

UNIVERZITA HRADEC KRÁLOVÉ

Přírodovědecká fakulta

Katedra chemie

**Příprava chirálních 5-substituovaných tryptaminových
derivátů jako potenciálních adjuvans**

Bakalářská práce

Autor: Karolína Knittelová

Studijní program: B1407 Chemie

Studijní obor: Toxikologie a analýza škodlivin

Vedoucí práce: RNDr. Dávid Maliňák, PhD.

UNIVERZITA HRADEC KRÁLOVÉ
Přírodovědecká fakulta
Akademický rok: 2018/2019

ZADÁNÍ BAKALÁŘSKÉ PRÁCE
(PROJEKTU, UMĚLECKÉHO DÍLA, UMĚLECKÉHO VÝKONU)

Jméno a příjmení: **Karolína Knittelová**
Osobní číslo: **S17CH060BP**
Studijní program: **B1407 Chemie**
Studijní obor: **Toxikologie a analýza škodlivin**
Název tématu: **Příprava chirálních 5-substituovaných tryptaminových derivátů jako potenciálních adjuvans**
Zadávající katedra: **Katedra chemie**

Z á s a d y p r o v y p r a c o v á n í :

1. Rešerše syntézy a biologické aktivity sloučenin využívaných jako ligandy TLR8 receptorů popsanych v odborné literatuře.
2. Syntéza, určení struktury a fyzikálně-chemických vlastností nově připravených chirálních 5-substituovaných tryptaminových derivátů, které budou následně poskytnuty na biologické testování jako potenciální agonisté/antagonisté TLR8 receptorů.
3. Sepsání bakalářské práce.

Rozsah grafických prací:

Rozsah pracovní zprávy: **30**

Forma zpracování bakalářské práce: **tištěná/elektronická**

Seznam odborné literatury:

Databáze Reaxys, Chemical abstract, Web of Science, Scopus

Vedoucí bakalářské práce: **RNDr. Dávid Maliňák, Ph.D.**
Katedra chemie

Datum zadání bakalářské práce: **23. září 2017**

Termín odevzdání bakalářské práce: **9. května 2019**

doc. RNDr. Jan Kříž, Ph.D.
děkan

L.S.

doc. PharmDr. Kamil Musílek, Ph.D.
vedoucí katedry

dne

Prohlášení

„Prohlašuji, že jsem bakalářskou práci vypracovala samostatně. Veškeré prameny a zdroje, ze kterých jsem v práci čerpala, jsou uvedeny v seznamu použitých literatury“

V Hradci Králové dne 9.5.2019

Karolína Knittelová

Poděkování

Práce vznikla díky institucionální podpoře Přírodovědecké fakulty Univerzity Hradec Králové.

Velice děkuji vedoucímu bakalářské práce RNDr. Dávidu Maliňákovi, PhD. za metodické vedení práce, cenné poznatky a pomoc při práci v laboratoři a za pomoc při sepisování bakalářské práce. Další poděkování patří RNDr. Miroslavu Psoťkovi, PhD. a Bc. Zuzaně Kohoutové za pomoc při experimentální části práce. Poděkování také patří PharmDr. Adamu Skarkovi, Ph.D. za změření enantiomerní čistoty a PharmDr. Rudolfu Andrýsovi, Ph.D. za měření hmotnostních spekter všech mých produktů a pomoc při měření optických otáčivostí. Poslední poděkování patří doc. PharmDr. Jiřímu Kunešovi, CSc. za měření NMR spekter všech připravených sloučenin.

Anotace

KNITTELOVÁ, Karolína; *Příprava chirálních 5-substituovaných tryptaminových derivátů jako potenciálních adjuvans*; Hradec Králové, 2019. Univerzita Hradec Králové. Přírodovědecká fakulta.

Bakalářská práce je zaměřena na syntézu chirálních 5-substituovaných tryptaminových derivátů, které budou testovány jako potenciální adjuvans. V teoretické části jsou popsány informace o adjuvans, mechanismu imunitní reakce a TLR receptorech. Podrobněji je popsán TLR8 receptor, jeho účinek, agonisté a antagonisté. Praktická část se věnuje syntéze jednotlivých chirálních derivátů a postupu reakce. Sloučeniny jsou charakterizovány pomocí NMR a MS.

Klíčová slova

adjuvans, 5-chlortryptaminové deriváty, 5-methoxytryptaminové deriváty, TLR-7, TLR-8

Anotation

The bachelor thesis is focused on the synthesis of chiral 5-substitued tryptamine derivatives which will be tested as a potential adjuvant. The theoretical part describes the information about adjuvant, mechanism of immune response and TLR receptors. In particular, TLR8 receptor, its effect, agonists and antagonists are described. The practical part deals with the synthesis of individual chiral derivatives and the progress of the reaction. The compounds are characterized by NMR and MS.

Keywords

adjuvants, 5-chlortryptamine derivates, 5-methoxytryptamine derivatives, TLR-7, TLR-8

Obsah	strana
Úvod	10
1. Teoretická část	11
1.1. <i>Adjuvans</i>	11
1.1.1. Druhy adjuvans	12
1.2. <i>Mechanismus imunitní reakce</i>	13
1.3. <i>TLR</i>	14
1.4. <i>TLR 8</i>	16
1.4.1. Přírození agonisté TLR8	18
1.4.2. Syntetický selektivní agonisté TLR8	18
1.4.3. TLR7/TLR8 agonisté	19
1.4.4. Antagonisté TLR7/TLR8	21
2. Design	23
3. Cíle práce	24
4. Výsledky a diskuse	25
5. Experimentální část	32
5.1. <i>Postup přípravy 5-methoxytryptaminových derivátů</i>	33
5.2. <i>Postup přípravy 5-chlortryptaminových derivátů</i>	40
6. Závěr	48
7. Použitá literatura	49

Seznam použitých zkratk

AIDS	syndrom získaného selhání imunity
APC	antigen prezentující buňky
DAD	detektor s diodovým polem
DC	dendritické buňky
DCC	<i>N,N</i> -dicyklohexylkarbodiimid
DCM	dichlormethan
DMF	<i>N,N</i> -dimethylformamid
DIPEA	<i>N,N</i> -diisopropylethylamin
dsRNA	dvou řetězcová ribonukleová kyselina
EA	Ethylacetát
ee	enantiomerní čistota
h	hodina
HATU	1-[Bis(dimethylamino)methylene]- <i>1H</i> -1,2,3-triazolo[4,5- <i>b</i>]pyridinium 3-oxid hexafluorofosfát
HAV	virus hepatitidy A
HBV	virus hepatitidy B
HIB	Haemophilus influenzae typu B
HOBt	hydroxybenzotriazol
HPV	lidský papilomavirus
hTLR	lidský toll-like receptor
IFN	interferon
IL	interleukin

LPS	lipopolysacharid
l.t.	laboratorní teplota
MHC	hlavní histokompatibilní komplex
MF	mobilní fáze
MS	hmotnostní spektroskopie
NF- κ B	nukleární faktor κ B
NK	přirozený zabíječ
NMR	nukleární magnetická rezonance
PAMP	struktury asociované s patogenitou
PRR	vzor rozpoznávající receptor
R_f	retenční faktor
SLE	systemový lupus erythematoses
S_NAc	nukleofilní acylová substituce
ssRNA	jedno řetězcová ribonukleová kyselina
Th	T pomocné buňky
TIR	toll/interleukin-1 receptor
TLC	tenkovrstvá chromatografie
TLR	toll-like receptor
TNF	tumor nekrotizující faktor

Úvod

S rozvojem medicíny a farmacie a celkovému vědeckému pokroku se vědci snaží po celém světě o zkvalitnění lidského života. Cílem medicíny a imunologie je podpora zdraví člověka. Cílem je i prevence, pomocí dostatečného stimulování vrozeného imunitního systému, vytvořit v těle silnou zásobu protilátek, která zabrání propuknutí nemoci. Právě očkování byla vyvinuta, aby lidský imunitní systém získal potřebné protilátky proti různým onemocněním, bez rizik spojených s plným propuknutím nemoci.

Historicky první adjuvans byly sloučeniny s hliníkem, konkrétně různé hliníkové soli. Bylo zjištěno, že v těle způsobují kaskádu zánětlivých reakcí, které podporují stimulaci imunitního systému a s tím spojenou tvorbu protilátek. První vakcíny obsahovaly atenuované viry či usmrcené bakterie, které v některých případech přítomnosti adjuvans nepotřebovaly. S moderní dobou a kvalitním přístrojovým vybavením dochází k větší čistotě vakcín a snížení nebezpečnosti antigenů, s tím je ale také spojená menší reakce imunitního systému na podaný antigen. K tomuto účelu byla právě vyvinuta adjuvans, které „uměle“ spouštějí tělu přirozené imunitní odpovědi. Díky adjuvans mohou být vakcíny podávány i lidem, kteří jsou imunologicky nezralí (např. malé děti) či oslabení (naopak lidé staří), a pro které by prodělání samotného onemocnění přinášelo velké zdravotní riziko. Moderní adjuvans cílí na skupinu TLR receptorů, které v těle spouštějí vrozené imunitní odpovědi.

Do budoucna se s výzkumem adjuvans mohou vyvinout nové vakcíny proti nejrůznějším nemocem. Ambiciózním cílem je připravit očkování proti smrtelným nemocem, například proti rakovině či nemoci AIDS. Již v dnešní době známe vakcínu proti rakovině děložního čípku, která pacientovi poskytuje imunitu proti HPV virům.

Praktickým cílem bakalářské práce je připravit dvacet chirálních tryptaminových derivátů substituovaných v poloze C5 pomocí nukleofilní acylové substituce, reakcí C5 substituovaného tryptaminu s chirální kyselinou, které budou poskytnuty na biologické *in vitro* testování jako potenciální adjuvans.

1. Teoretická část

1.1. Adjuvans

Adjuvans je skupina sloučenin, anorganického i organického původu, které jsou součástí očkování. Přestože vlastní imunitní odpověď v očkováních vyvolává obsažený antigen, jeho imunogenicita nemusí být dostatečně silná. Hlavní důvod použití adjuvans ve vakcínách je právě potřeba zvýšit imunogenicitu antigenů, které nejsou schopny vyvolat dostatečnou imunitní odpověď samy o sobě [1].

Živé oslabené vakcíny (atenuované) přítomnost adjuvans v některých případech nepotřebují, protože vyvolávají v lidském těle přirozenou reakci na infekci. Naproti tomu většina inaktivovaných vakcín obsah pomocných látek ve formě adjuvans vyžaduje, protože procesem inaktivace byla patogenní vlastnost mikroorganismu, která je odpovědná za vyvolání imunitní odpovědi, odstraněna [2].

Pomocné látky mají například za následek [3]:

- Zvýšení rychlosti a trvání imunitní odpovědi
- Zvyšují imunogenicitu slabých antigenů
- Ovlivňují vznik protilátky, její specificitu, rozdělení izotypu nebo podtřídy
- Stimulují buňkami zprostředkovanou imunitu, podporují slizniční imunitu
- Vyvolávají imunitní odpověď u imunologicky nezralých nebo oslabených jedinců
- Snížení dávky antigenu ve vakcíně a snížení nákladů
- Pomáhají překonat konkurenci antigenů u kombinovaných vakcín.

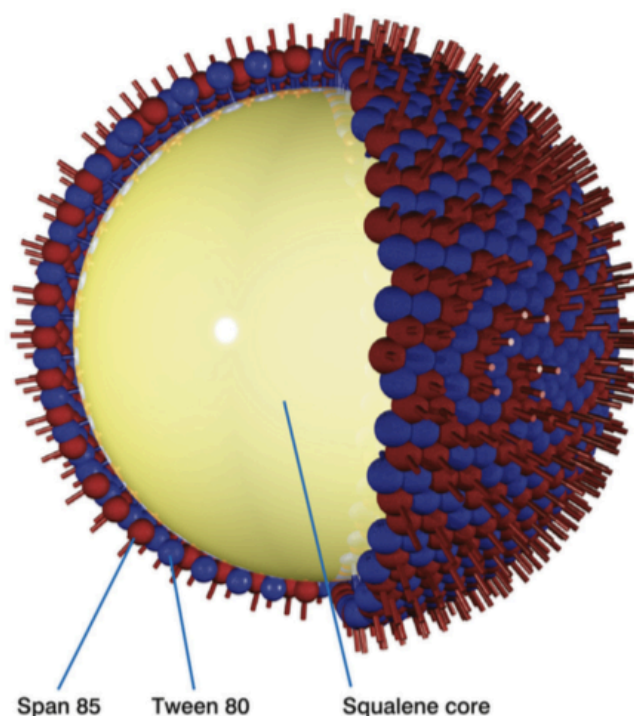
Adjuvans byla původně navržena pro použití na zvířatech, aby se zvýšil výtěžek sérových protilátek na výrobu antitoxinů [2]. V lidských vakcínách se adjuvans poprvé objevují ve 20. letech 20. století. V roce 1926 Alexander Glenny představil první vakcínu s adjuvans, díky vysrážení antigenu způsobující záškrt na částice síranu hlinito-draselného [2]. Vakcíny připravované v dnešní době obsahují vysoce čisté antigeny. S vyšší čistotou se ještě více snižuje schopnost antigenu spouštět přirozenou imunitní

reakci. Klasické soli hliníku nejsou vždy schopny vyvolat požadovanou imunitní odpověď, a je zapotřebí vyvíjet složitější adjuvans [2]. Ačkoli hlinité soli byly používány jako adjuvans po mnoho let, jejich mechanismus působení není přesně definován. Mechanismus účinku většiny adjuvans je stále předmětem studií a to brání dalšímu vývoji nových adjuvans. Imunizace často aktivuje komplexní kaskádu odpovědi a účinek adjuvans je často obtížně jasně rozlišován *in vivo*. [3].

1.1.1. Druhy adjuvans

Nejdéle používané adjuvans jsou sloučeniny s hliníkem. Je to zároveň nejrozšířenější adjuvans - nachází se v četných vakcínách, které se dodnes používají, včetně HAV, HBV, HPV, záškrtu a tetanu, konjugovaných vakcín proti *Haemophilus influenzae* typu B (HIB) a pneumokoků [4]. Obecně přítomnost hlinitých solí zvyšuje prozánětlivou reakci tkáně na podanou vakcínu a vychytávání antigenu. Nicméně preklinické a klinické studie ukázaly, že jsou méně účinné, než například emulze olej ve vodě [4]. Hliníkové soli mají totiž malý účinek na imunitní odpovědi typu Th-1 nebo cytotoxické T-buňky, které jsou důležité pro obranu proti intracelulárním patogenům. [2].

Emulze je směs dvou kapalin, které se navzájem nemísí. Jejich mísení je stabilizováno amfifilními molekulami označovanými jako emulgátory nebo povrchově aktivní látky [2]. Mohou být dvojího typu - voda v oleji nebo olej ve vodě. Pro použití v adjuvans se více osvědčila kombinace olej ve vodě. Příkladem takové pomocné látky je MF59 (Obrázek 1). MF59 je emulze typu olej ve vodě složená z 5% objemových skvalenu, 0,5% obj. polysorbátu 80 (Tween 80) a 0,5% obj. sorbitan trioleátu (Span 85) [5]. Vakcíny s tímto druhem adjuvans jsou používány proti sezonní chřipce. MF59 indukuje shluk a aktivaci antigen prezentujících buněk (APC) vedoucí k zánětlivých reakcím [2].



Obrázek 1 - Struktura MF59 [2]

Moderní adjuvans jsou založené na cílení dráhy toll-like receptorů (TLR). Objev TLR jako klíčových patogenních senzorů, které ovlivňují hostitelské vrozené a adaptivní imunitní systémy, vyvolal zájem o využití této cesty k vývoji potenciálních nových pomocných a terapeutických látek [4]. Příkladem adjuvans, které působí na jeden z druhů TLR receptorů je AS04. Jedná se o kombinované adjuvans, jejíž základem je lipopolysacharidový derivát, monofosforyl lipid A a hlinitá sůl [2]. Právě monofosforyl lipid A působí na TLR-4 jako agonista. Stimulace TLR-4 receptorů vede k uvolnění cytokinu, které zase zvyšují adaptivní imunitní odpověď stimulováním dozrávání Th buněk, zejména Th1 [2]. Tato reakce vede k požadovanému zlepšení imunitní odpovědi organismu. Vakcína obsahující AS04 je schválena pro použití proti HPV a HBV [4].

1.2. Mechanismus imunitní reakce

Zahájení imunitní odpovědi vakcinací se opírá o vrozené imunitní buňky a zprostředkovává se z velké části neutrofily a makrofágy [3]. Tyto buňky vznikají

z myeloidní vývojové větve krvetvorby. Nespecificky se na imunitě podílejí schopností fagocytovat [6].

Protože se jedná o děj nespecifický, musí buňky schopné fagocytovat umět rozpoznávat tělu vlastní přirozené buňky oproti potenciálně nebezpečným. Byly nalezeny nové mechanismy, které fagocyty používají k tomuto rozeznávání. Jedná se o skupinu receptorů PRR (vzor rozpoznávající receptor), které rozpoznávají PAMP (struktury asociované s patogenitou) a umožňují jim rozlišovat mezi různými širokými typy organismů, jako jsou bakterie, viry a paraziti [2]. PAMP jsou různé složky mikrobiálních těl (lipopolysacharidy bakterií nebo určité posloupnosti bází DNA typické pro bakterie) [6]. Mezi nejvíce prozkoumané PRR patří TLR. Objev PRR, PAMP a TLR a rozpoznání vazby mezi vrozenou a adaptivní imunitou přispělo k vývoji nových adjuvans [2].

Signály přijaté APC silně ovlivňují výsledné odpovědi od T- a B-lymfocytů, povahu odezvy T-buněk a vznik paměťových buněk. Nejdůležitějšími APC jsou dendritické buňky (DC), které ve svém nezralém stavu působí jako "sentinely" a cirkulují v periferních tkáních [3]. Obecně se dá říci, že adjuvans působí na imunitní obranné mechanismy přítomné v patogenních látkách pomocí interakce s APC a stimulováním vhodných imunitních odpovědí [2].

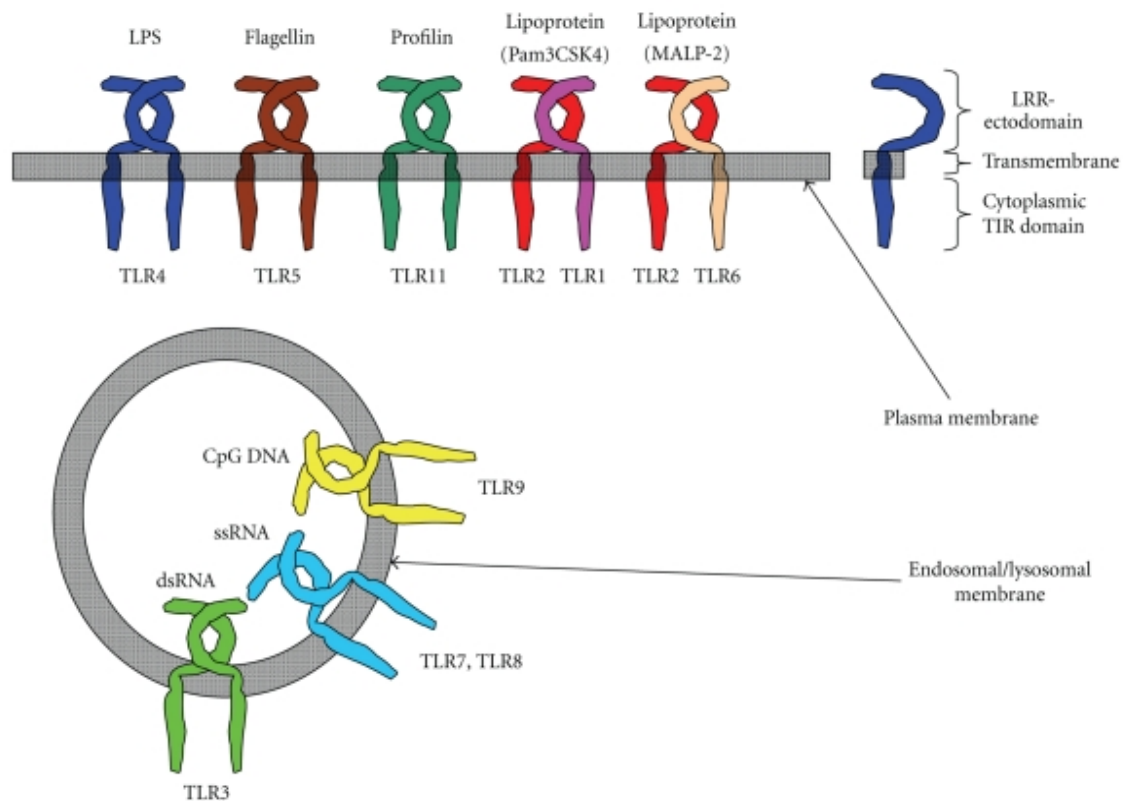
1.3. TLR

Toll-like receptory (TLR) patří do skupiny receptorů pro rozpoznávání vzorů (PRR), které rozpoznávají PAMP a slouží jako primární senzory vrozeného imunitního systému. Poprvé byli rozpoznáni při studiu obranyschopnosti mušky octomilky (*Drosophila melanogaster*). Na buňkách hemolymfy těchto mušek byla objevena skupina receptorů, které reagují se složkami těl mikrobů. Později byly velmi podobné receptory (TLR) objeveny i na buňkách imunitního systému savců [6]. Jeden rok po objevení receptoru v *Drosophile* byl popsán první savčí TLR. Tento receptor je nyní znám jako TLR4 [7].

TLR jsou transmembránové glykoproteiny typu I, které mají v savčí variantě délku 700-1100 aminokyselin. Jsou charakterizovány extracelulární doménou obsahující opakování bohaté na leucin a intracelulární doménu, která obsahuje oblast nazývanou doménou receptoru Toll / IL-1 (TIR) a transmembránovou doménou. Opakování bohaté

na leucin se nacházejí jak v cytoplazmatických, tak transmembránových proteinech a podílejí se na rozpoznávání ligandu, páskování a signální transdukci [7].

Dosud bylo identifikováno deset různých lidských typů TLR receptorů. Receptory TLR mají buňky jak na povrchu plasmatické membrány, tak na membránách organel uvnitř buňky, umějí tak rozeznávat extracelulární i intracelulární patogeny [6]. Každý receptor má svůj jedinečný typ ligandu, které jsou úzce spojeny s mikrobiálními molekulami. Jsou to například LPS (rozpoznávané TLR4), lipopeptidy (TLR2 v kombinaci s TLR1 nebo TLR6), flagellin (TLR5), jedno řetězcová RNA (TLR7 a TLR8), dvou řetězcová RNA (TLR3), DNA obsahující motiv CpG (rozpoznávanou TLR9) a profilin přítomný u uropatogenních bakterií (TLR 11) [8]. TLR1, TLR2, TLR4, TLR5, TLR6 a TLR11 jsou lokalizovány na povrchu buněk na rozpoznávání PAMP. Na druhou stranu TLR3, TLR7, TLR8 a TLR9 jsou exprimovány intracelulárně (například na endoplazmatickém retikulu) (Obrázek 2) [9].



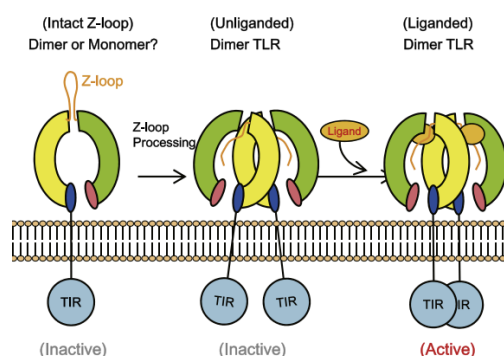
Obrázek 2 - Přehled extracelulárních a intracelulárních TLR [9]

Aktivace TLR pomocí jejich ligandů vede k produkci zánětlivých cytokinů, aktivaci MHC a NK, ovlivňuje se činnost APC. Tyto odpovědi spadají pod vrozenou imunitu. Cílením a amplifikováním efektorových funkcí T- a B-buněk pomocí aktivace TLR, je ovlivňována adaptivní imunitní odpověď. Stimulace TLR tedy slouží k propojení vrozené a adaptivní imunity a molekuly působící jako agonisté mohou proto být využívány jako silné adjuvans při vyvolávání imunitní odpovědi [8].

1.4. TLR 8

TLR8, podobně jako TLR7, TLR3 a TLR9, je lokalizován uvnitř buňky - intracelulárně na endosomální membráně (či lysozomální). TLR7 a TLR8 jsou umístěny v chromozómu X a jsou si fylogeneticky podobné. TLR8 je primárně exprimován v monocitech nebo v makrofágu a myeloidních dendritických buňkách. TLR8 doprovází TLR7 při rozpoznávání jeho ligandů [7]. TLR8 je strukturálně úzce souvislý s TLR7, s kterým sdílí stejné nativní ligandy, ale liší se v reakci na stejné látky [1].

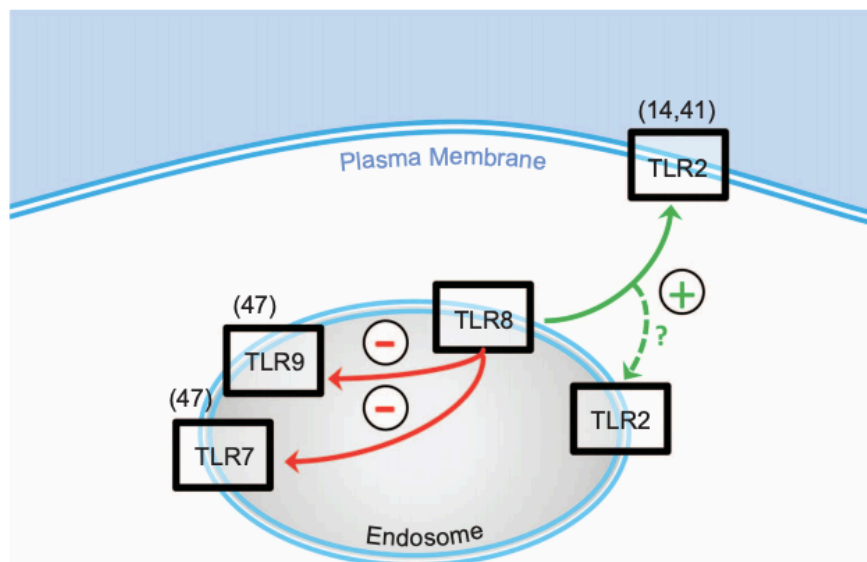
Až do nedávné doby bylo vedeno málo výzkumů na TLR8, protože se u myši předpokládalo, že je neaktivní. Některé studie však nyní ukazují roli TLR8 při produkci Interferonu typu 1 v reakci na virové infekce [7]. TLR8 (a s receptorem úzce propojený TLR7) jsou schopny rozpoznávat jednoduché jednovláknové RNA a krátké dvouřetězcové RNA. TLR7 a TLR8 mohou také detekovat oligoribonukleotidy a různé syntetické chemické látky jakožto jejich agonisty [10]. Agonisté TLR8 jsou nyní považováni za potenciální cíle pro vakcíny a rakovinové terapie vzhledem k jejich schopnosti aktivních zánětlivých imunitních odpovědí. TLR8 je schopen rozpoznat bakteriální RNA uvolněnou uvnitř fagosomů. Tato cesta zvyšuje regulaci tvorby mnoha zánětlivých cytokinů [7].



Obrázek 3 - Aktivace TLR8 - tvorba dimeru a vazba ligandu [12]

Aktivace TLR8 je doprovázena dimerizací (Obrázek 3). Podobně jako je tomu u receptorů TLR3, TLR1 a TLR2, dimerizace je důležitá k propojení endosomální TIR domény [1]. Syntetický agonisté váží dimer TLR8 ve dvou symetrických pozicích, což vyvolává přeuspořádání konfigurace, čímž se mění blízkost C-konců TLR8, a díky tomu i stabilita dimeru [11]. Po navázání agonistických ligandů se dimer TLR8 podrobí velkému strukturálnímu přesmyku, čímž molekula ligandu pronikne do dimerizačního rozhraní. Následně jsou vzájemné interakce narušeny a zcela reorganizovány tak, že C-konce jsou přivedeny do těsné blízkosti. Tato strukturální změna umožňuje dimerizaci intracelulárních TIR domén a následné získání adaptorových proteinů k iniciování signalizačních kaskád [12].

Zajímavostí endosomálních TLR je schopnost jejich vzájemné komunikace s ostatními TLR. Nové výzkumy ukázaly, že reakce na virové a bakteriální patogeny nejsou závislé na aktivaci jednotlivých TLR, ale na komplexní interakci TLR-TLR. Například stimulace monocytů a dendritických buněk probíhá současně se stimulací TLR8. Exprese TLR2 se zvyšuje po aktivaci TLR8, a naopak se inhibuje aktivita TLR7 a TLR9 (Obrázek 4). Všechno toto naznačuje přínosy použití agonistů TLR8 (či smíšených TLR7/TLR8) jako potenciálních adjuvans [10].



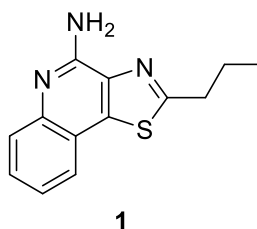
Obrázek 4 - Regulační efekt TLR8 - aktivace TLR2 a inhibice TLR9 a TLR7 [10]

1.4.1. Přirození agonisté TLR8

TLR8 sdílí stejný přirozený ligand jako receptor TLR7, a to jedno řetězcovou RNA (ssRNA). Ačkoli sekvenční specifické rozpoznání RNA pomocí TLR7 a TLR8 dosud nebylo zcela objasněno, byly nalezeny některé sekvenční preference: například ssRNA obsahující GU-bohaté oblasti (úseky bohaté na báze guanin a uracil) je silný agonista jak pro TLR8, tak pro TLR7 [12]. Dále bylo prokázáno, že TLR8 selektivně detekuje ssRNA, zatímco TLR7 primárně detekuje krátké úseky dvou řetězcové RNA (dsRNA), ale může také zareagovat na oligonukleotidy ssRNA [13].

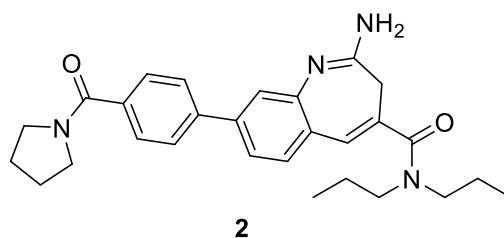
1.4.2. Syntetický selektivní agonisté TLR8

Díky fylogenetické a strukturní podobnosti TLR7 s TLR8 existuje velmi malé množství agonistů pouze pro receptor TLR8. TLR7-selektivní agonisté byli při indukci různých druhů interferonů (IFN) více účinní než selektivní agonisté TLR8. Naproti tomu, agonisté TLR8 více indukují důležité prozánětlivé cytokiny včetně TNF nebo IL-12 [8]. Je popsána thiazolochinolinová sloučenina jakožto čistý agonista TLR8. Jedná se o sloučeninu 3M-002/CL075, chemickým názvem 2-propylthiazol[4,5-*c*]chinolin-4-amin (**1**) (Obrázek 5) [8].



Obrázek 5 - TLR8 agonista – 3M002/CL075 (**1**)

Agonismus sloučenin na TLR8 nemusí být používán pouze za účelem potenciálního adjuvans. Poměrně nový stimulant TLR8 se zkratkou VTX-2337 a názvem motolimod (**2**) (Obrázek 6) je zkoumán pro svůj terapeutický potenciál při léčbě rakoviny. Cílem při podání VTX-2337 je vyvolat imunitní reakci na nádor a zlepšit odpovědi při klinicky schválených terapiích za pomoci monoklonálních protilátek a to především u pacientů se sníženou, na protilátce závislou, cytotoxickou aktivitou zprostředkovanou buňkami [10].



Obrázek 6 - Motolimod / VTX-2337 (2)

Další agonista TLR8 je v současné době ve vývoji jako potenciální terapeutický prostředek v léčbě alergické rhinitidy. Jedná se o sloučeninu se zkratkou VTX-1463. Jeho účinek je založen na indukci zánětlivých mediátorů jako je IL-12, IFN a různé monocyty. Aktivací TLR8 dojde ke stimulaci APC a potenciální změnou bilance Th1/Th2 ve prospěch snížení alergické reakce [10]. Jednorázová dávka VTX-1463, která byla podávána 24 hodin před vyvoláním alergenu, zeslabila odezvu zánětlivého mediátoru. Stimulace TLR8 pomocí VTX-1463 je užitečná při podávání před expozicí alergenem, ale vzhledem k poměrně rychlému nástupu účinku může být agonismus TLR8 užitečný jako doplněk symptomatické léčby alergické rhinitidy. [14]

Čistí TLR8 agonisté jsou pravděpodobně jedineční ve své schopnosti velmi silně indukovat produkci prozánětlivých cytokinů. Předpokládá se, že tato vlastnost souvisí se schopností cesty TLR8 silně indukovat intracelulární signalizaci zprostředkovanou jinými TLR. Potenciálním problémem se silnými prozánětlivými molekulami je jejich lokální nebo systémová toxicita [8].

1.4.3. TLR7/TLR8 agonisté

Přirozený ligand pro TLR7 je ssRNA, stejně jako pro TLR8. Díky své fylogenetické a strukturní podobnosti je možné najít smíšené agonisty, kteří působí jak na TLR7 tak na TLR8.

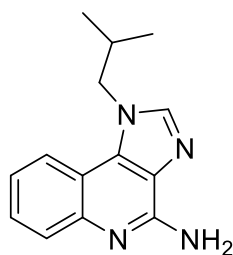
Schopnost TLR7 a TLR8 agonistů podnítit imunitní reakci ve stylu odpovědi Th1 je pravděpodobně multifaktoriální. Prvním faktorem je fakt, že TLR7 je exprimován převážně na B-buňkách produkující vysoké hladiny IFN typu I. Naproti tomu TLR8 je exprimován na monocytech (případně makrofágách), které produkují vysoké hladiny IL-12 a TNF, o nichž je známo, že zvyšují imunitu Th1. Dalším faktorem přispívajícím

pro působení agonistů TLR7/TLR8 je to, že aktivují různé transkripční faktory ve srovnání s jinými agonisty TLR, včetně nejen nukleárního faktoru- κ B (NF- κ B), ale i interferonového regulačního faktoru [8, 15].

Pro použití jako adjuvans byli vyvinuty agonisté TLR7-selektivní, TLR8-selektivní a TLR7/TLR8. Potenciální výhodou použití dvojitých agonistů TLR7/TLR8 je to, že jak plasmacytoidní tak myeloidní dendritické buňky (DC) jsou široce aktivovány, což vede k výraznější aktivaci NK buněk, stimulaci Th1 a inhibici Th2 odpovědi ve srovnání s použitím selektivního agonisty vůči TLR7 [15].

Jako agonisté působí na TLR7/TLR8 malé sloučeniny, které jsou deriváty imidazochinolinu. Mezi tyto deriváty se řadí imiquimod (R837) (3), který je často zařazován jako TLR7-selektivní a sloučeniny resiquimod (R848) (4) a CL097 (5), které jsou účinné dvojitě na TLR7/TLR8 [12].

Imiquimod (R837) (3), chemickým názvem 1-isobutyl-1*H*-imidazo[4,5-*c*]chinolin-4-amin (Obrázek 7), inhibuje produkci Th2 cytokinů pomocí IFN. Na několika zvířecích modelech bylo zjištěno že imiquimod inhibuje eozinofilii způsobenou virem nebo antigenem [16]. Imiquimod byl schválen pro lokální léčbu infekcí HPV spolu s dalšími virovými a onkologickými terapiemi včetně genitálních bradavic, prekancerózní aktinické keratózy a bazocelulárních karcinomů [17].



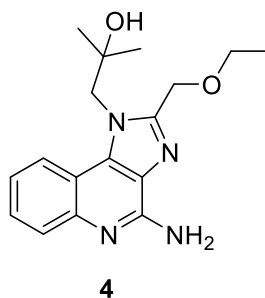
3

Obrázek 7 - Imiquimod (3)

Příkladem dalších selektivních agonistů na TLR7 je guanosinový derivát loxoribin a pyrimidinový derivát brompirimin [12].

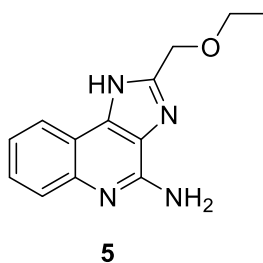
Resiquimod (R848) (4) je chemickým názvem 1-(4-Amino-2-(ethoxymethyl)-1*H*-imidazo[4,5-*c*]chinolin-1-yl)-2-methylpropan-2-ol (Obrázek 8). Studie ukazují, že TLR7 a TLR8 mohou nezávisle rozpoznávat stejnou imidazochinolinovou sloučeninu

R-848. Byla však pozorována rozdílná odpověď v závislosti na podané koncentraci agonisty [18]. Resiquimod indukuje endogenní produkci IFN, IL-12, TNF a dalších cytokinů z mononukleárních buněk, monocytů a DC. Ve srovnání s imiquimodem je více účinný v indukci cytokinů *in vitro* i *in vivo* [19].



Obrázek 8 - Resiquimod (4)

Sloučenina CL097 (5) je chemickým názvem 2-(ethoxymethyl)-1*H*-imidazo[4,5-*c*]chinolin-4amin (Obrázek 9) a strukturně je velmi podobná resiquimodu. Působí jako smíšený agonista TLR7/TLR8 [12].

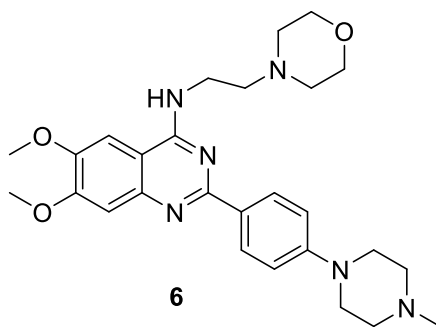


Obrázek 9 - CL097 (5)

1.4.4. Antagonisté TLR7/TLR8

Zkoumání antagonistů je spojeno s onemocněním systémový lupus erythematosus (SLE). SLE je autoimunitní onemocnění, které může postihnout téměř jakýkoli orgánový systém. Onemocnění je charakterizováno produkcí autoprotilátek specifických pro různé autoantigeny, včetně nukleových kyselin, chromatinu a ribonukleoproteinů [12]. Komplexy produkující protilátky, jsou inhibovány po terapii DNAasou nebo RNAasou [17].

Studie naznačují, že inhibice imunitní odpovědi zprostředkované TLR7, TLR8 a TLR9 může být příslibem pro léčbu SLE, proto byli antagonisté TLR7 a TLR8 navrženy jako nové terapeutické cíle pro léčbu lupusu [12]. Antimalarické léky, jako je chlorochin a hydroxychlorochin, jsou účinné v SLE a jsou antagonisty receptorů TLR7, TLR8 a TLR9 v submikromolárním rozmezí *in vitro*. Nejpokročilejším antimalarickým antagonistou je perorálně dostupný antagonist TLR7/8/9 CPG 52364 (6) (Obrázek 10) [17].

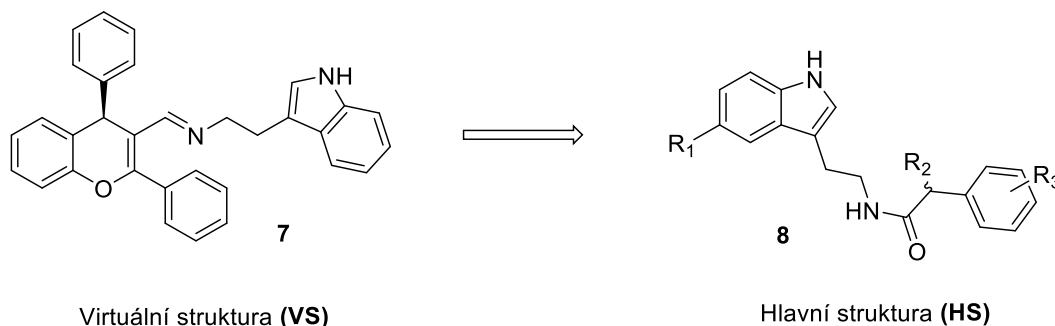


Obrázek 10 - CPG 52364 (6)

2. Design

Pro syntézu sloučenin, které by mohly být použity jako potenciální modulátory lidských TLR, se využívá virtuální vysokorychlostní skenování pomocí superpočítače. Při hledání modulátorů lidského toll-like receptoru 4 (hTLR4) byla využita virtuální knihovna. Jako zdroj velkého počtu ligandů byla použita databáze ZINC. Z databáze ZINC byla náhodně vybrána podtřída ligandů podobných léčivům působící na hTLR4 obsahující různých 130 000 chemických struktur. Použitím známých agonistů a antagonistů TLR4 jako strukturních templátů bylo vybráno 9700 různorodých sloučenin z výchozí ligandové databáze [20]. V *in silico* testování vykazovala struktura **VS** („virtuální screening“) (**7**) nejsilnější vazebnou energii na hTLR4. Struktura **VS** je komerčně dostupná, a přestože *in silico* vykazuje slibné výsledky, je ve vodě velice špatně rozpustná, a proto je potřeba strukturní optimalizace, aby se dosáhlo lepších farmakologických vlastností [20].

Racionálně bylo navrženo, že na rozdíl od struktury **VS** bude **HS** („hlavní struktura“) (**8**) obsahovat chirální centrum (Obrázek 11). Takto vznikla **HS** pro syntézu chirálních tryptaminových derivátů. 10 různých chirálních derivátů tryptaminu bylo již syntetizováno [21]. V této práci bylo navrženo, že **HS** bude substituována v poloze 5 chlorem či methoxyskupinou. Výsledné sloučeniny budou *in vitro* biologicky testovány, projdou počítačovým screeningem a bude zkoumán vliv geometrie na chirálním centru v interakci na hTLR8, ale také na dalších typech TLR receptorů.



Obrázek 11 - Struktura virtuálního screeningu (VS) a předlohová struktura (HS)

3. Cíle práce

Cílem bakalářské práce je připravit deset různých chirálních derivátů 5-methoxytryptaminu (**9**) a deset chirálních derivátů 5-chlortryptaminu (**10**) reakcí s příslušnými kyselinami (Schéma 1). Reakce bude probíhat mechanismem nukleofilní acylové substituce (S_NAc) a produktem budou chirální amidy. Všechny sloučeniny budou připravené ve formách (*S*-) a (*R*-) izomerů. Připravené deriváty poté budou biologicky *in vitro* testovány jako potenciální adjuvans.

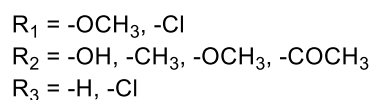
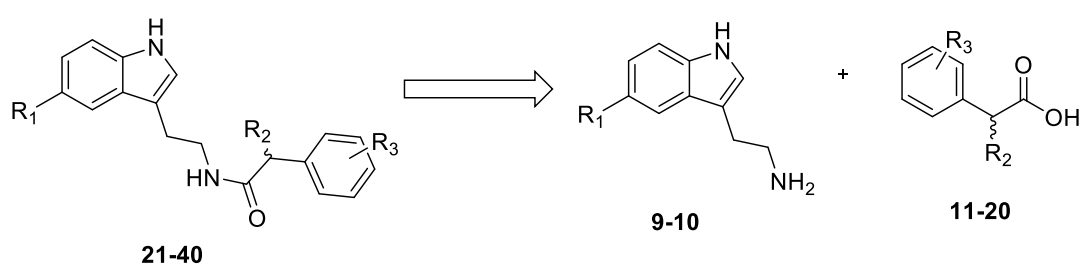


Schéma 1 - Retrosyntéza 5-substituovaných chirálních tryptaminových derivátů

4. Výsledky a diskuse

Pro syntézu byly použité jako výchozí látky chirální kyseliny: (*S*)-mandlová kyselina (**11**), (*R*)-mandlová kyselina (**12**), (*S*)-2-fenylpropanová kyselina (**13**), (*R*)-2-fenylpropanová kyselina (**14**), (*S*)-2-methoxy-2-fenylethanová kyselina (**15**), (*R*)-2-methoxy-2-fenylethanová kyselina (**16**), (*S*)-2-acetyl-2-fenylethanová kyselina (**17**), (*R*)-2-acetyl-2-fenylethanová kyselina (**18**), (*S*)-2-(2-chlorfenyl)-2-hydroxyethanová kyselina (**19**), (*R*)-2-(2-chlorfenyl)-2-hydroxyethanová kyselina (**20**) (Schéma 2).

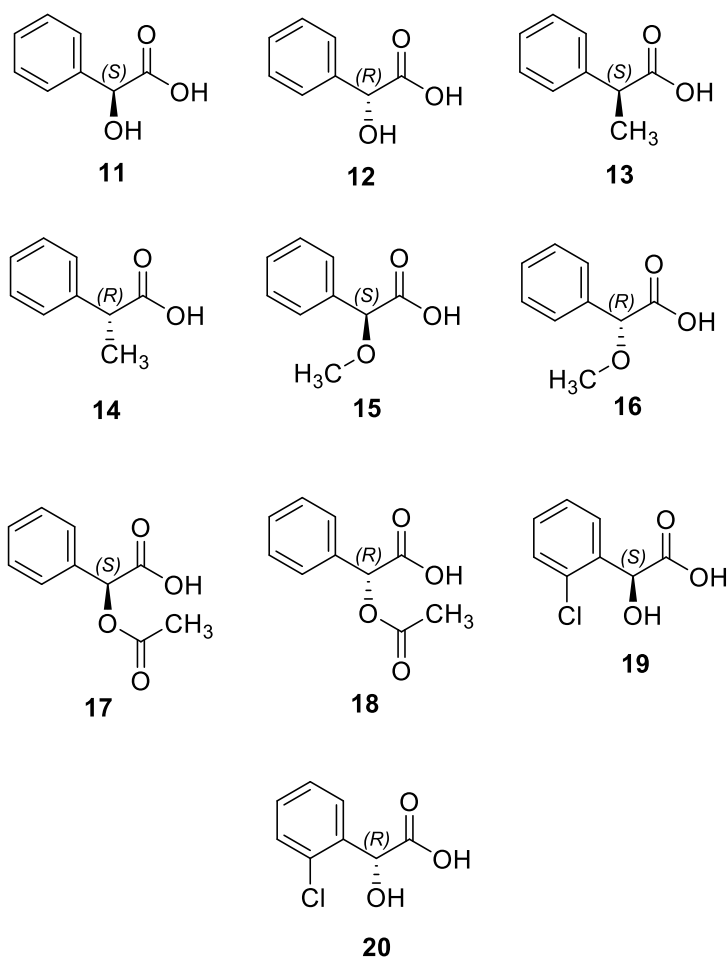


Schéma 2 - Přehled chirálních kyselin 11-20

Dále na tvorbu produktů byly také použity sloučeniny 5-methoxytryptamin (**9**) a 5-chlortryptamin (**10**). Dalšími použitými reakčními činidly byly *N,N*-dicyklohexylkarbodiimid (DCC) (**41**), hydroxybenzotriazol (HOBt) (**42**) a 1-

[Bis(dimethylamino)methylene]-*1H*-1,2,3-triazolo[4,5-*b*]pyridinium 3-oxid hexafluorofosfát (HATU) (**45**). Jako rozpouštědlo byl použit *N,N*-dimethylformamid (DMF). V reakcích pro přípravu 5-chlortryptaminových derivátů byl navíc použit *N,N*-diisopropylethylamin (DIPEA) jako báze, protože jako výchozí látka byl používán komerčně dostupný 5-chlortryptamin hydrochlorid.

Výchozí látkou pro syntézu derivátů 5-methoxytryptaminu byla vždy jedna z chirálních kyselin **11-20**, která byla rozpuštěna v DMF (Schéma 3). Po přidání DCC (**41**) a HOBt (**42**) vzniká z kyseliny aktivní ester **43**, který reakcí s amino skupinou 5-methoxytryptaminu poskytuje příslušné amidy **21-30**. Reakce probíhá mechanismem S_NAc, který je znázorněný ve Schématu 4. Hydroxylová skupina kyseliny nukleofilně napadá uhlík DCC, tím vzniká intermediát kyseliny s DCC. Karbonylový uhlík intermediátu v hybridizaci sp² následně podléhá nukleofilnímu ataku hydroxylové skupiny HOBt za vzniku aktivního esteru **43** a dicyklohexylmočoviny (**44**). Karbonylový uhlík aktivního esteru je nukleofilně atakován aminoskupinou 5-methoxytryptaminu. Dochází k S_NAc za vzniku příslušných amidů. Směs se nechala míchat 24 hodin při dusíkové atmosféře a laboratorní teplotě. Surová směs byla po reakci znečištěna vedlejším produktem dicyklohexylmočovinou (**44**), musela se proto přechistit pomocí filtrace, extrakce a sloupcovou chromatografií. Nejvyšší výtěžnost reakce (90%) byla při přípravě sloučeniny **25**, nejnižší (62%) při přípravě sloučeniny **24**.

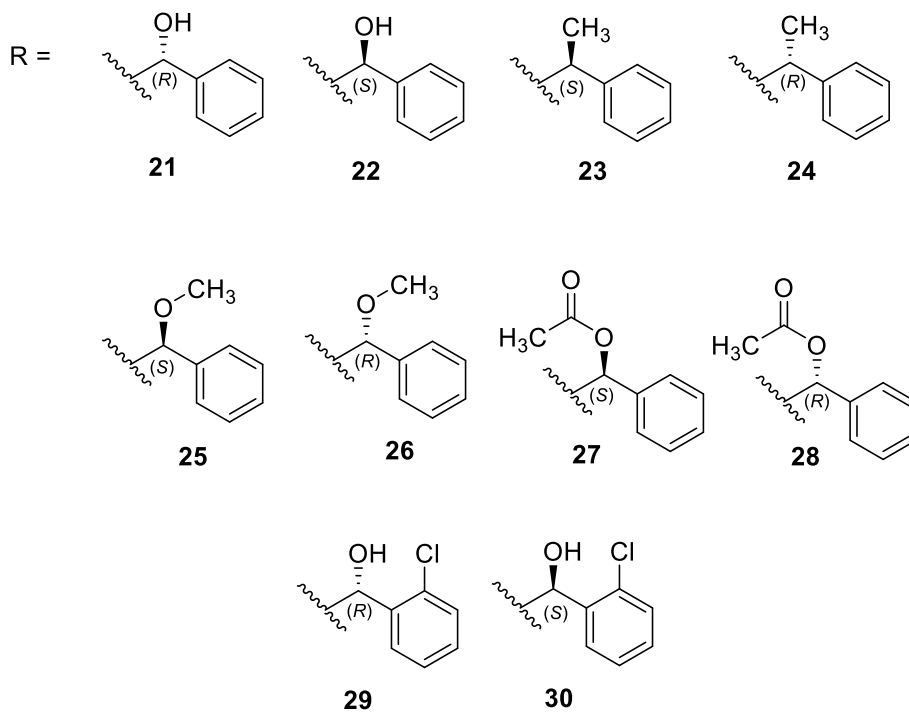
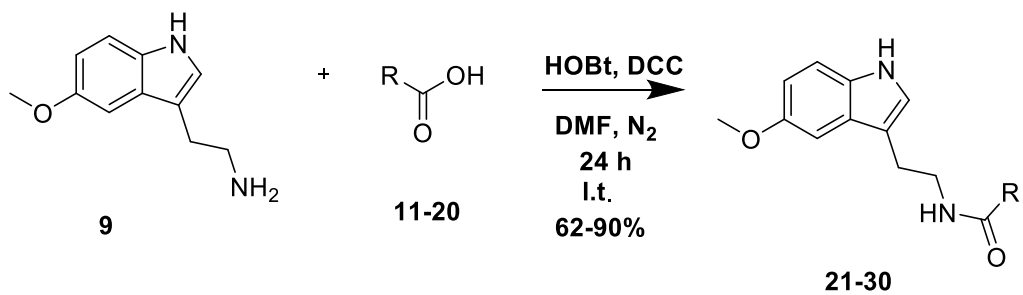


Schéma 3 - Příprava chirálních 5-methoxytryptaminových derivátů 21-30

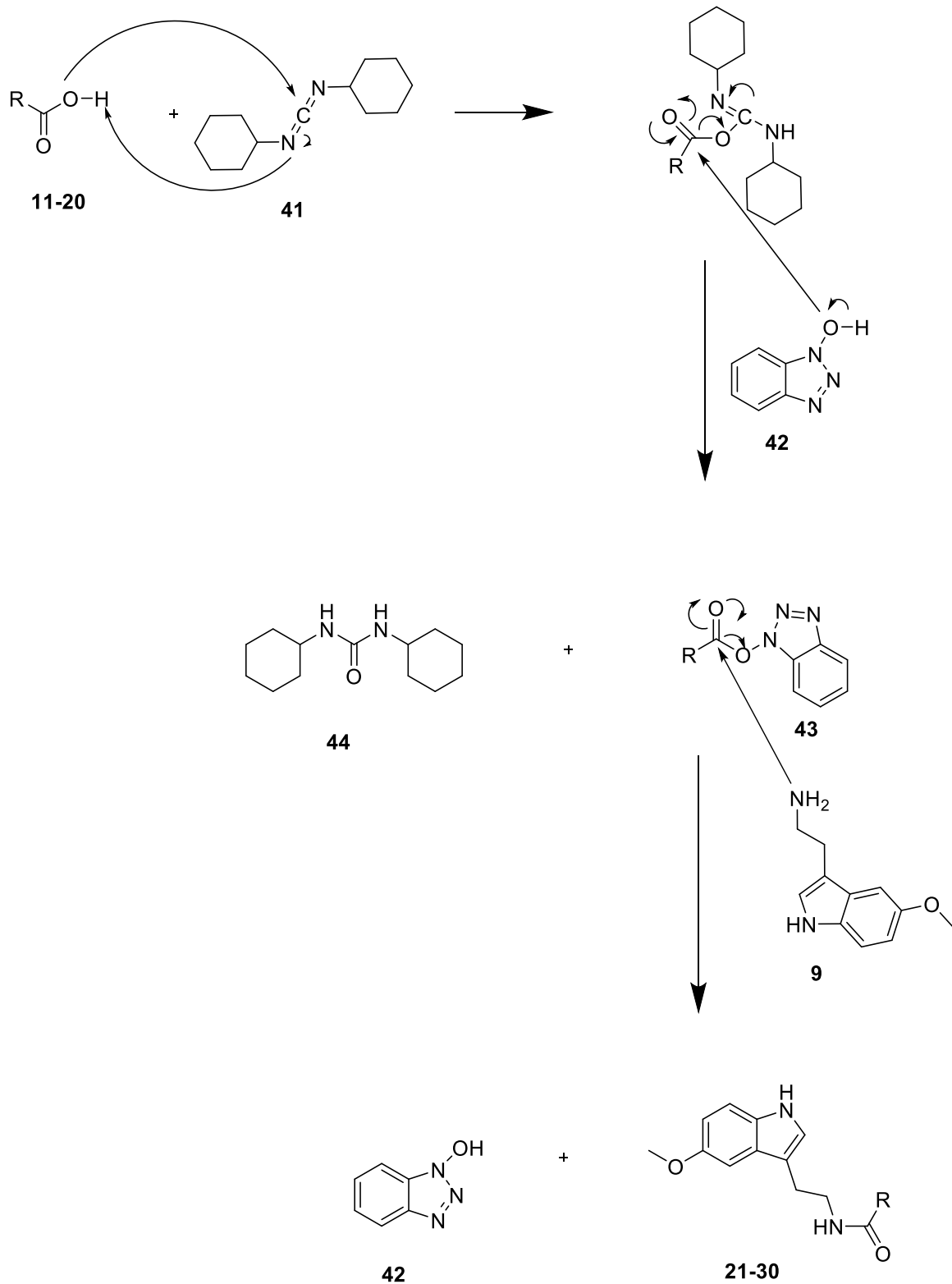


Schéma 4 - Mechanismus reakce pro přípravu 5-methoxytryptaminových derivátů

Stejný postup byl vyzkoušen i pro syntézu 5-chlortryptaminových derivátů. První pokus, bez použití báze, vyšel s velice nízkou výtěžností (23%), protože jako výchozí

látku jsme použili komerčně dostupný 5-chlortryptamin hydrochlorid. Do reakční směsi byl proto přidán diisopropylethylamin (DIPEA), který působil při reakci jako báze a vychytával uvolněnou HCl. Přestože po přidání DIPEA reakce probíhala se zdánlivě vyšší výtěžností (84%), produkt byl velmi silně znečištěn vedlejším produktem dicyklohexylmočovinou (**44**), kterou nešlo odstranit ani při použití všech čistících metod uvedených výše. Retenční faktor (R_f) dicyklohexylmočoviny (**44**) a výsledných produktů je si totiž velice blízký, a při reakci vznikalo nejspíše veliké množství vedlejšího produktu **44**, proto ani sloupcová chromatografie při použití vhodné polární fáze Heptan/EA 1/2, nedokázala nečistotu dostatečně oddělit. Proto musel být zvolen jiný postup.

Pro syntézu 5-chlortryptaminových derivátů byl rozpuštěn 5-chlortryptamin hydrochlorid (**10**) v DMF, a přidán DIPEA. Poté byla použita vždy jedna z chirálních kyselin **11-20** a HATU (**45**). Reakce je zapsána ve Schématu 5. Hydroxylová skupina kyseliny nukleofilně napadá uhlík HATU, tím vznikají intermediáty, které reagují za vzniku aktivního esteru **46** a tetramethylmočoviny (**47**). Karbonylový uhlík aktivního esteru je následně nukleofilně atakován aminoskupinou 5-chlortryptaminu. Dochází k S_NAc za vzniku příslušných amidů. Reakční mechanismus je znázorněn ve Schématu 6. Směs se nechala míchat 24 hodin při dusíkové atmosféře a laboratorní teplotě. Surová směs byla znečištěna vedlejším produktem tetramethylmočovinou (**47**), bylo proto potřeba produkt přechistit. Reakční směs byla rozpuštěna v DCM a organická fáze byla promývána třikrát vodou, poté následovala sloupcová chromatografie. Nejvyšší výtěžnost reakce (85%) byla při přípravě sloučeniny **40**, nejnižší (59%) pak při přípravě sloučeniny **32**.

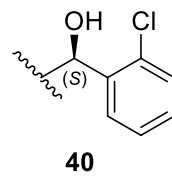
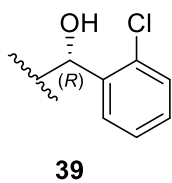
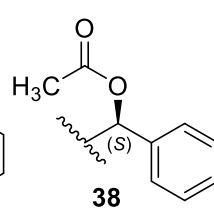
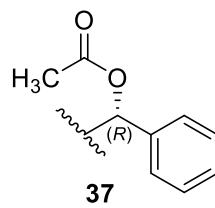
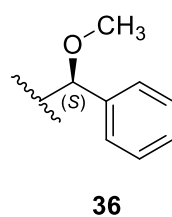
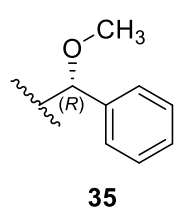
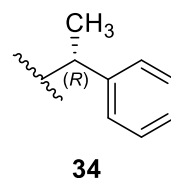
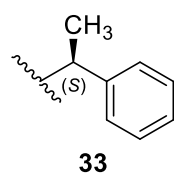
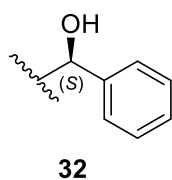
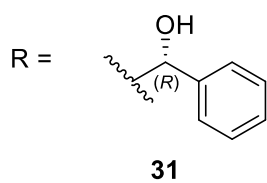
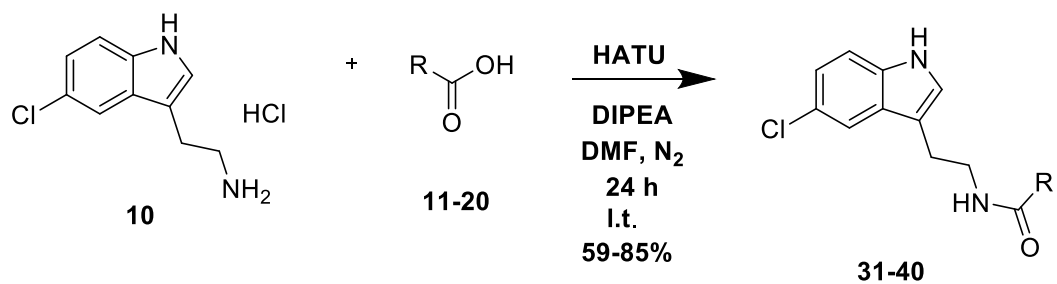


Schéma 5 – Příprava chirálních 5-chlortryptaminových derivátů 31-40

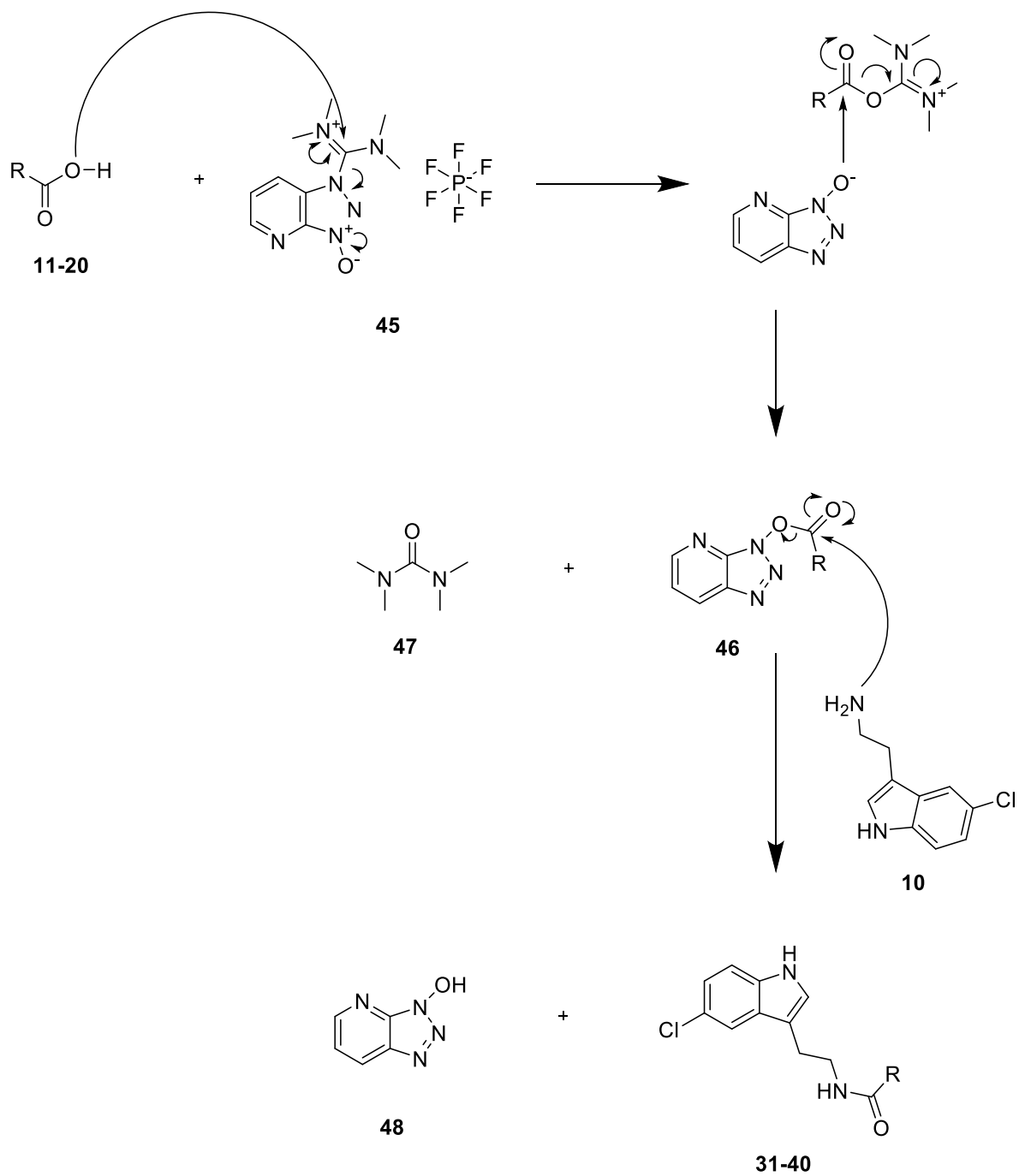


Schéma 6 - Mechanismus reakce přípravy 5-chlorotryptaminových derivátů

5. Experimentální část

Chemikálie a potřebná rozpouštědla byla dodána firmou Sigma-Aldrich a VWR International (Česká republika). Průběh reakce a přečišťování finálního produktu bylo kontrolováno metodou tenkovrstvé chromatografie (TLC). Pro TLC byly použity destičky Merck Silica gel 60 F₂₅₄ za použití mobilní fáze Heptan/EA 1/1. Detekce byla prováděna pod UV lampou s vlnovou délkou 254 nm. Teplota tání byla stanovena za pomoci bodotávku Buchi B-545 bez korekce.

¹H a ¹³C NMR spektra byla změřena v deuterovaném dimethylsulfoxidu (DMSO-*d*₆) na FT NMR spektrometru Varian S500 (499,87 MHz pro ¹H a 125,71 MHz pro ¹³C). Chemické posuny (δ) protonů v ¹H NMR a uhlíků v ¹³C NMR spektrech jsou uvedeny v jednotkách ppm. V ¹H NMR spektrech jsou uváděny chemické posuny signálů vzhledem k centrálnímu píku DMSO-*d*₆ ($\delta = 2,50$ ppm) a v ¹³C NMR spektrech vzhledem k centrálnímu píku DMSO-*d*₆ ($\delta = 39,43$ ppm). Interakční konstanty (*J*) jsou uvedeny v jednotkách Hz. Spinová multiplicita je vyjádřena jako s (singlet), d (doublet), dd (doublet doublet), t (triplet), q (quartet) nebo m (multiplet).

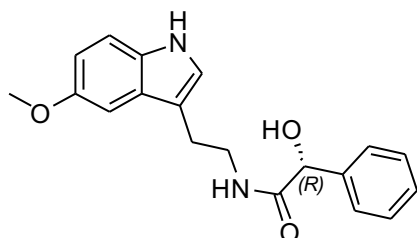
Hmotnostní spektra byla získána elektrosprejovou ionizací (ESI/MS) a selekcí iontu pomocí trojitého quadropólu na přístroji Agilent 6470. Spektra byla vyhodnocena prostřednictvím programu MassHunter Qualitative Analysis B.07.00 (Agilent Technologies, Santa Clara, USA).

Specifické optické otáčivosti byly naměřeny při teplotě 20 °C na digitálním polarimetru Krüss v 10 cm kyvetě v CHCl₃, a v práci jsou prezentovány jako: $[\alpha]_{\text{D}}^{20}$ (c v g/100 ml, dané rozpouštědlo). Enantiomerní čistota (ee.) byla měřena na chromatografickém systému Agilent 1260 Series vybaveného kolonou Phenomenex Lux Celulose-1 (250 x 4,6 mm, 10 μ m, P/N: 00G-4501-E0) a ochrannou kolonou (4 x 3,0 mm, AJ0-8403). Mobilní fáze A (20 mM hydrogenuhličitan amonný + 0,1% triethylamin) a B (stupeň gradientu CH₃CN) byla udržovaná při izokratickém poměru 45:55 a průtoků 1 ml/min. Separovaný vzorek byl udržován při teplotě 15 °C a teplota kolony byla 10 °C. Sloučeniny byly detekované detektorem DAD při vlnové délce 254 a 280 nm. Nekalibrovaná čistota byla vypočítána jako hodnota složené plochy na celkovou hodnotu plochy.

5.1. Postup přípravy 5-methoxytryptaminových derivátů

Příslušná chirální kyselina byla rozpuštěna v 11 ml DMF - kyseliny **11**, **12** (199 mg, 1,31 mmol, 1 eq), **13**, **14** (197 mg, 1,31 mmol, 1 eq), **15**, **16** (218 mg, 1,31 mmol, 1 eq) v 9 ml, **17**, **18** (255 mg, 1,31 mmol, 1 eq) a **19**, **20** (244 mg, 1,31 mmol, 1 eq). Poté byl přidán 5-methoxytryptamin (**9**) (250 mg, 1,31 mmol, 1 eq), hydroxybenzotriazol (HOBT) (**42**) (188 mg, 1,44 mmol, 1,1 eq) a *N,N*-dicyklohexylkarbodiimid (DCC) (**41**) (298 mg, 1,44 mmol, 1,1 eq). Směs se nechala míchat 24h při laboratorní teplotě a dusíkové atmosféře. Po 24 hodinách byla směs zfiltrována přes fritu za sníženého tlaku a promyta EA. Následně byl odpařen DMF v azeotropní směsi za přídavku toluenu. Po odpaření toluenu a DMF, byla směs rozpuštěna v 100 ml EA. Poté následovala extrakce s 10% NaHCO₃ (50 ml), ledovou vodou (50 ml), 1% kyselinou citronovou (50 ml) a nasyceným roztokem NaCl (50 ml). Po extrakci byla směs vysušena bezvodým Na₂SO₄ a zfiltrována. Filtr i Na₂SO₄ byl promyt EA. Po odpaření EA následovala sloupcová chromatografie. Pro sloučeniny byla použita mobilní fáze Petrolether/EA 1/1. Po skončené chromatografii byla MF odpařena a produkt byl vysušen pod vakuem.

(R)-2-hydroxy-*N*-(2-(5-methoxy-1*H*-indol-3-yl)ethyl)-2-fenylacetamid, **21**.



Sloučenina **21** byla izolována jako hnědý olej.

C₁₉H₂₀N₂O₃, M = 324,38 g.mol⁻¹

Výtěžnost: 280 mg (66%)

$[\alpha]_D^{20} = -141,0$ (c = 0,1; CHCl₃)

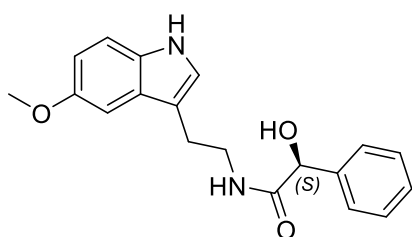
ee. (nerozděleno - nelze potvrdit chirální čistotu)

¹H NMR (500 MHz, DMSO-*d*₆): δ 2,80 (t; *J* = 7,5 Hz; 2H; CH₂); 3,34-3,39 (m; 2H; CH₂); 3,76 (s; 3H; OCH₃); 4,90 (d; *J* = 4,5 Hz; 1H; OH); 6,16 (d; *J* = 4,6 Hz; 1H; CH); 6,71 (dd; *J* = 2,4; 8,7 Hz; 1H; ArH); 7,06-7,07 (m; 2H; 2 x ArH); 7,21-7,32 (m; 4H; 4 x ArH); 7,37-7,39 (m; 2H; 2 x ArH); 8,05 (t; *J* = 5,9 Hz; 1H; NH); 10,63 (s; 1H; NH) ppm.

^{13}C NMR (126 MHz, DMSO- d_6): δ 25,2; 38,9; 55,3; 73,5; 100,1; 111,0; 111,3; 111,9; 123,2; 126,6; 127,2; 127,4; 127,8; 131,3; 141,3; 152,9; 171,8 ppm.

MS (ESI $^+$): $[\text{M}]^+$: vypočítaná hodnota pro $\text{C}_{19}\text{H}_{21}\text{N}_2\text{O}_3^+$ (m/z): 325,2; experimentální hodnota: 325,2.

(S)-2-hydroxy-N-(2-(5-methoxy-1H-indol-3-yl)ethyl)-2-fenylacetamid, 22.



Sloučenina **22** byla izolována jako hnědý olej.

$\text{C}_{19}\text{H}_{20}\text{N}_2\text{O}_3$, $M = 324,38 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$

Výtěžnost: 300 mg (71%)

$[\alpha]_{\text{D}}^{20} = +47,0$ ($c = 0,1$; CHCl_3)

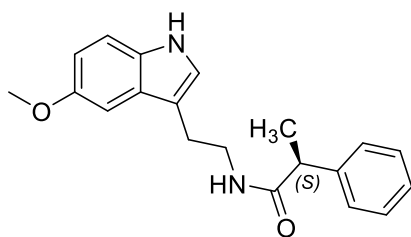
ee. (nerozděleno - nelze potvrdit chirální čistotu)

^1H NMR (500 MHz, DMSO- d_6): δ 2,79-2,82 (m; 2H; CH_2); 3,34-3,39 (m; 2H; CH_2); 3,76 (s; 3H; OCH_3); 4,90 (d; $J = 4,5 \text{ Hz}$; 1H; OH); 6,16 (d; $J = 4,6 \text{ Hz}$; 1H; CH); 6,71 (dd; $J = 2,4$; 8,7 Hz; 1H; ArH); 7,06-7,07 (m; 2H; 2 x ArH); 7,21-7,32 (m; 4H; 4 x ArH); 7,37-7,40 (m; 2H; 2 x ArH); 8,05 (t; $J = 5,9 \text{ Hz}$; 1H; NH); 10,63 (s; 1H; NH) ppm.

^{13}C NMR (126 MHz, DMSO- d_6): δ 25,2; 38,9; 55,3; 73,5; 100,1; 111,0; 111,3; 111,9; 123,2; 126,6; 127,2; 127,4; 127,8; 131,3; 141,3; 152,9; 171,8 ppm.

MS (ESI $^+$): $[\text{M}]^+$: vypočítaná hodnota pro $\text{C}_{19}\text{H}_{21}\text{N}_2\text{O}_3^+$ (m/z): 325,2; experimentální hodnota: 325,2.

(S)-N-(2-(5-methoxy-1H-indol-3-yl)ethyl)-2-fenylpropanamid, 23.



Sloučenina **23** byla izolována jako hnědý olej.

$C_{20}H_{22}N_2O_2$, $M = 322,41 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$

Výtěžnost: 270 mg (64%)

$[\alpha]_D^{20} = -22,0$ ($c = 0,1$; CHCl_3)

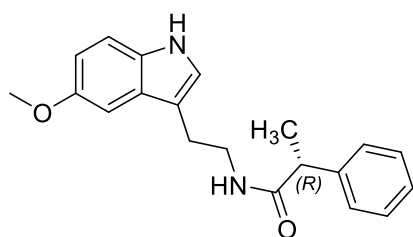
ee. = >99,9% (280 nm)

^1H NMR (500 MHz, DMSO- d_6): δ 1,32 (d; $J = 7,1 \text{ Hz}$; 3H; CH_3); 2,75 (t; $J = 7,4 \text{ Hz}$; 2H; CH_2); 3,24-3,33 (m; 2H; CH_2); 3,59 (q; $J = 7,0 \text{ Hz}$; 1H; CH); 3,75 (s; 3H; OCH_3); 6,71 (dd; $J = 2,4$; 8,7 Hz; 1H; ArH); 6,98-7,01 (m; 2H; 2 x ArH); 7,19-7,22 (m; 2H; 2 x ArH); 7,27-7,32 (m; 4H; 4 x ArH); 8,03 (t; $J = 5,6 \text{ Hz}$; 1H; NH); 10,61 (s; 1H; NH) ppm.

^{13}C NMR (126 MHz, DMSO- d_6): δ 18,5; 25,0; 39,4; 45,1; 55,3; 100,1; 110,9; 111,4; 111,9; 123,2; 126,3; 127,2; 127,4; 128,1; 131,3; 142,3; 152,9; 173,0 ppm.

MS (ESI⁺): $[\text{M}]^+$: vypočítaná hodnota pro $C_{20}H_{23}N_2O_2^+$ (m/z): 323,2; experimentální hodnota: 323,2.

(R)-N-(2-(5-methoxy-1H-indol-3-yl)ethyl)-2-fenylpropanamid, 24.



Sloučenina **24** byla izolována jako hnědý olej.

$C_{20}H_{22}N_2O_2$, $M = 322,41 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$

Výtěžnost: 260 mg (62%)

$[\alpha]_D^{20} = +10,0$ ($c = 0,1$; CHCl_3)

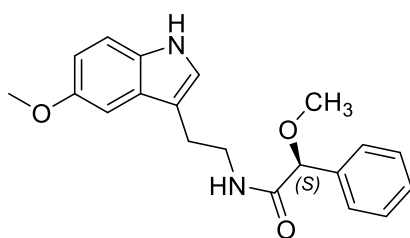
ee. = 99,8% (280 nm)

¹H NMR (500 MHz, DMSO-*d*₆): δ 1,32 (d; *J* = 7,1 Hz; 3H; CH₃); 2,74 (t; *J* = 7,4 Hz; 2H; CH₂); 3,23-3,32 (m; 2H; CH₂); 3,58 (q; *J* = 7,1 Hz; 1H; CH); 3,75 (s; 3H; OCH₃); 6,70 (dd; *J* = 2,4; 8,7 Hz; 1H; ArH); 6,98-7,00 (m; 2H; 2 x ArH); 7,19-7,22 (m; 2H; 2 x ArH); 7,27-7,32 (m; 4H; 4 x ArH); 8,02 (t; *J* = 5,6 Hz; 1H; NH); 10,61 (s; 1H; NH) ppm.

¹³C NMR (126 MHz, DMSO-*d*₆): δ 18,5; 25,0; 39,3; 45,1; 55,3; 100,1; 110,9; 111,4; 111,8; 123,2; 126,3; 127,1; 127,4; 128,1; 131,3; 142,3; 152,8; 173,0 ppm.

MS (ESI⁺): [M]⁺: vypočítaná hodnota pro C₂₀H₂₃N₂O₂⁺ (m/z): 323,2; experimentální hodnota: 323,3.

(*S*)-2-methoxy-*N*-(2-(5-methoxy-1*H*-indol-3-yl)ethyl)-2-fenylacetamid, 25.



Sloučenina **25** byla izolována jako žlutý olej.

C₂₀H₂₂N₂O₃, M = 338,40 g.mol⁻¹

Výtěžnost: 400 mg (90%)

[α]_D²⁰ = +92 (c = 0,025; CHCl₃)

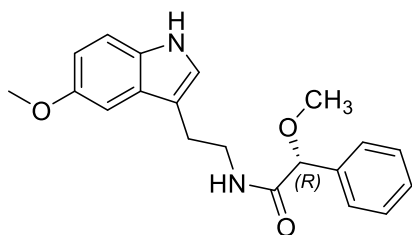
ee. (nerozděleno - nelze potvrdit chirální čistotu)

¹H NMR (500 MHz, DMSO-*d*₆): δ 2,79-2,82 (m; 2H; CH₂); 3,25 (s; 3H; OCH₃); 3,35-3,39 (m; 2H; CH₂); 3,76 (s; 3H; OCH₃); 4,61 (s; 1H; CH); 6,71 (dd; *J* = 2,4; 8,7 Hz; 1H; ArH); 7,05-7,06 (m; 2H; 2 x ArH); 7,22 (d; *J* = 8,7 Hz; 1H; ArH); 7,28-7,36 (m; 5H; 5 x ArH); 8,14 (t; *J* = 5,9 Hz; 1H; NH); 10,63 (s; 1H; NH) ppm.

¹³C NMR (126 MHz, DMSO-*d*₆): δ 25,1; 38,9; 55,3; 56,6; 83,2; 100,1; 110,9; 111,3; 111,9; 123,2; 127,0; 127,4; 127,8; 128,0; 131,3; 138,0; 152,9; 169,5 ppm.

MS (ESI⁺): [M]⁺: vypočítaná hodnota pro C₂₀H₂₃N₂O₃⁺ (m/z): 339,2; experimentální hodnota: 339,3.

(R)-2-methoxy-N-(2-(5-methoxy-1H-indol-3-yl)ethyl)-2-fenylacetamid, 26.



Sloučenina **26** byla izolována jako nažloutlý olej.

$C_{20}H_{22}N_2O_3$, $M = 338,40 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$

Výtěžnost: 333 mg (75%)

$[\alpha]_D^{20} = -128$ ($c = 0,025$; $CHCl_3$)

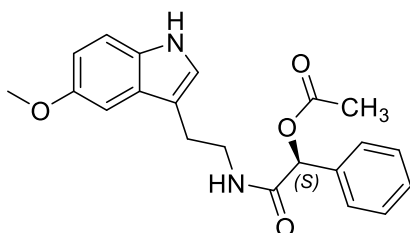
ee. (nerozděleno - nelze potvrdit chirální čistotu)

1H NMR (500 MHz, DMSO- d_6): δ 2,79-2,82 (m; 2H; CH_2); 3,25 (s; 3H; OCH_3); 3,35-3,39 (m; 2H; CH_2); 3,76 (s; 3H; OCH_3); 4,61 (s; 1H; CH); 6,71 (dd; $J = 2,4$; 8,7 Hz; 1H; ArH); 7,05-7,06 (m; 2H; 2 x ArH); 7,22 (d; $J = 8,7$ Hz; 1H; ArH); 7,28-7,36 (m; 5H; 5 x ArH); 8,14 (t; $J = 5,9$ Hz; 1H; NH); 10,62 (s; 1H; NH) ppm.

^{13}C NMR (126 MHz, DMSO- d_6): δ 25,1; 38,9; 55,3; 56,6; 83,2; 100,1; 110,9; 111,3; 111,9; 123,2; 127,0; 127,4; 127,8; 128,0; 131,3; 138,0; 152,9; 169,5 ppm.

MS (ESI⁺): $[M]^+$: vypočítaná hodnota pro $C_{20}H_{23}N_2O_3^+$ (m/z): 339,2; experimentální hodnota: 339,4.

(S)-2-((2-(5-methoxy-1H-indol-3-yl)ethyl)amino)-2-oxo-1-fenylethylacetát, 27.



Sloučenina **27** byla izolována jako bílá tuhá látka.

$C_{21}H_{22}N_2O_4$, $M = 366,41 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$

Výtěžnost: 380 mg (79%)

$T_t = 134,2-135,9 \text{ }^\circ\text{C}$

$[\alpha]_D^{20} = +100$ ($c = 0,025$; $CHCl_3$)

ee. = >99,9% (280 nm)

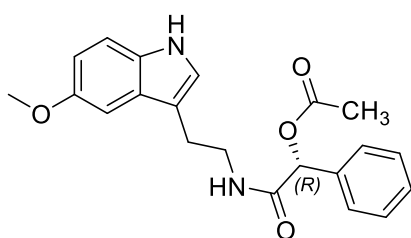
1H NMR (500 MHz, DMSO- d_6): δ 2,13 (s; 3H; CH_3); 2,77 (t; $J = 7,4$ Hz; 2H; CH_2); 3,29-3,35 (m; 2H; CH_2); 3,75 (s; 3H; OCH_3); 5,85 (s; 1H; CH); 6,72 (dd; $J = 2,4$; 8,7

Hz; 1H; ArH); 7,00-7,02 (m; 2H; 2 x ArH); 7,23 (d; $J = 8,7$ Hz; 1H; ArH); 7,35-7,39 (m; 3H; 3 x ArH); 7,42-7,44 (m; 2H; 2 x ArH); 8,36 (t; $J = 5,7$ Hz; 1H; NH); 10,64 (s; 1H; NH) ppm.

^{13}C NMR (126 MHz, DMSO- d_6): δ 20,6; 24,8; 39,3; 55,3; 75,0; 100,0; 110,9; 111,1; 111,9; 123,4; 127,3; 127,3; 128,3; 128,4; 131,3; 136,0; 152,9; 167,7; 169,5 ppm.

MS (ESI $^+$): $[\text{M}]^+$: vypočítaná hodnota pro $\text{C}_{21}\text{H}_{23}\text{N}_2\text{O}_4^+$ (m/z): 367,2; experimentální hodnota: 367,2.

(R)-2-((2-(5-methoxy-1H-indol-3-yl)ethyl)amino)-2-oxo-1-fenylethylacetát, 28.



Sloučenina **28** byla izolována jako bílá tuhá látka.

$\text{C}_{21}\text{H}_{22}\text{N}_2\text{O}_4$, $M = 366,41$ g.mol $^{-1}$

Výtěžnost: 400 mg (83%)

$T_f = 134,2$ - $135,9$ °C

$[\alpha]_D^{20} = -76$ ($c = 0,025$; CHCl_3)

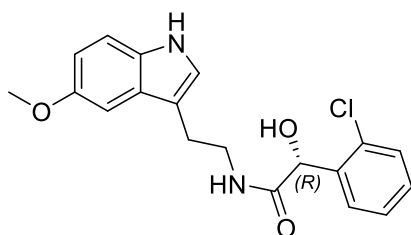
ee. = >99,9% (280 nm)

^1H NMR (500 MHz, DMSO- d_6): δ 2,13 (s; 3H; CH_3); 2,77 (t; $J = 7,4$ Hz; 2H; CH_2); 3,31-3,38 (m; 2H; CH_2); 3,75 (s; 3H; OCH_3); 5,84 (s; 1H; CH); 6,71 (dd; $J = 2,4$; 8,7 Hz; 1H; ArH); 6,99-7,01 (m; 2H; 2 x ArH); 7,22 (d; $J = 8,7$ Hz; 1H; ArH); 7,34-7,39 (m; 3H; 3 x ArH); 7,42-7,44 (m; 2H; 2 x ArH); 8,36 (t; $J = 5,7$ Hz; 1H; NH); 10,63 (s; 1H; NH) ppm.

^{13}C NMR (126 MHz, DMSO- d_6): δ 20,6; 24,8; 39,3; 55,3; 75,0; 100,0; 110,9; 111,1; 111,9; 123,4; 127,3; 127,3; 128,3; 128,4; 131,3; 136,0; 152,9; 167,7; 169,5 ppm.

MS (ESI $^+$): $[\text{M}]^+$: vypočítaná hodnota pro $\text{C}_{21}\text{H}_{23}\text{N}_2\text{O}_4^+$ (m/z): 367,2; experimentální hodnota: 367,2.

(R)-2-(2-chlorfenyl)-2-hydroxy-N-(2-(5-methoxy-1H-indol-3-yl)ethyl)acetamid, 29.



Sloučenina **29** byla získána jako bílý olej.

$C_{19}H_{19}ClN_2O_3$, $M = 358,82 \text{ g.mol}^{-1}$

Výtěžnost: 367 mg (78%)

$[\alpha]_D^{20} = -56,0$ ($c = 0,025$; $CHCl_3$)

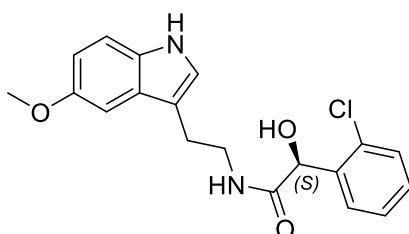
ee. = 97,7% (254 nm)

1H NMR (500 MHz, DMSO- d_6): δ 2,85 (t; $J = 7,5$ Hz; 2H; CH_2); 3,35-3,48 (m; 2H; CH_2); 3,76 (s; 3H; OCH_3); 5,29 (d; $J = 5,0$ Hz; 1H; OH); 6,35 (d; $J = 5,0$ Hz; 1H; CH); 6,72 (dd; $J = 2,4$; 8,7 Hz; 1H; ArH); 7,07-7,11 (m; 2H; 2 x ArH); 7,23 (d; $J = 8,7$ Hz; 1H; ArH); 7,26-7,33 (m; 3H; 3 x ArH); 7,40-7,42 (m; 1H; ArH); 8,14 (t; $J = 5,9$ Hz; 1H; NH); 10,64 (s; 1H; NH) ppm.

^{13}C NMR (126 MHz, DMSO- d_6): δ 25,1; 38,9; 55,3; 70,3; 100,2; 111,0; 111,3; 111,9; 123,2; 127,0; 127,4; 128,9; 129,0; 129,1; 131,3; 132,7; 139,1; 152,9; 170,9 ppm.

MS (ESI⁺): $[M]^+$: vypočítaná hodnota pro $C_{19}H_{20}ClN_2O_3^+$ (m/z): 359,1; experimentální hodnota: 359,2.

(S)-2-(2-chlorfenyl)-2-hydroxy-N-(2-(5-methoxy-1H-indol-3-yl)ethyl)acetamid, 30.



Sloučenina **30** byla izolována jako bílý olej.

$C_{19}H_{19}ClN_2O_3$, $M = 358,82 \text{ g.mol}^{-1}$

Výtěžnost: 339 mg (72%)

$[\alpha]_D^{20} = +80,0$ ($c = 0,025$; $CHCl_3$)

ee. = >99,9% (280 nm)

¹H NMR (500 MHz, DMSO-*d*₆): δ 2,85 (t; *J* = 7,4 Hz; 2H; CH₂); 3,35-3,48 (m; 2H; CH₂); 3,76 (s; 3H; OCH₃); 5,29 (d; *J* = 5,0 Hz; 1H; OH); 6,36 (d; *J* = 5,0 Hz; 1H; CH); 6,72 (dd; *J* = 2,4; 8,7 Hz; 1H; ArH); 7,07-7,11 (m; 2H; 2 x ArH); 7,23 (d; *J* = 8,7 Hz; 1H; ArH); 7,26-7,33 (m; 3H; 3 x ArH); 7,40-7,42 (m; 1H; ArH); 8,15 (t; *J* = 5,9 Hz; 1H; NH); 10,64 (s; 1H; NH) ppm.

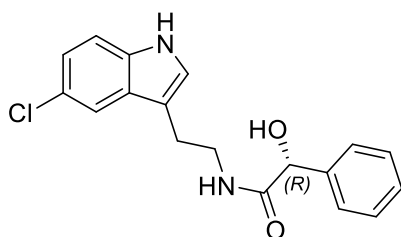
¹³C NMR (126 MHz, DMSO-*d*₆): δ 25,1; 38,9; 55,3; 70,3; 100,2; 111,0; 111,3; 111,9; 123,3; 127,0; 127,4; 128,9; 129,0; 129,1; 131,3; 132,7; 139,1; 152,9; 170,9 ppm.

MS (ESI⁺): [M]⁺: vypočítaná hodnota pro C₁₉H₂₀ClN₂O₃⁺ (m/z): 359,1; experimentální hodnota: 359,2.

5.2. Postup přípravy 5-chlortryptaminových derivátů

Nejdříve byl 5-chlortryptamin (**10**) (200 mg, 0,86 mmol, 1 eq) rozpuštěn v bezvodém DMF (9 ml). Poté byl přidán *N,N*-diisopropylethylamin (DIPEA) (0,37 ml, 2,16 mmol 2,5 eq), 1-[Bis(dimethylamino)methylene]-1*H*-1,2,3-triazolo[4,5-*b*]pyridinium 3-oxid hexafluorofosfát (HATU) (**45**) (361 mg, 0,95 mmol 1,1 eq) a příslušná chirální kyselina **11**, **12** (144 mg, 0,95 mmol, 1,1 eq), **13**, **14** (143 mg, 0,95 mmol, 1,1 eq), **15**, **16** (158 mg, 0,95 mmol, 1,1 eq), **17**, **18** (184 mg, 0,95 mmol, 1,1 eq), **19**, **20** (176 mg, 0,95 mmol, 1,1 eq). Směs se nechala míchat 24 hodin při laboratorní teplotě a dusíkové atmosféře. Po 24 hodinách byla směs rozpuštěna v dichlormethanu (DCM) (100 ml) a třikrát promyta s H₂O (3 x 50 ml). Poté byla směs vysušena bezvodým Na₂SO₄ a zfiltrována. Filtr i Na₂SO₄ byl promyt DCM. Po odpaření DCM následovala sloupcová chromatografie. Pro sloučeniny byla použita mobilní fáze Heptan/EA 1/1, s výjimkou sloučenin **31**, **32** pro které byla použita fáze Heptan/EA 1/2. Po skončení chromatografie byla MF odpařena a produkt byl vysušen pod vakuem.

(R)-N-(2-(5-chlor-1H-indol-3-yl)ethyl)-2-hydroxy-2-fenylacetamid, 31.



Sloučenina **31** byla izolována jako bílý olej.

$C_{18}H_{17}ClN_2O_2$, $M = 328,79 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$

Výtěžnost: 187 mg (65%)

$[\alpha]_D^{20} = -24,0$ ($c = 0,025$; $CHCl_3$)

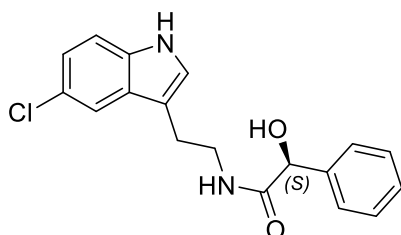
ee. (nerozděleno - nelze potvrdit chirální čistotu)

1H NMR (500 MHz, DMSO- d_6): δ 2,81 (t; $J = 7,5$ Hz; 2H; CH_2); 3,34-3,38 (m; 2H; CH_2); 4,89 (d; $J = 4,6$ Hz; 1H; OH); 6,16 (d; $J = 4,6$ Hz; 1H; CH); 7,06 (dd; $J = 2,1$; 8,6 Hz; 1H; ArH); 7,19 (d; $J = 2,2$ Hz; 1H; ArH); 7,24-7,37 (m; 6H; 6 x ArH); 7,62 (s; 1H; ArH); 8,09 (t; $J = 5,9$ Hz; 1H; NH); 11,01 (s; 1H; NH) ppm.

^{13}C NMR (126 MHz, DMSO- d_6): δ 24,9; 38,9; 73,5; 111,6; 112,8; 117,6; 120,7; 122,9; 124,5; 126,5; 127,2; 127,8; 128,3; 134,6; 141,3; 171,9 ppm.

MS (ESI⁺): $[M]^+$: vypočítaná hodnota pro $C_{18}H_{18}ClN_2O_2^+$ (m/z): 329,1; experimentální hodnota: 329,3.

(S)-N-(2-(5-chlor-1H-indol-3-yl)ethyl)-2-hydroxy-2-fenylacetamid, 32.



Sloučenina **32** byla izolována jako bílý olej.

$C_{18}H_{17}ClN_2O_2$, $M = 328,79 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$

Výtěžnost: 170 mg (59%)

$[\alpha]_D^{20} = +56,0$ ($c = 0,03$; $CHCl_3$)

ee. (nerozděleno - nelze potvrdit chirální čistotu)

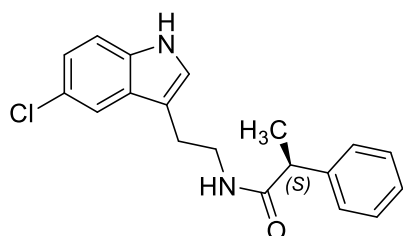
1H NMR (500 MHz, DMSO- d_6): δ 2,80 (t; $J = 7,5$ Hz; 2H; CH_2); 3,33-3,37 (m; 2H; CH_2); 4,89 (d; $J = 4,5$ Hz; 1H; OH); 6,15 (d; $J = 4,6$ Hz; 1H; CH); 7,06 (dd; $J = 2,0$; 8,6

Hz; 1H; ArH); 7,18 (d; $J = 2,1$ Hz; 1H; ArH); 7,24-7,37 (m; 6H; 6 x ArH); 7,62 (s; 1H; ArH); 8,08 (t; $J = 5,9$ Hz; 1H; NH); 11,01 (s; 1H; NH) ppm.

^{13}C NMR (126 MHz, DMSO- d_6): δ 24,9; 38,9; 73,4; 111,6; 112,8; 117,5; 120,7; 122,9; 124,5; 126,5; 127,2; 127,8; 128,3; 134,6; 141,3; 171,8 ppm.

MS (ESI $^+$): $[\text{M}]^+$: vypočítaná hodnota pro $\text{C}_{18}\text{H}_{18}\text{ClN}_2\text{O}_2^+$ (m/z): 329,1; experimentální hodnota: 329,1.

(S)-N-(2-(5-chlor-1H-indol-3-yl)ethyl)-2-fenylpropanamid, **33**.



Sloučenina **33** byla izolována jako bezbarvý olej.

$\text{C}_{19}\text{H}_{19}\text{ClN}_2\text{O}$, $M = 326,82 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$

Výtěžnost: 170 mg (60%)

$[\alpha]_{\text{D}}^{20} = -18,0$ ($c = 0,1$; CHCl_3)

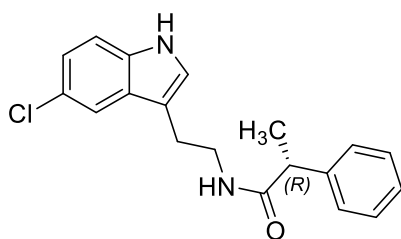
ee. = >99,9% (280 nm)

^1H NMR (500 MHz, DMSO- d_6): δ 1,31 (d; $J = 7,1$ Hz; 3H; CH_3); 2,74-2,77 (m; 2H; CH_2); 3,21-3,32 (m; 2H; CH_2); 3,56 (q; $J = 7,1$ Hz; 1H; CH); 7,05 (dd; $J = 2,1$; 8,6 Hz; 1H; ArH); 7,10 (d; $J = 2,2$ Hz; 1H; ArH); 7,19-7,23 (m; 1H; ArH); 7,26-7,30 (m; 4H; 4 x ArH); 7,34 (d; $J = 8,6$ Hz; 1H; ArH); 7,56 (s; 1H; ArH); 8,02 (t; $J = 5,7$ Hz; 1H; NH); 10,99 (s; 1H; NH) ppm.

^{13}C NMR (126 MHz, DMSO- d_6): δ 18,4; 24,7; 39,5; 45,1; 111,7; 112,7; 117,4; 120,6; 122,8; 124,5; 126,3; 127,1; 128,1; 128,3; 134,5; 142,2; 173,0 ppm.

MS (ESI $^+$): $[\text{M}]^+$: vypočítaná hodnota pro $\text{C}_{19}\text{H}_{20}\text{ClN}_2\text{O}^+$ (m/z): 327,1; experimentální hodnota: 327,3.

(R)-N-(2-(5-chlor-1H-indol-3-yl)ethyl)-2-fenylpropanamid, 34.



Sloučenina **34** byla izolována jako bezbarvý olej.

$C_{19}H_{19}ClN_2O$, $M = 326,82 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$

Výtěžnost: 215 mg (76%)

$[\alpha]_D^{20} = +6,0$ ($c = 0,1$; $CHCl_3$)

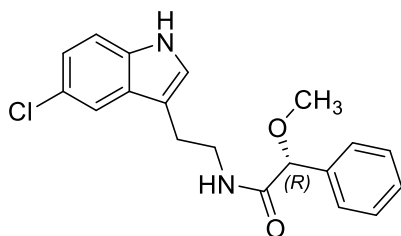
ee. = >99,9% (280 nm)

1H NMR (500 MHz, DMSO- d_6): δ 1,31 (d; $J = 7,1$ Hz; 3H, CH_3); 2,74-2,77 (m; 2H; CH_2); 3,21-3,32 (m; 2H; CH_2); 3,56 (q; $J = 7,1$ Hz; 1H; CH); 7,05 (dd; $J = 2,1$; 8,6 Hz; 1H; ArH); 7,10 (d; $J = 2,2$ Hz; 1H; ArH); 7,19-7,23 (m; 1H; ArH); 7,26-7,30 (m; 4H; 4 x ArH); 7,34 (d; $J = 8,6$ Hz; 1H; ArH); 7,56 (s; 1H; ArH); 8,02 (t; $J = 5,6$ Hz; 1H; NH); 10,99 (s; 1H; NH) ppm.

^{13}C NMR (126 MHz, DMSO- d_6): δ 18,4; 24,7; 39,5; 45,1; 111,7; 112,8; 117,5; 120,7; 122,9; 124,5; 126,3; 127,1; 128,1; 128,3; 134,5; 142,2; 173,0 ppm.

MS (ESI $^+$): $[M]^+$: vypočítaná hodnota pro $C_{19}H_{20}ClN_2O^+$ (m/z): 327,1; experimentální hodnota: 327,3.

(R)-N-(2-(5-chlor-1H-indol-3-yl)ethyl)-2-methoxy-2-fenylacetamid, 35.



Sloučenina **35** byla izolována jako bílá tuhá látka.

$C_{19}H_{19}ClN_2O_2$, $M = 342,82 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$

Výtěžnost: 180 mg (60%)

$T_t = 108,7-109,9 \text{ }^\circ\text{C}$

$[\alpha]_D^{20} = -44,0$ ($c = 0,025$; $CHCl_3$)

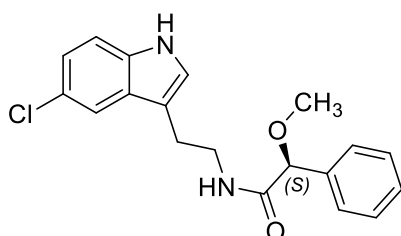
ee. = >99,9% (280 nm)

¹H NMR (500 MHz, DMSO-*d*₆): δ 2,82 (t; *J* = 7,4 Hz; 2H; CH₂); 3,25 (s; 3H; OCH₃); 3,32-3,37 (m; 2H; CH₂); 4,59 (s; 1H; CH); 7,06 (dd; *J* = 2,1; 8,6 Hz; 1H; ArH); 7,18 (d; *J* = 2,2 Hz; 1H; ArH); 7,28-7,36 (m; 6H; 6 x ArH); 7,62 (s; 1H; ArH); 8,17 (t; *J* = 5,9 Hz; 1H; NH); 11,00 (s; 1H; NH) ppm.

¹³C NMR (126 MHz, DMSO-*d*₆): δ 24,8; 39,1; 56,6; 83,2; 111,6; 112,8; 117,6; 120,7; 122,9; 124,6; 127,0; 127,8; 128,0; 128,3; 134,6; 138,0; 169,6 ppm.

MS (ESI⁺): [M]⁺: vypočítaná hodnota pro C₁₉H₂₀ClN₂O₂⁺ (m/z): 343,1; experimentální hodnota: 343,2.

(*S*)-*N*-(2-(5-chlor-1*H*-indol-3-yl)ethyl)-2-methoxy-2-fenylacetamid, 36.



Sloučenina **36** byla izolována jako bílá tuhá látka.

C₁₉H₁₉ClN₂O₂, M = 342,82 g.mol⁻¹

Výtěžnost: 220 mg (74%)

T_f = 109,3-111,0 °C

[α]_D²⁰ = +144,0 (c = 0,025; CHCl₃)

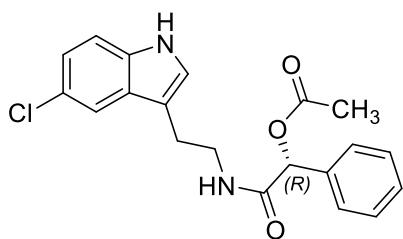
ee. = >99,9% (280 nm)

¹H NMR (500 MHz, DMSO-*d*₆): δ 2,81 (t; *J* = 7,4 Hz; 2H; CH₂); 3,25 (s; 3H; OCH₃); 3,32-3,37 (m; 2H; CH₂); 4,59 (s; 1H; CH); 7,06 (dd; *J* = 2,1; 8,6 Hz; 1H; ArH); 7,18 (d; *J* = 2,2 Hz; 1H; ArH); 7,28-7,35 (m; 6H; 6 x ArH); 7,62 (s; 1H; ArH); 8,17 (t; *J* = 5,9 Hz; 1H; NH); 11,00 (s; 1H; NH) ppm.

¹³C NMR (126 MHz, DMSO-*d*₆): δ 24,8; 39,1; 56,6; 83,2; 111,6; 112,8; 117,6; 120,7; 122,9; 124,6; 127,0; 127,8; 128,0; 128,3; 134,6; 138,0; 169,6 ppm.

MS (ESI⁺): [M]⁺: vypočítaná hodnota pro C₁₉H₂₀ClN₂O₂⁺ (m/z): 343,1; experimentální hodnota: 343,2.

(R)-2-((2-(5-chlor-1H-indol-3-yl)ethyl)amino)-2-oxo-1-fenylethylacetát, 37.



Sloučenina **37** byla izolována jako bílá tuhá látka.

$C_{20}H_{19}ClN_2O_3$, $M = 370,83 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$

Výtěžnost: 250 mg (77%)

$T_f = 146,4\text{-}148,1 \text{ }^\circ\text{C}$

$[\alpha]_D^{20} = -36,0$ ($c = 0,025$; CHCl_3)

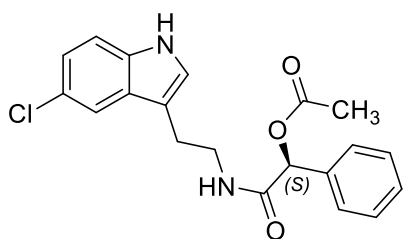
ee. (nerozděleno - nelze potvrdit chirální čistotu)

$^1\text{H NMR}$ (500 MHz, $\text{DMSO-}d_6$): δ 2,13 (s; 3H; CH_3); 2,77 (t; $J = 7,4 \text{ Hz}$; 2H; CH_2); 3,27-3,35 (m; 2H; CH_2); 5,83 (s; 1H; CH); 7,06 (dd; $J = 2,1, 8,6 \text{ Hz}$; 1H; ArH); 7,11 (d; $J = 2,2 \text{ Hz}$; 1H; ArH); 7,34-7,42 (m; 6H; 6 x ArH); 7,57 (s; 1H; ArH); 8,35 (t; $J = 5,8 \text{ Hz}$; 1H; NH); 11,00 (s; 1H; NH) ppm.

$^{13}\text{C NMR}$ (126 MHz, $\text{DMSO-}d_6$): δ 20,6; 24,5; 39,3; 75,0; 111,4; 112,8; 117,4; 120,7; 122,9; 124,7; 127,2; 128,2; 128,2; 128,4; 134,5; 135,9; 167,7; 169,5 ppm.

MS (ESI⁺): $[\text{M}]^+$: vypočítaná hodnota pro $\text{C}_{20}\text{H}_{20}\text{ClN}_2\text{O}_3^+$ (m/z): 371,1; experimentální hodnota: 371,2.

(S)-2-((2-(5-chlor-1H-indol-3-yl)ethyl)amino)-2-oxo-1-fenylethylacetát, 38.



Sloučenina **38** byla izolována jako bílá tuhá látka.

$C_{20}H_{19}ClN_2O_3$, $M = 370,83 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$

Výtěžnost: 250 mg (77%)

$T_f = 146,9\text{-}148,2 \text{ }^\circ\text{C}$

$[\alpha]_D^{20} = +156,0$ ($c = 0,025$; CHCl_3)

ee. (nerozděleno - nelze potvrdit chirální čistotu)

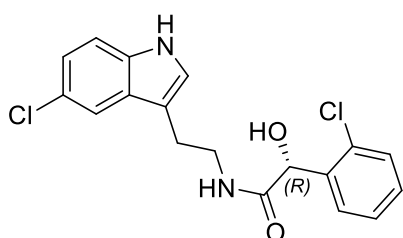
$^1\text{H NMR}$ (500 MHz, $\text{DMSO-}d_6$): δ 2,13 (s; 3H; CH_3); 2,77 (t; $J = 7,4 \text{ Hz}$; 2H; CH_2); 3,27-3,35 (m; 2H; CH_2); 5,83 (s; 1H; CH); 7,06 (dd; $J = 2,1, 8,6 \text{ Hz}$; 1H; ArH); 7,11 (d;

$J = 2,2$ Hz; 1H; ArH); 7,34-7,42 (m; 6H; 6 x ArH); 7,57 (s; 1H; ArH); 8,35 (t; $J = 5,7$ Hz; 1H; NH); 11,01 (s; 1H; NH) ppm.

^{13}C NMR (126 MHz, DMSO- d_6): δ 20,6; 24,6; 39,3; 75,0; 111,4; 112,8; 117,4; 120,7; 122,9; 124,7; 127,2; 128,2; 128,2; 128,4; 134,5; 135,9; 167,7; 169,5 ppm.

MS (ESI $^+$): $[\text{M}]^+$: vypočítaná hodnota pro $\text{C}_{20}\text{H}_{20}\text{ClN}_2\text{O}_3^+$ (m/z): 371,1; experimentální hodnota: 371,2.

(*R*)-*N*-(2-(5-chlor-1*H*-indol-3-yl)ethyl)-2-(2-chlorfenyl)-2-hydroxyacetamid, 39.



Sloučenina **39** byla izolována jako bezbarvý olej.

$\text{C}_{18}\text{H}_{16}\text{Cl}_2\text{N}_2\text{O}_2$, $M = 363,24$ g.mol $^{-1}$

Výtěžnost: 200 mg (63%)

$[\alpha]_{\text{D}}^{20} = -20,0$ ($c = 0,1$; CHCl_3)

ee. = >99,9% (280 nm)

^1H NMR (500 MHz, DMSO- d_6): δ 2,85 (t; $J = 7,5$ Hz; 2H; CH_2); 3,34-3,46 (m; 2H; CH_2); 5,28 (d; $J = 5,0$ Hz; 1H; OH); 6,35 (d; $J = 5,0$ Hz; 1H; CH); 7,06 (dd; $J = 2,1$; 8,6 Hz; 1H; ArH); 7,23-7,42 (m; 6H; 6 x ArH); 7,64 (s; 1H; ArH); 8,19 (t; $J = 6,0$ Hz; 1H; NH); 11,02 (s; 1H; NH) ppm.

^{13}C NMR (126 MHz, DMSO- d_6): δ 24,8; 39,0; 70,3; 111,6; 112,8; 117,6; 120,7; 122,9; 124,6; 127,0; 128,3; 128,9; 129,0; 129,1; 132,7; 134,6; 139,1; 170,9 ppm.

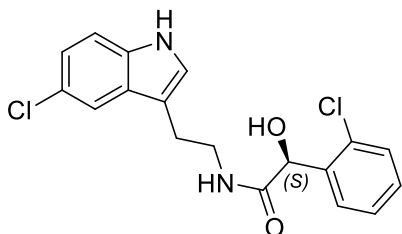
MS (ESI $^+$): $[\text{M}]^+$: vypočítaná hodnota pro $\text{C}_{18}\text{H}_{17}\text{Cl}_2\text{N}_2\text{O}_2^+$ (m/z): 363,1; experimentální hodnota: 363,1.

(S)-N-(2-(5-chlor-1H-indol-3-yl)ethyl)-2-(2-chlorofenyl)-2-hydroxyacetamid, 40.

Sloučenina **40** byla izolována jako bezbarvý olej.

$C_{18}H_{16}Cl_2N_2O_2$, $M = 363,24 \text{ g.mol}^{-1}$

Výtěžnost: 270 mg (85%)



$[\alpha]_D^{20} = +160,0$ ($c = 0,025$; $CHCl_3$)

ee. = >99,9% (280 nm)

1H NMR (500 MHz, DMSO- d_6): δ 2,85 (t; $J = 7,4$ Hz; 2H; CH_2); 3,34-3,46 (m; 2H; CH_2); 5,28 (d; $J = 5,0$ Hz; 1H; OH); 6,35 (d; $J = 5,0$ Hz; 1H; CH); 7,06 (dd; $J = 2,1$; 8,6 Hz; 1H; ArH); 7,23-7,42 (m; 6H; 6 x ArH); 7,64 (s; 1H; ArH); 8,19 (t; $J = 6,0$ Hz; 1H; NH); 11,02 (s; 1H; NH) ppm.

^{13}C NMR (126 MHz, DMSO- d_6): δ 24,8; 39,0; 70,3; 111,6; 112,8; 117,6; 120,7; 122,9; 124,6; 127,0; 128,3; 128,9; 129,0; 129,1; 132,7; 134,6; 139,1; 170,9 ppm.

MS (ESI⁺): $[M]^+$: vypočítaná hodnota pro $C_{18}H_{17}Cl_2N_2O_2^+$ (m/z): 363,1; experimentální hodnota: 363,2.

6. Závěr

V této bakalářské práci byly popsány základní informace o adjuvans, byla krátce představena historie adjuvans a druhy adjuvans, s ohledem na moderní poznatky. Dále zde byly uvedeny základní informace o TLR receptorech, jejich význam v organismu a typy lidských TLR. Podrobněji byl popsán TLR8, konkrétně jeho mechanismus aktivace, interakce s ostatními TLR, jeho agonisté a antagonisté.

V praktické části bylo připravených dvacet nových chirálních tryptaminových derivátů substituovaných v poloze 5, sloučeniny **21-30** odvozené od 5-methoxytryptaminu a sloučeniny **31-40** odvozené od 5-chlortryptaminu. Cíle práce byly splněny. Výsledné produkty byly přečištěny různými separačními metodami od vedlejších produktů (dicyklohexylmočoviny (**44**) nebo tetramethylmočoviny (**47**)). Všechny produkty byly získány s výtěžností větší než 59%.

Struktury všech produktů byly charakterizovány pomocí ^1H , ^{13}C NMR a MS analýzy. Teplota tání (T_f) byla změřena sloučeninám, které byly získány jako tuhé látky. Na polarimetru byla změřena specifická optická otáčivost chirálních molekul ($[\alpha]_D^{20}$). Dále u derivátů **23**, **24**, **27**, **28**, **29**, **30**, **33**, **34**, **35**, **36**, **39** a **40** byla určena enantiomerní čistota (ee. $\geq 97,7\%$), zatímco u derivátů **21**, **22**, **25**, **26**, **31**, **32**, **37** a **38** nebylo možné za daných analytických podmínek potvrdit enantiomerní čistotu, a tedy bude pravděpodobně nutné na chirální separaci použít jinou chirální kolonu.

Všechny připravené tryptaminové deriváty **21-40** budou poskytnuty na *in vitro* biologické testování aktivity a screening. Primárně bude sledován účinek na hTLR8, testování bude zároveň probíhat i na jiných typech TLR. Zároveň bude studován vliv geometrie chirálního centra na aktivitu.

7. Použitá literatura

- [1] HONEGR, Jan, Ondrej SOUKUP, Rafael DOLEZAL, David MALINAK, Marek PENHAKER, Roman PRYMULA a Kamil KUČA. Structural Properties of Potential Synthetic Vaccine Adjuvants - TLR Agonists. *Current Medicinal Chemistry*. 2015, **22**(29), 3306–3325.
- [2] GARÇON, Nathalie, Geert LEROUX-ROELS a Wen-Fang CHENG. Vaccine adjuvants. *Perspectives in Vaccinology*. 2011, **1**(1), 89–113.
- [3] O'HAGAN, Derek T., Mary Lee MACKICHAN a Manmohan SINGH. Recent developments in adjuvants for vaccines against infectious diseases. *Biomolecular Engineering*. 2001, **18**(3), 69-85.
- [4] MBOW, M Lamine, Ennio DE GREGORIO, Nicholas M VALIANTE a Rino RAPPUOLI. New adjuvants for human vaccines. *Current Opinion in Immunology*. 2010, **22**(3), 411-416.
- [5] PODDA, Audino. The adjuvanted influenza vaccines with novel adjuvants: experience with the MF59-adjuvanted vaccine. *Vaccine*. 2001, **19**(17-19), 2673-2680.
- [6] JÍLEK, Petr. *Základy imunologie*. 2., přeprac. vyd. Praha: Anyway, 2008. ISBN 978-80-254-2422-3.
- [7] VU, Ann, Andrew CALZADILLA, Sanaz GIDFAR, Rafael CALDERON-CANDELARIO a Mehdi MIRSAEIDI. Toll-like receptors in mycobacterial infection. *European Journal of Pharmacology*. 2017, **808**, 1-7.
- [8] WARSHAKOON, Hemamali J., Jennifer D. HOOD, Matthew R. KIMBRELL, et al. Potential adjuvant properties of innate immune stimuli. *Human Vaccines*. 2014, **5**(6), 381-394.
- [9] YAMAMOTO, Masahiro a Kiyoshi TAKEDA. Current Views of Toll-Like Receptor Signaling Pathways. *Gastroenterology Research and Practice*. 2010, **2010**, 1-8.
- [10] CERVANTES, Jorge L, Bennett WEINERMAN, Chaitali BASOLE a Juan C SALAZAR. TLR8: the forgotten relative revindicated. *Cellular & Molecular Immunology*. 2012, **9**(6), 434-438.
- [11] SHIMIZU, Toshiyuki. Structural insights into ligand recognition and regulation of nucleic acid-sensing Toll-like receptors. *Current Opinion in Structural Biology*. 2017, **47**, 52-59.
- [12] OHTO, Umeharu, Hiromi TANJI a Toshiyuki SHIMIZU. Structure and function of toll-like receptor 8. *Microbes and Infection*. 2014, **16**(4), 273-282.

- [13] HARTMANN, G. Nucleic Acid Immunity. *Advances in Immunology*. Elsevier, 2017, **2017**, s. 121-169.
- [14] ROYER, Christopher M., Karin RUDOLPH, Gregory N. DIETSCH, Robert M. HERSHBERG a Edward G. BARRETT. VTX-1463, a novel TLR-8 agonist, attenuates nasal congestion after ragweed challenge in sensitized beagle dogs. *Immunity, Inflammation and Disease*. 2016, **4**(1), 45-51.
- [15] TOMAI, M.A. a J.P. VASILAKOS. Toll-Like Receptor 7 and 8 Agonists for Vaccine Adjuvant Use. *Immunopotentiators in Modern Vaccines*. Elsevier, 2017, **2017**, s. 149-162.
- [16] MILLER, R.L, J.F GERSTER, M.L OWENS, H.B SLADE a M.a TOMAI. Review Article Imiquimod applied topically: a novel immune response modifier and new class of drug. *International Journal of Immunopharmacology*. 1999, **21**(1), 1-14.
- [17] SPYVEE, Mark, Lynn D. HAWKINS a Sally T. ISHIZAKA. Modulators of Toll-Like Receptor (TLR) Signaling. *Annual Reports in Medicinal Chemistry* Elsevier, 2010, **2010**, s. 191-207.
- [18] JURK, Marion, Florian HEIL, Jörg VOLLMER, Christian SCHETTER, Arthur M. KRIEG, Hermann WAGNER, Grayson LIPFORD a Stefan BAUER. Human TLR7 or TLR8 independently confer responsiveness to the antiviral compound R-848. *Nature Immunology*. 2002, **3**(6), 499-499.
- [19] SAUDER, D. N., M. H. SMITH, T. SENTA-MCMILLIAN, I. SORIA a T.-C. MENG. Randomized, Single-Blind, Placebo-Controlled Study of Topical Application of the Immune Response Modulator Resiquimod in Healthy Adults. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 2003, **47**(12), 3846-3852.
- [20] HONEGR, Jan, David MALINAK, Rafael DOLEZAL, et al. Rational design of novel TLR4 ligands by in silico screening and their functional and structural characterization in vitro. *European Journal of Medicinal Chemistry*. 2018, **146**, 38-46.
- [21] KOHOUTOVÁ, Zuzana. *Příprava nových tryptaminových derivátů jako potenciálních adjuvans*. Hradec Králové, 2018. Bakalářská práce. Univerzita Hradec Králová, Přírodovědecká fakulta. Vedoucí práce Dávid Maliňák.