UNIVERZITA KARLOVA
FARMACEUTICKÁ FAKULTA V HRADCI KRÁLOVÉ

Katedra anorganickej a organickej chémie

VYUŽITIE LAKTÓNOV V SYNTÉZE ACYLCERAMIDOV

Diplomová práca

Štefan Moravčík

Vedúci diplomovej práce: PharmDr. Lukáš Opálka, Ph.D.

Hradec Králové 2017

Prehlásenie

Prehlasujem, že táto práca je mojim pôvodným autorským dielom. Všetka literatúra a ďalšie zdroje, z ktorých som pri jej spracovaní čerpal, sú uvedené v zozname použitej literatúry a v práci sú riadne citované. Práca nebola využitá k získaniu iného alebo rovnakého titulu.

Štefan Moravčík

V Hradci Králové, 2017

Poďakovanie

Na tomto mieste by som sa chcel poďakovať svojmu školiteľovi PharmDr. Lukášovi Opálkovi, Ph.D. za odbornú pomoc, trpezlivosť a všetky poskytnuté rady. Poďakovanie za odbornú pomoc patrí aj Doc. PharmDr. Kateřine Vávrovej, Ph.D. Prof. Philipovi Wertzovi (University of Iowa, USA) patrí moje poďakovanie za zaslanie vzorky s ktorou som mohol pracovať v rámci mojej diplomovej práce. V neposlednom rade ďakujem svojej rodine a priateľom, ktorí ma pri písaní diplomovej práce podporovali.

Obsah

Abstrakt 5
Abstract 6
1. Úvod a cieľ práce 7
2. Teoretická časť 8
2.1. Stavba kože 8
2.2. Stratum corneum 9
2.3. Ceramidy 10
2.3.1. Acylceramidy 13
2.3.2. Biosyntéza acylceramidov 14
2.4. Povrchové lipidy *Equidae* 16
3. Výsledky a diskusia 19
4. Experimentálna časť 27
4.1. Chemikálie, prístroje a pomôcky 27
4.2. Spracovanie donkey sebum 27
4.3. Syntetická časť 28
5. Záver 42
6. Použité skratky 43
7. Literatúra 44

Abstrakt

Acylceramidy, podskupina ceramidov s ultradlhými reťazcami sú esenciálnou zložkou extracelulárnej lipidovej matrix v najvrchnejšej vrstve kože, *stratum corneum*. Majú nezastupiteľnú funkciu v prežití cicavcov na súši. Hlbšie pochopenie ich funkcie vo fyziológii a patofyziológii kože a ich terapeutického použitia je obmedzené ich limitovanou dostupnosťou.

Analýza povrchových lipidov osla (*E. asinus*) ukázala, že v týchto lipidoch sa nachádza až 56 % nerozvetvených ω-laktónov (equolidov), z ktorých 51,2 % tvorí nenasýtený dotriakontanolid a 41,3 % nenasýtený triakontanolid. Tieto laktóny sa svojou dĺžkou reťazca zhodujú s najbežnejšou dĺžkou acylového reťazca acylceramidov (30 a 32 atómov uhlíka) a mohli by teda nájsť uplatnenie pri ich totálnej syntéze.

Cieľom tejto práce bolo izolovať nenasýtený ω-laktón s 32 uhlíkovým skeletom (dotriakontanolid) zo zmesi povrchových lipidov osla, následne ho hydrogenovať a previesť na vhodný prekurzor (sukcinimidyl ester) a nájsť tak čo najjednoduchšiu syntetickú cestu jeho premeny na acylceramidy.

Vyskúšali sme mnoho syntetických ciest. Od priamej aminolýzy laktónu, cez reakciu s N-hydroxysukcinimidom v rôznych reakčných podmienkach po otvorenie laktónu na draselnú soľ ω-hydroxykyseliny, nasledované reakciou s disukcinimidyl karbonátom. Avšak všetky reakčné cesty sú komplikované nízkou rozpustnosťou týchto zlúčenín a veľmi nízkou reaktivitou. Najschodnejšia sa javí cesta otvorenia laktónu na metylester ω-hydroxykyseliny, následné chránenie ω-hydroxy skupiny, hydrolýza metylesteru a aktivácia na N-sukcinimidyl ester, čo je prekurzor, ktorý je možné priamo využiť pre syntézu acylceramidov.

Abstract

Acylceramides, subgroup of ceramides with ultralong chains, are essential component of extracellular lipid matrix in the uppermost skin layer, stratum corneum. They have crucial role in mammalian survival on dry land. Deeper understanding of their function in physiology of pathophysiology of the skin and their therapeutic potential are hampered by their limited availability.

Analysis of the skin surface lipids of the ass (*E. asinus*) has shown, that these lipids contain up to 56% of unbranched ω-lactones (equolides), from which 51.2% is mono-unsaturated dotriacontanolide and 41.3% is mono-unsaturated triacontanolide. Carbon chain length of these lactones match the most common length of carbon chain in acylceramides (30 and 32 carbon atoms) therefore they could be used in their total synthesis.

Aim of this thesis was to isolate mono-unsaturated ω-lactone with 32 carbon chain (dotriacontanolide) from the mixture of donkey skin surface lipids, followed by hydrogenation and transformation to the suitable precursor (succinmidyl ester) in order to find the easiest synthetic path in its conversion to acylceramides.

We have tried many synthetic pathways. From direct aminolysis of lactone, through reaction with N-hydroxysuccinimide in various reaction conditions to opening of the lactone to the potassium salt of ω-hydroxyacid, followed by reaction with dissucinimidyl carbonate. However, all synthetic pathways are complicated by low solubility of these compounds and their very low reactivity. Opening of the lactone to the methylester of ω-hydroxyacid, followed by protection of ω-hydroxy group, methylester hydrolysis and activation to the N-succinimidyl ester, which is precursor that can be directly used in acylceramide synthesis seems as the most suitable pathway.

1. Úvod a cieľ práce

Kožná bariéra umiestnená v *stratum corneum* je nevyhnutná pre život na súši. Tvoria ju korneocyty (ploché, odumreté bunky), ktoré sú obklopené lipidovým matrixom. Menšie poruchy v zložení lipidového matrixu kožnej bariéry sa prejavujú ochoreniami ako atopická dermatitída či psoriáza. Pri akýchkoľvek väčších poruchách umierajú jedinci skoro po narodení kvôli obrovským stratám vody cez kožu.

Nezastupiteľnou zložkou kožnej bariéry sú acylceramidy (podskupina ceramidov s ultradlhými reťazcami), ktoré sa okrem iného pomocou svojej ω-hydroxylovej skupiny viažu na povrch korneocytov a vytvárajú prvú vrstvu lipidov v medzibunkovom priestore *stratum corneum*, čo v podstate slúži ako matica pre usporiadanie ďalších vrstiev lipidov. Nanešťastie je ich výskum obmedzený ich dostupnosťou. Acylceramidy nie sú komerčne dostupné a ich totálna syntéza pozostáva z mnohých krokov s pomerne nízkym celkovým výťažkom. Ich izolácia z kože je taktiež náročná.

Analýza povrchových lipidov osla (*E. asinus*) ukázala, že obsahujú nenasýtené, nerozvetvené laktóny o dĺžke 30 a 32 uhlíkov, čo svojou dĺžkou odpovedá dĺžke acylového reťazca acylceramidov, a využitie týchto laktónov by mohlo výrazne skrátiť totálnu syntézu acylceramidov.

Cieľom tejto práce bolo vytvoriť jednoduchú a spoľahlivú syntetickú cestu, vedúcu od rôzne dlhých laktónov (C 15 a C 30 – 32), cez vhodný prekurzor až k acylceramidom. Hlavným cieľom tejto práce potom bolo izolovať nenasýtený ω-laktón s 32 uhlíkovým skeletom (dotriakontanolid) zo zmesi povrchových lipidov osla, jeho následná hydrogenácia a prevedenie na vhodný prekurzor (sukcinimidyl ester), ktorý by následne poskytol požadovaný acylceramid.

2. Teoretická časť

Koža (lat. *cutis*) je najväčší orgán ľudského tela, tvoriaci jeho povrch a tým aj bariéru organizmu voči fyzikálnym, chemickým a mikrobiologickým vplyvom okolia. Jednou z funkcií kože je prevencia straty vody z organizmu, ktorá je nevyhnutná pre prežitie cicavcov na súši. Koža dospelého človeka dosahuje povrch takmer 2 m^2, je hrubá od 0,5 do 4 mm a váži približne 3 kg [1].

2.1. Stavba kože

Koža sa skladá z dvoch hlavných vrstiev; pokožka (epidermis) a zamša (corium, dermis).

Epidermis je povrchová vrstva kože ektodermálneho pôvodu, čo sa stavby týka, je to vrstevnatý dlaždicový epitel. Základnými bunkami sú keratinocyty, ktoré sú dopĺňané ďalšími bunkami (symbiotickými); melanocyty, Langerhansove bunky a Merkelove bunky [1]. Epidermis je tvorená niekoľkými vrstvami buniek (Obr. 1):

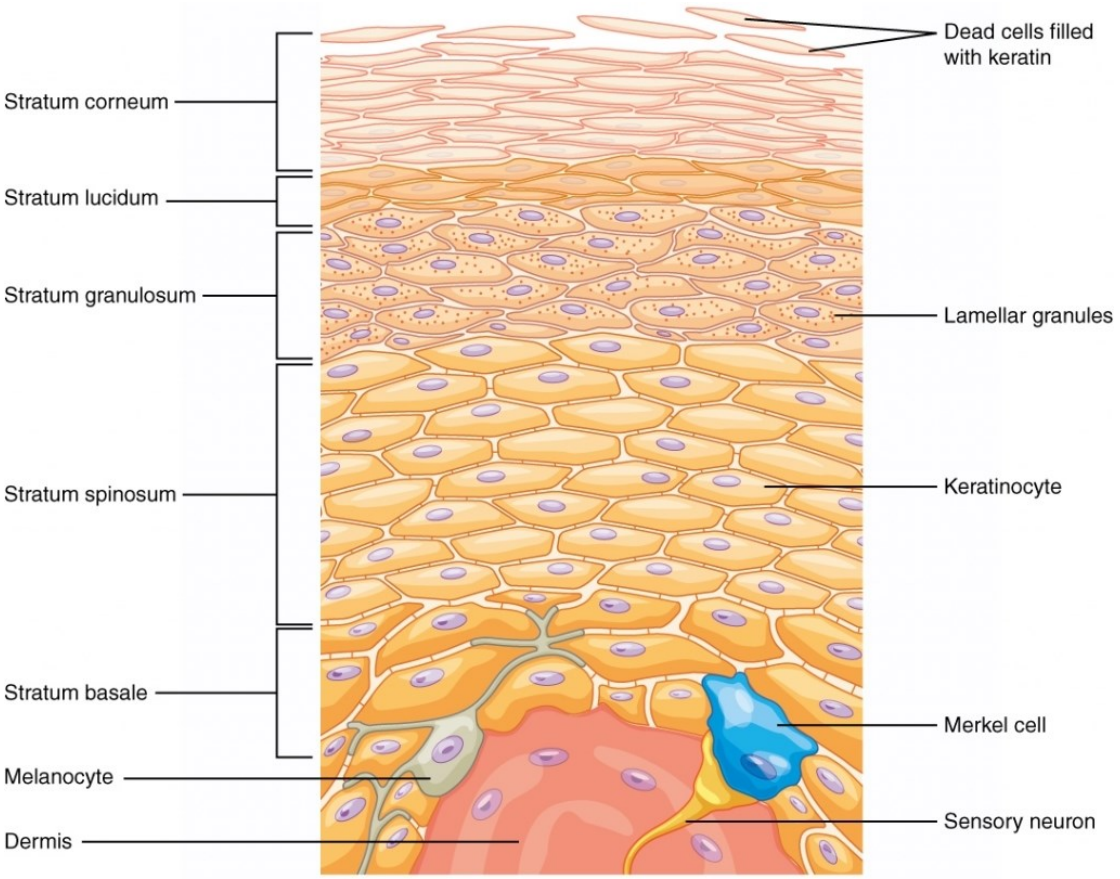
- *Stratum basale (cylindricum)* – zárodočná vrstva buniek pri bazálnej membráne, v ktorej ako jedinej prebieha bunkové delenie a vznik nových buniek.
- *Stratum spinosum* – nadväzuje na *stratum basale*, bunky v nej sa smerom k povrchu splošťujú v 2 – 5 vrstvách. Na kolmom reze je tvar buniek kopijovitý alebo polyedrický.
- *Stratum granulosum* – obsahuje 1 – 3 vrstvy buniek, v ktorých sa začínajú vytvárať zrná keratohyalínu (prekurzor keratínu), bunky postupujú k povrchu, diferencujú sa a podliehajú bunkovej smrti.
- *Stratum lucidum* – obsahuje bezjadrové bunky obsahujúce eleidín (ďalší prekurzor keratínu), je to tenká vrstva nápadná najmä v hrubej koži (dlane, chodidlá).
- *Stratum corneum* – najvrchnejšia vrstva epidermis, tvorená úplne zrohovatenými bunkami (korneocyty), ktoré sa z povrchu postupne odlupujú (*stratum disjunctum*).

Pod epidermis sa nachádza zamša, tá je tvorená dvomi vrstvami buniek:

- *Stratum papillare* – obsahuje väčšie množstvo väzivových buniek a je pretkaná sieťou kapilár.

- *Stratum reticulare* – hlbšia vrstva, obsahuje husté zväzky kolagénových vlákien, je zodpovedá za ťažnosť kože.

Pod zamšou sa nachádza podkožné väzivo (*tela subcutanea*).



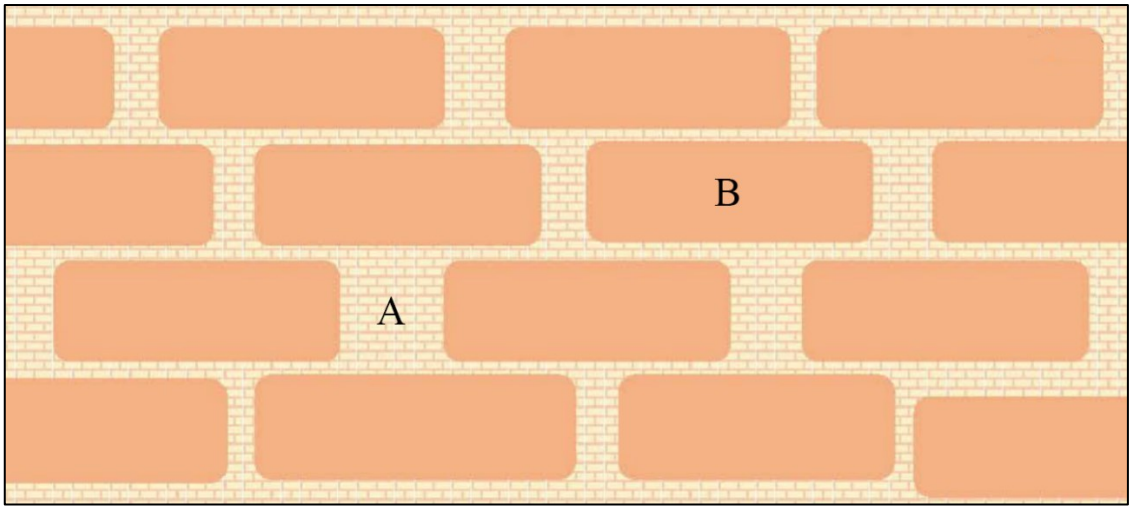
Obr. 1 Prierez ľudskou kožou, jednotlivé vrstvy epidermis

Zdroj: https://www.anatomylibrary.us/anatomy-of-epidermis/anatomy-of-epidermis-layers-of-the-skin-anatomy-and-physiology/

2.2. Stratum corneum

Stratum corneum (SC) je najvrchnejšia vrstva kože zložená z korneocytov tvoriacich priemerne 15-25 vrstiev (na chodidle až 100) [1]. V extracelulárnych priestoroch SC sa nachádza hlavná permeabilná bariéra kože, kde extracelulárne lipidové membrány zabraňujú prestupu vody z organizmu do vonkajšieho prostredia a zároveň bránia prieniku cudzorodých látok z vonkajšieho prostredia do organizmu (táto bariéra teda funguje v oboch smeroch – „*from inside out*“ a „*from outside in*“) [2]. Jedná sa o vysoko usporiadaný systém lamelárnych membrán, ktorého usporiadanie si možno zjednodušene predstaviť ako „bricks and mortar“ čo po preložení z angličtiny znamená „tehly a malta“. Korneocyty sú v tomto prípade tehlami a malta je tvorená extracelulárnymi lipidmi (Obr. 2) [3, 4]. Lipidy tvoriace tieto membrány sú zložené z ekvimolárnej zmesi ceramidov,

voľných mastných kyselín a cholesterolu s minoritnou prímesou derivátov cholesterolu, z čoho ceramidy predstavujú hmotnostne približne 50 % [5, 6]. Tento pomer je nevyhnutný pre správnu funkciu kožnej bariéry. Veľké výkyvy v zložení lipidovej matrix, prípadne nedostatok niektorej kľúčovej zložky, vedú k dramatickým stratám vody cez kožu a k úmrtiu krátko po pôrode. Menšie narušenie zloženia lipidovej matrix pozorujeme pri ochoreniach ako je psoriáza, lamelárna ichtióza, atopická dermatitída či Sjogren-Larssenov syndróm [4, 6, 7].



Obr. 2 Schéma *stratum corneum*. A – lipidový matrix, B – korneocyt

Zdroj: https://www.clfoundation.org/sites/default/files/events/Skincare_Jennings_Part1.pdf

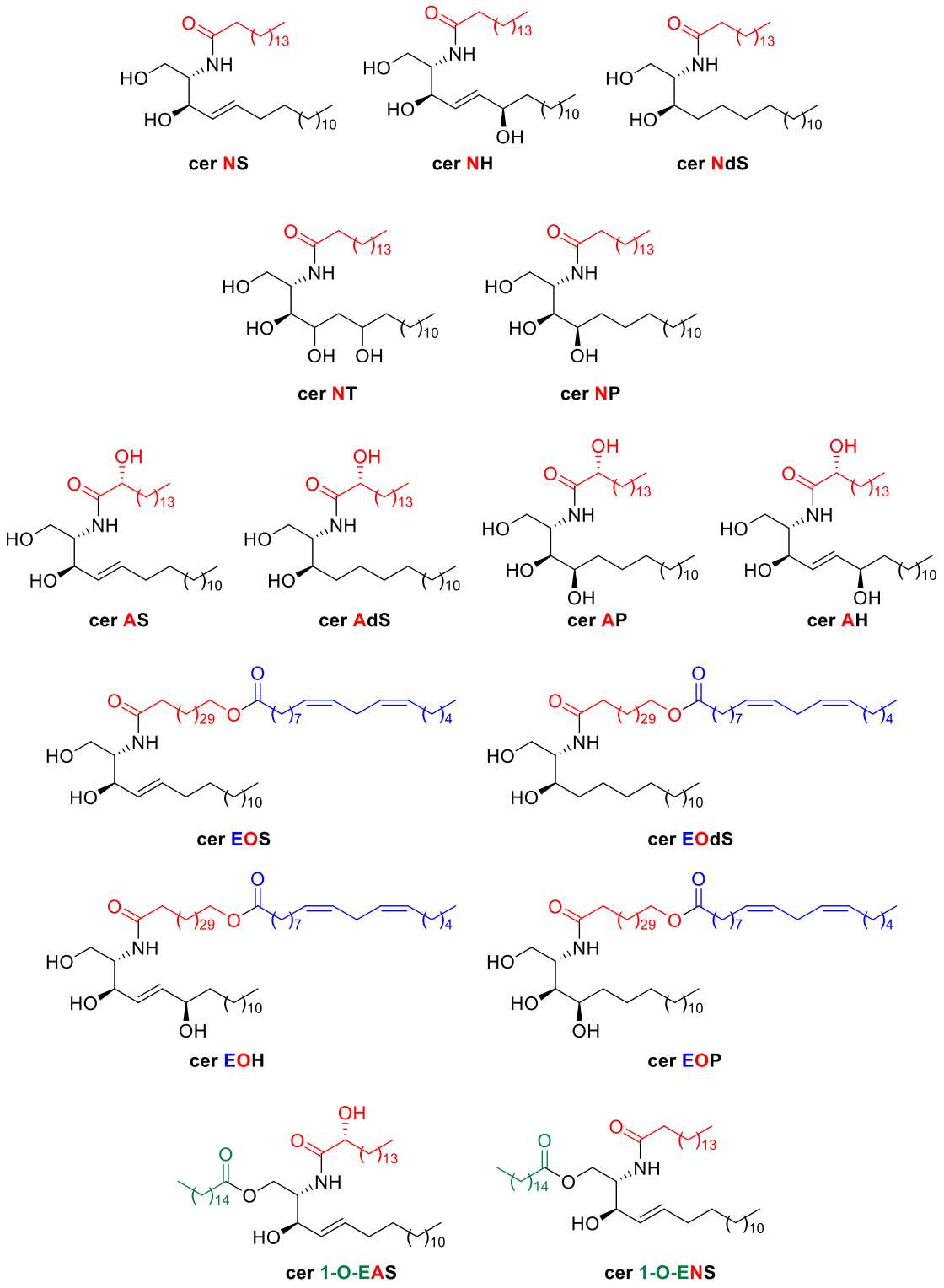
2.3. Ceramidy

Ceramidy (Cer) sú bioaktívne membránové lipidy, ktoré slúžia ako regulátory bunkových procesov (bunkový rast, metabolizmus, diferenciácia a bunková smrť) [8], ako stavebné kamene membrán a v neposlednom rade sú súčasťou kožnej bariéry [9].

Chemicky sú Cer zložené zo sfingoidnej bázy, na ktorej amino skupinu je naviazaný acyl dlhej mastnej kyseliny. Sfingoidná báza je aminoalkohol s dlhým reťazcom, zvyčajne s dĺžkou 18 uhlíkov (18 C) . Doteraz bolo objavených 5 rôznych sfingoidných báz: sfingozín – S, fytosfingozín – P, 6-hydroxysfingozín – H, dihydrosfingozín – dS a nie príliš dobre charakterizovaná, štyrikrát hydroxylovaná sfingoidná báza - T, boli však popísané aj sfingoidné bázy s reťazcom s 12 – 28 C [10]. Reťazec mastnej kyseliny má dĺžku od 16 do 36 C a je spravidla nasýtený, bez hydroxy skupiny (N), α-hydroxylovaný (A) alebo ω-hydroxylovaný (O). ω-hydroxy skupina acylu môže byť esterifikovaná ďalšou mastnou kyselinou (E) alebo kovalentne viazaná na membránové proteíny

korneocytov (P), čím tieto Cer tvoria lipidový obal korneocytov, takzvanú korneocytálnu lipidovú obálku [6, 10].

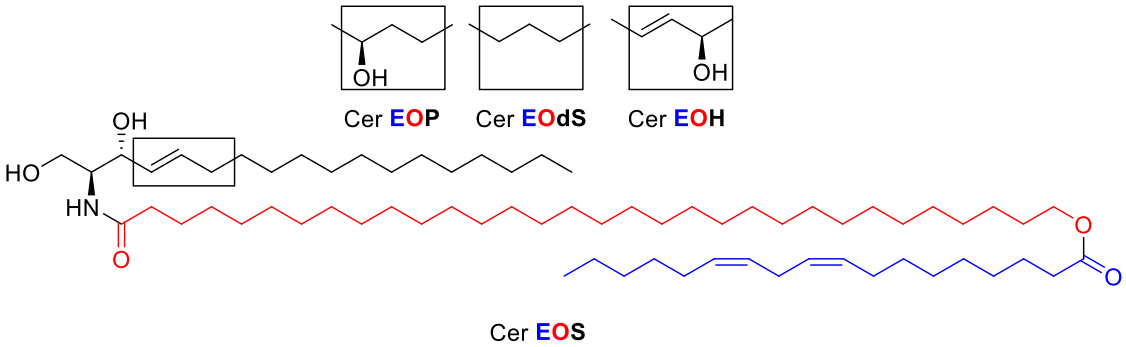
Názvoslovie Cer, navrhnuté v roku 1993 a následne niekoľkokrát upravené [10-12], pozostáva z 2 – 3 písmen [13]. Prvé písmeno vyjadruje, či je kyselina esterifikovaná (E, P alebo nemusí byť prítomné), ďalšie označuje typ kyseliny (N, A alebo O) a posledné označuje sfingoidnú bázu (S, P, H, dS alebo T). Tým pádom napríklad Cer AH bude pozostávať z α-hydroxykyseliny viazanej na 6-hydroxysfingozín, Cer POS bude zložený z ω-hydroxykyseliny viazanej svojou ω-hydroxy skupinou na proteín a zo sfingozínu. Vďaka variabilite sfingoidnej bázy, mastnej kyseliny a dĺžky jednotlivých reťazcov bolo celkovo popísaných viac než 400 rôznych Cer [10]. Z tohto dôvodu možno názvoslovie viac špecifikovať: označenie Cer AH24 nám okrem toho, že pozostáva z α-hydroxykyseliny a 6-hydroxysfingozínu, udáva tiež, že dĺžka acylu mastnej kyseliny je 24 C (u sfingoidnej bázy sa predpokladá 18 C). Najpresnejšou formou názvoslovia je vyjadrenie kompletnej substitúcie a dĺžky reťazcov: napríklad Cer EOS(d18:1/h32:0/18:2) nám udáva, že sfingoidnou bázou bude 18 C reťazec s dvomi hydroxylovými skupinami a jednou dvojitou väzbou (sfingozín) [10], acyl je ω-hydroxylovaná kyselina s 32 C a na ňu bude esterovou väzbou viazaná 18 C kyselina s dvomi násobnými väzbami (kyselina linolová) [9].



Obr. 3 Cer, ktoré boli doposiaľ objavené a popísané v ľudskom SC

2.3.1. Acylceramidy

Ako acylceramidy (acylCer), alebo Cer triedy EO, sú označované Cer zložené zo sfingoindnej bázy (S, dS, P, H) a ultradlhej, nasýtenej, ω-hydroxylovanej mastnej kyseliny. V acylCer má mastná kyselina až 38 C, najčastejšie 30, 32 a 34 C [4]. Mastná kyselina je v omega polohe esterifikovaná, u človeka to je v 95 % prípadov kyselina linolová. U iných druhov zvierat podiel linolovej kyseliny klesá (prasa – 75 až 77 %, potkany – 45 %). Pri nedostatku esenciálnych mastných kyselín u človeka je kyselina linolová nahradzovaná kyselinou olejovou alebo inými neesenciálnymi kyselinami, čo vedie k abnormálnym lamelárnym membránam a poruchám v kožnej bariére. Toto indikuje, že acylCer obsahujúce kyselinu linolovú, sú nevyhnutné pre správne fungovanie kožnej bariéry u človeka [2, 14].



Obr. 4 Molekula acylCer typu EOS, v rámčeku sú uvedené štruktúry ďalších sfingoidných báz, ktoré sa vyskytujú v acylCer.

AcylCer sú nevyhnutné pre správnu funkciu kožnej bariéry a pre prežitie na súši. Poruchy v biosyntéze acylCer sú nezlučiteľné so životom a jedince umierajú krátko po narodení kvôli obrovským stratám vody cez kožu [7].

Poruchy v zložení bariérových lipidov boli popísané pri niektorých kožných ochoreniach. Tab. 1 uvádza prehľad kožných ochorení, pri ktorých boli popísané narušené (znížené) hladiny acylCer [4, 13, 15, 16].

Ochorenie	Zmena hladiny acylcer
Lamelárna ichtyóza	CER [EOS] ↓
Psoriáza	CER [EOP] ↓
Nethertonov syndróm	CER [EOS], [EOP], [EOH], [EOdS] ↓
Atopická dermatitída	CER [EOS], [EOP], [EOH], [EOdS] ↓
Chanarinov-Dorfmanov syndróm	Acyl-CER ↓

Tab. 1 Kožné ochorenia a hladiny acylCer, ktoré sú pri nich znížené.

Dôkladnejšiemu preskúmaniu funkcie acylCer vo fyziológii a patofyziológii kožnej bariéry a ich možného terapeutického využitia bráni hlavne ich nedostupnosť. AcylCer nie sú komerčne dostupné, ich izolácia zo *stratum corneum* je náročná a syntéza je mnohokroková s nízkym celkovým výťažkom [17, 18].

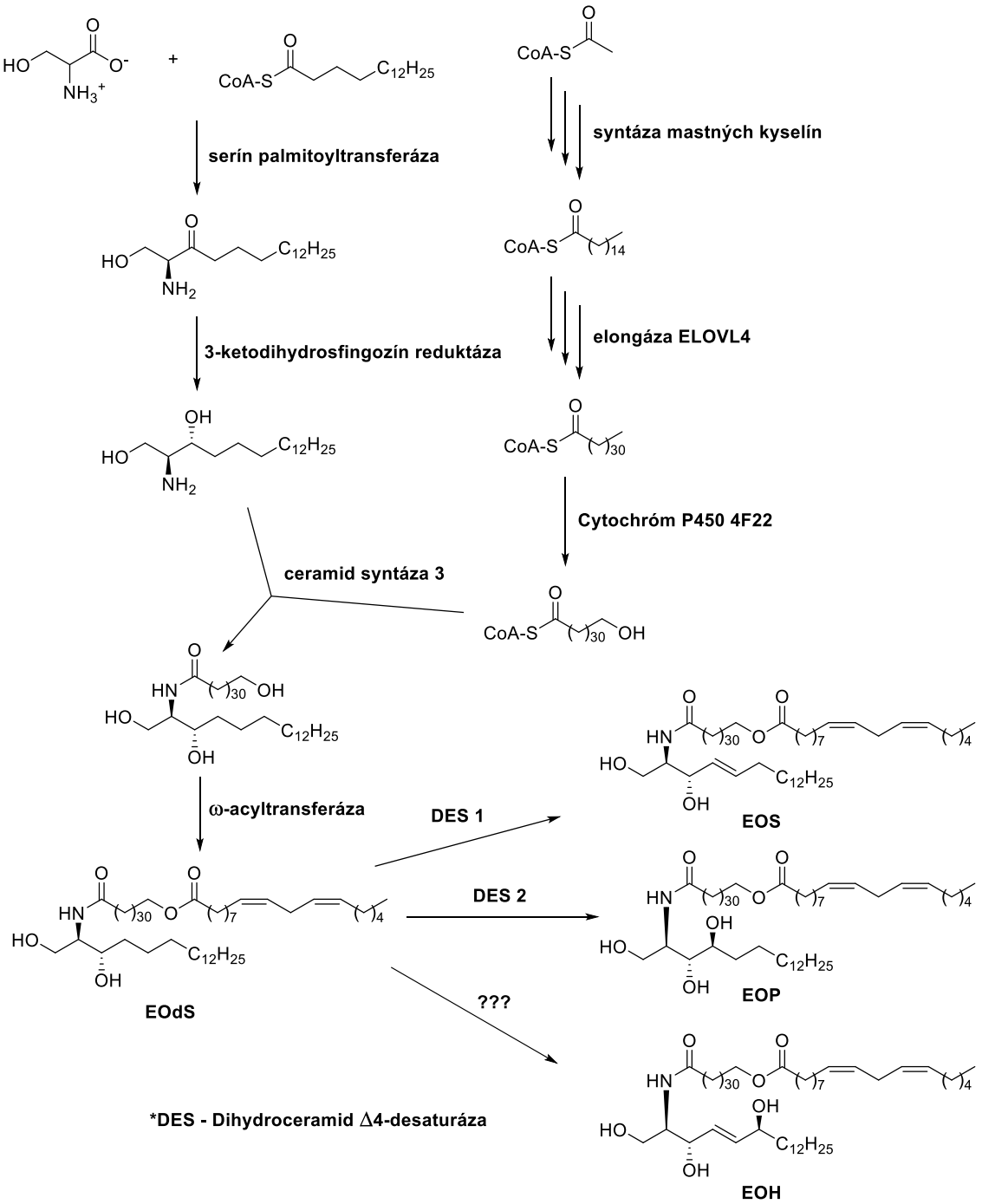
2.3.2. Biosyntéza acylceramidov

Biosyntéza sfingoidnej bázy je zhodná pre Cer aj acylCer a začína zo serínu a palmitoyl koenzýmu A (palmitoylCoA), ktoré sú kondenzované na 3-ketodihydrosfingozín (KDHSf) pomocou enzýmu serín palmitoyltransferázy. Keto skupina KDHSf je následne redukovaná 3-ketodihydrosfingozín reduktázou na hydroxy skupinu, produktom tejto reakcie je dihydrosfingozín [19]. K obmene sfingoidnej bázy (na sfingozín, fytosfingozín a 6-hydroxysfingozín) dochádza až po naviazaní acylu kyseliny na molekulu dihydrosfingozínu pomocou enzýmov zo skupiny desaturáz (dihydroceramid Δ4-desaturáza - DES). DES1 je zodpovedná za premenu dihydrosfingozínu na sfingozín, DES2 je zodpovedná za premenu dihydrosfingozínu na fytosfingozín [19]. Enzým zodpovedný za premenu dihydrosfingozínu na 6-hydroxysfingozín zatiaľ nebol nájdený [10].

Mastné kyseliny do dĺžky 16 C (kyselina palmitová) sú syntetizované komplexom syntázy mastných kyselín. Syntéza začína z krátkeho reťazca (napríklad acetyl) ktorý je predlžený o 2 C pochádzajúce z malonyl-CoA a redukovaný využitím NADPH. Cyklickým opakovaním tohto cyklu dosahuje reťazec dĺžku spomínaných 16 C [2, 20]. Za predlžovanie reťazca nad túto dĺžku sú zodpovedné enzýmy z rodiny elongáz, konkrétne ELOVL 1-7 (názov enzýmov je odvodený od ich funkcie – Elongation of very long chain fatty acid) [10, 20]. Každá z elongáz je špecifická voči inej dĺžke uhlíkového reťazca, pre syntézu acylCer je dôležitá ELOVL4, ktorá je nutná k syntéze reťazcov

dlhších ako 28 C [2, 21]. Následne je reťazec kyseliny ω-hydroxylovaný, za čo je zodpovedný CYP4F22 [22].

K syntéze kompletného acylCer ostávajú dva kroky. Spojenie dihydrosfingozínu s dlhým reťazcom kyseliny v podobe CoA a ω-esterifikácia mastnej kyseliny. Na acylácii dihydrosfingozínu acylom mastnej kyseliny sa podieľajú ceramid syntázy (CerS). Existuje 6 podtypov (CerS1-CerS6), z ktorých je pre syntézu ultradlhých Cer (C>26) potrebná CerS3 [23]. Za esterifikáciu v ω-polohe je zodpovedná ω-acyltransferáza, čo je posledná reakcia tejto biosyntetickej dráhy [24, 25].



Obr. 5 Prehľad biosyntetickej dráhy vedúcej k syntéze acylCer

2.4. Povrchové lipidy *Equidae*

Equidae (koňovité) je taxonomická čeľaď koní a im príbuzných zvierat vrátane oslov, zebier a mnohých ďalších druhov známych len z fosílii. Na povrchu ich kože sa nachádzajú lipidy, ktoré možno získať zo živých zvierat poliatím neporušenej kože acetónom [26]. Zmes takto získaných lipidov pozostáva hlavne z cholesterolu, esterov cholesterolu a ω-laktónov (Tab. 2). Oddelenie ω-laktónov od zvyšku lipidov je možné

chromatograficky na tenkej vrstve v mobilnej fáze Hexán:Benzén (1:1), týmto sa oddelí cholesterol od esterov cholesterolu a laktónov. Oddelenie esterov cholesterolu od laktónov je možné ďalšou chromatografiou na tenkej vrstve vyvolaním dvakrát po sebe v tetrachlorometáne ako mobilnej fáze [27].

Druh	Cholesterol	Estery cholesterolu	ω-laktóny
E. caballus	14	38	47
E. przewalskii	3	44	52
E. asinus	**10**	**24**	**56**
E. onager	2	29	67
E. grevyi	3	35	57

Tab. 2 Zloženie povrchových lipidov kože vybraných zvierat z čeľade koňovitých podľa analytickej tenkovrstvovej chromatografie. *E. caballus* – kôň, *E. przewalskii* - kôň Przewalského, *E. asinus* – osol, *E. onager* – osol ázijský, *E. grevyi* – zebra. Uvedené hodnoty predstavujú hmotnostné percentá z celkového množstva izolovaných lipidov.

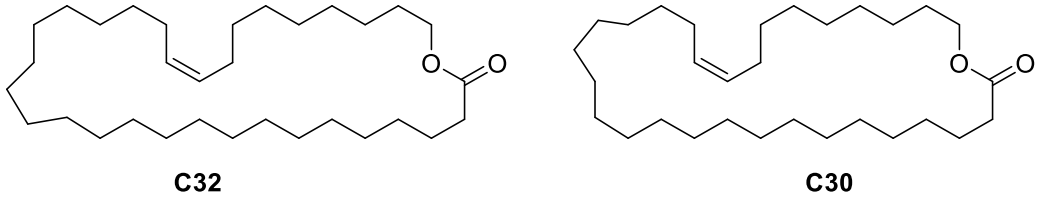
Zloženie laktónovej frakcie sa líši medzi jednotlivými druhmi (Tab. 3). Vetvené laktóny sa prevažne vyskytujú u koňa, osol a zebra produkujú prevažne laktóny s nerozvetveným reťazcom. Čo sa dĺžky týka, najfrekventovanejšie sú laktóny s dĺžkou reťazca 30, 32 a 34 C. Tým, že sa vyskytujú práve u tejto čeľade dostali tieto laktóny názov equolidy [27].

Dĺžka reťazca:		30	32i	32	34i	34	36i
E. caballus	s		7.8		4.7		
	u		16.4		47.3		9.4
E. przewalskii	s		1.7				
	u		23.4	5.8	32.5	1.8	2.1
E. asinus	s	2.1					
	u	**41.3**		**51.2**		**4.1**	
E. onager	s	13.9	16.2	4.4	2.5		
	u	6.9		31.6		5.1	
E. grevyi	s	20.9		7.4			
	u	5.4		43.7		14.2	

Tab. 3 Jednotlivé dĺžky laktónov v rámci čeľade koňovitých podľa plynovej chromatografie. s – nasýtené laktóny, u – nenasýtené laktóny, i – vetvenie na ω-1 uhlíku pred hydroxy skupinou.

V povrchových lipidoch produkovaných oslom (donkey sebum, DS) sa nachádza 56 % laktónov. Z nich tvorí nenasýtený dotriakontanolid 51,2 % a triakontanolid 41,3 % (Obr. 6). Reťazec oboch laktónov je nerozvetvený, čo je vhodné, pretože ich otvorením na ω-

hydroxykyselinu dlhú 30 alebo 32 C získavame skelet, ktorý je časťou acylCer (konkrétne reťazec ultra-dlhej mastnej kyseliny).



Obr. 6 Štruktúry laktónov obsiahnutých v povrchových lipidoch osla (*E. asinus*)

3. Výsledky a diskusia

Prvým krokom plánovanej prípravy acylCer z laktónov DS bolo spracovanie vzorky DS (1 g), ktoré nám láskavo poskytol prof. P. Wertz (University of Iowa, USA). Z literatúry je zrejmé, že táto vzorka bude obsahovať laktóny, cholesterol a jeho deriváty, ktoré je nutné od seba oddeliť. Aby bolo možné vo vzorke lepšie určiť laktónovú frakciu, bol najprv pripravený štandard ultradlhého laktónu, dotriakontanolid.

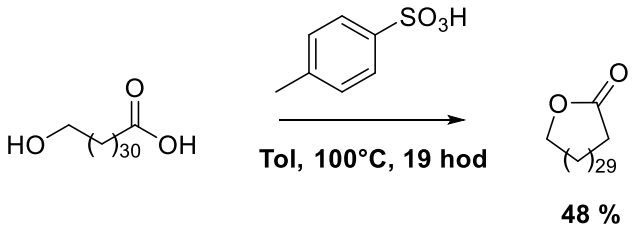


Schéma. 1 Zatváranie ω-kyseliny na laktón

V literatúre [28] je takéto uzatváranie laktónového kruhu popísané s použitím kyseliny benzénsulfónovej v benzéne. Výťažky boli popísané na 76 % pre tvorbu 18 C laktónu a 61 % pre tvorbu 23 C laktónu. V našom prípade sme vychádzali z 32-hydroxydotriakontánovej kyseliny, ktorá bola pripravená v rámci iného projektu [17], a s použitím *p*-toluénsulfónovej kyseliny v toluéne sme dosiahli výťažok 48 % pre 32 C laktón, čo považujeme za uspokojivý výsledok.

DS bolo čistené stĺpcovou chromatografiou. Bola použitá gradientová elúcia, najprv zmesou Hexán:Toluén (5:1). Po izolácii prvej frakcie (pravdepodobne estery cholesterolu) [29] sme zrýchlili mobilnú fázu na Hexán:Toluén (3:1) až (2:1). Po izolácii laktónovej frakcie (TLC porovnanie s pripraveným štandardom) bola mobilná fáza zmenená na Hexán:Etylacetát:Kyselina Octová (70:30:1). Po zmene mobilnej fázy sa nám podarilo izolovať ďalšiu frakciu obsahujúcu laktóny. Po ukončení chromatografie bol silikagél vysušený a extrahovaný dietyléterom. V éterovej frakcii sa už žiadne ďalšie laktóny nenachádzali. Celkovo sa z DS podarilo izolovať 47 mg laktónov. Ak budeme predpokladať, že zloženie DS je identické ako to analyzované v časti 2.4. pomocou plynovej chromatografie, výťažok tejto izolácie je 42 %. Zmes 30 C a 32 C laktónov nebolo možné rozdeliť pomocou TLC na reverznej fáze použitím rôznych mobilných fáz (Acetonitril:Chloroform – 1:1 a 2:3 a Acetonitril:Toluén – 2:1 a 1:1), vždy bola nájdená len jedna škvrna. O ich rozdelenie sa preto pokúsime až v závere syntézy.

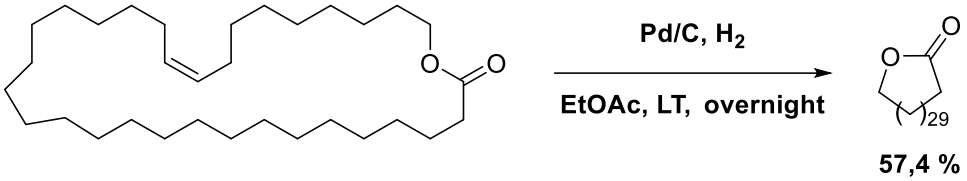


Schéma. 2 Hydrogenácia nenasýteného ultradlhého laktónu

Po izolovaní nenasýteného laktónu z DS bola ďalším krokom hydrogenácia násobnej väzby, ktorá sa nachádza v laktóne. Hydrogenácia mononenasýtených laktónov podobnej dĺžky (29 C, 31 C, 33 C) bola v literatúre popísaná s výťažkami okolo 90 % [30], nám sa pri podobných reakčných podmienkach podarilo získať výťažok len 57 % na 30/32 C laktóne. Zníženie výťažku mohlo byť pravdepodobne spôsobené nedokonalým vyčistením laktónu po jeho izolácii z DS.

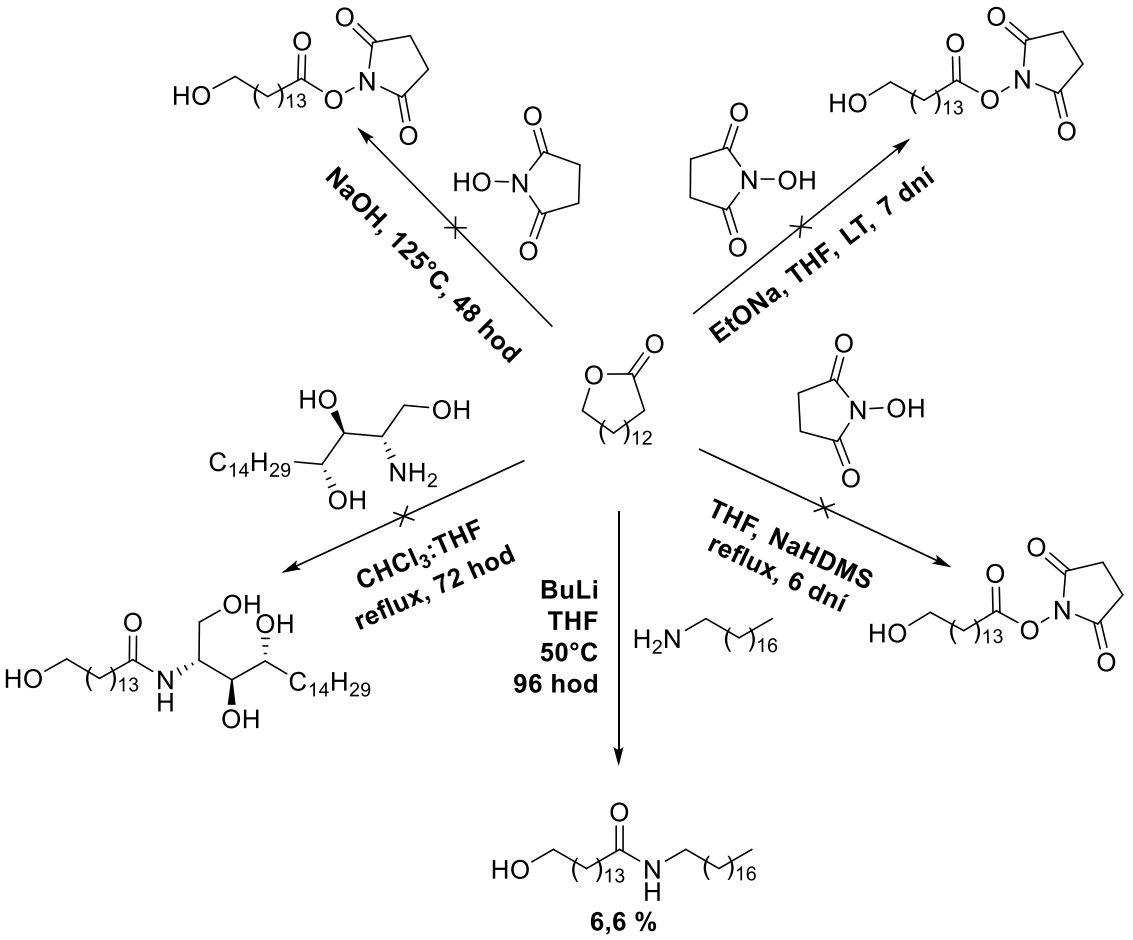


Schéma. 3 Rôzne reakcie uskutočnené s pentadekanolidom

V snahe naplniť ciele tejto práce, teda nájsť čo najjednoduchšiu cestu ako otvoriť dotriakontanolid na vhodný prekurzor, ktorý môže byť využitý v syntéze acylCer [17, 18, 31, 32] (či už priame otvorenie sfingoidnou bázou alebo dvojkrokovo s využitím

aktivovaného N-sukcinimidyl esteru). Kvôli pomerne malému množstvu dotriakontanolidu, ktorým sme disponovali, boli reakcie vykonané najprv na pentadekanolide, ktorý má síce kratší reťazec, avšak je komerčne dostupný. Ako prvú reakciu sme skúsili nukleofilnú substitúciu pomocou N-hydroxysukcinimidu (NHS), ktorá v literatúre nie je popísaná, prípadne substitúciu s jeho konjugovanou bázou (2,5-dioxopyrrolidín-1-olát), ktorá vznikla pridaním bázy do reakčnej zmesi.

Prvé reakčné podmienky boli nastavené tak, že sme nechali reagovať NHS s pentadekanolidom ako taveninu, do ktorej bol pridaný NaOH. Po rozpustení reakčnej zmesi v MeOH sme nedetegovali produkt. Keďže po pridaní NaOH reakčná zmes sčernela, rozhodli sme sa, že ďalšie reakcie budeme robiť v prítomnosti rozpúšťadla.

Reakcia NHS s pentadekanolidom v prítomnosti katalytického množstva etoxidu sodného (čo je obdoba reakcii popísaných v literatúre [33, 34]) nebola úspešná a produkt nebol detegovaný ani po 7 dňoch. Použili sme teda ekvivalentné množstvo etoxidu, produkt však taktiež nebol nájdený.

Reakcia bola zopakovaná s použitím bis(trimetylsilyl)amidu sodného (NaHMDS) ako silnejšej bázy než je etoxid. Pri pridávaní bázy pri laboratórnej teplote reakčná zmes zhnedla až sčernela, preto bola reakcia zopakovaná a pri pridávaní bázy bola reakčná zmes chladená na menej než 0 °C. Produkt však nebol detegovaný ani po 6 dňoch.

Vyvodili sme z toho, že priame štiepenie laktónu na N-sukcinimidyl ester nie je v našich podmienkach možné. Bola preto skúsená aminolýza pentadekanolidu. V prípade, že by táto reakcia prebiehala s uspokojivým výťažkom, bolo by možné pripraviť prekurzor acylCer jednokrokovou reakciou dotriakontanolidu s jednotlivými chránenými sfingoidnými bázami.

Aminolýza pentadekanolidu fytosfingozínom nebola na prvý pokus úspešná ani po 72 hod. Pre ďalšie reakcie sme sa preto rozhodli používať oktadecylamín – má podobné chemické vlastnosti, veľkosť molekuly, je však podstatne lacnejší.

Ďalším krokom bolo zvýšenie nukleofility reagujúceho amínu, jeho premenou na amid. Na toto bola využitá reakcia s butyllítiom (BuLi) ako bázy. Výťažok tejto reakcie s pentadekanolidom bol 7 %. Keďže sme predpokladali, že reaktivita dotriakontanolidu bude nižšia než pentadekanolidu, rozhodli sme sa nepokračovať ďalej v tejto ceste a zamerať sa na iné reakcie.

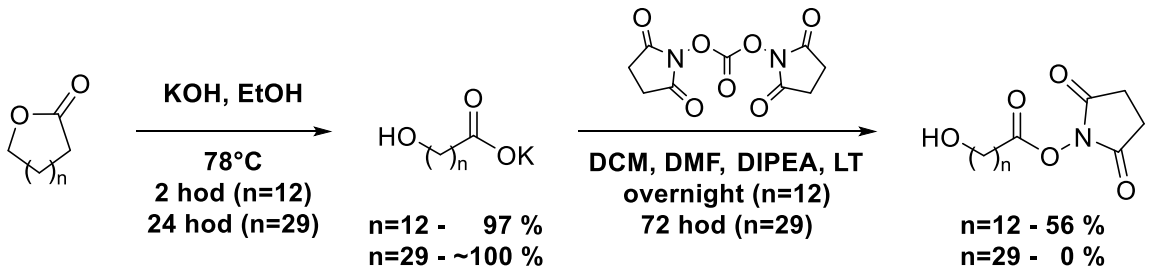


Schéma. 4 Aktivácia laktónov na sukcinimid-1-yl ester cez ich draselnú soľ

Bázická hydrolýza pomocou KOH v etanole je v literatúre popísaná s takmer kvantitatívnym výťažkom [35]. Samotná ω-hydroxykyselina je veľmi zle rozpustná, čo má vplyv na jej reaktivitu [17]. Predpokladali sme, že draselná soľ bude rozpustnejšia v zmesi rozpúšťadiel a tým pádom aj reaktívnejšia pre ďalší krok syntézy, ktorým je prevedenie na N-sukcinimidyl ester. Bežne sa na túto reakciu používa zmes NHS a karbodiimidu (dicyklohexylkarbodiimidu alebo N-(3-dimetylaminopropyl)-N′-etylkarbodiimidu) [36-38], my sme však použili disukcinimidylkarbonát (DSC), pretože s ním máme na pracovisku dobré skúsenosti. Na 15 C skelete prebiehala táto reakcia po optimalizácii s výťažkom 56 %, na 32 C skelete sa nám však ani po predĺžení reakčného času nepodarilo izolovať produkt. Pokus o izoláciu a prečistenie medziproduktu (draselnej soli) dopadol tiež neúspešne.

Ďalším krokom v syntéze bola príprava sukcinimid-1-yl-trifluoracetátu ako silnejšieho aktivačného činidla než je DSC, od ktorého sme očakávali získanie produktu sukcinimid-1-yl-32-hydroxydotriakontanoátu prostredníctvom syntézy cez draselnú soľ ω-hydroxykyseliny.

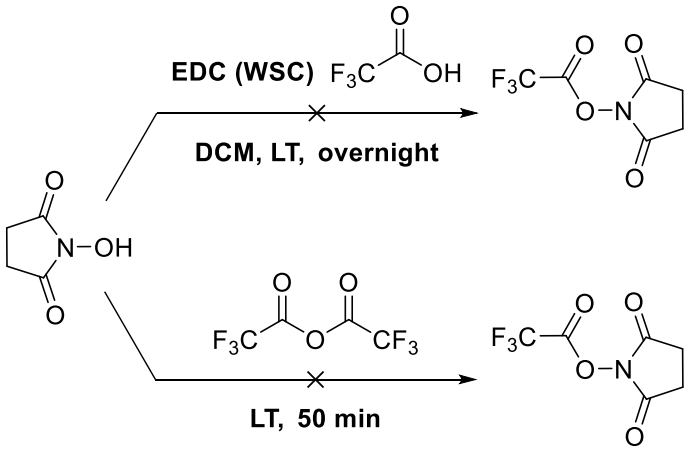


Schéma. 5 Syntéza sukcinimid-1-yl-trifluóroacetátu – silnejšieho aktivačného činidla

Syntéza s použitím kyseliny trifluóroctovej a WSC priniesla veľmi malý výťažok, najmä kvôli metóde čistenia (pridanie THF k reakčnej zmesi a následná kryštalizácia pri -20°C), preto sme pristúpili na ďalšiu metódu, ktorej čistenie spočíva v odparení nezreagovaného anhydridu a kyseliny trifluóoctovej na vákuovej odparke a hlbokom vákuu.

Syntéza sukcinimid-1-yl-trifluoracetátu rozpustením NHS v anhydride kyseliny trifluóroctovej prebieha podľa literatúry kvantitatívne [39]. Pri zopakovaní procedúry, tak ako bola popísaná v článku, sme však dostali zmes produktu, nezreagovaného NHS, anhydridu ako aj kyseliny trifluóroctovej. Reakcia bola zopakovaná s väčším nadbytkom anhydridu, po analýze produktu pomocou nukleárnej magnetickej rezonancie (NMR) sa v ňom však stále nachádzal nezreagovaný NHS. Keďže produktom tejto reakcie je vysoko reaktívna molekula, neostávalo mnoho možností ako túto látku vyčistiť tak aby sa pri čistení nerozkladala. Kvôli nespokojnosti s priebehom a výťažkom reakcie sme túto syntetickú cestu ďalej nerozvíjali.

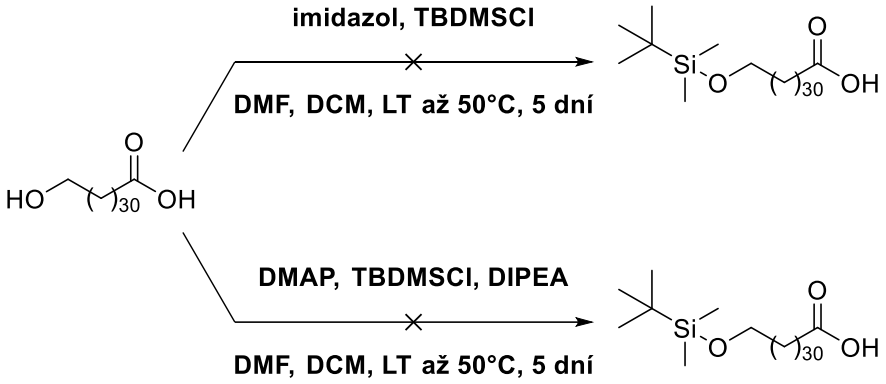


Schéma. 6 Chránenie ω-hydroxylovej skupiny dotriakontánovej kyseliny

V záujme zvýšenia rozpustnosti (zvýšením lipofility) a tím pádom aj reaktivity sme sa pokúsili ochrániť ω-hydroxy skupinu dotriakontánovej kyseliny pomocou *terc*-butyldimetylsilyl chloridu (TBDMSCl). Na kratších ω-hydroxy kyselinách (do 15 C) prebieha táto reakcia s výťažkom 50 – 83 % [40, 41], nám sa však ani po 5 dňoch a po zvýšení teploty nepodarilo detegovať žiadny produkt. Komplikáciou bola opäť veľmi nízka rozpustnosť a reaktivita 32-hydroxydotriakontánovej kyseliny.

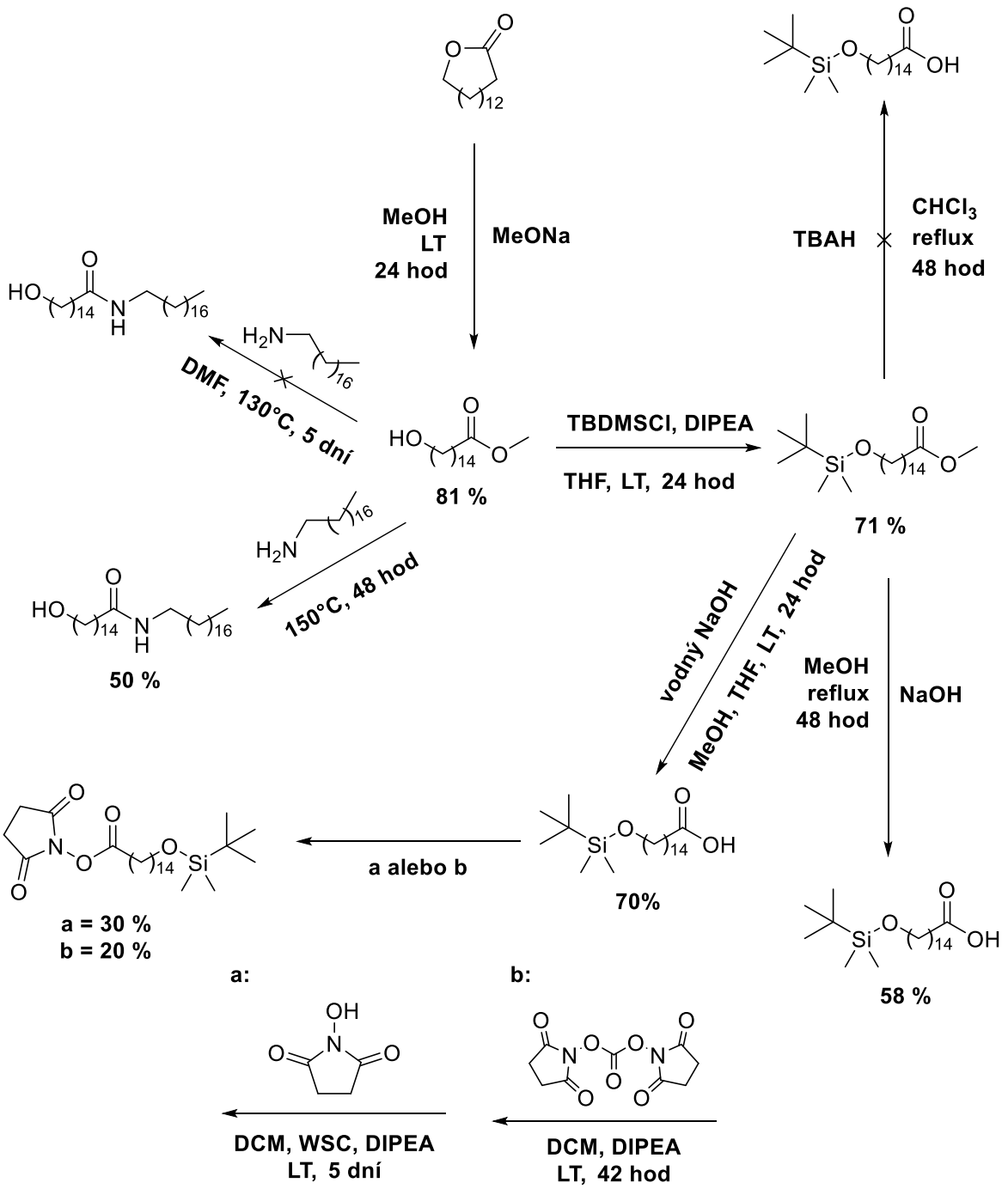


Schéma. 7 Syntetická cesta cez metylester ω-hydroxykyseliny, chránenie OH skupiny a následná hydrolýza metylesteru a aktivácia na sukcinimid-1-yl ester

Pretože žiadna z jedno- až dvoj-krokových syntéz neviedla k požadovanému produktu v prijateľnom výťažku, pristúpili sme na otvorenie laktónu na metylester s použitím metoxidu sodného v MeOH. S podobnými molekulami sú v literatúre popísane výťažky až cez 90 % pri použití vyššej reakčnej teploty a dlhšieho reakčného času [42]. My sme boli s výťažkom 81 % spokojní, vedeli by sme však ako postupovať, keby bola žiadúca optimalizácia syntézy.

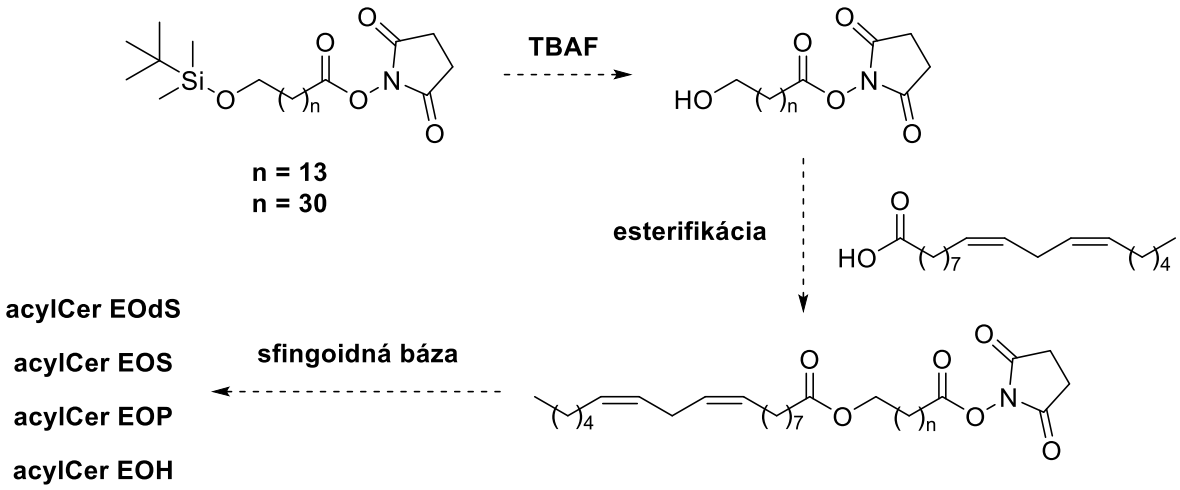
V rámci splnenia cieľov práce a teda v záujme nájsť čo najjednoduchšiu cestu premeny laktónov na acylCer sme sa ako nasledujúcu reakciu pokúsili o aminolýzu metyl-15-hydroxypentadekanoátu. Zmiešaním a rozpustením metyl-15-hydroxypentadekanoátu s oktadecylamínom v dimetylformamide (DMF) a následným zahrievaním reakčnej zmesi na 130°C nebol ani po 5 dňoch detegovaný produkt. Reakciou metyl-15-hydroxypentadekanoátu s oktadecylamínom v tavenine pri 150 °C po dobu 48 hod a následným čistením pomocou stĺpcovej chromatografie bolo získané množstvo produktu, ktoré odpovedalo 50 % výťažku. Analýza NMR však ukázala, že produktom je zmes amidu a metylesteru približne v pomere 1:1, ktorá sa za daných podmienok od seba nedá oddeliť.

Keďže samotná dotriakontánová kyselina je nerozpustná a nereaktívna, hydrolýza metylesteru ako ďalší reakčný krok by nemala význam. Rozhodli sme sa preto pre chránenie ω-hydroxy skupiny, od čoho sme očakávali zvýšenú rozpustnosť a teda aj reaktivitu na ďalšie kroky syntézy. Chránenie pomocou TBDMSCl prebieha (podľa literatúry) na metyl-12-hydroxydodekanoáte v závislosti na reakčných podmienkach s výťažkom 82 – 88 % [43, 44], nám sa podarilo získať výťažok 71 % na 15 C skelete.

Následným krokom syntézy bola hydrolýza metylesteru. Hydrolýza lipofilnou bázou v nepolárnom prostredí (tetrabutylamónium hydroxid (TBAH) v $CHCl_3$) neposkytla žiadaný produkt. Naopak pri hydrolýze v polárnom prostredí (NaOH v MeOH) bol získaný produkt s výťažkom 58 %. Literatúra [45] uvádza vyššie výťažky s použitím zmesi rozpúšťadiel (MeOH a THF) s vodným roztokom hydroxidu sodného. Touto cestou sa nám podarilo zvýšiť výťažok až na 70 %.

Nasledujúcim krokom tohto reakčného postupu bola aktivácia sililovanej kyseliny na N-sukcinimidyl ester. Vyšší výťažok (30 %) bol získaný reakciou s DSC. Reakčná zmes bola v tomto prípade čistená stĺpcovou chromatografiou s použitím mobilnej fázy Hexán:Chloroform (1:10). Aktivácia kyseliny pomocou NHS a N-(3-dimetylaminopropyl)-N′-etylkarbodiimidu (EDC, WSC) poskytla nižší výťažok (20 %), ako mobilná fáza pri stĺpcovej chromatografii však bola použitá zmes Hexán:Etylacetát (5:1) + 0,5 % kyseliny octovej. NMR spektrum druhej reakcie bolo oveľa čistejšie. Zhrnutím tohto kroku je, že vhodnejšie činidlo na aktiváciu je DSC a vhodnejšia mobilná fáza na stĺpcovú chromatografiu je zmes Hexán:Etylacetát (5:1) + 0,5 % kyseliny octovej. Táto reakcia si však ešte žiada optimalizáciu.

Zo všetkých, zatiaľ uskutočnených syntéz sa ako najschodnejšia javí syntéza uvedená na schéme č. 7, ktorá pozostáva z otvorenia laktónu na metylester ω-hydroxykyseliny, jeho následná sililácia, hydrolýza metylesteru a aktivácia na N-sukcinimidyl ester. Nasledujúcim krokom by bolo odchránenie hydroxy skupiny, esterifikácia s kyselinou linolovou a reakcia so sfingoidnou bázou, ktorá by poskytla finálny acylceramid. Následne je potrebné optimalizovať tento reakčný postup na dotriakontanolide.



4. Experimentálna časť

4.1. Chemikálie, prístroje a pomôcky

Východiskové látky, činidlá, rozpúšťadlá a ďalšie chemikálie a materiály boli zaobstarané od zavedených dodávateľov: Sigma-Aldrich (Schnelldorf, Nemecko), Merck (Darmstadt, Nemecko) a PENTA (Praha, Česká republika). Vzorka povrchových lipidov osla (1 g) bola získaná od prof. Philipa Wertza (University of Iowa, USA). 32-hydroxydotriakontanová kyselina bola pripravená v rámci iného projektu v pracovnej skupine.

Na charakterizáciu látok pomocou NMR boli použité prístroje Varian Mercury-Vx BB 300 (NMR analýza; ^{1}H pri 300 MHz a ^{13}C pri 75 MHz), Varian VNMR S500 (^{1}H pri 500 MHz a ^{13}C pri 125 MHz). Na tenkovrstvovú chromatografiu (TLC) boli použité TLC dosky Silica gel 60 F254 (Merck, Darmstadt, Nemecko). Na vyhodnotenie (detekciu) TLC dosiek boli použité 3 detekčné zmesi: 1) $Ce(SO_4)_2$, $H_3[P(Mo_3O_{10})_4]$, H_2SO_4 a voda; 2) $KMnO_4$, K_2CO_3, NaOH a voda; 3) Ninhydrín, n-butanol a kyselina octová, vždy nasledované miernym až intenzívnym zahriatím.

NMR spektrá boli vyhodnotené pomocou počítačového programu MestReNova. Schémy chemických reakcii boli vytvorené pomocou programu ChemDraw Professional.

4.2. Spracovanie donkey sebum

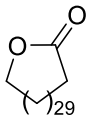
Prvá časť experimentálnej časti pozostávala z izolácie nenasýteného triakontanolidu a dotriakontanolidu z poskytnutej vzorky DS.

200 mg vzorku DS bolo čistených gradientovou stĺpcovou chromatografiou. Najprv bola použitá mobilná fáza Hexán:Toluén (5:1), ktorá bola zrýchlená postupne na Hexán:Toluén (3:1) až (2:1). Po izolácii laktónovej frakcie (TLC porovnanie s pripraveným štandardom) bola mobilná fáza zmenená na Hexán:Etylacetát:Kyselina octová (70:30:1). Po ukončení stĺpcovej chromatografie bol silikagél vysušený a extrahovaný dietyléterom. Podarilo sa nám získať 47 mg laktónov, čo predstavuje výťažok 42 %. Zmes 30 C a 32 C laktónov nebolo možné rozdeliť pomocou TLC na reverznej fáze použitím rôznych mobilných fáz, vždy bola nájdená len jedna škvrna. (Acetonitril:Chloroform – 1:1 (Rf = 0,4) a 2:3 (Rf = 0,67) a Acetonitril:Toluén – 2:1 (Rf = 0,22) a 1:1 (Rf = 0,58)).

Chromatografia bola zopakovaná so zvyšnými 800 mg s výťažkom 39 %.

4.3. Syntetická časť

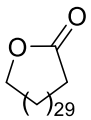
Dotriakontanolid – syntéza štandardu



30 mg 32-hydroxydotriakontánovej kyseliny (0,0604 mmol) a 28,5 mg *p*-toluénsulfónovej kyseliny (PTSA) (0,1655 mmol) boli zmiešané, rozpustené v 25 ml toluénu a zahrievané pri teplote 100 °C po dobu 19 hod. Po ukončení reakcie bolo rozpúšťadlo odparené a produkt bol čistený pomocou stĺpcovej chromatografie (Hexán:Etylacetát – 30:1). Bolo izolovaných 14 mg produktu ako biela pevná látka, čo predstavuje 48 %. Rf = 0,38 v Hexán Etylacetát (19:1). ^{1}H NMR (500 MHz, $CDCl_3$) δ 4.09 (t, J = 6.3 Hz, 2H), 2.31 (t, J = 7.3 Hz, 2H), 1.67 – 1.59 (m, 4H), 1.41 – 1.18 (m, 54H). ^{13}C NMR (126 MHz, $CDCl_3$) δ 174.01, 64.33, 34.50, 29.40, 29.37, 29.34, 29.31, 29.26, 29.23, 29.19, 29.11, 29.09, 29.06, 29.04, 28.98, 28.93, 28.90, 28.88, 28.61, 25.95, 25.05.

Reakcia bola zopakovaná vo väčšom množstve (400 mg kyseliny (0,8051 mmol) a 380 mg PTSA (2,2067 mmol) v 330 ml toluénu pri 130 °C, ~40 hod) s výťažkom 174 mg (44 %).

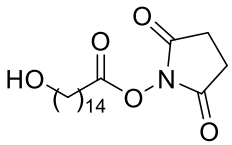
Dotriakontanolid – hydrogenácia



47 mg nenasýteného laktónu získaného z DS (0,0986 mmol) sme rozpustili v 10 ml etylacetátu a pridali 3,1 mg paládia na uhlíku (10 % Pd/C) (0,003 mmol). Atmosféru nad reakčnou zmesou sme pomocou balóniku vymenili za vodík, reakcia bežala cez noc pri laboratórnej teplote (LT). Reakcia bola ukončená odfiltrovaním paládia a následne bolo rozpúšťadlo odparené na vákuovej odparke. Reakčná zmes bola čistená stĺpcovou chromatografiou (Hexán:Etylacetát 19:1). Boli izolované 3 rôzne frakcie, prvá – 23 mg (Rf = 0,89 v Hexán:Etylacetát 6:1), druhá – 4 mg (Rf = 0,78 v Hexán:Etylacetát 6:1), tretia – 5 mg (Rf = 0,67 v Hexán:Etylacetát 6:1). Podľa analýzy NMR bol

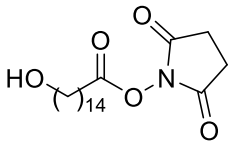
dotriakontanolid v prvej a druhej frakcii, čo spolu odpovedá 27 mg (57,4 %). ^{1}H NMR (500 MHz, $CDCl_3$) δ 4.09 (t, J = 6.4 Hz, 2H), 2.31 (t, J = 7.5, 2H), 1.66 – 1.59 (m, 4H), 1.37 – 1.23 (m, 54H). ^{13}C NMR (126 MHz, $CDCl_3$) δ 174.02, 64.35, 34.50, 34.18, 30.77, 30.31, 29.71, 29.66, 29.53, 29.46, 29.37, 29.33, 29.28, 29.21, 29.12, 29.06, 29.00, 28.94, 28.63, 25.96, 25.07.

Sukcinimid-1-yl-15-hydroxypentadekanoát (1)



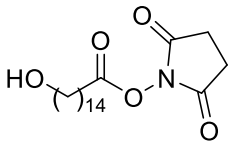
50 mg pentadekanolidu (0,208 mmol) a 240 mg NHS (2,085 mmol) boli zmiešané a vysušené na hlbokom vákuu. Reakčná zmes bola zahriata na 125 °C. Látky reagovali ako bezfarebná tavenina. Po 24 hod, kedy sa podľa TLC nič nestalo, bolo pridaných 83,4 mg NaOH (2,085 mmol). Pri pridávaní došlo k úniku pár. Odvtedy bola reakčná zmes čiernej farby. Po 48 hod bola reakčná zmes rozpustená v 5 ml MeOH. Produkt nebol na TLC detegovaný.

Sukcinimid-1-yl-15-hydroxypentadekanoát (2)



100 mg pentadekanolidu (0,416 mmol) a 105 mg NHS (0,912 mmol) boli zmiešané, vysušené na hlbokom vákuu a rozpustené v 10 ml bezvodého tetrahydrofuránu (THF). Bolo pridaných 3,1 mg etoxidu sodného (0,046 mmol) a reakčná zmes bola miešaná pri LT pod atmosférou argónu po dobu 24 hod. Keďže podľa TLC produkt nevznikal, bol reakčný čas predĺžený až na 7 dní, ale produkt sa nepodarilo detegovať.

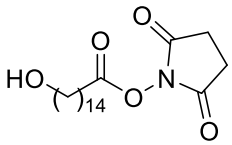
Sukcinimid-1-yl-15-hydroxypentadekanoát (3)



100 mg pentadekanolidu (0,416 mmol) a 105 mg NHS (0,912 mmol) boli zmiešané, vysušené na hlbokom vákuu a rozpustené v 10 ml bezvodého THF. Bolo pridaných

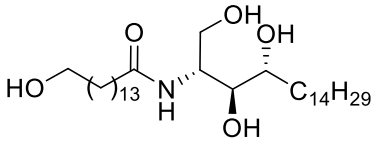
68,3 mg etoxidu sodného (1,004 mmol) a reakčná zmes bola miešaná pri LT pod atmosférou argónu po dobu 24 hod. Keďže podľa TLC produkt nevznikal, bol reakčný čas predĺžený až na 7 dní, ale produkt sa nepodarilo detegovať.

Sukcinimid-1-yl-15-hydroxypentadekanoát (4)



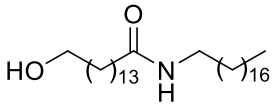
50 mg pentadekanolidu (0,208 mmol) a 240 mg NHS (2,085 mmol) boli zmiešané, vysušené na hlbokom vákuu a rozpustené v 5 ml bezvodého THF. Následne boli pridané 2,08 ml 1M roztoku NaHMDS (2,085 mmol) v THF ako bázy. Reakčná zmes bola pri pridávaní bázy chladená na menej než 0 °C. Reakčná zmes bola postupne zahrievaná k varu. Po 24 ani 48 hod nebol na TLC detegovaný produkt. Po 6 dňoch bola reakcia ukončená.

15-hydroxy-*N*-((2*R*,3*S*,4*R*)-1,3,4-trihydroxyoktadekán-2-yl)pentadekánamid - aminolýza pentadekanolidu



30 mg pentadekanolidu (0,1248 mmol) a 47,5 mg fytosfingozínu (0,150 mmol) boli zmiešané, rozpustené v zmesi $CHCl_3$:THF (1:1) a boli varené pod refluxom po dobu 72 hod. Reakcia bola monitorovaná pomocou TLC po 24, 48 a 72 hod. Žiadny produkt nebol nájdený vo významnom množstve.

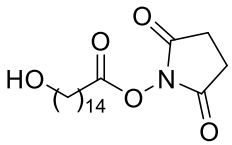
15-hydroxy-*N*-oktadecylpentadekánamid - aminolýza pentadekanolidu



280,3 mg oktadecylamínu (1,040 mmol) bolo rozpusteného v 5 ml bezvodého THF. Reakčná zmes bola chladená na menej než 0°C. Bolo pridaných 650 µl 1,6M roztoku BuLi (1,040 mmol). Po 10 minútach bolo pridaných 5ml THF v ktorých bolo rozpustených 50 mg pentadekanolidu (0,208 mmol). Po hodine boli na TLC detegované len východiskové látky, reakčná zmes bola teda zahriata na 50°C. Po 4 dňoch sme urobili

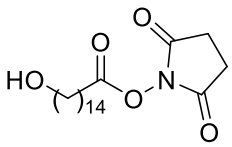
TLC v mobilnej fáze $CHCl_3$:MeOH (10:1) + 0,5 % trietylamínu (TEA), bola objavená nová škvrna s Rf = 0,43. Reakcia bola ukončená a čistená stĺpcovou chromatografiou ($CHCl_3$:MeOH – 20:1 + 0,5 % TEA). Bolo izolovaných 7 mg látky (7 %). Vzhľadom na nízky výťažok nebola látka popísaná pomocou NMR.

Sukcinimid-1-yl-15-hydroxypentadekanoát – reakcia cez draselnú soľ ω-hydroxykyseliny (1)



100 mg pentadekanolidu (0,416 mmol) a 35 mg KOH (0,624 mmol) boli zmiešané a rozpustené v 5 ml EtOH. Reakcia prebiehala za varu pod spätným chladičom 2 hod. Po ukončení reakcie bol EtOH odparený na vákuovej odparke a hlbokom vákuu. Získali sme 115 mg bielej kryštalickej látky (draselnej soli). Tá bola zmiešaná s 150 mg DSC (0,624 mmol), látky boli vysušené na hlbokom vákuu a boli rozpustené v 10 ml bezvodého DMF. Na záver bolo pridaných 0,2 ml diizopropyletylamínu (DIPEA) (1,248 mmol). Reakcia prebiehala v atmosfére argónu, pri LT cez noc. Po ukončení reakcie bolo pridaných 10 ml chloroformu a zmes bola extrahovaná 3 × 20 ml vody. Organická fáza bola vysušená pomocou Na_2SO_4, odparená a čistená stĺpcovou chromatografiou za použitia mobilnej fázy $CHCl_3$:MeOH (50:1). Boli izolované 2 frakcie (Rf = 0,70 a Rf = 0,55 v $CHCl_3$:MeOH – 10:1), podľa NMR bol produkt v prvej frakcii (13 mg, čo odpovedá výťažku 9 %). Látka bola charakterizovaná pomocou NMR, avšak elektronická podoba nebola dohľadaná.

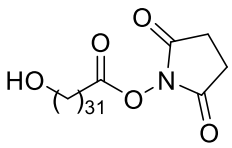
Sukcinimid-1-yl-15-hydroxypentadekanoát – reakcia cez draselnú soľ ω-hydroxykyseliny (2)



100 mg pentadekanolidu (0,416 mmol) a 35 mg KOH (0,624 mmol) boli zmiešané a rozpustené v 5ml EtOH. Reakcia prebiehala za varu pod vzdušným chladičom 2 hod. Po ukončení reakcie bol EtOH odparený na vákuovej odparke a hlbokom vákuu. Bolo získaných 119 mg bielej kryštalickej látky (draselnej soli). Tá bola zmiešaná s 150 mg

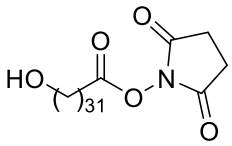
DSC (0,624 mmol), látky boli vysušené na hlbokom vákuu a rozpustené v zmesi bezvodých rozpúšťadiel: 12 ml DMF a 5 ml CH_2Cl_2 (DCM). Na záver bolo pridaných 0,2 ml DIPEA (1,248 mmol). Reakcia prebiehala v argónovej atmosfére pri LT po dobu 24 hod. Po ukončení reakcie bolo pridaných 10 ml chloroformu a zmes bola extrahovaná 3 × 20 ml vody. Organická fáza bola vysušená pomocou Na_2SO_4, odparená a čistená stĺpcovou chromatografiou za použitia mobilnej fázy $CHCl_3$:MeOH (50:1). Bolo izolovaných 80 mg pevnej lepkavej látky, čo predstavuje 56 %. Rf = 0,61 v $CHCl_3$:MeOH (10:1). ^{1}H NMR (500 MHz, $CDCl_3$) δ 3.64 (t, J = 6.7 Hz, 2H), 2.87 – 2.80 (s, 4H), 2.60 (t, J = 7.5 Hz, 2H), 1.74 (m, 2H), 1.60 – 1.53 (m, 2H), 1.43 – 1.37 (m, 2H), 1.28 (d, J = 13.3 Hz, 18H). ^{13}C NMR (126 MHz, $CDCl_3$) δ 169.17, 168.67, 63.04, 32.77, 30.91, 29.55, 29.52, 29.47, 29.38, 29.28, 29.03, 28.74, 25.70, 25.56, 25.44, 24.53.

Sukcinimid-1-yl-32-hydroxydotriakontanoát – reakcia cez draselnú soľ ω-hydroxykyseliny (1)



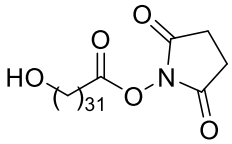
20 mg dotriakontanolidu (0,0418 mmol) a 3,5 mg KOH (0,0627 mmol) boli zmiešané a rozpustené v 2 ml EtOH. Reakčná zmes bola zahrievaná k varu po dobu 4,5 hod. Po ukončení reakcie bolo rozpúšťadlo odparené na vákuovej odparke. Bolo získaných 26 mg bielej kryštalickej látky (draselnej soli). Tie boli zmiešané s 17 mg DSC (0,0627 mmol) a rozpustené v zmesi 4 ml DMF a 2 ml DCM. Na záver bolo pridaných 0,023 ml DIPEA (0,1253 mmol). Reakcia prebiehala pod argónovou atmosférou pri LT po dobu 40 hod. Po ukončení reakcie bolo pridaných 10 ml $CHCl_3$ a nasledovala extrakcia s použitím 3 × 20 ml H_2O. Organická fáza bola vysušená pomocou Na_2SO_4. Po jej odparení na vákuovej odparke sme získali 8 mg pevnej bezfarebnej látky, ktoré boli odoslané na NMR. Podľa analýzy NMR nebol produkt prítomný.

Sukcinimid-1-yl-32-hydroxydotriakontanoát – reakcia cez draselnú soľ ω-hydroxykyseliny (2) – pokus o čiastočné vyčistenie medziproduktu



20 mg dotriakontanolidu (0,0418 mmol) a 6 mg KOH (0,1071 mmol) boli zmiešané a rozpustené v 5 ml EtOH. Reakčná zmes bola zahrievaná k varu po dobu 5 hod. Po ukončení reakcie bolo rozpúšťadlo odparené na vákuovej odparke. Produkt bol prepláchnutý vodou a prefiltrovaný najprv na frite (neúspešne – pevná látka sa dostala do filtrátu) a následne obyčajnou filtráciou (úspešne). Boli získané 2 mg látky. NMR spektrum nebolo merané.

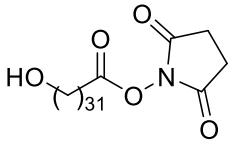
Sukcinimid-1-yl-32-hydroxydotriakontanoát – reakcia cez draselnú soľ ω-hydroxykyseliny (3)



20 mg dotriakontanolidu (0,0418 mmol) a 6 mg KOH (0,1071 mmol) boli zmiešané a rozpustené v 5 ml EtOH. Reakčná zmes bola zahrievaná k varu po dobu 5 hod. Po ukončení reakcie bolo rozpúšťadlo odparené na vákuovej odparke, látka bola zoškrabaná zo stien banky a vysušená na hlbokom vákuu. Do banky bol pridaný THF, ostala zrazenina v banke. Urobili sme TLC, Hexán:Etylacetát (12:1), v banke bol stále nezreagovaný laktón (Rf = 0,82). Nechali sme preto reakciu prebiehať ďalších 6 hodín. Podľa TLC nebol po 6 hod laktón prítomný. Reakcia bola ukončená a rozpúšťadlo bolo odparené. Získali sme 26 mg bielej kryštalickej látky (draselnej soli) ku ktorej sme pridali 17 mg DSC (0,0627 mmol). Látky boli vysušené na hlbokom vákuu a rozpustené v zmesi 4 ml DMF a 2 ml DCM. Následne bolo pridaných 30 µl DIPEA (0,1629 mmol). Reakcia prebiehala pod argónovou atmosférou pri LT. Po 45 hodinách boli pridané 2 ml DCM. Reakcia bola ukončená po 48 hod. Podľa TLC so štandardom produktu (sukcinimid-1-yl-32-hydroxydotriakontanoát, získaný v rámci iného projektu) sa produkt nachádzal v reakčnej zmesi (Rf = 0,5 v $CHCl_3$:MeOH 19:1). Rozpúšťadlá boli odparené a odsaté na vákuu. Produkt bol čistený stĺpcovou chromatografiou s mobilnou fázou $CHCl_3$:MeOH (100:1) ktorá bola postupne zrýchlená až na $CHCl_3$:MeOH (10:1). Vo frakciách nebol

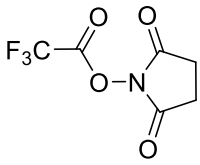
pomocou TLC detegovaný produkt. Po spojení všetkých frakcii a ich skoncentrovaní bolo získaných 9 mg bielej pevnej látky. Vzorka bola odoslaná na NMR. Spektrum neodpovedalo produktu.

Sukcinimid-1-yl-32-hydroxydotriakontanoát – reakcia cez draselnú soľ ω-hydroxykyseliny (4)



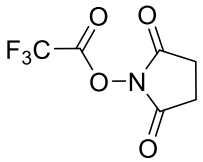
Navážky boli rovnaké ako v syntéze č. 3, reakčné časy boli predĺžené. Hydrolýza pomocou KOH na 24 hod a následná esterifikácia na 72 hod. Po ukončení reakcie bolo pridaných 15 ml H_2O a zmes bola extrahovaná 3 × 15 ml $CHCl_3$. Organické fázy boli spojené, vysušené pomocou Na_2SO_4 a rozpúšťadlo bolo odparené na vákuovej odparke. Získaná pevná látka bola spracovaná stĺpcovou chromatografiou ($CHCl_3$:MeOH – 50:1). Bolo izolovaných 13 mg bezfarebnej pevnej látky, ktoré boli odoslané na NMR. Spektrum neodpovedalo produktu.

Sukcinimid-1-yl-trifluoroacetát – príprava reaktívnejšieho aktivačného činidla (1)



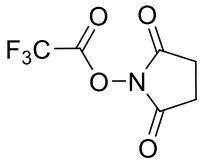
0,336 ml (4,385 mmol) kyseliny trifluóroctovej a 0,522 g NHS (4,536 mmol) boli zmiešané a rozpustené v 3,5 ml DCM. Na záver bolo do reakčnej zmesi pridaných 0,855 ml (5,057 mmol) WSC. Reakcia prebiehala cez noc pri LT. Po ukončení reakcie bolo pridaných 10 ml THF a reakčná zmes bola umiestnená na 20 min do -20°C. Vzniknuté kryštály boli odfiltrované. Kvôli neuspokojivému výťažku (rádovo v jednotkách mg produktu) sme prešli na nasledujúcu reakciu.

Sukcinimid-1-yl-trifluoroacetát – príprava reaktívnejšieho aktivačného činidla (2)



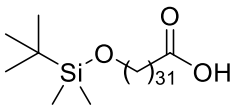
0,6 g NHS (5,213 mmol) bolo rozpustených v 1,09 ml (7,808 mmol) trifluóroacetanhydridu a miešaných pri laboratórnej teplote. Po 50 minútach bola reakcia ukončená a zbytky kyseliny trifluóroctovej boli odsaté na vákuovej odparke a potom na hlbokom vákuu (<1 mbar). Bolo získaných 1,2 g (109 %) značne hygroskopickej látky. Analýza NMR potvrdila prítomnosť nezreagovaného NHS, ako aj kyselinu trifluóroctovú a jej anhydrid. ^{1}H NMR (500 MHz, $CDCl_3$) δ 2.95 (s, 4H), 2.80 (s, 4H). ^{13}C NMR (126 MHz, $CDCl_3$) δ 172.95, 167.51, 158.86, 158.52, 153.77, 153.40, 114.96, 112.68, 25.50, 25.24.

Sukcinimid-1-yl-trifluoroacetát (3)



0,515 g NHS (4,475 mmol) bolo rozpustených v 1,8 ml (12,895 mmol) trifluóroacetanhydridu a miešané pri laboratórnej teplote. Po 2,5 hod bola reakcia ukončená a zbytky kyseliny trifluóroctovej boli odsaté na vákuovej odparke a potom na hlbokom vákuu (<1 mbar). Vzorka produktu bola odoslaná na analýzu NMR, potvrdila sa prítomnosť nezreagovaného NHS, ako aj kyseliny trifluóroctovej a jej anhydridu. ^{1}H NMR (500 MHz, $CDCl_3$) δ 2.96 (s, 4H), 2.81 (s, 4H). ^{13}C NMR (126 MHz, $CDCl_3$) δ 173.74, 167.68, 159.03, 158.69, 153.77, 153.41, 114.96, 112.69, 25.53, 25.27.

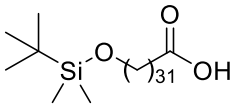
32-((*terc*-butyldimetylsilyl)oxy)dotriakontánová kyselina – chránenie ω-OH skupiny (1)



47 mg 32-hydroxydotriakontánovej kyseliny (0,095 mmol), 13 mg imidazolu (0,191 mmol) a 21 mg TBDMSCl (0,139 mmol) boli zmiešané, vysušené na hlbokom vákuu a rozpustené v zmesi bezvodých rozpúšťadiel: 1 ml DMF a 0,5 ml DCM. Reakcia

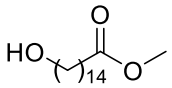
prebiehala pod argónovou atmosférou pri LT. Po 24 hod boli pridané 3 ml DCM. Po 48 hod bolo do reakčnej zmesi pridaných 21 mg TBDMSCl (0,139 mmol). Po 72 hod bola reakčná zmes zahriata na 50 °C. Reakcia bola po 5 dňoch ukončená, keď pomocou TLC nebol detegovaný produkt.

32-((*terc*-butyldimetylsilyl)oxy)dotriakontánová kyselina (2)



48 mg 32-hydroxydotriakontánovej kyseliny (0,097 mmol), 29 mg TBDMSCl (0,192 mmol) a 5,1 mg dimetylaminopyridínu (DMAP) (0,045 mmol) boli zmiešané, vysušené na hlbokom vákuu a rozpustené v zmesi bezvodých rozpúšťadiel: 1 ml DCM a 0,5 ml DMF. Na záver bolo pridaných 33 µl DIPEA (0,190 mmol). Reakcia prebiehala v argónovej atmosfére pri LT. Po 24 hod boli pridané ďalšie 3 ml DCM. Po 48 hod bolo pridaných 29 mg TBDMSCl (0,192 mmol). Po 72 hod bola reakčná zmes zahriata na 50 °C. Ani po 5 dňoch nebol detegovaný produkt pomocou TLC.

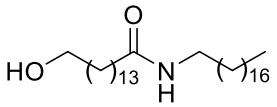
Metyl-15-hydroxypentadekanoát



50 mg pentadekanolidu (0,208 mmol) a 22,5 mg metoxidu sodného (0,417 mmol) bolo rozpustených v 8 ml bezvodého MeOH. Počas pridávania MeOH bola reakčná zmes chladená na 0 °C. Po pridaní rozpúšťadla reagovala reakčná zmes pri LT. Reakcia bola ukončená po 24 hod. Nasledovala stĺpcová chromatografia s použitím zmesi Hexán:Etylacetát (3:1) ako mobilnej fázy. Bolo izolovaných 46 mg produktu, čo predstavuje výťažok 81 %. Rf = 0,33 v Hexán:Etylacetát (3:1). ^{1}H NMR (500 MHz, $CDCl_3$) δ 3.67 (s, 3H), 3.64 (t, J = 6.4 Hz, 2H), 2.29 (m, 2H), 1.71 – 1.49 (m, 4H), 1.42 – 1.15 (m, 20H). ^{13}C NMR (126 MHz, $CDCl_3$) δ 174.33, 63.05, 51.41, 34.10, 32.80, 29.58, 29.55, 29.49, 29.41, 29.23, 29.12, 28.58, 25.72, 24.94.

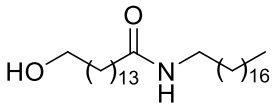
Reakcia bola zopakovaná s 500 mg pentadekanolidu (2,080 mmol) a 225 mg metoxidu sodného (4,165 mmol) v 80 ml MeOH. Po 24 hod bolo izolovaných 338 mg produktu, čo predstavuje výťažok 60 %.

15-hydroxy-*N*-oktadecylpentadekánamid – aminolýza metylesteru (1)



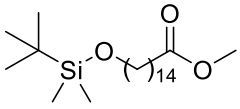
15 mg metyl-15-hydroxypentadekanoátu (0,055 mmol) a 15 mg oktadecylamínu (0,056 mmol) boli zmiešané a rozpustené v 5 ml DMF. Reakčná zmes bola zahrievaná na teplotu 130°C. Po 24 hod nebol detegovaný na TLC žiadny produkt, reakcia bola po 5 dňoch ukončená.

15-hydroxy-*N*-oktadecylpentadekánamid – aminolýza metylesteru (1)



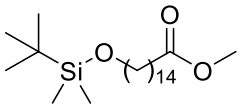
15 mg metyl-15-hydroxypentadekanoátu (0,055 mmol) a 15 mg oktadecylamínu (0,056 mmol) boli zmiešané a zahrievané na 150 °C za vzniku taveniny. Reakcia bola ukončená po 48 hod. Nasledovala stĺpcová chromatografia za použitia $CHCl_3$:MeOH (100:1) ako mobilnej fázy. Bolo izolovaných 14 mg produktu (výťažok 50 %), ktoré boli odoslané na NMR. Produktom bola zmes amidu a nezreagovaného metylesteru približne v pomere 1:1. Rf = 0,31 v $CHCl_3$:MeOH (100:1). ^{1}H NMR (500 MHz, $CDCl_3$) δ 3.59 (s, 3H), 3.50 (t, J = 6.8 Hz, 4H), 3.11 (t, J = 7.2 Hz, 2H), 2.23 (t, J = 7.5 Hz, 2H), 2.07 (t, J = 7.6 Hz, 2H), 1.48 (m, 8H), 1.19 (m, 74H), 0.80 (t, J = 6.9 Hz, 3H).

Metyl-15-*terc*-butyldimetylsilyloxypentadekanoát – chránenie OH skupiny(1)



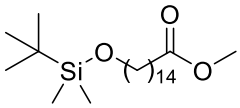
50 mg metyl-15-hydroxypentadekanoátu (0,184 mmol) bolo rozpustených v 2 ml bezvodého THF. 31 mg TBDMSCl (0,206 mmol) bolo rozpustených v 3 ml bezvodého THF. Roztok TBDMSCl bol za chladenia ľadom pridaný k roztoku metylesteru. Na záver bolo do reakčnej zmesi pridaných 36 µl DIPEA (0,207 mmol). Reakcia prebiehala pri LT 24 hod. Po 24 hod bolo do reakčnej zmesi pridaných 10 ml H_2O, ktoré boli extrahované 3 × 10 ml $CHCl_3$. Organické fázy boli spojené, vysušené Na_2SO_4 a rozpúšťadlo bolo odparené na odparke. Nasledovala stĺpcová chromatografia pri ktorej bola použitá zmes $CHCl_3$:Hexán (5:1) ako mobilná fáza. Kvôli neuspokojivému výťažku bola reakcia zopakovaná.

Metyl-15-*terc*-butyldimetylsilyloxypentadekanoát – chránenie OH skupiny (2)



50 mg metyl-15-hydroxypentadekanoátu (0,184 mmol) bolo rozpustených v 2 ml bezvodého THF. 33 mg TBDMSCl (0,219 mmol) bolo rozpustených v 3 ml bezvodého THF. Roztok TBDMSCl bol za chladenia ľadom pridaný k roztoku metylesteru. Na záver bolo do reakčnej zmesi pridaných 38 µl DIPEA (0,221 mmol). Reakcia prebiehala pri teplote 50°C. Po 48 hod sme do reakčnej zmesi pridali 66 mg TBDMSCl (0,438 mmol) a 76 µl DIPEA (0,438 mmol). Hodinu na to bolo pomocou TLC potvrdené, že sa v reakčnej zmesi už žiadny ďalší nesilylovaný metylester nenachádza. K reakčnej zmesi bolo pridaných 10 ml H_2O a bola extrahovaná 3 × 10 ml $CHCl_3$. Organické fázy boli spojené, vysušené Na_2SO_4 a rozpúšťadlo bolo odparené. Nasledovala stĺpcová chromatografia s použitím zmesi Hexán:$CHCl_3$ (1:1) ako mobilnej fázy. Bolo izolovaných 50 mg produktu (71 %). Rf = 0,75 (Hexán:$CHCl_3$ – 1:5), Rf = 0,4 (Hexán:$CHCl_3$ – 1:1). ^{1}H NMR (500 MHz, $CDCl_3$) δ 3.67 (s, 3H), 3.60 (t, J = 6.7 Hz, 2H), 2.30 (t, J = 8.7, 7.6 Hz, 2H), 1.66 – 1.58 (m, 2H), 1.50 (m, 2H), 1.27 (m, 20H), 0.90 (s, 9H), 0.05 (s, 6H). ^{13}C NMR (126 MHz, $CDCl_3$) δ 173.87, 60.10, 51.39, 34.10, 32.88, 29.62, 29.59, 29.57, 29.43, 29.24, 29.14, 25.97, 25.79, 24.98, 24.95, -5.27.

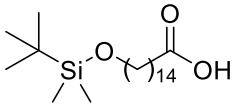
Metyl-15-*terc*-butyldimetylsilyloxypentadekanoát (3)



200 mg metyl-15-hydroxypentadekanoátu (0,734 mmol) bolo rozpustených v 18 ml bezvodého THF. Za chladenia ľadom bolo do reakčnej zmesi pridaných 1,47 ml 1M roztoku TBDMSCl v THF (1,470 mmol). Na záver bolo do reakčnej zmesi pridaných 256 µl DIPEA (1,477 mmol). Reakcia prebiehala pri LT. Po 24 hod sme do reakčnej zmesi pridali 1,5 ml 1M roztoku TBDMSCl v THF (1,500 mmol) a 260 µl DIPEA (1,500 mmol). Reakcia bola ďalších 15 hod zahrievaná na 40°C. Po ukončení reakcie bolo do reakčnej zmesi pridaných 10 ml H_2O a tá bola následne extrahovaná 3 × 10 ml $CHCl_3$. Organické fázy boli spojené, vysušené Na_2SO_4 a rozpúšťadlo bolo odparené. Nasledovala stĺpcová chromatografia pri ktorej bola ako mobilná fáza použitá zmes

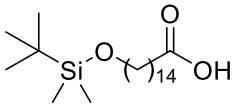
Hexán:$CHCl_3$ (13:7). Bolo izolovaných 194 mg metyl-15-*terc*-butyldimetylsilyloxypentadekanoátu (69 %).

15-*terc*-butyldimetylsilyloxypentadekánová kyselina (1)



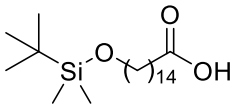
25 mg metyl-15-*terc*-butyldimetylsilyloxypentadekanoátu (0,065 mmol) a 517 mg triakontahydrátu TBAH (0,646 mmol) bolo zmiešaných a rozpustených v 5 ml $CHCl_3$. Reakčná zmes bola zahrievaná k varu. Po 24 hod nebol pomocou TLC detegovaný žiadny produkt. Reakcia bola ukončená po 48 hod, keď nebol detegovaný pomocou TLC žiadny produkt.

15-*terc*-butyldimetylsilyloxypentadekánová kyselina (2)



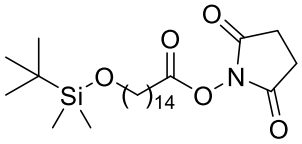
25 mg metyl-15-*terc*-butyldimetylsilyloxypentadekanoátu (0,065 mmol) a 26 mg NaOH (0,650 mmol) bolo zmiešaných a rozpustených v 5 ml MeOH. Reakčná zmes bola zahrievaná k varu. Po 24 hod bola pomocou TLC detegovaná nová škvrna – Rf = 0,05 v Hexán:$CHCl_3$ (1:10). Reakcia bola ukončená po 48 hod. Reakčná zmes bola neutralizovaná kyselinou trifluóroctovou a následne k nej bolo pridaných 10 ml H_2O. Nasledovala extrakcia s použitím 3 × 10 ml $CHCl_3$. Organické fázy boli spojené, vysušené Na_2SO_4 a rozpúšťadlo bolo odparené. Nasledovala gradientová stĺpcová chromatografia pri ktorej bola ako mobilná fáza použitá zmes Hexán:Etylacetát (21:4). Produkt vyšiel zo stĺpca až po zmene mobilnej fázy na Hexán:Etylacetát:Kys. octová (18:6:1). Bolo izolovaných 13,9 mg produktu (58 %), ktorý bol odoslaný na NMR. ^{1}H NMR (500 MHz, $CDCl_3$) δ 3.61 (t, J = 6.7 Hz, 2H), 2.35 (t, J = 7.5 Hz, 2H), 1.64 (m, 2H), 1.52 (m, 2H), 1.41 – 1.21 (m, 22H), 0.90 (s, 9H), 0.06 (s, 6H). ^{13}C NMR (126 MHz, $CDCl_3$) δ 179.37, 63.36, 34.08, 32.86, 29.62, 29.58, 29.56, 29.54, 29.52, 29.43, 29.38, 29.23, 29.07, 25.98, 25.78, 25.69, 24.74, -5.26.

15-*terc*-butyldimetylsilyloxypentadekánová kyselina (3)



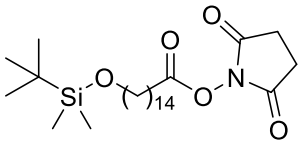
100 mg metyl-15-*terc*-butyldimetylsilyloxypentadekanoátu (0,259 mmol) bolo rozpustených v 5 ml zmesi THF:MeOH (1:1), ku ktorej bol pridaný 1 ml 10 % (m/v) vodného roztoku NaOH. Už po hodine bol pomocou TLC detegovaný vznikajúci produkt (Rf = 0,05 v Hexán:$CHCl_3$ – 1:10). Reakcia prebiehala 24 hod pri LT. Po ukončení reakcie bola reakčná zmes neutralizovaná pridaním HCl. Bolo pridaných 10 ml H_2O a nasledovala extrakcia 3 × 10 ml $CHCl_3$. Organické fázy boli spojené, vysušené pomocou Na_2SO_4 a odparené. Bolo získaných 67 mg produktu (70 %). Rf a NMR odpovedalo predchádzajúcej reakcii.

Sukcinimid-1-yl-15-((*terc*-butyldimetylsilyl)oxy)pentadekanoát (1)



13 mg 15-*terc*-butyldimetylsilyloxypentadekánovej kyseliny (0,035 mmol) a 18 mg DSC (0,070 mmol) boli zmiešané, vysušené na hlbokom vákuu a rozpustené v 1,5 ml bezvodého DCM. Na záver bolo pridaných 15 µl DIPEA (0,087 mmol). Reakcia prebiehala pod atmosférou argónu pri LT. Po 18 hod nebol na TLC v mobilnej fáze Hexán:Etylacetát (5:1) detegovaný žiadny produkt. Po zmene mobilnej fázy na Hexán:$CHCl_3$ (1:10) však boli jasne viditeľné dve škvrny (Rf = 0,21, Rf = 0,04). Reakcia bola ukončená po celkovom čase 42 hod. Nasledovala stĺpcová chromatografia s mobilnou fázou Hexán:$CHCl_3$ (1:10). Bolo izolovaných 5 mg látky (30 %), ktorá bola odoslaná na NMR. NMR potvrdilo prítomnosť látky vo vzorke, avšak látka nebola úplne čistá a vzhľadom k malému množstvu nebola ďalej čistená.

Sukcinimid-1-yl-15-((*terc*-butyldimetylsilyl)oxy)pentadekanoát (2)



30 mg 15-*terc*-butyldimetylsilyloxypentadekánovej kyseliny (0,081 mmol) a 41 mg DSC (0,160 mmol) boli zmiešané, vysušené na hlbokom vákuu a rozpustené v 3 ml bezvodého DCM. Na záver bolo pridaných 35 µl DIPEA (0,202 mmol). Reakcia prebiehala pod argónovou atmosférou pri LT. Po 24 hod nenastala podľa TCL žiadna zmena. Pridali sme preto ešte raz 41 mg DSC (0,160 mmol) a 35 µl DIPEA (0,202 mmol). O ďalších 72 hod (celkový čas 96 hod) nebola pozorovaná zmena na TLC. K reakčnej zmesi bolo pridaných 11,1 mg NHS (0,096 mmol) a 28,5 µl WSC (0,161 mmol). 5 dní na to (celkový čas 216 hod) bol na TLC detegovaný produkt (Rf = 0,29 v Hexán:Etylacetát – 5:1 + 0,5 % kyseliny octovej). Reakcia bola ukončená, rozpúšťadlo odparené na vákuovej odparke a nasledovala stĺpcová chromatografia pri ktorej bola použitá zmes Hexán:Etylacetát – 5:1 + 0,5 % kyseliny octovej ako mobilná fáza. Bolo izolovaných 6 mg produktu (20 %), ktoré boli odoslané na NMR. ^{1}H NMR (500 MHz, $CDCl_3$) δ 3.61 (t, J = 6.7 Hz, 2H), 2.84 (s, 4H), 2.61 (t, J = 7.5 Hz, 2H), 1.75 (m, 2H), 1.52 (m, 2H), 1.44 – 1.37 (m, 2H), 1.28 (d, J = 13.8 Hz, 18H), 0.90 (s, 9H), 0.06 (s, 6H). ^{13}C NMR (126 MHz, $CDCl_3$) δ 169.13, 168.66, 63.34, 32.89, 30.94, 29.69, 29.63, 29.60, 29.54, 29.44, 29.34, 29.08, 28.79, 25.98, 25.79, 25.58, 24.57, 18.38, -5.26.

5. Záver

Cieľom tejto práce bolo izolovať nenasýtený ω-laktón s 30 a 32 uhlíkovým skeletom (triakontanolid a dotriakontanolid) zo zmesi povrchových lipidov osla, kde sa nachádzajú spoločne s cholesterolom a jeho estermi. Ďalším krokom bola ich následná hydrogenácia a prevedenie na vhodný prekurzor (sukcinimidyl ester) a nájsť tak čo najjednoduchšiu syntetickú cestu ich premeny na acylceramidy.

Bol uskutočnený celý rad reakcií s cieľom získať vhodný prekurzor, avšak mnoho z nich bolo neúspešných. Najväčšou komplikáciou bola veľmi nízka rozpustnosť 32 C kyseliny (prípadne jej derivátov) a s tým spojená nízka reaktivita, čo je možné ukázať na rozdielnej reaktivite 15 C kyseliny a 32 C kyseliny, kedy kľúčové reakcie na 15 C kyseline prebehali, avšak za obdobných podmienok neprebiehali na 32 C kyseline.

Zo všetkých, zatiaľ uskutočnených syntéz sa ako najschodnejšia javí syntéza, ktorá pozostáva z otvorenia laktónu na metylester ω-hydroxylovanej kyseliny, jeho následnej sililácie, hydrolýzy metylesteru a aktivácie na N-sukcinimidyl ester. V tejto práci sme boli schopní čiastočne optimalizovať syntézu vedúcu k sukcinimid-1-yl-15-((*terc*-butyldimetylsilyl)oxy)pentadekanoátu, čo je zlúčenina priamo využiteľná na prípravu acylCer.

Do úspešného konca syntézy ostávajú už len 3 reakčné kroky. Nasledujúcim krokom by bolo odchránenie hydroxy skupiny, esterifikácia s kyselinou linolovou a reakcia so sfingoidnou bázou, ktorá by poskytla finálny acylCer. Následne je potrebné optimalizovať tento reakčný postup na dotriakontanolide.

6. Použité skratky

acylCer – acylceramidy

BuLi – butyllítium

C – počet atómov uhlíka

Cer – ceramidy

CerS – ceramid syntáza

CoA – koenzým A

DCM – dichlórmetán

DIPEA – diizopropyletylamín

DMF – dimetylformamid

DS – donkey sebum - zmes povrchových lipidov osla

DSC – disukcinimidylkarbonát

EDC - 1-etyl-3-(3-dimetylaminopropyl)karbodiimid

KDHSf – 3-ketodihydrosfingozín

LT – laboratórna teplota

NADPH – Nikotínamidadeníndinukleotidfosfát

NaHMDS – bis(trimetylsilyl)amid sodný

NHS – N-hydroxysukcinimid

NMR – nukleárna magnetická rezonancia

PTSA – *p*-toluénsulfónová kyselina

Rf – retenčný faktor

SC – *stratum corneum*

TBAF – tetrabutylamónium fluorid

TBAH – tetrabutylamónium hydroxid

TBDMSCl – *terc*-butyldimetylsilyl chlorid

TEA – trietylamín

THF – tetrahydrofurán

TLC – tenkovrstvová chromatografia

WSC – water soluble carbodiimide – vo vode rozpustný karbodiimid – viď EDC

7. Literatúra

1. Čihák, R., *Anatomie 3*. 1. vydání. 1997, Praha 7: Grada Publishing. s. 559-564.
2. Uchida, Y. and W.M. Holleran, *Omega-O-acylceramide, a lipid essential for mammalian survival.* J Dermatol Sci, 2008. **51**(2): p. 77-87.
3. Matsui, T. and M. Amagai, *Dissecting the formation, structure and barrier function of the stratum corneum.* Int Immunol, 2015. **27**(6): p. 269-80.
4. van Smeden, J., M. Janssens, G.S. Gooris, and J.A. Bouwstra, *The important role of stratum corneum lipids for the cutaneous barrier function.* Biochim Biophys Acta, 2014. **1841**(3): p. 295-313.
5. Feingold, K.R., *Thematic review series: skin lipids. The role of epidermal lipids in cutaneous permeability barrier homeostasis.* J Lipid Res, 2007. **48**(12): p. 2531-46.
6. Holleran, W.M., Y. Takagi, and Y. Uchida, *Epidermal sphingolipids: Metabolism, function, and roles in skin disorders.* FEBS Letters, 2006. **580**(23): p. 5456-5466.
7. Vasireddy, V., Y. Uchida, N. Salem, S.Y. Kim, M.N. Mandal, G.B. Reddy, R. Bodepudi, N.L. Alderson, J.C. Brown, H. Hama, A. Dlugosz, P.M. Elias, W.M. Holleran, and R. Ayyagari, *Loss of functional ELOVL4 depletes very long-chain fatty acids (> or =C28) and the unique omega-O-acylceramides in skin leading to neonatal death.* Hum Mol Genet, 2007. **16**(5): p. 471-82.
8. Hannun, Y.A. and L.M. Obeid, *Principles of bioactive lipid signalling: lessons from sphingolipids.* Nat Rev Mol Cell Biol, 2008. **9**(2): p. 139-50.
9. Rabionet, M., A. Bayerle, C. Marsching, R. Jennemann, H.J. Gröne, Y. Yildiz, D. Wachten, W. Shaw, J.A. Shayman, and R. Sandhoff, *1-O-acylceramides are natural components of human and mouse epidermis.* J Lipid Res, 2013. **54**(12): p. 3312-21.
10. Rabionet, M., K. Gorgas, and R. Sandhoff, *Ceramide synthesis in the epidermis.* Biochim Biophys Acta, 2014. **1841**(3): p. 422-34.
11. Robson, K.J., M.E. Stewart, S. Michelsen, N.D. Lazo, and D.T. Downing, *6-Hydroxy-4-sphingenine in human epidermal ceramides.* J Lipid Res, 1994. **35**(11): p. 2060-8.
12. Masukawa, Y., H. Narita, E. Shimizu, N. Kondo, Y. Sugai, T. Oba, R. Homma, J. Ishikawa, Y. Takagi, T. Kitahara, Y. Takema, and K. Kita, *Characterization of overall ceramide species in human stratum corneum.* J Lipid Res, 2008. **49**(7): p. 1466-76.
13. Motta, S., M. Monti, S. Sesana, R. Caputo, S. Carelli, and R. Ghidoni, *Ceramide composition of the psoriatic scale.* Biochim Biophys Acta, 1993. **1182**(2): p. 147-51.
14. Hamanaka, S., C. Asagami, M. Suzuki, F. Inagaki, and A. Suzuki, *Structure Determination of Glucosylβ1-N-(ω-O-Linoleoyl)-Acylsphingosines of Human Epidermis.* 1989. **105**(5): p. 684-690.
15. Imokawa, G., A. Abe, K. Jin, Y. Higaki, M. Kawashima, and A. Hidano, *Decreased level of ceramides in stratum corneum of atopic dermatitis: an etiologic factor in atopic dry skin?* J Invest Dermatol, 1991. **96**(4): p. 523-6.
16. Paige, D.G., N. Morse-Fisher, and J.I. Harper, *Quantification of stratum corneum ceramides and lipid envelope ceramides in the hereditary ichthyoses.* Br J Dermatol, 1994. **131**(1): p. 23-7.
17. Opálka, L., A. Kováčik, M. Sochorová, J. Roh, J. Kuneš, J. Lenčo, and K. Vávrová, *Scalable Synthesis of Human Ultralong Chain Ceramides.* Org Lett, 2015. **17**(21): p. 5456-9.
18. Muller, S. and R. Schmidt, *Synthesis of two unique compounds, a ceramide and a cerebroside, occurring in human stratum corneum.* Journal Fur Praktische Chemie-Practical Applications and Applied Chemistry, 2000. **342**(8): p. 779-784.
19. Gault, C., L. Obeid, and Y. Hannun, *An overview of sphingolipid metabolism: from synthesis to breakdown.* Adv Exp Med Biol, 2010. **688**: p. 1-23.
20. Jakobsson, A., R. Westerberg, and A. Jacobsson, *Fatty acid elongases in mammals: their regulation and roles in metabolism.* Prog Lipid Res, 2006. **45**(3): p. 237-49.

21. Li, W., R. Sandhoff, M. Kono, P. Zerfas, V. Hoffmann, B.C. Ding, R.L. Proia, and C.X. Deng, *Depletion of ceramides with very long chain fatty acids causes defective skin permeability barrier function, and neonatal lethality in ELOVL4 deficient mice.* Int J Biol Sci, 2007. **3**(2): p. 120-8.
22. Ohno, Y., S. Nakamichi, A. Ohkuni, N. Kamiyama, A. Naoe, H. Tsujimura, U. Yokose, K. Sugiura, J. Ishikawa, M. Akiyama, and A. Kihara, *Essential role of the cytochrome P450 CYP4F22 in the production of acylceramide, the key lipid for skin permeability barrier formation.* Proc Natl Acad Sci U S A, 2015. **112**(25): p. 7707-12.
23. Jennemann, R., M. Rabionet, K. Gorgas, S. Epstein, A. Dalpke, U. Rothermel, A. Bayerle, F. van der Hoeven, S. Imgrund, J. Kirsch, W. Nickel, K. Willecke, H. Riezman, H.J. Gröne, and R. Sandhoff, *Loss of ceramide synthase 3 causes lethal skin barrier disruption.* Hum Mol Genet, 2012. **21**(3): p. 586-608.
24. Takagi, Y., H. Nakagawa, N. Matsuo, T. Nomura, M. Takizawa, and G. Imokawa, *Biosynthesis of acylceramide in murine epidermis: characterization by inhibition of glucosylation and deglucosylation, and by substrate specificity.* J Invest Dermatol, 2004. **122**(3): p. 722-9.
25. Kihara, A., *Synthesis and degradation pathways, functions, and pathology of ceramides and epidermal acylceramides.* Prog Lipid Res, 2016. **63**: p. 50-69.
26. Downing, D.T. and S.W. Colton, *Skin surface lipids of the horse.* Lipids, 1980. **15**(5): p. 323-7.
27. Colton, S.W. and D.T. Downing, *Variation in skin surface lipid composition among the Equidae.* Comp Biochem Physiol B, 1983. **75**(3): p. 429-33.
28. Stoll, M. and A. Rouvé, *Vielgliedrige heterocyclische Verbindungen VIII. Zur Kenntnis der hochgliedrigen Mono- und Poly-lactonringe.* Helvetica Chimica Acta, 1935. **18**(1): p. 1087-1125.
29. Nicolaides, N., H.C. Fu, and G.R. Rice, *The skin surface lipids of man compared with those of eighteen species of animals.* J Invest Dermatol, 1968. **51**(2): p. 83-9.
30. Hon, Y.-S., Y.-C. Wong, C.-P. Chang, and C.-H. Hsieh, *Tishchenko reactions of aldehydes promoted by diisobutylaluminum hydride and its application to the macrocyclic lactone formation.* Tetrahedron, 2007. **63**(46): p. 11325-11340.
31. Tashiro, T. and K. Mori, *Synthesis of Sphingolipids with an ω-Esterified Long Acyl Chain, Ceramide Components of the Human Epidermis.* Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry, 2012. **76**(9): p. 1715-1720.
32. Masuda , Y. and K. Mori *Synthesis of sphingosine relatives. Part-26: Synthesis of ceramide 1 {(2S, 3R, 4E)-N-[30 '-(linoleoyloxy)triacontanoyl]-4-sphingenine}, a unique constituent of human skin.* Journal of the Indian Chemical Society, 2003. **80**(11): p. 1081-1083.
33. Almirante, N., A. Nicotra, V. Mandelli, S. Biondi, S. Stefanini, I.K. Sebhat, and M.M.C. Lo, *New angiotensin ii receptor blocker derivatives*. 2009, Google Patents.
34. Wolfe, S., M.-C. Wilson, M.-H. Cheng, G.V. Shustov, and C.I. Akuche, *Cyclic hydroxamates, especially multiply substituted [1,2]oxazinan-3-ones.* Canadian Journal of Chemistry, 2003. **81**(8): p. 937-960.
35. Bae, S.K., S.-H. Kim, J.-D. Kim, K.I. Koo, T.K. Ryeom, K. Ryeom, X. Fu, and Y.H. Chang, *Simplified syntheses of polymerizable bis-substituted phosphatidylcholines with various chain lengths.* Tetrahedron Letters, 2000. **41**(44): p. 8495-8498.
36. Zheng, G.-Q., X. H.U, J.M. Cassady, L.A. Paige, and R.L. Geahlen, *Synthesis of Myristoyl CoA Analogues and Myristoyl Peptides as Inhibitors of Myristoyl CoA:Protein /V-Myristoyltransferase.* Journal of Pharmaceutical Sciences, 1994. **83**(2): p. 233-238.
37. French, K.J., Y. Zhuang, R.S. Schrecengost, J.E. Copper, Z. Xia, and C.D. Smith, *Cyclohexyl-octahydro-pyrrolo[1,2-a]pyrazine-Based Inhibitors of Human N-Myristoyltransferase-1.* Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics, 2004. **309**(1): p. 340.

38. Yao, L.-Y., Q. Lin, Y.-Y. Niu, K.-M. Deng, J.-H. Zhang, and Y. Lu, *Synthesis of Lipoamino Acids and Their Activity against Cerebral Ischemic Injury.* Molecules, 2009. **14**(10).
39. Andreev, S.M., L.A. Pavlova, Y.A. Davidovich, and S.V. Rogozhin, *Synthesis of N-trifluoroacetoxysuccinimide and its reaction with organic bases.* Bulletin of the Academy of Sciences of the USSR, Division of chemical science, 1980. **29**(5): p. 785-789.
40. Brehm, E. and R. Breinbauer, *Investigation of the origin and synthetic application of the pseudodilution effect for Pd-catalyzed macrocyclisations in concentrated solutions with immobilized catalysts.* Organic & Biomolecular Chemistry, 2013. **11**(29): p. 4750-4756.
41. Arrieta-Baez, D., M. Cruz-Carrillo, M.B. Gómez-Patiño, and L.G. Zepeda-Vallejo, *Derivatives of 10,16-Dihydroxyhexadecanoic Acid Isolated from Tomato (Solanum lycopersicum) as Potential Material for Aliphatic Polyesters.* Molecules, 2011. **16**(6).
42. Naito, S., K. Taketomi, K. Yoshino, K. Morita, J. Sugita, and K. Yahagi, *Hair cosmetic composition*. 1995, Google Patents.
43. Krafft, M.E., W.J. Crooks, B. Zorc, and S.E. Milczanowski, *Reaction of Raney nickel with alcohols.* The Journal of Organic Chemistry, 1988. **53**(14): p. 3158-3163.
44. Mohanraj, S. and W.T. Ford, *Synthesis and cyclization of polymer-supported 12-hydroxydodecanoic thiol esters.* The Journal of Organic Chemistry, 1985. **50**(10): p. 1616-1620.
45. Kallury, R.K., U.J. Krull, and M. Thompson, *Synthesis of phospholipids suitable for covalent binding to surfaces.* The Journal of Organic Chemistry, 1987. **52**(24): p. 5478-5480.