

Univerzita Karlova
Přírodovědecká fakulta

Studijní program: Chemie
Studijní obor: Organická chemie



Bc. Lucie Josefa Lamačová

*Konjugáty cyklodextrin–léčivo vybavené targetujícími skupinami jako
protinádorová agens*
*Cyclodextrin–drug conjugates equipped with targeting groups as anticancer
agents*

Diplomová práce

Vedoucí diplomové práce: doc. RNDr. Jindřich Jindřich, CSc.

Praha, 2021

Prohlášení:

Prohlašuji, že jsem závěrečnou práci zpracovala samostatně a že jsem uvedla všechny použité informační zdroje a literaturu. Tato práce ani její podstatná část nebyla předložena k získání jiného nebo stejného akademického titulu.

V Praze, 19. 8. 2021

Podpis

Abstrakt

Tato diplomová práce se zabývá přípravou konjugátů cyklodextrinu s kancerostatikem 5-fluoruracilem a kyselinou listovou, která funguje jako targetující skupina. 5-Fluoruracil je k cyklodextrinu připojován přes acidolabilní linker, jehož rozštěpení je očekáváno ve sníženém pH v okolí maligní tkáně nebo uvnitř endozomu. Maligní tkáně také vykazují zvýšenou expresi receptoru pro kyselinu listovou a tohoto jevu je využíváno pro doručování terapeutických agens k této tkáni. Cyklodextriny jsou cyklické oligosacharidy, které jsou známy svou schopností komplexovat látky do své hydrofobní kavity a zvyšovat tak jejich rozpustnost, stabilitu a biologickou dostupnost.

Byl navržen postup pro přípravu konjugátu α -cyklodextrinu s 5-fluoruracilem a kyselinou listovou, který byl poté syntetizován.

Klíčová slova: cyklodextrin, fluoruracil, targetující skupina, kyselina listová, cílené doručování léčiv

Abstract

This diploma thesis deals with the synthesis of conjugates of cyclodextrin with the anticancer drug 5-fluorouracil and folic acid, which works as a targeting group. 5-Fluorouracil is connected to cyclodextrin via an acid-labile linker, which is expected to be cleaved in decreased pH in the proximity of malignant tissue or in the endosome. Malignant tissue also overexpresses receptor for folic acid, and this phenomenon is used for targeted delivery of therapeutic agents. Cyclodextrins are cyclic oligosaccharides, which are known for their ability to complex various compounds into their hydrophobic cavity and increase solubility, stability and bioavailability of these compounds.

A synthetic approach for the preparation of conjugate of cyclodextrin with 5-fluorouracil and folic acid was designed and the conjugate was subsequently synthesized.

Key words: cyclodextrin, fluorouracil, targeting group, folic acid, drug delivery

Obsah

| | |
|---|----|
| Abstrakt | 3 |
| Abstract..... | 4 |
| Použité zkratky..... | 7 |
| 1. Úvod..... | 10 |
| 2. Cíle práce | 11 |
| 3. Přehled problematiky | 12 |
| 3.1. Cyklodextriny | 12 |
| 3.1.1. Historie..... | 13 |
| 3.1.2. Struktura a vlastnosti | 14 |
| 3.1.3. Inkluzní komplexy..... | 15 |
| 3.1.4. Deriváty cyklodextrinů | 18 |
| 3.1.5. Farmaceutické využití cyklodextrinů a jejich derivátů | 24 |
| 3.2. Fluoruracil..... | 32 |
| 3.2.1. Farmakokinetika a farmakodynamika 5-FU..... | 33 |
| 3.2.3. Modulace účinků 5-fluoruracilu..... | 36 |
| 3.3. Kyselina listová jako targetující skupina..... | 38 |
| 3.4. Cu-katalyzovaná azido-alkynová cykloadice..... | 40 |
| 4. Výsledky a diskuse | 42 |
| 4.1. Koncept syntézy | 42 |
| 4.2. Příprava propargyloxymethylchloridu..... | 43 |
| 4.3. Alkylace 5-fluoruracilu..... | 44 |
| 4.4. 6 ^A -Azido-6 ^A -deoxy-β-cyklodextrin..... | 45 |
| 4.5. 6 ^A -Azido-6 ^A -deoxy-hexakis(6- <i>O-terc</i> -butyldimethylsilyl)-β-cyklodextrin..... | 47 |
| 4.6. 2- <i>O</i> -Boc-Aminoethyl-6 ^A -azido-6 ^A -deoxy-hexakis(6- <i>O-terc</i> -butyl-dimethylsilyl)-β-cyklodextrin..... | 47 |
| 4.7. 6- <i>O</i> -Bis(2,4,6-triisopropylbenzensulfonyl)-α-cyklodextrin | 49 |
| 4.8. Nepřímá příprava 6 ^{A,D} -diazido-6 ^{A,D} -dideoxy-α-CD | 49 |
| 4.9. 6 ^A -Amino-6 ^D -azido-6 ^{A,D} -dideoxy-α-cyklodextrin | 50 |
| 4.10. Konjugace cyklodextrinu s kyselinou listovou | 51 |
| 4.11. Cykloadice proléčiva 5-fluoruracilu s cyklodextrinem | 52 |
| 5. Závěr | 53 |
| 6. Experimentální část | 54 |
| 6.1. Obecné postupy a chemikálie..... | 54 |
| 6.2. Pracovní postupy..... | 55 |
| 6.2.1. Propargyloxymethylchlorid (1) | 55 |

| | |
|---|----|
| 6.2.2. 5-Fluor-1-((prop-2-yn-1-yloxy)methyl)pyrimidin-2,4-dion (2) | 56 |
| 6.2.3. 6 ^A - <i>O</i> - <i>p</i> -Toluensulfonyl-β-cyklodextrin (3) | 57 |
| 6.2.4. 6 ^A -Azido-6 ^A -deoxy-β-cyklodextrin (4) | 57 |
| 6.2.5. 6 ^A -Azido-6 ^A -deoxy-hexakis(6- <i>O</i> - <i>terc</i> -butyldimethylsilyl)-β-cyklodextrin (5) | 58 |
| 6.2.6. 2- <i>O</i> -Boc-Aminoethyl-6 ^A -azido-6 ^A -deoxy-hexakis(6- <i>O</i> - <i>terc</i> -butyldimethyl- silyl)-β-cyklodextrin (6)..... | 59 |
| 6.2.7. 6- <i>O</i> -Bis(2,4,6-trisopropylbenzensulfonyl)-α-cyklodextrin (7)..... | 60 |
| 6.2.8. 2 ^{A-F} ,3 ^{A-F} ,6 ^{A-F} -Oktadeka- <i>O</i> -benzyl-α-cyklodextrin (8) | 60 |
| 6.2.9. 2 ^{A-F} ,3 ^{A-F} ,6 ^{B-C} ,6 ^{E-F} -Hexadeka- <i>O</i> -benzyl-α-cyklodextrin (9) | 61 |
| 6.2.10. 2 ^{A-F} ,3 ^{A-F} ,6 ^{B-C} ,6 ^{E-F} -Hexadeka- <i>O</i> -benzyl-6 ^{A,D} -dibrom-6 ^{A,D} -dideoxy-α- cyklodextrin (10) | 62 |
| 6.2.11. 6 ^{A,D} -Diazido-6 ^{A,D} -dideoxy-α-cyklodextrin (12)..... | 63 |
| 6.2.12. Částečně MOMovaný 6 ^{A,D} -diazido-6 ^{A,D} -dideoxy-α-cyklodextrin..... | 64 |
| 6.2.13. 6 ^A -Amino-6 ^D -azido-6 ^{A,D} -dideoxy-α-cyklodextrin (13) | 64 |
| 6.2.14. 6 ^A -Pteroylglutamino-6 ^D -azido-6 ^{AD} -dideoxy-α-cyklodextrin (14)..... | 65 |
| 6.2.15. 6 ^A -Pteroylglutamino-6 ^D -(4-(((5-fluor-2,4-dioxypyrimidin-1-yl)methoxy)- methyl)-1,2,3-triazol-1-yl)-6 ^{AD} -dideoxy-α-cyklodextrin (15)..... | 66 |
| 7. Poděkování | 67 |
| 8. Literatura..... | 68 |

Použité zkratky

| | |
|---------------------|---|
| 5'-DFUR | 5'-deoxy-5-fluoruridin |
| 5-FU | 5-fluoruracil |
| Ac | acetyl |
| Bn | benzyl |
| Boc | <i>tert</i> -butyloxykarbonyl |
| BUP-1 | β -ureido-propionasa |
| CCW | proti směru hodinových ručiček (counterclockwise) |
| CD | cyklodextrin |
| CGTasa | cyklodextrin glukosyltransferasa |
| CH ₂ THF | 5,10-methylentetrahydrofolát |
| Cin | cinnamyl |
| CNDP | 3-kyano-2,6-dihydroxypyridin |
| COSY | korelační spektroskopie (Correlation Spectroscopy) |
| CW | po směru hodinových ručiček (clockwise) |
| DCC | dicyklohexylkarbodiimid |
| DCM | dichlormethan |
| DEPT | nezkreslené vylepšení přenosem polarizace (Distortionless Enhancement by Polarisation Transfer) |
| DHFU | dihydrofluoruracil |
| DHP | dihydropyrimidinasa |
| DIBAL-H | diisobutylaluminuimhydrid |
| DMF | <i>N,N</i> -dimethylformamid |
| DMSO | dimethylsulfoxid |
| DPD | dihydropyrimidin dehydrogenasa |
| DRIFT | infračervená spektroskopie rozptýleného odrazu s Fourierovou transformací (Diffuse Reflectance Infrared Fourier Transform Spectroscopy) |
| dRMP | 2-deoxyribosyl-5-monofosfát |
| ESI | ionizace elektrosprejem (Electrospray Ionization) |
| Et | ethyl |
| FA | kyselina listová, folát (folic acid) |
| FR | folátový receptor |
| FBAL | α -fluor- β -alanin |

| | |
|------------------|---|
| FdUMP | 5-fluor-2'-deoxyuridin-5'-monofosfát |
| FdUDP | 5-fluor-2'-deoxyuridin-5'-difosfát |
| FdUTP | 5-fluor-2'-deoxyuridin-5'-trifosfát |
| FUMP | 5-fluoruridin-5'-monofosfát |
| FUDP | 5-fluoruridin-5'-difosfát |
| FUPA | α -fluor- β -ureido-propionová kyselina |
| FUTP | 5-fluoruridin-5'-trifosfát |
| HMBC | heteronukleární ^1H - ^{13}C korelace přes více chemických vazeb (Heteronuclear Multiple-Bond Correlation) |
| HMDS | hexamethyldisilazan |
| HSQC | heteronukleární ^1H - ^{13}C korelace přes jednu chemickou vazbu (Heteronuclear Single Quantum Correlation) |
| HP β CD | 2-hydroxypropyl β -cyklodextrin |
| HP γ CD | 2-hydroxypropyl- γ -cyklodextrin |
| IR | infračervené záření (Infrared) |
| LD ₅₀ | dávka látky podané testovaným jedincům, která způsobí úhyn 50 % testovaných živočichů (lethal dose) |
| Me | methyl |
| MOM | methoxymethyl |
| MS | hmotnostní spektrometrie (Mass Spectrometry) |
| NHS | <i>N</i> -hydroxy-sukcinimid |
| NMR | nukleární magnetická rezonance (Nuclear Magnetic Resonance) |
| OPRT | orotát-fosforibosyltransferasa (orotate phosphoribosyl transferase) |
| Ph | fenyl |
| Pr | propyl |
| PRPP | 5-fosforibosyl-1- difosfátu (phosphoribosyl pyrophosphate) |
| RAMEB | náhodně methylovaný β -cyklodextrin (randomly methylated) |
| RM β CD | náhodně methylovaný β -cyklodextrin (randomly methylated) |
| RR | ribonukleotid reduktasa |
| rt | laboratorní teplota (room temperature) |
| RVO | rotační vakuová odparka |
| SBE β CD | sodná sůl sulfobutyletheru β -cyklodextrinu |
| TBAI | tetrabutylamoniumjodid |
| TBDMS | <i>terc</i> -butyldimethylsilyl |

| | |
|-----|--|
| TEA | triethylamin |
| THF | tetrahydrofuran |
| TK | thymidin kinasa |
| TLC | chromatografie na tenké vrstvě (Thin Layer Chromatography) |
| TMA | trimethylamin |
| TMS | trimethylsilyl |
| TP | thymidin fosforylasa (thymidine phosphorylase) |
| TS | thymidylát synthasa |
| UK | uridin kinasa |
| UP | uridin fosforylasa (uridine phosphorylase) |
| UV | ultrafialové záření (Ultraviolet) |

1. Úvod

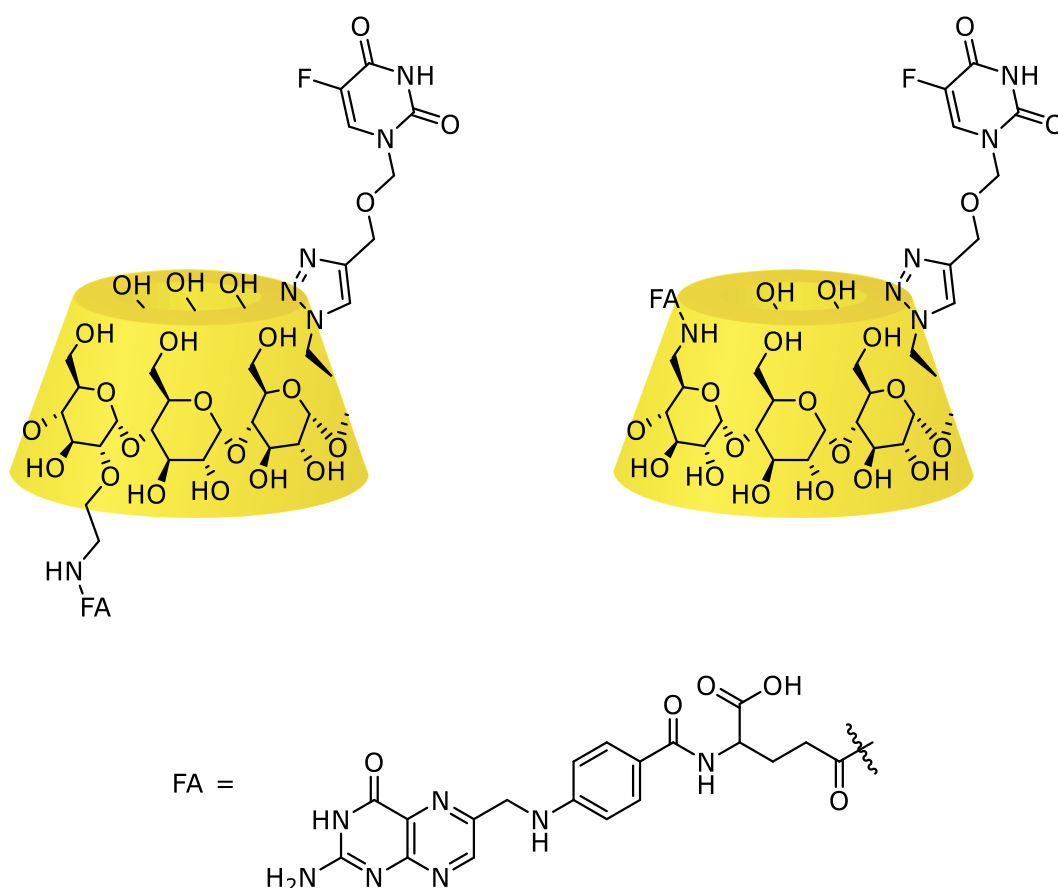
V roce 2020 zemřelo 19,3 milionů lidí na rakovinu, z toho 11,7 % na rakovinu prsu a 10,0 % na kolorektální karcinom¹. Jedním z nepostradatelných léčiv pro léčbu těchto typů rakovin je 5-fluoruracil (5-FU). Jeho distribuce k maligním tkáním však není ideální, 80–85 % podaného léčiva je enzymaticky metabolizováno a vylučováno močí². Bylo připraveno několik proléčiv 5-FU, která jsou v organismu rozštěpena za uvolnění aktivní formy látky. Je zde však stále velká potřeba optimalizace cíleného doručování tohoto léčiva.

K cílenému doručování léčiv k maligním tkáním se často využívá jedné jejich vlastnosti, a to zvýšené exprese receptoru pro kyselinu listovou. Konjugace diagnostických a terapeutických agens s kyselinou listovou pak vede k jejich zvýšené akumulaci v maligní tkáni³.

Cyklodextriny (CD) jsou supramolekulárními hostiteli, kteří do své hydrofobní kavity mohou komplexovat celou řadu látek. Tři nejběžnější typy cyklodextrinů – α -, β - a γ -CD mají různě velké kavity a mohou tvořit komplexy s hosty různé velikosti. Všechny tři nejběžnější CD a jejich deriváty nalézají uplatnění mimo jiné ve farmaceutickém průmyslu, kde se podílejí na optimalizaci doručování léčiv k cílovým tkáním. Důsledky inkluzní komplexace jsou zvýšení rozpustnosti, stability a biologické dostupnosti hosta⁴.

2. Cíle práce

Cílem této diplomové práce byla příprava supramolekulárních konjugátů kancerostatika 5-fluoruracilu s cyklodextrinem a molekulou kyseliny listové, která měla sloužit jako targetující skupina k maligním tkáním. Byly navrženy dva různé konjugáty. Základem prvního z nich byl β -cyklodextrin, k jehož primárnímu okraji byl připojen 5-fluoruracil přes acidolabilní linker, jehož rozštěpení bylo očekáváno ve sníženém pH v okolí maligní tkáně nebo uvnitř endozomu. Sekundární okraj cyklodextrinu byl pak alkylován aminoethylovým linkerem a k němu byla amidovou vazbou připojena molekula kyseliny listové. Druhý konjugát se skládal z α -cyklodextrinu, jehož dva protilehlé primární hydroxyly byly transformovány na aminovou a azidovou skupinu. K aminové skupině pak byla amidovou vazbou připojena kyselina listová a k azidové skupině byl opět připojen 5-fluoruracil přes acidolabilní linker (Obr. 1).

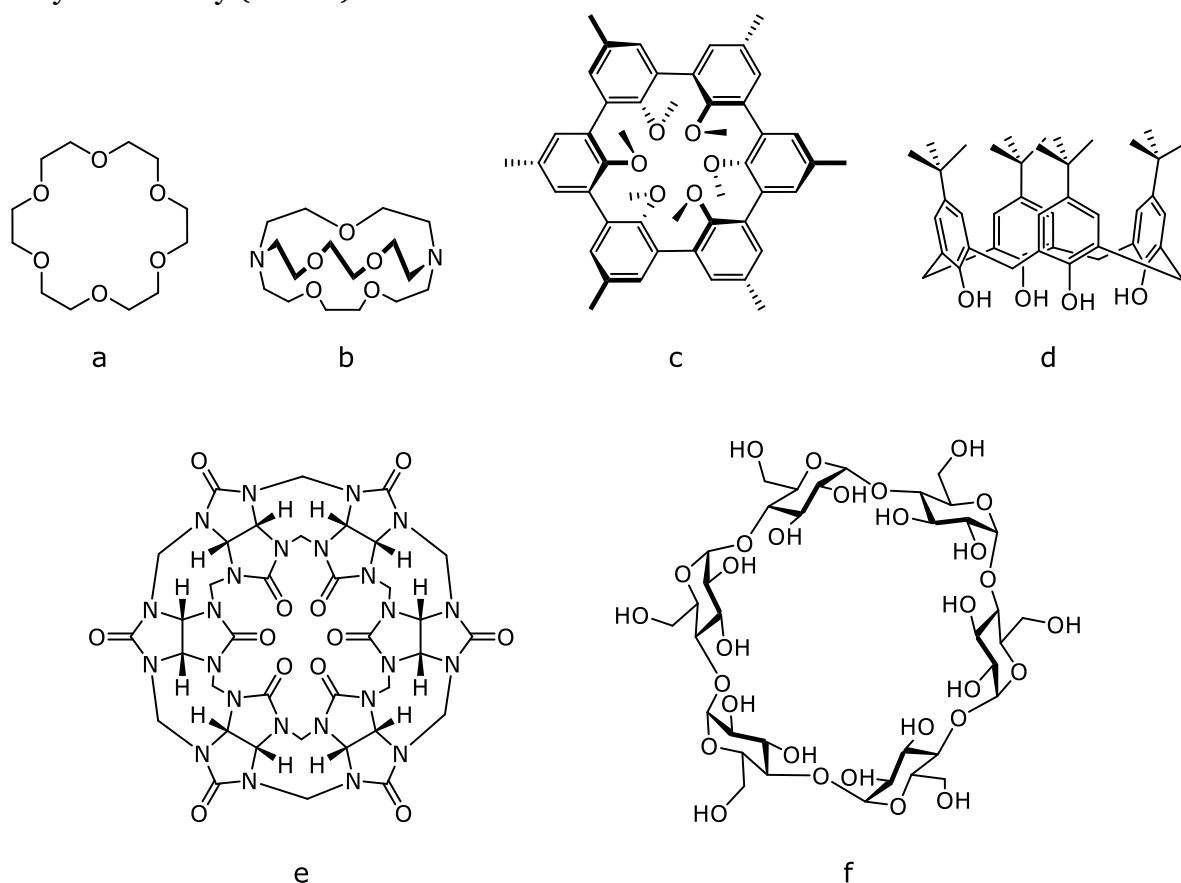


Obr. 1. Navržené cílové konjugáty

3. Přehled problematiky

3.1. Cyklodextriny

Supramolekulární chemie je obor zabývající se studiem chemických systémů, jejichž organizaci zajišťují kromě kovalentních vazeb také slabší vazebné interakce, např. vodíkové vazby, elektrostatické interakce, vazba kov–ligand, van der Waalsovy síly, π – π interakce nebo hydrofobní efekt. Za nejvýznamnější vědce v oblasti supramolekulární chemie jsou považováni Jean-Marie Lehn, Charles J. Pedersen a Donald J. Cram, kteří jsou nositeli Nobelovy ceny za chemii za rok 1987. Tito vědci stojí za objevem makrocyclických ligandů, jako jsou crown ethery, kryptandy a sferandy tvořících tzv. hostitel–host (anglicky host–guest) komplexy⁵. Mezi další látky tvořící tyto komplexy patří například kalixareny⁶, kukurbiturily⁷ a cyklodextriny (Obr. 2).



Obr. 2. Supramolekulární hostitelé: a) crown ether; b) kryptand; c) sferand; d) kalixaren; e) kukurbituril; f) cyklodextrin

Cyklodextriny^{8,9} (CD) jsou cyklické oligosacharidy, které vznikají ze škrobu působením enzymu cyklodextrin glukosyltransferasy (CGTasa). Pro svou netoxicitu a schopnost tvořit inkluzní komplexy s celou řadou látek nalézají využití v mnoha odvětvích průmyslu, např. farmaceutickém, chemickém, zemědělském, potravinářském nebo kosmetickém. Hlavními vlastnostmi, pro které jsou využívány, jsou schopnost zvýšení rozpustnosti, snížení těkavosti a stabilizace komplexovaných látek. Deriváty cyklodextrinů nalézají využití také v chromatografii nebo jako katalyzátory.

3.1.1. Historie

Historie cyklodextrinů¹⁰ se začala psát v roce 1891, kdy francouzský farmaceut a chemik Antoine Villiers zkoumal degradaci bramborového škrobu působením bakterie *Bacillus amylobacter* (pracoval pravděpodobně s kokulturou s *Bacillus macerans*). Vzniklé krystaly, které byly zřejmě směsí α - a β -cyklodextrinu, nazval celulosin pro stejnou odolnost vůči kyselé hydrolyze a nepřítomnosti redukujících cukrů jako u celulosy.

V roce 1903 se podařilo rakouskému chemikovi a bakteriologovi Franzi Schardingerovi připravit tytéž látky. Reakcí s jodem dokázal rozlišit mezi dvěma produkty degradace, které nazval krystalický dextrin A (nyní α -cyklodextrin) a krystalický dextrin B (nyní β -cyklodextrin). Optimalizací reakčních podmínek se mu podařilo docílovat až desetinásobných výtěžků než Villiersovi, publikoval také postupy pro jejich separaci a čištění a zkoumal jejich chemické vlastnosti¹¹.

Mezi 30. a 70. lety 20. století byly cyklodextriny dále studovány. Bylo zjištěno, že obsahují $\alpha(1\rightarrow4)$ glykosidické vazby a že se jedná o cyklické látky. Dále byl objeven také γ -cyklodextrin. Byla též prokázána jejich netoxicity a rozpoznán potenciál uplatnění v průmyslu⁸.

V současnosti se cyklodextriny vyrábějí v desetitisících tun ročně za cenu jen několika dolarů za kilogram. Mezi další významné osobnosti cyklodextrinové chemie patří maďarský chemik József Szejtli (1933–2004), zakladatel společnosti pro výzkum a vývoj cyklodextrinů Cyclolab v Budapešti a iniciátor konání International Cyclodextrin Symposium, které se poprvé konalo v roce 1981 v Budapešti⁹.

3.1.2. Struktura a vlastnosti

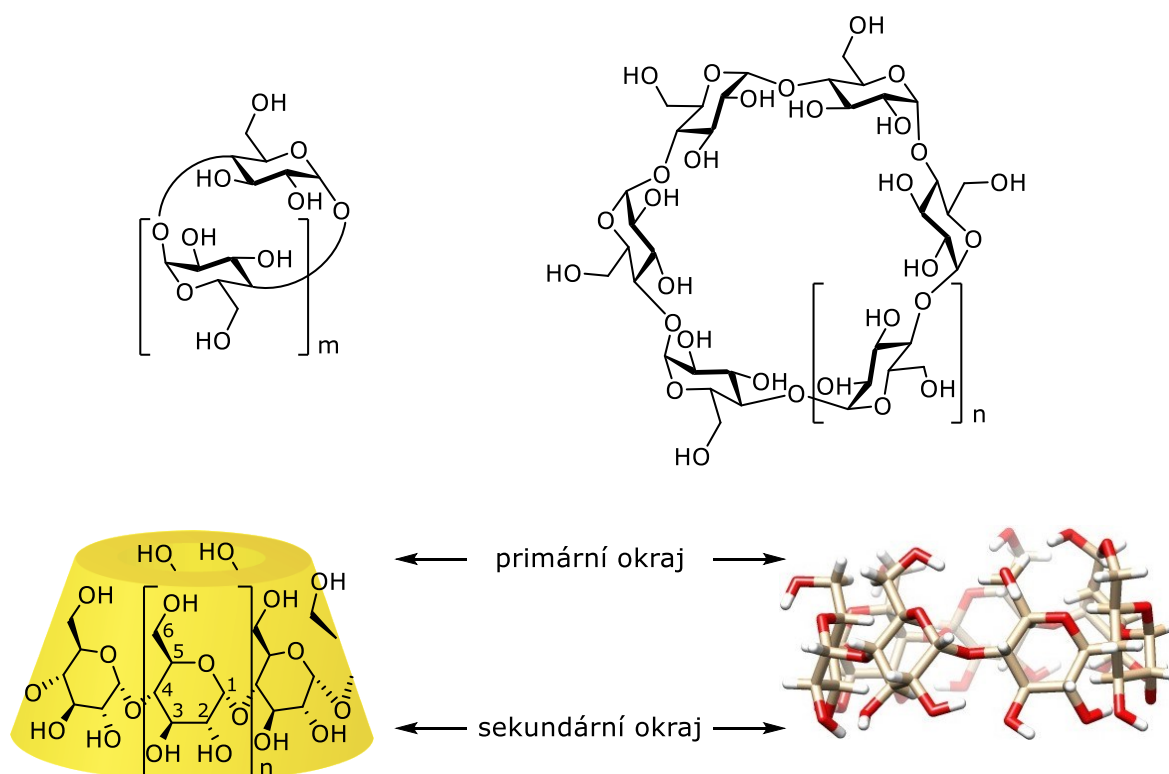
Stavebními jednotkami cyklodextrinů jsou molekuly α -D-glukopyranosy v židličkové konformaci vzájemně propojené 1→4 glykosidickou vazbou. Hlavními třemi zástupci rodiny cyklodextrinů jsou α -, β - a γ -cyklodextrin (Tabulka 1)⁸.

Tabulka 1. Vybrané vlastnosti α -, β - a γ cyklodextrinu⁸

| | α -CD | β -CD | γ -CD |
|--|--------------|-------------|--------------|
| počet glukopyranosových jednotek | 6 | 7 | 8 |
| molární hmotnost / g mol ⁻¹ | 972 | 1135 | 1297 |
| rozpustnost ve vodě při 25 °C / g 100 ml ⁻¹ | 14,5 | 1,85 | 23,2 |
| průměr kavity / Å | 4,7–5,3 | 6,0–6,5 | 7,5–8,3 |
| objem kavity / Å ³ | 174 | 262 | 427 |
| objem kavit v 1 molu CD / ml | 104 | 157 | 256 |
| optická otáčivost [α] _D při 25 °C | 150 ± 0,5 | 162,5 ± 0,5 | 177,4 ± 0,5 |
| pK _A při 25 °C | 12,332 | 12,202 | 12,081 |

Cyklodextriny jsou bílé krystalické látky. V silně kyselém prostředí a za zvýšené teploty podléhají kyselé hydrolyze, jsou ale stabilnější než jejich necyklické analogy¹². Díky konformaci glukopyranos mají molekuly cyklodextrinu tvar dutého komolého kuželu, na jehož užším (primárním) okraji jsou primární hydroxylové skupiny na uhlíku C6 a na jeho širším (sekundárním) okraji jsou situovány sekundární hydroxylové skupiny (C2-OH a C3-OH) (Obr. 3). Do kavity směřují vodíkové atomy C3-H a C5-H a kyslíky glykosidických vazeb. Kavita má hydrofobní charakter, vnější povrch molekuly a sekundární okraj mají naopak charakter hydrofilní⁸. Hydroxylové skupiny na uhlíku C2 vytvářejí vodíkové vazby s hydroxylovými skupinami na uhlíku C3 sousední glukopyranosové jednotky a vzniká tak pás vodíkových vazeb na sekundárním okraji molekuly. Tento pás stabilizuje nejvíce molekulu β -CD, který je proto výrazně méně rozpustný ve vodě. U α -CD vzniká méně vodíkových vazeb, které jsou navíc slabší. Naproti tomu γ -CD je díky své velikosti flexibilnější, a proto má ze všech tří nejvyšší rozpustnost.

Kromě těchto tří nejvýznamnějších byly připraveny také cyklodextriny s 3–4 glukopyranosovými jednotkami (CD3, CD4), v nichž už glukosa nezaujímá svou nejstabilnější konformaci¹³, s 5 jednotkami (pre- α -cyklodextrin)¹⁴, s 9–13 jednotkami (δ -, ϵ -, ζ -, η - a θ -cyklodextrin)^{15,16} nebo dokonce tzv. large ring cyklodextriny s počtem až 39 glukopyranosových jednotek¹⁷. Molekuly s 9 a více jednotkami už jsou však deformované, kavita je zborcená a menší než u γ -CD, proto je jejich využití pro komplexaci látek omezené⁸. Stejně tak CD s nižším počtem jednotek jsou kvůli malé kavitě a náročné přípravě pro využití v praxi nevhodné.

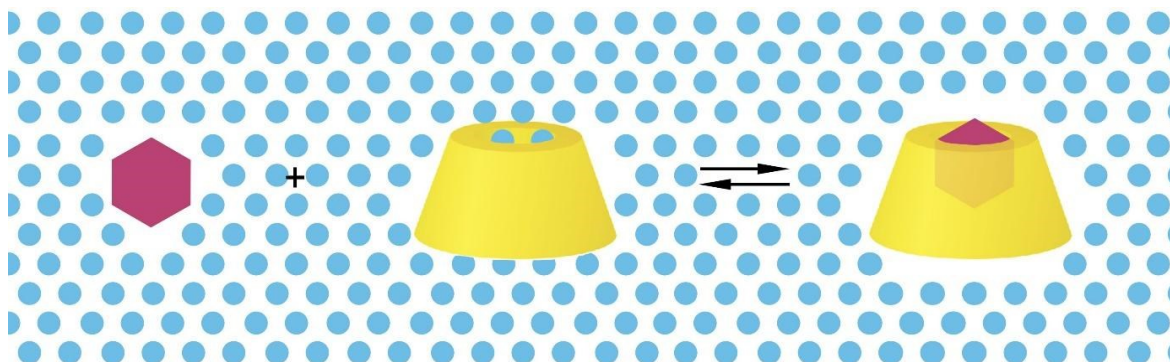


Obr. 3. Grafické reprezentace cyklodextrinů: α -CD ($m = 5$, $n = 1$), β -CD ($m = 6$, $n = 2$) a γ -CD ($m = 7$, $n = 3$)

3.1.3. Inkluzní komplexy

Nejvýznamnější vlastností cyklodextrinů je jejich schopnost tvořit inkluzní komplexy typu hostitel–host. Ve vodném prostředí je hydrofobní kavita obsazena molekulami vody a tento stav je energeticky nevýhodný. Vyskytuje-li se tedy v roztoku vhodná molekula, která je méně polární než voda, ochotně nahradí molekuly vody v kavitě za vzniku komplexu. Ve vodných roztocích se mezi inkluzním

komplexe a volnými molekulami CD a hosta ustavuje dynamická rovnováha (Obr. 4)^{8,18}.



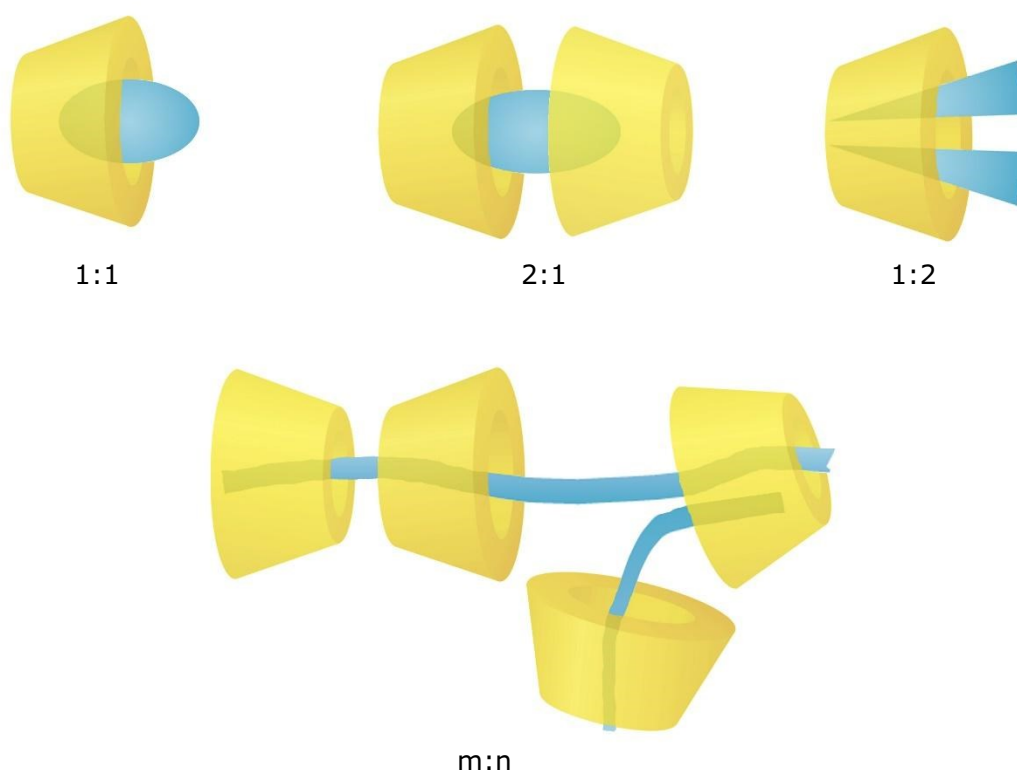
Obr. 4. Tvorba inkluzních komplexů CD–host ve vodném prostředí

Hlavními hnacími silami vzniku komplexů jsou van der Waalovy síly a hydrofobní efekt. Další interakce, které přispívají, jsou elektrostatické interakce dipól–dipól a vodíkové můstky mezi polárními částmi hosta a hydroxylovými skupinami na CD. Menší roli hraje také „indukovaná shoda“, kdy u CD dojde k malé konformační změně, která umožní optimalizovat výše zmíněné uplatňující se interakce. Často se uvádí, že hnací silou vzniku komplexu je také uvolnění „vysokoenergetické“ vody z hydrofobní kavity CD. Ve skutečnosti je tento jev opravdu spojen s poklesem entalpie, ale na druhou stranu dojde ke snížení konformační volnosti molekul vody vytvořením většího počtu vodíkových můstků v nadbytku vody jako rozpouštědla, čímž dojde k poklesu entropie. V rovnici pro změnu Gibbsovy energie

$$\Delta G = \Delta H - T\Delta S \quad (1)$$

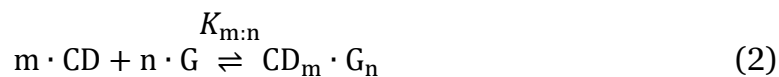
tedy dojde k odečtení přibližně stejně velkých členů a vyvázání vody z kavity CD vyjde jako energeticky neutrální děj¹⁹.

Inkluzní komplexy nemusí vznikat pouze v poměru 1:1 (Obr. 5). Větší hosté mohou být komplexováni i dvěma molekulami CD^{20–22} nebo naopak menších hostů se může do kavity vejít více^{23,24}. Dlouhé řetězce polyethylen- nebo polypropylenglykolu tvoří s větším počtem molekul CD tzv. polyrotaxany^{25,26}. Větvením komplexovaných linkerů mohou být připraveny supramolekulární „cross-linked“ polymery o různé stechiometrii²⁷.



Obr. 5. Komplexy CD a hosta v různých poměrech

Dynamická rovnováha, která se ustavuje mezi komplexem a volnými molekulami CD a hosta (G), může být kvantifikována pomocí vazebné konstanty K (používá se též označení konstanta stability komplexu nebo rovnovážná konstanta). Vazebná konstanta komplexu o stechiometrii $m:n$ $K_{m:n}$ může být vyjádřena pomocí rovnovážných koncentrací.



$$K_{m:n} = \frac{[\text{CD}_m \cdot \text{G}_n]}{[\text{CD}]^m \cdot [\text{G}]^n} \quad (3)$$

Hodnoty vazebné konstanty se pohybují typicky mezi 10^2 – 10^5 M^{-1} ^{8,18,28,29}.

Zásadním jevem spojeným s tvorbou inkluzních komplexů je ovlivnění fyzikálně-chemických vlastností komplexovaných látek. Jedná se především o následující změny⁸.

- Díky tvorbě komplexu je v roztoku zvýšena koncentrace rozpuštěných molekul hosta. Na druhou stranu může být snížena koncentrace CD v roztoku^{4,30,31}.
- Je ovlivněna chemická reaktivita hosta. Většinou je inkludovaná molekula stabilizována a její reaktivita je snížena. V některých případech může CD fungovat naopak jako umělý enzym a katalyzovat transformaci hosta^{32,33}.
- Spektrální vlastnosti inkludované molekuly mohou být modifikovány. Dochází například ke změnám chemických posunů v NMR spektrech^{34–36} nebo ke změnám v UV a fluorescenčních spektrech³⁷.
- Komplexací můžeme dosáhnout snížení těkavosti nebo nepříjemného zápachu inkludovaných látek^{38,39}.
- Protože hydrofilita komplexu je vyšší než samotného hosta, ovlivňují CD i chromatografickou mobilitu látek⁴⁰.

Díky těmto vlastnostem nacházejí CD uplatnění v potravinářství^{41,42}, kosmetice⁴³, analytické chemii (hlavně chromatografii)⁴⁰, textilním průmyslu^{44,45}, zemědělství⁴⁶ a především ve farmaceutickém průmyslu (viz kapitola 3.1.5).

3.1.4. Deriváty cyklodextrinů

Jestliže pro danou aplikaci není vhodný žádný z nativních cyklodextrinů, přichází na řadu jejich deriváty. CD mohou být derivatizovány z různých důvodů – pro zvýšení rozpustnosti v kýženém rozpouštědle, ovlivnění vazebné konstanty konkrétního hosta, umožnění přichycení na různé typy povrchů nebo konjugace s různými látkami jako jsou katalyzátory nebo léčiva. Díky tomu, že molekula CD obsahuje 18, 21 nebo 24 hydroxylových skupin o podobné reaktivitě, poskytuje jejich derivatizace obrovské množství možností, na druhou stranu je také velkou výzvou. Slovo „podobné“ je naprosto zásadní. Každá z glukosových jednotek obsahuje tři hydroxylové skupiny v polohách 2, 3 a 6, jejichž reaktivita není totožná, a skupiny spolu za daných reakčních podmínek soupeří. Hydrofobní kavita může navíc interferovat s činidly použitými v reakci a ovlivnit její průběh^{47–49}.

Kromě reakcí C-O-C a C-C vazeb, které vedou k rozkladu struktury CD, podléhají CD především elektrofilním atakům na hydroxylové skupiny. Hydroxyly v poloze 6 jsou primární a v polohách 2 a 3 sekundární. 6-OH jsou nejvíce přístupné a nejméně kyselé. Naopak 2-OH jsou nejkyselější ($pK_a = 12,2$) a 3-OH jsou nejméně

přístupné⁵⁰. V případě, že je použit nadbytek báze a jsou deprotonovány hydroxylové skupiny všech typů, elektrofilní činidlo bude atakovat 6-OH, protože jsou nejpřístupnější. Situace se ale zkomplikuje, bude-li použit reaktivnější elektrofil. Jeho atak bude méně selektivní a budou vznikat také produkty se substitucí na sekundárním okraji. Při použití kontrolovaného množství silné báze lze docílit deprotonace pouze nejkyselějších 2-OH. Jelikož jsou vzniklé oxyanionty nukleofilnější než nedeprotonované hydroxyly, mezi produkty převažuje regioisomer substituovaný v poloze 2. Nejnáročnější je pak substituce v poloze 3, kdy je potřeba využít komplexace činidla do kavity CD. Důležitou roli hraje také použité rozpouštědlo, které může ovlivnit nukleofilitu oxyaniontů nebo sílu komplexace činidla v kavitě. Množství faktorů, které ovlivňují selektivitu reakcí CD způsobuje, že jejich výtěžky často nejsou příliš vysoké⁴⁹.

Přístupů k syntéze derivátů CD⁴⁸ existuje několik a dají se rozdělit do dvou větších skupin – přímý a nepřímý:

- a) přímá („direct“) metoda – je provedena nespecifická substituce za vzniku směsi regioisomerů, které jsou dále chromatograficky separovány;
- b) chytrá přímá („smart-direct“) metoda – je využito fyzikálně-chemických vlastností CD a činidla a dochází ke vzniku jediného produktu ve vysokém výtěžku;
- c) biologická přímá („bio-direct“) metoda – při reakci jsou použity enzymy;
- d) nepřímá („indirect“) metoda – za cenu zvýšení počtu kroků a použití chránících skupin je docíleno kýženého produktu ve vysokém výtěžku;
- e) chytrá nepřímá („smart-indirect“) metoda – je použito selektivní odchránění persubstituovaného derivátů s vysokým výtěžkem;
- f) cyklizační nepřímá („cyclisation-indirect“) metoda – je připraven derivát oligosacharidu, který je nakonec zcyklizován za vzniku CD.

3.1.4.1. Monosubstituované deriváty

K monosubstituci⁴⁸ v poloze 2 lze použít přímou metodu, která využívá kyselosti hydroxylů v této poloze. Příkladem může být allylace α -CD za použití LiH jako silné báze (Schéma 1). Vedlejšími produkty jsou však také 6-O-allyl- α -CD a více-

substituované deriváty. 2-*O*-Allyl- α -CD lze připravit také nepřímou metodou, kdy je primární strana CD nejprve ochráněna *tert*-butyldimethylsilylovou skupinou⁵¹.

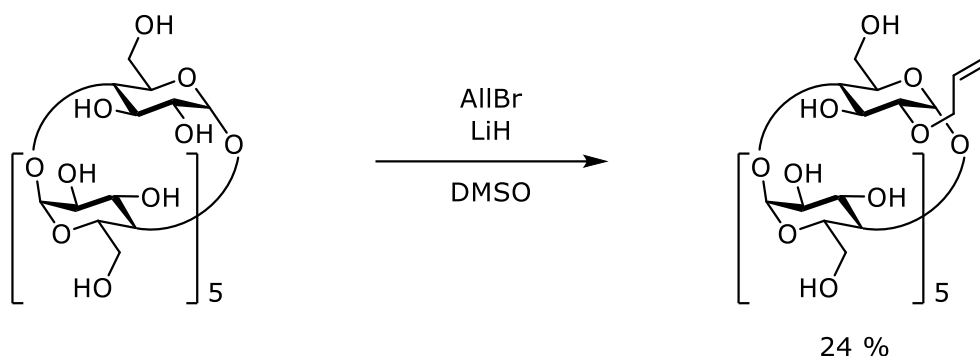


Schéma 1. Allylace α -CD do polohy 2

Substituce v nejméně přístupné poloze 3 je nejnáročnější. Jindřich *et al.* však objevili metodu, kdy za použití cinnamylbromidu, který se komplexuje do kavity β -CD, lze docílit i tohoto regioisomeru s vysokou regioselektivitou (Schéma 2)⁵².

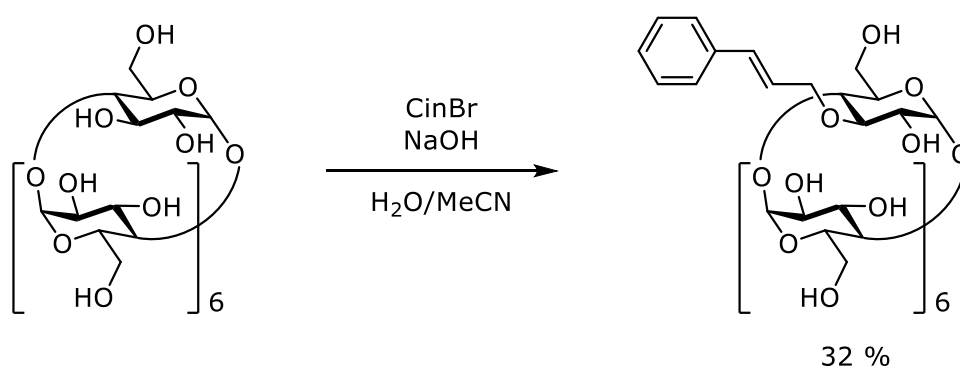


Schéma 2. Substituce β -CD v poloze 3

Vznik derivátů se substitucí v poloze 6 je většinou preferovaný, protože primární 6-OH jsou nejvíce přístupné. Reakce jsou většinou prováděny v pyridinu, který funguje jako rozpouštědlo a zároveň báze a v němž nejsou žádné hydroxylové skupiny deprotonovány. Při podobné nukleofilite všech hydroxylů proběhne reakce na nejprístupnějším 6-OH. Nejčastěji používaným prekurzorem pro syntézu různých derivátů je 6-*O*-tosyl-CD. Od všech tří nativních CD ho lze připravit reakcí s *p*-toluensulfonylchloridem v pyridinu. Při reakci probíhá pouze substituce v poloze 6, vedlejšími produkty jsou však vícesubstituované deriváty. Výtěžky reakcí se pohybují mezi 20–50 %⁵³. Z 6-*O*-tosyl-CD mohou být dále připravovány thioley⁵⁴ nebo *S*-alkyl deriváty⁵⁵, primární aminy (připravované z azidů Staudingerovou

reakcí⁵⁶), terciární a kvartérní aminy⁵³ nebo azidy, které jsou vhodnými substráty pro azido-alkynovou cykloadici⁵⁷ (Schéma 3).

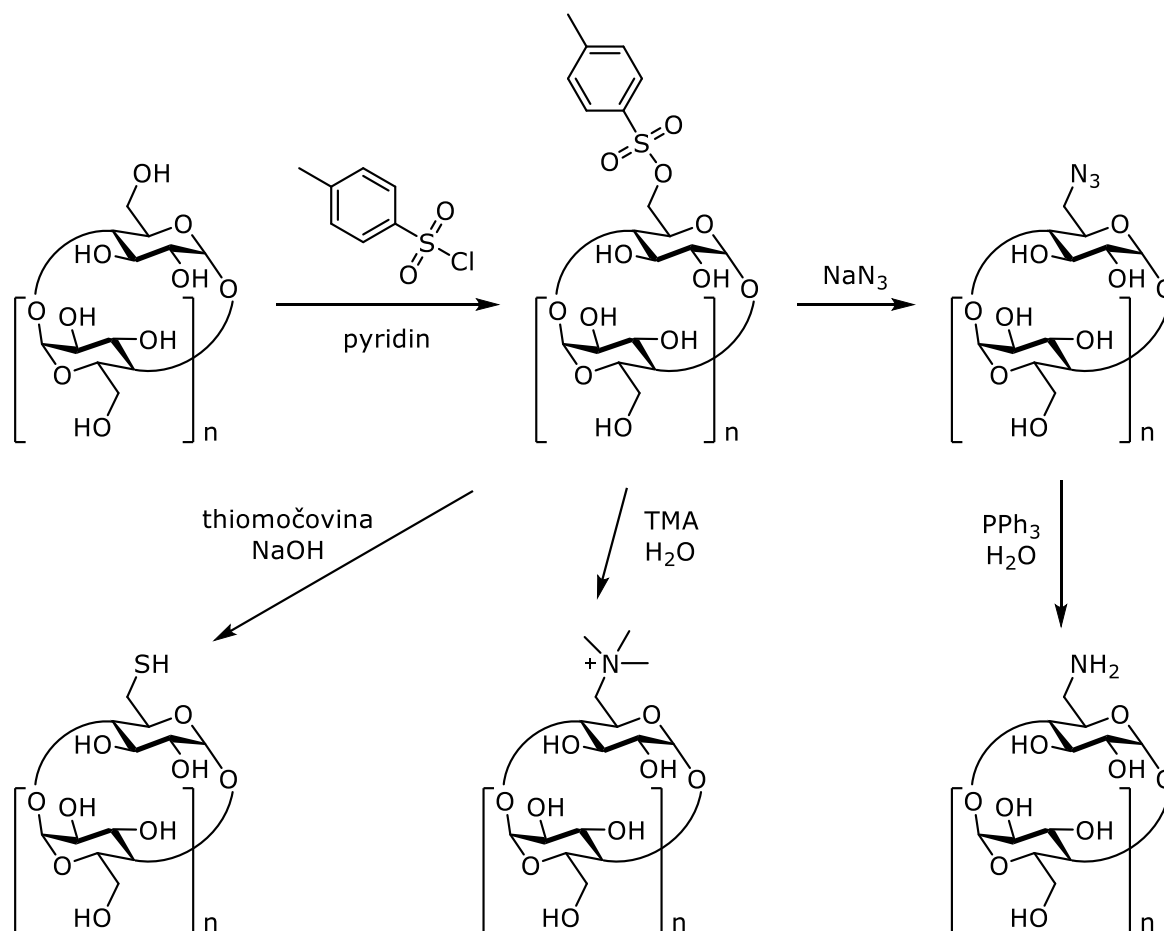
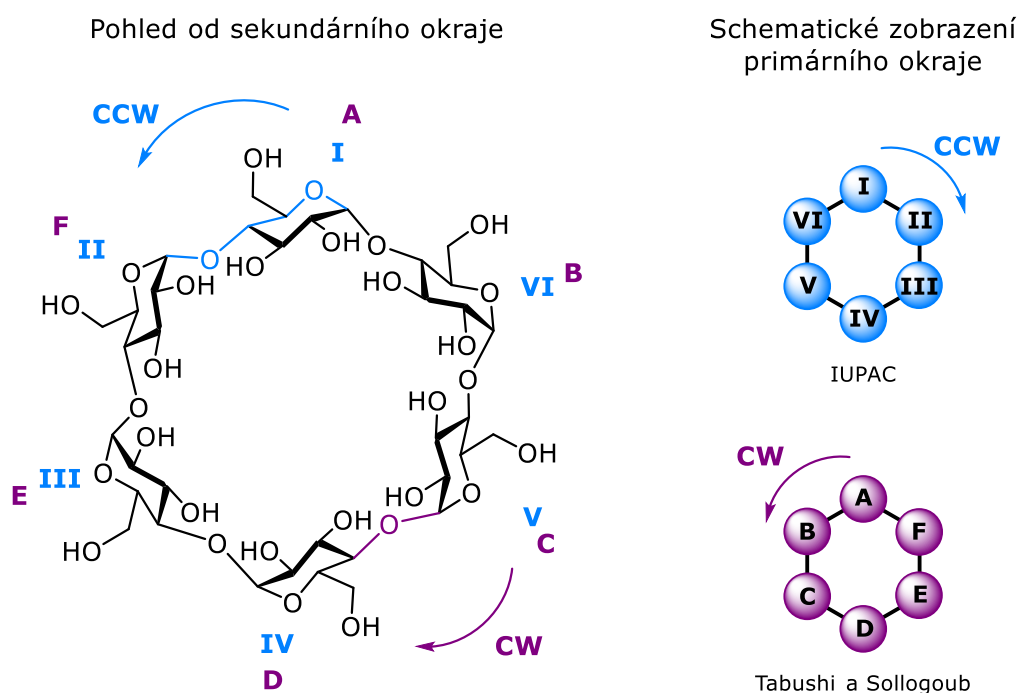


Schéma 3. Využití 6-O-tosyl-CD k přípravě dalších derivátů (α -CD ($n = 5$), β -CD ($n = 6$), γ -CD ($n = 7$))

Monosubstituované deriváty v poloze 6 lze připravit také „smart-indirect“ metodou. Reakce probíhá buď přes selektivní debenzylaci perbenzylovaného CD pomocí DIBAL-H o výtěžcích mezi 47–64 %, nebo selektivní demethylací permethylovaného CD také pomocí DIBAL-H o výtěžcích kolem 20 %. Použita může být také „indirect“ metoda s použitím sledu reakcí silylace hydroxyly v poloze 6, permethylace zbývajících hydroxylů, ochránění silylové skupiny pomocí fluoridového aniontu. Po těchto reakcích samozřejmě následuje transformace volného hydroxyly na kýžený derivát a případné odstranění zbývajících chránících skupin⁴⁹.

3.1.4.2. Disubstituované deriváty

Pro pojmenovávání vícesubstituovaných CD se používá označení jednotlivých glukosových jednotek pomocí velkých písmen nebo římských číslic. IUPAC doporučuje používat číslování glukosových jednotek římskými číslicemi proti směru hodinových ručiček (CCW), díváme-li se přes sekundární okraj⁵⁸. Jdeme tedy pomyslnou cestou od C1 první glukosové jednotky k jejímu C4 a poté teprve přes glykosidickou vazbu k další glukosové jednotce (Obr. 6). Tabushi *et al.* však přišli s číslováním velkými písmeny v opačném směru, tedy ve směru hodinových ručiček při pohledu na sekundární okraj (CW)⁵⁹. Řada významných chemiků zabývajících se CD (např. Sollogoub⁶⁰) se drží Tabushiho způsobu pojmenovávání. V této práci je též použito Tabushiho číslování.

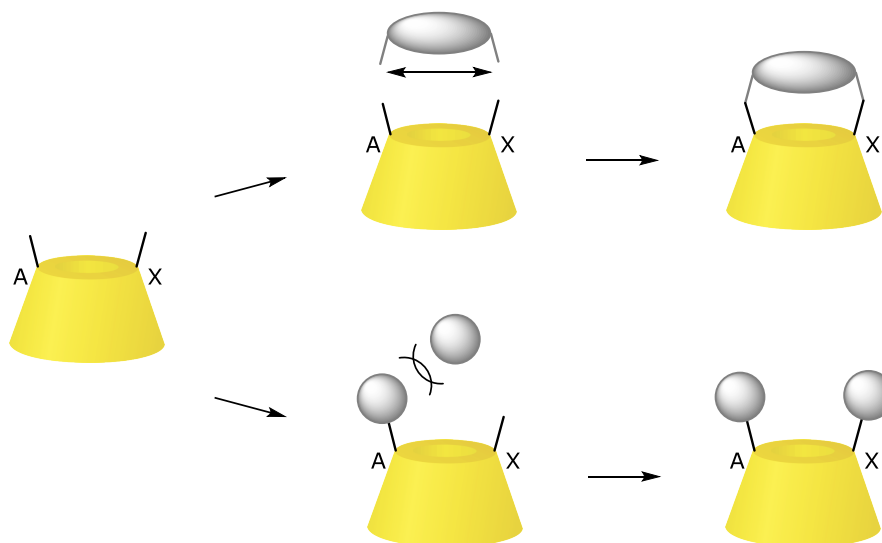


Obr. 6. Číslování glukosových jednotek na α -CD

Příprava disubstituovaných derivátů CD je většinou obtížnější než příprava monosubstituovaných. Budeme-li uvažovat substituci pouze na primárním okraji, která, jak již bylo řečeno, sama o sobě není vždy selektivní, substitucí dvěma stejnými substituenty můžeme získat tři různé regioisomery, jak na α -, tak na β -CD. Budeme-li ale chtít připravit heterodisubstituované deriváty CD můžeme už dostat 5 regioisomerů v případě α -CD a 6 regioisomerů v případě β -CD. Je totiž třeba nezapomínat, že CD jsou chirální sloučeniny a máme-li tedy dva různé substituenty

na sousedních glukosových jednotkách, ale v opačném pořadí, nezískali jsme stejnou látku, nýbrž tzv. pseudoenantiomery⁶¹. Připravit tedy selektivně jediný isomer může být značně náročné a často je třeba využívat sofistikované chromatografické separace.

Přístupy k přípravě disubstituovaných derivátů CD jsou dva – přímý a nepřímý. Přímý přístup využívá použití „capping“ substituentů nebo stericky náročných substituentů, které ovlivní selektivitu další substituce (Obr. 7)⁶².



Obr. 7. Přímá regioselektivní příprava disubstituovaných derivátů CD

„Capping“ metoda byla využita například k přípravě 6-diazido-6-dideoxy- α -CD, klíčového substrátu pro click reakce. Při reakci α -CD s *m*-benzendisulfonylchloridem a následné azidaci převažoval v reakční směsi AB regioisomer v poměru AB/AC/AD = 70/20/10. Při použití bifenyl-4,4'-disulfonylchloridu vznikaly diazidy v poměru AB/AC/AD = 44/40/16, přičemž výtěžek ani jedné z reakcí nepřekročil 5 %. Jednotlivé regioisomery musely být navíc izolovány pomocí HPLC⁶³. Použitím *trans*-stilben-4,4'-disulfonylchloridu lze připravit AD-regioisomer na β -CD, který vzniká téměř jako jediný isomer a byl izolován ve výtěžku 20 %⁶⁴.

Jako stericky náročná skupina byl použit například tris(4-*tert*-butylfenyl)methyl, tzv. supertrityl. Reakcí supertritylchloridu s α -CD, následnou methylovaním zbývajících hydroxylů a chromatografickou separací byly získány regioisomery ve výtěžcích 30 % (AD), 27 % (AC) a 8 % (AB)⁶⁵.

Pro nepřímý přístup je klíčová reakce perbenzylovaného CD s DIBAL-H. V případě α - a β -CD vzniká jediný regioisomer, u γ -CD vzniká směs dvou

(Schéma 4). Nevýhodou tohoto přístupu je ale jeho časová náročnost, neboť se jedná o čtyřkrokovou syntetickou sekvenci (perbenzylace, selektivní bisdebenzylace, transformace hydroxylů, debenzylace), a citlivost klíčové reakce na koncentraci DIBAL-H v reakční směsi^{66–68}.

Selektivní debenzylace se ukazuje být velmi silným nástrojem pro přípravu vícesubstituovaných CD. S jejím využitím je možné pěti kroky připravit 6^{A,D}-diazido-6^{A,D}-dideoxy- α -CD o celkovém výtěžku až 50 %^{63,69}. Sollogoubovi *et al.* se dokonce podařilo připravit α -CD se 6 a β -CD se 7 různými substituenty na primárním okraji^{60,70}.

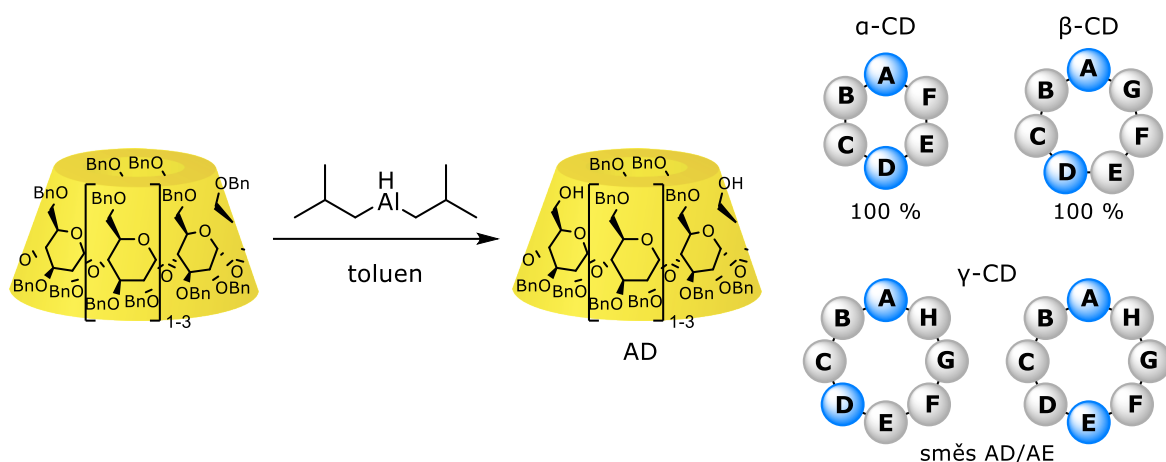


Schéma 4. Regioselektivní příprava disubstituovaných CD pomocí debenzylace

3.1.5. Farmaceutické využití cyclodextrinů a jejich derivátů

Ve vývoji nových léčiv se stal již rutinním tzv. high-throughput screening – testování milionů potenciálních léčiv najednou za pomoci robotiky a softwaru pro zpracování dat. Při přípravě nových potenciálních léčiv se uplatňuje tzv. Lipinského pravidlo pěti (Lipinski's rule of five). Léčivo splňující toto pravidlo by mělo být dobře rozpustné ve vodě, prostupovat buněčnými membránami a být použitelné pro orální podávání pacientům. Vhodný léčivý kandidát by neměl mít⁷¹:

- více než 5 donorů vodíkových vazeb;
- více než 10 akceptorů vodíkových vazeb;
- relativní molekulovou hmotnost vyšší než 500;
- rozdělovací koeficient oktanol/voda $\log P$ vyšší než 5.

S postupem času a množstvím testovaných látek vzniká tlak na přípravu nových a nových látek, což vede ke zvyšování jejich molekulové hmotnosti a lipofility. Z toho

důvodu je zde velká potřeba docílit orální biologické dostupnosti léčiv a ideální rozpustnosti léčiv pro parenterální podání pomocí excipientů ve formulaci léčivých přípravků⁷².

Cyklodextriny a jejich deriváty nalézají široké využití jako farmaceutické excipienty především pro své následující vlastnosti.

- Zvyšují rozpustnost, stabilitu a biologickou dostupnost léčiv^{4,73}.
- Snižují těkavost látek⁷⁴.
- Chrání před oxidací vzdušným kyslíkem a snižují citlivost na světlo a žaludeční kyselinu⁷⁴.
- Snižují rychlost rozkladu, disproportionace, polymerizace a autokatalytických reakcí komplexovaných látek⁷⁴.
- Umožňují převést kapalné nebo olejovité látky do práškové formy vhodné k tabletování^{72,74}.
- Omezují nepříjemnou chuť či zápach tím, že vytvořením komplexu zabrání interakci látky s chuťovým pohárkem, nebo přímo interakcí CD s proteinem v chuťovém pohárku^{75,76}.

α -CD a β -CD nejsou na rozdíl od γ -CD hydrolyzovány lidskými α -amylasami ve slinách a pankreatické šťávě⁷⁷. Jsou však štěpeny bakteriálními enzymy ve střevě. Se svou vysokou molekulovou hmotností a hydrofilitou nejsou CD schopny procházet střevní stěnou a v nízkých a středních dávkách jsou považovány za netoxické při orálním podání⁷⁸. Při intravenózním podání laboratorním myším je LD₅₀ α -, β - a γ -CD 1,0 g/kg, 0,8 g/kg a >4,0 g/kg. β -CD má vysokou afinitu k cholesterolu a dokáže ho extrahovat z buněčné membrány. Ve vysokých koncentracích může způsobovat hemolýzu erytrocytů. Intravenózní podání nesubstituovaného β -CD navíc není možné kvůli jeho nízké rozpustnosti, která vede k tvorbě sraženin v ledvinách. Zde se navíc akumulují jeho komplexy s cholesterolem a způsobují tak poškození ledvinových tubulů. Tomuto problému se však dá vyhnout jeho funkcionalizací⁷².

Nejpoužívanějšími deriváty CD pro lékové formulace jsou 2-hydroxypropyl- β -CD (HP β CD) a 2-hydroxypropyl- γ -CD (HP γ CD), methylovaný β -CD (randomly methylated β -CD, RM β CD, RAMEB) a sodná sůl sulfobutyletheru β -CD (SBE β CD), které mají především větší rozpustnost než nativní CD (Tabulka 2). Všechny tyto deriváty jsou náhodně substituovány a komerčně se dodávají s informací o stupni substituce. Změna rozpustnosti může být způsobena buď narušením pásu

vodíkových vazeb na sekundárním okraji, nebo zabráněním vzniku krystalů tím, že statistická směs různě substituovaných CD vytváří amorfni, nikoli krystalický materiál^{72,79}.

Tabulka 2. Nativní cyklodextriny a jejich deriváty používané ve farmaceutických produktech⁷⁸

| cyklodextrin | počet substitucí na glukosovou jednotku | M_r | rozpustnost ve vodě / mg/ml |
|----------------|---|-------|--------------------------------|
| α -CD | - | 972 | 145 |
| β -CD | - | 1135 | 18,5 |
| HP β CD | 0,65 | 1400 | >600 |
| RAMEB | 1,8 | 1312 | >500 |
| SBE β CD | 0,9 | 2163 | >500 |
| γ -CD | - | 1297 | 232 |
| HP γ CD | 0,6 | 1576 | >500 |

α -CD a jeho deriváty se používají pro tvorbu komplexů typicky s molekulami s alifatickým bočním řetězcem. β -CD komplexuje aromatické a heterocyklické molekuly a γ -CD se používá s většími molekulami jako jsou makrocikly a steroidy⁷⁸.

Nativní CD byly poprvé použity v lékových formulacích prostaglandinů v roce 1976 v Japonsku (Tabulka 3). Jde konkrétně o prostaglandin PGE₂ neboli dinoproston, který vykazuje účinky podobné oxytocinu a který se v komplexu s β -CD podává pacientkám pro vybuzení porodu. Další prostaglandin, PGE₁, alprostadil, způsobuje relaxaci hladké svaloviny a zvyšuje krevní průtok. Společně s α -CD se od roku 1979 podává pacientům k léčbě Buergerovy choroby a erektilní dysfunkce. Později byl kromě Japonska schválen také pro užívání v Evropě a USA. Nativní β -CD se využívá také k modulaci účinků nesteroidních protizánětlivých léčiv, které způsobují dráždění horní části zažívacího traktu a krvácení. Do této skupiny patří například piroxicam, který se používá k léčbě osteoartritidy a revmatoidní artritidy. Díky CD se zdánlivá rozpustnost zvýšila pětikrát, což vedlo ke snížení dráždění trávicího traktu, zvýšení rychlosti absorpce a nástupu účinků léčiva⁷².

RAMEB můžeme nalézt v lékové formulaci antibiotika chloramfenikolu pro použití v oftalmologii. Dále se používá při nasálním podání ženského steroidního hormonu estradiolu pro snížení symptomů menopauzy. Nasální podání umožňuje vyhnout se problémům orálního nebo transdermálního podání jako jsou efekt

prvního průchodu (first-pass effect) nebo pomalý nástup účinků a poskytuje podmínky podobnější fyziologické sekreci hormonu⁷².

HP β CD se vyskytuje v celé řadě léčivých přípravků k orálnímu, intravenóznímu, bukálnímu, rektálnímu, konjunktiválnímu nebo transdermálnímu podání. Příkladem může být itrakonazol – antifungální lék používaný k léčbě infekcí způsobených nejběžnějšími plísněmi rodu *Candida* a *Aspergillus*⁷². Dalším příkladem je ketoprofen – analgetikum používané k léčbě osteoartritidy, jehož orální podání způsobuje podráždění trávicího traktu. Díky HP β CD je možné transdermální podání jako vhodná alternativa⁷⁶. Všeobecně známý protizánětlivý diklofenak je společně s HPyCD dostupný ve formě očních kapek^{72,78}.

Nejnověji schváleným je pak SBE β CD, který se od roku 2002 přidává do lékových formulací intravenózně podávaného antifungálního léku vorikonazolu a intramuskulárně podávaného antipsychotika ziprasidonu⁷².

Tabulka 3. Schválené a prodávané léčivé přípravky obsahující cyklodextriny^{72,78,79}

| léčivo | způsob podání | komerční název | země prodeje |
|--|-------------------------|----------------------------------|--------------------------|
| α-cyklodextrin | | | |
| alprostadil (PGE ₁) | intravenózní | Prostavastin, Caverject, Edex | Evropa, Japonsko, USA |
| cefotiam hexetil hydrochlorid | orální | Pansporin T | Japonsko |
| β-cyklodextrin | | | |
| benexát | orální | Ulgut, Lonmiel | Japonsko |
| dinoproston (PGE ₂) | sublingvální | Prostarmon E | Japonsko |
| nikotin | sublingvální | Nicorette | Evropa |
| omeprazol | orální | Omebeta | Evropa |
| piroxikam | orální | Brexin | Evropa |
| kyselina tiaprofenová | orální | Surgamyl | Evropa |
| 2-hydroxypropyl-β-cyklodextrin | | | |
| cisaprid | rektální | Propulsid | Evropa |
| hydrokortizon | bukální | Dexocort | Evropa |
| indometacin | oční kapky | Indocid | Evropa |
| itrakonazol | orální, intravenózní | Sporanox | Evropa, USA |
| mitomycin | intravenózní | Mitozytrex | USA |
| náhodně methylovaný β-cyklodextrin | | | |
| 17 β -estradiol | nosní sprej | Aerodiol | Evropa |
| chloramfenikol | oční kapky | Clorocil | Evropa |
| sulfobutylether β-cyklodextrin | | | |
| vorikonazol | intravenózní | Vfend | Evropa, USA |

| | | | |
|---|-----------------|----------------|-------------|
| ziprasidon maleinát | intramuskulární | Geodon, Zeldox | Evropa, USA |
| γ-cyklodextrin | | | |
| Tc-99 teboroxim | intravenózní | CardioTec | USA |
| 2-hydroxypropyl-γ-cyklodextrin | | | |
| diklofenak sodný | oční kapky | Voltaren | Evropa |

Dalším příkladem zajímavého využití vlastností CD je látka sugammadex. Tento modifikovaný γ -CD tvoří komplexy s anestetiky rokuroniem a vekuroniem a je tak schopný zvrátit neuromuskulární blokádu jimi způsobenou⁸⁰. CD nemusí být využívány jen pro cílené doručování malých molekul. Výzkumy naznačují, že by mohly být v budoucnu používány také ve formulacích peptidů, proteinů a oligonukleotidů⁷². Probíhá například výzkum možnosti orálního podávání inzulinu⁸¹. Další studie zkoumají schopnost β -CD a jeho derivátů komplexovat cholesterol. Toho se dá využít například pro depleci cholesterolu v lipidových mikrodoménách v plazmatické membráně buněk infikovaných HIV, která způsobí snížení počtu virionů HIV⁸². Existuje také fatální neurodegenerativní Niemannova–Pickova choroba, při které dochází k masivní akumulaci cholesterolu v lysosomech. Využití HP β CD a HP γ CD k léčbě této choroby je také studováno⁸³.

CD mohou být využity v přípravě supramolekulárních materiálů pro doručování léčiv a genů. Jde o různé polymery, systémy schopné samouspořádávání (self-assembly), nanomicely a nanočástice. Pro jejich konstrukci jsou připravovány amfifilní nebo hydrofobní deriváty CD. Amfifilní můžeme rozdělit na neutrální, kationické a anionické⁸⁴. Neutrální amfifilní CD mohou mít esterifikované sekundární hydroxyly alkylovými řetězci o délce 2–14 uhlíků⁸⁵. Druhou možností je reakce per-6-bromcyklodextrinu s alkythiolátem za vzniku CD se substituovaným primárním okrajem s alkylovými řetězci o délce 2–18 uhlíků⁸⁶. Může být také provedena substituce hydrofobními skupinami na primárním okraji a zároveň hydrofilními na sekundárním okraji (oligoethylenglykol)⁸⁷. Kationické amfifilní CD mohou být připraveny zavedením aminové skupiny přímo místo hydroxylů CD⁸⁸ nebo na ω -uhlík oligoethylenglykolového řetězce buď na primárním nebo sekundárním okraji s hydrofobními substituenty na druhém z okrajů⁸⁹. Supramolekulární materiály z kationických CD mají potenciál pro doručování genů⁹⁰. Podobně je na anionické amfifilní CD zaváděna karboxylová⁹¹ nebo sulfátová skupina⁹². Hydrofobní CD jsou alkylované nebo acylované deriváty (např. ethyl, acetyl, butyryl)⁹³.

Polymery obsahující CD můžeme rozdělit na ty, které mají CD v hlavním řetězci, a ty, které mají CD zavěšené v bočním řetězci. K „zesíťování“ (crosslinking) CD se používá epichlorhydrin, diepoxidy nebo diisokyanáty. Například u polymerů β -CD a diisokyanátů bylo dosahováno vazebných konstant až 10^9 M^{-1} s látkami, které s monomerními CD vykazují vazebné konstanty kolem 10^3 M^{-1} ⁹⁴. Polymery s CD v hlavním řetězci se používají k výrobě koloidních nanosférických systémů, nanogelů a hydrogelů. Ty jsou využívány například k distribuci dezinfekčních léčiv při léčbě ran a popálenin⁹⁵ nebo řízenému uvolňování kancerostatika tamoxifenu⁹⁶. Mezi polymery s CD v bočním řetězci patří mimo jiné také dendrimery⁹⁷. Právě variabilita použití různých typů polymerů, jejich flexibility, velikosti či reaktivity poskytuje možnosti optimalizace jejich molekulové hmotnosti, hydrofobity, rozpustnosti nebo schopnosti vázat léčiva a činí z tohoto typu polymerů nadějně materiály pro cílené doručování léčiv^{72,84}.

Polymery obsahující CD se využívají pro doručování genů už od roku 1999 a všechny z nich mají polykationický charakter⁷². Vhodně vyladěné systémy mohou být schopny měnit vlastnosti hlenové vrstvy, indukovat otevření zonulae occludentes (tight junctions) nebo dokonce stimulovat příjem polymerových částic buňkou (cellular uptake). CD také chrání oligonukleotidy před působením endonukleas a modulují nechtěné vedlejší účinky jako je stimulace imunitního systému⁹⁸.

3.1.5.1. Konjugáty cyklodextrin–léčivo

Výše zmíněné aplikace CD pro doručování léčiv využívají pouze komplexace léčiva do kavity CD. V posledních letech se ale výzkum začal zaměřovat také na konjugaci léčiva přímo s CD. Kovalentně navázaný CD může výrazně ovlivnit farmakologické vlastnosti léčiva⁹⁹.

Nesteroidní antiflogistika jsou skupinou léčiv s analgetickými, protizánětlivými a antipyretickými účinky, do které patří například aspirin (kyselina acetylsalicylová), diklofenak, ibuprofen, ketoprofen a další. Přestože jsou v současnosti velice široce používány, mohou způsobovat závažné vedlejší účinky jako gastrointestinální krvácení nebo žaludeční vředy. Konjugace s CD umožňuje cílené doručování těchto léčiv do tlustého střeva a omezuje tak jejich nežádoucí účinky⁹⁹. Protože tyto látky nesou karboxylovou skupinu, jsou k CD připojovány

esterovou vazbou. Například v případě aspirinu navázaného esterovou vazbou na primárním okraji CD v žaludku k uvolňování téměř nedocházelo, v tenkém střevě se uvolňoval z 8,9 % a v tlustém střevě potom z 76,4 %¹⁰⁰.

Ulcerózní kolitida a Crohnova choroba jsou zánětlivá onemocnění tlustého střeva. 5-Aminosalicylová kyselina, která se používá k jejich léčbě, je však absorbována už ve vyšších úrovních trávicího traktu a způsobuje zde nežádoucí účinky. Její konjugace s CD byla zkoumána jako možnost optimalizace doručování léčiva do tlustého střeva⁹⁹.

Také kancerostatikum 5-fluoruracil (5-FU) používající se k léčbě rakoviny tlustého střeva bylo navázáno na β -CD s využitím esterové nebo amidové vazby. V obou případech slouží jako linker mezi 5-FU a β -CD jedna molekula kyseliny octové (Schéma 5). Byla zkoumána závislost uvolňování 5-fluoruracil-1-octové kyseliny (5-FUA) na pH. Poločasy štěpení esterové vazby při pH 1,2, 6,8 a 7,4 a teplotě 37 °C byly stanoveny na 500, 38 a 17 h. K výrazné hydrolyze konjugátu tedy nedochází před vstupem do tlustého střeva, protože sem při orálním podání člověku doputuje až mezi 7.–15. hodinou od požití. Konjugáty s amidovou vazbou byly štěpeny pouze v silně zásaditých roztocích při zvýšené teplotě. Dále bylo zjištěno, že vliv esterasy v tlustém střevě nijak neurychluje uvolňování 5-FUA. Pokud byl β -CD nejprve hydrolyzován α -amylasou na lineární oligosacharid, vliv esterasy na uvolnění 5-FUA se rapidně zvýšil. Při experimentech na myších pak bylo potvrzeno, že konjugát s esterovou vazbou přežije průchod žaludkem a tenkým střevem, 5-FUA je preferenčně uvolňován až v tlustém střevě, ale rychlost uvolňování je nízká¹⁰¹.

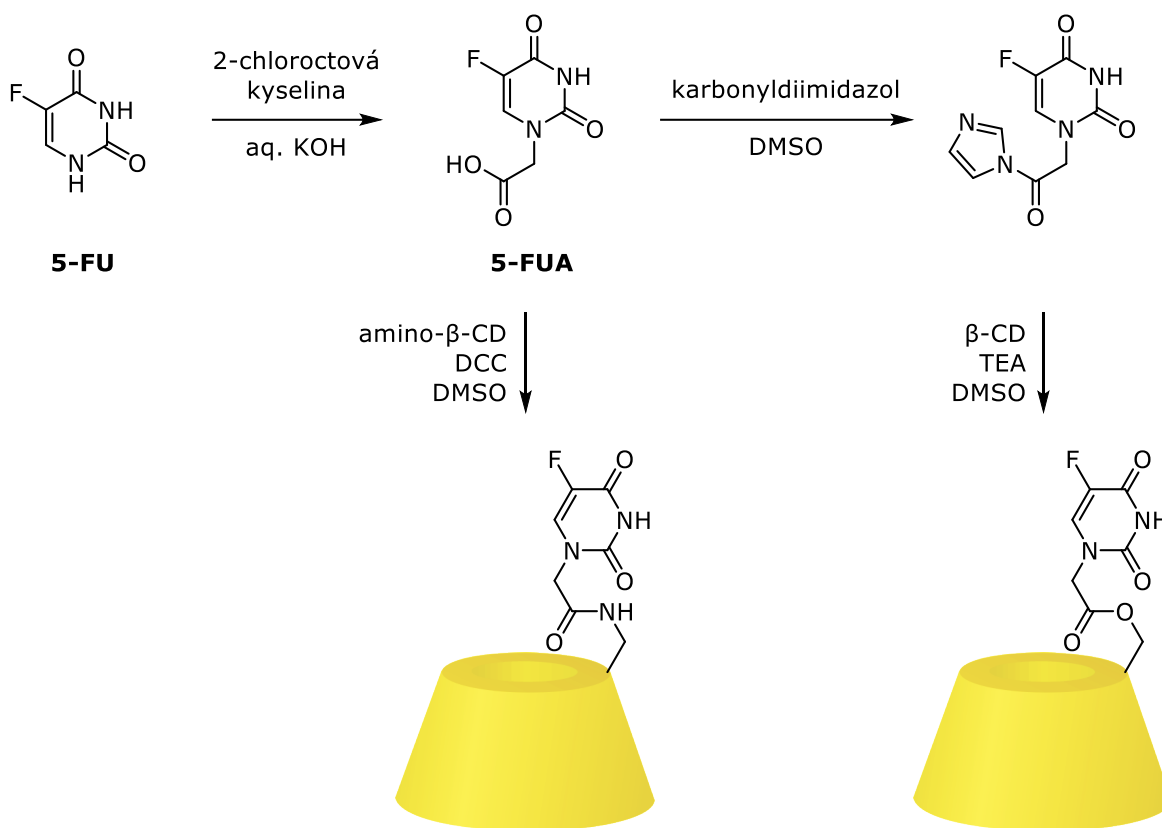
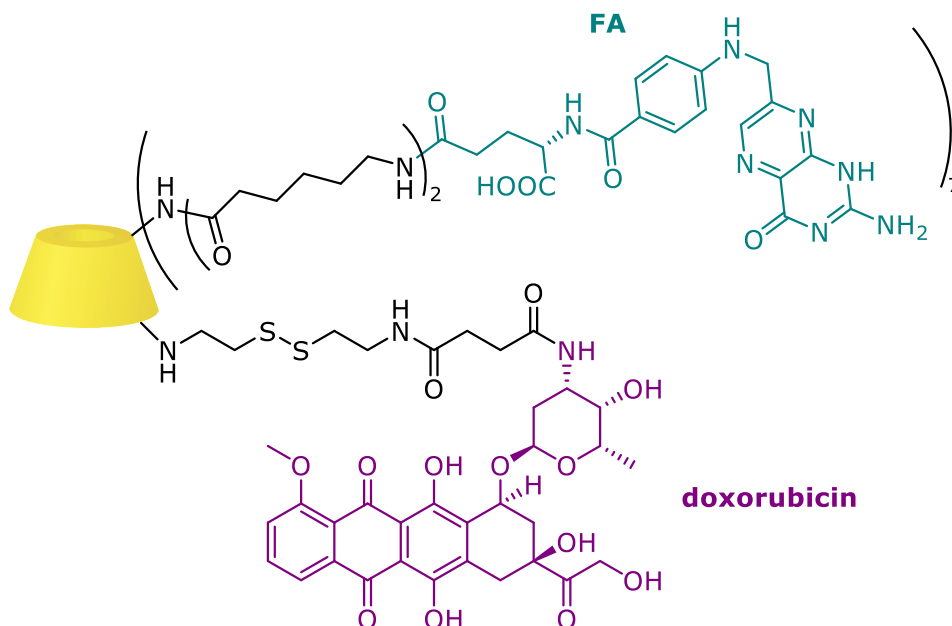


Schéma 5. Příprava konjugátů 5-FU s β -CD podle Udo *et al.*¹⁰¹

Dalším kancerostatikem, jehož konjugát s CD byl zkoumán, je doxorubicin. Mizusako *et al.* připravili β -CD nesoucí molekuly kyseliny listové (folic acid, FA) na primárním okraji jako targetující skupiny (tato problematika bude podrobněji rozebrána v kapitole 3.3) a na jeho sekundární okraj připojili přes acidolabilní linker léčivo doxorubicin. Linker obsahoval disulfidovou vazbu, jejíž rozštěpení v kyselém prostředí (například v endozomu) autoři očekávali (Obr. 8). Studie na rezistentní linii rakovinných buněk prokázala cytotoxický efekt konjugátu a zvýšení vstupu léčiva do buněk (cellular uptake)¹⁰².

Byly připraveny také konjugáty CD s léčivy peptidového charakteru, s nukleovými kyselinami pro genovou terapii nebo například se steroidními léčivy (např. estradiol¹⁰³, prednisolon¹⁰⁴)⁹⁹. Léčiva jsou k CD připojována esterovou nebo amidovou vazbou. Často je také použito propojení triazolem, který vzniká azidoalkynovou cykloadicí^{103,105}.



Obr. 8. Konjugát CD s kancerostatikem doxorubicinem vybavený FA jako targetujícími skupinami

3.2. Fluoruracil

5-Fluoruracil (5-FU) je léčivá látka prodáváná pod komerčními názvy Adrucil, Carac, Efudex, Fluoroplex a Tolak. Používá se k léčbě rakoviny prsu, kolorektálního karcinomu, rakoviny žaludku, slinivky, nosohltanu, rakovin hlavy a krku a aktinické keratózy^{106,107}. Rakovinou onemocnělo v roce 2020 19,3 milionů lidí a 10,0 milionů zemřelo, z toho 11,7 % zemřelo na rakovinu prsu a 10,0 % na kolorektální karcinom¹. Světová zdravotnická organizace zařadila 5-FU v roce 2019 na seznam nepostradatelných léčiv¹⁰⁸. Pacientovi může být podáván intravenózně nebo orálně ve formě prolečiv. Často také bývá podáván v kombinaci s dalším chemoterapeutikem¹⁰⁹.

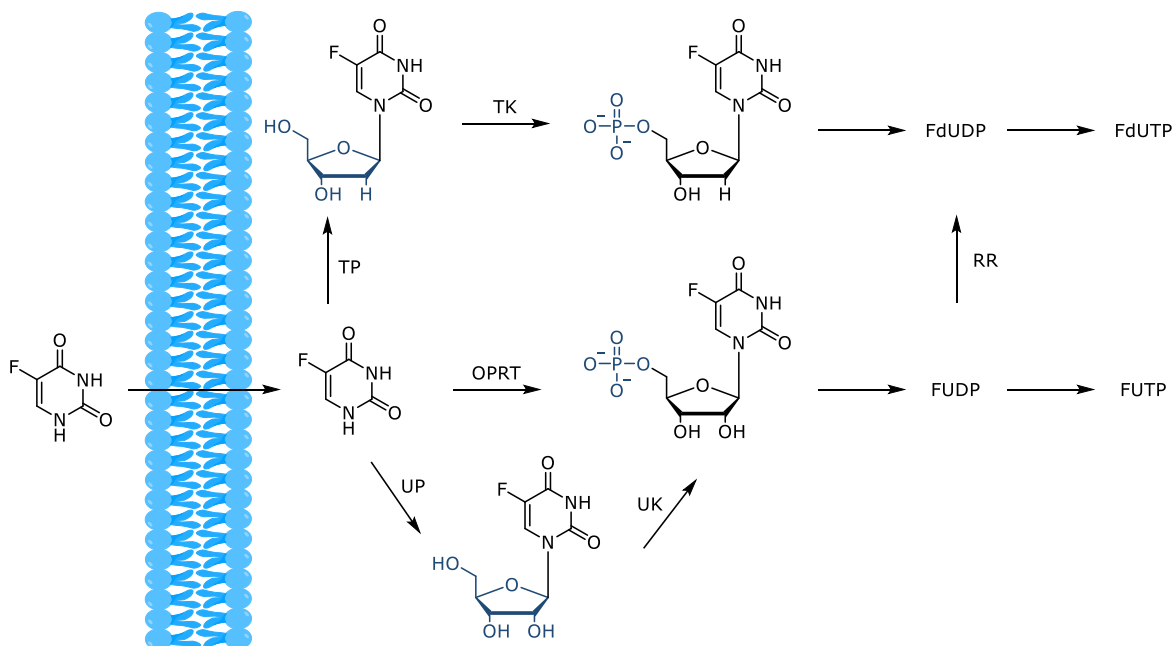
Historie jednoho z prvních protinádorových léčiv se začala psát v roce 1957, kdy Heidelberger navrhl a připravil několik fluorovaných derivátů pyrimidinu. V té době bylo známo, že záměna atomu vodíku za atom fluoru často vede k významnému biologickému efektu, že analoga nukleových kyselin mají potenciál vykazovat protinádorovou aktivitu a že uracil je inkorporován do DNA nádoru ve větší míře než do normální DNA¹¹⁰. Brzy bylo zjištěno, že 5-FU ovlivňuje biosyntézu derivátů

thyminu v nádorových a bakteriálních buňkách a je inkorporován do RNA místo uracilu¹¹¹.

3.2.1. Farmakokinetika a farmakodynamika 5-FU

Mechanismus účinku 5-FU^{2,106} je dvojitý. Zaprvé dochází k inhibici enzymu thymidylát syntasa, což vede k rozvrácení poměru koncentrací jednotlivých nukleotidů v buňce a poškození DNA. Zadruhé se jeho deriváty chybně inkorporují do několika typů RNA a ovlivňují tak jejich funkci. 5-FU vstupuje do buňky stejným transportním mechanismem jako uracil (Obr. 9). Sám o sobě nevykazuje žádnou cytotoxicitu, v buňce je metabolizován na jeden ze svých aktivních metabolitů: 5-fluoruridin-5'-trifosfát (FUTP), 5-fluor-2'-deoxyuridin-5'-trifosfát (FdUTP) nebo 5-fluor-2'-deoxyuridin-5'-monofosfát (FdUMP).

Po vstupu do buňky (Obr. 9) může být 5-FU přeměněn na 5-fluoruridin-5'-monofosfát (FUMP) buď přímo pomocí enzymu orotát-fosforibosyltransferasa (OPRT) a za přítomnosti 5-fosforibosyl-1-difosfátu (PRPP), nebo dvoukrokově pomocí enzymů uridin fosforylasa (UP) a uridin kinasa (UK). FUMP je pak dále fosforylován na difosfát (FUDP), respektive trifosfát (FUTP). Druhou možností je reakce 5-FU katalyzovaná enzymy thymidin fosforylasa (TP) a thymidin kinasa (TK) na 5-fluor-2'-deoxyuridin-5'-monofosfát (FdUMP). 5-Fluor-2'-deoxyuridin-5'-difosfát (FdUDP) může vzniknout fosforylací FdUMP nebo redukcí FUDP katalyzovanou enzymem ribonukleotid reduktasa (RR) a je dále fosforylován na trifosfát (FdUTP).

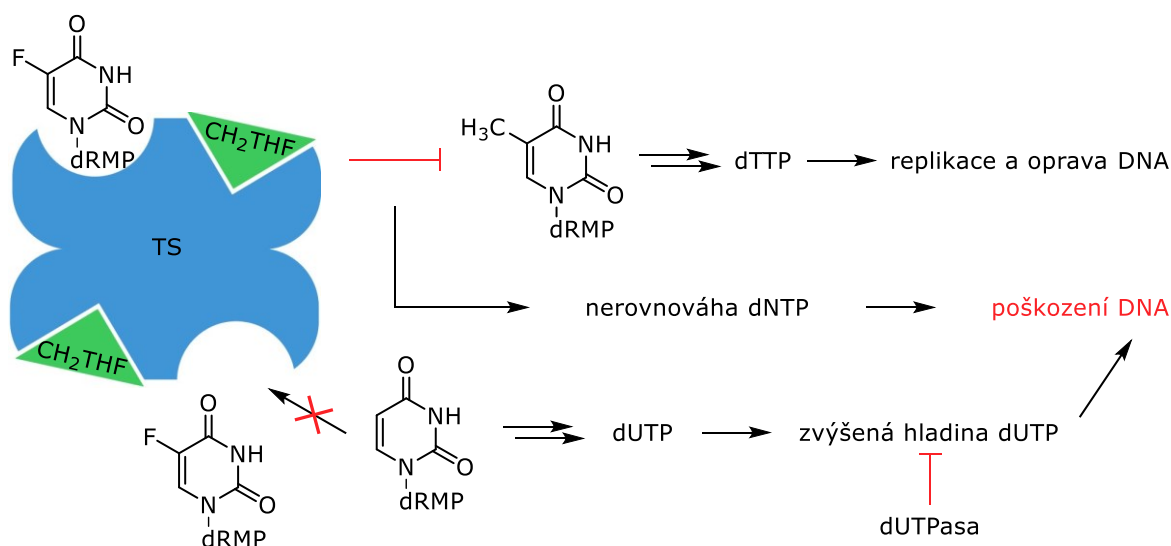


Obr. 9. Metabolismus 5-FU v buňce. 5-FU může být fosfodeoxyribosylován pomocí enzymů thymidin fosforylasy (TP) a thymidin kinasy (TK) nebo fosforibosylován buď přímo za katalýzy orotát-fosforibosyltransferasy (OPRT) nebo postupně pomocí uridin fosforylasy (UP) a uridin kinasy (UK). Oba monofosfáty mohou být dále fosforylovány na di- a trifosfáty. FUDP může být redukován na FdUDP za katalýzy ribonukleotid reduktasy (RR).

3.2.1.1. Inhibice thymidylát synthasy

Thymidylát synthasa (TS) katalyzuje metylaci 2'-deoxyuridin-5'-monofosfátu (dUMP) na 2'-deoxythymidin-5'-monofosfát (dTMP) s 5,10-methylentetrahydrofolátem (CH₂THF) jako kofaktorem – donorem methylu (Obr. 10). Tato reakce je jediným zdrojem thymidylátu syntetizovaného *de novo*, který je zásadním stavebním kamenem při syntéze a opravě DNA. TS je dimerem a každá z podjednotek nese dvě vazebná místa – pro CH₂THF a pro dUMP. FdUMP se váže do nukleotidového vazebného místa enzymu, a vzniká tak stabilní ternární komplex. Přirozený substrát dUMP se nemůže vázat na enzym a být přeměňován na dTMP. Tím roste poměr koncentrací dUMP/dTMP a dochází k rozvrácení rovnováhy hladin deoxynukleotidů v buňce. Deplece dTMP má za následek depleci dTTP, která vede k narušení procesu replikace a opravy DNA a následně k letálnímu poškození DNA a buněčné smrti.

V důsledku inhibice TS dochází navíc ke zvýšené hladině dUMP, který může být dále fosforylován na dUTP. Ten se společně s metabolitem 5-FU, FdUTP chybně inkorporuje do syntetizované DNA a tím způsobuje její další poškození. Záchranným mechanismem buňky proti zvýšené hladině dUTP a její chybné inkorporaci do DNA je enzym dUTPasa, který hydrolyzuje dUTP na dUMP a difosfát. Aktivita tohoto enzymu tak snižuje terapeutický účinek 5-FU^{2,106}.



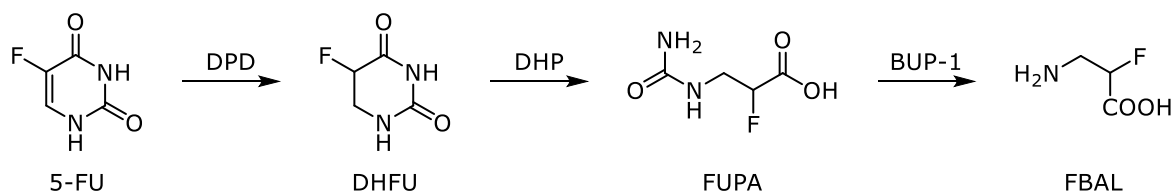
Obr. 10. Mechanismus poškození DNA pomocí inhibice TS. Blokováním vazebného místa enzymu FdUMP se zastaví syntéza thymidylátu a stoupne hladina dUMP v buňce. To způsobí změnu poměrů jednotlivých deoxynukleotidů, což vyústí v poškození DNA a buněčné smrti. Obranným mechanismem buňky je rozklad dUTP. (dRMP - 2-deoxyribosyl-5-monofosfát)

3.2.1.2. Inkorporace do RNA

5-FU narušuje také fungování RNA. Jeho metabolit FUTP je inkorporován do řetězce RNA a ovlivňuje ji na několika úrovních. Zaprvé inhibuje dozrávání ribozomální pre-rRNA na rRNA a narušuje posttranskripční modifikace tRNA. Dále blokuje sbalování a aktivitu snRNA, která se podílí na tzv. splicing, tedy vystřihávání intronů z pre-mRNA. Navíc jak rRNA, tak tRNA a snRNA přirozeně obsahují nukleosid pseudouridin, který vzniká posttranskripční modifikací z uridinu, a tato transformace je 5-FU též inhibována. Konečně inhibuje také polyadenylaci mRNA a tím vším výrazně ovlivňuje celkový buněčný metabolismus a životnost buňky¹⁰⁶.

3.2.1.3. Katabolismus

Výše popsaný anabolický osud však v těle potká jen asi 15–20 % molekul metabolizovaného 5-FU. Zbývajících 80–85 % je přeměňováno enzymem dihydropyrimidin dehydrogenasa (DPD) na inaktivní dihydrofluoruracil (DHFU). Ten je dále metabolizován na α -fluor- β -ureido-propionovou kyselinu (FUPA) a α -fluor- β -alanin (FBAL), který je vylučován močí (Obr. 11). Navíc 10–20 % podávaného 5-FU je vylučováno močí a 2–3 % žlučí v nezměněné podobě^{2,109}.



Obr. 11. Katabolismus 5-FU (DPD – dihydropyrimidin dehydrogenasa, DHFU – dihydrofluoruracil, DHP – dihydropyrimidinasa, FUPA – α -fluor- β -ureido-propionová kyselina, BUP-1 – β -ureido-propionasa, FBAL – α fluor- β -alanin)

3.2.3. Modulace účinků 5-fluoruracilu

Farmakologické vlastnosti 5-FU nejsou ideální, a tak jsou stále hledány možnosti, jak optimalizovat jeho účinek. Třemi možnými strategiemi jsou snížení degradace 5-FU, zvýšení jeho aktivace a podpoření vazby FdUMP na enzym TS. V praxi jich lze docílit třemi způsoby:

- použitím prolečiv 5-FU;
- použitím inhibitorů enzymu DPD;
- kombinací obojího.

Tegafur (ftorafur, 1-(2-tetrahydrofuryl)-5-fluoruracil, Obr. 12) je prvním prolečivem 5-FU a je podáván orálně. Aktivován může být jaterními nebo i systémovými enzymy. Hlavními vedlejšími účinky jsou gastrointestinální toxicita a neurotoxicita a pacienti není příliš dobře snášeni. Používá se tedy většinou v kombinaci s uracilem, se kterým soutěží o aktivní místo DPD a tím prodlužuje poločas 5-FU v organismu. Tato léčba je schválena pro klinické použití na lidech v 50 zemích světa^{2,112}.

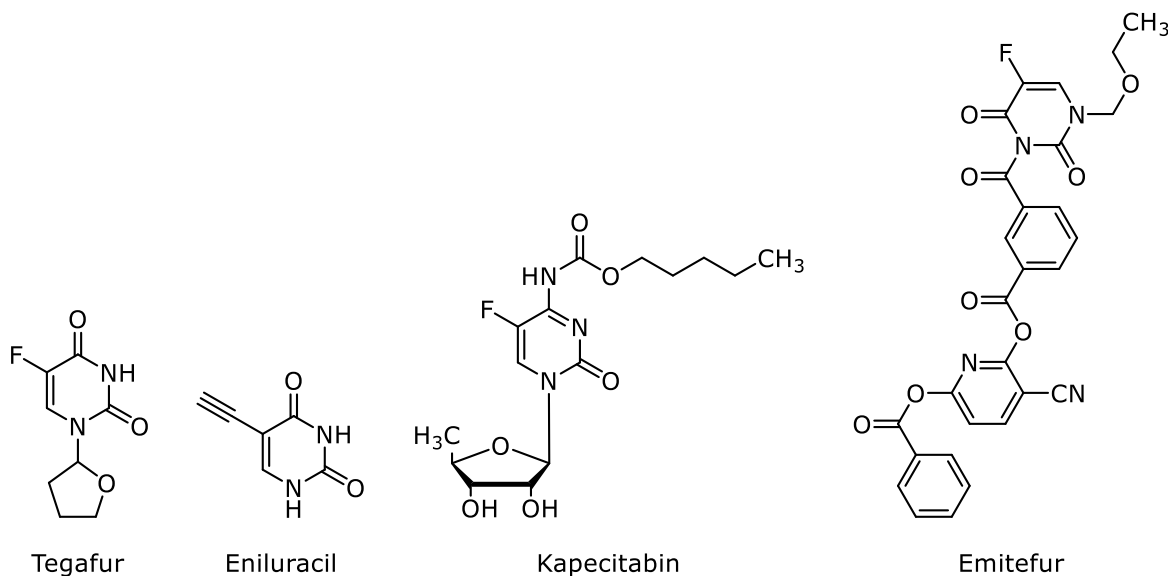
Eniluracil (5-ethynyluracil, Obr. 12) se ireverzibilně váže do aktivního místa DPD¹¹³. Podává se v kombinaci s 5-FU a zvyšuje jeho orální dostupnost¹¹⁴. Kvůli

negativním výsledkům však byly klinické zkoušky v roce 2000 zastaveny. Přesto eniluracil získal od americké FDA „Orphan Drug status“ pro léčbu maligního hepatomu².

Kapecitabin (Obr. 12) je orálně podávaným proléčivem 5-FU. V játrech je metabolizován na 5'-deoxy-5-fluoruridin (5'-DFUR), který je dále přeměněn enzymy TP nebo UP na 5-FU. Oba tyto enzymy vykazují vyšší aktivitu v maligní než v normální tkáni a dochází tedy k tumor-selektivní aktivaci léčiva. Kapecitabin se také ukazuje být méně toxický než samotný 5-FU a je jeho jediným proléčivem schváleným FDA pro klinické použití².

Emitefur (Obr. 12) je proléčivo 5-FU obsahující 3-kyano-2,6-dihydroxypyridin (CNDP), který je inhibítorem DPD. CNDP inhibuje DPD *in vitro* 2000krát efektivněji než uracil a prodlužuje tím poločas 5-FU v organismu¹¹⁵.

Leucovorin (folinová kyselina, 5'-formyltetrahydrofolát) je v buňce metabolizován na CH₂THF, který je kofaktorem TS a jeho vysoká intracelulární koncentrace je klíčová pro optimální vazbu FdUMP na TS. Při podání v kombinaci s 5-FU zvyšuje jeho *in vitro* i *in vivo* toxicitu pro rakovinné buňky^{2,106}.



Obr. 12. Proléčiva 5-FU a inhibitory DPD

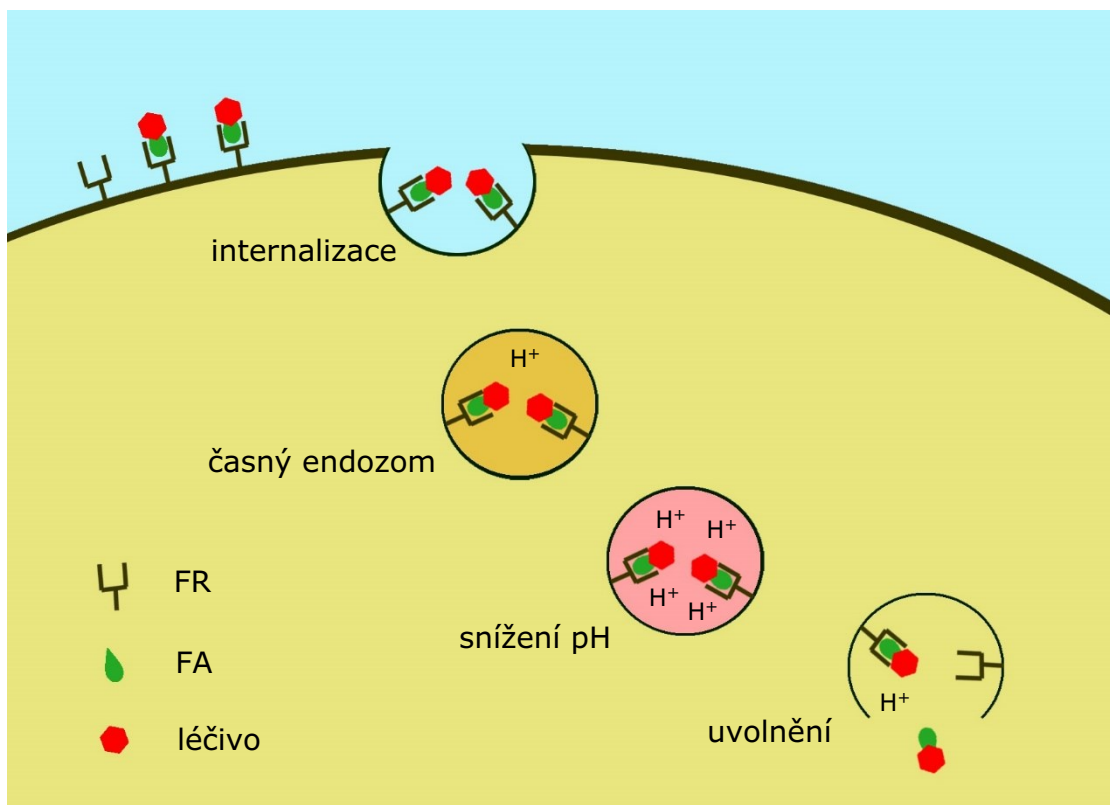
3.3. Kyselina listová jako targetující skupina

Kyselina listová (folát, folic acid, FA) se ukázala být optimální targetující skupinou pro doručování připojených diagnostických nebo terapeutických agens k rakovinným tkáním nebo místům zánětu. Užitečnost FA pro tyto aplikace tkví³:

- v relativně snadné možnosti konjugace s diagnostickými i terapeutickými agens;
- vysoké afinitě k folátovému receptoru (FR) i po její konjugaci;
- limitované distribuci FR v normálních tkáních a jeho zvýšené exprese na povrchu rakovinných buněk (FR- α isoforma) a aktivovaných makrofágů (FR- β isoforma).

Mezi rakoviny, u kterých se prokázala zvýšená exprese FR, patří rakovina vaječníku, plic, prsu, ledvin, mozku, endometria, tlustého střeva a myeloidních hematopoetických buněk. Aktivované makrofágy hrají roli při revmatoidní artritidě, lupénce, Crohnově chorobě, lupu, ateroskleróze, diabetu, ulcerózní kolitidě, osteoartritidě, glomerulonefritidě a sakroidóze. Cílené doručování pomocí kyseliny listové tedy může nalézat uplatnění i v léčbě těchto zánětlivých onemocnění³.

Přestože přesný mechanismus transportu FA pomocí FR do buňky zůstává nejasný, je jisté, že konjugáty s FA jsou nedestruktivně přijímány do savčích buněk receptorem zprostředkovanou endocytózou (Obr. 13). FA se váže na FR na povrchu rakovinné buňky a celý konjugát je bez ohledu na svou velikost pohlcen endozomem. Zde dojde ke snížení pH až k hodnotám 4,3–6,9. Samotná vazba FA na receptor je závislá na pH a při pH < 5 dramaticky klesá. Dochází tedy k uvolnění konjugátu z receptoru a po otevření endozomu také do cytosolu buňky¹¹⁶.



Obr. 13. Folátem zprostředkované doručování léčiv do rakovinných buněk exprimujících FR

V literatuře můžeme najít řadu prací, kde je FA konjugována s CD. Najdeme zde příklady připojení k 6-amino-CD^{117,118} nebo 3-amino-CD¹¹⁸ přes amidovou vazbu. Primární okraj byl FA také persubstitován¹¹⁹. Další možností je využití linkeru mezi oběma molekulami. Tím může být ethylendiamin¹²⁰ nebo polyethylenglykol^{121–123}. FA může být připojen také pomocí azido-alkynové cykloadice¹²⁴.

Ve většině případů bývá FA připojována k aminoskupině ať už na CD nebo na linkeru za přítomnosti činidel dicyklohexylkarbodiimid (DCC) a *N*-hydroxysukcinimid (NHS), kdy dochází ke vzniku aktivního esteru (Schéma 6). Jelikož je FA dikarboxylová kyselina, reakce může probíhat i na bližším α -karboxylu. Mezi produkty však převažuje γ -derivát v poměru $\gamma/\alpha = 80/20$ ¹¹⁸. Pro účely dalšího biologického testování se však často používá směs obou derivátů.

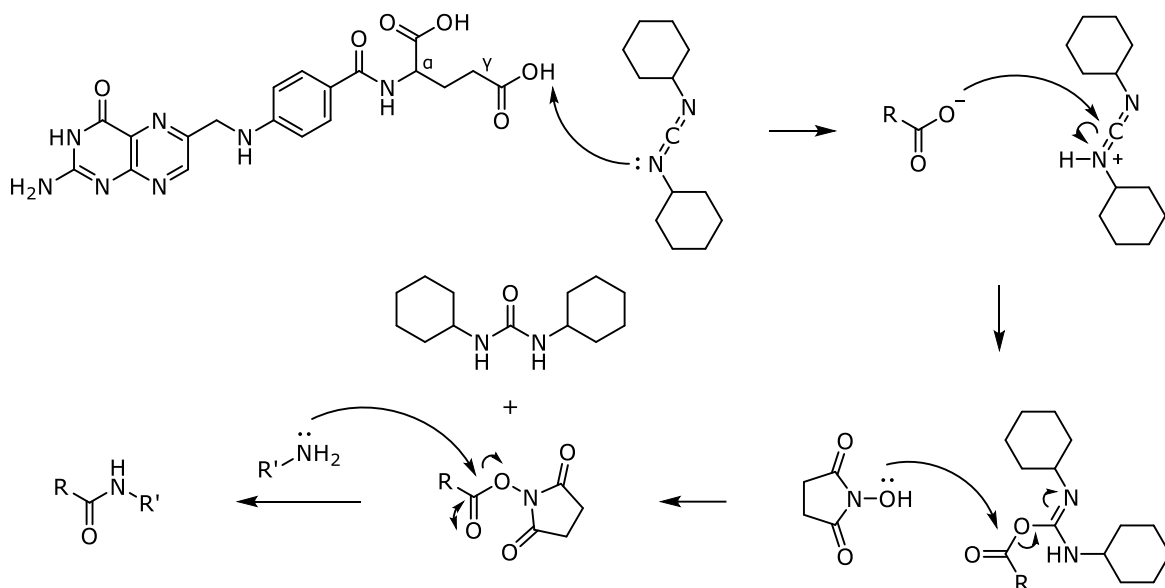


Schéma 6. Vznik amidu FA pomocí aktivace činidly DCC a NHS

3.4. Cu-katalyzovaná azido-alkynová cykloadice

Huisgenova 1,3-dipolární cykloadiční reakce azidů s alkyňy získala mnoho pozornosti v roce 2001, kdy byla objevena možnost katalýzy Cu(I). Ta vede k výraznému zlepšení rychlosti reakce a regioselektivity a byla objevena nezávisle na sobě v laboratořích chemiků Meldala¹²⁵ a Sharplesse¹²⁶. Úspěch Cu-katalyzované azido-alkynové cykloadice (CuAAC) tkví v tom, že je prakticky kvantitativní a velmi robustní a je použitelná dokonce ke spojování biomolekul a k *in vivo* reakcím. Vznikající triazol je inertní vůči oxidačním, redukčním i hydrolytickým podmínkám¹²⁷. Je zároveň nejznámějším zástupcem skupiny „click“ reakcí, které jsou definovány jako modulární, široce použitelné, vysokovýěžkové, stereospecifické a produkt by mělo být možné izolovat bez použití chromatografických metod¹²⁸. Zdrojem Cu může být jodid měďný, kovová měď nebo síran měďnatý v kombinaci s askorbátem sodným jako redukčním činidlem. Nejčastěji používanými rozpouštědly jsou THF, acetonitril nebo DMSO při použití CuI a směsi voda/alkohol při použití CuSO₄. Neexistuje žádná očividná korelace mezi použitou metodou a výtěžkem reakce, a je tedy potřeba optimalizace podmínek případ od případu¹²⁷. Mechanismus reakce ukazuje Schéma 7.

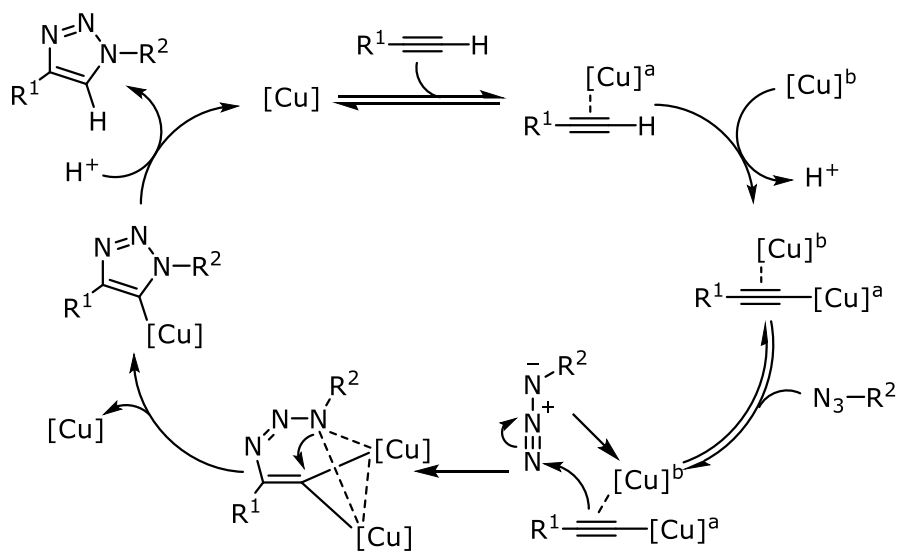


Schéma 7. Mechanismus CuAAC

4. Výsledky a diskuse

4.1. Koncept syntézy

Cílem této diplomové práce bylo připravit konjugáty CD s 5-fluoruracilem vybavené molekulou folátu jako targetující skupinou. K 5-fluoruracilu byl nejprve připojen acidolabilní linker s propargylovou skupinou. Díky Warburgovu efektu, tedy preferenci nádorových buněk pro anaerobní glykolýzu před aerobní, je v okolí tumorů nižší než fyziologické pH (asi 6,3 místo fyziologického 7,4)^{129,130}. Zároveň molekula kyseliny listové se spojuje s folátovým receptorem na povrchu buňky a endocytózou je dopravena do buňky¹⁰². Naším předpokladem tedy bylo, že v extracelulárním nebo endozomálním kyselém prostředí dojde k rozštěpení linkeru a uvolnění 5-FU. Na molekulu β -CD byla dvoukrokově zavedena azidová skupina (Schéma 8). Zbývající hydroxyly na primárním okraji byly ochráněny silylovou chránicí skupinou. Alkylace sekundárního okraje chráněným aminoethylbromidem se však ukázala být velmi problematickou a byli jsme nuceni strategii pozměnit.

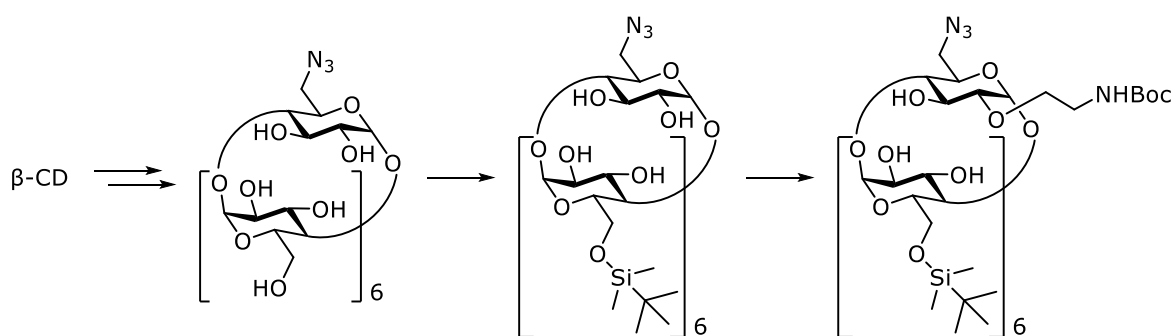


Schéma 8. Příprava derivátů β -CD pro primární syntetický plán

V novém cílovém produktu měly být léčivo i targetující skupina připojeny k primárnímu okraji CD (Schéma 9). Jelikož molekula 5-FU tvoří komplex jak s α -, tak s β -CD¹³¹, byl pro nový syntetický plán zvolen α -CD. Se svými 6 glukosovými jednotkami a tím danou větší symetrií je snazší připravit jeden konkrétní regioisomer ve vysokém výtěžku. Podobný derivát β -CD se z časových důvodů připravit nepodařilo. Příprava klíčového intermediátu 6^{AD}-diazido- α -CD byla vyzkoušena jak přímou, tak nepřímou metodou. Dvě metody přípravy byly také testovány při přípravě částečně redukováného 6^A-amino-6^D-azido- α -CD. Posledními dvěma kroky byly připojení folátu k aminoskupině amidovou vazbou a azido-alkynová cykloadice substituovaného 5-FU na CD.

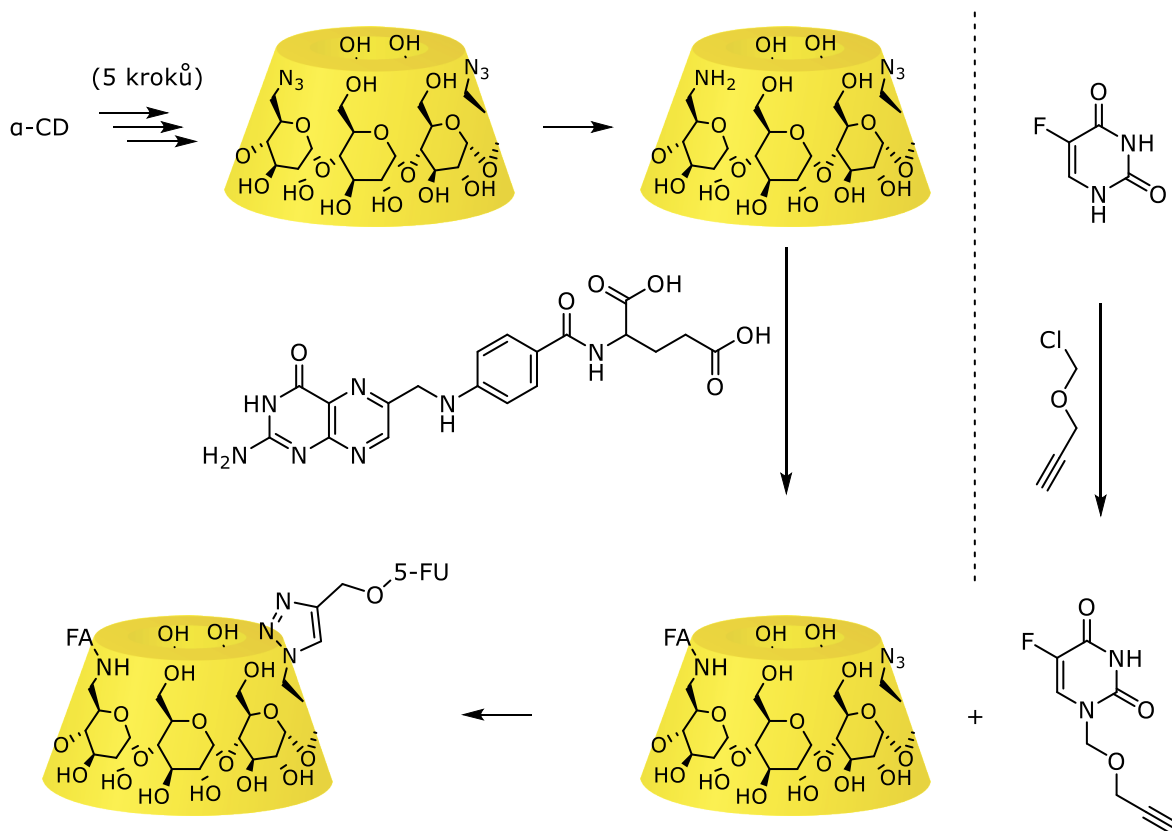


Schéma 9. Nový koncept syntézy

4.2. Příprava propargyloxymethylchloridu

Propargyloxymethylchlorid **1** byl nejprve připravován zaváděním plynného chlorovodíku (generovaného přikapáváním H_2SO_4 k $NaCl$) do suspenze paraformaldehydu v propargylalkoholu a produkt byl izolován pomocí sloupcové chromatografie^{132,133}. Touto metodou však bylo dosahováno jen velmi nízkého výtěžku (5–6 %) a hlavním produktem reakce byl bis(propargyloxy)methan.

Bos *et al.* připravovali podobné deriváty z různě substituovaných propargylalkoholů bez práce s plyny – přikapáváním alkoholů k suspenzi paraformaldehydu v trimethylsilylchloridu¹³⁴. Zároveň nebyla nutná chromatografická separace. Tato mnohem pohodlnější metoda se ukázala být vhodnou i k přípravě nesubstituovaného propargyloxymethylchloridu **1** ve výtěžku 32 % (Schéma 10).

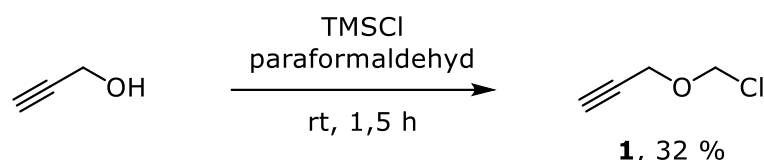


Schéma 10. Příprava propargyloxymethylchloridu

4.3. Alkylace 5-fluoruracilu

Alkylace 5-FU propargyloxymethylchloridem **1** byla nejprve prováděna za bazických podmínek v DMF. V literatuře bylo možné najít použití K_2CO_3 ¹³⁵, NaH ¹³⁶ a Et_3N ¹³⁷ pro přípravu podobných derivátů 5-FU. Ani s jednou z těchto bází však nedocházelo k reakci, a to ani za zvýšené teploty.

Jiným možným přístupem k alkylaci 5-FU je jeho předchozí silylace^{138,139}. Vorbrüggenova neboli silyl-Hilbertova-Johnsonova reakce je syntéza pyrimidinových nukleosidů z 2,4-bis((trimethylsilyl)oxy)pyrimidinů a chráněných glykosylhalidů katalyzovaná Lewisovou kyselinou (SnCl_4 , TMSOTf)^{140,141}. Analogickým přístupem se podařilo připravit kýžený produkt **2** (Schéma 11).

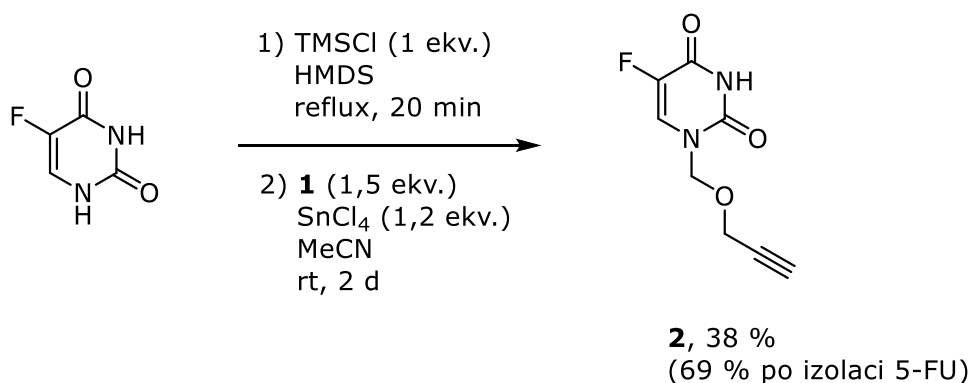
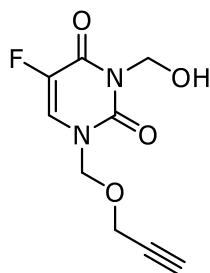


Schéma 11. Alkylace 5-FU

Bez katalýzy^{142,143} nebo s katalytickým množstvím¹⁴⁴ SnCl_4 k reakci nedocházelo, až při přidání 1,2 ekv.¹⁴⁵ začal v reakční směsi vznikat produkt. Při použití nadbytku výchozí látky **1** vznikal také vedlejší produkt. Z ^1H NMR spektra bylo zjištěno, že se jedná o produkt disubstituce, který je následně částečně hydrolyzován (látka **2a** na Obr. 14, nebylo zjištěno, zda druhá substituce probíhá na druhém z dusíků nebo na kyslíku).



2a

Obr. 14. Vedlejší produkt alkylace 5-FU

Největšího výtěžku (38 %, 69 % po izolaci nezreagovaného 5-FU) bylo dosaženo zředěním reakční směsi, kdy se podařilo omezit vznik vedlejšího produktu (Tabulka 4).

Tabulka 4. Alkylace 5-FU

| číslo reakce | báze | silylace | ekv. SnCl ₄ | c ₅ -FU / mol L ⁻¹ | ekv. 1 | produkt | výtěžek 2 |
|--------------|--------------------------------|----------|------------------------|--|---------------|---------------|------------------|
| 1 | K ₂ CO ₃ | - | - | 0,38 | 1 | - | - |
| 2 | NaH | - | - | 0,38 | 1 | - | - |
| 3 | Et ₃ N | - | - | 0,77 | 1 | - | - |
| 4 | - | ano | 1,2 | 0,15 | 1 | 2 | 11 % |
| 5 | - | ano | 0,05 | 0,10 | 1,2 | - | - |
| 6 | - | ano | 1,2 | 0,10 | 1,2 | 2 + 2a | 12 % |
| 7 | - | ano | 1,2 | 0,01 | 1,5 | 2 | 38 % |

4.4. 6^A-Azido-6^A-deoxy-β-cyklodextrin

Monotosylaci β-CD (Schéma 12) je možné provádět v pyridinu⁵⁶ nebo ve vodném roztoku NaOH^{146,147}, který je následně neutralizován roztokem HCl a dojde k vysrážení směsi produktu **3**, nezreagovaného β-CD a vícesubstituovaného derivátu ve formě bílých krystalů. Vícesubstituovaný derivát má velmi podobné chromatografické vlastnosti a izolace produktu je proto obtížná. V literatuře se vyskytuje řada metod separace pomocí srážení v acetonu nebo krystalizace ve vodě, jejichž použitím se však nelze vícesubstituovaného vedlejšího produktu zcela zbavit. Popr *et al.* vyvinuli metodu izolace, kdy je krystalizací v 50% vodném methanolu získáván čistý produkt obvykle ve výtěžku 20–30 %⁵³. Relativně nízký výtěžek reakce je dán také tím, že *p*-toluensulfonylchlorid jakožto tosylací činidlo je nerozpustný ve vodě a musí tedy nejprve dojít k vytvoření komplexu 1:1 s CD^{147,148}. 6^A-O-Tosyl-

β -CD byl nakonec připraven reakcí s *p*-toluensulfonylchloridem ve vodném roztoku NaOH a izolován popsanou metodou krystalizace z 50% vodného MeOH v celkovém výtěžku 26 %. Nutno dodat, že komerční *p*-toluensulfonylchlorid je dodáván ve formě poměrně velkých nesmáčivých krystalů a bez jejich předchozího rozmělnění ve třecí misce k reakci v podstatě nedocházelo.

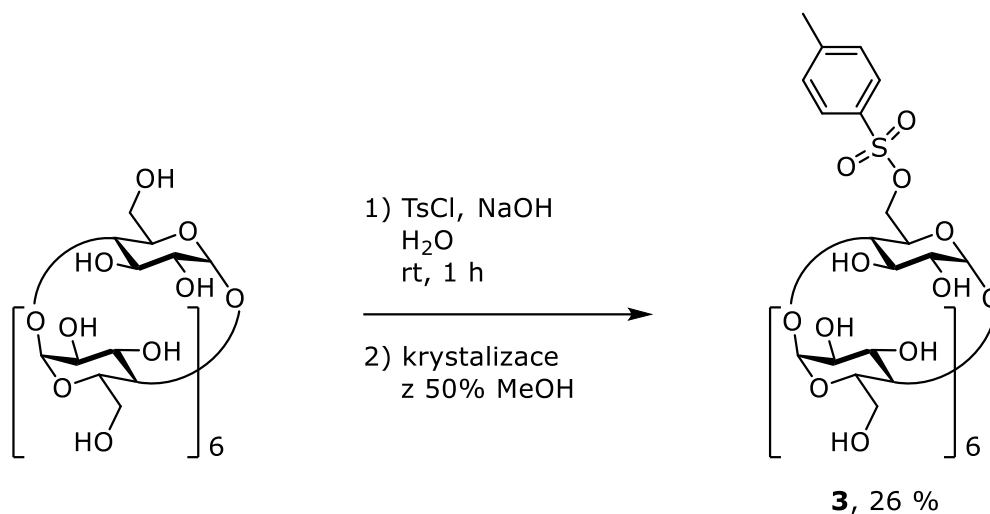


Schéma 12. Monotosylace β -CD

6^A-Azido-6^A-deoxy- β -CD **4** byl připraven modifikací publikovaného postupu za použití azidu sodného a DMF jako rozpouštědla (Schéma 13)¹⁴⁹. Separace se opět obešla bez sloupcové chromatografie, produkt byl vysrážen v acetonu.

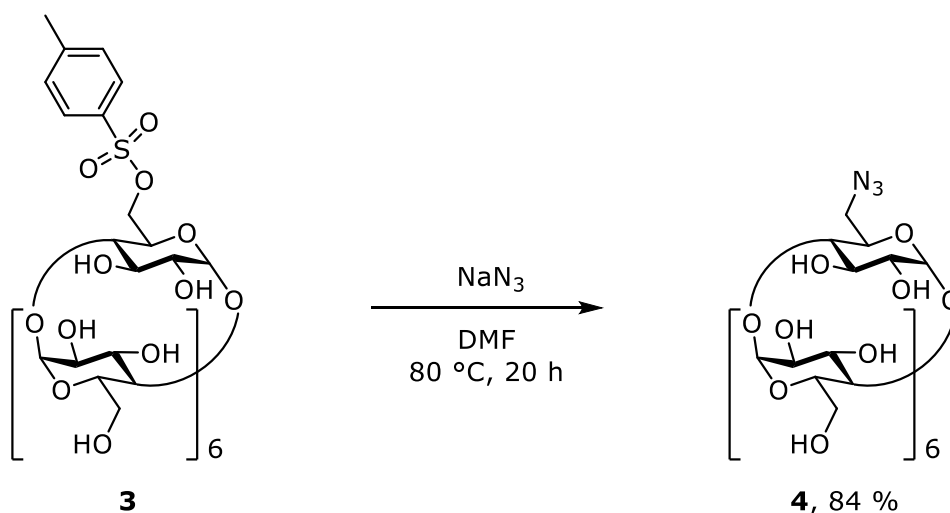


Schéma 13. Příprava 6^A-azido-6^A-deoxy- β -CD

4.5. 6^A-Azido-6^A-deoxy-hexakis(6-*O*-*tert*-butyldimethylsilyl)-β-cyklodextrin

Příprava 6^A-azido-hexakis(6-*O*-TBDMS)-β-CD **5** byla nejprve vyzkoušena v DMF s imidazolem jako bází a TBDMSCl jako silylačním činidlem¹⁵⁰. Touto metodou bylo docíleno výtěžku 28 %. Jako efektivnější se ukázalo použití pyridinu jako rozpouštědla a báze zároveň^{151–153}. Problémem reakce je, že ke vzniku derivátů silylovaných i na sekundárním okraji dochází dříve, než dojde k plné konverzi na produkt se 6 silylovými skupinami na primárním okraji. Chromatografická separace je pak náročná a dochází k velkým ztrátám. Benkovics *et al.* vyvinuli metodu separace per-6-silylovaného β-CD s využitím sloupcové chromatografie a dvou elučních směsí, z nichž jen jedna vymývá produkt¹⁵⁴. Jejich metoda byla vyzkoušena a ukázalo se, že je použitelná i pro 6^A-azido-6^A-deoxy-β-CD **4**. Klíčové zde je použití většího nadbytku silylačního činidla až do vymizení derivátů s volnými 6-OH z reakční směsi. Touto metodou bylo dosaženo výtěžku 56 % (Schéma 14).

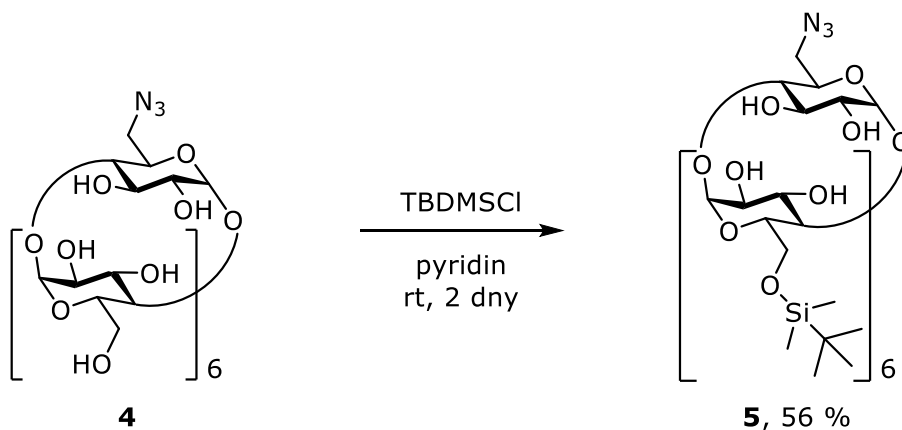


Schéma 14. Příprava 6^A-azido-hexakis(6-*O*-TBDMS)-β-CD

4.6. 2-*O*-Boc-Aminoethyl-6^A-azido-6^A-deoxy-hexakis(6-*O*-*tert*-butyldimethylsilyl)-β-cyklodextrin

Alkylace sekundárního okraje byla prováděna za standardních podmínek v DMSO s použitím NaH jako silné báze. Nukleofil byl aktivován přidavkem 15-crown-5 a elektrofil přidavkem tetrabutylamoniumjodidu (TBAI) (Schéma 15). Vznik produktu byl pozorován na TLC a po izolaci potvrzen ¹H NMR spektroskopií. Když však reakce byla opakována, ke vzniku produktu již nedocházelo. Reakce tedy

byla nasazena ještě několikrát s různými obměnami – chráněný aminoethylbromid z jiného zdroje, čerstvě vysušené rozpouštědlo, čerstvě připravený derivát CD, více či méně ekvivalentů báze, vynechání 15-crown-5, TBAI nebo obou, použití THF jako rozpouštědla. Při zvýšení reakční teploty docházelo k rozkladu chráněného aminoethylbromidu. Reakce byla dokonce nasazena jedním z kolegů z laboratoře, aby byla vyloučena případná systematická chyba. Pro vyloučení hypotézy vzniku agregátů, které by mohly bránit průběhu reakce, byla reakční směs ponechána 30 minut v ultrazvukové lázni. V žádném z dalších pokusů už se ale nepodařilo dosáhnout vzniku produktu.

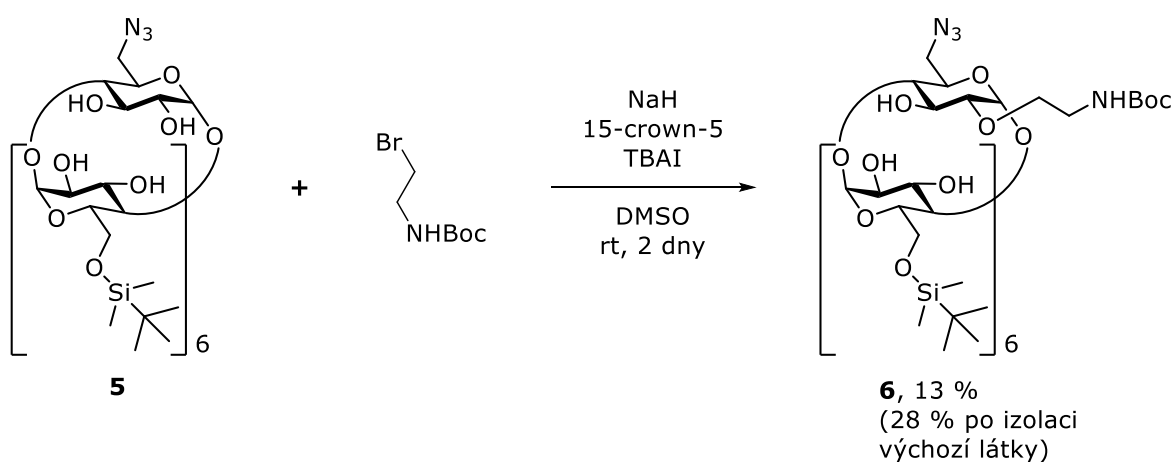


Schéma 15. Alkylace sekundárního okraje 6^A-azido-6^A-deoxy-hexakis(6-O-TBDMS)- β -CD chráněným aminoethylbromidem

Byly tedy vyzkoušeny i úplně jiné podmínky. Hanessian *et al.* připravoval β -CD allylovaný do polohy 2 z volného β -CD a allylbromidu v DMSO za použití LiH a LiI. Po vzoru jejich metody byla vyzkoušena reakce 6^A-O-azido- β -CD s chráněným aminoethylbromidem. Docházelo však ve vzniku směsi velkého množství látek. Přestože produkt byl v reakční směsi pozorován pomocí hmotnostní spektrometrie, nebyla tato metoda příliš vhodná pro přípravu kýženého intermediátu.

Dále byla vyzkoušena reakce s využitím katalyzátoru fázového přenosu („phase-transfer catalysis“). Bálint *et al.* připravovali heptakis(6-O-TBDMS-2,3-di-O-benzyl)- β -CD z heptakis(6-O-TBDMS)- β -CD a benzylbromidu v THF s použitím pevného KOH jako báze a methyltrifenylfosfoniumbromidu jako katalyzátoru. Analogickou metodou ani v tomto případě nedocházelo ke vzniku produktu a po dvou dnech již nebyl detekován chráněný aminoethylbromid v reakční směsi.

Uvedenými okolnostmi jsme byli nuceni pozměnit syntetický plán a pokusů o přípravu tohoto derivátu zanechat.

4.7. 6-O-Bis(2,4,6-triisopropylbenzensulfonyl)- α -cyklodextrin

Přímá příprava dvoukrokovým postupem sulfonace – azidace byla prvním možným přístupem k přípravě 6^{A,D}-diazido- α -CD. Naší strategií bylo použít stericky náročnou skupinu – triisopropylbenzensulfonyl, jejíž použití by mohlo vést preferenčně ke vzniku AD regioisomeru. V literatuře bylo toto sulfonační činidlo použito pouze s γ -CD. Autoři článku použili 3 ekvivalenty triisopropylsulfonylchloridu pro přípravu monosubstituovaného derivátu, který byl jediným produktem ve výtěžku 86 %¹⁵⁵. Byla tedy vyzkoušena reakce α -CD s 1, 3 a 6 ekvivalenty sulfonačního činidla. Při použití 1 ekv. byl na TLC pozorován pouze monosubstituovaný derivát. Při použití více ekvivalentů byl pozorován vznik monosubstituovaného derivátu a dále dvou dalších sloučenin s podobným R_F a ještě výše na TLC destičce byl detekován shluk dalších derivátů s téměř shodným R_F . Po separaci sloupcovou chromatografií s reverzní fází a analýze pomocí MS bylo zjištěno, že ony dvě sloučeniny s podobným R_F jsou dvěma různými regioisomery disubstituovaného derivátu. Tato metoda se tedy neukázala být vhodnou k přípravě AD regioisomeru ve vysokém výtěžku. Nutno poznamenat, že při použití 1 ekv. vznikal pouze monosubstituovaný derivát, na rozdíl od běžně používané metody sulfonace *p*-toluensulfonylchloridem, kdy vznik vícesubstituovaných derivátů komplikuje separaci a snižuje výtěžek^{53,155}. Použití triisopropylbenzensulfonylchloridu by tedy mohlo být výhodné při přípravě monosulfonovaného α -CD.

4.8. Nepřímá příprava 6^{A,D}-diazido-6^{A,D}-dideoxy- α -CD

Pro přípravu 6^{A,D}-diazido- α -CD **12** byla tedy zvolena nepřímá metoda. Syntéza se skládá z 5 kroků (Schéma 16). Prvním byla totální perbenzylace α -CD na 2^{A-F},3^{A-F},6^{A-F}-oktadeka-*O*-benzyl- α -CD **8**. Při reakci v DMSO s NaH jako bází a benzylchloridem vznikal produkt ve vysokém výtěžku 95 %¹⁵⁶. Selektivní AD debenzylace pomocí DIBAL-H^{66,68} probíhala nejprve přes monodebenzylovaný derivát až na bisdebenzylovaný derivát **9**. Komerčně dodávaný 1M roztok DIBAL-H

v toluenu musel být nejprve zakoncentrován na polovinu objemu, jinak reakce neprobíhala. Appelovou reakcí s CBr_4 a PPh_3 byl získán dibromperbenzyl- α -CD **10**^{157,158}. Odchránění zbývajících hydroxylových skupin bylo provedeno hydrogenací za katalýzy palladiem na aktivním uhlí a za vzniku 6^{A,D}-dibrom- α -CD **11**¹⁵⁷. Posledním krokem byla standardní azidace s NaN_3 v DMF za vzniku cílového diazidu **12**^{69,159}. Celkový výtěžek z volného α -CD činil 43 % po pěti krocích.

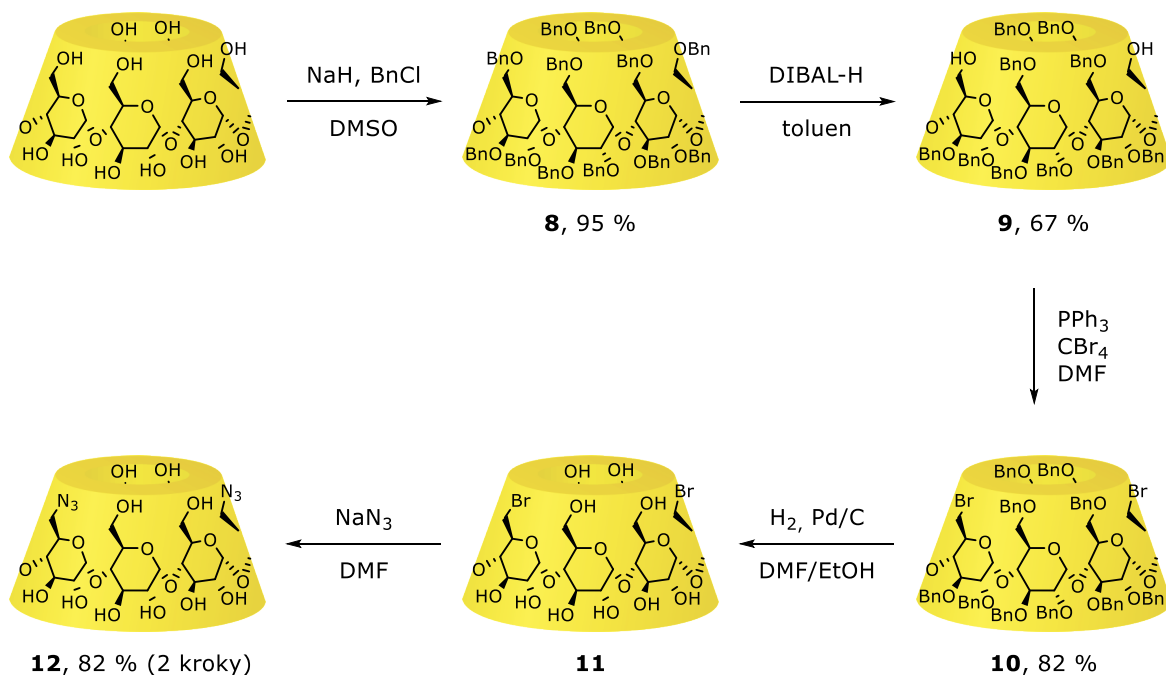


Schéma 16. Nepřímá příprava 6^{A,D}-diazido- α -CD z volného α -CD

4.9. 6^A-Amino-6^D-azido-6^{A,D}-dideoxy- α -cyklodextrin

Při plánování přípravy 6^A-amino-6^D-azido- α -CD **13** z 6^{AD}-diazido- α -CD **12** jsme se inspirovali přípravou [2-(2-azido-ethoxy)-ethoxy]-ethyl-aminu. Ta probíhá jako heterogenní reakce v diethyletheru a vodném roztoku HCl, kdy 2-bis(2-azido-ethoxy)-ethan jakožto relativně nepolární látka zůstává v organické fázi. Po přidavku PPh_3 a redukci první azidové skupiny na amin dojde ke zpolárnění molekuly díky protonaci aminu a jejímu přechodu z organické do vodné fáze. V té již není rozpustný redukující PPh_3 a redukce druhé azidové skupiny neproběhne¹⁶⁰. Naším konceptem tedy bylo zlipofilnit molekulu 6^{A,D}-diazido- α -CD **12** pomocí methoxymethylových chránících skupin natolik, aby byla rozpustná v organickém rozpouštědle, a po redukci první azidové skupiny přešla do vodného roztoku kyseliny, kde by došlo

k odchránění methoxymethylových skupin a byl by získán kýžený ve vodě rozpustný 6^A-amino-6^D-azido- α -CD **13** (Schéma 17). Bylo zjištěno, že optimální stupeň substituce je 8 MOM skupin na jednu molekulu diazido- α -CD. Roztok částečně MOMovaného 6^{A,D}-diazido- α -CD **12** v DCM byl přidán k 10 různým vodným roztokům kyselin (1M, 0,1M, 10⁻²M, 10⁻³M, 10⁻⁴M HCl a CH₃COOH). V žádné z reakčních směsí však nedocházelo ke vzniku kýženého produktu. V 1M HCl byl ve vodné fázi pozorován výchozí neochráněný 6^{A,D}-diazido- α -CD **12**. V ostatních reakčních směších byla pozorována pouze MOMovaná výchozí látka. V 10⁻⁴M HCl byl výchozí CD přítomen pouze v organické fázi. Ve zbývajících reakčních směších byl výchozí CD přítomen v různých poměrech v obou fázích bez zjevného trendu ve vztahu ke koncentraci kyseliny. Cílový intermediát **13** byl mezitím připraven metodou popsanou níže a další pokusy o optimalizaci tohoto přístupu nebyly provedeny.

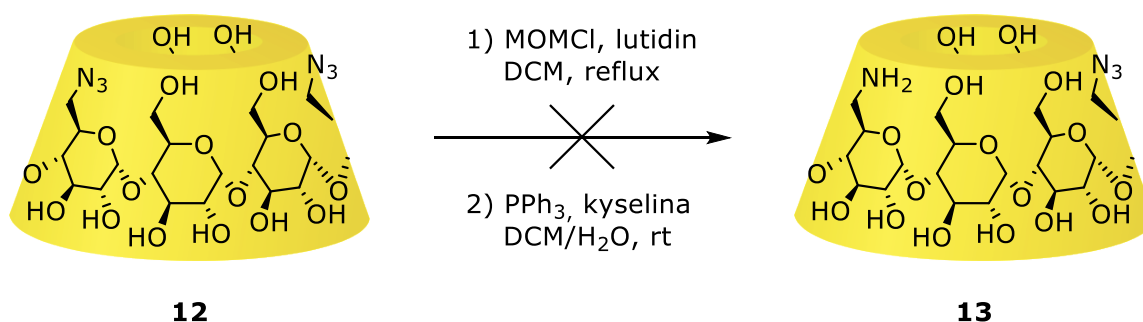


Schéma 17. Návrh přípravy 6^A-amino-6^D-azido- α -CD metodou heterogenní reakce

6^A-Amino-6^D-azido- α -CD **13** byl tedy nakonec připraven běžnou metodou pro přípravu primárních aminů na CD z azidů⁵⁶ s prostým použitím menšího množství redukčního činidla. Při použití 0,5 ekvivalentu PPh₃ byly získány pouze stopy 6^{A,D}-diamino- α -CD a podařilo se dosáhnout výtěžku 37 % a celkem 83 % po regeneraci výchozího diazidu **12**.

4.10. Konjugace cyklodextrinu s kyselinou listovou

Aktivace FA byla prováděna podle literatury^{118,161} v DMSO za přítomnosti triethylaminu (TEA) a ve tmě. Vzniklý aktivovaný folát byl poté zreagován s aminovou skupinou CD **13** analogicky podle článku, kde byl připravován podobný derivát β -CD¹¹⁸. Reakce probíhala v DMF za přítomnosti TEA po dobu dvou dní.

Přítomnost produktu **14** v reakční směsi byla potvrzena pomocí MS. Surový produkt vykazoval velice nízkou rozpustnost ve vodě, a tak byl převeden na svou amonnou sůl, jejíž rozpustnost již byla vyšší. Byl proveden pokus o izolaci látky pomocí slabého anexu s gradientem NH_4HCO_3 , z časových důvodů však nebyla izolace dokončena.

4.11. Cykloadice proléčiva 5-fluoruracilu s cyklodextrinem

První CuAAC byla vyzkoušena s 6-azido- β -CD **4** a propargyloxymethyl-5-FU **2** v DMF. Při použití 20 mol% CuI nebyl na TLC pozorován žádný produkt, a to ani po zvýšení reakční teploty na 50 °C. Bylo přidáno 20 mol% kovové mědi. Po 17 hodinách byl na TLC pozorován vznik nové látky s nižším R_F v plné konverzi z výchozího CD **4**. Pomocí MS bylo potvrzeno, že se jedná o kýžený produkt.

Analogickým postupem byl proveden pokus o přípravu cílového konjugátu látek **2** a **14**. Jelikož látku **14** se z časových důvodů nepodařilo izolovat, byla do této reakce použita reakční směs reakce předchozí. Po míchání reakční směsi obsahující 20 mol% kovové mědi přes noc byla na TLC pozorována plná konverze výchozího CD **14** na novou látku s nižším R_F . Vznik cílového konjugátu **15** byl potvrzen pomocí MS.

5. Závěr

V rámci této diplomové práce byly navrženy syntetické postupy pro přípravu dvou různých konjugátů kancerostatika 5-fluoruracilu s cyklodextrinem a kyselinou listovou jako targetující skupinou. Nejprve byla vypracována snadnější příprava propargyloxymethylchloridu, než byla dříve publikována. Následně byla optimalizována jeho reakce s 5-FU.

V případě prvního konjugátu – β -CD s 5-FU na primárním okraji a FA na sekundárním okraji – byl připraven klíčový intermediát 6^A-azido-6^A-deoxy-hexakis(6-*O*-TBDMS)- β -CD. Úspěšně byla optimalizována jeho příprava a izolace. V průběhu derivatizace sekundárního okraje však došlo ke vzniku nepřekonatelných problémů a příprava tohoto konjugátu byla opuštěna.

Druhý konjugát se skládal z α -CD s léčivem i targetující skupinou na primárním okraji. Byly zkoumány různé přístupy k přípravě klíčového intermediátu 6^A-amino-6^D-azido-6^{AD}-dideoxy- α -CD. Ten byl nakonec připraven šestikrokovou syntézou z nativního α -CD. K derivatizovanému α -CD se podařilo připojit molekulu FA, a poté i proléčivo 5-FU. Z časových důvodů se nepodařilo dokončit izolaci cílového konjugátu.

6. Experimentální část

6.1. Obecné postupy a chemikálie

Použité speciální chemikálie byly zakoupeny od firem Merck a Fluorochem. Běžné chemikálie a rozpouštědla byly zakoupeny od firem Penta a Lach-ner. Molekulová síta 3Å byla zakoupena od firem Merck a P-lab. Všechna rozpouštědla byla před použitím destilována, voda byla používána deionizovaná. DMF, DMSO a pyridin byly sušeny molekulovými síty. NH₃ byl používán jako 24% vodný roztok. Pro sloupcovou chromatografii byl použit silikagel 60 (40–63 μm) od firmy Merck. Pro preparativní sloupcovou reverzní chromatografii byl použit silikagel LiChroprep RP–18 40–63 μm (Merck, Darmstadt, Germany). Na eluci byl použit gradient H₂O → MeOH, kdy vždy po skočení eluce látek v dané směsi byl obsah MeOH zvýšen o 10 %. Pro TLC byly použity silikagelové destičky 60 F₂₅₄ od firmy Merck. Používané mobilní fáze byly následující:

S1: hexan/EtOAc 10/1

S2: hexan/EtOAc 1/1

S3: PrOH/H₂O/EtOAc/NH₃ 6/3/1/1

S4: EtOAc/EtOH/H₂O 20/5/4

S5: CHCl₃/MeOH/H₂O 5/4/1

S6: hexan/EtOAc 3/1

S7: hexan/EtOAc 2/1

K detekci cyklodextrinů byla TLC destička ponořena do 50% vodného roztoku H₂SO₄ a následně zahřáta horkovzdušnou pistolí. Aromatické látky byly detekovány pomocí UV záření o vlnové délce 254 a 366 nm. Dále byl k detekci použit bazický roztok manganistanu draselného (1,5 g KMnO₄, 10 g K₂CO₃ a 1,25 ml 10% NaOH v 200 ml vody) a roztok ninhydrinu (200 mg ninhydrinu, 95 ml butanolu, 5 ml 10% AcOH).

K odpařování rozpouštědel byla používána rotační vakuová odparka Büchi při teplotě 40–50 °C, následně byly produkty dosušovány do konstantní hmotnosti za sníženého tlaku pomocí olejové vývěvy při teplotách do 80 °C.

Pro měření infračervených spekter byly vzorky smíchány s KBr a byl použit přístroj Thermo Nicolet AVATAR 370 FT-IR s metodou DRIFT.

NMR spektra byla pořízena pomocí přístroje Bruker AVANCE III HD 400. Jako rozpouštědla byly použity DMSO-*d*₆, CDCl₃, D₂O a CD₃OD. Všechny chemické

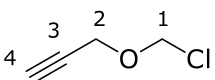
posuny jsou uvedeny v jednotkách ppm. Přiřazování spekter bylo prováděno za pomoci DEPT a 2D spekter (COSY, HSQC, HMBC). Ve výpisech spekter jsou desetinné čárky nahrazeny desetinnými tečkami pro větší přehlednost.

Hmotnostní spektra byla měřena pomocí přístroje LCMS 2020 Shimadzu s ionizací elektrosprejem. Vzorky byly rozpuštěny v methanolu. HRMS spektra byla měřena pomocí přístroje Agilent Technologies 6530 Accurate-Mass Q-TOF LC/MS s ionizací elektrosprejem a detekcí kvadrupólem nebo TOF.

Specifická optická rotace byla měřena pomocí přístroje Autopol III (Rudolph research, Flandres, New Jersey).

6.2. Pracovní postupy

6.2.1. Propargyloxymethylchlorid (1)

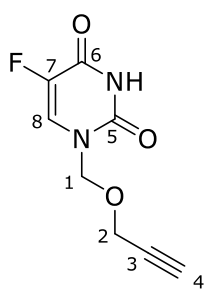
 Do suché baňky se suspenzí paraformaldehydu (536 mg, 17,84 mmol) v TMSCl (9,1 ml, 71,35 mmol) byl stříkačkou přikapán propargylalkohol (1,0 ml, 17,84 mmol). Reakční směs byla míchána za laboratorní teploty, dokud nedošlo ke zreagování pevného paraformaldehydu a vytvoření homogenní směsi (asi 1,5 h). Byl přidán chloroform, který byl následně odpařen společně s nadbytkem TMSCl. Produkt byl dosušen za sníženého tlaku pomocí olejové vývěvy. Podle ^1H NMR byly nečistoty přítomny jen v zanedbatelném množství a nebylo tedy nutné další čištění. Byla získána žlutá olejovitá látka (595 mg), výtěžek činil 32 %. ^1H NMR spektrum bylo ve shodě s literaturou¹³³.

$R_F = 0,30$ (S1, KMnO_4)

^1H NMR (400 MHz, CDCl_3): $\delta = 4.85$ (d, $J = 1.1$ Hz, 2 H, C1-H); 4.24 (dd, $J = 2.5$, 1.0 Hz, 2 H, C2-H); 2.43 (t, $J = 2.4$ Hz, 1 H, C4-H)

^{13}C NMR (100 MHz, CDCl_3): $\delta = 90.4$ (C1); 79.1 (C3); 74.8 (C4); 54.9 (C2)

6.2.2. 5-Fluor-1-((prop-2-yn-1-yloxy)methyl)pyrimidin-2,4-dion (2)



K 5-fluoruracilu (100 mg, 0,769 mmol) byly přidány HMDS (10 ml), TMSCl (0,1 ml, 0,769 mmol) a molekulová síta (asi 9,5 g) a reakční směs byla refluxována při 140 °C, dokud nebyla transparentní a homogenní (asi 20 min). Po zchlazení na laboratorní teplotu byla za sníženého tlaku oddestilována většina rozpouštědla. Ke zbytku byl přidán suchý acetonitril (80 ml) a SnCl₄ (0,92 ml 1M roztoku v DCM, 0,923 mmol). Během 15 min byl přikapán propargyloxymethylchlorid **1** (80 mg, 0,769 mmol). Po 23 h bylo přidáno dalšího půl ekvivalentu **1** (40 mg, 0,384 mmol). Po dalších 18 h byl již pozorován vznik vedlejšího produktu, a tak byl do reakční směsi přidán nasycený roztok NaHCO₃ (4 ml) a směs byla míchána 30 min. Vzniklá sraženina byla odfiltrována a k filtrátu byl přidán EtOAc (90 ml) a voda (20 ml). Organická fáze byla oddělena a vodná fáze byla extrahována EtOAc (4 × 10 ml). Organické fáze byly spojeny a sušeny MgSO₄ po dobu 1 h. Sušidlo bylo odfiltrováno a filtrát byl odpařen na RVO. Surový produkt byl rozpuštěn v methanolu a adsorbován na silikagel (1 g). Produkt byl izolován pomocí flash chromatografie (50 ml silikagelu, mobilní fáze hexan/EtOAc 1/1). Byly spojeny frakce obsahující čistý produkt a frakce obsahující čistý 5-FU. Frakce byly odpařeny na RVO a dosušeny pomocí olejové vývěvy za laboratorní teploty. Byl získán bílý krystalický produkt (58 mg) a výchozí 5-FU (45 mg). Výtěžek činil 38 %, 69 % po odečtení izolovaného 5-FU. ¹H NMR spektrum bylo v souladu s literaturou¹³².

$R_F = 0,36$ (S2, UV, KMnO₄)

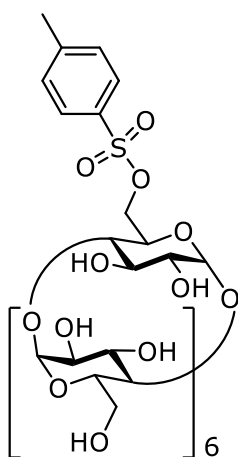
¹H NMR (400 MHz, CD₃OD): $\delta = 7.84$ (d, $J = 6.0$ Hz, 1 H, C8-H); 5.22 (s, 2 H, C1-H); 4.28 (d, $J = 2.4$ Hz, 2 H, C2-H); 2.92 (t, $J = 2.4$ Hz, 1 H, C4-H)

¹³C NMR (100 MHz, CD₃OD): $\delta = 159.76$ (C6); 151.65 (C5); 141.98 (d, $J = 234.34$ Hz, C7); 129.78 (d, $J = 33.1$ Hz, C8); 79.96 (C3); 77.64 (C1); 76.44 (C4); 57.78 (C2)

¹⁹F NMR (376 Hz, CD₃OD): $\delta = -169.57$ (d, $J = 6.1$ Hz)

HRMS (ESI): m/z [M+H]⁺: 199,0520 (vypočteno: 199,0514)

6.2.3. 6^A-O-*p*-Toluensulfonyl-β-cyklodextrin (3)



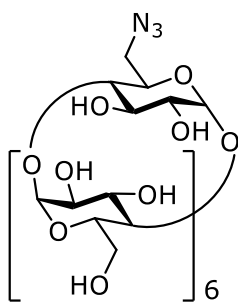
Suspenze β-CD (50,0 g, 44 mmol) a nadrceného *p*-toluensulfonylchloridu (10,9 g, 57,2 mmol) ve vodě (1 l) byla míchána 2 hodiny. Během jedné minuty byl přidán vodný roztok NaOH (183 ml, 21,7 g, 541,2 mmol). Poté, co na TLC nebyl pozorován vznik dalšího produktu (cca 1 hodina), byl odfiltrován nezreagovaný *p*-toluensulfonylchlorid a filtrát byl neutralizován 10M HCl. Reakční směs byla ponechána přes noc v lednici. Vzniklá sraženina byla odfiltrována, promyta acetonem a dosušena pomocí olejové vývěvy. Surový produkt byl refluxován v 50% vodném roztoku methanolu při 90 °C (objem rozpouštědla v ml byl desetinásobkem množství surového produktu v g). Po zchlazení roztoku byl produkt ponechán 1 hodinu krystalizovat za laboratorní teploty. Vzniklé krystaly byly odfiltrovány a krystalizace byla znovu opakována stejným způsobem. Produkt byl dosušen pomocí olejové vývěvy při 60 °C. Byl získán bílý krystalický produkt (14,8 g), výtěžek byl 26 %. ¹H NMR spektrum bylo v souladu s literaturou⁵³.

$R_F = 0,43$ (S3, 50% H₂SO₄)

¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆): δ = 7.75 (d, 2 H, H_{arom}); 7.43 (d, 2 H, H_{arom}); 5.85–5.59 (m, 14 H, CH-OH); 4.87–4.74 (m, 7 H, C1-H); 4.52–4.31 (m, 6 H, CH₂-OH); 3.71–3.20 (m, 42 H, 7 × C2-H, 7 × C3-H, 7 × C4-H, 7 × C5-H, 14 × C6-H); 2.43 (s, 3 H, CH₃)

ESI-MS: m/z [M+Na]⁺: 1311 (vypočteno: 1311,4)

6.2.4. 6^A-Azido-6^A-deoxy-β-cyklodextrin (4)



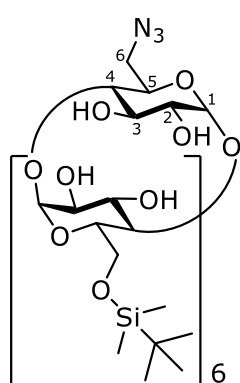
6^A-O-*p*-Toluensulfonyl-β-CD **3** (14,81 g, 11,48 mmol) a NaN₃ (14,94 g, 229,8 mmol) byly rozpuštěny v DMF (153 ml). Reakční směs byla zahřívána na 80 °C. Po 20 hodinách byla na TLC pozorována plná konverze výchozí látky. Nadbytek NaN₃ byl odfiltrován a produkt byl vysrážen v 80% vodném roztoku acetonu (2,25 l). Vzniklá sraženina byla odfiltrována a dosušena pomocí olejové vývěvy při 70 °C. Produktem byly bílé krystaly (11,18 g), výtěžek činil 84 %. ¹H NMR spektrum bylo v souladu s literaturou¹⁴⁹.

$R_F = 0,33$ (S3, 50% H_2SO_4)

1H NMR (400 MHz, DMSO- d_6): $\delta = 5.94$ – 5.54 (m, 14 H, CH-OH); 4.93 – 4.75 (m, 7 H, C1-H); 4.59 – 4.40 (m, 6 H, CH₂-OH); 3.83 – 3.51 (m, 28 H, 7 × C3-H, 7 × C5-H, 14 × C6-H); 3.42 – 3.15 (m, 14 H, 7 × C2-H, 7 × C4-H)

ESI-MS: m/z [M+Na]⁺: 1182 (vypočteno: 1182,4)

6.2.5. 6^A-Azido-6^A-deoxy-hexakis(6-*O*-*terc*-butyldimethylsilyl)- β -cyklo-dextrin (5)



6^A-Azido-6^A-deoxy- β -CD **4** (100 mg, 86,2 μ mol) byl rozpuštěn v suchém pyridinu (1,6 ml). K roztoku byl přidán TBDMSCl (110 mg, 0,733 mmol) a reakční směs byla míchána 22 hodin při laboratorní teplotě. Byl přidán další TBDMSCl (39 mg, 0,259 mmol). Dále bylo postupně přibližně po hodině přidáváno stejné množství TBDMSCl celkem čtyřikrát. Po dalších 16 hodinách již na TLC byl pozorován jen produkt a vícesylylované deriváty s vyšším R_F . Reakční směs byla nalita

do vody (30 ml) a míchána za vzniku bílé sraženiny. Sraženina byla odfiltrována na fritě a promyta vodou. Dále byla rozpuštěna v toluenu (2 ml), který byl poté odpařen na RVO. To bylo opakováno ještě dvakrát pro odstranění zbývajícího pyridinu. Odparek byl rozpuštěn v DCM a adsorbován na silikagel (1 g). Vícesylylované deriváty byly odděleny pomocí sloupcové chromatografie (5 g silikagelu) s použitím mobilní fáze DCM/MeCN/EtOH/NH₃ 40/40/20/4. Produkt byl vymyt mobilní fází DCM/MeCN/EtOH/H₂O 40/40/20/4. Frakce obsahující produkt byly spojeny, odpařeny na RVO a dosušeny pomocí olejové vývěvy při 70 °C. Byla získána nažloutlá krystalická látka (89 mg) s výtěžkem 56 %. NMR spektra byla v souladu s literaturou¹⁵².

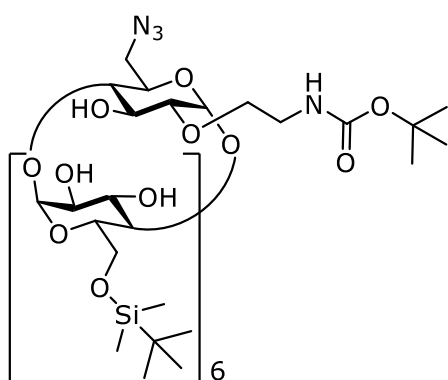
$R_F = 0,44$ (S4, 50% H_2SO_4)

1H NMR (400 MHz, CDCl₃): $\delta = 6.70$ (bs, 7 H, C2-OH); 5.25 (bs, 7 H, C3-OH); 4.99 – 4.80 (m, 7 H, C1-H); 4.09 – 3.30 (m, 42 H, 7 × C2-H, 7 × C3-H, 7 × C4-H, 7 × C5-H, 12 × C6a-H, 2 × C6b-H); 0.98 – 0.79 (m, 54 H, 6 × CH₃-C(CH₃)₂-Si); 0.09 – (-0.01) (m, 36 H, 12 × CH₃-Si)

^{13}C NMR (100 MHz, CDCl_3): $\delta = 102.13$ (C1); 81.90 (C4); 73.65 (C5); 72.71 (C2); 72.39 (C3); 62.52 (C6-Si); 51.46 (C6-N₃); 26.03 (C(CH₃)₃); 18.42 (C(CH₃)₃); -5.04 (C-Si)

ESI-MS: m/z [M+Na]⁺: 1867 (vypočteno: 1866,9)

6.2.6. 2-O-Boc-Aminoethyl-6^A-azido-6^A-deoxy-hexakis(6-O-*tert*-butyldimethylsilyl)- β -cyklodextrin (6)



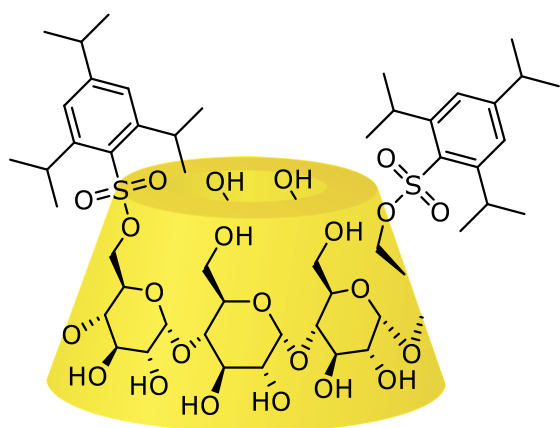
6^A-Azido-hexakis(6-O-TBDMS)- β -CD **5** (50 mg, 27,1 μmol) byl rozpuštěn v suchém DMSO (1 ml) a byla přidána molekulová síta (asi 0,3 g). K roztoku byl postupně přidán NaH (6,5 mg 60% suspenze v oleji, 0,163 mmol), po hodině 15-crown-5 (16 μl , 81,3 μmol) a TBAI (5 mg, 13,6 μmol). Po další hodině byl přidán *tert*-butyl(2-bromethyl)karbamát (7,3 mg, 32,5 μmol)

a reakční směs byla míchána 23 hodin. Na TLC byl pozorován vznik produktu. Byl přidán další *tert*-butyl(2-bromethyl)karbamát (7,3 mg, 0,0325 mmol) a směs byla míchána dalších 17 hodin. Stejně množství *tert*-butyl(2-bromethyl)-karbamátu bylo přidáno znovu. Po 4 hodinách už se podle TLC však množství produktu téměř nezměnilo a začal vznikat další vedlejší produkt. Reakční směs byla nakapána do vody (5 ml) a vzniklá sraženina byla odfiltrována na fritě a promyta vodou. Poté byla dosušena pomocí olejové vývěvy při 50 °C. Surový produkt byl rozpuštěn v chloroformu a adsorbován na silikagel (200 mg). Produkt byl izolován pomocí flash chromatografie (8 ml silikagelu, mobilní fáze DCM/MeOH 7/1 \rightarrow 6/1, průtok 5 ml/min) a dosušen pomocí olejové vývěvy při 50 °C. Byl získán produkt (7 mg), výtěžek činil 13 %, 28 % po odečtení regenerované výchozí látky.

$R_F = 0,65$ (S4, 50% H_2SO_4)

^1H NMR (400 MHz, CDCl_3): $\delta = 5.01\text{--}4.83$ (m, 7 H, C1-H); 4.22–3.12 (m, 46 H, 7 \times C2-H, 7 \times C3-H, 7 \times C4-H, 7 \times C5-H, 12 \times C6a-H, 2 \times C6b-H, 2 \times CH₂); 1.44 (s, 9 H, C(CH₃)₃); 0.96–0.79 (m, 54 H, 6 \times CH₃-C(CH₃)₂-Si); 0.09–(-0.01) (m, 36 H, 12 \times CH₃-Si)

6.2.7. 6-O-Bis(2,4,6-triisopropylbenzensulfonyl)- α -cyklodextrin (7)



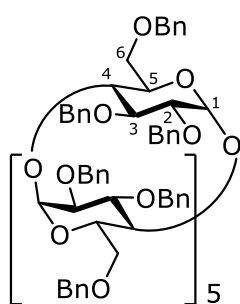
α -CD (3 \times 30 mg, 30,8 μ mol) byl rozpuštěn v suchém pyridinu (2 ml) ve třech vialkách (A, B, C). Triisopropylbenzensulfonylchlorid (A – 1 ekv., 9,3 mg, 30,8 μ mol; B – 3 ekv., 28 mg, 92,5 μ mol; C – 6 ekv., 56 mg, 0,1858 mmol) byl přidán k roztoku CD a reakční směs byla míchána dva dny. Na TLC byl pozorován výchozí α -CD a vznik 1 látky v reakci A

a 4 látek v reakcích B a C. Z reakce C byla za sníženého tlaku oddestilována většina rozpouštědla a deriváty CD byly vysráženy v acetonu (4 ml). Sraženina byla izolována centrifugací a rozpuštěna ve vodě. Směs byla separována pomocí sloupcové chromatografie s reverzní fází C18 (0,9 g reverzního silikagelu, mobilní fáze H₂O \rightarrow MeOH). V 0–10% MeOH eluoval α -CD, další látka pak v 50–60% MeOH (monosubstituovaný α -CD), směs látek v 80% MeOH a další směs látek v 90–100% MeOH. Směs dvou látek s podobným R_F na TLC elující v 80% MeOH byla analyzována pomocí MS, kde byl pozorován jediný signál odpovídající disubstituovanému derivátu α -CD.

$R_F = 0,59; 0,65$ (S5, 50% H₂SO₄)

ESI-MS: m/z [M+Na]⁺: 1528 (vypočteno: 1527,6)

6.2.8. 2^{A-F},3^{A-F},6^{A-F}-Oktadeka-O-benzyl- α -cyklodextrin (8)



α -CD (20,0 g, 20,6 mmol) byl rozpuštěn v suchém DMSO (480 ml). Po částech byl přidán NaH (27,2 g 60% suspenze v oleji, 678 mmol) a reakční směs byla míchána 30 minut. Poté byla reakční směs zchlazena ledovou lázní a po kapkách byl přidán benzylchlorid (63,9 ml, 555 mmol). Směs byla míchána přes noc. Po kapkách byla přidána voda (500 ml). Vodná fáze

byla extrahována diethyletherem (3 \times 1200 ml). Organická fáze byla vysušena MgSO₄, zfiltrována na fritě a odpařena na RVO. Surový produkt byl rozpuštěn v DCM (400 ml) a jedna polovina byla adsorbována na silikagel (100 g). Produkt byl

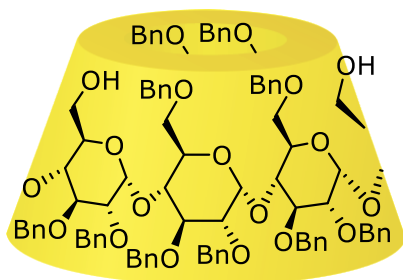
izolován pomocí sloupcové chromatografie (1200 g silikagelu, mobilní fáze hexan/EtOAc 20/1 → 5/2). Stejným způsobem byla zpracována i druhá polovina roztoku surového produktu v DCM. Produktem byla oranžová sirupovitá látka, po lyofilizaci z benzenu nažloutlá krystalická látka (48,4 g) o výtěžku 95 %. NMR spektra byla v souladu s literaturou¹⁵⁶.

$R_F = 0,53$ (S6, 50% H₂SO₄)

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃): $\delta = 7.28\text{--}7.07$ (m, 90 H, H_{arom}); 5.17 (d, $J = 10.9$ Hz, 6 H, C3-O-CH₂-Ph); 5.08 (d, $J = 3.4$ Hz, 6 H, C1-H); 4.86 (d, $J = 10.9$ Hz, 6 H, C3-O-CH₂-Ph); 4.51–4.41 (m, 12 H, C2-O-CH₂-Ph); 4.41–4.26 (m, 12 H, C6-O-CH₂-Ph); 4.13 (dd, $J = 9.7, 8.3$ Hz, 6 H, C3-H); 4.06–3.95 (m, 12 H, 6 × C4-H, 6 × C6-H); 3.92–3.86 (m, 6 H, C5-H); 3.58–3.39 (m, 12 H, 6 × C6-H, 6 × C2-H)

¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃): $\delta = 139.51$ (C_{arom}); 138.52 (C_{arom}); 138.32 (C_{arom}); 129.55–126.37 (m, C_{arom}); 98.63 (C1); 81.16 (C3); 79.39 (C4); 79.18 (C2); 75.73 (C3-O-CH₂-Ph); 73.53 (C6-O-CH₂-Ph); 72.89 (C2-O-CH₂-Ph); 71.69 (C5); 69.23 (C6)

6.2.9. 2^{A-F},3^{A-F},6^{B-C},6^{E-F}-Hexadeka-O-benzyl- α -cyklodextrin (9)



K perbenzylovanému α -CD **8** (20 g, 7,71 mmol) byl za chlazení ledem po kapkách přidán DIBAL-H (231 ml 1M roztoku v toluenu, 231,2 mmol), který byl předtím zakoncentrován na polovinu objemu. Směs byla ponechána míchat přes noc. Na TLC byl pozorován vznik produktu, v reakční směsi ale převažoval monodebenzylovaný derivát. Reakční směs byla ponechána míchat další den, dokud nedošlo k plné konverzi na produkt. Za chlazení ledem byla po kapkách přidána voda (300 ml) za intenzivního vývoje plynu. K vodné fázi byl přidán EtOAc (1200 ml) a na fritě byly odfiltrovány vzniklé hlinité soli. Organická fáze byla oddělena, vysušena MgSO₄, zfiltrována na fritě a odpařena na RVO. Surový produkt byl rozpuštěn v DCM a adsorbován na silikagel (87 g). Produkt byl izolován pomocí sloupcové chromatografie (1 kg silikagelu, mobilní fáze hexan/EtOAc 3/1). Frakce obsahující čistý produkt byly spojeny, opařeny na RVO a dosušeny pomocí olejové

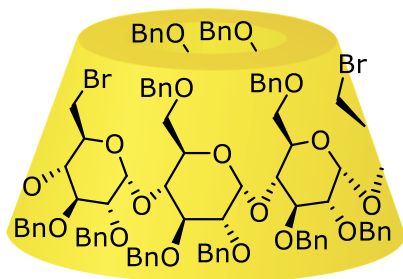
vývěvy při 50 °C. Produktem byl žlutý olej (12,5 g) o výtěžku 67 %. NMR spektra byla v souladu s literaturou¹⁵⁶.

$R_F = 0,50$ (S7, 50% H_2SO_4)

1H NMR (400 MHz, $CDCl_3$): $\delta = 7.36-7.06$ (m, 80 H, H_{arom}); 5.75 (d, $J = 3.9$ Hz, 2 H, C1-H); 5.47 (d, $J = 10.4$ Hz, 2 H, \underline{CH} -Ph); 5.21 (d, $J = 10.7$ Hz, 2 H, \underline{CH} -Ph); 4.95–4.88 (m, 4 H, \underline{CH} -Ph); 4.84–4.72 (m, 10 H, 4 \times C1-H, 6 \times \underline{CH} -Ph); 4.61–3.57 (m, 50 H, 2 \times H-2, 6 \times H-3, 6 \times H-4, 6 \times H-5, 12 \times H-6, 18 \times \underline{CH} -Ph); 3.47–3.42 (m, 4 H, C2-H); 3.11–2.74 (bs, 2 H, OH)

^{13}C NMR (100 MHz, $CDCl_3$): $\delta = 139.37$; 139.31; 138.70; 138.38; 138.08; 138.05; 137.88 (C_{arom}); 128.58–126.34 (m, C_{arom}); 98.39; 97.92; 97.77 (C1); 81.86; 81.73 (C3); 81.13; 81.02 (C4); 80.73 (C3); 79.91; 79.20; 77.83 (C2); 76.56; 76.18 (O- \underline{CH}_2 -Ph); 74.38 (C4); 74.10; 73.51; 73.49; 73.45; 73.13; 72.40 (O- \underline{CH}_2 -Ph); 72.13; 71.82; 71.38 (C5); 69.82; 69.67; 61.86 (C6)

6.2.10. 2^{A-F},3^{A-F},6^{B-C},6^{E-F}-Hexadeka-O-benzyl-6^{A,D}-dibrom-6^{A,D}-dideoxy- α -cyklodextrin (10)

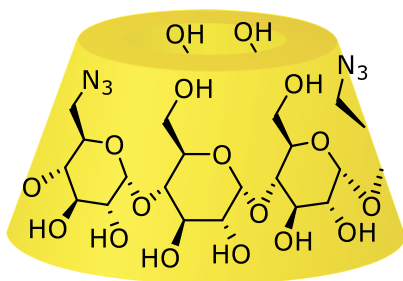
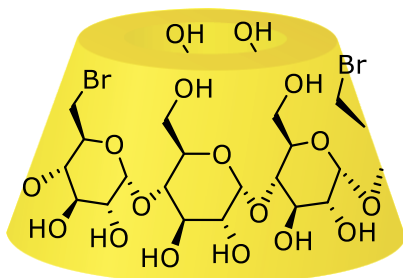


Do tříhrdlé baňky byl navážen CBr_4 (10,7 g, 32,3 mmol) a k němu byl za chlazení ledem přikapán roztok PPh_3 v suchém DMF (8,5 g, 32,3 mmol v 13 ml DMF). Vzniklá oranžová sraženina byla míchána asi 10 minut za laboratorní teploty. Bisdebenzylovaný α -CD **9** (5,2 g, 2,2 mmol) byl rozpuštěn v suchém DMF (6,5 ml) a roztok byl přidán do baňky. Reakční směs byla zahřáta na 70 °C a míchána 4 hodiny. Byl přidán MeOH (10 ml) a směs byla míchána ještě asi 10 minut. Po zchlazení na laboratorní teplotu byl přidán toluen (325 ml) a organická fáze byla extrahována vodou (3 \times 130 ml) a solankou (1 \times 130 ml). Organická fáze byla vysušena $MgSO_4$, zfiltrována na fritě a odpařena na RVO. Surový produkt byl rozpuštěn v DCM a adsorbován na silikagel (105 g). Produkt byl izolován pomocí sloupcové chromatografie (105 g silikagelu, mobilní fáze hexan/EtOAc 4/1 \rightarrow 2/1). Produktem byla hnědá sirupovitá látka (4,5 g) o výtěžku 82 %. NMR spektra byla v souladu s literaturou¹⁵⁷.

$R_F = 0,58$ (S6, 50% H_2SO_4)

1H NMR (400 MHz, $CDCl_3$): $\delta = 7.32-7.07$ (m, 80 H, H_{arom}), 5.28–3.36 (m, 74 H, 6 \times C1-H, 6 \times C2-H, 6 \times C3-H, 6 \times C4-H, 6 \times C5-H, 12 \times C6-H, 16 \times $\underline{CH_2Ph}$)

6.2.11. 6^{A,D}-Diazido-6^{A,D}-dideoxy- α -cyklodextrin (**12**)



Do baňky bylo naváženo palladium na aktivním uhlí (1,1 g 10% Pd/C, 1,0 mmol). Baňka byla 3 \times evakuována a vyplněna dusíkem. Perbenzylovaný dibrom- α -CD **10** (4,0 g, 1,6 mmol) byl rozpuštěn v 63 ml EtOH a 63 ml DMF a roztok byl degasován v ultrazvukové lázni po dobu 15 minut. Roztok byl přidán do baňky s uhlím a ta byla znovu evakuována. Do baňky byl přes septum zaveden vodík z balónku a baňka byla zahřáta na 50 °C. Po 8 hodinách byla na TLC pozorována plná konverze a zahřívání bylo ukončeno. Reakční směs byla zfiltrována přes křemelinu na fritě, stopy uhlí ale přešly do filtrátu.

Produkt byl z filtrátu vysrážen v acetonu (80 ml). Sraženina byla odfiltrována a vysušena pomocí olejové vývěvy. Dibrom- α -CD **11** (1,82 g látky znečištěné uhlím) byl rozpuštěn v DMF (5 ml). Byl přidán NaN_3 (0,27 g, 4,14 mmol) a reakční směs byla míchána při 80 °C přes noc. Produkt měl na TLC stejný R_F jako výchozí látka. Přítomnost výchozí látky byla detekována ponořením TLC destičky do 1% roztoku 4-(4-nitrobenzyl)pyridinu v EtOH, zahřátím horkovzdušnou pistolí a následným ponořením do vodného roztoku amoniaku. Po dosažení plné konverze byla většina DMF oddestilována za sníženého tlaku. Surový produkt byl z reakční směsi vysrážen v acetonu (100 ml), poté byl odfiltrován na fritě a dosušen pomocí olejové vývěvy. Produkt byl izolován pomocí sloupcové chromatografie s reverzní fází C18 (40 g reverzního silikagelu, mobilní fáze $H_2O \rightarrow MeOH$), kdy produkt eluoval ve 30% MeOH. Frakce obsahující produkt byly odpařeny a odparek byl dosušen pomocí olejové vývěvy při 60 °C. Produktem byla bílá krystalická látka (1,32 g), výtěžek činil 82 % po dvou krocích. NMR a MS spektra byla v souladu s literaturou^{69,157}.

$R_F = 0,47$ (S3, 50% H_2SO_4)

^1H NMR (400 MHz, D_2O): $\delta = 5.03\text{--}4.95$ (m, 6 H, C1-H); $3.93\text{--}3.70$ (m, 24 H, $6 \times$ C3-H, $6 \times$ C5-H, $12 \times$ C6-H); $3.64\text{--}3.45$ (m, 12 H, $6 \times$ C2-H, $6 \times$ C4-H)

^{13}C NMR (100 MHz, D_2O): $\delta = 101.48\text{--}101.08$ (m, C1); $82.14\text{--}81.33$ (m, C4); $73.38\text{--}70.58$ (m, C2, C3, C5); $60.48\text{--}60.44$ (m, C6-OH); 51.22 (C6- N_3)

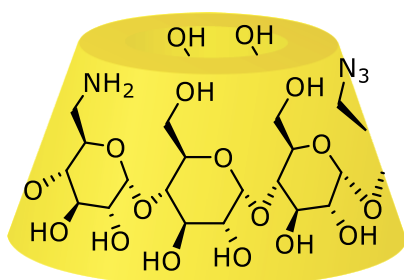
HRMS (ESI): dibromo- α -CD **11** m/z $[\text{M}+\text{H}]^+$: 1099,1518 (vypočteno: 1099,1534), $[\text{M}+\text{NH}_4]^+$: 1116,1796 (vypočteno: 1116,1799); diazido- α -CD **12** m/z $[\text{M}+\text{H}]^+$: 1023,3321 (vypočteno: 1023,3372), $[\text{M}+\text{NH}_4]^+$: 1040,3546 (vypočteno: 1040,3637)

6.2.12. Částečně MOMovaný 6^{A,D}-diazido-6^{A,D}-dideoxy- α -cyklodextrin

6^{A,D}-Diazido- α -CD (35 mg, 34, 2 μmol) byl suspendován v suchém DCM (2 ml). Byl přidán 2,6-lutidin (38 μl , 0,329 mmol) a za chlazení ledem byl přikapán methoxymethylchlorid (21 μl , 0,274 mmol). Reakční směs byla refluxována přes noc. Vzniknuvší homogenní reakční směs byla extrahována vodou (2 ml) a organická fáze byla odpařena na RVO. Odparek byl rozpuštěn v DCM (5 ml) a roztok byl rozdělen do 10 vialek. Do každé z nich pak byl přidán roztok kyseliny (0,5 ml 1M, 0,1M, 10^{-2}M , 10^{-3}M , 10^{-4}M HCl a CH_3COOH) a bezprostředně potom PPh_3 (0,9 mg, 3,4 μmol). Reakční směsi byly intenzivně míchány přes noc.

$R_F = 0,69$ (S3, 50% H_2SO_4)

6.2.13. 6^A-Amino-6^D-azido-6^{A,D}-dideoxy- α -cyklodextrin (**13**)



Diazido- α -CD **12** (300 mg, 0,293 mmol) byl rozpuštěn v DMF (3 ml) a byl přidán PPh_3 (39 mg, 0,147 mmol). Reakční směs byla míchána přes noc při 90°C . Na TLC byl pozorován vznik částečně redukováného produktu a diamino- α -CD s nejnižším R_F . Oba produkty bylo možné detekovat kromě

karbonizace v 50% kyselině sírové také pomocí ninhydrinu. Většina DMF byla oddestilována za sníženého tlaku a směs derivátů CD byla vysrážena v acetonu (20 ml). Sraženina byla odfiltrována na fritě a dosušena za sníženého tlaku. Dále byla sraženina rozpuštěna ve vodě a produkt byl izolován pomocí sloupcové

chromatografie s reverzní fází C18 (10 g reverzního silikagelu, mobilní fáze H₂O → MeOH), přičemž produkt eluoval v 10% MeOH. Frakce obsahující produkt a frakce obsahující výchozí diazido- α -CD **12** byly odpařeny a dosušeny pomocí olejové vývěvy. Produktem byla bílá krystalická látka (166 mg) o výtěžku 37 % (83 % po regeneraci výchozí látky).

R_F = 0,41 (S3, 50% H₂SO₄, ninhydrin)

¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆): δ = 5.64–5.36 (m, 12 H, CH-OH); 4.89–4.76 (m, 6 H, C1-H); 4.60–4.52 (m, 4 H, CH₂-OH); 3.82–3.54 (m, 22 H, 6 × C3-H, 6 × C5-H, 8 × HO-C6-H, 2 × N₃-C6-H); 3.45–3.23 (m, 12 H, 6 × C2-H, 6 × C4-H); 2.93–2.75 (m, 2 H, H₂N-C6-H)

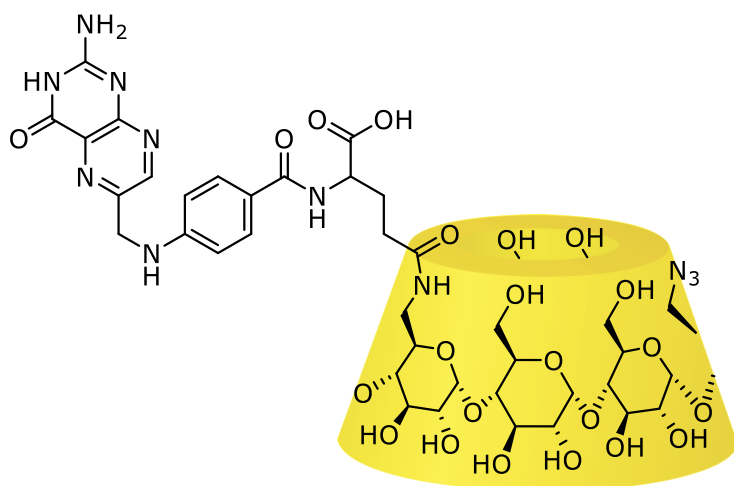
¹³C NMR (100 MHz, DMSO-*d*₆): δ = 102.48–101.30 (m, C1); 83.41–81.83 (m, C4); 73.59–70.10 (m, C2, C3, C5); 60.36–59.85 (m, C6-OH); 51.26 (C6-N₃); 41.81 (C6-NH₂)

IR (KBr): 3313, 2920, 2104 (azid), 1657, 1408, 1334, 1298, 1155, 1039 cm⁻¹

$[\alpha]_D^{25} = +122,4^\circ$ ($c = 5$ mM, DMSO)

HRMS (ESI): m/z [M+H]⁺: 997,3432 (vypočteno: 997,3467)

6.2.14. 6^A-Pteroylglutamino-6^D-azido-6^{AD}-dideoxy- α -cyclodextrin (**14**)



Kyselina listová (100 mg, 0,227 mmol) byla rozpuštěna v suchém DMSO (2 ml). Baňka byla obalena alobalem, aby mohla reakce probíhat ve tmě a byly přidány TEA (4 μ l), NHS (26 mg, 0,227 mmol) a DCC (47 mg, 0,227 mmol).

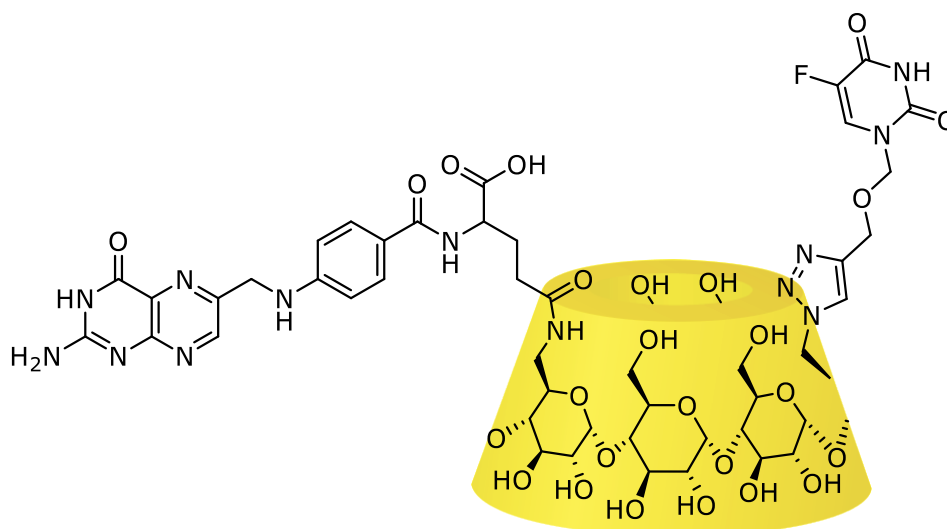
Reakční směs byla míchána přes noc při laboratorní teplotě. Poté byla z reakční směsi na fritě odfiltrována vzniklá dicyklohexylmočovina a produkt byl z roztoku vysrážen diethyletherem (50 ml). Oranžová sraženina byla odfiltrována a dosušena za sníženého tlaku. Amino-azido- α -CD **13** (20 mg, 20,1 μ mol) byl rozpuštěn v suchém DMF (1 ml) a byl přidán aktivovaný folát (31 mg, 60,2 μ mol). K roztoku

látek byl přidán TEA (4 μ l) a reakční směs byla míchána dva dny při laboratorní teplotě. Na TLC byl pozorován vznik nové látky s nižším R_F , než měl výchozí CD **13**. Ten již nebyl v reakční směsi pozorován. Vznik produktu byl potvrzen pomocí MS.

$R_F = 0,23$ (S3, 50% H_2SO_4)

ESI-MS: m/z $[M+H]^+$: 1421 (vypočteno: 1420,5), $[M+Na]^+$: 1443 (vypočteno: 1442,5)

6.2.15. 6^A-Pteroylglutamino-6^D-(4-(((5-fluor-2,4-dioxypyrimidin-1-yl)methoxy)methyl)-1,2,3-triazol-1-yl)-6^{AD}-dideoxy- α -cyklodextrin (**15**)



K 6^A-FA-6^D-azido- α -CD **14** (reakční směs z předchozí reakce, teoreticky 57 mg, 40,1 μ mol) v DMF (2 ml) byl přidán propargyloxymethyl-5-FU **2** (8 mg, 40,1 μ mol) a kovová měď (0,5 mg, 8,0 μ mol). Reakční směs byla míchána přes noc při laboratorní teplotě. Na TLC byl pozorován vznik nového produktu a zároveň vymizení výchozí látky. Vznik konjugátu **15** byl potvrzen pomocí MS.

$R_F = 0,18$ (S3, 50% H_2SO_4)

ESI-MS: m/z $[M+H]^+$: 1618,70 (vypočteno: 1618,52)

7. Poděkování

V první řadě bych ráda poděkovala svému školiteli doc. RNDr. Jindřichu Jindřichovi, CSc. za veškeré rady, pomoc a velikou trpělivost, kterou se mnou za roky práce v laboratoři měl.

Dále bych chtěla poděkovat Mgr. Petru Kasalovi za obrovskou ochotu poradit s jakýmkoliv problémem. Děkuji také všem současným i bývalým kolegům ze skupiny Supramolekulární chemie, jmenovitě pak Bc. Janu Zelenému, Mgr. Emě Chaloupecké a Mgr. Ivetě Chena, Ph.D. za přínosné konzultace.

Za měření IR spekter děkuji Mgr. Michalu Urbanovi, Ph.D., za měření optické rotace pak Mgr. Bohuně Šperlichové.

V neposlední řadě bych chtěla poděkovat rodině a kamarádům za podporu během celé doby studia.

8. Literatura

- (1) Sung, H.; Ferlay, J.; Siegel, R. L.; Laversanne, M.; Soerjomataram, I.; Jemal, A.; Bray, F. Global Cancer Statistics 2020: GLOBOCAN Estimates of Incidence and Mortality Worldwide for 36 Cancers in 185 Countries. *CA. Cancer J. Clin.* **2021**, *71* (3), 209–249. <https://doi.org/10.3322/caac.21660>.
- (2) Vodenkova, S.; Buchler, T.; Cervena, K.; Veskrnova, V.; Vodicka, P.; Vymetalkova, V. 5-Fluorouracil and Other Fluoropyrimidines in Colorectal Cancer: Past, Present and Future. *Pharmacol. Ther.* **2020**, *206*, 107447. <https://doi.org/10.1016/j.pharmthera.2019.107447>.
- (3) Low, P. S.; Henne, W. A.; Doorneweerd, D. D. Discovery and Development of Folic-Acid-Based Receptor Targeting for Imaging and Therapy of Cancer and Inflammatory Diseases. *Acc. Chem. Res.* **2008**, *41* (1), 120–129. <https://doi.org/10.1021/ar7000815>.
- (4) Loftsson, T.; Brewster, M. E. Pharmaceutical Applications of Cyclodextrins. 1. Drug Solubilization and Stabilization. *J. Pharm. Sci.* **1996**, *85* (10), 1017–1025. <https://doi.org/10.1021/js950534b>.
- (5) Lehn, J.-M. Supramolecular Chemistry—Scope and Perspectives Molecules, Supermolecules, and Molecular Devices(Nobel Lecture). *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1988**, *27* (1), 89–112. <https://doi.org/10.1002/anie.198800891>.
- (6) Kappe, T. The Early History of Calixarene Chemistry. In *Calixarenes 50th Anniversary: Commemorative Issue*; Vicens, J., Asfari, Z., Harrowfield, J. M., Eds.; Springer Netherlands: Dordrecht, 1994; pp 3–15. https://doi.org/10.1007/978-94-011-0267-4_1.
- (7) Cintas, P. Cucurbituril: Supramolecular Perspectives for an Old Ligand. *J. Incl. Phenom. Mol. Recognit. Chem.* **1994**, *17* (3), 205–220. <https://doi.org/10.1007/BF00708781>.
- (8) Szejtli, J. Introduction and General Overview of Cyclodextrin Chemistry. *Chem. Rev.* **1998**, *98* (5), 1743–1754. <https://doi.org/10.1021/cr970022c>.
- (9) Szejtli, J. Past, Present, and Future of Cyclodextrin Research. *Pure Appl. Chem.* **2004**, *76* (10), 1825–2845. <https://doi.org/10.1002/chin.200517261>.
- (10) Crini, G. Review: A History of Cyclodextrins. *Chem. Rev.* **2014**, *114* (21), 10940–10975. <https://doi.org/10.1021/cr500081p>.
- (11) Schardinger, F. Über thermophile Bakterien aus verschiedenen Speisen und Milch, sowie über einige Umsetzungsprodukte derselben in kohlenhydrathaltigen Nährlösungen, darunter krystallisierte Polysaccharide (Dextrine) aus Stärke. *Z. Für Unters. Nahr.- Genußmittel Sowie Gebrauchsgegenstände* **1903**, *19* (6), 865–880.
- (12) Szejtli, J.; Budai, Z. Acid Hydrolysis of β -Cyclodextrin. *Acta Chim. Acad. Sci. Hung.* **1976**, *91* (1), 73–80.
- (13) Ikuta, D.; Hirata, Y.; Wakamori, S.; Shimada, H.; Tomabechi, Y.; Kawasaki, Y.; Ikeuchi, K.; Hagimori, T.; Matsumoto, S.; Yamada, H. Conformationally Supple Glucose Monomers Enable Synthesis of the Smallest Cyclodextrins. *Science* **2019**, *364* (6441), 674–677. <https://doi.org/10.1126/science.aaw3053>.
- (14) Nakagawa, T.; Ueno, K.; Kashiwa, M.; Watanabe, J. The Stereoselective Synthesis of Cyclomaltopentaose. A Novel Cyclodextrin Homologue with D.P. Five. *Tetrahedron Lett.* **1994**, *35* (12), 1921–1924. [https://doi.org/10.1016/S0040-4039\(00\)73196-0](https://doi.org/10.1016/S0040-4039(00)73196-0).

- (15) Pulley, A. O.; French, D. Studies on the Schardinger Dextrins. XI. The Isolation of New Schardinger Dextrins. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **1961**, *5* (1), 11–15. [https://doi.org/10.1016/0006-291X\(61\)90071-7](https://doi.org/10.1016/0006-291X(61)90071-7).
- (16) Gattuso, G.; Nepogodiev, S. A.; Stoddart, J. F. Synthetic Cyclic Oligosaccharides. *Chem. Rev.* **1998**, *98* (5), 1919–1958. <https://doi.org/10.1021/cr960133w>.
- (17) Endo, T. Large-Ring Cyclodextrins. *Trends Glycosci. Glycotechnol.* **2011**, *23* (130), 79–92. <https://doi.org/10.4052/tigg.23.79>.
- (18) Del Valle, E. M. M. Cyclodextrins and Their Uses: A Review. *Process Biochem.* **2004**, *39* (9), 1033–1046. [https://doi.org/10.1016/S0032-9592\(03\)00258-9](https://doi.org/10.1016/S0032-9592(03)00258-9).
- (19) Liu, L.; Guo, Q.-X. The Driving Forces in the Inclusion Complexation of Cyclodextrins. *J. Incl. Phenom. Macrocycl. Chem.* **2002**, *42*, 1–14. <https://doi.org/10.1023/A:1014520830813>.
- (20) Kano, K.; Nishiyabu, R.; Asada, T.; Kuroda, Y. Static and Dynamic Behavior of 2:1 Inclusion Complexes of Cyclodextrins and Charged Porphyrins in Aqueous Organic Media. *J. Am. Chem. Soc.* **2002**, *124* (33), 9937–9944. <https://doi.org/10.1021/ja020253n>.
- (21) Anderson, T.; Nilsson, K.; Sundahl, M.; Westman, G.; Wennerstrom, O. C60 Embedded in γ -Cyclodextrin: A Water-Soluble Fullerene. *J. Chem. Soc. Chem. Commun.* **1992**, *8* (8), 604–606. <https://doi.org/10.1039/c39920000604>.
- (22) Mallick, A.; Haldar, B.; Chattopadhyay, N. Encapsulation of Norharmane in Cyclodextrin: Formation of 1:1 and 1:2 Inclusion Complexes. *J. Photochem. Photobiol. B* **2005**, *78* (3), 215–221. <https://doi.org/10.1016/j.jphotobiol.2004.11.008>.
- (23) Li, X.; Jin, Z.; Wang, J. Complexation of Allyl Isothiocyanate by α - and β -Cyclodextrin and Its Controlled Release Characteristics. *Food Chem.* **2007**, *103* (2), 461–466. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2006.08.017>.
- (24) Waleczek, K. J.; Marques, H. M. C.; Hempel, B.; Schmidt, P. C. Phase Solubility Studies of Pure (-)- α -Bisabolol and Camomile Essential Oil with β -Cyclodextrin. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* **2003**, *55*, 247–251. [https://doi.org/10.1016/S0939-6411\(02\)00166-2](https://doi.org/10.1016/S0939-6411(02)00166-2).
- (25) Wenz, G.; Han, B.-H.; Muller, A. Cyclodextrin Rotaxanes and Polyrotaxanes. *Chem. Rev.* **2006**, *106*, 782–817. <https://doi.org/10.1021/cr970027+> CCC: \$59.00.
- (26) Higashi, T.; Li, J.; Song, X.; Zhu, J.; Taniyoshi, M.; Hirayama, F.; Iohara, D.; Motoyama, K.; Arima, H. Thermoresponsive Formation of Dimethyl Cyclodextrin Polypseudorotaxanes and Subsequent One-Pot Synthesis of Polyrotaxanes. *ACS Macro Lett.* **2016**, *5* (2), 158–162. <https://doi.org/10.1021/acsmacrolett.5b00927>.
- (27) Iijima, K.; Aoki, D.; Sogawa, H.; Asai, S.; Takata, T. Synthesis and Characterization of Supramolecular Cross-Linkers Containing Cyclodextrin Dimer and Trimer. *Polym. Chem.* **2016**, *7* (21), 3492–3495. <https://doi.org/10.1039/C6PY00367B>.
- (28) Connors, K. A. The Stability of Cyclodextrin Complexes in Solution. *Chem. Rev.* **1997**, *97* (5), 1325–1358. <https://doi.org/10.1021/cr960371r>.
- (29) Rekharsky, M. V.; Inoue, Y. Complexation Thermodynamics of Cyclodextrins. *Chem. Rev.* **1998**, *98* (5), 1875–1918. <https://doi.org/10.1021/cr970015o>.

- (30) Loftsson, T.; Hreinsdóttir, D.; Másson, M. Evaluation of Cyclodextrin Solubilization of Drugs. *Int. J. Pharm.* **2005**, *302* (1–2), 18–28. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2005.05.042>.
- (31) Brewster, M. E.; Loftsson, T. Cyclodextrins as Pharmaceutical Solubilizers. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **2007**, *59* (7), 645–666. <https://doi.org/10.1016/j.addr.2007.05.012>.
- (32) Breslow, R.; Dong, S. D. Biomimetic Reactions Catalyzed by Cyclodextrins and Their Derivatives. *Chem. Rev.* **1998**, *98* (5), 1997–2012. <https://doi.org/10.1021/cr970011j>.
- (33) Dalal, D. S.; Patil, D. R.; Tayade, Y. A. B-Cyclodextrin: A Green and Efficient Supramolecular Catalyst for Organic Transformations. *Chem. Rec.* **2018**, *18* (11), 1560–1582. <https://doi.org/10.1002/tcr.201800016>.
- (34) Schneider, H.-J.; Hacket, F.; Rüdiger, V.; Ikeda, H. NMR Studies of Cyclodextrins and Cyclodextrin Complexes. *Chem. Rev.* **1998**, *98* (5), 1755–1786. <https://doi.org/10.1021/cr970019t>.
- (35) Pîrnau, A.; Bogdan, M.; Floare, C. G. NMR Spectroscopic Characterization of β -Cyclodextrin Inclusion Complex with Vanillin. *J. Phys. Conf. Ser.* **2009**, *182*, 1–6. <https://doi.org/10.1088/1742-6596/182/1/012013>.
- (36) Zhao, R.; Sandström, C.; Zhang, H.; Tan, T. NMR Study on the Inclusion Complexes of β -Cyclodextrin with Isoflavones. *Molecules* **2016**, *21* (4), 372. <https://doi.org/10.3390/molecules21040372>.
- (37) Zhang, Q.-F.; Jiang, Z.-T.; Guo, Y.-X.; Li, R. Complexation Study of Brilliant Cresyl Blue with β -Cyclodextrin and Its Derivatives by UV–Vis and Fluorespectrometry. *Spectrochim. Acta. A. Mol. Biomol. Spectrosc.* **2008**, *69* (1), 65–70. <https://doi.org/10.1016/j.saa.2007.03.009>.
- (38) Wang, J.; Cao, Y.; Sun, B.; Wang, C. Physicochemical and Release Characterisation of Garlic Oil- β -Cyclodextrin Inclusion Complexes. *Food Chem.* **2011**, *127* (4), 1680–1685. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2011.02.036>.
- (39) Del Toro-Sánchez, C. L.; Ayala-Zavala, J. F.; Machi, L.; Santacruz, H.; Villegas-Ochoa, M. A.; Alvarez-Parrilla, E.; González-Aguilar, G. A. Controlled Release of Antifungal Volatiles of Thyme Essential Oil from β -Cyclodextrin Capsules. *J. Incl. Phenom. Macrocycl. Chem.* **2010**, *67* (3–4), 431–441. <https://doi.org/10.1007/s10847-009-9726-3>.
- (40) Li, S.; Purdy, W. C. Cyclodextrins and Their Applications in Analytical Chemistry. *Chem. Rev.* **1992**, *92* (6), 1457–1470. <https://doi.org/10.1021/cr00014a009>.
- (41) Astray, G.; Gonzalez-Barreiro, C.; Mejuto, J. C.; Rial-Otero, R.; Simal-Gándara, J. A Review on the Use of Cyclodextrins in Foods. *Food Hydrocoll.* **2009**, *23* (7), 1631–1640. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2009.01.001>.
- (42) Marques, H. M. C. A Review on Cyclodextrin Encapsulation of Essential Oils and Volatiles. *Flavour Fragr. J.* **2010**, *25* (5), 313–326. <https://doi.org/10.1002/ffj.2019>.
- (43) Buschmann, H.-J.; Schollmeyer, E. Applications of Cyclodextrins in Cosmetic Products: A Review. *J. Cosmet. Sci.* **2002**, *53*, 185–191.
- (44) Szejtli, J. Cyclodextrins in the Textile Industry. *Starch - Stärke* **2003**, *55* (5), 191–196. <https://doi.org/10.1002/star.200390050>.
- (45) Bezerra, F. M.; Lis, M. J.; Firmino, H. B.; Dias da Silva, J. G.; Curto Valle, R. de C. S.; Borges Valle, J. A.; Scacchetti, F. A. P.; Tessaro, A. L. The Role of β -

- Cyclodextrin in the Textile Industry—Review. *Molecules* **2020**, *25* (16), 3624. <https://doi.org/10.3390/molecules25163624>.
- (46) Guo, H.; Zhang, J.; Liu, Z.; Yang, S.; Sun, C. Effect of Tween80 and β -Cyclodextrin on the Distribution of Herbicide Mefenacet in Soil–Water System. *J. Hazard. Mater.* **2010**, *177* (1–3), 1039–1045. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2010.01.025>.
- (47) Khan, A. R.; Forgo, P.; Stine, K. J.; D’Souza, V. T. Methods for Selective Modifications of Cyclodextrins. *Chem. Rev.* **1998**, *98*, 1977–1996. <https://doi.org/10.1021/cr970012b>.
- (48) Řezanka, M. Monosubstituted Cyclodextrins as Precursors for Further Use. *Eur. J. Org. Chem.* **2016**, *2016* (32), 5322–5334. <https://doi.org/10.1002/ejoc.201600693>.
- (49) Řezanka, M. Synthesis of Cyclodextrin Derivatives. In *Cyclodextrin Fundamentals, Reactivity and Analysis*; Fourmentin, S., Crini, G., Lichtfouse, E., Eds.; Environmental Chemistry for a Sustainable World; Springer International Publishing: Cham, 2018; Vol. 16, pp 57–103. https://doi.org/10.1007/978-3-319-76159-6_2.
- (50) Wenz, G. Cyclodextrins as Building Blocks for Supramolecular Structures and Functional Units. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1994**, *33* (8), 803–822. <https://doi.org/10.1002/anie.199408031>.
- (51) Hanessian, S.; Benalil, A.; Laferriere, C. The Synthesis of Functionalized Cyclodextrins As Scaffolds and Templates for Molecular Diversity, Catalysis, and Inclusion Phenomena. *J. Org. Chem.* **1995**, *60* (15), 4786–4797. <https://doi.org/10.1021/jo00120a023>.
- (52) Jindřich, J.; Tišlerová, I. Simple Preparation of 3I-O-Substituted β -Cyclodextrin Derivatives Using Cinnamyl Bromide. *J. Org. Chem.* **2005**, *70* (22), 9054–9055. <https://doi.org/10.1021/jo051339c>.
- (53) Popr, M.; Hybelbauerová, S.; Jindřich, J. A Complete Series of 6-Deoxy-Monosubstituted Tetraalkylammonium Derivatives of α -, β -, and γ -Cyclodextrin with 1, 2, and 3 Permanent Positive Charges. *Beilstein J. Org. Chem.* **2014**, *10*, 1390–1396. <https://doi.org/10.3762/bjoc.10.142>.
- (54) Martinelli, J.; Thangavel, K.; Tei, L.; Botta, M. Dendrimeric β -Cyclodextrin/GdIII Chelate Supramolecular Host-Guest Adducts as High-Relaxivity MRI Probes. *Chem. Eur. J.* **2014**, *20* (35), 10944–10952. <https://doi.org/10.1002/chem.201402418>.
- (55) Bednářová, E.; Hybelbauerová, S.; Jindřich, J. Optimized Methods for Preparation of 6I-(ω -Sulfanyl-Alkylene-Sulfanyl)- β -Cyclodextrin Derivatives. *Beilstein J. Org. Chem.* **2016**, *12*, 349–352. <https://doi.org/10.3762/bjoc.12.38>.
- (56) Tang, W.; Ng, S.-C. Facile Synthesis of Mono-6-Amino-6-Deoxy- α -, β -, γ -Cyclodextrin Hydrochlorides for Molecular Recognition, Chiral Separation and Drug Delivery. *Nat. Protoc.* **2008**, *3* (4), 691–697. <https://doi.org/10.1038/nprot.2008.37>.
- (57) Tichá, I. C.; Hybelbauerová, S.; Jindřich, J. New α - and β -Cyclodextrin Derivatives with Cinchona Alkaloids Used in Asymmetric Organocatalytic Reactions. *Beilstein J. Org. Chem.* **2019**, *15*, 830–839. <https://doi.org/10.3762/bjoc.15.80>.
- (58) McNaught, A. Nomenclature of Carbohydrates. *Pure Appl. Chem.* **1996**, *68* (10), 1919–2008. <https://doi.org/10.1351/pac199668101919>.

- (59) Tabushi, I.; Nabeshima, T.; Fujita, K.; Matsunaga, A.; Imoto, T. Regiospecific A,B Capping onto β -Cyclodextrin. Characteristic Remote Substituent Effect on ^{13}C NMR Chemical Shift and Specific Taka-Amylase Hydrolysis. *J. Org. Chem.* **1985**, *50* (15), 2638–2643. <https://doi.org/10.1021/jo00215a008>.
- (60) Wang, B.; Zaborova, E.; Guieu, S.; Petrillo, M.; Guitet, M.; Blériot, Y.; Ménand, M.; Zhang, Y.; Sollogoub, M. Site-Selective Hexa-Hetero-Functionalization of α -Cyclodextrin an Archetypical C6-Symmetric Concave Cycle. *Nat. Commun.* **2014**, *5* (1), 5354. <https://doi.org/10.1038/ncomms6354>.
- (61) Guieu, S.; Zaborova, E.; Blériot, Y.; Poli, G.; Jutand, A.; Madec, D.; Prestat, G.; Sollogoub, M. Can Hetero-Polysubstituted Cyclodextrins Be Considered as Inherently Chiral Concave Molecules? *Angew. Chem. Int. Ed.* **2010**, *49*, 2314–2318. <https://doi.org/10.1002/anie.200907156>.
- (62) Guieu, S.; Sollogoub, M. Advances in Cyclodextrin Chemistry. In *Modern Synthetic Methods in Carbohydrate Chemistry*; Wiley-VCH: Weinheim, Germany, 2014; pp 241–283.
- (63) Tichá, I.; Benkovics, G.; Malanga, M.; Jindřich, J. Enhanced Single-Isomer Separation and Pseudoenantiomer Resolution of New Primary Rim Heterobifunctionalized α -Cyclodextrin Derivatives. *Beilstein J. Org. Chem.* **2018**, *14*, 2829–2837. <https://doi.org/10.3762/bjoc.14.261>.
- (64) Tabushi, I.; Kuroda, Y.; Yokota, K.; Yuan, L. C. Regiospecific A,C- and A,D-Disulfonate Capping of β -Cyclodextrin. *J. Am. Chem. Soc.* **1981**, *103* (3), 711–712. <https://doi.org/10.1021/ja00393a056>.
- (65) Armspach, D.; Matt, D. The Tris(4-Tert-Butylphenyl)Methyl Group: A Bulky Substituent for Effective Regioselective Difunctionalisation of Cyclomaltohexaose. *Carbohydr. Res.* **1998**, *310*, 129–133. [https://doi.org/10.1016/S0008-6215\(98\)00139-6](https://doi.org/10.1016/S0008-6215(98)00139-6).
- (66) Pearce, A. J.; Sinay, P. Diisobutylaluminum-Promoted Regioselective De-O-benzylation of Perbenzylated Cyclodextrins: A Powerful New Strategy for the Preparation of Selectively Modified Cyclodextrins. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2000**, *39* (20), 3610–3612. [https://doi.org/10.1002/1521-3773\(20001016\)39:20<3610::AID-ANIE3610>3.0.CO;2-V](https://doi.org/10.1002/1521-3773(20001016)39:20<3610::AID-ANIE3610>3.0.CO;2-V).
- (67) Sollogoub, M. Site-Selective Heterofunctionalization of Cyclodextrins: Discovery, Development, and Use in Catalysis. *Synlett* **2013**, *24* (20), 2629–2640. <https://doi.org/10.1055/s-0033-1339877>.
- (68) Kumprecht, L.; Buděšínský, M.; Bouř, P.; Kraus, T. α -Cyclodextrins Reversibly Capped with Disulfide Bonds. *New J. Chem.* **2010**, *34* (10), 2254–2260. <https://doi.org/10.1039/c0nj00126k>.
- (69) Fredy, J. W.; Scelle, J.; Guenet, A.; Morel, E.; Adam de Beaumais, S.; Ménand, M.; Marvaud, V.; Bonnet, C. S.; Tóth, E.; Sollogoub, M.; Vives, G.; Hasenknopf, B. Cyclodextrin Polyrotaxanes as a Highly Modular Platform for the Development of Imaging Agents. *Chem. Eur. J.* **2014**, *20* (35), 10915–10920. <https://doi.org/10.1002/chem.201403635>.
- (70) Liu, J.; Wang, B.; Przybylski, C.; Bistri-Aslanoff, O.; Zhang, Y.; Sollogoub, M. Programmed Synthesis of Hepta-Differentiated β -Cyclodextrin: 1 out of 117655 Arrangements. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2021**, *60*, 12090–12096. <https://doi.org/10.1002/anie.202102182>.
- (71) Lipinski, C. A.; Lombardo, F.; Dominy, B. W.; Feeney, P. J. Experimental and Computational Approaches to Estimate Solubility and Permeability in Drug Discovery and Development Settings. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **1997**, *23* (1), 3–25. [https://doi.org/10.1016/S0169-409X\(96\)00423-1](https://doi.org/10.1016/S0169-409X(96)00423-1).

- (72) Davis, M. E.; Brewster, M. E. Cyclodextrin-Based Pharmaceuticals: Past, Present and Future. *Nat. Rev. Drug Discov.* **2004**, *3* (12), 1023–1035. <https://doi.org/10.1038/nrd1576>.
- (73) Loftsson, T. Cyclodextrins and the Biopharmaceutics Classification System of Drugs. *J. Incl. Phenom. Macrocycl. Chem.* **2002**, *44*, 63–67. <https://doi.org/10.1023/A:1023088423667>.
- (74) Szejtli, J. Cyclodextrins in Drug Formulations: Part I. *Pharm. Technol.* **1991**, *3*, 15–22.
- (75) Sohi, H.; Sultana, Y.; Khar, R. K. Taste Masking Technologies in Oral Pharmaceuticals: Recent Developments and Approaches. *Drug Dev. Ind. Pharm.* **2004**, *30* (5), 429–448. <https://doi.org/10.1081/DDC-120037477>.
- (76) Laza-Knoerr, A. L.; Gref, R.; Couvreur, P. Cyclodextrins for Drug Delivery. *J. Drug Target.* **2010**, *18* (9), 645–656. <https://doi.org/10.3109/10611861003622552>.
- (77) Irie, T.; Uekama, K. Pharmaceutical Applications of Cyclodextrins. III. Toxicological Issues and Safety Evaluation. *J. Pharm. Sci.* **1997**, *86* (2), 147–162. <https://doi.org/10.1021/js960213f>.
- (78) Jambhekar, S. S.; Breen, P. Cyclodextrins in Pharmaceutical Formulations I: Structure and Physicochemical Properties, Formation of Complexes, and Types of Complex. *Drug Discov. Today* **2016**, *21* (2), 356–362. <https://doi.org/10.1016/j.drudis.2015.11.017>.
- (79) Loftsson, T.; Brewster, M. E. Pharmaceutical Applications of Cyclodextrins: Basic Science and Product Development. *J. Pharm. Pharmacol.* **2010**, *62* (11), 1607–1621. <https://doi.org/10.1111/j.2042-7158.2010.01030.x>.
- (80) Naguib, M. Sugammadex: Another Milestone in Clinical Neuromuscular Pharmacology. *Anesth. Analg.* **2007**, *104* (3), 575–581. <https://doi.org/10.1213/01.ane.0000244594.63318.fc>.
- (81) Li, S.; Liang, N.; Yan, P.; Kawashima, Y.; Sun, S. Inclusion Complex Based on N-Acetyl-L-Cysteine and Arginine Modified Hydroxypropyl- β -Cyclodextrin for Oral Insulin Delivery. *Carbohydr. Polym.* **2021**, *252*, 117202. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2020.117202>.
- (82) Graham, D. R. M.; Chertova, E.; Hilburn, J. M.; Arthur, L. O.; Hildreth, J. E. K. Cholesterol Depletion of Human Immunodeficiency Virus Type 1 and Simian Immunodeficiency Virus with β -Cyclodextrin Inactivates and Permeabilizes the Virions: Evidence for Virion-Associated Lipid Rafts. *J. Virol.* **2003**, *77*, 8237–8248. <https://doi.org/10.1128/JVI.77.15.8237-8248.2003>.
- (83) Singhal, A.; Szente, L.; Hildreth, J. E. K.; Song, B. Hydroxypropyl-Beta and -Gamma Cyclodextrins Rescue Cholesterol Accumulation in Niemann–Pick C1 Mutant Cell via Lysosome-Associated Membrane Protein 1. *Cell Death Dis.* **2018**, *9* (10), 1019. <https://doi.org/10.1038/s41419-018-1056-1>.
- (84) Zhang, J.; Ma, P. X. Cyclodextrin-Based Supramolecular Systems for Drug Delivery: Recent Progress and Future Perspective. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **2013**, *65* (9), 1215–1233. <https://doi.org/10.1016/j.addr.2013.05.001>.
- (85) Tchoreloff, P. C.; Boissonnade, M. M.; Coleman, A. W.; Baszkin, A. Amphiphilic Monolayers of Insoluble Cyclodextrins at the Water/Air Interface. Surface Pressure and Surface Potential Studies. *Langmuir* **1995**, *11* (1), 191–196. <https://doi.org/10.1021/la00001a033>.

- (86) Ling, C.-C.; Darcy, R.; Risse, W. Cyclodextrin Liquid Crystals: Synthesis and Self-Organisation of Amphiphilic Thio- β -Cyclodextrins. *J. Chem. Soc. Chem. Commun.* **1993**, 5 (438–440), 3. <https://doi.org/10.1039/C39930000438>.
- (87) Mazzaglia, A.; Donohue, R.; Ravoo, B. J.; Darcy, R. Novel Amphiphilic Cyclodextrins: Graft-Synthesis of Heptakis(6-alkylthio-6-deoxy)- β -cyclodextrin 2-Oligo(Ethylene Glycol) Conjugates and Their Ω -Halo Derivatives. *Eur. J. Org. Chem.* **2001**, 9, 1715–1721. [https://doi.org/10.1002/1099-0690\(200105\)2001:9<1715::AID-EJOC1715>3.0.CO;2-A](https://doi.org/10.1002/1099-0690(200105)2001:9<1715::AID-EJOC1715>3.0.CO;2-A).
- (88) Parrot-Lopez, H.; Ling, C. C.; Zhang, P.; Baszkin, A.; Albrecht, G.; De Rango, C.; Coleman, A. W. Self-Assembling Systems of the Amphiphilic Cationic per-6-Amino- β -Cyclodextrin 2,3-Di-O-Alkyl Ethers. *J. Am. Chem. Soc.* **1992**, 114 (13), 5479–5480. <https://doi.org/10.1021/ja00039a100>.
- (89) Donohue, R.; Mazzaglia, A.; Ravoo, B. J.; Darcy, R. Cationic β -Cyclodextrin Bilayer Vesicles. *Chem. Commun.* **2002**, No. 23, 2864–2865. <https://doi.org/10.1039/B207238F>.
- (90) Ortiz Mellet, C.; Benito, J. M.; García Fernández, J. M. Preorganized, Macromolecular, Gene-Delivery Systems. *Chem. Eur. J.* **2010**, 16 (23), 6728–6742. <https://doi.org/10.1002/chem.201000076>.
- (91) Kraus, T.; Buděšínský, M.; Závada, J. General Approach to the Synthesis of Persubstituted Hydrophilic and Amphiphilic β -Cyclodextrin Derivatives. *J. Org. Chem.* **2001**, 66 (13), 4595–4600. <https://doi.org/10.1021/jo010046q>.
- (92) Dubes, A.; Bouchu, D.; Lamartine, R.; Parrot-Lopez, H. An Efficient Regio-Specific Synthetic Route to Multiply Substituted Acyl-Sulphated β -Cyclodextrins. *Tetrahedron Lett.* **2001**, 42, 9147–9151. [https://doi.org/10.1016/S0040-4039\(01\)01992-X](https://doi.org/10.1016/S0040-4039(01)01992-X).
- (93) Hirayama, F. Cyclodextrin-Based Controlled Drug Release System. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **1999**, 36 (1), 125–141. [https://doi.org/10.1016/S0169-409X\(98\)00058-1](https://doi.org/10.1016/S0169-409X(98)00058-1).
- (94) Ma, M.; Li, D. New Organic Nanoporous Polymers and Their Inclusion Complexes. *Chem. Mater.* **1999**, 11 (4), 872–874. <https://doi.org/10.1021/cm981090y>.
- (95) Fenyvesi, E.; Ujhazy, A.; Szejtli, J.; Putter, S.; Gan, T. G. Controlled Release of Drugs from CD Polymers Substituted with Ionic Groups. *J. Incl. Phenom. Macrocycl. Chem.* **1996**, 25, 185–189. <https://doi.org/10.1007/BF01041566>.
- (96) Daoud-Mahammed, S.; Couvreur, P.; Amiel, C.; Besnard, M.; Appel, M.; Gref, R. Original Tamoxifen-Loaded Gels Containing Cyclodextrins: In Situ Self-Assembling Systems for Cancer Treatment. *J. Drug Deliv. Sci. Technol.* **2004**, 14 (1), 51–55. [https://doi.org/10.1016/S1773-2247\(04\)50005-9](https://doi.org/10.1016/S1773-2247(04)50005-9).
- (97) Kihara, F.; Arima, H.; Tsutsumi, T.; Hirayama, F.; Uekama, K. In Vitro and In Vivo Gene Transfer by an Optimized α -Cyclodextrin Conjugate with Polyamidoamine Dendrimer. *Bioconjug. Chem.* **2003**, 14 (2), 342–350. <https://doi.org/10.1021/bc025613a>.
- (98) Mellet, C. O.; Fernández, J. M. G.; Benito, J. M. Cyclodextrin-Based Gene Delivery Systems. *Chem. Soc. Rev.* **2011**, 40 (3), 1586–1608. <https://doi.org/10.1039/C0CS00019A>.
- (99) Chu, H. M.; Zhang, R. X.; Huang, Q.; Bai, C. C.; Wang, Z. Z. Chemical Conjugation with Cyclodextrins as a Versatile Tool for Drug Delivery. *J. Incl.*

- Phenom. Macrocycl. Chem.* **2017**, 89 (1–2), 29–38. <https://doi.org/10.1007/s10847-017-0743-3>.
- (100) Ma, P.-P.; Luo, S.-X.; Wang, J.; Xu, L.-S.; Wang, Z.-Z.; Lee, C. S.; McNamara, D.; O'Morain, C. A. β -Cyclodextrin Based Colon Targeted Delivery Systems of Aspirin: Synthesis, and in Vitro Assessment. *J. Control. Release* **2015**, *213*, e150. <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2015.05.254>.
- (101) Udo, K.; Hokonohara, K.; Motoyama, K.; Arima, H.; Hirayama, F.; Uekama, K. 5-Fluorouracil Acetic Acid/ β -Cyclodextrin Conjugates: Drug Release Behavior in Enzymatic and Rat Cecal Media. *Int. J. Pharm.* **2010**, *388* (1–2), 95–100. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2009.12.039>.
- (102) Mizusako, H.; Tagami, T.; Hattori, K.; Ozeki, T. Active Drug Targeting of a Folate-Based Cyclodextrin–Doxorubicin Conjugate and the Cytotoxic Effect on Drug-Resistant Mammary Tumor Cells In Vitro. *J. Pharm. Sci.* **2015**, *104* (9), 2934–2940. <https://doi.org/10.1002/jps.24428>.
- (103) Kim, H.-Y.; Sohn, J.; Wijewickrama, G. T.; Edirisinghe, P.; Gherezghiher, T.; Hemachandra, M.; Lu, P.-Y.; Chandrasena, R. E.; Molloy, M. E.; Tonetti, D. A.; Thatcher, G. R. J. Click Synthesis of Estradiol–Cyclodextrin Conjugates as Cell Compartment Selective Estrogens. *Bioorg. Med. Chem.* **2010**, *18* (2), 809–821. <https://doi.org/10.1016/j.bmc.2009.11.046>.
- (104) Yano, H.; Hirayama, F.; Arima, H.; Uekama, K. Preparation of Prednisolone-Appended α -, β - and γ -Cyclodextrins: Substitution at Secondary Hydroxyl Groups and In Vitro Hydrolysis Behavior. *J. Pharm. Sci.* **2001**, *90* (4), 493–503. [https://doi.org/10.1002/1520-6017\(200104\)90:4<493::AID-JPS1007>3.0.CO;2-W](https://doi.org/10.1002/1520-6017(200104)90:4<493::AID-JPS1007>3.0.CO;2-W).
- (105) Lartia, R.; Jankowski, C. K.; Arseneau, S. On the Synthesis of Cyclodextrin-Peptide Conjugates by the Huisgen Reaction: Cyclodextrin-Peptide Conjugates. *J. Pept. Sci.* **2016**, *22* (8), 511–516. <https://doi.org/10.1002/psc.2899>.
- (106) Longley, D. B.; Harkin, D. P.; Johnston, P. G. 5-Fluorouracil: Mechanisms of Action and Clinical Strategies. *Nat. Rev. Cancer* **2003**, *3* (5), 330–338. <https://doi.org/10.1038/nrc1074>.
- (107) Fluorouracil. *Drugs.com*.
- (108) World Health Organization. World Health Organization Model List of Essential Medicines: 21st List 2019, 2019.
- (109) Leelakanok, N.; Geary, S.; Salem, A. Fabrication and Use of PLGA-Based Formulations Designed for Modified Release of 5-Fluorouracil. *J. Pharm. Sci.* **2018**, *107* (2), 513–528. <https://doi.org/10.1016/j.xphs.2017.10.012>.
- (110) Heidelberger, C.; Chaudhuri, N. K.; Danneberg, P.; Mooren, D.; Griesbach, L.; Duschinsky, R.; Schnitzer, R. J.; Plevin, E.; Scheiner, J. Fluorinated Pyrimidines, a New Class of Tumor-Inhibitory Compounds. *Nature* **1957**, *179*, 663–666. <https://doi.org/10.1038/179663a0>.
- (111) Cohen, S. S.; Flaks, J. G.; Barner, H. D.; Loeb, M. R.; Lichtenstein, J. The Mode of Action of 5-Fluorouracil and Its Derivatives. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **1958**, *44* (10), 1004–1012. <https://doi.org/10.1073/pnas.44.10.1004>.
- (112) Lamont, E. B.; Schilsky, R. L. The Oral Fluoropyrimidines in Cancer Chemotherapy. *Clin. Cancer Res.* **1999**, *5*, 2289–2296.
- (113) Porter, D. J.; Chestnut, W. G.; Merrill, B. M.; Spector, T. Mechanism-Based Inactivation of Dihydropyrimidine Dehydrogenase by 5-Ethynyluracil. *J. Biol. Chem.* **1992**, *267* (8), 5236–5242. [https://doi.org/10.1016/S0021-9258\(18\)42757-3](https://doi.org/10.1016/S0021-9258(18)42757-3).

- (114) Kindler, H. L.; Schilsky, R. L. Eniluracil: An Irreversible Inhibitor of Dihydropyrimidine Dehydrogenase. *Expert Opin. Investig. Drugs* **2000**, *9* (7), 1635–1649. <https://doi.org/10.1517/13543784.9.7.1635>.
- (115) Nemunaitis, J.; Eager, R.; Twaddell, T.; Corey, A.; Sekar, K.; Tkaczuk, K.; Thompson, J.; Hoff, P. M.; Pazdur, R. Phase I Assessment of the Pharmacokinetics, Metabolism, and Safety of Emitefur in Patients With Refractory Solid Tumors. *J. Clin. Oncol.* **2000**, *18* (19), 3423–3434. <https://doi.org/10.1200/JCO.2000.18.19.3423>.
- (116) Lu, Y.; Low, P. S. Folate-Mediated Delivery of Macromolecular Anticancer Therapeutic Agents. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **2002**, *54*, 675–693. <https://doi.org/10.1016/j.addr.2012.09.020>.
- (117) Yin, J.-J.; Sharma, S.; Shumyak, S. P.; Wang, Z.-X.; Zhou, Z.-W.; Zhang, Y.; Guo, P.; Li, C.-Z.; Kanwar, J. R.; Yang, T.; Mohapatra, S. S.; Liu, W.; Duan, W.; Wang, J.-C.; Li, Q.; Zhang, X.; Tan, J.; Jia, L.; Liang, J.; Wei, M. Q.; Li, X.; Zhou, S.-F. Synthesis and Biological Evaluation of Novel Folic Acid Receptor-Targeted, β -Cyclodextrin-Based Drug Complexes for Cancer Treatment. *PLoS ONE* **2013**, *8* (5), e62289. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0062289>.
- (118) Giglio, V.; Oliveri, V.; Viale, M.; Gangemi, R.; Natile, G.; Intini, F. P.; Vecchio, G. Folate-Cyclodextrin Conjugates as Carriers of the Platinum(IV) Complex LA-12. *ChemPlusChem* **2015**, *80* (3), 536–543. <https://doi.org/10.1002/cplu.201402342>.
- (119) Okamoto, A.; Motoyama, K.; Onodera, R.; Higashi, T.; Koshigoe, T.; Shimada, Y.; Hattori, K.; Takeuchi, T.; Arima, H. Design and Evaluation of Folate-Appended α -, β -, and γ -Cyclodextrins Having a Caproic Acid as a Tumor Selective Antitumor Drug Carrier in Vitro and in Vivo. *Biomacromolecules* **2013**, *14* (12), 4420–4428. <https://doi.org/10.1021/bm401340g>.
- (120) Ceborska, M. Folate Appended Cyclodextrins for Drug, DNA, and siRNA Delivery. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* **2017**, *120*, 133–145. <https://doi.org/10.1016/j.ejpb.2017.09.005>.
- (121) Caliceti, P.; Salmaso, S.; Semenzato, A.; Carofiglio, T.; Fornasier, R.; Fermeglia, M.; Ferrone, M.; Pricl, S. Synthesis and Physicochemical Characterization of Folate–Cyclodextrin Bioconjugate for Active Drug Delivery. *Bioconjug. Chem.* **2003**, *14* (5), 899–908. <https://doi.org/10.1021/bc034080i>.
- (122) Hyun, H.; Park, M. H.; Jo, G.; Lee, B. Y.; Choi, J. W.; Chun, H. J.; Kim, H. S.; Yang, D. H. Injectable Glycol Chitosan Hydrogel Containing Folic Acid-Functionalized Cyclodextrin-Paclitaxel Complex for Breast Cancer Therapy. *Nanomaterials* **2021**, *11* (2), 317. <https://doi.org/10.3390/nano11020317>.
- (123) Salmaso, S.; Semenzato, A.; Caliceti, P.; Hoebeke, J.; Sonvico, F.; Dubernet, C.; Couvreur, P. Specific Antitumor Targetable β -Cyclodextrin–Poly(Ethylene Glycol)–Folic Acid Drug Delivery Bioconjugate. *Bioconjug. Chem.* **2004**, *15* (5), 997–1004. <https://doi.org/10.1021/bc034186d>.
- (124) Zhang, H.; Cai, Z.; Sun, Y.; Yu, F.; Chen, Y.; Sun, B. Folate-Conjugated β -Cyclodextrin from Click Chemistry Strategy and for Tumor-Targeted Drug Delivery. *J. Biomed. Mater. Res. A* **2012**, *100*, 2441–2449. <https://doi.org/10.1002/jbm.a.34169>.
- (125) Tornøe, C. W.; Christensen, C.; Meldal, M. Peptidotriazoles on Solid Phase: [1,2,3]-Triazoles by Regiospecific Copper(I)-Catalyzed 1,3-Dipolar

- Cycloadditions of Terminal Alkynes to Azides. *J. Org. Chem.* **2002**, *67* (9), 3057–3064. <https://doi.org/10.1021/jo011148j>.
- (126) Rostovtsev, V. V.; Green, L. G.; Fokin, V. V.; Sharpless, K. B. A Stepwise Huisgen Cycloaddition Process: Copper(I)-Catalyzed Regioselective “Ligation” of Azides and Terminal Alkynes. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2002**, *41* (14), 2596–2599. [https://doi.org/10.1002/1521-3773\(20020715\)41:14<2596::AID-ANIE2596>3.0.CO;2-4](https://doi.org/10.1002/1521-3773(20020715)41:14<2596::AID-ANIE2596>3.0.CO;2-4).
- (127) Meldal, M.; Tornøe, C. W. Cu-Catalyzed Azide–Alkyne Cycloaddition. *Chem. Rev.* **2008**, *108* (8), 2952–3015. <https://doi.org/10.1021/cr0783479>.
- (128) Kolb, H. C.; Sharpless, K. B. The Growing Impact of Click Chemistry on Drug Discovery. *Drug Discov. Today* **2003**, *8* (24), 1128–1137. [https://doi.org/10.1016/S1359-6446\(03\)02933-7](https://doi.org/10.1016/S1359-6446(03)02933-7).
- (129) Denny, W. A. Prodrug Strategies in Cancer Therapy. *Eur. J. Med. Chem.* **2001**, *36* (7–8), 577–595. [https://doi.org/10.1016/S0223-5234\(01\)01253-3](https://doi.org/10.1016/S0223-5234(01)01253-3).
- (130) Tietze, L. F.; Neumann, M.; Mã, T.; Rajewsky, M. F.; Jã, E. Proton-Mediated Liberation of Aldophosphamide from a Nontoxic Prodrug: A Strategy for Tumor-Selective Activation of Cytocidal Drugs. *Cancer Res.* **1989**, *49*, 4179–4184.
- (131) Di Donato, C.; Lavorgna, M.; Fattorusso, R.; Isernia, C.; Isidori, M.; Malgieri, G.; Piscitelli, C.; Russo, C.; Russo, L.; Iacovino, R. Alpha- and Beta-Cyclodextrin Inclusion Complexes with 5-Fluorouracil: Characterization and Cytotoxic Activity Evaluation. *Molecules* **2016**, *21*, 1644–1657. <https://doi.org/10.3390/molecules21121644>.
- (132) Ozerov, A. A.; Brel, A. K. New Acetenyl Acyclic Nucleosides Synthesis of 1-(Propargyloxymethyl) Derivatives of Uracil. *Chem. Heterocycl. Compd.* **1993**, *29* (6), 684–686. <https://doi.org/10.1007/BF00531547>.
- (133) Hasan, A.; Srivastava, P. C. Synthesis and Biological Studies of Unsaturated Acyclonucleoside Analogs of S-Adenosyl-L-Homocysteine Hydrolase Inhibitors. *J. Med. Chem.* **1992**, *35* (8), 1435–1439. <https://doi.org/10.1021/jm00086a012>.
- (134) Bos, M.; Loncaric, C.; Wu, C.; Wulff, W. Studies on the Synthesis of Richardianidin-1 via the Tautomer-Arrested Annulation of Fischer Carbene Complexes. *Synthesis* **2006**, *2006* (21), 3679–3705. <https://doi.org/10.1055/s-2006-950313>.
- (135) Ozaki, S.; Watanabe, Y.; Hoshiko, T.; Nagase, T.; Ogasawara, T.; Furukawa, H.; Uemura, A.; Ishikawa, K.; Mori, H.; Hoshi, A.; Iigo, M.; Tokuzen, R. 5-Fluorouracil Derivatives. X.: Synthesis and Antitumor Activities of α -Alkoxyalkyl-5-Fluorouracils. *Chem. Pharm. Bull. (Tokyo)* **1986**, *34* (1), 150–157. <https://doi.org/10.1248/cpb.34.150>.
- (136) El-Sayed, W. A.; Abdel-Rahman, A. A.-H. Copper-Catalyzed Synthesis and Antimicrobial Activity of Disubstituted 1,2,3-Triazoles Starting from 1-Propargyluracils and Ethyl (4-Azido-1,2,3-Trihydroxybutyl)Furan-3-Carboxylate. *Z. Für Naturforschung B* **2010**, *65* (1), 57–66. <https://doi.org/10.1515/znb-2010-0110>.
- (137) Menger, F. M.; Rourk, M. J. Synthesis and Reactivity of 5-Fluorouracil/Cytarabine Mutual Prodrugs. *J. Org. Chem.* **1997**, *62* (26), 9083–9088. <https://doi.org/10.1021/jo971076p>.
- (138) Schwarz, B.; Cech, D.; Holý, A.; Škoda, J. Preparation, Antibacterial Effects and Enzymatic Degradation of 5-Fluorouracil Nucleosides. *Collect.*

- Czechoslov. Chem. Commun.* **1980**, 45 (11), 3217–3230. <https://doi.org/10.1135/cccc19803217>.
- (139) Trushule, M.; Kupche, É.; Augustane, I.; Verovskii, N. V.; Lukevits, É.; Bauman, L.; Gavar, R.; Stradyn', Ya. Synthesis, Antitumorigenic Activity, and Electrochemical Properties of Uracil Derivatives of the Furan Series. *Chem. Heterocycl. Compd.* **1991**, 27 (12), 1358–1364. <https://doi.org/10.1007/BF00515582>.
- (140) Wang, Z. Hilbert-Johnson Reaction. In *Comprehensive Organic Name Reactions and Reagents*; American Cancer Society, 2010; pp 1408–1414. <https://doi.org/10.1002/9780470638859.conrr314>.
- (141) Vorbrueggen, H. Adventures in Silicon-Organic Chemistry. *Acc. Chem. Res.* **1995**, 28, 509–520. <https://doi.org/10.1021/ar00060a007>.
- (142) Novikov, M. S.; Ozerov, A. A.; Brel', A. K.; Boreko, E. I.; Korobchenko, L. V.; Vladyko, G. V. Synthesis and Antiviral Activity of 1-[2-(Allyloxy)Ethoxymethyl]- and 1-[1,3-Di-(Allyloxy)-2-Propoxymethyl]Pyrimidines. *Pharm. Chem. J.* **1994**, 28 (2), 110–113. <https://doi.org/10.1007/BF02220020>.
- (143) Ozerov, A. A.; Novikov, M. S.; Brel', A. K.; Andreeva, O. T.; Vladykov, G. V.; Boreko, E. I.; Korobchenko, L. V.; Vervetchenko, S. G. Synthesis and Antiviral Activity of New Unsaturated Pyrimidine Acyclonucleosides. *Pharm. Chem. J.* **1991**, 25 (8), 560–565. <https://doi.org/10.1007/BF00777425>.
- (144) Lee, Y. S.; Kim, Y. H. Regioselective Alkylation and Arylation At The 6-Position Of Pyrimidine: Synthesis Of 5-Alkyl-6-Arylmethyl-2,4-Pyrimidinediones. *Synth. Commun.* **1999**, 29 (9), 1503–1517. <https://doi.org/10.1080/00397919908086130>.
- (145) Daumar, P.; Decombat, C.; Chezal, J.-M.; Debiton, E.; Madesclaire, M.; Coudert, P.; Galmier, M.-J. Design, Synthesis and in Vitro Drug Release Investigation of New Potential 5-FU Prodrugs. *Eur. J. Med. Chem.* **2011**, 46 (7), 2867–2879. <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2011.04.010>.
- (146) Tripodo, G.; Wischke, C.; Neffe, A. T.; Lendlein, A. Efficient Synthesis of Pure Monotosylated Beta-Cyclodextrin and Its Dimers. *Carbohydr. Res.* **2013**, 381, 59–63. <https://doi.org/10.1016/j.carres.2013.08.018>.
- (147) Law, H.; Benito, J. M.; García Fernández, J. M.; Jicsinszky, L.; Crouzy, S.; Defaye, J. Copper(II)-Complex Directed Regioselective Mono- p-Toluenesulfonylation of Cyclomaltoheptaose at a Primary Hydroxyl Group Position: An NMR and Molecular Dynamics-Aided Design. *J. Phys. Chem. B* **2011**, 115 (23), 7524–7532. <https://doi.org/10.1021/jp2035345>.
- (148) Takahashi, K.; Hattori, K.; Toda, F. Monotosylated α - and β -Cyclodextrins Prepared in an Alkine Aqueous Solution. *Tetrahedron Lett.* **1984**, 25 (31), 3331–3334. [https://doi.org/10.1016/s0040-4039\(01\)81377-0](https://doi.org/10.1016/s0040-4039(01)81377-0).
- (149) Bonnet, V.; Duval, R.; Tran, V.; Rabiller, C. Mono-N-Glycosidation of β -Cyclodextrin – Synthesis of 6-(β -Cyclodextrinylamino)-6-Deoxy-D-Galactosides and of N-(6-Deoxy- β -Cyclodextrinyl)Galacto-Azepane. *Eur. J. Org. Chem.* **2003**, 2003 (24), 4810–4818. <https://doi.org/10.1002/ejoc.200300449>.
- (150) Takeo, K.; Ueraura, K.; Mitoh, H. Derivatives of α -Cyclodextrin and the Synthesis of 6-O- α -D-Glucopyranosyl- α -Cyclodextrin. *J. Carbohydr. Chem.* **1988**, 7 (2), 293–308. <https://doi.org/10.1080/07328308808058926>.
- (151) Salameh, A.; Lazar, A. N.; Coleman, A. W.; Parrot-Lopez, H. Synthesis and Interfacial Properties of Amphiphilic β -Cyclodextrins and Their Substitution

- at the O-6 Position with a Mono Bio-Recognisable Galactosyl Antenna. *Tetrahedron* **2005**, *61* (36), 8740–8745. <https://doi.org/10.1016/j.tet.2005.06.054>.
- (152) Carofiglio, T.; Fornasier, R.; Lucchini, V.; Simonato, L.; Tonellato, U. Synthesis, Characterization, and Supramolecular Properties of a Hydrophilic Porphyrin- β -Cyclodextrin Conjugate. *J. Org. Chem.* **2000**, *65* (26), 9013–9021. <https://doi.org/10.1021/jo0010678>.
- (153) Giacalone, F.; D'Anna, F.; Giacalone, R.; Gruttadauria, M.; Riela, S.; Noto, R. Cyclodextrin-[60]Fullerene Conjugates: Synthesis, Characterization, and Electrochemical Behavior. *Tetrahedron Lett.* **2006**, *47* (46), 8105–8108. <https://doi.org/10.1016/j.tetlet.2006.09.052>.
- (154) Benkovics, G.; Malanga, M.; Cutrone, G.; Béni, S.; Vargas-Berenguel, A.; Casas-Solvas, J. M. Facile Synthesis of Per(6-O-Tert-Butyldimethylsilyl)- α -, β -, and γ -Cyclodextrin as Protected Intermediates for the Functionalization of the Secondary Face of the Macrocycles. *Nat. Protoc.* **2021**, *16* (2), 965–987. <https://doi.org/10.1038/s41596-020-00443-8>.
- (155) Palin, R.; Grove, S. J. A.; Prosser, A. B.; Zhang, M.-Q. Mono-6-(O -2,4,6-Triisopropylbenzenesulfonyl)- γ -Cyclodextrin, a Novel Intermediate for the Synthesis of Mono-Functionalised. *Tetrahedron Lett.* **2001**, *42*, 8897–8899. [https://doi.org/10.1016/S0040-4039\(01\)01934-7](https://doi.org/10.1016/S0040-4039(01)01934-7).
- (156) Sato, T.; Nakamura, H.; Ohno, Y.; Endo, T. Synthesis of 1,4-Anhydro-2,3,6-Tri-O-Benzyl- α -D-Glucopyranose by Cis-Ring-Closure of a Glycosyl Chloride. *Carbohydr. Res.* **1990**, *199*, 31–35. [https://doi.org/10.1016/0008-6215\(90\)84090-H](https://doi.org/10.1016/0008-6215(90)84090-H).
- (157) Kumprecht, L.; Buděšínský, M.; Vondrášek, J.; Vymětal, J.; Černý, J.; Císařová, I.; Brynda, J.; Herzig, V.; Koutník, P.; Závada, J.; Kraus, T. Rigid Duplex α -Cyclodextrin Reversibly Connected With Disulfide Bonds. Synthesis and Inclusion Complexes. *J. Org. Chem.* **2009**, *74* (3), 1082–1092. <https://doi.org/10.1021/jo802139s>.
- (158) Grishina, A.; Stanchev, S.; Kumprecht, L.; Buděšínský, M.; Pojarová, M.; Dušek, M.; Rumlová, M.; Křížová, I.; Rulišek, L.; Kraus, T. β -Cyclodextrin Duplexes That Are Connected through Two Disulfide Bonds: Potent Hosts for the Complexation of Organic Molecules. *Chem. Eur. J.* **2012**, *18* (39), 12292–12304. <https://doi.org/10.1002/chem.201201239>.
- (159) Ruiz García, Y.; Zelenka, J.; Pabon, Y. V.; Iyer, A.; Buděšínský, M.; Kraus, T.; Edvard Smith, C. I.; Madder, A. Cyclodextrin–Peptide Conjugates for Sequence Specific DNA Binding. *Org. Biomol. Chem.* **2015**, *13* (18), 5273–5278. <https://doi.org/10.1039/C5OB00609K>.
- (160) Klein, E.; DeBonis, S.; Thiede, B.; Skoufias, D. A.; Kozielski, F.; Lebeau, L. New Chemical Tools for Investigating Human Mitotic Kinesin Eg5. *Bioorg. Med. Chem.* **2007**, *15* (19), 6474–6488. <https://doi.org/10.1016/j.bmc.2007.06.016>.
- (161) Lee, R. J.; Low, P. S. Delivery of Liposomes into Cultured KB Cells via Folate Receptor-Mediated Endocytosis. *J. Biol. Chem.* **1994**, *269* (5), 3198–3204. [https://doi.org/10.1016/S0021-9258\(17\)41848-5](https://doi.org/10.1016/S0021-9258(17)41848-5).