



## **Nalezení vhodné a originální modifikace kyseliny hyaluronové pro nosičové systémy**





**Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně**  
**Fakulta technologická**

Disertační práce

**Nalezení vhodné a originální modifikace kyseliny  
hyaluronové pro nosičové systémy**



ÚSTAV  
CHEMIE

Autor: **Ing. Alena Matelová**

Studijní program: Chemie a technologie materiálů P2808  
Studijní obor: Chemie a technologie materiálů P2808V009

Školitel: doc. Mgr. Robert Vícha, Ph.D.

Konzultant: Glorie Huerta-Angeles, Ph.D.

Zlín, 2018

Klíčová slova: *Kyselina hyaluronová, nosiče léčiv, polymerní micely, estery kyseliny hyaluronové.*

Key words: *Hyaluronic acid, drug delivery systems, polymeric micelles, hyaluronic acid esters.*

„Nemůžeš? Přidej!“

Emil Zátopek

*If you can dream it you can do it!*

Na tomhle místě se patří poděkovat všem, kteří mi během mého doktorského studia byli nápomocni. Část svého studia jsem trávila ve firmě Contipro, za což jsem velmi vděčná, protože jsem se zde mnoho naučila nejen po stránce profesionální tak lidské a všechny získané zkušenosti (i ty špatné) mě významně posunuly kupředu.

Nejdůležitějšími lidmi, kterým chci svůj dík věnovat, je můj školitel Doc. Mgr. Robert Vícha, Ph.D., kterého si vážím nejen jako profesně příkladného a erudovaného školitele, ale zejména jako férového a ochotného člověka.

Ve firmě Contipro byla mou konzultantkou Glorie Huerta-Angeles, Ph.D. (pro přípravu derivátů). Určitou část práce týkající se nosičových systémů jsem konzultovala s Ing. Danielou Šmejkalovou, Ph.D., které také patří dík, a která je profesně člověkem na svém místě.

Dále děkuji všem studentům a kolegům, a to jak z univerzity, tak z firmy Contipro. Jmenovitě děkuji Mgr. Zdislavě Brúnové a Jarku Novotnému za neopominutelnou pomoc při přípravě nosičových systémů, Ing. Janu Duškovi, Ph.D. za spolupráci na přípravě derivátů HA, Ing. Mírovi Kulhánkovi za analytickou část a Mgr. Hance Vágnerové za provedení testů cytotoxicity mých derivátů.

Ing. Zdeňce Pruckové, Ph.D. děkuji za měření ITC.

V neposlední řadě děkuji Ústavu mikrobiologie LF Lékařské fakulty SZU v Bratislavě za stanovení inhibičního účinku klotrimazolu v nosičích a Ústavu chemie PřF MU v Brně za umožnění měření NMR spekter.

Zapomenout samozřejmě nemohu na finanční podporu od Interní grantové agentury ve Zlíně. Konkrétně projektům IGA/FT/2017/001, IGA/FT/2016/001, IGA/FT/2015/005 a IGA/FT/2012/005.

Z osobní sféry pro mě byla velmi důležitá, ne-li stěžejní, podpora rodiny, přátel a BK.

<b>1. ÚVOD .....</b>	<b>5</b>
<b>2. KYSELINA HYALURONOVÁ.....</b>	<b>7</b>
2.1. Výskyt hyaluronanu v organismu a jeho funkce .....	8
2.2. Terapeutické aplikace .....	9
2.3. Receptory hyaluronanu.....	11
2.4. Chemická stabilita hyaluronanu a jeho odbourávání v organismu.....	13
2.5. Funkční skupiny (význam, možnost modifikace) .....	16
<b>3. NOSIČOVÉ SYSTÉMY .....</b>	<b>26</b>
3.1. Typy nosičových systémů .....	27
3.1.1. Liposomy.....	27
3.1.2. Dendrimery.....	27
3.1.3. Polymersomy .....	27
3.1.4. Nanokapsule.....	28
3.2. Polymerní micely .....	28
3.3. Nosičové systémy na bázi HA.....	30
3.4. Blokované vs. roubované polymery.....	30
3.5. Metody přípravy micel.....	31
3.6. Aromatické nosiče .....	32
3.7. Nosiče na bázi amfifilního HA s aromatickými postranními řetězci.....	36
<b>4. CÍLE DISERTAČNÍ PRÁCE .....</b>	<b>40</b>
<b>5. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST .....</b>	<b>41</b>
5.1. Příprava esterů HA a $\omega$ -fenylmastných kyselin.....	41
5.1.1. Příprava esteru HA a 4-fenylmáslé kyseliny.....	41
5.1.2. Příprava esterů HA a 6-fenylhexanové kyseliny a 8-fenyl-oktanové kyseliny .....	42
5.1.3. Příprava esterů HA a Fmoc-6-Ahx-OH.....	42
5.1.4. Příprava esterů HA a 11-tolylundekanové kyseliny .....	42
5.1.5. Alternativní metody přípravy modifikačního činidla .....	44
5.2. Příprava esterů HA a 4-alkoxybenzoových kyselin.....	45
5.2.1. Příprava 4-oktyloxybenzoové kyseliny .....	45

5.2.2. Příprava esteru HA a 4-oktyloxybenzoové kyseliny .....	46
5.2.3. Příprava 4-decyloxybenzoové, 4-dodecyloxybenzoové, 4-tetradecyloxybenzoové, 4-hexadecyloxybenzoové kyseliny .....	46
5.3. Příprava esterů HA a 11-(9 <i>H</i> -karbazol-9-yl)undekanové kyseliny .....	46
5.3.1. Příprava 11-(9 <i>H</i> -karbazol-9-yl)undekanové kyseliny .....	46
5.3.2. Příprava esterů HA a 11-(9 <i>H</i> -karbazol-9-yl)undekanové kyseliny .....	47
5.4. Příprava esteru HA a DL- $\alpha$ - tokoferol sukcinátu .....	48
5.5. Charakterizace derivátů a stanovení DS pomocí NMR.....	48
5.6. Sledování průběhu reakce .....	48
5.6.1. Sledování průběhu reakce bez přídavku vody .....	48
5.6.2. Sledování průběhu reakce s přídavkem vody .....	49
5.7. Příprava nosičových systémů s resveratrolem, hledání optimálního postupu pro dosažení nejvyšší vazebné kapacity .....	49
5.8. Příprava nosičových systémů s klotrimazolem .....	50
5.9. Příprava nosičových systémů s fenylsalicylátém (PhS) .....	50
5.10. Příprava nosičových systémů se směsí klotrimazolu a DL- $\alpha$ -tokoferolu .....	50
5.11. Příprava nosičových systémů se směsí fenyl salicylátu (PhS) a DL- $\alpha$ -tokoferolu	51
5.12. Příprava nosičových systémů s Nilskou červení .....	51
5.13. Stanovení kritické agregační koncentrace .....	51
5.14. Stanovení stability micel s fluorescenční sondami (FRET) .....	51
5.14.1. Příprava nosičů s FRET barvivy .....	51
5.14.2. Stanovení stability micel.....	52
5.15. Stanovení dynamické viskozity připravených derivátů.....	52
5.16. Infračervená spektroskopie .....	52
5.17. Spektroskopické stanovení vazebné kapacity resveratrolu, retinyl-palmitátu, fenyl-salicylátu, klotrimazolu, DL- $\alpha$ -tokoferyl-sukcinátu a pyrenu .....	52
5.18. Nukleární magnetická rezonance (NMR) .....	53
5.19. Stanovení velikosti micel a $\zeta$ -potenciálu micel .....	54
5.20. SEC-MALLS (size exclusion chromatography-multi-angle laser light scattering)	54

5.21. Test životaschopnosti buněk v přítomnosti roztoků připravených derivátů HA a aromatických karboxylových kyselin .....	54
5.22. GC-MS analýzy.....	55
<b>6. VÝSLEDKY A DISKUZE.....</b>	<b>56</b>
6.1. Modifikace HA aromatickými modifikačními činidly .....	56
6.1.1. Obecný chemismus modifikační reakce .....	56
6.1.2. Výběr a zdůvodnění struktury modifikačních činidel .....	58
6.1.3. Optimalizace reakčních podmínek .....	67
6.1.4. Modifikace HA $\omega$ -fenylmastnými kyselinami .....	68
6.1.5. Srovnání významných parametrů přípravy a samotných modifikovaných HA .....	73
6.1.6. Modifikace HA a 11-(9H-karbazol-9-yl)undekanovou kyselinou .....	83
6.1.7. Modifikace HA a 4-alkoxybenzoovými kyselinami.....	88
6.1.8. Modifikace HA a DL- $\alpha$ -tokoferyl-sukcinátem .....	90
6.2. Stanovení stability micel s FRET barvivy .....	91
6.2.1. Stanovení stability micel.....	93
6.3. Stanovení kritické asociační koncentrace.....	98
6.3.1. Fluorescenční stanovení kritické asociační koncentrace.....	98
6.3.2. Stanovení CAC pomocí izotermální titrační mikrokolorimetrie .....	104
6.4. Dynamická viskozita.....	106
6.5. Studium inkorporace modelových látek do micel .....	110
6.6. Analýza inhibičního účinku klotrimazolu v nosiči .....	122
6.7. Stanovení velikosti a $\zeta$ -potenciálu micel.....	123
6.8. Cytotoxicita derivátů .....	125
6.9. Hemolytická aktivita derivátu HA-11C .....	130
<b>7. ZÁVĚR.....</b>	<b>131</b>
<b>PŘÍLOHY .....</b>	<b>134</b>
<b>CURRICULUM VITAE .....</b>	<b>136</b>
<b>SEZNAM ZKRATEK.....</b>	<b>141</b>
<b>SEZNAM OBRÁZKŮ.....</b>	<b>143</b>



<b>SEZNAM TABULEK.....</b>	<b>146</b>
<b>SEZNAM SCHÉMAT.....</b>	<b>147</b>
<b>SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY .....</b>	<b>147</b>



## 1. Úvod

Kyselina hyaluronová (HA) se dostala do povědomí široké veřejnosti jako „zázračná“ přísada přípravků proti stárnutí, jako výplň měkkých tkání při augmentacích\* či součást potravinových doplňků. Rozsah aplikací tohoto polymeru je však mnohem širší a serióznější. Kyselina hyaluronová našla využití v medicíně, a to zejména v oblasti tkáňového inženýrství, nosičů léčiv či očním lékařství. Kyselina hyaluronová je totiž tělu vlastní látka s ceněnými vlastnostmi (například biokompatibilita, biodegradabilita, snadná rozpustnost ve vodném prostředí), které právě tyto aplikace umožňují.

Zejména oblast farmaceutické chemie zabývající se nosičovými systémy léčiv založenými na HA přitahuje v posledních letech velkou pozornost. Tento fakt souvisí s narůstajícím procentem výskytu závažných onemocnění a zároveň rychle se vyvíjejícím farmaceutickým výzkumem zaměřeným na léčbu těchto onemocnění. Z povahy své struktury však slibné účinné látky mnohdy vykazují vlastnosti, které limitují jejich využití. Nosičové systémy mohou tyto nedostatky částečně nebo úplně potlačit a umožnit tak léčivu efektivně využít svůj potenciál.

I přes velký zájem mnoha výzkumných týmů o tuto oblast chemie je funkčních, a striktní parametry splňujících, nosičových systémů stále nedostatek. Na nosičové systémy jsou kladeny přísné nároky a aplikace mnoha navržených derivátů ztroskotá na nesplnění na první pohled nevýznamného parametru.

Nosičové systémy často nejsou schopny inkorporovat dostatečné množství léčiva a nejsou tudíž dostatečně efektivní. Velice důležitým parametrem je rovněž kompatibilita léčiva a nosičového systému. Mezi léčivem (které je zpravidla hydrofobního charakteru) a hydrofobní částí nosičového systému působí řada fyzikálních interakcí a je přínosné je využít tak, aby podpořily inkorporaci léčiva do nosičového systému. Na druhou stranu, ideální nosičový systém musí být navržen tak, aby byl dostatečně univerzální pro širokou řadu léčiv.

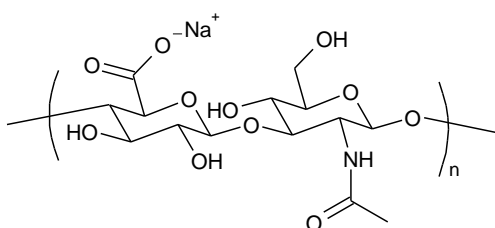
---

\* Zvětšení určité části lidského těla (např. rtů, prsou) pomocí vlastní tkáně nebo implantátu.

Cílem této práce bylo navrhnout a připravit nosičové systémy založené na HA, které splňují všechna kritéria na ně kladená a otestovat jejich funkčnost s modelovými látkami. Dále bylo nutné tyto výsledky a vlastnosti porovnat s hodnotami známých nosičových systémů a pokusit se vysvětlit důvod případných rozdílů mezi nimi. Většina léčiv jsou svou strukturou složité molekuly a velmi často také obsahují násobné vazby a aromatické kruhy. Klíčovou otázkou v této práci tedy bylo, zda zavedení strukturně podobných substituentů (aromatických kruhů) na HA přinese zlepšení sledovaných vlastností.

## 2. Kyselina hyaluronová

Kyselina hyaluronová (Obrázek 1) je lineární polysacharid, konkrétně mukopolysacharid,<sup>†</sup> přirozeně se vyskytující v tělech vyšších organismů i u některých kmenů bakterií. Poprvé byla popsána v roce 1934 Karlem Mayerem a Johnem Palmerem. Jednalo se o dosud neznámý polysacharid izolovaný ze sklivce oka skotu a Mayer s Palmerem zjistili, že nově objevená látka je tvořena aminocukrem a uronovou kyselinou a pojmenovali ji „kyselina hyaluronová“.<sup>1,2</sup> Tato látka se také často označuje jako „hyaluronát“ nebo „hyaluronan“, protože *in vivo* se vyskytuje jako polyaniont (každá glukuronátová jednotka HA nese na karboxylové skupině záporný náboj, který je vyvážen kationty, například Na<sup>+</sup>) a nikoliv ve své protonované formě.<sup>3,4</sup> Označení „kyselina hyaluronová“ se však hojně používá ve farmaceutickém prostředí, a často se také používají všechny názvy k označení téže látky.<sup>5</sup> Nebude-li uvedeno jinak, budu v této práci zkratku HA používat pro sodnou sůl, nikoliv kyselou formu této látky.



Obrázek 1: Kyselina hyluronová/hyaluronan.

Molekulární struktura HA je tvořena opakujícími se disacharidovými jednotkami D-glukuronové kyseliny a *N*-acetylglukosaminu. D-glukuronová kyselina je k *N*-acetylglukosaminu připojena  $\beta(1\rightarrow3)$  glykosidovou vazbou, zatímco opakující se disacharidové jednotky jsou spojeny  $\beta(1\rightarrow4)$  vazbami.<sup>6-8</sup>

V podmínkách fyziologického prostředí je vysoce hydrofilní HA obklopen molekulami vody spojenými vodíkovými můstky.<sup>3,9</sup> Ve formě polyaniontu je tento biopolymer tak hydrofilní, že váže až 1 000× více vody než by se dalo očekávat podle jeho molekulové hmotnosti.<sup>3,4</sup>

Beta uspořádání obou složek HA umožňuje výhodnější ekvatoriální uspořádání větších funkčních skupin (hydroxylových skupin, karboxylové skupiny, *N*-acetylové skupiny), menší vodíkové atomy zaujímají stericky méně výhodné axiální pozice. Z těchto důvodů je molekula disacharidu energeticky velmi stabilní.<sup>8</sup>

<sup>†</sup>Též glykosaminoglykan, jedná se o dlouhé nevětvené heteropolysacharidy tvořené opakujícími se disacharidovými jednotkami, v nichž je vždy jedním členem uronová kyselina a druhým glukosamin.

Každá disacharidová jednotka je pootočena o  $180^\circ$  vůči disacharidové jednotce předchozí a následující. V roztoku je páteř hyaluronanu stabilizována kombinací chemické struktury disacharidu HA, intramolekulárními vodíkovými vazbami, a interakcemi s rozpouštědly vytváří neuspořádanou strukturu. V pevném stavu molekula HA vytváří šroubovici se 2, 3 či 4 disacharidovými jednotkami na jednu otáčku v závislosti na přítomném protiionu ( $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ ,  $\text{Ca}^{2+}$ , apod.), ale byla pozorována i dvoušroubovice.<sup>10</sup> Řetězce HA se již při nízké koncentraci navzájem proplétají a vytváří kromě intra- i intermolekulární vodíkové vazby.

Molekulová hmotnost hyaluronanu se může pohybovat v rozmezí 0,1–10 MDa v závislosti na enzymu, který katalyzuje jeho syntézu.<sup>11,12</sup> Díky této vysoké molekulové hmotnosti a silným intermolekulárním interakcím jsou vodné roztoky HA velmi viskózní. Silně kyselé či silně bazické prostředí vyvolává štěpení řetězce tohoto polymeru.<sup>11</sup>

Díky své přirozené biokompatibilitě, fyzikálně–chemickým a biologickým vlastnostem je HA jedním z nejslibnějších polymerů využitelných ve farmacii pro nosičové systémy.<sup>2,13,14</sup> Mimo to je HA také častým výchozím materiálem pro nové biokompatibilní a biodegradabilní deriváty, které nalézají využití v tkáňovém inženýrství, hojení ran aj.<sup>14,15</sup>

Jedním z hlavních problémů vztahujícím se k chemické modifikaci hyaluronanu je jeho nerozpustnost v organických rozpouštědlech. Proto bývá hyaluronan často převáděn z původní přírodní formy na formu kyseliny nebo tetrabutylamoniové soli, které jsou rozpustné v polárních organických rozpouštědlech jako je například DMSO.<sup>11,16</sup>

## 2.1. Výskyt hyaluronanu v organismu a jeho funkce

Hyaluronan se přirozeně vyskytuje jak v tělech obratlovců, tak i v bakteriích. V živočišných tkáních tvoří HA jednu z jejich hlavních složek, je součástí zejména pojivových, epiteliálních a nervových tkání. Ve velkém množství se HA nachází také v očním sklivci, synoviální tekutině, kůži<sup>3,4</sup> a tvoří rovněž slizovité obaly vajíček některých organismů. U lidí se HA nejhojněji objevuje v kůži (více než 50 % celkového obsahu HA v organismu), kde jeho množství dosahuje průměrně asi 5 g.<sup>11,17</sup> Po dosažení věku cca 20 let však začíná u člověka množství této sloučeniny v organismu ubývat.<sup>3,4</sup>

Mezi nejdůležitější biologické funkce HA patří udržování elastoviskozity tekutých pojivových tkání, zajišťování hydratace tkání či transport vody,<sup>6,8</sup> což je založeno na vysoké hygroskopicitě HA. Hyaluronan má dobrý hydratační efekt zejména ve vrstvě *stratum corneum* (vrchní vrstva epidermis), kde ve většině případů zvyšuje penetraci léčiv.

Penetrace HA do hlubších vrstev kůže je však velmi pomalá a závisí na molekulové hmotnosti použitého HA.<sup>18</sup> Hyaluronan má také důležitou roli jako signální molekula, kdy interaguje s povrchovými receptory buněk (regulace buněčné proliferace, migrace a diferenciaci). Hyaluronan je taktéž nezbytný pro embryogenezi.<sup>8,19,20</sup>

Funkce HA výrazně závisí na jeho molekulové hmotnosti. Hranice mezi nízko- a vysokomolekulárním HA není přesně vymezená. Vercruysse<sup>21</sup> udává jako hraniční hodnotu 200–300 kDa, naproti tomu Dosio<sup>22</sup> či Vasi<sup>23</sup> však jdou se stanovením hranice do nižších hodnot (100 kDa).

Vysokomolekulární HA zajišťuje dobrou hydrataci podkoží, potlačuje imunitní odpověď organismu, a brání tak výraznému zhoršení zánětu. Dále působí proti angiogenezi<sup>12,24,25</sup> a přispívá k hojení ran podporou integrity tkání.<sup>21</sup>

Nízkomolekulární HA, který vzniká z vysokomolekulárního HA působením lokálně generovaných reaktivních forem kyslíku nebo enzymatickým působením,<sup>21</sup> přenáší signály o poškození tkání a mobilizuje imunitní buňky. Dále také stimuluje proliferaci buněk, působí prozánětlivě,<sup>12,24</sup> vyvolává angiogenezi<sup>21,24,25</sup> a přispívá k vytvoření jizvy.<sup>21</sup> Nízkomolekulární hyaluronan bývá tudíž přítomen v poškozených tkáních či v určitých nádorech<sup>19,26</sup> a jeho nadměrné množství v organismu může indikovat výskyt různých onemocnění.<sup>26,27</sup>

## 2.2. Terapeutické aplikace

Výborné fyzikálně–chemické a biologické vlastnosti (biokompatibilita, bezpečnost, minimum vedlejších reakcí v těle, biodegradabilita, přítomnost derivovatelných skupin apod.),<sup>8,11,23</sup> dělají z HA optimální materiál pro medicínální aplikace. Hyaluronan je injekčně dodáván do těla ke kompenzaci jeho přirozené ztráty v důsledku stárnutí, nemoci či operativních zákroků. Klinické použití zahrnuje dermální výplně, viskosuplementace poškozených kloubů či aplikace při oftalmologických operacích.<sup>11,18,19</sup>

Dále je HA využíván také při hojení ran.<sup>11,19</sup> Po poranění se hyaluronan v ráně přirozeně štěpí na malé fragmenty, které aktivují imunitní buňky a současně je hyaluronan v ráně i syntetizován a vytváří vlhké prostředí, které pomáhá hojení a množení buněk. Zranění se tak hojí mnohem rychleji a efektivněji. Na tomto principu fungují i přípravky urychlující hojení. Je-li na ránu takovýto přípravek aplikován, hyaluronan vtahuje do rány vodu z jejího okolí a s ní i růstové a výživové faktory.<sup>21,24,28,29</sup>

Díky své viskoelasticitě je HA zodpovědný za lubrikaci a mechanickou oporu kloubů. Při osteoartróze dochází (kromě zánětu) ke snižování koncentrace a molekulové hmotnosti HA, což vede k velkým problémům kloubů a nevratné destrukci kloubní chrupavky. Kromě ovlivnění zánětlivého procesu, může injektáž roztoku HA obnovit elasticitu a viskozitu synoviální tekutiny, poskytnout “odpružení” kloubům, a tím snížit bolest a zvýšit mobilitu pacienta.<sup>19,21,30</sup> Pro tyto aplikace se používá síťovaný hyaluronan o vysoké molekulové hmotnosti, který má lepší viskoelastické vlastnosti než hyaluronan nízkomolekulární.<sup>31</sup>

Hyaluronan je také běžně využíván v očním lékařství při implantacích nitroočních čoček při operaci šedého zákalu.<sup>19</sup> Tato operace zahrnuje odstranění stávající oční čočky a nahrazení za novou. Tkáň vnitřního prostoru oka se ale při takové operaci snadno poraní a špatně se hojí. Z toho důvodu lékaři při operaci injekčně vpravují do oka viskózní roztok hyaluronanu, který udržuje operativní prostor oka, chrání křehké tkáň a snižuje možnost zranění.<sup>21,32</sup>

Hyaluronan je také jedna z důležitých složek mnoha očních kapek, kde zvyšuje viskozitu roztoku,<sup>19,31</sup> což způsobí, že léčivo není rychle odstraněno z oka slzením a zlepšuje biodostupnost léčiva.<sup>31</sup> Různě koncentrované roztoky hyaluronanu se používají v očních kapkách proti syndromu suchého oka či jako součást roztoků na uchování měkkých kontaktních čoček jako zvlhčující činidlo, které zvyšuje komfort při jejich používání.<sup>32</sup>

Dále se HA používá během regeneračních pooperačních procesů.<sup>19</sup> Díky své vysoké hydrofilitě je hyaluronan vhodný pro aplikace, kde je nutná minimální buněčná adheze. Vlivem této adheze se v pooperačních ranách, kde přiléhají tkáň k sobě, mohou tvořit nežádoucí srůsty. Adheze bakteriálních buněk může také vyvolat infekci. Bariéry ze síťovaného hyaluronanu efektivně zabraňují přímému kontaktu tkání, a tím buněčné i bakteriální adhezi.<sup>30</sup>

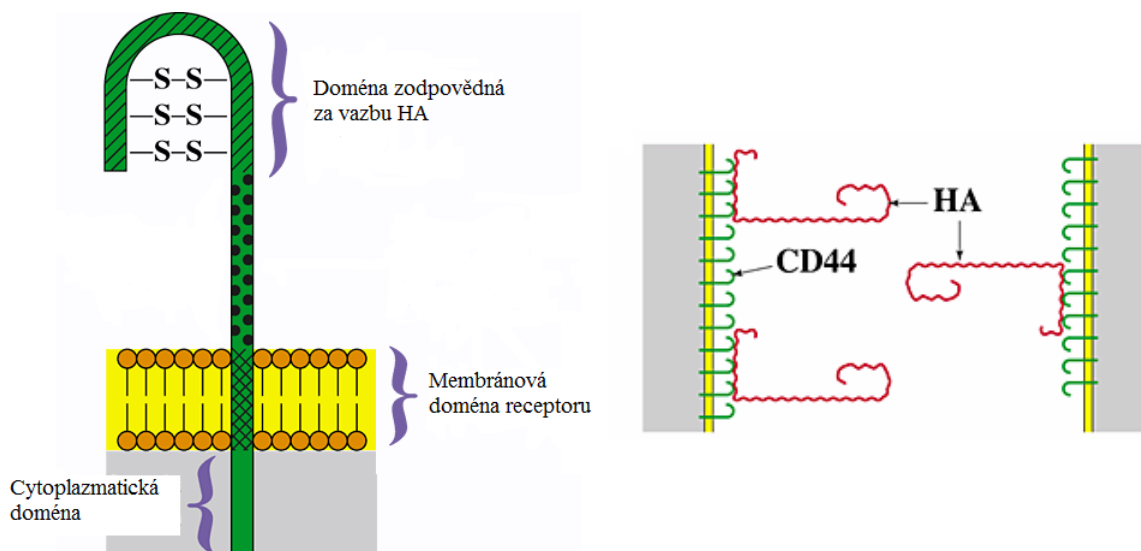
V kosmetice je HA populární jako výplň měkkých tkání (redukce vrásek, objemové augmentace například rtů aj.).<sup>21</sup> Při těchto zákrocích dochází k aplikaci síťovaného hyaluronanu, který je zpravidla lépe snášen než k těmto zákrokům také používaný kolagen.<sup>30</sup>



### 2.3. Receptory hyaluronanu

Zájem odborné veřejnosti zaujal HA také svou schopností se specificky vázat na mnohé nádorové buňky. Důvodem tohoto jevu je nadměrná exprese CD44 receptorů na povrchu těchto buněk.<sup>33,34</sup>

Mnohé unikátní vlastnosti HA a derivátů z něj připravených (nosičových systémů) mohou být přisouzeny právě specifickým vazbám a interakcím HA s hyaluronovými vazebnými proteiny označovanými jako hyaladheriny (Obrázek 2).<sup>33,35</sup> Většina hyaladherinů obsahuje specifické vazebné domény tvořené dvěma  $\alpha$ -helixy a dvěma antiparalelními  $\beta$ -listy.<sup>33</sup> Hyaluronan se váže pomocí své karboxylové skupiny na aminoskupinu receptoru pomocí vodíkových vazeb.<sup>36</sup> Za vazbu HA na receptor je zodpovědná N-terminální část receptoru (konkrétně kladně nabitá guanidinová skupina postranního řetězce argininu)<sup>37</sup> představovaná přibližně 90 aminokyselinovými zbytky.<sup>38</sup>



Obrázek 2: Stavba hyaladherinu (vlevo), vazba HA na hyaladheriny (vpravo).<sup>38</sup>

Nejlépe popsány HA receptory jsou CD44 receptor, lymfatický endoceliální HA receptor (LYVE-1) a RHAMM receptor (receptor, jehož prostřednictvím hyaluronan moduluje motilitu<sup>‡</sup> buněk).<sup>22,27,33,39</sup> RHAMM receptor (lokalizovaný na povrchu buněk) po interakci s HA předává normálním i maligním buňkám signály pro buněčnou migraci a proliferaci.<sup>40</sup> RHAMM receptor se váže k HA přes kladně nabitě aminokyselinové zbytky lokalizované na C-konci proteinového řetězce receptoru. Díky aminokyselinovým sekvencím na N-konci řetězce je zajištěna vazba RHAMM receptoru na mikrotubuly buněk.<sup>41</sup> Receptor CD44 zastává velké množství biologických rolí jako například

<sup>‡</sup> Hybnost, pohyblivost.

udržování struktury tkání pomocí adheze, zprostředkování buněčné migrace během morfogeneze, angiogeneze či nádorové invaze. LYVE-1 receptor se účastní zejména odbourávání HA.<sup>22,33</sup>

RHAMM receptor se ve zdravých tkáních nalézá jen v omezené míře, zatímco v nádorových tkáních je jeho množství značně vyšší. Vysoký výskyt tohoto receptoru se pojí zejména s přítomností metastáz.<sup>33</sup>

Receptor CD44 (respektive jeho isoforma CD44v6) se hojně vyskytuje v různých typech zhoubných nádorů.<sup>22,33,42,43</sup> Nadměrná exprese tohoto receptoru byla pozorována jen u metastázujících nádorů, zatímco u nemetastázujících nádorů a odpovídajících benigních tkání nikoliv. Nadměrná exprese těchto receptorů může usnadňovat vstup HA do nádorových buněk pomocí CD44-zprostředkované endocytózy, po níž následuje odbourávání HA pomocí intracelulárních hyaluronidáz. Díky této nadměrné expresi jsou tyto receptory vhodnými cílovými místy pro potenciální nosiče určené k léčbě či diagnostice nádorů.<sup>33</sup>

Stejně jako nadměrná exprese CD44 receptorů byl v metastázujících nádorových buňkách prokázán nadměrný výskyt hyaluronidáz (zejména Hyal1 a Hyal2), enzymů způsobujících odbourávání vysokomolekulárního HA.<sup>33</sup> Vliv samotného HA na vývoj nádoru zůstává kontroverzní. Jak již bylo zmíněno dříve, nízkomolekulární HA podporuje angiogenezi<sup>21,24,25</sup> a tudíž usnadňuje růst nádoru.<sup>19</sup> Některé výzkumy zase dokazují pozitivní efekt hyaluronidázy Hyal1 na potlačení růstu nádoru. Podle posledních studií je ovšem růst nádoru pozitivně stimulován při nízké koncentraci hyaluronidáz, a teprve až jejich vysoká koncentrace růst nádoru potlačuje.<sup>19,20,33</sup> Ačkoliv studie prokázaly úzký vzájemný vztah mezi HA a rakovinou, informace o vlivu HA, CD44 a hyaluronidáz na růst nádoru nejsou komplexní a stále zůstávají mnohé otázky ne zcela objasněny.<sup>12</sup>

Souvislost mezi obsahem HA a buněčnými receptory byla nalezena i v embryonálních kmenových buňkách, které mají aktivní vazebná místa pro HA, a jsou proto schopny HA internalizovat a zpracovávat. Embryonální kmenové buňky nalézají využití během tkáňové regenerace a v embryologickém vývoji. Velký potenciál mají kvůli svým dvěma hlavním vlastnostem: pluripotenci (schopnost diferenciaci do mnoha různých typů buněk) a sebeobnově.<sup>44-46</sup>

Během procesu embryogeneze hraje HA důležitou roli v epiteliálně–mezenchymální tranzici, což je kritický krok ve fázi rané embryogeneze pro diferenciaci pluripotentních embryonálních kmenových buněk na mezenchymální kmenové buňky, které slouží pro následnou tvorbu různých tkání. Selhání této interakce vedek tvorbě netypických tkání. A právě vazba vysokomolekulárního HANA CD44 receptor indukuje asociaci s kinázou zajišťující podporu epiteliálně–mezenchymální tranzice a diferenciaci, a tedy tvorbu zdravých a „správných“ tkání.<sup>45,46</sup>

Využití embryonálních kmenových buněk v regenerativní medicíně s sebou také nese nezbytnost jejich správné *in vitro* kultivace, což ale stále zůstává velkou výzvou. Právě kultivace embryonálních kmenových buněk v HA hydrogelech udržuje tyto buňky v nediferencovaném stavu a zachovává schopnost jejich diferenciaci po odstranění z kultivačního média.<sup>47,48</sup>

#### **2.4. Chemická stabilita hyaluronanu a jeho odbourávání v organismu**

Zatímco v čisté vodě nebo ve vodném roztoku fosfátového pufru je HA stabilní,<sup>49</sup> v organismu dochází k jeho rychlému rozkladu. S výjimkou sklivce, kde je poločas přeměny 20–70 dní, je obrat HA ve většině tkání překvapivě rychlý. Typický poločas přeměny v lidské pokožce je 2–5 dní, v kloubech a pohrudnici 0,5–1 den, a v přední komoře oka dokonce 1–2 h.<sup>18,22,50</sup> Odbourávání HA je vysoce kontrolovaný proces, pomocí kterého jsou generovány fragmenty HA o konkrétní velikosti, které slouží pro určené biologické funkce.<sup>11</sup>

Výše zmíněné fyziologické procesy mají na svědomí převážně specifické enzymy popsané níže. Kromě toho je ovšem HA rozkládán celou řadou dalších vlivů jako jsou reaktivní formy kyslíku (superoxid anion radikál, peroxid vodíku, hydroxylový radikál, peroxyinitrit, kyselina chlorná, ozón),<sup>20,31,51</sup> ultrazvuk,<sup>20,31</sup> teplo,<sup>20,31</sup> gamma záření,<sup>52</sup> elektrochemické vlivy,<sup>53</sup> působení  $\beta$ -záření<sup>52</sup> či silně kyselého/silně bazického prostředí.<sup>31,54</sup> Naproti tomu, vliv mikrovlnného záření na rozklad HA není dosud zcela objasněn. Při ozáření HA mikrovlnným zářením k rozkladu sice dochází, ale na základě dalších experimentů bylo zjištěno, že rozklad byl způsoben pravděpodobně pouze působením tepelných efektů, které mikrovlnné záření doprovází.<sup>55</sup>

Reaktivní formy kyslíku (ROS) jsou významným činitelem účastnícím se rozkladu živočišných tkání (obsahujících HA) a příbuzných komponent. ROS se významně podílí zejména na rozkladu synoviální tekutiny kloubů, která obsahuje (mimo jiné) velké

množství vysokomolekulárního HA. Během revmatoidní artritidy (zánětlivé onemocnění projevující se zejména zánětem a bolestí kloubů) dochází k postupnému rozkladu polymerních sacharidů (včetně HA) synoviální tekutiny.<sup>20,50</sup> V akutním stadiu této nemoci mohou ROS přispívat k destrukci kloubních struktur.<sup>19,20,50</sup> Mezi známé ROS patří superoxid anion radikál či peroxid vodíku, což jsou ROS, které samy o sobě nejsou schopny rozkládat HA, ale účastní se například reakcí s přechodnými kovy či jejich ionty, které produkují vysoce reaktivní a nebezpečné hydroxylové radikály. Konkrétně se jedná o Haberovu-Weissovou (Schéma 1A) a Fentonovu reakci (Schéma 1B).<sup>20</sup>

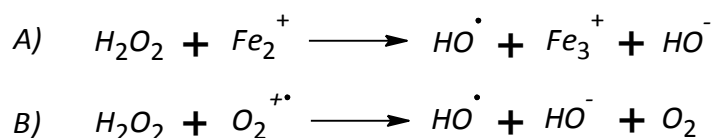


Schéma 1: Haberova–Weissova a Fentonova reakce.

Mezi další ROS patří singletový kyslík, peroxyinitrit či kyselina chlorná. Již zmíněný hydroxylový radikál je označován jako totální oxidant schopný oxidace takřka všech nízko- a vysokomolekulárních organických látek. Nebezpečí hydroxylových radikálů spočívá ve schopnosti odejmutí elektronu velké škále sloučenin za současného vytvoření nového radikálu, který může oxidovat další substráty.<sup>20</sup>

Tepelný rozklad HA závisí na použité teplotě a délce trvání záhřevu. Zatímco při teplotě 37 °C až 60 °C dochází jen k mírnému rozkladu práškového HA i HA v roztoku (při 60 °C je míra rozkladu jen zanedbatelně vyšší než při 37 °C), při 90 °C dochází již k výrazně rychlejšímu rozkladu řetězce. A to tak, že HA v roztoku vykázal již po dvou hodinách záhřevu na 90 °C téměř stejnou molární ztrátu jako po 12 h záhřevu na 60 °C. Práškový HA byl při 60 °C i 90 °C rozkládán rychleji než HA v roztoku.<sup>26</sup>

Chemická stabilita HA je také výrazně závislá na pH roztoku. Hyaluronan je nejstabilnější při neutrálním pH, naopak hodnoty pH blíží se ke krajním hodnotám způsobují jeho rozklad. V kyselém prostředí však probíhá rozklad HA mnohem rychleji než v prostředí bazickém.<sup>31,54</sup>

V přirozeném fyziologickém prostředí je HA odbouráván enzymaticky pomocí hyaluronidáz. Hyaluronidázy mohou být rozděleny do tří skupin podle jejich působení a vznikajících produktů. Tyto tři skupiny jsou: 1) hyaluronát 4-glykanohydrolázy; 2) hyaluronát 3-glykanohydrolázy a 3) mikrobiální hyaluronidázy (bakteriální lyázy). První

dvě skupiny enzymů patří mezi hydrolázy. Hyaluronát 4-glykanohydrolázy jsou enzymy, které náhodně štěpí  $\beta(1\rightarrow4)$  glykosidovou vazbu mezi *N*-acetylglukosaminem a kyselinou glukuronovou a produkují fragmenty se sudým počtem jednotek s *N*-acetylglukosaminem na redukujícím konci. Hyaluronát 3-glykanohydrolázy štěpí  $\beta(1\rightarrow3)$  vazbu polymeru. Tyto enzymy štěpí HA na fragmenty s glukuronovou kyselinou na redukujícím konci vznikajících oligosacharidů. Mikrobiální hyaluronidázy štěpí  $\beta(1\rightarrow4)$  glykosidovou vazbu HA pomocí  $\beta$ -eliminačního procesu (nikoliv hydrolýzy) a poskytují 4,5-nenasycené oligosacharidy různé délky, nejčastěji však disacharidy. Tyto enzymy byly nalezeny například v bakteriích *Streptococcus pneumoniae* a *S. agalactiae*.<sup>19,56</sup>

V těle savců je HA odbouráván pomocí vzájemného působení tří enzymů, konkrétně endoglykosidázy (štěpí polymer uvnitř řetězce, podle působení se jedná o hyaluronát 4-glykanohydrolázu) a dvou exoglykosidáz, které odštěpují koncové monosacharidy. Exoglykosidázy jsou označovány jako  $\beta$ -glukuronidáza (podle působení hyaluronát 3-glykanohydroláza) a  $\beta$ -*N*-acetylhexaminidáza (hyaluronát 4-glykanohydroláza). Biologické odbourávání HA začíná působením endoglykosidáz, které vytváří oligosacharidy o různé délce. Tyto fragmenty pak slouží jako substráty pro exoglykosidázy, které z nich odštěpují jednotlivé monosacharidy.<sup>19,20</sup> V savčím těle se hyaluronidázy vyskytují ve velkém množství ve varlatech, játrech a séru.<sup>57</sup> Mezi nejrozšířenější hyaluronidázy patří Hyal1 a Hyal2.<sup>11,20</sup> Hyal1 využívá jako substrát HA o jakékoliv velikosti a poskytuje zejména tetra- a hexaoligosacharidy. Hyal2 štěpí vysokomolekulární HA na středně velké fragmenty (přibližně 20 kDa).<sup>19,20</sup>

Odbourávání HA v organismu začíná navázáním HA do katalytického místa enzymu. Aminokyselinové zbytky lokalizované okolo katalytického místa zajistí dokonalé umístění polymerního řetězce a posun karbonylového kyslíku *N*-acetylové skupiny (vedle  $\beta(1\rightarrow4)$  glykosidové vazby, která má být štěpena) k C1 uhlíku téže monosacharidové jednotky tak, aby mezi nimi došlo k vytvoření kovalentního intermediátu (cyklický oxazoliový ion) (Schéma 2). Posun karbonylového kyslíku k místu interakce s C1 uhlíkem HA vede ke změně z židličkové konformace na zkroucenou vaničkovou konformaci.<sup>20</sup>

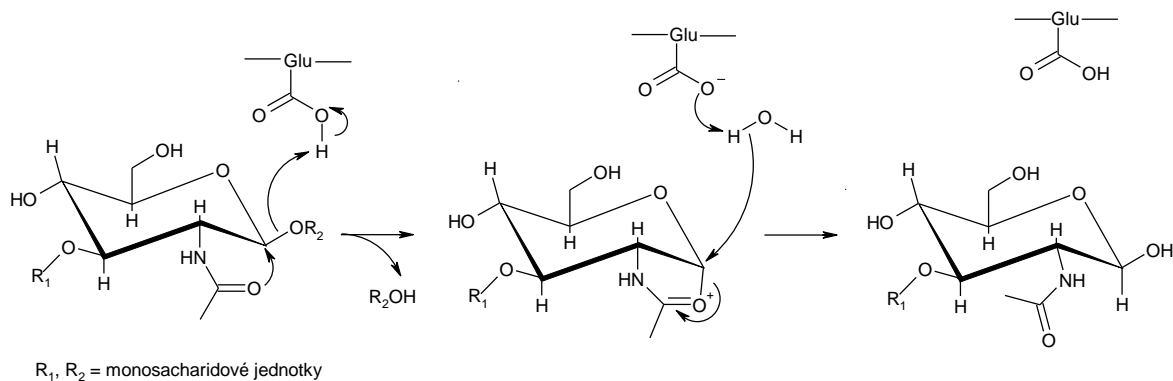


Schéma 2: Reakční mechanismus savčích hyaluronidáz.

Následuje rozštěpení glykosidové vazby a inverze konfigurace atomu anomerního uhlíku C1. Protonovaná kyselina glutamová (pocházející z enzymu) současně předává svůj proton glykosidovému kyslíku. Hydrolytické štěpení vazby intermediátu mezi karbonylovým kyslíkem a C1 pomocí molekuly vody v katalytickém místě vede k reprotonizaci kyseliny glutamové. Vzniklý HA fragment je následně vytěsněn z aktivního místa.<sup>20,57</sup> Během tohoto procesu je dvakrát změněna konfigurace na anomerním C1 uhlíku.<sup>20</sup>

V organismu je HA odbouráván komplexem enzymatických mechanismů zahrnující hyaluronidázové enzymy,<sup>11,19,20</sup> buněčnou internalizací HA buňkami pomocí CD44 receptorů<sup>11,23</sup> či pomocí ROS.<sup>23</sup> Právě kvůli rychlému odbourávání a nedostatečným mechanickým vlastnostem má přírodní hyaluronan jen omezené aplikace. Na základě těchto znalostí byly vyvinuty hydrogely, které mají vyšší odolnost vůči odbourávání a v tkáních vytváří trojdimensionální síťovitou strukturu, která rychlému odbourávání působením hyaluronidáz a reaktivních forem kyslíku brání.<sup>22</sup>

## 2.5. Funkční skupiny (význam, možnost modifikace)

Přírodní HA je mnohdy výhodné, zejména pro aplikace v oblasti medicíny či kosmetiky, modifikovat. Modifikací se získává nejčastěji amfifilní forma HA se zpomaleným *in vivo* odbouráváním nebo se připravují deriváty s požadovanými vlastnostmi (odlišná viskozita roztoků apod.). Běžnou modifikací je například síťování polymerů pro využití v tkáňovém inženýrství nebo příprava amfifilních derivátů s využitím pro nosičové systémy.

Modifikace HA tedy vede k přípravě derivátů, které mají fyzikálně–chemické vlastnosti lepší než přírodní polymer, ale současně zůstává zachována biokompatibilita a biodegradabilita přírodního HA.<sup>23,35</sup>

Modifikační reakce mohou být rozděleny do dvou skupin: na reakce vedoucí k vytvoření síťovaného produktu (Schéma 3, vpravo) či konjugátu (Schéma 3, vlevo). Tyto reakce jsou založeny na stejných mechanismech, ale liší se povahou modifikačního činidla, a tím i výsledného produktu. V případě síťovací reakce dochází působením modifikačního činidla se dvěma reaktivními skupinami ke spojení dvou

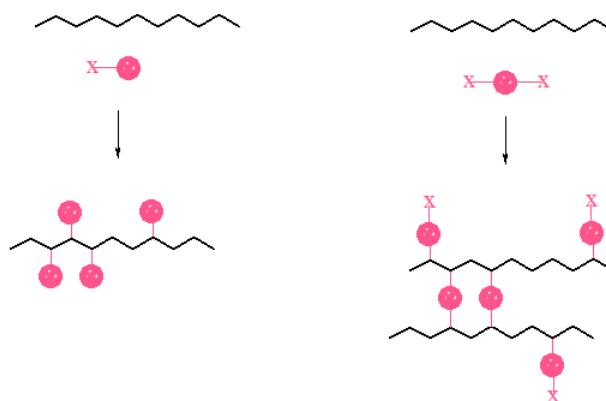


Schéma 3: Tvorba konjugovaného (vlevo) a síťovaného produktu (vpravo).

a více řetězců HA dvěma a více vazbami a vzniká tak 3D struktura (sít'). Konjugací reakcí dochází k navázání modifikačního činidla s jednou reaktivní funkční skupinou na řetězec HA.<sup>11</sup> V obou případech lze volbou podmínek a zejména poměru činidla a HA ovlivňovat míru zesíťování či konjugace HA.

Za účelem získání optimálních derivátů pro aplikace, bylo vypracováno mnoho postupů pro chemické modifikace obou typů funkčních skupin dostupných na řetězci přírodního HA, tedy karboxylových a hydroxylových skupin.<sup>11,23</sup> Nicméně, karboxylová skupina je rozpoznávacím místem pro HA receptory a hyaluronidázy, tudíž chemická modifikace těchto skupin může zásadním způsobem změnit biologické chování v organismu.<sup>24</sup> Také bylo zjištěno, že HA ztrácí schopnost cílení na CD44 receptory, je-li modifikována alespoň jedna čtvrtina karboxylových skupin.<sup>22</sup> Z tohoto úhlu pohledu se jako vhodnější alternativa jeví modifikace hydroxylových skupin HA.<sup>24</sup>

Není dosud známo, které hydroxylové skupiny dimeru reagují nejochotněji, předpokládá se ale, že reakce probíhají zejména na hydroxylové skupině lokalizované na uhlíku C6 *N*-acetylglukosaminu<sup>11,58</sup> kvůli lepšímu přístupu reagentů k primárnímu alkoholu.<sup>11</sup>

Jak již bylo zmíněno, některé reakce musí být prováděny v organických rozpouštědlech. Důvodem jejich použití je zpravidla náchylnost některých reakčních činidel k hydrolýze. Přírodní HA je však v bezvodém prostředí nerozpustný, a je proto převáděn na kyselou formu či tetrabutylamoniovou sůl.<sup>5,12</sup> Během tohoto kroku však zpravidla dochází

k nežádoucímu rozkladu řetězce HA<sup>59</sup> a tudíž reakce v jiném než vodném prostředí nejsou preferované.

Neselektivní modifikace hydroxylových funkčních skupin také umožňují získání produktu s vyšším substitučním stupněm než produkty získané substitucí karboxylových skupin (míněno v přepočtu na disacharidovou jednotku HA). Chemická modifikace hydroxylových skupin zachovává polyelektrolytický charakter řetězce HA a tudíž je zachována hydrofilita polymeru. Toto je důležitá vlastnost derivátů HA pro jejich aplikace v oblasti nosičových systémů léčiv,<sup>60</sup> protože při některých, zejména farmaceutických aplikacích (např. intravenózních podáních) je nezbytné, aby byly polymerní nosiče zcela rozpuštěné ve vodném prostředí a neagregovaly ve větší celky.

V závislosti na výše zmíněných faktech (rozpoznávací místo pro HA receptory, rozpustnost a rozklad během získávání kyselé formy HA, možnost dosažení vyššího stupně substituce) jsou preferovanější substituční reakce prováděné na hydroxylových skupinách HA.

V literatuře nejčastěji najdeme modifikační reakce vedoucí ke vzniku etherových vazeb, které byly využity pro přípravu konjugovaných i síťovaných derivátů. Síťování HA přes jeho hydroxylové skupiny bylo popsáno například pomocí 1,4-bis((oxiran-2-yl)methyloxy)butanu<sup>61</sup> (Schéma 4A), divinyl sulfonu<sup>61</sup> (Schéma 4B), či glutaraldehydu<sup>62</sup> (Schéma 4C). Konjugační reakce pak byla provedena pomocí ethylensulfidu<sup>63</sup> (Schéma 4D).



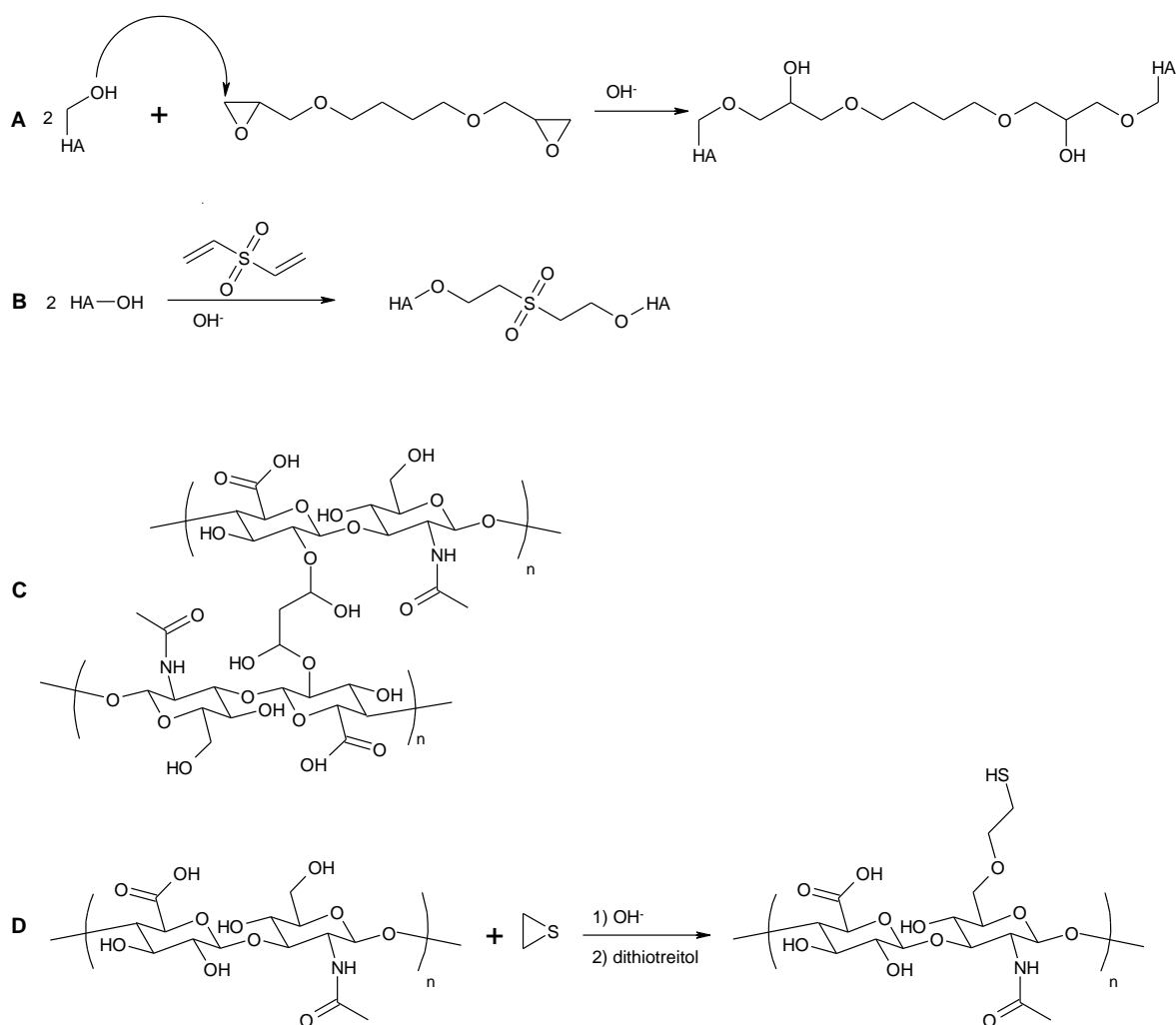


Schéma 4: Modifikační reakce HA za vzniku etherových vazeb mezi HA a modifikačním činidlem.

Estery HA (HA je poskytovatelem hydroxylové skupiny) byly připraveny například z oktenyl anhydridu kyseliny jantarové v bazickém prostředí<sup>7</sup> (Schéma 5). Nevýhodou je nutnost použití delší reakční doby (24 h) a výrazně většího molárního nadbytku anhydridu (20 ekvivalentů) pro dosažení vyššího stupně substituce kvůli současně probíhající hydrolýze anhydridu ve vodě. Právě voda je jediným použitým rozpouštědlem, což je v případě reakce s anhydridy kyselin velká nevýhoda, neboť tyto látky se, jak již bylo zmíněno, vodou rozkládají a navíc anhydridy arylmastných kyselin či nenasycených mastných kyselin mají velmi omezenou rozpustnost v tomto prostředí, která dále klesá s rostoucím počtem uhlíků v řetězci kyseliny. Příprava esterů HA s využitím těchto anhydridů jako modifikačních činidel proto obvykle probíhají jen do nízkého stupně substituce.<sup>64</sup>

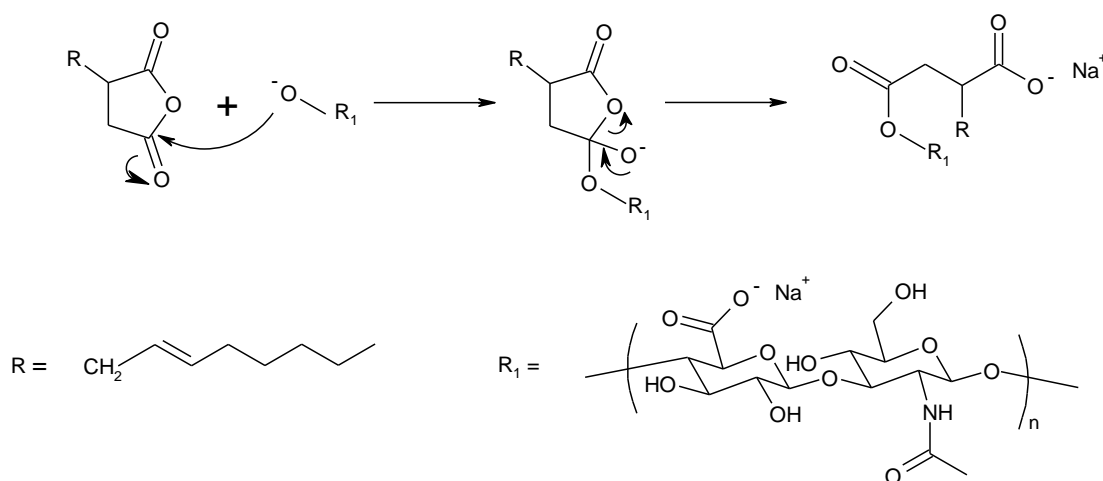
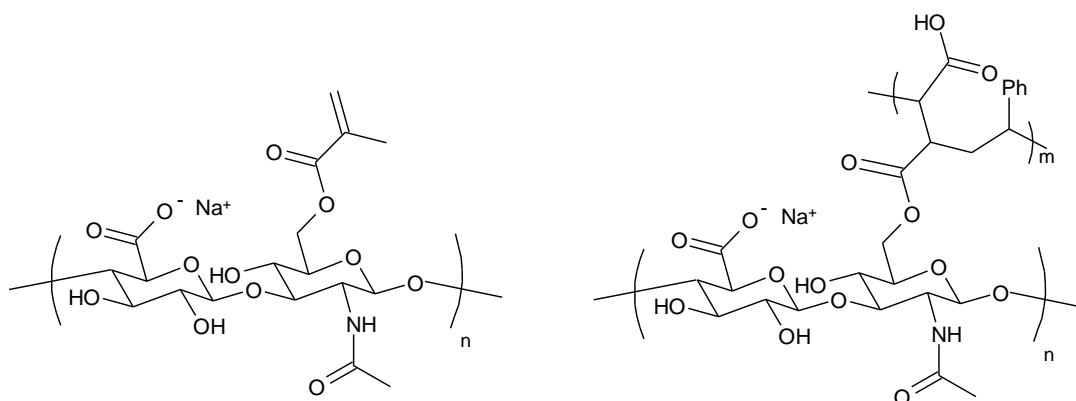


Schéma 5: Příprava esteru HA z oktenyl anhydridu kyseliny jantarové.

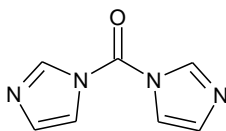
Obdobně byla provedena modifikace hydroxylových skupin HA (za vzniku esterů) pomocí acyklického anhydridu, konkrétně anhydridu kyseliny methakrylové<sup>65</sup> (Obrázek 3, vlevo) či také pomocí kopolymeru poly(styren-*co*-maleinanhydridu)<sup>66</sup> (Obrázek 3, vpravo).



Obrázek 3: Produkty modifikace HA pomocí anhydridů.

Výše zmíněné esterifikace však vycházejí z reakcí hydroxylových skupin HA s anhydridy. Neobsahuje-li však vázaná látka anhydridovou funkční skupinu, například vychází-li reakce přímo z příslušné kyseliny (karboxylová skupina), nelze tuto látku na HA tímto způsobem navázat, a je nutné k esterifikacím hydroxylových skupin HA použít vhodná aktivační činidla.

Pro modifikaci hydroxylových skupin hyaluronanu se jako aktivační činidlo využívá nejčastěji *N,N'*-karbonyldiimidazol (Obrázek 4, CDI).<sup>67</sup>



Obrázek 4: Struktura CDI.

Toto činidlo reaguje s karboxylovou skupinou navazované látky za vzniku  $\text{CO}_2$  a imidazolu jako vedlejších produktů.<sup>68</sup> Takto aktivovaná karboxylová skupina pak snadno interaguje s hydroxyly HA.<sup>69</sup> CDI má však i mnohé nevýhody. Tou je zejména náchylnost k hydrolyze. S vodou CDI reaguje bouřlivě za vzniku  $\text{CO}_2$  a imidazolu<sup>15</sup> (Schéma 6), a musí být proto používán v prostředí bezvodých organických rozpouštědel (např.  $\text{CHCl}_3$ , THF, benzenu nebo DMF), ve kterých je však HA (kyselá i přírodní forma) velmi obtížně rozpustný. Acylimidazolové deriváty jsou všeobecně relativně stabilní, a tedy i méně reaktivní, což může způsobit vznik vedlejších produktů.<sup>70</sup> Použití výrazného nadbytku CDI reakci sice urychlí, ale nadbytečný CDI zůstává v reakční směsi a brání acylaci.<sup>71</sup>

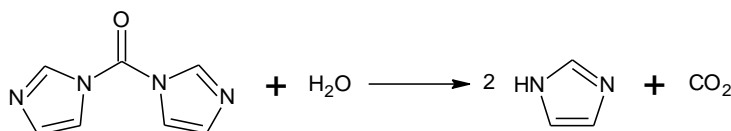
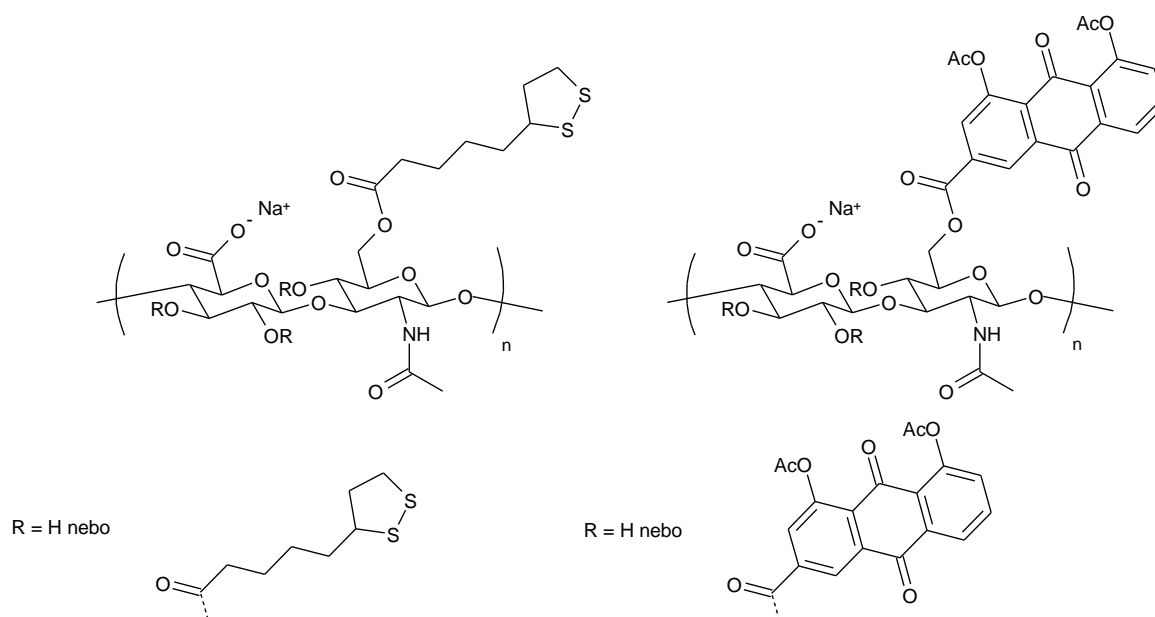


Schéma 6: Hydrolyza CDI.

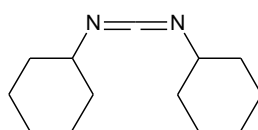
K urychlení reakce jsou proto běžně přidávány organokatalyzátory jako například 1-hydroxybenzotriazol (HOBt), 1,8-diazabicyklo[5.4.0]undec-7-en (DBU) aj. Použití těchto činidel však s sebou opět nese mnohé nevýhody, jako je riziko exploze (HOBt) či toxicita (DBU).<sup>70</sup> Při použití CDI jako aktivačního činidla může být esterifikace navíc doprovázena síťovací reakcí mezi hydroxylovými a karboxylovými skupinami HA.<sup>67</sup>

Příkladem přípravy esteru HA pomocí CDI je esterifikace kyselinou lipoovou ve formamidu (teratogen a podezřelý karcinogen). Maximální dosažený stupeň substituce (DS) byl 1,8 % (ref.<sup>69</sup>) (Obrázek 5, vlevo). Vyššího stupně substituce nebylo dosaženo ani při esterifikaci diacereinem v THF (maximální DS 2 %)<sup>72</sup> (Obrázek 5, vpravo).



Obrázek 5: Příklady esterů HA připravených za použití CDI jako kondenzačního činidla.

Dalším používaným kondenzačním činidlem je *N,N'*-dicyklohexylkarbodiimid (Obrázek 6, DCC) využívaný při přímých kondenzacích karboxylových kyselin s aminy.<sup>73,74</sup> či alkoholy<sup>63,75</sup> (Schéma 7).



Obrázek 6: Struktura DCC.

Jeho nevýhodou je nerozpustnost ve vodném prostředí, a proto se reakce musí provádět v polárních aprotických organických rozpouštědlech (například DMSO nebo DMF). V tomto prostředí je ovšem sodná sůl kyseliny hyaluronové nerozpustná a musí být, jak již bylo zmíněno, převedena na kyselou formu či tetrabutylamoniovou sůl. Jelikož samotný DCC vykazuje nízkou reaktivitu,<sup>76</sup> používá se spolu s organokatalyzátory, například 1,1,3,3-tetramethyl-4-(4-pyridyl)guanidinem,<sup>75</sup> který je však komerčně nedostupný, nebo 4-dimethylaminopyridinem (DMAP).<sup>77,78</sup>

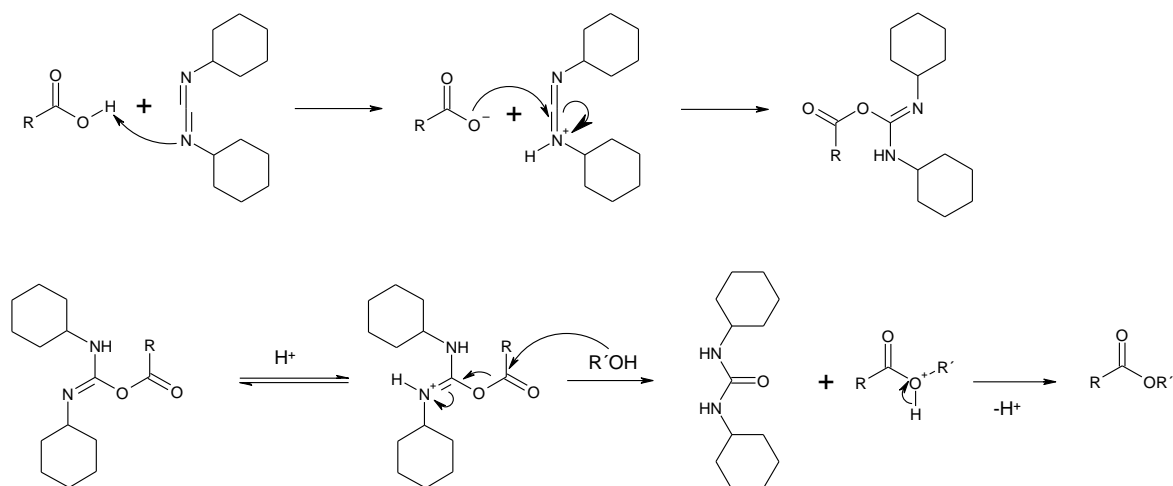
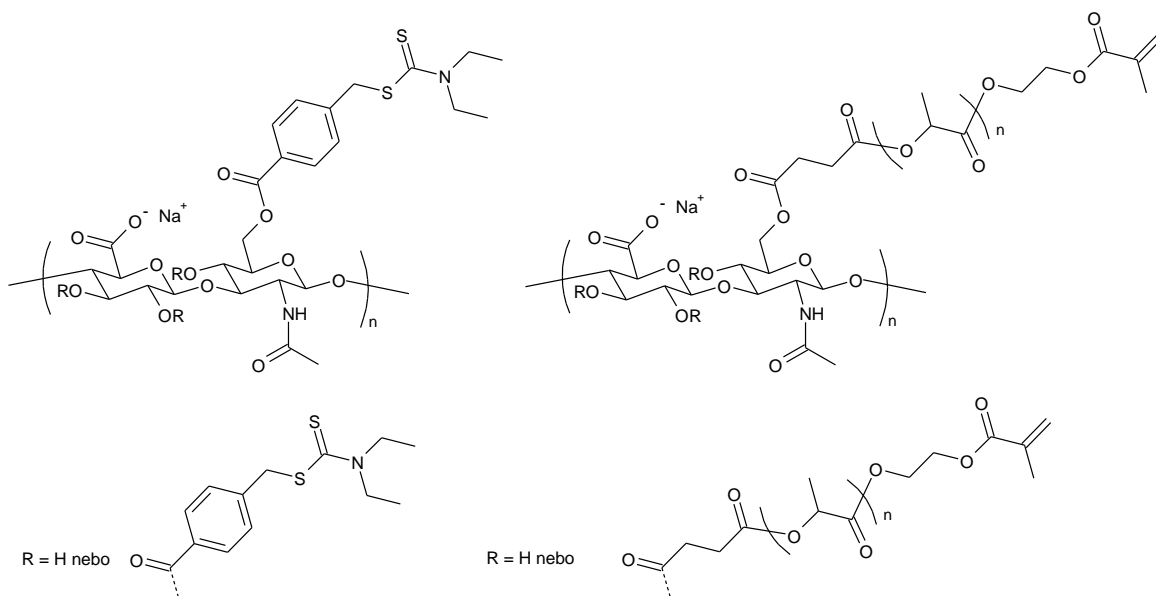


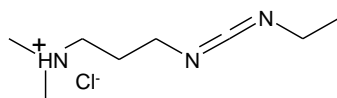
Schéma 7: Kondenzace karboxylové skupiny a alkoholu za použití DCC.

Ve velkém molárním nadbytku DCC dochází k intra- i intermolekulárnímu síťování HA. Za přispění DCC byl HA na jeho hydroxylových skupinách modifikován 4-(*N,N*-diethyldithiokarbamylmethyl)benzoovou kyselinou<sup>79</sup> (Obrázek 7, vlevo) či polyesterem na bázi kyseliny mléčné<sup>80</sup> (Obrázek 7, vpravo).



Obrázek 7: Příklady esterů HA připravených za použití DCC jako kondenzačního činidla

Ve vodě rozpustným analogem DCC je 1-ethyl-3-(3-dimethylaminoisopropyl)karbodiimid (Obrázek 8, EDC).<sup>81</sup>



Obrázek 8: Struktura EDC.

Toto činidlo indukuje tvorbu amidové<sup>82</sup> nebo esterové vazby mezi amino/hydroxylovou a karboxylovou skupinou. Běžně se EDC používá ve směsi s organokatalyzátory NHS<sup>82,83</sup> či HOBt.<sup>84</sup> Organokatalyzátor HOBt musí být použit ve vhodném rozpouštědle (halogenovaná rozpouštědla: CHCl<sub>3</sub>, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>), které zvýší rychlost tvorby a stabilitu reakčního intermediátu.<sup>84</sup> Opět tak vyvstává problém s velmi malou rozpustností HA v organických rozpouštědlech. Na druhou stranu, ve vodném prostředí je velmi nestabilní intermediát vznikající mezi EDC a karboxylovou skupinou, a proto je nezbytná přítomnost *N*-hydroxysukcinimidu (NHS) pro vytvoření stabilnějšího intermediátu.<sup>15</sup> Modifikační reakce v tomto prostředí (vodné) ale poskytují deriváty jen s nízkým stupněm substituce.

Extrémní podmínky reakce (vysoká teplota či vysoká koncentrace činidel) mohou při použití EDC způsobit tvorbu nežádoucího vedlejšího produktu intramolekulárním přesmykem acylu intermediátu EDC a HA (Schéma 8).<sup>82</sup> Velikou nevýhodou použití EDC/NHS při konjugaci je nezbytnost kontroly pH reakce. NHS-intermediát vzniká při kyselém pH (3,5–4,5), zatímco nukleofilní atak aminu žádá neutrální či zásadité pH, ve kterém je NHS-intermediát hydrolyticky labilní.<sup>4,77</sup> Tyto reakční podmínky (zejména kyselá pH) způsobují rozklad HA. Pro přípravu esterů z hydroxylových skupin HA je však EDC využíván jen zřídka. Popsána byla například příprava derivátu HA s kamptotecinem navázaným na HA přes peptidový linker.<sup>85</sup>

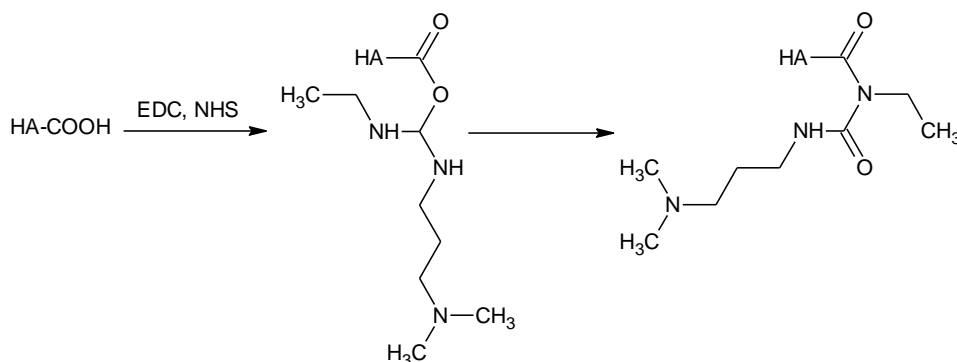
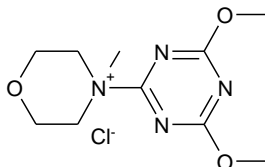


Schéma 8: Vedlejší produkt při použití EDC.

Dalším popsáním kondenzačním činidlem používaným pro přípravu esterů a amidů je 4-(4,6-dimethoxy-1,3,5-triazin-2-yl)-4-methylmorfolinium chlorid (Obrázek 9, DMTMM).<sup>2,86</sup>



Obrázek 9: Struktura DMTMM.

Tato látka může být získána z komerčních zdrojů či připravena reakcí 2-chlor-4,6-dimethoxy-1,3,5-triazinu (CDMT) a *N*-methylmorfolinu (NMM).<sup>86</sup> Bylo popsáno, že pro modifikace HA je optimální používat DMTMM v ekvimolárním množství či v nadbytku (až 4 násobný molární nadbytek vůči disacharidu HA),<sup>87</sup> což však zvyšuje náklady na reakční činidla. Reakce probíhají dosti dlouhou dobu (až 5 dní),<sup>4</sup> a to může vést k rozkladu řetězce HA. Oproti řadě předchozích činidel je DMTMM ve vodě rozpustný a stabilní. V organických rozpouštědlech je však DMTMM nestabilní a rozkládá se,<sup>4,77</sup> což je velkou nevýhodou neboť modifikační reakce se kvůli zajištění rozpustnosti modifikačního činidla obvykle provádějí ve směsi vody a organického rozpouštědla (mísitelného s vodou). Během reakce také dochází k rozkladu řetězce hyaluronanu.<sup>2</sup>

### 3. Nosičové systémy

V posledních letech dochází k nárůstu intenzity vývoje účinných léčiv, zejména proti závažným onemocněním. Při vývoji každého nového léčiva se zvažují dva hlavní aspekty – maximální účinnost proti danému onemocnění a co nejmenší vedlejší účinky. Nejúčinnější léčiva však často mívají velmi silné vedlejší nežádoucí účinky. Navíc se mohou připojit i další problémy související se způsobem podáním léčiva, jako jsou obtížná rozpustnost ve vodném prostředí a biologická dostupnost, krátká doba cirkulace v krevním řečišti, nevyhovující biodistribuce do cílového orgánu, kontakt léčiva s inaktivujícími látkami, jako například enzymy přítomnými v biologických tekutinách atd.<sup>88-92</sup> Naproti tomu, vazba léčiva na vhodně zvolený nosič může vést k potlačení nežádoucích fyzikálně–chemických vlastností, k prodloužení doby cirkulace v krevním řečišti a může rovněž umožnit cílenou dopravu léčiva do určité (například nádorové) tkáně (buňky či buněčného kompartmentu) a jeho řízené uvolňování na požadovaném místě působení. Přednostní doprava léčiva do tkáně, kde je jeho účinek žádoucí, pak zvýší jeho účinnost působení a omezí vedlejší systémové účinky.<sup>14,88,89</sup>

Aplikace většiny léčiv je však omezená zejména kvůli jejich špatné rozpustnosti ve vodném prostředí.<sup>14,88,93</sup> Odhaduje se, že ve vodném prostředí je špatně rozpustných až 70 % nových léčiv. V současné době se špatná rozpustnost léčiv ve vodném prostředí řeší například přidávkem surfaktantu Cremophor® EL. Tato látka však může způsobovat nežádoucí efekty<sup>94-96</sup> jako například hypersenzitivní reakce, nízký krevní tlak, tachykardii či bronchiální křeče.<sup>94,96</sup> Z tohoto důvodu se nyní významně rozvíjí výzkum nosičových systémů, které by měly zvýšit účinnost (zejména cytotoxických kancerostatických) léčiv<sup>14,88,89,97,98</sup> bez nežádoucích efektů. Pro zvýšení rozpustnosti léčiva ve vodném prostředí bylo vyzkoušeno mnoho postupů, ale jako nejslibnější cesta se však jeví využití polymerních micel.<sup>14,88,98-100</sup>

Některé nanosystémy vhodné pro dopravu léčiv (včetně polymerních micel) jsou vytvářeny hydrofobní asociací tzv. amfifilních molekul, tj. molekul, které mají určitou část výrazně hydrofobní a zbylá část molekuly je výrazně hydrofilní. Amfifilita je jedním z nejdůležitějších faktorů pro samoshlukování ve vodě.<sup>100-102</sup> Amfifilní polymery jsou z vědeckého hlediska velmi zajímavé materiály kvůli jejich (potenciální) aplikaci v oblasti nosičových systémů ve farmacii, v kosmetice, potravinářství, prostředcích osobní hygieny apod.<sup>99</sup>

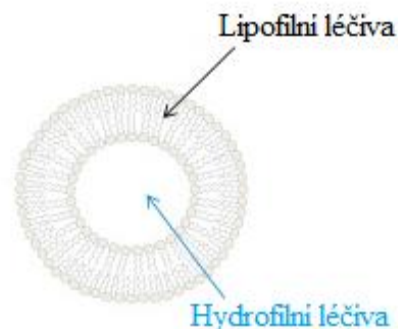


### 3.1. Typy nosičových systémů

Mezi nosičové systémy však nepatří jen výše zmíněné polymerní micely, ale i liposomy, dendrimery, polymersomy či nanokapsule, které mají jak své výhody, tak i nevýhody.

#### 3.1.1. Liposomy

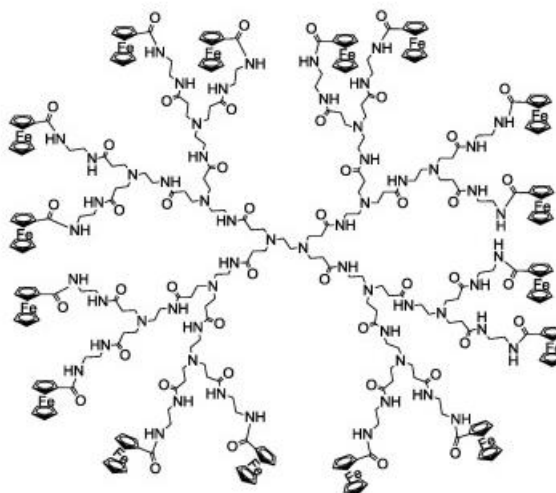
Liposomy jsou útvary tvořené fosfolipidovou dvojrůstvou s vnitřní dutinou vyplněnou vodnou fází (Obrázek 10). Polární charakter jádra umožňuje enkapsulaci polárních léčiv, zatímco amfifilní a lipofilní molekuly jsou pak zachyceny ve fosfolipidové dvojrůstvě.<sup>99,103,104</sup> Hlavní složkou liposomů jsou fosfolipidy a cholesterol, které jsou však finančně dosti náročné a způsobují vysoké náklady na přípravu těchto nosičů.<sup>103,104</sup> Liposomy jsou navíc při dlouhém skladování fyzikálně a chemicky nestabilní.<sup>103</sup>



Obrázek 10: Liposom.

#### 3.1.2. Dendrimery

Dendrimery jsou molekuly s vysoce větvenou symetrickou strukturou. Jsou tvořeny jádrem, rozvětvenými jednotkami a terminálními funkčními skupinami (Obrázek 11). Dendrimery jsou připravovány chemickou syntézou a je tedy možné připravit molekuly o známé molekulové hmotnosti a nízké polydisperzitě. Cílení dendrimerů je umožněno připojením cílicích ligandů na terminální funkční skupiny. Léčivo může vytvářet s okrajovými skupinami dendrimeru supramolekulární hostitel-host agregáty nebo může být vázáno nespecificky „uvnitř“ dendrimeru.<sup>99,105,106</sup> Velkou nevýhodou dendrimerů je však velká cenová náročnost jejich přípravy.<sup>105</sup>

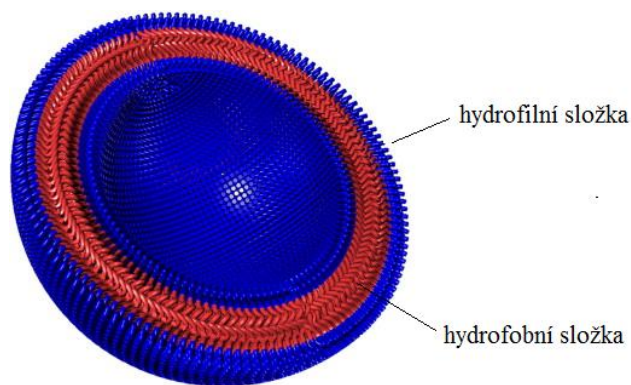


Obrázek 11: Dendrimer.

#### 3.1.3. Polymersomy

Polymersomy jsou nadmolekulární útvary tvořené z amfifilních vysokomolekulárních blokových kopolymerů (Obrázek 12). Strukturně jsou podobné liposomům (hydrofilní

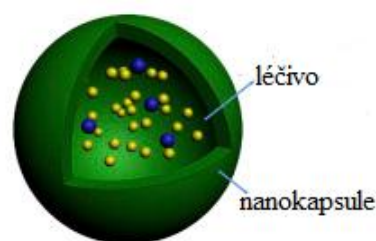
jádro), jsou však vytvořeny zpravidla ze syntetických polymerů. Polymersomy jsou mechanicky, chemicky i termodynamicky stabilnější než liposomy. Tloušťka membrány určuje jejich elasticitu, permeabilitu a mechanickou stabilitu. Polymersomy mohou enkapsulovat hydrofilní látky ve svém jádře, hydrofobní látky ve své membráně a/nebo na svém povrchu. Není však dosud popsáno žádné jejich využití v klinické praxi.<sup>95,107</sup>



Obrázek 12: Polymersom.

### 3.1.4. Nanokapsule

Nanokapsule jsou vezikulární systémy, ve kterých je léčivo uzavřeno v tekuté kavitě obklopené tenkou polymerní membránou (Obrázek 13).<sup>92,99</sup> Polymerní stěna nanokapsulí je vytvořena z neionických polymerů a obklopuje tak lipofilní jádro.<sup>92,99,108,109</sup> Vnitřní kavita může obsahovat aktivní látku v pevné i tekuté formě. Nanokapsule mohou nést aktivní látku také na svém povrchu.<sup>92,99</sup>



Obrázek 13: Nanokapsule.

## 3.2. Polymerní micely

Ze skupiny nosičových systémů však zájem odborné veřejnosti nejvíce zaujaly polymerní micely a velká část výzkumu v této oblasti se zaměřuje zejména na ně. Ve své disertační práci se také věnuji jejich přípravě, a proto je nyní rozeberu podrobněji než předchozí typy. Polymerní micely (Obrázek 14) jsou útvary, které mají hydrofobní jádro a hydrofilní obal, a jsou obvykle využívány jako nosiče hydrofobních léčiv.<sup>90,110-113</sup> Polymerní micely vznikají ve vodném prostředí z roubovaných či blokových kopolymerů.<sup>90,110</sup> Tyto makromolekuly obsahují hydrofobní segmenty, které tvoří jádro vzniklé micely, a které slouží k enkapsulaci hydrofobního léčiva. Hydrofilní obal naopak stabilizuje micelu vůči rozpoznávacím systémům retikuloendoteliálního systému a odděluje léčivo od vodného prostředí.<sup>90,110-113</sup>

Polymerní micely jsou velmi stabilní a ve srovnání se surfaktanty mají nízkou kritickou asociační koncentraci.<sup>8,90,110</sup> Hnací silou pro samoshlukování jsou nekovalentní interakce, zejména hydrofobní, elektrostatické a vodíkové vazby či  $\pi \cdots \pi$  stohování.<sup>13</sup> Způsob samoshlukování závisí na koncentraci polymeru a strukturních parametrech jako je počet, délka a distribuce hydrofobních skupin v rámci polymerního skeletu.<sup>114</sup>



Obrázek 14: Polymerní micela.

Polymerní micely jako nosičové systémy byly poprvé využity začátkem 90. let 20. století, kdy byly připraveny micely konjugované s doxorubicinem. Polymerní micely byly poté intenzivně studovány jako nosná média pro injektní léčivé látky špatně rozpustných ve vodě jako je paclitaxel, indomethacin, aphotericin B, adriamycin, dihydrotestosteron aj. Celkově bylo zjištěno, že polymerní micely jsou vysoce efektivní nosičové systémy.<sup>115</sup>

Léčivo může být v micelle vázáno buď hydrofobně (nekovalentně, tj. „rozpuštěno“ v jádře micely),<sup>90,116</sup> nebo přímo chemicky navázáno na polymerní nosič biodegradovatelnou vazbou.<sup>8,90,95,116</sup> Léčivo je poté uvolněno přerušением kovalentní vazby, ideálně ve specifickém cílovém místě.<sup>95</sup>

Tvorba micel ve vodném roztoku nastává v okamžiku, kdy koncentrace amfifilního polymeru vzroste nad určitou koncentraci označovanou jako kritická agregační koncentrace (CAC). Při této koncentraci začnou hydrofobní segmenty asociovat, aby minimalizovaly kontakt s molekulami vody, a hydrofilní řetězce se rozprostírají do vodného prostředí. Toto shlukování vede k tvorbě micelárních struktur.<sup>115,117</sup> Lipofilní léčiva pak mohou být zachycena v hydrofobním středu vzniklé micely (nekovalentní způsob).<sup>101,118</sup> Hodnoty CAC polymerních micel se pohybují v řádech  $10^{-6}$ – $10^{-7}$  M. Takto nízké hodnoty předurčují polymerní micely pro *in vivo* podání díky zachování micelární struktury, a tím prodloužení cirkulace v krevním řečišti.<sup>115</sup>

Polymerní micely ale zaujímají přednostní postavení nejen kvůli jejich příznivým hodnotám CAC a malé velikosti (10–200 nm), ale také kvůli vysoké stabilitě a solubilizační kapacitě, možnosti postupného uvolňování léčiva a akumulaci v nádorové tkáni (EPR efekt, viz níže).<sup>119,120</sup> Použití biodegradabilního a biokompatibilního polymeru (například hyaluronanu) pak zajišťuje zdravotní nezávadnost micel.<sup>120</sup>

Vysoký potenciál HA fungovat jako nosič souvisí jednak s jeho hydrofilní povahou (slouží jako hydrofilní část nosiče) a také s přirozenými receptory v organismu, které mají specifickou afinitu k HA (RHAMM receptory či CD44 receptory).<sup>23,118</sup> Během enzymatického rozkladu systému HA–léčivo, zajišťují CD44 receptory internalizaci HA buňkami, což umožňuje řízené intracelulární dodání léčiva.

Kromě cílení polymerních micel do nádorových tkání pomocí specifických interakcí polymerní složky micely a receptorů, se micely mohou dostat do nádorové tkáně také pomocí takzvaného EPR efektu (enhanced permeation and retention effect). EPR efekt je založen na faktu, že nádorová tkáň je struktura s velkými „póry“ mezi buňkami (je takzvaně „děravá“) a umožňuje tak průchod „velkých“ molekul,<sup>121-123</sup> obecně do cca 780 nm.<sup>122</sup> Zdravá tkáň má „póry“ výrazně menší, proto tyto molekuly (micely a podobně) nepropouští nebo propouští jen v omezené míře. Protože nádorové tkáně mívají špatný či žádný odvod lymfy, zůstávají nosiče v těchto tkáních déle.<sup>122-124</sup> Přesto však nemůže EPR efekt garantovat zajištění dostatečné koncentrace léčiva v buňkách.<sup>91</sup>

### 3.3. Nosičové systémy na bázi HA

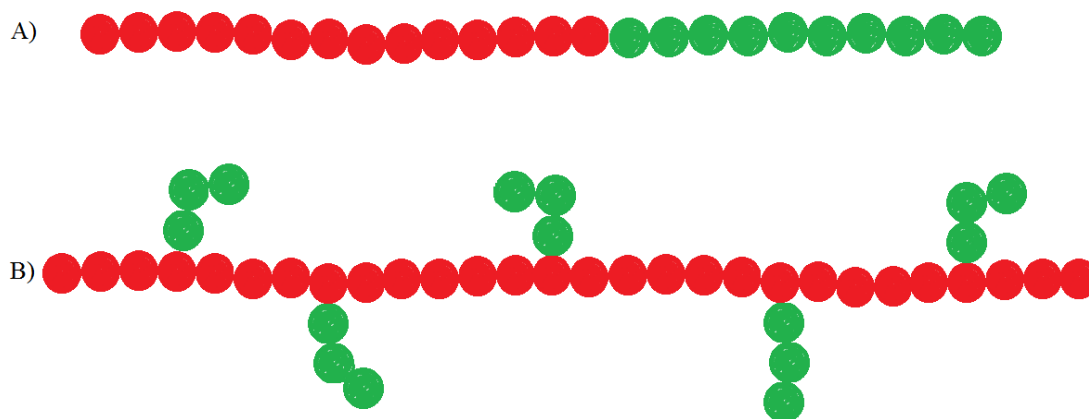
První polymerní micely byly připraveny ze syntetických polymerů.<sup>98,124</sup> Tyto nosičové systémy však mají mnohé nevýhody, zejména nízkou biokompatibilitu a biodegradabilitu.<sup>125</sup> Následně bylo ohnisko zájmu posunuto k přírodním materiálům. Některé přírodní polymery, jako chitosan či alginát, byly také použity pro nosičové systémy.<sup>126</sup> Chitosan je ale lidskému tělu cizí a při fyziologickém pH je obtížně rozpustný.<sup>127</sup> Alginát, který byl rovněž testován jako nosičový systém,<sup>128</sup> je však *in vivo* rozkládán příliš pomalu.<sup>18</sup>

Další přírodní polymer, který byl testován pro vývoj nosičových systémů, je HA. Rozvoji nosičů léčiv založených na přírodním HA však brání jeho vysoká hydrofilita a špatné biomechanické vlastnosti. Fyzikálně–chemické vlastnosti HA nejsou dostačující pro tvorbu stabilních agregátů ve vodném prostředí a enkapsulaci hydrofobních biologicky aktivních látek či léčiv.<sup>35,93</sup> HA také vykazuje nízkou biologickou stabilitu *in vivo* a krátkou dobu setrvání v organismu kvůli rychlému odbourávání.<sup>35</sup> Jako vhodná cesta ke zpomalení odbourávání HA v těle se využívá jeho chemická modifikace.<sup>18</sup>

### 3.4. Blokované vs. roubované polymery

Polymerní micely bývají nejčastěji připravovány z blokovaných (Obrázek 15A) či roubovaných polymerů (Obrázek 15B). Roubované polymery jsou polymery, jejichž

molekuly mají alespoň jeden blok navázaný jako vedlejší řetězec na hlavní polymerní kostře. Blokové polymery jsou takové polymery, jejichž molekuly jsou tvořeny bloky, které jsou řazeny lineárně za sebou.<sup>129</sup>



Obrázek 15: Blokový (A) a roubovaný (B) polymer

Nosičové systémy založené na blokových polymerech kyseliny hyaluronové byly připraveny napojením poly( $\gamma$ -benzyl-L-glutamátu),<sup>130</sup> poly(D,L-laktid-co-glykolidu)<sup>131</sup> nebo polyethylenglykolu<sup>132</sup> na HA. Všechny výše uvedené postupy však využívají kyselou formu HA a pro reakce je nutná dlouhá reakční doba (v řádu dní), což jsou podmínky, při nichž dochází k rozkladu polymerního řetězce HA. Nanočástice založené na blokových polymerech často pozbývají funkčnost kvůli limitovanému počtu hydrofobních stavebních složek připraveného blokového polymeru (maximální poměr hydrofilního polymeru vůči hydrofobní stavební složce může být 1:1).<sup>133</sup> Nevýhodou je také zpravidla vyšší hodnota CAC.<sup>134</sup> Oproti tomu ve prospěch roubovaných polymerů hovoří nízké hodnoty CAC micel připravených z těchto polymerů. Nízké hodnoty CAC jsou pro *in vivo* aplikace vhodné, protože se snižující se hodnotou CAC stoupá stabilita micel v oblasti běžně používaných koncentrací. Pro účely využití v oblasti nosičů léčiv je stabilita micel velice důležitá, protože málo stabilní micely snadno uvolňují léčivo ze svého jádra dříve než v cílovém místě.<sup>117</sup>

### 3.5. Metody přípravy micel

V závislosti na fyzikálně–chemických vlastnostech polymerů jsou používány dvě metody pro přípravu polymerních micel. První metoda (odpařovací) zahrnuje rozpuštění polymeru ve vhodném rozpouštědle, zatímco enkapsulovaná látka je rozpuštěna v organickém rozpouštědle nebo dispergována ve vodném prostředí spolu s polymerem.<sup>123,134</sup> Organická

fáze je přidána po kapkách do roztoku polymeru a za stálého míchání je rozpouštědlo odpařeno.<sup>134</sup> V některých případech bývá pro vytvoření micel aplikována vyšší teplota<sup>123,134</sup> nebo je směs naopak ochlazena.<sup>134</sup> Tato metoda přípravy se vyznačuje mnoha výhodami. Těmi jsou jednoduchost, relativní časová nenáročnost, možnost jednoduše zvyšovat množství zpracovávaného materiálu a zpravidla uspokojivá enkapsulační efektivita.<sup>123,134</sup>

Druhá technika je vhodná pro polymery, které nejsou zcela rozpustné ve vodě.<sup>123,134</sup> V tomto případě je jak léčivo, tak polymer rozpuštěný ve vhodném organickém rozpouštědle. Micelizace je v tomto případě závislá zejména na způsobu odstranění rozpouštědla. V případě, že je rozpouštědlo mísitelné s vodou, může být odstraněno pomocí dialýzy oproti deionizované vodě (tzv. dialyzační metoda).<sup>58,123,134</sup> Jsou-li použita rozpouštědla s vodou nemísitelná, dochází k enkapsulaci pomocí emulzifikačního procesu (olej ve vodě). Výhodou této metody je relativně vysoká vazebná kapacita a vysoká možnost interakce léčiva s polymerem díky tomu, že jsou rozpuštěny ve stejné fázi. Nevýhodou je použití organických rozpouštědel, nesnadné navyšování množství zpracovávaného materiálu a více kroků než v případě odpařovací metody.<sup>134</sup>

Dříve byla publikována i třetí metoda přípravy polymerních micel. Polymer i léčivo byly rozpuštěny v systému voda/*tert*-butanol a tato směs rozpouštědel byla odstraněna lyofilizací.<sup>123,134</sup> Tato metoda přípravy micel však pravděpodobně nepřináší žádné zásadní výhody.<sup>134</sup>

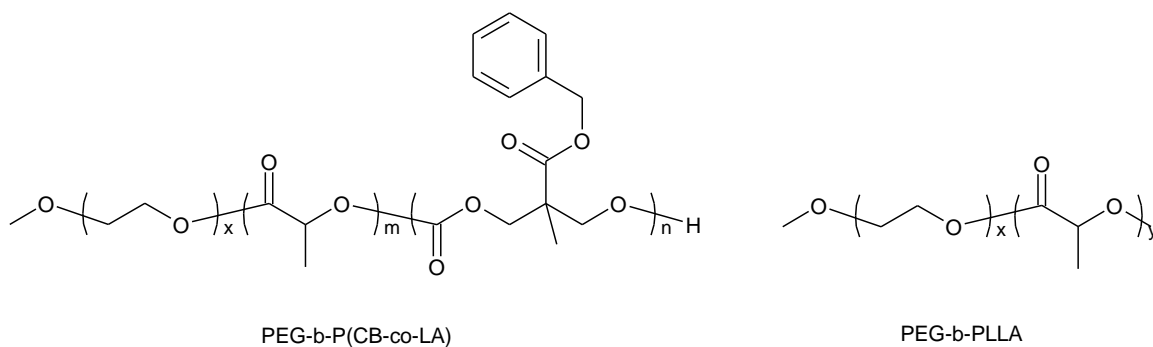
### 3.6. Aromatické nosiče

Dosavadní výzkumy se zaměřovaly zejména na přípravu amfifilních derivátů s alifatickými hydrofobními skupinami.<sup>2,135,136</sup> Modifikace polymerů pro nosičové systémy pomocí aromatických hydrofobních složek byla studována jen poměrně málo a častěji se jednalo o přípravu blokových nikoliv roubovaných polymerů.

Lze předpokládat, že léčiva aromatického charakteru, kterých je zejména mezi kancerostatickými léčivy většina,<sup>136</sup> mohou být lépe inkorporována do micel aromatických derivátů pomocí  $\pi \cdots \pi$  interakcí. Chemická modifikace polymerů pomocí aromatických hydrofobních skupin také způsobuje snížení kritické asociační koncentrace (CAC). Toto je velmi vítaný fakt,<sup>136</sup> protože při vysokých hodnotách CAC by nebyla možná *in vivo* aplikace.<sup>95,136</sup>

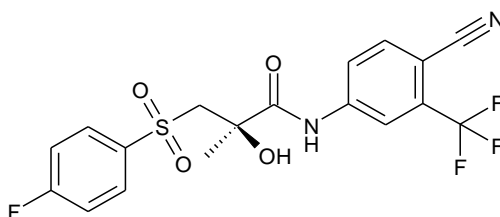
Výše zmíněnou hypotézu aromatického ukotvení léčiva v micelle potvrzuje i publikace, kde byla popsána příprava micel z blokových kopolymerů, konkrétně z methoxypolyethylenglykol-b-poly(karbonát-co-L-laktid)kopolymeru

[PEG-b-P(CB-co-LA)] a methoxypolyethylenglykol-b-poly(laktid)kopolymeru (PEG-b-PLLA) (Obrázek 16).<sup>137</sup>



Obrázek 16: Aromatický a nearomatický nosič pro enkapsulaci bicalutamidu.

Enkapsulovaným kancerostatickým léčivem byl bicalutamid (Obrázek 17). Bicalutamid je orálně podávané, ve vodě prakticky nerozpustné, léčivo, v jehož molekule jsou obsaženy dva aromatické kruhy.



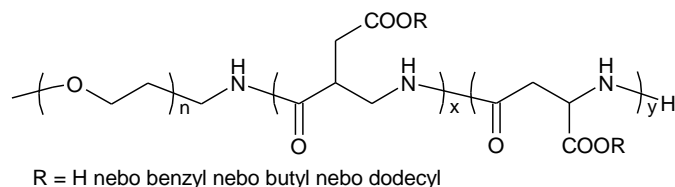
Obrázek 17: Bicalutamid.

Kopolymer PEG-b-PLLA je tvořen pouze dvěma druhy alifatických polymerních řetězců, zatímco PEG-b-P(CB-co-LA) obsahuje v postranním řetězci aromatický skelet (získaný zabudováním monomeru 5-methyl-5-benzyloxykarbonyl-1,3-dioxan-2-onu). Nejlepší PEG-b-P(CB-co-LA) vykazuje více než 4× vyšší hodnotu vazebné kapacity ( $4,10 \pm 0,23$ ) ve srovnání s PEG-b-PLLA ( $1,0 \pm 0,3$ ). Hodnoty CAC pro PEG-b-P(CB-co-LA) ( $0,002 \text{ g} \cdot \text{dm}^{-3}$ ) byly o řád nižší než pro PEG-b-PLLA ( $0,03 \text{ g} \cdot \text{dm}^{-3}$ ). A jak již bylo uvedeno dříve, CAC přímo souvisí se stabilitou polymerních micel v roztoku. Pro *in vivo* aplikace polymerních micel (například do krevního řečiště kdy dochází k velkému ředění) je vyšší stabilita micel žádoucí. *In vitro* testy také ukázaly, že micely tvořené PEG-b-P(CB-co-LA) jsou více účinné při postupném uvolňování bicalutamidu než micely připravené z PEG-b-PLLA. Testy cytotoxicity potvrdily, že léčivo vázané v micelle má

stejně inhibiční účinky na LNCaP (buněčná linie lidského nádoru prostaty) jako léčivo volné.

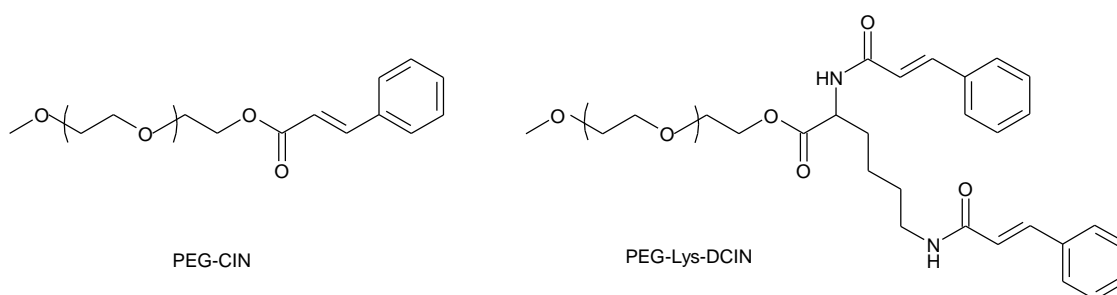
Nekovalentní vazba aromatického léčiva pomocí  $\pi \cdots \pi$  interakcí byla „pozorována“ mezi aromatickým léčivem a konjugátem oxidu grafenu a HA.<sup>138</sup> Aromatické léčivo je vázáno na grafen pomocí vodíkových vazeb a  $\pi \cdots \pi$  interakcí. Tento komplex je výborně rozpustný ve vodném prostředí a *in vitro* vykazuje inhibiční efekt na nádorové buňky.

Jako příklad lepších vlastností aromatického blokového polymeru může být uvedena také inkorporace camphothecinu do nosičů na bázi polyethylenglykol-polyaspartát esteru, substituovaného benzylovým, *n*-butylovým, dodecyllovým zbytkem či směsí dvou z těchto zbytků (Obrázek 18). Všechny micely s inkorporovaným camphothercinem vykazují podobné stability *in vitro*, nikoliv však *in vivo*. Micely, kde je polymer substituovaný pouze benzylem, vykazují *in vivo* delší cirkulační čas než micely, kde je polymer substituován zároveň *n*-butylem či dodecylem. Tento jev nastává i navzdory tomu, že hydrofobní jádra těchto „směsných“ micel mají více hydrofobní charakter (dodecyl–dvanáct uhlíkových atomů, benzyl – sedm uhlíkových atomů). Tyto výsledky naznačují, že nejen hydrofobicita, ale také fyzikální vlastnosti jako je rigidita či  $\pi \cdots \pi$  interakce jádra micely s léčivem přispívá k jeho inkorporaci a stabilitě.<sup>139</sup>



Obrázek 18: Nosič na bázi polyethylenglykol-polyaspartát esteru.

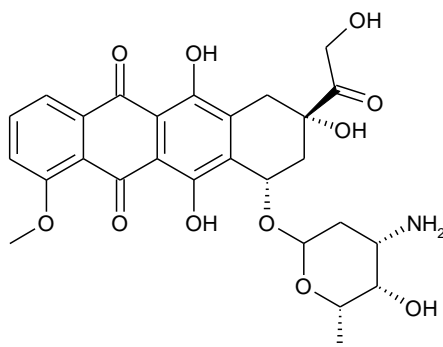
Aromaticky modifikované amfifilní polymery byly připraveny také z methoxypolyethylenglykolu (PEG) a kyseliny skořicové (PEG-CIN), a methoxypolyethylenglykolu a dvou molekul kyseliny skořicové, které jsou navázané na terminální skupině PEG přes lysin (PEG-Lys-DCIN)<sup>125</sup> (Obrázek 19).



Obrázek 19: PEG modifikovaný kyselinou skořicovou.



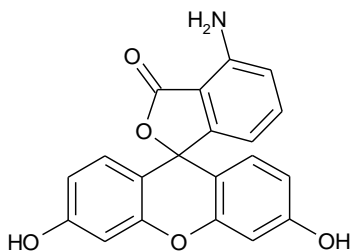
U těchto derivátů byla stanovena hodnota CAC na  $0,78 \text{ mg}\cdot\text{cm}^{-3}$  pro PEG-CIN a  $0,04 \text{ mg}\cdot\text{cm}^{-3}$  pro PEG-Lys-DCIN. Zdvojnásobením struktur zodpovědných za  $\pi\cdots\pi$  interakce klesla hodnota CAC zhruba 20×. U micel PEG-Lys-DCIN byla pozorována větší vazebná kapacita a pomalejší uvolňování doxorubicinu než u PEG-CIN. Dále byla studována protinádorová aktivita volného doxorubicinu (Obrázek 20) (v tomto případě jeho ve vodě rozpustné formy DOX·HCl) a doxorubicinu inkorporovaného v micelách. Studie probíhala na myších nádorových buňkách a bylo potvrzeno, že aktivita doxorubicinu je srovnatelná. Při aplikaci DOX·HCl a doxorubicinu inkorporovaného v micelách, bylo u myši, kterým byl podán DOX·HCl, pozorováno zarudnutí a otok v oblasti vpichu, váhový úbytek a malátnost. U myši, jimž byl doxorubicin podán prostřednictvím micelárního nosiče, nebyly tyto negativní efekty pozorovány. Hlavní nevýhodou těchto polymerních micel je však nízká stabilita při interakcích s krevními proteiny, zejména albuminem,  $\alpha$ - ,  $\beta$ - a  $\gamma$ -globuliny,<sup>125,140</sup> která je způsobena adsorbí těchto proteinů na povrch micel.<sup>140,141</sup>



Obrázek 20: Doxorubicin.

Dalším nedostakem je použitý základní polymer, protože PEG je syntetický nebiodegradabilní polymer.<sup>142,143</sup> Syntetické polymery, díky svému charakteru tělu cizí látky, jsou rychle po aplikaci odstraněny z organismu na základě své hydrofilicity. Takovéto polymery také neumožňují cílení léčiva do požadovaných míst jinak než pomocí pasivního směřování (EPR efekt), a to buď z důvodu jejich chemické povahy, nebo proto, že ztratily svou původní schopnost cílení kvůli chemické modifikaci.<sup>144</sup>

Byl však i popsán opačný případ, kdy nebylo pozorováno zvýšení vazebné kapacity při použití aromatického nosiče pro enkapsulaci aromatické látky. Při srovnání schopnosti inkorporace a stability aromatických látek v alifatickém a aromatickém nosiči bylo zjištěno, že 4-aminofluorescein (aromatická fluorescenční látka, Obrázek 21) je navzdory předpokladům lépe vázán do alifatického nosiče než do aromatického.<sup>145</sup>

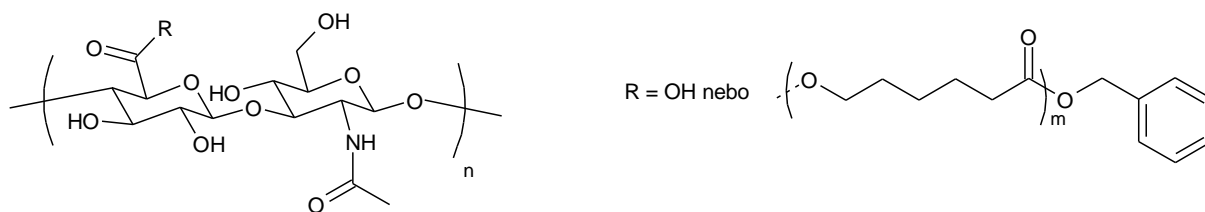


Obrázek 21: Struktura 4-aminofluoresceinu.

### 3.7. Nosiče na bázi amfifilního HA s aromatickými postranními řetězci

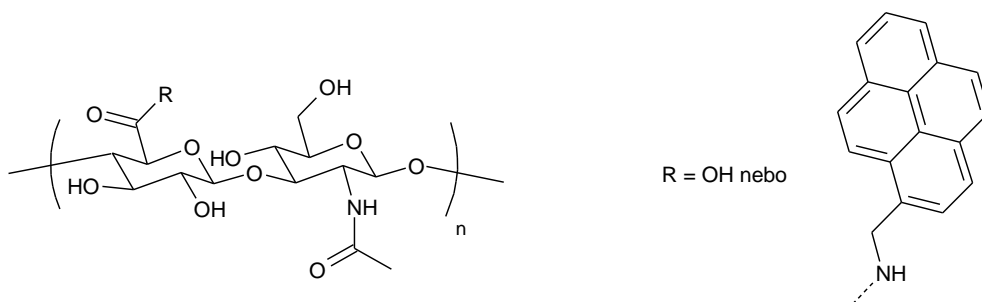
Známy jsou také aromatické nosiče založené na modifikované HA, které však vykazují mnohé nedostatky limitující jejich aplikace.

Jeden z těchto nosičů<sup>144</sup> (Obrázek 22), amfifilní roubovaný polymer kyseliny hyaluronové (kyselá forma), byl připraven z HA a polykaprolaktonu esterifikovaného na jeho konci benzylalkoholem (PCL), který byl získán polymerací benzylalkoholu a  $\epsilon$ -kaprolaktonu. Tato syntéza však vykazuje mnoho nevýhod. Využívá například kyselou formu hyaluronanu a vysokou teplotu (80 °C po dobu 4 h), což vede k rozkladu polysacharidového řetězce. Další nevýhodou je nemožnost přesně definovat délku alifatického řetězce kvůli polymerizaci. Při syntéze PCL se navíc používá vysoce toxický katalyzátor (2-ethylhexanoát cínatý) nedoporučený pro biomedicínské aplikace, což představuje zásadní problém kvůli registrační dokumentaci. Velikou nevýhodou takto připravených polymerních micel je také relativně vysoká hodnota CAC (0,05 g·cm<sup>-3</sup>).



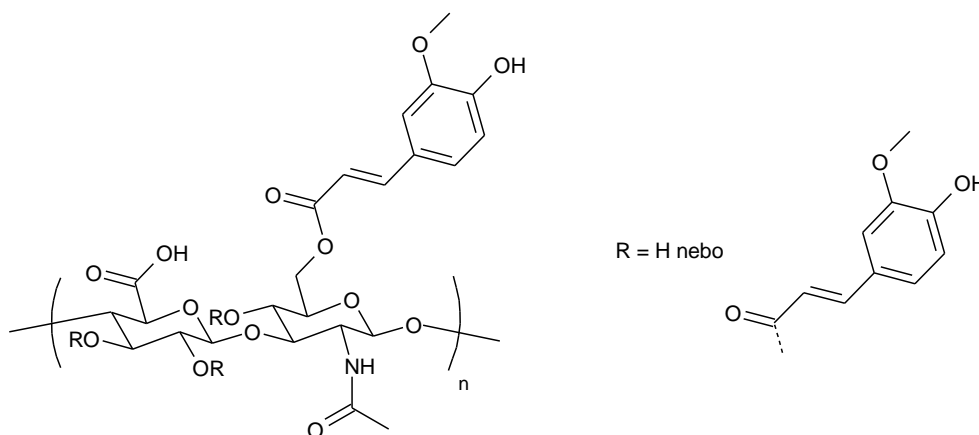
Obrázek 22: HA modifikovaný PCL.

Jiným aromatickým nosičem je kyselina hyaluronová (kyselá forma) substituovaná pyrenem<sup>146</sup> (Obrázek 23). 1-Pyrenmethylamin je ale navázán na karboxylovou skupinu HA a blokuje tak terapeuticky významné karboxylové skupiny polymeru.<sup>33</sup> Navíc bylo prokázáno, že deriváty pyrenu po dermální i podkožní expozici způsobují nádory u myši.<sup>147</sup>



Obrázek 23: Hyaluronan substituovaný 1-pyrenmethylaminem.

Existují i deriváty, kde byl HA modifikován aromatickými substituenty na hydroxylových skupinách<sup>148</sup> (Obrázek 24). Modifikace však bohužel probíhala za bezvodých podmínek a tudíž bylo nezbytné použít kyselou formu HA. Reakce byla prováděna ve formamidu, což je podezřelý karcinogen a potvrzený teratogen. U derivátů se stupněm substituce vyšším než 12 % je další nevýhodou velmi nízká rozpustnost v 0,2M NaCl.



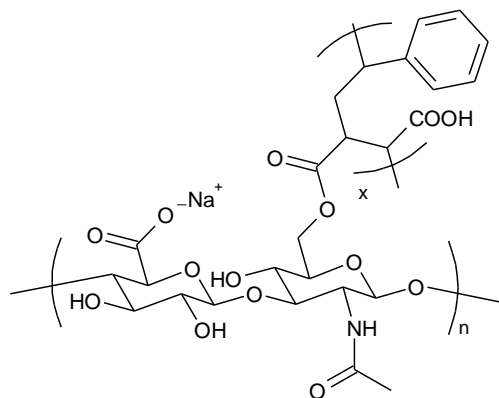
Obrázek 24: Hyaluronan modifikovaný derivátem kyseliny skořicové.

Jiný přístup nastiňuje práce, kde je HA modifikován přímo aromatickým léčivem přes vhodný linker. Tímto způsobem byla provedena modifikace HA 20-(S)-camptotecinem, což je přirozeně se vyskytující alkaloid s kancerostatickým účinkem. Tento postup přípravy je však zdlouhavý a zahrnuje výměnu hydroxylové skupiny na šestém uhlíku *N*-acetylglukosaminu za atom chloru, převedení sodné soli HA na tetrabutylamoniovou sůl a nahrazení atomu chloru za vzniku aminoskupiny. Oba tyto postupy zahrnují poměrně náročné reakční podmínky, které nežádoucím způsobem působí na HA. Samotný 20-(S)-camptotecin je navázán na vhodný linker a poté teprve probíhá modifikační reakce HA. Po aplikaci do organismu je léčivo uvolněno hydrolyzou esterové vazby mezi linkerem a léčivem. Již jen tento stručný popis napovídá, že se jedná

o poměrně náročný postup a v samotné práci je naznačeno, že se jedná spíše o teoretický přístup k věci.<sup>149</sup>

Výhody modifikace HA přes jeho hydroxylové skupiny (tedy zachování možnosti přirozeného cílení HA pomocí volných karboxylových skupin) byly využity i při substituci HA poly(styren-co-maleinanhydridem) (Obrázek 25) pro přípravu optimálního nosiče pro léčbu rakoviny slinivky. Jako léčivo byl v tomto případě používán 3,4-difluorbenzyliden kurkumin, tedy léčivo s aromatickou strukturou. Pro přípravu tohoto derivátu byly použity mírné reakční podmínky [slabě bazické vodné prostředí a DMSO pro rozpuštění poly(styren-co-maleinanhydridu), pokojová teplota]. Netoxický substituent byl na HA navázán za využití jednoduchého otevření anhydridového kruhu, tudíž nebylo zapotřebí použít další reakční komponenty, které by mohly (z)působit problémy při dalších aplikacích, které by byly špatně odstranitelné nebo například by způsobovaly degradaci HA řetězce.

Připravený derivát a jeho micely se ukázaly jako fungující nosičový systém. Tento derivát je netoxický, ve vodě rozpustný a jeho micely mají dobrou vazebnou kapacitu, velikost,  $\zeta$ -potenciál a i další vlastnosti nezbytné pro tyto aplikace.<sup>150</sup>



Obrázek 25: Hyaluronan modifikovaný poly(styren-co-maleinanhydridem).

Z výše uvedených informací je zřejmé, že HA je vhodným polymerem pro přípravu derivátů pro nosičové systémy. Je ovšem nutné pečlivě zvážit vhodnost modifikačních činidel a jejich vlastností, použité reakční podmínky či cílení modifikačních kroků na konkrétní skupiny HA. Výše uvedené příklady derivátů (respektive jejich množství) demonstrují nedostatek popsaných funkčních nosičů na bázi sodné soli HA, modifikované přes hydroxylové skupiny ve vodném prostředí. Ve své disertační práci se proto zabývám

způsobem modifikace HA modelovými aromatickými modifikačními činidly za, pokud možno, co nejšetrnějších reakčních podmínek.

#### 4. Cíle disertační práce

- Provést literární rešerši a na základě získaných informací navrhnout vhodná modifikační činidla obsahující aromatické kruhy, případně jejich přípravu a způsob modifikace HA s ohledem na zamýšlené aplikace v oblasti nosičů léčiv,
- připravit navržená modifikační činidla a provést jejich úplnou charakterizaci,
- modifikovat HA připravenými činidly a charakterizovat produkty dostupnými spektroskopickými metodami,
- využít modifikovaný HA pro přípravu polymerních micel s vybranými biologicky aktivními látkami a charakterizovat je,
- shrnout výsledky do publikací v odborných periodících a prezentovat je na vědeckých konferencích.

## 5. Experimentální část

### 5.1. Příprava esterů HA a $\omega$ -fenylmastných kyselin

#### 5.1.1. Příprava esteru HA a 4-fenylmásečné kyseliny

##### Postup

Hyaluronan (0,5 g; 1,25 mmol; 1,0 ekv., 6 nebo 15 kDa) bylo rozpouštěno 60 min v 8 cm<sup>3</sup> demineralizované vody. V třicáté minutě rozpouštění byla k vodnému roztoku přidána báze (2,0 ekv.) a propan-2-ol (IPA, 4 cm<sup>3</sup>). Po 60 minutách rozpouštění HA byl do roztoku přidán katalyzátor (DMAP; 0,0125 mmol; 0,01 ekv.; 0,0015 g) a následně i aktivační reakce. Takto vzniklá reakční směs byla míchána 2 h za laboratorní teploty.

Aktivovaná 4-fenylmásečná kyselina byla připravena přidávkem báze (2,0 ekv.; počítáno na disacharidovou jednotku hyaluronanu) a aktivačního činidla (benzoylchlorid; 2,0 ekv.) do roztoku 4-fenylmásečné kyseliny (2,0 ekv.; 0,4105 g; 2,5 mmol) v IPA (4 cm<sup>3</sup>) ve stejném okamžiku jako přídavek báze a rozpouštědla do vodného roztoku HA (viz výše).

##### Zpracování

K reakční směsi bylo přidáno 100 cm<sup>3</sup> IPA a cca 0,5 cm<sup>3</sup> nasyceného vodného roztoku NaCl. Vysrážený produkt byl nechán sedimentovat a nadbytečné rozpouštědlo bylo dekantováno. K sedimentu bylo přidáno 25 cm<sup>3</sup> směsi IPA a demineralizované vody (85:15, V:V), promícháno a opět necháno sedimentovat. Tento postup byl opakován tak, že sediment byl celkem promyt 4 × 25 cm<sup>3</sup> směsi IPA a demineralizované vody (85:15, V:V) a 4 × 25 cm<sup>3</sup> IPA. Sediment byl na Petriho misce sušen v horkovzdušné sušárně při 40 °C po dobu 20 h. Probíhala-li sedimentace příliš pomalu, byl sediment z roztoku získán centrifugací. Pro úplné odstranění vody (resp. reziduí rozpouštědel), byla v některých případech použita lyofilizace vzorku. V takovém případě byl derivát znovu rozpuštěn v minimálním množství demineralizované vody, zamražen a lyofilizován. Produkt reakce byl získán jako bezbarvý amorfni prášek ve výtěžku 85 %.

<sup>1</sup>H NMR (D<sub>2</sub>O) signály acylu:  $\delta$  1,90 (bs, 2H, CH<sub>2</sub>); 2,35–2,50 (bs, 2H, CH<sub>2</sub>); 2,60–2,73 (bs, 2H, CH<sub>2</sub>); 7,10–8,20 (m, 5H, C<sub>6</sub>H<sub>5</sub>) ppm.

### 5.1.2. Příprava esterů HA a 6-fenylhexanové kyseliny a 8-fenyloktanové kyseliny

Estery HA a 6-fenylhexanové kyseliny (HA–6C) a 8-fenyloktanové kyseliny (HA–8C) byly připraveny stejným postupem jako estery HA a 4-fenylmásečné kyseliny (viz kap. 5.1.1). Navážky a molární poměry všech reagentů byly shodné. K těmto reakcím byly použity 2,0 ekv. 6-fenylhexanové kyseliny (0,467 cm<sup>3</sup>; 2,5 mmol) a 2,0 ekv. 8-fenyloktanové kyseliny (0,540 cm<sup>3</sup>; 2,5 mmol). Produkty reakcí byly získány jako bezbarvé amorfni prášky ve výtěžcích 89 % (HA–6C) a 86 % (HA–8C).

HA–6C: <sup>1</sup>H NMR (D<sub>2</sub>O) signály acylu: δ 1,20–1,40 (bs, 2H, CH<sub>2</sub>), 1,50–1,72 (bs, 2H, CH<sub>2</sub>), 2,25–2,50 (bs, 4H, CH<sub>2</sub>), 2,55–2,70 (bs, 2H, CH<sub>2</sub>), 7,10–8,20 (m, 5H, C<sub>6</sub>H<sub>5</sub>) ppm.

HA–8C: <sup>1</sup>H NMR (D<sub>2</sub>O) signály acylu: δ 1,20–1,40 (bs, 6H, CH<sub>2</sub>), 1,50–1,70 (bs, 4H, CH<sub>2</sub>), 2,25–2,48 (bs, 2H, CH<sub>2</sub>), 2,54–2,68 (bs, 2H, CH<sub>2</sub>), 7,10–8,10 (m, 5H, C<sub>6</sub>H<sub>5</sub>) ppm.

### 5.1.3. Příprava esterů HA a Fmoc-6-Ahx-OH

Fmoc-6-Ahx-OH = *N*-9-(Fluorenylmethoxykarbonyl)-6-aminohexanová kyselina

Estery HA a Fmoc-6-Ahx-OH byly připraveny stejným postupem jako estery HA a 4-fenylmásečné kyseliny (kap. 5.1.1) za zachování stejných molárních poměrů všech reagentů s výjimkou IPA použitého pro rozpuštění Fmoc-6-Ahx-OH. V tomto případě bylo použito 6 cm<sup>3</sup>, protože 4 cm<sup>3</sup> nebyly dostačující. Do roztoku HA proto byly přidány jen 2 cm<sup>3</sup> místo 4 cm<sup>3</sup> IPA. K reakci byly použity 2 ekv. Fmoc-6-Ahx-OH (0,8835 g; 2,5 mmol). Produkty reakcí byly získány jako bezbarvé amorfni prášky ve výtěžcích 79–85 %.

<sup>1</sup>H NMR (D<sub>2</sub>O) signály acylu: δ 0,75–1,60 (m, 6H, CH<sub>2</sub>), 2,40 (bs, 2H, CH<sub>2</sub>COO), 2,98 (bs, 2H, NCH<sub>2</sub>), 4,34 (bs, 1H, CH), 6,75–8,25 (m, 8H, H<sub>arom.</sub>) ppm.

### 5.1.4. Příprava esterů HA a 11-tolylundekanové kyseliny

#### Příprava 11-tolylundekanové kyseliny

Postup a)

Monohydrát kyseliny 4-toluensulfonové (7,17 g; 37,71 mmol; 2,0 ekv.) byl rozpuštěn v methanolu (20 cm<sup>3</sup>). K tomuto roztoku byla přidána 11-bromundekanová kyselina (5 g; 18,86 mmol; 1,0 ekv.). Výsledný roztok byl refluxován 5 h. Po ochlazení reakční směsi byl methanol odpařen na RVO, získaný olej byl naředěn vodou (20 cm<sup>3</sup>) a extrahován DEE (3 × 20 cm<sup>3</sup>). Spojené organické podíly byly promyty vodou (2 × 40 cm<sup>3</sup>) a 30 cm<sup>3</sup> nasyceného roztoku NaCl. Organická fáze byla sušena nad Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> a odpařena na RVO.



Požadovaný produkt byl získán v podobě žlutého oleje ve výtěžku 94 % (4,86 g) a byl použit v následujícím kroku bez dalšího čištění.

$^1\text{H}$  NMR ( $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  1,25–1,34 (m, 10H,  $\text{CH}_2$ ), 1,42 (kv;  $J=7,3$  Hz; 2H;  $\text{CH}_2$ ), 1,62 (kv;  $J=7,3$  Hz; 2H;  $\text{CH}_2$ ), 1,85 (kv;  $J=7,3$  Hz; 2H;  $\text{CH}_2$ ), 2,30 (t;  $J=7,6$  Hz; 2H;  $\text{CH}_2$ ), 3,40 (t;  $J=6,8$  Hz; 2H;  $\text{CH}_2$ ), 3,67 (s, 3H,  $\text{CH}_3$ ) ppm.

Postup b)

Kyselina 11-bromundekanová (1,01 g; 3,80 mmol) byla rozpuštěna v methanolu ( $20\text{ cm}^3$ ). K tomuto roztoku bylo pomalu přikapáno  $0,1\text{ cm}^3$  koncentrované  $\text{H}_2\text{SO}_4$ . Výsledný roztok byl refluxován 5 h. K ochlazené reakční směsi byl přikapán nasycený vodný roztok  $\text{NaHCO}_3$  kvůli neutralizaci kyseliny a vzniklá směs byla extrahována hexanem ( $3 \times 5\text{ cm}^3$ ). Spojené organické podíly byly promyty  $15\text{ cm}^3$  vody a  $15\text{ cm}^3$  nasyceného roztoku  $\text{NaCl}$ . Organická fáze byla sušena nad  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  a odpařena na RVO. Požadovaný produkt byl získán v podobě žlutého oleje ve výtěžku 95 % (0,97 g) a byl použit v následujícím kroku bez dalšího čištění.

$^1\text{H}$  NMR ( $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  1,25–1,34 (m, 10H,  $\text{CH}_2$ ), 1,42 (kv;  $J=7,3$  Hz; 2H;  $\text{CH}_2$ ), 1,62 (kv;  $J=7,3$  Hz; 2H;  $\text{CH}_2$ ), 1,85 (kv;  $J=7,3$  Hz; 2H;  $\text{CH}_2$ ), 2,30 (t;  $J=7,6$  Hz; 2H;  $\text{CH}_2$ ), 3,40 (t;  $J=6,8$  Hz; 2H;  $\text{CH}_2$ ), 3,67 (s, 3H,  $\text{CH}_3$ ) ppm.

Bezvodý  $\text{AlCl}_3$  (2,4 g; 18 mmol; 1,5 ekv.) byl rozsuspendován v bezvodém toluenu ( $25\text{ cm}^3$ ) a vzniklá suspenze byla vychlazena na  $4\text{ }^\circ\text{C}$ . Do míchané suspenze byl v pětiminutových intervalech ve třech dávkách přidán methyl-11-bromundekanoát ( $2,9\text{ cm}^3$ ; 12 mmol; 1,0 ekv.). Reakční směs byla zahřáta na  $60\text{ }^\circ\text{C}$  a při této teplotě ponechána míchat 2 h. Vznikající  $\text{HBr}$  byl kvůli neutralizaci odváděn do roztoku  $\text{NaHCO}_3$ . Po ochlazení byla reakční směs nalita na led. Vodná fáze byla extrahována DEE ( $3 \times 25\text{ cm}^3$ ) a spojené organické podíly byly promyty 10% vodným roztokem  $\text{NaHCO}_3$  ( $50\text{ cm}^3$ ). Organická fáze byla sušena nad  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  a odpařena na RVO. Požadovaný produkt byl získán v podobě nažloutlého oleje (3,22 g).

$^1\text{H}$  NMR ( $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  1,05–1,35 (m, 12H,  $\text{CH}_2$ ), 1,45–1,65 (m, 4H,  $\text{CH}_2$ ), 2,2–2,3 (m, 5H,  $\text{CH}_2 + \text{CH}_3$ ), 2,55 (t;  $J=7,9$  Hz; 2H;  $\text{CH}_2$ ), 3,65 (m, 3H,  $\text{CH}_3$ ), 6,9–7,2 (m, 4 H,  $\text{CH}_{\text{arom}}$ ) ppm.

V posledním kroku byl methyl-11-tolylundekanoát (3,33 g; 11,36 mmol) emulgován v 10% roztoku NaOH v MeOH (30 cm<sup>3</sup>). Reakční směs byla refluxována 1 h. Po 10 min zahřívání vznikla bílá sraženina. Po ukončení zahřívání byl z reakční směsi odpařen MeOH. Sraženina byla naředěna 20 cm<sup>3</sup> H<sub>2</sub>O a pomocí koncentrované HCl bylo pH upraveno na hodnotu 2–3. Produkt byl z vodného roztoku extrahován diethyletherem (3 × 30 cm<sup>3</sup>). Spojené organické podíly byly promyty 10% NaHCO<sub>3</sub> (1 × 20 cm<sup>3</sup>), H<sub>2</sub>O (1 × 20 cm<sup>3</sup>) a sušeny nad Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>. Organická fáze byla sušena nad Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> a odpařena na RVO. Produkt byl získán v podobě nažloutlého oleje ve výtěžku 87 % (2,15 g).

<sup>1</sup>H NMR (CDCl<sub>3</sub>): δ 1,05–1,35 (m, 12H, CH<sub>2</sub>), 1,45–1,65 (m, 4H, CH<sub>2</sub>), 2,25–2,38 (m, 5H, CH<sub>2</sub> + CH<sub>3</sub>), 2,55 (t; *J*=7,9 Hz; 2H; CH<sub>2</sub>), 6,9–7,2 ppm (m, 4H, CH<sub>arom</sub>) ppm.

#### Příprava esteru HA a 11-tolyludekanové kyseliny

Reakce mezi HA a 11-tolyludekanovou kyselinou provedené za stejných podmínek jako reakce HA a ω-fenylalkylových kyselin (kap. 5.1.1). Produkty reakcí byly získány jako bezbarvý prášek ve výtěžku 68–85 %.

HA–11C: <sup>1</sup>H NMR (D<sub>2</sub>O) signály acylu: δ 1,10–1,35 (m, 12H, CH<sub>2</sub>), 1,50–1,70 (bs, 4H, CH<sub>2</sub>), 2,35–2,50 (bs, 4H, CH<sub>2</sub>+CH<sub>3</sub>), 2,55–2,62 (bs, 2H, CH<sub>2</sub>), 7,05–7,35 (m, 5H, C<sub>6</sub>H<sub>5</sub>) ppm.

#### **5.1.5. Alternativní metody přípravy modifikačního činidla**

Wittigova reakce trifenyfosfoniové soli methyl-11-bromundekanoátu a benzaldehydu

Příprava Wittigovy soli:

Postup a)<sup>151</sup>

Do směsi trifenyfosfanu (0,91 g; 3,48 mmol; 1,17 ekv.) a acetonitrilu (5 cm<sup>3</sup>) byl přikapán methyl-11-bromundekanoát (0,72 cm<sup>3</sup>; 3,0 mmol; 1,0 ekv.) a reakční směs byla refluxována celkem 46 h. Během zahřívání došlo k úplnému rozpuštění trifenyfosfanu. Poté bylo rozpouštědlo odpařeno na RVO a k odparku (hustý žlutý olej) byl přidán DEE, který byl po promíchání, olej byl dekantován a DEE byl odstraněn pipetou. Tento postup byl opakován do úplného odstranění nezreagovaného trifenyfosfanu (kontrolováno pomocí TLC). Produkt byl získán ve výtěžku 92 % (1,49 g).

Postup b)<sup>152</sup>

Trifenylfosfan (0,51 g; 1,96 mmol; 0,90 ekv.) byl rozpuštěn v bezvodém DMF (8 cm<sup>3</sup>) a k tomuto roztoku byl přikapán methyl-11-bromundekanoát (0,53 cm<sup>3</sup>; 2,20 mmol; 1,0 ekv.). Reakční směs byla zahřívána na teplotu 50–60 °C po dobu 23 h a poté na teplotu cca 100 °C po dobu 22 h. Produkt (hustý žlutý olej) byl z roztoku získán vysrážením přídatkem DEE a promyt novými porcemi DEE pro odstranění nezreagovaného trifenylofosfanu. Produkt byl získán ve výtěžku 97 % (1,05 g).

<sup>1</sup>H NMR (CDCl<sub>3</sub>): δ 1,15–1,28 (m, 10H, CH<sub>2</sub>), 1,52–1,65 (m, 6H, CH<sub>2</sub>), 2,26 (t; *J*=7,6 Hz; 2H; CH<sub>2</sub>), 2,58 (t; *J*=5,7 Hz; 2H; CH<sub>2</sub>), 3,63 (s, 3H, CH<sub>3</sub>), 7,67–7,85 (m, 15H, CH<sub>arom</sub>) ppm.

## 5.2. Příprava esterů HA a 4-alkoxybenzoových kyselin

### 5.2.1. Příprava 4-oktyloxybenzoové kyseliny

Methylester kyseliny 4-hydroxybenzoové (0,50 g, 3,33 mmol; 1,0 ekv.) byl přidán do směsi bezvodého DMF (6,6 cm<sup>3</sup>) a K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (1,37 g). K této směsi byl přikapán *n*-oktylbromid (0,57 cm<sup>3</sup>; 3,94 mmol; 1,0 ekv.) a reakční směs byla zahřívána na 60 °C. Při této teplotě byla reakční směs míchána 13,5 h. Poté byla reakční směs nalita na led, vodná fáze extrahována ethyl-acetátem (7 × 7 cm<sup>3</sup>), spojené organické podíly byly promyty vodou (40 cm<sup>3</sup>) a sušeny nad Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>. Po odfiltrování sušidla bylo rozpouštědlo odpařeno na RVO a požadovaný produkt získán v podobě bezbarvé krystalické látky ve výtěžku 85 % (0,75 g).

<sup>1</sup>H NMR (CDCl<sub>3</sub>): δ 0,82 (t; *J*=7,0 Hz; 3H; CH<sub>3</sub>), 1,19–1,24 (m, 8H, CH<sub>2</sub>), 1,39 (m, 2H, CH<sub>2</sub>), 1,73 (m, 2H, CH<sub>2</sub>), 3,81 (s, 3H, CH<sub>3</sub>), 4,00 (t; *J*=7,0 Hz; 2H; CH<sub>2</sub>), 6,83 (d; *J*=8,8 Hz; 2H; CH<sub>arom</sub>), 7,90 (d; *J*=8,8 Hz; 2H; CH<sub>arom</sub>) ppm.

Methylester kyseliny 4-oktyloxybenzoové (0,51 g; 1,92 mmol) byl rozpuštěn v EtOH (5 cm<sup>3</sup>) a k tomuto roztoku byl přidán KOH (0,51 g; 9,04 mmol). Reakční směs byla refluxována 5 h, kdy byla na základě TLC analýzy reakce ukončena. Reakční směs byla nalita na led a pH bylo převedeno do kyselé oblasti pomocí koncentrované HCl. Vysrážený pevný podíl ve formě bílé amorfnní látky byl odfiltrován za sníženého tlaku přes fritu, promyt vodou a vysušen. Požadovaný produkt získán v podobě bezbarvé amorfnní látky ve výtěžku 88 % (0,42 g).

$^1\text{H}$  NMR ( $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  0,82 (t;  $J=7,0$  Hz; 3H;  $\text{CH}_3$ ), 1,19–1,24 (m, 8H,  $\text{CH}_2$ ), 1,39 (m, 2H,  $\text{CH}_2$ ), 1,73 (m, 2H,  $\text{CH}_2$ ), 4,00 (t;  $J=7,0$  Hz; 2H;  $\text{CH}_2$ ), 6,83 (d;  $J=8,8$  Hz; 2H;  $\text{CH}_{\text{arom}}$ ), 7,90 (d;  $J=8,8$  Hz; 2H;  $\text{CH}_{\text{arom}}$ ) ppm.

### 5.2.2. Příprava esteru HA a 4-oktyloxybenzoové kyseliny

Hyaluronan (0,5 g; 1,25 mmol; 1,0 ekv.; 6 kDa) byl rozpouštěn po dobu 60 min v 8  $\text{cm}^3$  demineralizované vody. V třicáté minutě rozpouštění byl k roztoku přidán DIPEA (2,0 ekv.) a IPA (4  $\text{cm}^3$ ). Ve stejném okamžiku byl DIPEA (3,0 ekv.) s aktivačním činidlem (benzoylchlorid; 2,0 ekv.) přidán i do roztoku substituované kyseliny 4-hydroxybenzoové kyseliny (2,0 ekv.; 0,6258 g; 2,5 mmol) v IPA (4  $\text{cm}^3$ ). V 60. minutě rozpouštění HA byl do roztoku přidán katalyzátor (DMAP; 0,0015 g; 0,0125 mmol; 0,01 ekv.) a následně i roztok aktivované 4-oktyloxybenzoové kyseliny. Tato reakční směs byla míchána 2 h za pokojové teploty.

Zpracování probíhalo stejně jako v případě reakce HA s  $\omega$ -fenylmastnými kyselinami. Produkt reakce byl získán jako bezbarvý amorfní prášek ve výtěžku 92 % (0,52 g).

$^1\text{H}$  NMR ( $\text{D}_2\text{O}$ ) signály acylu:  $\delta$  0,80–0,90 (bs, 3H,  $\text{CH}_3$ ), 1,20–1,50 (bs, 12H,  $\text{CH}_2$ ), 1,80–1,88 (bs, 2H,  $\text{CH}_2$ ), 7,40–8,10 (m, 4H,  $\text{C}_6\text{H}_4$ ) ppm.

### 5.2.3. Příprava 4-decyloxybenzoové, 4-dodecyloxybenzoové, 4-tetradecyloxybenzoové, 4-hexadecyloxybenzoové kyseliny

Příprava dalších derivátů 4-hydroxybenzoové kyseliny s jiným alkylovým substituentem byly připraveny postupy v kapitole 5.2.1 a v kapitole 5.2.2.

$^1\text{H}$  NMR ( $\text{D}_2\text{O}$ ) signály acylu:  $\delta$  0,80–0,90 (bs, 3H,  $\text{CH}_3$ ), 1,20–1,50 (bs, 16H,  $\text{CH}_2$ ), 1,80–1,88 (bs, 2H,  $\text{CH}_2$ ), 7,40–8,10 (m, 4H,  $\text{C}_6\text{H}_4$ ) ppm.

$^1\text{H}$  NMR ( $\text{D}_2\text{O}$ ) signály acylu:  $\delta$  0,80–0,90 (bs, 3H,  $\text{CH}_3$ ), 1,20–1,50 (bs, 20H,  $\text{CH}_2$ ), 1,80–1,88 (bs, 2H,  $\text{CH}_2$ ), 7,40–8,10 (m, 4H,  $\text{C}_6\text{H}_4$ ) ppm.

## 5.3. Příprava esterů HA a 11-(9H-karbazol-9-yl)undekanové kyseliny

### 5.3.1. Příprava 11-(9H-karbazol-9-yl)undekanové kyseliny

Methyl-11-bromundekanoát (9,88 g; 35,38 mmol; 1,15 ekv.) byl rozpuštěn v DMSO (68  $\text{cm}^3$ ). Ke vzniklému roztoku byl přidán NaOH (9,19 g; 229,8 mmol) a karbazol (4,57 g; 27,30 mmol; 1,0 ekv.). Reakční směs byla zahřívána na teplotu přibližně 110  $^\circ\text{C}$  po dobu 14 h. Poté byla nalita na led, pH bylo pomocí koncentrované HCl převedeno do kyselého

oblasti a vzniklá sražená byla odfiltrována za sníženého tlaku přes fritu. Požadovaný produkt byl získán v podobě amorfni béžové látky (10,19 g). Podle  $^1\text{H}$  NMR analýzy došlo za podmínek reakce k částečnému odstranění chránící karboxylové skupiny. Poměr methylesteru a karboxylové kyseliny byl po provedení reakce (0,6:0,4).

$^1\text{H}$  NMR ( $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  1,40–1,20 (m, 12H,  $\text{CH}_2$ ), 1,62 (m, 2H,  $\text{CH}_2$ ), 1,88 (m, 2H,  $\text{CH}_2$ ), 2,34 (t;  $J=7,3$  Hz; 2H;  $\text{CH}_2$ ), 3,65 (t;  $J=0,55$  Hz; 3H;  $\text{CH}_3$ ), 4,30 (t;  $J=7,3$  Hz; 2H;  $\text{CH}_2$ ), 7,23 (t;  $J=7,3$  Hz; 2H;  $\text{CH}_{\text{arom}}$ ), 7,50–7,40 (m, 4H,  $\text{CH}_{\text{arom}}$ ), 8,10 (d;  $J=7,9$  Hz; 2H;  $\text{CH}_{\text{arom}}$ ) ppm.

Směs produktů z předchozí reakce (10,19 g) byla rozpuštěna v suspenzi MeOH ( $60\text{ cm}^3$ ) a NaOH (7,32 g; 183,0 mmol) a refluxována po dobu 14 h. Reakční směs byla nalita na led, pH bylo převedeno na hodnotu 2–3 pomocí koncentrované HCl a vzniklá sražená byla odfiltrována za sníženého tlaku přes fritu. Požadovaný produkt byl získán v podobě béžové pevné látky.

$^1\text{H}$  NMR ( $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  1,4–1,2 (m, 12H,  $\text{CH}_2$ ), 1,62 (m, 2H,  $\text{CH}_2$ ), 1,88 (m, 2H,  $\text{CH}_2$ ), 2,34 (t;  $J=7,6$  Hz; 2H;  $\text{CH}_2$ ), 4,30 (t;  $J=7,3$  Hz; 2H;  $\text{CH}_2$ ), 7,23 (t;  $J=7,0$  Hz; 2H  $\text{CH}_{\text{arom}}$ ), 7,5–7,4 (m, 4H,  $\text{CH}_{\text{arom}}$ ), 8,10 (d;  $J=7,9$  Hz; 2H;  $\text{CH}_{\text{arom}}$ ) ppm.

### 5.3.2. Příprava esterů HA a 11-(9H-karbazol-9-yl)undekanové kyseliny

Hyaluronan (0,5 g; 1,25 mmol; 1,0 ekv.; 6 nebo 15 kDa) bylo rozpouštěno 60 nebo 150 min v 8 nebo 5  $\text{cm}^3$  demineralizované vody. V třicáté minutě rozpouštění byla k vodnému roztoku přidána báze (2,0 ekv.) a IPA ( $4\text{ cm}^3$ ). Po 60 (nebo 15 min) rozpouštění byl do roztoku HA přidán katalyzátor (DMAP; 0,0125 mmol; 0,0015 g; 0,01 ekv.) a následně i aktivační reakce. Takto vzniklá reakční směs byla míchána 2 h.

Aktivovaná 11-(9H-karbazol-9-yl)undekanová kyselina byla připravena přidávkem báze (2,0 ekv.; počítáno na disacharidovou jednotku hyaluronanu) a aktivačního činidla (benzoylchlorid; 2,0 ekv.) do roztoku 11-(9H-karbazol-9-yl)undekanové kyseliny (2,0 ekv.; 0,4105 g; 2,5 mmol) v IPA ( $4\text{ cm}^3$ ) ve stejném okamžiku jako přidávek báze a rozpouštědla do vodného roztoku HA (viz výše).

### Zpracování

K reakční směsi bylo přidáno  $100\text{ cm}^3$  IPA a cca  $0,5\text{ cm}^3$  nasyceného vodného roztoku NaCl. Vysrážený produkt byl nechán sedimentovat a nadbytečné rozpouštědlo bylo dekantováno. K sedimentu bylo přidáno  $25\text{ cm}^3$  směsi IPA a demineralizované vody (85:15, V:V), promícháno a opět necháno sedimentovat. Tento postup byl opakován tak, že

sediment byl celkem promyt  $4 \times 25 \text{ cm}^3$  směsí IPA a demineralizované vody (85:15, V:V) a  $4 \times 25 \text{ cm}^3$  IPA. Sediment byl na Petriho misce sušen v horkovzdušné sušárně při  $40 \text{ }^\circ\text{C}$  po dobu 20 h. Probíhala-li sedimentace příliš pomalu, byl sediment z roztoku získán centrifugací. Pro úplné odstranění vody (resp. reziduí rozpouštědel), byla v některých případech použita lyofilizace vzorku. V takovém případě byl derivát znovu rozpuštěn v minimálním množství demineralizované vody, zamražen a lyofilizován. Produkty reakce byly získány jako bezbarvý amorfni prášek ve výtěžku 83–95 %.

$^1\text{H}$  NMR ( $\text{D}_2\text{O}$ ) signály acylu:  $\delta$  1,0–1,35 (m, 12H,  $\text{CH}_2$ ), 1,53 (bs, 2H,  $\text{CH}_2$ ), 1,87 (bs, 2H,  $\text{CH}_2$ ), 2,36 (bs, 2H,  $\text{CH}_2$ ), 3,99 (bs, 2H,  $\text{CH}_2$ ), 7,25–8,30 (m, 8H, CH) ppm.

#### 5.4. Příprava esteru HA a DL- $\alpha$ -tokoferol sukcinátu

Při přípravě esteru HA a tokoferol sukcinátu byly použity podmínky jako v případě přípravy esterů HA a 4-fenylmásečné kyseliny (viz kap. 5.1.1). Produkt byl získán jako bezbarvý amorfni prášek ve výtěžku 98 % (0,503 g).

$^1\text{H}$  NMR ( $\text{D}_2\text{O}$ ) signály acylu:  $\delta$  0,65–1,50 (m,  $\text{CH}_2$ ), 1,96 (s, 3H,  $\text{CH}_3$ ), 2,04 (s, 3H,  $\text{CH}_3$ ), 2,11 (s, 3H,  $\text{CH}_3$ ), 2,65 (s, 2H,  $\text{CH}_2$ ), 2,92 (s, 2H,  $\text{CH}_2$ ), 3,06 (s, 2H,  $\text{CH}_2$ ) ppm.

#### 5.5. Charakterizace derivátů a stanovení DS pomocí NMR

Stupeň substituce a čistota derivátů byly určovány z  $^1\text{H}$  NMR spekter. Vzorky pro NMR analýzy byly připravovány rozpuštěním cca 10 mg derivátu v 800  $\mu\text{l}$   $\text{D}_2\text{O}$ . Deriváty byly před měřením rozpouštěny alespoň 1 h za stálého míchání.

Stupeň substituce byl získán výpočtem poměru integrálních hodnot píků anomerních atomů vodíku HA a píků atomů vodíku alifatického řetězce.

#### 5.6. Sledování průběhu reakce

##### 5.6.1. Sledování průběhu reakce bez přídavku vody

- a) 4-Fenylmásečná kyselina (0,1027 g; 0,625 mmol; 1,0 ekv.) byla rozpuštěna v deuterovaném IPA ( $0,7 \text{ cm}^3$ ). K tomuto roztoku bylo přidáno ekvimolární množství DIPEA ( $0,1089 \text{ cm}^3$ ; 0,625 mmol; 1,0 ekv.) a benzoylchloridu ( $0,0726 \text{ cm}^3$ ; 0,625 mmol; 1,0 ekv.). Po přídavku benzoylchloridu byly v pravidelných intervalech (5; 10; 15 a 30 min) odebírány vzorky na NMR (100  $\mu\text{l}$  reakční směsi do 700  $\mu\text{l}$  deuterovaného chloroformu) a neprodleně bylo změřeno  $^1\text{H}$  NMR spektrum.

- b) 11-Tolylundekanová kyselina (0,3455 g; 1,25 mmol; 1,0 ekv.) byla rozpuštěna v deuterovaném IPA (2 cm<sup>3</sup>). K tomuto roztoku bylo přidáno ekvimolární množství DIPEA (0,2177 cm<sup>3</sup>; 1,25 mmol; 1,0 ekv.) a benzoylchloridu (0,1452 cm<sup>3</sup>; 1,25 mmol; 1,0 ekv.). Po přidavku benzoylchloridu byly v pravidelných intervalech (5; 10; 15; 30 a 60 min, 6,5 h, 7 dní) odebírány vzorky na NMR (100 µl reakční směsi do 700 µl deuterovaného chloroformu) a tyto neprodleně změřeny.
- c) i) 11-(9*H*-Karbazol-9-yl)undekanová kyselina (0,2197 g; 0,526 mmol; 1 ekv.) byla rozpuštěna v deuterovaném IPA (1 cm<sup>3</sup>). K této směsi byly přidány DIPEA (0,0808 g; 0,625 mmol; 1,0 ekv.) a benzoylchlorid (0,0726 cm<sup>3</sup>; 0,625 mmol; 1,0 ekv.). Po přidavku benzoylchloridu byly v pravidelných intervalech (0,5; 1,5; 2,5; 4,5; 6,5 a 24 h a po 6 dnech) odebírány vzorky na NMR (100 µl reakční směsi do 700 µl deuterovaného chloroformu) a tyto neprodleně změřeny.
- ii) 11-(9*H*-Karbazol-9-yl)undekanová kyselina (0,02197 g; 0,0625 mmol; 1,0 ekv.) a DIPEA (0,0109 cm<sup>3</sup>; 0,0625 mmol; 2 ekv.) byly rozpuštěny v deuterovaném IPA (0,1 cm<sup>3</sup>), po cca 5 min míchání byl přidán benzoylchlorid (0,00726 cm<sup>3</sup>; 0,0625 mmol; 1,0 ekv.). Od přidavku benzoylchloridu byla reakční směs míchána 2,5 h, poté bylo přidáno 700 µl deuterovaného CHCl<sub>3</sub>, směs byla promíchána a převedena do NMR kyvety a neprodleně byla změřena <sup>13</sup>C a HSQC NMR spektra.

#### 5.6.2. Sledování průběhu reakce s přidavkem vody

4-Fenylmásečná kyselina (0,2053 g; 1,25 mmol; 1 ekv.) byla rozpuštěna v deuterovaném IPA (2 cm<sup>3</sup>) a k tomuto roztoku byly přidány DIPEA (0,2177 cm<sup>3</sup>, 1,25 mmol; 1,0 ekv.) a benzoylchlorid (0,1452 cm<sup>3</sup>, 1,25 mmol; 1,0 ekv.). Po přidavku benzoylchloridu byly v pravidelných intervalech (0,5 h; 2,5 h; 4,5 h a 6,5 h) odebírány vzorky na NMR (100 µl reakční směsi do 700 µl deuterovaného chloroformu) a tyto neprodleně změřeny. Po každém odběru bylo do reakční směsi přidáno 100 µl demineralizované vody a získaná spektra byla porovnána a vyhodnocena.

#### 5.7. Příprava nosičových systémů s resveratrolem, hledání optimálního postupu pro dosažení nejvyšší vazebné kapacity

Příslušný derivát (100 mg) byl rozpuštěn v 10 cm<sup>3</sup> demineralizované vody. Poté byl roztok sonikován po dobu 15 min. Během sonikace byl vodný roztok chlazen vodou a ledem. Mezitím byl resveratrol rozpuštěn v rozpouštědle (methanol, ethanol nebo IPA) a poté byl během sonikace HA derivátu tento alkoholický roztok po kapkách přidán k roztoku HA

derivátu. Po úplném přidavku roztoku resveratrolu byla vzniklá směs míchána 1 h za laboratorní teploty. Poté byl roztok převeden do odpařovací baňky, promícháván cca 15 min ve vodní lázni zahřáté na teplotu 30 °C a následně byla rozpouštědla odpařena na RVO. Vzniklý film byl rehydratován 10 cm<sup>3</sup> demineralizované vody a sonikace byla zopakována (10 min) za stejných podmínek. Roztok byl přefiltrován přes skleněný stříkačkový filtr (1,0 μm) na Petriho misku a lyofilizován. Za účelem nalezení optimálních podmínek pro dosažení nejvyšší vazebné kapacity byly sonikační kroky vynechány a výsledky vazebných kapacit nosičových systémů připravených jednotlivými postupy byly porovnány.

### 5.8. Příprava nosičových systémů s klotrimazolem

Příslušný derivát HA- $\omega$ -FAK či HA-C18:1 (100 mg) byl po dobu přibližně 1 h rozpouštěn v 10 cm<sup>3</sup> demineralizované vody. Poté byl k tomuto vodnému roztoku přidán roztok klotrimazolu (10 mg) v IPA (5 cm<sup>3</sup>). Vzniklý roztok byl převeden do odpařovací baňky a promícháván cca 15 min ve vodní lázni zahřáté na teplotu 30 °C. Poté byla rozpouštědla odpařena na RVO. Vzniklý film byl rehydratován 10 cm<sup>3</sup> demineralizované vody. Roztok byl přefiltrován přes skleněný stříkačkový filtr (1,0 μm) na Petriho misku a lyofilizován.

Z lyofilizátu byl připraven vzorek na <sup>1</sup>H NMR analýzu (10 mg/800 μl D<sub>2</sub>O).

### 5.9. Příprava nosičových systémů s fenyl-salicylátem (PhS)

Příslušný derivát HA- $\omega$ -FAK či HA-C18:1 (100 mg) byl cca 1 h rozpouštěn v 10 cm<sup>3</sup> demineralizované vody. Poté byl k tomuto vodnému roztoku přidán roztok PhS (10 mg) v IPA (5 cm<sup>3</sup>). Vzniklý roztok byl převeden do odpařovací baňky a promícháván cca 15 min ve vodní lázni zahřáté na teplotu 30 °C. Poté byla směs rozpouštědel odpařena na RVO. Vzniklý film byl rehydratován 10 cm<sup>3</sup> demineralizované vody. Roztok byl přefiltrován přes stříkačkový filtr (1,0 μm, glass filter) na Petriho misku a lyofilizován.

Z lyofilizátu byl připraven vzorek na <sup>1</sup>H NMR analýzu (10 mg/800 μl D<sub>2</sub>O).

### 5.10. Příprava nosičových systémů se směsí klotrimazolu a DL- $\alpha$ -tokoferolu

Příslušný derivát HA- $\omega$ -FAK či HA-C18:1 (100 mg) byl cca 1 h rozpouštěn v 10 cm<sup>3</sup> demineralizované vody. Poté byl k tomuto vodnému roztoku přidán roztok klotrimazolu (10 mg) v IPA (2,5 cm<sup>3</sup>) a DL- $\alpha$ -tokoferolu (20 mg) v IPA (2,5 cm<sup>3</sup>). Vzniklý roztok byl převeden do odpařovací baňky a promícháván cca 15 min ve vodní lázni zahřáté na teplotu 30 °C. Poté byla rozpouštědla odpařena na RVO. Vzniklý film byl rehydratován 10 cm<sup>3</sup>



demineralizované vody. Roztok byl přefiltrován přes skleněný stříkačkový filtr (1,0  $\mu\text{m}$ ) na Petriho misku a lyofilizován.

Z lyofilizátu byl připraven vzorek na  $^1\text{H}$  NMR analýzu (10 mg/800  $\mu\text{l}$   $\text{D}_2\text{O}$ ).

### **5.11. Příprava nosičových systémů se směsí fenyl-salicylátu (PhS) a DL- $\alpha$ -tokoferolu**

Příslušný derivát HA- $\omega$ -FAK či HA-C18:1 (100 mg) byl cca 1 h rozpouštěn v 10  $\text{cm}^3$  demineralizované vody. Poté byl k tomuto vodnému roztoku přidán roztok PhS (10 mg) v IPA (2,5  $\text{cm}^3$ ) a DL- $\alpha$ -tokoferolu (20 mg) v IPA (2,5  $\text{cm}^3$ ). Vzniklý roztok byl převeden do odpařovací baňky a promícháván cca 15 min ve vodní lázni zahřáté na teplotu 30  $^\circ\text{C}$ . Poté byla rozpouštědla odpařena na RVO. Vzniklý film byl rehydratován 10  $\text{cm}^3$  demineralizované vody. Roztok byl přefiltrován přes skleněný stříkačkový filtr (1,0  $\mu\text{m}$ ) na Petriho misku a lyofilizován.

Z lyofilizátu byl připraven vzorek na  $^1\text{H}$  NMR analýzu (10 mg/800  $\mu\text{l}$   $\text{D}_2\text{O}$ ).

### **5.12. Příprava nosičových systémů s Nilskou červení**

Příslušný derivát HA- $\omega$ -FAK, HA-karb či HA-TOSU (100 mg) byl cca 1 h rozpouštěn v 10  $\text{cm}^3$  demineralizované vody. Poté byl k tomuto vodnému roztoku přidán roztok Nilské červeně (1 mg) v  $\text{CHCl}_3$  (3  $\text{cm}^3$ ). Vzniklá směs byla převedena do odpařovací baňky a promíchávána cca 15 min ve vodní lázni zahřáté na teplotu 30  $^\circ\text{C}$ . Poté byl  $\text{CHCl}_3$  odpařen na RVO. K vodnému roztoku byly přidány další 2  $\text{cm}^3$  čistého  $\text{CHCl}_3$ , směs byla řádně promísena a rozpouštědla byla odpařena. Vzniklý film byl rehydratován 10  $\text{cm}^3$  demineralizované vody. Roztok byl přefiltrován přes skleněný stříkačkový filtr (1,0  $\mu\text{m}$ ) na Petriho misku a lyofilizován.

### **5.13. Stanovení kritické agregační koncentrace**

Kritická agregační koncentrace byla stanovena ze závislosti intenzity fluorescence na koncentraci roztoků. Emisní spektra (580–700 nm) vodných roztoků v rozsahu koncentrací 0,00002–0,1  $\text{mg}\cdot\text{cm}^{-3}$  byla proměřována na fluorometru RF-5301 (Shimadzu) při excitaci světlem o vlnové délce 543 nm.

### **5.14. Stanovení stability micel s fluorescenční sondami (FRET)**

#### **5.14.1. Příprava nosičů s FRET barvivy**

Ve 20  $\text{cm}^3$  demineralizované vody bylo rozpuštěno 200 mg HA derivátu (HA- $\omega$ -FAK, HA-HBxC). V 10  $\text{cm}^3$  IPA byly rozpuštěny 2 mg DiO (3,3'-dioktadecyloxakarbocyanin

chloristan; donor). V 15 cm<sup>3</sup> IPA byly, za působení ultrazvukových vln (cca 5 min), rozpuštěny 2 mg Dil (1,1'-dioktadecyl-3,3,3',3'-tetramethylindokabocyanin chloristan; akceptor). Oba roztoky (DiO a Dil) byly smíseny a polovina nově vzniklého roztoku byla přilita k vodnému roztoku derivátu. IPA byl z roztoku odstraněn odpařením na RVO. Poté byl přidán zbytek roztoku (DiO a Dil) a IPA byl z roztoku opět odpařen. Vzniklý film byl rehydratován 20 cm<sup>3</sup> demineralizované vody. Roztok byl přefiltrován přes skleněný stříkačkový filtr (1,0 μm) na Petriho misku a lyofilizován.

#### 5.14.2. Stanovení stability micel

Ve 4 cm<sup>3</sup> roztoku bovinního sérového albuminu o koncentraci 40 mg·cm<sup>-3</sup> ve fyziologickém roztoku bylo rozpuštěno 6 mg micel s inkorporovanými FRET barvivy. Emisní spektra roztoků byla proměřována na fluorometru RF-5301 (Shimadzu) při excitaci světlem o vlnové délce 484 nm. Emise byla snímána v rozmezí 495–600 nm. Měření probíhalo při 37 °C a v časech 0 min, 15 min, 30 min, 45 min, 60 min, 75 min, 90 min, 105 min, 2 h, 3 h, 4 h, 5 h a 24 h. Stabilita micel nosiče byla stanovena porovnáním intenzit píků akceptoru a donoru.

#### 5.15. Stanovení dynamické viskozity připravených derivátů

Pro měření dynamické viskozity byly připraveny čiré 5% roztoky HA derivátů. Měřený derivát (250 mg) byl rozpuštěn v 0,9% roztoku NaCl v demineralizované vodě (5 cm<sup>3</sup>). Dynamická viskozita těchto roztoků byla měřena na přístroji Malvern Kinexus Pro<sup>+</sup> v rozmezí 0,1–5000 s<sup>-1</sup> při 25 °C. Vzorky byly měřeny s geometrií CP1/60 SR0917SS nebo CP2/20 SR1388SS v případě velmi viskózních gelů.

#### 5.16. Infračervená spektroskopie

Infračervená spektroskopie připravených derivátů byla měřena pomocí KBr tablet transmisní technikou na přístroji Shimadzu FT-IR-8400S. Každé spektrum bylo získáno z 64 skenů v rozsahu 400–4000 cm<sup>-1</sup>.

#### 5.17. Spektroskopické stanovení vazebné kapacity resveratrolu, retinyl-palmitátu, fenyl-salicylátu, klotrimazolu, DL- $\alpha$ -tokoferolu a pyrenu

Zásobní roztok inkorporované látky byl připraven ve směsi H<sub>2</sub>O:acetonitril (1:4, v:v). Z tohoto roztoku byly pipetováním připraveny roztoky o různých koncentracích a sestavena kalibrační křivka.

V 800  $\mu\text{l}$   $\text{H}_2\text{O}$  byly rozpuštěny 2 mg nosiče s inkorporovanou stanovovanou látkou a k tomuto roztoku bylo přidáno 3 200  $\mu\text{l}$  acetonitrilu a roztok byl důkladně promíchán a přefiltrován přes nylonový filtr (0,22  $\mu\text{m}$ ).

Roztoky byly měřeny v rozmezí vlnových délek 400–200 nm na přístroji Varian Cary 100 (resveratrol, pyren) nebo pomocí Waters HPLC Alliance e2695 s PDA detektorem 2998 za použití kolony Luna 5  $\mu\text{m}$  C18(2) 100A (150  $\times$  4,6 mm). Jako mobilní fáze byla použita 0,1% kyselina mravenčí v  $\text{H}_2\text{O}$  (A) a acetonitril (B) s průtokem 1  $\text{mg}\cdot\text{cm}^{-3}$ . Gradient: 20 % A/0 min, 0 % A/6 min, 0 % A/27 min, 20 % A/28 min, 20 % A/30 min. Teplota na koloně byla 40  $^\circ\text{C}$ . Fenyl-salicylát byl detekován při 309 nm, DL- $\alpha$ -tokoferol při 292 nm. V případě stanovení vazebné kapacity klotrimazolu s DL- $\alpha$ -tokoferolem byla použita kolona Waters Spherisorb C6 5  $\mu\text{m}$  (150  $\times$  4,6 mm) se složením mobilní fáze 0,5% trifluoroctová kyselina v  $\text{H}_2\text{O}$  (A) a acetonitril (B) a průtokem 1  $\text{mg}\cdot\text{cm}^{-3}$  s isokratickou elucí 25 % A : 75 % B. Délka analýzy byla 8 minut. Teplota na koloně byla 35  $^\circ\text{C}$ . Klotrimazol byl detekován při 265 nm, DL- $\alpha$ -tokoferol při 292 nm.

Obsah inkorporovaného retinyl-palmitátu byl stanoven pomocí UPCC chromatografie Waters se zpětným regulátorem tlaku 1600 psi a průtokem 2,0  $\text{mg}\cdot\text{cm}^{-3}$ , s kolonou Waters Acquity UPC<sup>2</sup> Torus 2-PIC, 1,7  $\mu\text{m}$  a gradientem 2%–9% MeOH v  $\text{CO}_2$ . Retinyl-palmitát byl detekován při 327 nm.

### 5.18. Nukleární magnetická rezonance (NMR)

Spektra NMR byla naměřena na přístroji BRUKER Avance<sup>TM</sup> III 500 s pracovní frekvencí 500 MHz ( $^1\text{H}$  NMR)/125 MHz ( $^{13}\text{C}$  NMR) nebo na spektrometru BRUKER AM-300 při frekvenci 300 MHz ( $^1\text{H}$ ) a 75,5 MHz ( $^{13}\text{C}$ ).

Pokud byly vzorky rozpuštěny v  $\text{D}_2\text{O}$ , byl jako vnitřní standard použita sodná sůl 3-(trimethylsilyl)propionové-2,2,3,3- $d_4$  kyseliny. Probíhala-li měření v jiných rozpouštědlech, bylo jako inertní standart používáno rozpouštědlo.

Vzorky na NMR byly připraveny rozpuštěním 8–10 mg látky v 800  $\mu\text{l}$  vhodného deuterovaného rozpouštědla nebo jejich směsi ( $\text{D}_2\text{O}$ ,  $\text{CDCl}_3$ ,  $\text{DMSO-}d_6$ ,  $\text{IPA-}d_8$ , acetonitril- $d_3$ ).

### **5.19. Stanovení velikosti micel a $\zeta$ -potenciálu micel**

Připravené nosiče byly rozpuštěny v H<sub>2</sub>O a byly tak připraveny roztoky o koncentraci 1 mg·cm<sup>-3</sup>. Tyto roztoky byly měřeny na přístroji Zetasizer Nano-ZS (633 nm He-Ne laser).

### **5.20. SEC-MALLS (size exclusion chromatography-multi-angle laser light scattering)**

Připravené deriváty HA a aromatických karboxylových kyselin byly rozpuštěny ve vodném roztoku o složení 0,1 M NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>·2H<sub>2</sub>O, 0,05% NaN<sub>3</sub>·H<sub>2</sub>O tak, aby byly připraveny roztoky o koncentraci 15 mg·cm<sup>-3</sup> a měřeny pomocí chromatografického systému od Wyatt Technology Corporation (Agilent deggaser Model G 1379A, Agilent HPLC pumpa Model G 1310A, Rheodyne ruční injektor Model 7125i, Ultrahydrogel lineární kolona 7,8 mm, chromatografický detektor, Viscostar diferenční viskozimetr, Optilab rEX diferenční difraktometr).

### **5.21. Test životaschopnosti buněk v přítomnosti roztoků připravených derivátů HA a aromatických karboxylových kyselin**

Biokompatibilita připravených derivátů HA a aromatických karboxylových kyselin byla testována na buněčné linii Swiss 3T3. Roztok testovaného derivátu (0,1;hm./obj.%) byl rozmíchán v kompletním kultivačním mediu a míchán přes noc. Poté byl roztok filtrován přes sterilní filtrační zařízení (0,22  $\mu$ m), vytvářející konečné koncentrace vzorku (1; 0,5 a 0,1 mg·cm<sup>-3</sup>). Tři tisíce buněk Swiss 3T3 bylo nasazeno na jamku 96-ti jamkových testovacích destiček. Buňky byly pěstovány po dobu 24 hodin před přidáním testovaných roztoků. Životaschopnost buněk byla měřena 0, 24, 48, 72 hodin po ošetření pomocí testus 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-difenyl tetrazolium-bromidem (MTT) a to tak, že 20  $\mu$ l zásobního roztoku MTT (5 mg·cm<sup>-3</sup>) bylo přidáno do 200  $\mu$ l media buněčné kultury v každé jamce. Destičky byly inkubovány při 37 °C v inkubátoru buněčných kultur po 2,5 h. MTT roztok byl odstraněn a bylo přidáno 220  $\mu$ l lyzačního roztoku. Buňky byly lyzovány po dobu 30 min při pokojové teplotě na orbitální třepačce a optická hustota byla měřena pomocí Microplate reader VERSAmax při vlnové délce 570 nm. Experimentální provedení bylo doplněno sadou kontrolních buněk pěstovaných v běžném mediu bez ošetření a slepými vzorky. MTT test byl využit k získání základních informací o buněčném metabolismu a proliferaci. Test životaschopnosti buněk byl opakován minimálně třikrát a z těchto výsledků byl vypočítán průměr. Do grafu byly výsledky uvedeny v procentech, srovnány s kontrolou a byla uvedena směrodatná odchylka průměrů (SEMs).

## 5.22. GC-MS analýzy

Pro kvalitativní i kvantitativní analýzu reakčních směsí byl použit plynový chromatograf s kvadrupólovým hmotnostním detektorem Shimadzu GC-MS QP2010, kolona Supelco SLB-5ms 30m × 0,25mm × 0,2 μm. Teplotní program: 100 °C/5 min; 25 °C/ min; 250 °C. Teplota nástřiku 250 °C. Nosný plyn: He. Iontový zdroj: 200 °C, 70 eV.

## 6. Výsledky a diskuze

Jak již bylo několikrát zmíněno výše, cílem této práce bylo připravit „aromatické“ nosičové systémy pro léčiva, jejichž molekuly obsahují aromatické kruhy. Tento výzkum zahrnuje mnoho kroků (průzkum literatury, navrzení vhodných aromatických karboxylových kyselin, modifikace HA, příprava nosičových systémů, charakterizace veškerých modifikačních činidel, derivátů HA, micel atd.) a jednotlivé navržené nosičové systémy musí podstoupit mnohé zkoušky a splnit různé parametry (zjištění cytotoxicity, stanovení stability v přítomnosti albuminu, zjištění kritické asociační koncentrace, velikosti micel atd.).

Diskuzní část této práce je rozčleněna na část zabývající se přípravou aromatických kyselin a jejich následné napojení na HA. V této části jsou shrnuty a diskutovány postupy vedoucí k přípravě veškerých derivátů, tedy jak aromatických karboxylových kyselin, tak derivátů HA včetně rozboru a vysvětlení problémů, které bylo nutné během syntéz řešit.

V druhé části této kapitoly jsou rozebrány výsledky měření vlastností připravených derivátů HA a micel z nich připravených. Během studia jednotlivých vlastností nosičových systémů byly zjištěny některé informace, které vedly k vyloučení některých nosičových systémů z dalšího výzkumu. Tyto skutečnosti jsou v textu komentovány a další sady experimentálních dat jsou z tohoto důvodu o vyřazené systémy chudší.

### 6.1. Modifikace HA aromatickými modifikačními činidly

#### 6.1.1. Obecný chemismus modifikační reakce

Podstatou esterifikační reakce je tvorba esterové vazby mezi hydroxylovou a karboxylovou skupinou. V tomto případě hydroxylové skupiny pocházejí z HA. Nejpravděpodobněji reaguje primární hydroxyl *N*-acetylglukosaminu z důvodu menšího sterického bránění. Karboxylová skupina při této reakci pochází z aromatické kyseliny používané k modifikaci. Hydroxylové skupiny HA byly vybrány proto, že při jejich modifikaci může být HA používán v přírodní podobě. Modifikační činidlo tak neblokuje terapeuticky významné karboxylové skupiny, a tím zároveň zachovává rozpustnost HA ve vodném prostředí. Příprava esterů HA zahrnuje dva kroky. Prvním z nich je aktivační reakce uvažované karboxylové kyseliny (Schéma 9A). V tomto kroku je připravena reaktivní forma aromatické karboxylové kyseliny, tedy směsný anhydrid uvažované kyseliny a aktivátoru, jimž je zde chlorid kyseliny benzoové. Tento krok probíhá reakcí aromatické karboxylové kyseliny a aktivátoru ve vhodném, s vodou mísitelném organickém

rozpouštědla, s přidavkem báze. Vzniklý směsný anhydrid se zpravidla neizoluje, ale je ihned v druhém kroku použit k reakci s HA ve směsi vody a organického rozpouštědla (stejného jako v aktivačním kroku), báze a katalyzátoru (Schéma 9B). V tomto roztoku pak dochází k vytváření esterové vazby mezi karboxylovou skupinou modifikačního činidla a hydroxylovou skupinou HA.

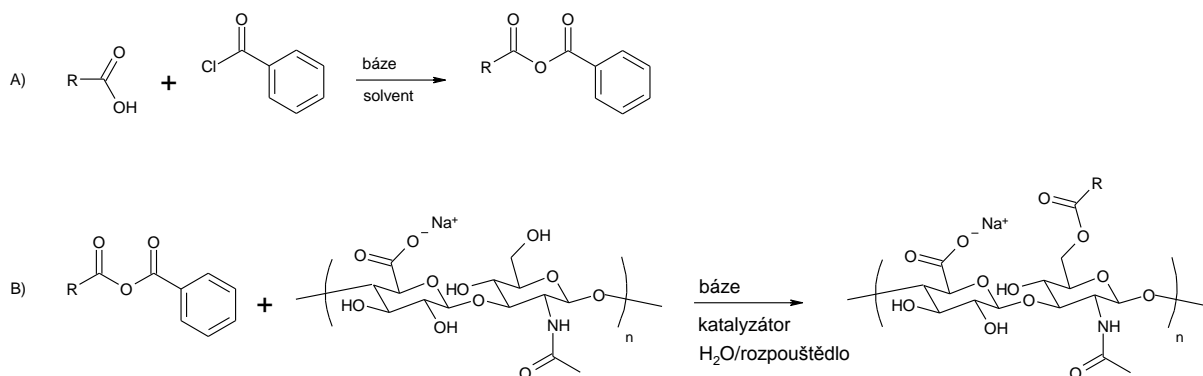


Schéma 9: Aktivační krok (A) a samotná modifikace hyaluronanu (B).

Místo benzoylchloridu může být použit také 2,4,6-trichlorbenzoylchlorid (Yamaguchi reagent), ale ten vykazuje nižší efektivitu<sup>153</sup>

Jako organické rozpouštědlo byl v experimentech popsanych v této práci nejčastěji používán IPA, v některých případech tetrahydrofuran. Methanol byl vyloučen kvůli své toxické povaze a ethanol kvůli ceně. Tetrahydrofuran je používán méně často z důvodu možné tvorby výbušných peroxidů, což by mohlo být nebezpečné při scale-up reakci. THF je také podezřelý karcinogen. Byl však vyzkoušen zejména s ohledem na možné ovlivnění charakteristik (zejména DS) připravovaných derivátů. Testován byl hlavně v případě reakcí s aromatickými kyselinami, které poskytovaly s HA deriváty s nízkým DS.

Ve druhém reakčním kroku je roztok směsného anhydridu přidán k roztoku HA ve směsi vody, organického rozpouštědla, báze a katalyzátoru. Jako katalyzátor se využívá 4-dimethylaminopyridin (DMAP). Mechanismus účinku katalyzátoru je znázorněn ve Schématu 10. Katalyzátor DMAP je činidlo zajišťující přenos acylových skupin a reaguje regioselektivně na stericky méně bráněné straně karbonylu. Tento katalyzátor je silnější nukleofil než kyslíkové atomy hydroxylových skupin HA a zároveň dobře odstupující skupina, což umožňuje rychlou reakci s hydroxylovými skupinami HA. Bohužel je DMAP řazen mezi vysoce toxické látky (A+). Ale jelikož je rozpustný jak ve vodě, tak v IPA, dochází k jeho úplnému odstranění během zpracování reakční směsi.

Vedlejší produkt reakce (kyselina benzoová) je stejně jako DMAP, nezreagovaná aromatická kyselina a báze odstraněn během promývání sraženiny produktu.

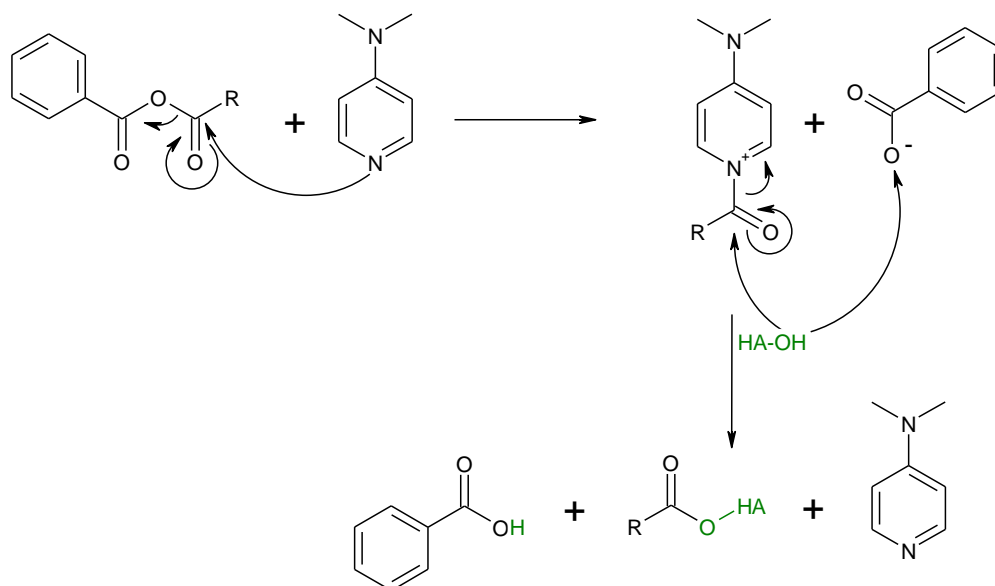


Schéma 10: Mechanismus účinku 4-dimethylaminopyridinu.

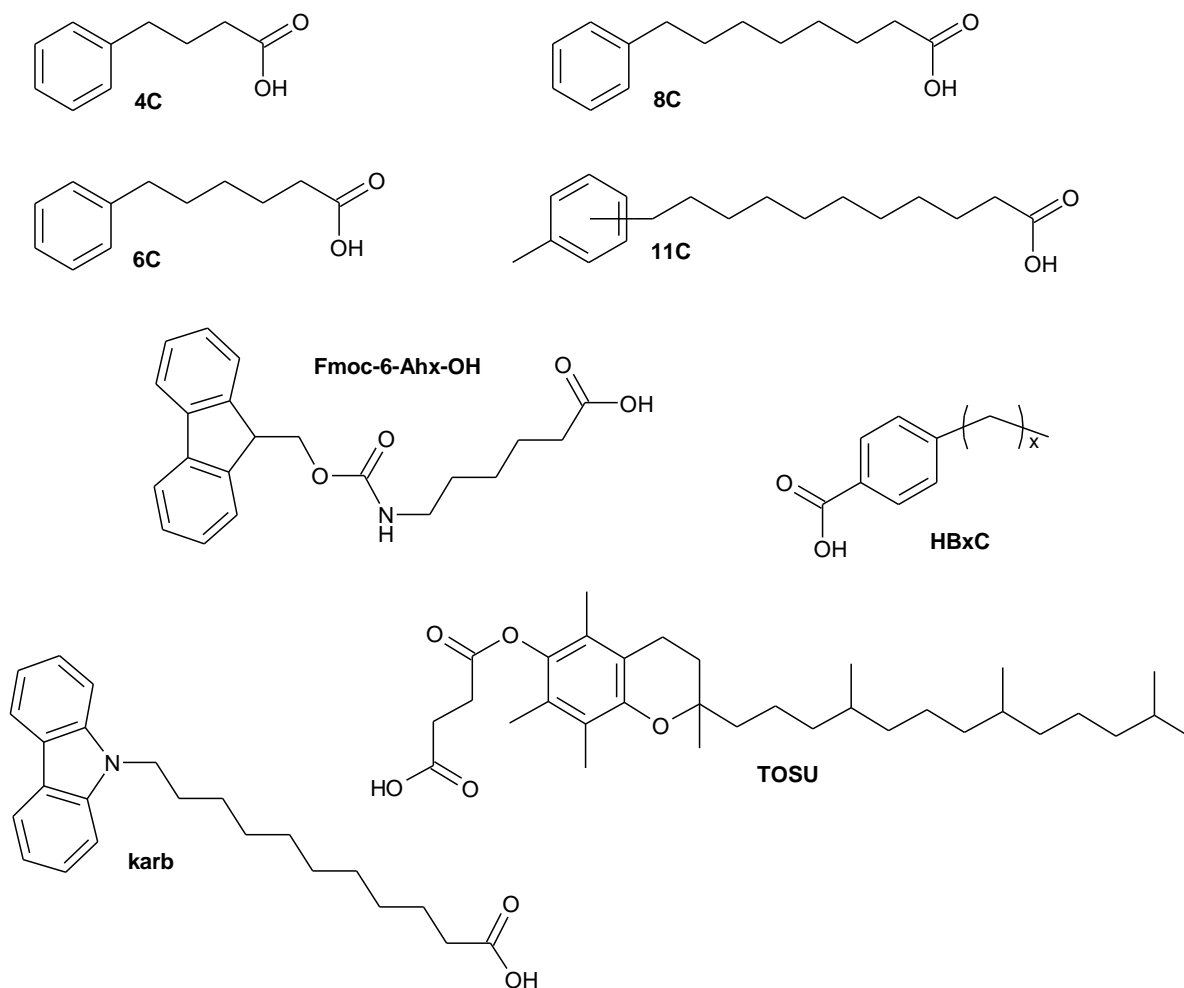
Po uplynutí reakční doby je modifikovaný HA z reakční směsi získán vysrážením a sedimentuje na dno kádinky/nádoby. Sraženina se s rozpouštědlem řádně promíchá (pomocí turaxu), sraženina se nechá opět sedimentovat a supernatant se odlije. Tento postup se opakuje tak, aby byla sraženina promyta alespoň čtyřikrát směsí IPA:H<sub>2</sub>O (odstranění NaCl, DMAP, báze, popř. dalších ve vodě rozpustných vedlejších produktů) a čtyřikrát IPA (odstranění vody, popřípadě dosud neodstraněné báze, DMAP či ve vodě nerozpustných látek).

### 6.1.2. Výběr a zdůvodnění struktury modifikačních činidel

Jako vhodné lipofilní substituenty byly vybrány organické karboxylové kyseliny obsahující ve své molekule aromatické jádro (Obrázek 26). Jako první byla vybrána 4-fenylmásečná kyselina (**4C**) kvůli dobré dostupnosti, manipulovatelnosti a ceně. Na základě sledování parametrů micel připravených z derivátů HA a 4-fenylmásečné kyseliny byly dále vybrány 6-fenylhexanová (**6C**), 8-fenyloktanová (**8C**) a 11-tolylundekanová kyselina (**11C**) (obecně  $\omega$ -fenylmastné kyseliny) s cílem porovnat vlastnosti micel připravených z derivátů HA a těchto kyselin. Jako další sada aromatických kyselin byla použita série 4-alkoxybenzoových kyselin (**HBxC**). Za zástupce stericky náročnějších kyselin byly vybrány Fmoc-6-Ahx-OH, 11-(9*H*-karbazol-9-yl)undekanová kyselina (**karb**) a DL- $\alpha$ -tokoferyl-sukcinát (**TOSU**). Všechny tyto vybrané kyseliny obsahují aromatický kruh



a lze u nich tedy předpokládat možnost tvorby  $\pi \cdots \pi$  interakcí mezi těmito acylovými zbytky tvořícími jádro polymerní micely a inkorporovanou aromatickou modelovou látkou. Tyto interakce by mohly vést ke zlepšení vlastností micel s inkorporovaným aromatickým léčivem.



Obrázek 26: Aromatické mastné kyseliny použité k modifikaci HA.

4-Fenylmásečná kyselina byla vybrána jako pilotní modifikační látka pro přípravu esterů HA s  $\omega$ -fenylmastnými kyselinami. Tato  $\omega$ -fenylmastná kyselina byla vybrána z důvodu dobré komerční dostupnosti a příhodné ceny (25 g cca 1000 Kč, Sigma-Aldrich). Mimo to se s touto látkou snadno manipuluje díky jejímu pevnému skupenství při laboratorní teplotě. 6-Fenylhexanová a 8-fenylloktanová kyselina jsou viskózní oleje s poměrně vysokou pořizovací cenou, komerčně hůře dostupné a zejména v případě 8-fenylloktanové kyseliny s dlouhou dodací lhůtou, což působilo v laboratorním měřítku problém s plánováním reakcí s ohledem na nejistou spotřebu této látky (opakování reakcí, reakce

s jinými ekvivalenty 8-fenyloktanové kyseliny vůči HA na základě výsledků předchozích reakcí).

Ačkoliv by se dalo předpokládat, že kyseliny se sudým počtem atomů v řetězci budou cenově dostupnější, opak je pravdou, a proto byla jako nejvhodnější výchozí látka s vyšším počtem uhlíkových atomů v řetězci vybrána 11-bromundekánová kyselina.

Z této látky pak bylo vyrobeno aromatické modifikační činidlo následujícím způsobem. 11-Bromundekánová kyselina byla pomocí Fisherovy esterifikace převedena na methyl ester, který poté posloužil jako alkylační činidlo při Friedelově-Craftsově alkylnaci toluenu (Schéma 11). Methyl-11-bromundekanoát je sice komerčně dostupné činidlo, ale jeho příprava z 11-bromundekánové kyseliny je levnější a není časově náročná. Navíc bylo zjištěno, že komerční methyl-11-bromundekanoát vykazuje stejné chování při alkylnaci toluenu jako námi připravený preparát. Proto jsme pro přípravu aromatického modifikačního činidla používali bromester vlastní výroby.

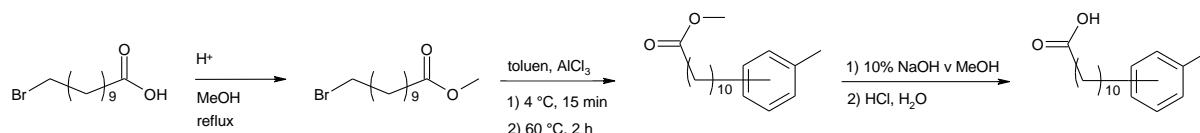


Schéma 11: Sled reakčních kroků vedoucích k přípravě aromatické karboxylové kyseliny odvozené od toluenu.

Esterifikační reakce reakce běží v kyselém prostředí, a jako zdroj protonů je možné použít kyselinu 4-toluensulfonovou (PTS)<sup>154</sup> nebo kyselinu sírovou<sup>155</sup> v různých molárních poměrech vůči výchozí 11-bromundekánové kyselině. V původní literatuře<sup>154</sup> byl použit výrazný přebytek kyseliny 4-toluensulfonové a to 5 ekv. PTS vůči 1 ekv. 11-bromundekánové kyseliny. Z důvodu snížení spotřeby kyselého katalyzátoru (cena, ekologické aspekty) byl v dalších reakcích vyzkoušen nižší přebytek (2 a 1,1 ekv.) kyseliny 4-toluensulfonové. Jako nejvhodnější se ukázal molární poměr 2 ekv. PTS vůči 1 ekv. 11-bromundekánové kyseliny. Čistota produktů v případě použití H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> i PTS byla srovnatelná. Proto byla pro další reakce používána H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>. Kvalita produktu byla sledována pomocí <sup>1</sup>H NMR.

Připravený methyl-11-bromundekanoát byl v dalším kroku použit pro Friedelovu–Craftsovu alkylnaci toluenu. Nejprve byl vyzkoušen postup převzatý z literatury.<sup>156</sup> Tato syntéza zahrnovala rozsuspendování AlCl<sub>3</sub> v bezvodém toluenu a ochlazení na 4 °C.

Při této teplotě bylo pomalu přidáno alkylační činidlo a po zahřátí na požadovanou teplotu byla reakční směs míchána 4 h, kdy byla ukončena naředěním vodou. Přestože autoři originálního postupu neuvádí žádné obtíže při reakci ani při separaci produktu a dosáhli výtěžku 57 %, v našem případě byla po zpracování reakční směsi izolována pouze výchozí látka. Proto byl experiment opakován za jiných podmínek. Jednak byl zvýšen přebytek  $\text{AlCl}_3$  (z 1,2 ekv. na 1,5 ekv.) a reakční směs byla zahřívána na cca 60 °C po dobu 4 h. V tomto případě jsme již pozorovali tvorbu alkylovaného toluenu. Doba zahřívání byla v další reakci snížena na 2 h, přičemž tato změna neměla vliv na výtěžek reakce. Navázání methyl-11-bromundekanoátu bylo potvrzeno pomocí  $^1\text{H}$  NMR spektroskopie. Přítomnost nezreagovaného výchozího methyl-11-bromundekanoátu byla v  $^1\text{H}$  NMR spektru indikována signálem vodíků  $\text{CH}_2$  skupiny v poloze 11 (vedle atomu Br) alkylového řetězce ( $\delta=3,41$  ppm), který byl díky silně elektronegativnímu bromu výrazně odstíněn (viz Příloha 1). Kdežto v případě navázání methyl-undekanoátu na toluen došlo k náhradě silně elektronegativního atomu bromu za atom uhlíku a signál se posunul k výrazně nižším hodnotám ppm (spektrum viz Příloha 2).

Porovnání integrálních intenzit píků příslušejících vodíkům chránící methoxyskupiny a signálů vodíků benzenového jádra však ukázalo, že nedocházelo pouze k tvorbě monosubstituovaného produktu (tedy substituci do jedné polohy *o*- nebo *p*- vůči methylu toluenu), ale v malé míře dochází i k tvorbě více substituovaného produktu. Pokud by došlo k navázání jedné molekuly alkylačního činidla na jednu molekulu toluenu, byl by poměr píků  $\delta=7,18-7,01$  ppm a  $\delta=3,68$  ppm 4:3. Integrální hodnota píků v „aromatické“ oblasti je však nižší (přibližně 3,6:3). Pravděpodobně dochází v malé míře i k substituci do *o*- a *p*-polohy současně. Ze sterických důvodů je málo pravděpodobné, že by jádro bylo substituované v obou *o*- polohách. Vícesubstituovaný produkt by mohl způsobovat síťování řetězců HA. Bylo by obtížně zjištělné, do jaké míry dochází k síťování, protože zdaleka ne všechny karboxylové skupiny mastných kyselin jsou ve výsledku navázány na hydroxyly HA. Toto síťování by mohlo způsobit například problém s rozpustností či při inkorporaci léčivých látek. Vzhledem k náhodnosti, může být míra síťování odlišná v závislosti na šarži, mohly by se také mírně lišit i vlastnosti derivátů HA a z nich připravených micel.

Jednou z alternativních možností získání vhodného aromatického modifikačního činidla byla alkylace benzenu. Přestože je v literatuře příprava monosubstituovaného benzenu pomocí Friedelovy–Craftsovy alkylace popsána,<sup>157-159</sup> nám se monosubstituovaný

benzenový derivát takto připravit nepodařilo. Protože jsme vždy pozorovali buď alkylation do vyššího stupně, nebo k naopak k tvorbě produktu vůbec nedocházelo, vyhodnotili jsme tuto reakci jako obtížně říditelnou. Podmínky reakcí a výsledky jsou shrnuty v Tabulce 1. První reakce byla provedena podle výše citovaného publikovaného postupu. U dalších reakcí byly pozměněny jednotlivé parametry (doba a teplota reakce, poměr methyl-11-bromundekanoátu a  $\text{AlCl}_3$ ). Kvůli rychlému průběhu nebyly reakce sledovány například pomocí GC–MS ale byly zpracovány po uběhnutí předem určeného času. Analýzy zpracovaných reakčních směsí ukázaly jen přítomnost výchozí látky (k reakci vůbec nedošlo; v případech **3**, **4** a **5**) nebo směs velkého množství produktů (**1**, **2**, **6** a **7**) zahrnující vícesubstituovaný benzen. Podmínky reakcí byly příliš radikální, a proto byl pro reakce **3**, **4** a **5** použit nižší poměr methyl-11-bromundekanoátu a  $\text{AlCl}_3$  a mírnější podmínky (teplota, čas). Tyto podmínky byly ale nedostatečné pro proběhnutí reakce. V dalších reakcích (**6** a **7**) byly všechny parametry mírně zvýšeny, ale ani v tomto případě nebyl získán požadovaný produkt.

Tabulka 1: Podmínky a výsledky alkylation benzenu.

	m-11-b*: $\text{AlCl}_3$ [n:n]	T [°C]	t [min]	Výsledek
<b>1</b>	1:3,7	60	240	směs
<b>2</b>	1:1,5	40	120	směs
<b>3</b>	1:1,2	rt	30	VL
<b>4</b>	1:1,2	rt	120	VL
<b>5</b>	1:1,2	40	30	VL
<b>6</b>	1:1,5	40	15	směs
<b>7</b>	1:1,5	rt	24	směs

\*m-11-b...methyl-11-bromundekanoát

O finální aplikaci těchto (benzenových) derivátů HA jsme z důvodu rizika kontaminace karcinogenním benzenem neuvažovali, chtěli jsme jej použít pro srovnání vlastností tohoto HA derivátu a derivátu získaného modifikací HA 11-tolylundekanovou kyselinou. Benzen je potvrzený lidský karcinogen, a je-li to možné, je vhodné se vyhnout jeho používání (nejen) při medicínských aplikacích. Pokud by bylo zjištěno, že vlastnosti těchto dvou typů derivátů a jejich micel jsou odpovídající, byl by nadále používán derivát z HA a 11-tolylundekanové kyseliny.

Po neúspěchu Friedelovy–Craftsovy alkylace benzenu byla vyzkoušena možnost zavést terminální fenylový substituent do struktury mastné kyseliny pomocí Wittigovy reakce. Výchozí látkou byl opět methyl-11-bromundekanoát, který byl převeden na Wittigovu sůl reakcí s trifenylyfosfanem. V dalším reakčním kroku mělo dojít k samotné Wittigově reakci připravené soli s benzaldehydem. Vzniklá dvojná vazba měla být hydrogenována pomocí vodíku na Raneyově niklu v EtOH či jiném vhodném rozpouštědle. V posledním kroku měla být pak odstraněna chránící skupina a znovu vytvořena karboxylová skupina nezbytná pro vlastní modifikaci hydroxylových skupin HA. Sled zamýšlených reakcí je uveden na Schématu 12.

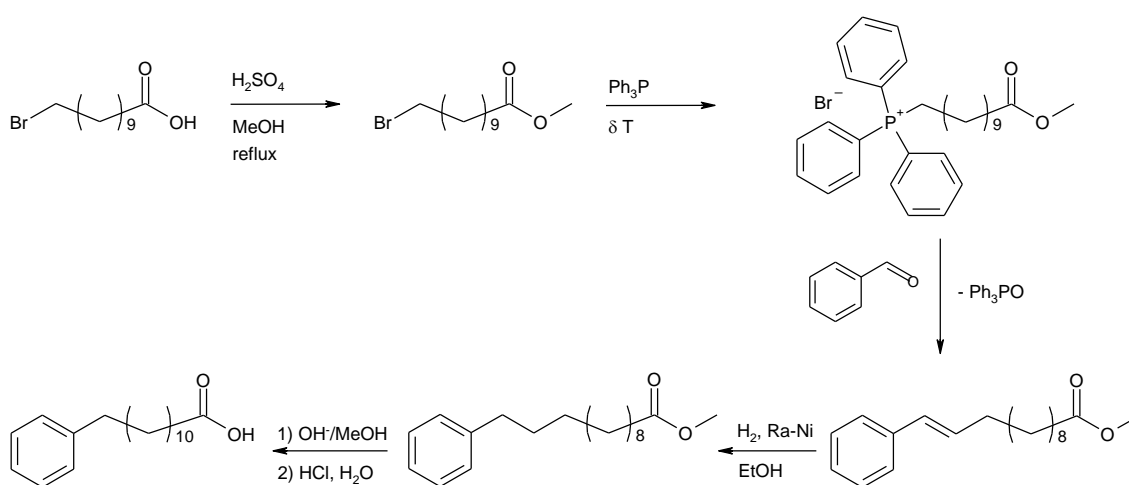


Schéma 12: Navržený postup vedoucí k přípravě 12-fenyldodekanové kyseliny.

Pro přípravu Wittigovy soli z methyl-11-bromundekanoátu a trifenylyfosfanu byla důležitá volba vhodného rozpouštědla. Nejprve byl vyzkoušen toluen.<sup>160</sup> V tomto rozpouštědle však, patrně pro nízkou polaritu, nedocházelo ke konverzi výchozích látek. Svou roli pravděpodobně sehrává i nízká reaktivita methyl-11-bromundekanoátu, neboť příprava Wittigových solí v toluenu je popsána.<sup>160</sup> V dalších reakcích jsme se rozhodli vyzkoušet polárnější prostředí, acetonitril<sup>161</sup> a *N,N*-dimethylformamid.<sup>162</sup> Reakční doba byla v obou případech relativně dlouhá (přibližně 45 h). Protože vysoce polární Wittigovu sůl nelze stanovit pomocí GC–MS a nukleární magnetickou rezonancí Ústav chemie dosud nedisponuje, bylo možné sledovat průběh reakce jen pomocí TLC sledováním úbytku  $\text{Ph}_3\text{P}$ , a až zpracovaný produkt byl podroben  $^1\text{H}$  NMR analýze.

Získaná Wittigova sůl byla podrobena reakci s benzaldehydem za různých podmínek. Nejprve byla reakce provedena v DMF za přítomnosti  $\text{K}_2\text{CO}_3$  jako báze,<sup>163</sup> ale ani po 27 h zahřívání nebyl pozorován vznik produktu. V dalším případě byl jako rozpouštědlo použit

IPA a jako báze LiOH.<sup>160</sup> V tomto případě byla reakční směs refluxována 42 h, avšak také bez úspěchu. Ani použití NaH jako báze a DMSO jako rozpouštědla<sup>164</sup> při teplotě cca 70 °C pod inertní atmosférou nevedlo po 20 h k tvorbě detekovatelného množství produktu. Produkt nevznikl bohužel ani tehdy, byla-li Wittigova sůl rozsuspendována ve vodě v prostředí NaOH, přidán benzaldehyd a vzniklá směs zahřívána na cca 70 °C po dobu 22 h. Ve všech případech byla v reakční směsi detekována jen přítomnost výchozích látek. Důvodem může být nízká reaktivita Wittigovy soli připravené z methyl-11-bromundekanoátu.

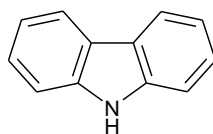
Poslední vyzkoušená možnost zavedení fenylu do struktury mastné kyseliny byla Grognardova reakce. Grignardovo činidlo (fenylmagnesiumbromid) a tetramethylethylendiamin (TMEDA) byly přidány do roztoku methyl-11-bromundekanoátu a FeCl<sub>3</sub>.<sup>165</sup> Reakční činidlo TMEDA zde hraje důležitou roli, neboť potlačuje nežádoucí vedlejší reakce, jako například tvorbu olefinů. Produktem první reakce byl nažloutlý olej, který obsahoval zejména výchozí methylester a pravděpodobně malé množství produktu (určeno dle <sup>1</sup>H NMR, jednotlivé komponenty nebyly separovány). Z důvodu přítomnosti velkého množství výchozí látky v produktu byl změněn poměr reakčních činidel, ale dle GC–MS analýzy bylo ve zpracované reakční směsi přítomno 63 % bifenyly a další vedlejší produkty. Požadovaný produkt nebyl pozorován.

Jako jediná možnost přípravy  $\omega$ -fenylalkanové kyseliny s délkou řetězce 11 nebo 12 uhlíkových atomů se tedy ukázala Friedelova-Craftsova alkylace toluenu. Ostatní pokusy o přípravu této kyseliny selhaly. Problémem Friedelovy-Craftsovy alkylace je obsah vícesubstituovaného derivátu v produktu, který může způsobovat síťování derivátu HA. Toto síťování by mohlo způsobit například problém s rozpustností a následně i při inkorporaci léčivých látek. Nicméně deriváty i micely připravené z HA modifikovaného touto kyselinou se projevily jako zcela funkční.

Po úspěšné přípravě derivátů HA s  $\omega$ -fenylmastnými kyselinami, vyvstala otázka, zda záměna benzenového kruhu za stericky náročnější a na  $\pi$ -elektrony bohatší systém ovlivní (a popřípadě do jaké míry) vlastnosti micel z tohoto derivátu připravených.

Jako skelet vhodný z hlediska ceny, dostupnosti či náročnosti navázání na methyl-11-bromundekanoát byl vybrán karbazol (Obrázek 27), což je heterocyklus tvořený třemi kondenzovanými kruhy a obsahující dusíkový atom. Karbazolový

heterocyklus je součástí mnoha přírodních biologicky aktivních látek majících kancerostatické, antibakteriální, antifungální, protizánětlivé či sedativní vlastnosti.<sup>166</sup>



Obrázek 27: Struktura karbazolu.

Kyselina 11-(9*H*-karbazol-9-yl)undekanová byla připravena tříkrokovou syntézou. V prvním kroku byl připraven methyl-11-bromundekanoát a ten byl použit pro alkylation karbazolu v bazickém prostředí a následně byla odstraněna ochranná skupina z karboxylové skupiny. Alkylation karbazolu byla již popsána v literatuře a přípravu jsme zopakovali stejným postupem.<sup>155</sup> Literární postup zahrnoval refluxování heterogenní směsi obsahující  $K_2CO_3$ , karbazol a methyl-11-bromundekanoát v acetonitrilu po dobu tří dnů. Při provádění reakce tímto postupem se po cca 28 h zahřívání na TLC kromě karbazolu a (pravděpodobně) požadovaného produktu začínala objevovat další skvrna indukující tvorbu nežádoucího produktu. Reakce byla proto ukončena.  $^1H$  NMR spektroskopie surového produktu potvrdila přítomnost výchozích látek, požadovaného methyl-11-(9*H*-karbazol-9-yl)undekanoátu a vedlejšího produktu, jehož strukturu se nepodařilo určit. Porovnáním integrálních intenzit produktu a výchozích látek bylo zjištěno, že požadovaný produkt vznikl jen ve velmi malém množství (zhruba v poměru 0,2:1 k výchozímu methyl-11-bromundekanoátu). Prodloužení reakční doby by sice pravděpodobně vedlo ke vzniku většího množství methyl-11-(9*H*-karbazol-9-yl)undekanoátu, ale také by pravděpodobně vznikalo větší množství nežádoucího produktu. Protože byla reakce prováděna za refluxu rozpouštědla, není možné zvýšit teplotu varu, a tudíž byl vyzkoušen jiný postup. Ten zahrnoval DMSO jako rozpouštědlo a NaOH jako bázi (Schéma 13).<sup>167</sup> Takhle reakce již proběhla s uspokojivým výsledkem. Podle  $^1H$  NMR analýzy došlo sice k tvorbě požadovaného produktu, ale za podmínek reakce došlo k částečnému odstranění ochranné karboxylové skupiny. Prodloužením reakční doby (o 6 h) k úplnému ochránění karboxylové skupiny nedošlo. To ovšem nepředstavovalo velký problém, protože třetím krokem postupu byla právě hydrolýza esteru.

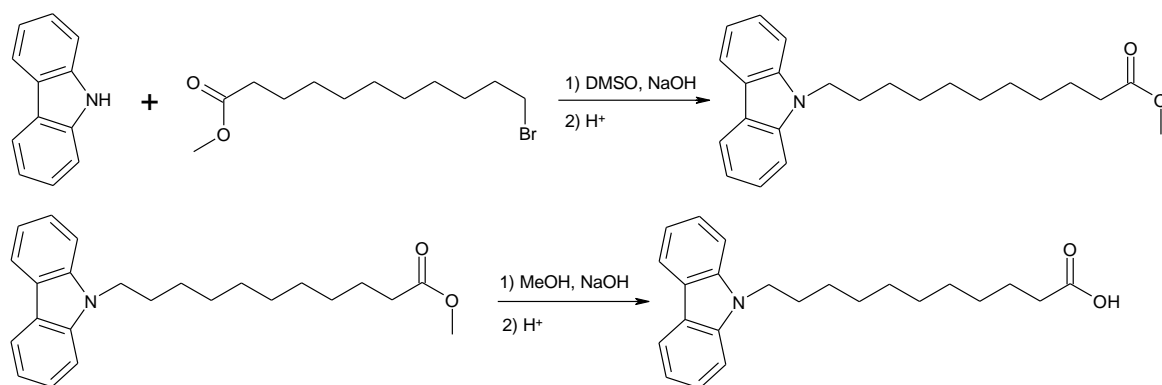


Schéma 13: Postup přípravy 11-(9H-karbazol-9-yl)undekanové kyseliny.

Další skupinou modifikačních činidel byla série 4-alkoxybenzoových kyselin. Byly zvoleny kyseliny substituované na kyslíkovém atomu hydroxylové skupiny dlouhými alkylovými řetězci C8, C10, C12, C14 a C16. Všechny tyto deriváty byly připraveny níže popsáním postupem a poté použity pro modifikaci HA.

Jako výchozí látka byl použit methyl-4-hydroxybenzoát. Substituce vodíkového atomu hydroxylové skupiny úspěšně proběhla za bezvodých bazických podmínek (DMF a  $K_2CO_3$ ) pod inertní atmosférou (Schéma 14).<sup>168</sup> Naproti tomu postup zahrnující použití 10%  $K_2CO_3$  jako báze v DMSO a míchání při laboratorní teplotě po dobu 4 h nevedl k tvorbě požadovaného produktu.<sup>169</sup> Výše uvedený úspěšný postup byl použit pro přípravu celé série *n*-alkoxybenzoových kyselin. Hydrolyza esteru proběhla během zahřívání methylesteru v bazickém prostředí (KOH v EtOH).<sup>170</sup> Požadované kyseliny byly z roztoku získány převedením pH do kyselé oblasti a odfiltrováním vysráženého produktu ze směsi. Tímto postupem došlo k uvolnění karboxylové funkce, díky které byly připravené deriváty posléze vázány na hydroxylové skupiny HA. Tyto reakce proběhly bez problémů stejně jako zpracování produktů. Za jiných podmínek, například NaOH v MeOH po dobu 45 h při laboratorní teplotě<sup>171</sup> nebo NaOH v dioxanu po dobu 20 h při laboratorní teplotě,<sup>172</sup> sice vznikal žádaný produkt, ale v poměrně malém množství. Poměr výchozí látka:produkt byl zhruba 1,5:0,5.

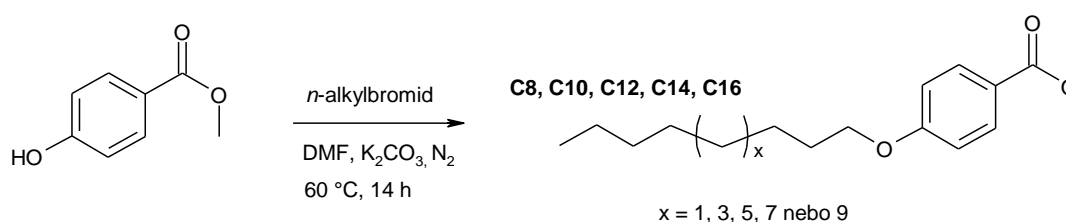


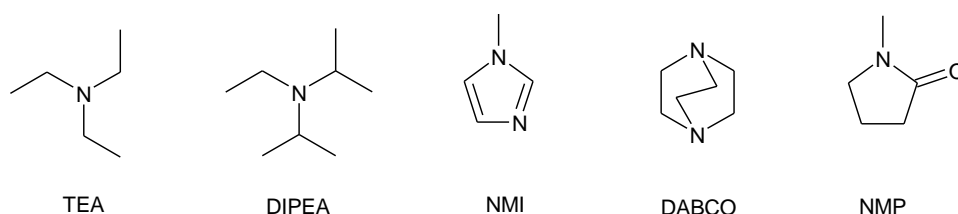
Schéma 14: Postup přípravy 4-alkoxybenzoátů.



### 6.1.3. Optimalizace reakčních podmínek

Důležité činidlo podílející se na zdárném průběhu reakce představuje báze. K vyzkoušení byly vybrány tyto báze: triethylamin (TEA), *N,N'*-diisopropylethylamin (DIPEA), *N*-methylimidazol (NMI), 1,4-diazabicyklo[2.2.2]oktan (DABCO) a 1-methyl-2-pyrrolidon (NMP) (Obrázek 28). Tyto báze jsou používány při modifikacích polysacharidů. S každou bází byla reakce provedena třikrát a výsledky (stupeň substituce – DS, čistota produktu podle  $^1\text{H}$  NMR) byly porovnány. Podmínky reakce včetně molárních poměrů činidel byly zachovány při všech reakcích. Všechny reakce byly prováděny s HA o molekulové hmotnosti 6 kDa kvůli velmi dobré rozpustnosti a tudíž snadné charakterizovatelnosti připravených derivátů.

Reakce HA a směsného anhydridu odvozeného od aromatické karboxylové kyseliny, nebyly dosud popsány. Bylo proto nutné optimalizovat reakční podmínky a zejména vybrat nejvhodnější organickou bázi. Reakce s každou bází byly vždy za daných podmínek provedeny třikrát pro zjištění reprodukovatelnosti. Ostatní podmínky (doba reakce, reaktanty a jejich navážky a ekvivalenty, zpracování) byly shodné pro reakce se všemi bázemi, aby výsledky mohly být vzájemně porovnány. Jako modifikační činidlo při těchto optimalizacích byla použita 4-fenylmáslná kyselina. Úspěšnost reakce byla hodnocena zejména na základě dvou parametrů a to podle stupně substituce HA požadovaným zbytkem kyseliny (DS) a čistotě produktu (Tabulka 2), která byla hodnocena pomocí  $^1\text{H}$  NMR spekter.



Obrázek 28: Báze použité pro katalýzu modifikační reakce.

Derivát HA s nejvyšším DS byl získán při použití TEA.  $^1\text{H}$  NMR spektrum produktu této reakce však vždy ukázalo přítomnost zbytkového TEA. Dodatečným rozpuštěním derivátu HA ve vodě a opakovaným promytím sice došlo k odstranění všech detekovatelných stop TEA, ale tento krok zvyšuje časovou a finanční náročnost přípravy těchto derivátů. Z tohoto důvodu byl jako nejvhodnější báze vybrán DIPEA. Reakce s touto bází poskytuje derivát se sice něco nižším stupněm substituce, ale báze je bez problému odstraněna již během běžného zpracování.

Tabulka 2: Výsledky modifikačních reakcí za použití různých bází.

Použitá báze	4C:HA[n:n]	DS [%]	Čistota*	Výtěžek [%]
TEA	2:1	39	ne	88
DIPEA	2:1	34	ano	85
NMI	2:1	0	ano	--
DABCO	2:1	7	ano	87
NMP	2:1	0	ano	--

\*přítomnost zbytků báze apod.

#### 6.1.4. Modifikace HA $\omega$ -fenylmastnými kyselinami

Není-li uvedeno jinak, byly všechny modifikační reakce provedeny třikrát a výsledný DS byl získán jako průměr tří hodnot. Baseline spektra byla vždy korigována. Pro výpočet DS derivátů HA byly použity píky anomerních vodíků a vodíků acetylové skupiny *N*-acetylglukosaminu HA a píky alifatických částí aromatických substituentů. Podmínky a výsledky modifikačních reakcí HA a 4-fenylmáslné kyseliny jsou uvedeny v Tabulce 3 a 4.

Stupeň substituce je ovlivňován mnoha faktory. Nejdůležitějším z nich, který se také využívá pro řízení DS, je molární poměr hyaluronanu (resp. jedné disacharidové jednotky) a modifikačního činidla. Postupem uvedeným výše byla připravena série derivátů s různým DS v závislosti na vstupním molárním poměru HA a modifikačního činidla.

Tabulka 3: Podmínky a výsledky modifikačních reakcí HA pomocí 4-fenylmáslné kyseliny s použitím báze DIPEA.

	4C:HA [n:n]	Báze	M <sub>w</sub> HA [kDa]	Výchozí množství HA [g]	DS [%]	Výtěžek [%]
<b>1</b>	2:1		6	0,5	32	85
<b>2*</b>	2:1		6	0,5	35	87
<b>3</b>	2:1		15	2	37	86
<b>4</b>	2:1	DIPEA	15	5	40	90
<b>5</b>	1:1		15	2	25	76
<b>6</b>	0,7:1		15	0,5	17	86
<b>7</b>	0,5:1		15	1	13	96

\*reakce byla provedena v THF

Přestože byla jako nejvhodnější báze vybrán DIPEA, byly provedeny i reakce s TEA pro získání derivátů HA s co nejvyšším DS. Důvodem k provedení těchto reakcí byl fakt, že

u micel připravených z HA modifikovaného alifatickými modifikačními činidly, byly pozorovány lepší vlastnosti (například vazebná kapacita) tehdy, když měl derivát HA vyšší DS. Proto jsme se snažili o derivát HA s nejvyšším DS, abychom zjistili, zda toto pravidlo platí i v případě micel z aromaticky modifikovaného HA.

S TEA byly proto také provedeny reakce s různými poměry HA a 4-fenylmásečné kyseliny (Tabulka 4), jinou navázkou a molekulovou hmotností HA, abychom zjistili, zda se zde účinek této báze projeví výraznějším zvýšením DS. Porovnání výsledků z Tabulky 3 a Tabulky 4 nicméně ukázalo, že použití TEA místo DIPEA výrazně nezvyšuje DS ani při jiných reakčních podmínkách ( $M_w$ , molární poměr HA:4-fenylmásečná kyselina, výchozí množství HA).

Tabulka 4: Podmínky a výsledky modifikačních reakcí HA a 4-fenylmásečné kyseliny s použitím báze TEA.

	4C:HA [n:n]	Báze	$M_w$ HA [kDa]	Výchozí množství HA [g]	DS [%]	Výtěžek [%]
<b>1</b>	2,5:1		6	0,5	20	79
<b>2</b>	2:1		6	1	31	88
<b>3</b>	2:1		15	0,5	34	83
<b>4</b>	2:1		15	2	33	80
<b>5</b>	1,5:1	TEA	15	0,5	28	92
<b>6</b>	1,2:1		15	0,5	23	85
<b>7</b>	1:1		15	0,5	24	93
<b>8</b>	0,7:1		15	1	16	77

V jedné reakci katalyzované DIPEA bylo standartně používané rozpouštědlo (IPA) nahrazeno tetrahydrofuranem a opět byl sledován vliv této změny na DS derivátu (Tabulka 3, řádek 2). Nicméně záměna rozpouštědla výrazně neovlivnila DS připravovaného derivátu, bylo zachováno používání IPA.

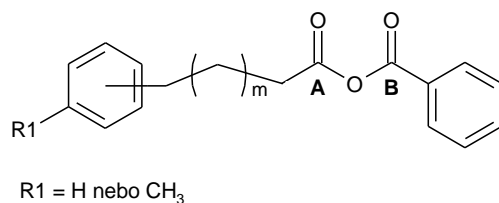
Dále zde bylo potvrzeno, že dobrého DS je dosahováno i při větším výchozím množství HA (Tabulka 3, řádky 3–5), což je důležité hledisko pro případný scale-up reakcí.

Reakcemi HA s 4-fenylmásečnou kyselinou byla stanovena závislost DS na vstupním molárním poměru modifikačního činidla k disacharidové jednotce HA. Ukázalo se, že DS stoupá se zvyšujícím se poměrem 4-fenylmásečné kyseliny vůči HA až do poměru 2:1 (4-fenylmásečná k.:HA). Je-li tento poměr 2,5:1, nastává propad a DS se snižuje (Tabulka

4, řádek 1). Příčinou tohoto jevu může být například vytváření vyšších asociátů mezi molekulami 4-fenylmásečné kyseliny, které pak nemohou vytvářet aktivovanou formu s benzoylchloridem. Nejvyššího DS je tedy možné dosáhnout s poměrem 2:1.

Během těchto experimentů bylo důležité zachovat časové provedení (například doba rozpuštění HA) reakce. Jelikož je HA polymer, musela být doba rozpouštění dostatečná, aby byl polymerní řetězec solvatován rozpouštědlem.

Směsný anhydrid, který byl vytvořen během aktivační reakce, má dvě elektrofilní místa (A a B), která mohou reagovat s hydroxylovými skupinami HA (Obrázek 29). Kvůli tomu může být HA modifikována dvěma různými substituenty, které s hydroxylovými skupinami HA vytváří stabilní esterovou vazbu. Aniont  $\text{Ph-COO}^-$  je však stabilnější, a proto je HA přednostně modifikována zbytkem  $\omega$ -FAK. I přes tuto skutečnost však k modifikaci HA benzoátem v malé míře dochází. Stupeň substituce benzoátem se pohybuje v rozmezí 0,1–3 %. Tento údaj byl získán z  $^1\text{H}$  NMR spektra. Šlo by namítnout, že i kyselina benzoová může být vhodným aromatickým substituentem HA. Jak však následující výsledky naznačí, neměly by tyto deriváty a jejich micely dobrou stabilitu v přítomnosti albuminu ani další požadované vlastnosti.



Obrázek 29: Směsný anhydrid – aktivovaná forma kyseliny.

Vyzkoušeny byly dvě molekulové hmotnosti HA, 6 a 15 kDa. Pro nosičové systémy je velice důležitá dobrá rozpustnost derivátů (a jejich micel) ve vodném prostředí. Pokud jsou zamýšlené také topické aplikace, je důležitá dobrá prostupnost nosičových systémů kůží. Z těchto důvodů je důležité používat HA o nižší molekulové hmotnosti, aby nevytvářela příliš viskózní roztoky a dobře prostupovala přes buněčné membrány. Viskozita HA stoupá s délkou řetězce, kromě toho mohou připojená modifikační činidla zvyšovat viskozitu prostřednictvím intra- a intermolekulárních interakcí.

Hyaluronan o molekulové hmotnosti 6 kDa byl použit hlavně pro některá testování (například výběr vhodné báze). Při takto nízké molekulové hmotnosti je zde již zastoupeno více fragmentů s velmi krátkým řetězcem, což může způsobovat problém například při

zpracování reakcí, kdy mohou být nechtěně snadno odstraněny. Hyaluronan o molekulové hmotnosti 15 kDa tedy byl vybrán jako nejvhodnější.

Stejně reakční podmínky použité pro modifikační reakce vedoucí ke vzniku derivátů HA–4C byly použity i pro reakce vedoucí ke vzniku derivátů HA–6C (Tabulka 5) a HA–8C (Tabulka 6). Jako báze byl v těchto reakcích již vždy používán DIPEA. 6-Fenylhexanová a 8-fenyl-oktanová kyselina byly vybrány pro modifikaci HA z důvodu porovnání vlivu délky alifatického řetězce těchto kyselin na vlastnosti micel připravených z těchto derivátů. Tato na první pohled malá změna ve struktuře kyselin měla však velmi výrazný vliv na vlastnosti derivátů i micel (bude diskutováno v dalších kapitolách) a na základě těchto výsledků byly navrženy a připraveny další kyseliny pro modifikaci HA.

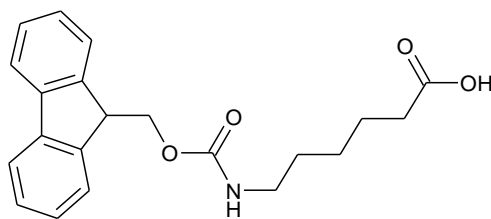
Tabulka 5: Podmínky a výsledky modifikačních reakcí HA a 6-fenylhexanové kyseliny.

	6C:HA [n:n]	Mw HA [kDa]	DS [%]	Výtěžek [%]
<b>1</b>	2:1	6	55	82
<b>2</b>	2:1	15	47	89
<b>3</b>	0,7:1	15	21	86
<b>4</b>	0,5:1	15	15	79
<b>5</b>	0,2:1	15	5	88

Tabulka 6: Podmínky a výsledky modifikačních reakcí HA a 8-fenyl-oktanové kyseliny.

	8C:HA [n:n]	Mw HA [kDa]	DS [%]	Výtěžek [%]
<b>1</b>	2:1	6	43	83
<b>2</b>	2:1	15	37	86
<b>3</b>	0,7:1	15	18	72
<b>4</b>	0,5:1	15	13	95

Jak již bylo naznačeno, se stoupající délkou řetězce aromatické mastné kyseliny použité pro modifikaci HA, se zlepšují vlastnosti micel, zejména jejich stabilita v přítomnosti krevních proteinů. Stabilita micel připravených z derivátu HA modifikovaného 8-fenyl-oktanovou kyselinou však stále nebyla dostačující (bližší komentář viz kapitola 6.2). Z tohoto důvodu byla hledána aromatická mastná kyselina s delším alifatickým řetězcem. Již 8-fenyl-oktanová kyselina však byla poměrně špatně komerčně dostupná a drahá. K dispozici jsme ale měli Fmoc–6–Ahx–OH (Obrázek 30), která má v alifatickém řetězci 10 atomů, a proto bylo vyzkoušeno, jak výsledné vlastnosti ovlivní.



Obrázek 30: Struktura Fmoc-6-Ahx-OH.

Tato kyselina byla použita jen jako „modelová“ látka s delším řetězcem než má 8-fenyloktanová kyselina, a nebyla proto brána v potaz přítomnost karbamátové funkce a její chemické vlastnosti. Pro modifikaci HA touto kyselinou byly použity stejné podmínky jako pro přípravu derivátů HA a  $\omega$ -fenylmastných kyselin. Výsledky těchto reakcí jsou uvedeny v Tabulce 7.

Tabulka 7: Podmínky a výsledky modifikačních reakcí HA a Fmoc-6-Ahx-OH.

	Fmoc:HA[n:n]	Mw HA [kDa]	DS [%]	Výtěžek [%]
<b>1</b>	2:1	6	14	85
<b>2</b>	2:1	15	14	79

Z Tabulky 7 je patrné, že při zachování týchž podmínek jako v předchozích reakcích byl DS derivátů HA s Fmoc-6-Ahx-OH významně nižší. To může být způsobeno například vysokou sterickou náročností, která brání navázání většího množství této kyseliny na HA. Výsledky stability micel v přítomnosti hovězího albuminu (kapitola 6.2) však nebyly povzbudivé, a proto nebyly další deriváty s touto kyselinou připraveny a také dále nebyly tyto deriváty zkoumány z hlediska možnosti jejich využití jako nosičových systémů.

Příprava esteru HA a 11-tolylundekanové kyseliny byla provedena za totožných podmínek jako příprava esterů HA a již výše zmíněných  $\omega$ -fenylmastných kyselin. Všechny reakce byly provedeny s HA o molekulové hmotnosti 15 kDa. Pokud byl molární poměr 11-tolylundekanová kyselina:HA roven 1,5:1 (Tabulka 8, řádek **1**), nebylo možné zjistit DS výsledného produktu. V tomto případě totiž nebylo možné získanou modifikovanou HA rozpustit na roztok, protože vždy vznikal gel, který nebylo možné převést do NMR kyvety. Snížení molárního poměru na 1:1 (Tabulka 8, řádek **2**) vedlo k tvorbě produktu s  $DS \cong 12$  %. Další snížení molárního poměru na 0,7:1 poskytlo deriváty se stejným DS (Tabulka 8, řádek **3**). Tyto hodnoty DS jsou ve srovnání s hodnotami získanými v případě použití jiných  $\omega$ -FAK (kapitola 6.1.5) nízké. Je však známo, že chemická reaktivita

dlouhých mastných kyselin klesá s délkou řetězce,<sup>173</sup> a proto tyto hodnoty DS nejsou natolik překvapivé.

Tabulka 8: Podmínky a výsledky modifikační reakce HA a 11-tolylundekanové kyseliny

	11C:HA[n:n]	T aktiv.rce/	c [%]	DS [%]	Výtěžek [%]
<b>1*</b>	1,5:1	rt/rt	3,1	--	--
<b>2</b>	1:1	rt/rt	3,1	12	85
<b>3</b>	0,7:1	rt/rt	3,1	15	79
<b>4</b>	0,7:1	0 °C/rt	5,0	13	82
<b>5**</b>	0,7:1	0 °C/rt	5,0	12	78
<b>6</b>	0,5:1	rt/rt	3,1	6	68

\*reakce byla provedena jen jednou, \*\*reakce byla provedena v THF, c [%]...koncentrace HA v rozpouštědlech.

Vzhledem k požadavku na deriváty s vysokým DS (kvůli předpokládaným lepším vlastnostem micel) jsme se reakční podmínky pokusili optimalizovat tak, aby byly získány deriváty s co nejvyšším DS. Na základě výsledků přípravy esterů HA s předchozími  $\omega$ -FAK (4-fenylmásečná kyselina atd.) lze navrhnout zvýšení poměru 11-tolylundekanové kyseliny v reakční směsi. Nicméně, vzhledem k výsledkům reakcí **1** a **2** (Tabulka 8) a vzhledem k tomu, že příprava této kyseliny je nejen časově, ale i finančně náročnější, hledali jsme jinou možnost jak DS derivátů zvýšit než zvýšením molárního poměru 11-tolylundekanové kyseliny k HA. Z Tabulky 8 je patrné, že snížení teploty aktivační reakce a zvýšení koncentrace reakčních činidel snížením objemů použitých rozpouštědel (reakce **4** a **5**) ke zvýšení DS nevedlo. Protože se nám po několika experimentech nepodařilo zvýšit DS, vyzkoušeli jsme, zdali klíčové vlastnosti modifikovaného HA, například vazebná kapacita micel či stabilita micel v přítomnosti albuminu, budou vyhovující i v případě nižších hodnot DS. Dále v kapitole 6.2 je popsáno, že tyto vlastnosti byly velmi dobré. Proto další reakce se záměrem zvýšit DS nebyly prováděny.

#### 6.1.5. Srovnání významných parametrů přípravy a samotných modifikovaných HA

Během přípravy derivátů HA-4C a zkoumání jejich vlastností a vlastností micel připravených z těchto derivátů bylo zjištěno, že tyto deriváty nemají zcela optimální vlastnosti (zejména stabilitu v roztoku albuminu). Proto byly postupně pro srovnání připraveny další, strukturně podobné deriváty (HA-6C, HA-8C a HA-11C). V Tabulce 9 jsou uvedeny výsledky pro všechny fenylové deriváty (HA-4C, HA-6C, HA-8C a HA-11C) připravené za stejných podmínek. Stupeň substituce udává počet molekul modifikačního činidla navázaných na sto disacharidových jednotek. Efektivita reakce

udává poměr množství karboxylové kyseliny navázané na HA vůči použitému množství této kyseliny pro reakci. Efektivita byla vypočítána podle níže uvedené rovnice. Podle tohoto ukazatele se jako nejvhodnější (nejefektivnější) jeví molární poměr  $\omega$ -FAK:HA 0,5:1 a 0,7:1. Se zvyšujícím se molárním poměrem těchto dvou reakčních činidel sice stoupá DS derivátů, ale efektivita reakcí klesá a příprava se tak stává neekonomickou.

$$\text{Efektivita rce} = \frac{DS * n_{HA}}{n_{\omega\text{-FAK}}}$$

Tabulka 9: Výsledky modifikace HA různými  $\omega$ -FAK.

	Derivát	$\omega$ -FAK: HA	DS [%]	Efektivita rce [%]	Výtěžek [%]
<b>1</b>		0,5 : 1	13	26,8	96
<b>2</b>		0,7 : 1	17	24,3	86
<b>3</b>	HA-4C	1 : 1	25	24,8	76
<b>4</b>		2 : 1	43	21,6	85
<b>5</b>		0,2 : 1	5	23,0	89
<b>6</b>		0,5 : 1	15	30,6	79
<b>7</b>	HA-6C	0,7 : 1	20	29,0	86
<b>8</b>		2 : 1	47	23,4	89
<b>9</b>		0,5 : 1	12	24,6	95
<b>10</b>	HA-8C	0,7 : 1	18	25,1	72
<b>11</b>		2 : 1	33	16,2	86
<b>12</b>	HA-11C	0,5 : 1	6	12,0	68
<b>13</b>		0,7 : 1	15	17,7	79

Z tabulky je patrné, že s výjimkou HA-4C derivátů DS<sup>§</sup> klesá s rostoucí délkou řetězce modifikačního činidla (Tabulka 9, například řádky **7**, **10** a **13** nebo **6**, **9** a **12**). Důvodem může být snižující se reaktivita výchozích kyselin.<sup>173</sup> Deriváty HA-4C se tomuto pravidlu vymykají. Důvodem může být jiné skupenství 4-fenylmásečné (pevné) než u zbývajících  $\omega$ -FAK (oleje), které může zapříčinit horší rozpustnost této kyseliny v rozpouštědle při vzniku směsného anhydridu.

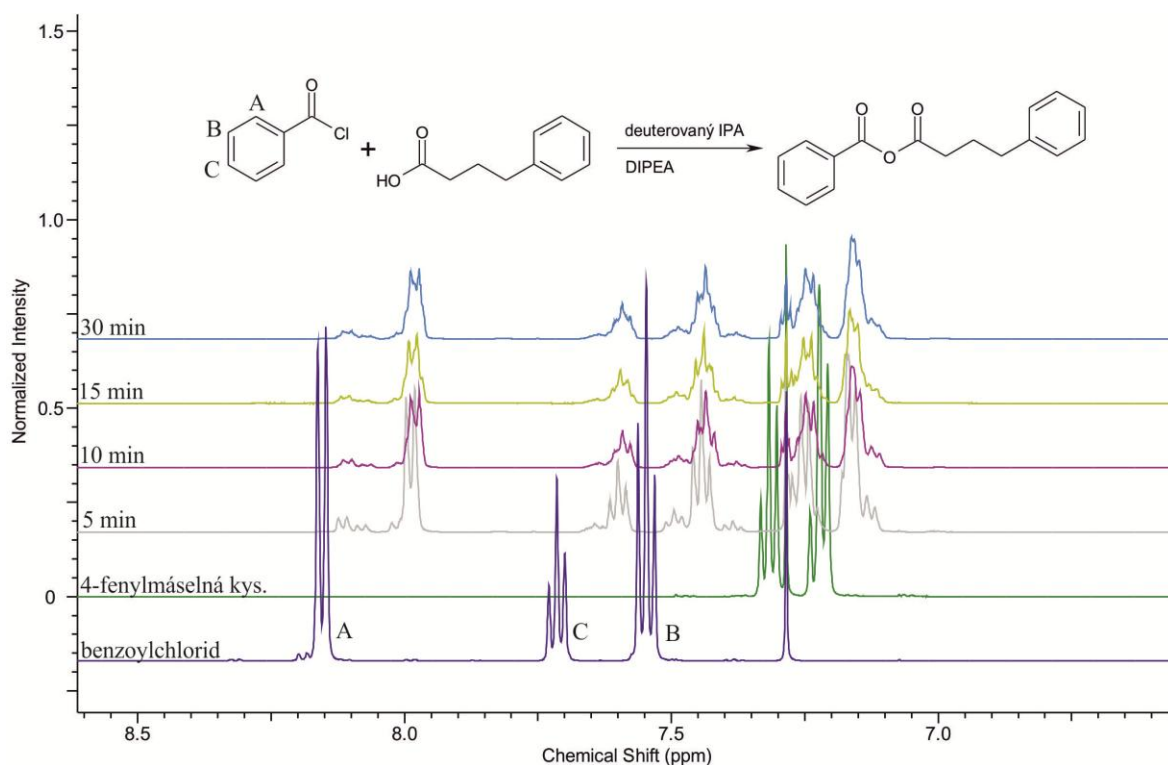
<sup>§</sup>Pro výpočty DS se obvykle používají signály HA odpovídající anomerním vodíkům ( $\delta=2,65$  a  $2,42$  ppm) a třem vodíkům  $\text{-NHC(O)CH}_3$  skupiny ( $\delta=2,01$  ppm). V případě tohoto konkrétního derivátu (HA-4C) však byly pro výpočet použity jen anomerní vodíky, protože signály vodíků jedné methylenové skupiny řetězce 4-fenylmásečné kyseliny ( $\text{Ph-CH}_2\text{-CH}_2\text{-}$ ) se nacházejí při přibližně stejné frekvenci jako vodíky  $\text{-NHC(O)CH}_3$  skupiny, a tudíž se ve spektrech překrývají.



Jak již bylo zmíněno výše, během aktivačního kroku dochází k tvorbě směšného anhydridu, který se po určité době (zpravidla 30 min), přidává do roztoku HA, kde dochází k vlastní modifikaci. Roztok aktivované mastné kyseliny je k HA přidáván, aniž by byl směšný anhydrid izolován, a tudíž nebývá obvykle ani detekován, ani charakterizován (například pomocí  $^1\text{H}$  NMR). Na základě dřívějších zkušeností s mastnými kyselinami bez aromatických zbytků byl pro aktivační krok nejprve zvolen půlhodinový interval. Protože však  $\omega$ -FAK jsou jiným typem modifikačního činidla a jejich reaktivita v aktivačním kroku může být jiná, bylo vhodné aktivační reakci podrobněji prozkoumat, a popřípadě najít optimální reakční dobu pro tento krok. Pokud je totiž zvolený půlhodinový interval příliš krátký, mohou v reakční směsi zůstat nezreagované výchozí látky. Případně naopak, 30 min aktivační doba může být příliš dlouhá a vznikající anhydrid může být nestabilní a rozpadat se záhy po vytvoření.

Proto jsme se rozhodli sledovat osud výchozích látek a vznikajícího anhydridu v čase. Reakce byla prováděna v deuterovaném IPA a v pravidelných intervalech byly odebírány vzorky (100  $\mu\text{l}$ ) do NMR kyvet a naředěny  $\text{CDCl}_3$ . Tento postup byl preferován oproti provádění série reakcí v NMR kyvetách kvůli snazší přípravě vzorků a také kvůli ceně rozpouštědel (deuterovaný IPA je dražší než deuterovaný  $\text{CDCl}_3$ ). Reakce byly provedeny jak prostým zopakováním běžně používané aktivační reakce (tedy smísením báze, benzoylchloridu a karboxylové kyseliny) tak i postupem, kdy byla do reakce přidávána voda pro zjištění jejího účinku na průběh reakce a stabilitu produktu.

Nejprve byla provedena aktivační reakce 4-fenylmáslé kyseliny bez přídavku vody. Vzorky z aktivační reakce byly odebrány po 5, 10, 15 a 30 minutách po startu reakce, kterým je přídavek benzoylchloridu. Pro názornost a snadné přiřazení jednotlivých signálů jsou na Obrázku 31 uvedena i spektra obou výchozích látek. Vlivem vytvoření směšného anhydridu dochází k posunu píků aromatických vodíkových atomů k nižším hodnotám ppm (Obrázek 31). Nejvýraznější je tento posun pro vodíkové atomy benzoylchloridu, které jsou nejbližší k substituentu (označeny písmenem A), protože tam je elektronová hustota v okolí jádra nejvíce ovlivněna.



Obrázek 31:  $^1\text{H}$  NMR spektra aktivační reakce 4-fenylmásečné kyseliny měřené v čase.

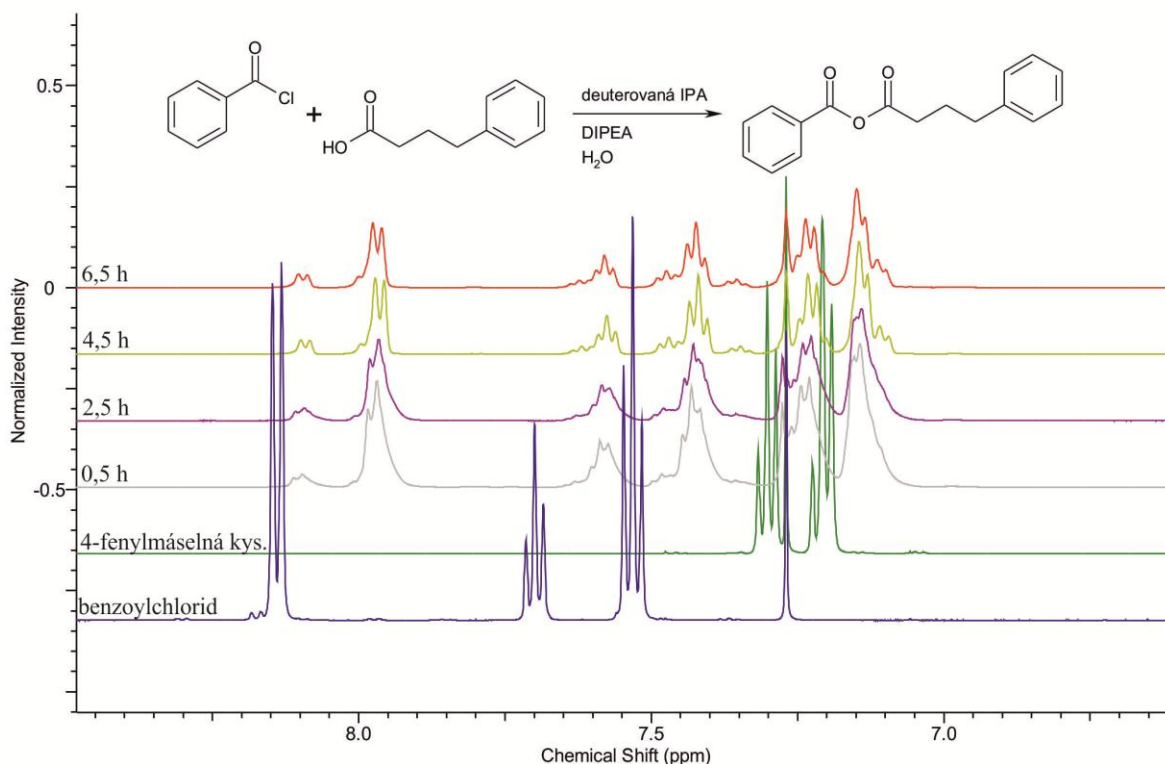
Píky s chemickým posunem  $\delta=8,2$  ppm ve spektrech reakční směsi pravděpodobně patří vodíkovým atomům kyseliny benzoové či jejímu anhydridu. Tato látka může v reakční směsi vznikat reakcí benzoylchloridu a vody přítomné v rozpouštědle či nepreferovaným štěpením směsného anhydridu. IPA nebyl před reakcí vysoušen, protože množství vody v tomto rozpouštědle je malé a případně vznikající kyselina benzoová nekomplikuje další průběh reakce. Ani v případě navázání na HA negativně neovlivňuje vlastnosti připravených derivátů (např. cytotoxicitu).

Výsledky měření průběhu této reakce ukázaly, že již po pěti minutách je směsný anhydrid pravděpodobně vytvořen a reakční směs neobsahuje výchozí benzoylchlorid ani volnou kyselinu 4-fenylmásečnou a nedochází ani ke změně integrálních hodnot jednotlivých signálů (Obrázek 31).

Aktivační reakce 4-fenylmásečné kyseliny byla provedena i s přidavkem vody. Důvodem bylo to, že tvorba směsného anhydridu probíhá v organickém rozpouštědle a poté je tento anhydrid přidáván do roztoku HA, který je rozpuštěn ve směsi vody a IPA. Může tedy dojít k předčasnému a nežádoucímu rozpadu tohoto anhydridu vlivem výrazného zvýšení obsahu vody v reakční směsi. Proto byl sledován osud směsného anhydridu 4-fenylmásečné

kyseliny a benzoylchloridu v čase, kdy po každém odběru (po 0,5; 2,5; 4,5 a 6,5 h) byla do reakční směsi přidána voda (Obrázek 32).

Ze spekter není zřejmé, že by ani po 6,5 h docházelo ke změnám ve složení směsi, tedy například k rozpadu směsného anhydridu. Dublet při  $\delta=8,1$  ppm patří pravděpodobně benzoové kyselině nebo, a to pravděpodobněji, anhydridu této kyseliny.



Obrázek 32:  $^1\text{H}$  NMR spektra aktivační reakce 4-fenylmásečné kyseliny měřené v čase po přidávacích vody.

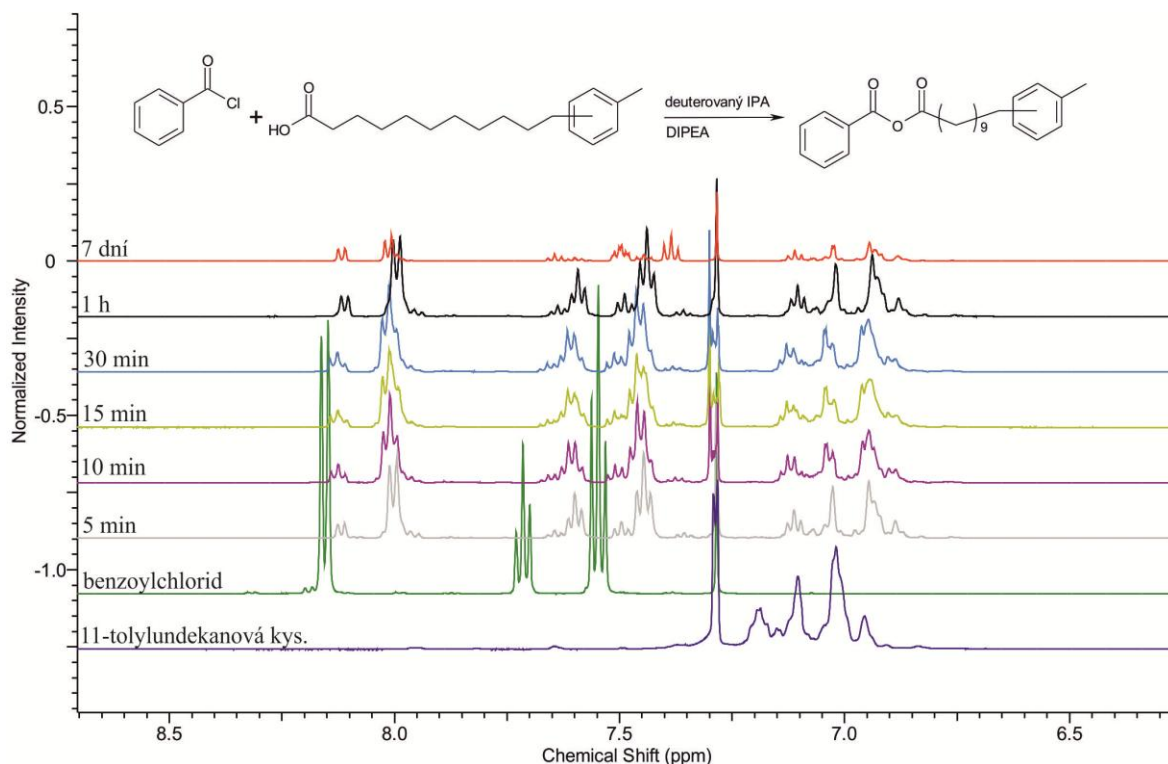
Jelikož reakce 11-tolylundekanové kyseliny s HA poskytují produkty s nízkým DS, bylo žádoucí prozkoumání aktivace této kyseliny, protože důvodem nízkého DS výsledných derivátů HA mohl být i problém při aktivačním kroku.

Sledování průběhu reakce bylo provedeno obdobně jako v předchozím případě. Po posledním odběru (po 1 h) byla reakční směs nechána míchat bez jakýchkoli zásahů a sedmý den po startu reakce bylo do reakční směsi přidáno 300  $\mu\text{l}$  demineralizované vody za účelem zjištění, jakým způsobem přítomnost vody ovlivní reakci a její produkt.

Podle  $^1\text{H}$  NMR spektra (posuny signálů a integrální hodnoty) bylo zjištěno, že produkt (anhydrid) je vytvořen již záhy po startu reakce, a že přítomná voda nezpůsobuje jeho rozklad (Obrázek 33).

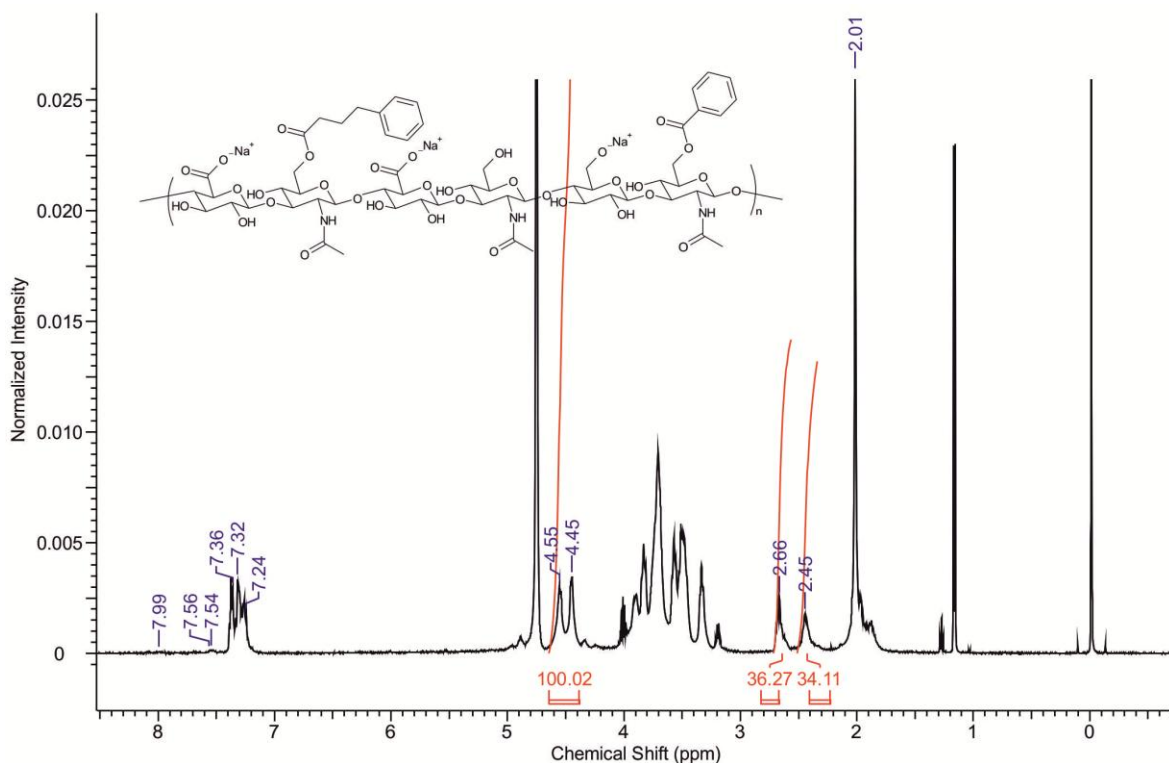
Tyto výsledky potvrzují hypotézu, že nízké stupně substituce derivátů získaných modifikační reakcí mezi HA a 11-tolylundekanovou kyselinou, byly pravděpodobně zapříčiněny nízkou reaktivitou směšného anhydridu 11-tolylundekanové a benzoylchloridu.<sup>173</sup>

I zde bylo možné pozorovat píky při  $\delta=8,1$  ppm patřící pravděpodobně anhydridu kyseliny benzoové pocházející z benzoové kyseliny a benzoylchloridu.



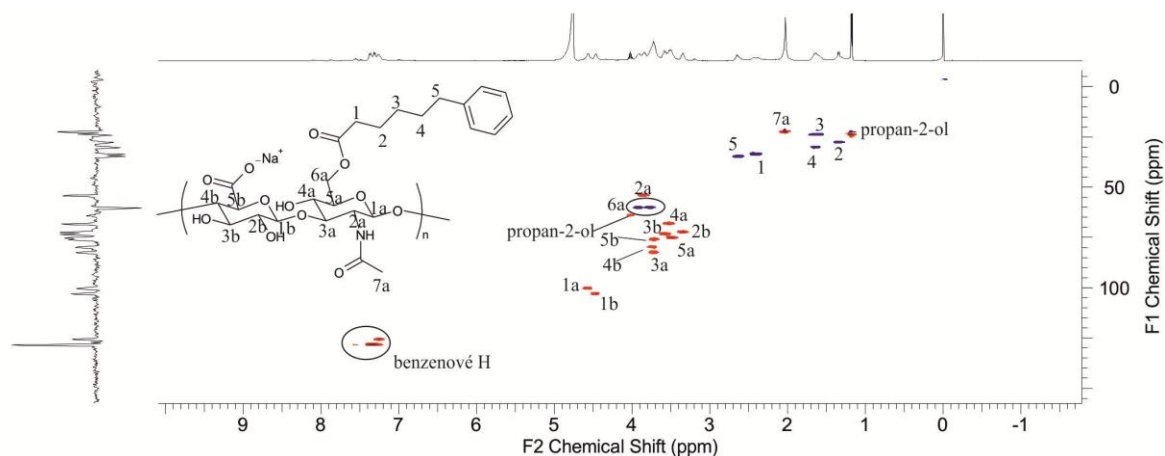
Obrázek 33:  $^1\text{H}$  NMR spektra aktivační reakce 11-tolylundekanové kyseliny.

Vzhledem k povaze modifikační reakce dochází ke štěpení směšného anhydridu nejen „ve prospěch“ požadovaného modifikačního činidla, ale v malém se na HA váže i zbytek kyseliny benzoové. Modifikace HA benzoátem byla pozorována pomocí  $^1\text{H}$  NMR spektroskopie. Signály vodíků benzenového kruhu benzoátu se nachází v oblasti  $\delta=7,58$ – $8,08$  ppm. Typické spektrum derivátu HA modifikovaného 4-fenylmáseľnou kyselinou je na Obrázku 34.

Obrázek 34:  $^1\text{H}$  NMR spektrum derivátu HA-4C.

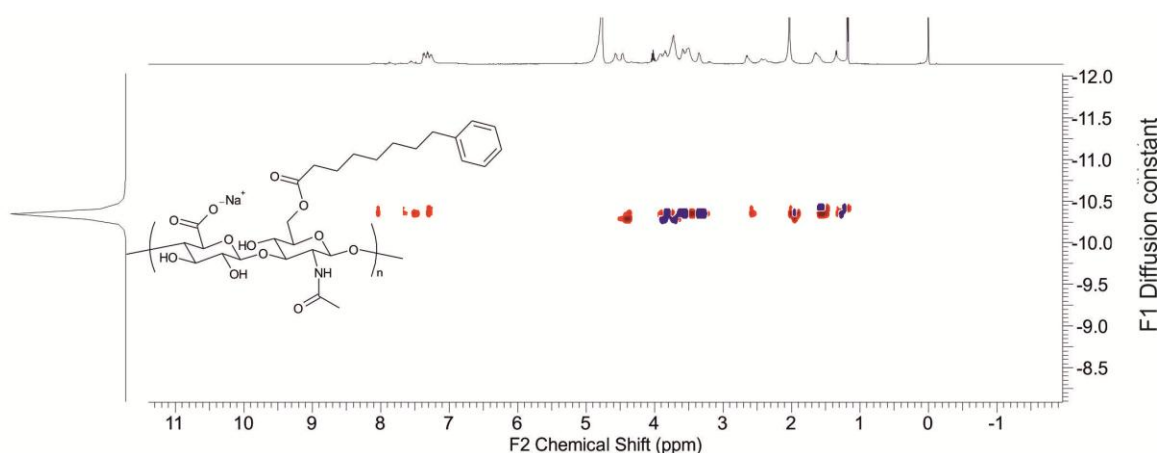
Připravené látky byly charakterizovány pomocí NMR metod. Nejčastěji byla používána  $^1\text{H}$  NMR spektroskopie. Pro nízkomolekulární látky byla využita také  $^{13}\text{C}$  NMR spektroskopie. Pro potvrzení navázání modifikačního činidla na HA a přiřazení jednotlivých píků příslušným vodíkovým atomům byly využity 2D NMR techniky (HSQC a DOSY).

HSQC NMR spektrum derivátu HA-6C je na Obrázku 35. Tato NMR analýza umožnila přesné přiřazení jednotlivých píků a potvrzuje vznik požadovaného produktu.



Obrázek 35: HSQC NMR spektrum derivátu HA-6C.

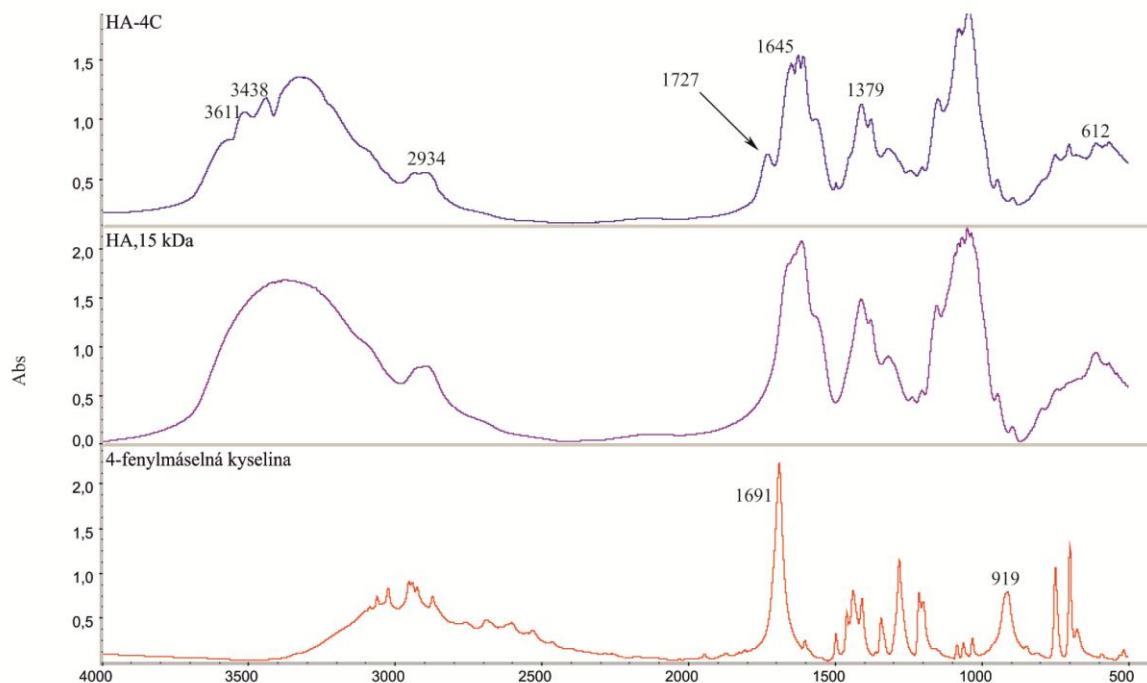
Pro potvrzení kovalentní vazby  $\omega$ -FAK na HA byla použita technika DOSY NMR. Tato technika umožňuje rozlišit různé komponenty ve směsi na základě jejich rozdílného difúzního koeficientu. Lze tak rozlišit například vysokomolekulární HA a případnou nenavázanou nízkomolekulární  $\omega$ -FAK. Pokud jsou jednotlivé komponenty pevně propojeny, mají stejnou pohyblivost a ve spektru jsou všechny píky zobrazeny v jedné linii. Jako příklad je zde uvedeno spektrum derivátu HA–8C (Obrázek 36). Lze zde vidět všechny píky v jedné rovině, což potvrzuje vznik kovalentní vazby mezi HA a 8-fenyloktanovou kyselinou.



Obrázek 36: DOSY NMR spektrum derivátu HA–8C.

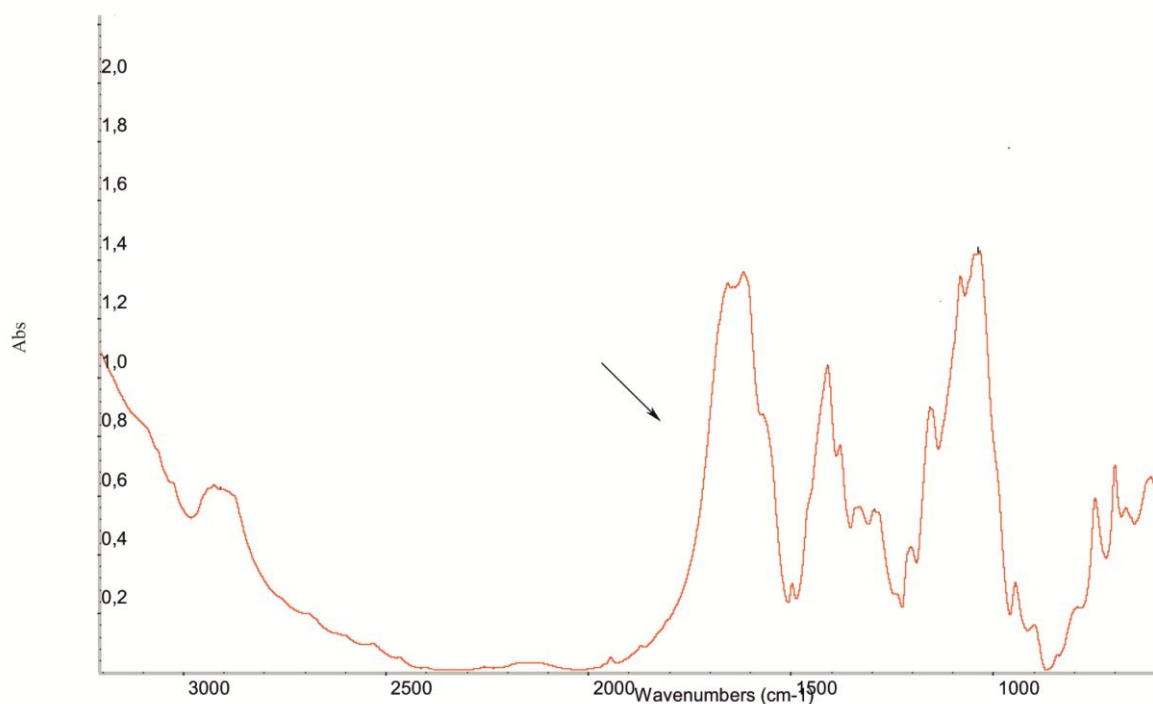
Infračervená spektroskopie byla použita především pro potvrzení vzniku kovalentní esterové vazby mezi karboxylovou skupinou modifikačního činidla a hydroxylovou skupinou HA. Takto byly charakterizovány všechny připravené deriváty HA. Na Obrázku 37 jsou spektra přírodního HA, 4-fenylmáslé kyseliny (modifikačního činidla) a výsledného modifikovaného HA. Ve spektru produktu je významný zejména pás o vlnočtu  $1727\text{ cm}^{-1}$ . Srovnáním spektra produktu se spektry výchozích látek je vidět, že tento pás nemůže pocházet z výchozích látek. S největší pravděpodobností tento pás přísluší valenční vibraci karbonylu esterové skupiny mezi HA a modifikačním činidlem. Tento pás také nepřímou poukazuje na úspěšné napojení aromatického modifikačního činidla na HA řetězec. Slabý pás  $3611\text{ cm}^{-1}$  může být přiřazen O—H valenčním vibracím, které vytváří O—H $\cdots\pi$  interakce mezi hydroxylovými skupinami HA a  $\pi$ -elektrony aromátů.<sup>174</sup> Ve spektru 4-fenylmáslé kyseliny jsou důležité pásy  $1691\text{ cm}^{-1}$  (valenční vibrace C=O) a  $919\text{ cm}^{-1}$  (deformační vibrace OC—OH). Tyto pásy jsou pozorovány pouze ve spektru 4-fenylmáslé kyseliny. Ve spektru produktu HA–4C pásy při těchto hodnotách nejsou pozorovány, což poukazuje na fakt, že není přítomna volná karboxylová kyselina. Pásy

2934, 1645, 1379 a  $612\text{ cm}^{-1}$  jsou charakteristické pro HA.<sup>175</sup> Tato podrobná analýza spekter je poměrně silným důkazem navázání nízkomolekulární látky (v tomto případě 4-fenylmáslé kyseliny) na HA.



Obrázek 37: Porovnání spekter 4-fenylmáslé kyseliny, přírodního HA a derivátu HA připraveného z těchto látek.

Abychom potvrdili předpoklad, že pás  $1727\text{ cm}^{-1}$  přísluší kovalentní esterové vazbě, a nemůže být přiřazen žádné jiné vazbě, byla provedena aktivační reakce bez použití benzoylchloridu. Na Obrázku 38 je infračervené spektrum směsi, která byla získána touto reakcí. Vzhledem k nepřítomnosti pásu  $1727\text{ cm}^{-1}$  je zřejmé, že v tomto případě nedošlo k vytvoření esterové vazby mezi HA a modifikačním činidlem a zmíněný pás nepochází ani z žádné výchozí látky či jejich interakcí.



Obrázek 38: Infračervené spektrum směsi HA a 4-fenylmásečné kyseliny.

Infračervenou spektroskopií byly charakterizovány všechny připravené deriváty a ve všech případech byl pozorován pás při hodnotě vlnočtu  $1727\text{ cm}^{-1}$  poukazující na vznik esterové vazby.

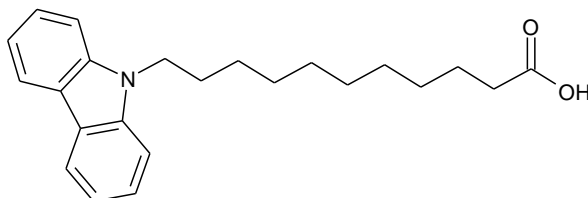
Pro zjištění, zda reakční podmínky modifikace HA nezpůsobují rozpad polymerního řetězce. Byly provedeny analýzy derivátů pomocí metody SEC–MALLS. Tato metoda se používá pro stanovení molekulové hmotnosti. Pro srovnání byly analyzovány nejen produkty reakcí, ale i výchozí HA. U všech testovaných modifikovaných HA byla zjištěna mírně vyšší molekulová hmotnost ve srovnání s výchozím HA. Tyto výsledky naznačují, že nedošlo k rozpadu polymeru, ale naopak k jeho modifikaci, a tím ke zvýšení molekulové hmotnosti.

Pro modifikační reakce se používá katalyzátor DMAP, který je toxický. Přestože je používán v opravdu zanedbatelném množství, může po zpracování zůstat jako součást produktu. Byla proto provedena HPLC analýza pro zjištění jeho přítomnosti DMAP v produktu. Touto metodou bylo zjištěno, že obsah DMAP v derivátu je pod limitem detekce ( $<0,005\text{ \% w:w}$ ).



### 6.1.6. Modifikace HA a 11-(9*H*-karbazol-9-yl)undekanovou kyselinou

I pro přípravu esteru HA a 11-(9*H*-karbazol-9-yl)undekanové kyseliny (Obrázek 39, karb) byly nejprve vyzkoušeny podmínky použité pro přípravu esteru HA a 4-fenylmásečné kyseliny. V tomto případě ale docházelo ke vzniku produktů s nízkým DS (přibližně 3 %). Z tohoto důvodu byly podmínky reakce upravovány (délka reakční doby obou reakcí, teplota reakcí, objem rozpouštědel).



Obrázek 39: Struktura karb.

Použité podmínky a výsledky jsou shrnuty v Tabulce 10. Není-li uvedeno jinak, byl pro tyto reakce použit HA o molekulové hmotnosti 15 kDa ve výchozím množství 0,5 g a IPA jako rozpouštědlo. Výsledky v této tabulce nejsou jako vždy průměry výsledků tří reakcí, ale výsledky jen jedné reakce, není-li uvedeno jinak.

Srovnání DS uvedených v Tabulce 10 ukazuje, že žádná změna reakčních podmínek nevedla k přípravě derivátu s výrazně vyšším DS. Nejvyšší dosažená hodnota stupně substituce byla 5,5 %.

Nejvýznamnějším činitelem ovlivňujícím DS výsledného derivátu je molární poměr modifikačního činidla vztažený na disacharidovou monomerní jednotku HA. V případě modifikace HA 11-(9*H*-karbazol-9-yl)undekanovou kyselinou však změna molárního poměru HA:karb nevedla k tvorbě produktu s vyšším DS (například řádky **3** a **8**). Kromě nízké reaktivity kyselin s dlouhým řetězcem<sup>173</sup> může být důvodem zisku derivátů s nízkým DS velká sterická náročnost karbazolové skupiny, která, je-li navázána na HA, brání přístupu dalších molekul modifikačního činidla k polymernímu řetězci. Jiným vysvětlením může být silná agregace modifikovaného HA, a tím zabránění přístupu dalších molekul modifikačního činidla.

Tabulka 10: Výsledky a podmínky modifikace HA 11-(9*H*-karbazol-9-yl)undekanovou kyselinou.

Sekce	HA:karb [n:n]	t aktiv.rce/doba rce [min]	T aktiv.rce/ reakce	Koncentrace HA[hm./obj.]	DS [%]	RPM	
<b>I</b>	<b>1</b>	1:0,7	0,5/2	0 °C/rt	5,0	<b>1,5</b>	250
	<b>2<sup>a</sup></b>	1:0,7	0,5/2	rt/rt	5,0	<b>4,2</b>	250
	<b>3<sup>a</sup></b>	1:1,5	0,5/2	0 °C/rt	5,0	<b>4,8</b>	250
	<b>4</b>	1:1	0,5/2	0 °C/rt	5,0	<b>3,8</b>	250
	<b>5</b>	1:1	0,5/5	0 °C/rt	5,0	<b>5,5</b>	500
	<b>7<sup>b</sup></b>	1:1	0,5/15	0 °C/rt	5,0	<b>5,1</b>	500
	<b>8<sup>a</sup></b>	1:2	0,5/2	0 °C/rt	5,0	<b>4,9</b>	500
	<b>II</b>	<b>9</b>	1:1	2,5/2	rt/rt	5,0	<b>5,4</b>
<b>10<sup>b,c</sup></b>		1:1	2,5/2	rt/rt	5,0	<b>4,1</b>	1000
<b>11<sup>d,e</sup></b>		1:1	2,5/2	rt/rt	5,0	<b>4,0</b>	1000
<b>12<sup>f</sup></b>		1:1	2,5/2	rt/rt	5,0	<b>5,3</b>	1000
<b>13<sup>d</sup></b>		1:1	2,5/2	rt/rt	5,0	<b>4,9</b>	1000
<b>14</b>		1:1	2,5/4	rt/rt	5,0	<b>4,9</b>	1000
<b>III</b>	<b>16<sup>d</sup></b>	1:1	2,5/2	rt/rt	3,1	<b>4,5</b>	500
	<b>17</b>	1:1	2,5/2	rt/rt	3,1	<b>3,4</b>	500
	<b>18</b>	1:1	2,5/2	0 °C/0 °C	3,1	<b>3,7</b>	500
	<b>19</b>	1:1	2,5/2	rt/40 °C	3,1	<b>4,0</b>	500

<sup>a</sup> jako rozpouštědlo byl použit THF, <sup>b</sup> průměr ze dvou opakovaných reakcí, <sup>c</sup> připraveno ve větších šaržích (z 1 g HA), <sup>d</sup> průměr ze tří opakovaných reakcí, <sup>e</sup> 6 kDa HA, <sup>f</sup> vodný roztok HA byl přidán k roztoku aktivační reakce.

Ve snaze nalézt optimální podmínky aktivačního kroku a zvýšit tak DS finálního derivátu HA bylo provedeno detailní sledování průběhu aktivačního kroku pomocí NMR (výsledky jsou uvedeny níže). Na základě získaných výsledků byla prodloužena doba aktivační reakce na 2,5 h (viz Tabulka 10), ale bohužel ani tato úprava postupu nevedla k tvorbě derivátů s vyšším DS.

Další příčinou nízkého DS může být použití rozpouštědla, které neumožnilo dokonalé rozpuštění 11-(9*H*-karbazol-9-yl)undekanové kyseliny před aktivační reakcí. Zde je nutno připomenout, že výběr rozpouštědla byl značně limitován. Použité rozpouštědlo musí být dobře mísitelné s vodou, protože se mísí s roztokem HA ve směsi vody a rozpouštědla. Z hlediska zamýšlených aplikací připravovaných derivátů HA nejsou vhodná toxická

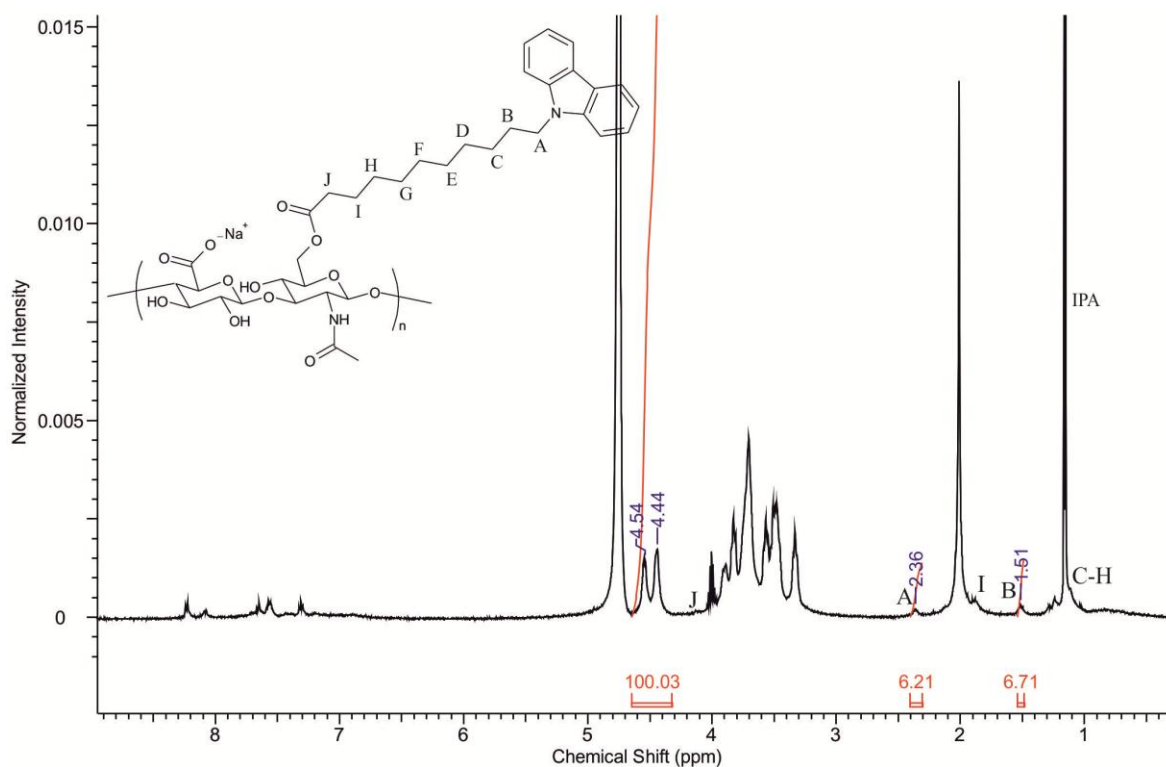
rozpouštědla, jako například methanol. Jako reakční prostředí byly proto používány IPA a THF. Ani v jednom z těchto rozpouštědel však nebyla 11-(9*H*-karbazol-9-yl)undekanová kyselina zcela rozpuštěna. Řešit tuto nízkou rozpustnost pomocí přídavku rozpouštědla by nebylo vhodné, protože po přídavku aktivační reakce do roztoku HA by velké množství organického rozpouštědla způsobilo vysrážení HA. Jedinou možností bylo celkově zvýšit objem rozpouštědel (a zachovat poměr rozpouštědla a vody), ale v tomto případě se rozpustnost výrazně nezlepšila (viz Tabulka 10, řádky **16–19**).

Kromě změny molárního poměru HA a modifikačního činidla a prodloužení doby, během níž dochází k aktivaci modifikačního činidla, byla upravována doba vlastní modifikační reakce, změněno rozpouštědlo, měněna teplota jak aktivačního, tak reakčního kroku. Měněn byl také celkový objem rozpouštědel (a tedy celková koncentrace činidel v roztoku) či intenzita míchání směsi. Bohužel ani změna těchto parametrů nevedla k tvorbě produktu s vyšším DS.

Jistou možností jak zvýšit reaktivitu a získat deriváty s vyšším DS by mohlo být provedení reakce při vyšší teplotě. Tohle řešení je však omezeno faktem, že HA se při vyšších teplotách významnou měrou rozkládá.<sup>20</sup> Proto byla reakce vyzkoušena při teplotě 40 °C (Tabulka 10, reakce **19**), ale ani za těchto podmínek nebyl pozorován vyšší stupeň substituce.

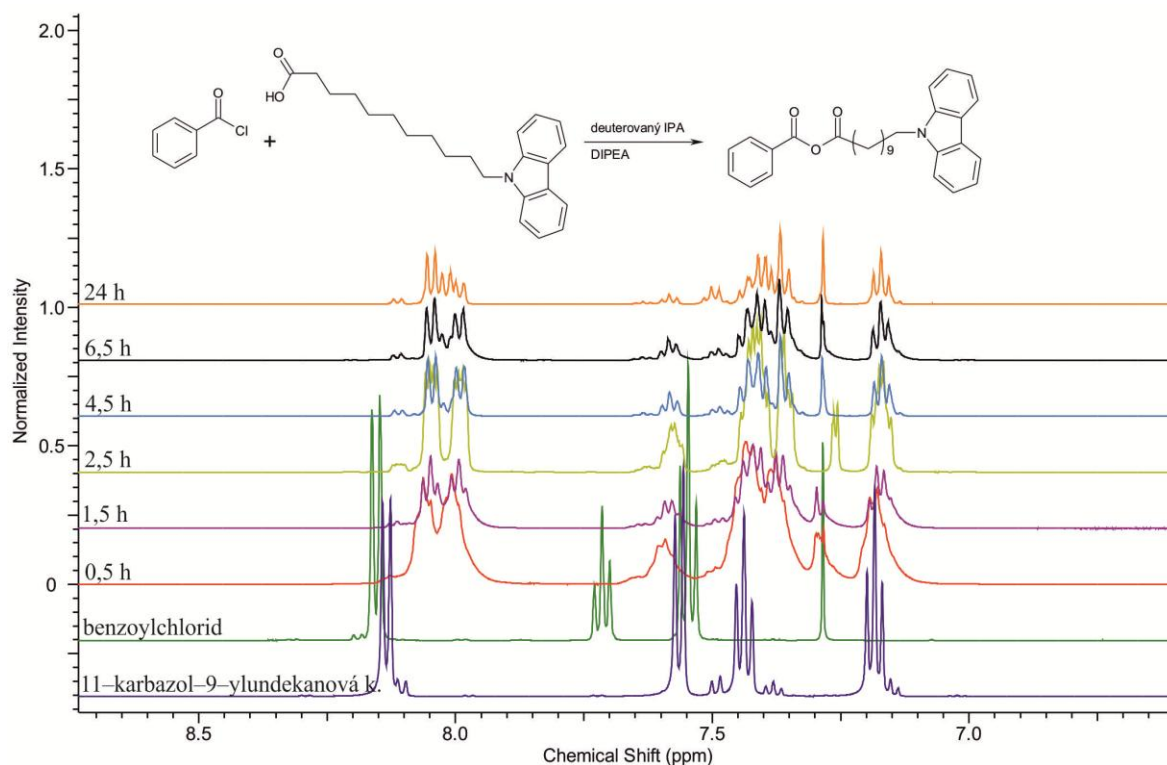
Získaný DS je uveden na jedno desetinné místo, nicméně každé stanovení s sebou nese chybu, tudíž tato hodnota je jen orientační. Ve výsledku lze říci, že všechny použité podmínky vedly ke vzniku derivátů s takřka stejným DS.

Stupeň substituce byl v tomto případě počítán pomocí integrálních intenzit signálů vodíků methylenových skupin A a B. Signál protonů methylenové skupiny **I** se překrývá s píkem methylových vodíků acetamidové skupiny *N*-acetylglukosaminu HA ( $-\text{NHC}(\text{O})\text{CH}_3$ ;  $\delta=2$  ppm) (Obrázek 40). Zbývající vodíky alifatického řetězce poskytují multiplot v oblasti  $\delta=1,2-1,0$  ppm. Ve stejné oblasti však poskytuje signál i použité rozpouštědlo IPA. V oblasti  $\delta=8,2-7,2$  ppm najdeme signály vodíkových atomů z aromatického kruhu modifikačního činidla.

Obrázek 40:  $^1\text{H}$  NMR spektrum HA–karb.

DOSY NMR spektrum stejně jako předchozích případech potvrdilo, že modifikační činidlo je na HA kovalentně navázáno. HSQC NMR spektrum derivátu HA–karb je v Příloze 3.

Stejně jako v případě derivátů HA a  $\omega$ -fenyl mastných kyselin, byl i pro derivát HA a 11-(9*H*-karbazol-9-yl)undekanovou kyselinu sledován průběh aktivační reakce v čase pomocí  $^1\text{H}$  NMR (Obrázek 41). Vzorky byly odebrány po 0,5; 1,5 2,5; 4,5; 6,5 a 24 h od startu reakce. Rozšíření signálů mohlo být způsobeno nedokonalým rozpuštěním 11-(9*H*-karbazol-9-yl)undekanové kyseliny v IPA. Na základě analýzy  $^1\text{H}$  NMR byl jako nejvhodnější aktivační doba vybrán interval 2,5 h. Poté již nedochází ke změně vzhledu spekter, a pravděpodobně tedy již nedochází k žádné reakci. Z tohoto důvodu byla v sérii modifikačních reakcí vedoucí k přípravě esterů HA použita delší doba aktivace (2,5 h místo 0,5 h).

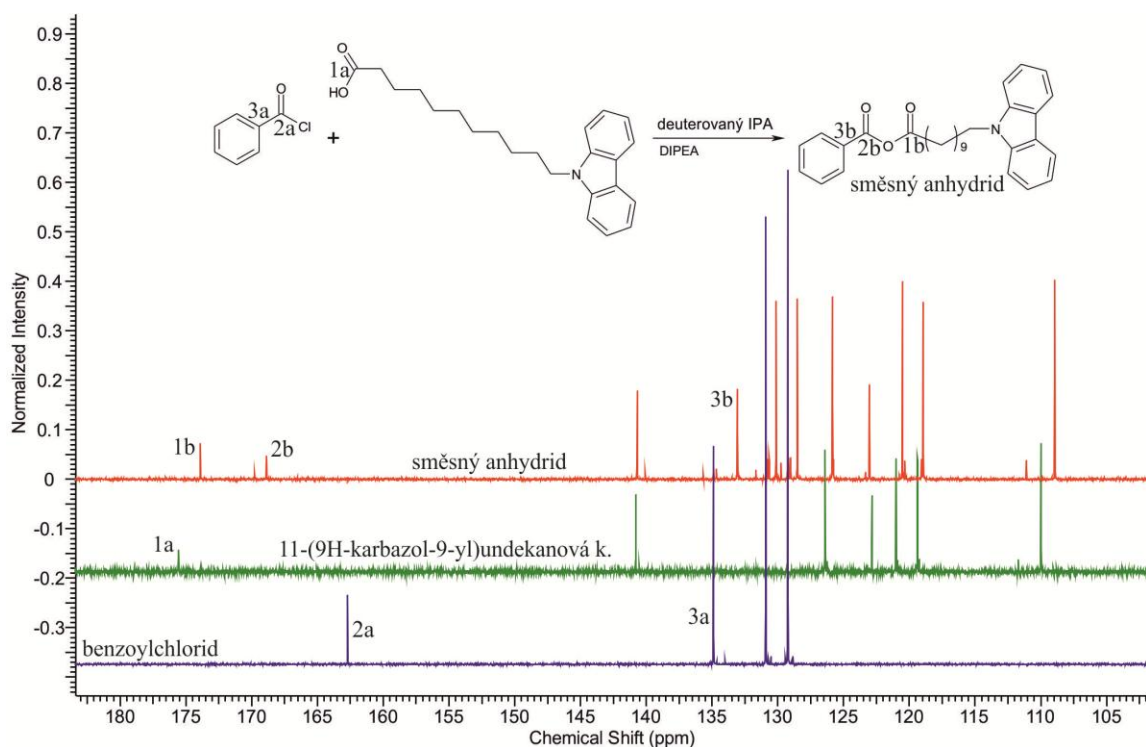


Obrázek 41:  $^1\text{H}$  NMR spektra aktivační reakce 11-(9*H*-karbazol-9-yl)undekánové kyseliny.

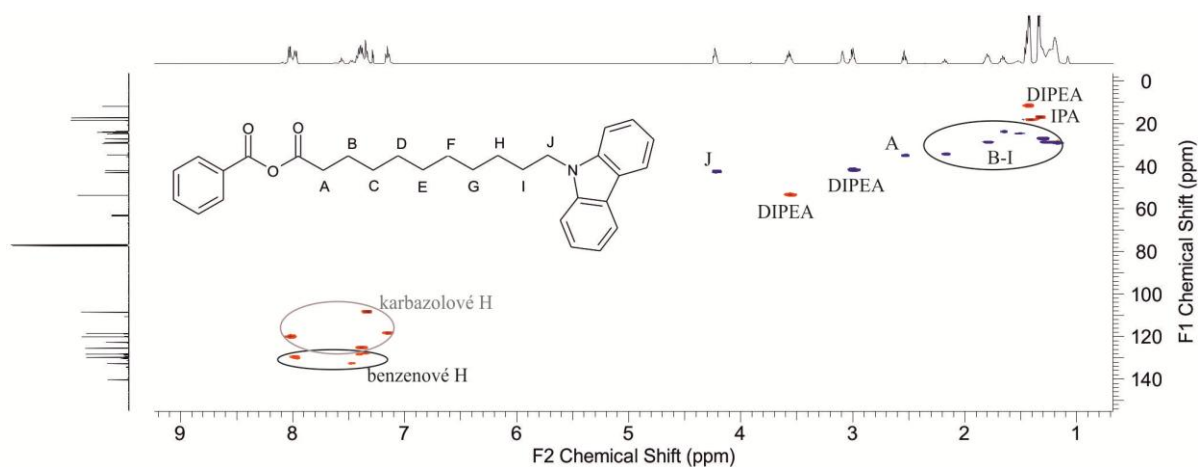
Pro úplnou charakterizaci produktu (směsného anhydridu) byla po 2,5 h změřena  $^{13}\text{C}$  a HSQC NMR spektra.

Na Obrázku 42 je část  $^{13}\text{C}$  NMR spektra směsného anhydridu vzniklého reakcí benzoylchloridu s 11-(9*H*-karbazol-9-yl)undekánovou kyselinou. Pro srovnání jsou zde uvedena i spektra výchozích látek. Vytvořením anhydridu dochází k posunu některých signálů ve spektru (nejvýznamnější jsou označeny). Mění se poloha hlavně signálů, které náleží uhlíkům nejbližší reakčního místa, tedy uhlíkům **1a** (z karboxylové skupiny 11-(9*H*-karbazol-9-yl)undekánové kyseliny), **2a** a **3a** (z benzoylchloridu). Slabý pík vlevo od píku **2b** ( $\delta=169$  ppm) patří patrně uhlíku karboxylové skupiny benzoové kyseliny, která v reakční směsi může vznikat například reakcí benzoylchloridu s vodou přítomnou v IPA.

Na Obrázku 43 je HSQC NMR spektrum reakční směsi benzoylchloridu a 11-(9*H*-karbazol-9-yl)undekánové kyseliny v deuterovaném IPA a za přítomnosti báze DIPEA, z tohoto důvodu jsou ve spektru viditelné kromě produktu i další reakční komponenty (DIPEA a IPA). HSQC spektrum bylo získáno po 2,5 h po startu reakce. Tato NMR technika pomohla přiřadit jednotlivé píky příslušným atomům.



Obrázek 42: Část  $^{13}\text{C}$  NMR spektra aktivační reakce 11-(9*H*-karbazol-9-yl)undekánové kyseliny po 2,5 h.



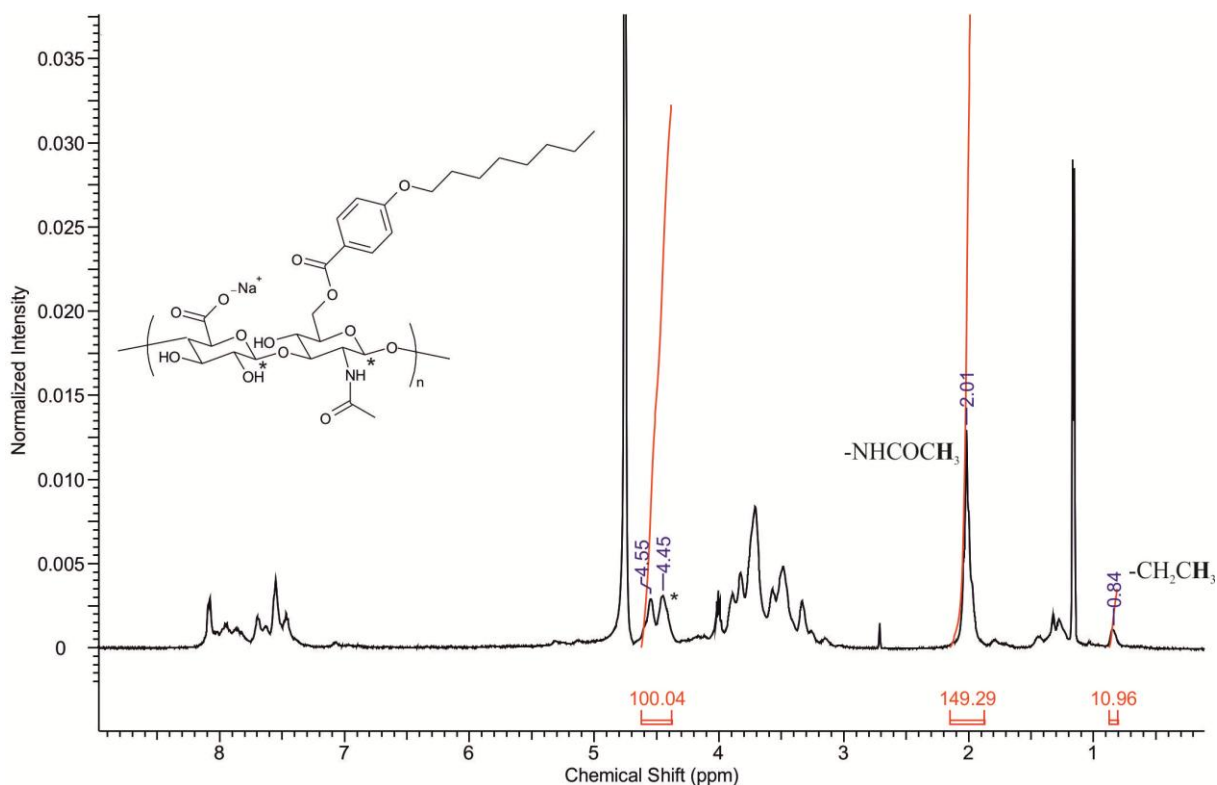
Obrázek 43: HSQC NMR spektrum aktivační reakce 11-(9*H*-karbazol-9-yl)undekánové kyseliny po 2,5 h.

### 6.1.7. Modifikace HA a 4-alkoxybenzoovými kyselinami

Posledními látkami použitými k modifikaci HA je série 4-alkoxybenzoových kyselin. Pro modifikaci HA substituovanou kyselinou benzoovou byl použit stejný postup jako v případě modifikace HA  $\omega$ -fenylmastnými kyselinami. Rozpustnost 4-alkoxybenzoových kyselin v IPA však byla oproti  $\omega$ -fenylmastným kyselinám špatná a velká část zůstala nerozpuštěna, což by mohlo způsobit tvorbu produktu s velmi nízkým DS. Když však byla ke směsi IPA a 4-alkoxybenzoové kyseliny přidána báze, došlo k lepšímu rozpuštění, které bylo indikováno projasněním směsi, i když nebylo zcela dokonalé. Z tohoto důvodu byl

přidán ještě jeden ekvivalent báze, a v tomto případě již došlo jen k malému zlepšení. Protože jsme chtěli získat deriváty se spíše vyšším DS, byly používány 3 ekv. báze. Srovnáním výsledků modifikace HA  $\omega$ -fenylmastnými kyselinami (HA- $\omega$ -FAK) a 4-alkoxybenzoovými kyselinami (HA-HBxC) (za stejných podmínek), bylo DS derivátů HA-HBxC nižší. Tohle však nemuselo být způsobeno nízkou rozpustností 4-alkoxybenzoových kyselin, ale i sterickými důvody. 4-Alkoxybenzoové kyseliny z podstaty své struktury modifikují HA tak, že benzenové jádro je velmi blízko páteři polymeru.

$^1\text{H}$  NMR spektrum derivátu HA s navázanou 4-oktyloxybenzoovou kyselinou je na Obrázku 44.



Obrázek 44:  $^1\text{H}$  NMR spektrum derivátu HA a 4-oktyloxybenzoové kyseliny.

Modifikace HA však úspěšně proběhla jen se třemi modifikačními činidly a to s 4-oktyloxy-, 4-decyloxy- a 4-dodecyloxybenzoovou kyselinou (Tabulka 11).

Také zde je pozorována modifikace HA benzoátem. Deriváty kyseliny 4-hydroxybenzoové substituované *n*-tetradecylbromidem a *n*-hexadecylbromidem jsou pravděpodobně již velmi málo reaktivní. Vysvětlením může být sbalení a propletení dlouhých alifatických

řetězců, čímž je bráněn přístup k reakčním činidlům. Tento jev není neobvyklý a při substituci polymerů byl již popsán.<sup>176</sup>

Tabulka 11: Výsledky modifikačních reakcí s využitím 4-oktyloxybenzoových kyselin.

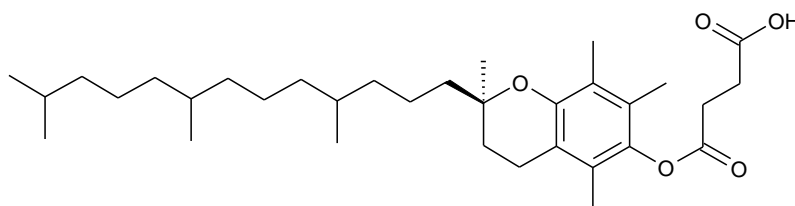
	Použitá kyselina	Použitá kyselina:HA [n:n]	DS [%]	Výtěžek [%]
<b>1</b>	HB8C	2:1	11	93
<b>2*</b>	HB8C	1:1	6	87
<b>3*</b>	HB10C	2:1	11	78
<b>4*</b>	HB12C	2:1	10	75
<b>5</b>	HB14C	2:1	--	
<b>6*</b>	HB16C	2:1	--	

\*reakce byla provedena pouze jednou.

V případě pokusu o modifikaci HA 4-tetradecyloxybenzoovou kyselinou byl pozorován velmi nízký až zanedbatelný stupeň substituce (DS < 1 %). V případě modifikace 4-hexadecyloxybenzoovou kyselinou však substituce není již téměř znatelná. Při pokusech o modifikaci HA 4-tetradecyloxybenzoovou a 4-hexadecyloxybenzoovou kyselinou bylo pozorováno malé množství navázaného benzoátu. Pro zjištění zda dochází k modifikaci HA, byly použity NMR techniky <sup>1</sup>H, DOSY a HSQC.

#### 6.1.8. Modifikace HA a DL- $\alpha$ -tokoferyl-sukcinátem

DL- $\alpha$ -Tokoferyl-sukcinát (Obrázek 45, TOSU) je derivátem tokoferolu, což je jeden z lipofilních vitaminů (vitamin E). Tokoferol se může vyskytovat v osmi stereoformách, a  $\alpha$ -tokoferol je v živočišných tkáních nejvíce zastoupená forma.  $\alpha$ -Tokoferyl-sukcinát je kancerostatická látka indukující apoptózu cílením na vazebná místa ubichinonu v dýchacím komplexu II mitochondrií nádorových buněk.<sup>177</sup>



Obrázek 45: Struktura TOSU.

Hyaluronan modifikovaný DL- $\alpha$ -tokoferyl-sukcinátem byl již popsán,<sup>178</sup> ovšem tento derivát byl napojen amidovou vazbou na karboxylovou skupinu HA, čemuž předcházelo převedení HA na kyselou formu (degradace řetězce) a úprava TOSU na formu vhodnou k napojení na karboxylovou skupinu.



V našem případě byl TOSU na HA navázán využitím stejného postupu jako v případě  $\omega$ -fenylmastných kyselin. Výchozí molární poměr disacharidu HA a DL- $\alpha$ -tokoferyl-sukcinátu byl zvolen 1:0,7 podle optimálního poměru disacharidu HA a 11-tolylundekanové kyseliny. Koncentrace HA v rozpouštědlech ( $H_2O + IPA$ ) byla pokaždé 3,1 (hm./obj.), a molekulová hmotnost HA byla 15 kDa. DL- $\alpha$ -Tokoferyl-sukcinát je stericky dosti náročné modifikační činidlo a poskytlo pouze deriváty s nízkým DS (1,1 %).

Připravené deriváty byly charakterizovány ( $^1H$  NMR, IČ) a použity pro přípravu micel s resveratrolem. U těchto micel byla určena vazebná kapacita, velikost a  $\zeta$ -potenciál. Dále byla stanovena dynamická viskozita roztoků těchto derivátů, CAC a cytotoxicita.

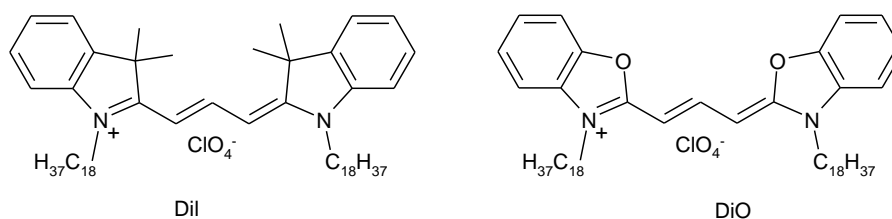
## 6.2. Stanovení stability micel s FRET barvivy

Jednou z důležitých vlastností nosičů léčiv je jejich stabilita ve fyziologickém prostředí. Po intravenózním podání na micely působí okolní prostředí (pH, soli), dostávají se do kontaktu s různými buňkami a zejména proteiny a nastává výrazné ředění. Pro použití v klinické praxi musí micely zůstat intaktní, aby mohly bránit předčasnému uvolnění léčiva.<sup>179,180</sup> Jako největší zdroj problémů se v živém prostředí jeví rychlá difúze účinných látek z micel a přítomnost krevních proteinů (albumin,  $\alpha$ -,  $\beta$ - a  $\gamma$ -globuliny), které se mohou adsorbovat na povrch micel.<sup>179,181</sup> Adsorpce sérových proteinů může indukovat předčasné uvolnění léčiva z micely díky štěpícímu efektu, který může nastat dříve, než micely dosáhnou cílových míst.<sup>181</sup> Interakce povrchu micely a proteinu výrazně naruší hydrofilně-lipofilní rovnováhu micely a ta tím ztrácí schopnost shlukování. Uvolňování léčiv z micel nastává také difúzí, která závisí na několika faktorech jako je charakter (tj. hlavně hydrofobicita) substituentů tvořící jádro micely, CAC polymeru, ze kterého je micela složena, molekulová hmotnost a molární objem léčiva či charakter použitého polymeru.

Některé publikace<sup>182-184</sup> popisují pozitivní účinek polyethylen glykolu (PEG) vázaného kovalentně na polymer (tzv. pegylace) na stabilitu micel. Mechanismus účinku zbytků PEG spočívá v bránění rozeznávání obranným systémem organismu, například makrofágy.<sup>185</sup> PEG (zpravidla o  $M_w=2-5$  kDa) bývá často používán konjugovaný s micelami připravenými z jiného polymeru, např. HA<sup>183</sup> či modifikovaného chitosanu,<sup>184</sup> nebo jako součást kopolymeru.<sup>186</sup> Jiné výzkumné skupiny však naopak popisují interakce

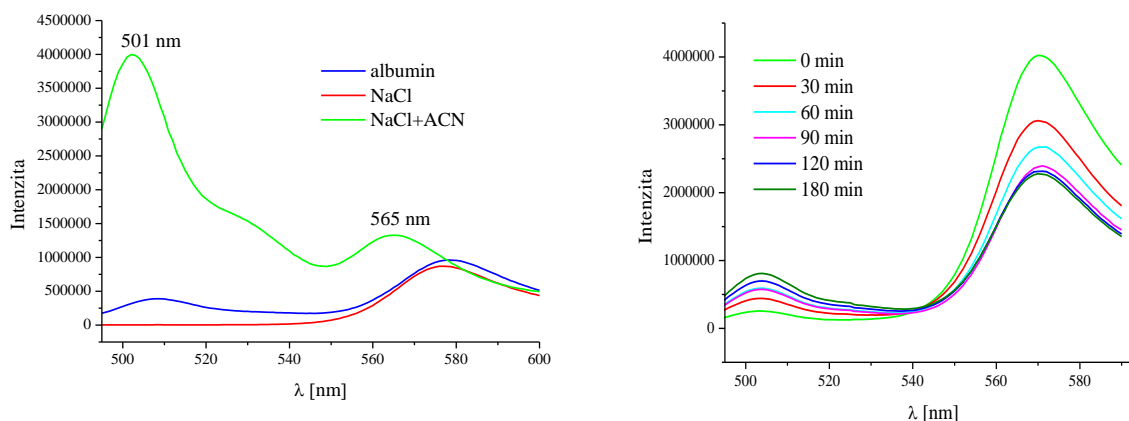
mezi PEG a proteiny nebo PEG-indukovanou tvorbu protilátek<sup>187</sup> a to i navzdory tomu, že PEG je obvykle považován za biokompatibilní polymer.<sup>180</sup>

Příliš rychlé a nekontrolované uvolňování léčiv z nosičů omezuje jejich aplikace. Pro zjištění *in vitro* stability polymerních micel v séru se používá metoda založená na principu fluorescenčního rezonančního přenosu energie (Förster resonance energy transfer, FRET). Tato metoda využívá nezářivého přenosu excitační energie mezi dvěma barvivy označovanými jako donor a akceptor. Když jsou obě tyto molekuly inkorporovány v jedné micelle a excitovány vhodnou vlnovou délkou, může nastat díky blízkosti molekul přenos energie mezi těmito molekulami, což se projeví poklesem intenzity fluorescence donoru a nárůstem intenzity fluorescence akceptoru.<sup>181</sup> Jako donor/akceptorový pár se často využívají dvojice proteinů odvozených od GFP (green fluorescence protein), nebo páry vhodných syntetických barviv, například fluorescein/rhodamin. V našem případě byla použita dvojice barviv DiO (3,3'-dioktadecyloxakarbocyanin chloristan) a Dil (1,1'-dioktadecyl-3,3,3',3'-tetramethylindikarbocynin chloristan) (Obrázek 46).



Obrázek 46: Struktura barviv Dil a DiO.

Excitační vlnová délka donoru (DiO) je 484 nm, po přenosu energie na akceptor (Dil) dochází k vyzáření energie o vlnové délce 565 nm. Energetický přenos nastane pouze tehdy, jsou-li molekuly donoru a akceptoru ve velmi těsném kontaktu. Když dojde k rozpadu micel a molekuly jsou uvolněny do prostředí, oddálí se od sebe a FRET efekt vymizí.<sup>181,188</sup> V takovémto případě dojde k posunu píku emise z 565 nm k 501 nm, což odpovídá fluorescenci samotného donoru.



Obrázek 47: Emisní spektrum micel derivátu HA-4C v různých roztocích (vlevo), emisní spektra micel derivátu HA-4C v přítomnosti roztoku albuminu v čase (vpravo).

Obrázek 47 (vlevo) zachycuje emisní spektrum micel HA-4C. Modrá linie odpovídá micelám rozpuštěným v roztoku albuminu, červená linie pak micelám rozpuštěným v 0,9 % vodném roztoku NaCl (fyziologický roztok) a zelená linie odpovídá roztoku micel v  $1 \text{ cm}^3$  0,9 % vodném roztoku NaCl s přídavkem  $3 \text{ cm}^3$  acetonitrilu. Přidání acetonitrilu k micelám způsobuje jejich destrukci a uvolnění FRET barviv do roztoku. Naproti tomu ve fyziologickém prostředí (Obrázek 47 vlevo, červená linie) nepozorujeme pík při 501 nm, což naznačuje, že micely zůstávají stabilní. V přítomnosti albuminu se micely sice pomalu rozpadají (malý pík při 501 nm, Obrázek 47 vlevo, modrá linie), ale zároveň je zachováno značné množství intaktních micel. Jsou-li micely v přítomnosti albuminu nestabilní, je možné v emisních spektrech pozorovat v čase zvyšování intenzity píku při 501 nm a snižování píku při hodnotě 565 nm (Obrázek 47, vpravo).

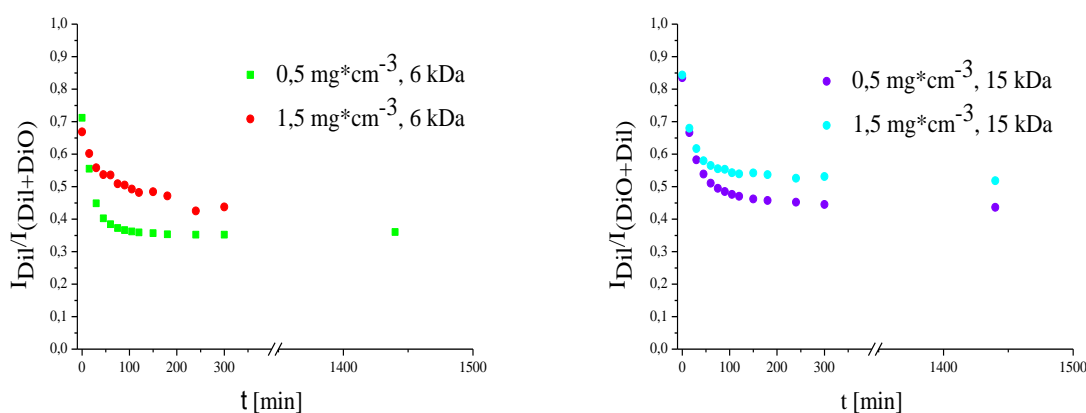
### 6.2.1. Stanovení stability micel

Micely s FRET barvivy byly připraveny odpařovací metodou. Donor i akceptor (DiO a Dil) byly rozpuštěny v IPA a tento roztok byl smísen s vodným roztokem modifikované HA, do jehož micel měla být tato barviva inkorporována. Pomalým odpařením rozpouštědel došlo k vytvoření micel a uzavření těchto barviv do jader micel.

Stabilita připravených micel byla studována sledováním fluorescence inkorporovaných barviv v čase. Připravené micely s enkapsulovanými FRET barvivy byly bezprostředně před měřením rozpuštěny ve fyziologickém roztoku v přítomnosti hovězího sérového albuminu o koncentraci  $40 \text{ mg} \cdot \text{cm}^{-3}$ , což odpovídá koncentraci analogického proteinu v lidském séru.<sup>189</sup> Roztoky micel byly připraveny v koncentracích 0,5 a  $1,5 \text{ mg} \cdot \text{cm}^{-3}$ . Proměřeny byly i deriváty HA modifikovaného stejným modifikačním činidlem, ale lišící

se molekulovou hmotností použitého HA. Stabilita micel nosiče byla stanovena porovnáním intenzit pík akceptoru a donoru  $I_{\text{DiI}}/(I_{\text{DiI}}+I_{\text{DiO}})$ . Získané výsledky byly zaneseny do grafů znázorňujících závislost poměru  $I_{\text{DiI}}/(I_{\text{DiI}}+I_{\text{DiO}})$  na čase.<sup>190</sup>

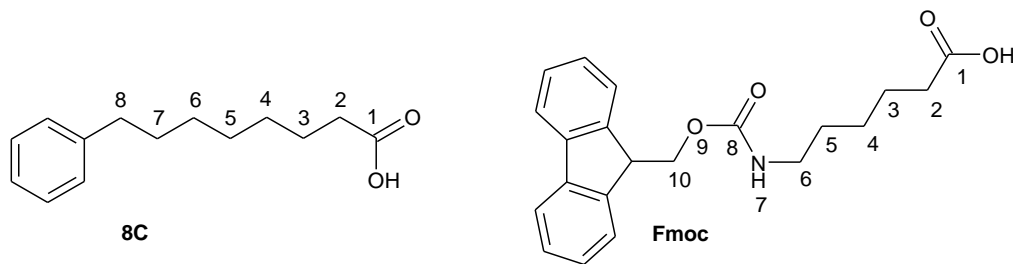
Na Obrázku 48 jsou výsledky sledování stability micel derivátů HA-4C v přítomnosti albuminu. Z Obrázku 48 vlevo je patrné, že již v čase nula (první měření) ihned po rozpuštění micel v roztoku albuminu, docházelo k jejich rozpadu a to při obou studovaných koncentracích, 0,5 i 1,5  $\text{mg}\cdot\text{cm}^{-3}$ . Tento proces pokračoval velice rychle a již během první hodiny po vystavení působení roztoku albuminu byla velká část micel nekompaktní. Na Obrázku 48 vlevo je vyneseno srovnání rozdílů stabilit micel derivátů HA-4C s HA  $M_w=6$  kDa (DS=32 %) při koncentraci 0,5 a 1,5  $\text{mg}\cdot\text{cm}^{-3}$ , vpravo jsou srovnány micely těchto derivátů připravených z HA o  $M_w=15$  kDa (DS=36 %) při týchž koncentracích jako v předchozím případě. V obou případech zůstávalo zachováno větší množství intaktních micel při vyšších počátečních koncentracích, nicméně i tak byla jejich stabilita velmi špatná. Také zde bylo možné pozorovat rychlejší degradaci pro méně koncentrované roztoky, což souhlasí s již dřívějšími pozorováními.<sup>180</sup>



Obrázek 48: Stabilita HA-4C derivátů v čase 0–24 h.

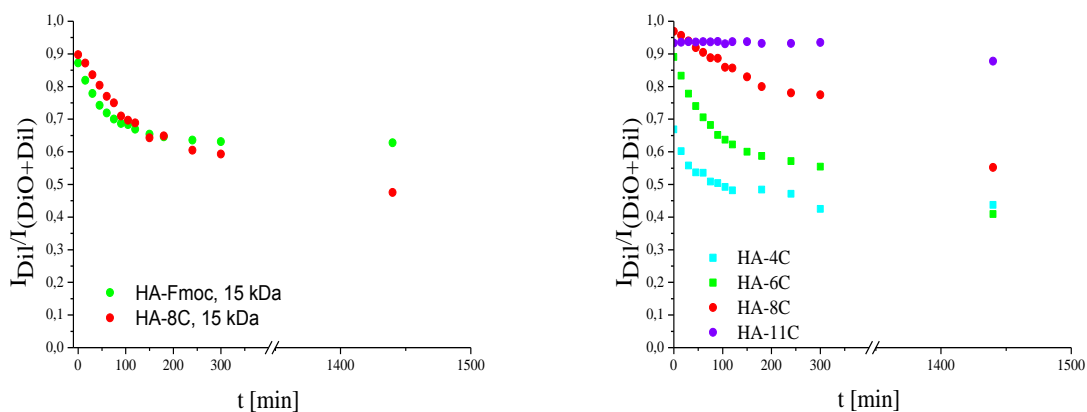
Na Obrázku 50 vlevo je porovnána stabilita micel derivátů HA-8C ( $M_w=15$  kDa, DS=37 %) a HA-Fmoc ( $M_w=15$  kDa, DS=14 %) při koncentraci 1,5  $\text{mg}\cdot\text{cm}^{-3}$ . Je patrné, že stabilita těchto derivátů byla takřka totožná, přestože dříve bylo pozorováno zvyšování stability micel se zvyšováním délky alifatického řetězce modifikačního činidla (Obrázek 49). Z tohoto důvodu byla pro micely derivátu HA-Fmoc očekávána větší stabilita než pro micely derivátu HA-8C. Důvodem tohoto jevu může být přítomnost hydrofilních

skupin v řetězce alkylačního činidla Fmoc, které mohou bránit vytvoření micel odolnějších ataku krevních proteinů (zde konkrétně albuminu).



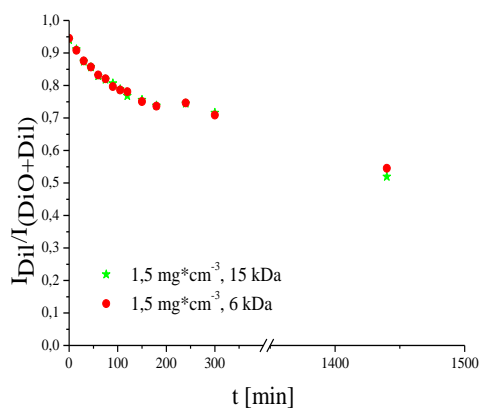
Obrázek 49: Struktury substituentů navázaných na HA.

Na Obrázku 50 vpravo je zachycen trend závislosti stability micel na délce alifatického řetězce použitého modifikačního činidla pro deriváty HA-4C, HA-6C, HA-8C a HA-11C. Z poměru  $I_{DiI}/(I_{DiI}+I_{DiO})$  lze pozorovat, že stabilita micel s délkou řetězce stoupala. Pomaleji se rozpadající micely si zachovávaly tento poměr v čase vyšší. Prodlužování délky řetězce pravděpodobně umožňuje lepší uspořádání jádra micely (benzenových jader modifikačního činidla) a vytvoření stabilnější micely. Micely derivátu HA-11C se jeví jako téměř optimálně stabilní a během sledování docházelo k rozpadu jen zanedbatelného množství micel.



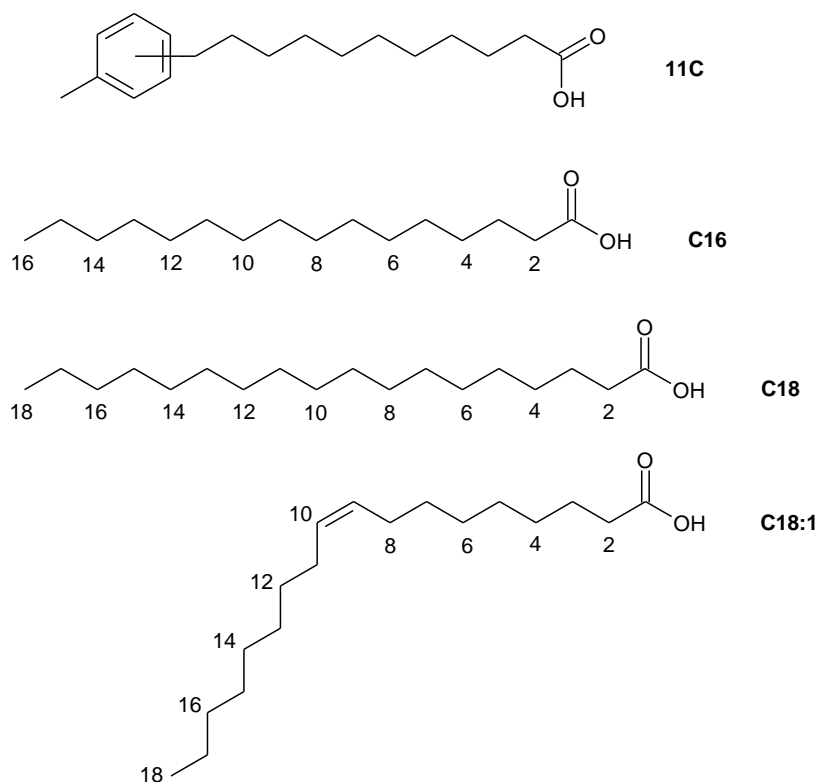
Obrázek 50: Srovnání stability HA-8C a HA-Fmoc (vlevo), srovnání stability micel derivátů HA-4C, HA-6C, HA-8C a HA-11C,  $M_w=15$  kDa,  $c=1,5$  mg·cm<sup>-3</sup> (vpravo).

Na Obrázku 51 je zobrazeno porovnání stability micel připravených z derivátů HA-6C lišících se molekulovou hmotností výchozího HA. Tímto pokusem jsme si potvrdili předpoklad, že stabilita micel nezávisí na molekulové hmotnosti původního HA. Stupeň substituce obou derivátů byl obdobný (DS=55 % a 47 % pro 6 a 15 kDa).



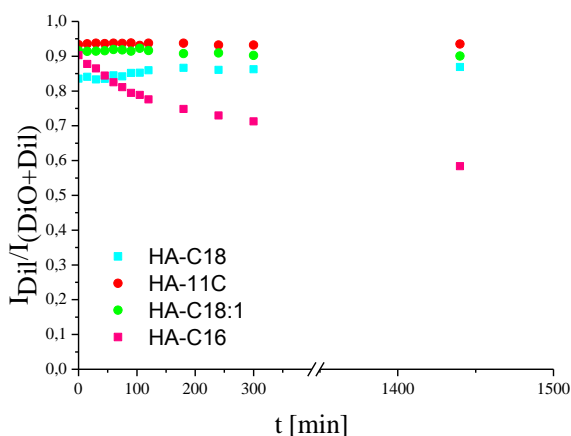
Obrázek 51: Porovnání stability micel HA-6C o Mw = 6 a 15 kDa.

Pro porovnání byly změřeny stability micel připravených z HA modifikovaného kyselinami bez aromatických jader – kyselinami stearovou (derivát HA-C18, DS=11 %), palmitovou (HA-C16, DS=14 %) a olejovou (HA-C18:1, DS=14 %). Tyto substituenty mají přibližně stejný počet uhlíkových atomů jako substituent v derivátu HA-11C (struktury karboxylových kyselin použitých pro modifikaci HA jsou uvedeny na Obrázku 52) a jsou produktem firmy Contipro. Derivát HA-C18:1 je považován za velmi dobrý nosičový systém.



Obrázek 52: Struktury karboxylových kyselin použitých pro modifikaci HA.

Micely HA–C16 jevíly známky nestability (intenzita emise donoru v čase klesá) (Obrázek 53), ale micely derivátů HA–11C, HA–18C a HA–C18:1 vykazovaly akceptovatelnou stabilitu po celou dobu experimentu. Pokud porovnáme stability těchto micel se stabilitami micel derivátu HA–11C, můžeme konstatovat, že stabilita micel připravených z nového derivátu HA–11C je srovnatelná se stabilitou micel HA–C18:1. Deriváty HA–11C a HA–C18:1 vytváří micely, které jsou v přítomnosti albuminu stabilní, protože ve sledovaném čase nedocházelo k pozorovatelnému rozpadání micel.

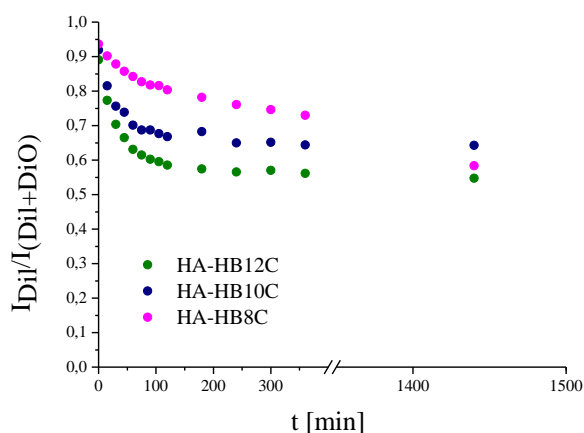


Obrázek 53: Srovnání stabilit micel HA–11C, HA–C18, HA–C16 a HA–C18:1 při koncentraci  $0,5 \text{ mg}\cdot\text{cm}^{-3}$ .

Další série testovaných micel byly micely připravené z derivátů HA a 4-alkoxybenzoových kyselin. Na Obrázku 54 je zachycena závislost poměru intenzit jednotlivých FRET barviv na čase při koncentraci micel v roztoku  $1,5 \text{ mg}\cdot\text{cm}^{-3}$ .

Všechny testované micely (HA–HB12C, HA–HB10C, HA–HB8C) se však v přítomnosti albuminu jevíly jako nestabilní. Pro micely tohoto typu derivátů nebyly pozorovány rozdíly jejich stability v závislosti na zvyšující se délce řetězce, ale opačný trend. Jako nejstabilnější byly vyhodnoceny micely s nejkratším alifatickým řetězcem, tj. 8 uhlíků. Možné vysvětlení tohoto trendu je bránění tvorby  $\pi\cdots\pi$  interakcí mezi benzenovými kruhy jádra micely alkylovými řetězci. Tahle teorie však nevysvětluje, proč stabilita s délkou řetězce klesá, protože stabilita micel z derivátů HA a kyseliny palmitové a stearové měla vzrůstající tendenci. Jiným možným vysvětlením klesající stability je přítomnost benzenového jádra, které je poměrně veliké a stericky náročné (náročnější než alifatický řetězec v případě palmitové či stearové kyseliny) a neumožní tak těsnější uspořádání jádra micel. Micely pak nejsou dostatečně kompaktní a snáze dochází k jejich rozpadu.

S klesající délkou alifatického řetězce 4-alkoxybenzoových kyselin jsou pak micely kompaktnější a tedy i stabilnější.



Obrázek 54: Stabilita micel v čase v přítomnosti albuminu.

Micely všech derivátů HA modifikovaným 4-alkoxybenzoovými kyselinami byly vyhodnoceny jako v čase málo stabilní a málo odolné krevním proteinům, a tudíž nevhodné pro použití jako nosičový systém. Naproti tomu, stabilita micel derivátu HA-11C byla velmi dobrá, což by umožnilo aplikaci takového nosičového systému do krevního řečiště.

Výše zmíněné výsledky ukazují na fakt, že pro stabilitu micel je velmi důležitým faktorem koncentrace testovaných micel a také struktura jejich jader. Protože stabilita micel stoupá s délkou alifatického řetězce  $\omega$ -fenylmastných kyselin, je možné, že delší řetězec umožní lepší uspořádání jádra a tedy zajistí větší „pevnost“ micel a jejich stabilitu. Naopak nebyla pozorována závislost stability micel na použité molekulové hmotnosti HA.

### 6.3. Stanovení kritické asociační koncentrace

#### 6.3.1. Fluorescenční stanovení kritické asociační koncentrace

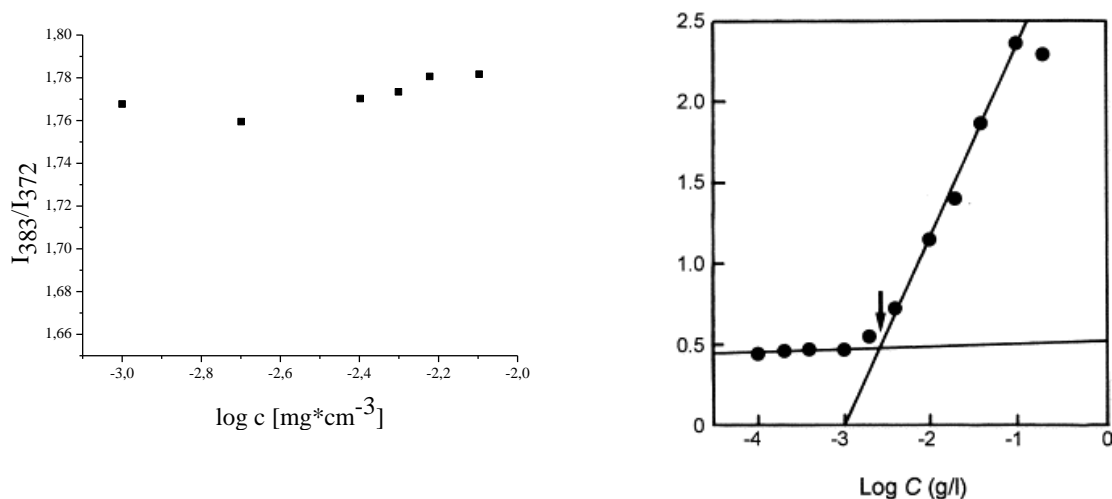
Kritická asociační koncentrace (CAC) je významný ukazatel kvality polymerních micel popisující hraniční koncentraci, při které dochází k samoshlukování (či naopak rozpadu micel).<sup>191</sup>

U látek schopných tvořit micely se CAC zpravidla stanovuje proměřením série roztoků o rozdílné koncentraci připravených rozpuštěním micel s inkorporovanou fluorescenční sondou. Koncentrace roztoků je nutno zvolit tak, aby v nejméně koncentrovaných roztocích byl amfifilní derivát ve formě samostatných řetězců (v takovém případě nejsou přítomny micely a fluorescenční sonda je uvolněna v roztoku). Nejvíce koncentrované

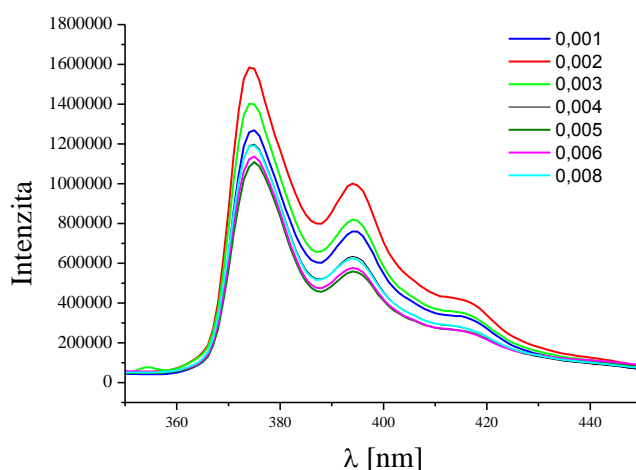


roztoky by pak zcela určitě měly obsahovat micely. Jako fluorescenční sonda se nejčastěji využívá pyren.<sup>192-194</sup> Pyren je ve vodě nerozpustná látka poskytující fluorescenční spektra v závislosti na povaze prostředí (polární roztok/nepolární prostředí jádra micely).<sup>193</sup> Je-li stanovovaný derivát v podobě klasického roztoku (micely nejsou vytvořeny), pyren je dispergován ve vodném prostředí. V okamžiku, kdy dojde ke tvorbě micel, pyren je uzavřen v hydrofobním jádře micely a poskytuje jiné fluorescenční spektrum. Pyren poskytuje ve fluorescenčním spektru pět výrazných píků. Pík při vlnové délce 383 nm je nejcitlivější na změnu polaritu prostředí.<sup>195</sup> Kritická asociační koncentrace se zjistí vnesením poměrů intenzit píků pyrenu při vlnových délkách 383 a 372 nm vůči logaritmu koncentrace jednotlivých roztoků.

Micely derivátu HA-4C s inkorporovaným pyrenem byly použity pro přípravu koncentrační řady roztoků v rozmezí 0,001–0,008 mg·cm<sup>-3</sup> (Obrázek 55 vlevo). Obrázek 55 vpravo znázorňuje výsledky stanovení CAC pomocí pyrenu jako fluorescenční sondy převzaté z literatury.<sup>196</sup> Hledaná CAC odpovídá bodu zlomu závislosti (označený šipkou). Průběh závislosti měření CAC micel derivátu HA-4C je odlišný od očekávaného, tedy od průběhu závislosti uvedeného v literatuře. Naměřená data nevykazují žádný zlom v křivce (měření bylo opakováno i s větším množstvím bodů a byla upravována osa Y, abychom zjistili, zda jen není špatně zvolené měřítko). Bylo pozorováno pouze snižování intenzity emise se stoupající koncentrací roztoků (Obrázek 56). Toto pozorování můžeme interpretovat například tak, že CAC v tomto rozsahu koncentrací nenastává. Nicméně, tuto možnost jsme vyvrátili stanovením CAC s Nilskou červení jako fluorescenční sondou (bude diskutováno dále). Pravděpodobnější je ale varianta, že může docházet ke zhášení fluorescence. Protože bylo toto měření opakováno, lze vyloučit chybu zapříčiněnou například nesprávnou koncentrací či jinou nesprávnou přípravou roztoků.

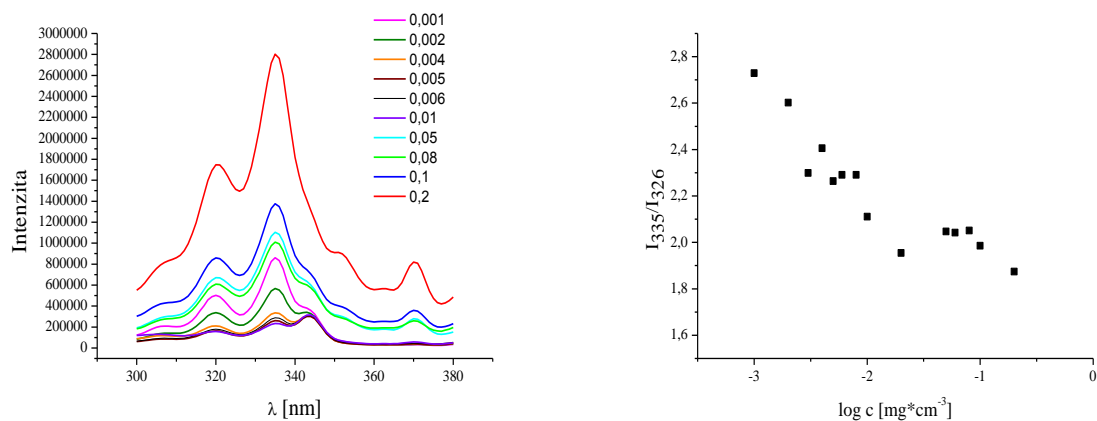


Obrázek 55: Emisní spektra micel s inkorporovaným pyrenem (vlevo), data z literatury<sup>196</sup> (vpravo).



Obrázek 56: Emisní spektra micel s inkorporovaným pyrenem.

Měřením fluorescence za pomoci pyrenu tedy CAC nemohla být stanovena. Je ovšem popsán jiný přístup vedoucí ke zjištění CAC derivátů, který by mohl nesnáze s měřením emisních spekter pyrenu obejít. Vyzkoušeli jsme tedy změřit nikoliv emisní, ale absorpční spektra.<sup>196</sup> Absorpční spektra (Obrázek 57, vlevo) však vykazovala stejnou nepravidelnost v závislosti na koncentraci jako spektra emisní a vnesením závislosti poměru intenzit (píků při vlnových délkách 335 a 326 nm) na logaritmu koncentrace do grafu (Obrázek 57, vpravo) opět neumožnilo zjistit CAC.



Obrázek 57: Absorpční spektra roztoků micel s inkorporovaným pyrenem.

Abychom vyloučili možnost, že problém nastává například jen při fluorescenčních měřeních, byla provedena měření pomocí UV/Vis spektroskopie. Nejprve byla proměřena kalibrační křivka samotného pyrenu a poté roztoky micel derivátů HA–4C. Jak roztoky pyrenu pro stanovení kalibrační řady, tak roztoky micel byly připraveny dvakrát, protože výsledky získané z prvního měření neměly logickou závislost (se snižující koncentrací micel se nesnižuje množství pyrenu) a druhé měření mělo tyto výsledky buďto potvrdit nebo získat výsledky správné.

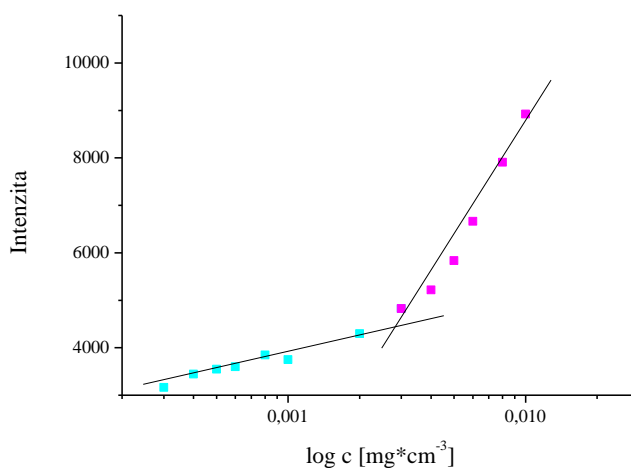
Tabulka 12: Výsledky UV/Vis stanovení množství pyrenu.

	$c$ [ $\text{mg}\cdot\text{cm}^{-3}$ ]	% [w/w]
A	2	0,15
B		0,07
A	1	0,32
B		0,16
A	0,5	0,18
B		0,19

Z Tabulky 12 je patrné, že měření množství pyrenu v nosiči není reprodukovatelné. Tyto dva typy měření (fluorescenční i UV/Vis) naznačují, že problém může být způsoben například interakcemi mezi pyrenem a hydrofobním jádrem micely.

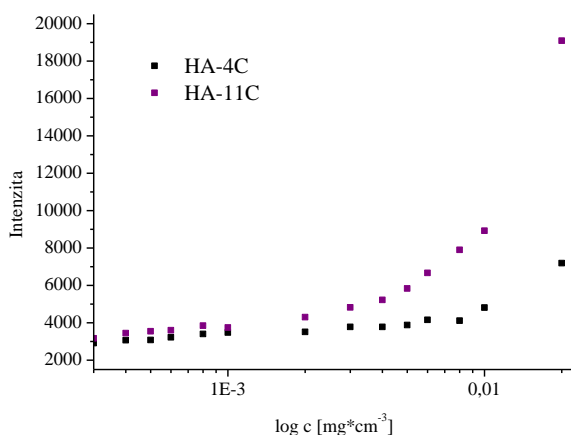
Z důvodu neúspěšného stanovení CAC amfifilních derivátů HA pomocí pyrenu jako fluorescenční sondy byl pyren nahrazen Nilskou červení.<sup>197</sup> Postup tohoto stanovení je totožný jako v případě použití pyrenu. Na Obrázku 58 je ukázána závislost intenzity záření na koncentraci micel derivátu, jehož CAC je stanovována, v tomto případě derivátu HA–4C. Průběh křivky v tomto obrázku je optimální pro stanovení hodnoty CAC. Hodnota

CAC byla nalezena při koncentraci  $0,003 \text{ mg}\cdot\text{cm}^{-3}$  jako průsečík přímek proložených oběma rameny závislosti. Stanovené hodnoty CAC derivátů  $\omega$ -fenylmastných kyselin jsou shrnuty v Tabulce 13. Deriváty pro měření byly vybrány tak, aby měly zhruba stejný DS. Nicméně je patrné, že stoupající délka alkanového řetězce  $\omega$ -fenylmastné kyseliny nemá na hodnotu CAC výraznější vliv.



Obrázek 58: Závislost intenzity záření na koncentraci micel derivátu HA-4C.

Na Obrázku 59 je uvedeno srovnání průběhů křivek závislosti intenzity záření fluorescenční sondy na koncentraci roztoků derivátu HA. Intenzita fluorescence Nilské červeně inkorporované do derivátu HA-11C narůstá výrazně strměji než intenzita fluorescence Nilské červeně inkorporované do derivátu HA-4C. Tenhle trend napovídá, že derivát HA-11C v okamžiku překročení hodnoty CAC začíná vytvářet velmi kompaktní micely, které fluorescenční sondu pevně uzavřou do svého hydrofobního jádra.



Obrázek 59: Srovnání křivek micel derivátů HA-4C a HA-11C.

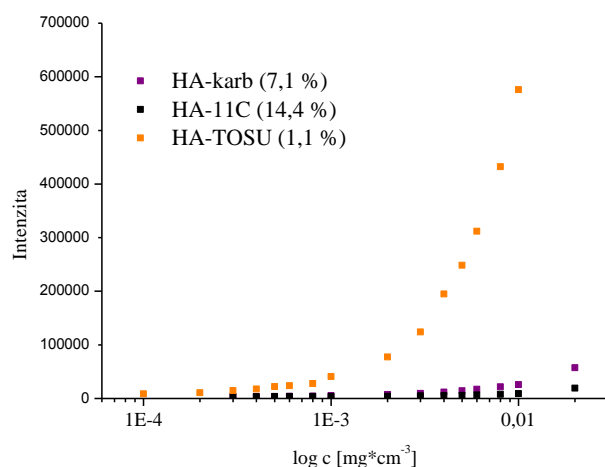
Stanovené hodnoty CAC jsou dostatečně nízké pro aplikace v oblasti nosičových systémů. Hodnoty CAC polymerních micel připravených z roubovaných polymerů popsanych v literatuře se pohybují ve stejných řádech<sup>198,199</sup> či jsou řádově vyšší.<sup>191,192,194</sup>

Tabulka 13: Hodnoty CAC jednotlivých derivátů.

Derivát	DS [%]	CAC[ mg·cm <sup>-3</sup> ]
HA-4C	14	0,004
HA-6C	15	0,003
HA-8C	18	0,003
HA-11C	13	0,003
HA-karb	7	0,001–0,002
HA-TOSU	1	0,001

Zavedením stericky náročnějšího a na  $\pi$ -elektrony bohatšího substituentu na řetězec 11-bromundekanové kyseliny lze předpokládat nižší CAC. Křivka závislosti intenzity záření na koncentraci pro derivát HA-karb (DS=7,1 %) je uvedena na Obrázku 60. Pro srovnání je zde uvedena i táž závislost derivátu HA-11C (DS=14,4 %). Agregace derivátu HA-karb nastává při koncentraci 0,001–0,002 mg·cm<sup>-3</sup>. Hodnoty CAC jsou pro oba tyto deriváty blízké, průběh křivek se však liší. Křivka derivátu HA-karb po dosažení CAC stoupá výrazně strměji než křivka derivátu HA-11C. Tento rozdíl lze opět přisoudit tvorbě kompaktnějších micel. Zde je nutno zmínit fakt, že derivát HA-karb má zhruba o

polovinu nižší DS (DS=7,1 %) oproti zbývajícím derivátům série HA- $\omega$ -fenylmastná kyselina (DS $\approx$ 15 %).



Obrázek 60: Srovnání tokových křivek roztoků derivátů HA-karb, HA-11C a HA-TOSU.

Také hodnota CAC derivátu HA-TOSU byla stanovena fluorescenčně za využití Nilské červeně jako fluorescenční sondy. V tomto případě má CAC hodnotu 0,001 mg·cm<sup>-3</sup>, obdobně jako derivát HA-karb.

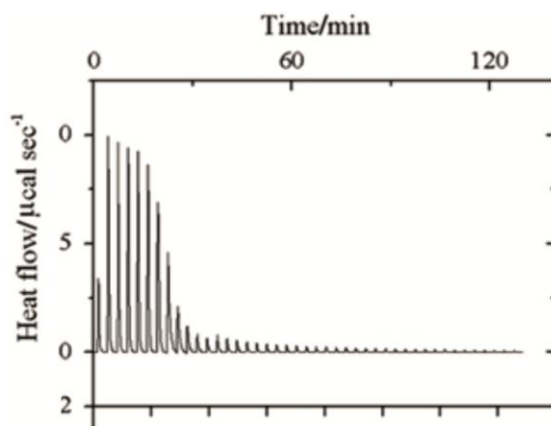
Na základě těchto výsledků lze konstatovat, že hodnota CAC není výrazněji ovlivněna strukturami použitých substituentů. Zajímavé je však srovnat průběh křivek jednotlivých typů micel. Srovnání průběhů křivek (například Obrázek 60 nebo Obrázek 61) vede k úvaze, že u derivátů HA-TOSU a HA-karb, oproti ostatním derivátům, může docházet při dosažení hodnoty CAC k výraznému asociačnímu chování derivátu a vytváření kompaktních micel zajišťujících těsný kontakt mezi fluorescenční sondou a hydrofobním jádrem micely.

### 6.3.2. Stanovení CAC pomocí izotermální titrační mikrokolorimetrie

Izotermální titrační kalorimetrie (ITC) je zavedená analytická technika rutinně používaná ke zjišťování termodynamických parametrů mnoha chemických a biologických systémů a dějů. Tvorba micel je termodynamický proces, tudíž je teoreticky možné pomocí ITC stanovit CMC/CAC\*\* (ref<sup>200</sup>), entalpii, entropii a volnou energii micelace amfifilních derivátů. ITC technika je založena na měření tepla, které je uvolňováno či absorbováno během interakcí komponent systému.<sup>201</sup> Tato technika je vysoce citlivá, a tudíž předčí

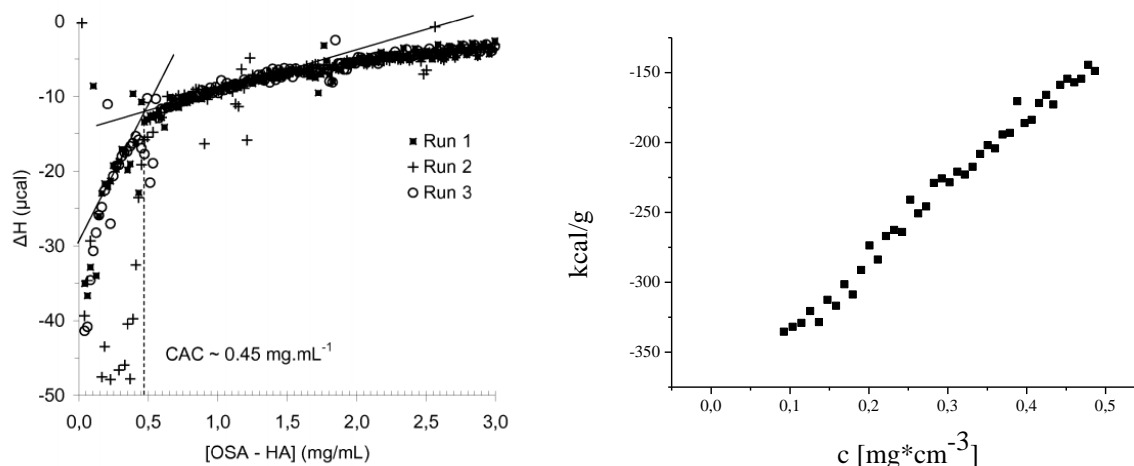
\*\* Termín CMC se používá tehdy, hovoříme-li o surfaktantech, kdežto pro polymerní systémy se používá termín CAC.

tradičtější techniky pro stanovení CMC/CAC jako je konduktometrie či měření dielektrické konstanty.<sup>202,203</sup> Nicméně, podmínkou nutnou je, aby studovaný proces měl dostatečné tepelné zabarvení. Stanovení CAC polymerů touto technikou je výhodné z toho důvodu, že polymer nemusí být pro stanovení nikterak upravován, modifikován či značen. Stanovení CMC/CAC pomocí ITC<sup>201,204</sup> probíhá tak, že mikrobyreta kalorimetru je naplněna roztokem surfaktantu/polymeru, který je po malých dávkách přidáván do cely obsahující totéž rozpouštědlo (zpravidla voda nebo pufr), které bylo použito pro rozpuštění surfaktantu/polymeru. Během prvních přídavek, kdy je v cele jen nízká koncentrace surfaktantu/polymeru, jsou pozorovány tepelné efekty signalizující disociaci přidávaných micel. V okamžiku kdy koncentrace surfaktantu/polymeru přesáhne hodnotu CMC/CAC, k disociaci již nedochází a termické efekty se výrazně snižují (Obrázek 61). Nepatrné entalpické změny, které jsou poté pozorovány, náleží ředění micel a nikoliv jejich rozpadu.<sup>203</sup>



Obrázek 61: Záznam titrace roztokem polymeru.<sup>203</sup>

Na Obrázku 62 vlevo je ukázána křivka závislosti entalpie na koncentraci amfifilního polymeru (HA modifikovaný oktadecenyl sukcinanhydridem). Na této křivce je patrné, že při určité koncentraci dochází k jejímu zlomu a od této koncentrace se tvar křivky výrazně mění.<sup>205</sup> Námí naměřené křivky charakteristický zlom v použitém intervalu koncentrací nevykazovaly (viz například měření derivátu HA-4C na Obrázku 62 vpravo). Proměřeno bylo několik vzorků derivátů HA-4C (o různých DS), HA-6C, HA-8C, HA-11C i HA-C18:1 a vybrané vzorky byly proměřeny v různých koncentracích 0,033; 0,33; 3,27; 9,6 a 16,5 mg·cm<sup>-3</sup>. Bohužel v žádném případě nebyl pozorován zlom entalpické křivky.



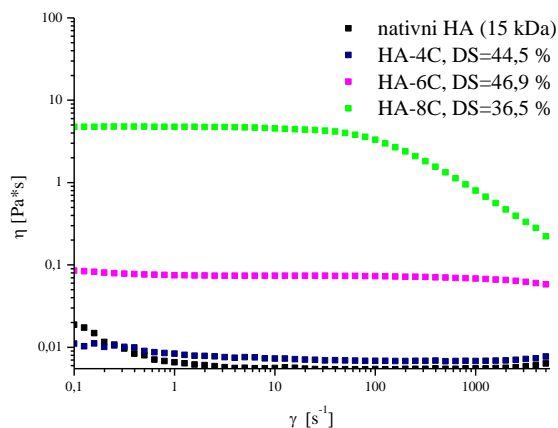
Obrázek 62: Zlom křivky závislosti entalpie na koncentraci polymeru, obrázek z literatury (vlevo)<sup>205</sup>, závislost entalpie na koncentraci našich derivátů.

#### 6.4. Dynamická viskozita

Dynamická viskozita je mírou vnitřního odporu způsobeného vnitřním mezimolekulovým třením, který musí kapalina překonat, aby došlo k jejímu toku. Čím větší mezimolekulové síly jsou, tím vyšší je dynamická viskozita roztoku. Viskozita roztoku pravděpodobně souvisí s rychlostí uvolňování léčiva z nosičových systémů. Zvyšující se viskozita roztoku nosičového systému pravděpodobně způsobuje pomalejší uvolňování léčiva ze systému.<sup>206,207</sup> Pomalé uvolňování léčiva je velmi důležitý parametr, který by měly nosičové systémy splňovat.

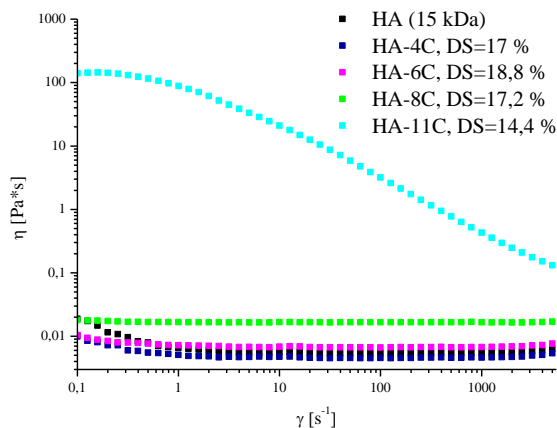
Na Obrázku 63 je znázorněna závislost dynamické viskozity (osa y) na smykové rychlosti (osa x). Porovnány jsou deriváty s DS okolo 40 % a přírodní HA. Z grafu je vidět, že viskozita roztoků derivátů stoupá s délkou řetězce modifikačního činidla. Derivát HA-11C nebyl s tak vysokým DS připraven, a není tedy možné viskozitu jeho roztoku porovnat s ostatními deriváty této řady.





Obrázek 63: Dynamická viskozita přírodního a modifikovaného HA ( $DS \cong 40\%$ ).

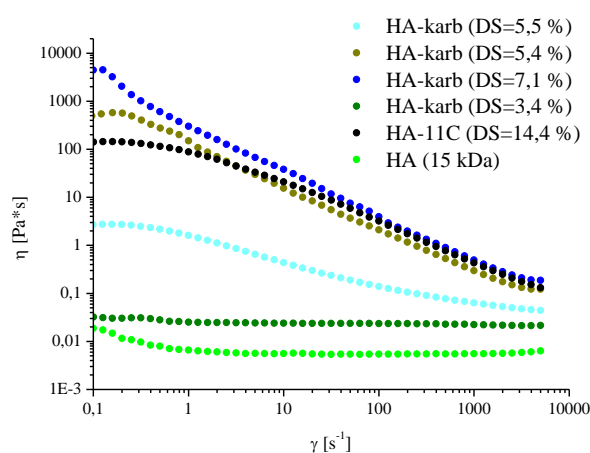
V Obrázku 64 je zanesena obdobná závislost, ale pro roztoky derivátů s  $DS$  okolo 17 %. Zde je pozorován stejný trend jako v případě roztoků derivátů s vyšším  $DS$ , tedy viskozita stoupající s délkou řetězce alifatického činidla. Nejvyšší viskozita byla pozorována u roztoku derivátu HA-11C. Jeho viskozita je dokonce vyšší než viskozita roztoků derivátů s  $DS \cong 40\%$ . Vysoká viskozita roztoku tohoto derivátu byla pozorována již pouhým okem, protože deriváty HA-4C, HA-6C a HA-8C vytvářely málo viskózní roztoky, kdežto derivát HA-11C vytvořil při stejné koncentraci homogenní gel.



Obrázek 64: Dynamická viskozita přírodního a modifikovaného HA ( $DS \cong 17\%$ ).

Viskozita stoupající v závislosti na délce řetězce modifikačního činidla může být způsobena pevnějším propletením hydrofobních řetězců a může poukazovat na sílu hydrofobních interakcí v jádře micel a vytvoření kompaktnější micely.<sup>208</sup>

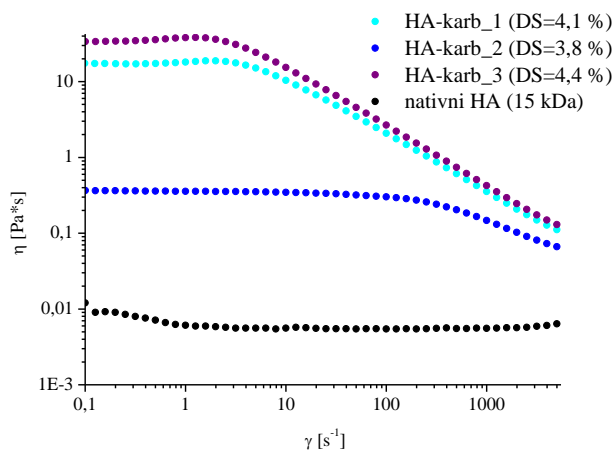
Dynamická viskozita byla sledována také u derivátů HA–karb s různým DS. Deriváty byly vybrány tak, aby rozpětí DS bylo co nejširší a případně se dal vysledovat případný rozdíl ve viskozitě roztoků derivátů s různým DS. Viskozita roztoků derivátů HA–karb byla změřena a porovnána jak mezi sebou (aby bylo možné vyvodit závěry, do jaké míry je dynamická viskozita závislá na hodnotě DS derivátů) tak s viskozitou roztoku derivátu HA–11C. Vzorky pro tato měření byly připraveny stejným způsobem jako vzorky série derivátů HA– $\omega$ -FAK. Na Obrázku 65 jsou znázorněny tokové křivky derivátů HA–karb s různými DS, které jsou srovnány s tokovou křivkou derivátu HA–11C. Lze zde pozorovat velké rozdíly hodnot dynamické viskozity derivátů s téměř shodným DS.



Obrázek 65: Tokové křivky derivátů HA–karb s různými DS.

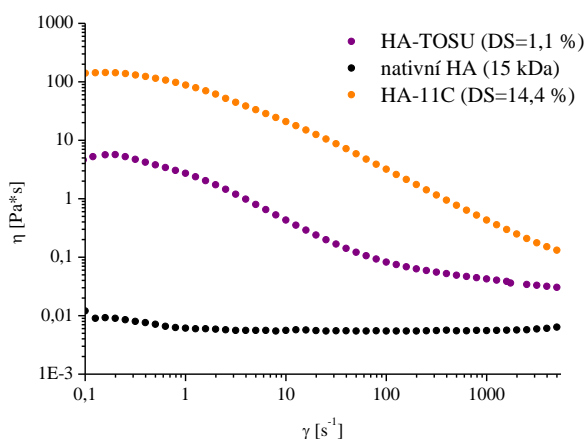
Výrazné rozdíly dynamické viskozity roztoků těchto derivátů jsou zarážející. Vysvětlením těchto výsledků by mohla být neexistující závislost mezi DS a dynamickou viskozitou roztoků. Pro srovnání byly proto měřeny roztoky derivátů HA–karb, které byly syntetizovány za stejných podmínek (čímž se předpokládá příprava derivátů se stejnými vlastnostmi). Nicméně ani v tomto případě (Obrázek 66) nevykazovaly roztoky stejnou viskozitu. Obdobný problém s těmito deriváty, tedy výrazné rozdíly v chování derivátů, které měly být velmi podobné, však byl později pozorován i u inkorporace modelové látky do micel těchto derivátů (viz kapitola 6.5). Nevyzpytatelné chování tohoto derivátu může být způsobeno například nedokonalým „skládáním“ hydrofobních substituentů uvnitř micely. Karbazolový heterocyklus je stericky náročný a uspořádání hydrofobních řetězců může tedy být náročnější. Při tvorbě micely (měření viskozity probíhá při koncentraci nad hodnotou CAC) dochází k náhodnému sbalování polymerního řetězce a může tak dojít k takovému uspořádání jádra, které není energeticky příliš výhodné. V takovém případě by

mohly být vlastnosti micel rozdílné i tehdy, byly-li deriváty použité pro jejich vznik připravené za stejných reakčních podmínek.



Obrázek 66: Tokové křivky derivátů HA–karb připravených za stejných podmínek.

Jako poslední srovnávaný derivát byl proměřen derivát HA-TOSU a výsledky byly porovnány s HA–11C (Obrázek 67). Dynamická viskozita derivátu HA–TOSU je nižší. Derivát je tedy méně viskózní, což bylo pozorováno i prostým okem, neboť HA–TOSU derivát vytvořil, na rozdíl od derivátu HA–11C, jen hustý roztok a nikoliv gel. Podle trendu, který byl pozorován pro roztoky derivátů HA– $\omega$ -FAK by tento výsledek měl poukazovat na možnou nižší vazebnou kapacitu než je vazebná kapacita micel derivátu HA–11C. Toto očekávání se však nepotvrdilo, jak naznačují výsledky stanovení vazebné kapacity těchto micel (kap. 6.5).



Obrázek 67: Tokové křivky derivátů HA–TOSU, HA–11C a přírodního HA.

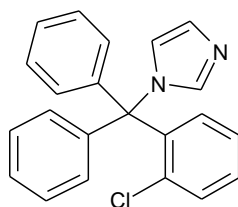
Měření dynamické viskozity ukázalo, že u derivátů HA- $\omega$ -FAK stoupá viskozita jejich roztoků s délkou alifatického řetězce. U derivátů HA-karb však podobná závislost pozorována nebyla. Vzhledem k porovnání výsledků vazebných kapacit micel derivátů HA-11C a HA-TOSU a viskozit těchto derivátů lze usoudit, že tato metody (měření dynamické viskozity) nelze použít pro predikci bazebné kapacity micel.

### 6.5. Studium inkorporace modelových látek do micel

Hlavním cílem této práce bylo ověřit hypotézu, že aromatické biologicky aktivní látky (například léčiva) budou v micelách na bázi aromaticky substituovaného HA pevněji inkorporovány než v micelách na bázi alifaticky substituovaného HA.

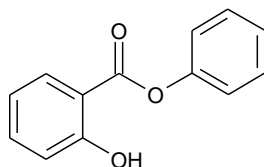
Měření míry inkorporace vybraných aromatických biologicky aktivních látek do micel získaných z připravených derivátů ukázalo, zda a do jaké míry byla vazebná kapacita micel ovlivněna délkou alifatického řetězce modifikačního činidla a stupni substituce derivátů. Vazebná kapacita těchto micel připravených z aromaticky modifikovaných HA poté byla porovnána s vazebnou kapacitou micel získaných z amfifilních derivátů HA modifikovaného nearomatickými modifikačními činidly.

Jako vhodné biologicky aktivní látky byly vybrány klotrimazol a fenyl-salicylát. Klotrimazol (Obrázek 68) je významné antifungální léčivo působící proti širokému spektru plísní, ale je velmi málo rozpustný ve vodě ( $0,49 \mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-3}$ ).<sup>209,210</sup> Klotrimazol inhibuje enzym cytochrom P450 14 $\alpha$ -demethylázu, který je nezbytný při syntéze buněčné membrány plísní. Klotrimazol vykazuje antimykotickou aktivitu vůči plísním *Candida spp.*, *Cryptococcus spp.*, dermatofytům, *Aspergillus spp.* a dalším.<sup>210</sup> Nejvíce se klotrimazol používá pro léčbu infekcí kůže (včetně nehtů) a sliznic.<sup>211</sup>



Obrázek 68: Struktura klotrimazolu.

Fenyl-salicylát (Obrázek 69) je látka mající protizánětlivé, bolest tišící, tělesnou teplotu snižující a protirevmatické účinky. Je známo, že se používá proti zánětům střev či jako povrchová desinfekce.<sup>212</sup> Intestinální antiseptické účinky fenyl-salicylátu jsou umožněny jeho hydrolyzou v tenkém střevě, kde vzniká fenol.<sup>213</sup>



Obrázek 69: Struktura fenyl-salicylátu.

Micely byly připraveny odpařovací metodou. Derivát HA byl rozpuštěn ve vodě a do tohoto roztoku byla přidána modelová látka (klotrimazol nebo fenyl-salicylát) rozpuštěná v IPA a rozpouštědla byla odpařena. Vzorky k měření vazebné kapacity (DL) byly připraveny tak, že k 10 mg vzorku byly přidány 2 cm<sup>3</sup> vody. Po úplném rozpuštění byl přidán IPA (8 cm<sup>3</sup>), roztok byl promíchán a přefiltrován přes nylonový filtr (0,22 μm). Hodnoty DL byly stanoveny pomocí HPLC chromatografie. Nejprve byly připraveny a proměřeny kalibrační roztoky modelové látky a vytvořena kalibrační přímka. Následně byl proměřen roztok rozbitých micel, ve kterých byla předem inkorporována modelová látka, a spočítáno bylo množství uvolněné modelové látky.

Tabulka 14: Vazebná kapacita micel s inkorporovným klotrimazolem.

	Derivát	DS [%]	DL [%]
<b>1</b>	HA-4C	13,4	5,37
<b>2</b>	HA-4C	41,6	6,26
<b>3</b>	HA-6C	15,3	7,35
<b>4</b>	HA-8C	13,1	6,96
<b>5</b>	HA-11C	14,4	6,53
<b>6</b>	HA-C18:1	14,0	4,25

Pro měření DL byly vybrány deriváty HA-4C až HA-11C se stupněm substituce cca 14 % (Tabulka 14, řádky **1**, **3–6**). V tomto případě inkorporace klotrimazolu nebyla pozorována závislost vazebné kapacity micel těchto derivátů na délce alifatického řetězce navázaných modifikačních činidel. Derivát HA-4C byl testován i s DS výrazně vyšším (41,6 %) (Tabulka 14, srovnaj řádky **1** a **2**). Zvýšení DS derivátu použitého pro tvorbu micel sice způsobilo zvýšení vazebné kapacity, ale rozdíl je poměrně malý.

V Tabulce 15 jsou shrnuty výsledky vazebné kapacity micel s inkorporovaným fenyl-salicylátem. Ani zde nebyla pozorována výrazná závislost DL na použitém derivátu.

Tabulka 15: Vazebná kapacita micel s inkorporovaným fenyl-salicylátem.

	Derivát	DS [%]	DL [%]
<b>1</b>	HA-4C	13,4	0,25
<b>2</b>	HA-4C	41,6	0,73
<b>3</b>	HA-6C	15,3	1,92
<b>4</b>	HA-8C	13,1	1,80
<b>5</b>	HA-11C	14,4	0,58
<b>6</b>	HA-C18:1	14,0	1,11

Mírný nárůst množství inkorporovaného fenyl-salicylátu v micelách byl pozorován u micel popsaných v Tabulce 15, řádky **3, 4 a 6**.

Tyto výsledky neodpovídaly našim předpokladům. Dalo by se očekávat, že DL se bude nějakým způsobem souvisle měnit v závislosti na použitém derivátu (respektive modifikačním činidle), nebo zůstane naopak neměnný. Důvodem těchto výsledků, ze kterých nelze pozorovat žádný stoupající či naopak neměnný trend, může být nesprávná příprava vzorků k měření. Pokud vzorky micel obsahovaly i léčivo, které nebylo inkorporované v jádru micely, ale bylo například po přípravě nedokonale odstraněno, přešlo po rozpuštění micel ve vodě léčivo do roztoku (a vznikne suspenze) a způsobilo, že naměřená hodnota DL neodpovídala skutečnému množství inkorporované modelové látky. Proto byly vybrány dvojce micely (Tabulka 15, řádek **3 a 4**) a vzorky ke stanovení DL byly připraveny odlišným postupem. Po rozpuštění vzorků ve vodě byl vzniklý roztok přefiltrován přes nylonový filtr (0,22  $\mu\text{m}$ ), což mělo odstranit v micely neinkorporovaný fenyl-salicylát, a teprve poté byly micely rozbity přidáním organického rozpouštědla a do roztoku byl uvolněn fenyl-salicylát inkorporovaný v jádře micely. Poté bylo opakováno stanovení množství fenyl-salicylátu (Tabulka 16).

Tabulka 16: Výsledky opakovaného stanovení vazebné kapacity (micely s inkorporovaným fenyl-salicylátem).

	Derivát	DS [%]	DL [%]
<b>1</b>	HA-6C	15,3	0,42
<b>2</b>	HA-8C	14,4	0,42

Srovnání naměřených hodnot (Tabulka 15, řádek **3** a **4** a Tabulka 16) ukazuje na možnost, že ve vzorku micel byla opravdu obsažena i neinkorporovaná modelová látka, která například adsorbovala na povrch micel díky slabým interakcím s hydrofobním skeletem HA, a během rehydratace a filtraci micel nebyla odstraněna.

Protože výsledky měření vazebných kapacit micel derivátů HA-4C, HA-6C, HA-8C a HA-11C nedopadly podle očekávání, byly hledány důvody tohoto jevu. Jak již bylo nastíněno výše, je pravděpodobné, že nedošlo k odstranění veškeré neinkorporované modelové látky. Ta zůstala po lyofilizaci ve směsi s micelami a po rozpuštění micel byla modelová látka rozsuspendována ve vodném roztoku. Pro podpoření této teorie byly provedeny jednoduché testy krátkodobé stability modelové látky v micel. Principiálně se jednalo o rozpuštění micel ve vodě a pozorování roztoku v čase. Micely, které neobsahují neinkorporovanou modelovou látku (a jsou ve vodném prostředí stabilní) by měly vytvořit homogenní roztok, který by se neměl měnit (kalit, sedimentovat apod.). Micely byly proto rozpuštěny v demineralizované vodě a vzhled vzniklého roztoku byl pravidelně kontrolován.

V Tabulce 17 jsou shrnuty výsledky krátkodobé stability micel s inkorporovaným klotrimazolem.

Tabulka 17: Výsledky krátkodobé stability micel s inkorporovaným klotrimazolem.

		t [h]											
Derivát	DS [%]	1	2	3	4	5	6	7	22	24	25	31	
<b>1</b>	HA-4C	13,4	–	–	–	*	*	*	*	* <sub>SS</sub>	* <sub>SS</sub>	* <sub>SS</sub>	* <sub>SS</sub>
<b>2</b>	HA-4C	41,6	–	–	–	*	*	*	*	* <sub>SS</sub>	* <sub>SS</sub>	* <sub>SS</sub>	* <sub>SS</sub>
<b>3</b>	HA-6C	15,3	–	–	–	*	*	*	*	* <sub>S</sub>	* <sub>S</sub>	* <sub>SS</sub>	* <sub>SS</sub>
<b>4</b>	HA-8C	14,4	–	–	–	*	*	*	*	*	*	* <sub>SS</sub>	* <sub>SS</sub>
<b>5</b>	HA-11C	13,1	–	–	–	*	*	*	*	* <sub>S</sub>	* <sub>S</sub>	* <sub>SS</sub>	* <sub>SS</sub>
<b>6</b>	HA-C18:1	14,0	–	–	–	*	*	*	*	* <sub>S</sub>	* <sub>S</sub>	* <sub>SS</sub>	* <sub>SS</sub>

– roztok bez gradientu či sediment, \*gradient, s malé množství sedimentu, ss sediment.

Již po čtyřech hodinách po rozpuštění bylo možné u dna zkumavek pouhým okem pozorovat vytváření mléčně zbarvené zóny a na druhý den byl na dně pozorován sediment (pevná bezbarvá látka). Tyto výsledky podpořily předpoklad, že byl přítomen klotrimazol, který nebyl inkorporován v jádře micely. Vysvětlením mohou být malé rozměry částic nerozpuštěného klotrimazolu, což způsobilo jeho nedokonalé odstranění (projde přes filtr).

V takovém případě byl klotrimazol po rozpuštění micel rozsuspendován ve směsi a při delším stání sedimentoval. Je také možné, že klotrimazol nebyl v jádře micely dostatečně pevně inkorporován a během doby byl uvolňován do roztoku.

V Tabulce 18 jsou shrnuty výsledky krátkodobé stability micel s inkorporovaným fenyl-salicylátem. U vzorků HA-6C a HA-8C bylo možné již po třech hodinách pozorovat vypadávání pevné bezbarvé látky a vytvoření sedimentu. Ostatní roztoky byly i po 24 h bez sedimentu. Tento fakt může být vysvětlen tím, že vzorky **3** a **4** obsahovaly volný (neinkorporovaný) fenyl-salicylát, který v (původně) roztoku sedimentoval. Této hypotéze odpovídají i vazebné kapacity těchto micel stanovené pomocí HPCL. Zatímco množství fenyl-salicylátu v ostatních nosičích bylo velmi nízké, nosiče **3** a **4** podle HPLC analýzy navázaly 2–8× větší množství modelové látky (Tabulka 15).

Tabulka 18: Výsledky krátkodobé stability micel s inkorporovaným fenyl-salicylátem.

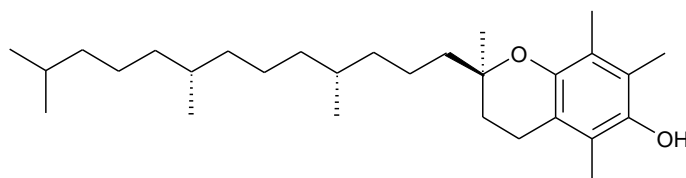
	Derivát	DS [%]	t [h]										
			1	2	3	4	5	6	7	22	24	25	31
<b>1</b>	HA-4C	13,4	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–
<b>2</b>	HA-4C	41,6	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	s
<b>3</b>	HA-6C	15,3	–	–	s	s	s	*s	*	*s	*s	*s	*s
<b>4</b>	HA-8C	14,4	–	–	s	s	s	*s	*	*s	*s	*s	*s
<b>5</b>	HA-11C	13,1	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–
<b>6</b>	HA-C18:1	14,0	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–

– roztok bez gradientu či sediment, \*gradient, s malý sediment.

Výsledky uvedené v Tabulce 17 a 18 je možné interpretovat tak, že připravené micely obsahovaly neinkorporovanou modelovou látku (potvrzeno v případě micel s fenyl-salicylátem) a/nebo byly připravené micely nestabilní.

Abychom vyřešili problém s nestabilitou micel, byly připraveny nosiče, které ve svém jádře kromě klotrimazolu či fenyl-salicylátu obsahovaly i DL- $\alpha$ -tokoferol (Obrázek 70). Tato látka byla ke klotrimazolu či fenyl-salicylátu do roztoku přidána v poměru 2:1 (w:w) ve prospěch DL- $\alpha$ -tokoferolu. Máme zkušenost, že tento dosud nepublikovaný postup, pomáhá zvyšovat stabilitu micel.



Obrázek 70: Struktura DL- $\alpha$ -tokoferolu.

Výsledky měření vazebné kapacity micel s inkorporovaným klotrimazolem a DL- $\alpha$ -tokoferolem jsou v Tabulce 19. V tomto případě byla pozorována závislost vazebné kapacity na struktuře modifikačního činidla (**1**, **3–5**) a hodnotě DS (**1** a **2**). Rozdíl ve vazebné kapacitě nejlepších aromatických micel HA–11C a alifatických micel HA–C18:1 není příliš výrazný. Tyto micely byly nechány testovat analýzu inhibičního účinku. Výsledky tohoto testu hovoří jednoznačně ve prospěch aromatických micel.

Tabulka 19: Výsledky měření vazebných kapacit micel se směsí klotrimazolu a DL- $\alpha$ -tokoferolu.

	Derivát	DS [%]	DL <sub>K</sub> [%]	DL <sub>T</sub> [%]
<b>1</b>	HA–4C	13,4	0,78	1,61
<b>2</b>	HA–4C	41,6	5,68	11,41
<b>3</b>	HA–6C	15,3	3,04	6,13
<b>4</b>	HA–8C	13,1	6,04	12,07
<b>5</b>	HA–11C	14,4	7,02	14,80
<b>6</b>	HA–C18:1	14,0	6,51	14,76

DL<sub>K</sub>...vazebná kapacita, množství inkorporovaného klotrimazolu v micelách, DL<sub>T</sub>...vazebná kapacita, množství inkorporovaného DL- $\alpha$ -tokoferolu v micelách.

Stejný trend je zřejmý z Tabulky 20, kde jsou uvedeny výsledky pro micely s inkorporovaným fenyl-salicylátem (DL<sub>F</sub>) a DL- $\alpha$ -tokoferolem (DL<sub>T</sub>). Micely vytvořené z derivátu HA–4C lišící se stupněm substituce (**1** a **2**) vykázaly výrazný rozdíl ve vazebné kapacitě. Micely derivátu s vyšším DS vázaly výrazně větší množství modelové aromatické látky. Tuto skutečnost je možné přisoudit  $\pi \cdots \pi$  interakcím mezi jádrem micel a modelovou látkou. Micely derivátů s vyšším DS přirozeně mají větší potenciál pro vytváření těchto interakcí. Porovnání výsledků micel z derivátů HA–4C až HA–11C s podobným DS ukazuje, že množství inkorporované modelové aromatické látky závisí na délce alifatického řetězce modifikačního činidla (**1**, **3–5**), tedy se stoupající délkou alifatického řetězce a s rostoucím DS vazebná kapacita stoupá. Tato rostoucí tendence lze

vysvětlit lepší schopností uzavřít modelovou látku do jádra micely díky možnosti výhodnějšího uspořádání skupin modelové látky a hydrofobních substituentů zodpovědných za vytváření  $\pi \cdots \pi$  interakcí.

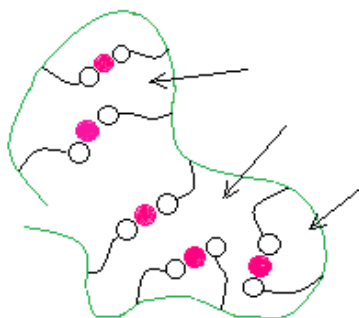
Lepší výsledky vazebných kapacit pro aromatické micely než pro micely připravené z alifatického derivátu (HA-C18:1) byly pozorovány i pro fenyl-salicylát jako modelovou látku.

Tabulka 20: Výsledky vazebných kapacit micel se směsí fenyl-salicylátu a DL- $\alpha$ -tokoferolu.

	Derivát	DS [%]	DL <sub>F</sub> [%]	DL <sub>T</sub> [%]
<b>1</b>	HA-4C	13,4	0,60	1,31
<b>2</b>	HA-4C	41,6	2,70	9,05
<b>3</b>	HA-6C	15,3	2,30	6,33
<b>4</b>	HA-8C	13,1	2,42	5,51
<b>5</b>	HA-11C	14,4	4,98	16,05
<b>6</b>	HA-C18:1	14,0	4,36	14,16

I pro tyto micely se směsí klotrimazolu a DL- $\alpha$ -tokoferolu a micely se směsí fenyl-salicylátu a DL- $\alpha$ -tokoferolu byl proveden test krátkodobé stability. V tomto případě všechny připravené micely prokázaly ve sledované době (cca 24 h) stabilitu, neboť v roztoku nebyla pozorována žádná sedimentace a nedocházelo ke změně vzhledu roztoků.

Způsob působení DL- $\alpha$ -tokoferolu v micelách není znám. Je však možné, že DL- $\alpha$ -tokoferol (zejména díky svému alifatickému řetězci) vyplňuje „volná“ místa (znázorněna šipkami, Obrázek 71) po vytvoření micely. Mezi tokoferolem, léčivem a substituenty tvořícími jádro micely vznikají nekovalentní interakce, které ji stabilizují. Vzhledem k chemické struktuře HA je možné, že se uplatňují i vodíkové vazby mezi hydroxylovými skupinami HA a O-atomy atomy tokoferolu.



Obrázek 71: Schematický náčrt micely s inkorporovaným léčivem (růžová).

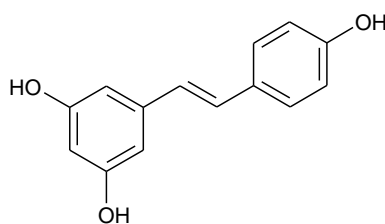
V dalších experimentech byla ověřena základní reprodukovatelnost přípravy micel a možnost připravit větší šarže. Příprava micel z derivátů HA-11C a HA-C18:1 s klotrimazolem a DL- $\alpha$ -tokoferolem byla proto pro každý derivát dvakrát zopakována se stejným množstvím výchozího derivátu (100 mg) pro zjištění základní reprodukovatelnosti a dvakrát ve větší šarži (200 mg). Tyto údaje jsou nezbytné pro případné použití v praxi. Z výsledků je zřejmé, že požadavky jak na reprodukovatelnost (Tabulka 21, řádky 1–4), tak na možnost přípravy micel ve větších šaržích (Tabulka 21, řádky 5–8) byl splněn.

Tabulka 21: Výsledky vazebných kapacit opakované přípravy micel s klotrimazolem a DL- $\alpha$ -tokoferolem.

	Derivát	DS [%]	Navážka derivátu [mg]	DL <sub>K</sub> [%]	DL <sub>T</sub> [%]
<b>1</b>	HA-11C	14,4	100	7,24	15,48
<b>2</b>	HA-11C	14,4	100	7,34	15,31
<b>3</b>	HA-C18:1	14,0	100	7,20	14,59
<b>4</b>	HA-C18:1	14,0	100	7,09	14,12
<b>5</b>	HA-11C	14,4	200	7,30	14,46
<b>6</b>	HA-11C	14,4	200	7,30	14,34
<b>7</b>	HA-C18:1	14,0	200	6,87	13,58
<b>8</b>	HA-C18:1	14,0	200	6,98	14,12

Jako další modelová látka byl vybrán resveratrol. Pro testování micel s touto modelovou látkou byly z řady derivátů HA- $\omega$ -FAK vybrány pouze micely derivátu HA-11C, protože vykazaly nejlepší vazebnou kapacitu pro modelové látky klotrimazol s DL- $\alpha$ -tokoferolem a fenyl-salicylát a DL- $\alpha$ -tokoferolem. Dále byl resveratrol inkorporován do micel derivátu

HA–karb a HA–TOSU. Pro srovnání vazebné kapacity micel aromatických derivátů a nearomatických derivátů byl resveratrol inkorporován i do micel derivátu HA–C18:1. Resveratrol (Obrázek 72) je neflavonoidní polyfenol přirozeně se vyskytující v mnoha rostlinách.<sup>214,215</sup> Díky přítomnosti dvojné vazby existuje resveratrol ve dvou diastereomerech *Z* a *E*,<sup>214,216</sup> přičemž jen *E* forma je biologicky aktivní.<sup>216</sup> Resveratrol vykazuje mnohé blahodárné účinky a využívá se pro různé, zejména topické, aplikace za různých fyziologických a patologických podmínek.<sup>214</sup> Jako nejranější objev prospěšnosti resveratrolu pro lidský organismus je považován kardioprotektivní účinek,<sup>215</sup> související s antioxidačními schopnostmi resveratrolu. V klinické praxi je resveratrol používán například k ošetření pokožky postižené psoriázou,<sup>214</sup> případně k ošetření pokožky napadené infekčními patogeny.<sup>215</sup> Rovněž bylo popsáno snížení symptomů onemocnění *acne vulgaris* při používání přípravků obsahujících resveratrol.<sup>214</sup> Zaznamenána byla i kladná úloha resveratrolu při hojení ran.<sup>214</sup>



Obrázek 72: Struktura resveratrolu.

Důležitým krokem bylo nalezení vhodného rozpouštědla pro rozpuštění resveratrolu. Methanol však kvůli své toxicitě není optimální pro zamýšlenou aplikaci micel v oblasti nosičových systémů. Byl však použit pro vyzkoušení rozpustnosti a vlivu na vazebnou kapacitu. Kromě toxicity je samozřejmě nutné brát ohled na mísitelnost rozpouštědla s vodou a bod varu (musí být nižší než bod varu vody). Jako alternativy byly proto vybrány ethanol a IPA. Zjištěné hodnoty vazebných kapacit micel obou derivátů HA–11C a HA–C18:1 s resveratrolelem jsou shrnuty v Tabulce 22. Všechna rozpouštědla rozpustila resveratrol na pravý roztok, a roztoky byly proto použity pro přípravu micel s inkorporovaným resveratrolelem.

Tabulka 22: Výsledky vazebných kapacit micel s inkorporovaným resveratrolem.

HA- 11C/res [mg/mg]	rozpouštědlo	DL [%]	HA-C18:1/res [mg/mg]	rozpouštědlo	DL [%]
100:5	IPA	<b>1,99</b>	100:5	IPA	<b>1,33</b>
100:5	MeOH	<b>1,42</b>	100:5	MeOH	<b>1,16</b>
100:3	IPA	<b>2,01</b>	100:3	IPA	<b>1,30</b>
100:3	MeOH	<b>2,85</b>	100:3	MeOH	<b>1,34</b>
100:3	EtOH	<b>2,78</b>	100:5	EtOH	<b>1,21</b>

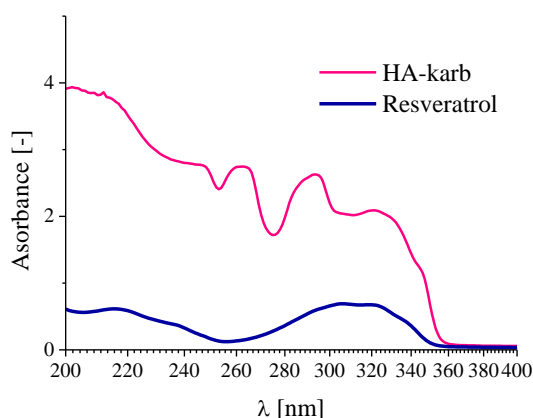
Vazebná kapacita micel připravených za použití methanolu jako rozpouštědla byla velmi dobrá, ale právě kvůli toxicitě nebude vhodné jej používat. Další použitá rozpouštědla, ethanol i IPA, použitá při inkorporaci poskytla micely s dobrou vazebnou kapacitou resveratrolu. Pro další testování byl, zejména kvůli ceně, používán IPA i přes to, že výsledky byly v rámci testovaných rozpouštědel nejhorší. Příprava micel z dalších derivátů (HA–karb a HA–TOSU) a resveratrolu byla tedy prováděna za využití IPA jako rozpouštědla pro resveratrol.

Nejprve byl vyzkoušen poměr polymer:resveratrol 100:3 a poté bylo množství resveratrolu zvýšeno na 5 mg (opět vůči 100 mg derivátu), abychom věděli, který poměr polymer:resveratrol je optimální. Zvýšení množství resveratrolu však nevedlo ke zvýšení vazebné kapacity, proto byl tento poměr (polymer:resveratrol) vyzkoušen jen pro dvě rozpouštědla (MeOH a IPA).

Stejně jako v případě inkorporace klotrimazolu a fenyl-salicylátu, byly micely s resveratrolem připraveny odpařovací metodou. V tomto případě však byla do postupu přípravy micel zařazena i sonikace, abychom zjistili její vliv na vazebnou kapacitu. Roztoky derivátů HA–11C a HA–C18:1 byly sonikovány během přidávání roztoku resveratrolu (po dobu 15 min) k derivátu HA a poté po rehydrataci micel (10 min) nebo pouze během přidávání roztoku resveratrolu k roztoku derivátů HA. Hodnoty vazebných kapacit takto připravených micel byly porovnány s hodnotami vazebných kapacit micel připravených pouze odpařovací metodou a bylo zjištěno, že sonikace nemá výrazný vliv na hodnotu vazebné kapacity sledovaných micel. Další enkapsulace byly proto prováděny pouze odpařovací metodou.

Hodnoty vazebných kapacit uvedených v Tabulce 22 mohly být získány pomocí UV/Vis spektroskopie, protože resveratrol má absorpční maximum při jiných vlnových délkách ( $\lambda_{\max}=306$  nm) než deriváty použité pro tvorbu micel.

Vazebná kapacita micel připravených z derivátu HA–karb byla rovněž stanovena na modelu inkorporování resveratrolu. Pro stanovení vazebné kapacity byly vybrány deriváty se čtyřmi různými stupni substituce (3,4 %; 4,1 %; 5,4 % a 7,2 %) abychom zjistili, zda i tyto nízké rozdíly v DS) mohou ovlivnit vazebnou kapacitu micel. Jeden derivát (DS=4,1 %) byl použit pro přípravu micel s dvěma různými navážkami resveratrolu (3 a 5 mg na 100 mg derivátu). Karbazolové jádro bohužel absorbuje při shodných vlnových délkách jako resveratrol (Obrázek 73), a tudíž není možné zjistit obsah resveratrolu v nosiči pomocí UV/Vis spektroskopie.



Obrázek 73: UV/Vis spektrum resveratrolu a derivátu HA–karb.

Vazebná kapacita byla proto stanovena pomocí HPLC metody. Výsledky jsou shrnuty v Tabulce 23.

Tabulka 23: Výsledky vazebné kapacity micel připravených z derivátu HA–karb.

	Derivát	DS [%]	Vstupní množství resveratrolu [mg]	DL [%]
<b>1</b>	HA–karb	3,4	3	<b>0,74</b>
<b>2</b>		4,1	5	<b>1,05</b>
<b>3</b>		4,1	3	<b>0,96</b>
<b>4</b>		5,4	3	<b>2,43</b>
<b>5</b>		7,2	3	<b>2,49</b>

Výsledky měření vazebných kapacit byly však překvapivě rozdílné a ani nevykazovaly žádnou závislost. Tyto výsledky korespondují s výsledky měření dynamických viskozit roztoků derivátů, kdy nebyla pozorována závislost dynamické viskozity roztoků na DS rozpuštěného derivátu. Důvodem diskutovaných výsledků může být například příliš stericky náročný substituent, který neumožní vytvoření dostatečně kompaktní micely.

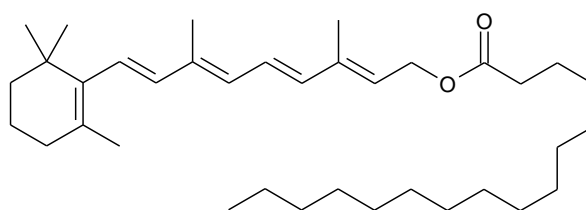
Do micel derivátu HA–TOSU byl inkorporován resveratrol taktéž odpařovací metodou, (bez sonikace). Z Tabulky 24 je patrné, že micely derivátu HA–TOSU mají velmi dobrou vazebnou kapacitu a to i přes velmi nízký stupeň substituce derivátu, z něhož jsou micely připravené (DS=1,1 %).

Tabulka 24: Srovnání vazebných kapacit micel vybraných derivátů.

Derivát	DS [%]	Vstupní množství derivátu [mg]	Vstupní množství resveratrolu [mg]	DL [%]
HA–C18:1	14,0	100	3	<b>1,30</b>
HA–11C	14,0	100	3	<b>2,01</b>
HA–TOSU	1,0	100	3	<b>2,84</b>

Pro získání dalších výsledků umožňujících srovnání aromatických micel HA–11C a alifatických micel HA–C18:1 byl výše zmíněný postup (odpařovací metoda) přípravy micel využit pro inkorporaci retinyl-palmitátu, jehož struktura také obsahuje velké množství dvojných vazeb schopných poskytnout  $\pi$ -elektrony pro vytvoření  $\pi \cdots \pi$  interakcí.

Retinoidy jsou skupinou látek zahrnující vitamin A (retinol) a jeho přirozené analogy jako je retinal, retinová kyselina či retinyl-palmitát.<sup>217</sup> Retinyl-palmitát (Obrázek 74) je nejstabilnější formou vitaminu A a zároveň slouží jako zásobní forma tohoto vitaminu. Retinoidy jsou esenciální pro normální růst, zrak, imunitu, embryogenezi a neurogenezi.<sup>218,219</sup> Retinoidy také inhibují vznik a rozvoj rakovinných nádorů.<sup>219</sup>



Obrázek 74: Struktura retinyl-palmitátu.

Z farmakologického hlediska nebyly popsány kvalitativní rozdíly mezi retinyl-palmitátem a ostatními retinoidy.<sup>220</sup> Retinoidy zaujaly v poslední době pozornost díky možnosti využití v problematice stárnutí kůže, protože tyto látky se podílí na regulaci růstu epitelálních buněk a syntéze kolagenu.<sup>219,221</sup> Dermální aplikace těchto látek je však velmi obtížná z důvodu jejich vysoké molekulové hmotnosti.<sup>222</sup> Dále také vykazují vysokou hydrofobicitu, a tudíž vyžadují aplikaci pomocí vhodného nosiče, který umožní jejich transport do tělních tekutin a buněk.<sup>223</sup>

Výsledky měření vazebných kapacit micel s enkapsulovaným retinyl-palmitátem jsou zaznamenány v Tabulce 25. Jako rozpouštědla pro retinyl-palmitát byly použity ethanol a IPA.

Tabulka 25: Výsledky vazebných kapacit micel s inkorporovaným retinyl-palmitátem (RP).

HA- 11C/RP [mg/mg]	vazebná kapacita [%]		HA-C18:1/RP [mg/mg]	vazebná kapacita [%]	
	rozpuštědlo			rozpuštědlo	
100:12	EtOH	<b>2,6</b>	100:12	EtOH	<b>2,4</b>
100:12	PrOH	<b>7,2</b>	100:12	PrOH	<b>4,3</b>

Z Tabulek 24 a 25 je jasné, že vazebná kapacita aromatických micel je vyšší než vazebná kapacita micel neobsahujících aromatický substituent. Lze předpokládat, že tento trend je způsoben přítomností  $\pi \cdots \pi$  interakcí a vysokou hydrofobicitou aromatického jádra micely a enkapsulované látky.<sup>192</sup>

Srovnání vazebných kapacit obou typů micel potvrzuje předpoklad o vyšší „afinitě“ aromatických léčiv či biologicky aktivních látek (resveratrol, retinyl-palmitát) k aromatickým micelám než k micelám neobsahující na  $\pi$ -elektrony bohaté jádro.

## 6.6. Analýza inhibičního účinku klotrimazolu v nosiči

Minimální inhibiční koncentrace (MIC) vyjadřuje nejnižší koncentraci antimikrobní látky, která inhibuje viditelný růst mikroorganismů.<sup>224</sup> Pro micely derivátů HA-11C a HA-C18:1 s inkorporovaným klotrimazolem a micely derivátů HA-11C a HA-C18:1 s inkorporovanou směsí klotrimazolu a DL- $\alpha$ -tokoferolu byla stanovena minimální inhibiční koncentrace na kvasinky *Candida albicans* v přítomnosti a bez přítomnosti enzymu Sphyl (procesivní lyáza z bakterie *Streptococcus pneumoniae*). Přítomnost



enzymu Sphyl měla za úkol simulovat reálné podmínky v organismu, protože lidské tělo přirozeně obsahuje enzymy způsobující rozpad HA. Je-li léčivo inkorporováno v micely, je z něj (v ideálním případě) uvolňováno postupně. Toto léčivo poté může působit na inokulované mikroorganismy. Výsledky tohoto testování jsou uvedeny v Tabulce 26.

Tabulka 26: Analýza inhibičního účinku klotrimazolu v nosiči.

Derivát	Inkorporovaná látka	MIC <sub>klotrimazol</sub> [mg·dm <sup>-3</sup> ]	MIC <sub>klotrimazol</sub> [mg·dm <sup>-3</sup> ] v přítomnosti Sphyl
--	klotrimazol	8	8
HA-C18:1	klotrimazol + DL- $\alpha$ -tokoferol	>55* (nosič 750† mg·dm <sup>-3</sup> )	13 (nosič 375 mg·dm <sup>-3</sup> )
HA-11C	klotrimazol + DL- $\alpha$ -tokoferol	>52 (nosič 750 mg·dm <sup>-3</sup> )	26 (nosič 375 mg·dm <sup>-3</sup> )
HA-C18:1	klotrimazol	--	15 (nosič 375 mg·dm <sup>-3</sup> )
HA-11C	klotrimazol	--	24 (nosič 375 mg·dm <sup>-3</sup> )

\*MIC klotrimazolu, †použitá koncentrace nosičového systému.

Z výsledků je patrné, že v případě kdy není použit enzym Sphyl, je MIC takřka shodné, což ukazuje na skutečnost, že uvolňování klotrimazolu z obou typů micel je srovnatelné. Zato stanovení MIC v přítomnosti enzymu Sphyl ukazuje, že k uvolňování klotrimazolu dochází pomaleji, protože k zajištění inhibice je nutné větší množství účinné látky (klotrimazolu), a to jak v případě micel s inkorporovaným klotrimazolem, tak v případě micel s inkorporovaným klotrimazolem a DL- $\alpha$ -tokoferolem.

Tyto výsledky potvrzují lepší vlastnosti aromatických micel ve vztahu k aromatickým léčivům, i přes to, že hodnoty vazebných kapacit aromatických a alifatických micel byly podobné. Stabilizace aromatických léčiv v jádrech aromatických micel, pravděpodobně díky  $\pi \cdots \pi$  interakcím, zajistí pomalé uvolňování léčiv, což je důležitá vlastnost nosičových systémů.

### 6.7. Stanovení velikosti a $\zeta$ -potenciálu micel

Látky rozpuštěné ve vodě se neustále chaoticky pohybují (tzv. Brownův pohyb). Tím dochází k přibližování jednotlivých částic a může dojít k jejich shlukování díky působení přitažlivých sil. Odpudivé síly shlukování zabraňují, kdežto síly přitažlivé jej podporují a mezi těmito silami existuje vztah, který může být vyjádřen velikostí  $\zeta$ -potenciálu. Hodnota

tohoto parametru naznačuje, který typ sil převáží. Jestliže všechny částice v suspenzi mají vysokou absolutní hodnotu  $\zeta$ -potenciálu, budou se navzájem odpuzovat a nebudou mít tendenci se shlukovat. Jestliže částice mají nízké hodnoty  $\zeta$ -potenciálu, pak odpuzování nebude dostatečné k tomu, aby zabránilo shlukování částic. Jako hraniční hodnota pro rozlišení stabilních a nestabilních roztoků se udává hodnota 30 (v absolutní hodnotě).<sup>225</sup>

Pro stanovení velikosti micel a  $\zeta$ -potenciálu byly vybrány jen ty micely, které prokázaly krátkodobou stabilitu. Výsledné hodnoty velikosti a  $\zeta$ -potenciálu micel jsou shrnuty v Tabulce 27. Velikost micel stoupá s délkou řetězce modifikačního činidla a stupněm substituce.  $\zeta$ -potenciál micel se pohybuje v rozmezí  $-40$  až  $-50$  mV. Micely s touto hodnotou  $\zeta$ -potenciálu jsou považovány za stabilní a nemělo by docházet k jejich shlukování a tedy vytváření nežádoucích agregátů ve vodném prostředí.

Tabulka 27: Výsledné hodnoty velikosti a  $\zeta$ -potenciálu micel.

	Derivát	DS	Modelové látky	Velikost	PdI	$\zeta$ -potenciál [mV]
<b>1</b>	HA-4C	13,4	klotrimazol	199,8	0,2	-52,6
<b>2</b>	HA-4C	41,6		689,2	0,3	-53,9
<b>3</b>	HA-6C	15,3		+	487,2	0,4
<b>4</b>	HA-8C	13,1	DL- $\alpha$ -tokoferol	583,1	0,2	-50,4
<b>5</b>	HA-11C	14,4		490,8	0,2	-44,5
<b>6</b>	HA-C18:1	14,0		529,2	0,2	-52,3
<b>7</b>	HA-4C	13,4	fenyl-salicylát	521,7	0,4	-35,0
<b>8</b>	HA-4C	41,6		258,7	0,5	-37,7
<b>9</b>	HA-11C	14,4		306,2	0,5	-51,4
<b>10</b>	HA-C18:1	14,0		345,2	0,3	-49,0
<b>11</b>	HA-4C	13,4	fenyl-salicylát	186,1	0,06	-47,0
<b>12</b>	HA-4C	41,6		514,0	0,4	-52,4
<b>13</b>	HA-6C	15,3		+	195,5	0,08
<b>14</b>	HA-8C	13,1	DL- $\alpha$ -tokoferol	359,6	0,2	-49,0
<b>15</b>	HA-11C	14,4		503,9	0,2	-50,6
<b>16</b>	HA-C18:1	14,0		489,2	0,2	-49,7
<b>17</b>	HA-TOSU	13,4	resveratrol	207,1	0,4	-53,6

## 6.8. Cytotoxicita derivátů

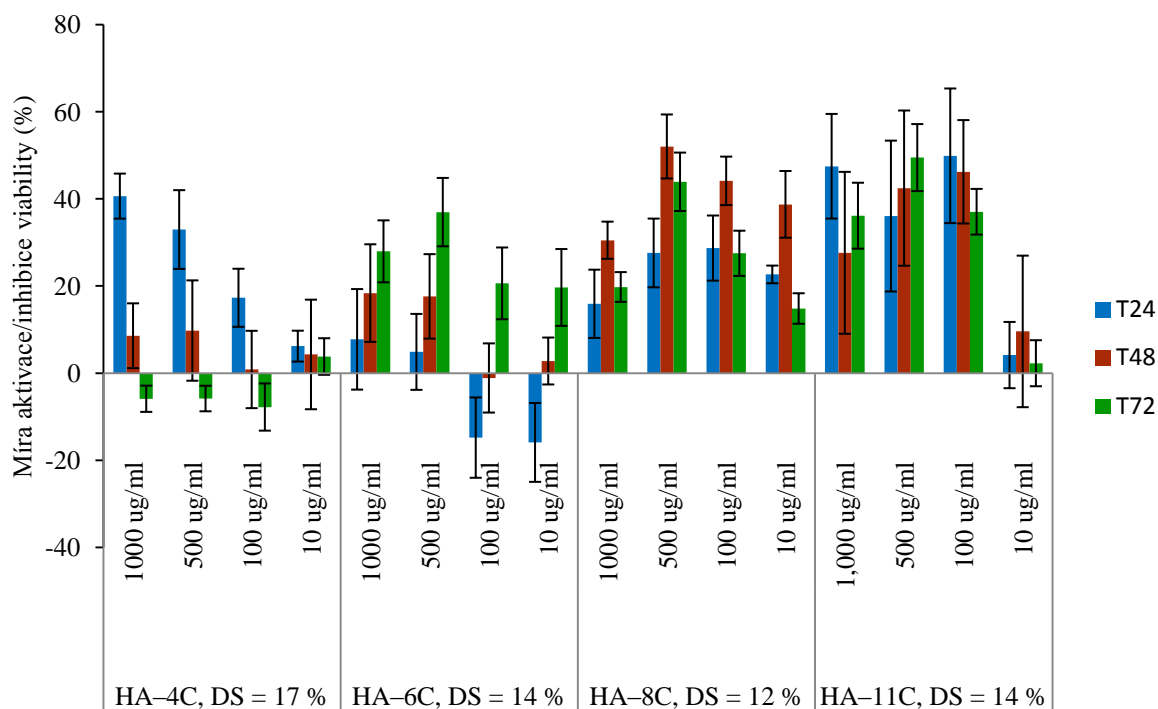
Jelikož jsou připravené deriváty HA zamýšleny pro *in vivo* aplikace, je důležité, aby nebyly toxické vůči organismu, do nějž jsou aplikovány. Látky obsahující ve svém skeletu benzenový kruh však obecně nebudí přílišnou důvěru. Na druhou stranu, je známo, že aromatické mastné kyseliny jsou běžnou součástí přírody a mají své, pro organismus prospěšné, funkce. Například 4-fenylmásečná kyselina vykazuje protinádorový efekt inhibicí histonových deacetyláz<sup>226</sup> či inhibuje stres endoplazmatického retikula.<sup>227</sup> Dříve byla tato látka používána k léčbě poruch močovinového cyklu.<sup>227</sup> Všechny použité aromatické mastné kyseliny jsou také přirozenou složkou kravského mléka.<sup>228</sup> 11-Tolylundekanová kyselina spolu s dalšími (aromatickými) mastnými kyselinami tvoří lipidovou část semen rostliny *Dracunculus vulgaris* (Drakovec obecný).<sup>229</sup> Je popsáno, že 4-fenylmásečná kyselina je z těla odstraněna  $\beta$ -oxidací na fenylacetát, poté dochází ke konjugaci s glutaminem za vytvoření fenylacetylglutaminu, který je z těla odstraněn ledvinami.<sup>227</sup>

I přes tyto znalosti je maximálně vhodné podrobit připravené deriváty testování na cytotoxicitu. Cytotoxický účinek byl sledován po dobu tří dnů (první den = T24, druhý den = T48, třetí den = T72) na Swiss 3T3<sup>††</sup> buňkách. Kromě buněk ošetřených roztoky derivátů byl sledován i slepý vzorek (označený jako CTRL). Porovnáním výsledků viability<sup>‡‡</sup> buněk po ošetření roztoky derivátů s výsledky viability buněk slepého vzorku je zřejmé, že ve sledovaném čase sledované deriváty nepůsobí na buňky toxicky v žádné testované koncentraci. Testovaná látka byla na buňky aplikována jako roztok o více koncentracích. Na Obrázku 75 je zachycena míra aktivace/inhibice viability v čase. Uvedený parametr naznačuje, zda a do jaké míry dochází k množení a růstu buněk (aktivace) či zda naopak dochází k redukci jejich počtu (inhibice) působením testované látky. Pokud se buňky i po aplikaci testované látky množí a rostou, nepůsobí na ně testovaná látka negativně. Výsledky působení testovaných látek se porovnávají s výsledky slepého vzorku, aby byla vyloučena možnost, že například používané buňky nejsou životaschopné samy o sobě.

---

<sup>††</sup> Myší fibroblasty buněčné linie 3T3 prokazují vysokou míru citlivosti na kontaktní inhibici (tj. zastavení dělení živočišných buněk v kultuře vzájemným dotekem) a jsou proto běžně používány pro testování cytotoxicity *in vitro*.

<sup>‡‡</sup> životaschopnost

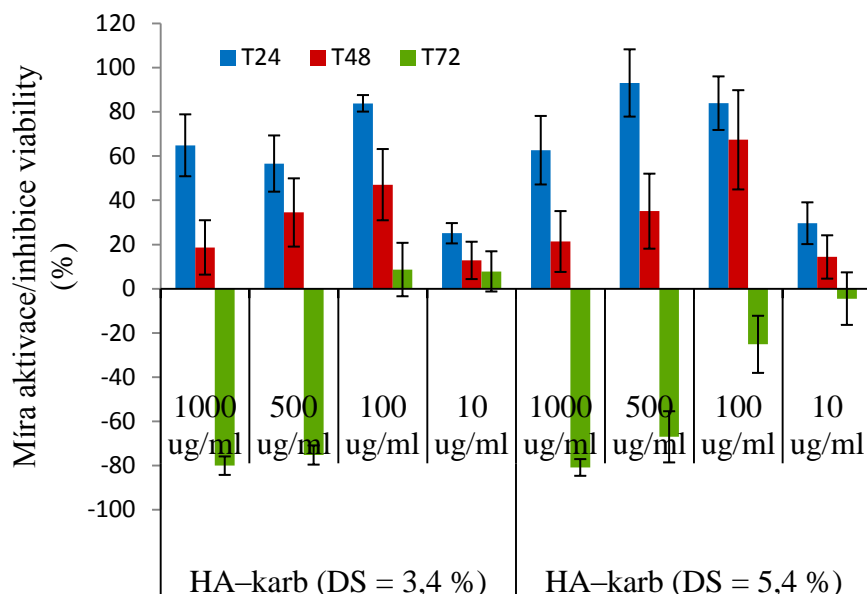


Obrázek 75: Míra aktivace/inhibice viability buněk roztoky derivátů HA-4C, HA-6C, HA-8C a HA-11C.

Obrázek 75 dokazuje, že všechny testované vzorky nejsou cytotoxické ve všech testovaných koncentracích. Hranice toxicity jsou určeny podle oficiální tabulky SZÚ (Státní zdravotní ústav), která uvádí, že vzorky vykazující inhibici menší než 20% nejsou považovány za cytotoxické, vzorky s inhibicí 20–40% mírně cytotoxické, vzorky inhibující 40–60 % buněk jsou středně cytotoxické a ty látky s mírou inhibice větší než 60 % jsou označovány za silně cytotoxické.

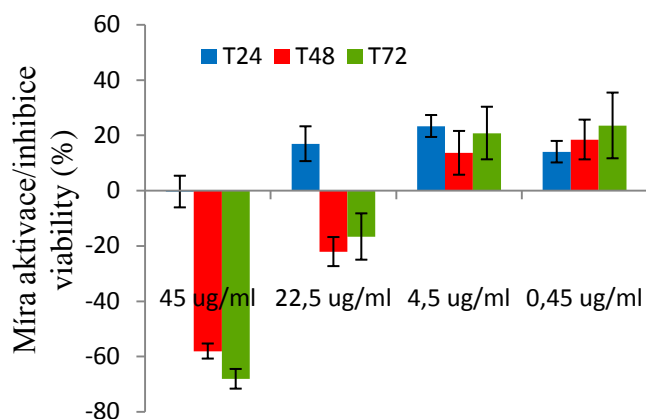
Další skupinou testovaných derivátů byly deriváty HA-karb a HA-TOSU. Deriváty HA-karb (s DS=3,4 a 5,4 %) po 24 h a 48 h nevykazovaly toxický efekt v žádné testované koncentraci (Obrázek 76). Po 72 h však deriváty HA-karb vykázaly inhibiční chování vůči 3T3 buňkám. Derivát HA-karb s DS=3,4 % vykazoval při koncentraci 1 000 a 500  $\mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-3}$  silně toxické účinky na 3T3 buňky. Derivát HA-karb s DS=5,4 % při koncentraci 1 000 a 500  $\mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-3}$  vykazoval silně toxické, při koncentraci 100  $\mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-3}$  slabě toxické účinky a jen v koncentraci 10  $\mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-3}$  nebyl derivát po 72 h působení cytotoxický. Zjištěné výsledky nemusely být způsobeny toxicitou derivátu, ale například nevytříděnými reagenty, použitými při přípravě těchto derivátů. Abychom vyloučili možnost, že inhibice buněk byla způsobena nečistotami, byly deriváty HA-karb přečištěny (rozpuštěny v minimálním množství vody, vysráženy pomocí IPA a nasyceného vodného roztoku NaCl a důkladně promyty čtyřmi porcemi směsi IPA/H<sub>2</sub>O (připravené v poměru 85:15, V:V) a poté čtyřmi

porcemi samotného IPA) a stanovení cytotoxicity bylo zopakováno. Opakované stanovení však nepřineslo zlepšení.



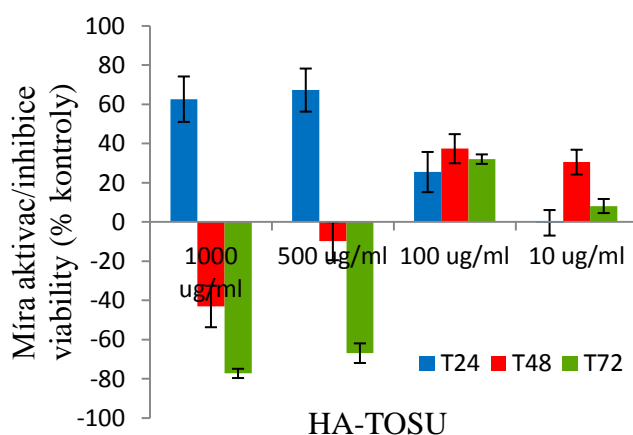
Obrázek 76: Míra aktivace/inhibice viability buněk ošetřených roztoky derivátů HA-karb.

Pro zjištění zdroje toxicity, kterým může být výchozí 11-(9*H*-karbazol-9-yl)undekanová kyselina či neodstraněná reakční činidla, byla podrobena stanovení samotná 11-(9*H*-karbazol-9-yl)undekanová kyselina, která byla rozpuštěna v médiu obsahujícím 0,5 % DMSO a aplikována na buňky. Touto zkouškou bylo zjištěno, že už při koncentraci 22,5  $\mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-3}$  11-(9*H*-karbazol-9-yl)undekanová kyselina inhibuje růst buněk (Obrázek 77). Protože toxické účinky nejsou pozorovány ihned ale až po dvou či třech dnech působení, je pravděpodobné, že toxická není 11-(9*H*-karbazol-9-yl)undekanová kyselina, ale například metabolity nebo produkty hydrolýzy, které od určité koncentrace inhibují růst buněk.



Obrázek 77: Míra aktivace/inhibice viability buněk ošetřených roztokem 11-(9H-karbazol-yl)undekanové kyseliny.

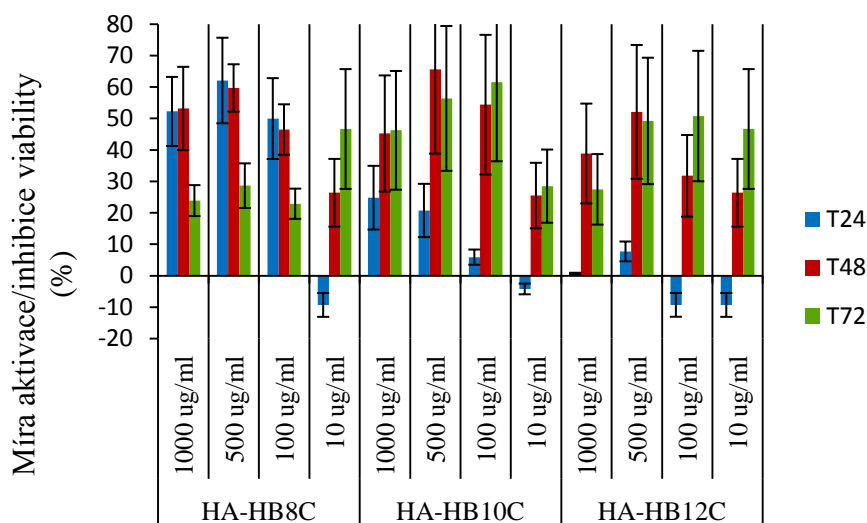
I derivát HA-TOSU byl podroben testování cytotoxicity. Tento derivát po 72 h testování působí v koncentraci 1000 a 500  $\mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-3}$  silně cytotoxicky (Obrázek 78). Derivát HA-TOSU byl po testování a ověření pravdivosti výsledků přečištěn. Původní derivát HA byl rozpuštěn ve vodě, z vodného roztoku byl vysrážen přidáním nadbytku IPA a malého množství nasyceného roztoku NaCl, poté byl promyt směsí IPA:H<sub>2</sub>O (8 ×, 85:15, V:V) a IPA (4×), vysrážený produkt byl dekantován a nadbytečná tekutina byla opatrně slita a vysrážený podíl byl vysušen v horkovzdušné sušárně. Tímto přečištěním měly být odstraněny případné nečistoty, které mohly zůstat v suspenzi derivátu v IPA, například po nedokonalém čištění derivátu, a mohly zkreslovat výsledky testů cytotoxicity. Testování bylo tedy zopakováno s přečištěným derivátem a s derivátem připraveným nezávisle provedenou reakcí. Bohužel toto opakované testování nepřineslo lepší výsledky a i tyto deriváty byly shledány cytotoxickými.



Obrázek 78: Míra aktivace/inhibice viability buněk ošetřených roztokem HA-TOSU.

Z tohoto důvodu byl výzkum tohoto derivátu i přes nadějně výsledky vazebné kapacity micel ukončen. Tyto výsledky byly poměrně překvapivé, protože dosud bylo známo, že  $\alpha$ -tokoferyl-sukcinát (semisyntetický analog  $\alpha$ -tokoferolu) prokázal selektivní toxicitu vůči nádorovým buňkám a netoxicitu či limitovanou toxicitu vůči nemaligním buňkám.<sup>230</sup> Vysvětlení pro toxicitu derivátu může být následující. Bylo totiž zjištěno, že  $\alpha$ -tokoferyl-sukcinát poskytuje pozitivní test výměny sesterských chromatid. Mechanismus výměny sesterských chromatid není dosud jednoznačně vysvětlen. Určitá frekvence jejich výměny je však běžná a spontánní. Je-li ovšem tento proces častější (14–100 výměn na chromozomový pár za jednu mitózu), představuje pro organismus riziko. Tato výměna je dávana do souvislosti s indukcí mutací a cytotoxicitou.<sup>231</sup>

Poslední testovanou skupinou derivátů HA byly tři deriváty substituované 4-alkoxybenzoovými kyselinami. V tomto případě nebyl ani z jeden derivátů nalezen jako cytotoxický (Obrázek 79).



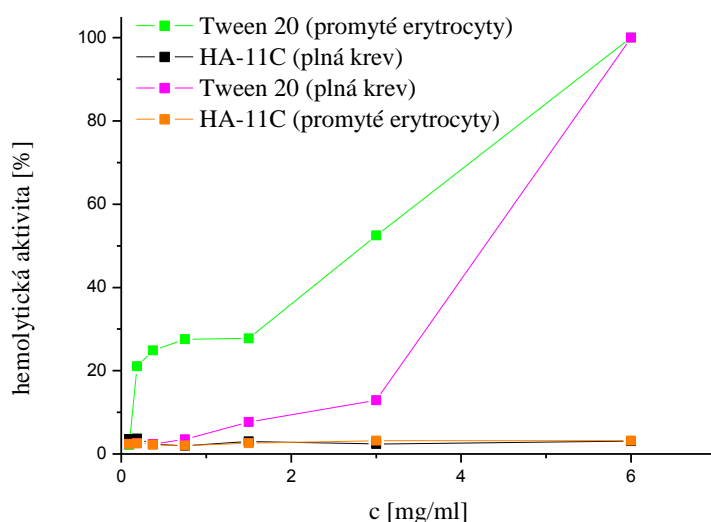
Obrázek 79: Míra aktivace/inhibice viability buněk ošetřených roztoky HA–HB8C, HA–HB10C a HA–HB12C.

Závěrem lze tedy konstatovat, že stanovení toxicity připravených derivátů HA vyloučilo dva typy derivátů: HA–karb a HA–TOSU. Zejména vyloučení derivátu HA–TOSU bylo velkým zklamáním, protože podle výsledků vazebné kapacity micel byl tento derivát velmi nadějný. Zbývající deriváty byly vyhovující: skupina HA- $\omega$ -FAK, HA–HB8C, HA–HB10C a HA–HB12C.

## 6.9. Hemolytická aktivita derivátu HA-11C

Neopomenutelným parametrem, podle kterého jsou posuzovány nosičové systémy, je jejich hemokompatibilita. Hemolýza nastává tehdy, když jsou membrány červených krvinek narušeny a dojde k uvolnění hemoglobinu z buňky. Hemolýza může v krajním případě negativně ovlivňovat zdraví a způsobovat například chudokrevnost či vysoký krevní tlak.<sup>232,233</sup> Materiály či látky zamýšlené jako nosičové systémy musí být proto hemokompatibilní.

Hemolytická aktivita derivátu HA-11C byla testována jak v systému plné krve tak i na promytých erythrocytech. Jako pozitivní kontrola byl použit materiál Tween 20, který způsobuje hemolýzu již v malé koncentraci. Pro samotný derivát HA-11C nebyla pozorována hemolytická aktivita (Obrázek 80).



Obrázek 80: Výsledek měření hemolytické aktivity derivátu HA-11C.



## 7. ZÁVĚR

Cílem této disertační práce bylo navrhnout originální funkční nosičové systémy založené na hyaluronanu (HA). Důležitým hlediskem byla zejména kompatibilita nosičových systémů s aromatickými léčivy. Bedlivě však byly sledovány také další parametry kladené na aplikace těchto nosičových systémů, jako například dostatečně nízká kritická asociační koncentrace nosičových systémů, jejich stabilita v přítomnosti krevního proteinu albuminu či cytotoxicita.

Navrženo bylo několik skupin nízkomolekulárních aromatických látek (modifikačních činidel), které mohly být nenáročnými postupy navázány na hydroxylové skupiny HA. Při navrhování vhodných substituentů musel být také brán zřetel na hledisko odbouratelnosti těchto látek v organismu. Během přípravy všech nízkomolekulárních látek byly použity netoxické reagenty nebo takové, které bylo možné z produktů beze zbytku, snadno a prokazatelně odstranit.

Samotný proces navázání připravených substituentů na HA byl navržen tak, aby HA nemusel být nikterak upravován (převáděn na kyselou formu a podobně), protože za podmínek používaných při těchto úpravách dochází zpravidla k degradaci polymerního řetězce. Modifikace vždy probíhaly na hydroxylových skupinách HA, tedy tak, aby karboxylové skupiny zůstaly volné. Tímto byla zachována rozpustnost HA ve vodném prostředí, a také umožněno přirozené cílení nosičových systémů na HA receptory.

Hyaluronan byl modifikován třemi skupinami substituentů:  $\omega$ -fenylmastnými kyselinami, 4-alkoxybenzoovými kyselinami a DL- $\alpha$ -tokoferyl-sukcinátem.  $\omega$ -Fenylmastné kyseliny se lišily délkou řetězce, což znamenalo, po navázání na HA, rostoucí vzdálenost aromatického jádra od řetězce polymeru. Derivát HA jedné z testovaných kyselin, 11-tolylundekanové kyseliny, se ukázal jako velmi dobrý nosičový systém splňující všechny požadavky. Jistým analogem této látky byla 11-(9*H*-karbazol-9-yl)undekanová kyselina, kde bylo benzenové jádro nahrazeno stericky náročnějším aromatickým systémem (karbazolem) a alkylový řetězec byl na aromát vázán přes dusíkový, nikoliv uhlíkový atom. Nosičový systém připravený z HA modifikovaného touto kyselinou se však ukázal být cytotoxický. Také výsledky vazebné kapacity nebyly uspokojivé, a proto bylo od dalšího výzkumu tohoto derivátu upuštěno. Stejný problém (toxicita vůči buňkám) byl pozorován i u nosičových systémů připravených z derivátů HA a DL- $\alpha$ -tokoferyl-sukcinátu, což bylo velké zklamání, protože micely těchto derivátů

vykazovaly vysokou vazebnou kapacitu i přes nízký stupeň substituce. Poslední skupinou testovaných derivátů byla série 4-alkoxybenzoových kyselin, které byly připraveny substitucí hydroxylové skupiny 4-hydroxybenzoové kyseliny různě dlouhými alifatickými řetězci. V tomto případě byl, po navázání na polymer, aromatický kruh stále ve stejné vzdálenosti od polymeru, ale prodlužoval se terminální alifatický řetězec tvořící jádro micely připravené z těchto derivátů. Tyto micely však nebyly stabilní v přítomnosti krevního proteinu albuminu, a tudíž byl jejich výzkum zastaven.

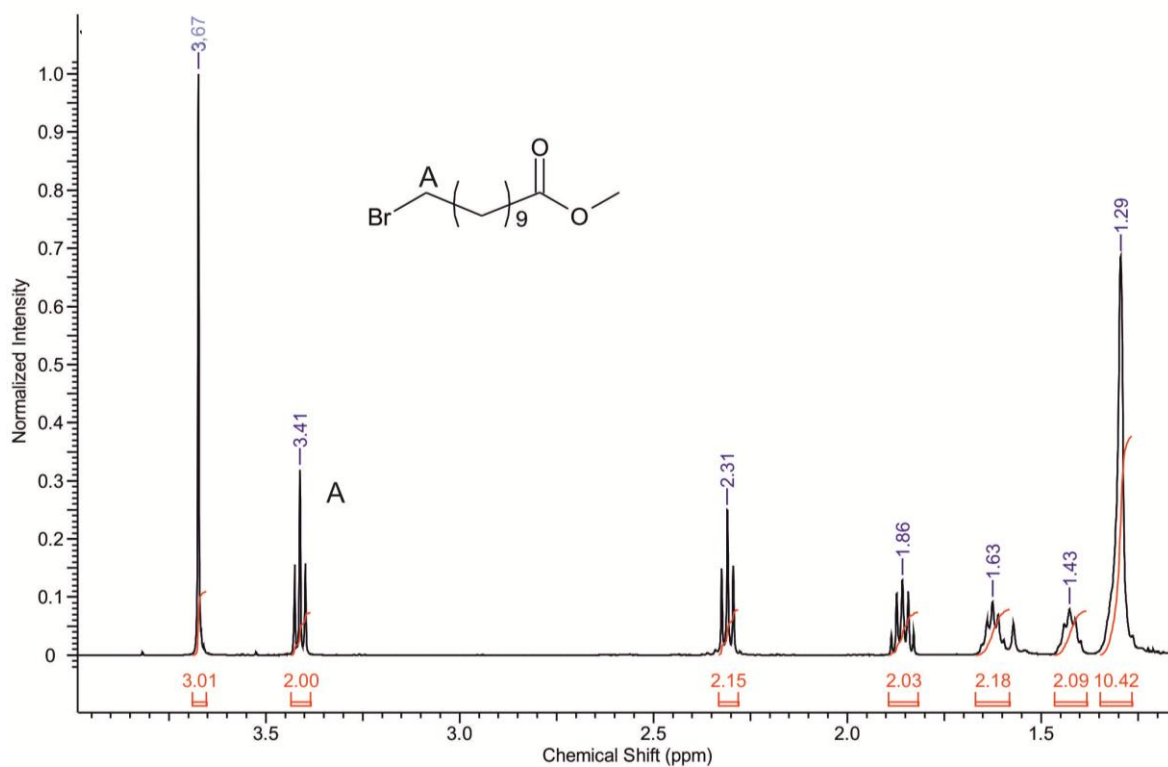
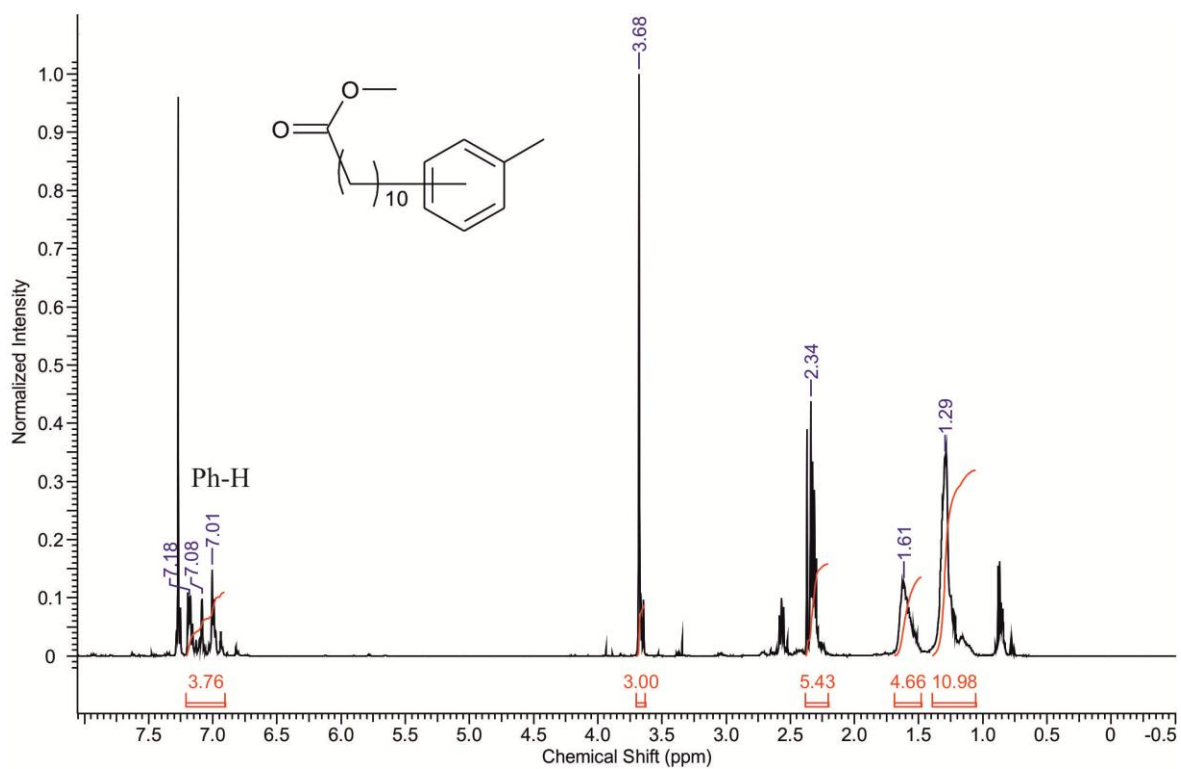
Vlastnosti připravených derivátů HA (například kritická asociační koncentrace, cytotoxicita) a zejména jejich micel (například vazebná kapacita, stabilita v přítomnosti albuminu), byly porovnány a byly vybrány ty deriváty, které splňovaly všechny požadavky kladené na funkční nosičové systémy. Uvedené parametry jsou velmi důležité, a jejich nesplnění vedlo k vyloučení derivátů HA a 4-alkoxybenzoových kyselin, DL- $\alpha$ -tokoferyl-sukcinátu a 11-(9*H*-karbazol-9-yl)undekanové kyseliny (a z nich připravených micel) z dalšího testování. U žádného z derivátů HA s  $\omega$ -fenylmastnými kyselinami naopak toxicita prokázána nebyla. Stabilita micel připravených z této skupiny derivátů stoupala v přítomnosti albuminu se stoupající délkou alifatického řetězce  $\omega$  fenylmastné kyseliny. Zatímco micely derivátu HA-4C byly nestabilní ve všech testovaných koncentracích, micely derivátu HA-11C již dosáhly dostatečné stability pro aplikace do krevního oběhu.

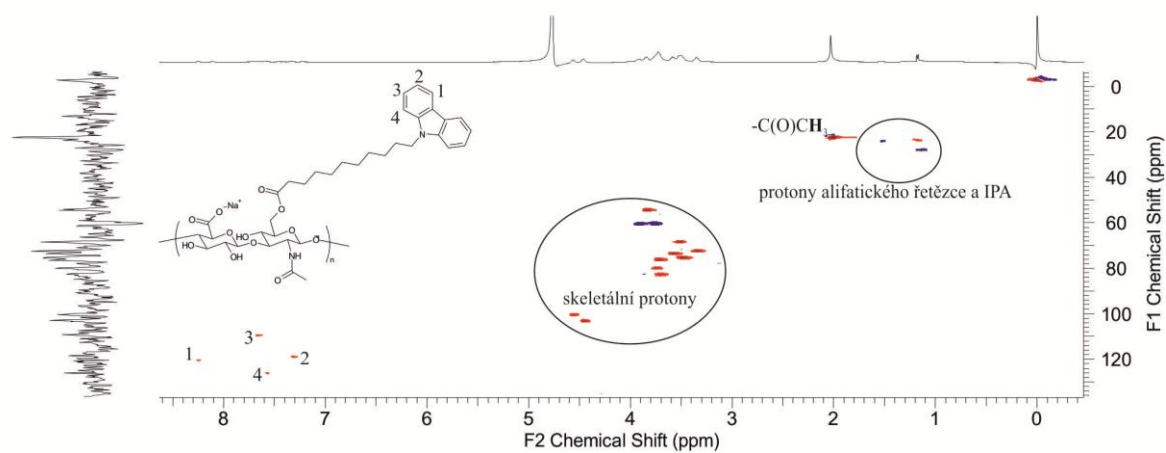
Stejný trend byl pozorován i pro vazebnou kapacitu micel. Se stoupající délkou alifatického řetězce  $\omega$ -fenylmastné kyseliny stoupá i množství inkorporované modelové látky. Micely derivátu HA-11C reprodukovatelně inkorporovaly větší množství aromatických modelových látek (resveratrolu a retinyl-palmitátu) než micely nearomatického derivátu HA-C18:1. V případě klotrimazolu významnější rozdíl ve vazebné kapacitě nenastával, ale bylo pozorováno pomalejší uvolňování klotrimazolu z aromatického nosičového systému než v případě alifatického nosičového systému. Tento jev může být připsán  $\pi \cdots \pi$  interakcím mezi aromatickým jádrem micely a  $\pi$ -elektronovými systémy modelových látek.

Z hlediska dalších sledovaných vlastností derivátů HA (CAC) i jejich micel ( $\zeta$ -potenciál, velikost micel) byly micely připravené z derivátu HA-11C shledány jako nejlépe vyhovující funkční nosičové systémy.

Dosažené výsledky se mohou stát inspirací pro další výzkum zabývající se vztahy mezi jádrem micely a inkorporovanou látkou/léčivem, zejména využití  $\pi \cdots \pi$  interakcí, protože tyto vztahy jsou pravděpodobně jedním z nejdůležitějších faktorů ovlivňujícím vazebnou kapacitu micel.

## Přílohy

Příloha 1: <sup>1</sup>H NMR spektrum methyl-11-bromundekanoátu.Příloha 2: <sup>1</sup>H NMR spektrum methyl-11-tolylundekanové kyseliny.



Příloha 3: HSQC NMR spektrum HA-karb.

## CURRICULUM VITAE

### Osobní údaje

Jméno a příjmení	Alena Matelová
Datum a místo narození	7.9.1988 ve Vsetíně
Trvalá adresa	Bratří Hlaviců 129, 755 01 Vsetín
Kontaktní údaje	+420 739 176 390, matelova.a@centrum.cz

### Dosažené vzdělání

- 2013 – nyní Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně, doktorský studijní program Chemie a technologie materiálů, od září 2017 kombinovaná forma studia
- 2011 – 2013 Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně, studijní program Chemie a technologie potravin, studijní obor Chemie potravin a bioaktivních látek, udělen titul Ing., *udělena Cena rektora*
- 2008 – 2011 Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně, studijní program Chemie a technologie potravin, udělen titul Bc.
- 2004 – 2008 Masarykovo gymnázium, Vsetín

### Pracovní zkušenosti

Srpen 2017– nyní

DPlast, a.s., U Tescomy 206, Zlín, 760 01

Laborant – technik centra VaV

- obsluha infračerveného spektrometru (řešení problémů neshodné výroby a reklamací), spolupráce na vývoji a zavádění nových zkušebních metod do praxe, zpracování technické dokumentace a příprava zkušebních postupů při zavádění nových přístrojů a zařízení v laboratoři, interní školení pracovníků laboratoře.

Září 2015 – srpen 2016, září 2013 – únor 2015

Contipro a.s., Dolní Dobrouč 401, 561 02

Asistent specialista R&D

- samostatná výzkumná činnost (návrhy a příprava organických sloučenin pro derivatizaci hyaluronanu, derivatizace hyaluronanu a příprava polymerních micel ze získaných derivátů, strukturní analýza připravených organických i polymerních sloučenin a popis vlastností).

### Zahraníční studijní stáž

březen/duben 2017 Státní Petrohradská Univerzita, Petrohrad, Ruská federace, Ústav vysokomolekulárních látek, školitel: Doc. Ing. Ivan Michajlovič Zorin, Ph.D., program Freemovers

### Publikační činnost

Jelínková, K., Surmová, H., Matelová, A., Rouchal, M., Prucková, Z., Dastychová, L., Nečas, M., Vícha, R. Cubane Arrives on the Cucurbituril Scene, *Organic Letters*, **2017**, *19*(10), 2698–2701.

Matelová, A., Huerta–Angeles, G., Šmejkalová, D., Brůnová, Z., Dušek, J., Vícha, R., Velebný, V. Synthesis of novel amphiphilic hyaluronan containing–aromatic fatty acids for fabrication of polymeric micelles, *Carbohydrate Polymers*, **2016**, *151*, 1175–1183.

Rouchal, M., Matelová, A., Pires de Carvalho, F., Bernat, R., Grbić, D., Kuřitka, I., Babinský, M., Marek, R., Čmelík, R., Vícha, R. Adamantane–bearing Benzylamides: Novel Building Blocks for Supramolecular Systems with Finely Tuned Binding Properties toward  $\beta$ –Cyclodextrin, *Supramolecular Chemistry*, **2013**, *25*, 349–361.

**Příspěvek ve sborníku**

Matelová, A., Huerta–Angeles, G., Brůnová Z., Šmejkalová, D., Vícha, R., Velebný, V., Synthesis of novel amphiphilic hyaluronan containing  $\pi\cdots\pi$  conjugated moieties as carriers for drug delivery, *12th International Conference on Polysaccharides–Glycoscience*, **2016**, 63–66.

**Příspěvky na konferencích – aktivní účast**

Matelová, A., Huerta–Angeles, G., Šmejkalová, D., Brůnová, Z., Vícha, R., Velebný V. May be drug loading content improved by aromatic amphiphiles?, *X. International conference of young scientists on chemistry “Mendeleev–2017”*, Petrohrad, Ruská federace, **2017**, P2.11. *Získáno ocenění “Nejlepší poster v sekci Polymeric materials: Methods of preparation and processing”*.

Matelová, A., Huerta–Angeles, G., Brůnová, Z., Šmejkalová, D., Vícha, R., Velebný, V. Synthesis of novel amphiphilic hyaluronan containing  $\pi$ – $\pi$  conjugated moieties as carriers for drug delivery, *12. International Conference on Polysaccharides–Glycoscience*, Praha, Česká republika, **2016**, ústní prezentace.

Matelová, A., Rouchal, M., Čmelík, R., Vícha, R. Preparation of Adamantylated *N*–Benzyl–acetamides and Study of Their Binding Properties Towards beta–Cyclodextrin, *13. Belgian Organic Synthesis Symposium*, Leuven, Belgie, **2012**, P295.

**Příspěvky na konferencích – pasivní účast**

Huerta–Angeles, G., Matelová, A., Brůnová, Z., Šmejkalová, D., Velebný, V. Synthesis of amphiphilic hyaluronan containing-phenyl fatty acids for the preparation of polymeric micelles for drug delivery. *International Conference On Nanomedicine And Nanobiotechnology – ICONAN*, Paříž, Francie, **2016**.

Fetin, P., Matelová, A., Povshednaya, M., Zorin, I., Bilibin, A.Yu. Comb-like polyelectrolyte with „Tailed counter-ions“. *9<sup>th</sup> International Symposium Molecular Mobility nad Order in Polymer Systems*. Petrohrad, Ruská federace, **2017**, P–089.



**Patent**

Matelová, A., Huerta–Angeles, G., Brůnová, Z., Šmejkalová, D., Dalecká, M., Velebný, V. Hydrophobized ester derivatives of hyaluronic acid or their salts, nanomicellar compositions, patent udělen.

**Účast na grantových projektech**

Projekt interní grantové agentury ve Zlíně IGA/FT/2017/001 – Funkční supramolekulární systémy, *spoluřešitel*.

Projekt interní grantové agentury ve Zlíně IGA/FT/2016/001 – Multitopické ligandy pro pokročilé supramolekulární systémy, *řešitel*.

Projekt interní grantové agentury ve Zlíně IGA/FT/2015/005 – Syntéza a charakterizace molekulárních komponent a studium vlastností souvisejících supramolekulárních systémů, *spoluřešitel*.

Projekt interní grantové agentury ve Zlíně IGA/FT/2012/005 – Supramolekulární stavebnice – syntéza komponent na bázi adamantanu a studium jejich fyzikálně–chemických vlastností, *spoluřešitel*.

## Seznam zkratk

CAC	kritická asociační koncentrace
CD44	buněčný receptor pro hyaluronan
CDI	<i>N,N'</i> -karbonyldiimidazol
Da	Dalton – relativní jednotka molekulové hmotnosti
DABCO	1,4-diazabicyklo[2.2.2]oktan
DBU	1,8-diazabicyklo[5.4.0]undec-7-en
DCC	<i>N,N'</i> -dicyklohexylkarbodiimid
DIPEA	N,N-diisopropylethylamin
DMAP	4-dimethylaminopyridin
DMF	dimethylformamid
DMSO	dimethylsulfoxid
DMTMM	4-(4,6-dimethoxy-1,3,5-triazin-2-yl)-4-methylmorfolinium chlorid
DOX	doxorubicin
DS	stupeň substituce
EDC	1-ethyl-3-(3-dimethylaminoisopropyl)karbodiimid
GC-MS	plynový chromatograf s hmotnostní detekcí
HA	hyaluronan
HOBt	1-hydroxybenzotriazol
IPA	propan-2-ol
LYVE-1	lymfatický endoceliální receptor pro hyaluronan
NHS	<i>N</i> -hydroxysukcinimid
NMI	1-methylimidazol
NMP	N-methyl-2-pyrrolidon
NMR	nukleární magnetická rezonance

---

PEG	polyethylenglykol
PTS	4-toluensulfonová kyselina
RHAMM	buněčný receptor pro hyaluronan
ROS	reaktivní formy kyslíku
TEA	triethylamin
THF	tetrahydrofuran

## Seznam obrázků

Obrázek 1: Kyselina hyluronová/hyaluronan.....	7
Obrázek 2: Stavba hyaladherinu (vlevo), vazba HA na hyaladheriny (vpravo).....	11
Obrázek 3: Produkty modifikace HA pomocí anhydridů.....	20
Obrázek 4: Struktura CDI.....	21
Obrázek 5: Příklady esterů HA připravených za použití CDI jako kondenzačního činidla.....	22
Obrázek 6: Struktura DCC.....	22
Obrázek 7: Příklady esterů HA připravených za použití DCC jako kondenzačního činidla .....	23
Obrázek 8: Struktura EDC.....	24
Obrázek 9: Struktura DMTMM.....	25
Obrázek 10: Liposom.....	27
Obrázek 11: Dendrimer.....	27
Obrázek 12: Polymersom.....	28
Obrázek 13: Nanokapsule.....	28
Obrázek 14: Polymerní micela.....	29
Obrázek 15: Blokový (A) a roubovaný (B) polymer.....	31
Obrázek 16: Aromatický a nearomatický nosič pro enkapsulaci bicalutamidu.....	33
Obrázek 17: Bicalutamid.....	33
Obrázek 18: Nosič na bázi polyethylenglykol-polyaspartát esteru.....	34
Obrázek 19: PEG modifikovaný kyselinou skořicovou.....	34
Obrázek 20: Doxorubicin.....	35
Obrázek 21: Struktura 4-aminofluoresceinu.....	36
Obrázek 22: HA modifikovaný PCL.....	36
Obrázek 23: Hyaluronan substituovaný 1-pyrenmethylaminem.....	37
Obrázek 24: Hyaluronan modifikovaný derivátem kyseliny skořicové.....	37
Obrázek 25: Hyaluronan modifikovaný poly(styren-co-maleinanhydridem).....	38
Obrázek 26: Aromatické mastné kyseliny použité k modifikaci HA.....	59
Obrázek 27: Struktura karbazolu.....	65
Obrázek 28: Báze použité pro katalýzu modifikační reakce.....	67
Obrázek 29: Směsný anhydrid – aktivovaná forma kyseliny.....	70
Obrázek 30: Struktura Fmoc-6-Ahx-OH.....	72
Obrázek 31: <sup>1</sup> H NMR spektra aktivační reakce 4-fenylmáslé kyseliny měřené v čase.....	76
Obrázek 32: <sup>1</sup> H NMR spektra aktivační reakce 4-fenylmáslé kyseliny měřené v čase po přídavcích vody.....	77
Obrázek 33: <sup>1</sup> H NMR spektra aktivační reakce 11-tolylundekanové kyseliny.....	78
Obrázek 34: <sup>1</sup> H NMR spektrum derivátu HA-4C.....	79
Obrázek 35: HSQC NMR spektrum derivátu HA-6C.....	79
Obrázek 36: DOSY NMR spektrum derivátu HA-8C.....	80
Obrázek 37: Porovnání spekter 4-fenylmáslé kyseliny, přírodního HA a derivátu HA připraveného z těchto látek.....	81
Obrázek 38: Infračervené spektrum směsi HA a 4-fenylmáslé kyseliny.....	82
Obrázek 39: Struktura karb.....	83

Obrázek 40: $^1\text{H}$ NMR spektrum HA–karb. ....	86
Obrázek 41: $^1\text{H}$ NMR spektra aktivační reakce 11-(9 <i>H</i> -karbazol-9-yl)undekanové kyseliny. .....	87
Obrázek 42: Část $^{13}\text{C}$ NMR spektra aktivační reakce 11-(9 <i>H</i> -karbazol-9-yl)undekanové kyseliny po 2,5 h.....	88
Obrázek 43: HSQC NMR spektrum aktivační reakce 11-(9 <i>H</i> -karbazol-9-yl)undekanové kyseliny po 2,5 h.....	88
Obrázek 44: $^1\text{H}$ NMR spektrum derivátu HA a 4-oktyloxybenzoové kyseliny. ....	89
Obrázek 45: Struktura TOSU. ....	90
Obrázek 46: Struktura barviv DiI a DiO.....	92
Obrázek 47: Emisní spektrum micel derivátu HA–4C v různých roztocích (vlevo), emisní spektra micel derivátu HA–4C v přítomnosti roztoku albuminu v čase (vpravo).....	93
Obrázek 48: Stabilita HA–4C derivátů v čase 0–24 h.....	94
Obrázek 49: Struktury substituentů navázaných na HA.....	95
Obrázek 50: Srovnání stability HA–8C a HA–Fmoc (vlevo), srovnání stability micel derivátů HA–4C, HA–6C, HA–8C a HA–11C, $M_w=15$ kDa, $c=1,5$ $\text{mg}\cdot\text{cm}^{-3}$ (vpravo). ....	95
Obrázek 51: Porovnání stability micel HA–6C o $M_w = 6$ a 15 kDa.....	96
Obrázek 52: Struktury karboxylových kyselin použitých pro modifikaci HA.....	96
Obrázek 53: Srovnání stabilit micel HA–11C, HA–C18, HA–C16 a HA–C18:1 při koncentraci $0,5$ $\text{mg}\cdot\text{cm}^{-3}$ . ....	97
Obrázek 54: Stabilita micel v čase v přítomnosti albuminu.....	98
Obrázek 55: Emisní spektra micel s inkorporovaným pyrenem (vlevo), data z literatury <sup>198</sup> (vpravo). ....	100
Obrázek 56: Emisní spektra micel s inkorporovaným pyrenem.....	100
Obrázek 57: Absorpční spektra roztoků micel s inkorporovaným pyrenem. ....	101
Obrázek 58: Závislost intenzity záření na koncentraci micel derivátu HA–4C. ....	102
Obrázek 59: Srovnání křivek micel derivátů HA–4C a HA–11C. ....	103
Obrázek 60: Srovnání tokových křivek roztoků derivátů HA–karb, HA–11C a HA–TOSU. .....	104
Obrázek 61: Záznam titrace roztokem polymeru. <sup>205</sup> ....	105
Obrázek 62: Zlom křivky závislosti entalpie na koncentraci polymeru, obrázek z literatury (vlevo) <sup>207</sup> , závislost entalpie na koncentraci našich derivátů. ....	106
Obrázek 63: Dynamická viskozita přírodního a modifikovaného HA ( $DS\cong 40$ %). ....	107
Obrázek 64: Dynamická viskozita přírodního a modifikovaného HA ( $DS\cong 17$ %). ....	107
Obrázek 65: Tokové křivky derivátů HA–karb s různými DS.....	108
Obrázek 66: Tokové křivky derivátů HA–karb připravených za stejných podmínek. ....	109
Obrázek 67: Tokové křivky derivátů HA–TOSU, HA–11C a přírodního HA.....	109
Obrázek 68: Struktura klotrimazolu. ....	110
Obrázek 69: Struktura fenyl-salicylátu.....	111
Obrázek 70: Struktura DL- $\alpha$ -tokoferolu.....	115
Obrázek 71: Schematický nákras micely s inkorporovaným léčivem (růžová). ....	117
Obrázek 72: Struktura resveratrolu.....	118
Obrázek 73: UV/Vis spektrum resveratrolu a derivátu HA–karb. ....	120
Obrázek 74: Struktura retinyl-palmitátu.....	121

Obrázek 75: Míra aktivace/inhibice viability buněk roztoky derivátů HA-4C, HA-6C, HA-8C a HA-11C. ....	126
Obrázek 76: Míra aktivace/inhibice viability buněk ošetřených roztoky derivátů HA-karb. ....	127
Obrázek 77: Míra aktivace/inhibice viability buněk ošetřených roztokem 11-(9 <i>H</i> -karbazol-9-yl)undekanové kyseliny. ....	128
Obrázek 78: Míra aktivace/inhibice viability buněk ošetřených roztokem HA-TOSU. ...	128
Obrázek 79: Míra aktivace/inhibice viability buněk ošetřených roztoky HA-HB8C, HA-HB10C a HA-HB12C. ....	129
Obrázek 80: Výsledek měření hemolytické aktivity derivátu HA-11C. ....	130

## Seznam tabulek

Tabulka 1: Podmínky a výsledky alkylace benzenu.....	62
Tabulka 2: Výsledky modifikačních reakcí za použití různých bází.....	68
Tabulka 3: Podmínky a výsledky modifikačních reakcí HA pomocí 4-fenylmásečné kyseliny s použitím báze DIPEA.....	68
Tabulka 4: Podmínky a výsledky modifikačních reakcí HA a 4-fenylmásečné kyseliny s použitím báze TEA.....	69
Tabulka 5: Podmínky a výsledky modifikačních reakcí HA a 6-fenylhexanové kyseliny.	71
Tabulka 6: Podmínky a výsledky modifikačních reakcí HA a 8-fenyl-oktanové kyseliny..	71
Tabulka 7: Podmínky a výsledky modifikačních reakcí HA a Fmoc-6-Ahx-OH.....	72
Tabulka 8: Podmínky a výsledky modifikační reakce HA a 11-tolylundekanové kyseliny	73
Tabulka 9: Výsledky modifikace HA různými $\omega$ -FAK.....	74
Tabulka 10: Výsledky a podmínky modifikace HA 11-(9 <i>H</i> -karbazol-9-yl)undekanovou kyselinou.....	84
Tabulka 11: Výsledky modifikačních reakcí s využitím 4-oktyloxybenzoových kyselin..	90
Tabulka 12: Výsledky UV/Vis stanovení množství pyrenu.....	101
Tabulka 13: Hodnoty CAC jednotlivých derivátů.....	103
Tabulka 14: Vazebná kapacita micel s inkorporovaným klotrimazolem.....	111
Tabulka 15: Vazebná kapacita micel s inkorporovaným fenyl-salicylátém.....	112
Tabulka 16: Výsledky opakovaného stanovení vazebné kapacity (micely s inkorporovaným fenyl-salicylátém).....	112
Tabulka 17: Výsledky krátkodobé stability micel s inkorporovaným klotrimazolem.....	113
Tabulka 18: Výsledky krátkodobé stability micel s inkorporovaným fenyl-salicylátém..	114
Tabulka 19: Výsledky měření vazebných kapacit micel se směsí klotrimazolu a DL- $\alpha$ -tokoferolu.....	115
Tabulka 20: Výsledky vazebných kapacit micel se směsí fenyl-salicylátu a DL- $\alpha$ -tokoferolu.....	116
Tabulka 21: Výsledky vazebných kapacit opakované přípravy micel s klotrimazolem a DL- $\alpha$ -tokoferolem.....	117
Tabulka 22: Výsledky vazebných kapacit micel s inkorporovaným resveratrolem.....	119
Tabulka 23: Výsledky vazebné kapacity micel připravených z derivátu HA-karb.....	120
Tabulka 24: Srovnání vazebných kapacit micel vybraných derivátů.....	121
Tabulka 25: Výsledky vazebných kapacit micel s inkorporovaným retinyl-palmitátem (RP).....	122
Tabulka 26: Analýza inhibičního účinku klotrimazolu v nosiči.....	123
Tabulka 27: Výsledné hodnoty velikosti a $\zeta$ -potenciálu micel.....	124

## Seznam schémat

Schéma 1: Haberova–Weissova a Fentonova reakce. ....	14
Schéma 2: Reakční mechanismus savčích hyaluronidáz. ....	16
Schéma 3: Tvorba konjugovaného (vlevo) a síťovaného produktu (vpravo). ....	17
Schéma 4: Modifikační reakce HA za vzniku etherových vazeb mezi HA a modifikačním činidlem. ....	19
Schéma 5: Příprava esteru HA z oktenyl anhydridu kyseliny jantarové. ....	20
Schéma 6: Hydrolýza CDI. ....	21
Schéma 7: Kondenzace karboxylové skupiny a alkoholu za použití DCC. ....	23
Schéma 8: Vedlejší produkt při použití EDC. ....	24
Schéma 9: Aktivační krok (A) a samotná modifikace hyaluronanu (B). ....	57
Schéma 10: Mechanismus účinku 4-dimethylaminopyridinu. ....	58
Schéma 11: Sled reakčních kroků vedoucích k přípravě aromatické karboxylové kyseliny odvozené od toluenu. ....	60
Schéma 12: Navržený postup vedoucí k přípravě 12-fenyldodekanové kyseliny. ....	63
Schéma 13: Postup přípravy 11-(9 <i>H</i> -karbazol-9-yl)undekanové kyseliny. ....	66
Schéma 14: Postup přípravy 4-alkoxybenzoátů. ....	66



## Seznam použité literatury

- <sup>1</sup>Liu L, Liu Y, Li J, Du G, Chen J. *Microbial Cell Factories*. **2011**, 10:99.
- <sup>2</sup>Bergman K, Elvingson C, Hilborn J, Svensk G, Bowden T. *Biomacromolecules*. **2007**, 8, 2190–2195.
- <sup>3</sup>Credi C, Biella S, De Marco C, Levi M, Suriano R, Turri S. *J Mech Behav Biomed Mater*. **2014**, 29, 309–316.
- <sup>4</sup>D'Este M, Eglin D, Alini M. *Carbohydr Polym*. **2014**, 108, 239–246.
- <sup>5</sup>Takehi K, Kinoshita M, Yasueda S. *J Chromatogr B*. **2003**, 797, 347–355. Takehi K, Kinoshita M, Yasueda S. *J Chromatogr B*. **2003**, 797, 347–355.
- <sup>6</sup>Mravec F, Pekar M, Velebný V. *Colloid Polym Sci*. **2008**, 86, 1681–1685.
- <sup>7</sup>Eenschooten C, Guillaumie F, Kontogeorgis GM, Stenby EH, Schwach-Abdellaoui K. *Carbohydr Polym*. **2010**, 79, 597–605.
- <sup>8</sup>Necas J, Bartosikova L, Brauner P, Kolar J. *Vet Med*. **2008**, 53, 397–411.
- <sup>9</sup>Schante CE, Zuber G, Herlin C, Vandamme TF. *Carbohydr Polym*. **2011**, 85, 469–489.
- <sup>10</sup>Cowman MK, Matsuoka S. *Carbohydr Res*. **2005**, 340, 791–809.
- <sup>11</sup>Schante CE, Zuber G, Herlin C, Vandamme TF. *Carbohydr Polym*. **2011**, 85, 469–489.
- <sup>12</sup>Karousou E, Misra S, Ghatak S, Dobra K, Götte M, Vignetti D, Passi A, Karamanos NK, Skadalis SS. *Matrix Biology*. **2017**, 59, 3–22.
- <sup>13</sup>Daoud-Mahammed S, Ringard-Lefebvre C, Razzouq N, Rosilio V, Gillet B, Couvreur P, Amiel C, Gref R. *J Colloid Interface Sci*. **2007**, 307, 83–93.
- <sup>14</sup>Manna U, Bharani S, Patil S. *Biomacromolecules*. **2009**, 10, 2632–2639.
- <sup>15</sup>Prestwich G, Marecak D, Marecek J, Vercruysse K, Ziebell M. *J Controlled Release*. **1998**, 53, 93–103.
- <sup>16</sup>Price RD, Berry MG, Navsaria HA. *J Plast Reconstr Aesthet Surg*. **2007**, 60, 1110–1119.
- <sup>17</sup>Spagnoli C, Kornjakov A, Ulman A, Balazs E, Lyubchenko Y, Cowman M. *Carbohydr Res*. **2005**, 340, 929–941.
- <sup>18</sup>Berko S, Maroda M, Bodnar M, Erös G, Hartmann P, Szentner K, Szabó-Révész P, Kemény L, Borbély J, Czányi E. *Eur Polym J*. **2013**, 49, 2511–2517.
- <sup>19</sup>Girish KS, Kemparaju K. *Life Sci*. **2007**, 80, 1921–1943.
- <sup>20</sup>Stern R, Kogan G, Jedrzejas MJ, Soltes L. *Biotechnol Adv*. **2007**, 25, 537–557.
- <sup>21</sup>Vercruysse K. Hyaluronan: A simple molecule with complex character. In: Williams P, ed. UK: Royal Society of Chemistry, **2011**, 261–291, eISBN: 978-1-84973-351-9.
- <sup>22</sup>Dosio F, Arpicco S, Stella B, Fattal E. *Adv Drug Deliv Rev*. **2016**, 97, 204–236.
- <sup>23</sup>Vasi A, Popa MI, Butnaru M, Dodi G, Verestiuc L. *Mater Sci Eng C-Mater Biol Appl*. **2014**, 38, 177–185.
- <sup>24</sup>Chanmee T, Ontong P, Itano N. *Cancer Lett*. **2016**, 375, 20–30.
- <sup>25</sup>Wang Y, Han G, Guo B, Huang J. *Pharmacol Rep*. **2016**, 68, 1126–1132.
- <sup>26</sup>Mondek J, Kalina M, Simulescu V, Pekar M. *Polym Degrad Stab*. **2015**, 120, 107–113.
- <sup>27</sup>Carvalho MP, Costa EC, Miguel SP, Correia IJ. *Carbohydr Polym*. **2016**, 150, 139–148.
- <sup>28</sup>Dicker KT, Gurski LA, Pradhan-Bhatt S, Witt RL, Farach-Carson MC, Jia X. *Acta Biomater*. **2014**, 10, 1558–1570.
- <sup>29</sup>Cutting KF. *J Wound Care*. **2011**, 20, 424–430.
- <sup>30</sup>Robert L. *Pathologie Biologie*. **2015**, 63, 32–34.
- <sup>31</sup>Lapcik L, Lapcik L, De Smedt S, Demeester J, Chabreck P. *Chem Rev*. **1998**, 98, 2663–2684.
- <sup>32</sup>Rah MJ. *Optometry*. **2011**, 82, 38–43.
- <sup>33</sup>Choi KY, Saravanakumar G, Park JH, Park K. *Colloid Surf B-Biointerfaces*. **2012**, 99, 82–94.
- <sup>34</sup>Dong X, Liu C. *J Nanomater*. **2010**, 906936. 9 stran.
- <sup>35</sup>Eenschooten C, Vaccaro A, Delie F, Guillaumie F, Tømmerås K, Kontogeorgis GM, Schwach-Abdellaoui K, Borkovec M, Gurny R. *Carbohydr Polym*. **2012**, 87, 444–451.
- <sup>36</sup>Lin WJ, Lee W, Shieh M. *Carbohydr Polym*. **2017**, 155, 101–108.
- <sup>37</sup>Naor D. *Front Immunol*. **2016**, 7, ISBN: 978-2-88919-913-6.
- <sup>38</sup>Toole BP. Glycoforum: Science of hyaluronan today. <http://www.glycoforum.gr.jp/science/hyaluronan/HA08/HA08E.html>. Accessed 27.3., 2017.
- <sup>39</sup>Jeong Y, Kim DH, Chung C, Yoo JJ, Choi KH, Kim CH, Ha SH, Kang DH. *Colloid Surf B-Biointerfaces*. **2012**, 90, 28–35.
- <sup>40</sup>Nedvetzki S, Gonen E, Assayag N, Reich R, Williams RO, Thurmond RL, Huang J, Neudecker BA, Wang F, Turley EA, Naor D. *Proc Natl Acad Sci U S A*. **2005**, 102, 1263–1263.
- <sup>41</sup>Tolg C, McCarthy JB, Yazdani A, Turley EA. *Biomed Res Int*. **2014**, 103923, 18 stran.
- <sup>42</sup>Xu Y, Asghar S, Yang L, et al.: *Carbohydr. Polym*. **2017**, 157, 419–428.

- <sup>43</sup> Zhu Y, Wang X, Chen J, Zhang J, Meng F, Deng C, Cheng R, Feijen J, Zhong Z. *J Controlled Release*. **2016**, *244*, 229–239.
- <sup>44</sup> Yen J, Ying J, Wang H, Yin L, Uckun F, Cheng J. *ACS Biomater. Sci. Eng.*, **2016**, *2*, 326–335.
- <sup>45</sup> Solis MA, Chen Y, Wong T, Bittencourt V, Lin Y, Huang L. *Biochem. Res. Int.*, **2012**, 11 stran.
- <sup>46</sup> Simpson RML, Hong X, Wong MM, Karamariti E, Bhaloo SI, Warren D, Konh W, Hu Y, Xu Q. *Stem Cells*, **2016**, *34*, 1225–1238.
- <sup>47</sup> Xu K, Narayanan K, Lee F, Bae KH, Gao S, Kurisawa M. *Acta Materialia*, 2015, *24*, 159–171.
- <sup>48</sup> Joddar B, Kitajima T, Ito Y. *Biomaterials*, **2011**, *32*, 8404–8415.
- <sup>49</sup> Al-Sibani M, Al-Harrasi A, Neubert RHH. *Eur J Pharm Sci*. **2016**, *91*, 131–137.
- <sup>50</sup> Soltes L, Mendichi R, Kogan G, Schiller J, Stankovska M, Arnhold J. *Biomacromolecules*. **2006**, *7*, 659–668.
- <sup>51</sup> Yue W. *Carbohydr Polym*. **2012**, *89*, 709–712.
- <sup>52</sup> Choi J, Kim J, Kim J, Kweon D, Lee J. *Carbohydr Polym*. **2010**, *79*, 1080–1085.
- <sup>53</sup> Gu Z, Cai Q, He Y, Fu T, Li F. *Carbohydr Polym*. **2010**, *82*, 521–523.
- <sup>54</sup> Tokita Y, Okamoto A. *Polym Degrad Stab*. **1995**, *48*, 269–273.
- <sup>55</sup> Bezakova Z, Hermannova M, Drimalova E, Malovikova A, Ebringerova A, Velebny V. *Carbohydr Polym*. **2008**, *73*, 640–646.
- <sup>56</sup> Li S, Jedrzejewski M. *J Biol Chem*. **2001**, *276*, 41407–41416.
- <sup>57</sup> Lepperdinger G, Fehrer C, Reitingner S. Chapter 4 - biodegradation of hyaluronan. In: Garg HG, Hales CA, eds. *Chemistry and biology of hyaluronan*. Oxford: Elsevier Science Ltd; **2004**, 71–82, ISBN: 978-0-08-044382-9.
- <sup>58</sup> Palao-Suay R, Gomez-Mascaraque LG, Aguilar MR, Vazquez-Lasa B, San Roman JT. *Prog Polym Sci*. **2016**, *53*, 207–248.
- <sup>59</sup> Pelletier S, Hubert P, Lapique F, Payan E, Dellacherie E. *Carbohydr Polym*. **2000**, *43*, 343–349.
- <sup>60</sup> Della Valle F, Romeo A, Esters of hyaluronic acid, **1989**, patent číslo US4957744.
- <sup>61</sup> Malson T, Lindqvist B, Gel of crosslinked hyaluronic acid for use as a vitreous humor substitute, **1986**, patent číslo WO/1986/000079.
- <sup>62</sup> Tomihata K, Ikada Y. *J Polym Sci Pol Chem*. **1997**, *35*, 3553–3559.
- <sup>63</sup> Serban MA, Yang G, Prestwich GD. *Biomaterials*. **2008**, *29*, 1388–1399.
- <sup>64</sup> Tommeraas K, Mellergaard M, Malle BM, Skagerlind P. *Carbohydr Polym*. **2011**, *85*, 173–179.
- <sup>65</sup> Seidlits SK, Khaing ZZ, Petersen RR, Nickels JD, Vanscoy JE, Shear JB, Schmidt CE. *Biomaterials*. **2010**, *31*, 3930–3940.
- <sup>66</sup> Kesharwani P, Banerjee S, Padhye S, Sarkar FH, Iyer AK. *Biomacromolecules*. **2015**, *16*, 3042–3053.
- <sup>67</sup> Borbely J, Rente T, Boonap M, Hyaluronic acid-based cross-linked nanoparticles. **2007**, patent číslo US20070224277.
- <sup>68</sup> Heinze T, Liebert T, Koschella A. *Esterification of polysaccharides*. Springer; **2006**. ISBN: 978-3-540-32103-3.
- <sup>69</sup> Picotti F, Fabbian M, Gianni R, Sechi A, Stucchi L, Bosco M. *Carbohydr Polym*. **2013**, *93*, 273–278.
- <sup>70</sup> Larrivee-Aboussafy C, Jones BP, Price KE, Hardink MA, McLaughlin RW, Lillie BM, Hawkins JM, Vaidyanathan R. *Org Lett*. **2010**, *12*, 324–327.
- <sup>71</sup> Morton R, Mangroo D, Gerber G. *Can J Chem -Rev Can Chim*. **1988**, *66*, 1701–1705.
- <sup>72</sup> Moeller M, Kaufmann B, Gurny R, Process for the esterification of hyaluronic acid with hydrophobic organic compounds, **2014**, patent číslo US20140163217.
- <sup>73</sup> Tsubokawa N, Hosoya M, Kurumada J. *React Funct Polym*. **1995**, *27*, 75–81.
- <sup>74</sup> Kato H, Hayashi M, Fukumori Y, Kaneko H. *Food Chem Toxicol*. **2002**, *40*, 1713–1718.
- <sup>75</sup> Wang Y, Ikeda A, Hori N, Takemura A, Ono H, Yamada T, Tsikatani T. *Polymer*. **2005**, *46*, 9793–9802.
- <sup>76</sup> Isobe T, Isikawa T. *J Org Chem*. **1999**, *64*, 6984–6988.
- <sup>77</sup> Ferrer MCC, Yang S, Eckmann DM. *Langmuir*. **2010**, *26*, 14126–14134.
- <sup>78</sup> Lee H, Lee K, Park TG. *Bioconjug Chem*. **2008**, *19*, 1319–1325.
- <sup>79</sup> Ohya S, Nakayama Y, Matsuda T. *Biomacromolecules*. **2001**, *2*, 856–863.
- <sup>80</sup> Sahoo S, Chung C, Khetan S, Burdick JA. *Biomacromolecules*. **2008**, *9*, 1088–1092.
- <sup>81</sup> Sam S, Touahir L, Andresa JS, Allongue P, Chazalviel J, Gouget-Laemmel AC, de Villeneuve CH, Morailon A, Ozanam F, Gabouze N, Djebbar S. *Langmuir*. **2010**, *26*, 809–814.
- <sup>82</sup> Wang C, Yan Q, Liu H, Zhou X, Xiao S. *Langmuir*. **2011**, *27*, 12058–12068.
- <sup>83</sup> Vashist SK. *Diagnostics*. **2012**, *2*, 23–33.
- <sup>84</sup> Pu YJ, Vaid RK, Boini SK, Towsley RW, Doecke CW, Mitchell D. *Org Process Res Dev*. **2009**, *13*, 310–314.

- <sup>85</sup> Norbedo S, Dinin F, Bosi S, Bergamin M, Murano E, Anticancer conjugates of camptothecin to hyaluronic acid, **2009**, patent číslo WO2009074678.
- <sup>86</sup> Kunishima M, Kawachi C, Iwasaki F, Terao K, Tani S. *Tetrahedron Lett.* **1999**, *40*, 5327–5330.
- <sup>87</sup> Barbucci R, Carboxylated polysaccharides phosphated or bisphosphonated derivatives, optionally cross-linked, and their preparation and biomedical uses, **2008**, patent číslo EP1992364.
- <sup>88</sup> Manna U, Bharani S, Patil S. *Biomacromolecules.* **2009**, *10*, 2632–2639.
- <sup>89</sup> Hruby M, Kucka J, Kozempel J, Lebeda O. *Chem Listy.* **2006**, *100*, 10–16.
- <sup>90</sup> Cao J, Su T, Zhang L, Liu R, Wang G, He B, Gu Z. *Int J Pharm.* **2014**, *471*, 28–36.
- <sup>91</sup> Wang X, Gu X, Wang H, Sun Y, Wu H, Mao S. *Eur J Pharm Sci.* **2017**, *96*, 255–262.
- <sup>92</sup> Van Nostrum V. Polymeric micelles for drug delivery. science topics.  
[http://www.scitopics.com/polymeric\\_micelles\\_for\\_drug\\_delivery.html](http://www.scitopics.com/polymeric_micelles_for_drug_delivery.html). Accessed 9.9.2013.
- <sup>93</sup> Krouska J, Pekar M, Kluckakova M, Sarac B, Bester-Rogac M. *Carbohydr Polym.* **2017**, *157*, 1837–1843.
- <sup>94</sup> Chu B, Shi S, Li X, Hu L, Shi L, Zhang H, Xu Q, Ye L, Lin G, Zhang N, Zhang X. *Int J Pharm.* **2016**, *513*, 118–129.
- <sup>95</sup> Zhang Y, Ren T, Gou J, Zhang L, Tao X, Tian B, Tian P, Yu D, Song J, Liu X, Chao Y, Xiao W, Tang X. *J Controlled Release.* **2017**, v tisku.
- <sup>96</sup> Gelderblom H, Verweij J, Nooter K, Sparreboom A. *Eur J Cancer.* **2001**, *37*, 1590–1598.
- <sup>97</sup> Lu Y, Park K. *Int J Pharm.* **2013**, *453*, 198–214.
- <sup>98</sup> Sosnik A, Raskin MM. *Biotechnol Adv.* **2015**, *33*, 1380–1392.
- <sup>99</sup> Rastogi A. PHARMATUTOR-ART-1652. <http://www.pharmatutor.org/articles/novel-drug-delivery-system>.
- <sup>100</sup> Akiyoshi K, Sunamoto J. *Supramol Sci.* **1996**, *3*, 157–163.
- <sup>101</sup> Goncalves C, Gama FM. *Eur Polym J.* **2008**, *44*, 3529–3534.
- <sup>102</sup> Nichifor M, Lopes S, Bastos M, Lopes A. *J Phys Chem B.* **2004**, *108*, 16463–16472.
- <sup>103</sup> Akbarzadeh A, Rezaei-Sadabady R, Davaran S, Joo SW, Zarghami N, Hanifehpour Y, Samiei M, Kouhi M, Nejati-Koskhi K. *Nanoscale Res Lett.* **2013**, *8*, 9 stran.
- <sup>104</sup> Pattni BS, Chupin VV, Torchilin VP. *Chem Rev.* **2015**, *115*, 10938–10966.
- <sup>105</sup> Klajnert B, Bryszewska M. *Acta Biochim Pol.* **2001**, *48*, 199–208.
- <sup>106</sup> Abbasi E, Aval SF, Akbarzadeh A, Milani M, Nasrabadi HT, Joo SW, Hanifehpour Y, Nejati-Kodhki K, Pashaei-Asl P. *Nanoscale Res Lett.* **2014**, *9*, 10 stran.
- <sup>107</sup> Mora-Huertas CE, Fessi H, Elaissari A. *Int J Pharm.* **2010**, *385*, 113–142.
- <sup>108</sup> Letchford K, Burt H. *Eur J Pharm Biopharm.* **2007**, *65*, 259–269.
- <sup>109</sup> Kothamasu P, Kanumur H, Ravur N, Maddu C, Parasuramrajam R, Thangavel S. *BiolImpacts.* **2012**, *2*, 71–81.
- <sup>110</sup> Muthiah M, Park S, Nurunnabi M, Lee J, Lee Y, Park H, Lee B, Min J, Park I. *Colloid Surf B-Biointerfaces.* **2014**, *116*, 284–294.
- <sup>111</sup> Pepic I, Lovric J, Filipovic-Grcic J. *Eur J Pharm Sci.* **2013**, *50*, 42–55.
- <sup>112</sup> al Bo AG, Soldi V, Giacomelli FC, Travelet C, Jean B, Pignot-Paintrand I, Borsali R, Fort S. *Langmuir.* **2012**, *28*, 1418–1426.
- <sup>113</sup> Rijcken CJF, Soga O, Hennink WE, van Nostrum CF. *J Controlled Release.* **2007**, *120*, 131–148.
- <sup>114</sup> Francis M, Cristea M, Winnik F. *Pure Appl Chem.* **2004**, *76*, 1321–1335.
- <sup>115</sup> Sezgin Z, Yuksel N, Baykara T. *Eur J Pharm Biopharm.* **2006**, *64*, 261–268.
- <sup>116</sup> Owen SC, Chan DPY, Shoichet MS. *Nano Today.* **2012**, *7*, 53–65.
- <sup>117</sup> Daman Z, Ostad S, Amini M, Gilani K. *Int J Pharm.* **2014**, *468*, 142–151.
- <sup>118</sup> Mayol L, Biondi M, Russo L, Malle BM, Schwach-Abdellaoui K, Borzacchiello A. *Carbohydr Polym.* **2014**, *102*, 110–116.
- <sup>119</sup> Podduturi VP, Magana IB, O'Neala DP, Derosa PA. *Comput Methods Programs Biomed.* **2013**, *112*, 58–68.
- <sup>120</sup> Saadat E, Amini M, Khoshayand MR, Dinarvand R, Dorkoosh FA. *Int J Pharm.* **2014**, *475*, 163–173.
- <sup>121</sup> Mourya VK, Inamdar N, Nawale RB, Kulthe SS. *Indian J Pharm Educ Res.* **2011**, *45*, 128–138.
- <sup>122</sup> Hrubý M. *Farmakochemie.* **2010**, 711–712.
- <sup>123</sup> Greish K. *Drug Discovery Today: Technologies.* **2012**, *9*, 161–166.
- <sup>124</sup> Lee SJ, Min HS, Ku SH, Son S, Kwon IC, Kim SH, Kim K. *Nanomedicine.* **2014**, *9*, 1697–1713.
- <sup>125</sup> Kang B, Opatz T, Landfester K, Wurm FR. *Chem Soc Rev.* **2015**, *44*, 8301–8325.
- <sup>126</sup> Kadajji VG, Betageri GV. *Polymers.* **2011**, *3*, 1972–2009.
- <sup>127</sup> Wu J, Wang C, Zhuo R, Cheng S. *Colloid Surf B-Biointerfaces.* **2014**, *123*, 498–505.
- <sup>128</sup> Ulery BD, Nair LS, Laurencin CT. *J Polym Sci Pt B-Polym Phys.* **2011**, *49*, 832–864.
- <sup>129</sup> International Union of Pure and Applied Chemistry.

- <sup>130</sup> Upadhyay KK, Bhatt AN, Mishra AK, Dwarakanath BS, Jain S, Schatz C, Le Meins J, Farooque A, Chandraiah G, Jain AK, Misra A, Lecommandoux S. *Biomaterials*. **2010**, *31*, 2882–2892.
- <sup>131</sup> Huang J, Zhang H, Yu Y, Chen Y, Wang D, Zhang G, Zhou G, Liu J, Sun Z, Sun D, Lu Y, Zhong Y. *Biomaterials*. **2014**, *35*, 550–566.
- <sup>132</sup> Novoa-Carballal R, Mueller AHE. *Chem Commun*. **2012**, *48*, 3781–3783.
- <sup>133</sup> Abbad S, Wang C, Waddad AY, Lv H, Zhou J. *Int J Nanomed*. **2015**, *10*, 305–320.
- <sup>134</sup> Cagel M, Tesan FC, Bernabeu E, Salgueiro MJ, Zubillaga MB, Moretton MA, Chiappetta DA. *Eur J Pharm Biopharm*. **2017**, *113*, 211–228.
- <sup>135</sup> Stefanello TF, Szarpak-Jankowska A, Appaix F, Louage B, Hamard L, De Geest BG, van der Sanden B, Nakamura CV, Auzély-Velty R. *Acta Biomater*. **2014**, *10*, 4750–4758.
- <sup>136</sup> Hong D, Lai P, Ku K, Lai Z, Chu I. *Polym Degrad Stab*. **2013**, *98*, 1578–1585.
- <sup>137</sup> Danquah M, Fujiwara T, Mahato RI. *Biomaterials*. **2010**, *31*, 2358–2370.
- <sup>138</sup> Zhou L, Zhou L, Wei S, Ge X, Zhou J, Jiang H, Li F, Shen J. *J Photochem Photobiol B-Biol*. **2014**, *135*, 7–16.
- <sup>139</sup> Opanasopit P, Yokoyama M, Watanabe M, Kawano K, Maitani Y, Okano T. *J Pharm Res*. **2004**, *21*(11), 2001–2008.
- <sup>140</sup> Kim S, Shi Y, Kim JY, Park K, Cheng J. *Expert Opin Drug Deliv*. **2010**, *7*, 49–62.
- <sup>141</sup> Pasut G, Paolino D, Celia C, Mero A, Joseph AS, Wolfram J, Cosco D, Schiavon O, Shen H, Fresta M. *J Controlled Release*. **2015**, *199*, 106–113.
- <sup>142</sup> Jones M, Leroux J. *Eur J Pharm Biopharm*. **1999**, *48*, 101–111.
- <sup>143</sup> Leung HW. *Encyclopedia of toxicology*. **2014**, *3*, 1043–1044.
- <sup>144</sup> Huang P, Yang C, Liu J, Wang W, Guo S, Li J, Sun Y, Dong H, Deng L, Zhang J, Liu J, Dong A. *J Mat Chem B*. **2014**, *2*, 4021–4033.
- <sup>145</sup> Takahashi A, Ozaki Y, Kuzuya A, Ohya Y. *Biomed Res Int*. **2014**, *579212*, 10 stran.
- <sup>146</sup> Jang E, Lim E, Choi Y, Kim E, Kim H, Kim D, Suh J, Huh Y, Haam S. et al. *J Mat Chem B*. **2013**, *1*, 5686–5693.
- <sup>147</sup> NTP 12th report on carcinogens. **2011**;12:iii-499.
- <sup>148</sup> Cappelli A, Grisci G, Paolino M, Giuliani G, Donati A, Mendichi R, Artusi R, Demiranda M, Zanardi A, Giorgi G, Vomero S. *J Mat Chem B*. **2014**, *2*, 4489–4499.
- <sup>149</sup> Norbedo S, Dinon F, Bergamin M, Bosi S, Aroulmoji V, Khan R, Murano E. *Carbohydr Res*. **2009**, *344*, 98–104.
- <sup>150</sup> Kesharwani P, Banerjee S, Padhye S, Sarkar FH, Iyer AK. *Biomacromolecules*. **2015**, *16*, 3042–3053.
- <sup>151</sup> Motoshima K, Ishikawa M, Hashimoto Y, Sugita K. *Bioorg Med Chem*. **2011**, *19*, 3156–3172.
- <sup>152</sup> Weyiu D, Jiaqi P, Chunming Z, Weiguo C. *J Chem Soc Perkin Trans*. **1991**, 1369–1373.
- <sup>153</sup> Huerta-Angeles G, Brandejsová M, Kulhánek J, Pavlík V, Šmejkalová D, Vágnerová H, Velebný V. *Carbohydr Pol*. **2016**, *152*, 815–824.
- <sup>154</sup> Groehn V, Moser R, Pugin B. *Adv Synth Catal*. **2005**, *347*, 1855–1862.
- <sup>155</sup> Khetubol A, Van Snick S, Hassien A, Frome E, Firdaus Y, Pandey L, David CC, Duerinckx K, Dehaen W, Hens Z, Van der Auweraer M. *J Appl Phys*. **2013**, *113*, 083507.
- <sup>156</sup> Subramanian M, Praveen Kumar V, Bhattacharya S. *Arkivoc*. **2002**, vii, 116–125.
- <sup>157</sup> Birch AM, Birtles S, Buckett LK, Kemmit PD, Smith GJ, Smith TJD, Turnbull AV, Wang SJY. *J Med Chem*. **2009**, *52*, 1558–1568.
- <sup>158</sup> Milkiewicz KL, Neagu IB, Parks DJ, Lu T. *Tetrahedron Lett*. **2003**, *44*, 7341–7343.
- <sup>159</sup> Moosseau JJ, Vallée F, Lorion MM, Charette AB. *J Am Chem Soc*. **2010**, *132*, 14412–14414.
- <sup>160</sup> Bosiak MJ, Jakubowska JA, Aleksandrak KB, Kaminski S, Kaczmarek-Kedziera A, Ziegler-Borowska M, Kedziera D, Adams J. *Tetrahedron Lett*. **2012**, *53*, 3923–3926.
- <sup>161</sup> Motoshima K, Ishikawa M, Hashimoto Y, Sugita K. *Bioorg Med Chem*. **2011**, *19*, 3156–3172.
- <sup>162</sup> Weyiu D, Jiaqi P, Chunming Z, Weiguo C. *J Chem Soc Perkin Trans*. **1991**, 1369–1373.
- <sup>163</sup> Boger DL, Corbett WL, Wiggins JM. *J Org Chem*. **1990**, *55*, 2999–3000.
- <sup>164</sup> Gribble AD, Dolle RE, Shaw A, McNair D, Novelli R, Novelli CE, Slingsby BP, Shah VP, Tew D, Saxty BA, Allen M, Groot PH, Pearce N, Yates J. *J Med Chem*. **1996**, *39*, 3569–3584.
- <sup>165</sup> Nakamura M, Matsuo K, Ito S, Nakamura E. *J Am Chem Soc*. **2004**, *126*, 3686–3687.
- <sup>166</sup> Gluszynska A. *Eur J Med Chem*. **2015**, *94*, 405–426.
- <sup>167</sup> Sekar R, Subbaih M, Sambandan A. *Dyes and Pigments*. **2012**, *94*(3), 503–511.
- <sup>168</sup> Wisastra R, Petra A, Kok M, Eleftheriadis N, Baumgartner MP, Camacho CJ, Haisma HJ, Dekker FJ. *Bioorg Med Chem*. **2013**, *21*, 7763–7778.
- <sup>169</sup> Abbott BJ, Fukuda DS. Preparation of p-(n-Octyloxy)benzoic Acid, **1980**, patent číslo US 4293482 A1.

- <sup>170</sup> Wang LY, Tsai HY, Lin HC. *Macromolecules*. **2010**, 43, 1277–1288.
- <sup>171</sup> Kiss Z. Drug Combination to treat drug resistant tumors, **2007**, patent číslo US2008/207738 A1.
- <sup>172</sup> Griffione G, Van Dooren T, De La Parra R, Allasia S, Marchand A, Kilonda A, Chaltin P. New Compounds for the treatment of neurodegenerative diseases, **2013**, patent číslo US2013/274260 A1.
- <sup>173</sup> Liu Y, Lotero E, Goodwin JG. *J Catal*. **2006**, 242(2), 278–286.
- <sup>174</sup> Vojta D, Vazdar M. *Spectrochim Acta A*. **2014**, 132, 6–14.
- <sup>175</sup> Luo C, Zhao J, Tu M, Zeng R, Rong J. *Mat Sci Eng C*. **2014**, 36, 301–308.
- <sup>176</sup> Jeon O, Song SJ, Lee KJ, Park MH, Lee SH, Hahn SK, Kim S, Kim BS. *Carbohydr Polym*. **2007**, 70, 251–257.
- <sup>177</sup> Martin-Saldana S, Palao-Suay R, Aguilar MR, Ramirez-Camacho R, Roman JS. *Acta Biomater*. **2017**, 53, 199–210.
- <sup>178</sup> Liang DS, Su HT, Liu YJ, Wang AT, Qi XR. *Biomaterials*. **2015**, 71 11-2.
- <sup>179</sup> Owen SC, Chan DPY, Shoichet MS. *Nano Today*. **2012**, 7, 53–65.
- <sup>180</sup> Kim S, Shi Y, Kim JY, Park K, Cheng JX. *Expert Opin Drug Deliv*. **2010**, 7, 49–62.
- <sup>181</sup> Lu J, Owe SC, Shoichet MS. *Macromolecules*. **2011**, 44, 6002–6008.
- <sup>182</sup> Choi J, Reipa V, Hitchins VM, Goering PL, Malinauskas RA. *Toxicol Sci*. **2011**, 123(1), 133–143.
- <sup>183</sup> Mei L, Zhang Z, Zhao L, Huang L, Yang XL, Tang J, Feng SS. *Adv Drug Deliv Rev*. **2013**, 65, 880–890.
- <sup>184</sup> Termsarasab U, Yoon IS, Park JH, Moon HT, Cho HJ, Kim DD. *Int J Pharm*. **2014**, 464, 127–134.
- <sup>185</sup> Menuier M, Goupil A, Lineard P. *Int J Pharm*. **2017**, 526, 157–166.
- <sup>186</sup> Zhao X, Poon Z, Engler AC, Bonner DK, Hammond PT. *Biomacromolecules*. **2012**, 13, 1315–1322.
- <sup>187</sup> Najafi- Hajivar S, Zakeri-Milani P, Mohammadi H, Niazi M, Soleymani-Goloujeh M, Baradaran B, Valizadeh H. *Biomed Pharmacother*. **2016**, 83, 1365–1378.
- <sup>188</sup> Morton SW, Zhao X, Quadir MA, Hammod PT. *Biomaterials*. **2014**, 35, 3489–3496.
- <sup>189</sup> Chien SC, Chen CY, Leu HB, Su CH, Yin WH, Tseng WK, Wu YW, Lin TH, Chang KC, Wang JH, Wu CC, Yeh HI, Chen JW. *Int J Cardiol*. **2017**, 241, 1–5.
- <sup>190</sup> Jiwanich S, Ryu JH, Bickerton S, Thayumanavan S. *J Am Chem Soc*. **2010**, 132, 10683–10685.
- <sup>191</sup> Chang R, Yang J, Ge S, Zhao M, Liang C, Xiong L, Sun Q. *Food Hydrocol*. **2017**, 67, 14–26.
- <sup>192</sup> Shi Y, van Steenberg MJ, Teunissen EA, Novo L, Grandmann S, Baldus M, van Nostrum CF, Hennink WE. *Biomacromolecules*. **2013**, 14, 1826–1837.
- <sup>193</sup> Bonferoni BC, Snadri G, Delleria E, Rossi S, Ferrari F, Mori M, Caramella C. *Eur J Pharm Biopharm*. **2014**, 87(1), 101–106.
- <sup>194</sup> Dong X, Liu C. *J Nanomater*. **2010**, 9 stran.
- <sup>195</sup> Chakraborty T, Chakraborty I, Ghosh S. *Arab J Chem*. **2011**, 4, 265–270.
- <sup>196</sup> Cheon JB, Jeong YI, Cho CS. *Polymer*. **1999**, 40, 2041–2050.
- <sup>197</sup> Eenschooten C, Vaccaro A, Delie F, Guillaumie F, Tommeraas K, Kontogeorgis GM, Schwach-Abdellaoui K, Borkovec M, Gurny R. *Carbohydr Polym*. **2012**, 87, 444–451.
- <sup>198</sup> Silva DS, Almeida A, Prezotti F, Cury B, Campana-Filho SP, Sarmiento B. *Colloids Surf B Biointerfaces*. **2017**, 152, 220–228.
- <sup>199</sup> Tommeraas K, Eenschooten C. Aryl/alkyl succinic anhydride hyaluronan derivatives. 2005, patent číslo US2012/0283213 A1.
- <sup>200</sup> Berrnaou M, Bales B, Zana R. *J Colloid Interface Sci*. **2003**, 267, 519–523.
- <sup>201</sup> Bouchemal K. *Drug Discov Today*. **2008**, 13, 960–972.
- <sup>202</sup> Waters LJ, Hussain T, Parkers GMB. *J Chem Thermodynamics*. **2012**, 53, 36–41.
- <sup>203</sup> Taheri-Kafrani A, Bordbar AK. *J Therm Anal Calorim*. **2009**, 98, 567–575.
- <sup>204</sup> Arnaud A, Bouteiller L. *Langmuir*. **2004**, 20, 6858–6863.
- <sup>205</sup> Tommeraas K, Eenschooten C. Hyaluronic acid derivatives. **2011**, patent číslo US2011/0319357 A1.
- <sup>206</sup> Obeidat WM, Price JC. *J Microencapsulation*. **2003**, 20(1), 57–65.
- <sup>207</sup> Ali A, Ahmed S. *Int J Biol Macromol*. **2018**, 109, 273–286.
- <sup>208</sup> Horvát G, Budai-Szucs M, Berko S, Szabo-Revesz P, Soos J, Facsko A, Maroda M, Mori M, Sandri G, Bonferoni MC, Caramella C, Scanyi E. *Int J Pharm*. **2015**, 494, 321–328.
- <sup>209</sup> Santos SS, Lorenzoni A, Ferreira LM, Mattiazzi J, Adams AIH, Benardi LB, Alves SH, Schaffazick SR, Cruz L. *Mater Sci Eng C*. **2013**, 33, 1389–1394.
- <sup>210</sup> Tonglairoum P, Ngawhirunpat T, Rojanarata T, Panomsuk S, Kaomongkolgit R, Opanasopit P. *Carbohydr Polym*. **2015**, 132, 173–179.
- <sup>211</sup> Kalhapure RS, Sonawane SJ, Sikwal DR, Jadhav M, Rambharose S, Mocktar C, Govender T. *Colloids Surf B Biointerfaces*. **2015**, 136, 651–658.
- <sup>212</sup> Kelley KL, Roselle NJ. Phenyl salicylate as a topical anti-inflammatory. **1981**, patent číslo US4404198.

- <sup>213</sup> Sen PK, Chatterjee P, Pal B. *J Mol Catal A Chem.* **2015**, 396, 23–30.
- <sup>214</sup> Scognamiglio I, De Stefano D, Campani V, Mayol L, Carnuccio R, Fabbrocini G, Ayala F, La Rotonda MI, De Rosa G. *Int J Pharm.* **2013**, 440, 179–187.
- <sup>215</sup> Mohammadi RK, Arablou T. *Biom Pharm.* **2017**, 91, 220–228.
- <sup>216</sup> Kumar R, Kaur K, Uppal S, Mehta SK. *Ultrason Sonochem.* **2017**, 37, 478–489.
- <sup>217</sup> Smutná M, Pribojová J, Večerková J, Hilscherová K. *Ecotoxicol Environ Saf.* **2017**, 138, 32–38.
- <sup>218</sup> Yokota S, Oshio S. *J Food Drug Anal.* **2017**, 26(2), 504–511.
- <sup>219</sup> Ibrahim T, Rouby MNE, Al-Sherbini ES, Noury HE, Morsy ME. *Photodiagnosis Photodyn Ther.* **2016**, 13, 316–322.
- <sup>220</sup> Wang SQ, Dusza SW, Lim HW. *J Am Acad Dermatol.* **2010**, 63, 903–906.
- <sup>221</sup> Teixeira Z, Dreiss CA, Lawrence MJ, Heenan RK, Machado D, Justo GZ, Gutierrez SS, Duran N. *J Colloid Interface Sci.* **2012**, 382, 36–47.
- <sup>222</sup> Bae Lee J, Ryeol Lee D, Cho Choi N, Jang J, Ho Park C, Seak Yoon M, Lee M, Won K, Hwang JS, Kim BM. *Eur J Pharm Sci.* **2015**, 78, 111–120.
- <sup>223</sup> Drabent R, Bryl K, Smyk B, Ulbrych K. *J Photochem Photobiol B.* **1997**, 37, 254–260.
- <sup>224</sup> Andrews JM. *J Antimicrob Chemother.* **2001**, 48, 5–16.
- <sup>225</sup> Honary S, Zahir F. *Trop J Pharm Res.* **2013**, 12(2), 265–273.
- <sup>226</sup> Li L, Deng H, Lou W, Sun X, Song M, Tao J, Xiao B, Guo J. *World J Gastroenterol.* **2012**, 18(1), 79–83.
- <sup>227</sup> Kolb PS, Ayaub EA, Zhou W, Yum V, Dickhout JG, Ask K. *Int J Biochem Cell Biol.* **2015**, 61, 45–52.
- <sup>228</sup> Schroder M, Abdurahman H, Ruoff T, Lehnert K, Vetter W. *J Am Oil Soc.* **2014**, 91, 1695–1702.
- <sup>229</sup> Rezanka T, Schreiberova O, Cejkova A, Sigler K. *Phytochem.* **2011**, 72, 1914–1926.
- <sup>230</sup> Wang J, Cui S, Bao Y, Xing J, Hao W. *Mat Sci Eng C.* **2014**, 43, 614–621.
- <sup>231</sup> Safety Assessment of Tocopherols and Tocotrienols as Used in Cosmetics, Tentative Amended Report for Public Comment.
- <sup>232</sup> Choi J, Reipa V, Hitchins VM, Goering PL, Malinauskas RA. *Toxicol Sci.* **2011**, 123(1), 133–143.
- <sup>233</sup> Dobrovolskaia MA, Clogston JD, Neun BW, Hall JB, Patri AK, McNeil SE. *Nano Lett.* **2008**, 8(8), 2180–2187.