

CZ 307719 B6

PATENTOVÝ SPIS

(11) Číslo dokumentu:

307 719

(13) Druh dokumentu: **B6**

(51) Int. Cl.:

C07D 209/16 (2006.01)
G01N 33/543 (2006.01)
G01N 33/94 (2006.01)

(19)
ČESKÁ
REPUBLIKA



ÚŘAD
PRŮMYSLOVÉHO
VLASTNICTVÍ

(21) Číslo přihlášky: 2015-962
(22) Přihlášeno: 31.12.2015
(40) Zveřejněno: 07.07.2017
(Věstník č. 27/2017)
(47) Uděleno: 06.02.2019
(24) Oznámení o udělení ve věstníku: 20.03.2019
(Věstník č. 12/2019)

(56) Relevantní dokumenty:
M. Maryška a kol., "Syntéza haptenu drog odvozených od tryptaminu", Studentská odborná konference Chemie je život 2013, Sborník abstraktů, 6.12.2013; Boulenguez P. a kol., "A new 5-hydroxy-indole derivative with preferential affinity for 5-HT1B binding sites", European Journal of Pharmacology, 1991, 194, str. 91-98; M. Maryška, "Komponenty imunochemických souprav pro detekci syntetických derivátů tryptaminů", diplomová práce, 2013, obhájená 2.6.2014 (dokument dostupný pouze omezenému okruhu osob).
CZ 28938 U1; DE 3719699 A1.

(73) Majitel patentu:
Vysoká škola chemicko-technologická v Praze,
Praha 6, CZ
(72) Původce:
Ing. Martin Kuchař, Ph.D., Kladno - Kročehlavy,
CZ
Ing. Anna Šuláková, Kopřivnice, CZ
Ing. Lucie Fojtíková, Hať, CZ
prof. Dr. RNDr. Oldřich Lapčík, Praha 6, CZ
Ing. Michal Maryška, Hradec Králové, CZ
Ing. Barbora Holubová, Ph.D., Praha 8, CZ
(74) Zástupce:
PATENT SKY s.r.o., Karlovarská 814/115, 161 00
Praha 6, Řepy

(54) Název vynálezu:
Použití derivátu tryptaminu
(57) Anotace:
Vynález se týká použití derivátů tryptaminu, součástí jejichž struktury je krátký spojovací můstek nesoucí karboxylovou funkční skupinu, a chemických postupů vedoucích k přípravě takovýchto sloučenin. Tyto deriváty tryptaminu lze s výhodou využít pro přípravu imunogenů konjugací s nosným proteinem. Polyklonální králičí protilátky získané z imunizovaných laboratorních zvířat lze uplatnit při vývoji rychlých, uživatelsky příjemných imunochemických testů formátu LFIA (Lateral-Flow Immunochromatographic Assay).

Použití derivátu tryptaminu

Oblast techniky

5

Vynález se týká derivátů tryptaminu, součástí jejichž struktury je krátký spojovací můstek nesoucí karboxylovou funkční skupinu, a chemických postupů vedoucích k přípravě takovýchto sloučenin. Tyto deriváty tryptaminu lze s výhodou využít pro přípravu imunogenů konjugací s nosným proteinem. Polyklonální králičí protilátky získané z imunizovaných laboratorních zvířat lze uplatnit při vývoji rychlých, uživatelsky příjemných imunochemických testů formátu LFIA (Lateral-Flow Immunochromatographic Assay).

10

Dosavadní stav techniky

15

Na drogové scéně se v posledních letech kromě tradičních drog (kokain, opiáty, amfetaminy, kanabinoidy) objevují také nové syntetické drogy (NSD). Důvodem je snaha výrobců a distributorů obejít stávající legislativní normy, v nichž jsou omamné a psychotropní látky vymezeny obvykle taxativně. Na ilegální trh se tak dostávají analoga známých látek s psychotropním potenciálem, která dosud nejsou uvedena na seznamu ilegálních látek, nebo jejichž prekurzory nejsou monitorovanými substancemi. Hlavní nebezpečí spojené s užíváním těchto nových syntetických drog (NSD) tkví v nedostatku informací o jejich farmakokinetickém a toxikologickém chování, neboť tyto látky neprošly žádnými klinickými testy.

20

Mezi nové syntetické drogy se řadí i skupina látek zvaná tryptaminy. Jedná se o halucinogenní látky a kromě syntetických derivátů existuje i několik přírodních tryptaminů, které patří mezi tradiční psychedelika. Tryptaminy jsou obecně agonisté serotoninových 5-HT receptorů, za halucinogenní efekt je zodpovědný agonismus především 5-HT_{2A} a 5-HT_{1A} subtypů těchto receptorů. Mezi nejznámější přírodní tryptaminy patří psilocin a psilocybin, účinné látky obsažené v halucinogenních houbách, zejména v lysohlávkách (*Psilocybe*). Tradiční roli v jihoamerických kulturách má dimethyltryptamin (DMT), kde je užíván zejména ve formě rituálního nápoje ayahuasca. Nápoj je připravován z několika druhů psychotropních rostlin vyskytujících se v Amazonii, zejména *Psychotria viridis* a *Diplopterys cabrerana*, obsahující jako aktivní látku právě DMT. V dnešní době není DMT záležitostí pouze Jižní Ameriky, často je připravován i synteticky a v čisté formě ho lze užívat i kouřením či intravenózně. Obecně platí, že k dosažení halucinogenního účinku přírodních tryptaminů při perorálním užití je nutné zároveň užít i inhibitor monoaminoxidas (MAO), jinak dojde k rychlé metabolizaci tryptaminů. Na základě strukturních variací bylo syntetizováno několik desítek syntetických tryptaminů, jejichž vlastnosti jsou závislé na strukturních modifikacích a dají se shrnout do několika základních skupin. Jednoduché syntetické tryptaminy, odvozené od DMT pouze variací alkylových substituentů na aminoskupině, působí na organismus podobně jako DMT, pouze s tím rozdílem, že nejsou po užití rozkládány MAO a jsou účinné i perorálně. Deriváty substituované v α-poloze jsou díky této substituci účinnými inhibitory MAO a zároveň mají kromě halucinogenních i výraznější stimulační účinky. Deriváty modifikované v poloze 5, nejčastěji methoxy skupinou, vykazují podobné účinky jako látky nesubstituované, jsou však výrazně účinnější. Mezi nejrozšířenější syntetické tryptaminy se řadí 5-methoxydimethyltryptamin (5-MeO-DMT), diisopropyltryptamin (DiPT), 5-methoxydiisopropyltryptamin (5-MeO-DiPT), alfa-methyltryptamin (α-MT) a 5-methoxydiallyltryptamin (5-MeO-DALT). S výjimkou 5-MeO-DMT lze všechny tyto deriváty užít perorálně bez nutnosti užití inhibitoru MAO. 5-MeO-DiPT je velmi potentní psychedelikum s dlouhou dobou účinku, jeho účinná dávka se pohybuje okolo 10 mg.

35

40

45

50

55

Tradiční drogy lze detekovat pomocí komerčních imunochemických testů založených na selektivní reakci protilátky a antigenu, kterým je v tomto případě hledaná omamná či psychotropní látka. K detekci NSD však tyto testy použít nelze. (Páleníček T, Kuchař M. Je

možná detekce a identifikace nových syntetických drog (NSD) pomocí orientačních testů? Adiktologie 2011;11:208–14.) Odhalit intoxikaci osob novými syntetickými drogami je možné pomocí metod klinické biochemie, a to zejména analýzou pomocí plynové či kapalinové chromatografie s hmotnostním detektorem (GC-MS či LC-MS), což je poměrně náročné jak na přístroje, tak na odbornost obsluhy. Sestavení přístrojově nenáročných, jednoduchých, uživatelsky příjemných imunochemických testů na principu LFIA (Lateral Flow Immunochromatographic Assay) by umožňovalo daleko rychlejší a levnější orientační detekci látek v biologickém materiálu ve zdravotnictví nebo při dopravních kontrolách řidičů a také při screeningu rostlinného materiálu.

Možnosti analýzy a detekce tryptaminů v biologických vzorcích jsou omezené prakticky na použití metod LC-MS či GC-MS. V literatuře je popsána metoda pro stanovení několika desítek tryptaminových derivátů v moči nebo krevní plazmě s limity detekce mezi 10 až 100 ng/ml v moči a 1 až 100 ng/ml v plazmě. (Meyer, M. R.; Caspar, A.; Brandt, S. D.; Maurer, H. H., A qualitative/quantitative approach for the detection of 37 tryptamine-derived designer drugs, 5 beta-carbolines, ibogaine, and yohimbine in human urine and plasma using standard urine screening and multi-analyte approaches. Analytical and bioanalytical chemistry 2014; 406(1):225–237.) Tyto metody jsou nedílnou součástí klinických testů, jejich nevýhodou je ale časová náročnost a nemožnost využití mimo laboratoř. Pro kvalitativní detekci tryptaminů v zachycených vzorcích lze použít detekční kity založené na barevné důkazové reakci, nicméně vzhledem k nízké specifitě a velkému množství možných zkřížených reakcí je jejich využití značně omezené. Z imunochemických metod pro detekci tryptaminů je v literatuře znám pouze radioimunochemografický test pro 5-MeO-DMT. (Strahilevitz, M. Immunological methods for treating mammals. US 4834973 (A), 30. květen 1989.)

Jako nosičové proteiny se používají hovězí sérový albumin (BSA), hovězí thyroglobulin (BTG), popř. další proteiny vhodných vlastností. Konjugáty se připravují reakcí aktivované formy haptenu (reaktivní anhydridy či estery) s ϵ -aminoskupinami lysinových zbytků proteinu za vytvoření amidových vazeb. Konjugací se dosáhne statisticky náhodného obsazení lysylů přítomných v proteinu.

Podstata vynálezu

Vynález se týká derivátů tryptaminu, součástí jejichž struktury je krátký spojovací můstek nesoucí karboxylovou funkční skupinu, a chemických postupů vedoucích k přípravě takovýchto sloučenin. Tyto deriváty tryptaminu lze s výhodou využít pro přípravu imunogenů konjugací s nosným proteinem. Polyklonální králičí protilátky získané z imunizovaných laboratorních zvířat lze uplatnit při vývoji rychlých, uživatelsky příjemných imunochemických testů formátu LFIA (Lateral-Flow Immunochromatographic Assay).

Spojovací můstek je připojen přes dusík aminoskupiny tryptaminu nebo v poloze 5 indolového jádra či přes kyslík v poloze 5 indolového jádra.

Sloučeniny se připraví převedením indolu reakcí s oxalylechloridem a methylaminem na příslušné 1*H*-indol-3-ylglyoxylylamidy. Z nich jsou redukcí tetrahydridohlitanem lithným získány příslušné *N*-methyltryptaminy, jejichž *N*-alkylací ethyl-esterem ω -bromalkanové kyseliny a následnou bazickou hydrolýzou je do molekuly zaveden spojovací můstek nesoucí karboxylovou funkční skupinu.

Nebo se sloučeniny připraví pomocí Fischerovy syntézy indolu 1,1-dimethoxy-4-(dialkylamino)butanalu a příslušných arylhydraziniových solí. Spojovací můstek je součástí struktury výchozí arylhydraziniové soli a podmínky reakce se liší podle toho, zda můstek už nese přímo karboxylovou skupinu, či esterovou funkční skupinu. V druhém případě je pro přípravu sloučenin nutná ještě hydrolýza.

Připravené deriváty tryptaminů lze s výhodou využít pro přípravu imunogenů konjugací s nosným proteinem. Polyklonální králičí protilátky získané z imunizovaných laboratorních zvířat lze uplatnit při vývoji rychlých, uživatelsky příjemných imunochemických testů formátu LFIA (Lateral-Flow Immunochromatographic Assay).

5

Pro získání protilátek proti těmto tryptaminům bylo nutné připojit je k nosnému proteinu a k tomuto účelu byly vytvořeny hapteny, nesoucí specifické spojovací můstky. Pro tyto účely byl jako vhodný nosný protein vybrán hovězí sérový albumin (BSA). Při tvorbě konjugátů byla využita metoda aktivovaného esteru, při níž je hapten reakcí s *N,N'*-dicyklohexylkarbodiimidem (DCC) a *N*-hydroxysukcinimidem (NHS) nejprve převeden na nestabilní derivát *O*-acylisomočoviny, a poté na aktivovaný ester. Vlastní konjugační reakce, při níž dochází k tvorbě amidové vazby mezi karboxylovou skupinou haptenu a primární aminoskupinou aminokyseliny lysinu v BSA, pak probíhala v reverzním micelárním prostředí anionaktivního tenzidu.

15 Způsob přípravy derivátů tryptaminu

Syntéza haptenu I a II je založena na metodě Speetera a Anthonyho pro výstavbu tryptaminových derivátů. (Speeter, M. E.; Anthony, W. C., The Action of Oxalyl Chloride on Indoles - a New Approach to Tryptamines. J Am Chem Soc 1954, 76(23):6208–6210.) Indol, případně 5-methoxyindol, je nejprve převeden reakcí s oxalylchloridem na příslušný glyoxylylchlorid. Jeho reakcí s methylaminem a následnou redukcí vzniklého amidu se připraví *N*-methyltryptamin, případně 5-methoxy-*N*-methyltryptamin. Alkylací dusíku aminoskupiny ethyl-4-brombutanoátem a následnou bazickou hydrolýzou je do molekuly zaveden spojovací můstek nesoucí karboxylovou funkční skupinu. Takto připravené hapteny, je proto možné konjugovat s ϵ -aminoskupinami lysinových zbytků proteinu za vytvoření amidových vazeb.

K přípravě haptenu III až VII byl využit přístup založený na Fischerově syntéze indolových derivátů vycházející z příslušných arylhydraziniových solí a acetalu 4-(*N,N*-dialkylamino)butanal. (Chen, C. Y.; Senanayake, C. H.; Bill, T. J.; Larsen, R. D.; Verhoeven, T. R.; Reider, P. J., Improved Fischer Indole Reaction for the Preparation of *N,N*-Dimethyltryptamines - Synthesis of L-695,894, a Potent 5-HT_{1D} Receptor Agonist. J Org Chem 1994, 59(13):3738–3741.) Hydraziniové soli lze připravit ve vysokém výtěžku z příslušných anilinů diazotací a následnou redukcí diazoniové soli pomocí SnCl₂·2H₂O. Při použití hydraziniové soli nesoucí na aromatickém jádře přímo spojku zakončenou karboxylovou funkcí se ukázalo, že za podmínek Fischerovy reakce nelze připravit hapteny IV a VI s 4-uhlíkatou spojkou. Úpravou podmínek Fischerovy reakce a použitím hydraziniových solí nesoucích na aromatickém jádře spojku s esterovou funkční skupinou se podařilo připravit příslušné indolové deriváty a jejich hydrolýzou byly získány hapteny III až VI. Zatímco 4-(*N,N*-dimethylamino)-1,1-dimethoxybutan, použitý pro přípravu haptenu III až VI, byl připraven podle postupů popsanych v literatuře (Koch, S. S. C.; Chamberlin, A. R., Enantioselective Preparation of Beta-Alkyl-Gamma-Butyrolactones from Functionalized Ketene Dithioacetals. J Org Chem 1993, 58(10):2725–2737.; Chen, C. Y.; Senanayake, C. H.; Bill, T. J.; Larsen, R. D.; Verhoeven, T. R.; Reider, P. J., Improved Fischer Indole Reaction for the Preparation of *N,N*-Dimethyltryptamines - Synthesis of L-695,894, a Potent 5-HT_{1D} Receptor Agonist. J Org Chem 1994, 59(13):3738–3741.) Pro přípravu 4-(*N,N*-diisopropylamino)-1,1-dimethoxybutanu byla použita inovativní syntetická cesta. Pro jeho syntézu je vycházeno ze sukcinanhydridu, který reakcí s diisopropylaminem poskytne monodiisopropylamid butandiové kyseliny. Redukcí tohoto amidu LiAlH₄ je získán 4-(*N,N*-diisopropylamino)butanol. Swernovou oxidací tohoto alkoholu a následnou acetalizací vzniklého aldehydu methanolem je získán 4-(*N,N*-diisopropylamino)-1,1-dimethoxybutan, který byl použit ve Fischerově reakci pro syntézu haptenu VII.

Antiséra proti jednotlivým drogám byla získána imunizací laboratorních králíků. Metodou enzymové imunoanalýzy byly testovány interakce králičích antisér připravených proti příslušným derivátům tryptaminu. S antiséry vykazujícími nejlepší charakteristiky byly pro imunochemické stanovení optimalizovány a charakterizovány varianty ELISA v nepřímém kompetitivním

uspořádání. Byl určen významný analytický parametr tzv. 50% intercept (I_{50} , viz tabulka). I_{50} představuje koncentraci analytu, potřebnou k vyvážení 50 % protilátek přítomných v reakčním roztoku, která je nezbytná pro kvalitativní stanovení derivátu tryptaminu v neznámém vzorku. Při imunoanalýze v nepřímém kompetitivním uspořádání soutěží antigen zakotvený na pevném nosiči (imobilizační konjugát) se stanovovaným antigenem ve vzorku o omezený počet vazebných míst na molekulách protilátky. Čím více antigenu obsahuje analyzovaný vzorek, tím méně protilátky se naváže na zakotvený antigen. Nenavázané složky se odstraní a přidá se enzymem značená sekundární protilátka proti navázané protilátce. Detekce je uskutečněna enzymovou reakcí, kdy vzniká barevný produkt, jehož intenzita zbarvení je měřena spektrofotometricky.

Byla získána celkem čtyři antiséra proti třem drogám a to DMT, 5MeO-DMT a DiPT. Byla získána dvě různá antiséra proti DMT, kdy byl k imunizaci použit konjugát BSA-I a konjugát BSA-II.

Dále bylo získáno antisérum proti 5MeO-DMT, kdy byl k imunizaci použit konjugát BSA-IV. A také antisérum proti DiPT, kdy byl k imunizaci použit konjugát BSA-VII.

Získaná antiséra byla testovaná na křížové reaktivity a bylo zjištěno, že velmi záleží na umístění spojovacího můstku, který má vliv na vazbu protilátka – antigen, tedy konformaci pro možnou vazbu.

Objasnění výkresů

Obr. 1: Schéma syntézy haptenu I až II.

Obr. 2: Schéma syntézy haptenu III a IV využívající arylhydraziniové soli nesoucí spojku s karboxylovou funkční skupinou.

Obr. 3: Schéma syntézy haptenu III až VI využívající arylhydraziniové soli nesoucí spojku s esterovou funkční skupinou.

Obr. 4: Schéma syntézy 4-(*N,N*-dimethylamino)-1,1-dimethoxybutanu.

Obr. 5: Schéma syntézy haptenu VII.

Obr. 6: Schéma syntézy 4-(*N,N*-diisopropylamino)-1,1-dimethoxybutanu.

Obr. 7: MALDI spektrum prokazující strukturu připraveného konjugátu haptenu I s BSA, detekující, že 13 molekul haptenu I se průměrně navázalo na nosný protein – BSA. Větší pík odpovídá jednou nabitému konjugátu, menší pík odpovídá 2x nabitému konjugátu.

Obr. 8: MALDI spektrum prokazující strukturu připraveného konjugátu haptenu II s BSA, detekující, že 3 molekuly haptenu II se průměrně navázaly na nosný protein – BSA. Větší pík odpovídá jednou nabitému konjugátu, menší pík odpovídá 2x nabitému konjugátu.

Obr. 9: MALDI spektrum prokazující strukturu připraveného konjugátu haptenu III s BSA, detekující, že 31 molekul haptenu III se průměrně navázalo na nosný protein – BSA. Větší pík odpovídá jednou nabitému konjugátu, menší pík odpovídá 2x nabitému konjugátu.

Obr. 10: MALDI spektrum prokazující strukturu připraveného konjugátu haptenu IV s BSA, detekující, že 28 molekul haptenu IV se průměrně navázalo na nosný protein – BSA. Větší pík odpovídá jednou nabitému konjugátu, menší pík odpovídá 2x nabitému konjugátu.

Obr. 11: MALDI spektrum prokazující strukturu připraveného konjugátu haptenu V s BSA, detekující, že 37 molekul haptenu VII se průměrně navázalo na nosný protein – BSA. Větší pík odpovídá jednou nabitému konjugátu, menší pík odpovídá 2x nabitému konjugátu.

5 Obr. 12: Schéma přípravy konjugátů haptenu s nosným proteinem – BSA.

Obr. 13: Schématický průběh nepřímé kompetitivní ELISA; A imobilizace konjugátu na stěny jamek mikrotitrační destičky; B aplikace kompetujících složek; C aplikace protilátky značené enzymem peroxidázou (Gar-Po); D aplikace substrátu pro peroxidázu; E enzymová reakce peroxidázy se substrátem; F zastavení enzymové reakce kyselinou sírovou; ● imobilizační konjugát; ○ analyt; ○ králičí antisérum; ▤ protilátka značená enzymem (Gar-Po); ○ substrát pro peroxidázu.

10

Obr. 14: Chemická struktura haptenu I - hydrochlorid 4-{N-[2-(1*H*-indol-3-yl)ethyl]-N-methyl}aminobutanové kyseliny

15

Obr. 15: Chemická struktura haptenu II. - hydrochlorid 4-[N-[2-(5-methoxy-1*H*-indol-3-yl)ethyl]-N-methyl]aminobutanové kyseliny

20 Obr. 16: Chemická struktura haptenu III. - hydrochlorid 2-{3-[2-(*N,N*-dimethylamino)ethyl]-1*H*-indol-5-yl}octové kyseliny

Obr. 17: Chemická struktura haptenu IV. - hydrochlorid 2-{3-[2-(*N,N*-dimethylamino)ethyl]-1*H*-indol-5-yloxy}octové kyseliny

25

Obr. 18: Chemická struktura haptenu V. - hydrochlorid 4-{3-[2-(*N,N*-dimethylamino)ethyl]-1*H*-indol-5-yl}butanové kyseliny

Obr. 19: Chemická struktura haptenu VI. - hydrochlorid 4-{3-[2-(*N,N*-dimethylamino)ethyl]-1*H*-indol-5-yloxy}butanové kyseliny

30

Obr. 20: Chemická struktura haptenu VII. - hydrochlorid {3-[2-(*N,N*-diisopropylamino)ethyl]-1*H*-indol-5-yl}octové kyseliny

35 Obr. 21: Analytická optimalizace ELISY

Obr. 22: Graf znázorňující titrační křivky imobilizačního konjugátu (konjugát haptenu VII s BSA) a antiséra Anti-DiPT.

40 Obr. 23: Schéma mikrotitrační destičky s koncentracemi

Obr. 24 Graf znázorňující kalibrační křivky pro různé kombinace imunoreagencií

Obr. 25. Schéma mikrotitrační destičky s hodnotami naměřených absorbancí

45

Obr. 26: Tabulka popisující přehled křížových reaktivit

Obr. 27: Hodnoty křížových reaktivit zbylých konjugátů byly získány obdobně dle příkladu 10, 10a a 11 s příslušným konjugátem

50

Příklady uskutečnění vynálezu

Příklad 1

5

Syntéza haptenu I

Výchozí indol (2,00 g, 17,1 mmol) byl rozpuštěn v diethyletheru (50 ml) a ke vzniklému roztoku byl po chlazení ledovou lázní přidán po kapkách oxalylchlorid (1,7 ml, 19,6 mmol). Směs byla
 10 míchána 1 hodinu při 0 °C a poté 2 hodiny při teplotě místnosti. Vzniklý barevný precipitát byl oddělen filtrací, promyt diethyletherem a usušen, čímž byl získán 2-(*1H*-indol-3-yl)-2-oxoacetylchlorid jako žlutá krystalická látka (3,31 g, 93 %).

2-(*1H*-indol-3-yl)-2-oxoacetylchlorid (3,31 g, 16,0 mmol) byl po částech přidán k vodnému
 15 roztoku methylaminu (40 % w/w, 22 ml) ochlazenému ledovou lázní. Vzniklá suspenze byla 2 hodiny míchána při 0 °C a poté byl precipitát zfiltrován. Rekrytalizací z tetrahydrofuranu/diethyletheru (THF/Et₂O) byl získán 2-(*1H*-indol-3-yl)-*N*-methyl-2-oxoacetamid jako lehce nažloutlá krystalická látka (2,61 g, 81 %).

Roztok 2-(*1H*-indol-3-yl)-*N*-methyl-2-oxoacetamidu (2,00 g, 9,9 mmol) v THF (200 ml) byl
 20 přikapán k suspenzi LiAlH₄ (3,79 g, 100,0 mmol) v THF (100 ml) ochlazené ledovou lázní. Směs byla následně refluxována 7 hodin, poté ochlazená ledovou lázní a opatrně rozložena přidávkem vody (40 ml), 20% roztoku NaOH (40 ml) a poté znovu vody (40 ml). Vzniklý precipitát byl
 25 odfiltrován a promyt THF. Filtrát byl odpařen, zbytek znovu rozpuštěn v dichlormethanu (200 ml), vzniklý roztok byl promyt vodou (3x 200 ml) a solankou (150 ml) a organická fáze vysušena MgSO₄. Kolonovou chromatografií (CH₂Cl₂:MeOH, 5:1 + 1 % NH₃ (aq)) byl získán *N*-methyltryptamin jako bezbarvý sirup (683 mg, 40 %), který stáním asi za jednu hodinu postupně vykrytalizoval.

Ke směsi *N*-methyltryptaminu (523 mg, 3,0 mmol) a NaI (450 mg, 3,0 mmol) v
 30 isopropylalkoholu (30 ml) byl přidán diisopropylethylamin (0,84 ml, 4,8 mmol) a ethyl-4-brombutanoát (878 mg, 4,5 mmol) a vzniklý roztok byl zahříván přes noc na 60 °C. Poté byla směs odpařena, zbytek rozpuštěn v dichlormethanu (75 ml) a roztok byl promyt 10% roztokem Na₂CO₃ (75 ml), vodou (75 ml) a solankou (75 ml). Kolonovou chromatografií (CH₂Cl₂:MeOH,
 35 10:1 + 1 % NH₃ (aq)) byl získán ethyl-4-{*N*-[2-(*1H*-indol-3-yl)ethyl]-*N*-methyl}aminobutanoát jako světle hnědý sirup (570 mg, 65 %).

Ke směsi ethyl-4-{*N*-[2-(*1H*-indol-3-yl)ethyl]-*N*-methyl}aminobutanoátu (433 mg, 1,5 mmol) a
 40 40% vodného ethanolu (22 ml) byl přidán NaOH (66 mg, 1,7 mmol) a směs byla míchána přes noc při teplotě místnosti. Poté byl roztok okyselen 1 mol/l HCl na pH = 1 a odpařen. Flash chromatografií na reverzní fázi (MeOH:H₂O, gradient 5 až 100 % MeOH) byl získán hydrochlorid 4-{*N*-[2-(*1H*-indol-3-yl)ethyl]-*N*-methyl}aminobutanové kyseliny (hapten I) jako bezbarvá sklovitá pěna (274 mg, 62 %).

¹H NMR (300 MHz, DMSO-d₆) δ: 1,90 (qui, 2H, J = 7,3 Hz, CH₂CH₂CH₂), 2,35 (t, 2H, J = 7,3
 45 Hz, NCH₂CH₂CH₂), 2,80 (s, 3H, NCH₃), 3,06 - 3,15 (m, 4H, NCH₂CH₂CH₂, ArCH₂CH₂), 3,21 - 3,31 (m, 2H, ArCH₂CH₂), 6,97 - 7,04 (m, 1H, ArH), 7,06 - 7,13 (m, 1H, ArH), 7,24 (d, 1H, J = 2,3 Hz, ArH), 7,34 - 7,39 (m, 1H, ArH), 7,62 (d, 1H, J = 7,6 Hz, ArH), 10,97 (s br, 1H, NH)

¹³C NMR (75 MHz, DMSO-d₆) δ: 20,09; 20,71; 31,51; 40,12; 55,06; 56,07; 110,12; 111,48;
 50 118,22; 118,37; 121,11; 123,05; 126,86; 136,21; 174,08

HRMS (ESI): *m/z* [M + H]⁺ vypočteno pro C₁₅H₂₀N₂O₂: 261,15975, nalezeno 261,15979

55

Příklad 1a

Syntéza Haptenu II

- 5 Hydrochlorid 4-[*N*-[2-(5-methoxy-*1H*-indol-3-yl)ethyl]-*N*-methyl]aminobutanové kyseliny (hapten II) byl připraven z 5-methoxy-*1H*-indolu podle postupu popsaného v příkladu 1 jako bezbarvá sklovitá pěna.

10 ^1H NMR (300 MHz, CD_3OD) δ : 1,86 (qui, 2H, $J = 6,2$ Hz, $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2$), 2,38 (t, 2H, $J = 6,2$ Hz, $\text{NCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2$), 2,77 (s, 3H, NCH_3), 3,03 - 3,14 (m, 4H, $\text{NCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2$, ArCH_2CH_2), 3,20 - 3,29 (m, 2H, ArCH_2CH_2), 3,80 (s, 3H, OCH_3), 6,78 (dd, 1H, $J_1 = 8,8$ Hz, $J_2 = 2,3$ Hz, ArH), 7,06 (d, 1H, $J = 2,3$ Hz, ArH), 7,10 (s, 1H, ArH), 7,25 (d, 1H, $J = 8,8$ Hz, ArH)

15 ^{13}C NMR (75 MHz, D_2O) δ : 19,77; 20,11; 33,89; 39,73; 55,38; 55,78; 56,00; 100,43; 108,32; 111,71; 112,90; 124,80; 126,77; 131,71; 153,00; 180,37

HRMS (ESI): m/z $[\text{M} + \text{H}]^+$ vypočteno pro $\text{C}_{16}\text{H}_{22}\text{N}_2\text{O}_3$: 291,17032, nalezeno 291,17050

20 Příklad 2

Syntéza haptenu III

25 Suspenze výchozí (4-aminofenyl)octové kyseliny (2,27 g, 15,0 mmol) v koncentrované HCl (30 ml) byla ochlazená na -5°C . Poté byl po kapkách přidán roztok NaNO_2 (1,09 g, 15,8 mmol) ve vodě (8 ml). Směs byla míchána 1 hodinu při -5°C a poté přikapána k roztoku $\text{SnCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (10,15 g, 45,0 mmol) v koncentrované HCl (20 ml) vychlazenému na -20°C a při této teplotě byla směs míchána další 2,5 hodiny. Vzniklý precipitát byl oddělen filtrací, promyt studeným ethanolom a usušen, čímž byl získán 4-(karboxymethyl)fenylhydrazinium-chlorid jako lehce nažloutlá krystalická látka (2,86 g, 94 %).

30 Roztok ethyl-4-chlorbutanoátu (12,30 g, 81,7 mmol) v suchém dichlormethanu (125 ml) byl ochlazen na -78°C a po kapkách byl přidán diisobutylaluminium hydrid (DIBAL-H) (94 ml, 1 mol/l roztok v hexanu). Směs byla míchána půl hodiny při -78°C , pak byla nalita k 10% HCl (160 ml) vychlazené ledovou lázní a celá směs byla 1 hodinu míchána při 0°C . Poté byla organická fáze oddělena, vodná extrahována dichlormethanem (2x 100 ml) a spojené organické podíly promyty solankou (300 ml) a usušeny pomocí MgSO_4 . Roztok byl zkoncentrován na vakuové rotační odparce a ke zbytku přidán methanol (35 ml) okyselený koncentrovanou H_2SO_4 (několik kapek). Vzniklá směs byla míchána přes noc, naředěna dichlormethanem (125 ml), promyta 10% roztokem NaHCO_3 (100 ml), vodou (100 ml) a solankou (100 ml) a organická fáze usušena pomocí MgSO_4 . Vakuovou destilací byl získán 4-chlor-1,1-dimethoxybutan jako bezbarvá kapalina (9,76 g, 78 %).

45 4-chlor-1,1-dimethoxybutan (4,86 g, 31,8 mmol) byl přidán k roztoku dimethylaminu ve vodě (30 ml, 40% w/w) a směs byla míchána 15 minut při teplotě místnosti. Poté byla reakční směs zahřívána na 65°C po dobu 3,5 hodiny. Po ochlazení na teplotu místnosti byla směs extrahována dichlormethanem (2x 50 ml), spojené organické podíly byly promyty 10% roztokem NaHCO_3 (100 ml) a solankou (100 ml) a usušeny pomocí MgSO_4 . Vakuovou destilací byl získán 4-(*N,N*-dimethylamino)-1,1-dimethoxybutan jako bezbarvá kapalina (4,32 g, 84 %).

50 Ke 4% H_2SO_4 (25 ml), která byla nejprve probublávána argonem při 50°C pro odstranění rozpuštěného kyslíku, byl přidán 4-(karboxymethyl)fenylhydrazinium-chlorid (608 mg, 3,0 mmol) a poté po kapkách 4-(*N,N*-dimethylamino)-1,1-dimethoxybutan (581 mg, 3,6 mmol). Reakční směs byla zahřívána 3,5 hodiny na 80°C , poté ochlazená na teplotu místnosti a reakční směs neutralizována pomocí 25% vodného amoniaku. Po odstranění rozpouštědla byl odparek

zbaven většiny anorganických solí promytím EtOH (30 ml) a vzniklý roztok byl odpařen. Poté byl odparek rozpuštěn v 1 mol/l HCl (30 ml), roztok odpařen a flash chromatografií na reverzní fázi (MeOH:H₂O, gradient 5 až 100 % MeOH) byl získán hydrochlorid 2-{3-[2-(*N,N*-dimethylamino)ethyl]-1*H*-indol-5-yl}octové kyseliny (hapten III) (414 mg, 56 %) jako bílá pevná látka.

¹H NMR (300 MHz, CD₃OD) δ: 2,87 (s, 6H, N(CH₃)₂), 3,11 - 3,21 (m, 2H, CH₂CH₂N), 3,30 - 3,39 (m, 2H, CH₂CH₂N), 3,66 (s, 2H, CH₂COOH), 7,07 (dd, 1H, J₁ = 8,5 Hz, J₂ = 1,5 Hz, ArH), 7,15 (s, 1H, ArH), 7,30 (d, 1H, J = 8,5 Hz, ArH), 7,51 (s, 1H, ArH)

¹³C NMR (75 MHz, D₂O) δ: 20,03; 41,42; 42,63; 57,50; 108,28; 112,21; 118,67; 123,56; 124,58; 125,63; 126,69; 135,47; 178,25

HRMS (ESI): *m/z* [M + H]⁺ vypočteno pro C₁₄H₁₈N₂O₂: 247,14410, nalezeno 247,14413

Příklad 3

Syntéza haptenu IV

K roztoku výchozího 4-aminofenolu (10,09 g, 100,0 mmol) v methanolu (250 ml) byl přidán triethylamin (30 ml, 210,0 mmol) a di-*tert*-butyl-dikarbonát (24 g, 110,0 mmol) a směs byla míchána přes noc při teplotě místnosti. Poté byl methanol odpařen, zbytek rozdělen mezi ethylacetát (250 ml) a 0,25 mol/l HCl (100 ml) a organická vrstva promyta nasyceným roztokem NH₄Cl (3x 70 ml). Kolonovou chromatografií (hexan:EtOAc, 1:1) byl získán *N*-(*tert*-butoxykarbonyl)-4-aminofenol (19,31 g, 92 %) jako bílá krystalická látka.

K roztoku *N*-(*tert*-butoxykarbonyl)-4-aminofenolu (8,40 g, 40,0 mmol) v acetonu (160 ml) byl přidán ethyl-bromacetát (13,36 g, 80,0 mmol) a pevný K₂CO₃ (16,58 g, 120,0 mmol) a vzniklá směs byla refluxována po dobu 4 hodin. Poté byla směs ochlazená na teplotu místnosti, pevný podíl odfiltrován a filtrát odpařen. Kolonovou chromatografií (hexan:ethylacetát (EtOAc), 4:1) byl získán ethyl-2-{4-[(*tert*-butoxykarbonyl)amino]fenoxy}acetát (11,29 g, 96 %) jako bezbarvý sirup, který stáním zkrystalizoval.

Suspenze ethyl-2-{4-[(*tert*-butoxykarbonyl)amino]fenoxy}acetátu XX (11,14 g, 37,7 mmol) v 1 mol/l HCl (100 ml) byla míchána při 60 °C po dobu 8 hodin. Poté byl vzniklý roztok ochlazen na teplotu místnosti a extrahován dichlormethanem (80 ml). Pomocí pevného Na₂CO₃ bylo pH vodné fáze upraveno na hodnotu 4 až 5 (podle pH papírku). Filtrací a sušením vzniklého precipitátu byla získána 2-(4-aminofenoxi)octová kyselina (5,71 g, 91 %) jako lehce nažloutlá krystalická látka.

Suspenze 2-(4-aminofenoxi)octové kyseliny (836 mg, 5,0 mmol) v koncentrované HCl (10 ml) byla ochlazená na -5 °C. Poté byl po kapkách přidán roztok NaNO₂ (363 mg, 5,3 mmol) ve vodě (3 ml). Směs byla míchána 1 hodinu při -5 °C a poté přikapána k roztoku SnCl₂·2H₂O (3,39 g, 15,0 mmol) v koncentrované HCl (7 ml) vychlazenému na -20 °C a při této teplotě byla směs míchána další 2,5 hodiny. Vzniklý precipitát byl oddělen filtrací, promyt studeným ethanolem a usušen, čímž byl získán 4-(karboxymethoxy)fenylhydrazinium-chlorid (937 mg, 86 %) jako bílá krystalická látka.

Ke 4% H₂SO₄ (15 ml), která byla nejprve probublávána argonem při 50 °C pro odstranění rozpuštěného kyslíku, byl přidán 4-(karboxymethoxy)fenylhydrazinium-chlorid (328 mg, 1,5 mmol) a poté po kapkách 4-(*N,N*-dimethylamino)-1,1-dimethoxybutan (290 mg, 1,8 mmol). Reakční směs byla zahřívána 3,5 hodiny na 80 °C, poté ochlazená na teplotu místnosti a neutralizována pomocí koncentrovaného vodného amoniaku. Po odstranění rozpouštědla byl odparek zbaven většiny anorganických solí promytím EtOH (15 ml) a vzniklý roztok byl

odpařen. Poté byl odparek rozpuštěn v 1 mol/l HCl (15 ml), roztok odpařen a flash chromatografií na reverzní fázi (MeOH:H₂O, gradient 5 až 100 % MeOH) byl získán hydrochlorid 2-{3-[2-(*N,N*-dimethylamino)ethyl]-*1H*-indol-5-yloxy}octové kyseliny (hapten IV) (209 mg, 53 %) jako bílá pevná látka.

5

¹H NMR (300 MHz, DMSO-d₆ + D₂O) δ: 2,72 (s, 6H, N(CH₃)₂), 2,90 - 3,00 (m, 2H, CH₂CH₂N), 3,08 - 3,18 (m, 2H, CH₂CH₂N), 4,26 (s, 2H, CH₂O), 6,73 (dd, 1H, J₁ = 8,8 Hz, J₂ = 2,1 Hz, ArH), 6,99 (d, 1H, J = 2,1 Hz, ArH), 7,10 (s, 1H, ArH), 7,21 (d, 1H, J = 8,8 Hz, ArH)

10

¹³C NMR (75 MHz, D₂O) δ: 20,11; 42,65; 57,43; 67,69; 100,87; 108,22; 112,26; 112,93; 124,81; 126,63; 131,74; 151,95; 177,21

HRMS (ESI): *m/z* [M + H]⁺ vypočteno pro C₁₄H₁₈N₂O₃: 263,13902, nalezeno 263,13912

15

Příklad 4

Syntéza haptenu VI

K roztoku *N*-(*tert*-butoxykarbonyl)-4-aminofenolu (8,40 g, 40,0 mmol) (viz příklad 3) v acetonu (160 ml) byl přidán ethyl-4-brombutanoát (15,60 g, 80,0 mmol) a pevný K₂CO₃ (16,58 g, 120,0 mmol) a vzniklá směs byla refluxována po dobu 6,5 hodiny. Poté byla směs ochlazena na teplotu místnosti, pevný podíl odfiltrován a filtrát odpařen. Kolonovou chromatografií (hexan:EtOAc, 4:1) byl získán ethyl-4-{4-[(*tert*-butoxykarbonyl)amino]fenoxy}butanoát (12,35 g, 97 %) jako bílá krystalická látka.

25

Trifluorooctová kyselina (12,5 ml) byla přidána k roztoku ethyl-4-{4-[(*tert*-butoxykarbonyl)amino]fenoxy}butanoátu (4,05 g, 12,5 mmol) v dichlormethanu (100 ml). Roztok byl míchán 3 hodiny, poté byl naředěn dalšími 100 ml dichlormethanu a neutralizován 10% roztokem NaHCO₃ (200 ml). Vodná fáze byla extrahována dichlormethanem (2x 50 ml), organické podíly byly spojeny a promyty solankou (150 ml). Flash chromatografií (hexan:EtOAc, gradient 30 až 50 % EtOAc) byl získán ethyl-4-(4-aminofenoxy)butanoát (2,63 g, 94 %) jako světle hnědý sirup.

30

Roztok ethyl-4-(4-aminofenoxy)butanoátu (2,63 g, 11,8 mmol) v koncentrované HCl (12 ml) byl ochlazen na -10 °C a poté byl přidán po kapkách roztok NaNO₂ (853 mg, 12,4 mmol) ve vodě (5 ml) tak, aby teplota směsi nepřesáhla 0 °C. Po přidavku byla reakční směs míchána ještě 10 minut a poté byla přidána po kapkách k roztoku SnCl₂·2H₂O (9,97 g, 44,2 mmol) v koncentrované HCl (7 ml) ochlazenému na -15 °C tak, aby teplota směsi nepřesáhla -5 °C. Po kompletním přidavku byla vzniklá suspenze ponechána ohřát na teplotu místnosti, zfiltrována a pevný podíl byl promyt ledovou vodou a diethyletherem. Usušením byl získán 4-[3-(ethoxykarbonyl)propyloxy]fenyldiazonium-chlorid (1,93 g, 60 %) jako bílá krystalická látka.

35

40

Ke 4% roztoku H₂SO₄ ve směsi ethanol:voda, 5:1 (15 ml), která byla nejprve probublávána argonem pro odstranění rozpuštěného kyslíku, byl přidán 4-[3-(ethoxykarbonyl)propyloxy]fenyldiazonium-chlorid (412 mg, 1,5 mmol) a poté po kapkách 4-(*N,N*-dimethylamino)-1,1-dimethoxybutan (290 mg, 1,8 mmol). Reakční směs byla zahřívána 4 hodiny na 85 °C, poté byla ochlazena ledovou lázní a naředěna dichlormethanem (20 ml). Vodná fáze byla alkalizována 1 mol/l roztokem NaOH, fáze byly odděleny a vodná ihned extrahována dichlormethanem (2x 20 ml). Organické podíly byly spojeny, sušeny MgSO₄ a kolonovou chromatografií (dichlormethan:methanol, 9:1 + 1 % NH₃ (aq)) byl získán ethyl-4-{3-[2-(*N,N*-dimethylamino)ethyl]-*1H*-indol-5-yloxy}butanoát (98 mg, 21 %) jako světle hnědý viskózní sirup.

50

Ke směsi ethyl-4-{3-[2-(*N,N*-dimethylamino)ethyl]-*1H*-indol-5-yloxy}butanoátu (95 mg, 0,3 mmol) a 20% ethanolu (15 ml) byl přidán 1 mol/l roztok NaOH (0,36 mmol, 0,36 ml) a reakční směs byla míchána přes noc při teplotě místnosti. Poté byla směs naředěna vodou (5 ml) a extrahována diethyletherem (2x 10 ml). Vodná fáze byla okyselena pomocí 1 mol/l HCl na pH = 1 a odpařena. Flash chromatografií na reverzní fázi (MeOH:H₂O, gradient 5 až 100 % MeOH) byl získán hydrochlorid 4-{3-[2-(*N,N*-dimethylamino)ethyl]-*1H*-indol-5-yloxy}butanové kyseliny (haptenu VI) (42 mg, 49 %) jako bílá pevná látka.

¹H NMR (300 MHz, CD₃OD) δ: 2,08 (qui, 2H, CH₂CH₂CH₂, J = 6,7 Hz), 2,39 (t, 2H, CH₂COOH, J = 7,2 Hz), 2,74 (s, 6H, N(CH₃)₂), 2,98 - 3,09 (m, 2H, CH₂CH₂N), 3,10 - 3,22 (m, 2H, CH₂CH₂N), 4,04 (t, 2H, CH₂O, J = 6,5 Hz), 6,76 (dd, 1H, J₁ = 8,8 Hz, J₂ = 2,2 Hz, ArH), 7,07 (s, 1H, ArH), 7,12 (d, 1H, J = 2,2 Hz, ArH), 7,22 (d, 1H, J = 8,8 Hz, ArH)

¹³C NMR (75 MHz, CD₃OD) δ: 22,08; 27,34; 35,02; 43,28; 59,00; 69,54; 102,28; 110,04; 113,18; 113,57; 124,71; 128,53; 133,33; 154,45; 181,83

Příklad 4a

Syntéza Haptenu V

Hydrochlorid 4-{3-[2-(*N,N*-dimethylamino)ethyl]-*1H*-indol-5-yl}butanové kyseliny (haptenu V) byl připraven z ethyl-4-(4-aminofenyl)butanoátu podle postupu popsaného v příkladu 4 jako bílá pevná látka.

¹H NMR (300 MHz, CD₃OD) δ: 1,95 (qui, 2H, CH₂CH₂CH₂, J = 7,3 Hz), 2,23 (t, 2H, CH₂COOH, J = 7,3 Hz), 2,68 - 2,80 (m, 8H, N(CH₃)₂ + CH₂Ar), 3,04 - 3,15 (m, 2H, CH₂CH₂N), 3,16 - 3,27 (m, 2H, CH₂CH₂N), 6,98 (dd, 1H, J₁ = 8,5 Hz, J₂ = 1,3 Hz, ArH), 7,09 (s, 1H, ArH), 7,25 (d, 1H, J = 8,5 Hz, ArH), 7,39 (s, 1H, ArH)

¹³C NMR (75 MHz, CD₃OD) δ: 22,04; 30,19; 36,96; 38,08; 43,36; 59,14; 109,85; 112,34; 118,38; 123,95; 124,17; 128,29; 134,02; 136,80; 171,57

Příklad 5

Syntéza 4-(*N,N*-diisopropylamino)-1,1-dimethoxybutanu

K roztoku sukcinanhydridu (10,07 g, 100 mmol) v dichlormethanu (300 ml) byl přidán diisopropylamin (21,8 ml, 300 mmol) a vzniklý roztok byl míchán 20 hodin při teplotě místnosti. Poté byla reakční směs zkoncentrována, byla přidána 1 mol/l HCl (250 ml) a vodná fáze byla extrahována dichlormethanem (3x 150 ml). Po sušení MgSO₄ a odpaření rozpouštědel byla získána 4-(*N,N*-diisopropylamino)-4-oxobutanová kyselina (16,50 g, 82 %) jako světle hnědý viskózní olej, který v lednici za dva dny zkrystalizoval.

Suspenze LiAlH₄ (6,83 g, 180 mmol) v THF (300 ml) byla ochlazená ledovou lázní a poté k ní byl přikapán po kapkách roztok 4-(*N,N*-diisopropylamino)-4-oxobutanové kyseliny (8,05 g, 40 mmol) v THF (150 ml). Po kompletním přidavku byla reakční směs refluxována 5 hodin. Poté byla směs ochlazená ledovou lázní a rozložena opatrným přidavkem vody (40 ml), 20% roztoku NaOH (40 ml) a opět vody (40 ml). Vzniklá suspenze byla zfiltrována a pevný podíl promyt diethyletherem. Filtrát byl odpařen a znovu rozpuštěn v dichlormethanu (250 ml), vzniklý roztok byl promyt vodou (3x 200 ml) a solankou (150 ml) a sušen MgSO₄. Vakuovou destilací byl získán 4-(*N,N*-diisopropylamino)butanol (4,91 g, 71 %) jako bezbarvá kapalina.

Dimethylsulfoxid (DMSO) (2,56 ml, 36 mmol) byl přidán po kapkách k roztoku oxalylchloridu (2,57 ml, 30 mmol) v suchém dichlormethanu (60 ml) ochlazenému na -55 °C a směs byla míchána ještě dalších 10 minut. Dále byl přidán po kapkách roztok 4-(*N,N*-diisopropylamino)butanolu (2,60 g, 15 mmol) v dichlormethanu (10 ml) a vzniklá směs byla po
 5 přidavku ještě 15 minut míchána při -55 °C. Pak byl ke směsi přikapán triethylamin (8,9 ml, 60 mmol) a reakční směs byla postupně ohřáta na teplotu místnosti (cca 1 h). Poté byla směs nalita do vody (130 ml), fáze byly odděleny a vodná byla extrahována dichlormethanem (2x 100 ml). Organické podíly byly spojeny, sušeny MgSO_4 a odpařeny. Získaný surový intermediát byl rozpuštěn v methanolu (50 ml), k roztoku byla přidána koncentrovaná H_2SO_4 (2,5 ml) a
 10 reakční směs byla míchána přes noc při teplotě místnosti. Poté byl roztok naředěn dichlormethanem (150 ml) a za chlazení ledovou lázní byl přidán 20% NaOH (100 ml) až do bazického pH (pH = 10). Fáze byly odděleny, vodná byla naředěna vodou (50 ml) a extrahována dichlormethanem (2x 75 ml). Organické fáze byly spojeny, promyty solankou (200 ml) a sušeny MgSO_4 . Vakuovou destilací byl získán 4-(*N,N*-diisopropylamino)-1,1-dimethoxybutan jako
 15 bezbarvá kapalina (1,74 g, 54 %).

t.v. = 51 až 55 °C (32 Pa).

^1H NMR (300 MHz, CDCl_3) δ : 0,98 (d, 12H, 2x $\text{CH}(\text{CH}_3)_2$, $J = 6,5$ Hz), 1,36 – 1,51 (m, 2H, $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{N}$), 1,53 – 1,63 (m, 2H, CHCH_2CH_2), 2,39 (t, 2H, CH_2N , $J = 7,3$ Hz), 2,99 (sept, 2H, 2x $\text{CH}(\text{CH}_3)_2$, $J = 6,5$ Hz), 3,31 (s, 6H, 2x OCH_3), 4,37 (t, 1H, $\text{CH}(\text{OCH}_3)_2$, $J = 5,8$ Hz)

^{13}C NMR (75 MHz, CDCl_3) δ : 20,69; 26,11; 30,28; 44,73; 48,16; 52,59; 104,66

25

Příklad 6

Příprava haptenu VII

K roztoku výchozí (4-aminofenyl)octové kyseliny (7,56 g, 50 mmol) v ethanolu (80 ml) byla přidána koncentrovaná kyselina sírová (3,7 ml) a směs byla refluxována po dobu 6 hodin. Poté byla směs ochlazená na teplotu místnosti a ponechána stát přes noc v lednici. Vzniklá suspenze byla zfiltrována a surový pevný produkt usušen. Přechištěním kolonovou chromatografií (hexan:EtOAc, 2:1), byl získán ethyl-(4-aminofenyl)acetát (6,54 g, 73 %) jako nažloutlá
 35 krystalická látka.

Roztok ethyl-(4-aminofenyl)acetátu (3,00 g, 16,7 mmol) v koncentrované HCl (17 ml) byl ochlazen na -10 °C a poté byl přidán po kapkách roztok NaNO_2 (1,20 g, 17,4 mmol) ve vodě (6 ml) tak, aby teplota směsi nepřesáhla 0 °C. Po přidavku byla reakční směs míchána ještě 10
 40 minut a poté byla přidána po kapkách k roztoku $\text{SnCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (14,17 g, 62,8 mmol) v koncentrované HCl (10 ml) ochlazenému na -15 °C tak, aby teplota směsi nepřesáhla -5 °C. Po kompletním přidavku byla vzniklá suspenze ohřáta na teplotu místnosti, zfiltrována a pevný podíl byl jednou promyt ledovou vodou a diethyletherem. Usušením byl získán 4-
 45 [(ethoxykarbonyl)methyl]fenylhydrazinium-chlorid (2,80 g, 73 %) jako bílá krystalická látka.

Ke 4% roztoku H_2SO_4 ve směsi ethanol:voda, 5:1 (25 ml), která byla nejprve probublávána argonem pro odstranění rozpuštěného kyslíku, byl přidán 4-
 [(ethoxykarbonyl)methyl]fenylhydrazinium-chlorid (461 mg, 2,0 mmol) a poté po kapkách 4-(*N,N*-diisopropylamino)-1,1-dimethoxybutan (522 mg, 2,4 mmol). Reakční směs byla zahřívána
 50 4 hodiny na 90 °C, poté byla ochlazená ledovou lázní a naředěna dichlormethanem (50 ml). Vodná fáze byla alkalizována 1 mol/l roztokem NaOH, fáze byly odděleny a vodná byla naředěna vodou (50 ml) a ihned extrahována dichlormethanem (3x 75 ml). Organické podíly byly spojeny, sušeny MgSO_4 a kolonovou chromatografií (dichlormethan:methanol, 9:1 + 1 % NH_3 (aq)) byl získán ethyl-{3-[2-(*N,N*-diisopropylamino)ethyl]-1H-indol-5-yl}acetát (337 mg, 51 %)
 55 jako nahnědlý viskózní sirup.

Ke směsi ethyl-{3-[2-(*N,N*-diisopropylamino)ethyl]-*1H*-indol-5-yl}acetátu (290 mg, 0,9 mmol) a 20% ethanolu (25 ml) byl přidán 1 mol/l roztok NaOH (1,0 mmol, 1,0 ml) a reakční směs byla míchána přes noc při teplotě místnosti. Poté byla směs naředěna vodou (10 ml) a extrahována diethyletherem. Vodná fáze byla okyselena pomocí 1 mol/l HCl na pH = 1 a odpařena. Flash chromatografií na reverzní fázi (MeOH:H₂O, gradient 5 až 100 % MeOH) byl získán hydrochlorid {3-[2-(*N,N*-diisopropylamino)ethyl]-*1H*-indol-5-yl}octové kyseliny (hapten VII) (201 mg, 67 %) jako bílá pevná látka.

¹H NMR (300 MHz, CD₃OD) δ: 1,26 (d, 12H, 2x CH(CH₃)₂, J = 6,5 Hz), 2,83 - 3,04 (m, 4H, CH₂CH₂N), 3,48 (sept, 2H, 2x CH(CH₃)₂, J = 6,5 Hz), 3,57 (s, 2H, CH₂COOH), 6,93 (s, 1H, ArH), 7,11 (dd, 1H, J₁ = 8,5 Hz, J₂ = 1,5 Hz, ArH), 7,24 (d, 1H, J = 8,5 Hz, ArH), 7,38 (s, 1H, ArH)

¹³C NMR (75 MHz, CD₃OD) δ: 18,12; 24,86; 46,58; 49,17; 55,86; 110,22; 112,32; 119,07; 124,39; 124,53; 128,12; 129,77; 136,74; 180,91

Příklad 7

Konjugace haptenu I s BSA

Hydrochlorid 4-{*N*-[2-(*1H*-indol-3-yl)ethyl]-*N*-methyl}aminobutanové kyseliny (hapten I) (19,2 mg, 64,7 μmol) byl rozpuštěn v dimethylsulfoxidu (200 μl), k roztoku byl přidán roztok *N,N'*-dicyklohexylkarbodiimidu (17,3 mg, 84,1 μmol) v dimethylsulfoxidu (170 μl) a roztok *N*-hydroxysukcinimidu (9,7 mg, 84,1 μmol) v dimethylsulfoxidu (100 μl). Reakční směs byla ponechána stát přes noc v mikrozkuhavce při teplotě místnosti po dobu 2 dnů, během kterých byly vyloučeny krystaly dicyklohexylmočoviny a průběh reakce byl monitorován pomocí TLC.

Reakční roztok byl nasát pipetou a přidán k albuminu. Tento roztok, bez vzniklých krystalů, byl přímo přidán k roztoku hovězího sérového albuminu (51,8 mg, 0,8 μmol) v bikarbonátovém pufru (4 ml). Dále byl přidán roztok dioktylsulfosukcinátu sodného v oktanu (27 ml) a reakční směs byla míchána 18 hodin při teplotě místnosti. Poté byl modifikovaný protein vysrážen ledovým acetonem (40 ml) a vzniklá suspenze byla centrifugována 30 minut při 4 °C (přetížení 1500 x g). Po odlití acetonu byl celý proces znovu opakován za stejných podmínek. Následně byl aceton znovu odlit a konjugát byl usušen na vzduchu. Poté byl konjugát rozpuštěn ve vodě (1,5 ml) a lyofilizován. Analýzou MALDI hmotnostní spektroskopií bylo určeno, že na jednu molekulu BSA je navázáno průměrně 13 molekul haptenu I. Množství navázaných molekul bylo vypočteno odečtením molární hmotnosti BSA od naměřené molární hmotnosti konjugátu (hodnota v maximu píku) a tento rozdíl byl vydělen molární hmotností haptenu po odečtení molární hmotnosti vody.

Příklad 8

Provedení nepřímé nekompetitivní ELISY

Imobilizace konjugátu na stěny jamek mikrotitrační destičky

Zásobní roztok imobilizačního konjugátu (hapten VII-BSA) byl naředěn na koncentraci 6,25 mol/l v 0,05 mol/l karbonát-bikarbonátovém pufru, pH 9,6 a pipetován do jamek mikrotitrační destičky v množství 100 μl na jamku. Imobilizace probíhala po dobu osmi hodin při teplotě místnosti. Nenavázaný imobilizační konjugát byl následující den odstraněn pomocí automatické promývačky 4x 300 μl 0,01 mol/l fosfátového pufru (PBS)-Tw (0,01mol/l PBS, pH 7,4 obohacený 0,05% Tweenem).

Aplikace kompetujících složek

Po promytí nenavázaného konjugátu byly do jamek mikrotitrační destičky pipetovány kompetující složky v pořadí 50 µl roztoku antigenu (kalibračního standardu diisopropyltryptaminu (koncentrační rozsah 5000 až 0 ng/ml) nebo vzorku slin)) ředěného v PBS a 50 µl roztoku králičího antiséra ředěného v příslušném pufru (různé pufrы pro různé systémy) na koncentraci 1,25 µg/ml. Inkubace probíhala za mírného třepání při teplotě místnosti, po dobu 1 hodiny. Nezreagované imunoreaktanty byly odstraněny opakovaným promytím jamek 0,01 mol/l PBS -Tw (4x 300 µl, promývačka).

Aplikace sekundární protilátky

Ke kvantifikaci navázaných králičích antisér na imobilizační konjugát byla využita protilátka GAR-Po (z angl. Goat Anti-Rabbit - kozi protilátka proti králičí protilátce značené peroxidázou). Protilátka Gar-Po byla ředěna 1:10 000 v 0,01 mol/l PBS -Tw a pipetována v množství 100 µl na jamku. Inkubace probíhala za mírného třepání při teplotě místnosti, po dobu 1 hodiny. Nenavázané antisérum bylo poté odstraněno opakovaným promytím jamek 0,01 mol/l PBS -Tw (4x 300 µl, promývačka).

Aplikace substrátu pro peroxidázu

Do každé jamky bylo následně přidáno 100 µl čerstvě připraveného roztoku substrátu pro peroxidázu (1 mg 3,3',5,5'-tetramethylbenzidinu (TMB) + 1 ml dimethylsulfoxidu + 9 ml 0,05mol/l citrát-fosfátového pufru; pH 5,0 + 2 µl 30% H₂O₂). Enzymová reakce probíhala za mírného třepání při teplotě místnosti deset minut.

V důsledku enzymové reakce změnila reakční směs barvu. K zastavení enzymové reakce byl použit přídatek 2 mol/l kyseliny sírové v množství 50 µl na jamku. Absorbance reakční směsi byla měřena v jamkách mikrotitrační destičky při vlnové délce 450 nm. Čím větší byla hodnota absorbance, tím méně analytu bylo navázáno.

Příklad 9

Imunizace laboratorních králíků pro získání Antiséra proti diisopropyltryptaminu (Anti-DiPT)

K imunizaci byl použit konjugát BSA-VII haptenu VII s hovězím sérovým albuminem (BSA).

Konjugát BSA-VII byl rozpuštěn ve sterilním fyziologickém roztoku a emulgoval se se stejným objemem kompletního Freudova adjuvans, byl aplikován subkutánně do tří až čtyř míst na zádech a nohou u králíků. Imunizace byla opakována čtyřikrát ve 4-týdenním období, přičemž jedna dávka obsahovala 0,3 mg imunogenu v 0,3 ml emulze. Finální sérum bylo získáno po 10 dnech od poslední imunizace srdeční punkcí za úplné anestezie. Sebrané antisérum se lyofilizuje a uchovává při -28 °C.

Zásobní roztok antiséra o koncentraci 1 mg/ml byl získán rozpuštěním lyofilizovaného králičího antiséra v 0,01 mol/l PBS a byl uchován při teplotě -28 °C. Před použitím byl temperován při teplotě místnosti po dobu minimálně patnácti minut.

Obdobně byla získána dvě různá antiséra proti DMT, kdy byl k imunizaci použit konjugát BSA-I a konjugát BSA-II.

Dále bylo získáno antisérum proti 5MeO-DMT, kdy byl k imunizaci použit konjugát BSA-IV.

Příklad 10

Metoda enzymové imunoanalýzy

- 5 Byla zjišťována schopnost antisér reagovat s analyty strukturně či funkčně podobnými cílovému analytu. Byly určeny optimální podmínky pro každý pár antiséra a konjugátu. S antiséry vykazujícími nejlepší charakteristiky byly pro imunochemické stanovení optimalizovány a charakterizovány varianty ELISA v nepřímém kompetitivním uspořádání.
- 10 Imobilizační konjugát (haptenu VII s BSA) o různých koncentracích 50; 25; 12,5; 6,25; 3,125; 0 ng/ml byl nanášen na stěny jamek mikrotitrační destičky. Zásobní koncentrace imobilizačního konjugátu (100 µg/ml) byla ředěna v 0,05 mol/l karbonát-bikarbonátovém pufru, pH 9,6. Imobilizace probíhala 8 hodin při teplotě místnosti.
- 15 Dále následovalo promytí destiček (4x 300 µl/jamka, 0,01 mol/l PBS -Tw (0,01 mol/l PBS, pH 7,4 obohacený 0,05% Tween 20)). Do jamek byl aplikován pufr 0,01 mol/l PBS (50 µl/jamka) a následně králičí antisérum Anti-DiPT (50 µl/jamka) o různých koncentracích (10; 5; 2,5; 1,25 a 0 µg/ml) ředěné v PBS-0,1% BSA (0,01 mol/l PBS obohacený 0,1% BSA). Inkubace pufru s králičím antisérem probíhala po dobu jedné hodiny. Po ukončení doby inkubace byly destičky
- 20 znovu promyty (4x 300 µl/jamka) PBS-0,05% Tw.
- Do jednotlivých jamek byla dávkována protilátka GAR-Po (100 µl/jamka) ředěná 10 000 x v PBS-0,05% Tw. Znovu probíhala hodinová inkubace za mírného třepání v třepačce. Poté následovalo promytí destiček 4x 300 µl/jamka PBS-0,05%Tw. Do každé jamky bylo následně
- 25 přidáno 100 µl čerstvě připraveného roztoku substrátu TMB (1 mg 3,3',5,5'-tetramethylbenzidinu+ 1 ml DMSO + 9 ml 0,05 mol/l citrát-fosfátového pufru; pH 5,0 + 2 µl 30% H₂O₂) (100 µl/jamka). Enzymová reakce probíhala za mírného třepání při teplotě místnosti deset minut.
- 30 V důsledku enzymové reakce změnila reakční směs barvu. K zastavení enzymové reakce byl použit přírůstek 2 mol/l kyseliny sírové v množství 50 µl na jamku. Absorbance reakční směsi byla měřena v jamkách mikrotitrační destičky při vlnové délce 450 nm. Čím větší byla hodnota absorbance, tím méně analytu bylo navázáno.
- 35 Z naměřených hodnot absorbancí byly vybrány tři kombinace koncentrací králičího antiséra a imobilizačního konjugátu. Jednalo se o tyto kombinace imobilizačního konjugátu – Anti-DiPT: 6,25 ng/ml – 1,25 µg/ml; 3,125 ng/ml – 1,25 µg/ml; 3,125 ng/ml – 2,5 µg/ml. S těmito kombinacemi koncentrací byly sestrojeny kalibrační křivky.

40

Příklad 10a

Sestrojení kalibračních křivek

- 45 Dělat se sedmibodové kalibrační křivky s použitím vybraných kombinací koncentrací imunoreagencií (většinou 4 kalibrační křivky na destičku; standard drogy např. od koncentrace 5000 ng/ml do 0 ng/ml v PBS).
- Imobilizační konjugát (konjugát haptenu VII s BSA) o koncentracích 6,25 a 3,125 ng/ml byl nanášen na stěnu jamek mikrotitrační destičky. Zásobní koncentrace imobilizačního konjugátu (100 µg/ml) byla ředěna v 0,05 mol/l karbonát-bikarbonátovém pufru, pH 9,6. Imobilizace probíhala 8 hodin při teplotě místnosti.
- 50 Dále následovalo promytí destiček (4x 300 µl/jamka, 0,01 mol/l PBS-Tw (0,01 mol/l PBS, pH 7,4 obohacený 0,05% Tween 20)). Do jamek byl aplikován diisopropyltryptamin (DiPT; zásobní
- 55

roztok 1 mg/ml v 96% ethanolu); koncentrační řada 5 000; 500; 50; 5; 0,5; 0,05 a 0 ng/ml v PBS (50 µl/jamka) a následně králíčí antisérum Anti-DiPT (50 µl/jamka) o koncentraci 1,25 nebo 2,5 µg/ml, (závislé na koncentračním páru) ředěné v PBS-0,1% BSA (0,01 mol/l PBS obohacený 0,1% BSA). Inkubace diisopropyltryptaminu s králíčí protilátkou probíhala po dobu jedné hodiny. Po ukončení doby inkubace byly destičky znovu promyty (4x 300 µl/jamka) PBS-0,05%Tw.

Do jednotlivých jamek byla dávkována protilátka GAR-Po (100 µl/jamka) ředěná 10 000 x v PBS-0,05% Tw. Znovu probíhala hodinová inkubace za mírného třepání v třepačce. Poté následovalo promytí destiček 4x 300 µl/jamka PBS-0,05% Tw. Do každé jamky bylo následně přidáno 100 µl čerstvě připraveného roztoku substrátu TMB (1 mg 3,3',5,5'-tetramethylbenzidinu+ 1 ml DMSO + 9 ml 0,05mol/l citrát-fosfátového pufru; pH 5,0 + 2 µl 30% H₂O₂) (100 µl/jamka). Enzymová reakce probíhala za mírného třepání při teplotě místnosti deset minut.

V důsledku enzymové reakce změnila reakční směs barvu. K zastavení enzymové reakce byl použit přídatek 2 mol/l kyseliny sírové v množství 50 µl na jamku. Absorbance reakční směsi byla měřena v jamkách mikrotitrační destičky při vlnové délce 450 nm. Čím větší byla hodnota absorbance, tím méně analytu bylo navázáno.

Byl vybrán koncentrační pár: imobilizační konjugát 6,25 ng/ml a Anti-DiPT 1,25 µg/ml. Sledovanými parametry kalibračních křivek byly hodnoty I₅₀, maximální hodnota absorbance, minimální hodnota absorbance (vypovídá o nespecifických interakcích, ideální hodnota absorbance do 0,2) a délka lineární křivky. Výše uvedené parametry byly sledovány v celé práci u všech hodnocení týkajících se kalibračních křivek.

Příklad 11

Křížové reaktivity

Křížové interakce se využívají k vyjádření specifity sestavené imunoanalýzy. Prostřednictvím křížových reakcí byla testována schopnost antiséra Anti-DiPT reagovat s analyty strukturně či funkčně podobnými diisopropyltryptaminu. S testovanými analyty byly sestaveny kalibrační křivky. Hodnoty I₅₀ získané z kalibračních křivek byly použity k výpočtu hodnot křížových

$$\text{reaktivit (CR) dle vztahu: } CR(\%) = \frac{c_{50\%}(A)}{c_{50\%}(B)} \cdot 100 = \frac{I_{50}(A)}{I_{50}(B)} \cdot 100$$

c_{50%}(A) = I₅₀(A).....koncentrace diisopropyltryptaminu při A_{50%}

c_{50%}(B) = I₅₀(B).....koncentrace křížově interagujícího analytu při A_{50%}

Byly sestaveny kalibrační křivky, které byly získány naředěním diisopropyltryptaminu a testovaných drog na koncentrace: 5000; 500; 50; 5; 0,5; 0,05 a 0 ng/ml v PBS. ELISA byla provedena dle standardního postupu (viz příklad 8). Získané hodnoty I₅₀ z každé křivky byly použity k výpočtu křížové reaktivity dle vztahu uvedeného výše.

Imobilizační konjugát (konjugát haptenu VII s BSA) o koncentracích 6,25 ng/ml byl nanášen na stěnu jamek mikrotitrační destičky. Zásobní koncentrace imobilizačního konjugátu (100 µg/ml) byla ředěna v 0,05 mol/l karbonát-bikarbonátovém pufru, pH 9,6. Imobilizace probíhala 8 hodin při teplotě místnosti.

Dále následovalo promytí destiček (4x 300 µl/jamka, 0,01 mol/l PBS-Tw (0,01 mol/l PBS, pH 7,4 obohacený 0,05% Tween 20)). Do jamek byl aplikován diisopropyltryptamin a testované analyty (zásobní roztoky 1 mg/ml v 96% ethanolu); koncentrační řada 5000; 500; 50; 5; 0,5; 0,05 a 0 ng/ml v PBS (50 µl/jamka) a následně králíčí antisérum Anti-DiPT (50 µl/jamka) o

koncentraci 1,25 µg/ml (závislé na koncentračním páru) ředěné v PBS-0,1% BSA (0,01 mol/l PBS obohacený 0,1% BSA). Inkubace diisopropyltryptaminu s králičí protilátkou probíhala po dobu jedné hodiny. Po ukončení doby inkubace byly destičky znovu promyty (4x 300 µl/jamka) PBS-0,05% Tw.

5

Do jednotlivých jamek byla dávkována sekundární protilátka GAR-Po (100 µl/jamka) ředěná 10 000 x v PBS-0,05% Tw. Znovu probíhala hodinová inkubace za mírného třepání v třepačce. Poté následovalo promytí destiček 4x 300 µl/jamka PBS-0,05% Tw. Do každé jamky bylo následně přidáno 100 µl čerstvě připraveného roztoku substrátu TMB (1 mg 3,3',5,5'-tetramethylbenzidinu + 1 ml DMSO + 9 ml 0,05mol/l citrát-fosfátového pufru; pH 5,0 + 2 µl 30% H₂O₂) (100 µl/jamka). Enzymová reakce probíhala za mírného třepání při teplotě místnosti deset minut.

15

V důsledku enzymové reakce změnila reakční směs barvu. K zastavení enzymové reakce byl použit přídatek 2 mol/l kyseliny sírové v množství 50 µl na jamku. Absorbance reakční směsi byla měřena v jamkách mikrotitrační destičky při vlnové délce 450 nm. Čím větší byla hodnota absorbance, tím méně analytu bylo navázáno.

20

Příklad 12

Analýza uměle kontaminovaného vzorku

25

Analytické vlastnosti sestavené imunoanalýzy byly testovány pomocí uměle kontaminovaných vzorků syntetických slin s cílovým analytem.

30

Vzorek slin byl uměle kontaminován diisopropyltryptaminem na koncentraci 20; 10 a 5 ng/ml. Pro vlastní test byla připravena kalibrační křivka dimethyltryptaminu (koncentrační řada 5 000; 500; 50; 5; 0,5; 0,05 a 0 ng/ml). Dále byly do mikrotitrační destičky aplikovány uměle kontaminované vzorky slin, které byly předem ředěny 10x k odstranění vlivu matrice. ELISA byla provedena dle standardního postupu (viz příklad 8). Z kalibrační křivky byly pro jednotlivé naměřené hodnoty absorbancí odečteny odpovídající koncentrace v ředěných vzorcích a v závislosti na ředění přepočteny na koncentraci v uměle kontaminovaném vzorku slin.

35

K vyhodnocení analýzy vzorků byla použita veličina výtěžnost, která byla vypočítána ze vztahu:

$$(\%) = \frac{c_p}{c} \cdot 100$$

c_p průměrná hodnota koncentrace z jednotlivých měření vzorku vyvinutou ELISA
 c hodnota koncentrace v kontaminovaném vzorku

40

Pro všechny uměle kontaminované vzorky byla výtěžnost metody vypočtena v rozsahu 89 až 112 %. Reprodukovatelnost metody, vyjádřená jako relativní směrodatná odchylka, byla vypočtena v rozsahu 6 až 18 %.

45

Průmyslová využitelnost

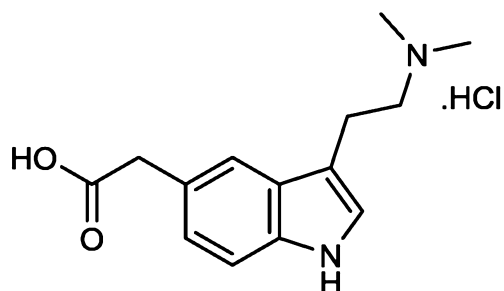
50

Aplikace v imunoanalytických metodách stanovení derivátů tryptaminu ve formátech nepřímé ELISA, LFIA, FIA a dalších, které využívají kompetice mezi hapténem – některým z připravených derivátů tryptaminu, a analytem – psychoaktivní látkou přítomnou ve vzorku, o vazebná místa protilátky.

PATENTOVÉ NÁROKY

Použití derivátu tryptaminu o názvu hydrochlorid 2-{3-[2-(*N,N*-dimethylamino)ethyl]-1*H*-indol-5-yl} octové kyseliny a struktura

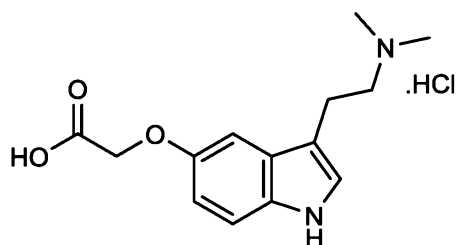
5



10

pro detekci tryptaminových drog vybraných ze skupiny 5-methoxydimethyltryptamin, dimethyltryptamin, psilocin nebo *O*-acetylpsilocin, 4-hydroxy-*N*-methyl-*N*-ethyl tryptamin nebo jejich směsi.

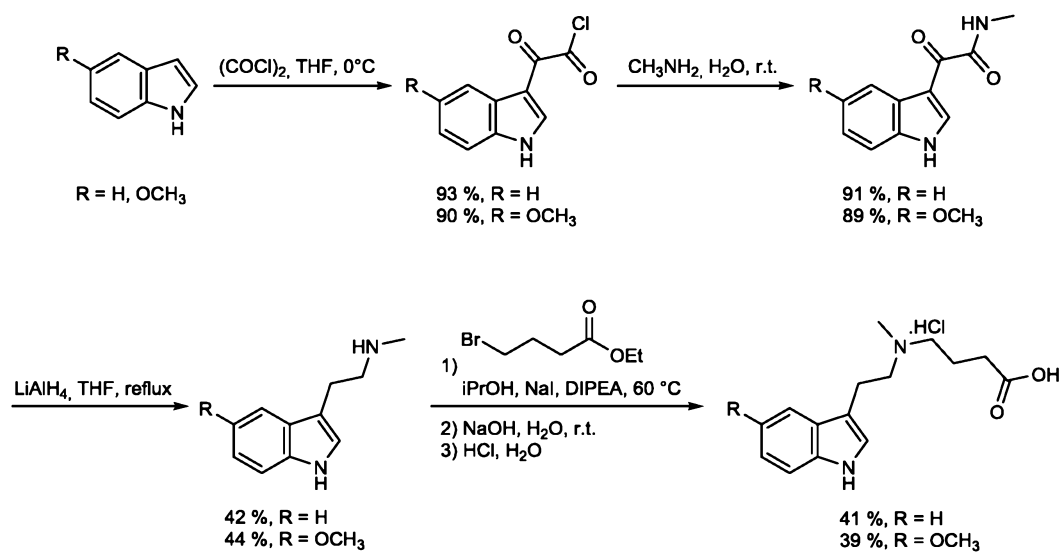
1. Použití derivátu tryptaminu o názvu hydrochlorid 2-{3-[2-(*N,N*-dimethylamino)ethyl]-1*H*-indol-5-yloxy} octové kyseliny a struktura



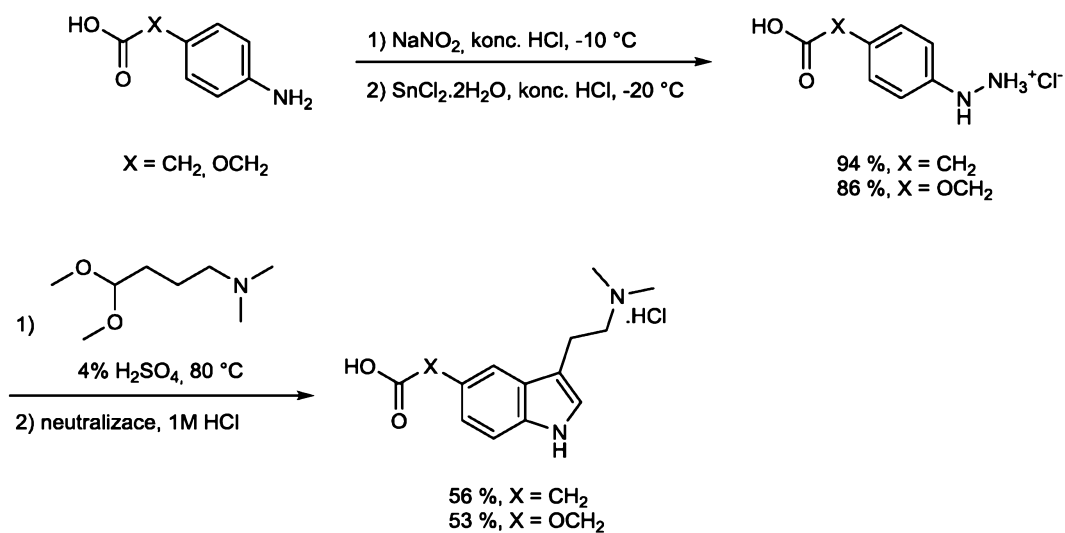
15

pro detekci tryptaminových drog psilocinu nebo směsi 5-methoxydimethyltryptaminu, dimethyltryptaminu a psilocinu.

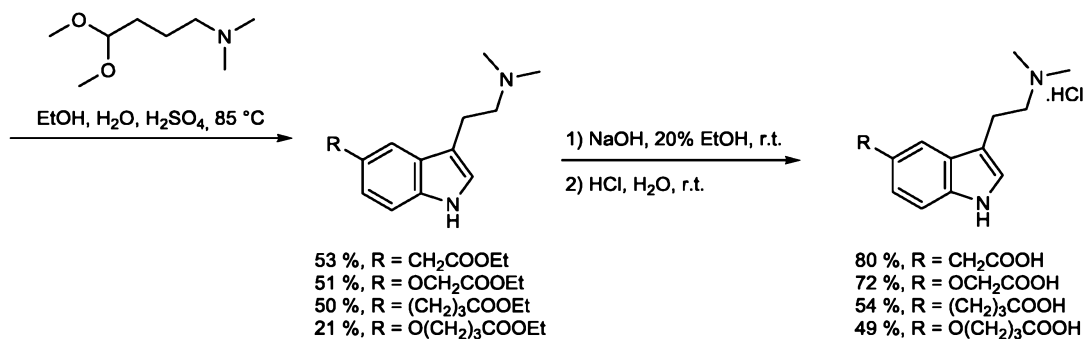
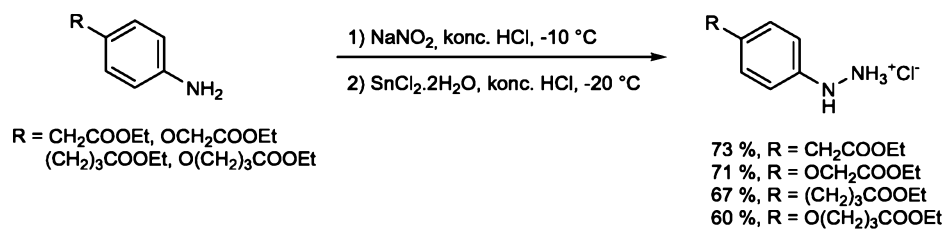
11 výkresů



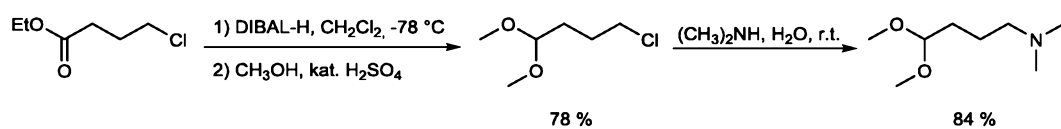
Obr. 1



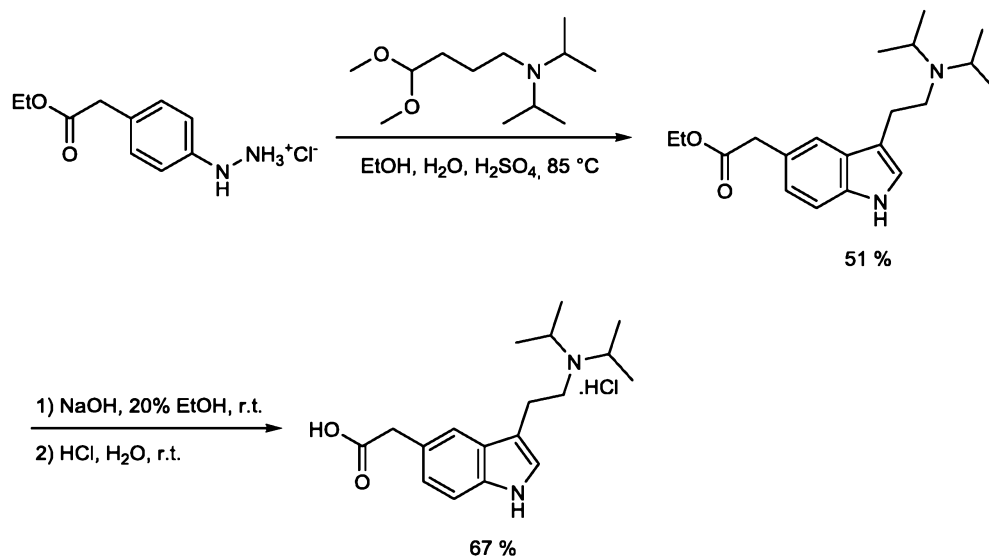
Obr. 2



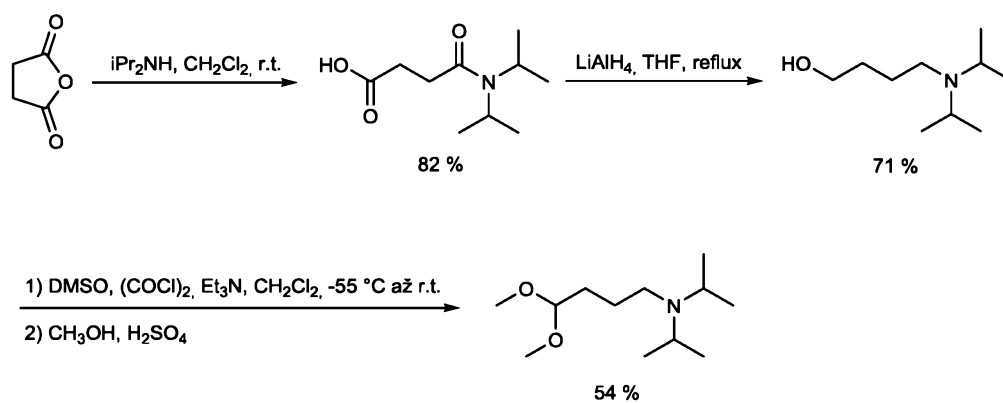
Obr. 3



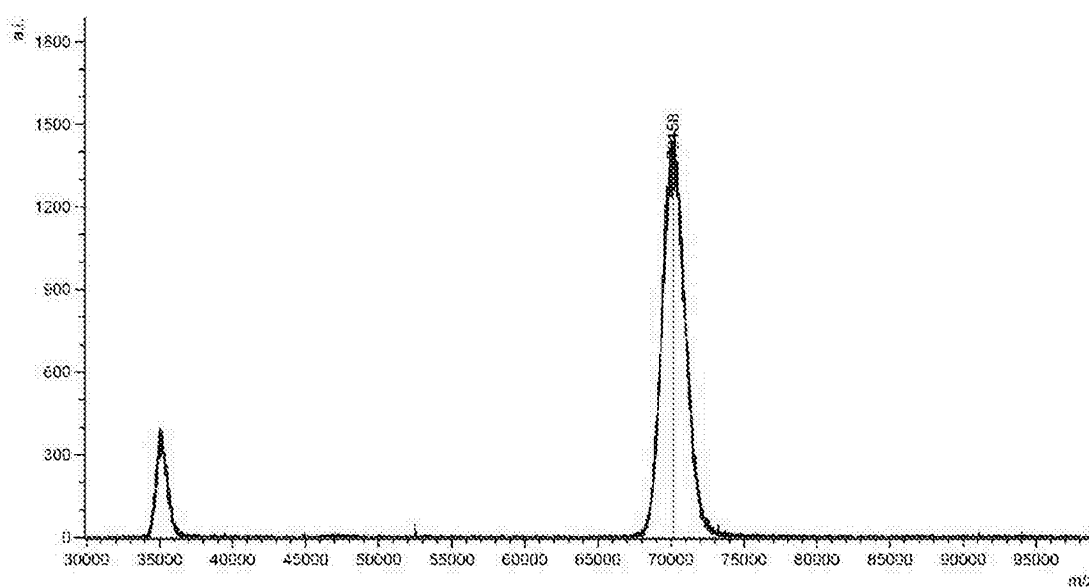
Obr. 4



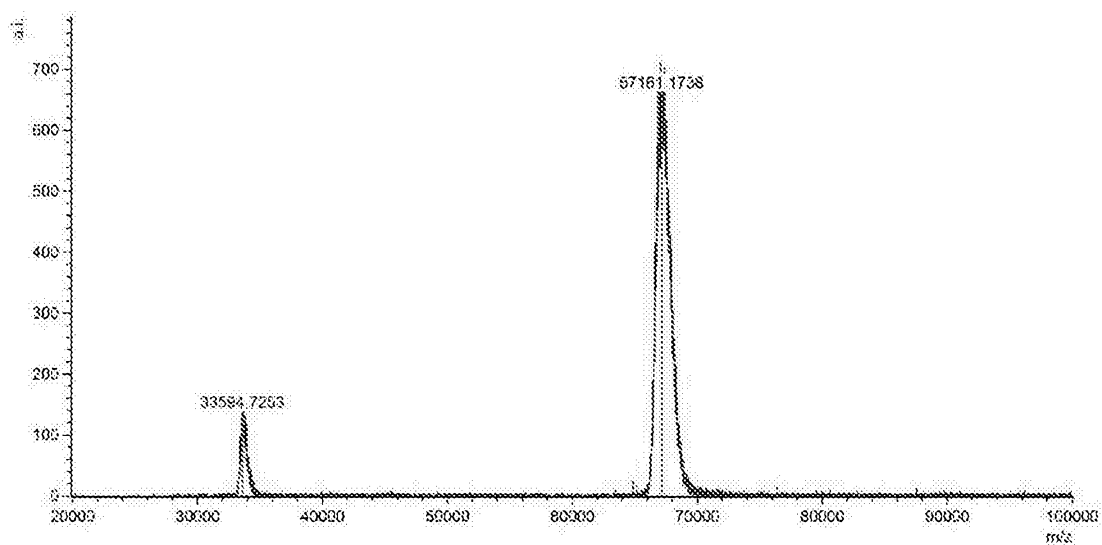
Obr. 5



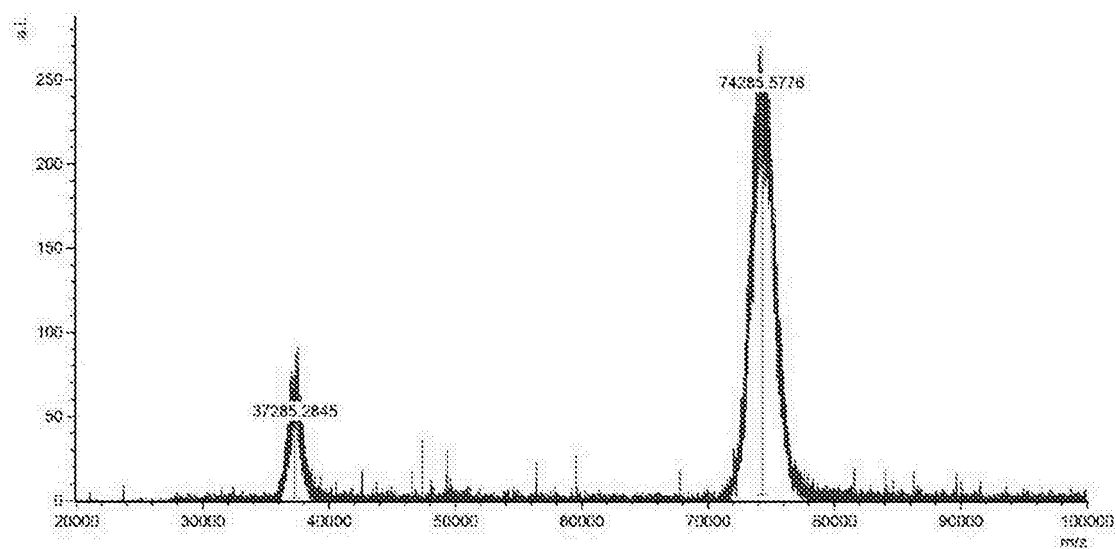
Obr. 6



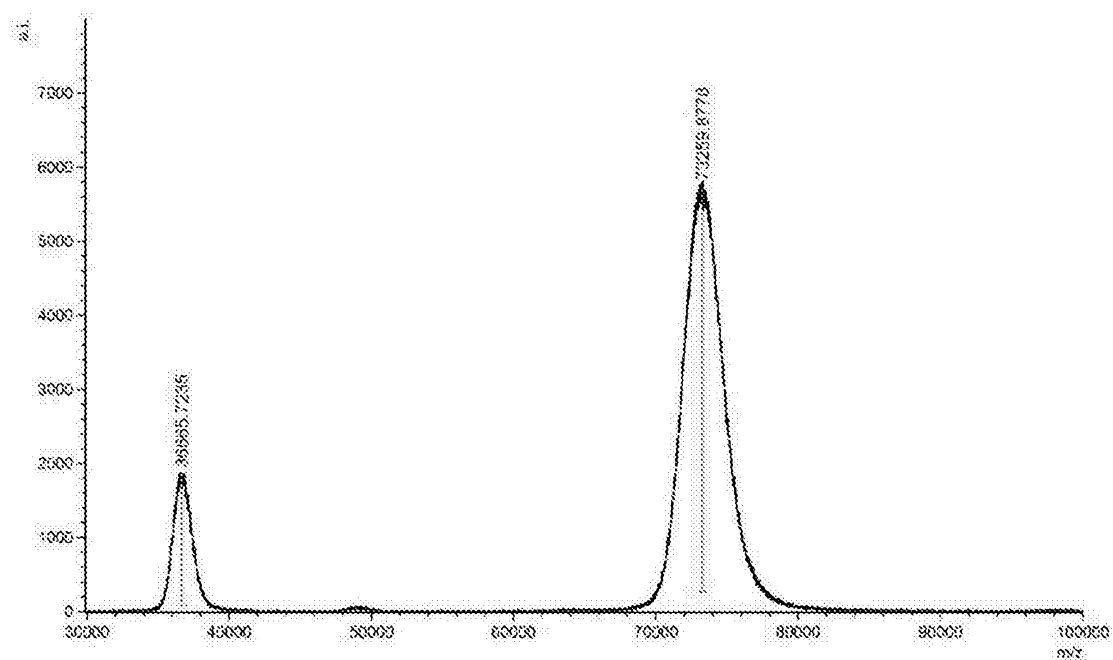
Obr. 7



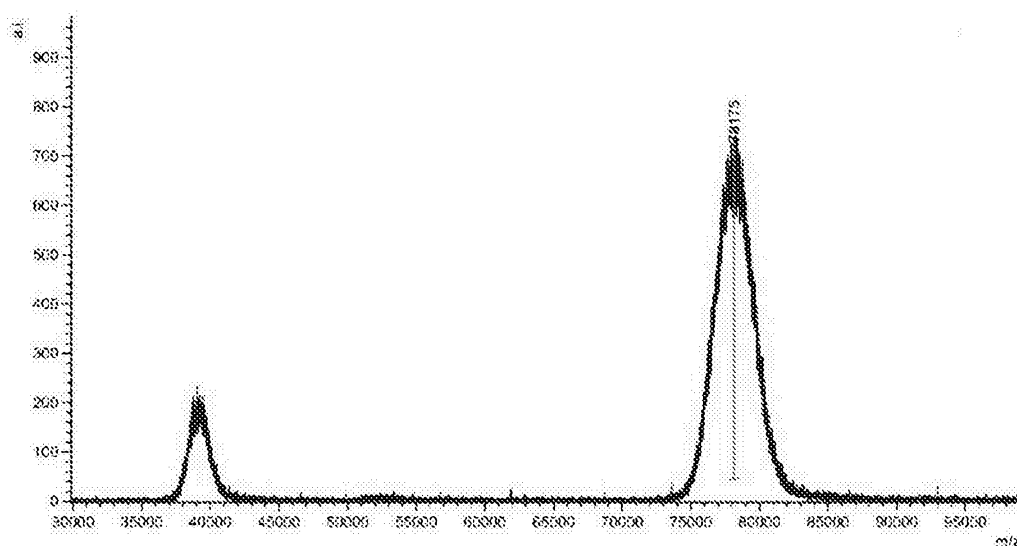
Obr. 8



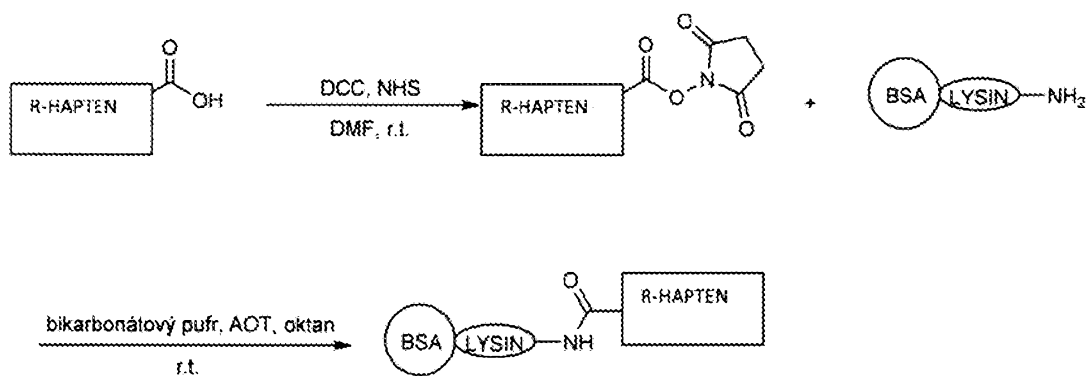
Obr. 9



Obr. 10



Obr. 11

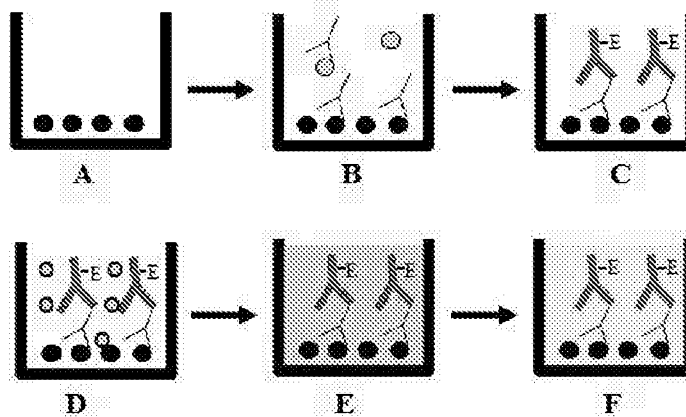


DMF=dimethylformamid

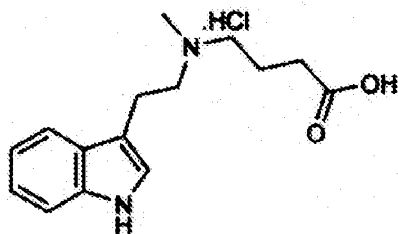
AOT= sodná sůl dioktyl sulfosukcinátu

DCC= *N,N'*-dicyklohexylkarbodiimid

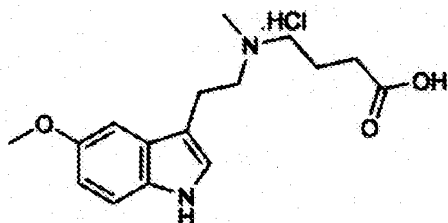
Obr. 12



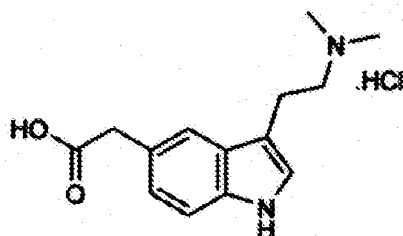
Obr. 13



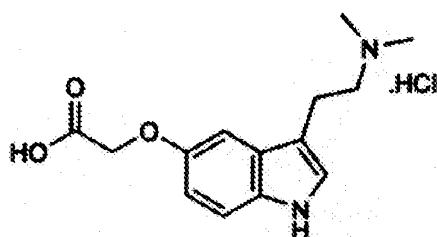
Obr. 14



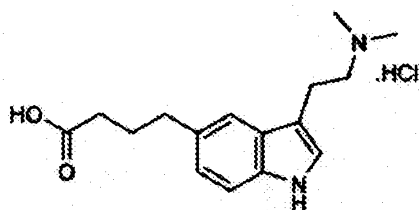
Obr. 15



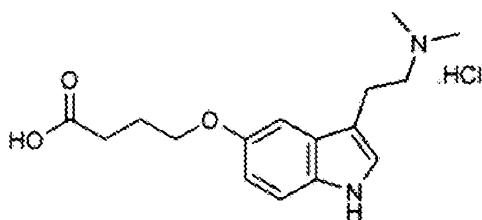
Obr. 16



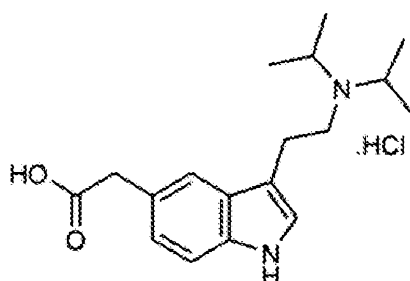
Obr. 17



Obr. 18



Obr. 19



Obr. 20

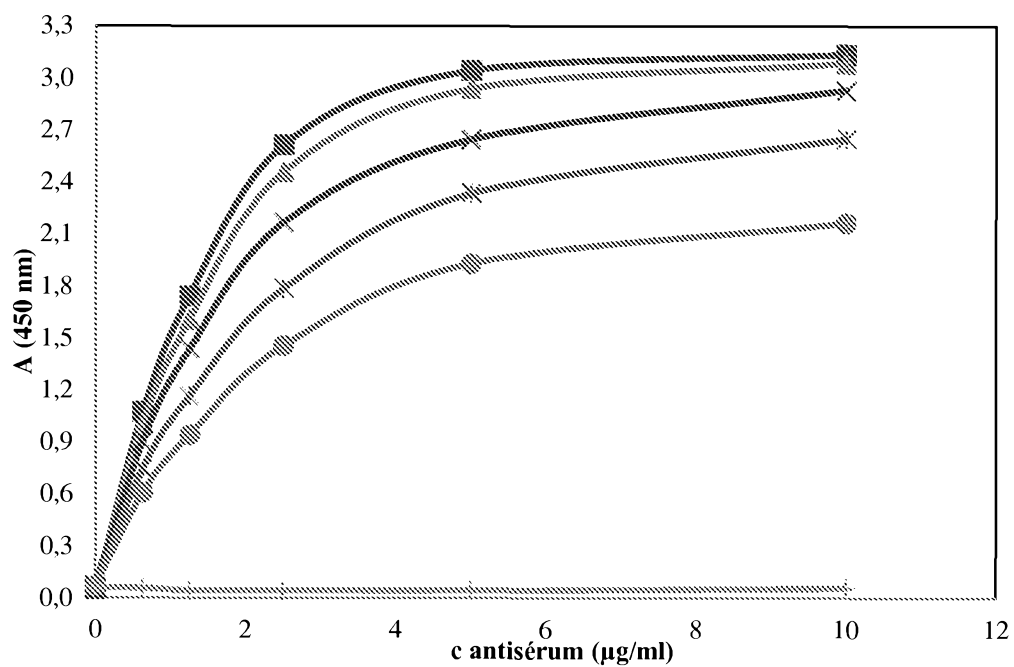
ELISA	$I_{50}^a \pm SD^b$ (ng.ml ⁻¹)	Lineární oblast (ng.ml ⁻¹)	LOD ^c $\pm SD^b$ (ng.ml ⁻¹)
Hapten I	0,52 $\pm$ 0,17	0,11 – 4,24	0,017 $\pm$ 0,005
Hapten III	27,27 $\pm$ 5,20	4,08 – 241,96	0,254 $\pm$ 0,059
Hapten IV	0,29 $\pm$ 0,07	0,03 – 4,93	0,006 $\pm$ 0,002
Hapten VII	3,36 $\pm$ 0,28	0,27 – 45,13	0,034 $\pm$ 0,005

^a I_{50} , 50% intercept

^b SD, směrodatná odchylka

^c LOD, limit detekce

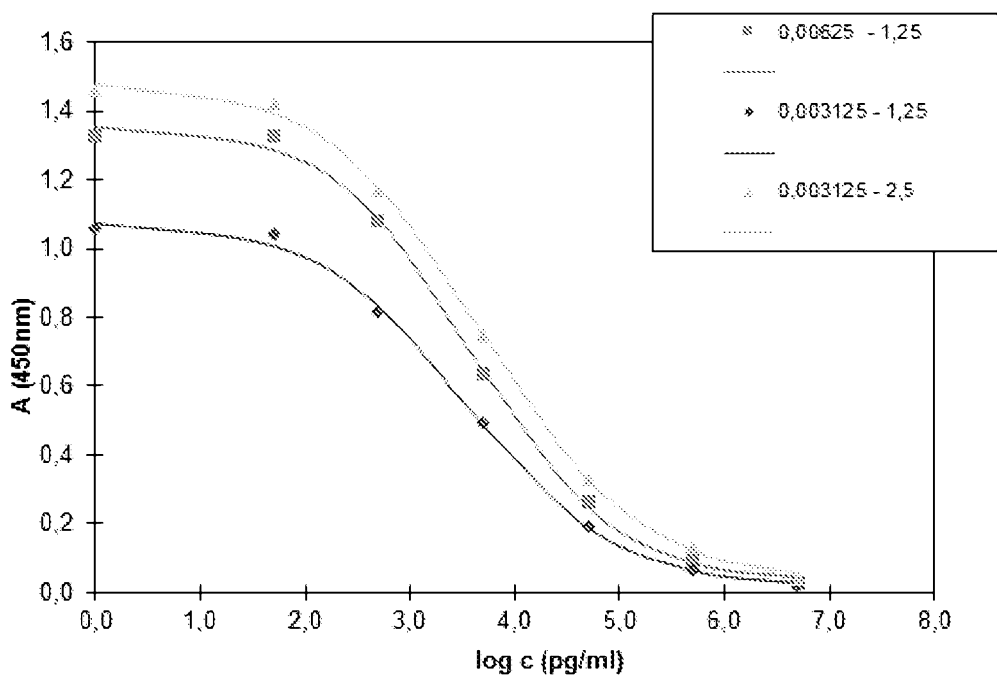
Obr. 21



---- konjugát VII-BSA 25 ng/ml
 ---- konjugát VII-BSA 12,5 ng/ml
 ---- konjugát VII-BSA 6,25 ng/ml
 ---- konjugát VII-BSA 3,125 ng/ml
 ---- konjugát VII-BSA 1,562 ng/ml
 ---- pouze 0,05 mol/l karbonát-bikarbonátový pufr, pH 9,6
 Obr. 22

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	imobilizovaný konjugát (ng/ml)
A	0	56	45	67	34	4	31	44	44	3	52	47	0
B	3,1	3,1	3,0	3,0	2,6	2,5	1,6	1,8	1,1	1,0	0,0	0,0	25
C	52	15	43	37	29	97	75	07	2	23	47	5	12,5
D	3,0	3,1		2,9	2,3	2,5	1,5	1,6	1,0	0,9	0,0	0,0	6,25
E	51	15	2,9	71	91	24	42	7	27	77	61	81	3,125
F	2,9	2,9	2,6	2,5	2,1	2,1	1,4	1,4	0,9		0,0	0,0	1,562
G	19	37	89	98	89	4	06	64	02	0,9	49	6	0
H	2,6	2,6	2,3	2,3	1,7	1,7	1,1	1,1	0,7	0,7	0,0	0,0	0
I	79	15	09	55	82	83	52	8	51	37	69	73	0
J	2,1	2,1	1,9	1,9	1,4	1,4	0,9	0,9	0,5	0,6	0,0	0,0	0
K	43	79	24	31	67	41	22	58	8	31	56	79	0
L	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0
M	52	58	43	44	44	44	4	49	51	61	55	67	0
N	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0
O	47	53	49	45	37	38	42	47	51	56	62	72	0
králíci profilak- tika (µg/ml)	10		5		2,5		1,25		0,625		0		

Obr. 23



— konjugát VII-BSA 3,125 ng/ml, Anti-DiPT 2,5 µg/ml; I_{50} = 4,80 ng/ml
 --- konjugát VII-BSA 6,25 ng/ml, Anti-DiPT 1,25 µg/ml; I_{50} = 3,96 ng/ml
 konjugát VII-BSA 3,125 ng/ml, Anti-DiPT 1,25 µg/ml; I_{50} = 3,44 ng/ml

Obr. 24

												Standard drogy	
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	
A	0	1,311	1,334	0,986	0,998	1,028	1,25	1,233	1,325				0
B	0,028	0,031	0,025	0,021	0,022	0,021	0,037	0,044	0,038				5000 ng/ml
C	0,085	0,092	0,1	0,066	0,066	0,067	0,121	0,159	0,119				500 ng/ml
D	0,228	0,273	0,28	0,193	0,192	0,189	0,338	0,335	0,309				50 ng/ml
E	0,534	0,675	0,691	0,467	0,498	0,506	0,711	0,783	0,742				5 ng/ml
F	1,025	1,117	1,092	0,82	0,803	0,821	1,192	1,17	1,144				0,5 ng/ml
G	1,223	1,381	1,376	1,011	1,068	1,047	1,451	1,399	1,407				0,05 ng/ml
H	1,174	1,234	1,419	1,028		1,091	1,45	1,476	1,455				0
imob. konjugát – Anti- DiPT(µg. ml ⁻¹)													
	0,00625 – 1,25		0,003125 – 1,25			0,003125 – 2,5							
	Anti DiPT												

Obr. 25

Křížová reaktivita (%)	
Testované standardy	
DiPT	100,00
5MeO-DiPT	88,43
5MeO-DALT	0,19
psilocin	0,10
DMT	0,09
4HO-MET	0,05
5MeO-DMT	0,04
αMT	< 0,001
O-acetylpsilocin	< 0,001
psilocybin	< 0,001
serotonin	< 0,001

DiPT: *N,N*-diisopropyltryptamin; 5MeO-DiPT: 1-methyl-5-methoxy-*N,N*-diisopropyltryptamin; 5MeO-DALT: *N,N*-diallyl-5-methoxytryptamin; DMT: dimethyltryptamin; 4HO-MET: 4-hydroxy-*N*-methyl-*N*-ethyl tryptamin; 5MeO-DMT: 5-methoxy-*N,N*-dimethyltryptamin; αMT: α-methyltryptamin

Obr. 26

Testované standardy	Křížová reaktivita (%)			
	Hapten I	Hapten III	Hapten IV	Hapten VII
DMT	100,00	53,48	38,89	0,09
5MeO-DMT	0,57	100,00	100,00	0,04
5MeO-DALT	1,90	0,95	2,46	0,19
DiPT	2,00	0,09	0,21	100,00
4HO-MET	2,16	5,87	20,08	0,05
α MT	0,14	0,07	0,04	< 0,001
O-acetylpsilocin	0,06	2,81	23,04	< 0,001
psilocin	3,60	225,71	149,63	0,10
psilocybin	< 0,001	0,07	0,08	< 0,001
serotonin	< 0,001	< 0,001	< 0,001	< 0,001
5MeO-DiPT	0,01	< 0,001	0,43	88,43

DMT: dimethyltryptamin, 5MeO-DMT: 5-methoxy-*N,N*-dimethyltryptamin, 5MeO-DALT: *N,N*-diallyl-5-methoxytryptamin, DiPT: *N,N*-diisopropyltryptamin, 4HO-MET: 4-hydroxy-*N*-methyl-*N*-ethyl tryptamin, α MT: α -methyltryptamin, 5MeO-DiPT: 1-methyl-5-methoxy-*N,N*-diisopropyltryptamin.

Obr. 27