



UNIVERZITA PALACKÉHO V OLOMOUCI
PŘÍRODOVĚDECKÁ FAKULTA
Katedra organické chemie

Syntéza nových derivátů squaramidu jako potenciálních inhibitorů mykobakteriální ATP synthasy

Bakalářská práce

Autor práce:

Jan CHASÁK

Studijní program:

Chemie

Studijní obor:

Bioorganická chemie a chemická biologie

Typ studia:

Prezenční

Vedoucí práce:

RNDr. Lucie BRULÍKOVÁ, Ph.D.

PROHLÁŠENÍ:

Čestně prohlašuji, že jsem závěrečnou bakalářskou práci na téma „Syntéza nových derivátů squaramidu jako potenciálních inhibitorů mykobakteriální ATP synthasy“ zpracoval samostatně pod vedením RNDr. Lucie Brulíkové, Ph.D. a s použitím informačních zdrojů a literatury, které dále cituji v seznamu zdrojů. Dále souhlasím, aby tato bakalářská práce byla zpřístupněna v knihovně Katedry organické chemie Univerzity Palackého.

V Olomouci dne 20. 1. 2020

.....
Jan CHASÁK

PODĚKOVÁNÍ:

V první řadě bych rád poděkoval své vedoucí práce, RNDr. Lucii Brulíkové, Ph.D., za vedení mé bakalářské práce a za příležitost být součástí její výzkumné skupiny. Díky také patří všem členům výzkumné skupiny za cenné rady, vzájemnou pomoc a výbornou atmosféru v laboratoři. Děkuji RNDr. Sandře Benické za provedení HRMS analýz, Mgr. Ondřeji Kováčovi a Dr. Soně Krajčovičové za změření potřebných NMR spekter a Lence Pospíšilové za uskutečnění biologických testů proti vybraným bakteriím. Za testy proti *M. tuberculosis* děkuji Dr. Daviemu Cappoenovi a jeho týmu (Laboratory for Microbiology, Parasitology and Hygiene, University of Antwerp). Za pomoc s dokováním látek děkuji pánům doc. RNDr. Karlu Berkovi, Ph.D. a Mgr. Ing. Václavu Bazgierovi, Ph.D. z Katedry fyzikální chemie PřF UP.

Mé díky bych chtěl dále směřovat ke své přítelkyni Tereze Šlitrové za podporu během celého probíhajícího studia a pomoci při tvorbě obrázků ATP synthasy. V neposlední řadě děkuji své rodině, díky jejichž podpoře a financím je mi studium umožněno.

Tato závěrečná práce vznikla za finanční podpory grantů Ministerstva školství, mládeže a tělovýchovy IGA_PrF_2019_027 a IGA_PrF_2020_012 a juniorského grantu UP JG_2019_002.

BIBLIOGRAFICKÁ KLASIFIKACE:

JMÉNO A PŘÍJMENÍ AUTORA: Jan Chasák

NÁZEV PRÁCE: Syntéza nových derivátů squaramidu jako potenciálních inhibitorů mykobakteriální ATP synthasy

TYP PRÁCE: Bakalářská

PRACOVIŠTĚ: Katedra organické chemie

VEDOUCÍ PRÁCE: RNDr. Lucie Brulíková, Ph.D.

ROK OBHAJOBY PRÁCE: 2020

ABSTRAKT:

Předložená bakalářská práce je zaměřena na design a syntézu nových derivátů squaramidu cílících mykobakteriální ATP synthasu. V teoretické části je pozornost věnována dosavadním syntetickým studiím, které vedou k přípravě squaramidového skeletu. Následuje popis známých antibakteriálních vlastností těchto derivátů a podrobný popis mykobakteriální ATP synthasy. Experimentální část práce soustředí svou pozornost na samotnou syntézu dvou strukturních typů squaramidů a optimalizaci jednotlivých reakčních kroků. Závěrem bakalářské práce je diskutována biologická aktivita připravených látek.

KLÍČOVÁ SLOVA: cyklobutendiony, squaramidy, antimykobakteriální aktivita, antibakteriální aktivita, ATP synthasa

POČET STRAN: 87

POČET PŘÍLOH: 1

JAZYK: čeština

BIBLIOGRAPHICAL IDENTIFICATION:**AUTHOR'S NAME A SURNAME:** Jan Chasák**TITLE:** Synthesis of novel squaramides as potent mycobacterial ATP synthase inhibitors**TYPE OF THESIS:** Bachelor**DEPARTMENT:** Department of organic chemistry**ADVISOR:** RNDr. Lucie Brulíková, Ph.D.**THE YEAR OF PRESENTATION:** 2020**ABSTRACT:**

The submitted bachelor thesis is focused on the design and synthesis of new squaramides derivatives targeting mycobacterial ATP synthase. In the theoretical part, attention is paid to existing synthetic studies that lead to a preparation of substances with squaramide scaffold, followed by description of their antibacterial properties and a detailed description of mycobacterial ATP synthase. The experimental part of the work is focused on the synthesis of two structural types of squaramides and the optimization of individual reaction steps. At the end of the thesis, the biological activity of prepared substances is discussed.

KEYWORDS: cyclobutenediones, squaramides, antimycobacterial activity, antibacterial activity, ATP synthase**NUMBER OF PAGES:** 87**NUMBER OF APPENDIXES:** 1**LANGUAGE:** Czech

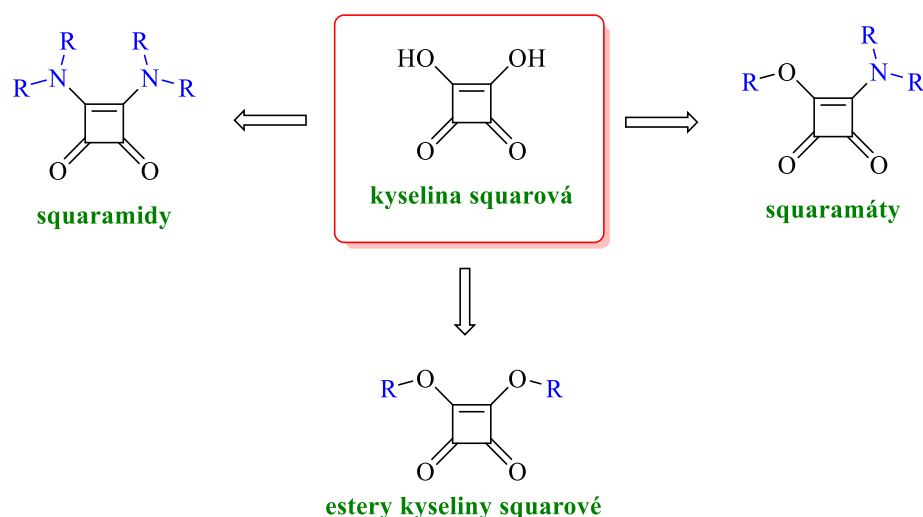
OBSAH

OBSAH	6
ÚVOD	7
CÍLE PRÁCE	10
TEORETICKÁ ČÁST	12
1 Syntéza squaramidů	12
2 Antibakteriální aktivita squaramidů.....	19
3 Mykobakteriální ATP synthasa	23
VÝSLEDKY A DISKUZE	28
4 Návrh molekul na základě molekulového dokování.....	28
5 Aminové deriváty squaramidu.....	31
5.1 Syntéza aminových derivátů.....	31
6 Arylové deriváty squaramidu.....	35
6.1 Syntéza arylových derivátů	36
7 Biologická aktivita	41
EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST	44
8 Obecné informace	44
9 Příprava aminových derivátů	45
9.1 Převedení kyseliny squarové na její dimethoxy derivát	45
9.2 Reakce s 2-aminomethylpyridinem	45
9.3 Substituce methoxy skupiny aminem	46
10 Arylové deriváty squaramidu	54
10.1 Převedení kyseliny squarové na její dichlorderivát.....	54
10.2 Substituce chloru arylem	54
10.3 Substituce chloru 2-aminomethylpyridinem	55
10.4 Převedení methoxy skupiny na squarovém kruhu na hydroxy skupinu	56
ZÁVĚR	57
SEZNAM ZKRATEK	58
SEZNAM POUŽITÝCH ZDROJŮ	59
PŘÍLOHY	68

ÚVOD

Deriváty cyklobutendionů, resp. deriváty kyseliny squarové (systematicky 3,4-dihydroxycyklobut-3-en-1,2-dion), představují významnou skupinu látek, která se dostala do popředí zájmu převážně díky rozsáhlým syntetickým¹⁻¹⁰ a biologickým aplikacím.^{1-3,11,12} Díky výzkumu posledních let u nich byla prokázána antibakteriální aktivita,¹³⁻¹⁹ včetně antimykobakteriální,²⁰ kterou se zabývá i tato práce. Nicméně kromě těchto účinků squaramidy vykazují také aktivitu cytotoxickou²¹⁻²⁶ či antiprotozoální.^{27,28} Dále nabízí zajímavé možnosti v oblasti enzymatické inhibice,²⁹⁻³¹ supramolekulární chemie^{32,33} nebo jako specifické katalyzátory asymetrických reakcí,¹ popř. jako transportéry iontů³⁴⁻³⁸ v organismu.

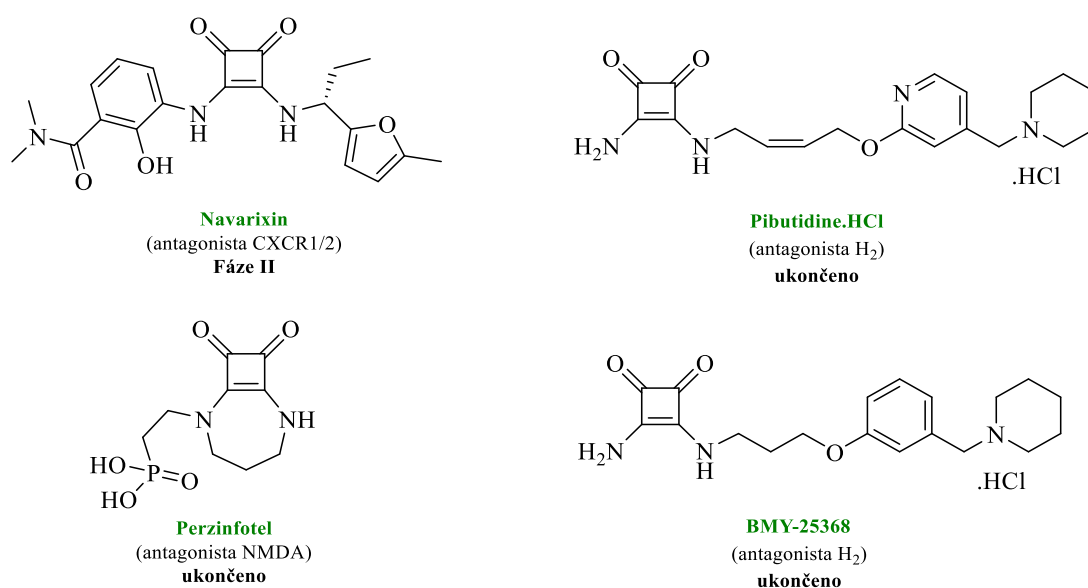
Mezi deriváty kyseliny squarové řadíme celou škálu analog (Obr. 1). Nejvýznamnějšími deriváty jsou však squaramidy, z jejichž struktury vyplývá schopnost četných nekovalentních vazeb s biologickým cílem. V tomto ohledu squaramidy nabízí možnost interakce pomocí čtyř vodíkových vazeb v roli donoru i akceptoru.



Obr. 1: Struktury derivátů odvozených od kyseliny squarové.

Ačkoliv na trhu zatím neexistuje jediný preparát obsahující tuto unikátní strukturu, zcela jistě stojí za zmínku, že někteří kandidáti vstoupili do různých fází klinických testů (Obr. 2). Naneštěstí se u většiny z nich objevily vážné nežádoucí účinky, proto byly testy ukončeny. Dnes je ve fázi II klinických testů pouze látka s názvem Navarixin

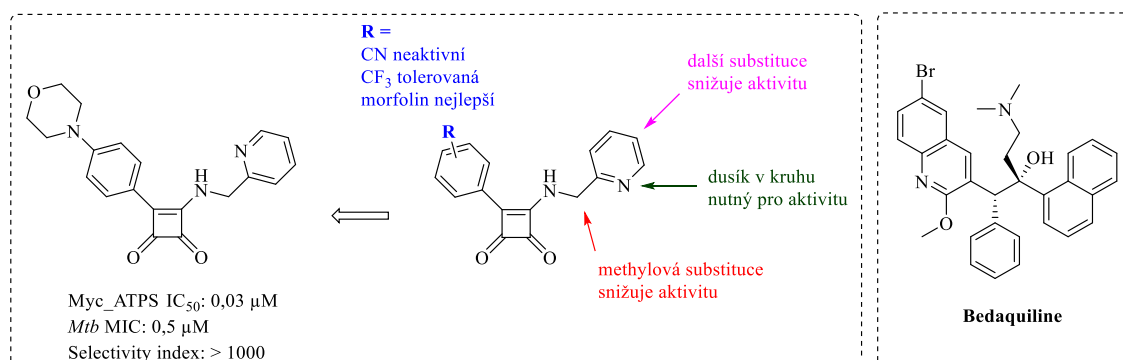
(SCH527123, MK-7123) působící jako antagonistu cystein chemokinového receptoru. Squaramid Pibutidin vykazuje H₂ antagonistický efekt a jeho testování bylo ukončeno ve fázi I. Perzinfotel působí jako antagonistu N-methyl-D-aspartátového receptoru (NMDA receptor), vykazuje neuroprotektivní efekt a byl zkoumán při léčbě mrtvice. Jeho výzkum byl ukončen v roce 2005 ve fázi II klinických testů. Dalším nadějným kandidátem byla látka BMY-25368 vyvinuta firmou Bristol-Myers Squibb působící jako antagonistu histaminového H₂ receptoru. Výzkum této látky byl ukončen ve fázi III.



Obr. 2: Kandidáti v různých fázích klinických testů.

S ohledem na zaměření výzkumné skupiny, ve které byla tato bakalářská práce vypracována, nás zaujala zvláště práce z roku 2017 publikovaná v časopise *Journal of Medicinal Chemistry*.²⁰ Kolektiv autorů zde prezentuje některé squaramidy, které prokázaly významnou antituberkulotickou aktivitu (Obr. 3). Na základě molekulového dokování i experimentů autoři prokázali, že uvedené látky působí jako inhibitory ATP synthasy. Za zmínku také stojí fakt, že zkoumané squaramidy působí v jiném místě než bedaquiline (Obr. 3) a nemají zkříženou rezistenci s bedaquiline-rezistentními mutanty. Bedaquiline je látka schválená FDA pro léčbu drug-rezistentních kmenů *Mtb* a rovněž cílí na podjednotku *c* ATP synthasy. Zatímco mechanismus účinku squaramidů spočívá ve schopnosti vmezeřit se mezi podjednotky *a* a *c* mykobakteriální ATP synthasy, čímž brání v tvorbě ATP, a tedy blokuje zdroj energie pro bakterii, bedaquilin (resp. diarylchinoliny obecně) se na podjednotku *c* ATP synthasy váže svou hydrofilní částí,

která interaguje s kyselými zbytky ATP synthasy.³⁹ Vytváří se tak rozsáhlý komplex držící pohromadě van der Waalsovými silami a $\pi - \pi$ interakcemi.



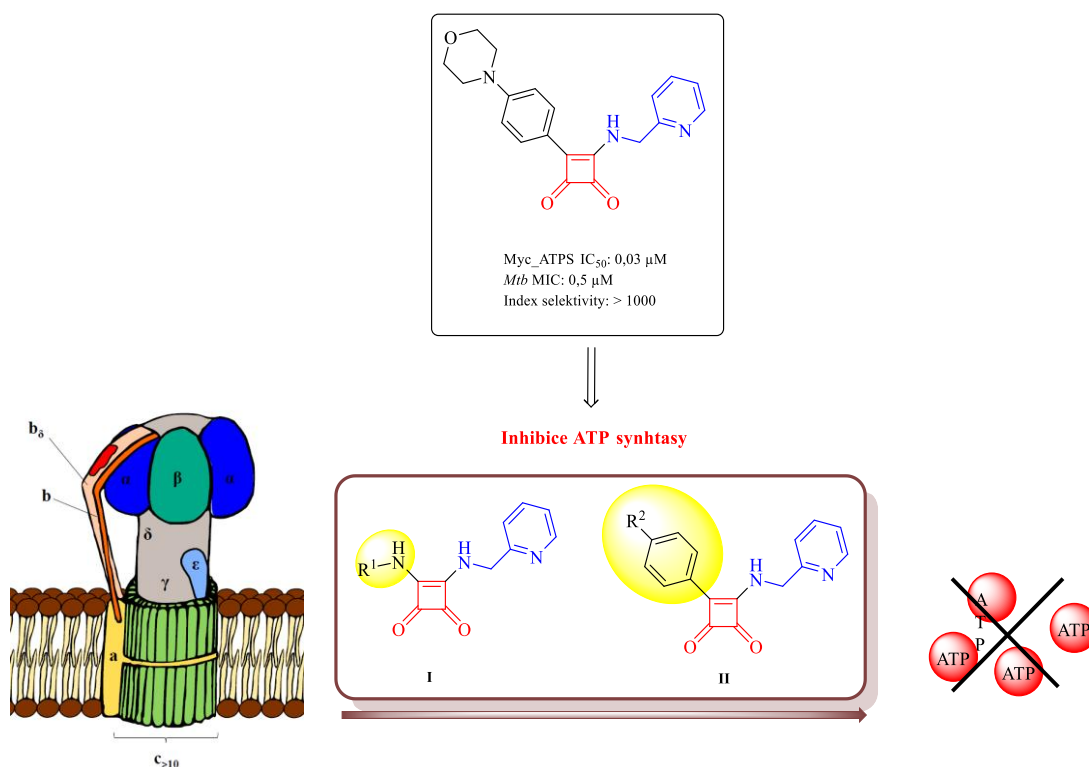
Obr. 3: : Znamé inhibitory ATP synthasy.

Vhodné možnosti substituce squarového kruhu lze vyvodit z provedených SAR studií (Obr. 3).²⁰ Poměrně rozsáhlé modifikace „pravé části“ molekuly naznačují, že přítomnost pyridinového zbytku vázaného přes methylenový můstek je pro výslednou aktivitu nezbytná. Nepřítomnost dusíkového heteroatomu stejně jako další substituce methylenového můstku aktivitu snižují. Naproti tomu modifikace „levé části“ molekuly nebyla až tak podrobně zkoumána. Ze SAR studie vyplývá, že podmínkou pro aktivitu struktury je přítomnost aromátu, jeho další substituce však poskytuje možnosti pro alternativní syntetické obměny.

Z výše uvedeného tedy vyplývá, že vhodný prostor pro další SAR studie nabízí právě modifikace „levé části“ molekuly, na kterou je zaměřená i tato bakalářská práce.

CÍLE PRÁCE

Cílem předložené bakalářské práce je design, syntéza a studium biologické aktivity nových derivátů squaramidu odvozených od parentální molekuly znázorněné na Obr. 4. Dle výše uvedených informací jsme se rozhodli pouze pro modifikaci „levé části“ molekuly. Substituce „pravé části“ squarového kruhu pomocí 2-aminomethylpyridinu zůstává tedy zachována. Ve spolupráci s kolegy z Katedry fyzikální chemie PřF UP bylo nejprve provedeno molekulové dokování celé řady squaramidových derivátů do stejného vazebného místa ATP synthasy jako v uvedené publikaci.²⁰ Na základě těchto výsledků byly následně navrženy 2 nové série látek (Obr. 4). Série derivátů **I** obsahuje oproti publikované struktuře NH můstek, který zajišťuje větší prostorovou volnost a možnost aditivní vodíkové interakce v aktivním místě enzymu. Pro druhou část práce byla navržena série látek **II**, které kopírují parentální molekulu v přímé vazbě aromátu na squaramidový kruh, avšak rozšiřují již známou řadu substituentů na aromátu.



Obr. 4: Navržené série squaramidových derivátů cílících na mykobakteriální ATP syntasu.

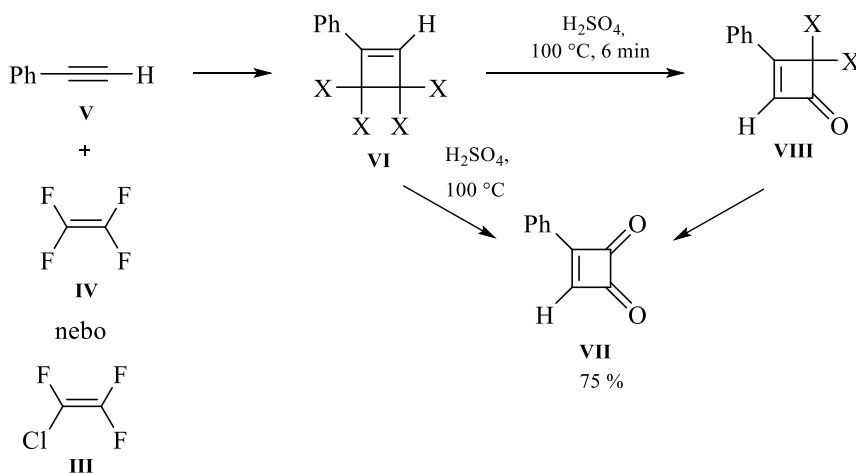
Jednotlivé dílčí cíle práce:

- Vypracování literární rešerše na dané téma.
- Návrh nových látek na základě molekulového dokování.
- Syntéza a optimalizace reakčních podmínek.
- Příprava série cílových sloučenin.
- Odeslání finálních derivátů na testování biologické aktivity.
- Zpracování získaných výsledků.

TEORETICKÁ ČÁST

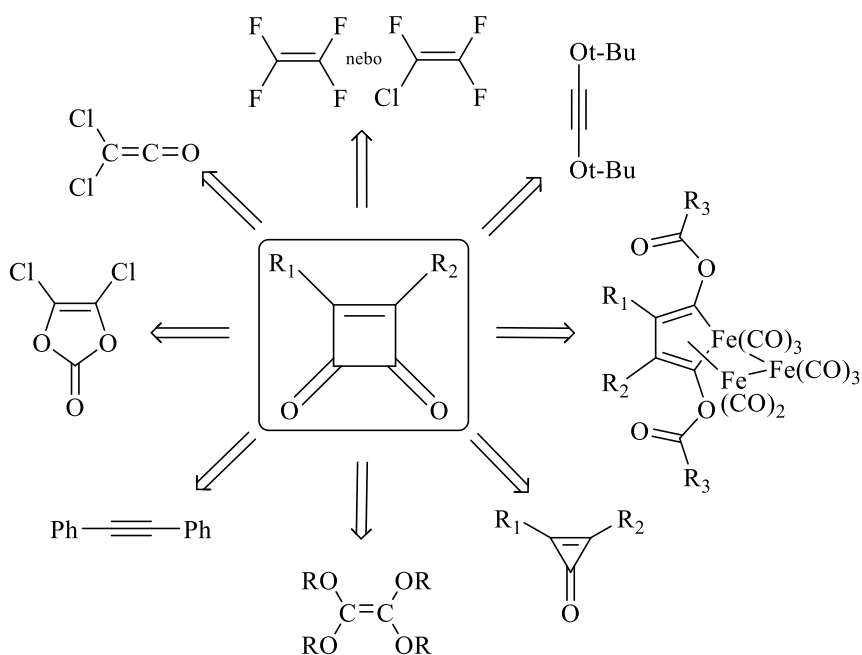
1 Syntéza squaramidů

Squaramidy jsou deriváty kyseliny squarové, jejíž hydroxylové skupiny jsou nahrazeny skupinami -NH_2 , resp. -NHR . Obecně pak deriváty kyseliny squarové nazýváme, podle systematického názvu struktury, cyklobutendiony. První cyklobutendion syntetizoval již v roce 1955 J. D. Roberts, pomocí cykloadiční reakce zobrazené na Obr. 5.⁷ Syntéza vychází z chlortrifluorethylenu **III** nebo tetrafluorethylenu **IV**, který reaguje s fenylacetylenem **V** za vzniku tetrahalogenovaného fenylcyklobutenu **VI**. Ten dále podléhá za teploty 100°C kyselé hydrolyze za vzniku cyklobutendionu **VIII**, a to buď přímo nebo přes dihalogenovaný fenylcyklobutenon **VII**.⁴⁰



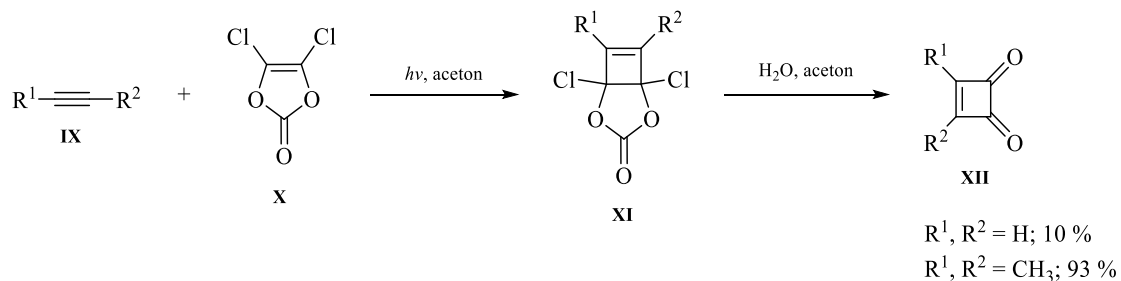
Obr. 5: První syntéza cyklobutendionu.

Dnes již existuje celá řada postupů vedoucích k syntéze těchto sloučenin. Jejich stručný přehled je uveden níže na Obr. 6. Dále v textu pak bude každá z cest popsána podrobněji.



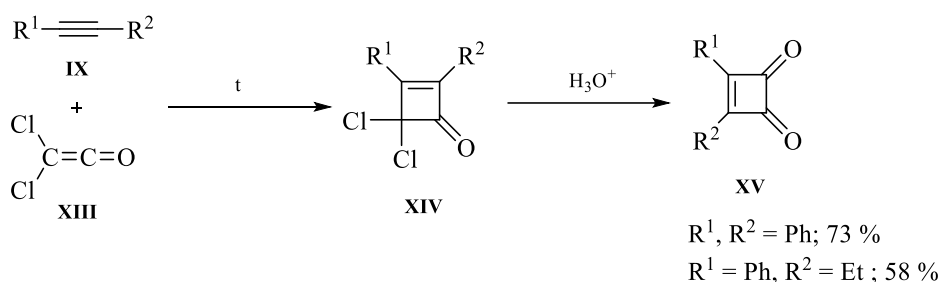
Obr. 6: Přehled reaktantů, pomocí kterých je možné nasyntetizovat cyklobutendiony.

Mezi nejrozšířenější syntetické postupy vedoucí k cyklobutendionům patří bezesporu cykloadiční reakce, které jsou jednoduše modifikovatelné a lze jimi připravit různě substituované squaramidy. Mimo již výše zmíněný postup adice alkynů na tetrahalogenalkeny, užitý J. D. Robertsem (Obr. 5),⁷ je možno provádět [2+2] cykloadiční pericyklickou reakci alkynů s dichlorovinylkarbonáty (Obr. 7).⁴¹ Tato reakce probíhá za ozařování roztoku dichlorovinylkarbonátu **X** a příslušného alkynu **IX** rozpuštěných v polárním aprotickém rozpouštědle, nejčastěji acetonu či acetonitrilu. Vzniká cyklický produkt **XI**, který při teplotě 60 °C dále podléhá hydrolyze v 60% roztoku acetonu ve vodě za formace konečného cyklobutendionu **XII**.



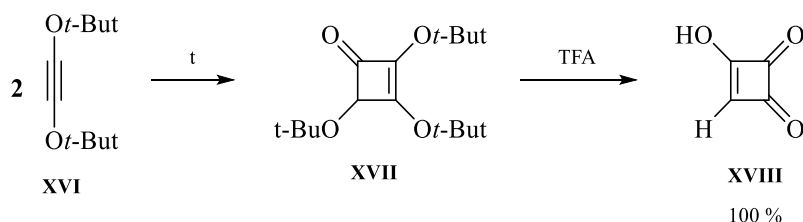
Obr. 7: Adice alkynů na dichlorovinylkarbonáty za formace cyklobutendionů.⁴¹

Velmi obdobným mechanismem lze cyklobutendiony připravit pomocí reakce alkynů **IX** s dichlorketenem **XIII** (Obr. 8).⁴² Analogicky zde taktéž vzniká meziprodukt **XIV**, který podléhá kyselé hydrolyze za vzniku produktu **XV**.



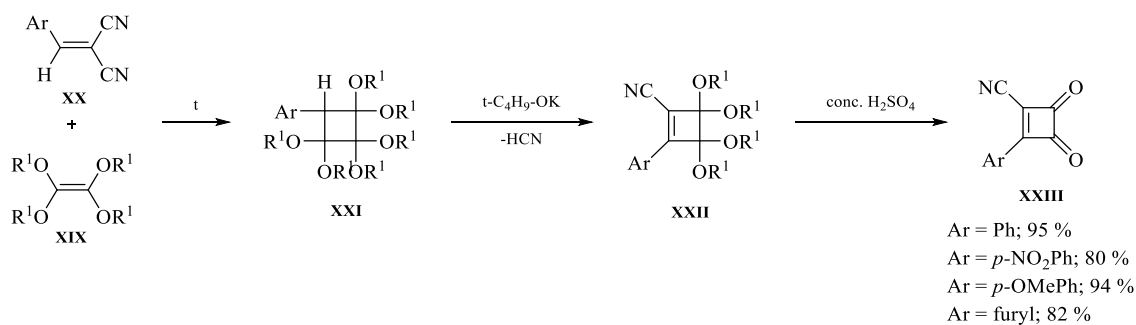
Obr. 8: Adice alkyňů na keteny za vzniku cyklobutendionů.⁴²

Cyklobutendiony vznikají dimerizací dvou molekul alkyňu (Obr. 9), konkrétně lze užít di-*t*-Butoxyethyn **XVI**. Produktem takového typu reakce je kyselina semisquarová **XVIII**.⁴³



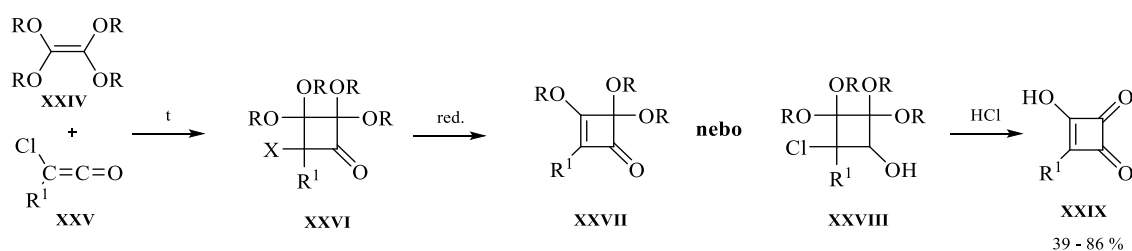
Obr. 9: Dimerizace 2 molekul alkyňu za vzniku semisquarové kyseliny.⁴³

Pro syntézu není nutné použít alkyňy, reakce paralelním způsobem běží povětšinou i s alkeny (Obr. 10). Můžeme tedy zmínit i adici elektronově bohatých alkenů, např. tetraalkoxyethylen **XIX**, na elektronově chudé alkeny, např. 1,1-dikyano-2-arylethylen **XX**. Reakce opět probíhá za ohřevu (konkrétní teplota v publikaci není uvedena) a vzniká 1,1,2,2-tetraalkoxy-3,3-dikyano-4-arylcyklobutan **XXI**, který za bazické katalýzy a odstoupení HCN poskytuje intermediát **XXII**, jehož hydrolyzou pomocí konc. H_2SO_4 vzniká 3-kyanocyklobutendion **XXIII**.⁴⁴



Obr. 10: Reakce 2 molekul alkyňu za vzniku cyklobutendionu.⁴⁴

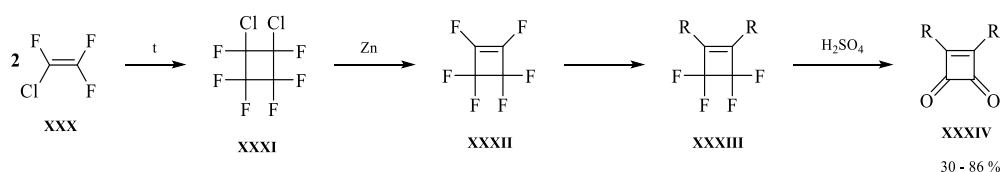
Stejně jako alkyny lze adovat i elektronově bohaté alkeny na keteny (Obr. 11).⁴⁵ Za zahřívání směsi tetreaalkoxyethylenu **XXIV** a chlorketenu **XXV** s následnou redukcí vzniká adiční produkt **XXVII** nebo **XXVIII** (v závislosti na substituentech), jeho kyselou hydrolyzou vzniká odpovídající semicyklobutendion **XXIX**. Pro tuto metodu lze využít i thioethery.⁷



Obr. 11: Adice elektronově bohatých alkenů na keteny za vzniku cyklobutendionů.⁴⁵

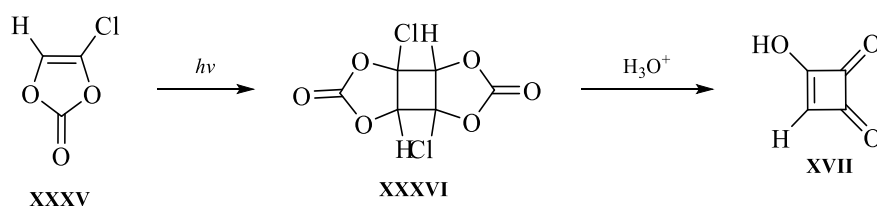
Poslední dvě metody týkající se přípravy cyklobutendionů jsou opět cyklodimerizace, tentokrát tetrahalogenethylenů a chlorvinylkarbonátů (cyklodimerizace alkinů byla zmíněna již výše).

U cyklodimerizace tetrahalogenethylenů se užívají fluoroderiváty **XXX** (bromo a chloro poskytují polymerizované struktury).⁴⁶ Dimerizace probíhá za zahřívání (konkrétní teplota v článku není uvedena), vzniklý cyklizovaný produkt **XXXI** se následně dechloruje pomocí Zn. Finálně dochází k nukleofilní substituci za odstoupení fluoridů a formace meziprojektu **XXXIII**, který se hydrolyzuje na cyklobutendion **XXXIV** (Obr. 12).



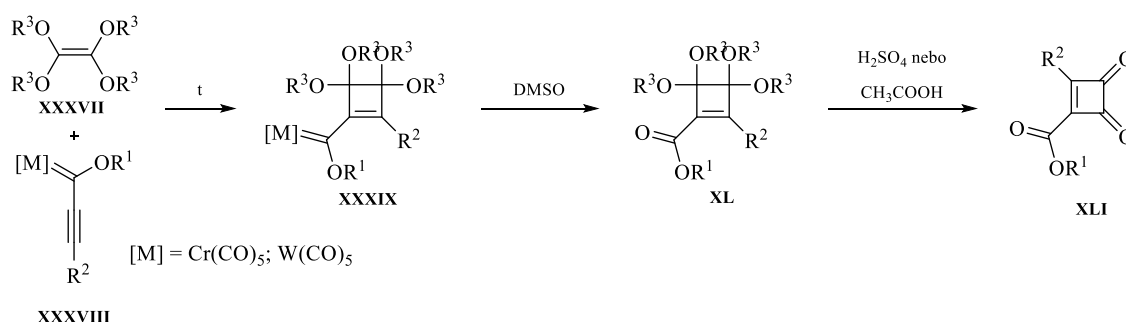
Obr. 12: Cyklodimerizace ethylenů za vzniku cyklobutendionů.⁴⁶

Výchozí látkou pro cyklodimerizační reakce vinylkarbonátů je chlorvinylkarbonát **XXXV**, který za pomoci UV ozařování podléhá [2+2] cykloadici. (Obr. 13).⁴⁷ Vzniklý cykloadukt **XXXVI** poté podléhá kyselé hydrolyze za finálního odstoupení vody. Vzniká opět kyselina semisquarová **XVII**.



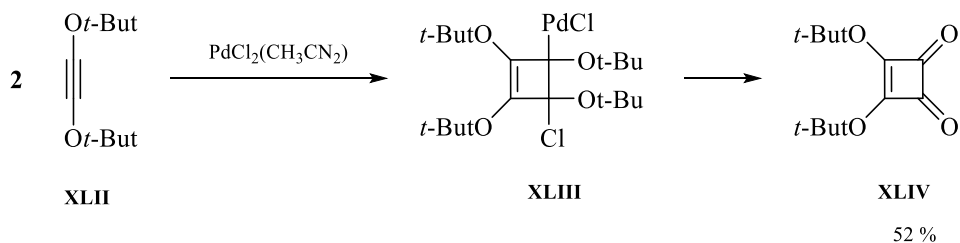
Obr. 13: Cyklodimerizace vinylnkarbonátů za vzniku cyklobutendionů.⁴⁷

Další z postupů vedoucích k přípravě cyklobutenedionů využívá komplexních sloučenin tranzitních kovů.⁴⁸ Jedním z takto využívaných komplexů je $\text{Cr}(\text{CO})_5$, popř. $\text{W}(\text{CO})_5$, které katalyzují reakci alkynylalkoxykarbenu **XXXVIII** s tetraalkoxyethylenem **XXXVII** (Obr. 14). Ta poskytuje cyklizované produkty **XXXIX** ve velmi dobrých výtěžcích. Vzniklé struktury jsou poté oxidovány v DMSO za reaktivní eliminace použitého kovu. Finální cyklobutendion **XLI** je získán kyselou hydrolyzou pomocí CH_3COOH nebo H_2SO_4 .



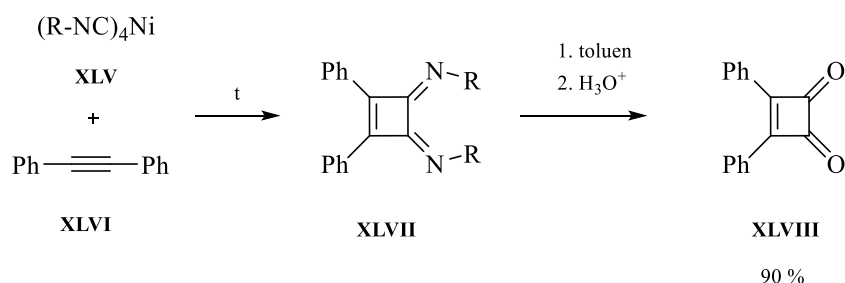
Obr. 14: Syntéza cyklobutendionů pomocí karbenů s komplexní částicí v molekule.⁴⁸

Další metoda využívá palladium dichloridový komplex, který umožňuje přímou cyklodimerizaci di-*t*-butoxyethynu **XLII** za vzniku di-*t*-butyl squarátu **XLIII**, který finálně podléhá eliminaci za vzniku produktu **XLIV** (Obr. 15).⁴⁹



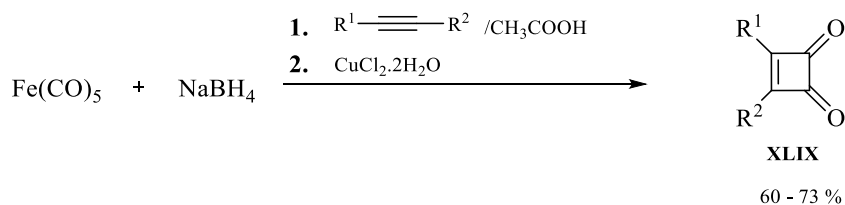
Obr. 15: Cyklodimerizace vedoucí k cyklobutendionům za katalýzy palladiumchloridovým komplexem.⁴⁹

Jedna z nových metod užívá komplex niklu, konkrétně ekvimolární množství tetrakis(arylisokyanid)niklu **XLV** a difenylacetylenu **XLVI** (Obr. 16).⁴⁹ Cyklický produkt **XLVII** se formuje za refluxu v toluenu. Finální cyklobutendion **XLVIII** je získán následným přidáním vodného roztoku HCl.



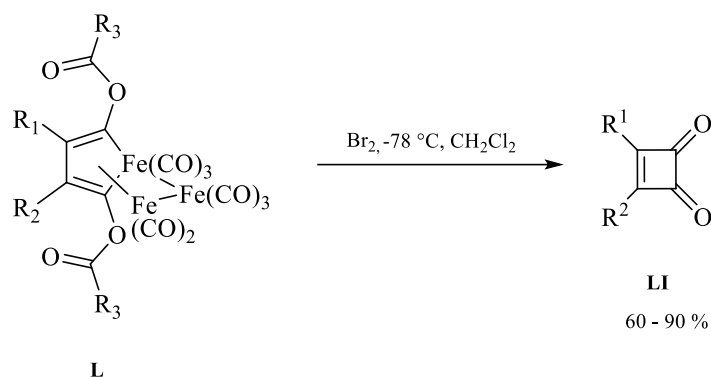
Obr. 16: Syntéza cyklobutendionů pomocí tetrakis(arylisokvanid)niklu.⁴⁹

Některé publikace také uvádí možnou formaci squaramidů z $[\text{HFe}_3(\text{CO})_{11}]^-$ komplexu, který je možné *in situ* připravit pomocí směsi $\text{Fe}(\text{CO})_5/\text{NaBH}_4/\text{CH}_3\text{COOH}$ (Obr. 17).⁵⁰ Komplex reaguje s alkyny a po oxidaci pomocí $\text{CuCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ vznikají příslušné cyklobutendiony **XLIX**.



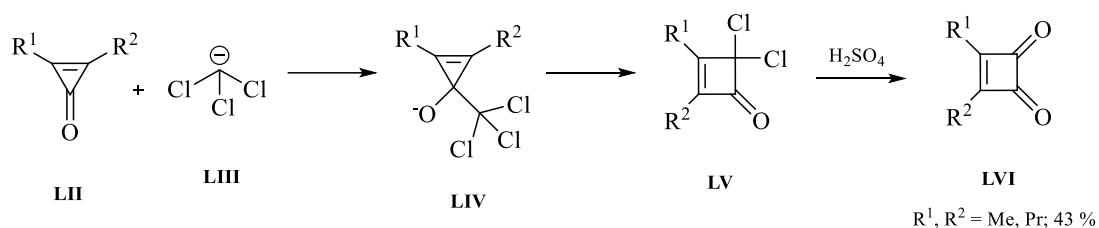
Obr. 17: Syntéza cyklobutendionů pomocí $[\text{HFe}_3(\text{CO})_{11}]^-$ komplexu.⁵⁰

Nedávno byla také publikována syntéza využívající oxidaci acyloxyferrolových komplexů **L** bromem (Obr. 18).⁵¹ Tato metoda poskytuje rozmanitou řadu squaramidů **LI** v dobrých výtěžcích.



Obr. 18: Syntéza cyklobutendionů pomocí acyloxyferrolových komplexů.⁵¹

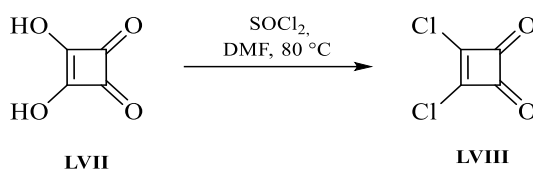
Přípravu cyklobutendionů lze uskutečnit také z cyklopropanových derivátů (Obr. 19).⁵² Zvětšení kruhu o uhlík je realizováno reakcí pomocí *in situ* generovaného trichlormethylového aniontu **LIII** s dialkylcyklopropanonem **LII**. Reakce poskytuje dichlorodialkylcyklobutenon **LV**, který je možné pomocí H_2SO_4 převést na příslušný dialkylcyklobutendion **LVI**.



Obr. 19: Příprava cyklobutendionů rozšířením trojčlenného kruhu.⁵²

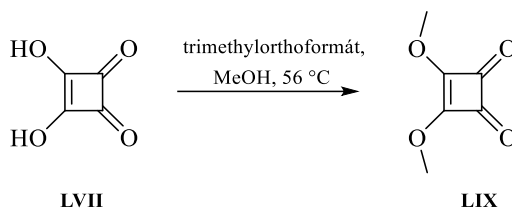
Relativně nejjednodušší příprava cyklobutendionů vychází z jiných cyklických prekurzorů.²⁰ Z halo či alkoxy derivátů lze připravit velmi širokou škálu různě substituovaných cyklobutendionů, včetně squaramidů. V obou případech se z hlediska reakčního mechanismu jedná o nukleofilní substituci, a právě tyto metody byly při praktické přípravě derivátů užívány nejvíce.

Dihalogen derivát kyseliny squarové lze připravit přidáním $SOCl_2$ ke kyselině squarové **LVII** s pár kapkami DMF (Obr. 20). Směs se nechá refluxovat 3 hodiny na 80 °C za formace dichlorproduktu **LVIII**.



Obr. 20: Příprava dichloroderivátu kyseliny squarové.²⁰

Alkoxy deriváty cyklobutendionů, neboli estery kyseliny squarové, lze syntetizovat opět z kyseliny squarové **LVII** (Obr. 21). Nejčastěji využívaným derivátem z této skupiny je dimetoxy derivát kyseliny squarové **LIX**, který lze připravit rozpuštěním kyseliny squarové v bezvodém MeOH a přidáním trimethylorthoformátu. Roztok se následně nechá refluxovat na 56 °C po dobu 24 h.²⁰



Obr. 21: Příprava dimethoxy derivátu kyseliny squarové.²⁰

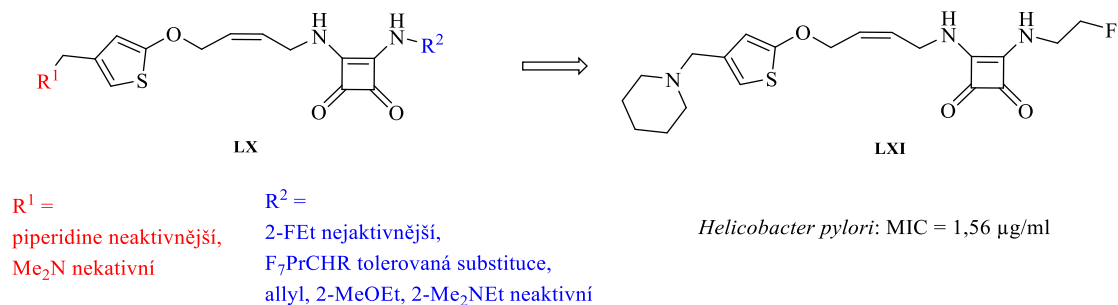
2 Antibakteriální aktivita squaramidů

Jak bylo řečeno v úvodu, squaramidy disponují širokospektrální biologickou aktivitou, včetně antibakteriální. V souvislosti s touto aktivitou je o squaramidy velký zájem, protože ačkoli existuje mnoho dostupných antibakteriálních sloučenin, jejich účinek je omezen vlivem vznikající rezistence bakterií na standardně podávané léky. Bakteriální infekce zároveň patří mezi nejčastější sekundární a nejvíce život ohrožující infekce u imunokompromitovaných pacientů. Potenciální řešení, alespoň v souvislosti s některými z bakteriálních nemocí, nabízí právě squaramidy.

První publikace uvádějící do souvislosti squarové struktury s antibakteriální aktivitou se objevily v roce 1996.⁵³ Článek autorů Kojima a kol. se zabývá působením squaramidů **LX** jako antagonistů H₂ receptorů s inhibiční aktivitou proti *Helicobacter pylori*.

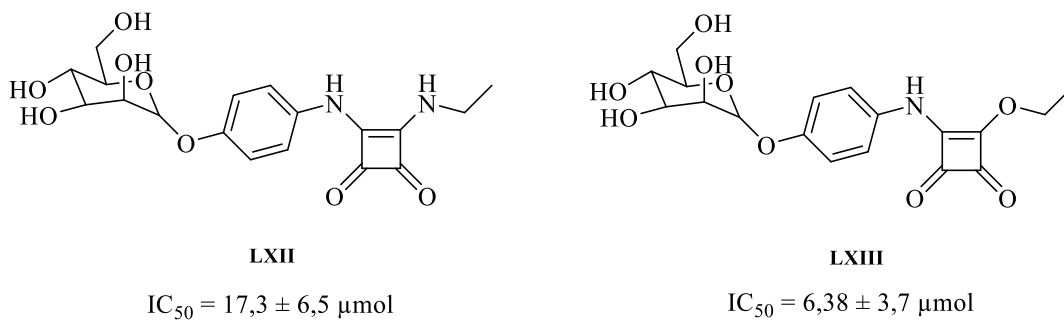
O dva roky později na publikaci zmíněnou výše navázala výzkumná skupina Kijima a kol.¹⁷ Některé jimi navržené deriváty vykazovaly natolik slibné inhibiční

aktivity proti *Helicobacter pylori*, že dosáhly klinických testů, jak již bylo zmíněné v úvodu. (Obr. 22)



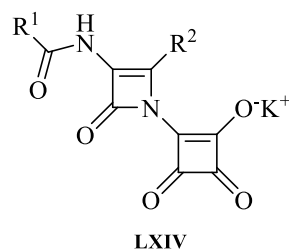
Obr. 22: Squaramidy vystupující jako inhibitory H₂ receptorů.^{17,53}

Publikace od Lindhorst a kol. uvádí zajímavý účinek mannosidických monoamidů kyseliny squarové **LXII** a **LXIII** na fimbrie (známé také jako *pily*), které bakterie používají k zachycení se na hostitelské buňce.^{14,18} Na koncích fimbrií některých bakterií se totiž nachází lektinové FimH (fimbrin D-mannose specific adhesin), který zajišťují tzv. mannosu-specifickou bakteriální adhezi. Nedávná publikace uvádí, že je možné navrhnout syntetické mannosidy, jejichž součástí je i squarový kruh, které mají vysokou afinitu k FimH a mohly by tak specificky inhibovat bakteriální adhezi (Obr. 23). Testy byly prováděné na *E. Coli*, jak standard byl užít pNPMAN (IC₅₀ = 274 ± 110 µM).¹⁴

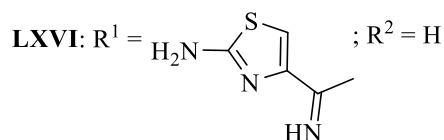


Obr. 23: Syntetické mannosidy schopné specificky inhibovat bakteriální adhezi.¹⁴

Publikace z roku 1992 také uvádí cyklobutendionový kruh jako zajímavou součást β-laktamových antibiotik **LXIV**.⁵⁴ Autoři článku se zabývali syntézou a testováním α-acylamino-*N*-(hydroxydioxocyclobutenyl)-β-laktamových struktur, nicméně ani jedna z testovaných látek nedosáhla lepších výsledků, než standardně užívaná β-laktamová antibiotika (konkrétní hodnoty aktivit v publikace nejsou uvedeny).



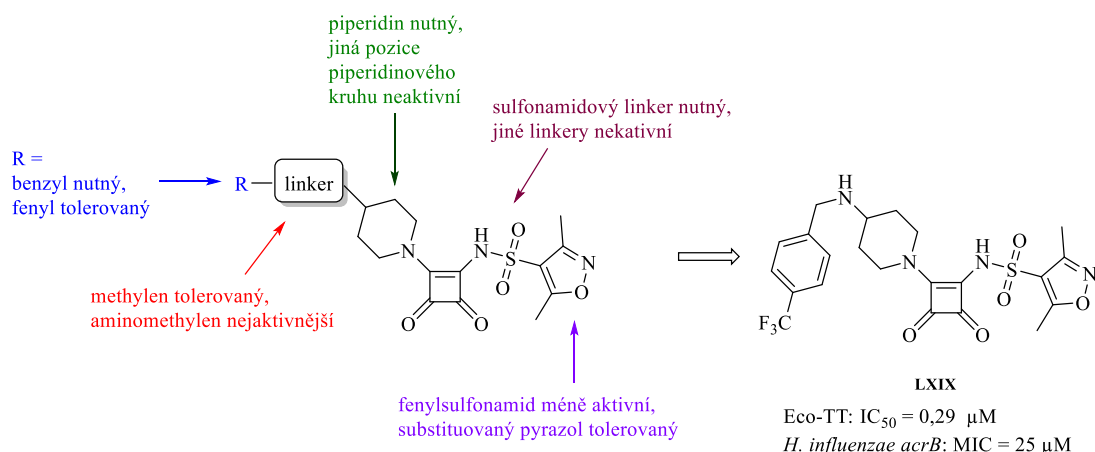
LXV: $R^1 = \text{PhOCH}_2$; $R^2 = \text{H}$



LXVII: $R^1 = \text{PhOCH}_2$; $R^2 = \text{CH}_3$

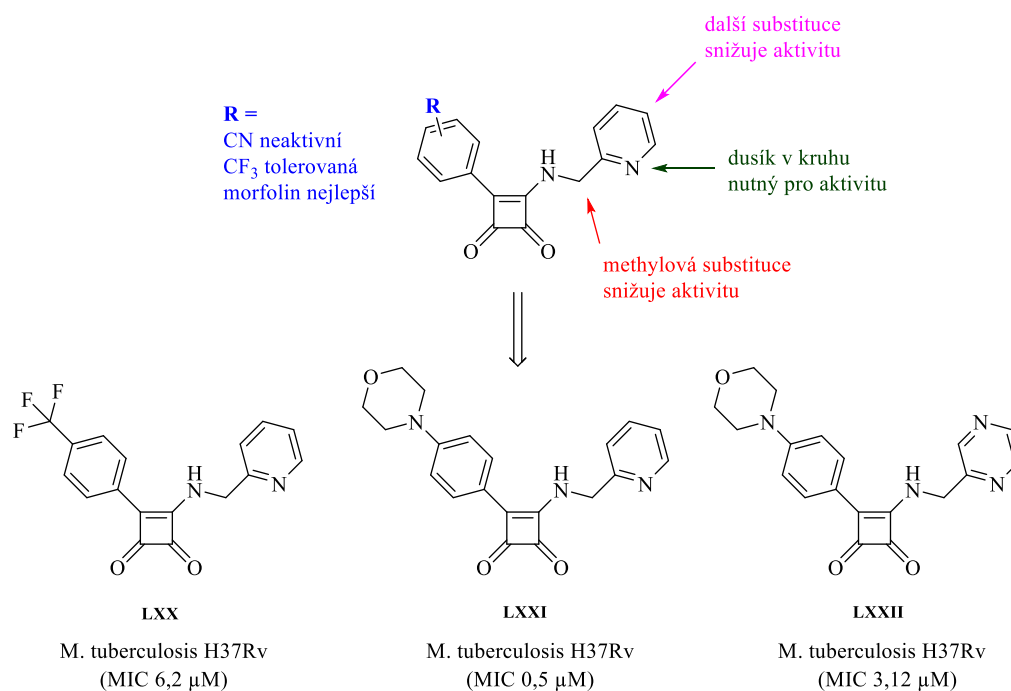
Obr. 24: Vybrané testované struktury obsahující spojení β -laktamových kruhů se squaramidy.⁵⁴

Vysoká účinnost squaramidů v rámci medicínální chemie byla nedávno potvrzena prací publikovanou v *J. Med. Chem.*¹⁹ Při hledání nového antibakteriálního léčiva se Murakami a kol. zaměřili na významný antibakteriální cíl - RNA polymerázu. Ta je nezbytná pro genovou expresi, růst buněk a obecně životaschopnost buňky.¹⁵ Použitím high-throughput screeningu byl identifikován nový vysoce aktivní strukturní skelet **LXIX** založený na squaramidové skupině (Obr. 25). Bylo prokázáno, že uvedený squaramid je schopen vázat se na RNA polymerázový switch region. To má za následek dysfunkci oblasti a následnou inhibici transkripce. Podrobné SAR studie prokázaly, že terminální isoxazolové a benzylové kruhy jsou nezbytné pro navázání struktury do oblasti switch regionu RNA. Nicméně autoři publikace také uvádí, že skelet nabízí mnoho dalších modifikací, které ještě nebyly důkladně prozkoumány.¹⁹



Obr. 25: Squaramidy jako potenciální inhibitory RNA polymerázy.¹⁹

Mimo výše zmíněnou antibakteriální aktivitu squaramidy disponují i aktivitou mykobakteriální. Skupina autorů Tantry a kol. vydala v roce 2017 publikaci, kde uvádí některé squaramidy s významnou antituberkulotickou aktivitou.²⁰ Na základě molekulového dokování bylo zjištěno, že uváděné látky mají schopnost inhibovat mykobakteriální ATP syntasu, konkrétně se vmezeřit mezi podjednotku *a* a *c* ATP syntasy a narušit tak energetický metabolismus buňky. Podrobné SAR studie uváděné v publikaci (Obr. 26) poukazují na důležitost substituce squarového kruhu na jedné jeho straně pomocí pyridinu. Další substituce pyridinu není nutná. Jako zásadní se jeví jeho dusíkový heteroatom, který vytváří klíčovou interakci pro aktivitu struktury. Druhá strana squarového kruhu je variabilní. Ze SAR studie vyplývá, že podmínkou pro aktivitu struktury je přítomnost aromátu, jeho další substituce však poskytuje možnosti pro modifikaci.



Obr. 26: Squaramidy s antimykobakteriální aktivitou působící jako inhibitory ATP synthasy.²⁰

Jako nejaktivnější struktura je v publikaci označený derivát **LXXI** substituovaný 2-aminomethylpyridinem na jedné straně squarového kruhu a fenylmorfolinem na straně druhé (Obr. 26). Jako klíčová se ukázala přítomnost kyslíkového atomu morfolinu, který se pomocí vodíkové interakce přes molekulu vody váže na Phe69 podjednotky *c* ATP synthasy. Dále pak z molekulového dokování vyplývá nutná přítomnost dusíkového atomu pyridinu, který vytváří π - π interakci a přímou vodíkovou vazbu s Arg186 podjednotky *a* ATP synthasy.²⁰

3 Mykobakteriální ATP synthasa

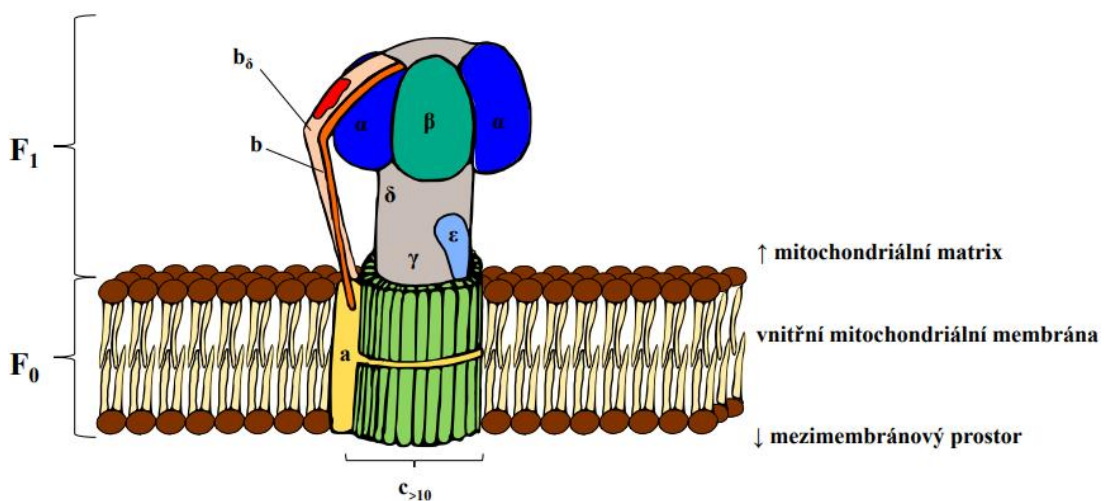
ATP synthasa je základním enzymem, který můžeme najít napříč všemi živými druhy. Vyskytuje se v mitochondriích živočišných buněk, v chloroplastech rostlin i v plazmatické membráně bakterií.⁵⁵ Jedná se o hydrofilní průchod vnitřní membránou mitochondrie, který umožňuje proudění protonů po směru elektrochemického potenciálu. Energie uvolněná při tomto průchodu se poté využívá k reakci fosfátu s ADP vznikající ATP.

ATP synthasa je dnes z pohledu medicínské chemie jedním z nejatraktivnějších molekulárních cílů. Je to dáno tím, že mezi lidskou, bakteriální i mykobakteriální ATP

synthasou jsou jak morfologické, tak funkční rozdíly, díky čemuž bychom měli být schopni působit selektivně na daný typ.³⁹

ATP synthasa má napříč všemi říšemi 2 základní části. Ty označujeme jako F_0 (tzv. rotorová část zabudovaná do mitochondriální membrány) a F_1 (statorová část).³⁹ Obě tyto části musí být spojeny, aby se zabránilo neproduktivní rotaci komplexu ATP synthasy. To zajišťuje prodloužená a převážně hydrofilní struktura nazývaná jako stonku statoru.

Mykobakteriální ATP synthasa (Obr. 27) obsahuje jako součást statorové části (F_1) $\alpha_3\beta_3$ hexamer a podjednotky γ , δ a ϵ . Rotorová část je složena z jedné podjednotky a , dvou podjednotek b a více než deseti podjednotek c ($a_1b_2c_{>10}$).³⁹ Velmi specifickým rysem mykobakteriální ATP synthasy je velmi úzké spojení (skoro až fúze) jedné z b podjednotek s δ podjednotkou.^{56,57} Experimenty odhalily, že strukturální odlišnost, a tím i částečná funkční specializace obou b podjednotek u mykobakterií, je výhodou, a to především díky možnosti větší stechiometrické variability, která umožňuje lepší vazbu ATP prekurzorů na $\alpha_3\beta_3$ hexamer (to zajišťuje především fúzovaná b podjednotka). Volná b podjednotka zvyšuje tuhost stonku statoru, čímž dochází k efektivnějšímu přenosu energie v rámci komplexu ATP synthasy. Přítomnost dvou různých typů podjednotek b také zlepšuje vzájemnou interakci obou těchto podjednotek, které tak tvoří "úzce propletenou vinutou cívku".^{58,59}



Obr. 27: Stavba mykobakteriální ATP-synthasy.

Standardní uspořádání bakteriální ATP synthasy (nacházející se např. u *E. Coli*) má oproti eukaryotní a mykobakteriální ATP synthase specificky umístěnou podjednotku δ , která se nachází na vrcholu $\alpha_3\beta_3$ hexameru, a dimerní podjednotku b , která se právě s δ podjednotkou spojuje.⁶⁰ Druhý rozdíl bakteriální ATP synthasy oproti té mykobakteriální spočívá v počtu monomerů podjednotky c . Zatímco u mykobakterie je těchto monomerů více než 10 (konkrétní počet není znám), u *E. Coli* jich bylo zjištěno přesně 10. Podjednotka c zajišťuje navázání protonů H^+ do ATP synthasy a svou rotací tak způsobuje tvorbu ATP.

U eukaryotní ATP synthasy je podjednotka δ nahrazena homologním proteinem (OSCP). Jeho poloha je totožná s polohou δ podjednotky v bakteriální ATP synthase. Kromě toho se u mitochondriálních ATP synthas nachází pouze jedna podjednotka b , doprovázená dvěma menšími podjednotkami označovanými jako d a F_6 .^{61,62} Eukaryotní buňky obvykle mívají pouze 8 monomerních jednotek u podjednotky c .^{63,64}

Mírnou odlišnost vykazují také ATP synthasy v chloroplastech, resp. ATP synthasy u bakterií schopných fotosyntézy.⁶⁵⁻⁶⁷ U nich se místo 2 b podjednotek nachází 2 homologní podjednotky (nazývané jako b a b' nebo I a II), které plnohodnotně nahrazují b homodimer.

Právě především díky specifické ATP synthase jsou některé druhy mykobakterií schopny přežít delší dobu v energeticky nepříznivých podmínkách, např. v prostředí s nízkým obsahem kyslíku nebo živin. S takovým prostředím se bakterie mohou setkat například v hostiteli v částech vzdálených plicím nebo uvnitř fagosomů lidských makrofágů.⁶⁸ Typickým příkladem takového druhu je *Mycobacterium tuberculosis*, popř. pak i *Mycobacterium leprae* či *Mycobacterium ulcerans*. Tyto mykobakteriální kmeny mohou přepnout svůj metabolismus do tzv. „spícího stavu“. V takovém období ustává replikace, zvyšuje se tloušťka buněčné stěny a dochází k poklesu tvorby proteinů a nukleových kyselin. Hlavním zdrojem energie jsou lipidy.

Mimo výše zmíněných morfologických rozdílů můžeme mezi ATP synthasami mykobakterií a ATP synthasami ostatních buněk (ať už bakteriálních nebo eukaryotních) najít také rozdíly funkční. Prvním, a asi největším z nich, je potlačení hydrolýzy ATP.⁶⁸ ATP synthasa je totiž schopna fungovat i reverzibilně, a tedy hydrolyzovat ATP. Tato funkce je u mykobakteriálních kmenů potlačena. Vzhledem k jejich stylu života je totiž třeba ATP využívat efektivně a nepromarnit ani jednu vytvořenou molekulu ATP.

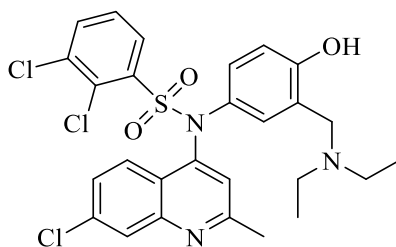
Další funkční rozdíl spočívá ve schopnosti využití proton-motivní síly.⁶⁰ Tato abilita přímo souvisí se stavbou ATP synthasy, konkrétně spočívá ve stavbě podjednotky

c (F₀). Jak bylo řečeno výše, jedná se o polymerní prstenec, který svou rotací způsobuje tvorbu ATP. Určujícím faktorem pro účinnost tvorby ATP je počet monomerních jednotek, protože právě s jejich počtem roste schopnost efektivně využívat protonový proud. Lidská ATP synthasa obsahuje těchto jednotek 8, ta bakteriální poté 10. U mykobakteriálních druhů přesný počet není znám. Je jich však zcela jistě více než 10. Vzhledem k podmínkám, s jakými se mykobakteriální druhy musí vyrovnat, je odhadováno, že disponují až 13 monomery.

Posledním z výrazných rozdílů, který je u mykobakteriálních ATP synthas znám, je spojen s jejich cytoplazmatickou membránou. Ta totiž vykazuje neobvyklé složení – obsahuje neobyčejně velké množství lipidu kardiolipinu.⁶⁸ A ten, např. u kvasinek, výrazně zvyšuje aktivitu ATP synthasy. Není tedy vyloučeno, že jeho zvýšený obsah má dopad i na funkci ATP synthasy u mykobakteriálních kmenů. Zda tomu tak ale opravdu je, prozatím zůstává otázkou.

Správné pochopení funkce ATP synthasy u mykobakterií a jejich odlišností od ATP synthas eukaryotních může vést k návrhu efektivně a selektivně působících léčiv.

Kromě látek uvedených v úvodní části práce patří mezi nejnadějnější kandidáty poslední doby struktury uváděné v publikaci z roku 2015.²¹ Autoři se v článku zabývají skupinou substituovaných chinolinů, z nichž jako nejúčinnější označují strukturu níže (LXXIII). Ta disponuje výbornou antimykobakteriální aktivitou a selektivitou, zároveň i baktericidním účinkem. Hodnoty IC₅₀ pro mykobakteriální ATPázu dosahují hodnoty IC₅₀ = 0,51 μM, pro savčí pak IC₅₀ > 100 μM. Mimo to látka vykazuje rychlou absorpci, distribuci a pomalou eliminaci. Celková účinnost uváděné struktury *in vivo* je cca dvojnásobná oproti účinku kontrolního léčiva ethambutolu. Proto jsou tyto výsledky příslibem do budoucna. Látka se nachází v preklinickém testování.



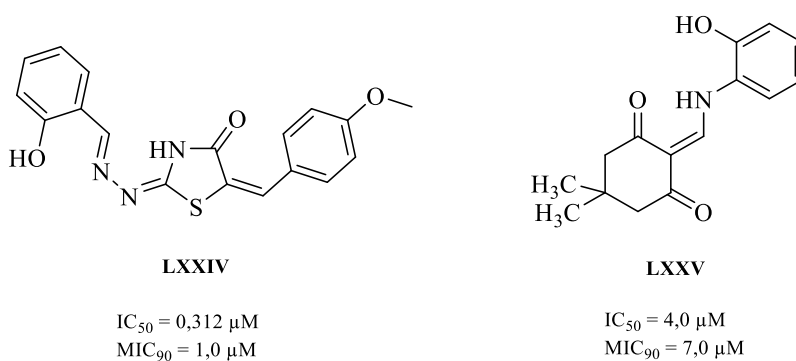
LXXIII

IC₅₀ (eukaryota) = 0,51 μM

IC₅₀ (mykobakterie) > 100 μM

Obr. 28: Nenadějnější struktura ze série chinolonů.²¹

Loňský článek autorů Kumar a kol. uvádí další dvě velmi nadějně struktury (**LXXIV**, **LXXV**), které svými IC_{50} dosahujícími hodnot 0,32 a 4,0 $\mu\text{g/ml}$ nabízí zajímavou potenciální alternativu.⁷⁰ Autoři textu s tímto výsledkem přišli po masivním biologickém testování více než 700 látek vykazujících aktivitu proti *Mycobacterium tuberculosis*. Obě struktury cílí právě na ATP syntas, což bylo dokázáno pomocí molekulové dokovací analýzy.



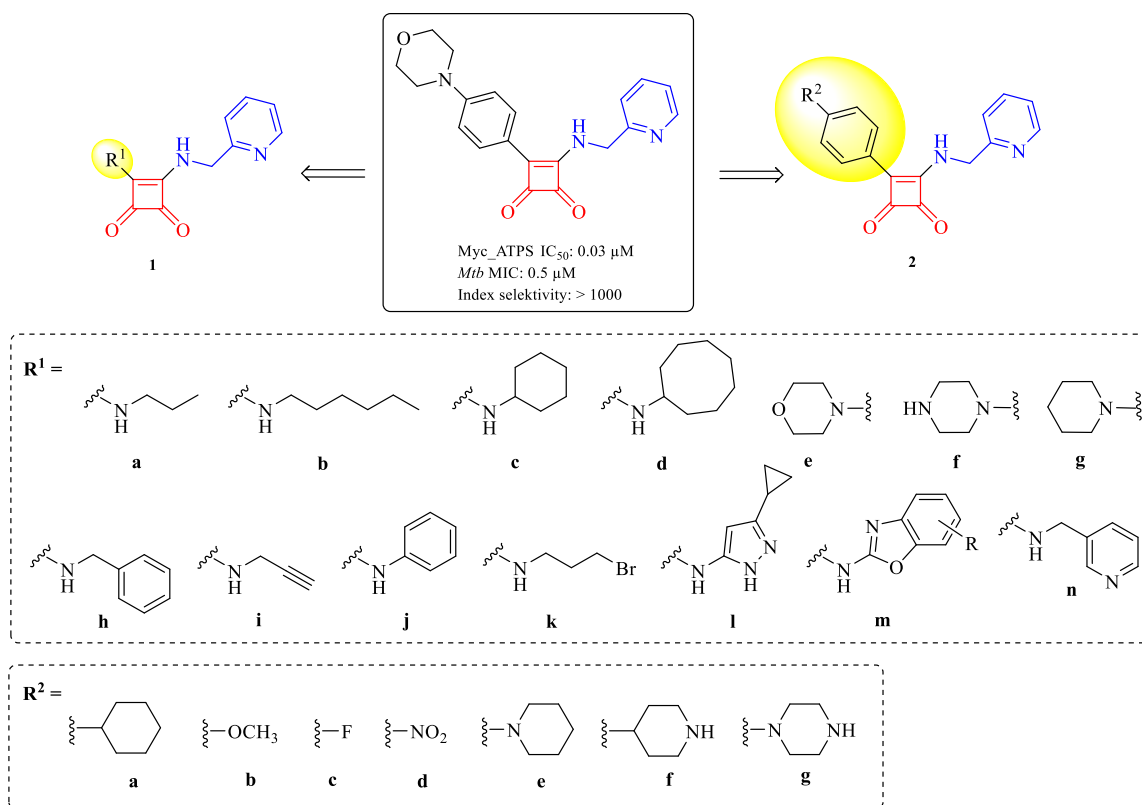
Obr. 29: Nově objevené struktury taktěž vykazující aktivitu proti tuberkulóze.

VÝSLEDKY A DISKUZE

Jak již bylo popsáno v úvodní části bakalářské práce, cílem tohoto projektu je design, syntéza a studium biologické aktivity nových derivátů odvozených od kyseliny squarové. S ohledem na tyto cíle je i následující kapitola rozdělena do několika podkapitol. V první z nich bude stručně nastíněn design nových látek na základě molekulového dokování. Následně bude podrobně diskutována syntéza jednotlivých derivátů, včetně optimalizací jednotlivých syntetických kroků navržených reakčních sekvencí. Tato část práce bude uzavřena popisem biologické aktivity připravených derivátů.

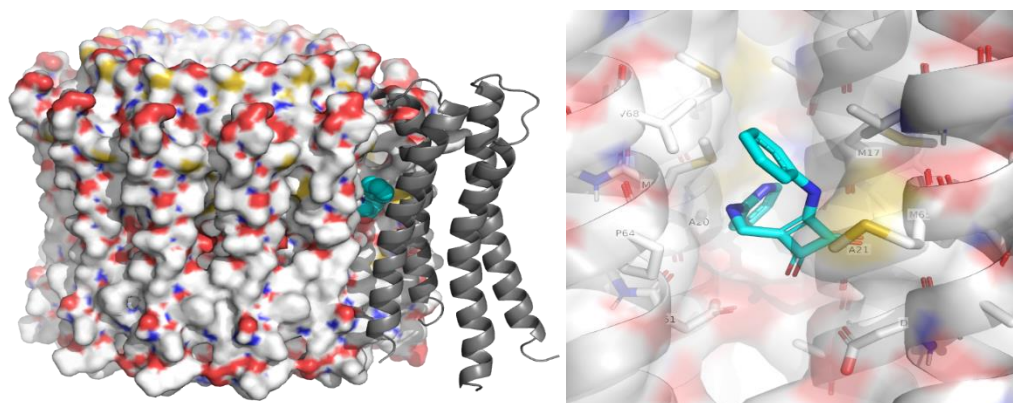
4 Návrh molekul na základě molekulového dokování

Inspirativní publikace popisující deriváty kyseliny squarové jako látky s významnou antimykobakteriální aktivitou²⁰ nás přivedla na myšlenku rozšířit tyto poznatky o další studie. Nejprve byly navrženy dva různé strukturní motivy **1** a **2** dle publikovaného derivátu (Obr. 30). Pro squaramidy **1** byly navrženy různé substituenty R^1 z řady alifatické, alicyklické, aromatické i heterocyklické. Obecně byly jednotlivé struktury vybírány s ohledem na svou různorodost, a tedy následnou možnost posouzení, jaký typ substituentu je nejvhodnější pro dosažení co možná nejvyšší biologické aktivity. Cílem bylo navrhnout takové deriváty, které by svou možností natočení substituentu mohly lépe dosahovat vazebného místa v ATP synthase. Protože se deriváty **1** pojí se squarovým kruhem prostřednictvím jednoduchou vazbou vázaného atomu dusíku, obsahují vždy minimálně o jednu rotující vazbu navíc oproti známým látkám. Jejich design byl podpořen také tím, že díky substituci aminem je do struktury zakomponován volný elektronový pár, který může přispívat k pevnějšímu zachycení ve vazebném místě díky vodíkové vazbě. Arylové deriváty **2** pak byly navrženy s vizí rozšíření řady derivátů uváděných v publikaci Tantry a kol.²⁰



Obr. 30: Přehled derivátů squaramidu navržených pro molekulové dokování.

Pomocí *in silico* molekulového dokování bylo dokázáno, že všechny navržené látky cílí na totéž vazebné místo ATP synthasy, jako je popsáno v publikaci Tantry a kol.²⁰ Deriváty se vmezeřují mezi podjednotky *a* a *c* ATP synthasy a zabraňují tak tvorbě ATP. Příkladem je squaramid **1j** znázorněn na Obr. 31.

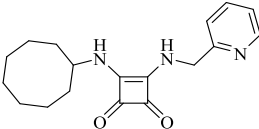
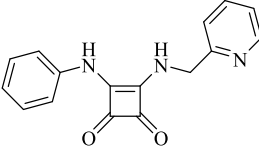
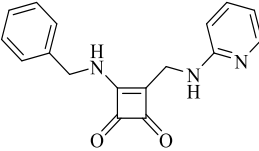
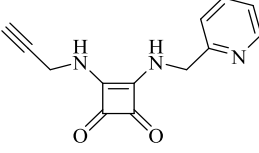
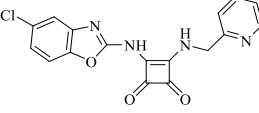
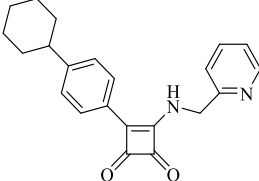
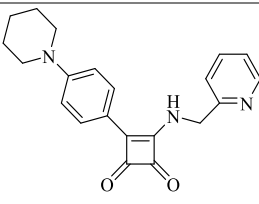
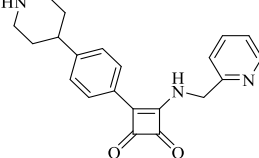


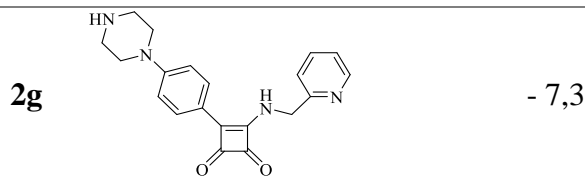
Obr. 31: Vmezeření se struktury **1j** mezi podjednotky *a* a *c* ATP synthasy.

Konkrétní vazebné energie se však liší v závislost na struktuře. Tyto energie byly porovnány s vazebnou energií již publikované látky (-7,7 kcal/mol). Některé

z testovaných látek dosahují vyšších hodnot vazebné energie. Deriváty s nejlepšími hodnotami jsou uvedeny v tabulce č. 1.

Tab. 1: Dokované struktury s hodnotami jejich vazebné energie.

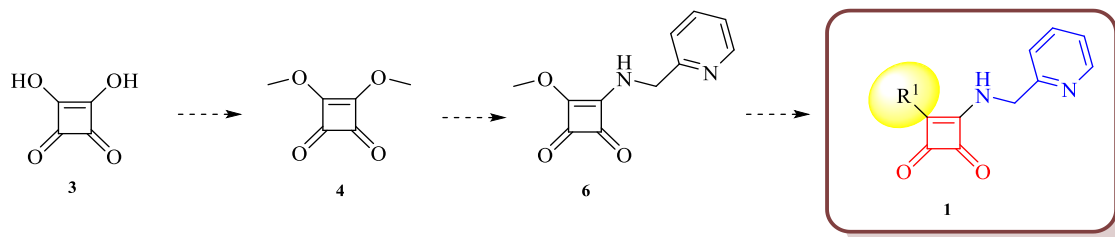
Kód	Struktura	Hodnota vazebné energie (kcal.mol ⁻¹)
1d		- 7,3
1j		- 7,0
1h		- 7,8
1i		- 7,1
1m		- 7,8
2a		- 8,5
2e		- 7,7
2f		- 8,1



5 Aminové deriváty squaramidu

První kapitola syntetické části předložené práce se zabývá aminovými deriváty kyseliny squarové (Obr. 32). Hlavní myšlenkou této části byl návrh reakční sekvence a její optimalizace tak, aby byla aplikovatelná na co možná nejširší škálu prekurzorů a poskytla tak širokou knihovnu rozmanitých derivátů určených k testování biologické aktivity.

Reakční sekvence vychází z komerčně dostupné kyseliny squarové, která je převedena na svůj dimethoxy derivát. Ten je poté na jedné straně selektivně substituován 2-aminomethylpyridinem. Druhá methoxy skupina je substituována pomocí některého z navržených prekurzorů za formace finálního produktu **1**. Jednotlivé kroky budou podrobně diskutovány dále.



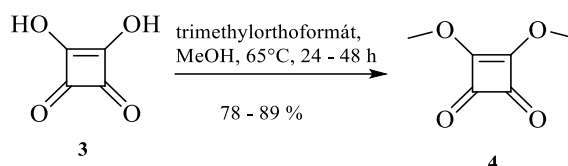
Obr. 32: Navržená reakční cesta pro syntézu aminových derivátů squaramidu.

5.1 Syntéza aminových derivátů

5.1.1 Převod kyseliny squarové na její dimethoxy derivát

Prvním krokem reakční sekvence pro získání aminového derivátu squaramidu **1** je převedení kyseliny squarové **3** na její dimethoxy derivát **4**. Reakce byla provedena pomocí trimethylorthoformátu v bezvodém MeOH za stálého ohřevu reakce na 65 °C po dobu 24 – 48 h. V případě neúplné konverze po 24 hodinách byl do reakční směsi přidán další ekvivalent trimethylorthoformátu. Po úplném zreagování kyseliny squarové bylo z reakční směsi odpařeno rozpouštědlo a produkt byl purifikován pomocí sloupcové

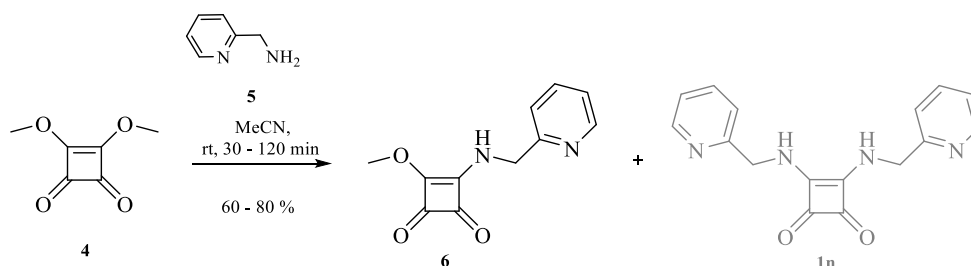
kapalinové chromatografie, jako mobilní fázi lze užít DCM/MeOH 9:0,5, jako vhodnější se však při opakování syntézy ukázalo užití mobilní fáze Hex/EtOAc 6:4 (větší rozdíl retenčních časů). V případě použití druhé ze zmíněných mobilní fázi je nutná sorpce látky na silikagel.



Obr. 33: Převod kyseliny squarové na její dimethoxy derivát.

5.1.2 Substituce methoxy skupiny 2-aminomethylpyridinem

Vzniklá methoxy skupina poté reagovala s komerčně dostupným 2-aminomethylpyridinem za vzniku derivátu **6**. Mimo této struktury reakcí vzniká jako vedlejší produkt také disubstituovaný squaramid (**1n**).



Obr. 34: Reakční schéma substituce methoxy skupiny za 2-aminomethylpyridin.

Pro selektivní získání monosubstituovaného produktu se jako určující faktor ukázalo rozpouštědlo. Pro reakci použitá rozpouštědla, včetně poměru obou vznikajících produktů reakce, jsou uvedeny v **Tabulce 2**.

Tab. 2: Přehled vyzkoušených rozpouštědel včetně poměru vznikajících produktů.

Rozpouštědlo	Poměr mono- a disubstituovaného produktu
MeOH	50 : 50
DMF	95 : 5
MeCN	90 : 10

U reakce velmi významnou roli hraje také reakční čas (30 – 120 min). Nejvyššího výtěžku (80 %) bylo dosaženo po 120 minutách průběhu reakce. Nicméně při delším setrvání produktu v reakční směsi dochází k jeho hydrolyze.

Přesto, že nejselektivněji se monosubstituovaný produkt formuje v DMF, pro opakovaná provedení reakce byl volen MeCN. A to z důvodu pouze velmi malého rozdílu poměrů vznikajících derivátů u obou reakcí a jeho jednoduššího odpaření.

Tato reakce, jak je zmíněno výše, byla také použita pro přípravu finálního derivátu **1n**, pro jehož získání byla naopak dvojnásobná substituce žádoucí. Podle toho u této reakce byly také zvoleny reakční podmínky – reakce byla realizována přes noc v MeOH za stálého ohřevu reakční směsi na 50 °C.

5.1.3 Substituce druhé methoxy skupiny aminem

Finálním krokem této reakční sekvence je substituce druhé methoxy skupiny za amin za formace finálního produktu **1**. Reakční podmínky tohoto kroku byly voleny v závislosti na použitém aminu. Zatímco alifatické aminy (nejnukleofilnější) reagovaly již za RT, pro aromatické aminy (**1j** – **1m**) bylo třeba reakční podmínky upravit (Tab. 3). Všechny reakce byly prováděny po dobu 24 hodin.

U sloučenin **1j** – **1n** bylo pro průběh reakce dostačující zvýšení teploty (50 °C, 24 h). Struktura **1m** navíc vyžadovala přidavek 1 ekv. báze, konkrétně bylo použito DBU. Bez přídavku báze nedocházelo k žádné konverzi. Kompletní přehled prekurzorů včetně reakčních podmínek a výtěžků uvádí tabulka č. 2.

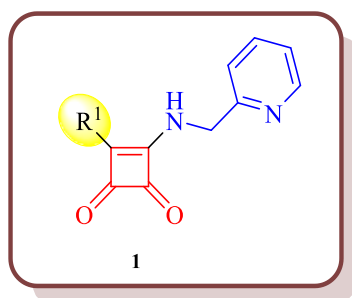
Z podmínek, za kterých příprava finálních struktur probíhala, vyčnívá derivát **1n**, který byl jako jediný připravován v MeOH. Jeho příprava v MeOH z důvodu znalosti průběhu této reakci při optimalizaci podmínek pro získání monosubstituovaného prekurzoru **6**, viz kap. 5. 1. 2.

Látky byly čištěny pomocí sloupcové kapalinové chromatografie a struktura potvrzena NMR spektroskopii. Při purifikaci je třeba velmi obezřetně zacházet s látkami **1k** a **1m**, které mají tendenci při provádění kapalinové chromatografie hydrolyzovat a na kolonách se tedy zdržovat. Pro usnadnění provedení kapalinové chromatografie lze látku **1k** částečně zbavit nečistot krystalizací z DCM.

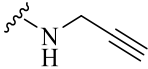
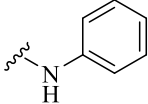
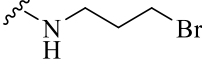
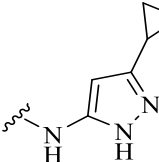
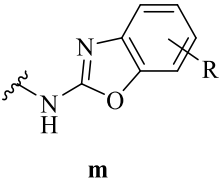
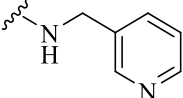
Výtěžky některých finálních látek nejsou ideální (především **1k** a **1m**), nicméně nízký výtěžek není způsobený průběhem reakce, ale jejím zpracováním (u dvou zmíněných struktur je to především jejich nestabilitou a tendencí hydrolyzovat, ale i u

dalších derivátů by optimalizací purifikace mohlo být dosaženo vyšších výtěžků). Optimalizace zpracování reakcí finálních struktur nebyla uskutečněna, všechny deriváty byly připraveny v dostatečném množství pro provedení všech analytických i biologických analýz. Pokud by některá z látek dosáhla významných hodnot biologické aktivity, zvýšení výtěžku, a tedy optimalizace purifikace by byla prioritou a byla by jí věnována pozornost.

Tab. 3: Přehled připravených produktů **1** s výtěžky a reakčními podmínkami.



Sloučenina	R ¹	Výtěžek [%] ^a	Reakční podmínky
1a		69	ekv. aminu, MeCN, RT
1b		64	ekv. aminu, MeCN, RT
1c		69	ekv. aminu, MeCN, RT
1d		77	ekv. aminu, MeCN, RT
1e		68	ekv. aminu, MeCN, RT
1f		33	ekv. aminu, MeCN, RT
1g		72	ekv. aminu, MeCN, RT
1h		85	ekv. aminu, MeCN, RT

1i		40	ekv. aminu, MeCN, RT
1j		48	ekv. aminu, MeCN, 50 °C
1k		20	ekv. aminu, MeCN, 50 °C
1l		48	ekv. aminu, MeCN, 50 °C
1m		7	ekv. aminu, ekv. DBU, MeCN, 50 °C
1n		65	2 ekv. aminu, MeOH, 50 °C

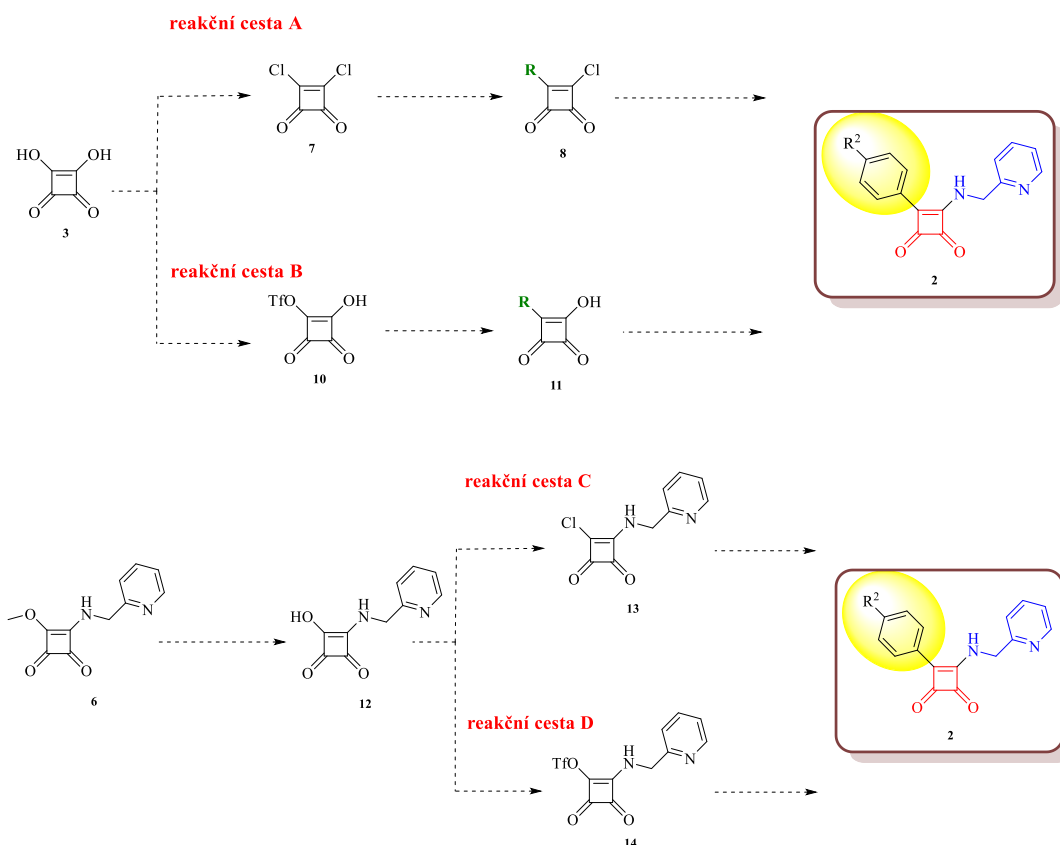
^aIzolovaný výtěžek po LC.

6 Arylové deriváty squaramidu

Pro přípravu druhé série squarových derivátů byly původně navrženy dva reakční postupy. První z nich, publikovaný Tantry a kol.²⁰ (Obr. 35, reakční cesta A), vychází z přípravy dichlorderivátu kyseliny squarové s následnou nukleofilní substitucí za postupného odstoupení atomů chloru v obou pozicích. Nejprve dochází k substituci za aryl, poté za 2-aminomethylpyridin. Pomocí této reakční sekvence byla připravena série finálních struktur **2**.

Protože však reakcemi bylo dosahováno pouze malých výtěžků, pokusili jsme se pro syntézu analogických struktur otevřít nový přístup (reakční cesta C). Ten vychází z již 2-aminomethylpyridinem substituovaného squarového kruhu, který je následně převeden na svůj halogenderivát. A analogicky jako v prvním případě dochází k nahrazení atomu halogenu aromátem. Navržený halogenderivát **13** bohužel nebyl připraven. Důvody budou diskutovány dále.

Pro neúspěšné zavedení halogenu jako odstupující skupiny do struktury squaramidu byla navržena nová syntetická cesta. Ta využívá jako odstupující skupinu triflát. Opět se zde, stejně jako u halogenů, nabízí možnost zavedení triflátu do struktury kyseliny squarové s následnou substitucí (reakční cesta B) nebo zavedení této odstupující skupiny do derivátu squaramidu s 2-aminomethylpyridinem (reakční cesta D). Z důvodu koronavirových opatření však tato reakční cesta nebyla prakticky realizována.



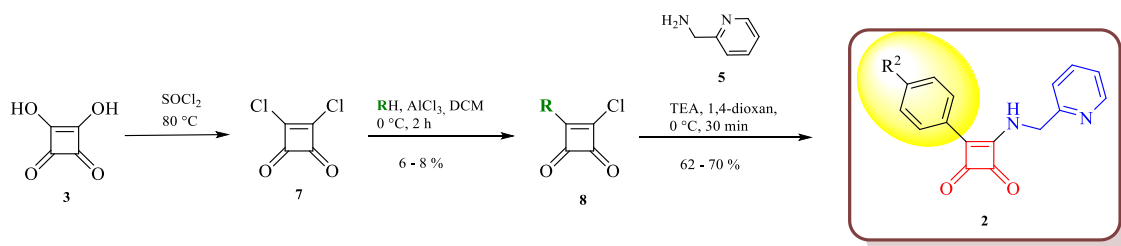
Obr. 35: Reakční sekvence pro syntézu arylových derivátů squaramidu vycházející z kyseliny squarové (výše), popř. z již substituovaného derivátu 2-aminomethylpyridinem (níže).

6.1 Syntéza arylových derivátů

Jak již bylo nastíněno výše, arylové deriváty byly syntetizovány převedením hydroxylové skupiny na odstupující skupinu, která byla substituována aromátem. Jako výchozí látka pro reakční sekvence byla buď kyselina squarová **3**, nebo derivát substituovaný 2-aminomethylpyridinem **6** (Obr. 35).

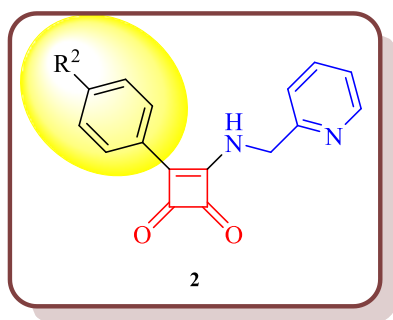
6.1.1 Publikovaný postup pomocí dichlorderivátu

Syntéza vychází z publikace z roku 2017 od Tantry a kol.²⁰ Výchozí látkou syntézy je kyselina squarová, která byla pomocí SOCl_2 s přídavkem DMF převedena na svůj dichlorderivát. K dichlorderivátu rozpuštěném v DCM a ochlazeném na $0\text{ }^\circ\text{C}$ byl konsektivně přidán ekvivalent příslušného aromátu a čtvrt ekvivalentu AlCl_3 . Purifikovaný monosubstituovaný produkt **8** byl následně rozpuštěn v dioxanu. Po ochlazení vzniklého roztoku na $0 - 5\text{ }^\circ\text{C}$ k němu byl přidán 2-aminomethylpyridin a TEA. Takto byly získány dva arylové squaramidy **2** (Tab. 3). Látky byly čištěny pomocí sloupcové kapalinové chromatografie a jejich struktura byla potvrzena NMR spektroskopií a HRMS.



Obr. 36: Syntéza arylových derivátů squaramidu pomocí dichlorderivátu kyseliny squarové.

Tab. 4: Přehled připravených produktů **2**.



Sloučenina	R ²	Výtěžek [%] ^a
2a		2
2b		4

^aVýtěžek čisté látky po LC.

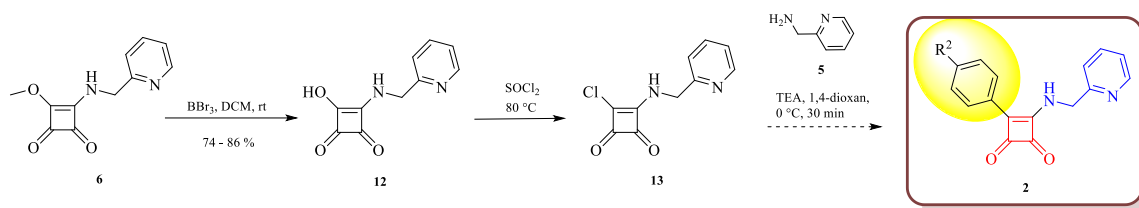
Výtěžky finálních produktů jsou velmi nízké, přestože substituenty jsou aktivované systémy (anisol mezomerním, cyklohexylbenzen indukčním efektem). Jejich nukleofilita však není dostatečně vysoká (v kombinaci s nepříliš velkou ochotou chloru odstupovat) pro dosažení vyšších výtěžků. S deaktivovanými systémy (zkoušeno s fluorbenzenem) k substituci nedochází vůbec. Právě nízké výtěžky byly hlavním důvodem přípravy pouze takto úzké série finálních látek a zároveň motivací k návrhu a otevření nového přístupu syntézy analogických struktur.

6.1.2 Nový přístup syntézy arylových derivátů squaramidu s užitím halogenidu jako odstupující skupiny

Vzhledem k nízkým výtěžkům při syntéze arylových derivátů squaramidů pomocí dichlorderivátu kyseliny squarové byl navržen nový přístup syntézy těchto látek. Ten vychází z kyseliny squarové, která je pomocí trimethylorthoformátu převedena na svůj dimethoxy derivát. Jedna z methoxy skupin je poté selektivně substituována 2-

aminomethylpyridinem (viz 5.1.2). Druhá methoxy skupina je poté pomocí BBr_3 modifikována na $-\text{OH}$ skupinu. Získaná hydroxy skupina by měla být přeměněna na halogen, který v posledním kroku reakční sekvence podléhá substituci aromátem. Konverze hydroxy skupiny na halogen bohužel, ani přes četné optimalizace (Tabulka č. 5), nebylo dosaženo, nový přístup tak nebyl otevřen.

Pro převedení hydroxylové skupiny na chlor byl nejprve jako chlorační činidlo používán thionyl chlorid, při čemž byla měněna reakční doba, později byl přidán i DMF jako katalyzátor. V souvislosti s SOCl_2 byl poté vyzkoušen i přírůstek rozpouštědla (THF nebo DMF) za přírůdku trifenylfosfinoxidu, 2,6-lutidinu nebo pyridinu jako katalyzátoru. Zároveň bylo měněno i množství SOCl_2 . Protože ani jedna z reakcí nevedla ke konverzi reaktantů, bylo vyzkoušeno jiné chlorační činidlo, konkrétně oxalyl chlorid. Ten byl vždy přidán k reakční směsi s rozpouštědlem (CHCl_3 , DMF, THF). Vyzkoušena byla opět přítomnost trifenylfosfinoxidu, 2,6-lutidinu a pyridinu jako katalyzátorů, avšak žádná z reakcí opět nevedla ke konverzi. Jako poslední bylo vyzkoušeno převedení hydroxylové skupiny na halogen pomocí koncentrovaných kyselin HBr a HCl , nicméně i tento pokus byl neúspěšný.



Obr. 37: Nový přístup k syntéze arylových derivátů squaramidu s užitím halogenu jako odstupující skupiny.

Tab. 5: Optimalizační tabulka kroku převedení methoxy skupiny na chlorid nového přístupu k syntéze arylových derivátů squaramidu

Experiment č.	Chlorační činidlo	Rozpouštědlo	Katalyzátor	teplota	Reakční čas
1	SOCl ₂ , velký nadbytek	-	-	80 °C	3 h
2	SOCl ₂ , velký nadbytek	-	-	80 °C	24 h
3	SOCl ₂ , velký nadbytek	-	DMF	80 °C	3 h
4	SOCl ₂ , velký nadbytek	-	DMF	80 °C	24 h
5	SOCl ₂ (1 ekv.)	DMF	trifenylfosfinoxid ⁷ ₁	RT	2 h
6	SOCl ₂ (1 ekv.)	THF	trifenylfosfinoxid ⁷ ₁	RT	2 h
7	SOCl ₂ (1 ekv.)	DMF	2,6-lutidin ⁷²	RT	2 h
8	SOCl ₂ (1 ekv.)	DMF	pyridin	RT	2 h
9	Oxalylchlorid (1 ekv.)	CHCl ₃	trifenylfosfinoxid ⁷ ₁	RT	2 h
10	Oxalylchlorid (1 ekv.)	DMF	trifenylfosfinoxid ⁷ ₁	RT	2 h
11	Oxalylchlorid (1 ekv.)	THF	trifenylfosfinoxid ⁷ ₁	RT	2 h
12	Oxalylchlorid (1 ekv.)	CHCl ₃	2,6-lutidin ⁷²	RT	2 h
13	Oxalylchlorid (1 ekv.)	CHCl ₃	pyridin	RT	2 h
14	HCl, velký nadbytek	-	-	RT	3 h
15	HCl, velký nadbytek	-	-	50 °C	3 h
16	HBr, velký nadbytek	-	-	RT	3 h
17	HBr, velký nadbytek	-	-	50 °C	3 h

6.1.3 Nový přístup k syntéze arylových derivátů squaramidu s užitím triflátu jako odstupující skupiny

Protože zavedení halogenu do struktury squaramidu jako odstupující skupiny bohužel nebylo úspěšné, byla navržena nová syntetická cesta, která zavádí triflát jako odstupující skupinu.

Stejně jako u zavedení halogenů se zde nabízely 2 možnosti, a to zavedení triflátu do již substituovaného squaramidu 2-aminomethylpyridinem, anebo jeho zavedení do kyseliny squarové (viz Obr. 35).

U zavedení triflátu do struktury kyseliny squarové je podmínkou vznik pouze triflátem monosubstituovaného produktu. Druhá z hydroxylových skupin by poté měla být převedena na methoxy skupinu s její následnou substitucí 2-aminomethylpyridinem za formace konečného produktu. Z důvodu koronavirových opatření však tato syntetická cesta nebyla prakticky realizována.

7 Biologická aktivita

Připravené finální produkty ze série **1** a **2** byly primárně testovány na svou *in vitro* antimykobakteriální aktivitu proti *M. tuberculosis* H37Ra. Testy byly prováděny na belgickém pracovišti v Antverpách (Laboratory for Microbiology, Parasitology and Hygiene, University of Antwerp). Dále byly všechny připravené látky testovány proti několika Gram-pozitivním a Gram-negativním bakteriálním kmenům (*Bacillus subtilis*, *Micrococcus luteus*, *Mycobacterium vaccae*, *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa* a *Escherichia coli*) na Katedře organické chemie.

Antimykobakteriální aktivita proti *M. tuberculosis* H37Ra (ATCC® 25177™) byla určována na základě minimální inhibiční koncentrace (MIC) a inhibiční koncentrace (IC₅₀). Jako porovnávací standard byl pro mykobakteriální testy užit isoniazid. Dále byla testována *in vitro* akutní cytotoxicita proti makrofágům RAW264.7 (ATCCR TIB-71™) s použitím tamoxifenu jako referenční látky.

Z Tabulky 6 je patrné, že zajímavé hodnoty aktivity vykazují zejména látky **1j**, **2a** a **2b**. U sloučeniny **1j** jsou známy kompletní biologické výsledky, zbylé dvě struktury prošly prvním kolem testů a dále bude určována jejich přesná hodnota MIC i IC₅₀. Z výsledků antimykobakteriálních testů vyplývá, že důležitou roli ve struktuře má nejspíš aromatický cyklus, nejlépe pokud je přímo zavedený na squarový kruh. V tomto ohledu

výsledky molekulového dokování neodpovídají výsledkům biologických testů. Dle získaných hodnot vazebných energie z molekulového dokování by se struktura s methylovým můstkem (**1h** či **1m**) měla vázat do aktivního místa ATP synthasy lépe. Výsledky biologického testování však ukázaly, že přítomnost aromatického cyklu co nejbližší squarovému kruhu je pro aktivitu klíčová (struktura **1j** podle této skutečnosti dosahuje výrazně vyšších hodnot aktivity oproti látce **1h**). Důležitost vazby aromátu na squarový kruh dokazuje látka **2b**, u které se výsledky hodnot molekulového dokování i biologických testů vzájemně shodují.

Tab. 6: *In vitro* antimykobakteriální aktivita proti *M. tuberculosis* H37Ra sloučenin **1** a **2**.

Sloučenina	IC ₅₀ /μM	MIC/μM	CC ₅₀ /μM
1a	>64	>64	>64
1b	>64	>64	>64
1c	>64	>64	>64
1d	51,54	>64	>64
1e	>64	>64	>64
1f	>64	>64	>64
1g	>64	>64	>64
1h	>64	>64	>64
1i	49,61	>64	>64
1j	10,65	15,14	>64
1k	>64	>64	>64
1l	>64	>64	>64
1m	>64	>64	>64
1n	>64	>64	>64
2a	NS	<32 ^a	ND
2b	NS	<32 ^a	ND
isoniazid	0,1	0,3	ND
Tamoxifen	ND	ND	11.06

^aTyto deriváty prochází v současné době dalším testováním a jejich přesná hodnota bude stanovena.

Bakteriální testy byly vyhodnoceny na základě rozměru inhibiční zóny. Pokud zóna po inkubaci dosáhla rozměru většího než 20 mm, byla stanovována minimální inhibiční koncentrace (MIC). Tabulka 7 uvádí přehled všech výsledků, z nichž vyplývá, že nejzajímavější jsou z tohoto pohledu látky **1m** a **2b**. Squaramid **1m** vykazuje zajímavou aktivitu proti *M. Vaccae* a derivát **2b** proti *E. Coli*. U obou tedy byla určena i jejich hodnota minimální inhibiční koncentrace (MIC).

Tab. 7: *In vitro* antibakteriální aktivita sloučenin **1** a **2**.

Sloučenina	<i>B. Subtilis</i> zóna/MI C	<i>M. Lutteus</i> zóna/MI C	<i>M. Vaccae</i> zóna/MI C	<i>S. Aureus</i> zóna/MI C	<i>P. aeruginosa</i> zóna/MIC	<i>E. Coli</i> zóna/MI C
1a	14	16	10	17	16	18
1b	10	16	10	16	12	15
1c	10	15	11	12	13	15
1d	13	18	10	13	16	16
1e	10	12	10	13	15	16
1f	13	13	10	16	17	16
1g	13	12	12	17	17	19
1h	10	12	10	14	14	15
1i	11	15	13	15	15	14
1j	10	14	15	15	14	16
1k	10	15	16	16	14	16
1l	13	16	17	17	16	16
1m	17	17	21/200	17	17	17
1n	14	18	11	16	14	19
2a	12	13	10	13	13	18
2b	13	18	10	14	12	26/100

EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

8 Obecné informace

Rozpouštědla a chemikálie byly zakoupeny od firmy Sigma-Aldrich (St. Louis, Missouri, USA) nebo Fluorochem (US).

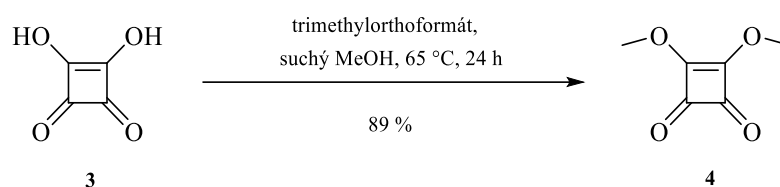
LC-MS analýzy byly provedeny na UHPLC-MS systému (Waters) složeného z UHPLC chromatografu Acquity s PDA detektorem a hmotnostního spektrometru s kvadrupólem. Byla použita Nucleodur Gravity C18 kolona (rozměry 1,8 μm , 2,1 x 50 mm) při 30 °C a rychlosti průtoku 600 $\mu\text{l}/\text{min}$. Mobilní fáze byla (A) 0,1% octan amonný ve vodě a (B) 0,1% octan amonný v acetonitrilu, lineárně naprogramovaná od 10 do 80 % B po 2,5 minuty, udržováno po dobu 1 minuty. Kolona byla reekvilibrována pomocí 10% roztoku B po dobu 1 minuty. ESI zdroj operoval pod proudem 5 μA s odpařovací teplotou 350 °C a kapilární teplotou 200 °C.

^1H a ^{13}C NMR spektra byla měřena na přístroji JEOL ECA400II (400 MHz) spektrometru za magnetické indukce 9,39 T (s užívanými frekvencemi 399,78 MHz pro ^1H a 100,53 MHz pro ^{13}C). Všechna NMR spektra byla pořízena za laboratorní teploty (21 °C) v rozpouštědlech DMSO- d_6 . ^1H a ^{13}C signály byly kalibrovány na signál těchto rozpouštědel. Chemické posuny δ jsou uvedeny v ppm (parts per million) a interakční konstanty (J) v hertzech (Hz).

HRMS analýza byla provedena na systému tvořeném kapalinovým chromatografem (Dionex UltiMate 3000, Thermo Fischer Scientific, MA, USA) a hmotnostním spektrometrem Exactive Plus Orbitrap high-resolution (Thermo Fischer Scientific, MA, USA). Jako ionizační zdroj byl použit elektrosprej a snímána byla spektra v kladném módu v rozmezí 100 – 1000 m/z. Chromatografická separace byla prováděna na koloně Phenomenex Gemini (C18, 50 x 2 mm, 3 μm částice), eluce byla izokratická, MF obsahovala 95 % MeOH a 5 % vody + 0,1 % HCOOH. Vzorčky byly připraveny rozpuštěním látek v počáteční mobilní fázi.

9 Příprava aminových derivátů

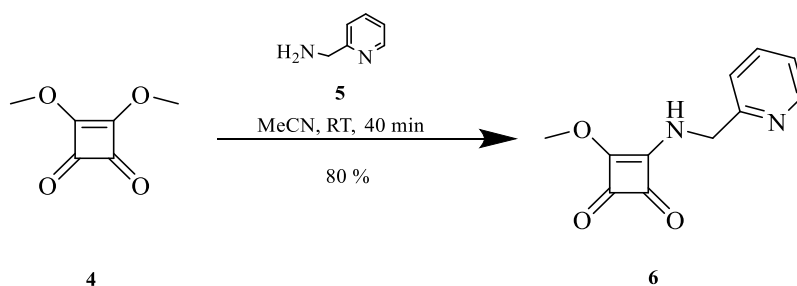
9.1 Převedení kyseliny squarové na její dimethoxy derivát



Kyselina squarová **3** (2,053 g; 18 mmol) byla odvážena do baňky a rozsuspendována v bezvodém methanolu (18 ml). K suspenzi byl následně přidán trimethylorthoformát (4 ml; 36,5 mmol). Takto připravená směs byla ponechána 24 hodin na magnetické míchačce pod zpětným chladičem za stálého ohřevu na 65 °C. Po uplynutí této doby bylo ze směsi odpařeno rozpouštědlo. Produkt **4** byl získán pomocí sloupcové kapalinové chromatografie (SiO₂, MF Hex/EtOAc 1:2) a dosušen na lyofilizátoru. Produkt **4** byl získán jako světle žlutá pevná látka ve výtěžku 2,558 g (89 %).

9.2 Reakce s 2-aminomethylpyridinem

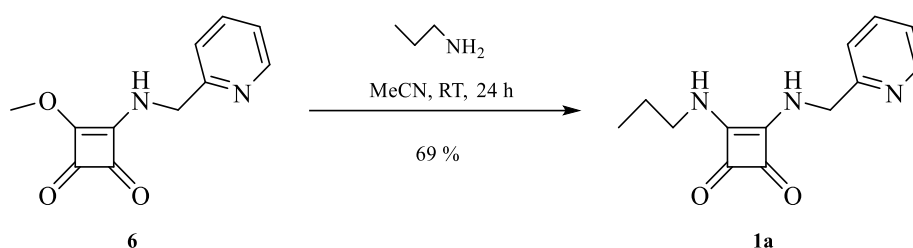
9.2.1 Příprava prekursoru: 3-methoxy-4-((pyridin-2-ylmethyl)amino)cyklobut-3-en-1,2-dion



Dimethoxy derivát kyseliny squarové **4** (1,84 g; 13 mmol) byl rozpuštěn v MeCN (15 ml). Do vzniklého roztoku byl pomalu za stálého míchání a chlazení přidán 2-aminomethylpyridin (1,33 ml; 13 mmol). Baňka s reakční směsí byla poté umístěna na magnetickou míchačku za RT na 40 minut. Po ochlazení reakční směsi v ledové lázni byla vzniklá sraženina odsáta, promyta MeCN a dosušena na lyofilizátoru. Produkt **6** byl získán jako bílá pevná látka ve výtěžku 2,25 g (80 %).

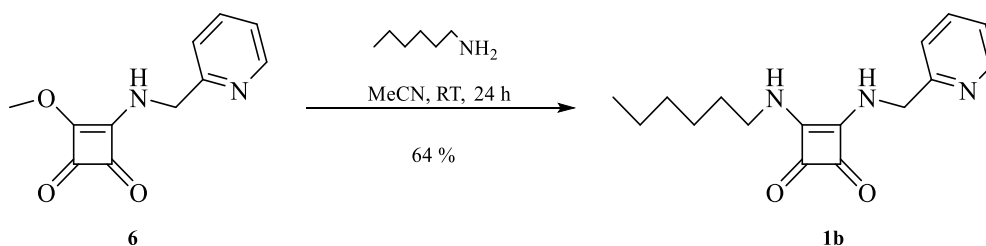
9.3 Substituce methoxy skupiny aminem

3-(Propylamino)-4-((pyridin-2-ylmethyl)amino)cyklobut-3-en-1,2-dion (**1a**)



Prekurzor **6** (200 mg; 0,916 mmol) byl rozpuštěn v MeCN (10 ml). Následně byl k roztoku přidán propylamin (75 μ l; 0,916 mmol). Reakční směs byla míchána za RT po dobu 24 h. Vzniklá sraženina byla odfiltrována, promyta MeCN, purifikována pomocí sloupcové kapalinové chromatografie (SiO_2 , MF: DCM/MeOH 9:1) a dosušena na lyofilizátoru. Produkt **1a** byl získán jako bílá pevná látka ve výtěžku 154,7 mg (69 %). ^1H NMR (400 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) δ 8.59 – 8.54 (m, 1H), 7.90 (br. s, 1H), 7.81 (td, $J = 7.7$, 1.8 Hz, 1H), 7.54 (br. s, 1H), 7.37 (d, $J = 7.8$ Hz, 1H), 7.35 – 7.30 (m, 1H), 4.83 (d, $J = 5.3$ Hz, 2H), 3.47 (d, $J = 5.6$ Hz, 2H), 1.59 – 1.48 (sxt, $J = 7.1$ Hz, 2H), 0.88 (t, $J = 7.4$ Hz, 3H). ^{13}C NMR (101 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) δ 182.79, 182.41, 168.07, 167.53, 157.61, 149.16, 137.15, 122.64, 121.59, 48.24, 44.98, 24.02, 10.79. HRMS: m/z : vypočteno pro $\text{C}_{13}\text{H}_{16}\text{N}_3\text{O}_2^+$: 246,1237 $[\text{M} + \text{H}]^+$; nalezeno: 246,1235.

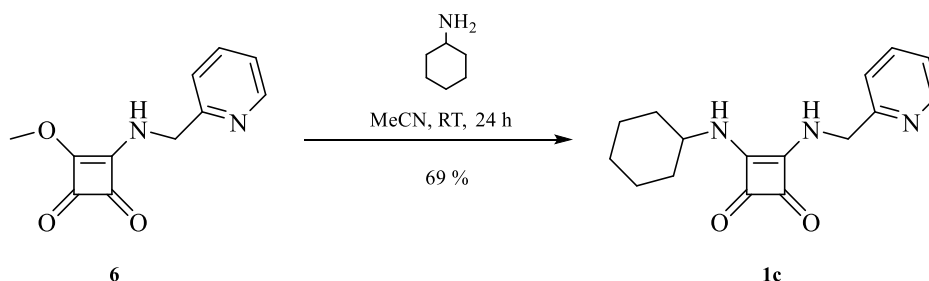
3-(Hexylamino)-4-((pyridin-2-ylmethyl)amino)cyklobut-3-en-1,2-dion (**1b**)



Prekurzor **6** (200 mg; 0,916 mmol) byl rozpuštěn v MeCN (10 ml). Následně byl k roztoku přidán hexylamin (123 μ l; 0,916 mmol). Reakční směs byla míchána za RT po dobu 24 h. Vzniklá sraženina byla odfiltrována a promyta MeCN. Produkt **1b** byl získán pomocí sloupcové kapalinové chromatografie (SiO_2 , MF: DCM/MeOH 9:1) a dosušen na lyofilizátoru. Produkt **1b** byl získán jako bílá pevná látka ve výtěžku 167,4 mg (64 %). ^1H NMR (400 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) δ 8.56 (d, $J = 4.4$ Hz, 1H), 7.89 (br. s, 1H), 7.81 (td, $J = 7.7$, 1.8 Hz, 1H), 7.50 (br. s, 1H), 7.37 (d, $J = 7.8$ Hz, 1H), 7.35 – 7.30 (m, 1H), 4.82 (d, $J = 4.9$ Hz, 2H), 3.51 (d, $J = 4.7$ Hz, 2H), 1.56 – 1.46 (m, 2H), 1.34 – 1.23 (m, 6H), 0.88

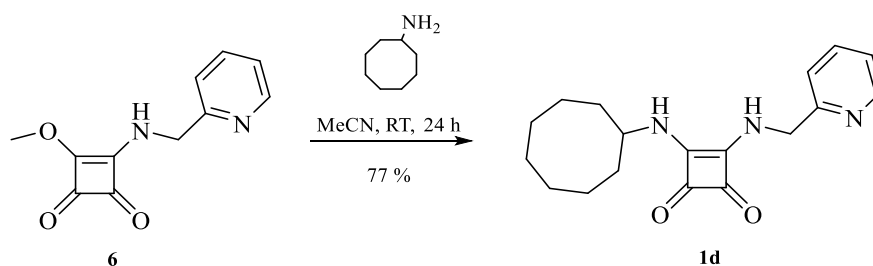
– 0.82 (m, 3H). ^{13}C NMR (101 MHz, DMSO- d_6) δ 182.78, 182.36, 167.98, 167.53, 157.52, 149.13, 137.10, 122.60, 121.55, 48.21, 43.26, 30.80, 30.64, 25.45, 21.99, 13.85. HRMS: m/z: vypočteno pro $\text{C}_{16}\text{H}_{22}\text{N}_3\text{O}_2^+$: 288,1707 [M + H] $^+$; nalezeno: 288,1706.

3-(Cyklohexylamino)-4-((pyridin-2-ylmethyl)amino)cyklobut-3-en-1,2-dion (**1c**)



Prekurzor **6** (200 mg; 0,916 mmol) byl rozpuštěn v MeCN (10 ml). Následně byl k roztoku přidán cyklohexylamin (105 μl ; 0,916 mmol). Reakční směs byla míchána za RT po dobu 24 h. Produkt **1c** byl získán odsáním ze směsi, promytím MeCN a dosušen na lyofilizátoru. Produkt **1c** byl získán jako bílá pevná látka ve výtěžku 173,2 mg (69 %). ^1H NMR (400 MHz, DMSO- d_6) δ 8.57 (d, $J = 4.5$ Hz, 1H), 7.82 (td, $J = 7.7, 1.8$ Hz, 2H – splývá s -NH-), 7.55 (br. s, 1H), 7.38 (d, $J = 7.8$ Hz, 1H), 7.33 (dd, $J = 7.1, 5.0$ Hz, 1H), 4.83 (d, $J = 5.1$ Hz, 2H), 3.79 (br. s, 1H), 1.92 – 1.83 (m, 2H), 1.72 – 1.64 (m, 2H), 1.58 – 1.50 (m, 1H), 1.37 – 1.23 (m, 4H), 1.22 – 1.13 (m, 1H). ^{13}C NMR (101 MHz, DMSO- d_6) δ 182.45, 182.30, 167.54, 167.16, 157.50, 149.14, 137.14, 122.64, 121.64, 51.95, 48.23, 33.65, 24.77, 23.91. HRMS: m/z: vypočteno pro $\text{C}_{16}\text{H}_{20}\text{N}_3\text{O}_2^+$: 286,3545 [M + H] $^+$; nalezeno: 286,1548.

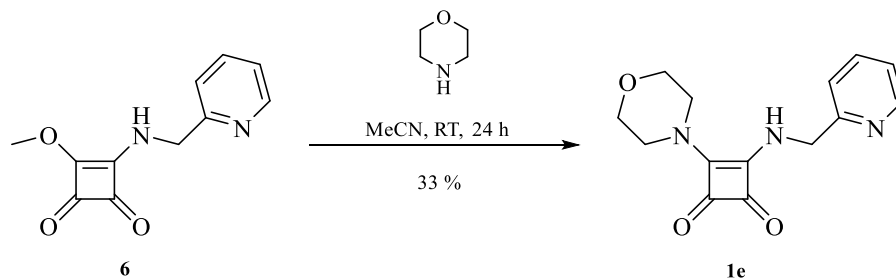
3-(Cyklooctylamino)-4-((pyridin-2-ylmethyl)amino)cyklobut-3-en-1,2-dion (**1d**)



Prekurzor **6** (200 mg; 0,916 mmol) byl rozpuštěn v MeCN (10 ml). Následně byl k roztoku přidán cyklooctylamin (126 μl ; 0,916 mmol). Reakční směs byla míchána za RT po dobu 24 h. Produkt **1d** byl získán odsáním ze směsi, promytím MeCN a dosušen na lyofilizátoru. Produkt **1d** byl získán jako bílá pevná látka ve výtěžku 220,6 mg (77 %). ^1H NMR (400 MHz, DMSO- d_6) δ 8.57 (d, $J = 4.7$ Hz, 1H), 7.82 (td, $J = 7.7, 1.7$ Hz, 2H

– splývá s -NH-), 7.56 (br. s, 1H), 7.38 (d, $J = 7.8$ Hz, 1H), 7.33 (m, 1H), 4.83 (d, $J = 5.4$ Hz, 2H), 4.08 (br. s, 1H), 1.92 – 1.80 (m, 2H), 1.68 – 1.44 (m, 12H). ^{13}C NMR (101 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) δ 182.58, 182.28, 167.55, 166.99, 157.39, 149.13, 137.14, 122.64, 121.66, 53.15, 48.22, 32.54, 26.81, 24.89, 22.59. HRMS: m/z : vypočteno pro $\text{C}_{18}\text{H}_{24}\text{N}_3\text{O}_2^+$: 314,1863 $[\text{M} + \text{H}]^+$; nalezeno: 314,1861.

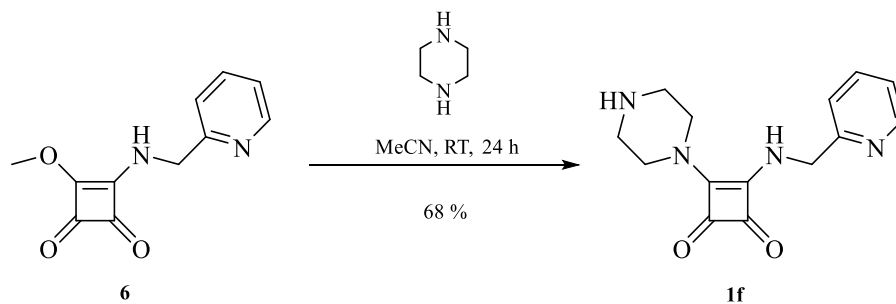
3-Morfolino-4-((pyridin-2-ylmethyl)amino)cyclobut-3-en-1,2-dion (**1e**)



Prekurzor **6** (200 mg; 0,916 mmol) byl rozpuštěn v MeCN (10 ml). Následně byl k roztoku přidán morfolin (80 μl ; 0,916 mmol). Reakční směs byla míchána za RT po dobu 24 h. Vzniklá sraženina byla odfiltrována a promyta MeCN. Produkt **1e** byl získán pomocí sloupcové kapalinové chromatografie (SiO_2 , MF: Hex/EtOAc 6:4) a dosušen na lyofilizátoru. Produkt **1e** byl získán jako bílá pevná látka ve výtěžku 81,3 mg (33 %). ^1H NMR (500 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) δ 8.54 (ddd, $J = 4.8, 1.7, 0.9$ Hz, 1H), 8.29 (t, $J = 6.2$ Hz, 1H), 7.80 (td, $J = 7.7, 1.8$ Hz, 1H), 7.40 (d, $J = 7.8$ Hz, 1H), 7.30 (ddd, $J = 7.5, 4.9, 1.0$ Hz, 1H), 4.88 (d, $J = 6.3$ Hz, 2H), 3.70 (s, 8H). ^{13}C NMR (101 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) δ 182.65, 182.56, 167.01, 166.10, 158.23, 149.08, 136.93, 122.43, 121.39, 65.92, 48.34, 46.79. HRMS: m/z : vypočteno pro $\text{C}_{14}\text{H}_{16}\text{N}_3\text{O}_3^+$: 274,1186 $[\text{M} + \text{H}]^+$; nalezeno: 274,1184.

^1H NMR (400 MHz,) δ

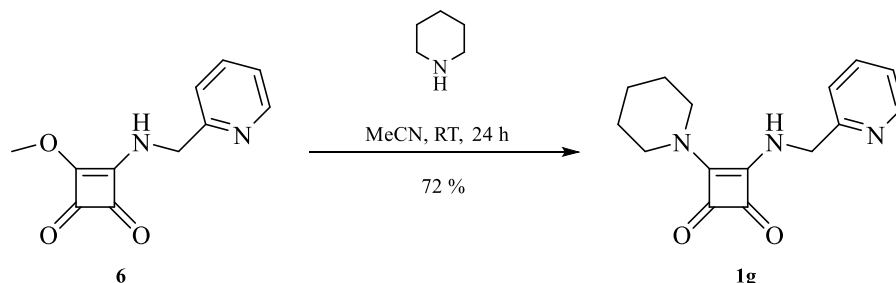
3-(Piperazin-1-yl)-4-((pyridin-2-ylmethyl)amino)cyclobut-3-en-1,2-dion (**1f**)



Prekurzor **6** (200 mg; 0,916 mmol) byl rozpuštěn v MeCN (10 ml). Následně byl k roztoku přidán piperazin (79 mg; 0,916 mmol). Reakční směs byla míchána za RT po

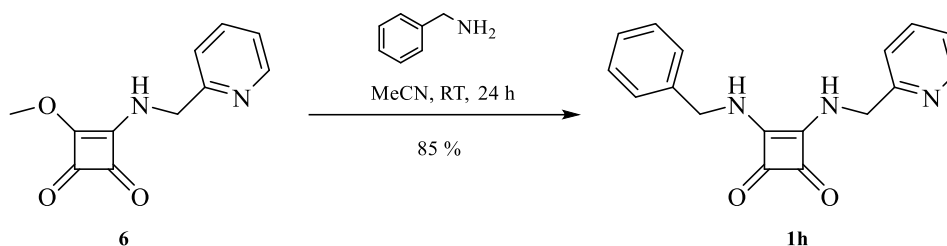
dobu 24 h. Vzniklá sraženina byla odfiltrována a promyta MeCN. Produkt **1f** byl získán pomocí sloupcové kapalinové chromatografie (SiO₂, MF: DCM/MeOH 9:0,5). Produkt **1f** byl dosušen na lyofilizátoru. Produkt **1f** byl získán jako bílá pevná látka ve výtěžku 170,1 mg (68 %). ¹H NMR (500 MHz, DMSO-*d*₆) δ 8.54 (d, *J* = 4.5 Hz, 1H), 8.22 (t, *J* = 5.9 Hz, 1H), 7.80 (td, *J* = 7.7, 1.8 Hz, 1H), 7.38 (d, *J* = 7.7 Hz, 1H), 7.32 – 7.27 (m, 1H), 4.89 (d, *J* = 6.0 Hz, 2H), 3.83 (s, 1H), 3.61 (s, 4H), 2.77 (t, *J* = 5.0, 4H). ¹³C NMR (126 MHz, DMSO-*d*₆) δ 182.76, 182.16, 166.80, 166.08, 158.37, 149.05, 136.91, 122.38, 121.32, 48.32, 47.85, 45.61. HRMS: *m/z*: vypočteno pro C₁₄H₁₇N₄O₂⁺: 273,1346 [M + H]⁺; nalezeno: 273,1344.

3-(Piperidin-1-yl)-4-((pyridin-2-ylmethyl)amino)cyclobut-3-en-1,2-dion (**1g**)



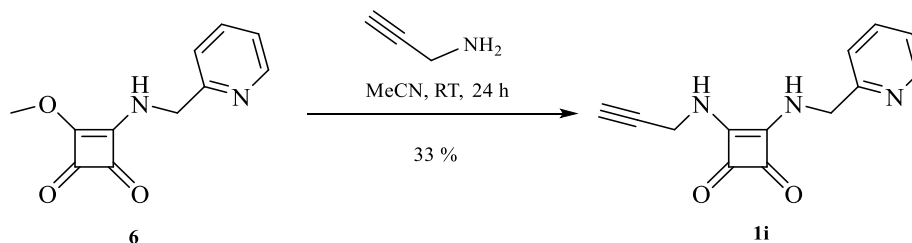
Prekurzor **6** (200 mg; 0,916 mmol) byl rozpuštěn v MeCN (10 ml). Následně byl k roztoku přidán piperidin (91 μl; 0,916 mmol). Reakční směs byla míchána za RT po dobu 24 h. Vzniklá sraženina byla odfiltrována a promyta MeCN. Produkt **1g** byl získán pomocí sloupcové kapalinové chromatografie (SiO₂, MF: DCM/MeOH 9:0,5). Produkt **1g** byl dosušen na lyofilizátoru. Produkt **1g** byl získán jako bílá pevná látka ve výtěžku 178,7 mg (72 %). ¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ 8.57 – 8.50 (m, 1H), 8.22 (t, *J* = 5.8 Hz, 1H), 7.85 – 7.75 (m, 1H), 7.38 (d, *J* = 7.8 Hz, 1H), 7.33 – 7.26 (m, 1H), 4.89 (d, *J* = 6.2 Hz, 2H), 3.66 (s, 4H), 1.60 (s, 6H). ¹³C NMR (101 MHz, DMSO-*d*₆) δ 183.37, 182.60, 167.34, 166.77, 158.99, 149.60, 137.46, 122.92, 121.84, 48.86, 48.14, 26.22, 23.74. HRMS: *m/z*: vypočteno pro C₁₅H₁₈N₃O₂⁺: 272,1394 [M + H]⁺; nalezeno: 272,1393.

3-(Benzylamino)-4-((pyridin-2-ylmethyl)amino)cyclobut-3-en-1,2-dion (**1h**)



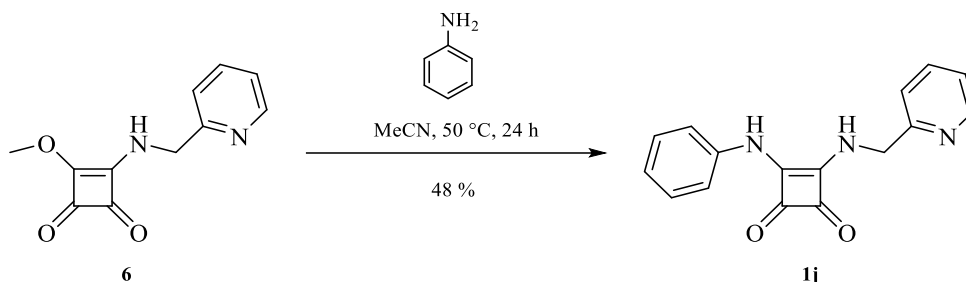
Prekurzor **6** (200mg; 0,916 mmol) byl rozpuštěn v MeCN (10 ml). Následně byl k roztoku přidán benzylamin (100 μl ; 0,916 mmol). Reakční směs byla míchána za RT po dobu 24 h. Produkt **1h** byl získán odsáním ze směsi a promytím MeCN. Produkt **1h** byl dosušen na lyofilizátoru. Produkt **1h** byl získán jako bílá pevná látka ve výtěžku 228,1 mg (85 %). ¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ 8.55 (d, *J* = 4.4 Hz, 1H), 7.91 (br. s, 1H), 7.80 (td, *J* = 5.89, 1.60 Hz, 1H), 7.41 – 7.26 (m, 8H), 4.83 (s, 2H), 4.73 (d, *J* = 6.0 Hz, 2H). ¹³C NMR (101 MHz, DMSO-*d*₆) δ 182.85, 182.67, 167.82, 167.57, 157.46, 149.13, 138.93, 137.09, 128.63, 127.49, 127.39, 122.61, 121.56, 48.24, 46.80. HRMS: *m/z*: vypočteno pro C₁₇H₁₆N₃O₂⁺: 294,1237 [M + H]⁺; nalezeno: 294,1236.

3-(Prop-2-yn-1-ylamino)-4-((pyridin-2-ylmethyl)amino)cyclobut-3-en-1,2-dion (**1i**)



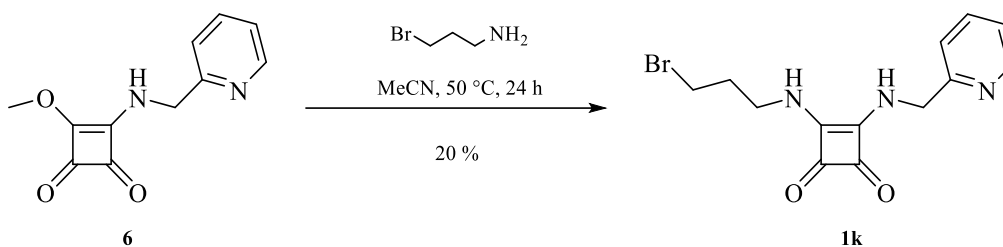
Prekurzor **6** (200 mg; 0,916 mmol) byl rozpuštěn v MeCN (10 ml). Následně byl k roztoku přidán propargylamin (58 μl ; 0,916 mmol). Reakční směs byla míchána za RT po dobu 24 h. Produkt **1i** byl získán odsáním ze směsi a promytím MeCN. Produkt **1i** byl dosušen na lyofilizátoru. Produkt **1i** byl získán jako bílá pevná látka ve výtěžku 67,7 mg (33 %). ¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ 8.57 (ddd, *J* = 4.8, 1.7, 0.9 Hz, 1H), 8.00 (br. s, 1H), 7.81 (td, *J* = 7.7, 1.8 Hz, 2H, splývá s -NH-), 7.37 (d, *J* = 7.8 Hz, 1H), 7.34 – 7.30 (m, 1H), 4.82 (d, *J* = 4.0 Hz, 2H), 4.37 (dd, *J* = 5.8, 2.2 Hz, 2H), 3.36 (t, *J* = 2.5 Hz, 1H). ¹³C NMR (101 MHz, DMSO-*d*₆) δ 183.59, 183.12, 168.54, 167.71, 158.00, 149.69, 137.65, 123.17, 122.09, 81.16, 75.73, 48.79, 33.26. HRMS: *m/z*: vypočteno pro C₁₃H₁₂N₃O₂⁺: 242,0924 [M + H]⁺; nalezeno: 242,0925.

3-(Phenylamino)-4-((pyridin-2-ylmethyl)amino)cyclobut-3-en-1,2-dion (**1j**)



Prekurzor **6** (200 mg; 0,916 mmol) byl rozpuštěn v MeCN (10 ml). Následně byl k roztoku přidán anilin (84 μ l; 0,916 mmol). Reakční směs byla míchána za stálého ohřevu na 50 °C po dobu 24 h. Produkt **1j** byl získán odsáním ze směsi a promytím MeCN. Produkt **1j** byl dosušen na lyofilizátoru. Produkt **1j** byl získán jako světle žlutá pevná látka ve výtěžku 122,2 mg (48 %). ^1H NMR (400 MHz, DMSO- d_6) δ 9.84 (s, 1H), 8.60 (d, $J = 4.5$ Hz, 1H), 8.21 (br. s, 1H), 7.84 (td, $J = 7.7, 1.5$ Hz, 1H), 7.44 (t, $J = 7.3$ Hz, 3H), 7.38 – 7.29 (m, 3H), 7.03 (t, $J = 7.3$ Hz, 1H), 4.94 (d, $J = 5.0$ Hz, 2H). ^{13}C NMR (101 MHz, DMSO- d_6) δ 184.05, 180.56, 169.09, 163.80, 156.94, 149.18, 139.02, 137.20, 129.31, 122.76, 122.61, 121.72, 118.02, 48.47. HRMS: m/z : vypočteno pro $\text{C}_{16}\text{H}_{14}\text{N}_3\text{O}_2^+$: 280,1081 $[\text{M} + \text{H}]^+$; nalezeno: 280,1080.

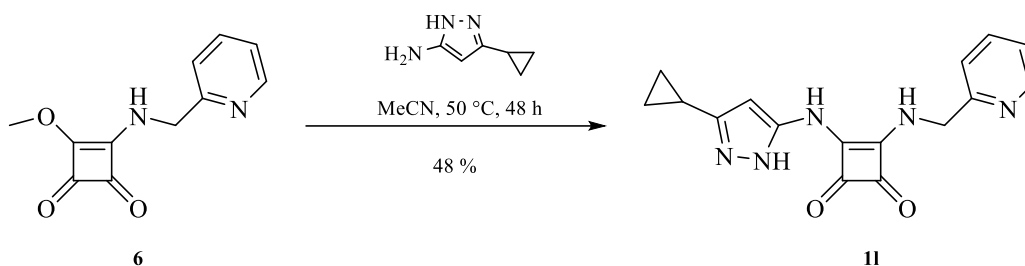
3-((3-Bromopropyl)amino)-4-((pyridin-2-ylmethyl)amino)cyclobut-3-en-1,2-dion (**1k**)



Prekurzor **6** (200 mg; 0,916 mmol) byl rozpuštěn v MeCN (10 ml). Následně byl k roztoku přidán 3-bromopropylamin (127 mg ; 0,916 mmol). Reakční směs byla míchána za stálého ohřevu na 50 °C po dobu 24 h. Vzniklá sraženina byla odsána a promyta MeCN. Produkt **1k** byl získán pomocí sloupcové kapalinové chromatografie po sorpci na silikagel (SiO_2 , MF: Tol/MeCN s přidavkem MeOH v celkovém poměru 9:2). Produkt **1k** byl dosušen na lyofilizátoru. Produkt **1k** byl získán jako bílá pevná látka ve výtěžku 59,7 mg (20 %). ^1H NMR (400 MHz, DMSO- d_6) δ 8.56 (ddd, $J = 4.8, 1.5, 0.8$ Hz, 1H), 8.01 (br. s, 1H), 7.81 (td, $J = 7.7, 1.8$ Hz, 1H), 7.70 (br. s, 1H), 7.38 (d, $J = 7.8$ Hz, 1H), 7.34 – 7.30 (m, 1H), 4.82 (d, $J = 4.9$ Hz, 2H), 3.62 (dd, $J = 12.5, 6.2$ Hz, 2H), 3.56 (t, $J =$

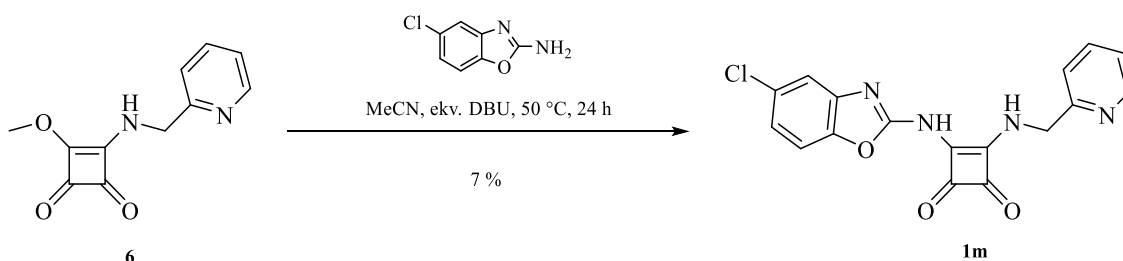
6.6 Hz, 2H), 2.12 – 2.04 (m, 2H). ^{13}C NMR (101 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) δ 182.71, 182.63, 167.91, 167.81, 160.01, 149.12, 137.10, 122.60, 121.56, 48.23, 41.76, 33.61, 31.47. HRMS: m/z : vypočteno pro $\text{C}_{13}\text{H}_{15}\text{BrN}_3\text{O}_2^+$: 324,0342 $[\text{M} + \text{H}]^+$; nalezeno: 324,0340.

3-((3-Cyklopropyl-1H-pyrazol-5-yl)amino)-4-((pyridin-2-ylmethyl)amino)cyclobut-3-en-1,2-dion (11)



Prekurzor **6** (200 mg; 0,916 mmol) byl rozpuštěn v MeCN (10 ml). Následně byl k roztoku přidán 3-cyklopropyl-1H-pyrazol-5-amin (115 mg; 0,916 mmol). Reakční směs byla míchána za stálého zahřevu na 50 °C po dobu 48 h. Produkt **11** byl získán odsáním ze směsi a promytím MeCN. Produkt **11** byl dosušen na lyofilizátoru. Produkt **11** byl získán jako světle bílá pevná látka ve výtěžku 134,6 mg (48 %). ^1H NMR (400 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) δ 12.20 (s, 1H), 10.48 (br. s, 1H), 8.86 (br. s, 1H), 8.63 – 8.51 (m, 1H), 7.81 (td, $J = 7.7, 1.8$ Hz, 1H), 7.40 (d, $J = 7.8$ Hz, 1H), 7.32 (dd, $J = 6.9, 5.1$ Hz, 1H), 5.69 (br. s, 1H), 4.94 (d, $J = 6.3$ Hz, 2H), 1.89 – 1.81 (m, 1H), 0.99 – 0.87 (m, 2H), 0.74 – 0.61 (m, 2H). ^{13}C NMR (101 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) δ 184.28, 168.50, 163.56, 157.40, 149.26, 148.24, 147.63, 137.11, 132.07, 122.56, 121.40, 90.42, 48.11, 7.85, 6.64. HRMS: m/z : vypočteno pro $\text{C}_{16}\text{H}_{16}\text{N}_5\text{O}_2^+$: 310,1299 $[\text{M} + \text{H}]^+$; nalezeno: 310,1300.

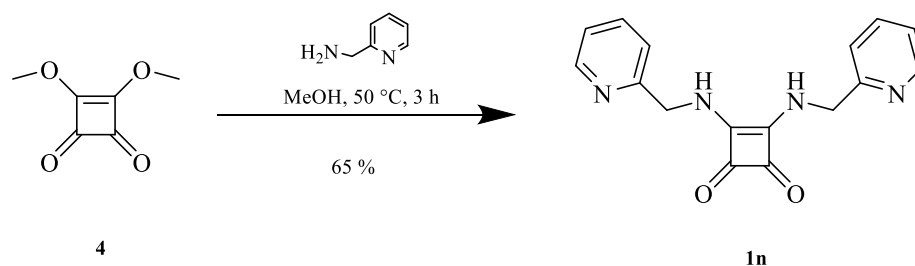
3-((5-Chlorbenzo[d]oxazol-2-yl)amino)-4-((pyridin-2-ylmethyl)amino)cyclobut-3-en-1,2-dion (1m)



Prekurzor **6** (200 mg; 0,916 mmol) byl rozpuštěn v MeCN (10 ml). Následně byl k roztoku přidán 5-chlorobenzoxazol-2-amin (154 mg; 0,916 mmol) a DBU (137 μl ; 0,916 mmol). Reakční směs byla míchána za stálého ohřevu na 50 °C po dobu 24 h. Po uplynutí

této doby bylo ze směsi odpařeno rozpouštědlo. Produkt **1m** byl získán pomocí sloupcové kapalinové chromatografie po sorpci na silikagel (SiO₂, MF: DCM/MeOH grad.). Produkt **1m** byl dosušen na lyofilizátoru. Produkt **1m** byl získán jako nažloutlá pevná látka ve výtěžku 21,2 mg (7 %). ¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ 9.33 (t, *J* = 6.2 Hz, 1H), 8.61 – 8.58 (m, 1H), 7.83 (m, 1H), 7.61 (d, *J* = 8.6 Hz, 1H), 7.58 (d, *J* = 2.1 Hz, 1H), 7.46 (d, *J* = 7.8 Hz, 1H), 7.34 (dd, *J* = 6.8, 5.0 Hz, 1H), 7.25 (dd, *J* = 8.6, 2.2 Hz, 1H), 5.01 (d, *J* = 6.2 Hz, 2H). ¹³C NMR (101 MHz, DMSO-*d*₆) δ 187.96, 181.59, 171.10, 160.00, 157.43, 157.06, 149.04, 147.02, 141.82, 137.07, 128.77, 122.77, 122.58, 121.31, 117.10, 111.28, 48.14. HRMS: *m/z*: vypočteno pro C₁₇H₁₂ClN₄O₃⁺: 355,0592 [M + H]⁺; nalezeno: 355,0591.

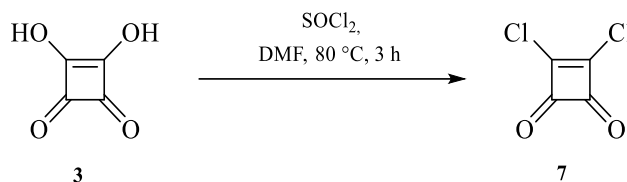
3-((Pyridin-2-ylamino)methyl)-4-((pyridin-2-ylmethyl)amino)cyklobut-3-en-1,2-dion (**1n**)



Dimethoxy derivát kyseliny squarové **4** (200 mg; 1,41 mmol) byl rozpuštěn v MeOH (10 ml). Do vzniklého roztoku byl poté pomalu a za stálého míchání přidán 2-aminomethylpyridin (290 μl; 2,82 mmol). Baňka s reakční směsí byla poté míchána za stálého ohřevu na 50 °C po dobu 3 h. Produkt **1n** byl získán odpařením rozpouštědla, purifikací pomocí sloupcové kapalinové chromatografie (SiO₂, MF: DCM/MeOH 9:1) a dosušením na lyofilizátoru. Produkt **1n** byl získán jako bílá pevná látka ve výtěžku 269,7 mg (65 %). ¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ 9.35 (d, *J* = 6.7 Hz, 2H), 8.54 (d, *J* = 4.4 Hz, 2H), 7.80 (td, *J* = 7.7, 1.7 Hz, 2H), 7.37 (d, *J* = 7.8 Hz, 2H), 7.31 (dd, *J* = 7.0, 5.2 Hz, 2H), 4.85 (d, *J* = 6.4 Hz, 4H). ¹³C NMR (101 MHz, DMSO-*d*₆) δ 178.77, 168.85, 168.54, 157.41, 149.13, 137.01, 122.56, 121.47, 48.33. HRMS: *m/z*: vypočteno pro C₁₆H₁₅N₄O₂⁺: 295,1190 [M + H]⁺; nalezeno: 295,1188.

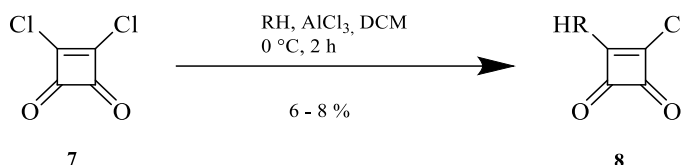
10 Arylové deriváty squaramidu

10.1 Převedení kyseliny squarové na její dichlorderivát



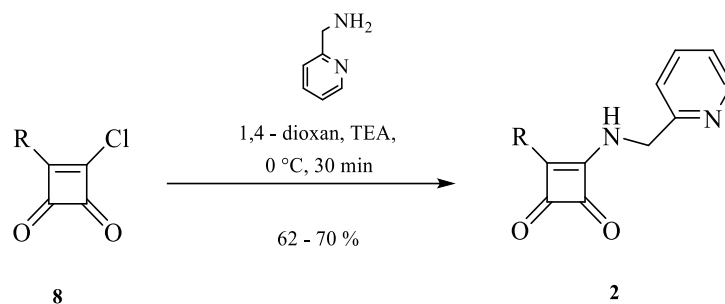
Kyselina squarová **3** (1 g; 8,77 mmol) byla navážena do baňky a přelita SOCl_2 (1,28 ml; 17,54 mmol). Ke směsi byl přikápnut DMF (katalytické množství). Takto připravená směs byla míchána pod zpětným chladičem za stálého ohřevu na 80 °C po dobu 3 hodin za formace produktu **7**. Nicméně jeho přítomnost nebyla dokazována, pro jeho nestálost, žádnými analytickými metodami. S celou reakční směsí bylo konsektivně pokračováno v reakční sekvenci.

10.2 Substituce chloru arylem



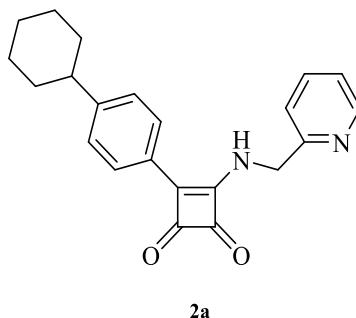
Reakční směs dichlorderivátu kyseliny squarové **7** (8,77 mmol teor.) byla rozdisolvována v 10 ml DCM. Vzniklý roztok byl ochlazen na 0 °C a při této teplotě byl k roztoku přidán AlCl_3 (0,529 g, 2,19 mmol) a methoxybenzen (8,77 mmol). Po přidání všech reagentů byla reakční směs míchána za RT po dobu 1,5 h. Po uplynutí této doby byl obsah baňky nalit na led a produkt **8** byl po rozpuštění ledu extrahován do 2 x 20 ml DCM. Organická vrstva byla poté promyta 10 ml solanky a 10 ml vody. DCM byl finálně odpařen. Produkt **8** byl získán pomocí sloupcové kapalinové chromatografie. (SiO_2 , MF: Hex/EtOAc grad.).

10.3 Substituce chloru 2-aminomethylpyridinem



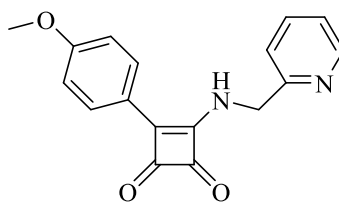
Reakční směs s prekurzorem **8** (0,45 mmol teor.) byla rozpuštěna v 1,4 – dioxanu (10 ml) a roztok byl ochlazen na 0° C. Za této teploty byl k roztoku přidán TEA (0,67 mmol) a 2-aminomethylpyridin (0,91 mmol). Směs byla poté 30 minut míchána za RT. Ze směsi bylo finálně odpařeno rozpouštědlo a odparek byl rozsuspendován v 5 ml vody. Suspenze byla přefiltrována a promyta vodou. Produkt **2** byl získán pomocí sloupcové kapalinové chromatografie (SiO₂, MF: Hex/EtOAc grad.) a dosušen na lyofilizátoru.

3-(4-Cyclohexylphenyl)-4-((pyridin-2-ylmethyl)amino)cyclobut-3-ene-1,2-dion (**2a**)



Produkt **2a** byl získán jako bílá pevná látka ve výtěžku 42 mg (2 %). ¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ 9.56 (t, *J* = 6.2 Hz, 1H), 8.55 (ddd, *J* = 4.8, 1.6, 0.8 Hz, 1H), 7.96 (d, *J* = 8.3 Hz, 2H), 7.81 (td, *J* = 7.7, 1.8 Hz, 1H), 7.44 (d, *J* = 7.9 Hz, 1H), 7.40 (d, *J* = 8.3 Hz, 2H), 7.32 (ddd, *J* = 7.4, 4.8, 0.8 Hz, 1H), 5.01 (d, *J* = 6.2 Hz, 2H), 2.57 (td, *J* = 11.3, 2.4 Hz, 1H, splývá s DMSO), 1.79 (d, *J* = 11.5 Hz, 4H), 1.71 (d, *J* = 12.4 Hz, 1H), 1.50 – 1.18 (m, 5H). ¹³C NMR (101 MHz, DMSO-*d*₆) δ 193.67, 189.44, 179.63, 162.64, 157.67, 151.17, 149.80, 137.58, 127.88, 127.50, 126.92, 123.24, 122.13, 49.41, 44.41, 34.14, 26.75, 26.01, 18.19. HRMS: *m/z*: vypočteno pro C₂₂H₂₃N₂O₂⁺: 347,1754 [M + H]⁺; nalezeno: 347,1752.

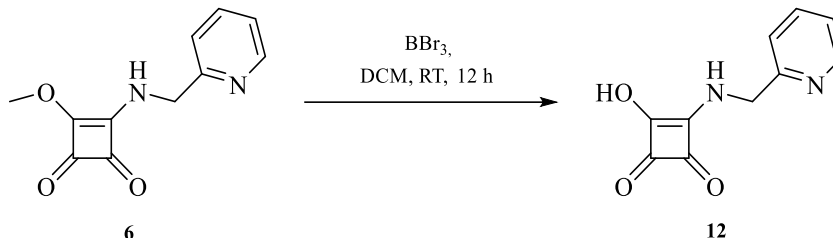
3-(4-Methoxyphenyl)-4-((pyridin-2-ylmethyl)amino)cyclobut-3-ene-1,2-dione (2b)



2b

Produkt **2c** byl získán jako bílá pevná látka ve výtěžku 109,2 mg (4 %). ^1H NMR (400 MHz, DMSO- d_6) δ 9.51 (t, $J = 6.1$ Hz, 1H), 8.55 (ddd, $J = 4.8, 1.6, 0.8$ Hz, 1H), 8.07 – 8.00 (m, 2H), 7.81 (td, $J = 7.7, 1.8$ Hz, 1H), 7.45 (d, $J = 7.8$ Hz, 1H), 7.32 (ddd, $J = 7.5, 4.9, 0.9$ Hz, 1H), 7.13 – 7.09 (m, 2H), 5.01 (d, $J = 6.1$ Hz, 2H), 3.84 (s, 3H). ^{13}C NMR (101 MHz, DMSO- d_6) δ 192.48, 188.44, 178.63, 178.55, 162.12, 161.14, 157.20, 149.24, 137.03, 128.27, 122.68, 122.08, 121.60, 114.56, 55.45, 48.82. HRMS: m/z : vypočteno pro $\text{C}_{17}\text{H}_{15}\text{N}_2\text{O}_3^+$: 295,1077 $[\text{M} + \text{H}]^+$; nalezeno: 295,1075.

10.4 Převedení methoxy skupiny na squarovém kruhu na hydroxy skupinu



Methoxy derivát **6** (0,5 g; 2,29 mmol) byl rozpuštěn v DCM (5 ml). Roztok byl poté ochlazen v Dewarově nádobě naplněné acetonem přisypáváním suchého ledu až na -56 °C. Při této teplotě byl k roztoku přidán BBr_3 (1,25 ml; 10,8 mmol). Vše za inertní atmosféry. Směs byla poté ještě další 1,5 hodiny, za stálého míchání, chlazena v Dewarově nádobě, poté byla umístěna na 10 hodin na míchačku za RT. Po uplynutí této doby byla, v baňce vzniklá sraženina, odsána a promyta DCM. Produkt byl částečně purifikován krystalizací z DCM, nepodařilo se jej však vyčistit dokonale.

ZÁVĚR

Předložená bakalářská práce se zabývá návrhem, syntézou a biologickou aktivitou nových derivátů squaramidu cílících na mykobakteriální ATP synthasu.

V teoretické části práce byla pozornost věnována popsaným syntetickým metodám, které vedou k přípravě derivátů kyseliny squarové. Dále byly diskutovány antibakteriální vlastnosti látek obsahujících ve své struktuře squarový kruh a na závěr této části bakalářské práce byla podrobně popsána struktura mykobakteriální ATP synthasy.

Diskusní část předkládané práce byla rozdělena do několika klíčových oblastí. Nejprve byly dle známých struktur cílících na mykobakteriální ATP synthasu navrženy nové deriváty a poté ve spolupráci s kolegy z Katedry fyzikální chemie PřF UP dokovány do aktivního místa tohoto enzymu. Následovala syntetická část práce, kde bylo připraveno celkem 16 derivátů. V první sérii látek bylo připraveno celkem 14 derivátů squaramidu pomocí jednoduché a univerzální metody s možností zavedení různorodých substituentů. Pro druhou sérii bylo navrženo několik látek, avšak vzhledem k problematické syntéze byly nakonec připraveny pouze deriváty **2**.

Všechny připravené finální sloučeniny byly testovány na svou antimykobakteriální aktivitu proti *M. tuberculosis* H37Ra. Tři z připravených struktur vykazují zajímavé hodnoty aktivit, jedná se o látky **1j** ($IC_{50} = 10,65$), **2a** a **2b**. U látky **1j** jsou známy kompletní výsledky antimykobakteriální aktivity, sloučeniny **2a** a **2b** jsou stále testovány (v prvním kole testů byly vyhodnoceny jako aktivní).

Látky byly také testovány na svou aktivitu proti několika Gram-pozitivním a Gram-negativním bakteriálním kmenům (*Bacillus subtilis*, *Micrococcus luteus*, *Mycobacterium vaccae*, *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa* a *Escherichia coli*). V prvním kole biologických testů byly detekovány dva pozitivní výsledky, a to u látky **1m** proti *M. Vaccae* a **2b** proti *E. Coli*. U obou tedy byla určena i jejich hodnota minimální inhibiční koncentrace (MIC).

Vzhledem k zajímavým výsledkům antimykobakteriální aktivity bude tato práce v nejbližší době rozšířena o další látky a kompletní výsledky poté publikovány v impaktovaném časopise.

SEZNAM ZKRATEK

DBU	1,8diazabicyklo(5.4.0)undec-7-en
DCM	dichlormethan
DMF	dimethylformamid
DMSO	dimethylsulfoxid
ekv.	ekvivalent
EtOAc	ethylacetát
Hex	hexan
IC	inhibiční koncentrace
MeCN	acetonitril
MeOH	methanol
Met	metyl
MF	mobilní fáze
MIC	minimální inhibiční koncentrace
NMR	nukleární magnetická resonance
RT	laboratorní teplota
SAR	vztah mezi strukturou a reaktivitou
<i>t</i> -but	terc-butyl
TEA	triethylamin
Tol	toluen

SEZNAM POUŽITÝCH ZDROJŮ

- (1) Han, X.; Zhou, H.-B.; Dong, C. Applications of Chiral Squaramides: From Asymmetric Organocatalysis to Biologically Active Compounds. *Chem. Rec.* **2016**, *16* (2), 897–906.
- (2) Ian Storer, R.; Aciro, C.; Jones, L. H. Squaramides: Physical Properties, Synthesis and Applications. *Chem. Soc. Rev.* **2011**, *40* (5), 2330–2346.
- (3) Wurm, F. R.; Klok, H. A. Be Squared: Expanding the Horizon of Squaric Acid-Mediated Conjugations. *Chem. Soc. Rev.* **2013**, *42* (21), 8220–8236.
- (4) Sopeña, S.; Martin, E.; Escudero-Adán, E. C.; Kleij, A. W. Pushing the Limits with Squaramide-Based Organocatalysts in Cyclic Carbonate Synthesis. *ACS Catal.* **2017**, *7* (5), 3532–3539.
- (5) Lynch, D. E.; Hamilton, D. G. Microreview: Pyrrol-3-Yl Squaraines (Including Indol-3-Yl Squaraines). *J. Heterocycl. Chem.* **2018**, *55* (6), 1249–1262.
- (6) Malerich, J. P.; Hagihara, K.; Rawal, V. H. Chiral Squaramide Derivatives Are Excellent Hydrogen Bond Donor Catalysts. *J. Am. Chem. Soc.* **2008**, *130* (44), 14416–14417.
- (7) Mukkanti, A.; Periasamy, M. Methods of Synthesis of Cyclobutenediones. *Ark. (Gainesville, FL, United States)* **2005**, No. 11, 48–77.
- (8) Rouf, A.; Tanyeli, C. Squaramide Based Organocatalysts in Organic Transformations. *Curr. Org. Chem.* **2016**, *20* (28), 2996–3013.
- (9) Karahan, S.; Tanyeli, C. Squaramide Catalyzed α -Chiral Amine Synthesis. *Tetrahedron Lett.* **2018**, *59* (42), 3725–3737.
- (10) Chen, P. H.; Dong, G. Cyclobutenones and Benzocyclobutenones: Versatile Synthons in Organic Synthesis. *Chem. - A Eur. J.* **2016**, *22* (51), 18290–18315.

- (11) Elliott, T. S.; Slowey, A.; Ye, Y.; Conway, S. J. The Use of Phosphate Bioisosteres in Medicinal Chemistry and Chemical Biology. *Medchemcomm* **2012**, *3* (7), 735–751.
- (12) Kovac, P.; Xu, P. Controlled and Highly Efficient Preparation of Carbohydrate-Based Vaccines: Squaric Acid Chemistry Is the Way to Go. *Carbohydr. Chem.* **2017**, *42*, 83–115.
- (13) Ohlsen, K.; Oelschlaeger, T. A.; Hacker, J.; Khan, A. S. Carbohydrate Receptors of Bacterial Adhesins: Implications and Reflections. *Top. Curr. Chem.* **2009**, *288* (Glycoscience and Microbial Adhesion), 109–120.
- (14) Grabosch, C.; Hartmann, M.; Schmidt-Lassen, J.; Lindhorst, T. K. Squaric Acid Monoamide Mannosides as Ligands for the Bacterial Lectin FimH: Covalent Inhibition or Not? *ChemBioChem* **2011**, *12* (7), 1066–1074.
- (15) Buurman, E. T.; Foulk, M. A.; Gao, N.; Laganas, V. A.; McKinney, D. C.; Moustakas, D. T.; Rose, J. A.; Shapiro, A. B.; Fleming, P. R. Novel Rapidly Diversifiable Antimicrobial RNA Polymerase Switch Region Inhibitors with Confirmed Mode of Action in *Haemophilus Influenzae*. *J. Bacteriol.* **2012**, *194* (20), 5504–5512.
- (16) Kojima, K.; Kurata, H.; Tabata, K.; Chemistry, M. Chart I Synthesis Derivative 12a MsOCH₂CHCHCH₂NHBOC C NHBO LiAlH Piperidine 6 : R = Me. **1996**, *6* (15), 1795–1798.
- (17) Kijima, H.; Isobe, Y.; Muramatsu, M.; Yokomori, S.; Suzuki, M.; Higuchi, S. Structure-Activity Characterization of an H₂-Receptor Antagonist, 3-Amino-4-[4-[4-(1-Piperidinomethyl)-2-Pyridyloxy]-Cis-2butenylamino]-3-Cyclobutene-1,2-Dione Hydrochloride (IT-066), Involved in the Insurmountable Antagonism against Histamine-Induced P. *Biochem. Pharmacol.* **1998**, *55* (2), 151–157.
- (18) Lindhorst, T. K.; Bruegge, K.; Fuchs, A.; Sperling, O. A Bivalent Glycopeptide to Target Two Putative Carbohydrate Binding Sites on FimH. *Beilstein J. Org. Chem.* **2010**, *6*, 801–809.

- (19) Molodtsov, V.; Fleming, P. R.; Eyermann, C. J.; Ferguson, A. D.; Foulk, M. A.; McKinney, D. C.; Masse, C. E.; Buurman, E. T.; Murakami, K. S. X-Ray Crystal Structures of Escherichia Coli RNA Polymerase with Switch Region Binding Inhibitors Enable Rational Design of Squaramides with an Improved Fraction Unbound to Human Plasma Protein. *J. Med. Chem.* **2015**, *58* (7), 3156–3171.
- (20) Tantry, S. J.; Markad, S. D.; Shinde, V.; Bhat, J.; Balakrishnan, G.; Gupta, A. K.; Ambady, A.; Raichurkar, A.; Kedari, C.; Sharma, S.; et al. Discovery of Imidazo[1,2-a]Pyridine Ethers and Squaramides as Selective and Potent Inhibitors of Mycobacterial Adenosine Triphosphate (ATP) Synthesis. *J. Med. Chem.* **2017**, *60* (4), 1379–1399.
- (21) Lu, M.; Lu, Q.-B.; Honek, J. F. Squarate-Based Carbocyclic Nucleosides: Syntheses, Computational Analyses and Anticancer/Antiviral Evaluation. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2017**, *27* (2), 282–287.
- (22) Liu, Z.; Wang, Y.; Han, Y.; Liu, L.; Jin, J.; Yi, H.; Li, Z.; Jiang, J.; Boykin, D. W. Synthesis and Antitumor Activity of Novel 3,4-Diaryl Squaric Acid Analogs. *Eur. J. Med. Chem.* **2013**, *65*, 187–194.
- (23) Quintana, M.; Alegre-Requena, J. V; Marques-Lopez, E.; Herrera, R. P.; Triola, G. Squaramides with Cytotoxic Activity against Human Gastric Carcinoma Cells HGC-27: Synthesis and Mechanism of Action. *Medchemcomm* **2016**, *7* (3), 550–561.
- (24) Soukariéh, F.; Nowicki, M. W.; Bastide, A.; Poyry, T.; Jones, C.; Dudek, K.; Patwardhan, G.; Meullenet, F.; Oldham, N. J.; Walkinshaw, M. D.; et al. Design of Nucleotide-Mimetic and Non-Nucleotide Inhibitors of the Translation Initiation Factor EIF4E: Synthesis, Structural and Functional Characterisation. *Eur. J. Med. Chem.* **2016**, *124*, 200–217.
- (25) Grabner, S.; Modéc, B.; Cemazar, M.; Bukovec, N. Crystal Structures and Cytotoxicity of Isopropylamine Pt(II) Complexes: A Trinuclear Squarato-Bridged [Pt₃(M₂-C₄O₄)₃(H₂NPri)₆]·3H₂O and a Mononuclear Cis-[Pt(NO₃)₂(H₂NPri)₂]. *J. Inorg. Biochem.* **2005**, *99* (7), 1465–1471.

- (26) Villalonga, P.; Fernandez de Mattos, S.; Ramis, G.; Obrador-Hevia, A.; Sampedro, A.; Rotger, C.; Costa, A. Cyclosquaramides as Kinase Inhibitors with Anticancer Activity. *ChemMedChem* **2012**, *7* (8), 1472–1480, S1472/1-S1472/20.
- (27) Ribeiro, C. J. A.; Kumar, S. P.; Gut, J.; Goncalves, L. M.; Rosenthal, P. J.; Moreira, R.; Santos, M. M. M. Squaric Acid/4-Aminoquinoline Conjugates: Novel Potent Antiplasmodial Agents. *Eur. J. Med. Chem.* **2013**, *69*, 365–372.
- (28) Marin, C.; Ximenis, M.; Ramirez-Macias, I.; Rotger, C.; Urbanova, K.; Olmo, F.; Martin-Escolano, R.; Rosales, M. J.; Canas, R.; Gutierrez-Sanchez, R.; et al. Effective Anti-Leishmanial Activity of Minimalist Squaramide-Based Compounds. *Exp. Parasitol.* **2016**, *170*, 36–49.
- (29) McGuirk, C. M.; Mendez-Arroyo, J.; Lifschitz, A. M.; Mirkin, C. A. Allosteric Regulation of Supramolecular Oligomerization and Catalytic Activity via Coordination-Based Control of Competitive Hydrogen-Bonding Events. *J. Am. Chem. Soc.* **2014**, *136* (47), 16594–16601.
- (30) Martin, B.; Lai, X.; Baettig, U.; Neumann, E.; Kuhnle, T.; Porter, D.; Robinson, R.; Hatto, J.; D'Souza, A.-M.; Steward, O.; et al. Early Process Development of a Squaramide-Based CXCR2 Receptor Antagonist. *Org. Process Res. Dev.* **2015**, *19* (8), 1038–1043.
- (31) Xie, J.; Comeau, A. B.; Seto, C. T. Squaric Acids: A New Motif for Designing Inhibitors of Protein Tyrosine Phosphatases. *Org. Lett.* **2004**, *6* (1), 83–86.
- (32) Lopez, C.; Ximenis, M.; Orvay, F.; Rotger, C.; Costa, A. Supramolecular Hydrogels Based on Minimalist Amphiphilic Squaramide-Squaramates for Controlled Release of Zwitterionic Biomolecules. *Chem. - A Eur. J.* **2017**, *23* (31), 7590–7594.
- (33) Tong, C.; Liu, T.; Saez Talens, V.; Noteborn, W. E. M.; Sharp, T. H.; Hendrix, M. M. R. M.; Voets, I. K.; Mummery, C. L.; Orlova, V. V.; Kieltyka, R. E. Squaramide-Based Supramolecular Materials for Three-Dimensional Cell Culture of Human Induced Pluripotent Stem Cells and Their Derivatives. *Biomacromolecules* **2018**, *19* (4), 1091–1099.

- (34) Cai, X.-J.; Li, Z.; Chen, W.-H. Tripodal Squaramide Conjugates as Highly Effective Transmembrane Anion Transporters. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2017**, *27* (9), 1999–2002.
- (35) Deng, L.-Q.; Lu, Y.-M.; Zhou, C.-Q.; Chen, J.-X.; Wang, B.; Chen, W.-H. Synthesis and Potent Ionophoric Activity of a Squaramide-Linked Bis(Choloyl) Conjugate. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2014**, *24* (13), 2859–2862.
- (36) Wu, X.; Busschaert, N.; Wells, N. J.; Jiang, Y.-B.; Gale, P. A. Dynamic Covalent Transport of Amino Acids across Lipid Bilayers. *J. Am. Chem. Soc.* **2015**, *137* (4), 1476–1484.
- (37) Elmes, R. B. P.; Jolliffe, K. A. Amino Acid-Based Squaramides for Anion Recognition. *Supramol. Chem.* **2015**, *27* (5–6), 321–328.
- (38) Busschaert, N.; Park, S.-H.; Baek, K.-H.; Choi, Y. P.; Park, J.; Howe, E. N. W.; Hiscock, J. R.; Karagiannidis, L. E.; Marques, I.; Felix, V.; et al. A Synthetic Ion Transporter That Disrupts Autophagy and Induces Apoptosis by Perturbing Cellular Chloride Concentrations. *Nat. Chem.* **2017**, *9* (7), 667–675.
- (39) Lu, P.; Lill, H.; Bald, D. ATP Synthase in Mycobacteria: Special Features and Implications for a Function as Drug Target. *Biochim. Biophys. Acta - Bioenerg.* **2014**, *1837* (7), 1208–1218.
- (40) Smutny, E. J.; Roberts, J. D. Phenylcyclobutadienoquinone. *J. Am. Chem. Soc.* **1955**, *77*, 3420.
- (41) Hinshaw, J. C. Synthesis of Cyclobutenedione. *J. Chem. Soc. [Section] D Chem. Commun.* **1971**, No. 12, 630.
- (42) Dehmlow, E. V.; Schell, H. G. Preparation of 3-Alkoxy-4-Alkyl-3-Cyclobutene-1,2-Diones. *Chem. Ber.* **1980**, *113* (1), 1–8.
- (43) Bou, A.; Pericas, M. A.; Serratosa, F. Synthetic Applications of Di-Tert-Butoxyethyne. II. New Syntheses of Squaric, Semisquaric, and Croconic Acids. *Tetrahedron Lett.* **1982**, *23* (3), 361–364.

- (44) Ooms, P. H. J.; Scheeren, J. W.; Nivard, R. J. F. Chemistry of Tetraalkoxyethenes. II. Synthesis of 3,3,4,4-Tetraalkoxy-1-Cyanocyclobutenes and 1,1,4,4-Tetraalkoxy-2-Cyanobutadienes. *Synthesis (Stuttg)*. **1975**, No. 4, 263–264.
- (45) Bellus, D. Synthesis and Reactivity of Compounds with Cyclobutane Ring(s). 11. [2 + 2] Cycloadditions of Tetraalkoxyethylenes with Ketenes: A General Route to 2-Substituted 1-Hydroxycyclobut-1-ene-3,4-Diones. *J. Am. Chem. Soc.* **1978**, *100* (25), 8026.
- (46) Cohen, S.; Lacher, J. R.; Park, J. D. Diketocyclobutenediol. *J. Am. Chem. Soc.* **1959**, *81*, 3480.
- (47) Scharf, H. D. Halovinylene Carbonates in the Organic Synthesis. *Angew. Chemie* **1974**, *86* (16), 567–580.
- (48) Camps, F.; Llebaria, A.; Moreto, J. M.; Ricart, S.; Vinas, J. M. An Efficient Synthesis of 3,4-Dioxocyclobutenecarboxylate Derivatives. *Tetrahedron Lett.* **1990**, *31* (17), 2479–2482.
- (49) Suzuki, Y.; Takizawa, T. Cycloaddition Reactions of Isocyanides with Diphenylacetylene Using Transition-Metal Complexes. *J. Chem. Soc. Chem. Commun.* **1972**, No. 14, 837–838.
- (50) Periasamy, M.; Rameshkumar, C.; Radhakrishnan, U. Novel Reaction of the [HFe₃(CO)₁₁]- Reagent with Alkynes: A New Synthesis of Cyclobutenediones. *Tetrahedron Lett.* **1997**, *38* (41), 7229–7232.
- (51) Rameshkumar, C.; Periasamy, M. Amine Induced Carbonylation of Alkynes to Cyclobutenediones Using Fe₃(CO)₁₂. *Tetrahedron Lett.* **2000**, *41* (15), 2719–2722.
- (52) Breslow, R.; Altman, L. J.; Krebs, A.; Mohacsi, E.; Murata, I.; Peterson, R. A.; Posner, J. Substituted Cyclopropanones. *J. Am. Chem. Soc.* **1965**, *87* (6), 1326–1331.
- (53) Kojima, K.; Nakajima, K.; Kurata, H.; Tabata, K.; Utsui, Y. Synthesis of a Piperidinomethylthiophene Derivative as H₂-Antagonist with Inhibitory Activity against Helicobacter Pylori. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **1996**, *6* (15), 1795–1798.

- (54) Ueda, Y.; Mikkilineni, A.; Partyka, R. A. Synthesis of α -(S)-Acylamino-N-(Hydroxydioxocyclobutenyl)- β -Lactams as Potential Antibiotics. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **1992**, 2 (12), 1541–1546.
- (55) Alberts, B.; Alexander, J.; Lewis, J.; Raff, M.; Roberts, K.; Walter, P. *Molecular Biology of the Cell, 4th Edition.*; Wiley, 2004.
- (56) Gajadeera, C. S.; Weber, J. Escherichia Coli F1Fo-ATP Synthase with a b/ δ Fusion Protein Allows Analysis of the Function of the Individual b Subunits. *J. Biol. Chem.* **2013**, 288 (37), 26441–26447.
- (57) Pallen, M. J. Evolutionary Links between FliH/YscL-like Proteins from Bacterial Type III Secretion Systems and Second-Stalk Components of the FoF1 and Vacuolar ATPases. *Protein Sci.* **2006**, 15 (4), 935–941.
- (58) Del Rizzo, P. A.; Bi, Y.; Dunn, S. D. ATP Synthase b Subunit Dimerization Domain: A Right-Handed Coiled Coil with Offset Helices. *J. Mol. Biol.* **2006**, 364 (4), 735–746.
- (59) Del Rizzo, P. A.; Bi, Y.; Dunn, S. D.; Shilton, B. H. The “Second Stalk” of Escherichia Coli ATP Synthase: Structure of the Isolated Dimerization Domain. *Biochemistry* **2002**, 41 (21), 6875–6884.
- (60) Meier, T.; Morgner, N.; Matthies, D.; Pogoryelov, D.; Keis, S.; Cook, G. M.; Dimroth, P.; Brutschy, B. A Tridecameric c Ring of the Adenosine Triphosphate (ATP) Synthase from the Thermoalkaliphilic Bacillus Sp. Strain TA2.A1 Facilitates ATP Synthesis at Low Electrochemical Proton Potential. *Mol. Microbiol.* **2007**, 65 (5), 1181–1192.
- (61) Willis, I. M.; Moir, R. D. Integration of Nutritional and Stress Signaling Pathways by Maf1. *Trends Biochem. Sci.* **2007**, 32 (2), 51–53.
- (62) Grandgirard, J.; Poinso, D.; Krespi, L.; Nénon, J. P.; Cortesero, A. M. Costs of Secondary Parasitism in the Facultative Hyperparasitoid Pachycrepoideus Dubius: Does Host Size Matter? *Entomol. Exp. Appl.* **2002**, 103 (3), 239–248.
- (63) Mitome, N.; Suzuki, T.; Hayashi, S.; Yoshida, M. Thermophilic ATP Synthase Has a Decamer C-Ring : Indication of Noninteger 10 : 3 H⁺ ATP Ratio And. *Pnas* **2004**, 101 (33), 12159–12164.

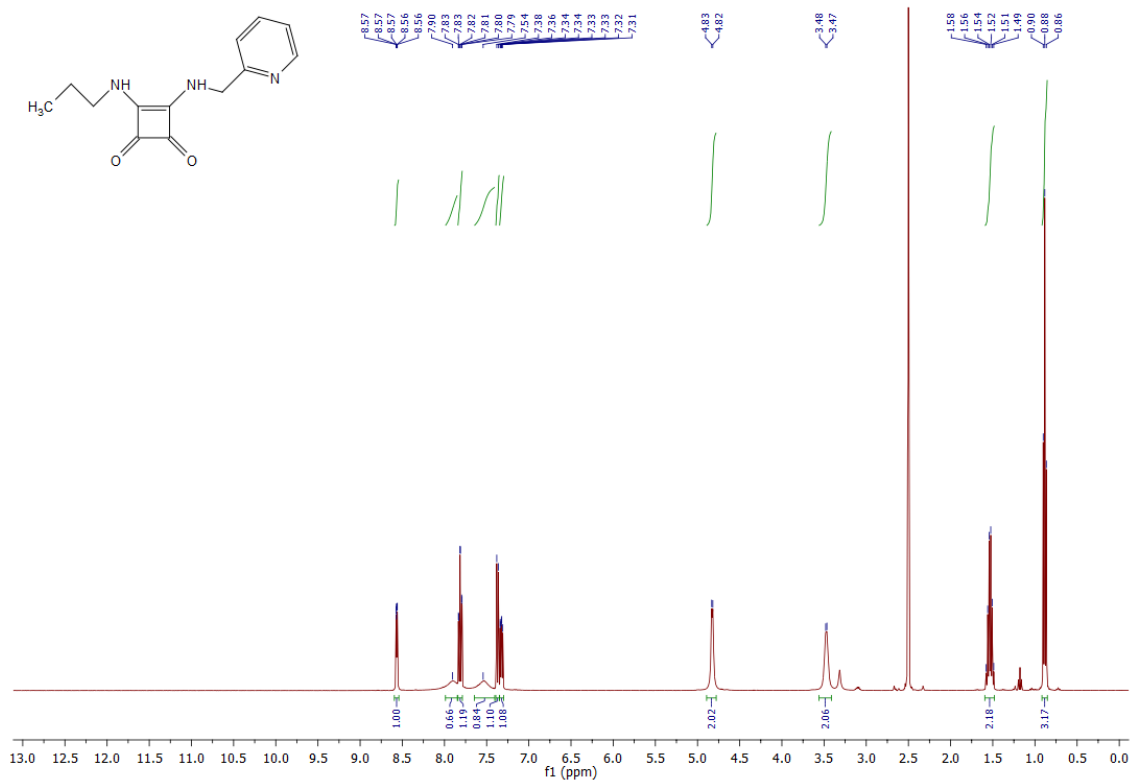
- (64) Jiang, W.; Hermolin, J.; Fillingame, R. H. The Preferred Stoichiometry of c Subunits in the Rotary Motor Sector of Escherichia Coli ATP Synthase Is 10. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2001**, *98* (9), 4966–4971.
- (65) Lill, H.; Nelson, N. The Atp1 and Atp2 Operons of the Cyanobacterium Synechocystis Sp. PCC 6803. *Plant Mol. Biol.* **1991**, *17* (4), 641–652.
- (66) Cozens, A. L.; Walker, J. E. The Organization and Sequence of the Genes for ATP Synthase Subunits in the Cyanobacterium Synechococcus 6301. Support for an Endosymbiotic Origin of Chloroplasts. *J. Mol. Biol.* **1987**, *194* (3), 359–383.
- (67) Peng, G.; Bostina, M.; Radermacher, M.; Rais, I.; Karas, M.; Michel, H. Biochemical and Electron Microscopic Characterization of the F1F0 ATP Synthase from the Hyperthermophilic Eubacterium Aquifex Aeolicus. *FEBS Lett.* **2006**, *580* (25), 5934–5940.
- (68) Lu, P.; Lill, H.; Bald, D. ATP Synthase in Mycobacteria: Special Features and Implications for a Function as Drug Target. *Biochim. Biophys. Acta, Bioenerg.* **2014**, *1837* (7), 1208–1218.
- (69) Singh, S.; Roy, K. K.; Khan, S. R.; Kashyap, V. K.; Sharma, A.; Jaiswal, S.; Sharma, S. K.; Krishnan, M. Y.; Chaturvedi, V.; Lal, J.; et al. Novel, Potent, Orally Bioavailable and Selective Mycobacterial ATP Synthase Inhibitors That Demonstrated Activity against Both Replicating and Non-Replicating M. Tuberculosis. *Bioorg. Med. Chem.* **2015**, *23* (4), 742–752.
- (70) Kumar, S.; Mehra, R.; Sharma, S.; Bokolia, N. P.; Raina, D.; Nargotra, A.; Singh, P. P.; Khan, I. A. Screening of Antitubercular Compound Library Identifies Novel ATP Synthase Inhibitors of Mycobacterium Tuberculosis. *Tuberc. (Oxford, United Kingdom)* **2018**, *108*, 56–63.
- (71) Denton, R. M.; An, J.; Adeniran, B. Phosphine Oxide-Catalysed Chlorination Reactions of Alcohols under Appel Conditions. *Chem. Commun.* **2010**, *46* (17), 3025–3027.

- (72) Smith, R. A.; Hertzog, D. L.; Osterhout, M. H.; Ladouceur, G. H.; Korpusik, M.; Bobko, M. A.; Jones, J. H.; Phelan, K.; Romero, R. H.; Hundertmark, T.; et al. Optimization of the 4-Aryl Group of 4-Aryl-Pyridine Glucagon Antagonists: Development of an Efficient, Alternative Synthesis. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2002**, *12* (9), 1303–1306.

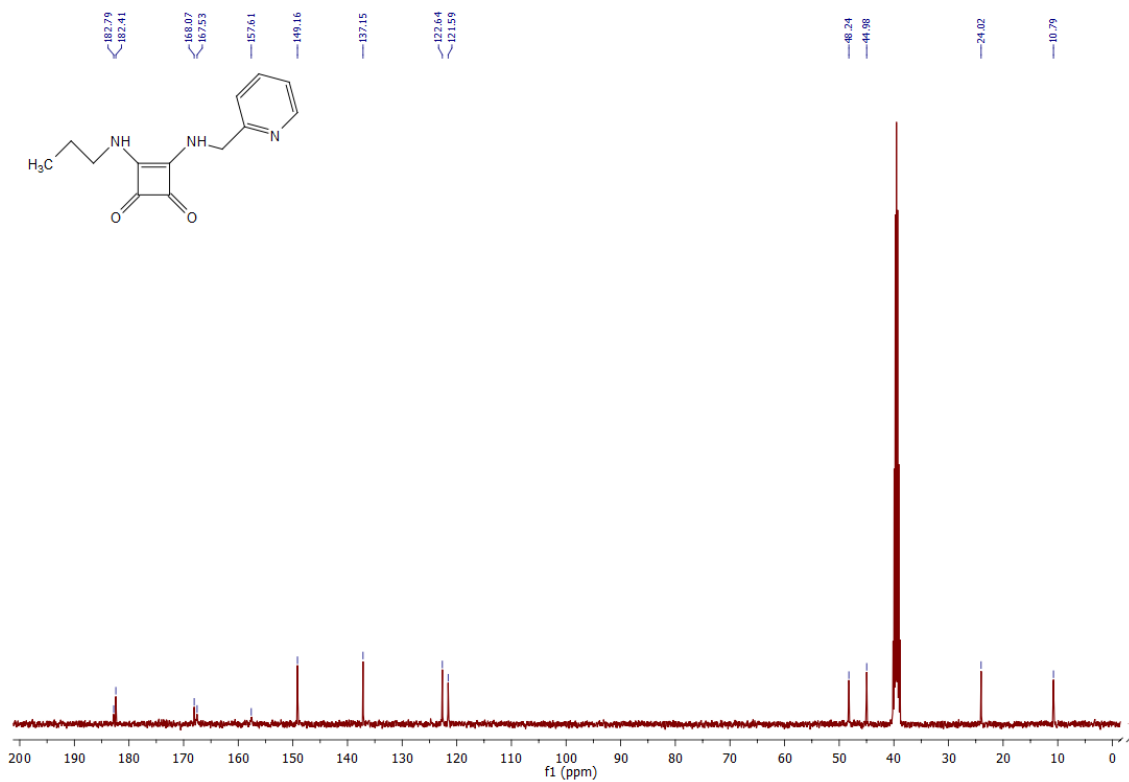
PŘÍLOHY



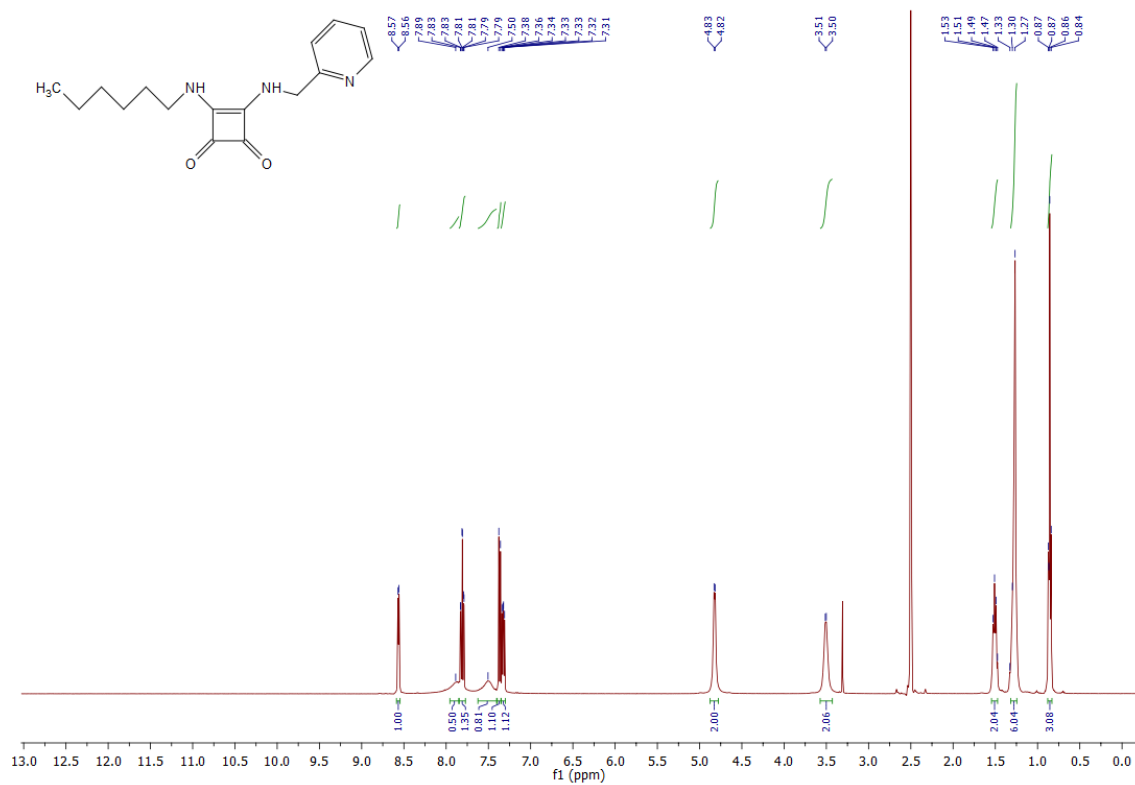
Spektrum 1: ¹H spektrum látky 1a



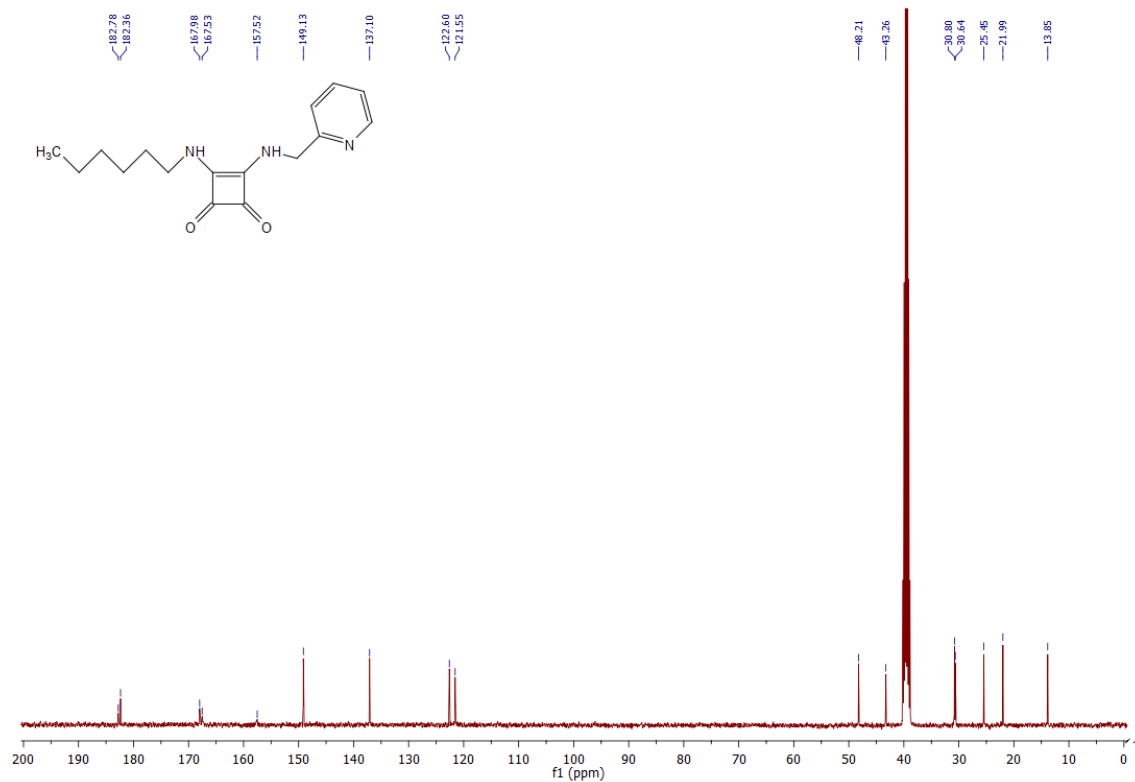
Spektrum 2: ¹³C spektrum látky 1a



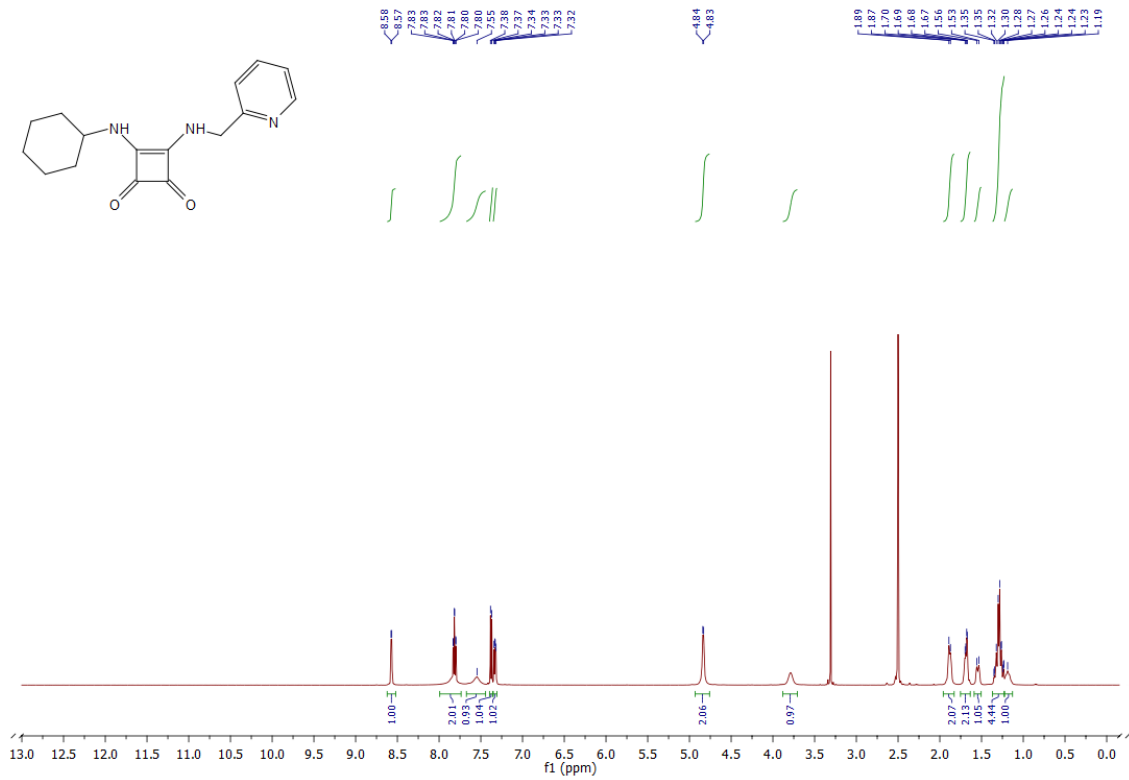
Spektrum 3: ^1H spektrum látky **1b**



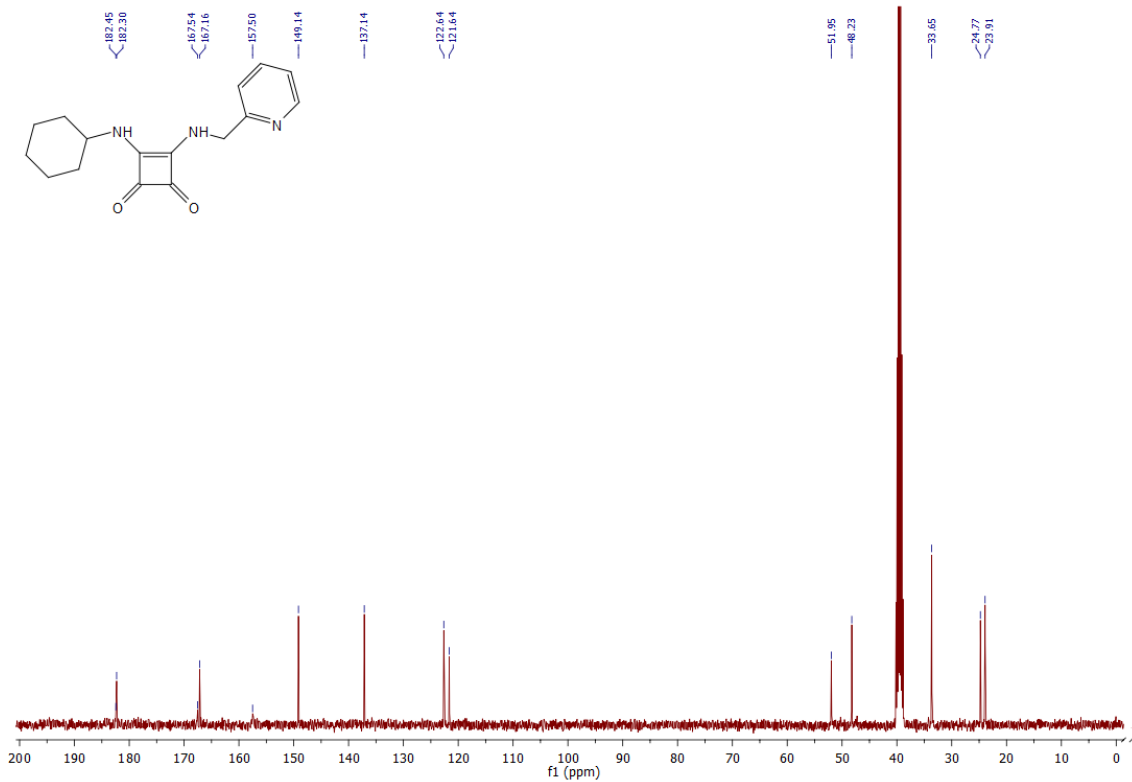
Spektrum 4: ^{13}C spektrum látky **1b**



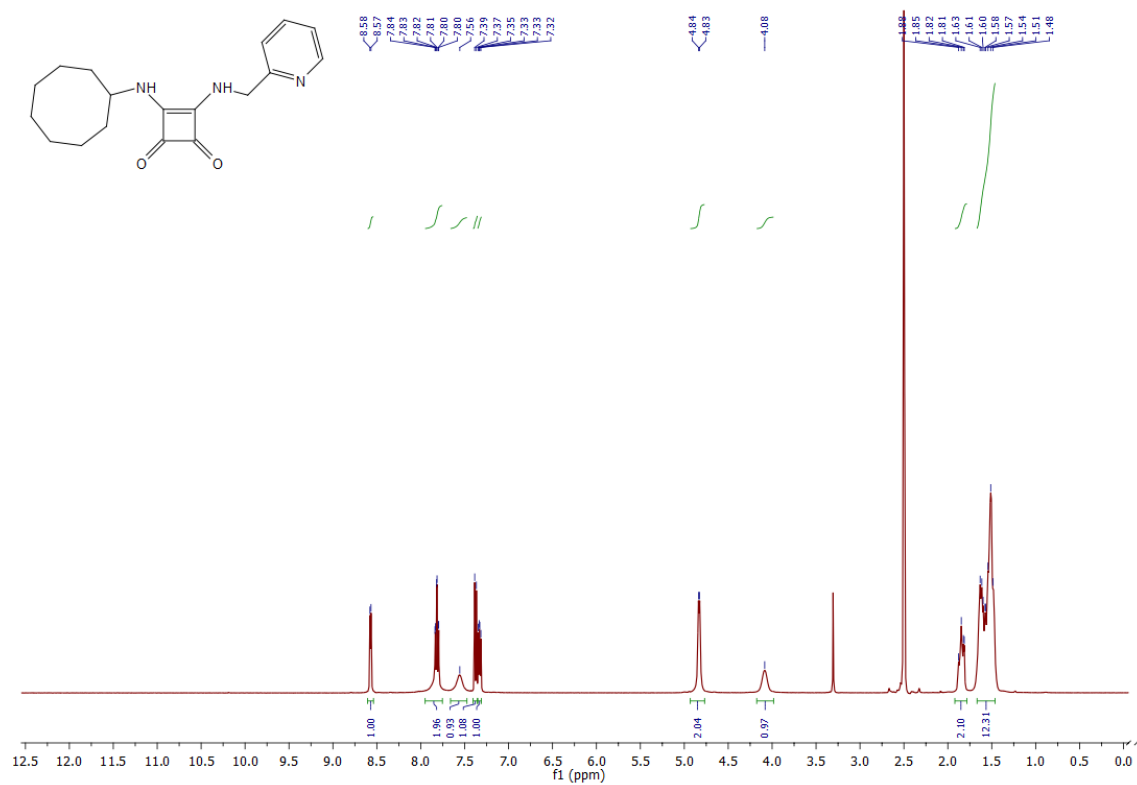
Spektrum 5: ^1H spektrum látky **1c**



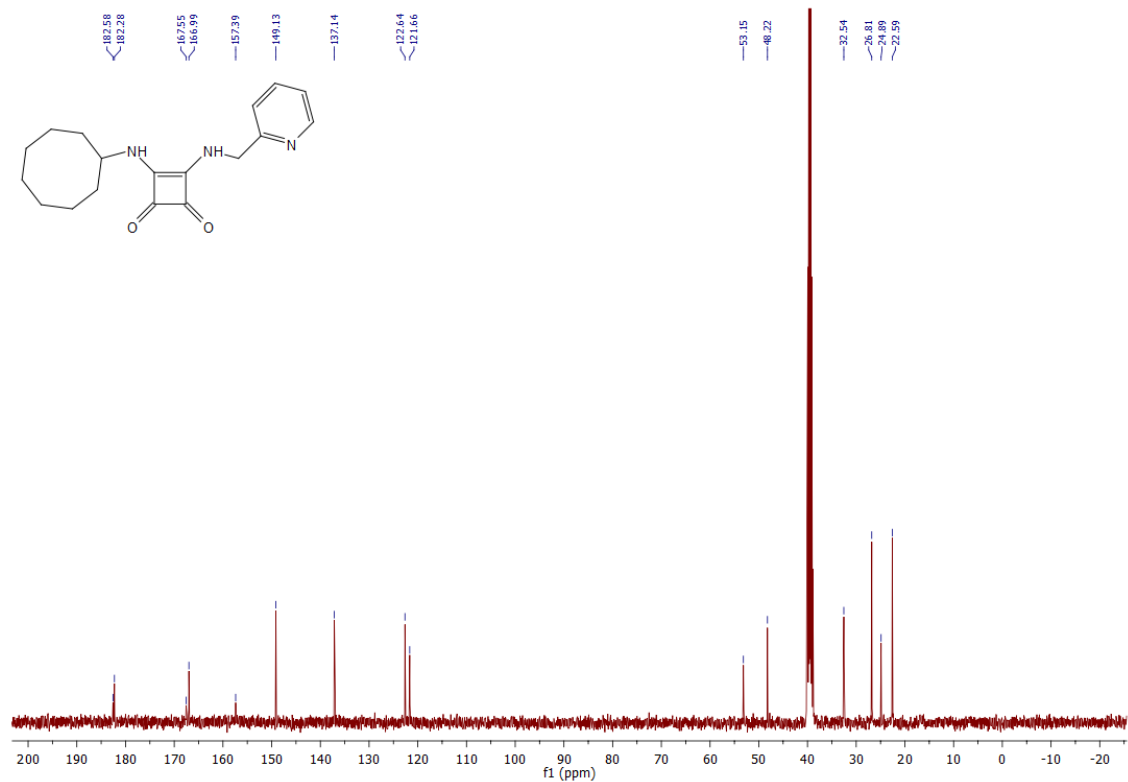
Spektrum 6: ^{13}C spektrum látky **1c**



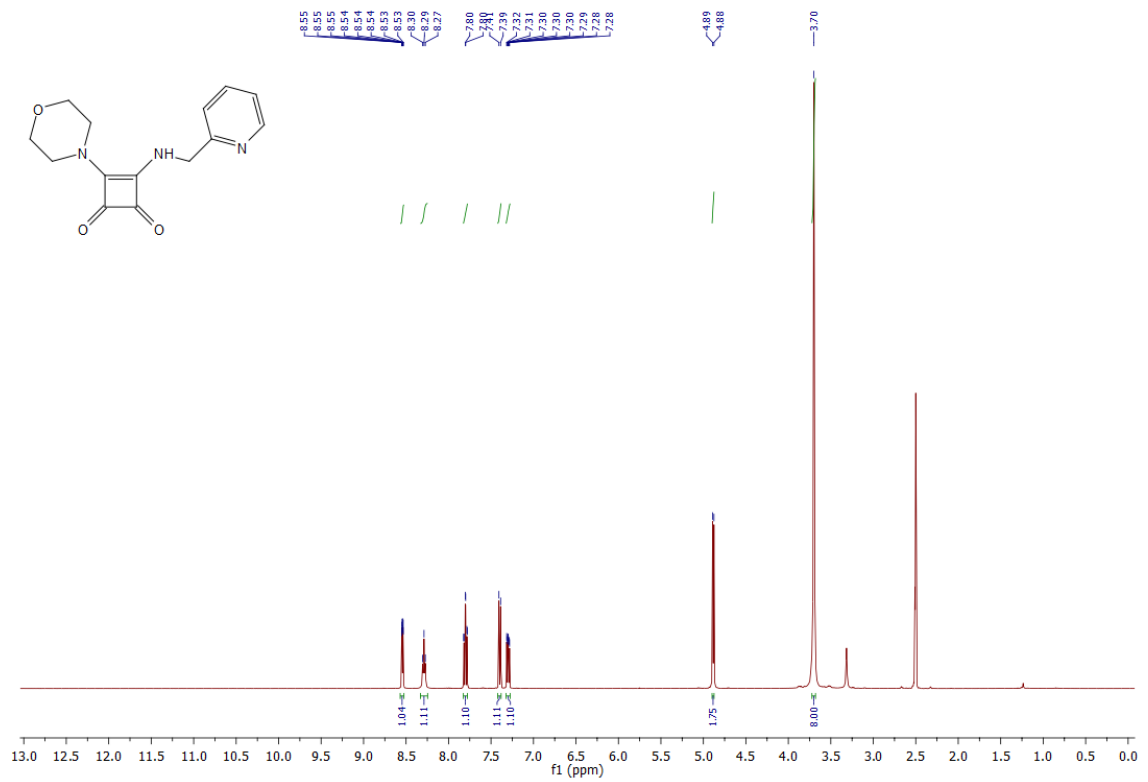
Spektrum 7: ¹H spektrum látky 1d



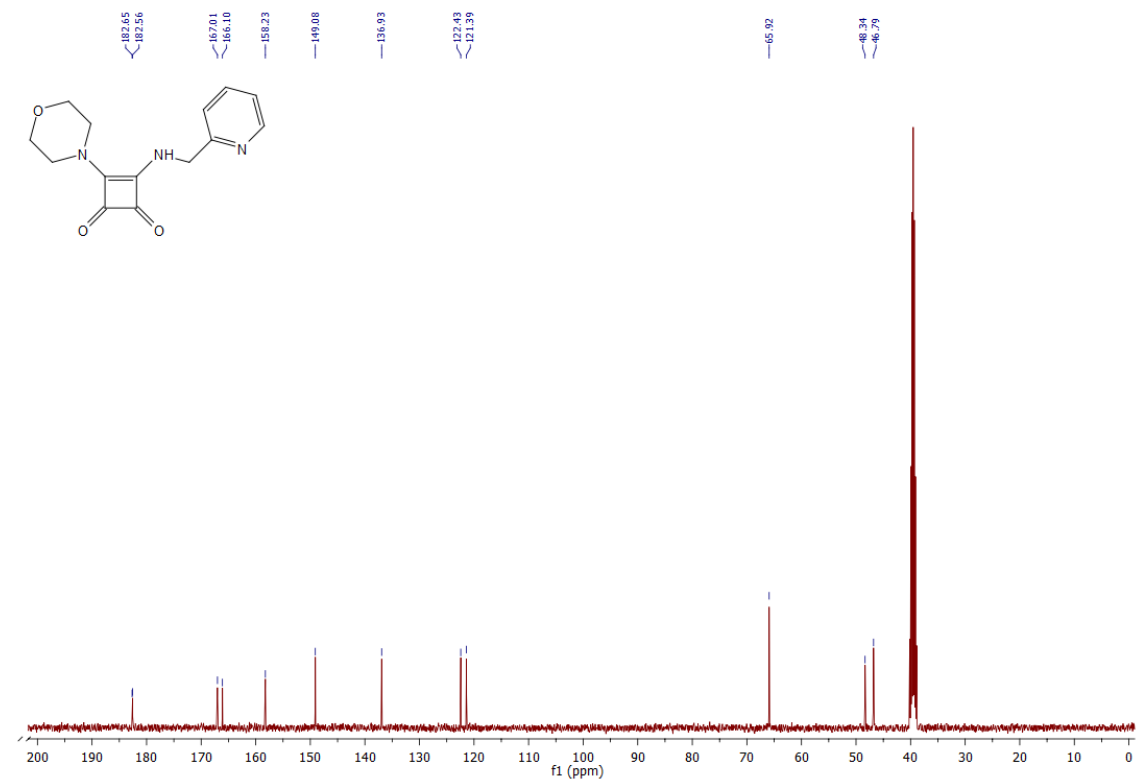
Spektrum 8: ¹³C spektrum látky 1d



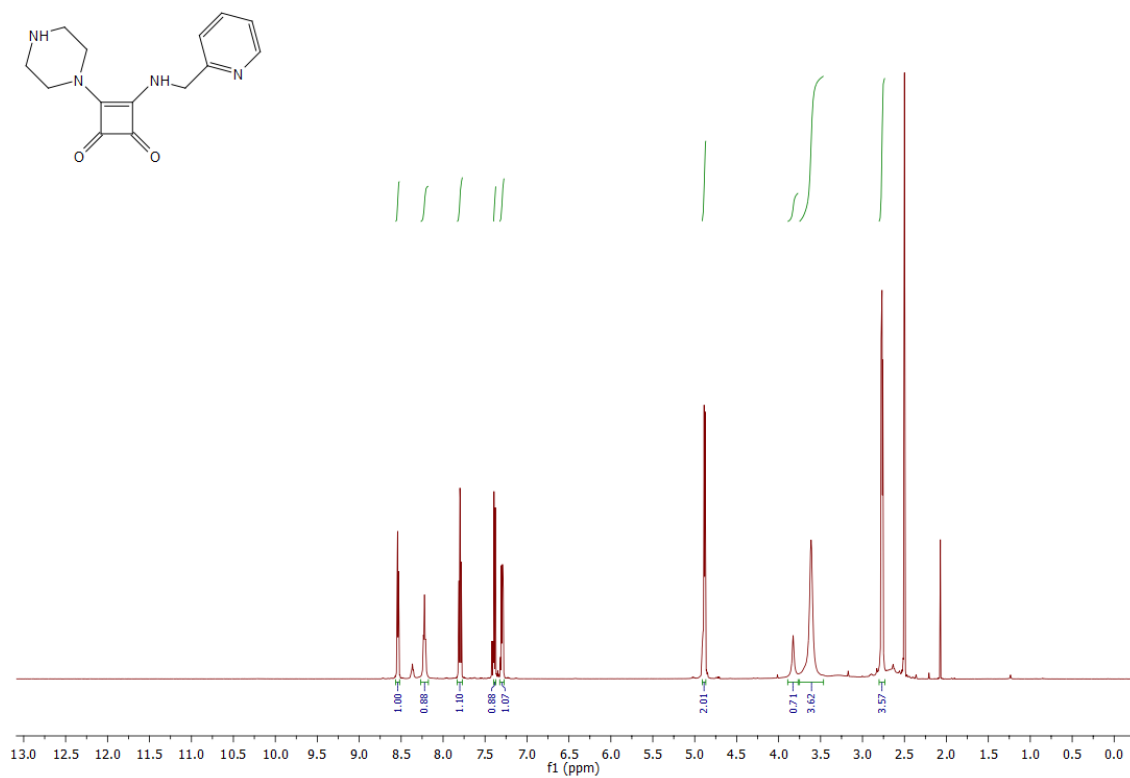
Spektrum 9: ^1H spektrum látky **1e**



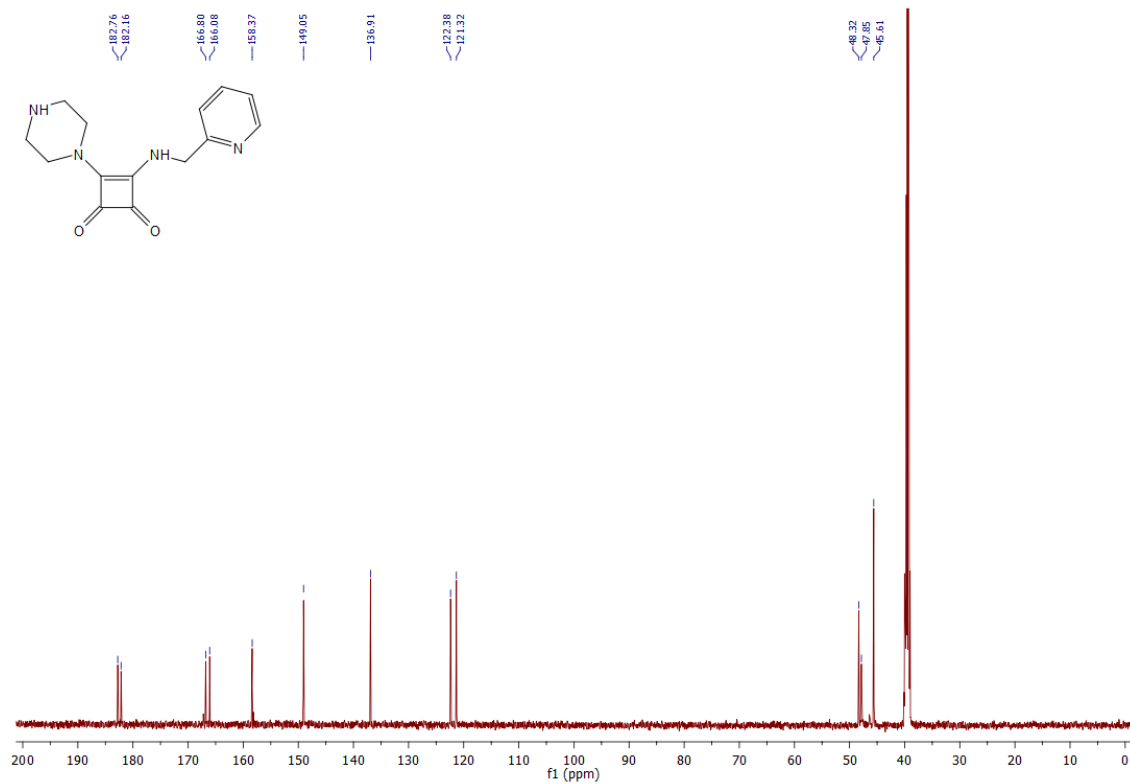
Spektrum 10: ^{13}C spektrum látky **1e**



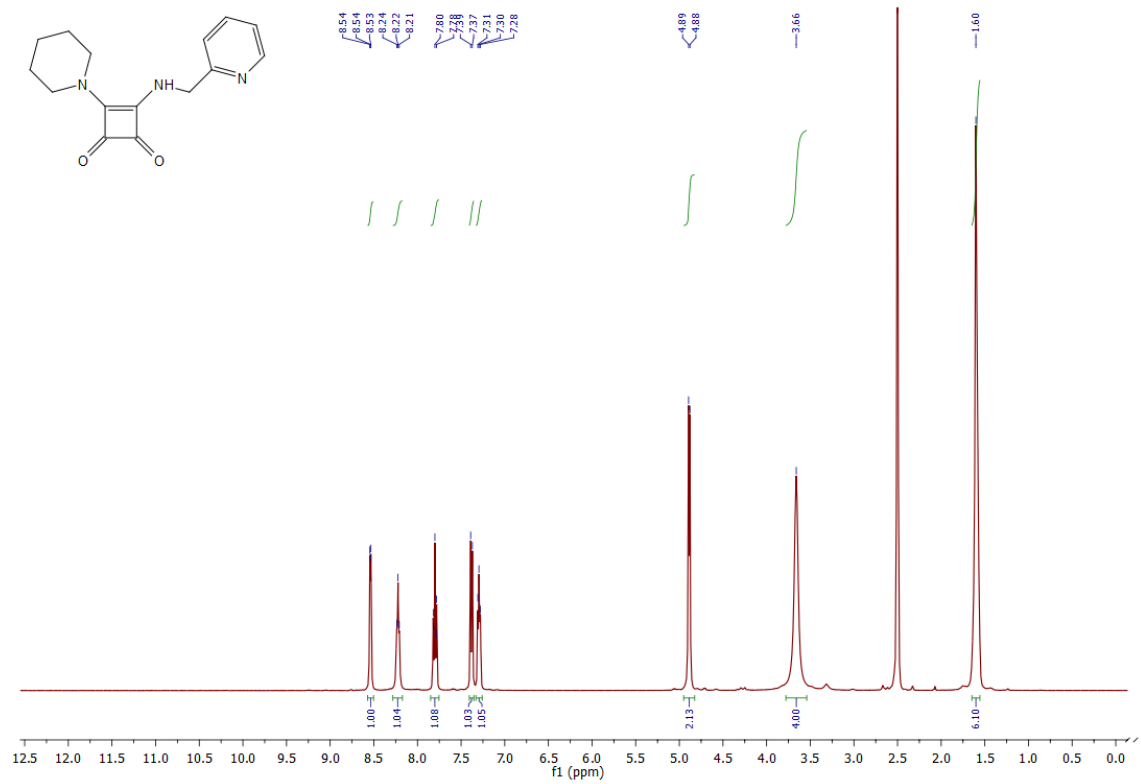
Spektrum 11: ^1H spektrum látky **1f**



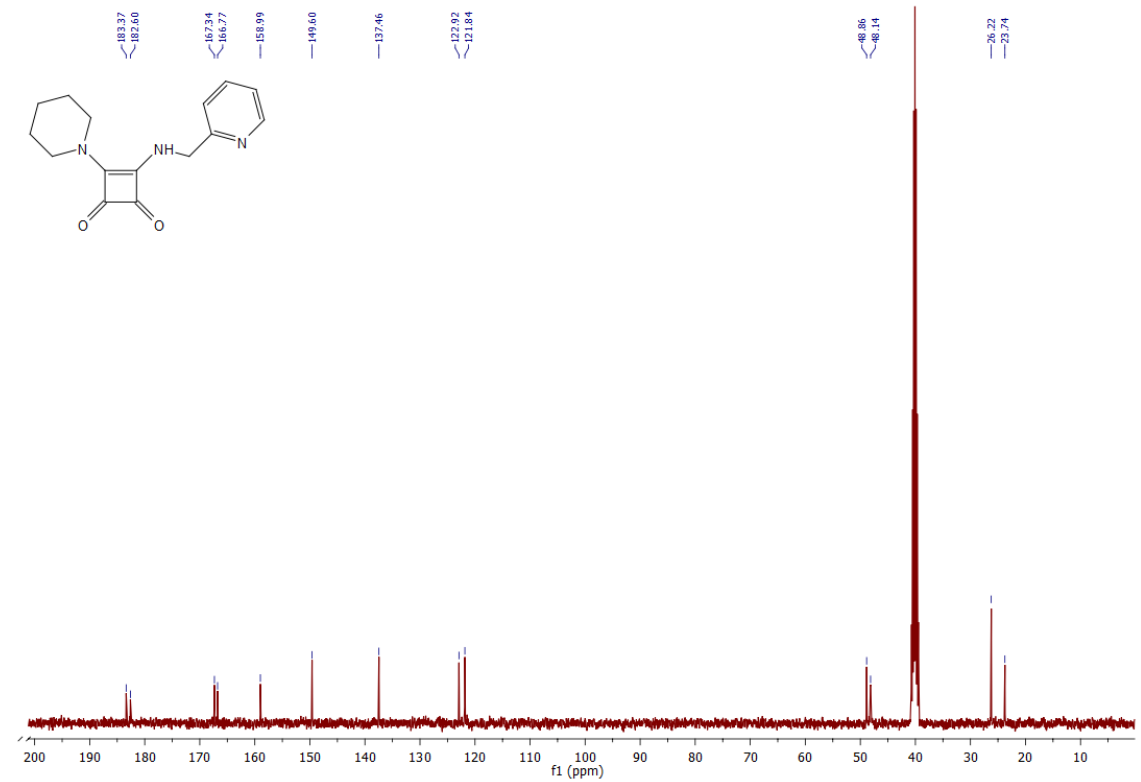
Spektrum 12: ^{13}C spektrum látky **1f**



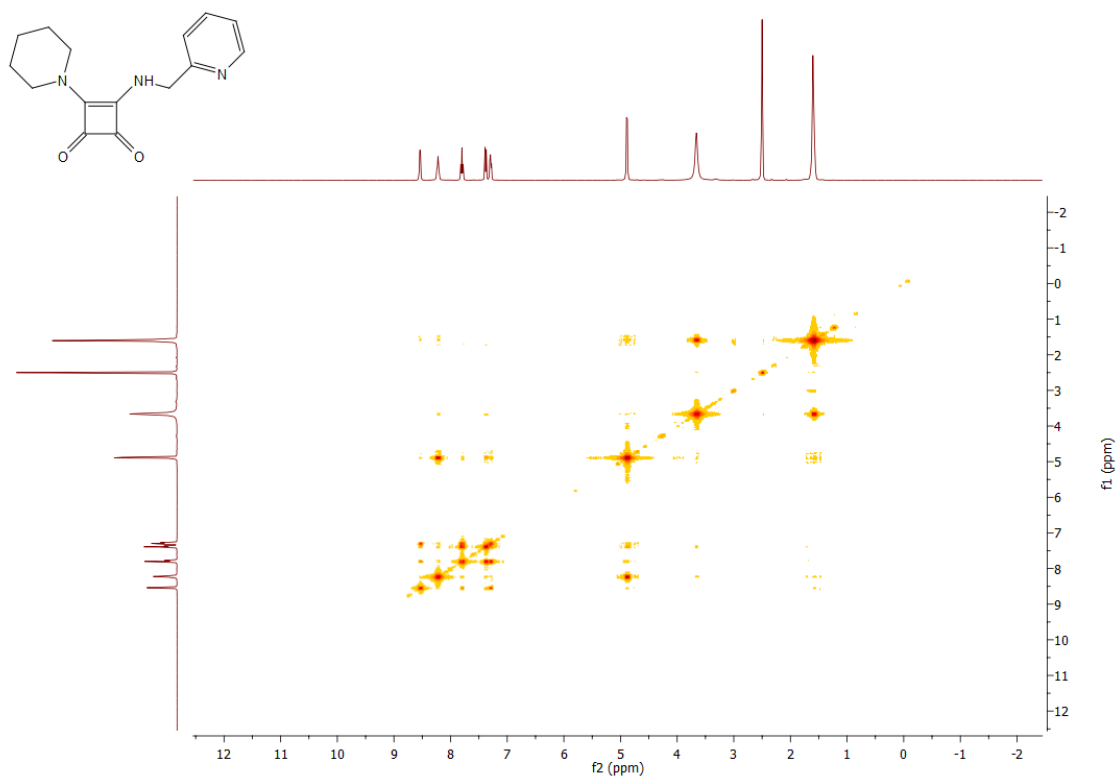
Spektrum 13: ^1H spektrum látky **1g**



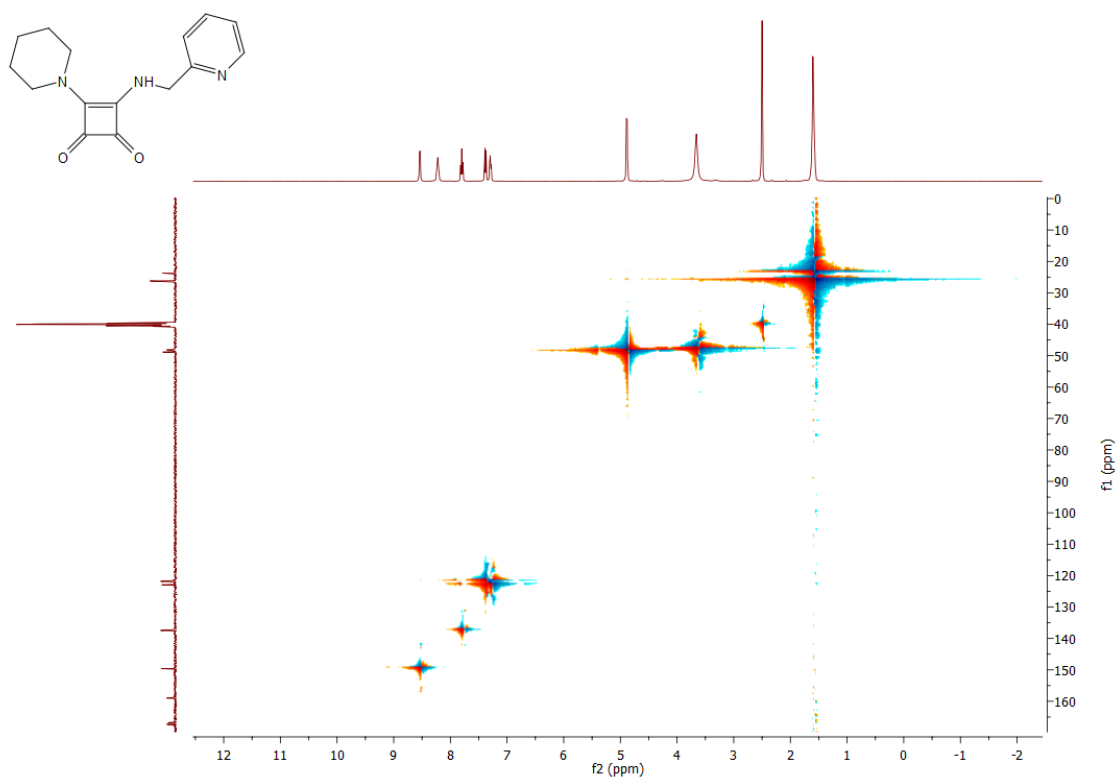
Spektrum 14: ^{13}C spektrum látky **1g**



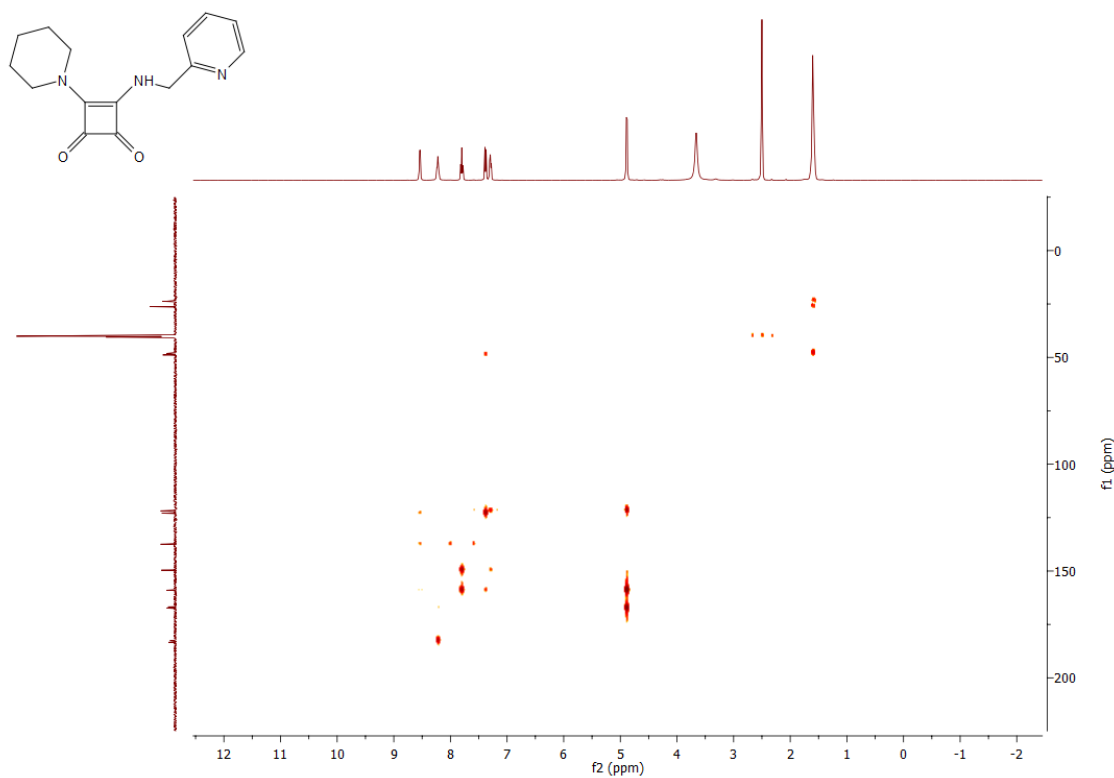
Spektrum 15: $^1\text{H} - ^1\text{H}$ COSY spektrum látky **1g**



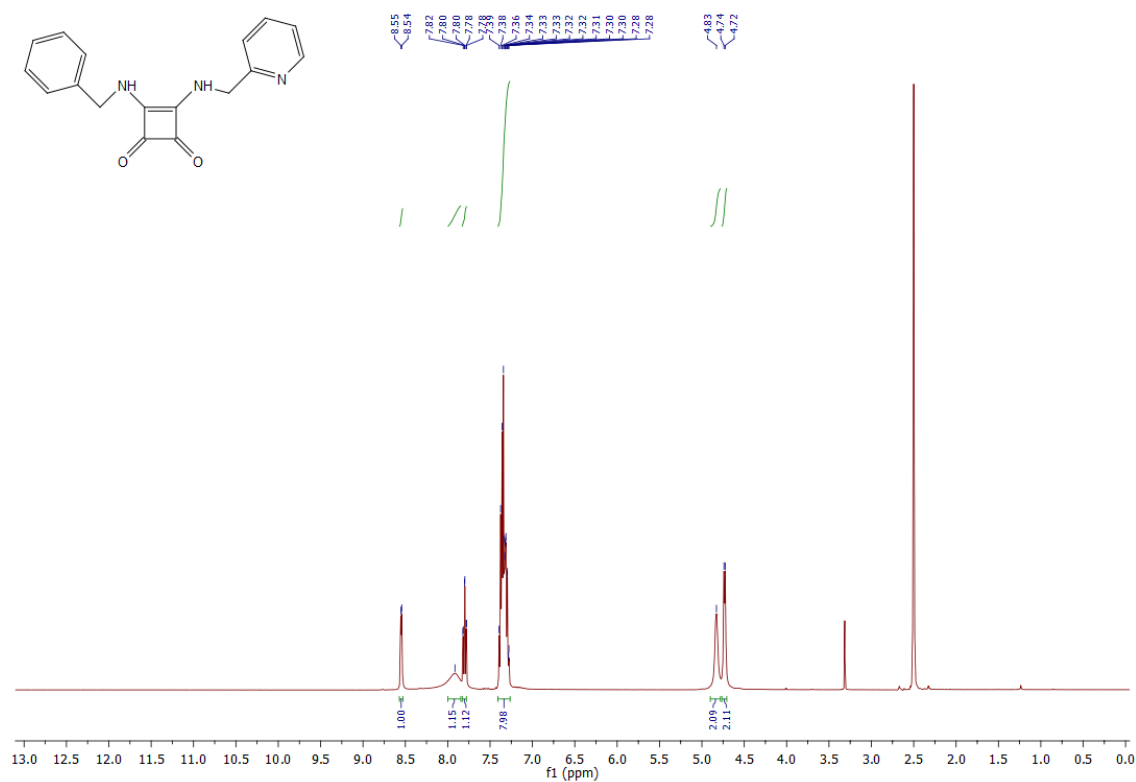
Spektrum 16: $^1\text{H} - ^{13}\text{C}$ HSQC spektrum látky **1g**



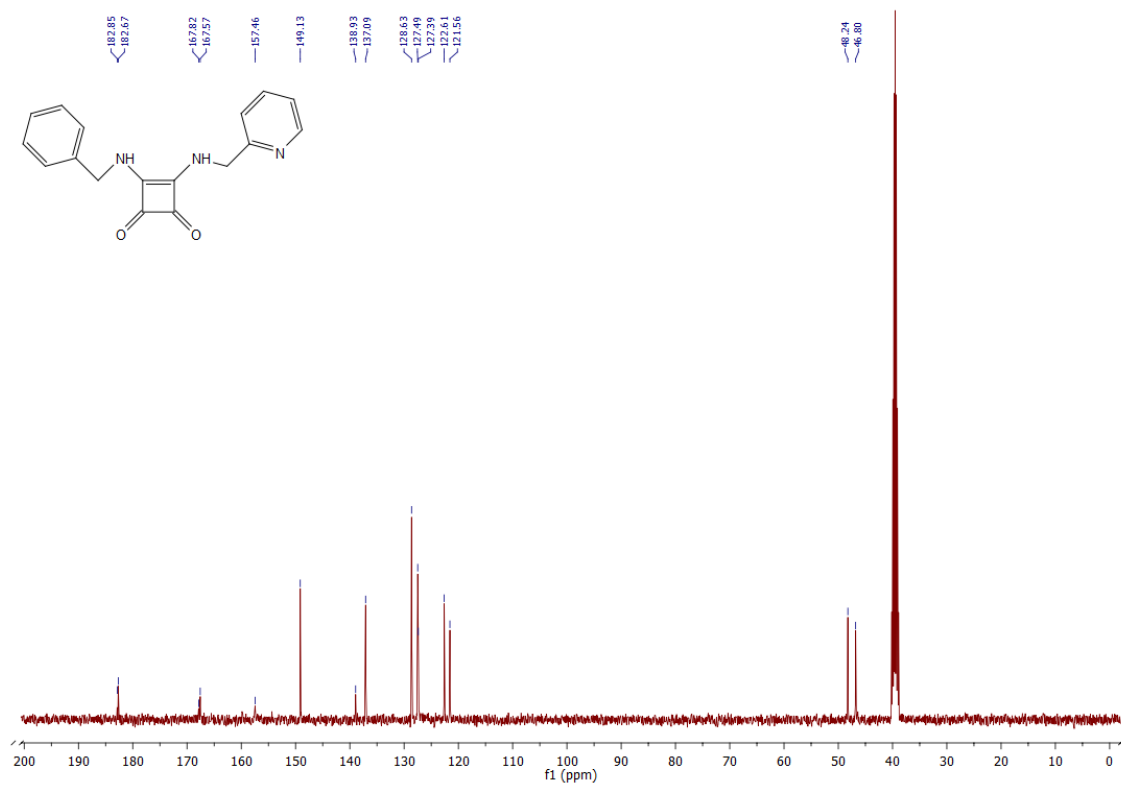
Spektrum 17: ^1H – ^{13}C HMBC spektrum látky **1g**



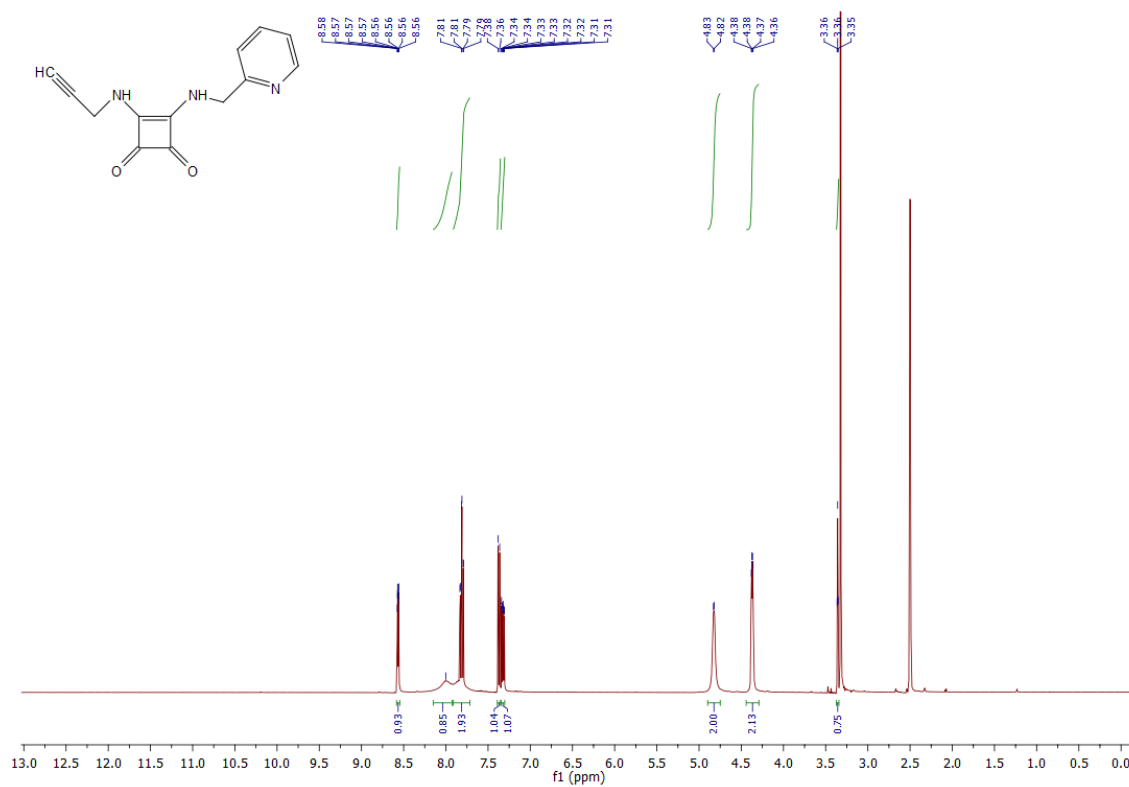
Spektrum 18: ^1H spektrum látky **1h**



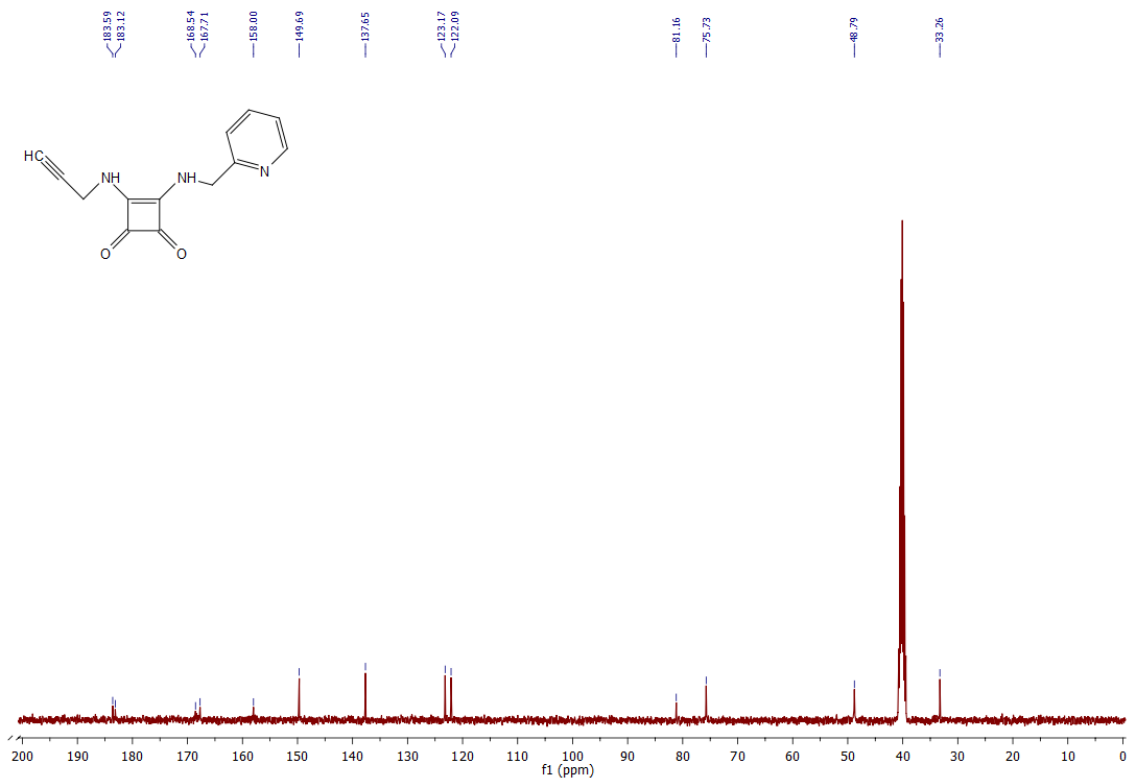
Spektrum 19: ^{13}C spektrum látky **1h**



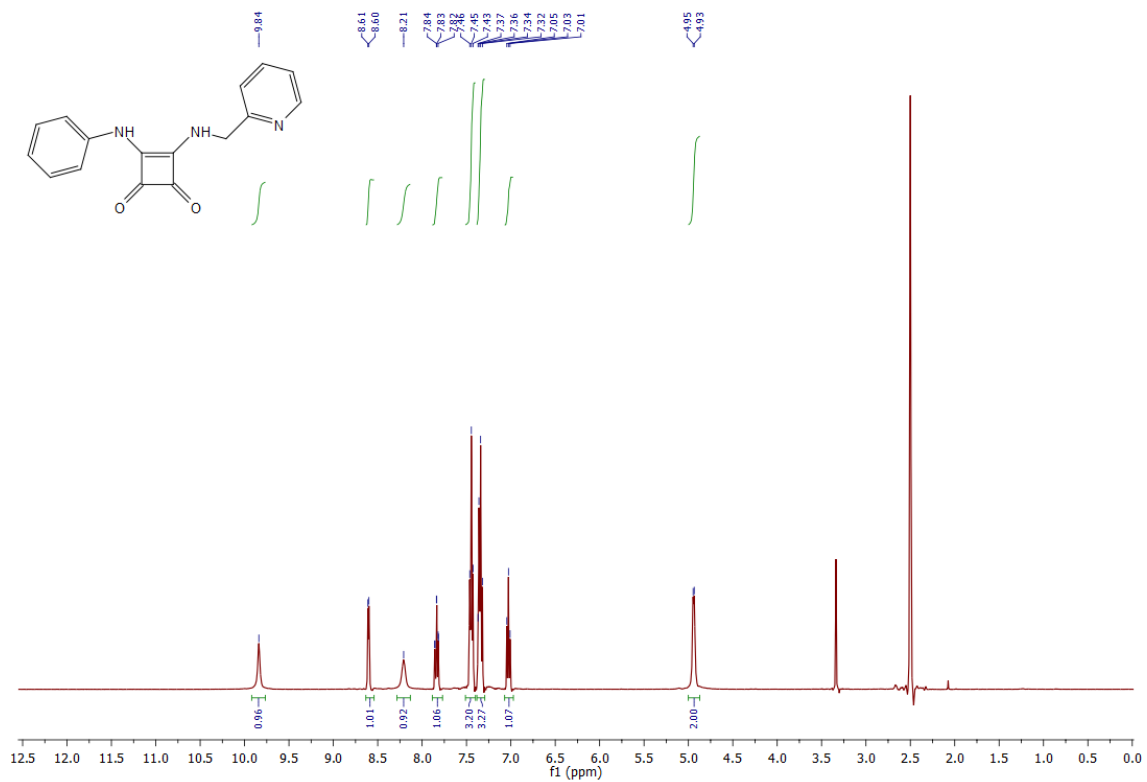
Spektrum 20: ^1H spektrum látky **1i**



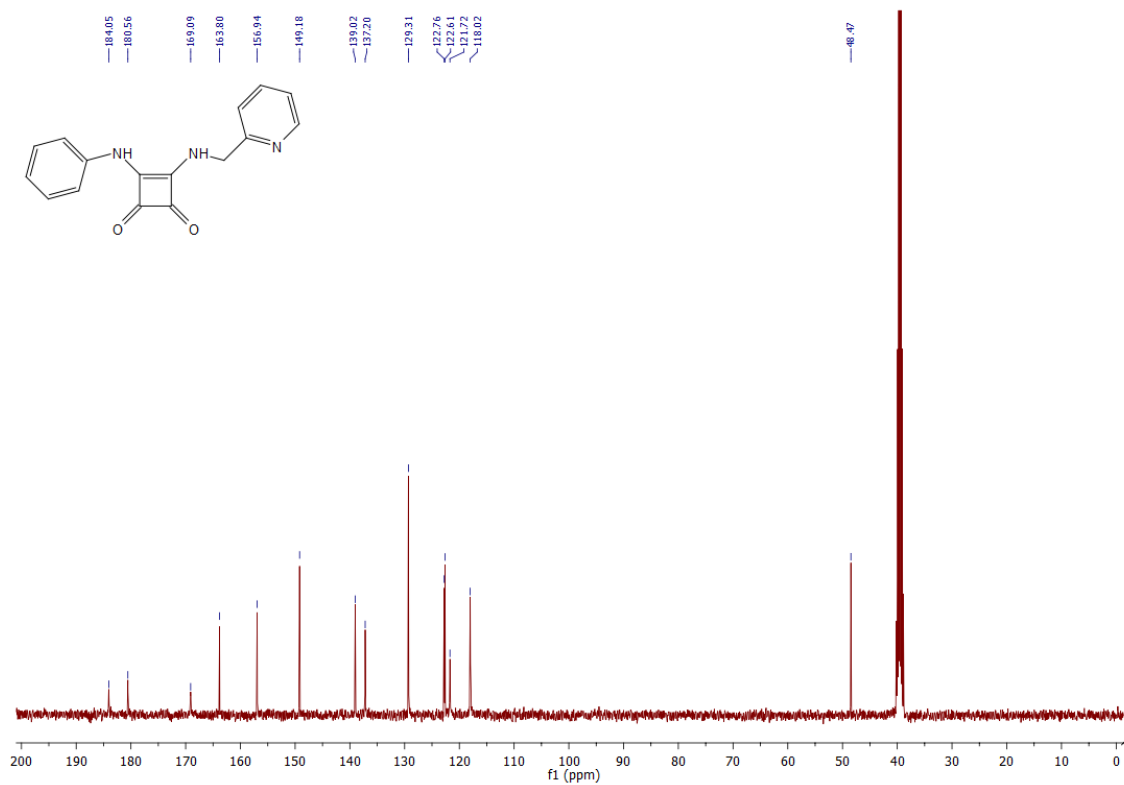
Spektrum 21: ^{13}C spektrum látky **1i**



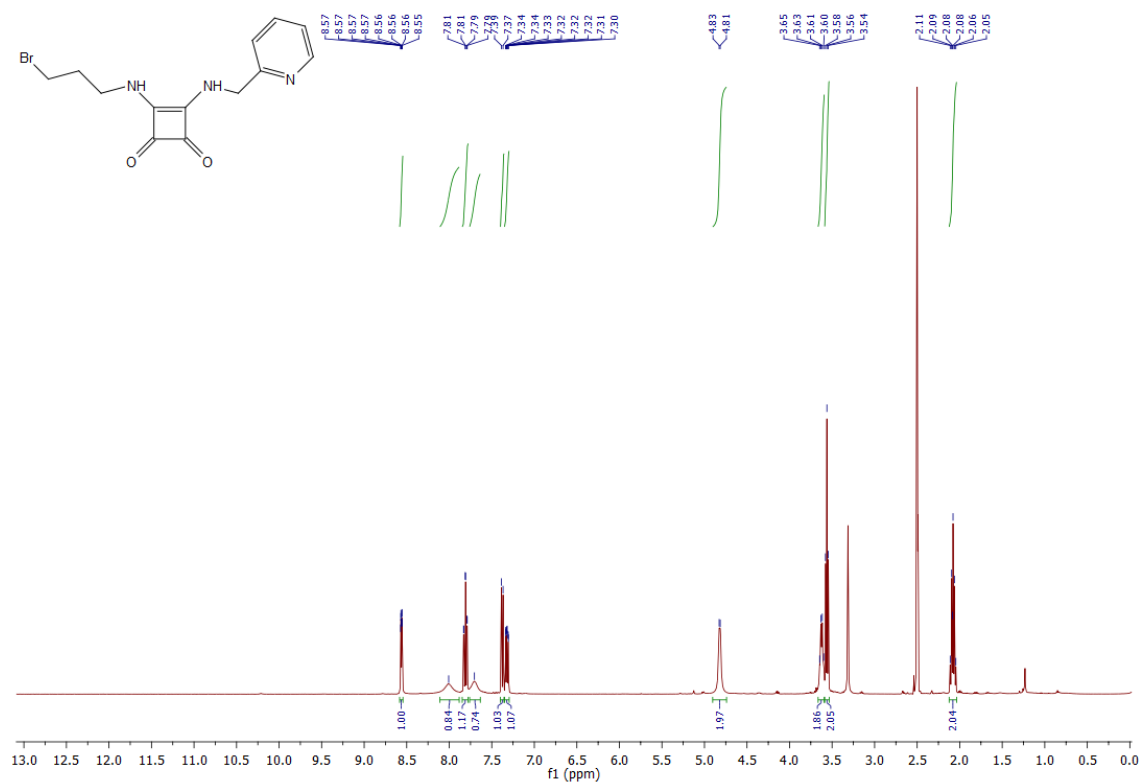
Spektrum 22: ^1H spektrum látky **1j**



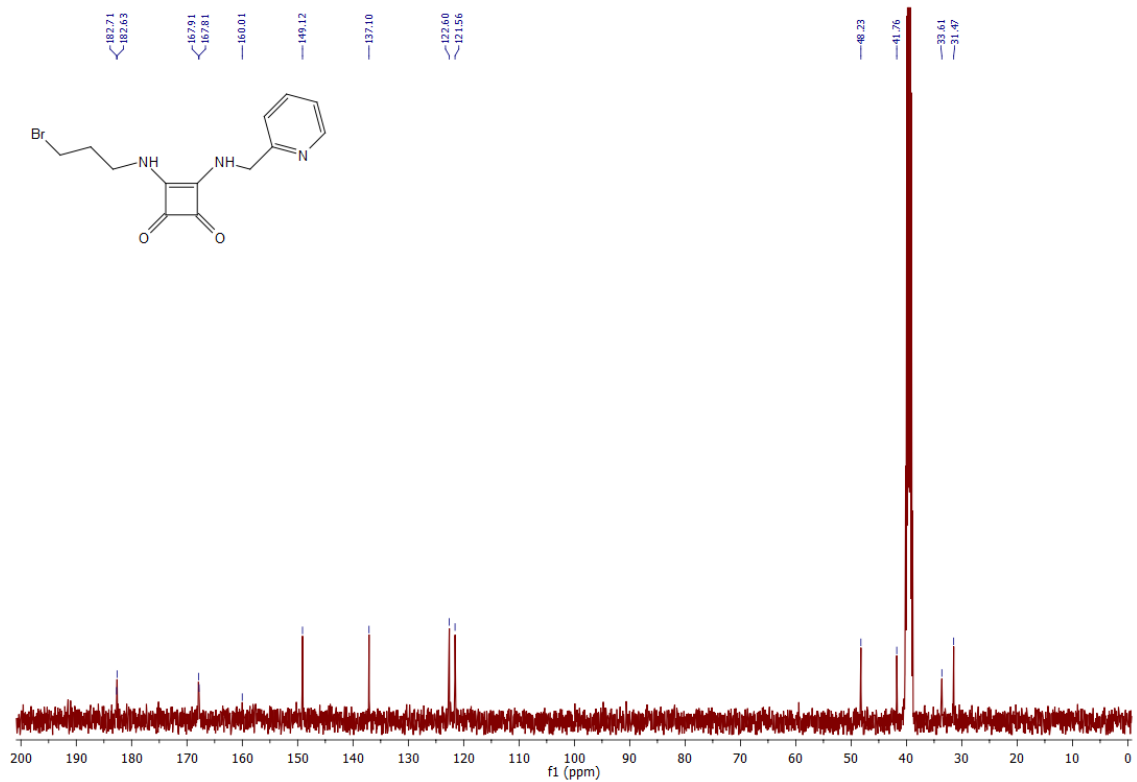
Spektrum 23: ^{13}C spektrum látky 1j



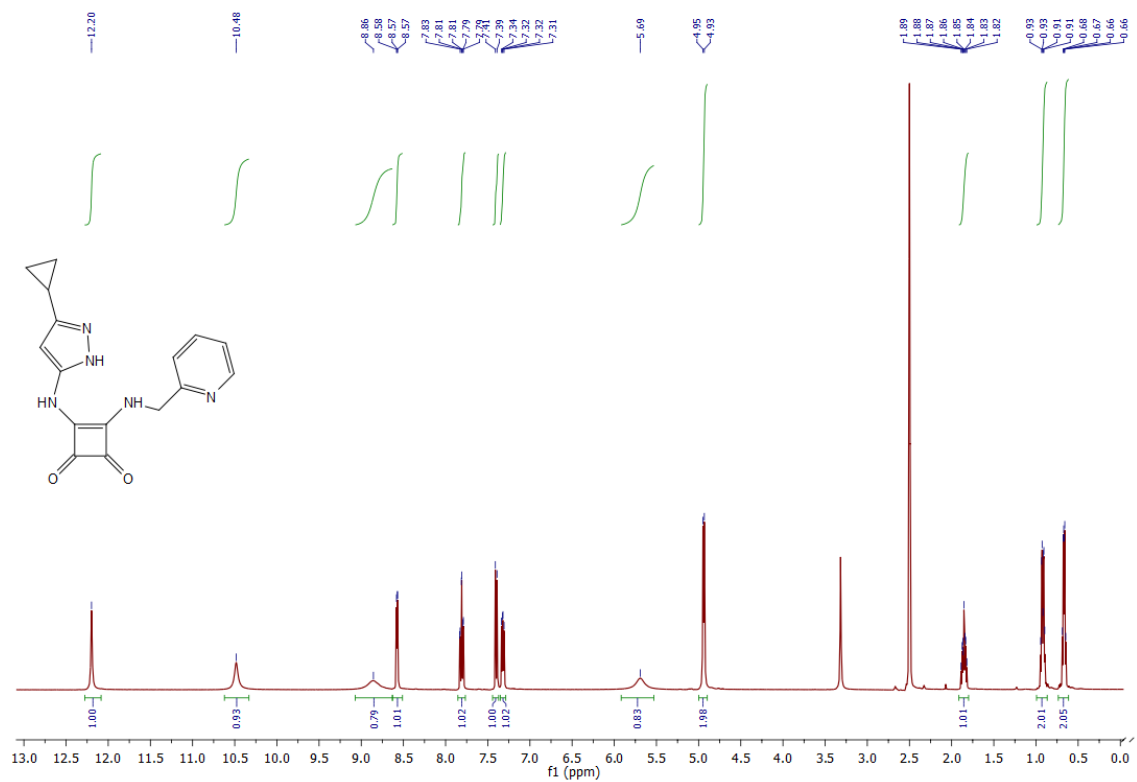
Spektrum 24: ^1H spektrum látky 1k



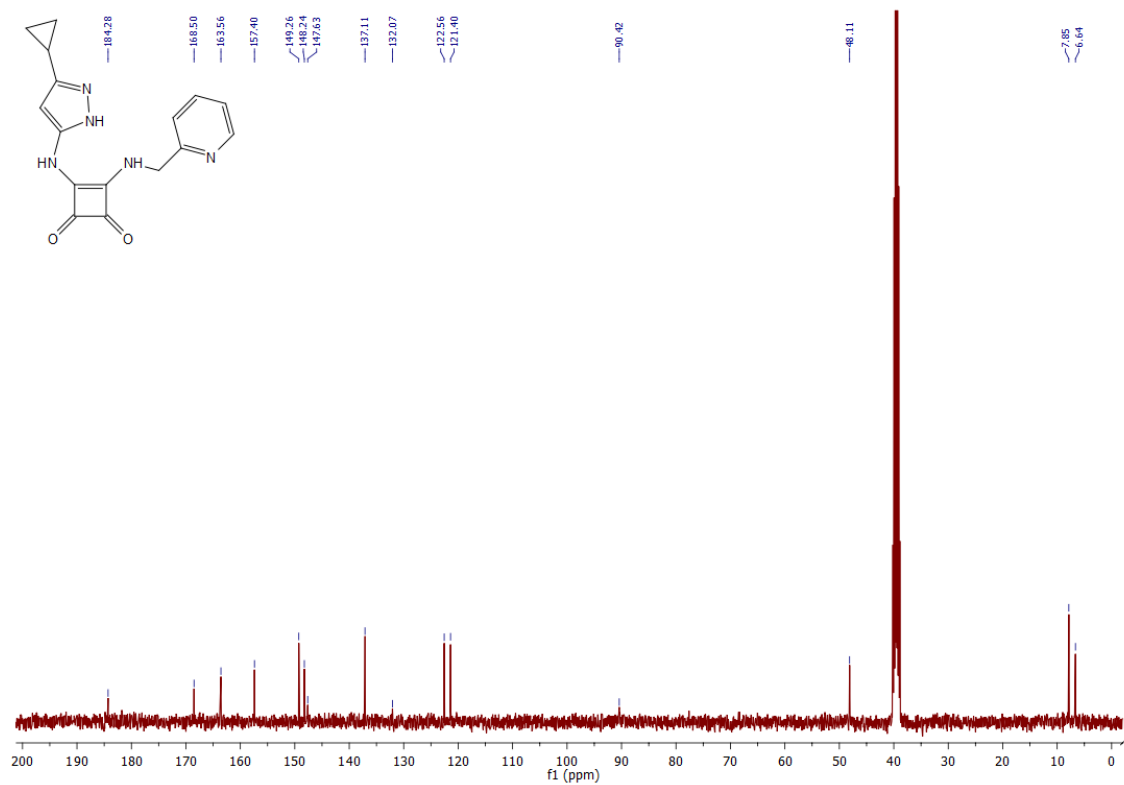
Spektrum 25: ^{13}C spektrum látky **1k**



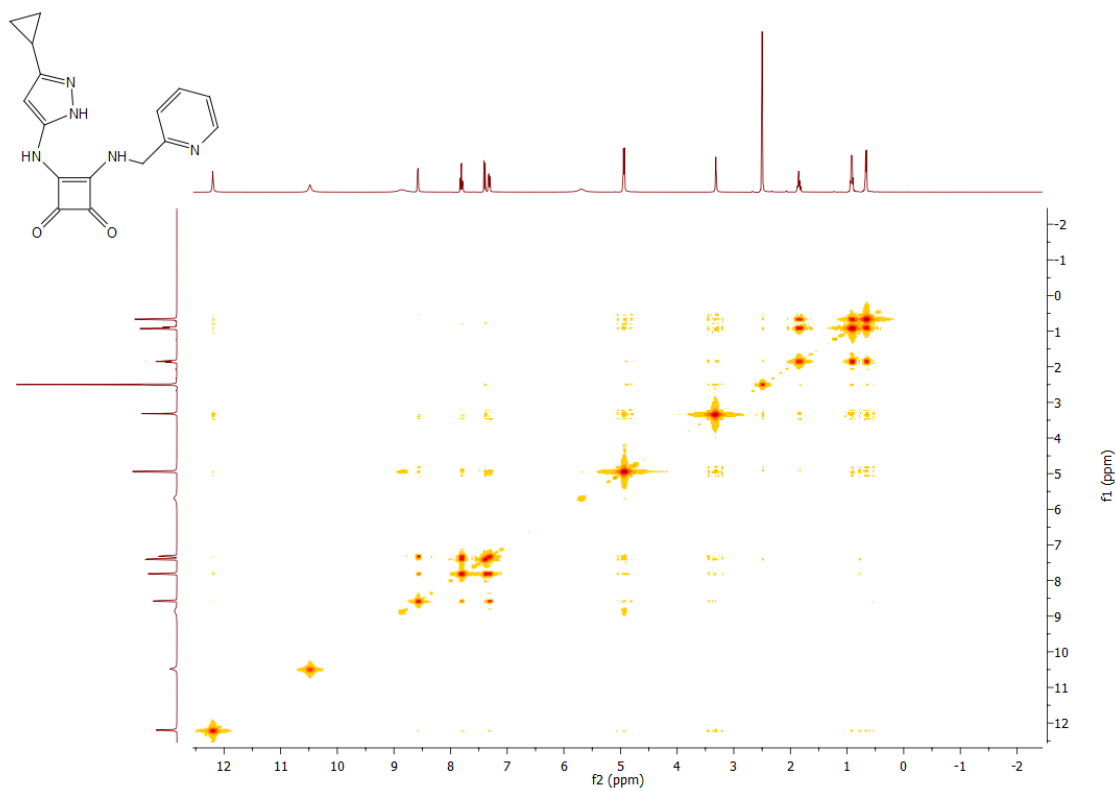
Spektrum 26: ^1H spektrum látky **1l**



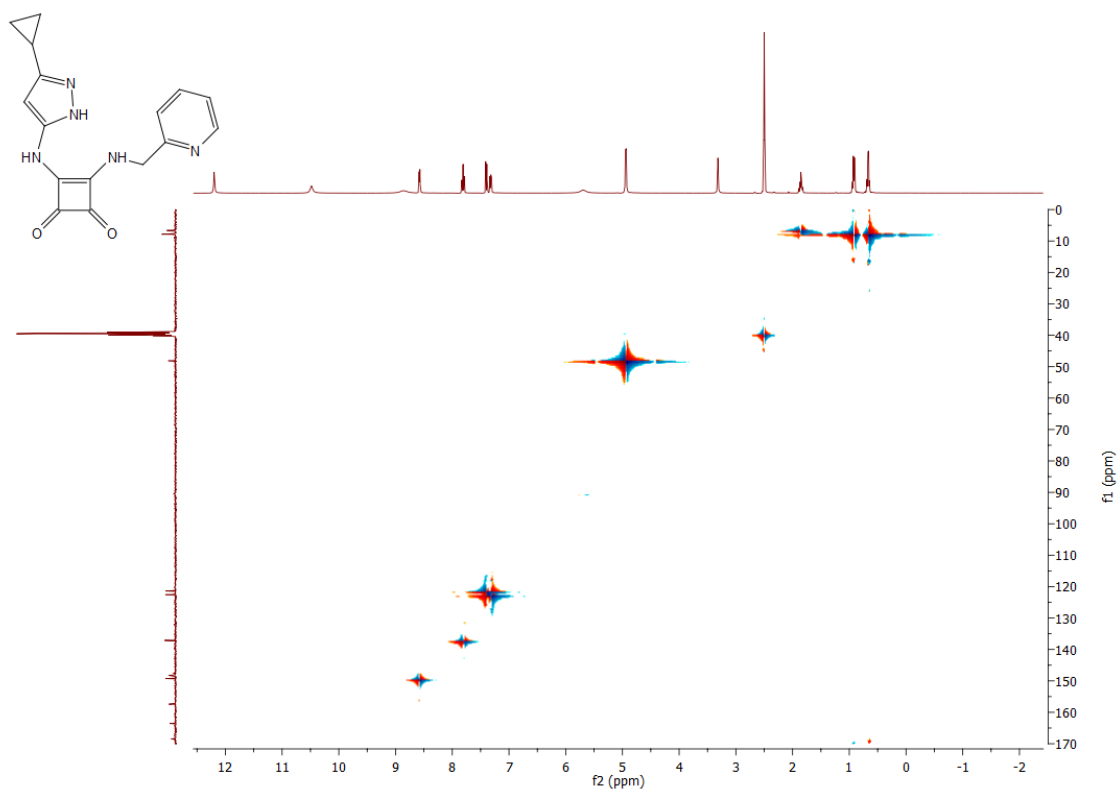
Spektrum 27: ^{13}C spektrum látky **11**



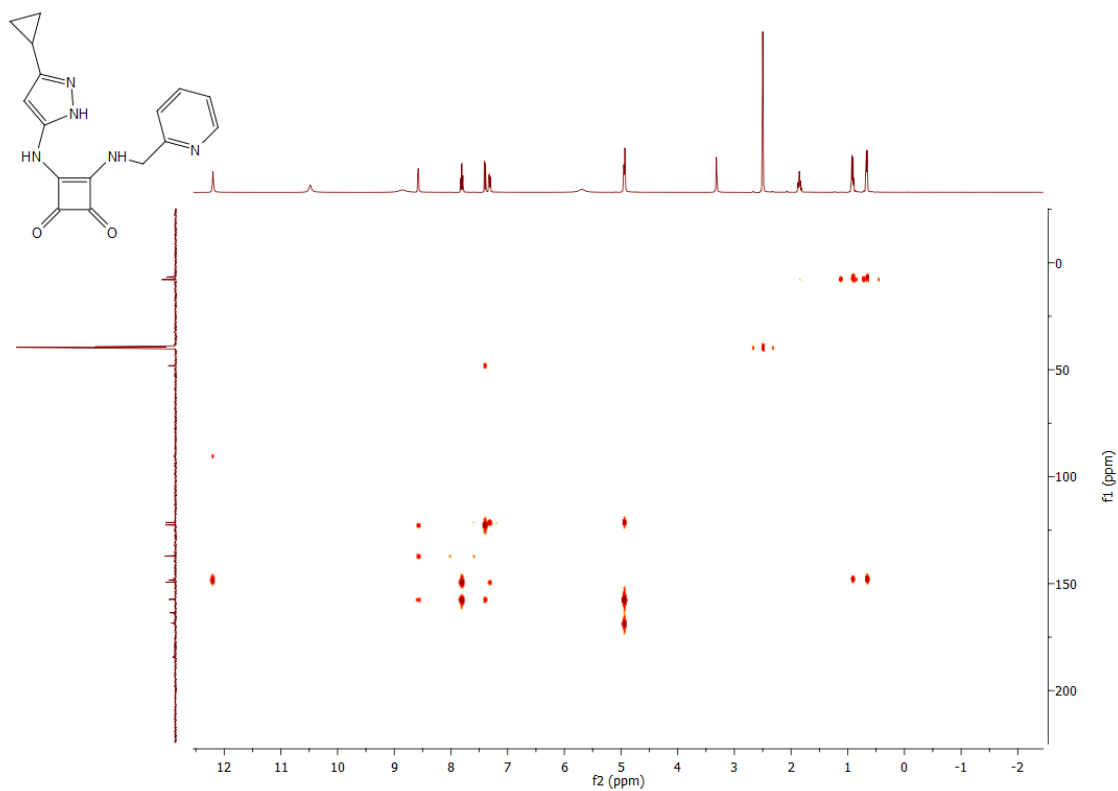
Spektrum 28: $^1\text{H} - ^1\text{H}$ COSY spektrum látky **11**



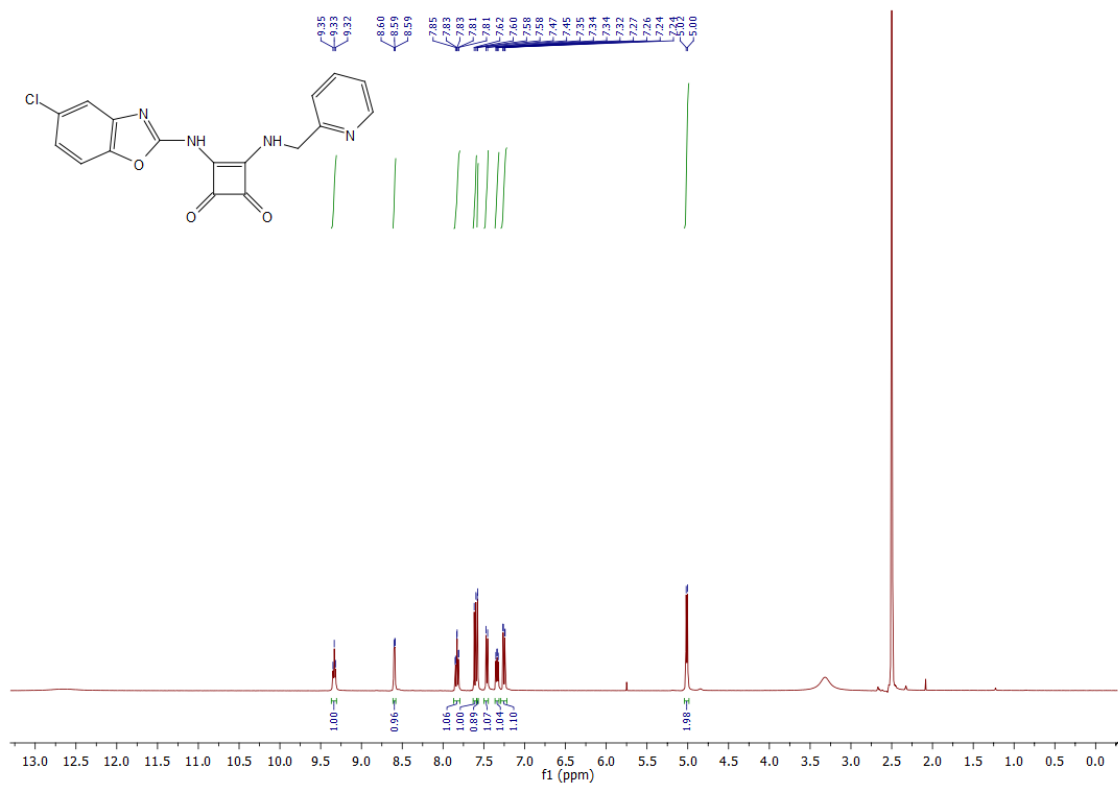
Spektrum 29: ^1H – ^{13}C HSQC spektrum látky **11**



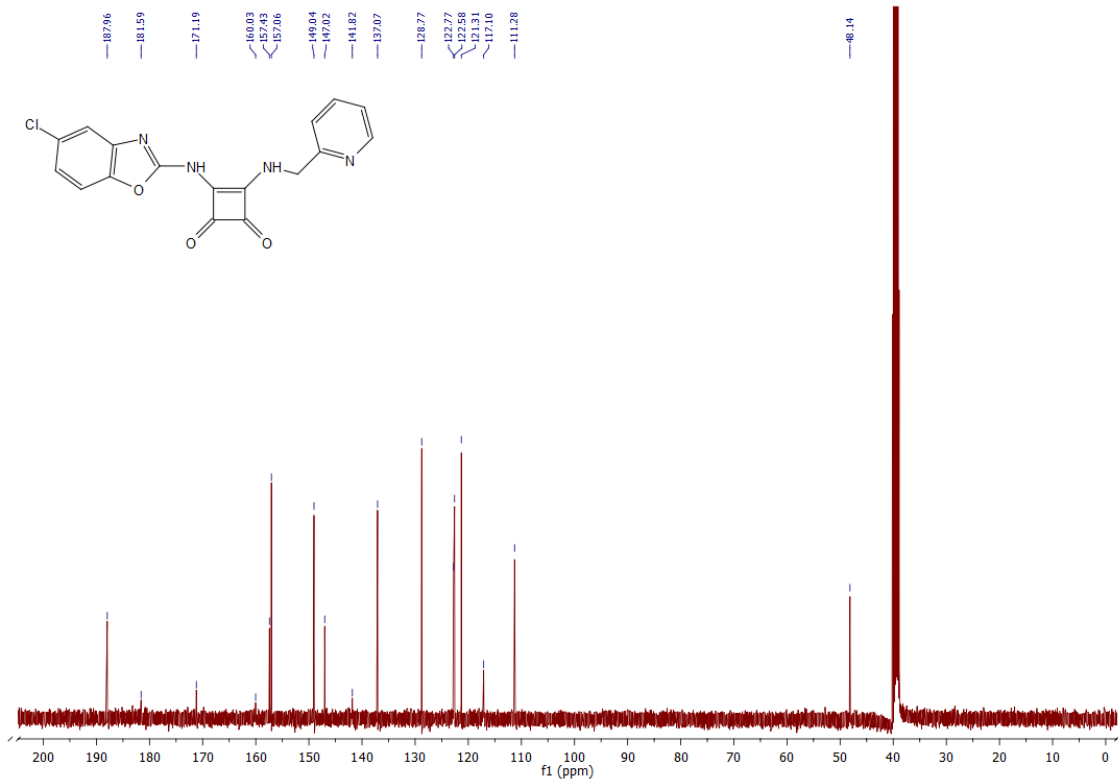
Spektrum 30: ^1H – ^{13}C HMBC spektrum látky **11**



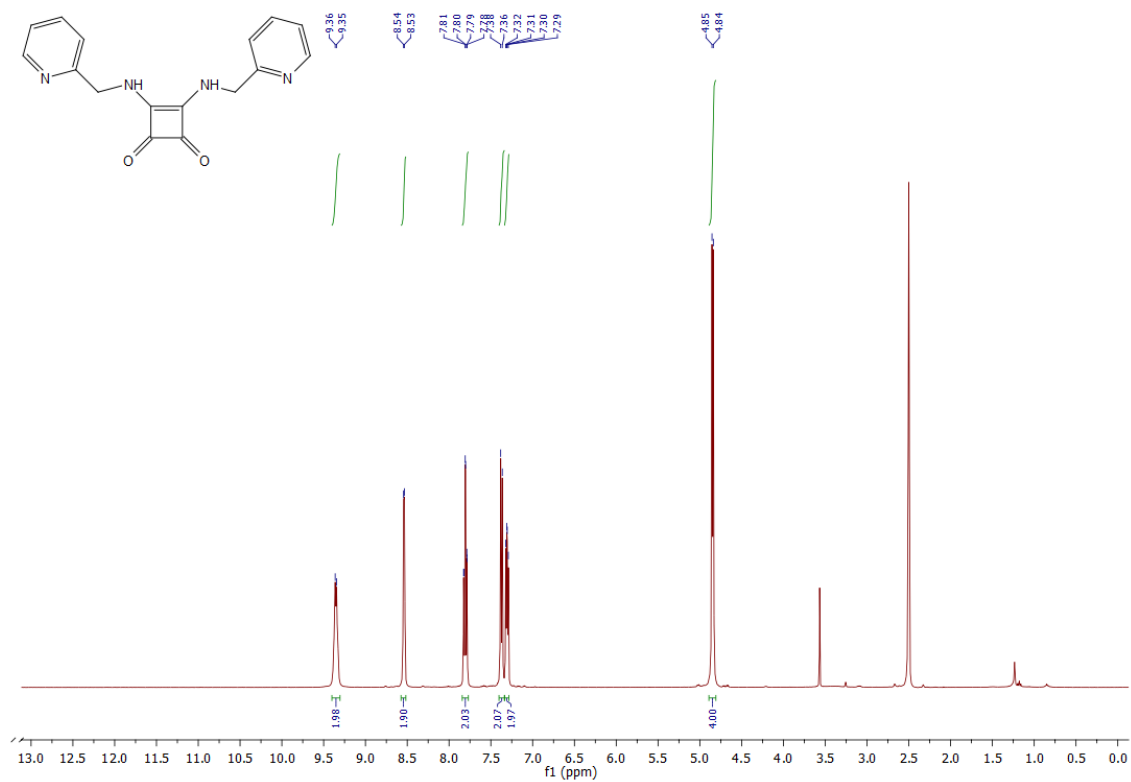
Spektrum 31: ^1H spektrum látky **1m**



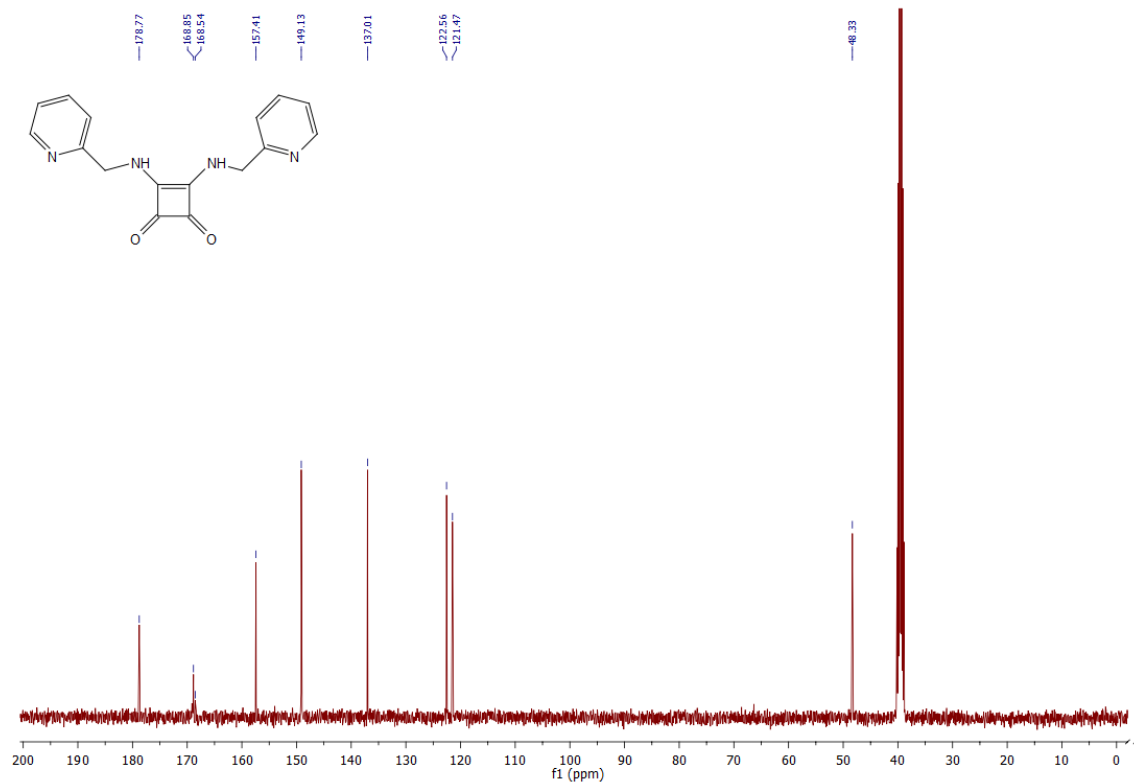
Spektrum 32: ^{13}C spektrum látky **1m**



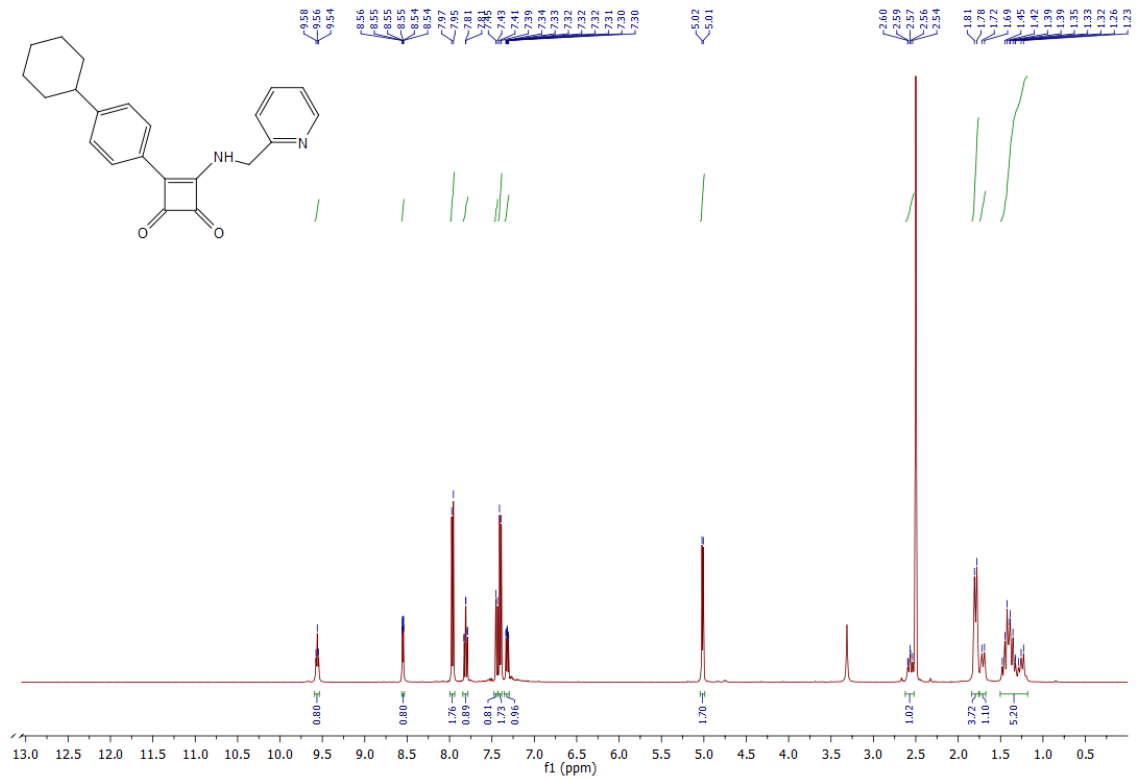
Spektrum 33: ^1H spektrum látky **1n**



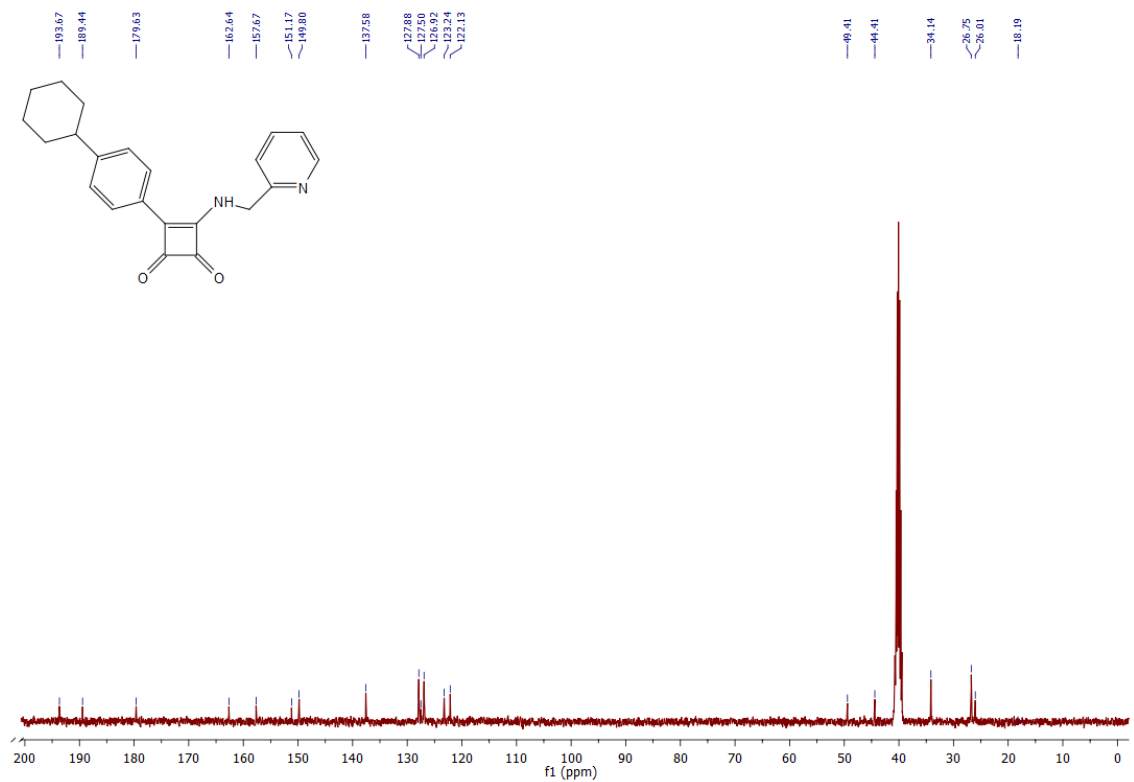
Spektrum 34: ^{13}C spektrum látky **1n**



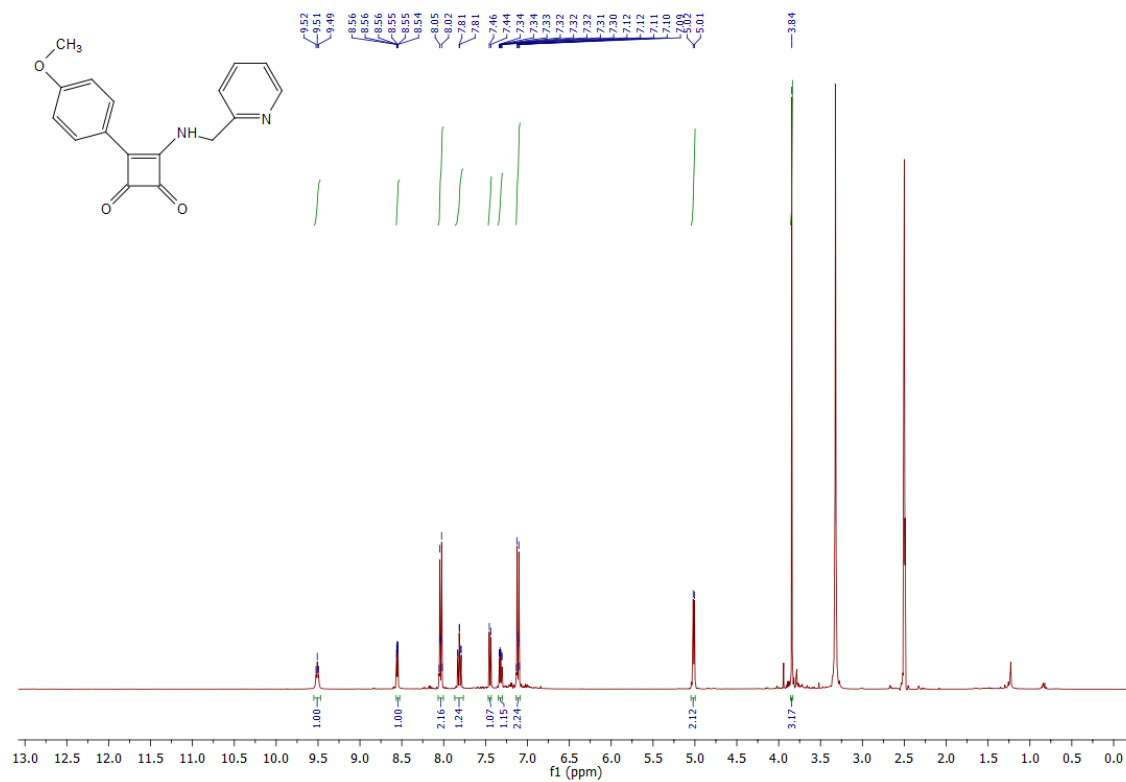
Spektrum 35: ^1H spektrum látky **2a**



Spektrum 36: ^{13}C spektrum látky **2a**



Spektrum 37: ^1H spektrum látky **2b**



Spektrum 38: ^{13}C spektrum látky **2b**

