

UNIVERZITA PALACKÉHO V OLOMOUCI

PŘÍRODOVĚDECKÁ FAKULTA

Katedra organické chemie



Syntéza nových inhibitorů mykobakteriální

Zmp1

Bakalářská práce

Autor: Jakub Ondřej

Studijní program: Chemie

Studijní obor: Bioorganická chemie a chemická biologie

Forma studia: Prezenční

Vedoucí práce: RNDr. Lucie Brulíková, Ph.D.

PROHLÁŠENÍ:

Čestně prohlašuji, že jsem závěrečnou bakalářskou práci na téma „Syntéza nových inhibitorů mykobakteriální Zmp1“ zpracoval samostatně pod vedením RNDr. Lucie Brulíkové, Ph.D. s využitím dostupné literatury a informačních zdrojů, které cituji v seznamu zdrojů. Dále udílím souhlas se zpřístupněním této bakalářské práce v knihovně Katedry organické chemie Univerzity Palackého.

V Olomouci dne 03. 08. 2021

.....
Jakub ONDŘEJ

PODĚKOVÁNÍ:

Hlavní dík patří paní RNDr. Lucii Brulíkové, Ph.D. za její odborné vedení, zkušený dohled a za to, že mi umožnila zúčastnit se práce v její výzkumné skupině. Té patří rovněž můj dík, a to za jejich kolegiální přístup, nádhernou atmosféru i za vyvedení ze spárů nedostatku znalostí v oblasti práce v laboratoři. Dále chci pomyslně sejmout klobouk před celou katedrou organické chemie za odhalení tajů organické chemie, možnost práce na špičkově připraveném pracovišti a zajímavostmi obsáhlé přednášky.

Další poděkování patří celé mé rodině za to, že za mnou vždy stáli a podrželi mě ve chvílích, kdy to bylo nejtěžší.

Svým poděkováním určitě neobsáhnou všechny lidi, kteří stáli vedle mě při této životní cestě. Ale určitě jim patří mé díky za to, že tady byli a svítili mi svým světlem na mou cestu. Ať už jsou mezi námi, nebo nejsou.

Tato závěrečná práce vznikla za finanční podpory grantů Ministerstva školství, mládeže a tělovýchovy IGA_PrF_2020_012, IGA_PrF_2021_024 a juniorského grantu UP JG_2019_002.

BIBLIOGRAFICKÁ KLASIFIKACE:

JMÉNO A PŘÍJMENÍ AUTORA: Jakub Ondřej
NÁZEV PRÁCE: Syntéza nových inhibitorů mykobakteriální Zmp1
TYP PRÁCE: Bakalářská
PRACOVNÍŠTĚ: Katedra organické chemie
VEDOUCÍ PRÁCE: RNDr. Lucie Brulíková, Ph.D.
ROK OBHAJOBY PRÁCE: 2021

ABSTRAKT:

Předložená bakalářská práce je zaměřena na design a syntézu nových inhibitorů mykobakteriálního virulentního enzymu Zmp1. Teoretická část pojednává o historickém pozadí tuberkulózy, dále sleduje známé možnosti léčby tuberkulózy, shrnuje funkci a problematiku zmíněného enzymu Zmp1 a popisuje syntézu již známých derivátů. Ve výsledkové části práce jsou diskutovány 2 navržené syntetické cesty vedoucí k požadovaným derivátům. Závěrem bakalářské práce jsou shrnuty všechny dosažené výsledky.

KLÍČOVÁ SLOVA: thiazolidindiony, antituberkulotika, inhibiční aktivita, metaloproteasa

POČET STRAN: 60

POČET PŘÍLOH: 16

JAZYK: čeština

BIBLIOGRAPHICAL IDENTIFICATION:

AUTHOR'S NAME A SURNAME: Jakub Ondřej
TITLE: Synthesis of novel mycobacterial Zmp1 inhibitors
TYPE OF THESIS: Bachelor
DEPARTMENT: Department of Organic Chemistry
ADVISOR: RNDr. Lucie Brulíková, Ph.D.
THE YEAR OF PRESENTATION: 2021

ABSTRACT:

The submitted bachelor thesis is focused on the design and synthesis of new inhibitors of mycobacterial virulent enzyme Zmp1. The theoretical part speaks about the historical foreground of tuberculosis, current options of medication against the disease, summarizes the function of the mycobacterial enzyme Zmp1 and shows synthetic pathways for already known inhibitors of Zmp1. In the result section are discussed 2 suggested synthetic pathways leading toward wanted derivatives. At the end of the thesis are recapitulated all achieved results.

KEYWORDS: thiazolidinediones, antituberculotics, inhibitory activity, metalloprotease

NUMBER OF PAGES: 60

NUMBER OF APPENDIXES: 16

LANGUAGE: Czech

OBSAH

ÚVOD.....	8
CÍLE PRÁCE.....	10
TEORETICKÁ ČÁST.....	11
1 Tuberkulóza	11
1.1 Historie tuberkulózy	12
2 Principy léčby TB a jejich limitace.....	12
2.1 Léčiva první linie.....	14
2.2 Antituberkulotika pro léčbu MDR a XDR-TB.....	15
2.3 Nová léčiva a jejich molekulární cíle	17
3 Vakcinace.....	19
4 Zmp1	20
4.1 Struktura Zmp1	20
4.2 Funkce inflamasomu a jeho inhibice Zmp1	21
5 Inhibitory Zmp1	22
5.1 Inhibitory Zmp1 s rhodaninovým skeletem	23
5.2 Inhibitory založené na hydroxamátech 8-hydroxychinolinonů.....	26
5.3 Inhibitory se substituovaným thiazolidin-2,4-dionovým skeletem	27
VÝSLEDKY A DISKUZE	29
6 Syntéza finálních derivátů pomocí přístupu 1	30
6.1 Příprava výchozí kyseliny 3	30
6.2 Příprava methylesteru 4.....	31
6.3 Reakce s <i>t</i> -butylbromoacetátem	32
6.4 Deprotekce chránící skupiny	32
6.5 Reakce s hydroxylaminy	33
6.6 Příprava kyseliny 8	34
7 Syntéza finálních derivátů pomocí přístupu 2	36
7.1 Příprava vhodných prekurzorů	36
7.2 Kondenzace aminokyselin a derivátu 3	37
EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST	40
8 Obecné informace	40
9 Příprava thiazolidindionových derivátů.....	41

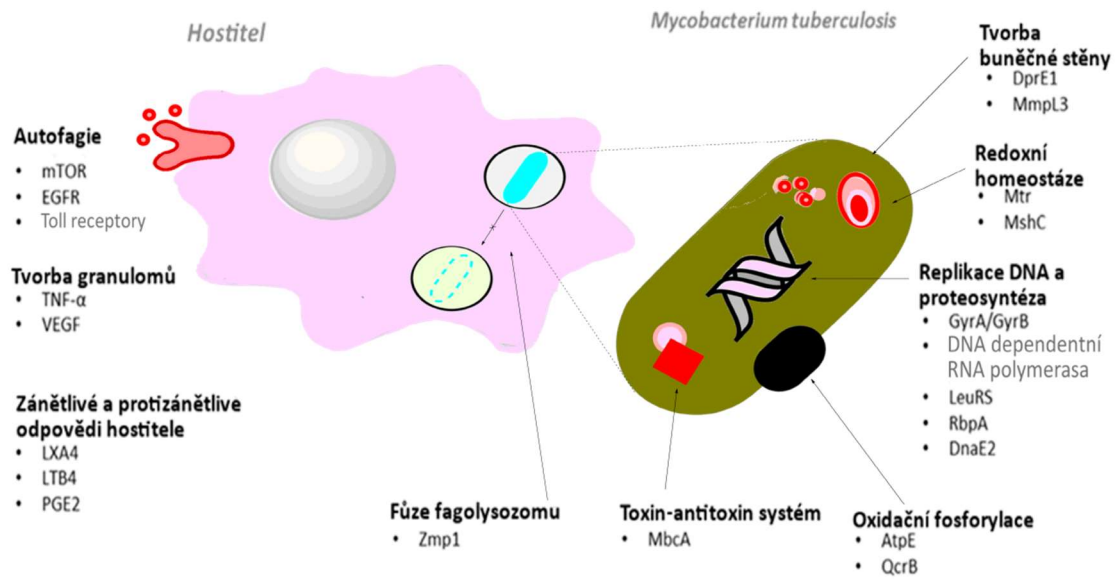
9.1	Syntéza kyseliny 3	41
9.2	Esterifikace kyseliny 3 za vzniku methylesteru 4	41
9.3	<i>N</i> -alkylace derivátu 4.....	42
9.4	Deprotekce <i>t</i> -butylesteru za vzniku kyseliny 6	43
9.5	Příprava allylhydroxamátu 7a.....	43
9.6	Příprava benzyhydroxylaminu 7b	44
9.7	Příprava methylesteru aminokyselin	45
9.8	Příprava dipeptidu	45
ZÁVĚR		46
SEZNAM ZKRATEK		47
SEZNAM POUŽITÝCH ZDROJŮ.....		48
PŘÍLOHY.....		53

ÚVOD

Mykobakteriální Zmp1 je proteáza vytvářená patogenní mykobakterií *Mycobacterium tuberculosis* (*Mtb*) a dle nejnovějších výzkumů je tento enzym považován za klíčový pro přežití *Mtb* uvnitř hostitelského makrofágu.^{1–3} Tato poměrně odolná bakterie je schopna vyvolat infekční onemocnění zvané tuberkulóza (TB).⁴ TB byla již nějakou dobu považována za vyřešený problém, v současnosti se však setkáváme se stále častější rezistencí na používaná léčiva. V roce 2019 bylo dle WHO nahlášených 206 tisíc nově nakažených multirezistentními kmeny, přičemž polovina těchto případů se vyskytuje v Indii, Číně a Rusku.⁵ Neméně významný problém je i délka léčby, která sehrává důležitou roli zvláště u imunokompromitovaných pacientů, kdy může být dlouhý léčebný plán v kombinaci s infekcí rezistentní bakterií fatální.^{6–12} Proto je výzkumu v této oblasti věnována velká pozornost. Snahou vědců je vyvinout nové látky, které by působily zcela novým mechanismem a byly účinné i na rezistentní kmeny bakterie. Rovněž jsou hledány i zcela nové molekulární cíle.^{13–21}

Aktuálně používaná léčiva mají schopnost zasáhnout do syntézy buněčné stěny, ovlivnit proteosyntézu, tvorbu nukleových kyselin nebo zasahovat do energetického metabolismu mykobakterie.⁶ Všechna tato léčiva působí na úrovni samotné bakterie. Jednotlivé molekulární cíle známých léčiv jsou znázorněny na Obr. 1. Existují však i látky, které jsou schopné působit na úrovni hostitele a ovlivnit imunitní odpověď organismu na přítomnost patogenu (Obr. 1).^{16,17,22–27} Jeden ze zajímavých molekulárních cílů na úrovni hostitele je již zmiňovaný enzym Zmp1, který hraje významnou roli v patogenitě *Mtb*. Ovlivňuje přežití *Mtb* v makrofágu, a proto se stal atraktivním cílem nově vyvíjených léčiv, která by mohla být využity v adjuvantní léčbě drug-rezistentních kmenů *Mtb*.^{19,28–30}

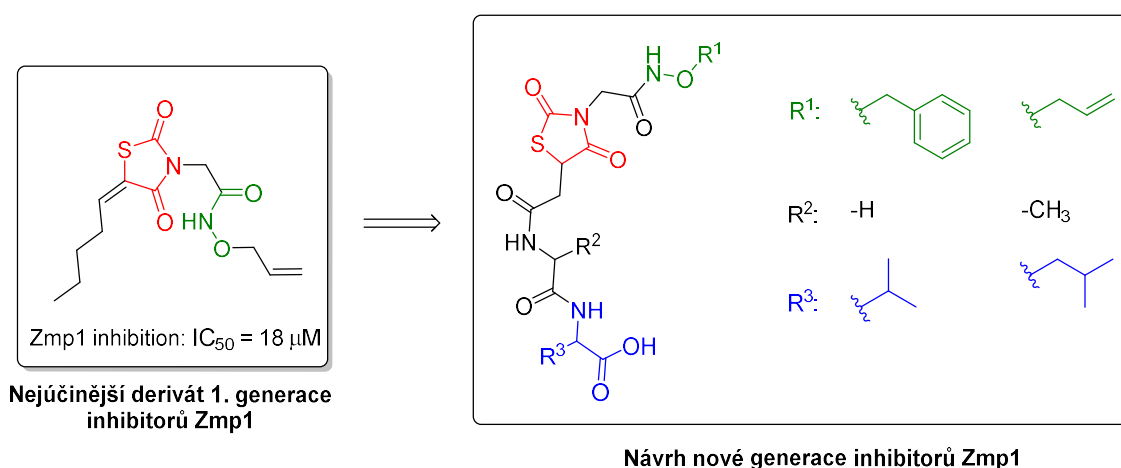
Ve výzkumné skupině, kde byla vypracována tato závěrečná práce, byla v roce 2019 vyvinuta první generace nových inhibitorů virulentního faktoru Zmp1.³¹ Dle dostupných výsledků a na základě *in silico* studií byla navržena nová generace inhibitorů, jejichž příprava je předmětem předkládané bakalářské práce.



Obrázek 1. Schéma strategických cílů pro boj s *Mtb*.³²

CÍLE PRÁCE

Cílem předkládané bakalářské práce je syntéza nových inhibitorů mykobakteriální Zmp1, které navazují na dřívější poznatky výzkumné skupiny. První generace inhibitorů poukázala na slibný potenciál derivátů thiazolidindionu substituovaného na dusíku v poloze 3 a uhlíku v poloze 5, z nichž neaktivnější derivát vykazující inhibici 18 μM je znázorněn na Obr. 2.²³ Dle molekulového dokování však tyto deriváty neinteragují s aktivním místem enzymu, ale pouze blokují vstup k aktivnímu místu. Z těchto důvodů byla navržena druhá generace inhibitorů (Obr. 2), které jsou substituovány delším peptidovým řetězcem, který má dle *in silico* studií předpoklady interakce se Zn atomem v aktivním místě metaloproteasy.



Obrázek 2. Schéma navržených derivátů.

Jednotlivé dílčí cíle práce:

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

TEORETICKÁ ČÁST

1 Tuberkulóza

Tuberkulóza (TB) je infekční onemocnění způsobené bakteriemi ze skupiny *Mycobacterium tuberculosis complex*, převážně však bakterií *Mycobacterium tuberculosis*. TB nejčastěji postihuje plíce, ale může zasáhnout i jakoukoli jinou část těla včetně kostí a nervového systému. TB je řazena mezi první desítku onemocnění, která celosvětově vedou k největšímu počtu úmrtí vlivem jediného infekčního patogenu. Podle reportu světové zdravotnické organizace (WHO) z roku 2020 bylo jen v roce 2019 nakaženo tuberkulózou přibližně 10 milionů lidí a zhruba 1,2 milionů lidí na následky tohoto onemocnění zemřelo.⁵ Nejvíce ohroženou skupinou lidí jsou imunokompromitovaní pacienti, např. lidé trpící onemocněním AIDS nebo lidé po léčbě rakoviny. Hlavními důvody závažnosti tohoto onemocnění jsou poměrně dlouhý a složitý léčebný režim a rovněž čím dál častější rezistence na současná léčiva. Postupně se rozvíjející hrozbou se stávají kmeny označované jako multilékově rezistentní (MDR-TB) a extenzivně rezistentní (XDR-TB). Multilékově rezistentní forma TB je definována jako rezistence na dvě nejúčinnější léčiva první linie, isoniazid a rifampicin. XDR-TB je oproti MDR-TB navíc rezistentní na jakýkoliv fluorochinolon a minimálně jeden injekční aminoglykosid (kapreomycin, amikacin, kanamycin).

Dle WHO je bakterií *M. tuberculosis* infikována zhruba třetina světové populace, avšak ne každá tato nákaza vede k rozvoji akutního infekčního onemocnění. Bakterie je schopna přežívat v latentním stavu a nezpůsobuje postiženému žádné problémy. Významným oslabením organismu však může přejít do aktivního stádia. Z tohoto důvodu je velká pozornost vědců směřována také na výzkum latentní (dormantní) formy TB a její souvislost s imunitním systémem člověka.⁵

1.1 Historie tuberkulózy

Jedny z prvních datovaných nálezů *Mtb* pochází z kosterních pozůstatků obyvatel Atlitu (Izrael, 50 kilometrů severně od města Tel Aviv) žijících zde 7000 př. n. l.³³ Svého vrcholu dosáhla TB v 18. a 19. století zejména v souvislosti s rozvojem industrializace a větší migrací obyvatelstva. V naší zemi se historicky vžil především termín souchotiny nebo úbytě.

Po převratném objevu Roberta Kocha, který jako první odhalil přítomnost a vzhled *Mtb* u lidí zasaženými tuberkulózou a popsal způsob barvení tohoto mikroorganismu v roce 1882,³⁴ se začala soustředit práce mnoha vědců na vytvoření vakcíny proti *Mtb*.⁴ Prvním úspěšným milníkem v očkování proti TB byl objev vakcíny Alberta Calmetta a Camilla Guérina na Pasteurově univerzitě. Oslabením *Mycobacterium bovis* (*Mbb*) připravili vakcínu BCG (Bacil Calmett-Guerinový). Tato vakcína byla poprvé použita na lidech už v roce 1921. V ČR byla plošná vakcinace (kalmetizace) dětí zavedena v roce 1952, avšak v roce 2010 se od tohoto postupu upustilo z důvodu světového mýcení choroby a kalmetizace je dobrovolná.³⁵

2 Principy léčby TB a jejich limitace

Důležitým milníkem účinné léčby TB se stal objev streptomycinu v roce 1943, kdy jej poprvé izoloval ze *Streptomyces griseus* Albert Schatz působící ve skupině doktora S. A. Waksmana na Rutgers University. Do této doby byla jedinou spolehlivou metodou léčba chirurgická, při níž se tuberkulózní uzlíky tzv. tuberkulomy odstraňovaly z pacientových plic.³⁶⁻³⁸

Současná terapie TB je založena především na užívání baktericidních látek (antibiotik, které bakterie usmrtí) či bakteriostatik (inhibujících jejich růst či reprodukci) nebo na jejich kombinaci. Tato léčiva můžeme rozdělit do pěti skupin znázorněných v Tabulce 1. Obecně stanovené léčebné režimy vychází především z citlivosti mykobakteriálních kmenů stanovené mikrobiologickými testy a zajišťují tak co nejúčinnější terapii a prevenci vzniku rezistence.³⁹ Aktuálně považuje WHO za nejúčinnější plně kontrolované krátkodobé režimy, tzv. DOTS (Directly Observed Treatment Short-Course).

Doporučený léčebný režim TB již mnoho let sestává ze dvou fází. První z nich je iniciační, trvá 2 měsíce a je podmíněna hospitalizací pacienta. V této fázi se obvykle podává kombinace čtyř perorálních léčiv první volby – isoniazid, rifampicin, pyrazinamid a ethambutol. V případě nutnosti se přidává streptomycin intramuskulárně. Pokud onemocnění odpovídá na léčbu v první intenzivní fázi, postupuje se následně v kontrolované pokračovací léčbě v podávání léku obsahující minimálně rifampicin a isoniazid po dobu nejméně 4 měsíců.⁴⁰

Jestliže je infekce multilékově rezistentní (MDR-TB) nebo extenzivně rezistentní (XDR-TB), volí se terapie pěti antituberkulotiky, která jsou účinná proti danému kmeni. Nejvhodnější kombinace by měla obsahovat pyrazinamid, jedno léčivo ze skupiny A, jedno léčivo ze skupiny B, dvě léčiva ze skupiny C a v případě nutnosti se může doplnit léčivy ze skupiny D (Tabulka 1). V případě rezistentní formy onemocnění trvá intenzivní fáze terapie 8 měsíců a celkově pak trvá až 20 měsíců. Dle nejnovějších poznatků WHO může být u pacientů, kteří nebyli léčeni antituberkulotiky druhé volby a jejich léčba je citlivá na léky skupiny A a B, terapie zkrácena na 9-12 měsíců.^{41,42}

Tabulka 1: Dnes užívaná antituberkulotika první linie a skupiny léčiv A–D pro léčbu MDR-TB a XDR-TB.

Perorální antituberkulotika první linie	isoniazid (INH), rifampicin (RIF) pyrazinamid (PZA), ethambutol (EMB)
skupina A – fluorochinolony	levofloxacin, moxifloxacin, gatifloxacin
skupina B – injekční léčiva	aminoglykosidy (streptomycin, amikacin, kanamycin), kapreomycin
skupina C – perorální antituberkulotika druhé linie	ethionamid/prothionamid, linezolid cykloserin/terizidon, clofazimin
skupina D – přídatná antituberkulotika	vysoké dávky INH, pyrazinamid, ethambutol
	bedaquilin, delamanid
	<i>p</i> -aminosalicylová kyselina, imipenem- cilastatin, meropenem, amoxicillin- klavulanát

2.1 Léčiva první linie

Mezi antituberkulotika první linie jsou řazeny perorální léčiva isoniazid, rifampicin, pyrazinamid a ethambutol (Tabulka 1). Do této skupiny léčiv bývá řazen i streptomycin, který je ovšem nutný aplikovat parenterálně, nejčastěji formou intramuskulárních injekcí.

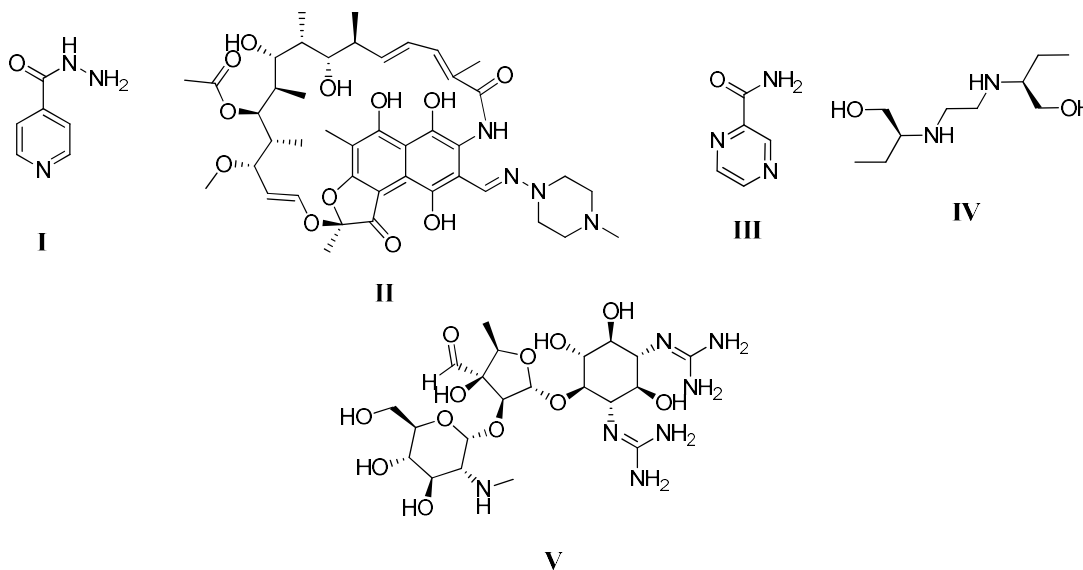
Isoniazid (I, Obr. 3) je jeden z nejstarších syntetických léků na TB působící baktericidně. Dnes je předepisován pro léčbu aktivní infekce *Mtb* společně s rifampicinem, pyrazinamidem a buď streptomycinem, nebo ethambutolem. Isoniazid byl rovněž schválen k profylaktické terapii. Po absorpci isoniazidu do organismu je přepravován do rostoucích bakterií, kde je katG genem kódovanými peroxidázami aktivován. Po aktivaci se váže na enoyl-ACP reduktasu (*InhA*) a inhibuje tak tvorbu mykologických kyselin nezbytných pro výstavbu buněčné stěny. Vznik rezistence na isoniazid je připisován vícero faktorům, ale hlavním faktorem je mutace v katG genu vedoucí k inaktivaci *InhA* enzymu, a tudíž nedochází k aktivaci isoniazidu. Takto rezistentní kmen *Mtb* je stále náchylný na léčbu ethionamidem, jenž je analog isoniazidu. Ovšem zde už není přesně popsána aktivace ani vznik rezistence.⁸

Rifampicin (II, Obr. 3) je antibiotikum získávané jako semisyntetický derivát z plísně *Amycolatopsis rifamycinica*. Jeho mechanismus účinku je založen na inhibici bakteriální RNA polymerasy. Rezistence na tento lék prudce narůstá po jeho širokém užívání adaptací jednobodovou mutací genu kódujícího β podjednotku RNA polymerasy (*rpoB*).⁴³

Pyrazinamid (III, Obr. 3) je jedním z hlavních léčiv při krátkodobé terapii aktivní formy TB společně s rifampicinem, isoniazidem a buď streptomycinem nebo ethambutolem. Obecně není doporučován k léčbě latentní formy TB. Přestože patří mezi nejstarší léčiva v této oblasti, jeho mechanismus účinku nebyl spolehlivě a přesvědčivě objasněn. Mezi nejpoužívanější teorie patří fakt, že se jedná o prodrug, které je přijato mykobakteriemi, konvertováno působením mykobakteriální pyrazinamidasy na pyrazinkarboxylát, a ten je následně aktivním efluxem vypuzen zpět mimo buňku. V granulomu (místě zánětu) existuje kyselé prostředí, ve kterém dochází k částečné protonaci karboxylátu a vzniku pyrazinkarboxylové kyseliny, která prostupuje difúzí zpět do mykobakteriální buňky, kde dochází ke kumulaci.⁸ Pyrazinamid-rezistentní kmene mutují v genu kódujícím PZAasu, kdy pod vlivem mutace dochází ke snížení aktivity a ke zvýšení rezistence.⁹

Ethambutol (IV, Obr. 3) je stejně jako předchozí léčiva podáván v kombinaci s dalšími látkami jako isoniazid, rifampicin či pyrazinamid. Jeho výhody spočívají v nízkých inhibičních dávkách a v synergii s ostatními léky (aminoglykosidy, rifamyciny a chinolony), kdy posiluje jejich účinky. Ethambutol působí pouze na aktivně rostoucí kmeny mykobakterií. Působí jako inhibitor arabinosyltransferas, které jsou důležité pro syntézu arabinogalaktamu a lipoarabinomannanu, ovšem přesný biochemický cíl tohoto léčiva není doposud přesně objasněn.⁸ Předpokládaný cíl ethambutolu, arabinosyltransferasa, je složená do operonu s dvěma dalšími enzymy. K rezistenci dochází mutací genu kódující tento operon na pozici 306 kodonu záměnou methioninu za valin, leucin nebo izoleucin.⁴⁴

Streptomycin (V, Obr. 3) je historicky první lék užívaný pro léčbu tuberkulózy. Je efektivní v léčbě aktivně rostoucích bacilů, zatímco na intracelulární a dormantní je neúčinný. Mechanismus účinku streptomycinu spočívá v navázání na 16S podjednotku rRNA a tím zastavuje syntézu proteinů.⁸ Budování rezistence vůči streptomycinu spočívá v mutacích genů kódujících výše zmíněnou ribosomální RNA a ribosomální protein S12, jenž stabilizuje pseudosmyčku tvořenou rRNA.⁹



Obrázek 3. Antituberkulotika první volby.

2.2 Antituberkulotika pro léčbu MDR a XDR-TB

Mezi látky používané pro léčbu rezistentních kmenů TB patří léky kategorie A-D uvedené v Tabulce 1. Řadíme mezi ně fluorochinolony, injekční léčiva, perorální léčiva 2. linie a

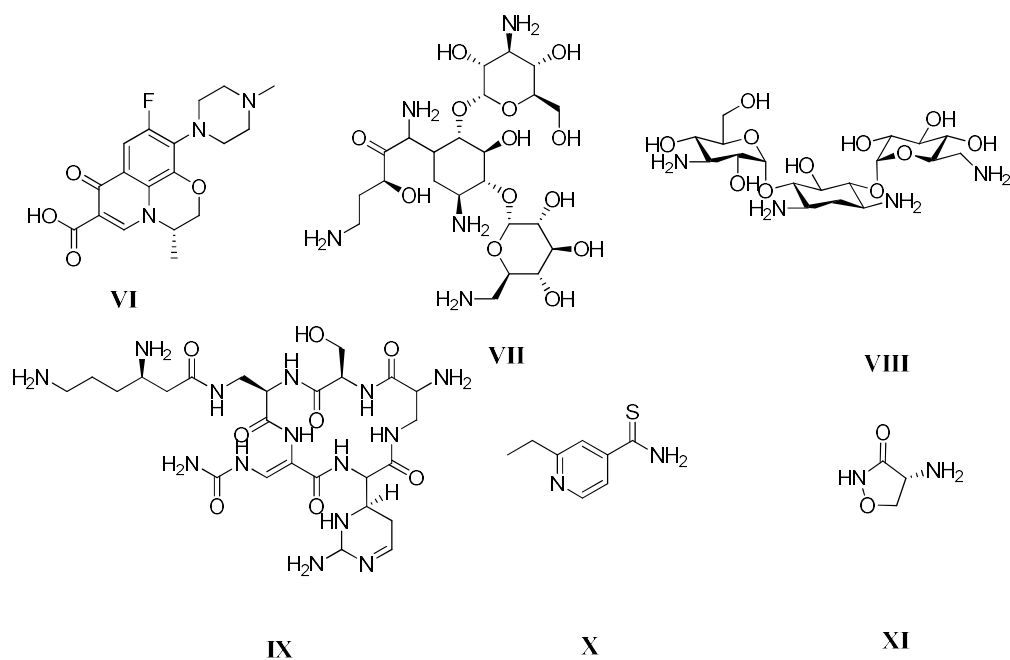
také přídatná antituberkulotika. Dále budou zmíněny nejvýznamnější látky z těchto skupin.

Cílem **fluorochinolonů** (např. **levofloxacin**, **VI**, Obr. 4) je bakteriální DNA gyrasa (topoisomerasa II), která aktivuje negativní nadšroubovicové vinutí DNA (tzv. supercoiling). Katalyzuje tedy proces navíjení do negativní superhelikální struktury kovalentně vázané cirkulární chromozomální a plazmidové molekuly DNA, která je uložena v bakteriální buňce. Gyrasa je důležitý bakteriální enzym, který je složen ze dvou podjednotek A a dvou podjednotek B. Rezistence na fluorochinolony spočívají v mutacích na pozicích Ala90 a Asp94, přičemž mutace na jedné aminokyselině nezpůsobí závažné změny v rezistenci, zatímco změnou na obou aminokyselinách způsobí silnou rezistenci na fluorochinolony.^{4,7}

Mezi injekční antituberkulotika řadíme skupinu aminoglykosidů, která kromě výše zmíněného streptomycinu (**V**, Obr. 3) zahrnuje **amikacin** (**VII**, Obr. 4) či **kanamycin** (**VIII**, Obr. 4). Injekčně se podává také **kapreomycin** (**IX**, Obr. 4). Poslední zmíněný je strukturně dosti odlišný proti ostatním, tudíž se s ním počítá jako náhradníkem, pokud by v budoucnu došlo ke zvýšení rezistence proti amikacinu/kanamycinu. Účinkem podávání aminoglykosidových anti-TB je ovlivnění proteinové syntézy, jenž je spjata s 16S rRNA.⁸

Perorální léčiva druhé volby zahrnují např. ethionamid či cykloserin. **Ethionamid** (**X**, Obr. 4.), se v léčbě TB používá od roku 1956 a slouží jako pro-drug stejně jako výše zmíněný isoniazid. Stejně jako isoniazid také inhibuje tvorbu mykolových kyselin nezbytných pro výstavbu buněčné stěny. Ovšem vznik rezistence vůči ethionamidu je méně častý než u isoniazidu.⁸

Posledním zmíněným léčivem druhé volby je širokospektrální antibiotikum **cykloserin** (**XI**, Obr. 4), cyklický analog D-alaninu. Jeho účinek spočívá v inhibici biosyntézy buněčné stěny prostřednictvím sekvenční blokády syntézy peptidoglykanu nutného pro výstavbu buněčné stěny. Může inhibovat 2 enzymy důležité pro syntézu peptidoglykanů - alaninracemasu a D-alanin-D-alaninligasu. Jeho širší využití je však limitováno nežádoucími účinky v podobě závažných neurologických poruch.⁸

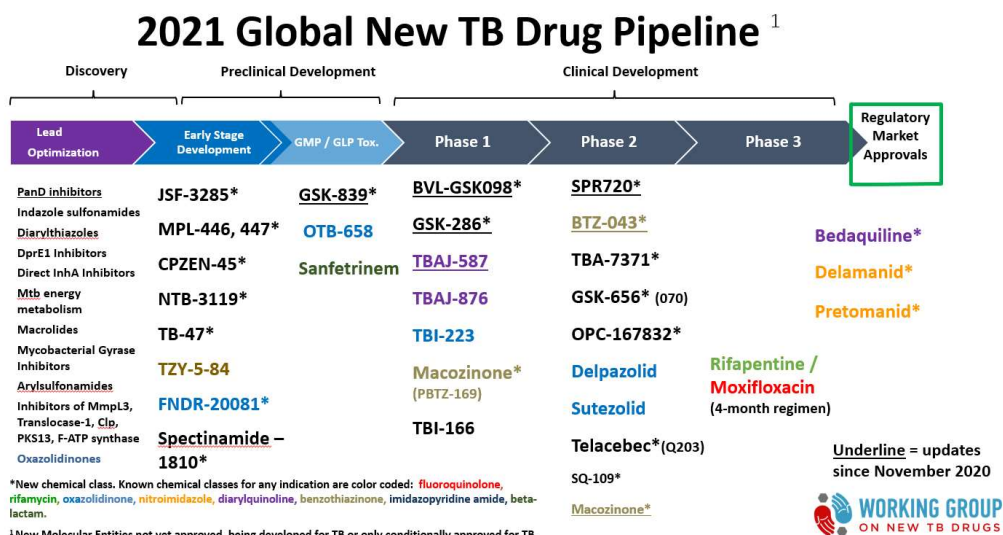


Obrázek 4. Antituberkulotika pro léčbu MDR-TB a XDR-TB.

2.3 Nová léčiva a jejich molekulární cíle

Jak již bylo zmíněno v úvodu, současná léčba TB má své limity. Proto je nutné vyvíjet nová léčiva, zvláště ta, která by významně zkrátila délku terapie a byla účinná i na rezistentní kmeny TB. Pracovní skupina Světové zdravotnické organizace pro boj s TB zveřejnila aktuální seznam léčiv v různých fázích preklinického i klinického vývoje. Souhrn těchto látek je uveden v Tabulce 2.

Tabulka 2: Souhrn látek právě se nacházejících v klinických testech. Převzato od Working group on new TB drugs.⁵



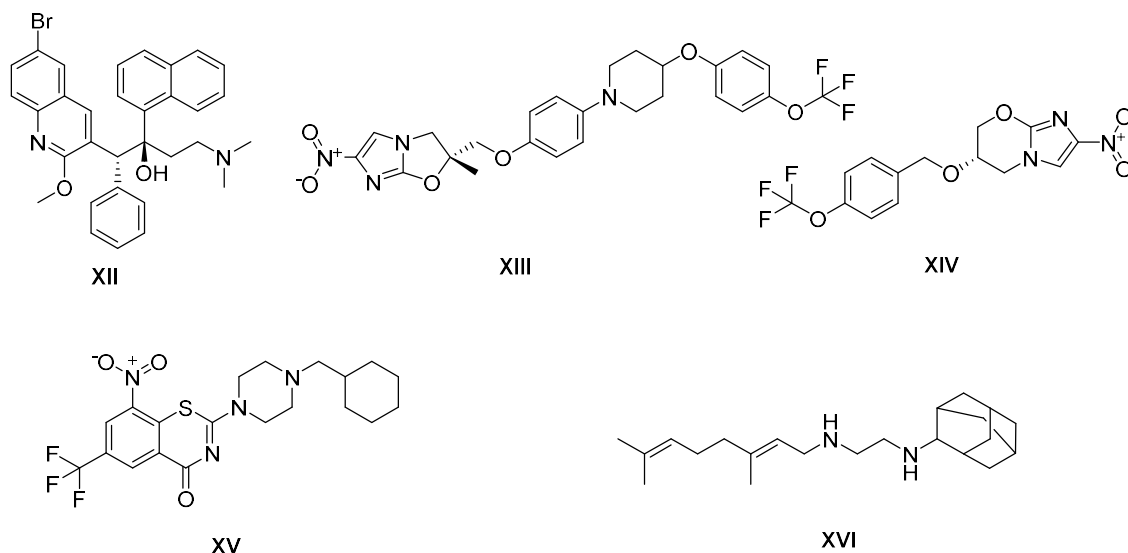
Mezi nejvýznamnější léčiva z této oblasti patří bedaquiline, delamanid, pretomanid, macozinone a derivát SQ109 (Obr. 5). **Bedaquiline** (XII, Obr. 5) spadá do skupin diarylchinolonů. Pro léčbu MDR-TB u dospělých jedinců byl jako doplněk k současným léčivům druhé linie americkou FDA schválen v roce 2012. Právě probíhají zkoušky tohoto léčiva v různých kombinacích pro léčbu kmenů TB rezistentních na fluorochinolonové léčiva. Bedaquiline cílí na *c* podjednotku ATP synthasy, kterou díky tvorbě komplexu blokuje a inhibuje tvorbu energie potřebnou pro množení bakterie.¹⁶ Díky této selektivní inhibici mykobakteriální ATP synthasy má vysokou baktericidní účinnost proti citlivým i multilékově rezistentním kmenům.

Delamanid (XIII, Obr. 5) patří do skupiny nitroimidazolů. Slouží jako prodrug, který se aktivuje až uvnitř organismu. FDA tento lék schválila pro užívání u dospělých pacientů od roku 2014. Delamanid způsobuje inhibici syntézy mykolových kyselin, což má za následek oslabení buněčné stěny a lepší permeabilitu léčiv dovnitř bacilu. U Delamanidu nebyly pozorovány antagonistické účinky s antiretrovirotiky, které užívají pacienti s HIV:^{18,45}

Pretomanid (XIV, Obr. 5) má velmi podobný mechanismus účinku jako Delamanid. Použití této látky pro léčbu XDR-TB bylo FDA schváleno v srpnu roku 2019.⁴⁶ Stejně jako Delamanid, patří i Pretomanid do skupiny nitroimidazolů. a inhibuje oxidaci hydroxymykolátů na ketomykoláty.³²

Macozinone/PBTZ169 (XV, Obr. 5) je řazen do skupiny piperazinobenzothiazonů a nachází se na hranici 1. a 2. fáze klinických testů. Váže se na enzyme DprE1, který je důležitý pro tvorbu komponent buněčné stěny. Z klinických studií vyplývá, že má synergické vlastnosti s bedaquilinem a clofazimem.⁴⁷

SQ109 (XVI, Obr. 5) je ethylendiaminový derivát a právě se nachází ve 3. fázi klinických testů. SQ109 vykazuje významnou aktivitu proti citlivým i MDR a XDR formám TB a jeho účinek se potencuje s účinkem izoniazidu, rifampicinu či bedaquilinu. Cílem SQ109 je transmembránový protein MmpL3, který je zodpovědný za přenos mykolových kyselin ve formě trehalózomomykolátu z cytoplasmy do prostoru buněčné stěny. Tento lipid se podílí na tvorbě dimykolátu, který má na starost integritu a pospolitost buněčné stěny.^{5,32}



Obrázek 5. Struktury léčiv v probíhajících klinických testech.

3 Vakcinace

Vakcinace spadá do hlavních kroků strategie WHO proti vymýcení tuberkulózy. Hlavní podstatou je imunizace populace v rizikových oblastech oslabeným kmenem *Mycobacterium bovis*, známým též jako Bacil Calmette-Guérinův (BCG).⁵ Historicky byl BCG první vakcínou proti tuberkulóze a o tento významný zvrat při boji s TB se zasloužili Albert Calmette a Camille Guérin. BCG vyvíjeli od roku 1905 a již v roce 1921 provedli první testy na lidech.

Současná očkovací strategie spočívá v preexpozičním očkování BCG, které chrání před onemocněním TB v dětství. Slouží k ochraně před nejzávažnějšími klinickými formami a netuberkulózními mykobakteriózami, ale nevede k eradikaci TB. Protektivní imunita může přetrvávat do dospělosti, bohužel však ne u všech jedinců, proto vakcinace pomocí BCG dostatečně nechrání před plicní TB v dospělosti. A proto také nesnížila celkovou závažnost této nemoci.

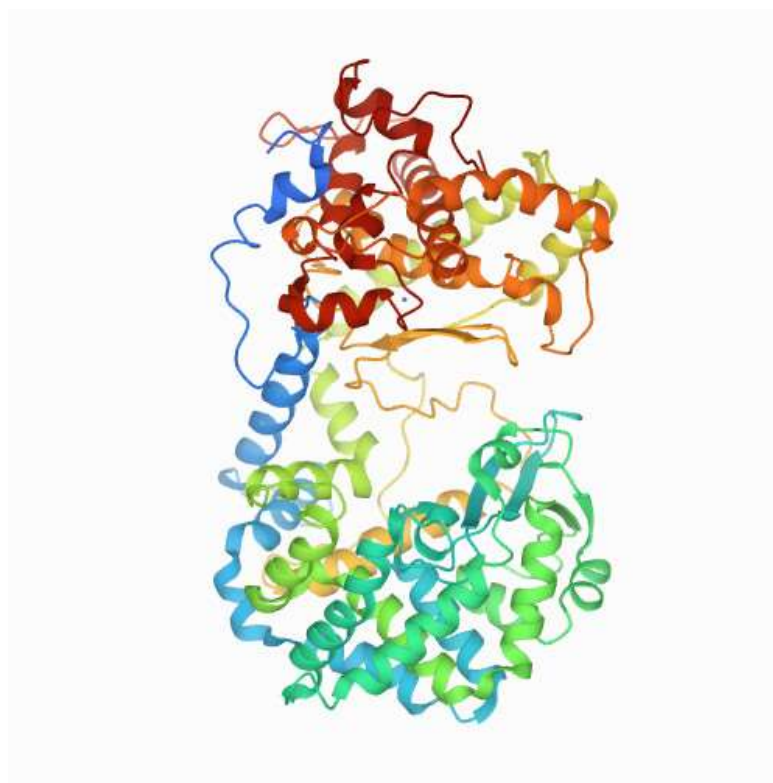
Z výše uvedených důvodů je tedy patrné, že je třeba se zaměřit i na využit nových očkovacích schémat k navození lepší imunity, než jaká vzniká po podání BCG, a to nejen při očkování novorozenců, ale i u mladistvých a dospělých.

4 Zmp1

Zinek závislá metlaoproteáza (Zmp1, Zinc-dependent metalloprotease-1) je mykobakteriální enzym, který sice neovlivňuje růst bakterií samotných, ale je životně důležitý pro přežití *Mtb* uvnitř hostitelského makrofágu. Podobný typ proteázy se nachází rovněž u *Mycobacterium leprae*, která je původcem lepry. Z hodnocení obou mykobakterií lze tvrdit, že Zmp1 patří mezi proteiny ovlivňující schopnost patogenu vyvolat u hostitele dané onemocnění (virulenci patogenu).⁴⁸

4.1 Struktura Zmp1

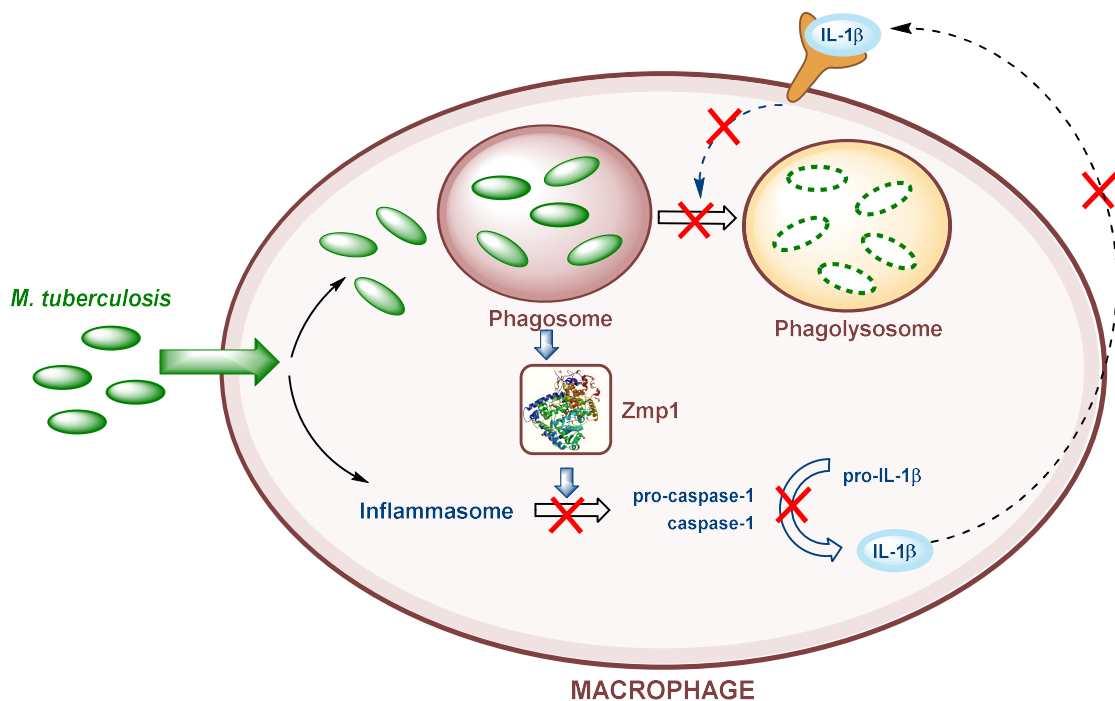
Co se týče struktury, enzym je tvořen dvěma α -helikálními laloky spojenými několika smyčkami přes ekvatoriální rovinu enzymu (Obr. 6).¹ Aktivní místo enzymu se nachází přibližně mezi dvěma helikálními laloky a je přístupné skrze malá okénka nacházející se naproti sobě na povrchu proteinu. Zinečnatý ion je koordinován s tetrahedrální geometrií mezi histidinovými zbytky His493 a His497.



Obrázek 6. Struktura mykobakteriální Zmp1.⁴⁹

4.2 Funkce inflammasomu a jeho inhibice Zmp1

Mykobateriální Zmp1 slouží jako jeden z důležitých enzymů pro přežití bakterie uvnitř hostitele (makrofágu). Jakmile bakterie vstoupí do plic a plicních sklípků, jsou fagocytovány alveolárními makrofágy za tvorby fagosomu, tvoří se interleukiny, které signalizují nutnost tvorby fagolysosomu pro rozložení patogenu (Obr. 7).^{50,51} *Mtb* má však schopnost celý tento proces blokovat. A to zejména díky své unikátní stavbě buněčné stěny a rovněž díky tzv. virulentním faktorům, což jsou molekuly produkované přímo bakterií, které blokují imunitní odpověď organismu na přítomnost *Mtb*. Právě zde je důležité zmínit Zmp1, která potlačuje funkci inflammasomu, jenž aktivuje neaktivní formu kaspas.^{3,25,28,52}



Obrázek 7. Schéma inhibičního působení Zmp1 na imunitní reakci makrofágu.⁴⁸

Aktivace inflammasomu je nezbytný proces vrozených imunitních odpovědí těla proti patogenním bakteriím. Běžné inflammasomy jsou tvořeny alespoň jednou sloučeninou ze souboru vrozených imunitních sensorů, takzvaných NOD-receptorů (NLR). Součástí NLR jsou proteinové receptory NALP3, NAIP5, IPAF a také adaptor ASC. Ty jsou zapojené v dráze pro aktivaci kaspasy-1 v imunitní odpovědi na bakteriální infekci. Odpovědí těla je aktivace cytokinů za vzniku interleukinu-1 β a interleukinu-18. Tuto aktivaci mohou spustit různé signály. Některé jsou běžné pro většinu bakterií, například produkty degradace buněčné stěny bakterií, které aktivují NALP3,

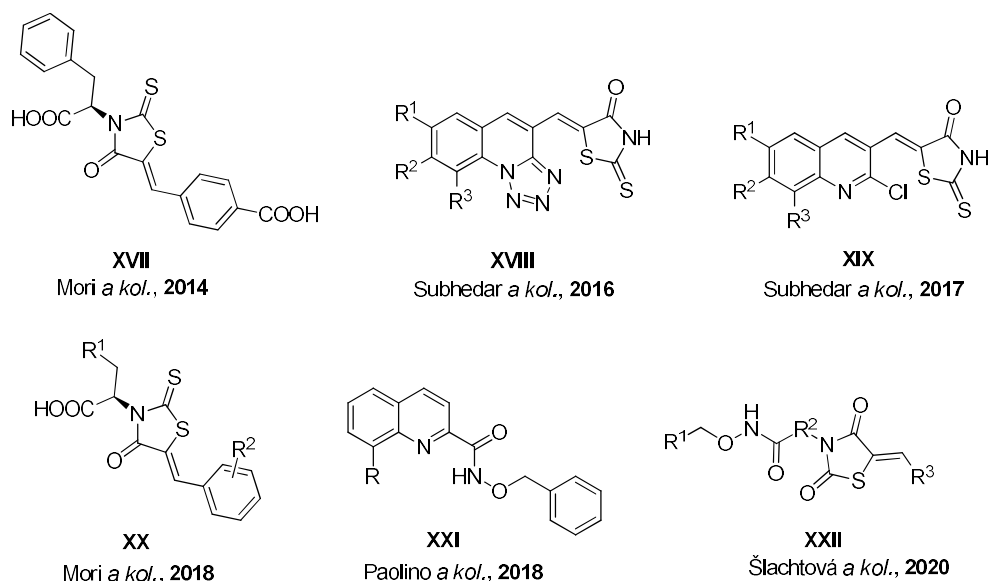
ASC-závislou dráhu inflamasomu. Ostatní signály jsou spuštěny živými bakteriemi a jsou více specifické. Objev enzymu Zmp1 v supernatantu buněčných kultur infikovaných *Mtb* byl průlom v studování života bakterie v organismu. V prvních studiích bylo navrženo, že je enzym vyplavován bakterií do organismu a ovlivňuje funkci peptidů a molekul zapojených při aktivaci inflamozomu.^{25,52}

Jednou z hlavních funkcí mykobakteriální Zmp1 je interference s aktivací proteinového oligomeru inflamasomu, který se nachází v cytosolu buněk, a maturací fagosomu (Obr. 7). Inhibice inflamasomu brání kaspase-1 v aktivaci interleukinu-1 β , jeho vazbě na IL-1R receptor a potlačuje dozrávání fagosomu za vzniku fagolysosomu sloužícího k likvidaci patogenů. Díky tomu dojde k přemnožení bakterií v makrofázích. Jestliže nedochází k dostatečné likvidaci bakterií v makrofázích, počnou se v plicích tvořit tzv. granulomy. Ty slouží jako rezervoár bakterií v těle hostitele a vyčkávají na příležitost opět napadnout organismus v období imunitní nedostatečnosti. Díky těmto granulomům může *Mtb* setrvávat v organismu až po dobu jednoho roku i přes léčbu antiTB léky.⁴⁸

5 Inhibitory Zmp1

Účinnost inhibice mykobakteriální Zmp1 je závislá na dostupnosti aktivního místa se zinečnatým iontem. Mezi pilotní studie zabývající se touto problematikou patří např. práce Petrera a kol., kteří studovali interakce této metaloproteasy s fosforamidonem a chelátory 1,10-fenantrolinem a EDTA.³ Dále následovalo jen omezené množství prací zabývajících se účinkem malých organických molekul na Zmp1.^{19,23,30,53–55} Všechny zkoumané látky mají jeden společný rys – obsahují určitou chemickou entitu s afinitou k Zn²⁺ iontu a okolnímu místu, takzvané zinek vázající skupiny (ZBG, zinc binding groups).

Většina dosud popsaných inhibitorů Zmp1 obsahuje rhodaninový^{30,53–55} či thiazolidindionový²³ skelet (Obr. 8). Dále se ze strukturního hlediska jedná o chemické sloučeniny na bázi hydroxamátů¹⁹ (Obr. 8). Tyto sloučeniny se totiž jeví velmi efektivní, co se afinity k Zn²⁺ iontu a jeho okolí díky π - π stackingu týče.



Obrázek 8. Struktury známých inhibitorů Zmp1.

5.1 Inhibitory Zmp1 s rhodaninovým skeletem

První inhibitory Zmp1 obsahující rhodaninový skelet byly popsány Mori a kol. v roce 2014 (Schéma 1).³⁰ Kombinací *in silico* designu a biochemických studií dospěli k Zmp1 inhibitoru **XVII** (Schéma 1) dosahujícího K_i *Mtb* Zmp1 = 94 nM. Syntéza tohoto inhibitoru vycházela z opticky čistého fenylalaninu **XXIII**, který reakcí se sirouhlíkem poskytl intermediát **XXIV**. Tento derivát byl následně reagován s chloracetátem sodným a cyklizován za kyselých podmínek za vzniku rhodaninu **XXVI**. V posledním kroku byla provedena Knoevenagelova kondenzace (resp. Verleyho modifikace) za vzniku požadovaného rhodaninu **XVII**.

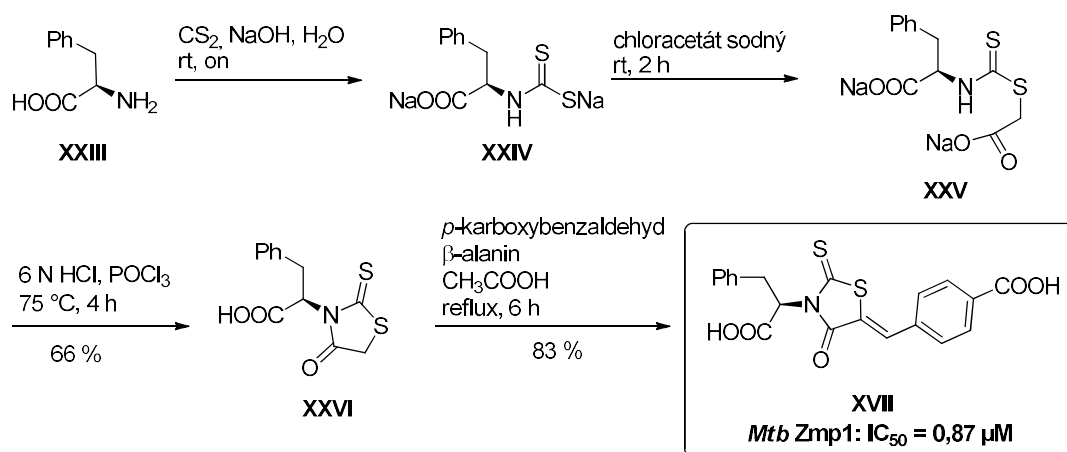


Schéma 1. Syntéza rhodaninového derivátu **XVII**.³⁰

Mori a kol. pak dále navázali na výše uvedenou práci a rozšířili syntetizované rhodaniny substitucemi R^1 a R^2 (Schéma 2).⁵⁵ K této sérii látek navíc přidali i substituované thiazoly (Schéma 3). Syntéza substituovaných rhodaninů probíhala obdobným způsobem jako u předchozí studie (Schéma 2). Příprava substituovaných thiazolů (Schéma 3) začíná methylací D-fenylalaninu **XXIII** za využití thionyl chloridu a methanolu za vzniku methylesteru D-fenylalaninu **XXVII**. Ten následně reaguje s methoxykarbonylisothiokyanátem v bazickém prostředí DIPEA za vzniku derivátu **XXVIII**. Ten byl hydrolyzován v prostředí NaOH za vzniku **XXIX**, jenž byl následně podroben Hantzchově syntéze thiazolu, kdy docházelo ke kondenzaci derivátu **XXIX** se substituovaným α -bromoacetofenonem za vzniku derivátu **XXX**.

Celkově všechny rhodaniny ukázali inhibiční aktivitu vůči rekombinantní Zmp1 v rozmezí $IC_{50} = 1,3 - 43,9 \mu M$, přičemž nejslibnější účinky vykázal derivát **XVIIa** (Schéma 2). Z thiazolů jen dva projeví měřitelnou inhibicí ($IC_{50} = 35,7$ a $41,3 \mu M$), přičemž aktivnější z těchto dvou derivátů, látka **XXXa**, je znázorněna na Schématu 3.

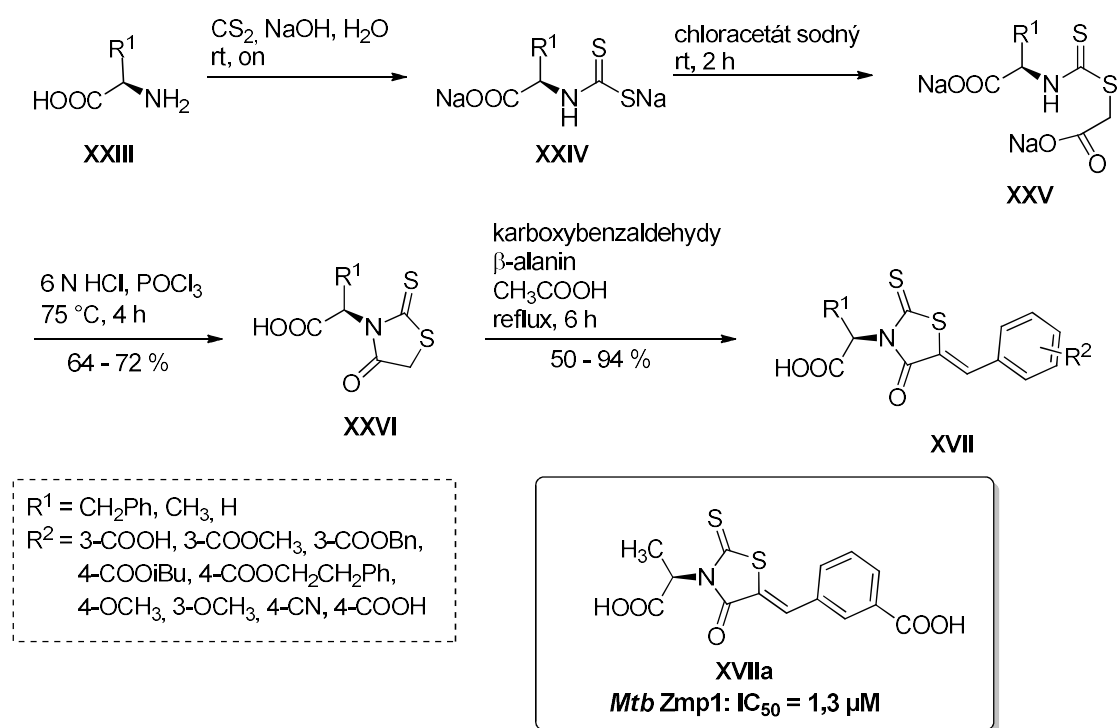


Schéma 2. Syntéza substituovaných rhodaninů.⁵⁵

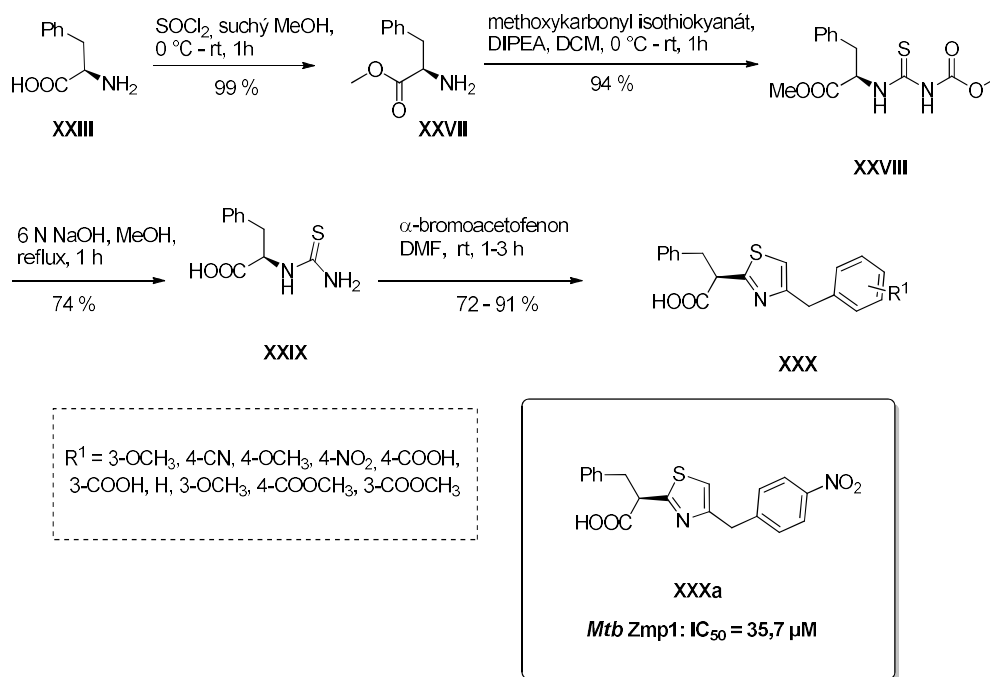


Schéma 3. Syntéza substituovaných thiazolových konjugátů **XXX**.⁵⁵

Subhedar a kol. se v roce 2016 zabývali konjugací tetrazolochinolinů se substituovanými rhodaniny a posuzovali jejich aktivitu vůči několika cílům.⁵³ Hlavním cílem jejich výzkumu se však stala inhibice mykobakteriální Zmp1. Klíčovým krokem syntézy (Schéma 4) byla Knoevenagelova kondenzace rhodaninového skeletu **XXXII** (substituovaného či nikoli) a tetrazolochinolinového skeletu **XXXI**. Reakce probíhala za bazické katalýzy 20 mol. % [HDBU][HSO₄]. Nejaktivnějším derivátem z této série se ukázal rhodanin **XVIIIa** (Schéma 4), který dosahoval hodnot MIC = 4,5 μg/ml.

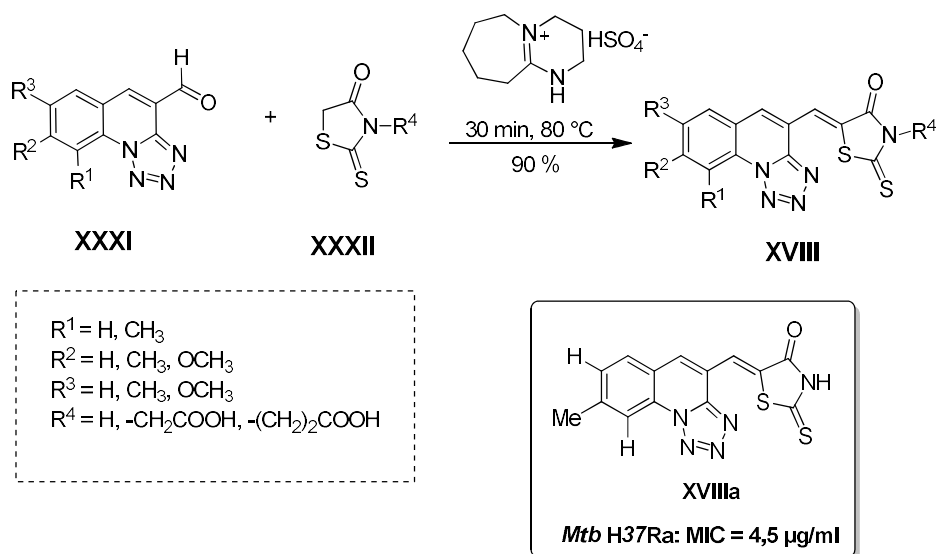


Schéma 4. Syntéza tetrazolochinolin-rhodaninových konjugátů **XVIII**.⁵³

Následující rok byly v téže skupině syntetizovány konjugáty rhodaninu s chinolinovými molekulami.⁵⁴ Příprava chinolinů (Schéma 5) vychází z patričných anilinů **XXXIII**, které se acetylují a připravený acetanilid **XXXIV** je formylován Vilsmeier-Haack metodou. Vzniknuvší aldehyd **XXXV** je následně podroben Knoevenagelově kondenzaci v bazickém prostředí za vzniků konjugátu **XXXV**. Všechny konjugáty z navržené série látek byly podrobeny biologickému testování oproti atenuovanému bacilu *Mtb*, *Mbb* a dalším bakteriálním a houbovým patogenům. Neaktivnějšími deriváty oproti *Mtb* se staly s IC₅₀ rovno 1,9 µg/ml deriváty **XIXa** a **XIXb**.

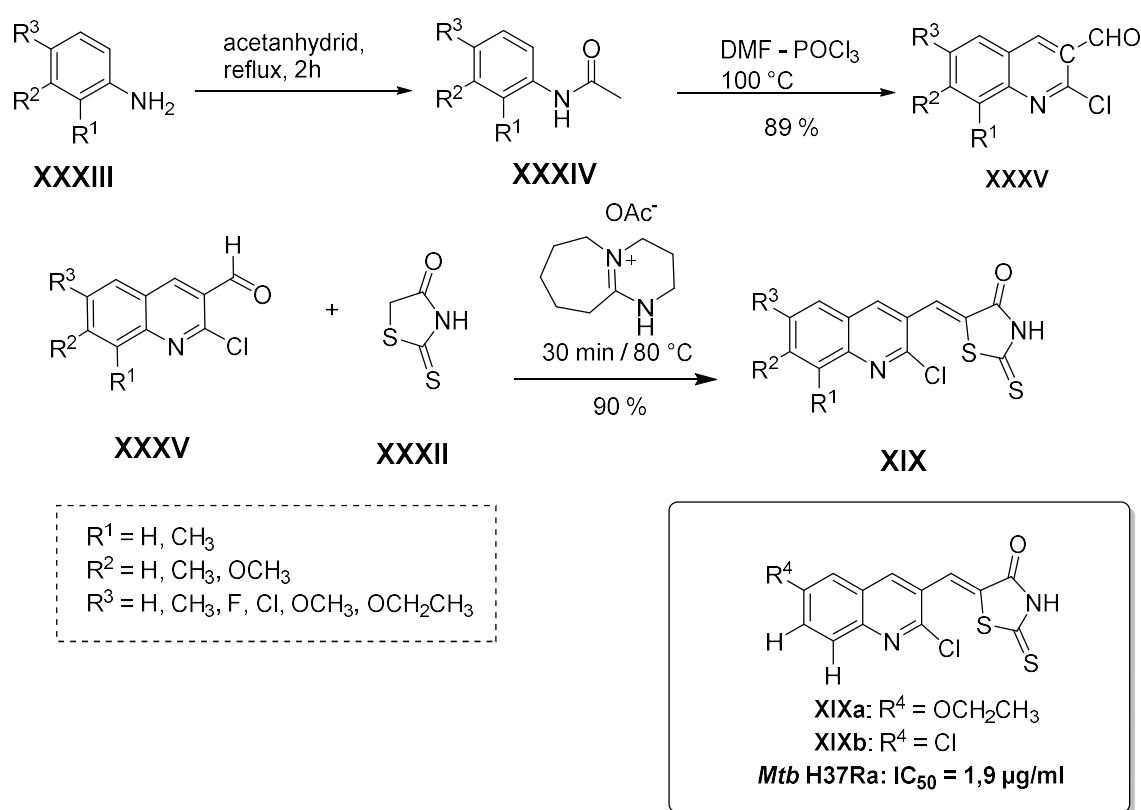


Schéma 5. Příprava chinolino-rhodaninových konjugátů.⁵⁴

5.2 Inhibitory založené na hydroxamátech 8-hydroxychinolinů

V roce 2018 vydala výzkumná skupina Marca Paolina článek zabírající se biologickou aktivitou látek s 8-hydroxychinolinovým jádrem.¹⁹ Na tomto chinolinovém jádře byla provedena substituce v poloze 2. Byla připravena série 18-ti látek, na kterých byl studován vztah struktury a inhibiční aktivity. Základním stavebním kamenem k syntéze požadovaných derivátů je 8-hydroxy-2-chinolinkarboxylová kyselina **XXXV**

(Schéma 6), která byla podrobena couplingu s hydroxylaminu **XXXVI** v prostředí *N*-methylmorfolinu (NMM), ethyl(dimethylaminopropyl)karbodiimidu (EDC) a hydroxybenzotriazolu (HOBt). Všechny látky byly smíseny a po rozpuštění v DMF byla reakce ponechána při laboratorní teplotě po dobu 2 hodin za vzniku hydroxamátu **XXXVII**.¹⁹

Ze všech studovaných derivátů se jako nejlepší ukázala látka **XXIa** (Schéma 6), která má v poloze 2 navázanou benzylohydroxamátovou skupinu.

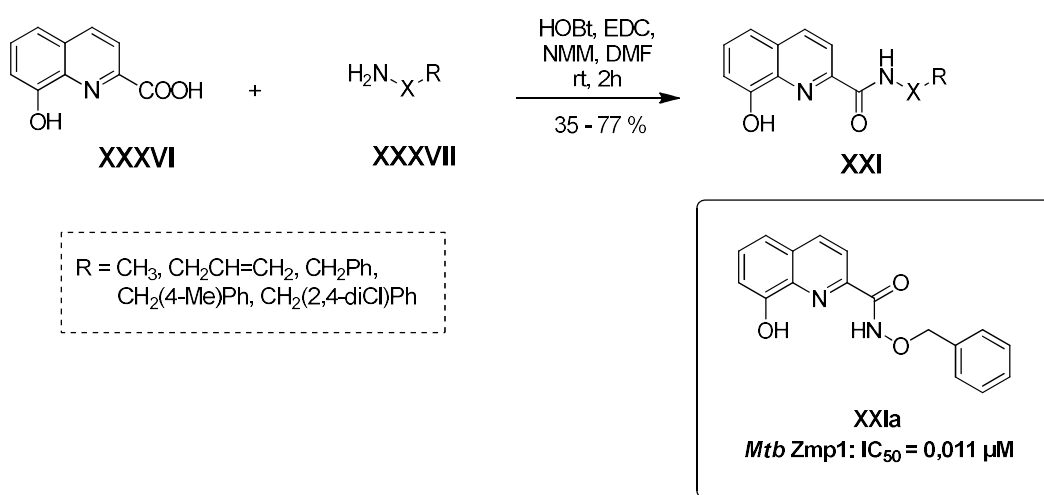
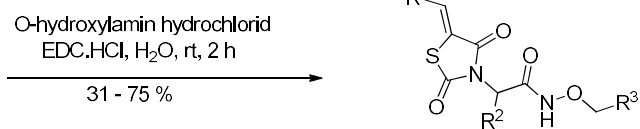
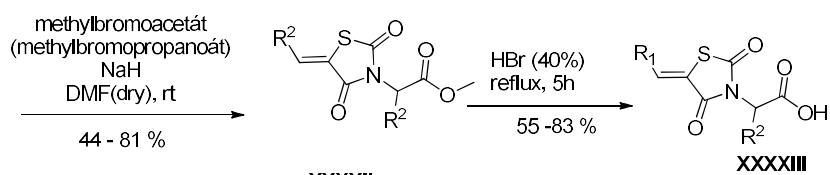
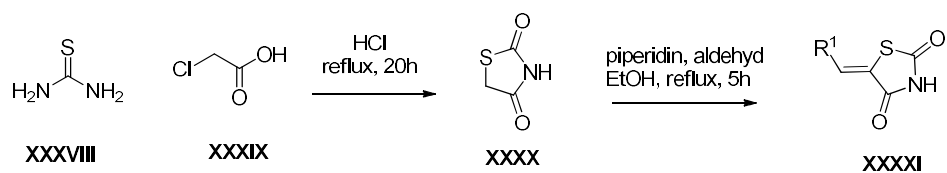


Schéma 6. Příprava hydroxamátových derivátů.¹⁹

5.3 Inhibitory se substituovaným thazolidin-2,4-dionovým skeletem

Prozatím poslední známé inhibitory mykobakteriální Zmp1 byl publikovány výzkumnou skupinou Dr. Brulíkové v roce 2020.²³ V této skupině byla připravena série thiazolidindion-hydroxamátů jejichž syntéza je znázorněna na Schématu 7. Výchozí TZD **XXXX** byl syntetizován kondenzací kyseliny chloroctové **XXXIX** s thiomocovinou **XXXVIII** v kyselém prostředí. Thiazolidindion **XXXX** byl dále podroben Knoevenagelově kondenzaci s příslušným aldehydem v prostředí piperidinu. Následně byly deriváty **XXXXI** *N*-alkylovány methylbromoacetátem v bazickém prostředí za vzniku intermediátů **XXXXII**. Dalším krokem syntézy byla tvorba karboxylové kyseliny **XXXXIII** v prostředí koncentrované HBr. Finálním krokem byla tvorba hydroxamátů **XXII** s *O*-hydroxylaminem v prostředí EDC.HCl.²³

Kompletní série látek byla podrobena biologickému testování na mykobakteriální Zmp1 a neaktivněji strukturou se jeví derivát **XXIIa** (Schéma 7).



R¹ = Ph, 4-CF₃Ph, 4-FPh, butyl
 R² = H, CH₃
 R³ = allyl, benzyl

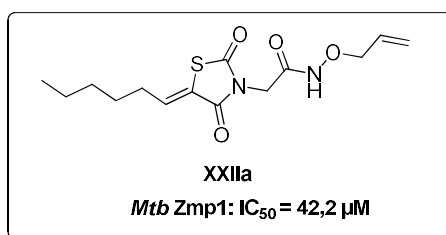


Schéma 7. Syntéza inhibitorů Zmp1 s thiazolidindionovým skeletem.²³

VÝSLEDKY A DISKUZE

K dosažení cílových derivátů byly zvoleny dva přístupy vycházející z dioxothiazolidinyl octové kyseliny (Schéma 8). První z nich spočívá v primární alkylation thiazolidinového skeletu na dusíku a následném vystavení peptidového řetězce. Druhý přístup je pak založen na opačném syntetickém postupu. Nejdříve je vystaven peptidový řetězec a až poté dochází k alkylation na dusíkovém heteroatomu thiazolidinového skeletu. Oba tyto přístupy budou podrobně diskutovány v následujících podkapitolách.

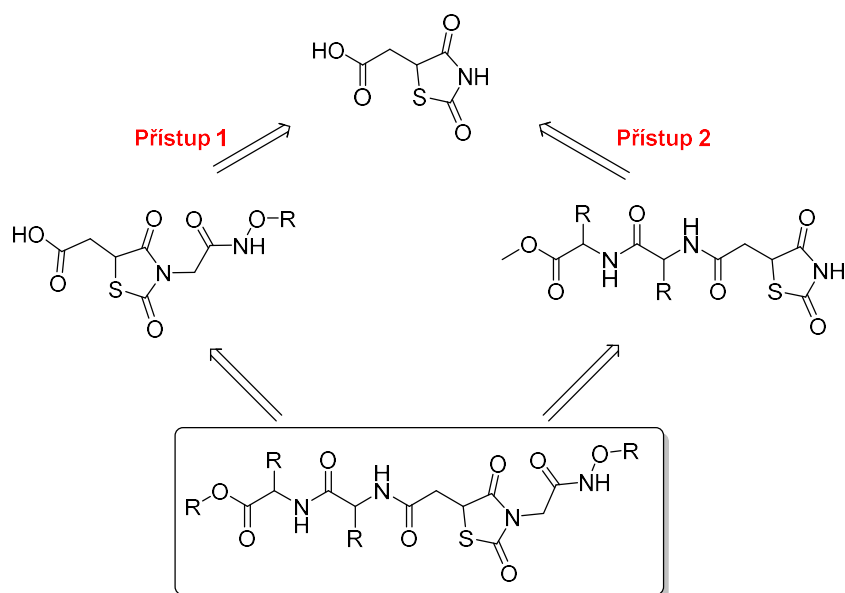


Schéma 8. Schématické znázornění dvou syntetických přístupů vedoucích k cílovým derivátům.

6 Syntéza finálních derivátů pomocí přístupu 1

První přístup k syntéze požadovaných derivátů spočívá v přípravě výchozí kyseliny **3**, která je následně ochráněna za vzniku esteru **4**. Dále následuje *N*-alkylace na thiazolidindionovém skeletu, vznik hydroxamátů **8** a nakonec zavedení požadovaného dipeptidu. Jednotlivé kroky syntézy budou postupně diskutovány v následujících podkapitolách.

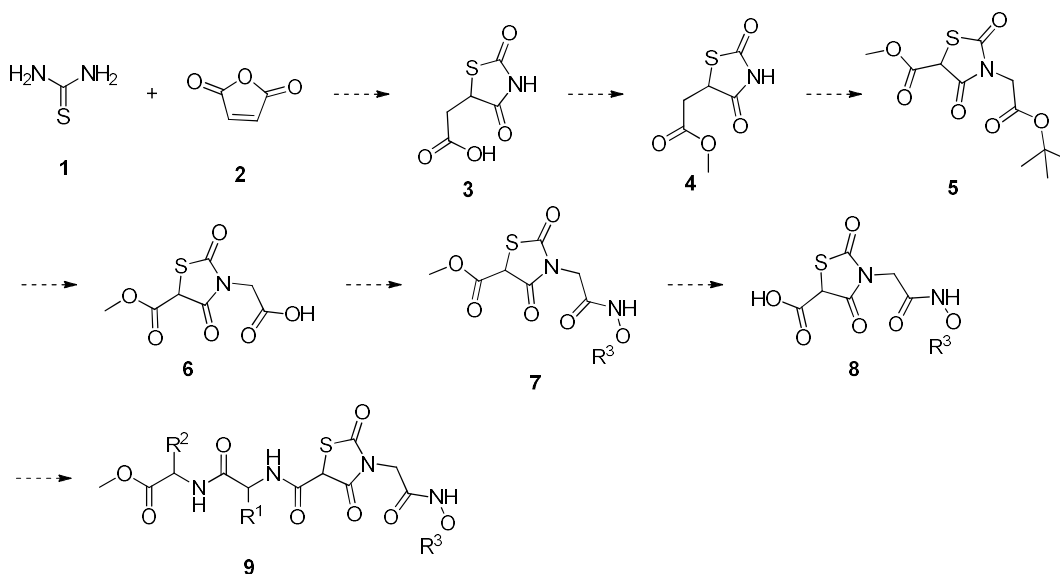


Schéma 9. Návrh syntetické cesty vedoucí k požadovaným derivátům pomocí přístupu 1.

6.1 Příprava výchozí kyseliny 3

Klíčovým krokem syntézy byla příprava výchozí dioxothiazolidinyl octové kyseliny **3** (Schéma 10). Tato sloučenina je již známá a podmínky pro přípravu byly převzaty od Zimenkovsii a kol.⁵⁶ Syntéza spočívá v kondenzaci thioamočoviny **1** s maleinanhydridem **2** v prostředí koncentrované kyseliny chlorovodíkové za refluxu po dobu 5 hodin. Po první hodině reakce byl pozorován vznik sraženiny, která následně opět přešla do roztoku. Po 5-ti hodinách byla reakční směs ochlazena a izolována. Pomocí LC-MS bylo zjištěno, že vzniká čistý produkt, jehož hmota však neodpovídala požadovanému produktu **3**. Následně jsme pomocí NMR zjistili, že nedochází k hydrolyze derivátu **10** (Schéma 10) na požadovaný produkt **3**, ale po udané době reakce je izolován právě imin **10**, což bylo potvrzeno i pomocí HRMS.

Poté jsme reakční dobu zvedli na 16 hodin a ta již byla dostačující k přípravě požadované kyseliny **3**. Kyselina byla připravována v několika šaržích, kdy výtěžky dosahovali 55–79 %. NMR spektra odpovídala publikovaným datům.⁵⁶

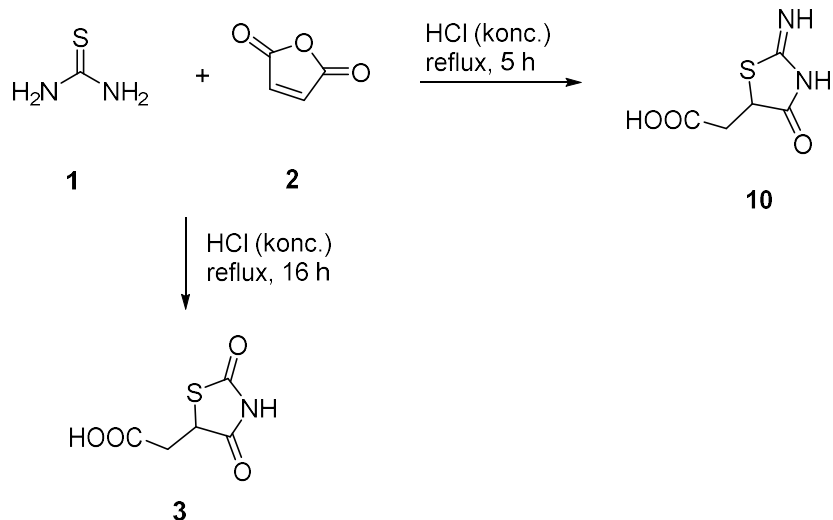


Schéma 10. Syntéza výchozí dioxothiazolidinyl octové kyseliny **3**.

6.2 Příprava methylesteru **4**

K ochranění karboxylové skupiny byla zvolena Fisherova esterifikace. Předtím, než jsme identifikovali nehydrolyzovaný iminový derivát **10**, byl právě tento derivát podroben esterifikaci karboxylové kyseliny za vzniku methylesteru **11** (Schéma 11). K thiazolidinovému substrátu **10** byl přidán methanol a za míchání byla přikapána koncentrovaná kyselina sírová. Tato reakce probíhala za refluxu po dobu 2–4 hodin za monitorování pomocí tenkovrstvé chromatografie (TLC) a LC-MS. Jakmile nebyla pozorována změna v konverzi, byla reakční směs odpařena buďto pod atmosférou N₂ nebo na rotační vakuové odparce (RVO) a následně byl produkt izolován za zisku bílé krystalické látky za zisku bílé krystalické látky **11**. Výtěžek této reakce činil 52 %.

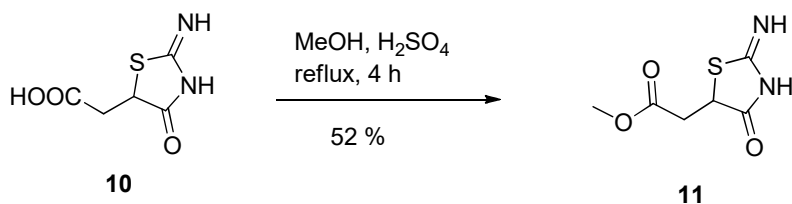


Schéma 11. Esterifikace iminového derivátu **10** na methylester **11**.

Stejné reakční podmínky byly použity pro syntézu požadovaného methylesteru **4** (Schéma 12). Tato syntéza probíhala v několika šaržích za zisku bílé krystalické látky **4** s výtěžky od 54 do 62 %.

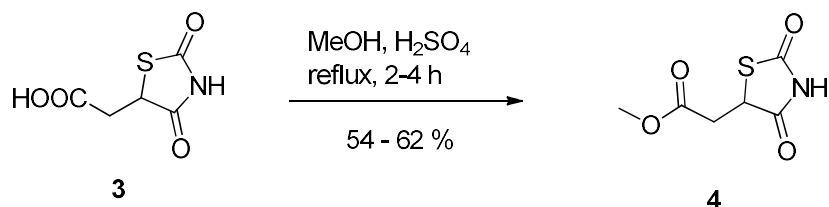


Schéma 12. Převedení karboxylové kyseliny **3** na methylester **4**.

6.3 Reakce s *t*-butylbromoacetátem

Následujícím krokem syntézy bylo navázání *t*-butylesteru octové kyseliny k substrátu **4**. Tato reakce probíhala s *t*-butyl bromoacetátem za bazické katalýzy K_2CO_3 v prostředí dimethylformamidu (DMF) (Schéma 13). Průběh reakce byl sledován pomocí TLC a LC-MS a po konverzi původního substrátu **4** na derivát **5** byla reakce postupně ochlazena na laboratorní teplotu a produkt extrahován z reakční směsi. Tato reakce byla několikrát opakována za výtěžků pohybujících se v rozmezí 73-83 % a získaným produktem **5** byl gel zelené barvy.

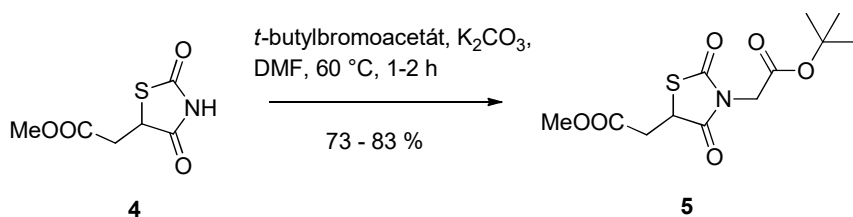


Schéma 13. Navázání *t*-butylacetátu na thiazolidinový substrát.

6.4 Deprotekce chránící skupiny

Abychom mohli navázat hydroxylaminy na náš substrát **6**, bylo třeba odštěpit *t*-butylester a vytvořit karboxylovou skupinu. Byla zvolena metoda štěpení pomocí kyseliny trifluoroctové (TFA) v prostředí dichlormethanu (DCM) za laboratorní teploty (Schéma 14). Monitorování reakce probíhalo v hodinových intervalech pomocí LC-MS.

Po dvou hodinách bylo dosaženo 100% odštěpení esteru. Zpracování spočívalo v odfoukání štěpící směsi a vysušení na RVO. Tato deprotektce byla prováděna v pěti šaržích za zisku hnědého oleje a výtěžkem odpovídajícím 90-98 %.

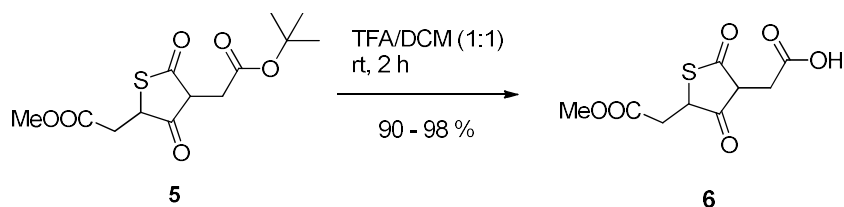


Schéma 14. Odchránění *t*-butylesteru a tvorba volné karboxylové kyseliny.

6.5 Reakce s hydroxylaminu

Navázání hydroxylaminů na karboxylovou kyselinu **6** bylo provedeno pomocí couplingu v prostředí EDC.HCl za míchání při laboratorní teplotě po dobu 16 hodin (Schéma 15). Monitoring reakce probíhal pomocí TLC a LC-MS. Po uplynutí 16 hodin, kdy byla pozorována úplná konverze výchozí látky, byly produkty extrahovány do ethylacetátu a následně purifikovány pomocí sloupcové chromatografie za užití gradientové eluce. Získané látky **7a** a **7b** byly průsvitné gely a jejich hmotnostní zisk odpovídal výtěžkům 58 % pro benzylhydroxamát **7b** a 60 % pro allylhydroxamát **7a**. Nižší výtěžky mohly být způsobeny sorpcí na silikagel z důvodu nerozpustnosti ve zvolené mobilní fázi.

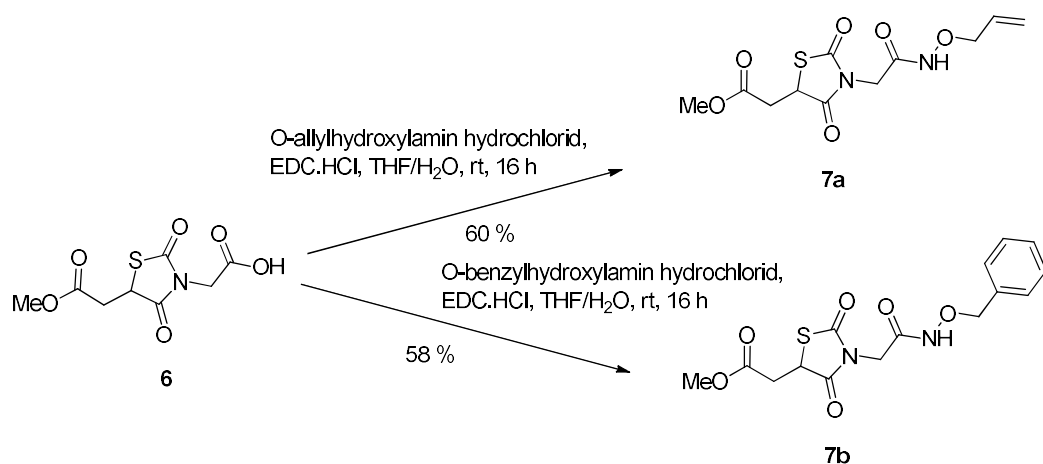


Schéma 15. Příprava hydroxamátů z výchozí kyseliny **6**.

6.6 Příprava kyseliny 8

Pro navázání aminokyseliny nebo dipeptidu na karboxylovou kyselinu v poloze 5 bylo potřeba odstranit methylesterovou skupinu a připravit volnou karboxylovou kyselinu (Schéma 16). Tento krok se ukázal jako nejproblematičtější z celého návrhu syntézy. Byly vyzkoušeny různé reakční podmínky (bazické i kyselé), bohužel se však ani v jednom případě nepodařilo izolovat kýžený produkt. Ve všech případech docházelo pravděpodobně buď k otevření thiazolidindionového cyklu či ke štěpení hydroxamátu (viz. dále).

Nejdříve byly vyzkoušeny podmínky z patentu Johnson a kol.⁵⁷ spočívající v bazické hydrolyze za využití 1M LiOH (Schéma 15). Nejprve byl derivát **7b** rozpuštěn v THF (1 ml/mmol) a k této směsi bylo přilito 3 molární ekvivalenty LiOH a směs byla míchána při RT po dobu 5 hodin. Po analýze reakční směsi však bylo zjištěno, že nevzniká požadovaný derivát, ale dochází ke vzniku produktu, který má pravděpodobně rozštěpen TZD cyklus (domněnka dle LC-MS a ¹H NMR). Dále jsme zkoušeli zkrátit reakční čas na 4h a poté na 1h. Zjistili jsme, že už po hodině byla výchozí látka odreagována, ale nevznikl požadovaný produkt, pouze neznámý derivát jako v předchozím případě. Z časových důvodů jsme se analýze neznámé látky dále nevěnovali.

Tato hydrolyza byla testována i na allylovém derivátu **7a**, avšak se stejným neúspěšným výsledkem.

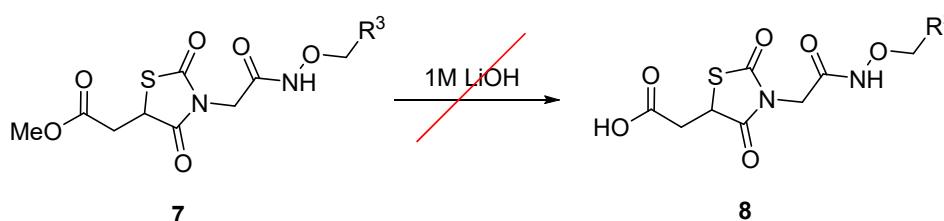


Schéma 16. Bazická hydrolyza methylesterové skupiny derivátu **7**.

Dále jsme testovali kyselou hydrolyzu s využitím 6M HCl (Schéma 17). Nejprve byl methylester **7a** smísen s 6M HCl a reakční směs byla ohřívána na 105 °C pod zpětným chladičem po dobu jedné hodiny. Monitoring této reakce byl prováděn pomocí TLC a LC-MS v půlhodinových intervalech. Po první půlhodině byl pozorován pomocí TLC úbytek původního substrátu a LC-MS analýza ukázala, že se odštěpil hydroxamát

i methylester a dal vzniknout pravděpodobně dikarboxylovému derivátu. Tento derivát nebyl potvrzen jinou analýzou, proto je níže uveden v hranatých závorkách.

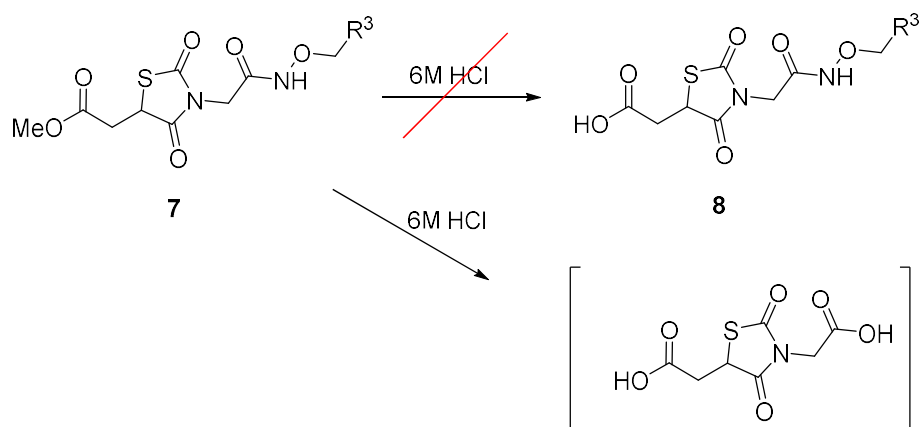


Schéma 17. Kyselá hydrolyza methylesterové skupiny derivátu 7.

Kyselá hydrolyza byla testována i při nižší teplotě 70 °C. Monitorování této reakce bylo prováděno v 30-ti minutových intervalech pomocí TLC a LC-MS. Analýza LC-MS ukázala, že již po půlhodině dochází ke vzniku majoritního množství dikarboxylového derivátu. Z těchto důvodů se ani kyselá hydrolyza pomocí HCl neukázala být vhodná.

Jelikož se nám nepodařilo v daném čase nalézt vhodné podmínky pro odstranění methylesterové chránící skupiny, musela být tato část projektu ukončena. Při zkoumání literatury jsme však nenarazili na žádné další reakční podmínky, které by mohly být použity tak, aby byl zachován thiazolidindionový skelet i hydroxamát. Pravděpodobně tedy tato strategie syntézy není vhodná.

7 Syntéza finálních derivátů pomocí přístupu 2

Druhý přístup k syntéze požadovaných derivátů vycházel ze stejné kyseliny jako v předchozím případě (Schéma 18). Ta by však měla být nejdříve modifikována za vzniku dipeptidu **12**. Poté by byl dusík *N*-alkylován *t*-butylbromoacetátem na produkt **13**, esterová skupina by byla odštěpena v prostředí TFA a dala tím vzniknout intermediátu **14**. Finálním krokem syntézy by byl coupling hydroxylaminů s volnou karboxylovou kyselinou za vzniku finálních derivátů **15**.

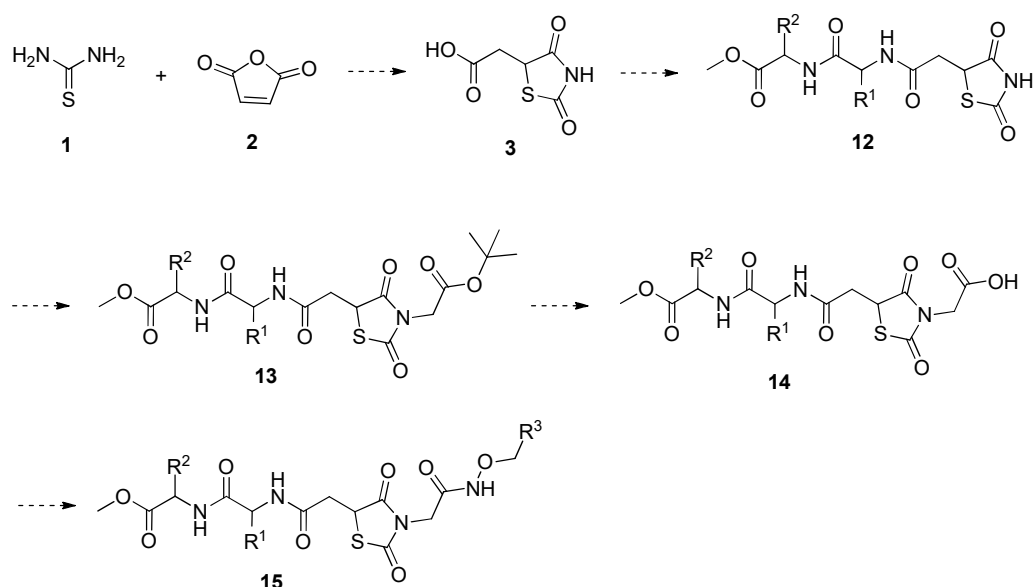


Schéma 18. Schéma plánu syntézy upřednostňující výstavbu dipeptidu.

7.1 Příprava vhodných prekurzorů

Výchozí kyselina **3** byla připravena stejným způsobem jako v předchozím případě (Kapitola 6.1). Dále bylo potřeba připravit dipeptid **12** (Schéma 18). K syntéze tohoto dipeptidu bylo přistupováno dvěma způsoby. Prvním z nich byla konjugace kyseliny **3** přímo s vhodně modifikovaným dipeptidem. Druhým způsobem pak byla postupná výstavba dipeptidu na kyselině **3**.

Nejprve však bylo nutné připravit si vhodně substituované prekurzory – methylestery aminokyselin Val a Leu (Schéma 19). Esterifikace probíhala pomocí SOCl₂ a MeOH po dobu 4 h. U Leu reakce probíhala kvantitativně, u Val byl výtěžek 73 %. Nižší výtěžek byl způsoben částečným vylitím reakční směsi neopatrnou manipulací.

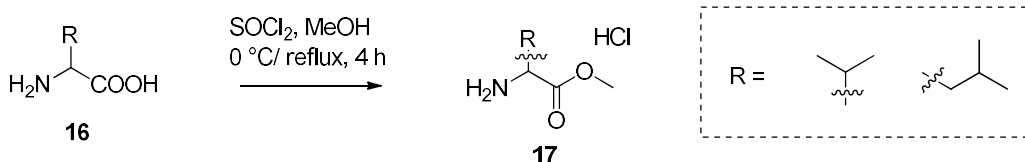


Schéma 19. Příprava methylesterů aminokyselin.

Z připravených methylesterů Val a Leu a komerčně dostupných dalších derivátů jsme chtěli připravit 4 požadované dipeptidy (Gly-Val, Gly-Leu, Ala-Val, Ala-Leu). Nejprve jsme začali syntézou dipeptidu **19** uvedeného na Schématu 20. Podmínky pro tuto reakci byly převzaty od kolegů ze skupiny, kteří tuto reakci prováděli přede mnou. Kyselina **18** byla rozpuštěna v DCM, smísena s HOBt, byla přikapána DIPEA a následně byl přidán EDC.HCl. Takto připravená směs byla míchána po dobu 15 minut při RT a následně k ní byla přidána druhá aminokyselina. Takto byla reakce míchána po dobu 19 hodin. Po izolaci látky **19** bylo zjištěno, že výtěžek je pouhých 11 %. Vzhledem k tomu, že konverze pozorována pomocí TLC byla vysoká, muselo dojít někde během syntézy k chybě v přípravě nebo zpracování finální látky a ovlivnit tak celkový výsledek syntézy.



Schéma 20. Příprava dipeptidu **19**.

Paralelně byly požadované dipeptidy připravovány i kolegy z výzkumné skupiny. Vzhledem k časové tísní způsobené karanténou kvůli aktuální pandemii koronaviru nebyla další syntéza dipeptidů realizována a požadované prekurzory mi byly poskytnuty kolegy. Tak mohla být realizována přímá konjugace kyseliny **3** s dipeptidem (Schéma 20).

7.2 Kondenzace aminokyselin a derivátu **3**

Nejdříve byla karboxylová kyselina **3** rozpuštěna v DMF a pak bylo přidáno HOBt, DIPEA a EDC (Schéma 21). Tato reakční směs byla míchána po dobu 15 minut a k ní následně přidán dipeptid Ala-Val. Dále byla reakční směs ponechána reagovat při RT po dobu 19 hodin a následně izolována extrakcí do DCM. Po analýze pomocí LC-MS byla

zjištěna velmi nízká konverze na požadovaný produkt. Jedna z domněnek je ta, že mohlo docházet k cyklizaci dipeptidu za tvorby 2,5-diketopiperazinu, což může negativně ovlivňovat konverzi na kýžený produkt **12a**.



Schéma 21. Coupling dipeptidu s volnou karboxylovou kyselinou **3**.

Abychom se vyhnuly možné kondenzaci dipeptidu na výše zmíněné diketopiperaziny, byla navržena postupná syntéza pomocí navázání jednotlivých aminokyselin pomocí EDC couplingu (Schéma 22). K této reakci bylo použito EDC.HCl za přítomnosti HOBT a DIPEA. Kyselina **3** byla rozpuštěna v DMF a následně byl přidán methylester aminokyseliny (Val, Leu), HOBT a poté přidána DIPEA. Takto připravená reakční směs byla míchána 15 minut za rt a k ní bylo přisypáno EDC.HCl. Takto směs reagovala 20 hodin. Po uplynutí reakční doby byla směs izolována a analyzována pomocí LC-MS. Z naměřených hodnot bylo zřejmé, že konverze na produkty **20a** a **20b** byla příliš nízká a výsledné produkty nebyly izolovány.

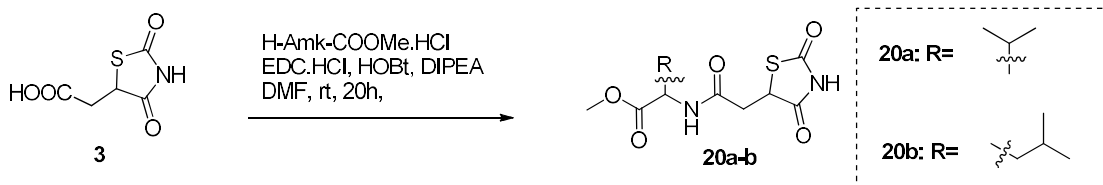


Schéma 22. Coupling aminokyselin s karboxylovou kyselinou **3**.

Nakonec byla vyzkoušena reakce, kde se místo EDC využívá HATU (Schéma 23). Tato reakce se prováděla v bazickém prostředí DIPEA. Reagenty jsou přidávány v přesném pořadí a směs reagována za RT přes noc. Dle LC-MS byla však opět pozorována velmi nízká konverze.⁵⁸

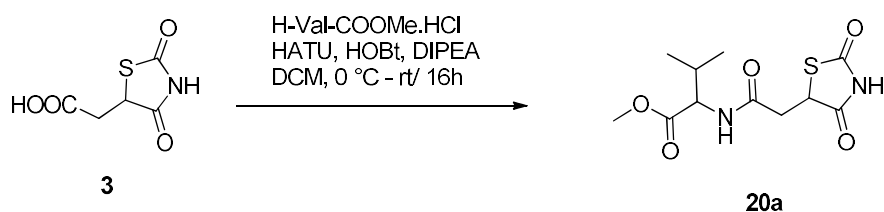


Schéma 23. Navázání aminokyseliny na výchozí dioxothiazolidinyl octovou kyselinu **3**.

Vzhledem k výše uvedeným neuspokojivým výsledkům couplingu aminokyselin s karboxylovou kyselinou **3** jsme se rozhodli vyzkoušet alternativní cestu, kdy byla nejprve karboxylová kyselina **3** převedena na reaktivnější acylchlorid **21** (Schéma 24). Reakční podmínky pro tuto reakci byly převzaty od Mischenko a kol.⁵⁹ Ty spočívaly ve smísení kyseliny **3** s dioxanem a thionylchloridem. Celá tato reakční směs byla následně vyhřívána na 80 °C pod zpětným chladičem. Po uplynutí jedné hodiny byla směs volně ochlazená na rt, k ní byl přilít hexan s předpokladem, že se bude produkt srážet (dle informací v literatuře). Ten se nesrážel, tudíž byla celá reakční směs odpařena na RVO a zbytek **21** byl použit do následující reakce. Následně byl reakční zbytek rozpuštěn v 1,4-dioxanu a míchán za rt. V druhé baňce byl mezitím methylester valinu rozpuštěn ve směsi TEA/1,4-dioxan (1 ml/10 ml). Dále byla reakce zahřáta na 90 °C po dobu 20 minut pod zpětným chladičem. Po analýze pomocí TLC bylo zjištěno, že došlo k částečné konverzi na produkt **20a**, avšak majoritním podílem byla původní kyselina **3**. Ani po prodloužení reakční doby na 18 hodin nebyl pozorován větší rozdíl v konverzi.

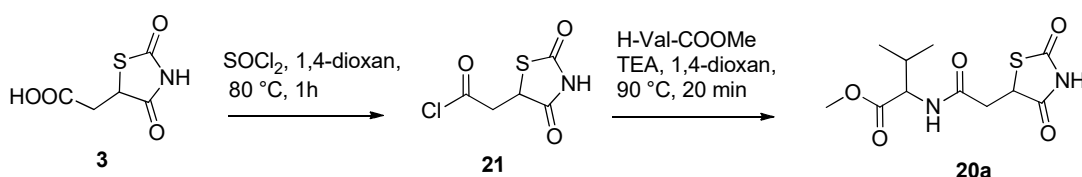


Schéma 24. Navázání methylesteru valinu na acylchlorid kyseliny **3**

Bohužel ani tento druhý syntetický plán nevedl k přípravě požadovaných finálních látek. Navržená cesta selhala již v přípravě dipeptidu navázaného na TZD. V porovnání s první syntetickou cestou ale existuje možnost, že budou nalezeny vhodné reakční podmínky.

EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

8 Obecné informace

Rozpouštědla a chemikálie byly zakoupeny od firmy Sigma-Aldrich (St. Louis, Missouri, USA) nebo Fluorochem (US). TLC analýza byla prováděna pomocí TLC hliníkových fólií Silica gel 60 F254 (Merck). Detekce skvrn byla realizována UV zářením při vlnové délce 254 nm.

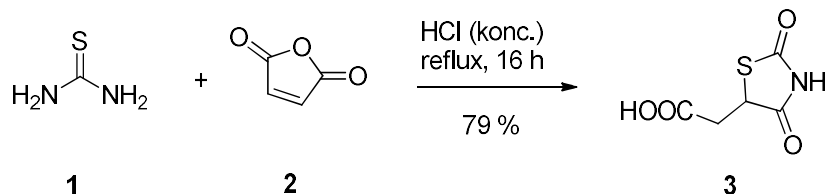
LC-MS analýzy byly provedeny na ULC-MS-MS systému (Waters) složeného z ULC-MS chromatografu Acquity s PDA detektorem a hmotnostního spektrometru s kvadrupólem. Byla použita Nucleodur Gravity C18 kolona (rozměry 1,8 μm , 2,1 x 50 mm) při 30 °C a rychlosti průtoku 600 $\mu\text{l}/\text{min}$. Mobilní 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. Vzorky byly připraveny rozpuštěním látek v počáteční mobilní fázi.

9 Příprava thiazolidindionových derivátů

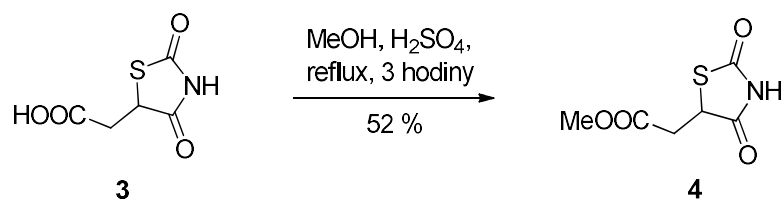
9.1 Syntéza kyseliny 3



Tato syntéza byla převzata od Zimenkovskii a kol.⁵⁶ Thiomočovina **1** (4 g; 52,4 mmol) a maleinanhydrid (5,12 g; 52,4 mmol) byly smíseny v třecí misce, rozetřeny na jemný prášek a převedeny do 50ml baňky s kulatým dnem. K této směsi byla přidána konc. HCl (14 ml). Reakční směs byla refluxována v olejové lázni po dobu 16 h. Po této době byla reakční směs ochlazená na RT, dále bylo přidáno 10 ml ledové vody a vzniklá sraženina odsáta a promyta ledovou vodou. Bílý krystalický prášek **3** byl dosušen v exsikátoru. Bylo získáno 7,26 g látky **3**, což odpovídá výtěžku 79 %.

¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ 12.74 (s, 1H), 11.99 (s, 1H), 4.65 (dd, *J* = 7.7, 4.7 Hz, 1H), 3.24 – 2.84 (m, 2H). ¹³C NMR (101 MHz, DMSO-*d*₆) δ 175.68, 172.50, 171.55, 46.66, 35.96. HRMS: *m/z* vypočteno pro C₅H₄NO₄S⁻: 173,9856 [M-H]⁻; nalezeno 173,9853.

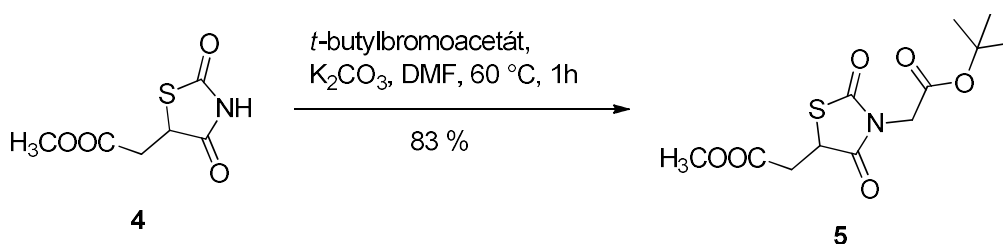
9.2 Esterifikace kyseliny 3 za vzniku methylesteru 4



Byla odvážena kyselina **3** (1,000 g; 5,7091 mmol), v baňce s kulatým dnem rozpuštěna v methanolu (15 ml) a k této směsi za míchání bylo přikapáno 20 kapek koncentrované kyseliny sírové. Celá směs se refluxovala pod zpětným chladičem po dobu tří hodin. Po kontrole doreagování směsi byl odpařen zbytek methanolu, směs byla rozpuštěna ve 100 ml vody a produkt byl extrahován do ethylacetátu (3x100 ml), následně byly spojené organické fáze promyty solankou, vysušeny bezvodým síranem sodným a odpařeny na RVO. Bylo izolováno 0,55 g bílé krystalické látky **4**, což odpovídá výtěžku 52 %.

^1H NMR (400 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) δ 12.06 (s, 1H), 4.69 (dd, $J = 7.2, 5.0$ Hz, 1H), 3.63 (s, 3H), 3.21 – 3.04 (m, 2H). ^{13}C NMR (101 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) δ 175.94, 172.51, 170.60, 51.90, 46.58, 35.62. HRMS: m/z vypočteno pro $\text{C}_6\text{H}_6\text{NO}_4\text{S}^-$: 188,0012 [M-H] $^-$; nalezeno 188,0010.

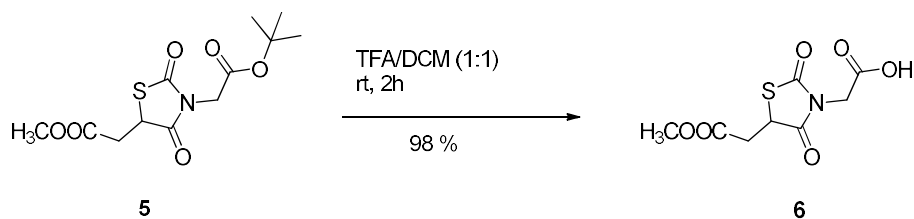
9.3 *N*-alkylace derivátu 4



Byla odvážena látka **4** (200 mg; 1,0571 mmol) do baňky s kulatým dnem, k ní přidán K_2CO_3 (292,2 mg, 2,1142 mmol), směs byla rozpuštěna v DMF (10 ml) a za míchání k této směsi byl přidán *t*-butylbromoacetát (171,7 μl ; 1,1628 mmol). Tato směs byla umístěna na magnetickou míchačku a byla zahřívána za míchání na 60 °C po dobu 1 h. Během reakce se na nerozpuštěném K_2CO_3 vytvořil oranžový film, který obarvil celou reakční směs. Po doreagování (kontrola pomocí TLC a LC-MS) byla směs ochlazená na RT, rozpuštěna ve 100 ml destilované vody a extrahována ethylacetátem (3x100 ml). Při extrakci byla organická i vodná fáze obarvena do zelena. Následně byly spojené organické fáze promyty solankou (2x60 ml), vysušeny pomocí bezvodého Na_2SO_4 a odpařeny na RVO. Produkt byl následně lyofilizován 48 h a získán ve formě zelené gelovité látky (268,4 mg; 83 %).

^1H NMR (400 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) δ 4.91 (dd, $J = 8.6, 4.2$ Hz, 1H), 4.20 (q, $J = 2.8$ Hz, 2H), 3.65 (s, 3H), 3.23 (dd, $J = 17.5, 4.2$ Hz, 1H), 3.07 (dd, $J = 17.6, 8.6$ Hz, 1H), 1.41 (s, 9H). ^{13}C NMR (101 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) δ 172.99, 171.00, 170.31, 165.44, 82.27, 52.05, 44.68, 42.62, 35.79, 27.52. HRMS: m/z vypočteno pro $\text{C}_{12}\text{H}_{12}\text{NO}_6\text{S}^-$: 302,0693 [M-H] $^-$; nalezeno 302,0704.

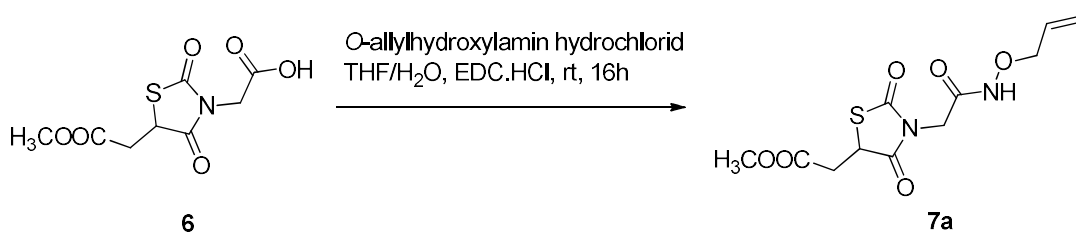
9.4 Deprotekce *t*-butylesteru za vzniku kyseliny **6**



Derivát **5** (574 mg; 1,8923 mmol) byl smísen v baňce s kulatým dnem se štěpící směsí TFA/DCM (1:1, 10 ml) a celá reakční směs byla míchána po dobu 2 hodin. Reakční směs přešla po 15 minutách z barvy zeleného gelu do slabě hnědého odstínu. Po ujištění se, že všechny původní substrát je převeden na intermediát **6**, byla štěpící směs odfoukána pod atmosférou N_2 , zvážena a použita do následné reakce couplingu s hydroxylaminou. Surový produkt byl získán v podobě hnědého gelu (460 mg, 98 %).

^1H NMR (400 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) δ 13.30 (s, 1H), 4.90 (dd, $J = 8.5, 4.2$ Hz, 1H), 4.21 (q, $J = 2.0$ Hz, 152H), 3.63 (s, 3H), 3.22 (dd, $J = 17.6, 4.2$ Hz, 1H), 3.08 (dd, $J = 17.6, 8.5$ Hz, 1H). ^{13}C NMR (101 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) δ 173.07, 171.07, 170.34, 167.84, 52.05, 44.68, 42.05, 35.80. HRMS: m/z vypočteno pro $\text{C}_8\text{H}_8\text{NO}_6\text{S}^-$: 246,0067 [M-H] $^-$; nalezeno 246,0077.

9.5 Příprava allylhydroxamátu **7a**

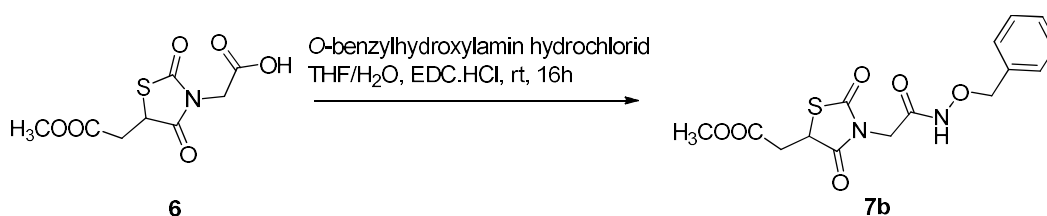


Volná karboxylová kyselina **6** (470 mg; 1,9011 mmol) byla rozsuspendována ve vodě (10 ml/mmol), k ní přidán rozpuštěný *O*-allylhydroxylamin hydrochlorid (312,4 mg; 2,8517 mmol) ve vodě (10 ml/mmol). Suspenze byla adjustována na pH 4,5 pomocí 1M NaOH, homogenizována přidávkem THF a následnou sonifikací do vzniku homogenního roztoku nažloutlé barvy. K takto připravené směsi byl přikapán roztok EDC.HCl (1,093 g; 5,7034 mmol) ve vodě (5 ml/mmol) za míchání rychlostí 4 ml roztoku/minutu. Tato směs byla následně míchána za RT po dobu 16 hodin a monitorována pomocí LC-MS. Poté byla směs rozpuštěna v 100 ml vody, extrahována do ethylacetátu (3x100 ml), spojené organické fáze byly promyty pomocí nasyceného roztoku NaHCO_3 a solanky (100 ml),

následně vysušeny pomocí bezvodého Na₂SO₄ a odpařeny na RVO. Takto získaný meziprodukt byl purifikován pomocí sloupcové kapalinové chromatografie (SiO₂, MF: Hex/EtAc grad. 1:1–1:2). Bylo izolováno 346,8 mg čistého produktu **7a** ve formě průhledného gelu, což odpovídá výtěžku 60 %.

¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ 11.34 (s, 1H), 5.96 – 5.86 (m, 1H), 5.46 – 5.19 (m, 2H), 4.84 (dd, *J* = 8.5, 4.1 Hz, 1H), 4.46 – 3.99 (m, 4H), 3.65 (s, 3H), 3.22 (dd, *J* = 17.6, 4.2 Hz, 1H), 3.08 (dd, *J* = 17.6, 8.6 Hz, 1H). ¹³C NMR (101 MHz, DMSO-*d*₆) δ 173.72, 171.70, 171.00, 162.93, 133.22, 120.06, 76.62, 52.61, 45.24, 41.80, 36.39. HRMS: *m/z* vypočteno pro C₁₁H₁₅N₂O₆S⁺: 303,0645 [M+H]⁺; nalezeno 303,0645.

9.6 Příprava benzylhydroxylaminu **7b**

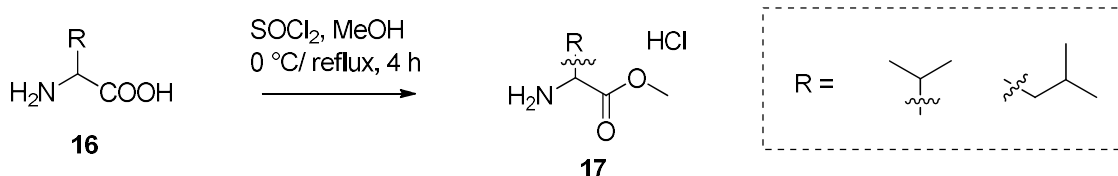


Volná karboxylová kyselina **6** (253 mg; 1,0234 mmol) byla rozsuspendována ve vodě (10 ml/mmol), k ní přidán rozpuštěný *O*-benzylhydroxylamin hydrochlorid (245,3 mg; 1,5354 mmol) ve vodě (10 ml/mmol). Suspenze byla adjustována na pH 4,5 pomocí 1M NaOH, homogenizována přidavkem THF a následnou sonifikací do vzniku homogenního roztoku nažloutlé barvy. K takto připravené směsi byl přikapán roztok EDC.HCl (588,6 mg, 3,0702 mmol) ve vodě (5 ml/mmol) za míchání rychlostí 4 ml roztoku/minutu. Tato směs byla následně míchána za RT po dobu 16 hodin a monitorována pomocí LC-MS. Poté byla směs rozpuštěna v 100 ml vody, extrahována do ethylacetátu (3x100 ml), spojené organické fáze byly promyty pomocí nasyceného roztoku NaHCO₃ a solanky (100 ml), následně vysušeny pomocí bezvodého Na₂SO₄ a odpařeny na RVO. Takto získaný meziprodukt byl purifikován pomocí sloupcové kapalinové chromatografie (SiO₂, MF: Hex/EtAc grad. 7:3–1:1). Bylo izolováno 272,6 mg produktu **7b** ve formě průhledného gelu, který byl přesušen na lyofilizátoru za vzniku 209,8 mg, což odpovídá výtěžku 58 %.

¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ 11.27 (d, *J* = 125.1 Hz, 1H), 7.38 (d, *J* = 5.2 Hz, 5H), 4.96–4.70 (m, 4H), 4.06 (d, 2H), 3.65 (s, 3H), 3.23 (dd, *J* = 17.6, 4.2 Hz, 1H), 3.09 (dd, *J* = 17.6, 8.6 Hz, 1H). ¹³C NMR (101 MHz, DMSO-*d*₆) δ 173.19, 171.19,

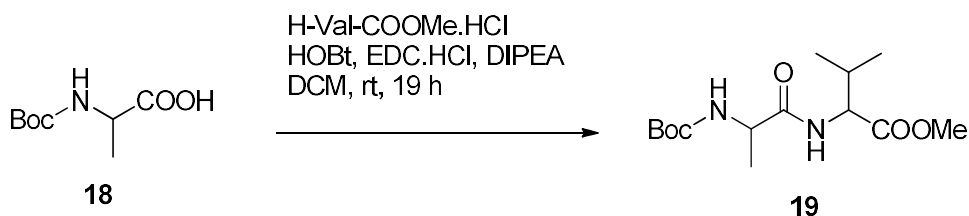
170.47, 162.55, 135.65, 128.90, 128.35, 77.08, 52.06, 44.69, 41.27, 35.87. HRMS: m/z vypočteno pro $C_{15}H_{17}N_2O_6S^+$: 353,0802 $[M+H]^+$; nalezeno 353,0797.

9.7 Příprava methylesteru aminokyselin



Aminokyselina (13,3 mmol, 1 molární ekvivalent) byla odvážena do kulaté baňky, rozpuštěna v MeOH (40 ml), zchlazena na $0\text{ }^\circ\text{C}$ v ledové lázni a za míchání byl do směsi přikapáván po stěně thionylchlorid (3,86 ml, 53,2 mmol, 4 molární ekvivalenty). Po dokapání veškerého $SOCl_2$ byla směs ještě 5 minut míchána při $0\text{ }^\circ\text{C}$ a poté se dala refluxovat na dobu 3,5 hodiny. Zpracování směsi spočívalo v odpaření zbytku kapalného podílu z reakční směsi a methylovaná aminokyselina nám zůstala v baňce. U methylace leucinu byl výtěžek 97 %, zatímco u valinu to bylo 73 %. Analytická data obou sloučenin odpovídají publikovaným datům.⁶⁰

9.8 Příprava dipeptidu



Byl navážen do baňky s kulatým dnem Boc-alanin (100 mg, 0,5285 mmol), rozpuštěn v 10 ml DCM, přidáno HOBt (97,1 mg, 0,6342 mmol), DIPEA (274 μl , 1,5858 mmol) a EDC.HCl (121,6 mg, 0,6342 mmol) a směs byla míchána 15 minut při RT. Poté byl přisypán methylovaný valin (88,6 mg, 0,5285 mmol) a směs reagovala na míchačce 19 hodin. Zpracování směsi spočívalo ve vytřepání organického podílu do DCM (3x50 ml), přesušení organických podílů pomocí $MgSO_4$ a nakonec odpaření rozpouštědla na RVO. Vzniklá směs byla sorbována na silikagel a byla čistěna sloupcovou kapalinovou chromatografií (SiO_2 . Pet:EtAc 2:3 isokraticky) pro zisk 18 mg látky **19**, což odpovídá výtěžku 11 %. Analytická data dipeptidu odpovídají publikovaným datům.⁶¹

ZÁVĚR

Předkládaná bakalářská práce se zabývá návrhem a syntézou druhé generace derivátů thiazolidindionu, jenž mají sloužit jako inhibitory mykobakteriální Zmp1.

Teoretická část práce popisuje historický vývoj tuberkulózy, zdokonalování její léčby a uvádí také souhrn dnes léků užívaných i léků v různých fázích preklinického i klinického vývoje. Dále se v teoretické části pojednává o struktuře, funkci mykobakteriální Zmp1 a dnes již známých inhibitorech tohoto enzymu.

V diskusi jsou popsány dvě rozdílné strategie, které byly navrženy k získání požadovaných derivátů, přičemž obě vychází z dioxothiazolidinyl octové kyseliny. První navržený plán spočíval v přípravě hydroxamátů a následné konverzi na dipeptidy. Tento syntetický plán bohužel selhal v deprotekcii methylesteru, pro kterou nebyly nalezeny vhodné reakční podmínky.

Druhá strategie byla založena na primární přípravě dipeptidů a následném převedení na hydroxamáty. Zde syntéza bohužel selhala již v počátcích, kdy se nepodařilo nelézt vhodné podmínky pro přípravu požadovaných dipeptidů TZD.

Bylo navrženo celkem 8 molekul, které měly být připraveny a odeslány na biologické testování pro zjištění inhibiční aktivity vůči mykobakteriální Zmp1. Vzhledem k aktuální pandemii koronaviru nemohlo být této problematice věnováno více času, který by si optimalizace jednotlivých kroků zcela jistě zasloužily. Bohužel tedy musím konstatovat, že ani jedna z finálních látek nebyla připravena. Během jednotlivých kroků syntézy však byly připraveny 4 nové deriváty, které byly plně charakterizovány pomocí ^1H i ^{13}C NMR a HRMS.

SEZNAM ZKRATEK

BCG	– Bacil Calmette-Guérinův
DCM	– dichlormethan
DIPEA	– diisopropylethylamin
DMF	– dimethylformamid
DOTS	– Directly Observed Treatment Short-Coursed
EDC	– ethyl(dimethylaminopropyl)karbodiimid
EDTA	– ethylendiamintetraoctová kyselina
EtAc	– ethylacetát
FDA	– úřad pro schvalování léčiv a potravin
HATU	- (1-[Bis(dimethylamino)methylen]-1H-1,2,3-triazolo[4,5-b]pyridinium-3-oxid hexafluorofosfát
Hex	– hexan
HOBt	– hydroxybenztriazol
LC-MS	– kapalinová chromatografie spojená s hmotnostní spektrometrií
<i>Mbb</i>	– <i>Mycobacterium bovis</i>
MDR-TB	– multilékově rezistentní tuberkulóza
<i>Mtb</i>	– <i>Mycobacterium tuberculosis</i>
NMM	– <i>N</i> -methylmorfolin
RT	– laboratorní teplota
RVO	– rotační vakuová odparka
TB	– tuberkulóza
TEA	– triethylamin
TLC	– tenkovrstvá chromatografie
WHO	– světová zdravotnická organizace
XDR-TB	– extenzivně rezistentní tuberkulóza
ZBG	– zinek vázající skupina (Zinc Binding Group)
Zmp1	– zinková metaloproteasa

SEZNAM POUŽITÝCH ZDROJŮ

- (1) Ferraris, D. M.; Sbardella, D.; Petrera, A.; Marini, S.; Amstutz, B.; Coletta, M.; Sander, P.; Rizzi, M. Crystal Structure of Mycobacterium Tuberculosis Zinc-Dependent Metalloprotease-1 (Zmp1), a Metalloprotease Involved in Pathogenicity. *J. Biol. Chem.* **2011**, *286* (37), 32475–32482.
- (2) Ferraris, D. M.; Rizzi, M. Zinc-Dependent Metalloprotease-1 (Zmp1). *Encyclopedia of Inorganic and Bioinorganic Chemistry*; John Wiley & Sons, Ltd: Chichester, UK, **2004**; pp 1–7.
- (3) Petrera, A.; Amstutz, B.; Gioia, M.; Hähnlein, J.; Baici, A.; Selchow, P.; Ferraris, D. M.; Rizzi, M.; Sbardella, D.; Marini, S.; Coletta, M.; Sander, P. Functional Characterization of the Mycobacterium Tuberculosis Zinc Metallopeptidase Zmp1 and Identification of Potential Substrates. *Biol. Chem.* **2012**, *393* (7), 631–640.
- (4) Cambau, E.; Drancourt, M. Steps towards the Discovery of Mycobacterium Tuberculosis by Robert Koch, 1882. *Clin. Microbiol. Infect.* **2014**, *20* (3), 196–201.
- (5) G. tuberculosis report. *Global Tuberculosis Report 2020*; 1396, **2020**
- (6) Antituberculous drugs: An overview - UpToDate
<https://www.uptodate.com/contents/antituberculous-drugs-an-overview> (accessed Nov 23, 2020).
- (7) Revel, V.; Cambau, E.; Jarlier, V.; Sougakoff, W. Characterization of Mutations in Mycobacterium Smegmatis Involved in Resistance to Fluoroquinolones. *ANTIMICROBLAL AGENTS Chemother.* **1994**, *38* (9), 1991–1996.
- (8) Nath, H.; Ryoo, S. First- and Second-Line Drugs and Drug Resistance. In *Tuberculosis - Current Issues in Diagnosis and Management*; 2013.
- (9) Blanchard, J. S. Molecular Mechanisms of Drug Resistance in Mycobacterium Tuberculosis. *Annu. Rev. Biochem.* **1996**, *65* (1), 215–239.
- (10) Williams, D. L.; Waguespack, C.; Eisenach, K.; Crawford, J. T.; Portaels, F.; Salfinger, M.; Nolan, C. M.; Abe, C.; Sticht-Groh, V.; Gillis, T. P. *Characterization of Rifampin Resistance in Pathogenic Mycobacteria*; **1994**.
- (11) Raviglione, M. C.; Smith, I. M. XDR Tuberculosis — Implications for Global Public Health. *N. Engl. J. Med.* **2007**, *356* (7), 656–659.
- (12) Grüber, G. Introduction: Novel Insights into TB Research and Drug Discovery. *Prog. Biophys. Mol. Biol.* **2020**, *152*, 2–5.
- (13) Palencia, A.; Li, X.; Bu, W.; Choi, W.; Ding, C. Z.; Easom, E. E.; Feng, L.; Hernandez, V.; Houston, P.; Liu, L.; Meewan, M.; Mohan, M.; Rock, F. L.; Sexton, H.; Zhang, S.; Zhou, Y.; Wan, B.; Wang, Y.; Franzblau, S. G.; Woolhiser, L.; Gruppo, V.; Lenaerts, A. J.; O'Malley, T.; Parish, T.; Cooper, C.

- B.; Waters, M. G.; Ma, Z.; Ioerger, T. R.; Sacchetti, J. C.; Rullas, J.; Angulo-Barturen, I.; Pérez-Herrán, E.; Mendoza, A.; Barros, D.; Cusack, S.; Plattner, J. J.; Alley, M. R. K. Discovery of Novel Oral Protein Synthesis Inhibitors of Mycobacterium Tuberculosis That Target Leucyl-TRNA Synthetase. *Antimicrob. Agents Chemother.* **2016**, *60* (10), 6271–6280.
- (14) SQ109. *Tuberculosis* **2008**, *88* (2), 159–161.
- (15) Andries, K.; Verhasselt, P.; Guillemont, J.; Göhlmann, H. W. H.; Neefs, J. M.; Winkler, H.; Van Gestel, J.; Timmerman, P.; Zhu, M.; Lee, E.; Williams, P.; De Chaffoy, D.; Huitric, E.; Hoffner, S.; Cambau, E.; Truffot-Pernot, C.; Lounis, N.; Jarlier, V. A Diarylquinoline Drug Active on the ATP Synthase of Mycobacterium Tuberculosis. *Science (80-)*. **2005**, *307* (5707), 223–227.
- (16) Lu, P.; Villellas, C.; Koul, A.; Andries, K.; Lill, H.; Bald, D. The ATP Synthase Inhibitor Bedaquiline Interferes with Small-Molecule Efflux in Mycobacterium Smegmatis. *J. Antibiot. (Tokyo)*. **2014**, *67* (12), 835–837.
- (17) Matsumoto, M.; Hashizume, H.; Tomishige, T.; Kawasaki, M.; Tsubouchi, H.; Sasaki, H.; Shimokawa, Y.; Komatsu, M. OPC-67683, a Nitro-Dihydro-Imidazooxazole Derivative with Promising Action against Tuberculosis In Vitro and In Mice. *PLoS Med.* **2006**, *3* (11), 466.
- (18) Chang, K. C.; Nuermberger, E.; Sotgiu, G.; Leung, C. C. New Drugs and Regimens for Tuberculosis. *Respirology* **2018**, *23* (11), 978–990.
- (19) Paolino, M.; Brindisi, M.; Vallone, A.; Butini, S.; Campiani, G.; Nannicini, C.; Giuliani, G.; Anzini, M.; Lamponi, S.; Giorgi, G.; Sbardella, D.; Ferraris, D. M.; Marini, S.; Coletta, M.; Palucci, I.; Minerva, M.; Delogu, G.; Pepponi, I.; Goletti, D.; Cappelli, A.; Gemma, S.; Brogi, S. Development of Potent Inhibitors of the Mycobacterium Tuberculosis Virulence Factor Zmp1 and Evaluation of Their Effect on Mycobacterial Survival inside Macrophages. *ChemMedChem* **2018**, *13* (5), 422–430.
- (20) Totaro, K. A.; Barthelme, D.; Simpson, P. T.; Jiang, X.; Lin, G.; Nathan, C. F.; Sauer, R. T.; Sello, J. K. Rational Design of Selective and Bioactive Inhibitors of the Mycobacterium Tuberculosis Proteasome. *ACS Infect. Dis.* **2017**, *3* (2), 176–181.
- (21) Protopopova, M.; Hanrahan, C.; Nikonenko, B.; Samala, R.; Chen, P.; Gearhart, J.; Einck, L.; Nacy, C. A. Identification of a New Antitubercular Drug Candidate, SQ109, from a Combinatorial Library of 1,2-Ethylenediamines. *J. Antimicrob. Chemother.* **2005**, *56* (5), 968–974.
- (22) Stover, C. K.; Warren, P.; VanDevanter, D. R.; Sherman, D. R.; Arain, T. M.; Langhorne, M. H.; Anderson, S. W.; Towell, J. A.; Yuan, Y.; McMurray, D. N.; Kreiswirth, B. N.; Barry, C. E.; Baker, W. R. A Small-Molecule Nitroimidazopyran Drug Candidate for the Treatment of Tuberculosis. *Nature* **2000**, *405* (6789), 962–966.
- (23) Šlachťová, V.; Šebela, M.; Torfs, E.; Oorts, L.; Cappoen, D.; Berka, K.; Bazgier, V.; Brulíková, L. Novel Thiazolidinedione-Hydroxamates as Inhibitors of Mycobacterium Tuberculosis Virulence Factor Zmp1. *Eur. J. Med. Chem.* **2020**, *185*.

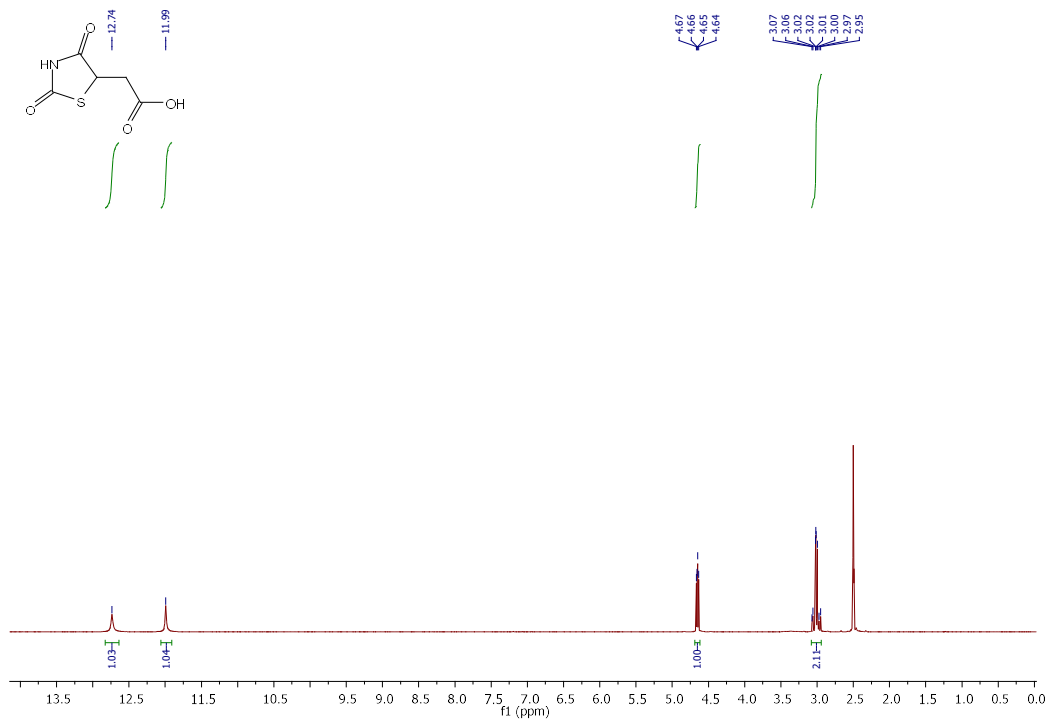
- (24) Wolucka, B. A. Biosynthesis of D-Arabinose in Mycobacteria - a Novel Bacterial Pathway with Implications for Antimycobacterial Therapy. *FEBS J.* **2008**, *275* (11), 2691–2711.
- (25) Lazarevic, V.; Martinon, F. Linking Inflammasome Activation and Phagosome Maturation. *Cell Host Microbe* **2008**, *3* (4), 199–200.
- (26) Lee, R. E.; Protopopova, M.; Crooks, E.; Slayden, R. A.; Terrot, M.; Barry, C. E. Combinatorial Lead Optimization of [1,2]-Diamines Based on Ethambutol as Potential Antituberculosis Preclinical Candidates. *J. Comb. Chem.* **2003**, *5* (2), 172–187.
- (27) Tahlan, K.; Wilson, R.; Kastrinsky, D. B.; Arora, K.; Nair, V.; Fischer, E.; Whitney Barnes, S.; Walker, J. R.; Alland, D.; Barry, C. E.; Boshoff, H. I. SQ109 Targets MmpL3, a Membrane Transporter of Trehalose Monomycolate Involved in Mycolic Acid Donation to the Cell Wall Core of Mycobacterium Tuberculosis. *Antimicrob. Agents Chemother.* **2012**, *56* (4), 1797–1809.
- (28) Ferraris, D. M.; Miggiano, R.; Rossi, F.; Rizzi, M. Mycobacterium Tuberculosis Molecular Determinants of Infection, Survival Strategies, and Vulnerable Targets. *Pathogens* **2018**, *7* (1).
- (29) Jacobsen, J. A.; Major Jourden, J. L.; Miller, M. T.; Cohen, S. M. To Bind Zinc or Not to Bind Zinc: An Examination of Innovative Approaches to Improved Metalloproteinase Inhibition. *Biochim. Biophys. Acta - Mol. Cell Res.* **2010**, *1803* (1), 72–94.
- (30) Mori, M.; Moraca, F.; Deodato, D.; Ferraris, D. M.; Selchow, P.; Sander, P.; Rizzi, M.; Botta, M. Discovery of the First Potent and Selective Mycobacterium Tuberculosis Zmp1 Inhibitor. *Bioorganic Med. Chem. Lett.* **2014**, *24* (11), 2508–2511.
- (31) Šlachťová, V.; Šebela, M.; Torfs, E.; Oorts, L.; Cappoen, D.; Berka, K.; Bazgier, V.; Brulíková, L. Novel Thiazolidinedione-Hydroxamates as Inhibitors of Mycobacterium Tuberculosis Virulence Factor Zmp1. *Eur. J. Med. Chem.* **2020**, *185*, 111812.
- (32) Torfs, E.; Piller, T.; Cos, P.; Cappoen, D. Opportunities for Overcoming Mycobacterium Tuberculosis Drug Resistance: Emerging Mycobacterial Targets and Host-Directed Therapy. *Int. J. Mol. Sci.* **2019**, *20* (12).
- (33) Hershkovitz, I.; Donoghue, H. D.; Minnikin, D. E.; Besra, G. S.; Lee, O. Y.-C.; Gernaey, A. M.; Galili, E.; Eshed, V.; Greenblatt, C. L.; Lemma, E.; Bar-Gal, G. K.; Spigelman, M. Detection and Molecular Characterization of 9000-Year-Old Mycobacterium Tuberculosis from a Neolithic Settlement in the Eastern Mediterranean. *PLoS One* **2008**, *3* (10).
- (34) Sakula, A. Robert Koch: Centenary of the Discovery of the Tubercle Bacillus, 1882. *Thorax* **1982**, *37* (4), 246–251.
- (35) Fatima, S.; Kumari, A.; Das, G.; Dwivedi, V. P. Tuberculosis Vaccine: A Journey from BCG to Present. *Life Sci.* **2020**, *252* (April), 117594.
- (36) ATS Discoveries Series, 2015. **2015**.

- (37) Steele, J. D. The Surgical Treatment of Pulmonary Tuberculosis. *Annals of Thoracic Surgery*. **1968**, pp 484–502.
- (38) Gaensler, E. A. The Surgery for Pulmonary Tuberculosis. *Am. Rev. Respir. Dis.* **1982**, 125 (3 II), 73–84.
- (39) iTrivio https://www.ipvz.cz/e-kurzy/2015/bakterialni_infekce/23727.html (accessed Oct 28, 2020).
- (40) iTrivio https://www.ipvz.cz/e-kurzy/2015/bakterialni_infekce/23725.html (accessed Apr 12, 2020).
- (41) WHO | Guidelines for Treatment of Drug-Susceptible Tuberculosis and Patient Care (2017 Update). *WHO* **2018**.
- (42) WHO Operational Handbook on Tuberculosis, Module 4: Treatment - Drug-Resistant Tuberculosis Treatment <https://www.who.int/publications/i/item/9789240006997> (accessed Mar 22, 2021).
- (43) Williams, D. L.; Waguespack, C.; Eisenach, K.; Crawford, J. T.; Portaels, F.; Salfinger, M.; Nolan, C. M.; Abe, C.; Sticht-Groh, V.; Gillis, T. P. Characterization of Rifampin Resistance in Pathogenic Mycobacteria. *Antimicrob. Agents Chemother.* **1994**, 38 (10), 2380–2386.
- (44) Kayukova, L. A.; Berikova, E. A. Modern Anti-Tuberculosis Drugs and Their Classification. Part I: First-Line Drugs. *Pharm. Chem. J.* **2020**, 54 (6), 555–563.
- (45) Liu, Y.; Matsumoto, M.; Ishida, H.; Ohguro, K.; Yoshitake, M.; Gupta, R.; Geiter, L.; Hafkin, J. Delamanid: From Discovery to Its Use for Pulmonary Multidrug-Resistant Tuberculosis (MDR-TB). *Tuberculosis*. Churchill Livingstone July 1, **2018**, pp 20–30.
- (46) Keam, S. J. Pretomanid: First Approval. *Drugs* **2019**, 79 (16), 1797–1803.
- (47) Lupien, A.; Vocat, A.; Foo, C. S. Y.; Blattes, E.; Gillon, J. Y.; Makarov, V.; Cole, S. T. Optimized Background Regimen for Treatment of Active Tuberculosis with the Next-Generation Benzothiazinone Macozinone (PBTZ169). *Antimicrob. Agents Chemother.* **2018**, 62 (11).
- (48) Ferraris, D. M.; Rizzi, M. Zinc-Dependent Metalloprotease-1 (Zmp1). *Encyclopedia of Inorganic and Bioinorganic Chemistry*; **2004**; Vol. 1, pp 1–7.
- (49) RCSB PDB - 6XLY: CRYOEM STRUCTURE OF MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS ZINC METALLOPROTEASE ZMP1 IN OPEN STATE <https://www.rcsb.org/structure/6xly> (accessed Jun 20, 2021).
- (50) Yates, R. M.; Hermetter, A.; Russell, D. G. The Kinetics of Phagosome Maturation as a Function of Phagosome/Lysosome Fusion and Acquisition of Hydrolytic Activity. *Traffic* **2005**, 6 (5), 413–420.
- (51) Münz, C. Autophagy in Immunity. In *Progress in Molecular Biology and Translational Science*; Elsevier B.V., **2020**; Vol. 172, pp 67–85.
- (52) Master, S. S.; Rampini, S. K.; Davis, A. S.; Keller, C.; Ehlers, S.; Springer, B.; Timmins, G. S.; Sander, P.; Deretic, V. Mycobacterium Tuberculosis Prevents Inflammasome Activation. *Cell Host Microbe* **2008**, 3 (4), 224–232.

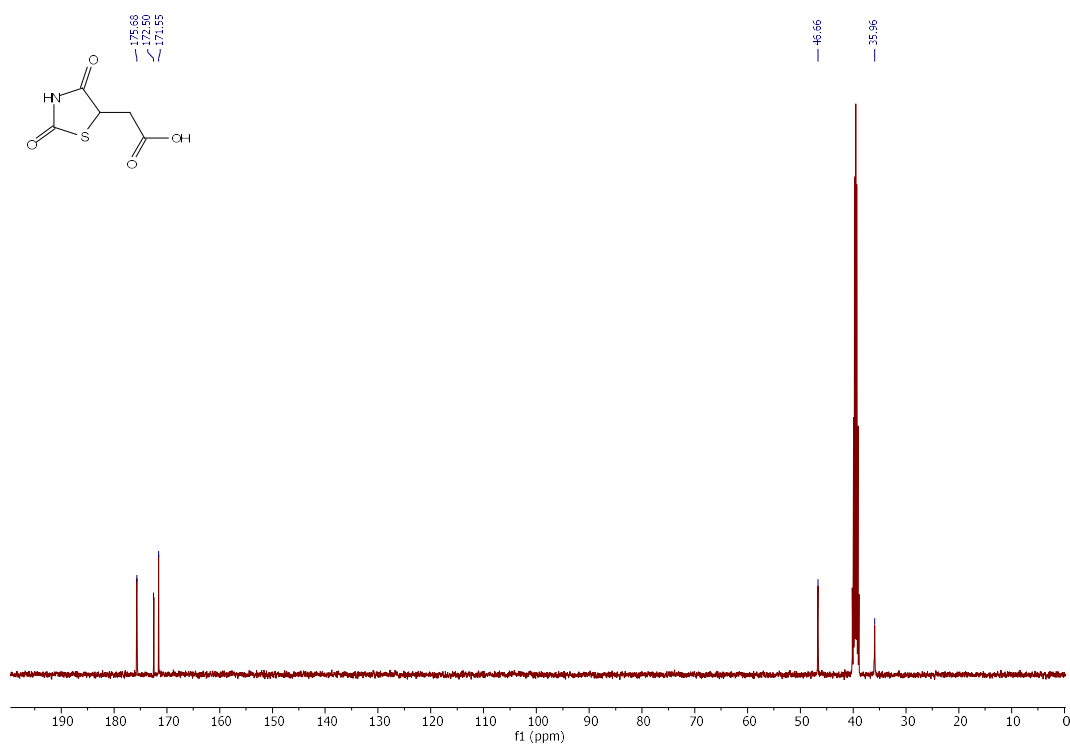
- (53) Subhedar, D. D.; Shaikh, M. H.; Nawale, L.; Yeware, A.; Sarkar, D.; Khan, F. A. K.; Sangshetti, J. N.; Shingate, B. B. Novel Tetrazoloquinoline-Rhodanine Conjugates: Highly Efficient Synthesis and Biological Evaluation. *Bioorganic Med. Chem. Lett.* **2016**, *26* (9), 2278–2283.
- (54) Subhedar, D. D.; Shaikh, M. H.; Shingate, B. B.; Nawale, L.; Sarkar, D.; Khedkar, V. M.; Kalam Khan, F. A.; Sangshetti, J. N. Quinolidene-Rhodanine Conjugates: Facile Synthesis and Biological Evaluation. *Eur. J. Med. Chem.* **2017**, *125*, 385–399.
- (55) Mori, M.; Deodato, D.; Kasula, M.; Ferraris, D. M.; Sanna, A.; De Logu, A.; Rizzi, M.; Botta, M. Design, Synthesis, SAR and Biological Investigation of 3-(Carboxymethyl)Rhodanine and Aminothiazole Inhibitors of Mycobacterium Tuberculosis Zmp1. *Bioorganic Med. Chem. Lett.* **2018**, *28* (4), 637–641.
- (56) Zimenkovskii, B. S.; Kutsyk, R. V.; Lesyk, R. B.; Matyichuk, V. S.; Obushak, N. D.; Klyufinska, T. I. SYNTHESIS AND ANTIMICROBIAL ACTIVITY OF 2,4-DIOXOTHIAZOLIDINE-5-ACETIC ACID AMIDES. *Pharm. Chem. J.* **2006**, *40* (6), 13–16.
- (57) Johnson, J. A.; Tora, G.; Pi, Z.; Phillips, M.; Yin, X.; Yang, R.; Zhao, L.; Chen, A. Y.; Taylor, D. S.; Basso, M.; Rose, A.; Behnia, K.; Onorato, J.; Chen, X.-Q.; Abell, L. M.; Lu, H.; Locke, G.; Caporuscio, C.; Galella, M.; Adam, L. P.; Gordon, D.; Wexler, R. R.; Finlay, H. J. Sulfonylated Benzothiazoles as Inhibitors of Endothelial. *ACS Med. Chem. Lett.* **2018**, *9* (12), 1263.
- (58) S, K.; JR, K.; S, A.; S, P.; S, V.; S, K.; R, Y. Novel 2-(2,4-Dioxo-1,3-Thiazolidin-5-Yl)Acetamides as Antioxidant and/or Anti-Inflammatory Compounds. *Eur. J. Med. Chem.* **2013**, *66*, 305–313.
- (59) Mishchenko, M.; Shtrygol, S.; Kaminsky, D.; Lesyk, R. Thiazole-Bearing 4-Thiazolidinones as New Anticonvulsant Agents. *Sci. Pharm.* **2020**, *Vol. 88*, Page 16 **2020**, *88* (1), 16.
- (60) Li, J.; Sha, Y. A Convenient Synthesis of Amino Acid Methyl Esters. *Molecules* **2008**, *13* (5), 1111.
- (61) Marchetti, L.; DeBoef, B. Solution-Phase Synthesis of Dipeptides: A Capstone Project That Employs Key Techniques in an Organic Laboratory Course. *J. Chem. Educ.* **2015**, *92* (9), 1536–1538.

PŘÍLOHY

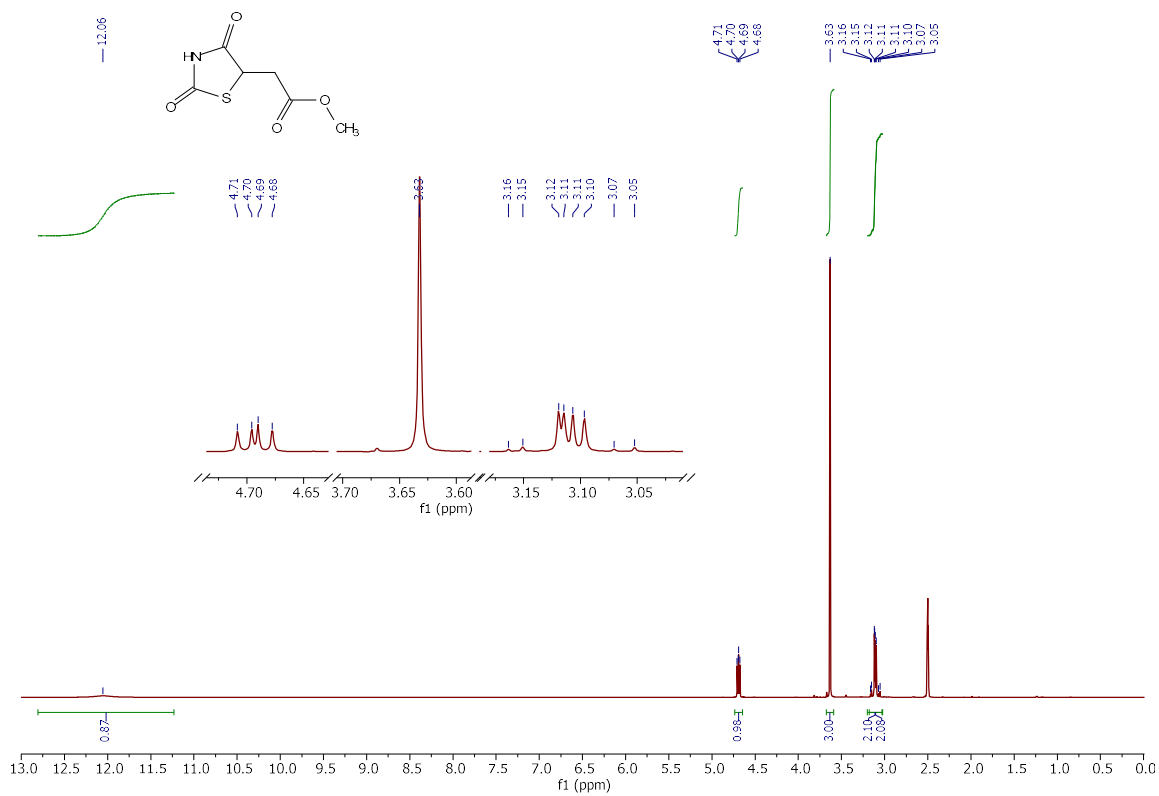
Příloha 1: ^1H NMR spektrum látky 3



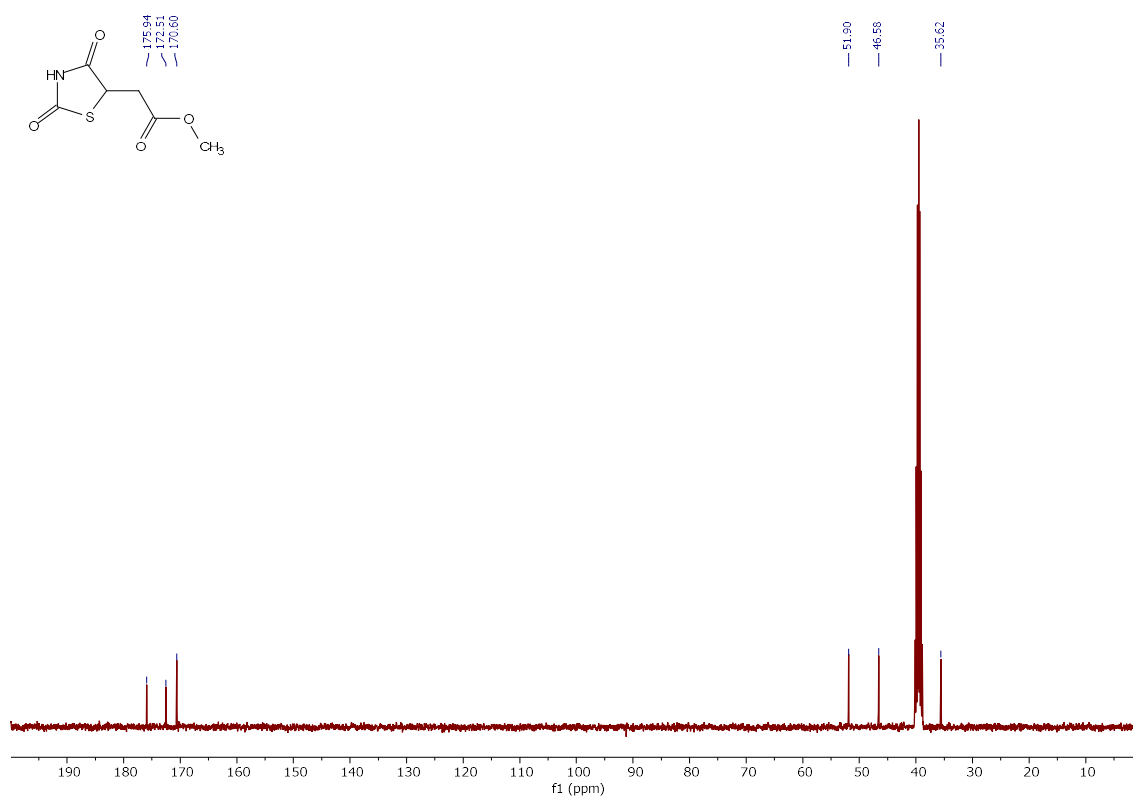
Příloha 2: ^{13}C NMR spektrum látky 3



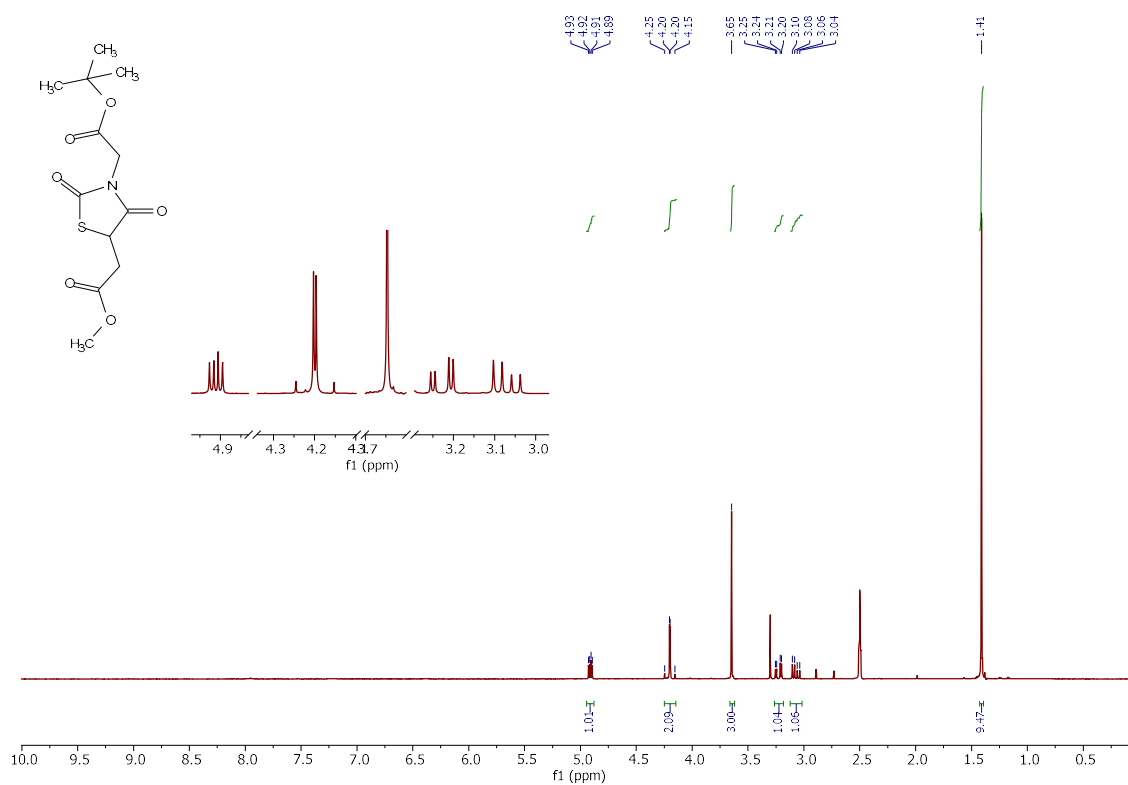
Příloha 3: ^1H NMR spektrum látky 4



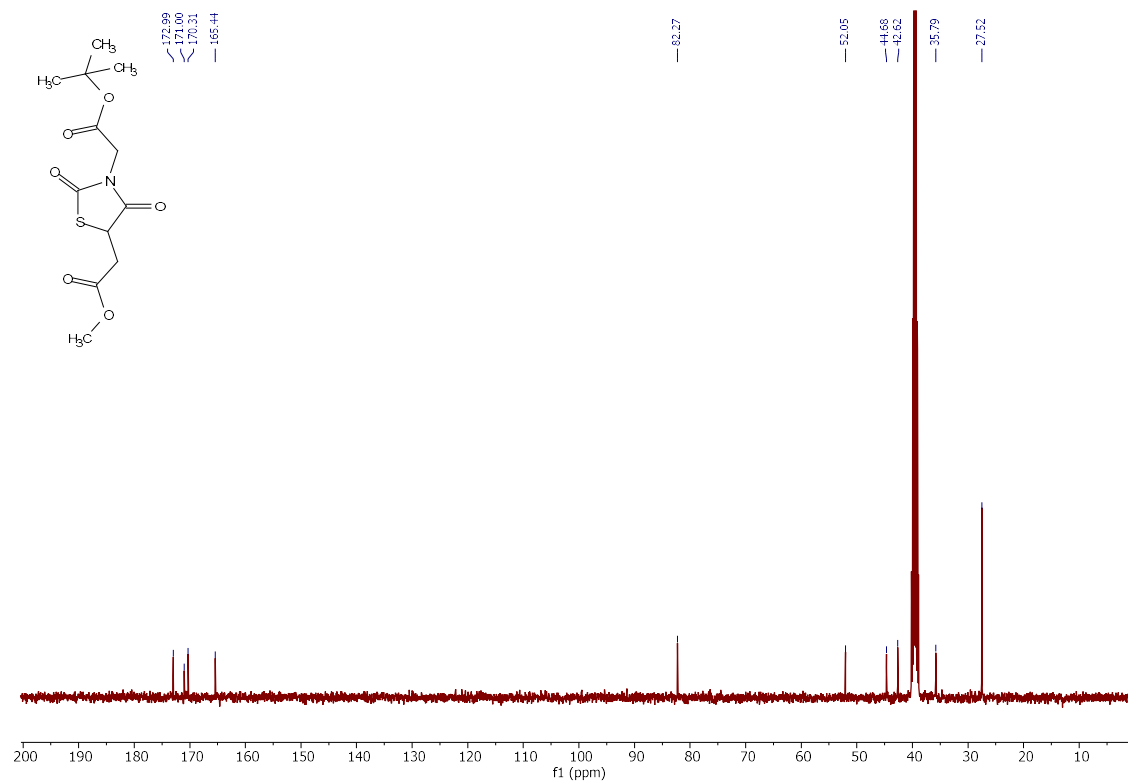
Příloha 4: ^{13}C NMR spektrum látky 4



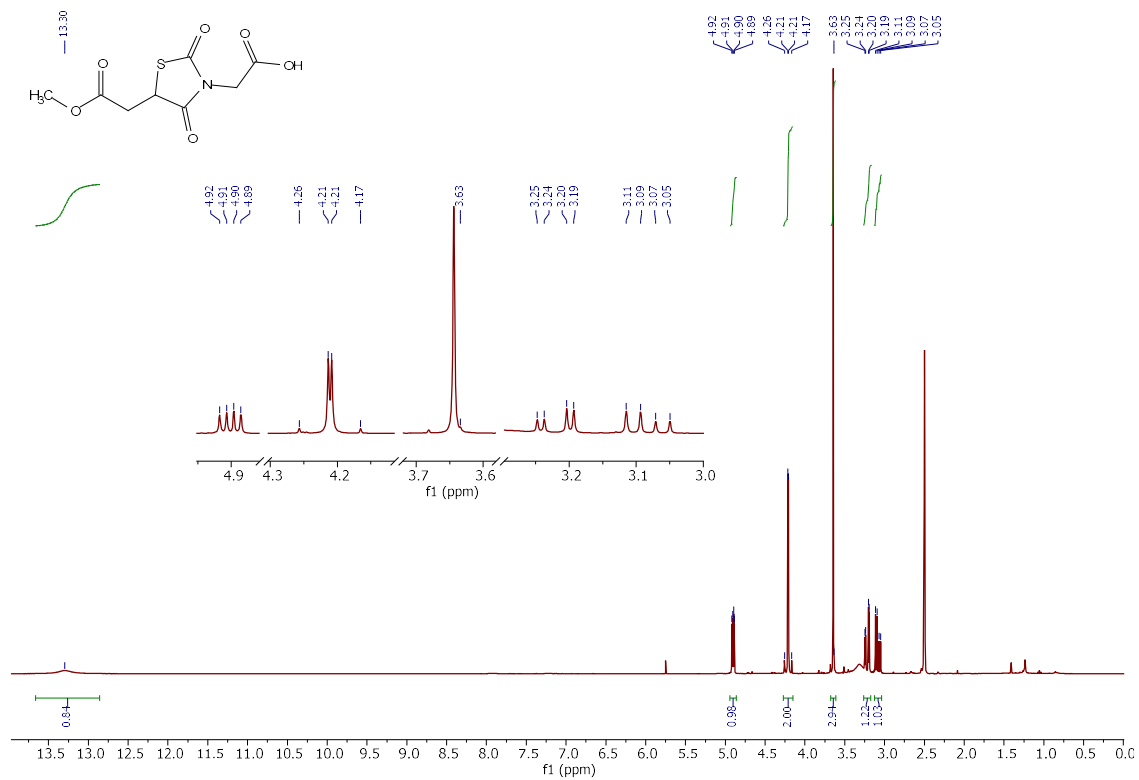
Příloha 5: ^1H NMR spektrum látky 5



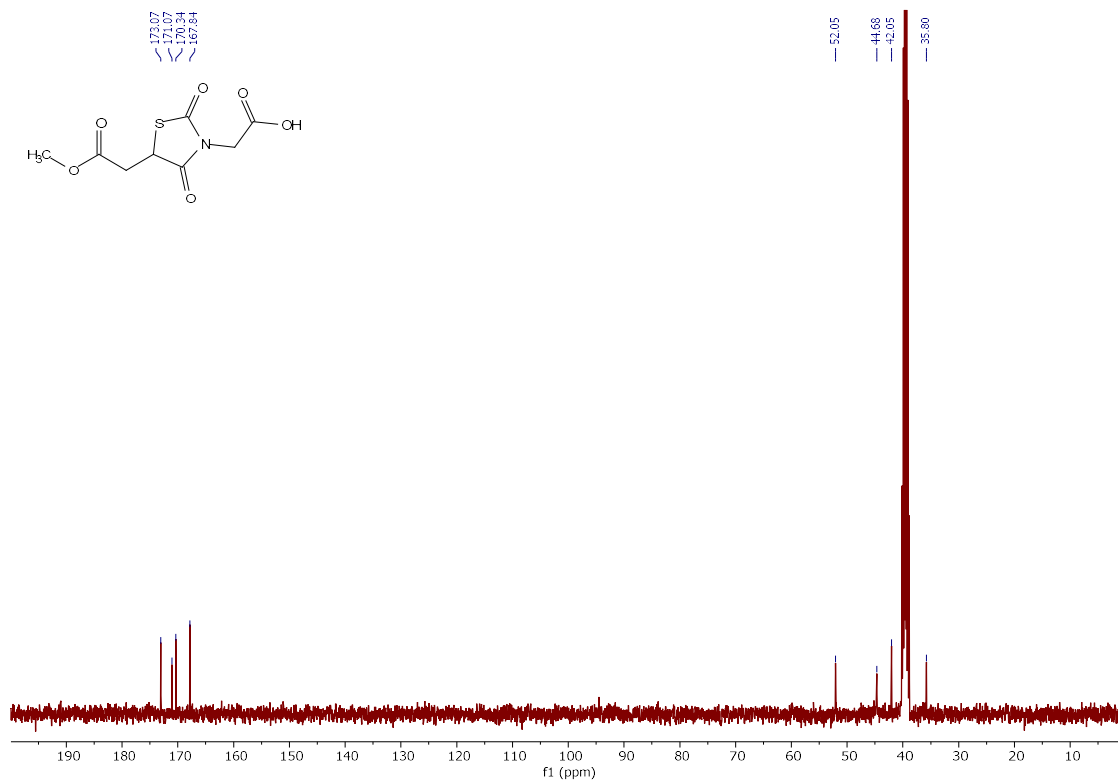
Příloha 6: ^{13}C NMR spektrum látky 5



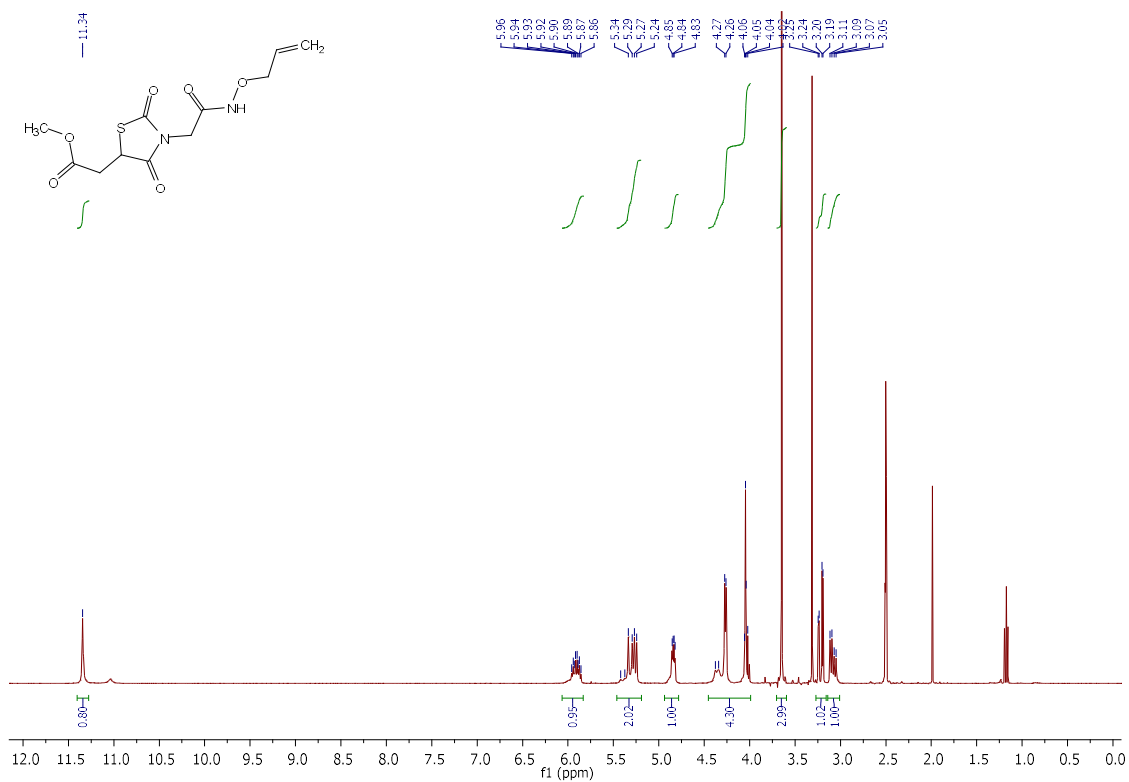
Příloha 7: ^1H NMR spektrum látky 6



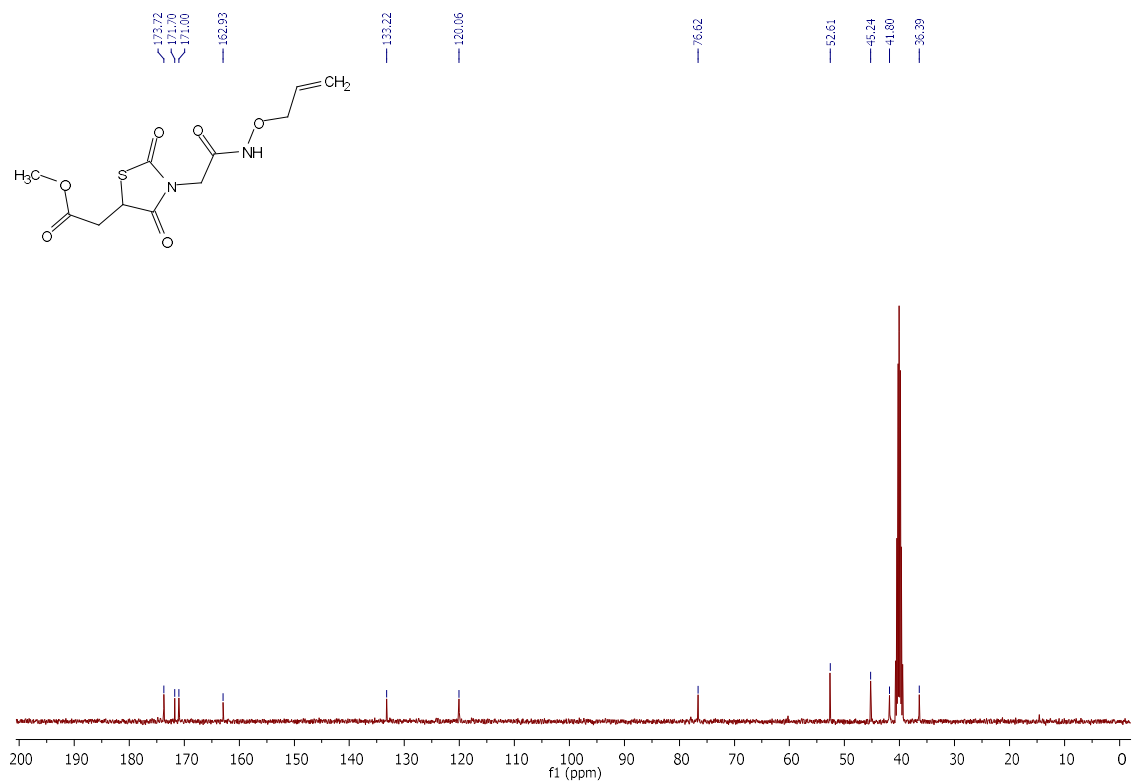
Příloha 8: ^{13}C NMR spektrum látky 6



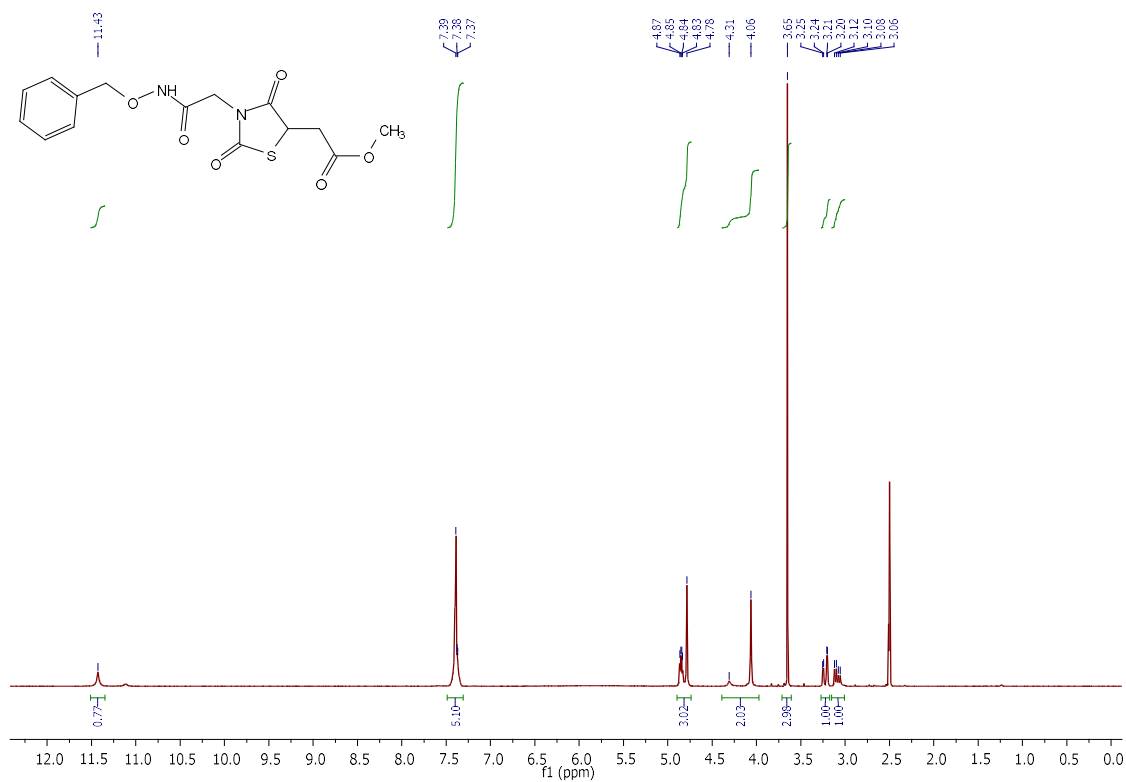
Příloha 9: ^1H NMR spektrum látky 7a



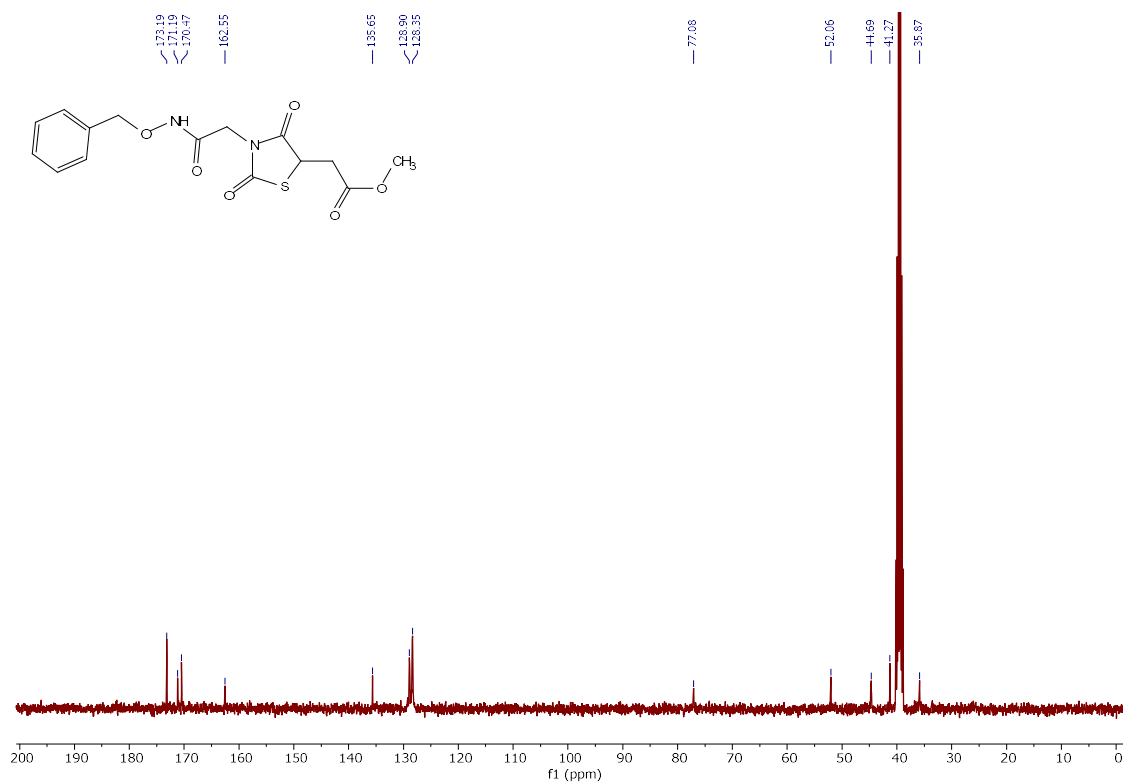
Příloha 10: ^{13}C NMR spektrum látky 7a



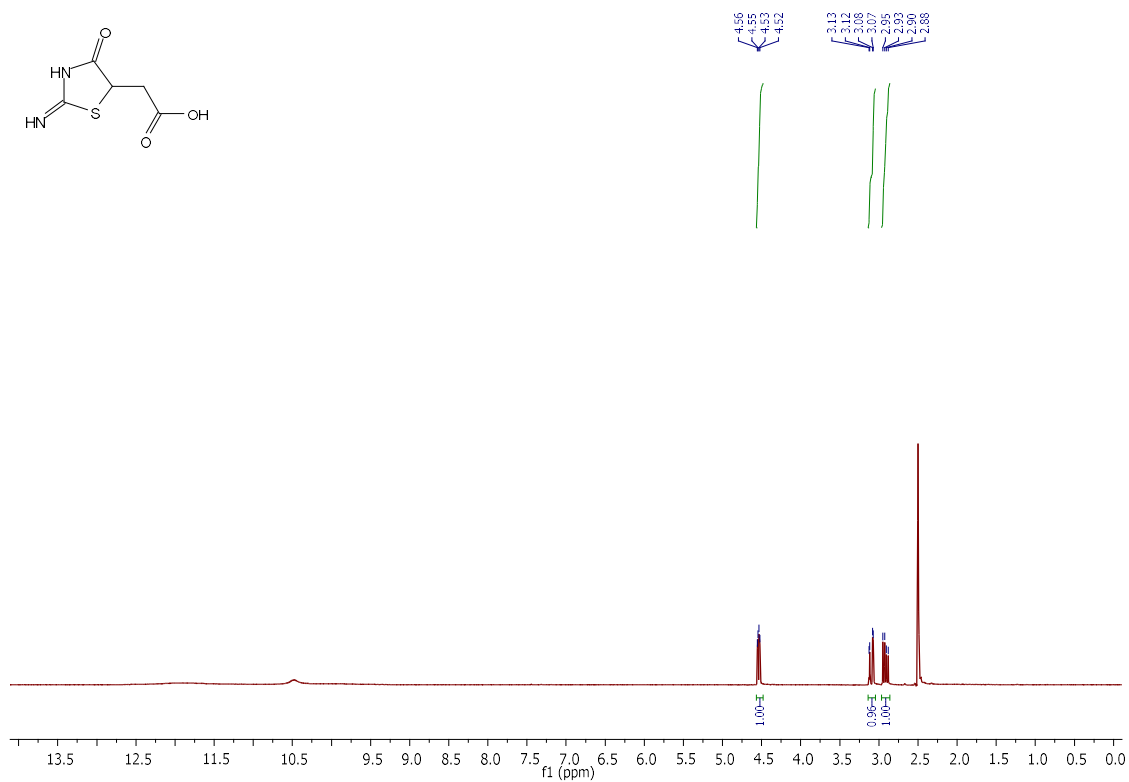
Příloha 11: ^1H NMR spektrum látky **7b**



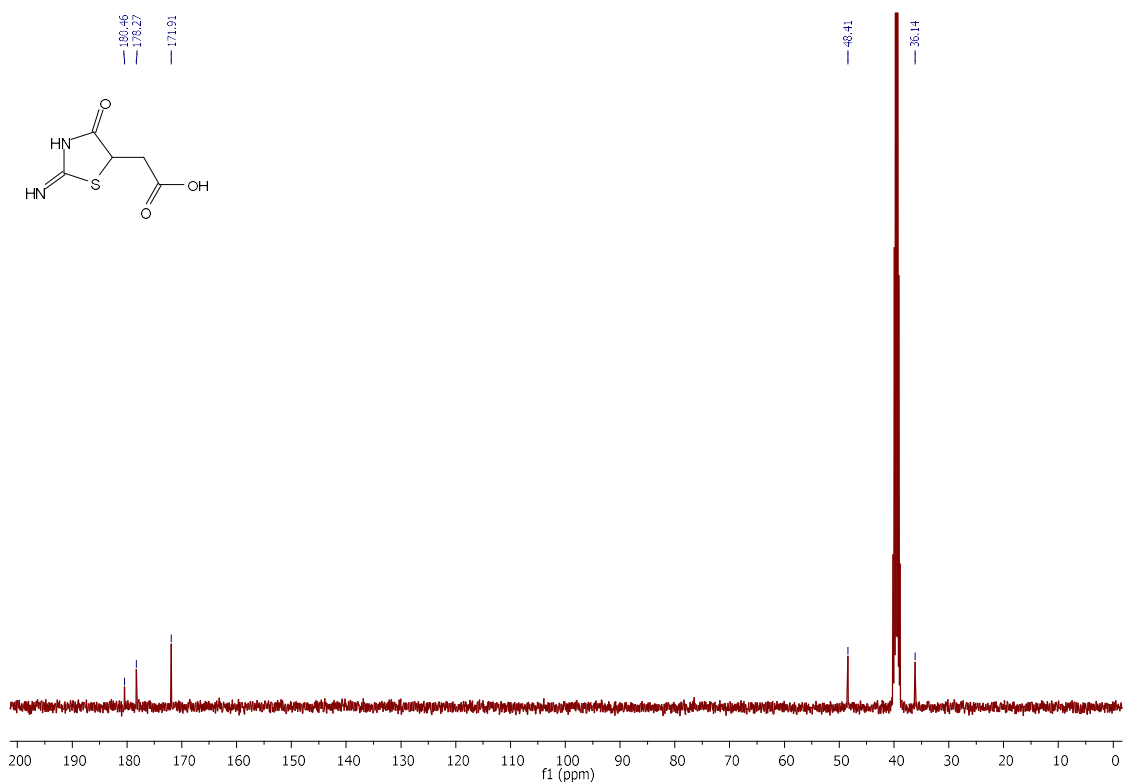
Příloha 12: ^{13}C NMR spektrum látky **7b**



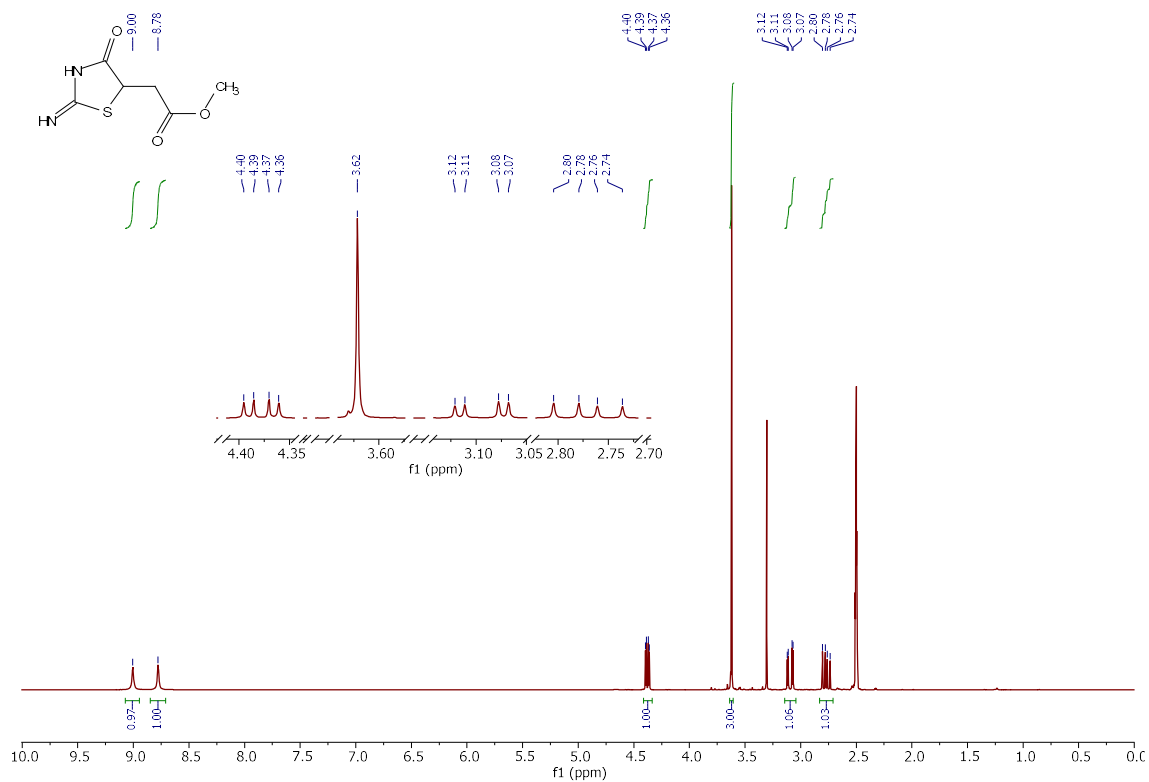
Příloha 13: ^1H NMR spektrum látky 10



Příloha 14: ^{13}C NMR spektrum látky 10



Příloha 15: ^1H NMR spektrum látky 11



Příloha 16: ^{13}C NMR spektrum látky 11

