

UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE

Přírodovědecká fakulta

Studijní program: Chemie

Studijní obor: Chemie



MARTIN HADZIMA

Fluorescenčně značené ligandy μ -opioidních receptorů
Fluorescently labeled ligands for the μ -opioid receptors

Bakalářská práce

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

Praha 2016

Prohlášení

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

V Praze dne 26. května 2016

Martin Hadzima

Poděkování

Chtěl bych poděkovat svému školiteli Ing. Aleši Macharovi, Ph.D., za pomoc při vedení mé bakalářské práce, obrovskou trpělivost a cenné rady při jejím vypracování. Dále bych chtěl poděkovat RNDr. Simoně Hybelbauerové, Ph.D., za zaškolení pro práci s NMR spektrometrem. Také bych chtěl poděkovat pracovníkům servisních laboratoří ÚOCHB AV ČR, za měření HRMS spekter a výzkumnému týmu doc. RNDr. Jana Kovalinky, CSc., za vstřícnou spolupráci. Další poděkování patří kolegům z laboratoře za každodenní pomoc a přátelskou atmosféru na pracovišti. Na závěr bych chtěl poděkovat své rodině a přítelkyni, za jejich morální a finanční podporu po dobu celého studia.

Abstrakt

Tato bakalářská práce se zabývá přípravou fluorescenčně značených opiátů, které umožňují pomocí fluorescenčních technik detekovat μ -opioidní receptory a blíže prostudovat interakci s jejich ligandy.

Jako substráty určené k chemickým modifikacím byly vybrány semi-syntetické opiáty naloxon a naltrexon. Jejich převedení na odpovídající C-6 hydrazony umožnilo sloučeniny dále modifikovat a sledovat, zda-li dojde ke změně jejich schopnosti se vázat na μ -opioidní receptory.

Nejprve byly připraveny známé adukty hydrazonů s isothiokyanátem fluoresceinu. Následně byly mezi uvedenou fluorescenční značku a opiátový fragment systematicky vkládány různě dlouhé spojky. Tyto spojky byly připraveny z tetraethylglykolu s cílem sledovat změnu vazebné konstanty takto upraveného ligandu opioidního receptoru.

Nakonec bylo rozhodnuto připravit konjugát, který by byl opatřen spojkou odpovídající svým rozměrem zhruba délce dekaethylglykolu. K tomu byly navrženy dva syntetické postupy konstrukce požadované spojky. Jeden využil přístup splňující podmínky click chemie a druhý byl založen na klasické tvorbě amidu.

Oba úspěšně připravené konjugáty byly převedeny na adukty s fluoresceinem, což umožnilo ověřit jejich vazbu s receptorem. Obě látky byly také poskytnuty druhému spolupracujícímu pracovišti, jež je použije k přípravě syntetické protilátky μ -opioidních receptorů.

Klíčová slova: *fluorescenční značky, opiáty, syntéza*

Abstract

This Bachelor's thesis deals with preparation of fluorescently labeled opiates, which allow detection of μ -opioid receptors and study of their interaction with ligands, using fluorescent techniques.

As substrates designated for chemical modifications were chosen semi-synthetic opiates, naloxone and naltrexone. Their conversion to corresponding C-6 hydrazones allowed further modifications of these substances and tracking, if any changes to their ability to interact with μ -opioid receptors occur.

Firstly, known adducts of these hydrazones with fluorescein isothiocyanate were prepared. Then, we inserted linkers of different lengths between the opiate fragment and the fluorescent tag, systematically. Mentioned linkers were prepared from tetraethyleneglycole derivatives with aim to study binding constants of modified μ -opioid receptor ligands.

In the end, we decided to prepare opiate conjugate with particular linkers of length corresponding, approximately, to decaethyleneglycole. Two different procedures were proposed for the preparation of this linker. One of them used click chemistry concept and the other was based on classic amide coupling.

Both conjugates were converted to adducts with fluorescein to verify their specific binding to μ -opioid receptors. They were also provided to co-operating group, which will use them for preparation of synthetic antibody for μ -opioid receptors.

Key words: *fluorescent tag, opiates, synthesis*

Seznam zkratek:

Boc	<i>t</i> -Butyloxykarbonyl
BODIPY	4,4-Difluor-4-bora-diazaindacen
bs	Široký singlet
CuAAC	Mědí katalyzována cykloadiční reakce alkynu s azidem
d	Dublet
DCM	Dichlormethan
dd	Dublet dubletů
DMF	<i>N,N</i> -Dimethylformamid
DMSO- <i>d</i> ₆	Deuterovaný dimethylsulfoxid
eq	Molární ekvivalent
Et	Ethyl
EtOAc	Ethyl-acetát
EtOH	Ethanol
GPCR	Receptory spřažené s G proteinem
HPLC	Vysokoúčinná kapalinová chromatografie
HPLC-MS	Vysokoúčinná kapalinová chromatografie v kombinaci s hmotnostní spektrometrií
HPMA	<i>N</i> -(2-Hydroxypropyl)methakrylamid
HRMS	Hmotnostní spektrometrie s vysokým rozlišením
m	Multiplet
Me	Methyl
MeOH	Methanol
MOR	μ-Opioidní receptory
NMR	Nukleární magnetická rezonance
o/n	Přes noc
p	Pentet
Pr	Propyl
q	Kvartet
RVO	Rotační vakuová odparka
s	Singlet
t	Triplet

TBTU	<i>O</i> -(Benzotriazol-1-yl)- <i>N,N,N',N'</i> -tetramethyluronium tetrafluoroborát
THF	Tetrahydrofuran
TLC	Tenkvrstvá chromatografie
TsCl	Tosylchlorid
UV	Ultrafialové záření
δ	Chemický posun v ppm

Obsah

1. Úvod	- 9 -
2. Teoretická část	- 11 -
2.1 Opioidní receptory	- 11 -
2.1.1 μ -Opioidní receptory	- 13 -
2.2 Ligandy opioidních receptorů	- 14 -
2.2.1 Opiáty přírodního původu.....	- 14 -
2.2.2 Semi-syntetické deriváty opiátů.....	- 15 -
2.3 Deriváty tetraethylenglykolu jako spojky	- 18 -
2.3.1 Přístup přes fenolický C-3 morfinanu.....	- 21 -
2.3.2 Přístup přes N-17 morfinanu.....	- 22 -
2.3.3 Přístup přes karbonyl na C-6 morfinanu.....	- 23 -
2.4 Koncept Click chemie	- 26 -
3. Cíle práce	- 28 -
4. Výsledky a diskuse	- 29 -
4.1 Příprava derivátů tetraethylenglykolu	- 29 -
4.1 Příprava fluorescenčně značených konjugátů	- 33 -
4.2.1 Přístup přes karbonyl na C-6 semi-syntetických opiátů	- 33 -
5. Experimentální část	- 40 -
5.1 Použité přístroje a chemikálie	- 40 -
5.2 Pracovní postupy	- 40 -
6. Závěr	- 55 -
7. Literatura	- 56 -

1. Úvod

V procesu přerodu lidského zkoumání okolního světa od pradávného, jenž všechno pozorované vysvětloval všemocnou vůlí (patričního) Boha, ve vědecký přístup, založený na kritickém posuzování experimentálních hodnot, bylo generacemi zvědavců postupně použito mnoho filozofických směrů. Bezsporně ten nejúspěšnější je založen na empirismu, tedy na postupu, který se opírá o výsledky měření a konfrontaci těchto výsledků s již formulovanou teorií. Nicméně i tento přístup má svoje limity. Nikoliv, že by selhával ve své podstatě, ale právě pro přísné držení se výsledků měření. Na první pohled se takové prohlášení může zdát poněkud lichým, ale stačí si uvědomit, že nikoliv každé měření je zrovna exaktní. Řada vědních disciplín, zvláště ty, které spadají do rodiny „life science“, se opírá o metody měření či detekce, jež mají velmi daleko k dokonalosti. Výsledkem toho je existence často zcela protichůdných závěrů publikovaných v recenzovaných časopisech.

Právě množství protichůdných, či chcete-li nepříliš do sebe zapadajících, zpráv o možném vlivu podávání analgetik na bázi opiátů na návrat rakoviny (relapsi) u již zaléčených pacientů, nás přivedlo k myšlence se tomuto rozporu s možnými velkými dopady na medicínu věnovat.¹⁻⁵

Uvažovali jsme i o možnosti modifikovat opiáty a využít je na cílení nádorů, které, jak bylo publikováno, expresují opioidní receptory na povrchu buněk ve velkém množství. Ve světle našich zkušeností z chemie morfinanů se to na první pohled zdálo jako snadné. Nicméně, rychle jsme s našimi kolegyněmi a kolegy z ÚOCHB narazili na problém, jak vůbec realizovat tyto studie spojené s opioidními receptory. Klíčovým nástrojem v biologii jsou protilátky, které lze použít k nepřebornému množství aplikací. V tomto společném projektu jich bylo zapotřebí již na samém začátku, kdy bylo nutno s jejich pomocí ověřit, zda-li buňky požadované opioidní receptory vůbec vytváří.

Je známo, že i buňky, které receptory prokazatelně tvoří, po čase mohou tuto schopnost ztratit. Proto je potřeba se pravidelně o jejich přítomnosti ujišťovat. Všechny komerčně dostupné protilátky μ -opioidních receptorů však trpí zásadním nedostatkem - jsou notoricky nespolehlivé a jako většina proteinů, i nepříliš stále (z pohledu organického chemika). Tento fakt je velmi frustrující, vezmete-li v úvahu, jak důležité jsou to receptory a jak velký zájem je jim stále věnován. Pokud bychom se

spoléhali na takovéto protilátky, každý následující výsledek by bylo nutné brát s velkou rezervou.

K jednoduchému určení, zda-li jsou opioidní receptory ve tkáni přítomny, je naštěstí možné použít i podstatně jednodušší chemické sloučeniny. Těmi jsou adukty ligandů (opiátů) s fluorescenční značkou. Pokud je takový značený ligand selektivní a dobře se na receptor váže, tak po promytí vzorku tkáně, by měření fluorescence mělo odhalit přítomnost fluorescenční značky na místě, kde je receptor.

Dalším krokem bylo formulování otázky, jestli by nebylo možné, při použití polymerního nosiče vhodného k biologickým aplikacím, připravit „syntetickou protilátku μ -opioidních receptorů“. Tedy chemicky stálý konjugát opiátu připravitelný v gramových množstvích, jenž by nahradil komerčně dostupné, avšak nespolehlivé protilátky na bázi proteinů.

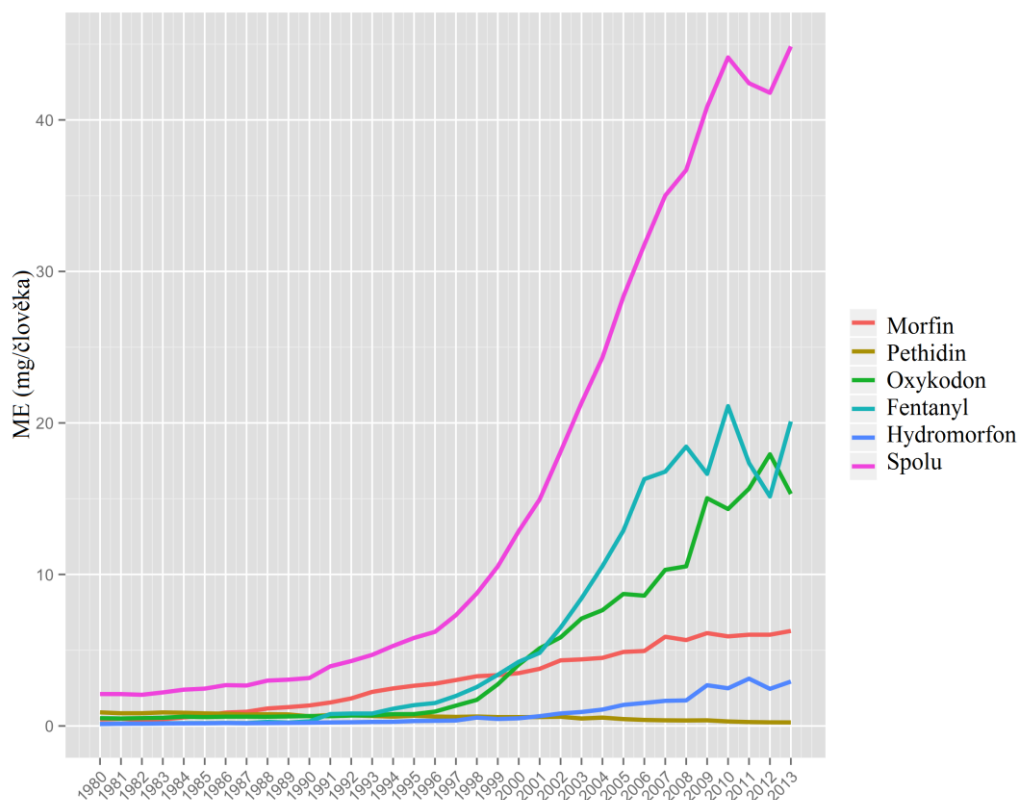
V následujících kapitolách se čtenář seznámí s jednotlivými koncepty, cíli a výsledky tohoto projektu.

2. Teoretická část

2.1 Opioidní receptory

Opiáty doprovázejí lidstvo po celá staletí. Využívají se v medicíně, ale též se i zneužívají (heroin, morfin), či nepravdělně aplikují pro „rekreační“ účely (oxykodon, buprenorfin). Pojem opium pochází z řeckého „opos“, což znamená v překladu šťáva. Opium je tekutina, která se získává z nezralých plodů rostliny *Papaver somniferum*.⁶ Ve skutečnosti se jedná o směs látek, která obsahuje podíl alkaloidů, zejména morfin a jeho deriváty, které souhrnně označujeme jako opiáty. Význam těchto sloučenin spočívá v jejich výjimečných analgetických účincích. Opiáty se využívají k tlumení silných bolestí, např. v terminálním stádiu nádorového onemocnění. V tomto odvětví zatím opiáty nenalezly konkurenci a jejich spotřeba neustále roste, jak to dokazuje i Obrázek 2.1. Na tomto grafu vidíme, že za posledních patnáct let došlo k více než čtyřnásobnému nárůstu spotřeby opiátů na člověka.⁷

Obrázek 2.1 Vývoj celosvětové spotřeby opiátů (ME = ekvivalent morfinu)⁷

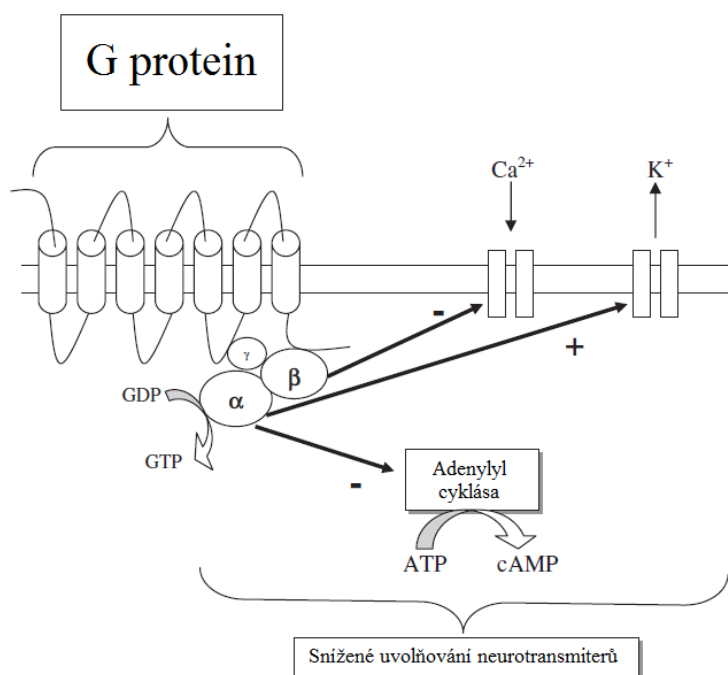


V roce 1805 byl Friedrichem Wilhelmem Adamem Sertünerem izolován čistý morfin.⁶ O mnoho let později, v roce 1898, byl připraven první semi-syntetický opiát, heroin. Následně v 20. století následovala řada derivátů jako naloxon, naltrexon či nalorfin. Tyto látky se lišily jak potencí vůči opioidním receptorům, tak svou povahou agonista-antagonista. Na konci 20. století byly objeveny první endogenní opiáty peptidové povahy. Všechny tyto objevy umožnily a podnítily studium mechanismu účinků opiátů. Teorie existence opioidních receptorů byla prvně formulována v roce 1954. A. H. Beckett a A. F. Casy dokázali, že biologická aktivita opiátů je způsobena asociací se specifickým receptorovým povrchem. To vedlo k myšlence, že pro studium a identifikaci těchto receptorů by mohly být použity radioznačené ligandy. Jakmile byly tyto sloučeniny připraveny, tři nezávislé skupiny v roce 1973 potvrdily existenci opioidních receptorů v mozku savců za využití ³H naloxonu. Na základě rozdílu mezi účinky jednotlivých opiátů byla vyslovena hypotéza, že existuje víc druhů opioidních receptorů. Tato hypotéza byla posléze potvrzena.

Dnes známe tři základní druhy opioidních receptorů: μ (mý), κ (kappa) a δ (delta). Existuje řada dalších receptorů, které však nejsou ani zdaleka tak prostudovány a jejich existence či funkce je spíše předmětem výzkumu.

Opioidní receptory řadíme do skupiny receptorů spřažených s G proteinem (GPCR), u kterých dochází k vyvolání účinku specifickým mechanismem.⁸ Ke vzniku odezvy nedochází přímo po změně strukturní konformace receptoru, ale tato informace je dále zprostředkována G proteinem.

Obrázek 2.2 Schéma mechanismu funkce opioidního receptoru⁸



GPCR receptory nemají přímé spojení s efektorovým proteinem.⁸ Při vazbě ligandu dochází ke konformačním změnám ve struktuře receptoru, které způsobují aktivaci G proteinu a následnou intracelulární transdukcí. Po aktivaci G proteinu dochází k disociaci α podjednotky, která následně způsobí v buňce řadu změn (Obrázek 2.2). V případě opioidních receptorů dochází k uzavření iontových kanálů pro vápenaté ionty a vypuzení draselných iontů, což vede k hyperpolarizaci buňky a inhibici adenylyl cyklázy, která má za úkol produkci cyklického adenosin monofosfátu. Ve výsledku tyto změny způsobí redukcí transmise nervových vzruchů a inhibici uvolňování neurotransmiterů. Tento mechanismus tedy objasňuje analgetické účinky ligandů opioidních receptorů.

2.1.1 μ -Opioidní receptory

μ -Opioidní receptory (MOR) zastávají výsostné postavení mezi opioidními receptory. Jednoduchým potvrzením výše uvedeného je například fakt, že analgetické účinky morfinu nebyly u myši se zablokovanými MOR pozorovány.⁸ Důvod, proč jsou tyto látky pro lidstvo a moderní medicínu tak důležité a nenahraditelné, je tedy spřažen právě s MOR.

Tento typ receptorů se nachází hlavně v centrální nervové soustavě (mozek, mícha), ale také v gastrointestinálním traktu.⁸ Právě jejich lokalizace je rovněž velmi zajímavá a zasluhuje bližší zkoumání. V centrální nervové soustavě jsou situovány presynapticky, na primárních aferentních nervech, což umožňuje přerušení nociceptivního stimulu. Největší překážkou využívání opiátů zůstávají vedlejší efekty, které jsou způsobovány především působením v periferní nervové soustavě. K nejznámějším patří hypoventilace či inhibice peristaltiky (vznik opiáty indukované zácpy). Bohužel, genetické studie ukazují, že jak žádané, tak i vedlejší účinky jsou jednoznačně způsobovány právě interakcí s MOR.

2.2 Ligandy opioidních receptorů

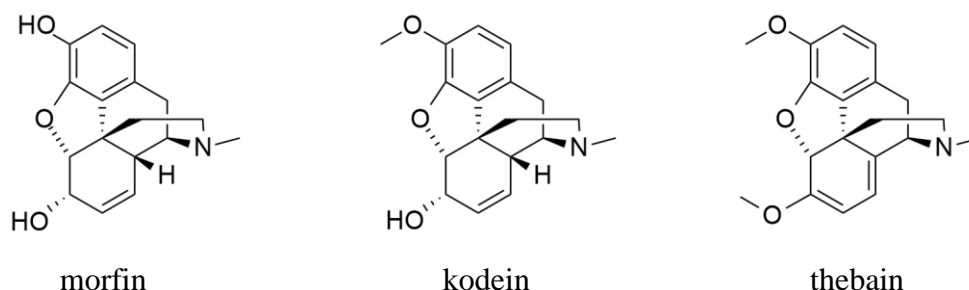
Ligandy opioidních receptorů dělíme do dvou základních skupin, endogenní a exogenní. Endogenní ligandy jsou peptidy, které se v těle uvolňují štěpením jejich prekurzorů (pro-enkefalin, pro-opiomelankortin, pro-dinorfin). Tyto látky fungují jako přirozené regulátory bolesti, emocí, dýchání atd. Větší pozornost v této práci je věnována exogenním opiátům, jejichž modifikacemi jsme se zabývali. Jedná se o nízkomolekulární látky, které se buď vyskytují v přírodě, nebo jsou semi-synteticky připravovány. Přestože těchto sloučenin je obrovské množství, každá z nich je z pohledu interakce s receptory unikátní. Tato skutečnost je dána existencí mnoha faktorů, které tento vztah popisují. Mezi nejdůležitější patří afinita, povaha agonista-antagonista, či biologická dostupnost. Všechny tyto vlastnosti se mohou navíc lišit ve vztahu k jednotlivým typům receptorů.

2.2.1 Opiáty přírodního původu

Nejznámějším zástupcem opiátů je bezesporu morfin. Jak již bylo zmíněno v předchozích částech, získává se z opia, kde jsou různě zastoupeny i další látky. Struktury těchto nejznámějších a nejdůležitějších se nacházejí ve Schématu 2.1. V současné době se morfin produkuje využitím vyšlechtěných kultivarů máku. Isolovaný koncentrát z těchto odrůd obsahuje až 90 % morfinu. Obdobně se získávají i kodein, thebain a částečně i oripavin. Bohužel příliš mnoho dalších informací o těchto

kultivarech není známo, protože představují mimořádně dobře střežené tajemství lídrů trhu. Pro úplnost dodávám, že obrát, jen v legální části trhu s opiáty, představuje více než deset miliard dolarů ročně (konzervativní odhad).

Schéma 2.1 *Struktury látek vyskytujících se v opiu*



Morfin je typickým příkladem silného agonisty s afinitou především vůči MOR.⁸ Opium obsahuje řadu dalších opiátů, které můžeme většinou označit za deriváty morfinu. Tyto látky jsou zastoupeny v menším množství a jejich využití není tak významné.

2.2.2 Semi-syntetické deriváty opiátů

Opiáty vyskytující se v přírodě poskytují jen omezený repertoár vlastností, což přímo vedlo k podnícení hledání nových derivátů. Požadavky na tyto sloučeniny jsou různé a většinou pocházejí z medicínského prostředí. Při přípravě těchto sloučenin se většinou využívá semi-syntetický přístup, tedy chemická transformace materiálu z polní produkce.

Výhodou máku, resp. *Papaver somniferum*, je jeho nenáročnost což umožňuje jeho pěstování ve velkém měřítku. Poté následuje extrakce, a izolace jednotlivých sloučenin. Na druhou stranu je potřeba podotknout, že separace jednotlivých alkaloidů ze směsi je velice náročná a to díky jejich podobným fyzikálně-chemickým vlastnostem.⁹ Navzdory těmto komplikacím je extrakce ekonomicky výhodnější než totální syntéza. Morfin je poměrně malá molekula, ale ve svém skeletu nese řadu funkčních skupin a pět chirálních center, což komplikuje jeho přípravu.¹⁰ V roce 1955 byla vypracována první metodika pro totální syntézu morfinu Marshalllem Gatesem, která vycházela z 2,6-dihydroxynaftalenu a skládá se z dvaceti sedmi kroků.¹¹ Gatesova

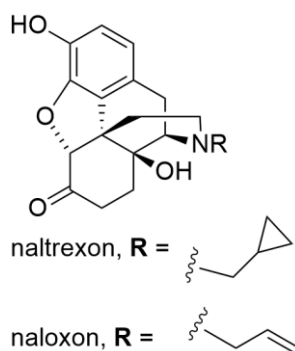
syntéza poskytuje morfin ve výtěžku menším než 1 %. Tato syntéza byla také první, která využila Diels-Alderovou reakci v kontextu totálních syntéz.

Další syntéza morfinu, která stojí za zmínku, byla publikována v roce 1980 Kennerem C. Ricem.¹² Tato syntéza zahrnuje 14 kroků a podle původního článku probíhá s celkovým výtěžkem 30 %.

V roce 2014 bylo celosvětově vyprodukováno 534 tun (v ekvivalentech morfinu) surového materiálu bohatého na morfin.¹³ Syntetická cesta, která by dokázala připravovat takovéto množství morfinu a byla ekonomicky výhodnější než kultivace *Papaver somniferum*, zatím nebyla nalezena a pravděpodobně ani není reálná. Dnešní ukázky nových metod pro syntézu morfinu slouží víc jako příklad aplikace nových postupů a reakcí v totálních syntézách, než že by skutečně usilovaly o přípravu morfinu.

Pro přípravu nových semi-syntetických derivátů lze využít zejména sloučeniny s vysokým zastoupením v přírodních zdrojích jako například morfin. Prvním semi-syntetickým opiátem byl heroin (diacetylmorfin), který měl poskytovat vyšší potenci než morfin a nižší riziko zneužití či vedlejších účinků.⁶ Posléze byl připraven první antagonist opioidních receptorů naloxon a jeho analog naltrexon (Schéma 2.2).

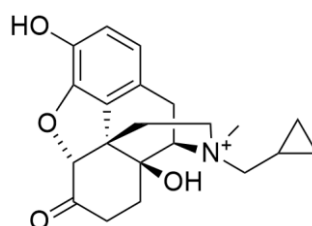
Schéma 2.2 Struktury naltrexonu a naloxonu



Antagonisté opioidních receptorů dnes nacházejí široké využití jak v medicíně, tak ve výzkumu. V medicíně se tyto látky využívají k záchraně života při předávkování nebo jako aditivum do tablet pro zabránění jejich zneužívání. Naloxon totiž není absorbován při gastrointestinálním požití, proto dochází k požadovanému účinku léku působením agonistů. V případě intravenózního užití však přidaný naloxon blokuje tento účinek. Ve výzkumu se antagonisté používají zejména ke studiu interakce ligand-receptor.

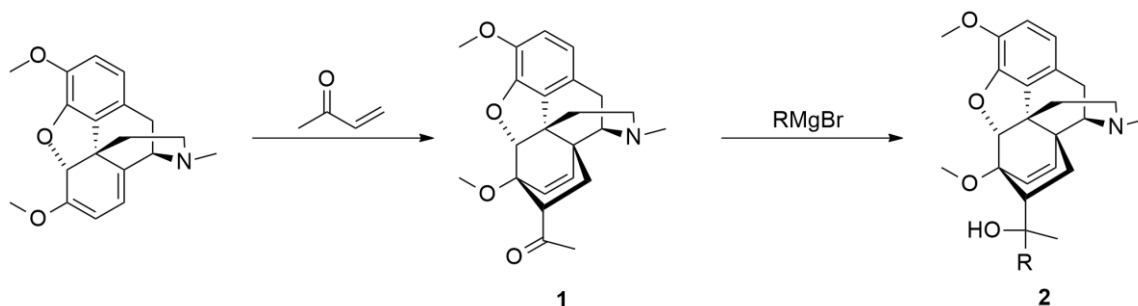
Zajímavou skupinou látek jsou antagonisté s účinkem čistě jenom v periferním nervovém systému. Zástupcem těchto sloučenin je methyl naltrexon, kvartérní amoniová sůl, která jakožto nabitá sloučenina nemůže procházet bariérou krev-mozek (Schéma 2.3). Díky této skutečnosti může methyl naltrexon eliminovat vedlejší účinky, vznikající působením agonistů v periferním nervovém systému, bez vlivu na analgetické účinky vznikající v centrální nervové soustavě.

Schéma 2.3 *Struktura methyl naltrexonu*



V 60. letech 20. století byla připravena řada derivátů oripavínu, které byly označeny jako „super-potentní“ agonisté MOR.¹⁴ Vykazují až 10000 krát silnější analgetické účinky než morfin. Jedná se o C-6,14 přemostěné deriváty, které se připravují Diels-Alderovou reakcí thebainu s methyl-vinyl ketonem (Schéma 2.4).

Schéma 2.4 *Příprava C-6,14 přemostěných derivátů thebainu*



Příklad této transformace je znázorněn výše. Sloučenina **1** může dále reagovat s libovolným Grignardovým činidlem za vzniku terciárního alkoholu **2**, který po C-3 O-demethylaci poskytne C-6,14 přemostěný derivát oripavínu. Délkou a charakterem řetězce „R“ můžeme doladit analgetickou potenci sloučeniny (10-1000, morfin = 1). Nejznámější z těchto derivátů je etorfin, kde symbol „R“ zastupuje propylový fragment.

Sledování relací struktura-afinita zůstává dodnes jedním z nejstudovanějších témat v chemii opiátů. I při přípravě různých konjugátů těchto sloučenin

(např. fluorescenčně značených) je potřeba zachovat afinitu k opioidním receptorům, a proto je třeba pečlivě volit místo syntetického opracování.

2.3 Deriváty tetraethylenglykolu jako spojky

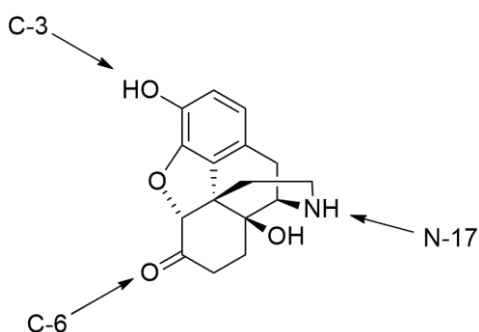
Polyethylenglykoly, respektive jejich deriváty, se v současné chemii využívají k různým účelům. Slouží jako výchozí látky pro syntézu crown etherů, speciálních polymerů a rovněž své užití našly i v biochemii.¹⁵ Kupříkladu se používají pro derivatizaci ligandů receptorů, k imobilizaci proteinů nebo modifikaci polypeptidů.

V našem případě byly tyto látky zvoleny jako řetězce pro spojení jednotlivých fragmentů připravovaných látek. Polyethylenglykoly mají dvě terminální hydroxy funkce, které můžou být substituovány rozličnými skupinami, jako jsou například azidy, isokyanáty, aminy a mnoho dalších. Takto modifikované polyethylenglykoly lze využít pro připojení k dalším fragmentům, jenž přináší požadované spektroskopické, či biochemické vlastnosti. Výhoda jejich využití při konstrukci konjugátů bioaktivních látek spočívá zejména v jejich rozpustnosti ve vodě i v organických rozpouštědlech, což významně ulehčuje jejich přípravu a izolaci.¹⁶ Mezi důležité vlastnosti těchto řetězců patří skutečnost, že nejsou imunogenní, toxické, v roztoku jsou vysoce mobilní a mají velký exkluzní objem.

Jako výchozí materiál k přípravě derivátů ethylenglykolů jsme zvolili tetraethylenglykol, protože je cenově nejdostupnější a kombinací dvou řetězců lze vytvořit i výrazně delší oktaethylenglykolovou spojku. Vzhledem k širokým možnostem jak lze ethylenglykoly modifikovat, námi provedený design těchto derivátů byl především ovlivněn jasně danou přítomností funkčních skupin morfinanového skeletu.

Ve struktuře opiátů, zobrazené na Schématu 2.5, existuje řada míst, které mohou být synteticky modifikovány a následně posloužit k vytvoření požadovaného konjugátu. Ze struktury je zřejmé, že C-3 fenolická, C-6 karbonylová a N-17 aminová skupina jsou nejpřístupnější k následným modifikacím. Právě tyto skupiny byly navrženy k zavedení ethylenglykolového řetězce a posléze i fluorescenční značky.

Schéma 2.5 *Přístupy pro syntetické opracování 14-hydroxymorfinanového skeletu*



Tetraethylenglykol lze jednoduše převádět na řadu derivátů, které umožňují následné prodlužování řetězců nebo spojení s požadovanými strukturami. Alkoholovou funkční skupinu lze nahradit pomocí nukleofilní substituce různými nukleofily, nicméně je potřeba ji nejprve převést na lepší odstupující skupinu, k čemuž se nejčastěji využívají chloridy sulfonových kyselin.

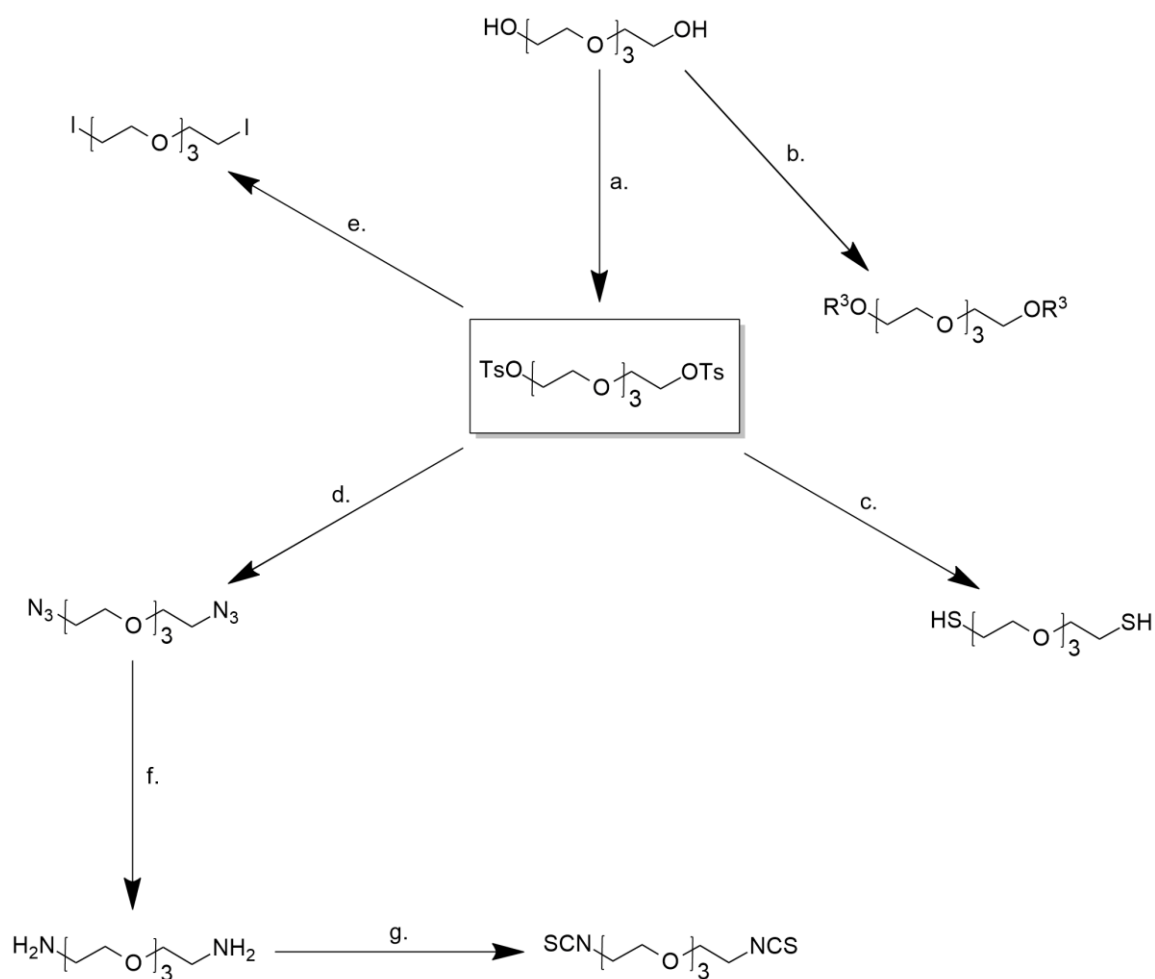
Schéma 2.6 *Deriváty tetraethylenglykolu*



$R^1, R^2 = X, OR^3, N_3, NH_2, NCS, SH.$

Schéma 2.6 ukazuje různé funkční skupiny, které mohou deriváty tetraethylenglykolu nést. Příklady transformací, včetně reakčních podmínek vedoucích k symetricky substituovaným derivátům, jsou uvedeny ve Schématu 2.7.

Schéma 2.7 Příprava derivátů tetraethylglykolu



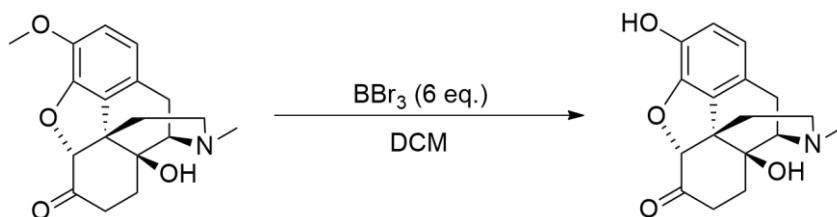
a. TsCl, KOH, 0 °C, 3 h; **b.** i) NaH, THF, rt; ii) R^3Cl ; **c.** i) AcSK, acetone, NaI, 60 °C, 18 h; ii) HCl, MeOH/H₂O, 120 °C, 3 h; **d.** NaN₃, DMF, 55 °C, o/n; **e.** NaI, acetone, 65 °C; **f.** H₂, Pd/C, EtOH, rt, 1,5 h; **g.** CSCl₂, CaCO₃, H₂O/DCM, 0 °C až rt, 1 h.

Příprava symetricky substituovaných tetraethylglykolů není náročná, avšak jejich využití je značně omezené. Kupříkladu, při click reakci substrátu nesoucího propargyl nemůžeme pro připojení spojky použít bis (azid), protože by docházelo k reakci se dvěma ekvivalenty substrátu, což by znemožňovalo připojení dalšího fragmentu do molekuly. Příprava nesymetricky substituovaných tetraethylglykolů vyžaduje náročnější syntetické sekvence, chránění funkčních skupin, či volbu vhodných molárních poměrů reaktantů. Studium přípravy nesymetricky substituovaných ethylglykolů je jeden z cílů této bakalářské práce.

2.3.1 Přístup přes fenolický C-3 morfinanu

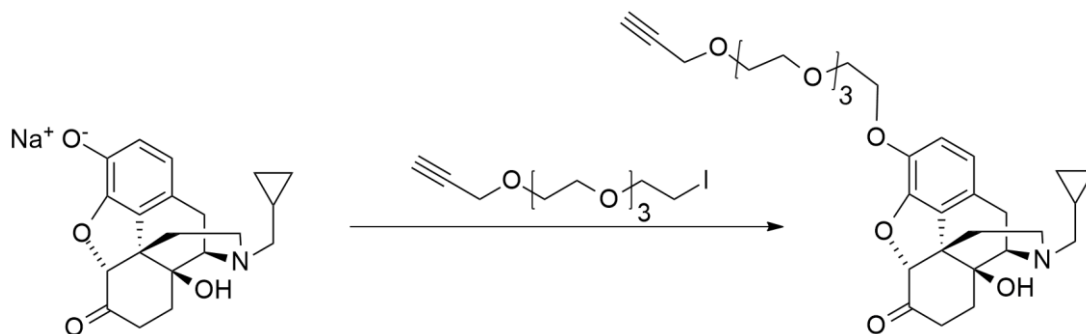
Williamsonovu syntézu etherů lze využít pro přípravu konjugátů, tedy aduktů, kombinující opiát s tetraethylenglykolovou spojkou ukončenou vhodnou skupinou použitelnou v bioortogonální chemii. V takovém případě je tetraethylenová spojka navázána přes C-3 fenol opiátu. Syntéza spočívá v reakci alkoxidu (tj. soli opiátu) s primárním alkylhalogenidem. Tento přístup v našem případě vyžaduje přípravu derivátu polyethyleneglykolu nesoucího halogen místo jedné z koncových hydroxy skupin. Na opačný konec polyetheru je potřeba zavést reaktivní skupinu, která umožní další spojovací reakce s fluorescenční značkou či polymerem. U sloučenin typu oxykodonu, které nesou na C-3 methoxy skupinu, je potřeba nejprve provést O-demethylaci pro přípravu fenolické OH skupiny. Tyto reakce byly provedeny dle literatury, jak to je zobrazeno na Schématu 2.8.¹⁷ Výsledky těchto experimentů nejsou dále blíže diskutovány, protože nejsou cílem předložené práce.

Schéma 2.8 O-demethylace oxykodonu¹⁷



Příklad zavedení spojky prostřednictvím C-3 fenolu na modelovém substrátu je uveden na Schématu 2.9. Propargylový konec spojky by bylo možné využít zejména v CuAAC reakci pro spojení s dalšími fragmenty.

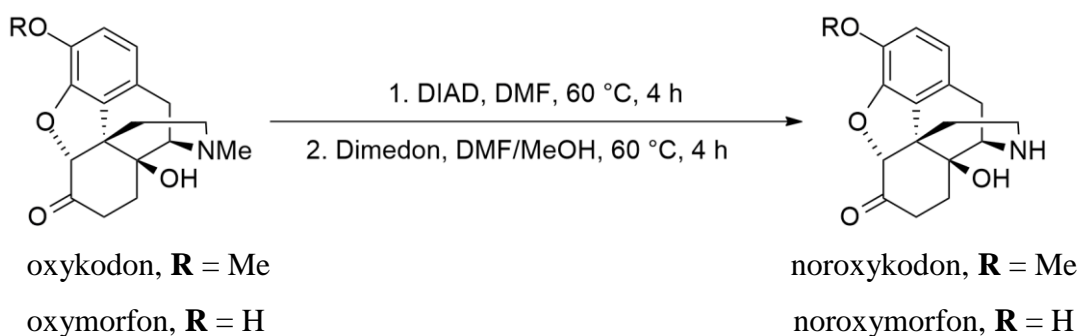
Schéma 2.9 Příklad připojení tetraethylenglykolového řetězce přes C-3 fenol



2.3.2 Přístup přes N-17 morfinanu

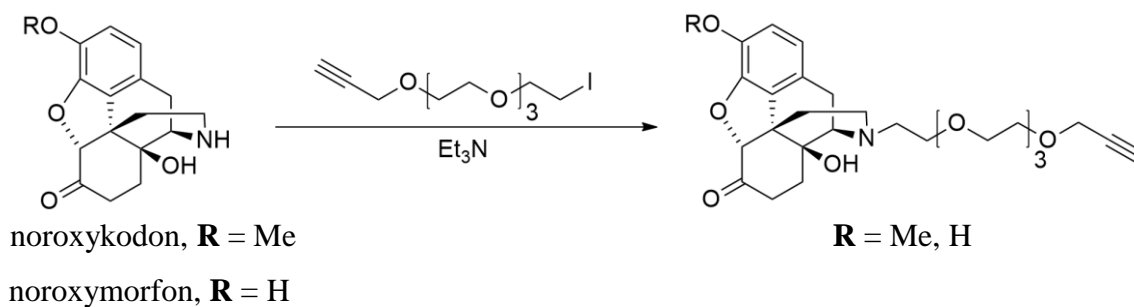
U přístupu přes N-17 je situace podobná jako u C-3 fenolu. Pro alkylation sekundárního aminu lze obdobně využít halogenderiváty tetraethylglykolu. U substrátů typu oxykodonu je potřeba nejprve provést N-demethylaci, pro kterou byly vyvinuté různé postupy. Nejmodernější postup využívá reakci s azodikarboxylátem¹⁸ či palladium katalyzované C-H aktivace¹⁹ (Schéma 2.10).

Schéma 2.10 N-demethylace s použitím azodikarboxylátu¹⁸



Převedení sekundárního aminu na terciární lze snadno provést s použitím podobných podmínek jako v případě alkylation fenolu. Příklad takové reakce je znázorněn na Schématu 2.11.

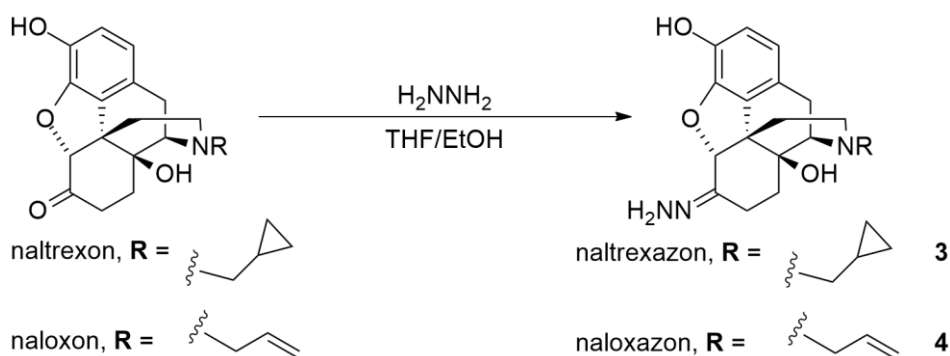
Schéma 2.11 Příklad připojení tetraethylglykolového řetězce přes N-17



2.3.3 Přístup přes karbonyl na C-6 morfinanu

Předložená bakalářská práce se blíže zabývá přístupem přes C-6 karbonylovou funkční skupinu, respektive přes její hydrazon. Vycházelo se ze známého postupu převedení naltrexonu nebo naloxonu na odpovídající hydrazony **3** a **4** (Schéma 2.12), které mohou následně reagovat s libovolným isothiokyanátem za vzniku *N,N'*-disubstituované thiomčoviny.²⁰

Schéma 2.12 Příprava hydrazonů naltrexonu (**3**) a naloxonu (**4**)²⁰

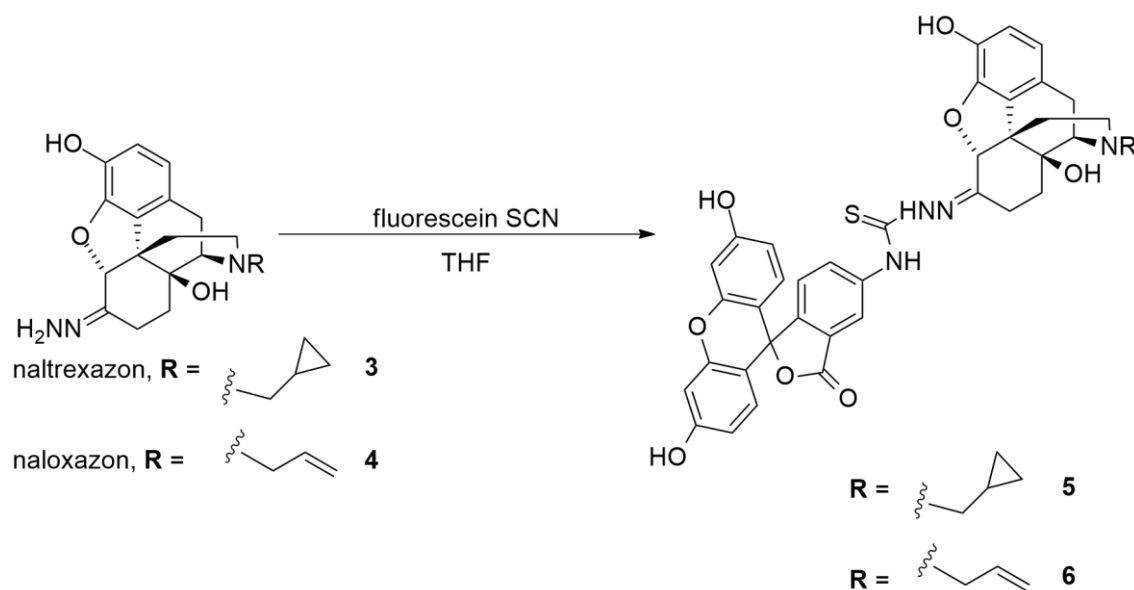


Při modifikaci karbonylové skupiny na uhlíku C-6 nedochází k výraznému snížení afinity, a v případě, že se využije transformace zachovávající sp² hybridizaci tohoto uhlíku, není dotčena ani antagonistická či agonistická povaha sloučeniny.²⁰

Naopak při alkylationi C-3 fenolické skupiny (Schéma 2.9) dochází již u stericky nenáročných substituentů k výraznému snížení afinity k receptorům.²¹ Přístup přes N-17 nebylo možné využít, jelikož byly pro fluorescentní značení zvoleny sloučeniny naloxon a naltrexon, které vykazují vysokou afinitu a selektivitu vůči MOR, právě díky přítomnosti svého allylového, respektive cyklopropylmethylového fragmentu na atomu N-17. Zároveň se dle krystalových struktur tento atom dusíku nachází hluboko uvnitř aktivního místa receptoru, tudíž můžeme předpokládat, že toto místo bude výjimečně citlivé na substituci.

Literatura popisuje přípravu fluorescentně značených ligandů MOR za využití hydrazonů **3** a **4**.²² Jejich reakce s fluorescein isothiokyanátem, poskytuje sloučeniny **5** a **6**, které byly v minulosti také testovány na afinitu vůči opioidním receptorům (Schéma 2.13).

Schéma 2.13 Příprava aduktů látek **3** a **4** s fluoresceinem²²



Výše zmíněné sloučeniny nás inspirovaly k využití právě této strategie pro přípravu konjugátů ligandů MOR, nesoucích fluorescenční značku připojenou přes tetraethylenglykolovou a oktaethylenglykolovou spojku. U konstrukce oktaethylenglykolové spojky byly zvoleny dva různé přístupy, konkrétně spojení tetraethylenglykolů s využitím CuAAC a tvorbou amidické vazby. V případě CuAAC dochází ke spojení fragmentů za vzniku 1,2,3-triazolu. Jelikož se jedná o planární nepolární heterocyklický systém, mohl by způsobovat interakci s lipofilními buněčnými membránami a snižovat tak specifitu interakce s receptory. Z tohoto důvodu byla zvolená i alternativa využívající spojení dvou tetraethylenglykolů prostřednictvím tvorby amidu.

Přítomnost atomu síry v thiomocovinové části konjugátu byla zvolena zcela cíleně. Elementární analýza polymeru s navázanými opiáty, přes spojku kombinující tetraethylenglykol a thiomocovinu, umožňuje přímo skrze stanovení obsahu síry určit množství, respektive koncentraci, opiátu v takovém polymerním materiálu.

Otázkou zůstává, jaký smysl má oddělení ligandu a fluorescenční značky polyethylenglykolovým řetězcem. K získání odpovědi je třeba začít zcela od samého začátku tohoto projektu. Fluorescenčně značené ligandy opioidních receptorů jsou komerčně těžce dostupné a jejich použití neposkytuje požadované výsledky. Problém v použití nízkomolekulárních sloučenin, jako **5** a **6**, spočívá v nutnosti použít vysoké koncentrace pro dostačující sílu interakce s receptory a fluorescentní odezvu.

Tento problém se vyskytuje zejména při studiích opioidních receptorů na buňkách imunitního systému, kde je jejich koncentrace nižší. Nižší koncentrace receptorů vyžaduje vyšší koncentraci ligandu pro získání zaznamatelné odezvy. Použití vyšší koncentrace však způsobuje nežádoucí zvyšování nespecifické interakce.²³

Tak se zrodila myšlenka spojit koncept iBodies s ligandy opioidních receptorů a připravit polymerní sloučeninu nesoucí ligandy MOR.²⁴ Námi připravené konjugáty, nesoucí fluorescenční značku, umožnily provést kontrolu, která měla za cíl ověřit vliv struktury a délky spojky na afinitu k MOR receptorům. V podstatě byl konjugát opiátu nanesen na vzorek obsahující MOR receptory a po následném promytí měl funkční konjugát umožnit vizualizaci MOR.

Pojem iBodies byl zaveden pro skupinu syntetických protilátek, které se skládají z HPMa kopolymeru, na který lze připevnit libovolnou nízkomolekulární látku sloužící jako ligand pro cílení léčiva či fluorescenční značky na vybraný cíl (např. receptor).²⁴ Použití polymerního řetězce řeší otázku koncentrace, jelikož zavádí do prostoru receptoru větší množství kovalentně vázaných ligandů, což extrémně zvyšuje sílu vazby k receptoru. Pro fluorescentní značení můžeme taky použít prakticky libovolnou koncentraci značky na polymeru a vyladit tak sílu odezvy. Koncept iBodies tedy představuje univerzální návod pro přípravu syntetických protilátek, které je možné cílit na téměř jakékoliv proteiny v živých organizmech.

Jedinou limitací tvorby iBodies je nutnost existence ligandu, který vykazuje vůči cílenému proteinu afinitu a lze jej přitom připojit na polymer. Pro připojení na polymer je nutno oddělit ligand spojkou, jelikož přítomnost polymeru v bezprostředním okolí ligandu by znemožňovalo interakci receptor-ligand, která je založena právě na prostorovém uspořádání ligandu. Proto cílem této práce bylo připravit konjugáty ligandů MOR, které nesou různě dlouhé spojky zakončené reaktivní skupinou. Tyto sloučeniny lze opatřit fluorescenční značkou a zkontrolovat jejich afinitu vůči MOR. V případě, že přítomnost spojky v struktuře ligandu dramaticky nesnížila afinitu vůči receptoru či specifitu interakce, lze místo fluorescenční značky připojit reaktivní část polymeru (NHS ester) a připravit tak syntetickou protilátku.

Výše zmíněné polymerní konjugáty by mely umožnit jednodušší provádění biochemických experimentů s MOR a umožnit další rozvoj v této oblasti.

2.4 Koncept Click chemie

Pojem click chemie byl definován v roce 2001 v článku K. Barry Sharplesse.²⁵ Click chemie se snaží inspirovat přírodními transformacemi, které dokáží syntetizovat nesmírně složité látky za využití jednoduchých přeměn a velice mírných podmínek. V přírodě dochází k vzniku komplexních struktur prostřednictvím spojení menších fragmentů a to je idea, kterou tento koncept zastává.

Dlouhodobým cílem click chemie je shromažďování sady efektivních a selektivních nástrojů k propojení jednotlivých fragmentů při syntézách komplikovaných, zejména bioaktivních, látek. Takovéto nástroje pak otevírají nové možnosti a cesty při přípravě léčiv, fluorescenčně značených konjugátů či modifikaci DNA. Pro začlenění reakce do konceptu click chemie byly formulovány striktní pravidla.²⁵ Transformace musí mít univerzální využití, probíhat s vysokými výtěžky, být stereospecifická a generovat jen neškodné vedlejší produkty, které mohou být odstraněny nechromatografickými metodami. Reakční podmínky musí být jednoduché (reakce ideálně nejsou rušeny přítomností vody a kyslíku), reaktanty jednoduše přístupné, produkt snadno izolovatelný (destilací nebo krystalizací) a reakce by měla probíhat bez rozpouštědla nebo v přítomnosti biokompatibilního rozpouštědla jako např. voda. Transformace splňující tyto podmínky lze využít také v živých organizmech, například pro studium syntézy DNA, jak to popisuje literatura.²⁶

Doposud byla vyvinuta řada postupů spadajících do konceptu click chemie. Tyto postupy jsou založeny na termodynamicky favorizovaných reakcích na bázi cykloadičních reakcí, nukleofilních substitucí či adicí na násobnou vazbu C=C.

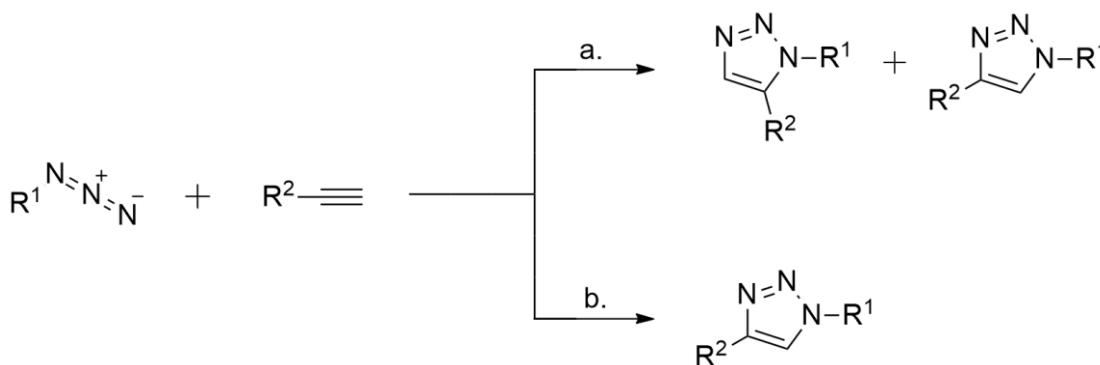
Nejvíce využívána reakce je tzv. CuAAC (z angl. Copper(I) catalyzed azide-alkyne cycloaddition), která spočívá v reakci azidu s acetylenem za vzniku 1,2,3-triazolu.²⁷ Jedná se v podstatě o katalyzovanou 1,3-dipolární cykloadici. Historie této chemické reakce se datuje do roku 1893, kdy Arthur Michael, známý zejména díky Michaelově adici, jako první popsal přípravu 1,2,3-triazolu reakcí fenylozidu s diethylacetylendikarboxylátem. V roce 1961 publikoval německý chemik Rolf Huisgen článek objasňující mechanismus termických 1,3-dipolárních cykloadicí a jejich využití k přípravě heterocyklických systémů.²⁸ Definoval 1,3-dipolární cykloadici jako reakci 1,3-dipólu a-b-c s takzvaným dipolarofilem d-e, který obsahuje násobnou vazbu (Schéma 2.14).

Schéma 2.14 1,3-dipolární cykloadice dle Huisgena²⁸



Použití této reakce v konceptu click chemie by však nebylo možné, jelikož reakce probíhá za zvýšené teploty a zároveň neregioselektivně. Změna přišla v roce 2002, kdy skupiny Valery V. Fokina and K. Barry Sharplesse nezávisle objevily mědi katalyzovanou variantu této reakce.²⁷ Po přidavku 1 mol. % CuSO₄ a 5 mol. % askorbátu sodného, který v roztoku generuje měďné ionty, dochází za laboratorní teploty k selektivnímu vzniku 1,4-disubstituovaného triazolu.

Schéma 2.15 Srovnání klasického provedení přípravy triazolů a CuAAC



a. zahřátí; **b.** Cu(I).

Ve Schématu 2.15 můžeme vidět jednoduché porovnání různých provedení reakce. Mědi katalyzovaná varianta splňuje všechny předpoklady pro zařazení do konceptu click chemie. Mechanismus CuAAC reakce není dodnes přesně známý a je stále předmětem výzkumu. První navržený mechanismus předpokládal koordinaci jednoho atomu mědi, později bylo navrženo, že může docházet ke koordinaci i druhého atomu mědi, což způsobuje dodatečné snížení energetické bariéry reakce.

3. Cíle práce

- Připravit hydrazony naloxonu a naltrexonu
- Připravit nesymetricky substituované tetraethylenglykoly
- Připravit adukty hydrazonu s isothiokyanátem tetraethylenglykolu s ohledem na možnost další modifikace druhého konce polyetherové spojky
- Provéřit možnost konstrukce oktaethylenglykolové spojky s propojením přes CuAAC a rovněž přes amidickou vazbu
- Zavést fluorescenční značku na modifikované deriváty naltrexonu

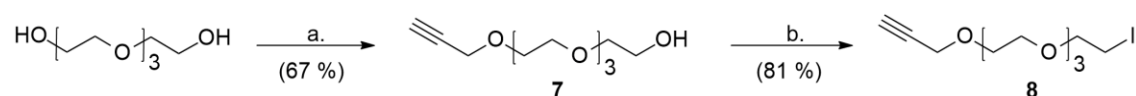
4. Výsledky a diskuse

4.1 Příprava derivátů tetraethylenglykolu

Pro přípravu požadovaných opioidních látek, nesoucích fluorescenční značku připojenou prostřednictvím různě dlouhých řetězců, bylo potřeba připravit sérii heterobifunkčních derivátů tetraethylenglykolu.

Jak již bylo diskutováno v úvodu, přístup přes N-17 nebo fenolický C-3 vyžaduje přípravu halogenderivátu tetraethylenglykolu.

Schéma 4.1 Příprava halogenderivátu tetraethylenglykolu²⁹

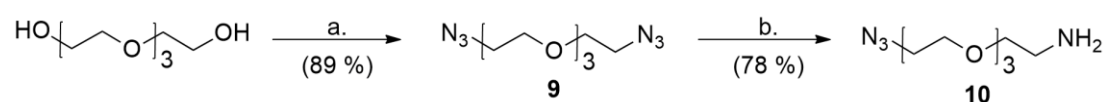


a. i) NaH, THF, rt; ii) propargyl bromid, rt, o/n; **b.** i) Et₃N, MeSO₂Cl, DCM, 0 °C, 4 h; ii) NaI, aceton, 65 °C, o/n.

Při použití nadbytku tetraethylenglykolu, až 10 eq., byl mono (propargylether) **7** připraven bez komplikací, ve vysokých výtěžcích. Připravená sloučenina **8** (Schéma 4.1) umožňuje reakci s alkokidem na bázi opiátu. Takto vzniklý ether nese na opačném konci tetraethylenglykolového řetězce propargyl umožňující následné využití click chemie pro prodloužení řetězce.

Pro přípravu spojek s aminovou terminální funkcí je pro zavedení atomu dusíku do molekuly vhodné připravit azidy, které lze posléze, dle potřeby, redukovat na aminy. Azidoderiváty lze připravit jednoduše nukleofilní substitucí, nejdříve je však nutné nahradit hydroxy skupiny tetraethylenglykolu lépe odstupující skupinou. Pro tenhle účel byl využit tosylát³⁰.

Schéma 4.2 Příprava bis (azidu) a následná monoredukce^{30, 31}

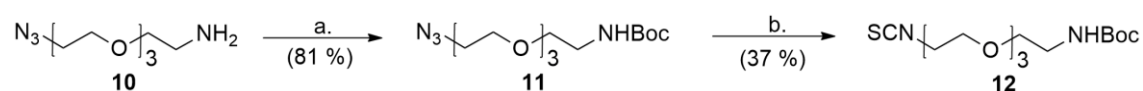


a. i) TsCl, KOH, 0 °C, 3 h; ii) NaN₃, DMF, 55 °C, o/n; **b.** PPh₃, 1 M HCl, H₂O/Et₂O, 0 °C až rt, o/n.

Po reakci tetraethylenglykolu s nadbytkem tosylchloridu vznikl bis (tosylát), který byl posléze převeden na tetraethylenglykol bis (azid) **9** reakcí s azidem sodným v DMF za zvýšené teploty (Schéma 4.2). Azid je funkční skupina, která se používá pro CuAAC reakci s alkynelem ve smyslu click chemie. Širší využití má však i amino funkce snadno dostupná z azidu redukcí. V případě námi připravených azidů byl redukován jeden nebo oba azidové konce řetězce na odpovídající aminy. Redukci obou azidů lze provést jednoduše palladium katalyzovanou hydrogenací. Pro monoredukci byla použita modifikovaná Staudingerova redukce.³¹ Při využití dvojfázového systému 1M HCl/Et₂O dochází k okamžité protonaci produktu monoredukce a jeho převedení do vodné vrstvy, což ve svém důsledku brání styku s trifenylofosfinem a zamezuje tak redukci druhé azido skupiny sloučeniny **10**. Reakce poskytovala při správném provedení produkt ve vysokých výtěžcích kolem 80 %, selektivně, bez vzniku bis (aminu).

Pro přípravu isothiokyanátu, který reagoval s hydrazonem naltrexonu a zároveň na opačné straně tetraethylenglykolového derivátu nesl amino funkci, bylo potřeba tuto amino funkci ochránit. Tento krok bylo nutno provést, protože bis (amino) derivát nelze selektivně převést na mono (isothiokyanát).

Schéma 4.3 Příprava isothiokyanátu zakončeného chráněnou aminovou funkcí^{32,33}

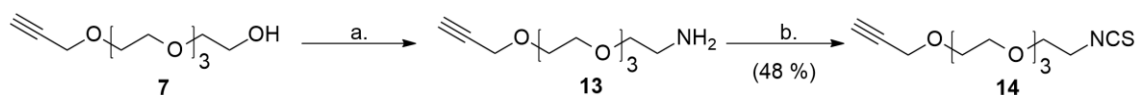


a. Et₃N, Boc₂O, DCM, rt, o/n; **b.** i) H₂, Pd/C, EtOH, rt, 1,5 h; ii) CSCl₂, CaCO₃, DCM/H₂O, 0 °C až rt, 1 h.

Amino funkce sloučeniny **10** byla ochráněna Boc skupinou.³² Následně byla katalyticky zredukována druhá azido funkce a vzniklý amin převeden na isothiokyanát **12** reakcí s thiofosgenem v přítomnosti CaCO₃ (Schéma 4.3).³³ Příprava isothiokyanátů probíhala s nejmenším výtěžkem z celé sekvence (30-40 %), ale jelikož byly tyto reakce prováděné na synteticky snadno dostupných substrátech, nepředstavovalo to překážku v přípravě těchto sloučenin.

Pro využití click chemie bylo nutné připravit spojku nesoucí propargyl, jako například sloučeninu **7**, kterou můžeme opatřit isothiokyanátem způsobem popsáným níže na Schématu 4.4.

Schéma 4.4 Příprava isothiokyanátu zakončeného propargyl éterem³³



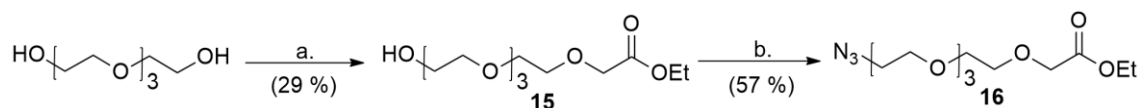
a. i) TsCl, Et₃N, DCM, o/n; ii) NaN₃, DMF, 55 °C, o/n; iii) PPh₃, THF, rt, o/n; **b.** CSCl₂, CaCO₃, DCM/H₂O, 0 °C až rt, 1 h.

Vzniklá sloučenina **14** umožňuje například reakci s hydrazonem a následné prodloužení řetězce click reakci s libovolným azido derivátem tetraethylenglykolu.

Alternativně byla využita tvorba amidu pro spojení dvou původně tetraethylenových fragmentů. Tento přístup zahrnoval přípravu karboxylové kyseliny odvozené od tetraethylenglykolu. Separace a čištění karboxylových kyselin je náročné, podobně jako u aminů, a proto je výhodnější pracovat například s estery, které můžeme v posledním kroku snadno hydrolyzovat. Příprava takové sloučeniny byla provedena obdobným způsobem jako v případě zavedení propargylu do sloučeniny **7**. Při přípravě sloučeniny **7** byl pro deprotonaci použit NaH a reakční směs byla míchaná přes noc v přítomnosti propargyl bromidu. Analogické reakční podmínky neposkytovaly sloučeninu **15**, proto byl v literatuře nalezen alternativní přístup.³⁴ Napodruhé již byla sloučenina **15** izolována. Výtěžek této reakce byl poměrně nízký, což bylo pravděpodobně způsobeno polárním charakterem sloučeniny **15**, který znemožňoval její extrakci do organického rozpouštědla.

Sloučenina **15** byla dále modifikována a opatřena další reaktivní skupinou - azidem. Poté byl ester **16** hydrolyzován v silně bazickém prostředí a vzniklá kyselina **17** byla použita bez dalšího čištění do následující reakce (Schéma 4.6).

Schéma 4.5 Příprava tetraethylenglykolu nesoucího esterovou funkci³⁴

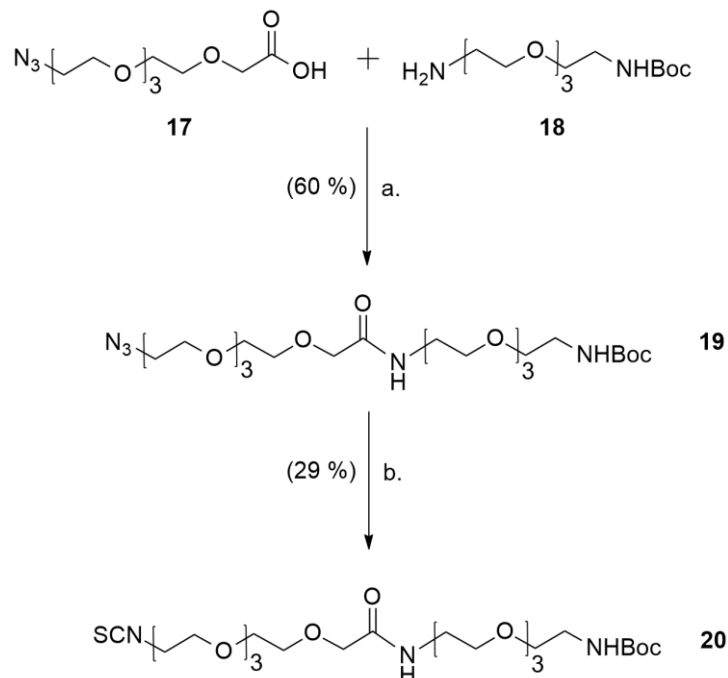


a. i) Na, 150 °C; ii) ethyl-bromacetát, 150 °C, o/n; **b.** i) TsCl, Et₃N, DCM, o/n; ii) NaN₃, DMF, 55 °C, o/n.

Kyselina **17** byla aktivována po deprotonaci triethylaminem pomocí TBTU, posléze byl do reakční směsi přidán amin **18** (Schéma 4.6). Oktaethylenglykolová

spojka byla poté převedena na isothiokyanát **20**, což umožnilo její spojení s naltrexazonem.

Schéma 4.6 Příprava oktaethylenglykolové spojky a její převedení na isothiokyanát³³



a. Et₃N, TBTU, DMF; **b.** i) H₂, Pd/C, EtOH, rt, 1,5 h; ii) C₂S₂Cl₂, CaCO₃, DCM/H₂O, 0 °C až rt, 2 h.

Mírnou nevýhodou tohoto přístupu bylo, že příprava isothiokyanátu **20**, která probíhala s nízkými výtěžky, byla provedena na substrátu, jehož příprava vyžadovala delší syntetickou sekvencí, a proto byl dostupný v menších množstvích.

4.1 Příprava fluorescenčně značených konjugátů

Při návrhu projektu byl diskutován i výběr fluorescenční značky, kde jako základní kritéria vystupovaly finanční náročnost a případná interakce značky s buněčnými membránami. Ta by mohla způsobovat neselektivitu interakce připravené sloučeniny s receptory. Jinak řečeno bylo třeba se vyhnout náhodné falešné odezvě tedy “nalepení” značky na lipofilní část studovaného vzorku prosté MOR receptoru. Na základě předešlých zkušeností s přípravou BODIPY v laboratoři byly tyto sloučeniny navrženy pro fluorescentní značení naltrexonu a naloxonu. Po bližším prostudování problematiky bylo zjištěno, že právě BODIPY vykazují jeden z největších faktorů interakce s lipidovými membránami, a proto nejsou vhodné pro tento účel.³⁵ Nakonec byl zvolen fluorescein, který je komerčně dostupný i ve formě isothiokyanátu. Je finančně nenáročný a jeho interakce s buněčnými membránami je zanedbatelná, tudíž nesnižuje selektivitu interakce.

4.2.1 Přístup přes karbonyl na C-6 semi-syntetických opiátů

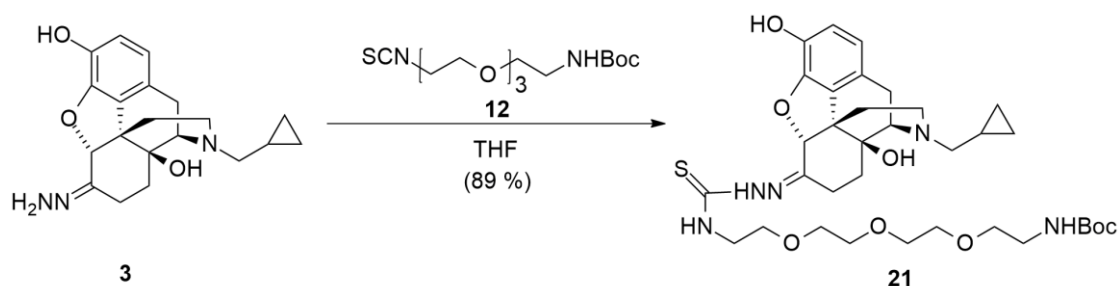
Jak již bylo zmíněno, přístup přes C-6 spočívá v převedení 14-hydroxymorfinanu na hydrazon a v následné reakci s isothiokyanátem. Příprava hydrazonů se provádí s použitím velkého přebytku hydrazinu, až 25 ekvivalentů, aby se zamezilo vzniku azinů. Pro reakce byl použit roztok hydrazinu v THF, ale později i 80% vodný hydrazin, přičemž u obou variant bylo dosaženo vysokých výtěžků. Připravené hydrazony **3** a **4** byly vysráženy přidávkem hexanu do roztoků v dichlormethanu, za snížené teploty (0 °C) a intenzivního míchaní. Při precipitaci za vyšší teploty docházelo k vylučování látek ve formě oleje.

Nejprve byl připraven adukt naltrexonu a naloxonu s fluoresceinem dle literatury.²² Reakce poskytla produkty **5** a **6** ve vysokých výtěžcích, které byly následně použity při biochemických experimentech. Na základě výsledků těchto experimentů a po zvážení cenové nákladnosti byl pro další verze fluorescenčně značených ligandů μ -opioidních receptorů použit pouze naltrexon.

Kvůli nutnosti vyzkoušet, zda-li připravený konjugát s ethylenglykolovou spojkou je stále ligandem MOR receptorů, byly dále připraveny sloučeniny, u kterých byl opioidní skelet a fluorescein oddělen různě dlouhými řetězci. Pro přípravu

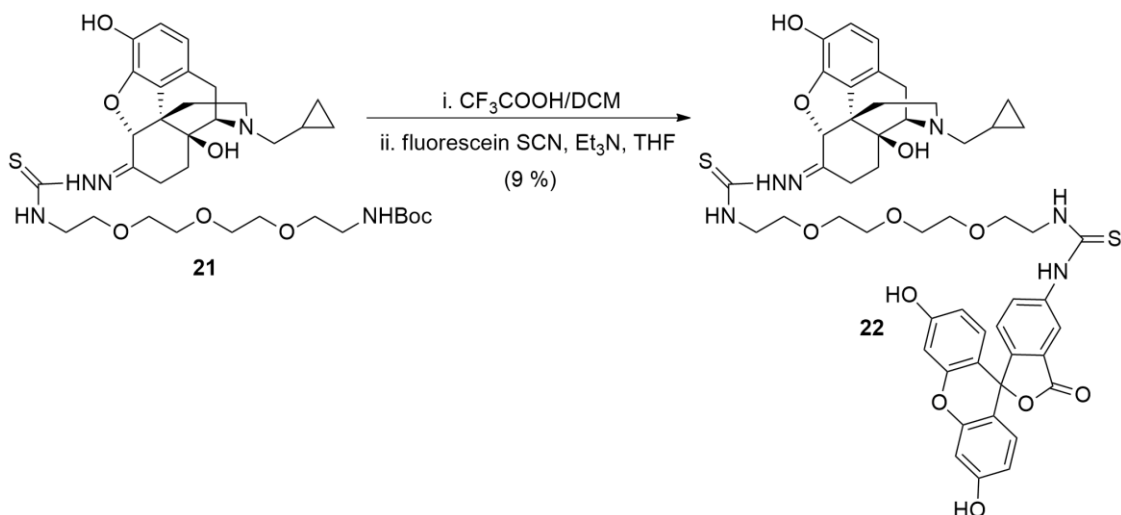
sloučeniny, kde spojka měla délku jednoho tetraethylglykolového řetězce, byla použita sloučenina **12**. Její reakcí s naltrexazonem byl získán konjugát naltrexonu **21**, nesoucí tetraethylglykolový řetězec zakončený amino skupinou chráněnou Boc skupinou (Schéma 4.7). Hydrazony, stejně jako dobře známé oximy, existují ve dvou možných isomerních formách, a tak tomu bylo i v tomto případě.³⁶ Vzniklé isomery spontánně přecházely jeden v druhý a z toho důvodu jejich oddělení nemělo smysl, a tudíž jsme dále pracovali s jejich směsí.

Schéma 4.7 Reakce naltrexazonu s isothiokyanátem **12**



Izolovaný konjugát **21** byl účinkem trifluoroctové kyseliny ochráněn a vzniklý primární amin byl následně sloučen s fluorescein isothiokyanátem za vzniku sloučeniny **22**, zobrazené na Schématu 4.8.

Schéma 4.8 Zavedení fluorescenční značky do sloučeniny **21**

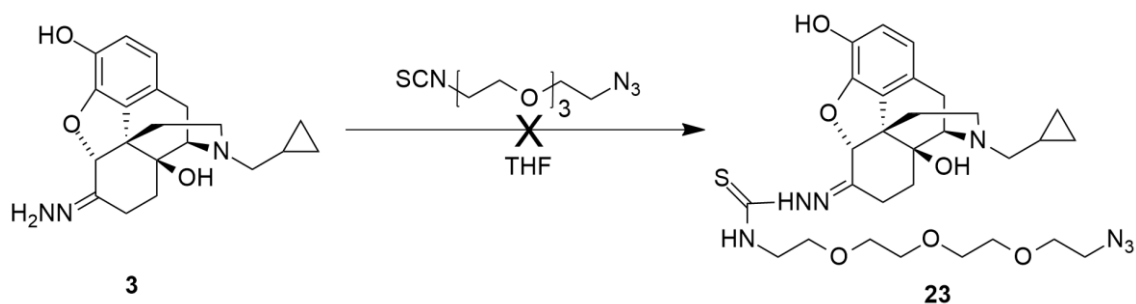


Takto připravený konjugát **22**, nesoucí fluorescenční značku, byl čištěn nejprve sloupcovou chromatografií reakční směsi, při které byl oddělen nadbytečný fluorescein.

Poté byla frakce obsahující předpokládaný produkt analyzována pomocí HPLC-MS. Přítomnost signálu, mající m/z 979,34, ve frakcích potvrdila vznik požadovaného produktu. Produkt byl posléze přečištěn využitím preparativního HPLC a charakterizován pomocí NMR spektrometrie. Uvedený výtěžek reakce je nízký, protože byl vypočten z reálného množství čistého produktu, který byl izolován. Jelikož množství látky, které lze přečistit pomocí HPLC je limitováno velikostí kolony, byl čistý produkt získán jenom z části frakce, která ho obsahovala dle HPLC-MS analýzy největší množství. Reálný výtěžek reakce by proto po přečištění všech frakcí mohl představovat až 50 %.

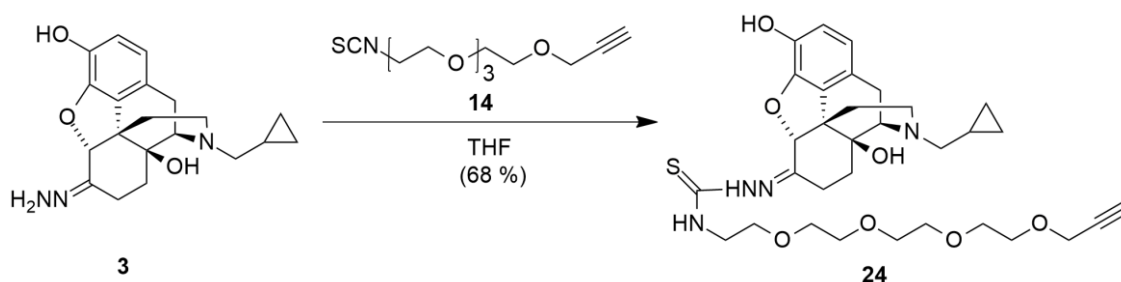
Dále bylo nutno připravit analogickou sloučeninu, která měla obsahovat dva tetraethylglykolové řetězce mezi fragmentem opiátu a fluoresceinu. Z možných způsobů propojení tetraethylglykolových derivátů byly vybrány dva nejklašičtější. První zvolený přístup zahrnoval click reakci pro spojení řetězců, a proto byla pro reakci s naltrexazonom použita spojka zakončená azidovou funkční skupinou. Navzdory opakovaným pokusům o přípravu sloučeniny **23**, znázorněné na Schématu 4.9, žádný z provedených experimentů tuto látku neposkytl.

Schéma 4.9 *Reakce naltrexazonu s isothiokyanátem zakončeným azidovou funkční skupinou*



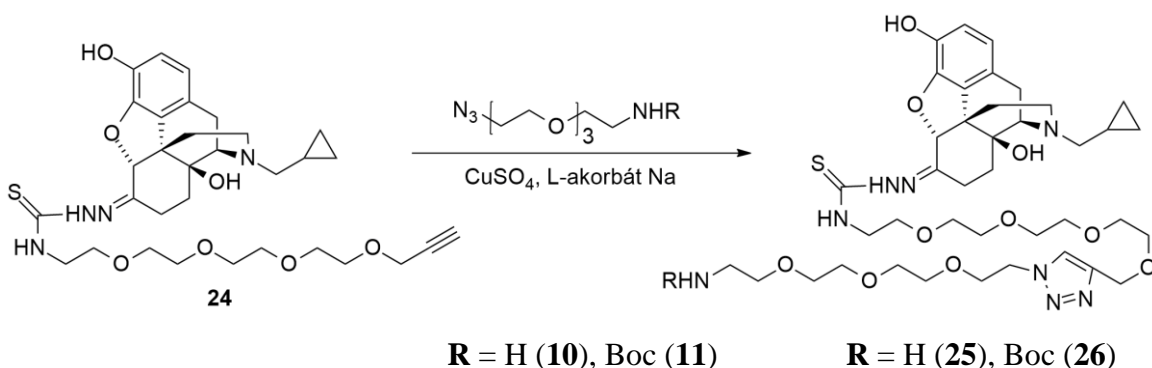
Zavedení azidové funkce do struktury konjugátu není nezbytně nutné, protože triazolovou spojku lze vytvořit doplňkovým způsobem - reakcí alkylazidu s konjugátem nesoucím propargylový fragment. Pro přípravu požadovaného propargylkonjugátu byla použita spojka **14**. Provedení reakce bylo analogické k výše uvedeným reakcím hydrazonů s isothiokyanáty (Schéma 4.10).

Schéma 4.10 *Reakce naltrexazonu s isothiokyanátem zakončeným propargyl etherem*



CuAAC reakce byla poprvé provedená se sloučeninou **10**.³⁷ Přítomnost volné aminové skupiny na konci řetězce se však ukázala jako velmi problematická, a proto byla následně provedena analogická reakce s použitím spojky **11** nesoucí skupinu NHBoc (Schéma 4.11).

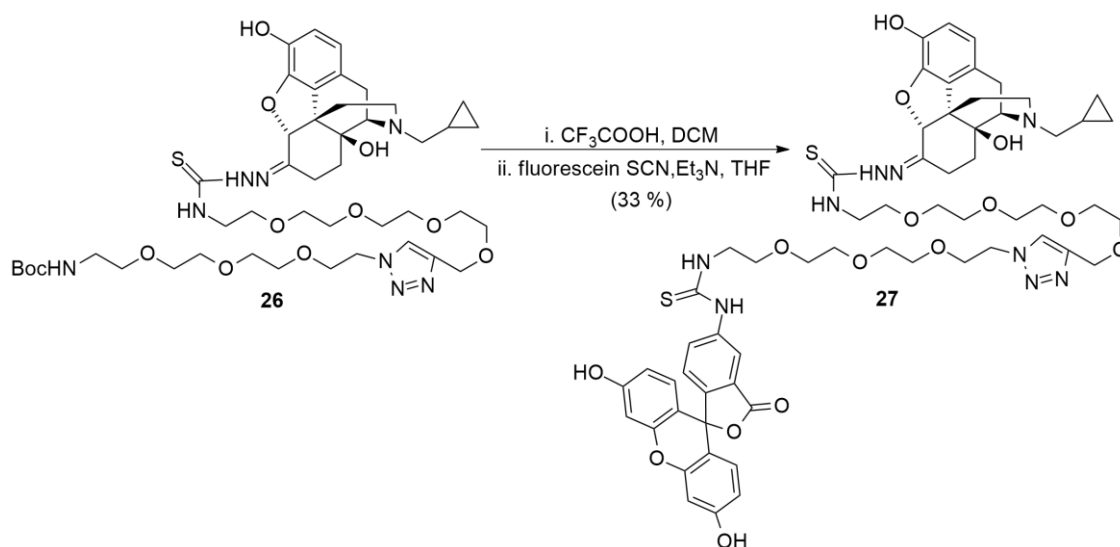
Schéma 4.11 *Click reakce pro prodloužení spojky*



Při použití azidu **11** bylo nutné konjugát **26** přechistit pomocí sloupcové chromatografie, jelikož reakční směs obsahovala řadu dalších sloučenin. Je třeba uvést, že po přidavku CuSO_4 reakční směs změnila barvu na temně zelenou, což může být způsobeno interakcí mědi s atomem síry v thioamocovinovém zbytku. Ani po přečištění pomocí chromatografie nebylo možné produkt **26** jednoznačně charakterizovat pomocí NMR spektroskopie. Tuto skutečnost lze vysvětlit právě existencí izomerů či rotamerů, kterých přítomnost u beztak složitých látek znemožňuje analýzu signálů v NMR spektrech. Z tohoto důvodu byly jednotlivé frakce analyzovány metodou HPLC-MS. Analýza potvrdila přítomnost produktu ve více frakcích, nejednalo se však o čistou látku, ale směs. Výtěžek reakce byl odhadnut na přibližně 30 %, na základě poměrů intenzit v HPLC-MS chromatogramu a NMR spektru.

Navzdory přítomnosti neznámých látek, byl produkt použit pro další reakci (Schéma 4.12). Analogicky jako v případě verze s krátkou spojkou byla aminová funkce uvolněna pro následnou reakci s fluorescein isothiokyanátem účinkem trifluoroctové kyseliny.

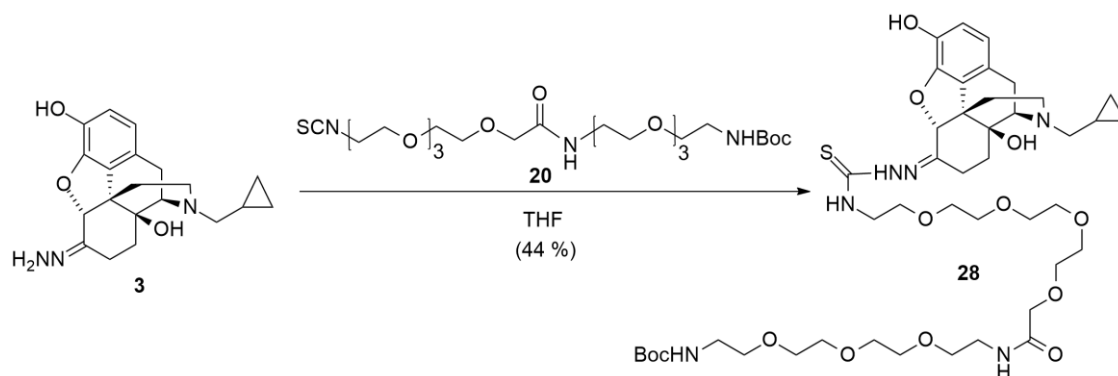
Schéma 4.12 Zavedení fluorescenční značky do sloučeniny **26**



Reakční směs byla v průběhu experimentu monitorována pomocí TLC, které ukázalo, že v roztoku se nachází nová látka, která by mohla být požadovaným produktem reakce **27**. Reakční směs byla následně rozdělena pomocí preparativního HPLC a jednotlivé frakce byly analyzovány metodou HPLC-MS, která potvrdila přítomnost konjugátu **27**.

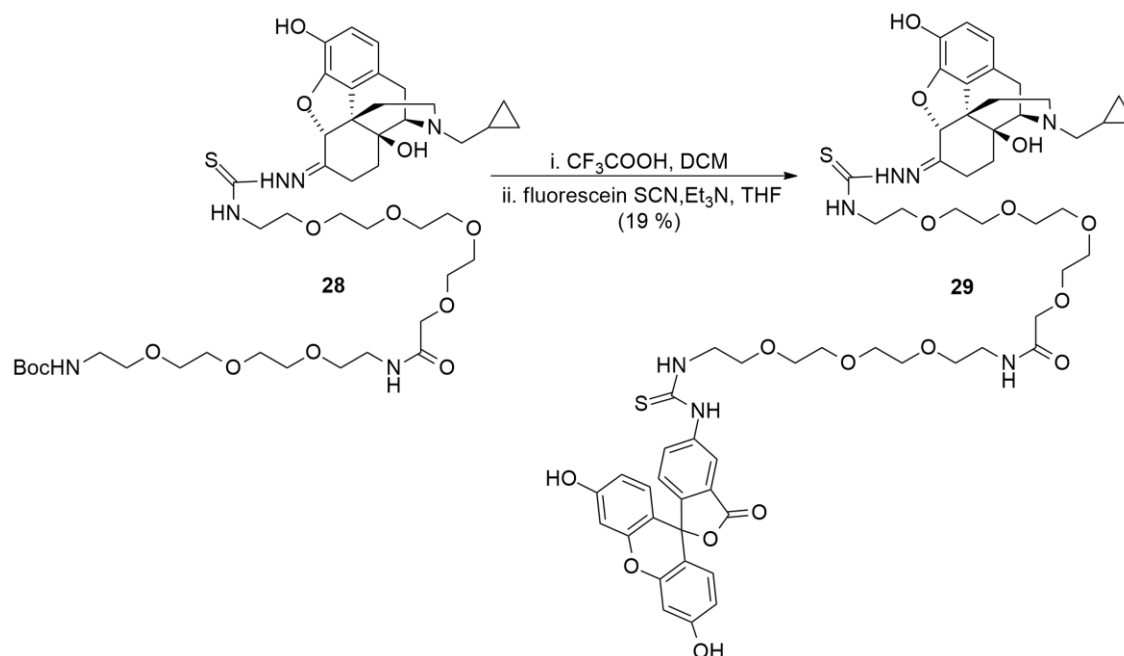
Druhý přístup pro přípravu verze s delší spojkou mezi opiátem a fluoresceinem zahrnoval dříve zmíněný vznik oktaethylenglykolové spojky tvorbou amidové vazby. Tato možnost je výhodná z řady důvodů. Jednak se tímto způsobem obejde problematický krok CuAAC reakce a za druhé amidová spojka je podstatně výhodnější než triazolová, pokud rozpustnost a hydrofilicita je jedním ze sledovaných faktorů. Další rozdíl tohoto syntetického přístupu s předchozím založeným na CuAAC, spočíval v tom, že celý oktaethylenglykolový řetězec **20** byl připraven před reakcí s naltrexazonem.

Schéma 4.13 *Reakce naltrexazonu s oktaethylglykolovým isothiokyanátem*



Vznik kýžené thiomočoviny **28** (Schéma 4.13) byl opět sledován metodou HPLC-MS, která ukázala přítomnost produktu. Produkt byl následně izolován standardní sloupcovou chromatografií ve výtěžku 44 %. Část takto získané sloučeniny **28** byla použita k přípravě syntetické protilátky MOR receptorů. Zbylý podíl látky byl použit při reakci s isothiokyanátem fluoresceinu (Schéma 4.14), obdobně jako v předchozích případech.

Schéma 4.14 *Zavedení fluorescenční značky do sloučeniny 28*



Složky reakční směsi byly separovány pomocí preparativního HPLC a následně Dr. Jana Pokorná (ÚOCHB) připravený fluorescenčně značený konjugát použila v biochemickém experimentu, který potvrdil, že sloučenina **29** se specificky váže k MOR

receptorům. Tím též potvrdila, že oktaethylenglykolové spojky s amidickým centrálním motivem jsou vhodné ke konstrukci syntetických polymerních protilátek MOR receptorů.

5. Experimentální část

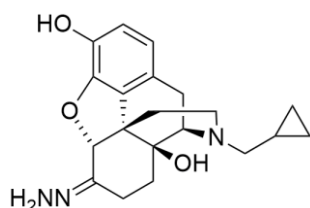
5.1 Použité přístroje a chemikálie

Všechny rozpouštědla a reaktanty byly použity, tak jak byly získány z komerčních zdrojů, kromě THF, který byl destilován ze směsi sodík-benzofenon pod ochrannou atmosférou argonu. Pro měření ^1H a ^{13}C NMR spekter byly použity přístroje Varian UNITY 300 (^1H při 300 MHz, ^{13}C při 75 MHz) a Bruker 400 (^1H při 400 MHz, ^{13}C při 100 MHz). Jako rozpouštědla byly použity CDCl_3 , CD_3OD a $\text{DMSO-}d_6$. Hmotnostní spektra HRMS byly měřeny na přístroji LTQ Orbitrap XL (Thermo Fisher Scientific). Reakční směsi byly analyzovány metodou HPLC-MS za použití HPLC přístroje Agilent Infinity 1260 v kombinaci s Q/TOF analyzátozem Agilent 6530. Produkty byly přečištěny pomocí preparativního HPLC za použití přístroje Agilent Infinity 1260 (gradient 2-100 % acetonitril, průtok 5 mL/min, délka programu 36 minut) s reverzní stacionární fází C18 na koloně.

Pro čištění pomocí sloupcové chromatografie byl používán silikagel 60 (0,063-0,100 mm; Merck) Pro sledování průběhu reakcí a sloupcové chromatografie byly používány TLC hliníkové desky s vrstvou silikagelu 60 F₂₅₄ (Merck).

5.2 Pracovní postupy

Naltrexazon (3)

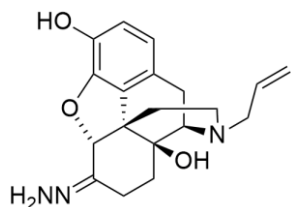


K roztoku naltrexonu hydrochloridu (2,0 g; 5,29 mmol) v EtOH (10 mL) a THF (40 mL) pod ochrannou atmosférou argonu byl přidán 80% hydrazin hydrát (8,4 g; 134 mmol) a reakční směs byla ponechána míchat přes noc. Poté byla reakční směs rozložena přidávkem 5% boritanu sodného (100 mL) a produkt byl extrahován DCM (3x50 mL). Spojené organické extrakty byly promyty vodou (30 mL) a vysušeny bezvodým MgSO_4 . Odparek byl rozpuštěn v DCM (20 mL), roztok vychlazen na 0 °C a

poté byl pomalu přikapán hexan (200 mL). Vysrážený produkt byl odfiltrován na Büchnerově nálevce, což poskytlo 1,6 g (85 %) bílého prášku.

¹H NMR (300 MHz, CDCl₃) δ 6,71 (d, *J* = 8,1 Hz, 1H); 6,55 (d, *J* = 8,1 Hz, 1H); 5,36 (bs, 1H); 4,95 (s, 1H); 3,16 – 3,09 (m, 1H); 3,04 (s, 1H); 2,67 (s, 1H); 2,54 (dd, *J* = 18,6; 6,0 Hz, 1H); 2,46 – 2,30 (m, 4 H); 2,28 (d, *J* = 8,3 Hz, 2H); 1,89 – 1,69 (bs, 2H); 1,70 – 1,53 (m, 2H); 1,48 – 1,39 (m, 1H); 0,92 – 0,80 (m, 1H); 0,59 – 0,50 (m, 12H); 0,18 – 0,10 (m, 2H); **¹³C NMR** (75 MHz, CDCl₃) δ 149,5; 143,8; 138,9; 130,7; 124,5; 119,3; 117,9; 89,1; 70,2; 62,3; 59,4; 48,0; 43,9; 31,9; 28,1; 22,9; 19,1; 9,6; 4,2; 3,8; **HRMS** vypočteno pro C₂₀H₂₆N₃O₃⁺ 356,1974; nalezeno [M+H⁺] 356,2084.

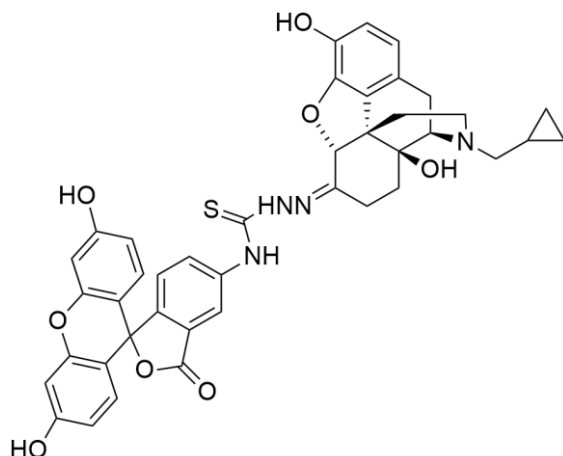
Naloxazon (4)



K roztoku naloxonu hydrochloridu (0,20 g; 0,50 mmol) v EtOH (2 mL) pod ochrannou atmosférou argonu byl přidán 1M roztok hydrazinu v THF (12,5 mL; 12,5 mmol) a reakční směs byla míchaná po dobu 2 hodin. Poté byl přidán 5% roztok boritanu sodného (15 mL) a vodná fáze byla extrahována DCM (3x10 mL). Spojené organické extrakty byly promyty vodou (10 mL) a vysušeny bezvodým MgSO₄. Odparek byl rozpuštěn v DCM (5 mL), roztok vychlazen na 0 °C a poté byl pomalu přikapán hexan (50 mL). Bylo získáno 0,12 g (71 %) vysráženého produktu, bílý prášek.

¹H NMR (300 MHz, CDCl₃) δ 6,72 (d, *J* = 8,1 Hz, 1H); 6,56 (d, *J* = 8,1 Hz, 1H); 5,89 – 5,73 (m, 1H); 5,35 (bs, 1H); 5,30 – 5,13 (m, 2H); 4,94 (s, 1H); 3,16 – 3,10 (m, 2H); 2,97 – 2,91 (m, 1H); 2,63 – 2,47 (m, 2H); 2,39 – 2,17 (m, 4H); 1,88 – 1,82 (m, 1H); 1,68 – 1,32 (m, 3H).

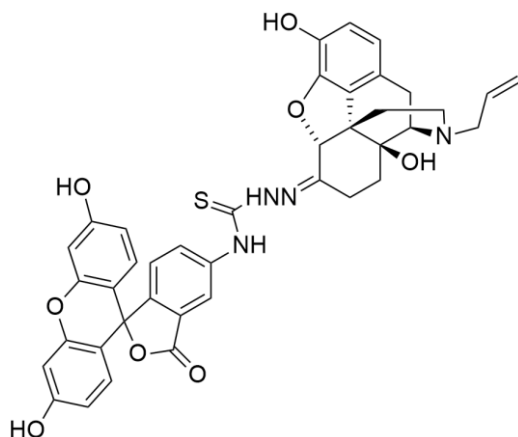
1-(*N*)-Fluoresceinyl naltrexon thiosemikarbazon (5)



K roztoku naltrexazonu (0,057 g; 0,16 mmol) v EtOH (2 mL) byl přidán roztok fluorescein isothiokyanátu (0,064 g; 0,16 mmol v 1 mL THF) a reakční směs byla ponechána míchat po dobu 2 hodin. Poté byl do roztoku přidán hexan (5 mL), což vedlo k vysrážení 0,085 g (70 %) produktu ve formě oranžového precipitátu.

¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ 8,44 (d, *J* = 1,8 Hz, 1H); 8,04 (dd, *J* = 8,8; 2,0 Hz, 1H); 7,26 (d, *J* = 8,4 Hz, 1H); 6,72 – 6,56 (m, 9H); 5,04 (s, 1H); 3,07 – 2,98 (m, 1H); 2,73 – 2,21 (m, 8H); 1,77 – 1,53 (m, 2H); 1,50 – 1,40 (m, 1H); 0,92 – 0,80 (m, 1H); 0,49 (t, *J* = 6,7 Hz, 2H); 0,14 (d, *J* = 5,1 Hz, 2H); **HRMS** vypočteno pro C₄₁H₃₇N₄O₈S⁺ 745,2332; nalezeno [M+H⁺] 745,2328.

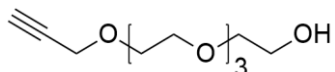
1-(*N*)-Fluoresceinyl naloxon thiosemikarbazon (6)



K roztoku naloxazonu (0,11 g; 0,32 mmol) v suchém THF (5 mL) byl přikapán roztok fluorescein isothiokyanátu (0,13 g; 0,32 mmol v 2 mL THF) a reakční směs byla ponechána míchat přes noc. Poté byl do roztoku přidán hexan (10 mL), což vedlo k vysrážení 0,21 g (88 %) produktu ve formě oranžového precipitátu.

¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ 8,45 (d, *J* = 2,0 Hz, 1H); 8,04 (dd, *J* = 8,3; 2,1 Hz, 1H); 7,26 (d, *J* = 8,3 Hz, 1H); 6,76 – 6,50 (m, 9H); 5,92 – 5,77 (m, 1H); 5,25 (d, *J* = 17,4 Hz, 2H); 5,15 (d, *J* = 10,2 Hz, 2H); 5,04 (s, 1H); 3,20 – 3,00 (m, 3H); 2,61 – 2,42 (m, 2H); 2,39 – 2,01 (m, 4H); 1,78 – 1,72 (m, 1H); 1,67 – 1,19 (m, 3H); **HRMS** vypočteno pro C₄₀H₃₅N₄O₈S⁺ 731,2175; nalezeno [M+H⁺] 731,2173.

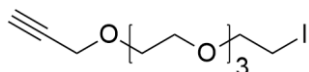
3,6,9,12-Tetraoxapentadec-14-yn-1-ol (7)



K roztoku tetraethylglykolu (10,0 g; 51,4 mmol) v suchém THF (20 mL) pod ochrannou atmosférou argonu byl opatrně, po částech, přidán 60% NaH v oleji (0,21 g; 5,14 mmol). Po chvíli byl přikapán 80% roztok propargyl bromidu v toluenu (0,56 mL; 5,14 mmol) a reakční směs byla ponechána míchat přes noc. Následně byla reakční směs rozložena přidavkem vody (20 mL) a produkt byl extrahován DCM (3x20 mL). Spojené organické extrakty byly promyty vodou (2x20 mL), solankou (20 mL) a vysušené bezvodým MgSO₄. Sloupcová chromatografie (silikagel; mobilní fáze DCM → DCM+5 % MeOH) poskytla 0,80 g (67 %) nažloutlého oleje.

¹H NMR (300 MHz, CDCl₃) δ 4,15 (d, *J* = 2,4 Hz, 2H); 3,72 – 3,50 (m, 16H); 2,40 (t, *J* = 2,4 Hz, 1H).

1-Jod-3,6,9,12-tetraoxapentadec-14-yn (8)

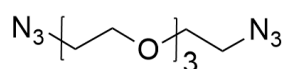


K roztoku sloučeniny **7** (0,80 g; 3,45 mmol) v DCM (15 mL) pod ochrannou atmosférou argonu byl přikapán triethylamin (1,05 g; 10,34 mmol) a reakční směs byla vychlazena ledovou lázní. Následně byl přidán mesylchlorid (0,59 g; 518 mmol) a reakční směs byla ponechána míchat 4 hodiny při laboratorní teplotě. Poté bylo rozpouštědlo odpařeno na RVO, odparek byl rozpuštěn v DCM (20 mL) a vytřepán 5% vodným roztokem kyseliny citrónové (15 mL) a solankou (15 mL). Organická fáze byla oddělena, rozpouštědlo odpařeno na RVO a odparek byl rozpuštěn v acetonu (10 mL). Do roztoku byl přidán pevný NaI (2,1 g; 14 mmol) a reakční směs byla míchána při 65 °C přes noc. Reakční směs byla rozložena přidavkem vody (10 mL) a vodným roztokem siřičitanu sodného (10 mL). Vodná fáze byla extrahována

DCM (3x20 mL) a spojené organické extrakty byly promyty vodou (2x10 mL), solankou (10 mL) a vysušeny bezvodým MgSO₄. Rozpouštědlo bylo odpařeno a produkt byl čištěn sloupcovou chromatografií (silikagel; mobilní fáze DCM → DCM+5 % MeOH). Reakce poskytla 0,95 g (81 %) žlutého oleje.

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 4,21 (d, *J* = 2,4 Hz, 2H); 3,76 (t, *J* = 7,2 Hz, 2H); 3,73 – 3,65 (m, 12H); 3,26 (t, *J* = 7,2 Hz, 2H); 2,43 (t, *J* = 2,4 Hz, 1H); ¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃) δ 79,8; 74,6; 72,1; 70,7 (3 C); 70,5; 70,3; 69,2; 58,5; 3,06; HRMS vypočteno pro C₁₁H₂₀O₄I⁺ 343,0401; nalezeno [M+H⁺] 343,0404; [M+Na⁺] 365,0221.

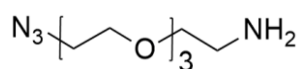
1,1'-Oxybis[2-(2-azidoethoxy)-ethan (9)



Roztok tetraethylglykolu (2,0 g; 0,011 mol) a tosyl chloridu (4,2 g; 0,022 mol) v DCM (10 mL) byl vychlazen na 0 °C. Do roztoku byl postupně přidán pevný KOH (1,2 g; 0,011 mol), tak aby teplota reakční směsi nepřesáhla 5 °C. Následně byla reakční směs ponechána míchat po dobu 3 hodin při teplotě 0 °C. Reakční směs byla poté rozložena přidavkem vody (20 mL) a produkt byl extrahován DCM (3x15 mL). Spojené organické extrakty byly promyty vodou (10 mL), solankou (10 mL) a vysušeny bezvodým MgSO₄. Rozpouštědlo bylo odpařeno a odparek rozpuštěn v DMF (15 mL). K roztoku byl pod inertní atmosférou přidán pevný NaN₃ (2,7 g; 0,042 mol). Reakční směs byla míchána přes noc při teplotě 50 °C. Reakční směs byla rozložena vodou (20 mL) a extrahována EtOAc (3x20 mL). Spojené organické vrstvy byly promyty vodou (15 mL), solankou (15 mL) a vysušeny bezvodým MgSO₄. Sloupcová chromatografie (silikagel; mobilní fáze hexan:EtOAc/1:1) poskytla 1,8 g (89 %) čirého oleje.

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 3,71 – 3,66 (m, 12H); 3,39 (t, *J* = 4,8 Hz, 4H); ¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃) δ 70,8; 70,1; 50,8; HRMS vypočteno pro C₈H₁₆O₃N₆Na⁺ 267,1176; nalezeno [M+Na⁺] 267,1178.

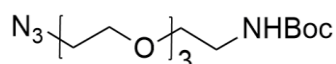
2-[2-[2-(2-Azidoethoxy)ethoxy]ethoxy]-ethanamin (10)



K suspenzi bis (azidu) **9** (1,00 g; 4,10 mmol) v 1M HCl (15 mL) vychlazené na 0 °C, pod ochrannou atmosférou argonu, byl za intenzivního míchání přikapán roztok

trifenylfosfinu (1,24 g; 4,72 mmol v 15 mL Et₂O). Reakční směs byla ponechána míchat do druhého dne za laboratorní teploty. Poté byla reakční směs zfiltrována přes smotek vaty a vodná fáze byla promyta Et₂O (3x10mL). Následně byla vodná fáze vychlazená na 0 °C a za míchání byl přidán pevný KOH (5,0 g; 89,3 mmol). Produkt byl extrahován DCM (3x10 mL) a spojené organické extrakty byly vysušeny bezvodým MgSO₄. Reakce poskytla 0,70 g (78 %) nažloutlého oleje. Sloučenina byla použita bez dalšího čištění, a proto nebyla dále charakterizována.

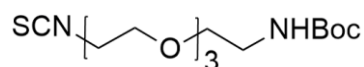
***t*-Butyl [2-[2-[2-(2-Azidoethoxy)ethoxy]ethoxy]ethyl]karbamát ester (11)**



K roztoku aminu **10** (0,33 g; 1,5 mmol) v DCM (10 mL) byl přidán triethylamin (0,3 g; 3,0 mmol). Po 5 minutách byl po částech přidán Boc₂O (0,50 g; 2,3 mmol) a reakční směs byla míchaná přes noc. Následně byla reakční směs rozložena vodou (10 mL) a produkt byl extrahován DCM (2x10 mL). Spojené organické extrakty byly promyty vodou (10 mL) a solankou (10 mL). Sloupcová chromatografie odparku (silikagel; mobilní fáze hexan:EtOAc/1:1 → hexan:EtOAc/1:2) poskytla 0,42 g (81 %) čirého oleje.

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 5,06 (bs, 1H); 3,71 – 3,59 (m, 10H); 3,54 (t, *J* = 5,6 Hz, 2H); 3,39 (t, *J* = 4,8 Hz, 2H); 3,31 (q, *J* = 5,2 Hz, 2H); 1,45 (s, 9H); **¹³C NMR** (100 MHz, CDCl₃) δ 70,7 (3 C); 70,3; 70,2; 70,1; 50,7; 28,5; **HRMS** vypočteno pro C₁₃H₂₆O₅N₄Na⁺ 341,1795; nalezeno [M+Na⁺] 341,1797.

***t*-Butyl [2-[2-[2-(2-isothiokyanatoethoxy)ethoxy]ethoxy]ethyl]karbamát (12)**

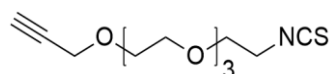


K roztoku azidu **11** (0,70 g; 2,20 mmol) v EtOH (10 mL) bylo přidáno 10% Pd/C (0,070 g) a reakční směs byla míchána 90 minut pod atmosférou vodíku. Poté bylo Pd/C odfiltrováno přes smotek vaty a filtrát byl odpařen dosucha. Odparek byl rozpuštěn v DCM (15 mL) a H₂O (15 mL) a do směsi byl přidán CaCO₃ (2,5 g; 25,0 mmol). Po vychlazení reakční směsi na 0 °C pod ochrannou atmosférou argonu, byl přikapán CCl₄ (1,3 g; 11,3 mmol) a reakční směs byla ponechána míchat za laboratorní teploty 1 hodinu. Poté byla reakční směs rozložena vodou (30 mL) a extrahována DCM (4x30 mL). Spojené organické extrakty byly promyty vodou

(2x20 mL), solankou (20 mL) a vysušeny bezvodým MgSO₄. Sloupcová chromatografie odparku (silikagel; mobilní fáze hexan:EtOAc/1:2) poskytla 0,27 g (37 %) nažloutlého oleje.

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 5,03 (bs, 1H); 3,75 – 3,61 (m, 12H); 3,55 (t, *J* = 5,2 Hz, 2H); 3,32 (q, *J* = 5,6 Hz, 2H); 1,45 (s, 9H); **¹³C NMR** (100 MHz, CDCl₃) δ 132,5; 70,9; 70,7; 70,3 (2 C); 69,4; 45,3; 28,5; **HRMS** vypočteno pro C₁₄H₂₆N₂O₅SNa⁺ 357,1459; nalezeno [M+Na⁺] 357,1455.

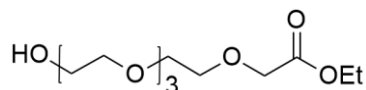
1-Isothiokyanato-3,6,9,12-tetraoxapentadec-14-yn (14)



K roztoku aminu **13** (0,45 g; 1,95 mmol) v DCM (15 mL) a H₂O (15 mL) byl přidán CaCO₃ (1,8 g; 18,0 mmol). Po vychlazení reakční směsi na 0 °C pod ochrannou atmosférou argonu byl přikapán CCl₄ (1,0 g; 8,70 mmol) a reakční směs byla ponechána míchat za laboratorní teploty 1 hodinu. Poté byla reakční směs naředěna H₂O (30 mL) a extrahována DCM (4x30 mL), spojené organické extrakty byly promyty vodou (2x20 mL), solankou (20 mL) a vysušeny bezvodým MgSO₄. Sloupcová chromatografie odparku (silikagel; mobilní fáze hexan:EtOAc/1:2) poskytla 0,25 g (48 %) nažloutlého oleje.

¹H NMR (300 MHz, CDCl₃) δ 4,21 (d, *J* = 2,4 Hz, 2H); 3,71 – 3,66 (m, 16H); 2,44 (t, *J* = 2,4, 1H); **¹³C NMR** (75 MHz, CDCl₃) δ 131,9; 79,4; 74,5; 70,4; 70,3 (2 C); 70,0; 69,0; 68,8; 58,0; 45,0.

Ethyl-14-hydroxy-3,6,9,12-tetraoxatetradekanoát (15)

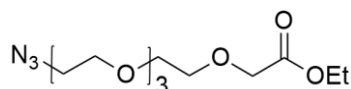


K tetraethylglykolu (10,0 g; 51,5 mmol) pod ochrannou atmosférou argonu byl přidán kovový sodík (0,60 g; 26,1 mmol). Reakční směs byla míchána při 120 °C do rozpuštění sodíku. Následně byl přidán ethyl-bromacetát (4,20 g; 25,1 mmol) a reakční směs byla dále míchána při 120 °C přes noc. Reakční směs byla rozložena vodou (30 mL), vodná vrstva byla extrahována DCM (3x20 mL). Spojené organické extrakty byly promyty vodou (2x20 mL), solankou (20 mL) a vysušeny bezvodým

MgSO₄. Sloupcová chromatografie odparku (silikagel; mobilní fáze DCM+10 % MeOH) poskytla 2,0 g (29 %) žlutého oleje.

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 4,22 (q, *J* = 7,2 Hz, 2H); 4,15 (s, 2H); 3,76 – 3,59 (m, 14H); 1,29 (t, *J* = 7,2 Hz, 3H); ¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃) δ 170,5; 72,6; 70,9; 70,6 (3 C); 70,5; 70,3; 68,7; 61,7; 60,9; 14,2; HRMS vypočteno pro C₁₂H₂₅O₇⁺ 281,1600; nalezeno [M+H⁺] 281,1599; [M+Na⁺] 303,1405.

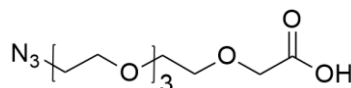
Ethyl-14-azido-3,6,9,12-tetraoxatetradekanoát (16)



K roztoku esteru **15** (0,71 g; 2,6 mmol) v DCM (5 mL) pod ochrannou atmosférou argonu byl přidán triethylamin (0,38 g; 3,8 mmol) a reakční směs byla vychlazena ledovou lázní. Po vychlazení byl přidán tosyl chlorid (0,48 g; 2,6 mmol) a reakční směs byla míchána přes noc. Následně byla rozložena vodou (10 mL), vodná vrstva byla extrahována DCM (3x10 mL), spojené organické extrakty byly promyty vodou (10 mL) a solankou (10 mL) a vysušeny bezvodým MgSO₄. Produkt reakce byl čištěn sloupcovou chromatografií (silikagel; mobilní fáze toluen:EtOAc/1:1) a rozpuštěn v DMF (5 mL). Do roztoku byl přidán pevný NaN₃ (0,4 g; 6,2 mmol) a reakční směs byla míchána přes noc při 55 °C. Poté byla reakční směs rozložena vodou (15 mL), vodní fáze extrahována DCM (3x10 mL), spojené organické extrakty promyty vodou (10 mL), solankou (10 mL) a vysušeny bezvodým MgSO₄. Sloupcová chromatografie odparku (silikagel; mobilní fáze hexan:EtOAc/1:1) poskytla 0,45 g (57 %) nažloutlého oleje.

¹H NMR (300 MHz, CDCl₃) δ 4,21 (q, *J* = 7,2 Hz, 2H); 4,15 (s, 2H); 3,76 – 3,64 (m, 14H); 3,39 (t, *J* = 4,8 Hz, 2H); 1,29 (td, *J* = 7,2; 0,6 Hz, 3H); ¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃) δ 170,4; 70,9; 70,7; 70,6 (3 C); 70,0; 68,7; 60,8; 50,7; 14,2.

14-Azido-3,6,9,12-tetraoxatetradekanová kyselina (17)

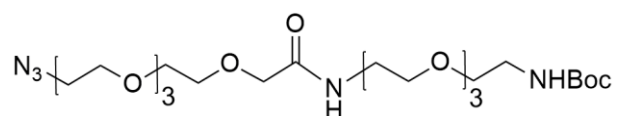


K roztoku esteru **16** (0,45 g; 1,5 mmol) v EtOH (10 mL) byl přidán vodný roztok NaOH (0,25 g; 5,9 mmol v 5 mL vody). Reakční směs byla zahřívána k varu po dobu 3 hodin. Poté byl EtOH odpařen na RVO a reakční směs byla rozložena vodným

5% roztokem HCl. Poté byla vodná fáze extrahována směsí DCM:isopropylalkohol/4:1 (3x20 mL). Spojené organické extrakty byly vysušeny bezvodým MgSO₄. Reakce poskytla 0,4 g (96 %) oranžového oleje.

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 4,18 (s, 2H); 3,78 – 3,66 (m, 14H); 3,40 (t, *J* = 5,2 Hz, 2H); ¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃) δ 173,3; 71,2; 70,7; 70,6; 70,5 (2 C); 70,3; 70,0; 68,6; 50,6; HRMS vypočteno pro C₁₀H₁₉O₆N₃Na⁺ 300,1166; nalezeno [M+Na⁺] 300,1167.

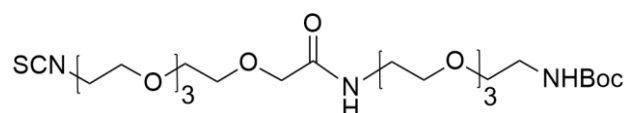
Spojka (19)



K roztoku kyseliny **17** (0,20 g; 0,73 mmol) v DMF (10 mL) pod ochrannou atmosférou argonu byl přidán triethylamin (0,22 g; 2,19 mmol). Po chvíli bylo přidáno TBTU (0,26 g; 0,81 mmol) a následně byl přikapán roztok aminu **18** (0,25 g; 0,80 mmol) v DMF (2 mL), reakční směs byla míchaná přes noc. Poté byla reakční směs rozložena vodou (20 mL) a produkt byl extrahován DCM (3x15 mL). Spojené organické extrakty byly promyty vodou (10 mL) a solankou (10 mL). Sloupcová chromatografie odparku (silikagel; DCM+5 % MeOH) poskytla 0,24 g (60 %) oranžového oleje.

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 7,18 (bs, 1H); 5,09 (bs, 1H); 4,00 (s, 2H); 3,76 – 3,47 (m, 28H); 3,39 (t, *J* = 5,2 Hz, 2H); 3,33 – 3,26 (m, 2H); 1,44 (s, 9H); ¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃) δ 170,1; 71,0; 70,8; 70,7 (3 C); 70,6 (3 C); 70,4; 70,3 (2 C); 70,1 (2 C); 69,9; 50,7; 28,5; HRMS vypočteno pro C₂₃H₄₆N₅O₁₀⁺ 552,3244; nalezeno [M+H⁺] 552,3240.

Spojka (20)

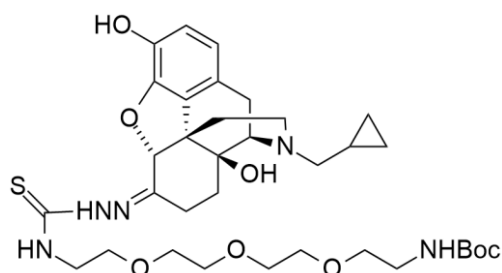


K roztoku azidu **19** (0,18 g; 0,31 mmol) v EtOH (5 mL) bylo přidáno 10% Pd/C (0,020 g) a reakční směs byla míchaná pod atmosférou vodíku přes noc. Poté bylo Pd/C odfiltrováno přes smotek vaty a filtrát byl odpařen dosucha. Odparek byl rozpuštěn ve směsi DCM (7 mL) a H₂O (7 mL) a do roztoku byl přidán CaCO₃ (0,32 g;

3,2 mmol). Po vychlazení reakční směsi na 0 °C pod ochrannou atmosférou argonu byl přikapán CCl₄ (0,23 g; 2,00 mmol) a reakční směs byla ponechána míchat za laboratorní teploty 1 hodinu. Poté byla reakční směs naředěna H₂O (20 mL) a extrahována DCM (4x15 mL), spojené organické extrakty byly promyty vodou (2x10 mL), solankou (10 mL) a vysušeny bezvodým MgSO₄. Sloupcová chromatografie odparku (silikagel; mobilní fáze DCM+5 % MeOH) poskytla 0,05 g (29 %) čirého oleje.

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 7,21 (bs, 1H); 5,11 (bs, 1H); 4,01 (s, 2H); 3,77 – 3,46 (m, 30H); 3,34 – 3,26 (m, 2H); 1,44 (s, 9H); ¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃) δ 170,1; 132,0; 71,0; 70,9; 70,7 (3 C); 70,6; 70,4; 70,3; 69,9; 69,4; 45,3; 28,5; HRMS vypočteno pro C₂₄H₄₆N₃O₁₀S⁺ 568,2904; nalezeno [M+H⁺] 568,2913; [M+Na⁺] 590,2715.

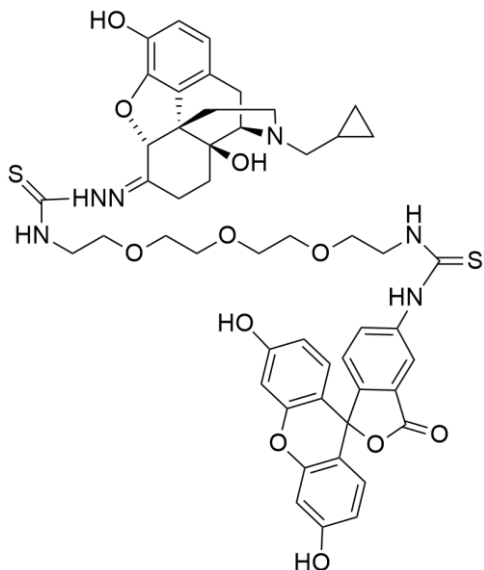
Konjugát (21)



Roztok naltrexazonu (0,23 g; 0,66 mmol) a sloučeniny **12** (0,22 g; 0,66 mmol) v suchém THF (5 mL) byl míchán při laboratorní teplotě po dobu 4 dnů, poté míchán přes noc při teplotě 50 °C. Reakční směs byla odpařena do sucha a sloupcová chromatografie (silikagel; DCM+10 % MeOH) poskytla 0,40 g (89 %) produktu ve formě žlutého oleje.

¹H NMR (300 MHz, CDCl₃) δ 8,68 (s, 1H); 8,20 (t, *J* = 5,6 Hz, 1H); 6,73 (d, *J* = 8,1 Hz, 1H); 6,59 (d, *J* = 8,2 Hz, 1H); 5,32 (s, 1H); 3,80 – 3,44 (m, 14H); 3,29 (q, *J* = 8,1 Hz, 2H); 3,15 (d, *J* = 5,8 Hz, 1H); 3,04 (d, *J* = 18,5 Hz, 1H); 2,68 (dd, *J* = 11,4; 3,8 Hz, 1H); 2,58 (dd, *J* = 18,4; 6,1 Hz, 1H); 2,43 – 2,22 (m, 6H); 1,72 – 1,63 (m, 2H); 1,50 – 1,45 (m, 1H) 1,44 (s, 9H); 0,92 – 0,78 (m, 1H); 0,54 (d, *J* = 8,2 Hz, 2H); 0,14 (d, *J* = 5,0 Hz, 2H); HRMS vypočteno pro C₃₄H₅₂N₅O₈S⁺ 690,3536; nalezeno [M+H⁺] 690,3530; [M+Na⁺] 712,3329.

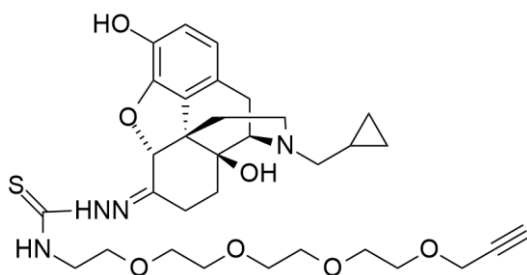
Konjugát (22)



K roztoku sloučeniny **21** (0,16 g; 0,24 mmol) v suchém DCM (5 mL) vychlazenému na 0 °C pod ochrannou atmosférou argonu byla přikapána CF₃COOH (5 mL) a reakční směs byl míchaná po dobu 90 minut za laboratorní teploty. Poté byla reakční směs odpařena do sucha a odparek rozpuštěn v suchém THF (5 mL). Do roztoku byl přidán triethylamin (0,072 g; 0,75 mmol) a následně roztok fluorescein isothiokyanátu (0,094 g; 0,24 mmol v 2 mL THF). Reakční směs byla míchána při 40 °C přes noc, poté odpařena do sucha a produkt byl přečištěn s využitím preparativního HPLC. Bylo izolováno 20 mg (9 %) oranžové pevné látky.

¹H NMR (400 MHz, CD₃OD) δ 8,23 (dd, *J* = 6,0; 2,0 Hz, 1H); 7,78 (d, *J* = 8,2 Hz, 1H); 7,18 – 7,08 (m, 1H); 6,99 – 6,50 (m, 9H); 5,06 (s, 1H), 3,98 (dd, *J* = 12,0; 6,3 Hz, 1H); 3,88 – 3,55 (m, 12H); 3,42 – 3,34 (m, 2H); 3,26 (p, *J* = 1,7 Hz, 1H), 3,14 – 3,08 (m, 1H) 2,98 – 2,89 (dt, 1H); 2,86 – 2,35 (m, 8H); 1,88 – 1,68 (m, 2H); 1,58 – 1,47 (m, 1H); 1,14 – 1,03 (m, 1H); 0,87 – 0,70 (m, 2H); 0,57 – 0,45 (m, 2H); HRMS vypočteno pro C₅₀H₅₅N₆O₁₁S₂⁺ 979,3370; nalezeno [M+H⁺] 979,3371.

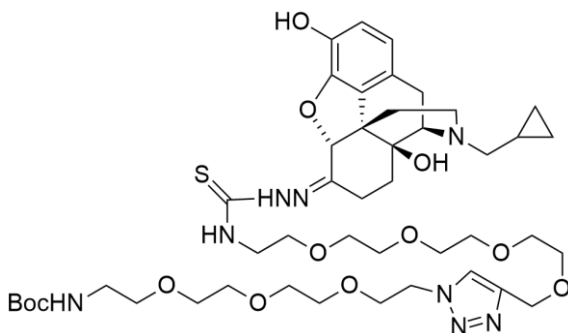
Konjugát (24)



Roztok naltrexazonu (0,37 g; 1,03 mmol) a isothiokyanátu **14** (0,28 g; 1,03 mmol) v suchém THF (10 mL) byl míchán při 50 °C po dobu 2 dnů. Poté byla reakční směs odpařena do sucha a sloupcová chromatografie (silikagel; mobilní fáze DCM+10 % MeOH) odparku poskytla 0,44 g (68 %) produktu v podobě žlutého oleje.

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 8,21 – 8,14 (m, 1H); 7,83 – 7,76 (m, 1H); 6,77 – 6,67 (m, 1H); 6,63 – 6,52 (m, 1H); 5,33 (s, 1H); 4,22 – 4,14 (m, 2H); 3,88 – 3,55 (m, 16H); 3,14 (t, *J* = 6,4 Hz, 1H); 3,05 (dd, *J* = 18,5; 4,6 Hz, 1H); 2,74 – 2,66 (m, 1H); 2,65 – 2,50 (m, 1H); 2,50 – 2,12 (m, 7H); 1,75 – 1,30 (m, 3H); 0,91 – 0,81 (m, 1H); 0,59 – 0,51 (m, 2H); 0,18 – 0,12 (m, 2H); HRMS vypočteno pro C₃₂H₄₅N₄O₇S⁺ 629,3009; nalezeno [M+H⁺] 629,3019; [M+Na⁺] 651,2824.

Konjugát (26)

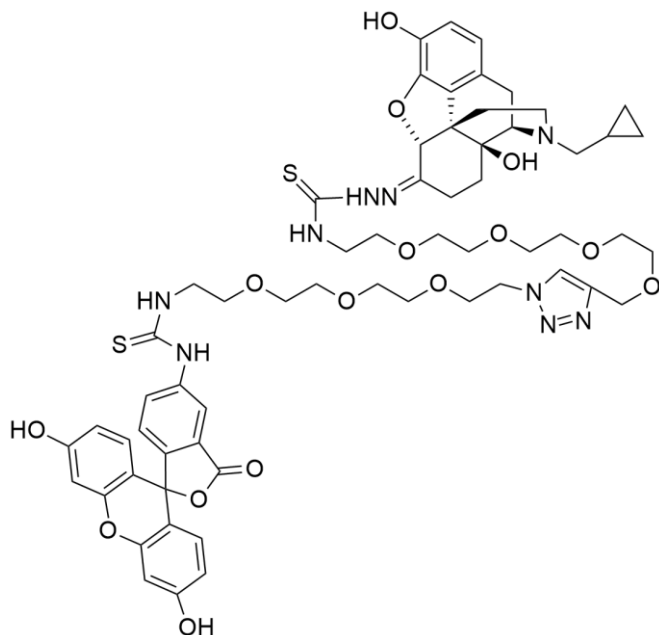


Roztok sloučeniny **24** (0,10 g; 0,16 mmol) a azidu **11** (0,071 g; 0,20 mmol) ve směsi THF (6 mL) a vody (2 mL) byl probublán argonem. Do roztoku byl přidán CuSO₄ (0,010 g; 0,035 mmol) a askorbát sodný (0,013 g; 0,07 mmol) a reakční směs byla ponechána míchat přes noc. Poté byl THF z reakční směsi odpařen na RVO. Odparek byl naředěn vodou (10 mL) a vodná fáze byla extrahována DCM (3x5 mL). Spojené organické extrakty byly vysušeny bezvodým MgSO₄. Sloupcová

chromatografie (silikagel; mobilní fáze DCM+10 % MeOH) odparku poskytla 0,055 g (32 %) produktu ve formě zeleného oleje.

^1H NMR spektrum bylo změřeno, ale nebylo interpretováno pro složitost; HRMS vypočteno pro $\text{C}_{45}\text{H}_{71}\text{N}_8\text{O}_{12}\text{S}^+$ 947,4912; nalezeno $[\text{M}+\text{H}^+]$ 947,4908; $[\text{M}+\text{Na}^+]$ 969,4739.

Konjugát (27)



K roztoku sloučeniny **26** (0,030 g; 0,032 mmol) v suchém DCM (2 mL) vychlazenému na 0 °C pod ochrannou atmosférou argonu byla přikapána CF_3COOH (2 mL) a reakční směs byl míchaná po dobu 90 minut za laboratorní teploty. Poté byla reakční směs odpařena do sucha a odparek rozpuštěn v suchém THF (5 mL). Do roztoku byl přidán triethylamin (0,011 g; 0,11 mmol) a následně roztok fluorescein isothiokyanátu (0,015 g; 0,039 mmol v 2 mL THF). Reakční směs byla ponechána míchat přes noc, poté odpařena do sucha a produkt byl přečištěn s využitím preparativního HPLC. Bylo izolováno 15 mg (33 %) produktu ve formě oranžové pevné látky.

^1H NMR spektrum bylo změřeno, ale nebylo interpretováno pro složitost; HRMS vypočteno pro $\text{C}_{61}\text{H}_{74}\text{N}_9\text{O}_{15}\text{S}_2^+$ 1236,4746; nalezeno $[\text{M}+\text{H}^+]$ 1236,4730; $[\text{M}+\text{Na}^+]$ 1258,4548.

Do roztoku byl přidán triethylamin (0,011 g; 0,11 mmol) a následně roztok fluorescein isothiokyanátu (0,011 g; 0,028 mmol v 1 mL THF). Reakční směs byla ponechána míchat přes noc, poté odpařena do sucha a produkt byl přečištěn s využitím preparativního HPLC. Bylo izolováno 7 mg (19 %) produktu ve formě oranžové pevné látky.

¹H NMR spektrum bylo změřeno, ale nebylo interpretováno pro složitost; **HRMS** vypočteno pro $C_{60}H_{74}N_7O_{16}S_2^+$ 1212,4633; nalezeno $[M+H^+]$ 1212,4650; $[M+Na^+]$ 1234,4464.

6. Závěr

Hlavním cílem této bakalářské práce byla příprava konjugátů naltrexonu nesoucích fluorescenční značku, oddělenou od morfinanového skeletu tetraethylen glykolovou spojkou (**22**) a oktaethylenglykolovou spojkou (**27** a **29**).

Příprava hydrazonů naltrexonu (**3**) i naloxonu (**4**), které byly klíčovými sloučeninami pro zavedení ethylenglykolových řetězců do molekuly, byla provedena bez větších problémů a poskytla produkty ve vysokých výtěžcích 70-90 %.

Nesymetricky substituované ethylenglykoly byly připraveny s využitím různých technik (chránění funkčních skupin, použití nadbytku substrátu, selektivní reakce). Ve většině případů bylo dosaženo vysokých výtěžků.

Tvorba *N,N'*-disubstituované thiomocoviny se ukázala jako obecná metoda pro přípravu žádaných konjugátů. Reakce hydrazonu **3** s řadou isothiokyanátů (**12**, **14** a **20**) probíhaly výborně za laboratorní nebo mírně zvýšené teploty. Produkty těchto reakcí (**21**, **24** a **28**) bylo možné jednoduše přečistit pomocí běžné sloupcové chromatografie. Jedinou nevýhodou tohoto přístupu byla přítomnost izomerů, která komplikovala zejména interpretaci NMR spekter.

Při přípravě oktaethylenglykolové spojky byly prostudovány oba přístupy zahrnující CuAAC a tvorbu amidu. Obě metody poskytly konjugáty v podobných výtěžcích. Kvůli nezvyklému zabarvení produktu reakce CuAAC (**26**) a přirozenějšímu charakteru amidického motivu, je druhý jmenovaný přístup považován za výhodnější.

Na závěr byly připravené konjugáty (**21**, **26** a **28**) opatřeny fluorescenční značkou, fluoresceinem. Všechny žádané sloučeniny (**22**, **27** a **29**) byly připraveny reakcí odpovídajícího konjugátu zakončeného volnou aminovou funkcí s fluorescein isothiokyanátem. Polární charakter těchto sloučenin znemožnil použití klasické sloupcové chromatografie pro čištění, a proto bylo využito preparativní HPLC s reverzní stacionární fází.

Sloučeniny (**22**, **27** a **29**) byly na spolupracujícím pracovišti (ÚOCHB) použity pro studium afinity vůči MOR. Příprava syntetických protilátek MOR připojením jedné ze sloučenin **21**, **26** či **28** na polymer je stále předmětem výzkumu (ÚMCH).

7. Literatura

- 1 J. Nguyen, K. Luk, D. Vang, W. Soto, L. Vincent, S. Robiner, R. Saavedra, Y. Li, P. Gupta, K. Gupta. *Br. J. Anaesth.* **2014**, *113*, i4-i13.
- 2 P. A. Singleton, T. Mirzapioazova, R. Hasina, R. Salgia, J. Moss. *Br. J. Anaesth.* **2014**, *113*, i103-i108.
- 3 B. Afsharimani, C. W. Doornebal, P. J. Cabot, M. W. Hollmann, M. – O. Parat. *Br. J. Pharmacol.* **2013**, *172*, 251-259.
- 4 J. P. Cata, V. Keerty, D. Keerty, L. Feng, P. H. Norman, V. Gottumukkala, J. R. Mehran. M. Engle. *Cancer Med.* **2014**, *3*, 900-908.
- 5 F. E. Lennon, T. Mirzapioazova, B. Mambetsariev, V. A. Poroyko, R. Salgia, J. Moss, P. A. Singleton. *PLoS ONE* **2014**, *9*, e91577.
- 6 B. N. Dhawan, F. Cesselin, R. Raghubir, T. Reisine, P. B. Bradley, P. S. Portoghese, M. Hamon. *Pharmacol. Rev.* **1996**, *48*, 567–592.
- 7 Dostupné na URL: http://www.painpolicy.wisc.edu/sites/www.painpolicy.wisc.edu/files/global_me.pdf [cit. 17.05.2016].
- 8 J. McDonald, D. G. Lambert. *Contin. Educ. Anaesth. Crit. Care Pain* **2005**, *5*, 22–25.
- 9 Dostupné na URL: https://www.unodc.org/unodc/en/data-and-analysis/bulletin/bulletin_1954-01-01_2_page005.html [cit. 17.05.2016].
- 10 N. Chida. *Top. Curr. Chem.* **2011**, *299*, 1–28.
- 11 M. Gates, G. Tschudi. *J. Am. Chem. Soc.* **1952**, *74*, 1109–1110.
- 12 K. C. Rice. *J. Org. Chem.* **1980**, *45*, 3135–3137.
- 13 Dostupné na URL: https://www.incb.org/documents/Publications/AnnualReports/AR2010/AR_2010_English.pdf [cit. 17.05.2016].
- 14 K. W. Bentley, A. L. Boura, A. E. Fitzgerald, D. G. Hardy, A. McCoubrey, M. L. Aikman, R. E. Lister. *Nature* **1965**, *206*, 102–103.
- 15 S. S. Iyer, A. S. Anderson, S. Reed, B. Swanson, J. G. Schmidt. *Tetrahedron Lett.* **2004**, *45*, 4285–4288.

- 16 J. M. Harris. *Poly(ethylene glycol) chemistry Biotechnical and Biomedical Applications* **1992**, Plenum Publishing Corporation
- 17 U. M. Musazzi, C. Matera, C. Dallanoce, F. Vacondio, M. De Amici, G. Vistoli, P. Minghetti. *Int. J. Pharm.* **2015**, *489*, 177–185.
- 18 E. H. Lauterbach, T. Dinkel, S. Heller, A. Bertogg. US20090163717.
- 19 A. Machara, D. P. Cox, T. Hudlicky. *Adv. Synth. Cat.* **2012**, *354*, 2713-2719.
- 20 G. W. Pasternak, E. F. Hahn. *J. Med. Chem.* **1980**, *23*, 674–676.
- 21 L. S. Schembri, L. A. Stoddart, S. J. Briddon, B. Kellam, M. Canals, B. Graham, P. J. Scammells. *J. Med. Chem.* **2015**, *58*, 9754–9767.
- 22 V. M. Kolb, A. Koman, L. Terenius. *Life Sci.* **1983**, *32*, 423–426.
- 23 A. G. Karaji, N. Khansari, B. Ansary, A. R. Dehpour. *Int. Immunopharmacol.* **2005**, *5*, 1019–1027.
- 24 P. Šácha, T. Knedlík, J. Schimer, J. Tykvart, J. Parolek, V. Navrátil, P. Dvořáková, F. Sedlák, K. Ulbrich, J. Strohalm, P. Majer, V. Šubr, J. Konvalinka, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2016**, *55*, 2356–2360.
- 25 H. C. Kolb, M. G. Finn, K. B. Sharpless. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2001**, *40*, 2004–2021.
- 26 C. Y. Jao, A. Salic. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2008**, *105*, 15779–15784.
- 27 V. V. Rostovtsev, L. G. Green, V. V. Fokin, K. B. Sharpless. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2002**, *41*, 2596–2599.
- 28 R. Huisgen. *Proc. Chem. Soc.* **1961**, 357-396.
- 29 L. N. Goswami, Z. H. Houston, S. J. Sarma, S. S. Jalisatgi, M. F. Hawthorne. *Org. Biomol. Chem.* **2013**, *11*, 1116–1126.
- 30 K. M. Bongers, R. J. B. H. N. van den Berg, L. H. Heitman, A. P. IJzerman, J. Oosterom, C. M. Timmers, H. S. Overkleeft, G. A. van der Marel. *Bioorg. Med. Chem.* **2007**, *15*, 4841–4856.
- 31 R. Okoth, A. Basu. *Beilstein J. Org. Chem.* **2013**, *9*, 608–612.
- 32 J. Joossens, K. Augustyns, A. M. Lambeir, P. van der Veken, J. van Soom, V. Magdolen. WO2015144933.

- 33 M. Aguilar-Moncayo, M. I. García-Moreno, A. Trapero, M. Egidio-Gabás, A. Llebaria, J. M. G. Fernández, C. O. Mellet. *Org. Biomol. Chem.* **2011**, *9*, 3698–3713.
- 34 S. Bhosale, S. Bhosale, T. Wang, M. Kopaczynska, J.-H. Fuhrhop, *J. Am. Chem. Soc.* **2006**, *128*, 2156–2157.
- 35 L. D. Hughes, R. J. Rawle, S. G. Boxer. *PLoS ONE* **2014**, *9*, e87649.
- 36 V. M. Kolb, D. H. Hua. *J. Org. Chem.* **1984**, *49*, 3824–3828.
- 37 F. Tran, A. V. Odell, G. E. Ward, N. J. Westwood, *Molecules* **2013**, *18*, 11639–11657.