

**UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE**  
**PŘÍRODOVĚDECKÁ FAKULTA**

*KATEDRA ORGANICKÉ A JADERNÉ CHEMIE*

*DIPLOMOVÁ PRÁCE*

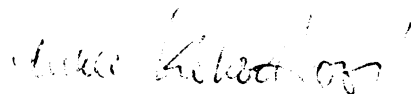
**Příprava a optimalizace syntézy trifunkčních metabolických  
konjugátů na bázi merkapturové kyseliny pro využití v radioterapii**

Praha 2006

Anna Kohoutová

Prohlašuji, že jsem tuto diplomovou práci vypracovala samostatně pod odborným vedením Mgr. Ladislava Drože, PhD., a že řádně cituji všechna převzatá data a skutečnosti.

V Praze 30. dubna 2007



Anna Kohoutová

# OBSAH

1. SEZNAM ZKRATEK A SYMBOLŮ.....	1
2. ÚVOD .....	2
3. CÍL PRÁCE.....	3
4. TEORETICKÁ ČÁST.....	4
4.1. Současný stav problematiky.....	4
4.1.1. Radioterapie.....	4
4.1.2. Imunoterapie.....	4
4.1.3. Cílená léčba.....	6
4.1.3.1. Mechanismus účinku.....	6
4.1.3.2. Specifické nosiče.....	6
4.1.3.3. Efektory.....	7
4.1.4. Radioimunoterapeutika.....	7
4.1.4.1. Monoklonální protilátka.....	8
4.1.4.2. Charakteristiky radionuklidů používaných v RIT.....	10
4.1.4.3. Bifunkční chelátory.....	12
4.1.4.3.1. Kritéria výběru BFC.....	13
4.1.4.3.2. Vývoj struktury BFC a dnes používané chelátorů.....	14
4.1.4.3.3. Současné způsoby přípravy acyklických chelátorů.....	15
4.1.4.3.4. Možné způsoby konjugace.....	17
4.1.4.4. Linkery.....	18
4.1.4.4.1. Důvody pro zavedení linkeru.....	18
4.1.4.4.2. Hodnocení zkoumaných linkerů.....	20
4.1.4.4.3. Používané linkery a způsoby jejich přípravy.....	22
4.2. Nastínění řešení.....	24
4.2.1. Konjugační komponenta.....	25
4.2.2. Bod větvení/jednotka větvení.....	26
5. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST.....	29
5.1. Obecné informace.....	29
5.2. Syntéza chelátoru.....	30
5.3. Syntéza konjugační komponenty.....	40
5.4. Syntéza linkeru.....	42
5.5. Reduktivní aminace – modelové substráty.....	47
6. DISKUZE.....	55
6.1. Příprava bifunkčního chelátoru na bázi substituované DTPA.....	55
6.1.1. Etapa I. Optimalizace podmínek redukce karboxamidické vazby.....	58
Etapa II. Zavedení nové strategie syntézy 9 bez použití redukce.....	60
6.1.2. Příprava penta-terc-butylesteru 1-(p-nitrobenzyl)dietyltri- pentaoctové kyseliny ( <b>10</b> ).....	61
6.1.3. Příprava penta-terc-butylesteru 1-(p-aminobenzyl)dietyltri- pentaoctové kyseliny ( <b>11</b> ).....	62

6.2. Příprava série heterobifunkčních linkerů.....	63
6.2.1. Příprava (N-sukcinimidyl)maleimidů třístupňovým sledem reakcí (Metoda A).....	66
6.2.2. Příprava esterů v jednom kroku (Metoda B).....	68
6.3. Konjugační komponenta – merkapturáty.....	69
6.4. Konjugace.....	70
6.4.1. Reduktivní aminace.....	71
6.4.2. Konjugace ve vodném a organickém prostředí za použití NaBH <sub>3</sub> CN.....	71
6.4.3. Reduktivní aminace za použití NaBH(OAc) <sub>3</sub> .....	72
6.4.4. Příprava konjugátů 1 a 2.....	73
<b>7. ZÁVĚR.....</b>	<b>76</b>
<b>8. CITACE – SEZNAM LITERATURY .....</b>	<b>78</b>
<b>9. KLÍČOVÁ SLOVA A ABSTRAKT.....</b>	<b>83</b>
<b>10. KEYWORDS AND ABSTRAKT.....</b>	<b>83</b>

## 1. SEZNAM ZKRATEK

b	široký
BFC	bifunkční chelátor
d	dublet
DCC	dicyklohexylcarbodiimid
EDA	ethylendiamin
EGFR	epidermální růstový faktor
HB	heterobifunkční
IgG	imunoglobulin G
HAMA	<u>h</u> uman <u>a</u> gainst <u>m</u> ouse <u>a</u> ntibody (anti-myší protilátka)
HMDS	hexamethyldisilazan
t	triplet
m	multiplet
mAb	monoklonální protilátka
q	kvintet
r.t.	laboratorní teplota
TAA	antigeny asociované s nádory
TSA	antigeny specifické pro nádory

## 2. ÚVOD

Více než 11 milionů lidí na světě ročně onemocní nějakým druhem nádorového onemocnění. Přes 6,5 milionu lidí na tato onemocnění zemře<sup>1</sup>. Tato nádorová onemocnění způsobují každý rok přes 12% celkových úmrtí. Představují druhou nejčastější příčinu úmrtí, a to i přes to, že se v této oblasti dosáhlo v posledních desetiletích obrovského pokroku. Rakovinná proliferace může postihnout téměř každou tkáň v těle. Nečastěji bývají zasaženy plíce, tlusté střevo, žaludek; u žen patří mezi nejčastější také rakovina prsu a děložního čípku<sup>1,2</sup>. Protože proti těmto onemocněním je známa pouze omezená prevence, je velice důležité zkoumat možnosti jejich léčby.

Z metod, které se v dnešní době nejčastěji uplatňují v klinické léčbě různých druhů malignit, lze zmínit především ablativní chirurgický zákrok, chemoterapii, hormonální léčbu a ozařování. Mezi nové a ambiciózní metody, které jsou v posledním desetiletí v popředí zájmu výzkumných skupin, patří především genová terapie a imunoterapie. Tyto způsoby léčby jsou pro svou selektivitu mnohem méně zátěžové pro organismus pacienta a zlepšují tak jeho kvalitu života po zákroku<sup>3,4</sup>.

Základní metody léčby se vhodně kombinují a doplňují. Každý ze zmiňovaných způsobů lze však použít jen do jisté míry. Všeobecnou snahou je šetrně odstranit co největší množství nádorových buněk. Proto vědci a lékaři věnují velkou pozornost zdokonalování dosud používaných způsobů léčby, optimalizaci operačních technik, zkoumání nových chemických látek a hledání zcela nových způsobů léčby.

Jedním ze způsobů léčby nádorových onemocnění je radioimunoterapie, která k odstranění rakovinných buněk využívá proudy elektromagnetického záření působícího přímo v místě rakovinného bujení. Molekuly určené k dopravení radioaktivního zářiče na místo určení jsou značené monoklonální protilátky. Pro jejich značení lze využít pouze omezeného množství radionuklidů, a proto se začaly využívat látky navázané na protilátku, schopné komplexovat širší spektrum radionuklidů. Příprava těchto látek - bifunkčních chelátorů - bývá náročná a často poskytuje neuspokojivé výtěžky. Nedostatkem jejich používání je kumulace radioaktivního metabolitu v detoxifikačních orgánech, které jsou pak dlouhou dobu poškozovány radioaktivním zářením.

Z výše uvedených důvodů se tato práce zabývá zjednodušením syntézy BFC, které by zpřístupnilo možnost přípravy většího množství těchto látek. Předkládaná práce zároveň přichází s návrhem trifunkčního aktivního systému, který by

zakomponováním specifického strukturního detoxifikačního parametru nesl další, v pořadí třetí informaci, která by mohla vést k usnadněnému vyloučení radioaktivního metabolitu z těla. Tím by tato práce mohla výrazně přispět k efektivnějšímu využití radioimunoterapeutik.

### 3. CÍL PRÁCE

Náplní předložené diplomové práce je navrhnout a připravit prototypovou molekulu trifunkčního metabolického konjugátu, kterou bude tvořit bifunkční chelátor, heterobifunkční linker a konjugační komponenta na bázi merkapturové kyseliny. Zavedení tohoto trifunkčního modelu do molekuly biologicky aktivního substrátu a komplexace s radionuklidem by mělo vést při biodistribuci v organismu ke změně poměru adresné a nežádoucí úrovně radioaktivity v nádoru a necílových orgánech.

Dílní kroky přípravy tohoto trifunkčního metabolického konjugátu jsou:

- a) Příprava bifunkčního chelátoru na bázi substituované DTPA.  
Etapa I. Optimalizace podmínek redukce karboxamidické vazby pomocí  $\text{BH}_3$ .THF.  
Etapa II. Zavedení nové strategie jeho syntézy bez použití redukce karboxamidické vazby.
- b) Příprava série heterobifunkčních linkerů na bázi aktivních esterů maleimidového typu s modulovanou délkou uhlíkového řetězce;
- c) Příprava reaktivních prekurzorů merkapturové kyseliny a nalezení podmínek pro jejich navázání do molekuly bifunkčního chelátoru;
- d) Příprava trifunkčního metabolického konjugátu spojením jeho jednotlivých částí (heterobifunkčního linkeru, aktivního prekurzoru merkapturové kyseliny a bifunkčního chelátoru) v jeden celek.

## 4. TEORETICKÁ ČÁST

### 4.1. Současný stav problematiky

#### 4.1.1. Radioterapie

Při ozařování je nádor vystaven proudu ionizujícího záření<sup>5</sup>, které poškozuje genetickou výbavu buňky; ta pak není schopná další proliferace<sup>4a</sup> a dochází tak ke zmenšení velikosti nádoru. Nejúčinněji působí záření při mitóze, tedy při vlastním dělení buněk. Důležitý je výběr typu záření, především jeho energie, tak aby bylo zasaženo co nejvíce nádorových buněk a zároveň co nejméně poškozena okolní somatická tkáň. Radioterapie nádoru se nejčastěji používá při léčbě solidních nádorů, v menší míře také pro léčbu leukémie<sup>4a</sup>.

Dalším důležitým faktorem, který ovlivňuje výsledek léčebného procesu, je způsob, jakým je pacient záření vystaven. Rozlišujeme vnější ozáření (pacient je ozářen z vnějšího zdroje), vnitřní ozáření (do blízkosti nádoru je implantován zářič ve formě drátku, kapsle nebo plíšku) a systémové ozáření (pacient přijme do těla radioaktivní materiál orálně či intravenózně)<sup>4a</sup>. Rozhodující vliv na účinnost radioterapie má i radiosenzitivita jednotlivých nádorů. Extrémně citlivé jsou nádory lymfatické tkáně a leukémie, naopak mezi nejméně radiosenzitivní nádory patří nádorová onemocnění mozku, svalové a pojivové tkáně.

Vedlejší účinky jsou do značné míry závislé na typu tkáně, která je ozařována<sup>4a</sup>. Mezi obecné negativní příznaky patří poškození kůže, ztráta ochlupení, únava, poruchy metabolismu, hemopoetického systému a neutropenie<sup>3a,6</sup>.

#### 4.1.2. Imunoterapie

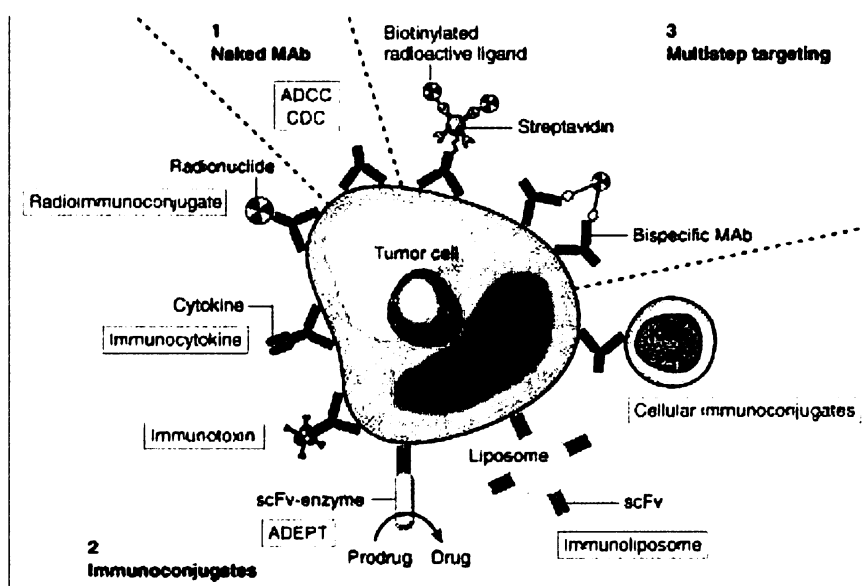
Doplňkovým a nově se rozvíjejícím způsobem léčby karcinomů, používaným především po odstranění nádorové masy, je imunoterapie. Je to léčebný postup založený na indukci protinádorové imunity nebo na využití imunitních mechanismů k cílenému směřování léčiv do místa nádoru.

Nádorové buňky se více či méně liší od normálních buněk, a proto by teoreticky měly být rozpoznány imunitními mechanismy a eliminovány. Odlišnosti od normálních buněk jsou však buď příliš malé, takže jsou imunitním systémem ignorovány, nebo nádorové buňky využívají mechanismy, které jim umožňují paralyzovat zbraně imunitního systému.



Základním předpokladem reakce imunitního systému s nádorovými buňkami je existence nádorově specifických povrchových antigenů, které umožňují imunitnímu systému jejich rozpoznávání. První takovou skupinou jsou antigeny specifické pro nádory (TSA), do níž patří proteiny, které se na normálních buňkách nevyskytují. Druhou skupinou tvoří antigeny asociované s nádory (TAA), což jsou antigeny, které se mohou vyskytovat i na normálních buňkách, liší se však kvantitou exprese.

Imunoterapie využívá k interakci s nádorovými buňkami monoklonálních protilátek proti nádorovým antigenům, na které jsou připojené toxiny, radioizotopy, nebo se k ovlivnění nádorové buňky využívá fyziologických funkcí samotných protilátek (opsonizace, indukce ADCC). Možnosti využití monoklonálních protilátek v protinádorové léčbě lze vidět na obrázku 1. Komplikací může být poškození somatických tkání (monoklonální protilátka je obvykle zaměřena proti TAA). Protilátka vyvolá vazbou na nádorový antigen indukci apoptózy nebo opsonizací aktivuje efektorové mechanismy imunity (fagocytózu).



Obr. 1<sup>8</sup>

Protilátky jsou v podstatě molekuly imunoglobulinů různých typů, nejčastěji však imunoglobuliny typu G (IgG), které nesou specifické receptory pro zcela malé části molekuly antigenu, zvané epitopy. Podle způsobu získávání a hlavně na základě jejich specifity rozlišujeme polyklonální a monoklonální protilátky. Polyklonální protilátky tvoří směs stovek až tisíců individuálně odlišných molekul imunoglobulinů s různou specifitou a schopností se vázat. Jsou produktem velkého počtu různých

klonů plazmocytů a reagují s řadou epitopů na jednom antigenu. Oproti tomu monoklonální protilátka vykazuje jednotnou specifitu k jedinému epitopu na antigenu<sup>7</sup>.

### **4.1.3. Cílená léčba**

#### **4.1.3.1. Mechanismus účinku**

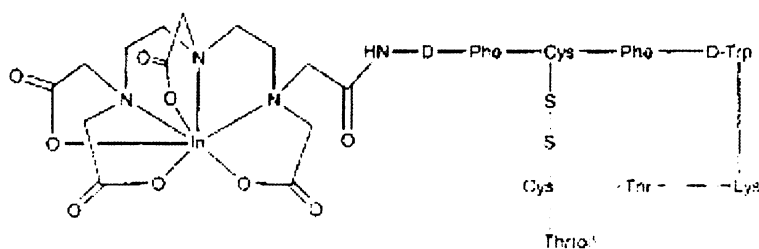
Mezi nejslibnější nové metody bezesporu patří cílená léčba. Její velikou výhodou je změna pohledu z obecné na molekulovou úroveň, tedy na buněčné a molekulové změny, které jsou pro nádorová onemocnění charakteristické. Cílená léčba využívá látky, které blokují růst a angiogenezi rakovinných buněk. Reagují se specifickými molekulami účastnicími se karcinogeneze (proces, při kterém se normální buňka stává karcinogení)<sup>4b</sup>. Způsobů, jak zamezit zhoubnému bujení, je několik. Můžeme se setkat s diferenciací terapií (násilné dozrání do podoby diferenciovaných buněk s malou či žádnou proliferací aktivitou, jejichž biologický cyklus je zakončen apoptózou), s ovlivněním receptoru pro epidermální růstový faktor EGFR (hraje klíčovou roli při proliferaci a rozsevu rakovinných buněk, s inhibicí tyrozinkináz (uplatňují se v procesech buněčného dělení, diferenciace a apoptózy) a s inhibicí cyklin-dependentních kináz (regulují postup buňky jednotlivými fázemi buněčného cyklu)<sup>9,10</sup>.

Účinná látka, která je při cílené léčbě vpravena do těla pacienta, obsahuje dvě složky: specifický nosič (část, která je zodpovědná za dopravení a navázání látky k nádoru) a efektor (část, která ovlivní nádor; terapeutická složka).

#### **4.1.3.2. Specifické nosiče**

Ve funkci doručovatele radioaktivity na místo určení pro terapeutické účely bylo za posledních 10 let použito nepřehledné množství radioaktivně značených substrátů. Mezi tyto substráty můžeme zařadit monoklonální protilátky<sup>11</sup> (tositumomab, ibritumomab - *Zevalin*, rituximab, gemtuzumab, alemtuzumab)<sup>8,10,12,13</sup>, jejich fragmenty<sup>14</sup>, onkofilní peptidy, (oktreotid<sup>11,15</sup>, lanreotid<sup>15</sup>, Tyr<sup>3</sup>-oktreotid<sup>16</sup>), peptidomimetika a receptorové ligandy nepeptidického charakteru<sup>11</sup>. V organismu se vážou selektivně na nádorový antigen a s ním vytvářejí pevné nekovalentní vazby. Díky vysoké specifitě takového nosiče působí terapeutická složka hlavně v oblasti nádoru. V současné době používaná kancerostatika s sebou přináší určitě

komplikace v podobě jejich zvýšené koncentrace v necílových orgánech, což značně omezuje jejich terapeutické využití. Riziko poškození necílových orgánů, především ledvin a jater, je ovlivněno zejména povahou a vlastnostmi radioaktivních metabolitů. Faktory, které mohou ovlivnit míru nežádoucích účinků, mohou být molekulová hmotnost, celkový náboj molekuly, způsob vylučování, stejně tak jako fyzikálně-chemická povaha radionuklidu.



<sup>111</sup>In-DTPA-oktreotid (OctreoScan)

Obr. 2 Příklad používaného léčiva

#### 4.1.3.3. Efektory

Jako efektory mohou být použity látky nebo fragmenty látek, jejichž hodnoty letální dávky jsou velmi nízké. Jejich cílem je účinně zasáhnout do klíčových mechanismů karcinogeneze<sup>10</sup>. Mezi tyto látky patří bakteriální a rostlinné toxiny (Diphtheria toxin, pseudomonal exotoxin, ricin A, saporin), cytotoxická léčiva (bleomycin, doxorubicin, chlorambucil) nebo komplex obsahující radionuklid (Ibritumomab tiuxetan /Zevalin/, Tositumomab /Bexxar/)<sup>12</sup>.

#### 4.1.4. Radioimunoterapeutika

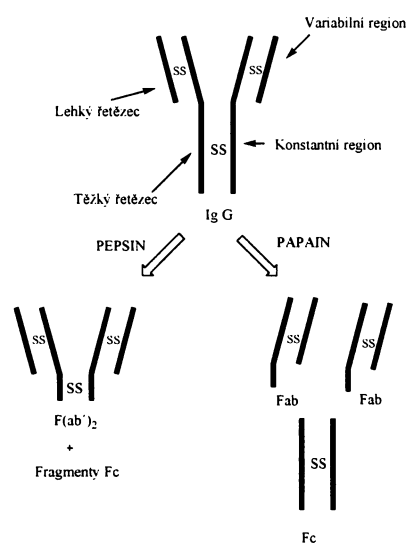
Mezi metody, které nabízejí široké spektrum použití, patří radioimunoterapeutická léčba pomocí radioimunoterapeutik. Jedná se o metodu založenou na spojení principů radioterapie a imunoterapie. Využívá jak imunitních mechanismů lidského organismu, tak i výkonného elektromagnetického záření jako zdroje usmrcení proliferujících buněk.

Výkonnou složku zde představuje radionuklid. Specifickým nosičem je potom monoklonální protilátka nebo onkofilní peptid. Nejdůležitějšími požadavky na cílené radioterapeutikum jsou rychlá a vysoká zadrž v nádoru, vysoký poměr koncentrace léčiva v nádoru proti necíleným tkáním v organismu, přiměřená doba setrvávání v nádoru i těle pacienta a rychlé vylučování metabolitů ledvinami. Díky kumulaci

radioléciva v nádoru a snadnému vylučování ledvinami by tak zůstaly somatické tkáně (ledviny, játra a kostní dřeň) ušetřeny nežádoucích účinků radioaktivity<sup>15</sup>. Výše uvedená charakteristika je popisem chování ideálního radioimmunoterapeutického preparátu. Klinická praxe a biodistribuční studie na zvířatech ukazují, že k objevení jeho optimalizované struktury povede i přes značný pokrok a objevy v této disciplíně ještě dlouhá cesta.

#### 4.1.4.1. Monoklonální protilátka

Krátce po úspěšných pokusech využívajících protilátku (směs imunoglobulinů) pro diagnostické účely<sup>17</sup> využil Bale v roce 1960 protilátku jako nosič radioaktivity do blízkosti nádoru<sup>18</sup>. Na tuto průkopnickou práci navázala řada dalších autorů a již v sedmdesátých letech byly publikovány práce zabývající se fragmenty imunoglobulinů a jejich terapeutické aplikace<sup>19,20</sup>. Pro obtížnost získávání čistých protilátek ze séra se výzkum zaměřil na využívání monoklonálních protilátek, které mohou být získány chemicky homogenní a vykazují konstantní aviditu k určitému epitopu. Pro imunoterapeutické účely začaly být monoklonální protilátky využívány na začátku 80. let<sup>21</sup>.



Obr. 3 Fragmentace imunoglobulinu G

Za účelem snížení retenční doby radioznačené protilátky v těle a poměru adresné a nežádoucí hladiny radioaktivity byly intenzivně zkoumány jednotlivé fragmenty imunoglobulinů<sup>14</sup> (viz. obrázek 3). Zatímco celá protilátka (150 kDa) je metabolizována v játrech a retikuloendotelovém systému, Fab fragment, vznikající

působením papsinu na intaktní molekulu imunoglobulinu a dosahující hmotnosti pouhých 50 kDa, setrvává v těle znatelně kratší dobu a následně je z těla vylučován ledvinami<sup>21,22,23,24</sup>. Nevýhodou těchto fragmentů oproti *divalentním* intaktním imunoglobulinům je slabší vazba na epitop, neboť disponují pouze jedním vazebným místem. Dále bylo zjištěno, že fragment Fc protilátek myšního původu nejčastěji způsobuje tvorbu HAMA protilátek, které jsou zodpovědné za alergické reakce<sup>25,26</sup>. Jako optimální se ukázala být struktura fragmentu označovaného F(ab')<sub>2</sub>, který je možno získat působením pepsinu na molekulu intaktního imunoglobulinu. Ten se vylučuje dostatečně snadno a rychle a dokáže uspokojivě doputovat k buňce nádoru a díky zachování divalence se internalizovat<sup>27,28</sup>.

Je známa celá řada monoklonálních protilátek nebo jejich fragmentů, které vykazují uspokojivou aviditu i specifitu k epitopům nádorových buněk. Vlastnosti fragmentů protilátek porovnává tabulka 1.

	<b>Celý Ig</b>	<b>F(ab')<sub>2</sub></b>	<b>Fab'</b>	<b>Fc</b>
<b>Přibližná MW (kD)</b>	<b>150</b>	<b>100</b>	<b>50</b>	<b>40-50</b>
<b>Biologický poločas v krvi</b>	<b>2 - 3 dny</b>	<b>1 den</b>	<b>hodiny</b>	<b>hodiny</b>
<b>Metabolizující orgán</b>	<b>játra</b>	<b>játra</b>	<b>ledviny</b>	<b>ledviny</b>
<b>Relativní koncentrace v nádoru<sup>a</sup></b>	<b>xxx</b>	<b>xx</b>	<b>x</b>	<b>x</b>

<sup>a</sup> Seřazeno od nejvyšší (xxx) po nejnižší (x) hodnotu.

*Tabulka 1 - Srovnání důležitých vlastností fragmentů anti-CEA Ig používaného pro léčbu rakoviny tlustého střeva.<sup>29</sup>*

Některé nádory jsou pro mAb nebo jejich fragmenty těžko dosažitelné, například pro špatné prokrvení postižené tkáně<sup>30</sup>. Proto se v některých případech (přítomnost peptidových receptorů v nádorových buňkách)<sup>31</sup> jako specifické nosiče používají známé malé peptidy (oktreotid, lanreotid) nebo peptidomimetika.

Bylo zjištěno, že nízkomolekulové onkofilní peptidy a fragmenty nižší molekulové hmotnosti se odbourávají převážně v ledvinách<sup>24</sup>. Díky jejich relativně malé velikosti jsou transportovány přes bazální membránu glomerulární filtrací.

Protože je tato membrána záporně nabitá, procházejí peptidy se síťově rozptýleným kladným nábojem snáze. V proximálních tubulech se peptidy a proteiny reabsorbují. Vážou se na negativně nabité megalinové receptory a jsou endocytozou transportovány do lysozomů, kde jsou štěpeny proteolytickými hydrolázami. Vzniklé metabolity jsou následně odstraněny spolu s ostatními odpadními produkty látkové výměny do moči nebo jsou transportovány zpět do krevního oběhu. Aminokyselinový metabolit s navázaným chelátem obsahujícím radionuklid však zůstává internalizován díky své vysoké hydrofilite uvnitř lumenální buňky proximálních tubulů. Nakumulovaná radioaktivita potom v ledvině způsobuje nefropatii<sup>24,28,32,33</sup>.

Vysycením megalinových receptorů, zodpovědných za zpětnou resorpci aminokyselin a nízkomolekulárních peptidů, lze v některých případech úspěšně nefropatii předcházet. Ke snížení renální retence radioaktivních metabolitů, navázaných na peptidický řetězec nebo aminokyselinu, dochází po intravenózním podání roztoků směsi bazických aminokyselin (arginin, lysin)<sup>16,24,32,33,34,35</sup>. Pro dosažení tohoto efektu je však třeba velmi vysokých koncentrací roztoků podávaných aminokyselin, což má za následek zdravotní obtíže pacientů, např. nauzeu, srdeční arytmií a hyperkalemii<sup>32,33</sup>.

#### ***4.1.4.2. Charakteristiky radionuklidů používaných v radioimunoterapii***

Úspěch radioterapeutického postupu závisí především na výběru radionuklidu. Jeho důležitými charakteristikami jsou poločas rozpadu, specifická aktivita, typ a energie záření, dostupnost a možná kvalita. Zároveň jsou však důležité i vlastnosti chelátoru, který bude radionuklid komplexovat<sup>11,36</sup>. Mezi radionuklidy jsou nejintenzivněji zkoumány lanthanoidy, <sup>90</sup>Y a <sup>67</sup>Cu, neboť mají podobnou koordinační chemii, a způsob chelatace a koordinace je uspokojivě rozvinut a pochopen<sup>11,36,37</sup>.

Fyzikální poločas rozpadu by měl korespondovat s biologickým poločasem rozpadu radiofarmaceutika. Jestliže bude poločas rozpadu radionuklidu příliš krátký, na cílové místo se dostane nedostačující dávka; je-li naopak poločas příliš dlouhý, způsobí zbytečné ozáření somatických tkání. Je rozumné vybírat z prvků, jejichž poločas rozpadu se pohybuje mezi 10 hodinami a 10 dny<sup>11,36</sup>. Pokud je nádor dobře prokrven a tedy snadněji přístupný léčivu, postačí radionuklid s kratším poločasem rozpadu.

Pro diagnostiku jsou vhodné zářiče  $\gamma$ , protože  $\gamma$  scintigrafie patří mezi běžné diagnostické metody<sup>37</sup>. Pro radioterapii můžeme používat jak  $\alpha$  tak  $\beta^-$  zářiče. Zářiče  $\alpha$  mají dobré cytotoxické vlastnosti, zejména jsou-li dopraveny a internalizovány v nádoru, neboť poskytují vysokoenergetické záření do vzdálenosti 50  $\mu\text{m}$ , což představuje vzdálenost odpovídající přibližně dvěma buněčným poloměrům. Jejich nevýhodou však je, že se často rozkládají na nestabilní, radioaktivní dceřiné prvky ( $^{211}\text{At} \rightarrow ^{211}\text{Po} \rightarrow ^{207}\text{Bi}$ )<sup>11,38</sup>. Proto je vhodné volit pouze ty radionuklidy, které poskytují stabilní dceřiné prvky.

Radionuklid <sup>a</sup>	Poločas rozpadu	Typ záření (MeV)	Maximální dolet částic
$^{67}\text{Cu}$	2,58 d	$\beta^-$ (0,54), $\gamma$ (0,185)	1,8 mm
$^{90}\text{Y}$	2,67 d	$\beta^-$ (2,28)	12,0 mm
$^{99\text{m}}\text{Tc}^{\text{b}}$	6,0 h	$\gamma$ (0,141)	
$^{111}\text{In}^{\text{b}}$	2,83 d	$\gamma$ (0,245)	
$^{177}\text{Lu}$	6,7 d	$\beta^-$ (0,497), $\gamma$ (0,208)	1,5 mm
$^{186}\text{Re}$	3,77 d	$\beta^-$ (1,08), $\gamma$ (0,131)	5,0 mm
$^{188}\text{Re}$	16,95 h	$\beta^-$ (2,13), $\gamma$ (0,155)	11,0 mm
$^{212}\text{Bi}$	1 h	$\alpha$ (7,8), $\gamma$ (0,72)	70 $\mu\text{m}$

<sup>a</sup> Charakteristiky radionuklidu použité z literatury<sup>36</sup>, pokud není uvedeno jinak

<sup>b</sup> Charakteristiky radionuklidu použité z literatury<sup>37</sup>

Tabulka 2 Charakteristiky vybraných radionuklidů

Nejčastěji se pro terapii používají prvky, které poskytují  $\beta^-$  záření, například  $^{131}\text{I}$ ,  $^{186}\text{Re}$ ,  $^{111}\text{Ag}$ ,  $^{67}\text{Cu}$  a  $^{90}\text{Y}$ . Z této skupiny nejčastěji používaný  $^{131}\text{I}$  má jednu výraznou nevýhodu, a tou je přítomnost velkého podílu velmi pronikavého  $\gamma$  záření. To představuje velkou zátěž pro tělo pacienta, zvláště pak pro kostní dřeň. Používání

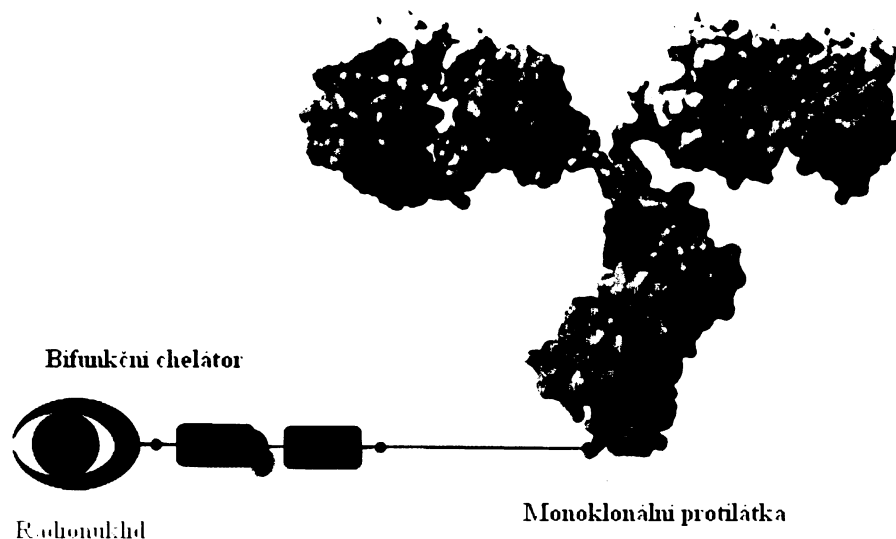
ostatních prvků z této skupiny by tuto zátěž zmírnilo, protože podíl  $\gamma$  záření je u nich výrazně snížen.

Záření emitované  $^{90}\text{Y}$  má vysokou energii s nulovým podílem  $\gamma$  záření. Samotné yttrium má však tendenci se usazovat v kostní dřeni, což může představovat jisté omezení, neboť při *in vivo* aplikaci může docházet k disociaci nebo transchelataci komplexu chelátoru s radionuklidem<sup>36</sup>.

V dnešní době se terapeuticky používá řada izotopů, ačkoli všechny nespĺňují požadovaná kritéria:  $^{67}\text{Cu}$ ,  $^{90}\text{Y}$ ,  $^{99\text{m}}\text{Tc}$ ,  $^{111}\text{In}$ ,  $^{177}\text{Lu}$ ,  $^{186}\text{Re}$ ,  $^{188}\text{Re}$  a  $^{212}\text{Bi}$ <sup>11</sup>. Některé jejich vlastnosti jsou uvedené v tabulce 2. Mezi nejslibnější prvky by mohly patřit  $^{111}\text{Ag}$  (podíl  $\gamma$  záření asi 7%) nebo  $^{186}\text{Re}$  ( $\gamma$  záření asi 16%)<sup>36</sup>.

#### 4.1.4.3. Bifunkční chelátory

V dnešní době se používají pro komplexaci radionuklidů tzv. bifunkční chelátory (BFC). Poprvé navrhl koncept bifunkčního chelátoru Sunberg v roce 1972<sup>38</sup>.



Obr. 4 Znárodnění vlastností BFC

Bifunkčnost je zajištěna dvěma různými funkčními skupinami, určenými k navázání na specifický nosič a k silné kovalentní koordinaci radionuklidu (viz obrázek 4).



#### 4.1.4.3.1. Kritéria výběru BFC

V dnešní době je používáno mnoho různých BFC a na jejich volbě často spočívá velká část terapeutického úspěchu. Výběr BFC je značně závislý na povaze a oxidačním čísle radionuklidu. V medicíně nejčastěji používané lanthanoidy mají zpravidla oxidační číslo III+ a koordinační číslo 8 – 9 nebo méně často 10. Termodynamická stabilita vzniklého komplexu je velmi důležitá, neboť volné kationty lanthanoidů jsou toxické a ukládají se v zubech a kostech<sup>39</sup>. Pro komplexaci těchto radionuklidů se proto s oblibou používají oktadentátní chelátory. Různé radionuklidy mají odlišnou koordinační chemii a vyžadují proto BFC s různými donorovými atomy.

Ligand	Gd <sup>12,15,20</sup>	In <sup>13,14</sup>	Y <sup>16,18,20</sup>	Cu <sup>13</sup>	Lu <sup>17,19,20</sup>	Sm <sup>19,20</sup>	Ga <sup>14</sup>
EDTA	14,7 <sup>a</sup>	22,1 <sup>a</sup>	-	15,9 <sup>a</sup>	19,8	17,1	21
DTPA	17,7 <sup>a</sup>	24,6 <sup>a</sup>	18,4 <sup>a</sup>	17 <sup>a</sup>	22,6	22,4	24,3
p-NO <sub>2</sub> Bn-DOTA	24,2	-	23,9	-	24,5	-	-
DOTA	25,3 <sup>a</sup>	23,9	22,4	-	25,4	23,15	21,3
TETA	14,7	21,9	14,8	12,6 <sup>a</sup>	15,3	14,5	19,7

<sup>a</sup> hodnoty odpovídají pH = 6,7, u ostatních hodnot autoři pH neuvádějí

<sup>b</sup> měřeno v roztocích s inotovou silou 0,1

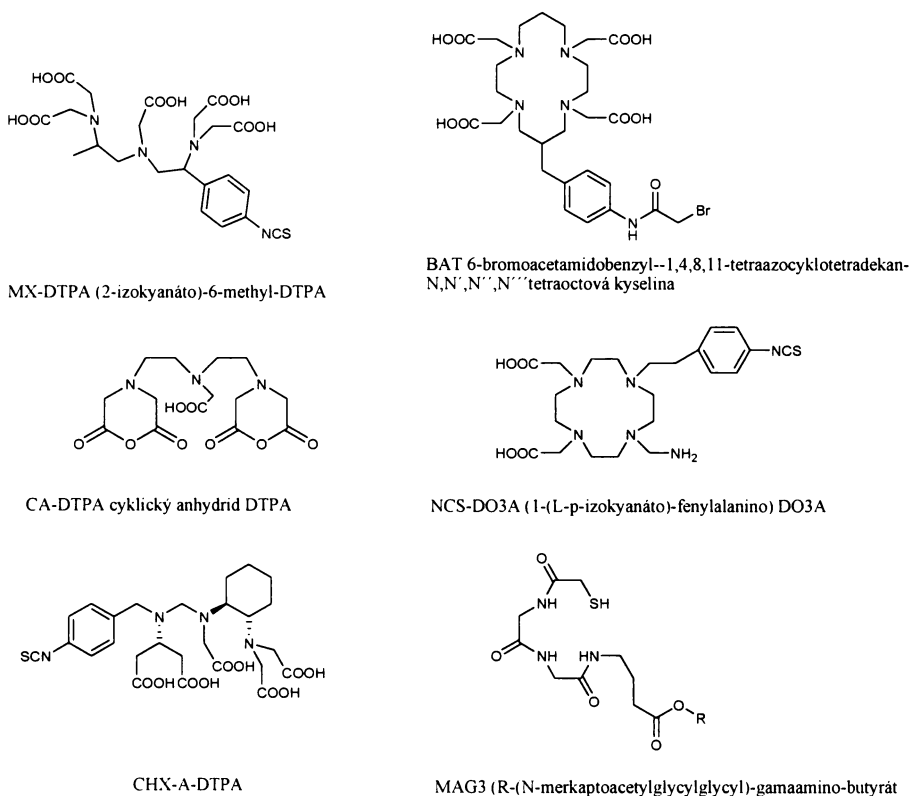
Tabulka 3 Srovnání konstant stability pro vybrané prvky a chelátory<sup>b</sup>

BFC můžeme rozdělit do dvou významných skupin, a to na lineární a makrocyclické. Liší se zejména kinetickou a termodynamickou stabilitou komplexů. Z tabulky konstant stability (viz tabulka 3) je zřejmé, že acyklické chelátory tvoří komplexy rychleji, ale radionuklidy vážou méně pevnou vazbou. Makrocyclické chelátory bývají konformačně rigidnější a jejich schopnost při komplexaci iontu přejít na vhodnou konformaci, potřebnou pro zachycení iontu, je omezena. Výsledkem toho je, že komplexace bývá pomalejší, což vzhledem k poločasů rozpadu některých radioaktivních izotopů může být překážkou. Z tohoto důvodu je kinetická stabilita jedním z hlavních kritérií při výběru vhodného chelátoru pro určitý izotop<sup>39</sup>. Rychlost

komplexace je možné urychlit zahřátím na vyšší teploty, v případě malých peptidů po dobu několika minut až na 90°C. Zvýšení teploty při komplexaci je ale limitující pro tvorbu imunokonjugátů s protilátkami, neboť většina protilátek denaturuje při teplotě kolem 40°C.

Výběru vhodného chelátoru je proto třeba věnovat velkou pozornost. V biomedicíně jsou široce rozšířené poly-amino-poly karboxylové chelátory s vysokou vazebností, které uspokojivě komplexují široké spektrum radionuklidů.

Základními požadavky na BFC je stabilita (musí být schopen přestát velké dávky elektromagnetického záření, které způsobuje tvorbu volných radikálů), vysoká hydrofilita (umožňuje bezproblémový metabolismus a exkreci), nízká schopnost tvorby izomerů a snadné připojení k makromolekule či linkeru<sup>11</sup>. V neposlední řadě je brán ohled i na ekonomické hledisko syntézy, protože současné radioimunokonjugáty bývají připravovány obtížnou mnohastupňovou syntézou, která poskytuje jen nízké výtěžky. Proto se velké úsilí věnuje zefektivnění přípravy BFC a jejich značení<sup>40</sup>.



Obr. 5 Příklady používaných BFC

#### 4.1.4.3.2. Vývoj struktury BFC a dnes používané chelátory

Jako první chelatační činidla použitá pro konjugaci s biologicky aktivním substrátem za současné komplexace radionuklidu byly navrženy deriváty C-

substituované EDTA. Z hlediska termodynamické a kinetické stability, kdy vznikající cheláty využívaly pro komplexaci čtyř acetátových skupin a dvou terciárně substituovaných dusíkových atomů, byly však shledány díky své omezené stabilitě *in vivo*, především pak v krevní plazmě, jako nevyhovující. C-substituovaný motiv EDTA byl následně nahrazen C-substituovanou DTPA. Mezi nejpoužívanější chelatační činidla patřila CA-DTPA, využívající ke kovalentní vazbě na protilátku acylaci jedné z aktivovaných karboxylových funkcí. Tím byla snížena stabilita komplexu *in vivo*, neboť ke komplexaci nuklidu byly využity opět jen 4 acetátové skupiny a 3 terciárně substituované dusíkové atomy. Za účelem snížení disociace radionuklidu z komplexu byla navržena páteřně substituovaná DTPA<sup>41,42</sup>. Touto modifikací se podařilo připravit řadu strukturně odlišných BFC (viz obrázek 5).

I když je afinita radiokovu k těmto ligandům velmi vysoká, stále nestačí ke kompletní inhibici transchelatačních reakcí s transferrinem, které nesou zodpovědnost za některé případy kumulace radionuklidu v játrech, v kostní dřeni či jiných tkáních<sup>43</sup>.

#### **4.1.4.3.3. Současné způsoby přípravy acyklických chelátorů**

Chelatace radionuklidu pomocí bifunkčních chelátorů se v klinické praxi s úspěchem využívá od počátku 90. let. Zvláště důležitá je pro ty nuklidy, kterými není možno značit samotnou protilátku přímo: <sup>67</sup>Cu, <sup>90</sup>Y, <sup>111</sup>In, <sup>177</sup>Lu, <sup>186</sup>Re, <sup>188</sup>Re a <sup>212</sup>Bi<sup>36</sup>. Syntéza BFC je však často komplikovaná. 10ti a vícestupňové syntézy nejsou výjimkou a výtěžky bývají často neuspokojivé<sup>44</sup>. Nároky na čistotu preparátů jsou přitom enormní. Proto je třeba hledat způsoby, jak syntézu těchto důležitých látek zefektivnit a zpřístupnit tak jejich využití širší veřejnosti.

Tato práce se zabývá přípravou modelového chelátoru na bázi 1B-DTPA, jehož aktivní derivát SCN-Bn-DTPA prvně popisuje Brechbiel<sup>44</sup>. Představuje tak první páteřně substituovaný derivát DTPA, který byl syntetizován za účelem lepší kinetické a termodynamické stability komplexu s radionuklidem.

Syntéza popsaná Brechbielem spočívá v reakci methylesteru p-nitrofenylalaninu s ethylendiaminem, redukci vzniklého amidu, následné karboxymethylaci a modifikaci aromatické funkční skupiny (viz schéma 1).

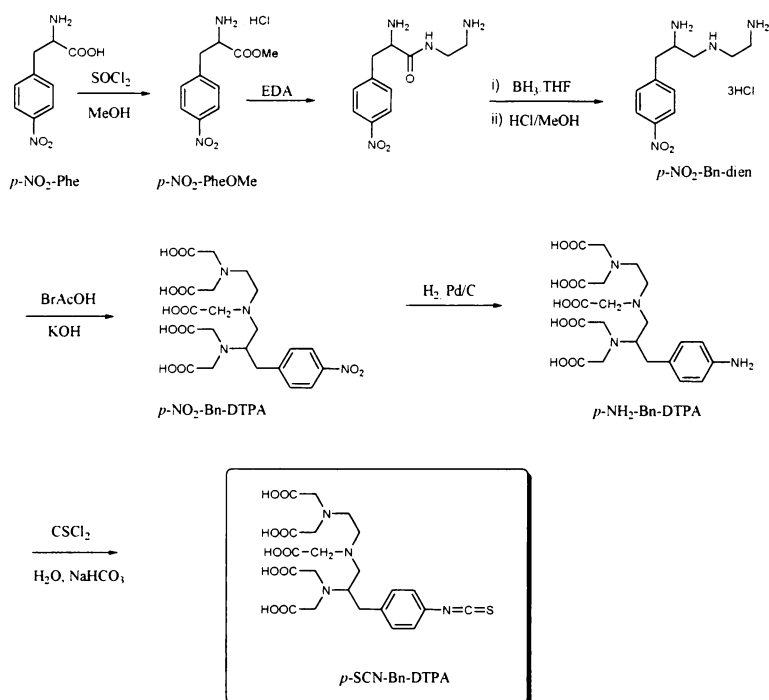


Schéma 1 Syntéza SCN-Bn-DTPA zavedená v r. 1986 Brechbielem<sup>44</sup>

Autor popisuje jako klíčový krok karboxymethylaci substituovaného hydrochloridu diethylentriaminu ( $p\text{-NO}_2\text{Bz-dien}$ ) ve výtěžku 35%, provedenou za použití bromoctové kyseliny a hydroxidu draselného při  $\text{pH} = 9 - 10$ . Ačkoli se podařilo připravit zmíněný chelátor, celkový výtěžek byl velice nízký (19%, ~ 200mg) a syntéza se neobešla bez opakovaného čištění pomocí preparativní HPLC (RP C18- gradientová eluce) a ionexové chromatografie (katex i anex). Další velkou nevýhodou této navržené syntézy je provedení vlastního redukčního kroku pomocí roztoku boranu v THF. Tento způsob sami autoři považují za náročný a nebezpečný. K získání dobrého výtěžku redukce je zapotřebí použít až 12ti násobného ekvivalentu jedovatého a na vzduchu samozápalného 1 M roztoku  $\text{BH}_3\cdot\text{THF}$ . Tento krok je také spojen s použitím a zpracováním relativně velkých objemů při miligramových navážkách. Redukční činidlo je sice komerčně dostupné, ale je také relativně velmi drahé (1586 Kč-100ml)<sup>44a</sup> a skladováním podléhá rozkladu.

Další práce publikovaná Mearesem v roce 2000 doznává značných zlepšení<sup>40</sup>. Autoři uvádějí úhrnný výtěžek syntézy 75% oproti původním 19%. Klíčový krok, karboxymethylace byla prováděna pomocí *tert*-butyl bromacetátu, DIEA a jodidu draselného v bezvodém dimethylformamidu. Redukční krok zde zůstává zachovaný v nezměněné podobě.

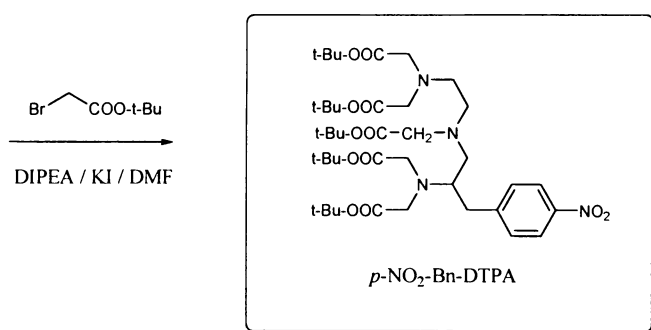
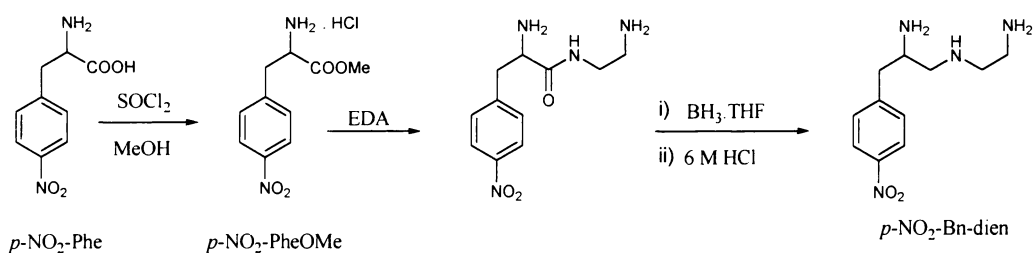


Schéma 2 Klíčová část syntézy chelátoru na bázi DTPA z r. 2000<sup>40</sup>

#### 4.1.4.3.4. Možné způsoby přímé konjugace

Vedle termodynamické a kinetické stability komplexu rozhoduje o úspěchu využití i způsob, jakým je BFC konjugován s biomolekulou. Protože reaktivními centry biologicky aktivním substrátu bývají zpravidla nukleofilní atomy síry a dusíku na sirmých (HS-), resp. dusíkatých funkcích (H<sub>2</sub>N-)<sup>39</sup>, bývají aktivní funkční skupiny BFC voleny tak, aby byly schopné se s těmito atomy konjugovat. Se slabě nukleofilní sírou v podobě thiolových skupin může reagovat mírně elektrofilní maleimid (A)<sup>43</sup> nebo aktivovaný alkyl bromid (B)<sup>45</sup> (viz schéma 3).

Větší zastoupení má však ve struktuře biomolekul volná NH<sub>2</sub> skupina, proto byla navržena řada způsobů pro konjugaci právě s aminoskupinou. Mezi nejefektivnější a nejčastěji zaváděné způsoby konjugace patří vznik amidické vazby (C)<sup>46</sup>, která vzniká reakcí aktivního esteru jedné karboxylové skupiny chelátoru s aminoskupinou bimolekuly. Další možností je vznik thiomocovinového můstku vytvořeného z isothiokyanátové skupiny chelátoru (D)<sup>47,48</sup>.

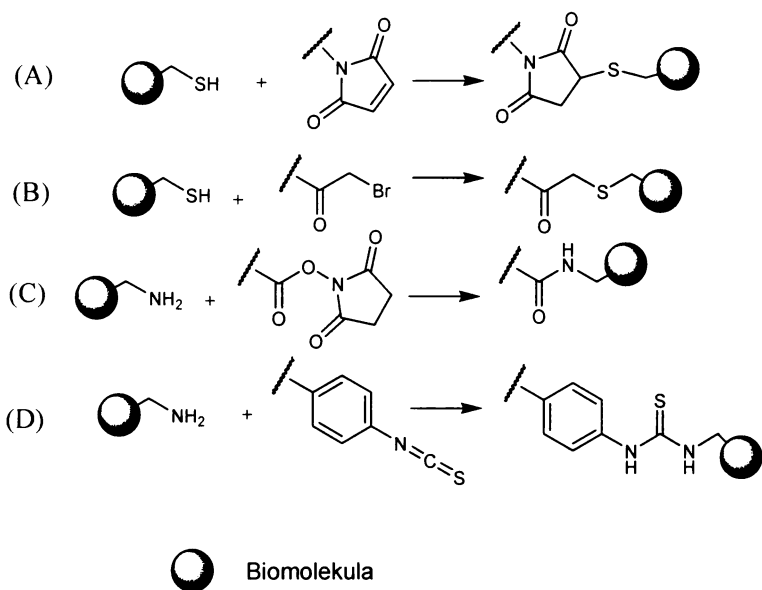


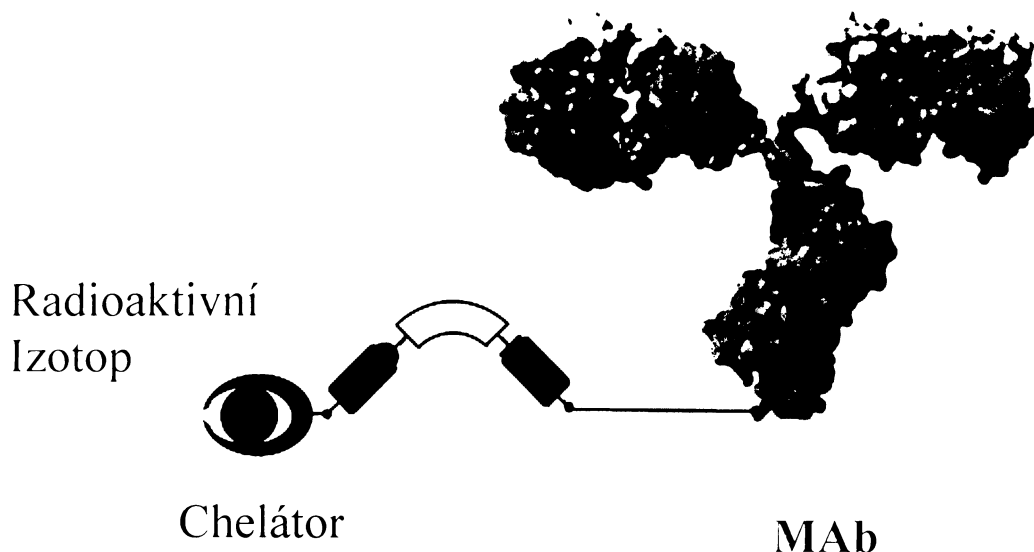
Schéma 3 Příklady konjugace chelátoru s dusíkatými a sirnými funkcemi biomolekuly

#### 4.1.4.4. Linkery

##### 2.1.4.4.1. Důvody pro zavádění linkeru

Vysoká a přetrvávající radioaktivita detekovaná v játrech a ledvinách představuje jeden z hlavních problémů praktického a bezpečného využití radiokonjugátů<sup>50</sup>. Konjugáty jsou v organismu, jako cizorodé látky, postupně odbourávány na menší metabolity. Jejich přítomnost byla prokázána například v jaterních a ledvinových lysozómech. Intracelulární chování radiometabolitů, uvolněných z polypeptidů po lysozomální proteolýze v hepatocytech a lumenárních buňkách, hraje klíčovou roli pro posouzení míry nežádoucích účinků daného imunokonjugátu<sup>51,52,53</sup>.

Snaha minimalizovat nebo zcela odstranit nežádoucí kumulaci radioaktivních metabolitů v necílových orgánech proto představuje jeden z hlavních cílů současného výzkumu. Jednou z možností, jak nežádoucí radiační zátěž necílových tkání a orgánů minimalizovat, je zavedení tzv. vhodně metabolizovatelného bifunkčního nebo heterobifunkčního linkeru (viz obr. 6).



*Obr. 6 Obecné schéma trifunkčního konjugátu*

Metoda využívá rozdílné enzymatické výbavy maligních a somatických buněk. V nádoru tak může chybět enzym, který by zmíněný linker štěpil, avšak ve zdravé tkáni může být tento enzym aktivní. Pokud je radiokonjugát odbourán somatickými buňkami, je část nesoucí zářič odštěpena a následně podléhá metabolizaci. Výsledný nízkomolekulární polární zbytek je potom snadno eliminačními procesy vyloučen z organismu močí<sup>50</sup>.

Obecně jsou na volbu vhodného metabolizovatelného linkeru kladeny dva základní požadavky:

- 1) Inertnost v chování linkeru po dobu cirkulace v krevním řečišti a během navázání a působení konjugátu v nádoru;
- 2) snadná metabolizace po odeznění farmakoterapeutického účinku na snadno exkretovatelné metabolity.

První práce, opírající se o využití metabolizovatelného spojení, byly publikovány v osmdesátých letech minulého století Hassemanem<sup>23,50</sup>. Od té doby bylo publikováno mnoho prací, které se zabývají chováním a vlastnostmi celé řady linkerů. Zavedením metabolizovatelného spojení bylo dosaženo zlepšení metabolizace a snížení retence radioaktivity v necílových orgánech. Bohužel je toto snížení ve většině případů vykompenzováno snížením koncentrace cílené radioaktivity v nádoru.

Jako příklad takových linkerů je možné uvést zavedení jednoduchých alifatických řetězců, které zvyšují lipofilitu konjugátu, nebo naopak využití vhodných, empiricky zjištěných sekvencí peptidů pro zvýšení hydrofility a vylučování z ledvin. Naproti tomu využití polyethylenglykolových fragmentů zase způsobuje zpomalení vylučování z hepatocytů<sup>11</sup>.

#### **4.1.4.4.2. Hodnocení zkoumaných linkerů**

a) Thiomočoviny: Tento linker někteří autoři řadí ke stabilním linkerům, nepředpokládají tedy jeho snadné štěpení<sup>54,55</sup>, vedoucí ke snížení retence v tkáních. Zavedení tohoto spojení mezi chelátor a biomolekulu je přesto výhodnější než přímé spojení těchto dvou komponent<sup>50,56</sup>.

Při srovnávání s některými nově navrženými linkery se však prokazuje jeho delší retence v krvi i ostatních tkáních<sup>57</sup>. Tento můstek je často používán jako srovnávací, neboť je v praxi často využíván ke konjugaci s protilátkou<sup>58,59,60</sup> a jeho chování v organismu je relativně dobře prozkoumáno. Ve většině prací nevyznívá jeho hodnocení příznivě, neboť se autoři pokoušejí navrhnout spojovací můstky se sníženou retencí v organismu. Zatím však nebyl nalezen linker s optimálními vlastnostmi: s nízkou retencí v necílových orgánech a s nezměněnou internalizací do nádoru.

b) Disulfidický: Zavedením disulfidického můstku byla pozorována rychlejší clearance z krve a jater, avšak také výrazné snížení hladiny radioaktivity v nádoru. To je pravděpodobně důsledkem výměnných reakcí mezi disulfidickou vazbou v konjugátu a sulfhydrylovými funkcemi v plazmě<sup>61,62</sup>, nebo možným předčasným štěpením tohoto můstku<sup>28,54,56</sup>. Sulfhydrylové skupiny vznikajícího metabolitu také pravděpodobně způsobují pozorovanou zvýšenou kumulaci v ledvinách<sup>23,56</sup>.

c) Diesterový: Tento linker označuje většina autorů za jeden z nejvhodnějších<sup>50,54,56,63</sup>. Hladina radioaktivity v nádoru zůstává téměř nezměněna oproti konjugátu bez použití linkeru<sup>23</sup>. Retence radioaktivity v játrech, krvi a ostatních tkáních je přitom výrazně nižší<sup>54</sup>. Nedostatkem tohoto spojení zůstává mírně zvýšená kumulace v ledvinách, kterou pozorovaly některé výzkumné skupiny. V tomto bodě se však literatura rozchází, někteří autoři uvádějí sníženou retenci v ledvinách<sup>56</sup>. Všeobecně jsou zkušenosti autorů s používáním esterové vazby v linkeru rozdílné.



d) Thioéterový: Toto spojení je řadou autorů považováno za celkem vhodné pro terapeutické využití. Jeho zavedení výrazně neovlivňuje internalizaci konjugátu v buňkách nádoru, snížení radioaktivity v necílových orgánech však není příliš významné<sup>50</sup>.

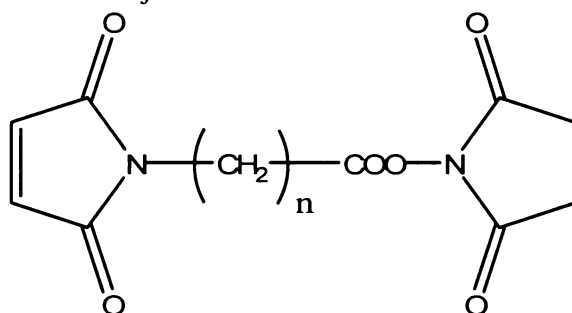
e) Peptidický: V oblasti zkoumání linkeru na bázi peptidů byla publikována řada prací, které zkoumaly vliv různých peptidických sekvencí na metabolismus konjugátů. Jedním z prvních objevených peptidických spojení byl tetrapeptid Ala-Leu-Ala-Leu, o němž je známo, že je štěpen jaterními peptidázami<sup>64</sup>. Ukázalo se, že peptidový linker se v játrech kathepsinem B opravdu metabolizuje. Dochází přitom ke vzniku <sup>111</sup>In-EDTA- *p*-benzylamido-Leu-Ala radioaktivního metabolitu, který se bohužel kumuluje v játrech<sup>65</sup>. Pro dosažení specifického štěpení a získání snadno vylučitelného metabolitu byla zkoumána řada dalších peptidických spojení: dekaeptidy (GFQGVQFAGF, GFGSVOFAGF)<sup>66</sup>, tetrapeptidy (GGGF<sup>69</sup>, GFGF, GPGF a samotný glycin<sup>28</sup>). Právě poslední zmíněná práce ukázala, že významným faktorem ovlivňujícím biodistribuci je nejen délka peptidického spojení, ale také aminokyselinová sekvence peptidu, neboť v jaterních lysozomech se vyskytují proteázy, které jsou specifické pro vazby Phe-X (kde X je libovolná aminokyselina), což ovlivňuje metabolizaci konjugátů obsahujících tento motiv. Autoři všeobecně soudí, že nalezení vhodného peptidového spojení je dobrou metodou vedoucí ke snížení kumulace radioaktivity v játrech.

f) Alkylový: V případě tohoto linkeru se literatura rozchází nejvíce. Zatímco většina prací se shoduje v tom, že alkylový linker není vhodný pro svou kumulaci v ledvinách<sup>23, 55</sup>, někteří autoři uvádějí opak<sup>57, 63</sup>. Byla dokonce pozorována i vysoká a přetrvávající radioaktivita v játrech<sup>50</sup>.

Přestože se literatura značně rozchází, faktem zůstává, že zavedením metabolizovatelného spojení se značně změní biodistribuce konjugátu. Rozložení radioaktivity v celém těle závisí na transportních a exkrečních charakteristikách vzniklých radioaktivních metabolitů, které vznikají rozštěpením použitého linkeru. Chování tohoto metabolitu v organismu je závislé nejen na chemické povaze zbytku linkeru, ale také na chemické struktuře chelátoru, neboť představuje hlavní složku metabolitu. Vzhledem k tomu, že každý z autorů studoval chování metabolitů za použití různých chelátorů, může i tento fakt vysvětlovat jejich rozdílné zkušenosti<sup>48</sup>.

#### 4.1.4.4.3. Současně používané linkery a způsoby jejich přípravy

Pro přípravu trifunkčního uskupení, které je předmětem této práce, byl zvolen heterobifunkční linker maleimidového typu s modulovanou délkou uhlíkového skeletu (viz obrázek 7). Maleimidová funkce na jedné straně je vhodným typem reaktantu pro volné -SH skupiny cysteinu zakomponovaného v protilátce. Reakce je velmi selektivní, rychlost adice je až 1000 krát vyšší než v případě aminoskupiny<sup>67</sup>. Tímto způsobem je možné zajistit selektivní navázání linkeru na protilátku.



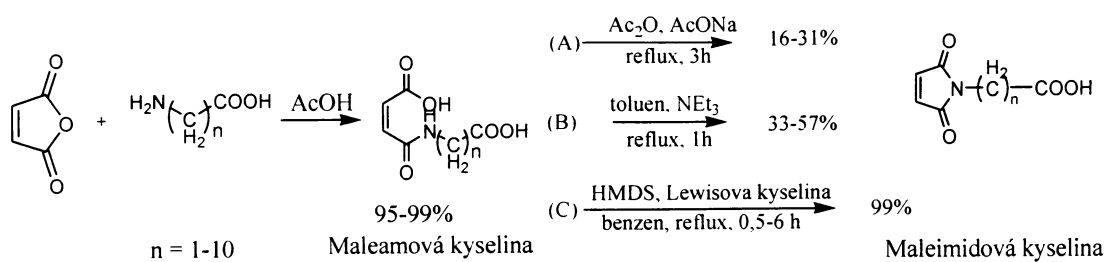
$$n = 1-10$$

Obr. 7 Obecný vzorec maleimidového linkeru

Reaktivní sukcinimidový ester na druhém konci molekuly zajišťuje konjugaci s aminoskupinou chelátu formou peptidické vazby. Přítomnost takto vzniklé peptidické vazby je důležitá, protože představuje vhodný substrát pro působení jaterních peptidáz. Je možné předpokládat, že hydrolýzou peptidické vazby tak vznikne enzymaticky dále nesnadno odbouratelný radioaktivní zbytek.

Jak ukazuje řada studií, modulace délky uhlíkového skeletu linkeru silně ovlivňuje chování radiometabolitu v těle<sup>68,69,70</sup>. Autoři porovnávali vliv délky alifatického řetězce od 3 do 11 atomů uhlíků. Jejich výsledky se ale mírně rozcházejí. Někteří shledali optimální délku mezi 5 až 8 uhlíkovými atomy<sup>68</sup>, delší řetězce označili za nevhodné. Jiná skupina autorů shledává jako vyhovující 5 a 10 uhlíkové řetězce<sup>69</sup>. Další práce uvádí jako nejvhodnější použití 3 až 8 uhlíkových řetězců<sup>70</sup>.

Prvním zavedeným způsobem přípravy je postup<sup>71</sup>, kde maleimidová kyselina vzniká po 3 hodinovém refluxu z kyseliny maleamové v přítomnosti acethydridu a acetátu sodného (reakce A ve schématu 4). Nutnost chromatografie a velmi nízké výtěžky jsou značnou nevýhodou této metody.

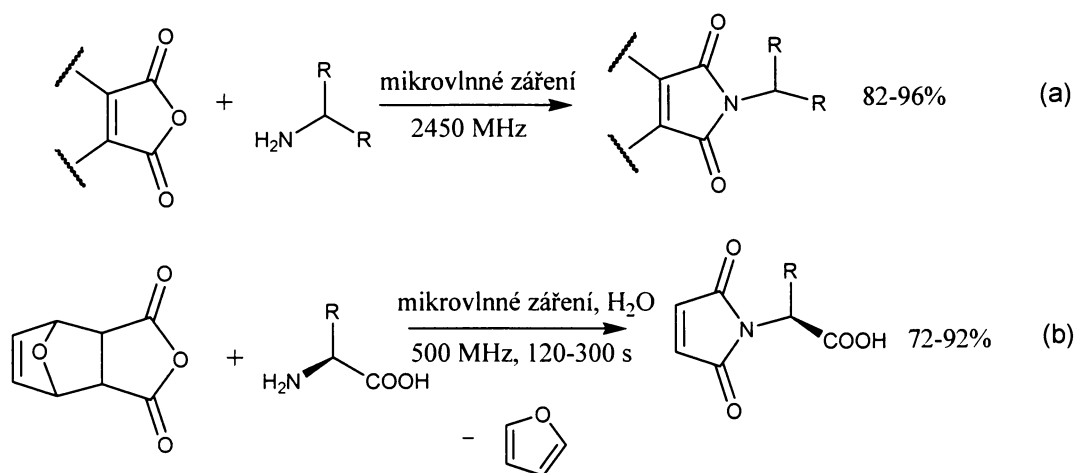


*Schéma 4 Způsoby vzniku maleimidů*

Příprava maleamové kyseliny je téměř kvantitativní, avšak její cyklizace bývá problematickým procesem s velmi nízkými výtěžky, zvláště v přítomnosti další volné karboxylové skupiny<sup>72</sup>. Nejčastěji používaným způsobem přípravy maleimidové kyseliny je reflux výchozí maleamové kyseliny v toluenu v přítomnosti 2 eq. NEt<sub>3</sub><sup>72a</sup> (reakce B ve schématu 4).

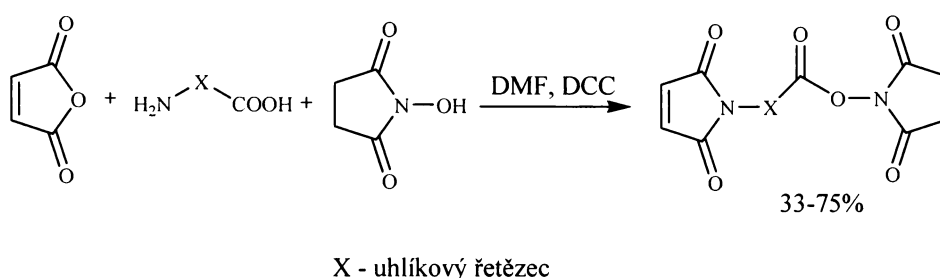
Problém nízkých výtěžků odstraňuje indická práce používající k cyklizaci HMDS a Lewisovu kyselinu. Reakčním médiem zůstává nepolární rozpouštědlo, ve kterém jsou výchozí maleamové kyseliny prakticky nerozpustné, proto je potřeba použít značných objemů rozpouštědel<sup>73,74</sup>.

Revoluční zlepšení slibují práce popisující přípravu maleimidů prostým zahřátím reakční směsi v konvenční mikrovlnné troubě<sup>75,76</sup> (schéma 5). Indická práce popisuje tuto reakci bez použití rozpouštědla (a), slovenská práce pracuje ve vodném prostředí (b).



*Schéma 5 Příprava maleimidů pomocí mikrovlnného záření*

Byla také popsána jednostupňová syntéza *N*-sukcinimidylmaleimidů, která je uskutečněna reakcí maleinanhydridu a příslušné *n*-aminoalkanové kyseliny za přítomnosti *N*-hydroxysukcinimidu a aktivátoru dicyklohexylkarbodiimidu<sup>77</sup>. Výtěžky při tomto způsobu provedení reakce dosahují ~ 30-70 %. Tímto reakčním uspořádáním se odstraňuje nejproblematictější krok, kterým je vlastní cyklizace maleamového derivátu. Současně zde probíhá i esterifikace druhé karboxylové skupiny *N*-hydroxysukcinimidem. Při této modifikaci reakce je nepolární rozpouštědlo nahrazeno polárním aprotickým rozpouštědlem (DMF), ve kterém jsou výchozí reaktanty (anhydrid kyseliny maleinové a *n*-aminoalkanové kyseliny) na rozdíl od benzenu dobře rozpustné.



*Schéma 6 Příprava N-sukcinimidylmaleimidů*

#### 4.2. Nastínění řešení

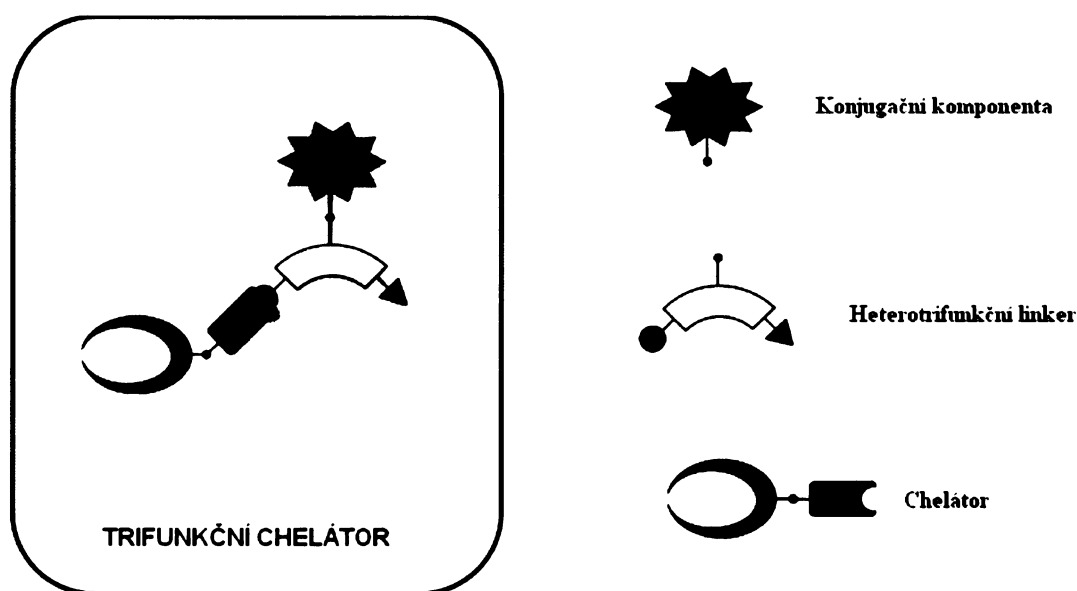
Z výše uvedených údajů je zřejmé, že dosud používaná radioléčiva, obsahující biologicky aktivní substrát ve funkci doručovatele a chelátor komplexující radionuklid, které jsou spojené pomocí linkeru, nepřinášejí optimální řešení, neboť po odbourání dochází ke vzniku radiometabolitů. Tyto metabolity se kumulují v tělních orgánech a způsobují jejich nežádoucí ozáření.

Pro zlepšení využitelnosti a účinnosti léčiva je třeba zabránit kumulaci vznikajících radioaktivních metabolitů. Možným řešením je zavést do molekuly léčiva jednotku, která po metabolizaci léčiva zajistí snadnější vyloučení metabolitu. Tato jednotka (konjugační komponenta) však nesmí způsobit předčasnou metabolizaci konjugátu, její vlastnosti se tedy musí projevit až po odeznění fáze doručení, ozáření cílených buněk a metabolizaci.

Optimálním místem pro zavedení této konjugační komponenty s detoxifikační funkcí je modifikovaný linker obsahující bod nebo jednotku větvení. Tato modifikovaná struktura linkeru musí nadále splňovat tato kritéria:

- musí být optimálně metabolizovatelná a vylučitelná (nese navázané složky tělu vlastní používané organismem při detoxifikaci xenobiotik);
- metabolit obsahující radionuklid musí mít hydrofilní vlastnosti pro zajištění snadné exkrece z organismu;
- nesmí negativně měnit poměr cílené a nežádoucí radioaktivity;
- nesmí ovlivňovat komplexační vlastnosti chelátoru.

Schéma zmiňovaného konjugátu je na obrázku 8.



Obr. 8 Znárodnění chelátoru

#### 4.2.1. Konjugační komponenta

Je známo, že biotransformace léčiv probíhá řadou mechanismů, vedle redukce, oxidace a hydrolýzy je to konjugace s různými látkami. Konjugace je reakce, při níž vznikají metabolity, obsahující složky tělu vlastní (konjugační složka) a xenobiotikum. Jednou z významných konjugačních složek lidského organismu je cystein, resp. acetylcystein, který se konjuguje především s halogenovanými aromatickými uhlovodíky, může se však uplatnit i u reaktivních alifatických

sloučenin za vzniku S-substituovaných merkapturových kyselin<sup>78</sup>. Po této konjugaci jsou vzniklé produkty vylučovány z těla.

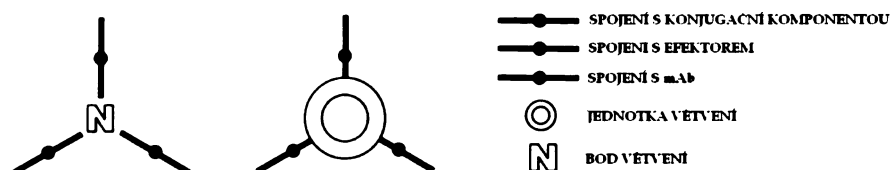
Z výše uvedeného existuje reálný předpoklad, že zabudování konjugační komponenty do té části radiokonjugátu, která bude po biotransformaci celého léčiva obsažena v metabolitu, přinese zlepšení exkrece tohoto metabolitu z těla.

#### 4.2.2. Bod větvení/jednotka větvení

Uspořádání a spojení komponent může být realizováno dvěma možnými způsoby. Jak je vidět na obrázku 9, centrem spojujícím všechny komponenty může být bod větvení nebo jednotka větvení.

Bodem větvení může být atom s vhodnou vazností a prostorovým uspořádáním. Vzhledem k tetraedrickému uspořádání a k uspokojivé vaznosti je ideální volbou atom dusíku. Prvkem větvení může být molekula, která obsahuje centra pro navázání několika různých funkčních celků. Obě centra větvení by měla splňovat několik základních podmínek:

- spojení centra větvení s biomolekulou musí být dostatečně pevné, přesto však štěpitelné jaterními peptidázami, aby umožňovalo vznik vhodného metabolitu;
- spojení centra větvení s efektozem a konjugační komponentou musí být dostatečně odolné vůči detoxifikačním procesům, aby nedocházelo rozdělení konjugační komponenty a složky obsahující konjugační komponentu;
- samotné centrum větvení musí být stabilní vůči metabolizaci.



Obr. 9 Znárodnění možnosti větvení

Vzhledem k použití linkerového spojení obsahujícího aktivní sukcinimidový ester vhodný k připojení na aminoskupinu, byl jako prvek větvení zvolen dusíkový atom chelátoru. Navíc modulace vzdálenosti efektozu od vazebného místa v protilátce v další farmakologické biodistribuční studii umožní vybrat v této třídě nových linkerů jeden s optimálním poměrem účinek/biodegradace.

K následnému připojení merkapturátu lze využít známých postupů. Schéma 7 znázorňuje snadnou reakci *N*-acetyl-*L*-cysteinu s akroleinem, kterou lze získat 3-

oxopropyl-*N*-acetyl-*L*-cystein. Za použití mírného a selektivního redukčního činidla lze provést reduktivní aminaci s aminoskupinou chelátoru<sup>79-83</sup>.

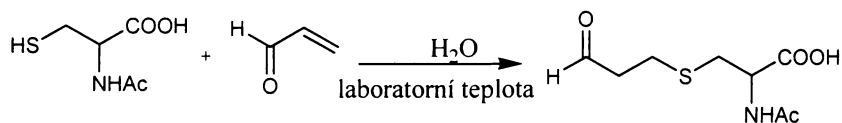


Schéma 7 Vznik merkapturátu

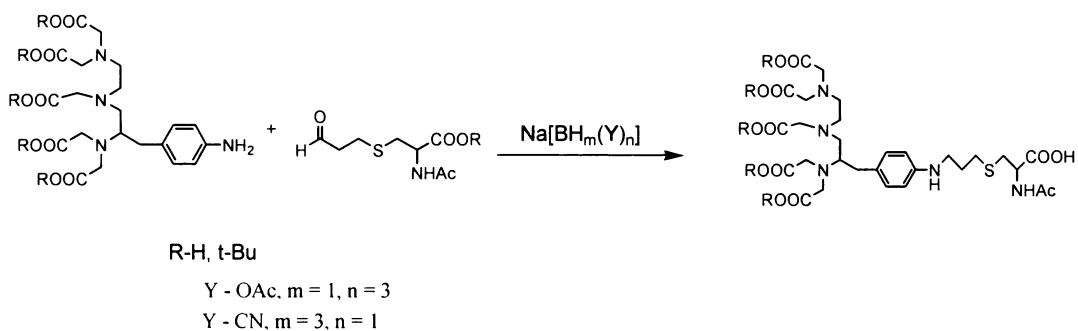


Schéma 8 Obecné znázornění reduktivní aminace za použití borohydridových redukčních činidel

Jednotkou větvení byla zvolena molekula triazinu pro optimální počet vazebných míst pro spojení všech funkčních center. Navíc je dobře znám způsob metabolizace této strukturní jednotky<sup>84</sup>. Pro zavedení funkčních jednotek lze použít reakcí známých z literatury<sup>85-87</sup> (viz schéma 9):

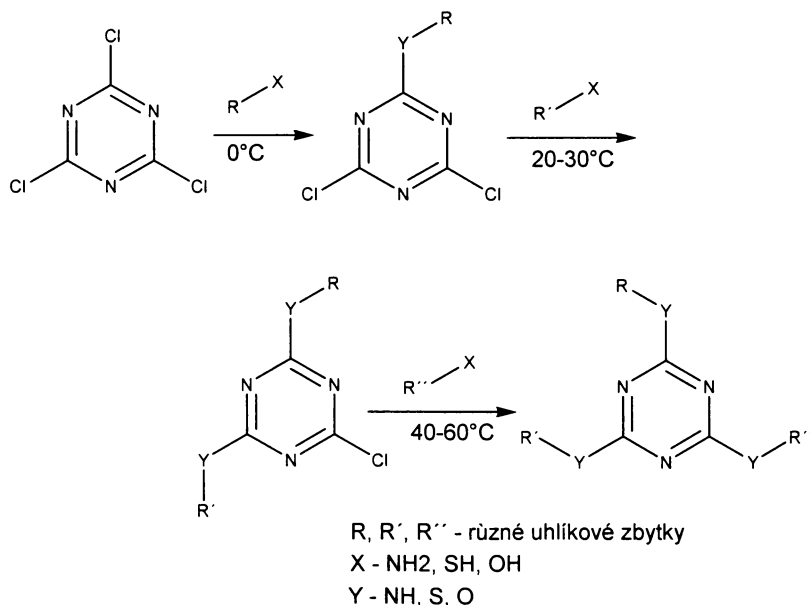
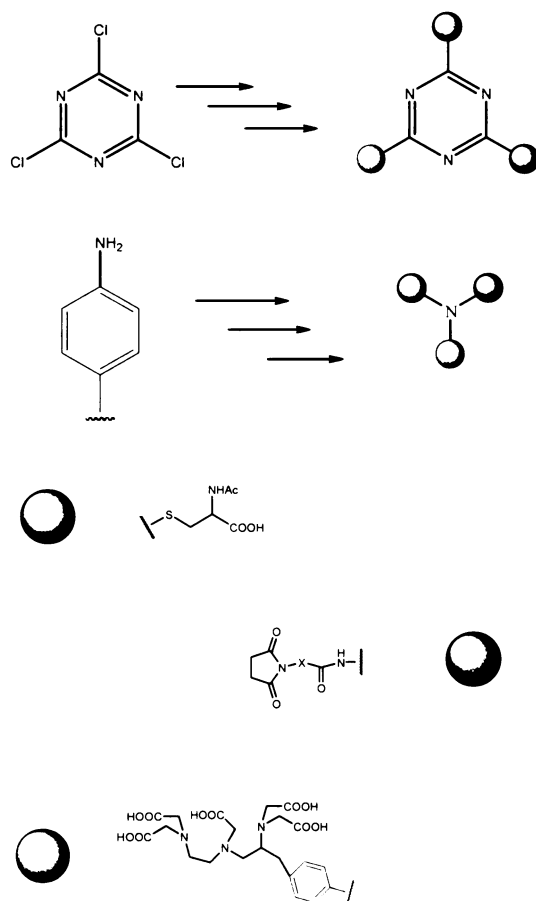


Schéma 9 Obecná reakce přípravy trisubstituovaného triazenu

Obr. 10 poskytuje informaci o konkrétním uspořádání jednotlivých funkčních jednotek navázaných na jednotku nebo na bod větvení. Výsledný konjugát tedy bude obsahovat chelátor (komplexační funkce), linker (spojovací a metabolická funkce) a konjugační komponentu (informační funkce).



Obr. 10 Konkrétní uspořádání konjugátu



## 5. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

### 5.1. Obecné informace

Teploty tání byly stanovovány na Koflerově bloku Boetius a nebyly korigovány. Průběh reakcí a identita připravených sloučenin byla sledována pomocí TLC na silikagelových foliích typu Silufol UV<sub>254</sub> (Sklárny Kavalier) a Kiesegel 60 F<sub>254</sub> od firmy Merck. Jako vyvíjecí soustavy byly použity tyto směsi rozpouštědel (jedná se o objemové poměry):

Soustava A: benzen/EtOAc 2:1	Soustava B: benzen/EtoAc 1:3
Soustava C: MeOH/NH <sub>4</sub> OH 4:1	Soustava D: MeOH/NH <sub>4</sub> OH 8:1
Soustava E: cyklohexan/EtoAc 2:1	Soustava F: cyklohexan/EtOAc/NEt <sub>3</sub> 49,5:49,5:1
Soustava G: EtoAc/MeOH/AcOH 49,5:49,5:1	Soustava H: CHCl <sub>3</sub> /MeOH/AcOH 49,5:49,5:1
Soustava I: CHCl <sub>3</sub> /aceton 95:5	Soustava J: EtOAc/aceton 4:1

K vizualizaci byla použita tato činidla: 0,1% methanolický roztok ninhydrinu k detekci primární aminskupiny a sekundárních aminů, roztok Draggendorfova činidla (20 ml 1,7% roztoku Bi(NO<sub>3</sub>) v 20% octové kyselině smícháno před použitím s 5 ml 40 % vodného roztoku jodidu draselného a 7 ml vody) pro detekci terciárních aminů a postřík 0,1 M roztokem síranu ceričitého ve 4 M roztoku kyseliny sírové pro detekci dicyklohexylmočoviny. Detekce maleimidů byla prováděna nejprve postříkem 0,1% ethanolického roztoku DTNB (5,5'-dithio-bis-nitrobenzoová kyselina) v pufru TRIS-HCl 1:1 a po vysušení postříkem 2% 2-merkptoethanolu v 80% ethanolu. Všechny látky byly detekovány zhášením fluorescence UV a v některých případech bylo použito jodových par.

Sloupcová chromatografie byla provedena na silikagelu typu Kiesegel 60 (63-200 μm) od firmy Merck. NMR spektra byla měřena na spektrometru Varian<sup>UNITY</sup> INOVA nebo Varian 300 Geminy při 25°C. Základní frekvence pro <sup>1</sup>H NMR byla 399,95 MHz, resp. 299,90 MHz, pro <sup>13</sup>C NMR 100,58 MHz, resp. 75,0 MHz. Pro měření spekter byla použita tato rozpouštědla: CDCl<sub>3</sub> (chemické posuny byly referencovány na vnitřní singlet standardu tetramethylsilanu při δ = 0,00 ppm pro <sup>1</sup>H

NMR, resp. na triplet rozpouštědla při  $\delta = 77,00$  ppm pro  $^{13}\text{C}$  NMR),  $\text{D}_2\text{O}$  (chemické posuny byly referencovány na singlet vnitřního standardu methanolu při  $\delta = 3,34$  ppm pro  $^1\text{H}$  NMR, resp. na singlet při  $\delta = 49,50$  ppm pro  $^{13}\text{C}$  NMR),  $d_6$ -DMSO (chemické posuny byly referencovány na septet rozpouštědla při  $\delta = 2,5$  ppm pro  $^1\text{H}$  NMR, resp.  $\delta = 39,52$  ppm pro  $^{13}\text{C}$  NMR).

Hmotová spektra byla měřena na spektrometru Inkos 50 fy Finnigan MAT technikami APPI a GC/MS, resp. na přístroji ZAB - EQ technikou FAB v pozitivním i negativním modu. Plynový chromatograf nebyl kalibrován, naměřené hodnoty procentuálního zastoupení je nutno brát jako přibližné mající informativní charakter.

Použité chemikálie byly získány od firem Lachema, Fluka, Aldrich a Merck.

## 5.2. Syntéza chelátoru

### ***p*-nitrofenylalanin dihydrát (1)<sup>88</sup>**

42,6 g jemně rozetřeného *L*-fenylalaninu (280 mmol) bylo během 3 hodin rozpuštěno za silného míchání v kyselině sírové (85 ml, 98%,  $\rho = 1,83 \text{ g/cm}^3$ ). Oranžový viskózní roztok byl ochlazen na  $-10^\circ\text{C}$  (led-sůl) a po kapkách bylo opatrně přidáno 21,3 ml vychlazené dýmavé kyseliny dusičné (1,1 eq., 308 mmol,  $\rho = 1,4 \text{ g/cm}^3$ ). Teplota směsi byla udržována mezi  $-10$  až  $-5^\circ\text{C}$ . Po 30 minutách byla reakční směs z lázně vytažena a po dalších 30 minutách byla nalita na 500 ml drceného ledu. Vyloučila se světlá sraženina a žlutý roztok ztmavnul. Směs byla neutralizována 25% roztokem hydroxidu sodného za vylučování další sraženiny. Po dosažení pH 6,5 byla směs ochlazená a přes noc ponechána v lednici. Sraženina byla odsáta na fritě S3 a promyta  $3 \times 20$  ml ledové destilované vody. Získaný surový produkt byl rekrystalizován s aktivním uhlím z 850 ml horké destilované vody. Filtrát byl přes noc ponechán v lednici a vzniklé krystaly byly odsáty, promyty  $3 \times 5$  ml vychlazeného ethanolu a sušeny na vzduchu. Bylo získáno 32,6 g (51,07%) nažloutlých krystalů o t.t.  $240,5 - 242^\circ\text{C}$  (lit.<sup>88</sup> uvádí  $242 - 244^\circ\text{C}$ ); MS (APPI):  $m/z$  (%): 211,3 (20) [M+H], 165 (24), 74 (100);  $^1\text{H}$  NMR (300 MHz,  $\text{D}_2\text{O}/\text{NaOH}$ ): 8,03 m (2H, Ar-H); 7,33 m (2H, Ar-H); 3,46 t (1H,  $J = 7,5$ ; CH); 2,97 ddd (2H,  $J_1 = 6,3$ ,  $J_2 = 14,4$ ,  $J_3 = 17,4$ ; Ph- $\text{CH}_2$ );  $^{13}\text{C}$  NMR (75 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ): 181,7; 146,93; 141,87; 130,3; 123,7; 57,5; 40,9; pro  $\text{C}_9\text{H}_{10}\text{N}_2\text{O}_4$  (228,2) vypočteno 47,37 %C, 5,30 %H, 12,28 %N; nalezeno 47,19 %C, 5,12 %H, 11,96 %N

### ***N*-(ethoxykarbonyl)-*p*-nitrofenylalanin (2a)**

K roztoku 2 g *p*-nitrofenylalanin dihydrátu (**1**) (8,76 mmol) ve 14 ml vody bylo za míchání přisypáno 2,21 g práškového hydrogenuhličitanu sodného (3 eq, 26,28 mmol). Po přidání 1,01 ml ethylchloroformiátu (1,2 eq, 10,51 mmol,  $\rho = 1,135$  g/ml) byla zakalená směs míchána 12 hodin. Reakční směs (pH = 8) byla opatrně okyselena 35% kyselinou chlorovodíkovou na pH = 2. Směs byla po nasycení chloridem sodným protřepána 8 × 25 ml dichlormethanu. Organické vrstvy byly spojeny a sušeny bezvodým síranem sodným. Dichlormethan byl oddestilován na RVO při 30 °C. Rekrytalizace látky ze směsi ethylacetát/hexan 7:5 poskytla 1,50 g (60,48%) béžových krystalů o t.t. 114 - 116,5°C; MS (FAB):  $m/z$  (%): 283,3 (18) [M+H]; <sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>): 8,15 m (2H, Ar-H); 7,35 m (2H, Ar-H); 5,50 d (1H, NH); 4,57 q (1H, CH-NH); 4,06 q (2H, O-CH<sub>2</sub>-CH<sub>3</sub>); 3,11 ddd (2H, Ph-CH<sub>2</sub>); 1,18 t (3H, O-CH<sub>2</sub>-CH<sub>3</sub>); <sup>13</sup>C NMR (100 MHz, CDCl<sub>3</sub>): 173,83; 156,38; 147,11; 144,45; 130,42; 123,66; 61,49; 54,65; 37,93; 14,50; pro C<sub>12</sub>H<sub>14</sub>N<sub>2</sub>O<sub>6</sub> (282,25) vypočteno 51,06 %C, 5,00 %H, 9,93 %N; nalezeno 51,36 %C, 4,72 %H, 9,82 %N

### **Methylester *p*-nitrofenylalaninu hydrochlorid (**3**)<sup>89</sup>**

Do 176 ml vychlazeného methanolu (0°C) bylo za míchání a stálého chlazení směsí led/sůl přikapáno 24 ml thionylchloridu (2,5 eq., 331 mmol). Do roztoku bylo nasypáno 30 g *p*-nitrofenylalanin dihydrátu (132 mmol). Během 2 hodin se suspenze nerozpustila a za další hodinu se z roztoku začal srážet bílý precipitát. Směs byla míchána 20 hodin. Methanol a thionylchlorid byly odstraněny za sníženého tlaku na RVO při teplotě lázně 48°C. Pro odstranění stop nasorbovaného chlorovodíku a oxidu siřičitého byl produkt sušen 5 dní v digestoři. Získáno bylo 32,0 g (93,30%) bílého prášku o t.t. 211 - 214°C (lit<sup>89a</sup> uvádí 205 - 209°C); MS (APPI):  $m/z$  (%): 225,1 (30) [M-HCl+H]; 165,0 (16); 119,1 (2); <sup>1</sup>H NMR (300 MHz, D<sub>2</sub>O): 8,20 m (2H, Ar-H); 7,47 m (2H, Ar-H); 4,47 t (1H, J = 7,5; CH); 3,78 s (3H, COOCH<sub>3</sub>); 3,38 ddd (2H; J<sub>1</sub> = 6,3, J<sub>2</sub> = 14,4, J<sub>3</sub> = 17,4; Ph-CH<sub>2</sub>); <sup>13</sup>C NMR (75 MHz, D<sub>2</sub>O): 169,23; 146,91; 141,45; 130,10; 123,83; 53,22; 53,13; 34,91; pro C<sub>10</sub>H<sub>13</sub>ClN<sub>2</sub>O<sub>4</sub> (260,67) vypočteno 46,08 %C, 5,03 %H, 13,60 %Cl, 10,75 %N; nalezeno 46,39 %C, 4,76%<sup>89</sup>H, 13,41 %Cl, 10,55 %N

### **Methylester *N*-(ethoxykarbonyl)-*p*-nitrofenylalaninu (4a)**

K suspenzi 2 g methylester *p*-nitrofenylalaninu hydrochloridu (7,6 mmol) v 25 ml destilované vody bylo přisypáno 3,2 g hydrogenuhličitanu sodného (5 eq., 38 mmol). Suspenze se stala těžko míchatelnou a proto bylo přidáno 10 ml dichlormethanu. Poté bylo přikapáno 0,87 ml ethylchloroformiátu (1,2 eq., 9,12 mmol,  $\rho = 1,139 \text{ g/cm}^3$ ). Vzniklá dvoufázová směs byla 4 hodiny intenzivně míchána, tak aby došlo k maximálnímu promísení fází. Vyloučená sraženina byla odfiltrována a promyta 2 × 5 ml ledové vody. Surový produkt byl po TLC (Kavalier, soustava A,  $R_f = 0,75$ ) čištěn přes sloupec silikagelu (soustava A). Čištění poskytlo 1,9 g (84,9 %) bílé pevné látky o t.t. 93,5 - 96°C; MS (GC/MS):  $m/z$  (%): 237,1 (21), 207 (22), 160 (100), 106 (99), 88 (96);  $^1\text{H NMR}$  (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ): 8,36 m (2H, Ar-H); 7,32 m (2H, Ar-H); 5,19 d (1H,  $J = 7,5$ ; NH); 4,68 dd (1H,  $J_1 = 6,3$ ,  $J_2 = 7,47$ ; CH-NH); 4,11 q (2H,  $J = 7,1$ ; O-CH<sub>2</sub>-CH<sub>3</sub>); 3,75 s (3H, O-CH<sub>3</sub>); 3,20 ddd (2H,  $J_1 = 5,8$ ,  $J_2 = 13,9$ ,  $J_3 = 50,5$ ; Phe-CH<sub>2</sub>); 2,21 t (3H,  $J = 7,1$ ; O-CH<sub>2</sub>-CH<sub>3</sub>);  $^{13}\text{C NMR}$  (100 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ): 171,42; 155,74; 147,17; 143,76; 130,20; 123,70; 61,41; 54,33; 52,60; 38,27; 14,48; pro  $\text{C}_{13}\text{H}_{16}\text{N}_2\text{O}_4$  (296,28) vypočteno 52,70 %C, 5,44 %H, 9,46 %N; nalezeno 52,97 %C, 5,33 %H, 9,61 %N

### ***N*-(ethoxykarbonyl)-*p*-nitrofenylalaninol (5a)**

1 g látky **4a** (3,38 mmol) byl za míchání rozpuštěn v 7 ml tetrahydrofuranu. Bylo přidáno 0,18 g tetrahydridoboritanu sodného (1,4 eq., 4,73 mmol) a po vychlazení reakční směsi (0°C) v ledové lázni bylo po kapkách přidáno 1,25 ml methanolu. Po 1 hodině míchání pod inertní atmosférou dusíku byla provedena TLC (Kavalier, soustava A,  $R_f = 0,5$ ), která prokázala kompletní konverzi. K reakční směsi bylo přikapáno 200  $\mu\text{l}$  kyseliny octové a po 5 minutách míchání byl roztok za sníženého tlaku odpařen na RVO. Viskózní žlutý zbytek byl rozpuštěn v 10 ml destilované vody a extrahován 3 × 10 ml ethylacetátu. Spojené organické vrstvy byly sušeny bezvodým síranem sodným a ethylacetát byl odpařen za sníženého tlaku na RVO. Čištěním přes sloupec silikagelu (soustava A) bylo získáno 0,74 g (77,0%) béžové pevné látky o t.t. 79 - 81,5°C; MS (APPI):  $m/z$  (%): 269,1 (98) [M+H]; 223,0 (10); 116,1 (8);  $^1\text{H NMR}$  (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ): 8,17 m (2H, Ar-H); 7,40 m (2H, Ar-H); 4,96 d (1H, NH); 4,08 q (2H, O-CH<sub>2</sub>-CH<sub>3</sub>); 3,95 m (1H, CH-NH); 3,64 ddd (2H, Ph-CH<sub>2</sub>); 2,98 m (2H, CH<sub>2</sub>-OH); 2,04 s (1H, OH); 1,21 (3H, O-CH<sub>2</sub>-CH<sub>3</sub>);  $^{13}\text{C NMR}$  (100 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ): 156,46;

146,83; 145,79; 130,13; 123,74; 63,64; 61,15; 53,51; 37,26; 14,51; pro  $C_{12}H_{16}N_2O_5$  (268,27) vypočteno 53,73 %C, 6,01 %H, 10,44 %N; nalezeno 53,96 %C, 5,81 %H, 10,32 %N

#### **Mesylát *N*-(ethoxykarbonyl)-*p*-nitrofenylalaninu (6a)**

K vychlazenému roztoku 0,5 g *N*-(ethoxykarbonyl)-*p*-nitrofenylalaninu (**5a**) (1,9 mmol) v 2,5 ml tetrahydrofuranu bylo přidáno 0,15 ml methansulfonylchloridu (1,1 eq, 2 mmol). Poté bylo přidáno 0,28 ml  $NEt_3$  (1,1 eq, 2 mmol). Téměř okamžitě se začala vylučovat sraženina triethylamonium chloridu. Po 30 minutách míchání byla provedena TLC (Kavalier, soustava B,  $R_f = 0,9$ ). Triethylamonium chlorid byl odfiltrován a promyt  $4 \times 1$  ml tetrahydrofuranu. Filtrát byl odpařen za sníženého tlaku na RVO a surový produkt byl čištěn přes sloupec silikagelu (soustava B). Čištění poskytlo 0,61 g (91,9%) světle hnědého oleje. MS (FAB):  $m/z$  (%): 347,4 (29) [M+H];  $^1H$  NMR (400 MHz,  $CDCl_3$ ): 8,19 m (2H, Ar-H); 7,41 m (2H, Ar-H); 4,97 d (1H, NH); 4,28 m (1H, CH-NH); 4,18 m (2H,  $CH_2$ -OMs); 4,11 q (2H, O- $CH_2$ - $CH_3$ ); 3,07 s (3H, O- $SO_2$ - $CH_3$ ); 3,03 m (Ph- $CH_2$ ); 1,22 t (3H, O- $CH_2$ - $CH_3$ );  $^{13}C$  NMR (100 MHz,  $CDCl_3$ ): 155,79; 147,09; 144,33; 130,11; 123,93; 69,59; 61,38; 51,07; 37,51; 37,07; 14,46; pro  $C_{13}H_{18}N_2O_7S$  (346,36) vypočteno 45,08 %C, 5,24 %H, 8,09 %N, 9,26 %S; nalezeno 44,73 %C, 5,17 %H, 8,39 %N, 9,13 %S

#### ***N*-(ethoxykarbonyl)-1-(*p*-nitrofenyl)-diethylentriamin (7a)**

Roztok 0,2 g látky **6a** (0,53 mmol, 0,2 g) ve 4 ml tetrahydrofuranu byl za míchání v jedné dávce přidán do 0,35 ml ethylendiaminu (10 eq., 5,3 mmol). Směs byla za míchání pod inertní atmosférou refluxována ( $t_{lázne} = 78^\circ C$ ). Po 4 hodinách ukázala TLC (Kavalier, soustava C,  $R_{f,výchozí}$  látky = 0,85) stálou přítomnost výchozího reaktantu **6a**. Po dalších 2 hodinách se podle TLC stav nezměnil a reakční směs byla ponechána volně stát do zchladnutí na laboratorní teplotu. Reakční směs byla zahuštěna za sníženého tlaku na RVO. Vzniklý žlutý olej byl rozpuštěn v 5 ml destilované vody a extrahován  $3 \times 7,5$  ml dichlormethanu. Spojené organické fáze byly sušeny bezvodým síranem sodným.  $^1H$  NMR spektrum ukázalo přítomnost několika různých látek.

### **Methylester *N*-(*tert*-butoxykarbonyl)-*p*-nitrofenylalaninu (4b)**

K suspenzi 30 g methylester *p*-nitrofenylalaninu hydrochloridu (**3**) (0,114 mol) v 150 ml dichlormethanu, bylo přidáno 37,8 g di-*tert*-butyl-dikarbonátu (0,171 mol). Potom bylo přidáno 600 ml 10% roztoku uhličitánu sodného (0,57 mol) a roztok zežloutl. Po 20 hodinách míchání byla organická vrstva oddělena. Vodná vrstva byla extrahována 3 × 100 ml dichlormethanu. Spojené organické vrstvy byly sušeny bezvodým síranem sodným. Oddestilováním dichlormethanu na RVO při teplotě 30°C bylo získáno 31,4 g (85,30%) bílého prášku o t.t. 101 - 103,5°C; MS (FAB): m/z (%): 325,3 (12) [M+H], 323,2 (87) [M-H]; <sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>): 8,16 m (2H, Ar-H); 7,32 m (2H, Ar-H); 5,07 d (1H, J = 7,6; NH); 4,64 dd (1H, J<sub>1</sub> = 7,2, J<sub>2</sub> = 5,5; CH-NH); 3,74 s (3H, O-CH<sub>3</sub>); 3,21 ddd (2H, J<sub>1</sub> = 5,6, J<sub>2</sub> = 14,0, J<sub>3</sub> = 61,2; Ph-CH<sub>2</sub>); 1,42 s (9H, C-(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>); <sup>13</sup>C NMR (100 MHz, CDCl<sub>3</sub>): 171,60; 155,13; 147,08; 144,00; 130,20; 123,62; 80,29; 54,05; 52,50; 38,33; 28,20; pro C<sub>15</sub>H<sub>20</sub>N<sub>2</sub>O<sub>6</sub> (324,33) vypočteno 55,55 %C, 6,22 %H, 8,64 %N; nalezeno 55,10 %C, 5,93 %H, 6,49 %N

### ***N*-(*tert*-butoxykarbonyl)-*p*-nitrofenylalaninol (5b)**

K roztoku 31,4 g látky **4b** (97,52 mmol) ve 150 ml tetrahydrofuranu bylo přidáno 5,16 g tetrahydridoboritanu sodného (1,4 eq., 136,5 mmol). Barva směsi se změnila na načervenalou. Pod inertní atmosférou dusíku byla směs míchána do rozpuštění veškerého tetrahydridoboritanu sodného. Poté bylo do reakční směsi po 1 ml přidáváno 62,4 ml methanolu. Roztok pěnil a barva se měnila na fialovou a postupně až na banánově žlutou. Po 2 hodinách byla provedena TLC (Merck, soustava A, R<sub>f</sub><sub>východního reaktantu</sub> = 0,7, R<sub>f</sub><sub>produktu</sub> = 0,2), která ukázala stálou přítomnost výchozího reaktantu **4b**. Po malých dávkách byl přidáván tetrahydridoboritan sodný až do celkového množství 2 eq. a methanol do celkového objemu 75 ml. Poté ukázala TLC vymizení výchozího reaktantu. Reakční směs byla odpařena za sníženého tlaku na RVO. Surový produkt byl rozpuštěn v 250 ml destilované vody a extrahován 3 × 250 ml ethylacetátu. Spojené organické fáze byly sušeny bezvodým síranem sodným. Odpaření ethylacetátu na RVO za sníženého tlaku poskytlo 25,12 g (87,33%) nažloutlého prášku kmínového zápachu, který byl dosušen na vzduchu. T.t. = 87 - 89°C; MS (FAB): m/z (%): 297 (10) [M+H]; <sup>1</sup>H NMR (400MHz, CDCl<sub>3</sub>): 8,16 m (2H, Ar-H); 7,41 m (2H, Ar-H); 4,94 vbs (1H, NH); 3,89 bs (1H, NH-CH); 3,63 ddd (2H, J<sub>1</sub> = 4,8, J<sub>2</sub> = 11,2, J<sub>3</sub> = 44,0; Ph-CH<sub>2</sub>); 2,98 t (2H, J = 7,2; CH<sub>2</sub>-OH); 1,39 s (9H,

O-C(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>); <sup>13</sup>C NMR (100 MHz, CDCl<sub>3</sub>): 155,80; 146,72; 146,05; 130,16; 123,64; 80,31; 63,73; 53,87; 37,41; 28,24; pro (296,14) vypočteno 56,75 %C, 6,80 %H, 9,45 %N; nalezeno 57,04 %C, 6,59 %H, 9,37 %N

### Mesylát *N*-(*tert*-butoxykarbonyl)-*p*-nitrofenylalaninu (**6b**)

K vychlazenému roztoku 10 g *N*-(*tert*-butoxykarbonyl)-*p*-nitrofenylalaninolu (**5b**) (33,8 mmol) bylo za míchání a udržování teploty pod -5°C přidáno 2,88 ml methansulfonylchloridu (1,1 eq, 37,2 mmol, ρ = 1,475 g/ml). Potom bylo přidáno 5,37 ml NEt<sub>3</sub> (1,1 eq, 37,2 mmol, ρ = 0,700 g/ml). Téměř okamžitě se vysrážel triamonium chlorid a pro umožnění dostatečného míchání bylo přidáno 75 ml tetrahydrofuranu. Po 2 hodinách prokázala TLC (Merck, soustava A, R<sub>f</sub> = 0,8) kompletní konverzi. Sraženina triethylamonium chloridu byla odfiltrována a žlutý filtrát byl odpařen za sníženého tlaku na RVO. Surový produkt byl rozpuštěn v 50 ml vody a extrahován 5 × 50 ml dichlormethanu. Spojené organické vrstvy byly sušeny bezvodým síranem sodným. Oddestilování dichlormethanu na RVO při teplotě 30°C poskytlo 12,02 g (94,87%) žlutého prášku o t.t. 63 - 64°C; MS (FAB): m/z (%): 375,5 (25) [M+H]; <sup>1</sup>H NMR (400MHz, CDCl<sub>3</sub>): 8,19 m (2H, Ar-H); 7,41 m (2H, Ar-H); 4,82 d (1H, NH); 4,22 m (1H, NH-CH); 4,19 d (2H, CH<sub>2</sub>-OMs); 3,07 s (3H, SO<sub>2</sub>-CH<sub>3</sub>); 3,01 d (2H, Ph-CH<sub>2</sub>); 1,40 s (9H, O-C(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>) <sup>13</sup>C NMR (100 MHz, CDCl<sub>3</sub>): 155,4; 147,1; 144,5; 130,1; 123,9; 86,4; 69,8; 58,5; 37,4; 37,2; 28,2; pro C<sub>15</sub>H<sub>22</sub>N<sub>2</sub>O<sub>7</sub>S (374,41) vypočteno 48,12 %C, 5,92 %H, 7,48 %N, 8,56 %S; nalezeno 47,69 %C, 5,98 %H, 7,36 %N, 8,17 %S

### *N*-(*tert*-butoxykarbonyl)-1-(*p*-nitrobenzyl) diethylentriamin (**7b**)

K roztoku 5 g látky **6b** (13,0 mmol) ve 40 ml tetrahydrofuranu bylo za inertní atmosféry dusíku přidáno 7,1 ml ethylendiaminu (130 mmol, 10 eq.). Roztok změnil barvu ze žluté na oranžovohnědou. Po 24 hodinách míchání v olejové lázni (t = 52 °C) byla provedena TLC (Merck, soustava D, R<sub>f</sub> = 0,4), která indikovala vymizení výchozího reaktantu. Čirý roztok byl oddělen od vzniklého oleje na dně a ten byl dekantován 3 × 5 ml tetrahydrofuranu. Spojené organické fáze byly odpařeny za sníženého tlaku na RVO. Světle hnědý olej byl rozpuštěn v 15 ml destilované vody a extrahován 3 × 20 ml dichlormethanu. Spojené organické vrstvy byly sušeny bezvodým síranem hořečnatým. Po oddestilování dichlormethanu při 30 °C na RVO bylo získáno 4,18 g (92,56%) surového produktu. Čištění přes sloupec silikagelu

(soustava D) poskytlo 3,90 g (86,28%) nahnědlého oleje. MS (FAB):  $m/z$  (%): 339,5 (20) [M+H];  $^1\text{H}$  NMR (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ): 8,15 m (2H, Ar-H); 7,37 m (2H, Ar-H); 4,87 d (1H, NH); 3,91 m (1H, CH-NH); 2,93-2,62 m (8H,  $\text{NH}_2\text{-CH}_2\text{-CH}_2\text{-NH-CH}_2\text{-CH(N-C(CH}_3)_3\text{)-CH}_2\text{-Ph}$ ); 1,26 s (9H, O-C(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>);  $^{13}\text{C}$  NMR (100 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ): 155,65; 146,77; 146,49; 130,29; 123,66; 79,62; 52,42; 52,25; 51,86; 42,29, 41,82; 28,51; pro  $\text{C}_{16}\text{H}_{26}\text{N}_4\text{O}_4$  (338,40) vypočteno 56,79 %C, 7,74 %H, 16,56 %N; nalezeno 56,86 %C, 7,49 %H, 16,31 %N

### ***p*-nitrofenylalanin-*N*-(2-aminoethyl)-amid (8)**

20,4 ml ethylendiaminu (10 eq., 0,153 mol) bylo mícháno za inertní atmosféry. Do tohoto roztoku byly během 2 hodin v 8 stejných dávkách přidány 4 g methylester *p*-nitrofenylalaninu hydrochloridu (**2**) (15,25 mmol). Po 24 hodinách byla fialová reakční směs odpařena za sníženého tlaku na RVO. Získaný červenohnědý olej byl rozpuštěn ve 30 ml 7 M roztoku čpavku a pH bylo upraveno 50% roztokem NaOH na pH = 11. Vodná fáze byla extrahována 8 × 25 ml dichlormethanu. Spojené organické fáze byly sušeny bezvodým síranem sodným. Oddestilováním dichlormethanu na RVO při teplotě 30°C bylo získáno 3,29 g (85,7%) žlutohnědého oleje. MS (FAB):  $m/z$  (%): 253,1 (19) [M+H];  $^1\text{H}$  NMR (400Hz,  $\text{CDCl}_3$ ): 8,18 m (2H, Ar-H); 7,41 m (2H, Ar-H); 3,77 m (1H, CH); 3,34 dd (1H, Ph-CH(H)-CH); 3,32 m (2H, CH<sub>2</sub>-NH-CO); 2,93 dd (1H, Ph-CH(H)-CH); 2,82 t (2H, CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-NH<sub>2</sub>);  $^{13}\text{C}$  NMR (100 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ): 173,63; 146,97; 145,83; 130,18; 123,77; 56,15; 41,72; 41,33; 40,90; pro  $\text{C}_{11}\text{H}_{16}\text{N}_4\text{O}_3$  (252,27) vypočteno 52,37 %C, 6,39 %H, 22,21 %N; nalezeno 51,87 %C, 6,09 %C, 21,95 %N

### **1-(*p*-nitrobenzyl)-diethylentriamin (9)<sup>40</sup>**

#### *a) redukce tetrahydridoboritanem sodným*

Pod inertní atmosférou dusíku bylo k roztoku 0,6 g *p*-nitrofenylalanin-*N*-(2-aminoethyl)-amidu (**8**) (2,38 mmol) ve 20 ml tetrahydrofuranu přidáno 0,68 g tetrahydridoboritanu sodného (7,5 eq., 17,85 mmol). Během 5 minut byl k reakční směsi opatrně přidán roztok 0,97 ml  $\text{BF}_3\cdot\text{Et}_2\text{O}$  (0,65 eq., 7,74 mmol, 1,1 g) v 18 ml tetrahydrofuranu. Barva roztoku se změnila z červenooranžové na žlutou. Směs byla refluxována 24 hodin. Poté stála dalších 24 hodin za laboratorní teploty. Ke směsi byl opatrně přidáván methanol tak dlouho, dokud se tvořily bublinky (asi 6,5 ml) a poté byla směs odpařena za sníženého tlaku na RVO. Získaný žlutý prášek byl rozpuštěn v



35 ml směsi 37% kyseliny chlorovodíkové a vody (1:1, v:v). Výsledný roztok byl 3 hodiny refluxován. Po 24 hodinách stání za laboratorní teploty byl hnědý roztok odpařen za sníženého tlaku na RVO. Získaná pevná látka byla rozpuštěna ve 20 ml směsi vody a 25% čpavku (1:1, v:v). 5 M roztokem hydroxidu draselného bylo pH upraveno na 11,5. Tato směs byla extrahována 6 × 20 ml dichlormethanu. Spojené organické vrstvy byly sušeny bezvodým síranem hořečnatým. Po oddestilování dichlormethanu na RVO při teplotě 30 °C bylo získáno 0,38 g (67,8%) oranžovohnědého oleje. MS (FAB): m/z (%): 253,15 (15) [M+H]; <sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>): 8,17 m (2H, Ar-H); 7,38 m (2H, Ar-H); 3,15 m (1H, CH-NH<sub>2</sub>); 2,93-2,47 m (8H, NH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-NH-CH<sub>2</sub>-CH(-NH<sub>2</sub>)-CH<sub>2</sub>-Ph); <sup>13</sup>C NMR (100 MHz, CDCl<sub>3</sub>): 147,43; 146,77; 130,16; 123,80; 55,93; 52,60; 52,53; 42,65; 41,69; pro C<sub>11</sub>H<sub>18</sub>N<sub>4</sub>O<sub>2</sub> (238,29) vypočteno 55,44 %C, 7,61 %H, 23,51 %N; nalezeno 54,71 %C, 7,11 %H, 23,07 %N

*b) redukce tetrahydridoboritanem lithným*

Ve 180 ml tetrahydrofuranu (sušeného se sodíkem) bylo smíseno 8,5 g chloridu litného (0,2 mol) a 7,57 g tetrahydridoboritanu sodného (0,2 mol). Pod inertní atmosférou dusíku byla tato směs míchána na magnetické míchače spolu s keramickými tělísky (průměr 0,5 cm). Po hodině se začala vylučovat sraženina chloridu sodného. Po 4 dnech míchání bylo odebráno asi 10 ml roztoku a byl proveden neúspěšný pokus sraženinu odfiltrovat.

Směs byla vychlazená na 0°C v lázni a přes septum bylo opatrně přidáno 33 ml (1,33 eq., 0,265 mol, ρ = 1,120 g/cm<sup>3</sup>) BF<sub>3</sub>.Et<sub>2</sub>O. Po 2 hodinách chlazení byla baňka vytažena z ledové lázně. Po ohřátí na laboratorní teplotu byl k reakční směsi opatrně přidáván oranžový roztok 5 g (19,8 mmol) *p*-nitrofenylalanin-*N*-(2-aminoethyl)-amidu (**8**) v 10 ml sušeného tetrahydrofuranu. Po 24 hodinách míchání za laboratorní teploty bylo za intenzivního míchání velice opatrně přikapáno 15 ml methanolu z důvodu odstranění přebytečného boranu. Směs silně pěnila a baňka se zahřívala. Filtrací přes fritu S3 byla odstraněna keramická míchátko a roztok byl za sníženého tlaku odpařen na RVO. Vzniklý světle žlutý zbytek byl 3 hodiny refluxován ve 40 ml směsi 37% kyseliny chlorovodíkové a vody (1:1, v:v). Po zchlazení reakční směsi na laboratorní teplotu byl oranžový roztok odpařen za sníženého tlaku na RVO. Získaný zbytek byl rozpuštěn ve 40 ml směsi vody a 25% čpavku (1:1, v:v). Tato směs byla extrahována 4 × 50 ml dichlormethanu. Spojené organické vrstvy byly sušeny

bezvodým síranem hořečnatým a za sníženého tlaku odpařeny na RVO. TLC analýza (Merck, soustava D,  $R_f = 0,6$ ) ukázala směs výchozího reaktantu a produktu. Tato směs byla dělena na kolonce silikagelu (100 g) za použití eluční soustavy D. Bylo získáno 3,73 g (72,10%) světle hnědého oleje. Spektrální charakteristiky ( $^1\text{H}$  NMR a  $^{13}\text{C}$  NMR) byly shodné s charakteristikami látky připravené postupem a).

*c) redukce boranovým komplexem tetrahydrofuranu*

Ve dvouhrdlé 250 ml baňce pod zpětným chladičem byl v 33 ml tetrahydrofuranu rozpuštěn 1 g *p*-nitrofenylalanin-*N*-(2-aminoethyl)-amidu (**8**) (3,96 mmol). Pod inertní atmosférou dusíku bylo přes septum opatrně přidáváno 40 ml 0,84 M roztoku boranového komplexu s tetrahydrofuranem. Reakční směs měnila barvu z oranžové na žlutou. Po 45 minutách míchání za laboratorní teploty byla směs refluxována 15 hodin. Po zchlazení na laboratorní teplotu byly do reakční směsi opatrně přikapány 4 ml destilované vody. Směs rozpouštědel byla odpařena za sníženého tlaku na RVO. Vzniklý žlutý prášek byl rozpuštěn ve 23,5 ml 6 M roztoku kyseliny chlorovodíkové. Tento roztok byl 3 hodiny refluxován a po zchladnutí na laboratorní teplotu odpařen za sníženého tlaku na RVO. Odparek byl rozpuštěn ve 33 ml směsi vody a 25% roztoku čpavku a pH upraveno na 11 přidáním 2 ml 5 M roztoku hydroxidu draselného. Vodná vrstva byla extrahována 5 × 50 ml dichlormethanu. Spojené organické vrstvy byly sušeny bezvodým síranem sodným a oddestilováním dichlormethanu na RVO při teplotě 30°C bylo získáno 0,72 g (74,27%) oranžovohnědého oleje.  $^1\text{H}$  NMR a  $^{13}\text{C}$  NMR spektra byla shodná se spektry látky připravené metodou a).

*d) příprava ochráněním *N*-(terc-butoxykarbonyl)-1-(*p*-nitrobenzyl) diethyltriaminu (**7b**)*

Do roztoku 0,1 g látky **7-b** (0,22 mmol) v 5 ml dichlormethanu bylo za míchání přidáno 0,3 ml trifluoroctové kyseliny (2,2 mmol, 0,25 g). Po 1 hodině byla reakční směs odpařena. Zbytek byl rozpuštěn ve 2 ml směsi vody a 25% roztoku čpavku (výsledné pH = 8). Tento roztok byl extrahován 4 × 5 ml dichlormethanu a spojené organické vrstvy byly sušeny bezvodým síranem hořečnatým. Oddestilování dichlormethanu na RVO při teplotě 30°C poskytlo 69 mg žlutohnědého oleje.  $^1\text{H}$  NMR ukázalo směs látek.

### 1-(*p*-nitrobenzyl)-diethylentriamin trihydrochlorid (**9b**)

Roztok 2,5 g látky **7b** (7,4 mmol) v 25 ml trifluoroctové kyseliny byl hodinu míchán za laboratorní teploty. Trifluoroctová kyselina byla za sníženého tlaku odpařena na RVO. Zbytek byl rozpuštěn v 5 ml vody a znovu odpařen za sníženého tlaku na RVO. Takto získaný olej byl rozpuštěn v 10 ml směsi kyseliny chlorovodíkové a vody (1:1, v:v). Po zahuštění na RVO byla tato směs po kapkách přidávána do 150 ml vychlazeného míchacího se bezvodého ethanolu. Získaná hygroskopická sraženina byla rychle odfiltrována na fritě S3 a promyta 2 × 5 ml bezvodého vychlazeného ethanolu. Filtrát byl odpařen do sucha. Po 5 hodinách na odpařování na membránové pumpě byl získán hnědý prášek. Po porovnání <sup>1</sup>H NMR spekter obou podílů byly tyto pevné látky spojeny. Celkem bylo získáno 2,24 g (88,19%) světle hnědé silně hygroskopické pevné látky. MS (FAB): m/z (%): 238,29 ([M-3HCl+H]); <sup>1</sup>H NMR (300MHz, D<sub>2</sub>O): 8,24 m (2H, Ar-H); 7,55 m (2H, Ar-H); 3,09 m (1H, CH-NH<sub>2</sub>); 3,57-3,38 m (6H, NH<sub>2</sub>-CH-CH<sub>2</sub>-NH-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-NH<sub>2</sub>); 3,35-3,11 dd (2H, Ph-CH<sub>2</sub>); <sup>13</sup>C NMR (75 MHz, D<sub>2</sub>O): 147,02; 141,26; 130,22; 124,02; 49,07; 48,66; 44,71; 35,73; 34,98; pro C<sub>11</sub>H<sub>21</sub>Cl<sub>3</sub>N<sub>4</sub>O<sub>2</sub> (234,67) vypočteno 38,00 %C, 6,09 %H, 30,59 %Cl, 16,11 %N; nalezeno 37,69 %C, 5,84 %H, 30,43%Cl, 15,75 %N

### Penta-*tert*-butyl ester 1-(*p*-nitrobenzyl)-diethylentriamin pentaoctové kyseliny (**10**)<sup>40</sup>

K roztoku 1,12 g 1-(*p*-nitrobenzyl)-diethylentriaminu (**9**) (3,2 mmol) v 50 ml dimethylformamidu bylo přidáno 8,7 ml DIPEA (1,56 eq., 0,05 mol). Poté bylo přidáno 4,37 ml *tert*-butyl bromacetátu (0,029 mol) a 0,6 g jodidu draselného (3,56 mmol). Baňka byla pod inertní atmosférou dusíku míchána 4 dny za laboratorní teploty. Dimethylformamid byl odpařen za sníženého tlaku na RVO při teplotě 38°C. Získaná pevná látka byla za míchání rozpuštěna ve 40 ml diethyletheru a 20 ml destilované vody. V dělicí nálevce byly tyto dvě vrstvy rozděleny a organická vrstva byla extrahována 25 ml destilované vody. Spojené vodné vrstvy byly dvakrát extrahovány 2 × 20 ml diethyletheru. Spojené organické vrstvy byly sušeny. Oddestilování diethyletheru na RVO poskytlo 4,49 g (96,10%) surového produktu, který bylo třeba čistit přes sloupec silikagelu (50 g, eluční soustava E, R<sub>f</sub> = 0,8). Čištění poskytlo 2,48 g (52,03%) žlutého oleje látky **10**. MS (FAB): m/z (%): 809,49

(45) [M+H];  $^1\text{H}$  NMR (300MHz,  $\text{CDCl}_3$ ): 8,11 m (2H, Ar-H); 7,48 m (2H, Ar-H); 3,44 s (4H,  $2\text{CH}_2\text{-COO-C(CH}_3)_3$ ); 3,40 s (2H,  $2\text{CH}_2\text{-COO-C(CH}_3)_3$ ); 3,30 s (2H,  $\text{CH}_2\text{-COO-C(CH}_3)_3$ ); 3,28-2,70 m (8H, N-CH( $\text{CH}_2\text{-Ph}$ )- $\text{CH}_2\text{-N-CH}_2\text{-CH}_2\text{-N}$ ); 2,43 m (1H, CH); 1,45 s (18H,  $2\text{COO-C(CH}_3)_3$ ); 1,43 s (27H, 3  $\text{COO-C(CH}_3)_3$ );  $^{13}\text{C}$  NMR (75 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ): 170,22; 170,13; 147,57; 146,66; 130,20; 123,87; 80,95; 80,84; 56,10; 55,71; 53,32; 53,14; 53,02; 52,67; 51,63; 28,09; 28,03; pro  $\text{C}_{41}\text{H}_{68}\text{N}_4\text{O}_{12}$  (808,48) vypočteno 60,87 %C, 8,47 %H, 6,93 %N; nalezeno 61,35%C, 8,69 %H, 6,73 %N

### **penta *terc*-butyl ester 1-(*p*-aminobenzyl)-diethylentriamin pentaoctové kyseliny (11)<sup>40</sup>**

Do roztoku 0,2 g látky **10** (0,24mmol) v 7 ml methanolu bylo přidáno 10% paladium na uhlí. V baňce byl udržován trvalý přetlak a vodík byl zaváděn tenkou kapilárou pod hladinu. Po 24 hodinách TLC prokázala (Merck, soustava E,  $R_f = 0,4$ ) úplné vymizení výchozího reaktantu. Reakční směs byla přefiltrována a světle žlutý filtrát byl za sníženého tlaku odpařen na RVO. Bylo získáno 0,169 g (88,02%) žlutého oleje. Tato směs byla dělena chromatograficky na sloupci silikagelu (20 g, eluční soustava F,  $R_f = 0,6$ ). Chromatografie poskytla 0,119 g (61,98%) světle žlutého oleje látky **11**. MS (FAB):  $m/z$  (%): 780,2 (25) [M+H];  $^1\text{H}$  NMR (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ): 6,98 m (2H, Ar-H); 6,59 m (2H, Ar-H); 3,50 m (4H,  $2\text{CH}_2\text{-COO-C(CH}_3)_3$ ); 3,42 s (2H,  $\text{CH}_2\text{-COO-C(CH}_3)_3$ ); 3,22 m (4H),  $2\text{CH}_2\text{-COO-}t\text{-Bu}$ ); 2,79-2,45 m (9H, N-CH( $\text{CH}_2\text{-Ph}$ )- $\text{CH}_2\text{-N-CH}_2\text{-CH}_2\text{-N}$ ); 1,43 s (27H,  $2\text{COO-C(CH}_3)_3$ ); 1,40 s (18H,  $3\text{COO-C(CH}_3)_3$ );  $^{13}\text{C}$  NMR (75 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ): 170,25; 170,18; 145,63; 130,39; 129,32; 117,37; 81,75; 81,67; 56,03; 55,87; 55,79; 53,47; 53,27; 52,97; 52,66; 51,74; 28,17; 28,27; pro  $\text{C}_{41}\text{H}_{70}\text{N}_4\text{O}_{10}$  (779,02) vypočteno 63,21 %C, 9,06 %H, 7,19 %N; nalezeno 63,51 %C, 9,12 %H, 7,29 %N;

### **5.3. Syntéza konjugační komponenty**

#### **Methylester *N*-acetylcysteinu (12)<sup>90</sup>**

Do 50 ml vychlazeného methanolu byl za míchání a stálého chlazení v lázni led/sůl přikapáván 1 ml (13,45 mmol,  $\rho = 1,640 \text{ g/cm}^3$ ) thionylchloridu. Teplota nepřekročila  $0^\circ\text{C}$ . Poté byly v jedné dávce přidány 2 g (12,25 mmol) *N*-acetyl-*L*-cysteinu. Reakční

směs byla vytažena z ledové lázně a za další dvě hodiny byla odpařena za sníženého tlaku na RVO při teplotě lázně nižší než 35°C. Vzniklý světle žlutý olej byl extrahován 4 × 40 ml ethylacetátu. Spojené organické vrstvy byly sušeny bezvodým síranem sodným. Roztok byl zahuštěn na RVO a přes noc v lednici vykrytalizovalo 0,4 g (18,43%) bílých krystalů látky **12**. Matečný louh byl čištěn přes sloupec silikagelu (20 g, eluční rozpouštědlo ethylacetát, R<sub>f</sub> = 0,8) a po krystalizaci spojených frací obsahujících produkt z horkého ethylacetátu bylo získáno dalších 1,18 g (54,28%). Celkem bylo získáno 1,58 g (72,71%) bílých krystalů o t.t. 79 - 80°C (lit.<sup>90</sup> uvádí 79 - 81°C); MS (FAB): m/z (%): 178,2 (25) [M+H]; 177 (18) [M<sup>+</sup>]; <sup>1</sup>H NMR (300MHz, CDCl<sub>3</sub>): 6,52 d (1H, NH); 4,88 dt (1H, J<sub>1</sub> = 7,5, J<sub>2</sub> = 3,6; CH); 3,78 s (3H, COOCH<sub>3</sub>); 2,99 ddd (2H, J<sub>1</sub> = 0,9, J<sub>2</sub> = 8,85, J<sub>3</sub> = 4,35; CH<sub>2</sub>); 2,06 s (3H, COCH<sub>3</sub>); 1,36 t (1H, J = 9,0; SH); <sup>13</sup>C NMR (75 MHz, CDCl<sub>3</sub>): 170,74; 170,00; 53,67; 52,89; 26,95; 23,21; pro C<sub>6</sub>H<sub>11</sub>NO<sub>3</sub>S (177,22) vypočteno 40,66 %C, 6,26 %H, 7,20 %N, 18,09 S; nalezeno 40,51%C, 6,23%H, 7,31%N, 18,15 %S

### **(3-oxopropyl)-N-acetylcystein (13)<sup>91</sup>**

K suspenzi 2,2 g *N*-acetyl-*L*-cysteinu (13,5 mmol, 2,2 g) v 7 ml destilované vody, bylo přidáno 0,92 ml akroleinu (13,5 mmol). Reakční směs se míchala 24 hodin pod inertní atmosférou dusíku. TLC (Merk, soustava F, R<sub>f</sub> = 0,7, detekce zhášením fluorescence UV) ukázala přítomnost produktu. Odpařením reakční směsi za sníženého tlaku na RVO při teplotě nižší než 41°C bylo získáno 2,90 g (98,24%) látky **13** ve formě žluté pryskyřice. MS (FAB): m/z (%): 220,3 (26) [M+H], 218,2 (57) [M-H]; <sup>1</sup>H NMR (300 MHz, *d*<sub>6</sub>-DMSO): 9,621 t (1H, J = 1,2; CHO); 8,09 d (1H, NH); 4,39 dt (1H, CH); 2,91-2,49 m (6H, CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-S-CH<sub>2</sub>); 1,85 s (3H, CH<sub>3</sub>CONH); <sup>13</sup>C NMR (75MHz, *d*<sub>6</sub>-DMSO): 201,86; 172,05; 169,29; 51,94; 42,80; 40,32; 32,96; 24,19; 22,28; pro C<sub>8</sub>H<sub>13</sub>NO<sub>4</sub>S (219,26) vypočteno 43,82 %C, 5,98 %H, 6,39 %N; nalezeno 43,74 %C, 5,94 %H, 6,48 %N, 14,47 %S

### **Methylester (3-oxopropyl)-N-acetylcysteinu (14)**

Reakce byla provedena za identických podmínek uvedených pro přípravu látky **13**. Bylo připraveno 0,377 g (95,44%) světle žluté pryskyřice látky **14**. MS (FAB): m/z (%): 234,3 (38) [M+H]; <sup>1</sup>H NMR (300MHz, *d*<sub>6</sub>-DMSO): 9,62 t (1H, CHO); 8,32 d (1H, J = 7,8; NH); 4,44 dt (1H, J<sub>1</sub> = 5,7, J<sub>2</sub> = 8,1; CH); 3,64 s (3H, COOCH<sub>3</sub>); 2,88

dd (1H,  $J_1 = 5,7$ ,  $J_2 = 13,5$ ; CH-HC(H)-S); 2,69-2,81 m (4H, CH-(H)CH-S-CH<sub>2</sub>-HCH-CHO); 2,49 m (1H, CHO-HC(H)); 1,85 s (1H, COCH<sub>3</sub>); <sup>13</sup>C NMR (75 MHz, *d*<sub>6</sub>-DMSO): 201,77; 171,14; 169,29; 51,93; 51,93 (pík má dvakrát větší intenzitu); 54,75; 32,68; 24,12; 22,18; pro C<sub>9</sub>H<sub>15</sub>NO<sub>4</sub>S (233,28) vypočteno 46,34 %C, 6,48 %H, 6,00 %N, 13,75 %S; nalezeno 46,49 %C, 6,51 %H, 5,97 %N, 13,58 %S

#### 5.4. Syntéza linkeru

##### *N*-karboxymethyl maleamová kyselina (15)<sup>92</sup>

*Obecný postup pro přípravu N-karboxyalkyl maleamových kyselin:*

K roztoku 31,9 g glycinu (0,425 mol) v 625 ml octové kyseliny bylo za míchání přisypáno 41,7 g (0,425 mol) maleinanhydridu. Průběh reakce byl sledován TLC analýzou (Merck, soustava G,  $R_f = 0,9$ ). Po kompletní konverzi byl vzniklý bílý precipitát odfiltrován na fritě S3, promyt 3 × 20 ml ledové vody a 15 ml vychlazeného ethanolu a sušen na vzduchu. Získáno bylo 69,5 g (95,6 %) bílého prášku o t.t. 188 - 189°C (lit<sup>92</sup> uvádí 187 - 188,5°C); MS (FAB): *m/z* (%): 174,2 (20) [M+H]; <sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>): 10-8 vbs (2H, NH, COOH); 6,53 dd (2H, CH=CH); 3,98 s (2H, CH<sub>2</sub>-COOH); <sup>13</sup>C NMR (100 MHz, CHCl<sub>3</sub>): 176,21; 166,84; 165,84; 134,24; 132,01; 42,23; pro C<sub>7</sub>H<sub>5</sub>NO<sub>4</sub> (173,12) vypočteno 41,63 %C, 4,08 %H, 8,09 %N; nalezeno 41,83 %C, 3,85 %H, 8,37 %N

##### 1-(*N*-maleimidyl)octová kyselina (16)

*Obecné způsoby přípravy maleimidů:*

##### **Způsob 1: cyklizace s NEt<sub>3</sub>**<sup>92</sup>

K roztoku 4 g *N*-karboxymethyl-maleamové kyseliny (15) (23,09 mmol) v 500 ml toluenu bylo přidáno 3,3 ml Et<sub>3</sub>N (2,1 eq., 48,25 mmol). Reakční směs byla refluxována 1 hodinu a pomocí Dean-Starkova aparátu byla azeotropicky jímána voda. Na dně vznikl narůžovělý olej. Po zchlazení směsi byl toluen dekantován a odpařen za sníženého tlaku na RVO. Získaný žlutý olej byl rozpuštěn v 18 ml vody a okyselen 300μl 37% kyseliny chlorovodíkové na pH = 2. Tento roztok byl extrahován 4 × 20 ml ethylacetátu. Spojené organické vrstvy byly sušeny bezvodým síranem sodným. Odpařením ethylacetátu za sníženého tlaku na RVO bylo získáno 1,33 g (37,15%) bílého prášku o t.t. 111 - 112°C (lit<sup>92</sup> uvádí 112 - 112,5°C); MS (FAB): *m/z*

(%): 156,1 (12) [M+H], 154 (100) [M-H]; <sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>): 10 - 8 vbs (1H; COOH); 6,81 s (2H, CH=CH); 4,34 s (2H, CH<sub>2</sub>); <sup>13</sup>C NMR (100 MHz, CDCl<sub>3</sub>): 172,49; 169,59; 134,52; 38,24; pro C<sub>7</sub>H<sub>8</sub>NO<sub>4</sub> (155,11) vypočteno 46,46 %C, 3,25 %H, 9,03 %N; nalezeno 46,97 %C, 3,67 %H, 8,79 %N.

### **Způsob 2: cyklizace s HMDS a Lewisovou kyselinou**<sup>74</sup>

K suspenzi 1 g (*N*-karboxymethyl-maleamové kyseliny (**15**) (5,78 mmol) v 300 ml benzenu pod zpětným chladičem bylo po zahřátí na 65°C přidáno 0,6 ml HMDS (0,5 eq., 2,89 mmol). Následně bylo přidáno 0,78 g bezvodého chloridu zinečnatého (čerstvě připraveného tavením) (1 eq., 5,78 mmol) a když reakční směs začala vřít, bylo přidáno ještě 1,8 ml HMDS (1,5 eq., 8,67 mmol). Po 24 hodinách refluxu byla reakční směs odpařena za sníženého tlaku na RVO. Získaná nažloutlá pevná látka byla rozpuštěna v 15 ml methanolu a roztok byl okyselen několika kapkami 1N kyseliny chlorovodíkové. Po 15 minutách míchání byla směs extrahována 3 × 20 ml ethylacetátu. Spojené organické vrstvy byly protřepány s 15 ml nasyceného roztoku hydrogenuhličitanu sodného a odpařeny za sníženého tlaku na RVO. Čištění přes sloupec silikagelu (20 g, eluční soustava G, R<sub>f</sub> = 0,6) poskytlo 0,37 g (41,3%) světlého prášku. Spektrální charakteristiky (<sup>1</sup>H NMR, <sup>13</sup>C NMR této látky byly shodné s charakteristikami látky připravené způsobem 1.

### **(*N*-sukcinimidyl)-1-(*N*-maleimido)acetát (**17**)**

*Obecné postupy pro esterifikaci maleimidů *N*-hydroxysukcinimidem:*

#### **Metoda A: esterifikace (*N*-maleimidyl)alkylových kyselin**<sup>72</sup>

Za chlazení v ledové lázni bylo 0,37 g 1-*N*-(maleimido)octové kyseliny (**16**) (2,38 mmol) rozpuštěno ve 20 ml ethylacetátu. Bylo přidáno 0,3 g *N*-hydroxysukcinimidu (1,1 eq., 2,6 mmol) a po jeho rozpuštění i 0,54 g dicyklohexylkarbodiimidu (1,1 eq., 2,6 mmol). Po 1 hodině byla ledová lázeň odstraněna a reakční směs se míchala přes noc za laboratorní teploty. Po okyselení několika kapkami 96% kyseliny octové byla reakční směs odpařena za sníženého tlaku na RVO. Získáno bylo 0,58 g (96,60%) světle hnědého prášku o t.t.: 181,5 - 183°C (lit.<sup>72</sup> uvádí 183 - 184°C; MS (FAB): m/z (%): 253,1 (32) [M+H]; <sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>): 6,89 s (2H, CH=CH); 4,68 s (2H, N-CH<sub>2</sub>-COO); 2,88 s (4H, CO-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-CO); <sup>13</sup>C NMR (100 MHz, CDCl<sub>3</sub>): 172,85; 170,45; 169,77; 135,20; 36,37; 25,25; pro C<sub>10</sub>H<sub>8</sub>N<sub>2</sub>O<sub>6</sub> (252,18) vypočteno 47,63 % C, 3,20 %H, 11,11 %N; nalezeno 47,39 %C, 3,28 %H, 10,97 %N.

### **Metoda B: příprava *N*-hydroxysukcinimidů v jednom kroku**<sup>77</sup>

K roztoku 1,31 g anhydridu kyseliny maleinové (13,3 mmol) v 10 ml dimethylformamidu byl přidán 1 g glycinu (13,3 mmol). Po rozpuštění aminokyseliny byl roztok míchán 2 hodiny. Reakční směs byla vychlazena na 0°C a bylo přidáno 1,91 g *N*-hydroxysukcinimidu (16,6 mmol) a následně 5,49 g dicyklohexylkarbodiimidu (26,6 mmol). Po 2 hodinách ze z reakční směsi začal vylučovat precipitát dicyklohexylmočoviny. Reakční směs změnila barvu na růžovou, která po 24 hodinách přešla až na hnědou. Po 24 hodinách míchání za laboratorní teploty byla dicyklohexylmočovina odfiltrována a promyta 2 ml vychlazeného dimethylformamidu. Filtrát byl odpařen za sníženého tlaku na RVO. Výsledný hnědý olej byl rozpuštěn v 10 ml 5% uhličitanu draselného a vodná vrstva byla extrahována 5 × 15 ml dichlormethanu. Spojené organické vrstvy byly sušeny bezvodým síranem sodným. Po oddestilování dichlormethanu na RVO bylo získáno 1,59 g (47,21%) světle hnědé pevné látky. Spektrální charakteristiky (<sup>1</sup>H NMR, <sup>13</sup>C NMR) této látky byly shodné s charakteristikami látky připravené metodou A.

### ***N*-karboxyhexyl maleamová kyselina (18)**<sup>92</sup>

Látka byla připravena podle obecného postupu popsaného u látky **15**. Výtěžek 93,0%. T.t.: 160 - 162 (lit<sup>92</sup> uvádí 159,5 - 161°C); MS (APPI-): m/z (%): 228,3 (98) [M-H], 209,9 (35), 96,0 (32); <sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>): 6,39 d (1H, J = 12,9; CH=CH); 6,26 d (1H, J = 12,9; CH=CH); 3,97 bs (3H, COOH, NH, OH); 3,32 t (2H, J = 7,2; NH-CH<sub>2</sub>); 2,33 t (2H, J = 7,2; CH<sub>2</sub>-COOH); 1,60 m (4H, NH-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>); 1,39 q (2H, NH-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>); <sup>13</sup>C NMR (100 MHz, CDCl<sub>3</sub>): 176,22; 166,24; 165,82; 134,08; 132,31; 39,66; 33,53; 27,95; 26,01; 24,05; pro C<sub>10</sub>H<sub>15</sub>NO<sub>5</sub> (229,23) vypočteno 52,40 %C, 6,60 %H, 6,11 %N; nalezeno 52,51 %C, 6,52 %H, 6,09 %N

### **6-(*N*-maleimidyl)hexanová kyselina (19)**<sup>92</sup>

Látka byla připravena způsobem 1 popsaným u látky **16**. Bylo získáno 0,84 g (30,43%) bílého prášku o t.t. 85 - 88°C (lit<sup>92</sup> uvádí 88 - 90°C); MS (APPI-): m/z (%): 209,9 (98) [M-H], 96,0 (50); <sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>): 6,70 s (2H, CH=CH); 3,52 t (2H, J = 7,2; CH<sub>2</sub>-N); 2,35 t (2H, J = 7,2; CH<sub>2</sub>-COOH); 1,66 q (2H, J = 7,6; N-CH<sub>2</sub>-



**CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>**); 1,62 q (2H, J = 7,6; N-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-**CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>**); 1,34 m (2H, N-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-**CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>**); <sup>13</sup>C NMR (100 MHz, CDCl<sub>3</sub>): 179,44; 170,83; 134,02; 37,52; 33,75; 28,11; 26,06; 24,04; pro C<sub>10</sub>H<sub>13</sub>NO<sub>4</sub> (211,21) vypočteno 56,86 %C, 6,20 %H, 6,63 %N; nalezeno 56,97 %C, 6,29 %H, 6,41 %N.

#### ***N*-(sukcinimidyl)-6-(*N*-maleimido)hexanoát (20)<sup>72,77</sup>**

Látka byla připravena podle obecného způsobu popsaného u látky **17**, s tím rozdílem, že reakce byla prováděna v dimethylformamidu.

Metodou **A** bylo z 0,5 g 6-(*N*-maleimido)hexanové kyseliny (**19**) získáno po 24 hodinách odpařování na membránové pumpě 0,61 g (83,71%) nahnědlého prášku o t.t. 60 - 61,5°C (lit.<sup>72</sup> uvádí 62 - 65°C); MS (APPI): m/z (%): 309,1 (80) [M+H], 293,3 (95), 225,5 (41); <sup>1</sup>H NMR (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>): 6,69 s (2H, CH=CH); 3,53 t (2H, J = 7,2; N-CH<sub>2</sub>); 2,84 s (4H, CO-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-CO); 2,61 t (2H, J = 7,2; CH<sub>2</sub>-COO); 1,78 q (2H, J = 7,6; N-CH<sub>2</sub>-**CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>**); 1,64 q (2H, J = 7,6; N-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-**CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>**); 1,41 m (2H, N-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-**CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>**); <sup>13</sup>C NMR (75 MHz, CDCl<sub>3</sub>): 170,79; 169,11; 168,33; 134,02; 37,39; 30,70; 27,98; 25,76; 25,53; 23,99; pro C<sub>14</sub>H<sub>16</sub>N<sub>2</sub>O<sub>6</sub> (308,29) vypočteno 54,54 %C, 5,23 %H, 9,09 %N; nalezeno 53,89 %C, 5,19 %H, 8,96 %N

Metoda **B** poskytla z 1 g ω-aminohexanové kyseliny 1,93 g (82,12%) hnědého prášku. Spektrální charakteristiky (<sup>1</sup>H NMR, <sup>13</sup>C NMR) byly totožné s charakteristikami látky **20** připravené metodou **A**.

#### ***N*-karboxybutyl maleamová kyselina (21)<sup>92</sup>**

Látka byla připravena podle obecného postupu popsaného u látky **15**. Z 10 g γ-aminobutanové kyseliny bylo získáno 18,96 (97,20%) bílé krystalické látky o t.t. 160,5 - 162°C (lit.<sup>92</sup> uvádí 161,5 - 162,5°C); MS (FAB): m/z (%): 202,3 (26) [M+H]; <sup>1</sup>H NMR (400 MHz, *d*<sub>6</sub>-DMSO): 6,42 d (1H, CH=CH); 6,27 d (1H, CH=CH); 5,0-4,0 bs (3H, COOH, OH, NH); 3,38 t (2H, NH-CH<sub>2</sub>); 2,39 t (2H, CH<sub>2</sub>-COOH); 1,90 q (2H, CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>); <sup>13</sup>C NMR (100 MHz, *d*<sub>6</sub>-DMSO): 176,39; 169,78; 167,2; 133,47; 131,66; 39,54; 33,29; 25,94; pro C<sub>8</sub>H<sub>11</sub>NO<sub>5</sub> (201,18) vypočteno 47,76 %C, 5,51 %H, 6,96 %N; nalezeno 47,07 %C, 5,47 %H, 6,39 %N

#### **4-(*N*-maleimidyl)butanová kyselina (22)<sup>92</sup>**

Látka byla připravena podle obecného postupu uvedeného u látky **16**

Způsobem 1 bylo připraveno z 1 g *N*-karboxybutyl maleamové kyseliny (**21**) 0,40 g (43,62%) bílého prášku o t.t. 88 - 90,5°C (lit.<sup>92</sup> uvádí 90 - 92°C).

Způsobem 2 bylo připraveno z 1g *N*-karboxybutyl maleamové kyseliny (**21**) 0,46 g (49,50%) bílého prášku o t.t. 89 - 91°C; MS (FAB): m/z (%) 184,2 (12) [M+H], 182,1 (73) [M-H]; <sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>): 6,74 s (2H, CH=CH); 3,56 t (2H, CH<sub>2</sub>-NH); 2,31 t (2H, COOH-CH<sub>2</sub>); 1,87 q (2H, CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>); <sup>13</sup>C NMR (100 MHz, CDCl<sub>3</sub>): 180,03; 170,89; 133,89; 37,02; 32,60; 24,29; pro C<sub>8</sub>H<sub>9</sub>NO<sub>4</sub> (183,16) vypočteno 52,46 %C, 4,95 %H, 7,65 %N; nalezeno 51,78 %C, 4,68 %H, 7,39 %N

### **(*N*-sukcinimidyl)-4-(*N*-maleimido)butanoát (**23**)<sup>93</sup>**

Látka byla připravena podle obecného způsobu uvedeného u látky **17**, s tím rozdílem, že reakce byla prováděna v dimethylformamidu.

Metodou **A** bylo z 0,95 g 4-(*N*-maleimidyl)butanové kyseliny (**22**) po 5 hodinách odpařování na membránové pumpě získáno 1,05 g (74,41%) narůžovělé pevné látky o t.t. 120,5 - 122°C (lit.<sup>93</sup> uvádí 124 - 132 °C); MS (FAB): m/z (%): 281,3 (37) [M+H]; <sup>1</sup>H NMR (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>): 6,61 s (2H, CH=CH); 3,60 t (2H, N-CH<sub>2</sub>); 2,80 s (4H, CO-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-CO); 2,62 t (2H, CH<sub>2</sub>-COO); 2,00 q (2H, N-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>); <sup>13</sup>C NMR (75 MHz, CDCl<sub>3</sub>): 170,73; 169,16; 167,92; 134,26; 36,71; 28,44; 25,64; 23,61; pro C<sub>12</sub>H<sub>12</sub>N<sub>2</sub>O<sub>6</sub> (280,23) vypočteno 51,43 %C, 4,32 %H, 10,00 %N; nalezeno 51,21 %C, 4,47 %H, 9,75 %N

Metodou **B** bylo z 1 g  $\gamma$ -aminobutanové kyseliny získáno 1,89 (69,7%) hnědé látky, která po čištění přes sloupec silikagelu (50 g, soustava I, R<sub>f</sub> = 0,8) poskytla 0,77 g (28,34%) světlého prášku o t.t. 121 - 124°C. Spektrální charakteristiky (<sup>1</sup>H NMR, <sup>13</sup>C NMR) byly shodné s látkou **23** připravenou metodou **A**.

### **(*N*-Sukcinimidyl)-4-(*N*-maleimidomethyl)cyklohexan-1-karboxylát (**24**)<sup>77</sup>**

Látka byla připravena podle obecného způsobu uvedeného u látky **17**.

Metodou **B** bylo z 1 g 2-(4-aminocyklohexyl)octové kyseliny připraveno 1,74 g (82,07%) bílé pevné látky o t.t. 165,5 - 166,5°C (lit.<sup>77</sup> uvádí 165 - 167°C); MS (FAB): m/z (%): 334,3 (24) [M+H]; <sup>1</sup>H NMR (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>): 6,70 s (2H, CH=CH); 3,37 d (2H, N-CH<sub>2</sub>-CH); 2,81 s (4H, CO-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-CO); 2,54 tt (1H, CH-COO); 2,12 m (2H, CH<sub>2</sub>-cyklus); 1,75 m (2H, CH<sub>2</sub>-cyklus), 1,69 m (1H, CH-CH<sub>2</sub>-N); 1,49 ddd (2H, CH<sub>2</sub>-cyklus), 1,05 m (2H, CH<sub>2</sub>-cyklus); <sup>13</sup>C NMR (75MHz, CDCl<sub>3</sub>): 171,06; 170,68; 169,29; 134,10; 43,44; 40,44; 36,13; 29,35; 28,06; 25,66; pro

$C_{16}H_{18}N_2O_6$  (334,32) vypočteno 57,48 %C, 5,43 %H, 8,38 %N; nalezeno 57,09 %C, 5,58 %H, 8,49 %N

#### **(*N*-sukcimidyl) 4-(*N*-maleimido)propionát (25)<sup>77</sup>**

Látka byla připravena podle obecného způsobu uvedeného u látky 17.

Metodou **B** bylo z 0,91 g  $\beta$ -alaninu získáno 2,43 g (89,31%) bílého prášku o t.t. 161 - 163°C (lit.<sup>77</sup> uvádí 164 - 166°C); MS (APPI): m/e (%): 267,0 (80) [M+H], 225,2 (70), 152,0 (22); <sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>): 6,74 s (2H, CH=CH); 3,94 t (2H, NH-CH<sub>2</sub>); 3,02 t (2H, CH<sub>2</sub>-COO); 2,83 s (4H, CO-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-CO); <sup>13</sup>C NMR (100 MHz, CDCl<sub>3</sub>): 170,15; 168,70; 165,96; 134,27; 32,94; 29,68; 25,51; pro  $C_{11}H_{10}N_2O_6$  (226,21) vypočteno 49,63 %C, 3,79 %H, 10,52 %N; nalezeno 49,78 %C, 3,61 %H, 10,48 %N

### **5.5. Reduktivní aminace – modelové substráty**

#### **Methylester *p*-amino benzoové kyseliny hydrochlorid (27)**

Do vychlazeného roztoku 18 ml methanolu (0°C) bylo za míchání a chlazení opatrně přikapáno 2,45 ml thionylchloridu (2,3 eq., 33,7 mmol,  $\rho = 1,640 \text{ g/cm}^3$ ). Po 15 minutách míchání byly přidány 2 g *p*-aminobenzoové kyseliny (14,6 mmol). Po 24 hodinách byla odfiltrována vzniklá sraženina. TLC analýza (Merk, soustava D, R<sub>f</sub> = 0,7) ukázala, že se jedná o produkt. Filtrát byl za sníženého tlaku odpařen na RVO. Získaný zbytek byl rozpuštěn v 10 ml methanolu a znovu odpařen za sníženého tlaku na RVO. Čištění přes sloupec silikagelu (20 g, soustava D) poskytlo 1,53 g (56,04%) bílého prášku. Společně s prvním podílem bylo získáno 2,23 g (81,68%) bílé pevné látky o t.t. 163 - 165°C. MS (FAB): m/z (%): 152,0 (47) [M-HCl+H], 120,0 (100); <sup>1</sup>H NMR (300 MHz, *d*<sub>6</sub>-DMSO): 9,48 bs (3H, NH<sub>3</sub><sup>+</sup>); 7,89 m (2H, Ar-H); 7,20 m (2H, Ar-H); 3,80 s (3H, COOCH<sub>3</sub>); <sup>13</sup>C NMR (75 MHz, *d*<sub>6</sub>-DMSO): 165,86; 142,71; 130,91; 124,37; 119,94; 52,05; pro  $C_{10}H_8ClNO_2$  (187,62) vypočteno 51,21 %C, 5,37 %H, 18,90 %Cl, 7,47 %N; nalezeno 51,39 %C, 5,49 %H, 19,16 %Cl, 7,87 %N

### **Methyl 4-(3-(2-methoxykarbonyl)-2-(acetamidoethylthio) propylamino) benzoát (29)**

*Obecný postup pro reduktivní aminace:*

0,40 g látky **27** (2,14 mmol) bylo rozpuštěno v 10 ml tetrahydrofuranu a pH tohoto roztoku bylo upraveno několika kapkami  $\text{NEt}_3$  na  $\text{pH} = 8$ . Byl přidán roztok 0,5 g methylester (3-oxopropyl)-*N*-acetylcysteinu (**14**) (2,14 mmol) v 5 ml tetrahydrofuranu. Po 10 minutách bylo přisypáno 1,35 g kyanoborohydridu sodného (10 eq., 21,4 mmol). Po 12 hodinách byla provedena TLC (Merck, ethylacetát,  $R_f = 0,7$ ). Po vymizení výchozích reaktantů byla reakční směs odpařena za sníženého tlaku na RVO. Získaný zbytek byl rozpuštěn v 4 ml destilované vody a extrahován  $3 \times 5$  ml dichlormethanu. Spojené organické vrstvy byly sušeny bezvodým síranem hořečnatým. Bylo získáno 0,55 g (87,31%) světle žlutého oleje látky **29**. MS (FAB):  $m/z$  (%): 369,5 (26)  $[\text{M}+\text{H}]$ ;  $^1\text{H}$  NMR (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ): 7,76 m (2H, Ar-H); 6,53 m (2H, Ar-H); 4,70 m (1H, CH-NHAc); 3,88 s (3H, Ph-COOCH<sub>3</sub>); 3,78 s (3H, CH-COOCH<sub>3</sub>); 3,00 dddd (2H, S-CH<sub>2</sub>-CH); 3,06 m (2H, NH-CH<sub>2</sub>); 2,42 t (2H, S-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>); 2,05 s (3H, NHCOCH<sub>3</sub>); 1,83 m (2H, S-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>);  $^{13}\text{C}$  NMR (75 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ): 170,74; 170,01; 166,23; 151,78; 130,73; 118,29; 113,31; 52,61; 51,32; 44,12; 33,73; 30,51; 26,71; 23,21; pro  $\text{C}_{17}\text{H}_{24}\text{N}_2\text{O}_5\text{S}$  (368,45) vypočteno 55,42 %C, 6,57 %H, 7,60 %N, 8,70 %S; nalezeno 54,72 %C, 6,06 %H, 7,31 %N, 8,43 %S

### **Methylester *N*-(fenyl-(*S*-(3-aminopropyl))-*N*-acetylcysteinu) (30)**

Látka byla připravována podle obecného postupu popsaného u látky **29** s tím rozdílem, že redukčním činidlem bylo buď 10 eq. kyanoborohydridu sodného nebo 1,5 equivalentu triacetoxyborohydridu sodného. Reakce byla prováděna bez přítomnosti báze.

Nejlepšího výtěžku a čistoty látky bylo dosaženo reakcí 0,019 ml anilínu (0,21 mmol) a 0,05 g methylester (3-oxopropyl)-*N*-acetylcysteinu (**14**) (0,21 mmol) ve 4 ml THF za použití 0,067 g triacetoxyborohydridu sodného (1,5 eq., 0,315 mmol). Získáno bylo 0,061 g (91,04%) světle žlutého oleje. MS (FAB):  $m/z$  (%): 311,4 (35)  $[\text{M}+\text{H}]$ ;  $^1\text{H}$  NMR (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ): 7,04 m (2H, Ar-H); 6,58 m (1H, Ar-H); 6,43 m (2H, Ar-H); 4,63 m (1H, CH-NHAc); 3,72 s (3H, COOCH<sub>3</sub>); 3,02 dddd (2H, S-CH<sub>2</sub>-CH); 3,12 m (2H, NH-CH<sub>2</sub>); 2,43 t (2H, S-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>); 2,05 s (3H, NHCOCH<sub>3</sub>); 1,86 m (2H, S-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>);  $^{13}\text{C}$  NMR (75 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ): 172,05; 169,34; 147,78; 129,63; 117,28; 113,74; 52,65; 51,33; 44,11; 33,71; 30,53; 26,70; 23,21; pro  $\text{C}_{15}\text{H}_{22}\text{N}_2\text{O}_3\text{S}$

(310,41) vypočteno 58,04 %C, 7,14 %H, 9,02 %N, 10,33 %S; nalezeno 57,49%C, 7,29 %H, 8,65 %N, 9,89%S

### ***N*-(*tert*-butoxykarbonyl)-1,2-etylendiamin (31)**

Do roztoku 6,12 ml ethylendiaminu (0,0916 mol, 5,5 g) ve 30 ml dioxanu byl během 2 a půl hodiny po kapkách přidáván roztok 2 g di-*tert*-butyl dikarbonátu (0,00916 mol) ve 20 ml dioxanu. Po 24 hodinách míchání byla reakční směs odpařena za sníženého tlaku na RVO. Ke získanému zbytku byl přidáno 40 ml vody a nerozpuštěná část byla odfiltrována. Filtrát byl extrahován 3 × 30 ml dichlormethanu a spojené organické vrstvy byly sušeny bezvodým síranem hořečnatým. Oddestilování dichlormethanu na RVO při teplotě 30 °C poskytlo 1,37 g (93,41%) nažloutlého oleje. MS (FAB): *m/z* (%): 161,2 (56) [M+H]; <sup>1</sup>H NMR (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>): 5,03 bs (1H, NHBoc); 3,14 q (2H, CH<sub>2</sub>-NH<sub>2</sub>); 2,77 t (2H, CH<sub>2</sub>-NHBoc); 1,42 s (9H, N-C(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>); 1,27 d (2H, NH<sub>2</sub>); <sup>13</sup>C NMR (75 MHz, CDCl<sub>3</sub>) : 156,33; 79,25; 43,41; 41,91; 28,48; pro C<sub>7</sub>H<sub>16</sub>N<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (160,21) vypočteno 52,48 %C, 10,07 %H, 17,48 %N; nalezeno 52,36 %C, 10,18 %H, 17,29 %N

### **Methyl 2-acetamido-3-(4,6-dichloro-1,3,5-triazin-2-ylthio)propanoát (32)**

Do vychlazeného roztoku (0°C) 1,04 g kyanurchloridu (5,65 mmol) v 10 ml acetonu byl za míchání a chlazení v lázni led/sůl přidán 1 g methylester *N*-acetylcysteinu (**12**) (5,65 mmol). Po jeho rozpuštění bylo přikapáno 0,76 ml 2,4,6-collidinu (1 eq., 5,65 mmol, ρ = 0,914 g/cm<sup>3</sup>). Reakční směs ihned zežloutla a začal se vylučovat 2,4,6-collidin hydrochlorid. Po 90 minutách míchání v ledové lázni byla provedena TLC analýza (Merck, soustava K, R<sub>f</sub> = 0,9), která indikovala vymizení výchozích reaktantů. 2,4,6-collidin hydrochlorid byl odfiltrován a žlutý filtrát byl odpařen za sníženého tlaku na RVO. Čištění přes sloupec silikagelu (20 g, soustava J, R<sub>f</sub> = 0,8) poskytlo 1,53 g (87,21%) světle žluté pevné látky. MS (APPI): *m/z* (%): 326 (33) [M+H], 325 (35) [M<sup>+</sup>], 283 (10); <sup>1</sup>H NMR (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>): 4,67 m (1H, CH-NHAc); 3,70 s (3H, COOCH<sub>3</sub>); 3,51 m (2H, S-CH<sub>2</sub>); 2,05 (3H, COCH<sub>3</sub>); <sup>13</sup>C NMR (75 MHz, CDCl<sub>3</sub>): 185,21; 170,93; 170,74; 170,01; 53,67; 52,91; 36,11; 23,21; pro C<sub>9</sub>H<sub>10</sub>Cl<sub>2</sub>N<sub>4</sub>O<sub>3</sub>S (325,17) vypočteno 33,24 %C, 3,10 %H, 21,81 %Cl; 17,23 %N, 9,86 %S; nalezeno 32,71 %C, 2,86 %H, 21,38 %Cl, 17,16 %N, 9,58 %S

**Methyl 2-acetamido-3-(4-(2-(*tert*-butoxykarbonylamino)ethylamino)-6-chloro-1,3,5-triazin-2-ylthio)propanoát**  
**(33)**

Do roztoku 1 g methylester (4,6-dichloro-1,3,5-triazin) *N*-acetylcysteinu (**32**) (3,08 mmol) v 5 ml acetonu byl přidán roztok 0,49 g *N*-(*tert*-butoxykarbonyl)-1,2-etylendiaminu (**31**) (3,08 mmol) v 5 ml acetonu. Po 15 minutách míchání bylo přidáno 0,42 ml 2,4,6-collidinu (1,05 eq., 3,26 mmol,  $\rho = 0,914 \text{ g/cm}^3$ ). Po 2 h míchání za laboratorní teploty se začal srážet 2,4,6-collidin hydrochlorid. Po dvou dalších hodinách míchání byla sraženina odfiltrována a filtrát odpařen za sníženého tlaku na RVO. Opakovaným rozpouštěním v malém množství acetonu a odfiltrováním nerozpuštěné pevné látky byl roztok zbaven zbytků 2,4,6-collidin hydrochloridu. Po čištění látky přes sloupec silikagelu (25 g, soustava J,  $R_f = 0,7$ ) bylo získáno 0,94 g (68,11%) žlutého oleje. MS (FAB):  $m/z$  (%): 449,0 (25) [ $M^+$ ];  $^1\text{H}$  NMR (300MHz,  $\text{CDCl}_3$ ): 4,67 m (1H, CHNHAc); 3,78 s (3H,  $\text{COOCH}_3$ ); 3,66-3,19 m (6H, NHBoc- $\text{CH}_2\text{-CH}_2\text{-NH}$ , S- $\text{CH}_2$ ); 2,05 s (3H,  $\text{COCH}_3$ ); 1,42 s (9H,  $\text{OC}(\text{CH}_3)_3$ );  $^{13}\text{C}$  NMR (75MHz,  $\text{CDCl}_3$ ): 183,91; 171,31; 170,74; 170,02; 161,33; 156,38; 79,31; 53,67; 51,92; 48,93; 41,21; 36,42; 28,52; 23,21; pro  $\text{C}_{16}\text{H}_{25}\text{ClN}_6\text{O}_5\text{S}$  (448,81); 42,81 %C, 5,61 %H, 7,90 %Cl, 18,72 %N, 7,14 %S; nalezeno 42,47 %C, 5,31 %H, 7,91 %Cl, 18,41 %N, 6,85 %S

***Terc*-butyl-2,2'-(2-((3-(4-(4-(2-acetamido-3-methoxy-3-oxopropylthio)-6-(2-(*tert*-butoxykarbonylamino)ethylamino)-1,3,5-triazin-2-ylamino)fenyl)-2-(bis(2-*tert*-butoxy-2-oxoethyl)amino)propyl)(2-*tert*-butoxy-2-oxoethyl)amino)ethylazandiyl)-diacetát**  
**(34)**

V 50 ml baňce byly smíseny roztoky 1 g látky **33** (1,89 mmol) 10 ml acetonu a 1,47 g látky **11** (1,89 mmol) v 10 ml acetonu. Bylo přidáno 0,5 ml 2,4,6-collidin (2 eq., 3,78 mmol) a reakční směs byla refluxována, dokud se nezačal srážet hydrochlorid 2,4,6-collidinu (asi 5 hodin). Po hodině byl roztok ochlazen na laboratorní teplotu a 2,4,6-collidin hydrochlorid odfiltrován. Filtrát odpařen za sníženého tlaku na RVO. Získaný zbytek byl rozpuštěn v acetonu, nerozpuštěná jemná sraženina byla odfiltrována a filtrát opět odpařen. Čištěním přes sloupec silikagelu (50 g, soustava J,  $R_f = 0,4$ ) bylo získáno 1,57 g (65,14%) žlutého oleje. MS (FAB): 1192,5 (23) [ $M+H$ ]; Ve  $^1\text{H}$  NMR spektru (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) byly nalezeny tyto charakteristické píky: (6,85 m (2H, Ar-H); 6,43 m (2H, Ar-H); 3,66 s (3H,  $\text{COOCH}_3$ ); 2,05 s (3H,

NCOCH<sub>3</sub>); 1,42 s (9H, OC(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>); 1,39 s (45H, 5 × C(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>); pro C<sub>57</sub>H<sub>94</sub>N<sub>10</sub>O<sub>16</sub>S (1191,48) vypočteno 57,43 %C, 7,95 %H, 11,76 %N, 2,69 %S; nalezeno 56,57 %C, 7,43 %H, 11,39 %N, 2,37 %S

**2-acetamido-3-(4-(2-aminoethylamino)-6-(4-(2-(bis(2-*tert*-butoxy-2-oxoethyl)amino)-3-((2-(bis(2-*tert*-butoxy-2-oxoethyl)amino)ethyl)(2-*tert*-butoxy-2-oxoethyl)amino)propyl)fenylamino)-1,3,5-triazin-2-ylthio)propanová kyselina (35)**

K roztoku 0,1 g hydroxidu lithného (5 eq., 4,2 mmol) ve 2 ml destilované vody bylo přidáno 6 ml methanolu. Tento roztok byl smísen s roztokem 1 g látky **34** (0,84 mmol) ve 3 ml methanolu. Po 12 hodinách míchání v inertní atmosféře argonu byla směs odpařena za sníženého tlaku na RVO (*t*<sub>lázne</sub> < 37°C). K odparku byly přidány 3 ml methanolu a pH bylo upraveno několika kapkami kyseliny citronové na pH = 5. Směs byla třepána s 5 ml dichlormethanu. Vodná vrstva byla extrahována 3 × 3 ml dichlormethanu. Spojené organické fáze byly sušeny bezvodým síranem sodným a odpařeny za sníženého tlaku na RVO (*t*<sub>lázne</sub> = 35°C).

Surový produkt byl rozpuštěn v 10 ml směsi *tert*-butylacetát/dichlormethan (4:1, v:v) a po kapkách bylo přidáno 0,11 ml methansulfonové kyseliny (2 eq., 1,68 mmol, ρ = 1,481 g/cm<sup>3</sup>). Po 12 hodinách míchání za laboratorní teploty pod inertní atmosférou argonu byla směs neutralizována 1 ml nasyceného vodného roztoku hydrogenuhličitanu sodného pro odstranění methansulfonové kyseliny. Látka byla extrahována 3 × 10 ml dichlormethanu. Spojené organické vrstvy byly sušeny bezvodým síranem sodným. Odpaření rozpouštědel za sníženého tlaku na RVO poskytlo 0,39 g (43,13%) žlutého oleje. MS (FAB): *m/z* (%): 1078,3 (24) [M+H]; V <sup>1</sup>H NMR spektru (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>) byly nalezeny tyto charakteristické píky: 6,84 m (2H, Ar-H); 6,43 m (2H, Ar-H); 4,79 m (1H, CH-NHAc); 3,33 m (10 H, 5NCH<sub>2</sub>COO*t*-Bu); 1,39 s (45H, 5COO-C(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>); pro C<sub>51</sub>H<sub>84</sub>N<sub>10</sub>O<sub>13</sub>S (1077,34) vypočteno 56,86 %C, 7,86 %H, 13,00 %N, 2,98 %S; nalezeno 56,03 %C, 7,51 %H, 12,39 %N, 2,19 %S

**2-acetamido-3-(4-(4-(2-(bis(2-*tert*-butoxy-2-oxoethyl)amino)-3-((2-(bis(2-*tert*-butoxy-2-oxoethyl)amino)ethyl)(2-*tert*-butoxy-2-oxoethyl)amino)propyl)fenylamino)-6-(2-(6-(2,5-dioxo-2,5-dihydro-1*H*-pyrrol-1-yl)hexanamido)ethylamino)-1,3,5-triazin-2-ylthio)propanová kyselina (36)**

Do roztoku 5 g látky **35** (0,46 mmol) v 5 ml dimethylformamidu bylo přidáno 0,22 g *N*-sukcinimidyl-6-(*N*-maleimido)hexanoátu (**20**) (1,5 eq., 0,696 mmol). Reakční směs

byla za míchání zahřívána na 35°C. Po 12 h byla reakční směs odpařena. Čištění přes sloupec silikagelu (50 g, soustava E, Rf = 0,6) poskytlo 0,37 g (61,98%) žlutého oleje. MS (FAB): m/z (%): 1286,6 (18) [M+H]; V <sup>1</sup>H NMR spektru (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>) byly nalezeny tyto charakteristické píky: 6,84 m (2H, Ar-H); 6,70 s (2H, CH=CH); 6,43 m (2H, Ar-H); 4,75 m (1H, CH-NHAc); 3,40 s (10H, 5CH<sub>2</sub>-COO*t*-Bu); 2,04 s (3H, NHCOOCH<sub>3</sub>); 1,39 s (45H, 3COO-C(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>); pro C<sub>62</sub>H<sub>98</sub>N<sub>11</sub>O<sub>15</sub>S (1285,57) vypočteno 57,92 %C, 7,68 %H, 11,98 %N, 2,49 %S; nalezeno 27,14 %C, 7,83 %H, 12,39 %N, 2,69 %S

**2,2'-(2-((3-(4-(4-(2-acetamido-2-karboxyethylthio)-6-(2-(6-(2,5-dioxo-2,5-dihydro-1*H*-pyrrol-1-yl)hexanamido)ethylamino)-1,3,5-triazin-2-ylamino)fenyl)-2(bis(karboxymethyl)amino)propyl)(karboxymethyl)amino)ethylazanediy)ldioctová kyselina**

### Konjugát 1 (37)

Do roztoku 0,5 g látky **36** (0,389 mmol) v 5 ml dichlormethanu bylo přidáno 0,29 ml trifluoroctové kyseliny (10 eq., 3,89 mmol). Po 6 hodinách míchání za laboratorní teploty pod inertní atmosférou dusíku byla reakční směs odpařena za sníženého tlaku na RVO. Zbytek byl rozpuštěn ve směsi 5 ml methanolu 0,5 ml destilované vody a znovu odpařen za sníženého tlaku na RVO. K získanému zbytku bylo přidáno 5 ml methanolu a směs byla opatrně odpařena na RVO za sníženého tlaku. Tento postup byl ještě 2 × opakován. Bylo získáno 0,351 g (91,16%) žlutého oleje. MS (FAB): m/z (%): 990 (46) [M<sup>+</sup>]; <sup>1</sup>H NMR spektrum (300 MHz, D<sub>2</sub>O) obsahovalo tyto charakteristické píky: 6,80 m (2H, Ar-H); 6,73 s (2H, CH=CH); 6,41 m (2H, Ar-H); 4,77 m (1H, CH-NHAc); 3,37 s (10H, 5CH<sub>2</sub>-COOH); 2,04 s (3H, NHCOOCH<sub>3</sub>); pro C<sub>41</sub>H<sub>55</sub>N<sub>11</sub>O<sub>16</sub>S (990) vypočteno 49,74 %C, 5,60 %H, 15,56 %N, 3,24 %S; nalezeno 49,29 %C, 5,84 %H, 15,14 %N, 3,59 %S

***tert*-butyl 2,2'-(2-((3-(4-(3-(2-acetamido-3-methoxy-3-oxopropylthio)propylamino)fenyl)-2-(bis(2-*tert*-butoxy-2-oxoethyl)amino)propyl)(2-*tert*-butoxy-2-oxoethyl)amino)ethylazanediy)ldiacetát**

### Meziprodukt 1b (38)

V 10 ml baňce byl smísen roztok 0,2 g látky **11** (0,26 mmol) ve 3 ml tetrahydrofuranu a roztok 0,061 g methylester (3-oxopropyl)-*N*-acetylcysteinu (**14**) (0,26 mmol) v 2 ml tetrahydrofuranu. Za míchání pod inertní atmosférou dusíku bylo přidáno 0,082 g triacetoxyborohydridu sodného (1,5 eq., 0,39 mmol). Po 12 hodinách míchání byla reakční směs odpařena za sníženého tlaku na RVO. Žlutý odparek byl rozpuštěn v 7



ml vody. Vodná vrstva byla extrahována 3 × 7 ml dichlormethanu. Spojené organické vrstvy byly sušeny bezvodým síranem sodným. Po oddestilování dichlormethanu na RVO při 30 °C byl získaný surový produkt čištěn přes sloupec silikagelu (20 g, elučňi rozpouštědlo ethylacetát, R<sub>f</sub> = 0,6). Po odpaření frakcí obsahujících produkt bylo získáno 0,20 g (81,30 %) sklovité amorfnní žluté látky. MS (FAB): m/z (%): 997,3 (23) [M+H]; <sup>1</sup>H NMR (300MHz, CDCl<sub>3</sub>): 6,90 m (2H, Ar-H); 6,38 m (2H, Ar-H); 4,87 m (1H, CHNHAc); 3,78 s (3H, COOCH<sub>3</sub>); 3,40 s (4H, 2CH<sub>2</sub>-COOt-Bu); 3,35 m (6H, 3CH<sub>2</sub>-COOt-Bu); 3,25-2,30 m (15H, Ph-CH<sub>2</sub>-CH-CH<sub>2</sub>-N-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-N; Ph-NH-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-S-CH<sub>2</sub>-CHAc); 2,02 s (3H, NHCOOCH<sub>3</sub>); 1,89 m (2H, CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-S); 1,41 s (18H, 2COO-C(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>); 1,38 s (27H, 3COO-C(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>); <sup>13</sup>C NMR (75 MHz, CDCl<sub>3</sub>): 170,74; 170,00; 169,67; 169,12; 144,76; 129,39; 126,12; 113,63; 80,95; 57,69; 57,33; 56,76; 56,34; 52,63; 51,78; 50,32; 50,05; 44,35; 38,19; 33,97; 30,17; 29,72; 28,83; 28,50; 23,20; pro C<sub>50</sub>H<sub>85</sub>N<sub>5</sub>O<sub>13</sub>S (996,3) vypočteno 60,28 %C, 8,60 %H, 7,03 %N, 3,22 %S; nalezeno 58,96%C, 8,14 %H, 7,49 %N, 3,57 %S

**2-acetamido-3-(3-(N-(4-(2-(bis(2-*terc*-butoxy-2-oxoethyl)amino)-3-((2-(bis(2-*terc*-butoxy-2-oxoethyl)amino)ethyl)(2-*terc*-butoxy-2-oxoethyl)amino)propyl)fenyl)-6-(2,5-dioxo-2,5-dihydro-1H-pyrrol-1-yl)hexanamido)propylthio)propanová**

### Meziprodukt 2b (39)

K roztoku 0,12 g hydroxidu lithného (5 eq., 5 mmol) ve 3 ml vody bylo přidáno 9 ml methanolu (výsledný poměr 1:4, v:v). K tomuto roztoku byl přidán roztok 1 g látky **38** (1 mmol) v 5 ml methanolu. Po 12 hodinách míchání v inertní atmosféře argonu byla reakční směs odpařena za sníženého tlaku na RVO při teplotě 35°C. Ke získanému zbytku byly přidány 3 ml destilované vody a pH bylo upraveno 0,1 ml kyseliny citronové na pH = 5. Tato směs byla protřepána s 3 ml dichlormethanu. Vodná vrstva byla extrahována 3 × 3 ml dichlormethanu a spojené organické fáze byly sušeny bezvodým síranem sodným.

Zbytek získaný odpařením byl rozpuštěn v 10 ml dimethylformamidu a smíchan s roztokem 0,46 g *N*-sukcinimidyl-6-maleimidohexanoátu (**20**) (1,5 eq., 1,5 mmol) v 5 ml dimethylformamidu. Reakční směs byla 12 hodin míchána pod inertní atmosférou při 35°C. Dimethylformamid byl odpařen za sníženého tlaku na RVO a surový produkt byl čištěn přes sloupec silikagelu (50 g, soustava E, R<sub>f</sub> = 0,6). Čištěním bylo získáno 0,933 g (78,14%) světle hnědého oleje. MS (FAB): m/z (%): 1176,5 (21) [M+H]; <sup>1</sup>H NMR (300MHz, CDCl<sub>3</sub>) spektrum obsahuje tyto

charakteristické píky: (7,17 m (2H, Ar-H); 7,05 m (2H, Ar-H); (6,68 s (2H, CH=CH); 3,41 m (10H, 5CH<sub>2</sub>-COOC(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>); 2,04 s (3H, NHCOCH<sub>3</sub>); 1,41 m (45H, 5COO-C(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>); pro C<sub>59</sub>H<sub>94</sub>N<sub>6</sub>O<sub>16</sub>S (1189,5) vypočteno 60,28 %C, 8,06 %H, 7,15 %N, 2,73 %S; nalezeno 59,47 %C, 7,53 %H, 7,48 %N, 2,31 %S

**2,2'-(2-((3-(4-(N-(3-(2-acetamido-2-karboxyethylthio)propyl)-6-(2,5-dioxo-2,5-dihydro-1H-pyrrol-1-yl)hexanamido)phenyl)-2-(bis(karboxymethyl)amino)propyl)(karboxymethyl)amino)ethylazanediyl)diactová kyselina**

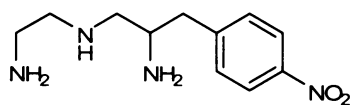
### **Konjugát 2 (40)**

K roztoku 0,5 g látky **39** (0,42 mmol) v 10 ml dichlormethanu bylo přidáno 0,31 ml trifluoroctové kyseliny (10 eq., 4,2 mmol). Směs byla míchána 8 h pod inertní atmosférou dusíku za laboratorní teploty a poté byla odpařena za sníženého tlaku na RVO. Surový produkt byl rozpuštěn ve směsi 5 ml methanolu a 0,5 destilované vody a za sníženého tlaku odpařen na RVO. Zbytek získaný po odpaření byl přelit methanolem a znovu odpařen za sníženého tlaku na RVO. Tento postup byl ještě 2 × opakován. Po 2 hodinách odpařování na membránové pumpě bylo získáno 0,32 g (85,16%) amorfni hnědé látky. MS (FAB): m/z (%): 895,9 (23) [M+H]; <sup>1</sup>H NMR (D<sub>2</sub>O, 300MHz) spektrum obsahuje tyto charakteristické píky: 7,25 m (2H, Ar-H); 7,14 s (2H, CH=CH); 6,15 m (2H, Ar-H); 3,56 m (10H, 5CH<sub>2</sub>-COOH); 2,12 s (3H, NHCOCH<sub>3</sub>); pro C<sub>39</sub>H<sub>54</sub>N<sub>6</sub>O<sub>16</sub>S (894,94) vypočteno 52,34 %C, 6,08 %H, 9,39 %N, 3,58 %S; nalezeno 52,78 %C, 6,24 %H, 9,69 %N, 3,87 %S

## 6. DISKUZE

### 6.1 Příprava bifunkčního chelátoru na bázi substituované DTPA

Pro úvodní experimenty byl jako modelový chelátor vybrán *p*-aminobenzylem substituovaný derivát diethyltriaminpentaoctové kyseliny (1-ABn-DTPA). Klíčovým meziproductem, jehož následnou karboxymethylací a redukcí se získá kýžený chelátor, je 1-(4-nitrobenzyl)diethyltriamin (**9**). Jeho příprava byla zkoumána ve dvou dílčích etapách.



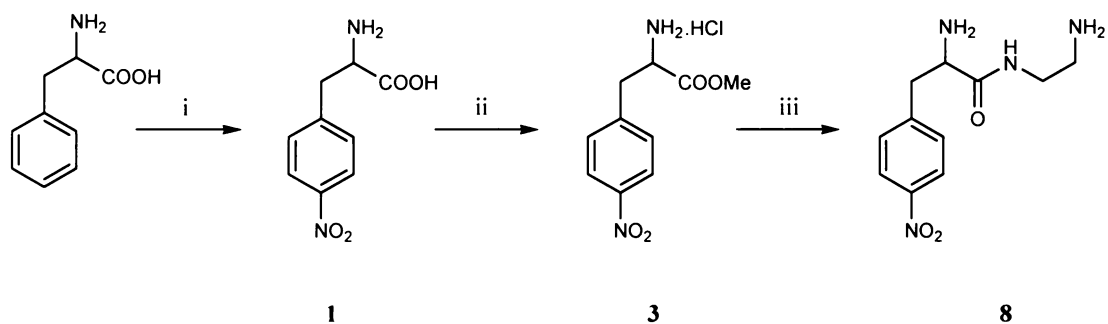
**9**

Obr. 11 Klíčový meziproduct (**9**)

#### 6.1.1a. Etapa I. Optimalizace podmínek redukce karboxamidické vazby

*Příprava meziproductů substituovaného fenylalaninu.*

Výchozí látkou pro přípravu aminu **9** je ve všech dosud publikovaných postupech dobře popsáný *p*-nitrofenylalanin (**1**). Tato látka byla připravena nitrací fenylalaninu dýmavou kyselinou dusičnou v 98% koncentrované kyselině sírové za chlazení na  $-5^{\circ}\text{C}$  podle postupu Daviese<sup>94</sup>. Autor práce popsal 75% výtěžek preparace, zatímco reprodukcí tohoto postupu a čištěním produktu krystalizací z vody byl získán hydrát *p*-nitrofenylalaninu pouze v 34% výtěžku. Největší ztráty při reakci byly pravděpodobně způsobeny oxidací benzylové  $\text{CH}_2$  skupiny fenylalaninu. HPLC analýzou surové reakční směsi bylo zjištěno, že vedlejším produktem reakce je vedle polohových izomerů nitrofenylalaninu také kyselina *p*-nitrobenzoová. Z těchto důvodů byl pro přípravu většího množství *p*-nitrofenylalaninu zvolen postup<sup>88</sup>, ve kterém bylo použito menšího než ekvivalentního množství koncentrované kyseliny dusičné. Výtěžek reakce v tomto provedení dosáhl 55%.



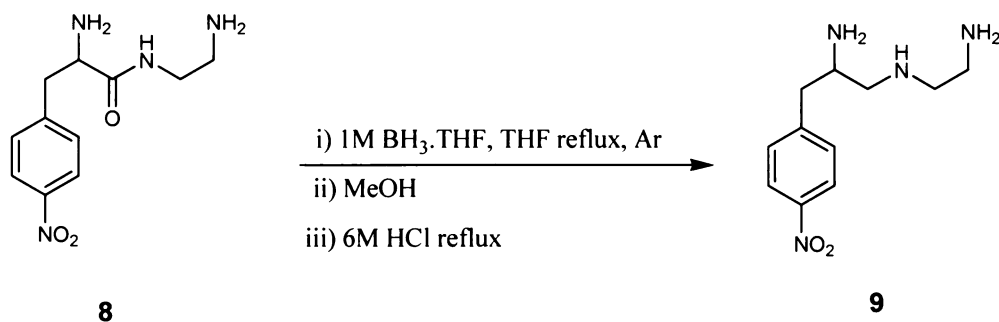
*Schéma 10*

i)  $\text{HNO}_3/\text{H}_2\text{SO}_4/-5^\circ\text{C}$ , 1 h ii)  $\text{MeOH}/\text{SOCl}_2$  iii) ethylendiamin, 10 eq.

*p*-nitrofenylalanin byl dále v téměř kvantitativním výtěžku převeden na methylester hydrochlorid (**3**), který hladce působením 10 ekvimolárního množství ethylendiaminu poskytl v 86% výtěžku příslušný 2-aminoethylamid (**8**) (viz schéma 10).

Společnou nevýhodou publikovaných metod, týkajících se vlastní přípravy chelátorů na bázi substituované Bn-DTPA, je velký počet reakčních stupňů provedených v konvergentním uspořádání a dále nízká výtěžnost posledních dvou kroků, a to redukce aminkarboxamidu **8** na triamin **9** a jeho následná pentakarboxymethylace.

Redukční krok tak představuje nevyhnutelný a z hlediska bezpečnosti práce při přípravě větších šarží i riskantní krok (viz schéma 11).



*Schéma 11 Konvenční způsob redukce karboxamidické vazby*

Nevýhodou používaného boranového komplexu ( $\text{BH}_3 \cdot \text{THF}$ ) je především jeho samozápalnost na vzduchu a také jeho vysoká cena. Sami autoři, využívající jeho selektivních redukčních vlastností, varují před nebezpečím exploze a nutností práce v inertní atmosféře. Pro redukci je nutné použít až 12 molárních ekvivalentů 1 M

boranového roztoku, to vyžaduje pro přípravu gramových množství aminu **9** pracovat řádově v litrových množstvích tohoto činidla.

Alternativním způsobem k redukci boranem, poprvé zavedeným v této práci, je generování boranového komplexu *in situ* přímo v reakční směsi. Pro nahrazení  $\text{BH}_3\cdot\text{THF}$  bylo použito tetrahydridoboritanu sodného a tetrahydridoboritanu lithného působením éterátu fluoridu boritého v tetrahydrofuranu (viz schéma 12).

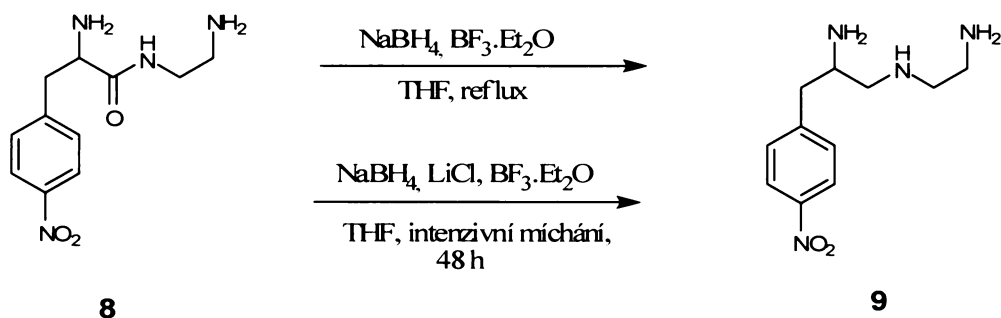


Schéma 12 Použité redukční cesty při přípravě 1-(*p*- $\text{NO}_2$ -Bn)-diethylentetraminu (**9**) pomocí alternativních přístupů.

Malou nevýhodou při použití tetrahydridoboritanu sodného jako redukčního činidla je jeho nízká rozpustnost v tetrahydrofuranu, který představuje klasické rozpouštědlo pro tento typ redukce. Pro zlepšení efektivity redukce byl  $\text{NaBH}_4$  nahrazen redukčním činidlem s vyšší rozpustností v tetrahydrofuranu, a to borohydridem lithným. Borohydrid lithný byl připraven *in situ* z chloridu lithného a borohydridu sodného. Jeho rozpustnost v THF je nesrovnatelně vyšší; zatímco nasycený roztok  $\text{NaBH}_4$  je 0,02 M, tak  $\text{LiBH}_4$  poskytne nasycený roztok až při koncentraci 11,43 M<sup>95</sup>. Stupeň konverze  $\text{NaBH}_4$  na  $\text{LiBH}_4$  je přitom do značné míry závislý na intenzitě míchání, reakčním čase i teplotě. Maximálního promísení za současného mechanického rozmělnování špatně rozpustného  $\text{NaBH}_4$  bylo dosaženo použitím magnetického míchání v kombinaci s keramickými tělísky. Sraženina vznikajícího chloridu sodného byla až překvapivě jemná a vznikly tak potíže při jejím odstraňování z roztoku. Porozita frity S3 byla nevyhovující a chlorid sodný jí procházel. Frita S4 se po krátké chvíli stala neprostupnou. Reakční směs obsahující  $\text{NaCl}$  byla proto bez filtrace použita do následující reakce.

Z tabulky 4 je vidět, že výtěžky jednotlivých redukčních kroků se příliš neliší.

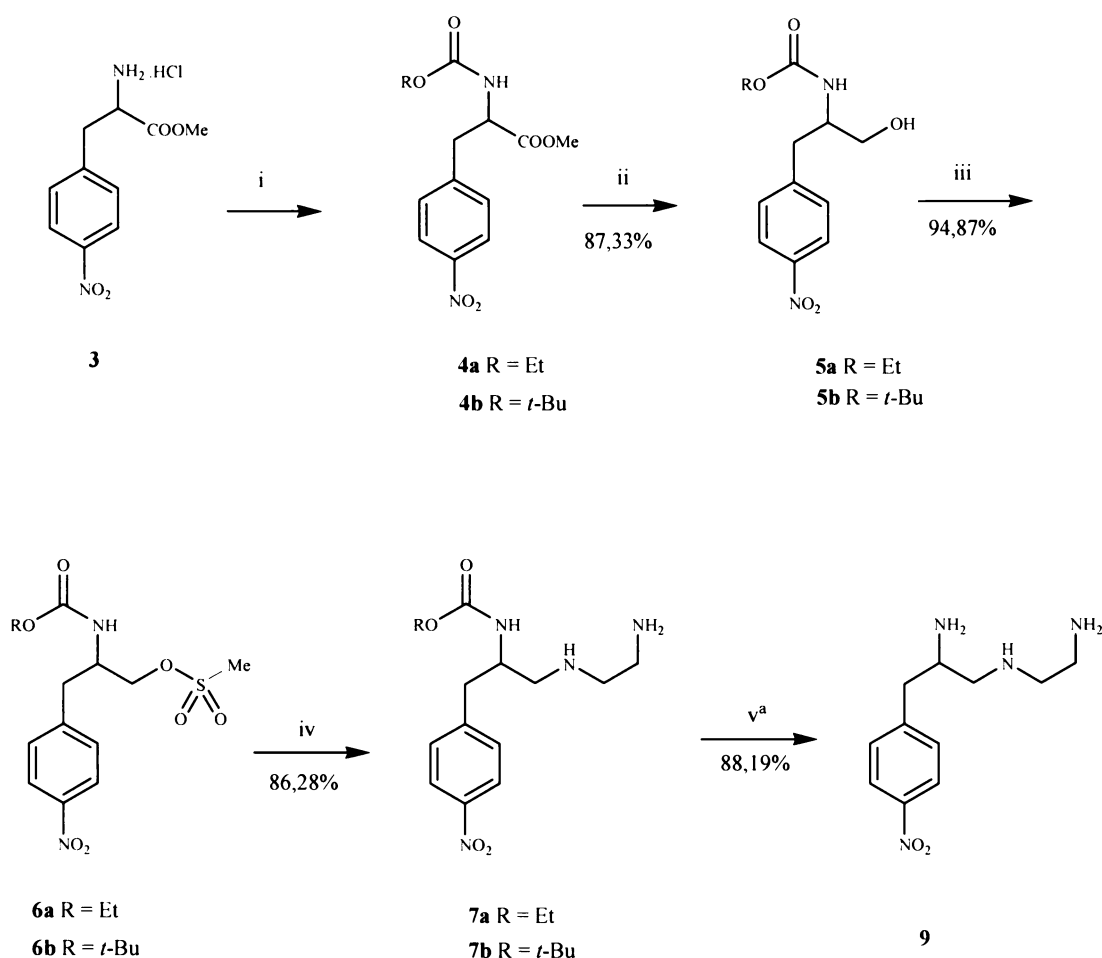
Použité činidlo	BH <sub>3</sub> .THF	NaBH <sub>4</sub> + BF <sub>3</sub> .Et <sub>2</sub> O	LiBH <sub>4</sub> + BF <sub>3</sub> .Et <sub>2</sub> O
výtěžek	74,3%	67,8%	72,1%
metoda čištění	Flash chromatografie	Flash chromatografie	nutnost sloupcové chromatografie
náročnost provedení	velká	nízká	střední

Tabulka 4 Porovnání metod redukce aminkarboxamidu **8** na triamin **9**

### 6.1.1b. Etapa II. Zavedení nové strategie syntézy **9** bez použití redukce

Alternativní přístup byl volen především s ohledem na eliminaci redukčního kroku a také na ekonomičnost a náročnost jednotlivých reakčních stupňů. Pro reakční kroky ii - iv ve schématu 13 bylo třeba chránit aminoskupinu esteru *p*-nitrofenylalaninu. V první volbě bylo chránění provedeno ethoxykarbonylovou skupinou (Eoc) pomocí etylchloroformiátu za vzniku chráněného derivátu **4a**. Tento chráněný prekurzor byl dále ve dvou krocích podle schématu 13 redukován a mesylován. Byl tak připraven reaktivní meziproduct **6a**. Výtěžky těchto kroků dosahují ~90%, bez nutnosti použití chromatografie. Pro zkrácení počtu reakčních kroků bylo chránění ethoxykarbonylem provedeno i v případě *p*-nitrofenylalaninu (**1**). Redukce této látky (**2a**) působením NaBH<sub>4</sub> v THF však neprobíhala uspokojivě a produkt nebylo možné snadno izolovat.

Při interakci látky **6a** s etylendiaminem bohužel dochází k reakci nežádoucím směrem. Vziká směs produktů, z nichž látka **7a** není ve směsi zastoupena majoritním podílem. <sup>1</sup>H a <sup>13</sup>C NMR analýzy reakční směsi ukázaly, že ethoxykarbonyl není za podmínek reakce dostatečně inertní chránicí skupinou. Modifikace reakčních podmínek zkrácením reakční doby (5h → 3,5h) nebo upravením reakční teploty (72°C → 48°C) nepřispělo ke vzniku jednotného produktu a nedošlo ani k obohacení směsi o produkt **7a**.



i. R = Et; ClCOOEt/H<sub>2</sub>O/CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/NaHCO<sub>3</sub>

R = *t*-Bu; (Boc)<sub>2</sub>O/H<sub>2</sub>O/CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/NaHCO<sub>3</sub>

ii. NaBH<sub>4</sub>, MeOH, THF, 24 h

iii. MeSO<sub>2</sub>Cl, NEt<sub>3</sub>, THF

iv. ethylendiamin, THF, N<sub>2</sub>, 5h reflux

v. TFA, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, 1h

<sup>a</sup> Výsledný produkt byl získán jako trihydrochlorid.

### Schéma 13 Alternativní cesta eliminující redukci

Chránič skupina Eoc byla proto zaměněna za *tert*-butoxykarbonyl (Boc) a reakční kroky byly zopakovány jako v případě látky **4b**. Zde klíčová reakce s ethylendiaminem probíhala bez problémů a byl získán čistý produkt **7b** ve výtěžku 86% . Následné odchránění bylo nejdříve provedeno klasicky působením TFA přes noc. <sup>1</sup>H a <sup>13</sup>C NMR analýza produktu však prokázala přítomnost těžko separovatelných nečistot. Deprotekce byla proto zkoumána za různých podmínek s několika různými činidly. Výsledky jsou shrnuty v tabulce 5.

Reakční činidlo	Reakční doba	Čistota produktu	Zpracování
TFA/CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	15 h r.t.	vedl. produkty	A
TFA	1 h r.t.	menší množství vedl. produktů	A
i) TFA ii) HCl:H <sub>2</sub> O (1:1) <sup>97</sup>	15 h/15 h r.t.	vedl. produkty	A
20% H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> <sup>96</sup>	15 h r.t.	velmi malý podíl vedl. produktů	A
TFA	1 h r.t.	bez nečistot	B

A – reakční směs odpařena, neutralizována H<sub>2</sub>O/NH<sub>4</sub>OH (1:1, v:v) na pH = 10, extrakce 5 × odpovídajícím množstvím CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>.

B – reakční směs zahuštěna, zbytek rozpuštěn ve směsi 36% HCl/H<sub>2</sub>O (1:1, v:v) a po kapkách přidávána do míchacího se roztoku bezvodého EtOH.

*Tabulka 5 Porovnání metod ochrání terciárního butoxykarbonylu*

Kýžený meziprodukt **9** byl v čisté formě připraven působením TFA po dobu jedné hodiny v 88% výtěžku a izolován jako trihydrochlorid.

Porovnáním výtěžnosti (tabulka 6) všech metod vedoucích k přípravě klíčového meziproduktu **9** lze zjistit, že navržená metodika poskytuje jen o málo nižší výtěžky, ale v porovnání s jednoduchostí jednotlivých kroků oproti náročnosti redukce pomocí BH<sub>3</sub>.THF je to jen zanedbatelná nevýhoda.

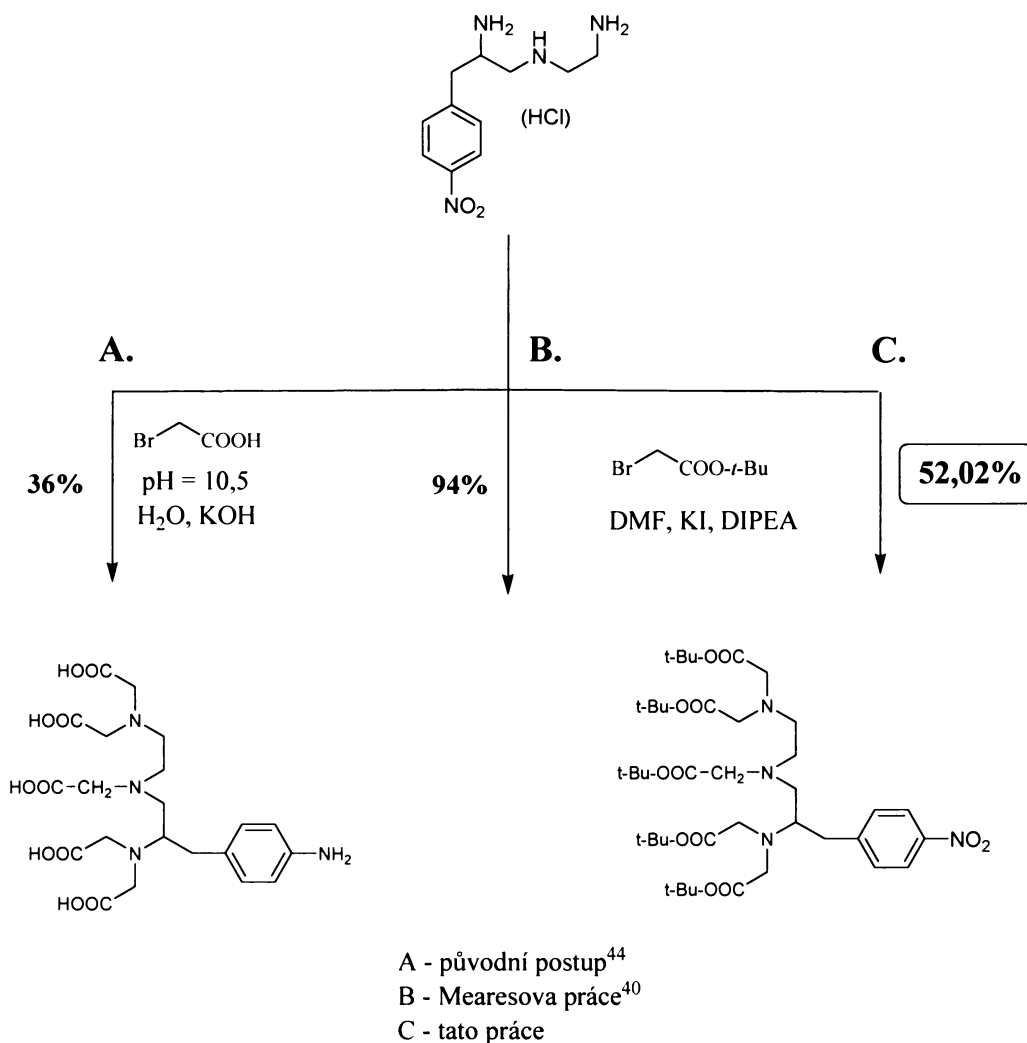
Metoda přípravy	Redukce BH <sub>3</sub> .THF	Redukce NaBH <sub>4</sub>	Redukce LiBH <sub>4</sub> generovaného <i>in situ</i>	Alternativní cesta za použití EOC chránění	Alternativní cesta za použití BOC chránění
Výtěžek	63,5%	58,1%	61,8%	-	57,7%

*Tabulka 6 Porovnání výtěžnosti popisovaných metod přípravy triaminu 9*



### 6.1.2. Příprava penta-*tert*-butylesteru 1-(*p*-nitrobenzyl)diethylentriamin-pentaoctové kyseliny (**10**)

Karboxymethylace triaminu **9** byla uskutečněna působením *tert*-butylbromacetátu za použití diisopropylethylaminu jako báze v bezvodém dimethylformamidu podle Mearesa,<sup>40</sup> který se detailním způsobem přípravy této látky zabývá (viz schéma 14). Autor v práci uvádí, že za těchto podmínek reakce vznikne pouze jediný produkt (penta-*tert*-butylester **10**), a to ve výtěžku 94%. Ostatní autoři v různých modifikacích dosahují výtěžku mezi 40 - 70% po chromatografickém dělení. Ani opakovanou reprodukcí a velmi pečlivým provedením popsaného Mearesova postupu nebylo možné dosáhnout uvedeného výtěžku 94%. Vznikající produkt **10** bylo třeba čistit přes sloupec silikagelu od vedlejších produktů a výtěžky se pohybovaly kolem 50%. Po důkladném přezkoumání Mearesovy práce bylo zjištěno, že hmotnostní a procentuální údaje vztahující se k výtěžku látky **10** si navzájem neodpovídají. Výtěžek reakce by tak musel přesahovat 100%. Další analýza ukázala na faktické chyby, kdy v práci neodpovídají výtěžky u zhruba poloviny připravených látek a neodpovídá u nich ani spektrální identifikace (MS, NMR). Zjištěné faktické chyby tak snižují hodnověrnost celé práce, která je pokládána za klíčovou.



*Schéma 14 Srovnání výtěžnosti karboxymetylací*

### 6.1.3. Příprava penta *tert*-butylesteru 1-(*p*-aminobenzyl)diethylentriamin pentaoctové kyseliny (11)

Redukce aminoesteru **10** byla provedena vodíkem na za katalýzy 10% Pd/C. Ani při opakovaném provedení neposkytla reakce uspokojivé výtěžky. Analýza reakční směsi ukázala na řadu meziproductů s velice podobným  $R_f$ , a to i po dlouhé reakční době pěti dnů. Při redukčních experimentech byl zkoumán také vliv použitého rozpouštědla. Reakce byla sledována v komerčním MeOH, bezv. MeOH a *tert*-BuOH. Byl také zjišťován možný vliv kyselé katalýzy za přídavku kyseliny octové na průběh redukce. Při jejím použití nebyla pozorována žádná významná změna. Také použití různých šarží 10% Pd/C nemělo na průběh redukce žádný vliv.

Produkt bylo nutné ve všech případech čistit chromatograficky. Výtěžky přitom nepřesahovaly 62%.

## 6.2. Příprava série heterobifunkčních linkerů

Při syntéze heterobifunkčních linkerů maleimidového typu byla snaha využít nově publikovaných moderních prací, které popisují snadnou přípravu maleimidových kyselin. Reprodukování práce slovenských autorů<sup>75</sup> mělo umožnit přípravu derivátu maleimidu reakcí trycklického anhydridu a příslušné aminokyseliny v publikovaném výtěžku (~ 85%) (viz schéma 15).

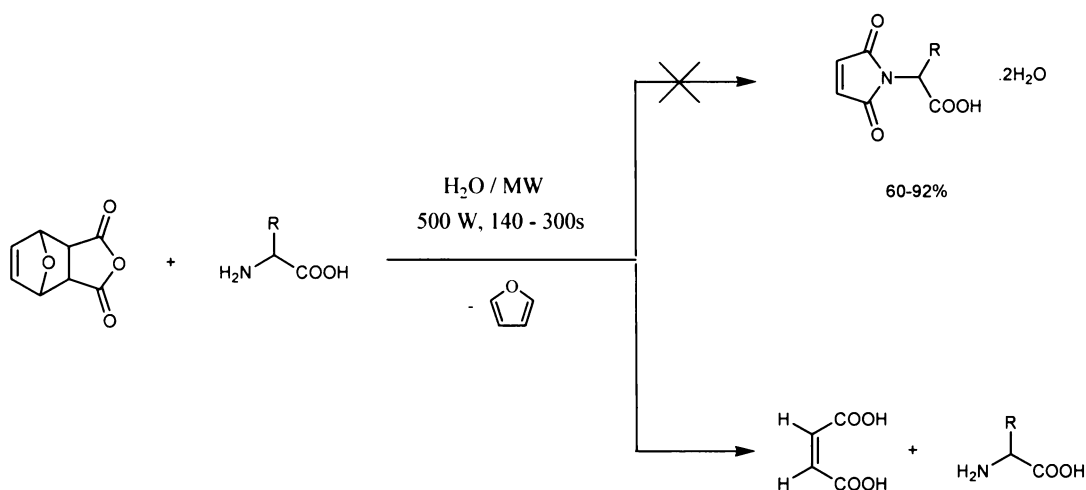
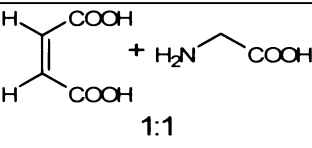
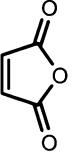
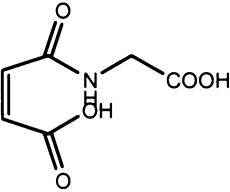
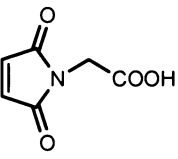
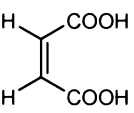
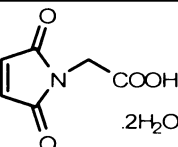


Schéma 15 Reakce provedená slovenskými autory (Katerda organické chemie, STU Bratislava)

Revizí tohoto postupu bylo dosaženo stejných výsledků, které popisovali autoři (stejně spektrální charakteristiky). Jak se ale ukázalo, závěry vyvozené autory z spektrálních dat byly zcela mylné. Analýzou  $^1\text{H}$  NMR a  $^{13}\text{C}$  NMR spekter a TLC chromatografie bylo prokázáno, že výsledný produkt reakce je směsí látek. A to maleinové kyseliny vzniklé z tricycklického anhydridu a vody a nezměněné výchozí aminokyseliny. Singlet vodíku v  $^1\text{H}$  NMR odpovídající  $\text{HC}=\text{C}$  skupině v kýženém *N*-maleimidu má chemický posun v rozmezí 6,8 – 6,9 ppm (v  $d_6$ -DMSO), ten ale neodpovídá hodnotě chemického posunu naměřeného autory revidované práce (6,04 ppm). Tato hodnota se blíží 6,2 ppm odpovídajícím olefinickým vodíkům maleinové kyseliny. Situaci dokumentuje tabulka 7

Látka	Bod tání <sup>a</sup> (°C)	<sup>1</sup> H NMR (DMSO- <i>d</i> <sub>6</sub> ) δ [ppm] <sup>a</sup>	<sup>13</sup> C NMR ( DMSO- <i>d</i> <sub>6</sub> ) δ [ppm] <sup>a</sup>
 <chem>O=C(O)/C=C/C(=O)O + NCC(=O)O &gt;&gt; [1:1]</chem>	-	3,57 s (2H, CH <sub>2</sub> ) 6,28 s (2H, CH=CH)	173,30; 42,56
	52 -54	7,05-7,1 s (2H, CH=CH)	163,4-164,6; 136,76
	187 - 188	6,42 dd (2H, CH=CH) 3,9 s (2H, CH <sub>2</sub> )	173,2; 165,8; 166,2; 134,1; 130,6; 43,2
	113 - 113,5	6,8 s (2H, CH=CH) 4,3-4,4 s (2H, CH <sub>2</sub> )	172,5; 169,6; 134,5; 42,5
	137 - 140 <sup>c</sup>	6,28 s (2H, CH=CH)	170,6; 134,3
 $\cdot 2\text{H}_2\text{O}$	118 - 121 <sup>b</sup>	6,04 s (2H, CH=CH) 3,75 s (2H, CH <sub>2</sub> ) <sup>b</sup>	174,2; 169,5; 134,8; 51,2 <sup>b</sup>

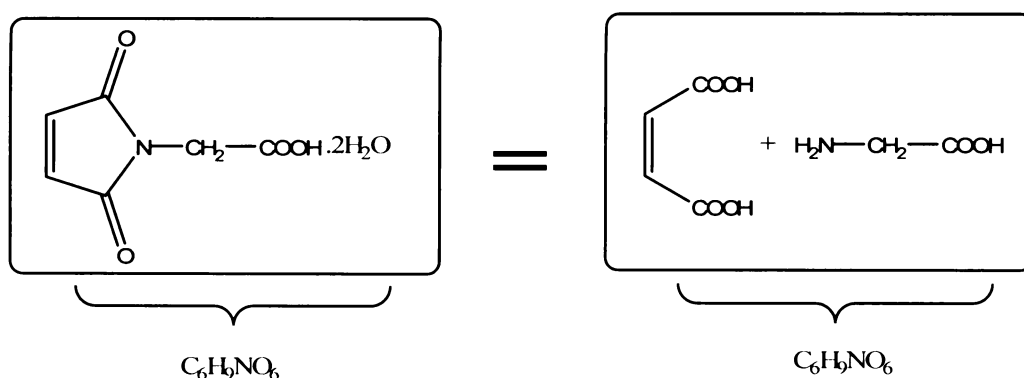
a – není-li uvedeno jinak jsou v tabulce uvedeny hodnoty získané v této práci

b – údaje převzaté z literatury č. 75

c – Chemické tabulky organických sloučenin Večeřa M. SNTL Praha 1975

*Tabulka 7 Body tání a <sup>1</sup>H a <sup>13</sup>C NMR látek vztahujících se k charakterizaci produktů při mikrovlnné syntéze maleimidů z glycinu podle schématu 15*

Stejný závěr je možné vyvodit i z údajů týkajících se elementární analýzy. Autoři uvádí, že všechny látky byly připraveny jako dihydráty. Literatura však popisuje maleimidové kyseliny jako látky hydráty netvořící.<sup>72,92</sup> Popisovaná přítomnost přebývajících dvou molekul vody v hypotetickém dihydrátu odpovídá právě dvěma molekulám vody, o které by měla být molekulová hmotnost produktu menší, kdyby k cyklizační kondenzaci docházelo (viz schéma 16). Elementární analýza tak odpovídá analýze ekvimolární směsi maleinové kyseliny a příslušné aminokyseliny pro *N*-(maleimidyl)octovou kyselinu.



*Schéma 16 Porovnání sumárních vzorců uváděné struktury produktu a navrhované směsi*

Porovnáním bodů tání s dříve publikovanými daty zjistíme, že ani jedna hodnota teploty tání v kritizované práci není shodná. Navíc body tání pro údajné maleinimidové kyseliny jsou uváděny v širokém rozmezí, které je typické pro směsi látek.

V další části této práce byla také reprodukována metoda zabývající se přípravou derivátů maleimidů působením mikrovlnného záření za vysokých teplot bez použití rozpouštědla.<sup>76</sup> Touto metodikou autoři dosahují výborných výtěžků 82-96%. Popsanou extrakcí reakční směsi chloroformem však nebyla získána žádná látka. Na nereprodukovatelnost této metodiky upozornila i jiná již dříve publikovaná práce.<sup>98</sup> Reakční směs, získaná reakcí maleinanhidridu a glycinu zahříváním v olejové lázni, byla podrobena <sup>1</sup>H NMR analýze, ze které vyplynuly následující skutečnosti:

- Při mírném zahřívání do 80°C dochází selektivně k tvorbě *N*-karboxymethyl maleamové kyseliny.

- Dalším zvyšováním teploty do 130°C po dobu 15 minut ale nedochází k její cyklizaci na maleimid.

<sup>1</sup>H NMR analýza prokázala vznik velmi pestré směsi sloučenin. V reakční směsi byla kromě stop *N*-karboxymethyl maleamové kyseliny prokázána také přítomnost signálů olefinických vodíků odpovídajících svým posunem a interakční konstantou derivátům *trans*- orientované fumarové kyseliny. Za těchto podmínek dochází tedy k izomerizaci na termodynamicky stabilnější deriváty fumarové kyseliny, které díky své geometrické orientaci nejsou dále schopny podléhat cyklizačním reakcím.

Integrací signálů odpovídajícím alifatické oblasti (CH a CH<sub>2</sub> skupinám) bylo zjištěno, že v součtu nekorespondují s integrací příslušející olefinickým vodíkovým atomům (HC=). Z tohoto faktu je možné vyvodit, že za podmínek reakce dochází také k adici na dvojné vazby vznikajících meziproduktů. Z výše uvedeného proto není zřejmě možné pouhým zahřátím převést maleamové deriváty na deriváty maleimidové.

Obě práce popisující přípravu *N*-maleimidů pomocí mikrovlnného záření obsahují faktické chyby nebo špatnou interpretaci výsledků a nebylo možné je s úspěchem reprodukovat.

Potřebné maleimidy byly tedy připravovány standardními postupy<sup>77,92</sup>.

### 6.2.1 Příprava (*N*-sukcinimidyl)maleimidů třístupňovým sledem reakcí (Metoda A)

(*N*-sukcinimidyl)maleimidy jsou běžně připravovány sledem tří reakčních kroků, ve kterých je nejprve připravena maleamová kyselina, která je následně cyklizována, a vzniklý maleimid je esterifikován *N*-hydroxysukcinimidem za přítomnosti aktivátoru dicyklohexylkarbondiimidu (viz schéma 14).

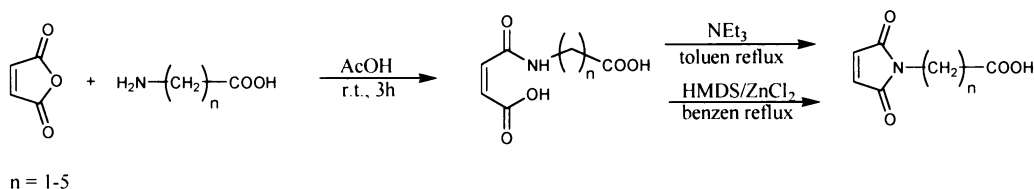
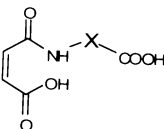
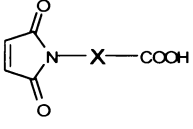
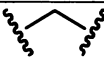

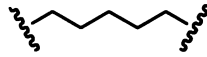


Schéma 14 Třístupňové syntézy (*N*-sukcinimidyl)maleimidů

Maleamové kyseliny **15**, **18** a **21** byly připraveny reakcí maleinanhydridu s příslušnou *n*-aminoalkylkarboxylovou kyselinou v prostředí kyseliny octové v téměř v kvantitativním výtěžku (viz schéma 14). Cyklizace byla provedena 1h

refluxem v toluenu za přítomnosti triethylaminu za současného azeotropického oddestilování vody. Špatná rozpustnost výchozích maleamových kyselin v nepolárních rozpouštědlech vede ke značnému snížení efektivity cyklizace. Výtěžky dosahují pouze 30-40% teorie. Druhá použitá srovnávací metodika cyklizací, uskutečněná reakcí hexamethyldisilazanu v benzenu za přítomnosti chloridu zinečnatého jako katalyzátoru, poskytla pouze směs produktů výchozí látky a příslušného cyklického derivátu. Výtěžky tohoto kroku po chromatografickém dělení dosahují hodnot mezi 30-44%. Problémem vlastní cyklizace je nízká rozpustnost výchozí maleamové kyseliny přesto, že bylo použito velkých objemů benzenu. Výsledky shrnuje tabulka č. 8.

necykl. forma látka č.	-X-	cykl. forma látka č.	výtěžek nesyklické formy [%] 	metoda -výtěžek cyklizace [%] 	výtěžek lit <sup>a</sup> .
15		16	96	A - 38 B - 41	97; 46 <sup>92</sup> 100; 99 <sup>74</sup>
21		22	97	A - 44 B - 50	87; 40 <sup>92</sup>
18		19	93	A - 30	94; 45 <sup>92</sup>

Metoda A: toluen, NEt<sub>3</sub>, reflux, 1h

Metoda B: benzen HMDS, ZnCl<sub>2</sub>, reflux 8h

a – první výtěžek odpovídá maleamové kyselině, druhý její cyklizaci

*Tabulka 8 Porovnání výtěžků obou cyklizačních kroků*

Následné esterifikace maleimidů *N*-hydroxysukcinimidem poskytly průměrné výtěžky (70-90%). Úhrnné výtěžky této třístupňové syntézy se tedy pohybují mezi 23 a 38%.

### 6.2.2. Příprava esterů v jednom kroku (Metoda B)

Asi nejzajímavější metodikou vedoucí k přípravě (*N*-sukcinimidyl)-maleimidů, která byla v této práci použita, je reakce, kdy je maleamová kyselina připravená *in situ* v DMF působením *n*-aminokyseliny a maleinanhydridu. Následná esterifikace a cyklizace maleamové kyseliny je uskutečněna *N*-hydroxysukcinimidem působením dicyklohexylkarbodiimidu viz chéma 17.

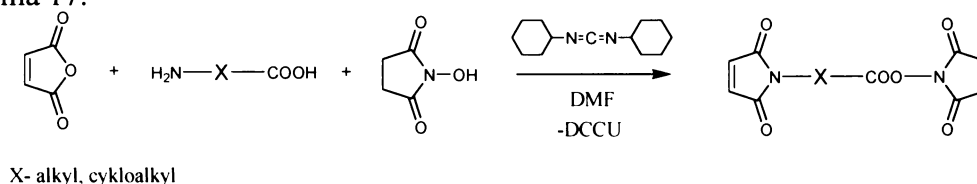
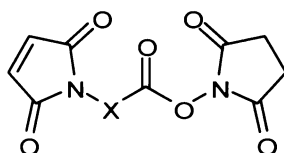


Schéma 17 Jednostupňová metoda přípravy (*N*-sukcinimidyl)-maleimidů

Problém nízkých výtěžků způsobený špatnou rozpustností reaktantů v reakčním médiu je v tomto uspořádání eliminován, protože všechny reaktanty i meziprodukty jsou v dimethylformamidu dobře rozpustné. Naopak z dicyklohexylkarbodiimidu vznikající dicyklohexylmočovina je v dimethylformamidu špatně rozpustná a lze ji snadno odfiltrovat. Průběh reakce je silně závislý na délce uhlíkového skeletu aminokyseliny (viz tabulka 9). Výtěžky v tomto jednostupňovém provedení dosahují 28-92%. Nejnižšího výtěžku bylo dosaženo v případě  $\gamma$ -aminobutanové kyseliny (28%) což je pravděpodobně způsobeno vznikem izomerního izomaleimidu (*N*-sukcinimidyl)butanoátu<sup>77</sup>. Reakce triglycinu poskytla pravděpodobně díky přítomnosti několika reakčních center neseparovatelnou směs. Tabulka 9 srovnává syntetická data získaná jednostupňovou a třístupňovou metodikou.





(*N*-sukcinimidyl)-OOC-X-maleimid

X	produkt	Metoda přípravy <sup>a</sup>	Výtěžek [%]	Výtěžek v lit. [%] (metoda)
	<b>17</b>	A B	38 47	36 <sup>72</sup> (A) 95 <sup>74</sup> (A)
	<b>25</b>	B	89	33 <sup>77</sup> (B) 60 <sup>100</sup> (B) 41 <sup>101</sup> (B) 99 <sup>74</sup> (A)
	<b>23</b>	A B	36 28	0 (B)
	<b>20</b>	A B	24 92	37 <sup>72</sup> (A)
	<b>24</b>	B	82	15-20 <sup>99</sup> (B) 75 <sup>77</sup> (B)
	<b>26</b>	B	- <sup>b</sup>	-

a) metoda A – třístupňová preparace

metoda B – jednostupňová reakce

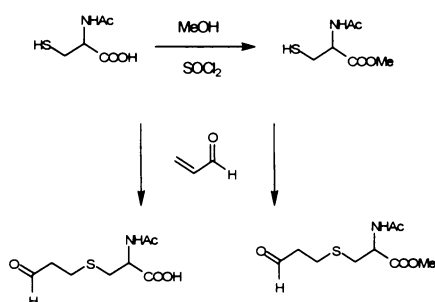
b) směs produktů

Tabulka 9 Srovnání syntetických dat přípravy (*N*-sukcinimidyl)-OOCX-maleimidů získaná jednostupňovou a třístupňovou metodikou.

### 6.3. Konjugační komponenta – merkapturáty

Michaleovou adicí byl komerční *N*-acetyl-*L*-cystein téměř kvantitativně (~98%) převeden na *S*-(3-oxopropyl)-*N*-acetylcystein. Pro reduktivní aminaci látky **11**, která byla prováděna v organickém prostředí, byl *N*-acetylcystein esterifikován

methanolem pomocí thionylchloridu na methylester **12**. Ester **12** byl poté převeden Michaleovou adicí s akroleinem na adiční produkt **14** (viz schéma 18).

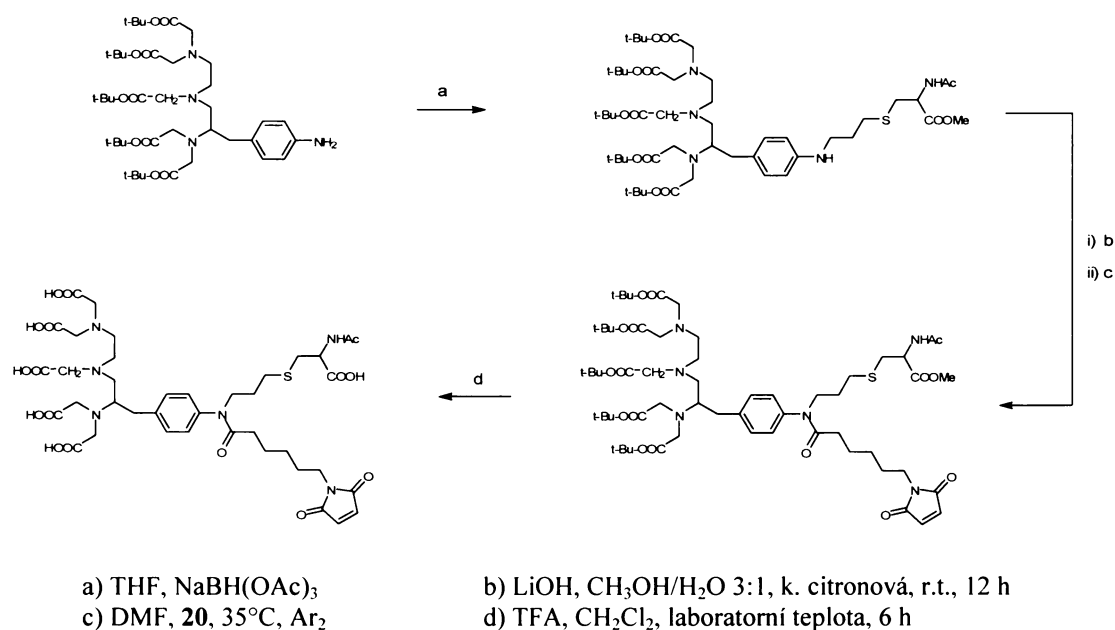


*Schéma 18 Reakční schéma přípravy S-(3-oxopropyl)-N-acetyl-cysteinů.*

Při esterifikaci bylo třeba odstranit veškeré stopy vlhkosti, jejich přítomnost pravděpodobně vedla k deacetylaci výchozí látky a ke vzniku metyl esteru S-(3-oxopropyl)-cysteinu. Při esterifikaci dochází ke vzniku malého množství vedlejších produktů. Čistá látka **14** byla získána opakovanou krystalizací ze směsi EtOAc/hexan 10:1 nebo čištěním směsi přes sloupec silikagelu (EtOAc/cykohehexan 4:1).

#### 6.4. Konjugace

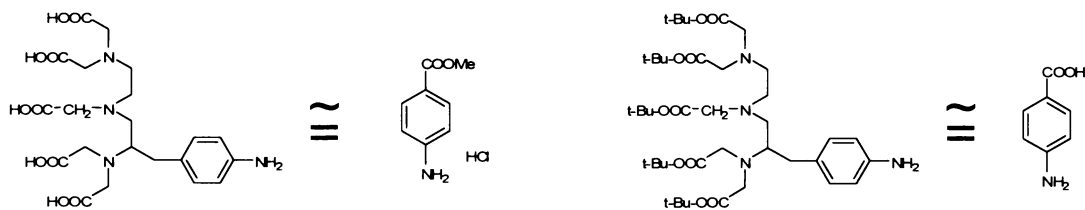
Konjugát **2** (**40**) byl připraven sledem tří reakcí popsaných ve schématu 19. V první reakci byla provedena reductivní aminace aminoskupiny esterifikovaného chelátoru (**11**)



*Schéma 19 Příprava konjugátu 2*

### 6.4.1. Reduktivní aminace

Optimalizace podmínek pro tento krok byla provedena na modelových substrátech *p*-aminobenzoové kyseliny a jejího methylesteru (**27**). *p*-aminobenzoová kyselina byla zvolena pro zastoupení 1-(*p*-aminobenzyl)-diethylentriamin pentaoctové kyseliny pro přítomnost volného karboxylu a slabě deaktivované aminoskupiny. Metylester *p*-amino benzoové kyseliny (**27**) byl zvolen pro zastoupení látky **11**. Příslušné aproximace znázorňuje obrázek 13.



Obr. 13. Názorná ukázka aproximovaných struktur pro konjugaci

### 6.4.2. Konjugace ve vodném a organickém prostředí za použití $\text{NaBH}_3\text{CN}$

Reduktivní aminace *p*-aminobenzoové kyseliny a S-(3-oxopropyl)-*N*-acetyl-cysteinu (**13**) byla studována za podmínek popsanych Hermansonem<sup>79</sup> (vodné prostředí za použití hydrogenuhličitanu pH = 8-9). Redukce byla uskutečněna 10 molárním přebytkem kyanoborohydridu sodného. Z <sup>1</sup>H NMR analýzy reakční směsi vyplynulo, že došlo k redukci aldehydické skupiny merkapturátového derivátu **13** za vzniku příslušného alkoholu. Dalším důvodem nežádoucího průběhu reakce může být přítomnost formy geminálního diolu aldehydické skupiny ve vodném prostředí se kterým je aldehydická forma v rovnováze (viz schéma 20). Geminální diol reduktivní aminaci nepodléhá. Díky přítomnosti volných karboxylů byla navíc izolace produktu od anorganických solí reaktivně obtížná.

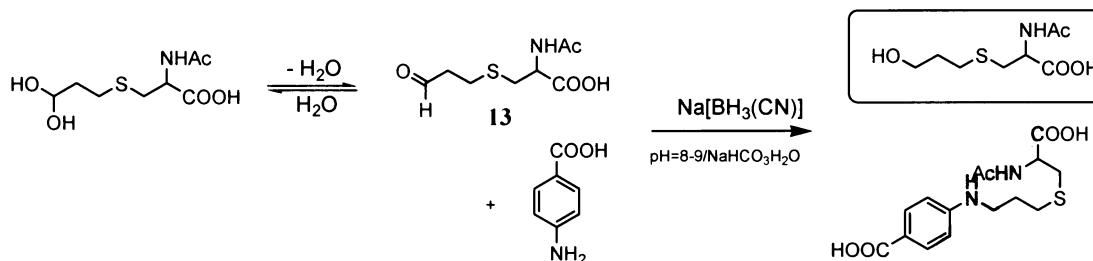


Schéma 20 Reduktivní aminace ve vodném prostředí.

Modifikace reakčního prostředí za účelem odstranění přítomnosti anorganických solí použitím  $\text{NEt}_3$  v methanolu nepřinesla žádné zlepšení. Analýza reakční směsi opět indikovala redukci výchozího merkapturátu **13**.

Reduktivní aminace látky **14** a methylesteru *p*-aminobenzoové **25** kyseliny byl odstraněn problém s izolací. Extrakcí bylo v těchto případech získáváno téměř kvantitativní množství organického substrátu, ale opět se jednalo o směs výchozí látky **25** a redukované formy látky **14** (viz schéma 21). Modifikace reakčního prostředí nepřinesla žádné zlepšení, reakce v bezvodém ethanolu poskytla opět směs látek. Výsledky redukcí jsou zahrnuty v tabulce 10 na str. 73.

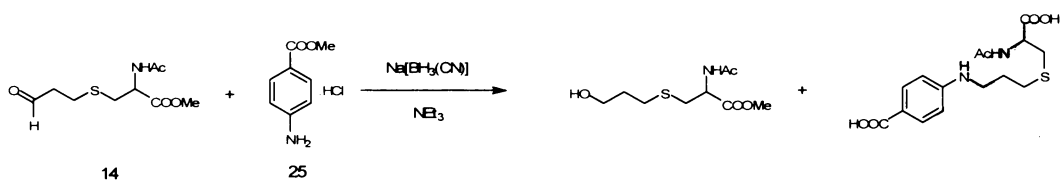


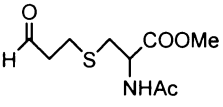
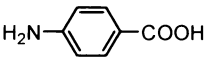
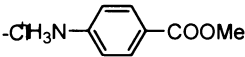
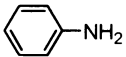
Schéma 21 Reduktivní aminace v organickém prostředí.

#### 6.4.3. Reduktivní aminace za použití $\text{NaBH}(\text{OAc})_3$

Pro optimalizaci reakčních podmínek reductivní aminace látky **11** byla testována dvě redukční činidla v prostředí tetrahydrofuranu nebo dichlorethanu.

Výhodou těchto rozpouštědel je ta, že potlačují vznik geminální formy diolu látky **14** a zlepšují izolaci produktu. Sérii experimentů provedených v tetrahydrofuranu a dichlorethanu (na základě rozpustnosti výchozích látek v uvedených rozpouštědlech) shrnuje tabulka 10.

Použití triacetoxyborohydridu sodného vedlo ve většině případů ke získání kýženého sekundárního aminu, jen v některých případech znečištěného výchozí látkou. Naproti tomu vedla reductivní aminace kyanoborohydridem ve většině případů k směsi redukovaného merkapturátu a výchozího aminu.

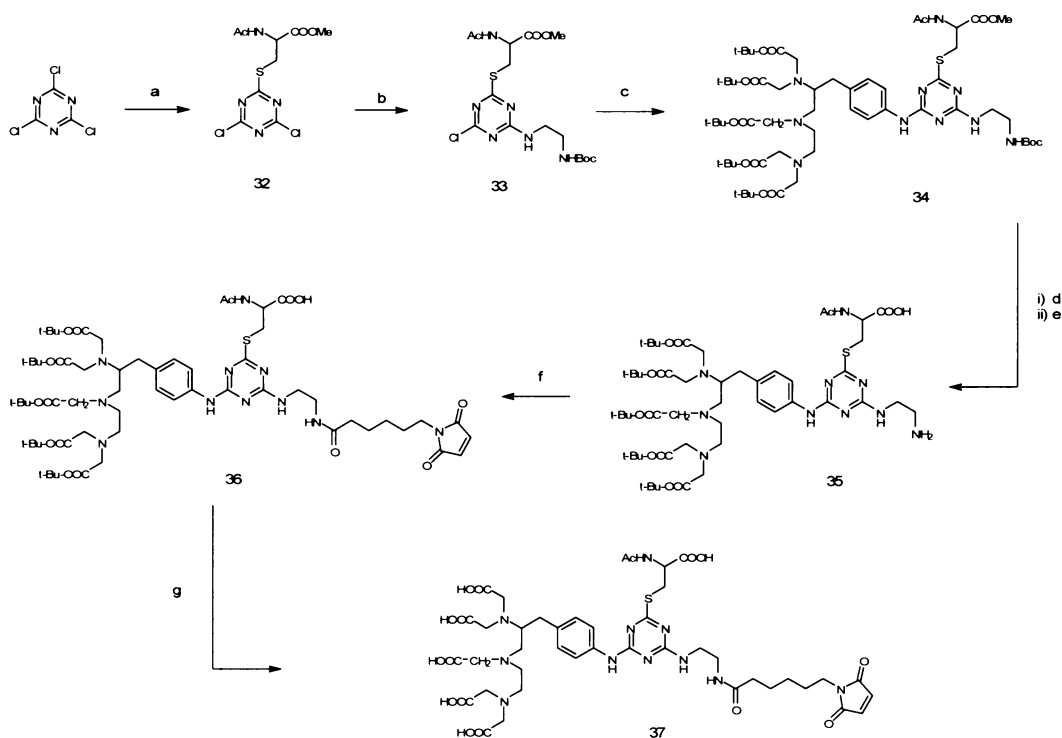
merkapturát	amin	Redukční činidlo/rozpouštědlo	Výsledek reakce
		<b>NaBH<sub>3</sub>CN</b> /THF	Směs v.l. a produktu, obtížná izolace
		<b>NaBH(OAc)<sub>3</sub></b> /DCE	Obtížná izolace, očekávaný produkt
		<b>NaBH<sub>3</sub>CN</b> /THF	Amin a redukováná forma merkapt.
		<b>NaBH(OAc)<sub>3</sub></b> /THF, Et <sub>3</sub> N	Rce proběhla, nutné čištění
		<b>NaBH(OAc)<sub>3</sub></b> /DCE, Et <sub>3</sub> N	Produkt mírně znečištěn v.l.
		<b>NaBH<sub>3</sub>CN</b> /THF	Rce proběhla
<b>NaBH(OAc)<sub>3</sub></b> /THF		Rce proběhla	

Tabulka 10 Srovnání výsledků reduktivních aminací v organických rozpouštědlech

#### 6.4.4. Příprava konjugátů 1 a 2

Po optimalizaci podmínek byla úspěšně provedena reduktivní aminace látek **11** a **14** ve dobrém výtěžku za použití 1,5 eq. triacetoxyborohydridu v tetrahydrofuranu. Selektivní hydrolýza methylesteru látky **38** byla provedena působením hydroxidu lithného ve vodněmethanolicím roztoku. Surový produkt byl bez čištění dále použit do reakce s heterobifunkčním linkerem v prostředí dimethylformamidu. Navázání látky **20** na sekundární aminoskupinu poskytlo po čištění meziprodukt **39**, který byl v prostředí dichlormethanu převeden během 6 hodin v inertní atmosféře trifluoroctovou kyselinou na konjugát 2 (viz schéma 19).

Příprava konjugátu **1**, využívajícího ke spojení jednotlivých funkčních celků triazinovou jednotku byla provedena sledem šesti reakčních kroků podle schématu



22.

a. **12**, 0°C, AcO, báze

b. **31**, AcO, r.t., báze

c. AcO, 45°C, báze

g. TFA, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, r.t., 6h

d. LiOH, CH<sub>3</sub>OH/H<sub>2</sub>O (3:1), laboratorní teplota, 12h

e. 5 eq. MeSO<sub>3</sub>H, *tert*-BuOAc/CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (4:1), Ar<sub>2</sub>

f. 1,5 eq. linkeru **20**, DMF, 35°C

Schéma 22 Příprava konjugátu **1** (**37**) využívajícího jednotku větvení

Pořadí reakcí bylo voleno podle reaktivnosti jednotlivých substrátů, v prvním kroku byl na molekulu kyanurchloridu substitucí chlorového atomu navázán methylester *N*-acetylcysteinu. Získá se tak reaktivní meziprodukt **32** který se za stejných podmínek (pouze za vyšší teploty) nechá reagovat *tert*-butoxy ethylendiaminem (**31**). Získaný bifunkční produkt byl v dalším kroku spojen za refluxu v acetonu s penta-*tert*-butylesterem chelátoru (**11**). Získaný meziprodukt **34** je v dalším kroku postupně selektivně hydrolyzován působením hydroxidu lithného v methanolu a vodě. Surová reakční směs byla zpracována bez izolace produktu. V dalším kroku se získaná látka podrobí selektivní debokaci uskutečněnou působením methylsírové kyseliny v prostředí *tert*-butyl-acetátu a dichlormethanu. Chromatografické čištění poskytlo v 43% výtěžku látku **35**, na kterou byl v další fázi

navázán heterobifunkční linker (**20**). Finální konjugát **1** byl následně získán kyselou deprotekcí *tert*-butyl esterových skupin kyselinou trifluoroctovou v dichlormethanu. Několika hodinová reakce pod inertní atmosférou dusíku poskytla v 80% výtěžku konjugát **1**.

Oba připravené konjugáty jsou připravené pro konjugaci s biologicky aktivním materiálem, který bude pro navázání obsahovat volné sulfhydrylové skupiny.

## 7. ZÁVĚR

V předkládané diplomové práci byla úspěšně provedena příprava dvou různých typů prototypových konjugátů s inovativním zavedením konjugační komponenty na bázi bifunkčního chelátoru a heterobifunkčního linkeru, lišících se navzájem v příslušném prvku větvení. V rámci přípravy jednotlivých funkčních složek konjugátů byla provedena optimalizace redukčního kroku syntézy bifunkčního chelátoru na bázi substituované DTPA. Byly tak zavedeny dva nové redukční systémy využívající vlastností dostupného tetrahydroboritanu sodného. Pro zefektivnění a možnost zavedení syntézy v semitechnologickém měřítku byla také zavedena nová metoda přípravy bifunkčního chelátoru na bázi substituované 1-Bn-DTPA s využitím *O*-mesylem aktivovaných a chráněných substituovaných fenylalaninůlů. Tato metoda navzdory většímu počtu reakčních kroků dává srovnatelné výtěžky a díky nenáročnosti jednotlivých reakčních stupňů poskytuje plnohodnotnou alternativu syntézy bez nutnosti použití chromatografie.

Pro potřeby výzkumu biodistribučního chování konjugátů s modulovanou délkou uhlíkatého řetězce linkeru byla připravena série heterobifunkčních linkerů na bázi aktivovaných esterů maleimidových kyselin. Provedená reexaminace literárně popsaných moderních postupů přípravy jejich prekurzorů<sup>75,76</sup> ukázala, že spektrální charakteristiky látek v diskutovaných člancích byly nesprávně vyhodnoceny, nebo že jsou postupy syntéz nereprodukovatelné. Výsledkem této srovnávací studie je zjištění, že termické uzavírání maleimidového kruhu nevede ke vzniku maleimidů, ale dochází k izomerizaci na deriváty fumarové kyseliny a také k zániku dvojné vazby. Bylo shledáno, že nejvýhodnější metodou syntézy některých těchto linkerů je příprava v jednom reakčním kroku na místo třístupňového provedení, a to reakcí příslušné aminokyseliny a maleinhydridu za přítomnosti dicyklohexylkarbodiimidu a *N*-hydroxysukcinimidu. Při tomto provedení reakce je možné jinak tři nutné reakční stupně provést v jednom kroku. Dalším zjištěním je, že úspěšnost použití této metody je limitována vzdáleností aminoskupiny a karboxylu v molekule aminokyseliny.

Klíčovým cílem práce bylo zavedení nové funkční jednotky do molekuly prototypového trifunkčního konjugátu. Touto jednotkou, určenou k odstranění nežádoucí úrovně radioaktivity z necílových orgánů, byl zvolen fragment merkapturové kyseliny. Tato komponenta byla vybrána s ohledem na fakt, že by



mohla do molekuly metabolitu vnést další informaci, která by vedla k jeho snadnějšímu vyloučení z organismu.

Merkaptoové prekurzory byly připojeny k molekule chelátoru za použití redukční aminace a příslušné *N*-alkylace. Optimalizace podmínek redukční aminace byla předem zkoumána na modelových substrátech, a to jak ve vodném, tak i nevodném prostředí za použití selektivních redukčních činidel na bázi borohydridu. Po následné konjugaci s heterobifunkčním linkerem a deprotekcí tak byly připraveny dva typy prototypových konjugátů. První typ konjugátu byl připraven pomocí redukční aminace s využitím dusíkového atomu chelátoru jako bodu větvení (konjugát 2). Druhý typ konjugátu využívá pro připojení všech komponent triazinové jednotky (konjugát 1). Oba typy konjugátů budou dále zkoumány z hlediska jejich biodistribuce a metabolizace v organismu.

## 8. SEZNAM LITERATURY - CITACE

1. Parkin D.M., Bray F., Ferlay J., Pisani P.: *CA Cancer J. Clin.* **2005**, 55, 74
2. [http://www.prevecenadoru.cz/mouprev/section\\_show.jsp?s=908&selId, Doc=131](http://www.prevecenadoru.cz/mouprev/section_show.jsp?s=908&selId, Doc=131) 12.3.2007
3. <http://www.linkos.cz/pacienti/lecba/dalsi.php>
  - 3a. <http://www.linkos.cz/pacienti/slovnicek.php?s=1&text=nežadoucí%20účinky%20radioterapie> 12.3.2007
  - 3b. <http://www.linkos.cz/pacienti/lecba/radioterapie.php?t=1> 12.3.2007
4. <http://www.cancer.gov/cancertopics/treatment/types-of-treatment> 12.3.2007
  - 4a. <http://www.cancer.gov/cancertopics/factsheet/Therapy/radiation> 12.3.2007
  - 4b. <http://www.cancer.gov/cancertopics/factsheet/Therapy/targeted> 12.3.2007
5. [http://www.cancer.org/docroot/ETO/content/ETO\\_1\\_4X\\_Monoclonal\\_Antibody\\_Therapy\\_Passive\\_Immunotherapy.asp?sitearea=ETO](http://www.cancer.org/docroot/ETO/content/ETO_1_4X_Monoclonal_Antibody_Therapy_Passive_Immunotherapy.asp?sitearea=ETO) 12.3.2007
6. <http://www.oncolink.com/treatment/article.cfm?c=5&s=27&id=322> 13.3.2007
7. Hořejší V., Bartůňková J.: *Základy imunologie*, str. 59, 88, 148, 175, 178, Triton, Praha 2005
8. [http://en.wikipedia.org/wiki/Monoclonal\\_antibody\\_therapy](http://en.wikipedia.org/wiki/Monoclonal_antibody_therapy) 13.7.2007
9. Green M.R.: *The New England Journal of Medicine* **2004**, 350, 2191
10. Adam Z., Pour L., Vorlíček J., Hájek R., Koptíková J., Šmardová J.: *Remedia* **2005**, 4
11. Liu S., Edwards D.S.: *Bioconjug. Chem.* **2001**, 12, 7
12. <http://www.sigmaaldrich.com/catalog/search/ProductDetail/FLUKA/15594> 3.4.2007
13. Waldman T.A.: *Nature Medicine* **2003**, 9, 269
14. Buchegger F., Pélegrin A., Delaloye B., Bischof-Delaloye A., Mach J-P.: *J. Nucl. Med.* **1990**, 31, 1035
15. McCarthy K.E., Woltering F.A., Antony L.B.: *Q. J. Nucl. Med.* **2000**, 44, 88
16. Jong M., Kwekkeboom D., Valkema R., Krenning E.P.: *Eur. J. Nucl. Med.* **2003**, 30, 463
17. Pressman D., Pressman R.: *Int. J. Appl. Radiat. Isot.* **1965**, 18, 617 v 70.
18. Bale W.F., Spar I.L., Goodland R.L.: *Cancer Res.* **1960**, 20, 1488
19. Khaw B.A., Haber E., Beller G.A.: *J. Clin. Inv.* **1976**, 58, 439
20. Khaw B.A., Fallon J.T., Beller G.A.: *Circulation* **1979**, 60, 1527
21. Berstein I.D., Tam M.R., Nowinski R.C.: *Science* **1980**, 207, 68 v Sfakianakis G.N., Sekand F.H.: *J. Nucl. Med.* **1982**, 23, 840 (odk. 17)
22. Behr T.M., Becker W.S., Bair H-J., Klein M.W., Stühler Ch.M., Cidlinsky K.P., Wittekind W., Scheele J.R, Wolf F.G.: *J. Nucl. Med.* **1995**, 36, 430

23. Haseman M.K., Goodwin D.A., Meares C.F., Kaminski M.S., Wensel T.G., McCall M.J., Levy R.: *Eur. J. Nucl. Med.* **1986**, *12*, 455
24. Smith-Jones P.M., Stolz B., Rainer A., Knecht H., Bruns Ch.: *Nucl. Med. Biol.* **1997**, *24*, 761
25. Moldofsky P.J., Powe J., Mulhern C.B. Jr., Hammond N., Sears H.F., Gatenby R.A., Steplewski Z., Koprowski H.: *Radiology* **1983**, *149*, 549
26. Larson S.M., Carrasquillo J.A., Krohn K.A., Brown J.P., McGuffin R.W., Ferens J.M., Graham M.M., Hill L.D., Beaumier P.L., Hellström K.E., Hellström I.: *J. Clin. Invest.* **1983**, *72*, 2101
27. Brouwers A., Mulders P., Oosterwijk E., Buijs W., Corstens F., Boerman O., Oyen W.: *Cancer Bioth. Radiopharm.* **2004**, *19*, 4466
28. Novak-Hofer I., Zimmermann K., Schubiger P.A.: *Cancer Bioth. Radiopharm.* **2001**, *16*, 469
29. Goldenberg D.M., Sharkey R.M.: *Q. J. Nucl. Med. Mol. Imaging* **2006**, *50*, 248
30. Jain R.K.: *Nat. Med.* **2001**, *7*, 987
31. Molina E.: *Int. J. Pharm.* **2006**, *310*, 125
32. Maack J., Johnson V., Kan S. T., Figueiredo J., Sigulem D.: *Kidney Int.* **1979**, *16*, 251
33. Bernard B.F., Krenning E.P., Breeman W.A., Rolleman E.J., Akker W.H., Visser T.J., Macke H., de Jong M.: *J. Nucl. Med.* **1997**, *38*, 1929
34. Rutheford R.A.D., Smith A., Waibel R., Schubiger P.A.: *Int. J. Cancer* **1997**, *72*, 522
35. Behr T.M., Sharkey R.M., Juweid M.E., Blumenthal R.D., Dunn R.M., Griffiths G.L., Bair H.J., Wolf F.G., Becker W.S., Goldenberg D.M.: *Cancer Res.* **1995**, *55*, 3825
36. Schubiger P.A., Alberto R., Smith A.: *Bioconjug. Chem.* **1996**, *7*, 167
37. Reichert D.E., Lewis J.S., Anderson C.J.: *Coordination Chem. Rev.* **1999**, *184*, 3
38. Sundberg W.M., Meares C.F., Goodwin D.A., Diamanti C.I.: *J. Med. Chem.* **1974**, *17*, 1304
39. Woods M., Sherry D.: *Chimica Oggy* **2005**, 31
40. Corson D.T., Meares C.F.: *Bioconjug. Chem.* **2000**, *11*, 262
41. Brechbiel M.W., Gansow O.A.: *Biocojug. Chem.* **1991**, *2*, 187
42. Baghrava K.K., Zhang Z.Y., Palestro Ch.J., Acharya S.A.: *J. Protein Chem.* **1999**, *18*, 761
43. Cox J.P.L., Craig A.S., Helps I.M., Jankowski K.J., Parker D., Eaton M.A.W., Millican A.T., Millar K., Beeley N.R.A., Boyce B.A.: *J. Chem. Soc. Perkin Trans. I* **1990**, 2567
44. Brechbiel M.W., Gansow O.A., Atcher R.W., Schlom J., Esteban J., Simpson D.E., Colcher D.: *Inorg. Chem.* **1986**, *25*, 2772

45. Hayward M.M., Adrian J.C. Jr., Schepartz A.: *J. Org. Chem.* **1995**, *60*, 3924
46. Schottelius M., Schwaiger M., Wester H-J.: *Tetrahedron Lett.* **2003**, *44*, 2393
47. McMurry T.J., Brechbiel M., Kumar K., Gansow O.A.: *Bioconjug. Chem.* **1992**, *3*, 108
48. Renn O., Meares C.F.: *Bioconjug. Chem.* **1992**, *3*, 563
49. Mondry A., Starynowicz P.: *Inorg. Chem.* **1997**, *36*, 1176
50. Akizawa H., Arano Y.: *Q. J. Nucl. Med.* **2002**, *46*, 206
51. Arano Y., Wakisaka K., Mukai T., Sezono T., Motonari H., Akizawa H., Kariyama C., Ohmomo Y., Tanaka Ch., Ishiyama M., Sakahara H., Konishi J., Yokoyama A.: *Nucl. Med. Biol.* **1996**, *23*, 129
52. Arano Y., Mukai T., Akizawa H., Uezono T., Monotari H., Wakisaka K., Kairiyama C., Yokoyama A.: *Nucl. Med. Biol.* **1995**, *22*, 555
53. Arano Y., Mukai T., Uezono T., Wakisaka K., Motonari H., Akizawa H., Taoka Y., Yokoyama A.: *J. Nucl. Med.* **1994**, *35*, 890
54. Quadri S.M., Vriesendorp H.M.: *Q. J. Nucl. Med.* **1998**, *42*, 250
55. Quadri S.M., Vriesendorp H.M., Leichner P.K., Williams J.R.: *J. Nucl. Med.* **1993**, *34*, 938
56. Paik Ch.H., Quadri S.M., Reba R.C.: *Nucl. Med. Biol.* **1989**, *16*, 475
57. Desphande S.V., DeNardo S.J., Meares C.F., McCall M.J., Adams G.P., DeNardo G.L.: *Nucl. Med. Biol.* **1989**, *16*, 587
58. Brechbiel M.W., Gansow O. A., Atcher R. W., Schlom J., Esteban J., Simpson D.E., Colcher D.: *Bioconjug. Chem.* **1986**, *25*, 2772
59. Li M., Meares C.F., Zhong G-R., Miers L., Xiong Ch-Y., DeNardo S.J.: *Bioconjug. Chem.* **1994**, *5*, 101
60. Kilne S.J., Betebenner D.A., Johnson D.K.: *Bioconjug. Chem.* **1991**, *2*, 26
61. Koizumi M., Endo K., Kunimatsu M., Sakahara H., Nakashima T., Kawamura Y., Watanabe Y., Saga T., Konishi J., Yamamuro T., Hosoi S., Toyania S., Arano Y., Yokoyama A.: *Cancer Res.* **1988**, *48*, 1189
62. Koizumi M., Endo K., Kunimatsu M., Sakahara H., Nakashima T., Kawamura Y., Watanabe Y., Ohmomo Y., Arano Y., Yokoyama A., Torizuka K.: *J. Immunol. Methods* **1987**, *104*, 93
63. Faivre-Chauvet A., Gestin J. F., Mease R.C., Sai-Maurel C., Thederz P., Slikin M., Meinken G.E., Srivastava S.C., Chatal J.F.: *Nucl. Med. Biol.* **1993**, *20*, 763
64. Trouet A., Masquelier M., Baurain R., Deprez-De Campeneere D.: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1982**, *79*, 626
65. Studer M., Kroger L.A., DeNardo S.J., Kukis D.L., Meares C.F.: *Bioconjug. Chem.* **1992**, *3*, 424
66. Petterson J.J., Meares C.F.: *Bioconjug. Chem.* **1998**, *9*, 618
67. King H.D., Dubowchik G.M., Walker M.A.: *Tetrahedron Lett.* **2002**, *43*, 1987

68. Hoffman T.J., Gali H., Smith C.J., Sieckman G.L., Gates D.L., Owen N.K., Volkert W.A.: *J. Nucl. Med.* **2003**, *44*, 823
69. Shuke N., Yokoyama K., Sun B-F., Kinuya S., Miyauchi T., Aburano T., Tonami N., Hisada K.: *J. Nucl. Med.* **1993**, *34*, 28P
70. Smith C.J., Gali H., Sieckman G.L., Higginbotham C.H., Volkert W.A., Hoffman T.J.: *Bioconjug. Chem.* **2003**, *14*, 93
71. Kigatawa T., Shimozono T., Aikawa T., Yoshida T., Nishimura H.: *Chem. Pharm. Bull.* **1981**, *29*, 1130
72. Keller O., Rudinger J.: *Helv. Chim. Acta* **1975**, *58*, 531
73. Reddy P.Y., Kondo S., Toru T., Ueno Y.: *J. Org. Chem.* **1997**, *62*, 2652
74. Fujita S., Reddy P.Y., Toru T. (Aisin Seiki Co., Ltd., Japan): *Appl. JP 97-250078*; *Chem. Abstr.* **1999**, *130*, 237467
75. Odruš V., Fišera L., Bradac V.: *Arkivoc* **2001**, *2*, 60
76. Borah H.N., Boruah R.C., Sandhu J.S.: *J. Chem. Res.* **1998**, *S*, 272
77. Nielsen O., Buchardt O.: *Synthesis* **1991**, 819
78. Večerková J.: *Biotransformace léčiv a její význam pro toxikologickou praxi*, str. 40, Praha **1997**
79. Hermanson, G.T.: *Bioconjugate techniques*, str.185-186, Academic Press, San Diego CA **1996**
80. Abdel-Magid A.F., Carson K.G., Hartus B.D., Maryanoff C.A., Shah R.D.: *J. Org. Chem.* **1996**, *61*, 3849
81. Lohse Ch., Jaeger L.L., Staimer N., Snaborn J.R., Jones A.D., Langó J., Gee S.J., Hammock B.D.: *J. Agric. Food Chem.* **2000**, *48*, 5913
82. Cabacungan J.C., Ahmed A.I., Feeney R.E.: *Analyt. Biochem.* **1982**, *124*, 272
83. Borch R.F., Bernstein M.D., Durst H.D.: *J. Am. Chem. Soc.* **1971**, *93*, 2897
84. Hutson D.H., Hoadley E.C., Griffiths M.H., Donninger C.: *J. Agric. Food Chem.* **1970**, *18*, 507
85. Staatz I., Ganze U.H., Roth H.J.: *Liebigs Ann. Chem.* **1989**, 51
86. Thurston J.T., Dudley J.R., Kaiser D.W., Hechenbleinker I., Schafer F.C., Holm-Hansen D.: *J. Am. Chem. Soc.* **1951**, *73*, 2981
87. Von Nestler H., Furst H.: *J. Prakt. Chemie* **1963**, *4*, 22
88. De León-Rodríguez L.M., Kovacz Z., Sherry A.D.: *Lett. Org. Chem.* **2005**, *2*, 160
89. Glen R.C., Martin G.R., Hill A.P., Hyde R.M., Woollard P.M., Salmon J.A., Buckingham J., Robertson A.D.: *J. Med. Chem.* **1995**, *38*, 3566
- 89a. Cummins C.H., Rutter E.W., Fordyce W.A.: *Bioconjug. Chem.* **1991**, *2*, 180
90. Conchillo A., Camps F., Messeguer A.: *J. Org. Chem.* **1990**, *55*, 1728
91. Hashmi M., Vamvakas S., Anders M.W.: *Chem. Res. Toxicol.* **1992**, *5*, 361
92. Rich D.H., Gesellchen P.D., Tong A., Cheung A., Buckner C.K.:

- J. Med. Chem. **1975**, *18*, 1004
93. Kigatawa T., Tanimori H., Yoshida K., Asada H., Miura T., Fujiwara K.:  
Chem. Pharm. Bull. **1982**, *30*, 2487
  94. Davies J.S., Mohammed K.A.: J. Chem. Soc. Perkin Trans II **1984**, 1723
  95. Brown H.C., Choi Y.M., Narasimhan S.: Inorg. Chem. **1982**, *21*, 3657
  96. Houghten R.A., Beckman A., Ostresh J.M.:  
Int. J. Pept. Protein Res. **1986**, *27*, 653
  97. Stahl G.L., Walter R., Smith C.W.: J. Org. Chem. **1978**, *43*, 2285
  98. Vidal T., Petit A., Loupy A., Gerte R.N.: Tetrahedron **2000**, *56*, 5473
  99. Adamczyk M., Johnson D.: Oppi briefs **1993**, *25*, 592
  100. Zhou M., Ghosh I.: Org. Lett. **2004**, *6*, 3561 supporting inf.
  101. Ede N.J., Tregear G.W., Haralambidis J.: Bioconjug. Chem. **1994**, *5*, 373

## 9. KLÍČOVÁ SLOVA A ABSTRAKT

Tato práce se zabývá návrhem struktury a přípravou prototypového metabolického konjugátu s inovativním zavedením konjugační komponenty (merkapturové kyseliny) na bázi bifunkčního chelátoru (1-Bn-DTPA) a heterobifunkčního linkeru (maleimidové kyseliny), lišících se navzájem v příslušném prvku větvení (dusíkový atom, triazinová jednotka). Tyto konjugáty by mohly zajistit snížení nežádoucí radioaktivity v necílových orgánech při radioterapii. Práce se zabývá přípravou série heterobifunkčních linkerů maleimidového typu a kriticky hodnotí některé dříve publikované práce. Předkládá nový způsob syntézy BFC chelátoru páteřně substituované DTPA. Výsledkem práce je příprava dvou různých typů konjugátů, lišících se povahou spojení jednotlivých komponent.

---

Radioimunoterapie, bifunkční chelátor, páteřně substituovaná DTPA, redukativní aminace, trifunkční konjugát, konjugáty merkapturové kyseliny, snížení nežádoucí úrovně radioaktivity

## 10. KEYWORDS AND ABSTRACT

We suggest a structure and synthesis of a new prototypal metabolic conjugate based on bifunctional chelator and heterobifunctional linker and particular application of a conjugation component for the purpose of reduction of radioactivity in nontarget tissues. We provides summary and evaluation of different methods of synthesis of maleimido active esters. This work also suggests a modification of synthesis of derivative of Bn-DTPA chelator, which replace a hazardous reduction step carried by  $\text{BH}_3\cdot\text{THF}$  complex by employment safer reduction agents ( $\text{NaBH}_4$  and  $\text{LiBH}_4$  with  $\text{BF}_3\cdot\text{Et}_2\text{O}$ ) or introduce alternative pathway avoiding reduction step completely. This pathway contains only easy reactions and final yield is comparable to old synthesis.

---

Radioimmunotherapy, bifunctional chelator, backbone substituted DTPA, reductive amination, trifunctional conjugate, mercapturic acid conjugates, reduction of nontarget radioactivity

## **Poděkování**

Ráda bych zde poděkovala všem, kteří mě v práci podporovali a pomáhali mi. Především chci poděkovat svému školiteli Mgr. Ladislavu Drožovi PhD., za vedení, trpělivost a cenné rady. Za ochotné měření spekter chci poděkovat RNDr. Ivě Tišlerové PhD., RNDr. Martinu Štíchovi a týmu z hmotnostní laboratoře na ÚOCHBu. Dále chci poděkovat za cenné rady a podporu RNDr. Simonu Cihelníkovi PhD.

Práce byla finančně podporována grantem projektu TANDEM FT-TA2/081, uděleným Ministerstvem obchodu a průmyslu České republiky