

# PŘIHLÁŠKA VYNÁLEZU

zveřejněná podle § 31 zákona č. 527/1990 Sb.

(19)  
ČESKÁ  
REPUBLIKA



ÚŘAD  
PRŮMYSLVÉHO  
VLASTNICTVÍ

(22) Přihlášeno: **29.03.2010**  
(40) Datum zveřejnění přihlášky vynálezu: **08.09.2010**  
(Věstník č. 36/2010)

(21) Číslo dokumentu:

**2010-230**

(13) Druh dokumentu: **A3**

(51) Int. Cl.:  
**C07D 495/04** (2006.01)

(71) Přihlašovatel:

Univerzita Palackého v Olomouci prof.RNDr. Miroslav  
Mašláň CSc. Mašláň Miroslav prof. RNDr. CSc.,  
Olomouc, CZ

(72) Původce:

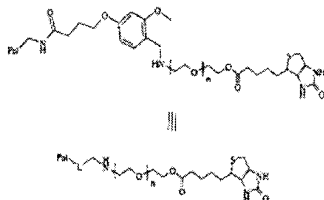
Soural Miroslav RNDr. Ph.D., Olomouc, CZ  
Hlaváč Jan doc. RNDr. Ph.D., Hlubočky, CZ  
Hradil Pavel prof. Ing. CSc., Hlušovice, CZ

(54) Název přihlášky vynálezu:

**Efektivní způsob biotinylace sloučenin s  
karboxylovou skupinou pomocí syntézy na  
pevné fázi pro potřeby afinitní  
chromatografie**

(57) Anotace:

Imobilizované deriváty biotinu obecného vzorce 7, kde n  
představuje počet ethylenoxy jednotek a nabývá hodnot 1-5 a  
symbol Pol představuje polystyrenovou pryskyřici tvořenou  
kopolymerem styrenu a divinylbenzenu, a způsob jejich  
přípravy syntézou na pevné fázi.





2010-130

## **Efektivní způsob biotinylace sloučenin s karboxylovou skupinou pomocí syntézy na pevné fázi pro potřeby afinitní chromatografie.**

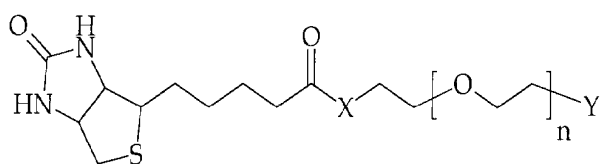
### Oblast techniky:

Vynález se týká přípravy a použití imobilizovaných derivátů biotinu s různě dlouhými řetězci polyethylenglykolu s využitím principu syntézy na pevné fázi. Popsaný koncept syntézy na pevné fázi umožňuje efektivní přípravu daných derivátů a jejich následné použití pro jednoduchou derivatizaci sloučenin obsahujících ve své struktuře karboxylovou skupinu. Takto derivatizované látky mohou být po odštěpení z pevné fáze použity pro zachycení na stacionární fázi pokryté avidinem. Komplex vzniklý specifickou vazbou avidin-biotin případně streptavidin-biotin je pak metodou afinitní chromatografie využíván především ve farmaceutickém výzkumu při identifikaci molekulárních cílů potenciálních léčiv.

### Dosavadní stav techniky

Derivatizace biologicky aktivních sloučenin molekulou biotinu je známý prostředek pro jejich studium za účelem identifikace enzymů, s kterými dané sloučeniny interagují, což výrazně přispívá ke zjištění mechanismu účinku těchto látek v buněčném systému. Biotinylované deriváty lze snadno imobilizovat metodou nekovalentní biospecifické interakce na chromatografické koloně vybavené stacionární fází pokrytou avidinem/streptavidinem. Při následném použití mobilní fáze obsahující buněčný lyzát dochází k zachycení cílových enzymů na koloně, jejich následné eluci a identifikaci. Tento druh separační metody se nazývá afinitní chromatografie a patří mezi nejfrekventovanější metody studia molekulárních cílů nových typů biologicky aktivních sloučenin (tj. potenciálních léčiv).

Za nejvhodnější typ derivátů biotinu používaných pro modifikaci látek za účelem jejich studia afinitní chromatografií jsou považovány deriváty obecné struktury **1**, kde lineární řetězec (tzv. raménko) sestávající se z různého počtu ethylenoxy jednotek je na jednom konci derivatizován biotinem, přičemž druhý konec řetězce je zakončen vhodnou funkční skupinou umožňující derivatizaci příslušné látky. Vhodný počet ethylenoxy jednotek (tj. délka raménka) není přesně definován, neboť se jedná o proměnlivou veličinu závislou na způsobu interakce mezi studovanou látkou a cílovým enzymem.



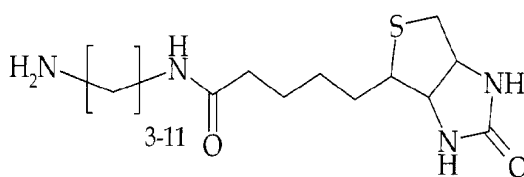
X = NH, O

Y = COOH, NH<sub>2</sub>, OH, OSO<sub>3</sub>Me, OSO<sub>3</sub>Ph...

**1**

Pro derivatizaci látek obsahujících ve své struktuře karboxylovou skupinu jsou v literatuře nejčastěji popisovány deriváty **1** (nebo jejich analoga s alternativní strukturou raménka) obsahující terminální primární aminoskupinu. Níže jsou uvedeny některé příklady takových derivátů.

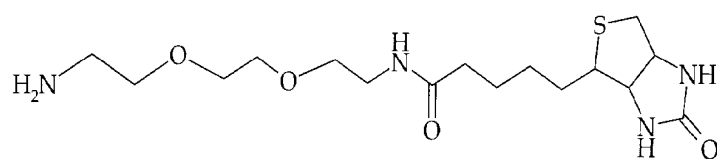
V literatuře je hojně popsána příprava a použití derivátů **2** pomocí syntézy v roztoku. Některé z těchto derivátů jsou i komerčně dostupné.



**2**

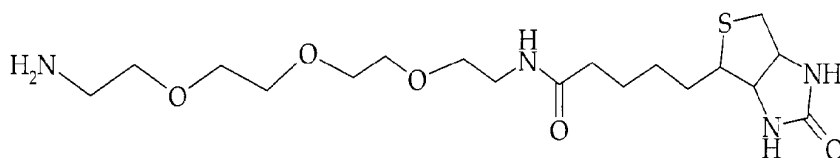
Znázorněný typ raménka (tj. pouze na bázi uhlíkatého skeletu) však není považován pro účely afinitní chromatografie za zcela vhodný z důvodů jeho efektivního zkrácení způsobeného hydrofobními interakcemi methylenových skupin a nebude mu proto zde věnována další pozornost. Uvedeny budou pouze některé konkrétní příklady derivátů s raménkem na bázi ethylenoxy jednotek nebo deriváty s raménky podobné struktury, která jsou prostá hydrofobních interakcí a jsou obecně považována z pohledu struktury za optimální.

V literatuře je popsána příprava derivátu **3** s dvěma ethylenoxy jednotkami. Sloučenina je připravována pomocí syntézy v roztoku a to biotinyací příslušného mono-Boc chráněného diaminu s výtěžkem až 83%. Derivát **3** byl následně použit pro derivatizaci a studium různých typů látek pomocí afinitní chromatografie (Zhong, Chun-Long; Yao, Zhu-Jun, *Huaxue Xuebao* **2008**, 66(9), 1074-1078; Sekine, Mitsuo; Okada, Kazuhisa; Seio, Kohji; Obata, Tohru; Sasaki, Takuma; Kakeya, Hideaki; Osada, Hiroyuki, *Bioorganic & Medicinal Chemistry* **2004**, 12(24), 6343-6349).



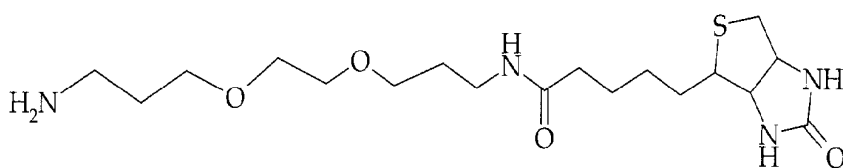
**3**

Popsána je rovněž příprava derivátu **4** s třemi ethylenoxy jednotkami připraveného biotinylní 2-[2-[2-(2-azidoethoxy)ethoxy]ethoxy]-ethanaminu a následnou redukcí terminálního azidu trifenylofosfinem. Syntéza je opět prováděna v roztoku (Fusz, Stefan; Srivatsan, Seergazhi G.; Ackermann, Damian; Famulok, Michael, *Journal of Organic Chemistry* **2008**, 73(13), 5069-5077).



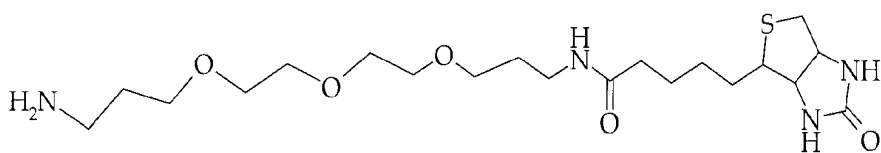
**4**

Dále je popsána příprava a použití derivátu **5** s raménkem v kombinaci ethylenoxy a propylenoxy jednotek. Daný derivát je připravován biotinylní odpovídajícího diaminu v roztoku s výtěžkem pouhých 22% (Zhang, Zhidong; Edwards, Patrick J.; Roeske, Roger W.; Guo, Lili, *Bioconjugate Chemistry* **2005**, 16(2), 458-464).



**5**

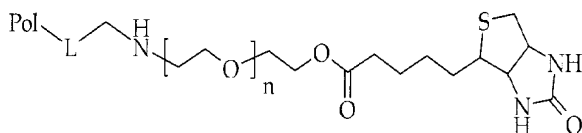
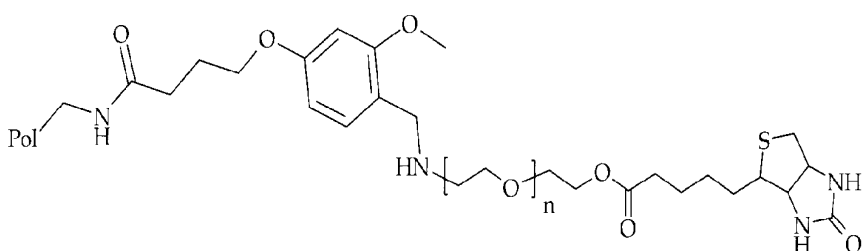
Podobný derivát **6** s kombinací ethylenoxy a propylenoxy jednotek byl rovněž připraven syntézou v roztoku a použit ke studiu derivátů nitrolotrioctové kyseliny (Huang, Zhaohua; Park, Joshua I.; Watson, Douglas S.; Hwang, Peter; Szoka, Francis C., Jr., *Bioconjugate Chemistry* **2006**, 17(6), 1592-1600).



6

# Podstata vynálezu

Předmětem předloženého vynálezu jsou imobilizované deriváty biotinu obecného vzorce 7



7

kde n představuje počet ethylenoxy jednotek a nabývá hodnot 1-5 a symbol Pol představuje polystyrenovou pryskyřici tvořenou kopolymerem styrenu a divinylbenzenu.

Podstatou vynálezu je dále příprava daných derivátů pomocí syntézy na pevné fázi, přičemž tato syntéza zahrnuje následující kroky (viz. Schema 1):

- Imobilizaci 2-(2-aminoethoxy)-ethanolu pomocí reduktivní aminace na polymerní pryskyřici obsahující navázaný 4-oxy-2-methoxybenzaldehyd za vzniku derivátu 8
- Derivatizaci imobilizovaného 2-(2-aminoethoxy)-ethanolu fluorenylmethoxykarbonylovou protektivní skupinou za vzniku derivátu 9
- Acylaci hydroxyskupiny v derivátu 9 biotinem a následnou deprotekcí aminoskupiny za vzniku derivátu 7a

- Esterifikaci hydroxyskupiny ve sloučenině **9** pomocí chloridu kyseliny methansulfonové, p-toluensulfonové nebo trifluoromethansulfonanhydridem za vzniku sloučeniny **10**
- Reakci esteru sulfonové kyseliny **10** s alkalickými solemi diethylenglykolu, triethylenglykolu nebo tetraethylenglykolu za vzniku sloučeniny **11**

Syntéza na pevné fázi ve srovnání se syntézou v roztoku obecně poskytuje řadu výhod. Mezi největší výhody patří především jednoduché instrumentální vybavení a jednoduché experimentální provedení syntézy, dále snadná příprava malých množství látek (i při mnohastupňových syntézách) a zejména eliminace purifikace jednotlivých meziproduktů velmi jednoduchá izolace produktů syntézy často bez nutnosti následnéhočištění. Zvláště poslední dvě jmenované výhody mají zásadní význam pro použití syntézy na pevné fázi pro účel popsany ve vynálezu, neboť biotinylované látky pro studium afinitní chromatografii je často potřeba syntetizovat v omezeném množství, přičemž vlivem nepříznivých vlastností produktů může docházet ke značným ztrátám a obtížím při jejich izolaci, které se zvyšují při nutnosti jejich purifikace.

To, že biotinylační jednotka je imobilizovaná na pevné fázi, tedy přináší výhody především v jednoduché a rychlé přípravě, snadné manipulaci s připravenými systémy a jednoduché finální izolaci cílových produktů. Vzhledem k tomu, že pouze některé typy biotinylačních jednotek pro derivatizaci látek v roztoku jsou komerčně dostupné a to většinou v malém množství za nepříznivou cenu, představuje popsany vynález efektivní způsob alternativního řešení dané problematiky.

V neposlední řadě je výhodou popsané metodiky její variabilita. Volbou reaktantů lze měnit sterické parametry cílových derivátů, tj. délku raménka, která může při provedení afinitní chromatografie značným způsobem ovlivňovat kvalitu interakce mezi studovanou látkou a cílovým enzymem. Jednoduchým způsobem tedy lze připravit a kombinovat jednotlivé typy biotinylačních jednotek.

Popsany koncept syntézy na pevné fázi, který přináší výše uvedené praktické výhody jak při vlastní přípravě, tak při použití derivátů 7, nebyl dosud v literatuře popsán.

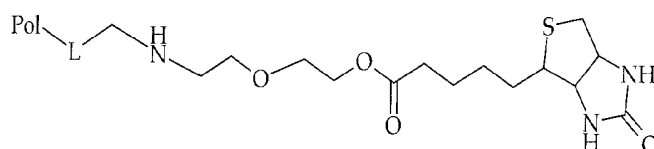
#### Příklady provedení vynálezu

Podstata přípravy a použití derivátů podle vynálezu je blíže objasněna v následujících příkladech. Tyto příklady mají pouze ilustrativní charakter a v žádném případě neomezují rozsah vynálezu.

## Postup přípravy derivátů 7:

### Příklad 1

#### Příprava imobilizovaného derivátu **7a** ( $n = 1$ )



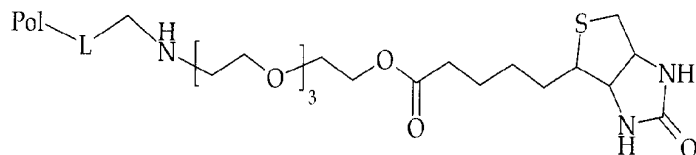
300 mg Aminomethylové pryskyřice vybavené BAL linkerem (loading systému 0.63 mmol/g) bylo suspendováno v roztoku 10% kyseliny octové v suchém *N,N*-dimethylformamidu (DMF) (3 ml) obsahujícího 1 mmol 2-(2-aminoethoxy)-ethanolu. Reakční směs byla třepána přes noc za laboratorní teploty. Poté byl přidán 1 mmol triacetoxymorhydridu sodného v roztoku 5% kyseliny octové v suchém DMF (1.5 ml). Reakční směs byla třepána 3 hodiny za laboratorní teploty, poté promyta 3 x DMF, následně třepána 10 min. s roztokem 10% piperidinu v DMF (3 ml), promyta 3 x DMF a 3 x dichloromethanem (DCM). Obdržená pryskyřice byla třepána v 0.2M roztoku fluorenylmethoxykarbonyl(hydroxysukcinimidu) (Fmoc-OSu) s ekvivalentem diisopropylethylaminu (DIEA) v DCM (3 ml) 2 hodiny za laboratorní teploty a pak promyta 3 x DCM. Obdržená pryskyřice byla třepána v DMF (3 ml) obsahující 1 mmol 1-hydroxybenzotriazolu (BtOH), 1 mmol *N,N'*-diisopropylkarbodiimidu (DIC), 1 mmol biotinu a 1 mmol DIEA přes noc za laboratorní teploty, poté byla pryskyřice promyta 3 x DMF. Tento reakční krok byl následně zopakován za stejných podmínek. Obdržená pryskyřice byla suspendována v roztoku 10% piperidinu v DMF (3 ml), třepána 15 minut za laboratorní teploty, promyta 3 x DMF, 3 x DCM, 3 x MeOH a vysušena v proudě dusíku.

Analýza produktu: 10 mg pryskyřice bylo třepáno v 0.5M roztoku Fmoc-OSu a DIEA v DCM (1 ml) 30 min. za laboratorní teploty, pak byla pryskyřice promyta 3 x DCM a třepána v 50%-ním roztoku kyseliny trifluoroctové (TFA) v DCM (0.5 ml). Poté byl vzorek odpařen dosucha v proudě dusíku a odpařek analyzován pomocí HPLC-UV-MS. Detekován produkt **7a** jako odpovídající Fmoc-derivát, ESI-MS  $m/z = 554.6$ ,  $[M+H]^+$ . čistota 98%.



## Příklad 2

### Příprava imobilizovaného derivátu **7b** ( $n = 3$ )



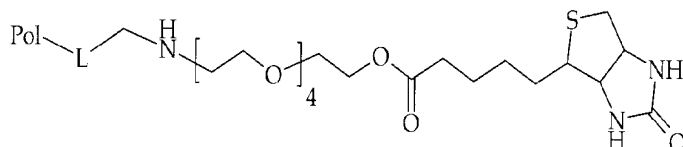
300 mg Aminomethylové pryskyřice vybavené BAL linkerem (loading 0.63 mmol/g) bylo suspendováno v roztoku 10% kyseliny octové v suchém DMF (3 ml) obsahujícího 1 mmol 2-(2-aminoethoxy)-ethanolu. Reakční směs byla třepána přes noc za laboratorní teploty. Poté byl přidán 1 mmol triacetoxyborohydridu sodného v roztoku 5% kyseliny octové v suchém DMF (1.5 ml). Reakční směs byla třepána 3 hodiny za laboratorní teploty, poté promyta 3 x DMF, následně třepána 10 min. s roztokem 10% piperidinu v DMF (3 ml), promyta 3 x DMF a 3 x DCM. Obdržená pryskyřice byla suspendována v 0.2M roztoku Fmoc-OSu s ekvivalentem DIEA v DCM (3 ml), třepána 2 hodiny za laboratorní teploty a pak promyta 3 x DCM. Obdržená pryskyřice byla třepána v 0.2M roztoku methansulfonylchloridu v pyridinu (3 ml) dvě hodiny za laboratorní teploty, pak promyta 3 x DMF. Obdržená pryskyřice byla třepána v 1M roztoku diethylenglykolátu lithného v dimethylsulfoxidu (DMSO) (3 ml) (roztok byl připraven smícháním ekvivalentu BuLi a diethylenglykolu za laboratorní teploty), třepána přes noc za laboratorní teploty, poté promyta 3 x DMF, třepána 10 minut s 20%-ním roztokem kyseliny octové v DMF, 10 minut s 20%-ním roztokem piperidinu v DMF, promyta 3 x DMF a 3 x DCM. Obdržená pryskyřice byla třepána v 0.2M roztoku Fmoc-OSu s ekvivalentem DIEA v DCM (3 ml) 2 hodiny za laboratorní teploty a pak promyta 3x DCM. Obdržená pryskyřice byla třepána v DMF (3 ml) obsahující 1 mmol BtOH, 1 mmol DIC, 1 mmol biotinu a 1 mmol DIEA přes noc za laboratorní teploty, poté byla pryskyřice promyta 3 x DMF. Tento reakční krok byl následně zopakován za stejných podmínek. Obdržená pryskyřice byla suspendována v roztoku 10% piperidinu v DMF (3 ml), třepána 15 minut za laboratorní teploty, pak promyta 3 x DMF, 3 x DCM, 3 x MeOH a vysušena v proudu dusíku.

Analýza produktu: 10 mg pryskyřice bylo třepáno v 0.5M roztoku Fmoc-OSu a DIEA v DCM (1 ml) 30 min. za laboratorní teploty, pak byla pryskyřice promyta 3 x DCM a třepána v 50%-ním roztoku TFA v DCM (0.5 ml). Poté byl vzorek odpařen dosucha v proudu dusíku a

odparek analyzován pomocí HPLC-UV-MS. Detekován produkt **7b** jako odpovídající Fmoc-derivát, ESI-MS  $m/z = 642.7$ ,  $[M+H]^+$ . čistota 95%.

### Příklad 3

#### Příprava imobilizovaného derivátu **7c** ( $n = 4$ )

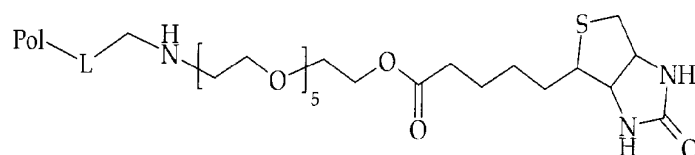


300 mg Aminomethylové pryskyřice vybavené BAL linkerem (loading 0.63 mmol/g) bylo suspendováno v roztoku 10% kyseliny octové v suchém DMF (3 ml) obsahujícího 1 mmol 2-(2-aminoethoxy)-ethanolu. Reakční směs byla třepána přes noc za laboratorní teploty. Poté byl přidán 1 mmol triacetoxyborohydridu sodného v roztoku 5% kyseliny octové v suchém DMF (1.5 ml). Reakční směs byla třepána 3 hodiny za laboratorní teploty, poté promyta 3 x DMF, následně třepána 10 min. s roztokem 10% piperidinu v DMF (3 ml), promyta 3 x DMF a 3 x DCM. Obdržená pryskyřice byla suspendována v 0.2M roztoku Fmoc-OSu s ekvivalentem DIEA v DCM (3 ml), třepána 2 hodiny za laboratorní teploty a pak promyta 3 x DCM. Obdržená pryskyřice byla třepána v 0.2M roztoku methansulfonylchloridu v pyridinu (3 ml) dvě hodiny za laboratorní teploty, pak promyta 3 x DMF. Obdržená pryskyřice byla suspendována v 1M roztoku triethylenglykolátu lithného v DMSO (3 ml) (roztok byl připraven smícháním ekvivalentu BuLi a triethylenglykolu za laboratorní teploty), třepána přes noc za laboratorní teploty, poté promyta 3 x DMF, třepána 10 minut s 20%-ním roztokem kyseliny octové v DMF, 10 minut s 20%-ním roztokem piperidinu v DMF, promyta 3 x DMF a 3 x DCM. Obdržená pryskyřice byla třepána v 0.2M roztoku Fmoc-OSu s ekvivalentem DIEA v DCM (3 ml) 2 hodiny za laboratorní teploty a pak promyta 3 x DCM. Obdržená pryskyřice byla třepána v DMF (3 ml) obsahující 1 mmol BtOH, 1 mmol DIC, 1 mmol biotinu a 1 mmol DIEA přes noc za laboratorní teploty, poté byla pryskyřice promyta 3 x DMF. Tento reakční krok byl následně zopakován 2x za stejných podmínek. Obdržená pryskyřice byla suspendována v roztoku 10% piperidinu v DMF (3 ml), třepána 15 minut za laboratorní teploty, pak promyta 3 x DMF, 3 x DCM, 3 x MeOH a vysušena v proudu dusíku.

Analýza produktu: 10 mg pryskyřice bylo třepáno v 0.5M roztoku Fmoc-OSu a DIEA v DCM (1 ml) 30 min. za laboratorní teploty, pak byla pryskyřice promyta 3 x DCM a třepána v 50%-ním roztoku TFA v DCM (0.5 ml). Poté byl vzorek odpařen dosucha v proudě dusíku a odparek analyzován pomocí HPLC-UV-MS. Detekován produkt **7c** jako odpovídající Fmoc-derivát, ESI-MS  $m/z = 686.8$ ,  $[M+H]^+$ . čistota 95%.

#### Příklad 4

##### Příprava imobilizovaného derivátu **7d** ( $n = 5$ )



300 mg Aminomethylové pryskyřice vybavené BAL linkerem (loading 0.63 mmol/g) bylo suspendováno v roztoku 10% kyseliny octové v suchém DMF (3 ml) obsahujícího 1 mmol 2-(2-aminoethoxy)-ethanolu. Reakční směs byla třepána přes noc za laboratorní teploty. Poté byl přidán 1 mmol triacetoxyborohydridu sodného v roztoku 5% kyseliny octové v suchém DMF (1.5 ml). Reakční směs byla třepána 3 hodiny za laboratorní teploty, poté promyta 3 x DMF, následně třepána 10 min. s roztokem 10% piperidinu v DMF (3 ml), promyta 3 x DMF a 3 x DCM. Obdržená pryskyřice byla suspendována v 0.2M roztoku Fmoc-OSu s ekvivalentem DIEA v DCM (3 ml), třepána 2 hodiny za laboratorní teploty a pak promyta 3 x DCM. Obdržená pryskyřice byla třepána v 0.2M roztoku methansulfonylchloridu v pyridinu (3 ml) dvě hodiny za laboratorní teploty, pak promyta 3 x DMF. Obdržená pryskyřice byla suspendována v 2M roztoku tetraethylenglykolátu sodného v DMSO (3 ml) (roztok byl připraven smícháním ekvivalentu NaH a tetraethylenglykolu za laboratorní teploty), třepána přes noc za laboratorní teploty, poté promyta 3 x DMF, třepána 10 minut s 20%-ním roztokem kyseliny octové v DMF, 10 minut s 20%-ním roztokem piperidinu v DMF, promyta 3 x DMF a 3 x DCM. Obdržená pryskyřice byla třepána v 0.2M roztoku Fmoc-OSu s ekvivalentem DIEA v DCM (3 ml) 2 hodiny za laboratorní teploty a pak promyta 3 x DCM. Obdržená pryskyřice byla třepána v DMF (3 ml) obsahující 1 mmol BtOH, 1 mmol DIC, 1 mmol biotinu a 1 mmol DIEA přes noc za laboratorní teploty, poté byla pryskyřice promyta 3 x DMF. Tento reakční krok byl následně zopakován 3 x za stejných podmínek. Obdržená



pryskyřice byla suspendována v roztoku 10% piperidinu v DMF (3 ml), třepána 15 minut za laboratorní teploty, pak promyta 3 x DMF, 3 x DCM, 3 x MeOH a vysušena v proudu dusíku.

Analýza produktu: 10 mg pryskyřice bylo třepáno v 0.5M roztoku Fmoc-OSu a DIEA v DCM (1 ml) 30 min. za laboratorní teploty, pak byla pryskyřice promyta 3 x DCM a třepána v 50%-ním roztoku TFA v DCM (0.5 ml). Poté byl vzorek odpařen dosucha v proudu dusíku a odparek analyzován pomocí HPLC-UV-MS. Detekován produkt **7d** jako odpovídající Fmoc-derivát, ESI-MS  $m/z = 730.8$ ,  $[M+H]^+$ . čistota 90%.

### Příklad 5

Postup použití derivátů **7**:

Obecný postup derivatizace sloučenin s karboxylovou skupinou použitím imobilizovaných derivátů **7**:

250 mg Výchozí aminomethylové pryskyřice bylo podrobena syntéze derivátů **7** dle výše uvedených postupů. Výsledná pryskyřice byla třepána s roztokem 0.5 mmol příslušné karboxylové kyseliny, 0.5 mmol BtOH a 0.5 mmol DIC ve směsi DMF a DCM (1:1, 2.5 ml) přes noc za laboratorní teploty. Obdržená pryskyřice byla promyta 3 x DMF, 3 x DCM a poté třepána v 50%-ním roztoku TFA v DCM (2.5 ml). Poté byla pryskyřice odfiltrována, filtrát odpařen dosucha v proudu dusíku a odparek sonifikován v diethyletheru. Vysrážená pevná látka byla odsáta a promyta diethyletherem. V případě, že vzhledem k rozpustnosti látky nebylo možné produkt vysrážet diethyletherem, byl odparek rozpuštěn v chloroformu (5 ml) a protřepán s 5%-ním roztokem hydrogenuhličitanu sodného (5 ml). Organická vrstva byla oddělena, vysušena síranem sodným a zahuštěna dosucha. V obou případech se výtěžky pohybují v rozmezí 70-90% teorie.

### Příklady použití:

| Studovaná<br>karboxylová<br>kyselina | Biotinylní<br>jednotka | Sloučenina <b>13</b><br><i>m/z</i> ([M-H] <sup>-</sup> )<br>(HPLC-UV-MS) | Sloučenina <b>13</b><br>Čistota (%)<br>(HPLC-UV-MS) |
|--------------------------------------|------------------------|--------------------------------------------------------------------------|-----------------------------------------------------|
| Fmoc-L-Ala                           | <b>7a</b>              | 625.7                                                                    | 95                                                  |
| Benzoová kyselina                    | <b>7a</b>              | 436.2                                                                    | 95                                                  |
| Nikotinová kyselina                  | <b>7a</b>              | 437.4                                                                    | 93                                                  |
| Propionová kyselina                  | <b>7a</b>              | 388.2                                                                    | 95                                                  |
| Fmoc-L-Ala                           | <b>7b</b>              | 713.8                                                                    | 92                                                  |
| Benzoová kyselina                    | <b>7b</b>              | 524.6                                                                    | 93                                                  |
| Nikotinová kyselina                  | <b>7b</b>              | 526.6                                                                    | 91                                                  |
| Propionová kyselina                  | <b>7b</b>              | 490.6                                                                    | 92                                                  |
| Fmoc-L-Ala                           | <b>7c</b>              | 757.8                                                                    | 93                                                  |
| Benzoová kyselina                    | <b>7c</b>              | 568.7                                                                    | 90                                                  |
| Nikotinová kyselina                  | <b>7c</b>              | 569.7                                                                    | 89                                                  |
| Propionová kyselina                  | <b>7c</b>              | 534.6                                                                    | 90                                                  |
| Fmoc-L-Ala                           | <b>7d</b>              | 801.8                                                                    | 88                                                  |
| Benzoová kyselina                    | <b>7d</b>              | 612.7                                                                    | 84                                                  |
| Nikotinová kyselina                  | <b>7d</b>              | 613.7                                                                    | 85                                                  |
| Propionová kyselina                  | <b>7d</b>              | 578.7                                                                    | 85                                                  |

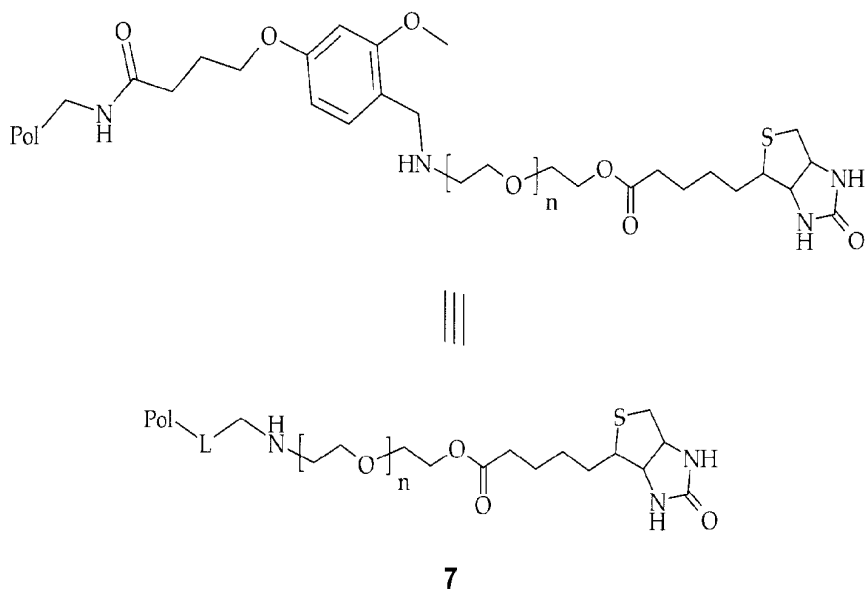
Struktura vybraných derivátů **13** byla potvrzena pomocí <sup>1</sup>H a <sup>13</sup>C NMR spektroskopie.

### Průmyslová využitelnost

Imobilizované deriváty obecného vzorce **7** jsou vhodné pro efektivní derivatizaci sloučenin obsahujících ve své struktuře karboxylovou skupinu a mohou tak sloužit k rutinní derivatizaci takových sloučenin a následnému studiu jejich vlastností pomocí afinitní chromatografie. To je využitelné zejména ve farmaceutickém výzkumu při určování molekulárního cíle biologicky aktivních látek.

## Patentové nároky

1. Imobilizované deriváty biotinu obecného vzorce 7 vyznačujících se tím,



že n představuje počet ethylenoxy jednotek a nabývá hodnot 1-5 a symbol Pol představuje polystyrenovou pryskyřici tvořenou kopolymerem styrenu a divinylbenzenu.

2. Způsob přípravy derivátů podle nároku 1 **vyznačující se tím**, že sloučeniny obecného vzorce 7 se připravují syntézou na pevné fázi (polymeru).

3. Způsob přípravy podle nároku 2 **vyznačující se tím**, že syntéza zahrnuje kroky:

- Imobilizaci 2-(2-aminoethoxy)-ethanolu pomocí redukční aminace na polymerní pryskyřici obsahující navázaný 4-oxy-2-methoxybenzaldehyd za vzniku derivátu 8
- Derivatizaci imobilizovaného 2-(2-aminoethoxy)-ethanolu fluorenylmethoxykarbonylovou protektivní skupinou za vzniku derivátu 9
- Acylaci hydroxyskupiny v derivátu 9 biotinem a následnou deprotekcí aminoskupiny za vzniku derivátu 7a
- Esterifikaci hydroxyskupiny ve sloučenině 9 pomocí chloridu kyseliny methansulfonové, p-toluensulfonové nebo trifluoromethansulfonanhydridem za vzniku sloučeniny 10



- Reakci esteru sulfonové kyseliny **10** s alkalickými solemi diethylenglykolu, triethylenglykolu nebo tetraethylenglykolu za vzniku sloučeniny **11**
- Derivatizaci sloučeniny **11** fluorenylmethoxykarbonylovou protektivní skupinou, následnou acylaci hydroxyskupiny biotinem a deprotekcí aminoskupiny za vzniku derivátu **7b-d**.

4. Způsob použití derivátů podle nároku 1 **vyznačující se tím**, že sloučeniny typu **7** jsou podrobeny reakci se sloučeninou obsahující karboxylovou skupinu za vzniku látek **12** a následně působením kyseliny trifluoroctové je odštěpen polymer za vzniku sloučenin **13**.