

Univerzita Karlova
Přírodovědecká fakulta

Studijní program: Chemie
Studijní obor: Medicinální chemie



Tereza Kárníková

Příprava modelových, self-immolativních spojek na bázi fosforu pro doručení oximů
Synthesis of model, self-immolative, phosphate-based linkers for delivery of oximes

Bakalářská práce

Vedoucí závěrečné práce/Školitel: Ing. Ondřej Baszczyński, PhD.

Praha, 2021

Prohlášení:

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

V Praze, *17. 06. 2021*

Podpis.....

Abstrakt

Tato bakalářská práce zkoumá možnost přípravy a využití oximových proléčiv. Cílem práce je doručení oximů pomocí self-immolativních spojek na bázi fosforu, které využívají cyklizační reakce a odstoupení nejkyselější skupiny (oxim) z fosforu. Za tímto účelem byly připraveny modelové systémy, které obsahují: 1) fotolabilní skupinu (DMNB), nebo mohou být enzymaticky aktivovatelné, 2) self-immolativní rameno obsahující fosfátové jádro, a 3) oxim jako odstupující skupinu. Jako modelové oximy byly použity acetofenonoxim, cyklohexanonoxim a proléčivo griseofulvinu (antifungální látka) – griseofulvinoxim. Byla studována především možnost přípravy těchto látek a schopnost jejich self-immolace (tj. řízeného rozpadu) a uvolnění odstupující skupiny (léčiva). Tyto reakce byly monitorovány pomocí ^{31}P NMR spektroskopie. Také byla studována stabilita připravených látek v pufrech.

Klíčová slova: oxim, proléčivo, self-immolace, self-immolativní spojky, fotoaktivace

Abstract

This bachelor thesis explores a possibility of preparation and usage of oxime prodrugs. Thesis aim is to deliver oximes by using self-immolative phosphorous-based linkers that undergo cyclization reaction, leading to the release of oxime from the phosphorous. For this purpose, model systems containing: (1) a photolabile DMNB group, or they could contain enzymatically activable ester group, (2) self-immolative arm with the phosphate core, and (3) oxime as the leaving group, were prepared. Acetophenone oxime, cyclohexanone oxime, and griseofulvin oxime were used as the model oximes. In particular, the synthesis of target molecules and their self-immolation (i.e., controlled breakdown) have been studied. These reactions were monitored by ^{31}P NMR spectroscopy. The stability study of the prepared substances in buffer solutions has also been performed.

Key words: *oxime, prodrug, self-immolation, self-immolative linkers, photoactivation*

Obsah

1. Úvod	8
2. Cíle práce.....	10
3. Teoretická část	11
3.1 Struktura a vlastnosti oximů	11
3.2 Využití oximů	11
3.3 Vybrané reakce vedoucí ke vzniku oximů	12
3.3.1 Nukleofilní adice hydroxylaminu na karbonylové sloučeniny	12
3.4 Vybrané reakce oximů	13
3.4.1 Beckmannův přesmyk.....	13
3.4.2 Syntéza oxim-etherů a oxim-esterů	14
3.5 Biologicky aktivní látky či léčiva obsahující aldoximy, ketoximy a O-alkylované oximy	14
3.5.1 Cefalosporinová antibiotika třetí generace.....	15
3.5.2 Oxikonazol	16
3.5.3 Pralidoxim a další oximy v antidotní terapii.....	16
3.6 Proléčiva	17
3.7 Vybraná oximová proléčiva	19
3.8 ProTide technologie	20
3.9 Využití efektu odstupující skupiny	22
4. Výsledky a diskuse.....	23
4.1 Syntetická strategie	23
4.2 Příprava výchozích látek	23
4.2.1 Oximy 4 a 6	24
4.2.2 Fotoaktivovatelné estery α -hydroxykyselin 9, 10 a 11	24
4.3 Příprava modelových proléčiv 17, 18, 21 a 22	25
4.3.1 Příprava intermediálních monochloridátů 13, 14, 16 a 19	26
4.3.2 Příprava enzymaticky aktivovatelných modelových proléčiv 17 a 18	27
4.3.3 Příprava fotoaktivovatelných modelových proléčiv 21 a 22	29
4.4 Příprava proléčiva griseofulvinu	31
4.5 Fotoaktivace	32
4.6 Stabilita látky 17 za fyziologického pH	33
5. Experimentální část	35
5.1 Obecné postupy a chemikálie	35
5.2 Příprava výchozích látek pro syntézu self-immolativních spojek	36

5.3	Syntéza intermediálních monochloridátů	38
5.4	Syntéza self-imolativních systémů s modelovými oximy	38
6.	Závěr.....	42
7.	Poděkování.....	43
8.	Literatura.....	44

Použité zkratky

AChE	acetylcholin esteráza
APCI	chemická ionizace za atmosférického tlaku
DCM	dichlormethan
DIPEA	<i>N,N</i> -diisopropylethylamin
DMNB	4,5-dimethoxy-2-nitrobenzyl
DMSO	dimethylsulfoxid
ekv.	ekvivalent
ESI	ionizace elektrosprejem
Et ₃ N	triethylamin
EtOAc	ethyl-acetát
EtOH	ethanol
grad.	gradient
h.	hodina
HBV	hepatitida typu B
HCV	hepatitida typu C
hex.	hexan
HRMS	hmotností spektrometrie s vysokým rozlišením
HSV	herpes simplex virus
LC-MS	kapalinová chromatografie s hmotnostní spektrometrií
MeCN	acetonitril
MeOH	methanol
min.	minuta
NaOAc	octan sodný
NMR	nukleární magnetická rezonance
PhMe	toluen
RVO	rotační vakuová odparka
sat.	nasycený
THF	tetrahydrofuran
TLC	chromatografie na tenké vrstvě (Thin Layer Chromatography)
TsOH	<i>para</i> -toluensulfonová kyselina
UV	ultrafialové záření (365 nm)

1. Úvod

Virové infekce, bakteriální infekce a mykózy jsou problémem společnosti již od nepaměti. S tím, jak se tyto mikroorganismy vyvíjí je souběžně potřeba neustále vyvíjet nová léčiva působící proti těmto patogenům. Nicméně sloučeniny potenciálně vhodné pro léčbu těchto infekcí mohou mít řadu problémů, kvůli kterým může být jejich využití neefektivní. Proto byl zaveden koncept proléčiv.

Proléčiva jsou obvykle farmakologicky inaktivní látky, jejichž strukturní základ tvoří molekula farmakologicky aktivní sloučeniny, která je chemicky modifikována vhodnými skupinami. Tato strukturní změna mateřské farmakologicky aktivní molekuly následně umožňuje překonání nejrůznějších bariér.¹ Příkladem takových bariér může být nízká rozpustnost ve vodě, kterou můžeme pozorovat například u kortikosteroidů, rychlý first-pass effect, který vykazuje například léčivo propranolol či nízká propustnost přes buněčné membrány.² Po překonání bariéry následně dojde *in vivo* k uvolnění vlastní farmakologicky aktivní sloučeniny.¹

V dnešní době tvoří látky, které mohou být klasifikovány jako proléčiva okolo 5 až 7 % všech schválených léčiv po celém světě.¹ Proléčiva mohou být odvozeny od přírodních látek nebo mohou být syntetická. Mezi proléčiva odvozená od přírodních látek patří například antitusikum/analgetikum kodein,² který se v těle metabolizuje na farmakologicky aktivní morfin. Jako zástupce syntetických proléčiv pak lze uvést antibiotikum bacampicillin, což je proléčivo ampicillinu,³ protizánětlivé proléčivo sulfasalazin používané například při léčbě Chronovy choroby⁴ či proléčiva nukleosidů, která jsou podkladem pro technologii ProTide.⁵

Před desítkami let bylo zjištěno, že nukleosidové analogy mohou být efektivními virostatiky např. proti virům HCV, HBV, HIV, HSV aj. či při léčbě nádorových onemocnění.⁵ Jejich využití má však některá omezení např. to, že syntetické nukleosidové analogy mají pozměněnou strukturu oproti přirozeně se vyskytujícím nukleosidům a jejich fosforylace, resp. aktivace *in vivo* neprobíhá úspěšně.⁵

Prof. Chris McGuigan však v 90. letech 20. století přišel s metodou známou pod názvem ProTide technologie. Tato technologie byla široce zkoumána, což vedlo k objevení v dnešní době již komerčně dostupných látek, a to konkrétně tenofovir-alafenamid a sofosbuvir.⁵ Mezi schválené indikace obou těchto léčiv, resp. proléčiv, patří HCV a HIV. V případě tenofovir-alafenamidu byla později schválenou indikací i HBV.⁶ Remdesivir je další proléčivo, využívající technologii ProTide.⁷ Toto proléčivo bylo schváleno v minulém roce pro léčbu onemocnění COVID-19.⁸

V naší laboratoři se zabýváme přístupem doručování léčiv, který je odvozen právě od technologie ProTide. V tomto případě však není doručován nukleosid, ale například léčivo s fenolickou strukturou, či v případě této práce léčivo s oximovou strukturou, přičemž odstoupení tohoto léčiva je dosaženo pomocí self-immolace a efektu odstupující skupiny. V tuto chvíli se zabýváme syntézou modelových self-immolativních spojek, resp. proléčiv, u nichž může být aktivace iniciována UV zářením.

2. Cíle práce

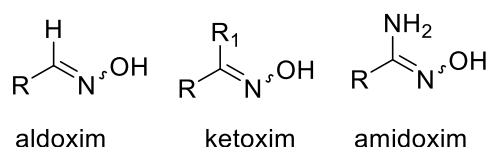
Cílem této bakalářské práce je studium možností přípravy proléčiv biologicky aktivních látek, obsahujících oximovou funkční skupinu jakožto modifikovatelnou část molekuly. Modelové látky budou odvozeny od fotoaktivovatelných či enzymaticky aktivovatelných self-immolativních spojek na bázi fosforu. Prvotním cílem této práce je příprava a studium vlastností, především stability modelových molekul a získané poznatky budou aplikovány při syntéze proléčiva griseofulvinu.

- Studium a příprava self-immolativních spojek, resp. modelových proléčiv
- Studium jejich stability
- Příprava proléčiva griseofulvinu

3. Teoretická část

3.1 Struktura a vlastnosti oximů

Oximy jsou látky, které mají strukturu iminu,⁹ přičemž na dusíkový atom je navázána hydroxylová skupina. Lze tedy říci, že se jedná o deriváty hydroxylaminu odvozené od karbonylových sloučenin. Podle struktury oximy rozdělujeme na aldoximy vznikající náhradou karbonylové skupiny v aldehydech, ketoximy vznikající z ketonů a amidoximy odvozené od amidů (obrázek 1).⁹



Obrázek 1. Struktura aldoximů, ketoximu a amidoximu. Převzato a upraveno.⁹

Oximy lze považovat za tautomerní formu příslušných nitrososloučenin (schéma 1). Pokud chceme určit k jaké tautomerní formě bude posunuta rovnováha řídíme se pravidlem, že pokud příslušná nitrososloučenina nese na uhlíku kromě nitroso skupiny též vodík, bude rovnováha posunuta ve prospěch oximu (schéma 1).¹⁰ Z uvedeného pravidla tedy vyplývá, že pouze terciární nitrososloučeniny jsou stabilní, jelikož již nemůže docházet k žádné tautomerii. Vzhledem k přítomnosti C=N dvojně vazby lze v molekule oximu pozorovat izomerii E/Z.

V porovnání s karbonylovými sloučeninami, od kterých jsou oximy odvozeny, je sp² hybridizovaný uhlík v oximech méně náchylný vůči nukleofilnímu ataku, a to díky nižší elektrofilitě uhlíkového atomu, která je způsobena nižší hodnotou elektronegativity dusíku oproti kyslíku, který se nachází v karbonylových sloučeninách.

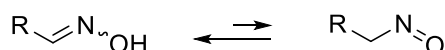


Schéma 1. Tautomerie mezi aldoximem a příslušnou nitrososloučeninou. Rovnováha je posunuta ve prospěch oximu.

3.2 Využití oximů

Sloučeniny obsahující oximovou funkční skupinu nachází široké uplatnění v mnoha odvětvích chemického a farmaceutického průmyslu. Cyklické oximy jsou důležitými meziprodukty pro přípravu laktamů, na které cyklické oximy přechází díky Beckmannově přesmyku.¹¹ Nejznámějším příkladem je bezesporu ε-kaprolaktam, který je široce využíván pro výrobu syntetických polyamidových vláken jako například nylon 6.¹¹ Příklady molekul obsahujících oximovou funkční skupinu lze také nalézt mezi farmakologicky aktivními

sloučeninami, které nacházejí uplatnění např. jako antimikrobiální či protizánětlivé agens,¹² nebo jako antidota při otravě organickými sloučeninami fosforu (organofosfáty).¹³ Na bázi oximů byly také navrženy micelární katalyzátory, které mají za cíl urychlit hydrolytickou reakci fosfátů a fosfonátů při dekontaminaci prostor zamořených nervově-paralytickými látkami.¹⁴ Oximy mohou rovněž vyvolávat vasodilatační účinky díky uvolňování NO vznikajícího jejich oxidací.⁹

3.3 Vybrané reakce vedoucí ke vzniku oximů

Existuje celá řada metod pro přípravu oximů, ovšem mezi nejběžnější z nich lze řadit nukleofilní adici hydroxylaminu na karbonylové sloučeniny.⁹ O této metodě se podrobněji zmíním v kapitole 3.3.1, neboť se jedná o metodu použitou v rámci této práce. Dále lze alifatické oximy získat např. částečnou redukcí primárních a sekundárních nitrosloučenin pomocí chloridu chromnatého¹⁵ či cínatého, nebo pomocí Se/NaBH₄.¹⁶ Při takovéto částečné redukci nitrosloučenin nejprve dochází ke vzniku nitroso-sloučeniny,¹⁵ která v případě primárních a sekundárních nitroso derivátů přechází na stabilnější tautomer – tedy oxim (schéma 2).

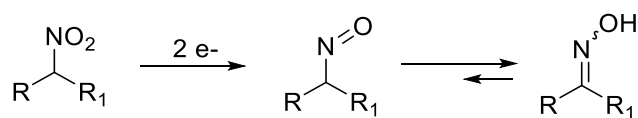


Schéma 2. Vznik oximu redukcí alifatické nitrosloučeniny.¹⁵

Mimo redukčních metod lze pro přípravu oximů použít též oxidaci alifatických aminů pomocí m-CPBA.¹⁷ Dalším způsobem může být elektrofilní nitrosace aktivovaných C-kyselin nitrosoniovým kationtem do α polohy¹⁵, kdy vznikající nitroso derivát následně podléhá nitroso-oxim tautomerii (viz schéma 1). Další možností přípravy oximů je radikálový přesmyk NO radikálu známým jako Bartonova reakce.¹⁸ I zde dojde ke vzniku nitroso sloučeniny a její tautomerii na oxim (schéma 1).¹⁸

3.3.1 Nukleofilní adice hydroxylaminu na karbonylové sloučeniny

Jak již bylo řečeno jedna z nejběžnějších metod přípravy oximů je reakce karbonylových sloučenin s hydroxylaminem.⁹

Mechanismus nukleofilní adice karbonylových sloučenin pomocí hydroxylaminu je analogický s mechanismem vzniku iminů. Volný elektronový pár na dusíku v hydroxylaminu nejprve nukleofilně atakuje karbonylovou skupinu, a poté dojde k transferu protonu z atomu dusíku na atom kyslíku za vzniku neutrálního hemiaminalu. Protonace

hydroxylové skupiny vede k eliminaci vody (jako lépe odstupující skupiny) a následným posunem elektronového páru dusíku vznikne iminiový ion. Nakonec dojde ke ztrátě protonu na atomu dusíku a regeneraci kyselého katalyzátoru za vzniku neutrální molekuly oximu¹⁹ (schéma 3).

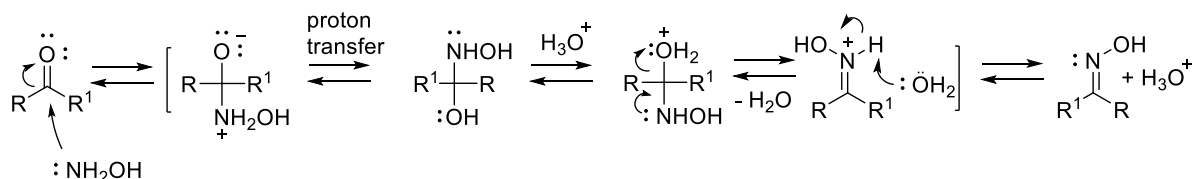


Schéma 3. Mechanismus vzniku oximů za podmínek nukleofilní adice hydroxylaminu. Převzato a upraveno.¹⁹

3.4 Vybrané reakce oximů

Velmi důležitou transformací oximů je Beckmannův přesmyk, a to především díky jeho využití v průmyslu pro přípravu ϵ -kaprolaktamu.¹¹ Mezi další významné transformace oximů patří jejich redukce za vzniku příslušných aminů¹⁵ či oxidace za vzniku nitroslouchenin.²⁰ Dále jejich přeměna na oxim ethery a oxim estery.²¹ Velmi zajímavou přeměnou oximů je také Hoch-Campbellova syntéza aziridinů, při níž je aziridin generován vícenásobnou adicí Grignardova činidla.²²

3.4.1 Beckmannův přesmyk

Beckmannův přesmyk je kyselě katalyzovaná reakce, jejímž produktem je příslušný amid karboxylové kyseliny (schéma 4).²³ Může probíhat jak na cyklických, tak acyklických oximech.²³ Prvním krokem je protonace dusíku následovaná přesunem protonu na kyslík, dalším krokem je eliminace vody během níž dojde k migraci alkyly, který je vůči původní hydroxylové skupině v poloze trans za vzniku karbokationtu, který se stabilizuje pomocí vody a reakce je zakončena transferem vodíku na dusík (schéma 4).²³

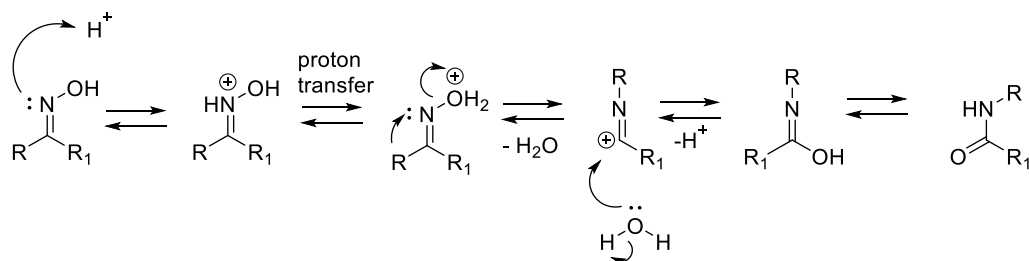


Schéma 4. Mechanismus Beckmannova přesmyku. Převzato a upraveno.²⁴

Pokud Beckmannův přesmyk budeme provádět na aldoximech s E izomerií, bude přednostně docházet k dehydratační reakci za vzniku nitrilu²³ (schéma 5).

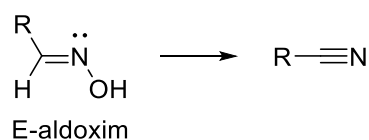


Schéma 5. Boční dehydratační reakce E-aldoximu

3.4.2 Syntéza oxim-etherů a oxim-esterů

Příprava oxim etherů a oxim esterů je jednou z dalších ukázek reaktivity oximů. Oximy mají amfoterní charakter ($\text{pK}_a \sim 11$, $\text{pK}_b \sim 12$).²⁵ Při použití báze, jejíž pK_a konjugované kyseliny je vyšší, než je pK_a příslušného oximu dojde k deprotonaci tohoto oximu, čímž je vygenerován nukleofil, který může vystupovat v řadě substitučních reakcí. Mezi používané báze pak patří např. triethylamin či NaH.^{21, 26} Příkladem takové substituční reakce je reakce chloridu kyseliny s oximem v prostředí vhodné báze v aprotickém rozpouštědle za nízké teploty ($0\text{ }^\circ\text{C}$) za vzniku oxim esteru,²⁶ (schéma 6). Jako substrát pro nukleofilní atak lze také použít alkylhalogenidy za vzniku oxim-etherů.²¹ (schéma 7).

Obdobně lze reakci probíhající mechanismem nukleofilní substituce aplikovat i na další substráty. Příkladem mohou být fosfáty substituované dobře odstupující skupinou, kterou může být opět např. chlorid. Dochází tedy k reakci fosfátu např. diethylchlorfosfátu se sodnou solí oximu, která může být vygenerována reakcí s NaH. Reakce probíhá v suchém rozpouštědle za vzniku oxim-fosfátu.^{27, 28}

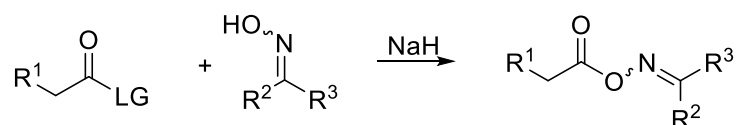


Schéma 6. Substituční reakce vedoucí k oxim-esteru. LG označuje odstupující skupinu.

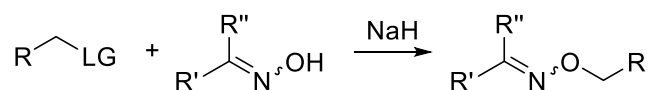
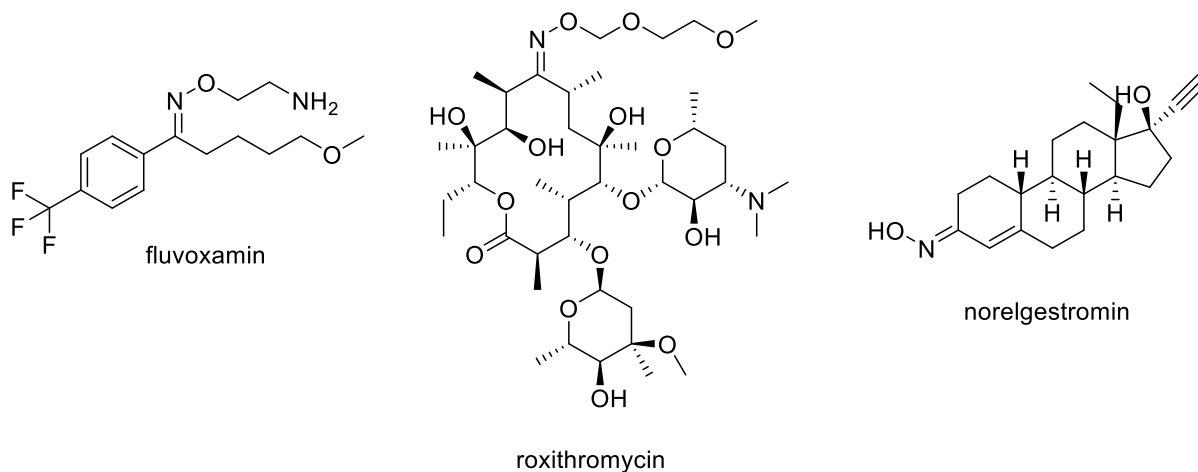


Schéma 7. Substituční reakce vedoucí k oxim-etherům. LG označuje odstupující skupinu.

3.5 Biologicky aktivní látky či léčiva obsahující aldoximy, ketoximy a O-alkylované oximy

Spektrum léčiv, jejichž struktura obsahuje oximovou skupinu je celá řada. Z léčiv, která jsou již na trhu, je možné zmínit např. některá antibiotika ze skupiny cefalosporinů třetí generace²⁹ a makrolidové antibiotikum roxithromycin.³⁰ Další důležitá farmaka obsahující oximovou skupinu jsou hormonální kontraceptivum norelgestromin³¹ či fluvoxamin ze skupiny selektivních inhibitorů zpětného vychytávání serotoninu (SSRI), který se využívá

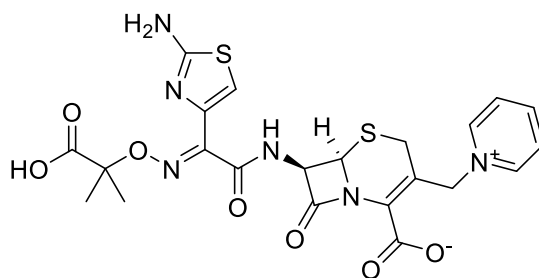
při léčbě depresí či obsedantně-kompulzivní poruchy.³² Pralidoxim či obidoxim jsou další léčiva obsahující oximovou skupinu a mají využití v antidotní terapii při otravě organofosfáty.¹³ Dále jsou některé sloučeniny obsahující oximovou skupinu ve fázi klinického či preklinického testování. Mezi ně patří např. istaroxim pro léčbu akutního i chronického srdečního selhání³³ nebo virostatikum SCH-C, které jakožto antagonistu HIV koreceptoru CCR-5, inhibuje vstup HIV-1 do buňky.³⁴ O některých vybraných sloučeninách se zmíním podrobněji v následujícím textu.



Obrázek 2. Struktury vybraných molekul fluvoxaminu, roxithromycinu a norelgestrominu.

3.5.1 Cefalosporinová antibiotika třetí generace

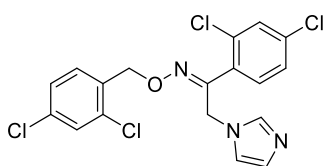
Obecně jsou cefalosporiny antibiotika obsahující beta-laktamovou strukturu. Jejich účinnost je ale snižována beta-laktamázami, enzymy zapříčiňujícími bakteriální rezistenci. V klinické praxi jsou proto žádoucí taková antibiotika, která vykazují zvýšenou stabilitu vůči těmto bakteriálním enzymům. Mezi ně patří právě třetí generace cefalosporinů, jejichž zástupci jsou například ceftazidim, cefotaxim, ceftizoxim, ceftriaxon, cefmenoxim. Včetně beta-laktamové struktury je společným jmenovatelem těchto sloučenin také přítomnost oximové funkční skupiny C=N-OR (Z izomer), která těmto antibiotikům propůjčuje zvýšenou stabilitu vůči hydrolytickému působení beta-laktamázy.²⁹



Obrázek 3. Struktura vybrané molekuly ceftazidimu.

3.5.2 Oxikonazol

Jedná se o léčivo z řady antimykotik patřící mezi deriváty imidazolu, které je využíváno v léčbě dermatologických mykóz či při kožních a genitálních kandidozách. Spektrum účinku oxikonazolu je široké a zahrnuje například kvasinku *Candida albicans* či houbu *Aspergillus fumigatus*.³⁵ Účinnost oxikonazolu, stejně jako v případě dalších antimykotických azolů, je založena na inhibici enzymu lanosterol-14 α -demethylázy (ERG 11), který je zodpovědný za syntézu ergosterolu – jednoho ze stavebních kamenů buněčné membrány hub – jehož nedostatek vede k porušení permeability a fluidity těchto membrán.^{35, 36}

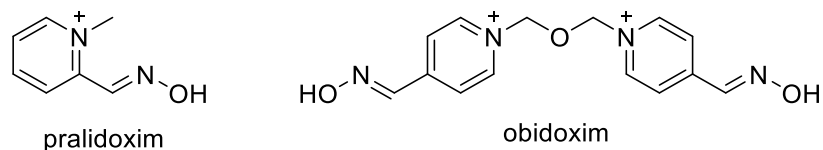


Obrázek 4. Struktura oxikonazolu.

3.5.3 Pralidoxim a další oximy v antidotní terapii

Intoxikace organickými sloučeninami fosforu je jednou z nejčastějších otrav, a to především z toho důvodu, že jsou tyto sloučeniny hojně využívány v pesticidech.³⁷ Organické sloučeniny fosforu jsou rovněž součástí některých nervově paralytických bojových látek, jako například sarin či tabun.¹³

Při proniknutí těchto látek do organismu dojde k inhibici enzymu acetylcholinesterázy (AChE), což je enzym, zodpovědný za hydrolytické štěpení neurotransmiteru acetylcholinu.¹³ Inhibice AChE je způsobena kovalentní modifikací serinu v aktivním centru tohoto enzymu fosforylací.³⁸ Takto inhibovaný enzym již není schopen hydrolyticky štěpit acetylcholin, a tak dochází k jeho kumulaci. To má za následek hyper-stimulaci cholinergních receptorů, která se může projevat například neuromuskulární bloádou či poruchou funkce dýchání, která může vést až k zástavě dechu.¹³ Mezi zástupce oximových antidot podávaných při otravě organofosfáty patří pralidoxim či obidoxim¹³ (obrázek 5).



Obrázek 5. Struktura pralidoximu a obidoximu.

Obecně je oximová skupina relativně silným nukleofilem, a proto je schopna aktivní místo AChE defosforylovat, díky reakci oximové skupiny s fosforylovaným serinem AChE. Touto reakcí dojde k vyvázání fosfátu z aktivního centra enzymu za vzniku volného enzymu a oxim-fosfonátu a tím pádem k reaktivaci AChE (schéma 8).^{38, 13}

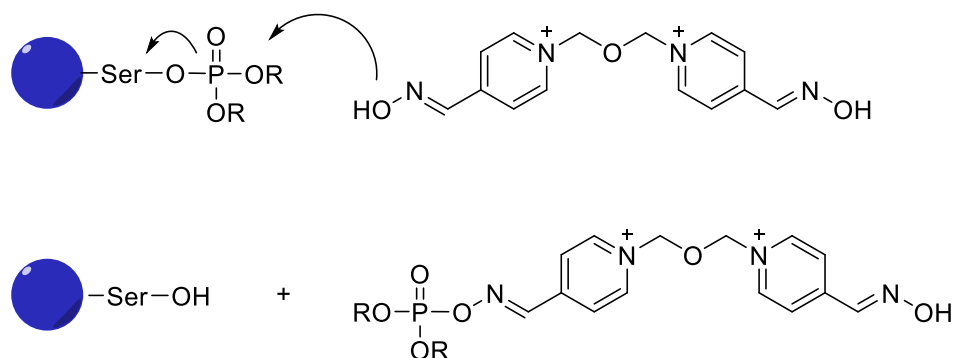


Schéma 8. Mechanismus reaktivace AChE obidoximem. Převzato a upraveno.³⁹

3.6 Proléčiva

Definice vystihující pojem proléčiva je následující: „Proléčiva jsou molekuly s nízkou či žádnou farmakologickou aktivitou, in vivo jsou převedeny na aktivní mateřské léčivo pomocí enzymatických nebo chemických reakcí, či kombinací obojího.“⁴⁰

Důvodem přípravy proléčiva je obvykle především snaha o zlepšení fyzikálně chemických vlastností či farmakokinetického profilu původního léčiva⁴¹ (přičemž druhé souvisí s prvním). Jako příklad může sloužit zvýšení rozpustnosti ve vodě, kterého může být docíleno zavedením polárních či ionizovatelných skupin do molekuly léčiva. Opačným případem je zvýšení lipofility mateřského léčiva, kterého dosáhneme zamaskováním přítomných polárních a ionizovatelných skupin. Vhodnými úpravami lze též ovlivnit biologický poločas léčiva, případně snížit (maskovat) jeho toxicitu. Pomocí proléčiv lze také cílit účinek léčiva do specifických tkání, kde je dále realizován uvolněním léčiva pomocí tkáňově specifické enzymatické aktivity.⁴¹

Podmínkou úspěchu proléčiva je, aby neaktivní část molekuly byla kovalentně navázaná, ale přesto byla jednoduše štěpitelná, například hydrolytickými reakcemi, a tak mohla jednoduše uvolnit vlastní biologicky aktivní látku, čehož musí být dosaženo v biologicky přiměřeném čase. Dalším kritériem je, aby nedocházelo k nežádoucím reakcím za fyziologických podmínek,⁴² ať již k nespecifické hydrolýze (např. pomocí esteráz obsažených v krevní plazmě), nebo k oxidativnímu či konjugativnímu metabolismu za účasti

enzymů z rodiny cytochromu P450. Samozřejmě žádná z částí molekuly proléčiva nesmí být toxická.⁴²

Mezi funkční skupiny, které jsou obvykle modifikovány, patří karboxylové kyseliny, aminy, hydroxyly a karbonyly. Karboxylové a hydroxylové skupiny bývají často modifikovány jako estery, které jsou schopné zamaskovat ionizované a polární funkční skupiny a tím umožnit léčivu prostup přes biologické membrány. K uvolnění mateřského léčiva poté dochází pomocí různých typů esteráz.⁴¹

Aminy jakožto bazické funkční skupiny, jsou za fyziologického pH obvykle protonované ve formě amoniového kationtu, který v důsledku náboje špatně prochází přes buněčnou (fosfolipidovou) membránu. Rovněž v případě primárních aminů pozorujeme tendenci k first-pass efektu. Aby byly tyto jevy potlačeny, bývají aminy modifikovány pomocí N-alkylace či N-acylace, případně jsou modifikovány jako Mannichovy a Shiffovy báze.⁴³

Mezi další modifikovatelné funkční skupiny mohou patřit guanidiny a amidiny. Jedná se o silně bazické skupiny, které budou za fyziologického pH ionizovány, což negativně ovlivňuje průchod léčiva přes membrány.⁴⁴ Zabránit protonaci a vzniku náboje na amidinu či guanidinu, lze takovou modifikací, která potlačí bazicitu těchto sloučenin – například zavedením oximové skupiny pomocí N-hydroxylace.⁴⁴ Vzhledem k zaměření této práce uvedu příklady některých oximových proléčiv podrobněji v následujícím textu.

3.7 Vybraná oximová prolečiva

Zavedení oximové skupiny pro vytvoření prolečiva bývá používáno s výhodou pro látky, které ve své struktuře nemají -OH, -COOH či -NH₂ skupinu.⁴¹ Jak již bylo zmíněno výše, příkladem mohou být léčiva obsahující amidiny a guanidiny,⁴¹ ale také třeba ketony,⁴⁵ přičemž uvolnění vlastního ketonu je zajištěno univerzálními mikrozomálními enzymy cytochromu P450.⁴¹

Příkladem, kdy je léčivo modifikováno na prolečivo oximovou skupinou může být gliclazid (schéma 9), který nachází uplatnění při léčbě onemocnění diabetes mellitus. Gliclazid samotný je jen velmi málo rozpustný ve vodě. Zavedením polární oximové funkční skupiny do struktury této molekuly dojde téměř až k stopadesátinásobnému zvýšení rozpustnosti oproti původní molekule.⁴⁶

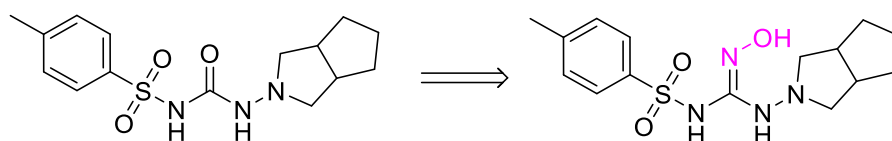


Schéma 9. Struktura původního léčiva gliclazidu a jeho oximového prolečiva.

Dalším příkladem je léčivo griseofulvin používané pro jeho antifungální vlastnosti na léčbu dermálních mykóz. Rovněž je testována biologická aktivita griseofulvinu a jeho analogů vůči linii nádorových buněk MDA-MB-231 způsobující karcinom prsu.⁴⁷ Problémem griseofulvinu, podobně jako v případě gliclazidu, je rovněž jeho nízká rozpustnost ve vodě. I zde lze zavedením oximové funkční skupiny (schéma 10), dosáhnout vyšší rozpustnosti.⁴⁸ Antifungální aktivita proti patogenům *Microsporium gypseum*⁴⁸, *Trichophyton rubrum*⁴⁷ a *Trichophyton mentagrophytes*⁴⁷ je však nižší než při použití griseofulvinu.^{47, 48} (*T. rubrum*: IC₅₀ griseofulvinu 0,38 μM, griseofulvinoximu 1,3 μM)⁴⁷.

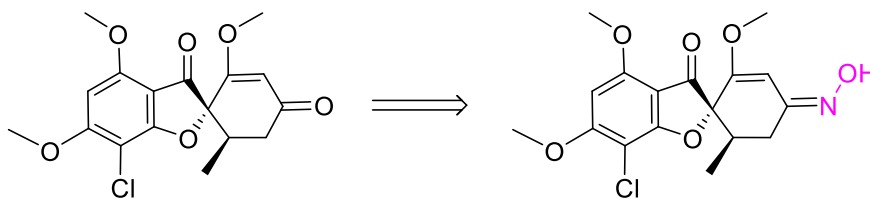


Schéma 10. Léčivo griseofulvin a jeho oximové prolečivo.

Posledním zde zmíněným příkladem jsou oximové deriváty některých β-adrenergických blokátorů (timolol aj.), které mohou fungovat též jako oftalmologika při léčbě zeleného zákalu. Oxidací alkoholu na keton a následným zavedením C=N-OH skupiny do molekuly β-adrenergického blokátoru (schéma 11) dojde ke ztrátě jeho systémové aktivity, čímž je

eliminován nežádoucí účinek na kardiovaskulární systém. Proléčivo je stabilní v systémovém oběhu a k jeho aktivaci dochází až pomocí enzymů exprimovaných v oční tkáni.⁴⁹

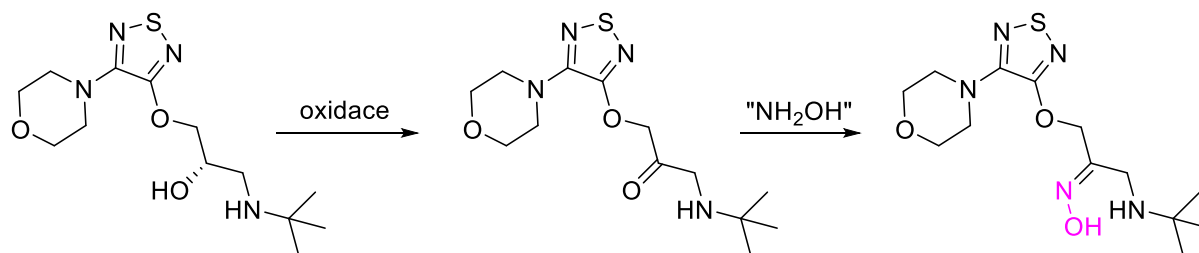
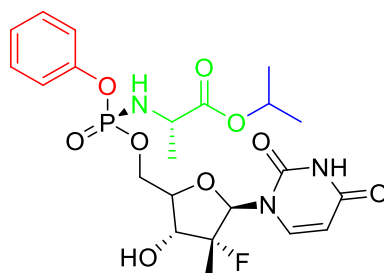


Schéma 11. Modifikace timololu na oximové proléčivo.

3.8 ProTide technologie

Označení ProTide vychází ze spojení pojmů „prodrug“ a „nucleotide“ – jedná se tedy o technologii využívanou zejména pro doručování nukleosidových analogů ve formě jejich nukleotidových proléčiv. Tato technologie je hojně využívána zejména v terapii virových onemocnění či nádorového bujení.⁵

Příkladem využití této technologie je komerčně dostupné léčivo sofosbuvir na němž bude ProTide technologie přiblížena. Jedná se o nukleosidové fosforamidátové proléčivo využívané při léčbě hepatitidy typu C působící inhibičně na virovou RNA polymerázu, čímž je zabráněno v syntéze virové RNA.⁵⁰



Obrázek 6. Struktura molekuly sofosbuviru. Barevně odlišený jednotlivé skupiny. (červeně – maskující arylová skupina, zeleně – maskující postranní řetězec = aminokyselina, modře – zbytek esteru aminokyseliny, černě – nukleosid monofosfát).

Pro dosažení požadované aktivity musí být nukleosidový inhibitor fosforylován na patřičný nukleosid trifosfát, přičemž připojení právě prvního fosfátu je nejpomalejším, a tedy rychlost určujícím krokem v tomto procesu. Proto je fosfát zaveden již jako součást proléčiva.⁵

Silný negativní náboj a polarita fosfátové skupiny však zabraňují účinnému transportu přes biologické membrány. Tento nedostatek je řešen maskováním náboje fosfátové skupiny ve formě esteru fenolu a fosforamidátu odvozeného od aminokyseliny L-alaninu. V případě

jiných nukleosidů lze využít k maskování fosfátové skupiny laktát, substituované fenoly či fosforamidáty odvozené od různých aminokyselin.⁵ Díky tomuto zamaskování se nukleosid fosfát stává neutrální a lipofilní molekulou, která prochází snadno do buňky. Uvnitř buňky jsou pak maskující skupiny odštěpeny, čímž se uvolní nukleotid, který je dále konvertován na aktivní léčivo ve formě příslušného nukleosid trifosfátu.⁵ Tento trifosforylovaný produkt sofosbuviru je začleněn do virové RNA jakožto „falešný“ nukleotid a tím dojde k ukončení syntézy virové RNA.⁵⁰

Mechanismus aktivace uvolnění léčiva zobrazuje schéma 12. Prvním krokem je hydrolyzáza esteru aminokyseliny. Touto reakcí je generováno nukleofilní činidlo (karboxylát), který v dalším kroku atakuje molekulu fosforu z fosfátové skupiny, přičemž tento proces doprovází odstoupení fenolu. Tím dojde k cyklizaci a vzniku nestabilního cyklického meziproductu A. Po cyklizaci dochází k opětovnému otevření kruhu nukleofilním atakem vody za vzniku fosforamidátu. Nakonec dojde k odštěpení aminokyseliny pomocí fosfoamidázy. To dá vzniku volnému monofosfátu, který již může být v buňce dále fosforylován na farmakologicky aktivní nukleosid trifosfát (schéma 12).⁵

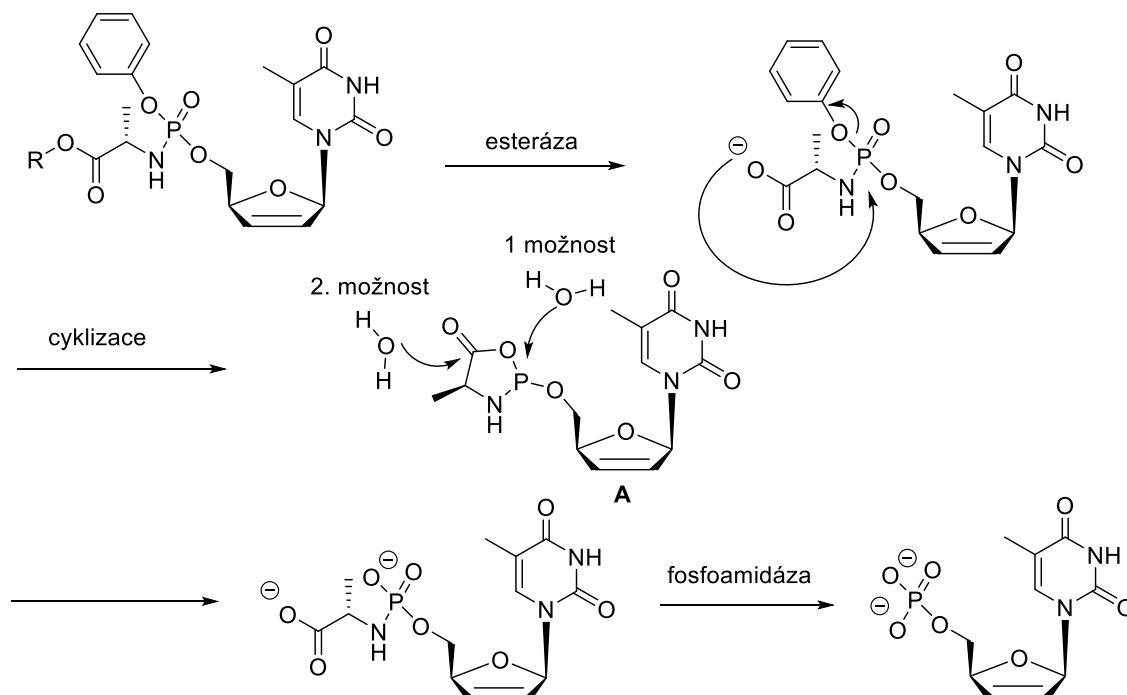
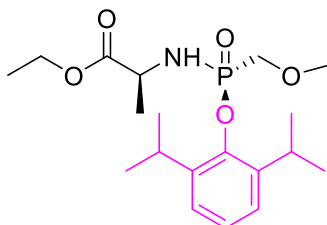


Schéma 12. Obecný mechanismus aktivace uvolnění léčiva. Převzato a upraveno.⁵

3.9 Využití efektu odstupující skupiny

ProTide technologii lze využít nejen na doručení nukleosidů, ale i jiných léčiv.⁵¹ Jak již bylo zmíněno v předchozích kapitolách, jako maskovací skupiny silného negativního náboje fosfátové skupiny mohou sloužit např. fenoly.⁵ Během cyklizace dochází k jejich odstoupení, a to tím ochotněji, čím je daný fenolický derivát kyslejší.⁵ V tomto přístupu lze jako odstupující skupinu využít právě fenolické léčivo, jako například propofol aj.⁵¹ (obrázek 7). V této práci je zkoušena možnost doručení jiné skupiny, a to oximu.



Obrázek 7. Fenolické léčivo propofol (růžová barva) modifikovaný fosforamidátem methoxy-methyl fosfonátu odvozeného od aminokyseliny L-alanin – (černá barva).

Pro pozorování uvolnění léčiva z molekuly proléčiva – lze využít sledování mechanismu a rychlosti aktivace v reálném čase pomocí ^{31}P NMR spektroskopie. Pro tento druh experimentu je výhodnější využít v prvním aktivačním kroku místo enzymatické hydrolyzy *in situ* fotoaktivaci příslušného fotolabilního derivátu pomocí UV záření. Jako fotolabilní substituent může být použit např. 4,5-dimethoxy-2-nitrobenzyl⁵² (schéma 13).

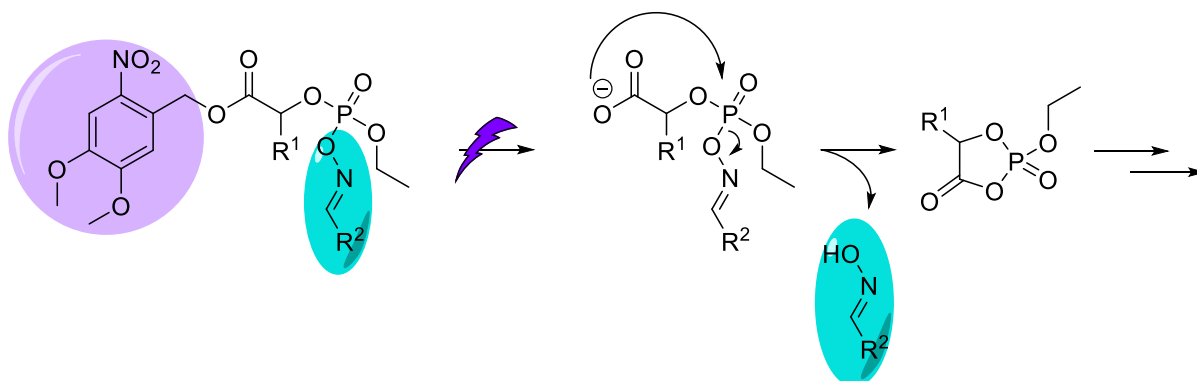


Schéma 13. Self-immolace pomocí fotoaktivace za odstoupení nejkyslejší skupiny.

4. Výsledky a diskuse

4.1 Syntetická strategie

Fosfoestery, fosforamidáty a další deriváty kyseliny fosforečné lze připravit reakcí příslušných fosforchloridátů s odpovídajícími alkoholy, aminy či dalšími nukleofily za bazických podmínek.⁵³ Pro přípravu požadovaných modelových proléčiv lze tedy využít syntetických cest zobrazených ve schématu 14. První metoda je ve schématu označena jako metoda A. Jedná se o nukleofilní substituci chloru v dichlorfosfátu (**a**) oximem (**b**) za vzniku monochloridátu (**c**).⁵⁴ V dalším kroku tento oxim-chlorfosfát (**c**) reaguje s esterem α -hydroxy kyseliny (**d**) (opět nukleofilní substituce) za vzniku příslušného modelového proléčiva (**f**). Alternativním postupem je záměna pořadí jednotlivých kroků, tedy příprava fosfochloridátu (**e**) reakcí esteru α -hydroxy kyseliny (**d**) s dichlorfosfátem (**a**) (metoda B). Fosfochloridát (**e**) lze dále použít bez čištění a izolace v dalším reakčním kroku, kdy reaguje s příslušným oximem (**b**) za vzniku modelových proléčiv (**f**).

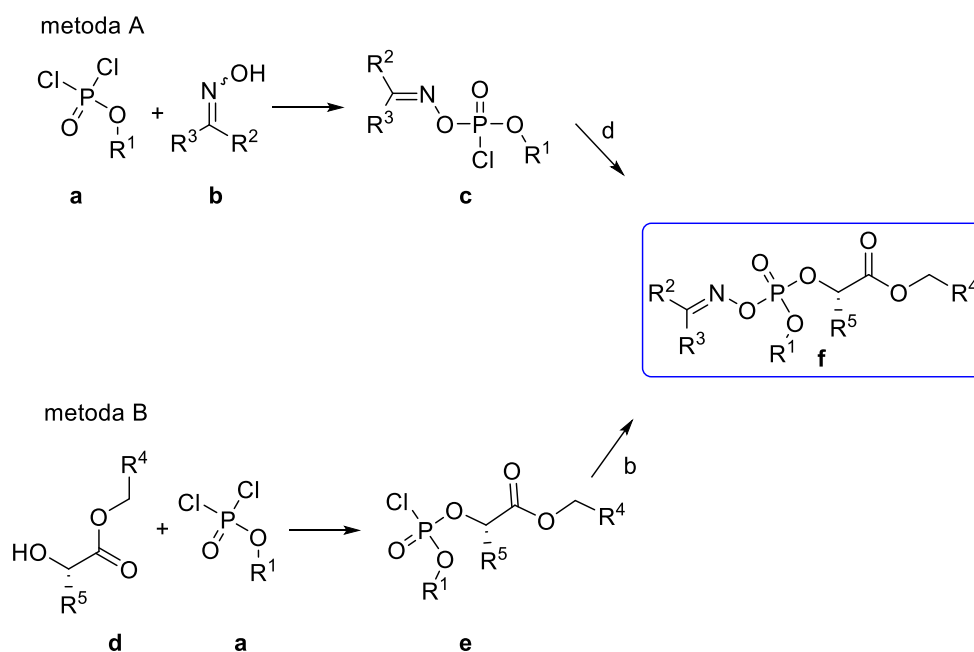


Schéma 14. Znázornění dvou možných reakčních cest vedoucích k požadovaným esterům kyseliny fosforečné

4.2 Příprava výchozích látek

Pro syntézu modelových sloučenin a vlastních proléčiv, tak jak je naznačeno ve schématu 14, bylo potřeba nejprve syntetizovat některé výchozí oximy a estery α -hydroxykyselin. O metodách přípravy těchto sloučenin pojednává následující text.

4.2.1 Oximy 4 a 6

V rámci této práce byl připraven acetofenonoxim (4) a griseofulvinoxim (6). Cyklohexanonoxim (1) a *p*-methoxyacetofenonoxim (2) byly získány z komerčních zdrojů. Acetofenonoxim (4) byl připraven podle literárního postupu⁵⁵ reakcí acetofenonu (3) s hydroxylaminem hydrochloridem v přítomnosti octanu sodného ve směsi ethanolu a vody (1:3) za refluxu (schéma 15). Rekrystalizace surového produktu z ethanolu vedla ke vzniku oximu 4 ve vysokém výtěžku 82 %.

Griseofulvinoxim (6), byl získán reakcí griseofulvinu (5) s hydroxylaminem hydrochloridem podle literárního postupu⁵⁶ (schéma 15). Flash chromatografie na silikagelu poskytla griseofulvinoxim (6) v dobrém výtěžku 75 %.

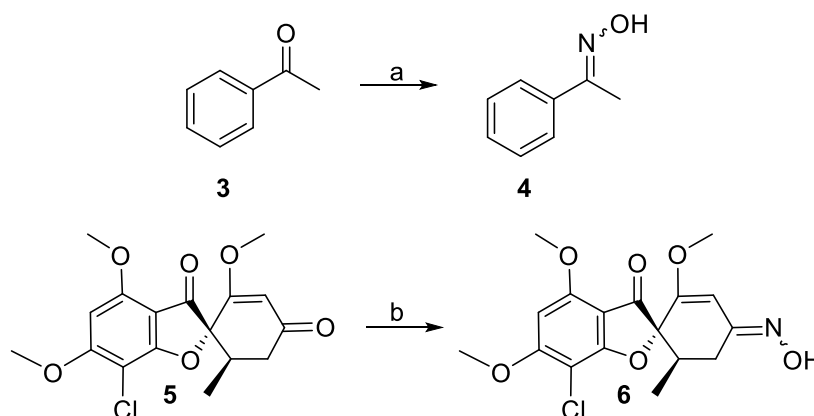


Schéma 15. Příprava oximů 4 a 6. a) $\text{NH}_2\text{OH}\cdot\text{HCl}$, EtOH , NaOAc , H_2O , reflux. 82 % (4). b) $\text{NH}_2\text{OH}\cdot\text{HCl}$, EtOH , NaOAc , reflux 75 % (6).

4.2.2 Fotoaktivovatelné estery α -hydroxykyselin 9, 10 a 11

V rámci této práce byly připravovány tři estery odvozené od L-mléčné, (*S*)-isopropylglykolové a glykolové kyseliny obsahující fotolabilní 4,5-dimethoxy-2-nitrobenzylový (DMNB) substituent. Tyto estery byly připraveny za účelem syntézy modelových fotoaktivovatelných proléčiv.

Ester 9 byl připraven podle literárního postupu⁵⁷ esterifikací DMNB alkoholu 7 s L-laktátem (8a) v toluenu za varu a katalýzy TsOH (schéma 16). Pro posun rovnováhy směrem k produktu byla vznikající voda odstraňována pomocí Dean-Starkovy aparatury. Reakční směs byla v tomto uspořádání míchána přes noc. Zmíněný postup poskytl surový produkt, který byl čištěn chromatografií na normální a následně na reverzní fázi, což poskytlo ester 9 s výtěžkem 34 %.

Za účelem získání derivátu s rychlejším průběhem self-immolace (Thorpe Ingoldův efekt)⁵² byl připraven stéricky náročnější ester 10. Ester 10 byl připraven reakcí kyseliny 8b

s DMNB alkoholem **7** podle literárního postupu⁵⁷. Izolace produktu byla provedena flash chromatografií na normální fázi následovanou chromatografií na reverzní fázi. Ester **10** byl získán s výtěžkem 54 %.

Pokus o přípravu esteru **11** byl motivován snahou o získání derivátu s nižší stericou náročností oproti esteru **9**, resp. **10**, čímž by bylo dosaženo pomalejšího průběhu self-immolace. Ester **11** byl taktéž připravován podle literatury⁵⁷ reakcí DMNB alkoholu **7** a kyseliny glykolové (**8c**). Výsledkem reakce byla však podle TLC velice komplikovaná směs, ze které se nepodařilo produkt izolovat.

Je známo, že v případě α -hydroxykyselin může docházet k homopolymeračním reakcím.⁵⁸ Z výsledků provedených reakcí lze pozorovat korelaci mezi stericou náročností použité kyseliny a výtěžky připravovaných esterů. V případě kyseliny **8b** byl výtěžek nejvyšší (54 %), neboť díky její stericé náročnosti je tato kyselina méně ochotná k homopolymeraci. V případě kyseliny **8a**, jejíž stericé nároky nejsou už tak vysoké jako v předchozím případě, pozorujeme nižší výtěžek (34 %). Při použití stericou nejméně náročné α -hydroxykyseliny **8c** se již produkt esterifikace nepodařilo izolovat.

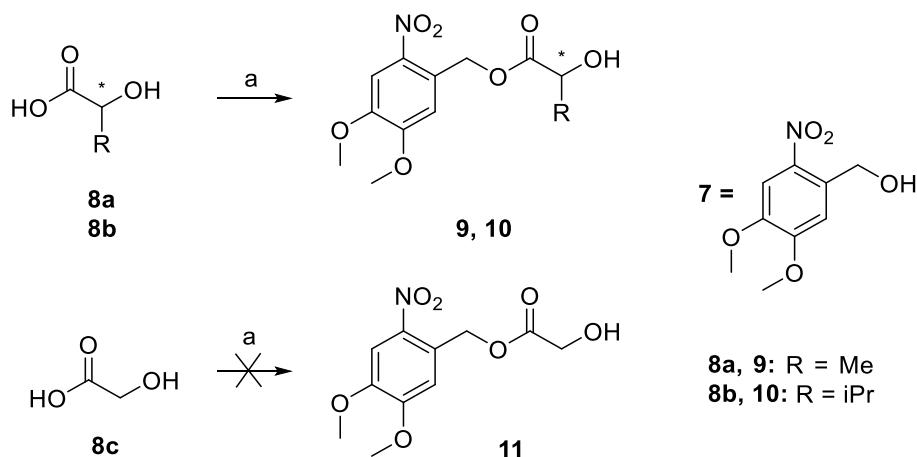


Schéma 16. Příprava esterů **9**, **10** a **11**. a) **7**, TsOH, reflux, toluen. 34 % (**9**), 54 % (**10**), ester **11** se nepodařilo izolovat.

4.3 Příprava modelových proléčiv **17**, **18**, **21** a **22**

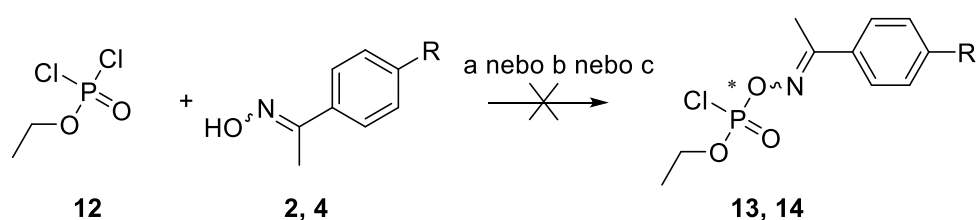
Přípravu modelových proléčiv **17**, **18**, **21** a **22** lze uskutečnit sekvenční reakcí diethylchlorfosfátu **12** s příslušnými nukleofily **2** a **4**, resp. **9** a **13**, přičemž reakce vede přes monochloridáty **13** a **14**, resp. **16** a **19** jakožto meziproducty. Principiálně lze využít dvou postupů, u nichž se liší pořadí přidavku nukleofilů k dichlorfosfátu (metody A a B, kapitola 4.1).

Všechna modelová proléčiva **17**, **18**, **21** a **22** byla získána jako směs dvou diastereomerů lišících se konfigurací na atomu fosforu. V případě modelových proléčiv **18**, **22**

se navíc jednalo o směs E/Z izomerů. Vznik diastereomerů vychází z chirálních center označených v jednotlivých schématech. V důsledku relativně nízké stability těchto produktů nebylo možné od sebe jednotlivé diastereomery odseparovat. Posuny signálů v ^{31}P , ^1H a ^{13}C NMR spektrech však souhlasily s očekávanými posuny u všech připravených látek. Spektra jsou ovšem v důsledku překryvů jednotlivých izomerů značně komplikovaná a mnohdy není možné stanovit multiplicitu signálů. Další potvrzení struktury bylo provedeno pomocí hmotnostní spektrometrie s vysokým rozlišením a také pomocí 2D NMR spekter.

4.3.1 Příprava intermediálních monochloridátů **13**, **14**, **16** a **19**

Pokus o přípravu intermediálních oxim-chlorfosfátů **13** a **14** (metoda A) vycházel z reakce oximů **2** a **4** s ethyl-dichlorfosfátem (**12**) v přítomnosti báze (schéma 17). Reakce byly provedeny v suchých rozpouštědlech za různých reakčních podmínek, jak je znázorňuje schéma 17.



4, 13: R = H
2, 14: R = OMe

Schéma 17. Příprava intermediátů **13** a **14**. Reakční podmínky: a) NaH, $0 \rightarrow 50$ °C, PhMe. b) Et_3N , $0 \rightarrow 50$ °C, PhMe. c) Et_3N , $0 \rightarrow 25$ °C, DCM.

U reakcí provedených v toluenu byl použit poměr výchozích látek oximu ku ethyl-dichlorfosfátu (**12**) 1,15:1 v souladu s literaturou.⁵⁴ Ačkoliv literatura⁵⁴ popisuje vznik oxim-chlorfosfátu ze sodné soli oximu, podle ^{31}P NMR spekter reakční směsi nevedlo použití NaH k požadovaným produktům **13** a **14**. Reakce oximu **2** v přítomnosti Et_3N také nevedla k požadovanému produktu **14**.

Nahrazení suchého toluenu za suché DCM, snížení reakční teploty, a použití nadbytku ethyl-dichlorfosfátu (**12**) vůči výchozímu oximu (2,5 ekv.), podle literárního postupu⁵⁹ rovněž nevedlo k produktu **14**.

Podle komplikovaných ^{31}P NMR spekter reakčních směsí, nelze jednoznačně určit k čemu během těchto reakcí došlo. Vzhledem ke struktuře výchozích látek je možné spekulovat o vícenásobném připojení oximu, neboť dochází k reakci silného nukleofilu s molekulou, v jejíž struktuře jsou přítomné dvě odstupující skupiny. Možnou konkurenční reakcí je také Beckmannův přesmyk, katalyzovaný dichlorfosfátem **12** (schéma 18).⁶⁰ Reakce

byla provedena s 1 ekv. báze a literatura⁶⁰ uvádí, že 1 ekv. báze vůči výchozímu fosfátu **12** je dostačující pro potlačení Beckmannova přesmyku.

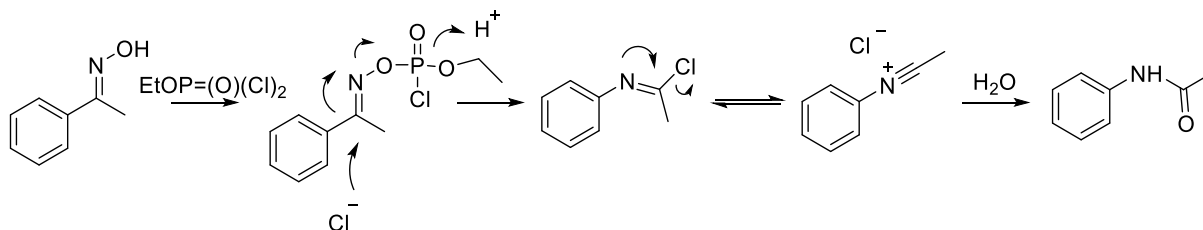


Schéma 18. Mechanismus Beckmannova přesmyku, který je katalyzován ethyl-dichlorfosfátem (**12**). Převzato a upraveno.⁶⁰

Ačkoliv by pravděpodobně změna reakčních podmínek (jako například reakční teploty, rozpouštědel či poměru ekvivalentů výchozích látek) mohla poskytnout požadované produkty, byla pro syntézu modelových proléčiv zvolena metoda B (kapitola 4.1, schéma 14). V rámci této metody je také potlačena možnost hypotetické katalýzy Beckmannova přesmyku, neboť s ním oxim přímo nereaguje.

Při použití syntetického postupu B vznikaly intermediáty **16** (kapitola 4.3.2, schéma 19) a **19** (kapitola 4.3.3, schéma 20). Vzhledem k jejich vysoké reaktivitě nebyly tyto látky izolovány, ale pouze „předčištěny“ pomocí extrakce destilovanou vodou, neboť případný nedoreagovaný dichlorfosfát **12** je během extrakce hydrolyzován na diethyl-pyrofosfát, který ochotně přechází do vody. Průběh reakcí vedoucí k těmto intermediátům byl monitorován pomocí ³¹P NMR spektroskopie reakční směsi. Vzhledem k tomu, že výchozí fosfát **12** je prochirální, byly monochloridáty **16** a **19** získány jako směs dvou diastereomerů, čemuž odpovídaly i ³¹P NMR spektra získaných látek. Stereoizomerie látek **16**, **19** je důsledkem přítomnosti stereogenního centra (ve schématech 19 – 22 vyznačena hvězdičkou) na atomu uhlíku a fosforu. Vzhledem k reaktivitě získaných látek **16** a **19** nebylo možné od sebe jejich diastereomery separovat a pro následující reakce tak byla použita jejich směs.

4.3.2 Příprava enzymaticky aktivovatelných modelových proléčiv **17** a **18**

Reakcí intermediátu **16** s oximy **1** a **4** byla získána enzymaticky aktivovatelná modelová proléčiva **17** a **18** (schéma 19). Vedlejší produkt reakce, triethylamonium chlorid byl od produktů **17** a **18** oddělen srážením pomocí THF a následnou filtrací. Tento postup byl zvolen s ohledem na možnost hydrolyzy produktů **17** a **18** v případě extrakce vodou.

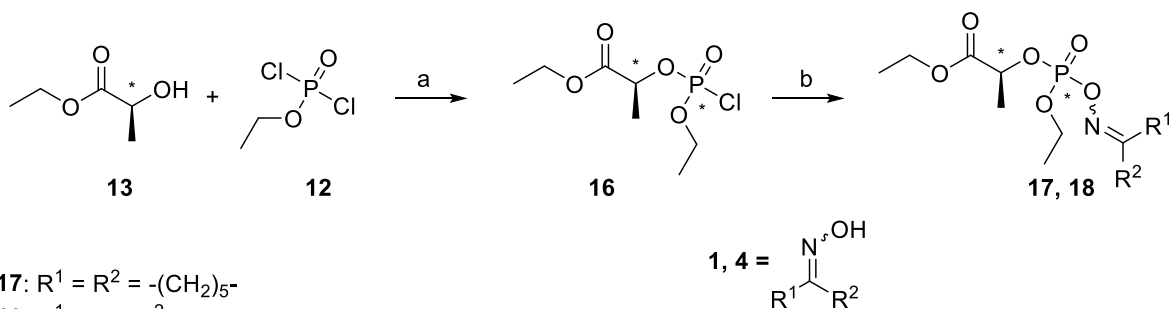
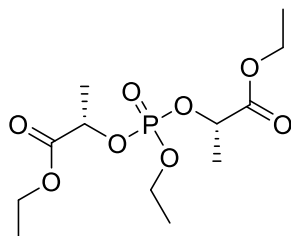


Schéma 19. Příprava intermediárního monochloridátu **16** a jeho následná reakce s oximy **1** a **4** vedoucí k modelovým proléčivům **17** a **18**. a) Et₃N, PhMe, 25 °C. b) **1** nebo **4**, Et₃N, DCM, 25 °C. 11 % (**17**); 7 % (**18**).

Měření ³¹P NMR spektra surového produktu **17** bylo z počátku provedeno v CDCl₃. Za těchto podmínek měření byl ve ³¹P NMR spektru zpozorován signál o nízké intenzitě, který nenáležel produktu (δ -1,33 ppm). Pravděpodobně se mohlo jednat o rozkladný produkt látky **17** způsobený stopami HCl ve starší lahvičce CDCl₃. Při opakovaném měření v CDCl₃ neutralizovaném uhličitánem draselným nebyl žádný takový signál nalezen. Ke stejnému závěru jsem totožným postupem došla i v případě surového produktu **18**.

Z tohoto důvodu byly pro izolaci produktů **17** a **18** pomocí flash chromatografie využity metody zahrnující např. neutralizaci kolony. Čištění látek **17** a **18** bylo vzhledem k nestabilitě těchto sloučenin v kyselém a patrně i vodném prostředí obecně velice náročné. Některé techniky separací jako například chromatografie na reverzní fázi proto nebylo vhodné použít. Vyzkoušené metody separací zobrazuje tabulka 1.

V případě obou sloučenin **17** i **18** byla jednou z původních nečistot látka znázorněná na obrázku 8. Tento vedlejší produkt pochází již z prvního kroku syntézy a jedná se o produkt dvojité substituce na ethyl-dichlorofosfátu ethyl-L-laktátem. Struktura nečistoty byla potvrzena porovnáním ³¹P NMR spektra proti připravenému standardu.



Obrázek 8. Struktura vzniklé nečistoty při přípravě látek **17** a **18**.

Produkt	Mobilní fáze	Kolona	Grad.	Poznámka k metodě	Výsledek
17	Hex:EtOAc	SiO ₂	0-70 %	Surová reakční směs byla nanesena na kolonu	Látku 17 se nepodařilo vyčistit.
17	Hex:EtOAc	SiO ₂	5-85 %	K mobilní fázi přidáno Et ₃ N (1 %).	Nové signály ve ³¹ P NMR oproti surovému produktu.
17	Hex:EtOAc	SiO ₂	0-40 %	Kolona byla zneutralizována bazí – DIPEA.	Látku 17 se nepodařilo vyčistit.
17	Hex:EtOAc	Al ₂ O ₃	0-33 %	-	Produkt 17 se podařilo vyčistit.
18	Hex:EtOAc	SiO ₂	0-100 %	Surová reakční směs byla nanesena na kolonu.	Látku 18 se nepodařilo vyčistit.
18	Hex-EtOAc	SiO ₂	0-70 %	K mobilní fázi přidáno Et ₃ N (1 %).	Nové signály ve ³¹ P NMR oproti surovému produktu.
18	Hex:EtOAc	Al ₂ O ₃	0-33 %	-	Produkt 18 obsahoval drobné nečistoty. Hlavní nečistoty byly odděleny.

Tabulka 1. Vyzkoušené metody separace pro purifikaci produktů 17 a 18.

4.3.3 Příprava fotoaktivovatelných modelových proléčiv 21, 22 a 25

Pro přípravu látek 21 a 22 byly jako výchozí látky použity fotoaktivovatelný DMNB ester 9 a dichlorfosfát 12 (schéma 20). Reakce těchto sloučenin podle literárního postupu⁶¹ poskytla monochloridát 19, který následně reagoval s oximy 1 a 4, čímž se podařilo připravit deriváty 21 a 22 (schéma 20).

K čištění produktu 21 byla využita chromatografie na reverzní fázi. Již po první chromatografii na reverzní fázi se ve ³¹P NMR spektru objevily dva nové signály δ 1,59 a

1,04 ppm, které se dalšími separacemi nepodařilo od produktu oddělit. Po poslední chromatografii (opět na reverzní fázi) byla intenzita těchto signálů ještě vyšší. Lze se tedy domnívat, že tyto signály mohou příslušet produktu vzniklému reakcí vody se sloučeninou **21**. Tato domněnka byla následně potvrzena, a to rozpuštěním sloučeniny **21** ve vodě a změřením ^{31}P NMR. Ve spektru bylo možné pozorovat výrazné snížení intenzit signálů náležících produktu **21**. Intenzity dvou signálů patřící diskutovanému vedlejšímu produktu se naopak výrazně zvýšily.

Poté co byla sloučenina **21** cíleně převedena na diskutovaný vedlejší produkt, bylo změřeno LC-MS. Hodnoty nejintenzivnějších píků byly 394, 425 a 439 [m/z]. Dále bylo zjištěno, že tento vedlejší produkt obsahoval DMNB skupinu (je fotosenzitivní). Z naměřených NMR spekter bylo také zřejmé, že se jedná o sloučeninu s chirálním fosforem (dva signály v ^{31}P NMR). Posun signálů v kladných hodnotách může naznačovat možnou migraci dusíku na fosfor. Toto tvrzení se ale nepodařilo dokázat. Zastoupení uvedeného vedlejšího produktu po poslední chromatografii bylo na základě intenzit signálů ve ^{31}P NMR spektru určeno jako cca 15 %.

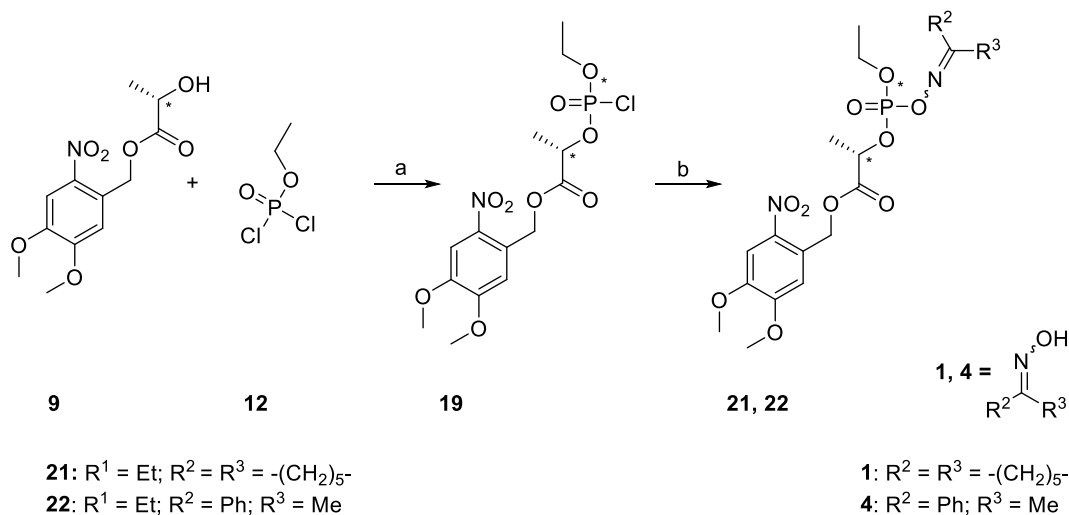


Schéma 20. Příprava fotoaktivovatelného intermediárního monochloridátu **19** a jeho reakce s oximy **1** a **4**. a) Et_3N , PhMe , 25°C , b) **1** nebo **4**, Et_3N , DCM , 25°C . 6,2 % (**21**), 24 % (**22**).

I v případě produktu **22** bylo vyzkoušeno několik metod chromatografií, mezi které patřily: a) separace na silikagelu, hex:EtOAc, grad. 0-100 % následovaná chromatografií na reverzní fázi, b) chromatografie na silikagelu zneutralizovaném bází – DIPEA s použitím mobilní fáze hex:EtOAc grad. 0-50 %, c) separace na alumině s mobilní fází hex:EtOAc grad. 0-40 %. Žádná z použitých metod však nevedla ke zcela čistému produktu **22**. Jako nejúčinnější metoda se jevila separace na alumině, avšak výtěžek po této chromatografii byl zhruba pouhých 1,5 mg. Pro ověření struktury látky **22** se podařilo získat pouze HRMS.

V případě nepřečištěného produktu bylo dále opakovaným měřením ^{31}P NMR v CDCl_3 zjištěno, že produkt **22** se v průběhu času (8 h) zcela rozpadá. Vysvětlením může být nestabilita vůči vodě či změnám pH (stopy kyseliny ve starší lahvičce CDCl_3).

Dále byl připravován fotoaktivovatelný produkt **25** a to ze stéricky náročnějšího esteru **10** (schéma 21). Nepodařilo se však získat potřebný intermediát **23**, kdy vzhledem ke stérické náročnosti alkoholu **10** reakce neproběhla, a to ani při přidání více ekvivalentů báze.

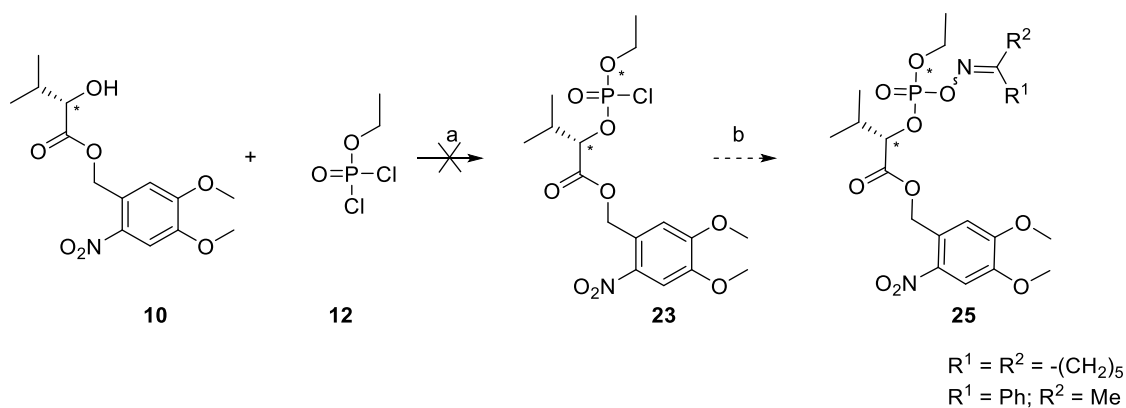


Schéma 21. Příprava intermediárního monochloridátu **25** a) Et_3N , PhMe , $25\text{ }^\circ\text{C}$. Produkt **25** nevznikl, patrně vzhledem ke stérické náročnosti alkoholu.

4.4 Příprava proléčiva griseofulvinu

Během optimalizace metodiky přípravy modelových self-immolativních fosfátových proléčiv bylo přistoupeno k syntéze proléčiva griseofulvinoximu (**6**) (schéma 22). Sloučenina **26** byla získána reakcí griseofulvinoximu (**6**) s monochloridátem **19** pod inertní atmosférou v suchém DCM v přítomnosti Et_3N . Surový produkt byl přečištěn chromatografií. Jelikož je látka **26** směsí dvou E/Z izomerů, z nichž každý je navíc zastoupen dvojicí diastereomerů, je poněkud obtížné určit čistotu produktu na základě NMR. Interpretace těchto NMR spekter je extrémně komplikovaná a nad rámec této bakalářské práce. Struktura produktu **26** však byla potvrzena pomocí hmotnostní spektrometrie s vysokým rozlišením.

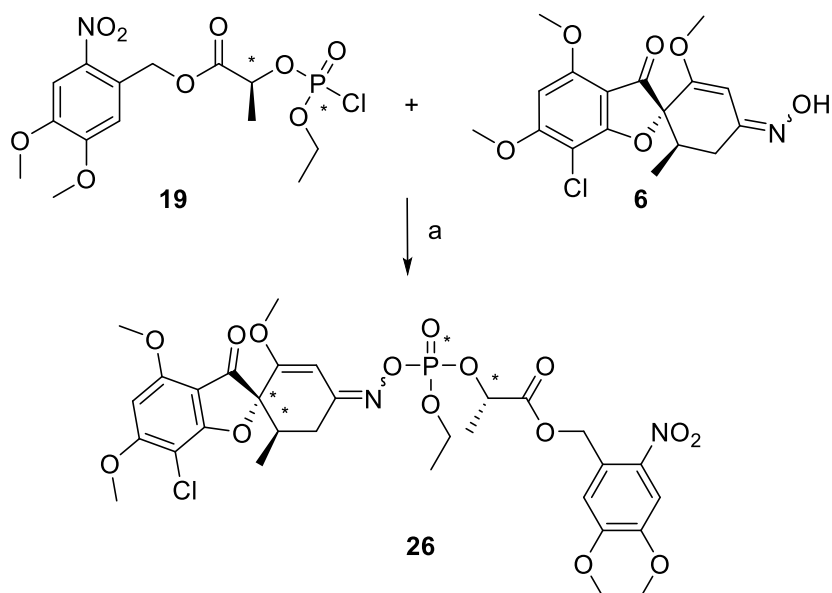


Schéma 22. Příprava proléčiva **26**. a) Et_3N , DCM, 25 °C.

4.5 Fotoaktivace

Pojem fotoaktivace byl již zmíněn v kapitole 3.9, jakožto nástroj pro monitorování průběhu self-immolační reakce.

Měření self-immolace látky **21** bylo provedeno RNDr. Eliškou Procházkovou, Ph.D. na ÚOCHB. Pro tento experiment byl použit produkt **21**, který byl kontaminován vedlejším produktem vzniklým reakcí vody s látkou **21** (viz kapitola 4.3.3). Z obrázku 9A můžeme vidět, že před ozařováním jsou přítomny dva signály odpovídající diastereomernímu produktu **21**, $\delta -0.81$ a 1.13 ppm (stereogenní centrum na fosforu). Po 15 min. ozařování *in situ* (obrázek 9A) byl pozorován vznik dvou nových signálů odpovídajících intermediátu **I** $\delta -0.68$ a -1.05 ppm, který vznikl odštěpením DMNB skupiny. Intenzita signálů intermediátu **I** se nadále zvyšovala na úkor signálů produktu **21**, a to až do zcela úplného vymizení signálů sloučeniny **21**. Ve 45. minutě bylo možno pozorovat i signály příslušící vedlejšímu produktu $\delta 1,85$ a $1,33$ ppm.

Obrázek 9B znázorňuje ozařování *ex situ*, s použitím desetinásobné koncentrace látky **21** oproti předchozímu případu 9A. Před ozařováním v obrázku 9B vidíme dva intenzivní signály, které náležejí látce **21** $\delta -0.81$ a 1.13 ppm, dva signály v kladných hodnotách náležící vedlejšímu produktu $\delta 1,85$ a $1,33$ ppm, a jeden signál náležící produktu hydrolyzy **hP** $\delta -1,48$, který vznikl pravděpodobně vlivem hydrolyzy látky **21** v cacodylátového pufru.

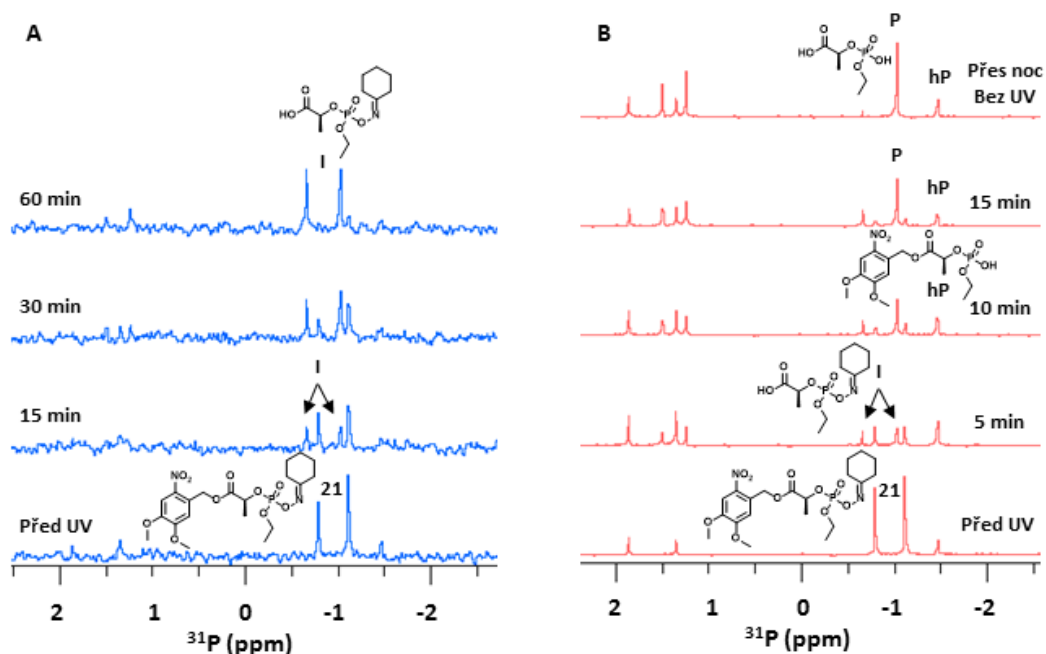
Během ozařování lze pozorovat vznik nových signálů, a to jak u dvojice signálů náležící vedlejšímu produktu, tak u dvojice signálů sloučeniny **21** (5. minuta). Tento jev ukazuje, že i vedlejší produkt je fotosenzitivní a ve své struktuře obsahuje DMNB. Pokud se

budeme dále soustředit pouze na signály sloučeniny **21** δ -0.81 a 1.13 ppm, můžeme z následujících měření pozorovat postupné snižování jejich intenzity, a to až do jejich vymizení. Současně s tím dochází ke zvýšení intenzity signálů produktu **P** δ -1,04. Vznik tohoto produktu **P** dokazuje, že během ozařování došlo ke kýženému odpadnutí oximu.

Struktura produktu **P** i produktu hydrolyzy **hP** byla ověřena pomocí HRMS (tabulka 2). Strukturu vedlejšího produktu se nepodařilo identifikovat, ale byly o ni zjištěny některé strukturní rysy.

název:	vypočteno:	nalezeno:
hP	C ₁₄ H ₁₉ O ₁₀ NP jako 392,07521	392,07452.
P	C ₅ H ₁₀ O ₆ P jako 197,02205	197,02196

Tabulka 2. Data získaná z HRMS pro produkt **P** a produkt hydrolyzy **hP**.



Obrázek 9. Série ³¹P NMR spekter látky **21** měřených ve směsi 50% CACO/DMSO před a po ozařování UV světlem (365 nm, 25 °C). A) 0.5 mM **21** s in situ ozařováním. B) 5 mM **21** s ex situ ozařováním. Struktura finálního produktu **P** a produktu hydrolyzy **hP** byla určena porovnáním ³¹P spekter s literaturou.⁶¹

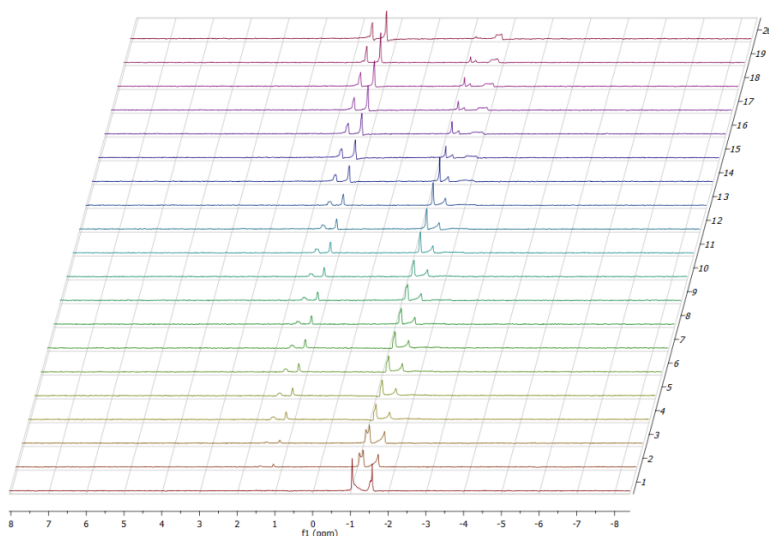
4.6 Stabilita látky **17** za fyziologického pH

Jelikož základním požadavkem na proléčivo je jeho stabilita za fyziologických podmínek, resp. jeho schopnost za požadovaných podmínek uvolnit léčivo, bylo potřeba ověřit stabilitu připravených modelových proléčiv. Stabilita těchto sloučenin byla ověřována za různých podmínek: 1) stabilita v roztoku běžného protického rozpouštědla (MeOH,); 2)

stabilita při fyziologickém pH = 7.4 (cacodylátový pufr nebo HEPES pufr,); 3) stabilita za bazických podmínek.

Sloučenina **17** byla po rozpuštění v MeOH stabilní po dobu minimálně 2 h. V cacodylátovém pufru (pH = 7,4) bylo z ^{31}P NMR spektra již po prvním měření evidentní, že došlo k hydrolyze modelové sloučeniny **17**. V ^{31}P NMR spektru byl pozorován pouze jeden signál $\delta -1,17$ ppm odpovídající hydrolytickému produktu **hP** látky **17**.

Produkt **17** byl také měřen v HEPES pufru o pH = 7,4 (obrázek 10). V tomto případě byl pozorován vznik dvou nových signálů v kladných hodnotách δ 1,55 a 1,21 ppm. Intenzity nově vzniklých signálů se v čase zvyšovaly na úkor signálů produktu **17**. Vzhledem k tomu, že se jedná o dvojici signálů, je zřejmé, že nenáleží produktu hydrolyzy. Obrázek 10 zobrazuje měření probíhající po dobu jednoho týdne (intervaly mezi jednotlivými měřeními nejsou ekvidistantní).



Obrázek 10. Průběh měření ^{31}P NMR spekter produktu **17** v čase za účelem monitorování stability produktu **17** v HEPES pufru o pH = 7,4 simulující fyziologické pH.

Dále byl zkoumán vliv bazického prostředí na látku **17**. K látce **17** byl přidán HEPES pufr o pH = 9. Pufr byl následně od směsi odseparován pomocí extrakce s DCM. Měření ^{31}P NMR organické fáze ukázalo, že došlo k velmi rychlé a úplné konverzi na neznámou látku se signály δ 1,47 a 1,18 ppm. Signály se stejným posunem byly pozorovány i v případě surového produktu **17** měřeného v DMSO. Dále byly tyto hodnoty posunů pozorovány i v případě produktu vzniklého v HEPES pufru o pH = 7,4 a to po extrakci s DCM, která sloužila k izolaci látky z pufru. Lze tedy spekulovat o tom, že vznik neznámé látky s posunem δ 1,47 a 1,18 ppm může být katalyzován bazickými podmínkami. Ze změřených NMR spekter lze usuzovat, že látka s těmito posuny ve své struktuře již neobsahuje cyklohexanonoxim. Z časových důvodů nebyla další charakterizace neznámé látky provedena.

5. Experimentální část

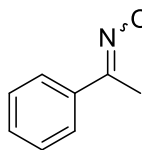
5.1 Obecné postupy a chemikálie

Komerčně dostupné chemikálie byly zakoupeny z běžných zdrojů (Sigma Aldrich, Penta, Merck, Fluorochem Ltd. UK, TCI-Europe) a jako takové byly bez dalšího čištění použity. Použitá suchá rozpouštědla byla taktéž zakoupena z již zmíněných komerčních zdrojů. Pro reakce, kde nebylo třeba použít suchých rozpouštědel, byla použita destilovaná rozpouštědla. Pro odpaření rozpouštědel byla použita rotační vakuová odparka. Dosušení produktů bylo provedeno pomocí olejové pumpy. Reakce, které vyžadovaly práci za inertních podmínek, byly provedeny pod atmosférou argonu. Pro monitorování průběhu reakcí byly využity TLC destičky Merck silikagel 60 F₂₅₄. K vyhodnocení TLC byla použita UV lampa o vlnové délce záření $\lambda = 254$ a 365 nm s následným vyvoláním pomocí roztoku manganistanu draselného a zahřátím horkovzdušnou pistolí. Flash chromatografie byly provedeny na přístroji od firmy ECOM s.r.o a jako stacionární fáze byl použit silikagel 60 (40 – 63 μm), C18 silikagel (C18 Lichroprep RP-18, 40 – 63 μm) či alumina (neutral Brockmann I, 50 – 200 μm).

Měření NMR spekter bylo provedeno na Bruker Avance III spektrometru s frekvencí 400 MHz pro ¹H, tedy 101 MHz pro ¹³C a 161 MHz pro ³¹P. Získaná spektra byla zpracována v programu MestReNova a chemické posuny byly referencovány na použité rozpouštědlo (CDCl₃ ¹H δ 7,26 a ¹³C δ 77,00). Měření hmotnostních spekter s vysokým rozlišením bylo provedeno na spektrometru LTQ orbitrap XL (Thermo Fisher Scientific) s použitím ionizace elektrosprejem či pomocí ionizace za atmosférického tlaku. Pro ozařování vzorků byla použita LED dioda (Thorlabs, Germany) o vlnové délce záření $\lambda = 365$ nm. Vzorek byl ozařován přímo v NMR kyvetě během měření pomocí multimode silica optického vlákna s 1 mm průměrem, 0.39 NA (Thorlabs, Germany).

5.2 Příprava výchozích látek pro syntézu self-immolativních spojek

Acetofenonoxim (4)

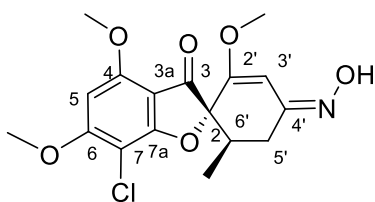


V roztoku acetofenonu (3) (1,2 ml, 10 mmol, 1 ekv.) v EtOH (10 ml) a destilované vodě (30 ml) byl rozpuštěn $\text{NH}_2\text{OH}\cdot\text{HCl}$ (1,04 g, 15 mmol, 1,5 ekv.) a NaOAc (2,05 g, 25 mmol, 2,5 ekv.). Vzniklá směs byla za refluxu míchána dvě hodiny. Následně byla provedena rušená krystalizace. Vzniklé krystaly byly odfiltrovány od matečného roztoku. Jejich následná rekrystalizace z EtOH poskytla produkt jako bílé krystaly s výtěžkem 1,11 g (82,1 %).

$^1\text{H NMR}$ (400 MHz, CDCl_3 , 25 °C): δ 7,65–7,61 (m, 2H); 7,41–7,36 (m, 3H); 2,30 (s, 3H).

$^{13}\text{C NMR}$ (101 MHz, CDCl_3 , 25 °C): δ 156,15; 136,54; 129,23; 128,49; 126,04; 12,12.

Griseofulvinoxim (6)

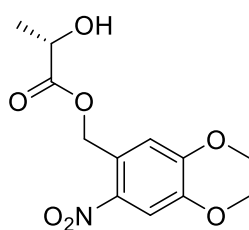


Griseofulvin (5) (352 mg, 1 mmol, 1 ekv.) byl za inertní atmosféry Ar rozpuštěn v suchém EtOH (16 ml). K rozpuštěnému griseofulvinu (5) byl přidán $\text{NH}_2\text{OH}\cdot\text{HCl}$ (208 mg, 3 mmol, 3 ekv.) a suchý NaOAc (246 mg, 3 mmol, 3 ekv.). Reakční směs byla míchána za refluxu tři hodiny. Směs ochlazená na laboratorní teplotu byla naředěna DCM (30 ml) a extrahována destilovanou vodou (40 ml) a solankou (20 ml). Organická fáze byla oddělena a vysušena Na_2SO_4 . Dále následovala filtrace Na_2SO_4 a odpaření rozpouštědla na RVO. Čištění pomocí flash chromatografie na normální fázi (SiO_2 , hexan/EtOAc, grad. 0-100 %) poskytlo produkt jako bílo-narůžovělou pevnou látku s výtěžkem 274 mg (74,6 %).

Pozn. Směs stereoizomerů E/Z v poměru cca. 1 : 1.

$^1\text{H NMR}$ (400 MHz, CDCl_3 , 25 °C): δ 6,28 a 5,60 (s, 1H, 3'); 6,12 a 6,12 (s, 1H, 5); 4,03 (s, 6H, 6-O-Me); 3,99 a 3,98 (s, 6H, 4-O-Me); 3,63 a 3,57 (s, 6H, 2'-O-Me); 3,14 (dd, $J_{\text{GEM}} = 16,9$, $J_{5'a-6'} = 4,9$, 2H; 5'a); 3,01 (dd, $J_{\text{GEM}} = 15,1$, $J_{5'a-6'} = 13,1$, 2H; 5'a); 2,72 (dd, $J_{\text{GEM}} = 16,9$, $J_{5'b-6'} = 13,0$, 2H; 5'b); 2,40 (dd, $J_{\text{GEM}} = 15,1$, $J_{5'b-6'} = 4,2$, 2H; 5'b); 2,52-2,66 (m, 2H, 6'); 0,95–0,98 (m, 6H, 6'- CH_3). $^{13}\text{C NMR}$ (101 MHz, CDCl_3 , 25 °C): δ 194,06 a 193,91 (3); 169,49 a 169,45 (7a); 164,31 a 164,29 (6); 161,34 a 158,73 (2'); 157,51 a 157,46 (4); 155,06 a 151,72 (4'); 105,63 a 105,59 (3a); 98,82 a 92,60 (3'); 97,15 (7); 91,41 a 91,35 (2); 89,18 a 89,16 (5); 56,90 a 56,89 (6-O-Me); 56,29 (4-O-Me); 56,14 a 55,91 (2'-O-Me); 36,40 a 35,27 (6'); 30,85 a 25,54 (5'); 14,35 a 14,23 (6'-Me).

4,5-dimethoxy-2-nitrobenzyl (*S*)-2-hydroxypropanoát (9)

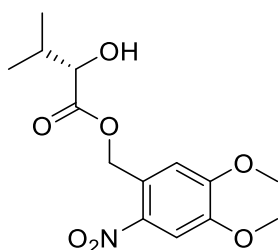


4,5-Dimethoxy-2-nitrobenzyl alkohol (7) (2,13 g, 10 mmol, 1,0 ekv.), a TsOH (0,2 g, 1,0 mmol, 0,1 ekv.) byly rozpuštěny v PhMe (100 ml) a poté byla přidána kyselina L-mléčná (8a) (0,9 g, 10 mmol, 1,0 ekv.). Esterifikace byla provedena podle Dean-Starkova protokolu. Reakční směs ochlazená na laboratorní teplotu byla adsorbována na SiO₂ (50 ml)

a rozpouštědlo bylo odpařeno na RVO. Předčištění pomocí flash chromatografie na normální fázi (SiO₂, DCM/MeOH, grad. 0-100 %) následované flash chromatografií na reverzní fázi (C18, H₂O/MeCN, grad. 0-50 %) poskytlo produkt jako oranžovou pevnou látku s výtěžkem 888 mg (34 %).

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃, 25 °C): δ 7,73 (s, 1H); 6,96 (s, 1H); 5,66 (d, *J* = 14,4, 1H); 5,55 (d, *J* = 14,4 Hz, 1H); 4,43–3,35 (m, 1H); 3,98 (s, 3H); 3,97 (s, 3H); 1,49 (d, *J* = 6,9, 3H). ¹³C NMR (101 MHz, CDCl₃, 25 °C): δ 174,05; 153,56; 148,39; 138,67; 125,85; 110,51; 108,37; 66,85; 64,26; 56,46; 56,44; 20,48. HRMS (ESI): *m/z* [M + Na]⁺ spočteno pro C₁₂H₁₅O₇NNa jako 308,0741, nalezeno 308,0742.

4,5-dimethoxy-2-nitrobenzyl (*S*)-2-hydroxy-3-methylbutanoát (10)



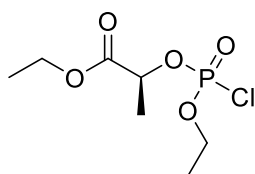
4,5-Dimethoxy-2-nitrobenzyl alkohol (7) (2,55 g, 12,0 mmol, 1,2 ekv.) a TsOH (172 mg, 1,0 mmol, 0,10 ekv.) byly rozpuštěny v PhMe (100 ml). Poté byla k této směsi přidána (*S*)-isopropylglykolová kyselina (8b) (1,18 g, 10,0 mmol, 1,0 ekv.). Esterifikace dále pokračovala podle Dean-Starkova protokolu přes noc. Vzniklá směs byla extrahována

NaHCO₃ (sat.) (60 ml), destilovanou vodou (60 ml) a solankou (60 ml). Oddělená organická fáze byla vysušena Na₂SO₄, který byl od roztoku oddělen filtrací. PhMe byl odpařen a reakční směs byla adsorbována na SiO₂ (50 ml) pomocí RVO. Předčištění flash chromatografií na normální fázi (SiO₂, DCM/MeOH, grad. 0-100 %), a následné čištění pomocí flash chromatografie na reverzní fázi (C18, H₂O/MeCN, grad. 0-50 %) poskytlo produkt jako červeno-hnědou pevnou látku s výtěžkem 1,68 g (54 %).

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃, 25 °C): δ 7,75 (s, 1H); 7,01 (s, 1H); 5,67 (d, *J* = 14,3, 1H); 5,59 (d, *J* = 14,3, 1H); 4,16 (d, *J* = 3,5, 1H); 4,00 (s, 3H); 3,99 (s, 3H); 2,18–2,07 (m, 1H); 1,07 (d, *J* = 7,0, 3H); 0,92 (d, *J* = 7,0, 3H). ¹³C NMR (101 MHz, CDCl₃, 25 °C): δ 174,38; 153,45; 148,57; 140,20; 125,90; 110,89; 108,33; 75,16; 64,19; 56,43; 32,26; 18,78; 16,03. HRMS (ESI): *m/z* [M + Na]⁺ spočteno pro C₁₄H₁₉O₇NNa jako 336,1054, nalezeno 336,1051.

5.3 Syntéza intermediálních monochloridátů

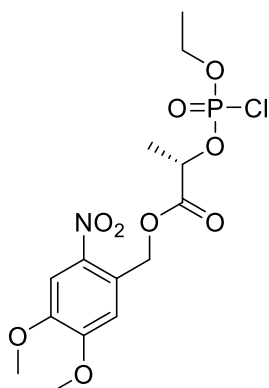
Ethyl (2*S*)-2-((chlor(ethoxy)fosforyl)oxy)propanoát (16)



Elhydichlorfosfát (12) (300 μ l, 2,5 mmol, 1 ekv.) a ethyl (2*S*)-2-hydroxypropanoát (13) (300 μ l, 2,6 mmol, 1,04 ekv.) byly rozpuštěny v suchém PhMe (15 ml). K tomuto roztoku byl přidán Et₃N (300 μ l, 2,15 mmol 0,86 ekv.) pod inertní atmosférou Ar. Reakční směs byla míchána přes noc při 25 °C. Vzniklá směs byla extrahována destilovanou vodou (50 ml) a solankou (30 ml) a organická fáze byla oddělena a vysušena pomocí MgSO₄. Následná filtrace a odpaření rozpouštědla na RVO poskytla surový produkt jako světle žlutou olejovitou kapalinu, která byla použita bez dalšího čištění v následujícím kroku.

³¹P NMR (162 MHz, CDCl₃, 25 °C): δ 4,45 a 3,54.

4,5-dimethoxy-2-nitrobenzyl (2*S*)-2-((chlor(ethoxy)fosforyl)oxy)propanoát (19)

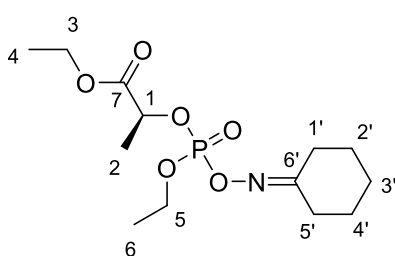


4,5-dimethoxy-2-nitrobenzyl 2-hydroxypropanoát (9) (142,8 mg, 0,5 mmol, 1,0 ekv.) byl rozpuštěn v suchém PhMe (2,5 ml). K tomuto roztoku byl přidán Et₃N (90,6 μ l, 0,65 mmol, 1,3 ekv.) a ethyldichlorfosfát (12) (63,2 μ l, 0,5 mmol, 1 ekv.). Reakční směs byla míchána přes noc při 25 °C. Vzniklá směs byla následně extrahována destilovanou vodou (40 ml) a oddělená organická fáze byla vysušena Na₂SO₄. Odfiltrování Na₂SO₄ a následné odpaření na RVO vedlo ke vzniku surového produktu jakožto hnědé silně viskózní kapaliny, která byla bez dalšího čištění použita v dalším kroku.

³¹P NMR (162 MHz, CDCl₃, 25 °C): δ 4,44 a 3,97.

5.4 Syntéza self-imolativních systémů s modelovými oximy

Ethyl (2*S*)-2-(((cyklohexyldenamino)oxy(ethoxy)fosforyl)oxy)propanoát (17)



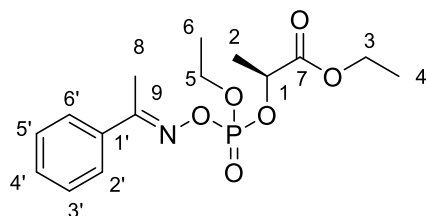
Ethyl (2*S*)-2-((chlor(ethoxy)fosforyl)oxy)propanoát (16) (159 mg, 0,65 mmol, 1,0 ekv.) byl rozpuštěn v suchém DCM (5 ml) za inertní atmosféry Ar. K roztoku byl přidán cyklohexanonoxim (1) (73,7 mg, 0,65 mmol 1,0 ekv.) a Et₃N (226,6 μ l, 1,6 mmol, 2,5 ekv.). Reakční směs byla míchána 72 hodin při 25 °C. Rozpouštědlo bylo odpařeno na RVO. Separace vedlejšího produktu (triethylamonium chloridu) z reakční směsi byla provedena frakčním srážením v THF (2 ml).

Triethylamonium chlorid byl od produktu odfiltrován. THF z roztoku produktu bylo odpařeno na RVO. Izolace pomocí flash chromatografie (Al₂O₃, hexan/EtOAc, grad. 0-33 %), vedla k produktu ve formě narůžovělé olejovité kapaliny s výtěžkem 23 mg (11 %).

Pozn. Směs diastereomerů v poměru 1 : 0,8.

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃, 25 °C): δ 5,07–4,95 (m, 2H, 1); 4,32–4,16 (m, 8H, 3 a 5); 2,58–2,53 (m, 4H, 1' nebo 5'); 2,32–2,26 (m, 4H, 1' nebo 5'); 1,74–1,69 (m, 4H, 2' nebo 4'); 1,68–1,59 (m, 8H, 2' nebo 4' a 3'); 1,61–1,57 (m, 6H, 2); 1,42–1,35 (m, 6H, 6); 1,30 (t, 3H, *J*₄₋₃ = 7,1; 4); 1,29 (t, 3H, *J*₄₋₃ = 7,1; 4). **¹³C NMR** (101 MHz, CDCl₃, 25 °C): δ 170,60 (d, *J*_{7-P} = 5,4; 7); 170,31 (d, *J*_{7-P} = 5,6; 7); 169,68–169,39 (m, 6'); 72,38–72,26 (m, 1); 64,83–64,67 (m, 5); 61,46 (3); 61,35 (3), 31,72 a 31,69 (2 x 1' nebo 5'); 26,64 a 26,60 (2 x 2' nebo 4'); 26,10 a 26,08 (2 x 5' nebo 1'); 25,56 a 25,54 (2' nebo 4'); 25,33 (3'); 19,34 (d, *J*_{2-P} = 5,4; 2); 19,07 (d, *J*_{2-P} = 5,4; 2); 16,06 (d, *J*_{6-P} = 6,6; 6); 14,08 a 14,07 (4). **³¹P NMR** (162 MHz, CDCl₃, 25 °C): δ 0,07 a –0,58. **HRMS (ESI)⁺**: *m/z* [M]⁺ spočteno pro C₁₃H₂₅O₆NP jako 322,1414, nalezeno 322,1415.

Ethyl (2*S*)-2-((ethoxy(((1-fenylethyliden)amino)oxy)fosforyl)oxy)propanoát (18)



Ethyl (2*S*)-2-((chlor(ethoxy)fosforyl)oxy)propanoat (16)

(159 mg, 0,65 mmol, 1,0 ekv.) byl rozpuštěn v suchém DCM (5 ml) pod inertní atmosférou Ar. K roztoku byl následně přidán acetofenonoxim (4) (87,8 mg, 0,65 mmol, 1 ekv.) a Et₃N (226,6 μl, 1,6, 2,5 ekv.). Reakce byla

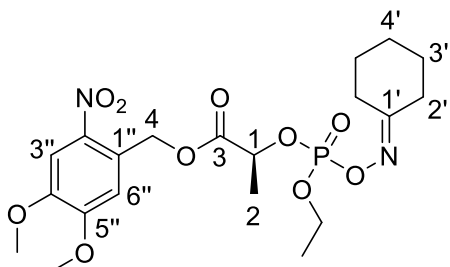
míchána 72 hodin při 25 °C. DCM byl poté odpařen na RVO. Vedlejší produkt reakce (triethylamonium chlorid) byl oddělen frakčním srážením v THF (2 ml) a jeho následnou filtrací. THF bylo odpařeno na RVO. Následná flash chromatografie (Al₂O₃, hexan/EtOAc, grad. 0-33 %) poskytla produkt jako nažloutlou olejovitou kapalinu s výtěžkem 16 mg (7 %).

Pozn. Směs dvou diastereomerů v poměru cca 1 : 0,8. E/Z izomerie se v NMR spektru téměř neprojevovala.

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃, 25 °C): δ 7,73–7,68 (m, 4H, 2', 6'); 7,48–7,38 (m, 6H, 3', 4', 5'); 5,14–5,05 (m, 2H, 1); 4,40–4,27 (m, 4H, 5); 4,27–4,09 (m, 4H, 3); 2,39–2,38 (m, 6H, 8); 1,61–1,49 (m, 6H, 2); 1,43–1,35 (m, 6H, 6); 1,31–1,18 (m, 6H, 4). **¹³C NMR** (101 MHz, CDCl₃, 25 °C): δ 170,51 (d, *J*_{7-P} = 5,4; 7); 170,23 (d, *J*_{7-P} = 5,4; 7); 163,78–164,11 (m, 9); 134,35 (d, *J*_{1'-P} = 2,0; 1'); 130,56 (4'); 128,54 a 128,51 (3', 5'); 126,83 a 126,79 (2' nebo 6'); 72,58 (d, *J*_{1-P} = 5,4; 1); 71,80 (d, *J*_{1-P} = 5,4; 1); 65,10 (d, *J*_{5-P} = 6,1; 5); 61,52 a 61,41 (3); 19,39 (d, *J*_{2-P} = 5,0; 2); 19,12 (d, *J*_{2-P} = 5,5; 2); 16,01 (d, *J*_{6-P} = 6,2; 6); 14,02 (d, *J*_{4-P} = 5,3;

4); 13,82 (d, $J_{8-P} = 2,0$; 8). ^{31}P NMR (162 MHz, CDCl_3 , 25 °C): δ -0,75 a -1,41. HRMS (ESI): m/z $[\text{M} + \text{Na}]^+$ spočteno pro $\text{C}_{15}\text{H}_{22}\text{O}_6\text{NNaP}$ jako 366,1077 a nalezeno 366,1079.

4,5-dimethoxy-2-nitrobenzyl (2S)-2-(((cyklohexylidenamino)oxy(ethoxy)-fosforyl)oxy)propanoát (21)



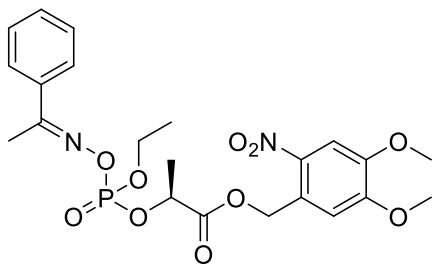
4,5-dimethoxy-2-nitrobenzyl (2S)-2-((chlor(ethoxy)-fosforyl)oxy)propanoát (19) (150 mg, 0,37 mmol, 1 ekv.) byl rozpuštěn v suchém DCM (4 ml) pod inertní atmosférou Ar. Dále byl přidán cyklohexanonoxim (1) (41,3 mg, 0,37 mmol, 1 ekv.) a Et_3N (129 μl , 0,925

mmol, 2,5 ekv). Reakční směs byla míchána 72 hodin při 25 °C. Předčištění pomocí flash chromatografie na reverzní fázi (C_{18} , $\text{H}_2\text{O}/\text{MeCN}$, grad. 0-100 %) a flash chromatografie na normální fázi (SiO_2 , hexan/ EtOAc grad. 0-100 % a následné čištění pomocí flash chromatografie na reverzní fázi (C_{18} , $\text{H}_2\text{O}/\text{MeOH}$, grad. 0-100 %) poskytlo tmavě hnědý silně viskózní olej jakožto z 15 % znečištěný produkt s výtěžkem 11 mg (6,2 %).

Pozn. Směs dvou diastereomerů v poměru cca. 1 : 0,8

^1H NMR (400 MHz, CDCl_3 , 25 °C): δ 7,73–7,77 (m, 2H, 3''); 7,19 a 7,18 (2 x s, 2H, 6''); 5,58–5,72 (m, 4H, 4); 5,13–5,22 (m, 2H, 1); 4,20–4,32 (m, 4H, O- CH_2 - CH_3); 4,05 a 4,04 (2 x s, 6H, 5''-O- CH_3); 3,97 (s, 6H, 4''-O- CH_3); 2,44–2,57 (m, 4H, 2' nebo 6'); 2,20–2,33 (m, 4H, 6' nebo 2'); 1,54–1,81 (m, 18H, 2, 3', 4', 5'); 1,31–1,42 (m, 6H, O- CH_2 - CH_3). ^{13}C NMR (101 MHz, CDCl_3 , 25 °C): δ 170,10 (d, $J_{3-P} = 5,0$; 3); 169,45–169,79 (m, 3, 1'); 153,96 a 153,91 (5''); 148,18 a 148,14 (4''); 139,40 a 139,34 (2''); 126,93 a 126,89 (1''); 109,90 a 109,78 (6''); 108,07 a 108,04 (3''); 72,47 (d, $J_{1-P} = 5,3$; 1); 72,46 (d, $J_{1-P} = 5,9$; 1); 64,91 (d, $J_{\text{CH}_2-P} = 6,2$; O- CH_2 - CH_3); 64,78 (d, $J_{\text{CH}_2-P} = 6,0$; O- CH_2 - CH_3); 64,02 a 63,87 (4); 56,88 a 56,77 (5''-O- CH_3); 56,38 a 56,38 (4''-O- CH_3); 31,68 a 31,62 (2' nebo 6'); 26,09 a 26,07 (6' nebo 2'); 26,64 a 26,57 (3', 4' nebo 5'); 25,55 a 25,49 (3', 4' nebo 5'); 25,28 a 25,24 (3', 4' nebo 5'); 19,26 (d, $J_{2-P} = 5,3$; 2); 19,07 (d, $J_{2-P} = 6,2$; 2); 16,08 (d, $J_{\text{CH}_3-P} = 6,5$; O- CH_2 - CH_3); 16,05 (d, $J_{\text{CH}_3-P} = 6,6$; O- CH_2 - CH_3). ^{31}P NMR (162 MHz, CDCl_3 , 25 °C): δ -0,09 a -0,33. HRMS (ESI)⁺: $[\text{M}]^+$ spočteno pro $\text{C}_{20}\text{H}_{30}\text{O}_{10}\text{N}_2\text{P}$ jako 489,1633 a nalezeno 489,1631.

4,5-dimethoxy-2-nitrobenzyl (2S)-2-(((1-fenylethylideno)amino)oxy)propanoát (22)

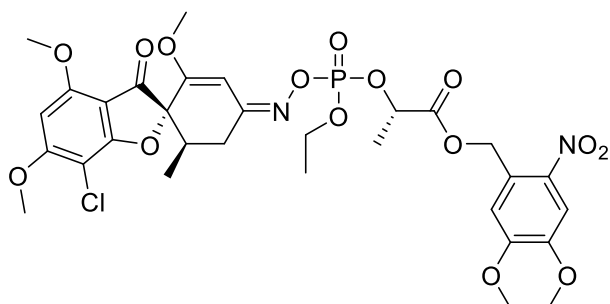


4,5-dimethoxy-2-nitrobenzyl (2S)-2-((chlor(ethoxy)fosfor yl)oxy)propanoat (79,4 mg, 0,2 mmol, 1 ekv.) byl rozpuštěn za inertní atmosféry Ar v suchém DCM (4 ml). K vzniklému roztoku byl přidán acetofenonoxim (26,0 mg, 0,2 mmol, 1 ekv.) a Et₃N (69,7 μl, 0,5 mmol 2,5 ekv.).

Reakční směs byla míchána při 25 °C 72 h. Rozpouštědlo bylo odpařeno na RVO. Čištění pomocí flash chromatografie (Al₂O₃, hexan/EtOAc, grad. 0-40 %) poskytlo mírně znečištěný produkt jako hnědo-žlutou viskózní kapalinu s výtěžkem cca 1,5 mg (1,5 %).

³¹P NMR (162 MHz, CDCl₃, 25 °C): δ -0,90 (s); -1,12 (s). HRMS (ESI): m/z [M + Na]⁺ spočteno pro C₂₂H₂₇O₁₀N₂NaP jako 533,1296, nalezeno 533,1297.

3,5-dimethoxy-2-nitrobenzyl (2S)-2-((((((2S,6'R,Z)-7-chlor-2',4,6-trimethoxy-6'-methyl-3-oxo-3H-spiro[benzofuran-2,1'-cyklohexan]-2'-en-4'-ylideno)amino)oxy)(ethoxy)-fosforyl)oxy)propanoát (26)



4,5-dimethoxy-2-nitrobenzyl (2S)-2-((chlor(ethoxy)fosforyl)oxy)propanoát (19) (90 mg, 0,22 mmol, 1 ekv.) a griseofulvinoxim (23) (75,2 mg, 0,2 mmol, 1 ekv.) byly rozpuštěny za inertní atmosféry Ar v suchém DCM (4 ml). Ke vzniklé směsi byl dále přidán Et₃N

(69,7 μl, 0,5 mmol, 2,5 ekv.) Reakční směs byla míchána 72 hodin. DCM bylo odpařeno na RVO. Čištění získané reakční směsi pomocí flash chromatografie na reverzní fázi (C18, H₂O/MeOH, grad. 0-100 %) poskytlo jasně žlutou pěnu s výtěžkem 38,4 mg (26 %). Řešení NMR spektra této látky je nad rámec této bakalářské práce, a tudíž byla struktura ověřena metodou HRMS.

HRMS (APCI) spočteno pro C₃₁H₃₇O₁₅N₂ClP jako 743,1615 a nalezeno m/z 743,1616.

6. Závěr

Jedním z cílů této bakalářské práce byla příprava modelových fotoaktivovatelných či enzymaticky aktivovatelných self-immolativních spojek, na bázi fosforu, pro doručení oximů a studium vlastností těchto sloučenin.

První část této práce zahrnovala syntézu výchozích oximů a fotoaktivovatelných DMNB esterů α -hydroxykyselin. Po úspěšné přípravě výchozích látek byly pro účely syntézy self-immolativních spojek navrženy a vyzkoušeny dva syntetické přístupy.

První postup selhal již v počátečním kroku syntézy, tedy během přípravy intermediátů **13** a **14**. Druhou metodou se podařilo připravit požadované enzymaticky aktivovatelné self-immolativní spojky **17**, **18** a fotoaktivovatelné self-immolativní spojky **21** a **22**. Všechny tyto látky ovšem vykazovaly nízkou stabilitu ve vodném či v kyselém prostředí, čímž bylo čištění a izolace těchto produktů značně komplikováno.

Self-immolativní spojku **17** se podařilo úspěšně vyčistit. V případě látek **18** a **22** byly v jejich NMR spektrech pozorovány drobné nečistoty. Látka **21** obsahovala neznámý vedlejší produkt, který pocházel z reakce látky **21** s vodou během chromatografie na reverzní fázi. Tento neznámý vedlejší se nepodařilo charakterizovat. Byly zjištěny pouze některé vlastnosti tohoto produktu, a to, že obsahuje stereogenní centrum na fosforu a je fotoaktivovatelný.

Dále bylo připraveno proléčivo griseofulvinoximu **26**, jehož struktura byla ověřena pomocí HRMS. Látka **26** byla izolována jako komplikovaná směs diastereo- a E/Z izomerů.

Studiem fotoaktivace látky **21** byl potvrzen self-immolační mechanismus uvolnění oximu z molekuly.

Mezi další cíle této práce patřilo studium stability připravených self-immolativních spojek. Pro tyto účely byl zvolen produkt **17**. Stabilitní testy látky **17** byly provedeny: a) v prostředí protického rozpouštědla (MeOH), b) v pufrech simulujících fyziologické pH (cacodylátový a HEPES pufr) c) v HEPES pufru o pH = 9.

Bylo zjištěno, že v MeOH je látka **17** stabilní, a to minimálně po dobu 2 hodin. V cacodylátovém pufru (pH = 7,4) došlo k okamžité hydrolýze látky **17** na odpovídající hydrolytický produkt, zatímco v HEPES pufru (pH = 7,4) docházelo ihned k rozkladu látky **17** na zcela nový neznámý produkt. Látka **17** podléhá zrychlené přeměně na neznámý produkt v bazickém HEPES pufru o pH = 9.

7. Poděkování

Na závěr bych v první řadě ráda poděkovala svému školiteli Ing. Ondřeji Baszczyňskému, PhD. za jeho ochotu a trpělivost při řešení problémů týkající se této bakalářské práce a současně s tím i za jeho čas strávený nad těmito diskusemi. Další poděkování patří RNDr. Ondřeji Štěpánkovi, Ph.D. a to především za jeho ochotu a pomoc při řešení syntetických problému v laboratoři, za jeho cenné rady v oblasti organické chemie a dále za jeho trpělivost a čas, který mi věnoval. Dále bych ráda poděkovala RNDr. Elišce Procházkové, Ph.D. z ÚOCHB za naměření experimentu fotoaktivace, za kontrolu přiřazených NMR spekter a za její pomoc s přiřazením a její cenné rady týkající se luštění 2D spekter. Poděkování patří i všem mým kolegům z laboratoře, za příjemnou a pozitivní atmosféru. V neposlední řadě bych chtěla poděkovat své rodině, partnerovi a svým přátelům, kteří mě podporovali během celého studia.

8. Literatura

- (1) Rautio, J.; Kumpulainen, H.; Heimbach, T.; Oliyai, R.; Oh, D.; Järvinen, T.; Savolainen, J. Prodrugs: Design and Clinical Applications. *Nat. Rev. Drug Discov.* **2008**, *7* (3), 255–270.
- (2) Wu, K.-M. A New Classification of Prodrugs: Regulatory Perspectives. *Pharmaceuticals* **2009**, *2* (3), 77–81.
- (3) Ehrnebo, M.; Nilsson, S.-O.; Boréus, L. O. Pharmacokinetics of Ampicillin and Its Prodrugs Bacampicillin and Pivampicillin in Man. *J. Pharmacokinet. Biopharm.* **1979**, *7* (5), 429–451.
- (4) Couto, D.; Ribeiro, D.; Freitas, M.; Gomes, A.; Lima, J. L. F. C.; Fernandes, E. Scavenging of Reactive Oxygen and Nitrogen Species by the Prodrug Sulfasalazine and Its Metabolites 5-Aminosalicylic Acid and Sulfapyridine. *Redox Rep. Commun. Free Radic. Res.* **2010**, *15* (6), 259–267.
- (5) Mehellou, Y.; Rattan, H. S.; Balzarini, J. The ProTide Prodrug Technology: From the Concept to the Clinic: Miniperspective. *J. Med. Chem.* **2018**, *61* (6), 2211–2226.
- (6) Slusarczyk, M.; Serpi, M.; Pertusati, F. Phosphoramidates and Phosphoramidates (ProTides) with Antiviral Activity. *Antivir. Chem. Chemother.* **2018**, 26.
- (7) Eastman, R. T.; Roth, J. S.; Brimacombe, K. R.; Simeonov, A.; Shen, M.; Patnaik, S.; Hall, M. D. Remdesivir: A Review of Its Discovery and Development Leading to Emergency Use Authorization for Treatment of COVID-19. *ACS Cent. Sci.* **2020**, *6* (5), 672–683.
- (8) <https://www.fda.gov/news-events/press-announcements/fda-approves-first-treatment-covid-19>
- (9) Sahyoun, T.; Arrault, A.; Schneider, R. Amidoximes and Oximes: Synthesis, Structure, and Their Key Role as NO Donors. *Molecules* **2019**, *24* (13).
- (10) Kukushkin, V. Yu.; Pombeiro, A. J. L. Oxime and Oximate Metal Complexes: Unconventional Synthesis and Reactivity. *Coord. Chem. Rev.* **1999**, *181* (1), 147–175.
- (11) Kaur, K.; Srivastava, S. Beckmann Rearrangement Catalysis: A Review of Recent Advances. *New J. Chem.* **2020**, *44* (43), 18530–18572.
- (12) Surowiak, A. K.; Lochyński, S.; Strub, D. J. Unsubstituted Oximes as Potential Therapeutic Agents. *Symmetry* **2020**, *12* (4), 575.
- (13) Kassa, J. Review of Oximes in the Antidotal Treatment of Poisoning by Organophosphorus Nerve Agents. *J. Toxicol. Clin. Toxicol.* **2002**, *40* (6), 803–816.
- (14) Cibulka, R.; Hampl, F.; Liska, F. Preparation and Use of Amphiphilic Oximes Derived from Azines. *Chem. Listy* **1998**, *92* (6).
- (15) Svoboda, J.; Vysoká škola chemicko-technologická v Praze. *Organická syntéza*; 2017. p. 50, p. 164
- (16) Cai, S.; Zhang, S.; Zhao, Y.; Wang, D. Z. New Approach to Oximes through Reduction of Nitro Compounds Enabled by Visible Light Photoredox Catalysis. *Org. Lett.* **2013**, *15* (11).
- (17) Patil, V. V.; Gayakwad, E. M.; Shankarling, G. S. M-CPBA Mediated Metal Free, Rapid Oxidation of Aliphatic Amines to Oximes. *J. Org. Chem.* **2016**, *81* (3), 781–786.
- (18) Akhtar, M.; Pechet, M. M. The Mechanism of the Barton Reaction. *J. Am. Chem. Soc.* **1964**, *86* (2), 265–268.
- (19) McMurry, J.; Vysoké učení technické v Brně. *Organická chemie*; VUTIUM; Vysoká škola chemicko-technologická: V Brně; V Praze, 2007.
- (20) Ballistreri, F.; Barbuzzi, E.; Tomaselli, G.; Toscano, R. Useful Oxidation Procedure of Oximes to Nitro Compounds with Benz-Mo in Acetonitrile. *Synlett* **2000**, *1996*, 1093–1094.

- (21) Wylie, B. B.; Isaacson, E. I.; Delgado, J. N. Synthesis of Oxime Esters and Ethers as Potential Psychotropic Agents. *J. Pharm. Sci.* **1965**, *54* (9), 1373–1376.
- (22) Campbell, K. N.; Campbell, B. K.; McKenna, J. F.; Chaput, E. P. The action of grignard reagents on oximes. III. The mechanism of the action of arylmagnesium halides on mixed ketoximes. A new synthesis of ethyleneimines. *J. Org. Chem.* **1943**, *08* (1), 103–109.
- (23) Otakar Červinka. *Mechanismy Organických Reakcí*, 2nd ed.; STNL/ALFA: Praha; Vol. 1981. p. 398
- (24) Lezcano-González, I.; Boronat, M.; Blasco, T. Investigation on the Beckmann Rearrangement Reaction Catalyzed by Porous Solids: MAS NMR and Theoretical Calculations. *Solid State Nucl. Magn. Reson.* **2009**, *35* (2), 120–129.
- (25) Aakeröy, C. B.; Sinha, A. S.; Epa, K. N.; Chopade, P. D.; Smith, M. M.; Desper, J. Structural Chemistry of Oximes. *Cryst. Growth Des.* **2013**, *13* (6), 2687–2695.
- (26) Bindu, P. J.; Mahadevan, K. M.; Satyanarayan, N. D.; Ravikumar Naik, T. R. Synthesis and DNA Cleavage Studies of Novel Quinoline Oxime Esters. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2012**, *22* (2), 898–900.
- (27) Fukuto, T. R.; Metcalf, R. L.; Jones, R. L.; Myers, R. O. Structure, Reactivity, and Biological Activity of O-(Diethyl Phosphoryl)Oximes and O-(Methylcarbamoyl)Oximes of Substituted Acetophenones and .Alpha.-Substituted Benzaldehydes. *J. Agric. Food Chem.* **1969**, *17* (5), 923–930.
- (28) Zhu, J.-L.; Wu, S.-T.; Shie, J.-Y. Access to Functionalized Bicyclo[4,3,0]Nonenes via Palladium-Catalyzed Oxidative Cyclization of 2-Allylcyclohexyl Oximes. *J. Org. Chem.* **2014**, *79* (8), 3623–3633.
- (29) Dunn, G. L. Ceftizoxime and Other Third-Generation Cephalosporins: Structure-Activity Relationships. *J. Antimicrob. Chemother.* **1982**, *10* (suppl_C), 1–10.
- (30) Bryskier, A. Roxithromycin: Review of Its Antimicrobial Activity. *J. Antimicrob. Chemother.* **1998**, *41 Suppl B*, 1–21.
- (31) Goa, K. L.; Warner, G. T.; Easthope, S. E. Transdermal Ethinylestradiol/Norelgestromin. *Treat. Endocrinol.* **2003**, *2* (3), 191–206.
- (32) Freeman, C. P. Fluvoxamine: Clinical Trials and Clinical Use. *J. Psychiatry Neurosci. JPN* **1991**, *16* (2 Suppl 1), 19–25.
- (33) Khan, H.; Metra, M.; Blair, J. E. A.; Vogel, M.; Harinsein, M. E.; Filippatos, G. S.; Sabbah, H. N.; Porchet, H.; Valentini, G.; Gheorghide, M. Istaroxime, a First in Class New Chemical Entity Exhibiting SERCA-2 Activation and Na–K-ATPase Inhibition: A New Promising Treatment for Acute Heart Failure Syndromes? *Heart Fail. Rev.* **2009**, *14* (4), 277–287.
- (34) Strizki, J. M.; Xu, S.; Wagner, N. E.; Wojcik, L.; Liu, J.; Hou, Y.; Endres, M.; Palani, A.; Shapiro, S.; Clader, J. W.; Greenlee, W. J.; Tagat, J. R.; McCombie, S.; Cox, K.; Fawzi, A. B.; Chou, C. C.; Pugliese-Sivo, C.; Davies, L.; Moreno, M. E.; Ho, D. D.; Trkola, A.; Stoddart, C. A.; Moore, J. P.; Reyes, G. R.; Baroudy, B. M. SCH-C (SCH 351125), an Orally Bioavailable, Small Molecule Antagonist of the Chemokine Receptor CCR5, Is a Potent Inhibitor of HIV-1 Infection in Vitro and in Vivo. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2001**, *98* (22), 12718–12723.
- (35) Fromtling, R. A. Overview of Medically Important Antifungal Azole Derivatives. *Clin. Microbiol. Rev.* **1988**, *1* (2), 187–217.
- (36) Zhang, J.; Li, L.; Lv, Q.; Yan, L.; Wang, Y.; Jiang, Y. The Fungal CYP51s: Their Functions, Structures, Related Drug Resistance, and Inhibitors. *Front. Microbiol.* **2019**, *10*.
- (37) Vl, Z. enviromentální aspekty užití organofosforových a karbamátových pesticidů schválených k užití v České republice. *Chem Listy* **2011**, *5*.

- (38) Worek, F.; Thiermann, H.; Wille, T. Organophosphorus Compounds and Oximes: A Critical Review. *Arch. Toxicol.* **2020**, *94* (7), 2275–2292.
- (39) Bharathi, S.; Wong, P. T.; Desai, A.; Lykhytska, O.; Choe, V.; Kim, H.; Thomas, T. P.; Baker, J. R.; Choi, S. K. Design and Mechanistic Investigation of Oxime-Conjugated PAMAM Dendrimers as the Catalytic Scavenger of Reactive Organophosphate. *J. Mater. Chem. B* **2014**, *2* (8), 1068–1078.
- (40) Rautio, J.; Meanwell, N. A.; Di, L.; Hageman, M. J. The Expanding Role of Prodrugs in Contemporary Drug Design and Development. *Nat. Rev. Drug Discov.* **2018**, *17* (8), 559–587.
- (41) Rautio, J.; Kumpulainen, H.; Heimbach, T.; Oliyai, R.; Oh, D.; Järvinen, T.; Savolainen, J. Prodrugs: Design and Clinical Applications. *Nat. Rev. Drug Discov.* **2008**, *7* (3), 255–270.
- (42) Černíková, A.; Jampilek, J. Strukturní modifikace léčiv ovlivňující biodostupnost a terapeutický účinek. *Chem. Listy* **2014**, *108* (1), 7–16.
- (43) Simplicio, A. L.; Clancy, J. M.; Gilmer, J. F. Prodrugs for Amines. *Molecules* **2008**, *13* (3), 519–547.
- (44) Clement, B. Reduction of N-Hydroxylated Compounds: Amidoximes (n-Hydroxyamidines) as Pro-Drugs of Amidines. *Drug Metab. Rev.* **2002**, *34* (3), 565–579.
- (45) Kumpulainen, H.; Mähönen, N.; Laitinen, M.-L.; Jaurakkajärvi, M.; Raunio, H.; Juvonen, R. O.; Vepsäläinen, J.; Järvinen, T.; Rautio, J. Evaluation of Hydroxyimine as Cytochrome P450-Selective Prodrug Structure. *J. Med. Chem.* **2006**, *49* (3), 1207–1211.
- (46) Surendran, V. Synthesis and Characterization of Novel Oxime Prodrug of Gliclizide. *Asian J. Chem.* **2014**, *26*, 6989–6992.
- (47) Rønne, M. H.; Raab, M. S.; Anderhub, S.; Boesen, S.; Krämer, A.; Larsen, T. O.; Clausen, M. H. Disparate SAR Data of Griseofulvin Analogues for the Dermatophytes *Trichophyton Mentagrophytes*, *T. Rubrum*, and MDA-MB-231 Cancer Cells. *J. Med. Chem.* **2012**, *55* (2), 652–660.
- (48) Fischer, L. J.; Riegelman, S. Absorption and Activity of Some Derivatives of Griseofulvin. *J. Pharm. Sci.* **1967**, *56* (4), 469–476.
- (49) Bodor, N.; Buchwald, P. Ophthalmic Drug Design Based on the Metabolic Activity of the Eye: Soft Drugs and Chemical Delivery Systems. *AAPS J.* **2005**, *7* (4), E820–E833.
- (50) Kattakuzhy, S.; Levy, R.; Kottlil, S. Sofosbuvir for Treatment of Chronic Hepatitis C. *Hepatol. Int.* **2015**, *9* (2), 161–173.
- (51) Wei, Y.; Qiu, G.; Lei, B.; Qin, L.; Chu, H.; Lu, Y.; Zhu, G.; Gao, Q.; Huang, Q.; Qian, G.; Liao, P.; Luo, X.; Zhang, X.; Zhang, C.; Li, Y.; Zheng, S.; Yu, Y.; Tang, P.; Ni, J.; Yan, P.; Zhou, Y.; Li, P.; Huang, X.; Gong, A.; Liu, J. Oral Delivery of Propofol with Methoxymethylphosphonic Acid as the Delivery Vehicle. *J. Med. Chem.* **2017**, *60* (20), 8580–8590.
- (52) Procházková, E.; Filo, J.; Cigáň, M.; Baszczyński, O. Sterically-Controlled Self-Immolation in Phosphoramidate Linkers Triggered by Light. *Eur. J. Org. Chem.* **2020**, *2020* (7), 897–906.
- (53) Merckling, F. A.; Rüedi, P. Diastereoselectivity in Nucleophilic Displacement Reactions at Phosphorus; Isolation and Characterization of a Pentacoordinated Intermediate. *Tetrahedron Lett.* **1996**, *37* (13), 2217–2220.
- (54) Zerba, E.; Fukuto, T. R. Hydrolytic and Toxicological Properties of Ethyl .Alpha.-Cyanobenzaldoxime Phosphoramidates. *J. Agric. Food Chem.* **1978**, *26* (6), 1365–1369.

- (55) Shi, P.; Li, S.; Hu, L.-M.; Wang, C.; Loh, T.-P.; Hu, X.-H. The Ruthenium-Catalyzed C–H Functionalization of Enamides with Isocyanates: Easy Entry to Pyrimidin-4-Ones. *Chem. Commun.* **2019**, 55 (74), 11115–11118.
- (56) Hamdy, A. K.; Sheha, M. M.; Abdel-Hafez, A. A.; Shouman, S. A. Design, Synthesis, and Cytotoxicity Evaluation of Novel Griseofulvin Analogues with Improved Water Solubility. *Int. J. Med. Chem.* **2017**, 2017.
- (57) Jia, C.; Yang, K.-W.; Liu, C.-C.; Feng, L.; Xiao, J.-M.; Zhou, L.-S.; Zhang, Y.-L. Synthesis, Characterization and Activity of New Phosphonate Dipeptides as Potential Inhibitors of VanX. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2012**, 22 (1), 482–484.
- (58) Gabirondo, E.; Sangroniz, A.; Etxeberria, A.; Torres-Giner, S.; Sardon, H. Poly(Hydroxy Acids) Derived from the Self-Condensation of Hydroxy Acids: From Polymerization to End-of-Life Options. *Polym. Chem.* **2020**, 11 (30), 4861–4874.
- (59) Zhu, J.-L.; Wu, S.-T.; Shie, J.-Y. Access to Functionalized Bicyclo[4,3,0]Nonenes via Palladium-Catalyzed Oxidative Cyclization of 2-Allylcyclohexyl Oximes. *J. Org. Chem.* **2014**, 79 (8), 3623–3633.
- (60) Kuo, C.-W.; Hsieh, M.-T.; Gao, S.; Shao, Y.-M.; Yao, C.-F.; Shia, K.-S. Beckmann Rearrangement of Ketoximes Induced by Phenyl Dichlorophosphate at Ambient Temperature. *Mol. Basel Switz.* **2012**, 17 (11), 13662–13672.
- (61) Šimon, P.; Tichotová, M.; Gallardo, M. G.; Procházková, E.; Baszczynski, O. Phosphate-Based Self-Immolative Linkers for Tunable Double Cargo Release. *Chem. – Eur. J.* n/a (n/a).