

UNIVERZITA KARLOVA

Přírodovědecká fakulta

Studijní program: Chemie

Studijní obor: Medicinální chemie



Bc. Kateřina Novotná

**NÁVRH A SYNTÉZA PROLÉČIV 6-DIAZO-5-OXO-L-NORLEUCINU;
POTENCIÁLNÍ LÉČBA GLIOBLASTOMU**

**DESIGN AND SYNTHESIS OF PRODRUGS OF 6-DIAZO-5-OXO-L-
NORLEUCINE; POTENTIAL TREATMENT FOR GLIOBLASTOMA**

DIPLOMOVÁ PRÁCE

Vedoucí závěrečné práce: RNDr. Pavel Majer, CSc.

Praha, 2020

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 12. 6. 2020

.....
Bc. Kateřina Novotná

PODĚKOVÁNÍ

Ráda bych touto cestou poděkovala svému školiteli, Pavlu Majerovi, za možnost pracovat na tomto skvělém projektu. Děkuji všem svým kolegům za cenné rady a příjemnou přátelskou atmosféru v laboratoři. Dále děkuji kolegům ze servisních skupin za pomoc při charakterizaci připravených látek. V neposlední řadě také děkuji mé rodině a přátelům za obrovskou podporu během celého mého studia.

ABSTRAKT

6-Diazo-5-oxo-L-norleucin (DON, **1**) je nestandardní aminokyselina s prokázanou protinádorovou aktivitou nalezená v půdních bakteriích rodu *Streptomyces*. Kvůli značné systémové toxicitě projevující se zejména v oblasti gastrointestinálního traktu však samotný DON není vhodným klinickým kandidátem pro léčbu nádorových onemocnění. Jednou z možností, jak problém jeho toxicity vyřešit, je reversibilní strukturní úprava této molekuly ochráněním jak její aminoskupiny, tak i karboxylové funkční skupiny, tedy přípravou tzv. proléčiva DONu. Připravené proléčivo může vhodně pozměnit distribuci DONu v těle a zároveň takto zvýšit jeho permeabilitu do mozkové tkáně. Díky této strukturní úpravě se mohou eliminovat jeho nežádoucí účinky a může potenciálně vzniknout látka pro léčbu mozkových tumorů, jako je např. glioblastoma multiforme (GBM).

V mojí diplomové práci je diskutováno pět strategií pro specifické doručení DONu do mozku s využitím různých typů jeho proléčiv. Nová proléčiva jsou navržena tak, aby byla schopná buď samovolné penetrace přes hematoencefalitickou bariéru, nebo aby byla substrátem pro některý z jejích influxních transportérů. Zároveň by tato proléčiva měla být stabilní v jiných metabolicky aktivních orgánech a krevní plazmě, aby byla dostatečně snížena již zmíněná systémová toxicita DONu. Substituenty na aminoskupině i karboxylové skupině DONu v připravených proléčivech by pak měly být enzymaticky snadno odštěpitelné v mozkových buňkách za uvolnění vlastního účinného chemoterapeutika – nesubstituovaného DONu. Uvedené biologické studie s připravenými proléčivy byly provedeny ve spolupráci s výzkumným týmem profesorky Barbary S. Slusher z Johns Hopkins Drug Discovery v Baltimore (USA).

ABSTRACT

6-Diazo-5-oxo-L-norleucine (DON, **1**) is a non-standard amino acid with proven antitumor activity found in soil bacteria of the genus *Streptomyces*. However, due to the considerable systemic toxicity manifested mainly in the gastrointestinal tract, DON alone is not a suitable clinical candidate for the treatment of cancer. One of the ways to solve the problem of its toxicity is the reversible structural modification of this molecule by protecting both its amino group and carboxyl functional group, by preparing the so-called prodrug of DON. The prepared prodrug may suitably alter the distribution of DON in the body and at the same time increase its permeability to brain tissue. Due to this structural modification, its side effects can be eliminated and a substance for the treatment of brain tumors, such as glioblastoma multiforme (GBM), can potentially be formed.

In my dissertation, five strategies for the specific delivery of DON to the brain using different types of its prodrugs are discussed. The new prodrugs are designed to be either capable of spontaneous penetration across the blood-brain barrier or of being a substrate for one of its influx transporters. At the same time, these prodrugs should be stable in other metabolically active organs and blood plasma in order to sufficiently reduce the already mentioned systemic toxicity of DON. Substituents on both the amino and carboxyl groups of DON in the prepared prodrugs should then be enzymatically easily cleaved in brain cells to release their own effective chemotherapeutic - unsubstituted DON. These biological studies with prepared prodrugs were performed in collaboration with the research team of Professor Barbara S. Slusher of Johns Hopkins Drug Discovery in Baltimore, USA.

POUŽITÉ ZKRATKY

ABC	ATP-binding cassette
AJ	adherent junction (adherentní spojení)
AMK	aminokyselina
BCRP	breast cancer resistance protein
Boc	<i>t</i> -butyloxykarbonyl
CED	convection enhanced delivery
CES	karboxyesteráza
CNS	centrální nervová soustava
COX	cyklooxygenáza
CTSL	katepsin L
DCM	dichlormethan
DIEA	<i>N,N</i> -diisopropylethylamin
DMF	dimethylformamid
DMSO	dimethylsulfoxid
DON	6-diazo-5-oxo-L-norleucin
DSC	<i>N,N'</i> -disukcinimidyl karbonát
ECD	extracelulární doména
EMA	european medicine agency (Evropská agentura pro léčivé přípravky)
ESI	elektrosprejová ionizace
FDA	food and drug administration (Úřad pro kontrolu potravin a léčiv)
Fmoc	9-fluorenylmethyloxykarbonyl
GBM	glioblastoma multiforme
GLUT1	glucose transporter 1 (glukózový transportér 1)
HAND	HIV-associated neurocognitive disorders
HATU	1-[bis(dimethylamino)methylen]-1 <i>H</i> -1,2,3-triazolo[4,5- <i>b</i>]pyridinium 3-oxid hexafluorofosfát
HDAC	histon deacetyláza
HEB	hematoencefalitická bariéra
HLB	hematolikvorová bariéra
HOSu	<i>N</i> -hydroxysukcinimid

HPLC	high-performance liquid chromatography (vysokoúčinná kapalinová chromatografie)
HR MS	high-resolution mass spectrometry (hmotnostní spektrometrie s vysokým rozlišením)
HTS	high throughput screening
i.v.	intravenózní
JAM	junction-associated molecules
LAT1	large amino acid transporter 1 (přenašeč velkých aminokyselin 1)
LC-MS	liquid chromatography – mass spectrometry (kapalinová chromatografie s hmotnostním spektrometrem)
LiHMDS	lithium hexamethyldisilazan, lithium bis(trimethylsilyl)amid
MAB	monoclonal antibody (monoklonální protilátka)
MAO	monoaminoxidáza
MMAE	monomethyl auristatin E
MPTP	1-methyl-4-fenyl-1,2,4,5-tetrahydropyridin
MPPP	1-methyl-4-fenyl-4-propionoxypiperidin
MRP	multidrug resistance-associated proteins
NADH	nikotinamidadeninukleotid redukována forma
(NAD ⁺)	nikotinamidadeninukleotid oxidovaná forma
NMR	nukleární magnetická rezonance
m-TOR	mammalian target of rapamycin
PCI	photochemical internalization (fotochemická internalizace)
PDT	photodynamic therapy (fotodynamická terapie)
PEG	polyethylenglykol
P-gp	P-glykoprotein
SAR	structure-reactivity relationship (vztah mezi strukturou a reaktivitou)
s.c.	subkutánní
THF	tetrahydrofuran
TJ	tight junction (těsné spojení)
TMS	tetramethylsilan
TMZ	temozolomid
UPLC-MS	ultra performance liquid chromatography – mass spectrometry

VEGF	vascular endothelial growth factor
WHO	world health organization (světová zdravotnická organizace)
ZO	zonula occludens

OBSAH

PROHLÁŠENÍ.....	3
PODĚKOVÁNÍ.....	5
ABSTRAKT.....	7
ABSTRACT.....	9
POUŽITÉ ZKRATKY.....	11
1 ÚVOD.....	17
2 CÍLE PRÁCE.....	19
3 TEORETICKÁ ČÁST.....	21
3.1 Hematoencefalitická a hematolikvorová bariéra.....	21
3.2 Těsná spojení (TJ) v hematoencefalitické bariéře.....	22
3.3 Transport látek přes hematoencefalitickou bariéru.....	24
3.4 Strategie doručení léčiv do CNS.....	27
3.4.1 Lokální metody podání.....	28
3.4.2 Dendrimery.....	28
3.4.3 Inhibice efluxních přenašečů.....	29
3.4.4 Strukturní modifikace molekul.....	30
3.4.5 Proléčiva.....	31
3.5 Glioblastoma multiforme (GBM).....	35
3.6 6-Diazo-5-oxo-L-norleucin (DON).....	37
4 VÝSLEDKY A DISKUSE.....	47
4.1 Návrh a vývoj léčiv.....	47
4.2 Příprava <i>t</i> -butyl esteru (45) a isopropyl esteru (38) 6-diazo-5-oxo-L-norleucinu.....	48
4.3 Proléčiva DONu s lipofilním charakterem.....	50
4.4 Proléčiva DONu cílená na glukózový přenašeč GLUT1.....	58
4.5 Proléčiva DONu obsahující arecaidin.....	69
4.6 Proléčiva DONu cílená na přenašeč LAT1.....	71
4.7 Proléčiva DONu obsahující biotin.....	74
5 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST.....	77
5.1 Obecné metody a použité chemikálie.....	77
5.2 Pracovní postupy.....	78

5.2.1	Příprava <i>t</i> -butyl esteru 6-diazo-5-oxo-L-norleucinu (45).....	78
5.2.2	Proléčiva DONu s lipofilním charakterem	80
5.2.3	Proléčiva DONu cílená na glukózový přenašeč GLUT1	97
5.2.4	Proléčiva DONu obsahující arekaidin	114
5.2.5	Proléčiva DONu cílená na přenašeč LAT1.....	119
5.2.6	Proléčiva DONu obsahující biotin	121
6	ZÁVĚR	131
7	LITERATURA.....	135

1 ÚVOD

Lidský mozek využívá velmi účinných obranných mechanismů pro zamezení proniknutí nežádoucích cizorodých látek do mozkových buněk, kde by mohly působit neurodegenerativně. Jeden z nejzásadnějších vlivů na výběr molekul procházejících do mozkové tkáně má hematoencefalitická bariéra (HEB). Tato semipermeabilní membrána sice chrání mozkovou tkáň před xenobiotiky, zároveň tím ale značně znesnadňuje přístup například také látkám určeným pro léčbu mozkových onemocnění.

Moje diplomová práce se zabývá přípravou tzv. proléčiv nestandardní přírodní aminokyseliny 6-díazo-5-oxo-L-norleucinu (DON, **1**), u něž byly v minulosti prokázány značné protirakovinné účinky v řadě klinických testů. Bohužel však kvůli jeho systémové toxicitě nemohl být schválen pro použití v běžné klinické praxi. Syntézou vhodných proléčiv DONu však lze docílit selektivního působení této látky pouze v místě nádoru. Substitucí jak jeho volné aminoskupiny, tak i karboxylové skupiny lze připravit proléčiva, která budou stabilní v krevní plazmě a metabolicky aktivních orgánech a zároveň budou schopny penetrace přes HEB, kde je přítomné enzymy rozštěpí na aktivní DON.

V následujícím textu je diskutováno pět různých strategií návrhu a přípravy proléčiv DONu cílených pro léčbu maligních mozkových nádorů, jako je glioblastoma multiforme (GBM). Celkem jsem připravila 27 nových proléčiv DONu inspirovaných strukturami již dříve připravených látek podobného charakteru. Takto připravená proléčiva by měla být schopna buď samovolné penetrace přes HEB, nebo průchodu do mozku aktivním transportem pomocí některého z přenašečů v HEB. Zároveň se snažíme nalézt takové proléčivo DONu, které bude selektivně enzymaticky štěpeno pouze v nádorových buňkách v mozku. U většiny syntetizovaných proléčiv DONu jsou také diskutovány provedené *in vitro* biologické studie zkoumající jejich stabilitu a schopnost průchodu těchto látek přes HEB.

2 CÍLE PRÁCE

⚠ Návrh a syntéza:

- proléčiv **53a-h**, **58a-c** a **65a-c** s lipofilním řetězcem připojeným na *N*-konci isopropyl esteru (**38**) nebo *t*-butyl esteru (**45**) DONu,
- proléčiv **70a-c**, **79**, **83**, **87** určených pro transport do mozku pomocí přenašeče GLUT1,
- proléčiv **95a-c** obsahujících arekaidinový strukturní motiv,
- proléčiva **101** určeného pro transport do mozku pomocí přenašeče LAT1,
- proléčiv **113** – **115** s připojeným biotinem přes PEG-linker, které pomocí nejsilnější ne vazebné interakce biotin-streptavidin budou navázány na protilátku, která zaručí doručení proléčiva k jejímu specifickému antigenu na membráně buňky.

⚠ Charakterizace připravených proléčiv a jejich intermediátů pomocí ^1H a ^{13}C NMR, ESI MS a HR ESI MS po izolaci produktů z reakční směsi v dostatečné čistotě (> 95%).

⚠ Interpretace dat z provedených biologických studií u jednotlivých proléčiv.

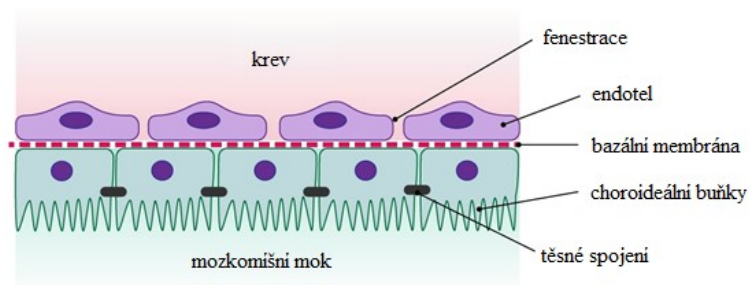
3 TEORETICKÁ ČÁST

3.1 Hematoencefalitická a hematolikvorová bariéra

V lidském mozku najdeme dva základní typy membrán, které jsou z hlediska cílené distribuce léčiv do mozkové tkáně významné. Jedná se o hematolikvorovou (HLB) a hematoencefalitickou (HEB) bariéru. Vzájemně se liší umístěním, strukturou, a tedy i propustností pro různé skupiny látek.⁽¹⁾ Jejich hlavní funkcí je především ochrana nervové tkáně před infekcí a xenobiotiky, která by mohla mozkové buňky poškodit. Dále regulují průchod iontů iontovými kanály pro ně určenými a kontrolují vstup makromolekul do mozkové tkáně pomocí specifických přenašečů. Většina velkých polárních látek musí být substrátem pro některý z transportérů, jinak jejich přenos do mozku není možný.⁽²⁾ Nesprávná funkce bariér je spojena s řadou neurodegenerativních onemocnění, jako jsou například Alzheimerova choroba, Parkinsonova choroba, epilepsie a glaukom, které souvisí s její vyšší propustností. Do mozku se tak dostávají molekuly, které by tam jinak nepronikly, a negativně ovlivňují činnost našeho hlavního řídicího orgánu.

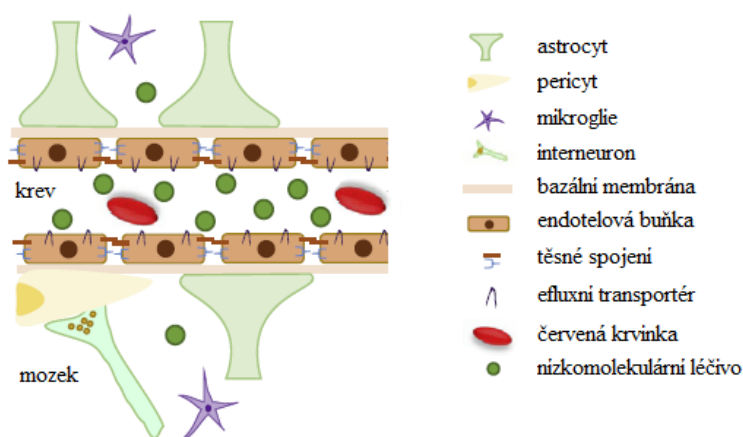
HLB odděluje krev od mozkomíšního moku (likvoru), který plní ochrannou funkci jak mechanickou, tak i metabolickou. Tlumí nárazy a otřesy mozku, zmírňuje důsledky prudkých změn tlaku a teploty. Zároveň napomáhá udržení homeostázy v okolí nervových buněk, jejich vyživování a detoxikaci. HLB je tvořena epiteliálními (gliovými) buňkami⁽³⁾ vzájemně spojenými tzv. těsnými spojeními (tight junctions, TJ), bazální membránou a vrstvou endotelu kapilár pia mater (**Obrázek 1**).⁽¹⁾

Obrázek 1: Hematolikvorová bariéra.⁽¹⁾



Z hlediska medicínální chemie je významnější membránou HEB separující krev od mozkové tkáně. Sestává ze tří vrstev (**Obrázek 2**). První z nich, která je v kontaktu s okolní krví, je tvořena endotelovými buňkami vzájemně spojenými těsnými spojeními (*zonula occludens*), které jsou v tomto případě mnohem méně permeabilní než těsná spojení HLB.⁽²⁾ Endotel je částečně obklopen mezenchymálními buňkami - pericyty, které jsou nesouvisle rozmístěny podél mozkových kapilár.⁽⁴⁾ Meziprostor vyplňuje bazální membrána (bazální lamina), která zároveň uzavírá prostor kolem pericytů a endotelových buněk. Na tuto membránu pak přisedají výběžky astrocytů, které regulují přítomnost těsných spojení na povrchu HEB, a tím ovlivňují její integritu a funkci. Struktura HEB není statická, ale mění se podle fyziologických podmínek.⁽⁵⁾ Vždy ale zabraňuje volné penetraci krevních buněk a neurotoxických složek plazmy do mozku. Na druhou stranu mozkový endotel tvoří opravdu velký prostor pro látkovou výměnu, kdy u dospělého jedince se pohybuje v rozmezí 12 – 18 m².⁽⁶⁾ Jedná se o velmi komplexní systém kapilár, kterých v mozku najdeme více než 100 miliard o celkové délce přesahující 600 km.⁽⁷⁾ Mozkové buňky jsou od nich vzdáleny nanejvýš 25 μm.⁽²⁾ Jakmile tedy molekula jednou projde přes HEB, může na ně prakticky okamžitě působit. Tato skutečnost je hlavním důvodem, proč je HEB zajímavým cílem pro vývoj nových léčiv cílených na centrální nervovou soustavu (CNS).

Obrázek 2: Struktura hematoencefalitické bariéry.⁽⁸⁾



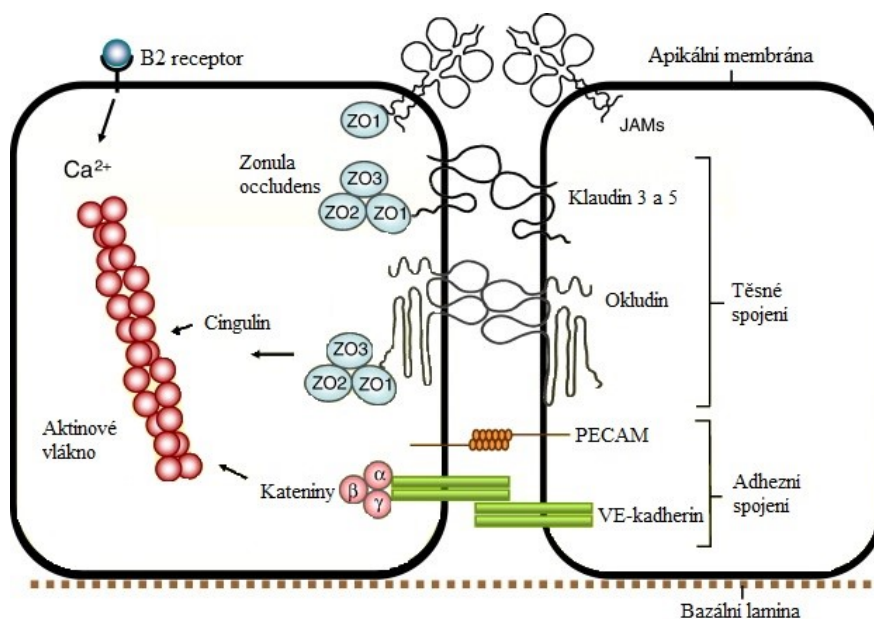
3.2 Těsná spojení (TJ) v hematoencefalitické bariéře

HEB má hydrofobní charakter, čímž umožňuje volný průchod pouze omezenému množství látek. Její selektivní propustnost zajišťují TJ, díky nimž jsou mozkové kapiláry

50–100× méně permeabilní než periferní krevní cévy.^(2,9) TJ jsou proteinové komplexy na apikální straně endoteliálních buněk, které drží sousední buňky spojené a umožňují přenos volně cirkulujících molekul v plazmě do mozkové tkáně. Mozek je tak zásoben potřebnými nutrienty, ale zároveň chráněn před nežádoucími neurotoxiny, neboť TJ jsou pro látky určité povahy neprůchozí. Vlastnosti takových molekul budou diskutovány v následující kapitole.

TJ obsahují integrální proteiny kladin 3 a kladin 5, okludin a JAM (junction-associated molecules). Kladin 3 a kladin 5 jsou tvořeny čtyřmi transmembránovými doménami, které zprostředkovávají vazbu se smyčkami kladinů sousedních buněk v extracelulární části (**Obrázek 3**).⁽³⁾ Selektivní ztráta kladinu 3 v glioblastomem postižených mozkových buňkách vede ke ztrátě integrity a některých funkcí HEB.^(2,10) Okludin obdobně vzájemně interaguje svými smyčkami, netvoří však póry pro malé ionty jako kladiny. Kladiny i okludin jsou uvnitř buňky navázány na strukturní proteiny ZO-1, ZO-2 a ZO-3, které pak dále zprostředkovávají vazbu přes cingulinové dimery na aktinový skelet. Zvýšením intracelulární koncentrace Ca^{2+} iontů může dojít k aktivaci aktinového vlákna, což vede ke změně uspořádání kladinů a okludinu na membráně, a tím i ke změně vlastností TJ. Buňky jsou takto schopné reagovat na změnu okolních podmínek.

Obrázek 3: Struktura těsných spojení.⁽²⁾



Nezbytné pro vznik TJ jsou adhezní spojení (adherens junctions, AJ), která jsou tvořena proteiny kadheriny.^(3,11) Kadheriny jsou přes další proteiny kateniny propojené s buněčnými aktinovými vlákny a jsou tedy zodpovědné za regulaci pohyblivosti buněk.⁽¹²⁾ Pokud dojde k porušení struktury AJ, naruší se také struktura TJ a celé HEB.⁽²⁾

3.3 Transport látek přes hematoencefalitickou bariéru

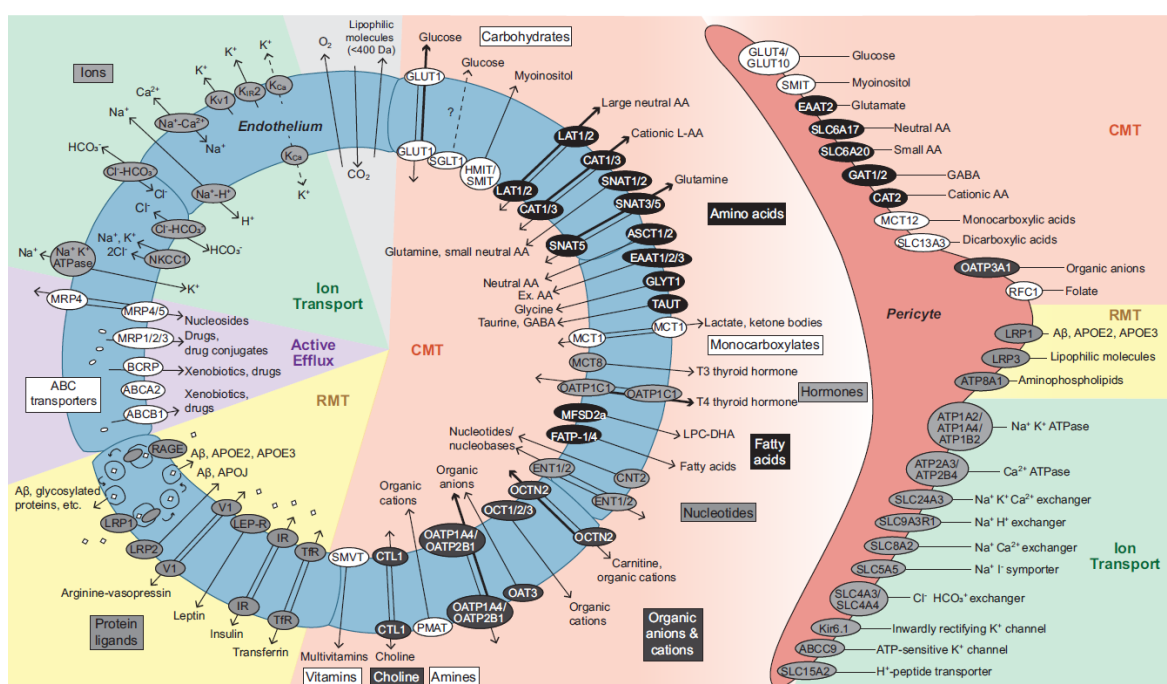
Jen velmi málo látek se přes HEB dostane pasivní difúzí. Jsou to zejména plyny (CO₂, O₂, NH₃), malé polární molekuly (voda, ethanol) a lipofilní steroidní hormony.⁽¹⁾ Ostatní molekuly mohou být přenášeny pomocí aktivního transportu, ale ne všechny k tomu mají vhodné vlastnosti. Pro sloučeniny, které mají schopnost penetrace přes HEB, byla na konci minulého století formulována Lipinského pravidla 5,^(11,13,14) podle nichž je membrána špatně prostupná pro molekuly s velkým polárním povrchem (větším než 80 Å²) a molekulovou hmotností nad 500 Da, součtem donorů vodíkových vazeb větším než 5 a součtem akceptorů vodíkových vazeb větším než 10. Problémem pro průchodnost membránou může být i vysoká afinita k plazmatickým proteinům. Důležitá je také hodnota logP (kde P je rozdělovací koeficient směsi oktanol/voda při pH 7,4), která reflektuje míru lipofility dané sloučeniny.⁽¹⁵⁾ Ideální hodnota logP se podle těchto pravidel pohybuje okolo hodnoty 2. Molekuly jsou selektovány nejen na základě velikosti, ale i náboje. Báze, které jsou kladně nabitě, projdou do mozku snáze než záporně nabitě kyseliny.

HEB je prostupná v obou směrech. Tzv. „uptake“ transportní systémy přenášejí molekuly do mozku, zatímco efluxní transportéry odvádí látky zpět do krve. Směr pohybu jejich substrátů je dán orientací těchto komplexů na membráně endotelové buňky. **Obrázek 4** zobrazuje přehled základních transportních systémů v HEB. V následujícím textu budou diskutovány pouze vybrané přenosové systémy. Rozsáhlý přehled je dostupný v literatuře.^(6, 16,17,18)

Během metabolických procesů probíhajících v CNS vznikají různé odpadní produkty, které by zde ve vyšší koncentraci mohly působit neurodegenerativně. Proto existuje v HEB velké množství efluxních přenašečů odvádějících tyto látky zpět do krevního řečiště. Mohou pak být přeneseny do ostatních orgánů a dále využity, nebo vyloučeny ven z těla. Zároveň tyto transportéry slouží jako druhý stupeň ochrany nervových buněk před škodlivými komponentami, které překonaly HEB. Nejvýznamnější z nich je rodina ABC (ATP-binding cassette) transportérů o 48 členech rozdělených do 7 podrodin, jejichž substráty jsou hlavně lipofilní látky.⁽²⁾ Největší pozornost je v HEB

věnována P-glykoproteinu (P-gp, ABCB1), MRP (multidrug resistance-associated proteins) a BCRP (breast cancer resistance protein, ABCA2).⁽⁶⁾ P-gp je transmembránový protein o velikosti 170 kD na apikální membráně endotelových buněk, kódovaný genem ABCB1. Je to ATP-dependentní protein se širokou substrátovou specifitou, což velmi ztěžuje vývoj léčiv cílených na nemoci CNS. Téměř 60% všech protinádorových substancí je jím totiž rozpoznáváno a následně vyloučeno ven z mozku, čímž rapidně klesá efektivita léčby a je nutné podávat vyšší dávky, které jsou však mnohdy pro organismus toxické.⁽¹³⁾

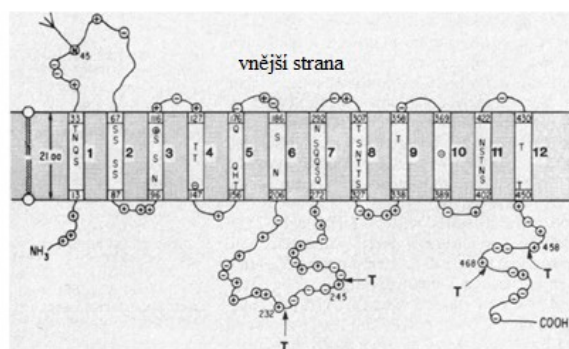
Obrázek 4: Přehled základních transportních systémů v HEB.⁽⁶⁾



Glukóza je klíčovým zdrojem energie pro mozkové buňky. Z krve do endotelu je transportována pomocí GLUT1 přenašeče ve směru koncentračního gradientu. Pokud poklesne její koncentrace v mozkovém tkáňovém moku, je okamžitě vyrovnána přenosem z okolní krve. Je tak udržována rovnováha mezi její hladinou v plazmě a v mozku. Substrátem GLUT1 není pouze glukóza, ale i další hexózy. Jedná se o uniporter, který je exprimován v endotelových buňkách, ale ne v neuronech.⁽¹⁹⁾ Jeho sekvence čítající 492 aminokyselin je známa již od roku 1985 (**Obrázek 5**)⁽²¹⁾ a je kódována genem SLC2A1.⁽⁶⁾ Je jedním z nejčastějších přenašečů v mozkovém endotelu. Jeho intracelulární část sestává ze 3 helixů, které tvoří vazebné místo pro cukr. Celkem obsahuje

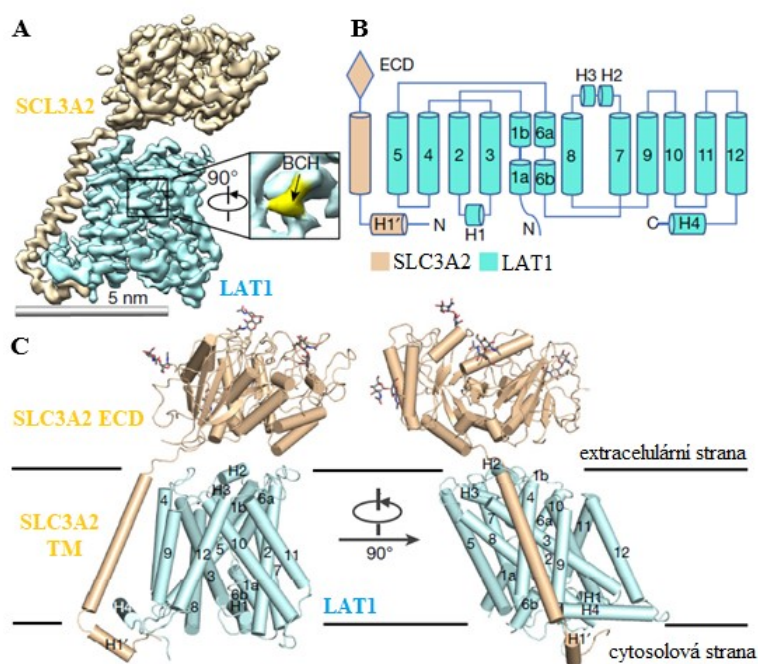
12 transmembránových domén. GLUT1 je produkován ve vyšší míře u řady různých nádorů, včetně glioblastomu multiforme (GBM), kde glukóza slouží jako klíčový zdroj energie pro masivně proliferující rakovinné buňky.^(19,20) Prognóza daného onemocnění pak koreluje s množstvím exprimovaných GLUT1 v nádoru. Čím lépe bude tkáň vyživována, tím rychleji může nádor pronikat do okolí. Studie zahrnující 52 pacientů s glioblastomem prokázala, že GLUT1 je zvýšeně produkován v hypoxických oblastech těchto nádorů.⁽²⁰⁾

Obrázek 5: Struktura GLUT1.⁽²¹⁾



Přenos esenciálních aminokyselin (AMK) do mozku je zprostředkováván čtyřmi členy rodiny přenašečů LAT1-4 (large neutral amino acid transporter 1-4). Pouze antiporter LAT1 byl identifikován ve zvýšené míře u různých typů nádorových onemocnění, zejména pak u GBM. Zde se jeho exprese zvyšuje s progresí nádoru, významně pak v metastázách, kde napomáhá vyživování nádorové tkáně a produkci signálních molekul pro aktivaci prorůstové kaskády mTOR. Tím zvyšuje rychlost proliferace rakovinných buněk a stává se významným cílem pro výzkum nových protinádorových léčiv.^(6, 22) Vhodnými substráty jsou pro něj zejména velké neutrální AMK, jako je tyrosin a tryptofan, dále leucin, isoleucin, fenylalanin, methionin, histidin nebo valin. Katalyzuje také přenos thyroideálních hormonů a některých léčiv do mozku.⁽²³⁾ Je kódován genem SLC7A5 a tvoří 12 transmembránových domén o sekvenci 926 AMK. LAT1 kovalentně váže glykoprotein SLC3A2, který určuje jeho pozici v plazmatické membráně a je klíčový pro jeho stabilitu a funkci (**Obrázek 6**).^(22, 24-26)

Obrázek 6: Struktura komplexu LAT1 – SLC3A2.^a (23)

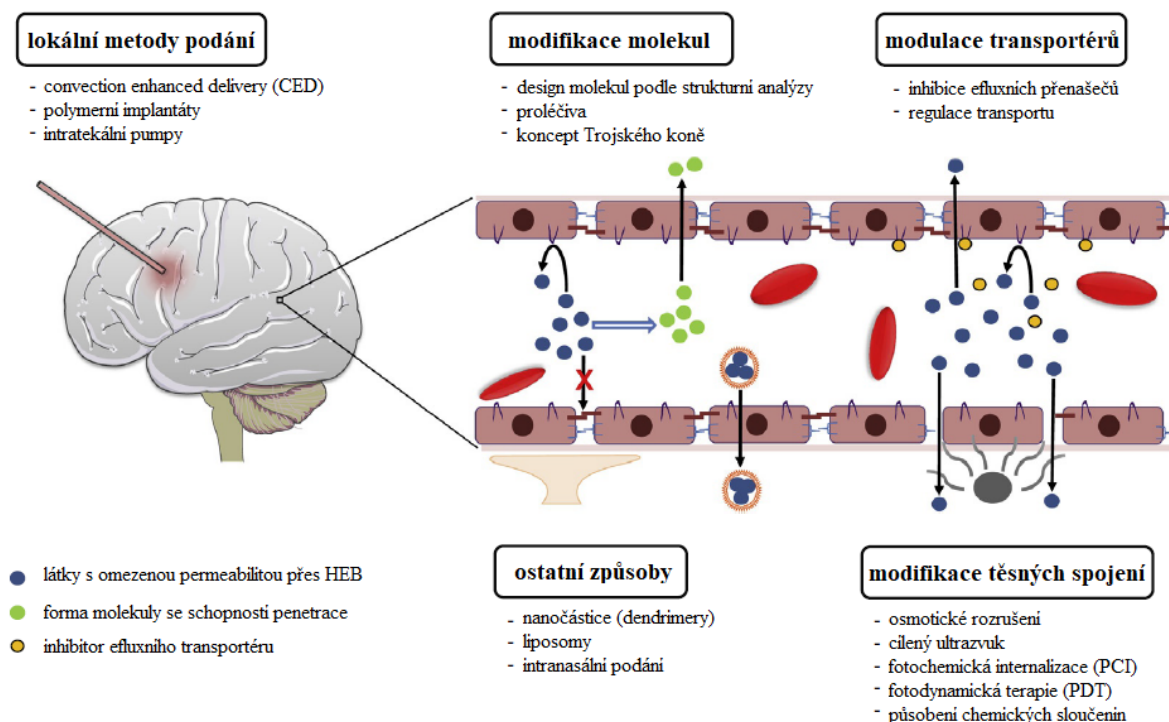


^a (A) Struktura lidského LAT1-SLC3A2 komplexu získaná kryo-elektronovou mikroskopií. LAT1 je reprezentován modře a SLC3A2 žlutě označenou částí. V molekule LAT1 je žlutě zvýrazněn navázaný inhibitor 2-amino-2-norbornankarboxylová kyselina (BCH); (B) schématické znázornění 12 transmembránových domén; (C) celková struktura komplexu; extracelulární doména (ECD), helix (H), transmembránová doména (TM).

3.4 Strategie doručení léčiv do CNS

Až 95% potenciálních protirakovinných sloučenin nedokáže prostoupit zdravou HEB.⁽⁵⁾ To je jednou z hlavních příčin, proč vývoj léků cílených do CNS trvá podstatně déle, než je tomu u jiných nemocí, a proč je stále velkou výzvou pro obor medicíně chemie. Bylo popsáno mnoho strategií, které doručení látek do mozku umožňují (Obrázek 7).⁽⁸⁾ U každé z nich najdeme množství výhod i rizik, ať už se jedná o invazivní metody mechanicky rozrušující ochrannou membránu, či o reverzibilní pozměnění struktury aktivní látky po dobu nezbytně nutnou pro její doručení na požadované místo, kde je následně biotransformována zpět v aktivní složku. Vybrané přístupy budou diskutovány dále, podrobný přehled ostatních metod je dostupný v odborné literatuře.⁽²⁷⁻³⁰⁾

Obrázek 7: Strategie doručení léčiv do mozku.⁽⁸⁾



3.4.1 Lokální metody podání

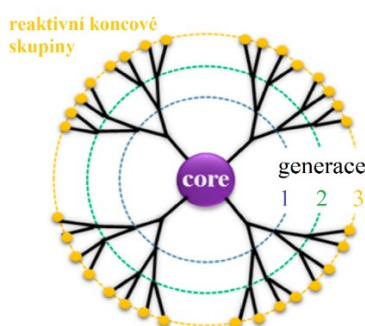
HEB lze překonat mechanicky přímým vpravením léčivých látek do mozkové tkáně. Zajistíme tak přesné doručení molekuly do daného místa v mozku v požadované koncentraci. Jedná se ale o invazivní a finančně nákladný způsob vyžadující komplikovaný chirurgický zásah spojený s vysokým rizikem infekce.⁽⁸⁾ Metoda „convection enhanced delivery“ (CED) umožňuje kontinuální přívod látek zvenčí pomocí operativně zavedeného infuzního katetru.⁽³⁰⁾ Jinou variantou je chirurgické zavedení intratekální pumpy nebo polymerního implantátu, čímž vytvoříme depozitní místo uvnitř mozku, ze kterého bude léčivo postupně uvolňováno v terapeutickém množství po delší časový úsek.

3.4.2 Dendrimery

Chemoterapeutika se mohou dostat do oblasti CNS také kovalentním připojením k různým typům nanočástic jakožto nosičů. Příkladem jsou dendrimery. Jedná se o středově symetrické makromolekuly nanometrových rozměrů složené ze tří hlavních částí (**Obrázek 8**). Uprostřed se nachází centrální jádro, které může být buď jednoatomové či víceatomové. Na něj jsou dvěma až čtyřmi vazbami napojeny opakující se stavební

jednotky první generace. Na každou z nich jsou pak navázány další dvě jednotky druhé generace. Tento trend stromového růstu se opakuje až po poslední generaci, která je zakončena reaktivními funkčními skupinami, u dendrimerů určených pro přenos léčiv v organismu se jedná nejčastěji o hydroxylovou skupinu. Anionické dendrimery jsou totiž na rozdíl od kationických biokompatibilní. Navíc hydrofilní skupiny zajišťují rozpustnost těchto nanočástic v polárních roztocích.⁽³¹⁾ Léčivo je pak kovalentně navázáno na tyto periferní funkční skupiny nebo „zapouzdřeno“ v kavitách dendrimeru, přičemž nosnost dendrimeru může být až 25% w/w. Název dendrimeru se odvíjí od počtu generací, ze kterých je vystavěn.⁽³²⁾

Obrázek 8: Schématická struktura dendrimerů.⁽³³⁾

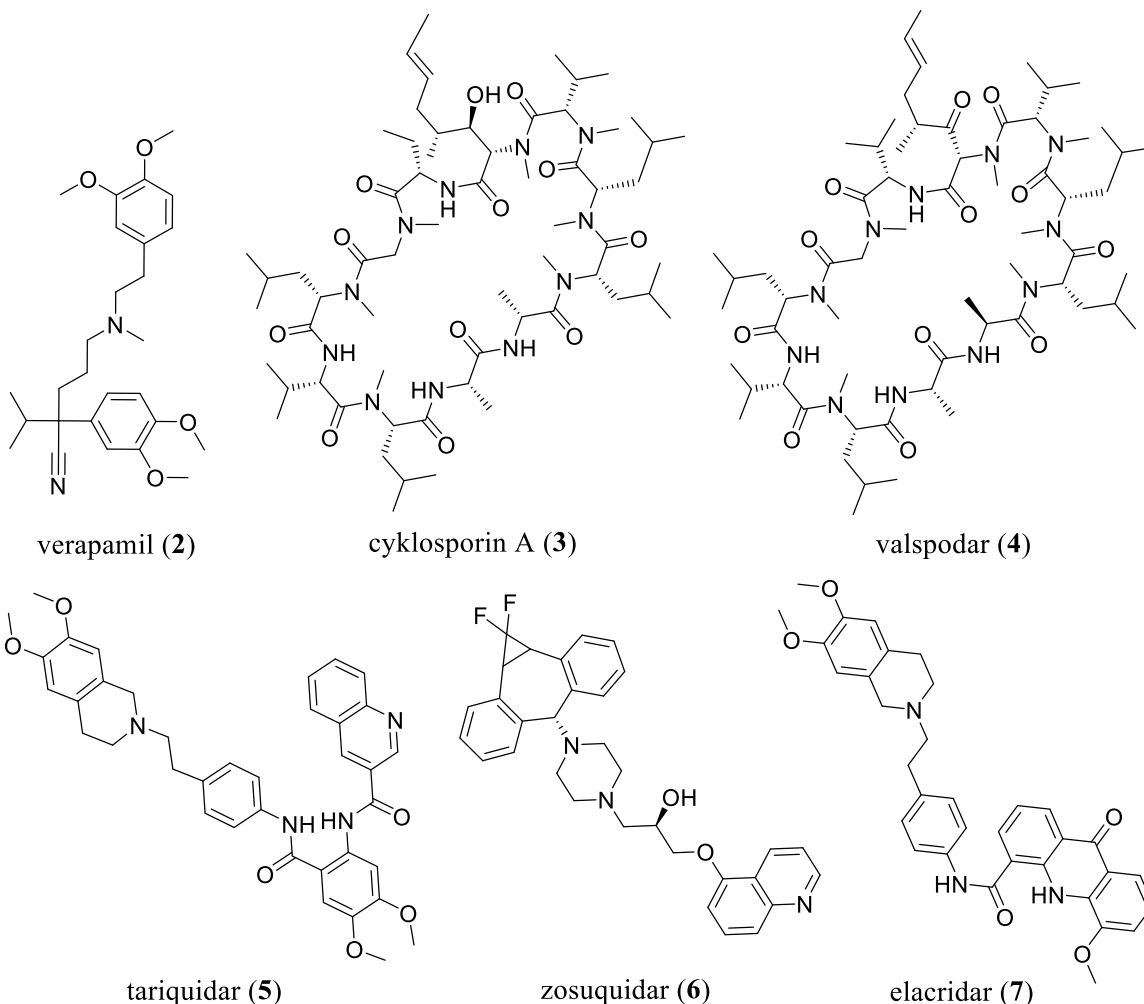


Výhodou těchto nanonosičů je jejich tvárnost. Můžeme je syntetizovat ve variabilních velikostech a s různým povrchovým nábojem. Podle toho jsou pak určeny jejich fyzikálně-chemické a biologické vlastnosti, které můžeme modifikovat tak, aby tyto dendrimery například snadněji procházely přes HEB.⁽³⁴⁾

3.4.3 Inhibice efluxních přenašečů

Přítomnost velmi účinných efluxních transportérů, které jsou často v nádorových buňkách produkovány ve vyšší míře, je také častou příčinou neúspěchů při vývoji účinných léčiv. Inhibicí jejich působení, zejména pak P-gp a BCRP, bychom mohli dosáhnout terapeutické koncentrace účinných látek uvnitř buněk.⁽³⁵⁾ Tento přístup se však z hlediska toxicity příliš neosvědčil. První generaci inhibitorů (verapamil (2), cyklosporin-A (3)) chyběla dostatečná selektivita a potence, což představovalo nutnost podávat při léčbě jejich vysoké dávky.^(36 - 37) Inhibitor druhé generace valspodar (4) byl sice aktivnější, ale zásadním nežádoucím účinkem byla jeho interference s cytochromem P450.⁽³⁸⁾

Problémy s toxicitou vykazovaly i látky třetí generace. Tariquidar (5) z tohoto důvodu neuspěl ve třetí fázi klinického testování, stejně tak zosuquidar (6) nebo elacridar (7).^(39–40) Dodnes nebyl nalezen žádný specifický inhibitor efluxních transportérů, který by byl schválen FDA.⁽⁸⁾ Je tedy nutné nalézt látku, která nebude substrátem efluxních přenašečů, a zároveň v určité formě projde HEB.⁽⁷⁾



3.4.4 Strukturní modifikace molekul

Nejvhodnějšími kandidáty pro snadný vstup do CNS jsou takové molekuly, které po podání snadno projdou v intaktní formě organismem a dostanou se v nezměněné formě do místa účinku. V případě sloučenin cílených do mozku je také výhodou, pokud nejsou substráty efluxních přenašečů a procházejí přes HEB.

Na základě studie provedené firmou Pfizer u 119 komerčních léčiv cílených na CNS a 108 preklinických kandidátů byly formulovány ideální hodnoty šesti fyzikálně-chemických vlastností pro molekuly penetrující přes HEB.⁽⁴¹⁾ Velká část z uvedených látek

splňující tato pravidla navíc nebyla substrátem pro P-gp. Zjištěné hodnoty klíčových parametrů jsou přehledně shrnuty v **Tabulce 1**. Na základě jejich znalosti lze snadněji vyvíjet nové molekuly, které budou pravděpodobně úspěšné alespoň v počátečních fázích klinického testování.

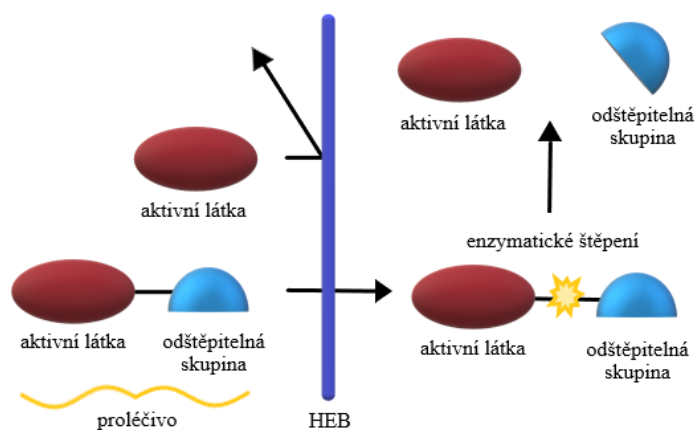
Tabulka 1: Hodnoty důležitých fyzikálně-chemických vlastností léčiv připravených za účelem vstupu do CNS.⁽⁴¹⁾

Parametr	Hodnota
Distribuční koeficient (ClogD) při pH = 7,4	≤ 2
Partiční koeficient (ClogP)	≤ 3
Relativní molekulová hmotnost	≤ 360
Topologická plocha polárního povrchu (tPSA)	40 až 90 Å ²
Počet donorů vodíkových vazeb	≤ 5
Nejbazičtější centrum v molekule (pKa)	≤ 8

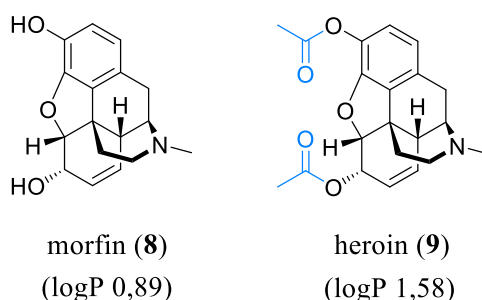
3.4.5 Proléčiva

Strategie umožňující výše diskutovaná kritéria splnit je využití proléčiv. Tento koncept je znám již od roku 1958.⁽³⁵⁾ Jedná se o deriváty biologicky aktivních molekul, které se po doručení do cílové tkáně kontrolovaně biotransformují specifickými enzymy zpět na účinnou látku (**Obrázek 9**).^(19,42) Tímto způsobem lze pozitivně ovlivnit vlastnosti dané molekuly, jako jsou rozpustnost, chemická stabilita či schopnost překonat HEB za současného zachování její účinnosti.^(43 – 45) Můžeme tak omezit i systémovou distribuci látky, čímž snížíme její možnou toxicitu. Odštěpitelná část by přitom měla být po uvolnění z proléčiva snadno degradovatelná, vyloučitelná a pro organismus netoxická.⁽³⁵⁾

Obrázek 9: Obecný mechanismus působení proléčiv v CNS.



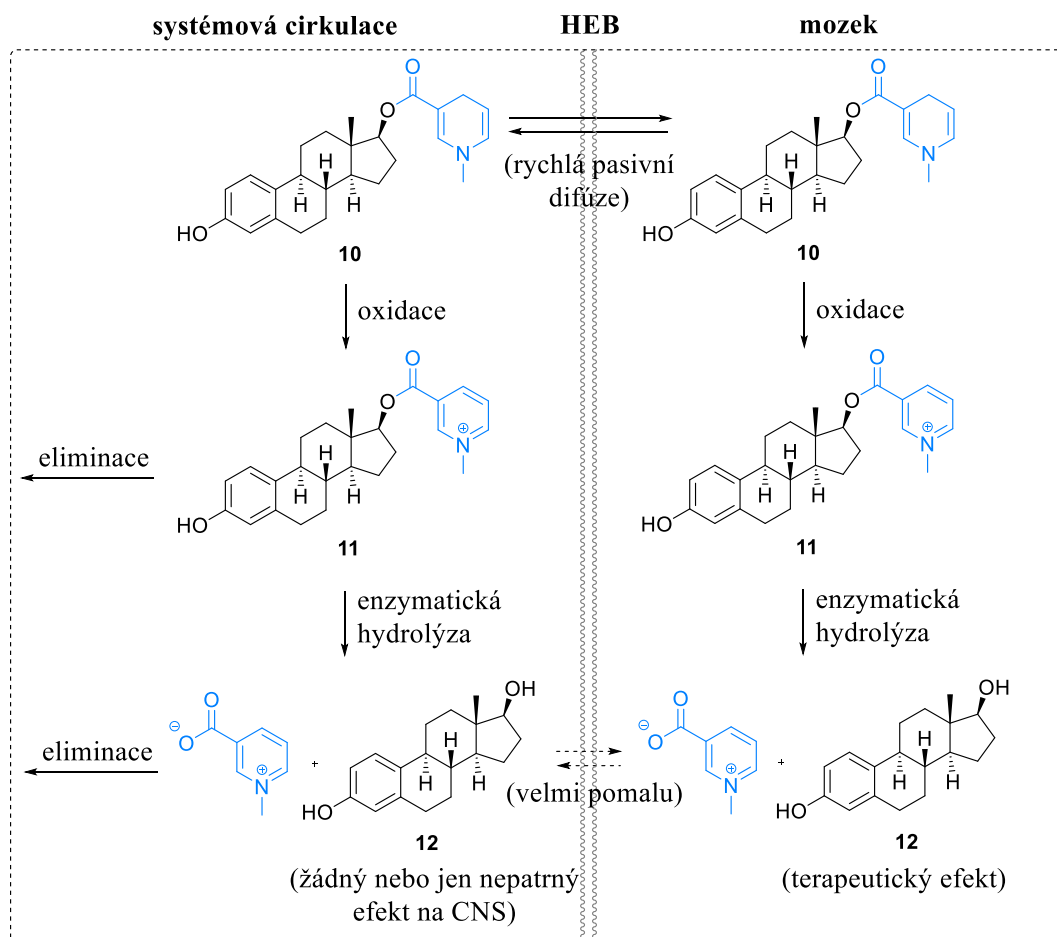
Polární látky obecně neprocházejí HEB pasivní difúzí. To lze vyřešit lipidizací jejich struktur, čímž ale zároveň zvýšíme afinitu dané molekuly k P-gp. Je proto žádoucí najít takové skupiny, které se po vstupu do mozku snadno odštěpí ještě před vyloučením proléčiva efluxním systémem zpět do krve. Předpokladem je také to, že ani samotná aktivní molekula nebude substrátem efluxních komplexů.⁽¹⁴⁾ Nejznámějším příkladem takové látky je heroin (**9**),⁽⁴⁶⁾ derivát morfinu (**8**) připravený dvojnásobnou acetylací jeho hydroxyskupin, který prochází zhruba 100× lépe přes HEB než samotný morfin.⁽³⁵⁾ Zvýšením logP v případě heroinu se molekula stává lipofilnější a přibližuje se tak ideální hodnotě logP, která se má podle Lipinského pravidel 5 pro látky cílené do CNS pohybovat okolo čísla 2.⁽⁴⁷⁾



Lipidizací sloučenin zároveň docílíme jejich vyšší distribuce i do ostatních tkání, čímž může dojít k vyvolání nežádoucích účinků. Proto byla navržena jiná strategie transportu proléčiv přes HEB. Využívá připojení lipofilního strukturního motivu k aktivní látce, který zajistí její specifickou distribuci do mozkové tkáně. Zde je látka dále oxidována na svou hydrofilní formu a lipofilní část je odštěpena přítomnými enzymy za uvolnění aktivní molekuly. Typickým příkladem je redoxní systém inspirovaný metabolickou přeměnou NADH na NAD⁺ běžně probíhající v organismu (**Schéma 1**).⁽⁴⁸⁾ Estrogen se běžně používá k hormonální substituční terapii u žen po menopauze. Snadno překonává HEB, ale v mozku je zadržován velmi málo. Pro jeho dostatečný účinek jsou pak nutné vysoké dávky, které ale mohou zapříčinit závažné vedlejší účinky jako vysoký krevní tlak či vznik nádoru. Bezpečnou variantou je využití proléčiva, které po uvolnění aktivní složky zajistí zvýšenou koncentraci volného estrogenu pouze v oblasti CNS. K tomuto účelu byl vyvinut preparát Estredox (**10**), v němž byla 1,4-dihydro-N-methylnikotinová kyselina připojena esterovou vazbou k lidskému 17β-estradiolu (**12**).⁽⁴⁹⁾
⁵⁰⁾ Takto vzniklé proléčivo **10** pasivně difunduje z cirkulující krve přes HEB, kde dojde

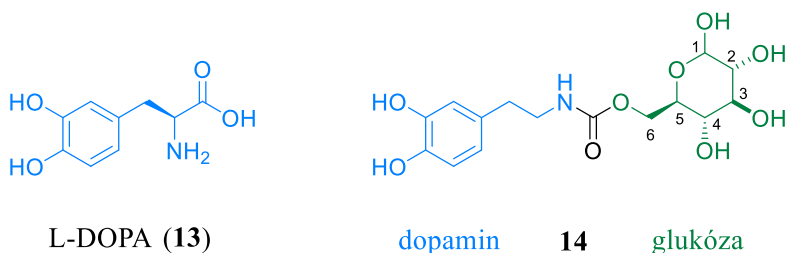
k jeho oxidaci na *N*-methylpyridinium (**11**), které velmi špatně prochází zpět. Příslušný estrogen je z molekuly odštěpen přítomnými esterázami.

Schéma 1: Metabolická přeměna proléčiva Estredox (**10**).⁽³⁵⁾

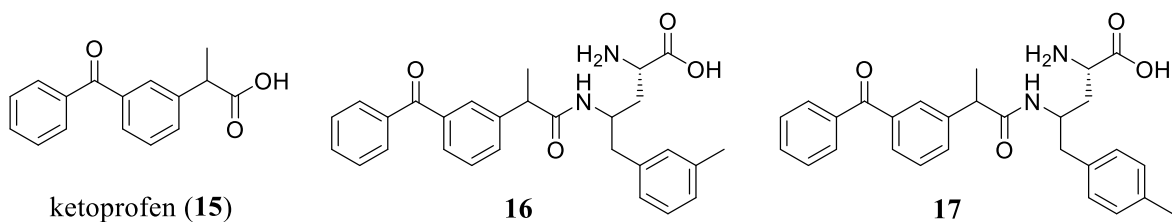


Jak již bylo zmíněno, v HEB se nachází široké spektrum transportérů se známými endogenními substráty (**Obrázek 4**). Připojením těchto molekul (nebo jejich částí) ke struktuře látek, které chceme doručit do mozku, vytvoříme proléčiva, která mohou mít též afinitu k příslušným přenosovým komplexům v bariéře. Jsou popsány experimenty, které tímto způsobem cílí na přenašeč GLUT1 s glukózovými deriváty dopaminu.⁽⁵¹⁾ Tento neurotransmitter je běžně produkován nervovými buňkami v mozku. Při Parkinsonově chorobě jsou tyto buňky poškozeny a nejsou schopny dopamin syntetizovat, čímž je znemožněn vzájemný přenos signálu, a pacienti tak ztrácí své motorické schopnosti.⁽⁵²⁾ Pro zmírnění průběhu nemoci je proto využíváno substituční léčby. Samotný dopamin ale není schopen prostoupit HEB. Je enzymaticky biotransformován z L-DOPA (**13**)

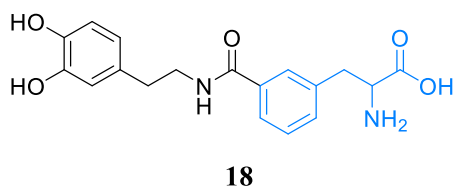
až v mozku. Proto bylo vyvinuto proléčivo, v němž je ke struktuře dopaminu připojen cukerný zbytek, který je přirozeným substrátem GLUT1. Testy byly prováděny na lidských erythrocytech, kde se vyskytuje stejná forma GLUT1 transportéru jako v HEB. Glukózový zbytek byl k dopaminu připojen přes různé typy linkerů v pozicích C-1, C-3 nebo C-6. Nejvyšší afinitu vykazovalo proléčivo **14** obsahující krátký karbamátový linker připojený k uhlíku C-6 glukózy, což nasvědčuje tomu, že vzdálenost aromatického kruhu a C-6 glukózy je významná pro aktivitu přenašeče.



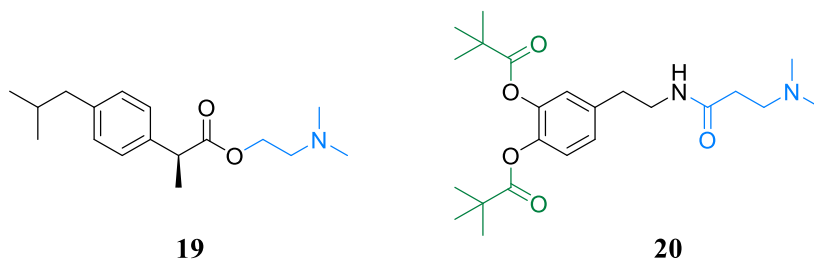
Zajímavý způsob pro doručení neuroprotektivních látek do CNS představuje i transportér velkých aminokyselin 1 (LAT1). Jeho výhodou je selektivní exprese na membránách endotelových buněk v HEB i v buňkách mozкового parenchymu. Proléčiva, která budou jeho substráty, pak mohou projít nejen HEB, ale dostanou se i do mozkových buněk.⁽⁴²⁾ Zároveň se vyhneme systémové expozici dané látky, čímž omezíme nežádoucí účinky. Ketoprofen (**15**) je neopioidní analgetikum neselektivně inhibující cyklooxygenázu 1 (COX-1) i cyklooxygenázu 2 (COX-2).⁽⁴²⁾ Tato látka ovšem není transportována selektivně pouze do mozkové tkáně, ale působí i v ostatních orgánech. Pro zvýšení její afinity k LAT1 a eliminaci jejího systémového působení v organismu byla připravena série proléčiv ketoprofenu, která byla zkoumána v *in vitro* studii zaměřené na sledování změn vlastností těchto proléčiv oproti původnímu ketoprofenu. Na pěti testovaných kandidátech bylo prokázáno, že důležitým strukturním motivem je aromatický kruh. Připojením aminokyseliny obsahující benzenové jádro se substituenty v polohách *meta* (**16**) nebo *para* (**17**) bylo dosaženo efektivního přenosu těchto molekul do mozku pomocí výše zmíněného transportéru. Alifatické aminokyseliny tuto schopnost neprokázaly.



Velký význam přítomnosti aromatické části v molekule pro afinitu k LAT1 byl potvrzen také v další studii, ve které byly srovnávány tři deriváty dopaminu obsahující ve své struktuře tři různé aminokyseliny.⁽⁵³⁾ Nejlepších výsledků dosáhla molekula s připojeným fenylalaninem přes amidovou vazbu v *meta* pozici aromatického kruhu (18). Tyto poznatky mohou být uplatněny při dalším vývoji léčiv přenášných přes HEB komplexem LAT1.



Obecným strukturním motivem, který zvyšuje efektivitu přenosu některých molekul do mozku, je terciární amin s lineárním řetězcem. Slabé báze zahrnující připojenou *N,N*-dimethylamino skupinu jsou v organismu protonovány na kvartérní dimethylamoniový kation a snadněji pak prochází přes HEB, než záporně nabitě molekuly. Tento koncept byl aplikován u proléčiv dexibuprofenu (19)⁽⁵⁴⁾ či dopaminu (20).⁽⁵⁵⁾



3.5 Glioblastoma multiforme (GBM)

Nádor je uskupení buněk autonomní povahy, které se nekontrolovatelně dělí v určité tkáni. Rozlišujeme jeho nezhoubné (benigní) a zhoubné (maligní) formy.⁽⁴⁾ Benigní útvar je nebezpečný pouze v případě, kdy svým expanzivním růstem utlačuje okolní orgány.

Oproti tomu maligní novotvar zakládá dceřinná ložiska, tzv. metastázy, a poškozují okolní tkáň tím, že do nich pomalu proniká a přetváří jejich strukturu. Metastázy vznikají na místech vzdálených od původního ložiska a jsou nejčastější příčinou úmrtí postižených jedinců.⁽⁵⁶⁾

GBM je primární maligní mozkový tumor klasifikovaný Světovou zdravotnickou organizací (WHO, World Health Organization) jako astrocytom IV. Stupně, tedy jako nejagresivnější forma gliomu.^(57 - 58) Zároveň je bohužel nejčastějším typem rakoviny centrální nervové soustavy s incidencí 0,6 až 3,7 případů na 100 000 lidí v celosvětovém měřítku.^(13, 14) Nejčastěji se vyskytuje u mužů ve věku mezi 50 a 70 lety.⁽⁵⁹⁾ Tvoří 54% všech gliomů a 16% ze všech primárních mozkových nádorů. GBM je letální onemocnění s mediánem přežití pouze 15 měsíců. Méně než 5% pacientů přežije déle než 5 let od stanovení diagnózy.⁽¹³⁾

Složení nádorové masy v GBM není konzistentní, ale lze ho obecně rozdělit na 2 části, kterými jsou jádro a okrajová oblast. V jádře tumoru jsou mozkové buňky kompletně nahrazeny nádorovými a krevní cévy jsou v této části propustnější než ve zdravé tkáni. Tato hypoxická část nádorové hmoty je charakteristická zvýšenou expresí VEGF (Vascular Endothelial Growth Factor) a jím indukovanou angiogenezí. Okrajová část nádoru je směsí zdravých a rakovinných buněk, které postupně napadají okolní tkáň, ale propustnost kapilár je u nich stejná jako ve zdravé tkáni. Vzhledem k této heterogenitě a různému stupni porušení funkce HEB je i distribuce léčiv do jednotlivých částí tkáně rozdílná. To vysvětluje malou účinnost chemoterapie a vysokou míru relapsu po chirurgickém odstranění nádoru, kterým nelze odstranit 100% rakovinných buněk. Nádorové kmenové buňky přežijí a z nich se může vyvinout nový tumor.⁽⁶⁰⁾ Molekuly s protinádorovou aktivitou, které se do mozku dostanou, jsou navíc často substráty P-gp, který je v GBM produkován ve zvýšené koncentraci. To je problém zejména v periferních částech nádoru, kde HEB zůstává plně funkční.

Konvenční metody léčby sestávají z mechanického odstranění co možná největší části nádorových buněk operací a následné radioterapie za současného užívání chemoterapeutik, nejčastěji temozolomidu (TMZ, **21**).^(4,13) Dále se používají deriváty nitrosomočoviny karmustin (**22**) a lomustin (**23**), platinová cytostatika cisplatina (**24**) a karboplatina (**25**) a prokarbazin (**26**). TMZ je malá, orálně dostupná molekula, působící jako alkylační činidlo. Methylování guaninu v pozici N-7 způsobí zastavení buněčného cyklu

nádorových buněk v G2/M fázi, čímž znemožní jejich další dělení.⁽⁶¹⁾ Používá se v kombinaci s radioterapií, díky níž jsou nádorové buňky citlivější k působení cytostatik, a která zároveň napomáhá spontánní přeměně TMZ v jeho aktivní formu v mozku (**Schéma 2**). Naneštěstí i tato látka je substrátem P-gp, což značně snižuje její koncentraci v tumoru a tedy i účinnost.

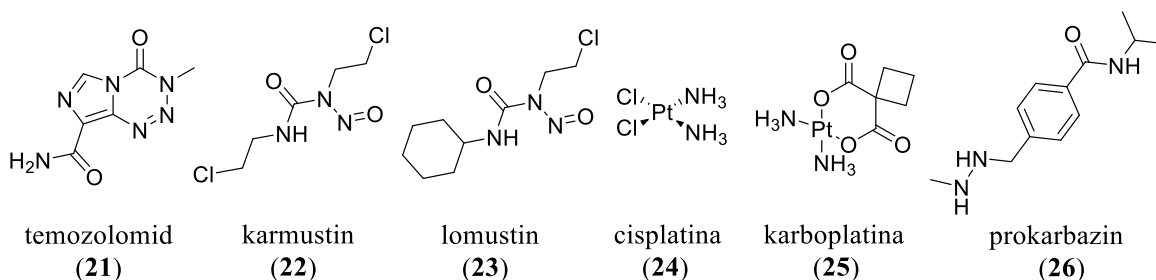
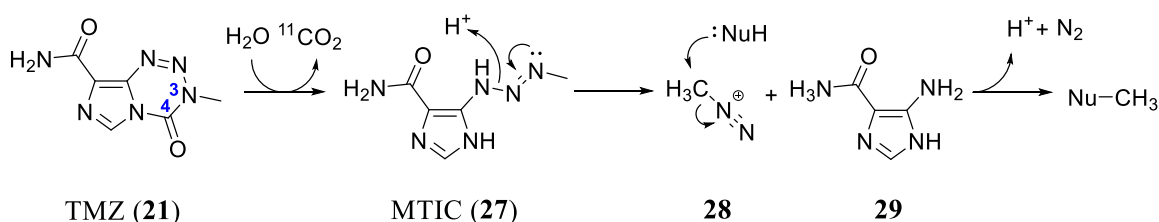


Schéma 2: Mechanismus aktivace Temozolomidu (**21**) v organismu.^{b (61)}



^b Pomocí radioaktivního značení prvků v molekule TMZ (**21**) bylo prokázáno, že uhlík v pozici 4 je při fyziologickém pH a v přítomnosti vody spontánně uvolněn ze struktury TMZ ve formě [¹¹C] oxidu uhličitého. Vznikající 5-(3-methyltriazen-1-yl)imidazol-4-karboxamid (MTIC, **27**) reaguje s molekulou vody za uvolnění reaktivního methyldiazoniového iontu (**28**), který následně působí jako alkylační činidlo pro guanin (NuH) v DNA za uvolnění molekuly N₂ a H⁺.

3.6 6-Diazo-5-oxo-L-norleucin (DON)

Rychle se dělicí rakovinné buňky vyžadují zvýšený příjem nejen glukózy, ale i L-glutaminu (**30**), který mimo jiné slouží jako zdroj NH₃ pro syntézu purinových a pyrimidinových bází.⁽⁶²⁾ Pokud dlouhodobě zamezíme přísunu této aminokyseliny do buněk, zastavíme tak jejich proliferaci. Tímto způsobem účinkuje i glutaminový antagonist 6-diazo-5-oxo-L-norleucin (DON, **1**), který strukturně mimikuje endogenní

substrát glutamináz glutamin a v jejich aktivním místě se váže kovalentně a ireversibilně, čímž inhibuje jejich funkci (**Obrázek 10** a **Schéma 3**).^(63–64)

Obrázek 10: Krystalová struktura ireversibilně navázaného DONu **1** v aktivním místě glutaminázové domény glutamin-dependentní NAD^+ syntetázy v *Mycobacterium tuberculosis*.⁽⁶⁴⁾

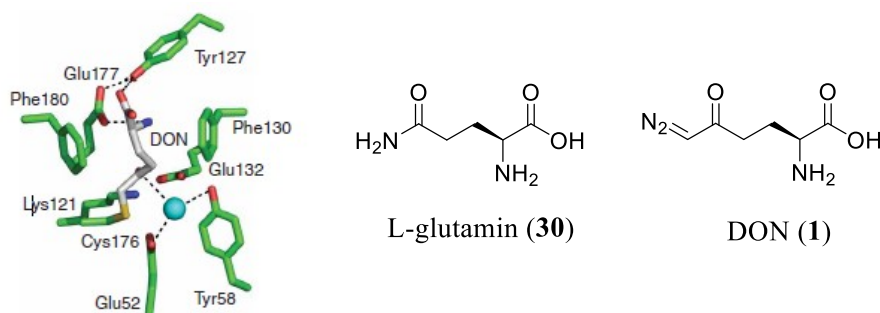
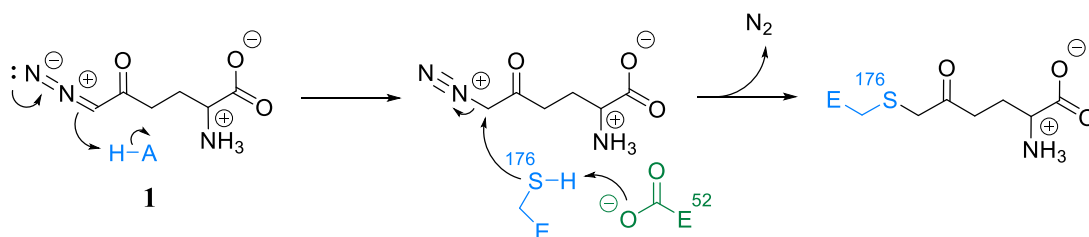


Schéma 3: Mechanismus ireversibilní inhibice glutamin-dependentní NAD^+ syntetázy DONem (**1**).^{c (64)}

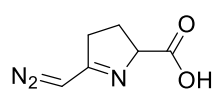


^c DON (**1**) je nukleofilně atakován cysteinem (Cys176), který je navázan v aktivním místě glutaminázové domény glutamin-dependentní NAD^+ syntetázy, za odstoupení molekuly dusíku a vytvoření kovalentní vazby S-C mezi enzymem a DONem (**1**).

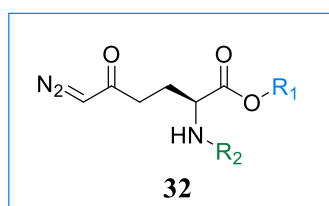
DON (**1**) byl objeven v padesátých letech 20. století v půdních bakteriích rodu *Streptomyces* a již v prvních studiích vykazoval velmi slibné výsledky z hlediska protinádorové aktivity.^(64, 65) Po objevení jeho cytostatických vlastností byl zkoumán jeho účinek v několika preklinických a později i klinických testech. I přes značnou biologickou aktivitu však byly studie s DONem postupně zastaveny, a to z důvodu jeho neselektivního působení v organismu a tím vyvolané systémové toxicitě projevující se zejména v oblasti gastrointestinálního traktu. Podrobné informace o syntéze, mechanismu působení

a klinickém testování této látky jsou uvedeny v mojí bakalářské práci,⁽⁶⁶⁾ na kterou tato diplomová práce navazuje.

Změnou distribuce dané molekuly v organismu můžeme ovlivnit rozsah vedlejších účinků. Proto byly navrženy a připraveny různé varianty proléčiv této nestandardní aminokyseliny. Jednou z reaktivních částí struktury DONu **1** je diazoketon. Jeho modifikací je však možné připravit pouze nestabilní deriváty (např. ketaly) či látky, které nejsou schopné reverzibilní přeměny na DON (cyklický diazo-imin (**31**)).⁽⁶⁶⁾ Proto byly u všech syntetizovaných proléčiv DONu maskovány pouze zbylé dvě reaktivní funkční skupiny – karboxylová skupina a aminoskupina (**32**).



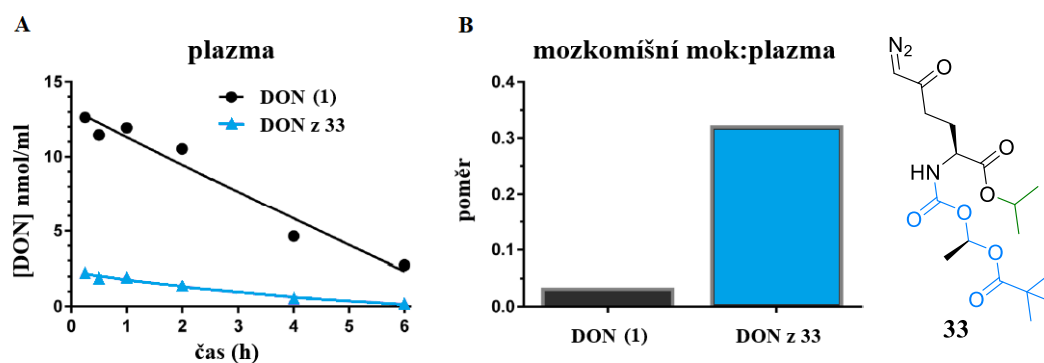
31



32

Prvním typem připravených proléčiv jsou deriváty DONu potenciálně využitelné pro léčbu GBM. Právě u glioblastomových rakovinných buněk byla prokázána tzv. „glutaminová závislost“, tedy zvýšená potřeba endogenního L-glutaminu, který je nutným metabolitem pro jejich růst.^(67 - 69) Inhibicí glutamináz přítomných v těchto nádorových buňkách můžeme docílit zastavení progresu nádoru. S využitím jednoduchého alkyl esteru maskujícího karboxylovou skupinu a methyl(pivaloyloxy)methoxy-karbonylového substituentu maskujícího aminoskupinu DONu (**33**) bylo dosaženo selektivního doručení této molekuly do mozkomíšního moku (**Graf 1**).⁽⁷⁰⁾ Ačkoli je látka **33** rychle metabolizována v myší plazmě, je velmi stabilní v opičí i lidské plazmě. Rychlejší metabolismus hlodavců ve srovnání s metabolismem vyšších živočichů není nijak neobvyklý a při testování potenciálních léčiv je nutné tuto skutečnost brát v úvahu.^(71 - 72) Proto byla provedena také farmakokinetická studie s DONem (**1**) a proléčivem **33** v opicích, jakožto v organismech, které jsou bližší člověku.

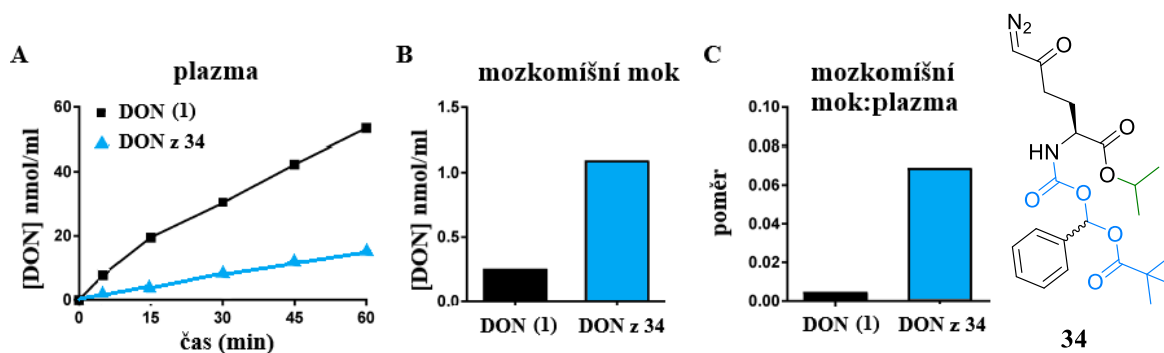
Graf 1: Srovnávací studie distribuce DONu uvolněného z proléčiva proléčiva **33** a DONu (**1**) *in vivo*.^{d (67)}



^d (A) Derivát **33** je minimálně metabolizován v opičí plazmě. (B) V opičím mozkomíšním moku je proléčivo **33** selektivně metabolizováno na DON. Jeho dosažená koncentrace je pak poměrově 10× vyšší než je tomu v případě podání volného DONu (**1**). DON (**1**) byl podán intravenózně (i.v.) v dávce 1,6 mg/kg a proléčivo **33** bylo podáno stejným způsobem v ekvivalentní dávce 3,6 mg/kg.

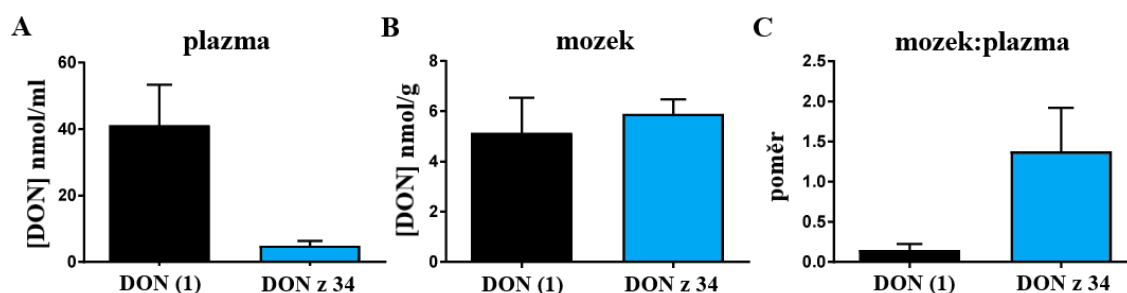
Velmi zajímavých hodnot dosáhlo i proléčivo **34** určené rovněž pro vstup do CNS a zkoumané jako možné chemoterapeutikum pro léčbu neurokognitivních poruch spojených s HIV (HIV-associated neurocognitive disorders, HAND).⁽⁷³⁾ HAND jsou způsobeny poškozením mozkových buněk glutamátem, který je v důsledku působení viru HIV v mozku produkován ve zvýšené míře. Inhibicí glutamináz je pak možné snížit syntézu glutamátu v postižených buňkách. Derivát **34** je DON s karboxylovou skupinou maskovanou isopropyl esterem a aminoskupinou substituovanou fenyloxy(methoxy-karboxyloxy) skupinou. Z naměřených dat bylo zjištěno, že zatímco v myši plazmě je látka **34** nestabilní, v prasečí i lidské plazmě vykazuje značnou stabilitu. Navíc proniká do mozku v mnohonásobně vyšší koncentraci než samotný DON (**1**) (Graf 2 a Graf 3).⁽⁷⁴⁾ Snazší prostupnost proléčiva **34** do mozkové tkáně oproti DONu (**1**) je také dána zvýšením hodnoty ClogP látky **34** připojením objemného lipofilního benzenového jádra k její struktuře. V případě DONu (**1**) je ClogP = -2,50, zatímco u derivátu **34** je hodnota ClogP = 2,75. Proléčivo **34** bylo využito v těchto počátečních studiích jako směs diastereomerů kvůli jejich obtížné separaci. Pro pokročilejší klinické experimenty bude nutné použít opticky čisté látky.

Graf 2: Distribuce proléčiva **34** a DONu (**1**) v mozkomíšním moku vs. v plazmě.⁽⁷⁴⁾



^e Proléčivo **34** bylo i.v. podáno praseti v dávce ekvivalentní k 1,6 mg/kg DONu (**1**) a po 60 minutách byl sledován poměr uvolněného DONu (**1**) z látky **34** v plazmě vs. v mozkomíšním moku (**C**). Stejný experiment byl proveden i se samotným DONem (**1**), který byl podán i.v. v dávce 1,6 mg/kg. Z dat naměřených pomocí LC-MS/MS vyplývá, že koncentrace DONu uvolněného z molekuly **34** byla v plazmě velmi nízká (**A**), což vypovídá o jeho stabilitě v tomto médiu. Naopak v mozkomíšním moku (**B**) je koncentrace DONu uvolněného z proléčiva **34** značně vyšší než koncentrace jaké je zde schopen dosáhnout samotný DON (**1**). Celkový poměr koncentrací v mozkomíšním moku vs. v plazmě (**C**) byl pak v případě DONu uvolněného z látky **34** více než 15× vyšší než u samotného DONu (**1**).

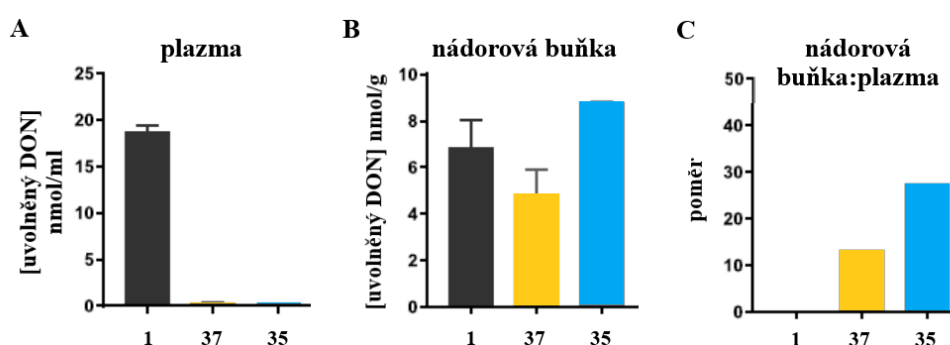
Graf 3: Distribuce DONu uvolněného z proléčiva **34** a DONu (**1**) v mozku vs. plazmě prasete.^{f (74)}



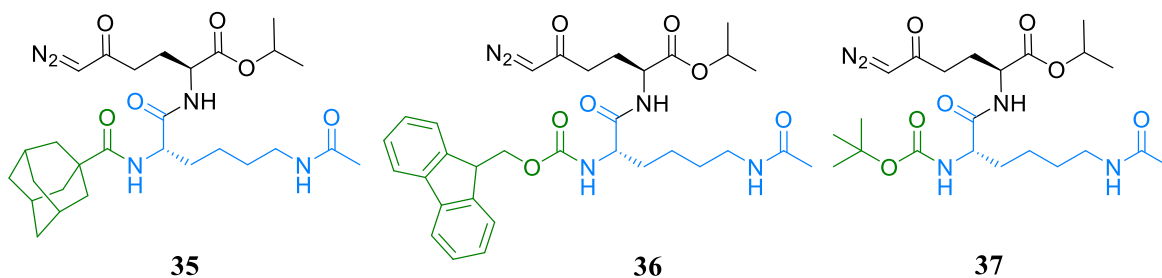
^f V terminální studii byl sledován poměr koncentrací DONu uvolněného z proléčiva **34** v prasečí plazmě (**A**) a mozku (**B**) 60 minut po podání. Stejné měření bylo provedeno i u prasete, kterému byl podán i.v. samotný DON (**1**). LC-MS/MS analýzou bylo prokázáno, že DON uvolněný z látky **34** dosahuje (**A**) v plazmě nízkých koncentrací a (**B**) v mozku vyšších koncentrací než samotný DON (**1**). To potvrzuje stabilitu proléčiva **34** v prasečí plazmě a jeho přednostní biokonverzi v DON v mozku. Celkový poměr koncentrací v mozku vs. v plazmě (**C**) byl u DONu uvolněného z derivátu **34** 9× vyšší než tomu bylo v případě samotného DONu (**1**).

Proléčiva DONu s karboxylovou skupinou ve formě isopropyl esteru a aminoskupinou substituovanou *N*- ϵ -acetyl-L-lysinem jsou inspirovány proléčivý puromycinu.^(75 - 76) V organismu je *N*- ϵ -acetyl-L-lysinový zbytek substrátem enzymů histon deacetylázy (HDAC) a katepsinu L (CTSL), které jsou v nádorových buňkách produkovány ve zvýšené míře. Předpokladem tedy bylo, že proléčiva obsahující *N*- ϵ -acetyl-L-lysinový motiv a vykazující stabilitu v plazmě budou selektivně metabolizována v nádorových buňkách zmíněnými enzymy. U puromycinových proléčiv bylo navíc prokázáno, že připojením lipofilní *t*-butyloxykarbonylové (Boc) či 9-fluorenylmethoxykarbonylové (Fmoc) skupiny k α -aminoskupině *N*- ϵ -acetyl-L-lysinu se zvýší průchodnost těchto látek přes buněčné membrány.⁽⁷⁵⁾ Ze série proléčiv DONu navržených v souladu s touto strategií vykazovala nejlepší stabilitu v prasečí a lidské plazmě molekula **35**, u níž byl *N*- ϵ -acetyl-L-lysinový zbytek substituován na α -aminoskupině lipofilní adamantyl-1-karboxylovou kyselinou.⁽⁷⁷⁾ Na rozdíl od proléčiva DONu **36** se substitucí na α -aminoskupině *N*- ϵ -acetyl-L-lysinu Fmoc skupinou, látka **35** vykazovala stabilitu také v jaterním homogenátu prasete. Proléčivo se substitucí na α -aminoskupině *N*- ϵ -acetyl-L-lysinu Boc skupinou (**37**) zase uvolňovalo v porovnání s látkou **35** méně DONu v nádorových buňkách a poměr koncentrací uvolněného DONu v nádorových buňkách vs. v plazmě byl u látky **35** téměř dvojnásobný oproti DONu uvolněnému z proléčiva **37** (**Graf 4**).⁽⁷⁷⁾

Graf 4: Distribuce DONu (**1**) a DONu uvolněného z proléčiv **35** a **37** v lidské plazmě vs. v nádorové buňce. ^g (77)

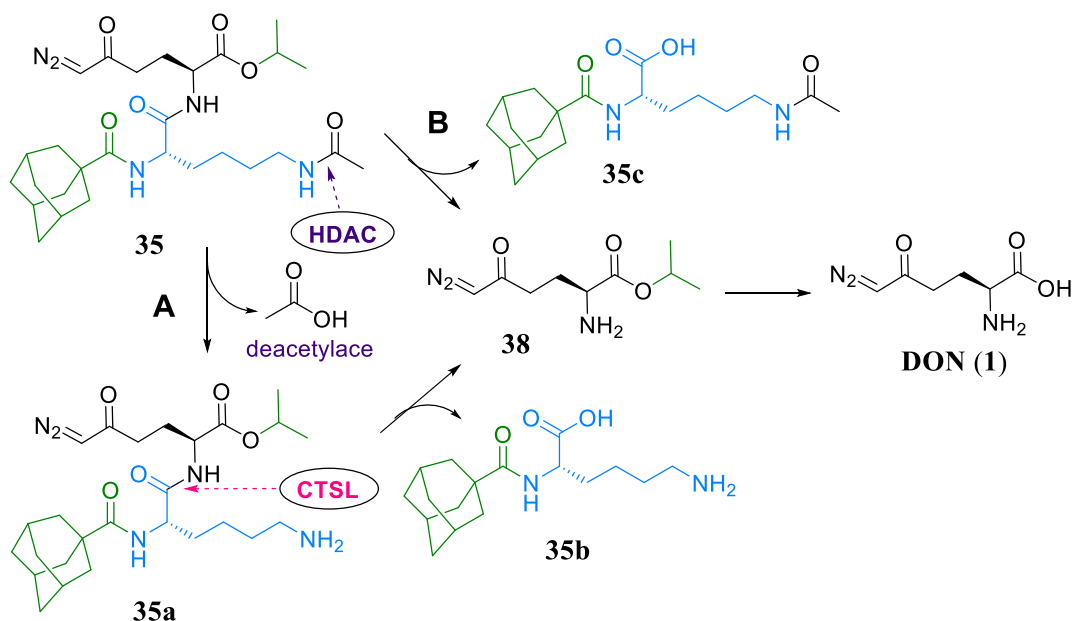


^g Obě proléčiva **37** i **35** jsou stabilní v lidské plazmě (**A**) a jsou enzymaticky aktivována na DON v nádorových buňkách (**B**). DON uvolněný z proléčiva **35** pak dosahuje nejlepších hodnot dosažených koncentrací v rakovinné buňce a zároveň nejlepšího poměru distribuce do nádorové buňky vs. do plazmy (**C**).



Studie také prokázala, že mechanismus aktivace proléčiva **35** v nádorových buňkách může probíhat odlišně, než bylo předpokládáno. Namísto postupného štěpení acetylu enzymem HDAC a následného uvolnění *N*- α -(adamantan-1-karbonyl)-*L*-lysinového zbytku (**35b**) katepsinem L za vzniku isopropyl esteru DONu (**38**) (Schéma 4A) docházelo z větší části k hydrolyze celé *N*- α -(adamantan-1-karbonyl)-*N*- ϵ -acetyl-*L*-lysinové části (**35c**) molekuly (Schéma 4B). V obou případech byl následně isopropyl ester **38** v rakoviných buňkách rychle hydrolyzován na DON (**1**).⁽⁷⁷⁾

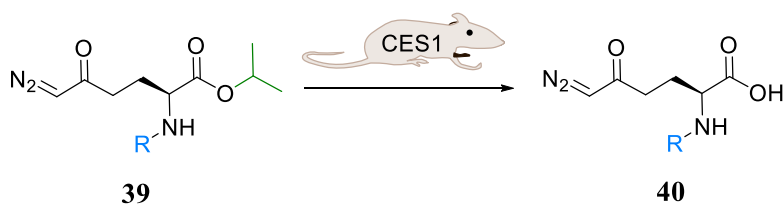
Schéma 4: Mechanismus aktivace proléčiva **35** v nádorových buňkách.⁽⁷⁷⁾



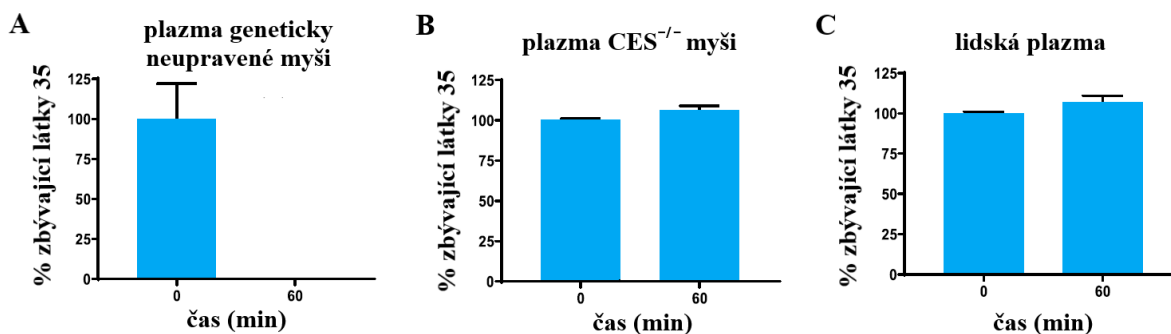
Pro studii farmakokinetického profilu proléčiva **35** byla jako modelový organismus blízký lidskému metabolismu zvolena transgenní myš s vyřazeným genem pro karboxyesterázu 1 (CES1). CES1 není produkována v lidské plazmě,⁽⁷⁸⁾ navíc je zodpovědná za nestabilitu proléčiv DONu v myší plazmě,⁽⁷⁷⁾ neboť katalyzuje hydrolyzu isopropyl esterové formy proléčiv DONu (**39**) v karboxylovou kyselinu (**40**), která pak již

není schopná proniknout do cílové tkáně a přeměnit se v DON (1) (Schéma 5). Tato hypotéza byla potvrzena ve srovnávací studii stability proléčiva 35 v CES^{-/-} myši, lidské plazmě a geneticky neupravené myši, kdy v běžné myši plazmě (Graf 5A) bylo během 60 minut proléčivo 35 metabolizováno úplně, zatímco v transgenní CES^{-/-} myši plazmě (Graf 5B) a lidské plazmě (Graf 5C) zůstalo stabilní.

Schéma 5: Enzymaticky katalyzovaná hydrolyza proléčiv DONu (39) v plazmě geneticky neupravené myši.



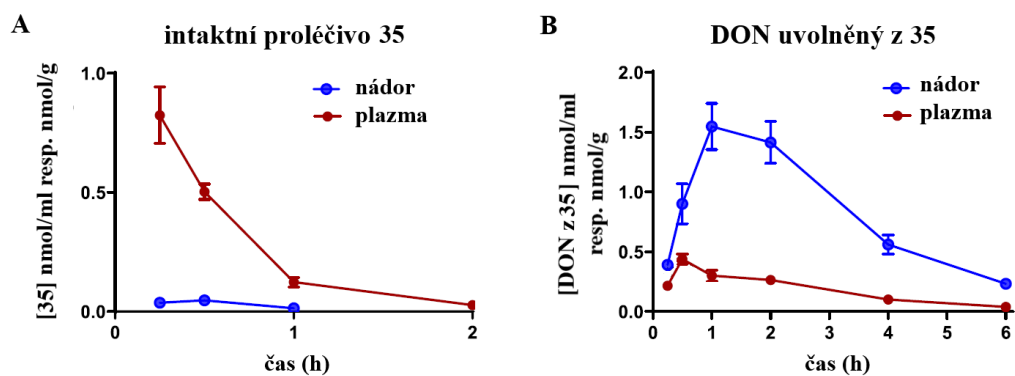
Graf 5: Srovnávací studie stability proléčiva 35.^h (77)



^h Z farmakokinetické studie v CES^{-/-} myši bylo prokázáno, že proléčivo 35 zůstává intaktní v plazmě (Graf 5A) a je přednostně distribuováno do nádorové tkáně, kde je enzymaticky štěpeno na DON (1) (Graf 5B).⁽⁷⁷⁾ Poměr distribuce proléčiva 35 do nádorových buněk vs. do plazmy je navíc 55× vyšší ve srovnání se samotným DONem (1).

Z výše uvedených příkladů je patrné, že správnou modulací struktury DONu je možné nasměrovat tuto molekulu v organismu do žádoucího místa působení a zabránit předčasné přeměně proléčiva v aktivní formu. Připojením vhodných enzymaticky odštěpitelných skupin lze cílit tuto z hlediska mechanismu působení velmi univerzální látku na odlišné typy onemocnění.

Graf 6: Farmakokinetická studie proléčiva **35** v CES^{-/-} myši.^{i (77)}



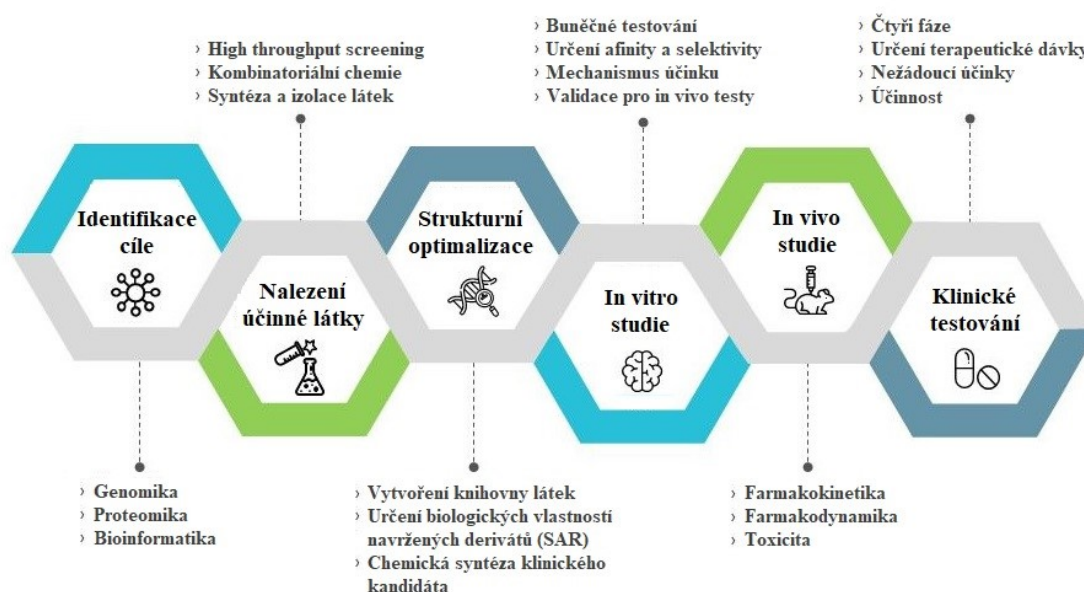
ⁱ Farmakokinetická studie proléčiva **35** a DONu (**1**) uvolněného z **35** v CES^{-/-} myši nesoucí EL4 nádorové buňky. Proléčivo **35** bylo podáváno subkutánně (s.c) v dávkách 3,2 mg/kg (1 mg/kg ekvivalentně k DONu).

4 VÝSLEDKY A DISKUSE

4.1 Návrh a vývoj léčiv

Vývoj nového léku je finančně i časově velmi náročná záležitost. Od návrhu jeho struktury až po ukončení klinického testování a uvedení na trh uplyne obvykle 10 až 15 let. Zjednodušené schéma jednotlivých fází vývoje léčiv je uvedeno v **Obrázku 11**. V procesu vývoje léku je nejprve nutné identifikovat cíl, ať už se jedná o nemoc či konkrétní protein, který je nutno inhibovat, nebo naopak aktivovat. Následuje hledání sloučeniny, která má požadovanou biologickou aktivitu. Tu lze obvykle predikovat na základě znalostí závislosti struktury a aktivity (structure-activity relationship, SAR) podobných sloučenin z literatury. K těmto účelům se využívají moderní počítačové vyhledávací metody s vysokou propustností (high throughput screening, HTS), které z tisíců látek v knihovnách dokáží vyselektovat desítky tzv. hitů, které se váží na zvolený cíl. Z hitů je posléze vybrána molekula s nejhodnějšími parametry (rozpuštěnost, molekulová hmotnost, bazicita, počet vodíkových donorů a akceptorů), tzv. lead.⁽⁷⁹⁾ Lead je dále strukturně upravován za účelem optimalizace jeho vlastností, které jsou testovány v řadě *in vitro* a později i v *in vivo* preklinických studiích. Nejlepší molekula pak pokračuje do klinického testování, kde je podávána lidským pacientům. Zjišťuje se její účinnost, vhodný způsob podání, maximální tolerovaná dávka i případné vedlejší účinky. Data z úspěšných klinických studií

Obrázek 11: Proces návrhu a vývoje léku.⁽⁸⁰⁾



jsou pak předána příslušné agentuře (U.S. Food and Drug Administration (FDA), European Medicine Agency (EMA)), která posléze udělí souhlas s uvedením léku na trh.

Moje diplomová práce se zabývá návrhem a syntézou proléčiv přírodní látky 6-diazo-5-oxo-L-norleucinu (**1**), u níž již známe cíl působení. Jsou jí enzymy s glutaminázovou aktivitou, pro něž je DON (**1**) irreverzibilním inhibitorem, jak již bylo zmíněno v předchozí kapitole. Není tedy třeba provádět finančně nákladný HTS. Z dostupných dat z literatury je navíc potvrzena slibná protinádorová aktivita této látky.⁶⁵ Strukturu DONu (**1**) je ale nutné modifikovat tak, abychom omezili její systémovou distribuci a zvýšili tak její specifické doručení do mozkové tkáně, čímž by mělo dojít k výraznému omezení nežádoucích účinků pozorovaných v již provedených klinických studiích^(81 – 83) se samotným DONem (**1**). K tomuto účelu jsem využila celkem pěti strategií návrhu a přípravy proléčiv DONu, které budou podrobně diskutovány v následujících kapitolách.

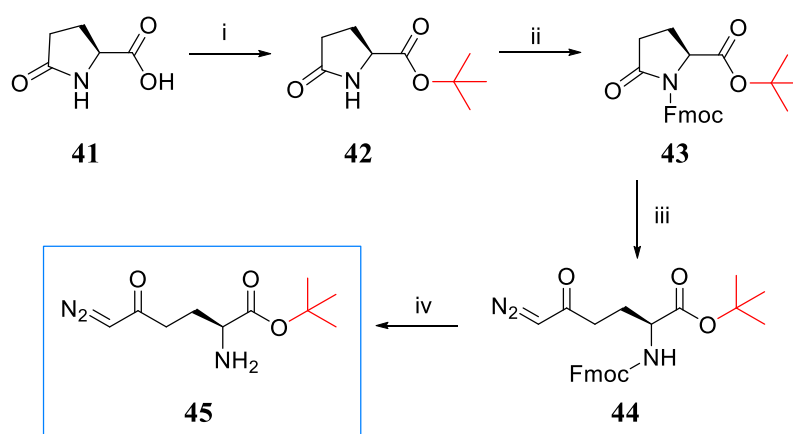
4.2 Příprava *t*-butyl esteru (**45**) a isopropyl esteru (**38**) 6-diazo-5-oxo-L-norleucinu

Jako základní stavební blok pro syntézu všech proléčiv jsem použila jednoduché estery DONu **45** (*t*-butyl) nebo **38** (isopropyl). Tyto dva strukturní motivy jsem zvolila na základě předchozích zkušeností s jejich stabilitou ve zvířecích modelech.^(70, 74, 77) Zatímco sekundární a terciární estery jsou v lidské plazmě stabilní, primární estery jsou zde enzymaticky snadno hydrolyzovány. Methyl ester a ethyl ester jsou tedy právě kvůli příliš rychlé biotransformaci často nevhodnými skupinami.

Výchozí látkou pro přípravu *t*-butyl esteru **45** (Schéma 6) je komerčně dostupná kyselina L-pyroglutamová **41**, jejíž trans-esterifikací *t*-butylacetátem za katalýzy koncentrovanou kyselinou chloristou jsem obdržela *t*-butyl ester **42**. Laktam **42** jsem následně ochránila Fmoc skupinou za vzniku imidu **43**. V reakci jsem záměrně použila méně než 1 ekvivalent silné báze (LiHMDS) a 5 ekvivalentů Fmoc-Cl, neboť v bazickém prostředí může docházet ke zpětnému odštěpení Fmoc skupiny. Nadbytkem Fmoc-Cl v reakční směsi jsem pak docílila posunutí rovnováhy reakce ve prospěch produktu **43**. Při chránění jsem záměrně využila zavedení Fmoc skupiny, která je snadno odštěpitelná za bazických podmínek, před Boc skupinou. Ta je štěpitelná pouze v kyselém prostředí, ve kterém je však nestabilní diazoketon, který se za takových podmínek přeměňuje

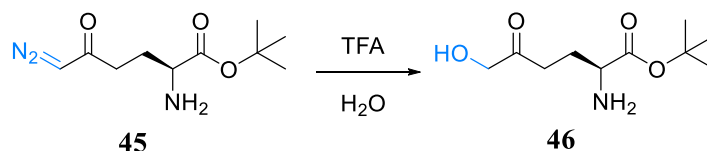
na α -hydroxyketon **46** (Schéma 7). V následujícím kroku syntézy je trimethylsilyldiazomethan deprotonován působením silné báze *n*-BuLi. Vznikající karbanion nukleofilně atakuje karbonyl laktamu **43** za otevření pyrrolidinového cyklu. Vznikající diazoketon **44** je charakteristický NMR signály vodíku a uhlíku sousedících s diazokupinou, kdy vodík v ^1H NMR spektru tvoří široký singlet v oblasti okolo 5,20 ppm (v CDCl_3) a uhlík v ^{13}C NMR spektru tvoří malý, často obtížně rozeznatelný signál v oblasti okolo 54 – 56 ppm (v CDCl_3). Aminogrupina meziprojektu **44** je v posledním kroku ochráněna v bazickém prostředí sekundárního aminu za vzniku *t*-butyl esteru DONu **45**.

Schéma 6: Syntéza *t*-butyl esteru 6-diazo-5-oxo-L-norleucinu (**45**).^j



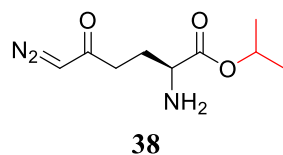
^j **Reakční podmínky:** (i) *t*-butyl acetát, konc. HClO_4 , lab. tep., 23 h, 75 %; (ii) LiHMDS, Fmoc-Cl, THF, -78°C až lab. tep., 21 h, 81 %; (iii) trimethylsilyldiazomethan, *n*-BuLi, THF, -116°C až -78°C , 3 h, 67 %; (iv) piperidin, DCM, lab. tep., 3 h, 67 %.

Schéma 7: Nestabilita diazoketonů v silně kyselém prostředí.



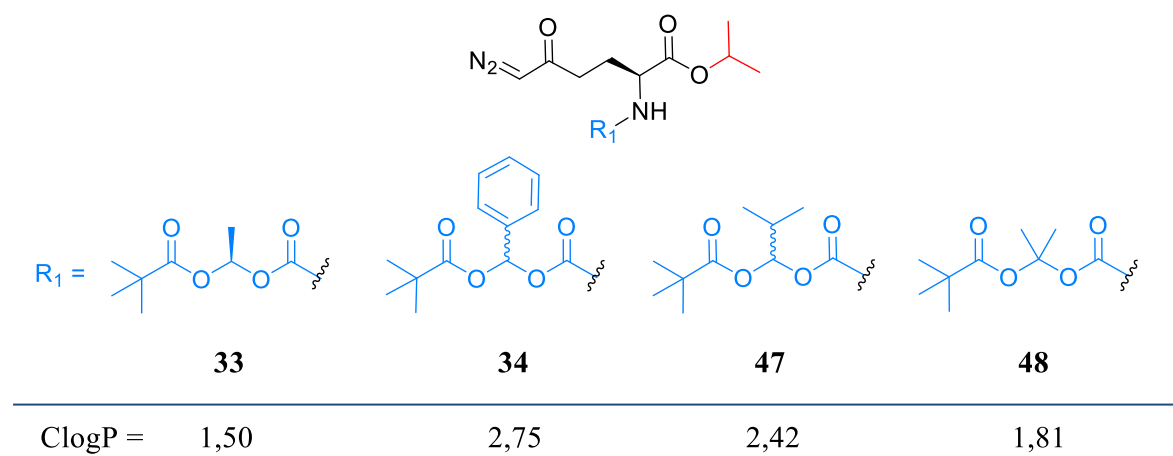
Analogicky jsem pak připravila i isopropyl ester **38** podle postupu uvedeného v mé bakalářské práci.⁽⁶⁶⁾ Od syntézy *t*-butyl esteru DONu **45** se liší pouze v prvním kroku, kde je v případě isopropylového derivátu využito Fisherovy esterifikace kyseliny

L-pyroglutamové v 2-propanolu za kyselých katalýz kyselinou *p*-toluensulfonovou a za použití molekulových sít vychytávajících vynikající molekuly vody v reakční směsi.



4.3 Proléčiva DONu s lipofilním charakterem

Jednou z nejčastějších strukturních modifikací polárních molekul, která se využívá pro zvýšení schopnosti penetrace těchto látek přes HEB, je jejich lipidizace.⁽⁴⁷⁾ Tuto strategii jsem využila i v případě proléčiv DONu (**1**). Vycházela jsem ze struktur již testovaných derivátů DONu s karboxylovou skupinou substituovanou isopropyl esterem a aminoskupinou maskovanou různými (pivaloyloxy)alkoxy-karboxylovými zbytky,⁽⁷⁴⁾ u nichž bylo v provedených *in vivo* studiích jasně prokázáno, že zvýšením hodnoty ClogP oproti samotnému DONu (ClogP = -2,50) dochází k lepší distribuci těchto látek do mozku. Čtyři z pěti testovaných kandidátů (**33**, **34**, **47** a **48**) byly navíc stabilní v opičí i lidské plazmě a DON z nich uvolněný dosahoval v mozku násobně vyšších koncentrací, než tomu bylo po podání samotného DONu (**1**). Proléčiva **33**, **34** a **47** však byla v mozku příliš rychle metabolizována, zatímco látka **48** zde byla naopak příliš stabilní, k uvolňování DONu z její struktury tedy docházelo příliš pomalu. Na základě těchto výsledků byly navrženy tři série nových proléčiv DONu, jejichž příprava a biologické studie budou diskutovány v následujícím textu.

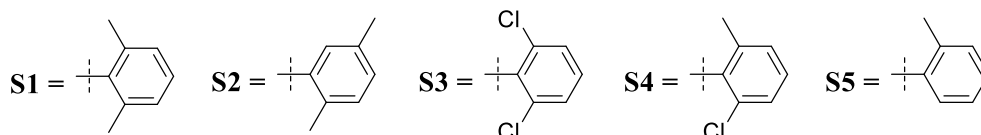
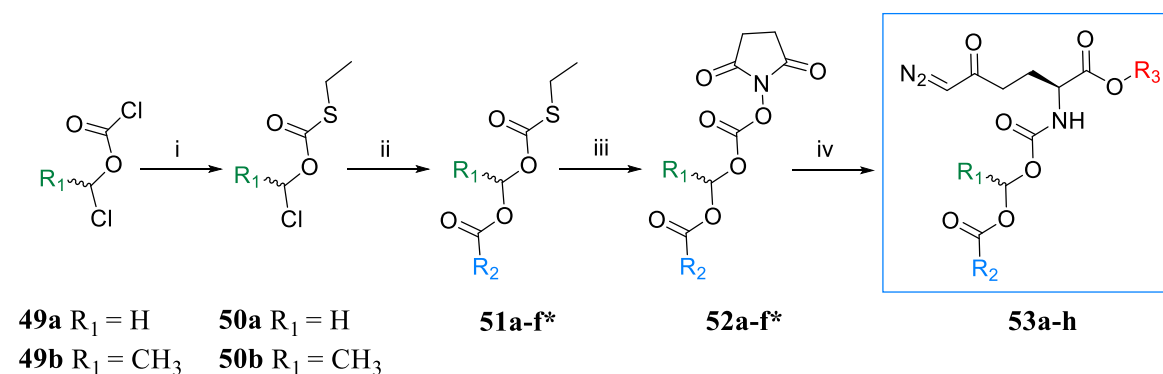


První série nově syntetizovaných proléčiv DONu vychází ze struktury **33**. Pro zpomalení její biotransformace v mozku jsem připravila osm nových proléčiv **53a-h**, u nichž je isopropyl ester ve většině případů nahrazen *t*-butyl esterem, který je pro esterázy v mozku obtížněji štěpitelný kvůli své vyšší sterické náročnosti. Druhou zásadní odlišností od struktury **33** je substituent R₂ (**Schéma 8**), kdy původní *t*-butylový motiv je nahrazen různě mono- nebo di-substituovaným benzenovým jádrem. Důvodem pro připojení těchto strukturních motivů je jejich lipofilita a zároveň také větší prostorová náročnost, díky níž by mělo opět docházet k pomalejšímu štěpení příslušným enzymem. Díky připojeným substituentům v polohách 2 a 6 na benzenovém jádře je navíc u proléčiv **53a-d** a **53f-g** omezena schopnost rotace vazby C-C mezi benzenovým jádrem R₂ a vedlejším karbonylovým uhlíkem.

Proléčiva **53a-h** jsem připravila z příslušných chlorokarbonátů **49a-b**. V přítomnosti báze triethylaminu tvoří ethanthiol thiolátový ion (EtS⁻), který nukleofilně atakuje daný chlorokarbonát **49a-b** za vzniku odpovídajícího thiokarbonátu **50a-b** a vysrážení triethylamonium chloridu jako vedlejšího produktu. Atom chloru látek **50a-b** je v následující reakci nukleofilně substituován příslušným karboxylátovým aniontem, který se generuje z dané karboxylové kyseliny v přítomnosti báze DIEA. Reakční směs je zahřívána na 70 °C a přebytek DIEA zde zároveň slouží i jako rozpouštědlo. Atom síry vznikajících meziproductů **51a-f** je v prostředí kyseliny peroxyoctové oxidován na sulfonyl, který je dobrou odstupující skupinou při následném nukleofilním ataku *N*-hydroxysukcinimidu (HOSu) na sousední karbonát. Vznikající *N*-sukcinimidyl karbonáty **52a-f** jsou pak nukleofilně atakovány aminoskupinou esteru DONu **38** nebo **45** za vzniku proléčiv **53a-h** izolovaných ve formě žlutých olejů.

S připravenými proléčivy **53a-h** byly provedeny *in vitro* studie stabilit v prasečí plazmě a prasečím jaterním homogenátu (**Graf 7**). Zatímco v plazmě bylo stabilních všech osm proléčiv, v jaterním homogenátu nepodlehly rychlé biotransformaci pouze látky **53a** a **53c**. Z naměřených dat je zřejmé, že změna isopropyl esteru v *t*-butyl ester má významný vliv na rychlost štěpení dané látky v jaterním homogenátu. Tento trend je patrný právě u derivátů **53a** a **53b** nebo také u dvojice látek **53c** a **53d**. Důležitým faktorem pro stabilitu proléčiv v prasečím jaterním homogenátu je i počet a poloha substituentů na připojeném benzenovém jádře, kdy nejlepších výsledků bylo dosaženo u proléčiv se substitucí dvěma methyly v polohách 2 a 6 na benzenovém kruhu.

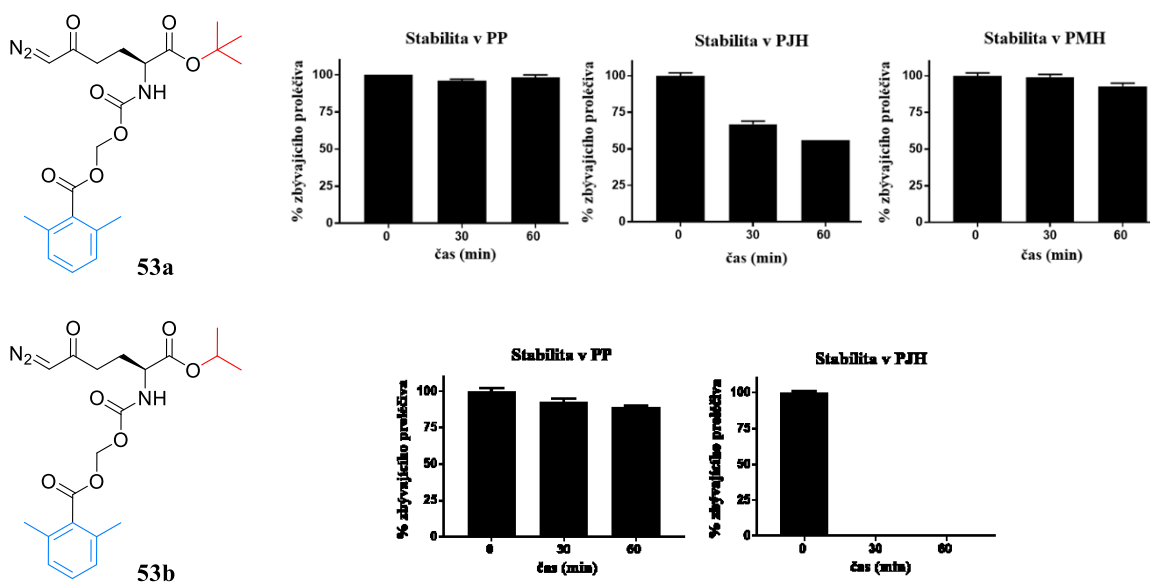
Schéma 8: Syntéza lipofilních derivátů 6-diazo-5-oxo-L-norleucinu (**53a-h**).^k

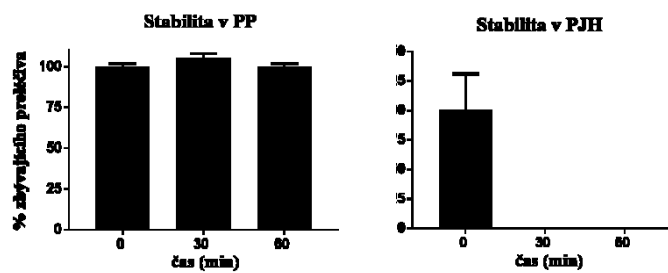
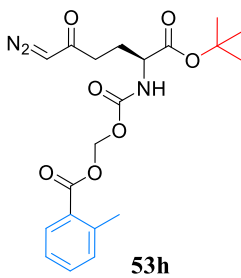
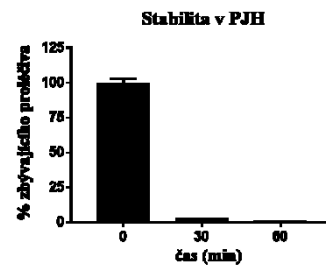
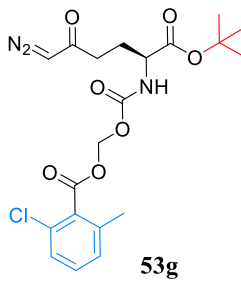
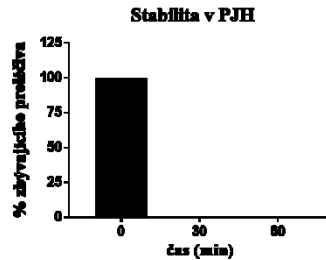
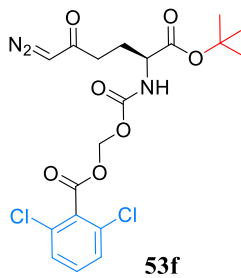
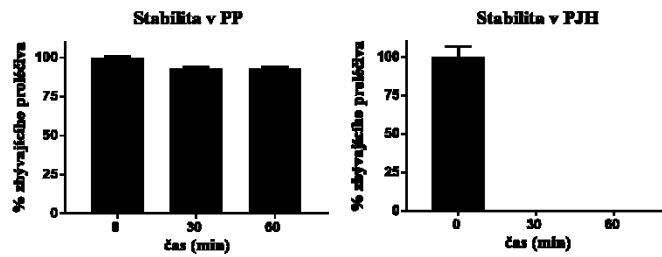
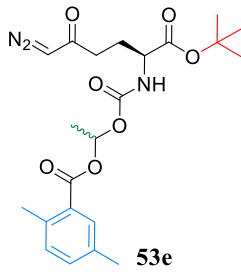
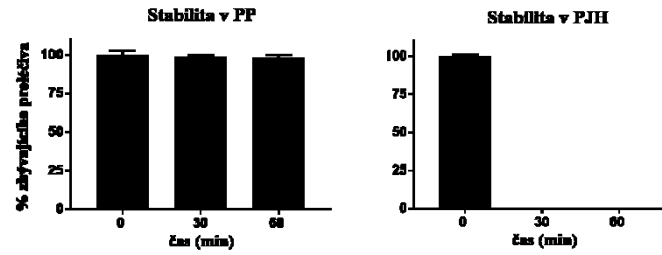
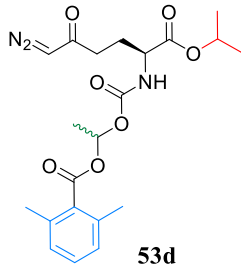
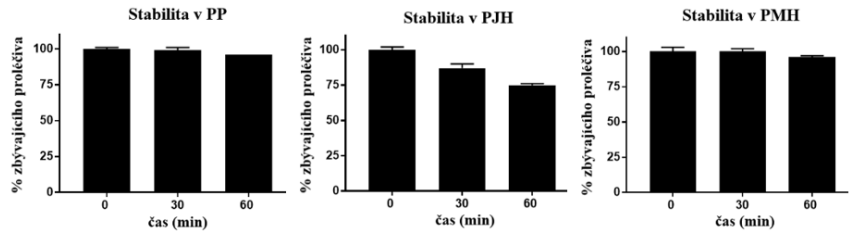
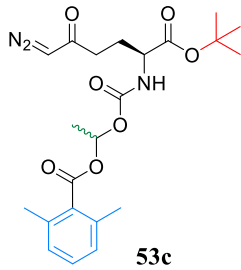


***51a, 52a** $R_1 = H$, $R_2 = S1$; **51b, 52b** $R_1 = CH_3$, $R_2 = S1$; **51c, 52c** $R_1 = CH_3$, $R_2 = S2$;
51d, 52d $R_1 = H$, $R_2 = S3$; **51e, 52e** $R_1 = H$, $R_2 = S4$; **51f, 52f** $R_1 = H$, $R_2 = S5$

^k **Reakční podmínky:** (i) EtSH, Et₃N, Et₂O, 0–5 °C až lab. tep., 18 h, 88 – 94 %; (ii) R₂COOH, DIEA, 70 °C, 18–24 h, 85–98 %; (iii) HOSu, 36% CH₃COOOH v CH₃COOH, DCM, 0–5 °C až lab. tep., 3,5 h, 47–57 %; (iv) **45** pro R₃ = *t*-Bu, **38** pro R₃ = *i*-Pr, DCM, lab. tep., 2–22 h, 63–94 %.

Graf 7: Naměřené hodnoty stabilit prolečiv **53a-h** v prasečí plazmě (PP), prasečím jaterním homogenátu (PJH) a prasečím mozgovém homogenátu (PMH).

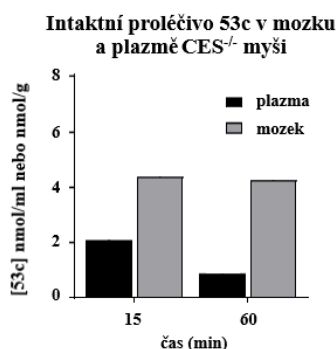




Látky **53a** a **53c**, které dosáhly nejvyšší stability v plazmě i jaterním homogenátu, byly dále testovány *in vitro* v prasečím mozkovém homogenátu, kde je žádoucí, aby docházelo k jejich pozvolnému enzymatickému štěpení na DON (**1**). Bohužel obě látky nebyly v tomto médiu téměř vůbec biotransformovány a nejsou tak vhodnými kandidáty pro potenciální léčbu mozkových tumorů.

Nejstabilnější proléčivo **53c** bylo také testováno v *in vivo* studii v CES^{-/-} myši (transgenní myši s vyřazeným genem pro karboxyesterázu 1), kde byla zkoumána schopnost proléčiva **53c** přecházet z plazmy do mozku (**Graf 8**). Poměr koncentrací intaktního proléčiva **53c** v mozku vs. v plazmě této myši odpovídal řádově vyšší hodnotě než je tomu u samotného DONu (**1**). U proléčiva **53c** je hodnota toho poměru 3, zatímco u DONu (**1**) činí 0,4. Bohužel ale v mozku nedochází ke štěpení proléčiva **53c** na aktivní DON (**1**).

Graf 8: Poměr koncentrací intaktního proléčiva **53c** *in vivo* v plazmě a mozku CES^{-/-} myši.



Zajímavou možností pro ovlivnění stability proléčiv se strukturálním motivem **53** je změna substituentu R₁. Z naměřených dat je zřejmé, že záměna H za CH₃ nemá žádný zásadní vliv na stabilitu, jak je vidět u proléčiv **53a** a **53c**, jejichž hodnoty stabilit v jaterním homogenátu jsou v podstatě srovnatelné. Pokud však do pozice R₁ připojíme objemnější substituent, můžeme tak znesnadnit přístup příslušnému enzymu a potenciálně zvýšit stabilitu této látky. Tato modifikace je v budoucnu zamýšlena i u strukturálního motivu **53g**, jehož stabilita v jaterním homogenátu byla ze souboru derivátů **53b** a **53d-h** nejvyšší.

Jiná strategie přípravy proléčiv DONu vychází ze struktury látky **34**, která je stabilní v prasečí i lidské plazmě, ale v mozku je příliš rychle štěpena na DON (**1**).⁽⁷⁴⁾ Pro snížení rychlosti její biotransformace v mozku jsem připravila proléčivo **58a**, jehož

struktura se od sloučeniny **34** liší formou esteru. Při jeho návrhu jsem vycházela z dat z předchozí studie prokazující, že záměna isopropyl esteru za *t*-butyl ester výrazně zvyšuje stabilitu daného proléčiva. Dále jsem připravila také dva deriváty **58b-c** s méně objemnými substituenty R₂.

Při syntéze látek **58a-c** (Schéma 9) jsem vycházela z benzaldehydu (**54**), který je nukleofilně atakován chloridovým aniontem uvolněným z trifosgenu v přítomnosti báze pyridinu. Vznikající intermediát nukleofilně atakuje další molekulu trifosgenu za vzniku látky **55** ve výborném výtěžku 98 %. V následující reakci dochází k nukleofilnímu útoku *p*-nitrofenolátového aniontu, který vzniká v reakční směsi v přítomnosti báze pyridinu, na chlorkarbonát **55** za vzniku karbonátu **56**. Z tohoto společného intermediátu jsem postupně syntetizovala všechny tři prekursory **57a-c** reakcí s rtuťnatou solí příslušné karboxylové kyseliny. Použitý isovalerát a pivalát rtuťnatý jsem připravila z oxidu rtuťnatého a příslušné karboxylové kyseliny zahříváním na 70 °C ve velmi dobrých výtěžcích 92 – 95 %, přičemž konverze výchozího žlutooranžového oxidu rtuťnatého je snadno identifikovatelná postupným odbarvením reakční směsi. Použitý octan rtuťnatý je komerčně dostupný. Posledním krokem přípravy proléčiv **58a-c** je opět nukleofilní substituce, kdy volná aminoskupina isopropyl esteru (**38**) či *t*-butyl esteru (**45**) DONu atakuje karbonyl látek **57a-c** za odstoupení *p*-nitrofenolu jako vedlejšího produktu.

Stabilita proléčiv **58a-c** byla testována *in vitro* v prasečím jaterním homogenátu, kde byly všechny tři látky velmi rychle metabolizovány (Graf 9). I přes zavedení *t*-butyl esteru namísto isopropyl esteru se tedy nepodařilo získat stabilnější proléčivo, než je tomu v případě původní látky **34**. V případě derivátů **58b** a **58c** se pouze potvrdila hypotéza, že krátký alifatický řetězec v poloze R₂ podporuje rychlou biotransformaci těchto proléčiv, a není tedy vhodným strukturním motivem. Pro přípravu dalšího nového proléčiva, které bude stabilnější než proléčivo **34**, je také zamýšleno využití 2,6-disubstituovaného fenylového substituentu v pozici R₂ a *t*-butylu v pozici R₃ (**59**). Tato látka zatím nebyla syntetizována.

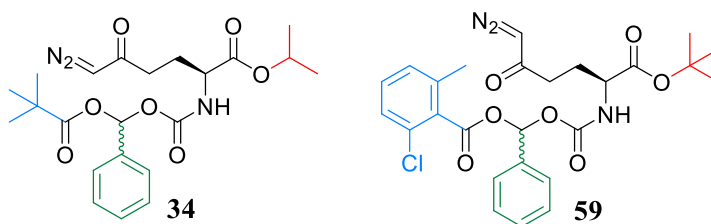
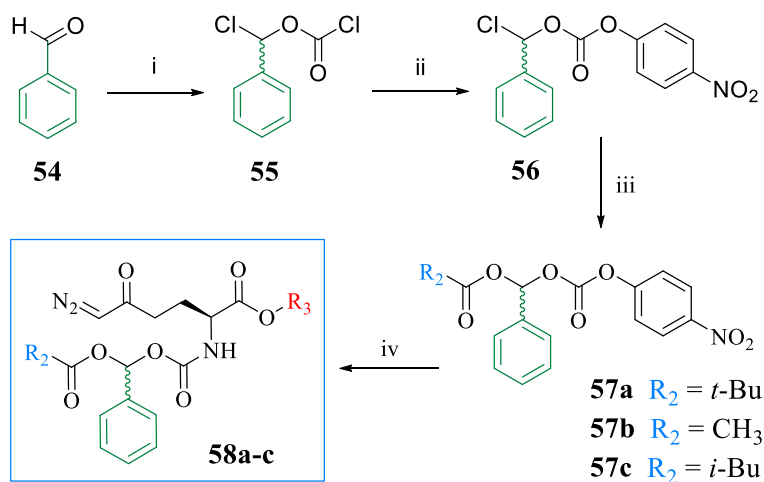
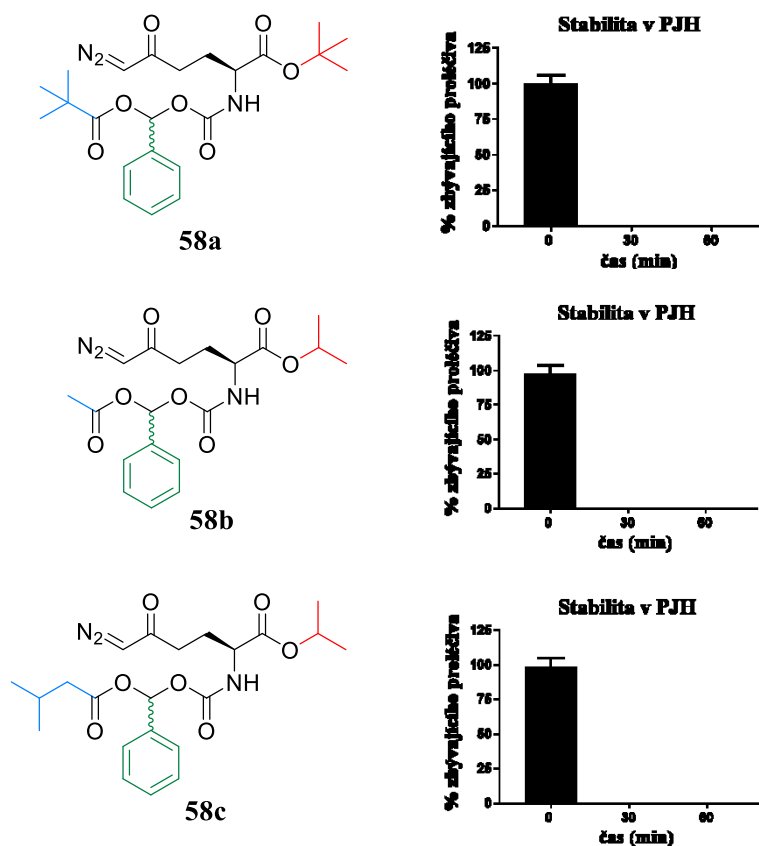


Schéma 9: Syntéza proléčiv DONu **58a-c**.¹



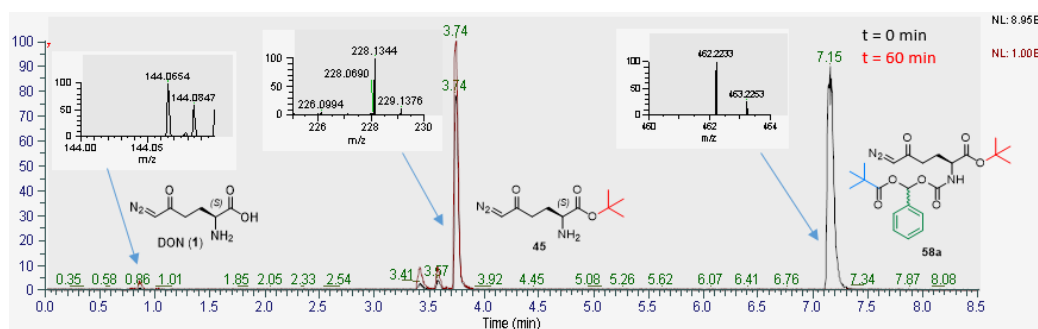
¹ **Reakční podmínky:** (i) trifosgen, pyridin, Et₂O, -10 °C až reflux, 3 h, 98 %; (ii) nitrofenol, pyridin, DCM, 0 °C až lab. tep., 2 h, 70 %; (iii) (R₂COO)₂Hg, DCM, lab. tep., 16 – 18 h, 82 – 95 %; (iv) **45** pro R₃ = *t*-Bu, **38** pro R₃ = *i*-Pr, DMF, 0 °C až lab. tep., 3 h; 79 – 93 %.

Graf 9: Naměřené hodnoty stabilit proléčiv **58a-c** v prasečím jaterním homogenátu (PJH).

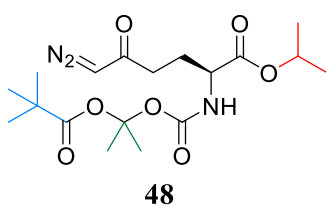


Při studii stability látky **58a** v jaterním homogenátu prasete byly z hmotnostního spektra identifikovány metabolity, na které je proléčivo enzymaticky štěpeno. Z naměřených hodnot je patrné, že lipofilní řetězec připojený na N-konci DONu není odbouráván po částech, ale dochází rovnou ke štěpení C-N vazby mezi aminoskupinou *t*-butyl esteru DONu a připojeným lipofilním řetězcem (**Obrázek 11**).

Obrázek 11: Metabolická studie enzymatického štěpení proléčiva **58a** v PJH.



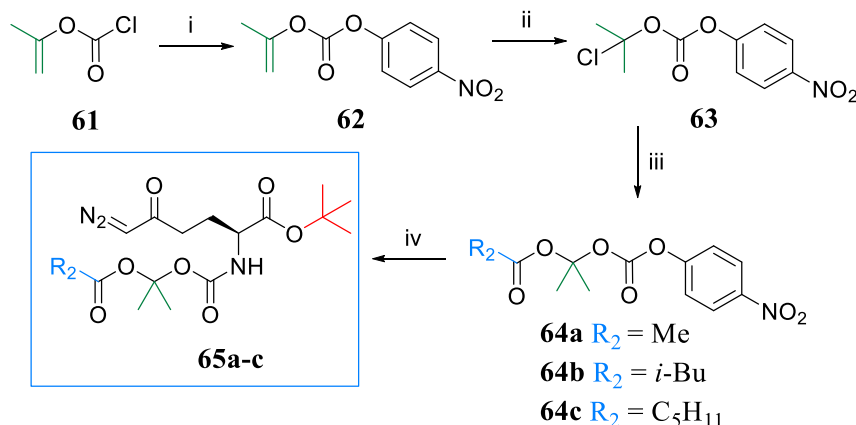
Třetí série nových proléčiv **65a-c** je zaměřena na látky, které budou v ideálním případě méně stabilní než proléčivo **48**, které v mozku téměř není metabolizováno. Původní *t*-butylový substituent v proléčivu **48** (modře) je vyměněn za méně objemný methyl (**65a**), isobutyl (**65b**), respektive pentyl (**65c**) (R_2 ve **Schématu 10**). Další změnou oproti původnímu proléčivu **48** je forma esteru (červeně), kdy isopropyl ester (**48**) je nahrazen *t*-butyl esterem u všech tří nově připravených derivátů. Důvodem je opět vyšší stabilita *t*-butyl esteru **45** oproti isopropyl esteru **38** vůči esterázám.



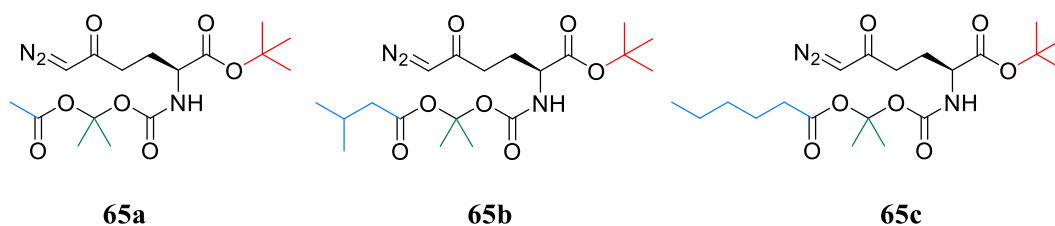
Proléčiva **65a-c** (**Schéma 10**) jsem připravila z komerčně dostupného isopropenyl chloroformiátu (**61**), jehož atom chloru je nukleofilně substituován *p*-nitrofenolátovým aniontem. Na exocyklickou dvojnou vazbu vznikajícího karbonátu **62** se následně aduje chlorovodík za vzniku chlorovaného intermediátu **63**. Z něj jsem dále připravila všechny tři deriváty **64a-c** reakcí s rtuťnatou solí příslušné karboxylové kyseliny. Použitý isovalerát a hexanoát rtuťnatý byly připraveny z oxidu rtuťnatého a příslušné karboxylové kyseliny

zahříváním na 70 °C. Posledním krokem přípravy proléčiv **65a-c** je nukleofilní atak volné aminoskupiny látky **45** na karbonyl molekul **64a-c**.

Schéma 10: Příprava proléčiv **65a-c**.^m



^m **Reakční podmínky:** (i) *p*-nitrofenol, pyridin, DCM, 0 °C až lab. tep., 1,5 h, 85 %; (ii) 4M HCl, dioxan, lab. tep., 23 h, kvant.; (iii) $(R_2\text{COO})_2\text{Hg}$, DCM, lab. tep., 19 – 24 h, kvant.; (iv) **45**, DMF, 0 °C až lab. tep., 4 h, 35 – 53 %.



Látky **65a-c** jsou nejnovějšími připravenými proléčivými a zatím nebyly testovány v *in vitro* studiích. Zavedením výše popsaných substituentů do pozice R_2 očekáváme snazší přístup příslušného enzymu k danému proléčivu a tedy rychlejší štěpení těchto látek v mozku oproti proléčivu **48**.

4.4 Proléčiva DONu cílená na glukózový přenašeč GLUT1

Proléčiva určená pro léčbu mozkových onemocnění mohou být také navržena tak, aby byla substrátem některého z influxních přenašečů v HEB. V případě proléčiv DONu jsem připravila šest nových strukturních motivů, které byly testovány jako potenciální substráty glukózového přenašeče GLUT1. Na základě poznatků ze studie⁽⁵¹⁾ již zmíněného proléčiva dopaminu (**14**) jsem k esteru DONu (**38** nebo **45**) připojila molekulu glukózy, která je sama endogenním substrátem tohoto transportéru v mozku. Pro snazší enzymatické štěpení je pak mezi esterem **38**, resp. **45** a glukózovým zbytkem vložena jedna či dvě

aromatické aminokyseliny (tryptofan nebo fenylalanin), které jsou ke glukózovému zbytku připojeny buď přímo (proléčiva **70a-c** a **79**), nebo přes různě dlouhý řetězec (proléčiva **83** a **87**).

Nejprve jsem připravila proléčiva **70a-c** (Schéma 12) lišící se vzájemně velikostí esteru. Syntetizovala jsem je z příslušného esteru DONu (**38** nebo **45**) a aminokyseliny tryptofanu peptidovým couplingem za využití HATU. HATU je činidlo, které vytvoří s karboxylovou skupinou tryptofanu v přítomnosti báze aktivní ester a při následném nukleofilním ataku volné aminoskupiny látky **38** nebo **45** na tento ester je pak dobrou odstupující skupinou. Aminoskupina vznikajících dipeptidů **67a-b** je v následující reakci ochráněna působením diethylaminu za vzniku látek **68a-b**, které pak mohou nukleofilně atakovat *N*-sukcinimidyl karbonát látky **71** za vzniku glukózových derivátů **69a-b**. Molekulu **71** jsem připravila z komerčně dostupné 1,2,3,4-tetra-*O*-acetyl- β -D-glukopyranózy, která v přítomnosti báze triethylaminu nukleofilně atakuje *N,N'*-disukcinimidyl karbonát (DSC) za vzniku bezbarvé pevné látky **71**. Pro přípravu proléčiva **70b** jsem v prvních optimalizačních experimentech použila vodný roztok hydrazinu. Po očekávaném ochránění acetylů z glukózového zbytku však vznikající acetyl-hydrazin, coby silný nukleofil, substituuje také isopropyl ester látky **70b** za vzniku nežádoucího acetylhydrazonu **72** (Schéma 11). Proto byla pro deprotektci acetylů zvolena jiná metoda přípravy s využitím methanolátu sodného.

Schéma 11: Předpokládaný mechanismus vzniku acetylhydrazonu **72**.

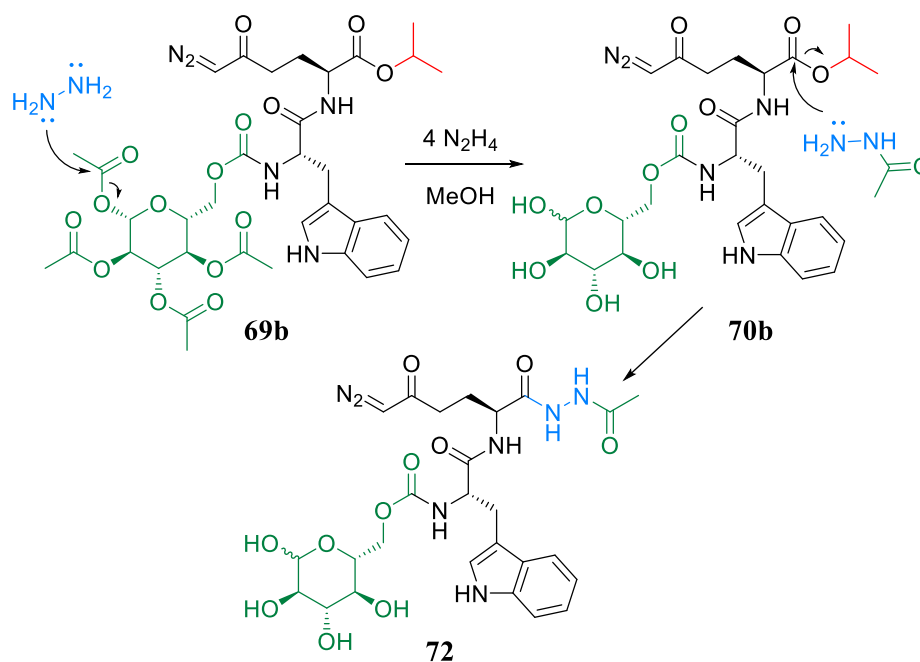
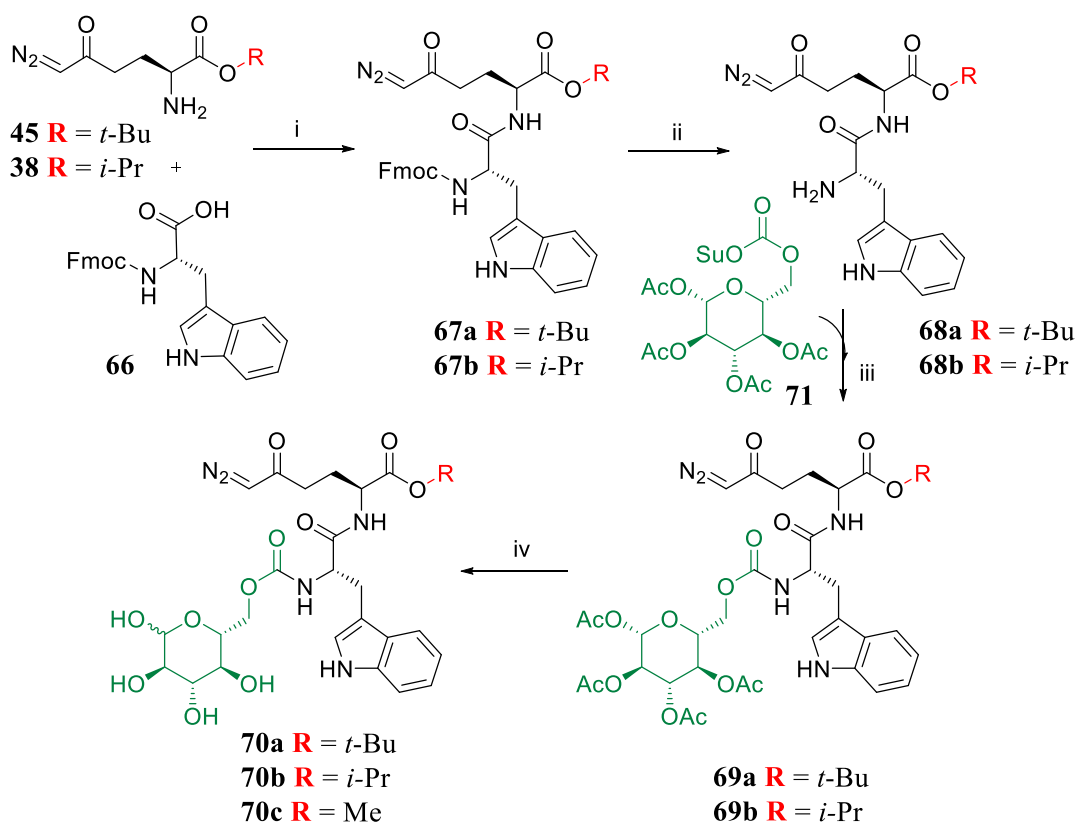


Schéma 12: Syntéza proléčiv 70a-c.ⁿ

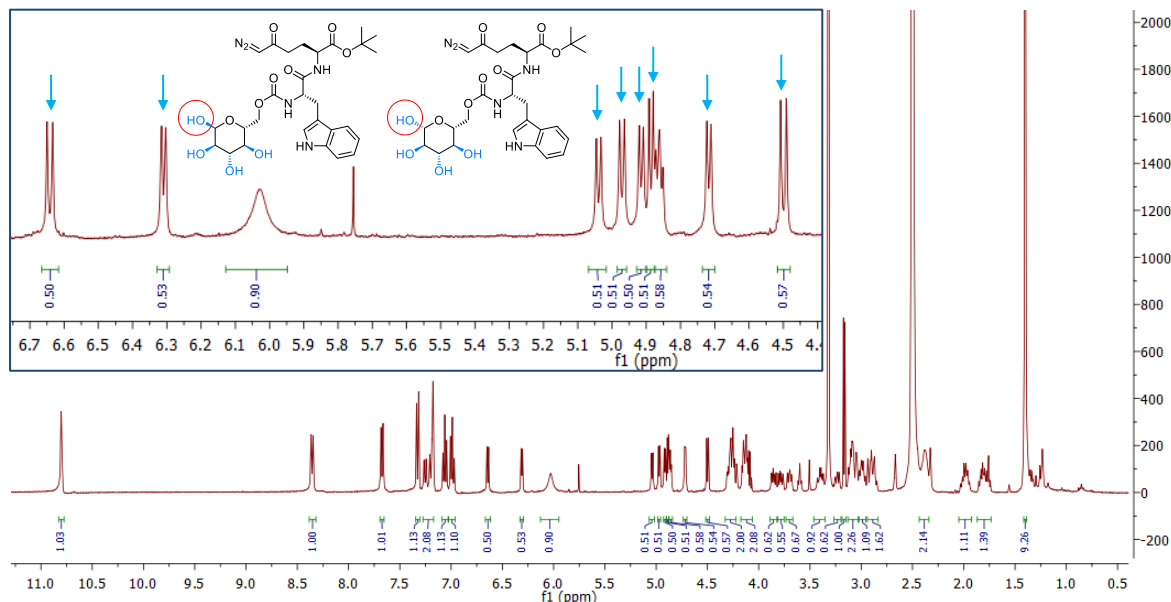


ⁿ **Reakční podmínky:** (i) HATU, DIEA, DCM, 0 °C až lab. tep.; 2,5 h, pro **67a**: 84 %; (ii) Et₂NH, DCM, lab. tep.; 4 – 6 h, 78 – 93 %; (iii) látka **71**, DCM, lab. tep.; 21 – 24 h, 95 %; (iv) MeONa, MeOH, lab. tep.; pro **70a**: 1 h, 82 %; pro **70b**: 30 min, 76%; pro **70c**: 18 h, 28 %.

Tento krok přípravy proléčiv **70a-c** je závislý na množství použitého methanolátu sodného a zvoleném reakčním čase, zejména pak v případě výchozího isopropyl esteru **69b**. Přidávkem katalytického množství methanolátu sodného dochází k selektivnímu odštěpení acetylů z glukózového zbytku. V průběhu reakce methanolát nukleofilně atakuje acetyl za vzniku methylacetátu a regenerace methanolátu, který pak nukleofilně atakuje další z acetylů. Po ochránění hydroxyskupiny na poloacetalovém uhlíku dochází ke vzniku obou anomerů v poměru 1:1. Tento poměr je dobře rozeznatelný z naměřeného ¹H NMR spektra, kdy čtyři vodíky glukózových hydroxylových skupin tvoří dvě série typických dubletů (**Obrázek 12**). Reakce musí být ukončena po krátkém čase (ideálně po 30 min), jinak dochází k postupné transesterifikaci isopropyl esteru **70b** na methyl ester **70c**. Tento trend jsem naopak vůbec nepozorovala v případě objemnějšího *t*-butyl esteru **70a**. Zamýšlený vznik methyl esteru **70c** lze tedy podpořit přidáním většího

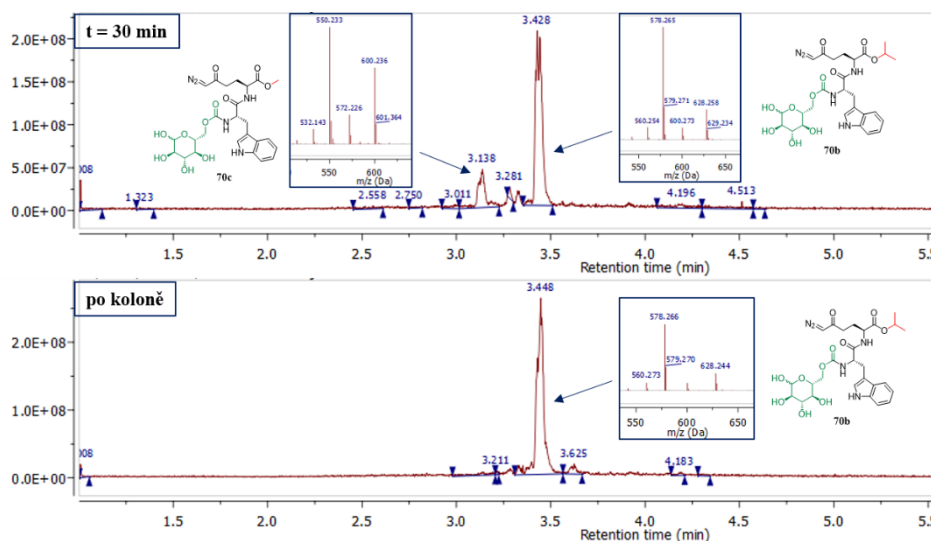
množství methanolátu sodného do reakce, v tomto případě 0,5 ekv., a prodloužením reakční doby.

Obrázek 12: Naměřené ^1H NMR spektrum proléčiva **70a** (v d_6 -DMSO).



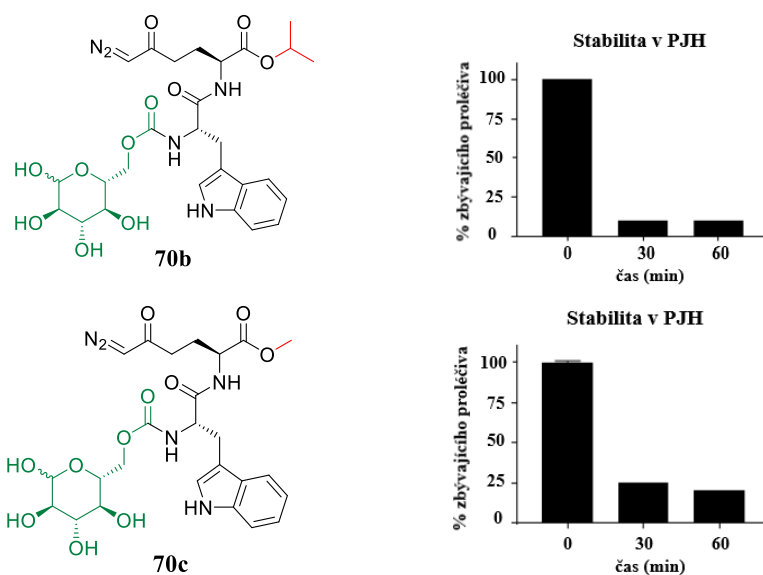
Konverze výchozích látek **69a-b** na produkty **70a-c** v reakční směsi jsem sledovala pomocí UPLC-MS. **Obrázek 13** ukazuje postupnou konverzi acetylovaného intermediátu **69b** na isopropyl ester **70b** a methyl ester **70c** při použití 0,1 ekv. methanolátu sodného, kdy po 30 minutách je ve spektru vedle píku odpovídajícího molekulové hmotnosti isopropyl esteru **70b** patrný už i nárůst píku odpovídajícího molekulové hmotnosti methyl esteru **70c**.

Obrázek 13: Sledování konverze látky **69b** na **70b** a **70c** pomocí UPLC-MS.

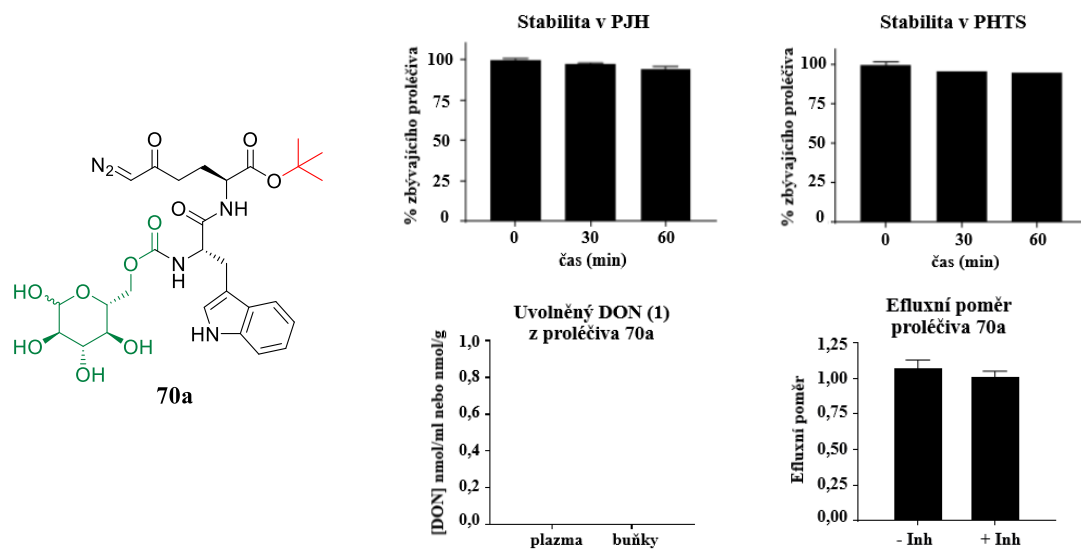


Stability proléčiv **70a-c** byly testovány *in vitro* v prasečím jaterním homogenátu, kde isopropyl ester **70b** i methyl ester **70c** podléhaly velmi rychlé biokonverzi (**Graf 10**). Objemnější *t*-butyl ester **70a** však v prasečím jaterním homogenátu zůstal intaktní (**Graf 11**), proto s ním byly provedeny další studie. V homogenátu tenkého střeva projevil podobně vysokou stabilitu jako v předchozím médiu, navíc se prokazatelně nejedná o substrát efluxního přenašeče P-gp. Proléčivo **70a** je nicméně velmi stabilní nejen v plazmě, ale také uvnitř buněk, kde je jeho biokonverze na DON (**1**) žádoucí. Žádný z připravených derivátů **70a-c** tedy není potenciálně vhodným proléčivem pro léčbu mozkových tumorů. Na základě těchto poznatků o vztahu struktury a odpovídající stability příslušných sloučenin však mohly být navrženy další nové strukturální motivy cílené na přenos do mozku pomocí transportéru GLUT 1.

Graf 10: Naměřené hodnoty stabilit proléčiv **70b-c** v prasečím jaterním homogenátu (PJH).



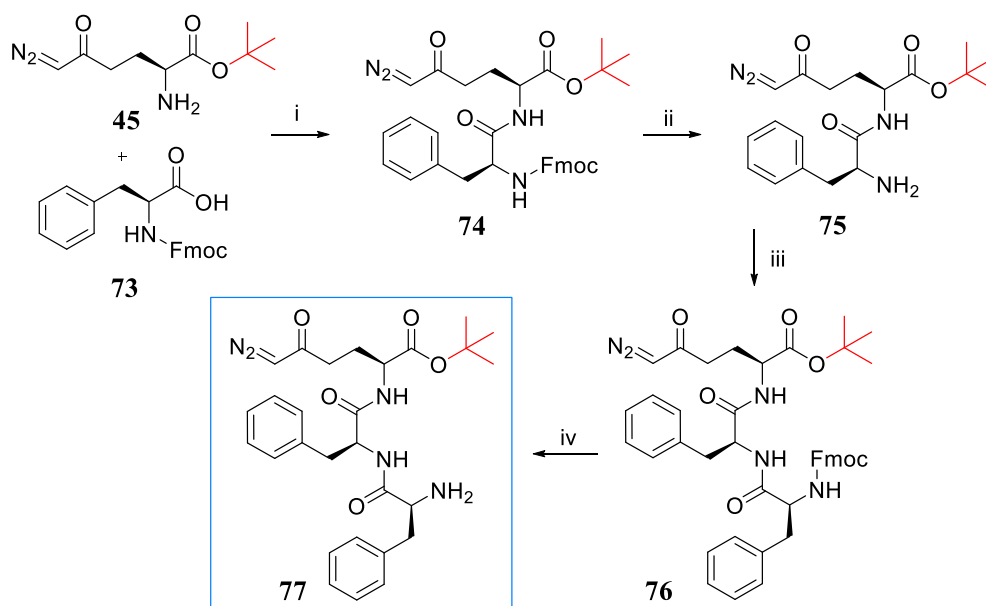
Graf 11: Naměřené hodnoty stabilit proléčiva **70a** v prasečím jaterním homogenátu (PJH) a prasečím homogenátu tenkého střeva (PHTS).



V další sérii jsem připravila tři proléčiva DONu **79**, **83** a **87**, v jejichž struktuře jsem pro zachování stability v plazmě a jaterním homogenátu ponechala *t*-butyl ester DONu (**45**). Pro zamýšlené snazší štěpení těchto molekul v buňce jsem pak připojila místo jedné aromatické aminokyseliny dvě, čímž se vytvořil delší linker mezi esterem DONu (**45**) a glukózovým zbytkem. V případě navržených molekul **83** a **87** jsou druhá aminokyselina a vedlejší glukózový zbytek propojeny ještě přes další alkylový (**83**) nebo alkoxylový (**87**) linker.

Proléčiva **79**, **83** a **87** jsem připravila z *t*-butyl esteru DONu (**45**), který peptidovým couplingem s Fmoc-L-Phe-OH (**73**) tvoří dipeptid **74** (Schéma 13). Aminokupina meziprojektu **74** je následně ochráněna a vznikající molekula **75** tvoří dalším peptidovým couplingem s molekulou Fmoc-L-Phe-OH tripeptid **76**. Jeho aminokupina je opět ochráněna sekundárním aminem Et₂NH za vzniku intermediátu **77**, který slouží jako základní stavební blok pro všechna tři diskutovaná proléčiva **79**, **83** a **87**.

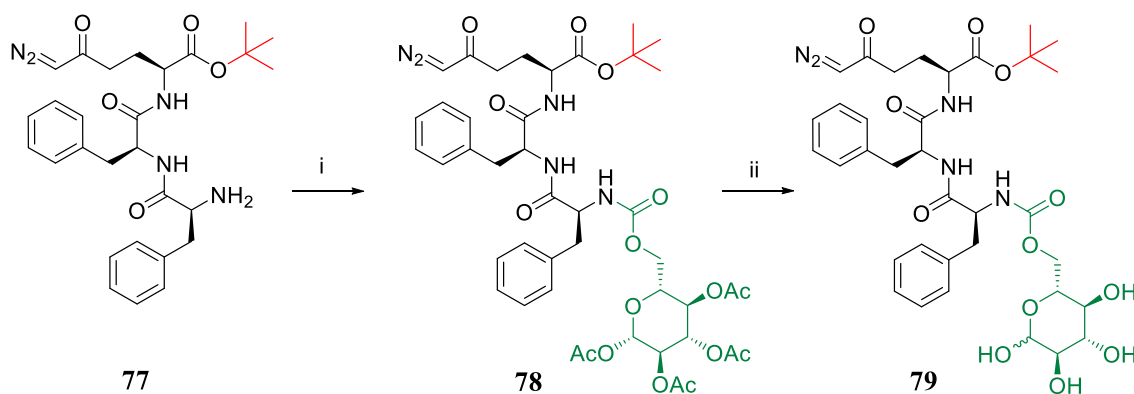
Schéma 13: Syntéza intermediátu 77.^o



^o **Reakční podmínky:** (i) HATU, DIEA, DCM, 0 °C až lab. tep., 17 h, 76 %; (ii) Et₂NH, DMF, lab. tep., 2 h, 96 %; (iii) Fmoc-L-Phe-OH, HATU, DIEA, DCM, 0 °C až lab. tep., 2 h, 90 %; (iv) Et₂NH, DMF, lab. tep., 1 h, 84 %.

Při přípravě proléčiva **79** aminoskupina látky **77** nukleofilně atakuje *N*-sukcinimidyl ester **71** za vzniku derivátu **78** (Schéma 14). Následnou čtyřnásobnou deacetylaci glukózového zbytku v molekule **78** jsem na základě zkušeností s přípravou látek **70a-c** provedla v prostředí katalytického množství methanolátu sodného v methanolu. Obě reakce proběhly s velmi dobrým výtěžkem (96 % a 90 %). Jejich průběh byl sledován opět pomocí UPLC-MS.

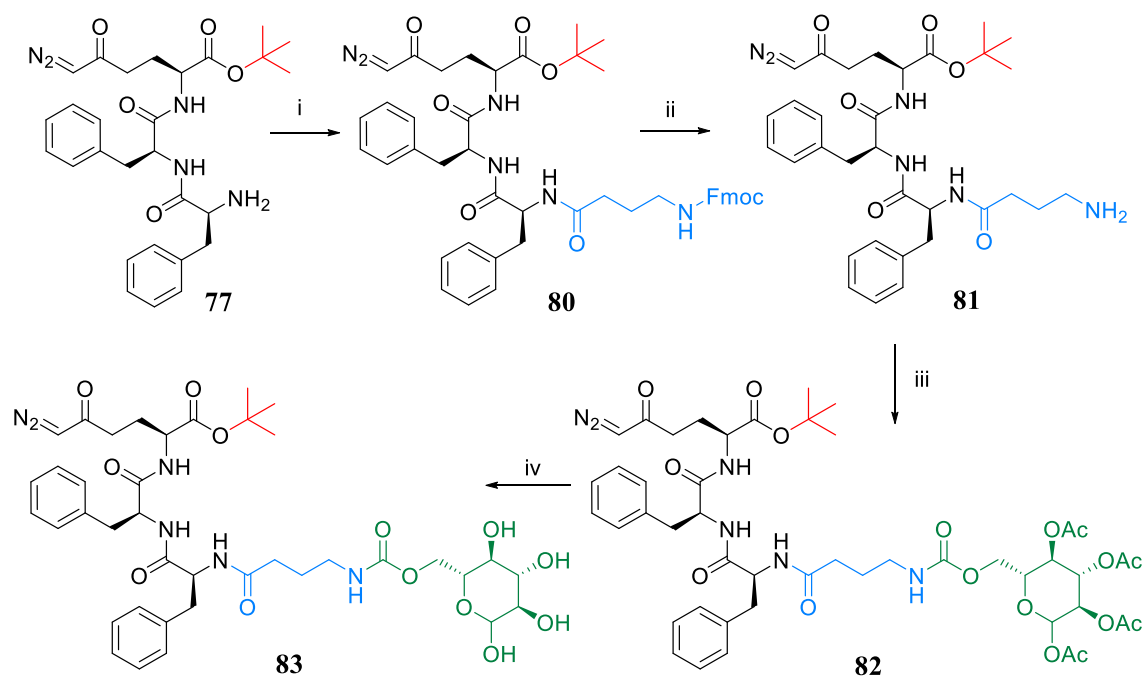
Schéma 14: Syntéza proléčiva 79.^p



^p **Reakční podmínky:** (i) látka **71**, DCM, lab. tep., 20 h, 96 %; (ii) MeONa, MeOH, lab. tep., 1 h, 90 %.

Při syntéze druhého proléčiva (**83**) jsem využila komerčně dostupnou 4-(Fmoc-amino)butanovou kyselinu, která peptidovým couplingem s tripeptidem **77** tvoří meziprodukt **80** (Schéma 15). Pro následné připojení glukózového zbytku k vytvořenému linkeru je nejprve nutné ochránit koncovou aminoskupinu molekuly **80** za vzniku látky **81**. Ta pak může nukleofilně atakovat *N*-sukcinimidyl ester **71** za vzniku molekuly **82**. Posledním krokem syntézy proléčiva **83** je čtyřnásobná deacetylace glukózového zbytku, k níž jsem opět zvolila metodu přípravy methanolátem sodným v methanolu. Jelikož se jedná o objemný *t*-butyl ester DONu, nepozorovala jsem současnou transesterifikaci v methyl ester stejně jako při přípravě *t*-butyl esteru **70a**, dokonce ani po dlouhé reakční době (24 h) a použití 0,5 ekv. MeONa.

Schéma 15: Syntéza proléčiva **83**.⁹

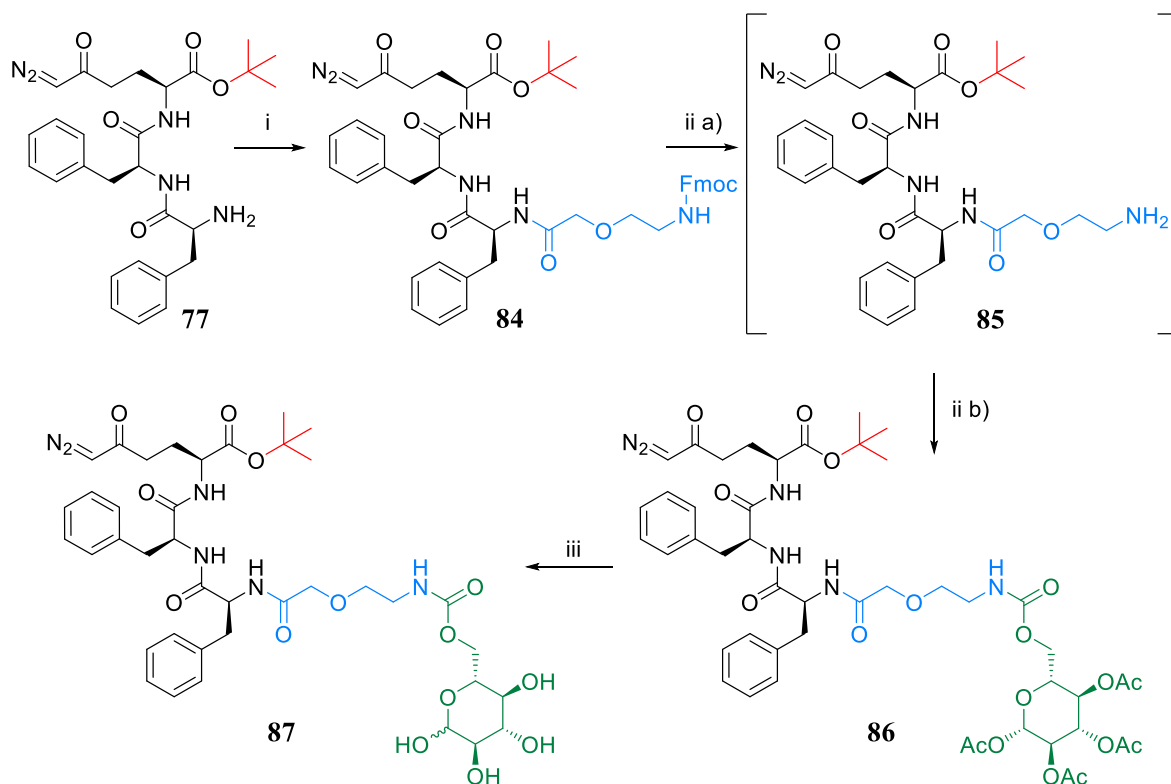


⁹ **Reakční podmínky:** (i) 4-(Fmoc-amino)butanová kyselina, HATU, DIEA, DMF, 0 °C až lab. tep., 16 h, 84 %; (ii) Et₂NH, DMF, lab. tep., 3 h, 52 %; (iii) látka **71**, DMF, lab. tep., 17 h, 92 %; (iv) MeONa, MeOH, lab. tep., 24 h, 54 %.

Pro přípravu třetího proléčiva (**87**) jsem použila komerčně dostupnou 5-(Fmoc-amino)-3-oxopentanovou kyselinu (Schéma 16), která peptidovým couplingem s aminoskupinou látky **77** tvoří molekulu **84**. V následujícím kroku je aminoskupina látky **84** ochráněna v bazickém prostředí Et₂NH, který je po vzniku meziproduktu **85** z reakční

směsi důkladně odpařen. Látka **85** pak není ze vzniklé směsi izolována, ale je rovnou použita do reakce s látkou **71**, kdy opět dochází k nukleofilnímu ataku volné aminoskupiny molekuly **85** na *N*-sukcinimidyl ester **71** za vzniku intermediátu **86**. Tímto způsobem jsem dosáhla lepšího výtěžku než v případě, kdy jsem intermediát **85** ze směsi izolovala sloupcovou chromatografií a až poté jej použila do reakce s *N*-sukcinimidyl esterem **71**. Nízký výtěžek (46 %) je také důsledkem obtížného čištění produktu **86** pomocí HPLC. Posledním krokem přípravy proléčiva **87** je opět čtyřnásobná deacetylace glukózového zbytku v molekule **86** katalytickým množstvím methanolátu sodného v methanolu s uspokojivým výtěžkem 68 %.

Schéma 16: Syntéza proléčiva **87**.^r

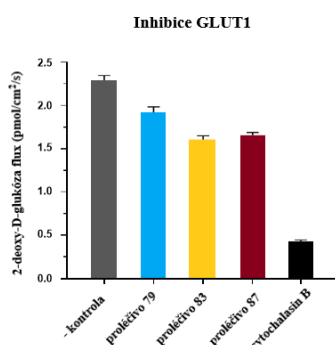


^r **Reakční podmínky:** (i) 5-(Fmoc-amino)-3-oxopentanová kyselina, HATU, DIEA, DMF, 0 °C až lab. tep., 17 h, 93 %; (ii) a) Et₂NH, DMF, lab. tep., 3 h; b) látka **71**, DCM, lab. tep., 1 h, 46 %; (iii) MeONa, MeOH, lab. tep., 30 min, 68 %.

Stabilita proléčiv **79**, **83** a **87** byla *in vitro* testována v prasečím jaterním homogenátu (PJH), prasečím homogenátu tenkého střeva (PHTS) a prasečím mozkovém homogenátu (PMH) (**Graf 13**). Naměřené hodnoty stabilit v jaterním homogenátu nebyly příliš uspokojivé, neboť nejstabilnější molekula **83** zde byla po 60 minutách metabolizována přibližně z 50 %. V homogenátu tenkého střeva pak dosahuje nejlepších výsledků proléčivo **79**, které v tomto médiu zůstává téměř intaktní na rozdíl od látek **83** a **87**. V prasečím mozkovém homogenátu ale všechna tři proléčiva vykazovala příliš vysokou stabilitu a nebyla téměř metabolizována na DON (**1**). Zároveň byla naměřena hmotnostní spektra jednotlivých proléčiv **79**, **83** a **87** v časech 0 a 60 min od jejich aplikace do prasečího jaterního homogenátu (**Graf 13**), která potvrzují jejich postupnou konverzi na metabolity **45** a **1**.

U proléčiv **79**, **83** a **87** byla stanovena také jejich afinita k přenašeči GLUT1 (**Graf 12**). 2-Deoxy-D-glukóza je endogenním substrátem tohoto transportéru. Měřením toku 2-deoxy-D-glukózy přes membránu pomocí GLUT1 v přítomnosti proléčiv **79**, **83** a **87** (500 μ M konc.) bylo zjištěno, že ani jedno z nově připravených proléčiv bohužel není vhodným substrátem pro GLUT1. Jako standard byl využit inhibitor GLUT1 cytochalasin B.

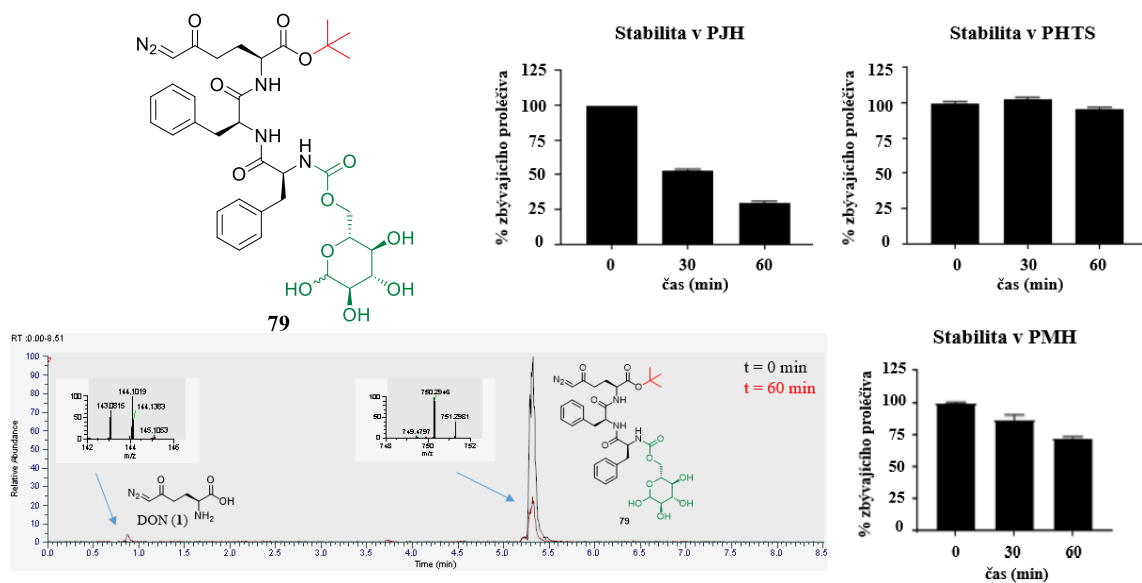
Graf 12: Inhibice GLUT1 proléčivy **79**, **83** a **87**.



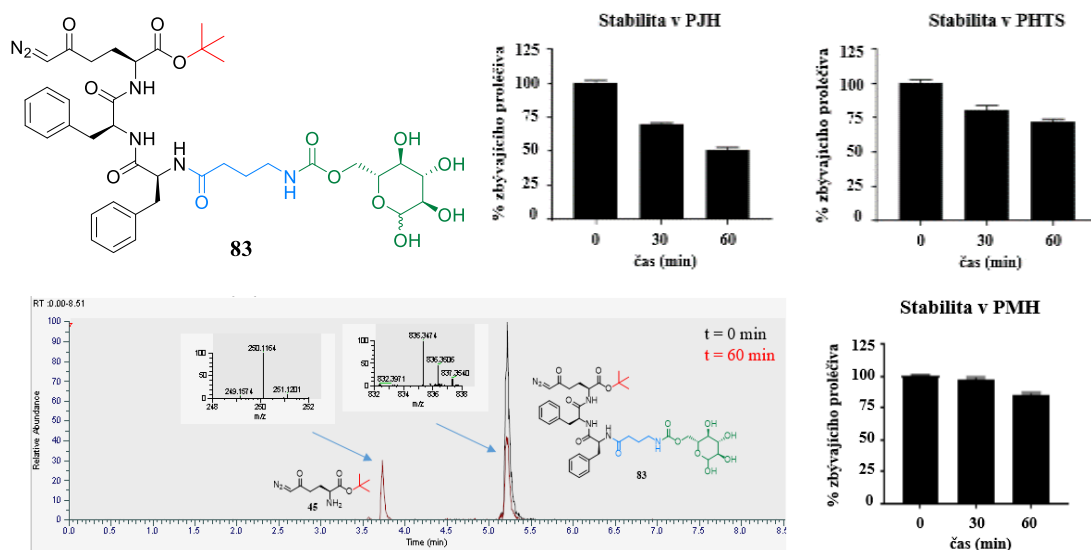
Ze získaných dat vyplývá, že připojení druhé aromatické aminokyseliny do struktury proléčiva DONu vede ke snížení jeho stability v játrech, což není žádoucí. Stejně tak prodloužení linkeru mezi esterem DONu a glukózovým zbytkem ve struktuře proléčiva vede k jeho snazšímu štěpení příslušným enzymem.

Graf 13: Stabilita proléčiv 79, 83 a 87.

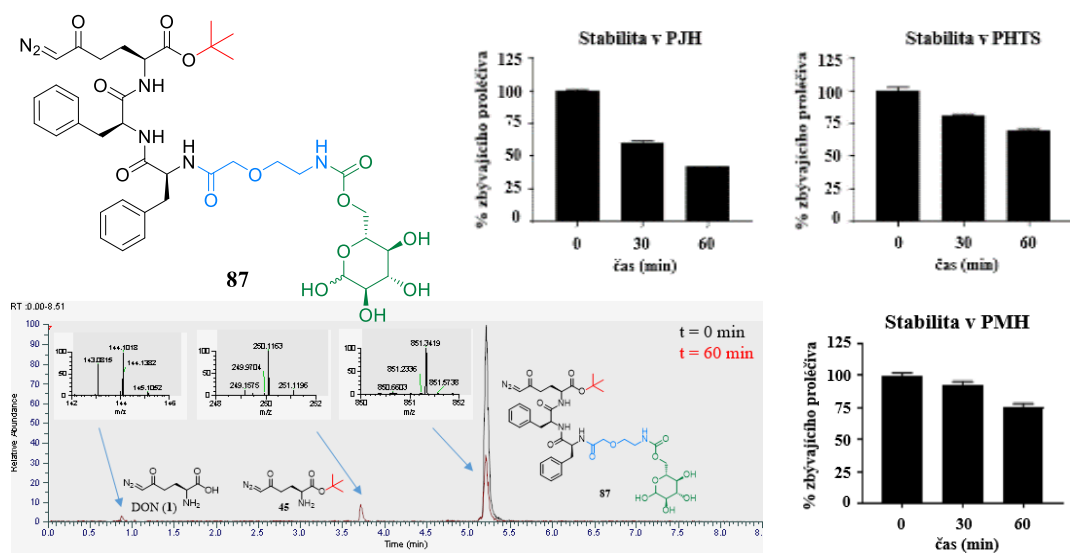
A



B



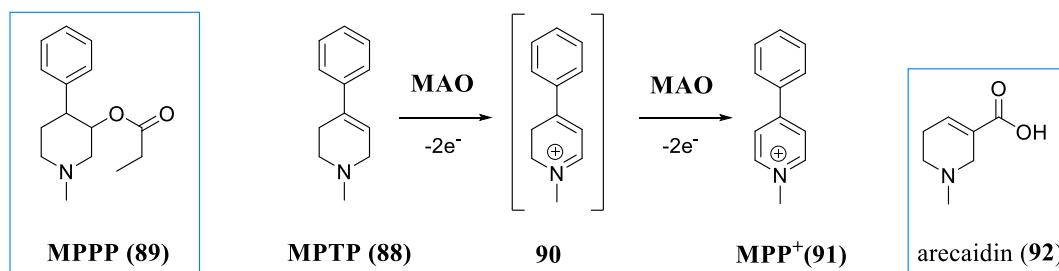
C



4.5 Proléčiva DONu obsahující arecaidin

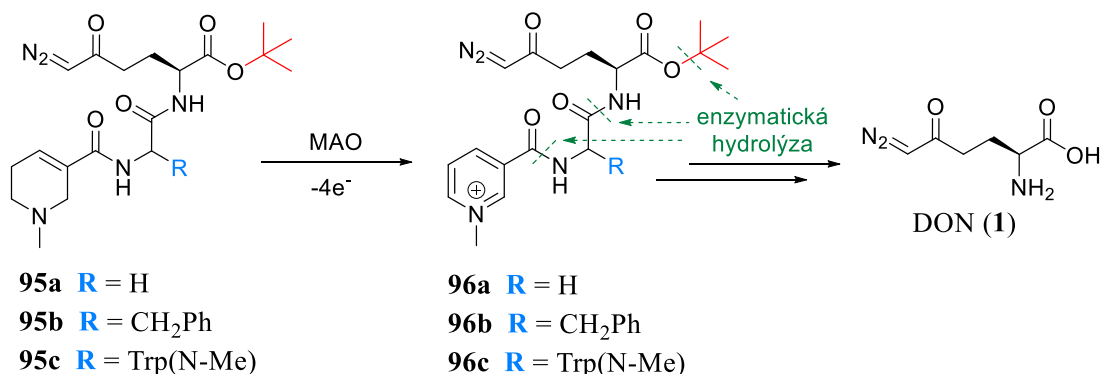
1-Methyl-4-fenyl-1,2,5,6-tetrahydropyridin (MPTP, **88**) je neurotoxický cyklický terciární allylamin navozující v lidském organismu parkinsonský syndrom degenerací substantia nigra ve středním mozku.⁽⁸⁴⁾ Tento jev byl pozorován u čtyř pacientů v různých částech Kalifornie, u nichž se vyvinul parkinsonský syndrom po svévolném systémovém podání „syntetického heroinu“, což je směs 1-methyl-4-fenyl-3-propionoxypiperidinu (MPPP, **89**) s MPTP (**88**) v různém poměru. MPTP (**88**) je vedlejším produktem při syntéze MPPP (**89**) a je komerčně dostupný. Celý příběh objevu účinků MPTP (**88**) popisuje neurolog Dr. Langston,⁽⁸⁵⁾ který tyto pacienty diagnostikoval. V mozku se MPTP (**88**) oxiduje enzymem monoaminoxidázou (MAO) přes dihydropyridiniový skelet (**90**) na 1-methyl-4-fenyl-pyridinium **91** (MPP⁺) (Schéma 17).⁽⁸⁶⁾ Další metabolismus znikajícího intermediátu MPP⁺ (**91**) není znám, pravděpodobně dále reaguje s nukleofilními částmi neuronových makromolekul.

Schéma 17: Metabolická přeměna MPTP (**88**) v savčím organismu pomocí MAO.⁽⁸⁵⁾



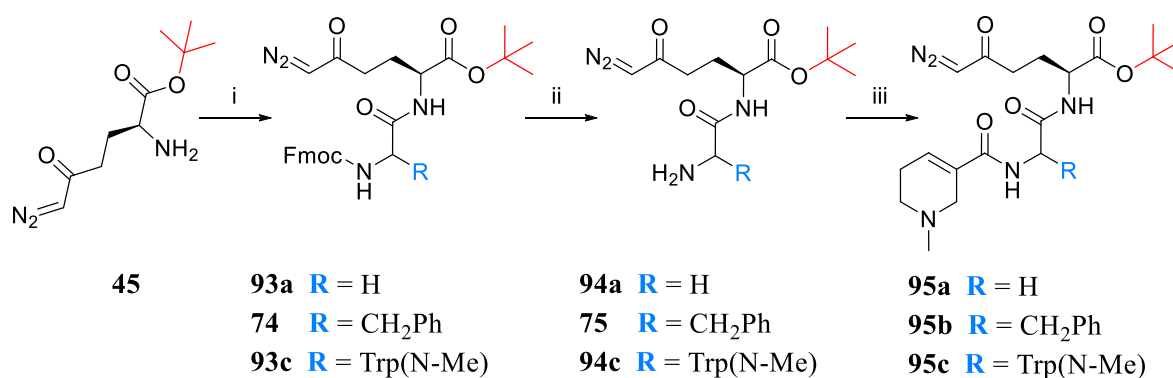
Arecaidin (**92**) je alkaloid obsažený v betelových oříšcích (areca nuts).⁽⁸⁷⁾ Obsahuje stejný piperidinový strukturální motiv jako molekula MPTP (**88**). Připojením tohoto 1,2,5,6-tetrahydropyridinového kruhu ve strukturách nově navržených proléčiv DONu (**95a-c**) by mohlo dojít stejným mechanismem jako v případě MPTP (**88**) k jeho enzymatické oxidaci v mozku na pyridinium **96a-c**, které bude následně ze struktury proléčiva hydrolyticky odštěpeno, jako tomu je například u již zmíněného Estredoxu (**10**). Hydrofilní oxidovaná forma proléčiva **96a-c** přitom špatně prochází přes membránu z mozku zpět do krevního řečiště. Proléčivo je tak v buňce trvale „zachyceno“. Předpokládaný mechanismus účinku je navržen ve **Schématu 18**.

Schéma 18: Předpokládaný mechanismus účinku proléčiv **95a-c**.



Při přípravě proléčiv **95a-c** jsem jako výchozí látku zvolila *t*-butyl ester DONu (**45**), který tvoří peptidovým couplingem s chráněnou aminokyselinou dipeptid **93a**, **74** nebo **93c** (Schéma 19). Aminokupina vznikajících meziproductů **93a**, **74** a **93c** je v následujícím kroku ochráněna za vzniku látek **94a**, **75** a **94c**. Posledním krokem syntézy proléčiv **95a-c** je připojení arekaidinového strukturního motivu peptidovým couplingem aminů látek **94a**, **75** a **94c** s arekaidin hydrochloridem aktivovaným činidlem HATU. V této reakci je použit větší přebytek báze (4 ekv.), neboť 1,1 ekv. je využito pro neutralizaci hydrochloridu v reakční směsi.

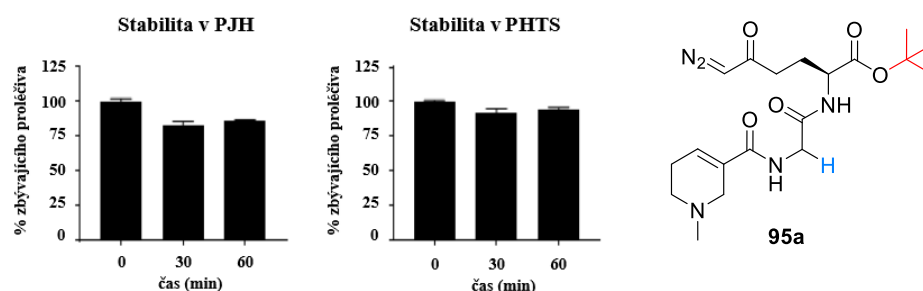
Schéma 19: Syntéza proléčiv **95a-c**.^s



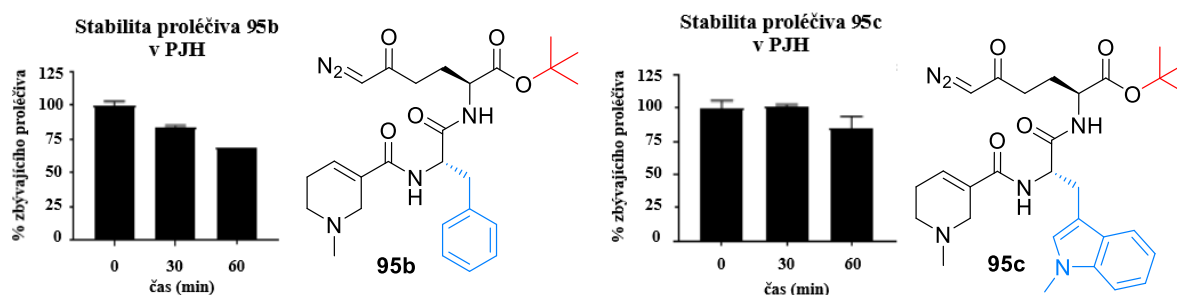
^s **Reakční podmínky:** (i) Fmoc-NH(CHR)COOH, HATU, DIEA, DCM, 0 °C až lab. tep., 2 h, 76 – 92 %; (ii) Et₂NH, DCM, lab. tep., 3h, 90 – 96 %; (iii) arekaidin hydrochlorid, HATU, DIEA, DMF, 0 °C až lab. tep., 3 h, 46 – 90 %.

Stabilita proléčiv **95a-c** byla testována *in vitro* v prasečím jaterním homogenátu (PJH). Všechna tři proléčiva jsou v tomto médiu metabolizována pouze z malé části (**Graf 15**), nejlepších hodnot pak dosahuje proléčivo **95a** (**Graf 14**). U proléčiva **95a** byla provedena studie stability také v homogenátu tenkého střeva prasete (PHTS), kde opět zůstávalo v intaktní formě (**Graf 14**). Další plánované biochemické studie identifikující jednotlivé metabolity připravených proléčiv zatím nebyly provedeny.

Graf 14: Stabilita proléčiva **95a**.



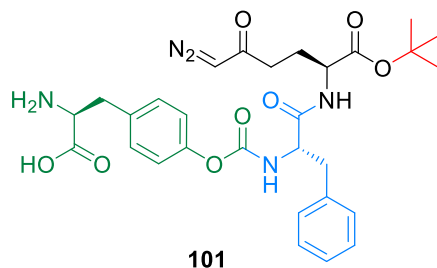
Graf 15: Stabilita proléčiv **95b** a **95c**.



4.6 Proléčiva DONu cílená na přenašeč LAT1

Jinou strategií pro selektivní doručení DONu (**1**) do mozkové tkáně je využití transportéru velkých neutrálních aminokyselin (LAT1), který se vyskytuje v membránách endotelových buněk v HEB a v buňkách mozkového parenchymu.⁽⁴²⁾ Syntézou vhodného proléčiva DONu, které projde organismem v intaktní formě až k HEB a zároveň bude substrátem tohoto přenašeče, lze docílit omezení systémové toxicity DONu (**1**) a jeho selektivního působení až v mozku. Důležitým faktorem je zároveň nízká afinita tohoto proléčiva k efluxnímu transportéru P-gp a také schopnost enzymatického štěpení proléčiva na DON (**1**) v mozkové tkáni.

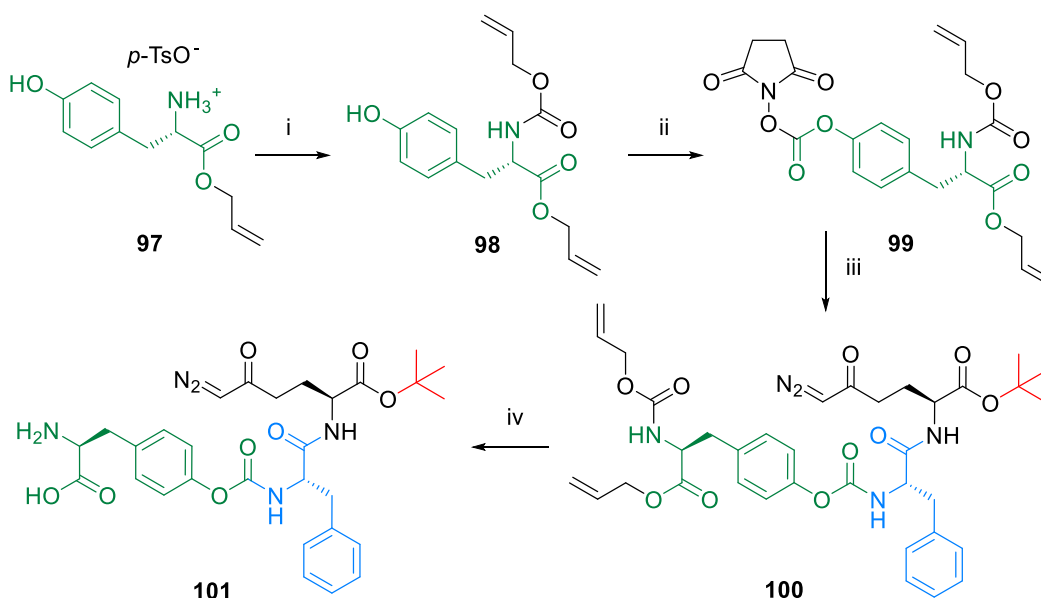
Při návrhu struktury proléčiva **101**, které by mělo splňovat zmíněné charakteristiky, jsem vycházela z poznatků o proléčivech dopaminu,⁽⁸⁸⁾ kde připojením aminokyseliny L-tyrosinu v *para* poloze jejího aromatického kruhu přes karbamátový linker k dopaminu bylo dosaženo zvýšeného přenosu tohoto proléčiva pomocí transportéru LAT1 do mozku a zároveň k jeho snadnému enzymatickému štěpení na dopamin. Proto jsem i ve struktuře proléčiva **101** připojila L-tyrosin přes karbamátový linker k L-fenylalaninu navázanému na aminoskupinu *t*-butyl esteru DONu (**45**).



Prvním krokem syntézy proléčiva **101** je ochránění aminoskupiny látky **97** allyloxykarbonylovou (Alloc) skupinou za vzniku meziprojektu **98** (Schéma 20). Hydroxyskupina látky **98** je v další reakci deprotonována v prostředí Et₃N a vznikající fenolátový anion nukleofilně atakuje *N,N*-disukcinimidyl karbonát (DSC) za vzniku intermediátu **99**. Takto připravený *N*-sukcinimidyl ester **99** je nukleofilně substituován aminoskupinou látky **75** v přítomnosti báze Et₃N. Posledním krokem přípravy proléčiva **101** je ochránění allylu z karboxylové skupiny a zároveň allyloxykarbonylu z aminoskupiny v molekule **100** za katalýzy Pd(PPh₃)₄ v přítomnosti fenylsilanu coby scavengeru. Nízký výtěžek (20 %) je důsledkem obtížné separace produktu **101** pomocí HPLC.

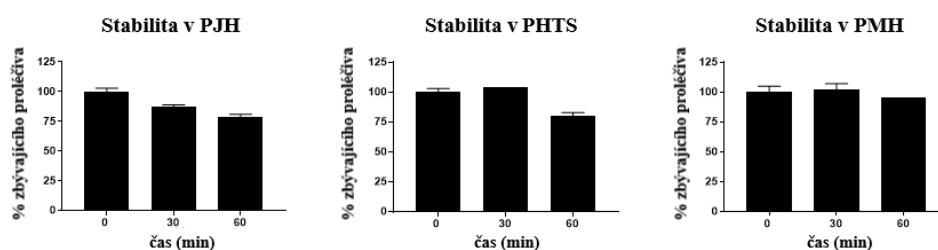
Stabilita proléčiva **101** byla testována *in vitro* v prasečím jaterním homogenátu (PJH), prasečím homogenátu tenkého střeva (PHTS) a prasečím mozkovém homogenátu (PMH), přičemž ve všech třech médiích byla metabolizována jen z nepatrné části (Graf 16). Další studie nicméně prokázala velmi nízké hodnoty uvolněného DONu (**1**) z proléčiva **101** nejen v plazmě, ale i v buňkách, a zároveň velmi omezenou afinitu proléčiva **101** k přenašeči LAT1 (Graf 17) měřením inhibice přenosu endogenního substrátu pro tento přenašeč L-leucinu přes HEB. Proléčivo **101** tedy také není vhodným kandidátem pro léčbu mozkových tumorů.

Schéma 20: Syntéza proléčiva **101**.^t

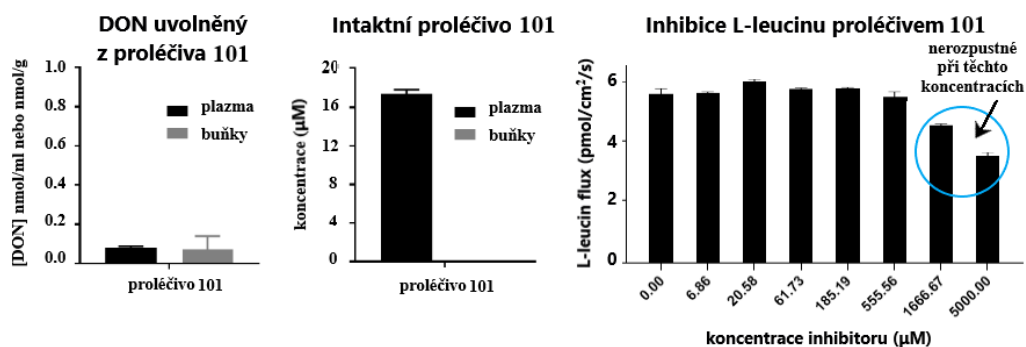


Reakční podmínky: (i) NaHCO₃, allyl chlorformiát, THF/H₂O (1:1), lab. tep., 18 h, 83 %; (ii) Et₃N, DSC, DCM, 0 °C až lab. tep., 2,5 h, 83 %; (iii) látka **75**, Et₃N, DCM, lab. tep., 18 h, 81 %; (iv) fenylsilan, Pd(PPh₃)₄, DMF, lab. tep., 1 h, 20 %.

Graf 16: Stabilita proléčiva **101** v prasečím jaterním homogenátu (PJH), prasečím homogenátu tenkého střeva (PHTS) a prasečím mozkovém homogenátu (PMH).



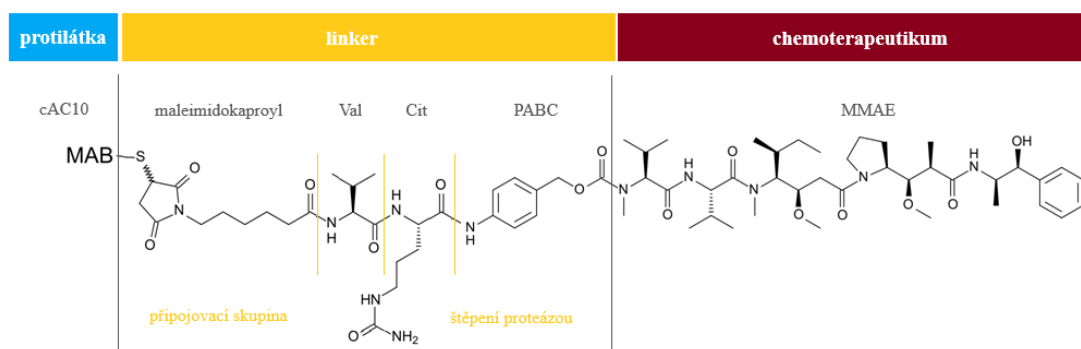
Graf 17: Stabilita proléčiva **101** a jeho schopnost inhibice příjmu L-leucinu.



4.7 Proléčiva DONU obsahující biotin

Brentuximab vedotin (**102**) je konjugát monoklonální protilátky (MAB) cAC10, která se váže na antigen CD30 exprimovaný v Hodgkinově lymfomu a systémovém anaplastickém velkobuněčném lymfomu, s aktivním chemoterapeutikem monomethyl auristatinem E (MMAE), který inhibuje polymerizaci mikrotubulů a který je k protilátce navázán přes velmi stabilní valin-citrulinový linker štěpitelný proteázou katepsinem B (**Obrázek 14**).⁽⁸⁹⁾ Úspěšně se využívá k léčbě pacientů s relapsem Hodgkinova lymfomu po autologní transplantaci kmenových buněk. Protilátka se specificky váže na příslušný antigen na povrchu buňky, což zajišťuje velkou specifitu distribuce léčiva. Přítomné enzymy (peptidázy) pak odštěpí navázané chemoterapeutikum, které se tím aktivuje a začne působit jako cytostatikum.

Obrázek 14: Struktura Brentuximab vedotinu (**102**).⁽⁹⁰⁾



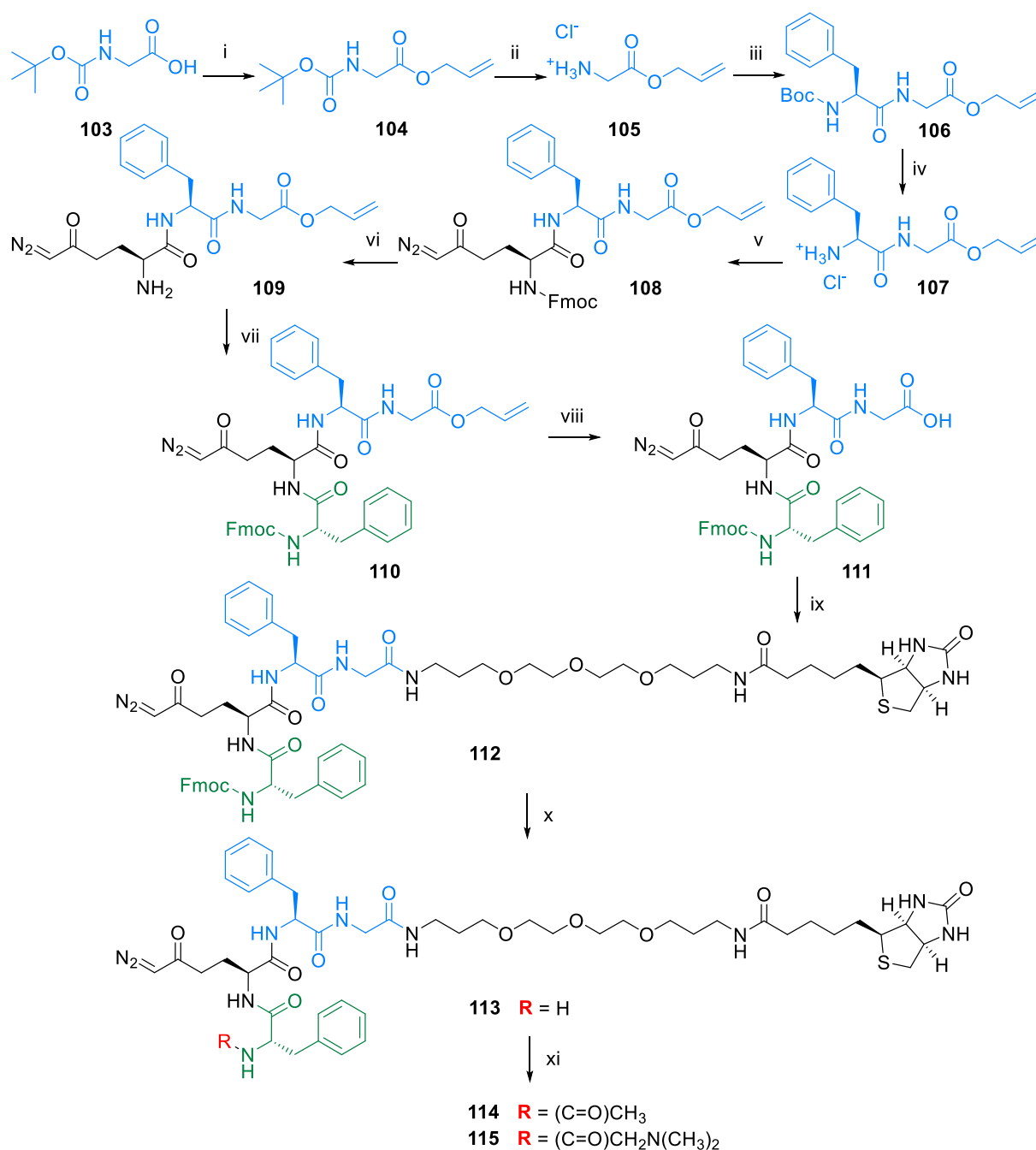
Na základě tohoto principu jsem navrhla tři proléčiva DONu **113**, **114** a **115**, v jejichž struktuře je DON (**1**) připojen na C-konci peptidovou vazbou k biotin-PEG-linkeru přes aminokyseliny L-fenylalanin a glycin. N-konec DONu (**1**) je maskován různě substituovaným L-fenylalaninem.

Při syntéze proléčiv **113**, **114** a **115** (**Schéma 21**) jsem vycházela z komerčně dostupné chráněné aminokyseliny Boc-Gly-OH (**103**), jejíž karboxylovou skupinu jsem ochránila allylovou skupinou za vzniku allyl (*t*-butoxykarbonyl)glycinátu **104**. Aminoskupina molekuly **104** je následně ochráněna v kyselém prostředí bezvodého 4M HCl v dioxanu za vzniku amoniové soli **105**, uvolnění CO₂ a isobutylenu jako vedlejších produktů reakce. Dalším krokem je peptidový coupling látky **105** s Boc-L-Phe-OH za vzniku dipeptidu **106**. Pro připojení další aminokyseliny na N-konci

molekuly **106** je nutné nejprve ochránit její aminoskupinu za vzniku amoniové soli **107**, která následným peptidovým couplingem s Fmoc-L-DON-OH tvoří tripeptid **108** ve velmi dobrém výtěžku 91 %. Aminoskupina látky **108** je pak opět ochráněna za vzniku molekuly **109**. Tato reakce probíhá s relativně nízkým výtěžkem (32 %), neboť volná aminoskupina látky **109** z části intramolekulárně nukleofilně atakuje diazoketon za vzniku cyklického diazoiminu jako vedlejšího produktu. Z důvodu této nestability jsem reakční směs nečistila sloupcovou chromatografií, ale po odpaření sekundárního aminu jsem reakční směs ihned použila k následujícímu peptidovému couplingu s Fmoc-L-Phe-OH za vzniku chráněného tetrapeptidu **110**. Jeho karboxylovou skupinu jsem v dalším kroku deallylovala pomocí Pd(PPh₃)₄ v přítomnosti fenylsilanu, přičemž vznikající karboxylovou kyselinu **111** jsem z reakční směsi neizolovala kvůli její velmi špatné rozpustnosti. Po odpaření rozpouštědla a fenylsilanu jsem látku v surovém stavu peptidovým couplingem připojila k biotin-(PEG)₄-NH₂ za vzniku látky **112**, kterou jsem z reakční směsi izolovala v poměrně nízkém výtěžku (38 %). Důvodem mohou být právě nečistoty ve výchozí látce **111** a obtížná separace produktu **112** pomocí HPLC. Aminoskupinu v molekule **112** jsem následně ochránila za vzniku proléčiva **113**, které je zároveň prekursorem pro proléčiva **114** a **115**. Tato dvě proléčiva jsem připravila reakcí molekuly **113** s příslušnými *N*-sukcinimidyl estery ve výtěžcích 52 % a 58 %.

Tato tři proléčiva patří mezi nejnověji připravené látky, proto s nimi zatím nebyly provedeny žádné biochemické studie. Předpokladem je, že biotin navázaný v molekule proléčiva se bude vázat k protilátce pomocí nejsilnější známé nekovalentní interakce biotin-streptavidin, jejíž výhodou je schopnost jedné molekuly streptavidinu vázat až čtyři molekuly biotinu, neboť se jedná o homotetramer.⁽⁹¹⁾ Protilátka slouží jako naváděcí systém, díky němuž bude proléčivo specificky doručeno do požadovaného místa působení stejně jako v případě Brentuximab vedotinu (**102**). Chemoterapeutikum, v našem případě DON (**1**), pak bude z peptidového linkeru odštěpeno přítomnými peptidázami. Tímto způsobem se vyhneme systémovému působení DONu (**1**) v organismu a omezíme tak jeho nežádoucí účinky za současného zachování jeho protinádorové aktivity.

Schéma 21: Syntéza proléčiv **113**, **114** a **115**.^u



^u **Reakční podmínky:** (i) allyl bromid, NaHCO₃, DMF, 50 °C, 18 h, 98 %; (ii) 4M HCl v dioxanu, lab. tep., 30 min, 84 %; (iii) Boc-L-Phe-OH, HATU, DIEA, DMF, 0 °C až lab. tep., 2 h, 82 %; (iv) 4M HCl v dioxanu, lab. tep., 20 min, 76 %; (v) Fmoc-L-DON-OH, HATU, DIEA, DMF, 0 °C až lab. tep., 3 h, 91 %; (vi) Et₂NH, DCM, lab. tep., 2,5 h, 32 %; (vii) Fmoc-L-Phe-OH, HATU, DIEA, DMF, 0 °C až lab. tep., 3 h, 61 %; (viii) fenyلسilan, Pd(PPh₃)₄, DCM/DMF (5:1), lab. tep., 30 min, kvant.; (ix) biotin-(PEG)₄-NH₂ · TFA, HATU, DIEA, DMF, 0 °C až lab. tep., 1,5 h, 38 %; (x) Et₂NH, DMF, lab. tep., 2,5 h, 54 %; (xi) DCM/DMF (10:1), lab. tep., 18 h, pro **114**: AcOSu, 52%; pro **115**: (*N,N*-dimethyl)glycin-OSu, 58 %.

5 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

5.1 Obecné metody a použité chemikálie

Průběh většiny reakcí byl sledován pomocí tenkovrstvé chromatografie s využitím silikagelových desek Kieselgel 60 F254 od firmy Merck.

Použité chemikálie byly zakoupeny od firmy Sigma Aldrich, TCI nebo Combi-Blocks a byly použity bez předchozího čištění. Bezvodá rozpouštědla byla zakoupena od stejných firem, nebo připravena podle postupů uvedených v literatuře⁽⁹²⁾ a destilována pod inertní atmosférou dusíku.

¹H NMR spektra byla měřena na přístroji Bruker Avance III™ HD 600 MHz při pracovní frekvenci 401 MHz nebo 501 MHz, ¹³C NMR spektra při 101 MHz či 126 MHz. Pro standardizaci ¹H NMR spekter byl použit interní signál TMS ($\delta = 0,00$ ppm; CDCl₃) nebo signály použitých rozpouštědel ($\delta = 7,26$ ppm pro CDCl₃, $\delta = 3,31$ ppm pro CD₃OD a $\delta = 2,50$ ppm pro *d*₆-DMSO). ¹³C NMR spektra byla kalibrována na signály použitých rozpouštědel ($\delta = 77,00$ ppm pro CDCl₃, $\delta = 49,00$ ppm pro CD₃OD a $\delta = 39,52$ pro *d*₆-DMSO). Chemický posun δ je uváděn v ppm.

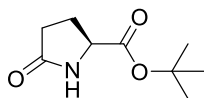
ESI hmotnostní spektra byla měřena na hmotnostním spektrometru Waters Micromass ZQ. Pro ESI hmotnostní spektra s nízkým rozlišením byl použit tandemový hybridní hmotnostní spektrometr Waters Q-Tof micro, který obsahuje kvadrupól a ortogonální průtokový hmotnostní analyzátor (TOF). Pro měření ESI hmotnostních spekter s vysokým rozlišením byl použit hybridní hmotnostní spektrometr LTQ Orbitrap XL s FT kombinující hmotnostní analyzátoři lineární iontovou past a orbitrap. Vzorky byly rozpouštěny v MeOH a aplikovány přímým nástřikem.

Některé látky byly přečištěny pomocí preparativního HPLC Jasco Inc. obsahujícího kolonu Reprosil 100 C18, 5 μ m, 250 \times 4 mm. UV detekce byla prováděna při $\lambda = 210$ nm.

5.2 Pracovní postupy

5.2.1 Příprava *t*-butyl esteru 6-diazo-5-oxo-*L*-norleucinu (45)

t-Butyl-(*S*)-5-oxopyrolidin-2-karboxylát (42)

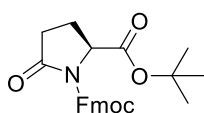


Látka **42** byla připravena podle publikovaného postupu⁽⁹³⁾ Kyselina *L*-pyroglutamová **41** (6,46 g; 50,0 mmol; 1 ekv.) byla suspendována v *t*-butylacetátu (100 ml). Do reakční směsi byla přidána koncentrovaná kyselina chloristá (70%; 1,5 ml; 25,0 mmol; 0,35 ekv.) a vzniklá suspenze byla míchána v tlakové baňce po dobu 23 hodin při laboratorní teplotě za postupného rozpuštění výchozí látky. Směs byla promyta nasyceným roztokem NaHCO₃ (200 ml) a vodná fáze byla opětovně extrahována DCM (2×100 ml). Spojené organické podíly byly sušeny bezvodým MgSO₄ a rozpouštědlo bylo odpařeno. Produkt **42** (6,97 g; 75 %) byl získán ve formě bezbarvé pevné látky.

¹H NMR (401 MHz, CDCl₃): 1,45 (s; 9H); 2,09 – 2,19 (m; 1H); 2,22 – 2,48 (m; 3H); 4,06 – 4,14 (m; 1H); 6,56 (s; 1H).

¹³C NMR (101 MHz, CDCl₃): 24,9; 28,1 (3C); 29,5; 56,2; 82,4; 171,2; 178,1.

1-((9*H*-Fluoren-9-yl)methyl)-2-(*t*-butyl)-(*S*)-5-oxopyrolidin-1,2-dikarboxylát (43)

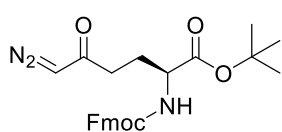


Látka **43** byla připravena podle publikovaného postupu.⁽⁹⁴⁾ Sloučenina **42** (1,20 g; 6,48 mmol; 1 ekv.) byla rozpuštěna v bezvodém THF (25 ml). Reakční směs byla ochlazená na -78 °C a během 5 minut do ní byl přikapán roztok LiHMDS (1M v THF; 6,20 ml; 6,15 mmol; 0,95 ekv.). Směs byla míchána 30 minut při stejné teplotě pod inertní atmosférou dusíku a následně byla během 30 minut přikapána pomocí kanyly k roztoku Fmoc chloridu (8,40 g; 32,4 mmol; 5 ekv.) v bezvodém THF (35 ml). Vzniklý čirý žlutý roztok byl míchán další 2 hodiny při -78°C, poté nechán pozvolna zahřát na laboratorní teplotu a při ní míchán ještě 18 hodin. Reakce byla ukončena přidávkem nasyceného roztoku NH₄Cl (10 ml) a dest. vody (10 ml). Vodná fáze byla oddělena a extrahována EtOAc (2×50 ml). Spojené organické podíly byly promyty nasyceným roztokem NaCl (50 ml) a sušeny bezvodým MgSO₄. Rozpouštědlo bylo odpařeno. Směs byla přečištěna sloupcovou chromatografií na silikagelu (mobilní fáze cyklohexan/EtOAc, 2:1) za zisku produktu **43** (2,14 g; 81 %) ve formě bezbarvé pevné látky.

¹H NMR (401 MHz, CDCl₃): 1,47 (s; 9H); 2,05 – 2,13 (m; 1H); 2,32 – 2,43 (m; 1H); 2,52 – 2,60 (m; 1H); 2,67 – 2,76 (m; 1H); 4,29 – 4,33 (t; *J* = 7,5 Hz; 1H); 4,40 – 4,44 (m; 1H); 4,52 – 4,60 (m; 2H); 7,31 – 7,35 (m; 2H); 7,39 – 7,43 (m; 2H); 7,73 – 7,78 (m; 4H).

¹³C NMR (101 MHz, CDCl₃): 22,1; 28,1 (3C); 31,4; 46,7; 59,6; 69,2; 82,8; 120,1 (2C); 125,6; 125,7; 127,4 (2C); 128,0 (2C); 141,4 (2C); 143,5; 143,6; 151,6; 170,3; 173,0.

***t*-Butyl-(*S*)-2-(((9*H*-fluoren-9-yl)methoxy)karbonyl)amino)-6-diazo-5-oxohexanoát (44)**



Roztok trimethylsilyldiazomethanu (2M v Et₂O; 2,40 ml; 4,85 mmol; 1,25 ekv.) byl rozpuštěn v bezvodém THF (30 ml) pod inertní argonovou atmosférou a reakční směs byla ochlazena na -98 °C. Během 15 minut bylo do roztoku přikapáno *n*-butyllithium (2,5 M v hexanu; 2,00 ml; 4,96 mmol; 1,28 ekv.) a směs byla míchána 30 minut při stejné teplotě. Vzniklý roztok byl následně pomocí kanyly během 30 minut přikapáván do roztoku látky **43** (1,58 g; 3,88 mmol; 1 ekv.) v bezvodém THF (40 ml) vychlazeném na teplotu -115 °C. Reakční směs byla pozvolně ohřáta na -78 °C a poté byla reakce ukončena přidávkem nasyceného roztoku NH₄Cl (10 ml) a dest. vody (10 ml). Vodná fáze byla po oddělení organické fáze extrahována EtOAc (50 ml), spojené organické podíly byly promyty dest. vodou (50 ml), solankou (50 ml) a sušeny bezvodým MgSO₄. Rozpouštědlo bylo odpařeno a surový produkt byl přečištěn sloupcovou chromatografií na silikagelu (mobilní fáze cyklohexan/EtOAc, 3:1) za zisku očekávaného produktu **44** (1,17 g; 67 %) ve formě pevné žluté látky.

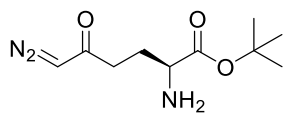
¹H NMR (401 MHz, CDCl₃): 1,50 (s; 9H); 1,94 – 2,07 (m; 1H); 2,18 – 2,29 (m; 1H); 2,31 – 2,53 (m; 2H); 4,21 – 4,32 (m; 2H); 4,41 (d; *J* = 7,1 Hz; 2H); 5,29 (bs; 1H); 5,50 (d; *J* = 8,1 Hz; 1H); 7,34 (tt; *J* = 7,4; 1,4 Hz; 2H); 7,43 (t; *J* = 7,4 Hz; 2H); 7,63 (dd; *J* = 7,7; 4,0 Hz; 2H); 7,79 (d; *J* = 7,3 Hz; 2H).

¹³C NMR (101 MHz, CDCl₃): 28,0 (3C); 28,1; 36,6; 47,3; 54,1; 54,9; 67,1; 82,7; 120,1; 120,1; 125,3 (2C); 127,2 (2C); 127,9 (2C); 141,4; 141,5; 143,9; 144,0; 156,2; 171,2; 193,8.

ESI MS: 472,2 ([M + Na]⁺).

HR ESI MS: vypočteno pro C₂₅H₂₇O₅N₃Na 472,18429; nalezeno 472,18399.

***t*-Butyl-(*S*)-2-amino-6-diazo-5-oxohexanoát (45)**



Látka **44** (6,00 g; 13,4 mmol; 1 ekv.) byla rozpuštěna v bezvodém DCM (60 ml). K vzniklému roztoku byl přidán piperidin (5,68 g; 6,50 ml; 66,7 mmol; 5 ekv.) a reakční směs byla míchána

pod inertní atmosférou dusíku 3 hodiny při laboratorní teplotě. Rozpouštědlo bylo odpařeno a směs byla přečištěna sloupcovou chromatografií na silikagelu (mobilní fáze DCM/MeOH, 30:1) za zisku produktu **45** (2,02 g; 67 %) ve formě žlutohnědé olejovité látky, která při skladování při -20 °C tuhne.

¹H NMR (401 MHz, CDCl₃): 1,43 (s; 9H), 1,58 (bs; 2H); 1,72 – 1,81 (m; 1H); 1,99 – 2,09 (m; 1H); 2,38 – 2,50 (m; 2H); 3,30 (dd; *J* = 8,3; 5,0; 1H); 5,27 (bs; 1H).

¹³C NMR (101 MHz, CDCl₃): 28,1 (3C); 29,8; 37,1; 54,4; 56,4; 81,4; 175,0; 194,4.

ESI MS: 228,1 ([M + H]⁺).

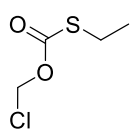
HR ESI MS: vypočteno pro C₁₀H₁₈O₃N₃ 228,13427; nalezeno 228,13411.

5.2.2 Proléčiva DONu s lipofilním charakterem

Obecný postup pro přípravu derivátů 50a-b

Chlorokarbonát **49a** (5,16 g; 3,60 ml; 40,0 mmol; 1 ekv.) nebo **49b** (5,72 g; 4,30 ml; 40,0 mmol; 1 ekv.) byl rozpuštěn v bezvodém Et₂O (50 ml) a reakční směs byla ochlazená na teplotu 0-5 °C a poté k ní byla přikapána směs triethylaminu (4,05 g; 5,60 ml; 40,0 mmol, 1 ekv.) a ethanthiolu (2,49 g; 3,00 ml; 40,0 mmol; 1 ekv.) v bezvodém Et₂O (15 ml). Vzniklá suspenze byla ponechána zahřát na laboratorní teplotu a při ní míchána přes noc (18 h). Sraženina (triethylamonium hydrochlorid) byla odfiltrována a promyta důkladně Et₂O (2×20 ml) a rozpouštědlo bylo opatrně odpařeno (lázeň 30 °C). Surový produkt **50a-b** byl použit do dalšího kroku bez předchozího čištění.

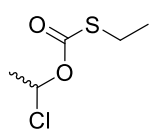
***O*-(Chloromethyl)-*S*-ethyl karbonothioát (50a)**



bezbarvá kapalina (5,44 g; 88 %)

¹H NMR (401 MHz, CDCl₃): 1,34 (t; *J* = 7,4 Hz; 3H); 2,93 (q; *J* = 7,4 Hz; 2H); 5,76 (s; 2H).

***O*-(1-Chloroethyl)-*S*-ethyl karbonothioát (50b)**



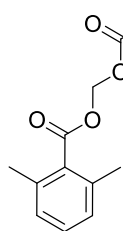
bezbarvá kapalina (6,34 g; 94 %).

¹H NMR (401 MHz, CDCl₃): 1,33 (t; *J* = 7,4 Hz; 3H); 1,81 (d; *J* = 5,8 Hz; 3H); 2,91 (dq; *J* = 7,4; 2,9 Hz; 2H); 6,59 (q; *J* = 5,8 Hz; 1H).

Obecný postup pro přípravu derivátů 51a-f

Thiokarbonát **50a** nebo **50b** (6,00 mmol; 1 ekv.) a příslušná karboxylová kyselina (18,0 mmol; 3 ekv.) byly rozpuštěny v diisopropylethylaminu (4,65 g; 6,27 ml; 36,0 mmol, 6 ekv.) a vzniklá směs byla zahřívána po dobu 18-24 hodin na teplotu 70 °C. Poté byla reakční směs ochlazená na laboratorní teplotu, rozpuštěna v EtOAc (100 ml) a promyta dest. H₂O (50 ml), 10% KHSO₄ (50 ml), opět dest. H₂O (50 ml) a nakonec solankou (50 ml). Organická fáze byla sušena bezvodým MgSO₄ a rozpouštědlo bylo odpařeno. Surový produkt byl následně přečištěn pomocí sloupcové chromatografie na silikagelu (mobilní fáze cyklohexan/EtOAc, 15:1).

((Ethylthio)karbonyloxy)methyl-2,6-dimethylbenzoát (51a)

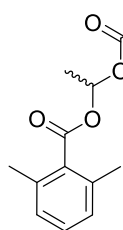


50a (928 mg) + 2,6-dimethylbenzoová kyselina (2,70 g); reakční čas 18 h; světle žlutá kapalina (1,58 g; 98 %).

¹H NMR (401 MHz, CDCl₃): 1,36 (t; *J* = 7,4 Hz; 3H); 2,36 (s; 6H); 2,93 (q; *J* = 7,4 Hz; 2H); 6,07 (s; 2H); 7,06 (d; *J* = 7,3 Hz; 2H); 7,24 (t; *J* = 7,3 Hz; 1H).

¹³C NMR (101 MHz, CDCl₃): 15,0; 19,8 (2C); 25,6; 80,5; 127,8 (2C); 130,1; 132,3; 135,6 (2C); 168,3; 170,9.

1-((Ethylthio)karbonyloxy)ethyl-2,6-dimethylbenzoát (51b)

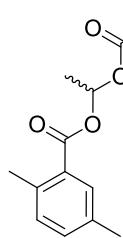


50b (1,01 g) + 2,6-dimethylbenzoová kyselina (2,70 g); reakční čas 18 h; bezbarvý olej (1,58 g; 93 %).

¹H NMR (401 MHz, CDCl₃): 1,33 (t; *J* = 7,4 Hz; 3H); 1,63 (d; *J* = 5,5 Hz; 3H); 2,34 (s; 6H); 2,89 (q; *J* = 7,4 Hz; 2H); 7,03 (d; *J* = 7,5 Hz; 2H); 7,18 – 7,25 (m; 2H).

¹³C NMR (101 MHz, CDCl₃): 15,0; 19,7; 19,8 (2C); 25,5; 90,3; 127,8 (2C); 129,8; 132,8; 135,3 (2C); 167,7; 169,9.

1-(((Ethylthio)karbonyl)oxy)ethyl-2,5-dimethylbenzoát (51c)

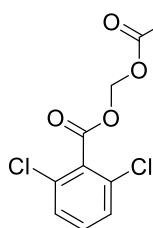


50b (1,01 g) + 2,5-dimethylbenzoová kyselina (2,70 g); reakční čas 24 h; světle žlutá kapalina (1,44 g; 85 %).

¹H NMR (401 MHz, CDCl₃): 1,32 (t; *J* = 7,4 Hz; 3H); 1,64 (d; *J* = 5,5 Hz; 3H); 2,35 (s; 3H); 2,55 (s; 3H); 2,80 – 2,96 (m; 2H); 7,13 (d; *J* = 7,8 Hz; 1H); 7,19 (q; *J* = 5,5 Hz; 1H); 7,23 (dd; *J* = 7,9; 2,0 Hz; 1H); 7,74 (d; *J* = 2,0 Hz; 1H).

¹³C NMR (101 MHz, CDCl₃): 14,9; 19,9; 20,9; 21,4; 25,4; 90,3; 128,2; 131,4; 131,8; 133,5; 135,4; 138,0; 165,3; 169,8.

(((Ethylthio)karbonyl)oxy)methyl-2,6-dichlorobenzoát (51d)



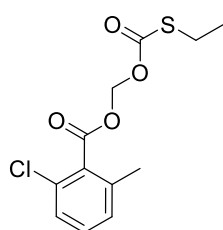
50a (928 mg) + 2,6-dichlorobenzoová kyselina (3,44 g); reakční čas 18 h; světle žlutá kapalina (1,82 g; 98 %).

¹H NMR (401 MHz, CDCl₃): 1,33 (t; *J* = 7,4 Hz; 3H); 2,91 (q; *J* = 7,4 Hz; 2H); 6,05 (s; 2H); 7,28 – 7,35 (m; 3H).

¹³C NMR (101 MHz, CDCl₃): 14,9; 25,6; 80,7; 128,0 (2C); 131,5;

132,1 (2C); 132,3; 163,3; 170,8.

(((Ethylthio)karbonyl)oxy)methyl-2-chloro-6-methylbenzoát (51e)

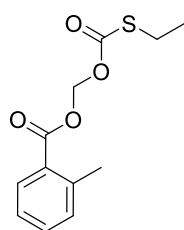


50a (928 mg) + 2-chloro-6-methylbenzoová kyselina (3,07 g); reakční čas 18 h; světle žlutá kapalina (1,66 g; 96 %).

¹H NMR (401 MHz, CDCl₃): 1,37 (t; *J* = 7,4 Hz; 3H); 2,36 (s; 3H); 2,94 (q; *J* = 7,4 Hz; 2H); 6,08 (s; 2H); 7,11 – 7,17 (m; 1H); 7,24 – 7,30 (m; 2H).

¹³C NMR (101 MHz, CDCl₃): 14,9; 19,5; 25,5; 80,6; 127,0; 128,6; 130,8; 130,9; 132,3; 137,3; 165,8; 170,8.

(((Ethylthio)karbonyl)oxy)methyl-2-methylbenzoát (51f)



50a (928 mg) + 2-methylbenzoová kyselina (2,45 g); reakční čas 19 h; světle žlutá kapalina (1,40 g; 92 %).

¹H NMR (401 MHz, CDCl₃): 1,36 (td; *J* = 7,4; 1,2 Hz; 3H); 2,64 (s; 3H); 2,93 (dq; *J* = 7,4; 1,2 Hz; 2H); 6,07 (s; 2H); 7,24 – 7,32 (m; 2H); 7,43 –

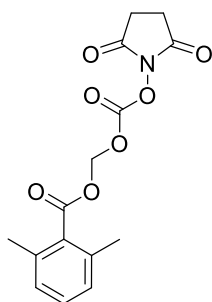
7,49 (m; 1H); 8,01 (dt; $J = 8,0; 1,3$ Hz; 1H).

^{13}C NMR (101 MHz, CDCl_3): 14,8; 21,9; 25,5; 80,6; 125,9; 127,9; 131,2; 131,9; 132,9; 141,4; 165,5; 170,8.

Obecný postup pro přípravu derivátů 52a-f

Intermediát **51a-f** (3,50 mmol; 1 ekv.) a HOSu (805 mg; 7,00 mmol; 2 ekv.) byly suspendovány v bezvodém DCM (10 ml). Reakční směs byla ochlazena na 0-5 °C a poté byl přikapán 36% roztok kyseliny peroxyoctové v kyselině octové (2,22 ml; 10,5 mmol; 3 ekv.), stejná teplota byla udržována dalších 30 minut a poté byla reakční směs ponechána zahřát na laboratorní teplotu. Po 3 hodinách byl přidán další DCM (50 ml) a organická fáze promyta dest. H_2O (30 ml) a solankou (30 ml). Organická fáze byla sušena bezvodým MgSO_4 a rozpouštědlo odpařeno. Surový produkt byl přečištěn pomocí sloupcové chromatografie na silikagelu (mobilní fáze cyklohexan/EtOAc 2:1).

(((2,5-Dioxopyrrolidin-1-yl)oxy)karbonyl)oxy)methyl-2,6-dimethylbenzoát (52a)

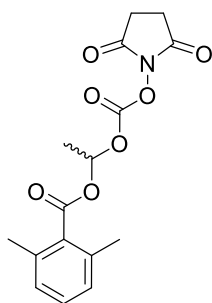


51a (939 mg); bezbarvá pevná látka (641 mg; 57 %).

^1H NMR (401 MHz, CDCl_3): 2,34 (s; 6H); 2,82 (s; 4H); 6,09 (s; 2H); 7,05 (d; $J = 7,6$ Hz; 2H); 7,23 (t; $J = 7,6$ Hz; 1H).

^{13}C NMR (101 MHz, CDCl_3): 19,9 (2C); 25,5 (2C); 83,6; 127,9 (2C); 130,4; 131,5; 135,8 (2C); 151,1; 167,7; 168,3 (2C).

1-(((2,5-Dioxopyrrolidin-1-yl)oxy)karbonyl)oxy)ethyl-2,6-dimethylbenzoát (52b)

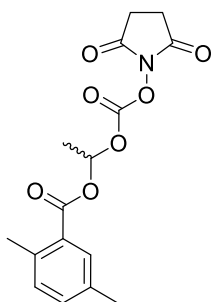


51b (988 mg); bezbarvá pevná látka (552 mg; 47 %).

^1H NMR (401 MHz, CDCl_3): 1,72 (d; $J = 5,4$ Hz; 3H); 2,32 (s; 6H); 2,82 (s; 4H); 7,04 (d; $J = 7,6$ Hz; 2H); 7,11 (q; $J = 5,4$ Hz; 1H); 7,21 (t; $J = 7,6$ Hz; 1H).

^{13}C NMR (101 MHz, CDCl_3): 19,5; 19,9 (2C); 25,5 (2C); 93,9; 127,8 (2C); 130,1; 132,1; 135,6 (2C); 150,2; 167,3; 168,4 (2C).

1-(((2,5-Dioxopyrrolidin-1-yl)oxy)karbonyl)oxy)ethyl-2,5-dimethylbenzoát (52c)

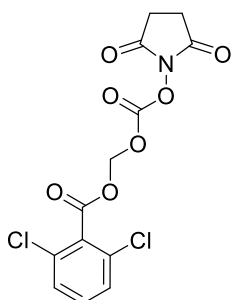


51c (988 mg); bezbarvá pevná látka (587 mg; 50 %).

¹H NMR (401 MHz, CDCl₃): 1,74 (d; *J* = 5,5 Hz; 3H); 2,36 (s; 3H); 2,55 (s; 3H); 2,82 (s; 4H); 7,06 (q; *J* = 5,5 Hz; 1H); 7,14 (d; *J* = 7,8 Hz; 1H); 7,25 (d; *J* = 8,8 Hz; 1H); 7,75 (s; 1H).

¹³C NMR (101 MHz, CDCl₃): 19,7; 20,9; 21,5; 25,6 (2C); 94,1; 127,4; 131,6; 131,9; 133,9; 135,6; 138,4; 150,1; 164,9; 168,4 (2C).

(((2,5-Dioxopyrrolidin-1-yl)oxy)karbonyl)oxy)methyl-2,6-dichlorobenzoát (52d)

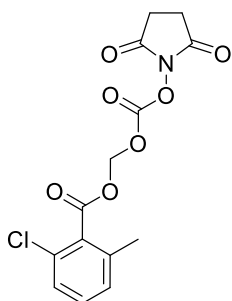


51d (1,08 g); bezbarvá pevná látka (684 mg; 54 %).

¹H NMR (401 MHz, *d*₆-DMSO): 2,83 (s; 4H); 6,19 (s; 2H); 7,52 – 7,71 (m; 3H).

¹³C NMR (101 MHz, *d*₆-DMSO): 25,4 (2C); 84,2; 128,6 (2C); 130,8 (2C); 130,9; 133,2; 150,6; 162,5; 169,6 (2C).

(((2,5-Dioxopyrrolidin-1-yl)oxy)karbonyl)oxy)methyl-2-chloro-6-methylbenzoát (52e)

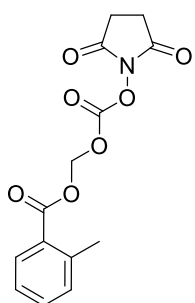


51e (1,01 g); bezbarvá pevná látka (574 mg; 48 %).

¹H NMR (401 MHz, *d*₆-DMSO): 2,29 (s; 3H); 2,83 (s; 4H); 6,17 (s; 2H); 7,33 (dd; *J* = 7,1; 1,7 Hz; 1H); 7,39 – 7,48 (m; 2H).

¹³C NMR (101 MHz, *d*₆-DMSO): 18,8; 25,4 (2C); 84,1; 126,9; 129,1; 129,5; 131,3; 131,7; 137,0; 150,7; 164,8; 169,6 (2C).

(((2,5-Dioxopyrrolidin-1-yl)oxy)karbonyl)oxy)methyl-2-methylbenzoát (52f)



51f (890 mg); bezbarvá pevná látka (570 mg; 53 %).

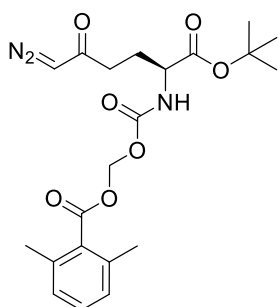
¹H NMR (401 MHz, *d*₆-DMSO): 2,45 (s; 3H); 2,74 (s; 4H); 6,04 (s; 2H); 7,24 – 7,35 (m; 2H); 7,47 (dt; *J* = 7,6; 4,4 Hz; 1H); 7,79 (d; *J* = 7,7 Hz; 1H).

¹³C NMR (101 MHz, *d*₆-DMSO): 21,1; 25,4 (2C); 84,3; 126,3; 127,2; 130,6; 132,0; 133,4; 140,4; 150,6; 164,7; 169,7 (2C).

Obecný postup pro přípravu derivátů 53a-h

NH₂DONCOOiPr **38** (107 mg, 0,500 mmol; 1 ekv.) nebo NH₂DONCOOtBu **45** (114 mg, 0,500 mmol; 1 ekv.) a Osu ester **52a-f** (0,550 mmol; 1.1 ekv.) byly rozpuštěny v bezvodém DCM (5 ml) a reakční směs byla míchána po dobu 2-22 hodin za laboratorní teploty pod inertní atmosférou. Surový produkt byl následně přečištěn pomocí sloupcové chromatografie na silikagelu (mobilní fáze DCM/EtOAc, 8:1).

(S)-(((1-(*t*-Butoxy)-6-diazo-1,5-dioxohexan-2-yl)karbamoyl)oxy)methyl-2,6-dimethylbenzoát (53a)



52a (177 mg); reakční čas 18 h; žlutý olej (171 mg; 79 %).

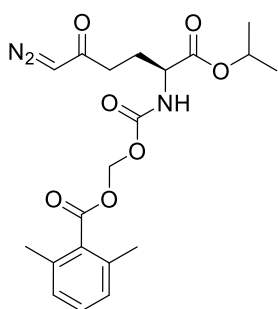
¹H NMR (401 MHz, CDCl₃): 1,45 (s; 9H); 1,91 – 2,03 (m; 1H); 2,14 – 2,25 (m; 1H); 2,31 (s; 6H); 2,31 – 2,48 (m; 2H); 4,24 (td; *J* = 8,2; 4,7 Hz; 1H); 5,25 (bs; 1H); 5,71 (d; *J* = 8,0 Hz; 1H); 5,92 (d; *J* = 5,8 Hz; 1H); 5,99 (d; *J* = 5,7 Hz; 1H); 7,01 (d; *J* = 7,6 Hz; 2H); 7,18 (t; *J* = 7,6 Hz; 1H).

¹³C NMR (101 MHz, CDCl₃): 19,8 (2C); 27,7; 28,0 (3C); 36,4; 54,1; 54,9; 80,5; 82,8; 127,8 (2C); 129,9; 132,6; 135,4 (2C); 154,3; 168,7; 170,6; 193,5.

ESI MS: 456,2 ([M + Na]⁺).

HR ESI MS: vypočteno pro C₂₁H₂₇O₇N₃Na 456,17412; nalezeno 456,17380.

(S)-(((6-Diazo-1-isopropoxy-1,5-dioxohexan-2-yl)karbamoyl)oxy)methyl-2,6-dimethylbenzoát (53b)



52a (177 mg); reakční čas 3 h; žlutý olej (132 mg; 63 %).

¹H NMR (401 MHz, CDCl₃): 1,24 (d; *J* = 6,2 Hz; 3H); 1,25 (d; *J* = 6,2 Hz; 3H); 1,94 – 2,05 (m; 1H); 2,14 – 2,27 (m; 1H); 2,32 (s; 6H); 2,32 – 2,50 (m; 2H); 4,31 (td; *J* = 8,3, 4,7 Hz; 1H); 5,04 (hept; *J* = 6,3 Hz; 1H); 5,25 (bs; 1H); 5,77 (d; *J* = 8,0 Hz; 1H); 5,93 (d; *J* = 5,7 Hz; 1H); 5,99 (d; *J* = 5,7 Hz; 1H); 7,02 (d; *J* = 7,3 Hz; 2H);

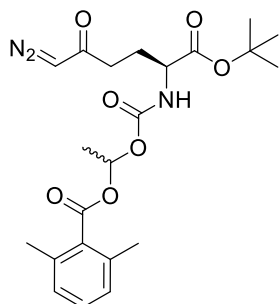
7,19 (t; *J* = 7,6 Hz; 1H).

¹³C NMR (101 MHz, CDCl₃): 19,8 (2C); 21,8; 21,8; 27,5; 36,4; 53,7; 54,9; 69,8; 80,5; 127,8 (2C); 129,9; 132,6; 135,4 (2C); 154,4; 168,7; 171,0; 193,4.

ESI MS: 442,2 ([M + Na]⁺).

HR ESI MS: vypočteno pro $C_{20}H_{25}O_7N_3Na$ 442,15847; nalezeno 442,15827.

(S)-(((1-(*t*-Butoxy)-6-diazo-1,5-dioxohexan-2-yl)karbamoyl)oxy)ethyl-2,6-dimethylbenzoát (53c) – směs dvou diastereomerů



52b (184 mg); reakční čas 2 h; žlutý olej (190 mg; 85 %).

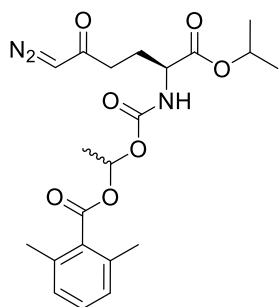
1H NMR (401 MHz, $CDCl_3$): [1,44 a 1,46] (s; 9H); [1,59 a 1,61] (d; $J = 5,2$ Hz; 3H); [1,88 – 2,04] (m; 1H); [2,13 – 2,26] (m; 1H); [2,32 a 2,33] (s; 6H); [2,35 – 2,50] (m; 2H); [4,24] (dtd; $J = 15,2, 8,3, 4,6$ Hz; 1H); [5,19 a 5,30] (bs; 1H); [5,48 a 5,53] (d; $J = 8,3$ (7,8) Hz; 1H); [6,98 – 7,09] (m; 3H); [7,18] (q; $J = 7,4$ Hz; 1H).

^{13}C NMR (101 MHz, $CDCl_3$): [19,7 a 19,7] (2C); [19,8 a 19,8]; [27,9 a 27,9]; [28,1 a 28,1] (3C); [36,4 a 36,5]; [53,9 a 54,0]; [54,8 a 54,9]; [82,8 a 82,9]; [90,0 a 90,2]; [127,7 a 127,8] (2C); [129,6 a 129,7]; [133,2 a 133,2]; [135,1 a 135,2] (2C); [153,8 a 153,9]; [168,0 a 168,1]; [170,6 a 170,9]; [193,7 a 193,8].

ESI MS: 470,2 ($[M + Na]^+$).

HR ESI MS: vypočteno pro $C_{22}H_{29}O_7N_3Na$ 470,18977; nalezeno 470,18941.

(S)-(((6-Diazo-1-isopropoxy-1,5-dioxohexan-2-yl)karbamoyl)oxy)ethyl-2,6-dimethylbenzoát (53d) – směs dvou diastereomerů



52b (184 mg); reakční čas 15 h; žlutý olej (162 mg ; 68 %).

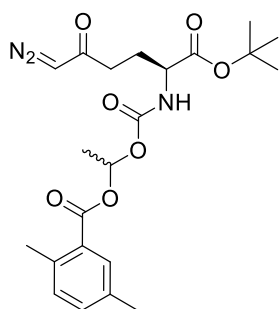
1H NMR (401 MHz, $CDCl_3$): [1,20 – 1,28] (m; 6H); [1,59 a 1,61] (d; $J = 5,2$ Hz; 3H); [1,90 – 2,06] (m; 1H); [2,14 – 2,28] (m; 1H); [2,31 a 2,33] (s; 6H); [2,36 – 2,52] (m; 2H); [4,31] (dtd; $J = 10,4, 8,4, 4,6$ Hz; 1H); [5,03] (hept; $J = 6,3$ Hz; 1H); [5,19 a 5,29] (bs; 1H); [5,55 a 5,59] (d; $J = 8,3$ (7,9) Hz; 1H); [6,96 – 7,11] (m; 3H); [7,18] (q; $J = 7,4$ Hz; 1H).

^{13}C NMR (101 MHz, $CDCl_3$): [19,7 a 19,8] (3C); [21,8 a 21,8] (2C); [27,7 a 27,8]; [36,3 a 36,5]; [53,6 a 53,6]; [54,9 a 55,0]; [69,8 a 69,8]; [90,0 a 90,2]; [127,7 a 127,7] (2C); [129,6 a 129,7]; [133,2 a 133,2]; [135,1 a 135,2] (2C); [153,8 a 153,9]; [168,0 a 168,1]; [171,0 a 171,2]; [193,6 a 193,7].

ESI MS: 456,2 ($[M + Na]^+$).

HR ESI MS: vypočteno pro $C_{21}H_{27}O_7N_3Na$ 456,17412; nalezeno 456,17382.

1-(((S)-1-(*t*-Butoxy)-6-diazo-1,5-dioxohexan-2-yl)karbamoyl)oxy)ethyl-2,5-dimethylbenzoát (53e) – směs dvou diastereomerů



52c (184 mg); reakční čas 17 h; žlutý olej (186 mg; 83 %).

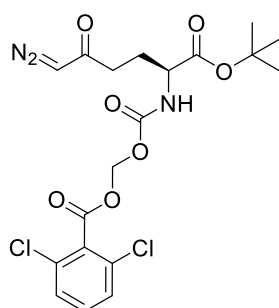
¹H NMR (401 MHz, CDCl₃): [1,44 a 1,46] (s; 9H); [1,60] (d; *J* = 5,5 Hz; 3H); [1,84 – 2,03] (m; 1H); [2,12 – 2,30] (m; 1H); [2,33 a 2,34] (s; 3H); [2,34 – 2,49] (m; 2H); [2,53 a 2,54] (s; 3H); [4,24] (tt; *J* = 8,5, 4,7 Hz; 1H); [5,26 a 5,29] (bs; 1H); [5,47 a 5,52] (d; *J* = 8,3 (7,9) Hz; 1H); [7,00 – 7,07] (m; 1H); [7,08 – 7,15] (m; 1H); [7,17 – 7,24] (m; 1H); [7,71] (s; 1H).

¹³C NMR (101 MHz, CDCl₃): [20,1 a 20,1]; [20,9 a 20,9]; [21,4 a 21,4]; [28,1 a 28,1] (3C); [28,2 a 28,2]; [36,4 a 36,6]; [53,8 a 54,0]; [54,8 a 54,8]; [82,7 a 82,7]; [89,8 a 90,0]; [128,6 a 128,6]; [131,3 a 131,3]; [131,8 a 131,8]; [133,2 a 133,3]; [135,4 a 135,5]; [137,7 a 137,7]; [153,9 a 154,0]; [165,6 a 165,8]; [170,7 a 170,9]; [193,7 a 193,9].

ESI MS: 470,2 ([M + Na]⁺).

HR ESI MS: vypočteno pro C₂₂H₂₉O₇N₃Na 470,18977; nalezeno 470,18950.

1-(((S)-1-(*t*-Butoxy)-6-diazo-1,5-dioxohexan-2-yl)karbamoyl)oxy)methyl-2,6-dichlorobenzoát (53f)



52d (199 mg); reakční čas 22 h; žlutý olej (164 mg; 69 %).

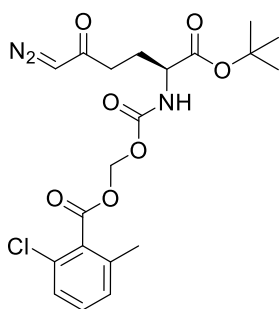
¹H NMR (401 MHz, CDCl₃): 1,46 (s; 9H); 1,90 – 2,02 (m; 1H); 2,15 – 2,29 (m; 1H); 2,29 – 2,52 (m; 2H); 4,26 (td; *J* = 8,3; 4,6 Hz; 1H); 5,27 (bs; 1H); 5,69 (d; *J* = 8,1 Hz; 1H); 5,95 (d; *J* = 5,8 Hz; 1H); 6,02 (d; *J* = 5,7 Hz; 1H); 7,27 – 7,34 (m; 3H).

¹³C NMR (101 MHz, CDCl₃): 27,9; 28,1 (3C); 36,4; 54,1; 54,9; 81,0; 82,9; 128,0 (2C); 131,4; 132,1 (2C); 132,6; 154,1; 163,7; 170,5; 193,5.

ESI MS: 496,1 ([M + Na]⁺).

HR ESI MS: vypočteno pro C₁₉H₂₁O₇N₃Cl₂Na 496,06488; nalezeno 496,06501.

1-(((*S*)-1-(*t*-Butoxy)-6-diazo-1,5-dioxohexan-2-yl)karbamoyl)oxy)methyl-2-chloro-6-methylbenzoát (53g)



52e (188 mg); reakční čas 22 h; žlutý olej (186 mg; 82 %).

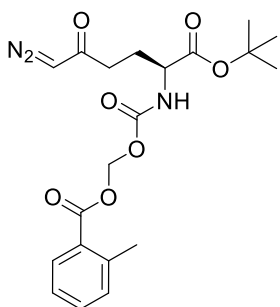
¹H NMR (401 MHz, CDCl₃): 1,46 (s; 9H); 1,91 – 2,02 (m; 1H); 2,14 – 2,26 (m; 1H); 2,33 (s; 3H); 2,32 – 2,49 (m; 2H); 4,25 (td; *J* = 8,2; 4,6 Hz; 1H); 5,26 (bs; 1H); 5,68 (d; *J* = 8,1 Hz; 1H); 5,94 (d; *J* = 5,8 Hz; 1H); 6,01 (d; *J* = 5,8 Hz; 1H); 7,08 – 7,12 (m; 1H); 7,19 – 7,24 (m; 2H).

¹³C NMR (101 MHz, CDCl₃): 19,6; 27,8; 28,1 (3C); 36,4; 54,1; 54,9; 80,8; 82,9; 127,0; 128,6; 130,7; 130,9; 132,7; 137,3; 154,2; 166,2; 170,6; 193,5.

ESI MS: 476,1 ([M + H]⁺).

HR ESI MS: vypočteno pro C₂₀H₂₄O₇N₃ClNa 476,11950; nalezeno 476,12007.

(*S*)-(((1-(*t*-Butoxy)-6-diazo-1,5-dioxohexan-2-yl)karbamoyl)oxy)methyl-2-methylbenzoát (53h)



52f (169 mg); reakční čas 2 h; žlutý olej (197 mg; 94 %).

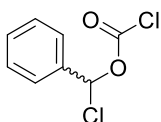
¹H NMR (401 MHz, CDCl₃): 1,44 (s; 9H); 1,90 – 2,01 (m; 1H); 2,13 – 2,25 (m; 1H); 2,27 – 2,49 (m; 2H); 2,60 (s; 3H); 4,24 (td; *J* = 8,1; 4,7 Hz; 1H); 5,25 (bs; 1H); 5,68 (d; *J* = 8,0 Hz; 1H); 5,92 (d; *J* = 5,9 Hz; 1H); 5,97 (d; *J* = 5,8 Hz; 1H); 7,19 – 7,28 (m; 2H); 7,41 (td; *J* = 7,4; 1,5 Hz; 1H); 7,97 (dd; *J* = 8,4; 1,5 Hz; 1H).

¹³C NMR (101 MHz, CDCl₃): 21,9; 27,7; 28,0 (3C); 36,4; 54,1; 54,8; 80,3; 82,8; 125,9; 128,2; 131,2; 131,9; 132,8; 141,3; 154,5; 166,1; 170,6; 193,5.

ESI MS: 442,2 ([M + Na]⁺).

HR ESI MS: vypočteno pro C₂₀H₂₅O₇N₃Na 442,15847; nalezeno 442,15828.

Chloro(fenyl)methyl karbonochloridát (55)



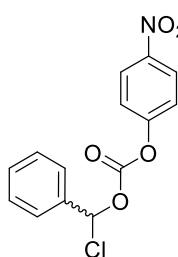
Benzaldehyd (4,25 g; 4,10 ml; 40,0 mmol; 1 ekv.) a pyridin (316 mg; 322 μl; 4,00 mmol; 0,1 ekv.) byly rozpuštěny v bezvodém Et₂O (20 ml).

Reakční směs byla ochlazena na teplotu -10 °C (aceton/pevný CO₂) a míchána pod inertní atmosférou dusíku. Roztok trifosgenu (13,1 g; 44,0 mmol; 1,1 ekv.) v bezvodém Et₂O (30 ml) byl přikapán během 10 minut. Vzniklá suspenze byla ponechána

zahřát na laboratorní teplotu, při ní míchána 1 hodinu a po dobu dalších 2 hodin zahřívána k refluxu. Pevná látka byla odfiltrována a důkladně promyta Et₂O (3×40 ml). Rozpouštědlo bylo odpařeno a získaný surový produkt **55** (8,04 g; 98 %) ve formě nažloutlé olejovité látky byl použit do dalšího kroku bez předchozího čištění.

¹H NMR (401 MHz, CDCl₃): 7,47 – 7,50 (m; 3H); 7,54 – 7,60 (m; 3H).

Chloro(fenyl)methyl-(4-nitrofenyl) karbonát (**56**)



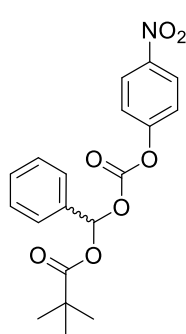
Látka **55** (4,10 g; 20,0 mmol; 1 ekv.) byla rozpuštěna v bezvodém DCM (15 ml) a poté byl přidán nitrofenol (2,78 g; 20,0 mmol; 1 ekv.). Vzniklá suspenze byla ochlazena na teplotu 0-5 °C a poté byl přikapán během 5 minut roztok pyridinu (1,58 g; 1,60 ml; 20,0 mmol; 1 ekv.) v bezvodém DCM (5 ml). Reakční směs byla míchána 30 minut při stejné teplotě a dalších 90 minut při laboratorní teplotě. Surový produkt byl přečištěn slupcovou chromatografií na silikagelu (mobilní fáze DCM) za zisku nažloutlé olejovité látky. Po přidavku cyklohexanu dochází ke krystalizaci produktu. Následnou filtrací, promytím krystalů dalším podílem cyklohexanu a sušením produktu za vakua byla získána bezbarvá pevná látka **56** (4,31 g; 70 %).

¹H NMR (401 MHz, CDCl₃): 7,33 (s; 1H); 7,41 – 7,50 (m; 5H); 7,58 – 7,63 (m; 2H); 8,28 – 8,34 (m; 2H).

Obecný postup pro přípravu derivátů 57a-c

Sloučenina **56** (615 mg; 2,00 mmol; 1 ekv.) a příslušná rtuťnatá sůl (2,40 mmol; 1,2 ekv.) byly rozpuštěny v bezvodém DCM (6,0 ml) pod inertní atmosférou. Vzniklá reakční směs byla míchána přes noc (16-18 hodin) za laboratorní teploty. Poté byl přidán DCM (20 ml) a směs byla promyta nasyceným roztokem NaHCO₃ (10 ml) a následně solankou (10 ml). Organická fáze byla sušena pomocí bezvodého MgSO₄ a rozpouštědlo odpařeno. Surový produkt byl použit do následujícího kroku bez dalšího přečištění.

(((4-Nitrofenyloxy)karbonyloxy)(fenyl)methyl pivalát (57a)



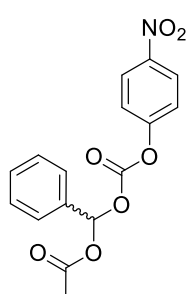
pivaloát rtuťnatý 967 mg; reakční čas 16 h;

světle žlutá pevná látka (618 mg; 95 %).

$^1\text{H NMR}$ (401 MHz, CDCl_3): 1,28 (s; 9H); 7,38 – 7,43 (m; 2H); 7,44 – 7,50 (m; 3H); 7,57 – 7,60 (m; 2H); 7,61 (s; 1H); 8,23 – 8,33 (m; 2H).

$^{13}\text{C NMR}$ (101 MHz, CDCl_3): 27,0 (3C); 39,1; 93,8; 121,9 (2C); 125,5 (2C); 126,8 (2C); 129,0 (2C); 130,5; 134,4; 145,7; 150,7; 155,3; 176,4.

(((4-Nitrofenyloxy)karbonyloxy)(fenyl)methyl acetát (57b)



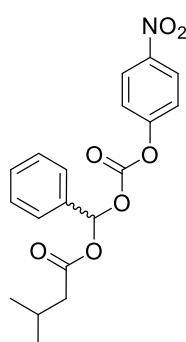
acetát rtuťnatý 765 mg, reakční čas 18 h;

světle žlutá pevná látka (543 mg; 82 %).

$^1\text{H NMR}$ (401 MHz, CDCl_3): 2,20 (s; 3H); 7,36 – 7,44 (m; 2H); 7,44 – 7,50 (m; 3H); 7,57 – 7,62 (m; 2H); 7,64 (s; 1H); 8,24 – 8,30 (m; 2H).

$^{13}\text{C NMR}$ (101 MHz, CDCl_3): 20,9; 93,6; 121,8 (2C); 125,4 (2C); 126,9 (2C); 129,0 (2C); 130,6; 134,1; 145,7; 150,6; 155,2; 168,9.

(((4-Nitrofenyloxy)karbonyloxy)(fenyl)methyl-3-methylbutanoát (57c)



isovaleroát rtuťnatý 967 mg; reakční čas 18 h;

světle žlutá pevná látka (534 mg; 82 %).

$^1\text{H NMR}$ (401 MHz, CDCl_3): 0,98 (d; $J = 1,8$ Hz; 3H); 1,00 (d; $J = 1,8$ Hz; 3H); 2,17 (dhept; $J = 13,7$; 6,8 Hz; 1H); 2,33 (d; $J = 6,9$ Hz; 1H); 2,34 (d; $J = 7,3$ Hz; 1H); 7,37 – 7,42 (m; 2H); 7,43 – 7,48 (m; 3H); 7,57 – 7,61 (m; 2H); 7,65 (s; 1H); 8,25 – 8,29 (m; 2H).

$^{13}\text{C NMR}$ (101 MHz, CDCl_3): 22,4; 22,4; 25,7; 43,1; 93,6; 121,9 (2C);

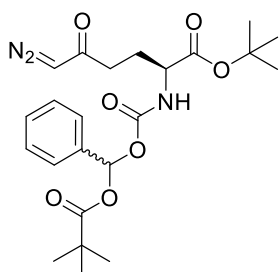
125,4 (2C); 126,9 (2C); 129,0 (2C); 130,5; 134,3; 145,7; 150,7; 155,3; 171,0.

Obecný postup pro přípravu derivátů 58a-c

Sloučenina **57a-c** (500 μmol ; 1 ekv.) byla rozpuštěna v bezvodém DMF (4,0 ml) a směs byla ochlazena na 0-5 °C. Poté byl přikapán roztok $\text{NH}_2\text{DONCOO}i\text{Pr}$ **38** (128 mg; 600 μmol ; 1,2 ekv.) nebo $\text{NH}_2\text{DONCOO}i\text{Bu}$ **45** (136 mg; 600 μmol ; 1,2 ekv.) v bezvodém DMF (2,0 ml). Směs byla nechána pozvolna zahřát na laboratorní teplotu a míchána další

3 hodiny. DMF bylo odpařeno a surový produkt byl přečištěn pomocí sloupcové chromatografie na silikagelu (mobilní fáze DCM/EtOAc, 15:1).

***t*-Butyl-(*S*)-6-diazo-5-oxo-2-(((fenyl(pivaloyloxy)methoxy)karbonyl)amino)hexanoát (58a)**



57a (187 mg); žlutý olej (215 mg; 93 %).

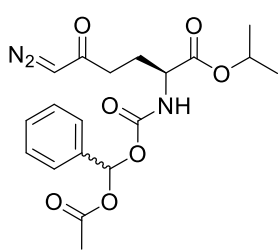
¹H NMR (401 MHz, CDCl₃): [1,20 a 1,22] (s; 9H); [1,43 a 1,46] (s; 9H); [1,87 – 2,01] (m; 1H); [2,11 – 2,29] (m; 1H); [2,29 – 2,53] (m; 2H); [4,23] (m; 1H); [5,21 a 5,37] (bs; 1H); [5,57 a 5,59] (d; *J* = 8,0 (7,9) Hz; 1H); [7,35 – 7,41] (m; 3H); [7,44 – 7,50] (m; 2H); [7,58 a 7,60] (s; 1H).

¹³C NMR (101 MHz, CDCl₃): [27,0 a 27,0] (3C); [27,7 a 27,7]; [28,0 a 28,0] (3C); [36,4 a 36,5]; [38,9 a 38,9]; [53,9 a 54,1]; [54,8 a 54,8]; [82,7 a 82,8]; [90,8 a 90,9]; [126,5 a 126,6] (2C); [128,6 a 128,6] (2C); [129,6 a 129,6]; [136,0 a 136,1]; [153,8 a 153,9]; [170,7 a 170,7]; [176,3 a 176,5]; [193,6 a 193,9].

ESI MS: 484,2 ([M + Na]⁺).

HR ESI MS: vypočteno pro C₂₃H₃₁O₇N₃Na 484,20542; nalezeno 484,20562.

***iso*-Propyl-(*S*)-2-(((acetoxy(fenyl)methoxy)karbonyl)amino)-6-diazo-5-oxohexanoát (58b)**



57b (166 mg); žlutý olej (184 mg; 91 %).

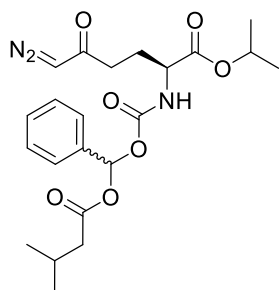
¹H NMR (401 MHz, CDCl₃): [1,20 a 1,21] (d; *J* = 4,5 Hz; 3H); [1,24 a 1,25] (d; *J* = 4,5 Hz; 3H); [1,89 – 2,03] (m; 1H); [2,07 a 2,10] (s; 3H); [2,12 – 2,29] (m; 1H); [2,30 – 2,49] (m; 2H); [4,32] (m; 1H); [5,01] (hept; *J* = 6,3 Hz; 1H); [5,21 a 5,36] (bs; 1H); [5,59 a 5,62] (d; *J* = 8,5 (8,4) Hz; 1H); [7,34 – 7,40] (m; 3H); [7,43 – 7,51] (m; 2H); [7,60 a 7,62] (s; 1H).

¹³C NMR (101 MHz, CDCl₃): [21,0 a 21,0]; [21,7 a 21,7]; [21,7 a 21,7]; [27,6 a 27,7]; [36,3 a 36,3]; [53,6 a 53,6]; [54,8 a 54,8]; [69,6 a 69,7]; [90,6 a 90,8]; [126,6 a 126,6] (2C); [128,6 a 128,6] (2C); [129,6 a 129,7]; [135,7 a 135,8]; [153,7 a 153,8]; [168,8 a 169,0]; [171,0 a 171,0]; [193,5 a 193,8].

ESI MS: 428,1 ([M + Na]⁺).

HR ESI MS: vypočteno pro $C_{19}H_{23}O_7N_3Na$ 428,14282; nalezeno 428,14262.

***iso*-Propyl-(*S*)-6-diazo-2-((((3-methylbutanoyl)oxy)(fenyl)methoxy)karbonyl)amino)-5-oxohexanoát (58c)**



57c (187 mg); žlutý olej (177 mg; 79 %).

1H NMR (401 MHz, $CDCl_3$): [0,92 a 0,94] (d; $J = 2,0$ Hz; 3H); [0,95 a 0,97] (d; $J = 1,5$ Hz; 3H); [1,22 a 1,24] (d; $J = 3,5$ Hz; 3H); [1,26 a 1,27] (d; $J = 4,4$ Hz; 3H); [1,91 – 2,04] (m; 1H); [2,06 – 2,19] (m; 2H); [2,20 – 2,30] (m; 2H); [2,28 – 2,54] (m; 2H); [4,32] (m; 1H); [5,04] (hept; $J = 6,3$ Hz; 1H); [5,21 a 5,37] (bs; 1H);

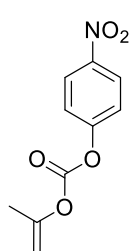
[5,58 a 5,61] (d; $J = 8,3$ (8,4) Hz; 1H); [7,34 – 7,44] (m; 3H); [7,45 – 7,55] (m; 2H); [7,63 a 7,65] (s; 1H).

^{13}C NMR (101 MHz, $CDCl_3$): [21,8 a 21,9] (2C); [22,5 a 22,5] (2C); [25,7 a 25,8]; [27,8 a 28,0]; [36,4 a 36,4]; [43,3 a 43,3]; [53,6 a 53,7]; [54,9 a 55,0]; [69,8 a 69,9]; [90,6 a 90,8]; [126,7 a 126,7] (2C); [128,7 a 128,7] (2C); [129,7 a 129,8]; [135,9 a 136,0]; [153,8 a 153,8]; [171,0 a 171,1]; [171,2 a 171,2]; [193,6 a 193,9].

ESI MS: 470,2 ($[M + Na]^+$).

HR ESI MS: vypočteno pro $C_{22}H_{29}O_7N_3Na$ 470,18977; nalezeno 470,18936.

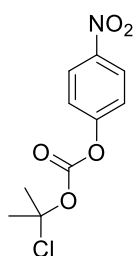
4-Nitrofenyl-prop-1-en-2-yl karbonát (62)



Isopropenyl chloroformiát (2,00 g; 1,70 ml; 16,6 mmol; 1 ekv.) a 4-nitrofenol (2,31 g; 16,6 mmol; 1 ekv.) byly suspendovány v bezvodém DCM (60 ml) pod inertní atmosférou dusíku. Reakční směs byla ochlazena na 0-5 °C a poté byl během 10 minut přikapán roztok pyridinu (1,31 g; 1,30 ml; 16,6 mmol; 1 ekv.) v bezvodém DCM (10 ml). Vzniklá směs byla míchána 30 minut při stejné teplotě a 60 minut při laboratorní teplotě. DCM byl odpařen a odparek byl znovu rozpuštěn v Et_2O (200 ml). Organická fáze byla promyta dest. H_2O (200 ml), 10 % kys. citronovou (200 ml) a znovu dest. vodou (200 ml), sušena bezvodým $MgSO_4$ a poté bylo rozpouštědlo odpařeno. Surový produkt byl přečištěn pomocí sloupcové chromatografie na silikagelu (mobilní fáze cyklohexan/DCM, 1:1) za zisku bezbarvé krystalické látky (3,15 g; 85 %).

$^1\text{H NMR}$ (401 MHz, CDCl_3): 2,06 (d; $J = 1,2$ Hz; 3H); 4,82 (dq; $J = 2,3; 1,2$ Hz; 1H); 4,96 (dd; $J = 2,0; 0,6$ Hz; 1H); 7,39 – 7,45 (m; 2H); 8,26 – 8,32 (m; 2H).

2-Chloropropan-2-yl-(4-nitrofenyl) karbonát (63)



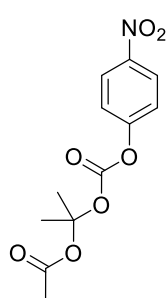
Látka **62** (3,20 g; 14,1 mmol; 1 ekv.) byla rozpuštěna v 4M HCl (11 ekv.) v dioxanu (45 ml) a reakční směs byla míchána po dobu 23 hodin za laboratorní teploty. Rozpouštědlo bylo odpařeno a produkt získaný v kvantitativním výtěžku byl použit do dalšího kroku bez předchozího čištění.

$^1\text{H NMR}$ (401 MHz, CDCl_3): 2,11 (s; 6H); 7,38 – 7,44 (m; 2H); 8,26 – 8,32 (m; 2H).

Obecný postup pro přípravu derivátů 64a-c

Sloučenina **63** (260 mg; 1,00 mmol; 1 ekv.) a příslušná rtuťnatá sůl (1,20 mmol; 1,2 ekv.) byly rozpuštěny v bezvodém DCM (15 ml) pod inertní atmosférou. Vzniklá reakční směs byla míchána přes noc (19-24 hodin) za laboratorní teploty. Poté byl přidán další DCM (30 ml) a směs byla promyta nasyceným roztokem NaHCO_3 (20 ml) a následně solankou (20 ml). Organická fáze byla sušena bezvodým MgSO_4 a rozpouštědlo odpařeno. Surový produkt byl získán v kvantitativním výtěžku a do následujícího kroku byl použit bez dalšího přečištění.

2-(((4-Nitrofenoxy)karbonyl)oxy)propan-2-yl acetát (64a)

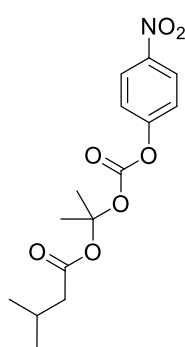


acetát rtuťnatý (382 mg); reakční čas 19 h; nažloutlá amorfnní látka.

$^1\text{H NMR}$ (401 MHz, CDCl_3): 1,93 (s; 3H); 2,11 (s; 6H); 7,37 – 7,45 (m; 2H); 8,25 – 8,32 (m; 2H).

$^{13}\text{C NMR}$ (101 MHz, CDCl_3): 21,1; 25,6 (2C); 107,9; 122,1 (2C); 125,3 (2C); 145,5; 149,0; 155,6; 170,8.

2-(((4-Nitrofenoxy)karbonyloxy)propan-2-yl-3-methylbutanoát (64b)

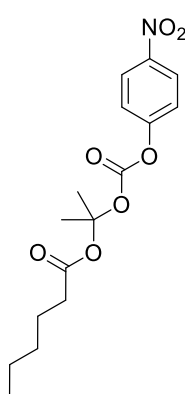


isovaleroát rtuťnatý (483 mg); reakční čas 24 h; nažloutlá amorfnní látka.

$^1\text{H NMR}$ (401 MHz, CDCl_3): 0,97 (d; $J = 6,6$ Hz; 6H); 1,93 (s; 6H); 2,07 – 2,16 (m; 1H); 2,21 (d; $J = 6,8$ Hz; 2H); 7,34 – 7,40 (m; 2H); 8,25 – 8,29 (m; 2H).

$^{13}\text{C NMR}$ (101 MHz, CDCl_3): 22,4 (2C); 25,5 (2C); 25,8; 44,2; 107,7; 122,0 (2C); 125,4 (2C); 145,5; 149,1; 155,4; 170,7.

2-(((4-Nitrofenoxy)karbonyloxy)propan-2-yl hexanoát (64c)



hexanoát rtuťnatý (517 mg); reakční čas 24 h; nažloutlá amorfnní látka.

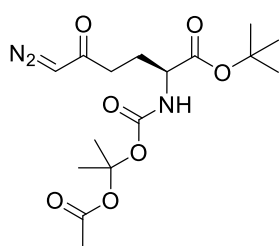
$^1\text{H NMR}$ (401 MHz, CDCl_3): 0,90 (t; $J = 7,1$ Hz; 3H); 1,27 – 1,38 (m; 4H); 1,57 – 1,72 (m; 2H); 1,94 (s; 6H); 2,35 (t; $J = 7,5$ Hz; 2H); 7,37 – 7,42 (m; 2H); 8,26 – 8,31 (m; 2H).

$^{13}\text{C NMR}$ (101 MHz, CDCl_3): 14,0; 22,4; 24,5; 25,5 (2C); 31,2; 35,0; 107,7; 122,0 (2C); 125,4 (2C); 145,5; 149,0; 155,4; 171,4.

Obecný postup pro přípravu derivátů 65a-c

Látka **64a-c** (0,500 mmol; 1 ekv.) byl rozpuštěn v bezvodém DMF (4 ml) a směs byla ochlazena na teplotu 0-5 °C. Poté byl přikapán roztok $\text{NH}_2\text{DONCOO}t\text{Bu}$ **45** (170 mg; 0,750 mmol; 1,5 ekv.) v bezvodém DMF (2 ml). Směs byla nechána pozvolna zahřát na laboratorní teplotu a míchána další 4 hodiny. DMF byl odpařen a surový produkt byl dvakrát přečištěn pomocí sloupcové chromatografie na silikagelu (mobilní fáze 1. cyklohexan/EtOAc, 3:1; 2. DCM/EtOAc, 15:1).

***t*-Butyl-(*S*)-2-(((2-acetoxypropan-2-yl)oxy)karbonyl)amino)-6-diazo-5-oxohexanoát (65a)**



64a (142 mg); žlutý olej (65 mg; 35 % přes dva kroky).

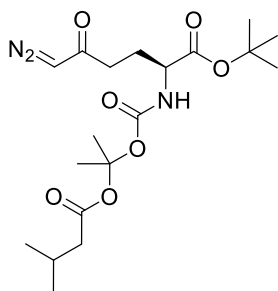
$^1\text{H NMR}$ (401 MHz, CDCl_3): 1,46 (s; 9H); 1,80 (s; 3H); 1,82 (s; 3H); 1,87 – 2,00 (m; 1H); 2,04 (s; 3H); 2,11 – 2,25 (m; 1H); 2,26 – 2,51 (m; 2H); 4,16 (td; $J = 8,2$; 4,9 Hz; 1H); 5,29 (bs; 1H); 5,38 (d; $J = 8,1$ Hz; 1H).

^{13}C NMR (101 MHz, CDCl_3): 22,2; 26,1; 26,6; 28,1 (3C); 29,8; 36,5; 53,7; 54,8; 82,6; 105,6 153,2; 168,9; 170,9; 193,7.

ESI MS: 394,1 ($[\text{M} + \text{Na}]^+$).

HR ESI MS: vypočteno pro $\text{C}_{16}\text{H}_{25}\text{O}_7\text{N}_3\text{Na}$ 394,15847; nalezeno 394,15839.

***t*-Butyl-(*S*)-6-diazo-2-(((2-((3-methylbutanoyl)oxy)propan-2-yl)oxy)karbonyl)amino)-5-oxohexanoát (65b)**



64b (163 mg); žlutá amorfni látka (110 mg; 53 % přes dva kroky).

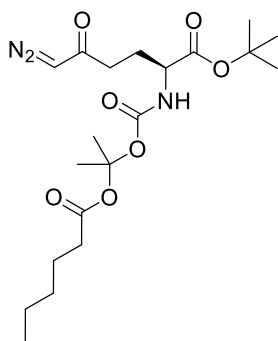
^1H NMR (401 MHz, CDCl_3): 0,94 (d; $J = 6,6$ Hz; 6H); 1,45 (s; 9H); 1,80 (s; 3H); 1,82 (s; 3H); 1,88 – 1,99 (m; 1H); 2,01 – 2,12 (m; 1H); 2,13 – 2,22 (m; 3H); 2,27 – 2,52 (m; 2H); 4,16 (td; $J = 8,1$ Hz; 4,7 Hz; 1H); 5,30 (bs; 1H); 5,41 (d; $J = 8,1$ Hz; 1H).

^{13}C NMR (101 MHz, CDCl_3): 22,4 (2C); 25,7; 25,9; 26,0; 27,9; 28,0 (3C); 36,5; 44,3; 53,6; 54,7; 82,5; 105,4; 153,1; 170,9 (2C); 193,7.

ESI MS: 436,2 ($[\text{M} + \text{Na}]^+$).

HR ESI MS: vypočteno pro $\text{C}_{19}\text{H}_{31}\text{O}_7\text{N}_3\text{Na}$ 436,20542; nalezeno 436,20532.

***t*-Butyl-(*S*)-6-diazo-2-(((2-(hexanoyloxy)propan-2-yl)oxy)karbonyl)amino)-5-oxohexanoát (65c)**



64c (170 mg); žlutá amorfni látka (81 mg; 38 % přes dva kroky).

^1H NMR (401 MHz, CDCl_3): 0,86 (t; $J = 7,0$ Hz; 3H); 1,22 – 1,33 (m; 4H); 1,43 (s; 9H); 1,51 – 1,64 (m; 2H); 1,78 (s; 3H); 1,80 (s; 3H); 1,84 – 1,97 (m; 1H); 2,09 – 2,21 (m; 1H); 2,25 (t; $J = 7,5$ Hz; 2H); 2,27 – 2,46 (m; 2H); 4,14 (td; $J = 8,1$; 4,7 Hz; 1H); 5,28 (bs; 1H); 5,38 (d; $J = 8,1$ Hz; 1H).

^{13}C NMR (101 MHz, CDCl_3): 14,0; 22,4; 24,5; 26,0; 26,1; 27,9; 28,0 (3C); 31,3; 35,2; 36,5; 53,7; 54,8; 82,5; 105,4; 153,2; 170,9; 171,6; 193,7.

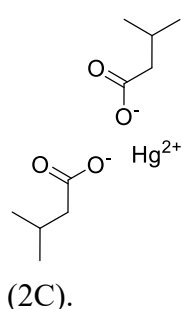
ESI MS: 450,3 ($[\text{M} + \text{Na}]^+$).

HR ESI MS: vypočteno pro $\text{C}_{20}\text{H}_{33}\text{O}_7\text{N}_3\text{Na}$ 450,22107; nalezeno 450,22089.

Příprava rtuťnatých solí

HgO (1,00 g; 4,62 mmol, 1 ekv.) byl rozpuštěn v příslušné kyselině (2 – 4 ekv.) a reakční směs byla po dobu 24 hodin zahřívána na teplotu 70 °C. Ukazatelem konverze výchozích látek na produkty je postupné odbarvení reakční směsi – doreagování žlutooranžového oxidu rtuťnatého. Vzniklá směs byla suspendována ve směsi cyklohexan/Et₂O 1:1 (20 ml), pevná látka byla zfiltrována, promyta dalším podílem směsi cyklohexan/Et₂O 1:1 (20 ml) a poté sušena za vakua přes noc.

Isovalerát rtuťnatý



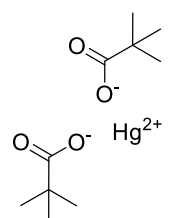
kyselina isovalerová (1,89 g; 9,24 mmol; 2 ekv.);

bezbarvá pevná látka (1,77 g; 95%).

¹H NMR (401 MHz, *d*₆-DMSO): 0,92 (d; *J* = 6,6 Hz; 12H); 1,97 (hept; *J* = 6,5 Hz; 2H); 2,13 (d; *J* = 7,1 Hz; 4H).

¹³C NMR (101 MHz, *d*₆-DMSO): 22,5 (4C); 22,6 (2C); 43,6 (2C); 175,4 (2C).

Pivaloát rtuťnatý



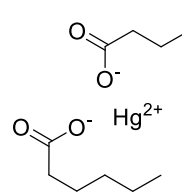
kyselina pivalová (1,89 g; 18,5 mmol; 4 ekv.);

bezbarvá pevná látka (1,71 g; 92%).

¹H NMR (401 MHz, *d*₆-DMSO): 1,16 (s; 18H).

¹³C NMR (101 MHz, *d*₆-DMSO): 28,4 (6C); 38,7 (2C); 180,9 (2C).

Hexanoát rtuťnatý



kyselina hexanová (2,15 g; 18,5 mmol; 4 ekv.);

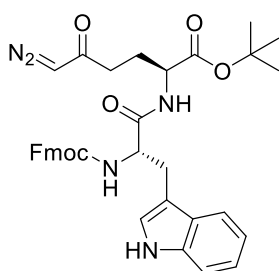
bezbarvá pevná látka (1,87 g; 94%).

¹H NMR (401 MHz, *d*₆-DMSO): 0,82 – 0,94 (m, 6H), 1,21 – 1,35 (m; 8H); 1,45 – 1,60 (m; 4H); 2,23 (t; *J* = 7,4 Hz; 4H).

¹³C NMR (101 MHz, *d*₆-DMSO): 13,9 (2C); 21,9 (2C); 25,6 (2C); 31,0 (2C); 34,2 (2C); 176,0 (2C).

5.2.3 Proléčiva DONu cílená na glukózový přenašeč GLUT1

t-Butyl-(*S*)-2-((*S*)-2-(((9*H*-fluoren-9-yl)methoxy)karbonyl)amino)-3-(1*H*-indol-3-yl)propanamido)-6-diazo-5-oxohexanoát (**67a**)



Fmoc-L-Trp-OH (3,10 g; 7,26 mmol; 1,1 ekv.) byl společně s HATU (3,01 g; 7,92 mmol; 1,2 ekv.) suspendován v bezvodém DCM (40 ml). Reakční směs byla ochlazená na 0-5 °C a míchána pod inertní atmosférou dusíku. K suspenzi byl přikapán DIEA (3,50 ml; 19,8 mmol; 3 ekv.). Směs byla míchána dalších 5 minut při stejné teplotě a následně k ní byl během 5 minut přikapán roztok látky **45** (1,50 g; 6,60 mmol; 1 ekv.) v bezvodém DCM (10 ml). Reakční směs byla míchána 30 minut při 0 °C a 2 hodiny při laboratorní teplotě. Vzniklý žlutý čirý roztok byl naředěn DCM (100 ml), promyt nasyceným roztokem NaHCO₃ (100 ml), dest. vodou (100 ml), 10% KHSO₄ (100 ml), opět dest. vodou (100 ml) a solankou (100 ml). Organický podíl byl sušen bezvodým MgSO₄ a rozpouštědlo bylo odpařeno. Odparek byl přečištěn sloupcovou chromatografií na silikagelu (mobilní fáze DCM/EtOAc, 3:1) za zisku očekávaného produktu **67a** (3,53 g; 84 %) ve formě pevné žluté látky.

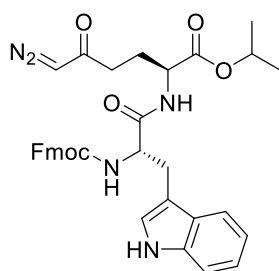
¹H NMR (401 MHz, *d*₆-DMSO): 1,41 (s; 9H); 1,78 – 1,88 (m; 1H); 2,04 – 2,14 (m; 1H); 2,32 – 2,44 (m; 2H); 2,95 (dd; *J* = 14,7; 10,5 Hz; 1H); 3,12 (dd; *J* = 14,6; 4,0 Hz; 1H); 4,11 – 4,19 (m; 4H); 4,34 (ddd; *J* = 10,0; 8,3; 3,9 Hz; 1H); 6,02 (bs; 1H); 6,99 (t; *J* = 7,3 Hz; 1H); 7,07 (t; *J* = 7,2 Hz; 1H); 7,21 (d; *J* = 2,3 Hz; 1H); 7,25 (td; *J* = 7,5; 1,1 Hz; 1H); 7,30 – 7,36 (m; 2H); 7,36 – 7,45 (m; 2H); 7,53 (d; *J* = 8,5 Hz; 1H); 7,62 (d; *J* = 7,5 Hz; 1H); 7,66 (d; *J* = 7,4 Hz; 1H); 7,70 (d; *J* = 7,8 Hz; 1H); 7,88 (d; *J* = 7,5 Hz; 2H); 8,38 (d; *J* = 7,5 Hz; 1H); 10,83 (bs; 1H).

¹³C NMR (101 MHz, *d*₆-DMSO): 25,9; 27,6 (3C); 27,8; 36,3; 46,6; 52,2; 52,2; 55,2; 65,6; 80,7; 110,2; 111,3; 118,2; 118,6; 120,1 (2C); 120,8; 123,9; 125,3; 125,4; 127,1 (2C); 127,2; 127,6 (2C); 136,1; 140,6 (2C); 143,7; 143,8; 155,8; 170,8; 172,2; 194,2.

ESI MS: 658,3 ([M + Na]⁺).

HR ESI MS: vypočteno pro C₃₆H₃₇O₆N₅Na 658,26361; nalezeno 658,26300.

Isopropyl-(S)-2-((S)-2-(((9H-fluoren-9-yl)methoxy)karbonyl)amino)-3-(1H-indol-3-yl)propanamido)-6-diazo-5-oxohexanoát (67b)



Fmoc-L-Trp-OH (4,40 g; 10,3 mmol; 1,1 ekv.) byl společně s HATU (4,28 g; 11,3 mmol; 1,2 ekv.) suspendován v bezvodém DCM (40 ml). Reakční směs byla ochlazená na teplotu 0-5 °C a míchána pod inertní atmosférou dusíku. K suspenzi byl přikápan DIEA (4,90 ml; 28,1 mmol; 3 ekv.) a směs byla míchána 5 minut při stejné teplotě za postupného rozpuštění suspenze v čirý žlutý roztok. Ke směsi byl přikápan roztok látky **38** (2,00 g; 9,38 mmol; 1 ekv.) v bezvodém DCM (10 ml). Reakční směs byla míchána 30 minut při 0 °C a 2 hodiny při laboratorní teplotě, kdy dochází k postupnému vysrážení části produktu **67b** z roztoku. Směs byla naředěna DCM (250 ml) a promyta nasyceným roztokem NaHCO₃ (100 ml), dest. vodou (100 ml), 1M HCl (100 ml), opět dest. vodou (100 ml) a solankou (100 ml). Organický podíl byl sušen bezvodým MgSO₄ a rozpouštědlo bylo odpařeno. Surový produkt **67b** získaný v kvantitativním výtěžku byl kvůli špatné rozpustnosti použit do dalšího kroku bez předchozího čištění.

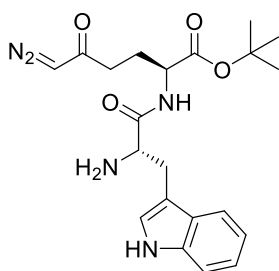
¹H NMR (401 MHz, CDCl₃): 1,19 (d; *J* = 6,3 Hz; 3H); 1,23 (d; *J* = 6,3 Hz; 3H); 1,81–1,92 (m; 1H); 2,01–2,28 (m; 3H); 3,18 (dd; *J* = 14,5; 7,1 Hz; 1H); 3,39 (dd; *J* = 14,2; 5,2 Hz; 1H); 4,20 (t; *J* = 7,1 Hz; 1H); 4,30–4,48 (m; 3H); 4,54 (q; *J* = 6,9 Hz; 1H); 4,88–4,99 (m; 1H); 5,07 (bs; 1H); 5,50 (d; *J* = 7,9 Hz; 1H); 6,59 (d; *J* = 7,4 Hz; 1H); 7,07 (bs; 1H); 7,14 (t; *J* = 7,0 Hz; 1H); 7,20 (t; *J* = 7,2 Hz; 1H); 7,30 (tdd; *J* = 7,5; 2,5; 1,1 Hz; 2H); 7,36 (d; *J* = 8,0 Hz; 1H); 7,40 (t; *J* = 7,5 Hz; 2H); 7,56 (t; *J* = 6,6 Hz; 2H); 7,67 (d; *J* = 7,9 Hz; 1H); 7,77 (d; *J* = 7,6 Hz; 2H); 8,23 (bs; 1H).

¹³C NMR (101 MHz, CDCl₃): 21,8; 21,8; 27,2; 28,5; 36,2; 47,2; 52,2; 55,8; 67,2; 69,2; 110,3; 111,4; 118,9; 120,0; 120,1; 120,1 (2C); 122,5; 123,7; 125,3; 125,3; 127,2 (2C); 127,6; 127,9 (2C); 136,4; 141,4 (2C); 143,9; 144,0; 156,1; 170,8; 171,4; 193,9.

ESI MS: 644,2 ([M + Na]⁺).

HR ESI MS: vypočteno pro C₃₅H₃₅O₆N₅Na 644,24795; nalezeno 644,24811.

***t*-Butyl-(*S*)-2-((*S*)-2-amino-3-(1*H*-indol-3-yl)propanamido)-6-diazo-5-oxohexanoát
(68a)**



Látka **67a** (3,53 g; 5,55 mmol; 1 ekv.) byla suspendována v bezvodém DCM (70 ml) pod inertní atmosférou dusíku. Ke směsi byl přidán diethylamin (5,74 ml; 55,5 mmol; 10 ekv.) a reakční směs byla míchána 6 hodin při laboratorní teplotě za postupného rozpuštění suspenze v čirý žlutý roztok. Rozpouštědlo bylo odpařeno a směs byla přečištěna sloupcovou chromatografií na silikagelu (mobilní fáze CHCl₃/MeOH, 30:1) za zisku očekávaného produktu **68a** (2,13 g; 93%) ve formě světle žluté pevné látky.

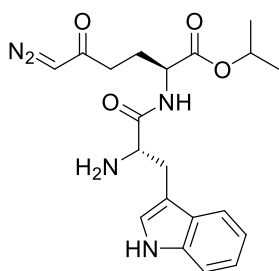
¹H NMR (401 MHz, CDCl₃): 1,48 (s; 9H); 1,88 – 2,00 (m; 1H); 2,01 – 2,28 (m; 5H); 3,07 (dd; *J* = 14,5; 8,1 Hz; 1H); 3,33 (dd; *J* = 14,5; 3,9 Hz; 1H); 3,79 (dd; *J* = 8,2; 4,1 Hz; 1H); 4,47 (td; *J* = 8,3; 4,2 Hz; 1H); 5,16 (bs; 1H); 7,09 – 7,16 (m; 2H); 7,21 (ddd; *J* = 8,1; 7,0; 1,2 Hz; 1H); 7,38 (dt; *J* = 8,1; 0,9 Hz; 1H); 7,69 (dd; *J* = 7,9; 1,0 Hz; 1H); 7,92 (d; *J* = 8,2 Hz; 1H); 8,51 (bs; 1H).

¹³C NMR (101 MHz, CDCl₃): 27,8; 28,1 (3C); 30,6; 36,6; 52,0; 54,8; 55,4; 82,5; 111,1; 111,4; 119,2; 119,7; 122,3; 123,6; 127,7; 136,5; 171,1; 174,6; 194,1.

ESI MS: 414,2 ([M + H]⁺).

HR ESI MS: vypočteno pro C₂₁H₂₈O₄N₅ 414,21358; nalezeno 414,21332.

**Isopropyl-(*S*)-2-((*S*)-2-amino-3-(1*H*-indol-3-yl)propanamido)-6-diazo-5-oxohexanoát
(68b)**



Surový produkt **67b** (5,83 g; 9,38 mmol; 1 ekv.) byl suspendován v DCM (100 ml), byl přidán diethylamin (9,70 ml; 93,8 mmol; 10 ekv.) a směs byla míchána 4 hodiny při laboratorní teplotě za postupného rozpouštění výchozí látky. Rozpouštědlo bylo odpařeno a odparek byl přečištěn sloupcovou chromatografií na silikagelu (mobilní fáze CHCl₃/MeOH, 30:1) za zisku očekávaného produktu **68b** (2,93 g; 78 % přes 2 kroky) ve formě žluté amorfnní látky.

¹H NMR (401 MHz, CDCl₃): 1,24 (d; *J* = 6,0 Hz; 3H), 1,25 (d; *J* = 6,0 Hz; 3H), 1,50 (bs; 2H); 1,88–2,00 (m; 1H); 2,04–2,27 (m; 3H); 3,04 (dd; *J* = 14,4; 8,2 Hz; 1H); 3,30 (ddd; *J* = 14,2; 4,2; 0,9 Hz; 1H); 3,74 (dd; *J* = 8,1; 4,2 Hz; 1H); 4,51 (td; *J* = 8,3; 4,0 Hz; 1H);

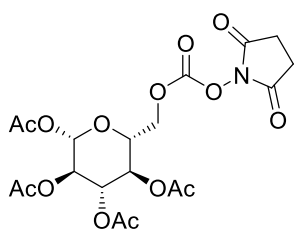
5,02 (hept; $J = 6,0$ Hz; 1H); 5,11 (bs; 1H); 7,08 (d; $J = 2,3$ Hz; 1H); 7,11 (ddd; $J = 8,0$; 7,1; 1,0 Hz; 1H); 7,19 (ddd; $J = 8,1$; 7,1; 1,1 Hz; 1H); 7,36 (d; $J = 8,1$ Hz; 1H); 7,67 (d; $J = 7,9$ Hz; 1H); 7,88 (d; $J = 8,2$ Hz; 1H); 8,45 (bs; 1H).

^{13}C NMR (101 MHz, CDCl_3): 21,8; 21,8; 27,7; 30,8; 36,6; 51,6; 54,8; 55,5; 69,5; 111,4 (2C); 119,2; 119,7; 122,3; 123,5; 127,7; 136,5; 171,4; 175,1; 193,9.

ESI MS: 422,2 ($[\text{M} + \text{Na}]^+$).

HR ESI MS: vypočteno pro $\text{C}_{20}\text{H}_{25}\text{O}_4\text{N}_5\text{Na}$ 422,17988; nalezeno 422,17992.

(2*S*,3*R*,4*S*,5*R*,6*R*)-6-((((2,5-dioxopyrrolidin-1-yl)oxy)karbonyl)oxy)methyl)tetrahydro-2*H*-pyran-2,3,4,5-tetrayl tetraacetát (71)



1,2,3,4-Tetra-*O*-acetyl- β -*D*-glukopyranóza (2,79 g; 8,00 mmol; 1 ekv.) byla rozpuštěna v bezvodém acetonitrilu (40 ml), byl přidán *N,N'*-disukcinimidyl karbonát (4,10 g; 16,0 mmol; 2 ekv.) a směs byla vychlazena na teplotu 0-5 °C. Na závěr byl přikapán triethylamin (1,62 g; 2,20 ml; 16,0 mmol; 2 ekv.) a směs byla

sonikována do rozpuštění pevné složky a poté míchána po dobu 18 hodin za laboratorní teploty pod inertní atmosférou dusíku. Acetonitril byl odpařen a surový produkt byl přečištěn pomocí sloupcové chromatografie na silikagelu (mobilní fáze EtOAc/toluen, 1:1). Získaný sirupovitý produkt byl precipitován ve směsi EtOAc/Et₂O za zisku bezbarvé pevné látky (2,88 g; 73 %).

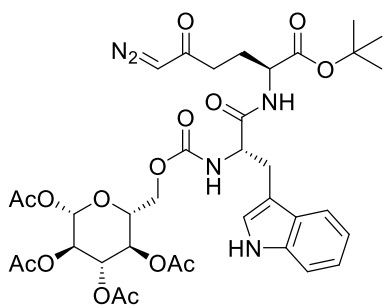
^1H NMR (401 MHz, CDCl_3): 2,02 (s; 3H); 2,03 (s; 3H); 2,07 (s; 3H); 2,14 (s; 3H); 2,84 (s; 4H); 3,93 (ddd; $J = 10,1$; 5,1; 3,4 Hz; 1H); 4,33 – 4,42 (m; 2H); 5,07 (dd; $J = 10,1$; 9,2 Hz; 1H); 5,13 (dd; $J = 9,5$; 8,2 Hz; 1H); 5,27 (t; $J = 9,4$ Hz; 1H); 5,75 (d; $J = 8,2$ Hz; 1H).

^{13}C NMR (101 MHz, CDCl_3): 20,7 (2C); 20,7; 20,9; 25,6 (2C); 68,3; 68,5; 70,2; 72,0; 72,6; 91,5; 151,4; 168,5 (2C); 169,0; 169,3; 169,6; 170,2.

ESI MS: 512,1 ($[\text{M} + \text{Na}]^+$).

HR ESI MS: vypočteno pro $\text{C}_{19}\text{H}_{23}\text{O}_{14}\text{NNa}$ 512,10070; nalezeno 512,10108.

(2R,3R,4S,5R,6R)-6-((5S,8S)-5-((1H-Indol-3-yl)methyl)-8-(4-diazo-3-oxobutyl)-11,11-dimethyl-3,6,9-trioxo-2,10-dioxa-4,7-diazadodecyl)tetrahydro-2H-pyran-2,3,4,5-tetrayl tetraacetát (69a)



Látka **68a** (400 mg; 0,967 mmol; 1 ekv.) a sloučenina **71** (521 mg; 1,06 mmol; 1,1 ekv.) byly rozpuštěny v bezvodém DCM (12 ml) pod inertní atmosférou dusíku a vzniklá reakční směs byla míchána po dobu 21 hodin při laboratorní teplotě. Rozpouštědlo bylo odpařeno a směs byla přečištěna sloupcovou chromatografií na silikagelu (mobilní fáze DCM/MeOH, 30:1) za zisku očekávaného produktu **69a** (724 mg; 95 %) ve formě pevné žluté látky.

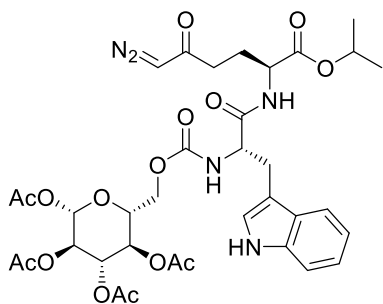
¹H NMR (401 MHz, CDCl₃): 1,42 (s; 9H); 1,80 – 1,92 (m; 1H); 1,99 – 2,11 (m; 15H); 3,19 (dd; *J* = 14,6; 6,4 Hz; 1H); 3,40 – 3,49 (m; 1H); 3,81 – 3,88 (m; 1H); 4,14 (dd; *J* = 12,2; 2,1 Hz; 1H); 4,35 (ddd; *J* = 16,7; 8,6; 3,0 Hz; 2H); 4,48 (q; *J* = 6,5 Hz; 1H); 5,03 – 5,17 (m; 3H); 5,22 – 5,30 (m; 1H); 5,40 (d; *J* = 8,1 Hz; 1H); 5,74 (dd; *J* = 8,3; 3,4 Hz; 1H); 6,57 (d; *J* = 7,6 Hz; 1H); 7,10 – 7,15 (m; 1H); 7,15 (ddd; *J* = 8,3; 7,1; 1,3 Hz; 1H); 7,17 – 7,22 (m; 1H); 7,36 (dt; *J* = 8,1; 1,0 Hz; 1H); 7,73 (d; *J* = 7,7 Hz; 1H); 8,41 (s; 1H).

¹³C NMR (101 MHz, CDCl₃): 20,7; 20,7; 20,7; 20,9; 27,4; 27,8; 28,1 (3C); 36,3; 52,4; 54,8; 55,5; 62,4; 67,8; 70,4; 73,0; 73,1; 82,6; 91,8; 110,0; 111,4; 119,1; 120,0; 122,4; 123,9; 127,6; 136,4; 155,4; 169,1; 169,5; 169,7; 170,2; 170,5; 171,1; 194,0.

ESI MS: 810,3 ([M + Na]⁺).

HR ESI MS: vypočteno pro C₃₆H₄₅O₁₅N₅Na 810,28044; nalezeno 810,27972.

(2R,3R,4S,5R,6R)-6-((5S,8S)-5-((1H-Indol-3-yl)methyl)-8-(4-diazo-3-oxobutyl)-11-methyl-3,6,9-trioxo-2,10-dioxa-4,7-diazadodecyl)tetrahydro-2H-pyran-2,3,4,5-tetrayl tetraacetát 69b



Látky **68b** (100 mg; 0,250 mmol; 1 ekv.) a **71** (135 mg; 0,275 mmol; 1,1 ekv.) byly rozpuštěny v bezvodém DCM (4 ml) pod inertní atmosférou dusíku a reakční směs byla míchána po dobu 24 h při laboratorní teplotě. Rozpouštědlo bylo odpařeno a odparek byl přečištěn sloupcovou chromatografií na silikagelu (mobilní fáze CHCl₃/MeOH,

30:1) za zisku očekávaného produktu **69b** (185 mg; 95 %) ve formě pevné žluté látky.

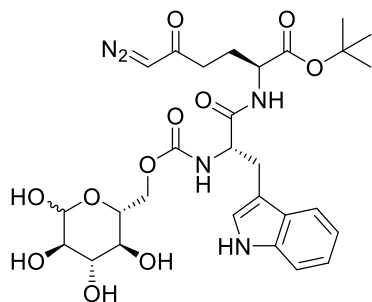
¹H NMR (401 MHz, CDCl₃): 1,20 (d; *J* = 6,3 Hz; 3H); 1,23 (d; *J* = 6,4 Hz; 3H); 1,76 – 1,92 (m; 1H); 1,95 – 2,19 (m; 15H); 3,19 (dd; *J* = 14,6; 6,7 Hz; 1H); 3,44 (dd; *J* = 14,6; 5,1 Hz; 1H); 3,86 (d; *J* = 6,9 Hz; 1H); 4,15 (dd; *J* = 12,2; 2,2 Hz; 1H); 4,27 – 4,54 (m; 3H); 4,96 (hept; *J* = 6,3 Hz; 1H); 5,05 – 5,18 (m; 3H); 5,25 (d; *J* = 9,5 Hz; 1H); 5,44 (d; *J* = 8,0 Hz; 1H); 5,73 (d; *J* = 8,4 Hz; 1H); 6,58 (d; *J* = 7,7 Hz; 1H); 7,10 – 7,17 (m; 2H); 7,17 – 7,23 (m; 1H); 7,34 – 7,39 (m; 1H); 7,72 (d; *J* = 7,8 Hz; 1H); 8,39 (bs; 1H).

¹³C NMR (101 MHz, CDCl₃): 20,7; 20,7; 20,8; 20,9; 21,8; 21,8; 27,3; 27,9; 36,2; 52,1; 54,8; 55,6; 62,4; 67,8; 69,6; 70,4; 73,0; 73,1; 91,8; 110,1; 111,4; 119,1; 120,0; 122,4; 123,9; 127,6; 136,4; 155,4; 169,1; 169,5; 169,7; 170,2; 170,9; 171,3; 193,9.

ESI MS: 796,3 ([M + Na]⁺).

HR ESI MS: vypočteno pro C₃₅H₄₃O₁₅N₅Na 796,26479; nalezeno 796,26421.

***t*-Butyl-(2*S*)-2-((2*S*)-3-(1*H*-indol-3-yl)-2-((((2*R*,3*S*,4*S*,5*R*)-3,4,5,6-tetrahydroxytetrahydro-2*H*-pyran-2-yl)methoxy)karbonyl)amino)propanamido)-6-diazo-5-oxohexanoát (70a)**



Látka **69a** (50,0 mg; 63,4 μmol; 1 ekv.) byla rozpuštěna v bezvodém MeOH (1 ml) pod inertní atmosférou dusíku. K reakční směsi byl přikapán čerstvě připravený roztok methanolátu sodného (0,340 mg; 6,34 μmol; 0,1 ekv.) v bezvodém MeOH (50 μl) a směs byla míchána 1 hodinu při laboratorní teplotě. Rozpouštědlo bylo odpařeno a

odparek byl přečištěn sloupcovou chromatografií na silikagelu (mobilní fáze DCM/MeOH, 5:1) za zisku očekávaného produktu **70a** (32 mg; 82 %) ve formě pevné světle žluté látky jakožto směsi α a β anomerů (1:1).

¹H NMR (401 MHz, CDCl₃): 1,40 (s; 9H); 1,75 – 1,87 (m; 1H); 1,93 – 2,25 (m; 1H); 2,32 – 2,43 (m; 2H); 2,83 – 3,28 (m; 4H); 3,40 (td; *J* = 9,1; 4,8 Hz; 0,5H); 3,67 – 3,75 (m; 0,5H); 3,79 (dd; *J* = 11,6; 6,8 Hz; 0,5H); 3,86 (dd; *J* = 11,5; 6,3 Hz; 0,5H); 4,06 – 4,18 (m; 3H); 4,20 – 4,34 (m; 2H); 4,51 (d; *J* = 6,7 Hz; 0,5H); 4,72 (d; *J* = 4,8 Hz; 0,5H); 4,89 (d; *J* = 4,7 Hz; 0,5H); 4,92 (d; *J* = 4,7 Hz; 0,5H); 4,98 (d; *J* = 5,5 Hz; 0,5H); 5,04 (d; *J* = 5,4 Hz; 0,5H); 6,03 (bs; 1H); 6,32 (d; *J* = 4,9 Hz; 0,5H); 6,65 (d; *J* = 6,5 Hz; 0,5H);

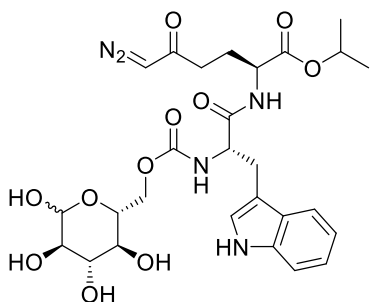
6,99 (t; $J = 7,4$ Hz; 1H); 7,06 (t; $J = 7,5$ Hz; 1H); 7,15 – 7,28 (m; 2H); 7,33 (d; $J = 8,0$ Hz; 1H); 7,68 (d; $J = 7,9$ Hz; 1H); 8,36 (d; $J = 7,6$ Hz; 1H); 10,75 – 10,86 (m; 1H).

^{13}C NMR (101 MHz, CDCl_3): 26,0; 27,6 (3C); 27,7; 36,2; 52,1; 54,0; 55,1; 64,3; [69,5 a 70,1]; [70,5 a 72,2]; [72,9 a 74,0]; [74,7 a 76,4]; 80,7; [92,2 a 96,8]; 110,1; 111,4; 118,2; 118,6; 120,9; 124,1; 127,2; 136,1; [156,0 a 156,1]; 170,8; [172,4 a 172,4]; 194,2.

ESI MS: 642,2 ($[\text{M} + \text{Na}]^+$).

HR ESI MS: vypočteno pro $\text{C}_{28}\text{H}_{37}\text{O}_{11}\text{N}_5\text{Na}$ 642,23818; nalezeno 642,23798.

Isopropyl-(2*S*)-2-((2*S*)-3-(1*H*-indol-3-yl)-2-((((2*R*,3*S*,4*S*,5*R*)-3,4,5,6-tetrahydroxytetrahydro-2*H*-pyran-2-yl)methoxy)karbonyl)amino)propanamido)-6-diazo-5-oxohexanoát (70b)



Látka **69b** (75,0 mg; 96,9 μmol ; 1 ekv.) byla rozpuštěna v bezvodém MeOH (1,5 ml) pod inertní atmosférou dusíku. K reakční směsi byl přikapán čerstvě připravený roztok methanolátu sodného (0,520 mg; 9,69 μmol ; 0,1 ekv.) v bezvodém MeOH (70 μl) a směs byla míchána 30 minut při laboratorní teplotě. Rozpouštědlo bylo odpařeno

a odparek byl přečištěn sloupcovou chromatografií na silikagelu (mobilní fáze DCM/MeOH, 5:1) za zisku očekávaného produktu **70b** (45 mg; 76 %) ve formě bezbarvé pevné látky.

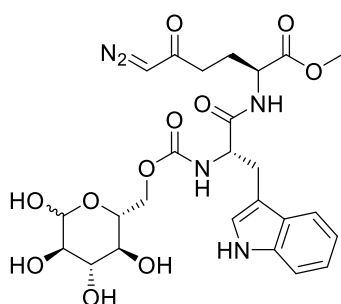
^1H NMR (401 MHz, CDCl_3): 1,18 (d; $J = 5,0$ Hz; 3H); 1,19 (d; $J = 5,0$ Hz; 3H); 1,76 – 1,90 (m; 1H); 1,94 – 2,08 (m; 1H); 2,34 – 2,47 (m; 2H); 2,83 – 3,15 (m, 4H), 3,24 (ddd; $J = 9,1$; 7,0; 1,8 Hz; 0,5H); 3,41 (td; $J = 9,2$; 4,5 Hz; 1H); 3,71 (ddd; $J = 10,0$; 6,1; 1,9 Hz; 0,5H); 3,80 (dd; $J = 11,6$; 6,9 Hz; 0,5H); 3,87 (dd; $J = 11,5$; 6,2 Hz; 0,5H); 4,06 – 4,34 (m; 4H); 4,52 (d; $J = 6,7$ Hz; 0,5H); 4,73 (d; $J = 4,8$ Hz; 0,5H); 4,85 – 4,95 (m; 2H); 4,99 (d; $J = 5,6$ Hz; 0,5H); 5,05 (d; $J = 5,4$ Hz; 0,5H); 6,02 (bs; 1H); 6,32 (d; $J = 4,7$ Hz; 0,5H); 6,65 (d; $J = 6,5$ Hz; 0,5H); 6,99 (t; $J = 7,4$ Hz; 1H); 7,07 (t; $J = 7,3$ Hz; 1H); 7,19 (s; 1H); 7,22 (d; $J = 8,1$ Hz; 0,5H); 7,27 (d; $J = 8,1$ Hz; 0,5H); 7,33 (d; $J = 8,0$ Hz; 1H); 7,67 (d; $J = 7,8$ Hz; 1H); 8,43 (d; $J = 7,6$ Hz; 1H); 10,80 (d; $J = 2,4$ Hz; 1H).

^{13}C NMR (101 MHz, CDCl_3): 21,5; 21,5; 25,9; 27,6; 36,2; 51,5; 54,1; 55,1; 64,4; 68,1; [69,5 a 70,1]; [70,5 a 72,2]; [72,9 a 74,0]; [74,7 a 76,5]; [92,2 a 96,8]; 110,1; 111,4; 118,2; 118,6; 120,9; 124,1; 127,2; 136,1; [156,0 a 156,1]; 171,1; [172,5 a 172,5]; 194,2.

ESI MS: 628,2 ($[M + Na]^+$).

HR ESI MS: vypočteno pro $C_{27}H_{35}O_{11}N_5Na$ 628,22253; nalezeno 628,22192.

Methyl-(2*S*)-2-((2*S*)-3-(1*H*-indol-3-yl)-2-((((2*R*,3*S*,4*S*,5*R*)-3,4,5,6-tetrahydroxytetrahydro-2*H*-pyran-2-yl)methoxy)karbonyl)amino)propanamido)-6-diazo-5-oxohexanoát (70c)



Látka **69b** (75,0 mg; 96,9 μ mol; 1 ekv.) byla rozpuštěna v bezvodém MeOH (1,5 ml) pod inertní atmosférou dusíku. K reakční směsi byl přikapán čerstvě připravený roztok methanolátu sodného (2,62 mg; 48,5 μ mol; 0,5 ekv.) v bezvodém MeOH (350 μ l) a směs byla míchána po dobu 18 hodin za laboratorní teploty. Rozpouštědlo bylo odpařeno a odparek byl přečištěn sloupcovou chromatografií (mobilní fáze DCM/MeOH, 5:1) za zisku produktu **70c** (56 mg; 28 %) ve formě bezbarvé pevné látky.

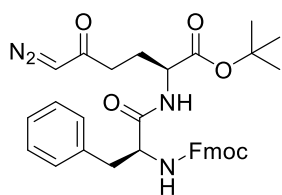
1H NMR (401 MHz, d_6 -DMSO): 1,71 – 1,87 (m; 1H); 1,89 – 2,09 (m; 1H); 2,27 – 2,42 (m; 2H); 2,85 – 3,14 (m; 4H); 3,32 (s; 3H); 3,68 – 3,90 (m; 2H); 4,09 – 4,36 (m; 4H); 4,59 – 4,76 (m; 1H); 4,84 – 5,06 (m; 3H); 5,24 (d; $J = 4,5$ Hz; 1H); 6,66 (bs; 1H); 6,95 – 7,00 (m; 1H); 7,06 (t; $J = 7,2$ Hz; 1H); 7,11 – 7,37 (m; 4H); 7,57 – 7,72 (m; 1H); 10,79 (s; 1H).

^{13}C NMR (101 MHz, d_6 -DMSO): 27,5; 36,3; 38,7; 48,6; 51,3; 55,2; 55,5; 70,2; 72,2; 72,9; 74,7; 76,4; 96,8; [110,1 a 110,2]; [111,3 a 111,3]; [118,2 a 118,2]; 118,6; [120,8 a 120,9]; [123,9 a 124,1]; [127,2 a 127,3]; [136,1 a 136,0]; [156,0 a 156,1]; 172,2; [173,2 a 173,3]; 207,6.

ESI MS: 600,3 ($[M + Na]^+$).

HR ESI MS: vypočteno pro $C_{25}H_{31}O_{11}N_5Na$ 600,19123; nalezeno 600,19014.

***t*-Butyl-(*S*)-2-((*S*)-2-((((9*H*-fluoren-9-yl)methoxy)karbonyl)amino)-3-fenylpropanamido)-6-diazo-5-oxohexanoát (74)**



Fmoc-L-Phe-OH (469 mg; 1,21 mmol; 1,1 ekv.) byl společně s HATU (460 mg; 1,21 mmol; 1,1 ekv.) suspendován v bezvodém DCM (10 ml) a reakční směs byla ochlazena na teplotu 0-5 °C a míchána pod inertní atmosférou dusíku. K této bezbarvé suspenzi byl přikapán DIEA (575 μ l; 3,30 mmol; 3 ekv.). Směs byla míchána 10 minut při stejné

teplotě a následně k ní byl přikapán roztok látky **45** (250 mg; 1,10 mmol; 1 ekv.) v bezvodém DCM (2 ml). Reakční směs byla míchána 30 minut při 0 °C a do druhého dne (16 h) při laboratorní teplotě. Směs byla naředěna DCM (50 ml), promyta 10% KHSO₄ (40 ml), dest. vodou (40 ml), nasyceným roztokem NaHCO₃ (40 ml), opět dest. vodou (40 ml), solankou (40 ml) a sušena bezvodým MgSO₄. Rozpouštědlo bylo odpařeno a směs byla přečištěna pomocí sloupcové chromatografie na silikagelu (mobilní fáze DCM/EtOAc, 3:1). Očekávaný produkt **74** (500 mg; 76 %) byl získán ve formě žluté pevné látky.

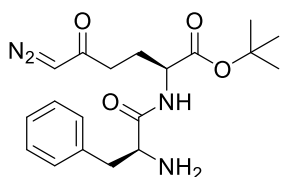
¹H NMR (401 MHz, *d*₆-DMSO): 1,40 (s; 9H); 1,76 – 1,87 (m; 1H); 1,93 – 2,06 (m; 1H); 2,35 – 2,43 (m; 2H); 2,79 (dd; *J* = 13,8; 10,9 Hz; 1H); 3,02 (dd; *J* = 13,8; 3,6 Hz; 1H); 4,05 – 4,21 (m; 4H); 4,29 (ddd; *J* = 10,9; 8,8; 3,6 Hz; 1H); 6,04 (bs; 1H); 7,15 – 7,22 (m; 1H); 7,22 – 7,44 (m; 8H); 7,63 (dd; *J* = 10,6; 7,5 Hz; 3H); 7,84 – 7,90 (m; 2H); 8,37 (d; *J* = 7,5 Hz; 1H).

¹³C NMR (101 MHz, *d*₆-DMSO): 26,0; 27,6 (3C); 36,3; 37,4; 46,5; 52,1; 55,9; 56,6; 65,6; 80,7; 120,1 (2C); 125,3 (2C); 126,4; 127,0 (2C); 127,6 (2C); 128,0 (2C); 129,2 (2C); 138,1 (2C); 140,6; 143,7; 143,8; 155,8; 170,7; 171,8; 194,1.

ESI MS: 619,3 ([M + Na]⁺).

HR ESI MS: vypočteno pro C₃₄H₃₆O₆N₄Na 619,25271; nalezeno 619,25162.

***t*-Butyl-(*S*)-2-((*S*)-2-amino-3-fenylpropanamido)-6-diazo-5-oxohexanoát (**75**)**



Látka **74** (462 mg; 0,774 mmol; 1 ekv.) byla rozpuštěna v bezvodém DMF (4 ml) pod inertní atmosférou dusíku. Do reakční směsi byl přidán diethylamin (800 μl; 7,74 mmol; 10 ekv.) a směs byla míchána 2 hodiny při laboratorní teplotě.

Rozpouštědlo bylo odpařeno a odparek byl přečištěn sloupcovou chromatografií na silikagelu (mobilní fáze DCM/MeOH, 30:1) za zisku produktu **75** (277 mg; 96 %) ve formě žluté amorfnní látky.

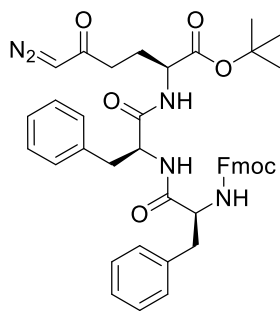
¹H NMR (401 MHz, *d*₆-DMSO): 1,40 (s; 9H); 1,71 (bs; 2H); 1,75 – 1,85 (m; 1H); 1,90 – 1,99 (m; 1H); 2,24 – 2,38 (m; 2H); 2,59 (dd; *J* = 13,4; 8,4 Hz; 1H); 2,95 (dd; *J* = 13,4; 4,5 Hz; 1H); 3,43 (dd; *J* = 8,4; 4,5 Hz; 1H); 4,07 – 4,17 (m; 1H); 6,05 (bs; 1H); 7,17 – 7,29 (m; 5H); 8,13 (d; *J* = 7,9 Hz; 1H).

^{13}C NMR (101 MHz, CDCl_3): 27,8; 28,1 (3C); 36,8; 41,1; 50,8; 54,8; 56,5; 82,5; 127,0; 128,8 (2C); 129,5 (2C); 137,8; 171,0; 174,4; 193,7.

ESI MS: 375,2 ($[\text{M} + \text{H}]^+$).

HR ESI MS: vypočteno pro $\text{C}_{19}\text{H}_{27}\text{O}_4\text{N}_4$ 375,20268; nalezeno 375,20248.

***t*-Butyl-(5*S*, 8*S*, 11*S*)-5,8-dibenzyl-11-(4-diazo-3-oxobutyl)-1-(9*H*-fluoren-9-yl)-3,6,9-trioxo-2-oxa-4,7,10-triazadodekan-12-oát (76)**



Fmoc-L-Phe-OH (273 mg; 0,705 mmol; 1,1 ekv.) byl společně s HATU (268 mg; 0,705 mmol; 1,1 ekv.) suspendován v bezvodém DCM (10 ml), reakční směs byla ochlazena na teplotu 0-5 °C a míchána pod inertní atmosférou dusíku. K této bezbarvé suspenzi byl přikapán DIEA (334 μl ; 1,92 mmol; 3 ekv.) a směs byla míchána 10 minut při stejné teplotě. Do reakční směsi byl přikapán

roztok látky **75** (240 mg; 0,640 mmol; 1 ekv.) v bezvodém DCM (2 ml) a vzniklý žlutý roztok byl míchán 30 minut při 0 °C a 1 hodinu při laboratorní teplotě. Reakční směs byla naředěna DCM (50 ml), promyta roztokem 10% KHSO_4 (40 ml), dest. vodou (40 ml), nasyceným roztokem NaHCO_3 (40 ml), opět dest. vodou (40 ml), solankou (40 ml) a sušena bezvodým MgSO_4 . Rozpouštědlo bylo odpařeno a odparek byl přečištěn sloupcovou chromatografií na silikagelu (mobilní fáze DCM/MeOH, 30:1) za zisku očekávaného produktu **76** (430 mg; 90 %) ve formě žluté pevné látky.

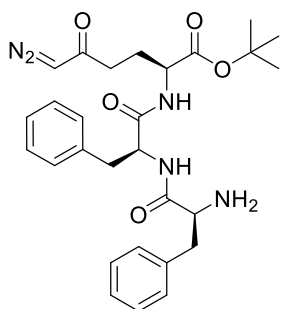
^1H NMR (401 MHz, d_6 -DMSO): 1,40 (s; 9H); 1,75 – 1,85 (m; 1H); 1,93 – 2,02 (m; 1H); 2,34 – 2,43 (m; 2H); 2,70 – 2,73 (m; 1H); 2,76 – 2,96 (m; 2H); 3,00 – 3,09 (m; 1H); 4,06 – 4,13 (m; 3H); 4,14 – 4,25 (m; 2H); 4,54 – 4,61 (m; 1H); 6,04 (bs; 1H); 7,12 – 7,19 (m; 2H); 7,20 – 7,33 (m; 10H); 7,38 – 7,43 (m; 2H); 7,54 (d; $J = 8,9$ Hz; 1H); 7,60 (t; $J = 8,0$ Hz; 2H); 7,83 – 7,90 (m; 2H); 8,12 (d; $J = 8,2$ Hz; 1H); 8,38 (d; $J = 7,5$ Hz; 1H).

^{13}C NMR (101 MHz, CDCl_3): 27,3; 27,9 (3C); 36,3; 37,9; 38,6; 47,0; 52,4; 54,4; 56,1; 67,2 (2C); 82,4; 120,0 (2C); 125,0; 125,1; 127,0; 127,1 (2C); 127,2; 127,8 (2C); 128,6 (2C); 128,8 (2C); 129,3 (2C); 129,4 (2C); 136,1 (2C); 141,3 (2C); 143,6 (2C); 156,0; 170,1; 170,2; 170,6; 193,8.

ESI MS: 766,3 ($[\text{M} + \text{Na}]^+$).

HR ESI MS: vypočteno pro $\text{C}_{43}\text{H}_{45}\text{O}_7\text{N}_5\text{Na}$ 766,32112; nalezeno 766,32095.

***t*-Butyl-(*S*)-2-((*S*)-2-((*S*)-2-amino-3-fenylpropanamido)-3-fenylpropanamido)-6-diazo-5-oxohexanoát (77)**



Látka **76** (410 mg; 0,551 mmol; 1 ekv.) byla rozpuštěna v bezvodém DMF (5 ml) pod inertní atmosférou dusíku. K roztoku byl přidán diethylamin (570 μ l; 5,51 mmol; 10 ekv.) a reakční směs byla míchána 1 hodinu při laboratorní teplotě. Rozpouštědlo bylo odpařeno a směs byla přečištěna sloupcovou chromatografií na silikagelu (mobilní fáze DCM/MeOH, 30:1) za zisku produktu

77 (240 mg; 84 %) ve formě žluté pevné látky.

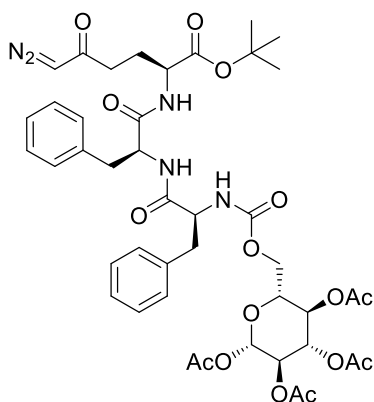
^1H NMR (401 MHz, d_6 -DMSO): 1,41 (s; 9H); 1,64 (bs; 2H); 1,74 – 1,84 (m; 1H); 1,92 – 2,00 (m; 1H); 2,33 – 2,40 (m; 2H); 2,66 – 2,73 (m; 1H); 2,79 – 2,92 (m; 3H); 3,00 (dd; $J = 13,8$; 4,5 Hz; 1H); 4,09 – 4,14 (m; 1H); 4,58 – 4,63 (m; 1H); 6,06 (bs; 1H); 7,12 – 7,27 (m; 10H); 8,04 (d; $J = 8,6$ Hz; 1H); 8,41 (d; $J = 7,6$ Hz; 1H).

^{13}C NMR (101 MHz, CDCl_3): 26,4; 27,5 (3C); 37,9; 39,0; 41,8; 52,3; 54,8; 56,5; 74,5; 82,5; 126,5; 127,5; 128,1; 128,3; 128,7; 129,2; 129,5 (2C); 129,8; 130,3; 136,7; 137,8; 170,4; 170,9; 174,6; 193,8.

ESI MS: 522,3 ($[\text{M} + \text{H}]^+$).

HR ESI MS: vypočteno pro $\text{C}_{28}\text{H}_{36}\text{O}_5\text{N}_5$ 522,27110; nalezeno 522,27060.

(2*R*,3*R*,4*S*,5*R*,6*R*)-6-((5*S*,8*S*,11*S*)-5,8-Dibenzyl-11-(4-diazo-3-oxobutyl)-14,14-dimethyl-3,6,9,12-tetraoxo-2,13-dioxa-4,7,10-triazapentadecyl)tetrahydro-2*H*-pyran-2,3,4,5-tetrayl tetraacetát (78)



Látky **77** (100 mg; 0,192 mmol; 1 ekv.) a **71** (103 mg; 0,211 mmol; 1,1 ekv.) byly rozpuštěny v bezvodém DCM (2 ml) pod inertní atmosférou dusíku. Reakční směs byla míchána přes noc (20 h) při laboratorní teplotě. Rozpouštědlo bylo odpařeno a směs byla přečištěna sloupcovou chromatografií na silikagelu (mobilní fáze DCM/MeOH, 50:1) za zisku očekávaného produktu **78** (165 mg; 96 %) ve formě žluté pevné látky.

^1H NMR (401 MHz, d_6 -DMSO): 1,40 (s; 9H); 1,73 – 1,83 (m; 1H); 1,91 – 2,08 (m; 13H); 2,34 – 2,42 (m; 2H); 2,61 – 2,74 (m; 2H); 2,78 – 2,90 (m; 2H); 3,04 (dd; $J = 14,0$; 4,3 Hz;

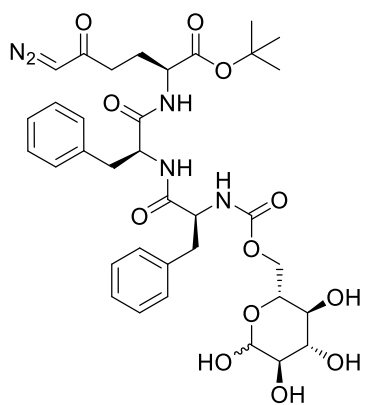
1H); 3,90 (d; $J = 3,9$ Hz; 2H); 4,05 – 4,17 (m; 3H); 4,49 – 4,58 (m; 1H); 4,85 – 4,97 (m; 2H); 5,37 – 5,50 (m; 1H); 6,03 (bs; 1H); 7,13 – 7,31 (m; 10H); 7,45 (d; $J = 8,5$; 1H); 8,09 (d; $J = 8,2$ Hz; 1H); 8,36 (d; $J = 7,7$ Hz; 1H).

^{13}C NMR (101 MHz, CDCl_3): 20,7 (3C); 21,0; 25,5; 27,5; 28,1 (3C); 36,4; 37,6; 52,4; 54,7; 56,4; 62,7; 67,8; 68,4; 70,3; 72,8; 72,9; 82,5; 91,9; 127,1; 127,3; 128,7 (2C); 129,0 (2C); 129,3 (2C); 129,4 (2C); 136,2; 136,6; 155,4; 169,2; 169,4; 169,7; 170,2; 170,3; 170,4; 170,6; 194,0.

ESI MS: 918,3 ($[\text{M} + \text{Na}]^+$).

HR ESI MS: vypočteno pro $\text{C}_{43}\text{H}_{53}\text{O}_{16}\text{N}_5\text{Na}$ 918,33795; nalezeno 918,33653.

***t*-Butyl-(5*S*,8*S*,11*S*)-5,8-dibenzyl-11-(4-diazo-3-oxobutyl)-3,6,9-trioxo-1-((2*R*,3*S*,4*S*,5*R*)-3,4,5,6-tetrahydroxytetrahydro-2*H*-pyran-2-yl)-2-oxa-4,7,10-triazadodekan-12-oát (79)**



Látka **78** (75,0 mg; 0,084 mmol; 1 ekv.) byla rozpuštěna v bezvodém MeOH (1,5 ml) pod inertní atmosférou dusíku. K reakční směsi byl přikapán čerstvě připravený roztok methanolátu sodného (0,450 mg; 8,40 μmol ; 0,1 ekv.) v MeOH (64 μl) a směs byla míchána 1 hodinu při laboratorní teplotě. Rozpouštědlo bylo odpařeno a odparek byl přečištěn sloupcovou chromatografií na silikagelu (mobilní fáze DCM/MeOH, 5:1) za zisku produktu **79**

(55 mg; 90 %) ve formě žluté amorfni látky.

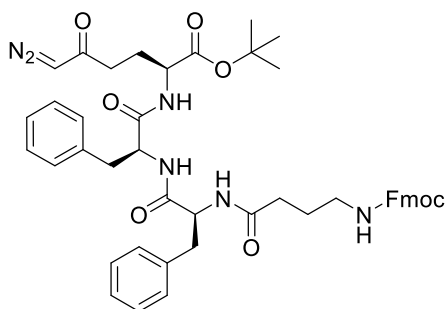
^1H NMR (401 MHz, d_6 -DMSO): 1,40 (s; 9H); 1,74 – 1,84 (m; 1H); 1,92 – 2,02 (m; 1H); 2,33 – 2,43 (m; 2H); 2,59 – 2,70 (m; 1H); 2,79 – 2,91 (m; 2H); 2,94 – 3,20 (m; 5H); 3,67 – 3,87 (m; 1H); 4,07 – 4,29 (m; 4H); 4,50 – 4,73 (m; 2H); 4,86 – 5,04 (m; 2H); 6,04 (bs; 1H); 6,46 (dd; $J = 130,0$; 5,7 Hz; 1H); 7,15 – 7,35 (m; 11H); 8,08 – 8,13 (m; 1H); 8,37 (d; $J = 7,6$ Hz; 1H).

^{13}C NMR (101 MHz, CDCl_3): 27,1; 27,8 (3C); 29,6; 36,4; 37,6; 52,3; 54,2; 56,4; 64,6; 69,3; 70,5; 72,1; 73,4; 73,9; 82,5; 92,3; 126,9; 127,0; 128,4 (2C); 128,6 (2C); 129,0 (2C); 129,2 (2C); 136,2; 136,3; 156,5; 170,4; 171,1; 171,9; 194,1.

ESI MS: 750,3 ($[\text{M} + \text{Na}]^+$).

HR ESI MS: vypočteno pro $\text{C}_{35}\text{H}_{45}\text{O}_{12}\text{N}_5\text{Na}$ 750,29569; nalezeno 750,29488.

***t*-Butyl-(10*S*,13*S*,16*S*)-10,13-dibenzyl-16-(4-diazo-3-oxobutyl)-1-(9*H*-fluoren-9-yl)-3,8,11,14-tetraoxo-2-oxa-4,9,12,15-tetraazaheptadekan-17-oát (80)**



4-(Fmoc-amino)butanová kyselina (41,0 mg; 0,127 mmol; 1,1 ekv.) a HATU (48,0 mg; 0,127 mmol; 1,1 ekv.) byly suspendovány v bezvodém DMF (1 ml), reakční směs byla ochlazena na teplotu 0-5 °C a míchána pod inertní atmosférou dusíku. Do reakční směsi byly postupně

přikapány DIEA (60 µl; 0,345 mmol; 3 ekv.) za postupného rozpuštění suspenze a po 10 minutách míchání také roztok látky **77** (60 mg; 0,115 mmol; 1 ekv.) v bezvodém DMF (2 ml). Směs byla míchána 30 minut při 0 °C a 15 hodin při laboratorní teplotě. Rozpouštědlo bylo odpařeno a odparek byl rozpuštěn v DCM (50 ml) s přidavkem *i*PrOH (1 ml). Organická fáze byla promyta 10% KHSO₄ (30 ml), dest. vodou (30 ml), nasyceným roztokem NaHCO₃ (30 ml), opět dest. vodou (30 ml), solankou (30 ml) a sušena bezvodým MgSO₄. Rozpouštědlo bylo odpařeno a směs byla přečištěna sloupcovou chromatografií na silikagelu (mobilní fáze DCM/MeOH, 30:1) za zisku produktu **80** (80 mg; 84 %) ve formě světle žluté pevné látky.

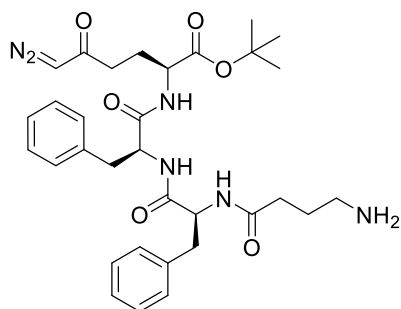
¹H NMR (401 MHz, *d*₆-DMSO): 1,40 (s; 9H); 1,74 – 1,87 (m; 1H); 1,90 – 2,04 (m; 3H); 2,30 – 2,42 (m; 2H); 2,58 – 2,75 (m; 3H); 2,78 – 2,98 (m; 4H); 3,00 – 3,11 (m; 1H); 4,00 – 4,34 (m; 4H); 4,41 – 4,60 (m; 2H); 6,04 (bs; 1H); 7,06 – 7,29 (m; 10H); 7,30 – 7,36 (m; 2H); 7,37 – 7,45 (m; 2H); 7,64 – 7,73 (m; 2H); 7,83 – 7,92 (m; 2H); 7,93 – 7,98 (m; 1H); 8,04 – 8,11 (m; 1H); 8,20 – 8,25 (m; 1H); 8,29 – 8,36 (m; 1H).

¹³C NMR (101 MHz, *d*₆-DMSO): 26,3; 26,5; 28,0 (3C); 32,6 (2C); 37,3; 37,4 (2C); 38,2; 51,9; 52,0; 53,5; 53,7; 81,2; 110,2; 120,5 (2C); 121,8 (2C); 126,6; 126,8; 127,7 (2C); 128,4 (2C); 128,5 (2C); 129,4 (2C); 129,5 (2C); 129,7 (2C); 137,9; 138,1 (2C); 138,4; 139,9; 143,0; 171,1 (2C); 171,5; 171,7; 172,2; 193,9.

ESI MS: 851,4 ([M + Na]⁺).

HR ESI MS: vypočteno pro C₄₇H₅₂O₈N₆Na 851,37388; nalezeno 851,37332.

***t*-Butyl-(*S*)-2-((*S*)-2-((*S*)-2-(4-aminobutanamido)-3-fenylpropanamido)-3-fenylpropanamido)-6-diazo-5-oxohexanoát (**81**)**



Látka **80** (80 mg; 96,5 μ mol; 1 ekv.) byla rozpuštěna v bezvodém DMF (1 ml) pod inertní atmosférou dusíku. Ke vzniklému roztoku byl přidán diethylamin (100 μ l; 0,965 mmol; 10 ekv.) a reakční směs byla míchána 3 hodiny při laboratorní teplotě. Rozpouštědlo bylo odpařeno a odparek byl přečištěn sloupcovou

chromatografií na silikagelu (mobilní fáze DCM/MeOH, 5:1 + 1 % Et₃N) za zisku očekávaného produktu **81** (36 mg; 52 %) ve formě žluté amorfnní látky.

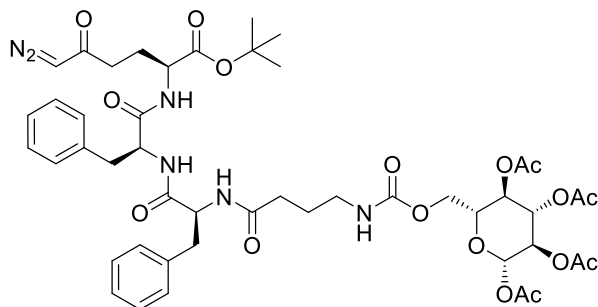
¹H NMR (401 MHz, *d*₆-DMSO): 1,40 (s; 9H); 1,75 – 1,84 (m; 1H); 1,91 – 2,03 (m; 3H); 2,34 – 2,37 (m; 2H); 2,42 (q; *J* = 7,1 Hz; 4H); 2,61 – 2,67 (m; 1H); 2,79 – 2,96 (m; 2H); 3,02 – 3,07 (m; 1H); 3,32 (bs; 2H); 4,09 – 4,15 (m; 1H); 4,43 – 4,48 (m; 1H); 4,52 – 4,58 (m; 1H); 6,05 (bs; 1H); 7,15 – 7,26 (m; 10H); 7,95 (d; *J* = 8,5 Hz; 1H); 8,05 (d; *J* = 8,3 Hz; 1H); 8,33 (d; *J* = 7,6 Hz; 1H).

¹³C NMR (101 MHz, *d*₆-DMSO): 26,1; 27,6 (3C); 28,4; 32,7; 37,4; 37,5; 40,7; 45,7; 52,0; 53,6; 53,8; 69,8; 80,7; 126,1; 126,3; 127,9 (2C); 128,0 (2C); 129,1 (2C); 129,2 (2C); 137,6; 138,0; 170,7; 171,1; 171,3; 172,0; 194,0.

ESI MS: 629,3 ([M + Na]⁺).

HR ESI MS: vypočteno pro C₃₂H₄₂O₆N₆Na 629,30580; nalezeno 629,30555.

(2*R*,3*R*,4*S*,5*R*,6*R*)-6-((10*S*,13*S*,16*S*)-10,13-Dibenzyl-16-(4-diazo-3-oxobutyl)-19,19-dimethyl-3,8,11,14,17-pentaoxo-2,18-dioxa-4,9,12,15-tetraazaikosyl)tetrahydro-2*H*-pyran-2,3,4,5-tetrayl tetraacetát (82**)**



Látky **81** (32 mg; 0,053 mmol; 1 ekv.) a **77** (28 mg; 0,058 mmol; 1,1 ekv.) byly rozpuštěny v bezvodém DMF (1 ml) pod inertní atmosférou dusíku. Reakční směs byla míchána přes noc (17 h) při laboratorní teplotě. Rozpouštědlo bylo

odpařeno a směs byla přečištěna sloupcovou chromatografií na silikagelu (mobilní fáze DCM/MeOH, 30:1) za zisku produktu **82** (48 mg; 92 %) ve formě pevné žluté látky.

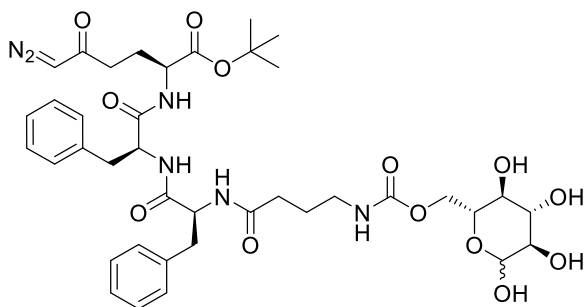
¹H NMR (501 MHz, CDCl₃): 1,31 (t; *J* = 6,3 Hz; 12 H); 1,44 (s; 9H); 1,67 – 1,73 (m; 2H); 1,87 – 1,94 (m; 2H); 2,10 – 2,16 (m; 2H); 2,35 – 2,41 (m; 2H); 2,90 – 2,94 (m; 2H); 3,02 – 3,15 (m; 4H); 4,10 – 4,26 (m; 3H); 4,33 – 4,37 (m; 1H); 4,50 – 4,54 (m; 1H); 4,57 – 4,62 (m; 1H); 4,88 – 4,97 (m; 2H); 5,26 (m; 1H); 5,42 (bs; 1H); 6,49 (d; *J* = 6,9 Hz; 1H); 6,73 (d; *J* = 7,8 Hz; 1H); 6,86 – 6,92 (m; 1H); 7,12 – 7,28 (m; 11H).

¹³C NMR (126 MHz, CDCl₃): 21,8 (4C); 25,7; 27,8; 28,1 (3C); 30,7; 32,5; 37,2; 37,4; 38,6; 39,4; 52,5; 54,7; 55,2; 62,1; 73,0; 73,1; 73,4; 73,5; 82,4; 91,9; 127,0; 127,2; 128,7 (2C); 128,8 (2C); 129,2 (2C); 129,4 (2C); 136,8; 136,9; 169,2; 169,4; 170,0; 170,2; 170,4; 170,6; 171,2; 172,2; 173,2; 194,3.

ESI MS: 1003,4 ([M + Na]⁺).

HR ESI MS: vypočteno pro C₄₇H₆₀O₁₇N₆Na 1003,39072; nalezeno 1003,39061.

***t*-Butyl-(10*S*,13*S*,16*S*)-10,13-dibenzyl-16-(4-diazo-3-oxobutyl)-3,8,11,14-tetraoxo-1-((2*R*,3*S*,4*S*,5*R*)-3,4,5,6-tetrahydroxytetrahydro-2*H*-pyran-2-yl)-2-oxa-4,9,12,15-tetraazaheptadekan-17-oát (**83**)**



Látka **82** (45 mg; 0,046 mmol; 1 ekv.) byla rozpuštěna v bezvodém MeOH (1 ml) pod inertní atmosférou dusíku. K reakční směsi byl přikapán čerstvě připravený roztok methanolátu sodného (1,24 mg; 22,9 μmol; 0,5 ekv.) v MeOH (180 μl) a

směs byla míchána přes noc (24 h) při laboratorní teplotě. Rozpouštědlo bylo odpařeno a odparek byl přečištěn sloupcovou chromatografií na silikagelu (mobilní fáze DCM/MeOH, 5:1) za zisku očekávaného produktu **83** (20 mg; 54 %) ve formě světle žluté pevné látky.

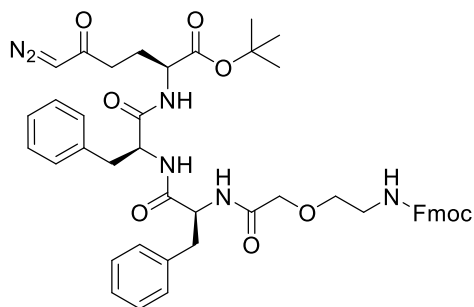
¹H NMR (401 MHz, MeOD): 1,47 (s; 9H); 1,58 – 1,66 (m; 2H); 1,84 – 1,90 (m; 1H); 2,09 – 2,19 (m; 3H); 2,40 (m; 2H); 2,72 – 2,81 (2H); 2,93 – 3,01 (m; 2H); 3,70 – 3,75 (m; 2H); 3,91 – 3,97 (m; 1H); 4,15 – 4,21 (m; 1H); 4,24 – 4,30 (m; 2H); 4,34 – 4,39 (m; 1H); 4,45 – 4,49 (m; 1H); 4,51 – 4,57 (m; 1H); 4,59 – 4,64 (m; 2H); 4,84 (bs; 1H); 5,06 – 5,10 (m; 1H); 7,14 – 7,28 (m; 10H).

¹³C NMR (101 MHz, MeOD): 27,1; 27,8; 28,0 (3C); 33,6 (2C); 38,5; 40,9; 53,8; 56,3; 65,1; 65,3; 73,1; 73,8; 74,7; 75,8; 76,3; 77,9; 94,0; 98,2; 127,7; 127,8; 129,4 (2C); 129,5 (2C); 130,2 (2C); 130,4 (2C); 138,3; 138,5; 172,0; 173,3; 173,6; 175,5 (2C); 193,1.

ESI MS: 835,4 ($[M + Na]^+$).

HR ESI MS: vypočteno pro $C_{39}H_{52}O_{13}N_6Na$ 835,34846; nalezeno 835,34836.

***t*-Butyl-(11*S*,14*S*,17*S*)-11,14-dibenzyl-17-(4-diazo-3-oxobutyl)-1-(9*H*-fluoren-9-yl)-3,9,12,15-tetraoxo-2,7-dioxa-4,10,13,16-tetraazaoktadekan-18-oát (84)**



5-(Fmoc-amino)-3-oxopentanová kyselina (72 mg; 0,211 mmol; 1,1 ekv.) byla společně s HATU (80 mg; 0,211 mmol; 1,1 ekv.) suspendována v bezvodém DMF (2 ml), suspenze byla ochlazena na teplotu 0-5 °C a míchána pod inertní atmosférou dusíku. K reakční směsi byl přidán DIEA (100 μ l;

0,576 mmol; 3 ekv.) a po 10 minutách míchání byl přikapán roztok látky **77** (100 mg; 0,192 mmol; 1ekv.) v bezvodém DMF (1 ml). Směs byla míchána 30 minut při 0 °C a přes noc (16 h) při laboratorní teplotě. Rozpouštědlo bylo odpařeno a odparek byl přečištěn sloupcovou chromatografií na silikagelu (mobilní fáze DCM/MeOH, 30:1) za zisku produktu **84** (150 mg; 93 %) ve formě světle žluté pevné látky.

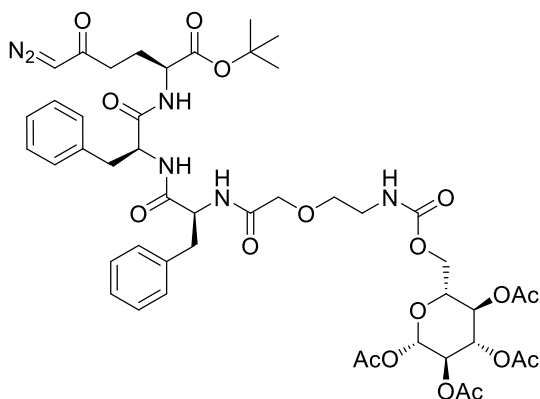
1H NMR (401 MHz, $CDCl_3$): 1,44 (s; 9H); 1,86 – 1,95 (m; 1H); 2,06 – 2,15 (m; 1H); 2,18 – 2,37 (m; 2H); 3,01 – 3,06 (m; 3H); 3,28 – 3,33 (m; 2H); 3,39 – 3,44 (m; 2H); 3,82 (s; 2H); 4,20 – 4,25 (m; 1H); 4,32 – 4,37 (m; 1H); 4,46 – 4,49 (m; 2H); 4,55 – 4,62 (m; 2H); 5,08 – 5,13 (m; 1H); 5,27 (bs; 1H); 6,50 (d; $J = 7,7$ Hz; 1H); 6,57 (d; $J = 7,6$ Hz; 1H); 6,85 (d; $J = 7,3$ Hz; 1H); 7,06 – 7,08 (m; 2H); 7,14 – 7,23 (m; 8H); 7,29 – 7,34 (m; 2H); 7,38 – 7,42 (m; 2H); 7,59 – 7,62 (m; 2H); 7,75 – 7,78 (m; 2H); 8,00 – 8,03 (m; 1H).

^{13}C NMR (101 MHz, $CDCl_3$): 26,1; 27,2; 27,9 (3C); 37,0; 37,6; 38,6; 40,8; 47,3; 52,4; 53,9; 54,4; 66,7; 70,2; 70,7; 82,4; 119,9; 120,0; 125,0 (2C); 126,9; 127,1 (2C); 127,2; 127,7 (2C); 128,5 (2C); 128,8 (2C); 129,3 (2C); 129,3 (2C); 136,2 (2C); 136,3 (2C); 141,4; 143,9 (2C); 156,6; 169,9; 170,2; 170,5; 194,0.

ESI MS: 867,4 ($[M + Na]^+$).

HR ESI MS: vypočteno pro $C_{47}H_{52}O_9N_6Na$ 867,36880; nalezeno 867,36865.

(2*R*,3*R*,4*S*,5*R*,6*R*)-6-((11*S*,14*S*,17*S*)-11,14-Dibenzyl-17-(4-diazo-3-oxobutyl)-20,20-dimethyl-3,9,12,15,18-pentaoxo-2,7,19-trioxo-4,10,13,16-tetraazahenikosyl)tetrahydro-2*H*-pyran-2,3,4,5-tetrayl tetraacetát (86)



Látka **84** (50 mg; 0,059 mmol; 1 ekv.) byla rozpuštěna v bezvodém DMF (1 ml) pod inertní atmosférou dusíku. K roztoku byl přidán diethylamin (612 μ l; 5,92 mmol; 100 ekv.) a reakční směs byla míchána 3 hodiny při laboratorní teplotě. Rozpouštědlo a přebytek sekundárního aminu byly odpařeny. Vzniklý intermediát byl společně s látkou **71**

(44 mg; 0,089 mmol; 1,5 ekv.) rozpuštěn v bezvodém DCM (1 ml) pod inertní atmosférou dusíku a směs byla míchána 1 hodinu při laboratorní teplotě. DCM byl odpařen a surová směs byla přečištěna sloupcovou chromatografií na silikagelu (mobilní fáze DCM/MeOH, 30:1) za zisku očekávaného produktu **86** (27 mg; 46 %) ve formě žluté pevné látky.

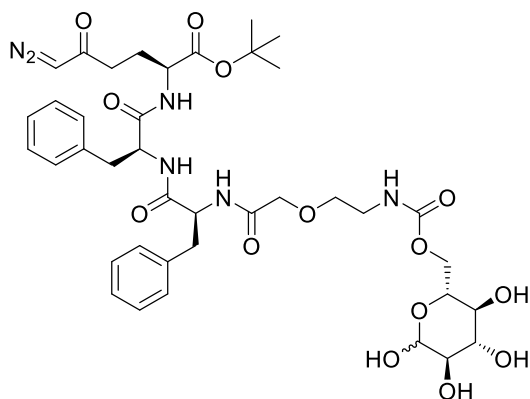
¹H NMR (401 MHz, *d*₆-DMSO): 1,40 (s; 9H); 1,76 – 1,85 (m; 1H); 1,93 – 2,04 (m; 13H); 2,32 – 2,39 (m; 2H); 2,77 – 2,85 (m; 2H); 3,07 – 3,09 (m; 2H); 3,21 – 3,29 (m; 2H); 3,41 – 3,47 (m; 2H); 3,66 – 3,80 (m; 2H); 3,98 – 4,19 (m; 4H); 4,51 – 4,60 (m; 2H); 4,89 – 4,96 (m; 2H); 5,44 (t; *J* = 9,6 Hz; 1H); 5,96 (d; *J* = 8,3 Hz; 1H); 6,04 (s; 1H); 7,15 – 7,28 (m; 10H); 7,37 (t; *J* = 5,7 Hz; 1H); 7,67 (d; *J* = 8,8 Hz; 1H); 8,22 (d; *J* = 8,2 Hz; 1H); 8,37 (d; *J* = 7,5 Hz; 1H).

¹³C NMR (101 MHz, *d*₆-DMSO): 20,3 (2C); 20,4 (2C); 25,3; 26,1; 27,6 (3C); 35,8; 37,3; 37,5; 46,5; 52,1; 53,1; 53,6; 61,9; 67,9; 69,5 (2C); 70,0; 71,9; 80,8; 90,7; 119,8; 125,4; 126,2; 126,3; 126,6; 127,0; 128,0 (2C); 129,2 (2C); 137,6 (2C); 155,73, 168,7; 168,8; 169,1; 169,2; 169,5 (2C); 170,7 (2C); 171,1; 194,1.

ESI MS: 1019,4 ([M + Na]⁺).

HR ESI MS: vypočteno pro C₄₇H₆₀O₁₈N₆Na 1019,38563; nalezeno 1019,38539.

***t*-Butyl-(11*S*,14*S*,17*S*)-11,14-dibenzyl-17-(4-diazo-3-oxobutyl)-3,9,12,15-tetraoxo-1-((2*R*,3*S*,4*S*,5*R*)-3,4,5,6-tetrahydroxytetrahydro-2*H*-pyran-2-yl)-2,7-dioxa-4,10,13,16-tetraazaoktadekan-18-oát (87)**



Látka **86** (27 mg; 0,027 mmol; 1 ekv.) byla rozpuštěna v bezvodém MeOH (0,5 ml) pod inertní atmosférou dusíku. K reakční směsi byl přikapán roztok methanolátu sodného (0,15 mg; 2,70 μmol; 0,1 ekv.) v MeOH (22 μl) a směs byla míchána 30 minut při laboratorní teplotě. Rozpouštědlo bylo odpařeno a odparek byl přečištěn sloupcovou chromatografií

na silikagelu (mobilní fáze DCM/MeOH, 5:1) za zisku produktu **87** (15 mg; 68 %) ve formě bílé pevné látky.

¹H NMR (401 MHz, *d*₆-DMSO): 1,40 (s; 9H); 1,76 – 1,85 (m; 1H); 1,93 – 2,02 (m; 1H); 2,31 – 2,43 (m; 2H); 2,76 – 2,84 (m; 2H); 2,87 – 3,00 (m; 2H); 3,02 – 3,07 (m; 2H); 3,08 – 3,14 (m; 2H); 3,24 – 3,31 (m; 4H); 3,67 – 3,80 (m; 2H); 3,89 – 4,01 (m; 1H); 4,10 – 4,15 (m; 1H); 4,24 – 4,32 (m; 1H); 4,51 – 4,59 (m; 2H); 4,74 (d; *J* = 4,7 Hz; 1H); 4,88 – 4,91 (m; 1H); 4,94 (d; *J* = 4,6 Hz; 1H); 4,98 (d; *J* = 5,6 Hz; 1H); 5,05 (d; *J* = 5,4 Hz; 1H); 6,05 (bs; 1H); 6,64 (d; *J* = 6,6 Hz; 1H); 7,16 – 7,27 (m; 10H); 7,67 – 7,70 (m; 1H); 8,23 (d; *J* = 8,3 Hz; 1H); 8,37 (d; *J* = 7,5 Hz; 1H).

¹³C NMR (101 MHz, CDCl₃): 22,9; 27,6; 28,1 (3C); 29,8; 37,7; 38,3; 52,5; 53,7; 54,1; 54,6; 63,7; 64,1; 70,7; 72,3; 73,6; 74,4; 74,8; 82,5; 95,9; 127,0; 127,2; 128,5 (2C); 128,8 (2C); 129,4 (2C); 129,6 (2C); 136,4; 136,6; 157,4; 170,5; 170,6; 170,7; 170,9; 194,6.

ESI MS: 851,3 ([M + Na]⁺).

HR ESI MS: vypočteno pro C₃₉H₅₂O₁₄N₆Na 851,34337; nalezeno 851,34308.

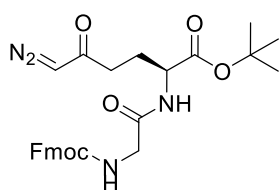
5.2.4 Proléčiva DONu obsahující arekaidin

Obecný postup pro přípravu derivátů 93a a 93c

Fmoc-AMK-OH (1 mmol; 1 ekv.) a HATU (418 mg; 1,1 mmol; 1,1 ekv.) byly suspendovány v bezvodém DCM (10 ml) a reakční směs byla ochlazená na teplotu 0-5 °C. Poté byl přikapán DIEA (388 mg; 522 μl; 3 mmol; 3 ekv.) a po 5 minutách nakonec i roztok sloučeniny **45** (227 mg; 1 mmol; 1 ekv.) v bezvodém DCM (3 ml). Reakční směs

byla míchána 30 minut za chlazení při stejné teplotě a poté ještě 90 minut při laboratorní teplotě. Byl přidán DCM (60 ml) a organická fáze byla promyta postupně nasyceným roztokem NaHCO₃ (40 ml), dest. H₂O (40 ml), 10% KHSO₄ (40 ml), opět dest. H₂O (40 ml) a solankou (40 ml) a sušena bezvodým MgSO₄. DCM byl odpařen. Surový produkt byl přečištěn pomocí sloupcové chromatografie na silikagelu (různé mobilní fáze) za zisku pevných světle žlutých produktů.

***t*-Butyl-(*S*)-2-(2-(((9*H*-fluoren-9-yl)methoxy)karbonyl)amino)acetamido)-6-diazo-5-oxohexanoát (93a)**



Fmoc-Gly-OH (297 mg); mobilní fáze: EtOAc; světle žlutá pevná látka (466 mg; 92 %).

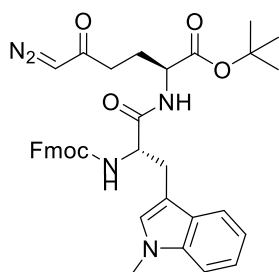
¹H NMR (401 MHz, CDCl₃): 1,46 (s; 9H); 1,92 – 2,05 (m; 1H); 2,15 – 2,26 (m; 1H); 2,28 – 2,48 (m; 2H); 3,84 – 3,98 (m; 2H); 4,24 (t; *J* = 7,1 Hz; 1H); 4,39 – 4,44 (m; 2H); 4,48 (td; *J* = 8,1; 4,5 Hz; 1H); 5,26 (bs; 1H); 5,47 (bs; 1H); 6,79 (d; *J* = 7,9 Hz; 1H); 7,31 (td; *J* = 7,5; 1,1 Hz; 2H); 7,40 (t; *J* = 7,4 Hz; 2H); 7,60 (d; *J* = 7,4 Hz; 2H); 7,76 (d; *J* = 7,5 Hz; 2H).

¹³C NMR (101 MHz, CDCl₃): 27,3; 28,0 (3C); 36,5; 44,4; 47,1; 52,4; 54,9; 67,3; 82,6; 120,0 (2C); 125,2 (2C); 127,1 (2C); 127,8 (2C); 141,3; 141,3; 143,8; 143,8; 156,7; 169,2; 170,8; 193,9.

ESI MS: 529,2 ([M + Na]⁺).

HR ESI MS: vypočteno pro C₂₇H₃₀O₆N₄Na 529,20576; nalezeno 529,20604.

***t*-Butyl-(*S*)-2-((*S*)-2-(((9*H*-fluoren-9-yl)methoxy)karbonyl)amino)-3-(1-methyl-1*H*-indol-3-yl)propanamido)-6-diazo-5-oxohexanoát (93c)**



Fmoc-L-Trp(*N*-Me)-OH (441 mg); mobilní fáze: DCM/EtOAc, 3:1; světle žlutá pevná látka (546 mg; 84 %).

¹H NMR (401 MHz, CDCl₃): 1,45 (s; 9H); 1,83 – 1,96 (m; 1H); 2,08 – 2,17 (m; 2H); 2,18 – 2,28 (m; 1H); 3,18 (dd; *J* = 14,6; 7,1 Hz; 1H); 3,34 – 3,47 (m; 1H); 3,76 (s; 3H); 4,23 (t; *J* = 7,1 Hz; 1H); 4,33 – 4,43 (m; 2H); 4,47 (dd; *J* = 10,5; 7,3 Hz; 1H); 5,06 (bs; 1H); 5,52 (d; *J* = 7,7 Hz; 1H); 6,57 (d; *J* = 7,3 Hz; 1H); 6,94 (s; 1H); 7,15 (t; *J* = 7,2 Hz; 1H); 7,23 – 7,28 (m; 2H); 7,29 – 7,33 (m; 2H); 7,34 (dd; *J* = 3,1; 1,1 Hz; 1H); 7,43 (t;

$J = 7,8$ Hz; 2H); 7,59 (t; $J = 7,2$ Hz; 2H); 7,71 (d; $J = 7,4$ Hz; 1H); 7,79 (d; $J = 7,5$ Hz; 2H).

^{13}C NMR (101 MHz, CDCl_3): 27,4; 28,1 (3C); 28,4; 32,8; 36,3; 47,3; 52,6; 54,7; 55,6; 67,2; 82,5; 108,6; 109,4; 119,1; 119,5; 120,1; 120,1; 122,0; 125,3; 125,3; 127,2 (2C); 127,8 (2C); 128,0; 128,3; 137,2; 141,4 (2C); 143,9; 144,0; 156,1; 170,5; 171,3; 193,8.

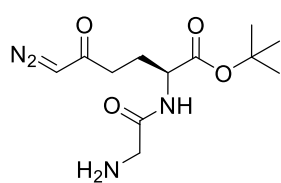
ESI MS: 672,3 ($[\text{M} + \text{Na}]^+$).

HR ESI MS: vypočteno pro $\text{C}_{37}\text{H}_{39}\text{O}_6\text{N}_5\text{Na}$ 672,27926; nalezeno 672,27867.

Obecný postup pro přípravu derivátů 94a a 94c

Sloučenina **93a** nebo **93c** (700 μmol ; 1 ekv.) byla rozpuštěna v bezvodém DCM (3 ml) pod inertní atmosférou dusíku. Poté byl do směsi přikapán diethylamin (512 mg; 724 μl ; 7,00 mmol; 10 ekv.) a reakční směs byla míchána po dobu 3 hodin za laboratorní teploty. DCM a přebytek aminu byly odpařeny a surový produkt byl přečištěn pomocí sloupcové chromatografie na silikagelu (různé mobilní fáze).

***t*-Butyl-(*S*)-2-(2-aminoacetamido)-6-diazo-5-oxohexanoát (94a)**



93a (355 mg); mobilní fáze: DCM/MeOH, 15:1; žlutá olejovitá látka (179 mg; 90 %).

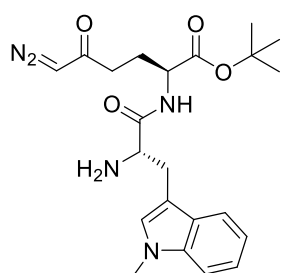
^1H NMR (401 MHz, CDCl_3): 1,43 (s; 9H); 1,73 (bs; 2H); 1,90 – 2,01 (m; 1H); 2,12 – 2,22 (m; 1H); 2,26 – 2,48 (m; 2H); 3,34 (s; 2H); 4,47 (td; $J = 8,4$; 4,7 Hz; 1H); 5,31 (bs; 1H); 7,75 (d; $J = 8,4$ Hz; 1H).

^{13}C NMR (101 MHz, CDCl_3): 28,0; 28,0 (3C); 36,8; 44,8; 51,9; 54,8; 82,5; 171,0; 172,9; 193,9.

ESI MS: 307,1 ($[\text{M} + \text{Na}]^+$).

HR ESI MS: vypočteno pro $\text{C}_{12}\text{H}_{20}\text{O}_4\text{N}_4\text{Na}$ 307,13768; nalezeno 307,13744.

***t*-Butyl-(*S*)-2-((*S*)-2-amino-3-(1-methyl-1*H*-indol-3-yl)propanamido)-6-diazo-5-oxohexanoát (94c)**



93c (455 mg); mobilní fáze: DCM/MeOH, 30:1; žlutá olejovitá látka (287 mg; 96 %).

^1H NMR (401 MHz, CDCl_3): 1,46 (s; 9H); 1,55 (bs; 2H); 1,86 – 1,99 (m; 1H); 2,06 – 2,35 (m; 3H); 2,98 (dd; $J = 14,4$; 8,5 Hz; 1H);

3,31 (dd; $J = 14,4; 3,3$ Hz; 1H); 3,72 (dd; $J = 8,6; 4,1$ Hz; 1H); 3,76 (s; 3H); 4,40 – 4,52 (m; 1H); 5,12 (bs; 1H); 6,94 (s; 1H); 7,12 (ddd; $J = 8,0; 6,9; 1,1$ Hz; 1H); 7,23 (ddd; $J = 8,2; 6,9; 1,1$ Hz; 1H); 7,29 (dt; $J = 8,2; 1,0$ Hz; 1H); 7,68 (dt; $J = 8,0; 1,0$ Hz; 1H); 7,87 (d; $J = 8,4$ Hz; 1H).

^{13}C NMR (101 MHz, CDCl_3): 28,0; 28,1 (3C); 30,8; 32,8; 36,8; 52,0; 54,7; 55,6; 82,4; 109,4; 110,1 (2C); 119,3; 119,4; 122,0; 128,1; 137,3; 171,2; 174,9; 193,9.

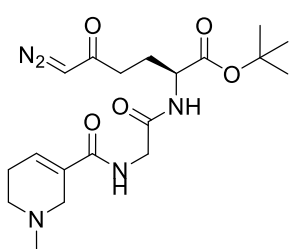
ESI MS: 450,2 ($[\text{M} + \text{Na}]^+$).

HR ESI MS: vypočteno pro $\text{C}_{22}\text{H}_{29}\text{O}_4\text{N}_5\text{Na}$ 450,21118; nalezeno 450,21112.

Obecný postup pro přípravu derivátů 95a-c

Arekaidin hydrochlorid (39 mg; 0,22 mmol; 1,1 ekv.) a HATU (91 mg; 0,24 mmol; 1,2 ekv.) byly suspendovány v bezvodém DMF (3 ml) a reakční směs byla ochlazená na teplotu 0-5 °C. Poté byl přikapán DIEA (103 mg; 139 μl ; 0,8 mmol; 4 ekv.) a po 5 minutách nakonec i roztok sloučeniny **94a**, **94c** nebo **75** (200 μmol ; 1 ekv.) v bezvodém DMF (1,5 ml). Reakční směs byla míchána 30 minut za chlazení při stejné teplotě a poté ještě 150 minut při laboratorní teplotě. DMF bylo odpařeno a odparek byl rozpuštěn v EtOAc (50 ml) a organická fáze byla promyta postupně nasyceným roztokem NaHCO_3 (30 ml) a solankou (30 ml) a poté sušena bezvodým MgSO_4 . EtOAc byl odpařen. Surový produkt byl přečištěn pomocí sloupcové chromatografie na silikagelu (různé mobilní fáze).

***t*-Butyl-(*S*)-6-diazo-2-(2-(1-methyl-1,2,5,6-tetrahydropyridine-3-**



karboxamido)acetamido)-5-oxohexanoát (95a)

94a (57 mg); mobilní fáze: DCM/MeOH, 15:1 + 1% Et_3N ; světle žlutá amorfnní látka (38 mg; 46 %).

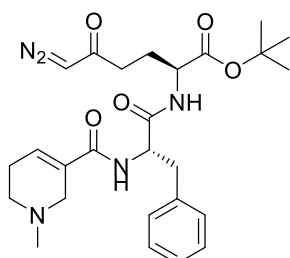
^1H NMR (401 MHz, CDCl_3): 1,44 (s; 9H); 1,89 – 2,01 (m; 1H); 2,11 – 2,21 (m; 1H); 2,29 – 2,45 (m; 2H); 2,45 – 2,52 (m; 2H); 2,60 (s; 3H); 2,86 (t; $J = 5,9$ Hz; 2H); 3,52 (q; $J = 2,4$ Hz; 2H); 3,97 (d; $J = 5,3$ Hz; 2H); 4,42 (td; $J = 8,1; 4,6$ Hz; 1H); 5,36 (bs; 1H); 6,66 (p; $J = 2,1$ Hz; 1H); 7,15 (t; $J = 5,3$ Hz; 1H); 7,24 (s; 1H).

^{13}C NMR (101 MHz, CDCl_3): 24,3; 27,2; 28,1 (3C); 36,5; 43,2; 43,9; 49,8; 51,8; 52,6; 55,1; 82,6; 129,9; 130,6; 166,4; 169,1; 170,8; 194,2.

ESI MS: 430,2 ($[M + Na]^+$).

HR ESI MS: vypočteno pro $C_{19}H_{29}O_5N_5Na$ 430,20609; nalezeno 430,20583.

***t*-Butyl-(2*S*)-6-diazo-2-((*S*)-2-(1-methyl-1,2,5,6-tetrahydropyridine-3-karboxamido)-3-fenylpropanamido)-5-oxohexanoát (95b)**



95 (75 mg); mobilní fáze: DCM/MeOH, 30:1 + 1% Et_3N ; světle žlutá amorfnní látka (69 mg; 69 %).

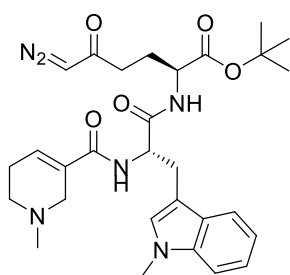
1H NMR (401 MHz, $CDCl_3$): 1,45 (s; 9H); 1,85 – 1,98 (m; 1H); 2,08 – 2,18 (m; 1H); 2,26 – 2,36 (m; 4H); 2,38 (s; 3H); 2,47 (q; $J = 5,7$ Hz; 2H); 3,05 (dq; $J = 15,9$; 2,6 Hz; 1H); 3,10 (d; $J = 6,6$ Hz; 2H); 3,15 (dq; $J = 16,1$; 2,5 Hz; 1H); 4,35 (td; $J = 7,8$; 4,7 Hz; 1H); 4,73 (q; $J = 6,6$ Hz; 1H), 5,28 (bs; 1H); 6,29 (d; $J = 7,6$ Hz; 1H); 6,50 (dt; $J = 3,9$; 2,0 Hz; 1H); 6,74 (d; $J = 7,3$ Hz; 1H); 7,16 – 7,22 (m; 2H); 7,22 – 7,29 (m; 3H).

^{13}C NMR (101 MHz, $CDCl_3$): 26,4; 27,3; 28,1 (3C); 36,4; 38,3; 45,9; 51,0; 52,6; 53,4; 54,2; 54,9; 82,6; 127,1; 128,7 (2C); 129,5 (2C); 131,3; 132,3; 136,4; 166,6; 170,4; 170,9; 193,9.

ESI MS: 520,3 ($[M + Na]^+$).

HR ESI MS: vypočteno pro $C_{26}H_{35}O_5N_5Na$ 520,25304; nalezeno 520,25305.

***t*-Butyl-(*S*)-6-diazo-2-((*S*)-2-(1-methyl-1,2,5,6-tetrahydropyridine-3-karboxamido)-3-(1-methyl-1*H*-indol-3-yl)propanamido)-5-oxohexanoát (95c)**



94c (86 mg); mobilní fáze: DCM/MeOH, 30:1 + 1% Et_3N ; světle žlutá amorfnní látka (99 mg; 90 %).

1H NMR (401 MHz, $CDCl_3$): 1,42 (s; 9H); 1,79 – 1,92 (m; 1H); 2,02 – 2,18 (m; 2H); 2,21 – 2,30 (m; 3H); 2,34 (s; 3H); 2,38 – 2,50 (m; 2H); 2,98 – 3,11 (m; 2H); 3,15 (dd; $J = 14,6$; 7,3 Hz; 1H); 3,35 (dd; $J = 14,6$; 5,1 Hz; 1H); 3,71 (s; 3H); 4,32 (td; $J = 7,9$; 4,4 Hz; 1H); 4,78 (td; $J = 7,3$; 5,1 Hz; 1H); 5,16 (bs; 1H); 6,42 (d; $J = 7,4$ Hz; 1H); 6,48 (tt; $J = 3,9$; 1,9 Hz; 1H); 6,67 (d; $J = 7,4$ Hz; 1H); 6,94 (s; 1H); 7,08 (ddd; $J = 8,0$; 6,9; 1,1 Hz; 1H); 7,19 (ddd; $J = 8,2$; 6,9; 1,2 Hz; 1H); 7,26 (d; $J = 8,1$ Hz; 1H); 7,66 (dt; $J = 7,9$; 1,0 Hz; 1H).

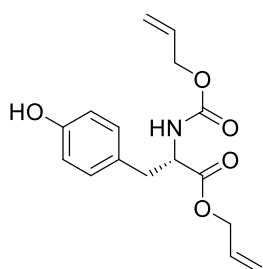
^{13}C NMR (101 MHz, CDCl_3): 26,3; 27,2; 28,0 (3C); 28,1; 32,7; 36,3; 45,8; 50,9; 52,6; 53,4; 53,8; 54,7; 82,3; 108,7; 109,4; 119,1; 119,3; 121,9; 128,1; 128,4; 131,4; 132,1; 137,1; 166,5; 170,5; 171,4; 193,8.

ESI MS: 573,3 ($[\text{M} + \text{Na}]^+$).

HR ESI MS: vypočteno pro $\text{C}_{29}\text{H}_{38}\text{O}_5\text{N}_6\text{Na}$ 573,27959; nalezeno 573,27861.

5.2.5 Proléčiva DONu cílená na přenašeč LAT1

Allyl ((allyloxy)karbonyl)-L-tyrosinát (**98**)⁽⁹⁵⁾

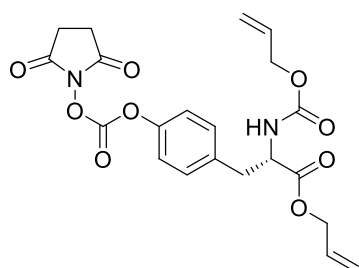


Allyl ester *L*-tyrosinu (sůl kyseliny *p*-toluensulfonové) (1,70 g; 4,32 mmol; 1 ekv.) byl rozpuštěn ve směsi THF/ H_2O 1:1 (15+15 ml), poté byl přidán hydrogenuhličitan sodný (1,08 g; 13,0 mmol; 3 ekv.) a na závěr allyl chloroformiát (780 mg; 680 μl ; 6,50 mmol; 1,5 ekv.). Reakční směs byla míchána po dobu 18 hodin

za laboratorní teploty. THF byl odpařen, k odparku byl přidán EtOAc (50 ml) a organická fáze byla promyta 1M HCl (50 ml), sušena bezvodým MgSO_4 a poté byl EtOAc odpařen. Surový produkt byl přečištěn pomocí sloupcové chromatografie na silikagelu (mobilní fáze cyklohexan/EtOAc, 4:1) za zisku bezbarvé krystalické látky (1,10 g; 83 %).

^1H NMR (401 MHz, CDCl_3): 2,96 – 3,12 (m; 2H); 4,56 (dt; $J = 5,6; 1,5$ Hz; 2H); 4,61 (dt; $J = 5,9; 1,3$ Hz; 2H); 4,61 – 4,66 (m; 1H); 5,01 (bs; 1H); 5,17 (bs; 1H); 5,18 – 5,36 (m; 4H); 5,88 (ddt; $J = 17,2; 10,4; 5,9$ Hz; 2H); 6,70 – 6,77 (m; 2H), 6,96 – 7,03 (m; 2H).

Allyl-(*S*)-2-(((allyloxy)karbonyl)amino)-3-(4-(((2,5-dioxopyrrolidin-1-yl)oxy)karbonyl)oxy)fenyl)propanoát (**99**)



Látka **98** (910 mg; 2,98 mmol; 1 ekv.) byla rozpuštěna v bezvodém DCM (25 ml) a reakční směs byla ochlazena na teplotu 0-5 °C. Poté byl přikapán triethylamin (603 mg; 831 μl ; 5,96 mmol; 2 ekv.) a po deseti minutách byl přisypán *N,N*-disuccinimidyl karbonát (1,14 g; 4,47 mmol; 1,5 ekv.).

Reakční směs byla míchána 30 minut při 0 °C a poté ještě 2 hodiny při laboratorní teplotě. Poté byl přidán další DCM (50 ml) a organická fáze byla promyta 10% KHSO_4 (40 ml), sušena bezvodým MgSO_4 a rozpouštědlo bylo odpařeno. Surový produkt **99** ve formě pevné bílé látky (1,10 g; 83 %) byl použit do následujícího kroku bez dalšího čištění.

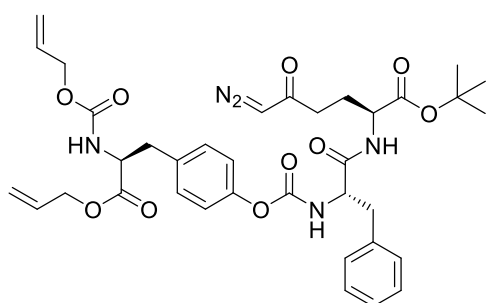
¹H NMR (401 MHz, CDCl₃): 2,87 (s; 4H); 3,04 – 3,20 (m; 2H), 4,56 (d; *J* = 5,7 Hz; 2H); 4,60 (dt; *J* = 5,9; 1,3 Hz; 2H); 4,66 (dd; *J* = 7,9; 5,8 Hz; 1H); 5,17 – 5,34 (m; 5H); 5,76 – 5,97 (m; 2H); 7,15 – 7,23 (m, 4H).

¹³C NMR (101 MHz, CDCl₃): 25,5 (2C); 37,5; 54,7; 65,9; 66,2; 117,9; 119,3; 120,4 (2C); 121,0; 130,5; 130,7 (2C); 135,0; 149,8; 150,2; 155,7; 168,8; 168,9; 171,2.

ESI MS: 469,1 ([M + Na]⁺).

HR ESI MS: vypočteno pro C₂₁H₂₂O₉N₂Na 469,12168; nalezeno 469,12175.

***t*-Butyl-(2*S*)-2-((2*S*)-2-(((4-((*S*)-3-(allyloxy)-2-(((allyloxy)karbonyl)amino)-3oxopropyl)fenoxy)karbonyl)amino)-3-fenylpropanamido)-6-diazo-5-oxohexanoát (100)**



Látky **99** (262 mg; 0,588 mmol; 1,1 ekv.) a **45** (200 mg; 0,534 mmol; 1 ekv.) byly rozpuštěny v bezvodém DCM (10 ml), poté byl přidán triethylamin (108 mg; 150 μl; 1,07 mmol; 2 ekv.) a reakční směs byla míchána po dobu 18 hodin pod inertní atmosférou dusíku za laboratorní

teploty. Poté byl přidán další DCM (50 ml) a organická fáze byla promyta nasyceným roztokem NH₄Cl (30 ml), sušena bezvodým MgSO₄ a rozpouštědlo bylo odpařeno. Surový produkt byl přečištěn sloupcovou chromatografií na silikagelu (mobilní fáze DCM/MeOH, 25:1) za zisku produktu **100** (306 mg; 81 %) ve formě světle žluté pevné látky.

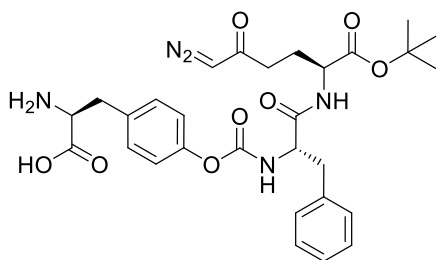
¹H NMR (401 MHz, CDCl₃): 1,44 (s; 9H); 1,87 – 2,01 (m; 1H); 2,07 – 2,21 (m; 1H); 2,22 – 2,43 (m; 2H); 2,98 – 3,21 (m; 4H); 4,34 – 4,50 (m; 2H); 4,54 (dt; *J* = 5,6; 1,4 Hz; 2H); 4,59 (dt; *J* = 5,9; 1,4 Hz; 2H); 4,61 – 4,71 (m; 1H); 5,15 – 5,35 (m; 5H); 5,74 (bs; 1H); 5,79 – 5,93 (m; 2H); 6,71 (bs; 1H); 6,98 (d; *J* = 8,2 Hz; 2H); 7,09 (d; *J* = 8,2 Hz; 2H); 7,15 – 7,40 (m; 6H).

¹³C NMR (101 MHz, CDCl₃): 27,3; 28,0 (3C); 36,2; 37,5; 38,5; 52,5; 54,8; 54,9; 56,3; 65,9; 66,1; 80,6; 117,9; 119,2; 121,6; 127,2; 128,7 (2C); 129,4 (2C); 130,2 (2C); 131,3 (2C); 132,5; 132,9; 136,1; 150,0; 154,1; 155,5; 170,4; 170,5; 171,2; 193,9.

ESI MS: 728,3 ([M + Na]⁺).

HR ESI MS: vypočteno pro C₃₆H₄₃O₁₀N₅Na 728,29021; nalezeno 728,28983.

(S)-2-Amino-3-(4((((S)-1(((S)-1(*t*-butoxy)-6-diazo-1,5-dioxohexan-2-yl)amino)-1-oxo-3-fenylpropan-2-yl)karbamoyl)oxy)fenyl)propanová kyselina (101)



Sloučenina **100** (200 mg; 0,283 mmol; 1 ekv.) byla rozpuštěna v bezvodém DMF (12 ml) a poté byly do reakční směsi přidány postupně fenylsilan (306 mg; 349 μ l; 2,83 mmol; 10 ekv.) a Pd(PPh₃)₄ (32,7 mg; 28,3 μ mol; 0,1 ekv.). Reakční směs byla míchána

po dobu 60 minut pod inertní atmosférou dusíku za laboratorní teploty. DMF byl odpařen a směs byla přečištěna pomocí preparativního HPLC (acetonitril/H₂O; 0,1 % HCOOH), frakce obsahující produkt byly spojeny a lyofilizovány a produkt **101** (33 mg; 20 %) byl získán ve formě bezbarvé pevné látky.

¹H NMR (401 MHz, *d*₆-DMSO): 1,40 (s; 9H); 1,76 – 1,88 (m; 1H); 1,92 – 2,02 (m; 1H); 2,31 – 2,42 (m; 2H); 2,73 – 2,87 (m; 2H); 3,07 (ddd; *J* = 13,3; 8,8; 4,1 Hz; 2H); 4,13 (td; *J* = 8,5; 5,4 Hz; 2H); 4,26 – 4,35 (m; 2H); 6,06 (bs; 1H); 6,84 (d; *J* = 8,5 Hz; 2H); 7,22 (dd; *J* = 16,8; 8,0 Hz; 4H); 7,33 (dt; *J* = 14,6; 7,6 Hz; 5H); 7,95 (d; *J* = 8,7 Hz; 1H); 8,43 (d; *J* = 7,5 Hz; 1H).

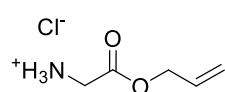
¹³C NMR (101 MHz, CDCl₃): 26,0; 27,7 (3C); 36,2; 37,5; 52,2; 54,6; 55,4; 56,2; 67,4; 80,8; 121,3 (2C); 126,4; 128,2 (2C); 129,3 (2C); 130,2 (2C); 134,2; 138,1; 149,6; 154,4; 169,0; 170,8; 171,6; 190,3.

ESI MS: 604,2 ([M + Na]⁺).

HR ESI MS: vypočteno pro C₂₉H₃₅O₈N₅Na 604,23778; nalezeno 604,23825.

5.2.6 Proléčiva DONu obsahující biotin

Allyl-glycinát hydrochlorid (105)



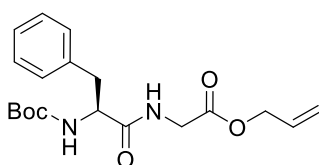
Boc-Gly-OH (15,0 g; 87,6 mmol; 1 ekv.) a hydrogenuhličitan sodný (18,4 g; 219 mmol; 2,5 ekv.) byly suspendovány v bezvodém DMF

(180 ml). Poté byl přidán allyl bromid (53,0 g; 38 ml; 438 mmol; 5 ekv.) a vzniklá reakční směs byla po dobu 18 hodin zahřívána na teplotu 50 °C. DMF byl odpařen a získaný odparek byl suspendován v Et₂O (180 ml), pevná látka byla odfiltrována a důkladně promyta dalším Et₂O (2×50 ml). Spojené organické frakce byly promyty nasyceným roztokem NaCl (2×25 ml), sušeny MgSO₄ a rozpouštědlo bylo odpařeno. Získaný meziprodukt allyl (*t*-butoxykarbonyl)glycinát **104** (18,5 g; 98 %) byl rozpuštěn ve 4M

roztoku HCl v dioxanu (90 ml) a za mírně exotermického průběhu byla reakce míchána po dobu 30 minut. Dioxan byl odpařen a získaný surový produkt byl suspendován v Et₂O (100 ml), sonikován po dobu 10 minut a poté míchán dalších 20 minut za chlazení na teplotu 0-5°C. Pevná látka byla poté zfiltrována, promyta Et₂O (20 ml) a sušena za vakua přes noc. Produkt byl izolován ve formě hydrochloridu **105** (11,2 g; 84 %) jako bezbarvá pevná látka.

¹H NMR (401 MHz, *d*₆-DMSO): 3,82 (s; 2H); 4,68 (dt; *J* = 5,4; 1,5 Hz; 2H); 5,26 (dq; *J* = 10,5; 1,5 Hz; 1H); 5,38 (dq; *J* = 17,3; 1,5 Hz; 1H); 5,93 (ddt; *J* = 17,2; 10,7; 5,4 Hz; 1H); 8,55 (s; 3H).

Allyl-(*t*-butoxykarbonyl)-L-fenylalanylglycinát (**106**)



Boc-L-Phe-OH (1,93 g; 7,26 mmol; 1,1 ekv.) a HATU (2,88 g; 7,59 mmol; 1,15 ekv.) byly rozpuštěny v bezvodém DMF (20 ml) pod inertní atmosférou dusíku. Reakční směs byla ochlazená na 0-5 °C a poté byl přikapán DIEA (3,41 g; 4,6 ml; 26,4 mmol; 4 ekv.). Po 5 minutách byl přidán roztok látky **105** (1,00 g; 6,60 mmol; 1 ekv.) v bezvodém DMF (5 ml). Reakční směs byla míchána 30 minut při stejné teplotě a poté 90 minut při laboratorní teplotě. DMF byl odpařen, odparek byl znovu rozpuštěn v EtOAc (250 ml) a postupně promyt nasyceným roztokem NaHCO₃ (100 ml), dest. H₂O (100 ml), 10% KHSO₄ (100 ml), opět dest. H₂O (100 ml) a solankou (100 ml). Organický podíl byl sušen bezvodým MgSO₄ a rozpouštědlo bylo odpařeno. Produkt **106** byl získán ve formě světle žluté amorfnní látky (1,96 g; 82 %) a do dalšího kroku byl použit bez dalšího čištění.

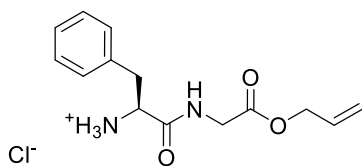
¹H NMR (401 MHz, CDCl₃): 1,39 (s; 9H); 3,04 (dd; *J* = 12,2; 7,5 Hz; 1H); 3,12 (dd; *J* = 13,9; 6,6 Hz; 1H); 3,95 (dd; *J* = 18,3; 4,8 Hz; 1H); 4,06 (dd; *J* = 18,3; 5,5 Hz; 1H); 4,41 (bs; 1H); 4,62 (dt; *J* = 5,8; 1,4 Hz; 2H); 5,02 (bs; 1H); 5,26 (dq; *J* = 10,5; 1,3 Hz; 1H); 5,32 (dq; *J* = 17,3; 1,3 Hz; 1H); 5,89 (ddt; *J* = 17,2; 10,4; 5,8 Hz; 1H); 6,47 (t; *J* = 5,9 Hz; 1H); 7,18 – 7,25 (m; 3H); 7,27 – 7,32 (m; 2H).

¹³C NMR (101 MHz, CDCl₃): 28,4 (3C); 38,5; 41,4; 55,8; 66,2; 119,1; 127,1; 128,8 (2C); 129,4 (3C); 131,5; 136,7; 163,4; 169,3; 171,7.

ESI MS: 385,2 ([M + Na]⁺).

HR ESI MS: vypočteno pro C₁₉H₂₆O₅N₂Na 385,17339; nalezeno 385,17316.

Allyl-L-fenylalanylglycinát hydrochlorid (107)



Sloučenina **106** (1,96 g; 5,40 mmol; 1 ekv.) byla rozpuštěna v 4M roztoku HCl v dioxanu (10 ml) a vzniklá směs byla míchána po dobu 20 minut za laboratorní teploty. Dioxan a zbytek HCl byly odpařeny. Surový produkt byl suspendován v Et₂O (30 ml), sonikován po dobu 10 minut a poté míchán dalších 20 minut za chlazení na teplotu 0-5°C. Pevná látka byla poté zfiltrována, promyta Et₂O (10 ml) a sušena za vakua přes noc. Produkt **107** byl izolován ve formě hydrochloridu jako bezbarvá pevná látka (1,22 g; 76 %).

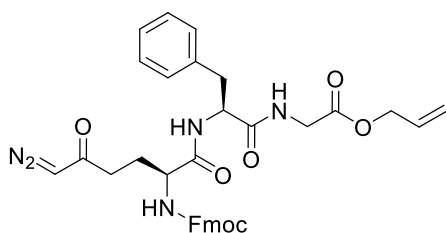
¹H NMR (401 MHz, *d*₆-DMSO): 3,03 (dd; *J* = 14,0; 7,3 Hz; 1H); 3,18 (dd; *J* = 14,1; 5,7 Hz; 1H); 3,93 (dd; *J* = 17,4; 5,7 Hz; 1H); 4,00 (dd; *J* = 17,4; 5,9 Hz; 1H); 4,11 (t; *J* = 6,6 Hz; 1H); 4,60 (dt; *J* = 5,4; 1,6 Hz; 2H); 5,23 (dq; *J* = 10,5; 1,5 Hz; 1H); 5,34 (dq; *J* = 17,3; 1,5 Hz; 1H); 5,91 (ddt; *J* = 17,2; 10,6; 5,4 Hz; 1H); 7,20 – 7,39 (m; 5H); 8,36 (bs; 3H); 9,23 (t; *J* = 5,8 Hz; 1H).

¹³C NMR (101 MHz, *d*₆-DMSO): 36,8; 40,7; 53,2; 64,9; 118,0; 127,1; 128,4 (2C); 129,7 (2C); 132,3; 134,9; 168,6; 169,0.

ESI MS: 263,1 ([M + H]⁺).

HR ESI MS: vypočteno pro C₁₄H₁₉O₃N₂ 263,13902; nalezeno 263,13884.

Allyl-((*S*)-2-(((9*H*-fluoren-9-yl)methoxy)karbonyl)amino)-6-diazo-5-oxohexanoyl)-L-fenylalanylglycinát (108)



Fmoc-L-DON-OH (1,11 g; 2,83 mmol; 1,05 ekv.) a HATU (1,13 g; 2,96 mmol; 1,10 ekv.) byly rozpuštěny v bezvodém DMF (20 ml) pod inertní atmosférou dusíku. Reakční směs byla ochlazená na 0-5 °C a poté byl přikapán DIEA (1,39 g; 1,9 ml; 10,8 mmol; 4 ekv.). Po 5 minutách byl přidán roztok látky **107** (804 mg; 2,69 mmol; 1 ekv.) v bezvodém DMF (6 ml). Reakční směs byla míchána 30 minut při stejné teplotě a poté 150 minut při laboratorní teplotě. DMF byl odpařen, odparek byl znovu rozpuštěn v EtOAc (250 ml) a postupně promyt nasyceným roztokem NaHCO₃ (100 ml), dest. H₂O (100 ml), 10% KHSO₄ (100 ml), dest. H₂O (100 ml) a solankou (100 ml). Organický podíl byl sušen bezvodým MgSO₄ a rozpouštědlo bylo odpařeno. Surový produkt byl přečištěn pomocí

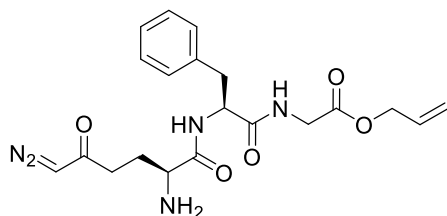
sloupcové chromatografie na silikagelu (mobilní fáze DCM/EtOAc, 1:1) za zisku světle žluté pevné látky **108** (1,57 g; 91 %).

¹H NMR (401 MHz, *d*₆-DMSO): 1,61 – 1,84 (m; 2H); 2,15 – 2,31 (m; 2H); 2,80 (dd; *J* = 13,8; 9,4 Hz; 1H); 3,02 (dd; *J* = 13,8; 4,5 Hz; 1H); 3,83 – 3,99 (m; 2H); 4,17 – 4,32 (m; 3H); 4,57 (dt; *J* = 5,5; 1,6 Hz; 3H); 5,21 (dq; *J* = 10,5; 1,5 Hz; 1H); 5,31 (dq; *J* = 17,2; 1,7 Hz; 1H); 5,82 – 5,94 (m; 1H); 5,96 (bs; 1H); 7,10 – 7,26 (m; 5H); 7,33 (t; *J* = 7,4 Hz; 2H); 7,42 (td; *J* = 7,5; 1,2 Hz; 2H); 7,46 (d; *J* = 8,2 Hz; 1H); 7,71 (dd; *J* = 7,6; 4,6 Hz; 2H); 7,89 (d; *J* = 7,5 Hz; 3H); 8,02 (d; *J* = 8,3 Hz; 1H); 8,53 (t; *J* = 5,9 Hz; 1H).

ESI MS: 660,3 ([M + Na]⁺).

HR ESI MS: vypočteno pro C₃₅H₃₅O₇N₅Na 660,24287; nalezeno 660,24213.

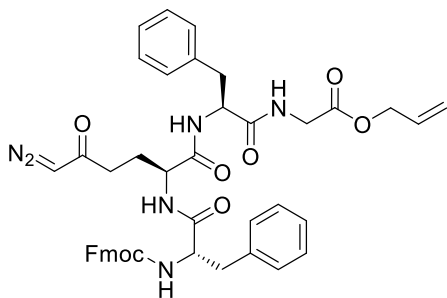
Allyl-((*S*)-2-amino-6-diazo-5-oxohexanoyl)-L-fenylalanylglycinát (**109**)



Sloučenina **108** (1,50 g; 2,35 mmol; 1 ekv.) byla rozpuštěna v bezvodém DCM (24 ml) a poté byl do reakce přikapán diethylamin (1,72 g; 2,4 ml; 23,5 mmol; 10 ekv.). Reakční směs byla míchána po dobu 2,5 hodin za laboratorní teploty pod inertní atmosférou dusíku. Rozpouštědlo a zbytek aminu byly odpařeny a surový produkt byl přečištěn pomocí sloupcové chromatografie na silikagelu (mobilní fáze DCM/MeOH, 15:1). Produkt **109** byl získán ve formě žluté amorfní látky (312 mg; 32 %) a z důvodu jeho značné nestability byl ihned použit do následujícího kroku.

¹H NMR (401 MHz, CDCl₃): 1,65 (bs; 2H); 1,77 – 1,93 (m; 2H); 2,12 – 2,25 (m; 2H); 3,02 (dd; *J* = 14,1; 8,9 Hz; 1H); 3,24 (dd; *J* = 14,1; 6,1 Hz; 1H); 3,41 (t; *J* = 6,2 Hz; 1H); 3,90 – 4,12 (m; 2H); 4,63 (dt; *J* = 5,8; 1,4 Hz; 2H); 4,67 (td; *J* = 8,7; 6,2 Hz; 1H); 5,17 (bs; 1H); 5,26 (dq; *J* = 10,4; 1,2 Hz; 1H); 5,32 (dq; *J* = 17,3; 1,2 Hz; 1H); 5,89 (ddt; *J* = 17,2; 10,4; 5,8 Hz; 1H); 6,66 (s; 1H); 7,16 – 7,36 (m; 5H); 7,73 (d; *J* = 8,2 Hz; 1H).

Allyl-((S)-2-(((S)-2-(((9H-fluoren-9-yl)methoxy)karbonyl)amino)-3-fenylpropanamido)-6-diazo-5-oxohexanoyl)-L-fenylalanyl-glycinát (110)



Fmoc-L-Phe-OH (308 mg; 0,794 mmol; 1,1 ekv.) a HATU (316 mg; 0,830 mmol; 1,15 ekv.) byly rozpuštěny v bezvodém DMF (12 ml) pod inertní atmosférou dusíku. Reakční směs byla ochlazena na 0 – 5 °C a poté byl přikapán DIEA (280 mg; 377 µl; 2,17 mmol; 3 ekv.). Po 5 minutách byl přidán

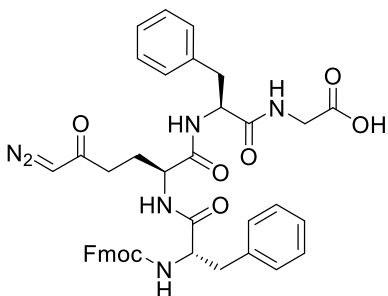
roztok látky **109** (300 mg; 722 µmol; 1 ekv.) v bezvodém DMF (5 ml). Reakční směs byla míchána 30 minut při stejné teplotě a poté 150 minut při laboratorní teplotě. DMF byl odpařen. Surový produkt byl přečištěn pomocí sloupcové chromatografie na silikagelu (mobilní fáze DCM/MeOH, 30:1) za zisku světle žluté pevné látky **110** (346 mg; 61 %).

¹H NMR (401 MHz, *d*₆-DMSO): 1,68 – 1,79 (m; 1H); 1,80 – 1,91 (m; 1H); 2,20 – 2,30 (m; 2H); 2,69 – 2,85 (m; 2H); 2,93 (dd; *J* = 13,9; 3,6 Hz; 1H); 3,04 (dd; *J* = 14,0; 4,6 Hz; 1H); 3,83 – 3,98 (m; 2H); 4,08 – 4,20 (m; 2H); 4,25 (q; *J* = 8,2 Hz; 2H); 4,52 – 4,62 (m; 3H); 5,21 (dq; *J* = 10,5; 1,4 Hz; 1H); 5,32 (dq; *J* = 17,3; 1,7 Hz; 1H); 5,90 (ddt; *J* = 17,2; 10,6; 5,4 Hz; 1H); 5,90 (bs; 1H); 7,11 – 7,34 (m; 13H); 7,40 (ddd; *J* = 8,7; 6,8; 1,7 Hz; 2H); 7,57 – 7,66 (m; 3H); 7,80 – 7,92 (m; 2H); 8,07 (t; *J* = 8,9 Hz; 2H); 8,51 (t; *J* = 5,9 Hz; 1H).

ESI MS: 807,2 ([M + Na]⁺).

HR ESI MS: vypočteno pro C₄₄H₄₄O₈N₆Na 807,31128; nalezeno 807,31059.

((S)-2-(((S)-2-(((9H-Fluoren-9-yl)methoxy)karbonyl)amino)-3-fenylpropanamido)-6-diazo-5-oxohexanoyl)-L-fenylalanyl-glycin (111)



Látka **110** (150 mg; 0,191 mmol; 1 ekv.) byla rozpuštěna ve směsi DCM/DMF 5:1 (10+2 ml). Fenylsilan (41 mg; 47 µl; 0,382 mmol; 2 ekv.) a následně Pd(PPh₃)₄ (2,2 mg; 2,00 µmol; 0,01 ekv.) byly přidány do reakční směsi a ta byla míchána po dobu 30 minut za laboratorní teploty. Rozpouštědla byla odpařena. Produkt **111** byl získán jako

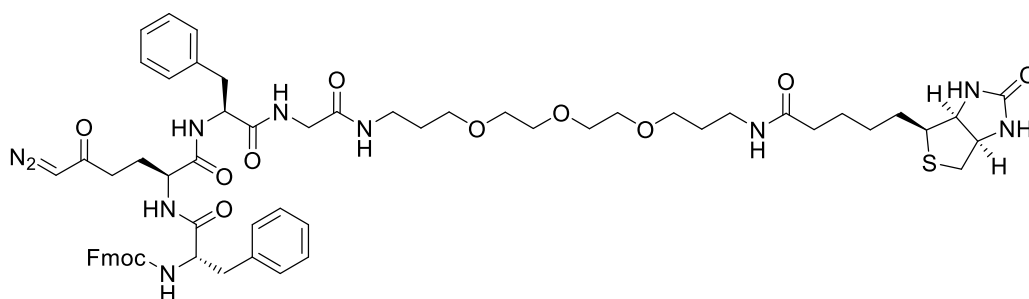
světle hnědá pevná látka v kvantitativním výtěžku (142 mg) a pro následující krok byl použit bez předchozího čištění.

$^1\text{H NMR}$ (401 MHz, d_6 -DMSO): 1,67 – 1,80 (m; 1H); 1,81 – 1,94 (m; 1H), 2,20 – 2,33 (m; 2H); 2,66 – 2,87 (m; 2H); 2,94 (dd; $J = 14,0; 3,3$ Hz; 1H); 3,06 (dd; $J = 13,9; 4,7$ Hz; 1H); 3,69 – 3,87 (m; 2H); 4,07 – 4,20 (m; 2H); 4,21 – 4,34 (m; 2H); 4,57 (dt; $J = 12,7; 4,5$ Hz; 2H); 5,93 (bs; 1H); 7,09 – 7,70 (m; 16H); 7,88 (d; $J = 7,6$ Hz; 2H); 8,05 (d; $J = 8,4$ Hz; 1H); 8,09 (d; $J = 7,8$ Hz; 1H); 8,30 – 8,36 (m; 1H); 12,62 (s; 1H).

ESI MS: 767,3 ($[\text{M} + \text{Na}]^+$).

HR ESI MS: vypočteno pro $\text{C}_{41}\text{H}_{39}\text{O}_8\text{N}_6$ 743,28349; nalezeno 743,28335.

(9H-Fluoren-9-yl)methyl-((2S,5S,8S)-8-benzyl-5-(4-diazo-3-oxobutyl)-3,6,9,12,28-pentaoxo-32-((3aS,4S,6aR)-2-oxohexahydro-1H-thieno[3,4-d]imidazol-4-yl)-1-fenyl-17,20,23-trioxa-4,7,10,13,27-pentaazadotriakontan-2-yl)karbamát (112)



Látka **111** (100 mg; 0,134 mmol; 1 ekv.) a HATU (56 mg; 0,148 mmol; 1,1 ekv.) byly rozpuštěny v bezvodém DMF (5 ml) a reakční směs byla ochlazená na teplotu 0-5 °C. Byl přidán DIEA (52 mg; 70 μl ; 0,403 mmol; 2 ekv.) a po 5 minutách byl přikápan roztok biotin-(PEG) $_4$ -NH $_2$ ·TFA (75 mg; 0,134 mmol; 1 ekv.) v bezvodém DMF (2,5 ml). Reakce byla míchána 30 minut při stejné teplotě a dalších 60 minut za laboratorní teploty pod inertní atmosférou dusíku. Reakční směs byla přečištěna na preparativním HPLC (acetonitril/H $_2$ O, 0,1 % HCOOH) a frakce obsahující produkt byly lyofilizovány. Očekávaný produkt **112** byl získán jako bezbarvá pevná látka (60 mg; 38 %).

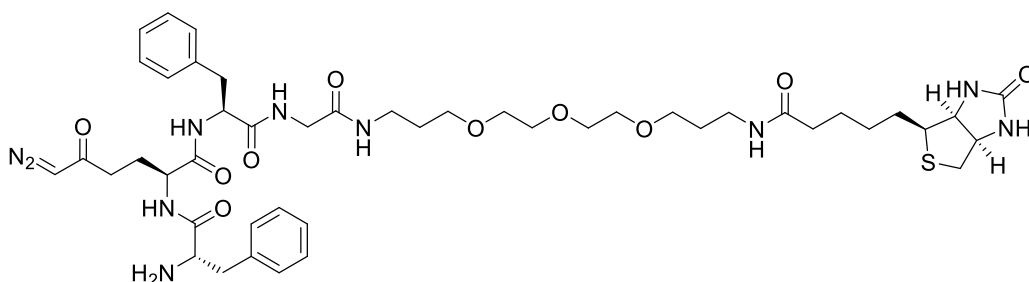
$^1\text{H NMR}$ (401 MHz, CDCl_3): 1,34 – 1,54 (m; 2H); 1,55 – 1,71 (m; 3H); 1,69 – 1,81 (m; 5H); 1,82 – 2,03 (m; 4H); 2,16 (t; $J = 7,5$ Hz; 2H); 2,26 – 2,50 (m; 1H); 2,66 (d; $J = 12,9$ Hz; 1H); 2,86 (dd; $J = 12,6; 5,0$ Hz; 1H); 2,90 – 3,02 (m; 2H); 3,08 – 3,16 (m; 2H); 3,25 – 3,38 (m; 6H); 3,45 – 3,66 (m; 12H); 3,81 – 3,98 (m; 2H); 4,13 – 4,21 (m; 1H); 4,21 – 4,27 (m; 1H); 4,28 – 4,34 (m; 1H); 4,34 – 4,42 (m; 1H); 4,41 – 4,49 (m; 1H); 4,58 – 4,66 (m; 1H); 5,30 (bs; 1H); 5,86 (bs; 1H); 6,39 (bs; 1H); 6,62 (d; $J = 13,2$ Hz; 1H); 6,71

(bs; 1H); 7,01 (t; $J = 6,0$ Hz; 1H); 7,08 – 7,35 (m; 12H); 7,39 (t; $J = 7,5$ Hz; 2H); 7,46 – 7,56 (m; 3H); 7,57 – 7,66 (m; 1H); 7,75 (d; $J = 7,6$ Hz; 2H); 8,26 (bs; 1H).

ESI MS: 1195,6 ($[M + Na]^+$).

HR ESI MS: vypočteno pro $C_{61}H_{76}O_{12}N_{10}NaS$ 1195,52571; nalezeno 1195,52608.

(S)-2-((S)-2-Amino-3-fenylpropanamido)-6-diazo-5-oxo-N-((S)-3,6,22-trioxo-26-((3a*S*,4*S*,6a*R*)-2-oxohexahydro-1*H*-thieno[3,4-*d*]imidazol-4-yl)-1-fenyl-11,14,17-trioxa-4,7,21-triazahexakosan-2-yl)hexanamid (113)



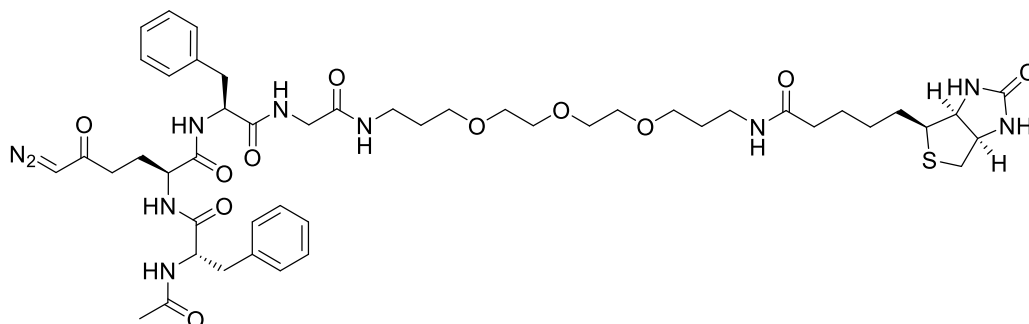
Látka **112** (60 mg; 0,051 mmol; 1 ekv.) byla rozpuštěna v bezvodém DMF (1 ml). Byl přidán diethylamin (112 mg; 158 μ l; 1,53 mmol; 30 ekv.) a reakční směs byla míchána po dobu 2,5 hodin za laboratorní teploty pod inertní atmosférou dusíku. DMF a přebytek aminu byly odpařeny. Surová reakční směs byla přečištěna na preparativním HPLC (acetonitril/ H_2O , 0,1 % $HCOOH$) a frakce obsahující produkt byly lyofilizovány. Očekávaný produkt **113** byl získán jako bezbarvá pevná látka (26 mg; 54 %).

1H NMR (401 MHz, d_6 -DMSO): 1,29 (tdd; $J = 16,0$; 10,8; 6,6 Hz; 2H); 1,48 (ddt; $J = 22,8$; 18,8; 7,8 Hz; 3H); 1,62 (dt; $J = 11,8$; 6,7 Hz; 5H); 1,72 (dq; $J = 13,5$; 7,8 Hz; 1H); 1,78 – 1,88 (m; 1H); 2,05 (t; $J = 7,6$ Hz; 2H); 2,16 – 2,24 (m; 2H); 2,50 – 2,53 (m; 2H); 2,56 – 2,69 (m; 3H); 2,79 – 2,86 (m; 2H); 2,94 (dd; $J = 13,6$; 4,3 Hz; 1H); 3,01 – 3,15 (m; 6H); 3,38 (td; $J = 6,4$; 2,4 Hz; 4H); 3,46 (dd; $J = 6,2$; 3,7 Hz; 4H); 3,51 (dd; $J = 5,7$; 3,3 Hz; 4H); 3,61 (dd; $J = 16,4$; 5,5 Hz; 1H); 3,71 (dd; $J = 16,4$; 6,0 Hz; 1H); 4,13 (ddd; $J = 7,7$; 4,4; 1,9 Hz; 1H); 4,22 – 4,28 (m; 1H); 4,27 – 4,34 (m; 1H); 4,48 (ddd; $J = 9,6$; 7,6; 4,9 Hz; 1H); 5,99 (bs; 1H); 6,37 (bs; 1H); 6,43 (bs; 1H); 7,16 – 7,22 (m; 4H); 7,23 – 7,28 (m; 6H); 7,68 (t; $J = 5,7$ Hz; 1H); 7,75 (t; $J = 5,6$ Hz; 1H); 8,05 (s; 1H); 8,26 (d; $J = 7,5$ Hz; 1H); 8,29 (t; $J = 5,7$ Hz; 1H).

ESI MS: 973,5 ($[M + Na]^+$).

HR ESI MS: vypočteno pro $C_{46}H_{66}O_{10}N_{10}NaS$ 973,45763; nalezeno 973,45745.

(S)-2-((S)-2-Acetamido-3-fenylpropanamido)-6-diazo-5-oxo-N-((S)-3,6,22-trioxo-26-((3a*S*,4*S*,6a*R*)-2-oxohexahydro-1*H*-thieno[3,4-*d*]imidazol-4-yl)-1-fenyl-11,14,17-trioxa-4,7,21-triazahexakosan-2-yl)hexanamid (114)



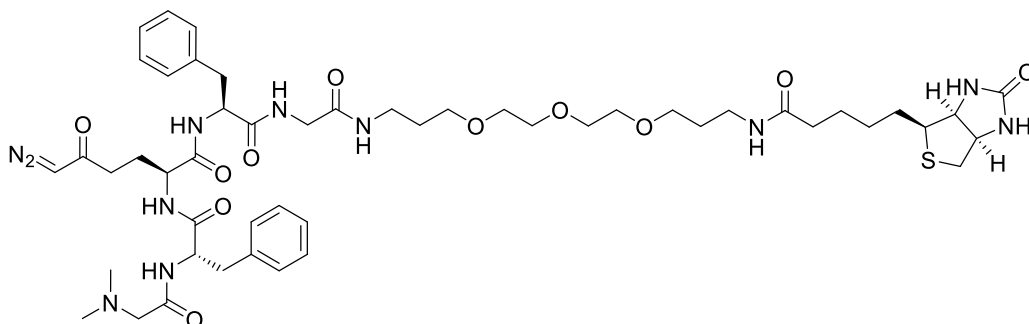
Látka **113** (10 mg; 11 μmol ; 1 ekv.) byla rozpuštěna ve směsi bezvodých rozpouštědel DCM/DMF 10:1 (0,5 + 0,05 ml). Ke vzniklému roztoku byl přidán AcOSu ester (3,30 mg; 0,021 mmol; 2 ekv.) a reakční směs byla míchána po dobu 18 hodin za laboratorní teploty pod inertní atmosférou dusíku. Rozpouštědla byla odpařena. Surová reakční směs byla přečištěna na preparativním HPLC (acetonitril/ H_2O , 0,1 % HCOOH) a frakce obsahující produkt byly lyofilizovány. Očekávaný produkt **114** byl získán jako bezbarvá pevná látka (5,4 mg; 52 %).

$^1\text{H NMR}$ (401 MHz, d_6 -DMSO): 1,21 – 1,37 (m; 2H); 1,40 – 1,54 (m; 3H); 1,54 – 1,69 (m; 5H); 1,74 (s; 3H); 1,71 – 1,91 (m; 2H); 1,99 – 2,08 (m; 2H); 2,31 – 2,38 (m; 1H); 2,57 (d; $J = 12,5$ Hz; 1H); 2,64 – 2,73 (m; 1H); 2,78 – 2,95 (m; 3H); 3,00 – 3,14 (m; 7H); 3,37 (t; $J = 6,4$ Hz; 4H); 3,41 – 3,49 (m; 4H); 3,47 – 3,53 (m; 4H); 3,60 (dd; $J = 16,5$; 5,6 Hz; 1H); 3,70 (dd; $J = 16,5$; 5,9 Hz; 1H); 4,12 (ddd; $J = 7,6$; 4,5; 1,8 Hz; 1H); 4,14 – 4,23 (m; 1H); 4,30 (dd; $J = 7,7$; 5,0 Hz; 1H); 4,43 – 4,53 (m; 2H); 5,97 (bs; 1H); 6,36 (bs; 1H); 6,42 (bs; 1H); 7,12 – 7,22 (m; 2H); 7,20 – 7,29 (m; 8H); 7,66 (t; $J = 5,7$ Hz; 1H); 7,74 (t; $J = 5,6$ Hz; 1H); 8,04 – 8,15 (m; 3H); 8,24 (dt; $J = 9,1$; 4,6 Hz; 1H).

ESI MS: 1015,5 ($[\text{M} + \text{Na}]^+$).

HR ESI MS: vypočteno pro $\text{C}_{48}\text{H}_{68}\text{O}_8\text{N}_{11}\text{O}_{10}\text{NaS}$ 1015,46819; nalezeno 1015,46797.

(S)-6-Diazo-2-((S)-2-(2-dimethylamino)acetamido-3-fenylpropanamido)-5-oxo-N-((S)-3,6,22-trioxo-26-((3a*S*,4*S*,6a*R*)-2-oxohexahydro-1*H*-thieno[3,4-*d*]imidazol-4-yl)-1-fenyl-11,14,17-trioxa-4,7,21-triazahexakosan-2-yl)hexanamid (115)



Látka **113** (10 mg; 0,011 mmol; 1 ekv.) byla rozpuštěna ve směsi bezvodých rozpouštědel DCM/DMF 10:1 (0,5 + 0,05 ml). Ke vzniklému roztoku byl přidán Osu ester *N,N*-dimethylglycinu (4,2 mg; 0,021 mmol; 2 ekv.) a reakční směs byla míchána po dobu 18 hodin za laboratorní teploty pod inertní atmosférou dusíku. Rozpouštědla byla odpařena. Surová reakční směs byla přečištěna na preparativním HPLC (acetonitril/H₂O, 0,1 % HCOOH) a frakce obsahující produkt byly lyofilizovány. Očekávaný produkt **115** byl získán jako bezbarvá pevná látka (6,3 mg; 58 %).

¹H NMR (401 MHz, *d*₆-DMSO): 1,22 – 1,40 (m; 2H); 1,40 – 1,57 (m; 3H); 1,55 – 1,69 (m; 5H); 1,69 – 1,82 (m; 1H); 1,80 – 1,93 (m; 1H); 2,01 – 2,09 (m; 2H); 2,06 (s; 6H); 2,24 – 2,35 (m; 2H); 2,58 (d; *J* = 12,5 Hz; 1H); 2,72 (d; *J* = 15,4 Hz; 1H); 2,79 – 2,89 (m; 4H); 3,00 (dd; *J* = 14,0; 4,3 Hz; 1H); 3,03 – 3,15 (m; 6H); 3,38 (t; *J* = 6,4 Hz; 4H); 3,43 – 3,48 (m; 4H); 3,49 – 3,53 (m; 4H); 3,62 (dd; *J* = 16,5; 5,6 Hz; 1H); 3,71 (dd; *J* = 16,5; 6,0 Hz; 1H); 4,13 (ddd; *J* = 7,7; 4,4; 1,9 Hz; 1H); 4,24 (td; *J* = 7,9; 5,7 Hz; 1H); 4,28 – 4,34 (m; 1H); 4,51 (ddd; *J* = 9,0; 7,4; 5,0 Hz; 1H); 4,56 – 4,65 (m; 1H); 6,00 (bs; 1H); 6,37 (bs; 1H); 6,43 (bs; 1H); 7,13 – 7,30 (m; 10H); 7,68 (t; *J* = 5,6 Hz; 1H); 7,71 – 7,79 (m; 2H); 8,17 (d; *J* = 9,2 Hz; 1H); 8,20 (d; *J* = 7,8 Hz; 1H); 8,29 (t; *J* = 5,8 Hz; 1H).

ESI MS: 1058,7 ([M + Na]⁺).

HR ESI MS: vypočteno pro C₅₀H₇₃O₁₁N₁₁NaS 1058,51039; nalezeno 1058,51006.

6 ZÁVĚR

V rámci méj diplomové práce jsem připravila celkem 27 nových proléčiv DONu (přehled struktur v **Příloze 1**) na základě pěti různých strategií zaměřených na doručení těchto látek do mozku.

V první části jsem úspěšně syntetizovala 14 nových proléčiv DONu s lipofilním řetězcem připojeným přes aminoskupinu DONu. První sérii látek **53a-h** navrženou na základě publikované struktury proléčiva **33** jsem připravila čtyř krokovou syntézou vycházející z chlorokarbonátů **49a-b** (**Schéma 8**). Všechna proléčiva **53a-h** jsou stabilní v prasečí plazmě. Proléčiva **53a** a **53c** pak nejsou metabolizována ani v prasečím jaterním homogenátu. Proléčivo **53c** navíc prochází do mozkových buněk výrazně lépe, než samotný DON, což bylo prokázáno v *in vivo* studii v transgenní CES^{-/-} myši (**Graf 8**). Bohužel však v mozku nedochází k jeho enzymatickému štěpení na DON (**Graf 7**). Druhou sérii proléčiv **58a-c** vycházející ze struktury **34** jsem úspěšně připravila čtyř krokovou syntézou z komerčně dostupného benzaldehydu (**54**), která zahrnuje postupně reakci s trifosgenem, *p*-nitrofenolem a rtuťnatou solí dané karboxylové kyseliny a konečně nukleofilní substituci *p*-nitrofenolového substituentu látek **57a-c** esterem DONu **38** nebo **45** (**Schéma 9**). V *in vitro* testech však připravená proléčiva **58a-c** prokázala minimální stabilitu v prasečí plazmě i přes zavedení objemnějšího *t*-butyl esteru do struktury místo původního isopropyl esteru (**34**) (**Graf 9**). Třetí sérii proléčiv **65a-c** navržených pro rychlejší štěpení v mozku ve srovnání s látkou **48** jsem úspěšně připravila čtyř krokovou syntézou z isopropenyl chloroformiátu (**61**). Syntetická cesta zahrnuje reakci s *p*-nitrofenolem, adici chlorovodíku na isopropenylový zbytek látky **62** a reakci s rtuťnatou solí dané karboxylové kyseliny. Proléčiva **65a-c** jsem pak v posledním kroku syntézy připravila reakcí *t*-butyl esteru DONu (**45**) s takto připravenými karbonáty **64a-c** (**Schéma 10**). U těchto látek zatím nebyly provedeny žádné biologické studie.

Dále jsem úspěšně připravila šest nových proléčiv DONu, která obsahují ve své struktuře glukózový zbytek navázaný přes atom C-6, určených pro přenos do mozku pomocí přenašeče GLUT1. První tři proléčiva **70a-c** jsem syntetizovala z esteru DONu **38** nebo **45** peptidovým couplingem s Fmoc-L-Trp-OH (**66**), ochráněním Fmoc skupiny vznikajících dipeptidů **67a-b**, nukleofilní substitucí N-sukcinimidyl esteru látky **71** připravenými dipeptidy **68a-b**, následným čtyřnásobným ochráněním acetylů

z hydroxyskupin glukózového zbytku látek **69a-b** a v případě proléčiva **70c** ještě transesterifikací isopropyl esteru **70b** na methyl ester **70c** (**Schéma 12**). Při této syntéze jsem úspěšně provedla detailní optimalizaci posledního kroku, kdy dochází k odchránění acetylů z glukózového zbytku a k současné transesterifikaci v závislosti na délce reakční doby a množství použitého methanolátu sodného, kdy isopropyl ester **70b** a methyl ester **70c** vznikají v různém poměru (**Obrázek 13**). Pouze proléčivo **70a** pak ukázalo stabilitu jak v prasečí plazmě, tak i prasečím jaterním homogenátu (**Graf 11**) na rozdíl od látek **70b** a **70c**, které obsahují méně objemný ester (**Graf 10**). Proléčivo **70a** navíc není substrátem efluxního transportéru P-gp (**Graf 11**). Bohužel ale nedochází k jeho štěpení ani v mozkových buňkách. Další tři nová glukózová proléčiva **79**, **83** a **87** jsem úspěšně připravila z *t*-butyl esteru DONu (**45**) peptidovými couplingy se dvěma molekulami L-fenylalaninu za vzniku tripeptidu **77** (**Schéma 13**), který pak byl společným stavebním blokem pro všechna tři proléčiva **79**, **83** a **87**. Molekulu **79** jsem připravila nukleofilní substitucí N-sukcinimidyl esteru **71** látkou **77** a následným odchráněním acetylů methanolátem sodným v methanolu ve výborných výtěžcích 96 % a 90 % (**Schéma 14**). Připojením 4-(Fmoc-amino)butanové kyseliny dalším peptidovým couplingem k molekule **77**, odchráněním Fmoc skupiny vznikajícího intermediátu **80**, dále připojením glukózového zbytku k látce **80** reakcí s N-sukcinimidyl esterem **71** a následnou deacetylací hydroxyskupin na glukózovém zbytku látky **82** jsem připravila proléčivo **83** (**Schéma 15**). Obdobným způsobem jsem připravila i proléčivo **87**, ovšem jako linker mezi molekulou **77** a glukózovým zbytkem **71** jsem využila 5-amino-3-oxopentanovou kyselinu (**Schéma 16**). Stabilita proléčiv **79**, **83** a **87** byla v *in vitro* testech sledována v prasečím jaterním homogenátu, kde však docházelo k jejich pozvolnému štěpení, a v homogenátu tenkého střeva, kde nejvyšší stability dosáhla látka **79** (**Graf 13**). Bohužel ani jedno z těchto proléčiv nebylo v prasečím mozковém homogenátu metabolizováno na DON a navíc bylo další studií prokázáno, že se nejedná o substráty přenašeče GLUT1 (**Graf 12**).

Nová proléčiva **95a-c** obsahující arecaidinový strukturní motiv jsem úspěšně připravila ve třech krocích zahrnujících peptidový coupling *t*-butyl esteru DONu (**45**) se třemi různými aminokyselinami (Fmoc-Gly-OH, Fmoc-L-Phe-OH a Fmoc-L-Trp(N-Me)-OH), odchráněním Fmoc skupiny a opětovným peptidovým couplingem získaných dipeptidů **94a**, **75** a **94c** s arecaidin hydrochloridem (**Schéma 19**). Dosud získaná data z biologických studií prokazují vysoké hodnoty stabilit proléčiv **95a-c**

v prasečím jaterním homogenátu (**Graf 14** a **Graf 15**). Další biologické testy s těmito látkami prozatím nebyly provedeny.

Nové proléčivo **101** navržené pro přenos přes HEB pomocí přenašeče LAT1 jsem úspěšně připravila čtyř krokovou syntézou z komerčně dostupné látky **97**, jejíž aminoskupinu jsem ochránila reakcí s allyl chlorformiátem. Vznikající meziproduct **98** nukleofilně atakuje *N,N*-disukcinimidyl karbonát a připravený *N*-sukcinimidyl ester **99** je pak nukleofilně substituován dipeptidem **75**. Jeho allylovou a allocovou chránící skupinu jsem v posledním kroku syntézy odstranila za katalýzy Pd(PPh₃)₄ v přítomnosti fenylsilanu (**Schéma 20**). Ačkoli je proléčivo **101** minimálně metabolizováno v prasečím jaterním homogenátu a homogenátu tenkého střeva, nedochází bohužel k jeho štěpení ani v mozgovém homogenátu (**Graf 16**). Proléčivo **101** navíc není substrátem přenašeče LAT1 (**Graf 17**).

V poslední části mé diplomové práce jsem navrhla a připravila tři proléčiva **113**, **114** a **115** určená pro specifickou distribuci v organismu vazbou k protilátce pomocí biotin-streptavidinové nekovalentní interakce. Protilátka by měla sloužit jako selektivní naváděcí systém pro takto vzniklé proléčivo. Při deseti, respektive jedenácti krokové syntéze proléčiv **113**, **114** a **115** jsem jako výchozí látku zvolila komerčně dostupný Boc-Gly-OH (**103**), jehož karboxylovou skupinu jsem ochránila allylem a Boc skupinu jsem následně ochránila pomocí 4M chlorovodíku v dioxanu. Vznikající aminokyselina **105** tvoří peptidovým couplingem s Boc-L-Phe-OH dipeptid **106**, jehož Boc skupinu jsem opět ochránila chlorovodíkem v dioxanu. Vznikající sloučenina **107** tvoří peptidovým couplingem s Fmoc-L-DON-OH tripeptid **108** a po ochránění jeho Fmoc skupiny a peptidovém couplingu s další aminokyselinou Fmoc-L-Phe-OH vzniká tetrapeptid **110**. Allyl navázaný na karboxylové funkční skupině látky **110** jsem pak za katalýzy Pd(PPh₃)₄ v přítomnosti fenylsilanu ochránila a připravená karboxylová kyselina **111** tvoří peptidovým couplingem s biotin-(PEG)₄-NH₂ prekursorem **112**. Proléčivo **113** jsem pak připravila ochráněním Fmoc skupiny látky **112**. Nukleofilní substitucí *N*-sukcinimidyl esteru kyseliny octové, respektive *N*-sukcinimidyl esteru (*N,N*-dimethyl)glycinu proléčivem **113** vznikají proléčiva **114** a **115** (**Schéma 21**). Pro tyto látky zatím nebyly provedeny žádné biologické studie.

Všech 27 nově připravených proléčiv DONu včetně jejich intermediátů jsem plně charakterizovala naměřením ¹H a ¹³C NMR a HR MS spekter. Na základě výsledků

z biologických studií jednotlivých proléčiv jsem získala užitečné informace o vztahu jejich struktury a odpovídající stability. Z naměřených dat bude v budoucnu čerpáno při hledání stabilnějších proléčiv DONu jak v plazmě, tak i v metabolicky aktivních orgánech a se schopností štěpení na aktivní DON selektivně v mozkových buňkách.

7 LITERATURA

- (1) Fontana, J.; Trnka, J.; Maďa, P.; Ivák, P.; Lavříková, P.; Nováková, L.; Pavelka, M.; Šajdíková, M. *Funkce buněk a lidského těla* [multimediální skripta]. Dostupné z: <http://fbt.cz/>
- (2) Abbott, N. J.; Patabendige, A.A.K.; Dolman, D.E.M.; Yusof, S.R.; Begley, D.J. *Neurobiol. Dis.* **2010**, *37*, 13 – 25.
- (3) Wolburg, H.; Lippoldt, A. *Vasc. Pharmacol.* **2002**, *38*, 323 – 337.
- (4) Sureshkumar, M.; Pandian, A. *Curr. Nanomed.* **2019**, *9*, 198 – 209.
- (5) Dong, X. *Theranostics* **2018**, *8* (6), 1481 – 1493.
- (6) Sweeney, M.D.; Zhao, Z.; Montagne, A.; Nelson, A.R.; Zlokovic, B. *Physiol. Rev.* **2019**, *99*, 21 – 78.
- (7) Sahi, J.; Li, Y. *Eur. Pharm. Rev.* **2016**, *1*.
- (8) Gampa, G.; Talele, S.; Kim, M.; Mohammad, A.; Griffith, J.; Elmquist, W.F. *Cancer Sensitizing Agents Chemother.* **2020**, *7*, 227 – 301.
- (9) Abbott, N.J. *J. Anat.* **2002**, *200*, 629 – 638.
- (10) Bauer, H.-Ch.; Krizbai, I.A.; Bauer, H.; Traweger, A. *Front. Neurosci.* **2014**, *8* (392), 1 – 21.
- (11) Zihni, C.; Mills, C.; Matter, K.; Balda, M.S. *Nat. Rev.* **2016**, *17*, 564 – 580.
- (12) Župková, M. *Buněčná a molekulární podstata metastazování* [online]. Brno: Masarykova univerzita, Přírodovědecká fakulta, Ústav biochemie, **2009**. Bakalářská práce. [cit. 2020-03-20]. Dostupné z: <https://theses.cz/id/vd2tz4/>
- (13) Wang, D.; Wang, Ch.; Wang, L.; Chen, Y. *Drug Delivery* **2019**, *26* (1), 551 – 565.
- (14) Shergalis, A.; Bakhead, A.; Luesakul, U.; Muangsin, N.; Neamati, N. *Pharmacol. Rev.* **2018**, *70*, 412 – 445.
- (15) Clark, D.E. *Drug. Discov. Today* **2003**, *8*, 927 – 933.
- (16) Stieger, B.; Gao, B. *Clin. Pharmacokinet.* **2015**, *54*, 225 – 242.
- (17) Barar, J.; Rafi, M.A.; Pourseif, M.M.; Omid, Y. *BioImpacts* **2016**, *6* (4), 225 – 248.
- (18) Urquhart, B.L.; Kim, R.B. *Eur. J. Clin. Pharmacol.* **2009**, *65* (11), 1063 – 1070.
- (19) Komaki, S.; Sugita, Y.; Furuta, T.; Yamada, K.; Moritsubo, M.; Abe, H.; Akiba, J.; Miyagi, N.; Nakamura, H.; Miyoshi, H.; Ohshima, K.; Morioka, M. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* **2019**, *78* (5), 389 – 397.

- (20) Geier, E.G.; Schlessinger, A.; Fan, H.; Gable, J.E.; Irwin, J.J.; Sali, A.; Giacomini, K.M. *PNAS* **2013**, *110* (14), 5480 – 5485.
- (21) Mueckler, M.; Caruso, C.; Baldwin, S.A.; Panico, M.; Blench, I.; Morris, H.R.; Allard, W.J.; Lienhard, G.E.; Lodish, H.F. *Science* **1985**, *229* (4717), 941 – 945.
- (22) Häfliger, P.; Charles, R.-P. *Int. J. Mol. Sci.* **2019**, *20*, 2428 – 2441.
- (23) Yan, R.; Zhao, X.; Lei, J.; Zhou, Q. *Nature* **2019**, *568*, 127 – 132.
- (24) Kanai, Y.; Segawa, H.; Ki, M.; Uchino, H.; Takeda, E.; Endou, H. *J. Biol. Chem.* **1998**, *273* (37), 23629 – 23632.
- (25) Del Amo, E.M.; Urtti, A.; Yliperttula, M. *Eur. J. Pharm. Sci.* **2008**, *35* (3), 161 – 174.
- (26) Kageyama, T.; Nakamura, M.; Matsuo, A.; Yamasaki, Y.; Takakura, Y.; Hashida, M.; Kanai, Y.; Naito, M.; Tsuruo, T.; Minato, N.; Shimohama, S. *Brain. Res.* **2000**, *879* (1 – 2), 115 – 121.
- (27) Blasi, P.; Giovagnoli, S.; Schoubben, A.; Ricci, M.; Rossi, C. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **2007**, *59* (6), 454 – 477.
- (28) Pardridge, W.M. *J. Cereb. Blood Flow Metab.* **2012**, *32* (11), 1959 – 1972.
- (29) van Tellingen, O.; Yetkin-Arik, B.; de Gooijer, M.C.; Wesseling, P.; Wurdinger, T.; de Vries, H.E. *Drug Resist. Updat.* **2015**, *19*, 1 – 12.
- (30) Lonser, R.R.; Sarntinoranont, M.; Morrison, P.F.; Oldfield, E.H. *J. Neurosurg.* **2015**, *122* (3), 697 – 706.
- (31) Prnka, T.; Šperlink, K. *Bionanotechnologie, nanobiotechnologie, nanomedicina*. Repronis, Ostrava **2006**. ISBN 80-7329-134-7.
- (32) Pouchlý, J. *Fyzikální chemie makromolekulárních a koloidních soustav*. 3. ed. VŠCHT v Praze, Praha **2008**. ISBN 978-80-7080-674-6.
- (33) Zhu, Y.; Liu, Ch.; Pang, Z. *Biomolecules* **2019**, *9* (790), 1 – 29.
- (34) Kesharwani, P.; Iver, A.K. *Drug. Discov. Today* **2015**, *20*, 536 – 547.
- (35) Rautio, J.; Laine, K.; Gynther, M.; Savolainen, J. *APPS J.* **2008**, *10* (1), 92 – 102.
- (36) Benson, A.B.; Trump, D.L.; Koeller, J.M.; Egorin, M.I.; Olman, E.A.; Witte, R.S.; Davis, T.E.; Tormey, D.C. *Cancer Treat. Rep.* **1985**, *69* (7 – 8), 795 – 799.
- (37) Verweij, J.; Herweijer, H.; Oosterom, R.; van der Burg, M.E.; Planting, A.S.; Seynaeve, C.; Stoter, G.; Nooter, K. *Br. J. Cancer* **1991**, *64* (2), 361 – 364.
- (38) Twentyman, P.R.; Bleehen, N.M.; *Eur. J. Cancer* **1991**, *27* (12), 1639 – 1642.

- (39) Hyafil, F.; Vergely, C.; Du Vignaud, P.; Grand-Perret, T. *Cancer Res.* **1993**, *53* (19), 4595 – 4602.
- (40) Dantzig, A.H.; Shepard, R.L.; Cao, J.; Law, K.L.; Ehlhardt, W.J.; Baughman, T.M.; Bumol, T.F.; Starling, J.J. *Cancer Res.* **1996**, *56* (18), 4171 – 4179.
- (41) Wager, T.T.; Hou, X.; Verhoest, P.R.; Villalobos, A. *ACS Chem. Neurosci.* **2010**, *1*, 435 – 449.
- (42) Puris, E.; Gynther, M.; Huttunen, J.; Petsalo, A.; Huttunen, K.M. *J. Controlled Release* **2017**, *261*, 93 – 104.
- (43) Gupta, D.; Gupta, S.V.; Lee, K.-D.; Amidon, G.L. *Mol. Pharm.* **2009**, *6*, 1604 – 1611.
- (44) Laksitorini, M.; Prasasty, V.D.; Kiptoo, P.K.; Siahaan, T.J. *Ther. Deliv.* **2014**, *5*, 1143 – 1163.
- (45) Rautio, J.; Laine, K.; Gynther, M.; Savolainen, J. *AAPS J.* **2008**, *10*, 92 – 102.
- (46) Oldendorf, W.H.; Hyman, S.; Braun, L.; Oldendorf, S.Z. *Science* **1972**, *178* (64), 984 – 986.
- (47) Leo, A.; Hansch, C.; Elkins, D. *Chem. Rev.* **1971**, *6*, 525 – 616.
- (48) Prokai-Tatrai, K.; Szarka, S.; Nguyen, V.; Sahyouni, F.; Walker, C.; White, S.; Talamantes, T.; Prokai, L. *Pharm. Anal. Acta* [online] **2012**, S7:002 [cit. 2020-04-01]. ISSN: 2153-2435. Dostupné z: <https://www.longdom.org/open-access/all-in-the-mind-brain-targeting-chemical-delivery-system-of-17-estradiol-estredox-produces-significant-uterotrophic-side-effect-2153-2435.S7-002.pdf>
- (49) Tamimi, A.F.; Juweid, M. *Glioblastoma* [online] **2017**, Brisbane (AU): Codon Publications. Kapitola 8. [cit. 2020-04-01]. ISBN-13: 978-0-9944381-2-6. Dostupné z: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK470003/>
- (50) Sziráki, I.; Horváth, K.; Bodor, N. *Pharmazie* **2006**, *61* (2), 140 – 143.
- (51) Fernández, C.; Nieto, O.; Fontenla, J.A.; Rivas, E.; de Ceballos, M.L.; Fernández-Mayoralas, A. *Org. Biol. Chem.* **2003**, *1*, 767 – 771.
- (52) Balestrino, R.; Schapira, A.H.V. *Eur. J. Neurol.* **2020**, *27*, 27 – 42.
- (53) Peura, L.; Malmioja, K.; Huttunen, K.; Leppänen, J.; Hämäläinen, M.; Forsberg, M.M.; Rautio, J.; Laine, K. *Pharm. Res.* **2013**, *30*, 2523 – 2537.
- (54) Li, Y.; Zhou, Y.; Jiang, J.; Wang, X.; Fu, Y.; Gong, Y.; Sun, X.; Zhang, Z. *J. Cereb. Blood Flow Metab.* **2015**, *35*, 1985 – 1994.

- (55) Li, Y.; Zhou, Y.; Qi, B.; Gong, T.; Sun, X.; Fu, Y.; Zhang, Z. *Mol. Pharm.* **2014**, *11*, 3174 – 3185.
- (56) Geiger, T.R.; Peeper, D.S. *Biochim. Biophys. Acta, Rev. Cancer* **2009**, *1796* (2), 293 – 308.
- (57) Holland, E.C. *PNAS* **2000**, *97* (12), 6242 – 6244.
- (58) Louis, D.N.; Perry, A.; Reifenberger, G.; von Deimling, A.; Figarella-Branger, D.; Cavenee, W.K.; Ohgaki, H.; Wiestler, O.D.; Kleihues, P.; Ellison, D.W. *Acta Neuropathol.* **2016**, *131* (6), 803 – 820.
- (59) Glioblastoma multiforme. *Aans.org* [online]. © 2020 American Association of Neurological Surgeons [cit. 2020-04-20]. Dostupné z: <https://www.aans.org/Patients/Neurosurgical-Conditions-and-Treatments/Glioblastoma-Multiforme>
- (60) Yu, Y.; Ramena, G.; Elble, R.C. *Front. Biosci.* **2012**, *4*, 1528 – 1541.
- (61) Saleem, A.; Brown, G.D.; Brady, F.; Aboagye, E.O.; Osman, S.; Luthra, S.K.; Ranicar, A.S.O.; Brock, C.S.; Stevens, M.F.G.; Newlands, E.; Jones, T.; Price, P. *Cancer Res.* **2003**, *63*, 2409 – 2415.
- (62) Walker, B.; Brown, M. F.; Lynas, J. F.; Martin, S. L.; McDowell, A.; Badet, B.; Hill, A.J. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2000**, *10*, 2795–2798.
- (63) LaRonde-LaBlanc, N.; Resto, M.; Gerratana, B. *Nat. Struct. Mol. Biol.* **2009**, *16*, 421–429.
- (64) LaRonde-LaBlanc, N.; Resto, M.; Gerratana, B. *Nat. Struct. Mol. Biol.* **2009**, *16*, 421–429
- (65) Dion, H. W.; Fusari, S. A.; Jakubowski, Z. L.; Zora, J. G.; Bartz, Q. R. *J. Am. Chem. Soc.* **1956**, *78*, 3075–3077.
- (66) Novotná, K. *Syntéza proléčiv glutaminového antimetabolitu 6-diazo-5-oxo-L-norleucinu* [online]. Praha: Univerzita Karlova, Přírodovědecká fakulta, Katedra organické chemie, **2018**. Bakalářská práce. [cit. 2020-05-01]. Dostupné z: <https://dspace.cuni.cz/handle/20.500.11956/103511>
- (67) Dranoff, G.; Elion, G.B.; Friedman, H.S.; Campbell, G.L.; Bigner, D.D. *Cancer Res.* **1985**, *45*, 4077 – 4081.

- (68) Fogal, V.; Babic, I.; Chao, Y.; Pastorino, S.; Mukthavaram, R.; Jiang, P.; Cho, Y.J.; Pingle, S.C.; Crawford, J.R.; Piccioni, D.E.; Kesari, S. *oncotarget* **2015**, *6*, 1157 – 1170.
- (69) Ru, P.; Williams, T.M.; Chakravarti, A.; Guo, D. *Cancers* **2013**, *5*, 1469 – 1484.
- (70) Rais, R.; Jančařík, A.; Tenora, L.; Nedelcovych, M.; Alt, J.; Englert, J.; Rojas, C.; Le, A.; Elgogary, A.; Tan, J.; Monincová, L.; Pate, K.; Adams, R.; Ferraris, D.; Powell, J.; Majer, P.; Slusher, B.S. *J. Med. Chem.* **2016**, *59*, 8621 – 8633.
- (71) Fu, J.; Pacyniak, E.; Leed, M.G.; Sadgrove, M.P.; Marson, L.; Jay, M. *J. Pharm. Sci.* **2016**, *105*, 989 – 995.
- (72) Van Gelder, J.; Shafiee, M.; De Clercq, E.; Penninck, F.; Van den Mooter, G.; Kinget, R.; Augustijns, P. *Int. J. Pharm.* **2000**, *205*, 93 – 100.
- (73) Mehellou, Y.; Rattan, H. S.; Balzarini, J. *J. Med. Chem.* **2017**, *61*, 2211 – 2226.
- (74) Nedelcovych, M.T.; Tenora, L.; Kim, B.-H.; Kelschenbach, J.; Chao, W.; Hadas, E.; Jančařík, A.; Prchalová, E.; Zimmermann, S.C.; Dash, R.P.; Gadiano, A.J.; Garrett, C.; Furtmüller, G.; Oh, B.; Brandacher, G.; Alt, J.; Majer, P.; Volsky, D.J.; Rais, R.; Slusher, B.S. *J. Med. Chem.* **2017**, *60*, 7386 – 7198.
- (75) Ueki, N.; Wang, W.; Swenson, C.; McNaughton, C.; Sampson, N.S.; Hayman, M.J. *Theranostics* **2016**, *6*, 808 – 816.
- (76) Ueki, N.; Lee, S.; Sampson, N.S.; Hayman, M.J. *Nat. Commun.* **2013**, *4*, č. 2735.
- (77) Tenora, L.; Alt, J.; Dash, R.P.; Gadiano, A.J.; Novotná, K.; Veeravalli, V.; Lam, J.; Kirkpatrick, Q.R.; Lemberg, K.M.; Majer, P.; Rais, R.; Slusher, B.S. *J. Med. Chem.* **2019**, *62*, 3524 – 3538.
- (78) Li, B.; Sedlacek, M.; Manoharan, I.; Boopathy, R.; Duysen, E.G.; Masson, P.; Lockridge, O. *Biochem. Pharmacol.* **2005**, *70*, 1673 – 1684.
- (79) Hughes, J.P.; Rees, S.; Kalindjian, S.B.; Philpott, K.L. *Br. J. Pharmacol.* **2011**, *162* (6), 1239 – 1249.
- (80) Drug Discovery and Development Process. *Slideteam.net* [online]. © 2020 SlideTeam [cit. 2020-05-10]. Dostupné z: <https://www.slideteam.net/drug-discovery-and-development-process.html>
- (81) Sklaroff, R.B.; Casper, E.S.; Magill, G.B.; Young, Ch.W. *Cancer Treat. Rep.* **1980**, *64*, 1247 – 1251.

- (82) Catane, R.; Ovejera, A.A.; Houchens, D.P.; von Hoff, D.D.; Davis, H.L.; Wolpert, M.K.; Rozenzweig, M.; Muggia, F.M. *Proc. Am. Assoc. Cancer Res. and Am. Soc. Clin. Oncol.* **1978**, *19*, C-41.
- (83) Krantz, S.; Rivers, S.; Dwight, R.W.; Corbus, H.F.; Wolf, J.; Green, I.; Spear, P.W.; Imperato, L.T.; Lobe, S.; Whittington, R.M.; Rumball, J.M.; Marquez, A.; Calbles, C.; Chernoff, A.I.; Misra, D.K.; Sullivan, R.D.; Miller, E.; Dietrich, F.S.; Plitman, G.I.; Close, H.P.; McCracken, S.; Glushien, A.S.; Rucknagel, D.L.; Li, C.C.; Kodlin, D. *J. Natl. Cancer Inst.* **1959**, *22* (2), 433 – 439.
- (84) Langston, J. W.; Ballard, P.; Tetrud, J. W.; Irwin, I. *Science* **1983**, *219* (4587), 979 – 980.
- (85) Langston, J. W. *J. Parkinson's Dis.* **2017**, *7*, S11 – S19.
- (86) Chiba, K.; Trevor, A.; Castagnoli, N. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **1984**, *120* (2), 574 – 578.
- (87) Voigt, V.; Laug, L.; Zebisch, K.; Thondorf, I.; Markwardt, F.; Brandsch, M. *J. Pharm. Pharmacol.* **2012**, *65*, 582 – 590.
- (88) Thiele, N. A.; Kärkkäinen, J.; Sloan, K. B.; Raution, J.; Huttunen, K. M. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2018**, *28*, 2856 – 2860.
- (89) Bradley, A. M.; Devine, M.; DeRemer, D. *Am. J. Health-Syst. Pharm.* **2013**, *70* (7), 589 – 597.
- (90) Journal of antibody-drug conjugates. *Adcreview.com* [online]. © Sunvalley Communication, LLC [cit. 2020-05-16]. Dostupné z: <https://www.adcreview.com/brentuximab-vedotin-sgn35/>
- (91) Holmberg, A.; Blomstergren, A.; Nord, O.; Lukacs, M.; Lundeberg, J.; Uhlén, M. *Electrophoresis* **2005**, *26* (3), 501 – 510.
- (92) Rosenberg, I.; Holý, A.; Masojídková, M. *Collect. Czech. Chem. Commun.* **1988**, *53*, 2753–2777.
- (93) Chiha, S.; Soicke, A.; Barone, M.; Müller, M.; Bruns, J.; Opitz, R.; Neudörfl, J. – M.; Kühne, R.; Schmalz, H. – G. *Eur. J. Org. Chem.* **2018**, *4*, 455 – 460.
- (94) Çalimsiz, S.; Lipton, M. A. *J. Org. Chem.* **2005**, *70* (16), 6218 – 6221.
- (95) Owens, A. E.; de Paola, I.; Hansen, W. A.; Liu, Y.-W.; Khare, S. D.; Fasan, R. *J. Am. Chem. Soc.* **2017**, *139* (36), 12559 – 12568.