

**Univerzita Pardubice**

**Fakulta chemicko-technologická**

Ústav organické chemie a technologie

**Syntéza aktivovaného isoniazidu pro přípravu jeho konjugátů**

BAKALÁŘSKÁ PRÁCE

AUTOR PRÁCE: Eliška Kaňková

VEDOUCÍ PRÁCE: prof. Ing. Miloš Sedlák, DrSc.

2020

**University of Pardubice**

**Faculty of Chemical Technology**

Institute of Organic Chemistry and Technology

**Synthesis of activated isoniazid derivative for preparation of conjugates**

BACHELOR THESIS

AUTHOR: Eliška Kaňková

SUPERVISOR: prof. Ing. Miloš Sedlák, DrSc.

2020

Univerzita Pardubice  
Fakulta chemicko-technologická  
Akademický rok: 2019/2020

## ZADÁNÍ BAKALÁŘSKÉ PRÁCE

(projektu, uměleckého díla, uměleckého výkonu)

Jméno a příjmení: **Eliška Kaňková**  
Osobní číslo: **C17317**  
Studijní program: **B2830 Farmakochemie a medicínální materiály**  
Studijní obor: **Farmakochemie a medicínální materiály**  
Téma práce: **Syntéza aktivovaného isoniazidu pro přípravu jeho konjugátů**  
Zadávající katedra: **Ústav organické chemie a technologie**

### Zásady pro vypracování

1. Proveďte literární rešerši týkající se polymerních konjugátů isoniazidu.
2. Zhodnoťte možnost přípravy derivátu isoniazidu, který bude možné navázat na polymerní nosič prostřednictvím pH-senzitivní vazby.
3. Pokuste se připravit vybraný derivát isoniazidu.
4. Připravený derivát charakterizujte dostupnými analytickými metodami.
5. Výsledky vyhodnoťte a zpracujte formou závěrečné zprávy.

Rozsah pracovní zprávy:  
Rozsah grafických prací:  
Forma zpracování bakalářské práce: **tištěná**

Seznam doporučené literatury:

Všechna dostupná chemická literatura.

Vedoucí bakalářské práce: **prof. Ing. Miloš Sedlák, DrSc.**  
Ústav organické chemie a technologie

Datum zadání bakalářské práce: **28. února 2020**  
Termín odevzdání bakalářské práce: **4. července 2020**

L.S.

---

**prof. Ing. Petr Kalenda, CSc.**  
děkan

---

**prof. Ing. Miloš Sedlák, DrSc.**  
vedoucí katedry

Prohlašuji:

Tuto práci jsem vypracovala samostatně. Veškeré literární prameny a informace, které jsem v práci využila, jsou uvedeny v seznamu použité literatury. Byla jsem seznámena s tím, že se na moji práci vztahují práva a povinnosti vyplývající ze zákona č. 121/2000 Sb., o právu autorském, o právech souvisejících s právem autorským a o změně některých zákonů (autorský zákon), ve znění pozdějších předpisů, zejména se skutečností, že Univerzita Pardubice má právo na uzavření licenční smlouvy o užití této práce jako školního díla podle § 60 odst. 1 autorského zákona a s tím, že pokud dojde k užití této práce mnou nebo bude poskytnuta licence o užití jinému subjektu, je Univerzita Pardubice oprávněna ode mne požadovat přiměřený příspěvek na úhradu nákladů, které na vytvoření díla vynaložila, a to podle okolností až do jejich skutečné výše.

Beru na vědomí, že v souladu s § 47b zákona č. 111/1998 Sb., o vysokých školách a o změně a doplnění dalších zákonů (zákon o vysokých školách), ve znění pozdějších předpisů a směrnicí Univerzity Pardubice č. 7/2019 Pravidla pro odevzdávání, zveřejňování a formální úpravu závěrečných prací, ve znění pozdějších dodatků, bude práce zveřejněna prostřednictvím Digitální knihovny Univerzity Pardubice.

V Pardubicích dne

Eliška Kaňková

## **Poděkování**

Na tomto místě bych chtěla poděkovat prof. Ing. Miloši Sedlákovi, DrSc. za poskytnutí možnosti pracovat na daném tématu. A dále děkuji Ing. Janu Bartáčkovi za pomoc při interpretaci NMR a IČ spekter, za vedení a cenné rady při řešení laboratorní techniky a v neposlední řadě velké díky za jeho trpělivost a pevné nervy.

## **Anotace**

Formou literární rešerše byl zhodnocen aktuální stav problematiky polymerních konjugátů antituberkulotika isoniazidu. Byla navržena struktura pH-senzitivního derivátu isoniazidu, obsahující zároveň kotvící skupinu, umožňující přípravu polymerních konjugátů. Byl připraven vybraný derivát *N*-(1-(4-vinylfenyl)-2,5,8,11,14-pentaoxahexadekan-16-yliden)-isonikotinohydrazid. Byly diskutovány možnosti zakotvení připraveného konjugátu na polymerní nosiče.

## **Klíčová slova**

isoniazid, konjugát, antituberkulotikum, pH-senzitivní vazba, medicínální chemie

## **Annotation**

The current state of the problem of polymeric conjugates of the antituberculous drug isoniazid was evaluated in the form of a literature review. The structure of a pH-sensitive isoniazid derivative which also contains an anchoring group, enabling the preparation of polymeric conjugates was proposed. A selected *N*-(1-(4-vinylphenyl)-2,5,8,11,14-pentaoxahexadecan-16-ylidene)-isonicotinohydrazide derivative was prepared. The possibilities of anchoring the prepared conjugate to polymeric carriers were discussed.

## **Keywords**

Isoniazid, tetraethyleneglycol, antituberculous drug, pH labile bond, medicinal chemistry

## Obsah

Seznam zkratk a značek .....	- 9 -
1. Úvod.....	- 11 -
2. Teoretická část .....	- 12 -
2.1. Isoniazid .....	- 12 -
2.1.1 Mechanismus účinku .....	- 13 -
2.2. pH labilní vazby .....	- 13 -
2.3. Hydrazid-hydrazon.....	- 14 -
2.4. Polymerní konjugáty isoniazidu.....	- 14 -
2.4.1. Konjugát s inulinem .....	- 14 -
2.4.2. Konjugát s poly(ethylenglykolem).....	- 15 -
2.4.3. Konjugát s transferinem .....	- 16 -
3. Experimentální část.....	- 20 -
3.1. Tetra(ethylenglykol)-mono-(4-vinylbenzyléter) (TEG-VBE).....	- 20 -
3.2. 16-methoxy-1-(vinylfenyl)-2,5,8,11,14,17-hexaoxaoktadekan (VBE-TEG-DME) -	- 21 -
3.3. N'-(1-(4-vinylfenyl)-2,5,8,11,14-pentaoxahexadekan-16-yliden)isonikotinohydrazid (VBE-TEG-INH) .....	- 22 -
4. Výsledky a diskuse.....	- 23 -
4.1. Syntéza cílové molekuly N'-(1-(4-vinylfenyl)-2,5,8,11,14-pentaoxahexadekan-16- yliden)isonikotinohydrazidu .....	- 24 -
Závěr -	- 27 -
Použitá literatura .....	- 28 -
Přílohy-	- 35 -



## Seznam zkratek a značek

ACN – acetonitril

API – aktivní účinná látka

ATP – adenosintrifosfát

CA – karboanhydráza

CS – chitosan

DCM – dichlormethan

DEMA – diethoxymethyl-acetát

DMPAP – 2,2-Dimethoxy-2-fenylacetofenon

EDC – 1-Ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)karbodiimid

enoyl-Acp – enoyl-acyl carrier protein reductase (protein reduktáza nesoucí enoyl-acyl)

FAS – fatty acid synthesis (syntéza mastných kyselin)

FTIR – infračervená spektroskopie s Fourierovou transformací

HPLC – vysokoúčinná kapalinová chromatografie

IHA – isonikotinoylhydrazonoacetylová kyselina

IHOP – isonikotinoylhydrazinyl-5-oxopentanová kyselina

INH – isoniazid

KatG – katalázo-peroxidázovým enzym

MA – anhydrid kyseliny maleinové

MTB – mykobakterium tuberculosis

NAD<sup>+</sup>/NADH+H<sup>+</sup> – nikotinamiddinukleotid

NHS – *N*-hydroxysukcimidu

NMR – nukleární magnetické rezonance

PBS – fosfátový pufr

PCL – polykaprolakton

PEG – polyethylenglykol

RAFT – Reversible addition–fragmentation chain-transfer (vratný adičně-fragmentační přenos řetězce)

TB – tuberkulóza

TEG – tetraethylenglykol

TEG-VBE – Tetra(ethylenglykol)-*mono*-(4-vinylbenzyléter)

Tf – transferin

THF – tetrahydrofuran

UV-Vis – oblast ultrafialového a viditelného světla

VBE-TEG-DME – 16-methoxy-1-(vinylfenyl)-2,5,8,11,14,17-hexaoxaoktadekan

VBE-TEG-INH – *N* - (1-(4-vinylfenyl)-2,5,8,11,14-pentaoxahexadekan-16-yliden)isonikotinohydrazid

## 1. Úvod

Tuberkulóza je onemocnění způsobené bakterií, nejčastěji *Mycobacteria tuberculosis* (MTB), většinou zasahující plíce. MTB je tyčinkovitá, Gram-pozitivní, pomalu rostoucí bakterie, jejíž buněčná stěna obsahuje mykolové kyseliny, a tudíž na ní nepůsobí standardní antibiotika. Mezi symptomy patří vykašlávání krvavého hlenu, bolest na hrudi, slabost, ztráta hmotnosti, horečka a noční pocení.<sup>1</sup> Uvolněné kapénky se šíří vzduchem, kašlem, kýchnutím nebo slinami.<sup>2,3,4</sup> V současnosti známe několik typů tuberkulózy zejména plicní, miliární, močopohlavní, osteoartikulární, kožní (lupus vulgaris), peritoneální, genitální, bovinní t., tuberkulózní meningitida, tuberkulózní perikarditida, etc.<sup>5,6,7</sup>

Zhruba čtvrtina světové populace je zasažena tuberkulózní bakterií, ale pouze část se skutečně nakazí tuberkulózou (TB) (mají latentní formu).<sup>1</sup> Rizikovou skupinou jsou lidé s oslabeným imunitním systémem (např. HIV/AIDS). V roce 2018 onemocnělo touto nemocí 5,7 miliónů mužů, 3,2 miliónů žen a 1,1 miliónů dětí a adolescentů celosvětové populace, z čehož 1,5 miliónů lidí zemřelo. TB se řadí mezi 10 nejčastějších příčin smrti.<sup>1</sup>

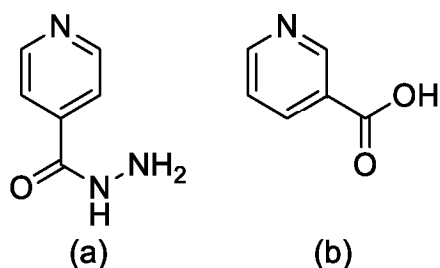
Farmakologická léčba spočívá v nasazení pomalu se uvolňující API, tedy podání proléčiva, která se uvolní po enzymatickém či chemickém působení prostředí a jako samotná bude interagovat s příslušným receptorem.<sup>8,9,10</sup> Jako proléčiva se používají konjugáty API s biokompatibilním polymerním nosičem jako jsou substituované poly(ethylenglykoly) či jejich blokové kopolymery.<sup>11,12,13,14</sup> Jako antituberkulotika „první volby“ se používají isoniazid, rifampicin, pyrazinamid a ethambutol, přičemž první dva jsou nejúčinnější.<sup>1,15</sup>

Konjugace léčiva s polymerem vytváří tzv. „Polymerní proléčivo“. Polymerní konjugáty konvenčních léčiv mají oproti svým prekurzorům s nízkou molekulovou hmotností několik výhod. Hlavní výhody zahrnují: méně vedlejších účinků; zvýšená terapeutická účinnost; zvýšení rozpustnosti ve vodě málo rozpustných nebo nerozpustných léčiv, což vede ke zvýšení biologické dostupnosti daného léčiva; ochrana léku před deaktivací a zachování jeho aktivity během cirkulace a transportu do cílového orgánu, tkáně či intracelulárního prostoru; snížení antigenní aktivity, a tím pádem méně výrazná imunologická odpověď a samozřejmě schopnost cíleného uvolnění léčiva.<sup>16,17</sup>

## 2. Teoretická část

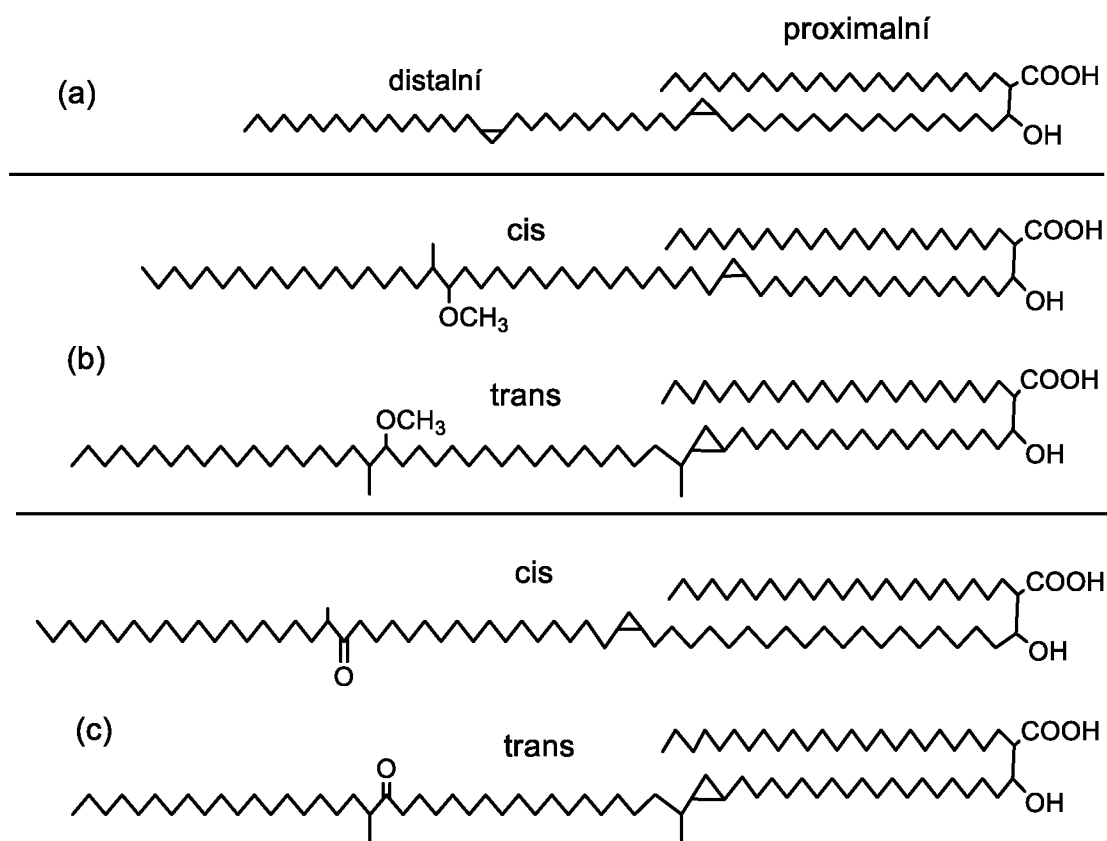
### 2.1. Isoniazid

Isoniazid (**INH**), jinak též hydrazid kyseliny isonikotinové, je derivátem niacinu (**Schéma 1**), tedy vitamínu B<sub>3</sub>. Niacin představuje klíčovou složkou metabolických drah organismů<sup>18</sup>. Jako univerzální příklad nepostradatelnosti této molekuly platný jak pro nás, Homo Sapiens Sapiens, tak i pro většinu organismů, které známe, lze uvést dýchací řetězec a na něj navázanou syntézu ATP. Na vnitřní membráně našich mitochondriích se niacin v podobě NADH+H<sup>+</sup> využívá k redukci komplexu I (sám se oxiduje na NAD<sup>+</sup>). Díky tomuto a mnohým dalším krokům dochází na konci této kaskády k redukci molekulárního kyslíku na vodu za vzniku ATP.<sup>19</sup>



**Schéma 1** - Struktura isoniazidu (a) a kyseliny nikotinové (b)<sup>15</sup>

Niacin je využíván mykobakteriemi též k syntéze stavebních kamenů jejich buněčné stěny, mykolových kyselin. Díky podobnosti **INH** s vitamínem B<sub>3</sub> působí jako antimetabolit při biosyntéze DNA a mimo jiné inhibuje tvorbu těchto kyselin. Mykolové kyseliny jsou mastné kyseliny (C<sub>74</sub>-C<sub>84</sub>) obsahující na α-uhlíku dlouhý alifatický řetězec, na β-uhlíku hydroxylovou skupinu a jeden až dva cyklopropanové kruhy.<sup>15,20,21</sup>



**Obrázek 1** - Chemické struktury mykolových kyselin z *M. tuberculosis*: α-mykolová kyselina (a), methoxy-mykolová kyselina (b) a keto-mykolová kyselina (c)<sup>20</sup>

### 2.1.1 Mechanismus účinku

Aktivací **INH** KatG vzniká isonikotinový acylový radikál, který se spontánně spojuje s NADH za vzniku nikotinoyl-NAD aduktu. Tento komplex se pevně váže na enoyl-Acp, což je klíčový enzym FAS systému. Dochází tak k inhibici syntézy mastných kyselin a tím pádem i k snížené syntéze mykolových kyselin.<sup>22,23</sup>

### 2.2. pH labilní vazby

K dosažení řízeného uvolňování léčiva v požadované lokaci jsou vyžadovány nosiče, které uvolní API až po spouštějících mechanismech. Takové mechanismy slouží i k zabránění uvolnění či deaktivaci léku během cesty na místo určení. Uvolnění léčiv na cílových místech v těle zapříčiňuje přítomnost specifických fyziologických podmínek.<sup>24,25</sup>

Při dodání léčiva je často žádoucí uvolňování léku až poté, co je fagocytováno buňkami.<sup>26,27</sup> Toho lze dosáhnout díky rozdílu v redoxním potenciálu mezi extracelulárním prostředím, které je spíše alkalické a intracelulárním prostředím, které je spíše acidické.

Buňky se musí chránit před dalším okyselením, což zabezpečuje jednak řada slabých kyselin a bází obsahující na postranním řetězci aminokyseliny a fosfátové skupiny, a jednak (HCO<sub>3</sub>)<sup>-</sup>,

což dohromady tvoří intracelulární pufr,<sup>28</sup> který vzniká za enzymatického působení CA z přijímaného CO<sub>2</sub>.<sup>29</sup>

### 2.3. Hydrazid-hydrazon

Hydrazid-hydrazony představují třídu organických sloučenin obsahující azomethinovou skupinu (–NH–N=CH–) spojené s karbonylovou skupinou, což je zodpovědné za jejich různé farmaceutické aplikace a mezi které se řadí i **INH**, resp. isonikotinoyl hydrazony.<sup>30</sup>

### 2.4. Polymerní konjugáty isoniazidu

#### 2.4.1. Konjugát s inulinem

V práci Afinjuoma a kol. se zaměřili na přípravu pH-citlivého konjugátu **INH** s inulinem pro cílené dávkování s využitím monocytů. Syntéza vychází z inulinu **1** který byl oxidován jodistanem sodným. Vznikající dialdehyd **2a** vratně cyklizuje na velmi reaktivní hemiacetal **2b**.<sup>31</sup> Ten byl následně spojen s **INH** přes hydrazonovou vazbu za vzniku konjugátu inulin-**INH** **3** citlivého na pH (Schéma 2).

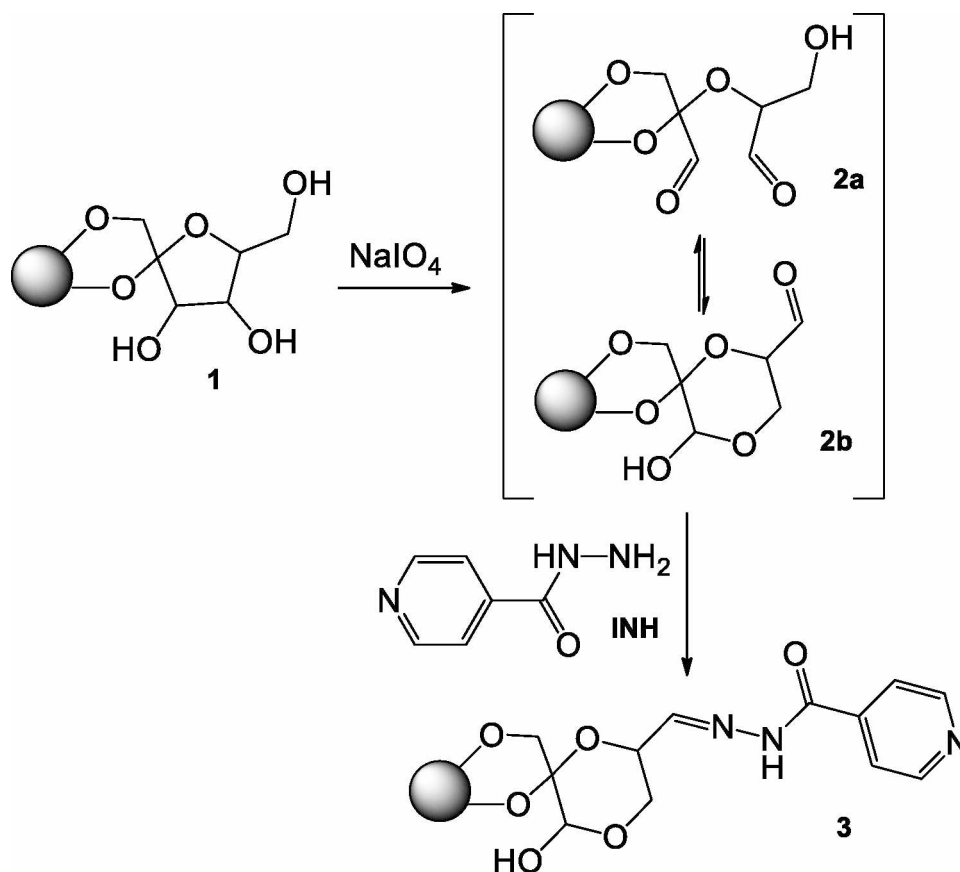


Schéma 2 – Syntéza inulin-INH konjugátu<sup>31</sup>

Studie buněčné absorpce potvrzují, že RAW 264.7 monocytární buňky pohltily konjugáty inulinu do endocytických kompartmentů prostřednictvím endocytózy. Studie intracelulární účinnosti ukazují, že inulinové konjugáty mají dávkově závislý cílený účinek proti monocytům

infikovaných MTB, způsobené účinnou internalizací a štěpením hydrazonové vazby kyselým prostředím lysosomu, který následně uvolnil isoniazid. Tyto výsledky jasně naznačují, že konjugáty inulinu mohou sloužit jako pH-senzitivní intracelulární dodávací systém pro léčbu TB.<sup>32,33</sup>

#### 2.4.2. Konjugát s poly(ethylen glykolem)

Výzkumný tým González-Toresse se zabýval PEGylací INH. Pomocí  $\gamma$ -radiací indukované syntézy byly připravovány konjugáty INH a PEG ( $M_r = 400$  g/mol) (Schéma 3).

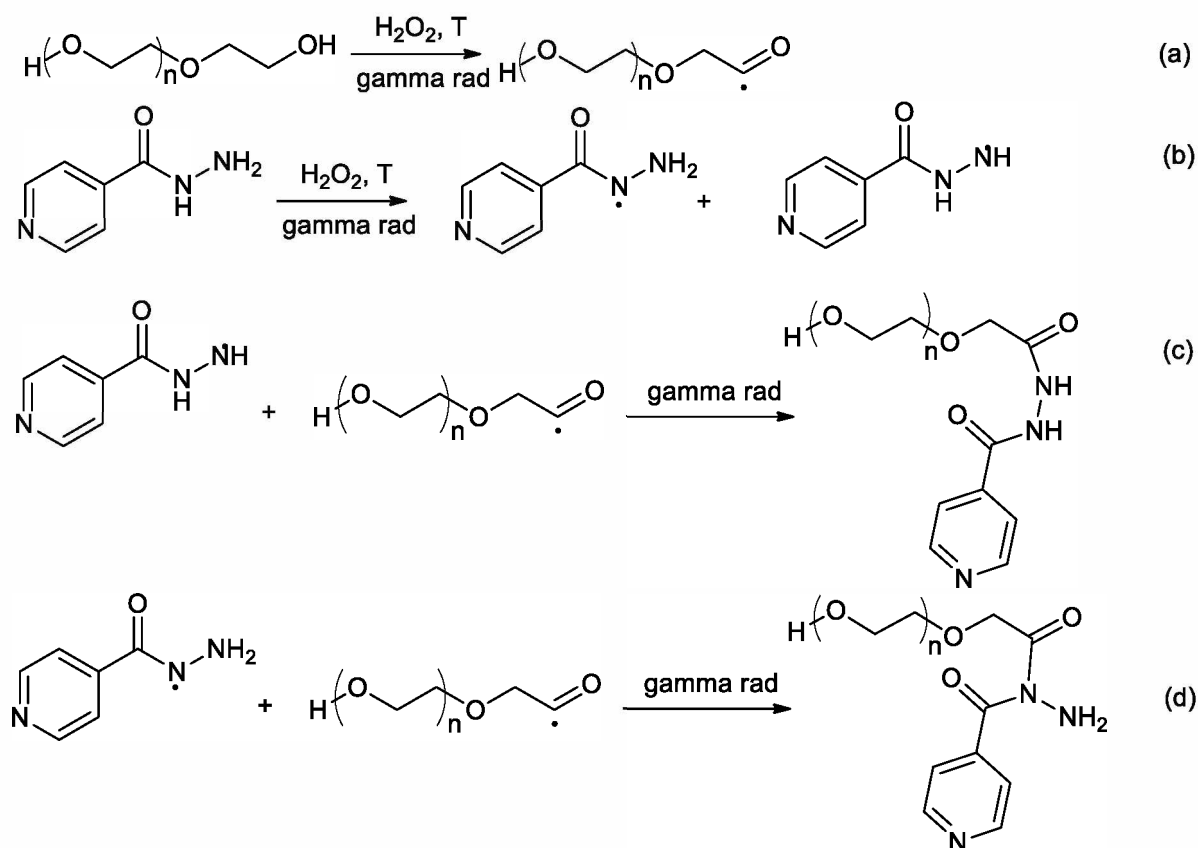


Schéma 3 - Navrhovaný mechanismus PEGylovaného INH indukovaného gama zářením<sup>34</sup>

V iniciačním kroku (a) byly generovány radikály PEG a INH (Schéma 3). PEG podléhá oxidaci na aldehyd a tvoří radikál na karbonylovém uhlíku, INH má možnosti tvořit radikál na amidovém i hydrazinovém dusíku (b). V druhém kroku (c,d) dochází ke kolizi radikálů INH a PEGu za vzniku proléčiva PEG-INH. Dle analýzy pomocí Ramanovy spektroskopie autoři usuzují, že konjugace pravděpodobně probíhá převážně na hydrazinový dusík (c). Ukázalo se, že PEG-INH inhiboval bakteriální růst nad 95% ve srovnání s INH, který vykazoval nižší hodnotu (80%) při koncentracích 0,25; 0,1; 1 a 5  $\mu\text{M}$ . Výzkum ukázal, že je možné kovalentně navázat PEG na INH pomocí navrženého mechanismu, a získat tak pomalu působící

isoniazidový derivát s nízkou toxicitou *in vitro* a vyšší antimykobakteriální účinností než samotný INH (Schéma 3).<sup>34</sup>

### 2.4.3. Konjugát s transferinem

Publikace<sup>35</sup> Sutara a kol. z roku 2019 pojednává o přípravě konjugátu INH s transferinem (Tf). Byly provedeny dvě syntézy, jejichž cílem byly dva odlišné konjugáty. První cesta vedla přes spojení INH s glyoxalovou kyselinou za vzniku isonikotinoylhydrazonoacetylové kyseliny (IHA) a druhá pak přes spojení INH s anhydridem kyseliny glutarové, což analogicky vedlo k isonikotinoylhydrazinyl-5-oxopentanové kyselině (IHOP). Oba připravené meziproducty (IHA, IHOP) byly amidickou vazbou navázány na transferin (Tf) za přítomnosti fosfátového pufru (regulace pH směsi), EDC a *N*-hydroxysukcinimidu (k aktivaci karboxylové skupiny pro kondenzaci s aminy za vzniku amidové vazby). Výsledky *in vitro* antituberkulárních testů ukázaly, že aktivita byla zachována v obou konjugátech. Konjugáty byly účinné proti intracelulárním Mtb H37Rv avšak postrádaly cytotoxický účinek při terapeutické koncentraci (Schéma 4).

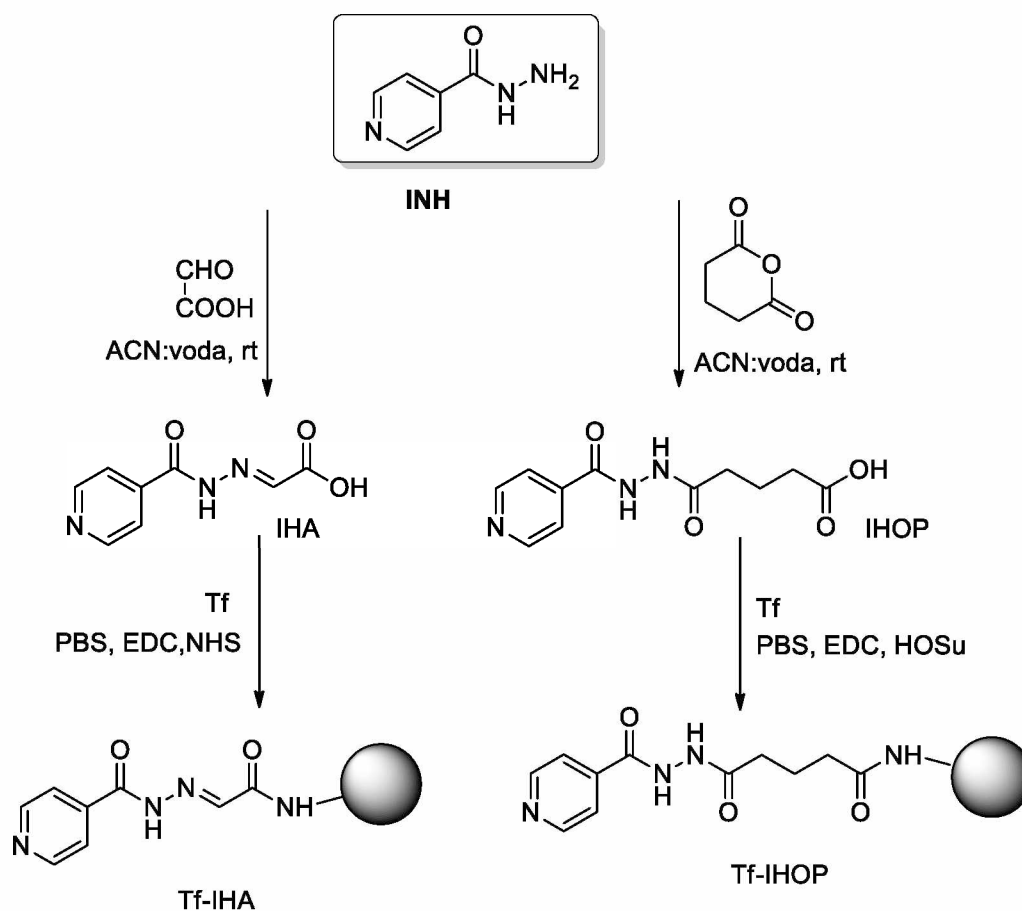


Schéma 4 - Syntéza konjugátů Tf-IHA a Tf-IHOP<sup>35</sup>



#### 2.4.4. Chitosan-g-polykaprolakton/maleinanhydrid-isoniazid polymerní micely

Práce výzkumné skupiny Rajendrana Amarnatha Praphakara a kol. se zabírala problematikou konstruování polymerních micel kombinujících přírodní a syntetické polymery.<sup>36</sup> Polymerní jádro bylo syntetizováno v několika krocích (Schéma 5).

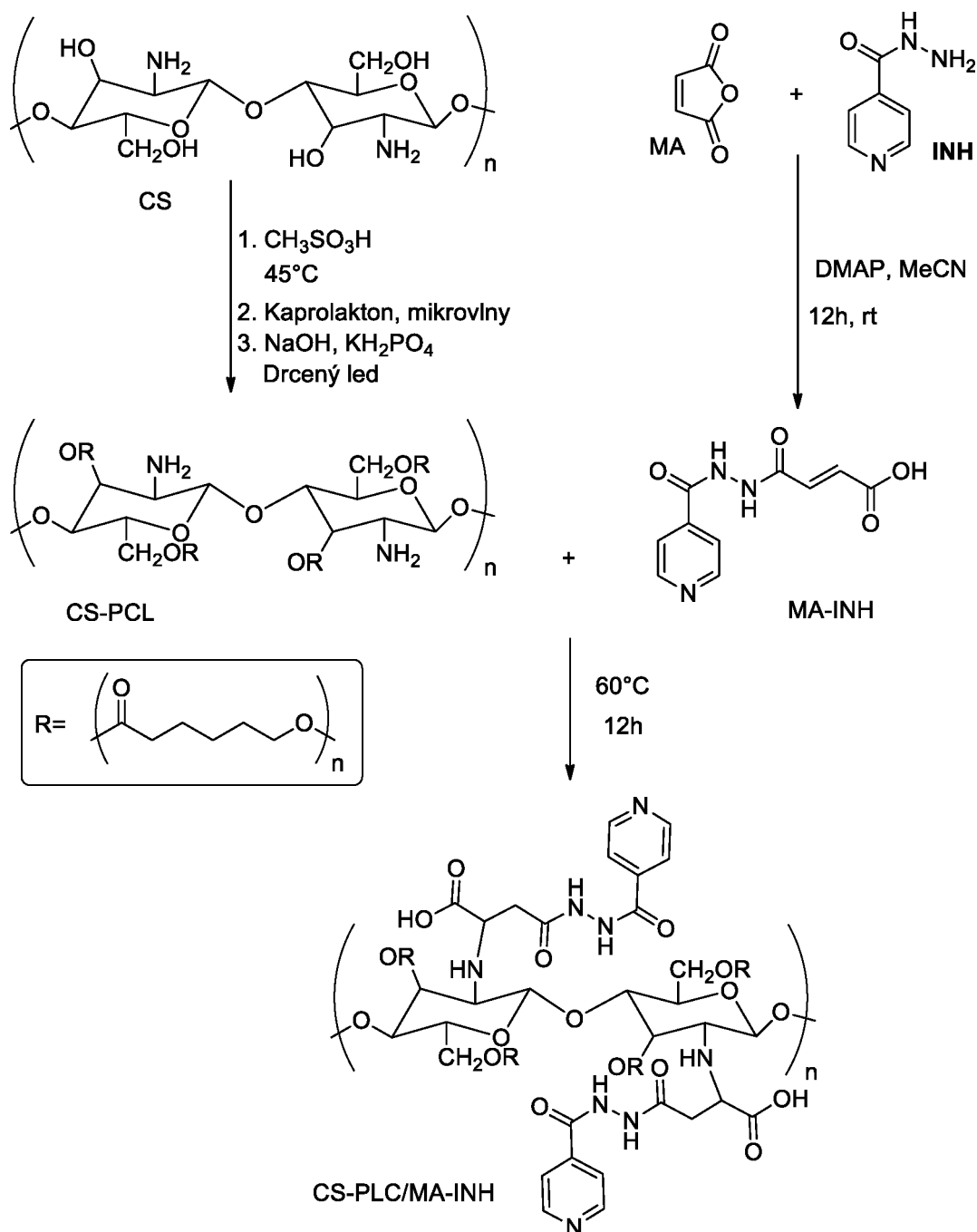


Schéma 5 – Syntéza polymerní micely s navázaným INH<sup>36</sup>

Nejprve byl chitosan (CS) zesíťován reakcí s  $\epsilon$ -kapolaktonem (PCL) za vzniku CS-PCL. INH byl aktivován pro zakotvení reakcí s maleinanhydridem (MA). Vlastní příprava konjugátu byla

provedena reakcí CS–PCL s MA–INH ve smyslu Michaelovy 1,4–adice za vzniku CS–PCL/MA–INH polymerního jádra. Netoxická povaha micel byla hodnocena *ex vivo* studii na buněčných liniích U937 a L929, a erythrocytech. Všechna pozorování naznačují, že polymerní micela naplněná léčivem je bezpečný a účinný systém pro dodání anti-TB léků bez ovlivnění mykobaktericidní aktivity (Schéma 5).

#### 2.4.5. Konjugát s magnetickými nanočásticemi Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>@SiO<sub>2</sub>

Výzkumná skupina prof. Sedláka vycházela ze snadno dostupných hydrofilních nanočásticích magnetitu. Povrch Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>@SiO<sub>2</sub> byl dále funkcionalizován aminoskupinou reakcí s 3-aminopropyltriethoxysilanem. V posledním kroku syntézy nanočástice Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>@SiO<sub>2</sub>–NH<sub>2</sub> byly podrobeny reakci s přebytkem ethyl(pyridin-4-ylkarbonyl)hydrazonoformiátem, který poskytl finální konjugát s INH připojené pomocí pH-senzitivní amidinové vazby (Schéma 6). V druhé části výzkumu bylo studováno uvolňování INH z konjugátu Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>@SiO<sub>2</sub>–INH za podmínek *in vitro* v roztocích kyseliny chlorovodíkové a fosfátového pufru při teplotě 37 ° C (Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>@SiO<sub>2</sub>–INH → INH + Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>@SiO<sub>2</sub>–NH<sub>2</sub>). V modelovém médium fosfátového pufru při pH = 5,3, který napodobuje patologickou tkáň, byl INH uvolněn s poločasem rozpadu t<sub>1/2</sub>=116 s. V fosfátovém pufru při pH = 7,4 byl konjugát stabilní. Připravený systém umožňuje působení INH na postiženou tkáň cíleným způsobem, jednak změnou pH, jednak možnou přesnou aplikací působením vnějšího magnetického pole díky magnetickému charakteru jádra Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>@SiO<sub>2</sub>.<sup>37</sup>

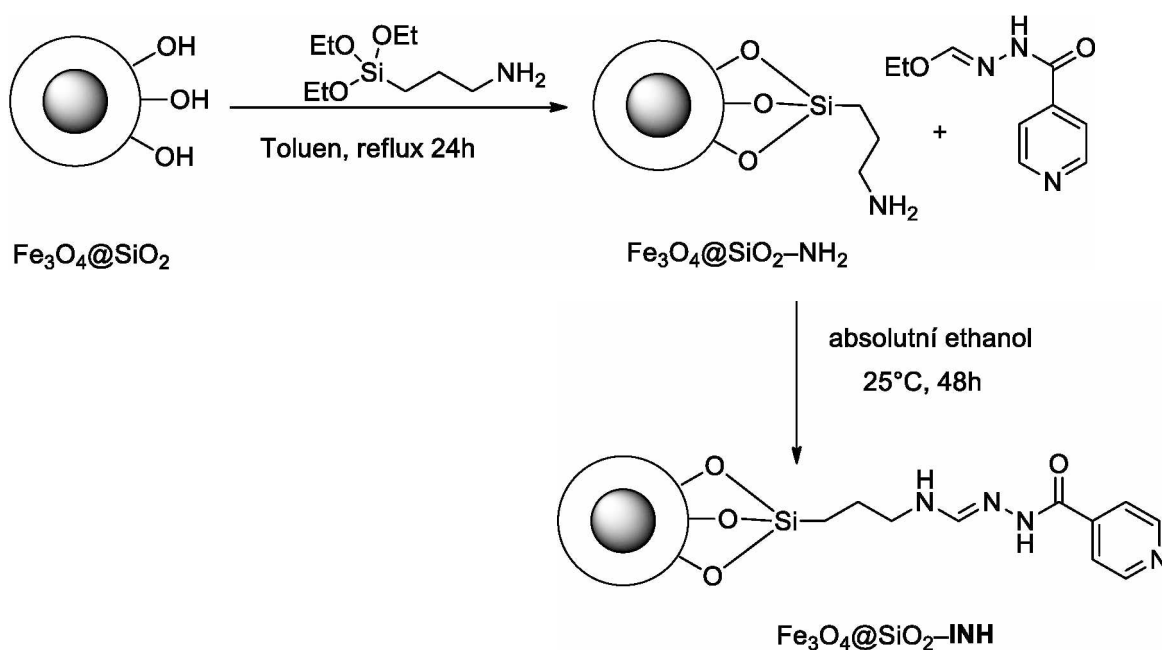


Schéma 6 – Příprava nanočástice Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>@SiO<sub>2</sub>–INH

#### 2.4.6. Konjugát s methoxypoly(ethylenglykol)-b-poly(L-lysin)

Publikace výzkumné skupina doc. Imramovského z roku 2012 pojednává o přípravě konjugátu **INH** s blokovým kopolymerem PEG-poly(L-lysin).<sup>14</sup> Blokový kopolymer (mPEG-b-PLL) byl připraven známou metodou NCA: polymerace s otevřením kruhu  $\alpha$ -(*N* $\epsilon$ -benzyloxykarbonyl)-L-lysin iniciovaný  $\alpha$ -amino- $\omega$ -methoxypoly(ethylenglykol). Ve druhém kroku reakce následovalo zrušení bloku benzyloxykarbonylové skupiny kyselinou trifluoroctovou.

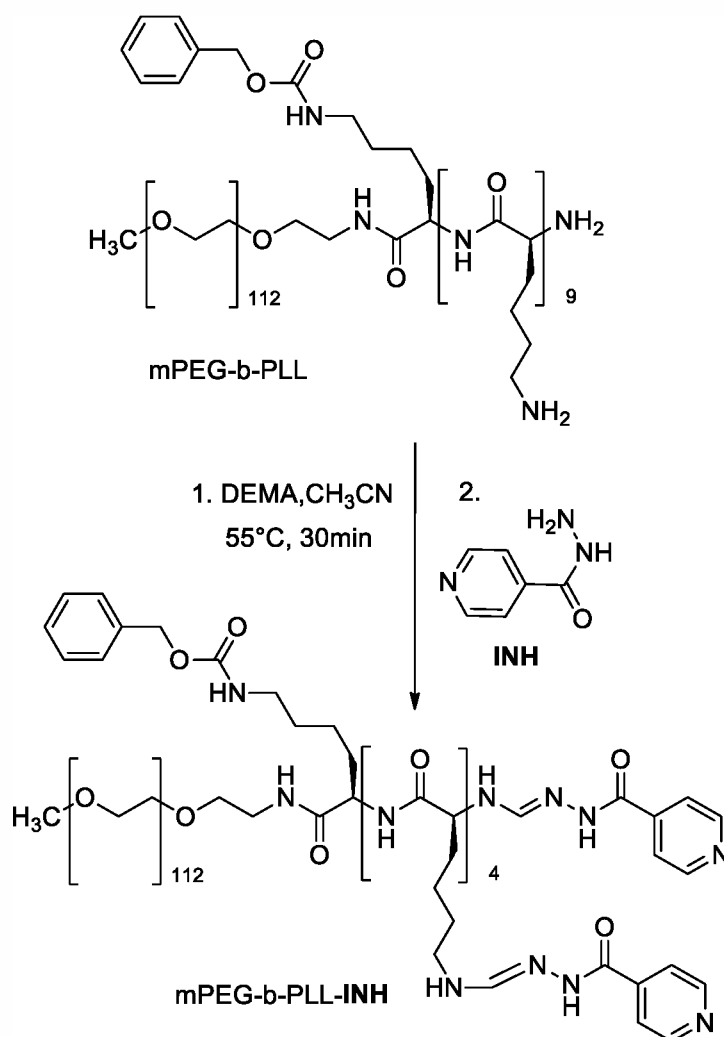


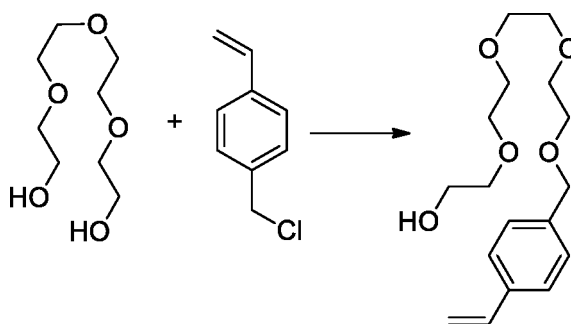
Schéma 7 – Syntéza konjugátu mPEG-b-PLL-INH<sup>14</sup>

Konjugát mPEG-b-PLL-INH byl připraven reakcí mPEG-b-PLL s ethyl(pyridin-4-ylkarbonyl)hydrazonoformiátem získaným in situ reakcí **INH** s DEMA (Schéma 7). Kromě biokompatibility je hlavní výhodou tohoto polymeru možnost připojit větší počet molekul **INH**, než v případě samotného funkcionalizovaného poly(ethylen)glykolu.

### 3. Experimentální část

Spektra v infračervené oblasti byla měřena na přístroji FT-IR Nicolet iS50, technikou zeslabené úplné reflektance (ATR) na jednodrazovém diamantovém krystalu, ve střední infračervené oblasti, v rozsahu vlnočtů  $4000 - 400 \text{ cm}^{-1}$  se spektrálním rozlišením  $4 \text{ cm}^{-1}$ . Oblast absorpce diamantového krystalu ( $1900 - 2400 \text{ cm}^{-1}$ ) byla, v případě absence charakteristických pásů v této oblasti, ze spekter odstraněna. NMR spektra byla měřena při laboratorní teplotě na přístroji Bruker AVANCE III 400 pracujícím při  $400,13 \text{ MHz}$  ( $^1\text{H}$ ) a  $100,62 \text{ MHz}$  ( $^{13}\text{C}$ ).  $^1\text{H}$  NMR spektra byla pro roztoky látek v  $\text{CDCl}_3$  kalibrována na tetramethylsilan ( $\delta 0,00 \text{ ppm}$ ).  $^{13}\text{C}$  NMR spektra byla kalibrována na středový signál multipletu rozpouštědla ( $\delta 77,16 \text{ ppm}$  v  $\text{CDCl}_3$ ).  $^{13}\text{C}$  NMR spektra byla s protonovým dekaplingem. Hmotnostní spektra s vysokým rozlišením byla měřena metodou „dried droplet“ pomocí MALDI hmotnostního spektrometru LTQ Orbitrap XL (Thermo Fisher Scientific, Bremen, Germany) vybaveného dusíkovým UV laserem ( $337 \text{ nm}$ ,  $60 \text{ Hz}$ ). Spektra byla měřena v režimu pozitivních iontů s rozlišením  $100\,000$  při  $m/z = 400$ , výsledné spektrum tvoří průměr ze všech měření. Použitou maticí byla 2,5-dihydroxybenzoová kyselina (DHB). Chemikálie byly pořízeny od společnosti Sigma-Aldrich, Acros Organics, Fluorochem nebo Penta a používány bez dalšího čištění. Flash chromatografie byla prováděna na přístroji Reveleris<sup>®</sup> X2 na kolonách naplněných silikagelem. Tenkovrstvá chromatografie byla prováděna na aluminiových destičkách potažených silikagelem  $\text{SiO}_2$  s vizualizací pomocí UV lampy ( $254$  nebo  $366 \text{ nm}$ ).

#### 3.1. Tetra(ethylglykol)-mono-(4-vinylbenzyléter) (TEG-VBE)



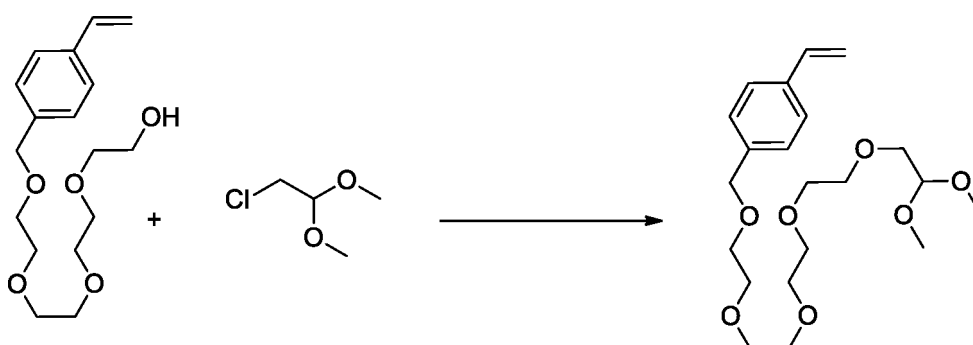
Do 250 ml baňky byl předložen tetra(ethylglykol) (12 ml;  $69,42 \text{ mmol}$ ), suchý THF (50 ml) a přidán NaH (1,23g 60% disperze v parafínu;  $51,26 \text{ mmol}$ ). Směs byla pod chlorkalciovým uzávěrem míchána po dobu 1 h. Za intenzivního míchání byl během 10 min přidán 4-vinylbenzylchlorid (1,9 ml;  $14,92 \text{ mmol}$ ). Směs byla míchána při laboratorní teplotě. Po 24 h byla do reakční směsi přidána voda (10 ml) a vodná fáze extrahována DCM ( $3 \times 50 \text{ ml}$ ). Spojené organické fáze byly extrahovány solankou a vysušeny  $\text{MgSO}_4$ . Surová směs byla

podrobena flash chromatografií (hexan→AcOEt). Produkt byl získán ve formě bezbarvého oleje (5,55 g; 17,88 mmol; 83 %). NMR ve shodě s literaturou<sup>38</sup>.

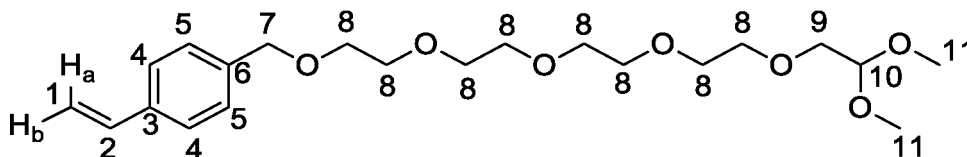
<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ ppm: 7.42 – 7.35 (m, 2H), 7.33 – 7.28 (m, 2H), 6.71 (dd, *J* = 17.6, 10.9 Hz, 1H), 5.74 (dd, *J* = 17.6, 1.0 Hz, 1H), 5.23 (dd, *J* = 10.8, 0.9 Hz, 1H), 4.55 (s, 2H), 3.74 – 3.56 (m, 16H), 2.73 (t, *J* = 6.1 Hz, 1H).

<sup>13</sup>C NMR (101 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ ppm: 137.8, 136.9, 136.5, 127.9, 126.2, 113.7, 72.9, 72.5, 70.6 (2×C), 70.6, 70.5, 70.3, 69.3, 61.6.

### 3.2. 16-Methoxy-1-(vinylfenyl)-2,5,8,11,14,17-hexaoxaoktadekan (VBE-TEG-DME)



Do 250 ml baňky byl předložen TEG-VBE (2,55 g; 8,21 mmol), suché THF (50 ml) a přidán NaH (0,68g 60% disperze v parafínu; 22,34 mmol). Směs byla pod chlorkalciovým uzávěrem míchána po dobu 30 min. Následně, za intenzivního míchání, byl přidán chloroacetaldehyd-dimethylacetal (20 ml; 87,82 mmol). Z reakční směsi byl na MiSo nástavci oddestilován THF a směs byla ponechána míchat při teplotě 120°C. Po 7 dnech byla do reakční směsi přidána voda (10 ml) a vodná fáze extrahována DCM (3 × 50 ml). Spojené organické fáze byly extrahovány solankou a vysušeny MgSO<sub>4</sub>. Surová směs byla podrobena flash chromatografií (hexan→AcOEt). Produkt byl získán ve formě žlutého oleje (0,6 g; 1,51mmol, 18 %)



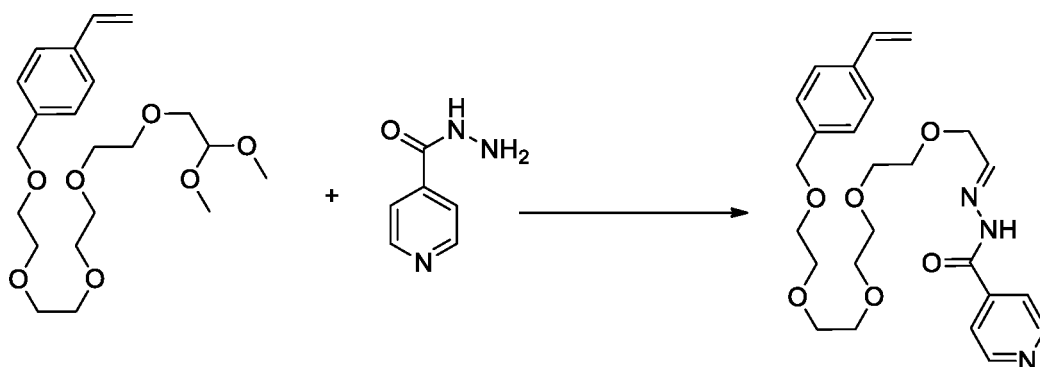
<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ ppm: 7.42 – 7.35 (m, 2H, H-4/5), 7.33 – 7.27 (m, 2H, H-4/5), 6.71 (dd, *J* = 17.6, 10.9 Hz, 1H, H-2), 5.74 (dd, *J* = 17.6, 1.0 Hz, 1H, H-1a), 5.23 (dd, *J* = 10.9, 1.0 Hz, 1H, H-1b), 4.55 (s, 2H, H-7), 4.51 (t, *J* = 5.2 Hz, 1H, H-10), 3.74 – 3.59 (m, 16H, H8), 3.54 (d, *J* = 5.2 Hz, 2H, H-9), 3.39 (s, 6H, H-11).

**<sup>13</sup>C NMR** (101 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ ppm: 138.0 (C-4/6), 137.0 (C-4/6), 136.6 (C-2), 128.0 (2×C, C-4/5), 126.3 (2×C, C-4/5), 113.8 (C-1), 102.8 (C-10), 73.0 (C-7), 71.0 (C-8), 71.0 (C-8), 70.7 (2×C, C-8), 70.7(3×C, C-8), 70.6 (C-8), 69.5 (C-9), 54.0 (2×C, C-11).

**FT-IR** (ATR): 3087; 3008; 2902; 2866; 2835; 1736; 1630; 1512; 1452; 1352; 1248; 1097; 989; 827 cm<sup>-1</sup>

**HRMS** m/z: Vypočteno: [M+Na]<sup>+</sup> 421,22022, Nalezeno: [M+Na]<sup>+</sup> 421,22028; Δ=0,14 ppm.

### 3.3. N'-(1-(4-Vinylfenyl)-2,5,8,11,14-pentaoxaheksadekan-16-yliden)isonikotinohydrazid (VBE-TEG-INH)



Do 250 ml baňky byl předložen **TEG-VBE-DME** (200 mg; 0,51 mmol), **INH** (70,6 mg; 5,15 mmol) rozpuštěn v 10 ml 90% EtOH), dále byla přidána pTsOH·H<sub>2</sub>O (50 mg; 0,263 mmol) a hydrochinon (5 mg; 0,045 mmol). Směs byla míchána za varu po dobu 20 h. Surová reakční směs byla odpařena za zisku hnědožlutého oleje, který nebylo možné přecistit krystalizací ani chromatografií (mobilní fáze: AcOEt).

**HRMS** m/z: Vypočteno: [M+H]<sup>+</sup> 472,24477, Nalezeno: [M+H]<sup>+</sup> 472,24601; Δ=2,63 ppm.

## 4. Výsledky a diskuse

V souladu se zadáním bakalářské práce byla navržena syntetická cesta vedoucí k dosud nepopsané sloučenině nesoucí vázaný **INH** ve formě pH-senzitivní vazby a zároveň nesoucí skupinu umožňující zakotvení na polymerní nosič. Vybraná sloučenina *N'*-(1-(4-vinylfenyl)-2,5,8,11,14-pentaoxahexadekan-16-yliden)isonikotinohydrazid (**VBE-TEG-INH**) splňuje tyto parametry.

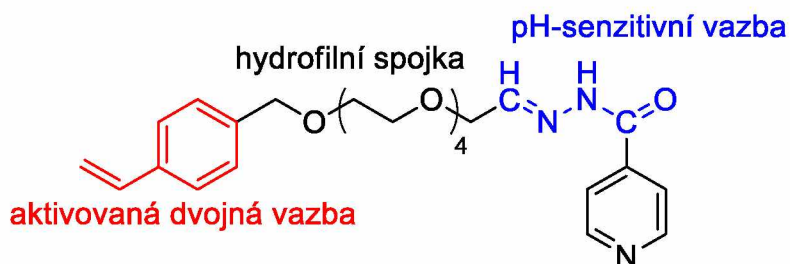


Schéma 8 - *N'*-(1-(4-vinylfenyl)-2,5,8,11,14-pentaoxahexadekan-16-yliden)isonikotinohydrazid

Terminální dvojná vazba styrenového typu umožňuje přímou emulzní polymeraci této sloučeniny<sup>39</sup> (Schéma 9; a), případně RAFT polymeraci na nosič<sup>40</sup> (Schéma 9; b).

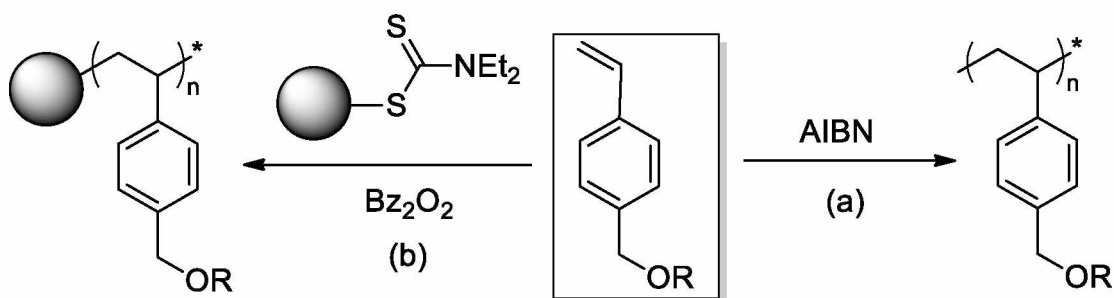


Schéma 9 – Možnost polymeračního zakotvení derivátů styrenu<sup>39,40</sup>

Zároveň může být post-modifikační strategií ukotvena na polymerní nosič buď pomocí tzv. thiol-enové klik reakce<sup>41</sup> (Schéma 10; b), nebo cross-metátéze<sup>42</sup> (Schéma 10; a).

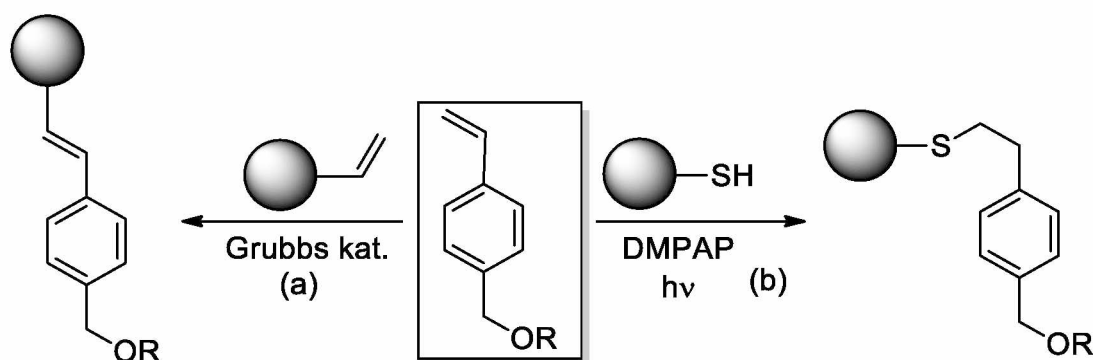
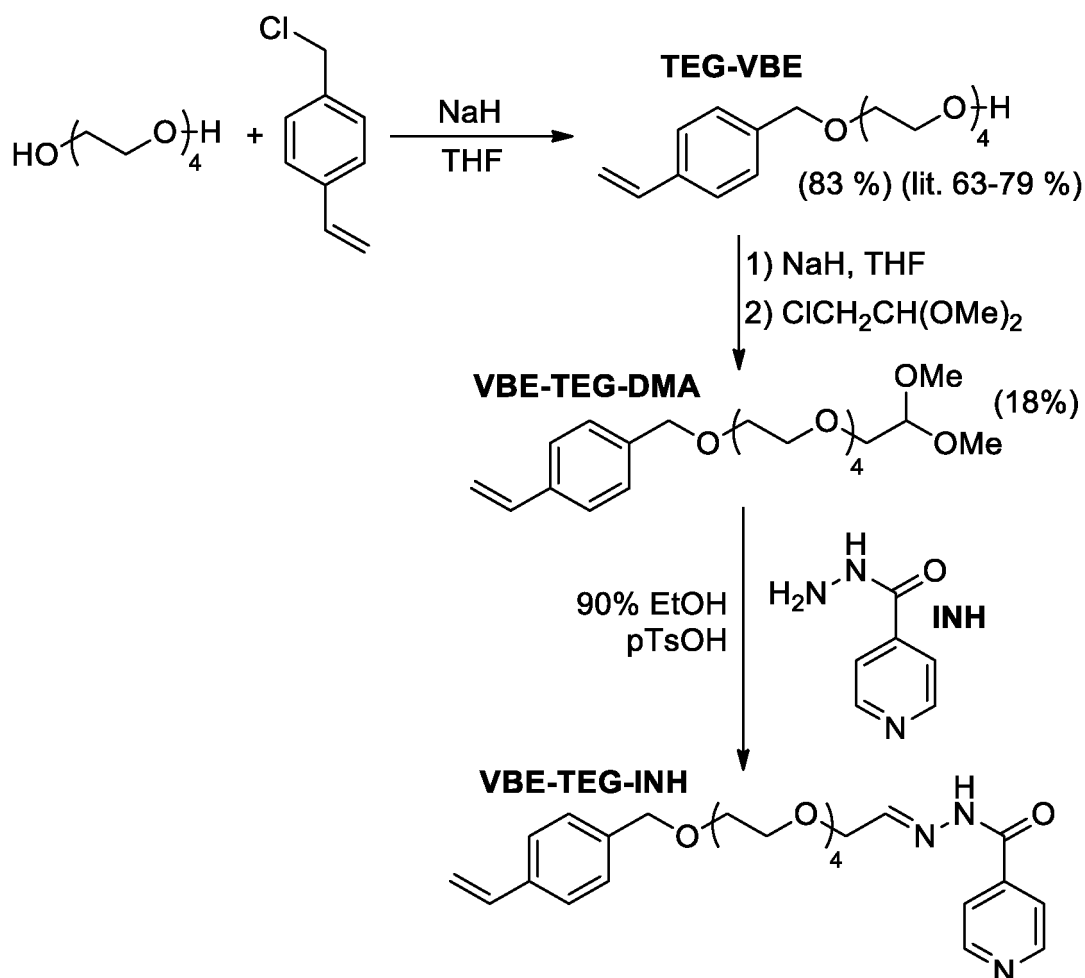


Schéma 10 – Postmodifikační ukotvení na již připravený polymerní nosič<sup>41,42</sup>

**INH** je ve sloučenině **VBE-TEG-INH** vázán přes hydrazido-hydrasonovou vazbu. Ta je četným motivem v řadě antimikrobiálních látek a může být snadno štěpena v kyselém prostředí<sup>43</sup>. Spojujícím článkem, mezi aktivovanou dvojnou vazbou a **INH** fragmentem je hydrofilní tetra(ethylglykolový) můstek, který je biokompatibilní.<sup>44</sup>

#### 4.1. Syntéza cílové molekuly *N'*-(1-(4-vinylfenyl)-2,5,8,11,14-pentaoxaheksadekan-16-yliden)isonikotinohydrazidu



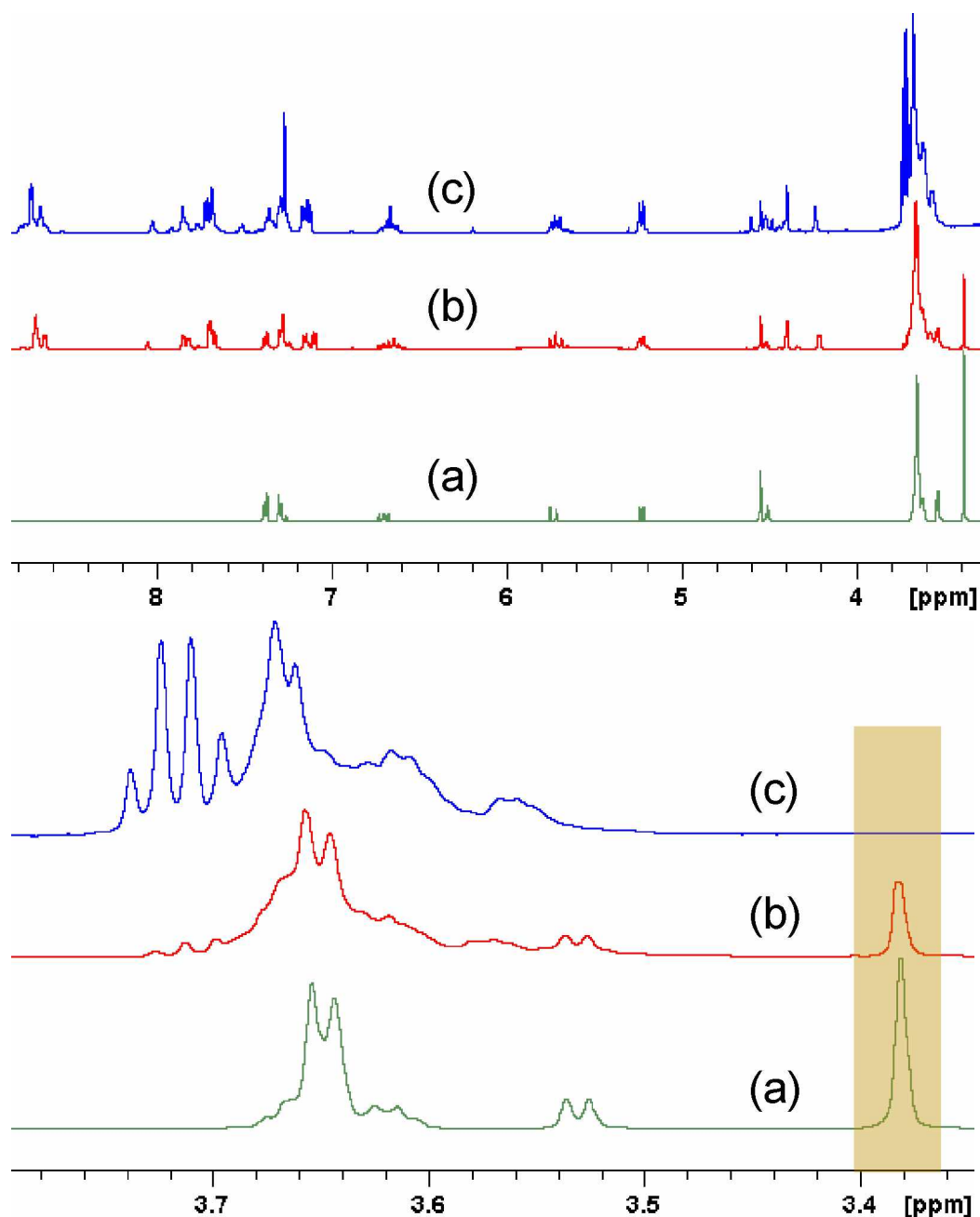
**Schéma 11** – Syntéza *N'*-(1-(4-vinylfenyl)-2,5,8,11,14-pentaoxaheksadekan-16-yliden)isonikotinohydrazidu

Byla navržena syntéza, vycházející z tetra(ethylglykolu), který byl dle literárního předpisu<sup>45</sup> deprotonován pomocí hydridu sodného, a vzniklý alkoholát byl nukleofilně substituován pomocí 4-vinylbenzylchloridu. Po chromatografické separaci byl získán tetra(ethylglykol)-*mono*-(4-vinylbenzyl)éter **TEG-VBE** ve výtěžku 83 % (lit. 63–79 %)<sup>46</sup>.

Druhým reakčním krokem byla deprotonace **TEG-VBE** hydridem sodným v THF, rozpouštědlo bylo následně odpařeno. K odparu byl přidán chloracetaldehyd-dimethylacetal, který sloužil zároveň jako reaktant i rozpouštědlo. Po chromatografické separaci byl izolován



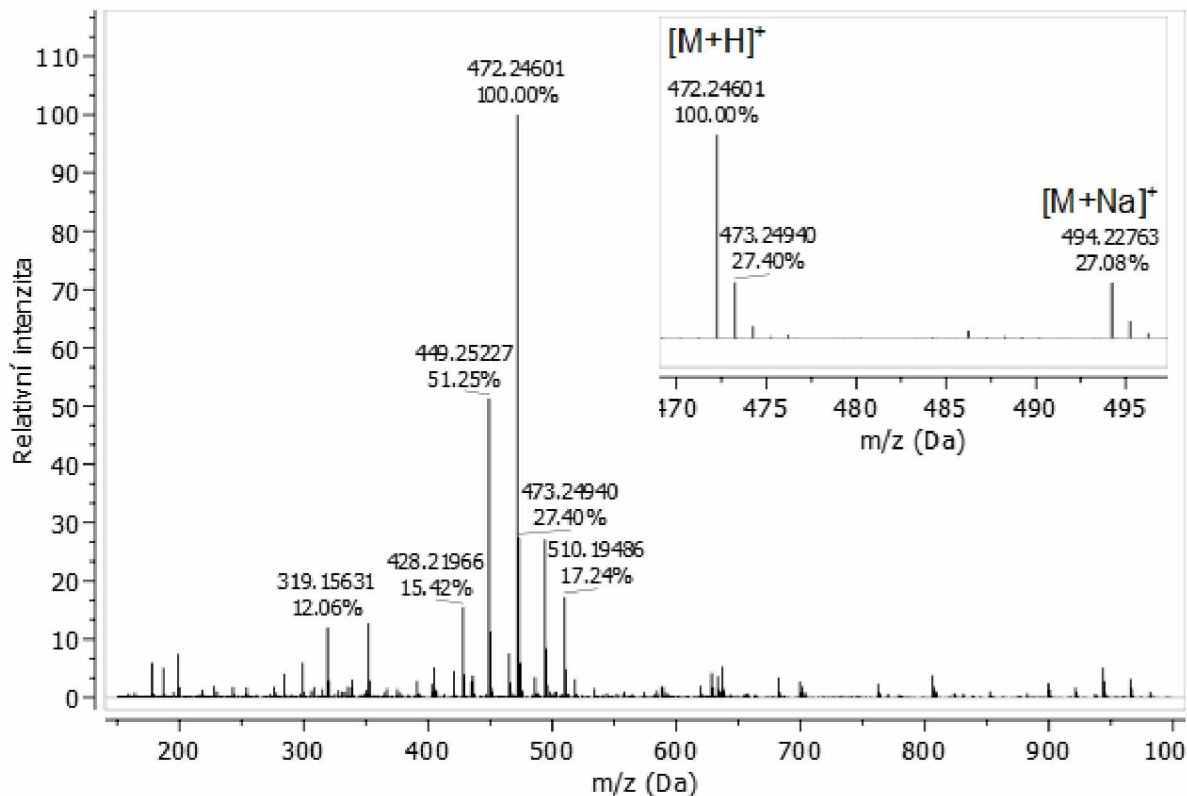
**VBE-TEG-DMA** ve výtěžku 18 %. Ani po vícenásobných optimalizacích se nepodařilo dosáhnout vyššího výtěžku. Sloučenina **VBE-TEG-DMA** je funkčním derivátem aldehydu a bylo možné provést jeho záměnu za jiný funkční derivát (hydrazon). Adaptací literárního předpisu<sup>47</sup> byla provedena přímá kondenzace **INH** s **VBE-TEG-DMA** za katalýzy *para*-toluensulfonovou kyselinou v 90% vodném ethanolu za varu. Reakční směs byla monitorována pomocí <sup>1</sup>H NMR (Obrázek 2).



Obrázek 2 – <sup>1</sup>H NMR spektra a) **VBE-TEG-DMA**, b) reakční směs po 6 h c) reakční směs po 20 h

Ze spekter je patrné, že již po 4 hodinách značně poklesla intenzita signálů methoxyskupin na  $\delta=3,39$  ppm. Zreagovala tedy značná část výchozí látky. Po reakční době 20 h již nebyl

pozorován signál methoxykupin. Reakce tedy proběhla úplně. V surové reakční směsi byly pomocí hmotnostní spektrometrie ve vysokém rozlišení s MALDI ionizací nalezeny hmoty, odpovídající aduktům očekávaného produktu **VBE-TEG-INH** (Obrázek 3).



Obrázek 3 – HRMS spektrum reakční směsi **VBE-TEG-INH**

Jako problematické se však ukázalo čištění surové reakční směsi. Pokusy o krystalizaci nebyly úspěšné. Tenkovrstvá chromatografie naznačovala možnost chromatografické separace, avšak pokusy o její provedení vedly s největší pravděpodobností k rozkladu produktu.

Cílový produkt **VBE-TEG-INH** tedy nebylo ani po opakovaných pokusech možné připravit v čistém stavu. Nemožnost získat cílový produkt **VBE-TEG-INH** v analyticky čistém stavu však nemusí být překážkou pro jeho úspěšné zakotvení do polymerní matrice.

## **Závěr**

Byla vypracována literární rešerše zaměřená na aktuální stav polymerních konjugátů antituberkulotika isoniazidu. Třístupňovou syntézou byl připraven *N'*-(1-(4-vinylfenyl)-2,5,8,11,14-pentaoxahexadekan-16-yliden)isonikotinohydrazid. Tato látka obsahuje isoniazid vázaný formou pH-senzitivní hydrazido-hydrazonové vazby a zároveň dvojnou vazbu styrenového typu, umožňující jeho další zakotvení. Cílová molekula byla připravena pouze ve stavu surové směsi, jelikož opakované pokusy o její čištění selhaly. Připravený konjugát bude použit ve formě surové reakční směsi pro zakotvení na různé polymerní nosiče a bude studována kinetika uvolňování isoniazidu.

## Použitá literatura

- (1) Tuberculosis <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/tuberculosis> (accessed Mar 18, 2020).
- (2) Cook, G. M.; Berney, M.; Gebhard, S.; Heinemann, M.; Cox, R. A.; Danilchanka, O.; Niederweis, M. *Physiology of Mycobacteria*; Elsevier, 2009; Vol. 55. [https://doi.org/10.1016/S0065-2911\(09\)05502-7](https://doi.org/10.1016/S0065-2911(09)05502-7).
- (3) Kumar, S.; Bajpai, R. P.; Bharadwaj, L. M. Diagnosis Of Tuberculosis Based On BioMEMS. *Proc. Int. Conf. Intell. Sens. Inf. Process. ICISIP 2004* **2004**, 237–242. <https://doi.org/10.1109/icisip.2004.1287659>.
- (4) Radzi, R. U. K. R. M.; Mansor, W.; Johari, J. Review of Mycobacterium Tuberculosis Detection. *Proc. - 2011 IEEE Control Syst. Grad. Res. Colloquium, ICSGRC 2011* **2011**, 189–192. <https://doi.org/10.1109/ICSGRC.2011.5991854>.
- (5) Stallworthy, J. A. Female Genital Tuberculosis. *Postgrad. Med. J.* **1956**, 32 (373), 75–79. <https://doi.org/10.1136/pgmj.32.373.517>.
- (6) Raut, V. S.; Mahashur, A. A.; Sheth, S. S. The Mantoux Test in the Diagnosis of Genital Tuberculosis in Women. *Int. J. Gynecol. Obstet.* **2001**, 72 (2), 165–169. [https://doi.org/10.1016/S0020-7292\(00\)00328-3](https://doi.org/10.1016/S0020-7292(00)00328-3).
- (7) Schiller, I.; Vordermeier, H. M.; Waters, W. R.; Whelan, A. O.; Coad, M.; Gormley, E.; Buddle, B. M.; Palmer, M.; Thacker, T.; McNair, J.; Welsh, M.; Hewinson, R. G.; Oesch, B. Bovine Tuberculosis: Effect of the Tuberculin Skin Test on in Vitro Interferon Gamma Responses. *Vet. Immunol. Immunopathol.* **2010**, 136 (1–2), 1–11. <https://doi.org/10.1016/j.vetimm.2010.02.007>.

- (8) Silva, M.; Lara, A. S.; Leite, C. Q. F.; Ferreira, E. I. Potential Tuberculostatic Agents: Micelle-Forming Copolymer Poly(Ethylene Glycol)-Poly(Aspartic Acid) Prodrug with Isoniazid. *Arch. Pharm. (Weinheim)*. **2001**, *334* (6), 189–193. [https://doi.org/10.1002/1521-4184\(200106\)334:6<189::AID-ARDP189>3.0.CO;2-6](https://doi.org/10.1002/1521-4184(200106)334:6<189::AID-ARDP189>3.0.CO;2-6).
- (9) Silva, M.; Ricelli, N. L.; Seoud, O. El; Valentim, C. S.; Ferreira, A. G.; Sato, D. N.; Leite, C. Q. F.; Ferreira, E. I. Potential Tuberculostatic Agent: Micelle-Forming Pyrazinamide Prodrug. *Arch. Pharm. (Weinheim)*. **2006**, *339* (6), 283–290. <https://doi.org/10.1002/ardp.200500039>.
- (10) Kubinyi, H. Prodrugs: Challenges and Rewards. Parts 1 and 2. Edited by Valentino J. Stella, Ronald T. Borchardt, Michael J. Hageman, Reza Oliyai, Hans Maag, and Jefferson W. Tilley. *ChemMedChem* **2008**, *3* (6), 1003–1004. <https://doi.org/10.1002/cmdc.200800115>.
- (11) Sedlák, M. Recent Advances in Chemistry and Applications of Substituted Poly(Ethylene Glycol)S. *Collect. Czechoslov. Chem. Commun.* **2005**, *70* (3), 269–291. <https://doi.org/10.1135/cccc20050269>.
- (12) Sedlák, M.; Pravda, M.; Kubicová, L.; Mikulčíková, P.; Ventura, K. Synthesis and Characterisation of a New PH-Sensitive Amphotericin B-Poly(Ethylene Glycol)-b-Poly(L-Lysine) Conjugate. *Bioorganic Med. Chem. Lett.* **2007**, *17* (9), 2554–2557. <https://doi.org/10.1016/j.bmcl.2007.02.009>.
- (13) Bílková, E.; Sedlák, M.; Imramovský, A.; Chárová, P.; Knotek, P.; Beneš, L. Prednisolone- $\alpha$ -Cyclodextrin-Star Poly(Ethylene Glycol) Polypseudorotaxane with Delayed PH-Sensitivity as a Targeted Drug Delivery System. *Int. J. Pharm.* **2011**, *414* (1–2), 42–47. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2011.04.060>.

- (14) Imramovský, A.; Grusová, L.; Beneš, L.; Pejchal, V.; Sedlák, M. Synthesis and Characterization of PH-Sensitive Conjugate of Isoniazid - Methoxypoly(Ethylene Glycol)-b-Poly(L-Lysine). *Bioorganic Med. Chem. Lett.* **2012**, *22* (18), 5952–5955. <https://doi.org/10.1016/j.bmcl.2012.07.054>.
- (15) Vilchèze, C.; Jacobs, W. R. The Isoniazid Paradigm of Killing, Resistance, and Persistence in Mycobacterium Tuberculosis. *J. Mol. Biol.* **2019**, *431* (18), 3450–3461. <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2019.02.016>.
- (16) Khandare, J.; Minko, T. Polymer-Drug Conjugates: Progress in Polymeric Prodrugs. *Prog. Polym. Sci.* **2006**, *31* (4), 359–397. <https://doi.org/10.1016/j.progpolymsci.2005.09.004>.
- (17) Maeda, H.; Wu, J.; Sawa, T.; Matsumura, Y.; Hori, K. Tumor Vascular Permeability and the EPR Effect in Macromolecular Therapeutics: A Review. *J. Control. Release* **2000**, *65* (1–2), 271–284. [https://doi.org/10.1016/S0168-3659\(99\)00248-5](https://doi.org/10.1016/S0168-3659(99)00248-5).
- (18) Voet, D.; Voet, J. G. Biochemie. Praha.
- (19) Hynek, R.; Valentová, O.; Kodíček, M. *Biochemie - chemický pohled na biologický svět*, 2nd ed.; VŠCHT: Praha, 2018.
- (20) Takayama, K.; Schnoes, H. K.; Armstrong, E. L.; Boyle, R. W. Site of Inhibitory Action of Isoniazid in the Synthesis of Mycolic Acids in Mycobacterium Tuberculosis. *J. Lipid Res.* **1975**, *16* (4), 308–317.
- (21) Takayama, K. Selective Action of Isoniazid on the Synthesis of Cell Wall Mycolates in Mycobacteria. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **1974**, *235* (1), 426–438. <https://doi.org/10.1111/j.1749-6632.1974.tb43281.x>.
- (22) Suarez, J.; Ranguelova, K.; Jarzecki, A. A.; Manzerova, J.; Krymov, V.;

- Zhao, X.; Yu, S.; Metlitsky, L.; Gerfen, G. J.; Magliozzo, R. S. An Oxyferrous Heme/Protein-Based Radical Intermediate Is Catalytically Competent in the Catalase Reaction of Mycobacterium Tuberculosis Catalase-Peroxidase (KatG). *J. Biol. Chem.* **2009**, *284* (11), 7017–7029. <https://doi.org/10.1074/jbc.M808106200>.
- (23) Timmins, G. S.; Master, S.; Rusnak, F.; Deretic, V. Nitric Oxide Generated from Isoniazid Activation by KatG: Source of Nitric Oxide and Activity against Mycobacterium Tuberculosis. *Antimicrob. Agents Chemother.* **2004**, *48* (8), 3006–3009. <https://doi.org/10.1128/AAC.48.8.3006-3009.2004>.
- (24) Fox, M. E.; Szoka, F. C.; Fréchet, J. M. J. Soluble Polymer Carriers for the Treatment of Cancer: The Importance of Molecular Architecture. *Acc. Chem. Res.* **2009**, *42* (8), 1141–1151. <https://doi.org/10.1021/ar900035f>.
- (25) Johnston, A. P. R.; Such, G. K.; Caruso, F. Triggering Release of Encapsulated Cargo. *Angew. Chemie - Int. Ed.* **2010**, *49* (15), 2664–2666. <https://doi.org/10.1002/anie.200906840>.
- (26) Stuart, M. A. C.; Huck, W. T. S.; Genzer, J.; Müller, M.; Ober, C.; Stamm, M.; Sukhorukov, G. B.; Szleifer, I.; Tsukruk, V. V.; Urban, M.; Winnik, F.; Zauscher, S.; Luzinov, I.; Minko, S. Emerging Applications of Stimuli-Responsive Polymer Materials. *Nat. Mater.* **2010**, *9* (2), 101–113. <https://doi.org/10.1038/nmat2614>.
- (27) Ulbrich, K.; Šubr, V. Polymeric Anticancer Drugs with PH-Controlled Activation. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **2004**, *56* (7), 1023–1050. <https://doi.org/10.1016/j.addr.2003.10.040>.
- (28) Casey, J. R.; Grinstein, S.; Orłowski, J. Sensors and Regulators of Intracellular PH. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **2010**, *11* (1), 50–61.

<https://doi.org/10.1038/nrm2820>.

- (29) Pastorekova, S.; Parkkila, S.; Pastorek, J.; Supuran, C. T. Carbonic Anhydrases: Current State of the Art, Therapeutic Applications and Future Prospects. *J. Enzyme Inhib. Med. Chem.* **2004**, *19* (3), 199–229. <https://doi.org/10.1080/14756360410001689540>.
- (30) Rollas, S.; Gulerman, N.; Erdeniz, H. Synthesis and Antimicrobial Activity of Some New Hydrazones of 4-Fluorobenzoic Acid Hydrazide and 3-Acetyl-2,5-Disubstituted-1,3,4-Oxadiazolines. *Farmaco* **2002**, *57* (2), 171–174. [https://doi.org/10.1016/S0014-827X\(01\)01192-2](https://doi.org/10.1016/S0014-827X(01)01192-2).
- (31) Zuberbühler, K.; Casi, G.; Bernardes, G. J. L.; Neri, D. Fucose-Specific Conjugation of Hydrazide Derivatives to a Vascular-Targeting Monoclonal Antibody in IgG Format. *Chem. Commun.* **2012**, *48* (56), 7100–7102. <https://doi.org/10.1039/c2cc32412a>.
- (32) Berezin, A. S.; Skorik, Y. A. Chitosan-Isoniazid Conjugates: Synthesis, Evaluation of Tuberculostatic Activity, Biodegradability and Toxicity. *Carbohydr. Polym.* **2015**, *127*, 309–315. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2015.03.060>.
- (33) Afinjuomo, F.; Barclay, T. G.; Parikh, A.; Chung, R.; Song, Y.; Nagalingam, G.; Triccas, J.; Wang, L.; Liu, L.; Hayball, J. D.; Petrovsky, N.; Garg, S. Synthesis and Characterization of PH-Sensitive Inulin Conjugate of Isoniazid for Monocyte-Targeted Delivery. *Pharmaceutics* **2019**, *11* (11). <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics11110555>.
- (34) González-Torres, M.; Guzmán-Beltrán, S.; Mata-Gómez, M. A.; González-Valdez, J.; Leyva-Gómez, G.; Melgarejo-Ramírez, Y.; Brostow, W.; Velasquillo, C.; Zúñiga-Ramos, J.; Rodríguez-Talavera, R. Synthesis, Characterization, and in Vitro Evaluation of Gamma Radiation-Induced



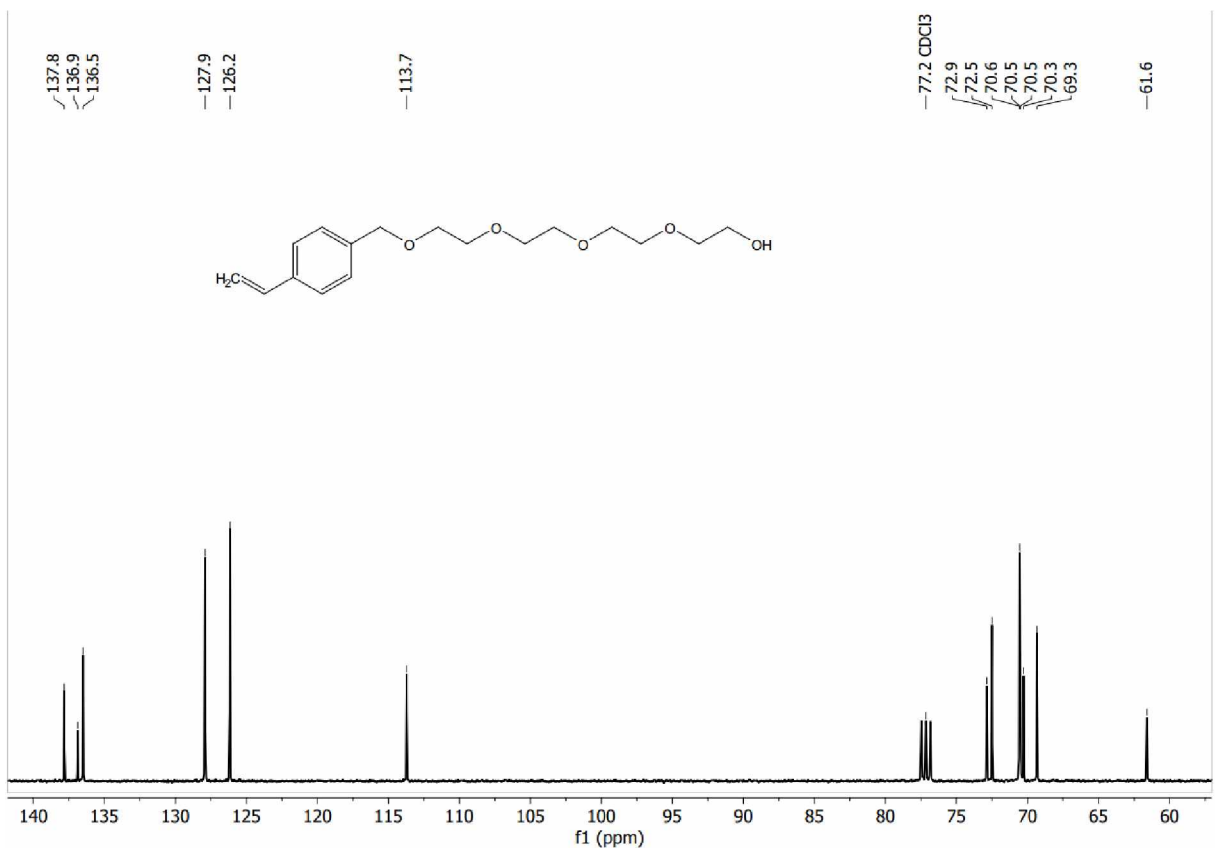
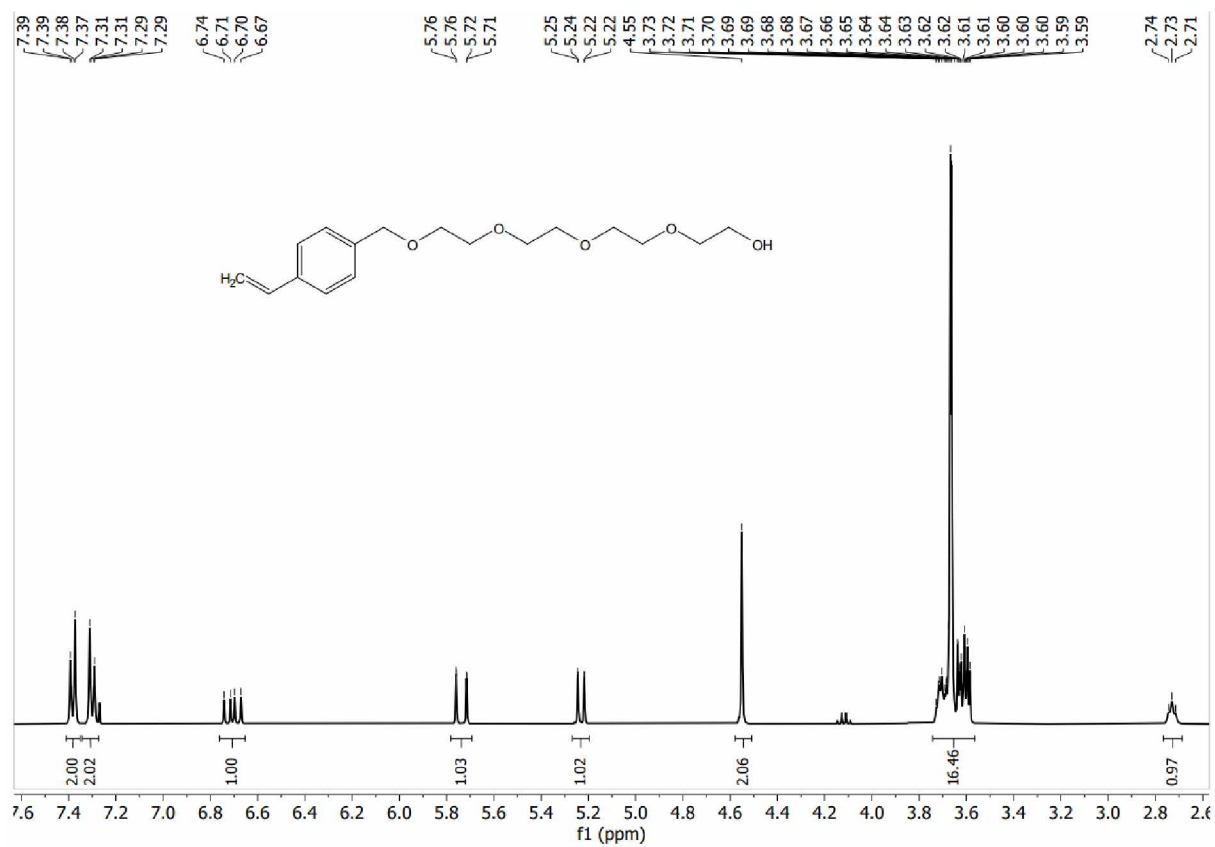
- PEGylated Isoniazid. *Electron. J. Biotechnol.* **2019**, *41*, 81–87.  
<https://doi.org/10.1016/j.ejbt.2019.07.005>.
- (35) Sutar, Y. B.; Mali, J. K.; Telvekar, V. N.; Rajmani, R. S.; Singh, A. Transferrin Conjugates of Antitubercular Drug Isoniazid: Synthesis and in Vitro Efficacy. *Eur. J. Med. Chem.* **2019**, *183*.  
<https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2019.111713>.
- (36) Amarnath Praphakar, R.; Sam Ebenezer, R.; Vignesh, S.; Shakila, H.; Rajan, M. Versatile PH-Responsive Chitosan-g-Polycaprolactone/Maleic Anhydride-Isoniazid Polymeric Micelle to Improve the Bioavailability of Tuberculosis Multidrugs. *ACS Appl. Bio Mater.* **2019**, *2* (5), 1931–1943.  
<https://doi.org/10.1021/acsabm.9b00003>.
- (37) Sedlák, M.; Bhosale, D. S.; Beneš, L.; Palarčík, J.; Kalendová, A.; Královec, K.; Imramovský, A. Synthesis and Characterization of a PH-Sensitive Conjugate of Isoniazid with Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>@SiO<sub>2</sub> Magnetic Nanoparticles. *Bioorganic Med. Chem. Lett.* **2013**, *23* (16), 4692–4695.  
<https://doi.org/10.1016/j.bmcl.2013.05.103>.
- (38) Yasukawa, T.; Miyamura, H.; Kobayashi, S. Polymer-Incarcerated Chiral Rh/Ag Nanoparticles for Asymmetric 1,4-Addition Reactions of Arylboronic Acids to Enones: Remarkable Effects of Bimetallic Structure on Activity and Metal Leaching. *J. Am. Chem. Soc.* **2012**, *134* (41), 16963–16966. <https://doi.org/10.1021/ja307913e>.
- (39) de La Cal, J. C.; Leiza, J. R.; Asua, J. M.; Buttè, A.; Storti, G.; Morbidelli, M. Emulsion Polymerization. *Handb. Polym. React. Eng.* **2008**, No. June 2016, 249–322. <https://doi.org/10.1002/9783527619870.ch6>.
- (40) Li, X.; Chen, M.; Yang, B.; Zhang, S.; Jia, X.; Hu, Z. Combining RAFT Precipitation Polymerization and Surface-Initiated RAFT Polymerization:

An Efficient Approach to Prepare Hairy Particles - Supported Proline. *RSC Adv.* **2014**, *4* (82), 43278–43285. <https://doi.org/10.1039/c4ra06176d>.

- (41) Hoyle, C. E.; Lowe, A. B.; Bowman, C. N. Thiol-Click Chemistry: A Multifaceted Toolbox for Small Molecule and Polymer Synthesis. *Chem. Soc. Rev.* **2010**, *39* (4), 1355–1387. <https://doi.org/10.1039/b901979k>.
- (42) Prunet, J.; Grimaud, L. One or More C=C Bond(s) Formed by Condensation: Condensation of Nonheteroatom-Linked Functions, Halides, Chalcogen, or Nitrogen Functions. *Compr. Org. Funct. Gr. Transform. II* **2004**, *1*, 669–722. <https://doi.org/10.1016/b0-08-044655-8/00015-5>.
- (43) Kölmel, D. K.; Kool, E. T. Oximes and Hydrazones in Bioconjugation: Mechanism and Catalysis. *Chem. Rev.* **2017**, *117* (15), 10358–10376. <https://doi.org/10.1021/acs.chemrev.7b00090>.
- (44) Alcantar, N. A.; Aydil, E. S.; Israelachvili, J. N. Polyethylene Glycol-Coated Biocompatible Surfaces. *J. Biomed. Mater. Res.* **2000**, *51* (3), 343–351. [https://doi.org/10.1002/1097-4636\(20000905\)51:3<343::AID-JBM7>3.0.CO;2-D](https://doi.org/10.1002/1097-4636(20000905)51:3<343::AID-JBM7>3.0.CO;2-D).
- (45) Verma, A. Sodium Hydride. *Synlett* **2010**, No. 15, 2361–2362. <https://doi.org/10.1055/s-0030-1258067>.
- (46) Soulé, J. F.; Miyamura, H.; Kobayashi, S. Powerful Amide Synthesis from Alcohols and Amines under Aerobic Conditions Catalyzed by Gold or Gold/Iron, -Nickel or-Cobalt Nanoparticles. *J. Am. Chem. Soc.* **2011**, *133* (46), 18550–18553. <https://doi.org/10.1021/ja2080086>.
- (47) Mastitski, A.; Niinepuu, S.; Haljasorg, T.; Järv, J. One-Pot Synthesis of Protected Benzylhydrazines from Acetals. *Org. Prep. Proced. Int.* **2018**, *50* (4), 416–423. <https://doi.org/10.1080/00304948.2018.1468983>.

# Přílohy

## $^1\text{H}$ a $^{13}\text{C}$ NMR spektra TEG-VBE



$^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$  NMR a FT-IR spektra VBE-TEG-DMA

