

UNIVERZITA KARLOVA

Přírodovědecká fakulta

Studijní program: Chemie

Studijní obor: Organická Chemie



Bc. Martin Hadzima

Příprava modifikovaných ligandů μ -opioidních receptorů

Preparation of modified ligands of μ -opioid receptors

Diplomová práce

Vedoucí diplomové práce: Ing. Aleš Machara, Ph.D.

Praha 2018

Prohlášení

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

V Praze dne 30. dubna 2018

Martin Hadzima

Poděkování

Chtěl bych poděkovat svému školiteli Ing. Aleši Macharovi, Ph.D., za profesionální vedení mé diplomové práce, trpělivost a cenné rady pro začínajícího chemika. Dále bych chtěl poděkovat Mgr. Pavlu Majerovi, Ph.D., za kvalitní zázemí a příjemné prostředí pro vypracování mé diplomové práce. Také bych chtěl poděkovat pracovníkům servisních laboratoří ÚOCHB AV ČR, za měření HRMS a NMR spekter a výzkumnému týmu doc. RNDr. Jana Kovalinky, Ph.D., za vstřícnou spolupráci. Další poděkování patří kolegům z laboratoře za každodenní pomoc a přátelskou atmosféru na pracovišti. Na závěr bych chtěl poděkovat své rodině a přítelkyni, za jejich morální a finanční podporu po dobu celého studia.

Abstrakt

Tato diplomová práce se zabývá přípravou modifikovaných ligandů μ -, δ - a κ -opioidních receptorů, a tím navazuje na bakalářskou práci autora.¹ Hlavním cílem předložené práce je modifikace vybraných ligandů na vhodném místě oligoethylenglykolovou spojkou, která umožní jejich využití v inovativním konceptu iBodies.²

Pro modifikace byly zvoleny ligandy naltrexon (μ -opioidní receptor), naltrindol (δ -opioidní receptor) a nalfurafin (κ -opioidní receptor). Naltrexon byl modifikován dle poznatků z bakalářské práce na atomu C-6 s vyvedením spojky přes etherovou a amidovou funkční skupinu. Zároveň byl studován vliv konfigurace nově vzniklého stereogenního centra atomu C-6 na biologickou aktivitu ligandu. V případě naltrindolu byl na základě literární rešerše zvolen přístup přes dusík indolu.³⁻⁵ Nalfurafin byl synteticky opracován na furanovém fragmentu.

Dále byla připravena série fluorescenčně značených ligandů. Zavedení fluorescenční značky umožnilo sledovat vliv vyvedení spojky na afinitu a selektivitu ligandů. Na základě těchto výsledků byly následně připraveny ligandy pro vývoj metody DIANA a pro přípravu syntetických protilátek opioidních receptorů dle konceptu iBodies.⁶

Klíčová slova: *naltrexon, ligand, receptor, konjugát, opioidní receptor*

Abstract

This diploma thesis deals with preparation of modified ligands of mu, delta and kappa opioid receptors, following up on the author's bachelor's thesis.¹ The main goal of the submitted thesis is ligand tethering at an appropriate position using oligoethylene glycol linkers, to enable their use in the innovative iBodies concept.²

Ligands chosen for modifications were: naltrexone (μ -opioid receptor), naltrindole (δ -opioid receptor) and nalfurafine (κ -opioid receptor). Naltrexone was modified, according to the bachelor's thesis results, at the C-6 position with linker attachment via ether and amide. At the same time, the influence of the configuration at the newly formed C-6 stereogenic center on biological activity was studied. In case of naltrindole, access through indole nitrogen was chosen based on the information in literature.³⁻⁵ Nalfurafine was modified on the furane fragment.

Series of fluorescently labeled ligands were prepared. Attachment of the fluorescent tag allowed us to study the affinity and selectivity of these modified ligands. Based on the results, ligands for development of DIANA method and for preparation of synthetic iBodies were synthesised.⁶

Key words: *naltrexone, receptor, conjugate, opioid receptor*

Seznam zkratek:

ACN	Acetonitril
Boc	<i>t</i> -Butyloxykarbonyl
BODIPY	4,4-Difluor-4-bora-diazaindacen
bs	Široký singlet
d	Dublet
DCC	Dicyklohexylkarbodiimid
DCM	Dichlormethan
dd	Dublet dubletů
ddd	Dublet dubletu dubletů
DIANA	DNA-linked Inhibitor Antibody Assay
DIPEA	<i>N,N</i> -Diisopropylethylamin
DOR	δ -Opioidní receptory
DMF	<i>N,N</i> -Dimethylformamid
DMSO- <i>d</i> ₆	Deuterovaný dimethylsulfoxid
dt	Dublet tripletů
EtOAc	Ethyl-acetát
EtOH	Ethanol
FACS	Fluorescenčně aktivovaná buněčná separace
FAP	Fibroblast activation protein
HPLC	Vysokoúčinná kapalinová chromatografie
HPLC-MS	Vysokoúčinná kapalinová chromatografie v kombinaci s hmotnostní spektrometrií
HPMA	<i>N</i> -(2-Hydroxypropyl)methakrylamid
HRMS	Hmotnostní spektrometrie s vysokým rozlišením
KOR	κ -Opioidní receptory
m	Multiplet
MeOH	Methanol
MOR	μ -Opioidní receptory
NMR	Nukleární magnetická rezonance
NHS ester	<i>N</i> -Hydroxysukcinimidyl ester
p	Pentet

PEG	polyethylenglykol
q	Kvartet
RVO	Rotační vakuová odparka
s	Singlet
SuOH	<i>N</i> -Hydroxysukcinimid
t	Triplet
td	Triplet dubletů
<i>t</i> BuXPhos Pd G3	[(2-Di- <i>t</i> -butylfosfino-2',4',6'-triisopropyl-1,1'-bifenylyl)-2-(2'-amino-1,1'-bifenylyl)] palladium(II) methansulfonát
TBTU	<i>O</i> -(Benzotriazol-1-yl)- <i>N,N,N,N'</i> -tetramethyluronium tetrafluoroborát
TEA	Triethylamin
TFA	Trifluoroctová kyselina
THF	Tetrahydrofuran
TsCl	Tosyl chlorid
UV	Ultrafialové záření
ÚMCH	Ústav makromolekulární chemie
q	Kvartet
qd	Kvartet dubletů
δ	Chemický posun v ppm

Obsah

1. Úvod.....	- 9 -
2. Teoretická část.....	- 10 -
2.1. Opioidní receptory a nádorové onemocnění.....	- 10 -
2.2. Ligandy opioidních receptorů a „message-address“ koncept...-	12 -
2.3 Nástroje pro studium opioidních receptorů.....	- 17 -
2.3.1 Konvenční nástroje	- 17 -
2.3.2 iBodies neboli syntetické protilátky	- 18 -
2.4 Design modifikovaných ligandů pro připojení k iBodies.....-	21 -
3. Cíle práce	- 27 -
4. Výsledky a diskuse	- 28 -
4.1. Příprava látek sloužících jako spojky.....	- 28 -
4.2. Příprava konjugátů cílených na μ-opioidní receptory.....-	32 -
4.3. Příprava konjugátů cílených na δ- a κ-opioidní receptory.....-	40 -
5. Experimentální část	- 47 -
5.1 Použité přístroje a chemikálie.....	- 47 -
5.2 Pracovní postupy.....	- 47 -
6. Závěr	- 78 -
7. Literatura.....	- 79 -

1. Úvod

Alkaloidy obsaženy v rostlině *Papaver somniferum*, známé jako opiáty, používají lidé prokazatelně již několik tisíciletí. Tyto sloučeniny, resp. jejich směsi, patří mezi vůbec nejstarší používané léčebné přípravky. Na začátku 19. století byl izolován čistý morfin lékárníkem Sertürnerem, což spolu s vývojem injekční jehly způsobilo revoluci v analgesii.⁷ Později, ve 20. století, byly připraveny první semi-syntetické deriváty opiátů a zároveň byl nastíněn mechanismus působení těchto látek prostřednictvím opioidních receptorů. Dnes známe několik poddruhů opioidních receptorů a desítky ligandů, které zastávají významné postavení v medicíně.

Bezesporu nejvýznamnější vlastností opiátů jsou jejich analgetické účinky. Používají se k tlumení jak akutních bolestí (např. po chirurgickém zákroku), tak bolestí chronického charakteru. Pacienti trpící nádorovým onemocněním v průběhu léčby často přijímají léky obsahující opiáty. V některých případech se jedná o takzvanou perioperativní péči, v pokročilých stádiích rakoviny se opiáty podávají při paliativní léčbě. Současná pozorování naznačují, že příjem opiátu má vliv na průběh nádorových onemocnění.⁸ Bohužel, situace je příliš komplikovaná a nepřehledná, protože opiáty ovlivňují řadu procesů v lidském těle, které jsou navíc ovlivněny dalšími faktory. Proto zatím nelze potvrdit, zdali výsledný vliv opiátů na nádorové onemocnění, respektive na jejich průběh, je pozitivní nebo negativní. Dopad opiátů na lidské zdraví je tedy nejasný, a proto studium opioidních receptorů je nanejvýše aktuální téma v medicíně a příbuzných oborech. Proto jsme se rozhodli vyzkoušet inovativní koncept iBodies pro přípravu nových fluorescenčně značených konjugátů, využitelných ve studiu opioidních receptorů. Věříme, že tento nový nástroj může najít svoje místo v tzv. life sciences.

V teoretickém úvodu práce se čtenář seznámí s problematikou vlivu opiátů na průběh nádorových onemocnění, dále bude objasněn „message-address“ koncept, který umožňuje cílení morfinanových ligandů na různé opioidní receptory. V navazujících kapitolách jsou vysvětleny základní principy konceptu iBodies a design opioidních ligandů použitelných v tomto konceptu. V druhé polovině magisterské práce jsou prezentovány a diskutovány dosažené výsledky.

2. Teoretická část

2.1. Opioidní receptory a nádorové onemocnění

Opioidní receptory představují v medicíně významný cíl terapeutického zásahu. Tyto receptory ovlivňují lidský organizmus mnoha způsoby. Především bývají zapojovány při tlumení různých nežádoucích projevů, jež doprovází řadu onemocnění. Nejznámějším příkladem je samozřejmě analgesie, dále pak tlumení kašle, průjmu, zácpy, dušnosti, svědění, léčba závislostí apod. Tyto příklady ukazují, že opioidní receptory dokážou ovlivňovat řadu na první pohled zdánlivě nesouvisejících procesů. Právě tato promiskuita přinesla opioidním receptorům velkou pozornost.

Pacienti trpící nádorovými onemocněními často zažívají středně silné až velmi silné bolesti. Někdy se jedná o následek samotného působení/růstu nádoru. V jiných případech bolest vzniká invazivním operačním zákrokem. Nehledě na příčinu, ve většině případů jsou pro potlačování bolesti používány právě opiáty, které jsou pro moderní medicínu nenahraditelné. V průběhu několika minulých let se začaly hromadit důkazy o tom, že podávání opiátů pacientům s nádorovým onemocněním může výrazně ovlivňovat průběh nemoci.⁹⁻¹⁴ Tato problematika je kvalitně zpracována v článku z roku 2016, který nese příznačný název „*Opioids and cancer: friend or foe?*“ („*Opiáty a nádorové onemocnění: přátelé nebo nepřátelé?*“).⁸

Mnozíci se preklinické a klinické studie nepřináší přesvědčivé vysvětlení vlivu opiátů na průběh nádorových onemocnění. Dochází spíše k dalšímu zamlžování a komplikování celé situace. Problémem jsou zejména velké rozdíly mezi *in vitro* a *in vivo* studiemi. Jediná informace, kterou můžeme s určitostí potvrdit je, že opioidní receptory a jejich stimulování ovlivňuje imunitní systém, angiogenesi a apoptózu. Dále se bohužel výsledky studií rozcházejí. Opioidní receptory jsou v těle přítomny na různých buňkách a jejich stimulace může na každém typu buněk vyvolávat mírně odlišný efekt. Na jedné straně stimulace opioidních receptorů způsobuje imunomodulaci, která ulehčuje přežití nádorovým buňkám.¹⁵ Na straně druhé je potřeba podotknout, že bolest samotná a také stres má podobný vliv na imunitní systém, a proto je těžké vliv těchto faktorů studovat odděleně. Aby byla situace ještě více komplikovaná, některé *in vitro* studie naznačují, že podávání morfinu může počet buněk imunitního systému ovlivňovat i pozitivně.¹⁶

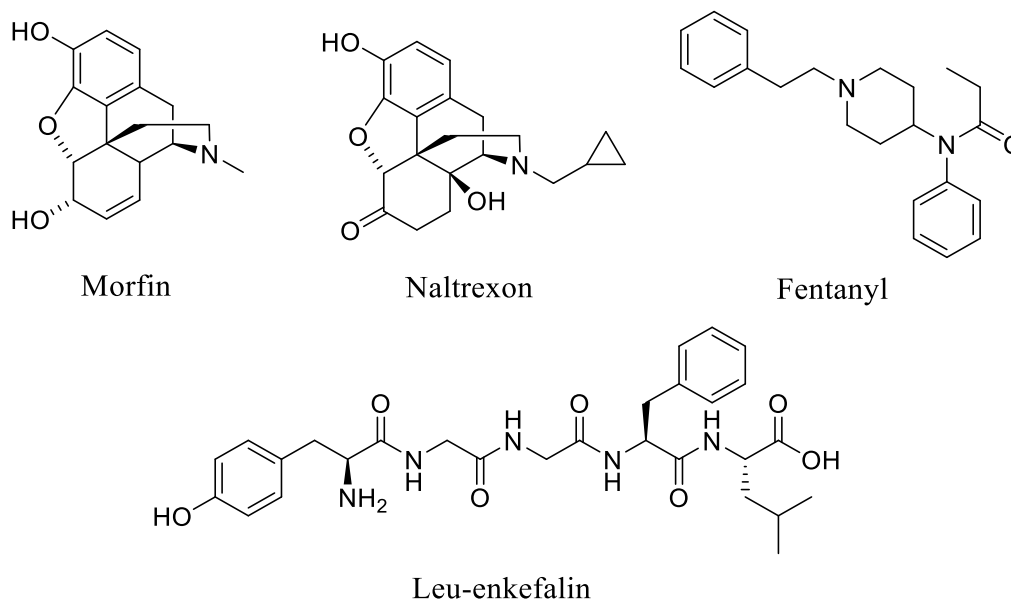
I v případě angiogenese, která má výrazný vliv na progresi tumoru, je situace nejasná. Většina studií naznačuje podporu angiogenese podáváním morfinu.¹⁷ Opět se však najdou i příklady, kde byla morfinem tlumena.¹⁸ Navíc v tomto případě pravděpodobně závisí na typu opioidních receptorů. Data naznačují, že stimulace κ -opioidních receptorů (KOR) by mohla potlačovat angiogenesi.¹⁹ Opioidní receptory ovlivňují také metastázování rakovinných buněk, které způsobuje šíření nádorů do jiných částí těla. V tomto případě se data liší v závislosti na druhu sledovaného nádoru.²⁰⁻²²

Výše zmíněné výsledky jsou velice frustrující, vezmeme-li v úvahu, jak zásadní problém s dopadem na životy milionů trpících pacientů to znamená. Vysazení opiátů z léčby nepřichází v úvahu, jelikož alternativa není dostupná. Ponechání pacienta v silných bolestech je samozřejmě nehumánní a ve svém důsledku stejně vede k podmínkám podporujícím růst nádoru. Tato situace jasně prokazuje, že chemie, biochemie a biologie opioidních receptorů ještě nenapsala svojí poslední kapitolu a další výzkum ve všech těchto disciplínách je nezbytný.

2.2. Ligandy opioidních receptorů a „message-address“ koncept

Díky velkému zájmu o opioidní receptory v předcházejících desetiletích dnes známe stovky jejich ligandů. Tyto ligandy můžeme dělit do podskupin podle různých kritérií jako afinita, selektivita, typ účinku (agonisté/antagonisté), výskyt (endogenní/exogenní) apod.

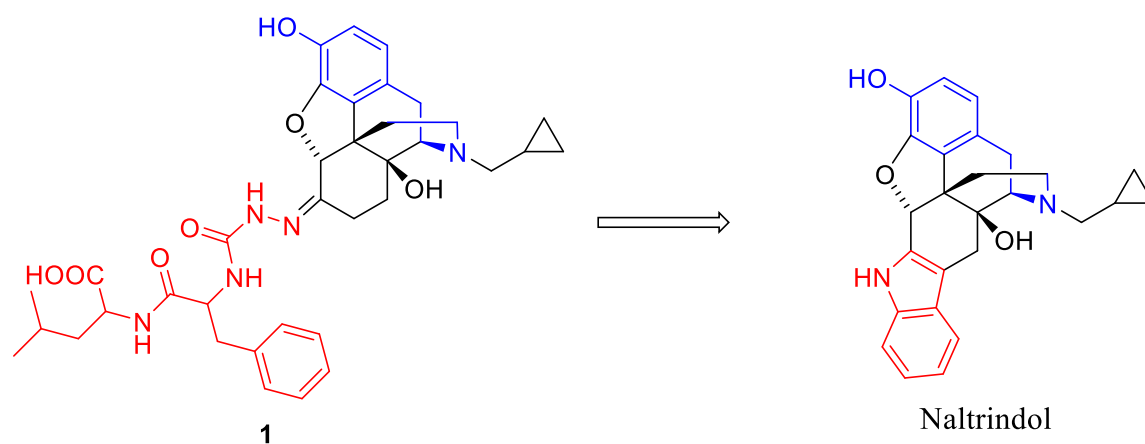
Schéma 2.1 *Struktury vybraných ligandů opioidních receptorů*



Vývoj nových ligandů opioidních receptorů přinesl mnoho výsledků, ale jedním z nejzásadnějších je určitě formulování takzvaného „message-address“ konceptu (MAK) neboli konceptu zprávy a adresy.²³⁻²⁷ Tento koncept byl při řešení práce zhusta využíván, a proto byl zařazen i do teoretického úvodu. Jedná se o teorii, která předpokládá existenci dvou regionů v molekule ligandu. Region nesoucí zprávu je v podstatě farmakoforem ligandu a je odpovědný za vazbu na receptor a biologickou odezvu. Region adresy udává selektivitu vazby na jednotlivé druhy receptorů díky doplňkové interakci s receptorem. Existuje několik druhů opioidních receptorů (μ , δ , κ , nociceptinový, ζ), přičemž každý z nich reguluje řadu fyziologických procesů. Proto selektivní ligandy jsou nenahraditelným nástrojem pro studium těchto receptorů a jejich role v organismu. MAK byl poprvé formulován v chemii morfinanů v roce 1986.²³ Portoghese a jeho kolegové připravili selektivní ligandy δ -opioidního receptoru na základě několika jednoduchých experimentů a úvah.²⁴ Po srovnání struktur endogenních peptidů předpokládali, že tyrosin ve struktuře výše zmíněného Leu-enkefalinu plní úlohu zprávy, zatímco fenylalanin je odpovědný za

selektivitu. Tuto hypotézu potvrdili faktem, že připojení části Leu-enkefalinu s fenylalaninem k morfinanovému ligandu výrazně ovlivnilo selektivitu vazby.²³ Struktura peptidem modifikovaného ligandu **1** se nachází na Schématu 2.2. Dále autoři předpokládali, že regionem adresy nemusí být pouze peptid, ale může jím být i jakýkoliv aromatický systém rozšiřující morfinanový skelet. Díky této úvaze byl připraven naltrindol, selektivní antagonistu DOR.²⁴

Schéma 2.2 Struktura peptidem rozšířeného naltrexonu **1** a naltrindolu²³⁻²⁴



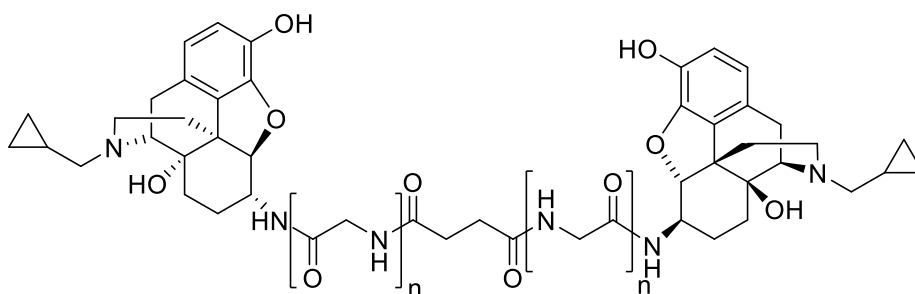
Modrá = region zprávy; Červená = region adresy

Zároveň si můžeme všimnout, že fenolická část a atom dusíku v piperidinové části morfinanu dokonale imitují tyrosin endogenních opioidních peptidů. Selektivita naltrindolu vůči DOR potvrdila, že morfinanový skelet jako takový je zprávou a pro modulaci selektivity musíme tento skelet doplnit vhodným způsobem. Dalším zajímavým poznatkem je zjištění, že v případě rozšíření morfinanu pouze o anelovaný pyrrol nebyla pozorována žádná změna v selektivitě.²⁴ To znamená, že za interakci s receptorem je odpovědné benzenové jádro anelovaného indolu, přičemž pyrrol plní funkci spojky a fixuje benzenové jádro ve vhodné poloze. Derivát rozšířený o benzofuran namísto indolu byl rovněž připraven a jeho selektivita vazby byla srovnatelná se selektivitou naltrindolu.²⁴

Dalším zajímavým přístupem při výzkumu opioidních receptorů byla příprava opioidních antagonistů se dvěma farmakofory.²⁵ V podstatě se jedná o dva morfinanové ligandy odděleny vhodnou spojkou. Délka a geometrie spojky může výrazně ovlivňovat selektivitu těchto derivátů. Pro vysvětlení tohoto jevu existují dvě teorie. Dle první může docházet k navázání obou ligandů do dvou vazebných míst daného ligandu v jednom proteinu. Druhá teorie navrhuje, že nemusí docházet k plnohodnotné vazbě druhého ligandu,

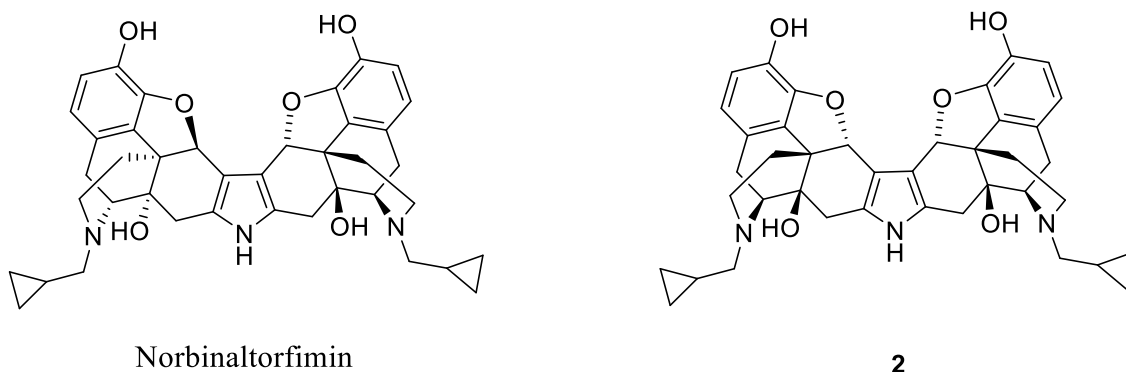
ten však může pozitivně nebo negativně interagovat s povrchem proteinu nebo vedlejším vazebným místem jiného ligandu. V obou případech je tento dvojitý efekt velice závislý na přesné geometrii proteinu, proto jej lze využít k ovlivnění selektivity. Tuto problematiku prozkoumal opět Portoghese a jeho skupina, jež připravila různé dimery naltrexonu, dle struktury uvedené ve Schématu 2.3.²⁵ Tyto ligandy byly vázány přes oligoglycinové spojky, jelikož glycinové fragmenty se často nacházejí i v endogenních opioidních peptidech.

Schéma 2.3 *Struktura dimerů naltrexonu*²⁵



Výsledky selektivity vazby těchto derivátů byly velice zajímavé. Délka spojky skutečně sehrála důležitou roli v selektivitě výsledných dimerů. Pro $n = 0$ byl dimer výrazně selektivní pro KOR, zatímco pro $n = 2$ pro MOR. Také bylo prokázáno, že v případě vazby na MOR se jedná o interakci dle první teorie, jelikož po nahrazení jednoho z ligandů enantiomerem došlo k narušení interakce a snížení afinity. U $n = 0$ bylo zajímavé, že po nahrazení sukcinylu za fumaryl došlo k snížení selektivity. Tento experiment prokazuje, že vzájemná orientace ligandů je opět velice důležitá pro selektivitu vazby. Proto byl navržen a syntetizován norbinaltorfimin a jeho *meso* izomer **2**.

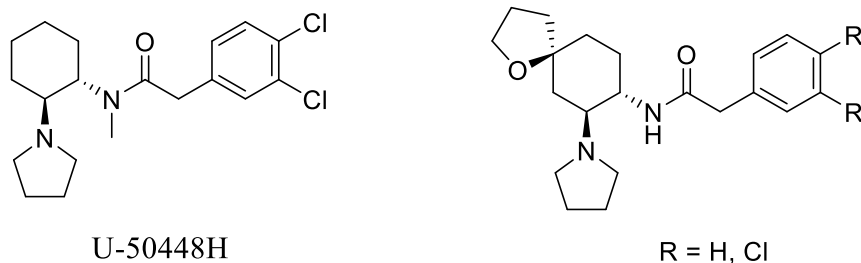
Schéma 2.4 *Struktura norbinaltorfiminu a meso izomeru 2*



Pyrrol mezi ligandy plní úlohu velice krátké, konformačně pevné spojky. Ukázalo se, že norbinaltorfimin je selektivním ligandem KOR a ligand **2** dokonce vykázal silnější interakci s receptorem, i když s poněkud menší selektivitou. Tyto experimenty prokázaly, že v případě KOR se nejedná o vazbu obou ligandů do vazebných míst pro opioidní ligandy, ale že jeden z ligandů se váže pravděpodobně do doplňkového vazebného místa, které není určeno pro opioidní ligand.

Nouze o selektivní ligand KOR, který by mohl být používán jako léčivo bez vedlejších efektů, opět oživila koncept zprávy a adresy na přelomu tisíciletí.²⁷ Tým japonských vědců na základě dostupných informací navrhl desítky derivátů naltrexonu, které byly otestovány z hlediska selektivity vůči KOR. Jak se ukázalo, tento koncept v chemii opiátů opět uspěl a vedl k objevu prvního κ -agonisty, který se následně začal prodávat jako léčivo na potlačení svědění. Přístup, který byl zvolen při designu léčiva, vycházel z výše zmíněného norbinaltorfiminu a série derivátů U-50488H, zobrazených na Schématu 2.5.

Schéma 2.5 *Struktura U-50488H a jeho derivátů*²⁸

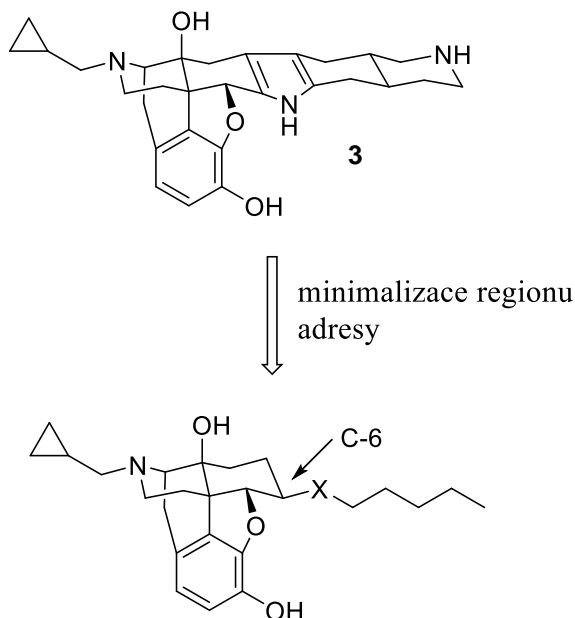


Agonisté většinou vyvolávají fyziologický účinek tím, že po vazbě na receptor dochází k pozměnění struktury receptoru. Naopak antagonisté se vážou na receptor, ale obsahují další strukturní část, která brání změně struktury receptoru. Norbinaltorfimin je antagonistá KOR, proto lze předpokládat, že pro dosažení agonismu musíme část molekuly odstranit. Přitom, ale nesmíme zasáhnout do částí struktury, jenž je odpovědná za selektivitu vazby.

Sloučenina **3** na Schématu 2.6 je zjednodušením norbinaltorfiminu. Postrádá aromatický kruh a většinu polárních skupin, kromě dusíku morfinanu. Důležité je, že tato sloučenina si zachovala antagonismus i selektivitu vůči KOR. To znamená, že nepolární část je odpovědná za selektivitu a dalším zjednodušením a uvolněním konformační restrikce by

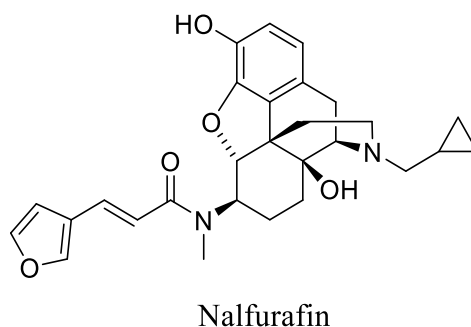
mohlo dojít ke změně z antagonisty na agonistu. Proto autoři nejdříve připravili několik derivátů s nepolárním C₆ fragmentem na uhlíku C-6 navázaným přes různé funkční skupiny.

Schéma 2.6 Logika designu agonisty KOR²⁷



Studovány byly ether, thioether, thioester, amid, amin a *N*-methyramid. V podstatě všechny tyto látky byly agonisty KOR, přičemž největší selektivitu vykazoval *N*-methyramid. V dalším kroku bylo připraveno několik derivátů vázaných přes *N*-methyramid, které se lišily nepolárním řetězcem. Postupně byla otestována řada karbocyklů a heterocyklů lišících se velikostí a substitucí. Výsledkem této snahy byl objev nalfurafinu, selektivního agonisty KOR, který je dnes schváleným léčivem v Japonsku. Jeho struktura se nachází na Schématu 2.7. Tato látka opět potvrdila využitelnost konceptu zprávy a adresy v chemii morfinanů. Zároveň se také potvrdilo, že změnou části molekuly lze antagonistu převést na agonistu.

Schéma 2.7 Struktura nalfurafinu



2.3 Nástroje pro studium opioidních receptorů

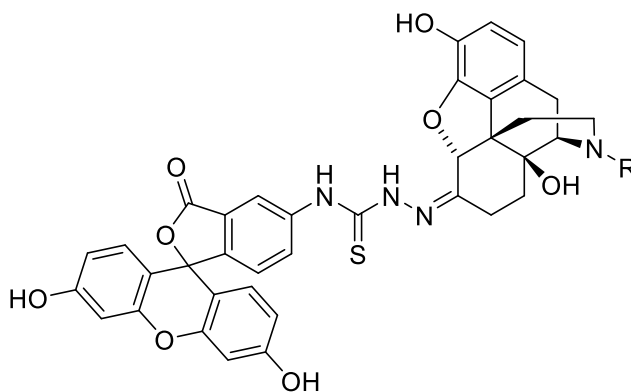
2.3.1 Konvenční nástroje

Nejstarší nástroje pro studium opioidních receptorů jsou radioligandy.²⁹ První tritiované ligandy vycházely ze známých ligandů jako naloxon, naltrexon, leu-enkefalin, později byly použity také syntetické peptidy DAMGO ([D-Ala², N-MePhe⁴, Gly-ol]-enkefalin) a DADLE ([D-Ala², D-Leu⁵]-enkefalin). Dnes již známe řadu velice specifických radioligandů pro všechny druhy opioidních receptorů. Radioligandy však sebou přináší řadu nevýhod, které komplikují jejich použití. Patří mezi ně například cena, vysoké pozadí při měření a specifická bezpečnost práce s radioaktivními sloučeninami.

Alternativou k radioligandům jsou fluorescenčně značené protilátky nebo ligandy. Fluorescenčně značené protilátky interagují s epitopem přítomným na proteinu mimo vazebného místa. Nevýhodou v tomto případě je, že epitop nemusí být pokaždé přítomný a přístupný. Dle zkušeností našich kolegů je značení opioidních receptorů protilátkami často nespolehlivé a málo reprodukovatelné. Velice užitečným přístupem je detekce pomocí fluorescenčně značených nízkomolekulárních ligandů. Příprava těchto modifikovaných ligandů vyžaduje vhodné opracování ligandu bez narušení afinity objemnou fluorescenční značkou. Neméně důležitý je výběr fluorescenční značky. Některé velice nepolární fluorescenční značky mohou způsobovat nespecifickou interakci s buněčnými stěnami.³⁰ Navíc modifikace nízkomolekulárního ligandu fluorescenční značkou výrazně ovlivňuje fyzikálně-chemické vlastnosti ligandu.

Vzhledem k dostupným informacím o vazebných poměrech morfinanových ligandů bylo poměrně jednoduché navrhnout a připravit řadu fluorescenčně značených ligandů. Jako první byly připraveny fluorescenčně značené deriváty naltrexonu, naloxonu a oxymorfonu znázorněné na Schématu 2.8.³¹ Tyto deriváty se dnes běžně používají pro značení zejména MOR.³² V literatuře, ale můžeme najít i příklady selhání těchto ligandů v některých systémech, zejména kvůli nespecifickým interakcím.³³ Obdobnými způsoby byly připraveny další fluorescenčně značené ligandy odvozené od naltrindolu a jiných ligandů.^{4,34,35} Ve většině případů se jako fluorofor používá fluorescein, ale můžeme se taky setkat s využitím BODIPY.³⁶ Kromě nepeptidických ligandů byla připravena také řada fluorescenčně značených opioidních peptidů.³⁷⁻³⁸

Schéma 2.8 *Struktura fluorescenčně značeného naltrexonu, naloxonu a oxymorfonu*³¹



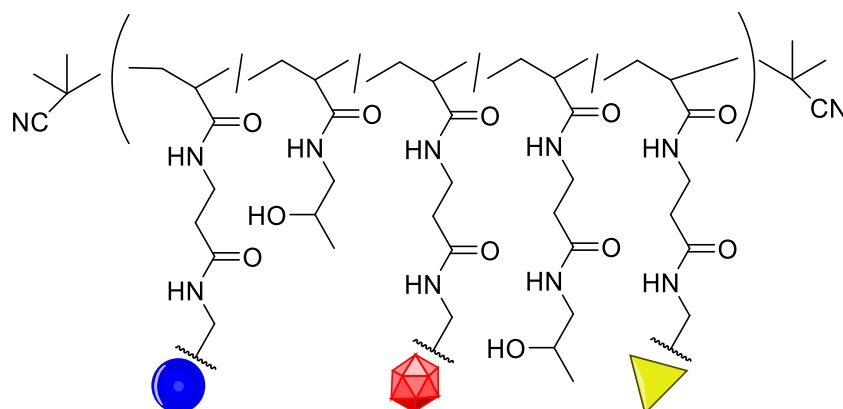
Naltrexon R = methylcyklopropyl
 Naloxon R = allyl
 Oxymorfon R = methyl

2.3.2 iBodies neboli syntetické protilátky

Koncept a název iBodies byl zaveden skupinou doc. Konvalinky v roce 2016.² Jedná se o polymerní syntetické konjugáty, které mimikují funkci protilátek a umožňují tak studovat receptory či enzymy. Tyto konjugáty jsou založené na hydrofilním polymeru, který umožňuje navázání více funkčních částí, jako například ligandů, fluorescenčních značek nebo afinitních kotev. Výše zmíněný polymer je složen z *N*-(2-hydroxypropyl) methakrylamidových jednotek, které jej činí dobře rozpustným ve vodě. Další důležitou vlastností tohoto polymeru je jeho minimální toxicita. Právě díky tomu byl tento polymer

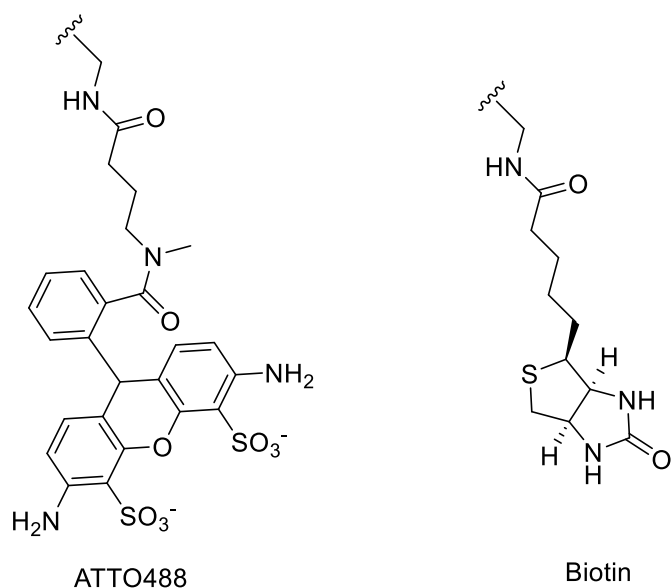
již v minulosti testován v oblasti doručování biologicky účinných látek na cílové místo nebo ve vývoji kontrastních látek pro zobrazovací techniky. Obecné schéma výše popisovaného „iBody“ je uvedeno na Schématu 2.9. Tyto syntetické protilátky lze používat v běžných biochemických experimentech jako imunoprecipitace, průtoková cytometrie nebo ELISA (Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay).

Schéma 2.9 *Obecné schéma iBody*



Výchozí polymerní prekurzor syntetické protilátky nese řadu reaktivních skupin (aktivovaných esterů), které umožňují připojení potřebných funkčních částí. A právě vhodným výběrem ligandů navázaných na polymerním nosiči se připraví selektivní syntetická protilátka vůči vybraným proteinům. Pro zachování afinity ligandu je potřeba jej oddělit od objemného polymeru vhodnou spojkou, aby nedocházelo k sterickému bránění interakce protein-ligand. Pro tyto účely se používají zejména oligoethylenglykolové řetězce o různé délce. Zatím se nepodařilo najít pravidlo pro optimální délku spojky, resp. jaký typ spojky lze s největším úspěchem obecně použít a proto na začátku přípravy iBody vždy začínáme s relativně dlouhou spojkou, kterou v průběhu řešení projektu různě chemicky pozměňujeme. Volbou vhodné fluorescenční značky na polymeru lze provádět fluorescenční experimenty při různých vlnových délkách. Analogicky se dá měnit i intenzita fluorescenční odezvy. Fluorescenční značka použitá v 1. generaci těchto protilátek byla ATTO488. Jako afinitní kotva byl zvolen biotin, který umožňuje imobilizaci díky silné afinitě k streptavidinu.

Schéma 2.10 Struktura ATTO488 a biotinu



Skupina doc. Konvalinky připravila a úspěšně otestovala iBodies cílené na enzym GCP-II (glutamát-karboxypeptidázu II), HIV-1 proteázu, pepsin a proteiny označené histidinovou značkou.² V případě GCP-II došlo ke snížení inhibiční konstanty oproti původnímu inhibitoru o tři řády. Tento efekt lze vysvětlit přítomností více inhibitorů ve struktuře iBody, což způsobuje zvýšení lokální koncentrace inhibitoru v okolí enzymu. Tento efekt není bohužel zcela obecný, jelikož u dalších studovaných enzymů se neprojevil.

Později v roce 2017 byl publikován článek o iBodies cílených na FAP (Fibroblast Activation Protein) protein, který je velké míře exprimován v rakovinných buňkách, zatímco běžně se v těle nevyskytuje.³⁹

Tyto vlastnosti z FAP činí vhodný terapeutický cíl (léčba) nebo také cíl pro zobrazování tumorů (diagnostika). Tato studie přinesla další důležité informace o použitelnosti konceptu iBody. Za prvé, opět se potvrdilo, že délka spojky hraje zásadní roli v efektivitě vazby polymerního konjugátu ligandu. Rozdíl mezi inhibiční konstantou inhibitoru FAP se spojkou PEG-5 a PEG-15 činil víc než jeden řád. Zároveň se ukázalo, že ani toto pravidlo není zcela obecné, protože u velice podobného inhibitoru byla závislost na délce spojky poměrně malá. Dále se ukázalo, že polymerní konjugát velice dobře inhiboval FAP i po naředění na nižší koncentrace, zatímco inhibice nízkomolekulárním inhibitorem byla naředěním výrazně snížena. Tento jev je pravděpodobně způsoben velikostí a nižší pohyblivostí polymerních konjugátů. Další zajímavou vlastností iBodies je, že dochází k pomalé internalizaci polymeru, což vede k zvyšování signálu fluorescence uvnitř

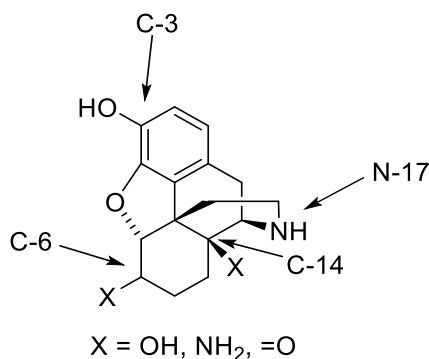
buněk po delší inkubaci. Inhibiční konstanty FAP-cílených polymerních konjugátů byly poněkud větší než inhibiční konstanty nízkomolekulárních inhibitorů, nicméně stále vykazovaly nanomolární aktivitu. Na druhou stranu lze konstatovat, že selektivita inhibice výrazně vzrostla, což je velice důležité, protože v těle se vyskytuje řada jiných proteinů podobných FAP.

Připravené iBodies byly také použity v řadě dalších experimentů. V první řadě pro afinitní izolace, dále pro metodu ELISA a konfokální mikroskopii. Tyto experimenty potvrdily že, vlastnosti iBodies jsou srovnatelné s běžnými protilátkami. Výhodou iBodies je zejména jejich cenová dostupnost, stabilita a modularita. V případě, že je známý nízkomolekulární inhibitor, jehož modifikace a vyvedení potřebné spojky výrazně neovlivní afinitu vůči proteinu, lze pomocí konceptu iBodies cílit jakýkoliv protein. U konvenčních fluorescenčně značených protilátek může výběr fluorescenční značky výrazně ovlivnit vlastnosti připraveného konjugátu, především se může změnit rozpustnost nebo se zvýší nespecifické interakce s buněčnými membránami.³⁰ iBodies však nesou fluorescenční značku v blízkosti hlavního řetězce polymeru, a proto obvykle nedochází k nespecifické vazbě s buněčnými membránami, ani v případě použití lipofilních fluoroforů. Dále můžeme na míru upravovat farmakokinetiku výsledného iBody změnou délky polymerního řetězce a ovlivňovat tak distribuci mezi tkáněmi.

2.4 Design modifikovaných ligandů pro připojení k iBodies

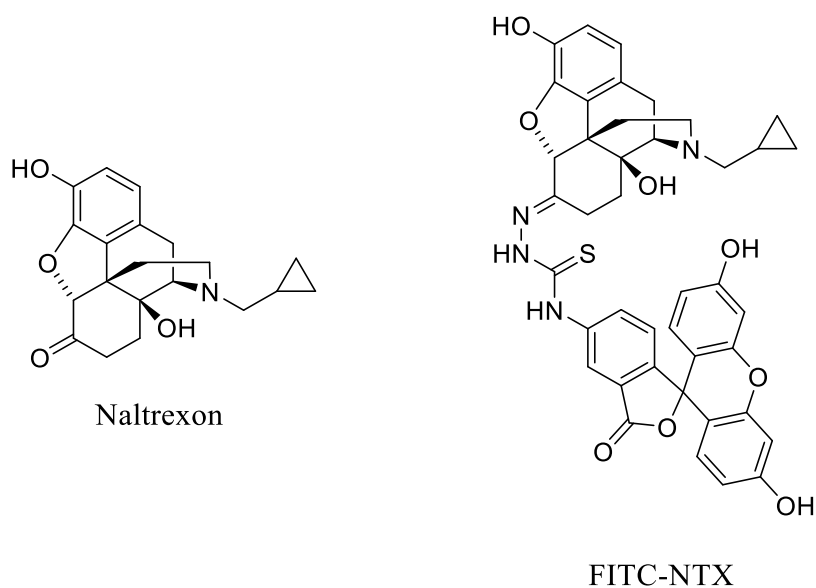
Prvním krokem v designu modifikovaných ligandů/inhibitorů je volba vhodného místa pro modifikaci. Teoreticky je nejvhodnějším místem část ligandu, která je nejvzdálenější od vazebného místa proteinu a která se neúčastní žádné důležité interakce v tomto místě. Jakákoliv strukturní modifikace by ideálně měla ovlivňovat afinitu/selektivitu pozměněného ligandu jen minimálně. Další důležitým kritériem je modifikovatelnost daného místa z pohledu syntetické chemie. Samozřejmě ne všechny atomy v daném ligandu lze synteticky opracovat. Pro modifikace jsou vhodné zejména heteroatomy (atomy O, S, N) nebo reaktivní místa jako dvojná vazba apod. Morfinanový skelet nabízí řadu reaktivních míst vhodných pro jednoduchou modifikaci, viz Schéma 2.11.

Schéma 2.11 Synteticky přístupné místa morfinanového skeletu



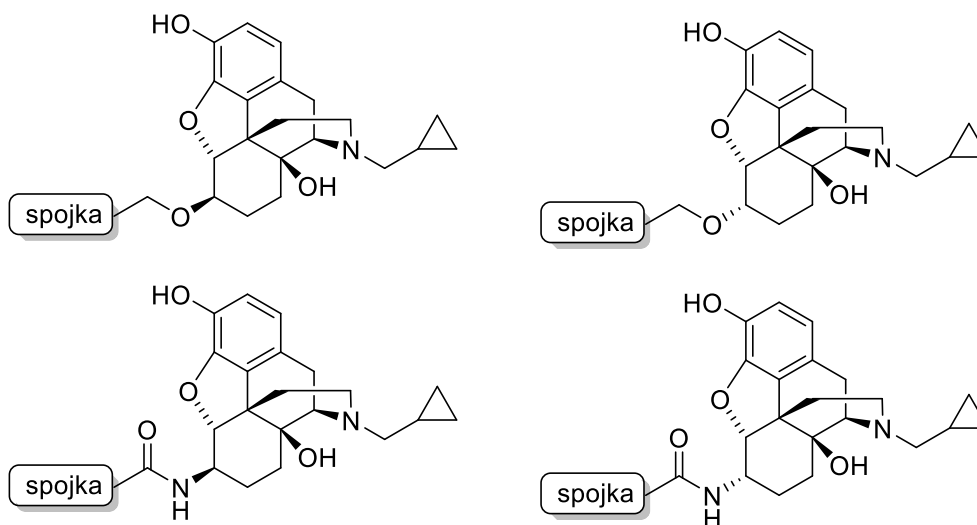
Nejpřístupnějšími místy pro chemickou modifikaci morfinanového skeletu jsou atomy C-3, C-6 a N-17. Drtivá většina opiátů se liší substitucí zejména na atomech C-6 a N-17. Naopak fenolická funkční skupina na atomu C-3 většinou zůstává v nezměněné podobě, protože vytváří důležitou interakci ve vazebném místě. Diverzita u C-6 je větší, některé opiáty v tomto místě mají keton, alkohol, amin nebo další komplikovanější funkční skupiny. Z předešlých zkušeností víme, že nejvhodnějším místem pro modifikaci je právě atom C-6. V naší laboratoři byly otestovány přístupy k iBody konjugátům přes všechna přístupná místa morfinanů a jedině modifikace na uhlíku C-6 vedla k zachování afinity vůči opioidním receptorům. Jako ligand pro modifikaci jsme zvolili naltrexon (antagonista MOR), vzhledem k dobré afinitě k receptorům, jeho dostupnosti a předešlým zkušenostem. V neposlední řadě je vhodné uvést, že naltrexon je antagonist opioidních receptorů, proto není uveden na seznamu kontrolovaných látek. Dříve zmíněný fluoresceinem značený derivát naltrexonu, zvaný FITC-NTX (adukt fluorescein isothiokyanátu a naltrexazonu) byl zvolen jako pozitivní kontrola.³¹ Jako spojky jsme se rozhodli využít, podobně jako v bakalářské práci, deriváty tetraethylenglykolu. Tyto sloučeniny jsou velice oblíbené v medicíně, zejména díky dobré rozpustnosti ve vodě i organických rozpouštědlech a nulové toxicitě.⁴⁰

Schéma 2.12 Struktura naltrexonu a fluorescenčně značeného FITC-NTX



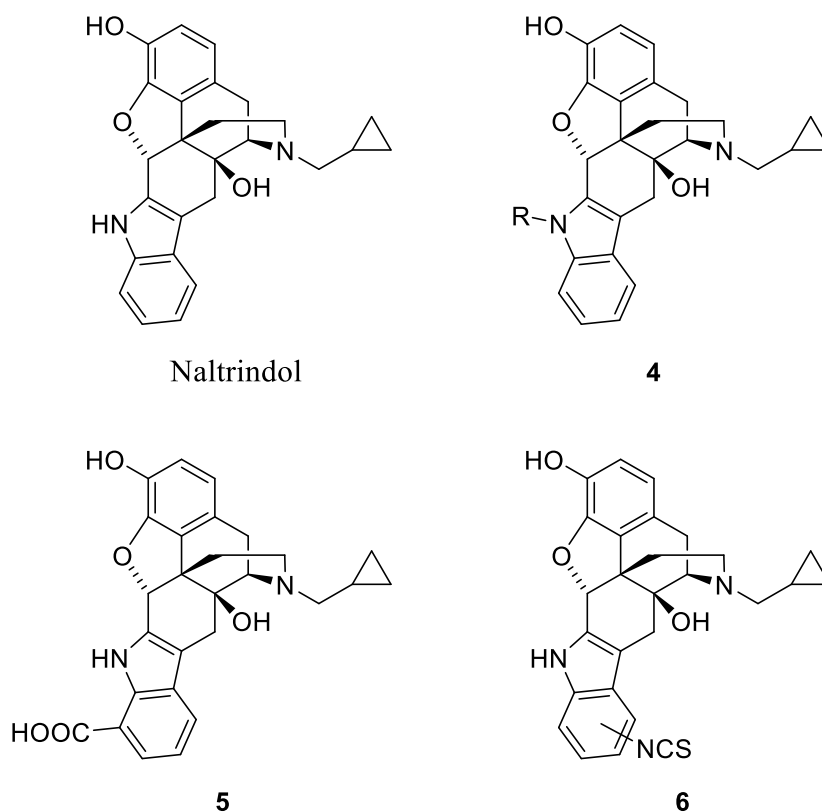
V rámci mé bakalářské práce jsem připravil různé deriváty naltrexonu, jež měly spojku k iBody vyvedenou z karbonylové funkční skupiny na uhlíku C-6.¹ Design těchto látek byl přímo inspirován látkou FITC-NTX. Výsledky bakalářské práce nás ujistily, že atom C-6 je skutečně vhodným místem k modifikaci, vzhledem k dobré afinitě fluorescenčně značených derivátů. Bohužel hydrolytická labilita hydrazonové (semithiokarbazonové) vazby komplikovala přípravu a testování polymerů. Proto jsme se při navrhování další generace prekurzorů pro iBody rozhodli použít vazbu mezi opiátem a spojkou, která bude stálá ve vodném prostředí. V úvahu přicházely tři způsoby vazby. Opiát propojit se spojkou pomocí etherické vazby nebo pomocí aminu či odpovídajícího amidu. Nejjednodušším způsobem jak připravit požadované intermediáty pro výše uvedené způsoby propojení je redukce ketonu C-6 na alkohol nebo na amin. Poté měla následovat samotná tvorba aduktu opiát-spojka. Při redukci ketonu dochází na uhlíku C-6 k vzniku nového stereogenního centra. V literatuře můžeme najít informace o tom, že oba tyto izomery jsou vůči opioidním receptorům aktivní, ale mohou se mírně odlišovat svojí afinitou či selektivitou.⁴¹⁻⁴² Proto jsme se rozhodli připravit čtyři různé modifikované ligandy cílené na MOR. Struktury navržených ligandů jsou znázorněny na Schématu 2.13. Tyto ligandy se od sebe odlišují prostorovým uspořádáním na stereogenním centru C-6 a způsobem vyvedení spojky. Poté jsme plánovali intermediáty otestovat *in vitro* na jejich afinitu vůči MOR a na základě získaných dat rozhodnout, které z nich budou použity pro přípravu iBody.

Schéma 2.13 Navržené struktury modifikovaných ligandů



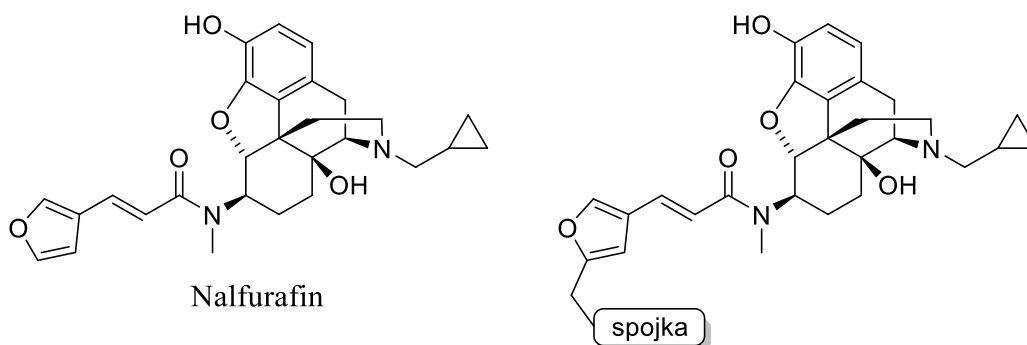
Dále jsme se rozhodli připravit iBodies pro cílení na DOR a KOR, protože tyto druhy opioidních receptorů jsou rovněž důležité a sledování jednotlivých druhů odděleně je v biochemii nutností. Design těchto ligandů byl poměrně jednoduchý, vzhledem ke zpracování dříve zmíněného „message-address“ konceptu. Selektivní ligandy DOR a KOR jsou známé, u DOR je dokonce popsána i řada modifikovaných ligandů. Nejznámějším selektivním ligandem DOR je naltrindol, derivát odvozený od naltrexonu. V průběhu let byla popsána řada derivátů naltrindolu, které vykazují dobrou afinitu a selektivitu vůči DOR, např. derivát s karboxylovou kyselinou (**5**) nebo isothiokyanátem (**6**) na benzenovém jádře indolu, viz Schéma 2.14.⁴³⁻⁴⁴ Nejvíce popsaných derivátů naltrindolu nese substituenty na atomu dusíku indolové části sloučeniny (**4**). Tímto přístupem byl připraven i fluoresceinem značený derivát naltrindolu.^{4,34} Vzhledem k jednoduchosti syntetického opracování v této poloze jsme se rozhodli zvolit právě tento přístup.

Schéma 2.14 Naltrindol a modifikované deriváty



Pro přípravu konjugátu cíleného na KOR jsme jako výchozí ligand zvolili nalfurafin. Drobnou komplikací v tomto případě bylo, že v literatuře nejsou popsány žádné deriváty, které by naznačovaly, kde lze molekulu vhodně modifikovat. Proto byl derivát nalfurafinu navržen pouze na základě předešlých zkušeností a nelze tuto volbu podložit výsledky publikovanými v odborné literatuře. Náš návrh konjugátu vychází z předpokladu, že furanový fragment směřuje ven z vazebného místa a proto modifikace na tomto vzdáleném konci by neměla výrazně ovlivňovat afinitu nebo selektivitu.

Schéma 2.15 Struktura nalfurafinu a navrhovaného derivátu



Pozornost jsme též věnovali nociceptinovému opioidnímu receptoru (NOR). Jedná se o poměrně nový druh opioidního receptoru, který byl potvrzen jako vhodný terapeutický cíl pro léčbu řady onemocnění. Všechny dostupné sondy pro studium NOR jsou založené na izotopicky značených ligandech, tudíž příprava fluorescenčně značeného konjugátu pro studium NOR by měla obrovský význam. Jedním z důvodů absence fluorescenčně značeného ligandu je určitě fakt, že žádný ze známých ligandů není morfinanového typu a detailní informace o vazbě těchto nových syntetických ligandů zatím nejsou dostupné.⁴⁵ Snaha o vyvedení spojky z těchto skeletů by byla srovnatelná se snahou „věštit z křišťálové koule“, a proto jsme se rozhodli, prozatím, přípravu odpovídajícího iBody nezkoušet.

3. Cíle práce

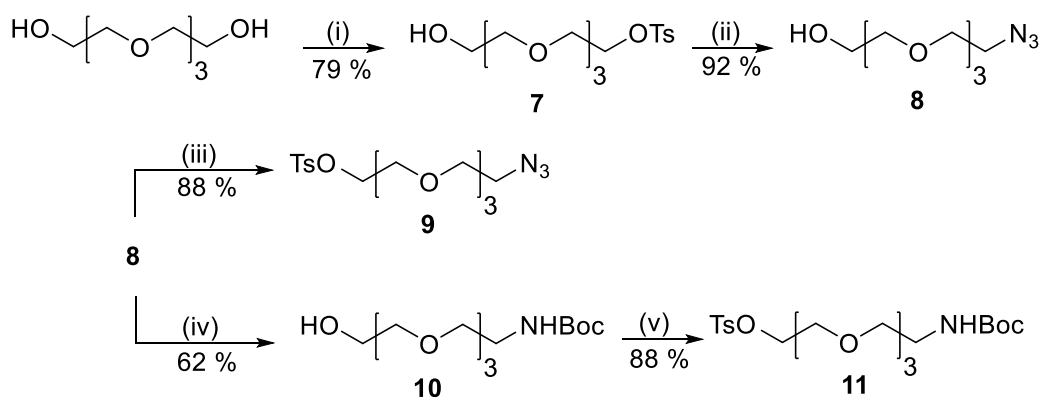
- Navrhnout a připravit modifikované ligandy cílené na μ -, δ - a κ -opioidní receptory vhodné pro přípravu iBodies
- Připravit fluorescenčně značené verze vybraných ligandů pro testování afinity a selektivity modifikovaných ligandů pomocí FACS
- Navrhnout a připravit modifikovaný ligand vhodný pro použití v metodě DIANA
- Diskutovat vztahy mezi způsobem vyvedení/délkou spojky a afinitou/selektivitou modifikovaných ligandů

4. Výsledky a diskuse

4.1. Příprava látek sloužících jako spojky

Struktura spojek byla navržena tak, aby umožňovala jejich připojení k ligandům prostřednictvím jednoduchých reakcí. Pro tento účel byly využity zejména alkylační reakce a amidové kaplingy. Jako alkylační činidla byly použity deriváty tetraethylglykolu ve formě esteru *p*-toluensulfonové kyseliny (tosylát). Druhý konec spojky byl upraven tak, aby umožňoval další modifikaci. Příprava uvedených spojek vycházela z komerčně dostupného a finančně nenáročného tetraethylglykolu, dle Schématu 4.1.

Schéma 4.1 Příprava tosylátů tetraethylglykolu⁴⁶⁻⁴⁷



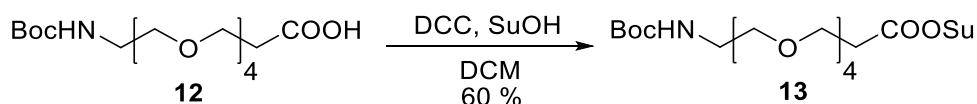
(i) TsCl, TEA, DCM, rt, 16 h; (ii) NaN₃, DMF, 55 °C, 16 h; (iii) TsCl, TEA, DCM, rt, 16 h; (iv) 10% Pd/C, H₂, Boc₂O, EtOH, rt, 16 h; (v) TsCl, TEA, DCM, rt, 16 h.

Prvním krokem přípravy strukturně různorodých spojek byla monotosylace tetraethylglykolu, která probíhala s velmi dobrým výtěžkem. Vznik disubstituovaného derivátu byl omezen použitím nadbytku tetraethylglykolu vůči tosyl chloridu. Dále byl tosylát **7** převeden na azid **8**, který posloužil jako maskovaná forma aminu a následně byl využíván k prodloužení řetězce.⁴⁶ Pro substituční reakci byla zvolena zvýšená teplota z důvodu nízké rozpustnosti azidu sodného v DMF při laboratorní teplotě. Následná tosylace této sloučeniny poskytla první kýženou spojku **9**. Nejjednodušší způsob převedení azidu na amin je katalytická redukce, ale v případě, že se v molekule nacházejí skupiny citlivé na katalytickou hydrogenaci nelze tuto metodu použít. Alternativně lze použít Staudingerovou redukci, která ale vyžaduje oddělení vzniklého trifenylyfosfin oxidu.

Proto jsme se rozhodli pro případy, kdy katalytickou redukcí nebude možné použít, nahradit azid aminem s chránicí skupinou Boc. Monoazidový derivát byl převeden na chráněný amin **10** katalytickou redukcí v přítomnosti di-*tert*-butyl bikarbonátu.⁴⁷ Tosylace této látky poskytla alkylační činidlo **11** zakončené aminem s chránicí skupinou Boc.

V případě, že opiátový ligand má být modifikován na aminové funkční skupině uhlíku C-6, je výhodnější využít amidového kaplingu. Pokud by tato sloučenina byla naopak převáděna na sekundární amin alkylací, hrozil by vznik produktů vícenásobné alkylace. Pro usnadnění přípravy amidových derivátů jsem připravil derivát tetraethylglykolu **13** s NHS esterem, dle Schématu 4.2. Opioidní ligandy obsahují řadu reaktivních míst (hydroxylových skupin) a proto jsem zvolil amidaci pomocí NHS esteru, který díky nižší reaktivitě vykazuje dobrou selektivitu pro reakci s aminem. Další výhodou NHS esterů je jejich stabilita. Jednou připravený NHS ester jsem mohl skladovat v lednici a použít jej dle potřeby.

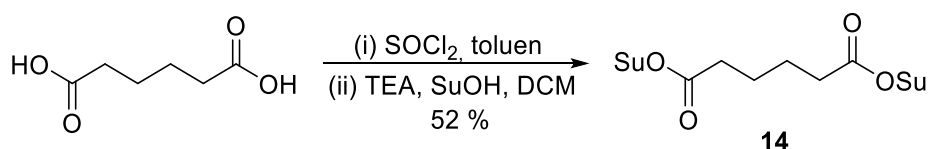
Schéma 4.2 Příprava aktivovaného esteru



Aktivovaný ester **13** byl připraven standardní metodou - reakcí odpovídající kyseliny s DCC a *N*-hydroxysukcinimidem.

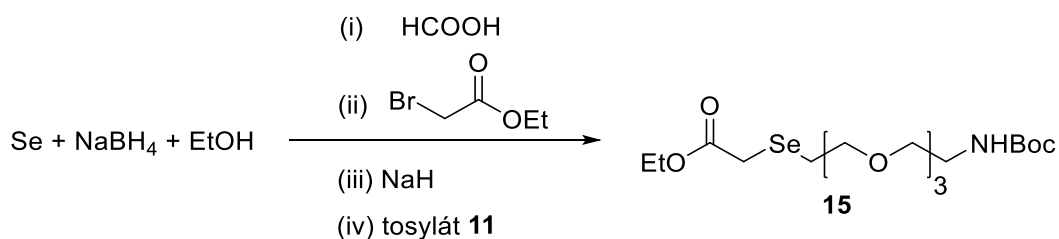
Pro využití modifikovaných ligandů v biochemických experimentech je potřeba spojku zakončit reaktivní skupinou, která umožní připojení k polymeru, povrchu apod. V některých případech je výhodnější spojku opatřit aminoskupinou. V jiných případech je vhodnější spojku zakončit naopak aktivovaným esterem. Z tohoto důvodu byl připraven bis-NHS ester kyseliny adipové **14**. Tento bis-NHS ester lze použít jako nástroj k „přepólování“ zakončení spojky z aminu na aktivovaný ester.

Schéma 4.3 Příprava bis-NHS esteru



Předešlé zkušenosti kolegů z biochemického oddělení ukázaly, že tetraethylglykolová spojka není vždy dostatečně dlouhá pro snížení sterickeho bránění polymeru v okolí ligandu. Proto jsme se rozhodli spojky prodloužit o další tetraethylglykolový řetězec. Zároveň jsme při té příležitosti řešili, jakým způsobem stanovíme koncentraci výše uvedených opiátu v iBodies. Po diskusi se spolupracujícím pracovištěm jsme jako nejvhodnější metodu vybrali elementární analýzu. Všechny atomy, které se přirozeně nacházejí v opioidním skeletu (C, N, O) jsou také součástí polymeru, proto obsah těchto prvků nelze použít k výpočtu koncentrace opiátu v iBodies. Za tímto účelem jsme museli vybrat vhodný prvek, jenž se dobře stanovuje elementární analýzou a zároveň jej vhodně zakomponovat do výsledného konjugátu. Tato modifikace samozřejmě nesmí ovlivnit biologickou aktivitu výsledné látky. Nejdřív jsme se rozhodli vyzkoušet přípravu nesymetricky substituovaných dialkyl selenidů.

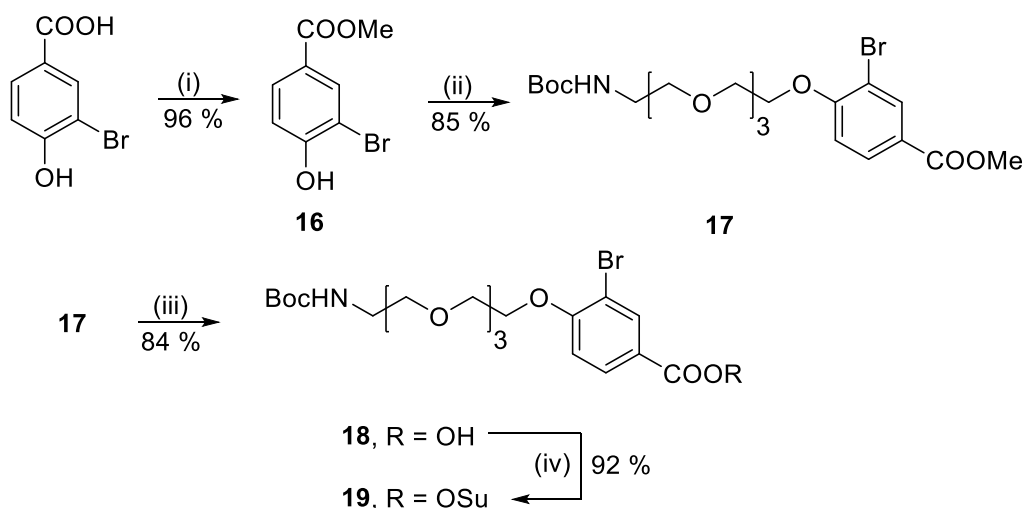
Schéma 4.4 Příprava nesymetrického organického selenidu **15**⁴⁸



Prvním krokem je reakce šedého selenu s NaBH₄ za přítomnosti ethanolu. Při této reakci vzniká selenidový anion, který může být posléze alkylován. Nejdřív se, ale do reakční směsi přidá kyselina mravenčí, která převede selenidový anion na anion hydrogen selenidový.⁴⁸ Tento krok zamezí dvounásobné alkylosti. Po alkylosti prvním alkylačním činidlem se selenid opět převede na anion reakcí s hydridem sodným. Vzniklý anion reaguje s druhým alkylačním činidlem za vzniku nesymetricky substituovaného organického selenidu.

Bohužel z této reakce se ani po opakovaném provedení za mírně odlišných podmínek nepovedlo izolovat žádný organický selenid. Proto jsme se rozhodli tento přístup opustit a zvolit přístup méně elegantní, ale za to synteticky jednodušší. Tento přístup spočíval v zavedení benzenového jádra nesoucího atom bromu mezi dva tetraethylglykolové řetězce. Jako výchozí sloučeninu jsme zvolili 3-brom-4-hydroxybenzoovou kyselinu. Přípravu kříženého derivátu **19** popisuje Schéma 4.5.

Schéma 4.5 Příprava spojky s aromatickým bromidem



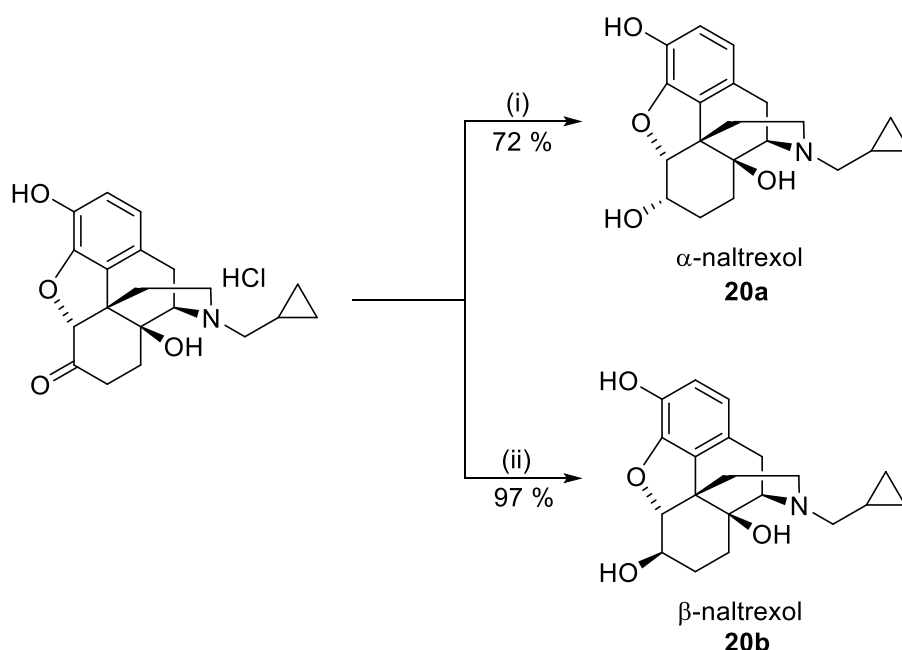
(i) H_2SO_4 , MeOH, 80 °C, 16 h; (ii) sloučenina **11**, K_2CO_3 , DMF, 50 °C, 16 h; (iii) NaOH, H_2O /dioxan, rt, 16 h; (iv) SuOH, TEA, TBTU, THF, rt, 16 h.

Prvním krokem přípravy spojky byla esterifikace benzoové kyseliny v methanolu za kyselé katalýzy, která probíhala téměř kvantitativně. Dále následovala alkylace fenolické funkční skupiny tosylátem **11** v DMF při 50 °C, jenž poskytla produkt v 85% výtěžku. Následně byl methyl-ester hydrolyzován vodným roztokem NaOH v dioxanu. Volná kyselina **18** byla poté převedena na odpovídající NHS ester **19**, který byl dále použit pro prodloužení jednotlivých spojek.

4.2. Příprava konjugátů cílených na μ -opioidní receptory

Jak již bylo zmíněno v teoretické části, nejvhodnějším místem pro modifikaci naltrexonu je karbonylový uhlík C-6. Příprava všech konjugátů vycházela z komerčně dostupného naltrexon hydrochloridu. Nejdřív byly připraveny oba diastereomery naltrexolu. Stereoselektivní přípravy obou izomerů jsou popsány v literatuře.⁴⁹⁻⁵⁰

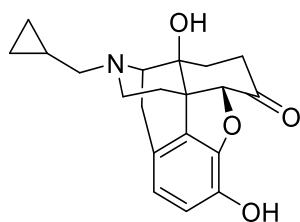
Schéma 4.6 Příprava diastereomerů naltrexolu⁴⁹⁻⁵⁰



(i) H_2 , 10% Pd/C, *i*PrOH/ H_2O , pH = 13, 4h; (ii) dioxid thiomocoviny, aq. 1M NaOH, 85 °C, 2h.

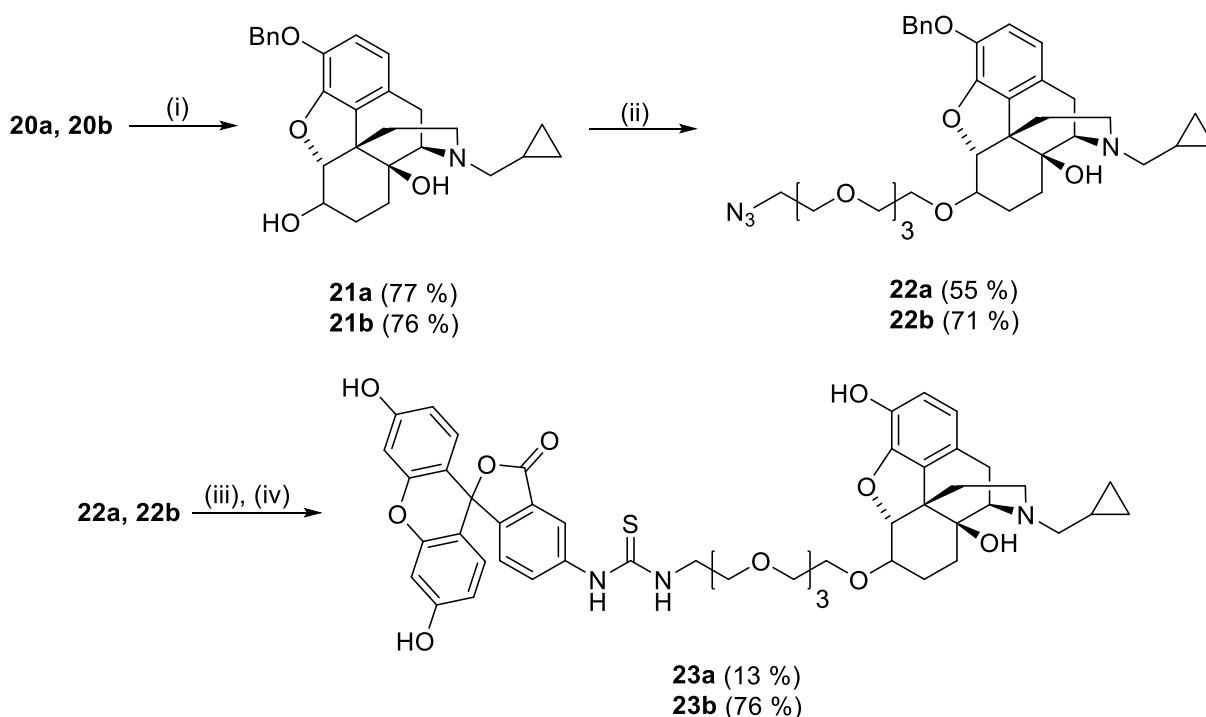
Izomer **20b** s orientací β na C-6 vzniká při redukci netradičním redukčním činidlem, dioxidem thiomocoviny.⁴⁹ Mechanismus této reakce není podrobně popsán a také není objasněno, proč vzniká přednostně tento izomer. Nicméně reakce poskytuje produkt ve velmi dobrém výtěžku, a proto nebylo třeba reakci dále studovat a optimalizovat. V případě α izomeru **20a** probíhá katalytická redukce selektivně, díky prostorovému uspořádání opioidního skeletu.⁵⁰ Při bazickém pH převládá enol forma C-6 ketonu, která může reagovat pouze z jedné strany. Z pro- β strany nemůže látka přistoupit ke katalyzátoru kvůli sterickeému bránění furanu a aromatického jádra. Tato skutečnost je patrná z prostorové struktury naltrexonu na Schématu 4.7. Naopak pro- α strana je dobře přístupná, proto vzniká tento izomer ve velmi dobrém výtěžku.

Schéma 4.7 Perspektivní zobrazení struktury naltrexonu



Další kroky byly v obou případech stejné, proto tyto reakce lze shrnout do jednoho zobecňujícího Schématu 4.8.

Schéma 4.8 Příprava konjugátů naltrexolu



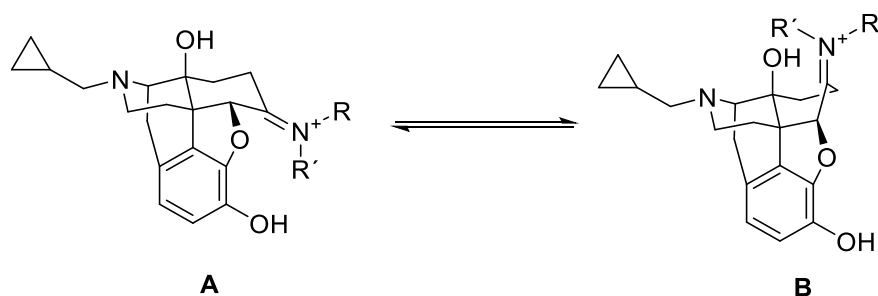
(i) BnBr, K₂CO₃, DMF, rt, 16 h; (ii) sloučenina **9**, NaH, DMF, rt, 2 dny; (iii) H₂, 10% Pd/C, EtOH, rt, 16 h; (iv) fluorescein NCS, THF, rt, 1 h.

Prvním syntetickým krokem bylo chránění fenolické funkce na uhlíku C-3, protože by při alkylační reakci konkurovala C-6 alkoholu a jistě by docházelo k vzniku nechtěného C-3 etheru. Díky rozdílné reaktivitě můžeme fenol alkylovat benzyl bromidem selektivně, produkt **21** vzniká ve velmi dobrém výtěžku.⁵¹ Důležitým faktorem je použití vhodné báze, v tomto případě jsem zvolil uhličitán draselný. Následně jsem alkyloval C-6 alkohol tosylátem **9**. V tomto případě jsem jako bázi použil hydrid sodný.

V dalším kroku jsem připravil fluorescenčně značené deriváty **23a** a **23b**. Nejdřív jsem katalytickou redukcí ochránil fenol a azid zredukoval na amin. Jako fluorescenční značku jsem použil fluorescein, který je komerčně dostupný ve formě isothiokyanátu. Tento reaktivní intermediát reagoval s aminem **22** za vzniku *N,N'*-disubstituované thiomocoviny. Tato reakce probíhá rychle, selektivně a v dobrém výtěžku. V případě α izomeru byl výtěžek nízký, protože při reakci docházelo k vzniku neznámého vedlejšího produktu. Tento vedlejší produkt jsem v případě β izomeru pozoroval také, tam však vznikl v menší míře. Fluorescenčně značené deriváty jsem poté předal na testování biologické aktivity pomocí metody FACS.

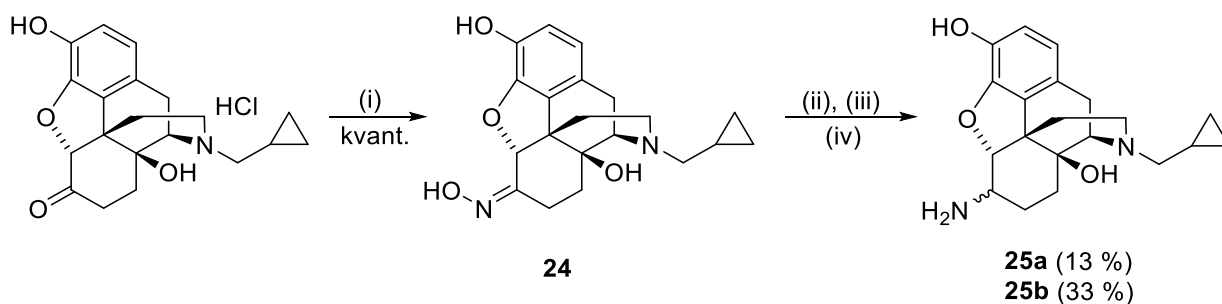
Dále jsem připravil konjugáty odvozené od naltrexaminu. Nejprve jsem tyto konjugáty připravil jako směs diastereomerů. Při závěrečném HPLC čištění se mi povedlo tyto izomery částečně oddělit a následné testování na FACS ukázalo, že mají mírně odlišnou aktivitu. Proto jsem posléze připravil oba diastereomery samostatně. Dle literatury by se měli konjugáty s orientací β vázat na MOR lépe, proto jsme pro redukcí zvolili metodu, při které vzniká β izomer preferenčně. Tuto redukcí popsal Portoghese v roce 1986.⁵² V literatuře bylo popsáno, že při redukcí iminů naltrexonu s objemnými substituenty R, R' vzniká přednostně β izomer.⁵³ Toto pozorování bylo vysvětleno domněnkou, že iminy naltrexonu zaujímají dvě různé konformace, dle Schématu 4.9. V případě objemnějších substituentů na dusíku iminu dochází k preferenci konformace B, která po redukcí poskytuje β diastereomer.

Schéma 4.9 Konformace iminů naltrexonu



Zjednodušením této reakce je varianta, kdy se naltrexon převede na naltrexon oxim, ten je následně redukován komplexem boranu.⁵² Redukční činidlo se silně koordinuje k oximu, což mimikuje objemné substituenty a vede k preferenci konformace B. Oba izomery naltrexaminu jsem připravil redukcí naltrexon oximu boranem (Schéma 4.10).

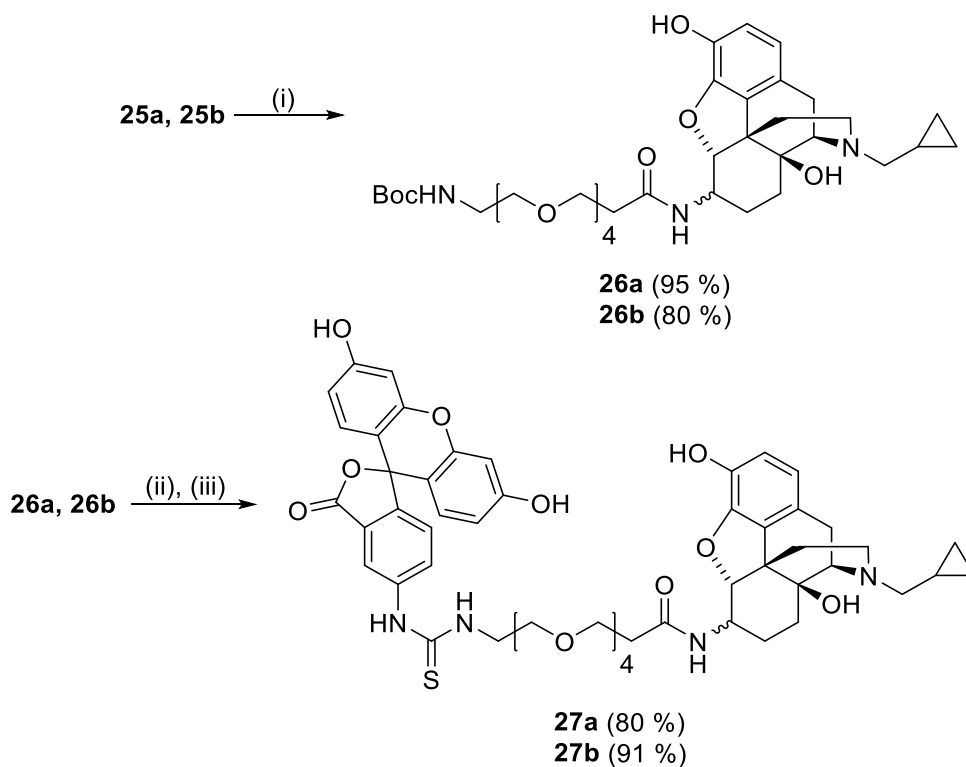
Schéma 4.10 Příprava diastereomerů naltrexaminu⁵²



(i) $\text{NH}_2\text{OH}\cdot\text{HCl}$, AcONa, EtOH/ H_2O , reflux, 3 h; (ii) $\text{BH}_3\cdot\text{THF}$, reflux, 2 dny; (iii) KOH, reflux, 2h; (iv) HCl, reflux, 2h.

Autoři publikace popisují vznik diastereomerů v poměru 10:1.⁵² V mém případě byl poměr 10:4, tudíž reakce neproběhla zdaleka tak selektivně jak naznačovala literatura. Nižší selektivita této reakce nepředstavovala žádný problémem, protože izomery bylo možné od sebe oddělit běžnou sloupcovou chromatografií a oba izomery jsem beztak potřeboval. Pro připojení spojky jsem v tomto případě použít aktivovaný ester **13**, viz Schéma 4.11.

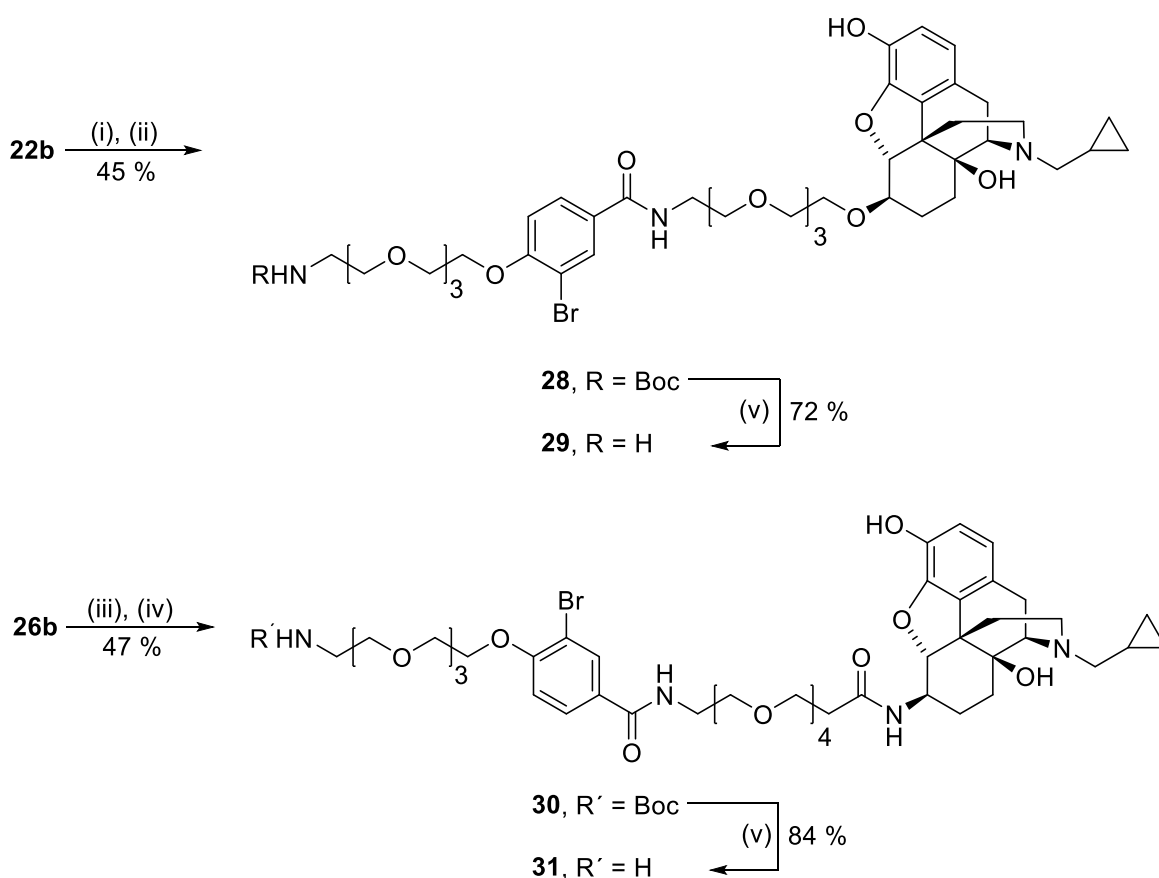
Schéma 4.11 Příprava konjugátů naltrexaminu



(i) sloučenina **13**, DMF, rt, 16 h; (ii) TFA, DCM, rt, 1,5 h; (iii) fluorescein NCS, TEA, THF, rt, 1h.

Poté jsem amin na konci spojky odchránil a následně jsem jej nechal reagovat s fluorescein isothiokyanátem za vzniku fluorescenčně značených konjugátů **27a** a **27b**. Oba tyto ligandy jsem opět předal k testování afinity. Testy ukázaly, že všechny ligandy se úspěšně vážou na MOR receptory, přičemž β izomery s o něco větší afinitou. Tudíž bylo prokázáno, že vyvedení tetraethylglykolové spojky přes C-6 amid a ether nenarušilo schopnost ligandu se vázat. Proto byly oba ligandy s β orientací vybrány pro prodloužení spojky a následnou přípravu iBody. Pro prodloužení spojky jsem následně použil výše zmíněný fragment **19**.

Schéma 4.12 Příprava konjugátů **29** a **31** pro připojení k polymeru

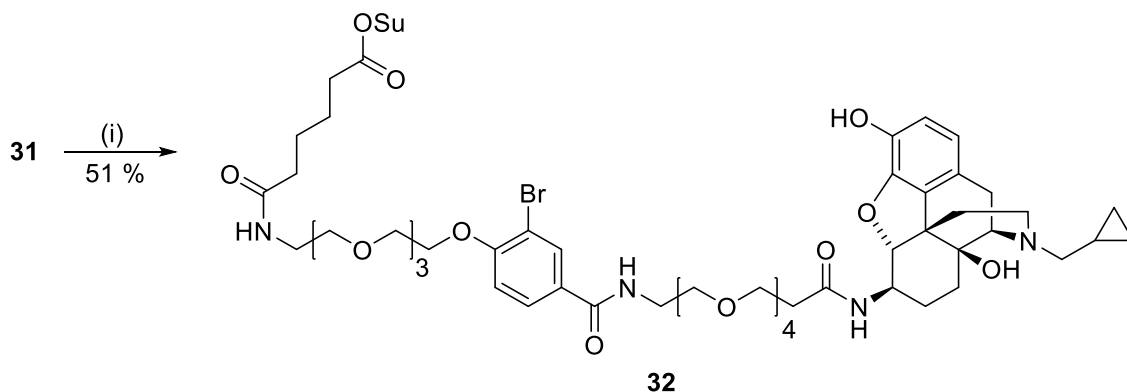


(i) H_2 , 10% Pd/C, EtOH, rt, 16 h; (ii) sloučenina **19**, DMF, rt, 16 h; (iii) TFA, DCM; (iv) sloučenina **19**, DMF, rt, 16 h; (v) TFA, DCM, rt, 1,5 h.

Konjugát **32** byl na spolupracujícím pracovišti také použit pro přípravu sondy pro metodu DIANA, dle Schématu 4.13. Tato metoda umožňuje stanovení disociačních konstant komplexu ligand-receptor.⁶ Sonda vzniká reakcí ligandu obsahujícího aktivovaný

ester s oligonukleotidem zakončeným volným aminem. Pro tento účel jsem použil bis-NHS ester kyseliny adipové **14**, který umožnil „přepólování“ aminu na aktivovaný ester **32**.

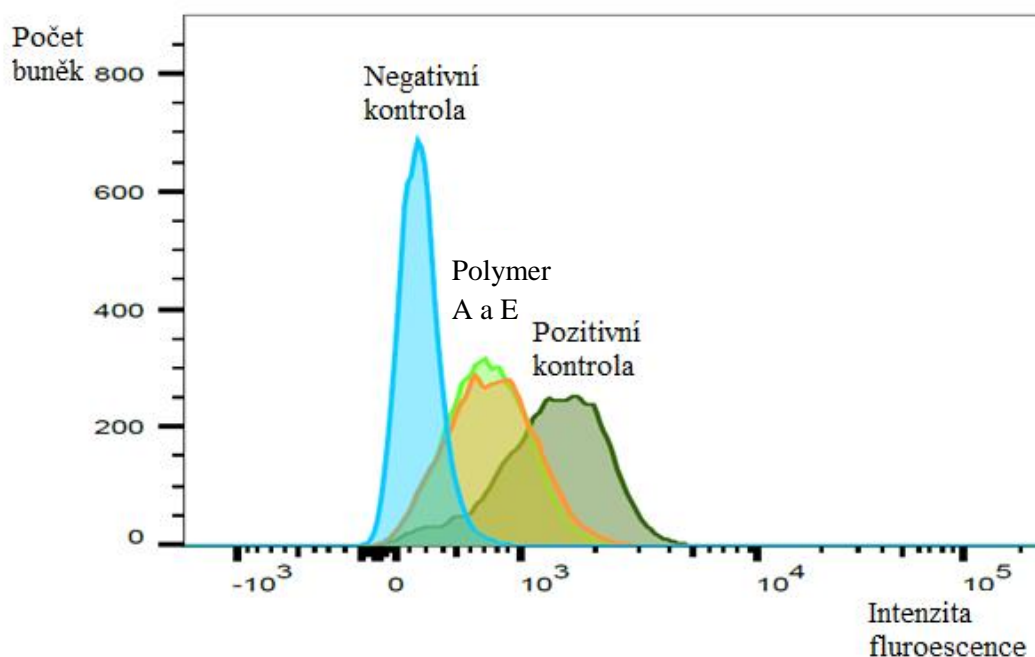
Schéma 4.13 Příprava konjugátu **32** pro DIANA sondu



(i) bis-NHS adipoát, TEA, DMF, rt, 16 h.

Použití velkého nadbytku bis-NHS esteru kyseliny adipové a pomalý přísávek aminu **31** k aktivovanému esteru umožnil získání produktu v dobrém výtěžku. Sonda pro metodu DIANA byla poté připravena, bohužel vzhledem ke složitosti MOR se zatím metodu nepovedlo pro tento systém optimalizovat. S využitím ligandů **29** a **31** byly připraveny první iBodies cílené na MOR. Polymer **A** s ligandem vázaným přes amid (konjugát **31**) a polymer **E** s ligandem vázaným přes ether (konjugát **29**). Jak ukázaly FACS experimenty, tyto iBodies se skutečně vázaly na MOR s afinitou srovnatelnou jako pozitivní kontrola, FITC-NTX. Jelikož zatím není dostupná metoda DIANA, nejsme schopni afinitu jednotlivých konjugátů kvantifikovat, můžeme je mezi sebou pouze srovnávat relativně.

Graf 4.1 Posun fluorescence buněk při použití různých fluorescenčně značených protilátek (koncentrace protilátek 10 nM)

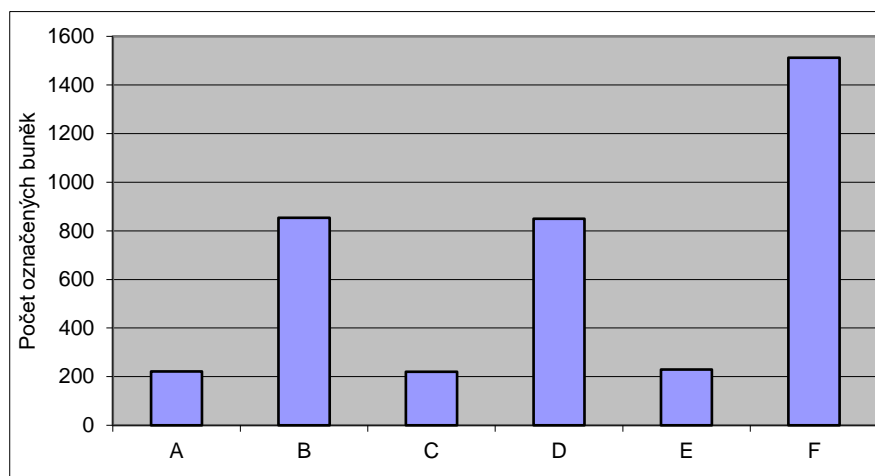


Negativní kontrola = přirozená fluorescence buněk; iBodies = polymer A a E; Pozitivní kontrola (FITC-NTX).

Jak vidíme na Grafu 4.1, při koncentraci 10 nM můžeme pozorovat s využitím metody FACS signifikantní posun ve fluorescenci populace buněk ve srovnání s negativní kontrolou (přirozená fluorescence buněk). Jak polymer **A**, tak polymer **E** se vážou s téměř identickou afinitou. Zároveň můžeme konstatovat, že oba připravené iBody značí méně intenzivně než referenční ligand s fluoroforem FITC-NTX. Kvantifikaci těchto údajů můžeme vidět na Grafu 4.2.

Graf 4.2 Počet označených buněk při použití různých protilátek

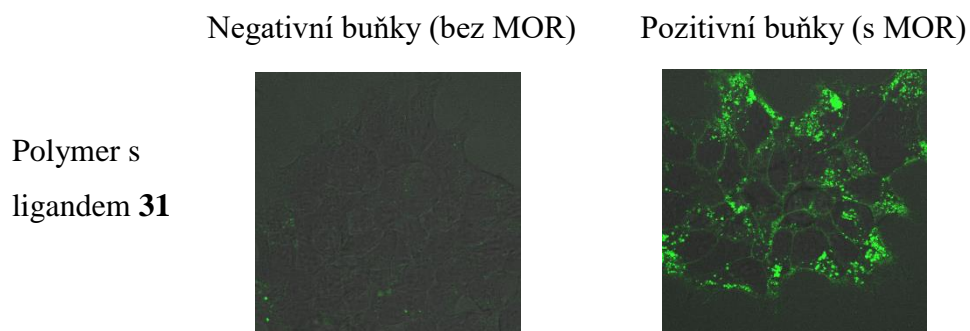
(koncentrace protilátek 10 nM)



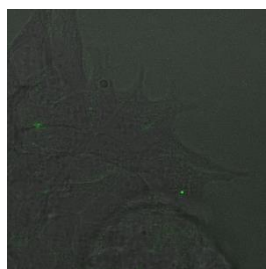
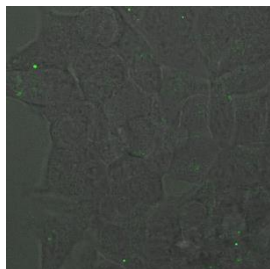
A = neg. buňky + polymer s etherem; B = poz. buňky + polymer s etherem; C = neg. buňky + polymer s amidem; D = poz. buňky + polymer s amidem; E = neg. buňky + referenční ligand; F = poz. buňky + referenční ligand

Zároveň je zde nutné podotknout, že iBody **A** se mírně odlišovalo od iBody **E** koncentrací ligandu na polymeru. U polymeru **E** byla koncentrace ligandů 11,75 na molekulu polymeru, přičemž u polymeru **A** 8,26 ligandu na molekulu polymeru. Po zahrnutí tohoto faktu můžeme konstatovat, že konjugát s amidem se pravděpodobně váže s větší afinitou. Dále bylo iBody **E** testováno také pro použití v konfokální mikroskopii. Výsledky jsou uvedeny na Obrázku 4.1.

Obrázek 4.1 Použití polymeru s ligandem **31** v konfokální mikroskopii



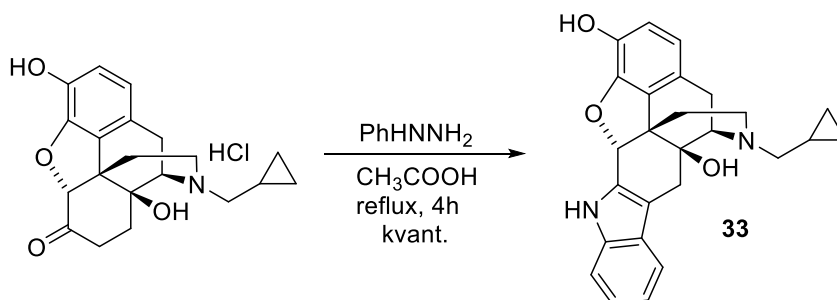
Polymer
bez ligandu
(kontrola)



4.3. Příprava konjugátů cílených na δ - a κ -opioidní receptory

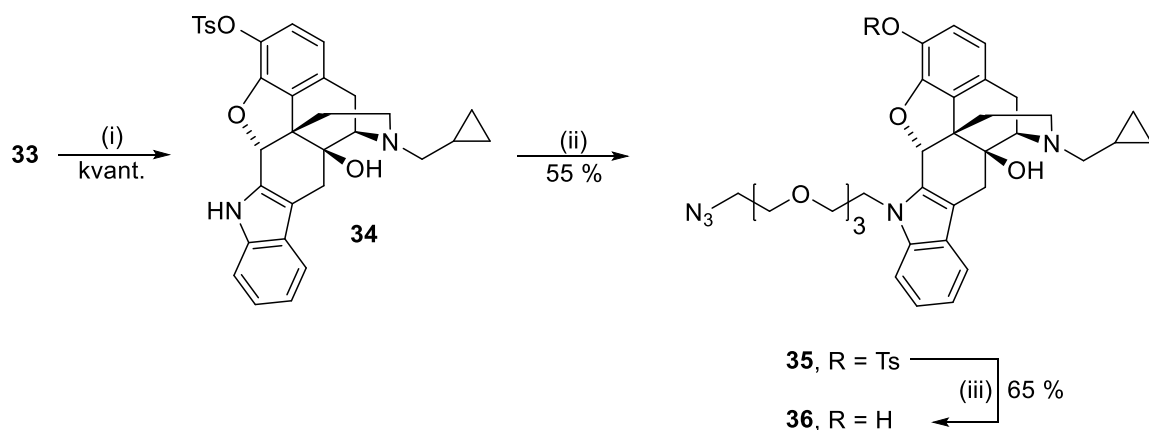
Pro cílení DOR receptorů byl zvolen naltrindol jako sloučenina, která má potenciál být úspěšně použita v konceptu iBody. Samotný naltrindol je selektivní antagonist DOR odvozený od naltrexonu. Naltrindol lze připravit v jednom kroku Fischerovou syntézou indolu z naltrexonu, dle Schématu 4.14.²⁴

Schéma 4.14 Příprava naltrindolu²⁴



Reakce naltrexon hydrochloridu s fenyldiazinem poskytla naltrindol v kvantitativním výtěžku. Pro alkylation indolu bylo potřeba, podobně jako u naltrexolu, nejprve ochránit fenol. V tomto případě byl tosylát zvolen jako chránicí skupina C-3 fenolu. Tento způsob byl již popsán v literatuře a poskytl ochráněný derivát **34** kvantitativně.⁵⁴ Poté jsem indol alkyloval tosylátem tetraethylglykolu **9**, dle Schématu 4.15. Produkt **35** vznikl v průměrném výtěžku.

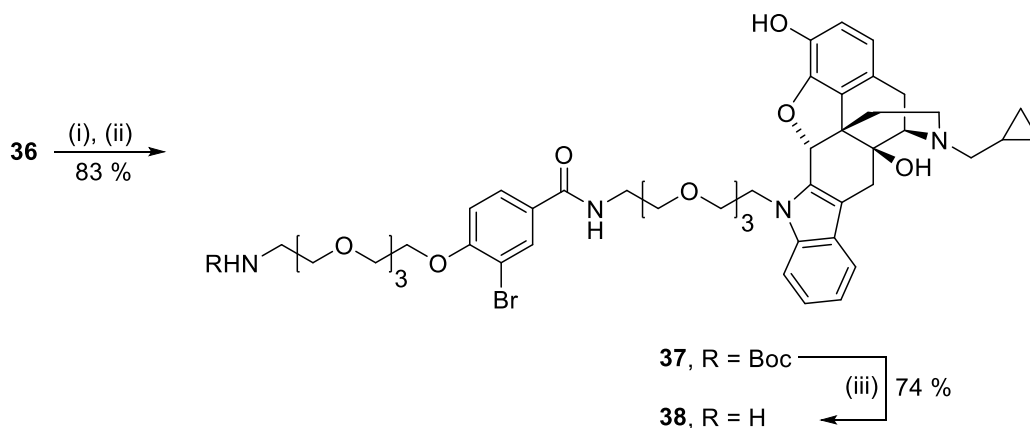
Schéma 4.15 Příprava konjugátu naltrindolu **36**⁵⁴



(i) TsCl, K₂CO₃, DMF, rt, 4h; (ii) sloučenina **9**, NaH, DMF, rt, 16 h; (iii) aq. 1M NaOH, *i*PrOH, reflux, 16 h.

Po alkylation indolu jsem fenolickou funkční skupinu na C-3 ochránil v bazickém vodném prostředí.⁵⁴ Poté jsem azid **36** převedl katalytickou redukcí na amin, který následně reagoval s aktivovaným esterem **19** pro prodloužení řetězce podobně jako v předchozích případech. Produkt vznikl ve velmi dobrém výtěžku.

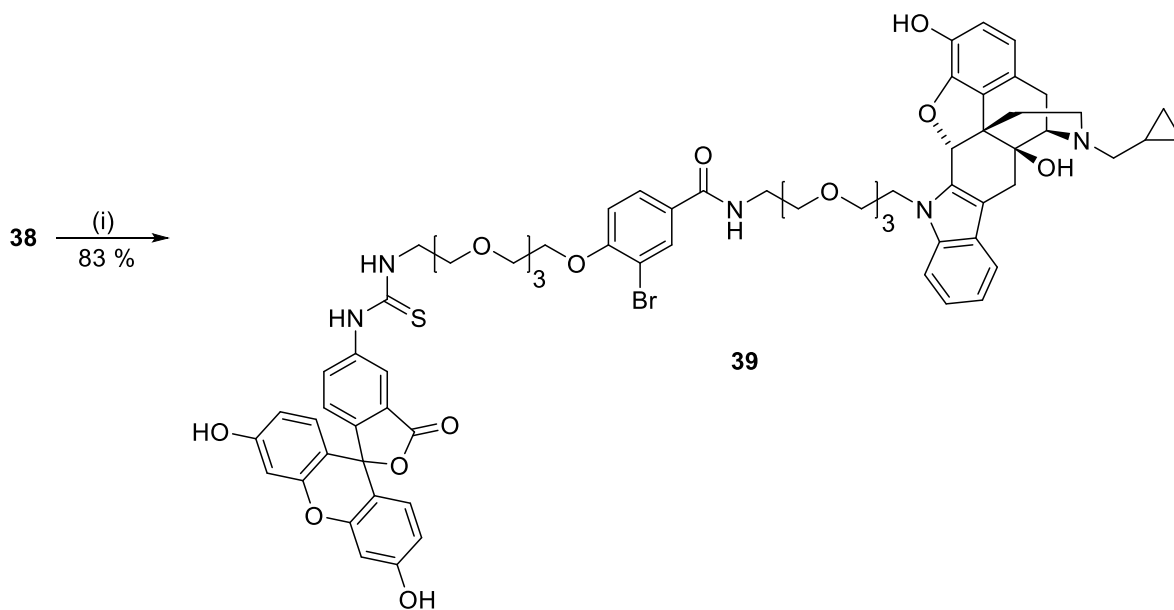
Schéma 4.16 Příprava konjugátu naltrindolu **38**



(i) H₂, 10% Pd/C, EtOH, rt, 3h; (ii) sloučenina **19**, DMF, rt, 16 h; (iii) TFA, DCM, rt, 1,5 h.

Poté jsem ochránil amin na konci řetězce sloučeniny **37** a po preparativním HPLC jsem sloučeninu **38** předal kolegům z ÚMCH pro tvorbu iBody. Současně jsem připravil fluorescenčně značený derivát **39** pro ověření zachování afinity a selektivity vazby na DOR (Schéma 4.17).

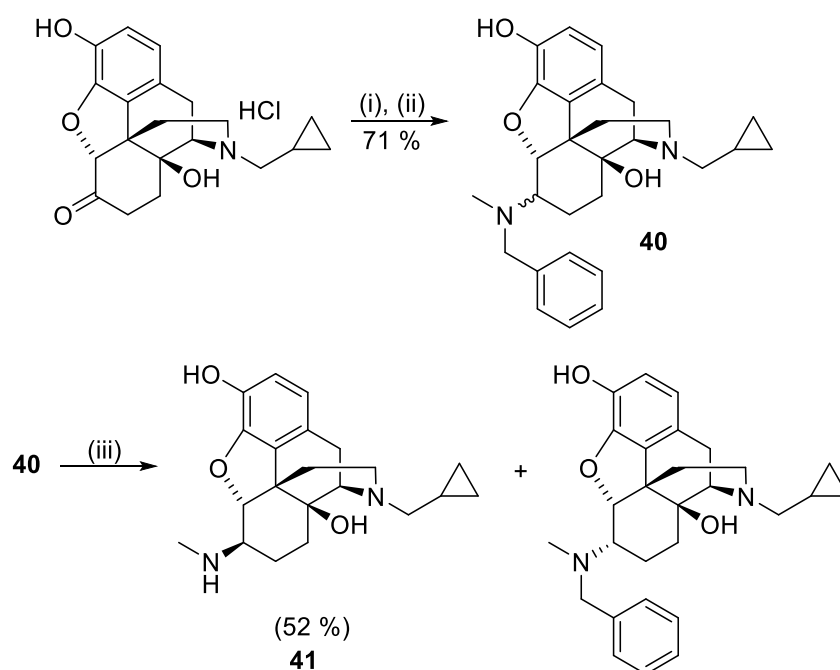
Schéma 4.17 Příprava fluorescenčně značeného konjugátu naltrindolu



(i) fluorescein NCS, TEA, THF, rt, 1h.

Posledním konjugátem, jenž jsem připravil, vychází z nalfurafinu. Vybranou sloučeninu jsem připravil ze dvou fragmentů **41** a **44**, jejichž přípravu postupně popíši v následujících odstavcích. Prvním fragmentem je β -*N*-methylnaltrexamin (**41**), jehož příprava opět vychází z naltrexonu, dle Schématu 4.18.

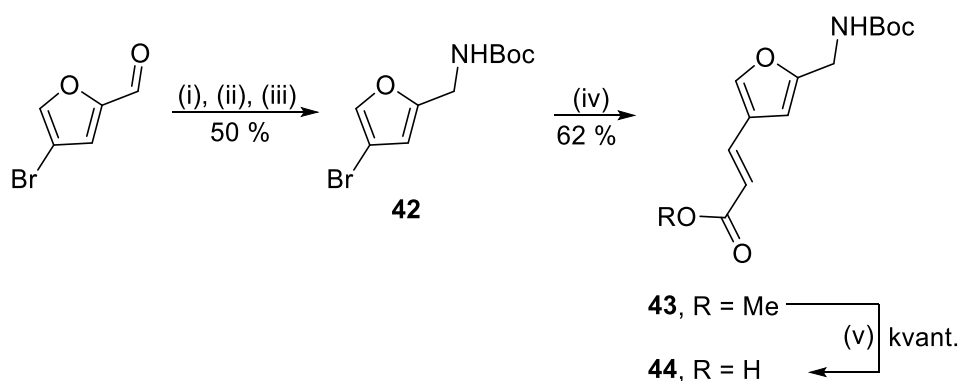
Schéma 4.18 Příprava β -*N*-methylnaltrexaminu (**41**)⁵⁵



(i) *N*-Benzylmethylamin, kyselina benzoová, *p*TsOH, toluen, reflux, 16 h; (ii) $\text{NaBH}_3(\text{CN})$, MeOH , rt, 16 h; (iii) H_2 , 10% Pd/C , AcOH , rt, 16 h.

Pro přípravu této látky jsem zvolil neobvyklý přístup, který opět využívá vlastností opioidního skeletu.⁵⁵ Nejdřív jsem připravil *N*-benzyl-*N*-methylnaltrexamin (**40**) redukcí příslušného iminu kyanoborohydridem. Tato látka vzniká jako směs diastereomerů v poměru přibližně 1:1. Následná katalytická debenzylace probíhá podobně jako u přípravy α -naltrexolu. Benzylový substituent u izomeru s α orientací na C-6 je bráněn skeletem, proto nemůže efektivně přistupovat ke katalyzátoru a k debenzylaci téměř nedochází. Naopak u izomeru s β orientací je benzylový substituent dobře přístupný a proto k debenzylaci dochází za standardních podmínek. Tudíž po katalytické redukci nebyl problém požadovaný produkt **41** jednoduše oddělit sloupcovou chromatografií. Syntéza druhého fragmentu nalfurafinu vychází z 4-bromfuraldehydu, viz Schéma 4.19.

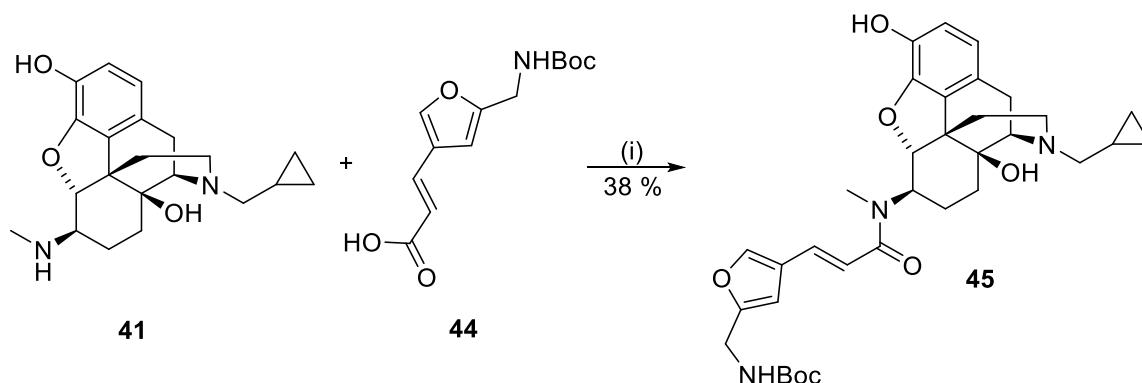
Schéma 4.19 Příprava furanového fragmentu **44**⁵⁶⁻⁵⁷



(i) AcONa, HONH₂·HCl, H₂O/EtOH, reflux, 1h; (ii) Zn, AcOH, rt, 16 h; (iii) Boc₂O, DIPEA, THF, rt, 2h; (iv) methyl-akrylát, TEA, DMF, *t*Bu XPhos Pd G3, 120 °C, 5h; (v) aq. 1M NaOH, dioxan/H₂O, rt, 16 h.

Výchozí aldehyd jsem nejprve převedl na oxim, který jsem poté zredukoval zinkem v ledové kyselině octové.⁵⁶ Vzniklý amin jsem ochránil skupinou Boc za standardních podmínek za vzniku sloučeniny **42** v průměrném výtěžku. Dalším krokem byla Heckova reakce s methyl-akrylátem.⁵⁷ Tato reakce vyžadovala optimalizaci, jelikož katalytické systémy jako PPh₃/Pd(OAc)₂ nebo SPhos Pd G3 vůbec neposkytly požadovaný produkt. Jako vhodný katalyzátor se nakonec ukázal komplex *t*Bu XPhos Pd G3, který poskytl produkt **43** v dobrém výtěžku. Posledním krokem byla hydrolyza esteru vodným hydroxidem sodným. Kyselinu **44** jsem dále použil v amidovém kaplingu s β-*N*-methylnaltrexaminem (**41**).

Schéma 4.20 Příprava konjugátu nalfurafinu **45**

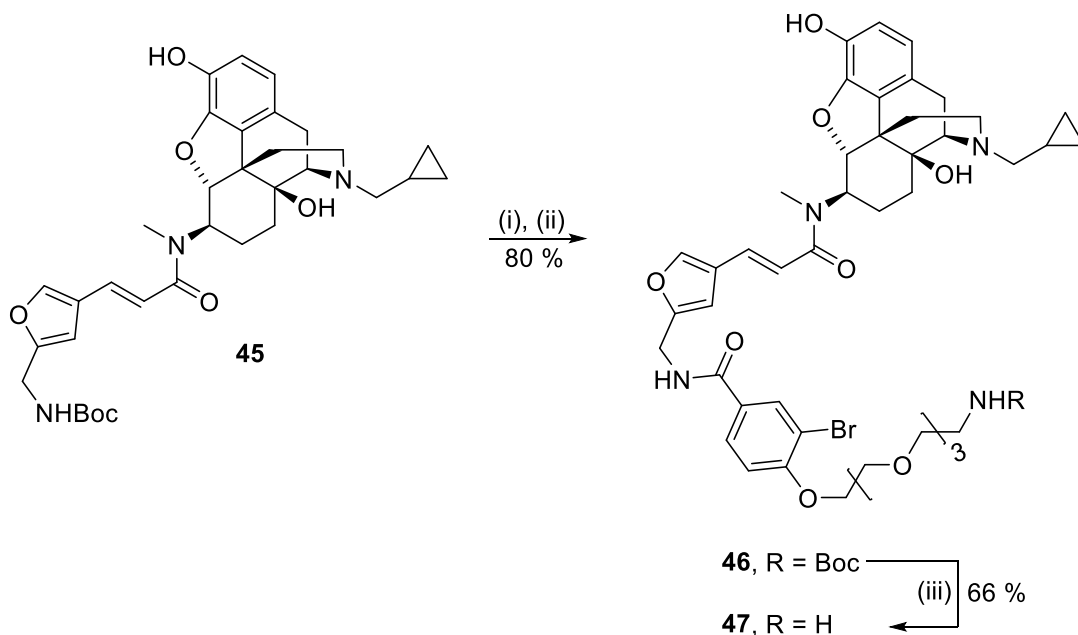


(i) PyBrOP, DIPEA, DMF, rt, 1h.

Jako činidlo pro amidový kapling jsem zvolil PyBrOP vzhledem k nižší očekávané reaktivitě sekundárního aminu **41**.⁵⁸ Dle HPLC-MS reakce probíhala čistě a kvantitativně. Jak se ukázalo později, problém byl s oddělením fosforamidu, který při reakci vzniká jako vedlejší produkt. Tato látka měla stejnou polaritu jako produkt **45**. Jediný způsob, jak je rozlišit byla chromatografie v kyselém prostředí, kde produkt s terciárním aminem změnil polaritu výrazně. Tato metoda čištění se pravděpodobně ovlivnila výtěžek reakce vzhledem k nestabilitě Boc chránicí skupiny v kyselém prostředí.

V případě konjugátu nalfurafinu jsme se rozhodli připojit ligand na polymer přes jeden tetraethylglykolový řetězec, jelikož furanový fragment navázaný na dusíku *N*-methylnaltrexaminu také částečně plní funkci spojky. Aminová funkční skupina sloučeniny **45** po odchránění reagovala s aktivovaným esterem **19**, dle Schématu 4.21. U vzniklého produktu jsem v NMR spektrech pozoroval existenci rotamerů v poměru přibližně 3:1. NMR spektra byla vyhodnocena pro více zastoupený rotamer. Dále jsem amin na konci tetraethylglykolového řetězce opět odchránil a finální látka **47** byla předána kolegům z ÚMCH pro přípravu iBody.

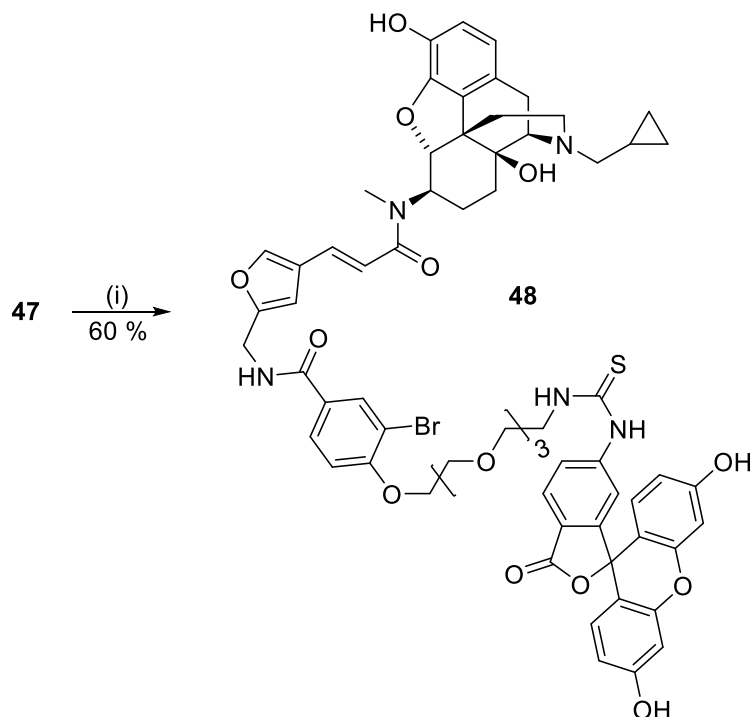
Schéma 4.21 Příprava konjugátu nalfurafinu **47**



(i) TFA, DCM, rt, 1,5 h; (ii) sloučenina **19**, DIPEA, DMF, rt, 16 h; (iii) TFA, DCM, rt, 1,5 h.

Analogicky jako v přechozích případech jsem připravil fluorescenčně značený konjugát **48** pro testování afinity a selektivity na FACS (Schéma 4.22).

Schéma 4.22 Příprava fluorescenčně značeného konjugátu nalfurafinu **48**



(i) fluorescein NCS, DIPEA, THF, rt, 1h.

Výše zmíněnými postupy jsem připravil požadované látky a splnil tak všechny cíle diplomového projektu. Pro úplnost dodávám, že biologické aktivity konjugátů cílených na DOR a KOR zatím nejsou stanoveny, protože kolegové z biochemického oddělení dosud neměli k dispozici buňky se stabilní transfekcí DOR a KOR.

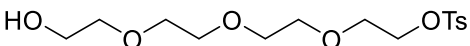
5. Experimentální část

5.1 Použité přístroje a chemikálie

Všechny rozpouštědla a reaktanty byly použity, tak jak byly získány z komerčních zdrojů, kromě THF, který byl destilován ze směsi sodík-benzofenon pod ochrannou atmosférou argonu. Pro měření ^1H a ^{13}C NMR spekter byly použity přístroje Varian UNITY 300 (^1H při 300 MHz, ^{13}C při 75 MHz), Bruker AVANCE III HD 400 (^1H při 400 MHz, ^{13}C při 100 MHz) a Bruker AVANCE III HD 600 (^1H při 600 MHz, ^{13}C při 150 MHz). Jako rozpouštědla byly použity CDCl_3 , CD_3OD a $\text{DMSO}-d_6$. Hmotnostní spektra HRMS byly měřeny na přístroji LTQ Orbitrap XL (Thermo Fisher Scientific). Reakční směsi byly analyzovány metodou HPLC-MS za použití HPLC přístroje Agilent Infinity 1260 v kombinaci s Q/TOF analyzátozem Agilent 6530. Produkty byly přečištěny pomocí preparativního HPLC za použití přístroje Agilent Infinity 1260 (průtok 10 mL/min, délka programu 50 minut) s reverzní stacionární fází C18 na koloně. Pro čištění pomocí sloupcové chromatografie byl používán silikagel 60 (0,063-0,100 mm; Merck). Pro sledování průběhu reakcí a sloupcové chromatografie byly používány TLC hliníkové desky s vrstvou silikagelu 60 F₂₅₄ (Merck).

5.2 Pracovní postupy

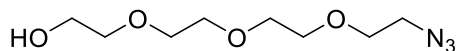
2-(2-(2-(2-Hydroxyethoxy)ethoxy)ethoxy)ethyl-4-methylbenzensulfonát (7)

 K tetraethylglykolu (20,0 g; 100 mmol) v DCM (30 mL) pod ochrannou atmosférou argonu byl přidán triethylamin (2,2 mL; 16 mmol). Následně byla reakční směs vychlazena ledovou lázní. Poté byl přidán pevný tosyl chlorid (1,91 g; 10 mmol) a reakční směs byla míchána přes noc při laboratorní teplotě. Druhý den byla reakční směs promyta vodou (30 mL) a vodná fáze byla extrahována DCM (2×20 mL). Spojené organické extrakty byly promyty 5% roztokem kyseliny citrónové (2×20 mL), vysušeny bezvodým MgSO_4 a odpařeny. Sloupcová chromatografie odparku (silikagel; mobilní fáze EtOAc) poskytla 2,81 g (79 %) bezbarvého oleje.

^1H NMR (400 MHz, CDCl_3) δ 7,81-7,76 (m, 2H); 7,36-7,30 (m, 2H); 4,18-4,11 (m, 2H); 3,73-3,55 (m, 14H); 2,43 (s, 3H); ^{13}C NMR (100 MHz, CDCl_3) δ 145,3; 133,4;

130,3; 128,4; 72,9; 71,2; 71,1; 70,9; 70,7; 69,7; 69,1; 62,1; 22,1; **HRMS** vypočteno pro $C_{15}H_{24}O_7NaS^+$ 371,1135; nalezeno 371,1133.

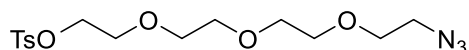
2-(2-(2-(2-Azidoethoxy)ethoxy)ethoxy)ethan-1-ol (**8**)



Azid sodný (2,10 g; 32 mmol) byl přidán k roztoku tosylátu **7** (2,84 g; 8 mmol) v DMF (10 mL) pod ochrannou atmosférou argonu. Roztok byl míchán při 55 °C přes noc. Druhý den byla reakční směs rozložena vodou (20 mL) a vodná fáze byla extrahována DCM (3x20 mL). Spojené organické extrakty byly promyty vodou (2x15 mL) a solankou (15 mL). Následně byly sušeny bezvodým $MgSO_4$ a rozpouštědlo bylo odpařeno. Sloupcová chromatografie odparku (silikagel; mobilní fáze EtOAc:MeOH / 85:15) poskytla 1,63 g (92 %) nažloutlého oleje.

1H NMR (400 MHz, $CDCl_3$) δ 3,74-3,69 (m, 2H); 3,69-3,63 (m, 10H); 3,62-3,57 (m, 2H); 3,38 (t, $J = 5,1$ Hz, 2H); **^{13}C NMR** (100 MHz, $CDCl_3$) δ 72,5; 70,7 (2C); 70,6; 70,4; 70,1; 61,7; 50,7; **HRMS** vypočteno pro $C_8H_{18}O_4N_3^+$ 220,1292; nalezeno 220,1292.

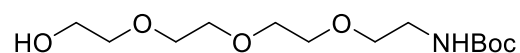
2-(2-(2-(2-Azidoethoxy)ethoxy)ethoxy)ethyl-4-methylbenzensulfonát (**9**)



K azidu **8** (1,4 g; 6,4 mmol) v DCM (10 mL) pod ochrannou atmosférou argonu byl přidán triethylamin (1,3 mL; 9,1 mmol). Po 5 minutách byla reakční směs vychlazena ledovou lázní a do reakční směsi byl přidán pevný tosyl chlorid (0,67 g; 7,5 mmol). Reakční směs byla míchána přes noc. Druhý den byla reakční směs promyta vodou (30 mL) a vodná vrstva byla extrahována DCM (2x30 mL). Spojené organické extrakty byly promyty 5% roztokem kyseliny citrónové (2x20 mL) a sušeny bezvodým $MgSO_4$. Rozpouštědlo bylo odpařeno, sloupcová chromatografie odparku (silikagel; mobilní fáze cyklohexan:EtOAc / 1:1) poskytla 2,1 g (88 %) nažloutlého oleje.

1H NMR (400 MHz, $CDCl_3$) δ 7,82-7,76 (m, 2H); 7,34 (d, $J = 6,5$ Hz, 2H); 4,18-4,12 (m, 2H); 3,71-3,55 (m, 12H); 3,40-3,34 (m, 2H); 2,44 (s, 3H); **^{13}C NMR** (100 MHz, $CDCl_3$) δ 144,9; 133,0; 129,9; 128,0; 70,8; 70,7; 70,6; 70,0; 69,3; 68,7; 50,7; 35,5; 21,7; **HRMS** vypočteno pro $C_{15}H_{23}O_6N_3NaS^+$ 396,1200; nalezeno 396,1200.

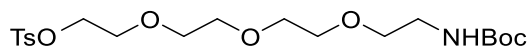
***tert*-Butyl(2-(2-(2-(2-hydroxyethoxy)ethoxy)ethoxy)ethyl)karbamát (10)**



K roztoku azidu **8** (1,6 g; 7,4 mmol) v ethanolu (30 mL) byl přidán Boc_2O (1,9 g; 8,9 mmol). Následně bylo přidáno 10% Pd/C (0,16 g) a reakční směs byla míchána přes noc pod přetlakem vodíku při laboratorní teplotě. Druhý den byla reakční směs zfiltrována přes vatku a rozpouštědlo bylo odpařeno. Následně byla přidána voda (30 mL) a vodná vrstva byla extrahována DCM (2×30 mL). Organické extrakty byly sušeny bezvodým MgSO_4 a rozpouštědlo odpařeno. Sloupcová chromatografie odparku (silikagel; mobilní fáze EtOAc:MeOH / 10:1) poskytla 1,35 g (62 %) bezbarvého oleje.

$^1\text{H NMR}$ (400 MHz, CDCl_3) δ 5,59 (bs, 1H); 3,72-3,53 (m, 12H); 3,50-3,45 (m, 2H); 3,29-3,21 (m, 2H); 1,38 (s, 9H); $^{13}\text{C NMR}$ (100 MHz, CDCl_3) δ 156,1; 78,8; 72,6; 70,6; 70,4; 70,2; 70,0; 61,5; 40,3; 28,4; **HRMS** vypočteno pro $\text{C}_{13}\text{H}_{27}\text{O}_6\text{NNa}^+$ 316,1731; nalezeno 316,1731.

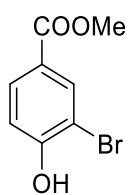
2,2-Dimethyl-4-oxo-3,8,11,14-tetraoxa-5-azahexadekan-16-yl-4-methylbenzensulfonát (11)



K derivátu tetraethylenglykolu **10** (1,4 g; 4,6 mmol) v DCM (15 mL) pod ochrannou atmosférou argonu byl přidán triethylamin (1 mL; 6,9 mmol). Po 5 minutách byl roztok vychlazen ledovou lázní a následně byl přidán pevný tosyl chlorid (1,1 g; 5,5 mmol). Reakční směs byla míchána přes noc při laboratorní teplotě. Druhý den byla reakční směs promyta vodou (20 mL). Vodná vrstva byla extrahována DCM (2×15 mL). Spojené organické extrakty byly promyty 5% roztokem kyseliny citrónové (2×20 mL) a solankou (20 mL). Poté byly sušeny bezvodým MgSO_4 a rozpouštědlo bylo odpařeno. Sloupcová chromatografie odparku (silikagel; mobilní fáze cyklohexan:EtOAc / 1:2) poskytla 1,8 g (88 %) bezbarvého oleje.

$^1\text{H NMR}$ (400 MHz, CDCl_3) δ 7,82-7,78 (m, 2H); 7,37-7,33 (m, 2H); 5,04 (bs, 1H); 4,19-4,14 (m, 2H); 3,72-3,68 (m, 2H); 3,63-3,57 (m, 8H); 3,53 (t, $J = 5,2$ Hz, 2H); 3,34-3,26 (m, 2H); 2,45 (s, 3H); 1,44 (s, 9H); $^{13}\text{C NMR}$ (100 MHz, CDCl_3) δ 156,0; 144,9; 133,1; 129,9; 128,0; 79,2; 70,8; 70,6; 70,5; 70,3; 70,2; 69,3; 68,7; 40,4; 28,5; 21,7; **HRMS** vypočteno pro $\text{C}_{20}\text{H}_{33}\text{O}_8\text{NNaS}^+$ 470,1819; nalezeno 470,1820.

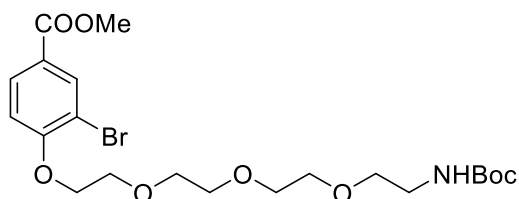
Methyl-3-brom-4-hydroxybenzoát (16)



K roztoku 3-brom-4-hydroxy benzoové kyseliny (1,0 g; 4,6 mmol) v methanolu (10 mL) byla přidána 96% kyselina sírová (0,5 mL; 8,2 mmol) a reakční směs byla míchána přes noc při 80 °C. Druhý den bylo rozpouštědlo odpařeno a odparek byl naředěn ethyl-acetátem (30 mL). Organická fáze byla promyta nasyceným roztokem NaHCO₃ (2×20 mL) a solankou (20 mL). Následně byla sušena bezvodým MgSO₄ a rozpouštědlo bylo odpařeno. Bylo získáno 1,0 g (96 %) bílé krystalické látky.

¹H NMR (300 MHz, CDCl₃) δ 8,24 (d, *J* = 2,0 Hz, 1H); 7,91 (dd, *J* = 8,5; 2,0 Hz, 1H); 7,05 (d, *J* = 8,5 Hz, 1H); 6,11 (bs, 1H); 3,89 (s, 3H); ¹³C NMR (75 MHz, CDCl₃) δ 166,7; 156,3; 134,0; 131,0; 124,0; 115,8; 110,1; 52,3; HRMS vypočteno pro C₈H₇O₃Br⁺ 229,9579; nalezeno 229,9576.

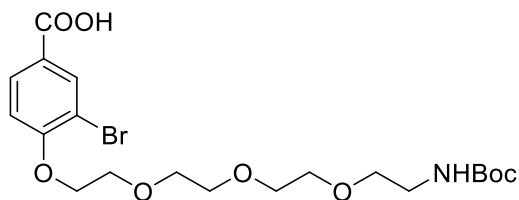
Methyl-3-bromo-4-((2,2-dimethyl-4-oxo-3,8,11,14-tetraoxa-5-azahexadekan-16-yl)oxy)benzoát (17)



K roztoku alkoholu **16** (0,10 g; 0,44 mmol) v DMF (5 mL) pod ochrannou atmosférou argonu byl přidán pevný K₂CO₃ (0,12 g; 0,88 mmol). Následně byl přidán tosylát **11** (0,16 g; 0,35 mmol) a reakční směs byla míchána při 50 °C přes noc. Druhý den byla reakční směs rozložena vodou (20 mL) a produkt byl extrahován DCM (2×20 mL). Spojené organické extrakty byly promyty vodou (2×20 mL) a solankou (20 mL). Následně byly sušeny bezvodým MgSO₄ a rozpouštědlo bylo odpařeno. Sloupcová chromatografie odparku (silikagel; mobilní fáze cyklohexan:EtOAc / 1:2) poskytla 0,18 g (85 %) bezbarvého oleje.

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 8,19 (d, *J* = 2,1 Hz, 1H); 7,97 (dd, *J* = 8,6; 2,1 Hz, 1H); 6,94 (d, *J* = 8,6 Hz, 1H); 5,04 (bs, 1H); 4,29-4,23 (m, 2H); 3,99-3,92 (m, 2H); 3,90 (s, 3H); 3,84-3,79 (m, 2H); 3,72-3,60 (m, 6H); 3,55 (t, *J* = 5,2 Hz, 2H); 3,35-3,27 (m, 2H); 1,45 (s, 9H); ¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃) δ 165,7; 158,9; 156,0; 134,8; 130,5; 123,9; 121,2; 111,9; 79,2; 71,2; 70,7; 70,6; 70,3; 70,2; 69,2; 52,2; 40,4; 28,4; HRMS vypočteno pro C₂₁H₃₃O₈NBr⁺ 506,1384; nalezeno 506,1386.

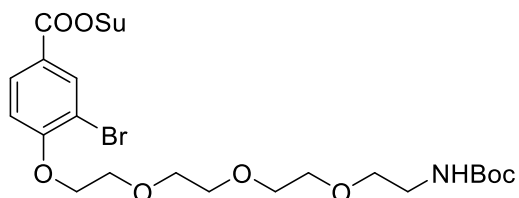
3-Brom-4-((2,2-dimethyl-4-oxo-3,8,11,14-tetraoxa-5-azahexadekan-16-yl)oxy)benzoová kyselina (18)



K roztoku esteru **17** (0,16 g; 0,32 mmol) v dioxanu (2 mL) byl přidán 0,5M roztok NaOH ve vodě (1,2 mL). Reakční směs byla míchána přes noc při laboratorní teplotě. Druhý den byla směs rozložena vodou (15 mL), pH upraveno na hodnotu 3-4 přidávkem 1M roztoku HCl a produkt byl extrahován DCM (3×15 mL). Spojené organické extrakty byly sušeny bezvodým MgSO₄ a rozpouštědlo odpařeno. Reakce poskytla 0,13 g (84 %) kyseliny ve formě bezbarvého oleje.

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 8,29 (d, *J* = 2,1 Hz, 1H); 8,02 (dd, *J* = 8,6; 2,1 Hz, 1H); 6,95 (d, *J* = 8,6 Hz, 1H); 5,10 (bs, 1H); 4,28 (t, *J* = 4,8 Hz, 2H); 3,98 (t, *J* = 4,8 Hz, 2H); 3,89-3,78 (m, 2H); 3,76-3,59 (m, 6H); 3,56 (t, *J* = 5,2 Hz, 2H); 3,37-3,28 (m, 2H); 1,46 (s, 9H); ¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃) δ 169,6; 159,4; 156,1; 135,4; 131,1; 123,2; 112,2; 111,9; 79,3; 71,2; 70,7; 70,6; 70,2; 69,3; 69,2; 40,4; 28,4; HRMS vypočteno pro C₂₀H₃₁O₈NBr⁺ 492,1228; nalezeno 492,1228.

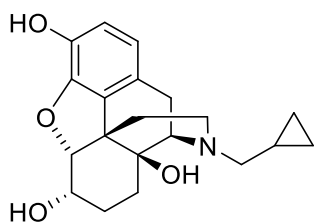
2,5-Dioxopyrrolidin-1-yl-3-bromo-4-((2,2-dimethyl-4-oxo-3,8,11,14-tetraoxa-5-azahexadekan-16-yl)oxy)benzoát (19)



K roztoku kyseliny **18** (0,10 g; 0,20 mmol) v THF (10 mL) pod ochrannou atmosférou argonu byl přidán triethylamin (57 μL, 0,40 mmol). Po 5 minutách bylo přidáno TBTU (0,08 g, 0,26 mmol), následně *N*-hydroxysukcinimid (0,03 g; 0,26 mmol). Reakční směs byla míchána přes noc. Druhý den bylo rozpouštědlo odpařeno. Sloupcová chromatografie odparku (silikagel; mobilní fáze DCM:MeOH / 93:7) poskytla 0,11 g (92 %) bezbarvého oleje.

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 8,33 (d, *J* = 2,1 Hz, 1H); 8,07 (dd, *J* = 8,7; 2,1 Hz, 1H); 7,01 (d, *J* = 8,7 Hz, 1H); 5,04 (bs, 1H); 4,30 (t, *J* = 4,7 Hz, 2H); 3,97 (t, *J* = 4,8 Hz, 2H); 3,83-3,78 (m, 2H); 3,72-3,59 (m, 6H); 3,54 (t, *J* = 5,1 Hz, 2H); 3,36-3,26 (m, 2H); 2,91 (s, 4H); 1,45 (s, 9H); ¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃) δ 169,2; 160,5 (2C); 156,0; 135,7; 131,8; 118,4; 112,5; 79,2; 71,2; 70,7; 70,6; 70,2 (2H); 69,4; 69,2; 40,4; 28,4; 25,7; HRMS vypočteno pro C₂₄H₃₃O₁₀N₂BrNa⁺ 611,1211; nalezeno 611,1213.

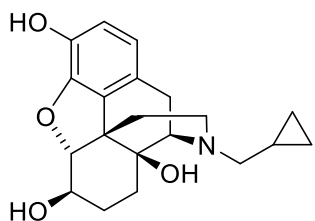
α -Naltrexol (20a)



K roztoku naltrexon hydrochloridu (0,20 g; 0,53 mmol) ve směsi *i*PrOH:H₂O / 1:2 (3 mL) byl přidáván vodný NaOH dokud pH nedosáhlo hodnoty 13. Následně bylo přidáno 10% Pd/C (20 mg) a reakční směs byla míchána pod přetlakem vodíku (2,7 atm) po dobu 4 h. Poté byl katalyzátor odfiltrován a reakční směs byla naředěna vodou (15 mL). Posléze bylo pH upraveno na hodnotu 9 přidávkem 10% vodného KHSO₄ a produkt byl extrahován ethyl-acetátem (3×15 mL). Spojené organické extrakty byly promyty vodou (20 mL), solankou (20 mL) a sušeny bezvodým MgSO₄. Po odpaření rozpouštědla bylo získáno 0,13 g (72 %) ve formě bílé krystalické látky.

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 6,72 (d, *J* = 8,1 Hz, 1H); 6,53 (d, *J* = 8,1 Hz, 1H); 4,69 (d, *J* = 4,3 Hz, 1H); 4,35-4,24 (m, 1H); 3,11 (d, *J* = 6,6 Hz, 1H); 3,04 (d, *J* = 18,5 Hz, 1H); 2,70-2,53 (m, 2H); 2,45-2,30 (m, 2H) 2,26 (d, *J* = 7,7 Hz, 2H); 1,81-1,63 (m, 2H); 1,63-1,57 (m, 1H); 1,52-1,40 (m, 1H); 1,21-1,10 (m, 1H); 0,92-0,78 (m, 1H); 0,61-0,51 (m, 2H); 0,20-0,11 (m, 2H); **¹³C NMR** 145,8; 137,9; 131,1; 125,4; 119,2; 117,8; 90,9; 70,1; 67,0; 62,2; 59,8; 47,4; 43,3; 33,5; 28,8; 23,4; 22,9; 9,5; 4,0; 3,9; **HRMS** vypočteno pro C₂₀H₂₆O₄N⁺ 344,1856; nalezeno 344,1852.

β -Naltrexol (20b)

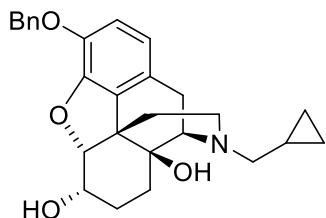


K roztoku naltrexon hydrochloridu (0,5 g; 1,3 mmol) ve vodném NaOH (5 mL, 1M) byl v průběhu 20 minut přidán roztok dioxidu thiomocoviny (0,57 g; 5,3 mmol) ve vodném NaOH (5 mL, 1M). Reakční směs byla poté míchána při 85 °C 2 hodiny. Poté byl roztok vychlazen ledovou lázní a pH bylo upraveno na hodnotu 8 přidávkem vodného roztoku NH₄Cl. Produkt byl extrahován směsí DCM: *i*PrOH / 4:1 (4×20 mL). Spojené organické extrakty byly sušeny bezvodým MgSO₄ a rozpouštědlo bylo odpařeno. Tímto postupem bylo získáno 0,44 g (97 %) produktu ve formě bílé krystalické látky.

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 6,72 (d, *J* = 8,1 Hz, 1H); 6,56 (d, *J* = 8,1 Hz, 1H); 4,59 (d, *J* = 6,3 Hz, 1H); 3,62-3,52 (m, 1H); 3,12 (d, *J* = 5,7 Hz, 1H); 3,02 (d, *J* = 18,4 Hz, 1H); 2,71-2,55 (m, 2H); 2,38 (d, *J* = 6,5 Hz, 2H); 2,32-1,92 (m, 3H); 1,74-1,60 (m, 2H); 1,51-1,32 (m, 2H); 0,90-0,78 (m, 1H); 0,58-0,50 (m, 2H); 0,17-0,10 (m, 2H);

^{13}C NMR (100 MHz, CDCl_3) δ 142,4; 139,8; 131,6; 124,2; 119,1; 117,5; 95,9; 72,8; 70,6; 62,2; 59,2; 47,5; 43,9; 30,7; 29,6; 25,9; 22,7; 9,4; 4,0; 3,8; **HRMS** vypočteno pro $\text{C}_{20}\text{H}_{26}\text{O}_4\text{N}^+$ 344,1856; nalezeno 344,1857.

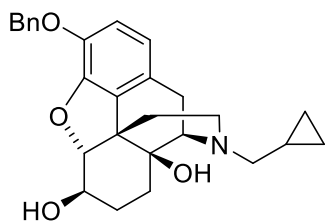
3-BnO- α -Naltrexol (21a)



K roztoku α -naltrexolu (0,12 g; 0,28 mmol) v DMF (5 mL) pod ochrannou atmosférou argonu byl přidán pevný K_2CO_3 (0,11 g; 0,56 mmol). Následně byl přikapán benzyl bromid (0,07 g; 0,34 mmol) a reakční směs byla míchána přes noc při laboratorní teplotě. Druhý den byla reakční směs rozložena vodou (10 mL) a vodná vrstva extrahována DCM (3x10 mL). Organické extrakty byly promyty vodou (2x10 mL) a solankou (10 mL). Následně byly sušeny bezvodým MgSO_4 a rozpouštědlo odpařeno. Sloupcová chromatografie odparku (silikagel; mobilní fáze DCM:MeOH / 20:1) poskytla 0,15 g (77 %) bezbarvého oleje.

^1H NMR (400 MHz, CDCl_3) δ 7,48-7,29 (m, 5H); 6,80 (d, $J = 8,2$ Hz, 1H); 6,57 (d, $J = 8,2$ Hz, 1H); 5,25 (d, $J = 12,2$ Hz, 1H); 5,15 (d, $J = 12,2$ Hz, 1H); 4,65 (d, $J = 4,7$ Hz, 1H); 4,17 (dt, $J = 10,3; 4,4$ Hz, 1H); 3,10 (d, $J = 6,5$ Hz, 1H); 3,05 (d, $J = 18,5$ Hz, 1H); 2,71-2,55 (m, 2H); 2,37 (dd, $J = 6,6; 4,0$ Hz, 2H); 2,30-2,21 (m, 2H); 1,82-1,71 (m, 1H); 1,69-1,53 (m, 2H); 1,51-1,42 (m, 1H); 1,16-1,04 (m, 1H); 0,92-0,81 (m, 1H); 0,59-0,52 (m, 2H); 0,17-0,11 (m, 2H); ^{13}C NMR (100 MHz, CDCl_3) δ 147,0; 140,4; 137,5; 131,9; 128,5; 128,0; 127,4; 126,8; 119,0; 116,9; 90,8; 71,9; 69,8; 66,7; 62,1; 59,6; 46,9; 43,3; 33,4; 28,3; 23,7; 22,9; 9,4; 4,0; 3,8; **HRMS** vypočteno pro $\text{C}_{27}\text{H}_{32}\text{O}_4\text{N}^+$ 434,2326; nalezeno 434,2326.

3-BnO- β -Naltrexol (21b)

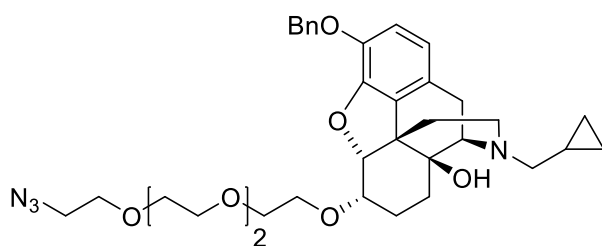


K roztoku β -naltrexolu (2,0 g; 4,6 mmol) v DMF (20 mL) pod ochrannou atmosférou argonu byl přidán pevný K_2CO_3 (1,9 g; 9,2 mmol). Následně byl přikapán benzyl bromid (1,4 g; 5,5 mmol) a reakční směs byla míchána přes noc při laboratorní teplotě. Druhý den byla reakční směs rozložena vodou (40 mL) a vodná vrstva byla extrahována DCM (3x30 mL). Organické extrakty byly promyty vodou (2x20 mL) a solankou (20 mL). Následně byly sušeny bezvodým MgSO_4

a rozpouštědlo bylo odpařeno. Sloupcová chromatografie odparku (silikagel; mobilní fáze DCM:MeOH / 20:1) poskytla 1,9 g (76 %) bezbarvého oleje.

$^1\text{H NMR}$ (400 MHz, CDCl_3) δ 7,47-7,24 (m, 5H); 6,78 (d, $J = 8,2$ Hz, 1H); 6,58 (d, $J = 8,2$ Hz, 1H); 5,25 (d, $J = 12,2$ Hz, 1H); 5,16 (d, $J = 12,2$ Hz, 1H); 4,48 (d, $J = 5,6$ Hz, 1H); 3,55-3,44 (m, 1H); 3,10 (d, $J = 5,9$ Hz, 1H); 3,04 (d, $J = 18,5$ Hz, 1H); 2,69-2,56 (m, 2H); 2,37 (d, $J = 6,5$ Hz, 2H); 2,25 (td, $J = 12,5; 5,0$ Hz, 1H); 2,14 (td, $J = 11,9; 3,5$ Hz, 1H); 2,00-1,88 (m, 1H); 1,65 (td, $J = 12,5; 5,0$ Hz, 1H); 1,59-1,47 (m, 2H); 1,40-1,31 (m, 1H); 0,91-0,80 (m, 1H); 0,58-0,51 (m, 2H); 0,17-0,11 (m, 2H); $^{13}\text{C NMR}$ (100 MHz, CDCl_3) δ 144,7; 142,2; 137,6; 132,3; 128,4; 127,9; 127,5; 126,1; 118,7; 116,9; 95,5; 72,0; 71,8; 70,1; 62,2; 59,3; 47,0; 43,7; 31,4; 29,1; 25,1; 22,7; 9,4; 3,9; 3,8; **HRMS** vypočteno pro $\text{C}_{27}\text{H}_{32}\text{O}_4\text{N}^+$ 434,2326; nalezeno 434,2327.

Konjugát 22a

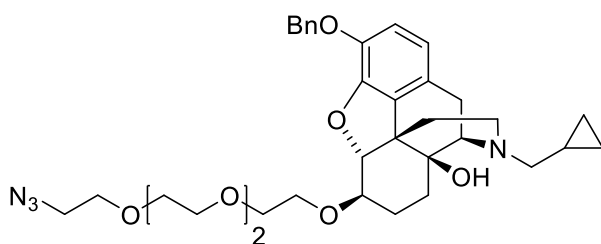


K roztoku sloučeniny **21a** (85 mg; 0,2 mmol) v DMF (3 mL) pod ochrannou atmosférou argonu byl přidán NaH (60%; 12 mg; 0,3 mmol) a reakční směs byla míchána 5 minut při laboratorní teplotě.

Následně byl přidán tosylát **9** (90 mg; 0,24 mmol) a reakční směs byla míchána dva dny při rt. Poté byla reakční směs rozložena vodou (10 mL) a produkt extrahován DCM (3×10 mL). Spojené organické extrakty byly promyty vodou (2×15 mL) a solankou (15 mL). Následně byly sušeny bezvodým MgSO_4 a rozpouštědlo bylo odpařeno. Sloupcová chromatografie odparku (silikagel; mobilní fáze DCM:MeOH / 10:1) poskytla 70 mg (55 %) nažloutlého oleje.

$^1\text{H NMR}$ (400 MHz, CDCl_3) δ 7,50-7,44 (m, 2H); 7,39-7,29 (m, 3H); 6,73 (d, $J = 8,2$ Hz, 1H); 6,50 (d, $J = 8,2$ Hz, 1H); 5,22 (d, $J = 12,0$ Hz, 1H); 5,17 (d, $J = 12,0$ Hz, 1H); 4,76 (d, $J = 4,5$ Hz, 1H); 3,96 (dt, $J = 10,1; 4,1$ Hz, 1H); 3,89-3,78 (m, 1H); 3,79-3,51 (m, 14H); 3,46-3,34 (m, 2H); 3,03 (d, $J = 18,7$ Hz, 1H); 2,73-2,54 (m, 2H); 2,41-2,31 (m, 2H); 2,24 (d, $J = 7,8$ Hz, 2H); 1,82-1,72 (m, 1H); 1,66-1,45 (m, 3H); 1,36-1,24 (m, 2H); 0,95-0,79 (m, 1H); 0,60-0,49 (m, 2H); 0,22-0,11 (m, 2H); $^{13}\text{C NMR}$ (100 MHz, CDCl_3) δ 147,9; 140,5; 137,7; 131,7; 128,4; 127,7; 118,1; 117,2; 95,11; 88,8; 74,7; 71,8; 70,7 (4C); 70,6 (2C); 70,0 (2C); 68,9; 62,3; 59,5; 50,7; 47,0; 43,4; 33,3; 28,3; 22,9; 21,2; 9,4; 4,0; 3,8; **HRMS** vypočteno pro $\text{C}_{35}\text{H}_{47}\text{O}_7\text{N}_4^+$ 635,3439; nalezeno 635,3441.

Konjugát 22b

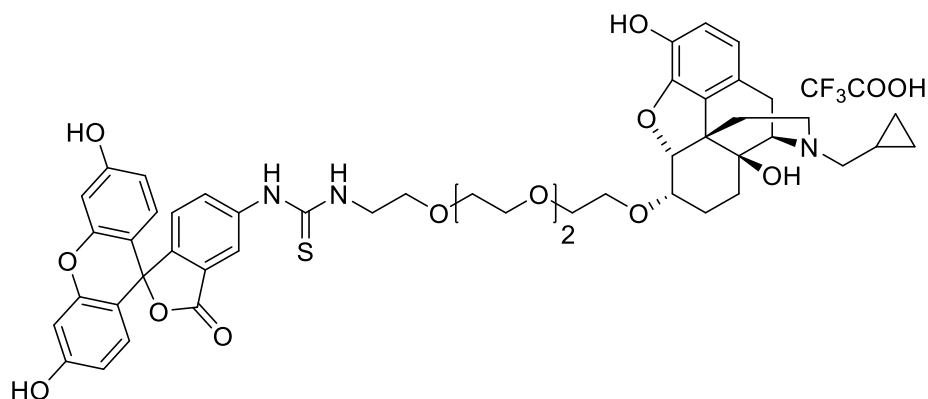


K roztoku sloučeniny **21b** (0,34 g; 0,8 mmol) v DMF (7 mL) pod ochrannou atmosférou Ar byl přidán NaH (60%; 0,13 g; 3,2 mmol) a reakční směs byla míchána 5 minut při laboratorní teplotě.

Následně byl přidán tosylát **9** (0,35 g; 0,94 mmol) a reakční směs byla míchána dva dny při laboratorní teplotě. Poté byla reakční směs rozložena vodou (25 mL) a produkt byl extrahován DCM (3×20 mL). Spojené organické extrakty byly promyty vodou (2×30 mL) a solankou (30 mL). Následně byly sušeny bezvodým MgSO₄ a rozpouštědlo bylo odpařeno. Sloupcová chromatografie odparku (silikagel; mobilní fáze DCM:MeOH / 10:1) poskytla 0,35 g (71 %) nažloutlého oleje.

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 7,48-7,26 (m, 5H); 6,77 (d, *J* = 8,2 Hz, 1H); 6,57 (d, *J* = 8,2 Hz, 1H); 5,21 (s, 2H); 4,58 (d, *J* = 6,4 Hz, 1H); 3,88-3,80 (m, 1H); 3,79-3,58 (m, 14H); 3,45-3,34 (m, 2H); 3,31-3,20 (m, 1H); 3,09 (d, *J* = 5,6 Hz, 1H); 3,02 (d, *J* = 18,4 Hz, 1H); 2,69-2,53 (m, 2H); 2,41-2,32 (m, 2H); 2,25 (td, *J* = 12,5; 5,0 Hz, 1H); 2,09 (td, *J* = 12,0; 3,7 Hz, 1H); 2,02-1,89 (m, 1H); 1,83-1,74 (m, 1H); 1,61 (dt, *J* = 13,3; 3,4 Hz, 1H); 1,54-1,41 (m, 1H); 1,35 (td, *J* = 13,5; 3,0 Hz, 1H); 0,94-0,77 (m, 1H); 0,58-0,50 (m, 2H); 0,19-0,10 (m, 2H); ¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃) δ 144,4; 142,5; 137,6; 132,6; 128,4; 127,8; 127,5; 125,9; 118,5; 117,3; 95,1; 81,0; 72,0; 70,8; 70,7; 70,6; 70,0 (2C); 69,2; 62,3; 59,2; 50,7; 47,6; 43,9; 30,7; 29,7; 24,0; 22,7; 9,5; 3,9; 3,8; HRMS vypočteno pro C₃₅H₄₇O₇N₄⁺ 635,3439; nalezeno 635,3440.

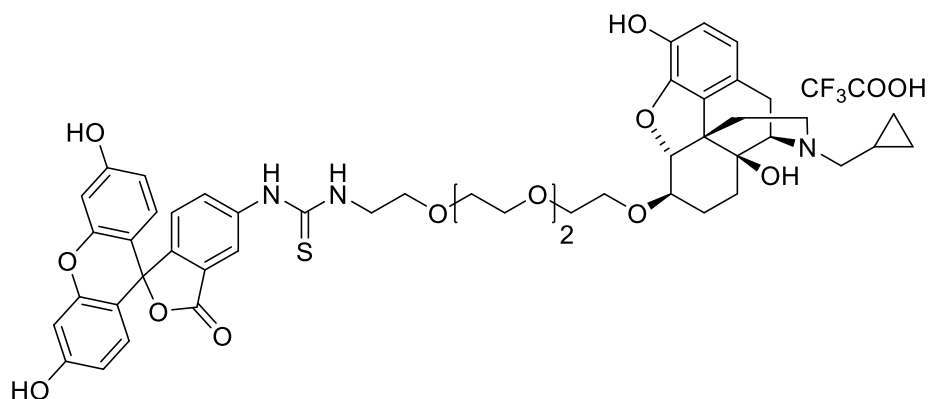
Konjugát 23a



K roztoku konjugátu **22a** (55 mg; 0,09 mmol) v ethanolu (5 mL) bylo přidáno 10% Pd/C (10 mg). Reakční směs byla míchána pod atmosférou vodíku přes noc při laboratorní teplotě. Druhý den byl katalyzátor odfiltrován a rozpouštědlo bylo odpařeno. Odparek byl rozpuštěn v THF (5 mL) pod ochrannou atmosférou argonu a následně byl přikapán roztok fluorescein isothiokyanátu (34 mg; 0,09 mmol v 1 mL THF). Reakční směs byla míchána 1 hodinu, poté bylo rozpouštědlo odpařeno. Preparativní HPLC odparku (C18; H₂O+0,1% TFA 98:2 ACN → H₂O+0,1% TFA 30:70 ACN) poskytlo 10 mg (13 %) oranžové látky.

¹H NMR (600 MHz, CD₃OD) δ 8,21 (d, *J* = 2,0 Hz, 1H); 7,85-7,72 (m, 1H); 7,16 (d, *J* = 8,1 Hz, 1H); 6,82-6,53 (m, 8H); 4,77 (d, *J* = 5,0 Hz, 1H); 3,95-3,43 (m, 21H); 3,10-3,03 (m, 2H); 2,88 (dd, *J* = 13,6; 7,5 Hz, 1H); 2,79 (td, *J* = 13,0; 4,2 Hz, 1H); 2,58 (td, *J* = 13,3; 5,0 Hz, 1H); 1,91-1,79 (m, 2H); 1,79 (dt, *J* = 14,1; 3,5 Hz, 1H); 1,69-1,55 (m, 2H); 1,46-1,39 (m, 1H); 1,11-1,03 (m, 1H); 0,84-0,68 (m, 2H); 0,54-0,44 (m, 2H); **¹³C NMR** (150 MHz, CD₃OD) δ 178,4; 170,1; 162,0; 154,6; 147,5; 140,8; 130,7 (2C); 129,2; 122,1; 120,2; 119,5; 118,8; 116,9; 114,5; 114,3; 112,0; 103,7; 89,0; 79,6; 79,2; 75,9; 73,8; 71,9; 71,7; 71,6; 71,5 (2C); 71,3; 64,3; 62,3; 59,0; 58,5; 48,0; 46,9; 45,7; 28,5; 24,8; 22,4; 18,5; 7,0; 6,4; 3,5; **HRMS** vypočteno pro C₄₉H₅₄O₁₂N₃S⁺ 908,3423; nalezeno 908,3428.

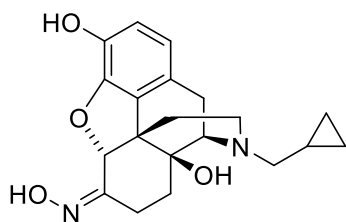
Konjugát 23b



K roztoku konjugátu **22b** (50 mg; 0,08 mmol) v ethanolu (5 mL) bylo přidáno 10% Pd/C (10 mg). Reakční směs byla míchána pod atmosférou vodíku přes noc při laboratorní teplotě. Druhý den byl katalyzátor odfiltrován a rozpouštědlo bylo odpařeno. Odparek byl rozpuštěn v THF (5 mL) pod ochrannou atmosférou argonu a následně byl přikapán roztok fluorescein isothiokyanátu (31 mg; 0,08 mmol v 1 mL THF). Reakční směs byla míchána 1 hodinu, poté bylo rozpouštědlo odpařeno. Preparativní HPLC odparku (C18; H₂O+0,1% TFA 98:2 ACN → H₂O+0,1% TFA 30:70 ACN) poskytlo 55 mg (76 %) oranžové krystalické látky.

¹H NMR (600 MHz, CD₃OD) δ 8,27 (d, *J* = 2,1 Hz, 1H); 7,82 (d, *J* = 8,2 Hz, 1H); 7,16 (d, *J* = 8,2 Hz, 1H); 6,90-6,78 (m, 4H); 6,70 (d, *J* = 8,2 Hz, 1H); 6,68-6,62 (m, 3H); 4,48 (d, *J* = 6,4 Hz, 1H); 3,89 (d, *J* = 6,0 Hz, 1H); 3,86-3,75 (m, 3H); 3,72 (t, *J* = 5,2 Hz, 2H); 3,69-3,58 (m, 13H); 3,28-3,21 (m, 1H); 3,11-3,02 (m, 3H); 2,85 (dd, *J* = 13,6; 7,7 Hz, 1H); 2,66 (td, *J* = 12,9; 4,1 Hz, 1H); 2,54 (td, *J* = 13,3; 4,8 Hz, 1H); 1,82-1,76 (m, 2H); 1,69 (dt, *J* = 14,1; 3,5 Hz, 1H); 1,60-1,52 (m, 1H); 1,50-1,39 (m, 1H); 1,11-1,04 (m, 1H); 0,85-0,67 (m, 2H); 0,56-0,42 (m, 2H); ¹³C NMR (150 MHz, CD₃OD) δ 181,4; 169,0; 161,9; 153,9; 142,6; 141,3; 129,7; 129,6; 128,1; 125,3; 120,1; 119,2; 118,0; 116,9; 115,0; 113,6; 111,3; 102,0; 93,3; 79,9; 70,3; 70,1; 70,0; 69,9; 68,7; 62,7; 57,2; 46,7; 46,1; 44,1; 29,0; 27,5; 22,9; 22,4; 5,4; 4,7; 1,9; HRMS vypočteno pro C₄₉H₅₄O₁₂N₃S⁺ 908,3423; nalezeno 908,3425.

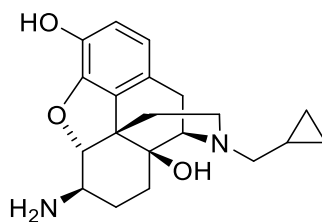
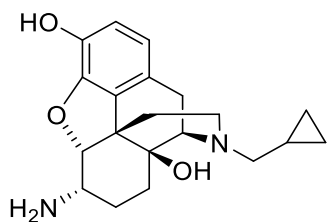
Naltrexon oxim (24)



K roztoku naltrexon hydrochloridu (1,5 g; 4,0 mmol) ve směsi EtOH:H₂O/10:1 (20 mL) byl přidán octan sodný (1,1 g; 14 mmol) a hydroxylamin hydrochlorid (0,4 g; 6,0 mmol). Reakční směs byla refluxována 3 hodiny. Následně byl ethanol z reakční směsi odpařen, byla přidána voda (20 mL) a produkt byl extrahován DCM (3×20 mL). Spojené organické extrakty byly sušeny bezvodým MgSO₄. Po odpaření rozpouštědla bylo získáno 1,41 g (kvant.) produktu ve formě bílé krystalické látky.

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 6,71 (d, *J* = 8,1 Hz, 1H); 6,58 (d, *J* = 8,1 Hz, 1H); 5,01 (s, 1H); 3,20-3,08 (m, 2H); 3,03 (d, *J* = 18,4 Hz, 1H); 2,73-2,63 (m, 1H); 2,56 (dd, *J* = 18,4; 6,0 Hz, 1H); 2,44-2,14 (m, 5H); 1,71-1,63 (m, 1H); 1,59-1,53 (m, 1H); 1,40 (td, *J* = 13,6; 4,3 Hz, 1H); 0,90-0,79 (m, 1H); 0,57-0,51 (m, 2H); 0,16-0,10 (m, 2H); **¹³C NMR** (100 MHz, CDCl₃) δ 159,3; 143,1; 138,9; 129,8; 124,5; 119,8; 118,1; 86,7; 70,1; 62,2; 59,2; 48,9; 44,0; 30,6; 29,1; 22,7; 18,6; 9,4; 4,0; 3,8; **HRMS** vypočteno pro C₂₀H₂₅O₄N₂⁺ 357,1809; nalezeno 357,1810.

6- α -Naltrexamin (25a) a 6- β -Naltrexamin (25b)

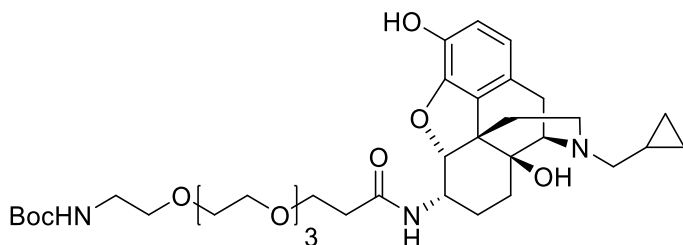


K roztoku naltrexon oximu (0,8 g; 2,2 mmol) v THF (5 mL) pod ochrannou atmosférou argonu byl přidán roztok BH₃·THF (1 M; 41 mL). Reakční směs byla zahřívána k varu dva dny. Poté byla přidána voda (10 mL), vodný roztok KOH (1M; 27 mL) a reakční směs byla dále zahřívána k varu 2 hodiny. Následně byla přidávána konc. HCl dokud pH reakční směsi nedosáhlo hodnoty 2. Reakční směs byla poté refluxována 2 hodiny. Následně byl THF z reakční směsi odpařen na RVO a pH bylo upraveno na hodnotu 8-9 přidávkem nasyceného roztoku NaHCO₃. Produkt byl extrahován CHCl₃ (4×75 mL), spojené organické extrakty byly sušeny bezvodým MgSO₄. Sloupcová chromatografie odparku (silikagel; mobilní fáze ACN:MeOH:NH₄OH / 25:5:1) poskytla 0,25 g (33 %) β -diastereoisomeru a 0,10 g (13 %) α -diastereomeru.

6- α -Naltrexamin (25a): $^1\text{H NMR}$ (400 MHz, CDCl_3) δ 6,66 (d, $J = 8,1$ Hz, 1H); 6,48 (d, $J = 8,1$ Hz, 1H); 4,59 (d, $J = 4,1$ Hz, 1H); 3,44 (dt, $J = 12,4; 4,1$ Hz, 1H); 3,06 (d, $J = 6,6$ Hz, 1H); 3,00 (d, $J = 18,5$ Hz, 1H); 2,67-2,49 (m, 2H); 2,41-2,12 (m, 4H); 1,68 (dt, $J = 14,5; 9,0$ Hz, 1H); 1,60-1,49 (m, 2H); 1,38 (ddd, $J = 14,5; 9,2; 1,8$ Hz, 1H); 1,08-0,94 (m, 1H); 0,91-0,74 (m, 1H); 0,58-0,46 (m, 2H); 0,14-0,07 (m, 2H); $^{13}\text{C NMR}$ (100 MHz, CDCl_3) δ 146,2; 138,5; 130,8; 124,8; 119,1; 118,6; 91,4; 70,0; 62,3; 59,8; 47,8; 47,2; 43,4; 34,1; 29,5; 24,2; 22,9; 9,5; 4,1; 3,9; **HRMS** vypočteno pro $\text{C}_{20}\text{H}_{27}\text{O}_3\text{N}_2^+$ 343,2018; nalezeno 343,2016.

6- β -Naltrexamin (25b): $^1\text{H NMR}$ (400 MHz, CDCl_3) δ 6,62 (d, $J = 8,1$ Hz, 1H); 6,53 (d, $J = 8,1$ Hz, 1H); 4,25 (d, $J = 7,0$ Hz, 1H); 3,05 (d, $J = 5,6$ Hz, 1H); 2,98 (d, $J = 18,3$ Hz, 1H); 2,64-2,50 (m, 3H); 2,35 (d, $J = 6,5$ Hz, 1H); 2,24-2,05 (m, 2H); 1,85-1,71 (m, 1H); 1,60 (dt, $J = 13,4; 3,2$ Hz, 1H); 1,47-1,35 (m, 2H); 0,89-0,76 (m, 1H); 0,56-0,47 (m, 2H); 0,14-0,08 (m, 2H); $^{13}\text{C NMR}$ (100 MHz, CDCl_3) δ 141,6; 141,1; 131,2; 123,0; 119,6; 118,6; 97,5; 70,5; 62,4; 59,3; 53,5; 47,5; 44,1; 31,0; 30,7; 25,7; 22,7; 9,6; 4,1; 3,9; **HRMS** vypočteno pro $\text{C}_{20}\text{H}_{27}\text{O}_3\text{N}_2^+$ 343,2018; nalezeno 343,2019.

Konjugát 26a



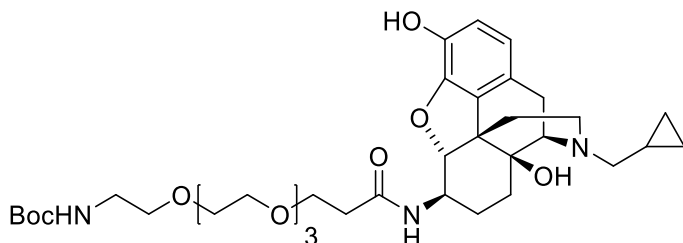
K roztoku α -naltrexaminu (60 mg; 0,17 mmol) v DMF (4 mL) byl přidán aktivovaný ester **13** (85 mg; 0,17 mmol) a reakční směs byla míchána přes noc. Druhý den bylo rozpouštědlo odpařeno. Sloupcová chromatografie odparku (silikagel; mobilní fáze DCM:MeOH / 10:1) poskytla 115 mg (95 %) bezbarvého oleje.

$^1\text{H NMR}$ (400 MHz, CDCl_3) δ 7,08 (d, $J = 8,7$ Hz, 1H); 6,70 (d, $J = 8,1$ Hz, 1H); 6,52 (d, $J = 8,1$ Hz, 1H); 5,14 (bs, 1H); 4,60 (d, $J = 4,3$ Hz, 1H); 4,53 (ddt, $J = 13,0; 8,6; 4,3$ Hz, 1H); 3,82-3,55 (m, 15H); 3,52 (t, $J = 5,2$ Hz, 2H); 3,30 (q, $J = 5,4$ Hz, 2H); 3,13 (d, $J = 6,6$ Hz, 1H); 3,03 (d, $J = 18,5$ Hz, 1H); 2,75-2,20 (m, 8H); 1,80 (dt, $J = 14,8; 9,4$ Hz, 1H); 1,68-1,53 (m, 2H); 1,49-1,32 (m, 11H); 0,97-0,80 (m, 1H); 0,60-0,48 (m, 2H); 0,16-0,10 (m, 2H); $^{13}\text{C NMR}$ (100 MHz, CDCl_3) δ 171,2; 156,2; 145,7; 137,9; 131,1; 125,5; 119,2; 117,6; 90,2; 79,4; 70,7; 70,6 (2C); 70,5; 70,4; 70,2 (2C); 69,5;

67,6; 62,3; 59,8; 47,2; 46,0; 43,3; 40,4; 37,2; 33,7; 29,6; 28,5; 23,0; 21,3; 9,4; 4,1; 4,0;

HRMS vypočteno pro $C_{36}H_{56}O_{10}N_3^+$ 690,3960; nalezeno 690,3965.

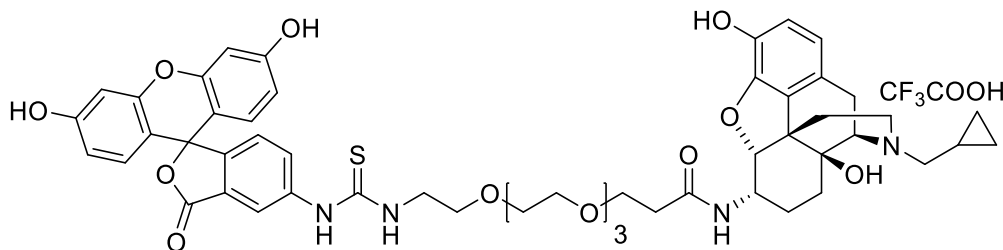
Konjugát 26b



K roztoku β -naltrexaminu (50 mg; 0,14 mmol) v DMF (4 mL) byl přidán aktivovaný ester **13** (70 mg; 0,14 mmol) a reakční směs byla míchána přes noc. Druhý den bylo rozpouštědlo odpařeno. Sloupcová chromatografie odparku (silikagel; mobilní fáze DCM:MeOH / 10:1) poskytla 80 mg (80 %) bezbarvého oleje.

1H NMR (400 MHz, $CDCl_3$) δ 6,91 (d, $J = 8,3$ Hz, 1H); 6,70 (d, $J = 8,1$ Hz, 1H); 6,53 (d, $J = 8,1$ Hz, 1H); 5,25 (bs, 1H); 4,41 (d, $J = 7,4$ Hz, 1H); 3,89-3,57 (m, 15H); 3,54 (t, $J = 5,1$ Hz, 2H); 3,30 (q, $J = 5,4$ Hz, 2H); 3,08 (bs, 1H); 3,00 (d, $J = 18,3$ Hz, 1H); 2,74-2,52 (m, 2H); 2,47 (t, $J = 5,6$ Hz, 2H); 2,41-2,33 (m, 2H); 2,25-2,09 (m, 2H); 1,82 (qd, $J = 12,6; 3,2$ Hz, 1H); 1,73-1,63 (m, 1H); 1,60-1,52 (m, 1H); 1,50-1,38 (m, 11H); 1,26 (d, $J = 12,1$ Hz, 1H); 0,90-0,78 (m, 1H); 0,58-0,47 (m, 2H); 0,16-0,06 (m, 2H); **^{13}C NMR** (100 MHz, $CDCl_3$) δ 171,2; 156,3; 142,7; 140,4; 131,1; 124,2; 119,1; 118,0; 93,2; 79,4; 70,7 (2C); 70,6 (2C); 70,5; 70,4; 70,3; 67,4; 62,5; 59,3; 51,3; 47,7; 44,3; 40,5; 37,4; 30,2; 28,6; 24,4; 22,8; 9,5; 4,1; 3,9; **HRMS** vypočteno pro $C_{36}H_{56}O_{10}N_3^+$ 690,3960; nalezeno 690,3961.

Konjugát 27a

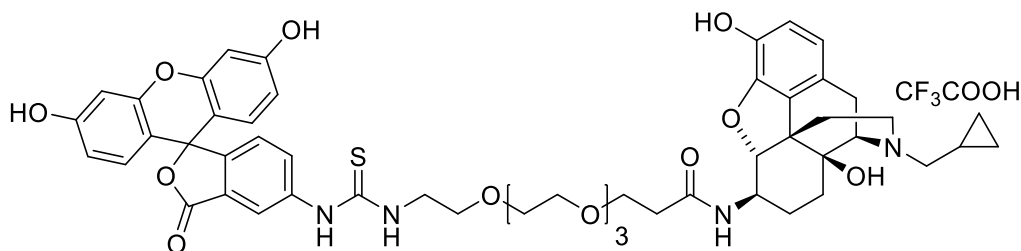


K roztoku konjugátu **26a** (42 mg; 0,06 mmol) v DCM (2 mL) byla přidána TFA (2 mL). Reakční směs byla míchána 90 minut při laboratorní teplotě. Následně bylo rozpouštědlo odpařeno. Odparek byl rozpuštěn v THF (3 mL) a byl přidán triethylamin

(17 μ L; 0,12 mmol). Po 5 minutách byl přidán fluorescein isothiokyanát (28 mg; 0,07 mmol) a reakční směs byla míchána 1 hodinu. Poté bylo rozpouštědlo odpařeno. Preparativní HPLC odparku (C18; H₂O+0,1% TFA 98:2 ACN \rightarrow H₂O+0,1% TFA 30:70 ACN) poskytlo 53 mg (80 %) oranžové látky.

¹H NMR (600 MHz, CD₃OD) δ 8,25 (d, J = 2,1 Hz, 1H); 7,81 (d, J = 8,3 Hz, 1H); 7,18 (d, J = 8,3 Hz, 1H); 6,87-6,75 (m, 5H); 6,73-6,59 (m, 4H); 4,57 (d, J = 8,0 Hz, 1H); 3,90 (d, J = 5,9 Hz, 1H); 3,75-3,50 (m, 20H); 3,39-3,33 (m, 2H); 3,16-3,02 (m, 2H); 2,85 (dd, J = 13,6; 7,7 Hz, 1H); 2,67 (td, J = 12,7; 3,9 Hz, 1H); 2,57 (td, J = 13,1; 4,7 Hz, 1H); 2,46 (t, J = 6,1 Hz, 2H); 1,88 (qd, J = 13,1; 2,6 Hz, 1H); 1,75-1,60 (m, 2H); 1,61-1,47 (m, 2H); 1,12-1,01 (m, 1H); 0,87-0,66 (m, 2H); 0,55-0,41 (m, 2H); **¹³C NMR** (150 MHz, CD₃OD) δ 182,8; 173,5; 170,9; 162,6; 162,3; 154,6; 147,3; 140,4; 130,6; 130,0; 123,2; 121,0; 119,5; 119,1; 116,8; 114,1; 111,9; 103,6; 89,4; 71,5 (3C); 71,4 (2C); 71,3 (2C); 70,8; 68,3; 63,5; 59,0; 48,5; 47,0; 45,5; 37,6; 34,4; 31,6; 30,7; 24,9; 21,1; 6,8; 6,3; 3,3; **HRMS** vypočteno pro C₅₂H₅₉O₁₃N₄S⁺ 979,3794; nalezeno 979,3799.

Konjugát 27b

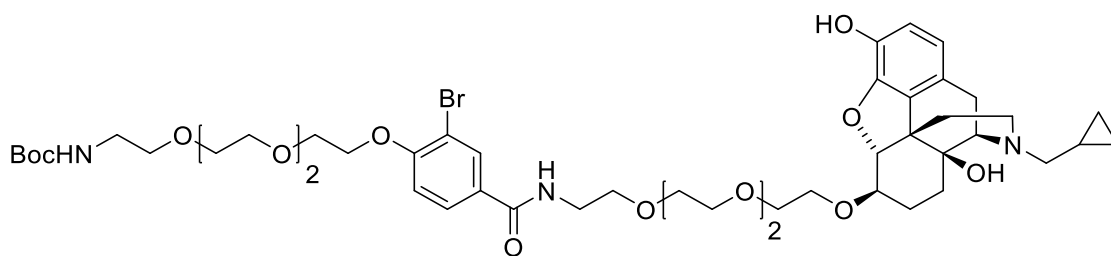


K roztoku konjugátu **26b** (35 mg; 0,05 mmol) v DCM (2 mL) byla přidána TFA (2 mL). Reakční směs byla míchána 90 minut při laboratorní teplotě. Následně bylo rozpouštědlo odpařeno. Odparek byl rozpuštěn v THF (3 mL) a byl přidán triethylamin (14 μ L; 0,10 mmol). Po 5 minutách byl přidán fluorescein isothiokyanát (23 mg; 0,06 mmol) a reakční směs byla míchána 1 hodinu. Poté bylo rozpouštědlo odpařeno. Preparativní HPLC odparku (C18; H₂O+0,1% TFA 98:2 ACN \rightarrow H₂O+0,1% TFA 30:70 ACN) poskytlo 50 mg (91 %) oranžové látky.

¹H NMR (600 MHz, CD₃OD) δ 8,25 (d, J = 2,1 Hz, 1H); 7,81 (d, J = 8,3 Hz, 1H); 7,18 (d, J = 8,3 Hz, 1H); 6,87-6,75 (m, 5H); 6,73-6,59 (m, 4H); 4,57 (d, J = 8,0 Hz, 1H); 3,90 (d, J = 5,9 Hz, 1H); 3,75-3,50 (m, 20H); 3,39-3,33 (m, 2H); 3,16-3,02 (m, 2H); 2,85 (dd, J = 13,6; 7,7 Hz, 1H); 2,67 (td, J = 12,7; 3,9 Hz, 1H); 2,57 (td, J = 13,1; 4,7 Hz, 1H); 2,46 (t, J = 6,1 Hz, 2H); 1,88 (qd, J = 13,1; 2,6 Hz, 1H); 1,75-1,60 (m, 2H);

1,61-1,47 (m, 2H); 1,12-1,01 (m, 1H); 0,87-0,66 (m, 2H); 0,55-0,41 (m, 2H); ^{13}C NMR (150 MHz, CD_3OD) δ 182,8; 173,9; 170,6; 161,9; 161,6; 155,2; 143,8; 143,0; 130,9 (2 C); 130,7; 129,4; 126,6; 121,7; 120,9; 119,7; 114,8 (2C); 114,7; 112,5; 103,5; 92,1; 71,6; 71,5 (2C); 71,4 (2C); 71,3; 70,1; 68,1; 64,3; 58,7; 52,6; 48,3; 47,5; 45,5; 37,8; 31,0; 28,9; 24,7; 24,4; 6,8; 6,2; 3,4; **HRMS** vypočteno pro $\text{C}_{52}\text{H}_{59}\text{O}_{13}\text{N}_4\text{S}^+$ 979,3794; nalezeno 979,3801.

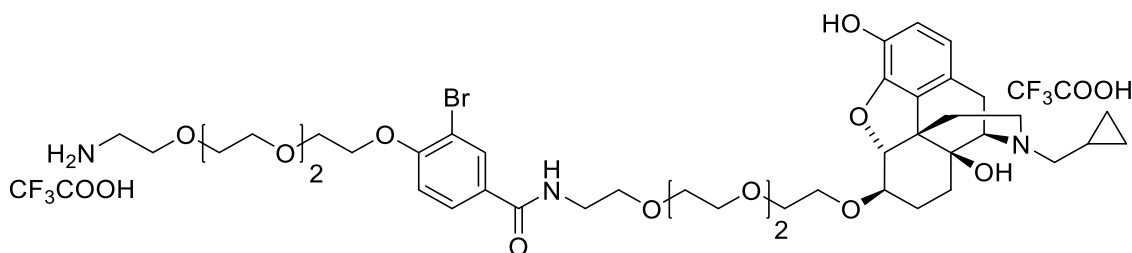
Konjugát 28



K roztoku konjugátu **22b** (60 mg; 0,11 mmol) v ethanolu (5 mL) bylo přidáno 10% Pd/C (10 mg). Reakční směs byla míchána pod atmosférou vodíku přes noc při laboratorní teplotě. Druhý den byl katalyzátor odfiltrován a rozpouštědlo bylo odpařeno. Odparek byl rozpuštěn v DMF (5 mL) pod ochrannou atmosférou argonu. Poté byl přidán aktivovaný ester **19** (50 mg; 0,09 mmol) a reakční směs byla míchána přes noc při laboratorní teplotě. Druhý den bylo rozpouštědlo odpařeno. Sloupcová chromatografie odparku (silikagel; mobilní fáze DCM:MeOH / 10:1) poskytla 38 mg (45 %) nažloutlého oleje.

^1H NMR (400 MHz, CDCl_3) δ 8,10 (d, $J = 2,2$ Hz, 1H); 7,82 (dd, $J = 8,6; 2,2$ Hz, 1H); 7,42 (bs, 1H); 6,88 (d, $J = 8,6$ Hz, 1H); 6,68 (d, $J = 8,1$ Hz, 1H); 6,51 (d, $J = 8,1$ Hz, 1H); 5,05 (bs, 1H); 4,40 (d, $J = 6,5$ Hz, 1H); 4,20 (t, $J = 4,8$ Hz, 2H); 3,95-3,89 (m, 2H); 3,81-3,76 (m, 2H); 3,75-3,46 (m, 24H); 3,29 (q, $J = 5,4$ Hz, 2H); 3,19-3,03 (m, 2H); 2,97 (d, $J = 18,3$ Hz, 1H); 2,65-2,48 (m, 2H); 2,24-2,02 (m, 2H); 1,84 (qd, $J = 12,9; 2,7$ Hz, 1H); 1,76-1,67 (m, 1H); 1,61-1,52 (m, 1H); 1,42 (s, 9H); 1,38-1,18 (m, 4H); 0,89-0,77 (m, 1H); 0,55-0,46 (m, 2H); 0,16-0,06 (m, 2H); ^{13}C NMR (100 MHz, CDCl_3) δ 166,2; 158,5; 157,5; 156,0; 142,4; 140,0; 132,8; 128,3; 128,2; 118,8; 177,5; 112,3; 111,8; 94,7; 80,7; 79,2; 71,2; 70,7; 70,6 (2C); 70,5; 70,4 (2C); 70,2; 70,1 (2C); 70,0; 69,4; 69,1; 68,5; 62,3; 59,2; 47,7; 44,0; 40,2; 29,6; 28,4; 23,4; 22,7; 9,3; 4,0; 3,8; **HRMS** vypočteno pro $\text{C}_{48}\text{H}_{71}\text{O}_{14}\text{N}_3\text{Br}^+$ 992,4114; nalezeno 992,4117.

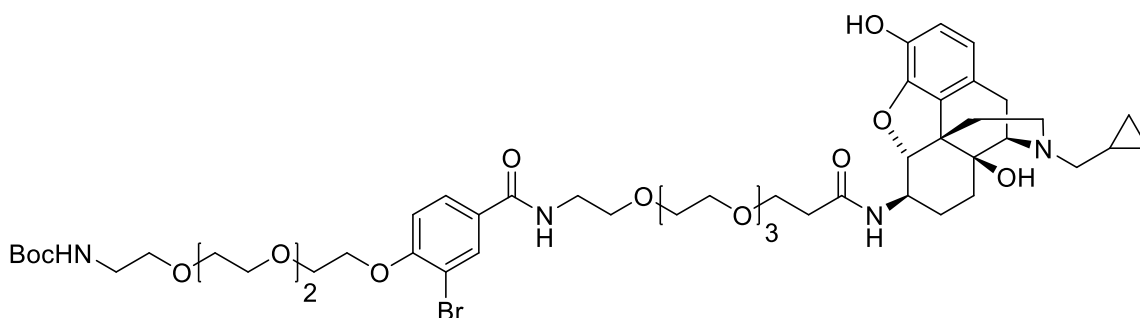
Konjugát 29



K roztoku konjugátu **28** (35 mg; 0,035 mmol) v DCM (2 mL) byla přidána TFA (2 mL). Reakční směs byla míchána 90 minut při laboratorní teplotě. Následně bylo rozpouštědlo odpařeno. Preparativní HPLC odparku (C18; H₂O+0,1% TFA 98:2 ACN → H₂O+0,1% TFA 30:70 ACN) poskytlo 26 mg (72 %) bílé krystalické látky.

¹H NMR (600 MHz, CD₃OD) δ 8,07 (d, *J* = 2,2 Hz, 1H); 7,83 (dd, *J* = 8,6; 2,2 Hz, 1H); 7,13 (d, *J* = 8,6 Hz, 1H); 6,74 (d, *J* = 8,1 Hz, 1H); 6,69 (d, *J* = 8,1 Hz, 1H); 4,50 (d, *J* = 6,3 Hz, 1H); 4,30-4,25 (m, 2H); 3,95-3,89 (m, 2H); 3,82-3,75 (m, 3H); 3,72-3,58 (m, 23H); 3,57-3,52 (m, 2H); 3,37-3,33 (m, 1H); 3,24 (dt, *J* = 9,5; 6,7 Hz, 1H); 3,15-3,03 (m, 4H); 2,87 (dd, *J* = 13,6; 7,6 Hz, 1H); 2,68 (td, *J* = 12,9; 4,1 Hz, 1H); 2,56 (td, *J* = 13,2; 4,8 Hz, 1H); 1,83-1,77 (m, 2H); 1,71 (dt, *J* = 14,1; 3,5 Hz, 1H); 1,58 (dd, *J* = 13,3; 3,8 Hz, 1H); 1,52-1,42 (m, 1H); 1,13-1,05 (m, 1H); 0,86-0,69 (m, 2H); 0,55-0,45 (m, 2H); ¹³C NMR (150 MHz, CD₃OD) δ 166,4; 157,3; 142,1; 140,9; 131,7; 129,3; 127,5; 127,3; 119,7; 118,8; 117,5; 111,9; 110,7; 92,8; 79,5; 70,0; 69,9; 69,6 (3C); 69,4; 69,3 (2C); 68,6; 68,5; 68,3; 65,9; 62,2; 56,8; 46,2; 45,6; 39,1; 38,7; 28,5; 27,0; 22,4; 22,0; 4,9; 4,3; 1,4; HRMS vypočteno pro C₄₃H₆₃O₁₂N₃Br⁺ 892,3590; nalezeno 892,3591.

Konjugát 30

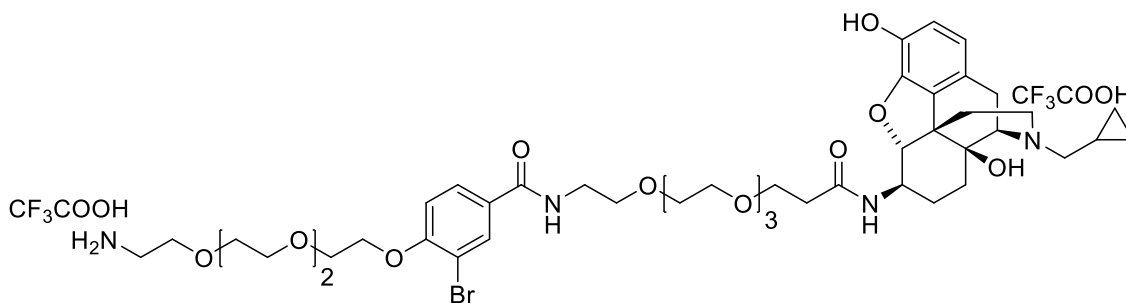


K roztoku konjugátu **26b** (70 mg; 0,10 mmol) v DCM (2 mL) byla přidána TFA (2 mL). Reakční směs byla míchána 90 minut při laboratorní teplotě. Následně bylo rozpouštědlo odpařeno. Odparek byl rozpuštěn v DMF (5 mL) pod ochrannou atmosférou argonu. Poté byl přidán triethylamin (27 μL; 0,20 mmol), aktivovaný ester

19 (65 mg; 0,11 mmol) a reakční směs byla míchána přes noc za rt. Druhý den bylo rozpouštědlo odpařeno. Sloupcová chromatografie odparku (silikagel; mobilní fáze DCM:MeOH/10:1) poskytla 50 mg (47 %) bezbarvého oleje.

$^1\text{H NMR}$ (400 MHz, CDCl_3) δ 8,05 (d, $J = 2,2$ Hz, 1H); 7,79 (dd, $J = 8,6; 2,2$ Hz, 1H); 7,29 (t, $J = 5,5$ Hz, 1H); 6,98 (d, $J = 8,2$ Hz, 1H); 6,91 (d, $J = 8,6$ Hz, 1H); 6,68 (d, $J = 8,1$ Hz, 1H); 6,53 (d, $J = 8,1$ Hz, 1H); 5,08 (bs, 1H); 4,44 (d, $J = 7,5$ Hz, 1H); 4,20 (t, $J = 4,8$ Hz, 2H); 3,96-3,87 (m, 2H); 3,82-3,54 (m, 30H); 3,51 (t, $J = 5,2$ Hz, 2H); 3,35-3,21 (m, 3H); 3,01 (d, $J = 18,6$ Hz, 1H); 2,82 (dd, $J = 11,6; 4,4$ Hz, 1H); 2,68 (dd, $J = 18,7; 5,9$ Hz, 1H); 2,56 (dd, $J = 12,8; 6,5$ Hz, 1H); 2,46 (dd, $J = 12,8; 6,9$ Hz, 1H); 2,40 (t, $J = 5,7$ Hz, 2H); 2,32 (td, $J = 12,6; 4,8$ Hz, 1H); 2,20 (td, $J = 12,0; 3,6$ Hz, 1H); 1,78 (qd, $J = 12,8; 3,1$ Hz, 1H); 1,69-1,51 (m, 2H); 1,41 (s, 9H); 0,98-0,83 (m, 1H); 0,60-0,51 (m, 2H); 0,20-0,12 (m, 2H); $^{13}\text{C NMR}$ (100 MHz, CDCl_3) δ 174,3; 171,7; 166,1; 157,6; 142,7; 140,6; 132,7; 130,8; 128,4; 128,2; 123,2; 119,2; 118,3; 112,5; 112,0; 92,8; 79,3; 71,3; 70,8; 70,6 (3C); 70,3 (3C); 70,0; 69,5; 69,2; 67,3; 62,8; 59,3; 51,3; 47,4; 44,8; 40,5; 40,1; 37,2; 30,2; 28,5; 25,6; 24,3; 23,1; 8,7; 4,2 (2C); **HRMS** vypočteno pro $\text{C}_{51}\text{H}_{76}\text{O}_{15}\text{N}_4\text{Br}^+$ 1063,4485; nalezeno 1063,4491.

Konjugát 31

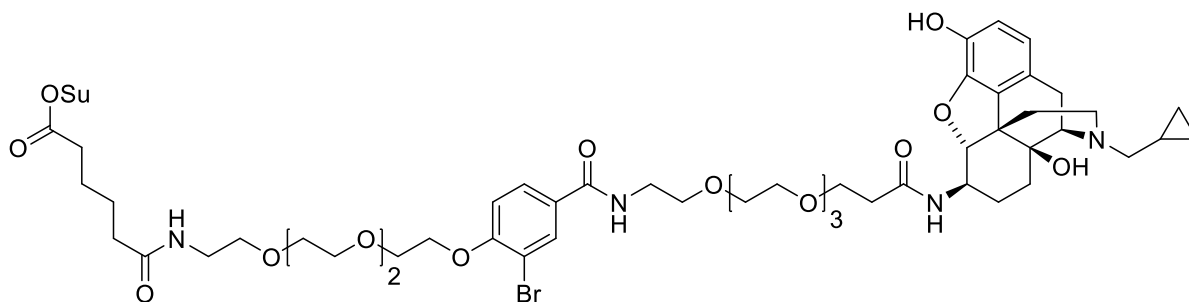


K roztoku konjugátu **30** (45 mg; 0,04 mmol) v DCM (2 mL) byla přidána TFA (2 mL). Reakční směs byla míchána 90 minut při laboratorní teplotě. Následně bylo rozpouštědlo odpařeno. Preparativní HPLC odparku (C18; $\text{H}_2\text{O}+0,1\%$ TFA 98:2 ACN \rightarrow $\text{H}_2\text{O}+0,1\%$ TFA 30:70 ACN) poskytlo 42 mg (84 %) bílé látky.

$^1\text{H NMR}$ (400 MHz, CD_3OD) δ 8,07 (d, $J = 2,2$ Hz, 1H); 7,83 (dd, $J = 8,6; 2,2$ Hz, 1H); 7,13 (d, $J = 8,6$ Hz, 1H); 6,78-6,68 (m, 2H); 4,57 (d, $J = 7,9$ Hz, 1H); 4,33-4,24 (m, 2H); 3,96-3,87 (m, 3H); 3,83-3,75 (m, 2H); 3,75-3,50 (m, 24H); 3,40-3,32 (m, 2H); 3,19-3,05 (m, 4H); 2,89 (dd, $J = 13,6; 7,6$ Hz, 1H); 2,75-2,64 (m, 1H); 2,59 (td, $J = 13,0; 4,5$ Hz, 1H); 2,46 (t, $J = 6,1$ Hz, 2H); 1,96-1,49 (m, 6H);

1,42-1,22 (m, 2H); 1,17-1,04 (m, 1H); 0,87-0,67 (m, 2H); 0,56-0,42 (m, 2H); ^{13}C NMR (100 MHz, CD_3OD) δ 173,8; 178,3; 159,2; 143,8; 143,0; 133,6; 130,7; 129,4; 129,2; 121,8; 120,9; 119,7; 113,9; 112,6; 92,2; 71,9; 71,5; 71,4 (2C); 71,3 (2C); 71,2; 70,5; 70,4; 68,1; 67,8; 64,3; 58,7; 52,6; 47,5; 41,0; 40,6; 37,8; 34,7; 31,0; 28,9; 24,7; 24,4; 6,8; 6,1; 3,4; **HRMS** vypočteno pro $\text{C}_{46}\text{H}_{68}\text{O}_{13}\text{N}_4\text{Br}^+$ 963,3961; nalezeno 963,3964.

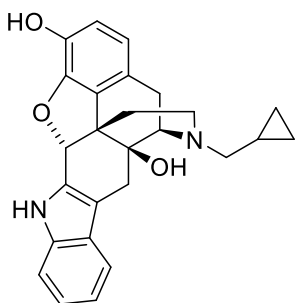
Konjugát 32



K roztoku aktivovaného esteru **14** (112 mg; 0,33 mmol) v DMF (5 mL) pod ochrannou atmosférou argonu byl přidán triethylamin (42 μL ; 0,26 mmol) a následně roztok konjugátu **31** (70 mg; 0,07 mmol) v DMF (1 mL) v průběhu 2 hodin. Sloupcová chromatografie odparku (silikagel; mobilní fáze DCM:EtOH / 10:1) poskytla 40 mg (51 %) bezbarvého oleje.

^1H NMR (400 MHz, CDCl_3) δ 8,06 (d, $J = 2,2$ Hz, 1H); 7,81 (dd, $J = 8,6; 2,2$ Hz, 1H); 7,57 (bs, 1H); 6,92 (d, $J = 8,7$ Hz, 1H); 6,79 (d, $J = 8,2$ Hz, 1H); 6,59 (d, $J = 8,2$ Hz, 1H); 6,46 (bs, 1H); 4,56 (d, $J = 7,5$ Hz, 1H); 4,26-4,15 (m, 2H); 3,97 (bs, 1H); 3,93-3,89 (m, 2H); 3,82-3,76 (m, 2H); 3,76-3,47 (m, 28H); 3,39 (t, $J = 5,3$ Hz, 2H); 3,35-3,21 (m, 3H); 3,00-2,90 (m, 1H); 2,82 (s, 4H); 2,71-2,47 (m, 3H); 2,46-2,34 (m, 2H); 2,21 (t, $J = 6,9$ Hz, 2H); 2,00-1,88 (m, 1H); 1,78-1,68 (m, 5H); 1,65-1,54 (m, 1H); 1,54-1,38 (m, 2H); 1,29-1,12 (m, 2H); 0,80-0,70 (m, 2H); 0,50-0,40 (m, 2H); ^{13}C NMR (100 MHz, CDCl_3) δ 172,6; 169,4; 168,6; 166,2; 157,5; 142,9; 141,8; 132,7; 129,3; 128,2 (2C); 119,5; 119,3; 112,4; 111,7; 92,0; 71,1; 70,6; 70,5; 70,3 (2C); 70,2; 70,1; 70,0; 69,7; 69,4; 69,1; 67,2; 63,4; 59,1; 50,8; 45,7; 39,9; 39,2; 35,7; 30,7; 25,6; 24,7; 24,1; 23,5; 5,9; 4,7; 4,6; **HRMS** vypočteno pro $\text{C}_{56}\text{H}_{79}\text{O}_{18}\text{N}_5\text{Br}^+$ 1188,4598; nalezeno 1188,4603.

Naltrindol (33)

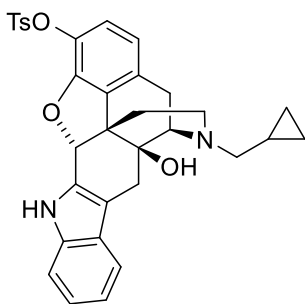


K roztoku naltrexon hydrochloridu (0,50 g; 1,3 mmol) v ledové kyselině octové (15 mL) pod ochrannou atmosférou argonu byl přidán fenylhydrazin (0,29 g; 2,6 mmol). Reakční směs byla zahřívána k varu 4 hodiny. Následně bylo rozpouštědlo odpařeno, odparek rozpuštěn ve vodě (15 mL) a pH bylo upraveno na hodnotu 8 přidávkem nasyceného vodného roztoku NaHCO₃.

Následně byl pevný podíl odfiltrován. Bylo získáno 0,55 g (kvant.) hnědé pevné látky.

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 8,75 (bs, 1H); 7,39 (d, *J* = 7,8 Hz, 1H); 7,21 (d, *J* = 8,2 Hz, 1H); 7,09 (t, *J* = 7,3 Hz, 1H); 6,99 (t, *J* = 7,3 Hz, 1H); 6,55 (d, *J* = 8,1 Hz, 1H); 6,48 (d, *J* = 8,1 Hz, 1H); 5,67 (s, 1H); 3,37 (d, *J* = 6,4 Hz, 1H); 3,09 (d, *J* = 18,6 Hz, 1H); 2,88 (d, *J* = 15,7 Hz, 1H); 2,79 (dd, *J* = 18,6; 6,5 Hz, 1H); 2,69 (dd, *J* = 11,4; 4,5 Hz, 1H); 2,62 (d, *J* = 15,7 Hz, 1H); 2,49-2,31 (m, 3H); 2,26 (td, *J* = 11,9; 3,2 Hz, 1H); 1,73 (d, *J* = 11,6 Hz, 1H); 0,92-0,81 (m, 1H); 0,61-0,49 (m, 2H); 0,20-0,08 (m, 2H); **¹³C NMR** (100 MHz, CDCl₃) δ 143,0; 139,2; 137,4; 130,8; 129,1; 126,8; 125,1; 122,8; 119,3; 119,1; 117,3; 111,5; 111,4; 85,5; 72,9; 62,3; 59,6; 48,1; 43,8; 31,5; 28,9; 27,0; 23,2; 9,5; 4,2; 3,9; **HRMS** vypočteno pro C₂₆H₂₇O₃N₂⁺ 415,2016; nalezeno 415,2017.

3-TsO-Naltrindol (34)

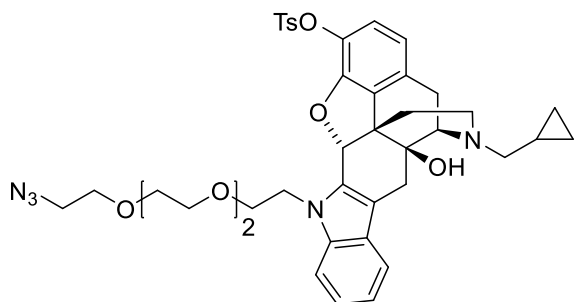


K roztoku naltrindolu (0,49 g; 1,2 mmol) v DMF (5 mL) pod ochrannou atmosférou argonu byl přidán pevný K₂CO₃ (1,14 g; 8,3 mmol) a tosyl chlorid (0,25 g; 1,3 mmol). Reakční směs byla míchána 5 hodin. Poté byla naředěna vodou (20 mL) a produkt extrahován DCM (3×20 mL). Spojené organické extrakty byly sušeny bezvodým MgSO₄ a rozpouštědlo bylo odpařeno. Reakce poskytla 0,65 g (kvant.) produktu ve formě hnědé krystalické látky.

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 8,25 (bs, 1H); 7,62 (d, *J* = 8,4 Hz, 2H); 7,39 (d, *J* = 7,9 Hz, 1H); 7,29 (d, *J* = 8,1 Hz, 1H); 7,21-7,13 (m, 1H); 7,08 (d, *J* = 8,1 Hz, 2H); 7,03 (t, *J* = 7,5 Hz, 1H); 6,76 (d, *J* = 8,3 Hz, 1H); 6,56 (d, *J* = 8,3 Hz, 1H); 5,59 (s, 1H); 3,44-3,35 (m, 1H); 3,12 (d, *J* = 19,0 Hz, 1H); 2,97-2,67 (m, 4H); 2,53 (d, *J* = 15,8 Hz, 1H); 2,49-2,38 (m, 1H); 2,28 (s, 3H); 2,21 (dt, *J* = 12,1; 6,2 Hz, 1H); 1,60 (d, *J* = 13,2 Hz, 1H); 0,97-0,82 (m, 1H); 0,64-0,52 (m, 2H); 0,22-0,10 (m, 2H); **¹³C NMR** (100 MHz, CDCl₃)

δ 148,2; 145,2; 137,4; 132,6; 132,5; 132,0; 129,5; 128,6; 128,4; 126,7; 123,3; 123,1; 119,5; 119,1; 118,8; 111,7; 111,5; 86,1; 72,5; 62,1; 59,6; 47,9; 43,6; 31,3; 28,9; 23,7; 21,7; 9,4; 4,3; 3,9; **HRMS** vypočteno pro $C_{33}H_{33}O_5N_2S^+$ 569,2105; nalezeno 569,2106.

Konjugát (35)

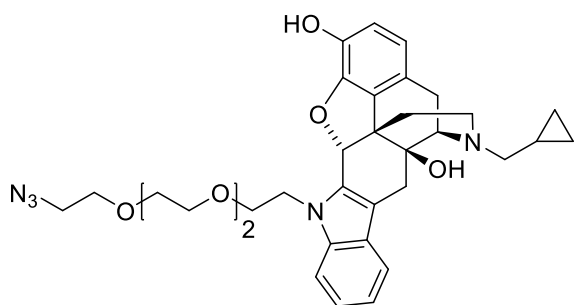


K roztoku sloučeniny **34** (0,29 g; 0,52 mmol) v DMF (5 mL) pod ochrannou atmosférou argonu byl přidán NaH (60%; 24 mg; 1,0 mmol) a reakční směs byla míchána 5 minut při laboratorní teplotě. Následně byl přidán tosylát **9** (0,28 mg; 0,75

mmol) a reakční směs byla míchána při laboratorní teplotě přes noc. Poté byla reakční směs rozložena vodou (20 mL) a produkt extrahován DCM (3×20 mL). Spojené organické extrakty byly promyty vodou (2×20 mL) a solankou (30 mL). Následně byly sušeny bezvodým $MgSO_4$ a rozpouštědlo bylo odpařeno. Sloupcová chromatografie odparku (silikagel; mobilní fáze DCM:MeOH / 20:1) poskytla 0,22 g (55 %) bezbarvého oleje.

1H NMR (400 MHz, $CDCl_3$) δ 7,65 (d, $J = 8,4$ Hz, 2H); 7,38 (d, $J = 7,8$ Hz, 1H); 7,35 (d, $J = 8,3$ Hz, 1H); 7,18 (ddd, $J = 8,2; 7,0; 1,2$ Hz, 1H); 7,13 (d, $J = 8,1$ Hz, 2H); 7,02 (ddd, $J = 7,9; 7,0; 1,0$ Hz, 1H); 6,76 (d, $J = 8,3$ Hz, 1H); 6,54 (d, $J = 8,3$ Hz, 1H); 5,73 (s, 1H); 4,86 (bs, 1H); 4,47 (ddd, $J = 14,5; 7,8; 6,5$ Hz, 1H); 4,26 (ddd, $J = 14,8; 6,2; 4,5$ Hz, 1H); 3,90-3,74 (m, 2H); 3,69-3,47 (m, 10H); 3,42-3,29 (m, 3H); 3,12 (d, $J = 18,9$ Hz, 1H); 2,91-2,69 (m, 1H); 2,58-2,34 (m, 4H); 2,31 (s, 3H); 2,21 (td, $J = 12,3; 3,7$ Hz, 1H); 1,61 (dd, $J = 12,8; 2,2$ Hz, 2H); 0,96-0,83 (m, 1H); 0,64-0,52 (m, 2H); 0,23-0,10 (m, 2H); **^{13}C NMR** (100 MHz, $CDCl_3$) δ 148,2; 145,2; 137,8; 132,7; 132,0; 129,6; 129,5 (2C); 128,7; 126,4; 123,2; 122,7; 119,2; 118,8; 110,7; 109,9; 85,7; 72,4; 71,0; 70,8; 70,7 (2C); 70,3; 70,2; 70,1; 70,0; 62,1; 59,6; 50,8; 48,0; 43,8; 43,6; 31,5; 28,9; 23,6; 21,7; 9,4; 4,2; 4,0; **HRMS** vypočteno pro $C_{41}H_{48}O_8N_5S^+$ 770,3218; nalezeno 770,3222.

Konjugát 36

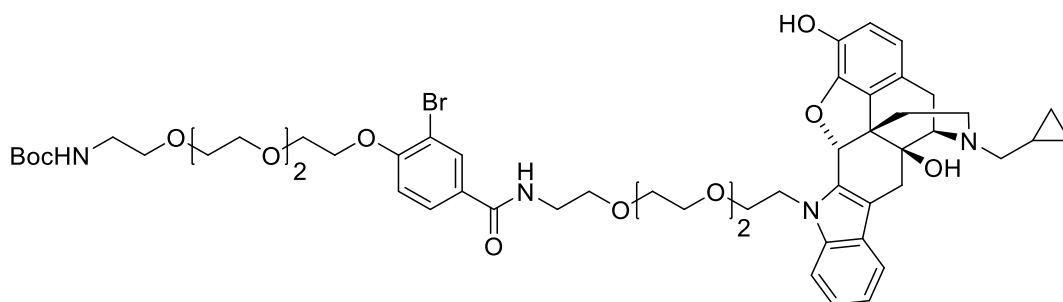


K roztoku konjugátu **35** (0,20 g; 0,25 mmol) v *i*PrOH (15 mL) byl přidán vodný roztok NaOH (1 M; 8 mL). Reakční směs byla refluxována přes noc. Rozpouštědlo bylo odpařeno, reakční směs naředěna vodou (15 mL) a pH upraveno

1M HCl na hodnotu 8-9. Produkt byl extrahován DCM (3×15 mL). Následně byl extrakt sušen bezvodým MgSO₄ a rozpouštědlo bylo odpařeno. Sloupcová chromatografie odparku (silikagel; mobilní fáze DCM:MeOH / 10:1) poskytla 0,10 g (65 %) bezbarvého oleje.

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 7,41 (d, *J* = 7,9 Hz, 1H); 7,31 (d, *J* = 8,3 Hz, 1H); 7,17 (ddd, *J* = 8,2; 7,0; 1,2 Hz, 1H); 7,03 (ddd, *J* = 7,9; 6,9; 1,0 Hz, 1H); 6,60 (d, *J* = 8,1 Hz, 1H); 6,52 (d, *J* = 8,1 Hz, 1H); 5,84 (s, 1H); 4,51 (dt, *J* = 14,5; 7,2 Hz, 1H); 4,35 (dt, *J* = 14,6; 5,6 Hz, 1H); 3,89 (t, *J* = 6,7 Hz, 2H); 3,77-3,51 (m, 12H); 3,45-3,27 (m, 3H); 3,12 (d, *J* = 18,6 Hz, 1H); 2,98-2,70 (m, 2H); 2,65 (dd, *J* = 15,6; 1,3 Hz, 1H); 2,54-2,24 (m, 3H); 1,86-1,75 (m, 1H); 0,99-0,82 (m, 1H); 0,64-0,52 (m, 2H); 0,28-0,12 (m, 2H); ¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃) δ 143,2; 139,2; 137,7; 131,0; 130,2; 126,6; 122,6; 119,3; 119,2; 119,0; 117,4; 111,1; 109,7; 84,9; 72,8; 72,6; 71,1; 70,9; 70,8; 70,7 (3C); 70,5; 70,2; 70,0; 62,4; 61,9; 59,6; 50,8; 48,3; 43,8; 29,1; 23,3; 9,5; 4,3; 4,0; HRMS vypočteno pro C₃₄H₄₂O₆N₅⁺ 616,3130; nalezeno 616,3133.

Konjugát 37

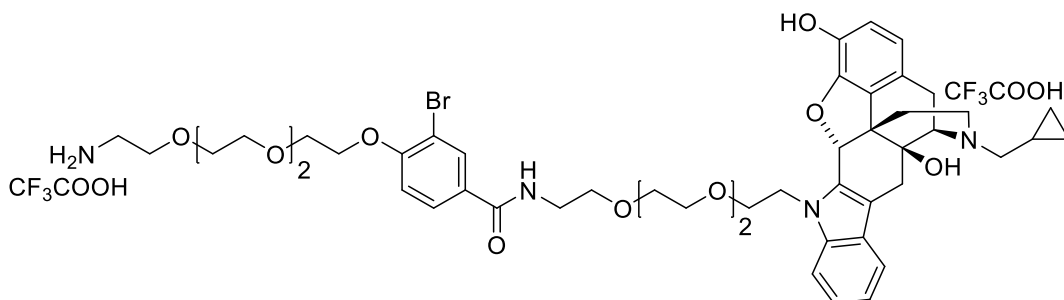


K roztoku konjugátu **36** (75 mg; 0,12 mmol) v ethanolu (5 mL) bylo přidáno 10% Pd/C (10 mg). Reakční směs byla míchána pod atmosférou vodíku 3 hodiny. Poté byl katalyzátor odfiltrován a rozpouštědlo bylo odpařeno. Odparek byl rozpuštěn v DMF (5 mL) pod ochrannou atmosférou Ar. Poté byl přidán aktivovaný ester **19** (80 mg; 0,13 mmol) a reakční směs byla míchána přes noc při laboratorní teplotě. Druhý den bylo rozpouštědlo

odpařeno. Sloupcová chromatografie odparku (silikagel; mobilní fáze DCM:MeOH/10:1) poskytla 105 mg (83 %) bezbarvého oleje.

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 8,06 (d, *J* = 2,2 Hz, 1H); 7,77 (dd, *J* = 8,6; 2,2 Hz, 1H); 7,39 (d, *J* = 7,8 Hz, 1H); 7,24 (d, *J* = 8,3 Hz, 1H); 7,14 (ddd, *J* = 8,2; 7,0; 1,2 Hz, 1H); 7,00 (ddd, *J* = 7,9; 7,0; 1,0 Hz, 1H); 6,83 (d, *J* = 8,6 Hz, 1H); 6,60 (d, *J* = 8,6 Hz, 1H); 5,74 (s, 1H); 5,11-4,96 (m, 1H); 4,44 (dt, *J* = 14,6; 7,3 Hz, 1H); 4,28-4,10 (m, 3H); 3,92-3,86 (m, 2H); 3,81-3,76 (m, 4H); 3,73-3,55 (m, 22H); 3,33-3,21 (m, 2H); 3,11 (d, *J* = 18,6 Hz, 1H); 2,92-2,77 (m, 1H); 2,64 (d, *J* = 15,6 Hz, 1H); 2,54-2,01 (m, 5H); 1,77-1,69 (m, 1H); 1,43 (s, 9H); 0,99-0,82 (m, 1H); 0,63-0,52 (m, 2H); 0,27-0,11 (m, 2H); **¹³C NMR** (100 MHz, CDCl₃) δ 166,1; 157,8; 156,2; 143,2; 139,5; 137,6; 132,7; 132,5; 130,7; 130,2; 128,6; 128,2; 126,6; 124,7; 122,6; 119,3; 119,2; 119,0; 117,6; 112,5; 112,0; 109,5; 84,6; 79,3; 72,8; 72,7 (2C); 71,3; 70,8; 70,7; 70,6 (2C); 70,5; 70,3 (2C); 70,1 (2C); 70,0; 69,9; 69,8; 69,5; 69,2; 62,4; 61,5; 59,6; 50,8; 48,3; 43,6; 40,5; 40,1; 36,6; 28,6; 9,7; 4,3; 3,9; **HRMS** vypočteno pro C₅₄H₇₂O₁₃N₄Br⁺ 1063,4274; nalezeno 1063,4273.

Konjugát 38

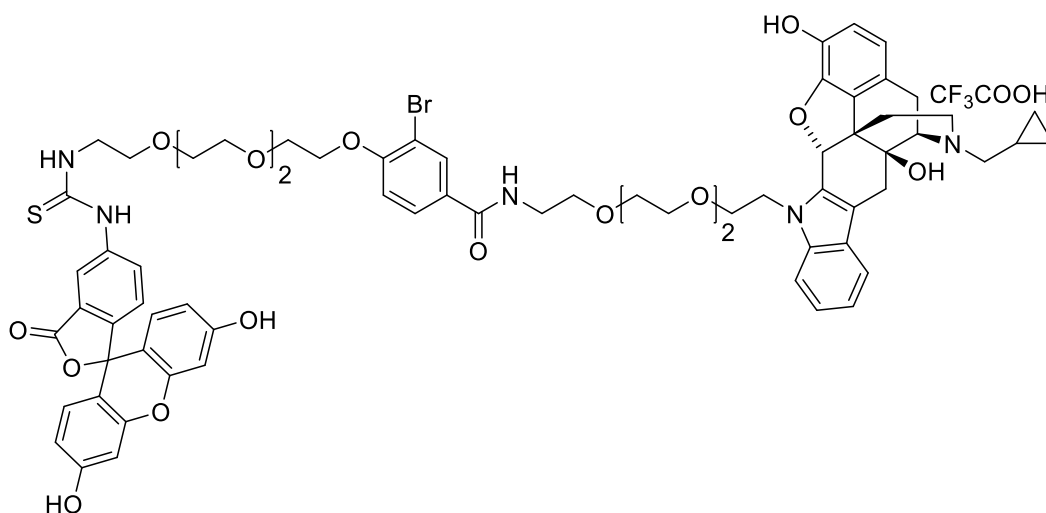


K roztoku konjugátu **37** (80 mg; 0,08 mmol) v DCM (2 mL) byla přidána TFA (2 mL). Reakční směs byla míchána 90 minut při laboratorní teplotě. Následně bylo rozpouštědlo odpařeno. Preparativní HPLC odparku (C18; H₂O+0,1% TFA 98:2 ACN → H₂O+0,1% TFA 30:70 ACN) poskytlo 67 mg (74 %) bílé krystalické látky.

¹H NMR (400 MHz, CD₃OD) δ 8,06 (d, *J* = 2,2 Hz, 1H); 7,81 (dd, *J* = 8,6; 2,2 Hz, 1H); 7,40 (d, *J* = 9,1 Hz, 2H); 7,16 (ddd, *J* = 8,4; 7,1; 1,1 Hz, 1H); 7,07 (d, *J* = 8,7 Hz, 1H); 7,05-6,96 (m, 1H); 6,68 (s, 2H); 5,99 (s, 1H); 4,60 (ddd, *J* = 15,0; 8,0; 5,6 Hz, 1H); 4,38 (dt, *J* = 15,1; 4,3 Hz, 1H); 4,27-4,15 (m, 3H); 3,95-3,83 (m, 4H); 3,82-3,72 (m, 2H); 3,71-3,42 (m, 21H); 3,42-3,34 (m, 2H); 3,19 (dd, *J* = 12,6; 4,6 Hz, 1H); 3,09 (t, *J* = 5,1 Hz, 2H); 3,05-2,97 (m, 2H); 2,93 (td, *J* = 12,9; 3,9 Hz, 1H); 2,82-2,68 (m, 2H); 2,02-1,90 (m, 1H); 1,23-1,08 (m, 1H); 0,94-0,72 (m, 2H); 0,59-0,46 (m, 2H);

^{13}C NMR (100 MHz, CD_3OD) δ 168,3; 159,2; 144,8; 142,3; 139,1; 133,6; 131,4; 130,5; 129,4; 129,1; 127,7; 123,8; 122,6; 120,6; 120,3; 119,7; 119,4; 113,8; 112,6; 111,2; 109,6; 84,7; 73,6; 71,9; 71,8; 71,5; 71,4; 71,2 (2C); 70,5; 70,4; 67,8; 63,8; 58,9; 48,2; 47,7; 44,8; 41,0; 40,6; 30,3; 29,9; 25,0; 6,9; 6,3; 3,4; **HRMS** vypočteno pro $\text{C}_{49}\text{H}_{64}\text{O}_{11}\text{N}_4\text{Br}^+$ 963,3750; nalezeno 963,3758.

Konjugát 39

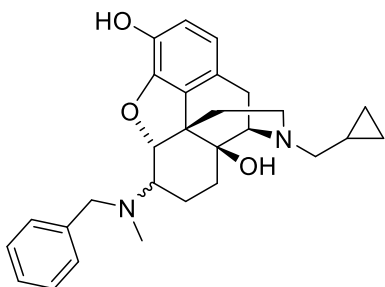


Konjugát **38** (34 mg; 0,03 mmol) byl rozpuštěn v THF (3 mL) a poté byl přidán triethylamin (16 μL ; 0,11 mmol). Po 5 minutách byl přidán fluorescein isothiokyanát (13 mg; 0,03 mmol) a reakční směs byla míchána 1 hodinu. Následně bylo rozpouštědlo odpařeno. Preparativní HPLC odparku (C_{18} ; $\text{H}_2\text{O}+0,1\%$ TFA 98:2 ACN \rightarrow $\text{H}_2\text{O}+0,1\%$ TFA 30:70 ACN) poskytlo 34 mg (83 %) oranžové krystalické látky.

^1H NMR (600 MHz, CD_3OD) δ 8,22 (s, 1H); 7,99 (d, $J = 2,2$ Hz, 1H); 7,79-7,70 (m, 2H); 7,37-7,30 (m, 2H); 7,14-7,07 (m, 2H); 7,00-6,91 (m, 2H); 6,81-6,72 (m, 4H); 6,66-6,57 (m, 4H); 5,94 (s, 1H); 4,56 (ddd, $J = 15,1; 8,0; 5,6$ Hz, 1H); 4,33 (dt, $J = 15,0; 4,3$ Hz, 1H); 4,17 (d, $J = 6,6$ Hz, 1H); 4,14-4,03 (m, 2H); 3,88-3,35 (m, 33H); 3,35-3,30 (m, 1H); 3,16-3,08 (m, 1H); 3,00-2,91 (m, 2H); 2,86 (td, $J = 12,9; 3,9$ Hz, 1H); 2,76-2,63 (m, 2H); 1,94-1,85 (m, 1H); 1,14-1,05 (m, 1H); 0,87-0,69 (m, 2H); 0,53-0,42 (m, 2H); ^{13}C NMR (100 MHz, CD_3OD) δ 182,7; 170,5; 168,3; 161,7; 161,4; 159,2; 155,2; 144,8; 142,2; 139,0; 133,6; 131,4; 131,0; 130,5; 129,4; 129,0; 127,6; 123,8; 122,5; 120,7; 120,4; 119,7; 119,4; 118,6; 116,3; 113,8; 112,7; 111,1; 109,6; 103,5; 84,6; 73,6; 72,0; 71,8; 71,6; 71,5; 71,4 (2C); 71,2; 70,4; 70,3 (2C); 63,7; 58,9; 47,6; 45,5; 44,8;

41,0; 40,6; 30,3; 29,9; 25,0; 6,9; 6,3; 3,4; **HRMS** vypočteno pro $C_{70}H_{75}O_{16}N_5BrS^+$ 1352,4107; nalezeno 1352,4118.

6-*N*-Benzyl-*N*-methylnaltrexamin (40)

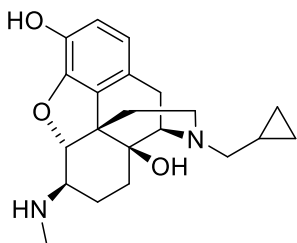


Ke směsi naltrexon hydrochloridu (1,50 g; 4,0 mmol) v toluenu (40 mL) byl přidán *N*-benzylmethylamin (0,8 ml; 6,2 mmol), kyselina benzoová (0,68 g; 5,6 mmol) a kyselina *p*-toluensulfonová (0,01 g; kat.). Reakční směs byla zahřívána k varu přes noc v Dean-Starkově aparatuře.

Druhý den byla reakční směs přiodpařena do objemu 10 mL. Byl přidán methanol (20 mL) a $NaBH_3CN$ (0,27 g; 4,4 mmol) a reakční směs byla míchána přes noc. Následně bylo rozpouštědlo odpařeno, odparek byl suspendován v nasyceném roztoku $NaHCO_3$ (30 mL) a produkt extrahován DCM (3×20 mL). Spojené organické extrakty byly sušeny bezvodým $MgSO_4$ a rozpouštědlo bylo odpařeno. Sloupcová chromatografie odparku (silikagel; mobilní fáze DCM:MeOH / 10:1) poskytla 1,26 g (71 %) bílé krystalické látky.

1H NMR (400 MHz, $CDCl_3$) δ 7,39-7,27 (m, 4H); 7,24-7,17 (m, 1H); 6,64 (d, $J = 8,1$ Hz, 1H); 6,50 (d, $J = 8,2$ Hz, 1H); 4,69 (d, $J = 8,0$ Hz, 1H); 3,81 (d, $J = 13,5$ Hz, 1H); 3,57 (d, $J = 13,5$ Hz, 1H); 3,04 (d, $J = 5,8$ Hz, 1H); 2,99 (d, $J = 18,3$ Hz, 1H); 2,66-2,49 (m, 3H); 2,45-2,28 (m, 6H); 2,22 (td, $J = 12,4; 4,9$ Hz, 1H); 2,10 (td, $J = 11,9; 3,6$ Hz, 1H); 2,03-1,87 (m, 1H); 1,66-1,55 (m, 2H); 1,48-1,40 (m, 1H); 1,34-1,24 (m, 1H); 0,89-0,77 (m, 1H); 0,56-0,48 (m, 2H); 0,16-0,08 (m, 2H); **^{13}C NMR** (100 MHz, $CDCl_3$) δ 142,4; 139,7; 139,6; 131,9; 128,9; 128,4; 127,0; 124,7; 118,7; 116,8; 91,3; 70,6; 63,6; 62,6; 59,3; 47,9; 44,2; 38,2; 30,7; 22,8; 17,9; 22,9; 9,6; 4,0 (2C); **HRMS** vypočteno pro $C_{28}H_{35}O_3N_2^+$ 447,2642; nalezeno 447,2644.

6- β -*N*-Methylnaltrexamin (41)

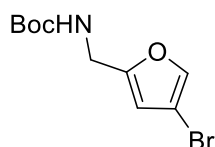


K roztoku 6-*N*-benzyl-*N*-methylnaltrexaminu (1,25 g; 2,8 mmol) v kyselině octové (40 mL) bylo přidáno 10% Pd/C (0,1 g) a reakční směs byla míchána pod atmosférou vodíku přes noc. Druhý den byl katalyzátor odfiltrován a rozpouštědlo bylo odpařeno. Odparek byl rozpuštěn ve vodě (30 mL), pH upraveno na hodnotu 8 přídatkem $NaHCO_3$ a produkt extrahován DCM (3×30 mL). Spojené organické extrakty byly sušeny bezvodým $MgSO_4$ a rozpouštědlo bylo odpařeno. Sloupcová

chromatografie odparku (silikagel; mobilní fáze EtOAc:MeOH:NH₄OH / 10:8:0,3) poskytla 0,52 g (52 %) bílé krystalické látky.

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 6,64 (d, *J* = 8,0 Hz, 1H); 6,53 (d, *J* = 8,0 Hz, 1H); 4,54 (d, *J* = 7,5 Hz, 1H); 3,04 (d, *J* = 5,6 Hz, 1H); 2,99 (d, *J* = 18,2 Hz, 1H); 2,68-2,51 (m, 3H); 2,48 (s, 3H); 2,35 (d, *J* = 6,5 Hz, 1H); 2,27-2,07 (m, 2H); 2,01-1,87 (m, 1H); 1,67-1,56 (m, 2H); 1,47-1,35 (m, 2H); 0,88-0,76 (m, 1H); 0,56-0,45 (m, 2H); 0,15-0,06 (m, 2H); **¹³C NMR** (100 MHz, CDCl₃) δ 142,1; 141,1; 131,3; 123,3; 119,4; 118,5; 90,6; 70,5; 62,5; 59,3; 58,9; 47,4; 44,1; 30,9; 30,5; 29,8; 22,8; 21,4; 9,6; 4,1; 3,9; **HRMS** vypočteno pro C₂₁H₂₉O₃N₂⁺ 357,2173; nalezeno 357,2177.

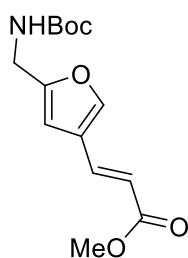
***tert*-Butyl-((4-bromfuran-2-yl)methyl)karbamát (42)**



K roztoku 4-bromfuraldehydu (0,50 g; 2,9 mmol) ve směsi H₂O:EtOH / 1:1 (10 mL) byl přidán octan sodný (0,42 g; 5,1 mmol) a hydroxylamin hydrochlorid (0,35 g; 5,0 mmol). Reakční směs byla zahřívána k varu 1 hodinu. Poté byla reakční směs rozložena vodou (20 mL) a produkt byl extrahován ethyl-acetátem (3×20 mL). Spojené organické extrakty byly promyty solankou (30 mL) a sušeny bezvodým MgSO₄. Rozpouštědlo bylo odpařeno a odparek rozpuštěn v ledové kyselině octové (15 mL). Následně byl přidán kovový zinek (0,74 g; 11,1 mmol) a reakční směs byla míchána přes noc při laboratorní teplotě. Druhý den byl zinek oddělen filtrací a rozpouštědlo odpařeno. Odparek byl rozpuštěn v DCM (20 mL) a vytřepán nasyceným roztokem NaHCO₃ (20 mL). Následně byla organická vrstva promyta solankou (15 mL) a sušena bezvodým MgSO₄. Odparek byl rozpuštěn v THF (20 mL) pod ochrannou atmosférou Ar. Následně byla přidána DIPEA (1,6 mL; 9 mmol) a Boc₂O (0,76 g; 3,5 mmol). Reakční směs byla míchána 2 hodiny při laboratorní teplotě. Následně bylo rozpouštědlo odpařeno, odparek rozpuštěn v DCM (20 mL), organická vrstva byla promyta 10% vodným KHSO₄ (20 mL), vodou (20 mL) a solankou (15 mL). Spojené organické extrakty byly sušeny bezvodým MgSO₄ a rozpouštědlo odpařeno. Sloupcová chromatografie odparku (silikagel; mobilní fáze cyklohexan:EtOAc / 3:1) poskytla 0,40 g (50 %) nažloutlé pevné látky.

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 7,34 (d, *J* = 0,9 Hz, 1H); 6,27 (s, 1H); 4,85 (bs, 1H); 4,26 (d, *J* = 5,9 Hz, 2H); 1,45 (s, 9H); **¹³C NMR** (100 MHz, CDCl₃) δ 155,6; 153,4; 140,4; 110,6; 100,2; 80,1; 37,8; 28,5; **HRMS** vypočteno pro C₁₀H₁₄O₃NBrNa⁺ 298,0049; nalezeno 298,0050.

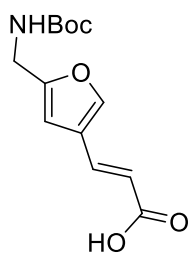
Methyl-(*E*)-3-(5-(((*tert*-butoxykarbonyl)amino)methyl)furan-3-yl)akrylát (43)



K roztoku sloučeniny **42** (0,29 g; 1,1 mmol) v DMF (5 mL) byl přidán triethylamin (0,6 mL; 4,2 mmol), methyl-akrylát (0,29 mL; 3,2 mmol) a *t*BuXPhos Pd G3 (0,13 g; 0,16 mmol). Reakční směs byla míchána pod ochrannou atmosférou argonu při 120 °C po dobu 5 hodin. Poté bylo rozpouštědlo odpařeno. Sloupcová chromatografie odparku (silikagel; mobilní fáze cyklohexan:EtOAc / 2:1) poskytla 0,19 g (62 %) žluté krystalické látky.

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 7,55 (d, *J* = 0,9 Hz, 1H); 7,51 (d, *J* = 15,8 Hz, 1H); 6,40 (s, 1H); 6,11 (dd, *J* = 15,8; 0,6 Hz, 1H); 4,89 (bs, 1H); 4,28 (d, *J* = 6,0 Hz, 2H); 3,77 (s, 3H); 1,45 (s, 9H); ¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃) δ 167,5; 155,7; 154,4; 144,1; 134,9; 123,5; 117,7; 104,7; 80,1; 51,8; 37,8; 28,5; HRMS vypočteno pro C₁₄H₁₉O₅NNa⁺ 304,1155; nalezeno 304,1160.

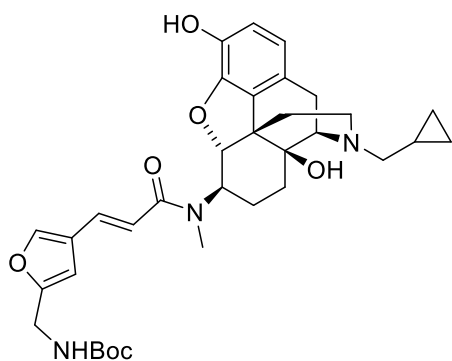
Kyselina (*E*)-3-(5-(((*tert*-butoxykarbonyl)amino)methyl)furan-3-yl)akrylová (44)



K roztoku esteru **43** (0,18 g; 0,64 mmol) ve směsi dioxan:voda / 1:1 (10 mL) byl přidán 1M vodný roztok NaOH ve vodě (1,3 mL). Reakční směs byla míchána přes noc při laboratorní teplotě. Druhý den byla reakční směs rozložena vodou (15 mL), pH upraveno na hodnotu 3-4 přidávkem 10% vodného KHSO₄ a produkt byl extrahován DCM (3×15 mL). Spojené organické extrakty byly sušeny bezvodým MgSO₄ a rozpouštědlo odpařeno. Reakce poskytla 0,17 g (kvant.) kyseliny ve formě bílé krystalické látky.

¹H NMR (400 MHz, CD₃OD) δ 7,73 (s, 1H); 7,53 (d, *J* = 15,8 Hz, 1H); 6,51 (s, 1H); 6,14 (dd, *J* = 15,8; 0,6 Hz, 1H); 4,20 (s, 2H); 1,45 (s, 9H); ¹³C NMR (100 MHz, CD₃OD) δ 170,5; 156,4; 145,7; 136,6; 124,8; 118,8; 105,1; 80,5; 38,2; 28,7; HRMS vypočteno pro C₁₃H₁₇O₅NNa⁺ 290,0999; nalezeno 290,1001.

Konjugát 45

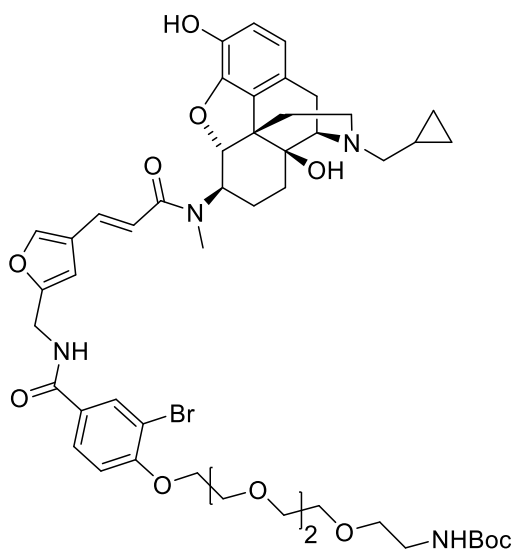


K roztoku kyseliny **44** (0,15 g; 0,53 mmol) a 6- β -*N*-methylnaltrexaminu (0,22 g; 0,61 mmol) v DMF (5 mL) pod ochrannou atmosférou argonu byl přidán DIPEA (0,33 mL; 1,9 mmol) a reakční směs byla vychlazena ledovou lázní. Následně byl přidán PyBrOP (0,26 g; 0,56 mmol) a reakční směs byla míchána 1 hodinu. Poté bylo rozpouštědlo odpařeno.

Sloupcová chromatografie odparku (silikagel; mobilní fáze DCM:MeOH:AcOH / 10:2:0,1) poskytla produkt, který byl vytřepáním s nasyceným vodným roztokem NaHCO₃ převeden na volný amin. Reakce poskytla 0,13 g (38 %) produktu ve formě bezbarvého oleje.

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 7,45-7,36 (m, 2H); 7,03 (d, *J* = 8,1 Hz, 1H); 6,63 (d, *J* = 8,1 Hz, 1H); 6,55 (s, 1H); 6,49 (d, *J* = 15,2 Hz, 1H); 5,29 (bs, 1H); 4,58 (d, *J* = 8,0 Hz, 1H); 4,39 (dd, *J* = 15,7; 7,0 Hz, 1H); 4,04-3,92 (m, 1H); 3,16-3,01 (m, 2H); 3,00 (s, 3H); 2,72-2,56 (m, 2H); 2,47-2,07 (m, 5H); 1,73-1,15 (m, 14H); 0,94-0,78 (m, 1H); 0,59-0,47 (m, 2H); 0,19-0,04 (m, 2H); ¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃) δ 167,8; 156,7; 152,9; 143,0; 141,7; 140,9; 132,1; 127,9; 124,6; 119,5; 118,8; 117,3; 114,1; 106,9; 89,9; 80,9; 70,2; 62,4; 59,3; 58,2; 47,9; 44,1; 37,7; 31,0; 28,9; 28,6; 23,5; 22,9; 9,6; 4,1; 4,0; HRMS vypočteno pro C₃₄H₄₄O₇N₃⁺ 606,3174; nalezeno 606,3179.

Konjugát 46

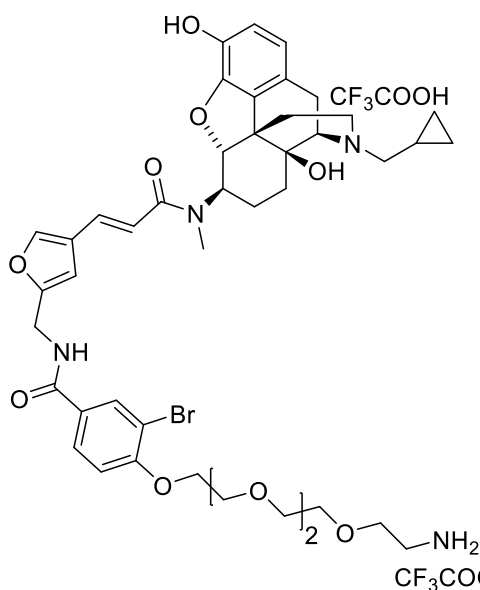


K roztoku konjugátu **45** (58 mg; 0,10 mmol) v DCM (2 mL) byla přidána TFA (2 mL). Reakční směs byla míchána 90 minut při rt. Následně bylo rozpouštědlo odpařeno. Odparek byl rozpuštěn v DMF (3 mL) pod ochrannou atmosférou Ar. Poté byl přidán DIPEA (67 μ L; 0,39 mmol), aktivovaný ester **19** (68 mg; 0,11 mmol) a reakční směs byla míchána přes noc při rt. Druhý den bylo rozpouštědlo odpařeno. Sloupcová chromatografie odparku

(silikagel; mobilní fáze DCM:MeOH / 10:1) poskytla 75 mg (80 %) bezbarvého oleje.

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 8,06 (d, *J* = 2,2 Hz, 1H); 7,84 (bs, 1H); 7,76 (dd, *J* = 8,6; 2,2 Hz, 1H); 7,37-7,29 (m, 2H); 6,96 (d, *J* = 8,1 Hz, 1H); 6,81 (d, *J* = 8,6 Hz, 1H); 6,65 (s, 1H); 6,58-6,49 (m, 2H); 5,03 (bs, 1H); 4,72 (dd, *J* = 15,4; 6,3 Hz, 1H); 4,56 (d, *J* = 7,8 Hz, 1H); 4,26 (dd, *J* = 15,3; 5,3 Hz, 1H); 4,17-4,11 (m, 2H); 3,92-3,83 (m, 2H); 3,83-3,72 (m, 3H); 3,71-3,53 (m, 6H); 3,49 (t, *J* = 5,2 Hz, 2H); 3,25 (q, *J* = 5,4 Hz, 2H); 3,18-3,01 (m, 2H); 2,97 (s, 3H); 2,74-2,55 (m, 2H); 2,46-2,07 (m, 5H); 1,71-1,32 (m, 14H); 0,91-0,78 (m, 1H); 0,58-0,49 (m, 2H); 0,18-0,06 (m, 2H); **¹³C NMR** (100 MHz, CDCl₃) δ 168,1; 166,9; 158,1; 156,2; 153,0; 142,7; 141,7; 140,9; 132,1; 131,8; 128,3; 127,3; 124,7; 119,6; 119,1; 117,5; 112,5; 112,1; 107,0; 89,9; 79,4; 71,3; 70,8; 70,7; 70,3 (2C); 70,1; 69,5; 69,1; 62,4; 59,3; 58,4; 47,8; 40,5; 37,2; 30,8; 29,0; 28,6; 23,4; 22,9; 9,6; 4,1; 4,0; **HRMS** vypočteno pro C₄₉H₆₄O₁₂N₄Br⁺ 979,3704; nalezeno 979,3717.

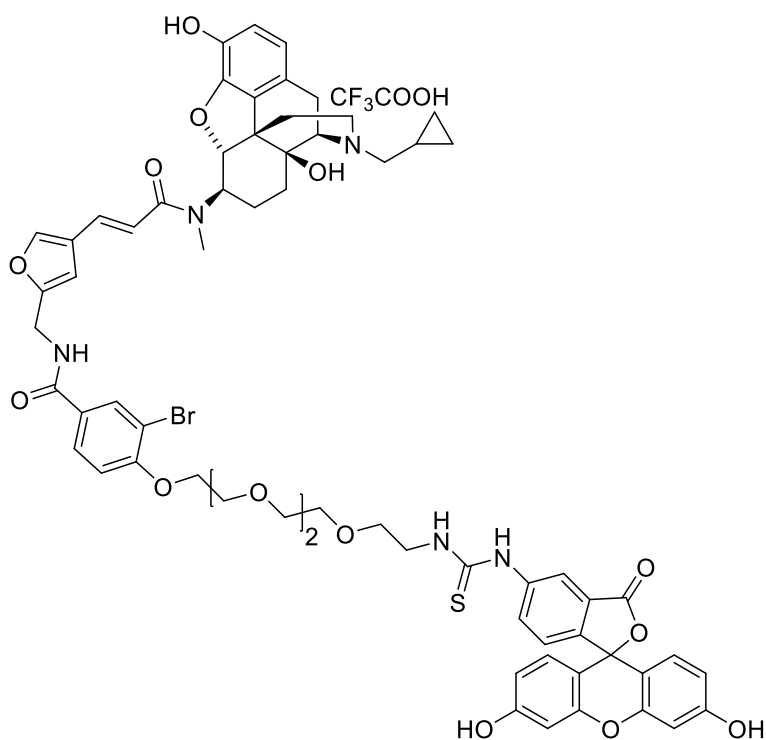
Konjugát 47



K roztoku konjugátu **46** (70 mg; 0,07 mmol) v DCM (2 mL) byla přidána TFA (2 mL). Reakční směs byla míchána 90 minut při rt. Následně bylo rozpouštědlo odpařeno. Preparativní HPLC odparku (C18; H₂O+0,1% TFA 98:2 ACN → H₂O+0,1% TFA 30:70 ACN) poskytlo 53 mg (66 %) bílé látky.

¹H NMR (400 MHz, CD₃OD) δ 8,14 (d, *J* = 2,2 Hz, 1H); 7,89 (dd, *J* = 8,6; 2,2 Hz, 1H); 7,65 (s, 1H); 7,30 (d, *J* = 15,3 Hz, 1H); 7,16 (d, *J* = 8,6 Hz, 1H); 6,88-3,65 (m, 2H); 6,48 (s, 1H); 6,43 (d, *J* = 15,3 Hz, 1H); 4,79 (d, *J* = 8,1 Hz, 1H); 4,56-4,50 (m, 2H); 4,33-4,25 (m, 2H); 4,00-3,89 (m, 3H); 3,73-3,61 (m, 10H); 3,43-3,33 (m, 2H); 3,24-3,06 (m, 5H); 3,01 (s, 3H); 2,95-2,85 (m, 1H); 2,77-2,57 (m, 2H); 2,34-2,18 (m, 1H); 1,86-1,43 (m, 4H); 1,19-1,03 (m, 1H); 0,91-0,68 (m, 2H); 0,57-0,45 (m, 2H); **¹³C NMR** (100 MHz, CD₃OD) δ 170,4; 169,6; 168,1; 159,5; 154,9; 145,0; 143,0; 134,6; 133,8; 131,1; 129,5; 128,8; 125,6; 122,0; 121,6; 119,1; 113,9; 112,7; 106,1; 89,5; 72,0; 71,6; 71,5; 71,3; 70,5; 70,4; 67,8; 64,1; 58,8; 48,2; 47,7; 40,6; 37,7; 31,6; 28,6; 24,4; 23,3; 6,8; 6,2; 3,4; **HRMS** vypočteno pro C₄₉H₆₄O₁₂N₄Br⁺ 879,3180; nalezeno 879,3189.

Konjugát 48



Konjugát **47** (30 mg; 0,03 mmol) byl rozpuštěn v THF (3 mL), byl přidán DIPEA (15 μ L; 0,08 mmol). Po 5 minutách byl přidán fluorescein isothiokyanát (11 mg; 0,03 mmol) a reakční směs byla míchána 1 hodinu. Poté bylo rozpouštědlo odpařeno. Preparativní HPLC odparku (C18; H₂O+0,1% TFA 98:2 ACN \rightarrow H₂O+0,1% TFA 30:70 ACN) poskytlo 22 mg (60 %) oranžové látky.

¹H NMR (600 MHz, CD₃OD) δ 8,18 (s, 1H); 8,06 (d, J = 2,2 Hz, 1H); 7,81 (dd, J = 8,6; 2,2 Hz, 1H); 7,77-7,69 (m, 1H); 7,58 (s, 1H); 7,24 (d, J = 15,3 Hz, 1H); 7,12 (d, J = 8,3 Hz, 1H); 7,06 (d, J = 8,6 Hz, 1H); 6,82-6,50 (m, 8H); 6,40 (s, 1H); 6,34 (d, J = 15,3 Hz, 1H); 4,69 (d, J = 8,1 Hz, 1H); 4,46 (s, 2H); 4,17 (s, 2H); 3,90-3,52 (m, 16H); 3,34-3,28 (m, 1H); 3,09-2,95 (m, 2H); 2,93 (s, 3H); 2,86-2,74 (m, 1H); 2,68-2,49 (m, 2H); 2,23-2,10 (m, 1H); 1,75-1,35 (m, 4H); 1,07-0,94 (m, 1H); 0,80-0,60 (m, 2H); 0,49-0,35 (m, 2H); ¹³C NMR (150 MHz, CD₃OD) δ 182,7; 170,3; 170,5; 169,6; 168,1; 159,5; 155,4; 155,0; 145,0; 143,8; 142,9; 134,7; 133,8; 131,0; 130,9; 129,6; 128,7; 125,6; 121,9; 121,7; 119,7; 118,9; 118,6; 116,3; 114,7; 113,9; 112,8; 105,9; 103,5; 89,4; 71,6; 71,5; 71,3; 71,2; 70,5; 70,4; 70,3; 64,0; 59,4; 58,7; 48,2; 47,6; 45,5; 37,8; 31,6; 29,1; 28,6; 24,4; 23,2; 21,9; 6,8; 6,2; 3,4; HRMS vypočteno pro C₆₅H₆₇O₁₅N₅BrS⁺ 1268,3538; nalezeno 1258,3547.

6. Závěr

Cílem této diplomové práce bylo navrhnout a připravit spojkou modifikované ligandy MOR, DOR a KOR, které si zachovají svoji afinitu a umožní využití těchto ligandů v konceptu iBodies. V případě MOR byla připravena série fluorescenčně značených konjugátů, na kterých byl studován vliv způsobu vyvedení spojky na afinitu a selektivitu ligandu. Na základě dat získaných z této série, byly vybrány dva ligandy (**29**, **31**), které byly připraveny a použity pro přípravu prvních iBodies cílených na MOR. Biochemické testování ukázalo vlastnosti srovnatelné s konvenčními protilátkami, což potvrzuje univerzálnost tohoto konceptu a možnost jeho rozšíření pro cílení receptorů. Zároveň byl syntetizován ligand (**32**) pro metodu DIANA, která umožní kvantifikaci vazebných konstant nově připravených iBodies.

Dále byly navrženy a připraveny ligandy cílené na DOR (**38**) a KOR (**47**), které byly předány kolegům z biochemického oddělení. Výsledky biochemických experimentů s využitím těchto ligandů zatím nejsou dostupné.

Na závěr lze konstatovat, že stanovené cíle diplomové práce byly splněny. U iBodies cílených na MOR bohužel nebylo dosaženo „multivalent binding efektu“, který byl pozorován např. u GCP-II, kde připojení ligandů na polymer snížilo inhibiční konstanty o několik řádů. Tím opět potvrzujeme, že tento efekt není obecný pro všechny proteiny. Na druhou stranu, i za cenu mírného snížení afinity, vnášíme do světa nástrojů pro značení OR novou technologii „iBodies“, která přináší řadu výhod, jež byly nastíněny v teoretické části.

7. Literatura

- 1 M. Hadzima. *Fluorescenčně značené ligandy μ -opioidních receptorů*, **2016**.
- 2 P. Šácha, T. Knedlík, J. Schimer, J. Tykvart, J. Parolek, V. Navrátil, P. Dvořáková, F. Sedlák, K. Ulbrich, J. Strohalm, P. Majer, V. Šubr, J. Konvalinka, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2016**, *55*, 2356–2360.
- 3 V. L. Korlipara, A. E. Takemori, P. S. Portoghese, *J. Med. Chem.* **1995**, *38*, 1337-1343.
- 4 V. L. Korlipara, J. Ells, J. Wang, S. Tam, R. Elde, P. S. Portoghese, *Eur. J. Med. Chem.* **1997**, *32*, 171-174.
- 5 R. A. Duval, R. L. Allmon, J. R. Lever, *J. Med. Chem.* **2007**, *50*, 2144-2156.
- 6 V. Navrátil, J. Schimer, J. Tykvart, T. Knedlík, V. Vlk, P. Majer, J. Konvalinka, P. Šácha, *Nucleic Acids Res.* **2016**, *45*, e10.
- 7 B. N. Dhawan, F. Cesselin, R. Raghubir, T. Reisine, P. B. Bradley, P. S. Portoghese, M. Hamon. *Pharmacol. Rev.* **1996**, *48*, 567–592.
- 8 T. Wigmore, P. Farquhar-Smith, *Curr. Opin. Support. Palliat. Care* **2016**, *10*, 109-118.
- 9 J. Nguyen, K. Luk, D. Vang, W. Soto, L. Vincent, S. Robiner, R. Saavedra, Y. Li, P. Gupta, K. Gupta. *Br. J. Anaesth.* **2014**, *113*, i4-i13.
- 10 P. A. Singleton, T. Mirzapioiazova, R. Hasina, R. Salgia, J. Moss. *Br. J. Anaesth.* **2014**, *113*, i103-i108.
- 11 B. Afsharimani, C. W. Doornebal, P. J. Cabot, M. W. Hollmann, M. – O. Parat. *Br. J. Pharmacol.* **2013**, *172*, 251-259.
- 12 J. P. Cata, V. Keerty, D. Keerty, L. Feng, P. H. Norman, V. Gottumukkala, J. R. Mehran. M. Engle. *Cancer Med.* **2014**, *3*, 900-908.
- 13 F. E. Lennon, T. Mirzapioiazova, B. Mambetsariev, V. A. Poroyko, R. Salgia, J. Moss, P. A. Singleton. *PLoS ONE* **2014**, *9*, e91577.
- 14 M. A. Patino, R. E. Ramirez, C. A. Perez, L. Feng, P. Kataria, J. Myers, J. P. Cata, *Oral Oncol.* **2017**, *74*, 1-7.
- 15 E. Y. Zhang, J. Xiong, B. L. Parker, A. Y. Chen, P. E. Fields, X. Ma, J. Qiu, T. M. Yankee, *Br. J. Pharmacol.* **2011**, *164*, 1829-1844.

- 16 M. P. Fuggetta, P. Di Francesco, R. Falchetti, A. Cottarelli, L. Rossi, M. Tricarico, G. Lanzilli, *J. Exp. Clin. Cancer*. **2005**, *24*, 255-263.
- 17 K. Gupta, S. Kshirsagar, L. Chang, R. Schwartz, P. Y. Law, D. Yee, R. P. Hebbel, *Cancer Research* **2002**, *62*, 4491-4498.
- 18 L. Koodie, S. Ramakrishnan, S. Roy, *Am. J. Pathol.* **2010**, *177*, 984-997.
- 19 K. Yamamizu, S. Furuta, Y. Hamada, A. Yamashita, N. Kuzumaki, M. Narita, K. Doi, S. Katayama, H. Nagase, J. K. Yamashita, M. Narita, *Sci. Rep.* **2013**, *3*, 3213.
- 20 Y. Harimaya, K. Koizumi, T. Andoh, H. Nojima, Y. Kuraishi, I. Saiki, *Cancer Lett.* **2002**, *187*, 121-127.
- 21 I. S. Zagon, K. A. Rahn, P. J. McLaughlin, *Neuropeptides* **2007**, *41*, 441-452.
- 22 P. Ecimovic, D. Murray, P. Doran, J. McDonald, D. G. Lambert, D. J. Buggy, *Br. J. Anaesth.* **2011**, *107*, 916-923.
- 23 A. W. Lipowski, S. W. Tam, P. S. Portoghese, *J. Med. Chem.* **1986**, *29*, 1222-1225.
- 24 P. S. Portoghese, M. Sultana, H. Nagase, A. E. Takemori, *J. Med. Chem.* **1988**, *31*, 281-282.
- 25 P. S. Portoghese, *TiPS* **1989**, *10*, 230-235.
- 26 T. G. Metzger, M. Germana Paterlini, P. S. Portoghese, D. M. Ferguson, *Neurochem. Res.* **1996**, *21*, 1287-1294.
- 27 K. Kawai, J. Hayakawa, T. Miyamoto, Y. Imamura, S. Yamane, H. Wakita, H. Fujii, K. Kawamura, H. Matsuura, N. Izumimoto, R. Kobayashi, T. Endo, H. Nagase, *Bioorganic Med. Chem.* **2008**, *16*, 9188-9201.
- 28 J. Szmuczkovicz, P. F. Von Voigtlander, *J. Med. Chem.* **1982**, *25*, 1125-1126.
- 29 J. A. H. Lord, A. A. Waterfield, J. Hughes, H. W. Kosterlitz, **1977**, *267*, 495-499.
- 30 L. D. Hughes, R. J. Rawle, S. G. Boxer, *PLoS ONE* **2014**, *9*, e87649.
- 31 V. M. Kolb, A. Koman, L. Terenius, *Life Sci.* **1983**, *33*, 423-426.
- 32 B. W. Madsen, C. L. Beglan, C. E. Spivak, *J. Neurosci. Methods* **2000**, *97*, 123-131.
- 33 A. G. Karaji, N. Khansari, B. Ansary, A. Dehpour, *Int. Immunopharmacol.* **2005**, *5*, 1019-1027.

- 34 T. Kshirsagar, A. H. Nakano, P.-Y. Law, R. Elde, P. S. Portoghese, *Neurosci. Lett.* **1998**, *249*, 83-86.
- 35 A. Chang, C. C. Chao, A. E. Takemori, G. Gekker, S. Hu, P. K. Peterson, P. S. Portoghese, *J. Med. Chem.* **1998**, *39*, 1729-1735.
- 36 P. J. Emmerson, S. Archer, W. El-Hamouly, A. Mansour, H. Akil, F. Medzihradsky, *Biochem. Pharmacol.* **1997**, *54*, 1315-1322.
- 37 R. A. Houghten, C. T. Dooley, J. R. Appel, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2004**, *14*, 1947-1951.
- 38 S. Arttamangkul, V. Alvarez-Maubecin, G. Thomas, J. T. Williams, D. K. Grandy, *Mol. Pharmacol.* **2000**, *58*, 1570-1580.
- 39 P. Dvořáková, P. Bušek, T. Knedlík, J. Schimer, T. Etrych, L. Kostka, L. Stollinová Šromová, V. Šubr, P. Šácha, A. Šedo, J. Konvalinka, *J. Med. Chem.* **2017**, *60*, 8385-8393.
- 40 J. M. Harris, *Poly(ethylene glycol) chemistry Biotechnical and Biomedical Applications* **1992**, Plenum Publishing Corporation
- 41 N. Chatterjie, C. E. Inturrisi, H. B. Dayton, H. Blumberg, *J. Med. Chem.* **1975**, *18*, 490-492.
- 42 Z. Guo, Z. Feng, L. Xu, X. Zhao, US8962647B1, **2015**.
- 43 P. S. Portoghese, F. Farouz-Grant, M. Sultana, A. E. Takemori, *J. Med. Chem.* **1995**, *38*, 402-407.
- 44 P. S. Portoghese, M. Sultana, W. L. Nelson, P. Klein, A. E. Takemori, *J. Med. Chem.* **1992**, *35*, 4086-4091.
- 45 N. T. Zaveri, *J. Med. Chem.* **2016**, *59*, 7011-7028.
- 46 D. J. Leaver, R. M. Dawson, J. M. White, A. Polyzos, A. B. Hughes, *Org. Biomol. Chem.* **2011**, *9*, 8465-8474.
- 47 K. Brunner, J. Harder, T. Halbach, J. Willibald, F. Spada, F. Gnerlich, K. Sparrer, A. Beil, L. Mockl, C. Brauchle, K. K. Conzelmann, T. Carell, *Angew. Int. Ed.* **2015**, *54*, 1946-1949.
- 48 A. Krief, M. Trabelsi, W. Dumont, M. Derock, *Synlett* **2004**, *10*, 1751-1754.
- 49 N. Chatterjie, C. E. Inturrisi, *J. Med. Chem.* **1975**, *18*, 490-492.
- 50 R. Rezale, T. S. Bailey, US2010/0036128A1, **2010**.

- 51 J. Perez, A. Q. Han, G. Kumaran, Y. Rotshteyn, WO2008/070462A2, **2008**.
- 52 M. S. Mohamed, P. S. Portoghese, *J. Org. Chem*, **1986**, *51*, 105-106.
- 53 L. M. Sayre, P. S. Portoghese, *J. Org. Chem*. **1980**, *45*, 3366-3368.
- 54 W. B. Mathews, C. M. Kinter, J. Palma, R. V. Daniels, H. T. Ravert, R. F. Dannals, J. R. Lever, *J. Labelled Cpd. Radiopharm*. **1999**, *42*, 43-54.
- 55 Y.-Y. Wang, Y.-K. Li, Y.-T. Su, C.-C. Hung, C.-H. Yao, US8816084B1, **2014**.
- 56 T. F. Gajewski, S. Spranger, M. Leung, WO2014/066834A1, **2014**.
- 57 G. A. Salman, A. Ali, M. Hussain, R. A. Khera, P. Langer, *Synthesis* **2011**, *11*, 2208-2214.
- 58 J. Coste, E. Frérot, P. Jouin, *J. Org. Chem*. **1994**, *59*, 2437-2446.