

**Charles University in Prague, Faculty of Science
Department of Organic Chemistry**

**Univerzita Karlova v Praze, Přírodovědecká fakulta
Katedra organické chemie**

Ph.D. study program: Organic chemistry
Doktorský studijní program: Organická chemie

Summary of the Ph.D. Thesis
Autoreferát disertační práce



**SYNTHESIS OF CYCLODEXTRIN DERIVATIVES FOR
PRACTICAL APPLICATIONS**
**SYNTÉZA CYKLODEXTRINOVÝCH DERIVÁTŮ PRO
PRAKTICKÉ APLIKACE**

Martin Popr

Supervisor/Školitel: doc. RNDr. Jindřich Jindřich, CSc.

Prague, 2016

Abstract

The first part of this PhD thesis is focused on the synthesis of a series of monosubstituted tetraalkylammonium cyclodextrin (CD) derivatives. The emphasis was placed on the possible applicability of the synthetic process to multigram or even industrial scale. Monotosylation of the native cyclodextrins (α -, β -, γ -) on the primary side of the macrocycle afforded the starting materials. Derivatives with one cationic group were prepared by the reaction with aqueous trimethylamine. The reaction of the mono-Ts-CD with neat *N,N,N'*-trimethylethane-1,2-diamine or *N,N,N'*-trimethylpropane-1,3-diamine and subsequent methylation led to derivatives with the substituent bearing two cationic groups (PEMEDA- and PEMPDA- CD). Analogs bearing a moiety with three tetraalkylammonium sites were synthesized by reaction of mono-Ts-CD with bis(3-aminopropyl)amine with subsequent methylation. 1,3-Dipolar cycloaddition of mono-6-azido- β -CD with diaminoacetylenes followed by methylation led to analogs with a variable distance of the charged substituent from the CD core. The majority of the presented reactions are straightforward, relatively high-yielding and the workup does not require chromatographic steps.

The second part of the work is dealing with the determination of properties of the selected prepared derivatives. Thermal stability of the two charged analogs PEMEDA- β -CD and PEMPDA- β -CD, which differ in the substituent linker length (ethylene and propylene respectively) was studied by ^1H NMR experiment. The measured kinetics of the Hofmann degradation proved PEMPDA- β -CD to have higher thermal stability and was selected as the most suitable host molecule for further measurements. The inclusion capabilities of permanently charged PEMPDA- β -CD in aqueous solution with three model aromatic guests (salicylic acid, *p*-methoxyphenol and *p*-nitroaniline) were determined by isothermal titration microcalorimetry (ITC) and the obtained values of stability constants (K_s) compared to the ones of native β -CD. Permanently charged cationic CD derivatives were successfully deposited on the anionic solid surface of polymeric Nafion[®] 117 membrane via electrostatic interactions. Deposition kinetics and coverage of the surface were determined by ELSD. The ability of the ionic assembly on the solid surface to encapsulate aromatic compounds from aqueous solution was measured by UV/Vis spectrometry.

Keywords: Cyclodextrins, Tetraalkylammonium derivatives, Cationic, Monosubstitution, Regioselectivity, Host-guest complex, Thermal stability, Solid surface, Inclusion properties

Abstrakt

První část této disertační práce je zaměřena na syntézu série monosubstituovaných tetraalkylamoniových derivátů cyklodextrinů (CD). Důraz byl kladen především na možné rozšíření syntetického procesu na přípravu látek v multigramovém, případně i průmyslovém měřítku. Základní výchozí látky byly připraveny monotosylací přírodních cyklodextrinů (α -, β - a γ -) na primárním okraji makrocyklu. Deriváty nesoucí substituent s jednou kationickou skupinou byly připraveny reakcí s vodným roztokem trimethylaminu. Reakce mono-Ts-CD s *N,N,N'*-trimethylethan-1,2-diaminem nebo *N,N,N'*-trimethylpropan-1,3-diaminem následovaná methyloací vedla k derivátům se substituentem nesoucím dvě kationické skupiny (PEMEDA- a PEMPDA- β -CD). Analoga se substituentem opatřeným třemi tetraalkylamoniovými funkčními skupinami byly syntetizovány pomocí reakce mono-Ts-CD s bis(3-aminopropyl)aminem následovanou kvarternizací methyljodidem. 1,3-Dipolární cykloadice mono-6-azido- β -CD s diaminoacetyleny, následovaná methyloací poskytla deriváty s variabilní vzdáleností permanentně nabitého substituentu od makrocyklu CD. Většina reakcí vykazovala relativně vysoké výtěžky produktů, bez nutnosti použití chromatografických separačních postupů, k jejich přečištění.

Druhá část práce se zabývá určováním vlastností vybraných připravených látek. Nejprve byla studována teplotní stabilita dvou vybraných analogů (PEMEDA- β -CD a PEMPDA- β -CD), které se liší délkou linkeru spojujícího nabitý atom dusíku v substituentu. Měření kinetiky Hofmannovy eliminace ukázalo, že PEMPDA- β -CD, mající propylenový linker, je stabilnější než PEMEDA- β -CD s ethylenovým linkerem, a proto byla vybrána jako vhodná hostitelská molekula pro další experimenty. Komplexační vlastnosti nabitého derivátu PEMPDA- β -CD byly ověřeny ve vodném prostředí se třemi modelovými aromatickými hosty (kyselinou salicylovou, *p*-methoxyfenolem a *p*-nitroanilinem). Pomocí izotermální titrační mikrokolorimetrie (ITC) byly získány hodnoty vazebných konstant (K_s) a byly porovnány s hodnotami naměřenými pro nesubstituovaný β -CD. Trvale nabitě kationické deriváty CD byly úspěšně ukotveny na pevnou fázi anionického polymeru (Nafion[®] 117) pomocí elektrostatických interakcí. Kinetika depozice na povrch a stupeň pokrytí byly určeny pomocí ELSD. Schopnost iontového seskupení na pevném povrchu enkapsulovat aromatické hosty z vodného roztoku byla zkoumána pomocí UV/Vis spektrometrie.

Získané výsledky naznačují, že připravené kationické deriváty CD si zachovávají schopnost komplexovat vhodné aromatické molekuly v roztoku i ukotvené na pevnou fázi.

Klíčová slova: Cyklodextriny, Tetraalkylamoniové deriváty, Kationické látky, Monosubstituce, Regioselektivita, Host-guest komplexace, Termální stabilita, Pevný povrch, Inkluzní komplexy

Table of contents

1. Introduction	5
2. Aims of the study.....	6
3. Materials and methods	7
4. Results and discussion	8
4.1 Preparation of the target compounds	8
4.2 Properties of the prepared derivatives	12
5. Conclusions	17
6. References.....	18
1. Úvod.....	19
2. Cíle práce	20
3. Materiál a metodika	21
4. Výsledky a diskuze	22
4.1 Příprava cílových sloučenin	22
4.2 Vlastnosti připravených derivátů	26
5. Závěry	31
6. Použitá literatura.....	32
Curriculum vitae.....	33
List of publications / Seznam publikací.....	34

1. INTRODUCTION

Naturally occurring and chemically modified cyclodextrins (CDs) are a very interesting group of organic compounds, which were first reported by Williers in 1891¹. They have a molecular structure of cyclic oligosaccharides and are composed of α -(1 \rightarrow 4)-linked D-glucopyranose units forming a macrocycle. In three-dimensional space, they occupy the shape of a hollow truncated cone, which has a hydrophilic surface, while the cavity is relatively lipophilic. These features indicate the main area of cyclodextrin utilization, which is based on their ability to form noncovalent inclusion complexes with a large variety of organic and inorganic guests.

Historically, there have been three main stages in the development of CD technology^{2,3}. The first discovery period (1891 - 1930s) included mostly studies of converting starch to mixtures of cyclic oligosaccharides using different bacterial strains, like *Bacillus macerans*⁴ and their separation. The second period (1930s - 1970s) covered systematic research on CDs and their inclusion complexes. In 1936 the cyclic structure of CDs was first proposed along with the introduction of procedures for obtaining pure fractions⁵. The last period (1970s – present) can be marked as a time of industrial production and utilization of CDs. Many patents and CD-related publications have been released through past few decades, and a mass production and utilization has been enabled.

Recently the annual production of cyclodextrins is exceeding 10,000 tons, and the average price is 5 USD per kilogram⁶. Today we can meet with CDs in our everyday life because they are often used for drug formulations⁷, as food additives⁸, in cosmetics industry⁹ or separation science¹⁰ and many other areas¹¹.

To expand and support further options of utilization of CDs, new methods for preparation of their derivatives and novel methods for modern applications need to be introduced. Routes for the synthesis of new chemically modified CDs, which show specific properties, need to be explored. Such derivatives may be then employed in the construction of “smart” materials (gels¹², polymers¹³, assemblies¹⁴), that can be designed for various practical purposes, such as transdermal delivery of drugs^{15,16}.

2. AIMS OF THE STUDY

The main goal of this thesis was to propose and execute the synthesis of a complete (α -, β -, γ -) series of novel cyclodextrin derivatives monosubstituted with a substituent bearing one or more permanently charged tetraalkylammonium functional groups. In the next phase, the prepared derivatives were to be deposited on an anionic solid surface via simple ionic interactions. Such assembly was to be designed to encapsulate proper therapeutic agents and finally serve as a potential drug carrier for transdermal drug delivery.

The synthetic process can be summarized into following steps:

- Monotosylation of α -, β - and γ - CDs in position 6
- Substitution of the p-toluenesulfonate group with an amine nucleophile
- Quaternization by methyl iodide (MeI)
- Preparation of analogs bearing azidoethane function
- Preparation of analogs with variable length of the linker, which connects the charged substituent to the CD core via “click” chemistry

The determination of the properties of prepared compounds can be summarized into following steps:

- NMR measurement of thermal degradation kinetics of derivative with two charges separated by ethylene linker vs. derivative with propylene linker
- Determination of inclusion properties of cationic CD derivatives in solution with model guest compounds
- Immobilization of cationic derivatives on solid anionic surface
- Inclusion of model guest molecules from the solution in the cavities of cationic CD derivatives anchored on a solid surface

3. MATERIALS AND METHODS

^1H NMR spectra were acquired on Varian VNMRS 300 at 300 MHz and ^{13}C at 75 MHz. For determination of the substituent position DEPT and 2D NMR measurements (H,H-COSY, HSQC, and HMBC) were performed on Bruker AVANCE III at 600 MHz (^1H) and 125 MHz (^{13}C). All chemical shift values (δ) are reported in ppm and coupling constants in Hz. Atoms of the CD glucose rings and substituents were labeled according to the established standards used in the publications regarding CD chemistry (Figure 1).

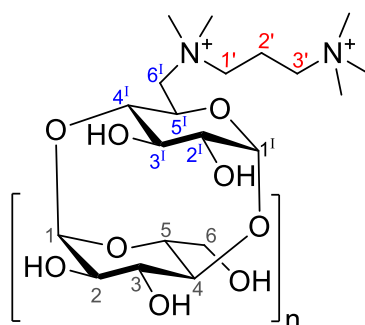


Figure 1. An example of the atom numbering in the NMR data listing.

Mass spectra were obtained on Bruker ESQUIRE 3000 ES-ion trap instrument with electrospray ionization (ESI). Infrared spectroscopy was performed on Thermo Nicolet AVATAR 370 FT-IR instrument. Samples were prepared as suspension with KBr and measured by DRIFT method. HRMS ESI spectra were acquired on Thermo Fisher Scientific LTQ Orbitrap XL instrument. Specific optical rotation was measured on Rudolph Research AUTOPOL III polarimeter at 589 nm. Melting points were determined on Kofler apparatus NAGEMA-RAPIDO with temperature gradient 4 °C/min. Thin layer chromatography (TLC) was performed on silica gel coated aluminum sheets DC-Alufolien Keisegel 60 F₂₆₅ (Merck, Darmstadt, Germany). Dipping in 50 % H₂SO₄ with subsequent carbonization by a heat gun was used for spot detection for all CD derivatives. Silica gel 60 (40-63 μm ; Fluka, Neu-Ulm, Switzerland) was used to perform preparative flash column chromatography. Organic solvents were distilled before use. β - and γ -CD were purchased from WAKO Chemicals (Germany). α -CD from Wacker-chemie. Other chemicals and reagents were purchased from common commercial sources.

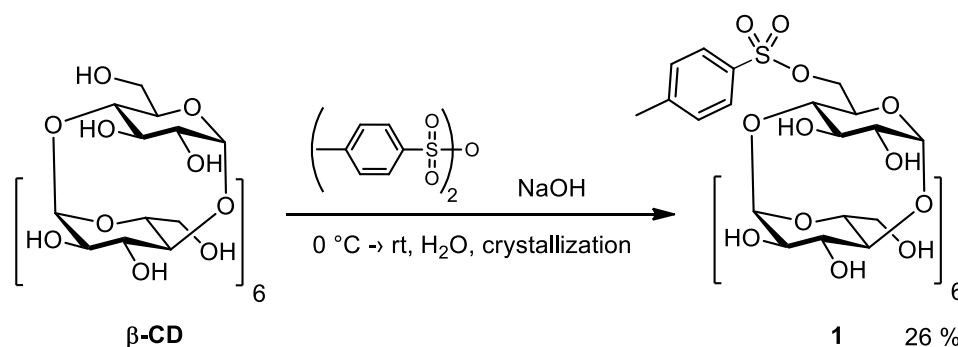
For determination of the inclusion properties of prepared derivatives and binding to the solid surface, the following instruments and materials were used. ITC measurements were carried out on GE MicroCalTM iTC₂₀₀. ELSD measurements were performed using Shimadzu LC-20AD HPLC pump and evaporative light scattering detector Alltech[®] 3300 ELSD. UV/Vis spectra were acquired on THERMO Spectronic Helios Gamma. The hydrodynamic radius of particles, R_h , and the scattering intensity, I_s , were measured at a scattering angle of $\theta = 173^\circ$ with a Zetasizer Nano-ZS instrument, Model ZEN3600 (Malvern Instruments, UK). H₂O and MeOH washes of the Nafion[®] were obtained using shaker Scientific Industries Vortex-Genie 2 at 1500 RPM For UV/Vis measurements the β -CD was recrystallized from water before use (10 g of β -CD from 100 ml of H₂O). Nafion[®] 117 membrane was obtained from Ion Power, Munich, Germany.

4. RESULTS AND DISCUSSION

Preparation of the target compounds

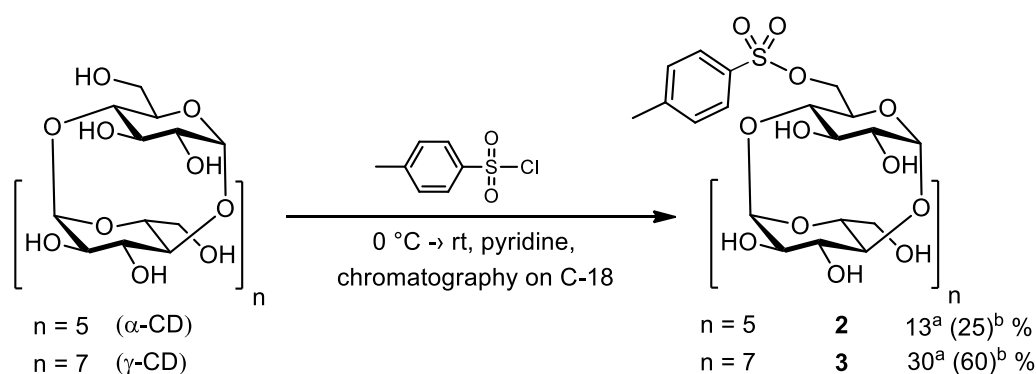
Synthesis of 6-*O*-tosyl- monosubstituted CD derivatives

The first reaction step in the sequence leading toward the tetraalkyl ammonium-substituted CD derivatives is the regioselective monotosylation of native CDs in position 6. This is the most critical and scope-limiting step in the whole sequence, as the most of the subsequent modifications afford products in nearly quantitative yields. 6¹-*O*-*p*-Toluenesulfonyl- β -cyclodextrin **1** was prepared by the reaction of β -CD with *p*-toluenesulfonic anhydride (Ts₂O) in the aqueous base employing the published procedure¹⁷, which was modified (Scheme 1). The product was purified by a novel method consisting of repeated crystallization in MeOH/H₂O (1:1 v/v) mixture which gives pure **1** satisfying overall yield of 26 %.



Scheme 1. Synthesis of mono-Ts- β -CD.

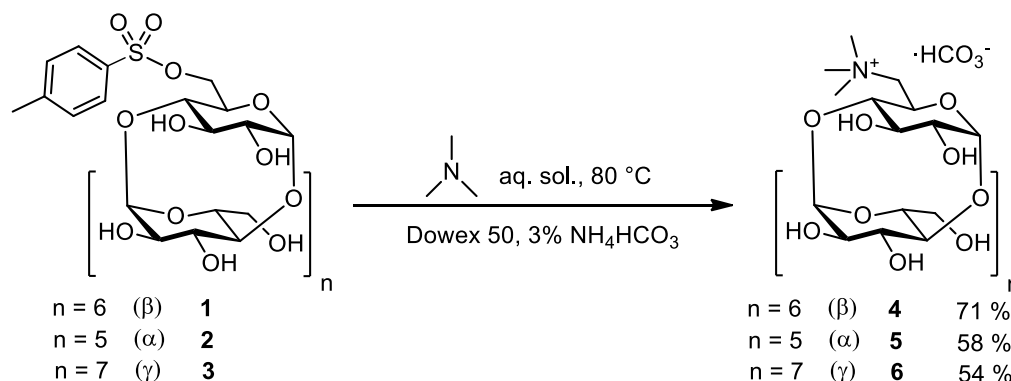
The monotosylates of α - and γ -CDs have been prepared by the modification of the conventional method employing TsCl in pyridine¹⁸ (Scheme 2). Again, this reaction provides a mixture of products with several degrees of substitution. Pure **2** and **3** were obtained using flash chromatography on reverse phase C-18, using step gradient, in excellent purity and sufficient yields of 13 % and 30 % respectively. After subtracting the amounts of the recovered native CD, which can be recycled, the corrected yields of **2** and **3** were 25 % and 60 % respectively.



Scheme 2. Synthesis mono-Ts- α - and γ -CDs. ^a Regular yields of monotosylates. ^b Corrected yields, when the amount of recovered starting material is taken into account.

Synthesis of monotrimethylammonio CD derivatives

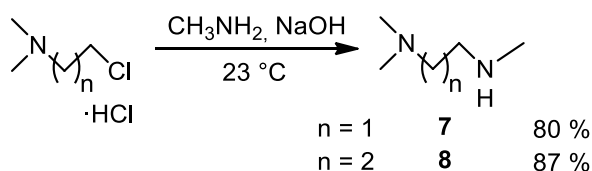
The series of derivatives bearing one tetraalkylammonium group were prepared by the reaction of respective CD monotosylates with aqueous trimethylamine, which is cheap and commercially available (Scheme 3). 6^L-(*N,N,N*-trimethylammonio)-6^L-deoxy- derivatives of α -, β - and γ -cyclodextrin (**4**, **5** and **6**) were obtained in reasonable 71 %, 58 % and 54 % yields respectively.



Scheme 3. Synthesis of monotrimethylammonio- series of CD derivatives.

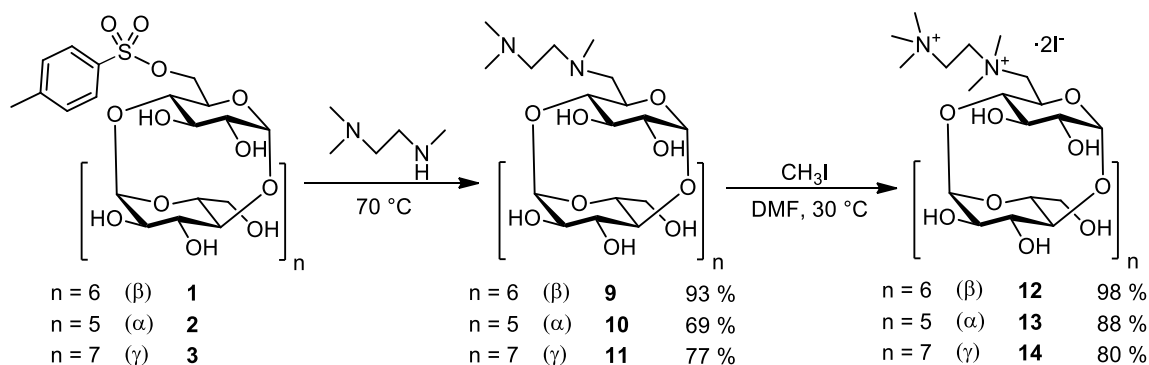
Synthesis of CD derivatives monosubstituted with quaternary diamine

CD derivatives bearing a substituent with two tetraalkylammonium groups separated by variable-length alkyl chain were prepared in a two-step procedure. Initially, the *N,N,N'*-trimethylethane-1,2-diamine **7** was prepared from *N*-(2-chloroethyl)-dimethylamine hydrochloride and MeNH₂ (40 % solution in H₂O) (Scheme 4) by the published procedure¹⁹.



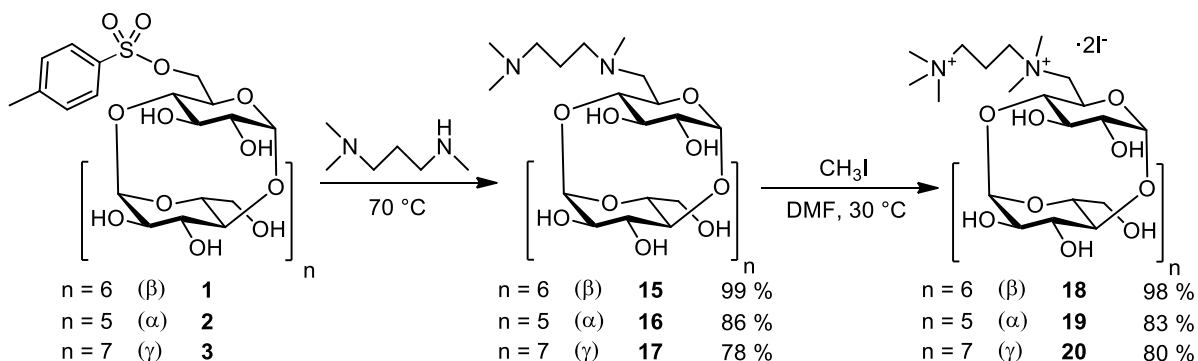
Scheme 4. Preparation of diamines **7** and **8** as reagents for further synthesis.¹⁹

In the first step **7** reacted directly with the monotosylates **1**, **2** and **3** to yield intermediates **9**, **10** and **11** respectively (Scheme 5). This solvent-free modification avoids unwanted side reactions, and unreacted **7** can be easily recovered by distillation. The final quaternization of the tertiary amine intermediates by methyl iodide (MeI) gave pure **12** (PEMEDA- β -CD) in nearly quantitative yield. Analogs **13** and **14** were prepared by the identical procedure as PEMEDA- β -CD (Scheme 6).



Scheme 5. Synthesis of PEMEDA CD derivatives.

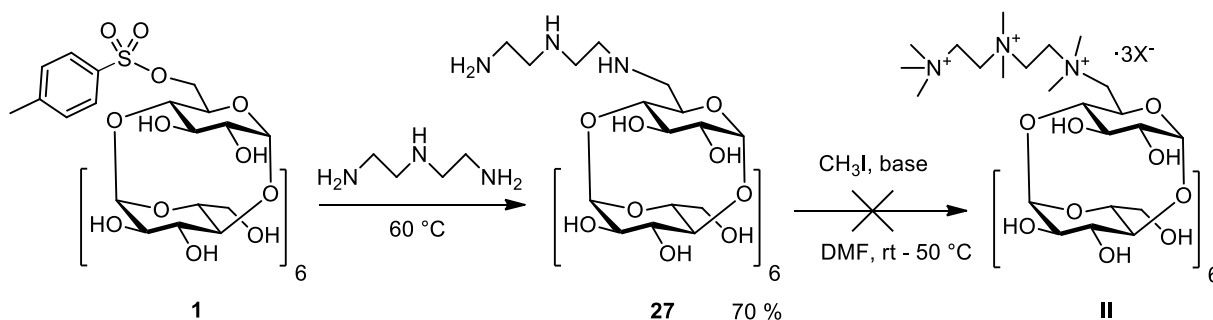
Due to the lower stability of the final products of the PEMEDA-series a new complete series of derivatives with propylene linker separating the charged nitrogen moieties was synthesized. The identical synthetic protocol, as for preparation of **12** and its α - and γ -analogs was employed, with the only modification of using *N,N,N'*-trimethylpropane-1,3-diamine **8** as the nucleophilic reagent (Scheme 6). Products **18**, **19** and **20** with propylene linker (PEMPDA-series) proved to be more stable and resistant toward Hofmann elimination.



Scheme 6. Synthesis of PEMPDA CD derivatives.

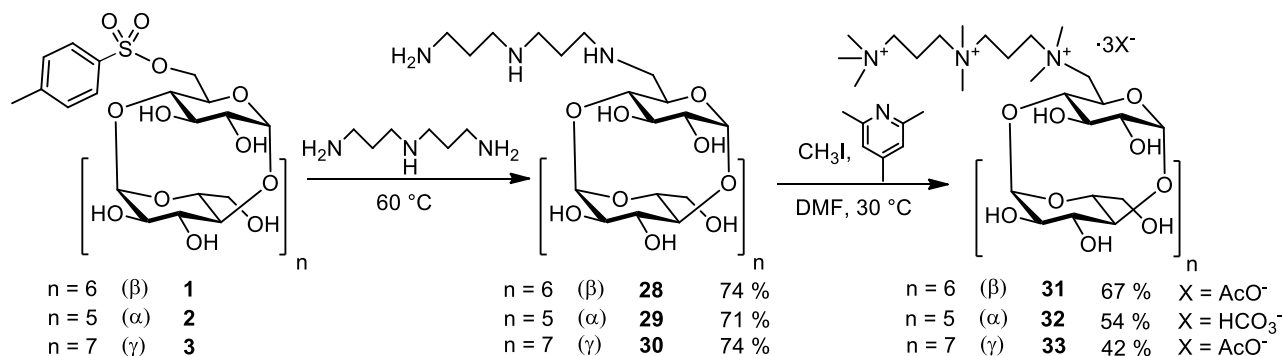
Synthesis of CD derivatives monosubstituted with quaternary triamine

To complete the series of positively charged monosubstituted CD derivatives, the analogs bearing substituent with three tetraalkyl ammonium groups in position 6 were prepared. The dry mono-Ts- β -CD **1** reacted with the diethylenetriamine to yield 70 % of 6¹-((2-((2-Aminoethyl)amino)ethyl)amino)-6¹-deoxy- β -cyclodextrin **27** in a solvent-free reaction (Scheme 7). Product **27** had to be purified on a column of strong cation exchanger in H⁺ form. Next, the methylation of **27** was carried out, employing MeI and sterically hindered base, but the reaction did not give product **II** (Scheme 7).



Scheme 7. Unsuccessful attempt to synthesize β -CD derivative bearing methylated diethylenetriamine.

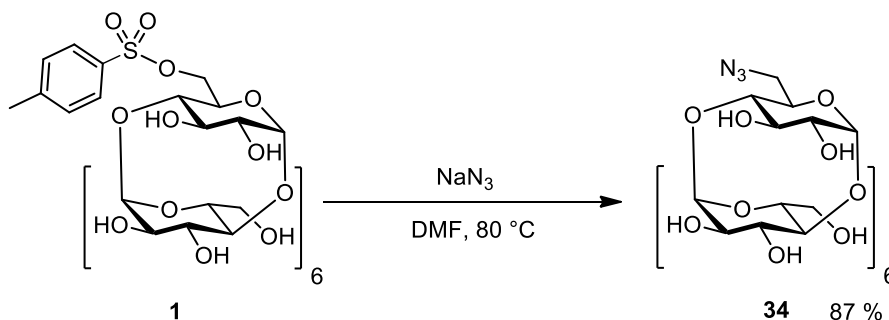
The previous failure to prepare PEMEDA- analog with three permanent positive charges (**II**), guided us toward the strategy employing more suitable triamine bis(3-aminopropyl)-amine (*N'*-(3-aminopropyl)propane-1,3-diamine, norspermidine). The reaction of starting tosylates **1-3** with bis(3-aminopropyl)-amine gave intermediates **29-30** in reasonable yields ranging from 71 to 74 % (Scheme 8). Purification on silica gel column gave the pure compound **30** in the form of triacetate salt. The methylation of intermediates **29-30** afforded the products **31-33** in good yields (Scheme 8).



Scheme 7. Synthesis of CD derivatives monosubstituted with quaternary triamine moiety.

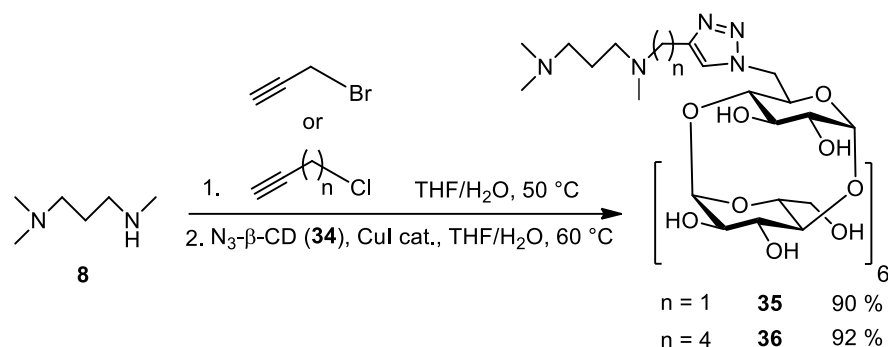
Synthesis of tetraalkylammonium CD derivatives with variable linker length by 1,3-dipolar cycloaddition

Analogs of PEMPDA-β-CD with variable linker length were prepared by the reaction of 6¹-azido-6¹-deoxy-β-CD **34** (mono-N₃-β-CD) with two acetylenic halides via 1,3-dipolar CuAAC, also referred to as “click” reaction.²⁰ In the first step mono-N₃-β-CD was prepared by the modification of published procedure²¹ from mono-Ts-β-CD **1** and sodium azide (Scheme 9). Pure compound **34** was obtained in 87 % yield, without a need of chromatographic purification.



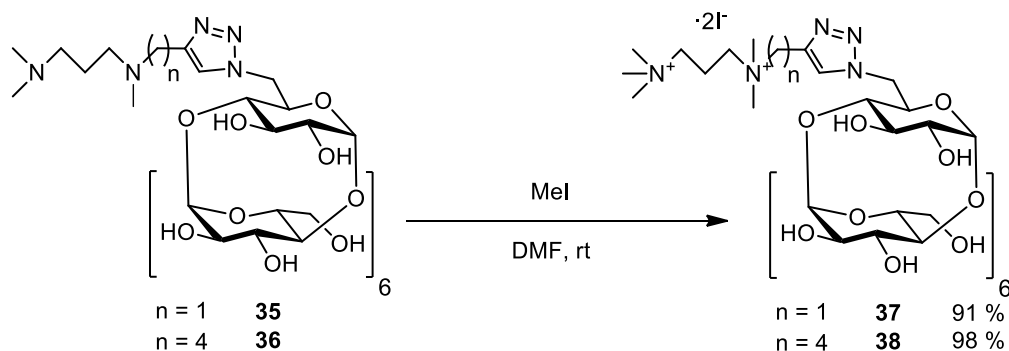
Scheme 8. Synthesis of N₃-β-CD.

The subsequent conversion was carried out as two-step one-pot reaction. In the first step either propargyl bromide or 6-chloro-1-hexyne was used as electrophilic reagent to react with the diamine **8** to yield acetylenic diamine intermediate (Scheme 10). This product was used directly in the second step, which is the copper (I) catalyzed click reaction with **34**. Pure products **35** and **36** were obtained in high yields of 90 % and 92 % respectively.



Scheme 9. Preparation of the tertiary diamine intermediates via one-pot reaction.

The final reaction toward the PEMPDA- analogs with variable linker length is the quaternization using MeI (Scheme 11). Product **35** contains methylene linker and was obtained in 91 % yield in the form of diiodide. Analog **36** has the PEMPDA- moiety attached by butylene linker and was obtained in a nearly quantitative yield of 98 %.

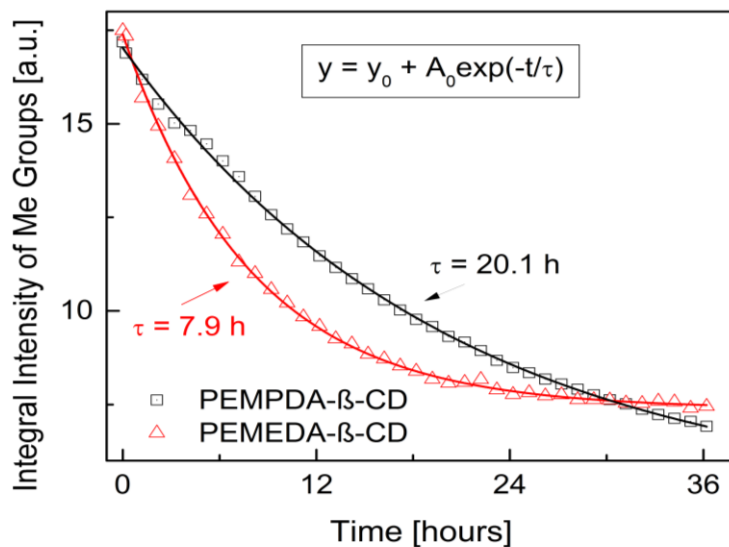


Scheme 10. Final quaternization of intermediate tertiary amine derivatives of CD with variable linker length using MeI.

Properties of the prepared derivatives

Thermal stability of PEMEDA- and PEMPDA- β -CD

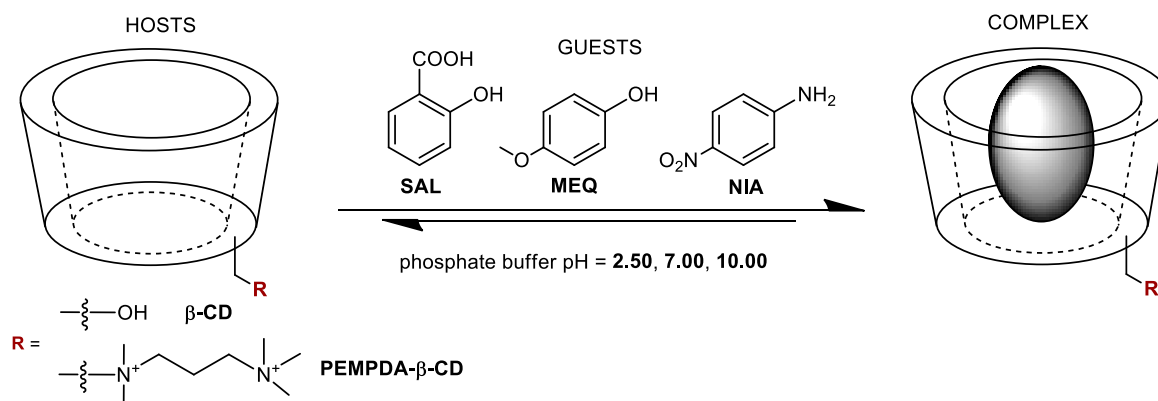
The kinetics of the thermal decomposition of PEMEDA- and PEMPDA- β -CD diiodides were investigated to determine the individual half-lives of the two compounds. ^1H NMR experiment at elevated temperature (50°C) was set up. Spectra of the sample solutions in D_2O , with 20 equivalents of NaOH were acquired every hour in the course of 36 hours. The decreasing values of the integral intensity of CH_3 protons of the substituent were plotted against time and kinetic curves for each derivative were obtained (Graph 1). The resulting kinetic profiles show the PEMPDA- β -CD to be the more stable derivative. The decomposition half-life times were calculated by fitting the experimental data by monoexponential function and are 7.9 h and 20.1 h for the PEMEDA- β -CD and PEMPDA- β -CD, respectively.



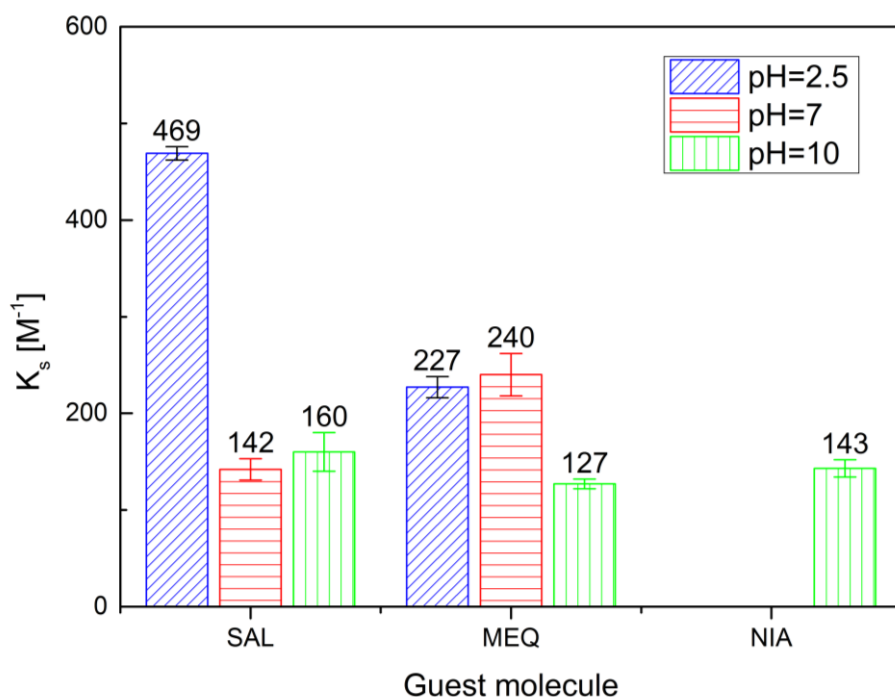
Graph 1. Decomposition kinetics of PEMEDA- and PEMPDA-β-CD at 50 °C as determined by ¹H NMR thermal experiment.

Inclusion properties of PEMPDA-β-CD in solution

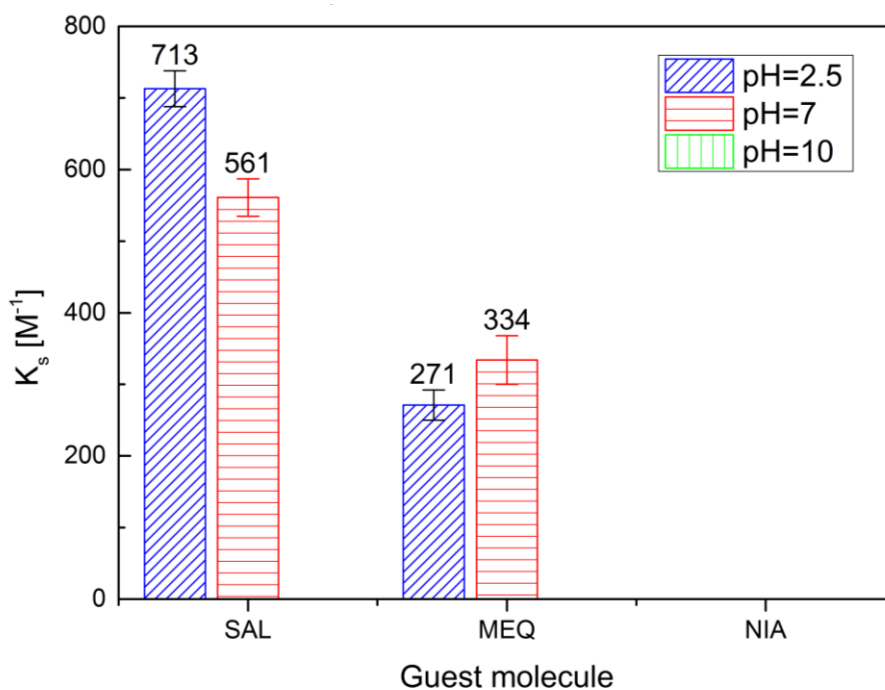
The ability of a representative PEMPDA-β-CD diiodide to form inclusion complexes with organic aromatic compounds was evaluated. The values of stability constants (K_s) of PEMPDA-β-CD with series of three aromatic guest molecules (salicylic acid – SAL, *p*-methoxyphenol – MEQ, *p*-nitroaniline – NIA) at three different pH values (2.50, 7.00, 10.00) were measured by Isothermal Titration Microcalorimetry (ITC) and compared to the ones obtained for native β-CD (Scheme 12, Graph 2 and 3).



Scheme 11. Host and guest molecules employed in K_s determination in solution at different pH



Graph 2. Stability constants for β -CD with SAL, MEQ and NIA obtained by ITC measurements.

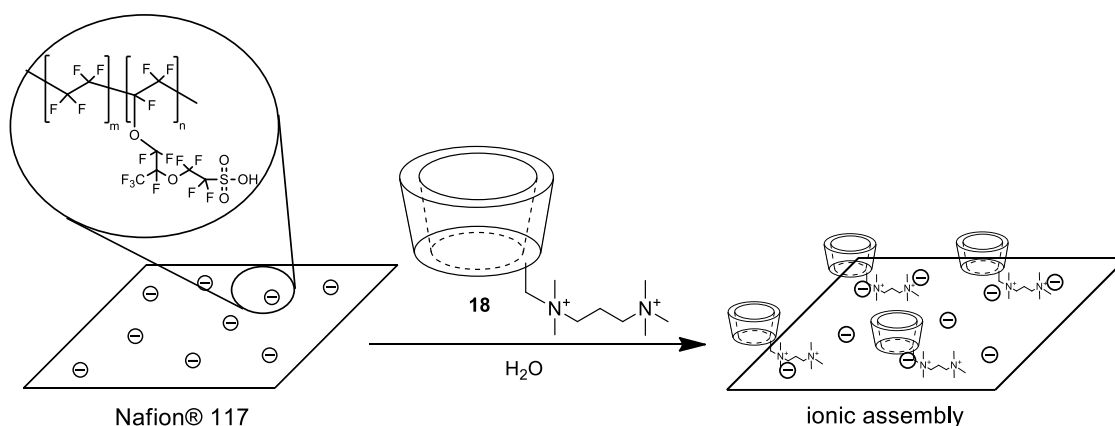


Graph 3. Stability constants for PEMPDA- β -CD with SAL, MEQ and NIA obtained by ITC measurements.

Immobilization of PEMPDA- β -CD on anionic surface via ionic self-assembly

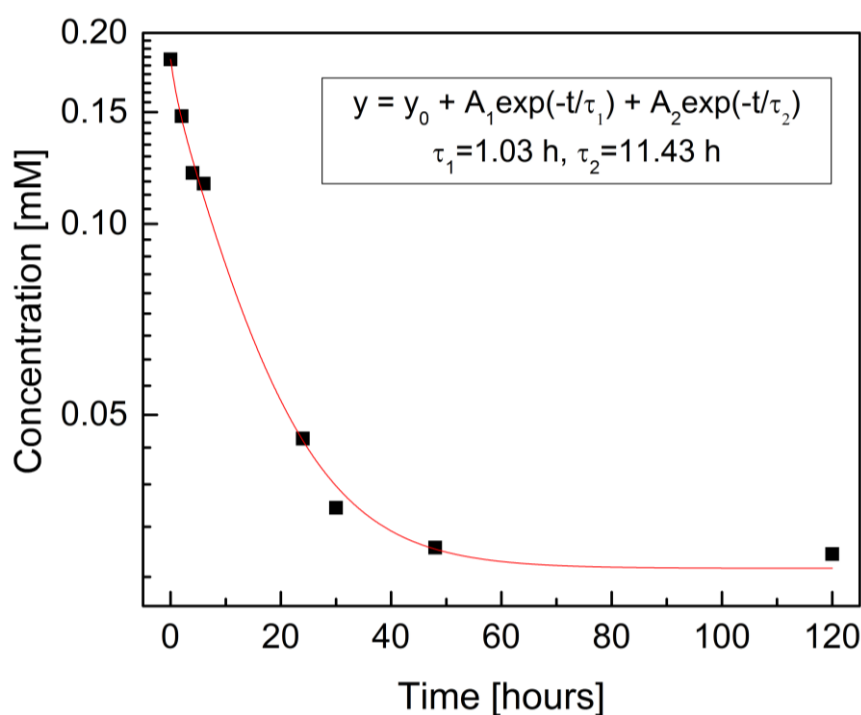
After we have verified, that cationic PEMPDA- β -CD maintains its complexation abilities, the next task was to deposit the macrocyclic host onto solid support via ionic

interactions (Scheme 13). Negatively charged Nafion[®] 117 (sulfonated tetrafluoroethylene fluoropolymer-copolymer) was selected as the model solid surface.



Scheme 12. Deposition of PEMPDA-β-CD onto solid surface (Nafion[®] 117).

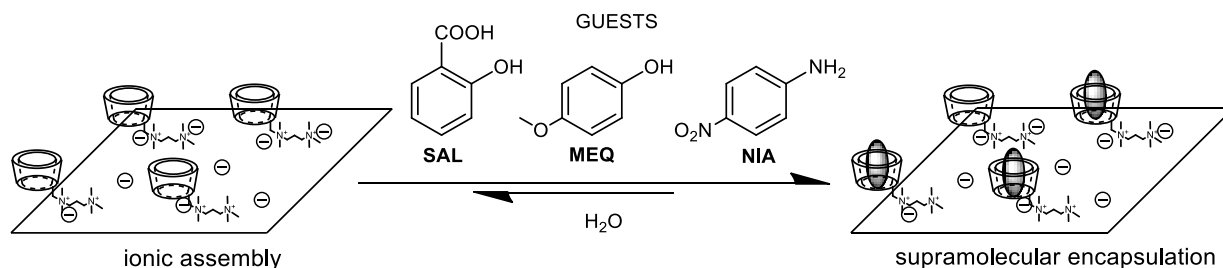
To obtain information about the amount of immobilized PEMPDA-β-CD together with deposition kinetics, the concentration decay was monitored by direct injection of the reaction mixture into the Evaporative light scattering detector (ELSD). The deposition time constants were calculated by fitting the experimental data by two exponential decay functions. Two time constants – $\tau_1 = 1.03$ h and $\tau_2 = 11.43$ h were obtained (Graph 4).



Graph 5. Deposition kinetics of PEMPDA-β-CD onto Nafion[®] 117 as obtained from ELSD detection of the decreasing concentration in the solution.

Inclusion of model guest molecules from the solution into the cavities of Nafion[®]-bound PEMPDA- β -CD

The ability of the ionic assembly of PEMPDA- β -CD anchored on the surface of Nafion[®] 117 to accommodate a small series of simple aromatic guest molecules (SAL, MEQ, and NIA) was studied. The cut-outs of Nafion[®] 117 foil in NH₄⁺ form (100 mm², 35 mg) with known amount of deposited PEMPDA- β -CD (5 mg) were stirred in the aqueous solution of the guest for 20 h, to reach equilibrium inclusion (Scheme 14). The extent of inclusion was quantified by UV/Vis measurement of the MeOH washes.



Scheme 13. Inclusion of three model guests into the cavities of immobilized PEMPDA- β -CD.

The extent of inclusion of guests into cavities of anchored PEMPDA- β -CD is expressed as *ROC* (ratio of occupied cavities) is defined as a molar percentage of the cavities forming inclusion complex. The highest *ROC* was obtained for SAL (34.5 %) which corresponds very well with the data from the measurement of complexation in the solution (Table 1).

Table 1. Results of the inclusion of different guests on the Nafion[®] 117 and PEMPDA- β -CD ionic assembly at neutral pH.

guest	<i>c</i> (guest) M	<i>n</i> (included guest) mol	<i>n</i> (CD on surface)	<i>ROC</i> %
SAL	1.40E-02	1.14E-06	3.30E-06	34.5
SAL	1.40E-03	1.05E-07	3.30E-06	3.2
MEQ	1.40E-02	5.76E-07	3.30E-06	17.5
MEQ	1.40E-03	4.55E-08	3.30E-06	1.4
NIA	3.20E-03	3.40E-07	3.30E-06	10.3
NIA	3.20E-04	1.40E-08	3.30E-06	0.4

5. CONCLUSIONS

In the synthetic part of the thesis a complete series of positively charged monosubstituted CD derivatives was successfully prepared. Previously described procedures for synthesis of key starting materials (6-*O*-tosyl- monosubstituted derivatives of α -, β - and γ -CDs) were optimized to afford products in highest possible yields and purity. Reactions of monotosylates with tertiary or secondary amines, diamines, and triamines, followed by quaternization with MeI, afforded CD derivatives bearing substituent with one, two, or three tetraalkylammonium groups, respectively. Additionally, cationic derivatives equipped with azidoethane function and two analogs of PEMPDA- β -CD with variable linker length (attached by CuAAC) were prepared. The majority of the prepared compounds were obtained in multigram scale by straightforward reaction sequences from commercially available and inexpensive starting materials, without the need for any chromatographic purification steps. Prepared target compounds can be used as versatile hosts with variable cavity size and number of cationic sites, having the ability to be immobilized on an anionic surface. The possibility of using the cationic CD derivatives for preparation of novel chiral stationary phase for HPLC,²² and as chiral selectors in CZE,²³ has been investigated.

The second part of the thesis is focused on the determination of properties of selected compounds. Thermal stability of two most promising monosubstituted bis(tetraalkylammonium) CD derivatives PEMEDA-, and PEMPDA- β -CD was studied by ¹H NMR experiment at elevated temperature. Resulting kinetic profiles of thermal degradation revealed that the analog with longer propylene linker PEMPDA- β -CD is less vulnerable toward thermal decomposition caused by Hofmann elimination. The ability of PEMPDA- β -CD to form supramolecular complexes was studied by ITC using three model guest molecules (salicylic acid – SAL, *p*-methoxyphenol – MEQ, *p*-nitroaniline – NIA) at three pH values (2.50, 7.00 and 10.00). We discovered that PEMPDA- β -CD can encapsulate SAL and MEQ at acidic and neutral pH. Values of the calculated complex stability constants indicate the formation of complexes with comparable stabilities to the ones of native β -CD. A method for immobilization of PEMPDA- β -CD onto the solid surface of Nafion[®] 117, along with the determination of the surface coverage and deposition kinetics by ELSD, was developed. Finally, the ability of PEMPDA- β -CD deposited on an anionic surface to encapsulate the three model guests was investigated. A straightforward method for quantification of the inclusion extent, using UV/Vis spectrometric measurement of MeOH washes, was introduced. Best results were obtained for SAL, where 34.5 % of the available cavities of the PEMPDA- β -CD were in the form of inclusion complexes. The amount of included guests in the PEMPDA- β -CD anchored onto a solid surface correlates quite nicely with the stability constants of the corresponding complexes in solution. Presented conclusions are promising for the intended application of supramolecular ionic assemblies of positively charged CD derivatives as drug delivery systems for controlled release of suitable bioactive compounds.

6. REFERENCES

- (1) Villiers, A. *Compt. Rend.* **1891**, *112*, 536–538.
- (2) Szejtli, J. *Chem. Rev.* **1998**, *98* (5), 1743–1754.
- (3) Crini, G. *Chem. Rev.* **2014**, *114* (21), 10940–10975.
- (4) Schardinger, F. *Wien. Klin. Wochenschr.* **1904**, *17*, 207.
- (5) Freudenberg, K.; Blomquist, G.; Ewald, L.; Stoff, K. *Ber. Dtsch. Chem. Ges.* **1936**, *69*, 1258.
- (6) Xiao, P.; Dudal, Y.; Corvini, P. F.-X.; Pieleš, U.; Shahgaldian, P. *Polym. Chem.* **2011**, *2* (6), 1264–1266.
- (7) Loftsson, T.; Brewster, M. E. *J. Pharm. Pharmacol.* **2010**, *62* (11), 1607–1621.
- (8) Astray, G.; Gonzalez-Barreiro, C.; Mejuto, J. C.; Rial-Otero, R.; Simal-Gándara, J. *Food Hydrocoll.* **2009**, *23* (7), 1631–1640.
- (9) H.-J. Buschmann; Schollmeyer, E. *J. Cosm. Sci.* **2002**, *53* (3), 185–191.
- (10) Schneiderman, E.; Stalcup, A. M. *J. Chromatogr. B. Biomed. Sci. App.* **2000**, *745* (1), 83–102.
- (11) Del Valle, E. M. M. *Process Biochem.* **2004**, *39* (9), 1033–1046.
- (12) Rodriguez-Tenreiro, C.; Alvarez-Lorenzo, C.; Rodriguez-Perez, A.; Concheiro, A.; Torres-Labandeira, J. J. *Pharm. Res.* **2006**, *23* (1), 121–130.
- (13) van de Manacker, F.; Vermonden, T.; van Nostrum, C. F.; Hennink, W. E. *Biomacromolecules* **2009**, *10* (12), 3157–3175.
- (14) Chen, Y.; Liu, Y. *Chem. Soc. Rev.* **2010**, *39* (2), 495–505.
- (15) Matsuda, H.; Arima, H. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **1999**, *36* (1), 81–99.
- (16) Langer, R.; Tirrell, D. A. *Nature* **2004**, *428* (6982), 487–492.
- (17) Zhong, N.; Byun, H.-S.; Bittman, R. *Tetrahedron Lett.* **1998**, *39* (19), 2919–2920.
- (18) Tang, W.; Ng, S.-C. *Nat Protoc.* **2008**, *3* (4), 691–697.
- (19) De Costa, B. R.; Radesca, L.; Di Paolo, L.; Bowen, W. D. *J. Med. Chem.* **1992**, *35* (1), 38–47.
- (20) Kolb, H. C.; Finn, M. G.; Sharpless, K. B. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2001**, *40* (11), 2004–2021.
- (21) Bonnet, V.; Duval, R.; Tran, V.; Rabiller, C. *Eur. J. Org. Chem.* **2003**, *2003* (24), 4810–4818.
- (22) Kučerová, G.; Kalíková, K.; Procházková, H.; Popr, M.; Jindřich, J.; Coufal, P.; Tesařová, E. *Chromatographia* **2016**, *79* (9–10), 529–536.
- (23) Havlikova, M.; Bosakova, Z.; Benkovics, G.; Jindrich, J.; Popr, M.; Coufal, P. *Chem. Pap.* **2016**, *70* (9), 1144–1154.

1. ÚVOD

Přírodní a chemicky modifikované cyklodextriny (CD) jsou velmi zajímavou skupinou organických látek, které byly poprvé popsány Williersem v roce 1891¹. Z hlediska struktury se jedná o makrocyclické sacharidy, složené z D-glukopyranosových jednotek, které jsou spojené pomocí α -(1→4) glykosidických vazeb. V prostoru zaujímají tvar dutého komolého kužele, jehož povrch je hydrofilní, kdežto vnitřní kavita je relativně lipofilní. Tyto vlastnosti umožňují cyklodextrinům tvorbu nekovalentních inkluzních komplexů s řadou organických i anorganických látek.

Z historického hlediska rozlišujeme tři hlavní etapy vývoje CD technologie^{2,3}. První etapa (1891 - 1930s) zahrnuje hlavně studie o transformaci škrobu na cyklické oligosacharidy pomocí různých bakteriálních kmenů, jako je např. *Bacillus macerans*⁴ a jejich separaci. V druhém období (1930s - 1970s) se výzkum soustřeďoval na CD a jejich inkluzní komplexy. V roce 1936 byla poprvé navržena cyklická struktura CD, společně s metodami purifikace přírodních CD. Poslední období (1970s – současnost) by se dalo popsat jako etapa průmyslové produkce a využívání CD. Za posledních několik desetiletí bylo vydáno nespočet publikací a patentů o CD, a také byla umožněna jejich masová produkce a využívání.

V současnosti roční produkce cyklodextrinů převyšuje 10000 tun a průměrná cena se pohybuje kolem 5 dolarů za kilogram⁶. Dnes se můžeme s CD potkat v našem každodenním životě, protože se často používají jako součást léčiv⁷, přídatné látky v potravinách⁸, v kosmetickém průmyslu⁹, v separačních technikách¹⁰ a mnohých dalších oblastech¹¹.

Pro další rozšiřování způsobů využití CD je zapotřebí vývoj nových metod pro přípravu jejich derivátů. Je třeba hledat nové způsoby syntézy derivátů CD se specifickými vlastnostmi. Takovéto deriváty by poté mohly být, mimo jiné, využity pro konstrukci nových tzv. “chytrých” materiálů, jako jsou gely¹², polymery¹³ a jiné konstrukty. Deriváty mohou být navrženy a využity pro specifické potřeby, jako je např. transdermální transport léčiv^{15,16}.

2. CÍLE PRÁCE

Hlavním cílem této práce byl návrh a provedení syntézy kompletní série nových monosubstituovaných cyklodextrinových derivátů, nesoucích substituent s jednou nebo více permanentně nabitými tetraalkylamoniovými funkčními skupinami. V následné fázi mají být tyto připravené deriváty ukotveny na anionickou pevnou fázi pomocí iontových interakcí. Navržené seskupení by mělo být schopné enkapsulovat různá léčiva a potenciálně sloužit jako nosič pro transdermální transport léčiv.

Cílené syntetické procesy by se daly shrnout do následujících bodů:

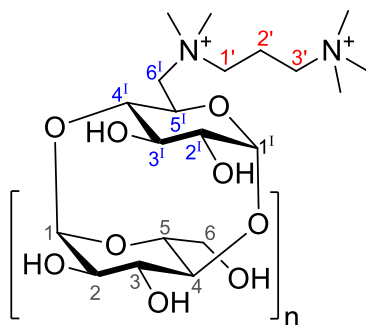
- Monotosylace α -, β - a γ - CD v poloze 6
- Substituce monotosylátů nukleofilními aminy
- Kvarternizace pomocí methyljodidu (MeI)
- Příprava analogů nesoucích azidoethanovou funkční skupinu
- Příprava analogů s variabilní délkou linkeru spojující nabitý substituent s CD makrocylem, pomocí tzv. “click“ reakce

Stanovení vlastností vybraných připravených derivátů bylo shrnuto do těchto bodů:

- Stanovení kinetiky teplotní degradace derivátů, se dvěma náboji oddělenými pomocí ethylenového nebo propylenového linkeru, pomocí NMR
- Stanovení inkluzních vlastností vybraných kationických derivátů CD v roztoku se sérií modelových hostujících molekul
- Ukotvení kationických derivátů na anionický pevný povrch
- Vychytávání modelových hostujících molekul z roztoku do kavit CD derivátů ukotvených na pevné fázi

3. MATERIÁL A METODIKA

^1H NMR spektra byla pořízena na přístroji Varian VNMRS 300 při 300 MHz a ^{13}C při 75 MHz. Pro stanovení pozic substituentů a kompletní přiřazení metodami DEPT a 2D NMR (H,H-COSY, HSQC a HMBC) byl použit Bruker AVANCE III při 600 MHz (^1H) a 125 MHz (^{13}C). Všechny hodnoty chemických posunů (δ) jsou uváděny v jednotkách ppm a interakční konstanty v Hz. Atomy glukosových jednotek CD a substituentů jsou značeny podle běžných zvyklostí v CD literatuře (Obrázek 1).



Obrázek 1. Příklad číslování atomů CD derivátů, použité ve výpisech NMR signálů.

Hmotnostní spektra byla získána na přístroji Bruker ESQUIRE 3000 ES-ion trap s ionizací elektrosprejem (ESI). Infračervená spektroskopie byla měřena na přístroji Thermo Nicolet AVATAR 370 FT-IR. Vzorky byly připraveny jako suspenze v KBr a měřeny metodou DRIFT. HRMS ESI spektra byla získána na přístroji Thermo Fisher Scientific LTQ Orbitrap XL. Specifické rotace byly měřeny na polarimetru Rudolph Research AUTOPOL III při 589 nm. Teploty tání byly stanoveny na Koflerově bloku NAGEMA-RAPIDO s teplotním gradientem 4 °C/min. Chromatografie na tenké vrstvě (TLC) byla prováděna na hliníkových deskách s naneseným silikagelem DC-Alufolien Keisegel 60 F₂₆₅ (Merck, Darmstadt, Německo). Pro detekci CD derivátů bylo použito ponoření do 50 % H₂SO₄ s následnou karbonizací pomocí zahřátí horkovzdušnou pistolí. Před použitím byla organická rozpouštědla vždy předestilována. β - and γ -CD byly zakoupeny od WAKO Chemicals (Německo). α -CD od Wacker-chemie. Ostatní chemikálie a reagenty byly zakoupeny z běžných komerčních zdrojů.

Pro stanovení inkluzních vlastností připravených derivátů a vazbu na pevnou fázi byly použity následující přístroje a materiály: ITC měření byla provedena na GE MicroCalTM iTC₂₀₀. ELSD měření byla provedena pomocí Shimadzu LC-20AD HPLC pumpy a ELSD detektoru Alltech[®] 3300 ELSD. UV/Vis spektra byla pořízena na THERMO Spectronic Helios Gamma. Hydrodynamický průměr částic R_h , a intenzita rozptylu I_s , byly měřeny při rozptylovém úhlu $\theta = 173^\circ$ pomocí Zetasizeru Nano-ZS, Model ZEN3600 (Malvern Instruments, UK). H₂O and MeOH oplachy Nafionu[®] byly získány pomocí vortexu Scientific Industries Vortex-Genie 2 při 1500 RPM. Pro účely UV/Vis měření byl β -CD rekrystalizován z vody (10 g β -CD ze 100 ml H₂O). Fólie Nafion[®] 117 byla zakoupena od Power, Mnichov, Německo.

4. VÝSLEDKY A DISKUZE

Příprava cílových sloučenin

Syntéza 6-*O*-tosyl- monosubstituovaných derivátů CD

První reakcí v sekvenci vedoucí k tetraalkylamoniovým derivátům CD je regioselektivní monotosylace přírodního CD v poloze 6. Je to navíc kritický a zároveň, z hlediska výtěžků, limitující krok z celé reakční sekvence, pokud zohledňujeme fakt, že většina následných konverzí probíhá s vysokými výtěžky. 6¹-*O*-*p*-Toluensulfonyl-β-cykloextrin **1** byl připraven podle publikované procedury¹⁷, která byla modifikována, a to reakcí β-CD s anhydridem *p*-toluensulfonové kyseliny ve vodné bázi (Schéma 1). Produkt byl přečištěn použitím nové metodiky, a to krystalizace ve směsi MeOH/H₂O (1:1 v/v). Čistá látka **1** byla získána ve 26 % výtěžku.

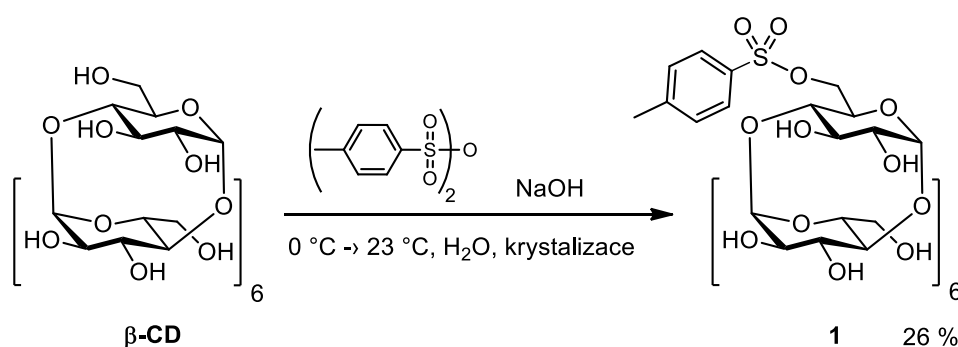


Schéma 1. Syntéza mono-Ts-β-CD.

Monosubstituované tosyláty α- a γ- CD byly připraveny modifikací publikovaného postupu, založeného na reakci CD s TsCl v pyridinu¹⁸ (Schéma 2). Obdobně jako v případě tosylace β-CD, reakce poskytuje směs izomerů s různým stupněm substituce. Čisté látky **2** a **3** byly získány pomocí sloupcové chromatografie na reverzní fázi C-18 s použitím krokového gradientu v uspokojivých výtěžcích 13 % a 30 %. Po odečtení množství zpětně získaného nezreagovaného výchozího CD, který může být opětovně použit, jsou korigované výtěžky látek **2** a **3** 25 a 60 %.

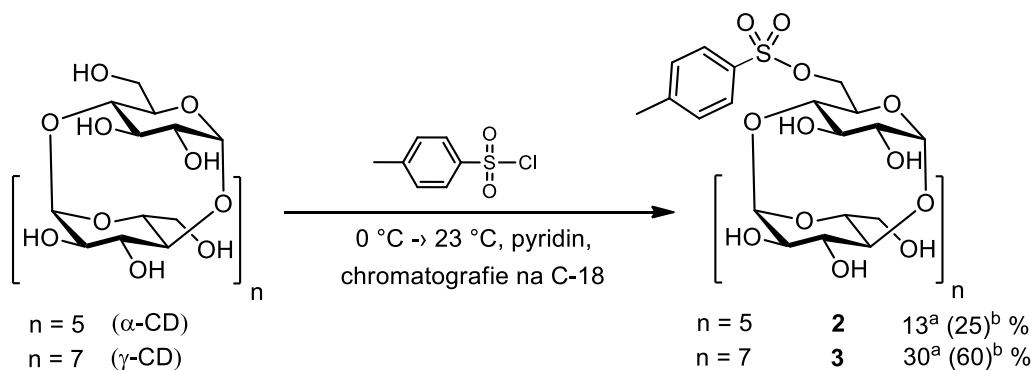


Schéma 2. Syntéza mono-Ts-α- a γ-CD. ^a Běžné výtěžky monotosylátů. ^b Korigované výtěžky, po odečtení množství zpětně získané výchozí látky.

Syntéza monotrimethylamoniových CD derivátů

Série derivátů nesoucích jednu tetraalkylamoniovou skupinu byla připravena reakcí příslušných CD monotosylátů s trimethylaminem, který je levnou a běžně dostupnou výchozí chemikálií (Schéma 3). 6^L-(*N,N,N*-trimethylamonio)-6^L-deoxy-deriváty α -, β - a γ -cyklodextrinu (**4**, **5** a **6**) byly získány v uspokojivých výtěžcích 71, 58 a 54 %.

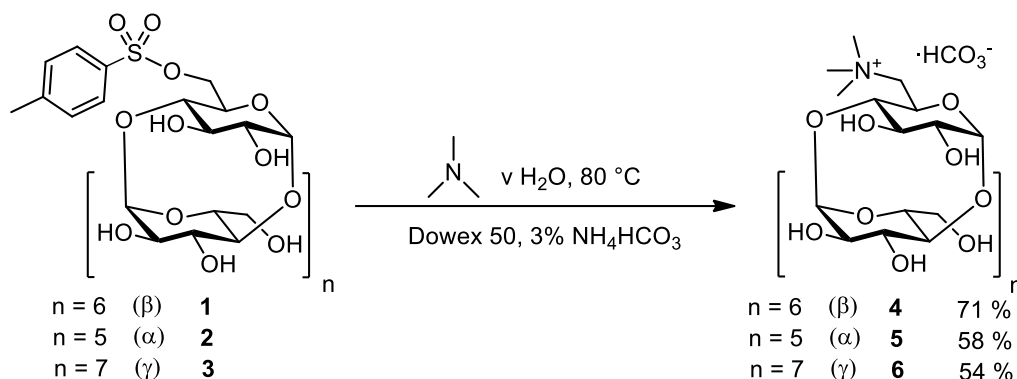


Schéma 3. Syntéza série monotrimethylamoniových derivátů CD.

Syntéza CD derivátů monosubstituovaných kvarterním diaminem

CD deriváty vybavené substituentem se dvěma tetraalkylamoniovými skupinami oddělenými variabilním linkerem byly připraveny ve dvou krocích. Nejprve byl připraven *N,N,N'*-trimethylethan-1,2-diamin **7** z *N*-(2-chlorethyl)-dimethylaminu hydrochloridu a MeNH₂ (40 % roztok v H₂O) (Schéma 4) dle publikovaného postupu¹⁹. Diaminy **7** and **8** lze zakoupit od běžných komerčních zdrojů, ale cena za 1 g je cca 10 × dražší, než při popsané přípravě v laboratoři.

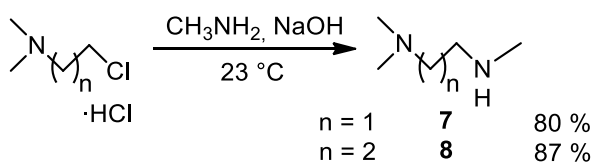


Schéma 4. Příprava diaminů **7** a **8** jako reagentů pro další kroky syntézy.¹⁹

V prvním kroku látka **7** reagovala přímo s monotosyláty **1**, **2** a **3** za vzniku meziproductů **9**, **10** a **11** (Schéma 5). Tato modifikace reakce bez rozpouštědla předchází problémům s nežádoucími bočními reakcemi a nezreagované činidlo **7** může být s výhodou recyklováno pomocí destilace. Finální kvarternizace intermediátu v podobě terciárního aminu byla realizována methyljodidem (MeI) a poskytla čistou látku **12** (PEMEDA- β -CD) v takřka kvantitativním výtěžku. Analoga **13** a **14** byla připravena stejným postupem jako PEMEDA- β -CD (Schéma 6).

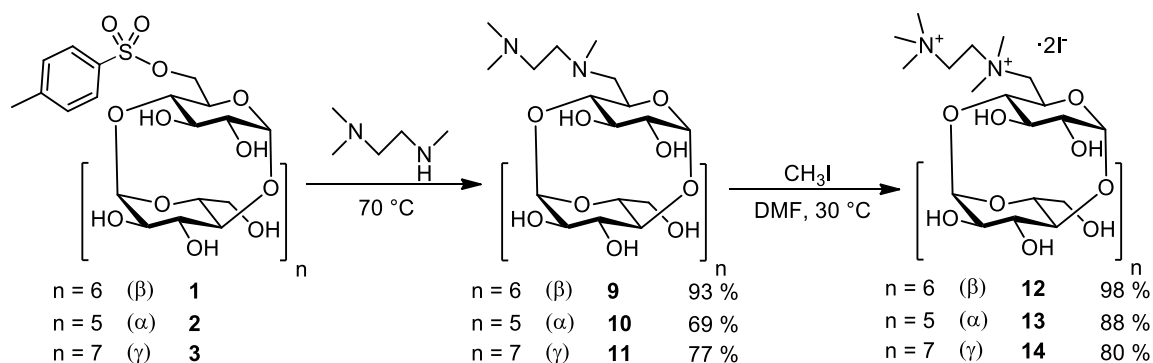


Schéma 5. Syntéza PEMEDA- série CD derivátů.

Díky relativně nižší stabilitě produktů PEMEDA- série byla navržena nová generace derivátů s propylenovým linkerem oddělujícím dva kvarterní dusíky. Byl využit identický syntetický předpis, jako pro přípravu látky **12** a jejich α - a γ - analogů, s jedinou změnou v použití *N,N,N'*-trimethylpropan-1,3-diaminu **8** jako nukleofilního činidla (Schéma 6). Produkty **18**, **19** a **20** s propylenovým linkerem (PEMPDA- série) se ukázaly být odolnější proti tepelné degradaci.

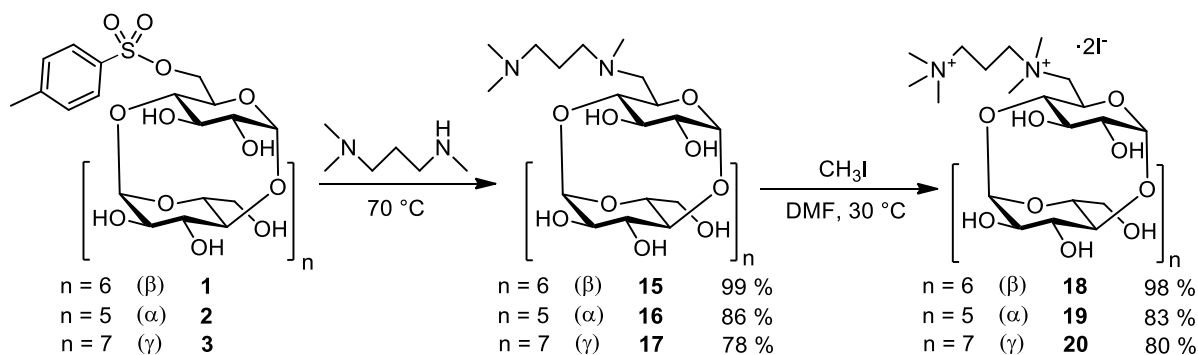


Schéma 6. Syntéza PEMPDA- série CD derivátů.

Syntéza CD derivátů monosubstituovaných kvarterním triaminem

Pro finalizaci série pozitivně nabitých monosubstituovaných derivátů CD bylo třeba připravit analoga, nesoucí substituent se třemi tetraalkylamoniovými skupinami, v poloze 6. Mono-Ts- β -CD **1** reagoval s diethyltrieminem za vzniku 6¹-((2-((2-Aminoethyl)amino)ethyl)amino)-6¹-deoxy- β -cyklodextrin **27** ve výtěžku 70 % (Schéma 7). Produkt **27** bylo nutné přečistit na koloně silného katexu v H⁺ cyklu. Dále byla snaha o metylaci látky **27** pomocí MeI v přítomnosti stericky bráněné báze, avšak reakce produkt **II** neposkytla (Schéma 7).

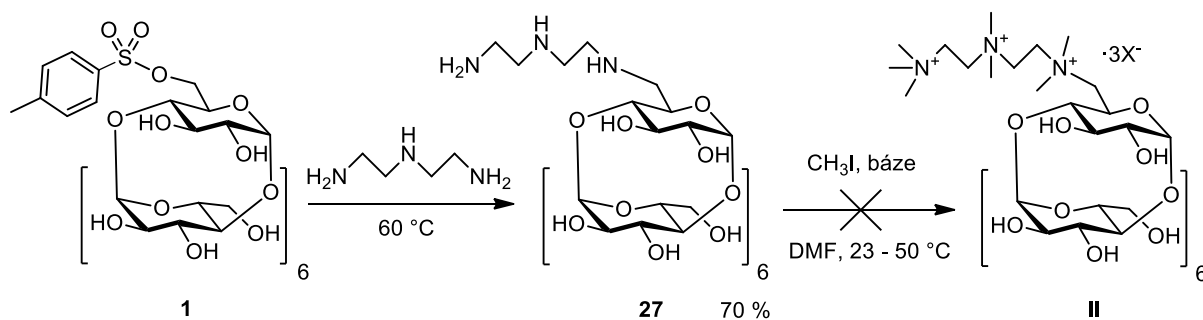


Schéma 7. Pokus o přípravu derivátu β -CD nesoucím permethylovaný diethylentriamin.

Předchozí nezdar při přípravě PEMEDA- analoga se třemi permanentními kladnými náboji (II), nás přivedl ke strategii použít vhodnější triamin (3-aminopropyl)-amin (*N'*-(3-aminopropyl)propan-1,3-diamin, Norspermidin). Reakce výchozích tosylátů **1-3** s bis(3-aminopropyl)-aminem vedla k meziproduktům **29-30** s uspokojivými výtěžky v rozsahu 71 až 74 % (Schéma 8). Látka **30** musela být přečištěna na sloupci silikagelu a byla získána ve formě triacetátu. Methylace intermediátů **29-30** vedla k produktům **31-33** (Schéma 8).

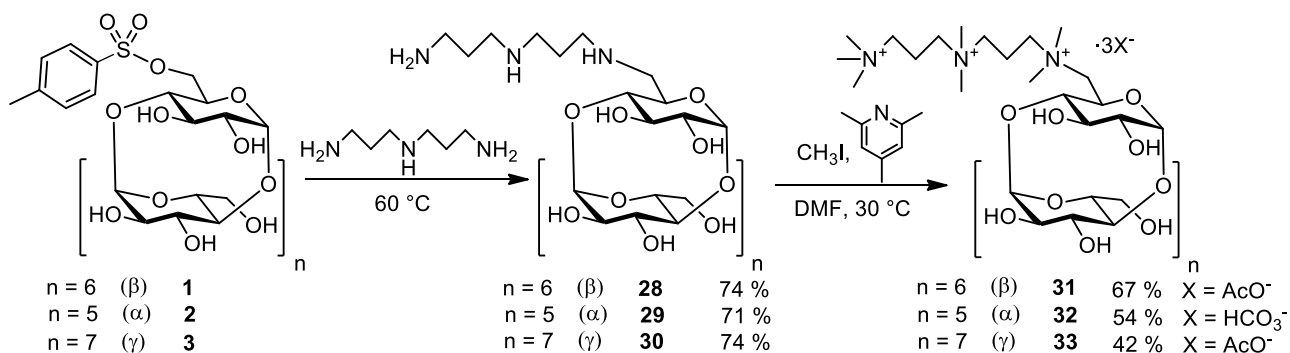


Schéma 8. Syntéza CD derivátů monosubstituovaných kvarterním triaminem.

Syntéza tetraalkylamoniových CD derivátů s variabilní délkou linkeru pomocí 1,3-dipolární cykloadice

Pomocí 1,3-dipolární Huisgenovy cykloadice, známou také jako tzv. "click" reakce²⁰, byla připravena analoga PEMPDA- β -CD s variabilní délkou linkeru, reakcí 6¹-azido-6¹-deoxy- β -CD **34** (N_3 - β -CD) s dvěma acetylenickými halidy. V prvním kroku byl připraven N_3 - β -CD modifikací publikovaného postupu²¹ z mono-Ts- β -CD **1** a azidu sodného (Schéma 9). Čistá látka **34** byla získána v 87 % výtěžku, bez nutnosti chromatografického čištění.

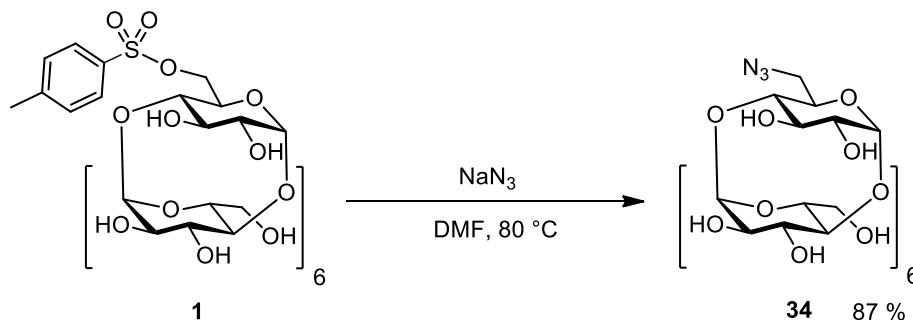


Schéma 9. Syntéza N_3 - β -CD.

Následující konverze byla provedena jako dvoukroková "one-pot" reakce. V prvním kroku reagoval buďto propargylbromid nebo 6-chlorhex-1-yn, jako elektrofilní činidlo, s diaminem **8** za vzniku acetylenického diaminu (Schéma 10). V druhém kroku, kterým je CuAAC reakce s látkou **34**, katalyzovaná jednomocnou mědí, byl tento meziprodukt použit přímo a bez izolace. Čisté látky **35** a **36** byly získány ve výtěžcích 90 a 92 %.

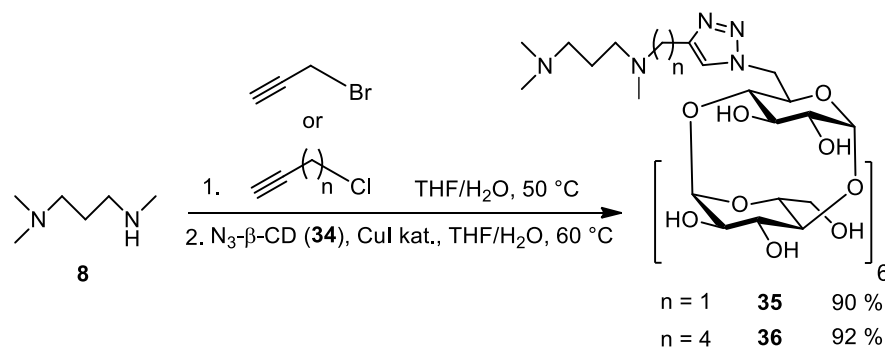


Schéma 10. Příprava intermediátů nesoucích terciární diamin, pomocí "one-pot" reakce.

Konečnou reakcí k přípravě PEMPDA- analogů s variabilní délkou linkeru je kvarternizace pomocí MeI (Schéma 11). Produkt **35** obsahující methylenový linker byl získán v 91 % výtěžku. Analog **36**, mající PEMPDA- strukturní motiv připojený butylenovým linkerem, byl získán v téměř kvantitativním výtěžku 98 %.

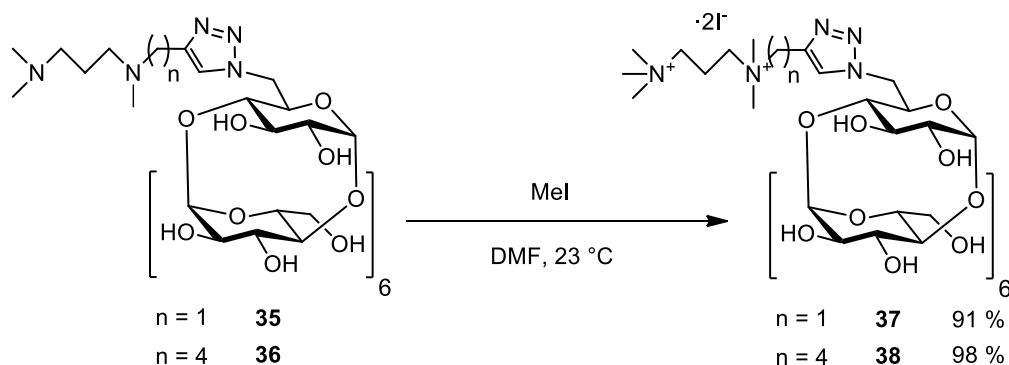
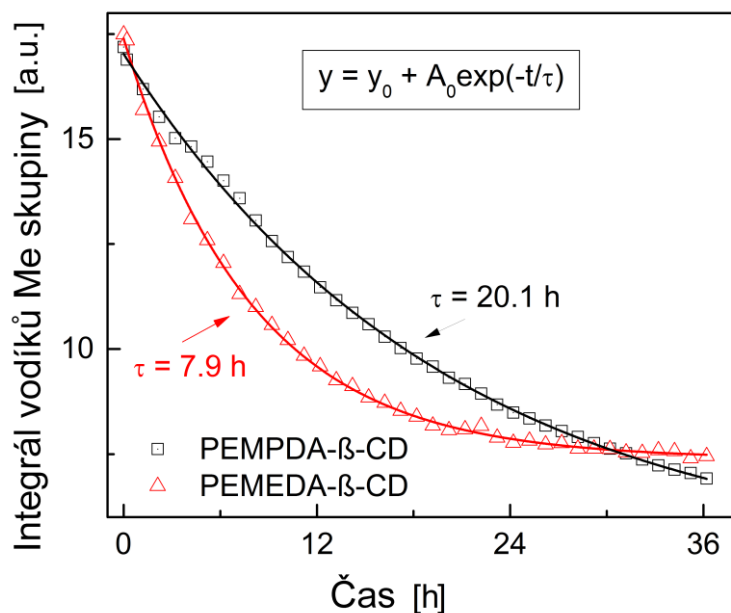


Schéma 11. Závěrečná kvarternizace meziproduktů **35** a **36** pomocí MeI.

Vlastnosti připravených derivátů

Teplotní stabilita PEMEDA- a PEMPDA-β-CD

Kinetika teplotního rozkladu PEMEDA- a PEMPDA-β-CD ve formě diiodidů byla studována za účelem stanovení individuálních poločasů rozkladu těchto dvou látek. Stanovení bylo provedeno pomocí ^1H NMR experimentu za zvýšené teploty (50 °C). Spektra vzorků v D_2O , s 20 ekvivalenty NaOH byla snímána každou hodinu po dobu 36 hodin. Klesající hodnoty integrálu signálu CH_3 protonů ve spektrech obou derivátů byly vyneseny proti času pro získání kinetických křivek (Graf 1). Výsledné kinetické profily jasně indikují, že PEMPDA-β-CD je stabilnější derivát. Hodnoty poločasů rozpadu, které byly získány proložení bodů monoexponenciální funkcí, jsou 7,9 h pro PEMEDA-β-CD a 20,1 h pro PEMPDA-β-CD.



Graf 1. Kinetiky tepelné degradace PEMEDA- a PEMPDA-β-CD při 50°C stanovené ¹H NMR teplotním experimentem.

Inkluzní vlastnosti PEMPDA-β-CD v roztoku

Byla zkoumána schopnost PEMPDA-β-CD diiodidu tvořit inkluzní komplexy s organickými aromatickými látkami. Hodnoty konstant stability (K_s) PEMPDA-β-CD se sérií tří aromatických hostů (kyselina salicylová – SAL, *p*-methoxyfenol – MEQ, *p*-nitroanilin – NIA) při třech různých hodnotách pH (2,50; 7,00 a 10,00), byly změřeny pomocí izotermální titrační kalorimetrie (ITC) a porovnány s hodnotami naměřenými pro β-CD (Schéma 12, Graf 2 a 3).

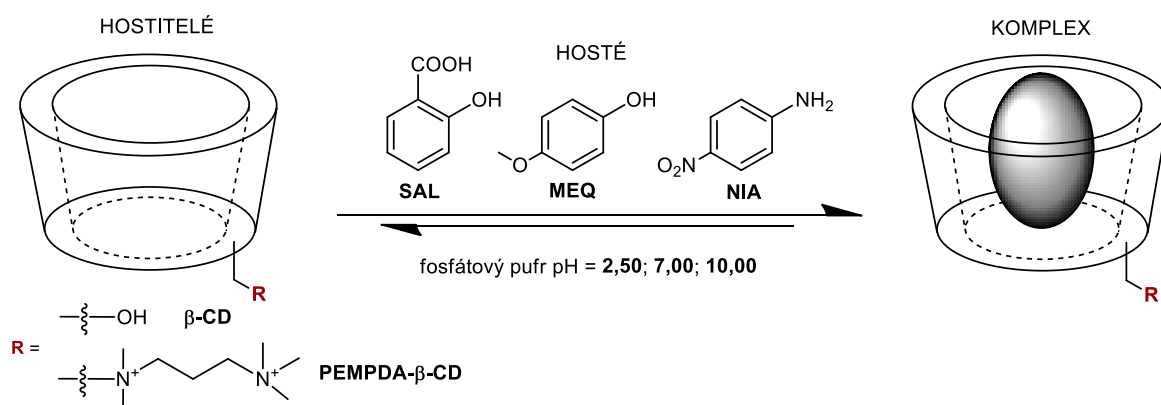
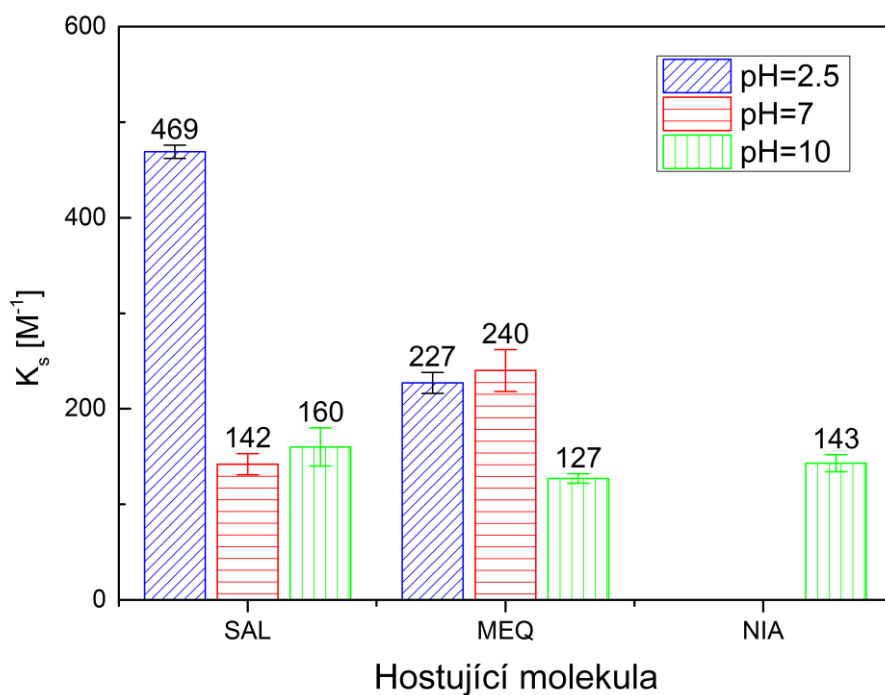
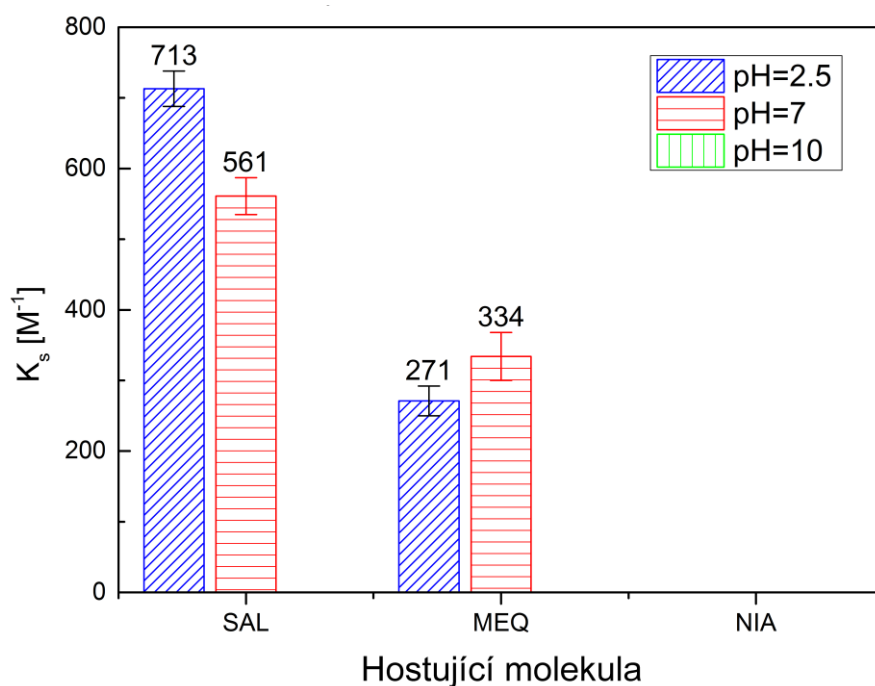


Schéma 12. Hostitelské a hostující molekuly použité pro stanovení K_s při různých hodnotách pH.



Graf 2. Konstanty stability pro β -CD se SAL, MEQ a NIA získané pomocí ITC měření.



Graf 3. Konstanty stability pro PEMPDA- β -CD se SAL, MEQ a NIA získané pomocí ITC měření.

Imobilizace PEMPDA- β -CD na anionickém povrchu pomocí iontové samoskladby

Dalším krokem po ověření, že nabitý derivát PEMPDA- β -CD si zachoval komplexační vlastnosti, bylo dalším úkolem deponovat tohoto makrocyclického hostitele na pevný povrch pomocí iontových interakcí (Schéma 13). Negativně nabitý Nafion[®] 117, což je polymer sulfonovaného tetrafluorethylenu, byl vybrán jako modelový pevný povrch.

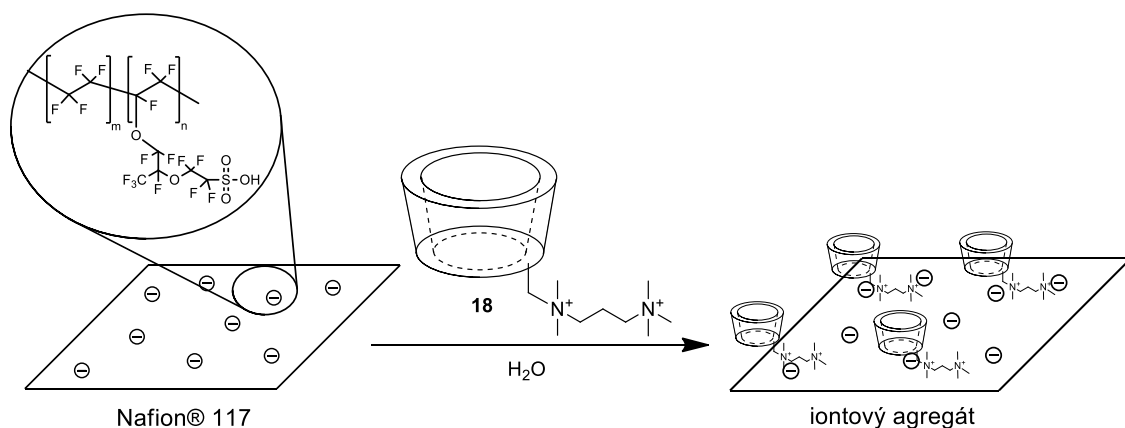
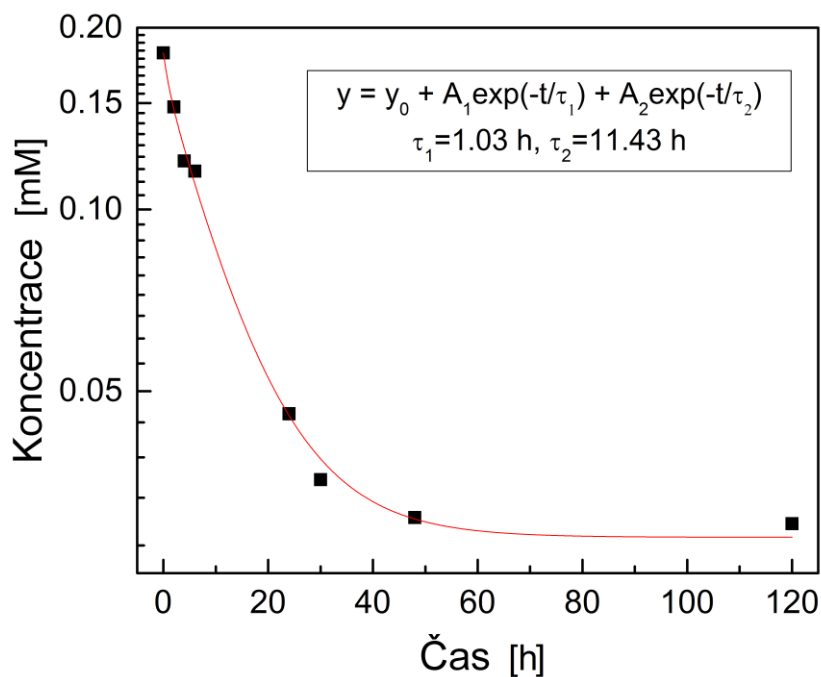


Schéma 13. Depozice PEMPDA-β-CD na pevný povrch (Nafion® 117).

Abychom zjistili množství imobilizovaného PEMPDA-β-CD, a také kinetiku depozice, byl měřen úbytek koncentrace pomocí HPLC detektoru ELSD. Časové konstanty navázání na povrch byly vypočítány pomocí proložení bodů křivkou dvojitě exponenciální funkcí. Byly získány dvě časové konstanty – $\tau_1 = 1,03$ h a $\tau_2 = 11,43$ (Graf 6).



Graf 4. Kinetika depozice PEMPDA-β-CD na Nafion® 117, získané pomocí ELSD detekce klesající koncentrace v roztoku.

Inkluze modelových hostů z roztoku do kavit PEMPDA-β-CD imobilizovaném na pevném povrchu polymeru Nafion®

Byla studována schopnost PEMPDA-β-CD ukotveného na pevné fázi (Nafion® 117) inkudovat ve své kavitě sérii jednoduchých aromatických hostujících molekul (SAL, MEQ a NIA). Výřezy nafionové fólie v NH_4^+ cyklu (100 mm^2 , 35 mg) se známým množstvím deponovaného PEMPDA-β-CD (5 mg) byly míchány ve vodném roztoku hosta po 20 h, pro dosažení rovnováhy inkluze (Schéma 14). Množství inkudovaného hosta bylo kvantifikováno pomocí UV/Vis měřením oplachů fólie methanolem.

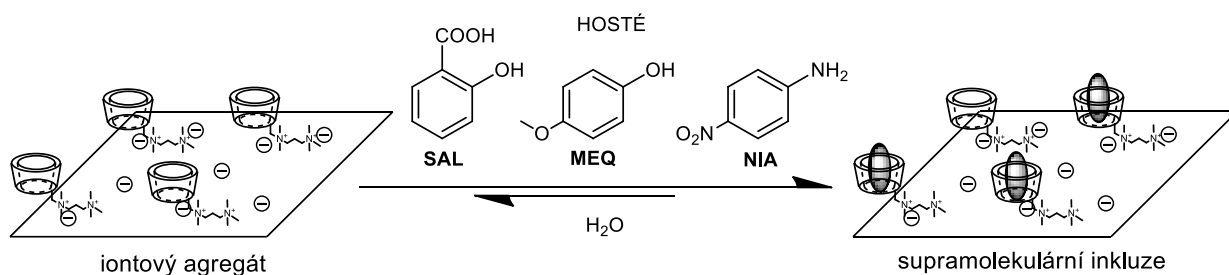


Schéma 14. Inkluze tří modelových hostů do kavit ukotveného PEMPDA-β-CD.

Rozsah inkluze hostů je vyjádřen jako *ROC* (podíl kavit tvořících komplex), který je definován jako molární procento kavit tvořících inkluzní komplex. Nejvyšší *ROC* byl zjištěn pro SAL (34,5 %), což velmi dobře koreluje s naměřenou hodnotou K_s v roztoku (Tabulka 1).

Tabulka 1. Výsledky měření inkluze aromatických hostů do kavit PEMPDA-β-CD deponovaného na povrchu nafionu, při neutrálním pH.

host	c (host) M	n (inklud. host) mol	n (CD na povrchu)	ROC %
SAL	1,40E-02	1,14E-06	3,30E-06	34,5
SAL	1,40E-03	1,05E-07	3,30E-06	3,2
MEQ	1,40E-02	5,76E-07	3,30E-06	17,5
MEQ	1,40E-03	4,55E-08	3,30E-06	1,4
NIA	3,20E-03	3,40E-07	3,30E-06	10,3
NIA	3,20E-04	1,40E-08	3,30E-06	0,4

5. ZÁVĚRY

V syntetické části práce byla úspěšně připravena ucelená série pozitivně nabitých monosubstituovaných derivátů CD. Dříve publikované postupy pro přípravu klíčových výchozích materiálů (6-*O*-tosyl- monosubstitované deriváty α -, β - a γ -CD) byly optimalizovány za účelem dosažení nejvyšších možných výtěžků a čistot. Reakce monotosylátů s terciárními nebo sekundárními aminy, diaminy a triaminy, s následnou kvarternizací pomocí MeI, poskytly příslušně substituované CD deriváty nesoucí substituent s jednou, dvěmi, nebo třemi tetraalkylamoniovými skupinami. Dále byla připravena analoga PEMPDA- β -CD vybavená azidoethanovou funkcí a dvě látky s variabilní délkou linkeru (připojeném pomocí CuAAC reakce). Většina připravených látek byla získána v několikagramovém měřítku pomocí jednoduchých reakčních sekvencí, z běžně dostupných výchozích látek, bez nutnosti chromatografické purifikace. Připravené cílové sloučeniny mohou být použity jako univerzální hostitelé s variabilní velikostí kavity a počtem kationických center, se schopností ukotvení na anionický povrch. Některé z nabitých produktů se také osvědčily jako chirální separátory v kapilární zónové elektroforéze.

Druhá část práce byla zaměřena na stanovení vlastností vybraných sloučenin. Teplotní stabilita dvou nejslibnějších bis(tetraalkylamoniových) CD derivátů PEMEDA- a PEMPDA- β -CD byla studována pomocí ^1H NMR měření za zvýšené teploty. Výsledné kinetické profily teplotního rozkladu odhalily, že analog s delším propylenovým linkerem PEMPDA- β -CD je odolnější vůči rozkladu pomocí Hofmannovy eliminace. Pomocí ITC byla zkoumána schopnost PEMPDA- β -CD tvořit supramolekulární komplexy se třemi modelovými hosty (kyselina salicylová – SAL, *p*-methoxyfenol – MEQ, *p*-nitroaniline – NIA), při třech hodnotách pH (2,50; 7,00; a 10,00). Bylo zjištěno, že PEMPDA- β -CD je schopný inkludovat SAL a MEQ při kyselém a neutrálním pH. Hodnoty vypočtených konstant stability dokazují vznik komplexů se srovnatelnou stabilitou, jako vykazuje přírodní β -CD. Byla vyvinuta metoda pro imobilizaci PEMPDA- β -CD na pevném anionickém povrchu (Nafion[®] 117), společně se stanovením rozsahu a kinetiky navázání pomocí ELSD. Dále byla zkoumána schopnost PEMPDA- β -CD, deponovaného na pevném povrchu, inkludovat tři modelové hosty. Byla vyvinuta metoda pro jednoduché stanovení rozsahu inkluze pomocí UV/Vis spektrometrického měření MeOH oplachů. Nejlepších výsledků bylo dosaženo pro SAL, kdy se 34,5 % dostupných kavít na povrchu nacházelo ve formě inkluzního komplexu. Množství inkludovaných hostů dobře koreluje s hodnotami naměřených konstant stability, s totožnými hosty, v roztoku. Předkládané závěry jsou slibné pro plánované využití supramolekulárních iontových agregátů, složených z pozitivně nabitých derivátů CD deponovaných na pevném povrchu, jako nosiče léčiv s kontrolovaným uvolňováním vhodných bioaktivních látek.

6. POUŽITÁ LITERATURA

- (1) Villiers, A. *Compt. Rend.* **1891**, 112, 536–538.
- (2) Szejtli, J. *Chem. Rev.* **1998**, 98 (5), 1743–1754.
- (3) Crini, G. *Chem. Rev.* **2014**, 114 (21), 10940–10975.
- (4) Schardinger, F. *Wien. Klin. Wochenschr.* **1904**, 17, 207.
- (5) Freudenberg, K.; Blomquist, G.; Ewald, L.; Stoff, K. *Ber. Dtsch. Chem. Ges.* **1936**, 69, 1258.
- (6) Xiao, P.; Dudal, Y.; Corvini, P. F.-X.; Pieleš, U.; Shahgaldian, P. *Polym. Chem.* **2011**, 2 (6), 1264–1266.
- (7) Loftsson, T.; Brewster, M. E. *J. Pharm. Pharmacol.* **2010**, 62 (11), 1607–1621.
- (8) Astray, G.; Gonzalez-Barreiro, C.; Mejuto, J. C.; Rial-Otero, R.; Simal-Gándara, J. *Food Hydrocoll.* **2009**, 23 (7), 1631–1640.
- (9) H.-J. Buschmann; Schollmeyer, E. *J. Cosm. Sci.* **2002**, 53 (3), 185–191.
- (10) Schneiderman, E.; Stalcup, A. M. *J. Chromatogr. B. Biomed. Sci. App.* **2000**, 745 (1), 83–102.
- (11) Del Valle, E. M. M. *Process Biochem.* **2004**, 39 (9), 1033–1046.
- (12) Rodriguez-Tenreiro, C.; Alvarez-Lorenzo, C.; Rodriguez-Perez, A.; Concheiro, A.; Torres-Labandeira, J. J. *Pharm. Res.* **2006**, 23 (1), 121–130.
- (13) van de Manacker, F.; Vermonden, T.; van Nostrum, C. F.; Hennink, W. E. *Biomacromolecules* **2009**, 10 (12), 3157–3175.
- (14) Chen, Y.; Liu, Y. *Chem. Soc. Rev.* **2010**, 39 (2), 495–505.
- (15) Matsuda, H.; Arima, H. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **1999**, 36 (1), 81–99.
- (16) Langer, R.; Tirrell, D. A. *Nature* **2004**, 428 (6982), 487–492.
- (17) Zhong, N.; Byun, H.-S.; Bittman, R. *Tetrahedron Lett.* **1998**, 39 (19), 2919–2920.
- (18) Tang, W.; Ng, S.-C. *Nat. Protoc.* **2008**, 3 (4), 691–697.
- (19) De Costa, B. R.; Radesca, L.; Di Paolo, L.; Bowen, W. D. *J. Med. Chem.* **1992**, 35 (1), 38–47.
- (20) Kolb, H. C.; Finn, M. G.; Sharpless, K. B. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2001**, 40 (11), 2004–2021.
- (21) Bonnet, V.; Duval, R.; Tran, V.; Rabiller, C. *Eur. J. Org. Chem.* **2003**, 2003 (24), 4810–4818.
- (22) Kučerová, G.; Kalíková, K.; Procházková, H.; Popr, M.; Jindřich, J.; Coufal, P.; Tesařová, E. *Chromatographia* **2016**, 79 (9–10), 529–536.
- (23) Havlikova, M.; Bosakova, Z.; Benkovics, G.; Jindrich, J.; Popr, M.; Coufal, P. *Chem. Pap.* **2016**, 70 (9), 1144–1154.

Curriculum vitae

Jméno **POPR MARTIN**
Adresa **NOVÁ PASÍŘSKÁ 3, 46601, JABLONEC NAD NISOU, ČESKÁ REPUBLIKA**
Telefon **+420723857669**
E-mail **popr@natur.cuni.cz**
Národnost česká
Datum narození 12.5.1985

VZDĚLÁNÍ

- Období (od – do) 2005 - 2010
• Název a typ organizace poskytující vzdělání či kurzy Univerzita Karlova v Praze, Přírodovědecká fakulta
• Získaný titul Bakalářský a Magisterský studijní program Klinická a toxikologická analýza Bc., Mgr.
- Období (od – do) 2010 - současnost
• Název a typ organizace poskytující vzdělání či kurzy Univerzita Karlova v Praze, Přírodovědecká fakulta, Katedra organické chemie
Doktorský studijní program Organická chemie

PRACOVNÍ ZKUŠENOSTI

- Období (od – do) 2014 - současnost
• Jméno a adresa instituce CZ-OPENSREEN, Ústav molekulární genetiky, v.v.i.
• Hlavní pracovní náplň Compound management
• Dosažená pozice Head of Compound management
• Hlavní pracovní náplň a odpovědnost Správa knihoven sloučenin pro High throughput screening, ovládání laboratorní automatizace

MATEŘSKÝ JAZYK **ČESKÝ JAZYK**

OSTATNÍ JAZYKY

- Čtení **ANGLICKÝ JAZYK**
výborně
- Psaní dobře
- Mluvený projev výborně
TOEFL – úroveň C1

- Čtení **NĚMECKÝ JAZYK**
dobře
- Psaní základy
- Mluvený projev základy

TECHNICKÉ SCHOPNOSTI A DOVEDNOSTI Ovládání PC na uživatelské úrovni.
Programy: MS Office, Origin, ChemDraw, Mestrelab Mnova, Photoshop CS2, aj.

ŘIDIČSKÉ PRŮKAZY Skupina A1, B, C

List of publications / Seznam publikací

- Popr, M.; Hybelbauerová, S.; Jindřich, J.: Synthesis of 3¹-O and 2¹-O-monosubstituted derivatives of per-6-azido-β-cyclodextrin—potential molecular scaffolds *Carbohydrate Research* **2012**, *361*, 148–154.
Journal impact factor (2015): 1.82.
- 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 Journal of Organic Chemistry* **2014**, *10*, 1390–1396.
Journal impact factor (2015): 2.70.
- Popr, M.; Filippov, K. S.; Matushkin, N.; Dian, J.; Jindřich, J.: Properties of cationic monosubstituted tetraalkylammonium cyclodextrin derivatives – their stability, complexation ability in solution or when deposited on solid anionic surface *Beilstein Journal of Organic Chemistry* **2015**, *11*, 192–199.
Journal impact factor (2015): 2.70.
- Kalíková, K.; Kučerová, G.; Procházková, H.; Popr, M.; Jindřich, J.; Coufal, P.; Tesařová, T.: Chromatographic Characterization of a New Cationic β-CD Based Stationary Phase Prepared by Dynamic Coating *Chromatographia* **2016**, *79* (9–10), 529–536.
Journal impact factor (2015): 1.33.
- Havlíková, M.; Bosáková, Z.; Benkovics, G.; Jindřich, J.; Popr, M.; Coufal, P.: Use of 6-O-monosubstituted derivatives of β-cyclodextrin-bearing substituent with two permanent positive charges in capillary electrophoresis *Chemical Papers* **2016**, *70* (9), 1144–1154.
Journal impact factor (2015): 1.33.