



UNIVERZITA PALACKÉHO V OLMOUCI

PŘÍRODOVĚDECKÁ FAKULTA

Katedra organické chemie

**Syntéza nových inhibitorů mykobakteriálního
virulentního enzymu Zmp1**

Bakalářská práce

Autor práce: Veronika MOULEOVÁ

Studijní program: Chemie

Studijní obor: Bioorganická chemie a chemická biologie

Typ studia: Prezenční

Vedoucí práce: Mgr. Milan DAK

Olomouc 2023

PROHLÁŠENÍ

Prohlašuji, že jsem bakalářskou práci na téma „Syntéza nových inhibitorů mykobakteriálního virulentního enzymu Zmp1“ vypracovala samostatně pod vedením Mgr. Milana Daka a všechny použité zdroje a literatura byly řádně citovány. Tato práce nebyla využita jako závěrečná práce k získání jiného nebo obdobného druhu vysokoškolské kvalifikace.

Souhlasím s tím, aby byla práce zpřístupněna v knihovně Katedry organické chemie Přírodovědecké fakulty Univerzity Palackého v Olomouci.

V Olomouci dne 17.5.2023

Veronika MOULEOVÁ

PODĚKOVÁNÍ

Hned v úvodu bych chtěla nejvíce poděkovat svému vedoucímu práce Mgr. Milanu Dakovi za jeho vstřícný přístup, trpělivost, odpovědi na všechny mé otázky a obohacující konzultace. Kdykoliv jsem potřebovala, vždy mi poradil a jsem mu za to velmi vděčná. Dále děkuji RNDr. Lucii Brulíkové, Ph.D. za možnost pracovat na zajímavém tématu v její výzkumné skupině. Další poděkování patří prof. Mgr. Marku Šebelovi, Ph.D. za provedení biologického testování připravených látek. V neposlední řadě děkuji RNDr. Adamu Příbylkovi Ph.D. za provedení HRMS analýz. Děkuji také svojí rodině nejen za finanční podporu. Tato závěrečná práce vznikla za finanční podpory grantů IGA_PrF_2022_022, IGA_PrF_2023_20 a Juniorského grantu UP JG_2019_002.

BIBLIOGRAFICKÁ IDENTIFIKACE

Jméno a příjmení autora: Veronika MOULEOVÁ
Název práce: Syntéza nových inhibitorů mykobakteriálního virulentního enzymu Zmp1
Typ práce: bakalářská
Pracoviště: Katedra organické chemie,
Přírodovědecká fakulta
Univerzity Palackého, Olomouc
Školitel: Mgr. Milan DAK
Rok obhajoby práce: 2023

Abstrakt:

Předložená bakalářská práce se zabývá syntézou potenciálních inhibitorů enzymu Zmp1 druhé generace. Teoretická část je věnována doposud známým antituberkulotikům, možnostem vakcinace a problematice rezistentních kmenů. Dále pak podrobněji popisuje enzym Zmp1 a způsob jakým blokuje imunitní odpověď organismu. V jejím závěru jsou zmíněny výzkumy, které se zabývaly syntézou potenciálních inhibitorů Zmp1 a jejich výsledky. Experimentální část se věnuje samotné syntéze navržených indolových derivátů a optimalizacím jednotlivých reakčních kroků. Ve výsledkové části práce jsou rozebrány dva navržené syntetické postupy, které ale nevedly k požadovaným cílovým derivátům. Dále jsou zde popsány úvahy a samotná syntéza látek z alternativní knihovny. V závěru práce jsou zmíněny výsledky testování inhibičních vlastností připravených derivátů.

Klíčová slova: zinečnatá metaloproteasa, tuberkulóza, antituberkulotika, biologická aktivita
Počet stran: 72
Počet příloh: 1
Jazyk: čeština

BIBLIOGRAPHICAL IDENTIFICATION

Author's name and surname:	Veronika MOULEOVÁ
Title:	Synthesis of novel mycobacterial virulence factor Zmp1 inhibitors
Type of thesis:	bachelor
Department:	Department of organic chemistry Faculty of Science, Palacký University, Olomouc
Advisor:	Mgr. Milan DAK
The year of presentation:	2023
Abstract:	<p>The bachelor thesis deals with the synthesis of potential second-generation inhibitors of the Zmp1 enzyme. The theoretical part is dedicated to so far known antituberculosis drugs, vaccination possibilities and the problem of resistant strains. It also describes in detail the Zmp1 enzyme and the way it blocks the immune response of the organism. It concludes by mentioning the studies that dealt with the synthesis of potential Zmp1 inhibitors and their results. The experimental part focuses on the synthesis of the designed indole derivatives and the optimization of individual reaction steps. The results section of the work analyzes two suggested synthetic approaches that didn't lead to the desired target derivatives. It also discusses considerations and the synthesis of compounds from an alternative library. In the conclusion of the work are mentioned the results of testing the inhibitory properties of the prepared derivatives.</p>
Keywords:	zinc metalloprotease, antitubercotics, tuberculosis, biological activity
Number of pages:	72
Number of appendixes:	1
Language:	Czech

OBSAH

1	SEZNAM ZKRATEK	9
2	ÚVOD	11
3	CÍLE PRÁCE.....	14
4	TEORETICKÁ ČÁST	16
	4.1. Mycobacterium tuberculosis	16
	4.1.1. Morfologie bakterie	17
	4.2. Tuberkulóza.....	17
	4.2.1. Léčba TB	18
	4.2.2. Problematika rezistentních kmenů	21
	4.2.3. Vakcinace	21
	4.3. Zmp1.....	22
	4.3.1. Struktura Zmp1	22
	4.3.2. Funkce Zmp1 a imunitní odpověď organismu	24
	4.4. Inhibitory Zmp1	25
	4.4.1. Deriváty rhodaninu a aminothiazolu	25
	4.4.2. Deriváty 8-hydroxichinolinu a kyseliny hydroxamové	27
	4.4.3. Deriváty thiazolidindionu (TZD)	28
	4.4.4. Deriváty thiazolidindionu, indolu a pyrolu	30
6	VÝSLEDKY A DISKUZE	33
	6.1. Syntéza intermediátů pro přípravu finální látek	34
	6.1.1. <i>N</i> -alkylace methyl indol-3-karboxylátu.....	35
	6.1.2. Deprotekce terc-butyl esteru.....	35
	6.1.3. Syntéza allyl/benzylhydroxamátu	36
	6.1.4. Hydrolýza methylesterů.....	37
	6.2. Příprava série finálních látek.....	38

6.2.1. Protekce linkeru.....	39
6.2.2. Nukleofilní acylová substituce	40
6.2.3. Karbodiimidová metoda	42
6.3. Příprava alternativní série finálních látek.....	45
6.2.5 Protekce vybraných aminokyselin.....	45
6.2.6. Tvorba amidické vazby pomocí karbodiimidu.....	46
6.4. Biologická aktivita.....	48
5 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST	49
5.1. Obecné informace.....	49
5.2. Syntéza indolových derivátů	50
5.2.1. Syntéza methyl 1-(2-(terc-butoxy)-2-oxoethyl)-1 <i>H</i> -indol-3-karboxylátu (2)	50
5.2.2 Syntéza 2-(3-(methoxycarbonyl)-1 <i>H</i> -indol-1-yl)octové kyseliny (3)	50
5.2.3. Syntéza methyl 1-(2-((allyloxy)amino)-2-oxoethyl)-1 <i>H</i> -indol-3-karboxylátu (4a).....	51
5.2.4. Syntéza methyl 1-(2-((benzyloxy)amino)-2-oxoethyl)-1 <i>H</i> -indol-3-karboxylátu (4b)	52
5.2.5. Syntéza 1-(2-((allyloxy)amino)-2-oxoethyl)-1 <i>H</i> -indol-3-karboxylové kyseliny (5a)	52
5.2.6. Syntéza 1-(2-((benzyloxy)amino)-2-oxoethyl)-1 <i>H</i> -indol-3-karboxylové kyseliny (5b).....	53
5.2.6. Syntéza methyl-3-aminopropanátu (7)	53
5.2.7. Syntéza methyl-4-aminobutanoátu (9)	54
5.2.7. Syntéza methyl 3-(1-(2-((allyloxy)amino)-2-oxoethyl)-1 <i>H</i> -indol-3-karboxamido)propanoátu (14a)	54
5.2.8. Syntéza methyl 4-(1-(2-((allyloxy)amino)-2-oxoethyl)-1 <i>H</i> -indol-3-karboxamido)butanoátu (14b)	55
5.2.8. Syntéza methyl 3-(1-(2-((benzyloxy)amino)-2-oxoethyl)-1 <i>H</i> -indol-3-karboxamido)butanoátu (14c)	56

5.2.9	Syntéza methyl 4-(1-(2-((benzyloxy)amino)-2-oxoethyl)-1 <i>H</i> -indol-3-karboxamido)butanoátu (14d)	57
7	ZÁVĚR	58
8	SEZNAM POUŽITÝCH ZDROJŮ	60
9	Přílohy	65

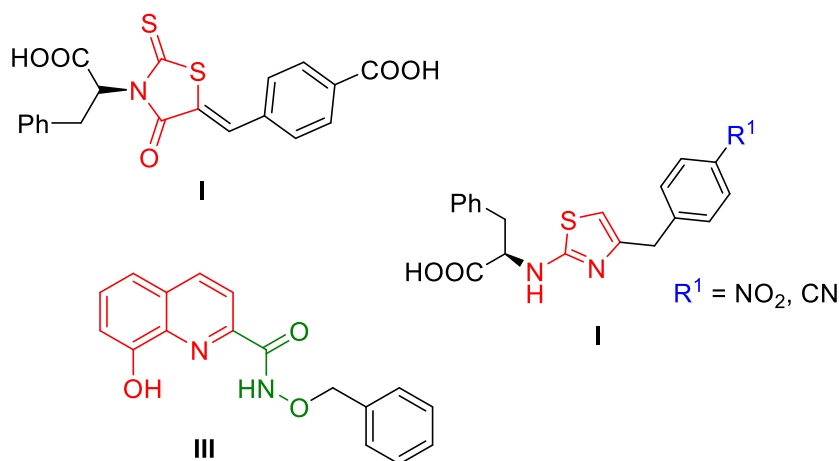
1 SEZNAM ZKRATEK

AMK	aminokyselina/y
BCG	Bacillus Calmette-Guérin
Bezv.	bezvodý
DCM	dichlormethan
DIC	<i>N,N'</i> -diisopropylkarbodiimid
DIPEA	diisopropylethylamine
DMAP	4-dimethylaminopyridin
DMF	dimethylformamid
DMSO	dimethylsulfoxid
EDC·HCl	<i>N</i> -ethyl- <i>N'</i> -(3-dimethylaminopropyl) karbodiimid hydrochlorid
EtOAc	ethylacetát
FDA	U.S. Food and Drug Administration
GABA	kyselina γ -aminomáselná
HATU	<i>O</i> -(7-Azabenzotriazol-1-yl)- <i>N,N,N',N'</i> -tetramethyluronium hexafluorophosphate
Hex	hexan
HOBt	<i>N</i> -hydroxybenzotriazol
LC-MS	kapalinová chromatografie s hmotnostní spektrofotometrií
MF	mobilní fáze
Mtb	<i>Mycobacterium tuberculosis</i>
NMR	nukleární magnetická rezonance
rt	laboratorní teplota
RVO	rotační vakuová odparka
SF	stacionární fáze
TB	tuberkulóza
TFA	trifluoroctová kyselina
TLC	tenkovrstvá chromatografie
TZD	thiazolidindion
VL	výchozí látka

VP	vedlejší produkt(y)
WHO	světová zdravotnická organizace
ZBG	zinc binding group
Zmp1	zinečnatá metaloproteasa 1

2 ÚVOD

Mykobakteriální enzym Zmp1 umožňuje bakterii *Mycobacterium tuberculosis* unikat imunitnímu systému svého hostitele. Jedná se o enzym ze skupiny zinečnatých metaloproteas. Jednou z možných cest v boji proti tuberkulóze je syntéza nových potenciálních antituberkulotik, která budou schopna, díky své zinc binding group – části molekuly, která přímo interaguje se Zn^{2+} kationtem v aktivním místě (ZBG), právě tento enzym inhibovat. Dostupné studie nasvědčují tomu, že Zmp1 přispívá k zabránění tvorby fagolysosomu. V buňce makrofágu tak nedochází k eliminaci bakterie a později může dojít k rozvoji aktivní formy TBC.

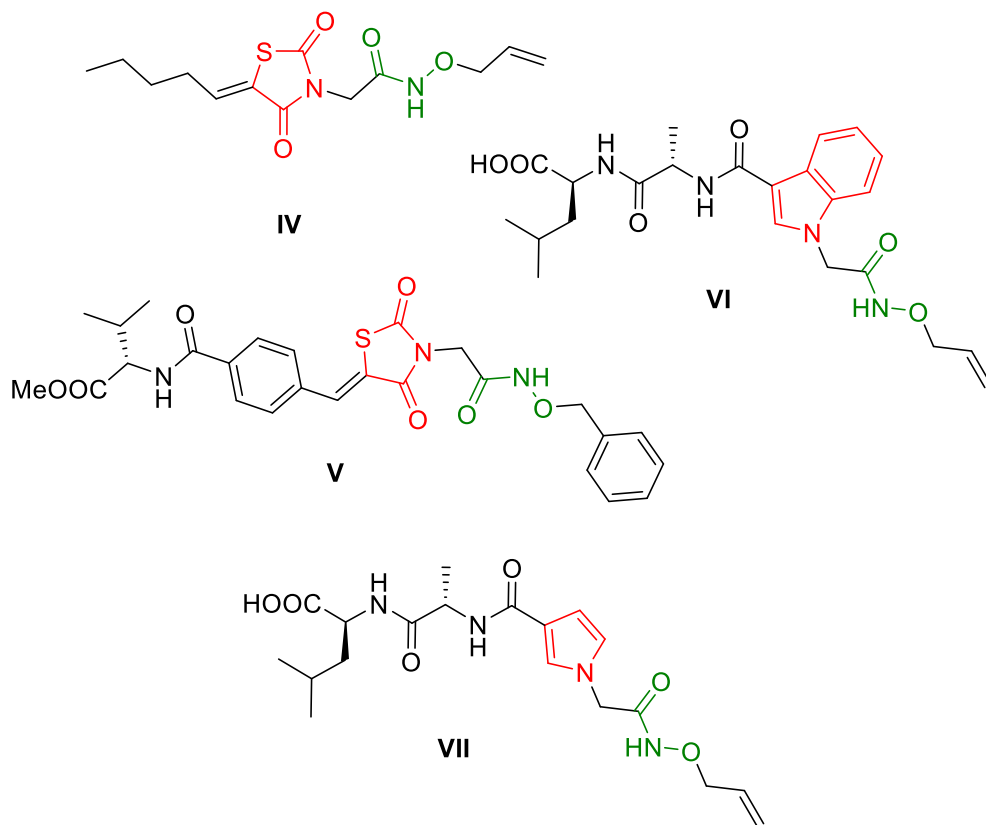


Obr. 1: První připravené potenciální Zmp1 inhibitory

Díky poznatkům o krystalické struktuře Zmp1/fosoramidon¹ bylo popsáno aktivní místo tohoto enzymu. Na základě těchto znalostí vznikly výzkumy, které se věnovaly návrhu a syntéze prvních potenciálních inhibitorů Zmp1 (Obr. 1), která cílila právě na enzym Zmp1. Jednalo se o deriváty rhodaninu, aminothiazolu a 8-hydroxychinolinu s navázaným hydroxamát. Látky na Obr. 1 vykazovaly nejvyšší inhibiční schopnosti.^{2, 3, 4}

Z dat, která tyto studie přináší, vyplývá doporučení zachovat základní skelet v podobě výše uvedených heterocyklů a zachování hydroxamátové funkční skupiny. Problémem, na který tyto látky narážely, bylo např. jejich různé chování v aktivním místě, kdy některé měly více vazebných míst.

Syntéza nových inhibitorů Zmp1 je mj. téma, kterým se pod vedením RNDr. Lucie Brulíkové, Ph.D zabývá naše výzkumná skupina, jejíž členové jsou autoři následujících studií,^{5,6} které navazují na výše zmíněné zahraniční výzkumy.



Obr. 2: Potenciální inhibitory Zmp1 připravené v naší výzkumné skupině

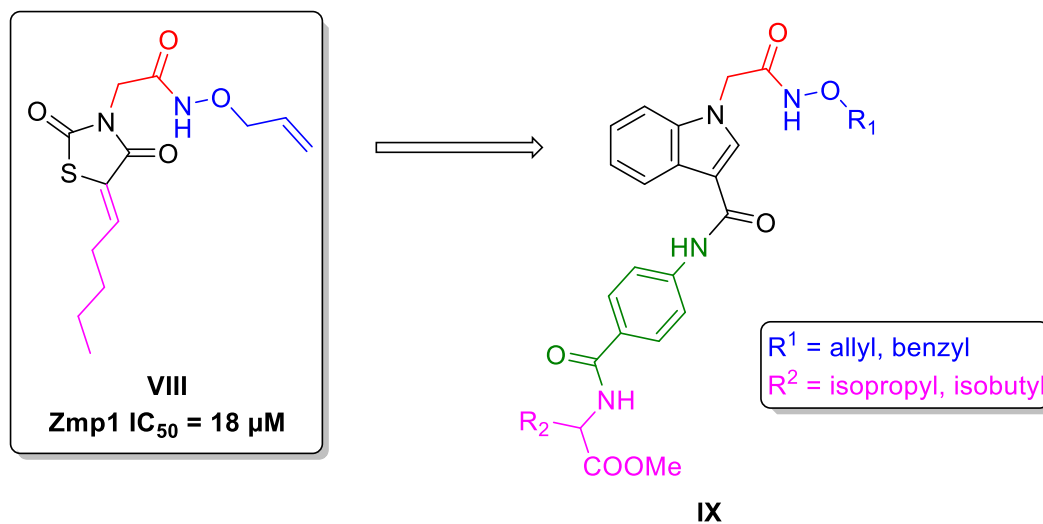
První studie⁵ popisuje návrh a syntézu potenciálních inhibitorů Zmp1 první generace (IV, Obr. 2.), které měly jako základní heterocyclus thiazolidindion. Na základě molekulového dokování těchto látek bylo zjištěno, že spíše okupují vstup do aktivního místa, kde je molekula natočena tím způsobem, že alifatické reziduum směřuje dovnitř, přičemž vně míří hydroxamátový zbytek. Z tohoto důvodu nedochází k přímé interakci se Zn^{2+} kationtem. Byly proto navrženy a syntetizovány nové potenciální inhibitory druhé generace (V, VI, VII Obr. 2) s prodlouženou a modifikovanou ZBG. Zároveň došlo také k nahrazení thiazolidindionu (z důvodu možných interakcí s vícero biologickými cíli) za indol a pyrol.⁶

Vzhledem k tomu, že výzkum a syntéza potenciálních inhibitorů Zmp1 započaly teprve nedávno, kdy krystalická struktura Zmp1 byla publikována v roce 2011¹ a první

syntéza potenciálních inhibitorů byla publikována v roce 2014⁴, jedná se tak o ještě zcela neprobádaný cíl, který do budoucna přináší mnoho různých syntetických možností.

3 CÍLE PRÁCE

Cílem této bakalářské práce je syntéza nových inhibitorů druhé generace mykobakteriálního enzymu Zmp1. Práce navazuje na předchozí výzkum naší výzkumné skupiny, kdy jako nejslibnější se ukázala struktura **VIII** (Obr. 3) s $IC_{50} = 18 \mu M$, která sice vykazovala inhibiční schopnost, avšak na základě molekulového dokování neinteragovala přímo se zinečnatým kationtem, nýbrž pouze blokovala vstup do aktivního místa Zmp1. V první generaci byl jako základní heterocyklus zvolen thiazolidindion. Kvůli možným interakcím s více molekulárními cíli byl nahrazen indolem, který se nachází mj. v molekule fosforamidonu. Ten slouží jako standard pro řadu metaloproteas. Na základě molekulového dokování molekuly **VIII**, bylo také zjištěno, že do aktivního místa je orientovaná alifatická část molekuly (růžově), namísto předpokládaného hydroxamátu (modře). V důsledku této skutečnosti bylo nutné alifatický řetězec modifikovat pomocí vhodné funkční skupiny, která by byla schopná interakce v aktivním místě jako tzv. zinc binding group (ZBG). Přestože zde hydroxamát nehraje roli ZBG, jak bylo původně zamýšleno, byl na základě molekulového dokování zachován.



Obr. 3: Návrh cílových derivátů

Jednotlivé dílčí cíle předkládané práce:

1. Vypracování literární rešerše na dané téma.
2. Návrh syntetického plánu a cílových derivátů na základě molekulového dokování.
3. Syntéza navržených derivátů a optimalizace reakčních podmínek.
4. Příprava série cílových sloučenin.
5. Otestování biologické aktivity finálních derivátů.
6. Sepsání bakalářské práce.

4 TEORETICKÁ ČÁST

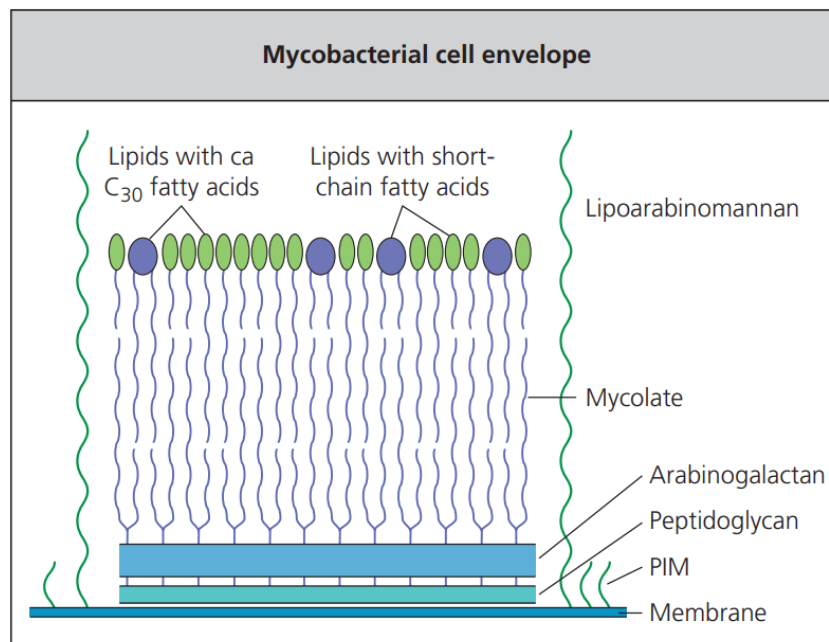
Teoretická část předkládané bakalářské práce se věnuje popisu bakterie *Mycobacterium tuberculosis* a onemocnění, které způsobuje – tuberkulóze. Jsou zde popsány doposud používaná léčiva první a druhé linie antituberkulotik. Také je zde nastíněna problematika rezistentních kmenů a možnosti prevence ve formě vakcinace.

Dále pojednává o enzymu Zmp1, konkrétně o jeho struktuře, funkci a imunitní odpovědi napadeného organismu. V závěru jsou detailně popsány doposud provedené studie, které se zaměřují na výzkum a syntézu potenciálních inhibitorů Zmp1.

4.1. *Mycobacterium tuberculosis*

Komplex Mycobacterium tuberculosis je soubor několika bakterií, kdy nejméně devět druhů z rodu *Mycobacterium*, čeledi *Mycobacteriaceae* a řádu *Actinomycetales* způsobují onemocnění nazývané tuberkulóza u lidí. *Mycobacterium tuberculosis sensu stricto* je nejčastějším původcem lidské TB na světě.⁷ *Mycobacterium africanum* má na svědomí TB v západní Africe. Velmi vzácným původcem TB v oblasti východní Afriky je *Mycobacterium canettii*. TB se vyskytuje i u zvířat, kdy původcem jsou různé druhy mykobakterií a domestikace dobytka je považována za možný první případ přenosu na člověka.⁸

4.1.1. Morfologie bakterie



Obr. 4: Schéma buněčné stěny Mtb⁹

Mykobakterie je nepohyblivá, nesporeující aerobní bakterie. Její tvar připomínají rovné až lehce zakřivené tyčinky. Od ostatních bakterií se liší vysokým obsahem lipidů (např. mykolové kyseliny) v buněčné stěně, což má za následek vyšší odolnost vůči barvení – acidorezistentní tyčinky. Těžko se barví podle Grama, tudíž jsou označovány jako Gram neutrální. Používá se Ziehl-Neelsenovo barvení.¹⁰ Buněčná membrána (Obr. 4) je složená z fosfolipidové dvojvrstvy, do které jsou zasazeny transmembránové proteiny. Na vnější straně se nachází peptidoglykan kovaltně vázaný na arabinogalaktan.⁹

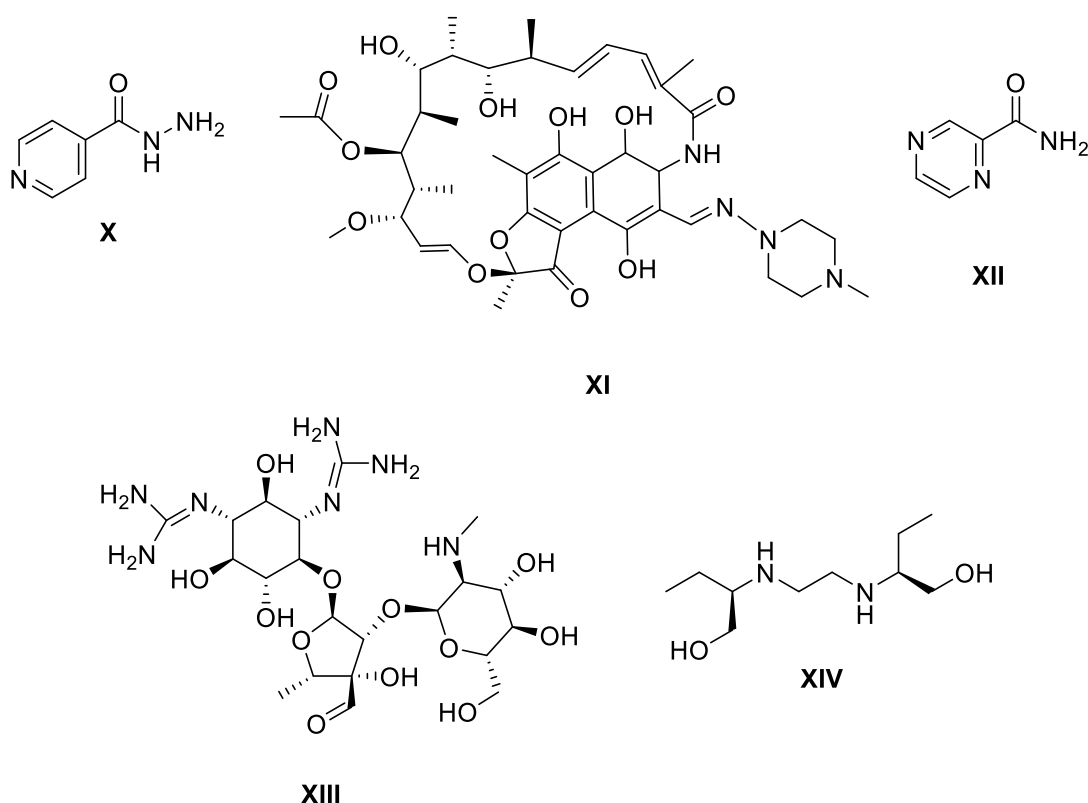
4.2. Tuberkulóza

Tuberkulóza je infekční onemocnění, které způsobuje *Mycobacterium tuberculosis* (*Mtb*). Šíří se ve formě kapének vzduchem při kontaktu s nakaženým. Může postihnout jakoukoliv část těla, avšak převažují plíce. Šíří se vzduchem z nakaženého (kašláním, kýcháním).¹¹

V roce 2019 bylo celosvětově s TB nově diagnostikováno 7,1 mil lidí. V roce 2020 toto číslo v důsledku pandemie COVID-19 výrazně pokleslo na 5,8 mil (-18 %). Za rok 2021 už se setkáváme s mírným nárůstem, kdy WHO (World Health Organization) uvádí celosvětový počet nově diagnostikovaných s TB na 6,4 mil lidí. Velký propad

v nově diagnostikovaných měl za následek zvýšený počet lidí, kteří nebyli diagnostikováni a předpokládá se, že tato skutečnost přispěla ke zvýšení úmrtnosti (1,6 mil. lidí za rok 2021) v důsledku TB, a také k častějšímu nevědomému komunitnímu přenosu v jehož důsledku se u nakažených nediodagnostikovaných jedinců rozvinulo aktivní onemocnění TB.¹² Co se statistik z České republiky týče, z Registru tuberkulózy (RTBC)¹³ vyplývá, že v roce 2021 bylo nahlášeno celkem 357 případů onemocnění TB. Po porovnání s předchozím rokem se stav hlášených snížil (RTBC uvádí o 11 případů méně oproti roku 2020). Z dlouhodobého hlediska pak dochází k poklesu výskytu tohoto onemocnění a v mezinárodním měřítku se řadíme k zemím s nízkým výskytem TB. Za rok 2021 bylo nahlášeno 37 úmrtí (může zahrnovat i dodatečně nahlášená úmrtí za předchozí období). Zpráva RTBC za rok 2022 není zatím k dispozici.

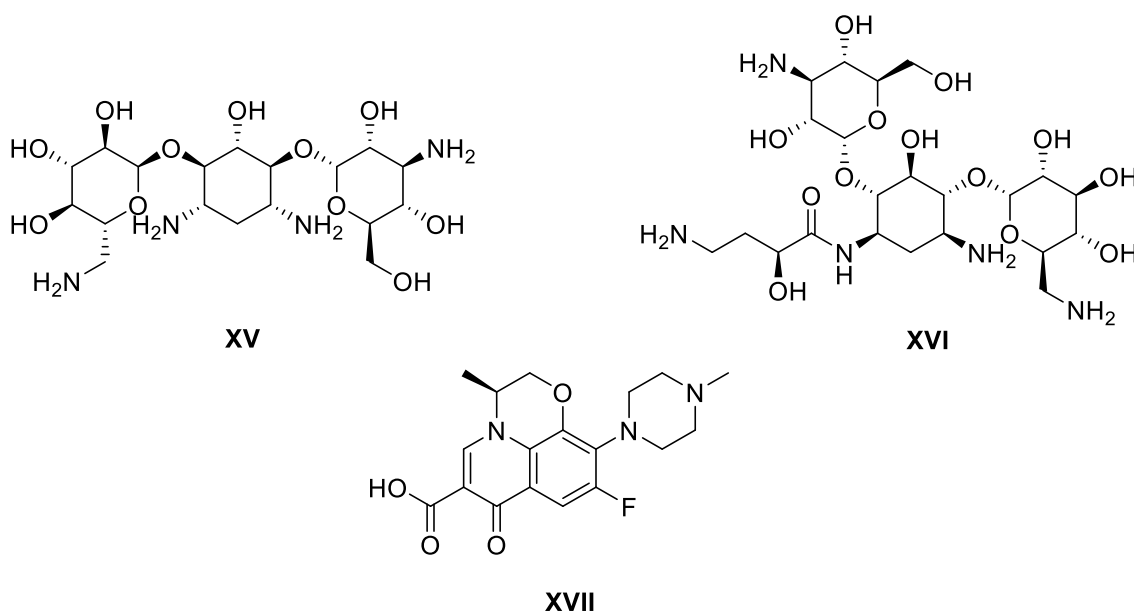
4.2.1. Léčba TB



Obr. 5: Léčiva první linie

Léčba TB je dlouhodobá. Délka léčby se odvíjí od kmenu bakterie. U senzitivních kmenů trvá obvykle 6 měsíců, u rezistentních kmenů se celková doba léčby odvíjí od konkrétní situace pacienta a může se pohybovat kolem jednoho roku a více.¹⁴ Podávají se

kombinace různých antituberkulotik. U TB mluvíme o léčivech první linie (Obr. 5), konkrétně jde o **isoniazid** (X, Obr. 5), který je charakterizován jako jeden z nejeftivnějších a nejspecifičtějších antituberkulotik. **Rifampicin** (XI, Obr. 5) je léčivo, jehož mechanismus účinku spočívá ve vazbě na β -podjednotku RNA polymerázy. Tím dochází k její inhibici a neprobíhá transkripce a exprese *Mtb* genů. **Pyrazinamid** (XII, Obr. 5), který se používá při krátkodobé terapii aktivní TB a není doporučováno k léčbě latentní formy TB (jedná se o formu onemocnění, kdy je imunologickými testy prokázána infekce *Mtb*, avšak neobjevují se klinické příznaky a symptomy. RTG hrudníku je v normě¹⁵). **Ethambutol** (XIV, Obr. 5) cílí na biosyntézu arabinogalaktamu buněčné stěny (viz Obr. 4). Tyto léčiva se podávají perorálně. Parenterálně se pak podává **streptomycin** (XIII, Obr. 5), který se váže na 16S rRNA a následně inhibuje syntézu proteinů.¹¹

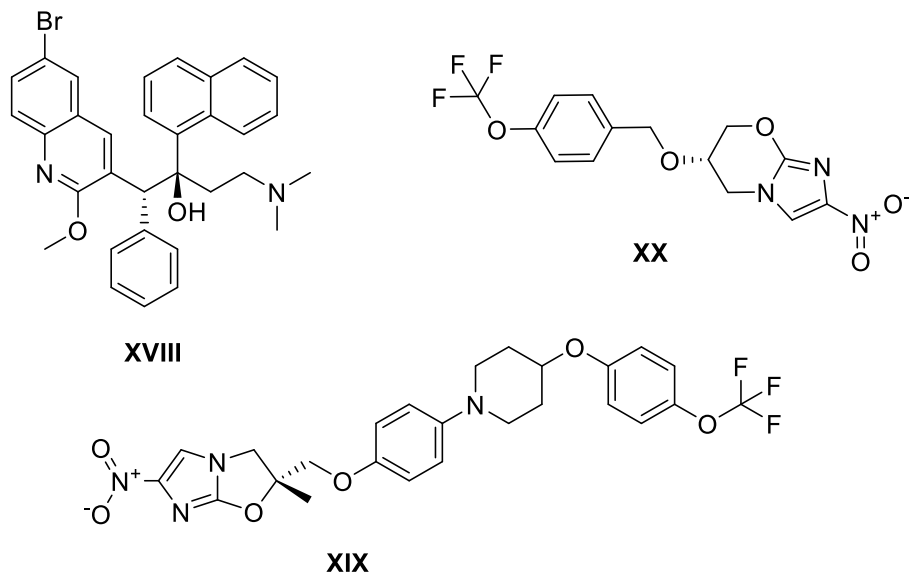


Obr. 6: Léčiva druhé linie

Léčiva druhé linie (Obr. 6) zahrnují tři skupiny léčiv: injekční, fluorochinolony a perorální léčiva. Injekční léčiva jako například **kanamycin** (XV, Obr. 6) a **amikacin** (XVI, Obr. 6) inhibují dva hlavní geny *RpsL* a *rrs*, které jsou zodpovědné za formování proteinů u *Mtb*.

Fluorochinolony např. **levofloxacin** (XVII, Obr. 6) cílí na bakteriální DNA gyrasu, která se skládá ze dvou A a dvou B podjednotek, které jsou obklopeny geny *gyrA* a *gyrB*.^{11,16,17}

Problémem léčby se stala rezistence bakterií na některá antituberkulotika. Ta vzniká v důsledku mutací v několika genech (*katG*, *ahpC*, *inhA*) a bude lépe popsána v následující kapitole. V důsledku rozvíjející se rezistence cílí výzkum na syntézu nových potenciálních antituberkulotik proti multirezistentní TB (MDR-TB)



Obr. 7: Nová schválená léčiva pro léčbu MDR/XDR-TB

Jedním z nově schválených léčiv pro MDR-TB je perorální přípravek s názvem SIRTURO, jehož léčivou látkou je **bedaquilin** patřící do skupiny diarylchinolonů (XVIII, Obr. 7). FDA bylo v roce 2012 schváleno jako součást kombinované léčby MDR-TB. Bedaquilin inhibuje ATP syntasou bakterie, konkrétně cílí na její *c* podjednotku. Dochází tak k inhibici metabolismu *Mtb*.

Další perorální léčivo nese název Delytba (FDA schváleno 2014) s účinnou látkou **delemanid** (XIX, Obr. 7), které je také určeno pro léčbu MDR-TB. Delemanid patří do skupiny látek zvaných nitroimidazoly. Pro zachování účinnosti je také potřeba podávat léčivo v kombinaci s dalšími antituberkulotiky určenými pro léčbu MDR-TB. Mechanismus účinku spočívá v inhibici biosyntézy kyseliny mykolové v mykobakteriích a je vhodný i pro pacienty, kteří se léčí s HIV.

Pretomanid (XX, Obr. 7) je další perorální schválené léčivo (FDA 2019) ze skupiny nitroimidazolů. Používá se v kombinaci s léčivy na bázi bedaquilinu a linezolidu k léčbě extenzivně lékově rezistentní TB (XDR-TB) nebo MDR-TB. Stejně jako delemanid inhibuje biosyntézu kyseliny mykolové, čímž zabraňuje v biosyntéze buněčné stěny. (viz Obr. 4).^{18,19,20}

4.2.2. Problematika rezistentních kmenů

První případ rezistence se datuje do roku 1943, kdy byl objeven streptomycin, ale jeho nadměrné užívání mělo za následek pokles účinnosti. Rezistenci můžeme rozdělit do následujících čtyř skupin. **Monorezistentní** TB charakterizuje formu onemocnění, kdy *Mtb* při testu citlivosti *in vitro* je rezistentní pouze na jedno antituberkulotikum z první linie léčiv (viz kapitola 4.2.1). Pojem **polyrezistentní** TB se používá, pokud je kmen rezistentní na více než jedno antituberkulotikum z první linie léčiv mimo již vyskytující se rezistenci na isoniazid a rifampicin. Pokud je kmen rezistentní na kombinaci isoniazidu a rifampicinu, hovoří se o **multirezistenci**. **Extenzivní léková rezistence** je označení pro *Mtb*, které je kromě multirezistence odolné zároveň vůči jakýmkoliv fluorochinolovým antituberkulotikum a současně také na minimálně jedno ze tří parenterálních antituberkulotik. Nejnovější definice ještě doplňují o **pre-extendivně lékovou rezistenci**, kdy jsou bakterie citlivé vůči léčivům z obou linií.²¹

Příčiny rezistentních kmenů jsou různé. Může se např. jednat o neadekvátní léčebný režim, chybné dávkování, předčasné ukončení léčby, migrace obyvatel, genetická mutace *Mtb* a další.²²

Léčba rezistentních forem spočívá v individuální kombinaci několika různých antituberkulotik, která obvykle trvá déle než 12 měsíců.²³

4.2.3. Vakcinace

V současné době je jedinou schválenou vakcínou proti tuberkulóze vakcína bacillus Calmette-Guérin (BCG).²⁴ Vakcína je založená na oslabené živé bakterii odvozené od *M. bovis*, která se přirozeně vyskytuje ve skotu a dalších zvířatech, u kterých způsobuje TB a kterou od roku 1906 zkoumali lékař Léon Charles Albert Calmett a veterinář Jean-Marie Camille Guérin v Pasteurově institutu v Lille. Vyvinuli tak první BCG vakcínu, která byla perorálně poprvé podána novorozenci v roce 18. července 1921.^{25,26}

V důsledku pěstování BCG v různých laboratořích a za různých podmínek se nyní používá komerčně několik podkmenů s genetickými rozdíly, nikoliv však s rozdíly v účinku nebo bezpečnosti. Konkrétně se jedná o ruský podkmen (Moskva-368), bulharský podkmen (Sofia SL222) a podkmen Tokio 172-1.²⁶

V roce 2019 až 88 % dětí na celém světě, které dostaly BCG vakcínu v prvním roce života, získaly více než 70% ochranu před závažnými formami TB ve školním věku.

Naopak u dospělých je účinnost ochrany BCG vakcíny mnohonásobně nižší. V návaznosti na studie, které poukázaly na velmi malou účinnost u dospělých WHO nedoporučuje přeočkovávání i v případě, že tuberkulinový test je negativní.²⁷ V České republice bylo plošné očkování novorozenců zahájeno roku 1953. V důsledku výše zmíněného zjištění, že vakcína nemá u dospělých jedinců téměř žádnou účinnost, bylo v roce 2009 přeočkování zrušeno a koncem roku 2010 zrušeno i plošné očkování novorozenců. Očkují se pouze vysoce rizikové děti (např. jeden z rodičů, sourozenec nebo jakýkoliv člen stejné domácnosti má aktivní TB).^{25,26}

4.3. Zmp1

Zinečnatá metaloproteasa 1 (Zmp1) je jedním ze Zn^{2+} dependentních proteinů, které se vyskytují u *Mtb*. Tento protein hraje důležitou roli při imunitní odpovědi organismu. Ovlivňuje dozrávání fagosomů v makarofázích skrze potlačení zánětlivé imunitní odpovědi, kdy je exprimován během infekce, a následné formování fagolysosomu. Mechanismus bude podrobně popsán níže.^{28,5}

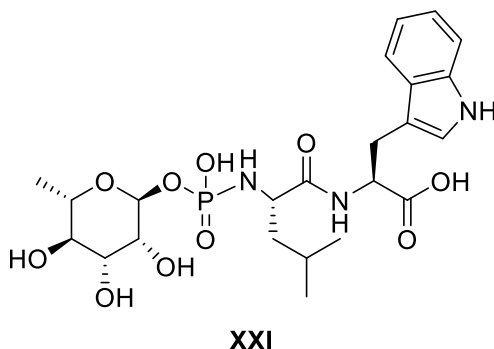
Jedná se o protein spadající do skupiny M13 endopeptidas, které v organismu regulují biologickou aktivitu mnohých hormonů, peptidů a jsou zahrnuty v procesech, jako jsou např. regulace krevního tlaku (Neprilysin), prevence hemolytických reakcí a dalších. Endopeptidasy pak dělíme na základě hlavních katalytických mechanismů. Jedna z těchto skupin se nazývá metaloproteasy, kam patří i Zmp1.¹

4.3.1. Struktura Zmp1

Bioinformatickou analýzou genomu *Mtb* byly zjištěny tři údajné Zn^{2+} metaloproteasy Rv0198c (Zmp1), Rv1977 (Zmp2) a Rv2869c (Zmp3). Všechny jsou založeny na aktivním místě HExxH, který je společný pro všechny Zn^{2+} metaloproteasy.²⁹ Role genu Rv2869c byla popsána ve spojitosti s metabolismem lipidů. Gen není důležitý pro přežití *Mtb*, ale je transkripčním regulátorem genů zodpovědných za syntézu a degradaci lipidů.³⁰

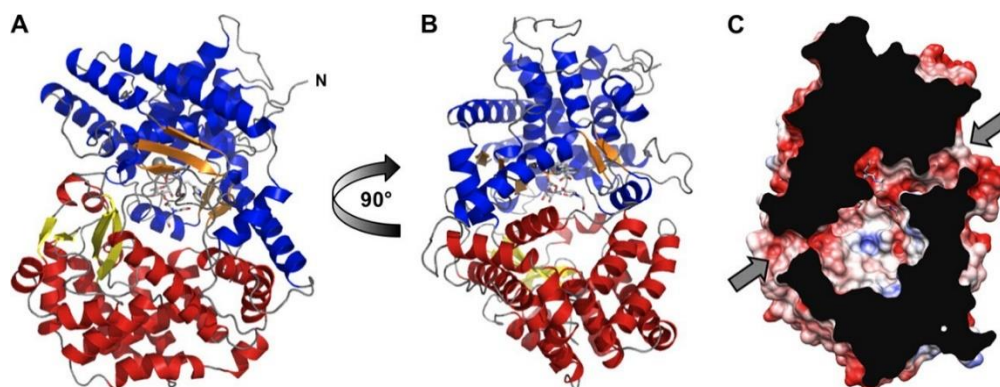
Pro všechny M13 endopeptidasy jsou charakteristická vazebná místa Zn^{2+} (jak již dříve zmíněný HExxH, tak ExxxD) a místo pro substrát/inhibitor (VNAXY). Glutamátový zbytek HExxH je nezbytný pro katalýzu, jelikož katalyzuje polarizaci molekuly vody,

která usnadňuje reakci nukleofilu s peptidovou vazbou na substrátu. Tím následně dochází ke štěpení substrátu.



Obr. 8: Fosforamidon

Krystalická struktura Zmp1 (Obr. 9) byla zjištěna reakcí s inhibitorem fosforamidonem (XXI, Obr. 8), který interaguje přímo se zinečnatým kationtem, a zároveň blokuje vstup do aktivního místa (78% inhibice).^{5,31}



Obr. 9: Krystalická struktura enzymu Zmp1¹

Sekundární struktura proteinu (Zmp1) sestává ze dvou hlavních laloků, vykazujíc α -helikální uspořádání. Tyto laloky jsou vzájemně propojeny několika smyčkami v rámci celého proteinu. Enzymaticky aktivní místo je situováno mezi oběma laloky a je dostupné skrze dva opačně lokalizované otvory (Obr. 9).

Obr. 9 znázorňuje tři náhledy na enzym Zmp1. Nejprve celkovou strukturu Zmp1 (A). Barvy rozlišují jednotlivé sekundární struktury proteinu (Zmp1). Převažuje zde α -helix (modrá a červená barva), ale obsahuje i β -skládaný list (oranžová a žlutá barva). Červená a modrá zároveň od sebe oddělují horní a dolní lalok. Celý protein je provlečen

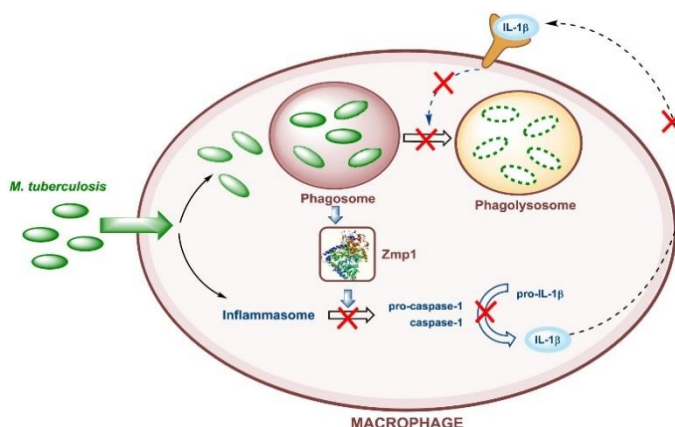
smyčkami, které zde mají šedou barvu. Kation Zn^{2+} , který má tvar tetraedru, je zde vyobrazen jako kulovitá šedá oblast v horní části proteinu.

Vertikálním pootočením o 90° získáme pohled z profilu (B). Dále je zde zobrazen elektrostatický potenciál – modré zbarvení odpovídá kladnému náboji, červené negativnímu (C). Šipky znázorňují vstupní a výstupní místa v podobě mezer a dutin pro substrát/produkt k aktivnímu místu.¹

4.3.2. Funkce Zmp1 a imunitní odpověď organismu

Patofyziologie této bakterie spočívá v potlačení imunitní odpovědi organismu, která se projeví nepřítomností jednoho z hlavních protizánětlivých cytokinů interleukinu – 1β (IL- 1β), a to kvůli proteinu Zmp1.

Přesný mechanismus patogeneze Zmp1 nebyl zatím plně vyjasněn. I přes zjištění, že potlačením Zmp1 genu dojde k reaktivaci kaspázy-1 a produkci cytokinů,⁴ se později ukázalo, že odstranění genu v myším modelu, kódujícího Zmp1, vedlo naopak ke zvýšení virulence bakterie.^{32,1}



Obr. 10: Inhibice dozrávání fagosomu způsobená Zmp1⁵

V plicních sklípcích dochází k fagocytóze bakterie buňkami imunitního systému – makrofágy. Uvnitř makrofágu vzniká fagosom (Obr. 10). Zprvu jsou bakterie vystavené hydrolytickému prostředí, ale v případě nedostatečnosti vyše imunitní buňka signál k vytvoření fagolysosomu, který má za následek zneškodnění bakterie. Běžně je mechanismus takový, že multiproteinový komplex = inflammasom, složený z cytosolických proteinových senzorů ze skupiny NLRs (Nod-like receptory = nucleotide-binding oligomerization domain like receptors), rozpozná bakteriální dsDNA. Prokaspáza-1 se po komplexotvorné reakci s inflammasomem přechází na kaspázu-1, která

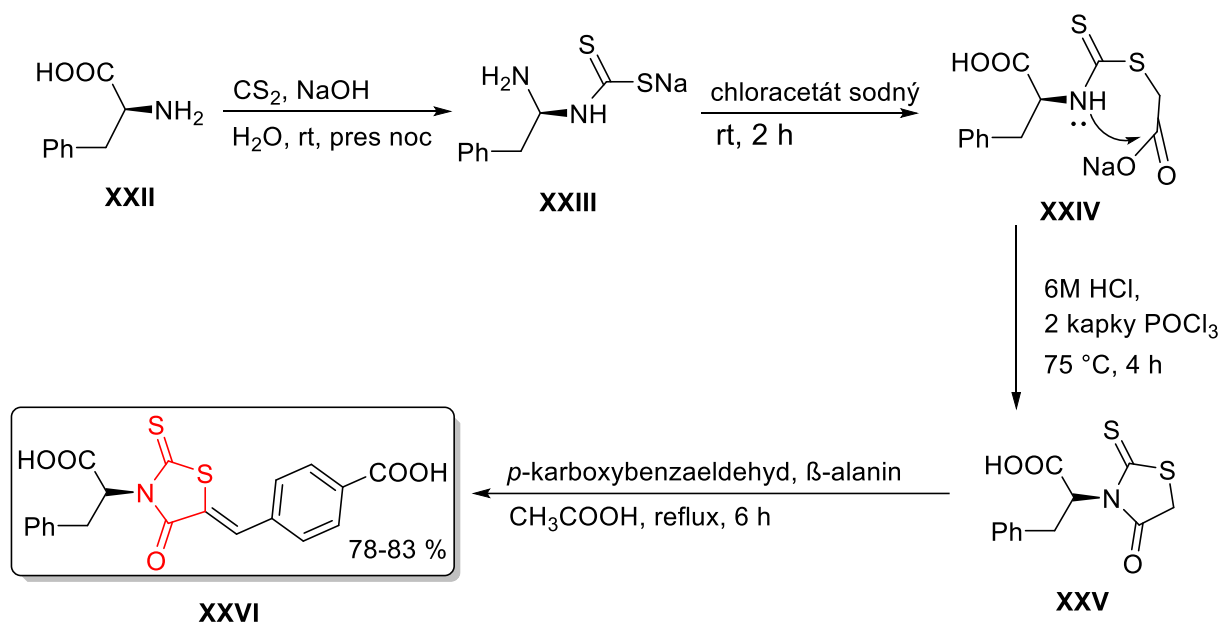
štěpí pro-interleukin-1 β na jeho maturovanou formu v podobě cytokinů IL-1 β . Ty se vážou na povrchu makrofágu na IL-1 receptory1 a spustí formování fagolysozomu.³³ To se ale v případě *Mtb* neděje. Zmp1 potlačuje aktivitu inflamasomu prostřednictvím inhibice procesu aktivace kaspázy-1, a tedy zabraňuje i tvorbě IL- β z pro-IL-1 β . To vysvětluje, proč tento cytokin není při imunitní odpovědi organismu přítomen.¹

4.4. Inhibitory Zmp1

Návrh nových potenciálních inhibitorů čerpá z poznatků o krystalické struktuře Zmp1.¹ Vychází z molekulového dokování navržených struktur do aktivního místa. Následuje příprava knihovny látek, která je posléze podrobena biologickému testování. Doposud provedené studie zmiňují deriváty rhodaninu, aminothiazolu, hydroxychinolinu a thiazolidindion/pyrol/indol hydroxamátů.^{5,4,2,36}

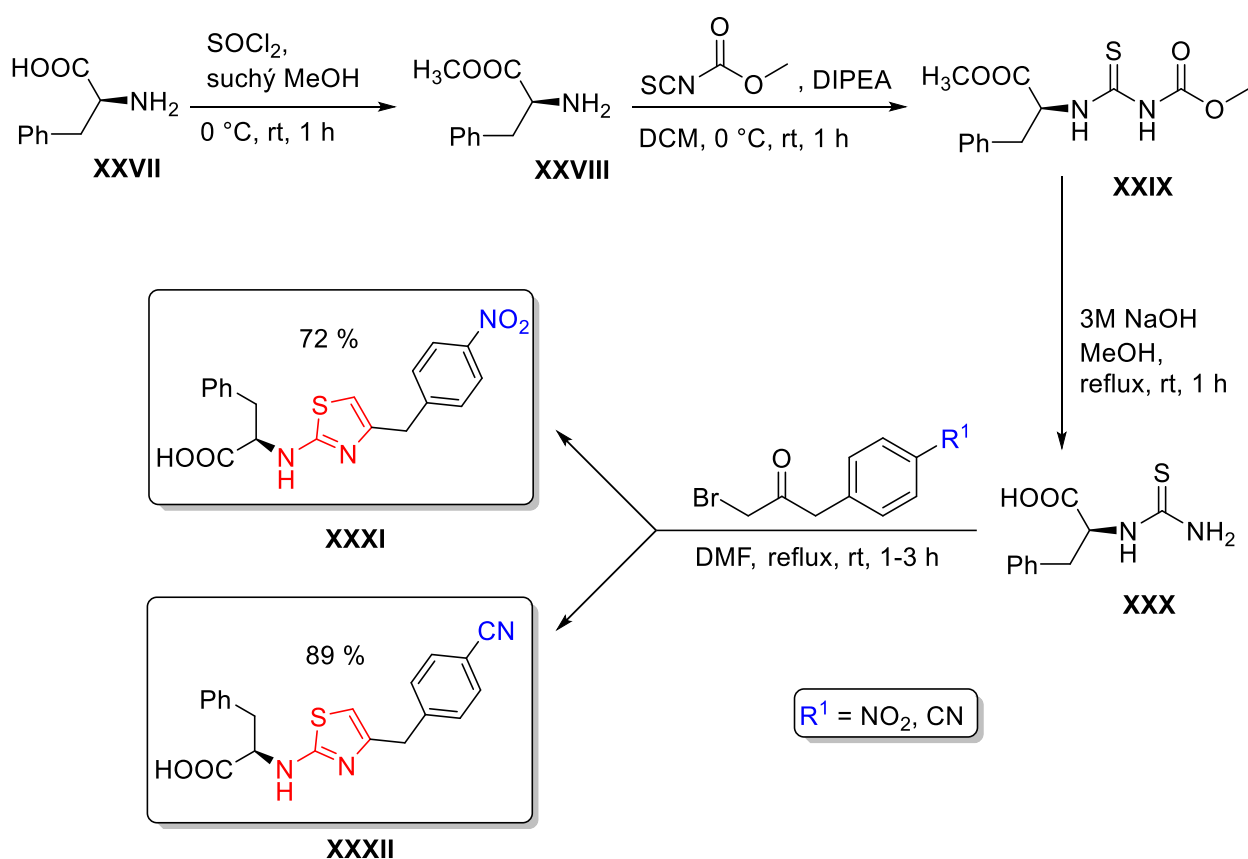
4.4.1. Deriváty rhodaninu a aminothiazolu

Na základě zjištění, že molekula fosforamidonu vykazuje inhibiční schopnosti vůči Zmp1, vznikla o tři roky později v roce 2014 studie,⁴ která zároveň zohledňovala možné interakce s výše zmíněným Neprilysinem, jakožto proteinem ze stejné skupiny metaloproteas.



Obř. 11: Stereoselektivní syntéza *R*-modifikovaného rhodaninu

Tento výzkum vychází z již známé krystalické struktury Zmp1/fosforamidon.¹ Zabývá se multidisciplinárním dvoukrokovým structure-based virtual screeningem – návrh inhibitoru na základě známé struktury biologického cíle, a dále samotnou syntézou prvních selektivních inhibitorů Zmp1. Jako základní heterocyklus je zde zvolen rhodanin. Testy *in vitro* přinesly výsledky v podobě molekuly **XXVI** (Obr.11), kdy oba její enantiomery vykazovaly dobré inhibiční schopnosti, avšak *R* isomer byl selektivnější. Podle molekulárního modelu je zde karboxylová skupina na fenylalaninu jako ZBG. Obr. 1 zachycuje jeho stereoselektivní syntézu.



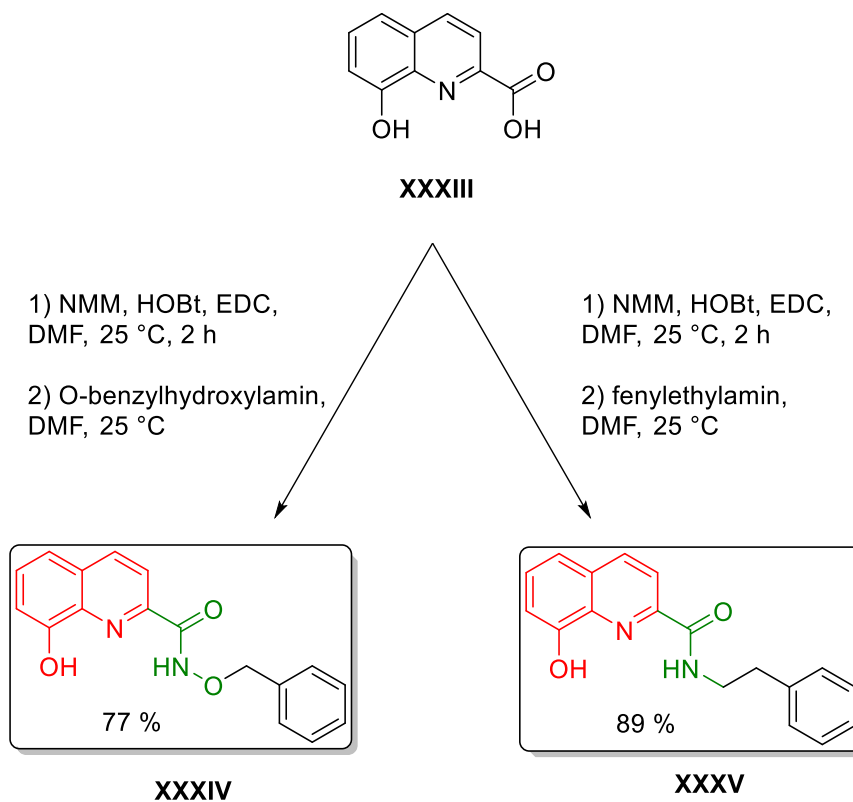
Obr. 12: Syntéza derivátů aminothiazolu

Začátkem roku 2018 byl publikován článek,² který se zabýval výzkumem látek, jejichž struktura vychází z 3-(karboxymethyl)rhodaninu a navazuje tak na předchozí výzkum. Zároveň je zde zvolen nový základní heterocyklus v podobě aminothiazolu.

Na základě tohoto a předchozích výzkumů se došlo ke konkrétním závěrům. Téměř všechny látky, které mají jako základní heterocyklus rhodanin, vykazovaly inhibiční vlastnosti, a to v rozmezí IC₅₀ = 1,3 – 43,9 μM. Pokud jako základní skelet byl

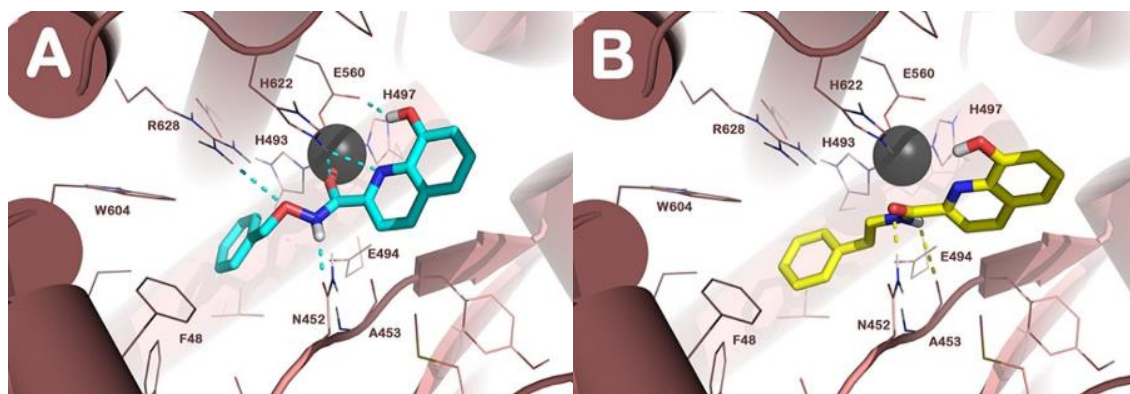
zvolen aminothiazol, inhibiční účinek se projevoval pouze u dvou molekul (**XXXI** a **XXXII**, Obr. 12), a to konkrétně $IC_{50} = 41,3 \mu\text{M}$, resp. $35,7 \mu\text{M}$.

4.4.2. Deriváty 8-hydroxychinolinu a kyseliny hydroxamové



Obr. 13: Syntéza derivátů 8-hydroxychinolinu a hydroxamátů

V ten samý rok (2018) vyšel další článek.³ Taktéž se zabýval vývojem potenciálních inhibitorů Zmp1, zaměřil se ale na deriváty 8-hydroxychinolinu s navázaným hydroxamátem (Obr. 13).

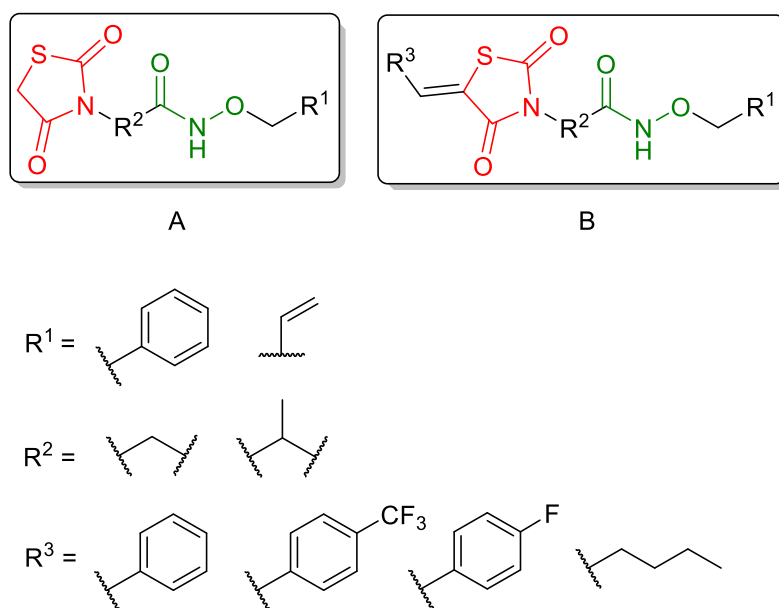


Obr. 14: Molekulové dokování molekul **XXXIV** (A) a **XXXV** (B) do aktivního místa³

Bylo však zjištěno, že látka **XXXIV** má dvě vazebná místa (Obr. 14), která mají za následek rozdílné chování molekuly (jedno má za následek požadované snížení afinity substrátu, ale druhé zvyšuje jeho afinitu, tudíž zvyšuje enzymatickou aktivitu Zmp1). Vztah mezi strukturou a aktivitou byl v případě **XXXIV** popsán koordinační vazbou vhodně umístěné karbonylové skupiny se Zn^{2+} a zbylé části molekuly interagovaly s okolními skupinami v aktivním místě. Došlo k vytvoření vodíkové vazby mezi 8-hydroxy skupinou a E560, hydroxamová NH skupina reagovala s N452, hydroxamový atom kyslíku vytvářel vazbu s R628. Atom dusíku v poloze 1 a karbonylový kyslík utvořili dvě vodíkové vazby s H622. Dále pak díky π - π interakcím (benzylový kruh s W604, H493 a F48 [nazývané S1' místo]; hydroxychinolin s H622) docházelo ke stabilizaci vazebné pozice inhibitoru v aktivním místě.

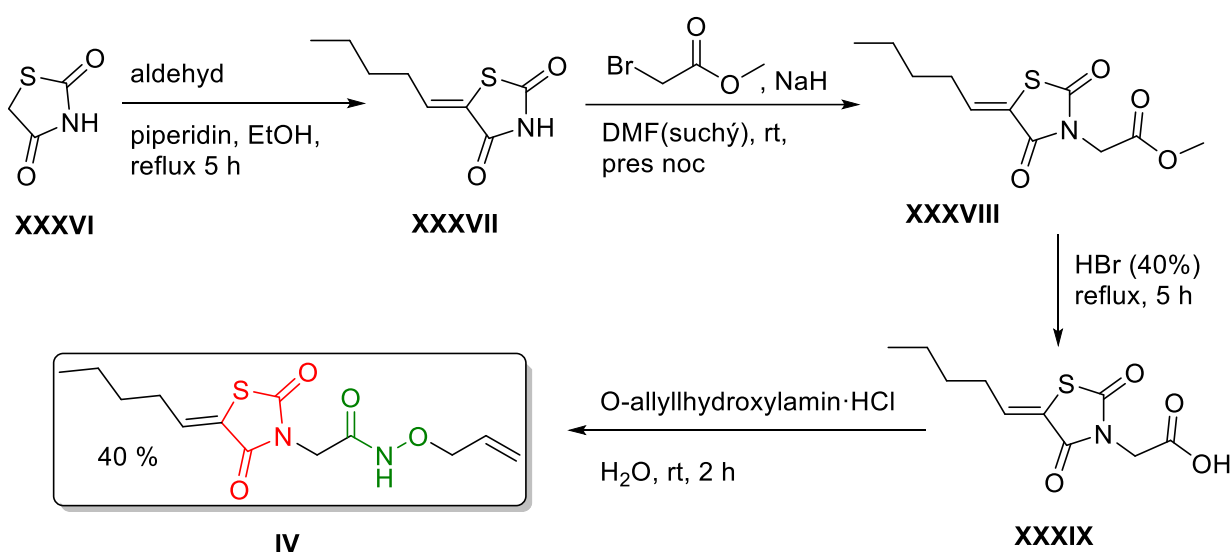
Nepřítomnost hydroxamového atomu kyslíku v molekule **XXXV** měla vliv na její inhibiční schopnost, která byla velmi nízká oproti molekule **XXXIV**. Bylo tedy potvrzeno, že látky, které obsahují tento hydroxamový atom kyslíku, vykazují vyšší inhibiční schopnosti, oproti látkám, které jej ve své struktuře nemají. Jeho absence má za následek neschopnost vytvořit vazbu s R628, a tím pádem molekula nedokáže přiblížit karbonylovou skupinu dostatečně blízko Zn^{2+} iontu.³

4.4.3. Deriváty thiazolidindionu (TZD)



Obr. 15: Navržené a připravené struktury

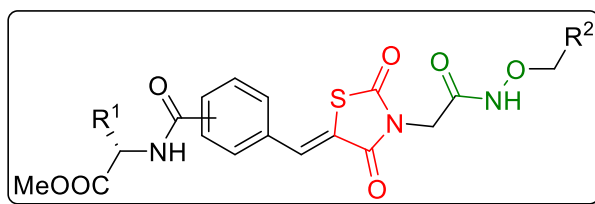
Na oba výzkumy, které byly zmíněny v předchozích podkapitolách, navazuje článek z roku 2020⁵, na kterém se mj. podíleli členové naší výzkumné skupiny. Zabývá se syntézou první generace thiazolidindion-hydroxamových derivátů a jejich inhibičními vlastnostmi. Byly navrženy dvě základní struktury (Obr. 15). Obě obsahují jako základní heterocyklus thiazolidindion, substituovaný na dusíku v poloze 3 skupinou R², na kterou jsou navázány deriváty hydroxamové kyseliny R¹ (A, Obr. 15). Druhá struktura má navíc substituovanou polohu 5 skupinou R³ (B, Obr. 15).



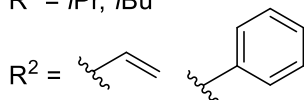
Obr. 16: Látka Syntéza látky **IV** s nejlepšími inhibičními účinky

Výzkum ukázal, že všechny připravené sloučeniny vykazovaly v závislosti na své struktuře různou inhibiční aktivitu. Navázaná benzylová skupina jako R¹ se projevila jako příčina nižší inhibice v porovnání s allylovou skupinou v této poloze. Jako nejpravděpodobnější inhibitor se ukázala látka **IV** (Obr. 16). Jako jediná vykazovala *in vitro* malou antimykobakteriální aktivitu vůči k extracelulárnímu *Mtb* H37Ra. Její inhibiční účinky jsou zřejmě dány přítomností nepolárního alifatického řetězce, který může interagovat s hydrofobními částmi, kam se větší molekuly nedostanou. Svou roli také hraje nevyztužený linker v podobě methylenů.⁵

4.4.4. Deriváty thiazolidindionu, indolu a pyrolu

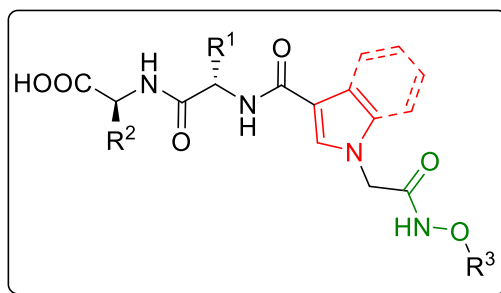


R¹ = *i*Pr, *i*Bu



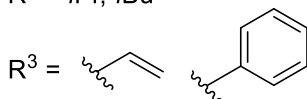
Aromatická substituce = *p*-, *m*-

Obr. 17: Navržené a připravené TZD deriváty



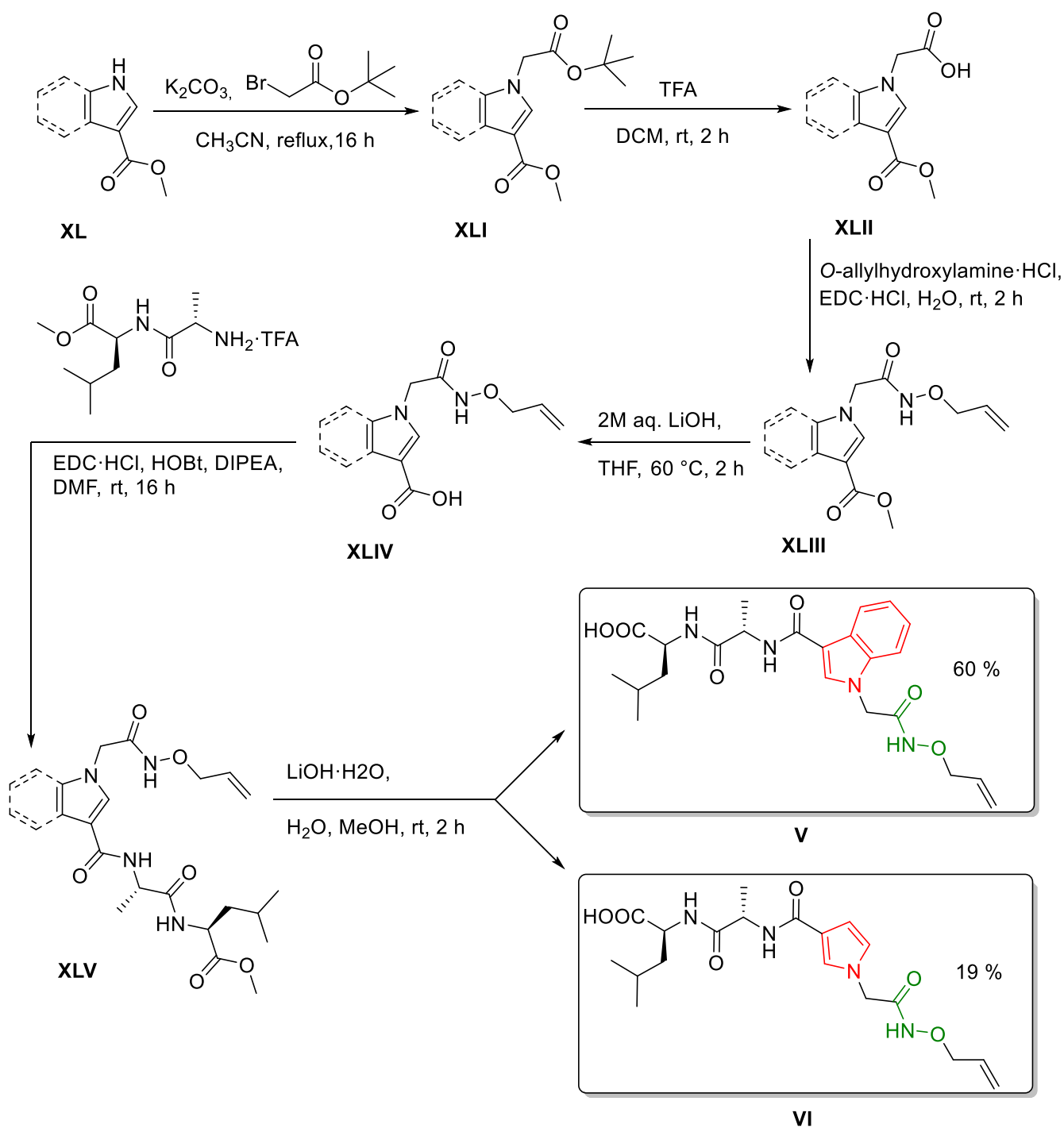
R¹ = H, Me

R² = *i*Pr, *i*Bu



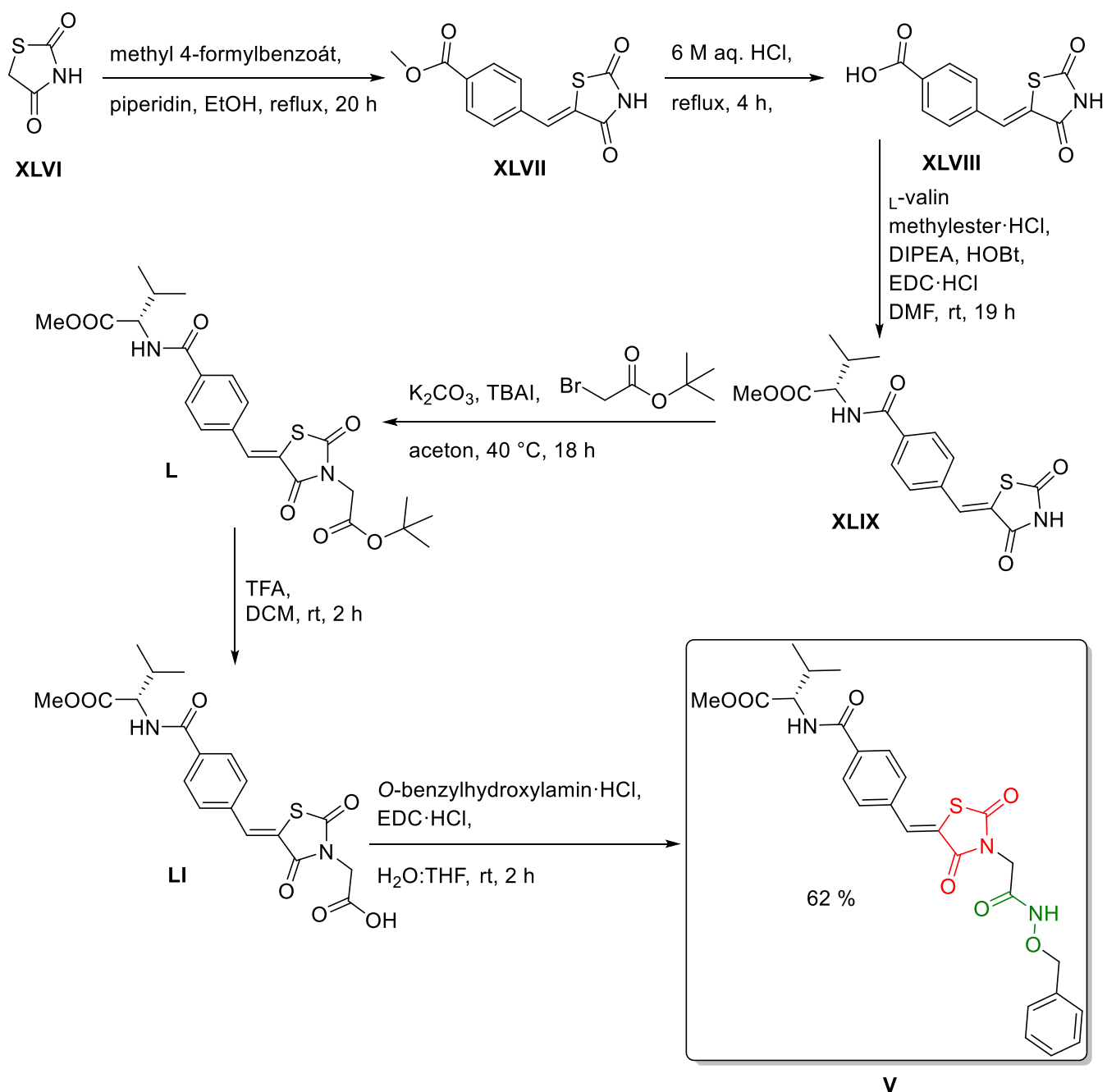
Obr. 18: Navržené a připravené deriváty indolu/pyrolu

Na předchozí studii⁵ navazuje výzkum z roku 2022⁶, který byl proveden v rámci naší výzkumné skupiny. Na základě molekulového dokování bylo zjištěno, že první generace TZD nedosáhne až k aktivnímu místu a zdržuje se spíše u jeho vstupu. Tento výzkum se zaměřoval na návrh a syntézu potenciálních inhibitorů Zmp1 druhé generace, kdy alifatický řetězec u TZD první generace byl nahrazen prodlužujícím linkerem, na jehož konci byla jako ZBG zvolená methylesterová skupina (Obr.17). Ukázalo se ale, že TZD může reagovat s vícero biologickými cíli,³⁴ a proto byly dále připraveny také knihovny, které měly jako svůj základní skelet indol a pyrol (Obr. 18). Na základě molekulového dokování zde byl zachován hydroxamát



Obr. 19: Syntéza indol/pyrol derivátů **V** a **VI**

Za zmínku zde stojí látky **V** a **VI** (Obr. 19). Jejich schopnost inhibice Zmp1 byla $86 \pm 6\%$, $\text{IC}_{50} = 20\ \mu\text{M}$; $88 \pm 8\%$, $\text{IC}_{50} = 17\ \mu\text{M}$). Při testech *in vitro* už ale vykazovaly horší inhibiční schopnosti než látky z TZD knihovny (Obr. 17).



Obr. 20: Syntéza TZD derivátu V

U všech připravených látek (Obr. 17 a Obr. 18) nebyla pozorována žádná významná akutní *in vitro* toxicita při aplikaci do 128 μM na RAW264,7 na myších makrofázích a MRC-5 lidských plicních fibroblastech. V konkrétním případě, kdy buňky makrofágů nakažené *Mtb* byly vystaveny látkám ze skupiny TZD, došlo u látky V (Obr. 20) po 72 h k 83,2% redukci intracelulárního přežití bakterie. Výzkum došel k závěru, že TZD jsou stále slibným cílem a je potřeba se do budoucna více zabírat výzkumem SAR - Structure-Activity Relationship (vztahem mezi strukturou a reaktivitou).

6 VÝSLEDKY A DISKUZE

Cílem předkládané bakalářské práce je syntéza nových inhibitorů druhé generace mykobakteriálního enzymu Zmp1. V první části této kapitoly budou podrobně diskutovány jednotlivé reakční kroky, které vedly k syntéze výchozích intermediátů **A** (Schéma 1). Druhá část bude věnována rozdílným syntetickým postupům, které byly zvoleny za účelem získání finální knihovny látek **B**. V závěru této kapitoly budou popsány a diskutovány reakční podmínky a jejich optimalizace, které vedly k syntéze finální knihovny látek **C**, které byly navrženy jako alternativa původně zamýšlené knihovny **B**.

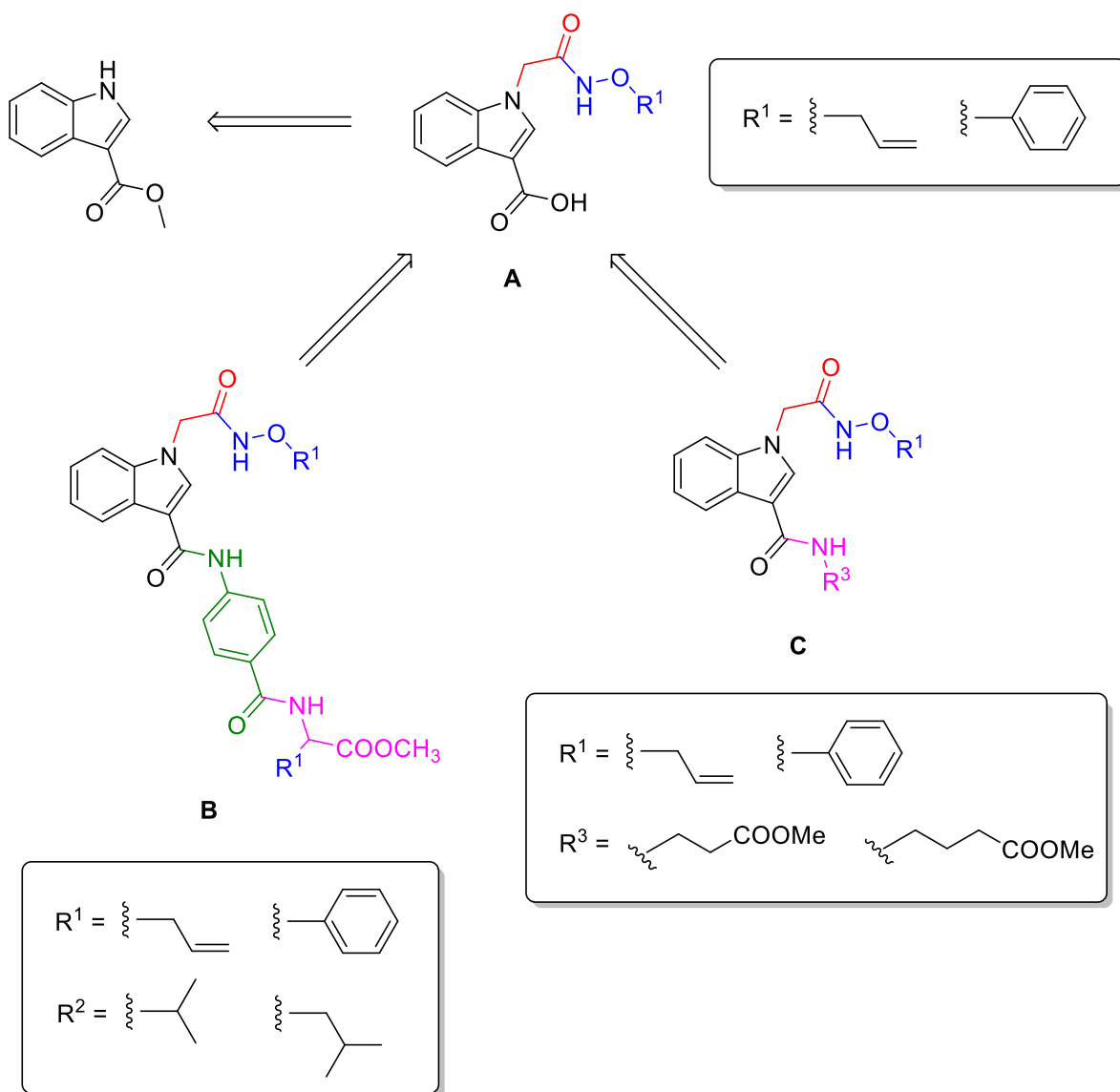


Schéma 1: Finální knihovny látek

6.1. Syntéza intermediátů pro přípravu finální látek

Zde budou detailně popsány jednotlivé reakční kroky, které vedou k přípravě výchozích intermediátů **5a** a **5b** (Schéma 2).

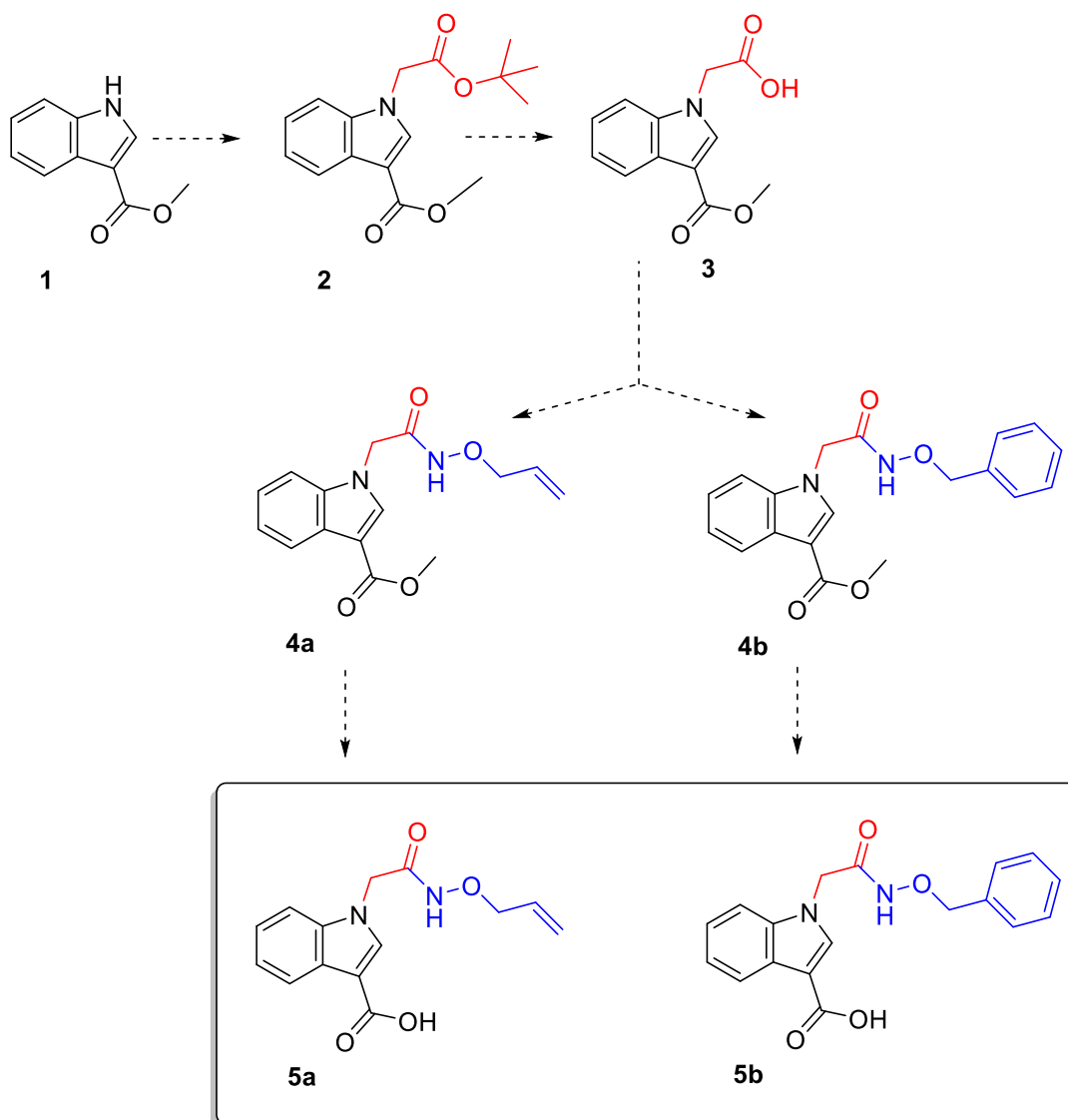


Schéma 2: Návrh syntézy intermediátů **5a** a **5b**

6.1.1. *N*-alkylace methyl indol-3-karboxylátu

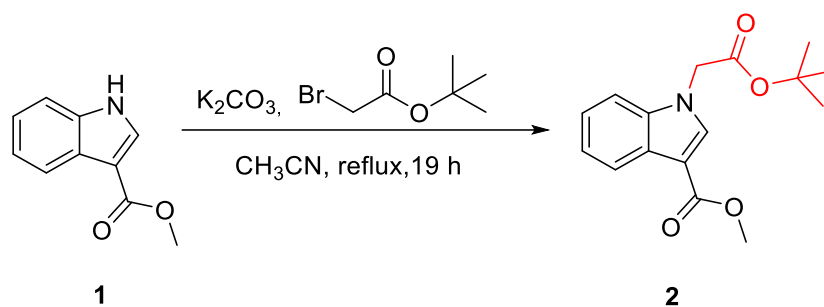


Schéma 3: *N*-alkylace methyl indol-3-karboxylátu

Výchozí methyl indol-3-karboxylát **1** byl podroben *N*-alkylaci (Schéma 3) v přítomnosti *tert*-butyl bromoacetátu a K₂CO₃. Jako rozpouštědlo byl použit CH₃CN. Směs byla míchána pod refluxem po dobu 19 hodin za vzniku požadované sloučeniny **2** s výtěžkem 67 %. Tato reakce byla provedena podle podmínek uvedených v patentu³⁵ a vzhledem k uspokojivým výtěžkům ji nebylo nutné dále optimalizovat.

6.1.2. Deprotekce *tert*-butyl esteru

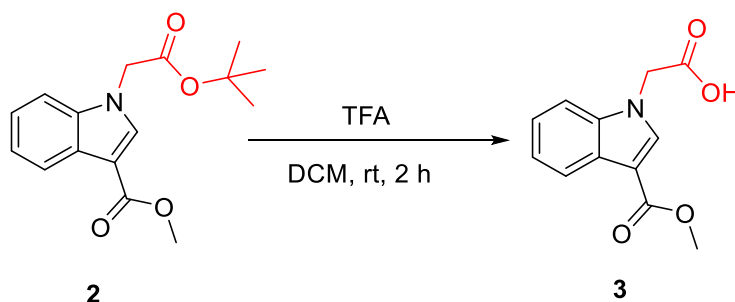


Schéma 4: Deprotekce *tert*-butyl esteru

Podle podmínek uvedených v patentu³⁵ byla provedena deprotektce *tert*-butyl esteru (Schéma 4). Výchozí látka **2** byla rozpuštěna ve směsi TFA/DCM a ponechána reagovat za laboratorní teploty po dobu 2 h. Produktem byla látka **3** s kvantitativní výtěžností a reakční podmínky nebylo potřeba optimalizovat.

6.1.3. Syntéza allyl/benzylhydroxamátu

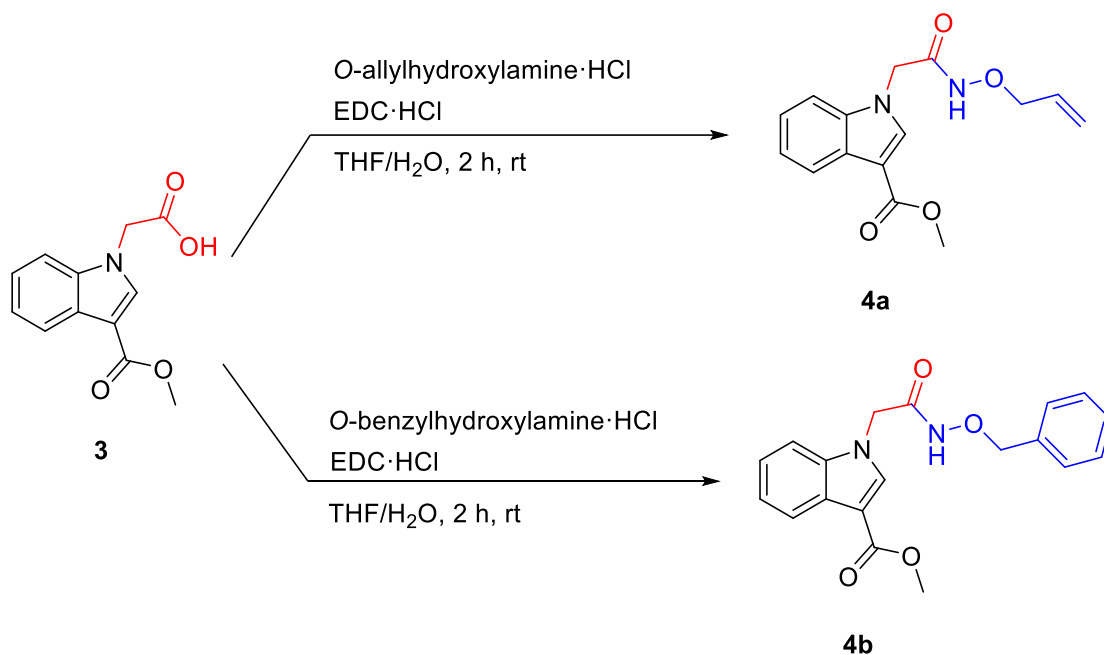


Schéma 5: Syntéza allyl/benzylhydroxamátu

Syntéza allyl/benzylhydroxamátu (Schéma 5) byla provedena na základě reakčních podmínek uvedených v článku.⁵ Výchozí látka **3** byla suspendována v destilované vodě s následným přidavkem vodného roztoku *O*-allylhydroxylaminu/*O*-benzylhydroxylaminu. V případě potřeby bylo pH upraveno 1M NaOH a za pomoci minimálního množství THF byla suspenze převedena na roztok. Následně byl přikapán vodný roztok EDC·HCl a reakce byla míchána 2 h za laboratorní teploty. Produkty **4a** a **4b** byly získány s uspokojivými výtěžky (66 %, resp. 82 %), a proto nebylo potřeba reakční podmínky dále optimalizovat.

6.1.4. Hydrolýza methylesterů

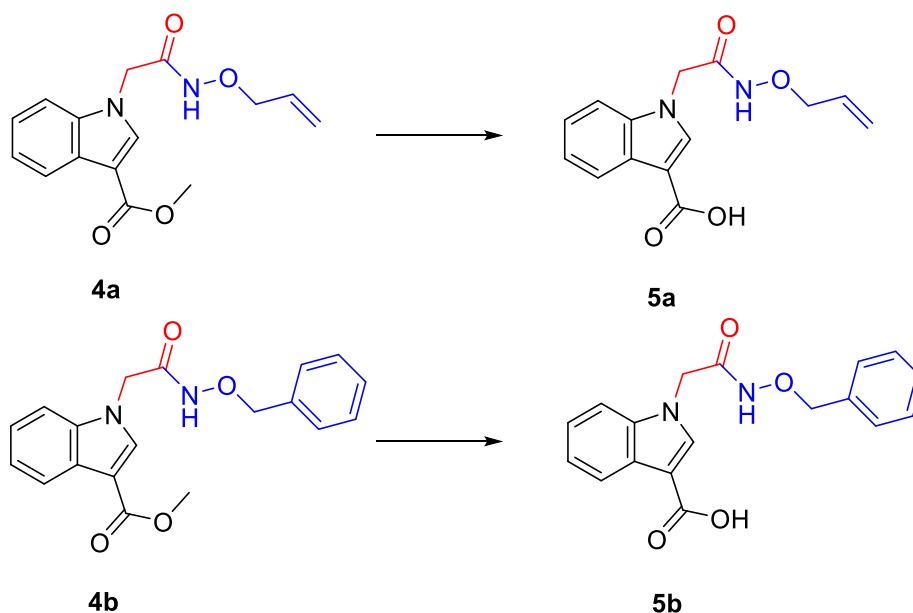


Schéma 6: Hydrolýza methylesterů

Hydrolýza výchozích komponent **4a** a **4b** na produkty **5a** a **5b** (Schéma 6) byla nejprve provedena za užití 2M vodného roztoku LiOH (15,0 ekv.) v prostředí THF za laboratorní teploty po dobu 28 h na základě podmínek uvedených v článku,⁵ které ale neposkytovaly uspokojivé výsledky (43% konverze). Bylo proto nutné zvolit vhodnější podmínky bazické hydrolýzy. Zprvu byl zvolen pevný LiOH·H₂O, jehož užití je popsáno v patentu.³⁶ Reakce probíhala v přítomnosti 3,0 ekv. pevného LiOH·H₂O v prostředí THF/H₂O za laboratorní teploty po dobu 72 h. Ani zde nebyla konverze uspokojivá (32 %). Následně byla optimalizována reakční teplota na 50 °C, kdy bylo zvoleno stejné množství LiOH·H₂O (3,0 ekv.) a reakce byla míchána ve směsi THF/H₂O. Po 48 h bylo dosaženo 90% konverze podle LC-MS analýzy. Dalším cílem bylo vyzkoušet zkrátit reakční čas. Kvantitativní konverze v krátkém čase s výtěžkem 85 % po izolaci bylo dosaženo za použití podmínek popsanych v patentu.³⁷ Pevný NaOH (19,8 ekv.) zde byl použit jako alternativní báze. Reakce probíhala v prostředí MeOH/H₂O při 80 °C po dobu 2 h.

Tab. 1: Optimalizace reakčních podmínek pro hydrolyzu methylesteru

<i>báze</i>	<i>ekv.</i>	<i>rozpuštědlo</i>	<i>teplota (°C)</i>	<i>čas (h)</i>	<i>LC-MS konverze</i>
2M LiOH	15,0	THF	rt	28	43 %
LiOH·H ₂ O	3,0	THF/H ₂ O (1:1)	rt	72	32 %
LiOH·H ₂ O	3,0	THF/H ₂ O (1:1)	50	48	90 %
NaOH	19,8	MeOH/H ₂ O (3:1)	80	2	93 %

6.2. Příprava série finálních látek

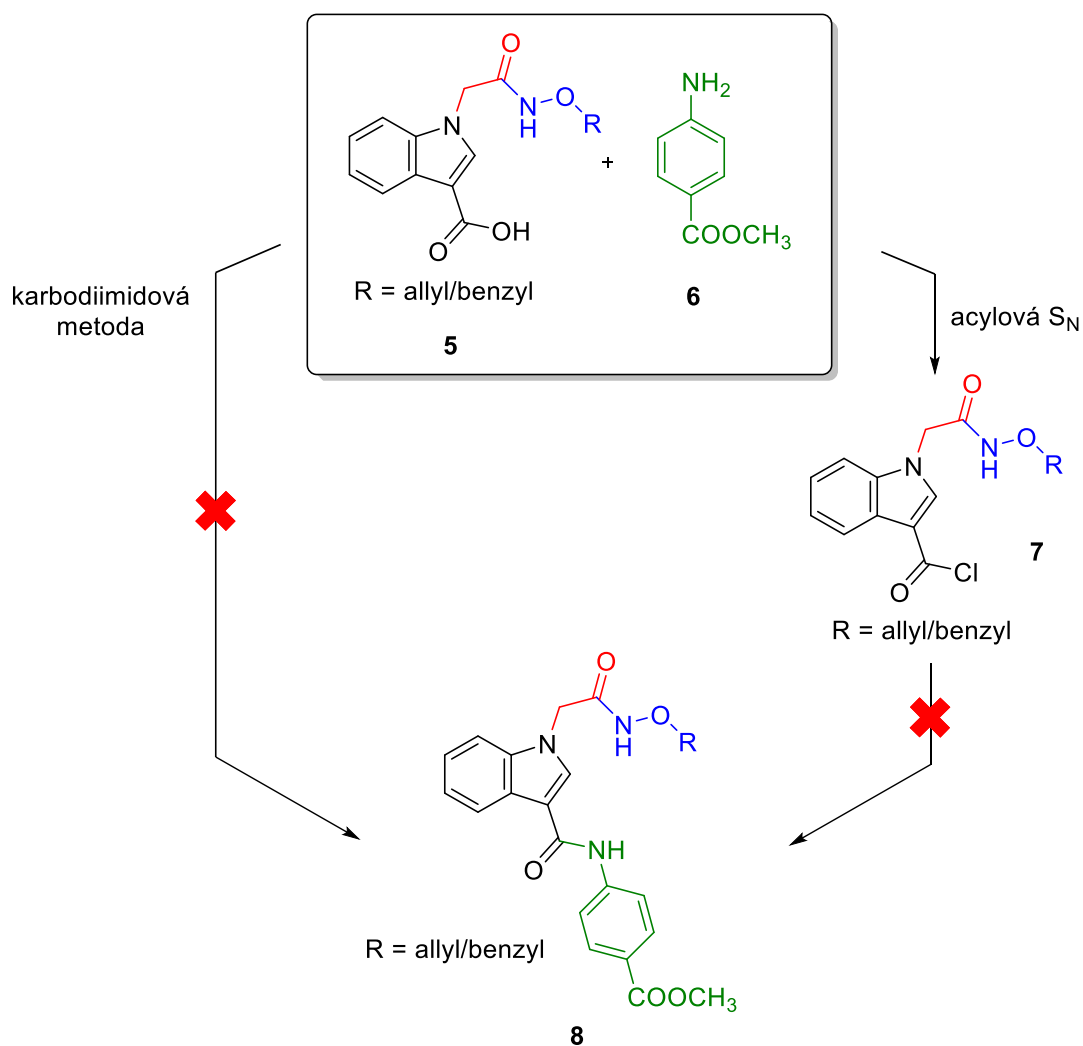


Schéma 7: Původně navržené syntetické postupy

V této podkapitole budou diskutovány dva rozdílné syntetické postupy (Schéma 7), které byly zvoleny pro syntézu finálních látek z knihovny **B** (Schéma 1). Důvod přípravy látek **8** (Schéma 7) vychází z předpokladu, že aromatický substituent bude vystupovat jako prodlužovací část (linker) mezi indolovou částí molekuly a koncovou aminokyselinou, která by tak měla lépe dosáhnout do aktivního místa enzymu a pomocí vhodné funkční skupiny vytvořit požadovanou interakci se Zn^{2+} kationem.

6.2.1. Protekce linkeru

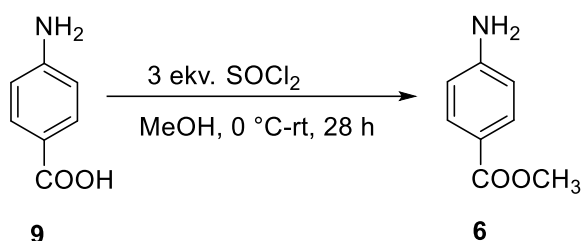


Schéma 8: Protekce linkeru

Protekce linkeru (Schéma 8) byla provedena podle podmínek uvedených v článku.³⁸ Jako chlorační činidlo zde byl použit SOCl₂ (3 ekv.), který byl za 0 °C přikapán k roztoku výchozí *p*-aminobenzoové kyseliny **9** v MeOH. Reakce byla následně míchána za laboratorní teploty po dobu 28 h. Zvolené podmínky poskytovaly uspokojivé výtěžky (91 %) a reakci nebylo potřeba optimalizovat.

6.2.2. Nukleofilní acylová substituce

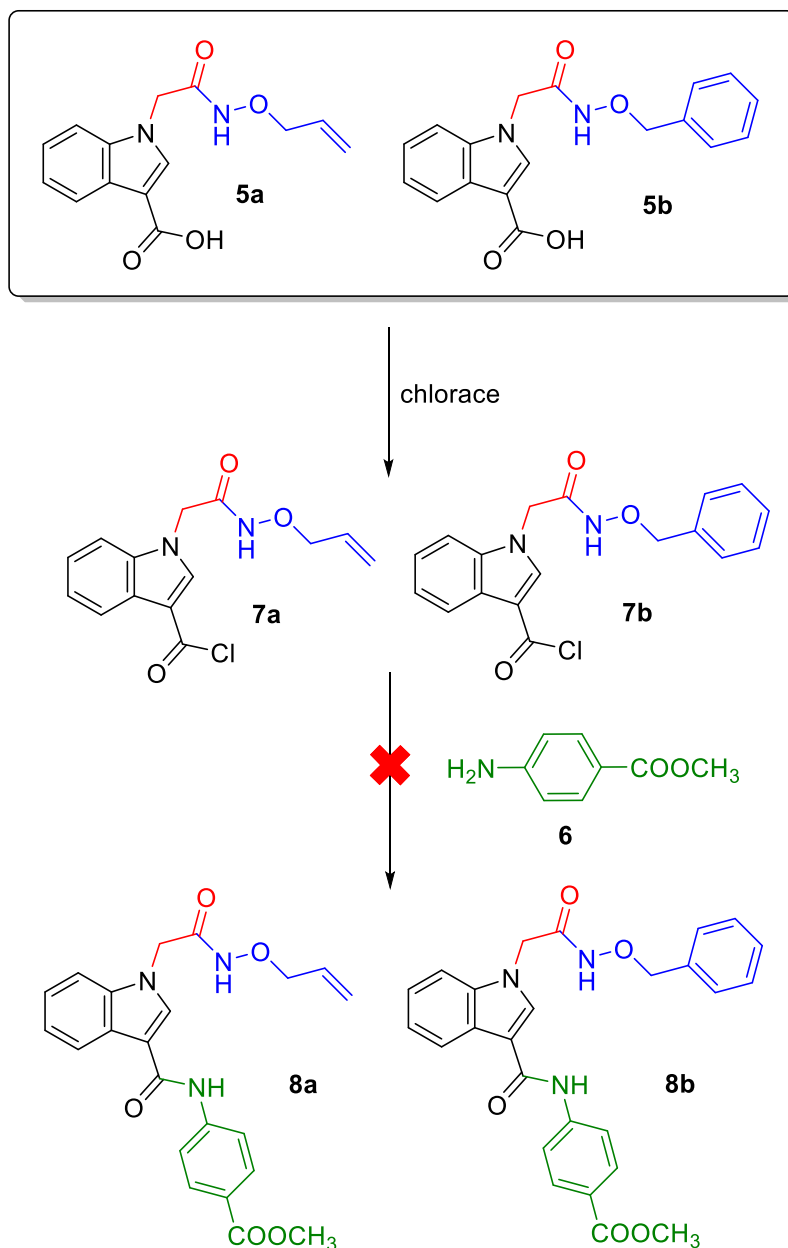


Schéma 9: Napojení linkeru pomocí nukleofilní acylové substituce

Tato reakční cesta vychází z intermediátů **5a** resp. **5b** (Schéma 9), jejichž příprava byla popsána výše (viz kapitola 6.1.). Cílem této metody bylo napojení linkeru za tvorby amidů **8a** a **8b** přes acylchloridy **7a** a **7b**, které byly v reakci využity bez žádné bližší purifikace.

První reakce byla provedena s oxalyl chloridem (Tab. 2) jakožto chloračním činidlem podle článku.³⁹ Výchozí kyselina **5a** resp. **5b** (Schéma 9) byla po dobu 1 h při 50 °C míchána s 37 ekv. oxalyl chloridu. Po uběhnutí 1 h byla směs ponechána na RVO k zakonzentrování. Viskózní meziprodukt **8a** resp. **8b** byl rozpuštěn v bezv. DCM

a zchlazen na 0 °C, za kterých bylo přidáno 2,5 ekv. linkeru **6**. Reakce byla míchána 20 h za laboratorní teploty. Konverze byla podle LC-MS velmi nízká (4 %).

Snížení poměru chloračního činidla podle podmínek vycházejících z publikace,⁴⁰ vedlo v následujícím reakčním kroku k nedetekovatelnosti finálního amidu **8a** resp. **8b**. Jako alternativní chlorační činidlo byl zvolen SOCl₂, který byl použit současně za stejných podmínek. Konverze takto připraveného acylchloridu na příslušný amid byla v tomto případě o pár procent lepší a SOCl₂ byl upřednostněn pro další optimalizace reakčních podmínek.

Za účelem zvýšení konverze byla chlorace kyseliny provedena za laboratorní teploty v nadbytku SOCl₂ a k takto připravenému chlor derivátu byl poté po důkladném zakoncentrování a odpaření na RVO přidán linker, ale ani v tomto případě nebyla detekována uspokojivá konverze. Velice špatná konverze se ukázala i po přidavku báze v podobě K₂CO₃ pro neutralizaci případně kyselého prostředí. Proběhla tedy snaha o chloraci za zvýšené teploty 75 °C, která byla taktéž bez výrazné změny konverze v acylačním kroku.

Nejvyšší dosažená konverze (26 %) byla detekována u zvýrazněné reakce, kdy použitým chloračním činidlem byl nadbytek SOCl₂ a reakce byla míchána 3,5 h při 75 °C. Vysušený acylchlorid byl rozpuštěn v bezv. DCM a za laboratorní teploty pak k němu bylo přisypáno 2,5 ekv. linkeru. Reakce byla míchána při 40 °C po dobu 20 h.

Problém při tomto syntetickém kroku zřejmě nevychází z nedokonalé konverze kyseliny na příslušný acylchlorid, ale pravděpodobně z nízké reaktivity aromatického aminu, který je silně deaktivován přítomností esterové skupiny. Vzhledem k hodně nízké konverzi i přes řadu optimalizací bylo od tohoto syntetického postupu opuštěno.

Tab. 2: Optimalizace reakčních podmínek pro acylovou nukleofilní substituci

<i>chlorační činidlo</i>	<i>ekv.</i>	<i>teplota (°C)</i>	<i>čas (h)</i>	<i>rozpouštědlo</i>	<i>K₂CO₃ (ekv.)</i>	<i>linker (ekv.)</i>	<i>čas (h)</i>	<i>teplota (°C)</i>	<i>LC-MS konverze</i>
oxalyl chlorid	37,0	50	1	bezv. DCM	–	2,5	20	0→rt	4 %
oxalyl chlorid	11,5	50	1	bezv. DCM	–	2,5	22	0→rt	bez konverze
SOCl ₂	11,5	50	1	bezv. DCM	–	2,5	22	0→rt	11 %
SOCl ₂	nadbytek	rt	1	bezv. DCM	–	2,5	22	rt	10 %

SOCl ₂	nadbytek	75	1	bezv. DCM	–	2,5	22	rt	9 %
SOCl ₂	nadbytek	75	3,5	bezv. DCM	–	2,5	20	rt	13 %
SOCl ₂	nadbytek	75	3,5	bezv. DCM	nadbytek	2,5	20	rt	6 %
SOCl ₂	nadbytek	75	3,5	bezv. DCM	–	2,5	20	rt→40	26 %
SOCl ₂	nadbytek	75	3,5	bezv. DCM	nadbytek	2,5	20	40	14 %

6.2.3. Karbodiimidová metoda

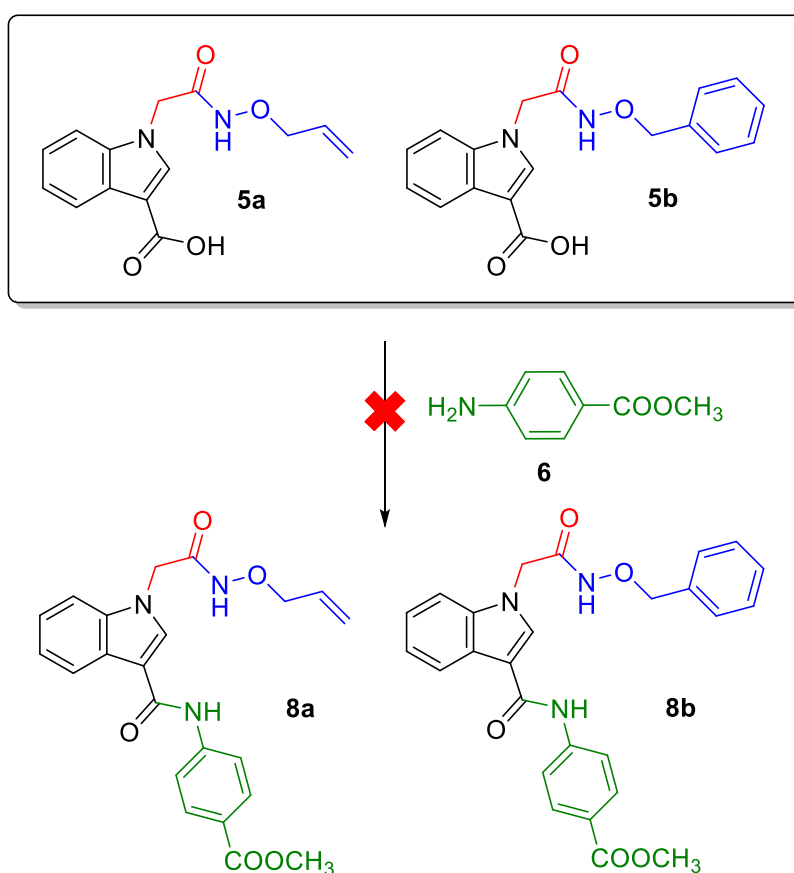


Schéma 10: Napojení linkeru pomocí karbodiimidu

Tato reakční cesta vychází z intermediátů **5a** resp. **5b** (Schéma 10), jejichž příprava byla popsána výše (viz kapitola 6.1.). Cílem této metody bylo napojení linkeru pomocí karbodiimidu za vhodné aktivace.

Výchozí látka **5a** resp. **5b** byla společně s EDC·HCl (1,1 ekv.) a HOBt(1,1 ekv.) rozpuštěna v DMF. Po promíchání byl k takto připravenému roztoku přidán roztok 0,9 ekv. linkeru **6** s 3,0 ekv. DIPEA v DMF. Směs byla míchána za laboratorní teploty po

dobu 2 h. Na základě detekce LC-MS reakce neposkytovala uspokojivé výsledky. Bylo zde velké množství nezreagované výchozí látky **5a** resp. **5b** a vedlejších produktů. Stejně podmínky byly znovu použity s rozdílem, kdy byla vynechána DIPEA. V dalším případě pak bylo za stejných reakčních podmínek změněno pořadí přidání jednotlivých komponent, kdy výchozí látka byla nejprve s linkerem rozpuštěna v DMF a posléze bylo k tomuto roztoku přidáno EDC·HCl s HOBt. Ve všech výše uvedených případech byla LC-MS detekována přítomnost VL, VP a při změně pořadí přidání komponent byl kromě VL a VP detekován také nezreagovaný linker.

Stejně podmínky a postup jako v případě první reakce byly znovu použity s rozdílem v reakčním čase, který byl zvýšen na 24 h. Detekce LC-MS ukázala prakticky kvantitativní konverzi (předpokládalo se, že látka na LC-MS špatně ionizuje, a proto není možné najít její přesnou hmotu). Po zpracování bylo zjištěno, že produkt nevzniká a došlo pouze k vyzolování nezreagovaného linkeru. V hmotnostní spektru jsme detekovali pík odpovídající látce o $M_r = 440$, což by mohlo nasvědčovat přítomnosti aktivovaného esteru (komplexu karboxylové kyseliny s HOBt). V návaznosti na výše uvedené podmínky spočívala jejich optimalizace ve zvýšení reakční teploty a počtu ekv. u všech reaktantů s výjimkou báze. Detekce LC-MS ani TLC neprokázala přítomnost požadovaných produktů, pouze VP.

Následující podmínky EDC·HCl (2,0 ekv.), HOBt (1,1 ekv.), linker (0,9 ekv.) v prostředí DMF byly aplikovány v teplotním rozmezí od laboratorní teploty po 70 °C a v časovém rozmezí 2–20 h. Ve všech těchto případech LC-MS detekce ukázala přítomnost velkého množství VP v různém rozpětí molárních hodnot a opět potvrdila přítomnost vedlejšího produktu pravděpodobně v podobě aktivovaného esteru.

Po podrobnějším prozkoumání dostupné literatury jsme se rozhodli podle podmínek uvedených v patentu⁴¹ vyzkoušet alternativní karodiimid. Na základě předloženého postupu bylo v reakční baňce rozpuštěno 1,2 ekv. linkeru v DMSO, a poté byla přisypána výchozí látka **5a** resp. **5b**. Následně bylo přidáno 1,5 ekv. DIC, 1,2 ekv. HATU a směs byla ponechána reagovat při 60 °C 23 hodin. Detekce LC-MS neprokázala ani v tomto případě přítomnost produktu.

Při další optimalizaci byla vyzkoušena záměna rozpouštědla za DCM, případně směs DCM/DMF (2:1) a použití pouze katalytického množství HOBt. Reakční směs byla míchána za laboratorní teploty po dobu 2 h. Požadovaný produkt **8a** resp. **8b** nebyl LC-MS detekován, pouze VL a VP.

Stejně jako v případě tvorby amidu pomocí acylchloridu lze pravděpodobně poukázat na velice nízkou reaktivitu aminového linkeru v důsledku deaktivace esterovou skupinou. V důsledku neúspěšných optimalizací bylo od tohoto způsobu napojení linkeru opuštěno.

Tab. 3: Optimalizace reakčních podmínek pro karbodiimidovou metodu

<i>karbodiimid</i>	<i>ekv.</i>	<i>HOBt</i> (<i>ekv.</i>)	<i>linker</i> (<i>ekv.</i>)	<i>DIPEA</i> (<i>ekv.</i>)	<i>rozpouštědlo</i>	<i>teplota</i> (°C)	<i>čas</i> (h)	<i>LC-MS</i> <i>detekce</i>
EDC·HCl	1,1	1,1	0,9	3,0	DMF	rt	2	VL + VP
EDC·HCl	2,0	1,5	1,2	1,2	DMF	55	2	pouze VP
EDC·HCl	1,1	1,1	0,9	–	DMF	rt	2	VL + VP
EDC·HCl	1,1	1,1	0,9	–	DMF	rt	24	pouze linker
EDC·HCl	1,1	1,1	0,9	–	DMF	rt	2	VL + linker + VP
EDC·HCl	2,0	1,1	0,9	–	DMF	rt	2	linker + VP
EDC·HCl	2,0	1,1	0,9	–	DMF	50	20	VP
EDC·HCl	2,0	1,1	0,9	–	DMF	70	20	VP
DIC + HATU	1,5 + 1,2	–	1,2	–	DMSO	60	23	VL + VP
DIC	1,2	0,1	1,0	–	DCM	rt	2	VL + VP
DIC	1,2	0,1	1,0	–	DCM/DMF (2:1)	rt	2	VL + VP

6.3. Příprava alternativní série finálních látek

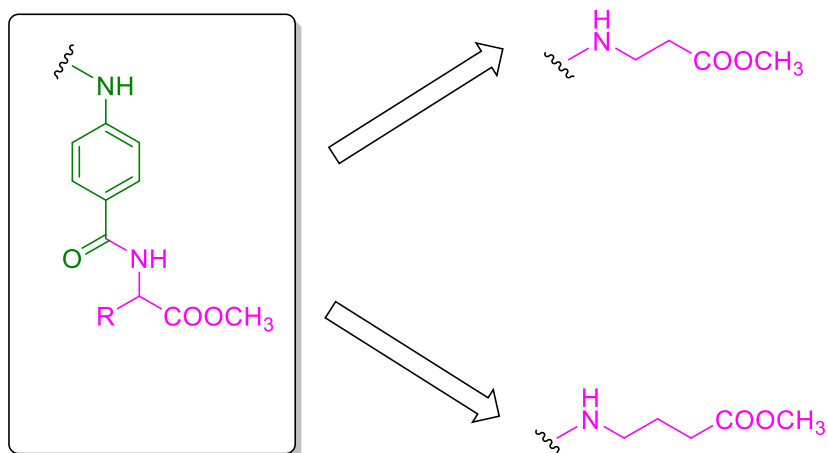
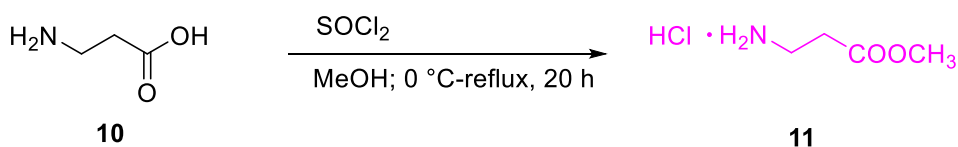


Schéma 11: Alternativní volba substituentů

Oba výše zmíněné syntetické postupy (Schéma 7) byly několikrát optimalizovány (viz Tab. 2 a 3), ale žádná reakce nevedla k finální knihovně látek **B** (Schéma 1). Původně navržený linker **6** (Schéma 7), se nepodařilo napojit pravděpodobně v důsledku jeho nedostačující nukleofility, na kterou má zásadní vliv esterová skupina se záporným mezomerním efektem. Je známo, že aromatické aminy jsou mnohem méně nukleofilní než odpovídající alifatické aminy vzhledem k zapojení volného elektronového páru na dusíku do konjugace s aromatickou částí molekuly. V tomto případě je pravděpodobně elektronová hustota dusíku navíc ještě silně odstíněna v důsledku záporného mezomerního efektu. Pro alternativní postup byla navržena nová knihovna látek **C** (Schéma 1), kde byly využity delší aminokyseliny (Schéma 11) za předpokladu, že tyto aminokyseliny díky svým delším alifatickým řetězcům již dosáhnou do aktivního místa enzymu, kde vytvoří požadovanou interakci, a nebude tedy nutné vkládat linker mezi indolovou část molekuly a samotnou aminokyselinu.

6.2.5 Protekce vybraných aminokyselin



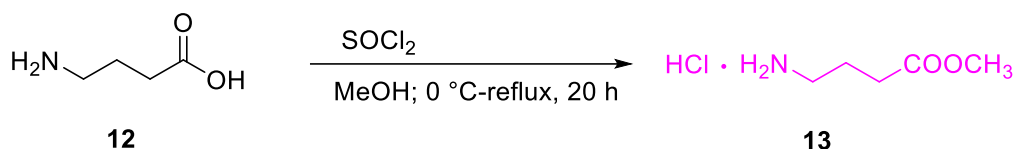


Schéma 12: Protekce vybraných aminokyselin

Protekce aminokyselin (Schéma 12) byla provedena podle podmínek uvedených v článku.⁴² Jako chlorační činidlo zde byl použit SOCl_2 (1,5 ekv.), který byl za $0\text{ }^\circ\text{C}$ přikapáván k roztoku výchozích aminokyselinám **10** a **12** v MeOH. Reakční směs byla míchána za laboratorní teploty 20 h. Zvolené podmínky poskytovaly kvantitativní výtěžky esterů **11** a **13** a reakci nebylo tedy potřeba optimalizovat.

6.2.6. Tvorba amididcké vazby pomocí karbodiimidu

Zde budou podrobně popsány optimalizace reakčních podmínek, které vedly k syntéze finálních indolových derivátů (Schéma 13).

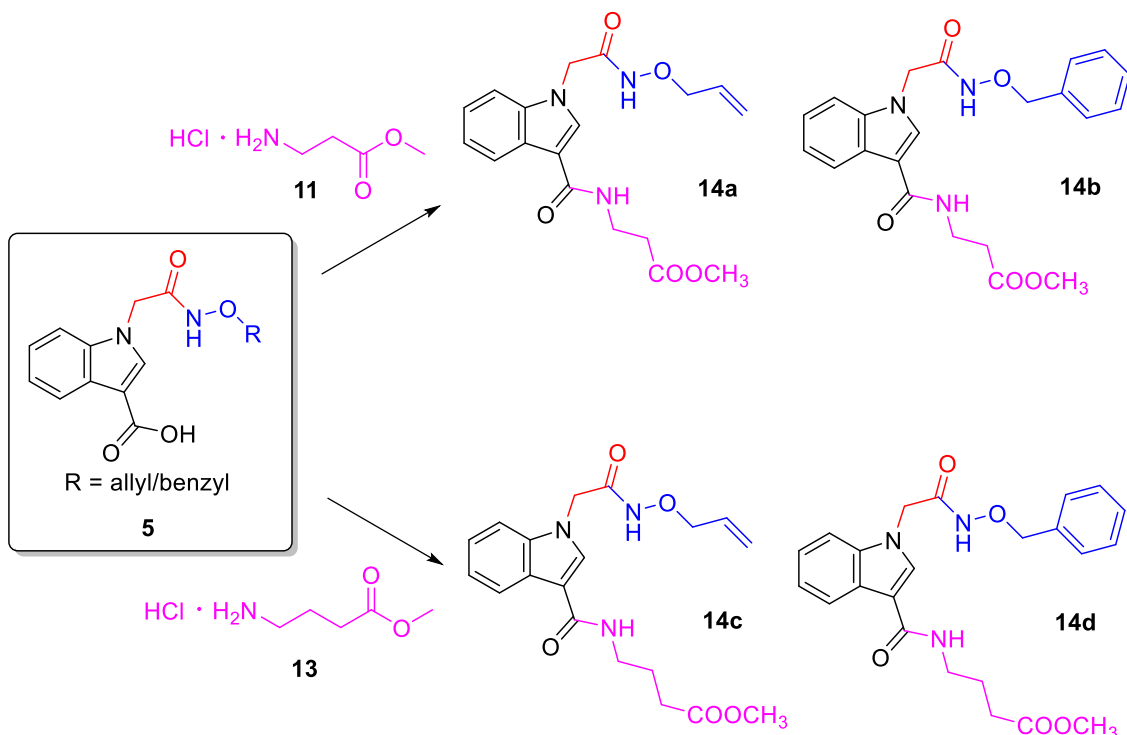


Schéma 13: Napojení modifikovaných AMK pomocí karbodiimidu

Pro napojení vhodně modifikovaných aminokyselin byla zvolena syntetická metoda pomocí karbodiimidu. Chráněná aminokyselina **20**, resp. **22** byla společně s 1,0 ekv. báze (DIPEA) rozpuštěna v DMF. Tento roztok byl následně smíchan s roztokem výchozího

intermediátu **A** v DMF za laboratorní teploty. Nakonec bylo přisypáno 1,1 ekv. EDC·HCl a 1,1 ekv. HOBt. Směs byla ponechána míchat za laboratorní teploty po dobu 19 h. Následně byla provedena detekce LC-MS. V reakční směsi byl detekován produkt s 13% konverzí a značné množství nezreagované výchozí látky. Směs byla nechána doreagovat při 50 °C po dobu 2 h. Následná detekce LC-MS nepotvrdila vyšší konverzi.

Byla provedena optimalizace na základě podmínek uvedených v článku.⁴³ Výchozí intermediát **A** byl rozpuštěn v DMF a následně bylo přisypáno 1,1 ekv. protekované AMK **20**, resp. **22** a 1,7 ekv. DMAP. Za 0 °C pak bylo do reakční směsi přisypáno 1,2 ekv. EDC·HCl. Reakce byla ponechána míchat za laboratorní teploty 22 h. Přítomnost produktu bez známek výchozí látky byla potvrzena pomocí LC-MS s konverzí 63 %. (Tyto podmínky se později ukázaly jako nejlepší a byly aplikovány pro přípravu všech finálních produktů, viz Tab. 4). Pro získání ještě vyšší konverze bylo zvýšeno množství přidávaného linkeru na 1,3 ekv., avšak konverze již zůstala při obdobném postupu stejná (63 %).

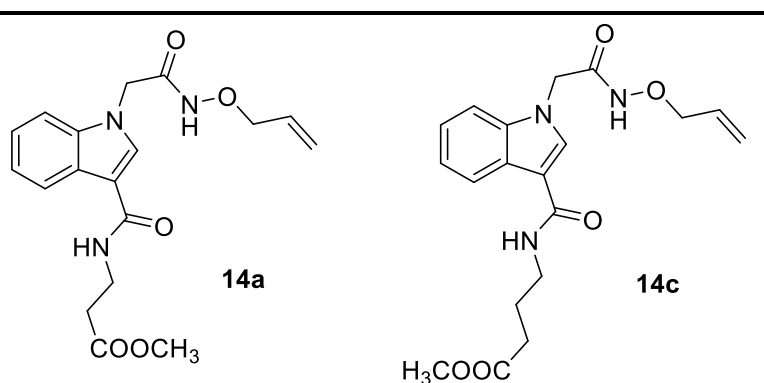
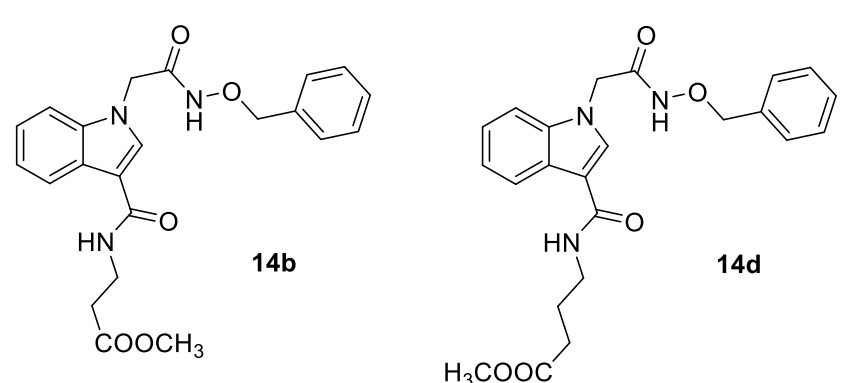
Tab.4: Optimalizace reakčních podmínek pro karbodiimidovou metodu

<i>EDC·HCl</i> (ekv.)	<i>aktivátor</i>	<i>ekv.</i>	<i>AMK (ekv.)</i>	<i>rozpuštědlo</i>	<i>DIPEA</i> (ekv.)	<i>teplota</i> (°C)	<i>čas</i> (h)	<i>LC-MS</i> <i>konverze</i>
1,1	HOBt	1,1	0,9	DMF	1,0	rt → 50	21	13 %
1,2	DMAP	1,7	1,1	DMF	–	0 → rt	22	63 %
1,2	DMAP	1,7	1,3	DMF	–	0 → rt	22	63 %

6.4. Biologická aktivita

Všechny finální látky byly testovány na komerčně zakoupeném mykobakteriálním enzymu Zmp1 za účelem zjištění jejich inhibičních vlastností ve spolupráci s prof. Mgr. Markem Šebelou, Ph.D. na pracovišti C. R. Haná v Olomouci. Pro zjištění procentuální inhibice byla látka **14a–14d** (substrát) smíchána s enzymem a v 2minutových intervalech (0,1–20 min) byly odebrány jednotlivé vzorky. Úbytek substrátu byl následně charakterizována pomocí hmotnostní spektrometrie s typem ionizace MALDI. Inhibiční vlastnosti byly testovány pro různé koncentrace enzymu. Látky **14a** a **14c** s allylovým substituentem inhibovaly uvedený enzym z 60 %. Látky **14b** a **14d** s benzylovým substituentem bohužel nevykazovaly žádný inhibiční účinek. Další testování biologické aktivity z časových důvodů neproběhlo.

Tab. 5: Tabulka inhibičních vlastností finálních látek na enzymu Zmp1

<i>Struktura</i>	<i>Inhibiční účinek (%)</i>
 <p>14a 14c</p>	60
 <p>14b 14d</p>	neinhibuje

5 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

5.1. Obecné informace

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

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.

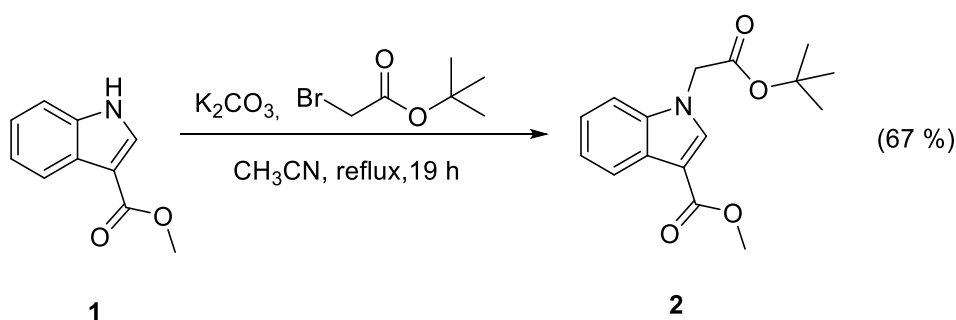
^1H a ^{13}C NMR spektra byla měřena na přístroji JEOL ECA400II (400 MHz) spektrometru za magnetické indukce 9,39 T (s užívanými frekvencemi 399,78 MHz pro ^1H a 100,53 MHz pro ^{13}C). Dále na přístroji JEOL ECX-500SS (500 MHz) spektrometru za magnetické indukce 11,75 T (s užívanými frekvencemi 500,16 MHz pro ^1H a 125,77 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 prováděna 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 i záporném módu v rozsahu od *x* do *y* *m/z* (rozsah vidíte v naměřeném spektru). Chromatografická separace byla prováděna na koloně Phenomenex Gemini (C18, 50 x 2 mm, 3 μm částice), eluce byla izokratická, MF 80 % ACN a 20 % pufru (0,01M octan amonný) nebo 95% MeOH + 5% voda + 0.1% HCOOH. Vzorky byly připraveny rozpuštěním látek v počáteční mobilní fázi.

5.2. Syntéza indolových derivátů

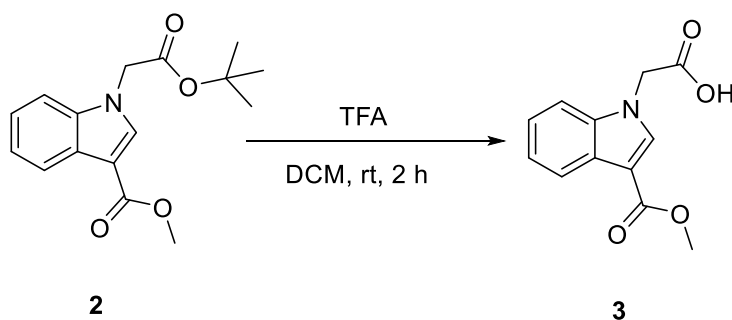
Zde jsou podrobně popsány jednotlivé reakční kroky, které byly v rámci předkládané bakalářské práce provedeny. Vzhledem k faktu, že některé látky byly v naší skupině již připraveny, jsou tedy charakterizovány pouze pomocí ^1H NMR. Všechny nově připravené látky jsou již plně charakterizovány pomocí vybraných analytických metod (^1H NMR, ^{13}C NMR, HRMS). Některá spektra prekurzorů obsahují zbytková rozpouštědla a vodu.

5.2.1. Syntéza methyl 1-(2-(terc-butoxy)-2-oxoethyl)-1H-indol-3-karboxylátu (2)



Do reakční baňky byly naváženy 2 g (11,4 mmol) látky **1**, přidáno 50 ml CH_3CN , 3,6 g (26 mmol) K_2CO_3 a 2,4 ml (16,24 mmol) terc-butyl bromoacetátu. Směs byla refluxována 19 hodin při 90 °C. Zpracování bylo provedeno přidáním 50 ml destilované vody a následnou extrakcí pomocí EtOAc (3x100 ml). Surový produkt byl odpařen na RVO a přečištěn krystalizací ze směsi EtOAc:Hex. Produktem byla bílá krystalická látka **2** s výtěžkem 2,20 g (67 %). ^1H NMR (500 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) δ 8.13 (s, 1H), 8.03 – 8.00 (m, 1H), 7.48 – 7.45 (m, 1H), 7.27 – 7.21 (m, 2H), 5.12 (s, 2H), 3.82 (s, 3H), 3.31 (s, 2H), 1.42 (s, 9H).

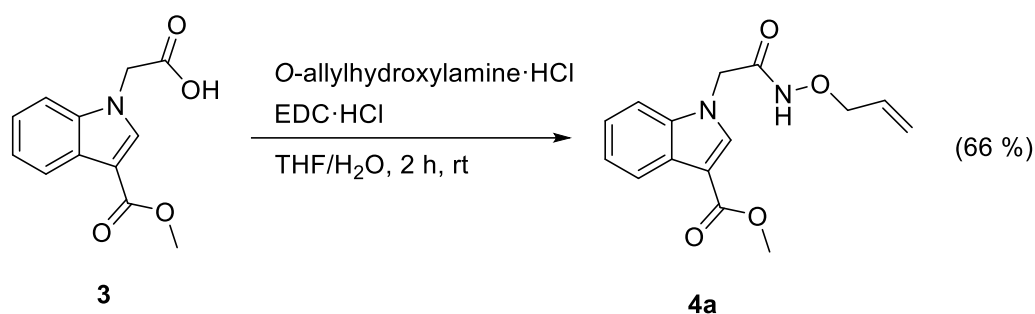
5.2.2 Syntéza 2-(3-(methoxycarbonyl)-1H-indol-1-yl)octové kyseliny (3)



Do reakční baňky bylo odváženo 2,20 g (7,6 mmol) látky **2**, která byla rozpuštěna ve směsi DCM (40 ml) a TFA (9 ml). Reakční směs byla ponechána míchat za laboratorní teploty po dobu 2 h. Poté byla odpařena na RVO. Produktem byla krystalická látka **3** narůžovělé barvy s kvantitativním výtěžkem. $^1\text{H NMR}$ (500 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) δ 8.14 (s, 1H), 8.03 – 8.00 (m, 1H), 7.52 – 7.49 (m, 1H), 7.27 – 7.21 (m, 2H), 5.14 (s, 2H), 3.82 (s, 3H).

5.2.3. Syntéza methyl 1-(2-((allyloxy)amino)-2-oxoethyl)-1H-indol-3-karboxylátu

(4a)

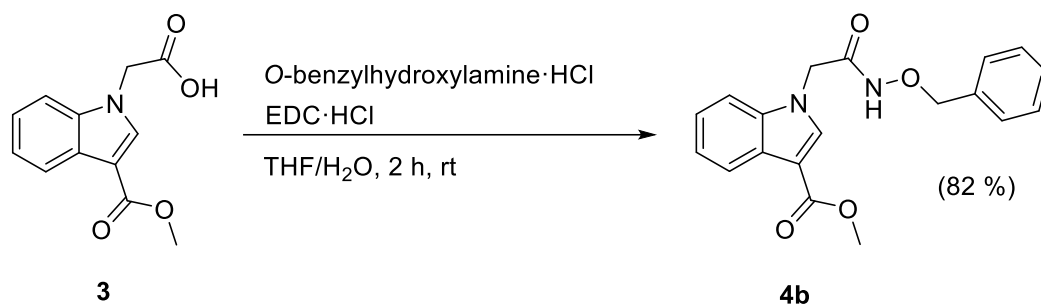


Do reakční baňky bylo odváženo 1,06 g (4,5 mmol) látky **3**, která byla suspendována ve 40 ml destilované vody. K suspenzi byl přidán roztok 0,75 g (6,8 mmol) *O*-allylhydroxylaminu v 60 ml vody. pH směsi bylo upraveno podle potřeby na hodnotu 4–4,5 pomocí 1M NaOH. Dále bylo přidáno minimální množství THF, dokud nedošlo k rozpuštění výchozí látky. Na závěr byl do reakční směsi přikapán roztok 2,62 g (13,7 mmol) EDC·HCl v 60 ml vody. V průběhu přikapávání se tvořil bílý zákal. Směs byla ponechána míchat za laboratorní teploty po dobu 2 h.

Surový produkt **4a** byl extrahován 3x100 ml EtOAc a po odpaření rozpouštědel na RVO byl přečištěn pomocí sloupcové chromatografie (SiO_2 , MF = EtOAc:Hex = 6,5:1,5). Produktem byla bílá pevná látka s výtěžkem 0,87 g (66 %). $^1\text{H NMR}$ (500 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) δ 11.50 (s, 1H), 8.11 (s, 1H), 8.03 – 8.00 (m, 1H), 7.47 – 7.44 (m, 1H), 7.28 – 7.21 (m, 2H), 5.92 (ddt, $J = 16.7, 10.5, 6.1$ Hz, 1H), 5.33 – 5.23 (m, 2H), 4.86 (s, 2H), 4.30 (d, $J = 6.0$ Hz, 2H), 3.82 (s, 3H).

5.2.4. Syntéza methyl 1-(2-((benzyloxy)amino)-2-oxoethyl)-1H-indol-3-karboxylátu

(4b)

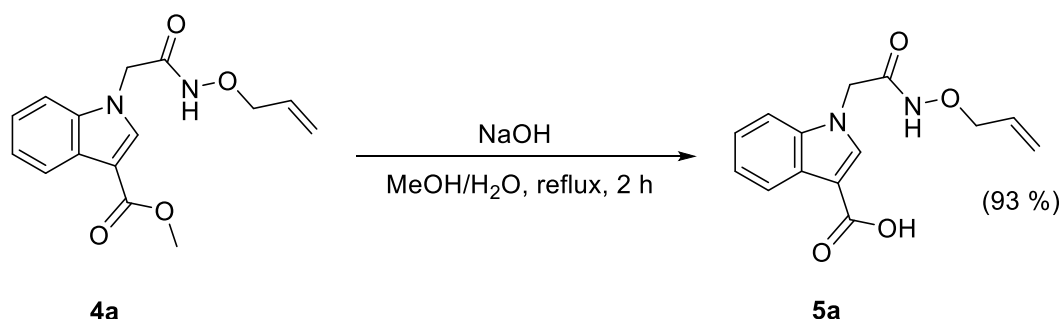


Do reakční baňky bylo odváženo 1,06 g (4,5 mmol) látky **3**, která byla suspendována ve 40 ml destilované vody. K suspenzi byl přidán roztok 1,09 g (6,8 mmol) *O*-benzylhydroxylaminu v 60 ml vody. pH směsi bylo upraveno podle potřeby na hodnotu 4 - 4,5 pomocí 1M NaOH. Dále bylo přidáno minimální množství THF, dokud nedošlo k rozpuštění výchozí látky. Na závěr byl do reakční směsi přikapán roztok 2,62 g (13,7 mmol) EDC·HCl v 60 ml vody. V průběhu přikapávání se tvořil bílý zákal. Směs byla ponechána míchat za laboratorní teploty po dobu 2 h.

Produkt **4b** se z roztoku vyloučil ve formě sraženiny, která byla zfiltrována a vysušena pod vakuem. Produktem byla pevná narůžovělá látka s výtěžkem 1,27 g (82 %). ¹H NMR (500 MHz, DMSO-*d*₆) δ 11.54 (s, 1H), 8.11 (s, 1H), 8.05 – 8.00 (m, 1H), 7.56 – 7.35 (m, 6H), 7.29 – 7.21 (m, 2H), 5.17 – 4.79 (m, 4H), 3.82 (s, 3H).

5.2.5. Syntéza 1-(2-((allyloxy)amino)-2-oxoethyl)-1H-indol-3-karboxylové kyseliny

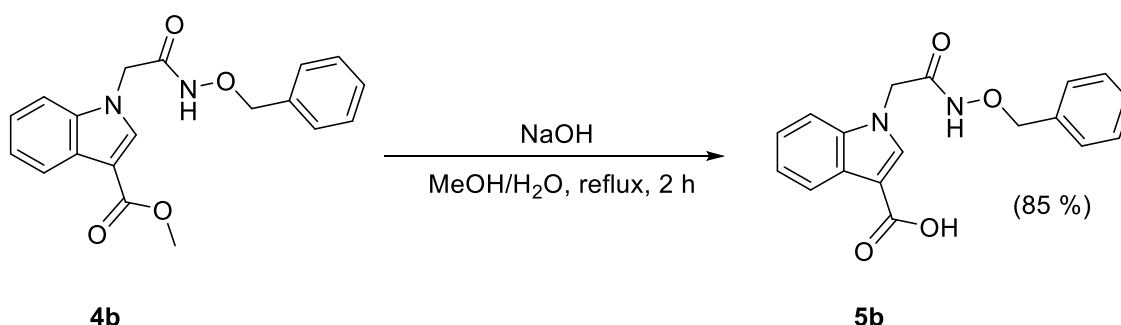
(5a)



Methyl ester **4a** (0,87 g; 3 mmol) byl rozpuštěn ve 40 ml směsi MeOH/H₂O v poměru 3:1. Do roztoku bylo přidáno 2,39 g (6 mmol) pevného NaOH a směs byla refluxována při 80 °C po dobu 2 h. Po této době byla směs zakonzentrována na RVO, a následně bylo

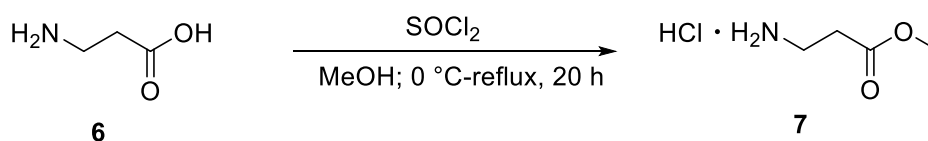
pH upraveno na hodnotu 2-3 pomocí 1M HCl. Surová směs byla extrahovaná 3x100 ml EtOAc a spojené organické extrakty posléze i solankou. Zbytková voda byla odstraněna bezvodým MgSO₄. Směs byla přefiltrována a odpařena na RVO. Produktem byla pevná bílá látka s výtěžkem 0,81 g (93 %). ¹H NMR (500 MHz, DMSO-d₆) δ 12.00 (s, 1H), 11.50 (s, 1H), 8.04 – 8.01 (m, 2H), 7.45 – 7.41 (m, 1H), 7.26 – 7.18 (m, 2H), 5.92 (ddt, *J* = 16.7, 10.5, 6.1 Hz, 1H), 5.33 – 5.23 (m, 2H), 4.84 (s, 2H), 4.30 (s, 2H).

5.2.6. Syntéza 1-(2-((benzyloxy)amino)-2-oxoethyl)-1*H*-indol-3-karboxylové kyseliny (**5b**)



Methyl ester **4b** (1.13 g; 3,3 mmol) byl rozpuštěn ve 40 ml směsi MeOH/H₂O v poměru 3:1. Do roztoku bylo přidáno 2,65 g (6 mmol) pevného NaOH a směs byla refluxována při 80 °C po dobu 2 h. Po této době byla směs zakonzentrována na RVO, a následně bylo pH upraveno na hodnotu 2–3 pomocí 1M HCl. Surová směs byla extrahovaná 3x100 ml EtOAc a spojené organické extrakty posléze i solankou. Zbytková voda byla odstraněna bezvodým MgSO₄. Směs byla přefiltrována a odpařena na RVO. Produktem byla bílá pevná látka s výtěžkem 0,91 g (85 %). ¹H NMR (500 MHz, DMSO-d₆) δ 12.03 (s, 1H), 11.54 (s, 1H), 8.05 – 8.00 (m, 2H), 7.50 – 7.33 (m, 6H), 7.27 – 7.18 (m, 2H), 5.15 – 4.80 (m, 4H).

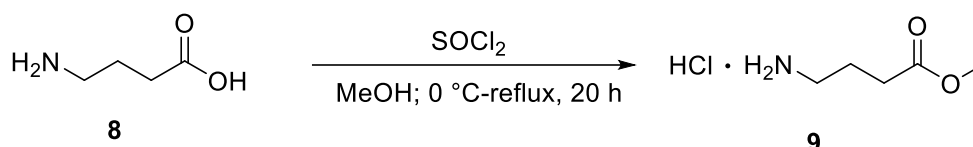
5.2.6. Syntéza methyl-3-aminopropanátu (**7**)



Do reakční baňky bylo odváženo 0,5 g β-alaninu (**6**), který byl rozpuštěn v 3,5 ml MeOH. Vzniklá suspenze byla ochlazená na 0 °C. K ochlazené směsi byl opatrně přikapáno

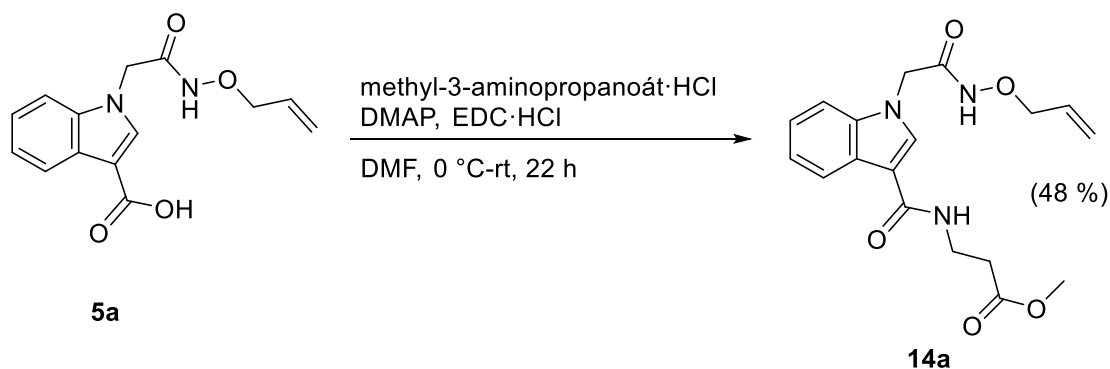
610 μl (8,4 mmol) SOCl_2 . Reakční směs byla ponechána refluxovat při 70 $^\circ\text{C}$ po dobu 20 h. Rozpouštědlo a zbytkový SOCl_2 byly poté odpařeny na RVO. Produktem byla bílá krystalická látka **7** s kvantitativní konverzí. Naměřená data korespondují s daty publikovanými.⁴²

5.2.7. Syntéza methyl-4-aminobutanoátu (**9**)



Do reakční baňky bylo odváženo 0,5 g GABA (**8**), která byla rozpuštěna v 3,5 ml MeOH. Vzniklá suspenze byla ochlazená na 0 $^\circ\text{C}$. K ochlazené směsi byl opatrně přikapáno 530 μl (7,3 mmol) SOCl_2 . Reakční směs byla ponechána refluxovat při 70 $^\circ\text{C}$ 20 h. Rozpouštědlo a zbytkový SOCl_2 byly poté odpařeny na RVO. Produktem byla bílá krystalická látka **9** s kvantitativní konverzí. Naměřená data korespondují s daty publikovanými.⁴²

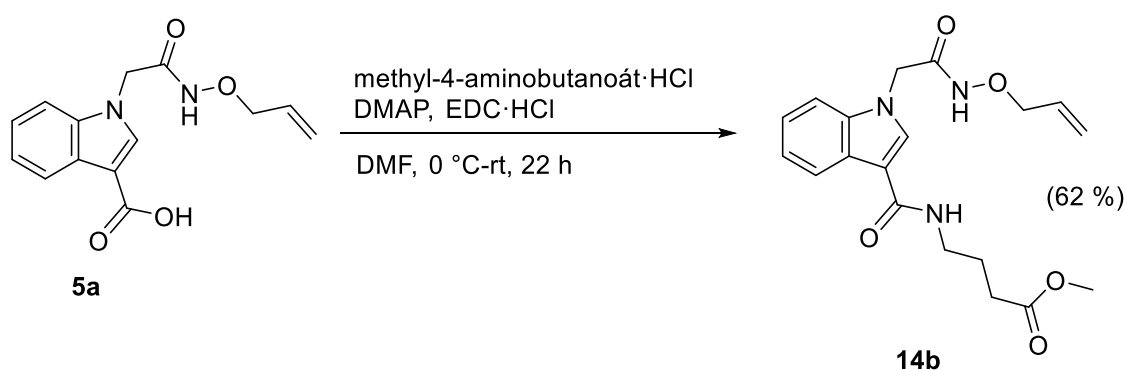
5.2.7. Syntéza methyl 3-(1-(2-((allyloxy)amino)-2-oxoethyl)-1H-indol-3-karboxamido)propanoátu (**14a**)



Do reakční baňky bylo naváženo 200 mg (0,73 mmol) látky **5a**, která byla následně rozpuštěná v 5 ml DMF. Poté byl do roztoku přisypáno 112 mg (0,81 mmol) methyl 3-aminopropanoátu·HCl a 151 mg (12,4 mmol) DMAP. Směs byla umístěna do ledové lázně a za 0 $^\circ\text{C}$ bylo přidáno 168 mg (0,88 mmol) EDC·HCl. Reakce byla míchána 22 h za laboratorní teploty. Surová směs byla poté okyselena 1M HCl na pH = 1. Následně bylo přilito 20 ml destilované vody a vodná fáze byla extrahována 3x20 ml DCM.

Spojené organické frakce byly promyty solankou, vysušeny bezvodým MgSO₄ a odpařeny na RVO. Surový produkt byl přečištěn pomocí sloupcové chromatografie (SiO₂, MF = DCM:MeOH = 9,5:0,5). Produktem **14a** byla bílá krystalická látka s výtěžkem 126 mg (48 %). ¹H NMR (500 MHz, DMSO-d₆) δ 11.52 (s, 1H), 8.14 (d, J = 7.8 Hz, 1H), 8.02 (t, J = 5.1 Hz, 1H), 7.96 (s, 1H), 7.41 (d, J = 8.1 Hz, 1H), 7.17 (dt, J = 24.9, 7.0 Hz, 2H), 5.92 (ddt, J = 16.7, 10.5, 6.1 Hz, 1H), 5.34 – 5.23 (m, 2H), 4.78 (s, 2H), 4.30 (d, J = 5.9 Hz, 2H), 3.62 (s, 3H), 3.49 (q, J = 6.9 Hz, 2H), 2.60 (t, J = 6.9 Hz, 2H). ¹³C NMR (126 MHz, DMSO-D₆) δ 171.93, 164.18, 163.85, 136.41, 132.78, 131.99, 126.40, 122.02, 121.16, 120.75, 119.60, 110.21, 110.06, 76.09, 51.32, 46.67, 34.82, 33.98. HRMS: m/z vypočteno pro C₁₈H₂₂N₃O₅⁺: 360,1554 [M+H]⁺; nalezeno: 360,1550.

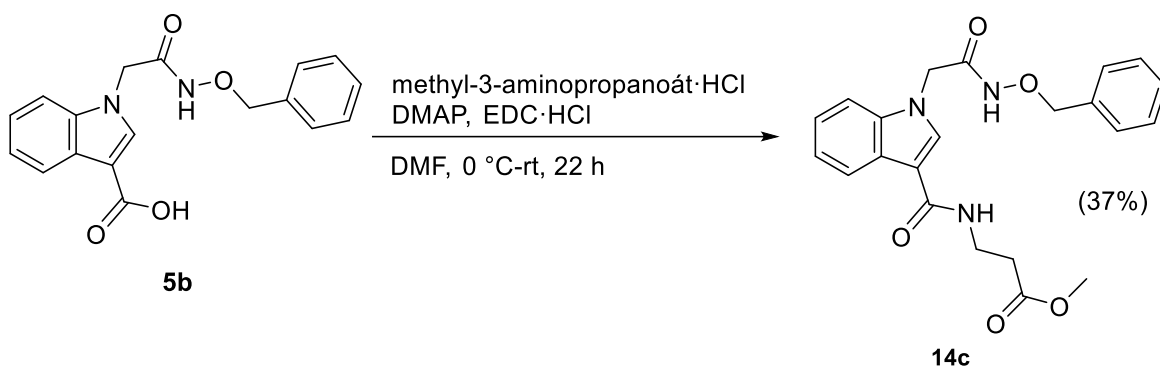
5.2.8. Syntéza methyl 4-(1-(2-((allyloxy)amino)-2-oxoethyl)-1H-indol-3-karboxamido)butanoátu (14b)



Do reakční baňky bylo naváženo 200 mg (0,73 mmol) látky **5a**, která byla následně rozpuštěná v 5 ml DMF. Poté byl do roztoku přisypáno 123 mg (0,80 mmol) methyl 4-aminobutanoátu·HCl a 151 mg (12,4 mmol) DMAP. Směs byla umístěna do ledové lázně a za 0 °C bylo přidáno 168 mg (0,88 mmol) EDC·HCl. Reakce byla míchána 22 h za laboratorní teploty. Surová směs byla poté okyselena 1M HCl na pH = 1. Následně bylo přilito 20 ml destilované vody a vodná fáze byla extrahována 3x20 ml DCM. Spojené organické frakce byly promyty solankou, vysušeny bezvodým MgSO₄ a odpařeny na RVO. Surový produkt byl přečištěn pomocí sloupcové chromatografie (SiO₂, MF = DCM:MeOH = 9,5:0,5). Produktem **14b** byla bílá krystalická látka s výtěžkem 172 mg (62 %). ¹H NMR (500 MHz, DMSO-d₆) δ 11.52 (s, 1H), 8.15 (d, J = 7.8 Hz, 1H), 7.98 – 7.93 (m, 2H), 7.41 (d, J = 8.2 Hz, 1H), 7.17 (dt, J = 26.7, 7.1 Hz, 2H), 5.92 (ddt, J = 16.7, 10.5, 6.1 Hz, 1H), 5.35 – 5.23 (m, 2H), 4.78 (s, 2H), 4.30 (d, J = 6.0 Hz, 2H), 3.59 (s,

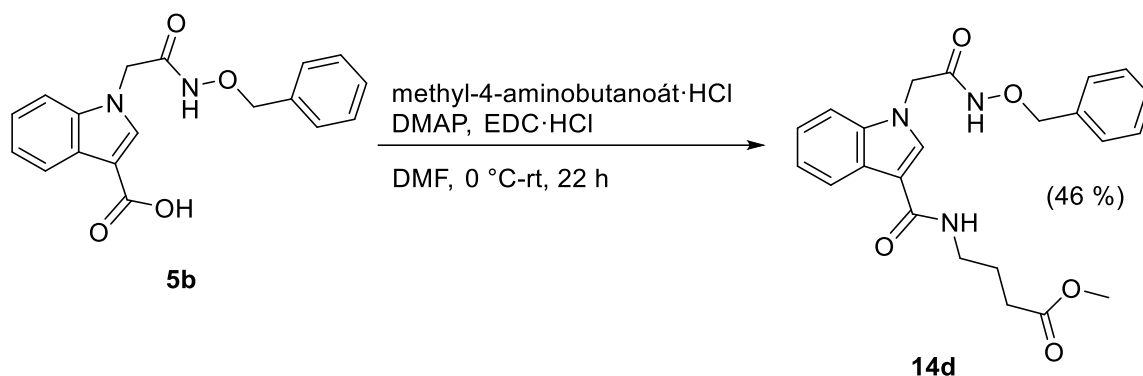
3H), 3.27 (q, J = 6.8 Hz, 2H), 2.39 (t, J = 7.5 Hz, 2H), 1.79 (p, J = 7.2 Hz, 2H). ^{13}C NMR (126 MHz, DMSO-D6) δ 173.18, 164.13, 163.87, 136.41, 132.79, 131.80, 126.49, 121.97, 121.24, 120.68, 119.59, 110.38, 110.02, 76.10, 51.20, 46.68, 37.74, 30.87, 24.84. HRMS: m/z vypočteno pro $\text{C}_{19}\text{H}_{24}\text{N}_3\text{O}_5^+$: 374,1710 $[\text{M}+\text{H}]^+$; nalezeno: 374,1710.

5.2.8. Syntéza methyl 3-(1-(2-((benzyloxy)amino)-2-oxoethyl)-1H-indol-3-karboxamido)butanoátu (14c)



Do reakční baňky bylo naváženo 200 mg (0,62 mmol) látky **5b**, která byla následně rozpuštěná v 5 ml DMF. Poté bylo do roztoku přisypáno 94 mg (0,68 mmol) methyl 3-aminopropanoátu \cdot HCl a 128 mg (10,5 mmol) DMAP. Směs byla umístěna do ledové lázně a za 0 °C bylo přidáno 142 mg (0,74 mmol) EDC \cdot HCl. Reakce byla míchána po dobu 22 h za laboratorní teploty. Surová směs byla poté okyselena 1M HCl na pH = 1. Následně bylo přilito 20 ml destilované vody a vodná fáze byla extrahována 3x20 ml DCM. Spojené organické frakce byly promyty solankou, vysušeny bezvodým MgSO_4 a odpařeny na RVO. Surový produkt byl přečištěn pomocí sloupcové chromatografie (SiO_2 , MF = DCM:MeOH = 9,5:0,5). Produktem **14c** byla bílá krystalická látka s výtěžkem 92 mg (37 %). ^1H NMR (500 MHz, DMSO-d6) δ 11.56 (s, 1H), 8.15 (d, J = 7.7 Hz, 1H), 8.03 (t, J = 5.0 Hz, 1H), 7.97 (s, 1H), 7.49 – 7.34 (m, 6H), 7.18 (dt, J = 22.8, 7.1 Hz, 2H), 5.10 – 4.78 (m, 4H), 3.62 (s, 3H), 3.50 (q, J = 6.8 Hz, 2H), 2.61 (t, J = 6.9 Hz, 2H). ^{13}C NMR (126 MHz, DMSO-D6) δ 171.93, 164.19, 163.99, 136.42, 135.67, 132.00, 128.91, 128.33, 126.41, 122.05, 121.16, 120.76, 110.22, 110.07, 77.00, 51.32, 46.68, 34.82, 33.98. HRMS: m/z vypočteno pro $\text{C}_{22}\text{H}_{24}\text{N}_3\text{O}_5^+$: 410,1710 $[\text{M}+\text{H}]^+$; nalezeno: 410,1712.

5.2.9 Syntéza methyl 4-(1-(2-((benzyloxy)amino)-2-oxoethyl)-1H-indol-3-karboxamido)butanoátu (14d)



Do reakční baňky bylo naváženo 200 mg (0,62 mmol) látky **5b**, která byla následně rozpuštěná v 5 ml DMF. Poté bylo do roztoku přisypáno 104 mg (0,68 mmol) methyl 4-aminobutanoátu·HCl a 128 mg (10,5 mmol) DMAP. Směs byla umístěna do ledové lázně a za 0 °C bylo přidáno 142 mg (0,74 mmol) EDC·HCl. Reakce byla míchána po dobu 22 h za laboratorní teploty. Surová směs byla poté okyselena 1M HCl na pH = 1. Následně bylo přilito 20 ml destilované vody a vodná fáze byla extrahována 3x20 ml DCM. Spojené organické frakce byly promyty solankou, vysušeny bezvodým MgSO₄ a odpařeny na RVO. Surový produkt byl přečištěn pomocí sloupcové chromatografie (SiO₂, MF = DCM:MeOH = 9,5:0,5). Produktem **14d** byla bílá krystalická látka s výtěžkem 121 mg (46 %). ¹H NMR (500 MHz, DMSO-d₆) δ 11.56 (s, 1H), 8.16 (d, J = 7.7 Hz, 1H), 8.00 – 7.95 (m, 2H), 7.48 – 7.34 (m, 6H), 7.18 (dt, J = 23.8, 7.1 Hz, 2H), 5.10 – 4.77 (m, 4H), 3.59 (s, 3H), 3.28 (q, J = 6.7 Hz, 2H), 2.39 (t, J = 7.5 Hz, 2H), 1.80 (p, J = 7.2 Hz, 2H). ¹³C NMR (126 MHz, DMSO-D₆) δ 173.19, 164.14, 163.99, 136.42, 135.68, 131.80, 128.90, 128.33, 126.50, 122.00, 121.24, 120.68, 110.40, 110.04, 76.99, 51.20, 46.69, 37.75, 30.87, 24.85. HRMS: m/z vypočteno pro C₂₃H₂₆N₃O₅⁺: 424,1867 [M+H]⁺; nalezeno: 424,1866.

7 ZÁVĚR

Cílem této bakalářské práce byla syntéza nových potenciálních inhibitorů mykobakteriálního enzymu Zmp1, která navazuje na předchozí výzkumy a jedná se tak o inhibitory Zmp1 druhé generace.

Teoretická část nejprve stručně pojednává o samotné *Mtb* a obecně popisuje onemocnění TB, které tato bakterie způsobuje. Dále je zde nastíněna problematika vakcinace a rezistentních kmenů. Kromě doposud známých léčiv zde byly v závěru popsány výzkumy, které se zabývaly syntézou nových potenciálních antituberkulotik, jejichž cílem je právě enzym Zmp1. Byl zde také nastíněn nejpravděpodobnější doposud známý mechanismus tohoto enzymu.

Na základě předchozích výzkumů byl navržen syntetický postup, který měl za cíl připravit látky se základním skeletem v podobě indolu. Data z molekulového dokování doporučila zachovat hydroxamátovou skupinu se substituenty v podobě allylu a benzylu a jako ZBG zde byly zvoleny aminokyseliny Ile a Val, které byly napojeny přes aromatický prodlužující linker, aby se ZBG mohla dostat blíže aktivnímu místu.

Pro napojení linkeru byly zvoleny dva syntetické postupy pro tvorbu amidické vazby, a to nukleofilní acylová substituce a syntéza pomocí karbodiimidu. I přes řadu optimalizací vykazovaly oba přístupy velmi nízkou konverzi, kdy nejvyšší naměřená konverze byla pouze 26 %. Neúspěšnost v obou těchto případech byla přisuzována nízké reaktivitě aromatického aminu (linkeru), který je silně deaktivován přítomností esterové skupiny. Proto i po podrobnějším prostudování a aplikaci podmínek uvedených v dostupné literatuře bylo od těchto syntetických postupů, které měly vést k finálním látkám z knihovny **B**, opuštěno.

Na základě těchto závěrů byla navržena alternativní knihovna finálních látek **C**, kde bylo cílem vyzkoušet napojit delší aminokyseliny, které by nevyžadovaly vložení prodlužující části v podobě linkeru mezi samotnou aminokyselinu a indolovou část molekuly. Konkrétně byly zvoleny β -Ala a GABA.

Napojení těchto AMK bylo provedeno za použití karbodiimidové metody, která vykazovala uspokojivé výtěžky a tímto způsobem byly připraveny všechny finální látky (**14a,14b,14c,14d**) z alternativní knihovny **C**. U těchto látek byla také ve spolupráci s prof. Mgr. Markem Šebelou, Ph.D. na pracovišti C. R. Haná v Olomouci testována

schopnost inhibice enzymu Zmp1, která v případě látek **14b** a **14d** byla nulová. U látek **14a** a **14c** vykazovala hodnotu 60 %. Další biologické testování z časových důvodů neproběhlo.

8 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. <https://doi.org/10.1074/jbc.m111.271809>.
- (2) 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. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2018**, *28* (4), 637–641. <https://doi.org/10.1016/J.BMCL.2018.01.031>.
- (3) Paolino, M.; Brindisi, M.; Vallone, A.; Butini, A.; Campiani, G.; Nannicini, Ch.; 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.; Ca, 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. <https://doi.org/10.1002/CMDC.201700759>.
- (4) 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. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2014**, *24* (11), 2508–2511. <https://doi.org/10.1016/J.BMCL.2014.04.004>.
- (5) Slachtova, V.; Sebela, M.; Torfs, E.; Oorts, L.; Cappoen, D.; Berka, K.; Bazgier, V.; Brulikova, L. Novel Thiazolidinedione-Hydroxamates as Inhibitors of Mycobacterium Tuberculosis Virulence Factor Zmp1. *Eur. J. Med. Chem.* **2020**, *185*, 1–13. <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2019.111812>.
- (6) Dak, M.; Šlachtová, V.; Šebela, M.; Bazgier, V.; Berka, K.; Smiejkowska, N.; Oorts, L.; Cappoen, D.; Brulíková, L. Novel Heterocyclic Hydroxamates as Inhibitors of the Mycobacterial Zinc Metalloprotease Zmp1 to Probe Its Mechanism of Function. *Eur. J. Med. Chem.* **2022**, *244*, 1–15. <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2022.114831>.

- (7) Harouna Hamidou, Z.; Mamadou, S.; Saad, J. Molecular Detection of Mycobacterium Tuberculosis Sensu Stricto in the Soil of Niger. *New Microbes New Infect.* **2021**, *44*, 1–6. <https://doi.org/10.1016/J.NMNI.2021.100939>.
- (8) Talbot, E. A.; Raffa, B. J. Mycobacterium Tuberculosis. *Mol. Med. Microbiol. Second Ed.* **2014**, *3*, 1637–1653. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-397169-2.00092-5>.
- (9) van Ingen, J. Mycobacteria. *Infect. Dis. (Auckl).* **2017**, *2*, 1645-1659.e2. <https://doi.org/10.1016/B978-0-7020-6285-8.00185-4>.
- (10) Kuroda, H.; Hosokawa, N. Gram-ghost Bacilli. *J. Gen. Fam. Med.* **2019**, *20* (1), 31–32. <https://doi.org/10.1002/JGF2.212>.
- (11) Jnawali, H. N.; Ryoo, S. First– and Second–Line Drugs and Drug Resistance. In *Tuberculosis - Current Issues in Diagnosis and Management*; IntechOpen, 2013; pp 163–180. <https://doi.org/10.5772/54960>.
- (12) WHO - *Global Tuberculosis Report 2022*; Global tuberculosis report 2022. Geneva: World Health Organization; 2022. Licence: CC BY-NC-SA 3.0 IGO.
- (13) Ústav zdravotnických informací a statistiky České republiky. *Základní Přehled Epidemiologické Situace ve Výskytu Tuberkulózy v České Republice v Roce 2021*.
- (14) Peloquin, C. A.; Davies, G. R. The Treatment of Tuberculosis. *Clin. Pharmacol. Ther.* **2021**, *110* (6), 1455–1466. <https://doi.org/10.1002/cpt.2261>.
- (15) Lin, P. L.; Flynn, J. L. Understanding Latent Tuberculosis: A Moving Target. *J. Immunol.* **2010**, *185* (1), 15–22. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.0903856>.
- (16) Jha, M.; Singh, M.; Singh, G. P. Modeling of Second-Line Drug Behavior in the Treatment of Tuberculosis Using Petri Net. *Int. J. Syst. Assur. Eng. Manag.* **2021**, 1–10. <https://doi.org/10.1007/S13198-021-01320-7/FIGURES/8>.
- (17) Joshi, S.; Yadav, D.; Yadav, R. Fluoroquinolones: A Review on Anti-Tubercular Activity. *Monatshefte fur Chemie* **2021**, *152* (8), 881–894. <https://doi.org/10.1007/S00706-021-02806-7/TABLES/5>.
- (18) Wu, H. Y.; Tian, Y.; Wang, X. D.; Sun, J. S.; Fan, L. C.; Chen, M. X.; Li, R.; Chen, Y. Twenty-Four-Week Interim Outcomes of Bedaquiline-Containing Regimens in Treatment of Adolescents with Rifampicin-Resistant Tuberculosis: A Retrospective Cohort Study in China. *J. Paediatr. Child Health* **2022**, *58* (1), 116–121. <https://doi.org/10.1111/JPC.15672>.
- (19) Jyoti M. Benni. Bedaquiline: A Promising New Agent for the Treatment of MDR-TB. *J. Drug Dev. Res.* **2013**, *5* (2), 24–28.

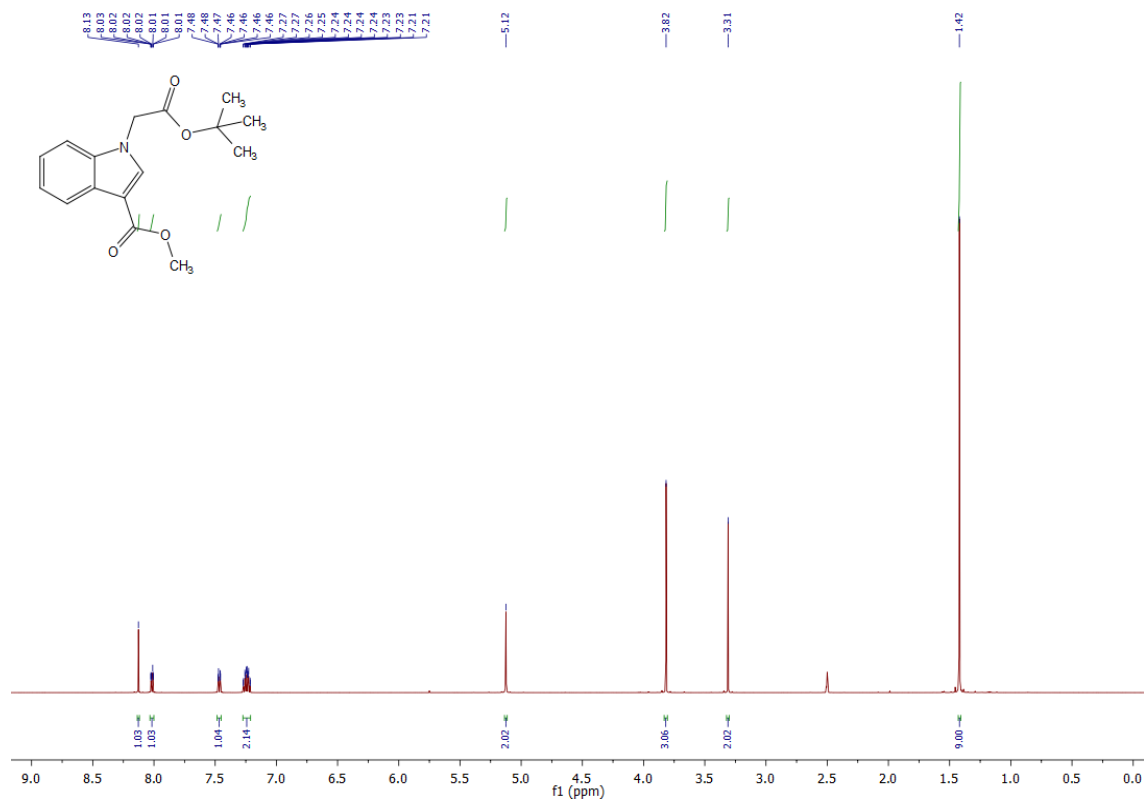
- (20) SÚKL - Státní ústav pro kontrolu léčiv. Pradaxa - Příloha i souhrn údajů o přípravku https://www.ema.europa.eu/documents/product-information/sovaldi-epar-product-information_cs.pdf.
- (21) Li, Z.; Liu, F.; Chen, H.; Han, Y.; You, Y.; Xie, Y.; Zhao, Y.; Tan, J.; Guo, X.; Cheng, Y.; Wang, Y.; Li, J.; Cheng, M.; Xia, S.; Niu, X.; Wei, L.; Wang, W. A Five-Year Review of Prevalence and Treatment Outcomes of Pre-Extensively Drug-Resistant plus Additional Drug-Resistant Tuberculosis in the Henan Provincial Tuberculosis Clinical Medicine Research Centre. *J. Glob. Antimicrob. Resist.* **2022**, *31*, 328–336. <https://doi.org/10.1016/j.jgar.2022.09.010>.
- (22) Bártů, V. Tuberkulóza a Její Rezistentní Formy. *Interní Med.* **2007**, *9* (9), 372–373.
- (23) Caminero Luna, J. A.; Pérez Mendoza, G.; Rodríguez de Castro, F. Multi-Drug Resistant Tuberculosis, Ten Years Later. *Med. Clínica (English Ed.)* **2021**, *156* (8), 393–401. <https://doi.org/10.1016/j.medcle.2020.08.009>.
- (24) Venkataswamy, M. M.; Goldberg, M. F.; Baena, A.; Chan, J.; Jacobs, W. R.; Porcelli, S. A. In Vitro Culture Medium Influences the Vaccine Efficacy of Mycobacterium Bovis BCG. *Vaccine* **2012**, *30* (6), 1038–1049. <https://doi.org/10.1016/J.VACCINE.2011.12.044>.
- (25) Lange, C.; Aaby, P.; Behr, M. A.; Donald, P. R.; Kaufmann, S. H. E.; Netea, M. G.; Mandalakas, A. M. 100 Years of Mycobacterium Bovis Bacille Calmette-Guérin. *Lancet Infect. Dis.* **2022**, *22* (1), e2–e12. [https://doi.org/10.1016/S1473-3099\(21\)00403-5](https://doi.org/10.1016/S1473-3099(21)00403-5).
- (26) Wallenfels, J. Epidemiologie Tuberkulózy. *Kardiol Rev Int Med* **2019**, *21* (3), 125–128.
- (27) Rodrigues, L. C.; Pereira, S. M.; Cunha, S. S.; Genser, B.; Ichihara, M. Y.; De Brito, S. C.; Hijjar, M. A.; Dourado, I.; Cruz, A. A.; Sant’Anna, C.; Bierrenbach, A. L.; Barreto, M. L. Effect of BCG Revaccination on Incidence of Tuberculosis in School-Aged Children in Brazil: The BCG-REVAC Cluster-Randomised Trial. *Lancet* **2005**, *366* (9493), 1290–1295. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(05\)67145-0](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(05)67145-0).
- (28) Vemula, M. H.; Ganji, R.; Sivangala, R.; Jakkala, K.; Gaddam, S.; Penmetsa, S.; Banerjee, S. Mycobacterium Tuberculosis Zinc Metalloprotease-1 Elicits Tuberculosis-Specific Humoral Immune Response Independent of Mycobacterial Load in Pulmonary and Extra-Pulmonary Tuberculosis Patients. *Front. Microbiol.*

- 2016**, 7, 1–12. <https://doi.org/10.3389/FMICB.2016.00418>.
- (29) 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. <https://doi.org/10.1016/J.CHOM.2008.03.003>.
- (30) Makinoshima, H.; Glickman, M. S. Regulation of Mycobacterium Tuberculosis Cell Envelope Composition and Virulence by Intramembrane Proteolysis. *Nature* **2005**, 436 (7049), 406–409. <https://doi.org/10.1038/NATURE03713>.
- (31) Trotsko, N. Antitubercular Properties of Thiazolidin-4-Ones – A Review. *Eur. J. Med. Chem.* **2021**, 215, 1–22. <https://doi.org/10.1016/J.EJMECH.2021.113266>.
- (32) Muttucumaru, D. G. N.; Smith, D. A.; McMinn, E. J.; Reese, V.; Coler, R. N.; Parish, T. Mycobacterium Tuberculosis Rv0198c, a Putative Matrix Metalloprotease Is Involved in Pathogenicity. *Tuberculosis* **2011**, 91 (2), 111–116. <https://doi.org/10.1016/J.TUBE.2010.11.010>.
- (33) What is the Inflammasome? <https://www.news-medical.net/life-sciences/What-is-the-Inflammasome.aspx> (accessed Feb 24, 2022).
- (34) Pouliot, M.; Jeanmart, S. Pan Assay Interference Compounds (PAINS) and Other Promiscuous Compounds in Antifungal Research. *J. Med. Chem.* **2016**, 59 (2), 497–503. <https://doi.org/10.1021/acs.jmedchem.5b00361>.
- (35) Altmann, E.; Hommel, U.; Lorthiois, E. L. J.; Maibaum, J. K.; Ostermann, N.; Quancard, J.; Randl, S. A.; Simic, O.; Vulpetti, A.; Rogel, O. Indole Compounds or Analogues Thereof Useful for the Treatment of Age-Related Macular Degeneration (Amd). WO2012093101 (A1).
- (36) Kleemann, H.-W.; Carry, J.-Ch.; Desmazeau, P.; Mignani, S.; Bouquerel, J.; Genevois-Borella, A.; Roman, B. 3-Guanidinocarbonyl-1-Heteroaryl-Indole Derivates, Preparation Process, Their Use as Medicaments, and Pharmaceutical Compositions Comprising Them.
- (37) Shin, Y.; Cee, V. J.; Tegley, C. M.; Lanman, B. A.; Wurz, R. P.; Yang, K. C.; Ma, V. Van; Erlanson, D.; Jeong, J. W.; Fucini, R. V.; Iwig, J. Preparation of Substituted Indoles as KRAS G12C Inhibitors and Methods of Using the Same, May 28, 2020.
- (38) Waibel, K. A.; Nickisch, R.; Möhl, N.; Seim, R.; Meier, M. A. R. A More Sustainable and Highly Practicable Synthesis of Aliphatic Isocyanides. *Green Chem.* **2020**, 22 (3), 933–941. <https://doi.org/10.1039/C9GC04070F>.
- (39) Zhang, T. Y.; Liu, C.; Chen, C.; Liu, J. X.; Xiang, H. Y.; Jiang, W.; Ding, T. M.;

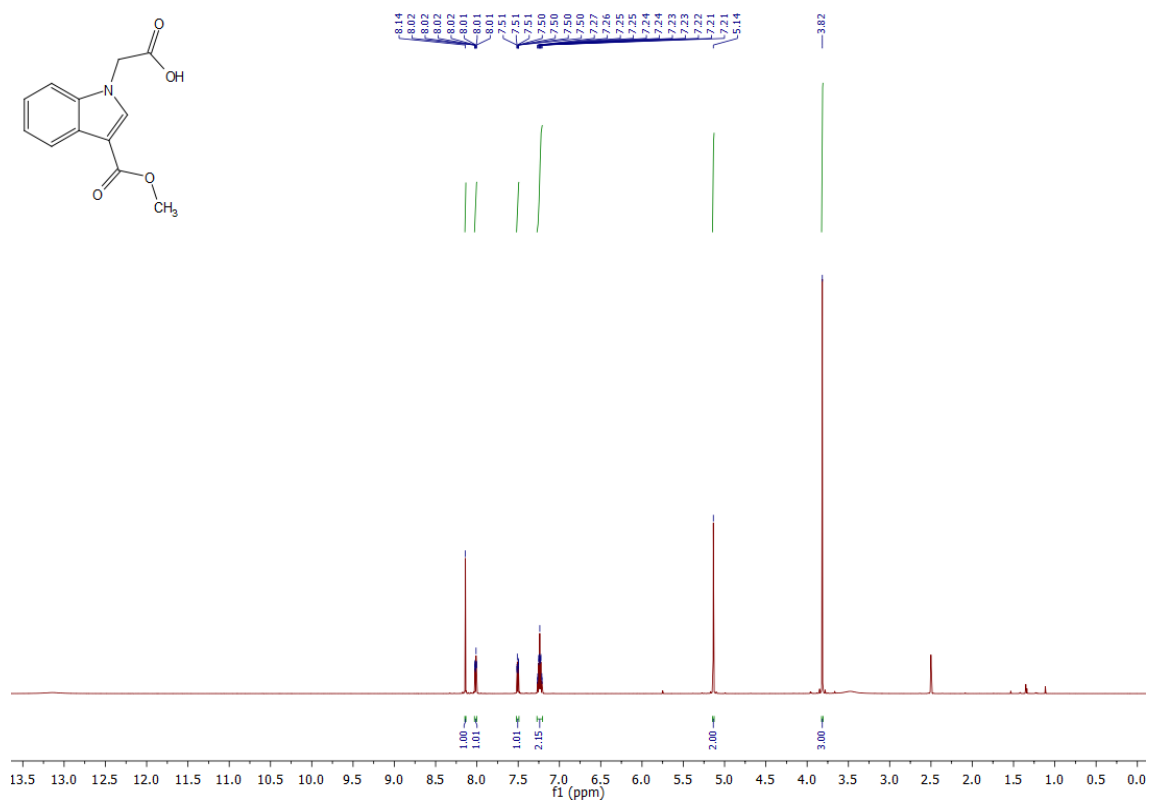
- Zhang, S. Y. Copper-Mediated Cascade C-H/N-H Annulation of Indolocarboxamides with Arynes: Construction of Tetracyclic Indoloquinoline Alkaloids. *Org. Lett.* **2018**, *20* (1), 220–223. https://doi.org/10.1021/ACS.ORGLETT.7B03580/ASSET/IMAGES/LARGE/OL-2017-03580V_0006.JPEG.
- (40) Zhang, T. Y.; Liu, C.; Chen, C.; Liu, J. X.; Xiang, H. Y.; Jiang, W.; Ding, T. M.; Zhang, S. Y. Copper-Mediated Cascade C-H/N-H Annulation of Indolocarboxamides with Arynes: Construction of Tetracyclic Indoloquinoline Alkaloids. *Org. Lett.* **2018**, *20* (1), 220–223. https://doi.org/10.1021/ACS.ORGLETT.7B03580/ASSET/IMAGES/LARGE/OL-2017-03580V_0006.JPEG.
- (41) Heisler, I.; Mueller, T.; Buchmann, B.; Cleve, A.; Siebeneicher, H.; Koppitz, M.; Schneider, D.; Bauser, M.; Heroult, M.; Neuhaus, R.; Petrul, H.; Quanz-Schoeffel, M. N-Pyrazolyl Carboxamides as Glucose Transport Inhibitors and Their Preparation. WO2016202898A1.
- (42) Dekker, F. J.; Ghizzoni, M.; van der Meer, N.; Wisastra, R.; Haisma, H. J. Inhibition of the PCAF Histone Acetyl Transferase and Cell Proliferation by Isothiazolones. *Bioorg. Med. Chem.* **2009**, *17* (2), 460–466. <https://doi.org/10.1016/j.bmc.2008.12.008>.
- (43) Nguyen, T. N. T.; Saleem, R. S. Z.; Luderer, M. J.; Hovde, S.; Henry, R. W.; Tepe, J. J. Radioprotection by Hymenialdisine-Derived Checkpoint Kinase 2 Inhibitors. *ACS Chem. Biol.* **2012**, *7* (1), 172–184. <https://doi.org/10.1021/CB200320C>.

9 PŘÍLOHY

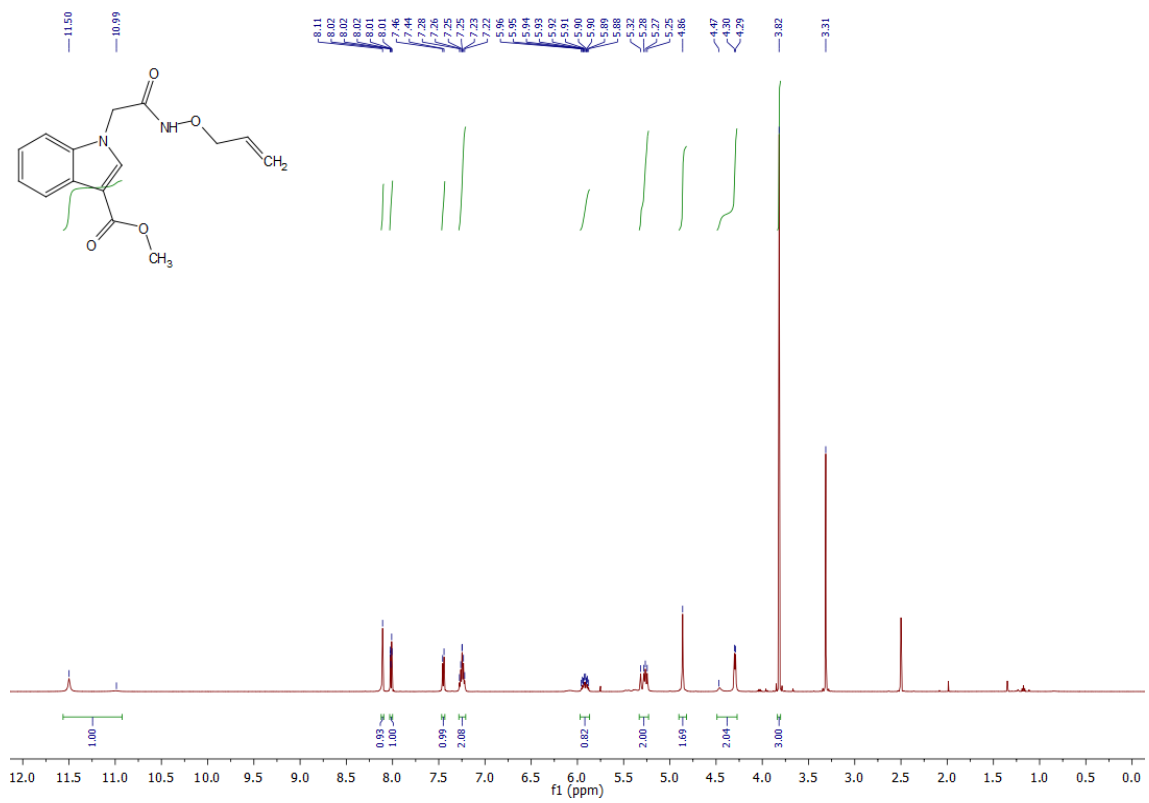
Spektrum 1: ^1H spektrum látky 2



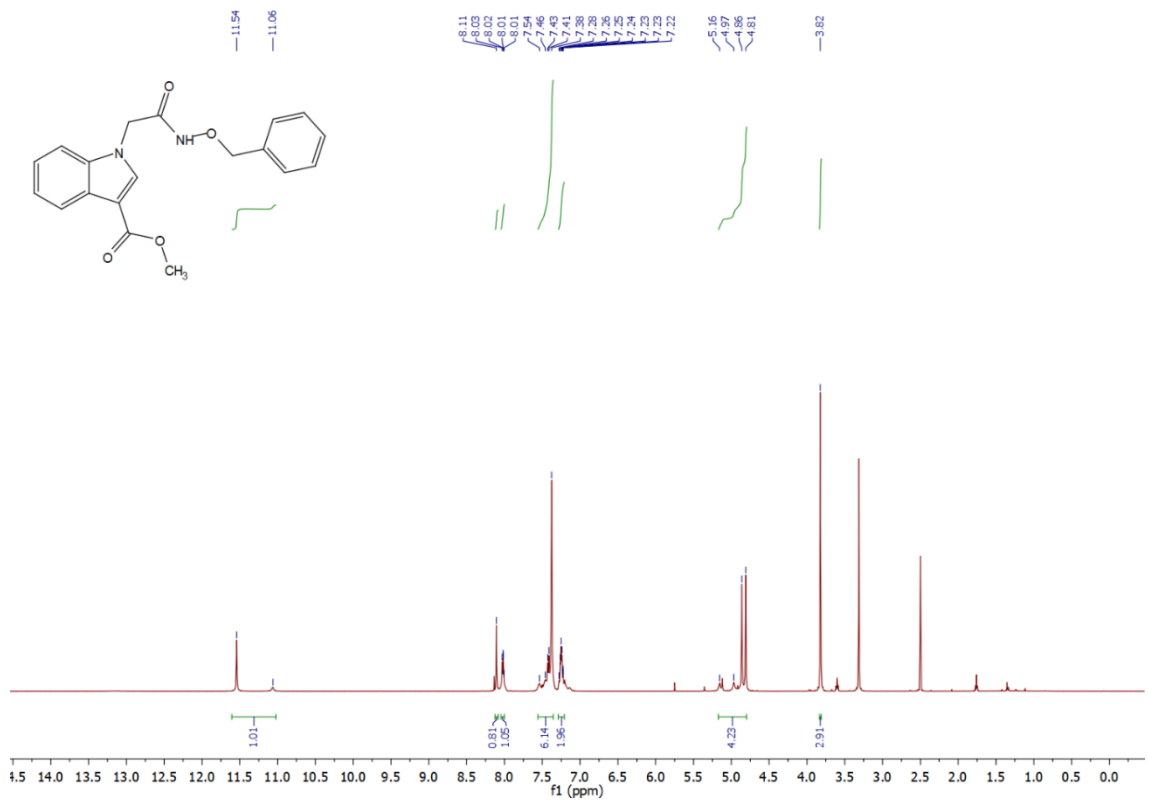
Spektrum 2: ^1H spektrum látky 3



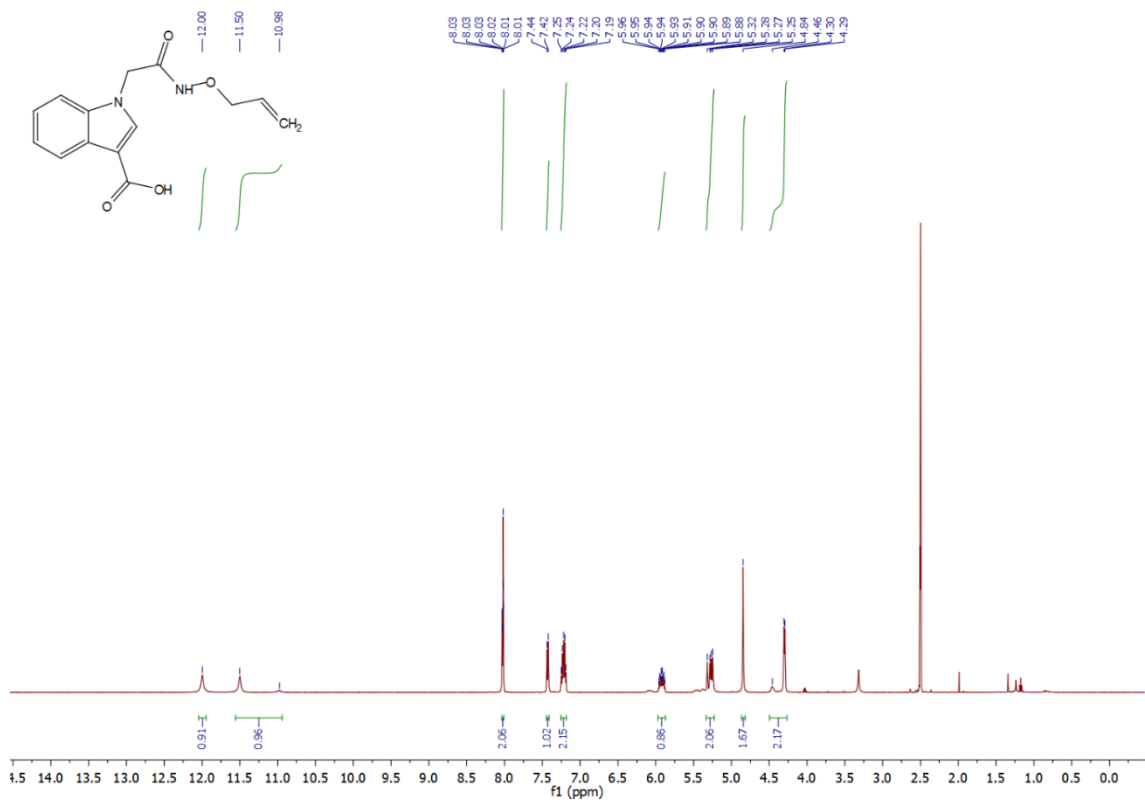
Spektrum 3: ¹H spektrum látky 4a



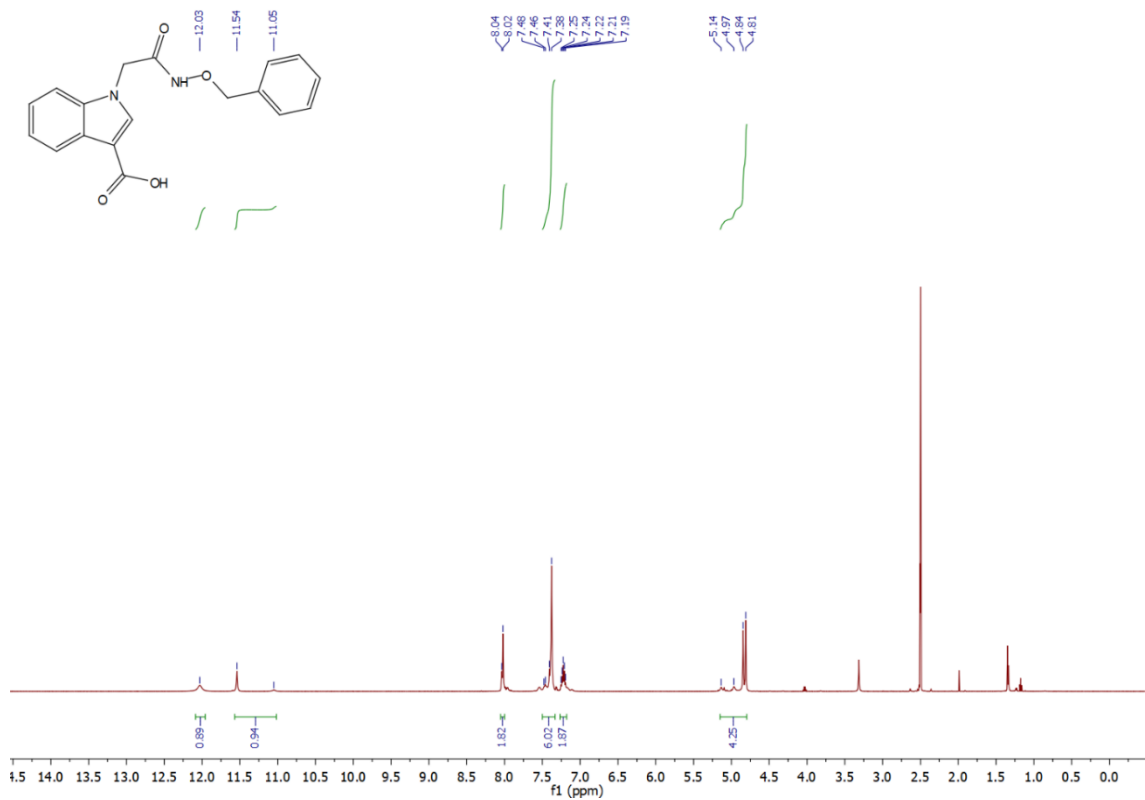
Spektrum 4: ¹H spektrum látky 4b



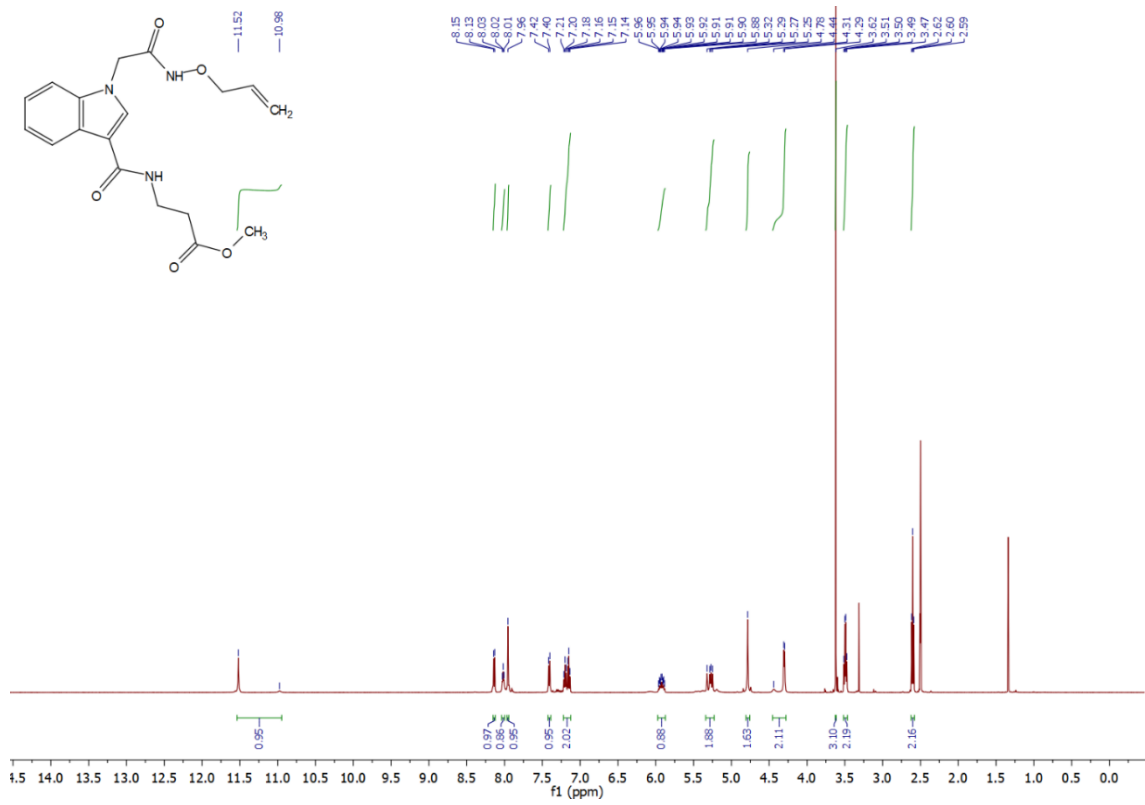
Spektrum 5: ^1H spektrum látky **5a**



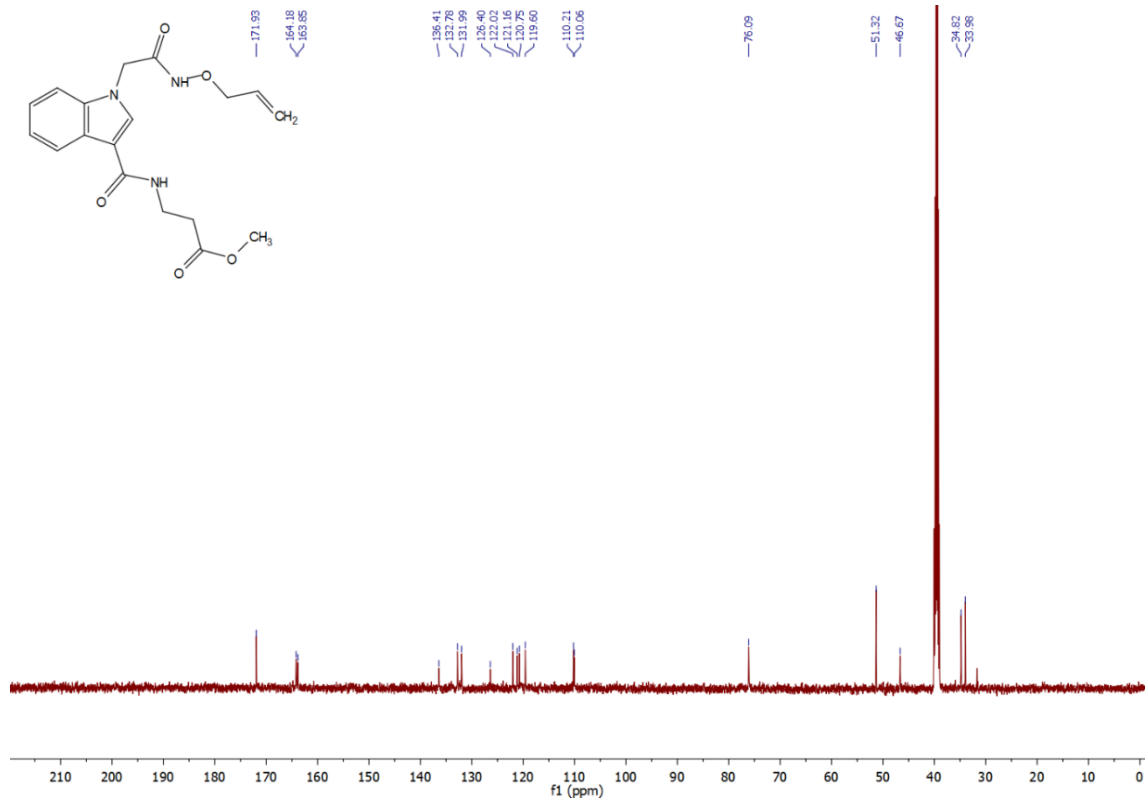
Spektrum 6: ^1H spektrum látky **5b**



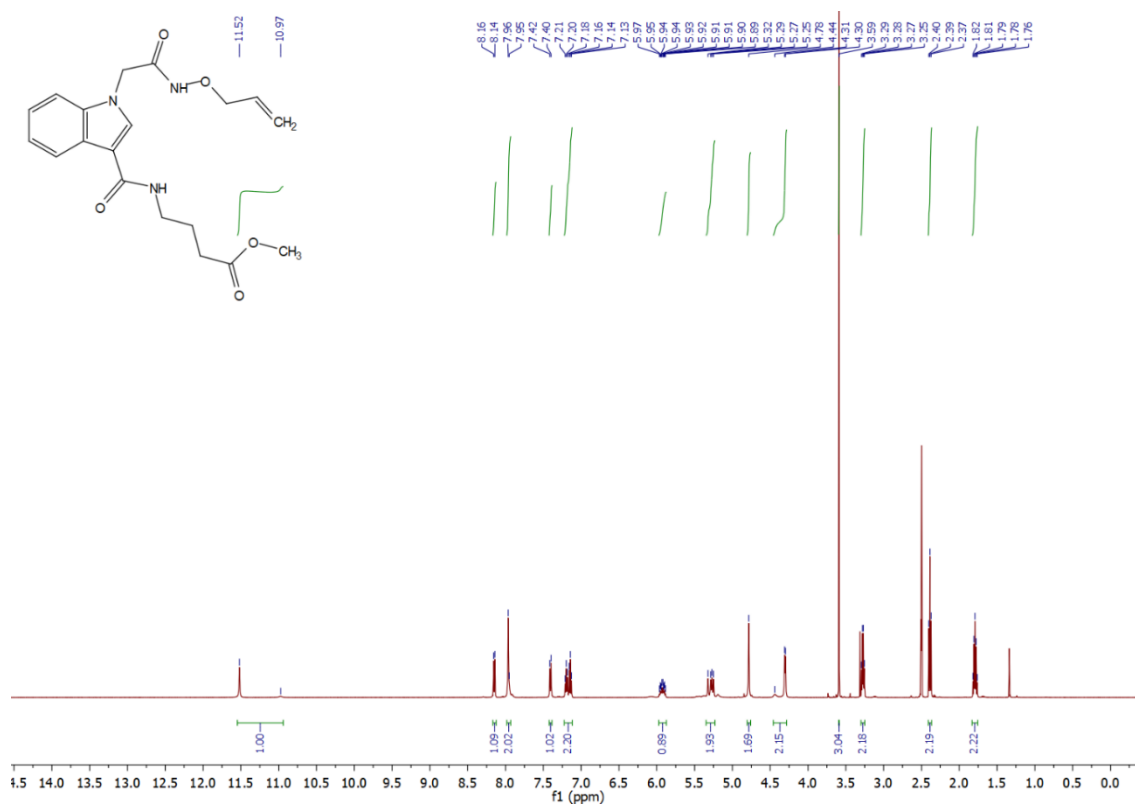
Spektrum 7: ^1H spektrum látky 14a



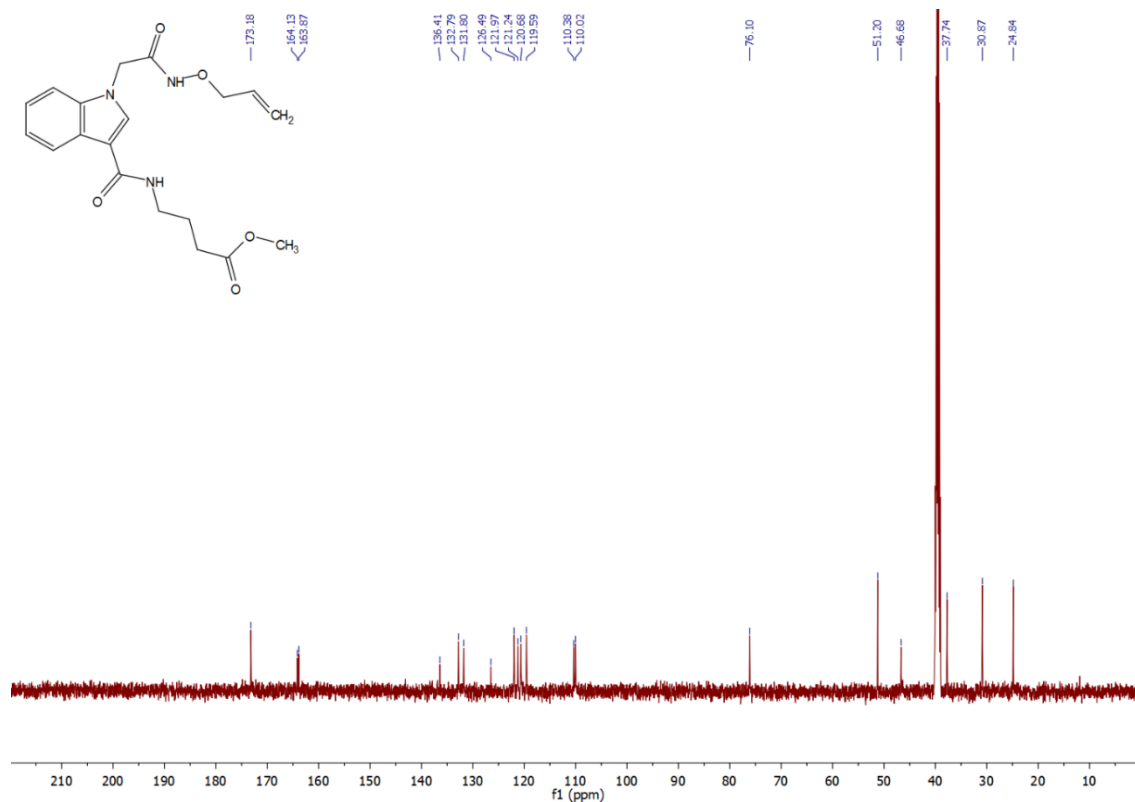
Spektrum 8: ^{13}C spektrum látky 14a



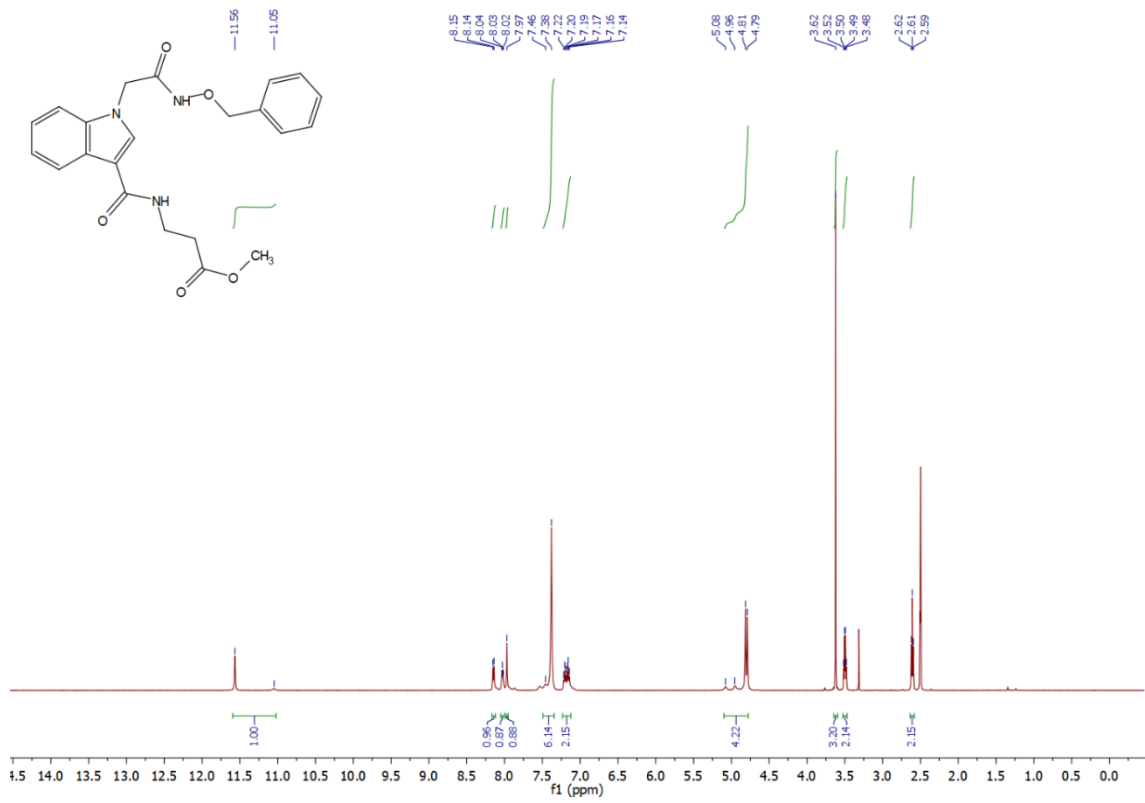
Spektrum 9: ^1H spektrum látky 14b



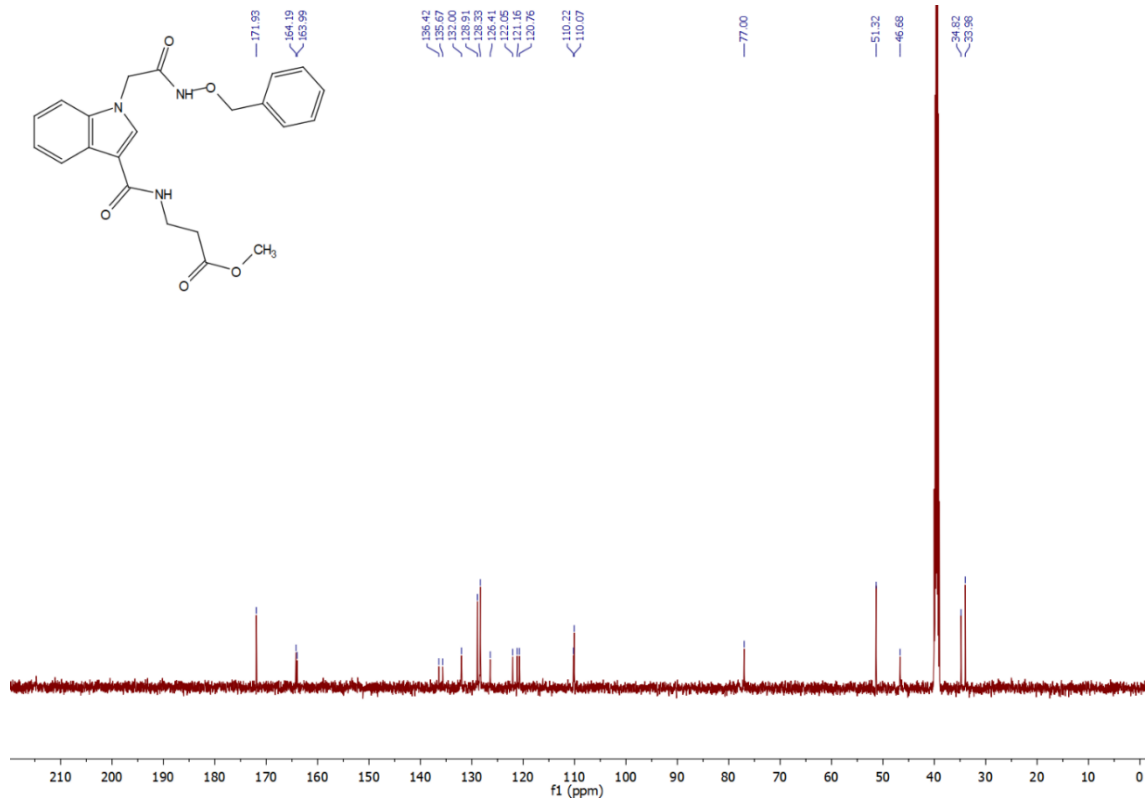
Spektrum 10: ^{13}C spektrum látky 14b



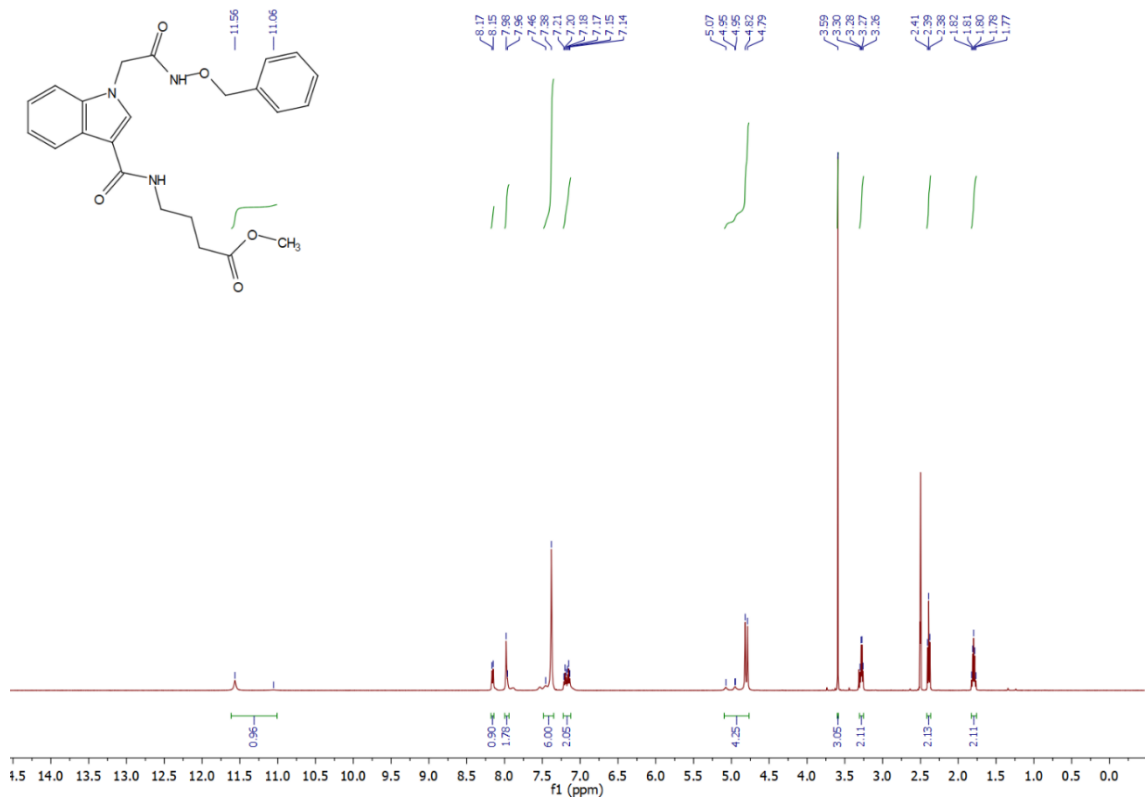
Spektrum 11: ^1H spektrum látky **14c**



Spektrum 12: ^{13}C spektrum látky **14c**



Spektrum 13: ^1H spektrum látky **14d**



Spektrum 14: ^{13}C spektrum látky **14d**

