

## Disertační práce

# Cyklodextrinové polymery pro dopravu léčiv

*Studijní program:*

P3942 Nanotechnologie

*Studijní obor:*

3942V001 Nanotechnologie

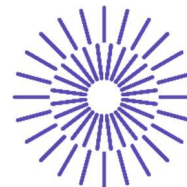
*Autor práce:*

**Ing. Ilona Krabicová**

*Vedoucí práce:*

doc. RNDr. Michal Řezanka, Ph.D.

Liberec 2023



## Doctoral thesis

# Cyclodextrin polymers for drug delivery

*Study program:*

P3942 Nanotechnology

*Field of study:*

3942V001 Nanotechnology

*Author:*

**Ing. Ilona Krabicová**

*Supervisor:*

doc. RNDr. Michal Řezanka, Ph.D.

Liberec 2023

## Prohlášení

Prohlašuji, že svou disertační práci jsem vypracovala samostatně jako původní dílo s použitím uvedené literatury a na základě konzultací s vedoucím mé disertační práce.

Jsem si vědoma toho, že na mou disertační práci se plně vztahuje zákon č. 121/2000 Sb., o právu autorském, zejména § 60 – školní dílo.

Beru na vědomí, že Technická univerzita v Liberci nezasahuje do mých autorských práv užitím mé disertační práce pro vnitřní potřebu Technické univerzity v Liberci.

Užiji-li disertační práci nebo poskytnu-li licenci k jejímu využití, jsem si vědoma povinnosti informovat o této skutečnosti Technickou univerzitu v Liberci; v tomto případě má Technická univerzita v Liberci právo ode mne požadovat úhradu nákladů, které vynaložila na vytvoření díla, až do jejich skutečné výše.

Současně čestně prohlašuji, že text elektronické podoby práce vložený do IS STAG se shoduje s textem tištěné podoby práce.

Beru na vědomí, že má disertační práce bude zveřejněna Technickou univerzitou v Liberci v souladu s § 47b zákona č. 111/1998 Sb., o vysokých školách a o změně a doplnění dalších zákonů (zákon o vysokých školách), ve znění pozdějších předpisů.

Jsem si vědoma následků, které podle zákona o vysokých školách mohou vyplývat z porušení tohoto prohlášení.

15.12.2023

Ilona Krabicová

## Poděkování

V první řadě bych ráda poděkovala vedoucímu práce, doc. RNDr. Michalu Řezankovi, Ph.D. za zasvěcení do světa cyklodextrinů a cenné rady. Dále bych ráda poděkovala doc. Ing. Bohumilu Dolenskému, Ph.D. a Christopheru Hobbsovi za NMR analýzy, všem kolegům za skvělé pracovní prostředí a také rodině a přátelům za podporu na mé cestě za doktorátem.

Na závěr bych ráda poděkovala prof. Francescu Trottovi a všem kolegům z Turínské univerzity, že mě přijali do „nanohoubařské rodiny“ s otevřenou náručí a ukázali mi, že není třeba se bát vydat se do světa.



Desidero inoltre ringraziare il Prof. Francesco Trotta e tutti i colleghi dell'Università di Torino per avermi accolta nella “famiglia delle nanopugne” e avermi dimostrato che non bisogna avere paura di andare all'estero.



Autorka děkuje za servisní služby poskytnuté velkou výzkumnou infrastrukturou NanoEnviCz (Projekt č. LM2023066) podporovanou MŠMT ČR.

## Anotace

Práce se zabývá syntézou prekurzorů pro přípravu cyklodextrinových polymerů s aplikovatelností v oblasti dopravy léčiv. Jednotlivé kapitoly jsou dále zaměřeny na syntézu derivátů vhodných k přípravě lineárních cyklodextrinových polymerů a také k přípravě náhodně zesíťovaných struktur (cyklodextrinových nanohub). Na základě porovnání náročnosti syntézy prekurzorů byly zesíťované polymery vyhodnoceny jako snáze uplatnitelné v praxi a byly syntetizovány dva druhy modifikovaných nanohub. Cholesterolem funkcionalizované nanohouby byly navrženy pro zvýšení biologické dostupnosti resveratrolu a zvýšení efektivity léčby rakoviny. Manosou funkcionalizované nanohouby byly připraveny za účelem vyvinout nosič pro cílenou dopravu léčiv do buněk se specifickými receptory. Účinnost modifikace nanohub byla ověřena v experimentech *in vitro*.

## Klíčová slova

Cyklodextrin; polymer; lineární polymer; cyklodextrinové nanohouby; funkcionalizace; doprava léčiv

## **Annotation**

The work aims on the synthesis of precursors for the preparation of cyclodextrin polymers with applicability in the field of drug delivery. Individual chapters are further focused on the synthesis of derivatives suitable for the preparation of linear cyclodextrin polymers and also for the preparation of randomly cross-linked structures (cyclodextrin nanosponges). Based on the comparison of the complexity of the precursors synthesis, the cross-linked polymers were evaluated as more applicable in practice, and two types of modified nanosponges were synthesized. Cholesterol-functionalized nanosponges were designed to increase the bioavailability of resveratrol and extend the effectiveness of cancer treatment. Mannose-functionalized nanosponges were prepared in order to develop a carrier for the targeted delivery of drugs to cells with specific receptors. The efficacy of the nanosponge modification was studied in experiments *in vitro*.

## **Key words**

Cyclodextrin; polymer; linear polymer; cyclodextrin nanosponge; functionalization; drug delivery

# Obsah

Seznam zkratk a symbolů .....	9
Úvod.....	12
<b>1 Teoretická část .....</b>	<b>13</b>
1.1 Cyklodextriny .....	13
1.2 Cyklodextrinové polymery .....	14
1.3 Lineární cyklodextrinové polymery .....	15
1.3.1 Polymery s CD součástí hlavního řetězce .....	15
1.4 Síťované CD polymery.....	18
1.5 Cyklodextrinové nanohouby .....	20
1.5.1 Funkcionalizace nanohub.....	21
1.6 Použití cyklodextrinových polymerů v medicíně .....	22
1.7 Nosiče léčiv funkcionalizované cholesterolem.....	26
1.8 Nosiče léčiv funkcionalizované manosou.....	28
<b>2 Cíle disertační práce .....</b>	<b>34</b>
<b>3 Experimentální část.....</b>	<b>35</b>
3.1 Materiály pro syntézu.....	35
3.2 Materiály pro biologické experimenty.....	35
3.3 Analytické metody .....	36
3.3.1 Hmotnostní spektrometrie (MS).....	36
3.3.2 Infračervená spektroskopie (FTIR) .....	36
3.3.3 Nukleární magnetická rezonance (NMR) .....	36
3.3.4 Stanovení obsahu mědi pomocí hmotnostní spektrometrie s indukčně vázaným plazmatem (ICP-MS).....	37
3.3.5 Měření velikosti částic (Dynamický rozptyl světla, DLS) .....	37
3.4 In-vitro experimenty .....	37
3.4.1 Kultivace buněčných kultur.....	37
3.4.2 Příprava suspenzí s obsahem resveratrolu .....	38
3.4.3 MTT test buněčné viability.....	38
3.4.4 Internalizace materiálu do buněk .....	38
3.5 Příprava prekurzorů pro lineární cyklodextrinové polymery.....	39
3.5.1 Syntéza přemostěných cyklodextrinových prekurzorů.....	39
3.5.2 Syntéza cyklodextrinových prekurzorů – chránění benzylovými skupinami.....	40
3.5.3 Syntéza oligoethylenových linkerů .....	41
3.6 Syntéza cholesterolem funkcionalizovaných cyklodextrinových nanohub.....	43
3.6.1 Syntéza cholesterolem funkcionalizovaného cyklodextrinu .....	43
3.6.2 Postup přípravy CDI nanohub funkcionalizovaných cholesterolem.....	43

3.6.3	Příprava suspenzí cholesterolem modifikovaných nanohub .....	45
3.6.4	Fluorescenční značení pro experimenty <i>in vitro</i> .....	45
3.7	<i>Syntéza manosou funkcionalizovaných CD nanohub</i> .....	46
3.7.1	Syntéza cyclodextrinových prekurzorů.....	46
3.7.2	Přímá syntéza propargylované manosy .....	47
3.7.3	Tříkroková syntéza propargylované manosy .....	48
3.7.4	Postup přípravy CDI nanohub funkcionalizovaných manosou.....	50
3.7.5	Příprava suspenzí manosou modifikovaných nanohub.....	53
<b>4</b>	<b>Výsledky a diskuse .....</b>	<b>54</b>
4.1	<i>Lineární cyclodextrinové polymery</i> .....	54
4.2	<i>Cyclodextrinové nanohouby funkcionalizované cholesterolem</i> .....	58
4.2.1	Syntéza modifikovaných cholesterolových nanohub.....	58
4.2.2	<i>In vitro</i> experimenty.....	61
4.3	<i>Cyclodextrinové nanohouby funkcionalizované manosou</i> .....	65
4.3.1	Syntéza propargyl- $\alpha$ -D-mannopyranosidu .....	65
4.3.2	Syntéza manosou funkcionalizovaných nanohub .....	69
<b>5</b>	<b>Závěr .....</b>	<b>77</b>
<b>6</b>	<b>Seznam vlastních publikací.....</b>	<b>79</b>
<b>7</b>	<b>Příspěvky na konferenci .....</b>	<b>80</b>
<b>8</b>	<b>Použitá literatura .....</b>	<b>81</b>
	<b>Přílohy.....</b>	<b>96</b>
A.	<i>Analýza manosových derivátů pomocí NMR</i> .....	96
B.	<i>Vyhodnocení in vitro experimentů s Chol-<math>\beta</math>-CD</i> .....	108



## Seznam zkratek a symbolů

Ac	acetyl
Ar	argon
Bn	benzyl
CD	cyklodextrin
CDI	1,1'-karbonyldiimidazol
DIBAL-H	diisobutylaluminium hydrid
DMAP	4-dimethylaminopyridin
DMF	<i>N,N</i> -dimethylformamid
DMSO	dimethylsulfoxid
DNA	deoxyribonukleová kyselina
EDC	ethyl(dimethylaminopropyl)karbodiimid
EDTA	kyselina ethylendiamintetraoctová
Et	ethyl
FBS	fetal bovine serum (fetální bovinní sérum)
FTIR	infračervená spektroskopie s Fourierovou transformací
HIV	human immunodeficiency virus (virus lidské imunitní nedostatečnosti)
HMDI	hexamethylendiisokyanát
HPLC	high performance liquid chromatography (vysokoúčinná kapalinová chromatografie)
HRMS	high-resolution mass spectrometry (hmotnostní spektrometrie s vysokým rozlišením)
Chol	cholesterol

ICP-MS	inductively coupled plasma mass spectrometry (hmotnostní spektrometrie s indukčně vázaným plazmatem)
Man	manosa
MCF-7	buněčná linie karcinomu prsu
Me	methyl
MOF	metal-organic framework (organokovová síť)
MS	mass spectrometry (hmotnostní spektrometrie)
MTT	3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5-difenyltetrazolium bromid
NMR	nuclear magnetic resonance (nukleární magnetická rezonance)
NS	nanosponge (nanohouba)
PBS	phosphate buffered saline (fosfátový pufr)
PEG	polyethylenglykol
Ph	fenyl
PMDA	dianhydrid pyromelitové kyseliny
PVA	polyvinylalkohol
RNA	ribonukleová kyselina
RSV	resveratrol
RT	room temperature (pokojová/laboratorní teplota)
SEM	scanning electron microscopy (skenovací elektronová mikroskopie)
SR-FTIR	synchrotron radiation Fourier transform infrared spectroscopy (synchrotronová radiační infračervená spektroskopie s Fourierovou transformací)
TAM	tumor associated macrophage (makrofág asociovaný s nádory)
TEA	triethylamin

THF	tetrahydrofuran
TLC	thin layer chromatography (chromatografie na tenké vrstvě)
Ts	tosyl

## Úvod

Cyklodextriny jsou cyklické oligosacharidy ve tvaru dutého komolého kužele. Díky tomu cyklodextriny vynikají svou schopností tvořit inkluzní komplexy s hydrofobními molekulami, čímž mohou pozměnit vlastnosti hostující molekuly, např. její rozpustnost a odolnost vůči degradaci. S cyklodextriny se můžeme setkat mj. v potravinářství, kosmetice, medicíně nebo chemii. Možnosti jejich aplikací lze ještě rozšířit použitím cyklodextrinů ve větších celcích, např. v polymerních strukturách. Můžeme tak dosáhnout nových vlastností, snazší manipulace s materiálem i zlepšení inkluzní kapacity. Vlastnosti polymerů lze modifikovat volbou spojek (resp. síťovadla), stupněm zesíťování nebo funkcionalizací cyklodextrinových jednotek.

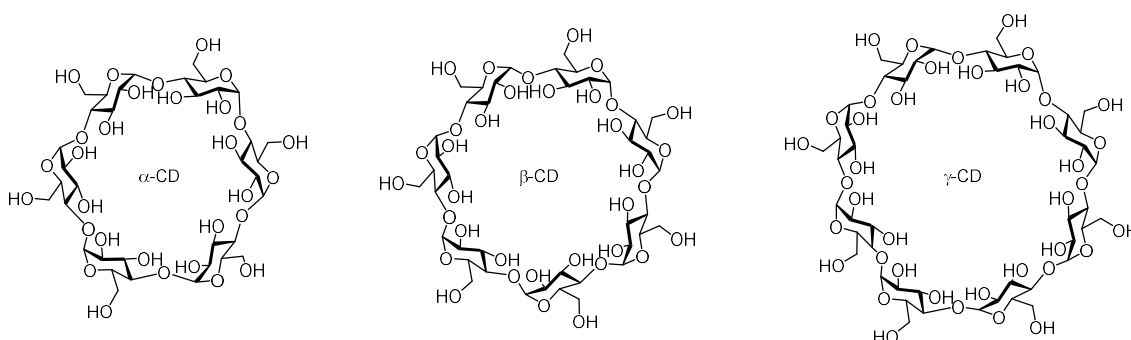
Cyklodextrinové polymery mohou být lineární nebo zesíťované, s cyklodextriny navázanými na řetězec v podobě „přívěsku“ nebo součástí polymerního řetězce. Mezi typy nejméně diskutované v literatuře patří lineární polymery s cyklodextriny součástí polymerního řetězce. Mnohem intenzivněji studované jsou zesíťované nerozpustné cyklodextrinové polymery označované též jako cyklodextrinové nanohouby. Ty v posledních dvou dekáдах prokázaly svou aplikovatelnost v mnoha oborech vč. potravinářství, životního prostředí, zemědělství, ale především farmacie a dopravy léčiv. Enkapsulací aktivní látky do vhodného nosiče je možné dosáhnout mj. její vyšší stability, rozpustnosti a biologické aktivity. Navíc je tak možné dosáhnout cílené léčby, nižšího dávkování, eliminace nežádoucích účinků na zbytek organismu, postupného uvolňování aktivní látky z nosiče a pomalejšího odbourávání z organismu. Díky snadné modifikovatelnosti struktury nanohub v poslední době nabývají na atraktivitě jejich funkcionalizované varianty s vlastnostmi přizpůsobenými konkrétní aplikaci, např. cílení do specifických buněčných receptorů nebo snazšího prostupu přes membrány a bariéry.

Tato práce se zabývá přípravou nových cyklodextrinových polymerů a jejich prekurzorů. Syntetizované polymery by v budoucnu měly najít uplatnění v dopravě léčiv při terapii závažných a těžko léčitelných onemocnění.

# 1 Teoretická část

## 1.1 Cyklodextriny

Cyklodextriny (CD) jsou oligosacharidy přírodního původu, které vznikají enzymatickou metabolizací škrobu.<sup>1</sup> Cyklodextriny se mezi sebou liší počtem glukopyranosových jednotek, ze kterých jsou složeny. Nejdostupnější a zároveň nejčastěji využívané jsou CD složené ze 6, 7 a 8 jednotek, které se označují jako  $\alpha$ -,  $\beta$ -, respektive  $\gamma$ -CD (obrázek 1). Struktura CD připomíná dutý komolý kužel s hydrofilním povrchem a hydrofobní vnitřní kavitou, do které jsou CD schopny nekovalentně zachytávat jiné molekuly<sup>2</sup> nebo ionty.<sup>3</sup>



**Obrázek 1:** Struktura cyklodextrinů  $\alpha$ ,  $\beta$  a  $\gamma$ .

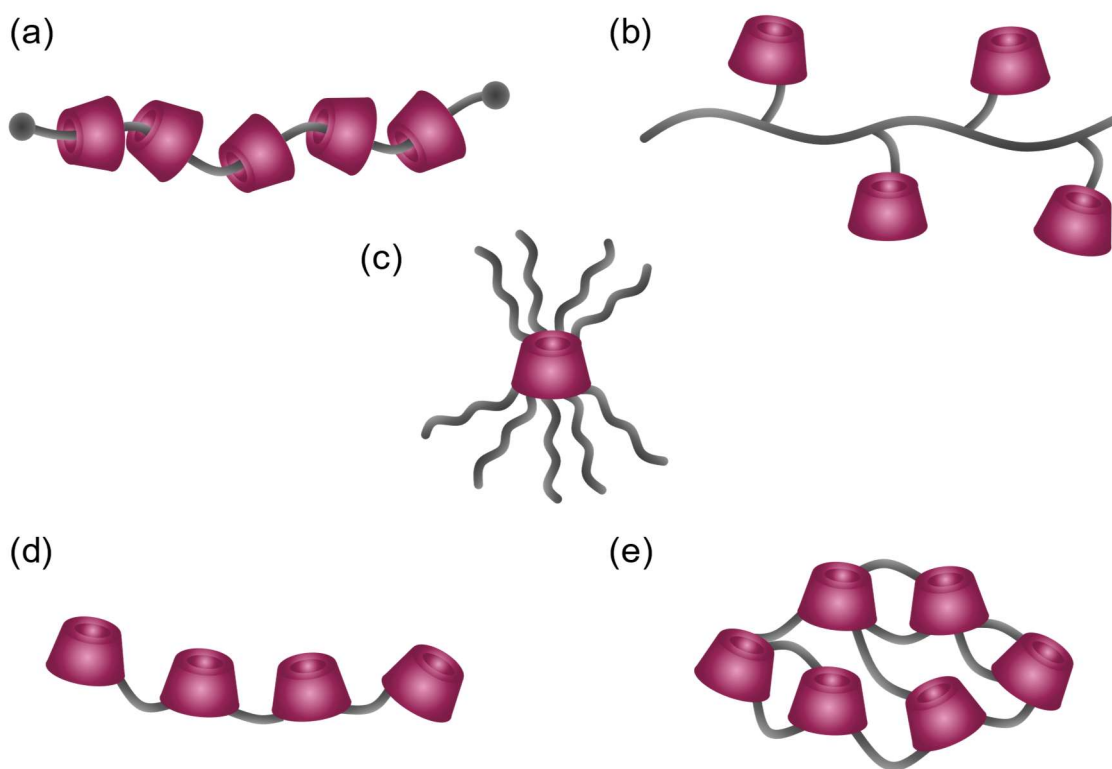
Enkapsulací látek do kavity cyklodextrinu lze změnit jejich fyzikálně-chemické vlastnosti, především rozpustnost, biologické interakce<sup>2</sup> (např. schopnost projít přes biologické bariéry) či ochránit citlivé molekuly před degradací<sup>4</sup>. Zároveň lze CD použít pro separaci nežádoucích látek z prostředí. Díky těmto vlastnostem našly CD uplatnění v mnoha oborech, především v potravinářství<sup>5</sup>, farmacii<sup>6</sup>, chemii<sup>7</sup>, kosmetice<sup>8</sup>, medicíně<sup>9</sup> a environmentálních aplikacích<sup>10</sup>.

Díky velkému počtu hydroxylových skupin ve struktuře lze CD snadno funkcionalizovat vhodnými skupinami. Tím je možné modifikovat fyzikální a chemické vlastnosti CD, vytvářet deriváty se speciálními vlastnostmi (např. fluorescence<sup>11</sup>, cílení na specifické biologické receptory<sup>12</sup>), tvořit prekurzory pro struktury vzniklé samoskladbou (např. amfifilní CD<sup>13</sup>), lipozomy, nanočástice, hydrogely<sup>14</sup> a polymerní struktury<sup>15</sup> (hvězdicovité, síťované, lineární, aj.).

## 1.2 Cyklodextrinové polymery

Cyklodextrinové polymery uváděné v literatuře můžeme dělit do skupin několika způsoby. Kromě dělení těchto polymerů na rozpustné a nerozpustné, můžeme je rozdělit také podle struktury (obrázek 2). Cyklodextrinové polymery mohou být lineární<sup>16</sup>, zesíťované<sup>17–19</sup> nebo připravené pomocí samoskladby<sup>20</sup>. Zpravidla nacházejí uplatnění ve formě roztoků<sup>21,22</sup>, hydrogelů<sup>23,24</sup> nebo částic<sup>25–27</sup>.

Cyklodextrinové polymery se také mohou lišit způsobem připojení CD. Ty mohou být vázány nekovalentně na polymerní řetězec (např. polyrotaxany)<sup>28</sup>, kovalentně jako „přívěsek“ na polymerním řetězci<sup>19</sup> nebo mohou být přímo součástí řetězce (např. CD nanohouby, některé lineární polymery)<sup>16,29,30</sup>.



**Obrázek 2:** Typy cyklodextrinových polymerů: polyrotaxany (a), CD připojené k polymernímu řetězci (b), hvězdicové polymery s CD jádrem (c), lineární polymery s CD součástí řetězce (d), zesíťované CD polymery (e).

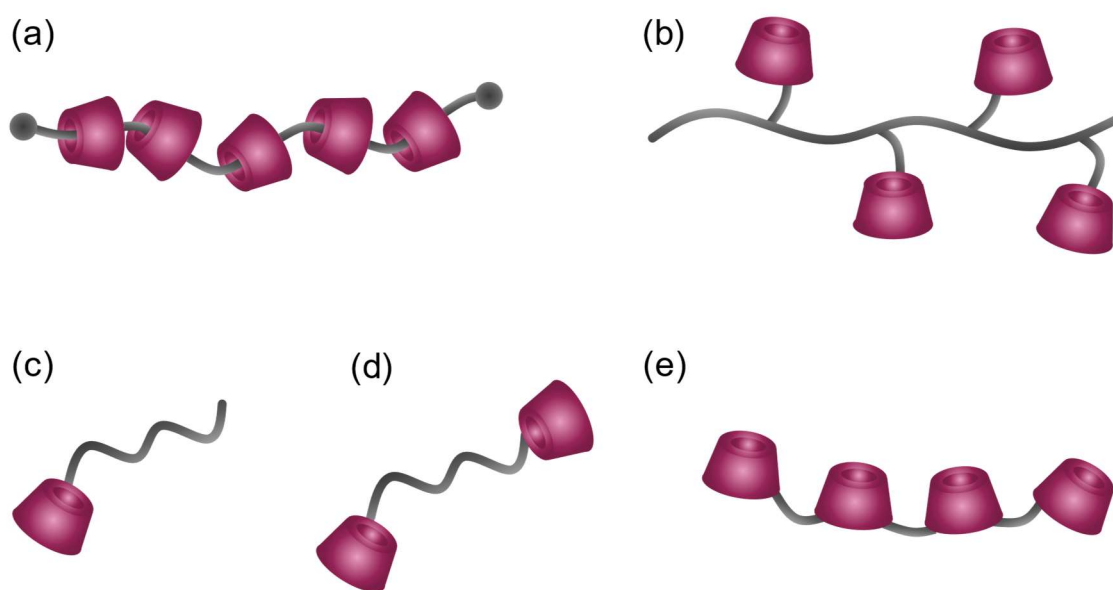
CD polymery nacházejí uplatnění v aplikacích, kde samotné CD nevyhovují, např. v důsledku rozpustnosti, obtížné manipulace, neschopnosti inkorporace specifických molekul, apod. Zakomponování CD do většího celku může usnadnit manipulaci s výsledným materiálem (např. při separaci nežádoucích látek z prostředí) a využít synergického efektu kombinace cyklodextrinu a polymerního

materiálu.<sup>31</sup> Například mohou být do struktury díky síťování vhodným síťovadlem inkorporovány i hydrofilní molekuly, které nemají afinitu ke kavitě CD.<sup>32</sup>

Jelikož je téma cyklodextrinových polymerů poměrně široké, tato práce se bude nadále blíže věnovat polymerům s kovalentně vázanými cyklodextriny a především typům, s nimiž se pracuje v experimentální části této práce.

### 1.3 Lineární cyklodextrinové polymery

Lineárních cyklodextrinových polymerů je několik variant, jež se liší především způsobem, jakým jsou cyklodextriny zakomponovány do řetězce (obrázek 3). Mohou totiž tvořit jakýsi přívěsek k lineárnímu řetězci, můžeme je navléknout na polymerní řetězec (polyrotaxany), nebo je lze použít jako monomer přímo do struktury hlavního řetězce.<sup>15,33</sup>



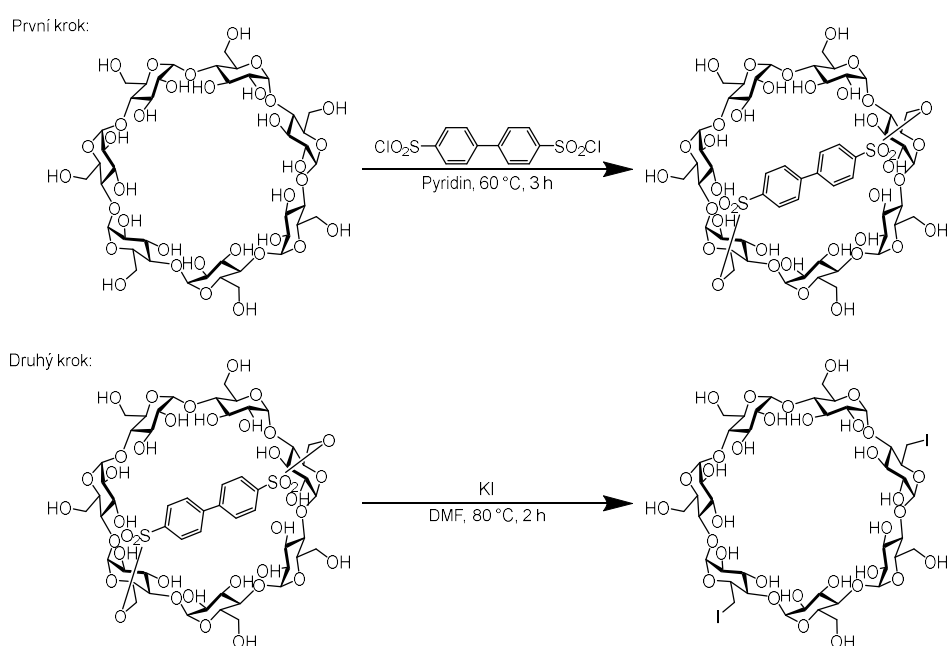
**Obrázek 3:** Různé typy lineárních CD polymerů podle způsobu připojení CD – polyrotaxany (a), CD připojené k hlavnímu řetězci (b), polymery zakončené CD (c) a (d), CD jako jeden z monomerů součástí hlavního řetězce (e).

#### 1.3.1 Polymery s CD součástí hlavního řetězce

Lineární polymery s cyklodextriny součástí polymerního řetězce jsou jedny z nejméně zastoupených CD polymerů v dostupné literatuře. Základním

problémem je vytvoření (selektivně) disubstituovaného cyklodextrinového derivátu, který by bylo možné využít jako monomerní jednotku lineárního polymeru.

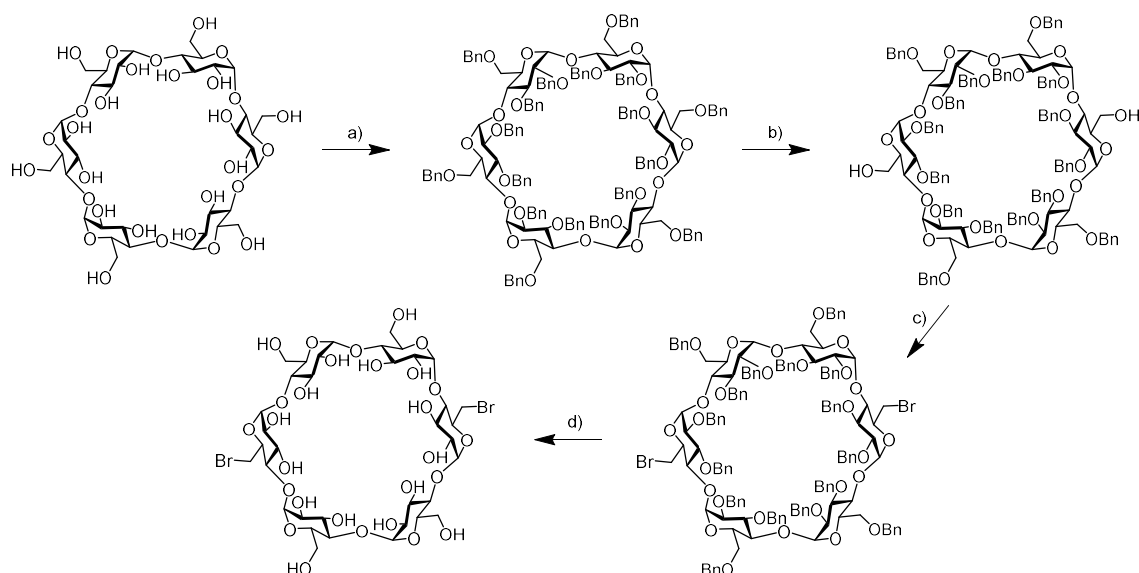
Jednou z variant je takzvané přemostění cyklodextrinu<sup>16,34–36</sup> – modifikace difunkční molekulou, která se díky své struktuře naváže na specifické hydroxylové skupiny na cyklodextrinu a v dalších syntetických krocích funguje jako snadno odstupující skupina (viz schéma 1). Disubstituovaný derivát cyklodextrinu poté může reagovat s další vhodnou difunkční molekulou za vzniku kopolymeru s uspořádáním ABAB. Takto připravené cyklodextrinové polymery byly testovány jako nosiče makromolekulárních látek<sup>34</sup> a léčiv proti rakovině<sup>36</sup>.



**Schéma 1:** Syntéza selektivně substituovaného cyklodextrinu pomocí přemostění.<sup>34</sup>

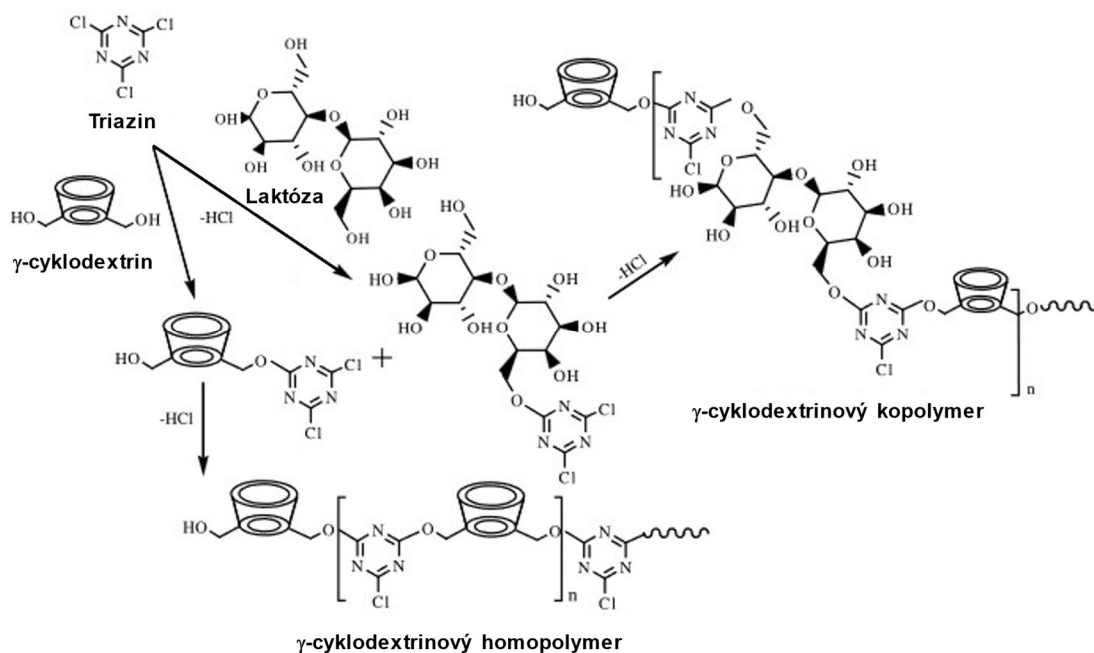
Jinou variantu syntézy selektivně disubstituovaného CD nabídl Kumprecht a kol.<sup>37</sup> navazující na dříve publikované práce Lecourt a kol.<sup>38</sup> a Pearce a Sinaj<sup>39</sup>. Metoda spočívala v navázání vhodných chránících skupin na všechny hydroxylové skupiny CD. Následně se selektivně odstranily dvě chránící skupiny na specifických místech, uvolněné hydroxylové skupiny byly nahrazeny halogenem, a nakonec byl odstraněn i zbytek chránících skupin. Výsledkem byl selektivně disubstituovaný cyklodextrin připravený k navázání vhodných funkčních skupin, podobně jako v postupu s přemostěnými CD. Nevýhodou tohoto postupu v porovnání s přemostěním je mnohem více reakčních kroků (schéma 2).





**Schéma 2:** Syntéza selektivně substituovaného cyklodextrinu pomocí chránících skupin<sup>37,38</sup>: a) benzylchlorid, NaH, DMSO, Ar, 21 °C, 18 h; b) DIBAL-H, 50 °C, 20 min, 87 %; c) CBr<sub>4</sub>, Ph<sub>3</sub>P, DMF, 60°C, 95 %; d) H<sub>2</sub>, Pd/C, DMF-EtOH, 40 bar, 21 °C, 92%.

Další publikovanou variantou přípravy lineárního CD kopolymeru je „one-pot“ syntéza spojující disacharid (maltosu, či laktosu) a cyklodextrin do polymerního řetězce pomocí trichlortriazinu (viz schéma 3).<sup>40,41</sup> Autoři se zabývají způsobem, jak předejít síťování polymeru<sup>37</sup>, nediskutují ale reprodukovatelnost takové struktury. Jak zajistit, že se jednotky disacharidu a cyklodextrinu uspořádají pokaždé ve stejném pořadí, že budou zastoupeny v řetězci ve stejném poměru apod. Nabízí se otázka, jak velký vliv bude toto mít na vlastnosti výsledného polymeru. Nicméně i tento způsob polymerizace cyklodextrinu přinesl výhody, dle autorů jde totiž o snazší a lépe kontrolovatelnou syntézu v porovnání s polymerizací epichlorhydrinem.<sup>40,41</sup>



**Schéma 3:** Příprava lineárních cyklodextrinových (ko)polymerů “one-pot” syntézou.<sup>41</sup>

Zvláštním případem lineárního polymeru je tubulární polymer, jenž připravil Harada a kol.<sup>42</sup> propojením cyklodextrinů navlečených na lineární řetězec polyethylenglykolu (PEG). PEG, který sloužil jako pomocná struktura byl nakonec odstraněn a zůstal tubulární CD polymer.

### 1.4 Síťované CD polymery

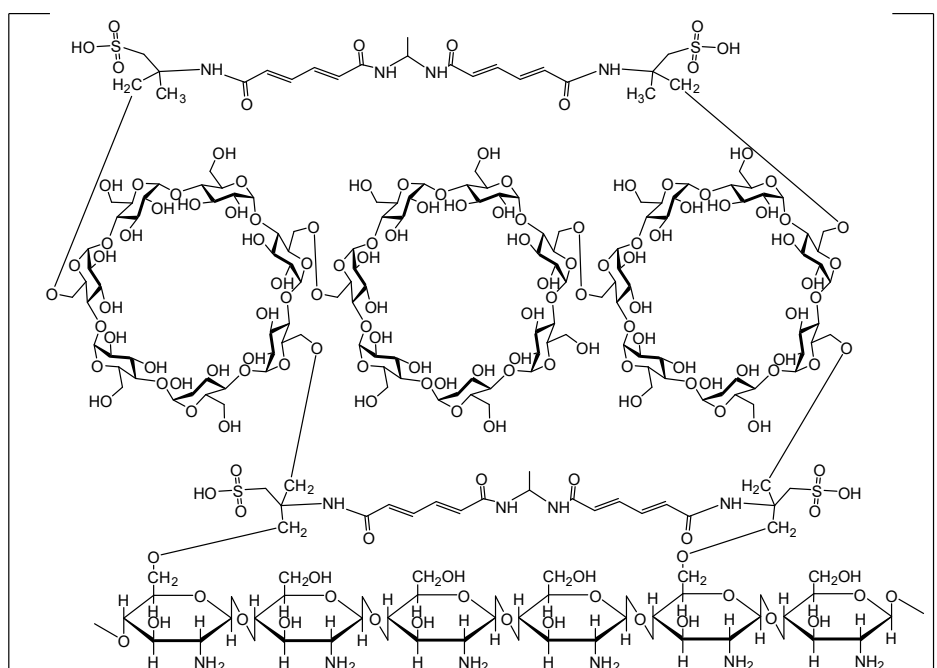
Síťované CD polymery patří vůbec k prvním CD polymerům popsaným v literatuře. V 60. letech 20. století Solms a Egli<sup>43</sup> publikovali přípravu CD polymeru síťovaného epichlorohydrinem. Ukázalo se, že tento polymer vyniká schopností zachytávat organické molekuly, jako jsou benzaldehyd, anilin, *p*- a *o*-nitrofenol. Efektivita záchytu byla závislá nejen na velikosti inkorporovaných molekul, ale také na jejich tvaru. Od té doby se začalo zkoumat možné použití CD polymerů v separačních technikách pro záchyt organických polutantů<sup>44</sup>, nukleových kyselin<sup>45</sup> a také některých látek obsažených v potravinách (např. kofein, narigin)<sup>46,47</sup>.

Konkrétním případem CD polymeru využitelným k separacím je například porézní hydroxypropyl- $\beta$ -CD polymer síťovaný tetrafluorotereftalonitrilem.<sup>48</sup> Tento polymer byl navržen k efektivnímu záchytu thiofenových sulfidů z paliv.

Cílem studie bylo také zjistit, jakou roli hraje pozice cyklodextrinu pro synergický efekt meso- a mikropórů v polymeru (pro ilustraci hypotézy autorů viz obrázek 4). Design polymeru zajistil materiálu velký povrch a vysokou efektivitu záchytu sulfidů podpořenou synergickým efektem obou typů pórů urychlujícím difuzi zachytávané molekuly. Ukázalo se také, že na orientaci cyklodextrinů v polymeru záleží, jelikož sulfidy migrovaly do kavity cyklodextrinu především jeho širším koncem.



**Obrázek 4:** Ilustrace hypotézy Duan a kol. o vlivu orientace mikropóru vůči mezopóru v polymeru. Autoři předpokládali, že do cyklodextrinu orientovaného užším koncem k mezopóru bude omezena migrace sulfidu do kavity CD a neprojeví se synergický efekt pórů. <sup>48</sup>



**Obrázek 5:** Struktura nanogelu na bázi β-CD a chitosanu. <sup>49</sup>

V některých případech není snadné zařadit cyklodextrinový polymer do jedné ze zmiňovaných skupin, například síťovaný kopolymer cyklodextrinu a chitosanu představený v práci Shoukat a kol. <sup>49</sup> (viz obrázek 5). Autoři vytvořili nanogel spojením β-CD, chitosanu, akrylamidomethylpropansulfonové kyseliny

a methylenbisakrylamidu. Materiál byl, stejně jako mnoho dalších, vytvořen proto, aby zlepšil rozpustnost a biologickou dostupnost léčiv nerozpustných ve vodě. Tento materiál uspěl, a to jak v experimentech zaměřených na schopnost inkorporovat léčivo, tak i na biologickou dostupnost a toxicitu materiálu *in vitro* a *in vivo*.

Významnou skupinou cyklodextrinových polymerů vytvořených síťováním jsou cyklodextrinové nanohouby, kterým je věnována v této práci samostatná kapitola.

### **1.5 Cyklodextrinové nanohouby**

Velkou skupinu síťovaných CD polymerů tvoří takzvané cyklodextrinové nanohouby (v originále „cyclodextrin nanosponges“), v literatuře popisované jako nerozpustné vysoce zesíťované CD polymery. Termín „nanosponges“ byl poprvé použit v roce 1999, aby vyzdvihl strukturu připomínající houbu a především schopnost polymeru zachytávat velké množství chemických látek.<sup>50,51</sup> V průběhu let se toto označení v literatuře ujalo, CD nanohouby získaly na popularitě a prošly rozsáhlým vývojem s cílem modifikovat vlastnosti polymerů a dosáhnout tak ideálních vlastností potřebných pro specifické aplikace.

Jednou z hlavních výhod CD nanohub je, že jsou založeny na sacharidech přírodního původu, což vede k nízké toxicitě, a velkému množství hydroxylových skupin, které mohou být využity k funkcionalizaci. Nanohouby ukázaly schopnost inkorporovat nejen hydrofobní molekuly do cyklodextrinové kavity, ale též zachytávat hydrofilní molekuly do prostorů mezi stěnou cyklodextrinu a síťovadlem.<sup>32,52</sup> Tímto objevem se velmi rozšířilo pole jejich využití a nanohouby se dostaly na pozici univerzálního nosiče. Funkcionalizací a vhodným výběrem síťovadla lze navíc změnit fyzikálně-chemické vlastnosti polymeru a vytvořit tak strukturu přesně podle potřeb zamýšlené aplikace. V průběhu let bylo testováno použití nanohub v různých oborech včetně katalýzy<sup>53</sup>, ukládání plynů<sup>54</sup>, zpomalovačů hoření<sup>55</sup>, životního prostředí<sup>56</sup>, zemědělství<sup>57</sup>, biomedicíně<sup>58</sup>, farmacii<sup>59</sup>, aj.<sup>25</sup> V poslední dekádě získaly nanohouby na popularitě obzvlášť v oblasti medicíny, konkrétně v cílené dopravě léčiv.<sup>60–62</sup>

Z chemického hlediska lze CD nanohouby rozdělit podle typu použitého síťovadla na karboxylové, urethanové, esterové a etherové nanohouby. V rámci vývoje byly nanohouby obohacovány o specifické vlastnosti, jako je např. schopnost fluorescence, elektrický náboj, schopnost reagovat na podněty z prostředí nebo zvýšená selektivita inkorporace daná molekulárním imprintingem.<sup>63</sup> S rostoucím zájmem o aplikaci v medicíně byly nanohouby funkcionalizovány biologicky aktivními ligandy, jež se mohou navázat na specifické buněčné receptory a umožnit například cílenou dopravu terapeutik.<sup>64,65</sup>

### 1.5.1 Funkcionalizace nanohub

Funkcionalizací cyklodextrinových nanohub lze dosáhnout specifických vlastností výhodných pro zamýšlenou aplikaci, např. náboje, skupiny s vysokou afinitou k určitým hostujícím molekulám nebo naopak k vazebným místům materiálů či tkání. Opět je možné provést funkcionalizaci různými způsoby – k síťování použít funkcionalizovaný CD, využít k dosažení kýženého efektu funkční skupiny síťovadla nebo funkcionalizovat již hotové nanohouby. Při síťování funkcionalizovaných CD je nutné mít na paměti, že přítomnost funkčních skupin může mít zásadní vliv na tvorbu polymerní sítě. Hustota zesíťování CD může být přítomností nové funkční skupiny snížena nebo dokonce nemusí k vůbec dojít k vytvoření polymerní struktury.<sup>63</sup>

Funkcionalizaci hotového polymeru využil Singh a kol.<sup>65</sup> k navázání cholesterolu na nanohouby. Funkcionalizace nosiče cholesterolem byla provedena za účelem zlepšit internalizaci do buněk a zvýšit kapacitu pro navázání léčiva. Jelikož CD nanohouby jsou nerozpustné, výběr analýz pro potvrzení struktury je poměrně omezený. Úspěšné navázání cholesterolu na nanohouby autoři ověřili za pomoci SR-FTIR (Synchrotronové radiační infračervené spektroskopie s Fourierovou transformací) a termální analýzy. Obdobně funkcionalizoval nanohouby i Lembo a kol.<sup>66</sup> při přípravě nosičů acykloviru. Karboxylové nanohouby byly zreagovány se sukcinanhydridem za vzniku karboxylových nanohub. Přítomnost karboxylových funkčních skupin autoři ověřili titračně a FTIR analýzou. Funkcionalizace nanohub výrazně ovlivnila množství navázaného léčiva, snížila rychlost jeho uvolňování a zároveň zvýšila jeho antivirotické účinky *in vitro*.

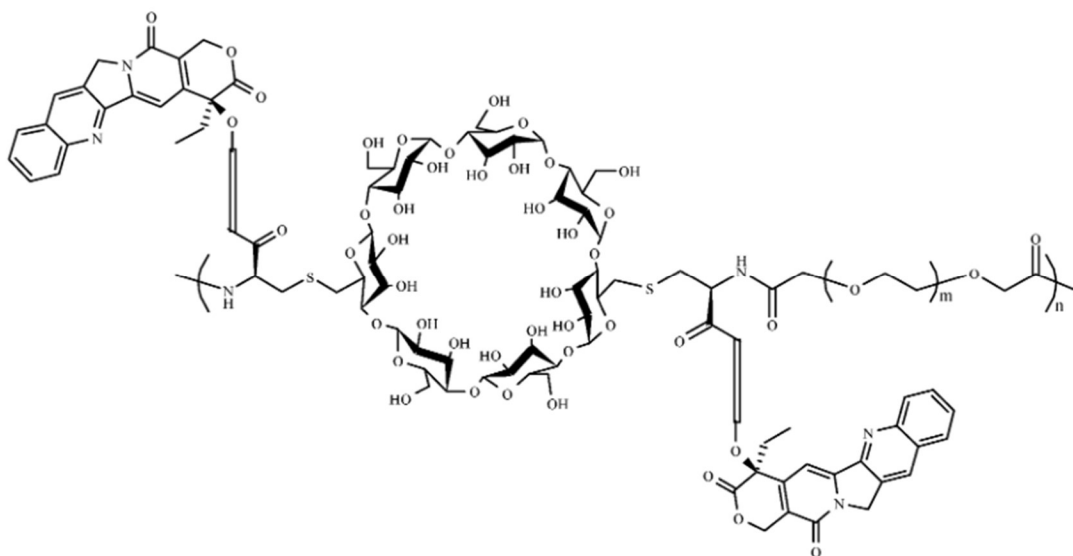
## 1.6 Použití cyklodextrinových polymerů v medicíně

Již několik dekád jsou zkoumány možnosti využití cyklodextrinů, jejich derivátů a polymerů v oblasti medicíny. Hlavní motivací je schopnost těchto materiálů sloužit jako nosiče široké škály molekul, proto jsou zpravidla využívány pro cílenou dopravu různých látek.

Velkou kapitolou v aplikacích cyklodextrinových polymerů je jejich možné využití jako nosiče makromolekulárních látek. Výzkum skupiny M. E. Davise<sup>67</sup> se zaměřoval na tvorbu lineárních kladně nabitých CD polymerů pro navázání DNA. Polyamidin-CD kopolymer rozpustný ve vodě byl podroben testům *in vitro* i *in vivo*, kde prokázal nízkou toxicitu, je schopný vytvářet komplexy s DNA a umožňuje transfekci *in vitro*. Vlastnosti polymeru, jeho schopnost vázat na sebe DNA a jeho toxicita závisí nejen na typu cyklodextrinu a jeho funkcionalizaci, ale také na volbě linkeru a hustotě náboje v polymerním řetězci.<sup>34,35</sup> Dle práce Popielarski a kol.<sup>35</sup> porovnávající vlastnosti analogických polymerů  $\beta$ -CD a  $\gamma$ -CD prokázaly polymery  $\gamma$ -CD nižší toxicitu, ačkoli byly jinak identické. Hwang a kol.<sup>34</sup> studoval závislost toxicity na délce linkeru, přičemž s rostoucí délkou linkeru a tím rostoucí vzdáleností skupin nesoucích náboj klesala toxicita zkoumaných polymerů. Zároveň ale též klesala rozpustnost, která s dalším prodloužením linkeru pravděpodobně způsobila náhlý nárůst toxicity polymeru. Obohacení polymerní struktury o imidazolový kruh je možné podpořit transfekci aniž by došlo k negativnímu ovlivnění toxicity.<sup>68,69</sup> Struktura polymeru tedy hraje zásadní roli v jeho působení na organismus, a to i v případě změny délky linkeru o pouhých několik uhlíků.

Podobně jako předešlé (pomocí disubstituce cyklodextrinu přemostěním), ovšem s využitím jiného typu linkeru byl připraven cyklodextrinový polymer navržený pro tvorbu konjugátů s camptothecinem, farmakem používaným při léčbě rakoviny.<sup>36,70</sup> Na rozdíl od jiných polymerů, tento váže léčivo do struktury kovalentně přes glycinové nebo triglycinové linkery (obrázek 6). Navázáním terapeutika na cyklodextrinový polymer se výrazně zvýšila rozpustnost léčiva, zvýšila se efektivita léčby, a to jak v porovnání s volným léčivem, tak i s léčivem vázaným na jiný typ polymeru (polyethylenglykol).<sup>70</sup> Navíc se léčivo z polymerní

struktury uvolňovalo postupně, takže byla zajištěno pozvolné dlouhodobé dávkování.<sup>36,70</sup>



**Obrázek 6:** Lineární cyklodextrinový polymer s léčivem kovalentně vázaným ke struktuře přes glycinový nebo triglycinový linker.<sup>36</sup>

Lineární cyklodextrinový polymer byl též navržen pro léčbu Niemann-Pickovy choroby (hromadění cholesterolu v lysozomech). Materiál byl testován na myších s touto chorobou a dle výsledků studie výrazně prodloužil jejich život. V porovnání s dříve studovaným hydroxypropyl- $\beta$ -CD měl nový polymer vyšší biologickou dostupnost, pomalejší odbourávání, potřebné dávkování bylo 5krát nižší, a navíc polymer dokázal překonat hematoencefalickou bariéru. Polymer byl navržen tak, aby obsahoval degradabilní linker, který zajistil degradaci polymeru v kyselém pH lysozomů a zbytky po degradaci bylo možné vyloučit.<sup>16</sup>

V oblasti designu nosičů léčiv byl navržen lineární kopolymer na bázi maltosy a cyklodextrinu jako nosič léčiva proti HIV. Tento polymer rozpustný ve vodě prokázal svou biokompatibilitu a zvýšil rozpustnost navázaného léčiva, tudíž by dle autorů mohl být nosičem i pro jiná léčiva nerozpustná ve vodě.<sup>40</sup>

Cyklodextrinové nanohouby jsou studovány pro biomedicínské aplikace již téměř 20 let. Za tu dobu prokázaly, že nejsou mutagenní, dráždivé, nevyvolávají alergie, nejsou toxické pro buněčné kultury a byly dobře snášeny při intravenózním podání myším.<sup>71</sup> Lze je podávat orálně, inhalačně, intravenózně a byly též testovány pro transdermální podání v podobě gelů.<sup>71-74</sup> Inkorporací léčiva do

nanohub lze předejít rekrytalizaci hydrofobních léčiv ve vodném prostředí, stabilizovat léčivo během lyofilizace a usnadnit jeho dopravu do buněk.<sup>71</sup>

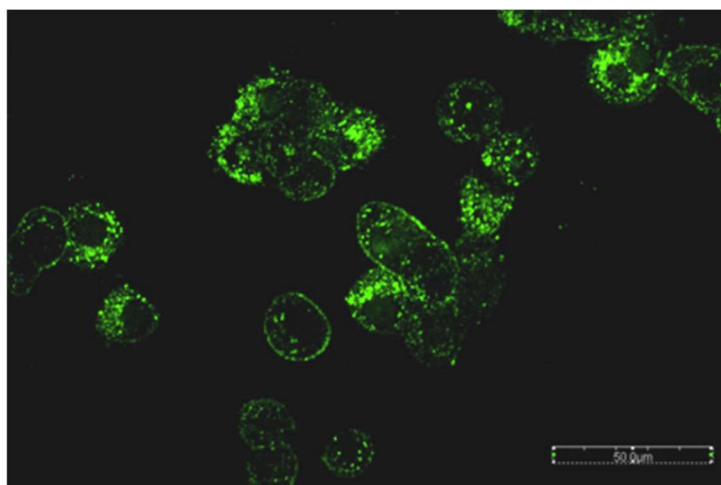
Experimenty ukázaly, že nanohouby jsou schopny zachycovat jak lipofilní, tak hydrofilní léčiva a navíc umožňují jejich pozvolné uvolňování<sup>32,64,75</sup> a zlepšují biologickou dostupnost<sup>76</sup>. Použití cyklodextrinových nanohub jako nosiče nabízí zlepšení rozpustnosti léčiv ve vodě a předchází agregaci léčiva inkorporací do částic stabilní nanosuspenze<sup>73,77</sup>, zároveň pomáhá stabilizovat inkorporované látky a působí preventivně proti jejich degradaci.<sup>71,73,78</sup> Inkorporace do nanohub byla testována např. u některých léčiv s analgetickým a protizánětlivým účinkem (mimo jiné kyselina acetylsalicylová<sup>79</sup>, diclofenac<sup>72</sup>, ibuprofen<sup>24</sup>), antioxidantů (např. resveratrol<sup>23,80</sup>), antivirotik (mj. acyklovir<sup>66</sup>), léků proti rakovině (paclitaxel<sup>81</sup>, doxorubicin<sup>62,65</sup>, erlotinib<sup>82</sup>, aj.), diabetu<sup>83</sup>, Parkinsonově chorobě<sup>84</sup> a HIV<sup>85,86</sup>. Kromě enkapsulace léčiv byly nanohouby testovány také v dopravě enzymů, proteinů, protilátek a vakcín.<sup>60,71</sup>

Nespornou výhodou cyklodextrinových nanohub je možnost jejich modifikace signálními molekulami. Jedním z prvních případů byly fluorescenční karbonylové nanohouby, jež umožnily sledování internalizace materiálu do buněk.<sup>66</sup> Díky modifikaci fluorescenčně aktivní molekulou lze sledovat internalizaci nosiče do buněk jak *in vitro* tak *in vivo*. V některých případech ke sledování osudu nosiče postačí využití inkorporace fluorescenčně aktivní molekuly (léčiva).<sup>64</sup> Tato metoda má však i své nevýhody, a sice ztrácí efekt ve chvíli, kdy molekula léčiva opustí hostitelskou částici, a také nelze aplikovat na všechna farmaka.

Zajištěním schopnosti reagovat na změny v prostředí nebo zvýšením afinity ke specifickému typu buněk je možné zajistit uvolňování enkapsulované látky v cílové tkáni a zvýšit tak efektivitu léčebné kúry. Příkladem jsou nanohouby reagující na přítomnost intracelulárního antioxidantu glutathionu (obrázek 7), jehož koncentrace je v krevní plazmě v porovnání s rakovinnými buňkami o několik řádů nižší.<sup>87</sup> Uvolnění léčiva z tohoto nosiče je řízeno právě koncentrací glutathionu v prostředí, aktivní látka se tedy uvolní až v cílových buňkách a nekoluje volně v organismu. Efektivita cílené léčby obzvláště při nižších dávkách léčiva byla v porovnání s užitím volného léčiva bez nosiče vyšší úměrně obsahu glutathionu v buňkách<sup>64,87</sup>, buněčná internalizace rychlejší<sup>87</sup> a zároveň by se



tímto přístupem měla snížit úroveň expozice organismu léčivu, což by mělo vést k redukci vedlejších účinků<sup>88</sup>.



**Obrázek 7:** Internalizace nanohub reagujících na přítomnost glutathionu do rakovinných buněk. Snímek byl pořízen 15 minut od počátku expozice buněk nanohoubám. Fluorescenci způsobuje kumarin 6 inkorporovaný do nanohub.<sup>87</sup>

K tomu, aby bylo možné použít materiály v medicínských aplikacích, je nutné vyloučit jejich toxicitu. Ta je závislá především na chemické struktuře (u nanohub především na použitém typu síťovadla, které zásadně ovlivňuje vlastnosti polymeru), na způsobu podání léčiva a na pravidelnosti podávání. Bezpečnost při orálním podání byla již prokázána u nanohub na bázi  $\beta$ -cyklodextrinu síťovaného karbonyldiimidazolem (CDI), dianhydridem kyseliny pyromelitové (PMDA) a hexamethylendiisokyanátem (HMDI) jak v případě akutní toxicity, tak opakovaného podávání potkanům po dobu 28 dnů. Podle výsledků studie nemají nanohouby při perorálním podání negativní účinky na organismus, a to nezávisle na velikosti částic. V testech toxicity byly totiž sledovány jak částice o velikosti v rozmezí 400 – 550 nm, tak 50 – 200 nm.<sup>89</sup> Bezpečnost těchto typů nanohub je obzvláště důležitá, jelikož síťovadla CDI a PMDA patří v literatuře mezi nejčastěji používaná pro přípravu cyklodextrinových nosičů s potenciálními aplikacemi ve farmacii. Dalšími studiemi podporujícími bezpečnost CD nanohub jsou práce Khalida a kol.<sup>90</sup>, při které byly provedeny testy akutní toxicity při orálním podání nanohub síťovaných methylenbisakrylamidem na potkanech, a práce Songa a kol.<sup>91</sup>, která se zabývala hepatotoxicitou karbonylových nanohub (síťovaných difenylkarbonátem) u zebřiček.

## **1.7 Nosiče léčiv funkcionalizované cholesterolem**

V rámci dopravy léčiv může být limitujícím aspektem překonání biologických bariér a penetrace do buněk.<sup>92</sup> K dosažení vyšší biokompatibility a zlepšení interakcí mezi nosiči léčiv a buňkami (popř. jejich receptory) se hojně používá modifikace materiálu – ať se to týká jeho povrchu nebo celé chemické struktury.<sup>65</sup> K tomuto účelu mohou velmi dobře posloužit přírodní lipidy či steroidy (mezi něž patří i cholesterol), jelikož tyto látky hrají v životě buňky významnou roli – podílejí se mj. na tvorbě buněčné membrány, metabolizaci hormonů, buněčné adhezi a přenosu signálů mezi buňkou a jejím okolím.<sup>93</sup> Cholesterol je v literatuře převážně využíván k tvorbě amfifilních látek a nanostruktur vzniklých samouspořádáním, především micel a lipozomů.<sup>94–97</sup> Rozličné (nano)struktury<sup>65,98–100</sup> modifikované cholesterolem byly testovány jako nosiče aktivních látek vhodných pro léčbu rakoviny a genovou terapii.

Funkcionalizace materiálu cholesterolem zvyšuje jeho lipofilicitu, což přináší řadu výhod v biologických aplikacích, včetně usnadnění průchodu přes biologické bariéry, prodloužení cirkulace v organismu, zvýšení selektivity distribuce a zvýšení biologické dostupnosti. Díky tomu mohou tyto materiály přispět k velkému pokroku v léčbě těžko léčitelných onemocnění mozku, léčbě mozkových infekcí, zánětlivých onemocnění nebo karcinomu.<sup>101–104</sup> Cholesterolový ligand navázaný na polymerní částice prokázal, že je vhodný na podporu internalizace materiálu do buňky. Pro fibroblasty byl materiál netoxický, nicméně měl vliv na narušení buněčné membrány glioblastomu, čímž omezil růst nádoru. Tento materiál tedy nemá jen funkci nosiče, ale může při léčbě působit synergicky s použitým léčivem.<sup>92</sup>

Polymerní částice modifikované cholesterolem se také ukázaly jako slibný materiál při léčbě rakoviny prsu.<sup>99</sup> Nanočástice měly dobrou hemokompatibilitu a snížily toxicitu enkapsulovaného doxorubicinu pro buňky kardiomyocytu v porovnání s volným léčivem. Na druhou stranu na buňky prsního nádoru (MCF-7) působily i nosiče bez léčiva toxicky a po inkorporaci léčiva měly oproti volnému doxorubicinu několikanásobně vyšší efekt na snížení buněčné viability, jelikož usmrtily až 90 % nádorových buněk. Navíc se inkorporací léčiva do nosiče znatelně zvýšila účinnost a mohlo být použito nižší dávkování doxorubicinu v porovnání s dostupnou literaturou.

Rovněž funkcionalizace dendrimerů byla již publikována. Cholesterolem funkcionalizované dendrimery na bázi polyethylenglykolu byly navrženy pro cílenou dopravu hydrofobních léčiv přes hematoencefalickou bariéru. Ke snazšímu prostupu přes bariéru má pomáhat cholesterolová složka, přičemž další funkční části zajišťují fluorescenci nosiče a cílení na specifické receptory. Funkcionalizace cholesterolem neovlivnila kapacitu materiálu navázat léčivo ani jeho terapeutickou aktivitu, ale prodloužila dobu uvolňování inkorporovaného léčiva.<sup>102</sup>

V dostupné literatuře zaměřené na cholesterol a cyklodextriny byla publikována řada studií zaměřených na komplexaci cholesterolu CD v rámci biologických aplikací, ať již se jednalo o záchyt cholesterolu z organismu<sup>105,106</sup> nebo o dodání cholesterolu v cyklodextrinovém nosiči<sup>107,108</sup>. Nicméně prací zaměřených na funkcionalizaci CD cholesterolem je poskrovnu.

Nejvíce zastoupenými strukturami na bázi cholesterolem modifikovaných CD jsou ty vzniklé samoskladbou z amfifilních CD, např. tenký film<sup>109</sup> vzniklý samoskladbou na mezifázovém rozhraní se schopností zachytávat z roztoku molekuly azobenzenu nebo amfifilní CD<sup>110,111</sup>, jež lze použít pro tvorbu membrán nebo je lze inkorporovat do fosfolipidových mono- a dvojvrstev. Autoři se zabývali vlivem počtu cholesterolových skupin na pevnost vazby mezi cyklodextrinem a membránou a dotkli se i problematiky volby linkeru pojícího CD a cholesterol vzhledem k možné „auto-komplexaci“ navázaného cholesterolu do kavity CD v závislosti na délce spoje. Poskytli tak důležité podklady pro pochopení problematiky tvorby takových struktur, nicméně nezabývali se jejich využitím.

Amfifilní CD mohou být použity jako součást nejen membrán, ale také fosfolipidových vezikulů.<sup>112</sup> Rostoucí podíl CD ve struktuře zvýšil permeabilitu vezikulu, nicméně již v malém množství umožnily CD inkorporaci hydrofobních molekul a vezikuly tak mohou sloužit jako nosiče pro molekuly funkcionalizované sacharidy, barvivy, léčiva či látky zprostředkující cílenou dopravu.<sup>113</sup>

Příprava amfifilních CD funkcionalizovaných cholesterolem byla v literatuře popsána několika způsoby, a sice jako reakce aminového derivátu CD s cholesterol chloroformátem<sup>114</sup>, či reakce mono-, resp. diaminového derivátu

methylo-CD s deriváty cholesterolu obsahujícími karboxylovou funkční skupinu<sup>110,112,115</sup>.

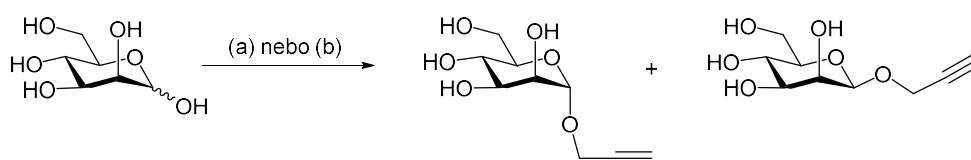
Benefitem získaným modifikací cholesterolem CD-MOF (metal-organic framework) bylo zvýšení stability materiálu, jelikož se zpomalil jeho rozklad ve vodném prostředí. V porovnání s CD-MOF, který se téměř okamžitě rozložil po kontaktu s vodou, cholesterolem modifikovaný MOF si zachoval svou strukturu i po 24 h díky zvýšení hydrofobicity materiálu. Funkcionalizace cholesterolem také zachovala krystalickou strukturu a volnou CD kavitu na rozdíl od jiných metod stabilizace MOF (např. pomocí fullerenu inkorporovaných do CD kavity). Překonáním problému se stabilitou ve vodě se výrazně zvyšuje aplikovatelnost tohoto slibného materiálu na poli biomedicíny. Velký potenciál ukázal svou biokompatibilitou, schopností inkorporace léčiva, prodloužením jeho doby cirkulace v krvi a postupným uvolňováním stejně jako zlepšením internalizace léčiva do buněk.<sup>98</sup>

O funkcionalizaci cyklodextrinových polymerů cholesterolem je v dostupné literatuře jen velmi málo informací. Byla popsána biofunkcionalizace CD nanohub cholesterolem, a sice ve formě postfunkcionalizace karboxylových nanohub cholesterol hemisukcinátem za účelem zvýšit jejich biologickou aktivitu a efektivitu dopravy léčiva. Tato modifikace zvýšila adsorpci doxorubicinu v nanohoubách a usnadnila internalizaci nanohub do buněk. Množství cholesterolu navázaného v CD nanohoubách bylo kvantifikováno pomocí HPLC po hydrolyze materiálu amoniakem.<sup>65</sup>

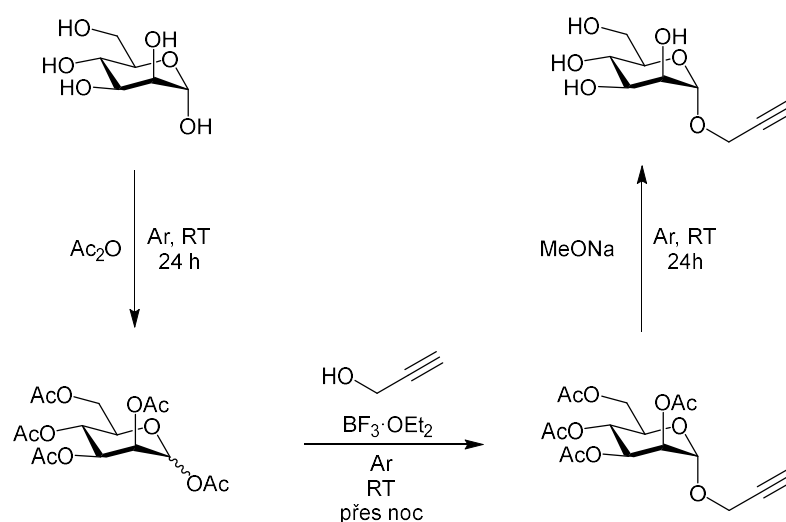
## ***1.8 Nosiče léčiv funkcionalizované manosou***

Manosa patří mezi biologicky významné sacharidy. D-Manosa se používá ve farmaceutickém průmyslu jako součást doplňků stravy podporujících léčbu a prevenci infekcí močových cest. V rámci studií zaměřených na cílenou dopravu léčiv je manosa využívána jako ligand pro funkcionalizaci nosičů za účelem cílené dopravy do buněk produkujících manosové receptory, např. do makrofágů<sup>116</sup> nebo nádorových buněk<sup>117,118</sup>. Manosu lze navázat na celou řadu nanostruktur, mj. na lipozomy<sup>116</sup>, nanogely<sup>119</sup> či nanočástice<sup>120</sup>, a to jak kovalentně, tak nekovalentně fyzikální adsorpcí na povrch nosiče.<sup>121</sup>

Kovalentně lze manosu na nanomateriál navázat dvěma způsoby – buď na již předem připravený materiál, nebo na jednotlivé stavební bloky, které se následně uspořádají do finální nanostruktury. Jednou variantou navázání manosu je za pomoci bifunkčního linkeru, např. karbonyldiimidazolu.<sup>117</sup> Častější je však použití mědnými ionty katalyzované cykloadice azidu a alkyne (patřící mezi tzv. „click reakce“), jíž lze snadno selektivně modifikovat chemickou povahu stavebních bloků a tím i vlastnosti výsledného materiálu.<sup>116</sup> Aby bylo možné tento postup aplikovat, je třeba nejprve připravit vhodné deriváty manosu a funkcionalizované nanostruktury. Příprava manosových derivátů obsahujících trojnou vazbu je uvedena v dostupné literatuře, přičemž je popsáno několik odlišných postupů: různé varianty přímé syntézy (schéma 4) nebo syntéza s využitím chránících skupin (schéma 5). Všechny nalezené zdroje uvádějí jako produkt přímé syntézy  $\alpha$ -anomer<sup>122–128</sup>, pouze několik z nich popsalo vznik  $\beta$ -anomeru jako vedlejšího produktu<sup>125,128</sup>.



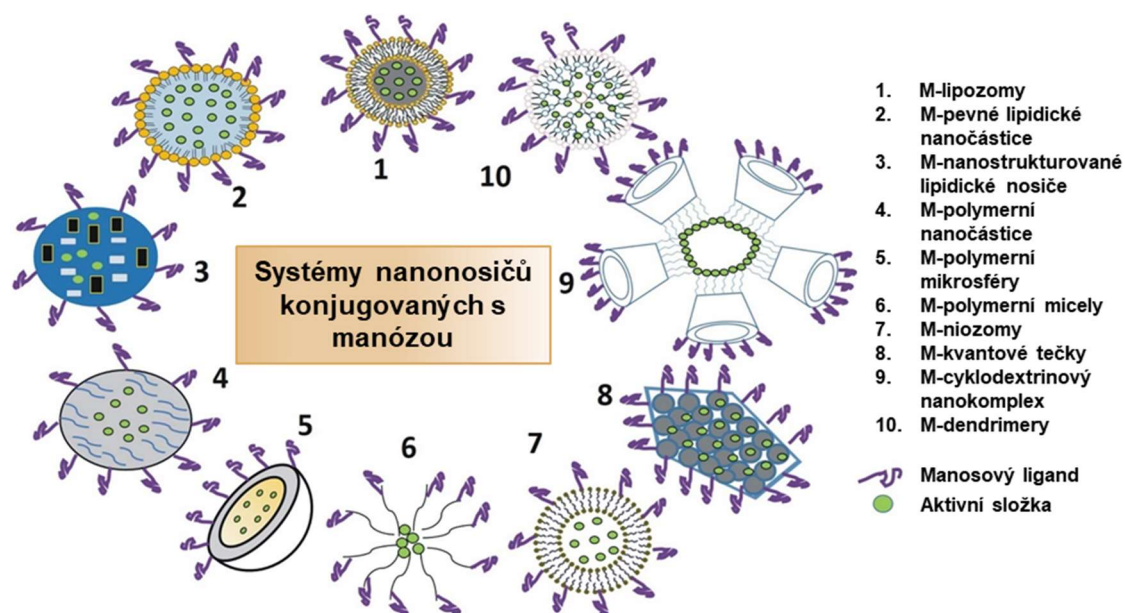
**Schéma 4:** Jednokroková syntéza propargyl-manosidů. Postupy přípravy uvedené v literatuře: (a) propargyl alkohol, HCl, RT, přes noc;<sup>122</sup> (b) propargyl alkohol, H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> na silika gelu, 65 °C, 2 h.<sup>123</sup>



**Schéma 5:** Tříkroková syntéza propargyl- $\alpha$ -D-manopyranosy.<sup>129</sup>

Manosa je v organismu rozpoznávána tzv. manosovými receptory, což jsou transmembránové proteiny exprimované buňkami imunitního systému (mezi ně

patří makrofágy a dendritické buňky), epitelovými buňkami a také některými typy nádorových buněk (např. buňky karcinomu prsu<sup>130</sup> nebo kolorektálního karcinomu<sup>117</sup>). Manosové receptory mají schopnost rozpoznat a navázat sacharidy, především manosu, fukosu, *N*-acetylglukosamin, glukosu a některé oligosacharidy. Zprostředkovávají endocytózu, jsou důležité pro mezibuněčný přenos signálů, zpracování antigenů a také fagocytózu, jelikož rozpoznávají patogeny s povrchem obsahujícím sacharidy, jako je HIV, virus denge, *Candida albicans*, aj. Z tohoto důvodu mohou hrát klíčovou roli při cílené léčbě rakoviny, tuberkulózy, lokálních infekcí a při modulaci imunitních reakcí.<sup>121,131</sup> Z literatury vyplývá, že důležitou roli hraje i množství manosových ligandů na nosiči.<sup>132</sup> Biologická aktivita manosylovaných struktur, jejich buněčné rozpoznávání a internalizace pomocí endocytózy řízené manosovými receptory rostou spolu s narůstajícím množstvím manosových frakcí ve struktuře.<sup>132–134</sup>



**Obrázek 8:** Různé typy manosou funkcionalizovaných nosičů léčiv.<sup>132</sup>

Chemoterapie je jednou z nejrozšířenějších metod boje s rakovinným bujením. Většina užívaných léčiv, mezi něž patří např. doxorubicin, paklitaxel a docetaxel, však nepůsobí selektivně jen na rakovinné buňky, nýbrž i na ostatní rychle se dělící buňky. Léčbu tak doprovází řada nežádoucích účinků (ztráta vlasů, nevolnost, zvracení) a při dlouhodobém užívání těchto léčiv hrozí vznik rezistence. Tyto nežádoucí efekty léčby by mohly být eliminovány inkorporací léčiv do nosiče funkcionalizovaného manosou a cílenou dopravou k buňkám s vysokou expresí manosových receptorů včetně mnoha druhů rakovinných

buněk. Zvýší se tak efektivita léčby a sníží se toxické účinky na zbytek organismu.<sup>131,135,136</sup>

Velkou skupinou buněk, na něž lze pomocí manosy cílit a řešit tak širokou škálu zdravotních problémů, jsou makrofágy. V minulosti byly považovány za překážku v oblasti cílené dopravy léčiv. Postupně se však zjistilo, že makrofágy hrají podstatnou roli v organismu, jeho obranyschopnosti, ale také ve vývoji nemocí a nádorů.<sup>137</sup> Některé patogeny (např. bakterie způsobující tuberkulózu a salmonelózu nebo původce leishmaniózy) jsou schopny využít makrofágy pro svou ochranu a komplikují tak konvenční léčbu antibiotiky.<sup>137,138</sup> Cílenou dopravou do makrofágů by se zároveň antibiotika dopravila k patogenům a mohla by se tím zvýšit efektivita léčby. Dalšími onemocněními, kde hrají makrofágy důležitou úlohu, jsou např. infekce HIV, Gaucherova choroba a revmatoidní artritida. V posledních letech se do popředí zájmu dostaly tzv. makrofágy asociované s nádory (TAM), které se významně podílejí na vývoji rakovinného bujení a potlačují imunitní reakce bojující s nádorovou tkání, čímž vytvářejí prostředí vhodné pro růst nádorové tkáně a výrazně zhoršují prognózu. V rámci cílené terapie jsou TAM buď eliminovány, nebo přeprogramovány na jiný typ makrofágů, jež působí prozánětlivou a protinádorovou reakci v organismu. Díky schopnosti migrovat v těle i na obtížně dostupná místa, do nádorů, přes hematoencefalickou bariéru<sup>139</sup> do mozkové tkáně, mohly by makrofágy sloužit i jako „nosiče nosičů léčiv“.<sup>137,140,141</sup> Jinými slovy by nosič s enkapsulovaným léčivem nejprve pronikl do makrofágů, které by jej dopravily do léčené tkáně.

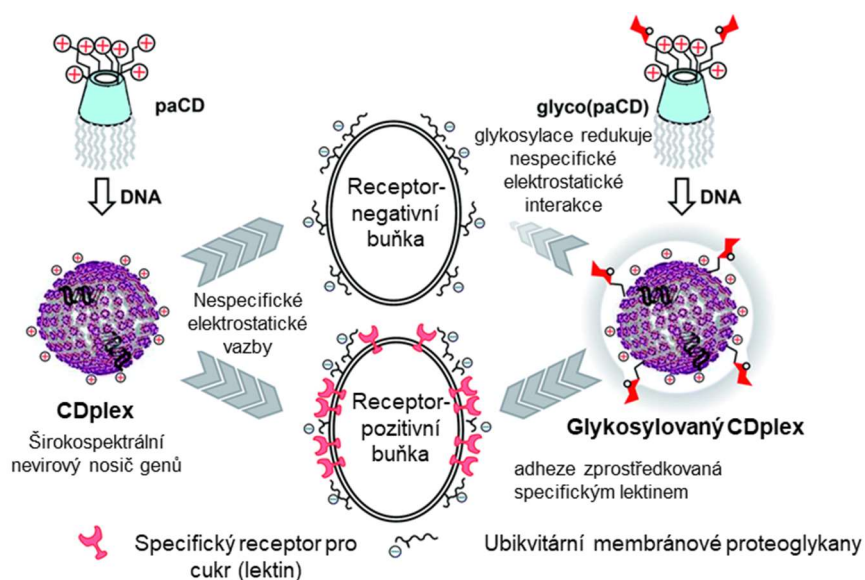
V dostupné literatuře lze dohledat několik případů použití cyklodextrinů modifikovaných manosou za účelem cílené léčby rakoviny, dopravy do makrofágů i v jiných v medicínských aplikacích. Methylovaný CD modifikovaný manosou<sup>118</sup> byl připraven jako intravenózně podávaný prostředek určený k léčbě rakoviny střev. Funkcionalizace manosou měla za úkol umožnit cílení do nádorových buněk a do TAM. V *in vitro* a *in vivo* experimentech materiál výrazně omezil nádorové bujení i přítomnost TAM a zároveň byl při intravenózním podání velmi dobře přijat organismem a měl zanedbatelné vedlejší účinky. Potvrdila se i zásadní role manosového ligandu v cílení do obou typů patogenních buněk a v selektivitě toxického účinku na buňky v závislosti na přítomnosti manosových receptorů.

Schopnost akumulace v rakovinných buňkách prokázaly samoskladbou vytvořené cyklodextrinové nosiče funkcionalizované za účelem cílení do manosových receptorů kolorektálního karcinomu. Při porovnání s jejich nefunkcionalizovanými analogy se modifikací zvýšila efektivita internalizace do buněk. Navíc se zvýšila také biologická dostupnost léčiva a jeho toxický efekt na nádorové buňky po enkapsulaci do funkcionalizovaného CD nosiče. Vhodnost nosiče pro daný záměr pak potvrdily experimenty *in vivo*, jelikož enkapsulace léčiva pomohla dopravit léčivo do střev (naproti tomu zjištěná koncentrace částic v žaludku, játrech a ledvinách byla nízká) a ochránila jej před působením žaludečních šťáv. Díky tomuto nosiči se také podařilo deaktivovat makrofágy asociované s nádory.<sup>117</sup>

Ať už cílení do více typů buněk nebo doprava více molekul najednou je velkou výzvou. Pomocí nosičů na bázi manosou modifikovaných CD a alginátu sodného bylo možné enkapsulovat zároveň melanomový antigen a imiquimod, léčivo s antitumorózními účinky. I tyto materiály ukázaly, že manosa ve struktuře a cílení na receptory usnadnily internalizaci do buněk, konkrétně do dendritických buněk a makrofágů.<sup>142</sup>

Nosiče funkcionalizované manosou obsahující cyklodextriny<sup>143,144</sup> i jiné sacharidy<sup>145-147</sup> jsou studovány také v souvislosti s jejich použitím v genové terapii a dopravě RNA využitelné při vakcinaci nebo proteinové substituční terapii. Manosylací nabitých struktur<sup>144</sup> složených z amfifilních cyklodextrinů se navázáním sacharidového ligandu odstínila schopnost neselektivních elektrostatických interakcí, a naopak byla dodána schopnost selektivních interakcí s manosovými receptory (obrázek 9). Chitosanové částice modifikované manosou byly zkoumány jako nosiče pro cílenou dopravu do dendritických buněk, jež se vyskytují mj. v nádorové tkáni.<sup>146,147</sup> Ve formě tzv. mikrosfér se modifikované chitosanové částice osvědčily také jako nosiče proteinů pro efektivní vakcinaci proti bakterii *Pseudomonas aeruginosa*.<sup>145</sup>





**Obrázek 9:** Schematické znázornění selektivity cyklodextrinového nosiče DNA. Kladně nabitý nosič interaguje neselektivně s buňkami jen na základě elektrostatického působení. Přidáním sacharidového ligandu (manosy) jsou preferovány interakce se specifickými receptory a potlačeny účinky elektrostatických interakcí.<sup>144</sup>

Proti bakteriím, konkrétně proti *Mycobacterium tuberculosis* způsobující tuberkulózu, mohou manosylované nosiče bojovat díky potenciálu cílit do alveolárních makrofágů, ve kterých jsou zmíněné bakterie schopny přežít a navíc jsou tak chráněné před působením konvenční léčby antibiotiky.<sup>148</sup> Velký vliv na vlastnosti pevných lipidických částic (solid lipid nanoparticles) měl použitý surfaktant, Tween® 80 oproti PVA (polyvinylalkoholu) zlepšil kapacitu materiálu pro navázání léčiva, zároveň se ale snížila stabilita částic v roztoku. Mechanismus transportu nosiče do cílových buněk ovlivňuje mj. velikost částic – velmi malé částice mohou být internalizovány díky receptorům zprostředkované endocytózou, mikročástice jsou primárně fagocytovány makrofágy. Studované částice o velikosti okolo 500-600 nm dle publikovaných výsledků lépe penetrovaly do makrofágů díky obsahu manosy, a sice endocytózou řízenou manosovými receptory.

## 2 Cíle disertační práce

Cílem této disertační práce byla syntéza cyklodextrinových derivátů jako prekurzorů pro nové cyklodextrinové polymery s potenciální aplikací v dopravě léčiv.

Dílčí cíle byly stanoveny následovně:

- a) Syntéza prekurzorů pro přípravu lineárních cyklodextrinových polymerů s definovanou strukturou.
- b) Syntéza cyklodextrinových prekurzorů pro přípravu nových zesíťovaných cyklodextrinových polymerů (cyklodextrinových nanohub).
- c) Posouzení náročnosti syntézy různých typů cyklodextrinových polymerů a její přínosnosti s ohledem na možnosti jejich využití v praxi.
- d) Ověření možnosti použití připravených cyklodextrinových polymerů v oblasti medicíny se zaměřením na dopravu léčiv.

## 3 Experimentální část

### 3.1 Materiály pro syntézu

Beta cyklodextrin byl zakoupen u společnosti Cyclolab; benzylchlorid, 1,1'-karbonyldiimidazol (CDI), 4-(dimethylamino)pyridin (DMAP), anhydrid kyseliny octové, anhydrid kyseliny pyromelitové (PMDA), askorbát sodný, azid sodný, syntetická D-(+)-manosa, diisobutylaluminium hydrid (DIBAL), EDC hydrochlorid, hydrid sodný, cholesterol hemisukcinát, palladium na uhlí, propargyl alkohol, *p*-toluensulfonylchlorid, tetrabromomethan, trifenyfosfin, triethylamin, tri- a tetraethylenglykol byly zakoupeny od Sigma-Aldrich; síran měďnatý (pentahydrát), chlorid sodný, kyselina chlorovodíková a sírová u společnosti Lachner. Fluorid boritý - ethylether komplex ( $\text{BF}_3 \cdot \text{OEt}_2$ ), propargylbromid, síran hořečnatý byl zakoupen u TCI, sodná sůl kyseliny ethylendiamintetraoctové ( $\text{Na}_2\text{EDTA}$ ) byla zakoupena u společnosti Lachema. Síran sodný, uhličitan sodný a hydroxid sodný byly dodány od společnosti Penta, kyselina *p*-toluensulfonová od společnosti Fluka.

Rozpouštědla aceton, cyklohexan, ethylacetát, dichlormethan, dimethylsulfoxid (DMSO) a chloroform byly dodány společností Lachner; *N,N*-dimethylformamid (DMF), ethanol, methanol, hexan, pyridin, THF a toluen společností Penta. Bezvodý dichlormethan byl zakoupen od výrobce Acros a použit bez dalších úprav. DMF, DMSO a methanol byly sušeny na molekulových sítích (4Å pelety, Acros).

Bezvodý  $\beta$ -CD byl pro syntézu nanohub sušen v sušárně při teplotě 90 °C přes noc, pro syntézu přemostěných CD byl sušen pod vakuem při teplotě 90 °C po dobu 3-8 h.

Methanolát sodný byl připraven reakcí sodíku (2,3 g) s bezvodým methanolem (100 ml) v inertoní atmosféře.

### 3.2 Materiály pro biologické experimenty

Buněčné kultury (fibroblasty a nádorová linie MCF-7) byly zakoupeny u Pasture Institute National Cell Bank of Tehran (Írán). Kultivační médium RPMI bylo

dodáno společností GIBCO Laboratories, FBS bylo zakoupeno u Cegrogen-Biotech, MTT a resveratrol u Sigma Aldrich.

### **3.3 Analytické metody**

#### 3.3.1 Hmotnostní spektrometrie (MS)

Analýza probíhala na hmotnostním spektrometru Sciex X500R qTOF (AB Sciex, USA). Pro měření byla využita průtoková injekční analýza v pozitivním módu se sběrem dat od 100 do 2000 m/z. Mobilní fázi tvořil methanol a 0,1% vodný roztok kyseliny mravenčí v poměru 9:1.

#### 3.3.2 Infračervená spektroskopie (FTIR)

Infračervená spektroskopie s Fourierovou transformací (FTIR) byla provedena na přístroji Nicolet iZ10 od ThermoFisher Scientific (USA) s diamantovým krystalem. Pro analýzu byla použita technika ATR s 8 skeny pozadí a 8 skeny vzorku, měření bylo provedeno v rozsahu 4000-400  $\text{cm}^{-1}$  s rozlišením 4  $\text{cm}^{-1}$ . Ke zpracování spekter byl použit software Omnic.

#### 3.3.3 Nukleární magnetická rezonance (NMR)

NMR analýza v kapalně fázi byla provedena na 500 MHz zařízení (JEOL, Japonsko) při 25 °C. Chemické posuny ( $\delta$ ) jsou uvedeny v ppm a interakční konstanty ( $J$ ) v Hz. Chemické posuny  $^1\text{H}$  and  $^{13}\text{C}$  ve spektrech jsou vztaženy k referenčnímu signálu tetramethylsilanu s využitím tabelovaných signálů rozpouštědel HDO 4,66 ppm,  $\text{CHCl}_3$  7,26 ppm,  $\text{CHD}_2\text{OD}$  3,31 ppm, a  $\text{C}_6\text{HD}_5$  7,16 ppm u  $^1\text{H}$  spekter a  $\text{CDCl}_3$  77,16 ppm,  $\text{CD}_3\text{OD}$  49,00 ppm, a  $\text{C}_6\text{D}_6$  128,06 ppmu  $^{13}\text{C}$  spekter. K analýze struktur produktů syntéz byla provedena řada standardních NMR experimentů a interpretována spektra včetně 2D COSY, HSQC, HMBC, TOCSY, NOESY, ROESY, selektivních 1D NOESY, 1D TOCSY a selektivních homodekaplovaných  $^1\text{H}$  NMR spekter.

NMR analýza v pevné fázi (Solid-state NMR) byla provedena na 400 MHz přístroji (JEOL, Japonsko) při 25 °C. Všechna <sup>13</sup>C spektra byla měřena při 20kHz, jako reference byl použit  $\gamma$ -glycin (174,1 ppm). Relaxační časy a počet snímků byly zvoleny v závislosti na vzorku a typu experimentu.

### 3.3.4 Stanovení obsahu mědi pomocí hmotnostní spektrometrie s indukčně vázaným plazmatem (ICP-MS)

Pro stanovení zbytků mědi po funkcionalizaci byly vzorky připraveny následovně. Cyklodextrinové nanohouby byly suspendovány v koncentrované kyselině dusičné (4 ml), směs byla zahřívána v rozkladné mikrovlnném rozkladném systému Multiwave PRO (Anton Paar, Rakousko) při výkonu 900 W po dobu 45 min s maximální teplotou v systému 240 °C a maximálním tlaku 57,6 bar. Po vychladnutí byla rozložená směs zředěna deionizovanou vodou (50 ml). Takto připravené vzorky byly analyzovány pomocí ICP-MS (PerkinElmer NexION 300D, USA). Množství mědi ve vzorku je vztaženo na množství 1 g nanohub.

### 3.3.5 Měření velikosti částic (Dynamický rozptyl světla, DLS)

Dynamický rozptyl světla byl analyzován na přístroji Malvern Zetasizer Nano (Velká Británie). Velikost částic a polydisperzita byly měřeny při úhlu rozptylu 90°. Měření probíhala při laboratorní teplotě a byla provedena v triplikátu.

## ***3.4 In-vitro experimenty***

### 3.4.1 Kultivace buněčných kultur

Fibroblasty (3T3) a MCF-7 nádorové buňky byly kultivovány v médiu RPMI 1640 obohaceným o 10 % FBS a 1 % roztok penicilinu a streptomycinu. Buňky byly kultivovány v lahvičkách v inkubátoru při 37 °C a atmosférou s 5 % CO<sub>2</sub>. Médium bylo měněno každý druhý den.

### 3.4.2 Příprava suspenzí s obsahem resveratrolu

Suspenze pro *in vitro* testování účinnosti resveratrolu byly připraveny následovně. Do vodné suspenze nanohub byl přidán resveratrol v hmotnostním poměru 1:4 (resveratrol:NS). Suspenze byly míchány ve tmě při pokojové teplotě 30 min a před aplikací na buněčné kultury byly zfiltrvány přes stříkačkový filtr o velikosti pórů 0,45 µm.

### 3.4.3 MTT test buněčné viability

Ke zhodnocení buněčné viability byl použit test MTT (3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5-difenyltetrazolium bromid). Buňky byly inkubovány v 96-jamkové destičce a po dosažení 80% konfluence byly vystaveny testovaným materiálům. Po expozici, bylo kultivační médium odstraněno, buňky byly opláchnuty 1X fosfátovým pufrům (PBS) a nakonec bylo přidáno 100 µl bezsérového média obsahujícího roztok MTT o koncentraci 0,5 mg/ml. Následně byly buňky inkubovány po dobu 4 h při 37 °C, poté bylo médium odsáto, bylo přidáno 100 µl DMSO a buňky byly ponechány další 1 h při 37 °C. Buněčná viabilita byla vyhodnocena spektrofotometricky analyzátořem ELISA (Biotech, San Jose, CA, USA, software Gen5™). Absorbance byla měřena při vlnových délkách 560 nm (pozadí) a 630 nm. Jako reference bylo použito měření čistého DMSO. Po odečtení absorbance pozadí a rozpouštědla byla stanovena buněčná viabilita jako procentuální hodnota vztažená k hodnotám naměřeným u buněčné kontroly (jež nebyla vystavena testovaným materiálům). Výpočet viability můžeme vyjádřit vztahem:

$$\text{Buněčná viabilita [\%]} = \frac{A_{\text{testovaných buněk}} - A_{\text{rozpouštědla}}}{A_{\text{buněčné kontroly}} - A_{\text{rozpouštědla}}} \times 100$$

### 3.4.4 Internalizace materiálu do buněk

Internalizace fluorescenčně značených materiálů byla testována kvalitativně i kvantitativně na nádorové buněčné linii MCF-7 při koncentraci 500 µg/ml. Pro účely kvalitativní analýzy pomocí mikroskopie byly buňky nasazeny do 6-jamkové destičky v hustotě 5×10<sup>5</sup> buněk/jamku. Buňky byly inkubovány

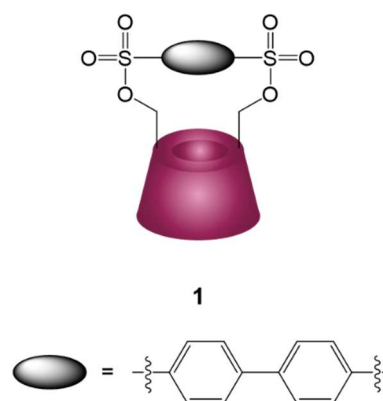
přes noc a následně vystaveny testovaným materiálům po dobu 24 h při 37 °C. Buňky byly pozorovány pomocí Cytation 5 Cell Imaging Multi-Mode Reader (San Jose, CA USA, Gen5™ software). Kvantitativně byl příjem částic studován pomocí průtokové cytometrie. Buňky byly nasazeny do 12-jamkové destičky o koncentraci  $2 \times 10^5$  buněk/jamku a inkubovány po dobu 24 h pro dosažení 80% konfluence. Poté byly buňky vystaveny testovaným materiálům po dobu 24 h při 37 °C. Nakonec byly buňky tripsinizovány, promyty PBS a analyzovány pomocí průtokového cytometru Fluorescence-activated Cell Sorting (FACS) caliber flow cytometer (BD Pharmingen™, BD Biosciences, USA).

### 3.5 Příprava prekurzorů pro lineární cyclodextrinové polymery

#### 3.5.1 Syntéza přemostěných cyclodextrinových prekurzorů

##### Přemostěný $\beta$ -CD (**1**)

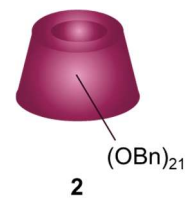
Syntéza přemostěných  $\beta$ -CD vycházela z dříve publikovaných prací Loa a kol.<sup>149</sup>, Dinga a kol.<sup>150</sup> a Tabushiho a kol.<sup>151</sup> V sušeném pyridinu (12 ml) byl rozpuštěn bezvodý  $\beta$ -CD (0,45 g; 0,4 mmol) při teplotě 50 °C. Za stálého míchání byl do roztoku v několika porcích přidán bifenyl-4,4'-disulfonylchlorid (0,14 g; 0,4 mmol) a směs byla míchána při 50 °C další 3 hodiny. Poté bylo rozpouštědlo slito, odpařeno za sníženého tlaku, surový produkt rozpuštěn ve vodě a nečistoty v podobě oligomerů a nezreagovaného  $\beta$ -CD byly vysráženy ve směsi acetonitrilu s vodou.



### 3.5.2 Syntéza cyklodextrinových prekurzorů – chránění benzylovými skupinami

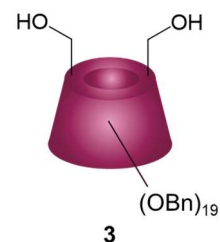
#### Per-O-benzyl- $\beta$ -cyklodextrin (**2**)

Perbenzylace  $\beta$ -CD byla provedena podle dříve publikovaného postupu<sup>38</sup> s drobnými modifikacemi. V bezvodém DMSO (140 ml) byl v inertní atmosféře smíchán bezvodý  $\beta$ -CD (8,60 g; 7,6 mmol) a hydrid sodný (11,10 g; 277,3 mmol). Následně byl do směsi během jedné hodiny přikapáván benzyl chlorid (31,30 ml; 272,2 mmol) a reakční směs byla dále míchána přes noc při laboratorní teplotě v inertní atmosféře. Reakce byla monitorována TLC (cyklohexan-EtOAc 3:1), dokud ve směsi nebyl detekován žádný nezreagovaný  $\beta$ -CD. Poté byla reakce ukončena opatrným přidáním methanolu (35 ml), směs byla zředěna vodou (200 ml) a produkt byl extrahován chloroformem (3  $\times$  200 ml). Organická fáze byla opláchnuta solankou (3  $\times$  200 ml), vysušena bezvodým MgSO<sub>4</sub> a odpařena. Surový produkt byl přečištěn na koloně (nejprve toluen, pak toluen-EtOAc 9:1) a byl získán produkt **2** ve formě pěny (21,77 g; 95 %). Spektrální data (HRMS a NMR) byla shodná s literaturou.<sup>38</sup>



#### Per-O-benzyl-6<sup>A,D</sup>-dihydroxy- $\beta$ -cyklodextrin (**3**)

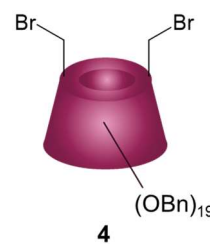
Selektivní debenzylace byla realizována podle postupu Lecourt a kol.<sup>38</sup> K perbenzylovanému CD **2** z předchozího kroku (21,64 g; 7,2 mmol) byl pomalu přikapáván pomocí lineárního dávkovače (CR pump ZS 100) DIBAL (72 ml; 107,2 mmol) v inertní atmosféře. Reakční směs byla míchána 48 h při 50 °C v inertní atmosféře. Nezreagovaný DIBAL byl hydrolyzován opatrným přikapáním vody při 0 °C. Produkt byl extrahován toluenem (2  $\times$  200 ml), organická fáze byla vysušena bezvodým MgSO<sub>4</sub> a odpařena. Surový produkt byl přečištěn na koloně (cyklohexan-EtOAc 5:1) a byl získán produkt **3** (11,35 g; 56 %) ve formě bílé pěny. Spektrální data (HRMS a NMR) byla shodná s literaturou.<sup>38</sup>





### Per-*O*-benzyl-6<sup>A,D</sup>-dibromo-β-cyklodextrin (**4**)

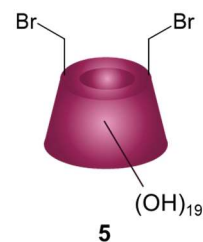
Pro syntézu per-*O*-benzyl-6<sup>A,D</sup>-dibromo-β-cyklodextrin byla použita metoda popsaná v literatuře<sup>37</sup> s drobnými modifikacemi. V bezvodém DMF (7 ml) byly v inertní atmosféře smíseny tetrabrommethan (1,05 g; 3,2 mmol) a trifenylfosfin (0,83 g; 3,2 mmol). Do směsi byl přidán selektivně debenzylovaný CD **3**



(1,49 g; 0,5 mmol) rozpuštěný v bezvodém DMF (3 ml). Reakční směs byla míchána při 60 °C přes noc. Poté byla reakce zastavena přidáním methanolu (10 ml), směs byla ochlazena na laboratorní teplotu a zředěna toluenem (150 ml). Organická fáze byla vytřepána s vodou (3 × 100 ml), vysušena bezvodým MgSO<sub>4</sub> a odpařena. Surový produkt byl přečištěn kolonovou chromatografií (toluen-EtOAc 50:1) a byl získán produkt **4** (1,09 g; 70 %) ve formě bílé pěny. HRMS: [M+2NH<sub>4</sub>]<sup>2+</sup> = 1503,8; pro C<sub>175</sub>H<sub>190</sub>Br<sub>2</sub>N<sub>2</sub>O<sub>33</sub><sup>2+</sup> vypočteno 1504,1. Spektrální data NMR byla shodná s literaturou.<sup>152</sup>

### 6<sup>A,D</sup>-dibromo-β-cyklodextrin (**5**)

Debenzylace byla provedena podle modifikovaného postupu uvedeného v literatuře<sup>37</sup>. V reakčním autoklávu byl ve směsi DMF a ethanolu (1:1, 120 ml) rozpuštěn cyclodextrin **4** (10,59 g; mmol) a roztok byl degasován v sonikační lázni. Do roztoku bylo přidáno palladium na uhlí (10% w/w; 1,03 g) a autokláv byl naplněn vodíkem. Směs byla míchána při 70 °C pod tlakem 8 bar. Průběh reakce byl monitorován TLC.



### 3.5.3 Syntéza oligoethylenových linkerů

#### Obecný postup syntézy α, ω-dipropargyl-ethylenglykolových linkerů

Syntéza byla provedena podle dříve publikovaného postupu<sup>153</sup> s drobnými modifikacemi. Ethylenglykol (tri-, nebo tetra-; 7,5 mmol) byl rozpuštěn v bezvodém THF (30 ml) v inertní atmosféře. Poté byl do roztoku přidán hydroxid sodný (1,36 g; 34,3 mmol) a propargyl bromid (3,6 ml; 33,6 mmol). Reakční směs byla přivedena k varu a refluxována 6 h. Průběh reakce byl

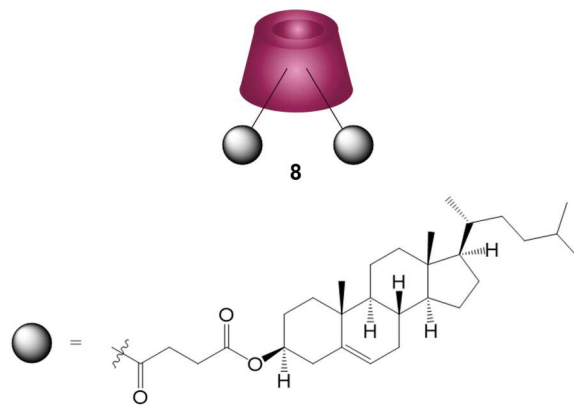


### 3.6 Syntéza cholesterolem funkcionalizovaných cyklodextrinových nanohub

#### 3.6.1 Syntéza cholesterolem funkcionalizovaného cyklodextrinu

Cholesteryl- $\beta$ -cyklodextrin (Chol- $\beta$ -CD; **8**)

V DMF (60 ml) byl rozpuštěn cholesterol hemisukcinát (1,72 g; 3,5 mmol), k němuž byly následně přidány DMAP (0,43 g; 3,5 mmol) a EDC hydrochlorid (1,01 g; 5,3 mmol). Nakonec byl do směsi přidán bezvodý  $\beta$ -CD (2,00 g; 1,8 mmol) a roztok byl



míchán 24 h při teplotě 45 °C. Poté byl roztok ochlazen na pokojovou teplotu, přesrážen ve vodě (600 ml), přefiltrován a opláchnut malým množstvím acetonu. Surový produkt ve formě prášku byl přečišťován acetonem v Soxhletově extraktoru po dobu 24 h. Finální produkt **8** byl získán ve formě bílého prášku (2,83 g, 78 %).  $^{13}\text{C}$  ss-NMR (100,52 MHz,)  $\delta$  172.68 (-COO-), 140.48 (C=C, cholesterol), 123.48 (C=C, cholesterol), 104.22 (C-1), 82.53 (C-4), 73.86 (C2, C-3, C-5), 61.37 (C-6), 58.02 (C-6 modifikovaný), 50.84 (cholesterol), 43.28 - 20.03 (cholesterol).

#### 3.6.2 Postup přípravy CDI nanohub funkcionalizovaných cholesterolem

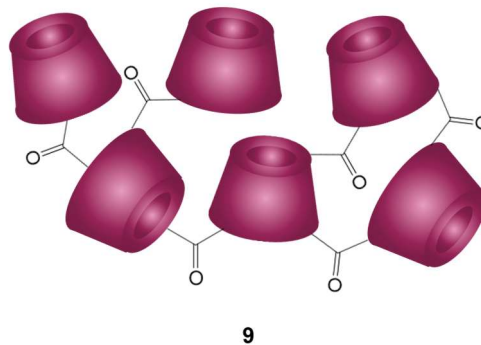
Obecná syntéza karbonylových (CDI) nanohub

Karbonylové nanohouby byly syntetizovány na základě metodiky uvedené v literatuře<sup>80</sup>. Bezvodý CD byl rozpuštěn v sušeném DMF (6 ml na 1 g CD), do směsi byl poté přidán CDI v molárním poměru 1:4 (CD/CDI). Reakční směs byla míchána přes noc při teplotě 90 °C. Ke zgelovatění došlo po několika hodinách. Gel byl podrcen v třecí misce, promyt vodou (500 ml) a acetonem (250 ml). Výsledné nanohouby získané ve formě bílého prášku byly promývány acetonem v Soxhletově extraktoru po dobu 24 h.

### Karboonylové nanohouby (CDI NS; **9**)

K přípravě kontrolního vzorku nanohub podle obecného postupu byl použit nativní bezvodý  $\beta$ -CD (20,0 g; 17,6 mmol). Ke zgelovatění došlo po cca 1 hodině. Produkt **9** byl získán ve formě nažloutlého prášku (25,02 g).

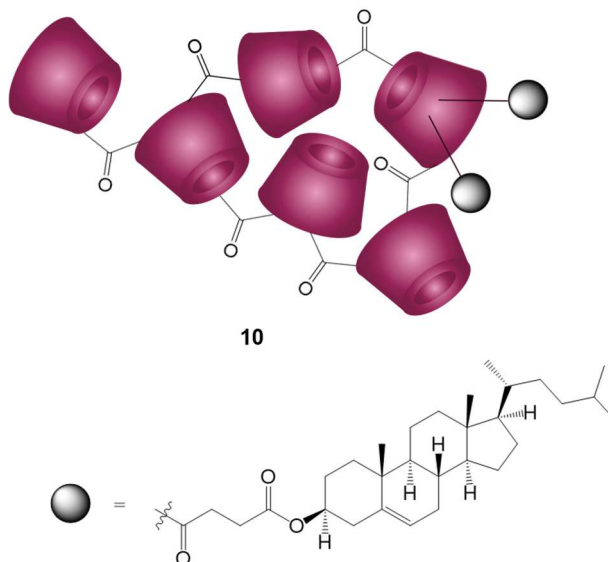
$^{13}\text{C}$  ss-NMR (100,52 MHz,)  $\delta$  149.54 (C=O), 96.71 (C-1), 75.87 (C-4), 66.72 (C-2, C-3, C-5), 54.90 (C-6).



### Cholesterolem funkcionalizované nanohouby 10% (Chol-NS 10%; **10**)

K přípravě cholesterolových nanohub podle obecného postupu byla použita směs bezvodého Chol- $\beta$ -CD **8** (0,40 g; 0,2 mmol) a  $\beta$ -CD (1,97 g; 1,7 mmol) v poměru 1:9 (Chol- $\beta$ -CD/ $\beta$ -CD). Ke zgelovatění došlo po cca 2 hodinách. Produkt **10** byl získán ve formě bílého prášku (2,69 g).

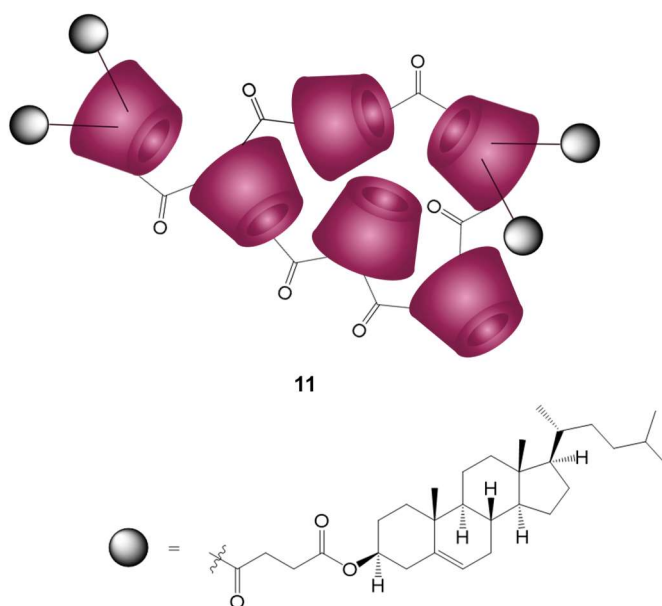
$^{13}\text{C}$  ss-NMR (100,52 MHz,)  $\delta$  145.26 (C=O), 125.16 (C=C, cholesterol), 92.13 (C-1), 71.23 (C-4), 62.29 (C-2, C-3, C-5), 50.21 (C-6), 32.96-20.29 (cholesterol).



### Cholesterolem funkcionalizované nanohouby 30% (Chol-NS 30%; **11**)

K přípravě cholesterolových nanohub podle obecného postupu byla použita směs bezvodého Chol- $\beta$ -CD **8** (1,20 g; 0,6 mmol) a  $\beta$ -CD (1,53 g; 1,4 mmol) v poměru 3:7 (Chol- $\beta$ -CD/ $\beta$ -CD).

Ke zgelovatění došlo po cca 7 hodinách. Produkt **11** byl získán ve formě bílého prášku (3,03 g).  $^{13}\text{C}$  ss-NMR (100,52 MHz,)  $\delta$  162.45 (-COO-), 144.65 (C=O), 124.60 (C=C, cholesterol), 91.73 (C-1), 71.02 (C-4), 62.03 (C-2, C-3, C-5), 49.87 (C-6), 31.74-15.37 (cholesterol).



#### 3.6.3 Příprava suspenzí cholesterolem modifikovaných nanohub

Nanohouby byly suspendovány v destilované vodě v koncentraci 1 mg/ml a míchány na magnetické míchače po dobu 1 h. Případné aglomeráty částic byly rozrušeny následnou homogenizací v sonikační lázni po dobu 15-20 min. Před aplikací na buněčné kultury byly suspenze filtrovány přes stříkačkový filtr s velikostí pórů 0,45  $\mu\text{m}$ .

#### 3.6.4 Fluorescenční značení pro experimenty *in vitro*

Testované materiály (0,5 g) byly suspendovány v DMSO (2 ml) při 45 °C po dobu 30 min. Poté byl do směsi přidán fluorescein (50 mg) a CDI (25 mg). Směs byla míchána 2 h při 45 °C. Produkt byl pětikrát promyt acetonem kvůli odstranění zbytků DMF a fluoresceinu.

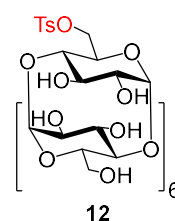
### 3.7 Syntéza manosou funkcionalizovaných CD nanohub

#### 3.7.1 Syntéza cyclodextrinových prekurzorů

##### 6<sup>A</sup>-O-toluensulfonyl-β-cyklodextrin (TsO-β-CD; **12**)

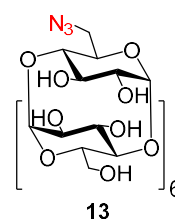
Tosylanhydrid byl připraven podle publikovaného postupu<sup>155</sup>. V dichlormethanu (250 ml) byl smíchán tosyl chlorid (40 g) s monohydrátem kyseliny *p*-toluensulfonové (10 g). Směs byla míchána přes noc při pokojové teplotě, poté byla zfiltrována a rozpouštědlo z filtrátu bylo odpařeno.

Získaný anhydrid byl použit pro tosylyaci β-CD<sup>155</sup>. V baňce byl připraven roztok β-CD (23,01 g; 20,3 mmol) ve vodě (500 ml), ke kterému byl přidán tosylanhydrid (9,97 g; 30,4 mmol). Směs byla míchána 2 h při pokojové teplotě a poté do ní byl přidán roztok hydroxidu sodného (10,21 g ve 100 ml vody). Roztok byl míchán dalších 10 minut, poté byl přefiltrován, filtrát byl neutralizován kyselinou chlorovodíkovou a přes noc uložen v lednici. Produkt byl získán filtrací a několikrát rekrystalizován z 50% methanolu. Čistý produkt **12** měl podobu bílého prášku (4,91 g; 19 %). Spektrální data (HRMS a NMR) byla shodná s literaturou.<sup>156</sup>



##### 6<sup>A</sup>-azido-6<sup>A</sup>-deoxy-β-cyklodextrin (N<sub>3</sub>-β-CD; **13**)

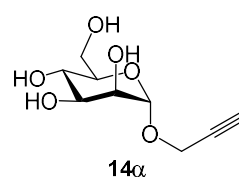
Syntéza azidového derivátu byla provedena dle postupu uvedeného v literatuře<sup>157</sup>. Do roztoku **12** (5,20 g; 4,0 mmol) ve vodě (53 ml) byl při teplotě 80 °C přidán azid sodný (1,32 g; 20,3 mmol). Směs byla míchána při stejné teplotě další 4 h. Poté byl roztok vysrážen v acetonu (320 ml) a sraženina byla zfiltrována a vysušena. Za účelem přečištění byl surový produkt rozpuštěn ve vodě (10 ml/g produktu), přesrážen v 6násobném množství acetonu, zfiltrován a vysušen. Finální produkt **13** byl získán v podobě bílého prášku (4,30 g, 92 %). Spektrální data (HRMS a NMR) byla shodná s literaturou.<sup>156</sup>



### 3.7.2 Přímá syntéza propargylované manosy

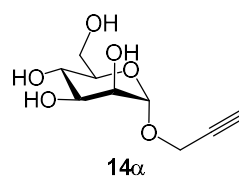
1-*O*-propargyl-D-manopyranosid (**14**) – syntéza katalyzovaná kyselinou chlorovodíkovou

Přímá syntéza byla provedena podle metodiky popsané v práci Richards a kol.<sup>122</sup> V baňce byla smíchána D-manosa (0,30 g; 1,67 mmol) s propargyl alkoholem (3 ml; 86,9 mmol). Do směsi byla přidána HCl (0,15 ml; 0,45 mmol) a směs byla míchána přes noc při pokojové teplotě. Rozpouštědlo bylo z reakční směsi odpařeno za sníženého tlaku a produkty byly chromatograficky separovány na koloně (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>-MeOH 9:1). Z chromatografie byly získány 2 frakce ve formě žluté medovité látky, frakce A (107,1 mg; 18 %) a frakce B (47 mg; 8 %), detailní složení jednotlivých frakcí je uvedeno v diskusi (kapitola 4.3.1). HRMS: [M + Na]<sup>+</sup> = 241,067; pro C<sub>9</sub>H<sub>14</sub>NaO<sub>6</sub><sup>+</sup> vypočteno 241,068.



1-*O*-propargyl-D-manopyranosid (**14**) – syntéza katalyzovaná kyselinou sírovou

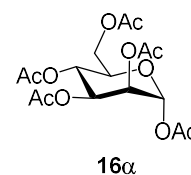
Přímá syntéza katalyzovaná kyselinou sírovou byla provedena podle publikovaného postupu od Roye a Mukhopadhyae.<sup>123</sup> Do suspenze D-manosy (0,3 g; 1,67 mmol) v propargyl alkoholu (480 μl; 8,33 mmol) byla přidána kyselina sírová imobilizovaná na silikagelu (8,8 mg). Směs byla míchána 2 h při 65 °C a poté byl produkt izolován kolonovou chromatografií, při které byl jako mobilní fáze použit nejprve CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> pro odstranění nezreagovaného propargyl alkoholu a poté směs CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>-MeOH (15:1). Produkt byl získán ve formě bílé pevné látky (133,4 mg; 37 %; směs anomerů s výtěžky 26 % pro **14α**, 8 % pro **14β**, 2 % pro **15α** a 1 % pro **15β**). Data všech produktů získaná NMR analýzou jsou uvedena v příloze A.



### 3.7.3 Tříkroková syntéza propargylované manosy

#### *Per-O-acetyl-manopyranosa (16)*

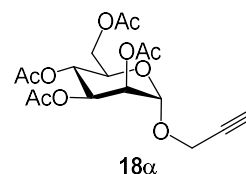
První krok syntézy spočíval v acetylaci manosy upraveným postupem od Zhao a kol.<sup>158</sup> D-manosa (5,0 g; 27,8 mmol) byla rozpuštěna v pyridinu (40 ml) a následně byl po kapkách při 0 °C přidán acetanhydrid (26 ml; 275 mmol). Směs byla pomalu ohřáta na pokojovou teplotu a míchána přes noc. Roztok byl zředěn ethylacetátem (30 ml), poté extrahován 3,6% kyselinou chlorovodíkovou (5 × 10 ml) a nakonec opláchnut solankou (2 × 15 ml). Spojené organické fáze byly separovány, vysušeny bezvodým MgSO<sub>4</sub>, zfiltrovány a odpařeny na vakuové odparce. Surový produkt byl přečištěn pomocí kolonové chromatografie (hexan-EtOAc 1:1) a produkt byl získán ve formě viskózní kapaliny (8,32 g, 77 %; směs anomerů: 66 %  $\alpha$ -pyranosa **16 $\alpha$** , 10 %  $\beta$ -pyranosa **16 $\beta$** , 1 %  $\alpha$ -furanosa **17 $\alpha$** , 0,1 %  $\beta$ -furanosa **17 $\beta$** ). HRMS: [M+Na]<sup>+</sup> = 413,103; vypočteno pro C<sub>16</sub>H<sub>22</sub>NaO<sub>11</sub><sup>+</sup> 413,105; [2M+Na]<sup>+</sup>: 803,219; vypočteno pro C<sub>32</sub>H<sub>44</sub>NaO<sub>22</sub><sup>+</sup> 803,222. <sup>1</sup>H NMR  $\alpha$ -pyranosy **16 $\alpha$**  (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>):  $\delta$  = 6.06 (dd, *J* = 2.0, 0.7 Hz, 1H), 5.32 (m, 1H), 5.32 (m, 1H), 5.23 (m, 1H), 4.25 (dd, *J* = 12.4, 4.9 Hz, 1H), 4.08 (dd, *J* = 12.4, 2.5 Hz, 1H), 4.03 (m, 1H), 2.15 (s, 3H), 2.14 (s, 3H), 2.07 (s, 3H), 2.03 (s, 3H), 1.98 (s, 3H); <sup>13</sup>C NMR  $\alpha$ -pyranosy **16 $\alpha$**  (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>):  $\delta$  = 170.72, 170.07, 169.82, 169.62, 168.15, 90.69, 70.69, 68.83, 68.42, 65.63, 62.19, 20.92, 20.82, 20.77, 20.72, 20.70. Data všech produktů získaná NMR analýzou jsou uvedena v příloze A.





### *prop-2-yn-1-yl-2,3,4,6-tetra-O-acetyl-D-manopyranosid (18)*

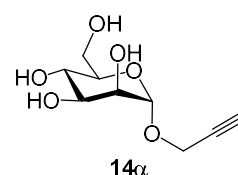
Druhý krok syntézy byl proveden podle dříve publikovaného postupu.<sup>159</sup> Peracetylovaná manosa **16** (8,32 g; 21,3 mmol; směs anomerů) byla v inertní atmosféře rozpuštěna v bezvodém CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (80 ml). Poté byl přidán propargylalkohol (6,20 ml; 107,6 mmol) a roztok byl ochlazen na 0 °C. Ke směsi byl pomalu přikapán BF<sub>3</sub>·OEt<sub>2</sub> (13,20 ml; 107,2 mmol), roztok byl pomalu přiveden na pokojovou teplotu a míchán 24 h. Následně byl roztok naředěn CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (100 ml) a nalit do ledové vody (150 ml). Organická fáze byla separována, promyta nasyceným roztokem NaHCO<sub>3</sub> (3 × 200 ml), poté vodou (200 ml) a nakonec vysušena bezvodým Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>. Surový produkt byl přečištěn pomocí kolonové chromatografie (hexan-EtOAc 2:1) a finální produkt **18α** byl získán ve formě bílých krystalů (5,82 g; 71 %). Kromě produktu **18α** byly izolovány i další frakce obsahující směs anomerů, celkový výtěžek po započítání ostatních frakcí byl 5,95 g. Spektrální data produktu **18α** odpovídala literatuře.<sup>159</sup> Data všech produktů získaná NMR analýzou jsou uvedena v příloze A.



### *1-O-propargyl-α-D-manopyranosid (14α)*

Třetí krok syntézy byl také proveden dle literatury.<sup>159</sup>

Propynyl-tetra-O-acetyl-manopyranosid **18α** (5,76 g; 14,9 mmol) byl rozpuštěn ve směsi bezvodého CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (10 ml) a bezvodého methanolu (40 ml) v inertní atmosféře.



Do reakční směsi byl přikapáván 1M methanolát sodný v methanolu (2,6 ml). Směs byla míchána v inertní atmosféře 24 h při laboratorní teplotě. Následně byla reakční směs neutralizována pomocí iontoměniče DOWEX ve formě H<sup>+</sup>, zfiltrována a koncentrována *in vacuo*. Surový produkt byl čištěn pomocí kolonové chromatografie (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>-MeOH 6:1), ze které byl získán čistý produkt **14α** ve formě bílých krystalů (2,71 g; 83 %). HRMS: [M + Na]<sup>+</sup> = 241,067; pro C<sub>9</sub>H<sub>14</sub>NaO<sub>6</sub><sup>+</sup> vypočteno 241,068. FTIR ν: 3269 cm<sup>-1</sup> (C≡C-H), 2120 cm<sup>-1</sup> (C≡C). <sup>1</sup>H NMR α-pyranosy **14α** (500 MHz, D<sub>2</sub>O): δ = 4.93 (dm, *J* = 1.8 Hz, 1H), 4.25 (dd, *J* = 15.9, 2.4 Hz, 1H), 4.21 (dd, *J* = 15.9, 2.4 Hz, 1H), 3.85 (ddd, *J* = 3.5, 1.8, 0.3 Hz, 1H), 3.78 (dd, *J* = 12.3, 1.9 Hz, 1H), 3.69 (ddd, *J* = 9.5, 3.5, 0.4 Hz, 1H),

3.66 (dd,  $J = 12.3, 5.6$  Hz, 1H), 3.58 (t,  $J = 9.8$  Hz, 1H), 3.56 (m, 1H), 2.82 (t,  $J = 2.5$  Hz, 1H);  $^{13}\text{C}$  NMR  $\alpha$ -pyranosy (500 MHz,  $\text{D}_2\text{O}$ ):  $\delta = 98.80, 78.87, 76.21, 73.17, 70.50, 69.98, 66.66, 60.86, 54.60$ .

### 3.7.4 Postup přípravy CDI nanohub funkcionalizovaných manosou

#### Obecná syntéza karbonylových (CDI) nanohub

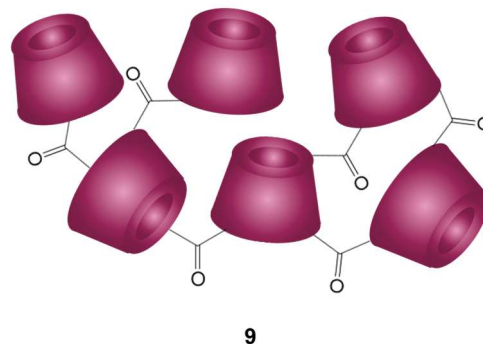
Karbonylové nanohouby byly syntetizovány na základě metodiky uvedené v literatuře<sup>80</sup>. Bezvodý CD byl rozpuštěn v sušeném DMF (6 ml na 1 g CD), do směsi byl poté přidán CDI v molárním poměru 1:4 (CD/CDI). Reakční směs byla míchána přes noc při teplotě 90 °C. Ke zgelovatění došlo po několika hodinách. Gel byl podrcen v třecí misce, promyt vodou (500 ml) a acetonem (250 ml). Výsledné nanohouby získané ve formě bílého prášku byly promývány acetonem v Soxhletově extraktoru po dobu 24 h.

#### Karbonylové nanohouby (CDI NS; **9**)

K přípravě kontrolního vzorku nanohub podle obecného postupu byl použit nativní bezvodý  $\beta$ -CD (20,0 g; 17,6 mmol). Ke zgelovatění došlo po cca 1 hodině. Produkt **9** byl získán ve formě nažloutlého prášku

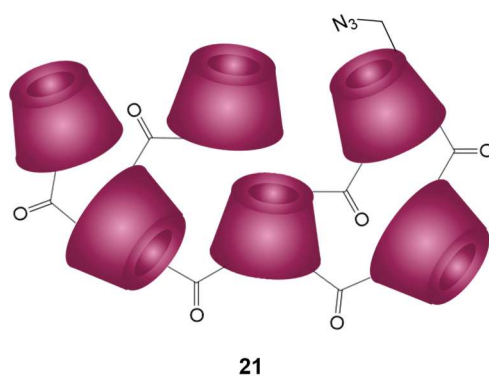
(25,02 g).

$^{13}\text{C}$  ss-NMR (100,52 MHz,)  $\delta$  149.54 (C=O), 96.71 (C-1), 75.87 (C-4), 66.72 (C-2, C-3, C-5), 54.90 (C-6).



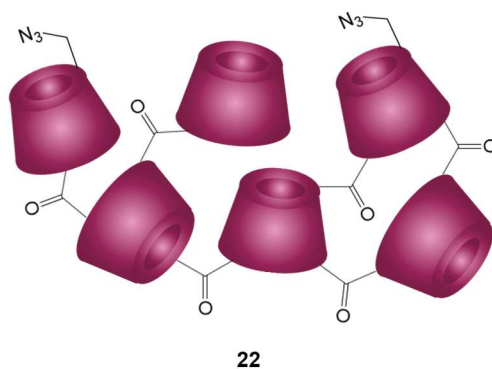
### Azidové nanohouby 10% (N<sub>3</sub>-NS 10%; **21**)

K přípravě azidových nanohub podle obecného postupu byla použita směs bezvodého N<sub>3</sub>-β-CD **13** (0,55 g; 0,5 mmol) a β-CD (4,85 g; 4,2 mmol) v poměru 1:9 (N<sub>3</sub>-β-CD/β-CD). Ke zgelovatění došlo po cca 10 hodinách. Produkt **21** byl získán ve formě nažloutlého prášku (6,41 g). <sup>13</sup>C ss-NMR (100,52 MHz,) δ 157.16 (C=O), 104.10 (C-1), 83.61 (C-4), 74.37 (C-2, C-3, C-5), 62.64 (C-6).



### Azidové nanohouby 50% (N<sub>3</sub>-NS 50%; **22**)

K přípravě azidových nanohub podle obecného postupu uvedeného v kap. 3.6.2 byla použita směs bezvodého N<sub>3</sub>-β-CD **13** (2,50 g; 2,2 mmol) a β-CD (2,44 g; 2,2 mmol) v poměru 1:1 (N<sub>3</sub>-β-CD/β-CD). Ke zgelovatění došlo po cca 10 hodinách. Produkt **22** byl získán ve formě nažloutlého prášku (5,49 g). <sup>13</sup>C ss-NMR (100,52 MHz,) δ 155.65 (C=O), 102.39 (C-1), 81.73 (C-4), 72.49 (C-2, C-3, C-5), 61.00 (C-6).



### Obecný postup funkcionalizace azidových nanohub manosou

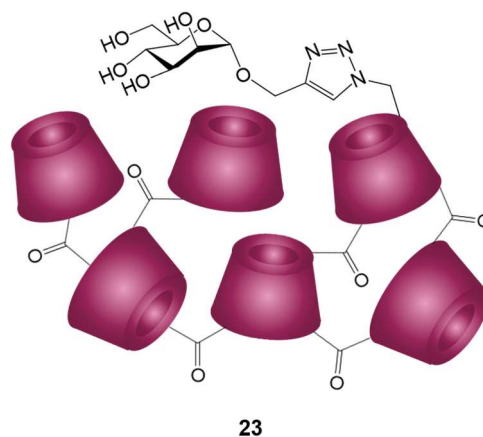
Postup funkcionalizace CD nanohub byl proveden obdobně jako v dostupné literatuře<sup>13</sup>. Množství reaktantů a katalyzátoru bylo vztaheno k množství N<sub>3</sub>-β-CD obsaženého v nanohoubách. V DMF byl rozpuštěn propargyl-α-D-mannopyranosid (7,5 ekv.). Ve dvouhrdlé baňce byl v inertní atmosféře ve vodě (20 ml) smíchán síran měďnatý (1 ekv.) s askorbátem sodným (2 ekv.) a s N<sub>3</sub>-NS. Následně byl do suspenze po kapkách přidáván propargyl-α-D-mannopyranosid v DMF. Suspenze byla míchána při 60 °C po dobu 45 h, poté byla zfiltrována a

nerozpustné nanohouby byly promyty vodou a acetonem. Zbytky katalyzátorů byly odstraněny za použití chelačního činidla. Nanohouby byly přidány do vodného roztoku Na<sub>2</sub>EDTA (c = 10 mg/ml), míchány 2 hodiny při pokojové teplotě, suspenze byla zfiltrována. Tento postup byl opakován, dokud se roztok barvil do modra v důsledku přítomnosti měďnatých iontů. Dále byly nanohouby promývány vodou v Soxhletově extraktoru po dobu 16 h a usušeny.

#### Manosou funkcionalizované nanohouby 10% (Man-NS 10%; **23**)

K funkcionalizaci azidových nanohub podle obecného postupu byly použity azidové nanohouby N<sub>3</sub>-NS 10% (6,01 g) a propargyl- $\alpha$ -D-mannopyranosid (0,78 g; 3,6 mmol) v DMF (15 ml). Produkt **23** byl získán ve formě nažloutlého prášku (6,80 g).

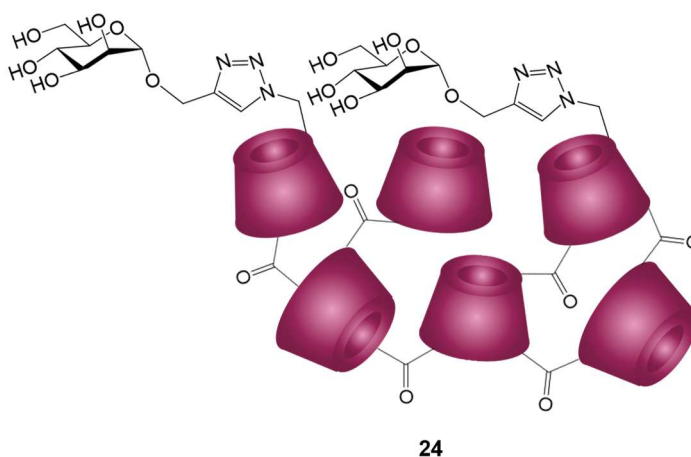
<sup>13</sup>C ss-NMR (100,52 MHz,)  $\delta$  157.28 (C=O), 104.22 (C-1), 83.70 (C-4), 74.48 (C-2, C-3, C-5), 62.87 (C-6).



#### Manosou funkcionalizované nanohouby 50% (Man-NS 50%; **24**)

K funkcionalizaci azidových nanohub podle obecného postupu byly použity azidové nanohouby N<sub>3</sub>-NS 50% (5,21 g) a propargyl- $\alpha$ -D-mannopyranosid (3,55 g; 16,3 mmol) v DMF (15 ml). Produkt byl získán ve formě nažloutlého prášku (6,47 g).

<sup>13</sup>C ss-NMR (100,52 MHz,)  $\delta$  157.77 (C=O), 146.67 (triazol), 130.51 (triazol), 104.68 (C-1), 84.27 (C-4), 74.93 (C-2, C-3, C-5), 63.50 (C-6), 54.21.



### 3.7.5 Příprava suspenzí manosou modifikovaných nanohub

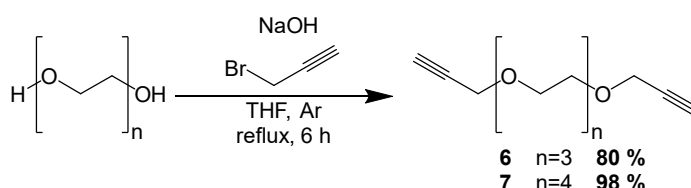
Nanohouby byly mlety ve formě vodné suspenze (5 g nanohub ve 300 ml vody) v laboratorním mlýnu MiniCer (Netzsch, Indie) po dobu 120 min při 3000 rpm a poté lyofilizovány. Pro přípravu suspenzí byly dispergovány nanohouby ve vodě v koncentraci 0,5 mg/ml a směs byla homogenizována přístrojem Ultra-Turrax® T18 digital (IKA, Německo) po dobu 10 min při 24000 rpm. Na závěr byly suspenze filtrovány přes stříkačkový filtr o velikosti pórů 0,45  $\mu\text{m}$ .

## 4 Výsledky a diskuse

### 4.1 Lineární cyklodextrinové polymery

Výhodou lineárních cyklodextrinových polymerů je jejich jasně definovaná struktura se snadnou reprodukovatelností, obzvláště pokud vznikly ze selektivně substituovaných cyklodextrinů. Lineární polymery je možné také zpracovat např. do podoby vláken. K vytvoření lineárního polymeru bylo potřeba syntetizovat selektivně substituované CD a jejich lineární spojky.

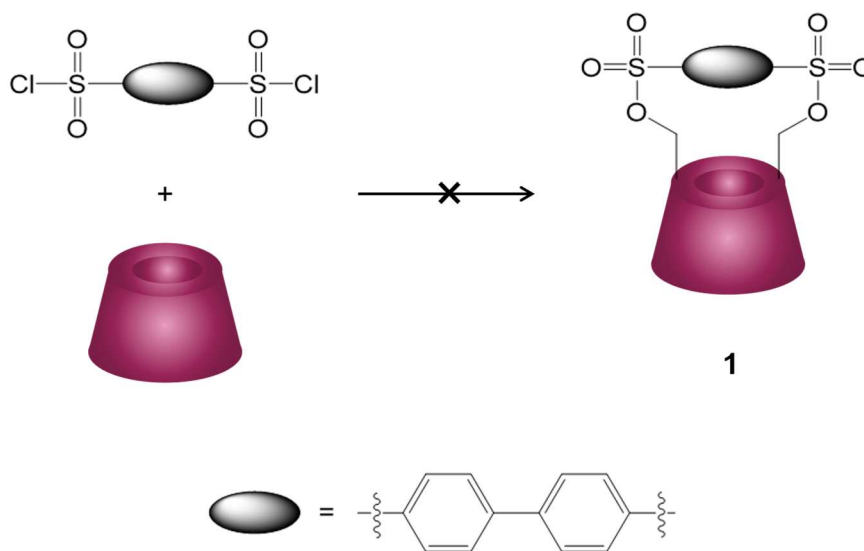
Jako složka spojující jednotky CD byly zvoleny oligoethylglykoly, a sice tri- a tetraethylglykol. Vzhledem k jednoduchosti reakce a její vysoké selektivitě bylo k vazbě mezi polymerními jednotkami cílem využít „click reakci“ alkynu a azidu, bylo tedy nutné syntetizovat vhodné deriváty jednotlivých složek. Deriváty  $\alpha$ ,  $\omega$ -dipropargyl-ethylglykolových linkerů byly připraveny podle dříve publikovaného postupu<sup>153</sup> (schéma 6) s uspokojivými výtěžky 80 %, resp. 98 %. Chemické posuny získané z NMR spekter odpovídaly údajům v literatuře a výsledky MS korespondovaly s teoretickými hodnotami.



**Schéma 6:** Schéma přípravy dipropargyl-ethylglykolových linkerů.

K vytvoření selektivně substituovaných CD byly vyzkoušeny dvě různé metody: přemostěním CD snadno odstupující difunkční skupinou a syntéza s využitím benzylových chránících skupin. Přemostěné CD byly připravovány metodou publikovanou v literatuře<sup>149–151</sup> (schéma 7). Původní metodikou ani jejími modifikacemi zahrnujícími změnu rozpouštědla nebo báze, různé intenzity sušení výchozích látek a rozpouštědel, změnu reakční teploty a času se nepodařilo dosáhnout publikovaného výtěžku a čistoty. Reakce vedly ke vzniku směsi produktů s nízkým výtěžkem, jelikož většina vstupního CD zreagovala do podoby nerozpustných oligomerů, jež se usadily na povrchu baňky. Výtěžek byl poté ještě snížen ztrátami během separace a čištění. Přemostěný  $\beta$ -CD se ukázal jako velmi nestabilní látka, která se snadno rozkládá při kontaktu s vlhkostí a během

průchodu kolonou při chromatografii, jeho syntéza je náročná na kvalitu použitých chemikálií a způsob provedení a zároveň poskytuje velmi nízké výtěžky. Z tohoto důvodu byla metoda přemostění CD vyhodnocena jako nevhodná pro účely této disertační práce. Výsledky této metody přípravy přemostěných CD publikované v literatuře se různí. Výtěžky reakce dosahují hodnot od 15-20 % (Liu a kol.<sup>160</sup>, Lo a kol.<sup>149</sup>, Tabushi a kol.<sup>151</sup>) až po 80 % (Ding a kol.<sup>150</sup>). Příčiny nízkých výtěžků ani další možné problémy této reakce však přímo diskutovány nejsou. Chena Tichá se ve své disertační práci<sup>161</sup> mj. zabývá přemostěnými CD a zmiňuje problematiku a omezení této metody, zejména v souvislosti se selektivitou přemostění, obtížností separace produktů a náchylností přemostěných CD k hydrolýze.



**Schéma 7:** Příprava přemostěného  $\beta$ -CD. V originální metodice dle Tabushiho<sup>151</sup> je reakce prováděna v pyridinu při 50 °C a ukončena po 3 h.

Druhou variantou přípravy selektivně disubstituovaných CD bylo použití benzylových chránících skupin (schéma 8). Tato metoda je časově náročnější a vyžaduje chromatografické čištění jednotlivých meziproduktů, nicméně perbenzylace a následné použití DIBAL-H vede k velmi selektivnímu procesu přípravy 6<sup>A</sup>,6<sup>D</sup>-diolu se snadno reprodukovatelnými výsledky. Kromě syntézy diolů lze DIBAL-H použít též k odstranění jedné benzylové skupiny<sup>162</sup> nebo v několika krocích při přípravě selektivně multifunkcionalizovaných CD<sup>163</sup>.

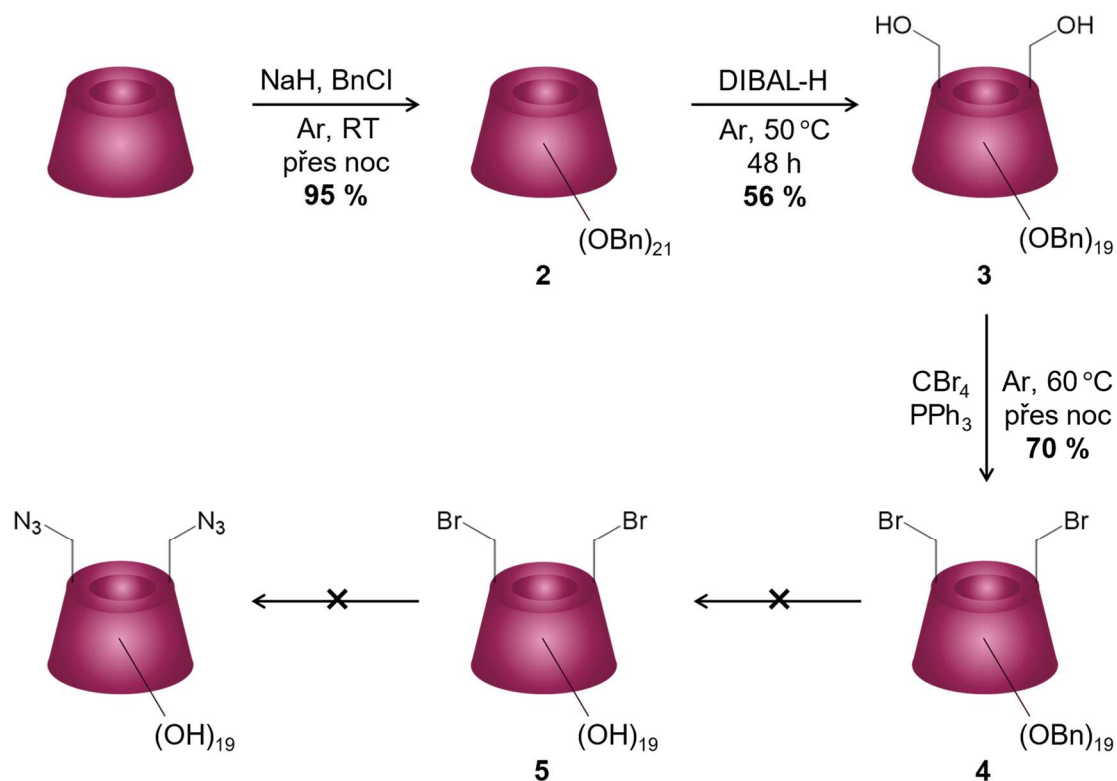
V prvním kroku přípravy selektivně disubstituovaného  $\beta$ -CD byly na všechny hydroxylové skupiny  $\beta$ -CD navázány benzylové funkční skupiny, které bylo

možné ve druhém kroku selektivně odstranit na pozicích 6<sup>A</sup> a 6<sup>D</sup> pomocí DIBAL-H v toluenu.<sup>38</sup> Oba kroky byly bez potíží reprodukovatelné podle postupu uvedeného v literatuře s velmi uspokojivými výtěžky 95 % pro produkt **2** a 56 % pro produkt **3**. Oba produkty byly analyzovány MS a NMR a získaná data se shodovala s údaji v literatuře. Během selektivní debenzylace se ukázalo, že jedním ze zásadních faktorů ovlivňujících průběh reakce a vznik mono-, či diolu je dávkování DIBAL-H do reakční směsi. Při rovnoměrném pomalém přikapávání pomocí lineárního dávkovače byla v porovnání s průběžným ručním přidáváním spotřeba hydridu výrazně nižší (zhruba poloviční) a reakční doba kratší při dosažení stejných výsledků, a sice maximálního možného výtěžku diolu. V literatuře byl již dříve diskutován vliv reakčních podmínek na selektivitu procesu debenzylace a množství vedlejších produktů, především vliv teploty a parametrů roztoku DIBAL-H, jako je jeho koncentrace a použité rozpouštědlo.<sup>37,162</sup> Vliv dávkování hydridu mezi nimi dle mého nejlepšího vědomí diskutován není.

Ve třetím kroku<sup>37</sup> byly volné hydroxylové skupiny substituovány bromem podle postupu popsáno v literatuře. Po čištění na koloně byl produkt **4** získán s výtěžkem 70 %. Cílem následujícího kroku bylo odstranění chránících skupin z cyklodextrinu, tedy získání dibromo- $\beta$ -CD **5**. V původní práci byla reakce popsána na  $\alpha$ -CD, v této disertační práci byl stejný postup aplikován na  $\beta$ -CD a průběh reakce byl monitorován TLC. Výsledkem experimentů však byla směs produktů v různém stupni debenzylace, a to jak při aplikování původního pracovního postupu, tak jeho modifikací (použití různých zdrojů vodíku, a sice z balonku, přímo z tlakové lahve, či reakce v autoklávu při tlaku 8 bar; modifikace reakční teploty a času; změna katalyzátoru). Grishina a kol.<sup>152</sup> diskutují vliv rozpouštědlového systému na průběh reakce. V rozpouštědlovém systému THF/voda pozorovali autoři článku debrominaci modifikovaného  $\beta$ -CD probíhající zároveň s jeho debenzylací. Rozpouštědlový systém DMF/EtOH, jenž byl použit v této disertační práci, se jim však osvědčil a získali dibromo- $\beta$ -CD s uspokojivým výtěžkem i čistotou. Dalšími parametry, které mohly mít za následek neúspěch experimentů, je použití příliš nízkého tlaku během reakce (Kumprecht a kol.<sup>37</sup> stejně jako Grishina a kol.<sup>152</sup> použili pro syntézu tlak 40 bar) a kvalita použitých katalyzátorů. Právě výběr katalyzátoru má na průběh hydrogenolýzy zásadní vliv. Velikost částic, rovnoměrnost distribuce na



uhlíkovém substrátu, stejně jako množství a forma obsaženého palladia výrazně ovlivňují efektivitu katalýzy a hrají tak klíčovou roli v úspěšnosti syntézy.<sup>164</sup> Jelikož se nepodařilo ani přes veškeré úsilí získat kýžený produkt **5**, byl tento způsob přípravy  $\beta$ -CD prekurzorů také vyhodnocen jako nevhodný.



**Schéma 8:** Pětikroková příprava selektivně disubstituovaného  $\beta$ -CD.

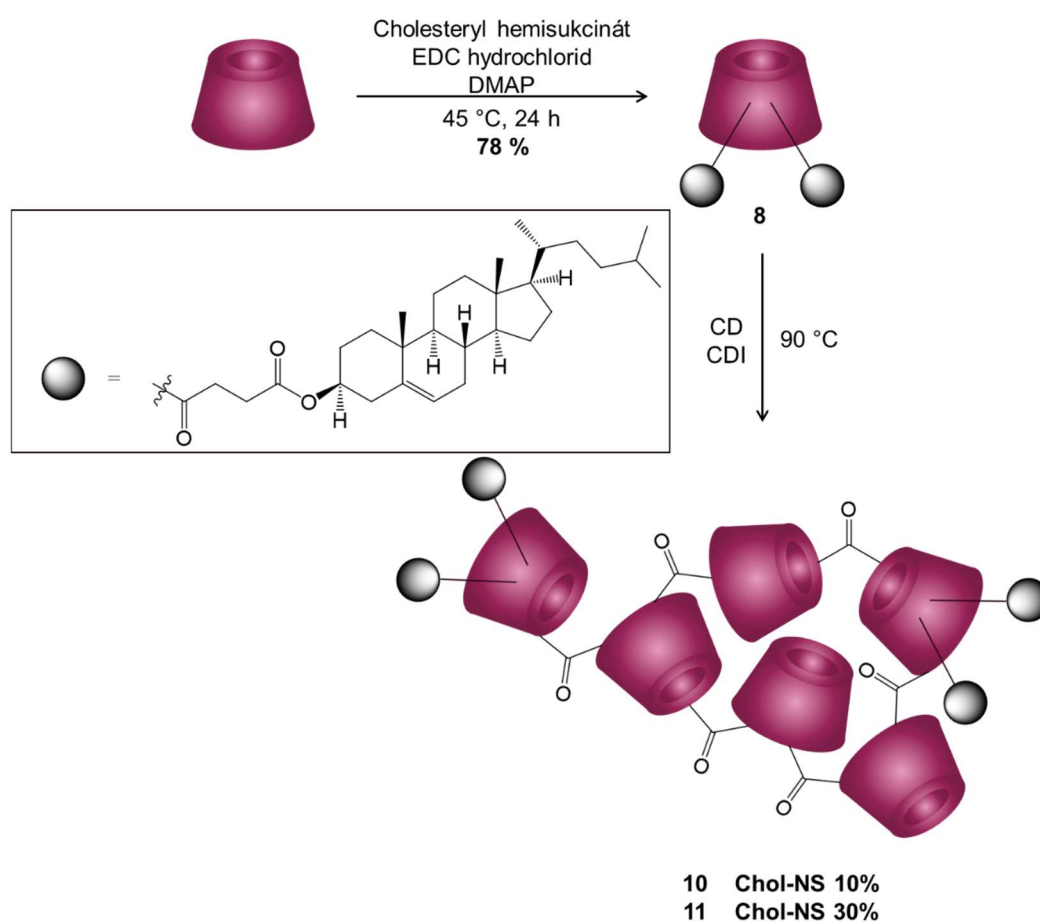
I přes výhody, jako je definovaná struktura, přesná reprodukovatelnost a možnost zvláknění, byly takovéto lineární polymery shledány nevhodnými pro praktické použití v medicíně. Důvodem byla především náročnost přípravy selektivně substituovaných cyklodextrinů, jež by sloužily jako prekurzory pro přípravu těchto polymerů. Další práce byla proto zaměřena na náhodně spojené síťované polymery, a sice tzv. cyklodextrinové nanohouby. Ty byly již dříve studovány jako potenciální nosiče léčiv, jejich funkcionalizace má za cíl přidat nanohoubám nové vlastnosti zvyšující efektivitu dopravy a účinnost inkorporované aktivní látky.

## 4.2 Cyklodextrinové nanohouby funkcionalizované cholesterolem

V rámci této disertační práce byly připraveny cyklodextrinové nanohouby funkcionalizované cholesterolem s potenciální aplikací jako nosiče terapeutik pro léčbu rakoviny.

### 4.2.1 Syntéza modifikovaných cholesterolových nanohub

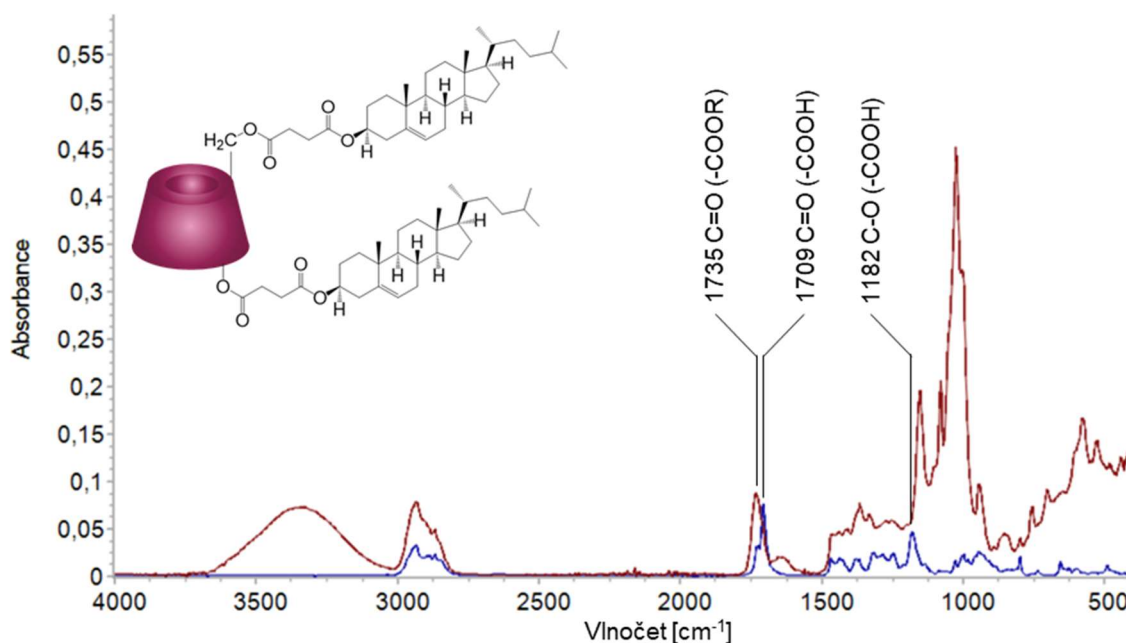
Cholesterolem modifikované CD nanohouby byly připraveny síťováním funkcionalizovaného Chol- $\beta$ -CD **8** (schéma 9).



**Schéma 9:** Příprava karbonylových nanohub funkcionalizovaných cholesterolem.

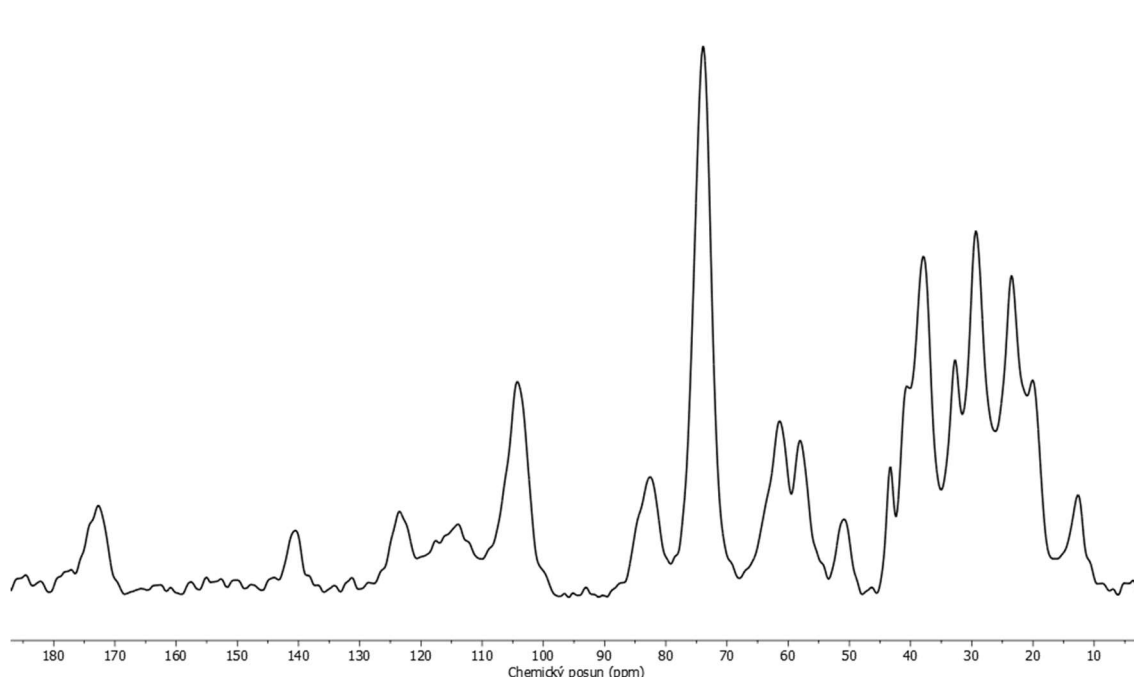
Modifikovaný CD (**8**) byl syntetizován postupem, který je popsán v literatuře pro postfunkcionalizaci CD nanohub.<sup>65</sup> Produkt byl analyzován pomocí FTIR a NMR v kapalně i pevné fázi. Na základě výsledků byl kvantifikován obsah cholesterolu ve struktuře. Analýza FTIR ukázala posun signálu karboxylové kyseliny z oblasti 1709  $\text{cm}^{-1}$  na 1734  $\text{cm}^{-1}$ , což lze přisuzovat vzniku esterové vazby mezi cholesterolem hemisukcinátem a CD. NMR analýza produktu **8** byla nejprve

provedena v kapaln  formě. Během měření však docházelo k problémům pravd podobn  zp soben m vznikem asociátů. Ty se nepodařilo odstranit i přesto, že byly NMR experimenty realizovány v různých podmínkách lišícími se rozpou t delov m systémem, zředit m vzorku i teplotou. Kvůli komplikacím při měření a interpretaci spekter bylo přikročeno k analýze v pevn  fázi.



**Obrázek 10:** FTIR spektrum Chol- -CD (**8**; hn d ) a cholesteryl hemisukcin tu (modr ). Reakcí hemisukcin tu s CD došlo ke změně signálu hemisukcin tu v oblasti 1709 cm<sup>-1</sup>, což lze přisoudit zm n  karboxylov  kyseliny na esterovou skupinu. Cholesterol je na CD navázán n hodn , obrázek ilustruje možné vazby.

Pro kvantifikaci cholesterolu ve struktuře ze získaného <sup>13</sup>C ss-NMR spektra (obrazek 11) posloužil signál C1 z CD, jehož integrál byl porovnán se signály 15 uhlíků cholesterolu s chemick m posunem mezi 20-40 ppm. Výsledky ss-NMR derivátu **8** ukázaly, že na ka d y CD se navázaly 2 cholesterolov  skupiny, což odpov d  poměru reaktantů během syntézy. Stupněm substituce CD při funkcionalizaci cholesterolem se zab v j v sv  práci Shaikh a kol., kteří jako maxim ln  dosažiteln  stupeň substituce určili 3 a sami v experiment ln  části dosáhli stupně substituce 2.<sup>165</sup>

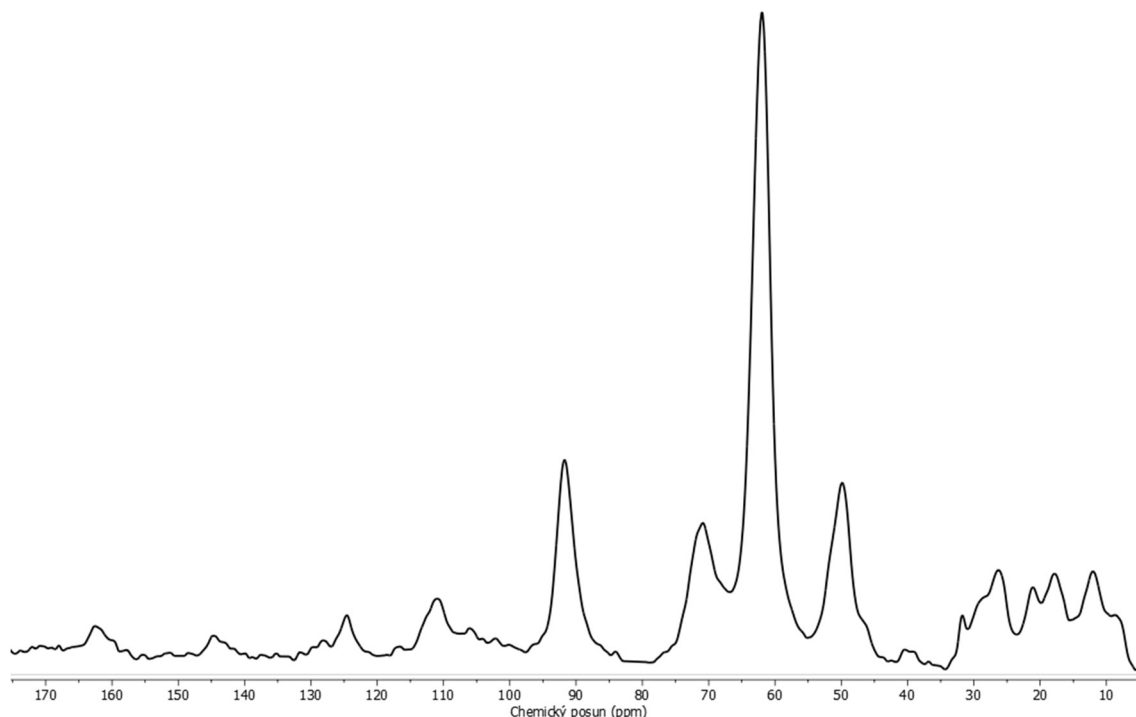


**Obrázek 11:**  $^{13}\text{C}$  ss-NMR spektrum Chol- $\beta$ -CD (**8**).

Ačkoli je postmodifikace použitá v literatuře<sup>65</sup> rychlá a snadná, její nevýhodou je nemožnost kontroly nad průběhem modifikace a počtem navázaných funkčních skupin. Naproti tomu použitím funkcionalizovaného CD jako prekurzoru bylo možné kontrolovat obsah cholesterolu ve výsledném materiálu a posoudit vliv množství funkčních skupin na biologickou odezvu.

Cholesterolový derivát CD byl síťován ve formě směsi s nativním  $\beta$ -CD v poměru 1:9 (Chol-NS 10%; **10**) a 3:7 (Chol-NS 30%; **11**) a byl sledován vliv funkčních skupin a jejich množství na vlastnosti a chování při biologických experimentech. Ukázalo se, že přítomnost cholesterolu zásadně ovlivnila schopnost síťování, jelikož s rostoucím podílem derivátu **8** ve směsi CD se měnily vlastnosti vzniklého gelu a doba gelace. Při podílu derivátu **8** vyšším než 30 % ke gelaci vůbec nedošlo. Analýzou ss-NMR bylo zjištěno, že ve struktuře **10** připadá 1 cholesteryl na

každých 7,3 CD, zatímco ve struktuře **11** (obrázek 12) je to 1 cholesteryl na každých 1,5 CD.



**Obrázek 12:**  $^{13}\text{C}$  ss-NMR spektrum Chol-NS 30% (**11**).

Ze syntetizovaných cholesterolových nanohub byly připraveny vodné suspenze, u nichž byla ověřena velikost polymerních částic DLS analýzou (tabulka 1) a dále byly materiály podrobeny experimentům *in vitro*.

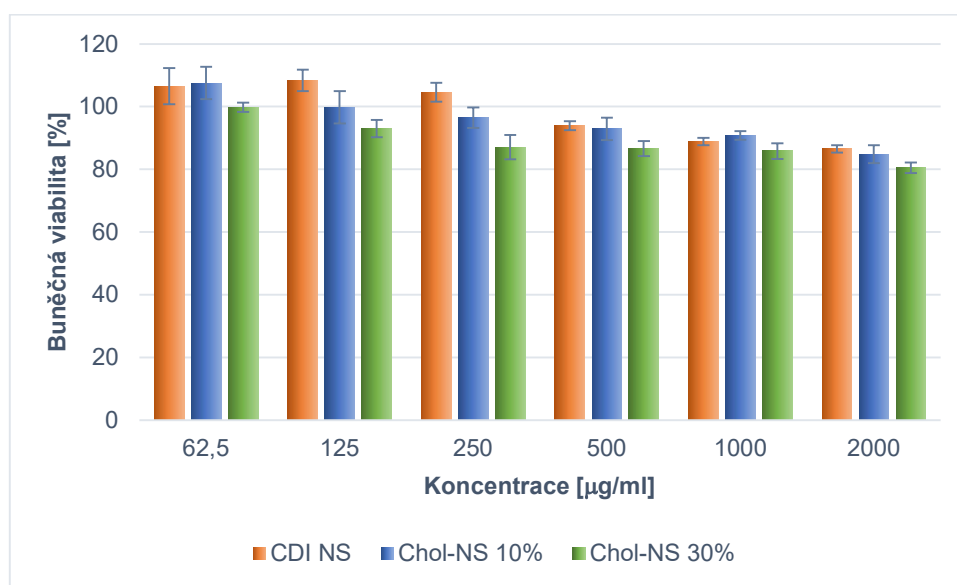
**Tabulka 1:** Výsledky DLS analýzy velikosti částic připravených suspenzí nanohub funkcionalizovaných cholesterolem.

	<b>Velikost částic [nm]</b>
Chol-NS 10% ( <b>10</b> )	194,8 ± 2,9
Chol-NS 30% ( <b>11</b> )	167,9 ± 18,2
CDI NS ( <b>9</b> )	211,2 ± 6,0

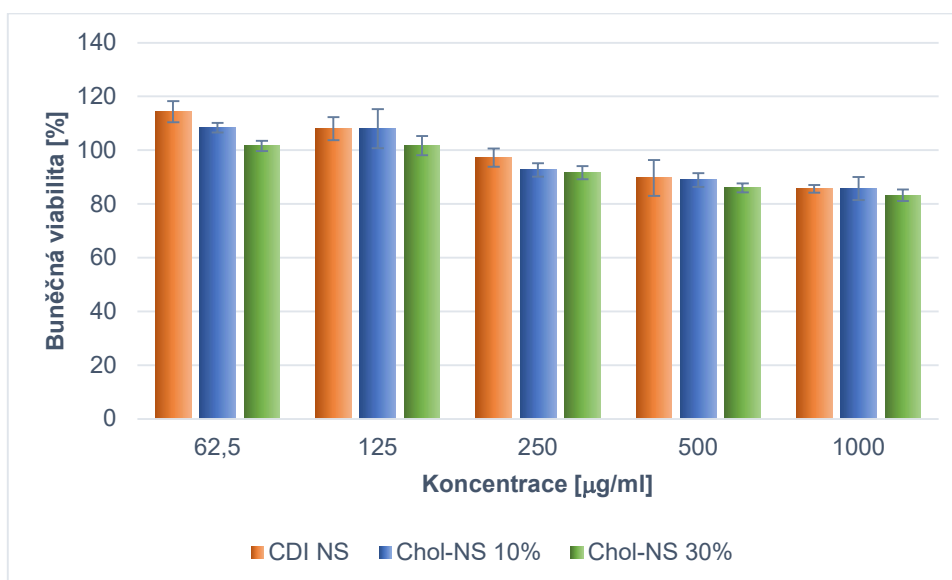
#### 4.2.2 *In vitro* experimenty

Cytotoxicita materiálů byla zkoumána na dvou buněčných liniích – fibroblastech a nádorové linii MCF-7. Při experimentech monitorujících buněčnou viabilitu

byly mezi sebou porovnávány účinky suspenzí dvou typů cholesterolových nanohub – Chol-NS 10% (**10**) a Chol-NS 30% (**11**) s nefunkcionalizovanými karbonylovými nanohoubami (CDI NS; **9**) jako referenčním materiálem, a to v různých koncentracích až do koncentrace 2 mg/ml vůči fibroblastům (graf 1) a do koncentrace 1 mg/ml vůči nádorovým buňkám (graf 2). Toxicita byla ověřena také u cholesterolem modifikovaného Chol- $\beta$ -CD **8** (výsledky *in vitro* experimentů zaměřených na Chol- $\beta$ -CD jsou uvedeny v příloze B). U žádného z testovaných materiálů aplikovaných v daných koncentracích neklesla viabilita buněk pod 80 %. V literatuře byly cholesterolové nanohouby testovány též na buněčné linii HeLa (lidské epiteliální nádorové buňky) vůči které ukázaly NS zanedbatelnou toxicitu i při maximální testované koncentraci 100  $\mu$ g/ml.<sup>65</sup> Na základě výše uvedených výsledků korespondujícími se závěry Singha a kol.<sup>65</sup> lze usoudit, že cholesterolem funkcionalizované cyklodextrinové nanohouby jsou v testovaných koncentracích biokompatibilní.

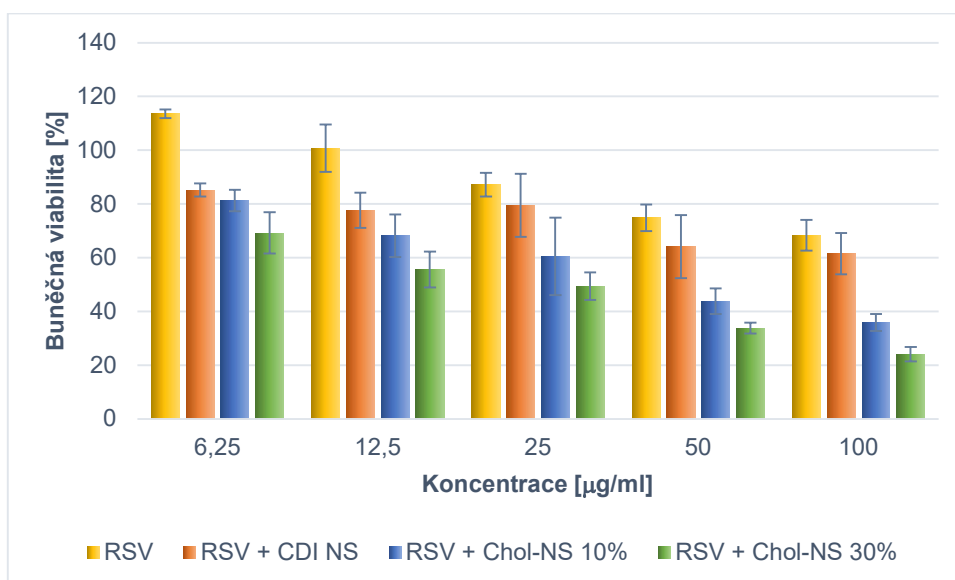


**Graf 1:** Výsledky MTT testu buněčné viability po kontaktu 3T3 fibroblastů se suspenzemi nanohub ukázaly, že toxicita nanohub vůči fibroblastům je velmi nízká.



**Graf 2:** Výsledky MTT testu buněčné viability nádorových buněk MCF-7 po expozici cyklodextrinovým nanohoubám funkcionalizovaným cholesterolem.

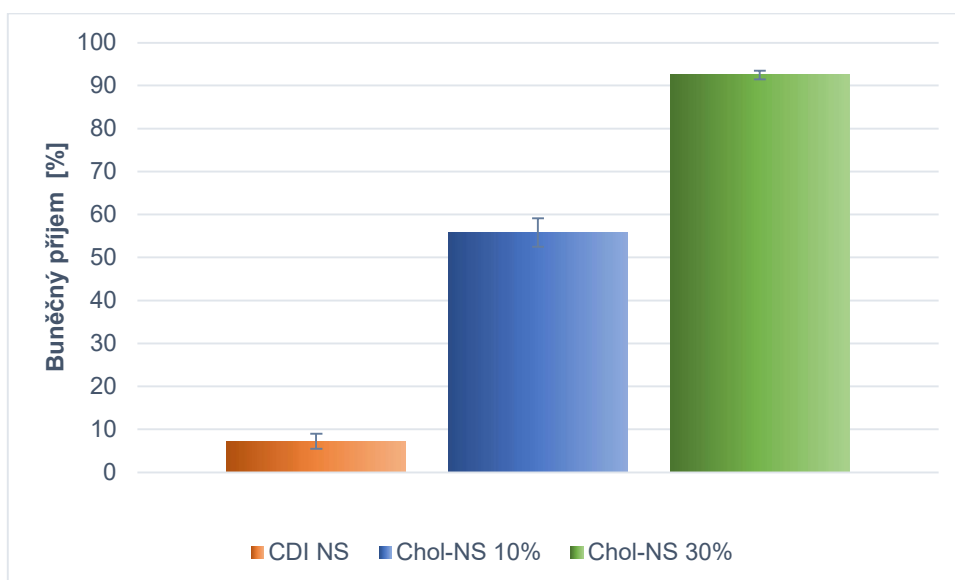
Životaschopnost buněk byla po kontaktu se všemi materiály v daných koncentracích vyšší než 80 %. Jako modelová látka inkorporovaná do nosičů byl zvolen resveratrol (RSV), přírodní antioxidant s popsány protizánětlivými, protimutagenními a protirakovinnými účinky. Problémem použití resveratrolu je jeho fotosenzitivita a špatná rozpustnost ve vodě, s čímž se pojí i jeho nízká biologická dostupnost.<sup>166,167</sup> Inkorporace resveratrolu do CD nanohub a její vliv na stabilitu a účinnost tohoto potenciálního léčiva byl již dříve popsán v literatuře.<sup>168</sup> Naše výsledky ukázaly, že vhodnou funkcionalizací nosiče lze tento efekt výrazně posílit. Při kontaktu buněčné linie MCF-7 se suspenzí cholesterolem modifikovaných nanohub s resveratrolem (RSV + Chol-NS) se prudce zvýšil jeho toxický účinek vůči nádorovým buňkám (graf 3), tedy jeho účinnost. Zatímco životaschopnost buněk při kontaktu s resveratrolem při koncentraci 25 µg/ml byla vyšší než 80 %, v přítomnosti RSV + Chol-NS 30% (**11**) klesla viabilita pod 50 %. Při vystavení suspenzi RSV + Chol-NS 30% odpovídající koncentraci účinné látky 100 µg/ml byla životaschopnost buněk dokonce nižší než 25 % oproti téměř 70% viabilitě při kontaktu s volným RSV o stejné koncentraci. Výsledky také ukázaly, že funkcionalizace cholesterolem má na účinnost RSV výrazný vliv a rozdíl v efektivitě mezi modifikovanými a nemodifikovanými nanohoubami se dále zvyšoval s rostoucí koncentrací RSV, resp. suspenze. Nárůst účinnosti terapie může být také způsoben snazší internalizací nosiče s účinnou látkou do buněk způsobené obsahem cholesterolu ve struktuře.<sup>167</sup>



**Graf 3:** Buněčná viabilita MCF-7 nádorové buněčné linie vystavené suspenzím RSV + Chol-NS v porovnání s účinkem suspenze nefunkcionalizovaných nanohub s RSV a volného RSV. Synergií RSV a nanohub v suspenzi vzrostla jeho schopnost inhibice nádorových buněk až 2,8 x v závislosti na aplikované koncentraci a na typu nosiče.

Z výsledků průtokové cytometrie provedené na buňkách MCF-7 vyplynulo, že funkcionalizace cholesterolem má na transport do buněk zásadní vliv (graf 4). Díky modifikaci se zvýšil příjem částic buňkou ze 7 % u nemodifikovaných nanohub **9** až na 92 % u nanohub **11**. Zvýšený buněčný příjem cholesterolem modifikovaných materiálů byl již dříve popsán např. u funkcionalizovaných nanohub aplikovaných na buněčnou linii HeLa<sup>65</sup> a také u poly(amidoaminových) nanočástic<sup>169</sup> použitých jako nosič genů do MCF-7 nádorových buněk. Ve druhém případě byl dokonce popsán vliv obsahu cholesterolu na internalizaci, jelikož autoři studovali rozdíly mezi materiály se 14 % - 87 % navázaného cholesterolu a obdobně jako v této disertační práci pozorovali zvýšení prostupu částic do buněk v závislosti na rostoucím obsahu cholesterolu ve struktuře.





**Graf 4:** Kvantifikace příjmu cyklodextrinových nanohub funkcionalizovaných cholesterolem nádorovými buňkami MCF-7 pomocí průtokové cytometrie.

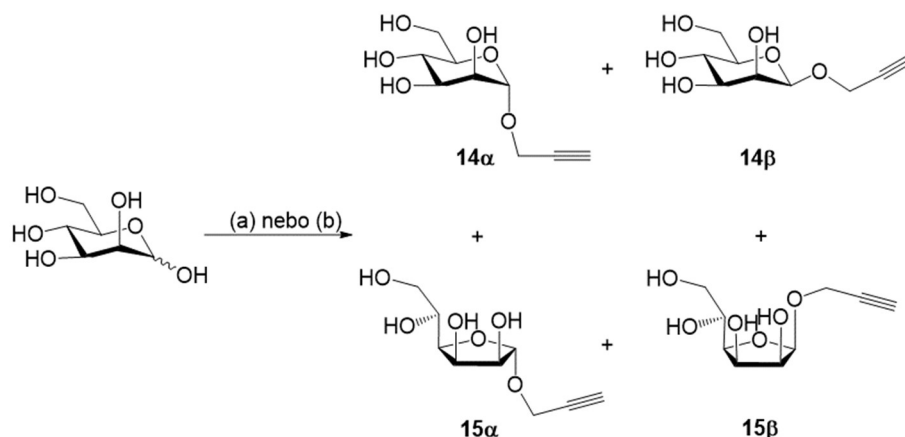
### ***4.3 Cyklodextrinové nanohouby funkcionalizované manosou***

V oblasti cílené dopravy léčiv se manosou funkcionalizované nosiče používají pro dopravu terapeutik do buněk produkujících manosové receptory, jako jsou makrofágy nebo nádorové buňky.<sup>116,117</sup> V této práci byla manosa kovalentně navázána na cyklodextrinové nanohouby, aby byl vytvořen nosič pro cílenou dopravu léčiv. Pro funkcionalizaci nanohub byla využita metoda „click“ cykloadice alkynu a azidu.

#### **4.3.1 Syntéza propargyl- $\alpha$ -D-mannopyranosidu**

Aby bylo možné kovalentně navázat manosu na nanohouby, bylo potřeba syntetizovat vhodný manosový derivát. V literatuře lze dohledat několik variant přípravy propargyl- $\alpha$ -D-mannopyranosidu, mezi něž patří přímá syntéza katalyzovaná kyselinou chlorovodíkovou<sup>122</sup> (schéma 10a), přímá syntéza katalyzovaná kyselinou sírovou imobilizovanou na silikagelu<sup>123</sup> (schéma 10b) a tříkroková syntéza využívající chránících skupin<sup>159</sup> (schéma 11, schéma 12 a schéma 13). V rámci této disertační práce byly vyzkoušeny všechny 3 přístupy a jejich produkty byly analyzovány NMR a MS. Podrobnou analýzou produktů nukleární magnetickou spektroskopií bylo možné odhalit, že se jednotlivé

postupy přípravy liší hlavně selektivitou procesu. Forma manosy použitá pro funkcionalizaci nosiče léčiv však může mít zásadní vliv na jeho funkci.<sup>129</sup>



**Schéma 10:** Jednokroková syntéza propargyl-manosidů. Postupy přípravy uvedené v literatuře: (a) propargyl alkohol, HCl, RT, přes noc<sup>122</sup>; (b) propargyl alkohol, H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> na silika gelu, 65 °C, 2 h<sup>123</sup>.

Analýzy ukázaly, že přímou syntézou katalyzovanou HCl provedenou podle postupu publikovaného Richards a kol.<sup>122</sup> byla připravena směs produktů ve formě propargyl- $\alpha$ -D-mannopyranosidu (**14 $\alpha$** ), propargyl- $\beta$ -D-mannopyranosidu (**14 $\beta$** ), propargyl- $\alpha$ -manofuranosidu (**15 $\alpha$** ) a propargyl- $\beta$ -manofuranosidu (**15 $\beta$** ) v poměru 28:12:51:9, s procentuálními výtěžky 7 % **14 $\alpha$** , 3 % **14 $\beta$** , 13 % **15 $\alpha$** , and 2 % **15 $\beta$**  vypočtenými na základě vstupního množství manosy. Jednotlivé produkty se nepodařilo řádně oddělit ani při důkladném čištění na koloně, podařilo se získat pouze dvě frakce, jejichž složení je uvedeno v tabulce 2. Kvůli nízké selektivitě reakce a obtížné separaci produktů byla tato metoda vyhodnocena pro naše účely funkcionalizace nanohub jako nevhodná, ačkoli Richards a kol. použili ve své práci produkt syntézy bez dalšího čištění.

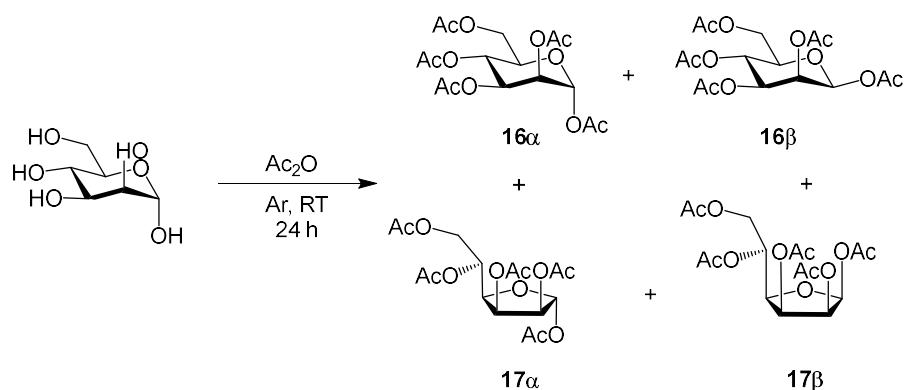
**Tabulka 2:** Přehled procentuálních výtěžků v jednotlivých separovaných frakcích a celkový výtěžek propargyl-manosidů.

Isomer	Výtěžek ve frakci A [%]	Výtěžek ve frakci B [%]	Výtěžek v kombinovaných frakcích A+B [%]
<b>14<math>\alpha</math></b>	4,0	3,0	7,0
<b>14<math>\beta</math></b>	0,6	2,5	3,1
<b>15<math>\alpha</math></b>	12,3	0,5	12,8
<b>15<math>\beta</math></b>	0,6	1,7	2,3
<b>Celkový výtěžek</b>	17,5	7,7	25,2

Druhou variantou přímé syntézy propargyl- $\alpha$ -D-mannopyranosidu byla reakce katalyzovaná  $H_2SO_4$  imobilizovanou na silikagelu<sup>123</sup>, která je v literatuře užívána častěji než předchozí alternativa a výtěžky uvedené jednotlivými autory se pohybují v intervalu 30-90 %.<sup>123-128</sup> Na rozdíl od výsledků uvedených v literatuře, které popisují tvorbu propargyl- $\alpha$ -D-manopyranosidu (**14 $\alpha$** ) a zřídka též vedlejšího produktu v podobě propargyl- $\beta$ -D-manopyranosidu (**14 $\beta$** )<sup>125,128</sup>, v našem případě byla pozorována rozmanitější směs produktů. Je nutné též poznamenat, že v literatuře byly často analyzovány produkty této reakce po jejich následné acetylaci, zatímco v našem případě nebyly produkty před analýzou kromě čištění dále upravovány. Ze spekter NMR bylo možné identifikovat směs pyranosidů **14 $\alpha$**  a **14 $\beta$**  a furanosidů **15 $\alpha$**  a **15 $\beta$**  vyskytující se v molárním poměru 712:209:57:22 a s vypočtenými výtěžky 26 % pro **14 $\alpha$** , 8 % pro **14 $\beta$** , 2 % pro **15 $\alpha$**  a 1 % pro **15 $\beta$** .

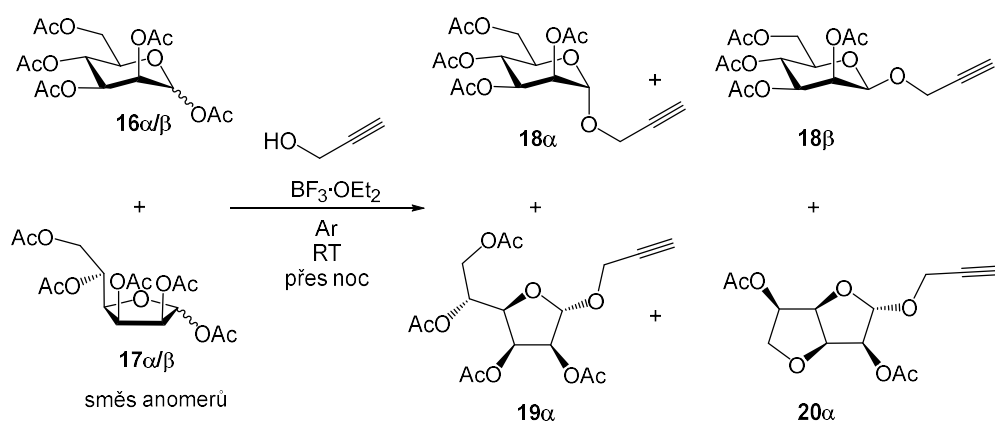
Vzhledem k výsledkům přímých syntéz, byla nakonec zvolena metoda tříkrokové syntézy. Cílem prvního kroku provedeného dle publikovaného postupu<sup>158</sup> bylo získat per-*O*-acetyl- $\alpha$ -D-manopyranosid, jenž byl skutečně majoritním produktem reakce (Schéma 11). Kromě **16 $\alpha$**  se podařilo analýzou NMR identifikovat vedlejší produkty ve formě  $\beta$ -pyranosidu **16 $\beta$**  a stopová množství furanosidů **17 $\alpha$** , **17 $\beta$**  v poměru 860:129:10:1, což odpovídá výtěžkům 66 % pro **16 $\alpha$** , 10 % pro **16 $\beta$** , 1 % pro **17 $\alpha$**  a 0,1 % pro **17 $\beta$** . Tvorba per-*O*-acetyl- $\beta$ -

manopyranosidu byla již dříve v literatuře popsána, nebyla však kvantifikována.<sup>158,170</sup>



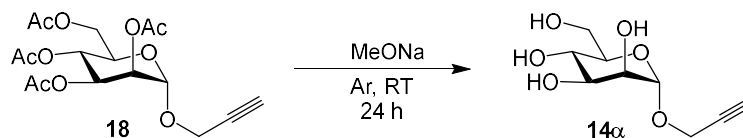
**Schéma 11:** První krok tříkrokové syntézy propargyl- $\alpha$ -D-manopyranosidu vedl ke vzniku 4 produktů.

V druhém kroku bylo cílem vytvořit acetylovaný propynyl- $\alpha$ -D-manopyranosid (schéma 12). Jelikož nebylo možné dokonale separovat produkty prvního kroku, byla jako výchozí látka použita směs anomerů. Ačkoli byl v literatuře popsán vznik pouze jednoho produktu<sup>159,171</sup>, reakcí vznikla směs látek **18 $\alpha$** , **18 $\beta$** , propargyl-tetraacetyl- $\alpha$ -furanosy (**19 $\alpha$** ) a propargyl-anhydromanosy (**20 $\alpha$** ), jejíž struktura byla identifikována na základě NOE experimentů a podobností s údaji v literatuře<sup>172</sup>. Podle výsledků NMR analýzy byl poměr anomerů 9803:149:32:7, což odpovídá výtěžkům 82 % pro **18 $\alpha$**  (na základě množství **16 $\alpha$** ), 8 % pro **18 $\beta$**  (vztaženo k **16 $\beta$** ), 23 % pro **19 $\alpha$**  (vztaženo k **17 $\alpha$** ) a 5 % pro **20 $\alpha$**  (vztaženo k **17 $\alpha$** ). Produkty bylo možné separovat celkem do 3 frakcí, přičemž jedna obsahovala čistý produkt **18 $\alpha$** , jenž byl použit pro další krok syntézy.



**Schéma 12:** Druhý krok syntézy vedl ke tvorbě směsi propargyl-tetraacetyl-manopyranosy ve formě  $\alpha$ - i  $\beta$ -, propargyl-tetraacetyl- $\alpha$ -furanosy a propargyl-anhydromanosy.

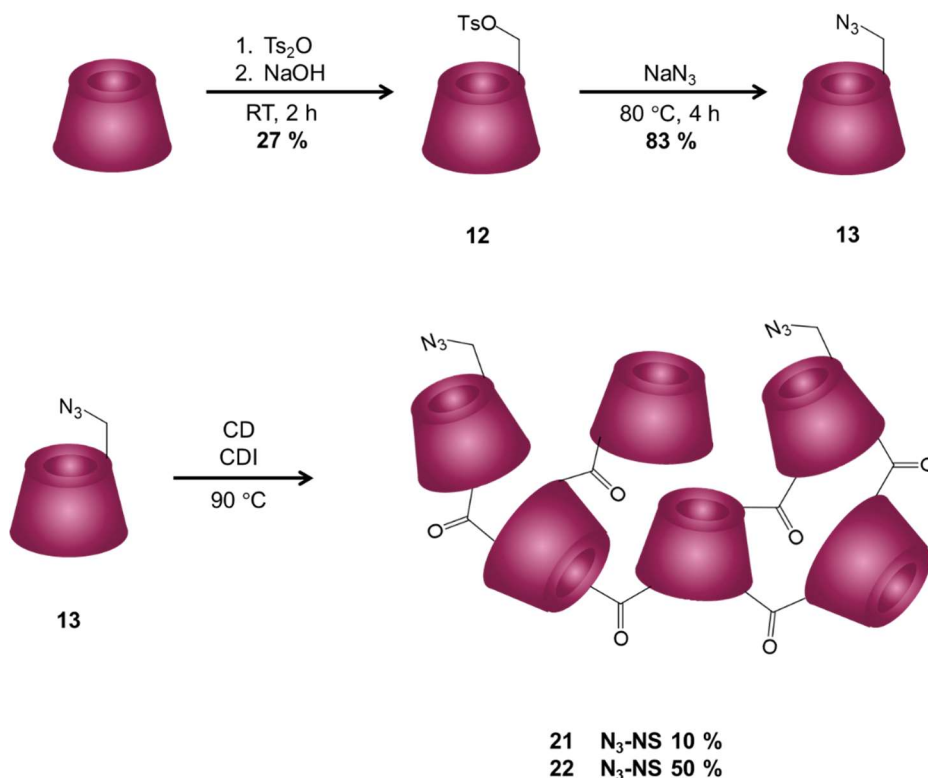
V závěrečném kroku<sup>159</sup> (schéma 13) bylo cílem odstranění chránících acetylových skupin a získání čistého propargyl- $\alpha$ -D-manopyranosidu (**14 $\alpha$** ). V souladu s literaturou<sup>158,173,174</sup> byl reakcí získán jeden produkt s uspokojivým výtěžkem 83 %, který byl dále použit pro funkcionalizaci azidových nanohub.



**Schéma 13:** Poslední krok tříkrokové syntézy založený na odstranění chránících acetylových skupin s produktem ve formě propargyl- $\alpha$ -D-manopyranosidu.

#### 4.3.2 Syntéza manosou funkcionalizovaných nanohub

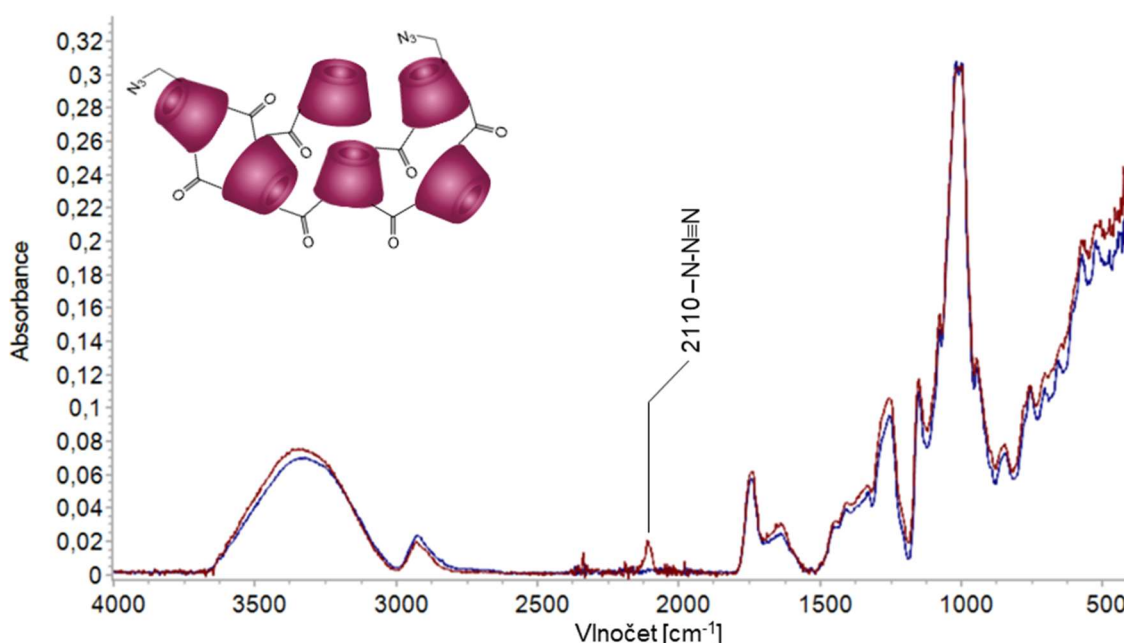
Manosou funkcionalizované nanohouby byly syntetizovány v několika krocích, jež zahrnovaly přípravu azidem funkcionalizovaného CD, jeho zesíťování a postfunkcionalizaci manosou (schéma 14 a schéma 15). Tento postup byl zvolen z několika důvodů: tímto způsobem je možné kontrolovat množství funkčních skupin v nanohoubách, funkcionalizace azidem znamená přípravu „univerzální nanohouby“, na niž se dá pomocí „click“ reakce alkynu a azidu navázat libovolný ligand a jednotlivé kroky syntézy jsou selektivní a velmi snadné.



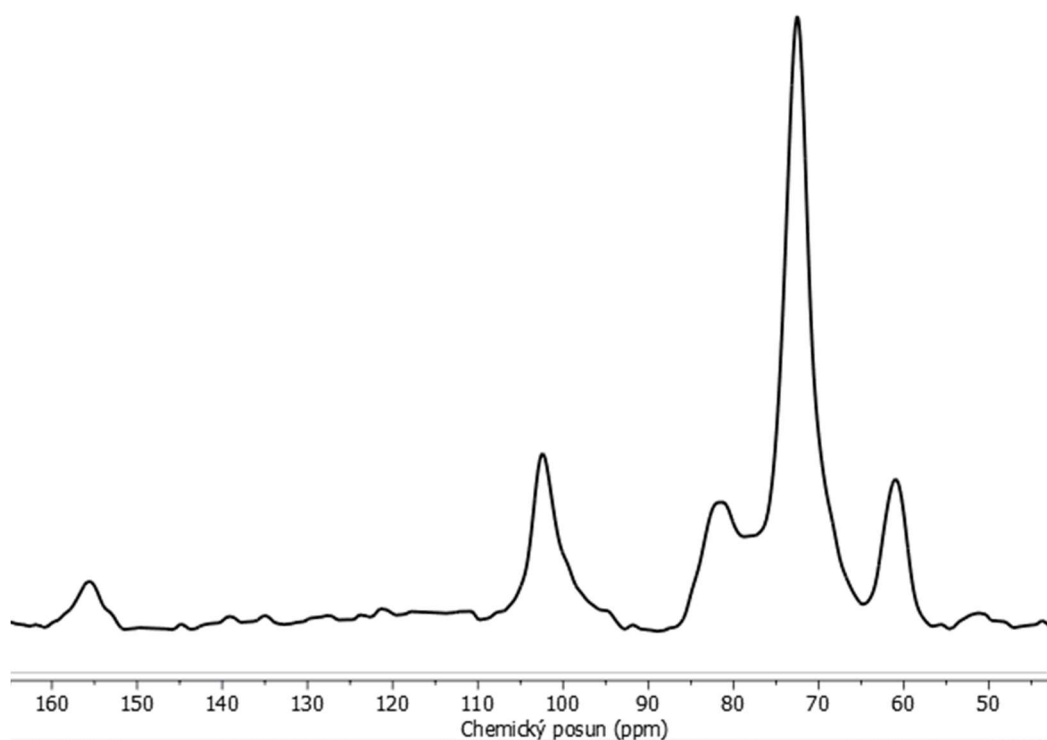
**Schéma 14:** Příprava manosou funkcionalizovaných cyklodextrinových nanohub zahrnovala nejprve syntézu  $N_3$ - $\beta$ -CD a jeho zesíťování.

Monoazid  $N_3$ - $\beta$ -CD (**13**) byl připraven z TsO- $\beta$ -CD (**12**) podle postupů popsanych v literatuře.<sup>155,157</sup> Struktury obou prekurzorů byly potvrzeny analýzou MS a NMR, jejichž výsledky se shodovaly s publikovanými údaji.

Azidový CD **13** byl následně zesíťován karbonyldiimidazolem dle standardního postupu pro přípravu karbonylových nanohub<sup>80</sup>. V dostupné literatuře zatím modifikace cyklodextrinových nanohub azidem nebyla popsána. Obdobně jako u cholesterolových nanohub byla pro síťování použita směs azidového derivátu **13** s nativním  $\beta$ -CD, aby bylo možné regulovat množství vazebných míst v nanohoubě. Byl zvolen poměr  $N_3$ - $\beta$ -CD: $\beta$ -CD 1:9 a 1:1, nicméně se během prvotních experimentů podařilo úspěšně syntetizovat polymer s poměrem cyklodextrinů až 9:1. Cílem bylo porovnat vliv počtu vazebných míst na postfunkcionalizaci a na biologickou odezvu vyvolanou připraveným materiálem. Struktura nanohub  $N_3$ -NS 10% (**21**) a  $N_3$ -NS 50% (**22**) byla analyzována FTIR a ss-NMR. Ve spektru z infračervené spektroskopie (obrázek 13) bylo možné pozorovat signál azidové funkční skupiny s posunem  $2110\text{ cm}^{-1}$ , který hraje významnou roli při vyhodnocení úspěšnosti navázání manosy.

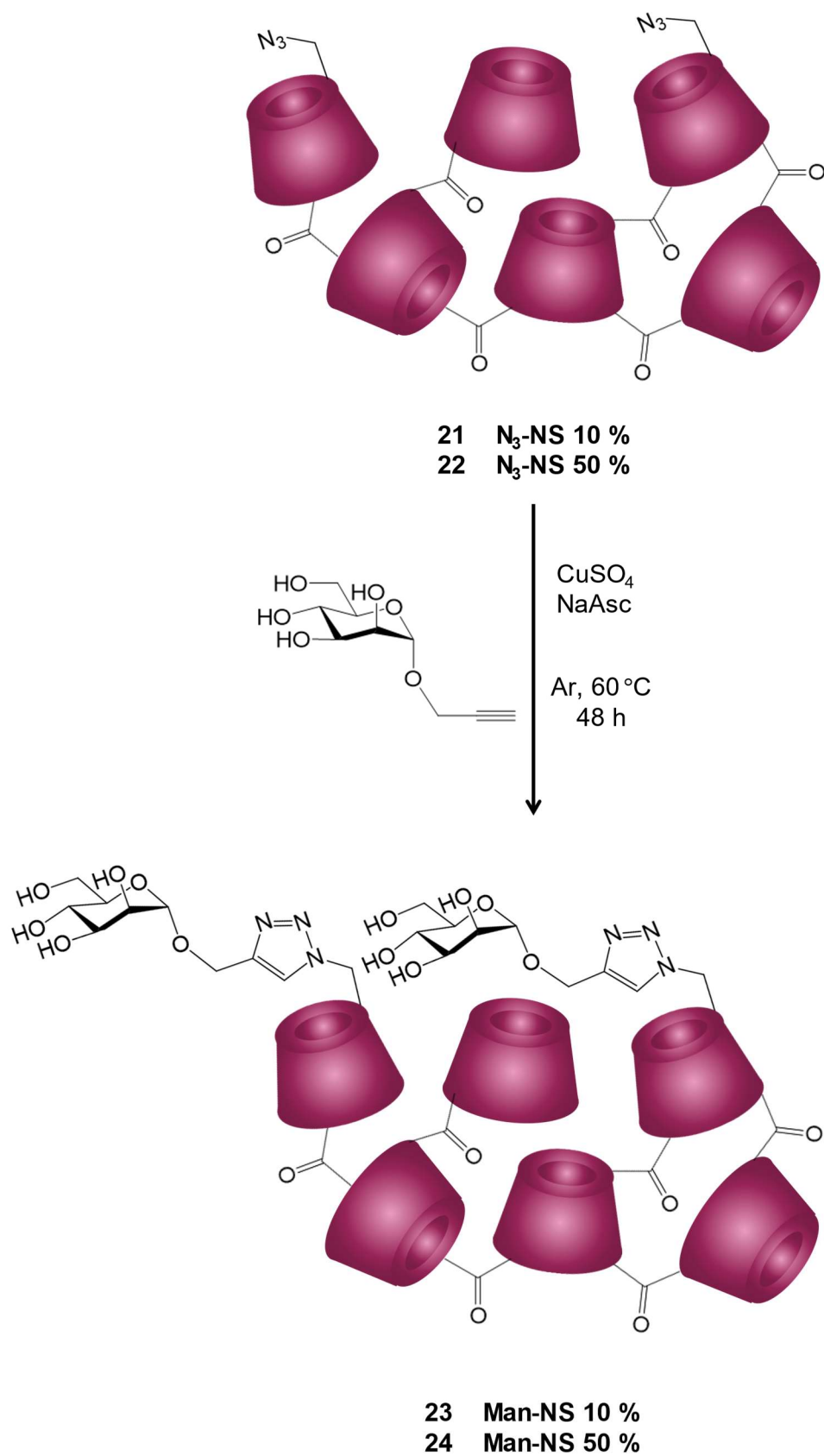


**Obrázek 13:** FTIR spektrum  $N_3$ -NS 50% (**22**; hnědá) a CDI NS (**9**; modrá).



**Obrázek 14:**  $^{13}\text{C}$  ss-NMR spektrum  $\text{N}_3\text{-NS 50\% (22)}$ .

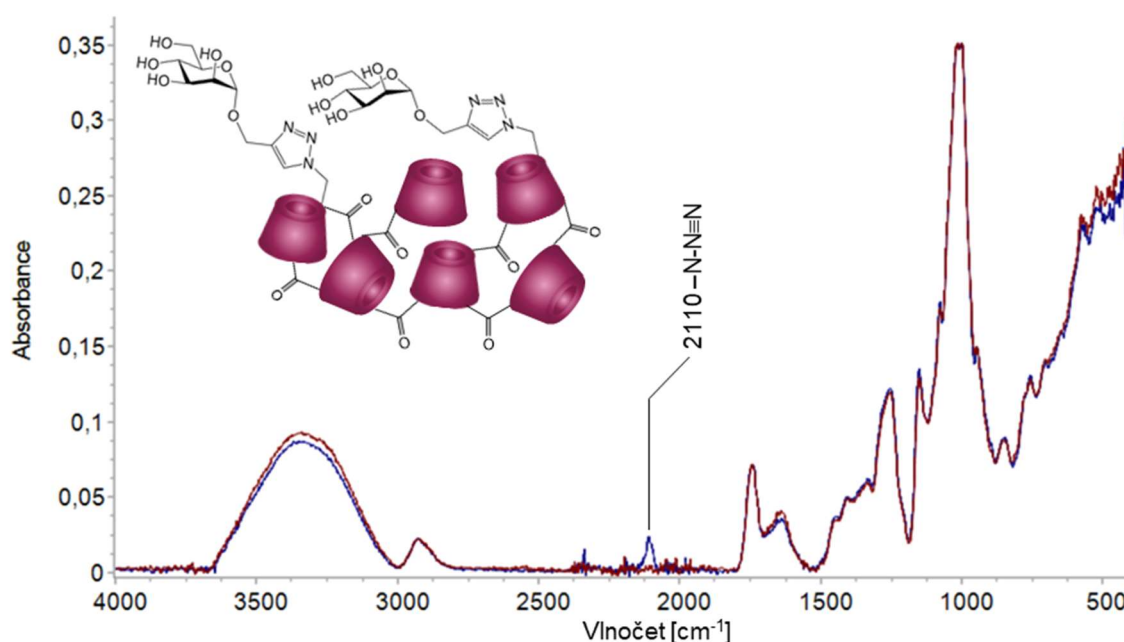
Jelikož jsou nanohouby nerozpustným materiálem, byly analyzovány NMR v pevné fázi. V  $^{13}\text{C}$  spektrech získaných analýzou DD-MAS (Obrázek 14) bylo možné identifikovat uhlíky CD a porovnáním signálu pocházejícím z karbonylu (155 ppm) a C-1 z cyklodextrinu (102 ppm) určit stupeň zesíťování polymeru. Na každý CD v nanohoubě  $\text{N}_3\text{-NS 50\% (22)}$  připadá v průměru 1,5 molekuly síťovadla.



**Schéma 15:** Postmodifikace karbonylových azidových nanohub manosou pomocí „click“ cykloadice alkynu a azidu.

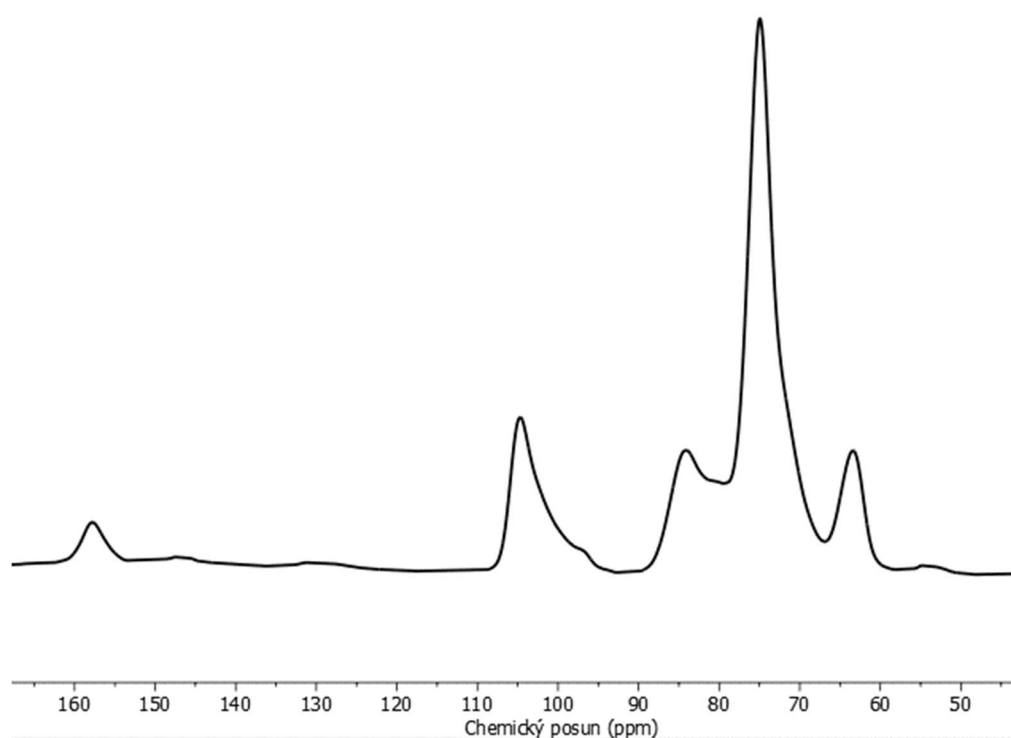


Nakonec byl na azidové nanohoubě **21** a **22** navázán derivát manosy **14α** reakcí alkyne a azidu (schéma 15). Tato reakce spolu s dalšími „click reakcemi“ je populární především díky své jednoduchosti a selektivitě a byla v literatuře aplikována na řadu nosičů léčiv.<sup>13,175</sup> Manosou modifikované CD nanohoubě **23** a **24** byly analyzovány FTIR a ss-NMR. Vznikem triazolového kruhu z azidu byl eliminován signál  $-N-N\equiv N$  ( $2110\text{ cm}^{-1}$ ) pozorovaný v FTIR spektru<sup>176</sup>, změna spektra v této oblasti je po funkcionalizaci nejvíce patrná (obrázek 15). Další oblastí, jež během reakce alkyne a azidu prochází změnami, je oblast  $3300\text{--}3010\text{ cm}^{-1}$  (C-H valenční vibrace 1,2,3-triazolu).<sup>176</sup> V této oblasti se ovšem vyskytují také signály pocházející ze struktury CD a CD nanohub, změna způsobená „click“ reakcí tedy není v této části spektra výrazná.



**Obrázek 15:** FTIR spektrum Man-NS 50% (**24**; hnědá) a N3-NS 50% (**22**; modrá).

V  $^{13}\text{C}$  ss-NMR spektrech (obrázek 16) bylo po navázání manosy možné pozorovat signály CD a síťovadla (157 ppm) a také přízdvihy v oblastech 130 ppm a 145 ppm pocházející z nově vzniklých triazolových kruhů<sup>180</sup>. Ve spektru Man-NS 50% (**24**) byl pozorovatelný též signál 54 ppm, který patří C-6 substituovanému uhlíku.



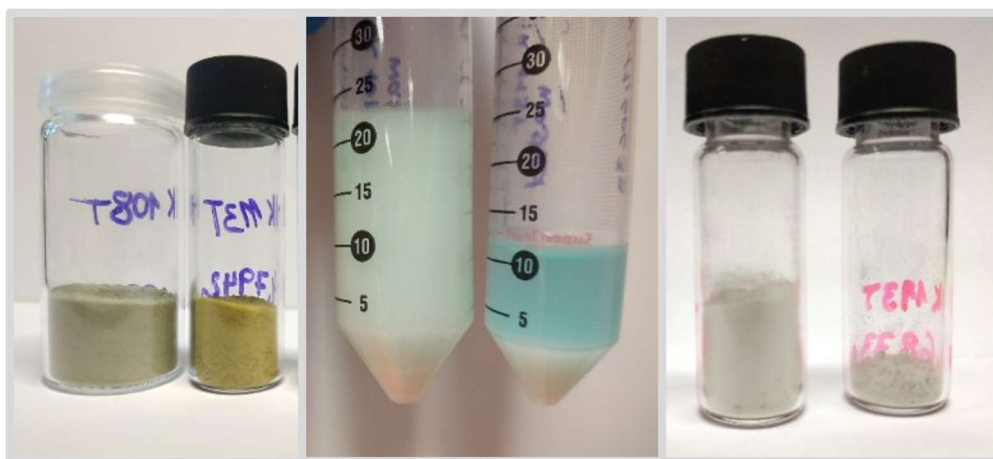
**Obrázek 16:**  $^{13}\text{C}$  ss-NMR spektrum Man-NS 50% (**24**).

Důležitým parametrem polymerních částic je mimo chemického složení i jejich velikost. Manosou funkcionalizované nanohouby byly pomlety ve formě suspenze v mlýnu MiniCer 120 min při 3000 rpm a poté lyofilizovány. Jelikož v *in vitro* experimentech budou materiály použity ve formě suspenze, byla provedena optimalizace přípravy suspenzí manosových nanohub. Nejúčinnější variantou byla homogenizace suspenzí přístrojem Ultra-Turrax® (10 min při 24000 rpm) a výsledné suspenze byly podrobeny analýze DLS (tabulka 3).

**Tabulka 3:** Výsledky DLS analýzy velikosti částic ve vodné suspenzi manosou funkcionalizovaných nanohub.

	<b>Velikost částic [nm]</b>
Man-NS 10% ( <b>23</b> )	157,8 ± 19,5
Man-NS 50% ( <b>24</b> )	132,2 ± 2,7
CDI NS ( <b>9</b> )	115,4 ± 1,6

Nanohouby v minulosti prokázaly, že mají vysokou afinitu nejen vůči širokému spektru léčiv, ale také vůči dalším látkám včetně těžkých kovů.<sup>177,178</sup> Vzhledem k tomu, že navázání manosy na nanohouby bylo katalyzováno měďnými ionty, byly nanohouby přečištěny mícháním ve vodném roztoku Na<sub>2</sub>EDTA<sup>179</sup> (obrázek 17) a zbytkové množství mědi v nanohoubách bylo analyzováno pomocí ICP-MS. Měď sice patří mezi esenciální prvky v organismu důležité především pro správnou funkci enzymů, její nadbytek však může vést k produkci volných radikálů, tím narušovat strukturu lipidů, proteinů, aj. a mít tak až fatální následky pro správnou funkci buněk.<sup>180</sup> Z výsledků (tabulka 4) je patrné, že ačkoli po —funkcionalizaci nanohub manosou zůstává velké množství katalyzátoru v nanohoubách, komplexace Na<sub>2</sub>EDTA je velmi účinným prostředkem k jeho eliminaci z materiálu. Podle studie provedené na myších fibroblastech<sup>181</sup> odpovídá LD<sub>50</sub> koncentraci 46 µg/ml měďnatých iontů. Takové množství by odpovídalo obsahu zbytkové mědi v suspenzi nanohub **24** o koncentraci cca 9 g/ml, což několikanásobně přesahuje běžně testované koncentrace suspenzí.



**Obrázek 17:** Nanohouby funkcionalizované manosou kontaminované po reakci zbytky mědi (vlevo); v průběhu čistícího procesu (uprostřed) a po čištění (vpravo).

**Tabulka 4:** Výsledky ICP-MS analýzy zbytkové mědi v nanohoubách před čištěním a po čištění Na<sub>2</sub>EDTA.

	<b>Obsah mědi</b>	
	<b>Před čištěním</b> [mg/g]	<b>Po čištění</b> [mg/g]
Man-NS 10% ( <b>23</b> )	0,750	0,002
Man-NS 50% ( <b>24</b> )	20,364	0,005

Zajímavým poznatkem na poli medicíny je, že rakovinné buňky obsahují vyšší množství mědi než ostatní buňky v těle.<sup>180</sup> Jejich proliferace, ale také angiogeneze rakovinné tkáně a tvorba metastáz, je závislá na dostatečném přísunu mědi. Záchyt mědi pomocí chelatačních činidel pomohl inhibovat růst nádorové tkáně *in vivo*.<sup>180,182</sup> Dokonce použitím chelátoru došlo též ke změnám u makrofágů asociovaných s nádory, které u myši vedly k nárůstu protinádorové reakce imunitního systému.<sup>182,183</sup> Pokud by manosylované cyklodextrinové nanohouby prokázaly dostatečnou schopnost záchytu měďnatých iontů a dokázaly by působit v organismu jako chelatační činidlo, mohly by tak mimo funkce nosiče léčiv ještě dále podpořit terapii záchytem mědi z rakovinné tkáně a přímo tak omezit její růst.

## 5 Závěr

Cílem této disertační práce bylo připravit nové cyklodextrinové polymery s CD zakomponovanými do polymerního řetězce, popř. polymerní sítě. Tyto nové struktury by měly najít potenciální využití v oblasti medicíny, především v cílené dopravě léčiv.

Jedním ze zkoumaných přístupů byla tvorba definovaných lineárních polymerů založených na spojení selektivně disubstituovaných CD difunkčními spojkami. Tento typ CD polymerů je v literatuře zastoupen jen velmi řídky. Bylo zjištěno, že syntéza takových materiálů je problematická. Proto byla v dalších částech práce zaměřena pozornost především na vývoj nových náhodně síťovaných polymerů, které mají větší potenciál nalézt praktické využití v oblasti dopravy léčiv.

Cyklodextriny díky velkému množství hydroxylových skupin nabízejí velký prostor pro modifikaci funkčními skupinami, které dodávají výslednému materiálu unikátní vlastnosti. V rámci této práce byly připraveny CD nanohouby funkcionalizované cholesterolem, které usnadnily dopravu resveratrolu do nádorových buněk. Tento antioxidant zkoumaný pro své protirakovinné účinky disponuje nízkou stabilitou, špatnou rozpustností ve vodě a nízkou biologickou dostupností, což velmi limituje jeho účinnost. Synergickým působením resveratrolu a cholesterolových nosičů se zřetelně zvýšila efektivita terapie. Po vystavení buněk karcinomu prsu suspenzi cholesterolových nanohub s resveratrolem došlo k výrazné inhibici buněčné aktivity v porovnání s účinky jednotlivých složek, tedy samotného resveratrolu a samotných nanohub. Výsledky průtokové cytometrie ukázaly, že funkcionalizace cholesterolem mnohonásobně zvyšuje příjem materiálu nádorovými buňkami a množství cholesterolu ve struktuře hraje v tomto procesu velmi významnou roli. Díky funkcionalizaci bylo možné dosáhnout zvýšení buněčného příjmu nanohub ze 7 % až na 93 %. Cyklodextrinové nanohouby funkcionalizované cholesterolem ukázaly, že mají velký potenciál v oblasti dopravy léčiv a mohly by být účinným pomocníkem v boji proti rakovině.

Funkcionalizace cholesterolem přinesla velice slibné výsledky pro potenciální aplikaci v dopravě léčiv. Velmi žádanou vlastností nosičů léčiv je ale také možnost cílené dopravy do konkrétních typů buněk a interakce s jejich specifickými

receptory. Tato funkcionalizace cholesterolem neposkytuje, a proto byly připraveny cyklodextrinové nanohouby funkcionalizované manosou. Glykosylace materiálu měla za úkol umožnit cílení do specifických receptorů přítomných jen v některých typech buněk a umožnit tak zaměření terapie na léčenou oblast. Zároveň by tak došlo k eliminaci nežádoucích účinků na zbytek organismu. Nejprve byly připraveny nanohouby modifikované azidovými funkčními skupinami.

Azidové nanohouby mají potenciál sloužit jako univerzální prekurzor pro širokou škálu funkcionalizovaných nanohub. Je též možné regulovat množství funkčních skupin změnou poměru CD a jeho azidového derivátu použitého při přípravě nanohub. Použitím cykloadice alkynu a azidu může být na takový prekurzor navázána řada aktivních látek, resp. jejich derivátů obsahujících terminální trojnou vazbu. Ačkoli je tato reakce katalyzována měďnými ionty, bylo experimentálně ověřeno, že s použitím chelatačních činidel lze zbytky katalyzátoru z nanohub účinně eliminovat.

Pro účely této disertační práce byly materiály dále modifikovány manosou, jež by měla umožnit cílení do buněk s vysokou expresí manosových receptorů, mezi něž patří např. jaterní buňky, makrofágy a rakovinné buňky. V rámci přípravy manosou modifikovaných materiálů byly též porovnány různé způsoby syntézy alkynového derivátu manosity a analýzou NMR byla identifikována řada dosud nepopsaných produktů těchto reakcí. V neposlední řadě byla během přípravy této disertace navázána spolupráce s několika zahraničními pracovišti, a sice s Katedrou chemie Turínské univerzity (Turín, Itálie), Ústavem genetického a biomedicínského výzkumu ve Výzkumné nemocnici Humanitas (Milán, Itálie) a Ústavem geotechniky Slovenské Akademie Věd (Košice, Slovensko).

Vývoj nosičů léčiv je dlouhý proces, během něhož je potřeba provést řadu experimentů, jež potvrdí vhodnost studovaných materiálů pro danou aplikaci. Sepsáním této disertační práce proto cesta nekončí. Připravené materiály budou v budoucnu podrobeny dalším experimentům, mezi něž můžeme zařadit např. *in vitro* testování interakce manosou funkcionalizovaných nanohub s makrofágy, ověření schopnosti jejich cílení na specifické buněčné receptory, inkorporace léčiva do těchto nanohub a studium kinetiky jeho uvolňování.

## 6 Seznam vlastních publikací

1. Krubicová, I.; Dolenský, B.; Řezanka, M. Selectivity of 1-O-Propargyl-d-Mannose Preparations. *Molecules* **2022**, *27* (5), 1483. <https://doi.org/10.3390/molecules27051483>.
2. Mátková, V.; Holubová, B.; Krubicová, I.; Kulhánková, J.; Řezanka, M. Hybrid Organosilane Fibrous Materials and Their Contribution to Modern Science. *Polymer* **2021**, *228*, 123862. <https://doi.org/10.1016/j.polymer.2021.123862>.
3. Cecone, C.; Hoti, G.; Krubicová, I.; Appleton, S. L.; Caldera, F.; Bracco, P.; Zanetti, M.; Trotta, F. Sustainable Synthesis of Cyclodextrin-Based Polymers by Exploiting Natural Deep Eutectic Solvents. *Green Chem.* **2020**, *22* (17), 5806–5814. <https://doi.org/10.1039/D0GC02247K>.
4. Krubicová, I.; Appleton, S. L.; Tannous, M.; Hoti, G.; Caldera, F.; Rubin Pedrazzo, A.; Cecone, C.; Cavalli, R.; Trotta, F. History of Cyclodextrin Nanosponges. *Polymers* **2020**, *12* (5), 1122. <https://doi.org/10.3390/polym12051122>.
5. Strnadová, K.; Stanislav, L.; Krubicová, I.; Sabol, F.; Lukášek, J.; Řezanka, M.; Lukáš, D.; Jenčová, V. Drawn Aligned Polymer Microfibres for Tissue Engineering. *J. Ind. Text.* **2019**, 152808371882531. <https://doi.org/10.1177/1528083718825318>.

## 7 Příspěvky na konferenci

1. Krabicová, I.; Khazaei Monfared, Y.; Hobbs C. J.; Caldera, F.; Matencio Durán, A.; Řezanka, M.; Trotta, F. Cholesterol-functionalized  $\beta$ -CD Nanosponges for Drug Delivery. *7<sup>th</sup> European Cyclodextrin Conference*, Budapest, Hungary, **2023**.
2. Krabicová, I.; Řezanka, M.; Caldera, F.; Trotta, F. Cyclodextrin Nanosponges Functionalized with Mannose. *8<sup>th</sup> EuChemS Chemistry Congress*, Lisbon, Portugal, **2022**.
3. Krabicová, I.; Appleton, S. L.; Řezanka, M.; Caldera, F.; Cavalli, R.; Trotta, F. Preparation of Mannose-functionalized  $\beta$ CD Nanosponges. *20<sup>th</sup> International Cyclodextrin Symposium*, Giardini Naxos, Italy, **2022**.
4. Krabicová, I.; Appleton, S. L.; Řezanka, M.; Caldera, F.; Cavalli, R.; Trotta, F. Synthesis and characterization of functionalized  $\beta$ -cyclodextrin Nanosponges. *13<sup>th</sup> International Conference on Nanomaterials - Research & Application*, Brno, Czech Republic, **2021**.
5. Krabicová, I.; Appleton, S. L.; Řezanka, M.; Caldera, F.; Cavalli, R.; Trotta, F. Synthesis of functionalized  $\beta$ -cyclodextrin Nanosponges. *20th Interdisciplinary Meeting of Young Life Scientists*, online, **2021**.
6. Krabicová, I.; Karmazínová, P.; Řezanka, M. Synthesis of Cyclodextrin Derivatives for Hybrid Nanomaterials. *7th EuCheMS Chemistry Congress*, Liverpool, UK, **2018**.



## 8 Použitá literatura

- (1) Liu, Z.; Ye, L.; Xi, J.; Wang, J.; Feng, Z. Cyclodextrin Polymers: Structure, Synthesis, and Use as Drug Carriers. *Prog. Polym. Sci.* **2021**, *118*, 101408. <https://doi.org/10.1016/j.progpolymsci.2021.101408>.
- (2) Crini, G. Review: A History of Cyclodextrins. *Chem. Rev.* **2014**, *114* (21), 10940–10975. <https://doi.org/10.1021/cr500081p>.
- (3) Prochowicz, D.; Kornowicz, A.; Lewinski, J. Interactions of Native Cyclodextrins with Metal Ions and Inorganic Nanoparticles: Fertile Landscape for Chemistry and Materials Science. *Chem. Rev.* **2017**, *117* (22), 13461–13501. <https://doi.org/10.1021/acs.chemrev.7b00231>.
- (4) Ioele, G.; De Luca, M.; Garofalo, A.; Ragno, G. Photosensitive Drugs: A Review on Their Photoprotection by Liposomes and Cyclodextrins. *Drug Deliv.* **2017**, *24* (2), 33–44. <https://doi.org/10.1080/10717544.2017.1386733>.
- (5) Liu, Y.; Chen, Y.; Gao, X.; Fu, J.; Hu, L. Application of Cyclodextrin in Food Industry. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* **2022**, *62* (10), 2627–2640. <https://doi.org/10.1080/10408398.2020.1856035>.
- (6) Arima, H.; Motoyama, K.; Higashi, T. Potential Use of Cyclodextrins as Drug Carriers and Active Pharmaceutical Ingredients. *Chem. Pharm. Bull. (Tokyo)* **2017**, *65* (4), 341–348. <https://doi.org/10.1248/cpb.c16-00779>.
- (7) Lima, C. G. S.; Pauli, F. P.; Madriaga, V. G.; Amaral, A. A. P.; Graciano, I. A.; Meira, V. L.; da S. M. Forezi, L.; Ferreira, V. F.; de M. Lima, T.; de Carvalho da Silva, F. Supramolecular Catalysts for Organic Synthesis: Preparation and Applications of Cyclodextrins and Calixarenes in C–C Cross-Coupling Reactions. *Eur. J. Org. Chem.* **2022**, *2022* (35), e202200904. <https://doi.org/10.1002/ejoc.202200904>.
- (8) Santos, J. S.; Barradas, T. N.; Tavares, G. D. Advances in Nanotechnology-Based Hair Care Products Applied to Hair Shaft and Hair Scalp Disorders. *Int. J. Cosmet. Sci.* **2022**, *44* (3), 320–332. <https://doi.org/10.1111/ics.12780>.
- (9) Kovacs, T.; Nagy, P.; Panyi, G.; Szente, L.; Varga, Z.; Zakany, F. Cyclodextrins: Only Pharmaceutical Excipients or Full-Fledged Drug Candidates? *Pharmaceutics* **2022**, *14* (12), 2559. <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics14122559>.
- (10) Zhu, B.; Shao, R.; Li, N.; Min, C.; Liu, S.; Xu, Z.; Qian, X.; Wang, L. Progress of Cyclodextrin Based-Membranes in Water Treatment: Special 3D Bowl-like Structure to Achieve Excellent Separation. *Chem. Eng. J.* **2022**, *449*, 137013. <https://doi.org/10.1016/j.cej.2022.137013>.
- (11) Liu, Z.; Zhou, W.; Li, J.; Zhang, H.; Dai, X.; Liu, Y.; Liu, Y. High-Efficiency Dynamic Sensing of Biothiols in Cancer Cells with a Fluorescent  $\beta$ -Cyclodextrin Supramolecular Assembly. *Chem. Sci.* **2020**, *11* (18), 4791–4800. <https://doi.org/10.1039/DoSC00414F>.
- (12) Yin, J.-J.; Zhou, Z.-W.; Zhou, S.-F. Cyclodextrin-Based Targeting Strategies for Tumor Treatment. *Drug Deliv. Transl. Res.* **2013**, *3* (4), 364–374. <https://doi.org/10.1007/s13346-013-0140-4>.
- (13) Ye, Z.; Zhang, Q.; Wang, S.; Bharate, P.; Varela-Aramburu, S.; Lu, M.; Seeberger, P. H.; Yin, J. Tumour-Targeted Drug Delivery with Mannose-Functionalized Nanoparticles Self-Assembled from Amphiphilic  $\beta$ -Cyclodextrins. *Chem. - Eur. J.* **2016**, *22* (43), 15216–15221. <https://doi.org/10.1002/chem.201603294>.

- (14) Tian, B.; Liu, Y.; Liu, J. Smart Stimuli-Responsive Drug Delivery Systems Based on Cyclodextrin: A Review. *Carbohydr. Polym.* **2021**, *251*, 116871. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2020.116871>.
- (15) Yao, X.; Huang, P.; Nie, Z. Cyclodextrin-Based Polymer Materials: From Controlled Synthesis to Applications. *Prog. Polym. Sci.* **2019**, *93*, 1–35. <https://doi.org/10.1016/j.progpolymsci.2019.03.004>.
- (16) Kulkarni, A.; Caporali, P.; Dolas, A.; Johnny, S.; Goyal, S.; Dragotto, J.; Macone, A.; Jayaraman, R.; Fiorenza, M. T. Linear Cyclodextrin Polymer Prodrugs as Novel Therapeutics for Niemann-Pick Type C1 Disorder. *Sci. Rep.* **2018**, *8* (1), 9547. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-27926-9>.
- (17) Kim, H.; Han, J.; Park, J.-H. Cyclodextrin Polymer Improves Atherosclerosis Therapy and Reduces Ototoxicity. *J. Controlled Release* **2020**, *319*, 77–86. <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2019.12.021>.
- (18) Alsaiee, A.; Smith, B. J.; Xiao, L.; Ling, Y.; Helbling, D. E.; Dichtel, W. R. Rapid Removal of Organic Micropollutants from Water by a Porous  $\beta$ -Cyclodextrin Polymer. *Nature* **2016**, *529* (7585), 190–194. <https://doi.org/10.1038/nature16185>.
- (19) Bai, L.; Yan, H.; Bai, T.; Feng, Y.; Zhao, Y.; Ji, Y.; Feng, W.; Lu, T.; Nie, Y. High Fluorescent Hyperbranched Polysiloxane Containing  $\beta$ -Cyclodextrin for Cell Imaging and Drug Delivery. *Biomacromolecules* **2019**, *20* (11), 4230–4240. <https://doi.org/10.1021/acs.biomac.9b01217>.
- (20) Li, X.; Liu, H.; Li, J.; Deng, Z.; Li, L.; Liu, J.; Yuan, J.; Gao, P.; Yang, Y.; Zhong, S. Micelles via Self-Assembly of Amphiphilic Beta-Cyclodextrin Block Copolymers as Drug Carrier for Cancer Therapy. *Colloids Surf. B Biointerfaces* **2019**, *183*, 110425. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2019.110425>.
- (21) Karpkird, T.; Khunsakorn, R.; Noptheeranuphap, C.; Jettanasen, J. Photostability of Water-Soluble Inclusion Complexes of UV-Filters and Curcumin with Gamma-Cyclodextrin Polymer. *J. Incl. Phenom. Macrocycl. Chem.* **2016**, *84* (1), 121–128. <https://doi.org/10.1007/s10847-015-0589-5>.
- (22) Guo, J.; Lin, L.; Wang, Y.; Zhang, W.; Diao, G.; Piao, Y. Supramolecular Design Strategy of a Water-Soluble Diphenylguanidine-Cyclodextrin Polymer Inclusion Complex. *Molecules* **2022**, *27* (20), 6919. <https://doi.org/10.3390/molecules27206919>.
- (23) Pushpalatha, R.; Selvamuthukumar, S.; Kilimozhi, D. Cyclodextrin Nanosponge Based Hydrogel for the Transdermal Co-Delivery of Curcumin and Resveratrol: Development, Optimization, in Vitro and Ex Vivo Evaluation. *J. Drug Deliv. Sci. Technol.* **2019**, *52*, 55–64. <https://doi.org/10.1016/j.jddst.2019.04.025>.
- (24) Ferro, M.; Castiglione, F.; Punta, C.; Melone, L.; Panzeri, W.; Rossi, B.; Trotta, F.; Mele, A. Anomalous Diffusion of Ibuprofen in Cyclodextrin Nanosponge Hydrogels: An HRMAS NMR Study. *Beilstein J. Org. Chem.* **2014**, *10* (1), 2715–2723. <https://doi.org/10.3762/bjoc.10.286>.
- (25) Trotta, F. Cyclodextrin Nanosponges and Their Applications. In *Cyclodextrins in Pharmaceuticals, Cosmetics, and Biomedicine*; John Wiley & Sons, Ltd, 2011; pp 323–342. <https://doi.org/10.1002/9780470926819.ch17>.
- (26) Li, D.; Ma, M. Nanosponges for Water Purification. *Clean Prod. Process.* **2000**, *2* (2), 112–116. <https://doi.org/10.1007/s100980000061>.
- (27) Pawar, A. Y.; Jadhav, K. R.; Rao, J. B.; Tapkir, A. D.; Malpure, P. S.; Bachhav, R. S. Development and Characterization of Griseofulvin Nanosponges to

- Enhance Bioavailability: Pharmaceutical Science-Pharmaceutics. *Int. J. Life Sci. Pharma Res.* **2022**, P99–P111. <https://doi.org/10.22376/ijpbs/lpr.2022.12.5.P99-111>.
- (28) Tonelli, A. E. Polymers Containing Non-Covalently Bound Cyclodextrins. *Polymers* **2019**, *11* (3), 425. <https://doi.org/10.3390/polym11030425>.
- (29) Krabicová, I.; Appleton, S. L.; Tannous, M.; Hoti, G.; Caldera, F.; Rubin Pedrazzo, A.; Ceccone, C.; Cavalli, R.; Trotta, F. History of Cyclodextrin Nanosponges. *Polymers* **2020**, *12* (5), 1122. <https://doi.org/10.3390/polym12051122>.
- (30) Morin-Crini, N.; Winterton, P.; Fourmentin, S.; Wilson, L. D.; Fenyvesi, É.; Crini, G. Water-Insoluble  $\beta$ -Cyclodextrin–Epichlorohydrin Polymers for Removal of Pollutants from Aqueous Solutions by Sorption Processes Using Batch Studies: A Review of Inclusion Mechanisms. *Prog. Polym. Sci.* **2018**, *78*, 1–23. <https://doi.org/10.1016/j.progpolymsci.2017.07.004>.
- (31) Folch-Cano, C.; Yazdani-Pedram, M.; Olea-Azar, C. Inclusion and Functionalization of Polymers with Cyclodextrins: Current Applications and Future Prospects. *Molecules* **2014**, *19* (9), 14066–14079. <https://doi.org/10.3390/molecules190914066>.
- (32) Cavalli, R.; Trotta, F.; Tumiatti, W. Cyclodextrin-Based Nanosponges for Drug Delivery. *J. Incl. Phenom. Macrocycl. Chem.* **2006**, *56* (1), 209–213. <https://doi.org/10.1007/s10847-006-9085-2>.
- (33) Qie, S.; Hao, Y.; Liu, Z.; Wang, J.; Xi, J. Advances in Cyclodextrin Polymers and Their Applications in Biomedicine. *Acta Chim. Sin.* **2020**, *78* (3), 232. <https://doi.org/10.6023/A20010006>.
- (34) Hwang, S. J.; Bellocq, N. C.; Davis, M. E. Effects of Structure of  $\beta$ -Cyclodextrin-Containing Polymers on Gene Delivery. *Bioconjug. Chem.* **2001**, *12* (2), 280–290. <https://doi.org/10.1021/bc0001084>.
- (35) Popielarski, S. R.; Mishra, S.; Davis, M. E. Structural Effects of Carbohydrate-Containing Polycations on Gene Delivery. 3. Cyclodextrin Type and Functionalization. *Bioconjug. Chem.* **2003**, *14* (3), 672–678. <https://doi.org/10.1021/bc034010b>.
- (36) Cheng, J.; Khin, K. T.; Davis, M. E. Antitumor Activity of  $\beta$ -Cyclodextrin Polymer–Camptothecin Conjugates. *Mol. Pharm.* **2004**, *1* (3), 183–193. <https://doi.org/10.1021/mp049966y>.
- (37) Kumprecht, L.; Buděšínský, M.; Vondrášek, J.; Vymětal, J.; Černý, J.; Císařová, I.; Brynda, J.; Herzig, V.; Koutník, P.; Závada, J.; Kraus, T. Rigid Duplex  $\alpha$ -Cyclodextrin Reversibly Connected With Disulfide Bonds. Synthesis and Inclusion Complexes. *J. Org. Chem.* **2009**, *74* (3), 1082–1092. <https://doi.org/10.1021/jo802139s>.
- (38) Lecourt, T.; Herault, A.; Pearce, A. J.; Sollogoub, M.; Sinaÿ, P. Triisobutylaluminium and Diisobutylaluminium Hydride as Molecular Scalpels: The Regioselective Stripping of Perbenzylated Sugars and Cyclodextrins. *Chem. - Eur. J.* **2004**, *10* (12), 2960–2971. <https://doi.org/10.1002/chem.200305683>.
- (39) Pearce, A. J.; Sinaÿ, P. Diisobutylaluminum-Promoted Regioselective De-O-Benzoylation of Perbenzylated Cyclodextrins: A Powerful New Strategy for the Preparation of Selectively Modified Cyclodextrins. *Angew. Chem.* **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).

- (40) Shown, I.; Baek-Ko, W.; Murthy, C. N. Cyclodextrin-Based Low Molecular Weight Polymers as Encapsulates for Nonpolar Drug Molecules. *Polym. Bull.* **2012**, *69* (1), 1–13. <https://doi.org/10.1007/s00289-011-0684-8>.
- (41) Shown, I.; Murthy, C. N. Synthesis and Characterization of Linear Water-Soluble Gamma-Cyclodextrin Based Polymers as Drug Carrier Systems. *Supramol. Chem.* **2008**, *20* (6), 573–578. <https://doi.org/10.1080/10610270701500084>.
- (42) Harada, A.; Li, J.; Kamachi, M. Synthesis of a Tubular Polymer from Threaded Cyclodextrins. *Nature* **1993**, *364* (6437), 516–518. <https://doi.org/10.1038/364516a0>.
- (43) Solms, J.; Egli, R. H. Harze Mit Einschlu shohlr umen von Cyclodextrin-Struktur. *Helv. Chim. Acta* **1965**, *48* (6), 1225–1228. <https://doi.org/10.1002/hlca.19650480603>.
- (44) Crini, G.; Bertini, S.; Torri, G.; Naggi, A.; Sforzini, D.; Vecchi, C.; Janus, L.; Lekchiri, Y.; Morcellet, M. Sorption of Aromatic Compounds in Water Using Insoluble Cyclodextrin Polymers. *J. Appl. Polym. Sci.* **1998**, *68* (12), 1973–1978. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1097-4628\(19980620\)68:12<1973::AID-APP11>3.0.CO;2-T](https://doi.org/10.1002/(SICI)1097-4628(19980620)68:12<1973::AID-APP11>3.0.CO;2-T).
- (45) Hoffman, J. L. Chromatography of Nucleic Acids on Cross-Linked Cyclodextrin Gels Having Inclusion-Forming Capacity. *J. Macromol. Sci. Part - Chem.* **1973**, *7* (5), 1147–1157. <https://doi.org/10.1080/10601327308060488>.
- (46) Su, C.-S.; Yang, C.-P. Partial Removal of Various Food Components from Aqueous Solution Using Crosslinked Polymers of Cyclodextrins with Epichlorohydrin. *J. Sci. Food Agric.* **1991**, *54* (4), 635–643. <https://doi.org/10.1002/jsfa.2740540414>.
- (47) Shaw, P. E.; Buslig, B. S. Selective Removal of Bitter Compounds from Grapefruit Juice and from Aqueous Solution with Cyclodextrin Polymers and with Amberlite XAD-4. *J. Agric. Food Chem.* **1986**, *34* (5), 837–840. <https://doi.org/10.1021/jf00071a018>.
- (48) Duan, Z.; Bian, H.; Zhu, L.; Xia, D. Efficient Removal of Thiophenic Sulfides from Fuel by Micro-Mesoporous 2-Hydroxypropyl- $\beta$ -Cyclodextrin Polymers through Synergistic Effect. *Sep. Purif. Technol.* **2022**, *300*, 121884. <https://doi.org/10.1016/j.seppur.2022.121884>.
- (49) Shoukat, H.; Pervaiz, F.; Rehman, S.; Noreen, S. Development of  $\beta$ -Cyclodextrin/Chitosan-Co-Poly (2-Acrylamide-2-Methylpropane Sulphonic Acid) Cross-Linked Hybrid IPN-Nanogels to Enhance the Solubility of Rosuvastatin: An in Vitro and in Vivo Attributes. *J. Drug Deliv. Sci. Technol.* **2022**, *75*, 103696. <https://doi.org/10.1016/j.jddst.2022.103696>.
- (50) DeQuan Li; Min Ma. Nanosponges: From Inclusion Chemistry to Water Purifying Technology. *Chemtech* **1999** (29), 31–37.
- (51) DeQuan Li; Min Ma. Nanoporous Polymers: New Nanosponge Absorbent Media. *Filtr. Sep.* **1999**, *36* (10), 26–28. [https://doi.org/10.1016/S0015-1882\(00\)80050-6](https://doi.org/10.1016/S0015-1882(00)80050-6).
- (52) Vyas, A.; Saraf, S.; Saraf, S. Cyclodextrin Based Novel Drug Delivery Systems. *J. Incl. Phenom. Macrocycl. Chem.* **2008**, *62* (1), 23–42. <https://doi.org/10.1007/s10847-008-9456-y>.
- (53) Sadjadi, S.; Heravi, M. M.; Daraie, M. Cyclodextrin Nanosponges: A Potential Catalyst and Catalyst Support for Synthesis of Xanthenes. *Res. Chem. Intermed.* **2017**, *43* (2), 843–857. <https://doi.org/10.1007/s11164-016-2668-7>.

- (54) Cavalli, R.; Akhter, A. K.; Bisazza, A.; Giustetto, P.; Trotta, F.; Vavia, P. Nanosponge Formulations as Oxygen Delivery Systems. *Int. J. Pharm.* **2010**, *402* (1), 254–257. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2010.09.025>.
- (55) Alongi, J.; Poskovic, M.; Visakh, P. M.; Frache, A.; Malucelli, G. Cyclodextrin Nanosponges as Novel Green Flame Retardants for PP, LLDPE and PA6. *Carbohydr. Polym.* **2012**, *88* (4), 1387–1394. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2012.02.038>.
- (56) Iravani, S.; Varma, R. S. Nanosponges for Water Treatment: Progress and Challenges. *Appl. Sci.* **2022**, *12* (9), 4182. <https://doi.org/10.3390/app12094182>.
- (57) Demasi, S.; Caser, M.; Caldera, F.; Dhakar, N. K.; Vidotto, F.; Trotta, F.; Scariot, V. Functionalized Dextrin-Based Nanosponges as Effective Carriers for the Herbicide Ailanthone. *Ind. Crops Prod.* **2021**, *164*, 113346. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2021.113346>.
- (58) Atchaya, J.; Girigoswami, A.; Girigoswami, K. Versatile Applications of Nanosponges in Biomedical Field: A Glimpse on SARS-CoV-2 Management. *Bionanoscience* **2022**, *12* (3), 1018–1031. <https://doi.org/10.1007/s12668-022-01000-1>.
- (59) Iravani, S.; Varma, R. S. Nanosponges for Drug Delivery and Cancer Therapy: Recent Advances. *Nanomaterials* **2022**, *12* (14), 2440. <https://doi.org/10.3390/nano12142440>.
- (60) S, S.; S, A.; Krishnamoorthy, K.; Rajappan, M. Nanosponges: A Novel Class of Drug Delivery System - Review. *J. Pharm. Pharm. Sci.* **2012**, *15* (1), 103–111. <https://doi.org/10.18433/J3K308>.
- (61) Chilajwar, S. V.; Pednekar, P. P.; Jadhav, K. R.; Gupta, G. J.; Kadam, V. J. Cyclodextrin-Based Nanosponges: A Propitious Platform for Enhancing Drug Delivery. *Expert Opin. Drug Deliv.* **2014**, *11* (1), 111–120. <https://doi.org/10.1517/17425247.2014.865013>.
- (62) Trotta, F.; Dianzani, C.; Caldera, F.; Mognetti, B.; Cavalli, R. The Application of Nanosponges to Cancer Drug Delivery. *Expert Opin. Drug Deliv.* **2014**, *11* (6), 931–941. <https://doi.org/10.1517/17425247.2014.911729>.
- (63) Caldera, F.; Tannous, M.; Cavalli, R.; Zanetti, M.; Trotta, F. Evolution of Cyclodextrin Nanosponges. *Int. J. Pharm.* **2017**, *531* (2), 470–479. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2017.06.072>.
- (64) Daga, M.; Ullio, C.; Argenziano, M.; Dianzani, C.; Cavalli, R.; Trotta, F.; Ferretti, C.; Zara, G. P.; Gigliotti, C. L.; Ciamporcerio, E. S.; Pettazzoni, P.; Corti, D.; Pizzimenti, S.; Barrera, G. GSH-Targeted Nanosponges Increase Doxorubicin-Induced Toxicity “in Vitro” and “in Vivo” in Cancer Cells with High Antioxidant Defenses. *Free Radic. Biol. Med.* **2016**, *97*, 24–37. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2016.05.009>.
- (65) Singh, P.; Ren, X.; Guo, T.; Wu, L.; Shakya, S.; He, Y.; Wang, C.; Maharjan, A.; Singh, V.; Zhang, J. Biofunctionalization of  $\beta$ -Cyclodextrin Nanosponges Using Cholesterol. *Carbohydr. Polym.* **2018**, *190*, 23–30. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2018.02.044>.
- (66) Lembo, D.; Swaminathan, S.; Donalisio, M.; Civra, A.; Pastero, L.; Aquilano, D.; Vavia, P.; Trotta, F.; Cavalli, R. Encapsulation of Acyclovir in New Carboxylated Cyclodextrin-Based Nanosponges Improves the Agent’s Antiviral Efficacy. *Int. J. Pharm.* **2013**, *443* (1–2), 262–272. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2012.12.031>.

- (67) Gonzalez, H.; Hwang, S. J.; Davis, M. E. New Class of Polymers for the Delivery of Macromolecular Therapeutics. *Bioconjug. Chem.* **1999**, *10* (6), 1068–1074. <https://doi.org/10.1021/bc990072j>.
- (68) Mishra, S.; Heidel, J. D.; Webster, P.; Davis, M. E. Imidazole Groups on a Linear, Cyclodextrin-Containing Polycation Produce Enhanced Gene Delivery via Multiple Processes. *J. Controlled Release* **2006**, *116* (2), 179–191. <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2006.06.018>.
- (69) Davis, M. E.; Pun, S. H.; Bellocq, N. C.; Reineke, T. M.; Popielarski, S. R.; Mishra, S.; Heidel, J. D. Self-Assembling Nucleic Acid Delivery Vehicles via Linear, Water-Soluble, Cyclodextrin-Containing Polymers. *Curr. Med. Chem.* **2004**, *11* (2), 179–197. <https://doi.org/10.2174/0929867043456179>.
- (70) Cheng, J.; Khin, K. T.; Jensen, G. S.; Liu, A.; Davis, M. E. Synthesis of Linear,  $\beta$ -Cyclodextrin-Based Polymers and Their Camptothecin Conjugates. *Bioconjug. Chem.* **2003**, *14* (5), 1007–1017. <https://doi.org/10.1021/bc0340924>.
- (71) Allahyari, S.; Trotta, F.; Valizadeh, H.; Jelvehgari, M.; Zakeri-Milani, P. Cyclodextrin-Based Nanosponges as Promising Carriers for Active Agents. *Expert Opin. Drug Deliv.* **2019**, *16* (5), 467–479. <https://doi.org/10.1080/17425247.2019.1591365>.
- (72) Conte, C.; Caldera, F.; Catanzano, O.; D'Angelo, I.; Ungaro, F.; Miro, A.; Pellosi, D. S.; Trotta, F.; Quaglia, F.  $\beta$ -Cyclodextrin Nanosponges as Multifunctional Ingredient in Water-Containing Semisolid Formulations for Skin Delivery. *J. Pharm. Sci.* **2014**, *103* (12), 3941–3949. <https://doi.org/10.1002/jps.24203>.
- (73) Shringirishi, M.; Prajapati, S. K.; Mahor, A.; Alok, S.; Yadav, P.; Verma, A. Nanosponges: A Potential Nanocarrier for Novel Drug Delivery-a Review. *Asian Pac. J. Trop. Dis.* **2014**, *4*, S519–S526. [https://doi.org/10.1016/S2222-1808\(14\)60667-8](https://doi.org/10.1016/S2222-1808(14)60667-8).
- (74) Bastiancich, C.; Scutera, S.; Alotto, D.; Cambieri, I.; Fumagalli, M.; Casarin, S.; Rossi, S.; Trotta, F.; Stella, M.; Cavalli, R.; Musso, T.; Castagnoli, C. Cyclodextrin-Based Nanosponges as a Nanotechnology Strategy for Imiquimod Delivery in Pathological Scarring Prevention and Treatment. *J. Nanopharmaceutics Drug Deliv.* **2014**, *2* (4), 311–324. <https://doi.org/10.1166/jnd.2014.1071>.
- (75) Trotta, F.; Cavalli, R. Characterization and Applications of New Hyper-Cross-Linked Cyclodextrins. *Compos. Interfaces* **2009**, *16* (1), 39–48. <https://doi.org/10.1163/156855408X379388>.
- (76) Rao, M. R. P.; Chaudhari, J.; Trotta, F.; Caldera, F. Investigation of Cyclodextrin-Based Nanosponges for Solubility and Bioavailability Enhancement of Rilpivirine. *Aaps Pharmscitech* **2018**, *19* (5), 2358–2369. <https://doi.org/10.1208/s12249-018-1064-6>.
- (77) Trotta, F.; Zanetti, M.; Cavalli, R. Cyclodextrin-Based Nanosponges as Drug Carriers. *Beilstein J. Org. Chem.* **2012**, *8* (1), 2091–2099. <https://doi.org/10.3762/bjoc.8.235>.
- (78) Singireddy, A.; Subramanian, S. Cyclodextrin Nanosponges to Enhance the Dissolution Profile of Quercetin by Inclusion Complex Formation. *Part. Sci. Technol.* **2016**, *34* (3), 341–346. <https://doi.org/10.1080/02726351.2015.1081658>.
- (79) Shende, P. K.; Trotta, F.; Gaud, R. S.; Deshmukh, K.; Cavalli, R.; Biasizzo, M. Influence of Different Techniques on Formulation and Comparative Characterization of Inclusion Complexes of ASA with  $\beta$ -Cyclodextrin and

- Inclusion Complexes of ASA with PMDA Cross-Linked  $\beta$ -Cyclodextrin Nanosponges. *J. Incl. Phenom. Macrocycl. Chem.* **2012**, *74* (1), 447–454. <https://doi.org/10.1007/s10847-012-0140-x>.
- (80) Dhakar, N. K.; Matencio, A.; Caldera, F.; Argenziano, M.; Cavalli, R.; Dianzani, C.; Zanetti, M.; Manuel Lopez-Nicolas, J.; Trotta, F. Comparative Evaluation of Solubility, Cytotoxicity and Photostability Studies of Resveratrol and Oxyresveratrol Loaded Nanosponges. *Pharmaceutics* **2019**, *11* (10), 545. <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics11100545>.
- (81) Mognetti, B.; Barberis, A.; Marino, S.; Berta, G.; Francia, S.; Trotta, F.; Cavalli, R. In Vitro Enhancement of Anticancer Activity of Paclitaxel by a Cremophor Free Cyclodextrin-Based Nanosponge Formulation. *J. Incl. Phenom. Macrocycl. Chem.* **2012**, *74* (1–4), 201–210. <https://doi.org/10.1007/s10847-011-0101-9>.
- (82) Dora, C. P.; Trotta, F.; Kushwah, V.; Devasari, N.; Singh, C.; Suresh, S.; Jain, S. Potential of Erlotinib Cyclodextrin Nanosponge Complex to Enhance Solubility, Dissolution Rate, in Vitro Cytotoxicity and Oral Bioavailability. *Carbohydr. Polym.* **2016**, *137*, 339–349. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2015.10.080>.
- (83) Olteanu, A. A.; Aramă, C.-C.; Radu, C.; Mihăescu, C.; Monciu, C.-M. Effect of  $\beta$ -Cyclodextrins Based Nanosponges on the Solubility of Lipophilic Pharmacological Active Substances (Repaglinide). *J. Incl. Phenom. Macrocycl. Chem.* **2014**, *80* (1), 17–24. <https://doi.org/10.1007/s10847-014-0406-6>.
- (84) Trotta, F.; Caldera, F.; Cavalli, R.; Soster, M.; Riedo, C.; Biasizzo, M.; Uccello Barretta, G.; Balzano, F.; Brunella, V. Molecularly Imprinted Cyclodextrin Nanosponges for the Controlled Delivery of L-DOPA: Perspectives for the Treatment of Parkinson's Disease. *Expert Opin. Drug Deliv.* **2016**, *13* (12), 1671–1680. <https://doi.org/10.1080/17425247.2017.1248398>.
- (85) Rao, M. R. P.; Shirsath, C. Enhancement of Bioavailability of Non-Nucleoside Reverse Transcriptase Inhibitor Using Nanosponges. *AAPS PharmSciTech* **2017**, *18* (5), 1728–1738. <https://doi.org/10.1208/s12249-016-0636-6>.
- (86) Zainuddin, R.; Zaheer, Z.; Sangshetti, J. N.; Momin, M. Enhancement of Oral Bioavailability of Anti-HIV Drug Rilpivirine HCl through Nanosponge Formulation. *Drug Dev. Ind. Pharm.* **2017**, *43* (12), 2076–2084. <https://doi.org/10.1080/03639045.2017.1371732>.
- (87) Trotta, F.; Caldera, F.; Dianzani, C.; Argenziano, M.; Barrera, G.; Cavalli, R. Glutathione Bioresponsive Cyclodextrin Nanosponges. *ChemPlusChem* **2016**, *81* (5), 439–443. <https://doi.org/10.1002/cplu.201500531>.
- (88) Momin, M. M.; Zaheer, Z.; Zainuddin, R.; Sangshetti, J. N. Extended Release Delivery of Erlotinib Glutathione Nanosponge for Targeting Lung Cancer. *Artif. Cells Nanomedicine Biotechnol.* **2018**, *46* (5), 1064–1075. <https://doi.org/10.1080/21691401.2017.1360324>.
- (89) Shende, P.; Kulkarni, Y. A.; Gaud, R. S.; Deshmukh, K.; Cavalli, R.; Trotta, F.; Caldera, F. Acute and Repeated Dose Toxicity Studies of Different  $\beta$ -Cyclodextrin-Based Nanosponge Formulations. *J. Pharm. Sci.* **2015**, *104* (5), 1856–1863. <https://doi.org/10.1002/jps.24416>.
- (90) Khalid, Q.; Ahmad, M.; Minhas, M. U.; Batool, F.; Malik, N. S.; Rehman, M. Novel Beta-Cyclodextrin Nanosponges by Chain Growth Condensation for Solubility Enhancement of Dexibuprofen: Characterization and Acute Oral

- Toxicity Studies. *J. Drug Deliv. Sci. Technol.* **2021**, *61*, 102089. <https://doi.org/10.1016/j.jddst.2020.102089>.
- (91) Song, J.; Long, J.; Xie, L.; Sun, Q.; Zhang, L.; Chen, H.; Deng, M.; Li, X. Solubilization and Changes of Physicochemical Properties of Baicalin by Nano Sponge, and Toxicity of Zebrafish Liver. *J. Drug Deliv. Sci. Technol.* **2020**, *60*, 102003. <https://doi.org/10.1016/j.jddst.2020.102003>.
- (92) Misiak, P.; Niemirowicz-Laskowska, K.; Markiewicz, K. H.; Misztalewska-Turkowicz, I.; Wielgat, P.; Kurowska, I.; Siemiaszko, G.; Destarac, M.; Car, H.; Wilczewska, A. Z. Evaluation of Cytotoxic Effect of Cholesterol End-Capped Poly(N-Isopropylacrylamide)s on Selected Normal and Neoplastic Cells. *Int. J. Nanomedicine* **2020**, *15*, 7263–7278. <https://doi.org/10.2147/IJN.S262582>.
- (93) Olim, F.; Neves, A. R.; Vieira, M.; Tomás, H.; Sheng, R. Self-Assembly of Cholesterol-Doxorubicin and TPGS into Prodrug-Based Nanoparticles with Enhanced Cellular Uptake and Lysosome-Dependent Pathway in Breast Cancer Cells. *Eur. J. Lipid Sci. Technol.* **2021**, *123* (5), 2000337. <https://doi.org/10.1002/ejlt.202000337>.
- (94) Ercole, F.; Whittaker, M. R.; Quinn, J. F.; Davis, T. P. Cholesterol Modified Self-Assemblies and Their Application to Nanomedicine. *Biomacromolecules* **2015**, *16* (7), 1886–1914. <https://doi.org/10.1021/acs.biomac.5b00550>.
- (95) Kudina, O.; Tarnavchyk, I.; Khomenko, O.; Budishevskaya, O.; Voronov, S.; Voronov, A. PEG and Cholesterol-Containing Pyromellitates: Synthesis and Self-Assembly. *Macromol. Chem. Phys.* **2013**, *214* (23), 2761–2767. <https://doi.org/10.1002/macp.201300488>.
- (96) Mu, C.-F.; Cui, F.; Yin, Y.-M.; Cho, H.-J.; Kim, D.-D. Docetaxel-Loaded Chitosan-Cholesterol Conjugate-Based Self-Assembled Nanoparticles for Overcoming Multidrug Resistance in Cancer Cells. *Pharmaceutics* **2020**, *12* (9), 783. <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics12090783>.
- (97) Sen, M.; Al-Amin, M.; Kicková, E.; Sadeghi, A.; Puranen, J.; Urtti, A.; Caliceti, P.; Salmaso, S.; Arango-Gonzalez, B.; Ueffing, M. Retinal Neuroprotection by Controlled Release of a VCP Inhibitor from Self-Assembled Nanoparticles. *J. Controlled Release* **2021**, *339*, 307–320. <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2021.09.039>.
- (98) Singh, V.; Guo, T.; Xu, H.; Wu, L.; Gu, J.; Wu, C.; Gref, R.; Zhang, J. Moisture Resistant and Biofriendly CD-MOF Nanoparticles Obtained via Cholesterol Shielding. *Chem. Commun.* **2017**, *53* (66), 9246–9249. <https://doi.org/10.1039/C7CC03471G>.
- (99) Misiak, P.; Niemirowicz-Laskowska, K.; Markiewicz, K. H.; Wielgat, P.; Kurowska, I.; Czarnomysy, R.; Misztalewska-Turkowicz, I.; Car, H.; Bielawski, K.; Wilczewska, A. Z. Doxorubicin-Loaded Polymeric Nanoparticles Containing Ketoester-Based Block and Cholesterol Moiety as Specific Vehicles to Fight Estrogen-Dependent Breast Cancer. *Cancer Nanotechnol.* **2023**, *14* (1), 23. <https://doi.org/10.1186/s12645-023-00176-9>.
- (100) Kim, W. J.; Chang, C.-W.; Lee, M.; Kim, S. W. Efficient siRNA Delivery Using Water Soluble Lipopolymer for Anti-Angiogenic Gene Therapy. *J. Controlled Release* **2007**, *118* (3), 357–363. <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2006.12.026>.
- (101) Markovic, M.; Ben-Shabat, S.; Keinan, S.; Aponick, A.; Zimmermann, E. M.; Dahan, A. Lipidic Prodrug Approach for Improved Oral Drug Delivery



- and Therapy. *Med. Res. Rev.* **2019**, *39* (2), 579–607. <https://doi.org/10.1002/med.21533>.
- (102) Fu, F.-F.; Zhou, B.-Q.; Ouyang, Z.-J.; Wu, Y.-L.; Zhu, J.-Y.; Shen, M.-W.; Xia, J.-D.; Shi, X.-Y. Multifunctional Cholesterol-Modified Dendrimers for Targeted Drug Delivery to Cancer Cells Expressing Folate Receptors. *Chin. J. Polym. Sci.* **2019**, *37* (2), 129–135. <https://doi.org/10.1007/s10118-019-2172-9>.
- (103) Riccardi, C.; Napolitano, F.; Montesarchio, D.; Sampao, S.; Melone, M. A. B. Nanoparticle-Guided Brain Drug Delivery: Expanding the Therapeutic Approach to Neurodegenerative Diseases. *Pharmaceutics* **2021**, *13* (11), 1897. <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics13111897>.
- (104) Liu, L.; Guo, K.; Lu, J.; Venkatraman, S. S.; Luo, D.; Ng, K. C.; Ling, E.-A.; Moochhala, S.; Yang, Y.-Y. Biologically Active Core/Shell Nanoparticles Self-Assembled from Cholesterol-Terminated PEG–TAT for Drug Delivery across the Blood–Brain Barrier. *Biomaterials* **2008**, *29* (10), 1509–1517. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2007.11.014>.
- (105) Mahjoubin-Tehran, M.; Kovanen, P. T.; Xu, S.; Jamialahmadi, T.; Sahebkar, A. Cyclodextrins: Potential Therapeutics against Atherosclerosis. *Pharmacol. Ther.* **2020**, *214*, 107620. <https://doi.org/10.1016/j.pharmthera.2020.107620>.
- (106) Coisne, C.; Tilloy, S.; Monflier, E.; Wils, D.; Fenart, L.; Gosselet, F. Cyclodextrins as Emerging Therapeutic Tools in the Treatment of Cholesterol-Associated Vascular and Neurodegenerative Diseases. *Molecules* **2016**, *21* (12), 1748. <https://doi.org/10.3390/molecules21121748>.
- (107) Wojtusik, J.; Wang, Y.; Pukazhenthi, B. S. Pretreatment with Cholesterol-Loaded Cyclodextrins Prevents Loss of Motility Associated Proteins during Cryopreservation of Addra Gazelle (*Nanger Dama Ruficollis*) Spermatozoa. *Cryobiology* **2018**, *81*, 74–80. <https://doi.org/10.1016/j.cryobiol.2018.02.007>.
- (108) Yang, S. X.; Adams, G. P.; Zwiefelhofer, E. M.; Rajapaksha, K.; Anzar, M. Cholesterol-Cyclodextrin Complex as a Replacement for Egg Yolk in Bull Semen Extender: Sperm Characteristics Post-Thawing and in Vivo Fertility. *Anim. Reprod. Sci.* **2021**, *225*, 106691. <https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2021.106691>.
- (109) Gao, Y.; Jiao, T.; Xing, R.; Zhang, L.; Zhou, J.; Peng, Q. Construction and Self-Assembly of Beta-Cyclodextrin Derivative Composite Langmuir Films: Host-Guest Reaction and Nanostructures. *Colloids Surf. Physicochem. Eng. Asp.* **2017**, *533*, 68–75. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfa.2017.08.025>.
- (110) Bauer, M.; Charitat, T.; Fajolles, C.; Fragneto, G.; Daillant, J. Insertion Properties of Cholesteryl Cyclodextrins in Phospholipid Membranes: A Molecular Study. *Soft Matter* **2012**, *8* (4), 942–953. <https://doi.org/10.1039/C1SM06346D>.
- (111) Bauer, M.; Fajolles, C.; Charitat, T.; Wacklin, H.; Daillant, J. Amphiphilic Behavior of New Cholesteryl Cyclodextrins: A Molecular Study. *J. Phys. Chem. B* **2011**, *115* (51), 15263–15270. <https://doi.org/10.1021/jp205917q>.
- (112) Klaus, A.; Fajolles, C.; Bauer, M.; Collet, M.; Mallet, J.-M.; Daillant, J. Amphiphilic Behavior and Membrane Solubility of a Dicholesteryl-Cyclodextrin. *Langmuir* **2011**, *27* (12), 7580–7586. <https://doi.org/10.1021/la200863c>.

- (113) Kauscher, U.; Stuart, M. C. A.; Drücker, P.; Galla, H.-J.; Ravoo, B. J. Incorporation of Amphiphilic Cyclodextrins into Liposomes as Artificial Receptor Units. *Langmuir* **2013**, *29* (24), 7377–7383. <https://doi.org/10.1021/la3045434>.
- (114) Auzély-Velty, R.; Perly, B.; Taché, O.; Zemb, T.; Jéhan, P.; Guenot, P.; Dalbiez, J.-P.; Djedai`ni-Pilard, F. Cholesteryl-Cyclodextrins: Synthesis and Insertion into Phospholipid Membranes. *Carbohydr. Res.* **1999**, *318* (1), 82–90. [https://doi.org/10.1016/S0008-6215\(99\)00086-5](https://doi.org/10.1016/S0008-6215(99)00086-5).
- (115) Collot, M.; Garcia-Moreno, M. I.; Fajolles, C.; Roux, M.; Mauclaire, L.; Mallet, J.-M. Bis Antennae Amphiphilic Cyclodextrins: The First Examples. *Tetrahedron Lett.* **2007**, *48* (48), 8566–8569. <https://doi.org/10.1016/j.tetlet.2007.09.020>.
- (116) Nguyen, H.; Katavic, P.; Bashah, N. A. H.; Ferro, V. Synthesis of Mannose-Cholesterol Conjugates for Targeted Liposomal Drug Delivery. *Chemistryselect* **2016**, *1* (1), 31–35. <https://doi.org/10.1002/slct.201600007>.
- (117) Bai, H.; Wang, J.; Phan, C. U.; Chen, Q.; Hu, X.; Shao, G.; Zhou, J.; Lai, L.; Tang, G. Cyclodextrin-Based Host-Guest Complexes Loaded with Regorafenib for Colorectal Cancer Treatment. *Nat. Commun.* **2021**, *12* (1), 759. <https://doi.org/10.1038/s41467-021-21071-0>.
- (118) Ohno, Y.; Toshino, M.; Mohammed, A. F. A.; Fujiwara, Y.; Komohara, Y.; Onodera, R.; Higashi, T.; Motoyama, K. Mannose-Methyl- $\beta$ -Cyclodextrin Suppresses Tumor Growth by Targeting Both Colon Cancer Cells and Tumor-Associated Macrophages. *Carbohydr. Polym.* **2023**, *305*, 120551. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2023.120551>.
- (119) De Coen, R.; Vanparijs, N.; Risseeuw, M. D. P.; Lybaert, L.; Louage, B.; De Koker, S.; Kumar, V.; Grooten, J.; Taylor, L.; Ayres, N.; Van Calenbergh, S.; Nuhn, L.; De Geest, B. G. pH-Degradable Mannosylated Nanogels for Dendritic Cell Targeting. *Biomacromolecules* **2016**, *17* (7), 2479–2488. <https://doi.org/10.1021/acs.biomac.6b00685>.
- (120) Kutcherlapati, S. N. R.; Koyilapu, R.; Boddu, U. M. R.; Datta, D.; Perali, R. S.; Swamy, M. J.; Jana, T. Glycopolymer-Grafted Nanoparticles: Synthesis Using RAFT Polymerization and Binding Study with Lectin. *Macromolecules* **2017**, *50* (18), 7309–7320. <https://doi.org/10.1021/acs.macromol.7b01265>.
- (121) Baranyai, Z.; Soria-Carrera, H.; Alleva, M.; Millán-Placer, A. C.; Lucía, A.; Martín-Rapún, R.; Aínsa, J. A.; de la Fuente, J. M. Nanotechnology-Based Targeted Drug Delivery: An Emerging Tool to Overcome Tuberculosis. *Adv. Ther.* **2021**, *4* (1), 2000113. <https://doi.org/10.1002/adtp.202000113>.
- (122) Richards, S.-J.; Fullam, E.; Besra, G. S.; Gibson, M. I. Discrimination between Bacterial Phenotypes Using Glyco-Nanoparticles and the Impact of Polymer Coating on Detection Readouts. *J Mater Chem B* **2014**, *2* (11), 1490–1498. <https://doi.org/10.1039/C3TB21821J>.
- (123) Roy, B.; Mukhopadhyay, B. Sulfuric Acid Immobilized on Silica: An Excellent Catalyst for Fischer Type Glycosylation. *Tetrahedron Lett.* **2007**, *48* (22), 3783–3787. <https://doi.org/10.1016/j.tetlet.2007.03.165>.
- (124) Shaikh, N.; Russo, L.; Cipolla, L.; Nicotra, F. Ultrasonic Assisted Fischer Glycosylation: Generating Diversity for Glycochemistry. *Mol. Divers.* **2011**, *15* (2), 341–345. <https://doi.org/10.1007/s11030-010-9281-2>.
- (125) Basuki, J. S.; Esser, L.; Duong, H. T. T.; Zhang, Q.; Wilson, P.; Whittaker, M. R.; Haddleton, D. M.; Boyer, C.; Davis, T. P. Magnetic Nanoparticles with

- Diblock Glycopolymers Give Lectin Concentration-Dependent MRI Signals and Selective Cell Uptake. *Chem Sci* **2014**, *5* (2), 715–726. <https://doi.org/10.1039/C3SC52838C>.
- (126) Su, L.; Zhang, W.; Wu, X.; Zhang, Y.; Chen, X.; Liu, G.; Chen, G.; Jiang, M. Glycocalyx-Mimicking Nanoparticles for Stimulation and Polarization of Macrophages via Specific Interactions. *Small* **2015**, *11* (33), 4191–4200. <https://doi.org/10.1002/sml.201403838>.
- (127) Oz, Y.; Abdouni, Y.; Yilmaz, G.; Becer, C. R.; Sanyal, A. Magnetic Glyconanoparticles for Selective Lectin Separation and Purification. *Polym. Chem.* **2019**, *10* (24), 3351–3361. <https://doi.org/10.1039/C8PY01748D>.
- (128) Raposo, C. D.; Conceição, C. A.; Barros, M. T. Nanoparticles Based on Novel Carbohydrate-Functionalized Polymers. *Molecules* **2020**, *25* (7), 1744. <https://doi.org/10.3390/molecules25071744>.
- (129) Krabicová, I.; Dolenský, B.; Řezanka, M. Selectivity of 1-O-Propargyl-d-Mannose Preparations. *Molecules* **2022**, *27* (5), 1483. <https://doi.org/10.3390/molecules27051483>.
- (130) Namazi, H.; Pooresmaeil, M.; Salehi, R. Construction of a New Dual-Drug Delivery System Based on Stimuli-Responsive Co-Polymer Functionalized D-Mannose for Chemotherapy of Breast Cancer. *Eur. Polym. J.* **2023**, *188*, 111958. <https://doi.org/10.1016/j.eurpolymj.2023.111958>.
- (131) Hu, J.; Wei, P.; Seeberger, P. H.; Yin, J. Mannose-Functionalized Nanoscaffolds for Targeted Delivery in Biomedical Applications. *Chem.-Asian J.* **2018**, *13* (22), 3448–3459. <https://doi.org/10.1002/asia.201801088>.
- (132) Patil, T. S.; Deshpande, A. S. Mannosylated Nanocarriers Mediated Site-Specific Drug Delivery for the Treatment of Cancer and Other Infectious Diseases: A State of the Art Review. *J. Controlled Release* **2020**, *320*, 239–252. <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2020.01.046>.
- (133) Wijagkanalan, W.; Kawakami, S.; Takenaga, M.; Igarashi, R.; Yamashita, F.; Hashida, M. Efficient Targeting to Alveolar Macrophages by Intratracheal Administration of Mannosylated Liposomes in Rats. *J. Controlled Release* **2008**, *125* (2), 121–130. <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2007.10.011>.
- (134) Yeeprae, W.; Kawakami, S.; Yamashita, F.; Hashida, M. Effect of Mannose Density on Mannose Receptor-Mediated Cellular Uptake of Mannosylated O/W Emulsions by Macrophages. *J. Controlled Release* **2006**, *114* (2), 193–201. <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2006.04.010>.
- (135) de Vries, W. C.; Tesch, M.; Studer, A.; Ravoo, B. J. Molecular Recognition and Immobilization of Ligand-Conjugated Redox-Responsive Polymer Nanocontainers. *ACS Appl. Mater. Interfaces* **2017**, *9* (48), 41760–41766. <https://doi.org/10.1021/acsami.7b15516>.
- (136) Tobias, J. S.; Hochhauser, D. *Cancer and Its Management*; John Wiley & Sons, 2014.
- (137) Pei, Y.; Yeo, Y. Drug Delivery to Macrophages: Challenges and Opportunities. *J. Controlled Release* **2016**, *240*, 202–211. <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2015.12.014>.
- (138) Monack, D. M.; Mueller, A.; Falkow, S. Persistent Bacterial Infections: The Interface of the Pathogen and the Host Immune System. *Nat. Rev. Microbiol.* **2004**, *2* (9), 747–765. <https://doi.org/10.1038/nrmicro955>.
- (139) Anselmo, A. C.; Mitragotri, S. Cell-Mediated Delivery of Nanoparticles: Taking Advantage of Circulatory Cells to Target Nanoparticles. *J. Controlled*

- Release* **2014**, *190*, 531–541.  
<https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2014.03.050>.
- (140) Madsen, S. J.; Christie, C.; Hong, S. J.; Trinidad, A.; Peng, Q.; Uzal, F. A.; Hirschberg, H. Nanoparticle-Loaded Macrophage-Mediated Photothermal Therapy: Potential for Glioma Treatment. *Lasers Med. Sci.* **2015**, *30* (4), 1357–1365. <https://doi.org/10.1007/s10103-015-1742-5>.
- (141) Choi, J.; Kim, H.-Y.; Ju, E. J.; Jung, J.; Park, J.; Chung, H.-K.; Lee, J. S.; Lee, J. S.; Park, H. J.; Song, S. Y.; Jeong, S.-Y.; Choi, E. K. Use of Macrophages to Deliver Therapeutic and Imaging Contrast Agents to Tumors. *Biomaterials* **2012**, *33* (16), 4195–4203. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2012.02.022>.
- (142) Ji, Z.; Tan, Z.; Li, M.; Tao, J.; Guan, E.; Du, J.; Hu, Y. Multi-Functional Nanocomplex Codelivery of Trp2 and R837 to Activate Melanoma-Specific Immunity. *Int. J. Pharm.* **2020**, *582*, 119310. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2020.119310>.
- (143) Blakney, A. K.; Abdouni, Y.; Yilmaz, G.; Liu, R.; McKay, P. F.; Bouton, C. R.; Shattock, R. J.; Becer, C. R. Mannosylated Poly(Ethylene Imine) Copolymers Enhance saRNA Uptake and Expression in Human Skin Explants. *Biomacromolecules* **2020**, *21* (6), 2482–2492. <https://doi.org/10.1021/acs.biomac.0c00445>.
- (144) Méndez-Ardoy, A.; Díaz-Moscoso, A.; Mellet, C. O.; Giorgio, C. D.; Vierling, P.; Benito, J. M.; Fernández, J. M. G. Harmonized Tuning of Nucleic Acid and Lectin Binding Properties with Multivalent Cyclodextrins for Macrophage-Selective Gene Delivery. *RSC Adv.* **2015**, *5* (93), 76464–76471. <https://doi.org/10.1039/C5RA16087A>.
- (145) Cui, Z.; Han, D.; Sun, X.; Zhang, M.; Feng, X.; Sun, C.; Gu, J.; Tong, C.; Lei, L.; Han, W. Mannose-Modified Chitosan Microspheres Enhance OprF-OprI-Mediated Protection of Mice against *Pseudomonas Aeruginosa* Infection via Induction of Mucosal Immunity. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **2015**, *99* (2), 667–680. <https://doi.org/10.1007/s00253-014-6147-z>.
- (146) Kim, T. H.; Nah, J. W.; Cho, M.-H.; Park, T. G.; Cho, C. S. Receptor-Mediated Gene Delivery into Antigen Presenting Cells Using Mannosylated Chitosan/DNA Nanoparticles. *J. Nanosci. Nanotechnol.* **2006**, *6* (9–10), 2796–2803. <https://doi.org/10.1166/jnn.2006.434>.
- (147) Kim, T. H.; Jin, H.; Kim, H. W.; Cho, M.-H.; Cho, C. S. Mannosylated Chitosan Nanoparticle-Based Cytokine Gene Therapy Suppressed Cancer Growth in BALB/c Mice Bearing CT-26 Carcinoma Cells. *Mol. Cancer Ther.* **2006**, *5* (7), 1723–1732. <https://doi.org/10.1158/1535-7163.MCT-05-0540>.
- (148) Costa, A.; Sarmiento, B.; Seabra, V. Mannose-Functionalized Solid Lipid Nanoparticles Are Effective in Targeting Alveolar Macrophages. *Eur. J. Pharm. Sci.* **2018**, *114*, 103–113. <https://doi.org/10.1016/j.ejps.2017.12.006>.
- (149) Lo, W.; Zhang, P.; Ling, C.-C.; Huang, S.; Holm, R. H. Formation, Spectroscopic Characterization, and Solution Stability of an  $[\text{Fe}_4\text{S}_4]^{2+}$  Cluster Derived from  $\beta$ -Cyclodextrin Dithiolate. *Inorg. Chem.* **2012**, *51* (18), 9883–9892. <https://doi.org/10.1021/ic301324u>.
- (150) Ding, Y.; Vara Prasad, C. V. N. S.; Ding, C.; Wang, B. Synthesis of Carbohydrate Conjugated 6A,6D-Bifunctionalized  $\beta$  Cyclodextrin Derivatives as Potential Liver Cancer Drug Carriers. *Carbohydr. Polym.* **2018**, *181*, 957–963. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2017.11.054>.

- (151) Tabushi, I.; Yamamura, K.; Nabeshima, T. Characterization of Regiospecific AC- and AD-Disulfonate Capping of  $\beta$ -Cyclodextrin. Capping as an Efficient Production Technique. *J. Am. Chem. Soc.* **1984**, *106* (18), 5267–5270. <https://doi.org/10.1021/ja00330a039>.
- (152) Grishina, A.; Stanchev, S.; Kumprecht, L.; Buděšínský, M.; Pojarová, M.; Dušek, M.; Rumlová, M.; Křížová, I.; Rulíšek, L.; Kraus, T.  $\beta$ -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>.
- (153) Averick, S.; Karácsony, O.; Mohin, J.; Yong, X.; Moellers, N. M.; Woodman, B. F.; Zhu, W.; Mehl, R. A.; Balazs, A. C.; Kowalewski, T.; Matyjaszewski, K. Cooperative, Reversible Self-Assembly of Covalently Pre-Linked Proteins into Giant Fibrous Structures. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2014**, *53* (31), 8050–8055. <https://doi.org/10.1002/anie.201402827>.
- (154) Shan, M.; Bujotzek, A.; Abendroth, F.; Wellner, A.; Gust, R.; Seitz, O.; Weber, M.; Haag, R. Conformational Analysis of Bivalent Estrogen Receptor Ligands: From Intramolecular to Intermolecular Binding. *ChemBioChem* **2011**, *12* (17), 2587–2598. <https://doi.org/10.1002/cbic.201100529>.
- (155) Zhong, N.; Byun, H. S.; Bittman, R. An Improved Synthesis of 6-O-Monosyl-6-Deoxy- $\beta$ -Cyclodextrin. *Tetrahedron Lett.* **1998**, *39* (19), 2919–2920. [https://doi.org/10.1016/S0040-4039\(98\)00417-1](https://doi.org/10.1016/S0040-4039(98)00417-1).
- (156) Bonnet, V.; Duval, R.; Tran, V.; Rabiller, C. Mono-N-Glycosidation of  $\beta$ -Cyclodextrin – Synthesis of 6-( $\beta$ -Cyclodextrinylamino)-6-Deoxy-D-Galactosides and of N-(6-Deoxy- $\beta$ -Cyclodextrinyl)Galacto-Azepane. *Eur. J. Org. Chem.* **2003**, *2003* (24), 4810–4818. <https://doi.org/10.1002/ejoc.200300449>.
- (157) Trelenkamp, T.; Ritter, H. Poly(*N*-Vinylpyrrolidone) Bearing Covalently Attached Cyclodextrin via Click-Chemistry: Synthesis, Characterization, and Complexation Behavior with Phenolphthalein. *Macromolecules* **2010**, *43* (13), 5538–5543. <https://doi.org/10.1021/ma100812q>.
- (158) Zhao, J.; Liu, Y.; Park, H.-J.; Boggs, J. M.; Basu, A. Carbohydrate-Coated Fluorescent Silica Nanoparticles as Probes for the Galactose/3-Sulfogalactose Carbohydrate–Carbohydrate Interaction Using Model Systems and Cellular Binding Studies. *Bioconjug. Chem.* **2012**, *23* (6), 1166–1173. <https://doi.org/10.1021/bc2006169>.
- (159) Poláková, M.; Beláňová, M.; Mikušová, K.; Lattová, E.; Perreault, H. Synthesis of 1,2,3-Triazolo-Linked Octyl (1→6)- $\alpha$ -D-Oligomannosides and Their Evaluation in Mycobacterial Mannosyltransferase Assay. *Bioconjug. Chem.* **2011**, *22* (2), 289–298. <https://doi.org/10.1021/bc100421g>.
- (160) Liu, Y.; Xu, J.; Craig, S. L. Hierarchical Self-Assembly of Noncovalent Amphiphiles. *Chem. Commun.* **2004**, No. 16, 1864–1865. <https://doi.org/10.1039/B405982D>.
- (161) Chena Tichá, I. Synthesis of Cyclodextrin Derivatives for Organocatalysis. Disertační práce, Univerzita Karlova, Praha, 2019.
- (162) Marquick, A. L.; Montero, J.-L.; Lebrun, A.; Barragan-Montero, V. Straightforward Synthesis towards Mono and Bis-Phosphonic Acid Functionalised  $\beta$ -Cyclodextrins. *Tetrahedron* **2015**, *71* (10), 1616–1621. <https://doi.org/10.1016/j.tet.2014.12.019>.
- (163) Bistri, O.; Sinaÿ, P.; Jiménez Barbero, J.; Sollogoub, M. Chemical Clockwise Tridifferentiation of  $\alpha$ - and  $\beta$ -Cyclodextrins: Bascule-Bridge or

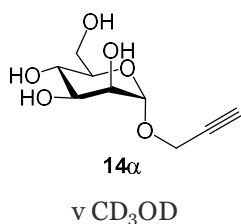
- Deoxy-Sugars Strategies. *Chem. – Eur. J.* **2007**, *13* (35), 9757–9774. <https://doi.org/10.1002/chem.200700971>.
- (164) Crawford, C. J.; Qiao, Y.; Liu, Y.; Huang, D.; Yan, W.; Seeberger, P. H.; Oscarson, S.; Chen, S. Defining the Qualities of High-Quality Palladium on Carbon Catalysts for Hydrogenolysis. *Org. Process Res. Dev.* **2021**, *25* (7), 1573–1578. <https://doi.org/10.1021/acs.oprd.0c00536>.
- (165) Shaikh, V. A. E.; Lonikar, S. V.; Dhobale, D. A.; Pawar, G. M. Cholesterol-Linked  $\beta$ -Cyclodextrin—A Thermotropic Liquid-Crystalline Derivative. *Bull. Chem. Soc. Jpn.* **2007**, *80* (10), 1975–1980. <https://doi.org/10.1246/bcsj.80.1975>.
- (166) Devi, P.; Sharma, P.; Rathore, C.; Negi, P. Novel Drug Delivery Systems of Resveratrol to Bioavailability and Therapeutic Effects. In *Resveratrol - Adding Life to Years, Not Adding Years to Life*; A. Badria, F., Ed.; IntechOpen, 2019. <https://doi.org/10.5772/intechopen.79739>.
- (167) Poonia, N.; Narang, J. K.; Lather, V.; Beg, S.; Sharma, T.; Singh, B.; Pandita, D. Resveratrol Loaded Functionalized Nanostructured Lipid Carriers for Breast Cancer Targeting: Systematic Development, Characterization and Pharmacokinetic Evaluation. *Colloids Surf. B-Biointerfaces* **2019**, *181*, 756–766. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2019.06.004>.
- (168) Pushpalatha, R.; Selvamuthukumar, S.; Kilimozhi, D. Carbonyl and Carboxylate Crosslinked Cyclodextrin as a Nanocarrier for Resveratrol: In Silico, in Vitro and in Vivo Evaluation. *J. Incl. Phenom. Macrocycl. Chem.* **2018**, *92* (3), 261–272. <https://doi.org/10.1007/s10847-018-0843-8>.
- (169) Chen, C.-J.; Wang, J.-C.; Zhao, E.-Y.; Gao, L.-Y.; Feng, Q.; Liu, X.-Y.; Zhao, Z.-X.; Ma, X.-F.; Hou, W.-J.; Zhang, L.-R.; Lu, W.-L.; Zhang, Q. Self-Assembly Cationic Nanoparticles Based on Cholesterol-Grafted Bioreducible Poly(Amidoamine) for siRNA Delivery. *Biomaterials* **2013**, *34* (21), 5303–5316. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2013.03.056>.
- (170) Wamhoff, E.-C.; Hanske, J.; Schnirch, L.; Aretz, J.; Grube, M.; Varón Silva, D.; Rademacher, C. <sup>19</sup>F NMR-Guided Design of Glycomimetic Langerin Ligands. *ACS Chem. Biol.* **2016**, *11* (9), 2407–2413. <https://doi.org/10.1021/acscchembio.6b00561>.
- (171) Wardrop, D. J.; Zhang, W.; Fritz, J. Stereospecific Entry to [4.5]Spiroketal Glycosides Using Alkylidenecarbene C–H Insertion. *Org. Lett.* **2002**, *4* (4), 489–492. <https://doi.org/10.1021/ol016975l>.
- (172) Koll, P.; Komander, H.; Meyer, B. Carbohydrates Containing the 2,6-Dioxabicyclo[3.3.0]octane Skeleton - 3,6-Anhydrohexofuranose Derivatives with D-Gluc, D-Manno, L-Ido, and L-Gulo Configuration. *Liebigs Ann. Chem.* **1983**, No. 8, 1310–1331.
- (173) Kramer, S.; Langhanki, J.; Krumb, M.; Opatz, T.; Bros, M.; Zentel, R. HPMA-Based Nanocarriers for Effective Immune System Stimulation. *Macromol. Biosci.* **2019**, *19* (6), 1800481. <https://doi.org/10.1002/mabi.201800481>.
- (174) Zhang, Q.; Cai, Y.; Li, Q.-Y.; Hao, L.-N.; Ma, Z.; Wang, X.-J.; Yin, J. Targeted Delivery of a Mannose-Conjugated BODIPY Photosensitizer by Nanomicelles for Photodynamic Breast Cancer Therapy. *Chem. - Eur. J.* **2017**, *23* (57), 14307–14315. <https://doi.org/10.1002/chem.201702935>.
- (175) Garcia-Alvarez, F.; Martinez-Garcia, M. Click Reaction in the Synthesis of Dendrimer Drug-Delivery Systems. *Curr. Med. Chem.* **2022**, *19* (19), 3445–3470. <https://doi.org/10.2174/0929867328666211027124724>.

- (176) Sun, S.; Wu, P. Mechanistic Insights into Cu(I)-Catalyzed Azide–Alkyne “Click” Cycloaddition Monitored by Real Time Infrared Spectroscopy. *J. Phys. Chem. A* **2010**, *114* (32), 8331–8336. <https://doi.org/10.1021/jp105034m>.
- (177) Berto, S.; Bruzzoniti, M. C.; Cavalli, R.; Perrachon, D.; Prenesti, E.; Sarzanini, C.; Trotta, F.; Tumiatti, W. Synthesis of New Ionic  $\beta$ -Cyclodextrin Polymers and Characterization of Their Heavy Metals Retention. *J. Incl. Phenom. Macrocycl. Chem.* **2007**, *57* (1), 631–636. <https://doi.org/10.1007/s10847-006-9273-0>.
- (178) Berto, S.; Bruzzoniti, M. C.; Cavalli, R.; Perrachon, D.; Prenesti, E.; Sarzanini, C.; Trotta, F.; Tumiatti, W. Highly Crosslinked Ionic  $\beta$ -Cyclodextrin Polymers and Their Interaction with Heavy Metals. *J. Incl. Phenom. Macrocycl. Chem.* **2007**, *57* (1), 637–643. <https://doi.org/10.1007/s10847-006-9270-3>.
- (179) Cao, Y.; Li, J.; Liu, J.; Liu, H.; Jiang, Y.; Zhang, H. Preparation and Characterisation of a Novel Copper-Imprinted Polymer Based on  $\beta$ -Cyclodextrin Copolymers for Selective Determination of Cu<sup>2+</sup> Ions. *Polym. Int.* **2019**, *68* (4), 694–699. <https://doi.org/10.1002/pi.5752>.
- (180) Tang, X.; Yan, Z.; Miao, Y.; Ha, W.; Li, Z.; Yang, L.; Mi, D. Copper in Cancer: From Limiting Nutrient to Therapeutic Target. *Front. Oncol.* **2023**, *13*.
- (181) Cao, B.; Zheng, Y.; Xi, T.; Zhang, C.; Song, W.; Burugapalli, K.; Yang, H.; Ma, Y. Concentration-Dependent Cytotoxicity of Copper Ions on Mouse Fibroblasts in Vitro: Effects of Copper Ion Release from TCu380A vs TCu220C Intra-Uterine Devices. *Biomed. Microdevices* **2012**, *14* (4), 709–720. <https://doi.org/10.1007/s10544-012-9651-x>.
- (182) Lopez, J.; Ramchandani, D.; Vahdat, L. Copper Depletion as a Therapeutic Strategy in Cancer. In *Essential Metals in Medicine: Therapeutic Use and Toxicity of Metal Ions in the Clinic*; De Gruyter: Berlin, Boston, 2019; Vol. 19, pp 303–330. <https://doi.org/10.1515/9783110527872-018>.
- (183) Chakraborty, P.; Das, S.; Banerjee, K.; Sinha, A.; Roy, S.; Chatterjee, M.; Choudhuri, S. K. A Copper Chelate Selectively Triggers Apoptosis in Myeloid-Derived Suppressor Cells in a Drug-Resistant Tumor Model and Enhances Antitumor Immune Response. *Immunopharmacol. Immunotoxicol.* **2014**, *36* (2), 165–175. <https://doi.org/10.3109/08923973.2014.897727>.

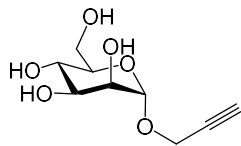
## 9 Přílohy

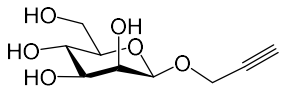
### A. Analýza manosových derivátů pomocí NMR

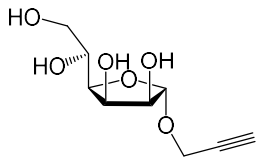
Tabulka A-1: NMR charakteristiky manosových derivátů.

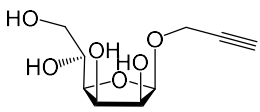
Produkt	C1		C2		C3		C4		C5		C6	
	H1		H2		H3		H4		H5		H6	
 <p><b>14<math>\alpha</math></b> v CD<sub>3</sub>OD</p>		99.819		71.997		72.473		68.455		75.063		62.807
	4.964 dt		3.795 dd		3.670 ddd		3.620 t		3.509 dddd		3.835 dd	
	$J_{HH} = 1.7, 0.5$		$J_{HH} = 3.3, 1.7$		$J_{HH} = 9.4, 3.3, 0.4$		$J_{HH} = 9.5$		$J_{HH} = 9.6, 5.9, 2.4,$		$J_{HH} = 11.8, 2.4$	
	$^1J_{HC} = 169.6$								0.6		3.704 dd	
	<b>O1-CH<sub>2</sub>CCH</b>		OH		OH		OH				$J_{HH} = 11.8, 5.9$	
	54.808		5.461 široký d		5.216 široký d		5.412 široký d				OH	
	4.273 d										5.242 široký t	
	$J_{HH} = 2.4$											
	$^1J_{HC} = 149.3$											
			75.959									
		80.018										
2.850 t												
$J_{HH} = 2.4$												
$^1J_{HC} = 251.0$												
$^2J_{HC} = 49.9$												

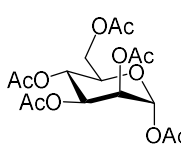
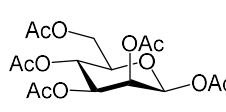


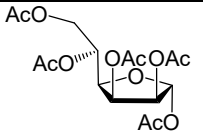
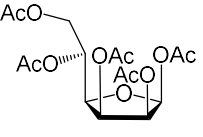
Produkt	C1		C2		C3		C4		C5		C6	
	H1		H2		H3		H4		H5		H6	
 <p>14<math>\alpha</math> v D<sub>2</sub>O</p>		98.798		69.977		70.500		66.663		73.173		60.858
	4.927 dm		3.846 ddd		3.689 ddd		3.575 ~t <sup>b</sup>		~3.563 m <sup>b</sup>		3.782 dd	
	$J_{HH} = 1.8$		$J_{HH} = 3.5, 1.8, 0.3$		$J_{HH} = 9.5, 3.5, 0.4$		$J_{HH} = \sim 9.8$				$J_{HH} = 12.3, 1.9$	
	<b>O1-CH<sub>2</sub>CCH</b>										3.663 dd	
											$J_{HH} = 12.3, 5.6$	
		54.599										
		(54.590) <sup>a</sup>										
	4.250 dd											
	$J_{HH} = 15.9, 2.4$											
	4.206 dd											
	$J_{HH} = 15.9, 2.4$											
		78.873										
	(78.422, t, $J_{CD} 7.7$ ) <sup>a</sup>											
	76.212											
	(75.986, t, $J_{CD} 39.2$ ) <sup>a</sup>											
2.817 t												
$J_{HH} = 2.5$												

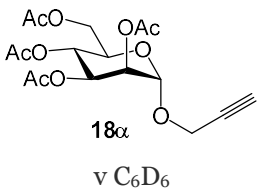
Produkt	C1		C2		C3		C4		C5		C6	
	H1		H2		H3		H4		H5		H6	
 <p><b>14β</b> v D<sub>2</sub>O</p>		98.104		70.500		72.961		66.882		76.406		61.098
		4.757 d		3.901 ddd		3.563 dd		3.478 t		3.293 ddd		3.829 dd
		$J_{\text{HH}} = 1.0$		$J_{\text{HH}} = 3.3, 1.0, 0.3$		$J_{\text{HH}} = 9.8, 3.3$		$J_{\text{HH}} = 9.7$		$J_{\text{HH}} = 9.8, 6.5, 2.3$		$J_{\text{HH}} = 12.3, 2.3, 0.3$
		<b>O1-CH<sub>2</sub>CCH</b>										3.633 d
			56.070									$J_{\text{HH}} = 12.3, 6.5$
		4.364 dm <sup>b</sup>										
		$J_{\text{HH}} = 16.0$										
		4.348 dm <sup>b</sup>										
		$J_{\text{HH}} = 16.0$										
			78.968									
		76.277										
	2.820 t											
	$J_{\text{HH}} = 2.4$											

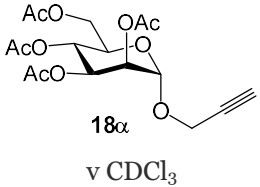
Produkt	C1		C2		C3		C4		C5		C6	
	H1		H2		H3		H4		H5		H6	
 <p><b>15<math>\alpha</math></b> v D<sub>2</sub>O</p>		100.235		71.899		69.659		79.840		69.867		63.049
	5.081 dd		4.157 dd		4.216 dd		3.926 ddd		3.880 ddd		3.747 dd	
	$J_{\text{HH}} = 4.9, 0.4$		$J_{\text{HH}} = 5.1, 4.9$		$J_{\text{HH}} = 5.1, 4.1$		$J_{\text{HH}} = 9.3, 4.1, 0.4$		$J_{\text{HH}} = 9.3, 5.8, 2.6$		$J_{\text{HH}} = 12.0, 2.6$	
	<b>O1-CH<sub>2</sub>CCH</b>										3.586 dd	
		55.400										$J_{\text{HH}} = 12.0, 5.8$
	4.213 d											
$J_{\text{HH}} = 2.4$												
	79.391											
	75.837											
2.780 t												
$J_{\text{HH}} = 2.4$												

Produkt	C1		C2		C3		C4		C5		C6	
	H1		H2		H3		H4		H5		H6	
 <p><b>15β</b> v D<sub>2</sub>O</p>		106.488		76.967		71.234		79.579		69.028		63.075
		5.080 ddd		4.099 dd		4.241 dddd		3.976 dd		3.840 ddd		3.708 dd
		$J_{\text{HH}} = 4.1, 0.4, 0.3$		$J_{\text{HH}} = 4.7, 4.1$		$J_{\text{HH}} = 4.7, 3.0, 0.4, 0.2$		$J_{\text{HH}} = 8.8, 3.0, 0.3$		$J_{\text{HH}} = 8.8, 6.1, 2.9$		$J_{\text{HH}} = 12.1, 2.9, 0.2$
		<b>O1-CH<sub>2</sub>CCH</b> <b>(nebo D)</b>										3.533 dd
			55.880									$J_{\text{HH}} = 12.1, 6.1$
		(55.872) <sup>a</sup>										
		4.260 dd										
		$J_{\text{HH}} = 15.9, 2.4$										
		4.218 dd										
		$J_{\text{HH}} = 15.9, 2.4$										
		79.092										
	(78.642, t, $J_{\text{CD}} 7.5$ ) <sup>a</sup>											
		76.100										
	(75.870, t, $J_{\text{CD}} 38.6$ ) <sup>a</sup>											
	2.808 t											
	$J_{\text{HH}} = 2.5$											

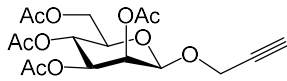
Produkt	C1		C2		C3		C4		C5		C6	
	H1		H2		H3		H4		H5		H6	
 <p><b>16<math>\alpha</math></b> v CDCl<sub>3</sub></p>	90.690	68.422	68.825	65.630	70.693	62.186	6.058 dd $J_{\text{HH}} = 2.0, 0.7$ $J_{\text{HC}} = 177.8$	5.234 m <sup>b</sup>	~5.32 m <sup>b</sup>	~5.32 m <sup>b</sup>	~4.026 m <sup>b</sup>	4.253 dd $J_{\text{HH}} = 12.4, 4.9$ 4.077 dd $J_{\text{HH}} = 12.4, 2.5$
	<b>O1-Ac</b>	<b>O2-Ac</b>	<b>O3-Ac</b>	<b>O4-Ac</b>	<b>O6-Ac</b>							
	68.148	169.821	170.071	169.621	170.722							
	20.919	20.824	20.696	20.718	20.770							
	2.144 s	2.151 s	1.981 s	2.028 s	2.067 s							
 <p><b>16<math>\beta</math></b> v CDCl<sub>3</sub></p>	90.509	68.273	70.728	65.505	73.368	62.151	5.840 d $J_{\text{HH}} = 1.2$	5.458 ddd $J_{\text{HH}} = 3.3, 1.2, 0.4$	5.112 dd $J_{\text{HH}} = 10.0, 3.3$	5.263 td $J_{\text{HH}} = 9.9, 0.4$	3.786 ddd $J = 9.9, 5.4, 2.4$	4.279 dd $J_{\text{HH}} = 12.4, 5.4$ 4.116 dd $J_{\text{HH}} = 12.4, 2.4$
	<b>O1-Ac</b>	<b>O2-Ac</b>	<b>O3-Ac</b>	<b>O4-Ac</b>	<b>O6-Ac</b>							
	168.456	170.282	169.875	169.665	170.736							
	20.784	20.830	20.597	20.734	20.807							
	2.076 s	2.187 s	1.978 s	2.028 s	2.067 s							

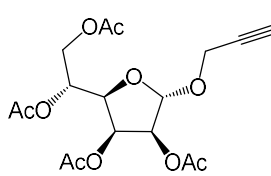
Produkt	C1		C2		C3		C4		C5		C6	
	H1		H2		H3		H4		H5		H6	
 <p><b>17α</b> v CDCl<sub>3</sub></p>	6.206 ddd $J_{HH} = 3.4, 0.5, 0.4$	98.48	5.35 dd $J_{HH} = 5.0, 3.4$	75.45	5.59 ddd $J_{HH} = 5.0, 4.2, 0.4$	70.39	4.46 dd $J_{HH} = 8.7, 4.2$	77.44	překryv signálů 5.27 $J_{HH} = 8.7, 5.8, 2.4$		4.56 dd $J_{HH} = 12.3, 2.5$ 4.07 dd $J_{HH} = 12.3, 5.8$	62.69
 <p><b>17β</b> v CDCl<sub>3</sub></p>	6.32 dd $J_{HH} = 4.8, 0.5$		5.24 ~t <sup>b</sup> $J_{HH} \sim 5.0$		5.62 dd $J_{HH} = 5.4, 4.8$		4.39 dd $J_{HH} = 9.4, 4.7$		Nebyly pozorovány kvůli překryvům a nízké koncentraci		Nebyly pozorovány kvůli překryvům a nízké koncentraci	

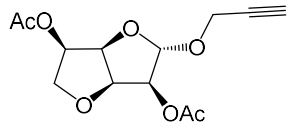
Produkt	C1		C2		C3		C4		C5		C6		
	H1		H2		H3		H4		H5		H6		
 <p><b>18<math>\alpha</math></b> v C<sub>6</sub>D<sub>6</sub></p>	96.828	69.953	69.639	66.308	69.753	62.301							
	4.954 ddd $J_{HH} = 1.8, 0.7, 0.4$	5.566 dd $J_{HH} = 3.2, 1.8$	5.658 dd <sup>b</sup> $J_{HH} = 10.2, 3.2$	5.703 dd <sup>b</sup> $J_{HH} = 10.2, 9.5$	3.899 dddd $J_{HH} = 9.5, 4.8, 2.5, 0.7$	4.361 dd $J_{HH} = 12.3, 4.8$							
	<b>O1-CH<sub>2</sub>CCH</b>	<b>O2-Ac</b>	<b>O3-Ac</b>	<b>O4-Ac</b>		<b>O6-Ac</b>							
	54.837	169.534	169.461	169.392		170.030							
	3.818 dd $J_{HH} = 15.8, 2.4$	20.146	20.293	20.218		20.321							
	1.584 s	1.696 s	1.654 s			1.722 s							
	3.767 dd $J_{HH} = 15.8, 2.5$												
	78.385												
	75.666												
	1.925 t $J_{HH} = 2.4$												

Produkt	C1		C2		C3		C4		C5		C6		
	H1		H2		H3		H4		H5		H6		
 <p><b>18<math>\alpha</math></b> v CDCl<sub>3</sub></p>	96.363	69.466	69.033	66.143	69.102	62.433	5.014 ddd $J_{HH} = 1.8, 0.7, 0.4$	5.255 dd $J_{HH} = 3.6, 1.8$	5.32 překryv	5.28 dd $J_{HH} = 10.1, 9.5$	4.005 dddd $J_{HH} = 9.8, 5.2, 2.5, 0.7$	4.269 dd $J_{HH} = 12.3, 5.2$ 4.096 dd $J_{HH} = 12.3, 2.5$	
	<b>O1-CH<sub>2</sub>CCH</b>	<b>O2-Ac</b>	<b>O3-Ac</b>	<b>O4-Ac</b>	<b>O6-Ac</b>								
	55.064	170.047	169.941	169.798	170.736								
	4.295 d $J_{HH} = 2.4$	20.957	20.748	20.781	20.836								
	75.706	2.145 s	1.973 s	2.023 s	2.086 s								
	78.035												
	2.465 t $J_{HH} = 2.4$ $^1J_{HC} = 251.8$ $^2J_{HC} = 49.6$												



Produkt	C1		C2		C3		C4		C5		C6	
	H1		H2		H3		H4		H5		H6	
 <p><b>18β</b> v CDCl<sub>3</sub></p>		95.752		68.842		71.199		66.053		72.637		62.432
	4.936 d		5.472 dd		5.081 dd		5.253 t		3.690 ddd		4.301 dd	
	$J_{\text{HH}} = 1.2$		$J_{\text{HH}} = 3.3, 1.2$		$J_{\text{HH}} = 10.0, 3.3$		$J_{\text{HH}} = 10.0$		$J_{\text{HH}} = 9.9, 5.3, 2.6$		$J_{\text{HH}} = 12.3, 5.3$	
											4.145 dd	
											$J_{\text{HH}} = 12.3, 2.6$	

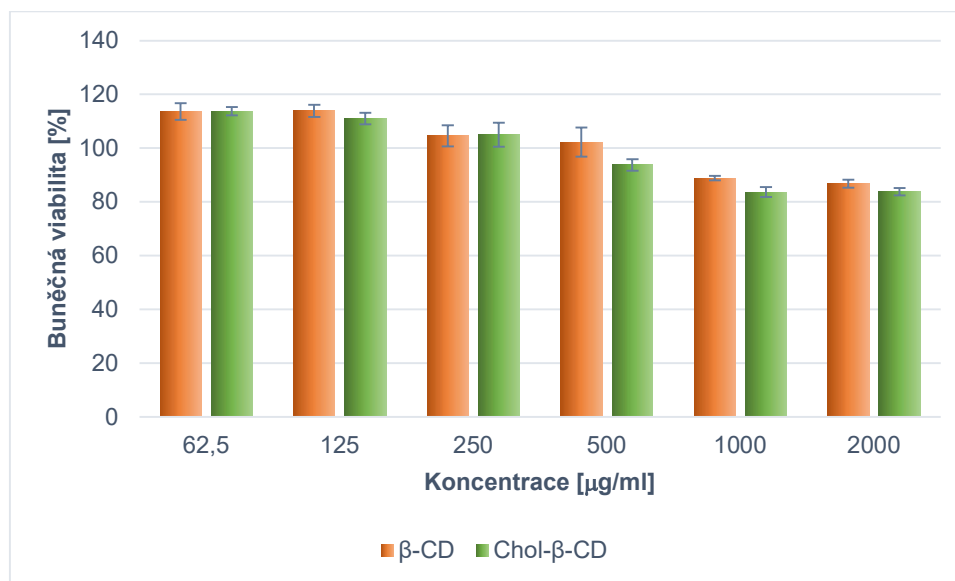
Produkt	C1		C2		C3		C4		C5		C6	
	H1		H2		H3		H4		H5		H6	
 <p><b>19<math>\alpha</math></b> v CDCl<sub>3</sub></p>	103.559	76.458	70.760	76.289	68.177	63.003	5.300 dt $J_{\text{HH}} = 2.8, 0.5$	5.230 dd $J_{\text{HH}} = 5.2, 2.8$	5.586 ddd $J_{\text{HH}} = 5.2, 4.3, 0.5$	4.380 ddd $J_{\text{HH}} = 8.9, 4.3, 0.5$	5.279 ddd $J_{\text{HH}} = 8.9, 5.6, 2.4$	4.544 dd $J_{\text{HH}} = 12.3, 2.4$ 4.147 dd $J_{\text{HH}} = 12.3, 2.6$
	<b>O1-CH<sub>2</sub>CCH</b>	<b>O2-Ac</b>	<b>O3-Ac</b>	<b>O5-Ac</b>	<b>O6-Ac</b>							
	55.356	169.432	169.597	169.822	170.785							
	2.27 dd $J_{\text{HH}} = 15.7, 2.5$	20.509	20.471	20.900	20.866							
	4.22 dd $J_{\text{HH}} = 15.7, 2.4$	2.066 s	2.047 s	2.006 s	2.062 s							
	78.547											
	75.209											
	2.455 t $J_{\text{HH}} = 2.4$											

Produkt	C1		C2		C3		C4		C5		C6		
	H1		H2		H3		H4		H5		H6		
 <p><b>20<math>\alpha</math></b> v CDCl<sub>3</sub></p>		105.541		77.673		80.360		79.324		72.578		69.104	
	5.372 dq		5.048 dd		4.848 ddd		4.793 široký t		4.990 dddd		3.685 ddd		
	$J_{HH} = 1.2, 0.5$		$J_{HH} = 6.1, 1.2$		$J_{HH} = 6.1, 5.0, 0.6$		$J_{HH} = 5.1$		$J_{HH} = 9.1, 6.9, 5.1, 0.6$		$J_{HH} = 9.1, 8.5, 0.4$		
											4.087 dd		
											$J_{HH} = 8.5, 6.9$		
		<b>O1-CH<sub>2</sub>CCH</b>		<b>O2-Ac</b>						<b>O5-Ac</b>			
		54.575		169.798						170.447			
	2.24 dd			20.555						20.794			
	$J_{HH} = 15.7, 2.4$		2.120 s							2.137 s			
	4.20 dd												
$J_{HH} = 15.7, 2.4$													
<i>nebyl pozorován</i>													
		75.131											
2.445 t													
$J_{HH} = 2.4$													

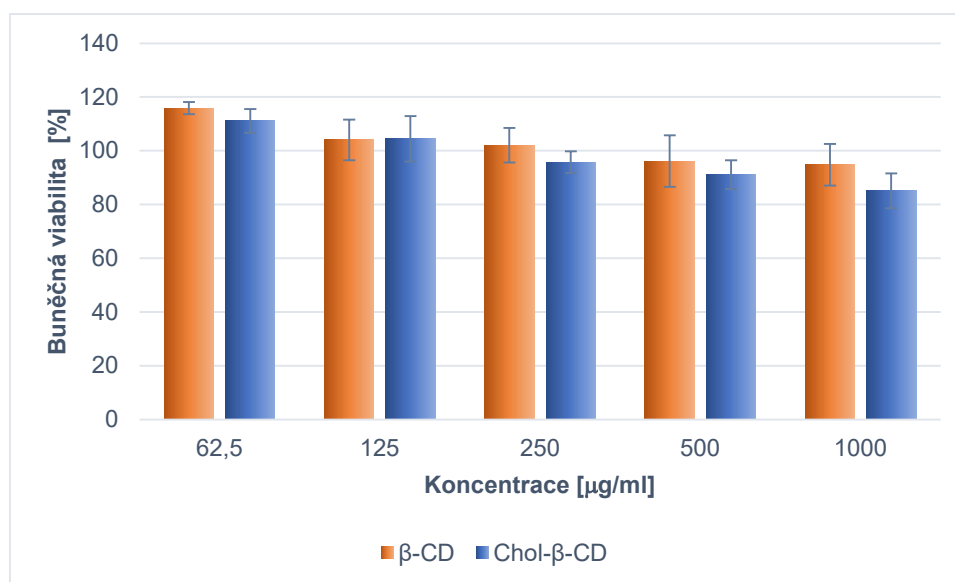
<sup>a</sup> Signál isotopologu s deuteriem v propargylové skupině, tedy O6-CH<sub>2</sub>-C=CD.

<sup>b</sup> Signál je zkreslen efekty druhého řádu.

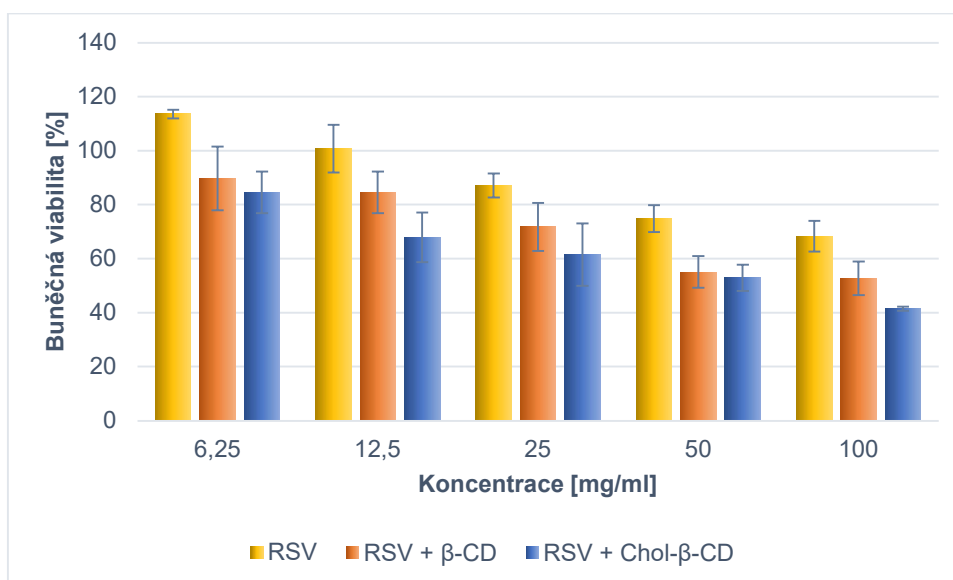
## B. Vyhodnocení in vitro experimentů s Chol- $\beta$ -CD



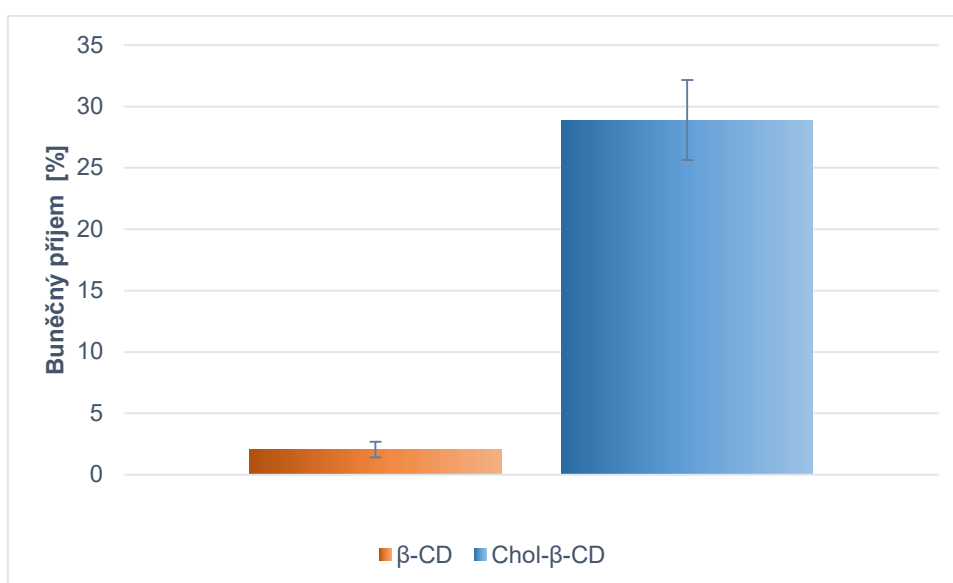
**Graf B-1:** Výsledky MTT testu viability fibroblastů po kontaktu s  $\beta$ -CD a funkcionalizovaným Chol- $\beta$ -CD. Ani při koncentraci 2 mg/ml neklesla životaschopnost buněk pod 80 %, toxický účinek materiálů byl tedy nízký.



**Graf B-2:** Výsledky MTT testu viability MCF-7 nádorové buněčné linie po kontaktu s  $\beta$ -CD a funkcionalizovaným Chol- $\beta$ -CD. Ani při koncentraci 1 mg/ml neklesla životaschopnost buněk pod 80 %, toxický účinek samotných materiálů byl tedy nízký.



**Graf B-3:** Výsledky MTT testu viability MCF-7 nádorové buněčné linie po kontaktu s resveratrolem a s jeho komplexy s  $\beta$ -CD a s funkcionalizovaným Chol- $\beta$ -CD. Komplexací RSV do  $\beta$ -CD se zvýšila jeho schopnost inhibovat proliferaci nádorových buněk a funkcionalizace nosiče cholesterolem tento efekt dále posílila. Životaschopnost nádorových buněk byla v případě aplikace komplexu RSV + Chol- $\beta$ -CD přibližně o třetinu nižší než při aplikaci samotného RSV.



**Graf B-4:** Výsledky experimentu zaměřeného na internalizaci  $\beta$ -CD do buněk MCF-7. Funkcionalizace cholesterolem několikanásobně zvýšila schopnost CD překonat buněčnou membránu a proniknout přímo do nádorových buněk.