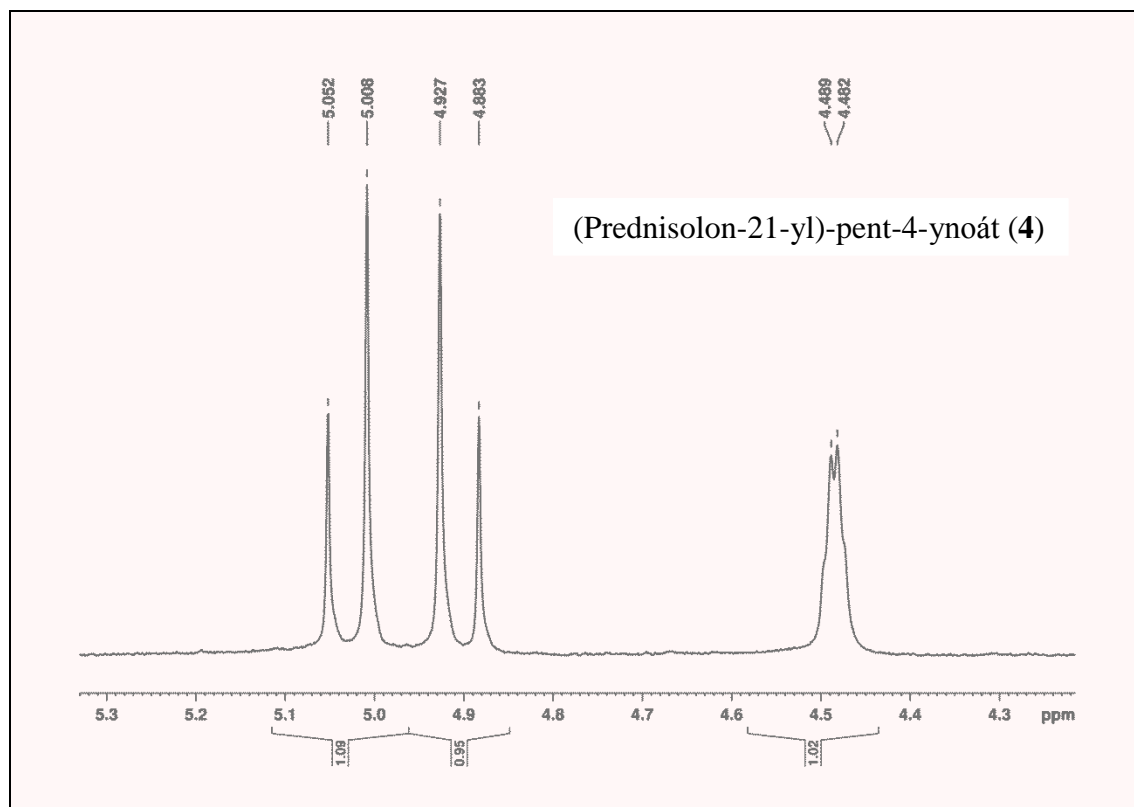
produktu **3** z činidla, které jsem použil v přebytku. Pent-4-ynoylchlorid **3** má totiž velmi podobný bod varu ( $46\text{--}48\text{ }^\circ\text{C}/2,5\text{ KPa}$ )<sup>66</sup> jako thionylchlorid, proto se mi nepodařilo tyto látky destilací od sebe oddělit. Zvolil jsem proto jiné činidlo, a to roztok fosgenu v  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  (20 % wt). Průběh reakce jsem monitoroval pomocí  $^1\text{H}$  NMR spektroskopie. Zjistil jsem, že reakce v tomto prostředí za laboratorní teploty probíhá velmi pomalu, po 13 dnech byla konverze jen cca 20%ní. Změnil jsem reakční podmínky, reakční směs byla zahřívána k refluxu. Ke zvýšení konverze však nedošlo, neboť veškerý fosgen vydestiloval z reakční směsi. V dalším pokusu jsem proto místo roztoku fosgenu použil pevný trifosgen a jako rozpouštědlo suchý chloroform. Refluxem reakční směsi byla pomocí  $^1\text{H}$  NMR spektroskopie zjištěna konverze: 7 dní – 25 %; 14 dní – 42 %. Urychlit reakci se mi podařilo katalýzou DMF (tři kapky), v tomto případě byla po 5 hodinách konverze prakticky 100 % (Schéma 15). Izolaci chloridu **3** jsem provedl snadno, a to oddestilováním rozpouštědla z reakční směsi. Výtěžek byl prakticky kvantitativní.

Následně jsem provedl acylaci prednisolonu jedním ekvivalentem chloridu kyseliny pent-4-ynové (**3**) v prostředí suchého acetonitrilu a za přítomnosti triethylaminu jako báze (Schéma 3). Ačkoli molekula prednisolonu obsahuje celkem tři hydroxylové skupiny, předpokládal jsem selektivní acylaci hydroxyly na uhlíku 21, neboť se jedná o primární hydroxylovou skupinu, která by měla být nejreaktivnější (vzhledem k sekundární hydroxylové skupině na uhlíku 11 a terciární hydroxylové skupině na uhlíku 17). Tento předpoklad se potvrdil, neboť jsem po ukončení reakce (24 h;  $25\text{ }^\circ\text{C}$ ) pomocí TLC a NMR spektroskopie identifikoval v reakční směsi pouze (prednisolon-21-yl)-pent-4-ynoát (**4**) a malé množství nereagovaného prednisolonu. Zjistil jsem, že tyto látky lze od sebe separovat pomocí sloupcové chromatografie na silikagelu za použití aceton/AcOEt (1/2) jako mobilní fáze. Sloučeninu **4** lze rovněž přečistit rekrystalizací ze směsi chloroform/AcOEt (1/1). V případě, kdy jsem použil chlorid **3** v nadbytku (cca 1,5 ekv.), došlo k úplné acylaci hydroxyly v pozici 21, avšak pozoroval jsem zároveň částečnou acylaci dalších hydroxylů prednisolonu. Tyto nežádoucí produkty obsahující dvě acylové skupiny se mi od sloučeniny **4** nepodařilo jak pomocí sloupcové chromatografie, tak i rekrystalizace oddělit, proto považuji použití pouze jednoho ekvivalentu činidla za optimální. Zvýšení konverze (96%) jsem dosáhl prodloužením reakční doby na 3 dny ( $25\text{ }^\circ\text{C}$ )

Schéma 15 - Příprava chloridu k. pent-4-ynové (**3**)

(Prednisolon-21-yl)-pent-4-ynoát (**4**) jsem charakterizoval bodem tání,  $^1\text{H}$  a  $^{13}\text{C}$  NMR spektroskopií, hmotnostní spektroskopií s vysokým rozlišením, infračervenou spektroskopií a čistotu jsem ověřil stanovením elementární analýzy. Na Obrázku 15 je část  $^1\text{H}$  NMR spektra, ve které je zřejmá změna chemického posunu ( $\delta$  5,03, resp. 4,90 ppm) a tvaru ( $2\times$  dublet) signálu skupiny  $-\text{COCH}_2\text{O}-$  sloučeniny **5** (ester) ve srovnání s výchozím prednisolonem: ( $\delta$  4,65, resp. 4,28 ppm) a tvar ( $2\times$  dublet dubletů) způsobený spin-spinovou interakcí s OH skupinou.

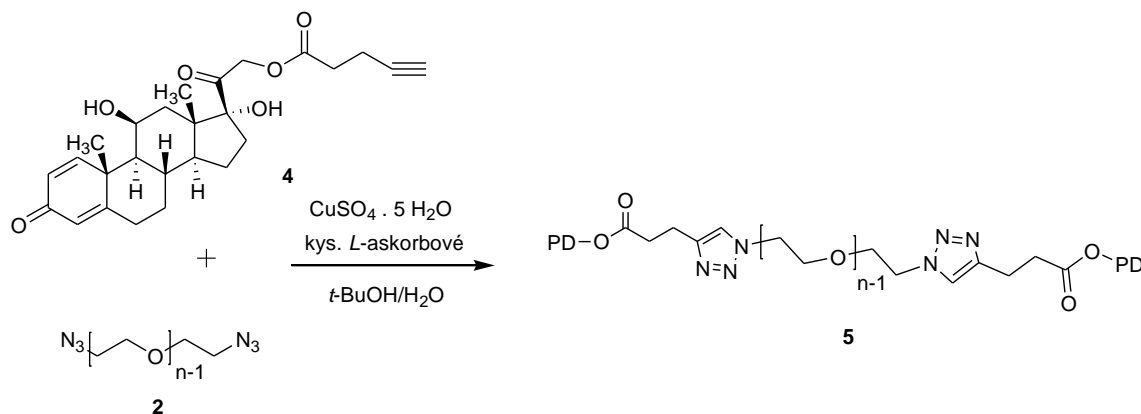




**Obrázek 15** - Výřez  $^1\text{H}$  NMR spektra prednisolonu a (prednisolon-21-yl)-pent-4-ynoátu  
(4)

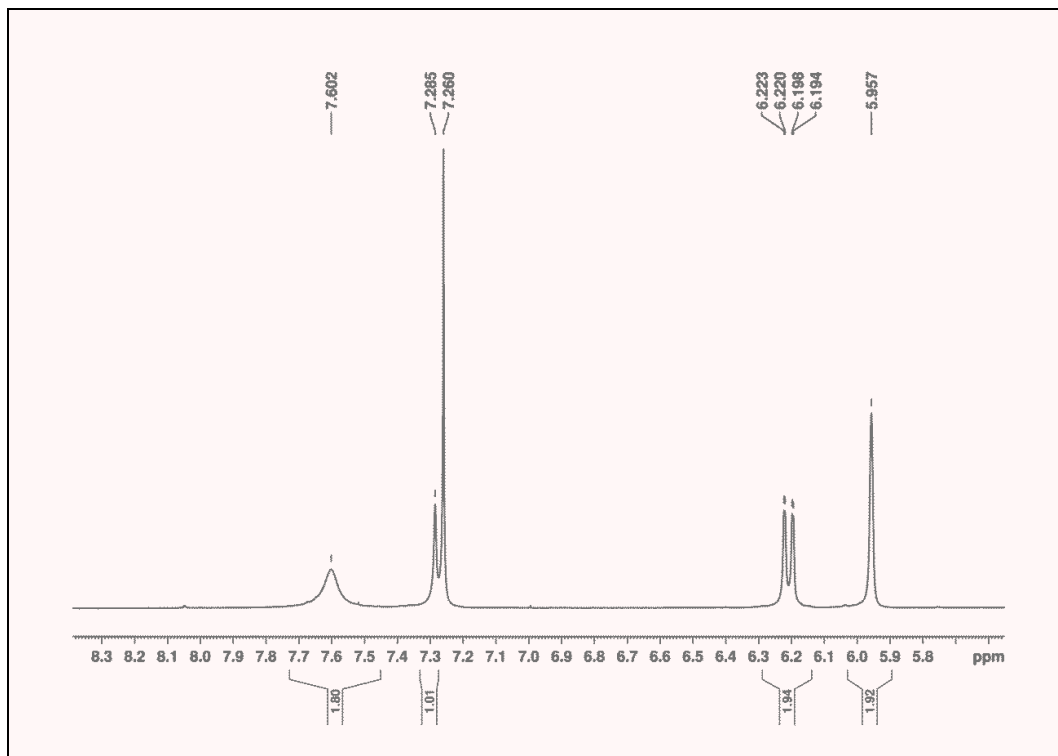
### 3.1.3 Huisgenova 1,3-dipolární cykloadice

Huisgenovu 1,3-dipolární cykloadici mezi (prednisolon-21-yl)-pent-4-ynoátem (4) a  $\alpha,\omega$ -diazido-poly(ethylenglykolem) (2) jsem studoval ve směsi rozpouštědel *t*-BuOH/H<sub>2</sub>O (1/1),<sup>56</sup> ve které jsou při reakční teplotě (65 °C) rozpustné jak výchozí organické látky, tak i měďná sůl. Reakce tedy probíhala v homogenním prostředí. Měďnou sůl jsem připravil *in situ* redukcí CuSO<sub>4</sub>·5H<sub>2</sub>O kyselinou L-askorbovou (Schéma 16).<sup>56</sup> Vzhledem k tomu, že během reakce docházelo k postupné reoxidaci měďných iontů (změna barvy reakční směsi ze žluté na zelenou), dávkoval jsem v 8 hodinových intervalech další kyselinu L-askorbovou. (Prednisolon-21-yl)-pent-4-ynoát (4) jsem použil v přebytku (1,25 ekv.), aby došlo k jeho navázání na obě azidové skupiny. Konjugát 5 spolu s přebytečným (prednisolon-21-yl)-pent-4-ynoátem (4) jsem izoloval z reakční směsi extrakcí do CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>. Následně jsem produkt 5 izoloval srážením etherem (výchozí (prednisolon-21-yl)-pent-4-ynoát (4) je v etheru rozpustný) a rekrystalizací z isopropylalkoholu. Výtěžek byl velmi vysoký, a to 98 %.

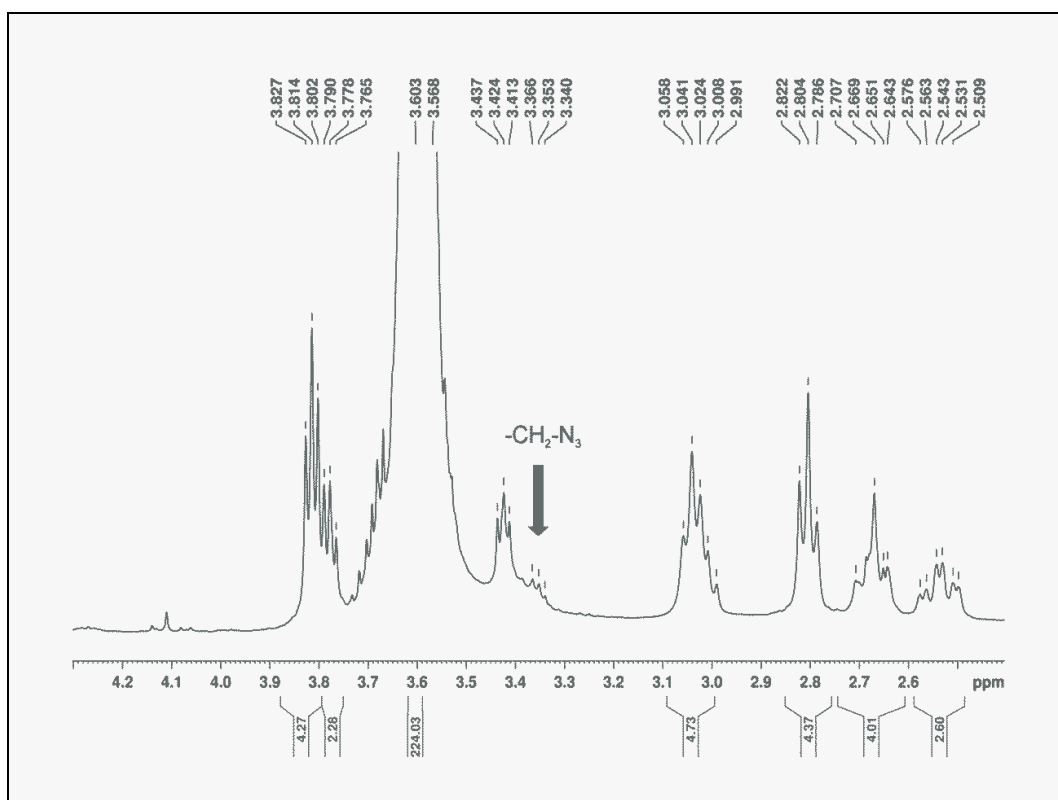


**Schéma 16** - Příprava konjugátu (prednisolon-21-yl)-pent-4-ynoátu s  $\alpha,\omega$ -diazido-poly(ethylenglykolem) (**5**)

Struktura konjugátu **5** byla potvrzena  $^1\text{H}$  NMR spektroskopií. Ve spektru (Obrázek 16) je zřejmý nový signál patřící 1,2,3-triazolovému cyklu ( $\delta$  7,60 ppm), který je relativně široký. Důvod rozšíření signálu nedokáží vysvětlit, nicméně bylo v literatuře<sup>67,68,69</sup> nalezeno mnoho případů 1,2,3-triazolových derivátů, jejichž aromatický =CH– signál byl rovněž poměrně široký. Dále je v  $^1\text{H}$  NMR spektru zřejmá změna chemického posunu  $\text{CH}_2$  skupiny vázané na triazol ( $\delta$  = 4,45 ppm), z původních  $\delta$  = 2,69 ppm patřící skupině  $\text{CH}_2\text{C}\equiv\text{C}$  sloučeniny **4**. Lze rovněž zaznamenat zánik signálu skupiny  $-\text{C}\equiv\text{CH}$  (singlet,  $\delta$  1,98) ppm. Integrovaní intenzity přibližně odpovídají zastoupení dvou molekul prednisolonu na 45 jednotek ethylenglykolu ( $M = 2000$  g/mol), což potvrzuje navázání (prednisolon-21-yl)-pent-4-ynoátu (**4**) na obě koncové skupiny  $\alpha,\omega$ -diazido-poly(ethylenglykolu) (**2**). Vzhledem ke složitosti  $^1\text{H}$  NMR spektra však nelze vyloučit nepatrné zastoupení (cca 5 %) konjugátu, který by obsahoval pouze jednu jednotku prednisolonu a současně volnou azidovou skupinu (produkt monocykloadice). Přítomnost tohoto nežádoucího konjugátu naznačuje vzhled  $^1\text{H}$  NMR spektra v oblasti azidové skupiny ( $\delta$  3,50–3,30 ppm) (Obrázek 17).



Obrázek 16 - Výřez  $^1\text{H}$  NMR spektra konjugátu (prednisolon-21-yl)-pent-4-ynoátu s  $\alpha,\omega$ -diazido-poly(ethylenglykolem) (5)



Obrázek 17 – Výřez  $^1\text{H}$  NMR spektra konjugátu (prednisolon-21-yl)-pent-4-ynoátu s  $\alpha,\omega$ -diazido-poly(ethylenglykolem) (5)

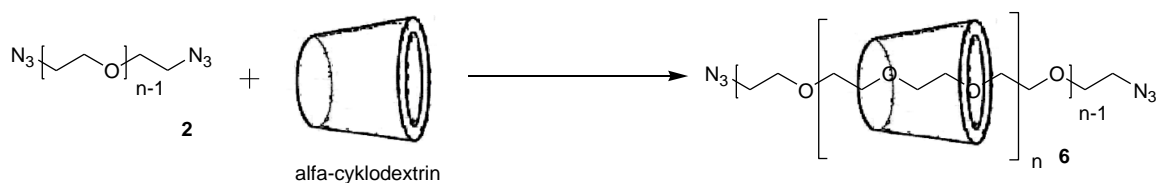
## 3.2 Zhodnocení přípravy polypseudorotaxanů 6 a 7

### 3.2.1 Příprava polypseudorotaxanu $\alpha$ -cyklodextrin- $\alpha,\omega$ -diazido-poly(ethylenglykol) 6

Polypseudorotaxany patří do skupiny inkluzních sloučenin (komplexů) polymerních konjugátů s cyklodextriny. Inkluze je důsledkem schopnosti jedné sloučeniny (hostitel) pomocí vhodných sterických vlastností a polaritě prostorově uzavřít druhou složku (host). Tvorba inkluzních sloučenin je podmíněna prostorovým uspořádáním, interakcemi typu van der Waalsových sil a orientačními dipólovými interakcemi. Vznik inkluzních sloučenin nevyplývá z chemické afinity ani z přítomnosti určitých funkčních skupin. Hostitelská molekula musí obsahovat volné prostory molekulárních rozměrů a molekula hosta musí svým prostorovým uspořádáním odpovídat velikosti kavity hostitelské molekuly. Inkluzní sloučeniny mohou být monomolekulární nebo – jak je tomu v případě této práce – polymolekulární. Je-li molekula v dutině vázána tak, že se již nemůže vyvázat (například zavedením objemných skupin na obou stranách interní molekuly), jedná se o komplex rotaxanu. Naproti tomu pseudorotaxany nejsou kineticky stabilní, protože cyklodextriny se mohou znovu vyvléknout z polymerního řetězce.<sup>1</sup>

Polypseudorotaxan **6** vzniklý navlékáním  $\alpha$ -cyklodextrinových jednotek na řetězec  $\alpha,\omega$ -diazido-poly(ethylenglykolu) (**2**) jsem připravil podle postupu popisujícího přípravu analogických polypseudorotaxanu na bázi  $\alpha$ -cyklodextrinu a poly(ethylenglykolu)<sup>1</sup> (Schéma 17). Uvedený postup uvádí reakční čas 14 dní, který jsem v mém případě dodržel, nicméně ke vzniku polypseudorotaxanu **6** dochází velmi pravděpodobně během podstatně kratší doby, což lze sledovat vizuálně jako vznik sraženiny z homogenního roztoku. Množství  $\alpha$ -cyklodextrinu bylo zvoleno tak, aby na každou ethylenglykolovou jednotku byla v reakční směsi přítomná jedna molekula  $\alpha$ -cyklodextrinu. To představuje přebytek minimálně 2 ekv., a to vzhledem k tomu, že u dříve připravených polypseudorotaxanů byl vypočten poměr odpovídající 2,2 ethylenglykolovým jednotkám vůči jedné molekule  $\alpha$ -cyklodextrinu.<sup>70</sup> Produkt **6** jsem izoloval centrifugací, roztok přebytečného  $\alpha$ -cyklodextrinu obsažený ve sraženině jsem odstranil vícenásobnou dekantací. Dle <sup>1</sup>H NMR spektroskopie jsem zjistil, že počet  $\alpha$ -cyklodextrinových jednotek je cca 18, což odpovídá 2,5 jednotkám ethylenglykolu na jeden  $\alpha$ -cyklodextrin. Při tomto poměru  $\alpha$ -cyklodextrin/poly(ethylenglykol) byl

vypočtený výtěžek reakce prakticky kvantitativní. Stejného výsledku jsem dosáhl i v případě opakovaných syntéz polypseudorotaxanu **6**. Kromě charakterizace pomocí  $^1\text{H}$  NMR spektroskopie byla rovněž stanovena elementární analýza, která potvrdila, že polypseudorotaxan **6** obsahuje ve vnitřních prostorech  $\alpha$ -cyklodextrinů kromě poly(ethylenového) řetězce rovněž molekuly vody.



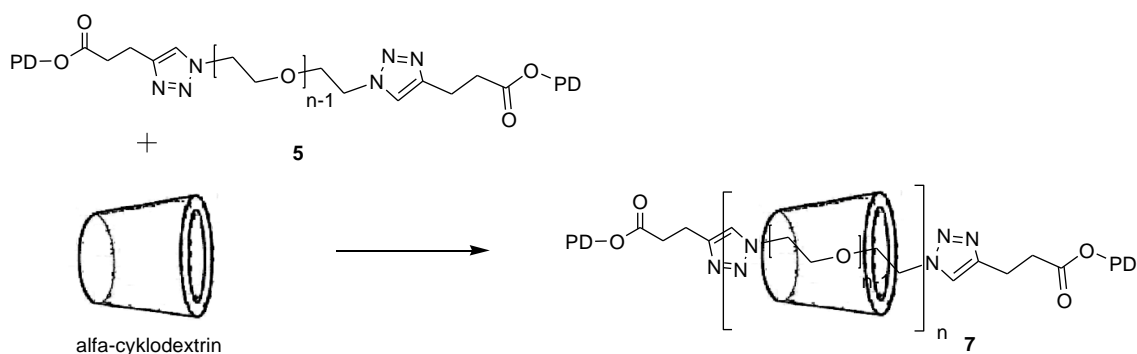
**Schéma 17** - Schéma přípravy polypseudorotaxanu  $\alpha$ -cyklodextrin- $\alpha,\omega$ -diazido-poly(ethylen glykolu) (**6**)

### 3.2.2 Studium přípravy polypseudorotaxanu $\alpha$ -cyklodextrin-konjugát (prednisolon-21-yl)-pent-4-ynoátu s $\alpha,\omega$ -diazido-poly(ethylen glykolem) **7**

#### Pokus 1

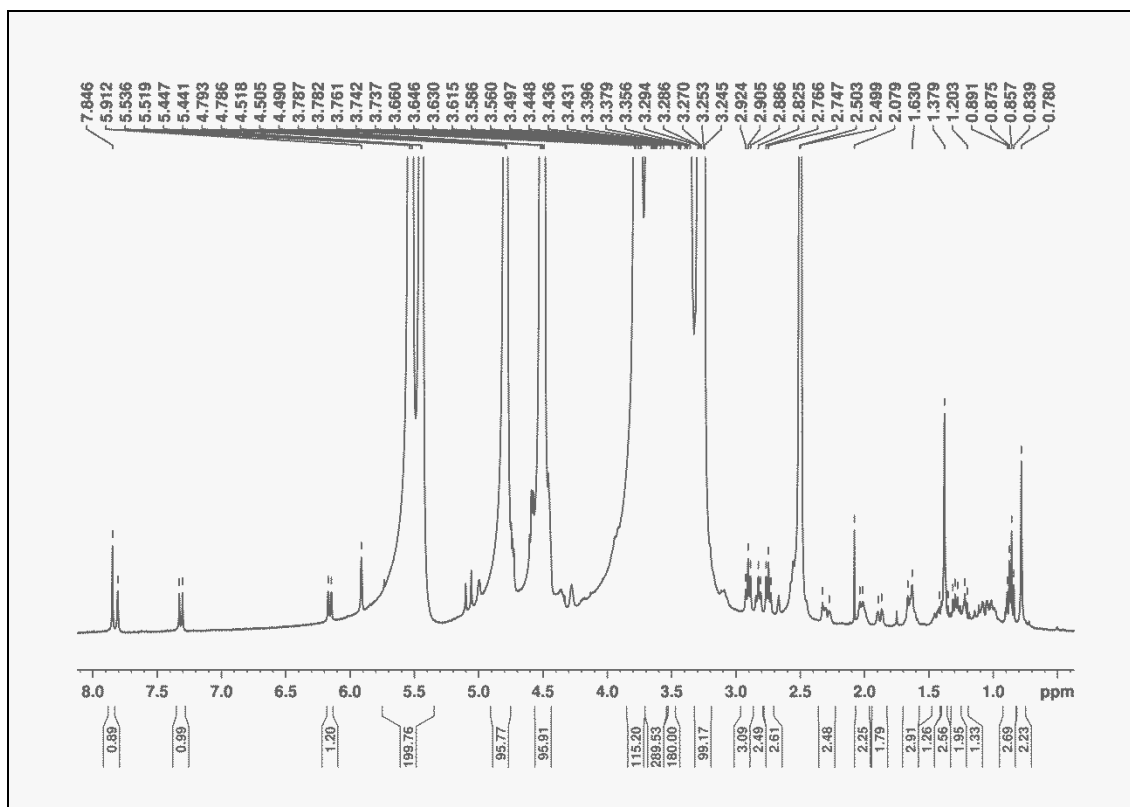
Při studiu přípravy polypseudorotaxanu  $\alpha$ -cyklodextrin-konjugát (prednisolon-21-yl)-pent-4-ynoátu s  $\alpha,\omega$ -diazido-poly(ethylen glykolem) (**7**) jsem vycházel z experimentálních podmínek, za kterých jsem úspěšně připravil polypseudorotaxan **6**: přebytek  $\alpha$ -cyklodextrinu, laboratorní teplota, redistilovaná voda a reakční čas 14 dní (Schéma 18). Ve srovnání s přípravou sloučeniny **6** jsem v tomto případě pozoroval v průběhu reakce vznik pouze nepatrného množství sraženiny, která se vytvořila především na počátku reakce. Vzniklou sraženinu jsem separoval centrifugací a roztok přebytečného  $\alpha$ -cyklodextrinu obsažený ve sraženině jsem odstranil vícenásobnou dekantací.



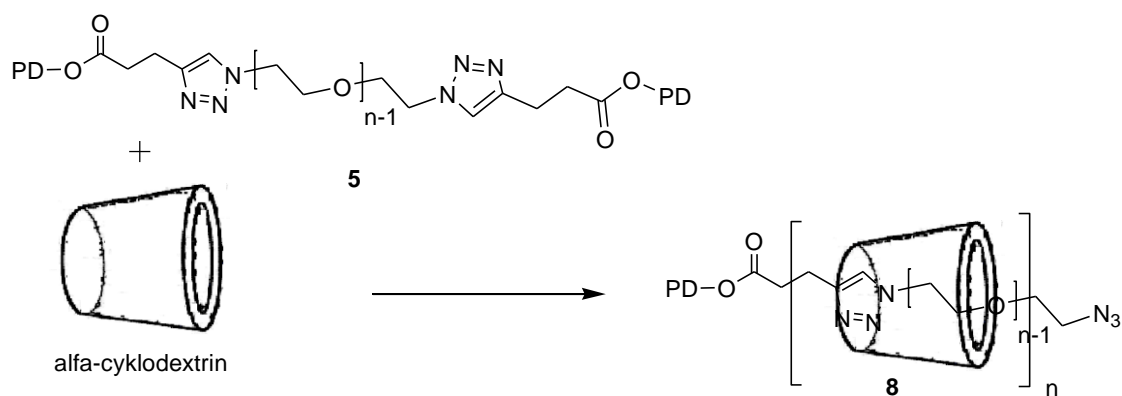


**Schéma 18** - Příprava polypseudorotaxanu  $\alpha$ -cyklodextrin-konjugát (prednisolon-21-yl)-pent-4-ynoát s  $\alpha,\omega$ -diazido-poly(ethylenglykolem) (**7**)

Dle  $^1\text{H}$  NMR spektroskopie jsem zjistil, že počet  $\alpha$ -cyklodextrinových jednotek je cca 16, což odpovídá 2,8 jednotkám ethylenglykolu na jeden  $\alpha$ -cyklodextrin. Zastoupení molekul prednisolonu však dle  $^1\text{H}$  NMR spektroskopie odpovídá pouze jedné přítomné molekule (Obrázek 18). Tento fakt lze vysvětlit tak, že izolovaný polypseudorotaxan **8** vznikl z konjugátu, který obsahoval pouze prednisolon-triazolovou jednotku na jednom konci řetězce poly(ethylenglykolu) (Obrázek 19). Jak již bylo diskutováno v předchozí kapitole, přítomnost této nežádoucí formy konjugátu **5** v množství cca 5 % nelze zcela vyloučit, viz Obrázek 17. Tento předpoklad podporuje rovněž výtěžek sloučeniny **8**, která odpovídá cca 5–10% konverzi.



**Obrázek 18** -  $^1\text{H}$  NMR spektrum polypseudorotaxanu  $\alpha$ -cyklodextrin-konjugát (prednisolon-21-yl)-pent-4-ynoátu s  $\alpha,\omega$ -diazido-poly(ethylen glykolem) (**8**)

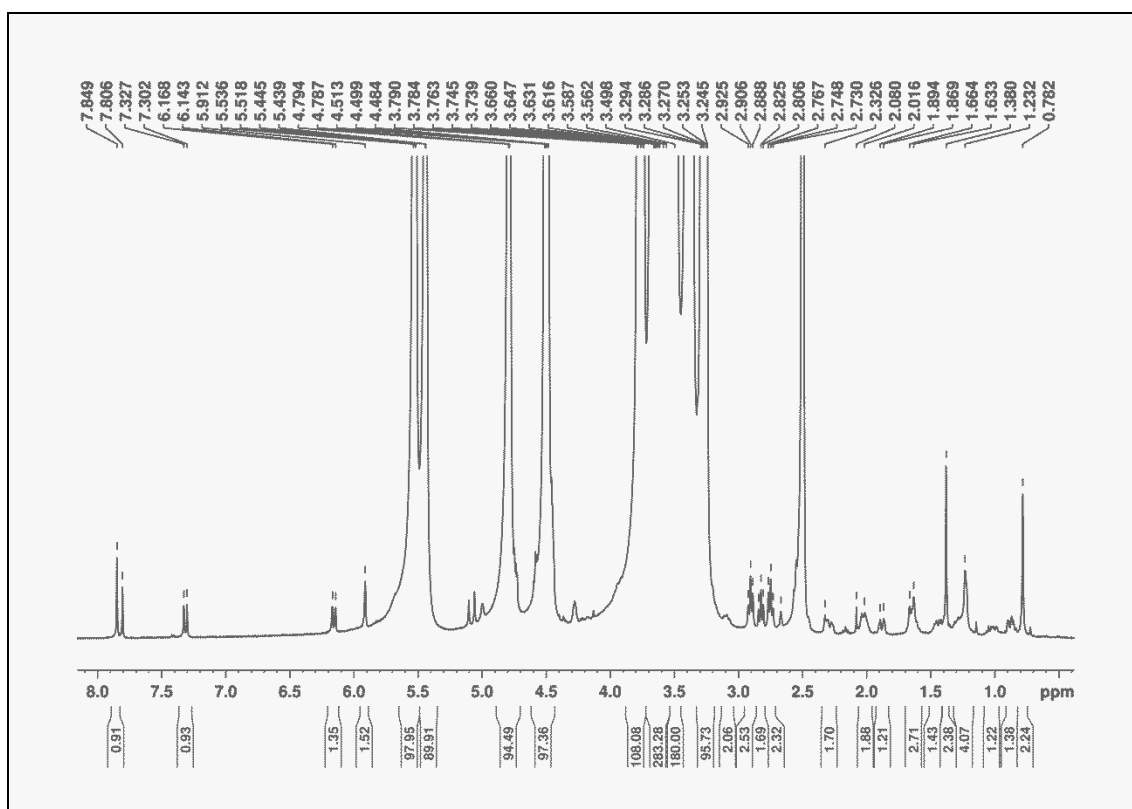


**Obrázek 19** - Schéma rotaxanu  $\alpha$ -cyklodextrin-konjugát-poly(ethylen glykol) s prednisolonom pouze na jednom konci

## Pokus 2

Vznik a rozpad polypseudorotaxanů představuje rovnovážný proces.<sup>71</sup> Rozhodl jsem se proto ve druhém pokusu provést přípravu polypseudorotaxanu **7** při vyšší teplotě, tak aby bylo dosaženo rovnováhy, tj. navlečení  $\alpha$ -cyklodextrinů na poly(ethylen glykol). Lze totiž předpokládat, že přítomný prednisolon na koncích

lineárního poly(ethylenglykolu) významně zvyšuje aktivační energii inkluzního procesu, a proto tento děj probíhá v případě konjugátu **5** výrazně pomaleji, než tomu bylo v případě  $\alpha,\omega$ -diazido-poly(ethylenglykolu) (**2**). Reakční teplotu jsem zvýšil z 20 °C na 70 °C, reakční čas a množství  $\alpha$ -cyklodextrinu bylo zachováno. V průběhu reakce jsem pozoroval vznik určitého množství sraženiny. Její separaci jsem provedl centrifugací a sraženina byla promyta redestilovanou vodou. Dle  $^1\text{H}$  NMR spektroskopie jsem zjistil, že izolovaný materiál má prakticky stejné složení jako polypseudorotaxan **8** získaný v Pokusu 1 (Obrázek 20). Rovněž výtěžek byl podobný, cca 5–10 %. Lze proto předpokládat, že inkluzní sloučeninu vytvářel pouze „monosubstituovaný“ poly(ethylenglykol).

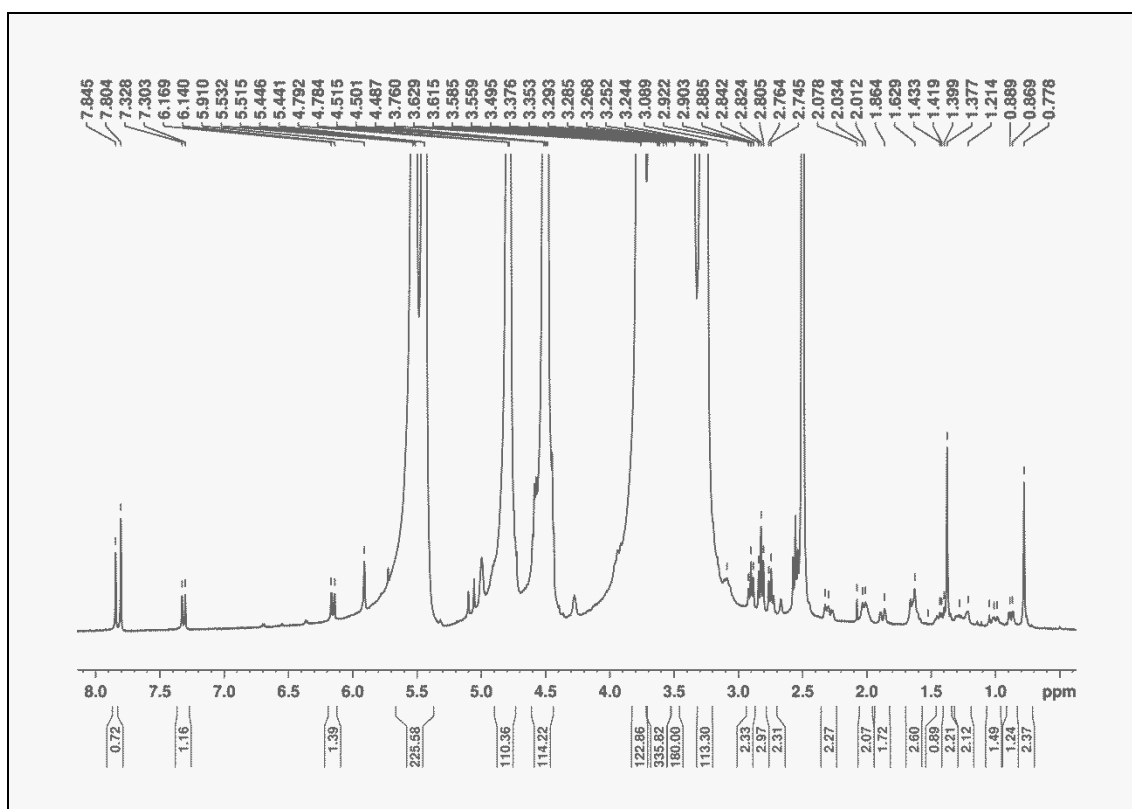


**Obrázek 20** -  $^1\text{H}$  NMR spektrum polypseudorotaxanu  $\alpha$ -cyklodextrin-konjugát (prednisolon-21-yl)-pent-4-ynoátu s  $\alpha,\omega$ -diazido-poly(ethylenglykolem) (**8**)

### Pokus 3

V některých pracích zabývajících se termodynamikou vzniku polypseudorotaxanů poly(ethylenglykolu) a  $\alpha$ -cyklodextrinu bylo zjištěno, že rychlost navlékání  $\alpha$ -cyklodextrinových jednotek je zvyšována přítomností iontů.<sup>72,73,74</sup> Efekt souvisí se změnou (zvýšením) polaroty reakčního prostředí, která ovlivňuje rychlost

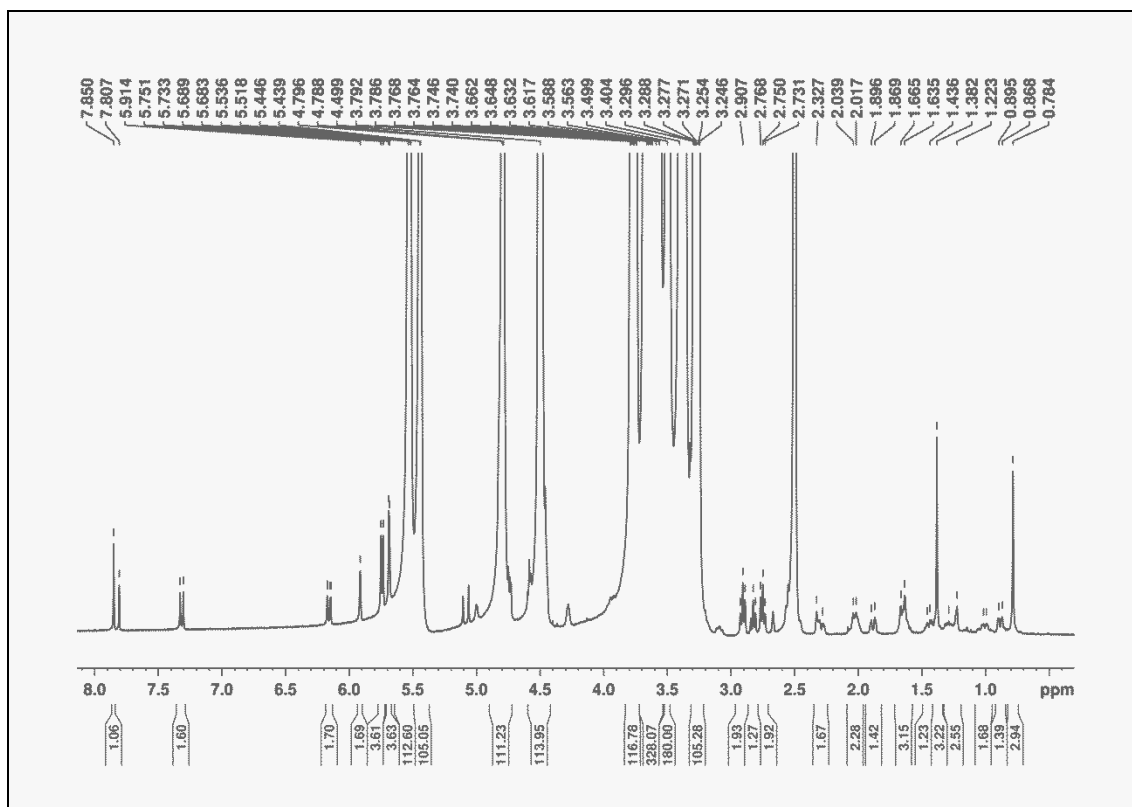
navlékání poly(ethylenglykolového) řetězce do hydrofobní kavity  $\alpha$ -cyklodextrinu. Značné zvýšení rychlosti navlékání  $\alpha$ -cyklodextrinu bylo pozorováno především v přítomnosti lithných iontů.<sup>72</sup> V dalším pokusu jsem proto do reakční směsi přidal LiCl, a to v množství odpovídající koncentraci 0,1 M, což je koncentrace, při které byl pozorován efekt urychlení vzniku polypseudorotaxanu.<sup>72</sup> Ostatní reakční podmínky byly stejné jako v případě Pokusu 2. Separaci vzniklé sraženiny jsem provedl centrifugací a sraženina byla promyta redestilovanou vodou. Dle <sup>1</sup>H NMR spektroskopie jsem zjistil, že izolovaný materiál má prakticky stejné složení jako polypseudorotaxan **8** získaný v Pokusech 1 a 2 (Obrázek 21). Hmotnost izolované sraženiny však byla vyšší (cca 5×). Provedením elementární analýzy byla zjištěna přítomnost chloru (1,49 %) v produktu, což znamená, že značné množství LiCl se stalo součástí zformovaného polypseudorotaxanu **8**. Přítomný LiCl ovlivňuje celkovou molekulovou hmotnost inkluzní sloučeniny, což vysvětluje vyšší hmotnost získaného produktu (nikoli však procentuální výtěžek). Na základě těchto faktů se domnívám, že inkluzní sloučeninu vytvářel pouze „monosubstituovaný“ poly(ethylenglykol).



**Obrázek 21** - <sup>1</sup>H NMR spektrum polypseudorotaxanu  $\alpha$ -cyklodextrin-konjugát (prednisolon-21-yl)-pent-4-ynoátu s  $\alpha,\omega$ -diazido-poly(ethylenglykolem) (**8**)

#### Pokus 4

V posledním pokusu jsem provedl reakci v přítomnosti katalytického množství  $\beta$ -cyklodextrinu (5 mol %). V literatuře jsou totiž zdokumentovány případy, kdy cyklodextrin urychloval vznik inkluzních sloučenin.<sup>75,76,77,78,79</sup> Katalytický efekt hostitelské molekuly (např. cyklodextrinu) mající vyšší afinitu ke koncové části polymerního řetězce se vysvětluje tímto mechanismem: Nejprve hostitelská molekula, která má nižší afinitu ke koncové části hostu (polymeru), se na něj rovnovážně naváže (je přítomna v přebytku) a následně je tato hostitelská molekula potlačena do řetězce polymeru hostitelskou molekulou katalyzátoru (na základě její vyšší afinity ke koncové části řetězce). Po rovnovážném uvolnění této hostitelské molekuly (katalyzátoru) se pak celý cyklus opakuje.<sup>75</sup> Hypotéza Pokusu 4 je založena na faktu, že  $\beta$ -cyklodextrin se vyznačuje větší kavitou, do které je inkluze prednisolonové molekuly snadnější. Mohl by tedy fungovat jako hostitel s vyšší afinitou ke koncové části polymerního řetězce – vázaný prednisolon. Vlastní poly(ethylenglykol) pak vytváří inkluzní sloučeniny pouze s  $\alpha$ -cyklodextrinem, s  $\beta$ -cyklodextrinem nikoli. Ostatní reakční podmínky byly stejné jako v případě Pokusu 2. Sraženinu jsem separoval centrifugací a byla promyta redestilovanou vodou. Dle  $^1\text{H}$  NMR spektroskopie jsem však zjistil, že izolovaný materiál má prakticky stejné složení jako polypseudorotaxan **8** získaný v Pokusech 1–3 (Obrázek 22), a proto se hypotéza o katalytickém účinku  $\beta$ -cyklodextrinu nepotvrdila.



**Obrázek 22** -  $^1\text{H}$  NMR spektrum polypseudorotaxanu  $\alpha$ -cyklodextrin-konjugát (prednisolon-21-yl)-pent-4-ynoátu s  $\alpha,\omega$ -diazido-poly(ethylenglykolem) (**8**)

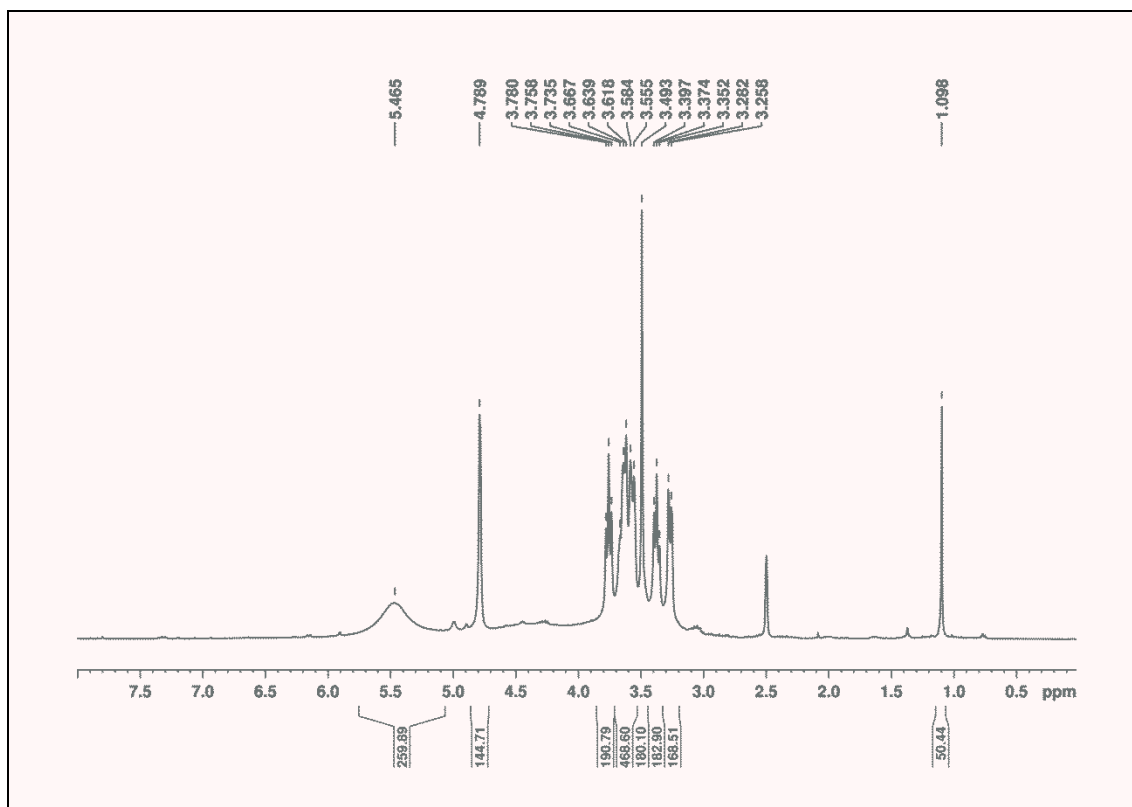
### 3.2.3 Studium přípravy polypseudorotaxanu $\alpha$ -cyklodextrin-konjugát (prednisolon-21-yl)-pent-4-ynoátu s $\alpha,\omega$ -diazido-poly(ethylenglykolem) **7** s využitím 1,3-dipolární cykloadice

V další části výzkumu jsem se zabýval přípravou polypseudorotaxanu  $\alpha$ -cyklodextrin-konjugát (prednisolon-21-yl)-pent-4-ynoátu s  $\alpha,\omega$ -diazido-poly(ethylenglykolem) (**7**) s využitím Huisgenovy 1,3-dipolární cykloadice (prednisolon-21-yl)-pent-4-ynoátu (**4**) na polypseudorotaxan **6**. Cílem bylo připravit polypseudorotaxan **7** jinou metodou, provést jeho charakterizaci a porovnat jeho fyzikálně-chemické vlastnosti s polypseudorotaxanem **7** získaným navlékáním  $\alpha$ -cyklodextrinu na konjugát **5**. Volba Huisgenovy 1,3-dipolární cykloadice spočívala v tom, že se jedná obecně o reakci probíhající velmi rychle, s vysokými výtěžky a značnou univerzálností (viz kap. 1.5). Právě rychlost reakce je klíčovým faktorem, neboť je nutné, aby proces navázání prednisolonu proběhl dříve, než dojde v reakčním prostředí k úplnému uvolnění  $\alpha$ -cyklodextrinových jednotek z výchozího polypseudorotaxanu **6**.

Při prvním pokusu jsem 1,3-cykloadiční reakci provedl v DMSO, ve kterém je polypseudorotaxan **6** relativně stabilní.<sup>80</sup> Reakční podmínky jsem zvolil stejné jako v případě přípravy konjugátu **5** s tím rozdílem, že jsem prodloužil reakční čas z 2 dní na 7 dní. (Prednisolon-21-yl)-pent-4-ynoát (**4**) jsem použil v přebytku (1,5 ekv.). Produkt jsem z reakční směsi izoloval jeho vysrážením vodou a následnou centrifugací sraženiny. Dle <sup>1</sup>H NMR spektroskopie jsem zjistil, že izolovaným materiálem je pouze výchozí látka – (prednisolon-21-yl)-pent-4-ynoát (**4**).

Ve druhém pokusu jsem místo DMSO jako rozpouštědla použil směs *t*-BuOH/H<sub>2</sub>O (1/1). Toto rozpouštědlo lze na rozdíl od DMSO snadno odstranit destilací, což umožnilo lepší separaci produktu z reakční směsi. Měďnou sůl jsem pro reakci odstranil promytím produktu vodou a přebytečný (prednisolon-21-yl)-pent-4-ynoát (**4**) promytím etherem. Dle <sup>1</sup>H NMR spektroskopie jsem zjistil, že produktem je fyzikální směs výchozí sloučeniny **4** a  $\alpha$ -cyklodextrinu, neboť ve spektru chyběl signál poly(ethylenglykolu) ( $\delta = 3,50$  ppm). Z toho vyplývá, že za uvedených reakčních podmínek proběhlo pouze uvolnění  $\alpha$ -cyklodextrinových jednotek z výchozího polypseudorotaxanu **6**.

Ve třetím pokusu jsem proto použil směs *t*-BuOH/H<sub>2</sub>O (1/1), kterou jsem nasýtil  $\alpha$ -cyklodextrinem. Předpokládal jsem, že se tím zajistí vyšší stabilita výchozího polypseudorotaxanu **6**, neboť dojde k dynamické rovnováze mezi uvolňováním a navlékáním  $\alpha$ -cyklodextrinu. Zjistil jsem však, že samotný *t*-BuOH vytváří s  $\alpha$ -cyklodextrinem v daném prostřední špatně rozpustnou inkluzní sloučeninu, což se projevilo vznikem sraženiny, a to ještě před přidáním ostatních reaktantů. Tento předpoklad se potvrdil i <sup>1</sup>H NMR spektroskopii izolované sraženiny, neboť ve spektru je kromě signálů patřících výchozímu polypseudorotaxanu **6** rovněž jasně patrný signál odpovídající *tert*-butylové skupině ( $\delta = 1,10$  ppm) příslušné inkluzní sloučeniny (Obrázek 23).



**Obrázek 23** -  $^1\text{H}$  NMR spektrum izolovaného produktu – směsi výchozího polypseudotaxanu **6** a inkluzní sloučeniny  $\alpha$ -cyklodextrin/ *t*-BuOH.

Na základě těchto provedených experimentů se domnívám, že Huisgenova 1,3-dipolární cykloadice prednisolon-21-yl)-pent-4-ynoátu (**4**) na polypseudotaxan **6** probíhá velmi pomalu, pravděpodobně z důvodu sterického bránění azidových funkčních skupin molekulami  $\alpha$ -cyklodextrinu. Jako rychleji probíhající děj jsem pozoroval uvolňování  $\alpha$ -cyklodextrinových jednotek z výchozího polypseudotaxanu **6**.



## 4. Závěr

V rámci této diplomové práce jsem připravil a charakterizoval nový konjugát prednisolonu a poly(ethylenglykolu) ( $M \sim 2000$  g/mol) **5**. Podstatou navázání prednisolonu na polymer bylo využití Huisgenovy 1,3-dipolární cykloadice (prednisolon-21-yl)-pent-4-ynoátu (**4**) na  $\alpha,\omega$ -diazido-poly(ethylenglykol) (**2**). Vlastní (prednisolon-21-yl)-pent-4-ynoát (**4**) jsem připravil acylací prednisolonu chloridem kyseliny pent-4-ynové (**3**), získané působením trifosgenu na kyselinu pent-4-ynou.  $\alpha,\omega$ -Diazido-poly(ethylenglykol) (**2**) jsem pak připravil dvoukrokovou syntézou z poly(ethylenglykolu), který jsem nejprve převedl působením methansulfonylchloridu na  $\alpha,\omega$ -bis(methansulfonyl)poly(ethylenglykol) (**1**) a následně jsem methansulfonylové skupiny sloučeniny **1** substituoval působením azidu sodného.

V další části diplomové práce jsem se zabýval studiem vzniku inkluzní sloučeniny konjugátu **6** a  $\alpha$ -cyklodextrinu. Výsledný polypseudorotaxan **7** se mi však ani v jednom ze čtyř pokusů provedených za různých podmínek nepodařilo připravit. Izoloval jsem pouze inkluzní sloučeninu **8** vznikající pravděpodobně z nečistoty (cca 5 %) přítomné v konjugátu **5**, která obsahuje prednisolon připojený jenom na jeden konec poly(ethylenglykolového) řetězce. Důvodem neúspěšnosti přípravy polypseudorotaxanu **7** je pravděpodobně velikost molekuly prednisolonu, která brání navlékání  $\alpha$ -cyklodextrinů na poly(ethylenglykolový) řetězec. Tento závěr je tedy v rozporu s výsledky studie publikované dříve.<sup>1</sup>

V poslední části diplomové práce jsem se zabýval přípravou polypseudorotaxanu **7** s využitím Huisgenovy 1,3-dipolární cykloadice (prednisolon-21-yl)-pent-4-ynoátu (**4**) na inkluzní sloučeninu  $\alpha$ -cyklodextrinu a  $\alpha,\omega$ -diazido-poly(ethylenglykolu) **6**. Ani v tomto případě se mi však nepodařilo polypseudorotaxan **7** připravit. Důvodem je pravděpodobně nízká reaktivita výchozího polypseudorotaxanu **6**, ve kterém jsou azidové funkční skupiny blokovány hostitelskými molekulami  $\alpha$ -cyklodextrinu.

## Literatura

1. Bílková, E.; Sedlák, M.; Dvořák, B.; Ventura K.; Knotek, P.; Beneš, L.: *Org. Biomol. Chem.*, **2010**, *8*, 5423–5430.
2. Konečný J.: *Bakalářská práce*, Univerzita Pardubice, Pardubice, **2014**.
3. McMurry, J.: *Organická chemie*, Vutium, Brno, **2007**, *27*, 1045.
4. Alan Xu; Timothy L. Madden: *Analytical methods for therapeutic drug monitoring and toxicology*, **2001**, Booknews, Washington, 101–103.
5. European Pharmacopoeia Commission. *European Pharmacopoeia 5.0: Prednisolone* [online databáze]. London: The Pharmaceutical Press, **2004**, 2298–2299, [cit. 10. 5. 2017].
6. Fiel, S. B.; Vincken, W.: *J. Asthma*, **2006**, *43*, 321–331.
7. Rosenberg, W.; Ireland, A.; Jewell, D. P.: *J. Clin. Gastroenterol*, **1990**, *12*, 40–41.
8. Saag, K. G.: *Cur. Rheumatol. Rep.*, **2002**, *4*, 218–225.
9. Thrower, B. W.: *Neurologist*, **2009**, *15*, 1–5.
10. Davis, M.; Williams, R.; Chakraborty, J.; English, J.; Marks, V.; Ideo, G.; Tempini, S.: *Br. J. Clin. Pharmacol.*, **1978**, *5*, 501–505.
11. Lambrou, G. I.; Vlahopoulos, S.; Papatheanasiou, C.; Papanikolaou, M.; Karpusas, M.; Zoumakis, E.; Tzortzotou-Stathopoulou, F.: *Leuk. Res.*, **2009**, *33*, 1684–1695.
12. Robert, C. H. jr; Ferid, M. In: *The Pharmacological Basis of Therapeutics*, Molinoff, P. B.; Ruddon, R. W., Eds. Goodman and Gilman's. New York: The McGraw-Hill Companies, Inc. Press **1996**, 1459–1489.
13. Bílková, E.; Imramovský, A.; Sedlák, M.: *Curr. Pharm. Des.*, **2011**, *17*, 3577–3595.
14. Gangolli, S. (ed): *Dictionary of Substances and Their Effects* (3rd Electronic Edition), **2005**, Royal Society of Chemistry, Cambridge, 269.
15. Czock, D.; Keller, F.; Rasche, F. M.; Häussler, U.: *Clin. Pharmacokinet.*, **2005**, *44*, 61–98.
16. Snell, E. S.: *Br. J. Demartol.*, **1976**, *94*, 15–23.
17. Laan, R. F. J. M.; Jansen, T. L. T. A., Van Riel, P. L. C. M.: *Rheumatology*, **1999**, *38*, 6–12.

18. Státní ústav pro kontrolu léčiv. *Český lékopis 2009*. Praha: Lékopisná komise Ministerstva zdravotnictví České republiky, **2009** [cit. 10. 8. 2017].
19. European Pharmacopoeia Commission. *European Pharmacopoeia 5.0: Prednicarbatum, Prednisoloni acetat, Prednisoloni natrii phosphas, Prednisoloni pivalas*. [online databáze]. London: The Pharmaceutical Press, **2004**, 2297–2303, [cit. 10. 5. 2017].
20. Fernandez, M.; Parra, J.; Vazqueza, B.; Lopez-Bravo, A.; San Roma, J.: *Biomaterials*, **2005**, 26, 3311–3318.
21. Jung, Y. J.; Doh, M. J.; Kim, I. H.; Kong, H.; Lee, J. S.; Kim, Y. M.: *J. Pharm. Pharmacol.*, **2003**, 55, 1075–1082.
22. Augustijns, P.; Annaert, P.; Heylen, P.; Van den Mooter, G.; Kinget R.: *Int. J. Pharm.*, **1998**, 166, 45–53.
23. Hikima, T.; Tojo, K.: *Pharm. Res.*, **1997**, 14, 197–202.
24. Wang, C. ; Zhao, M. ; Qui, X. ; Peng, S.: *Bioorg. Med. Chem.*, **2004**, 12, 4403–4421.
25. Baraldi, P. G.; Romagnoli, R.; del Carmen Nuñez, M.; Perretti, M.; Paul-Clark, M. J.; Ferrario, M.; Govoni, M.; Benedini, F.; Ongini, E.: *J. Med. Chem.*, **2004**, 47, 711–719.
26. Fiorucci, S.; Antonelli, E.; Distrutti, E.; Del Soldato, P.; Flower, R. J., Paul Clark, M. J.; Morelli, A.; Perretti, M.; Ignarro, L. J.: *PNAS*, **2002**, 99, 15770–15775.
27. Mallei, A.; Aden, S. A.; Bachis, A.; Brandoli, C.; Ongini, E.; Mocchetti, I.: *Brain Res.*, **2005**, 1062, 16–25.
28. Oliveira, M. S. S.; De O. Barreto, E.; Zamuner, S.; Pires, A. L. A.; Ferreira, T. P. T.; Cordeiro, R. S. B.; Lagente, V.; Martins, M. A.; Wallace, J. L.; E Silva, P. M. R.: *Clin. Exp. Allergy*, **2008**, 38, 1830–1837.
29. Ferrer, S.; Naughton, D. P.; Threadgill, M. D.: *Tetrahedron*, **2003**, 59, 3437–3444.
30. Parveen, I.; Naughton, D. P.; Wish, W. J. D.; Threadgill, M. D.: *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **1999**, 9, 113–118.
31. Márquez Ruiz, J. F.; Radics, G.; Windle, H.; Serra, H. O.; Simplicio, A. L.; Kedziora, K.; Fallon, P. G.; Kelleher, D. P.; Gilmer, J. F.: *J. Med. Chem.*, **2009**, 52, 3205–3211.

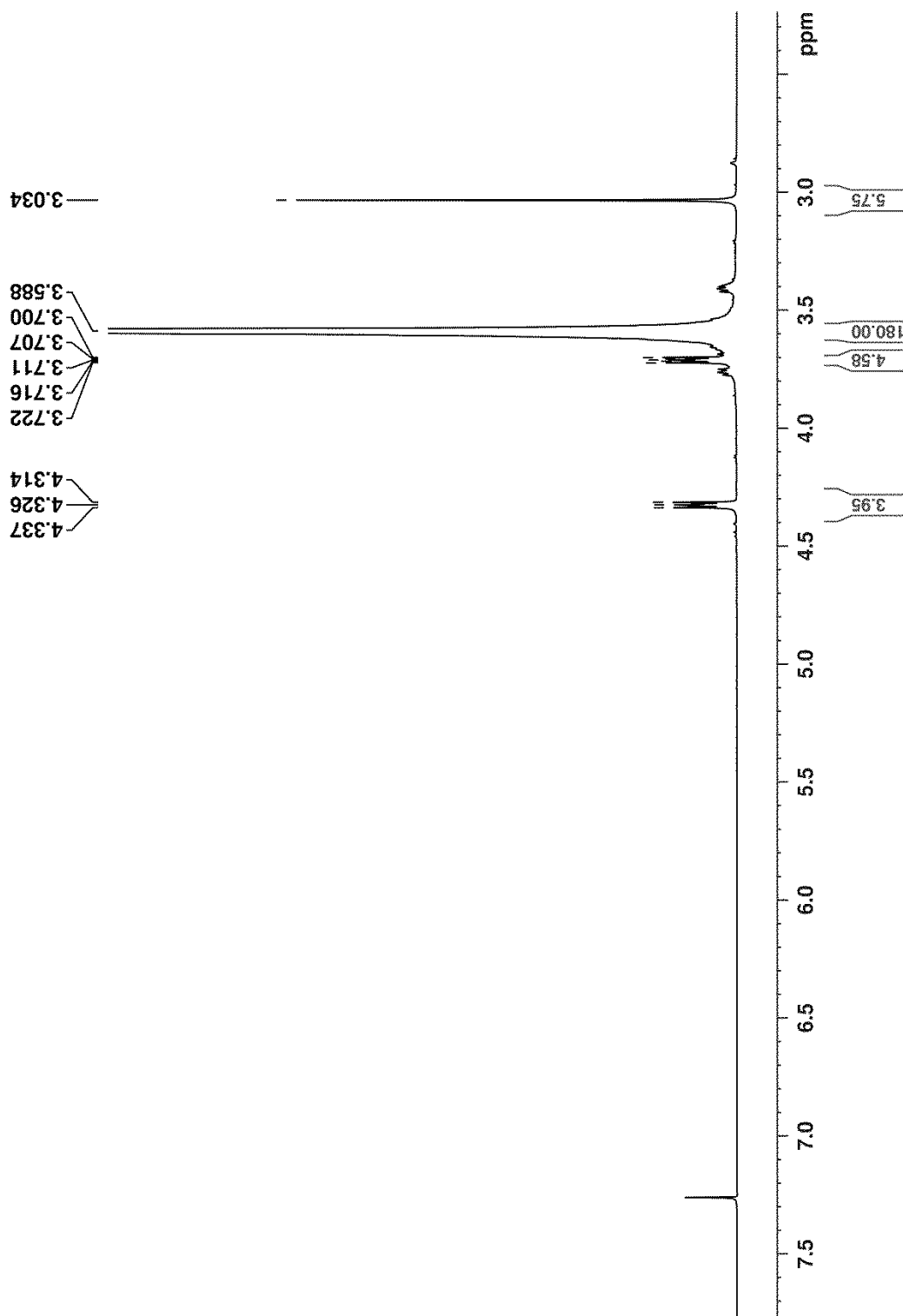
32. Yano, H.; Hirayama, F.; Arima, H.; Uekama, K.: *Chem. Pharm. Bull.*, **2000**, *48*, 1125–1128.
33. Yano, H.; Hirayama, F.; Arima, H.; Uekama, K.: *J. Pharm. Sci.*, **2001**, *90*, 493–503.
34. Yano, H.; Hirayama, F.; Arima, H.; Uekama, K.: *J. Pharm. Sci.*, **2001**, *90*, 2103–2112.
35. Yano, H.; Hirayama, F.; Kamada, M.; Arima, H.; Uekama K.: *J. Controlled Release*, **2002**, *79*, 103–112.
36. Krakovičová, H.; Etrych, T.; Ulbrich, K.: *Eur. J. Pharm. Sci.*, **2009**, *37*, 405–412.
37. Takakura, Y.; Hashida, M.: *Crit. Rev. Oncol. Hematol.*, **1995**, *18*, 207–231.
38. Ulbrich, K.; Šubr, V.: *Adv. Drug. Deliv. Rev.*, **2004**, *56*, 1023–1050.
39. Ihre, H. R.; Padilla De Jesus, O. L.; Szoka Jr., F. C.; Fréchet, J. M. J.: *Bioconjugate Chem.*, **2002**, *14*, 443–452.
40. Vinšová, J.; Vavříková, E.: *Curr. Pharm. Design*, **2008**, *14*, 1311–1326.
41. Yuan, Z. X.; Sun, X.; Gong, T.; Ding, H.; Fu, Y.; Zhang, Z. R.: *J. Drug Target.*, **2007**, *15*, 269–278.
42. Mehvar, R.; Robinson, M. A.; Reynolds, J. M.: *J. Pharm. Sci.*, **1995**, *84*, 815–818.
43. Mehvar, R.; Dann, R. O.; Hoganson, A.: *J. Controlled Release*, **2000**, *68*, 53–61.
44. Payan, E.; Jouzeau, J. Y.; Lopicque, F.; Bordji, K.; Simon, G.; Gillet, P.; O'Regan, M.; Netter, P.: *J. Controlled Release*, **1995**, *34*, 145–153.
45. Taglienti, A.; Valentini, M.; Sequi, P.; Crescenzi, V.: *Biomacromolecules*, **2005**, *6*, 1648–1653.
46. Taglienti, A.; Sequi, P.; Valentini, M.: *Carbohydr. Res*, **2009**, *344*, 245–249.
47. Lee, E. S.; Oh, K. T.; Kim, D.; Youn, Y. S.; Bae, Y. H.: *J. Controlled Release*, **2007**, *123*, 19–26.
48. Liu, M.; Fréchet, J. M. J.: *Pharm. Sci. Technol. Today*, **1999**, *2*, 393–401.
49. Khandare, J.; Kolhe, P.; Pillai, O.; Kannan, S.; Lieh-Lai, M.; Kannan, R. M.: *Bionjugate Chem.*, **2005**, *16*, 330–337.
50. Perumal, O.; Khandare, J.; Kohle, P.; Kannan, S.; Lieh-Lai, M., Kannan, R. M.: *Bioconjugate Chem.*, **2009**, *20*, 842–846.
51. Bria, M.; Bigot, J.; Cooke, G.; Lyskaw, J.: *Tetrahedron*, **2009**, *65*, 500–407.
52. Han, Y.; Yuan, L.; Li, G.; Huang, L.: *Polymer*, **2016**, *83*, 92–100.

53. Kolb, H. C.; Finn, M. G.; Sharpless, K. B.: *Angew. Chem. Int. Ed.*, **2001**, *40*, 2004–2021.
54. Wang, C.; Liu, C.; Zhu, X. W.: *J. Polym. Sci.*, **2016**, *54*, 407–417.
55. Shigehiro, H.; Kazunori, K.: *Bioconjugate Chem.*, **2007**, *18*, 2191–2196.
56. Cintas, P.; Martina, K.; Robaldo, B.; Garella, D.: *Collect. Czech. Chem. Commun.*, **2007**, *72*, 1014–1024.
57. Alonso, F.; Moglie, Y.; Radivoy G.: *Eur. J. Org. Chem*, **2010**, 1875–1884.
58. Opsteen, J. A.; Hest, J. C. M.: *Chem. Commun.*, **2005**, 57–59
59. Higashi, T.; Hirayama, F.; Arima, H.: *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **2007**, *17*, 1871–1874.
60. Horský, J.; Jindřich, J.: *Chem. Listy*, 2013, *107*, 769–776.
61. Li, J.; Loh, X. J.: *Adv. Drug Deliv. Rew.*, **2008**, *60*, 1000–1017.
62. Higashi, T.; Motoyama, K.; Arima, H.: *J. Drug Del. Sci. Tech.*, **2013**, *23*, 523–529.
63. Wenz, G.; Han, B. H.; Muller, A.: *Chem. Rev.*, **2006**, *106*, 782–817.
64. Bílková, E.; Imramovský, A.; Buchta, V.; Sedlák, M.: *Int. J. Pharm.*, **2010**, *386*, 1–5.
65. Sedlák, M.; Drabina, P.; Bílková, E.; Šimůnek, P.; Buchta, V.: *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **2008**, *18*, 2952–2956.
66. Kutschy, P.; Kristian, P.; Dzurilla, M.; Koščík, D.; Nádaskay, R.: *Collect. Czech. Chem. Commun.*, **1987**, *52*, 995–1005.
67. Ozkal, E.; Llanes, P.; Bravo, F.; Ferrali, A.; Pericàs, M. A.: *Adv. Synth. Catal.*, **2014**, *356*, 857–869.
68. Simonet, R. D.; Chinit, M. G.; Bruno, I.; Riccio, R.; Mueller, D.; Werz, O.; Bifulco, G.: *J. Med. Chem.*, **2011**, *54*, 1565–1575.
69. Fernandez, A. M.; Muñoz, O. M.; Jaramillo, J. L.; Mateo, F. H.; Gonzales, F. S.: *Adv. Synth. Catal.*, **2010**, *352*, 3306–3320.
70. Jiao, S.; Goh, S. H.; Valiyaveetil, S.: *Macromolecules*, **2002**, *35*, 1980–1983.
71. Harada, A.; Hashidzume, A.; Yamaguchi, H.; Takashima, Y.: *Chem. Rev.*, **2009**, *109*, 5974–6023.
72. Nostro, P. L.; Lopes, J. R.; Ninham, B. W.; Baglioni, P.: *J. Phys. Chem. B*, **2002**, *106*, 2166–2174.
73. Guo, X. Q.; Song, L. X.; Du, F. Y.; Dang, Z.; Wang, M.: *J. Phys. Chem. B*, **2011**, *115*, 1139–1144.

74. Arati, J.; Ito, K.: *J. Polym. Sci., Part A: Polym. Chem.*, **2006**, *44*, 532–538.
75. Liu, Y.; Li, X. Y.; Zhang, H. Y.; Li, C. J.; Ding, F.: *J. Org. Chem.*, **2007**, *72*, 3640–3645.
76. Ding, Z. J.; Zhang, H. Y.; Wang, L. H.; Ding, F.; Liu, Y.: *Org. Lett.*, **2011**, *13*, 856–859.
77. Gavina, P.; Tatay, S.: *Curr. Org. Synth.*, **2010**, *7*, 24–43.
78. Leclercq, L.; Noujeim, N.; Sanon, S. H.; Schmitzer, A. R.: *J. Phys. Chem. B*, **2008**, *112*, 14176–14184.
79. Li, Z.; Liu, G.; Xue, W.; Wu, D.; Yang, Y. W.; Wu, J.; Liu, S. H.; Yoon, J.; Yin, J.: *J. Org. Chem.*, **2013**, *78*, 11560–11570.
80. Harada, A.; Kamachi, M.: *Macromolecules*, 1990, **23**, 2821–2823.

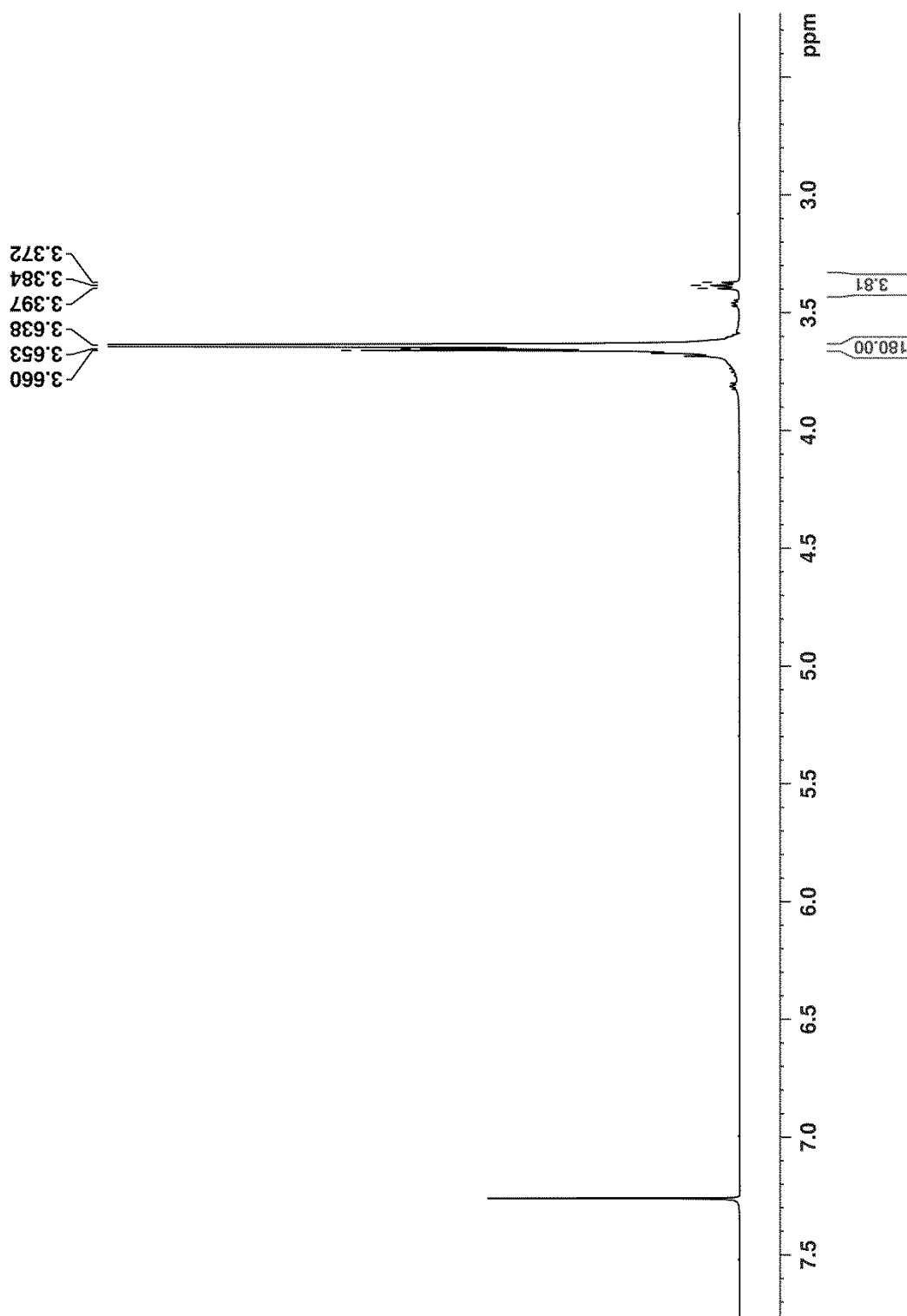
## **Přílohy**

$^1\text{H}$  NMR spektrum  $\alpha,\omega$ -bis(methansulfonyl)poly(ethylenglykolu) (1)

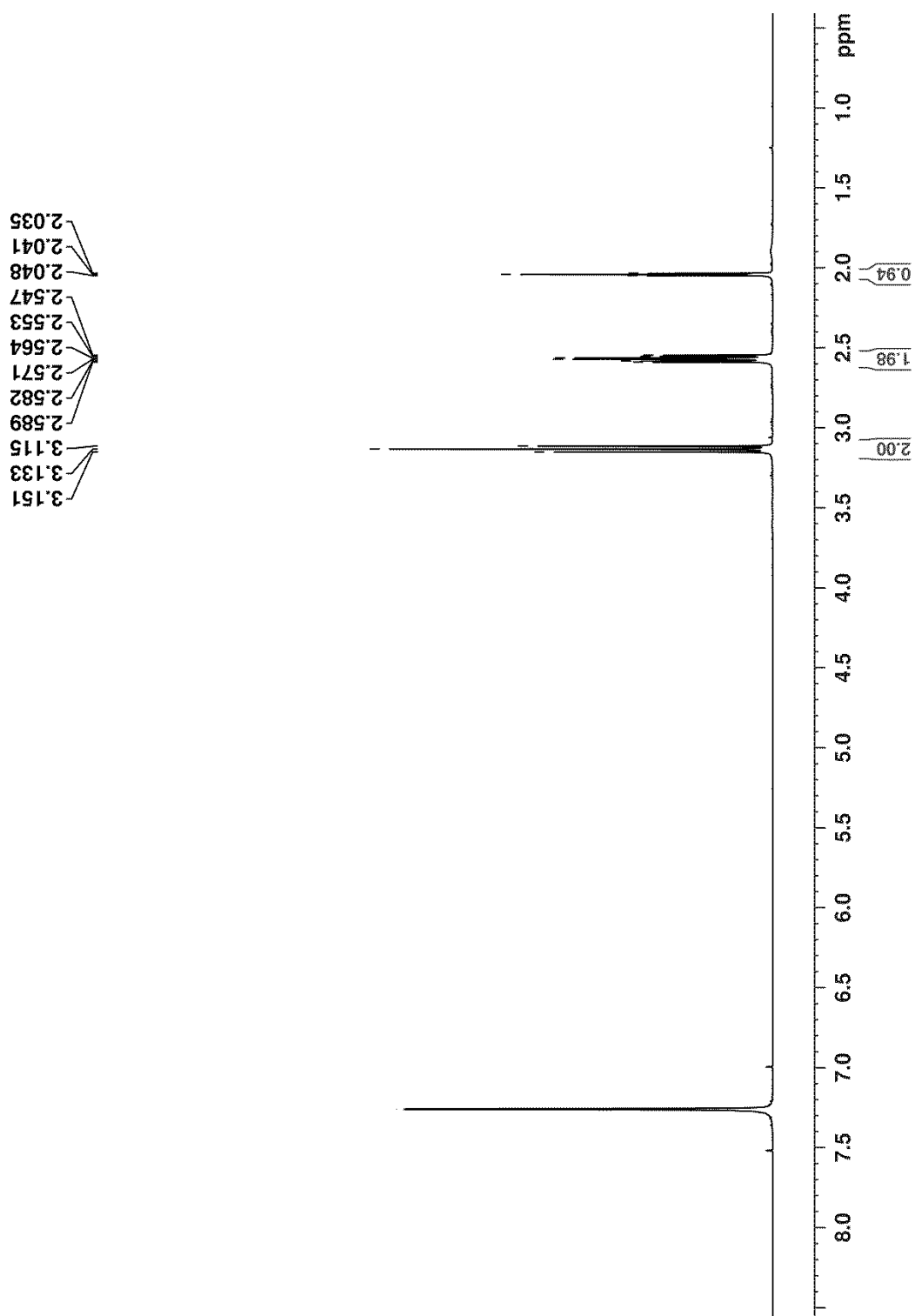




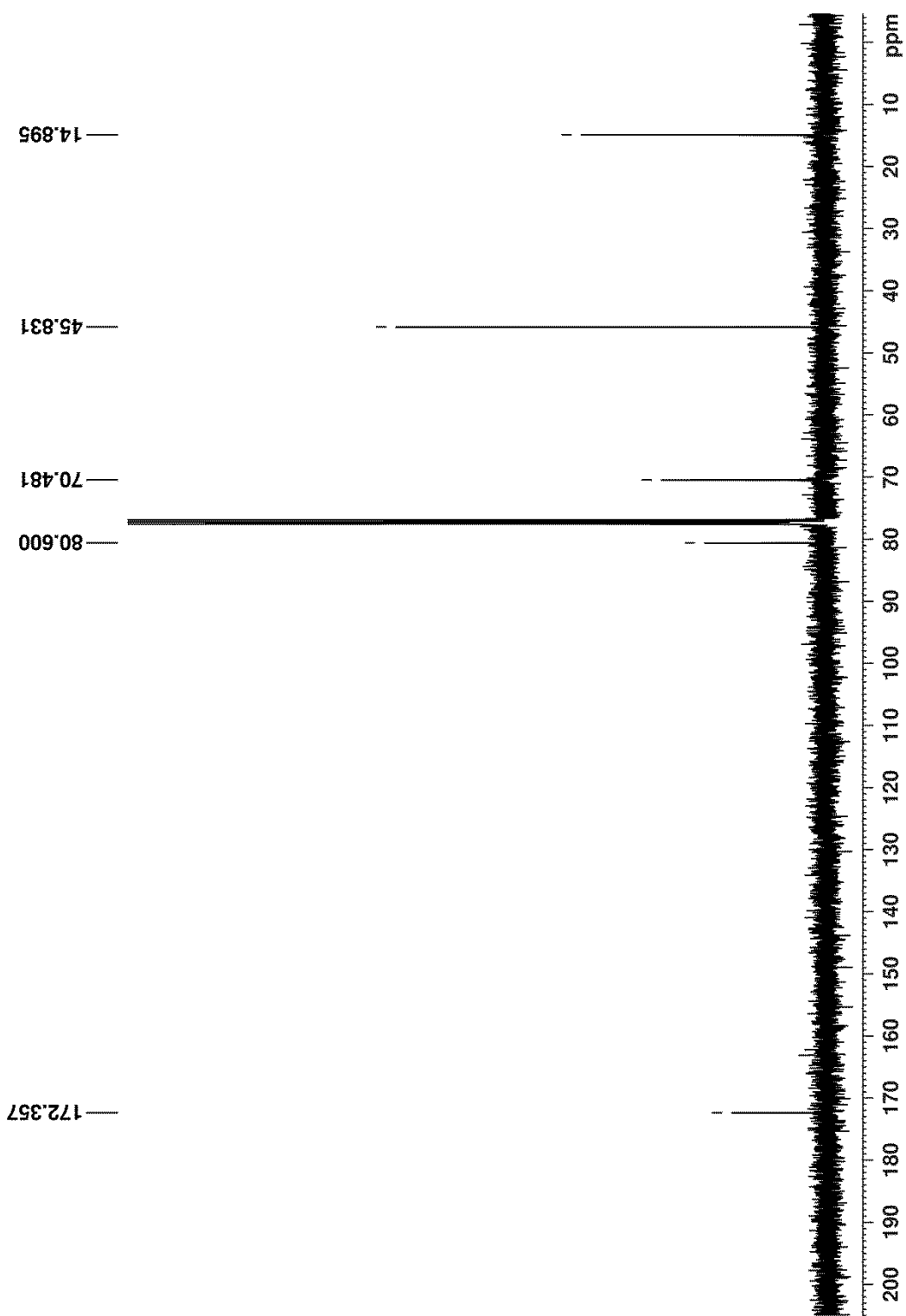
$^1\text{H}$  NMR spektrum  $\alpha,\omega$ -diazido-poly(ethylenglykolu) (2)



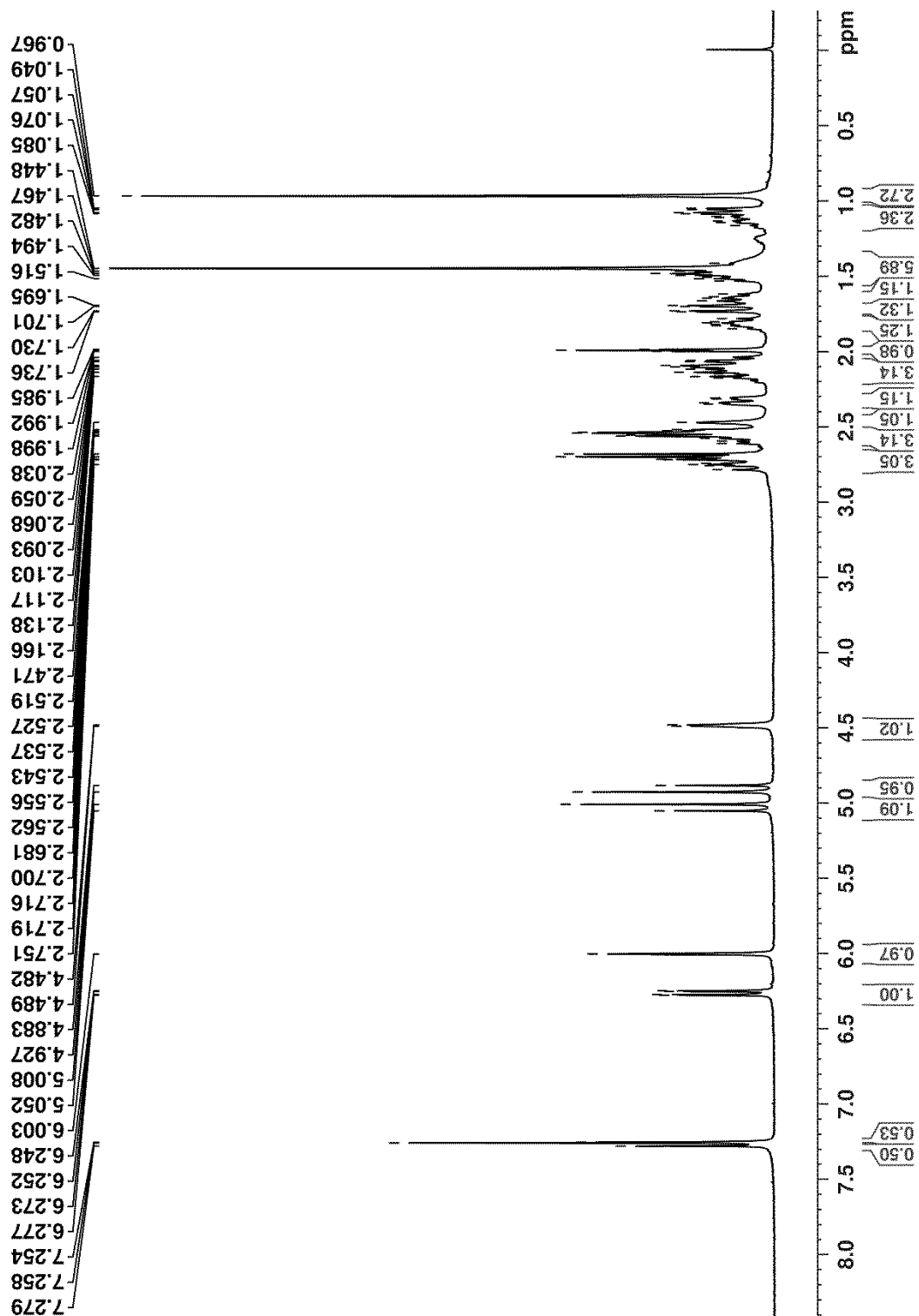
$^1\text{H}$  NMR spektrum chloridu kyseliny pent-4-ynové (3)



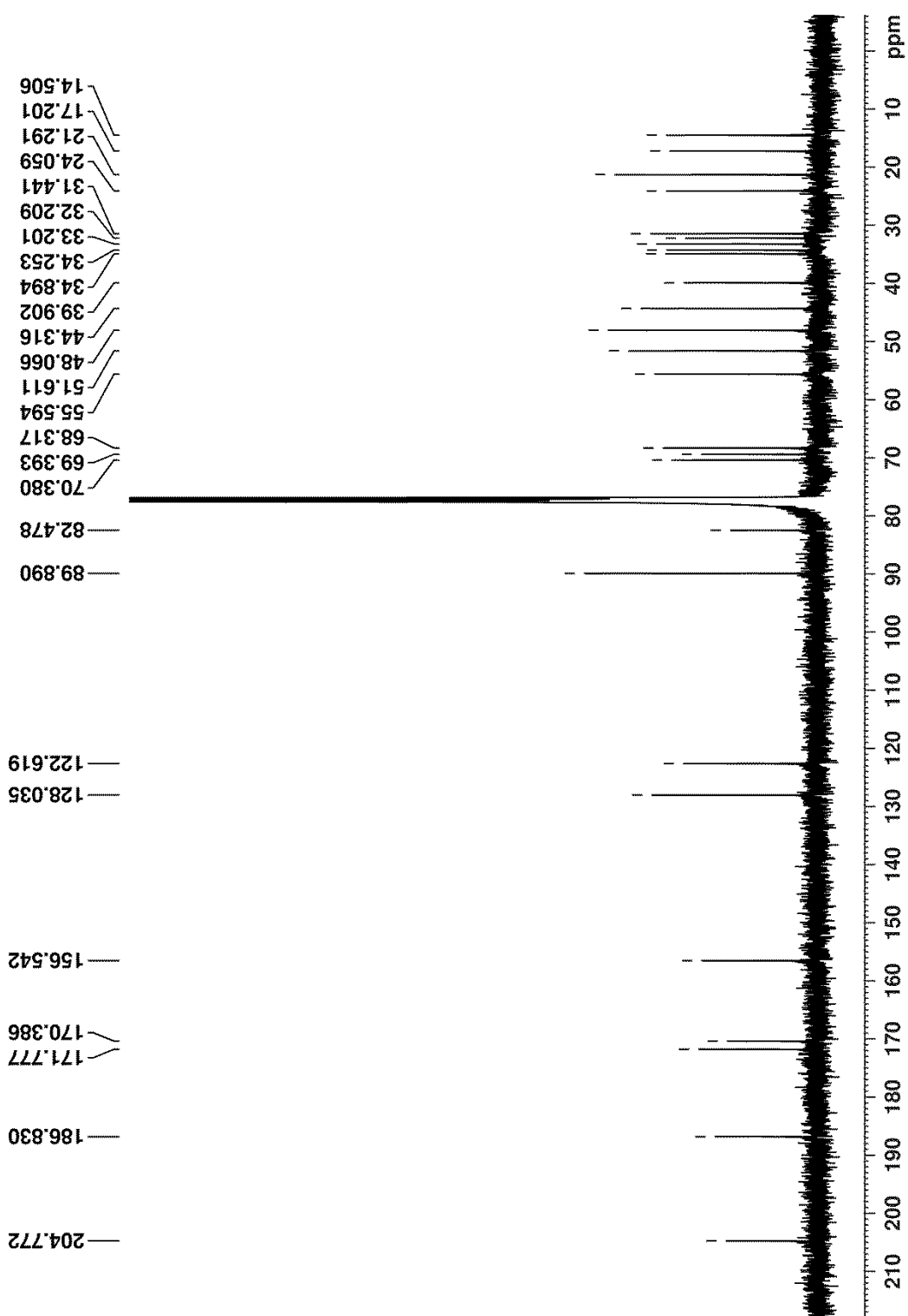
<sup>13</sup>C NMR spektrum chloridu kyseliny pent-4-ynové (3)



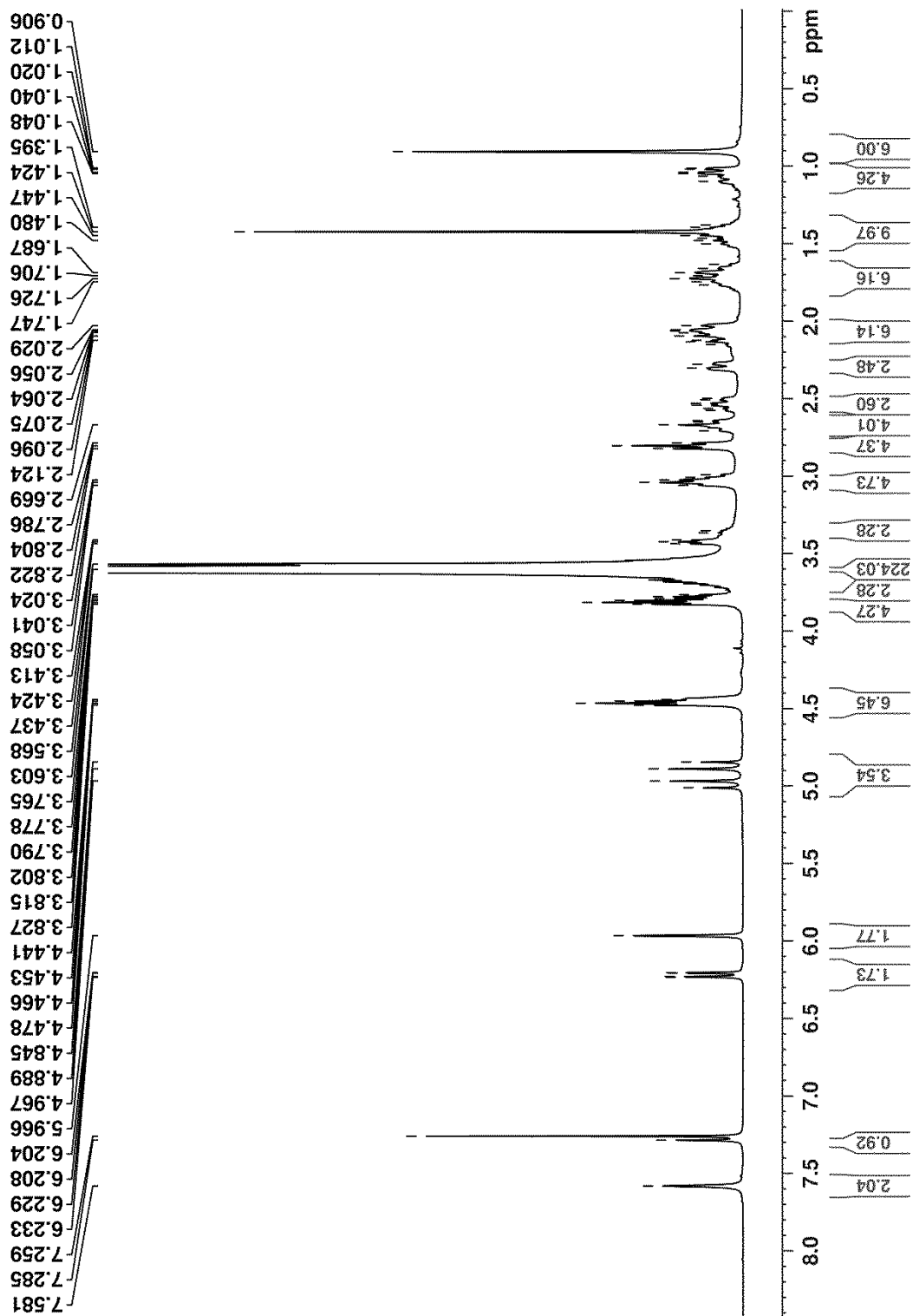
<sup>1</sup>H NMR spektrum (prednisolon-21-yl)-pent-4-ynoátu (4)



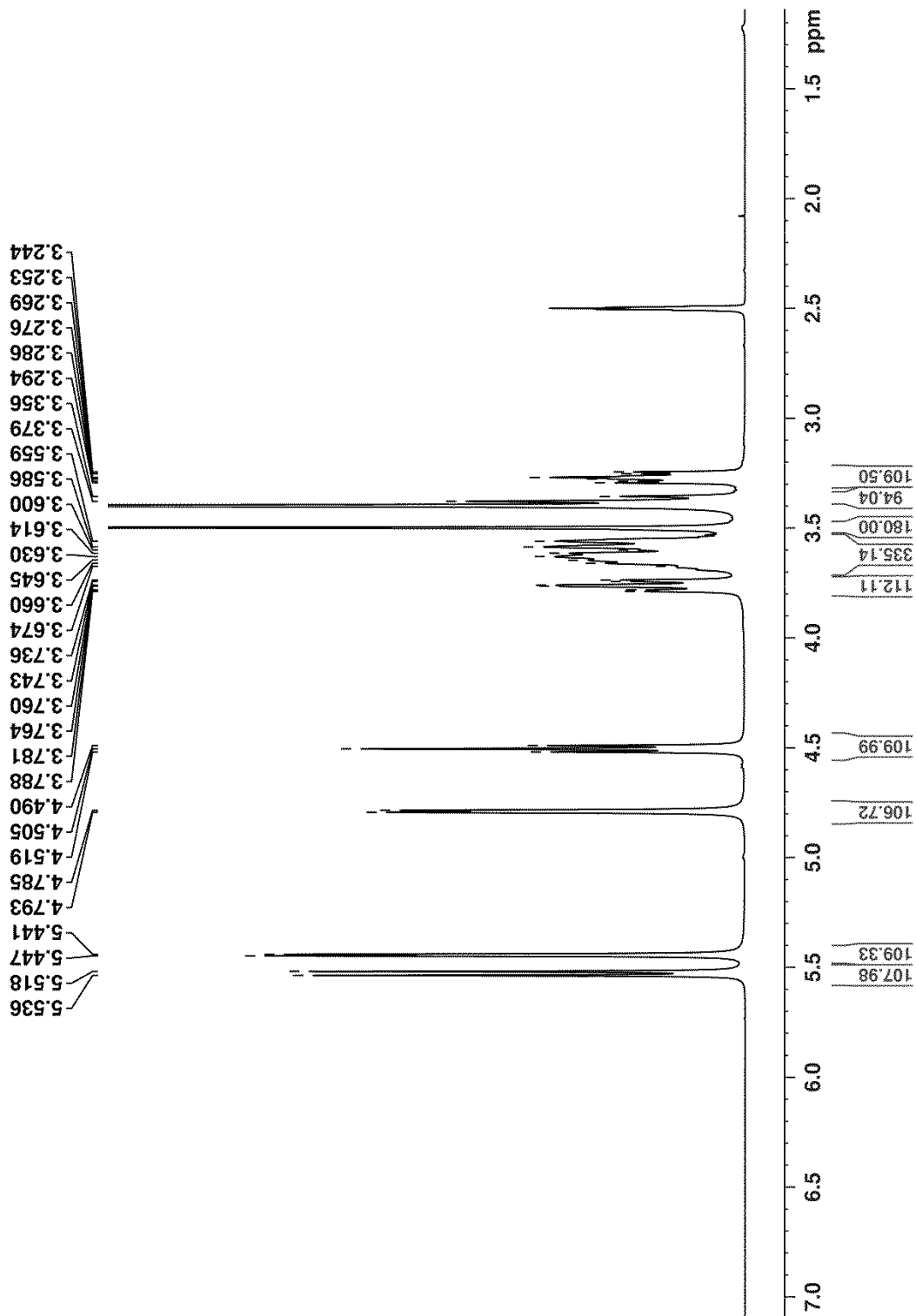
<sup>13</sup>C NMR spektrum (prednisolon-21-yl)-pent-4-ynoátu (4)



<sup>1</sup>H NMR spektrum konjugátu (prednisolon-21-yl)-pent-4-ynoátu s  $\alpha,\omega$ -diazido-poly(ethylglykolem) (5)



<sup>1</sup>H NMR spektrum Polypseudorotaxan α-cyklodextrin-α,ω-diazido-poly(ethylenglykol)  
(6)



## ÚDAJE PRO KNIHOVNICKOU DATABÁZI

<b>Název práce</b>	<b>Studium interakce mezi <math>\alpha</math>-cyklodextrinem a konjugátem prednisolon -poly(ethylenglykol)</b>
<b>Autor práce</b>	<b>Bc. Konečný Jan</b>
<b>Obor</b>	<b>Technologie organických specialit</b>
<b>Rok obhajoby</b>	<b>2017</b>
<b>Vedoucí práce</b>	<b>doc. Ing. Pavel Drabina, Ph.D.</b>
<b>Anotace</b>	Byl připraven a charakterizován nový typ konjugátu prednisolonu s poly(ethylenglykolem). Způsob navázání prednisolonu na polymer spočíval v provedení Huisgenovy 1,3-dipolární cykloadice mezi (prednisolon-21-yl)-pent-4-ynoátem a $\alpha,\omega$ -diazido-poly(ethylenglykolem). Byly podrobně studovány dvě různé metody přípravy inkluzní sloučeniny (polypseudorotaxanu) konjugátu (prednisolon-21-yl)-pent-4-ynoátu s $\alpha,\omega$ -diazido-poly(ethylenglykolem) a $\alpha$ -cyklodextrinu. Obě metody však požadovaný polypseudorotaxan neposkytovaly.
<b>Klíčová slova</b>	Prednisolon; Poly(ethylenglykol); $\alpha$ -Cyklodextrin; Huisgenova cykloadice; Polypseudorotaxan