

STŘEDOŠKOLSKÁ ODBORNÁ ČINNOST

Obor č. 3: Chemie

Syntéza inhibitorů fibroblastového aktivačního proteinu odvozených od 2-kyanopyrrolidinu

Natan Sidej
Hlavní město Praha

Praha 2018

STŘEDOŠKOLSKÁ ODBORNÁ ČINNOST

Obor č. 3: Chemie

**Syntéza inhibitorů fibroblastového aktivačního
proteinu odvozených od 2-kyanopyrrolidinu**

**Synthesis of fibroblast activation protein inhibitors
derived from 2-cyanopyrrolidine**

Autor: Natan Sidej

Škola: Gymnázium, Praha 6, Arabská 14

Kraj: Hlavní město Praha

Konzultant: Mgr. Adéla Provazníková

Praha 2018

Prohlášení

Prohlašuji, že jsem svou práci SOČ vypracoval samostatně a použil jsem pouze prameny a literaturu uvedené v seznamu bibliografických záznamů.

Prohlašuji, že tištěná verze a elektronická verze soutěžní práce SOČ jsou shodné.

Nemám závažný důvod proti zpřístupnění této práce v souladu se zákonem č. 121/2000 Sb., o právu autorském, o právech souvisejících s právem autorským a o změně některých zákonů (autorský zákon) ve znění pozdějších předpisů.

V Praze dne 27. 3. 2018

Natan Sidej

Poděkování

Tímto bych chtěl poděkovat Mgr. Adéle Provazníkové za vstřícnost, ochotu, pomoc při práci v laboratoři a za její trpělivý přístup během konzultování. Mé další díky patří Ing. Petru Šimonovi, PhD. za jeho zkušené rady a připomínky, kterých si velmi vážím.

Dále bych chtěl poděkovat Bc. Petře Dvořákové za změření biologických aktivit připravených látek a Ing. Kateřině Bártové za vyhotovení NMR spekter a výpisů.

Mé velké díky patří doc. RNDr. Janu Konvalinkovi, CSc. za to, že mne přijal do své výzkumné skupiny a umožnil mi si vyzkoušet, jaké je to pracovat ve vědeckém prostředí a v profesionálně zařízené laboratoři.

V neposlední řadě bych rád vyjádřil díky své rodině, přátelům a blízkým za to, že mne v mé práci a studiu neustále podporovali i ve chvílích, kdy to nebylo snadné.

Anotace

Tato práce se zabývá syntézou inhibitorů fibroblastového aktivačního proteinu (FAP). K jeho expresi dochází téměř výlučně v nádorové tkáni, což z něj činí výjimečný terapeutický cíl protinádorové terapie. Během práce byla úspěšně připravena série látek, jejichž struktura vychází z publikovaných poznatků o inhibici FAP. Syntéza byla postavena na střídání odchraňovacích a kondenzačních kroků, přičemž konkrétní reakční podmínky byly pro každý krok optimalizovány. Průběh všech reakcí byl detailně sledován pomocí LC-MS a tenkovrstvé chromatografie. Látky byly čištěny chromatografickými metodami (HPLC, FLASH) a poté charakterizovány NMR spektroskopií. Během syntézy byla objevena dosud nepopsaná vedlejší reakce způsobená činidlem PyBroP. Její produkt byl izolován a plně charakterizován. Po vyvrácení několika možných hypotéz byla odhalena příčina vzniku vedlejšího produktu na základě sérií dodatečných experimentů a byly navrženy postupy, jak se této nežádoucí reakci vyhnout. Všechny připravené látky byly testovány na FAP a jemu příbuzných proteinech. Výsledky ukazují, že byl nalezen nový nízkonanomolární inhibitor prolyloligopeptidasy (PREP) a nový submikromolární inhibitor FAP.

Klíčová slova

fibroblastový aktivační protein; serinová proteasa; medicínální chemie; vývoj léčiv

Abstract

This work deals with the synthesis of fibroblast activation protein (FAP) inhibitors. FAP expression occurs almost exclusively in tumor tissue, which makes it an exceptional therapeutic target. A series of compounds, whose structures are based on known facts about FAP inhibition, was successfully synthesized. The synthesis comprises of deprotection and condensation reaction steps, for which reaction conditions were optimized. The course of all reactions was tracked by LC-MS and thin-layer chromatography. The compounds were purified using chromatographic methods (HPLC, FLASH) and then characterized through NMR spectroscopy. During the synthesis, a yet unknown side reaction, caused by the PyBroP reagent, was discovered. After disproving several hypotheses, the cause of the reaction was explained on the basis of further experimental procedures and a way of evading this reaction was proposed. All compounds were tested against FAP and proteins related to it. The results indicate, that a new low nanomolar prolyl oligopeptidase (PREP) and a new submicromolar FAP inhibitor were discovered.

Keywords

fibroblast activation protein; serine protease; medicinal chemistry; drug development

SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK

Ac	acetyl
Boc	<i>tert</i> -butyloxykarbonyl
DCM	dichlormethan
DIPEA	diisopropylethylamin
DMF	dimethylformamid
DPP	dipeptidylpeptidasa
ekv.	ekvivalent
EtOAc	ethyl acetát
FAP	fibroblastový aktivační protein
GLP-1	<i>glucagon-like peptide 1</i> glukagonu podobný peptid 1
HATU	2-(7-aza-1H-benzotriazol-1-yl)- <i>N,N,N',N'</i> -tetramethyluronium hexafluorofosfát
HOAt	1-hydroxy-7-azabenzotriazol
HOBt	1-hydroxybenzotriazol
HPLC	<i>high-performance liquid chromatography</i> vysokoúčinná kapalinová chromatografie
Chin	chinolin-4-karboxyl
IC ₅₀	střední inhibiční konstanta
LC-MS	<i>liquid chromatography – mass spectrometry</i> kapalinová chromatografie – hmotnostní spektrometrie
LT	laboratorní teplota
Me	methyl
MeCN	acetonitril
NMR	nukleární magnetická rezonance
Ph ₃ P	trifenylfosfin

PREP	prolyloligopeptidasa
<i>p</i> -TsOH · H ₂ O	monohydrát kyseliny <i>para</i> -toluensulfonové
PyBroP	brom-tripyrrolidinyl-fosfonium hexafluorofosfát
Pyrr	pyrrolidin
Pyrr ₃ PO	tripyrrolidinylfosfin oxid
RVO	rotační vakuová odparka
TFA	<i>trifluoroacetic acid</i> kyselina trifluoroctová
TLC	<i>thin-layer chromatography</i> tenkovrstvá chromatografie
TSTU	<i>N,N,N',N'</i> -tetramethyl- <i>O</i> -(<i>N</i> -sukcinimidyl)uronium tetrafluorborát
UV-VIS	<i>ultraviolet – visible light</i> ultrafialové – viditelné světlo
Z	benzyloxykarbonyl

OBSAH

Seznam použitých zkratk	5
1 Úvod	8
2 Teoretická část	9
2.1 Fibroblastový aktivační protein (FAP)	9
2.1.1 Charakteristika a struktura	9
2.1.2 Enzymová aktivita	9
2.1.3 Štěpení peptidové vazby serinovými proteasami	10
2.1.4 Příbuzné proteiny FAP	11
2.1.5 Inhibitory	12
2.2 Syntéza inhibitorů FAP	16
2.2.1 Tvorba amidové vazby	16
2.2.2 Kondenzační činidla	18
2.2.3 Chránicí skupiny při syntéze peptidů	21
3 Experimentální část	23
3.1 Chemikálie a přístrojové vybavení	23
3.2 Pracovní postupy	23
3.2.1 Obecné pracovní postupy	24
3.2.2 Konkrétní syntetické kroky	24
4 Výsledky a diskuse	29
4.1 Syntéza	30
4.1.1 Příprava výchozí látky	30
4.1.2 Syntéza látek <i>N</i> -Boc-AA-ProCN a <i>N</i> -Ac-AA-ProCN	31
4.1.3 Syntéza látek <i>N</i> -Chin-AA-ProCN	34
4.1.4 Vedlejší produkt kondenzace s PyBroP	36
4.1.5 Optimalizace aktivace kyseliny pomocí činidla PyBroP	39
4.2 Inhibiční aktivity látek	42
4.2.1 Metody měření a výsledky	42
4.2.2 Aktivita látek <i>N</i> -Boc-AA-ProCN	43
4.2.3 Aktivita látek <i>N</i> -Ac-AA-ProCN	45
4.2.4 Aktivita látek <i>N</i> -Chin-AA-ProCN	45
5 Závěr	47
6 Použitá literatura	48
7 Seznam obrázků, schémat a tabulek	50
8 Příloha 1: NMR spektra syntetizovaných látek	52

1 ÚVOD

Fibroblastový aktivační protein (FAP) již od svého objevení na přelomu 80. a 90. let sehrává důležitou roli na poli protinádorové terapie. Tento enzym disponuje dvojitou katalytickou aktivitou a exprimuje se téměř výlučně v nádorové tkáni, což z něj činí slibný terapeutický cíl.

Exprese, ke které dochází převážně v nemocné tkáni, je z terapeutického hlediska nespornou výhodou, protože je díky ní sníženo riziko zásahu a poškození zdravé tkáně. Duální aktivita této proteasy také umožňuje její velmi selektivní inhibici, při které nedochází k nežádoucímu utlumení činnosti příbuzných proteinů.

Terapeutický potenciál FAP je obrovský a z toho důvodu je věnována patřičná pozornost vývoji jeho nových inhibitorů. Ty jsou často založeny na dipeptidových strukturách, které napodobují přirozené substráty. Z literatury vyplývá, že ke štěpení dochází výhradně za aminokyselinou prolin, jejíž struktura je tedy stěžejní pro vazbu látky na FAP. Z toho důvodu byla odbornými publikacemi inspirována série látek, vycházejících z (*R*)-2-kyanopyrrolidinu, jehož struktura je od prolinu odvozená. Hlavním cílem této práce je jejich syntéza a charakterizace, doplněná o optimalizaci reakčních podmínek za účelem zajištění snadného zpracování reakčních směsí. Dalším cílem je analýza výsledků biochemického testování inhibičních vlastností syntetizovaných látek, podložená doposud známými poznatky o strukturách a chování cílových enzymů.

Součástí práce je také objasnění příčiny dosud neznámé a v literatuře nepopsané vedlejší reakce, způsobené činidlem PyBroP. Její úspěšné vysvětlení na základě experimentálně podložené hypotézy je důležitým poznatkem pro vývoj a syntézu obdobných peptidomimetik.

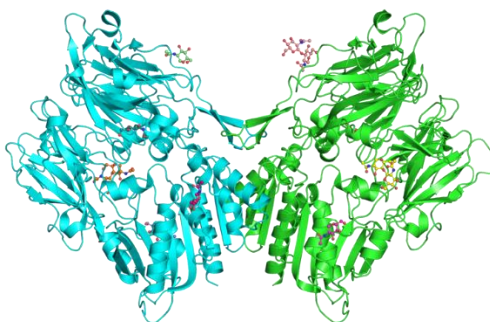
2 TEORETICKÁ ČÁST

2.1 Fibroblastový aktivační protein (FAP)

Fibroblastový aktivační protein je serinová proteasa, která se krátce po svém objevení dostala do středu vědeckého zájmu. Důvodem bylo zjištění, že k expresi FAP dochází v drtivé většině nádorových fibroblastů,¹ zatímco v nepostížených fibroblastech se téměř neexprimuje [2]. FAP má dvojitou enzymovou aktivitu - štěpí dipeptidy z *N*-konce proteinů (dipeptidylpeptidasový charakter) [3], ale je také schopen štěpit peptidy uvnitř řetězce (endopeptidasový charakter) [4]. Protein FAP vykazuje vysokou substrátovou specifitu, která umožňuje velmi selektivní inhibici. Tyto dva faktory ho činí potenciálním terapeutickým cílem na poli protinádorové terapie.

2.1.1 Charakteristika a struktura

FAP je tvořen celkem 760 aminokyselinami. Je klasifikován jako integrální membránový protein typu II – vyskytuje se na rozhraní buněčné membrány, jeho *N*-konec se nachází uvnitř buňky (6 aminokyselin), 18 aminokyselin tvoří jeho membránovou část a jeho *C*-terminální zbytek o délce 736 aminokyselin tvoří objemnou mimobuněčnou část. Katalyticky aktivní je pouze jeho 170 kDa homodimer (Obrázek 1) [5].



Obrázek 1 – Model krystalové struktury katalyticky aktivního 170kDa homodimeru FAP. Jednotlivé monomerní jednotky jsou barevně odlišeny. Převzato z [6].

2.1.2 Enzymová aktivita

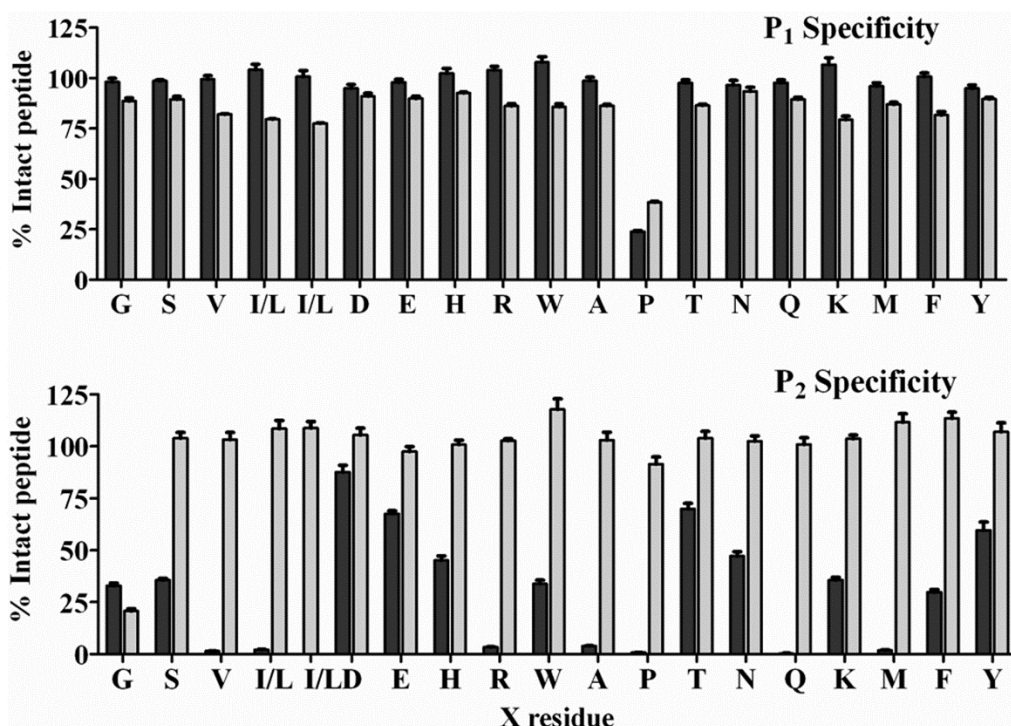
Prolyloligopeptidasy, mezi které je FAP řazen, jsou charakteristické odštěpováním dipeptidů z *N*-konce proteinů. K tomu dochází výhradně za aminokyselinou za aminokyselinovým zbytkem od prolinemu (Pro).² Strukturu dipeptidu lze tedy zapsat jako *N*-P₂-Pro, kde P₂ značí nespécifikovanou aminokyselinu. Edosada *et al.* [7] zkoumali vliv různých aminokyselin v pozici P₂ na substrátovou specifitu a ukázali, že FAP má největší tendenci odštěpovat dipeptidy, pokud se v P₂ nachází isoleucin (Ile), prolin nebo arginin (Arg). Platí, že aminokyseliny P₂ s rozměrnými, hydrofobními, aromatickými či kladně nabitými

¹ **fibroblast** = buňka vazivové tkáně, která do svého okolí uvolňuje mimobuněčnou hmotu a proteiny [1].

² Třípísmenné značení aminokyselin podle smluvené konvence.

postranními řetězci jsou preferovány před aminokyselinami se postranními řetězci, nesoucími záporný náboj (Obrázek 2) [8].

V rámci stejné studie byla také zkoumána endopeptidasová aktivita FAP. Prostřednictvím *N*-acetylace aminokyseliny P₂ byly simulovány podmínky pro endopeptidasové štěpení, acetyl navázaný na terminální atom dusíku představoval další pokračování peptidového řetězce. Výsledky ukázaly, že po acetylaci *N*-konce výrazně poklesla aktivita FAP vůči substrátům z první série experimentů. Jediným substrátem, který FAP efektivně štěpil, byla sekvence *N*-Ac-Gly-Pro (Obrázek 2). Dodatečně bylo ukázáno, že tato sekvence vykazuje specifitu pro FAP oproti jeho blízkým homologům. Proto se stala výchozí strukturou pro vývoj potenciálních inhibitorů FAP.



Obrázek 2 – Substrátová specifita FAP vzhledem k aminokyselinám v pozicích P₁ a P₂. Sloupce znázorňují procentuální koncentraci neporušeného substrátu po 24 h inkubaci při 37 °C. Tmavé sloupce znázorňují substráty s volným *N*-konce, světlé znázorňují substráty s *N*-acetylovaným koncem. Aminokyseliny jsou reprezentovány jednopísmenným značením. Převzato z [8].

2.1.3 Štěpení peptidové vazby serinovými proteasami

Katalytická triáda neboli trojice aminokyselin zodpovědných za enzymovou aktivitu je u většiny serinových proteas, včetně FAP, tvořena histidinem (His), serinem (Ser) a aspartátem (Asp). Jejich umístění u FAP je Ser624,³ His734 a Asp702 [4].

Mechanismus štěpení probíhá adičně-eliminacním mechanismem (Schéma 1). Spočívá v ataku karbonylového uhlíku peptidové vazby hydroxylovou skupinou serinu. Ta je deprotonována imidazolovou skupinou histidinu a stává se tak nukleofilem. Po zmíněném nukleofilním ataku

³ Číslo udává pořadí aminokyseliny v sekvenci proteinu, čísluje se vzestupně od *N*-konce.

vzniká tetraedrální intermediát a imidazolový kation (adiční krok **1**). Dochází ke štěpení peptidové vazby, uvolňuje se *N*-terminální část rozštěpeného substrátu za současného přenosu protonu z imidazolu na dusík aminoskupiny (eliminací krok **2**). Zpětnou deacylací serinu dochází k obnovení katalytického centra a uvolnění *C*-terminální části rozštěpeného substrátu, atakujícím nukleofilem je v tomto případě voda (kroky **3** a **4**) [9].

Aspartát se na rozdíl od histidinu a serinu štěpení neúčastní přímo, nicméně je důležitý pro stabilizaci imidazolové skupiny během vytvoření imidazolového iontu a tetraedrálního intermediátu. K interakci dochází prostřednictvím vodíkové vazby mezi reakce se neúčastnícím dusíkem imidazolu a kyslíkem karboxylové skupiny aspartátu [10].

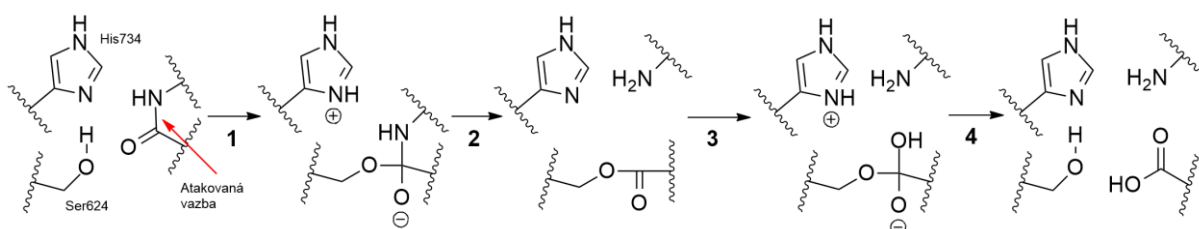


Schéma 1 - Mechanismus štěpení peptidové vazby serinovými proteasami. Na schématu jsou vyznačeny postranní řetězce serinu Ser624 a histidinu His734, prostřednictvím kterých FAP adičně-eliminacím mechanismem štěpí peptidové vazby v substrátech. Převzato a upraveno z [9].

2.1.4 Příbuzné proteiny FAP

FAP spadá do prolyllooligopeptidasové rodiny S9 (databáze MEROPS, viz [11]). Ta je dále klasifikována na podrodiny, přičemž FAP náleží podrodině S9B. V té se nachází jeho homology dipeptidylpeptidasa IV (DPPIV), DPP8 a DPP9. Nejblížejším homologem je DPPIV, se kterou sdílí 52% sekvence [5]. Největší část sekvenční homologie je pozorovatelná v *C*-terminální mimobuněčné doméně FAP.

DPPIV je z celé podrodiny nejvíce charakterizovaná a prostudovaná. Bylo ukázáno, že štěpí bioaktivní peptidy a tím sehrává roli v široké škále patologických procesů. Zjistilo se, že DPPIV štěpí glukagonu podobný peptid GLP-1 *in vivo* a tím utlumuje sekreci inzulínu, proto byla DPPIV označena jako terapeutický cíl pro léčbu diabetu II. typu [12].

Na základě silné homologie FAP a DPPIV byla provedena testování za účelem porovnání aktivity těchto dvou peptidas. Aertgeerts *et al.* [4] využili substráty s *N*-koncem blokováným benzyloxykarbonylovou chránicí skupinou a ukázali, že DPPIV je lepší exopeptidasa než FAP a naopak, že endopeptidasový charakter FAP je o mnoho silnější než u DPPIV. Tento jev byl vysvětlen přítomností záporně nabitého aspartátu Asp663, který DPPIV umožňuje lépe rozpoznat *N*-terminální kladně nabitou NH_3^+ skupinu. Na odpovídajícím místě je u FAP přítomen alanin Ala657, který je důležitý pro rozpoznání substrátů a enzymovou aktivitu. Po mutaci FAP, při které byl Ala657 nahrazen aspartátem, zhruba 350× poklesla jeho endopeptidasová aktivita vůči sekvenci Gly-Pro a naopak byla posílena jeho exopeptidasová aktivita [4].

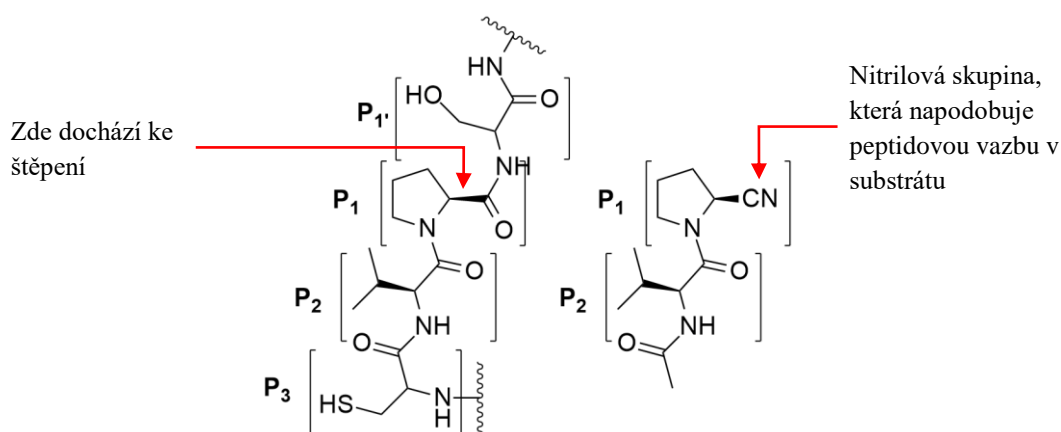
Prolyl oligopeptidasa (PREP), patřící do podrodiny S9A, má výhradně endopeptidasovou aktivitu, kterou sdílí s FAP. PREP, stejně jako FAP, štěpí substráty za prolinem. Yoshimoto *et al.* [13] prokázali, že PREP velice dobře štěpí substráty chráněné benzyloxykarbonylovou skupinou, a naopak nevykazuje téměř žádnou aktivitu vůči stejným, nechráněným substrátům. V rámci studie byla také testována aktivita PREP vůči stejným, chráněným substrátům, u kterých došlo k záměně prolinu za alanin. K hydrolyze peptidové vazby za alaninem docházelo také, avšak mnohem pomaleji. Nechráněné substráty opět nevykazovaly žádnou aktivitu.

2.1.5 Inhibitory

Zmíněné poznatky ze screeningových studií se staly východiskem pro vývoj inhibitorů zmíněných peptidas. Primárním ukazatelem účinnosti inhibitorů je tzv. inhibiční konstanta (IC_{50}), která udává množství inhibitoru, potřebné ke snížení katalytické aktivity enzymu o polovinu. Typicky se uvádí v jednotkách molární koncentrace, hodnoty se pohybují řádově mezi μM a pM .

Druhým žádoucím faktorem inhibitoru je jeho selektivita. Na základě podobné enzymové aktivity může docházet k inhibici příbuzného enzymu, což je nežádoucí. Selektivita se obvykle vyjadřuje jako bezrozměrná veličina daná poměrem rovnovážných konstant inhibice jednotlivých enzymů.

Pro snazší popisování struktur inhibitorů je v práci zaveden systém značení pořadí aminokyselin, který se standardně používá pro značení aminokyselin v krátkých peptidech (Obrázek 3). Zde je například v pozici P_1 prolin a v pozici P_2 L-valin. Obdobně se značí další aminokyseliny, obsažené ve struktuře inhibitoru.

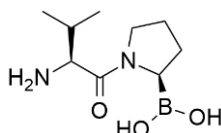


Obrázek 3 - Systém značení pořadí aminokyselin ve strukturách inhibitorů. Vlevo je ukázka značení jednotlivých aminokyselin v rámci peptidového řetězce. Ty se v závislosti na místě štěpení značí P_1 , P_1 , P_2 atp. Vpravo je uveden příklad inhibitoru, jehož struktura je popsána analogickým způsobem. V práci je u inhibitorů tento systém pro přehlednost používán i nadále.

Velká část již známých inhibitorů FAP je založena na dipeptidové struktuře, která obsahuje funkční skupinu schopnou podstoupit nukleofilní atak kyslíkem serinu v katalytickém místě FAP. Velkou skupinu těchto látek tvoří různé deriváty pyrrolidin-2-boronové kyseliny,

kde je boronová skupina interagujícím elektrofilem [8, 14]. Tato struktura je analogická ke struktuře L-prolinu, který je klíčovým pro aktivitu FAP.

Příkladem takového inhibitoru je látka Val-*boro*Pro (Talabostat, PT-100, Obrázek 4), vycházející z l-valinu v pozici P2. Talabostat byl prvním objeveným inhibitorem FAP a dostal se do druhé fáze klinického testování, ale pozorované účinky byly velmi slabé. Aby se účinky Talabostatu projevíly, musela být zvýšena dávka, což způsobilo projevy toxicity. Val-*boro*Pro také není selektivní vůči FAP a dochází k inhibici DPPIV, DPP8 a DPP9 [15]. Z toho důvodu bylo od dalšího testování upuštěno.



Obrázek 4 - Struktura inhibitoru Val-*boro*Pro.

O strukturu pyrrolidin-2-boronové kyseliny se opírají Poplawski *et al.* [8]. Zkoumali účinky různých *N*-substituentů na selektivitu inhibitoru vůči FAP a vůči PREP. (Tabulka 1) Nejvyšší selektivitu pro FAP vzhledem k PREP projevila látka Gly-*boro*Pro (Tabulka 1, **1**), což koreluje s poznatkem, že FAP efektivně štěpí substráty se sekvencí Gly-Pro. Vzhledem k volnému *N*-konci tato látka nevykazuje žádnou specifitu vůči FAP oproti dipeptidylpeptidasám. Po *N*-substituci této látky naftalen-1-karbonylem (Tabulka 1, **2**) a pyridin-4-karbonylem (Tabulka 1, **3**) došlo k výraznému poklesu aktivity vůči všem DPP (v souladu s popsanou exopeptidasovou aktivitou DPP), ale rozdíly v selektivě vůči FAP a PREP téměř zmizely.

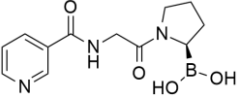
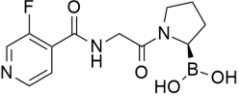
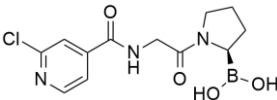
Tabulka 1 - Inhibiční vlastnosti derivátů kyseliny boronové **1-5**. Poslední sloupec udává selektivitu pro FAP vůči PREP. Převzato a upraveno z [8].

Látka	Struktura	IC ₅₀ [nM]					IC ₅₀ PREP / IC ₅₀ FAP
		DPPIV	DPP8	DPP9	FAP	PREP	
1		13 ± 2,1	180 ± 32	98 ± 20	52 ± 9,2	47000 ± 45000	900
2		>100000	1200 ± 300	420 ± 130	2,3 ± 0,4	1,8 ± 0,3	0,8
3		2800 ± 540	1900 ± 260	1000 ± 570	0,47 ± 0,05	5,0 ± 0,7	11
4		>100000	5600 ± 1300	3400 ± 800	36 ± 4.8	13000 ± 4300	360
5		>100000	>100000	>100000	>100000	1,3 ± 0,2	>77000

Stejná studie ukázala, že náhrada glycinu v pozici P₂ D-alaninem (Tabulka 1, **4**) zhoršila inhibiční schopnosti vůči PREP o 4 řády, přičemž silná inhibice FAP zůstala zachována. Struktura s D-alaninem v pozici P₂ se jeví jako optimální vzhledem k selektivitě a účinnosti.

Poplawská *et al.* se dále zabývala optimalizací *N*-substituovaného pyridinového kruhu. Protonovaný dusík v poloze 4 může tvořit vodíkové vazby s karbonylovým kyslíkem kyseliny glutamové Glu204 ve struktuře FAP a zvyšovat tak selektivitu inhibitoru (PREP nedisponuje funkční skupinou, která by mohla být akceptorem vodíkové vazby). Substituce pyridinového kruhu halogeny (F, Cl) v polohách 5 a 6 ještě více posiluje účinnost vůči FAP, ale 2-3× zhoršuje selektivitu pro FAP vůči PREP (Tabulka 2).

Tabulka 2 - Vliv polohy atomu dusíku a halogenových substituentů na aktivitu vůči FAP a PREP. Převzato a upraveno z [8].

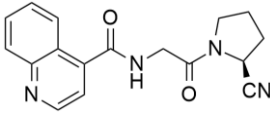
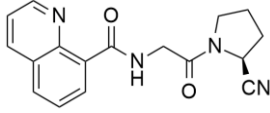
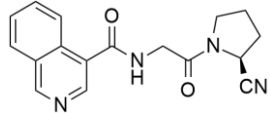
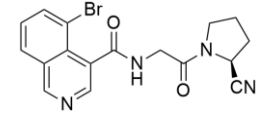
Látka	Struktura	IC ₅₀ [nM]		$\frac{IC_{50PREP}}{IC_{50FAP}}$
		FAP	PREP	
6		500 ± 95	91000 ± 65000	180
7		15 ± 0,9	1600 ± 190	110
8		9,4 ± 1,1	1300 ± 200	140

Studie dále testovala vliv různých D-aminokyselin v pozici P₂ na aktivitu inhibitoru. Pro experimenty byl *N*-konec inhibitoru substituován chinolin-4-karbonylem. Výsledky ukázaly, že s narůstající velikostí postranního řetězce D-aminokyseliny P₂ se rychle snižuje aktivita vůči FAP až do míry, kdy látka s FAP neinteraguje.

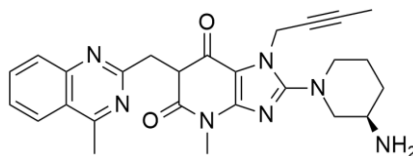
Poplawski *et al.* [8] dále identifikovali účinný a selektivní inhibitor PREP (Tabulka 1, **5**). Pyridinový dusík mimo polohu 4 a L-valin v poloze P₂ potlačují aktivitu vůči FAP, *N*-substituce dusíku aminokyseliny P₂ naopak snižuje aktivitu vůči DPP (*N*-konec není volný).

Ve stejném roce Jansen *et al.* [16] publikovali sérii inhibitorů FAP založenou taktéž na struktuře Gly-Pro. Boronová skupina je zde nahrazena nitrilovou funkční skupinou a *N*-konec glycinu nese chinolinkarbonylovou strukturu. Chinolín zajišťuje selektivitu pro FAP – jeho π -elektrony mohou nevázebně interagovat s kladně nabitou guanidinovou částí postranního řetězce argininu Arg123. Pozice atomu dusíku v chinolinu má zjevně zásadní vliv na afinitu inhibitoru pro FAP. V rámci studie byly testovány jeho různá umístění (Tabulka 3), což způsobilo kolísání inhibiční konstanty FAP v rozmezí tří řádů. Nejlepších výsledků dosahuje dusík právě v pozici 4 (Tabulka 3, **9**), nejhorších v pozicích 8 a 3 (Tabulka 3, **10**, **11**). Substituce atomu bromu v pozici 5 způsobila prudké zhoršení inhibice PREP, látka (Tabulka 3, **12**) je z této série nejspecifičtějším inhibitorem FAP.

Tabulka 3 - Inhibiční vlastnosti látek **9-12**. Převzato a upraveno z [16].

Látka	Struktura	IC ₅₀ [nM]					$\frac{IC_{50PREP}}{IC_{50FAP}}$
		DPPIV	DPP8	DPP9	FAP	PREP	
9		>100000	>100000	>100000	10,3 ± 0,4	860 ± 70	84
10		>100000	>100000	>100000	2170 ± 90	8200 ± 800	3,8
11		>100000	>100000	>100000	4800 ± 200	610 ± 70	0,1
12		>100000	>100000	>100000	11 ± 0,4	>50000	4545

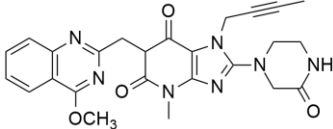
Jansen *et al.* v jiné studii [14] jako výchozí bod pro vývoj nové třídy inhibitorů FAP zvolili již publikovaný inhibitor DPPIV, Linagliptin (**13**, Obrázek 5). Ten neinteraguje s DPP8, DPP9 ani s PREP, místo toho vykazuje submikromolární hodnoty inhibiční konstanty pro FAP. Selektivita a ověřené terapeutické účinky Linagliptinu byly silným východiskem pro vývoj inhibitorů FAP založených na podobné struktuře.



Obrázek 5 - Inhibitor DPPIV Linagliptin (**13**).

V rámci studie byla publikována velmi rozsáhlá série látek založených na xantinovém heterocyklickém jádře. Látka **14** (Tabulka 4), u které došlo k zavedení piperazinového kruhu (za účelem odstranění skupiny NH₂, která je klíčová pro interakci s DPPIV) a methoxyskupiny na chinazolinový kruh (za účelem zvýšení selektivity pro FAP vzhledem k DPPIV), jevila nejlepší výsledky z celé série. Je prvním inhibitorem FAP, který není závislý na interagující elektrofilní části, není založen na dipeptidové struktuře, a přesto vykazuje řádově mikromolární hodnoty inhibičních konstant.

Tabulka 4 - Inhibiční vlastnosti látky **14**. Místo testování vůči DPP8 byla testována vůči DPPII, dalšímu ze členů rodiny dipeptidylpeptidas. Převzato a upraveno z [14].

Látka	Struktura	IC ₅₀ [nM]				
		DPPIV	DPPII	DPP9	FAP	PREP
14		>100000	>100000	>100000	5800 ± 500	>100000

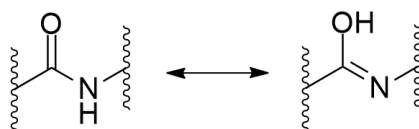
2.2 Syntéza inhibitorů FAP

Většina výše popsaných a publikovaných inhibitorů FAP se opírá o dipeptidové struktury, které jsou podloženy informacemi o substrátové specifitě a chování FAP. Spadají tak do kategorie peptidomimetik, syntetických nízkomolekulárních látek vycházejících ze struktur přirozeně se vyskytujících peptidů. Peptidomimetika napodobují části sekvencí výchozích peptidů, které zodpovídají za jejich biologickou aktivitu. Jsou tak účinným nástrojem pro vývoj nových léčiv a inhibitorů. Jejich příprava proto z velké části vychází z metod organické syntézy amidů.

2.2.1 Tvorba amidové vazby

Aminokyseliny jsou charakteristické svou schopností vytvářet mezi sebou amidové vazby a provázet se tak do větších celků. Výsledné látky nazýváme peptidy, v případě vysokého počtu aminokyselin hovoříme o proteinech. Rovnováha procesu vzniku kovalentní amidové vazby mezi funkčními skupinami NH₂ a COOH je ve vodných roztocích ve prospěch reaktantů. Proto musí být při syntéze proteinů v živých organismech dodávána energie. Tvorba amidových vazeb v laboratoři probíhá nepřímo s pomocí kondenzačních činidel [17].

Díky tautomerii amidové skupiny, ke které přispívá delokalizovaný, volný elektronový pár dusíku, má amidová vazba odlišné vlastnosti od běžné jednoduché vazby C–N. Tautomerie zamezuje rotaci kolem vazby, amidová vazba tedy zaujímá planární geometrii [17] (Obrázek 6).



Obrázek 6 – Tautomerie amidové vazby vyjádřená dvojicí rezonančních struktur

Syntézu amidové vazby lze provést několika způsoby. Prvním z nich je reakce aminu s acylhalogenidem (Schéma 2). Halogen navázaný na karbonylový uhlík svými silně elektronegativními účinky polarizuje vazbu C–X a zvyšuje tak elektrofilní charakter atomu uhlíku. Aminogrupa ho nukleofilně atakuje a vzniká tetraedrální intermediát. Halogen v dalším kroku odstupuje, utvoří sůl s volným aminem a vylučuje se jako vedlejší produkt [18].

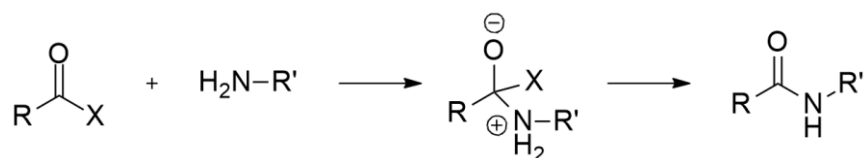


Schéma 2 - Syntéza amidu reakcí acylhalogenidu s aminem

Nevýhodou při syntéze amidů z aminů a acylhalogenidů je vznik halogenovodíku HX, který je třeba neutralizovat dalším ekvivalentem aminu. Alternativou je provedení reakce v přítomnosti jiné báze (např. NaOH, KOH), která kyselinu neutralizuje. Vzniklý hydroxylový anion ale také atakuje acylhalogenid. Tento problém lze obejít Schotten-Baumannovou syntézou (Schéma 3), která se provádí ve dvoufázovém systému nemísitelných rozpouštědel (např. voda/dichlormethan). Výchozí acylhalogenid a amin zůstanou v organické fázi, uvolněný halogenidový anion přechází do vodného, bazického roztoku. Tento postup lze zvolit v případě, že jsou výchozí látky mísitelné s daným organickým rozpouštědlem [18].

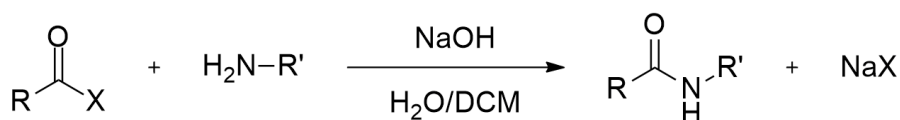


Schéma 3 - Schotten-Baumannova syntéza amidů

Obdobně lze amidy syntetizovat reakcí aminů s anhydridy (Schéma 4). Atakovaným elektrofilem je jeden ze dvou karbonylových uhlíků příslušného anhydridu (kyslík zvyšuje elektrofilitu uhlíku). Produktem reakce je amid a anion kyseliny, ze které byl anhydrid odvozen.

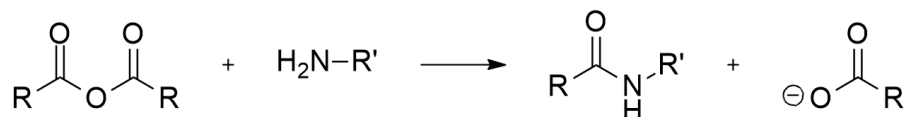


Schéma 4 - Syntéza amidů reakcí anhydridu s aminem

Amidy mohou také vznikat reakcí aminů s keteny, sloučeninami s kumulovanými dvojnými vazbami C=C=O (Schéma 5). Uhlík nesoucí skupinu CO je nukleofilně napaden, dochází k přenosu protonu z napadajícího aminu a vzniká amid.

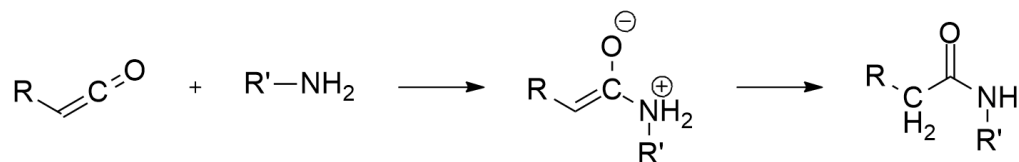


Schéma 5 - Syntéza amidů reakcí ketenu s aminem

Výše uvedené způsoby vzniku amidů jsou vhodné pro syntézu nízkomolekulárních sloučenin, nicméně pro syntézu peptidů se nehodí. Reakční podmínky jsou agresivní a vzhledem k možné délce a složitosti peptidových řetězců může docházet k nežádoucím vedlejším reakcím a poškození struktury výsledné látky.

2.2.2 Kondenzační činidla

Peptidová kondenzační činidla jsou látky, které se využívají během syntézy peptidů. Jejich funkce spočívá v aktivaci karboxylové skupiny, kterou poté může aminoskupina nukleofilně atakovat. Aktivace probíhá relativně rychle, *in situ* a s malým počtem vedlejších reakcí (aktivace karboxylové skupiny kondenzačními činidly je šetrnější než syntetické přístupy uvedené v odstavci 2.2.1). Činidla jsou v současné době dobře komerčně dostupná [19]. Kondenzační činidla se dělí podle struktury na karbodiimidy, fosfoniové a uroniové soli. Během syntézy jsem využíval tři činidla z posledních dvou jmenovaných skupin, kterým se bude kapitola dále věnovat.

Mechanismus kondenzačních činidel je založen na aktivaci prostřednictvím esteru, který dokáže zesílit elektrofilní charakter karbonylového uhlíku a umožnit atak aminoskupinou. Pokud má aminokyselina chirální centrum (každá přirozeně se vyskytující aminokyselina kromě glycinu), pak vyvstává riziko nežádoucí reakce – racemizace.

Jeden z hlavních mechanismů racemizace α -aminokyselin⁴ je enolizace (Schéma 6). Míra racemizace je úzce spjata se způsobem aktivace karboxylové skupiny. Pokud se na aktivaci podílí báze, pak je vyšší šance, že dojde k odtržení protonu z α -uhlíku a následné enolizaci. Riziko racemizace se také zvyšuje, pokud je aktivující skupina zároveň dobrou odstupující skupinou. Z toho důvodu je vysoký výtěžek kondenzační reakce spjat s vyšší racemizací (agresivnější činidla) [20].

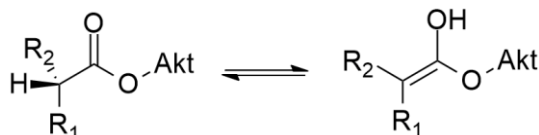
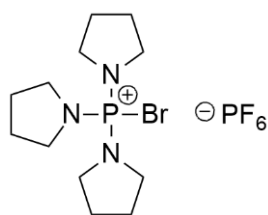


Schéma 6 - Enolizace α -aminokyselin (resp. jejich aktivních esterů). Aktivující skupina je označena Akt.

Mechanismus aktivace kyselin fosfoniovými činidly je založen na reakci příslušného karboxylátového anionu s fosfoniovou solí. Proto je během kondenzace nutná přítomnost báze za účelem deprotonace kyseliny [20].

PyBroP (brom-tripyrrolidinyl-fosfoniumhexafluorofosfát, Obrázek 7) je fosfoniové činidlo, jehož mechanismus se zakládá na tvorbě tripyrrolidinofosfoniového esteru. PyBroP je užitečným pro tvorbu terciárních amidů – jiná činidla, založená např. na tvorbě esterů odvozených od HOBt (1-hydroxybenzotriazolu), nedokážou zprostředkovat kondenzaci efektivně a dochází k vyšší míře racemizace [21].

⁴ Aminoskupina NH₂ je navázaná na α -uhlík (atom uhlíku navázaný na karboxylovou skupinu).



Obrázek 7 - Kondenzační činidlo PyBroP

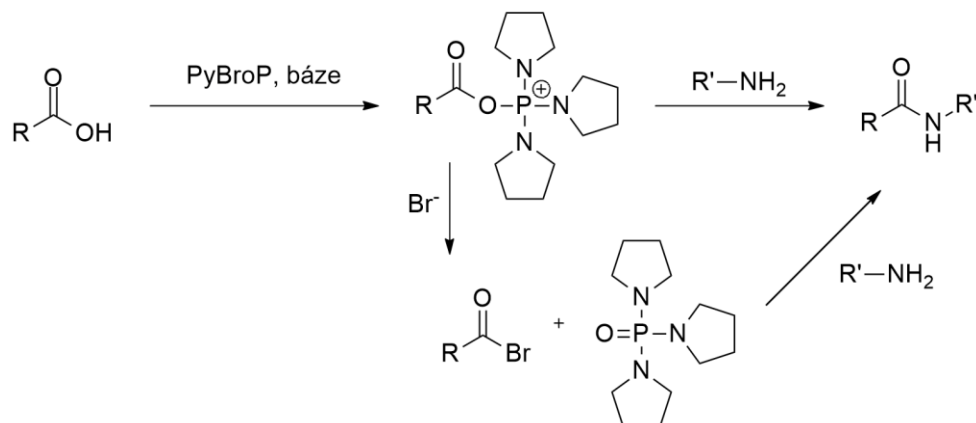
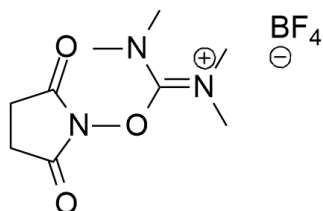


Schéma 7 - Vznik peptidové vazby pomocí činidla PyBroP

Mechanismus činidla PyBroP je popsán dvojím způsobem (Schéma 7). K tvorbě peptidické vazby dochází buďto přímým nukleofilním atakem aminoskupiny na aktivovaný karbonylový uhlík, nebo přes acylbromidový intermediát (tripyrrolidinylfosfoniový kation utvoří oxid a vylučuje se jako vedlejší produkt) [21].

TSTU (*N,N,N',N'*-tetramethyl-*O*-(*N*-sukcinimidyl)uronium tetrafluorborát, Obrázek 8) je činidlem ze skupiny uroniových solí. TSTU reaguje s karboxylovou skupinou a dochází ke tvorbě *N*-hydroxysukcinimidylacylu (Schéma 8). Aktivace tímto způsobem je mírnější než v případě HOBt/HOAt (1-hydroxy-7-azabenzotriazol) esterů. Na druhou stranu je jednodušší vzniklý *N*-hydroxysukcinimid po reakci odstranit díky jeho rozpustnosti ve vodě [21]. Tyto estery lze také izolovat.



Obrázek 8 - Peptidové kondenzační činidlo TSTU

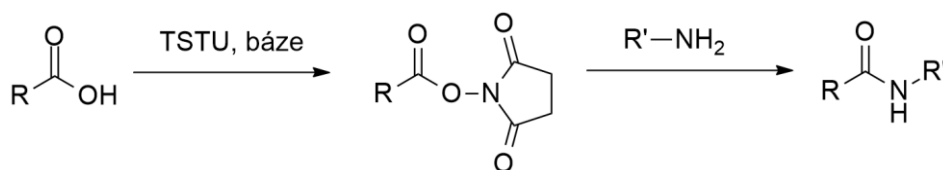
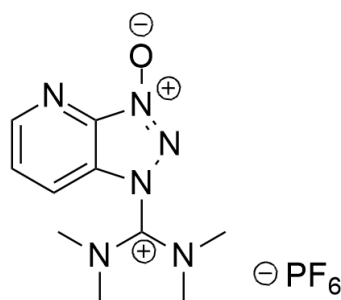
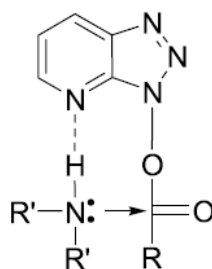


Schéma 8 - Vznik peptidové vazby pomocí činidla TSTU

HATU (2-(7-aza-1H-benzotriazol-1-yl)-*N,N,N',N'*-tetramethyluronium hexafluorofosfát, Obrázek 9) bylo druhé uroniové činidlo, se kterým jsem pracoval. Mechanismus HATU je založen na aktivaci prostřednictvím HOAt (1-hydroxy-7-azabenzotriazol) esteru. Ten je velmi nestabilní a velice reaktivní, obzvláště díky schopnosti katalyzovat nukleofilní atak aminoskupiny v rámci molekuly. To ho činí aktivnějším než TSTU. Katalýzu zajišťuje atom dusíku v pozici 7, který s aminoskupinou interaguje prostřednictvím vodíkové vazby (Obrázek 10). Vysoká reaktivita HOAt způsobuje, že racemizace probíhá pouze v malé míře [21]. Nevýhodou HATU může mj. být i jeho vysoká pořizovací cena.



Obrázek 9 - Peptidové kondenzační činidlo HATU.



Obrázek 10 - Stabilizace atakující aminoskupiny HOAt esterem. Převzato z [21].

Nevýhodou uroniových činidel obecně je riziko vedlejší reakce, při které dochází k navázání guanidinylového zbytku na aminoskupinu výchozí látky (Schéma 9), což znemožní tvorbu peptidové vazby (nukleofilní atak nemůže proběhnout). Tento jev nastává v případech, kdy nebyla kompletně aktivována karboxylová skupina, popř. byly zvoleny špatné stechiometrické podmínky kondenzační reakce (uroniové činidlo je ve větším nadbytku). Reakci lze také předejít přidáním HOAt do reakční směsi [21].

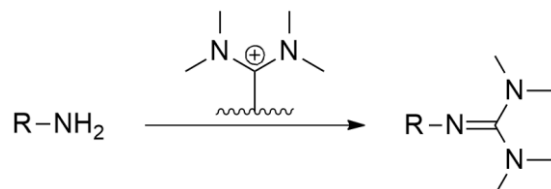


Schéma 9 - Vedlejší reakce při použití uroniových činidel.

2.2.3 Chránící skupiny při syntéze peptidů

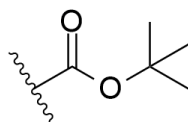
V organické syntéze rozlišujeme řadu funkčních skupin, přičemž je každá z nich reaktivní svým specifickým způsobem. Může nastat situace, ve které jsou reakční podmínky nekompatibilní s některou ze skupin a dochází k vedlejším reakcím. Chránící skupiny jsou nástrojem pro modifikaci reaktivity funkčních skupin během syntézy. Jedná se o skupiny, jimiž derivatizujeme danou funkční skupinu a zajistíme požadovaný průběh syntézy. Během reakční sekvence je lze podle potřeby zavádět, či odstraňovat a tím ji optimalizovat.

Ideální chránící skupina by měla splňovat následující kritéria:

1. Aplikace chránící skupiny je selektivní vůči dané funkční skupině a probíhá s vysokým výtěžkem.
2. Během dalších syntetických kroků je chránící skupina stálá.
3. Odchránění funkční skupiny je selektivní, použítá činidla nereagují s jinými částmi molekuly [22].

Univerzální chránící skupina neexistuje. Namísto toho se pro různé funkční skupiny vybírá z několika způsobů chránění, které jsou navzájem kompatibilní. Vhodně zvolenými chránícími skupinami, jejichž aplikace a odstranění se navzájem nenarušují, lze optimalizovat reakční sekvenci.

Terc-butyloxykarbonylová skupina (Boc) je jedna z nejpoužívanějších ochranných skupin (Obrázek 11). Spadá mezi karbamáty, které se využívají k protekci aminoskupin. Je charakteristická svou stálostí vůči většině bází a nukleofilů [22].



Obrázek 11 - *terc*-butyloxykarbonylová chránící skupina

Aplikace Boc-chránící skupiny se provádí v bazickém prostředí pomocí Boc-anhydridu Boc_2O (Schéma 10). Lze také použít aktivní estery a jiné deriváty jako např. BocN_3). Aminoskupina atakuje jeden z elektrondeficitních karbonylových uhlíků Boc-anhydridu a přes tetraedrální intermediát dochází k navázání chránící skupiny [23].

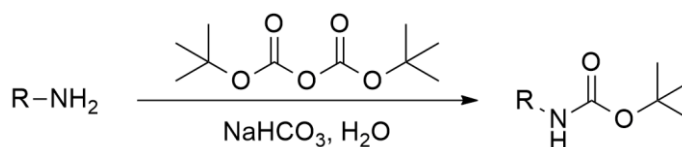


Schéma 10 - Aplikace *terc*-butyloxykarbonylové chránící skupiny

Boc-skupina je labilní při nízkém pH, proto se k odchránění využívá silných kyselin (Schéma 11). Odchránění začíná protonací karbonylového kyslíku kyselinou. Dále se odštěpí *tert*-butylový karbokation a na chráněném dusíku vzniká karboxylová skupina. Tento karbamát spontánně dekarboxyluje a uvolní se oxid uhličitý CO₂. Odchráněný amin se vylučuje v podobě soli použité kyseliny.

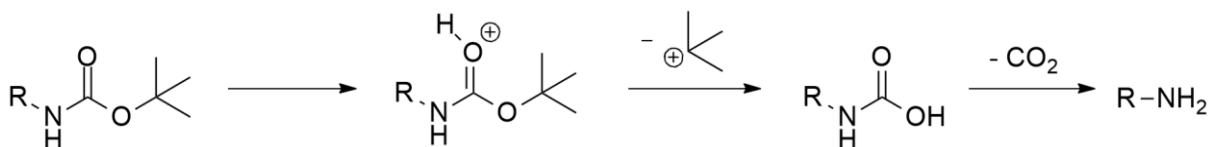


Schéma 11 – Mechanismus odštěpení *tert*-butyloxykarbonylové chránicí skupiny

Uvolněný *tert*-butylový karbokation je deprotonován konjugovanou bází použité kyseliny a dochází ke tvorbě isobutenu. Může být také „vychytáván“ z reakční směsi vhodnými činidly, které s ním zreagují [24].

V literatuře je často pro odchránění doporučována kyselina trifluoroctová (TFA). Během syntézy inhibitorů FAP nesoucích nitrilovou funkční skupinu [25] bylo pozorováno, že při deprotekcí pomocí TFA v acetonitrilu dochází k nežádoucí Ritterově reakci (Schéma 12).

Atom dusíku v nitrilové funkční skupině je velmi slabou bází a nukleofilem (jeho volný elektronový pár se nachází v nízkoenergetickém orbitalu *sp*). *Tert*-butylový karbokation, uvolněný během odchránění, je dostatečně reaktivní a naváže se na nitrilový dusík. Molekula vody nukleofilně atakuje nitrilový uhlík, dochází k přenosu protonů a vzniká sekundární amid [18].

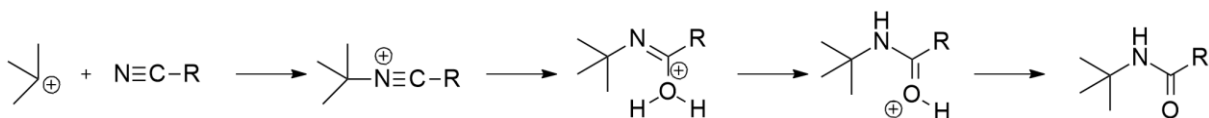


Schéma 12 - Ritterova reakce

3 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

3.1 Chemikálie a přístrojové vybavení

Rozpouštědla byla dodána společnostmi Lachner, VWR Chemicals a Penta. Bezvodá rozpouštědla pod argonovou atmosférou byla pořízena od výrobce Sigma-Aldrich. Deuterovaná rozpouštědla byla dodána společností Euriso-top. Všechny výchozí látky byly vyrobeny společnostmi Fluorochem, Sigma-Aldrich a Acros Organics. Kondenzační činidla jsou produkty společností Sigma-Aldrich a Merck. *N*-acetoxy-sukcinimid byl dodán společností Tokyo Chemical Industries.

HPLC aparatura byla tvořena UV-detektorem Biotronik BT 3035, pumpou Jasco PU-987, směšovačem Watrex a degazérem Waters. FLASH chromatografie byly provedeny na přístroji Teledyne Isco Combi Flash Rf+ na reverzní fázi (Silikagel C18). Tenkovrstvé chromatografie byla prováděny s použitím aluminiových desek Merck (Silikagel 60, F₂₅₄).

LC-MS analýzy byly provedeny na systému Waters Acquity UPLC/MS s použitím gradientu voda – acetonitril (0,1% kyseliny mravenčí), gradient 0 – 100 % po dob 7 minut na koloně Phenomex Gemini-NX 3 μ C18 110 Å, 100 \times 2,00 mm, průtok 0,5 ml/min.

NMR spektra byla měřena na přístroji Bruker Avance III HD 500 MHz se širokopásmovou kryosondou s ATM modulem (5 mm CPBBO BB-¹H/¹⁹F/¹⁵N/D Z/GRD).

3.2 Pracovní postupy

Pro přehlednost budou syntetizované sloučeniny označovány zkratkami *N-X-AA-ProCN*, kde ProCN je označení nitrilu odvozeného od prolinu a který je součástí každé připravené sloučeniny. Zkratkou AA je obecně označena aminokyselina vázaná amidovou vazbou na pyrrolidinový dusík prolinnitrilu. V poloze písmena X budou použity zkratky substituentů vázaných na aminovou skupinu aminokyseliny AA (Tabulka 6).

Tabulka 5 - Vysvětlivky zkratk použitých pro značení syntetizovaných látek

Zkratka	Název
Gly	Glycin
ProCN	Prolinnitril
Val	Valin
Ala	Alanin
AA	Aminokyselina
Ac	Acetyl
Chin	Chinolin-4-karboxyl
Boc	<i>Terc</i> -butyloxykarbonyl

3.2.1 Obecné pracovní postupy

Obecný postup 1: kondenzace *N-X-AA* s ProCN. *N*-substituovaná aminokyselina (1,4 ekv.) byla rozpuštěna v DMF (cca 200 ekv.). Do roztoku bylo přidáno činidlo PyBroP (1,2 ekv.) a DIPEA (5 ekv.). Po 30-60 min. byl do reakční směsi přidán ProCN (1 ekv.). Po 24 h míchání za laboratorní teploty (dále LT) byla reakční směs zpracována. Pracovní postup byl inspirován literaturou [25] a optimalizován (viz Výsledky a diskuse).

Obecný postup 2: odchránění *N-Boc-AA-ProCN*. Látka byla rozpuštěna v 1M HCl v EtOAc (cca 6 ekv. HCl). Po 24 h míchání za LT byla reakční směs odpařena na RVO. Odparek byl rozpuštěn v MeOH a složky reakční směsi byly odděleny pomocí FLASH chromatografie. Frakce obsahující produkt byly odpařeny na RVO. Průběh reakce byl sledován pomocí TLC. Pracovní postup byl inspirován literaturou [16].

Obecný postup 3: kondenzace AA-ProCN s chinolin-4-karboxylovou kyselinou. Karboxylová kyselina (1,4 ekv.) byla rozpuštěna v DMF (cca 130 ekv.). Do vzniklého roztoku bylo přidáno činidlo TSTU (1,2 ekv.) a DIPEA (5 ekv.). Po 1 h míchání při LT byl do reakční směsi přidán roztok AA-ProCN (1 ekv.) v DMF (cca 160 ekv.). Po 24 h míchání při LT byla provedena FLASH chromatografie. Frakce s produktem byly odpařeny na RVO. Dočištění produktu od nečistot bylo provedeno pomocí HPLC.

Obecný postup 4: acetylace AA-ProCN. *N*-acetoxysukcinimid (1,4 ekv.) byl rozpuštěn v DMF (cca 130 ekv.). Do vzniklého roztoku byla přidána látka AA-ProCN (1 ekv.). Po 24 h míchání za LT byly složky reakční směsi separovány pomocí FLASH chromatografie na reverzní fázi. Frakce s produktem byly odpařeny na RVO. Dočištění produktu od nečistot bylo provedeno pomocí HPLC.

Látky byly čištěny pomocí HPLC za použití mobilní soustavy 0,1 % TFA / MeCN. Použité gradienty jsou uvedeny v pracovních postupech.

3.2.2 Konkrétní syntetické kroky

Příprava ProCN (1). *N*-Boc-2-kyanopyrrolidin (3,684 g, 19 mmol) byl rozpuštěn v MeCN (cca 175 ml). Za stálého míchání byl přidán monohydrát kyseliny *p*-toluensulfonové (8,400 g, 44 mmol). Po 24 h míchání při LT bylo rozpouštědlo odpařeno na RVO. K odparku bylo přidáno přibližně 50 ml EtOAc a roztok byl vystaven ultrazvuku. Po cca 2 minutách došlo k resuspenzi produktu. Směs byla zfiltrována přes fritu S4. Uvedeným postupem bylo získáno 4,539 g 2-kyanopyrrolidinium tosylátu (**1**) ve formě bílého prášku ve výtěžku 85 %. Průběh reakce byl sledován pomocí TLC.

Příprava *N*-Boc-Gly-ProCN (2a). Látka byla připravena obecným postupem 1. Poté byla provedena FLASH chromatografie (gradient: H₂O → 100 % MeCN). Frakce obsahující produkt byly odpařeny na RVO. 95 % odparku bylo použito pro další reakce. Zbytek byl rozpuštěn v MeOH a produkt byl izolován pomocí HPLC. Frakce, ve kterých se nacházel produkt, byly lyofilizovány. Uvedeným postupem bylo získáno 9,2 mg *N*-Boc-Gly-ProCN (2a) ve výtěžku 11 % (vztaženo k odebrané části odparku). Průběh reakce byl sledován pomocí TLC.

MS: [M -Boc +H]⁺ = 154,158 (pro C₇H₁₂N₃O vypočteno 154,19).

¹H NMR (500 MHz, MeOH-d₄): 1.45 (s, 9H, CH₃-*t*-butyl); 2.18 (m, 2H, H-3); 2.24 (m, 2H, H-2); 3.52 (m, 1H, H-4a); 3.68 (m, 1H, H-4b); 3.85 (d, 1H, $J_{2'a,2'b} = 17.3$ Hz, H-2'a); 3.91 (d, 1H, $J_{2'b,2'a} = 17.3$ Hz, H-2'b); 4.77 (dd, 1H, $J_{1,2a} = J_{1,2b} = 5.3$ Hz, H-1).

¹³C NMR (125.7 MHz, MeOH-d₄): 26.16 (CH₂-3); 28.67 (CH₃-*t*-butyl); 30.94 (CH₂-2); 43.62 (CH₂-2'); 46.80 (CH₂-4); 47.90 (CH-1); 80.70 (C-4'); 119.57 (CN); 158.53 (C-3'); 170.54 (C-1')

Příprava *N*-Boc-L-Val-ProCN (2b). Látka byla připravena obecným postupem 1. Poté byla dvakrát provedena extrakce do DCM v systému DCM/H₂O a z organické fáze byl zbytek vody extrahován do nasyceného vodného roztoku NaCl. Do organické fáze bylo přidáno cca 10 g bezvodého MgSO₄ pro dosušení. Směs byla poté zfiltrována přes fritu S3 a filtrát byl odpařen na RVO. Odparek byl rozpuštěn v EtOAc a rozdělen v poměru 2:1. Větší část byla bez čištění použita pro další krok syntézy. Zbytek byl rozpuštěn ve 3 ml MeOH a zbaven nečistot pomocí FLASH chromatografie (gradient: H₂O → 80 % MeCN). Produkt byl dočištěn pomocí HPLC (35 → 85 % MeCN). Frakce obsahující produkt byly lyofilizovány. Uvedeným postupem bylo získáno 19 mg *N*-Boc-L-Val-ProCN (2b) ve výtěžku 10 % (vztaženo k odebrané části odparku).

MS: [M -Boc +H]⁺ = 196,246 (pro C₁₀H₁₈N₃O vypočteno 196,27).

¹H NMR (500 MHz, MeOH-d₄): 0.99 (d, 3H, $J_{\text{CH}_3,\text{CH}} = 6.8$ Hz, CH₃-isopropyl); 0.99 (d, 3H, $J_{\text{CH}_3,\text{CH}} = 6.7$ Hz, CH₃-isopropyl); 1.43 (s, 9H, CH₃-*t*-butyl); 2.02 (m, 1H, CH-isopropyl); 2.10-2.36 (m, 4H, H-2, H-3); 3.75 (ddd, 1H, $J_{4a,4b} = 10.0$ Hz, $J_{4a,3a} = 7.1$ Hz, $J_{4a,3b} = 5.3$ Hz, H-4a); 3.83 (dt, 1H, $J_{4b,4a} = 10.0$ Hz, $J_{4b,3a} = J_{4b,3b} = 7.3$ Hz, H-4b); 4.08 (d, 1H, $J_{2',\text{CH}} = 8.2$ Hz, H-2'); 4.78 (dd, 1H, $J_{1,2a} = 7.9$ Hz, $J_{1,2b} = 4.0$ Hz, H-1)

¹³C NMR (125.7 MHz, MeOH-d₄): 18.77 (CH₃-isopropyl); 19.30 (CH₃-isopropyl); 26.23 (CH₂-3); 28.67 (CH₃-*t*-butyl); 30.85 (CH₂-2); 32.01 (CH-isopropyl); 47.67 (CH-1); 48.13 (CH₂-4); 59.15 (CH-2'); 80.59 (C-4'); 119.51 (CN); 158.13 (C-3'); 173.76 (C-1')

Příprava *N*-Boc-L-Ala-ProCN (2c). Látka byla připravena obecným postupem 1. Poté byla třikrát provedena extrakce do DCM v systému DCM/H₂O a po odebrání organické fáze byl zbytek vody extrahován do nasyceného roztoku NaCl. Do organické fáze bylo přidáno cca 10 g bezvodého Na₂SO₄ pro dosušení. Směs byla poté zfiltrována přes fritu S3 a filtrát byl odpařen na RVO. Odparek byl rozpuštěn v EtOAc a rozdělen v poměru 2:1. Větší část byla bez čištění

použita pro další krok syntézy. Zbytek byl rozpuštěn ve 3 ml MeOH a zbaven nečistot pomocí FLASH chromatografie (gradient: H₂O → 70 % MeCN). Produkt byl izolován pomocí HPLC (15 → 40 % MeCN). Frakce obsahující produkt byly lyofilizovány. Uvedeným postupem bylo získáno 41 mg *N*-Boc-*L*-Ala-ProCN (**2c**) ve výtěžku 25 % (vztaženo k odebrané části odparku).

MS: [M -Boc +H]⁺ = 167,790 (pro C₈H₁₄N₃O vypočteno 168,22).

¹H NMR (500 MHz, MeOH-d₄): 1.31 (d, 3H, *J*_{CH₃,2'} = 7.1 Hz, CH₃-2'); 1.43 (s, 9H, CH₃-*t*-butyl); 2.21-2.36 (m, 4H, H-2, H-3); 3.67-3.75 (m, 2H, H-4); 4.32 (q, 1H, *J*_{2',CH₃} = 7.1 Hz, H-2'); 4.78 (dd, 1H, *J*_{1,2a} = 7.8 Hz, *J*_{1,2b} = 3.6 Hz, H-1)

¹³C NMR (125.7 MHz, MeOH-d₄): 16.95 (CH₃-2'); 26.31 (CH₂-3); 28.67 (CH₃-*t*-butyl); 30.80 (CH₂-2); 47.60 (CH₂-4); 47.95 (CH-1); 49.1 (CH-2'); 80.61 (C-4'); 119.61 (CN); 157.77 (C-3'); 174.49 (C-1')

Příprava *N*-Boc-*D*-Ala-ProCN (2d**).** Látka byla připravena obecným postupem 1. Poté byla třikrát provedena extrakce do DCM v systému DCM/H₂O a z organické fáze byl zbytek vody extrahován do nasyceného vodného roztoku NaCl. Do organické fáze bylo přidáno cca 10 g bezvodého Na₂SO₄ pro dosušení. Směs byla poté zfiltrována přes fritu S3 a filtrát byl odpařen na RVO. Odparek byl rozpuštěn v EtOAc a rozdělen v poměru 2:1. Větší část byla bez čištění použita pro další krok syntézy. Zbytek byl rozpuštěn ve 3 ml MeOH a zbaven nečistot pomocí FLASH chromatografie (gradient: H₂O → 70 % MeCN). Produkt byl izolován pomocí HPLC (15 → 40 % MeCN). Frakce obsahující produkt byly lyofilizovány. Uvedeným postupem bylo získáno 30 mg *N*-Boc-*D*-Ala-ProCN (**2d**) ve výtěžku 18 % (vztaženo k odebrané části odparku).

MS: [M -Boc +H]⁺ = 168,188 (pro C₈H₁₄N₃O vypočteno 168,22).

Výchozí látka *N*-Boc-*D*-Ala byla kontaminována příslušným *L*-Ala diastereomerem. Z toho důvodu nebyl pro *N*-Boc-*D*-Ala-ProCN (**2d**) vyhotoven NMR výpis. Ze spektra je ale patrné, že se v testovaném vzorku očekávaný produkt nachází.

Příprava Gly-ProCN (3a**).** Látka byla připravena obecným postupem 2 (gradient FLASH chromatografie: 0,1% TFA → 100 % MeCN). Získaný odparek byl rozdělen v poměru 2:1 a zvlášť odpařen pro další reakce, produkt nebyl izolován od nečistot.

MS: [M +H]⁺ = 154,164 (pro C₇H₁₂N₃O vypočteno 154,19).

Příprava *L*-Val-ProCN (3b**).** Látka byla připravena obecným postupem 2 (gradient FLASH chromatografie: 0,1% TFA → 50 % MeCN). Získaný odparek byl rozdělen v poměru 2:1 a zvlášť odpařen pro další reakce, produkt nebyl izolován od nečistot.

Příprava *L*-Ala-ProCN (3c**).** Látka byla připravena obecným postupem 2 (gradient FLASH chromatografie: 0,1% TFA → 10 % MeCN). Získaný odparek byl rozdělen v poměru 2:1 a zvlášť odpařen pro další reakce, produkt nebyl izolován od nečistot.

Příprava D-Ala-ProCN (3d). Látka byla připravena obecným postupem 2 (gradient FLASH chromatografie: 0,1% TFA → 10 % MeCN). Získaný odparek byl rozdělen v poměru 2:1 a zvlášť odpařen pro další reakce, produkt nebyl izolován od nečistot.

Příprava N-Ac-Gly-ProCN (4a). Látka byla připravena obecným postupem 4 (gradient FLASH chromatografie 0,1% TFA → 100 % MeCN, gradient 2 → 10 % MeCN). Frakce obsahující produkt byly lyofilizovány. Uvedeným postupem bylo získáno 9 mg N-Ac-Gly-ProCN (4a) v izolovaném výtěžku 25 %.

MS: $[M + H]^+ = 196,555$ (pro $C_9H_{14}N_3O_2$ vypočteno 196,23).

Látka N-Ac-Gly-ProCN byla charakterizována pomocí NMR (Příloha 1), ale z důvodu kontaminace testovaného vzorku vzniklým beznitrilovým vedlejším produktem (viz Výsledky a diskuse) nebyl vyhotoven NMR výpis.

Příprava N-Ac-L-Val-ProCN (4b). Látka byla připravena obecným postupem 4 (gradient FLASH chromatografie, 0,1% TFA → 50 % MeCN, gradient HPLC 2 → 18 % MeCN). Frakce obsahující produkt byly lyofilizovány. Uvedeným postupem bylo získáno 12 mg N-Ac-L-Val-ProCN (4b) v izolovaném výtěžku 15 %.

MS: $[M + H]^+ = 238,242$ (pro $C_{12}H_{20}N_3O_2$ vypočteno 238,31).

Látka N-Ac-L-Val-ProCN (4b) nebyla charakterizována pomocí NMR z důvodu nedostatečného množství pro vytvoření vzorku po biochemickém testování.

Příprava N-Ac-L-Ala-ProCN (4c). Látka byla připravena obecným postupem 4 (gradient FLASH chromatografie, 0,1% TFA → 40 % MeCN, gradient HPLC 2 → 10 % MeCN). Během pracovního postupu došlo ke ztrátě produktu (viz Výsledky a diskuse).

Příprava N-Ac-D-Ala-ProCN (4d). Látka byla připravena obecným postupem 4 (gradient FLASH chromatografie 0,1% TFA → 40 % MeCN, gradient HPLC 2 → 10 % MeCN). Během pracovního postupu došlo ke ztrátě produktu (viz Výsledky a diskuse).

Příprava N-Chin-Gly-ProCN (5a). Látka byla připravena obecným postupem 3 (gradient FLASH chromatografie 0,1% TFA → 100 % MeCN, gradient HPLC 2 → 30 % MeCN). Frakce obsahující produkt byly lyofilizovány. Uvedeným postupem bylo získáno 7 mg N-Chin-Gly-ProCN (5a) v izolovaném výtěžku 1,3 % + 123 mg surové směsi, která obsahovala vedlejší produkt (viz Výsledky a diskuse).

MS: $[M + H]^+ = 309,239$ (pro $C_{17}H_{17}N_4O_2$ vypočteno 309,34).

Látka N-Ac-Gly-ProCN byla charakterizována pomocí NMR (Příloha 1), ale z důvodu kontaminace testovaného vzorku vzniklým beznitrilovým vedlejším produktem (viz Výsledky a diskuse) nebyl vyhotoven NMR výpis.

Příprava N-Chin-L-Val-ProCN (5b). Látka byla připravena obecným postupem 3 (gradient FLASH chromatografie 0,1% TFA → 65 % MeCN, gradient HPLC 10 → 35 % MeCN).

Frakce obsahující produkt byly lyofilizovány. Uvedeným postupem bylo získáno 13 mg *N*-Chin-L-Val-ProCN (**5b**) v izolovaném výtěžku 5,7 % + 29 mg surové směsi, která obsahovala vedlejší produkt (viz Výsledky a diskuse).

MS: $[M + H]^+ = 351,275$ (pro $C_{20}H_{23}N_4O_2$ vypočteno 351,42).

1H NMR (500 MHz, MeOH- d_4): 1.12 (d, 3H, $J_{CH_3, CH} = 6.8$ Hz, CH_3); 1.13 (d, 3H, $J_{CH_3, CH} = 6.8$ Hz, CH_3); 2.17-2.42 (m, 5H, H-2'', H-3'', H-isopropyl); 3.89 (ddd, 1H, $J_{4''a, 4''b} = 9.9$ Hz, $J_{4''a, 3''a} = 7.1$ Hz, $J_{4''a, 3''b} = 5.2$ Hz, H-4''a); 4.06 (dt, 1H, $J_{4''b, 4''a} = 9.9$ Hz, $J_{4''b, 3''a} = J_{4''b, 3''b} = 7.3$ Hz, H-4''b); 4.65 (d, 1H, $J_{2', CH} = 8.5$ Hz, H-2'); 4.90 (dd, 1H, $J_{1', 2''a} = 8.3$ Hz, $J_{1', 2''b} = 4.3$ Hz, H-1''); 7.71 (d, 1H, $J_{3, 2} = 4.6$ Hz, H-3); 7.78 (ddd, 1H, $J_{6, 5} = 8.5$ Hz, $J_{6, 7} = 6.9$ Hz, $J_{6, 8} = 1.2$ Hz, H-6); 7.94 (ddd, 1H, $J_{7, 6} = 6.9$ Hz, $J_{7, 8} = 8.5$ Hz, $J_{7, 5} = 1.3$ Hz, H-7); 8.15 (d, 1H, $J_{8, 7} = 8.5$ Hz, H-8); 8.23 (d, 1H, $J_{5, 6} = 8.5$ Hz, H-5); 9.03 (d, 1H, $J_{2, 3} = 4.7$ Hz, H-2)

^{13}C NMR (125.7 MHz, MeOH- d_4): 19.18 (CH_3); 19.23 (CH_3); 26.35 (CH_2 -3''); 30.96 (CH_2 -2''); 31.78 (CH-isopropyl); 47.82 (CH-1''); 48.46 (CH_2 -4''); 59.19 (CH-2'); 119.49 (CN); 120.55 (CH-3); 126.37 (C-4a); 127.00 (CH-5); 127.82 (CH-8); 129.75 (CH-6); 132.85 (CH-7); 146.14 (C-8a); 146.81 (C-4); 149.89 (CH-2); 169.30 (C-1'); 172.76 (C-3')

Příprava *N*-Chin-L-Ala-ProCN (5c). Látka byla připravena obecným postupem 3 (gradient FLASH chromatografie 0,1% TFA → 50 % MeCN, gradient HPLC 5 → 18 % MeCN). Frakce obsahující produkt byly lyofilizovány. Uvedeným postupem bylo získáno 21 mg *N*-Chin-L-Ala-ProCN (**5c**) v izolovaném výtěžku 8,1 % + 26 mg surové směsi, která obsahovala vedlejší produkt (viz Výsledky a diskuse).

MS: $[M + H]^+ = 323,217$ (pro $C_{18}H_{19}N_4O_2$ vypočteno 323,37).

1H NMR (500 MHz, MeOH- d_4): 1.52 (d, 3H, $J_{CH_3, 2'} = 7.1$ Hz, CH_3); 2.22-2.39 (m, 4H, H-2'', H-3''); 3.81-3.94 (m, 2H, H-4''); 4.83-4.93 (m, 2H, H-1'', H-2'); 7.81 (d, 1H, $J_{3, 2} = 4.8$ Hz, H-3); 7.82 (ddd, 1H, $J_{6, 5} = 8.5$ Hz, $J_{6, 7} = 6.9$ Hz, $J_{6, 8} = 1.2$ Hz, H-6); 7.98 (ddd, 1H, $J_{7, 6} = 6.9$ Hz, $J_{7, 8} = 8.5$ Hz, $J_{7, 5} = 1.4$ Hz, H-7); 8.16 (d, 1H, $J_{8, 7} = 8.5$ Hz, H-8); 8.38 (d, 1H, $J_{5, 6} = 8.5$ Hz, H-5); 9.07 (d, 1H, $J_{2, 3} = 4.8$ Hz, H-2)

^{13}C NMR (125.7 MHz, MeOH- d_4): 16.32 (CH_3); 26.41 (CH_2 -3''); 30.91 (CH_2 -2''); 47.87 (CH_2 -4''); 48.09 (CH-1''); 49.46 (CH-2'); 119.60 (CN); 120.63 (CH-3); 126.53 (C-4a); 127.04 (CH-8); 127.35 (CH-5); 130.03 (CH-6); 133.35 (CH-7); 145.97 (C-8a), 146.93 (C-4); 149.47 (CH-2); 168.63 (C-1'); 173.51 (C-3')

Příprava *N*-Chin-D-Ala-ProCN (5d). Látka byla připravena obecným postupem 3 (gradient FLASH chromatografie 0,1% TFA → 50 % MeCN, gradient HPLC 5 → 18 % MeCN). Frakce obsahující produkt byly lyofilizovány. Uvedeným postupem bylo získáno 14 mg *N*-Chin-D-Ala-ProCN (**5d**) v izolovaném výtěžku 67 % + 115 mg surové směsi, která obsahovala vedlejší produkt (viz Výsledky a diskuse).

Výchozí látka *N*-Boc-D-Ala byla kontaminována příslušným L-Ala diastereomerem. Z toho důvodu nebyl pro *N*-Chin-D-Ala-ProCN (**5d**) vyhotoven NMR výpis. Ze spektra je ale patrné, že se v testovaném vzorku očekávaný produkt nachází.

MS: $[M + H]^+ = 323,214$ (pro $C_{18}H_{19}N_4O_2$ vypočteno 323,37).

4 VÝSLEDKY A DISKUSE

4.1 Syntéza

Na základě poznatků z literatury byla navržena reakční sekvence pro přípravu žádaných látek (Schéma 13). Syntéza vychází z komerčně dostupného 2-kyanopyrrolidinu s chráněnou aminoskupinou. Po jejím odchránění následovala kondenzační reakce se čtyřmi různými *N*-substituovanými aminokyselinami – glycinem, *L*-valinem, *L*-alaninem a *D*-alaninem. Takto připravená látka byla znovu odchráněna a poté acetylována *N*-acetoxy-sukcinimidem (Ac-O-NSu), resp. kondenzována s chinolin-4-karboxylovou kyselinou. Produkty těchto reakcí byly finální látky.

V této kapitole budou pro přehlednost používána zkrácená označení syntetizovaných látek nadefinovaná v odstavci 3.2.

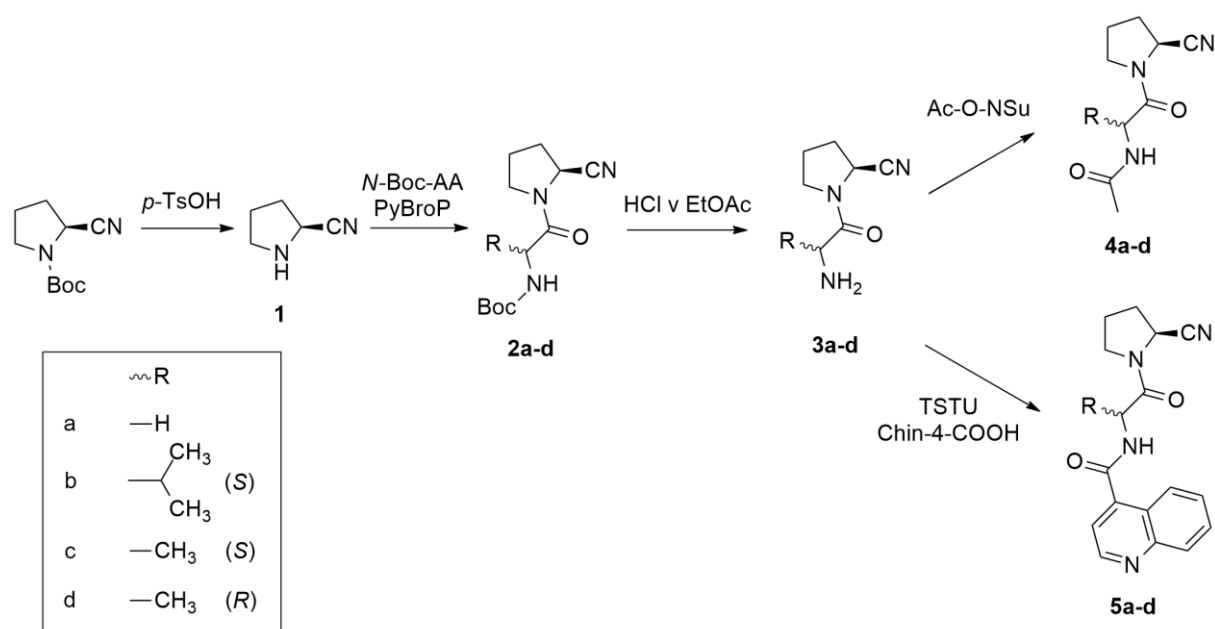


Schéma 13 - Reakční sekvence

V rámci syntézy byla provedena optimalizace reakčních podmínek pro odchránovací a kondenzační reakce. Cílem optimalizace bylo nalezení reakčních podmínek, pro které je zpracování reakčních směsí co nejjednodušší.

4.1.1 Příprava výchozí látky

Prolinnitril (**1**), který byl výchozí látkou syntézy, byl připraven odchráněním komerčně dostupného *N*-Boc-2-kyanopyrrolidinu. Odchránění (Schéma 14) bylo provedeno ve vodě, v acetonitrilu (inspirováno [25]) a v dichlormethanu. Po 48 h byly reakční směsi analyzovány pomocí TLC. Na základě této analýzy bylo zřejmé, že v acetonitrilu a dichlormethanu výchozí látka kompletně zreagovala, nicméně byly detekovány nečistoty (zejména v dichlormethanu). Ve vodě reakce neproběhla úplně, byly vidět stopy výchozí látky, které po zahřátí vodné reakční

směsi na 50 °C po dobu 24 h zmizely. Na základě těchto poznatků byl acetonitril zvolen jako nejvhodnější rozpouštědlo. Oproti vodě se acetonitril snadno odpařuje na RVO, výtěžek reakcí byla uspokojivá a vzniklé nečistoty bylo možné z odparku extrahovat nepolárním rozpouštědlem.

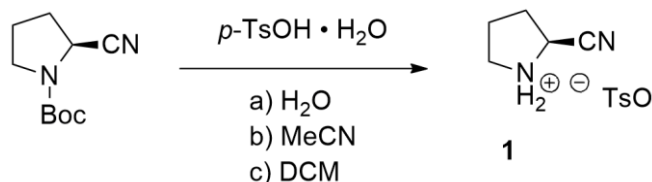
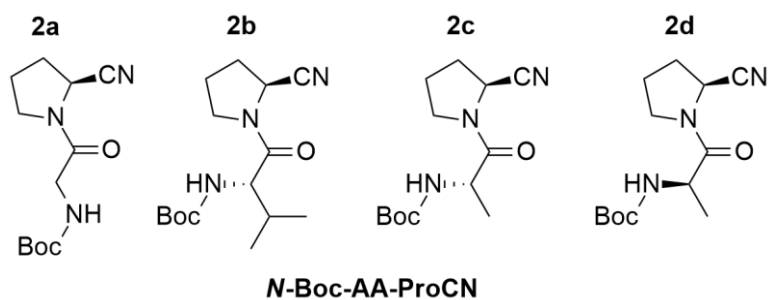


Schéma 14 – Odchraňování *N*-Boc-prolinitrilu. Reakce byla optimalizována ve smyslu použitého rozpouštědla.

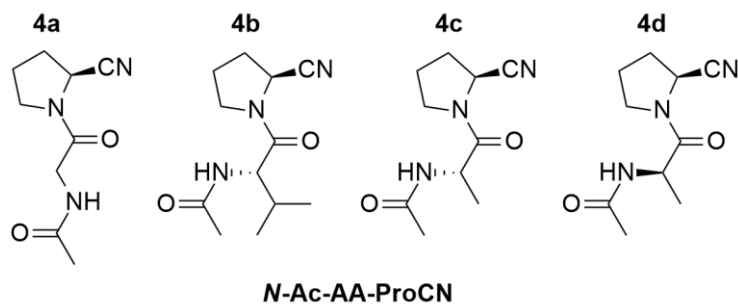
4.1.2 Syntéza látek *N*-Boc-AA-ProCN a *N*-Ac-AA-ProCN

Látky *N*-Boc-AA-ProCN (**2a-d**, Obrázek 12) byly připraveny kondenzací příslušných aminokyselin za použití činidla PyBroP. Přestože se jedná o meziprodukty syntézy, látky byly izolovány za účelem zjištění vlivu *tert*-butyloxykarbonylové chránicí skupiny na jejich biologickou aktivitu. Pro jejich přípravu nebylo zapotřebí dalších reakcí, byly pouze čištěny pomocí FLASH a HPLC chromatografií.



Obrázek 12 - Syntetizované látky *N*-Boc-AA-ProCN

Látky *N*-Ac-AA-ProCN (**4a-d**, Obrázek 13) byly syntetizovány reakcí *N*-acetoxy-sukcinimidu s látkami AA-ProCN (**3a-d**). Tento postup byl zvolen po neúspěšném pokusu o syntézu *N*-Ac-Gly-ProCN (**4a**) pomocí kondenzace *N*-acetyl-glycinu s prolinitrilem (**1**) za použití kondenzačního činidla (Schéma 15).



Obrázek 13 - Syntetizované látky *N*-Ac-AA-ProCN

Díky absenci konjugovaných násobných vazeb mají tyto látky špatnou schopnost absorpce UV-VIS⁵ záření a obtížněji se detekují během chromatografických procedur. Ve srovnání s ostatními syntetizovanými látkami také nemají dobře ionizovatelné funkční skupiny, což zhoršuje jejich detekci pomocí LC-MS.

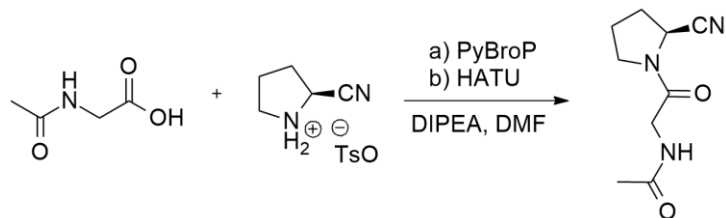
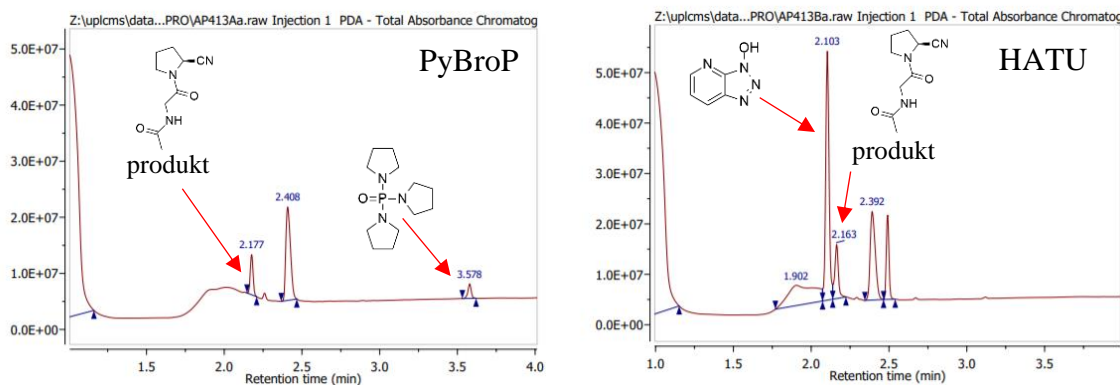


Schéma 15 - Příprava *N*-Ac-Gly-ProCN (**4a**) kondenzační reakcí

Od zmíněného pracovního postupu bylo upuštěno po komplikacích s izolací složek reakční směsi pomocí FLASH chromatografie. Ve smyslu konzistentnosti práce by byla příprava *N*-Ac-AA-ProCN (**4a-d**) pomocí kondenzačních reakcí výhodnější, nicméně reakce s *N*-acetylglycinem (Schéma 15) probíhaly v nízkém výtěžku. Z toho důvodu bylo přistoupeno k přípravě pomocí reakce *N*-acetoxysukcinimidu s Gly-ProCN (**3a**). V té nefiguruje kondenzační činidlo, postup je tedy jednodušší. *N*-hydroxysukcinimid, vedlejší produkt reakce, je rozpustný ve vodě, díky čemuž je následná separace složek reakční směsi jednodušší [21] (analogie s vedlejším produktem TSTU, viz Kondenzační činidla).

V rámci syntézy látek *N*-Boc-AA-ProCN a *N*-Ac-AA-ProCN byly kondenzační reakce mezi ProCN a *N*-substituovanou aminokyselinou optimalizovány ve smyslu použitého činidla. Bylo rozhodováno mezi činidly PyBroP a HATU, jelikož jsou obě dostatečně reaktivní pro kondenzaci sekundárních aminů. PyBroP v reakční směsi tvoří méně fragmentů (Obrázek 14), činidlo HATU pro analogickou reakci využili Jansen *et al.* [25].

⁵ UV-VIS (*angl.* ultraviolet-visible) je označení pro ultrafialovou až viditelnou část elektromagnetického spektra.



Obrázek 14 - Ilustrační LC-MS chromatogramy reakce *N*-acetylglucinu s prolinnitrem (1).

Vlevo je reakce s PyBroP. V čase 2,177 min se eluuje produkt (vyznačen modře). Pík vedlejšího produktu reakce Ph_3PO má retenční čas 3,595 min.

Vpravo je reakce s HATU. Pík 1-hydroxy-7-azabenzotriazolu (HOAt) má retenční čas 2,103 min. V jeho blízkosti je pík produktu s retenčním časem 2,163 min (vyznačen modře). V čase 2,509 min dochází k eluci tetramethylmočoviny, vedlejšího produktu HATU.

První optimalizovanou kondenzací byla reakce ProCN s *N*-Ac-Gly (Schéma 16). Reakční směsi jsem analyzoval prostřednictvím LC-MS. U reakce s HATU dochází těsně před elucí produktu k eluci fragmentu činidla, 1-hydroxy-7-azabenzotriazolu (HOAt). Rozdíl jejich retenčních časů je malý, což znesnadňuje následné chromatografické rozdělení (Obrázek 14 vpravo).

Tato situace v případě reakce s PyBroP nenastává. Vedlejší produkt činidla tripyrrolidinofosfinoxid (Pyrr_3PO , odstavec 2.2.2, Schéma 7) se eluuje později. Žádné výrazné nečistoty v okolí signálu produktu na LC-MS chromatogramu nebyly detekovány (Obrázek 14 vlevo). Na základě těchto poznatků bylo vyhodnoceno, že vhodnější činidlo pro tuto reakci je PyBroP. Na základě analýzy reakčních směsí pomocí LC-MS se zdálo, že volba činidla mezi PyBroP a HATU nemá žádný vliv na samotný průběh reakce.

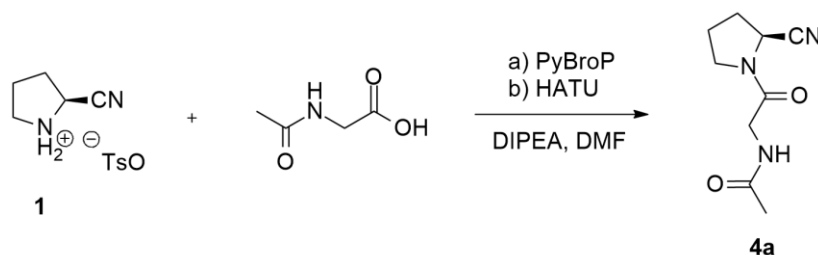


Schéma 16 – Kondenzace ProCN s *N*-Ac-Gly. Reakce byla optimalizována ve smyslu použitého činidla.

Druhou optimalizovanou kondenzací byla reakce ProCN s *N*-Boc-Gly (Schéma 17). Retenční čas produktu je podstatně vyšší, než u *N*-acetylovaného derivátu, což je způsobeno hydrofobní *tert*-butylovou částí chránící skupiny (Obrázek 15). Během reakce s HATU proto nenastává komplikace v podobě blízkých elučních časů 1-hydroxy-7-azabenzotriazolu (HOAt) a produktu.

V případě reakce s PyBroP je rozdíl retenčních časů produktu a Pyrr_3PO dostatečný pro jejich chromatografické rozdělení.

Dle chromatogramů probíhá reakce s oběma činidly stejně dobře. Pro další reakce byl za účelem zachování konzistence pracovního postupu zvolen PyBroP.

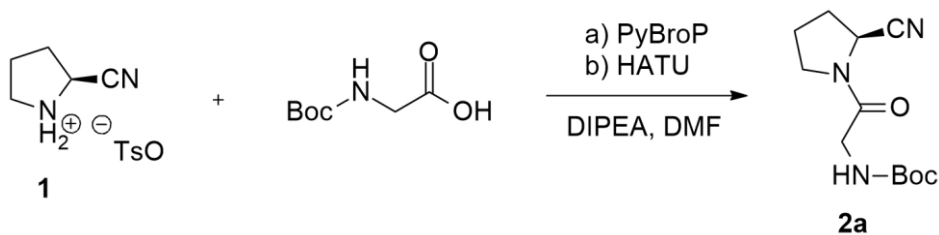
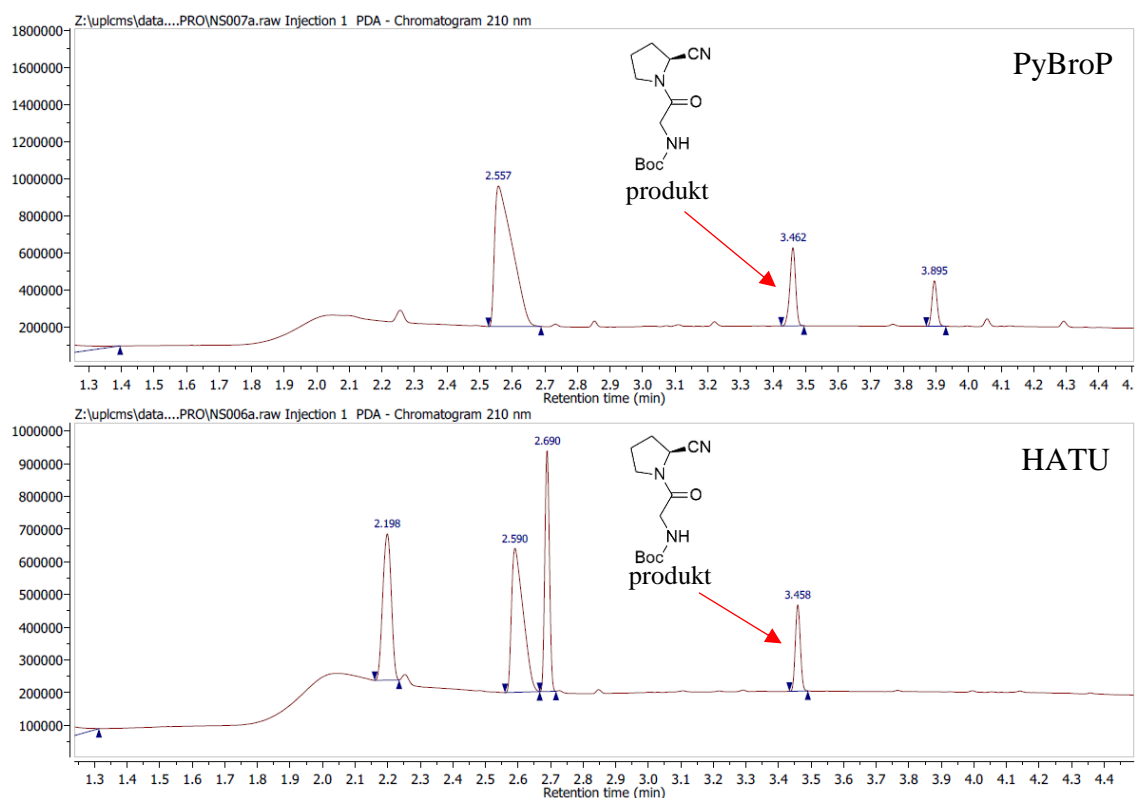


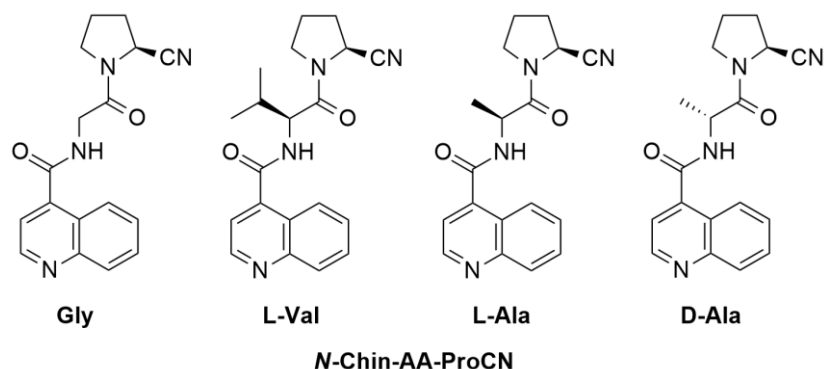
Schéma 17 - Kondenzace ProCN s *N*-Boc-Gly. Reakce byla optimalizována ve smyslu použitého činidla.



Obrázek 15 - Ilustrační LC-MS chromatogram reakce *N*-Boc-glycinu s prolinitrilem (1). Nahoře je reakce s činidlem PyBroP, v čase 3,895 min dochází k eluci vedlejšího produktu Ph_3PO . Dole je reakce s činidlem HATU. Pík produktu je v obou případech vyznačen modře.

4.1.3 Syntéza látek *N*-Chin-AA-ProCN

Látky *N*-Chin-AA-ProCN (5a-d, Obrázek 16) byly syntetizovány za účelem porovnání vlivu aminokyseliny v pozici P_2 na selektivitu a výslednou inhibiční aktivitu látky vůči FAP, PREP a DPPiV. V tomto případě nebylo zapotřebí optimalizovat reakci mezi AA-ProCN (3a-d) a chinolin-4-karboxylovou kyselinou ve smyslu použitého kondenzačního činidla, protože se jedná o kondenzaci primárního aminu. Pro tu je plně dostačující mírnější činidlo TSTU (Odstavec 2.2.2).



Obrázek 16 - Syntetizované látky *N*-Chin-AA-ProCN

V rámci syntézy *N*-Chin-AA-ProCN byl nejprve ochráněn *N*-Boc-AA-ProCN (Schéma 18). Zde se metoda ochrání pomocí *p*-TsOH a MeCN neosvědčila, prostřednictvím TLC byla v reakční směsi detekována výchozí látka. Lepších výsledků bylo dosaženo použitím 1M roztoku HCl v EtOAc, v tomto případě veškerá výchozí látka zreagovala.

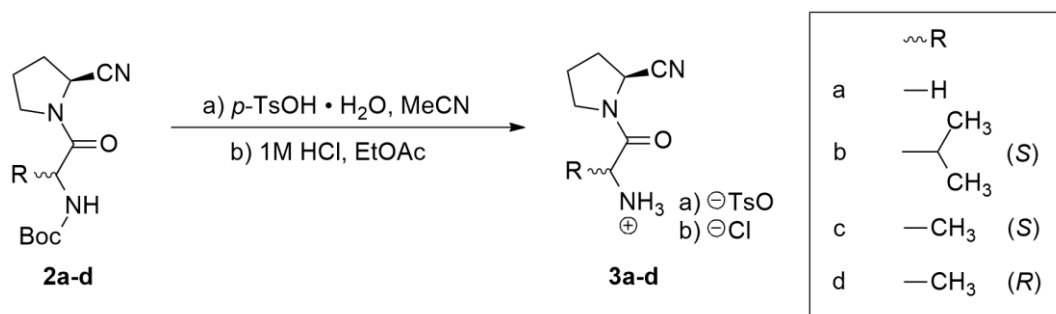


Schéma 18 - Odchráníení *N*-Boc-AA-ProCN. Reakce byla optimalizována ve smyslu použité kombinace kyseliny a rozpouštědla.

Následujícím krokem byla kondenzace ochráněné látky AA-ProCN (**3a-d**) s chinolin-4-karboxylovou kyselinou s pomocí činidla TSTU (Schéma 19). Tento krok probíhal úspěšně a bez komplikací, převážně díky dobré schopnosti UV-VIS absorpce výsledné látky, způsobené aromatickým substituentem, která usnadnila čištění látky. K dobrému průběhu reakce také přispívá mírnější charakter použitého činidla (viz Kondenzační činidla). Během zpracování reakční směsi se ale vyskytla neočekávaná komplikace, která negativně ovlivnila průběh celé syntézy.

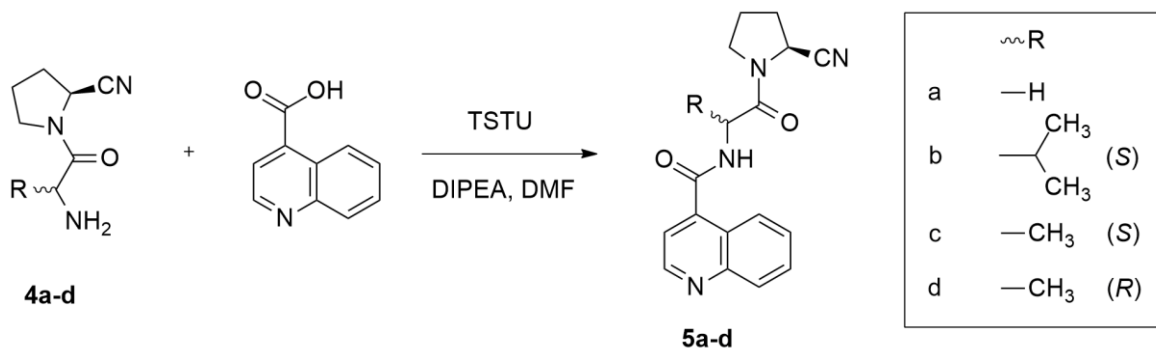
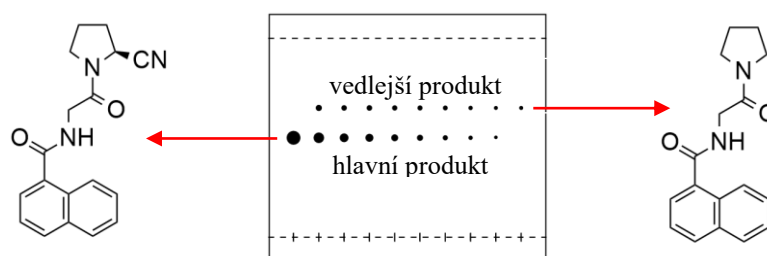


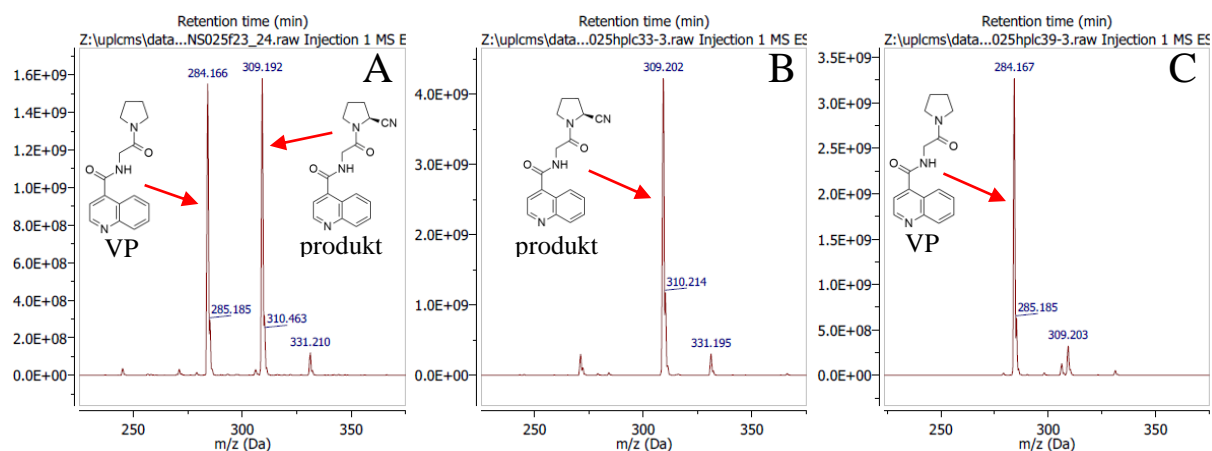
Schéma 19 - Kondenzace chinolin-4-karboxylové kyseliny s látkami AA-ProCN (**3a-d**).

4.1.4 Vedlejší produkt kondenzace s PyBroP

Během izolace látky *N*-Chin-Gly-ProCN (**5a**, Obrázek 16), při jejíž syntéze bylo použito činidlo PyBroP, byly ve frakcích z HPLC pomocí TLC detekovány stopy dvou látek namísto jedné (Obrázek 17). Ty se podařilo na HPLC částečně oddělit, frakce s převahou jedné, či druhé látky byly dále testovány na LC-MS. Chromatogramy ukázaly, že se jedná o směs *N*-Chin-Gly-ProCN a neznámé látky, jejíž retenční čas byl identický s retenčním časem produktu, ale naměřená relativní molekulová hmotnost byla o 25 jednotek nižší (Obrázek 18). Tento rozdíl je o 1 menší než relativní molekulová hmotnost nitrilové funkční skupiny. Proto bylo navrženo, že se jedná o derivát *N*-Chin-Gly-ProCN, v jehož struktuře je nitrilová skupina nahrazena atomem vodíku (Obrázek 19).

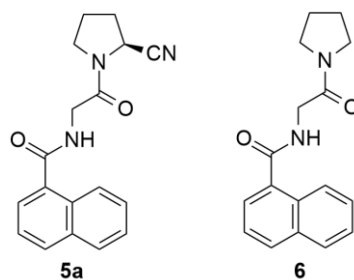


Obrázek 17 - Tenkovrstevná chromatografie HPLC frakcí, pomocí které byla zjištěna přítomnost vedlejšího produktu.



Obrázek 18 – LC-MS chromatogram A znázorňuje složení reakční směsi před provedením HPLC. Chromatogram B (resp. C) ukazuje složení frakce, ve které převažuje produkt (resp. vedlejší produkt – v obrázku značeno VP). Z chromatogramů B a C je patrné, že došlo k částečnému oddělení obou látek.

Část nečekaného vedlejšího produktu se podařilo izolovat a jeho struktura byla potvrzena pomocí NMR (Příloha 1). Výsledky ukázaly, že se opravdu jednalo o analog *N*-Chin-Gly-ProCN bez nitrilové skupiny (látko bude dále značena jako *N*-Chin-Gly-Pyrr (**6**)).



Obrázek 19 - Struktury *N*-Chin-Gly-ProCN (**5a**) a vedlejšího produktu *N*-Chin-Gly-Pyrr (**6**)

Podle literatury odštěpení nitrilové skupiny probíhá obtížně a pouze za silně redukčních podmínek [26]. Takové ale během syntézy nebyly použity. První navrženou hypotézou byla kontaminace výchozí látky *N*-Boc-ProCN z výroby. *N*-Boc-ProCN a 2-kyanopyrrolidinium tosylát (**1**) proto byly analyzovány pomocí NMR.

Výsledky měření prokázaly naprostou čistotu těchto dvou látek (Příloha 1), přítomnost vedlejšího produktu tedy nebyla způsobena kontaminací z výroby.

Fosfiny jsou látky používané jako redukční činidla [18]. Po vyvrácení možnosti kontaminace výchozí látky z výroby byla navržena další hypotéza, že odštěpení nitrilové funkční skupiny zprostředkovává tripyrrolidinofosfin Pyrr₃P, odvozený od činidla PyBroP. Z toho důvodu byly provedeny orientační reakce směsi *N*-Chin-Gly-ProCN (**5a**) s *N*-Chin-Gly-Pyrr (**6**) s činidlem PyBroP a redukčními činidly NaBH₄ a Ph₃P (Schéma 20).

Odštěpování nitrilu pomocí tetrahydridoboritanu sodného dokumentuje Simpkins *et al.* [27]. Trifenylfosfin Ph₃P je silné redukční činidlo používané pro Staudingerovu reakci, při níž dochází k redukcí azidů na příslušné aminy [18].

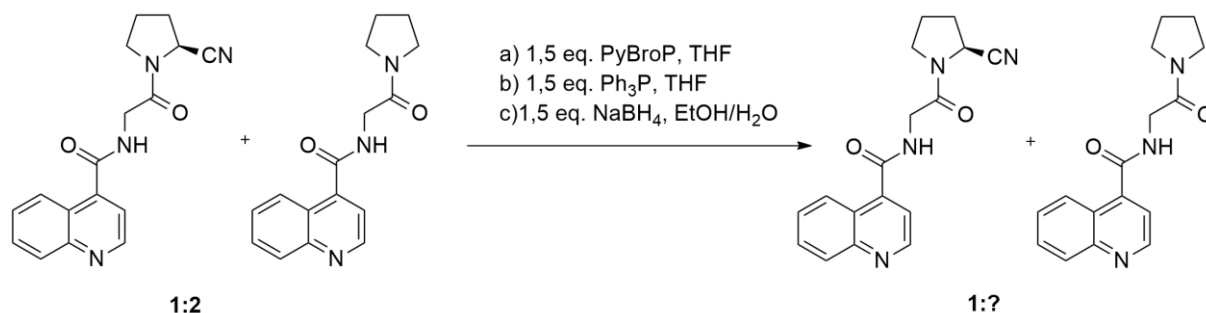
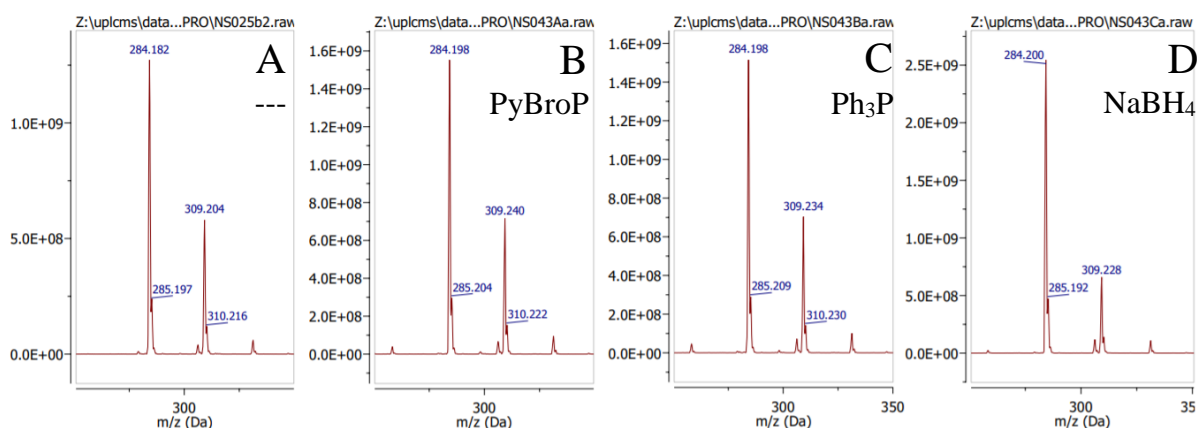


Schéma 20 - Orientační reakce s redukčními činidly

Při redukčním štěpení nitrilové skupiny by se měl poměr obou látek posunout ve prospěch *N*-Chin-Gly-Pyrr, což bylo sledováno pomocí LC-MS (Obrázek 20). V reakci s PyBroP (Obrázek 20 vlevo) i v reakci s Ph₃P (Obrázek 20 uprostřed) k žádné změně oproti původnímu stavu nedošlo. V reakci s NaBH₄ (Obrázek 20 vpravo) se poměr změnil ve prospěch látky bez nitrilu. Tetrahydridoboritan sodný tedy dokázal odštěpit nitrilovou skupinu, na rozdíl od Ph₃P a činidla PyBroP. Hypotéza byla tedy vyvrácena, tripyrrolidinofosfin nemá dostatečně silné redukční účinky, aby způsobil odštěpení nitrilu.



Obrázek 20 - Srovnání poměrů *N*-Chin-Gly-ProCN a *N*-Chin-Gly-Pyrr. LC-MS chromatogram A ukazuje poměr v reakční směsi před orientačními reakcemi. Chromatogram B patří reakci s PyBroP, chromatogram C patří reakci s Ph₃P a chromatogram D reakci s NaBH₄. V reakci D je zjevná změna poměru relativních množství jednotlivých složek.

Další hypotézou byla domněnka, že aktivovaná kyselina místo s ProCN reaguje s pyrrolidinem uvolněným z činidla. Pro ověření byla provedena sada orientačních reakcí, při nichž byl *N*-benzyloxykarbonylglycin⁶ vystaven působení činidla PyBroP bez přídavku prolinnitru. Pokud by byla hypotéza správná, mělo by docházet ke kondenzaci použité kyseliny a pyrrolidinu uvolněného z činidla za vzniku *N*-Z-Gly-Pyrr (Schéma 21).

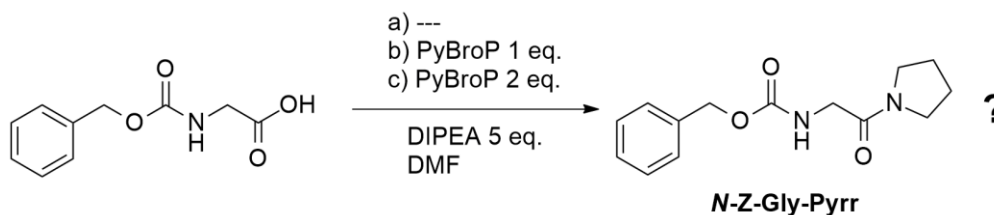
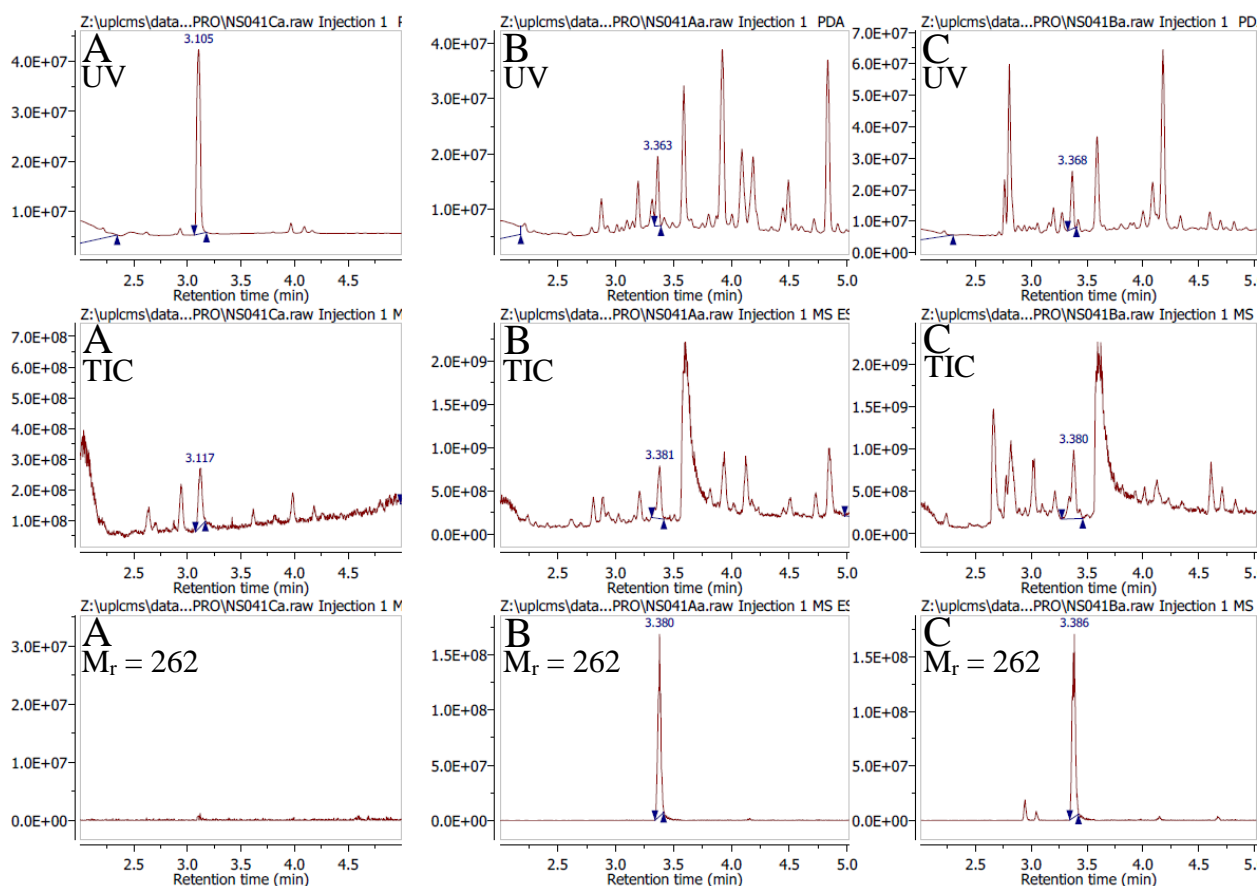


Schéma 21 - Orientační reakce *N*-Cbz-Gly s činidlem PyBroP

Reakční směsi byly testovány na LC-MS. Z chromatogramů je patrné, že ke vzniku *N*-Z-Gly-Pyrr došlo (Obrázek 21).

⁶ Benzyloxykarbonylová skupina (Z-) byla zvolena pro její dobrou schopnost UV-VIS absorpce a tudíž snazší detekci.



Obrázek 21 - LC-MS chromatogramy reakce Z-Gly s činidlem PyBroP. V reakční směsi A nebylo žádné činidlo, v reakční směsi B byl 1 ekv. činidla a v reakční směsi C byly 2 ekv. činidla. Horní řádek ukazuje UV spektra, prostřední množství detekovaných iontů⁷ a spodní detekci Z-Gly-Pyrr ($M_r = 262$). Z chromatogramů B a C je patrné, že ke vzniku Z-Gly-Pyrr po přidání činidla PyBroP došlo.

4.1.5 Optimalizace aktivity kyseliny pomocí činidla PyBroP

Za účelem dalšího ověření hypotézy byl proveden experiment, sledující závislost relativních množství produktů *N*-Z-Gly-Pyrr a *N*-Z-Gly-ProCN na době aktivace kyseliny činidlem PyBroP. Pokud je hypotéza pravdivá, pak lze očekávat, že se s narůstající aktivační dobou bude zvyšovat množství vedlejšího produktu, vzniklého zreagováním aktivované kyseliny s pyrrolidinem uvolněným z činidla (Schéma 21).

Součástí experimentu bylo šest orientačních reakcí mezi *N*-benzyloxykarbonylglycinem a 2-kyanopyrrolidinium tosylátem (**1**) (Schéma 22). Zvolené časové intervaly mezi přidáním činidla a přidáním 2-kyanopyrrolidinu (**1**) byly 5, 10, 20, 30, 45 a 60 minut. Reakční směsi byly analyzovány na LC-MS.

⁷ TIC – total ion current (angl.)

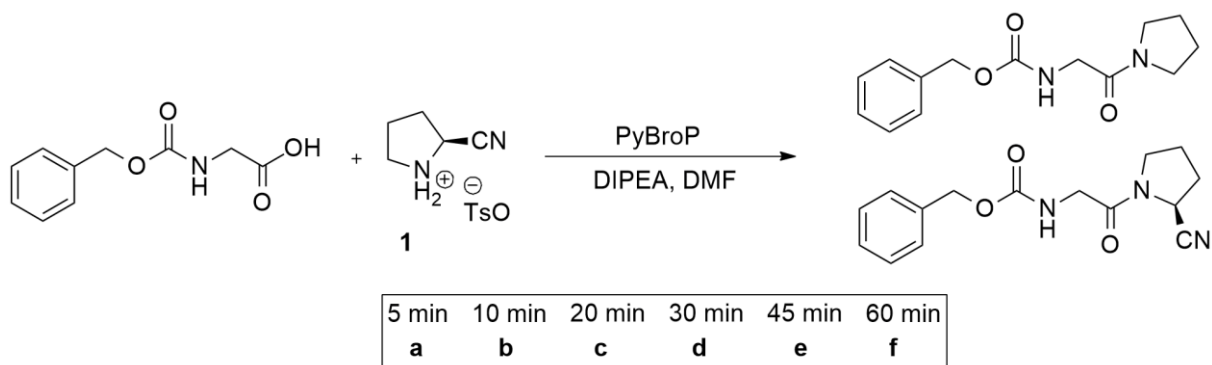
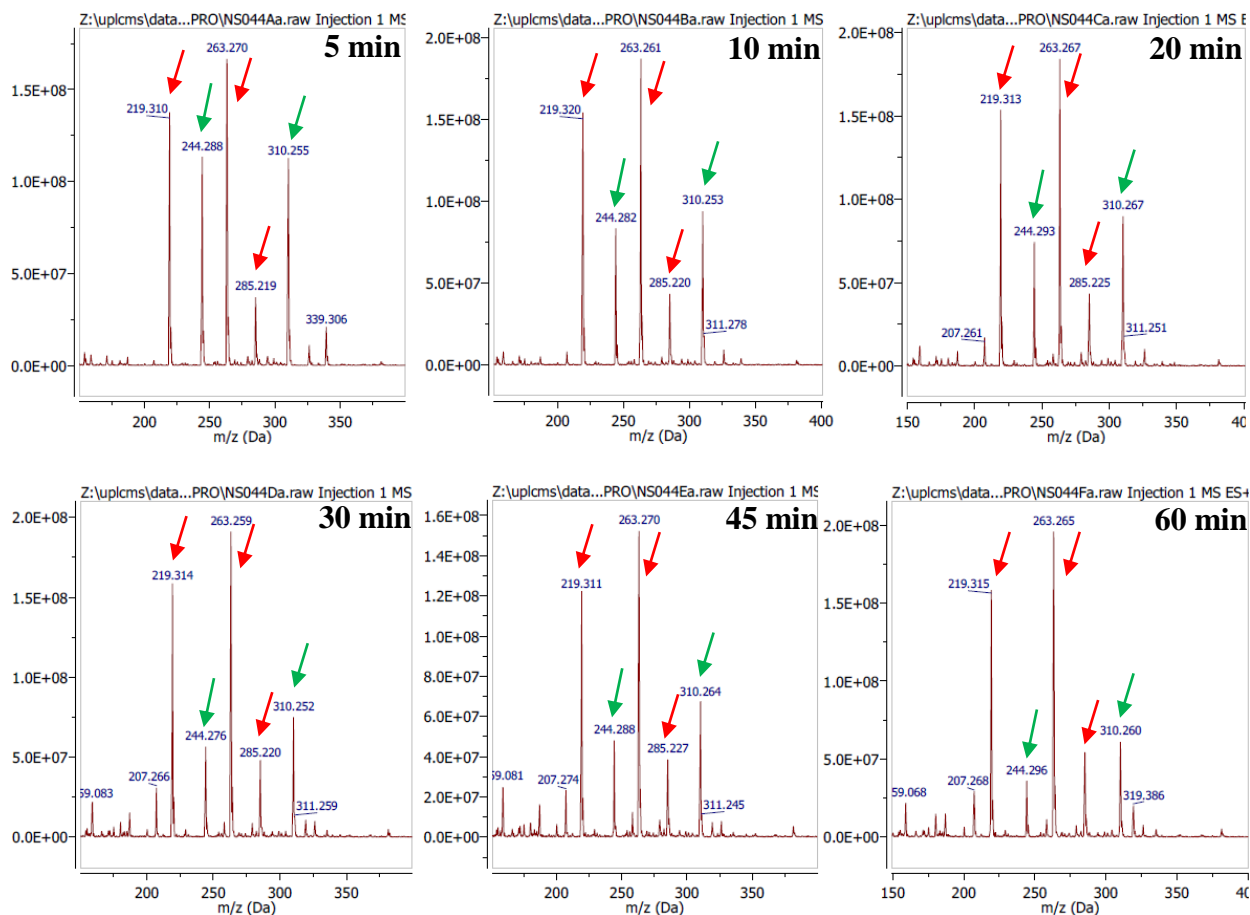


Schéma 22 - Sledování aktivační doby činidla PyBroP

Domnívaná závislost mezi aktivační dobou a relativním množstvím látky bez nitrilové skupiny byla potvrzena pomocí LC-MS (Obrázek 22). K největšímu poklesu relativního množství produktu dochází mezi 5 a 10 min. aktivační doby (cca o 30 %). Z toho plyne, že pro eliminaci vzniku nežádoucích produktů během kondenzačních reakcí s činidlem PyBroP je potřeba zkrátit dobu vyhrazenou pro aktivaci kyseliny činidlem.



Obrázek 22 – Závislost složení reakční směsi na aktivační době činidla. V pravém horním rohu je vyznačena doba aktivace. Zeleně jsou označeny píky náležící produktu s nitrilem ($[M_r - \text{CO}_2 + \text{H}^+] = 244$, $[M_r + \text{Na}^+] = 310$), červeně jsou označeny píky vedlejšího produktu bez nitrilu ($[M_r - \text{CO}_2 + \text{H}^+] = 219$, $[M_r + \text{Na}^+] = 285$). Největší pokles relativního množství produktu je mezi 5 a 10 min. aktivace.

Z LC-MS chromatogramů, které podložily rozhodnutí o používání činidla PyBroP, byl patrný náznak vedlejší reakce, při níž vzniká vedlejší produkt s pyrrolidinem, ale domníval jsem se, že se jedná pouze o fragmenty vzniklé na MS. Proto bylo činidlo vybráno – na základě informací o eluci jeho fragmentů se PyBroP jevil jako lepší alternativa pro HATU. Retrospektivně se toto rozhodnutí jeví jako neoptimální, právě z důvodu výše popsané vedlejší reakce. Ta ale nebyla v literatuře doposud popsána, a proto se s ní nedalo předem počítat.

4.2.2 Aktivita látek *N*-Boc-AA-ProCN

Látka *N*-Boc-Gly-ProCN (**2a**) nevykazuje optimální inhibiční vlastnosti vůči žádnému z testovaných proteinů. Hodnoty IC_{50} se pro DPPIV a PREP pohybují v řádu jednotek μM . Vůči FAP je látka nejméně aktivní, IC_{50} nabývá hodnot vyšších než $10 \mu\text{M}$ a to i přesto, že látka obsahuje sekvenci Gly-Pro, která je pro inhibici FAP klíčová.

Záměna glycinu za L-valin (látka *N*-Boc-L-Val-ProCN, **2b**) o jeden řád vylepšila potenciál látky inhibovat DPPIV. Hodnota IC_{50} pro PREP v tomto případě poklesla více než desetkrát, což je v souladu s poznatkem, že L-valin v pozici P_2 zvyšuje afinitu pro PREP ([8], je třeba zmínit, že zde zkoumané inhibitory mají místo nitrilu skupinou boronovou). Na inhibici FAP neměla změna aminokyselin P_2 vliv.

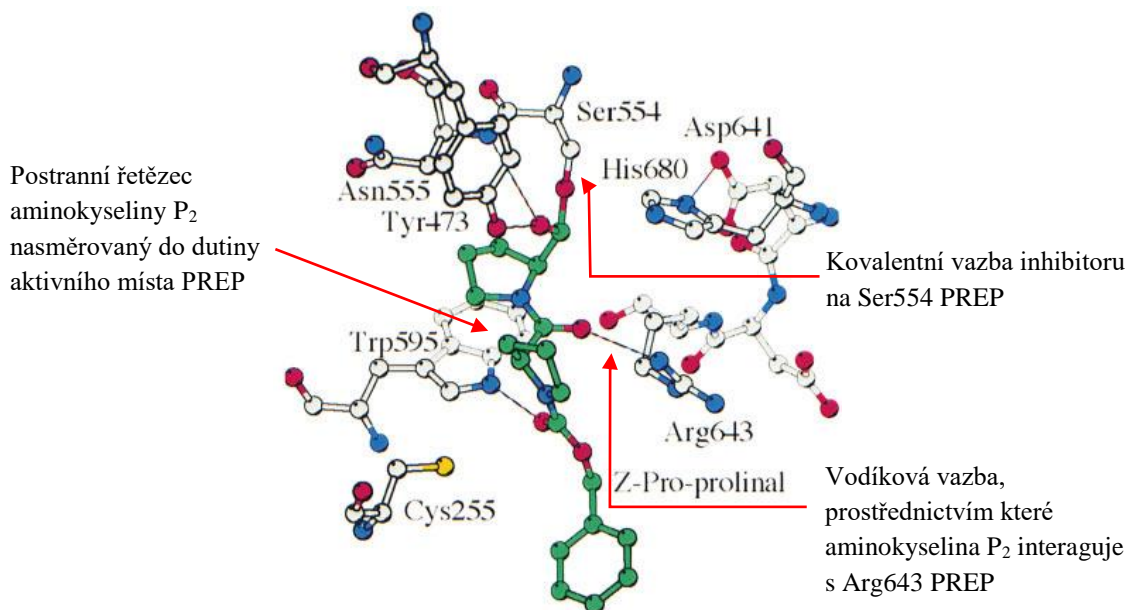
Náhrada L-valinu L-alaninem (látka *N*-Boc-L-Ala-ProCN, **2c**) vrátila hodnoty IC_{50} pro DPPIV do mikromolárního řádu. Zároveň došlo k dalšímu vylepšení inhibice PREP. Ze skupiny látek **2a-d**, nesoucích *N*-Boc skupinu, je *N*-Boc-L-Ala-ProCN vůči PREP nejvíce aktivní. Inhibice FAP opět zůstala nezměněna.

Výměna L-alaninu za jeho enantiomer (*N*-Boc-D-Ala-ProCN, **2d**) způsobila zhoršení inhibice PREP. Poplawski *et al.* [8] ukázali, že D-alanin v pozici P_2 zhoršuje selektivitu vůči PREP a zároveň zvyšuje selektivitu pro FAP (poznatek byl založen na boronových inhibitech) – k žádnému zlepšení afinity pro FAP ale nedošlo. Během NMR charakterizace bylo zjištěno, že výchozí látka obsahující D-alanin byla mírně kontaminována L-alaninem, což může získané hodnoty IC_{50} ovlivnit.

Z naměřených hodnot pro látky *N*-Boc-AA-ProCN (**2a-d**) je zjevné, že přítomnost aminokyseliny v pozici P_2 nesoucí alkylový postranní řetězec významně zlepšuje vazbu látky na PREP. Tento poznatek koreluje s výsledky SAR⁸ studie [8], které ukázaly závislost mezi strukturou postranního řetězce aminokyseliny P_2 a afinitou pro PREP (resp. pro FAP). Čím větší byl postranní řetězec, tím více rostla afinita pro PREP a současně klesala afinita pro FAP.

Jev lze vyložit jako důsledek odlišného uspořádání vazebných míst, do kterých se ligand váže. Interakce aminokyseliny v pozici P_2 s vazebným místem PREP je zprostředkována vodíkovou vazbou mezi karbonylovým kyslíkem vazby Pro- P_2 v inhibitoru a Arg643 v aktivním místě enzymu. Struktura vazebného místa PREP způsobuje orientaci postranního řetězce aminokyseliny P_2 do dutiny, která je schopna pojmout i stericky rozměrnější struktury (Obrázek 23, [29]).

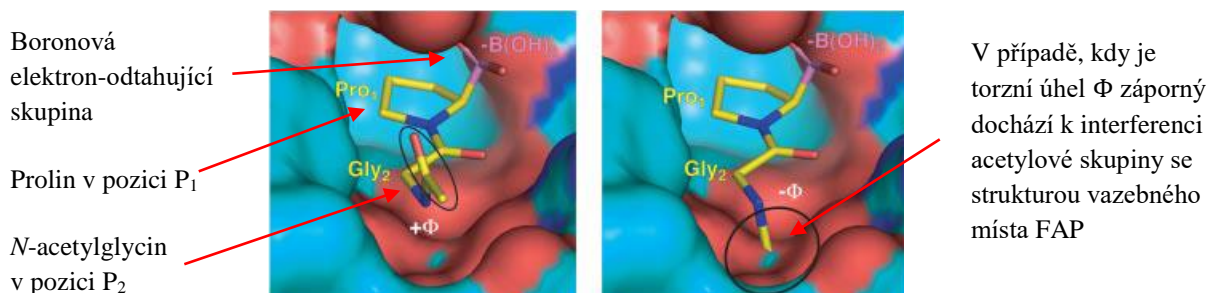
⁸ *Structure-activity relationship (angl.)* – vztah mezi aktivitou a strukturou látky



Obrázek 23 - Struktura aktivního místa PREP. Zeleně je vyznačena struktura kovalentně navázaného inhibitoru, Z-Pro-prolinalu. Prolin v pozici P₂ je orientován do popsané dutiny. Převzato z [29].

Pro FAP nejsou dostupné informace o jeho krystalové struktuře v komplexu s inhibitorem. V případě DPPIV je krystalová struktura dobře prostudována, a proto lze na základě silné homologie mezi FAP a DPPIV (zejména v oblasti jejich extracelulárních domén) vyvozovat racionální závěry o vazbě substrátu na FAP.

Edosada *et al.* [7] počítačovým modelováním ukázali, že v pozici P₂ je ze sterických důvodů jakákoliv jiná aminokyselina než glycin pro FAP nepřijatelná (glycin díky absenci postranního řetězce dokáže zaujmout prostorovou konfiguraci, která neinterferuje se strukturou vazebného místa FAP, Obrázek 24). To je v souladu jak se zjištěními Poplawské *et al.*, tak s námi naměřenými hodnotami.



Obrázek 24 – Model vazby N-Ac-Gly-boroPro na FAP. Glycin je jediná aminokyselina, která je schopna zaujmout kladný torzní úhel Φ (vlevo). V případě, že je torzní úhel Φ záporný, dochází k interferenci se strukturou vazebného místa FAP (vpravo). Převzato z [7].

4.2.3 Aktivita látek *N*-Ac-AA-ProCN

U *N*-Ac-Gly-ProCN (**4a**) byla naměřena velmi slabá inhibiční aktivita. Nahrazení glycinu L-valinem (*N*-Ac-L-Val-ProCN, **4b**) způsobilo zlepšení aktivity vůči PREP (v souladu s popsaným mechanismem vazby aminokyseliny P₂ na PREP) a vůči DPPIV, hodnoty se u obou proteinů pohybují v řádu μM.

Slabé aktivity *N*-acetylovaných látek, ve srovnání například s *N*-chinolin-4-karboxylovanými, lze vysvětlit absencí klíčových struktur pro dobrou vazbu na FAP, či PREP (vazba na DPPIV je vyloučena díky acetylaci atomu dusíku, která ho zablokuje pro interakci s enzymem [4]). U FAP bylo prokázáno, že dochází k interakcím mezi kladně nabitým Arg123 a π-elektrony aromatických substituentů ligandu. Dalšího zlepšení vazebných schopností inhibitoru na FAP lze dosáhnout implementací atomu dusíku do struktury substituentu, který po protonaci ne vazebně interaguje s Glu209 [8]. V případě vazby na PREP je v pozici P₃ preferována hydrofobní a nebo stericky rozměrnější struktura (tento poznatek vychází z charakteru postranních řetězců, jež tvoří vazebné místo pro aminokyselinu P₃ [29]). Acetyl žádnou z těchto vlastností nedisponuje, což zdůvodňuje jeho špatnou inhibiční aktivitu vůči všem testovaným enzymům.

4.2.4 Aktivita látek *N*-Chin-AA-ProCN

Látka *N*-Chin-Gly-ProCN (**5a**) je v literatuře [16] popsána jako nanomolární inhibitor FAP. Námí naměřené hodnoty pro FAP (IC₅₀ = 15 ± 1,8 nM) jsou v souladu s publikací. V případě IC₅₀ pro PREP si hodnoty neodpovídají – podle našich měření tato látka vykazuje hodnotu 90 ± 10 nM, což je téměř desetkrát méně, než publikovaná hodnota 860 ± 70 nM. V případě DPPIV jsou publikované hodnoty také zhruba o řád vyšší (Poplawski *et al.* [8] uvádí, že IC₅₀ látky **5a** pro DPPIV nabývá hodnot vyšších než 100 μM).

Tento rozdíl naměřených hodnot IC₅₀ může být zapříčiněn rozdíly v použitých biochemických metodách. Získané hodnoty jsou závislé na podmínkách, při kterých bylo měření prováděno, jmenovitě na koncentraci substrátu, či použitém pufru. Výpovědní hodnota porovnávání IC₅₀ může být tedy zkreslena (oproti situaci, kdy jsou porovnávány rovnovážné konstanty inhibice K_i, které jsou normované na koncentraci substrátu).

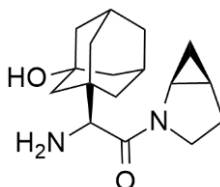
Po náhradě glycinu L-valinem (látka *N*-Chin-L-Val-ProCN, **5b**) dochází k prudkému zhoršení afinity pro FAP a výsledná látka se tak stává selektivní pro PREP. Zde se opět potvrzuje pozitivní vliv alkylového postranního řetězce aminokyseliny P₂ na afinitu vůči PREP.

N-Chin-L-Ala-ProCN (**5c**) je z celé série látek nejúčinnějším inhibitorem PREP, IC₅₀ se pohybuje v řádu jednotek nM, zatímco vůči DPPIV a FAP látka nevykazuje téměř žádnou inhibiční aktivitu. Lze pozorovat analogii s aktivitami látek *N*-Boc-AA-ProCN (**2a-d**), kde L-alanin také způsobil řádové zlepšení IC₅₀ pro PREP. Aromatický chinolin pravděpodobně dokáže zprostředkovat dobrou vazbu v pozici P₃ na PREP a současně je postranní řetězec L-alaninu orientován do popsané dutiny.

U látky *N*-Chin-D-Ala-ProCN (**5d**) dochází k rozporu s poznatkem, že D-alanin zvyšuje selektivitu pro FAP [8]. Vazba na FAP je v tomto případě silnější, než u látek **5b** a **5c**, nicméně hodnota IC₅₀ pro FAP je stále o tři řády horší, než pro PREP. U látek **5c** a **5d**, obsahujících alanin, také nebylo zjištěno zhoršení vazby na PREP po záměně L-alaninu za D-alanin (na rozdíl od látek *N*-Boc-Ala-ProCN (**2c-d**), kde k jevu zjevně došlo). I v tomto případě mohly být výsledky ovlivněny kontaminací L-alaninem.

Testování vedlejšího produktu *N*-Chin-Gly-Pyrr (**6**) ukázalo, že tato látka vykazuje hodnoty IC₅₀ pro FAP a pro PREP, které se řádově pohybují v desetinách μM, navzdory tomu, že látka nese žádnou elektron-odtahující skupinu schopnou podstoupit nukleofilní atak, která se zdála pro interakci se serinem v katalytickém místě FAP klíčová. Tento jev lze vysvětlit jako důsledek možné kontaminace testovaného vzorku analogem *N*-Chin-Gly-ProCN, nesoucím nitrilovou skupinu (na HPLC a LC-MS docházelo k překryvu píků těchto dvou látek, a proto je možné, že se ve vzorku *N*-Chin-Gly-Pyrr stále vyskytovalo stopové množství *N*-Chin-Gly-ProCN, které měření ovlivnilo). NMR spektrum *N*-Chin-Gly-Pyrr ale ukázalo, že je látka naprosto čistá, kontaminace by proto musela být téměř zanedbatelná.

Fakt, že látka *N*-Chin-Gly-Pyrr (**6**) je schopna inhibovat i přesto, že nese zmíněnou elektron-odtahující skupinu (tzv. *warhead*), lze opět vysvětlit srovnáním FAP s DPPIV. Simpkins *et al.* [27] zkoumali beznitrilové inhibitory DPPIV a dospěli k závěru, že přítomnost nitrilové, či jiné elektron-odtahující skupiny není nutná, za předpokladu, že substrát v pozicích P₂/P₃ obsahuje substituent, který je pro daný enzym afinní. V případě DPPIV tímto substituentem byl 3-hydroxyadamantyl, který se na DPPIV výborně váže (K_i = 10 ± 3 nM, Obrázek 25).



Obrázek 25 – Inhibitor DPPIV, nesoucí 3-hydroxyadamantyl, který zvyšuje afinitu pro DPPIV.

Zde je zjevná paralela s testovanou látkou *N*-Chin-Gly-Pyrr (**6**), která nese chinolin-4-karboxyl. Ten prostřednictvím π -interakcí a vodíkové vazby zaručuje dobrou vazbu na FAP. K inhibici tedy dochází v důsledku sterické blokáce aktivního místa. Je samozřejmé, že látka *N*-Chin-Gly-ProCN (**5a**) inhibuje FAP mnohem lépe, protože elektrostatické přitažlivé síly mezi nitrilovou skupinou a katalytickým serinem sílu vazby na FAP dále umocňují.

5 ZÁVĚR

V rámci práce bylo připraveno celkem deset látek cílených na fibroblastový aktivační protein, jehož zvýšená exprese v tkáni epiteliálních nádorů z něj činí slibný terapeutický cíl. Syntetický postup spočíval ve střídání kondenzačních a odchraňovacích kroků.

Počátečním krokem syntézy byla příprava 2-kyanopyrrolidinu odchráněním komerčně dostupného *N*-Boc-2-kyanopyrrolidinu. Tato látka byla kondenzována s *N*-substituovanými aminokyselinami glycinem, L-valinem, L-alaninem a D-alaninem za vzniku série sloučenin nesoucích *terc*-butyloxykarbonyl, resp. acetyl (látky **2a-d**, resp. **4a-d**). Pro syntézu poslední řady látek bylo potřeba odchránit aminovou skupinu *terc*-butyloxykarbonylovaných derivátů a kondenzovat je s chinolin-4-karboxylovou kyselinou.

Všechny látky (včetně chráněných meziproductů) byly čištěny chromatografickými metodami (FLASH, HPLC) a charakterizovány pomocí LC-MS a NMR spektroskopie.

Během kondenzačních reakcí vznikal nečekaný nežádoucí vedlejší produkt. V rámci práce byla příčina studována a identifikována jako důsledek použití činidla PyBroP v kondenzačních reakcích. Na základě těchto poznatků byl navržen a ověřen alternativní postup syntézy, při němž nežádoucí produkt nevzniká.

Všechny syntetizované látky byly testovány na enzymech FAP, PREP a DPPIV. Nejzajímavější jsou dvě z nich. První, dosud nepublikovaná látka *N*-Chin-L-Ala-ProCN (**5c**) je novým nanomolárním inhibítozem enzymu PREP ($IC_{50} = 2,5 \pm 0,07$ nM), který je výrazně exprimován v mozku. V současné době je intenzivně studována role PREP v duševních poruchách (např. schizofrenie, deprese, mánie, či autismus) [30].

Další překvapivý objev se vztahuje k nežádoucímu produktu syntézy, látce *N*-Chin-Gly-Pyrr (**6**). Navzdory absenci nitrilové skupiny tato látka neztratila schopnost inhibovat FAP ($IC_{50} = 121 \pm 5,6$ nM). Oproti jejímu analogu s nitrilovou skupinou ($IC_{50} = 15 \pm 1,8$ nM) došlo ke zhoršení inhibiční schopnosti pouze o jeden řád. Na základě tohoto zjištění by mohly být navrženy nové třídy inhibitorů s odlišným mechanismem inhibice.

Fibroblastový aktivační protein je opravdu velmi zajímavým a slibným předmětem vědeckého bádání, a to nejen proto, že by jeho výzkum mohl odhalit dosud neznámé poznatky o probíhajících dějích v nádorových tkáních. Jeho terapeutický potenciál je zásadní, a z toho důvodu je třeba vývoji i optimalizaci nových tříd inhibitorů FAP věnovat značnou pozornost.

6 POUŽITÁ LITERATURA

- [1] J. B. Reece *et al.*, *Campbell biology*, Tenth edition. Boston: Pearson, 2014.
- [2] P. Garin-Chesa, L. J. Old, a W. J. Rettig, „Cell surface glycoprotein of reactive stromal fibroblasts as a potential antibody target in human epithelial cancers.", *Proc. Natl. Acad. Sci.*, roč. 87, č. 18, s. 7235–7239, 1990.
- [3] J. E. Park, M. C. Lenter, R. N. Zimmermann, P. Garin-Chesa, L. J. Old, a W. J. Rettig, „Fibroblast activation protein, a dual specificity serine protease expressed in reactive human tumor stromal fibroblasts", *J. Biol. Chem.*, roč. 274, č. 51, s. 36505–36512, 1999.
- [4] K. Aertgeerts *et al.*, „Structural and Kinetic Analysis of the Substrate Specificity of Human Fibroblast Activation Protein α ", *J. Biol. Chem.*, roč. 280, č. 20, s. 19441–19444, kvě. 2005.
- [5] M. L. Piñeiro-Sánchez, L. A. Goldstein, J. Dodt, L. Howard, Y. Yeh, a W.-T. Chen, „Identification of the 170-kDa melanoma membrane-bound gelatinase (seprase) as a serine integral membrane protease", *J. Biol. Chem.*, roč. 272, č. 12, s. 7595–7601, 1997.
- [6] „Search the PDB archive < PDBe < EMBL-EBI". [Online]. Dostupné z: [https://www.ebi.ac.uk/pdbe/entry/search/index?uniprot_accession:\(P97321%20OR%20Q12884\)](https://www.ebi.ac.uk/pdbe/entry/search/index?uniprot_accession:(P97321%20OR%20Q12884)). [Viděno: 20-bře-2018].
- [7] C. Y. Edosada *et al.*, „Selective Inhibition of Fibroblast Activation Protein Protease Based on Dipeptide Substrate Specificity", *J. Biol. Chem.*, roč. 281, č. 11, s. 7437–7444, bře. 2006.
- [8] S. E. Poplawski *et al.*, „Identification of Selective and Potent Inhibitors of Fibroblast Activation Protein and Prolyl Oligopeptidase", *J. Med. Chem.*, roč. 56, č. 9, s. 3467–3477, kvě. 2013.
- [9] L. Polgár, „The catalytic triad of serine peptidases", *Cell. Mol. Life Sci.*, roč. 62, č. 19–20, s. 2161–2172, říj. 2005.
- [10] F. Jordan a L. Polgar, „Proton nuclear magnetic resonance evidence for the absence of a stable hydrogen bond between the active site aspartate and histidine residues of native subtilisins and for its presence in thiolsubtilisins", *Biochemistry (Mosc.)*, roč. 20, č. 22, s. 6366–6370, 1981.
- [11] N. D. Rawlings, A. J. Barrett, a R. Finn, „Twenty years of the *MEROPS* database of proteolytic enzymes, their substrates and inhibitors", *Nucleic Acids Res.*, roč. 44, č. D1, s. D343–D350, led. 2016.
- [12] E. J. Hamson, F. M. Keane, S. Tholen, O. Schilling, a M. D. Gorrell, „Understanding fibroblast activation protein (FAP): Substrates, activities, expression and targeting for cancer therapy", *PROTEOMICS - Clin. Appl.*, roč. 8, č. 5–6, s. 454–463, čer. 2014.
- [13] T. Yoshimoto, M. Fischl, R. C. Orlowski, a R. Walter, „Post-proline cleaving enzyme and post-proline dipeptidyl aminopeptidase. Comparison of two peptidases with high specificity for proline residues.", *J. Biol. Chem.*, roč. 253, č. 10, s. 3708–3716, kvě. 1978.
- [14] K. Jansen *et al.*, „Selective inhibitors of fibroblast activation protein (FAP) with a xanthine scaffold", *Med Chem Commun*, roč. 5, č. 11, s. 1700–1707, 2014.
- [15] R. Liu, H. Li, L. Liu, J. Yu, a X. Ren, „Fibroblast activation protein: A potential therapeutic target in cancer", *Cancer Biol. Ther.*, roč. 13, č. 3, s. 123–129, úno. 2012.
- [16] K. Jansen *et al.*, „Selective Inhibitors of Fibroblast Activation Protein (FAP) with a (4-Quinolinoyl)-glycyl-2-cyanopyrrolidine Scaffold", *ACS Med. Chem. Lett.*, roč. 4, č. 5, s. 491–496, kvě. 2013.
- [17] R. H. Garrett a C. M. Grisham, *Biochemistry*, Sixth edition. Boston, MA: Cengage Learning, 2017.
- [18] J. Clayden, N. Greeves, a S. G. Warren, *Organic chemistry*, 2nd ed. Oxford ; New York: Oxford University Press, 2012.

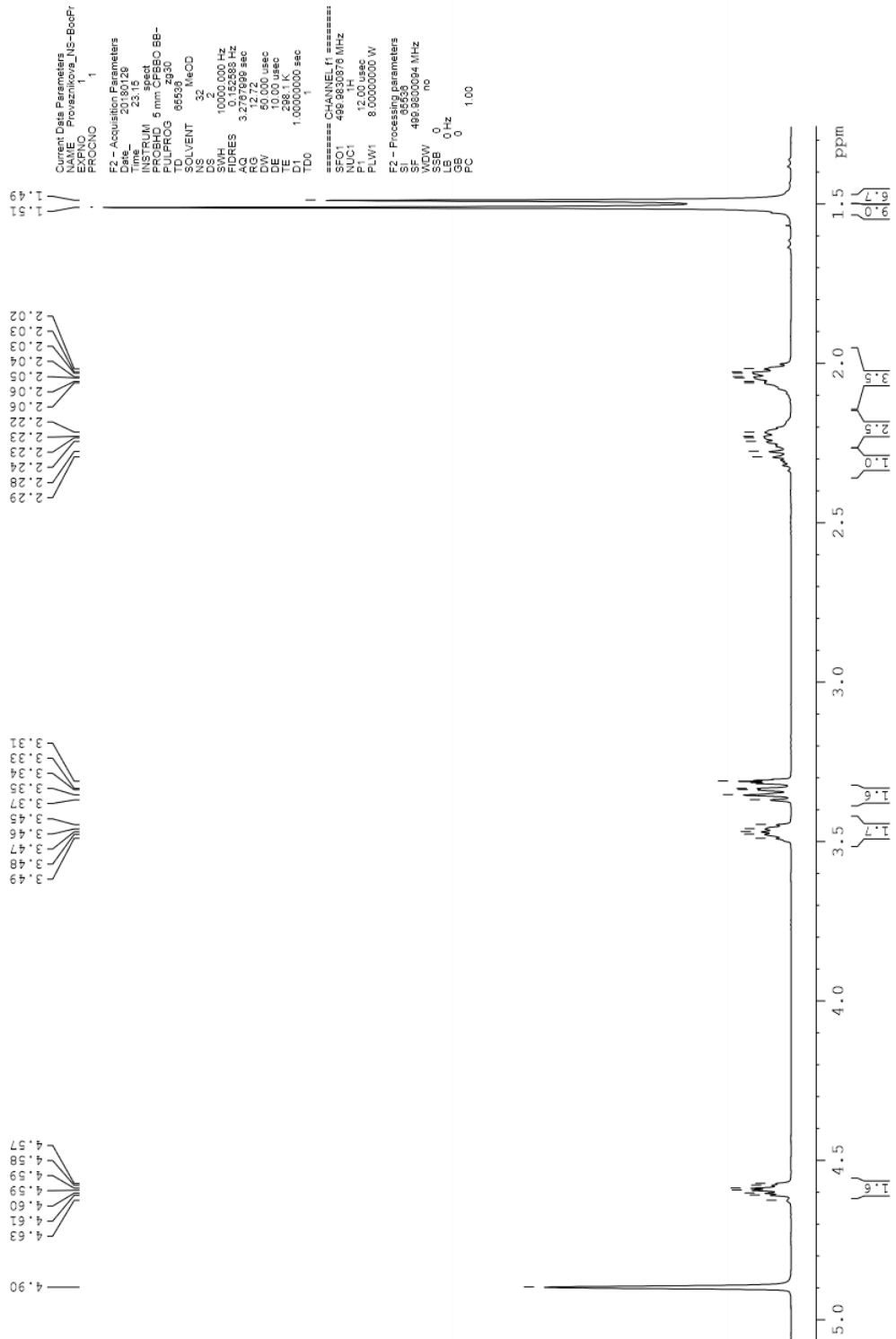
- [19] A. Schimmerová, „Příprava nesymetrického azaftalocyaninu pro značení DNA sond zvyšujících citlivost molekulárně-biologických metod“, 2017.
- [20] F. Albeicicio, R. Chinchilla, D. J. Dodsworth, a C. Nájera, „NEW TRENDS IN PEPTIDE COUPLING REAGENTS“, *Org. Prep. Proced. Int.*, roč. 33, č. 3, s. 203–303, čer. 2001.
- [21] C. A. G. N. Montalbetti a V. Falque, „Amide bond formation and peptide coupling“, *Tetrahedron*, roč. 61, č. 46, s. 10827–10852, lis. 2005.
- [22] J. Svoboda, *Organická syntéza I*, 1. vydání. Praha: VŠCHT, 2010.
- [23] A. Isidro-Llobet, M. Alvarez, a F. Albericio, „Amino acid-protecting groups“, *Chem. Rev.*, roč. 109, č. 6, s. 2455–2504, 2009.
- [24] P. Biesel, L. Al-Momani, a M. Müller, „The tert-butyl group in chemistry and biology“, *Org. Biomol. Chem.*, roč. 6, č. 15, s. 2655, 2008.
- [25] K. Jansen *et al.*, „Extended structure-activity relationship and pharmacokinetic investigation of (4-quinolinoyl)glycyl-2-cyanopyrrolidine inhibitors of fibroblast activation protein (FAP)“, *J. Med. Chem.*, roč. 57, č. 7, s. 3053–3074, dub. 2014.
- [26] J. McMurry, *Organic chemistry*, Ninth edition. Boston, MA, USA: Cengage Learning, 2016.
- [27] L. M. Simpkins *et al.*, „Potent non-nitrile dipeptidic dipeptidyl peptidase IV inhibitors“, *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, roč. 17, č. 23, s. 6476–6480, pro. 2007.
- [28] P. Dvořáková *et al.*, „Inhibitor-Decorated Polymer Conjugates Targeting Fibroblast Activation Protein“, *J. Med. Chem.*, roč. 60, č. 20, s. 8385–8393, říj. 2017.
- [29] V. Fülöp, Z. Böcskei, a L. Polgár, „Prolyl Oligopeptidase: An Unusual β -Propeller Domain Regulates Proteolysis“, *Cell*, roč. 94, č. 2, s. 161–170, čvc. 1998.
- [30] N. Momeni, B. M. Nordström, V. Horstmann, H. Avarseji, a B. V. Sivberg, „Alterations of prolyl endopeptidase activity in the plasma of children with autistic spectrum disorders“, *BMC Psychiatry*, roč. 5, s. 27, čer. 2005.

7 SEZNAM OBRÁZKŮ, SCHÉMAT A TABULEK

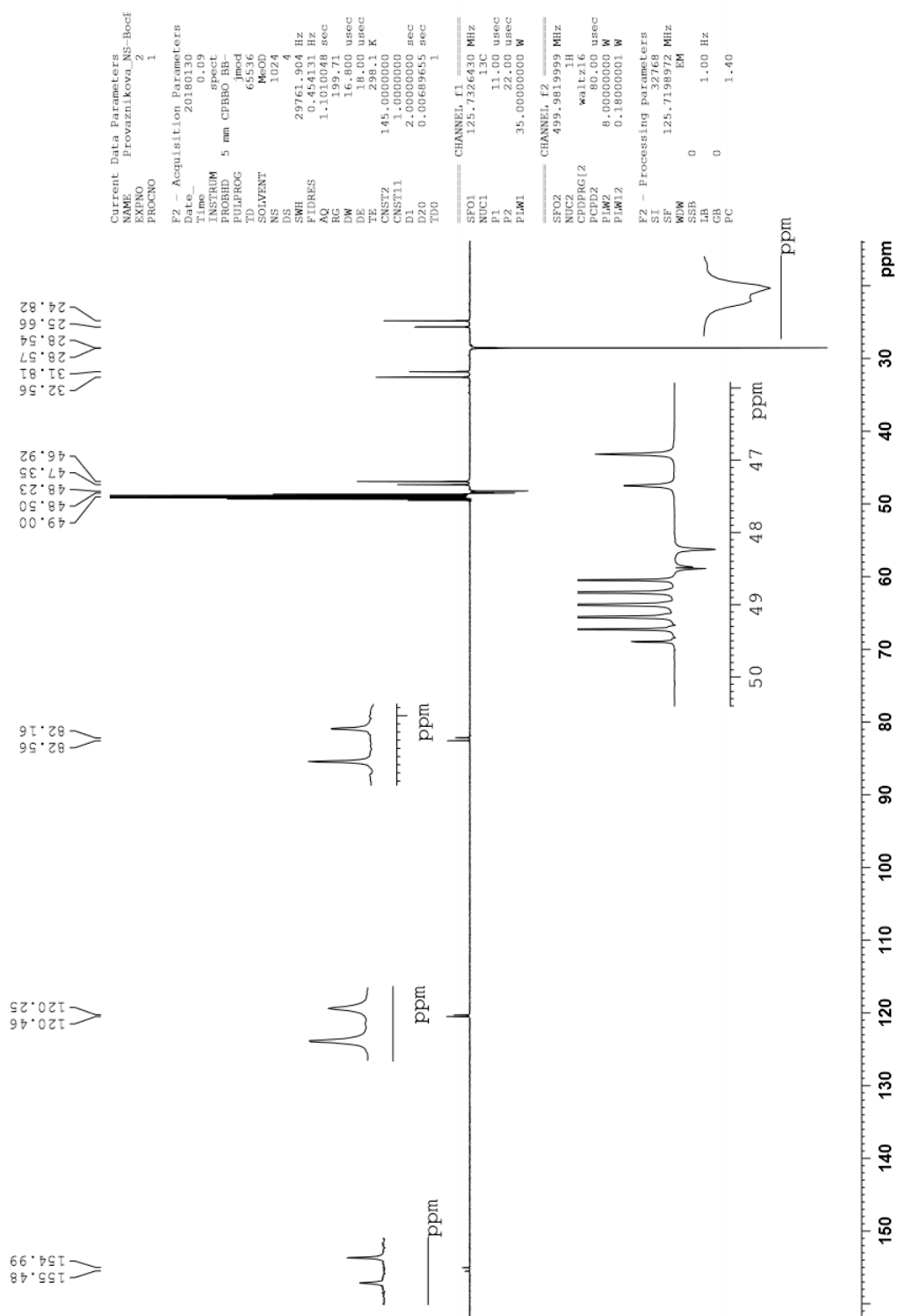
Obrázek 1 - 170 kDa homodimer FAP	9
Obrázek 2 - P ₁ a P ₂ specifita FAP	10
Obrázek 3 - Systém značení pořadí aminokyselin ve strukturách inhibitorů	12
Obrázek 4 - Struktura inhibitoru Val- <i>boro</i> Pro	13
Obrázek 5 - Inhibitor DPPIV Linagliptin	15
Obrázek 6 Tautomerie amidové vazby	16
Obrázek 7 - Kondenzační činidlo PyBroP	19
Obrázek 8 - Peptidové kondenzační činidlo TSTU	19
Obrázek 9 - Peptidové kondenzační činidlo HATU	20
Obrázek 10 - Stabilizace atakující aminoskupiny HOAt esterem	20
Obrázek 11 - <i>tert</i> -butyloxykarbonylová chránící skupina	21
Obrázek 12 - Syntetizované látky <i>N</i> -Boc-AA-ProCN	31
Obrázek 13 - Syntetizované látky <i>N</i> -Ac-AA-ProCN	31
Obrázek 14 - LC-MS chromatogram reakce <i>N</i> -acetylglycinu s prolinnitrem	33
Obrázek 15 - LC-MS chromatogram reakce <i>N</i> -Boc-glycinu s prolinnitrem	34
Obrázek 16 - Syntetizované látky <i>N</i> -Chin-AA-ProCN	35
Obrázek 17 - Tenkovrstevná chromatografie HPLC frakcí	36
Obrázek 18 - LC-MS chromatogram reakční směsi před HPLC	36
Obrázek 19 - Struktury <i>N</i> -Chin-Gly-ProCN a <i>N</i> -Chin-Gly-Pyrr	37
Obrázek 20 - Srovnání poměrů <i>N</i> -Chin-Gly-ProCN a <i>N</i> -Chin-Gly-Pyrr	38
Obrázek 21 - LC-MS chromatogramy reakce <i>Z</i> -Gly s činidlem PyBroP	39
Obrázek 22 - Závislost složení reakční směsi na aktivační době činidla	40
Obrázek 23 - Struktura aktivního místa PREP	44
Obrázek 24 - Model vazby <i>N</i> -Ac-Gly- <i>boro</i> Pro na FAP	44
Obrázek 25 - Inhibitor DPPIV, nesoucí 3-hydroxyadamantyl	46
Schéma 1 - Mechanismus štěpení peptidové vazby serinovými proteasami	11
Schéma 2 - Syntéza amidu reakcí acylhalogenidu s aminem	17
Schéma 3 - Schotten-Baumannova syntéza amidů	17
Schéma 4 - Syntéza amidů reakcí anhydridu s aminem	17
Schéma 5 - Syntéza amidů reakcí ketenu s aminem	17
Schéma 6 - Enolizace α -aminokyselin (resp. jejich aktivních esterů)	18
Schéma 7 - Vznik peptidové vazby pomocí činidla PyBroP	19
Schéma 8 - Vznik peptidové vazby pomocí činidla TSTU	19
Schéma 9 - Vedlejší reakce při použití uroniových činidel	20
Schéma 10 - Aplikace <i>tert</i> -butyloxykarbonylové chránící skupiny	21
Schéma 11 - Mechanismus odštěpení <i>tert</i> -butyloxykarbonylové chránící skupiny	22
Schéma 12 - Ritterova reakce	22
Schéma 13 - Reakční sekvence	30
Schéma 14 - Odchraňování <i>N</i> -Boc-prolinnitru	31

Schéma 15 - Příprava <i>N</i> -Ac-Gly-ProCN kondenzační reakcí	32
Schéma 16 – Kondenzace ProCN s <i>N</i> -Ac-Gly	33
Schéma 17 - Kondenzace ProCN s <i>N</i> -Boc-Gly	34
Schéma 18 - Odchránění <i>N</i> -Boc-AA-ProCN	35
Schéma 19 - Kondenzace chinolin-4-karboxylové kyseliny s látkami AA-ProCN.....	35
Schéma 20 - Orientační reakce s redukčními činidly	37
Schéma 21 - Orientační reakce <i>N</i> -Cbz-Gly s činidlem PyBroP	38
Schéma 22 - Sledování aktivační doby činidla PyBroP	40
Tabulka 1 - Inhibiční vlastnosti derivátů kyseliny boronové 1-5	13
Tabulka 2 - Vliv polohy atomu dusíku a halogenových substituentů na aktivitu.....	14
Tabulka 3 - Inhibiční vlastnosti látek 9-12	15
Tabulka 4 - Inhibiční vlastnosti látky 14	16
Tabulka 6 - Vysvětlivky zkratk použitých pro značení syntetizovaných látek.....	23
Tabulka 7 - Střední inhibiční konstanty syntetizovaných látek	42

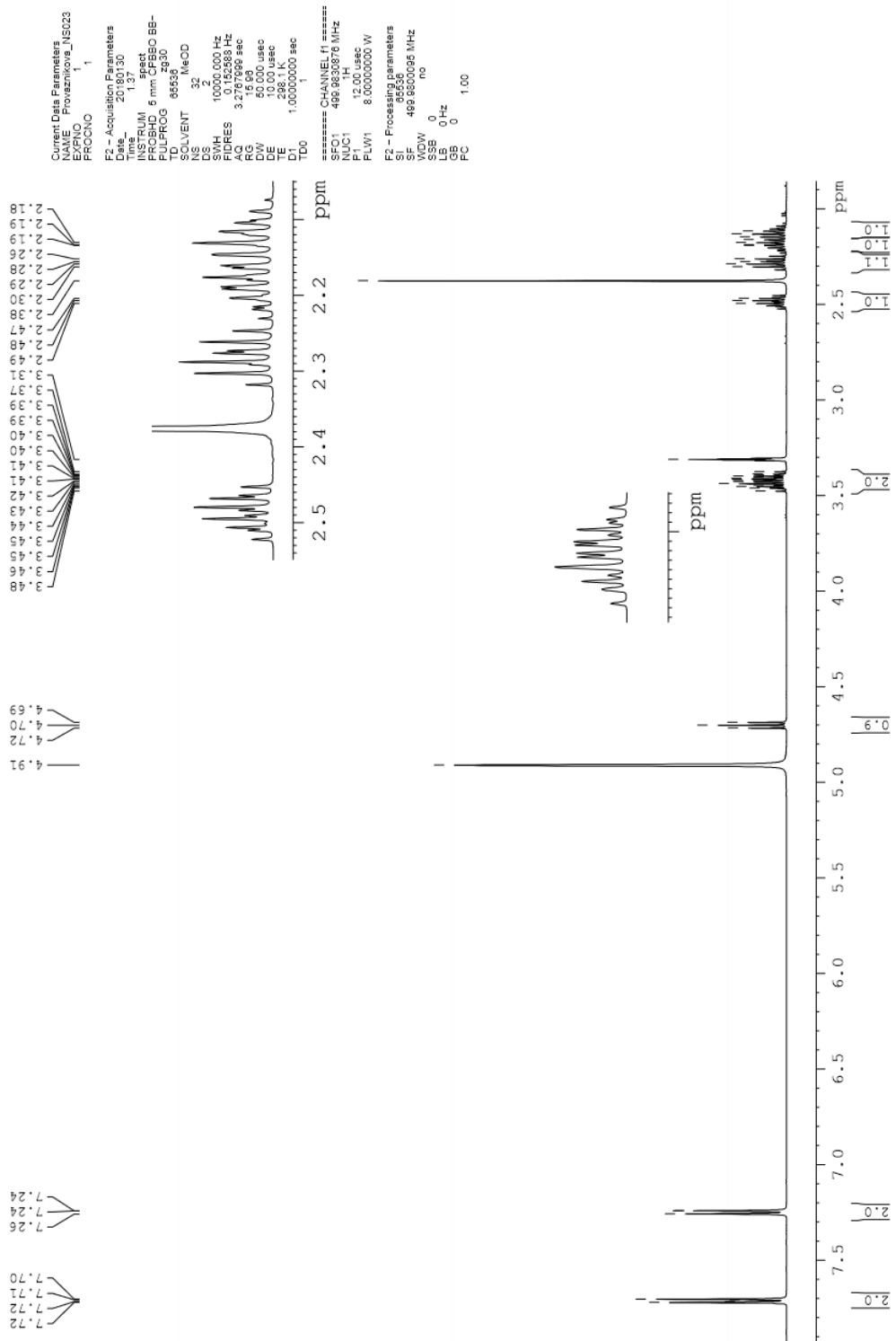
8 PŘÍLOHA 1: NMR SPEKTRA SYNTETIZOVANÝCH LÁTEK



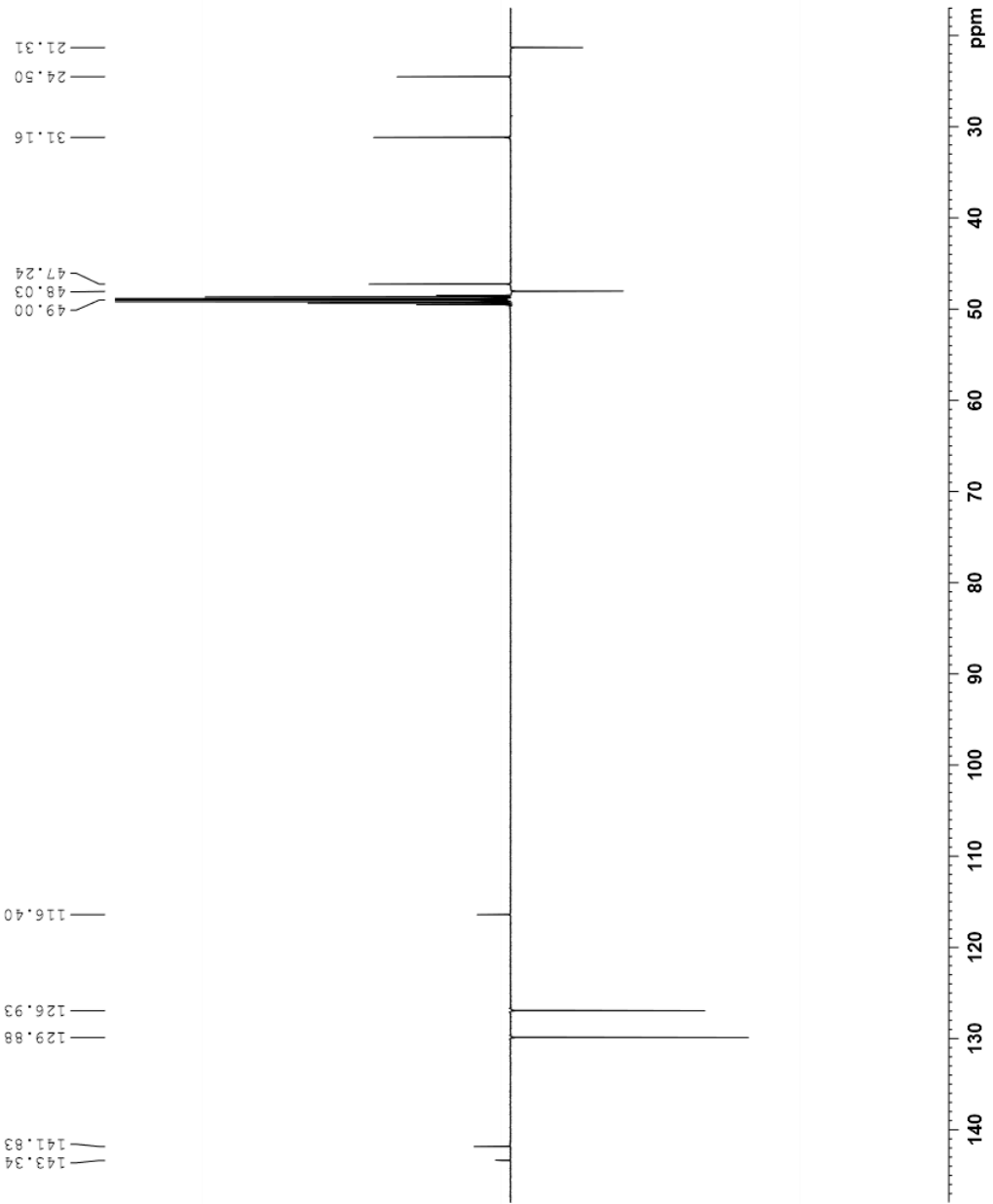
Spektrum 1 - *N*-Boc-ProCN ¹H



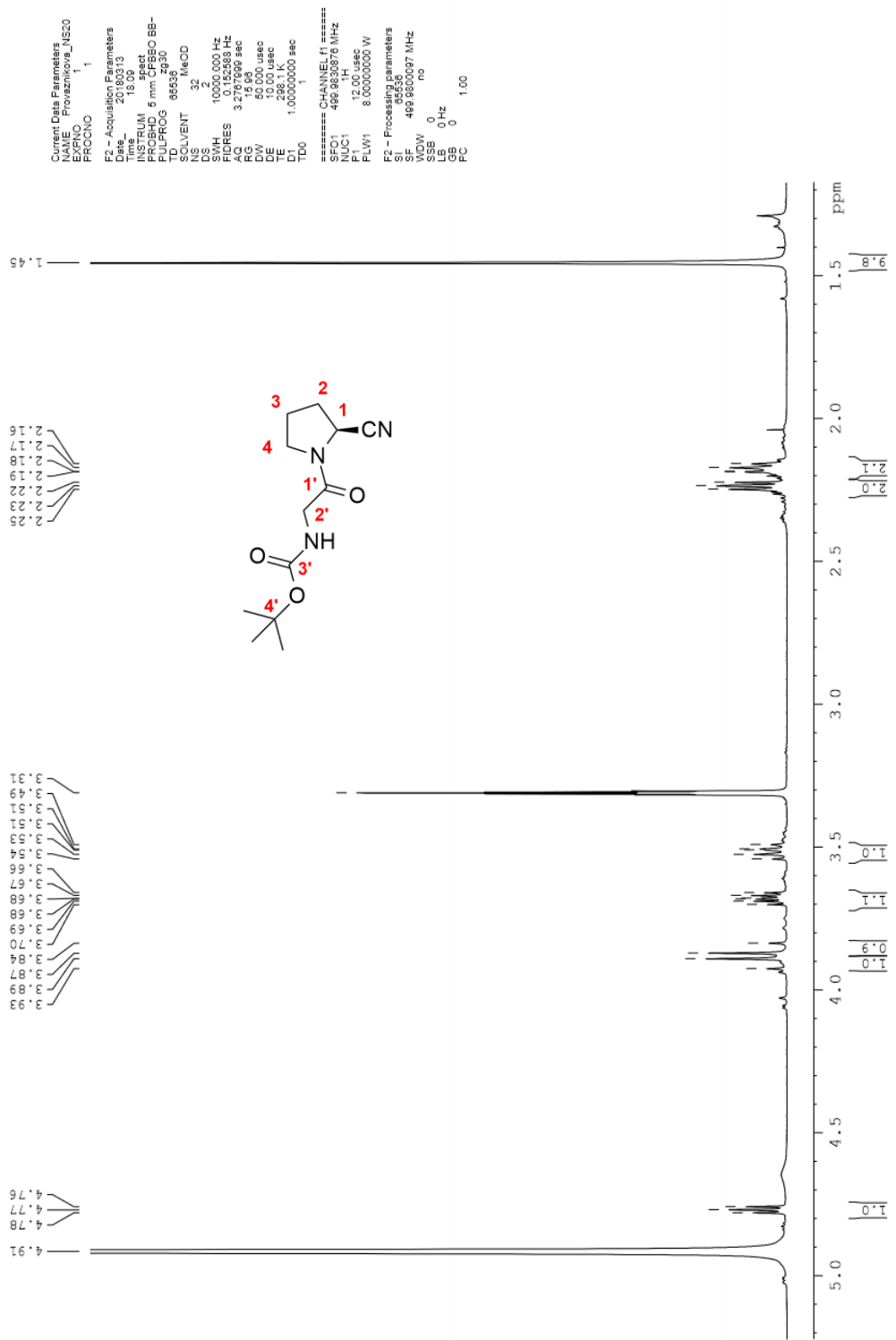
Spektrum 2 - N-Boc-ProCN APT



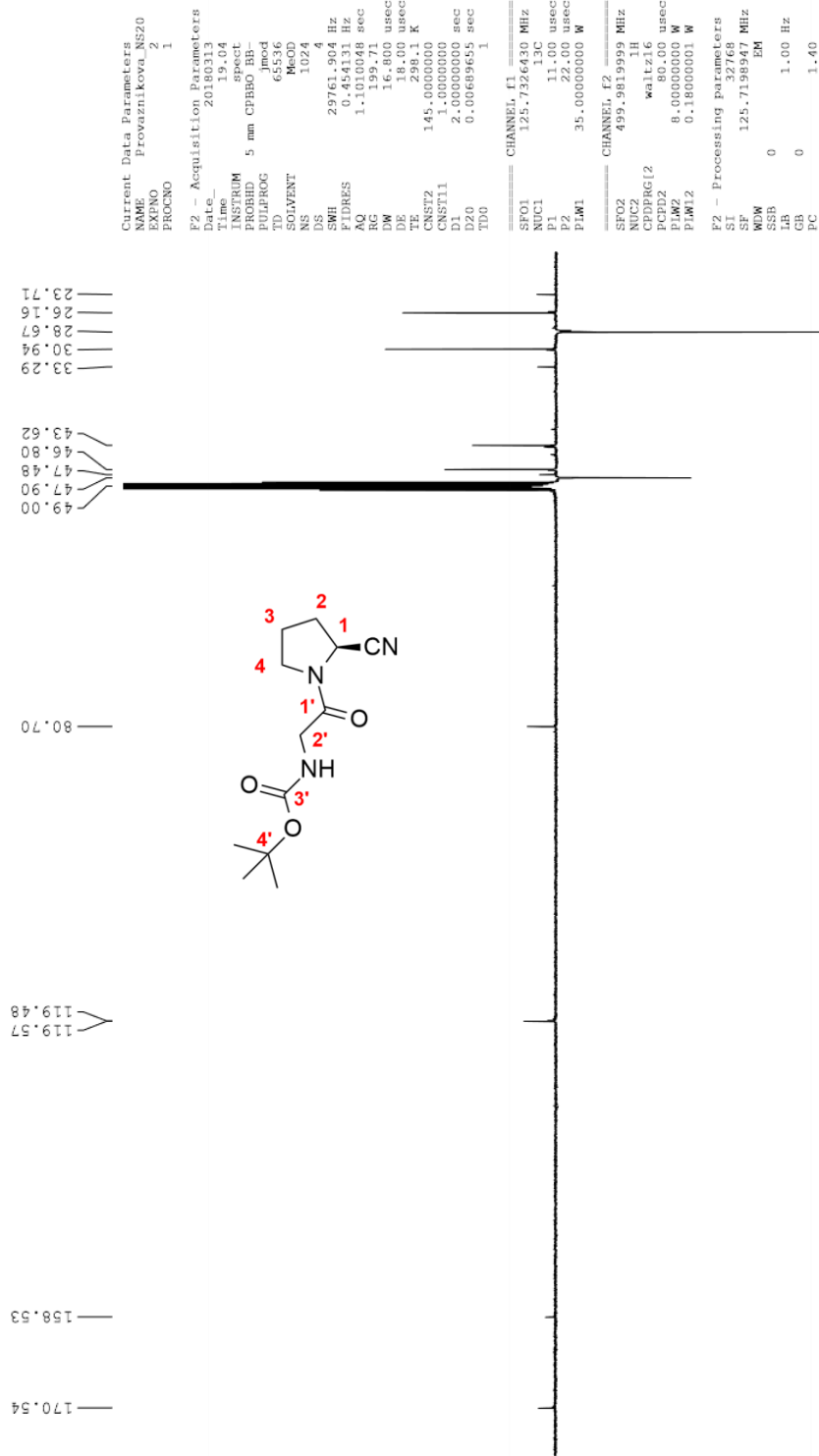
Spektrum 3 - ProCN ¹H



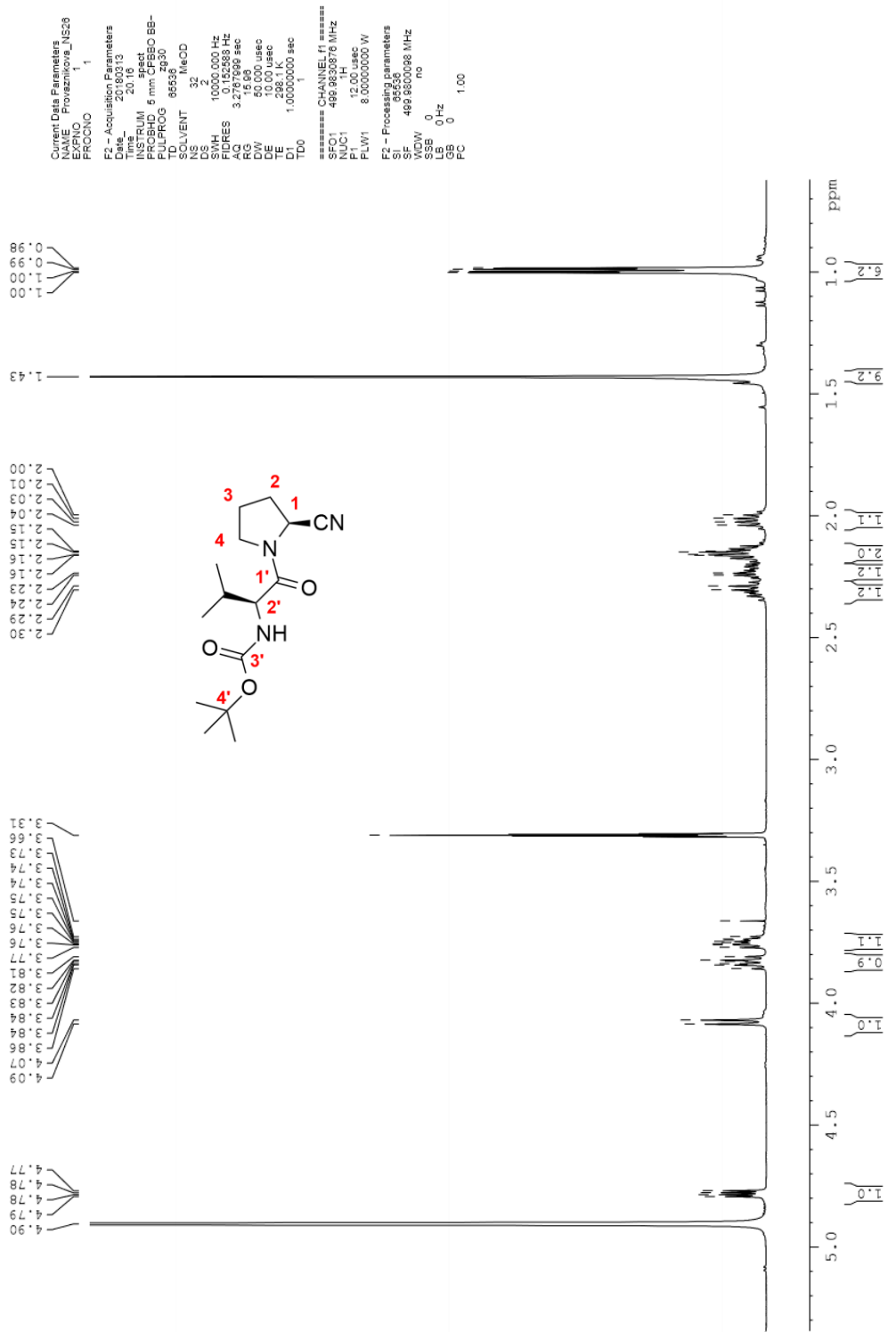
Spektrum 4 - ProCN APT



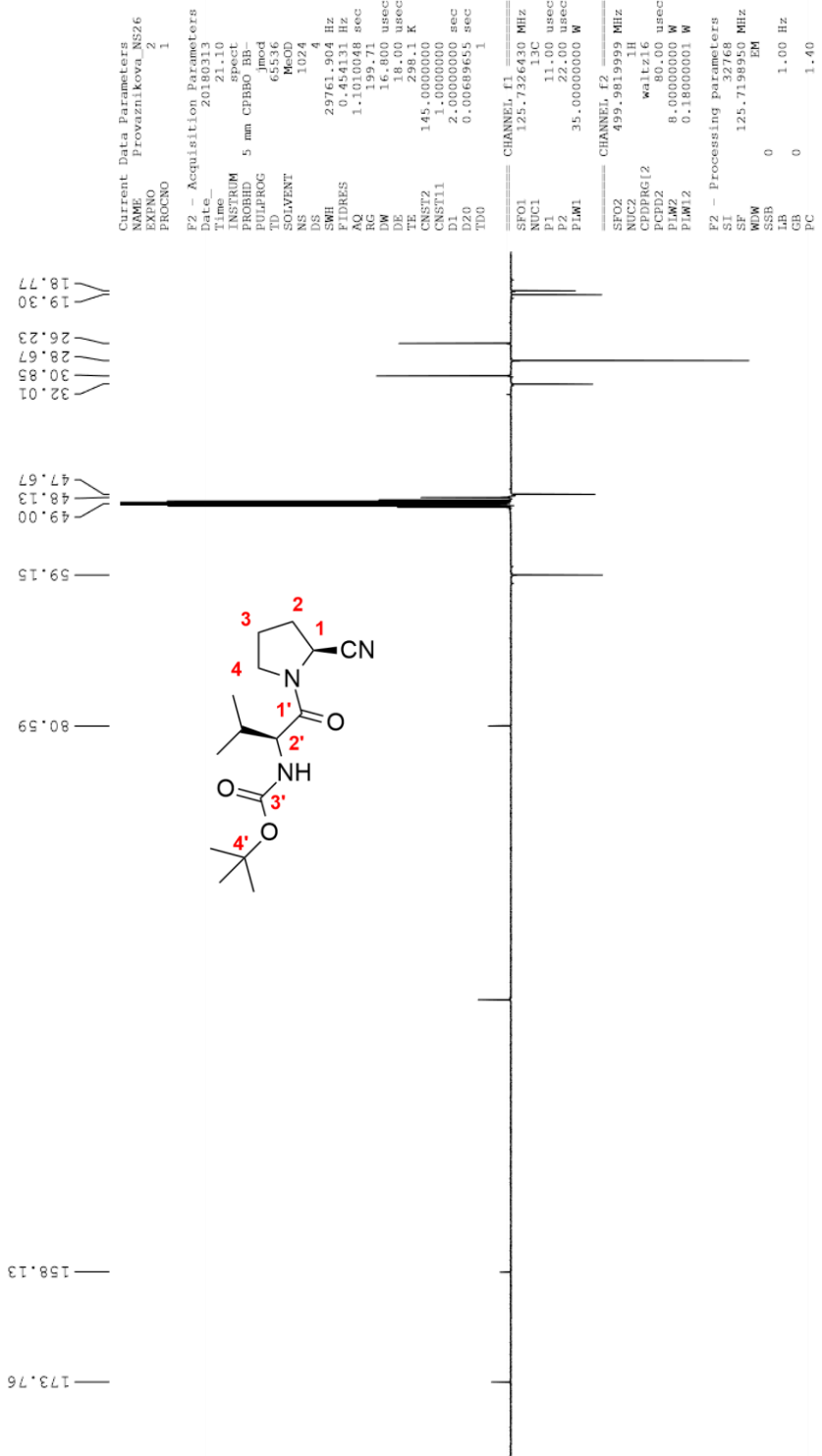
Spektrum 5 - N-Boc-Gly-ProCN ¹H



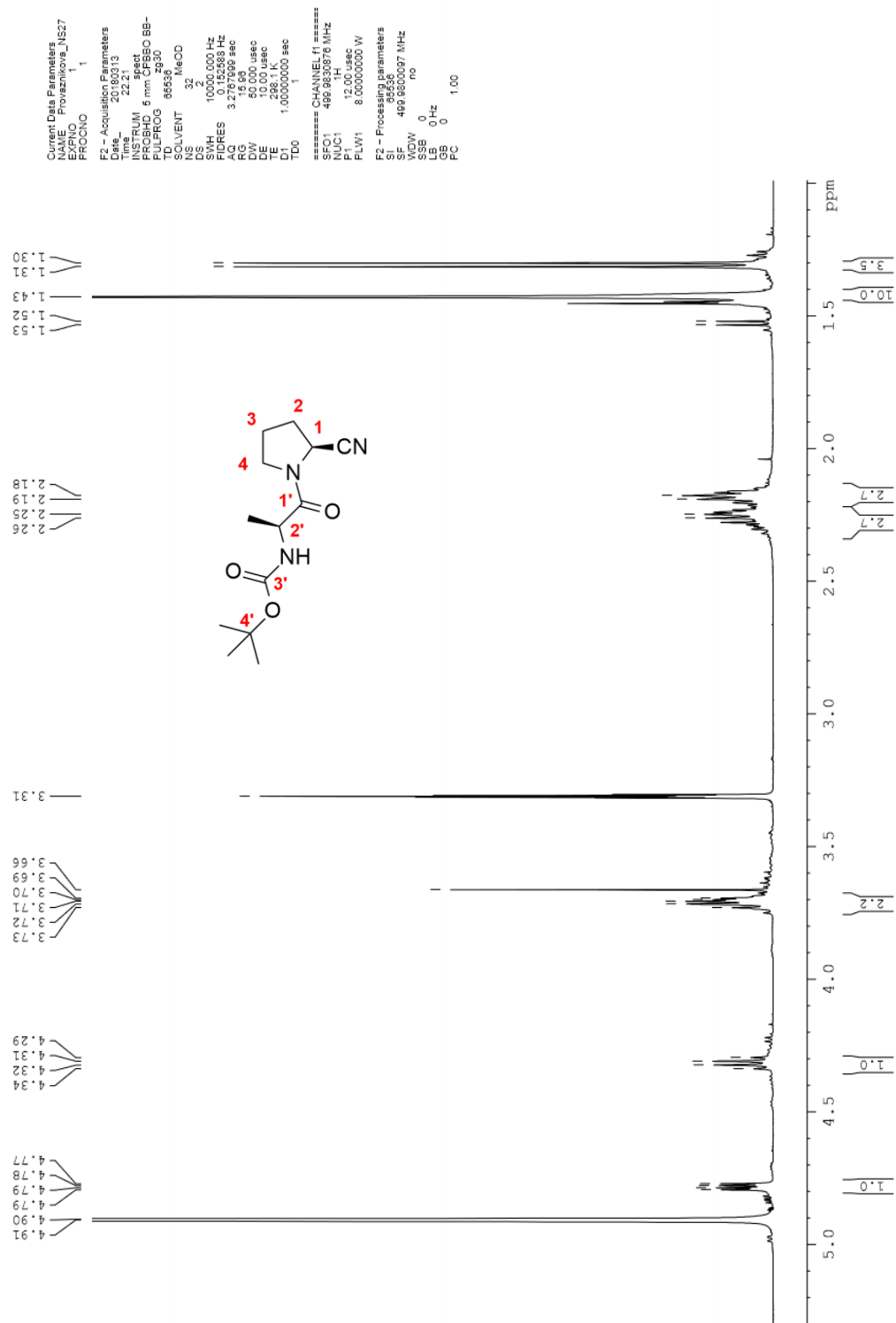
Spektrum 6 - N-Boc-Gly-ProCN APT



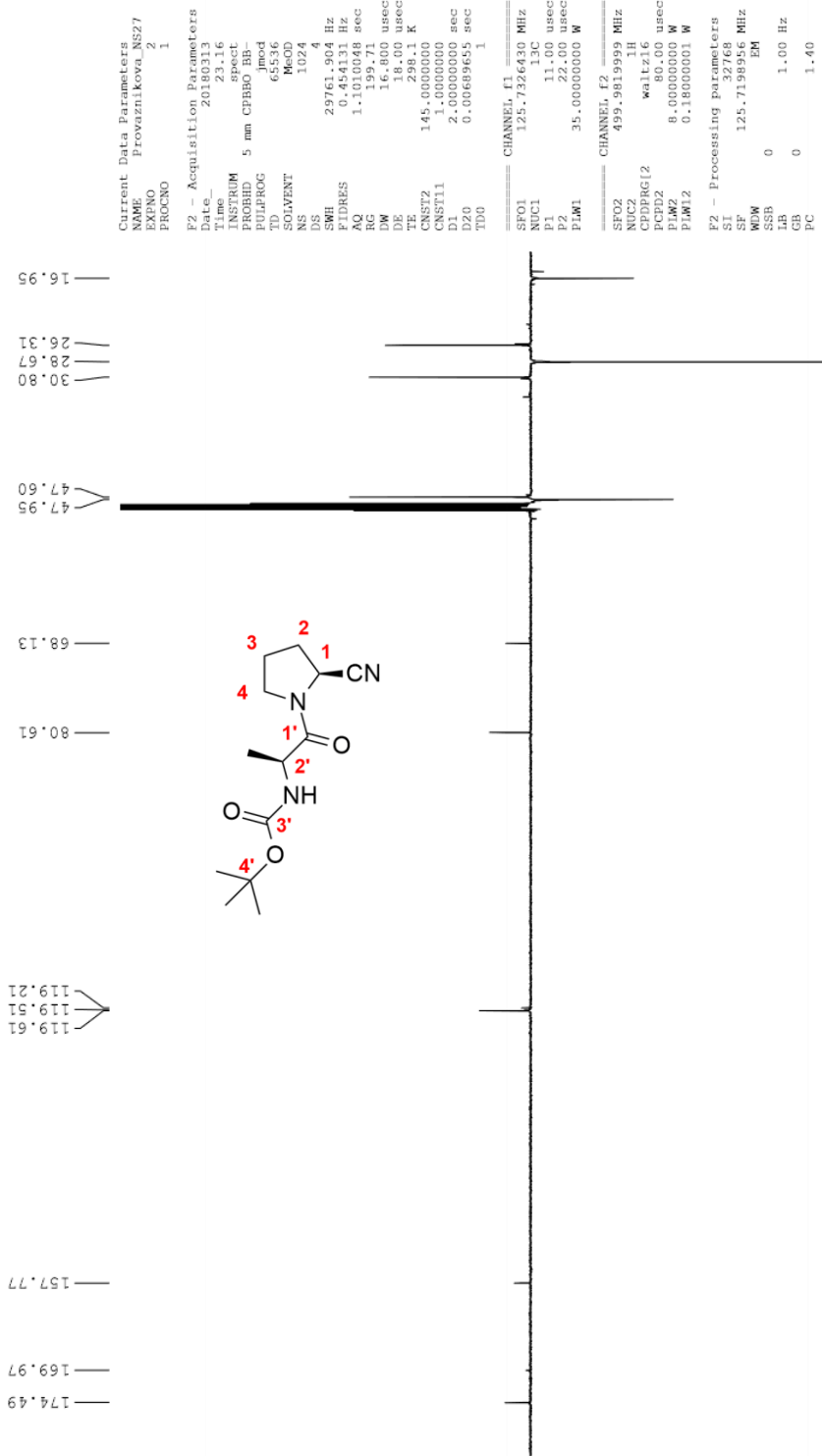
Spektrum 7 – N-Boc-L-Val-ProCN ¹H



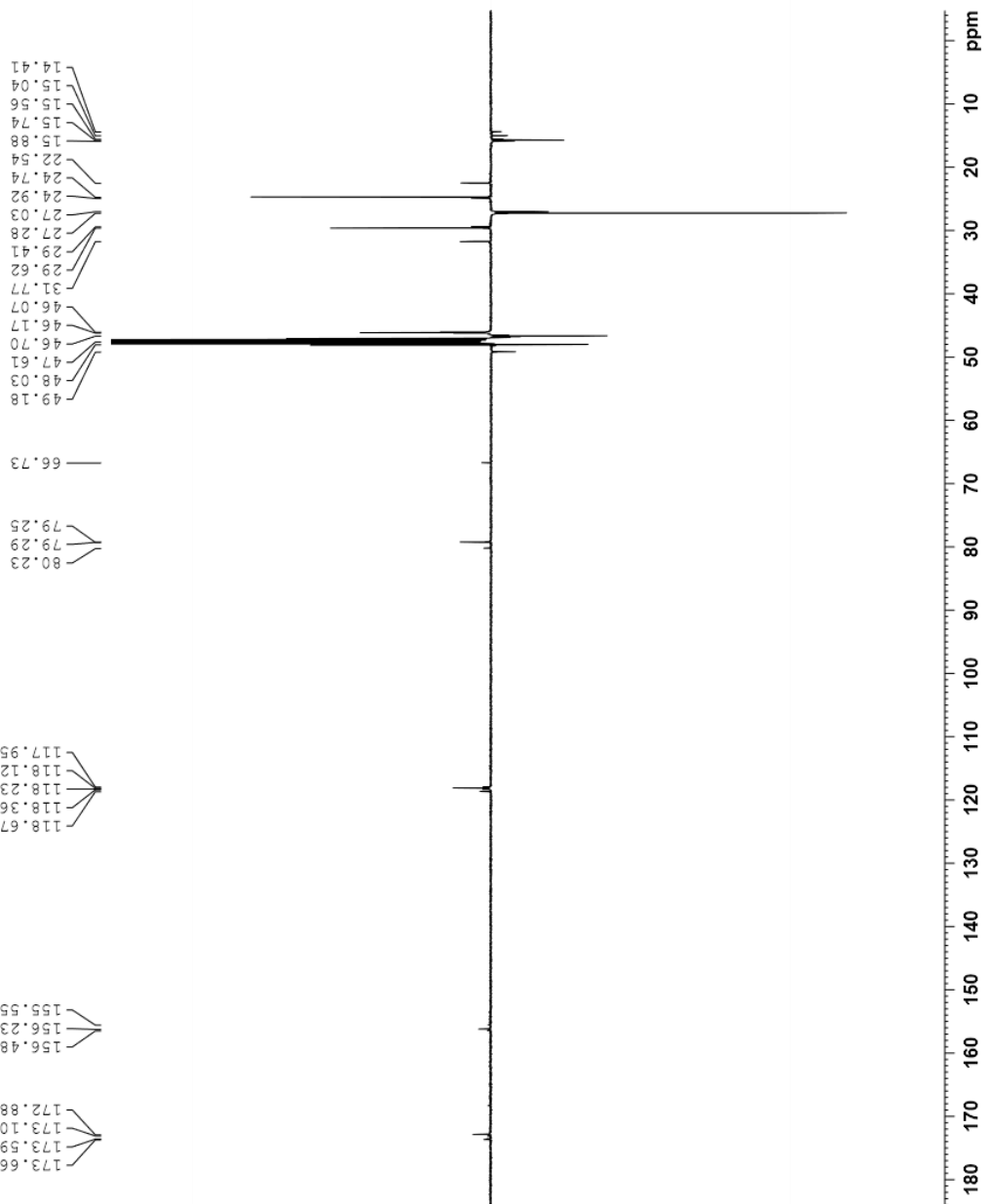
Spektrum 8 - N-Boc-L-Val-ProCN APT



Spektrum 9 - N-Boc-L-Ala-ProCN ¹H



Spektrum 10 - N-Boc-L-Ala-ProCN APT



Current Data Parameters
 NAME Provozniikova_NS28
 EXPNO 2
 PROCNO 1

F2 - Acquisition Parameters
 Date_ 20180314
 Time 1.22
 INSTRUM spect
 PROBH0 5 mm CPBBO BB-
 PULPROG jmod
 TD 65536
 SOLVENT MeOD
 NS 1024
 DS 4
 SWH 29761.904 Hz
 FIDRES 0.454131 Hz
 AQ 1.1010048 sec
 RG 199.71
 DW 16.800 usec
 DE 18.00 usec
 TE 298.15 K
 CNST2 145.000000
 CNST11 1.00000000
 D1 2.00000000 sec
 D20 0.00689655 sec
 TD0 1

CHANNEL F1
 SFO1 125.7326430 MHz
 NUQ1 1
 P1 11.00 usec
 F2 22.00 usec
 PLW1 35.000000000 W

CHANNEL F2
 SFO2 499.9819999 MHz
 NUQ2 1H
 P1 11.00 usec
 F2 22.00 usec
 PLW2 35.000000000 W

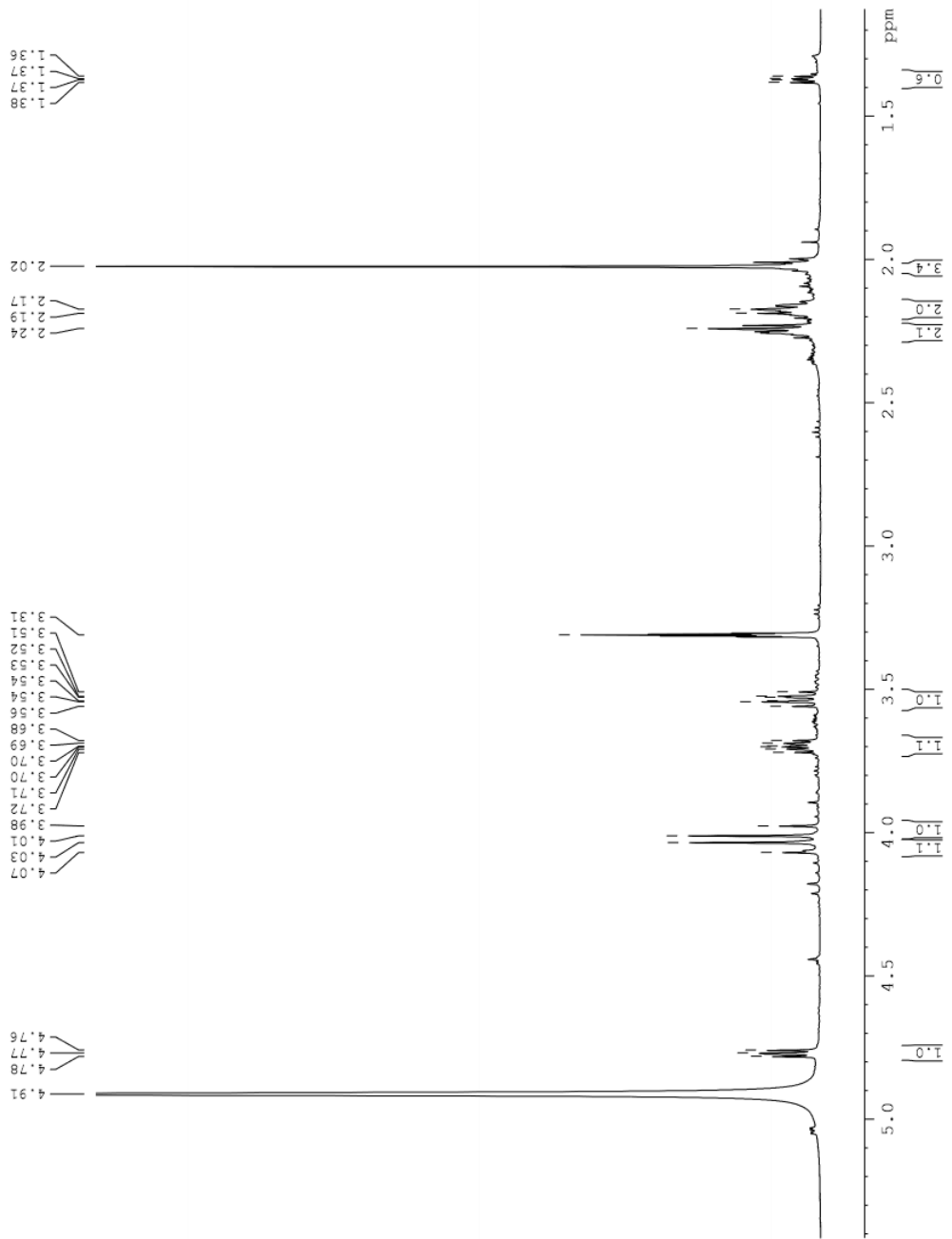
F2 - Processing parameters
 SI 32768
 SF 125.7200710 MHz
 WDW EM
 SSB 0
 GB 0
 PC 1.40

Spektrum 12 - N-Boc-D-Ala-ProCN APT

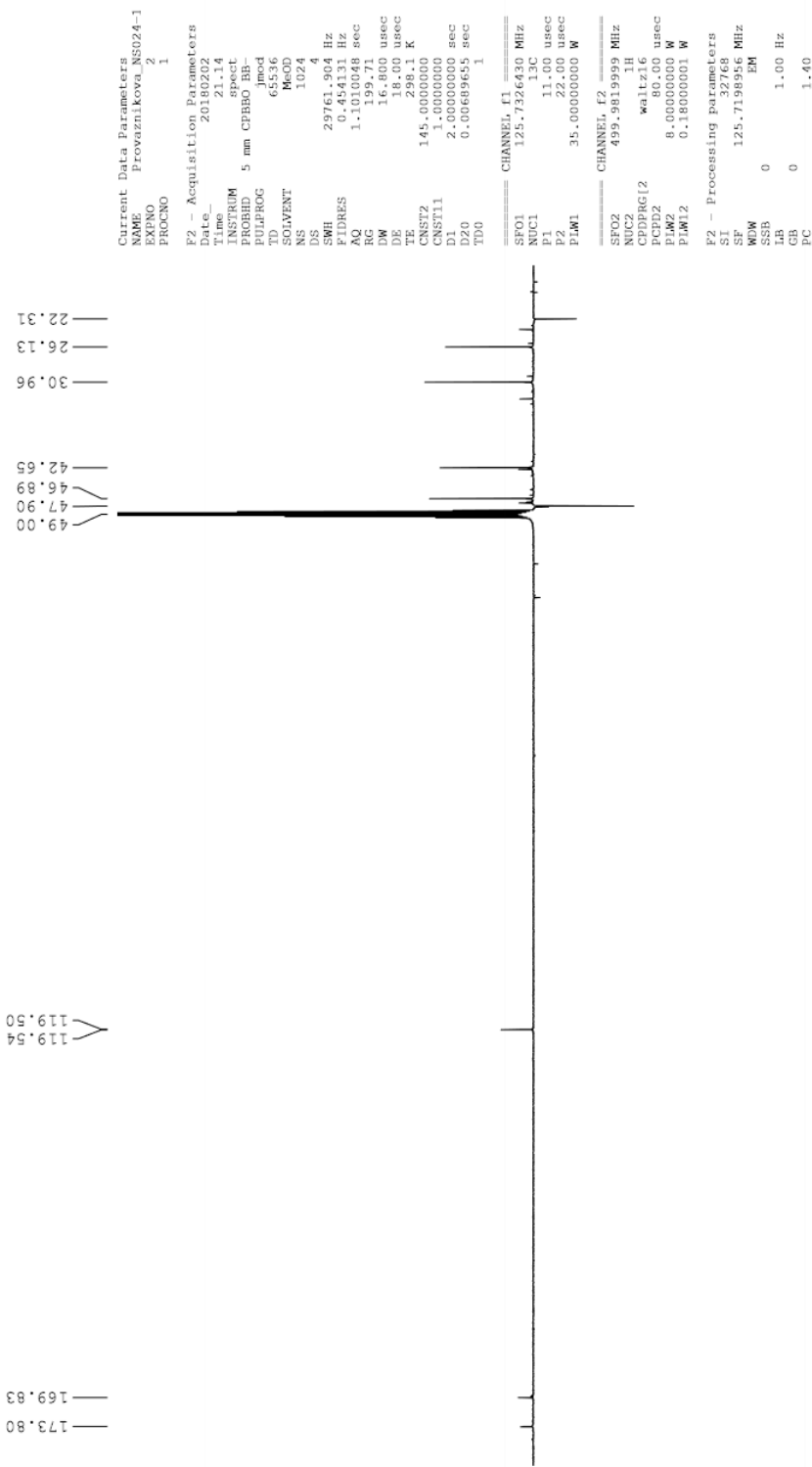

```

Current Data Parameters
=====
EXPNO      1
PROCNO     1
=====
F2 - Acquisition Parameters
=====
Date_      20080205
Time      11:14
INSTRUM    spect
PROBHD     6 mm CPBBO BB-
PULPROG    zgpg30
TD          65536
SOLVENT     MeOD
NS          32
DS          4
SVAH        10000.000 Hz
FIDRES      0.152583 Hz
AQ          3.2767996 sec
RG          327.680
DVI         50.000 usec
DE          10.00 usec
TE          298.2 K
TD0         1.0000000 sec
=====
===== CHANNEL f1 =====
NUC1        1H
P1          12.00 usec
PL1         0.00000000 W
FLW1        8.00000000 W
=====
F2 - Processing parameters
=====
SI          65536
SF          499.9500004 MHz
SSB         0
LB          0 Hz
GB          0
PC          1.00

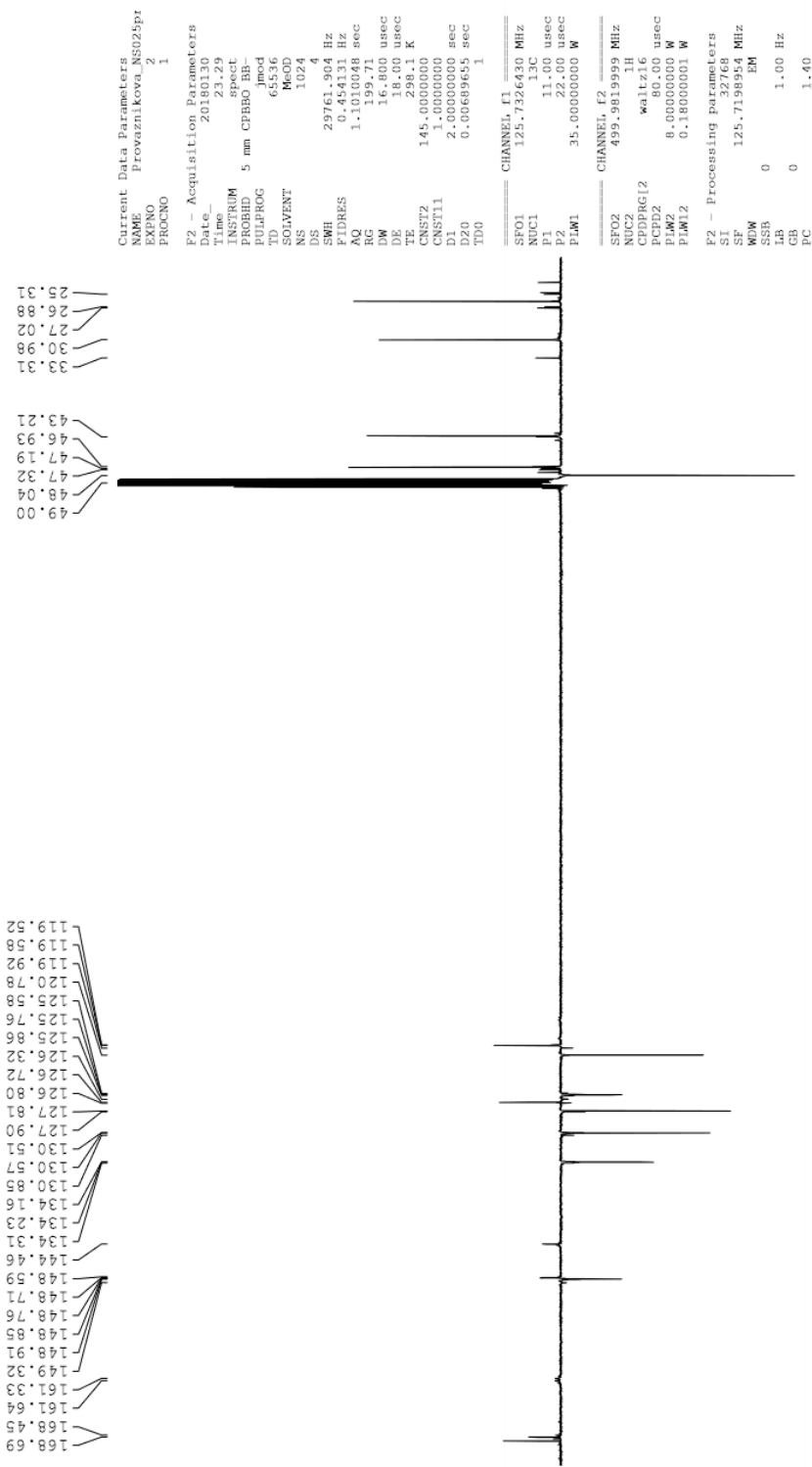
```



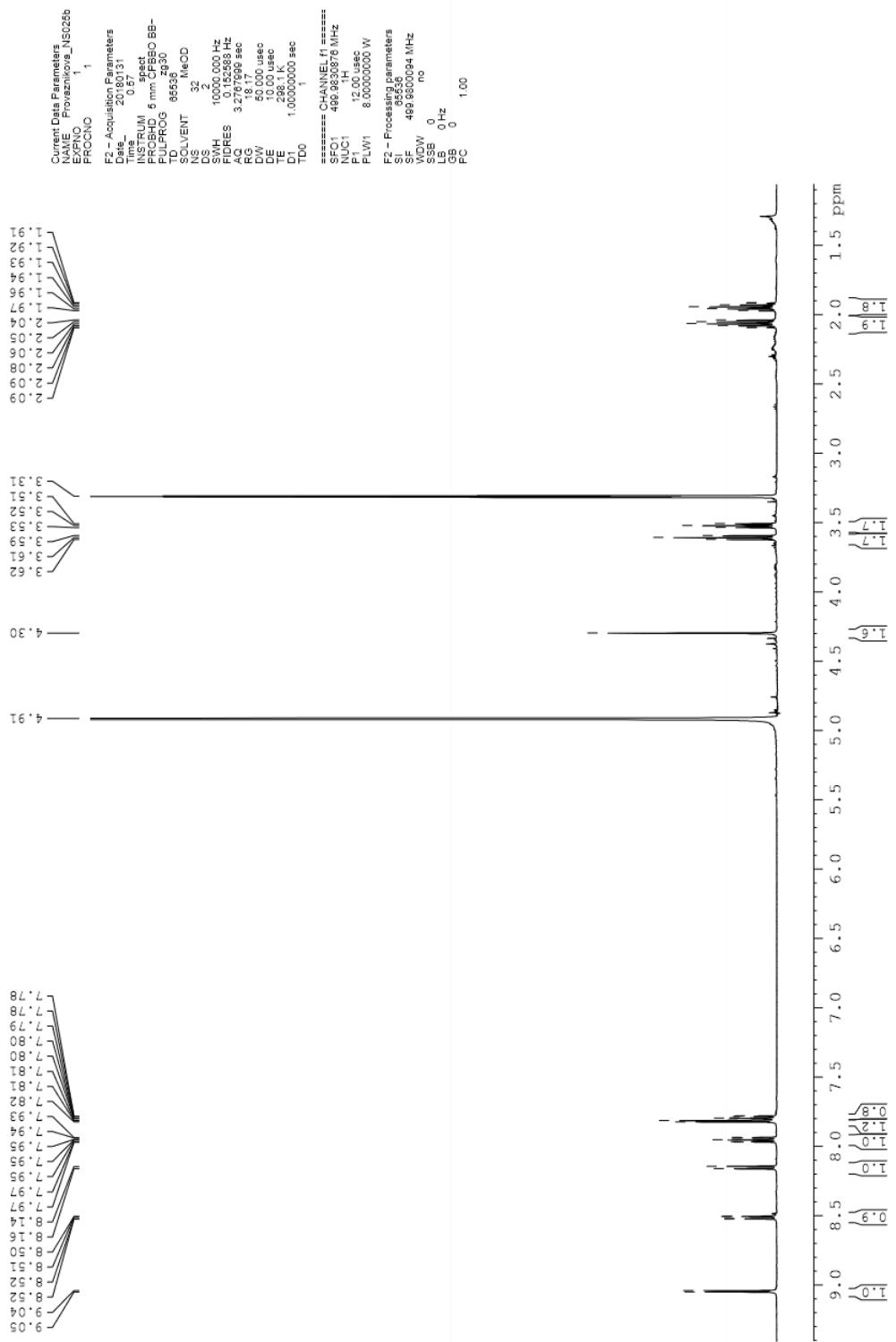
Spektrum 13 – N-Ac-Gly-ProCN ¹H



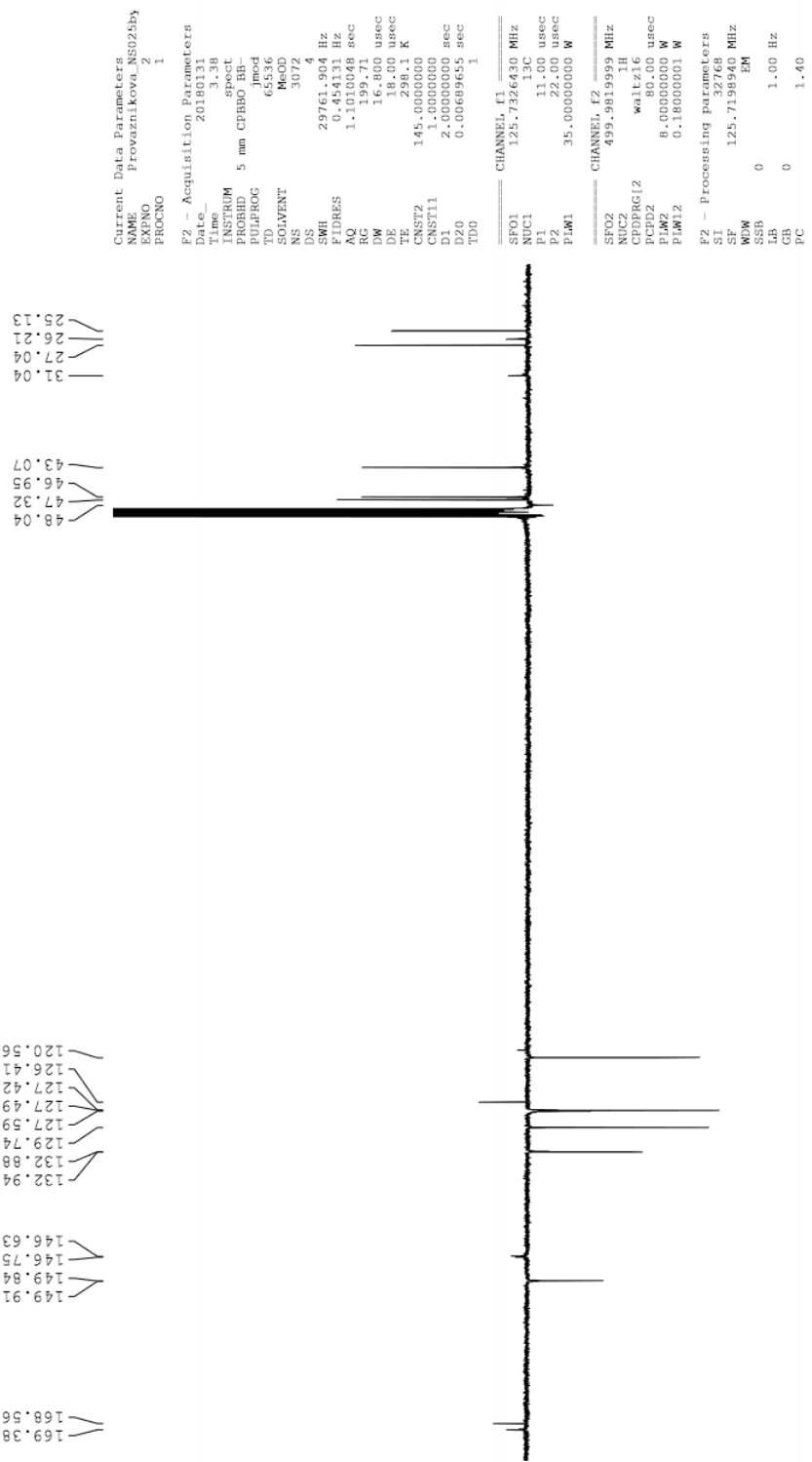
Spektrum 14 – N-Ac-Gly-ProCN APT



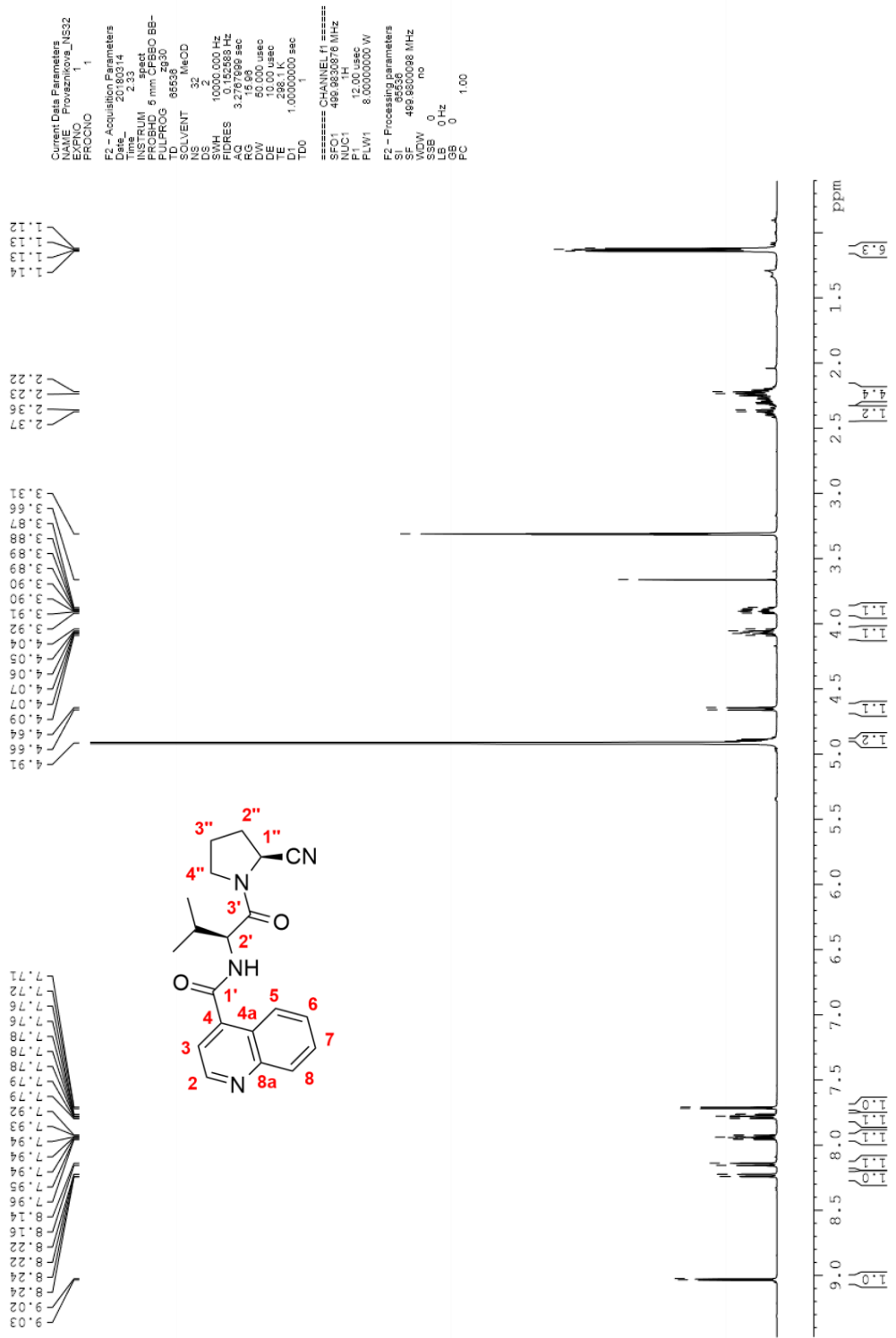
Spektrum 16 – N-Chin-Gly-ProCN APT



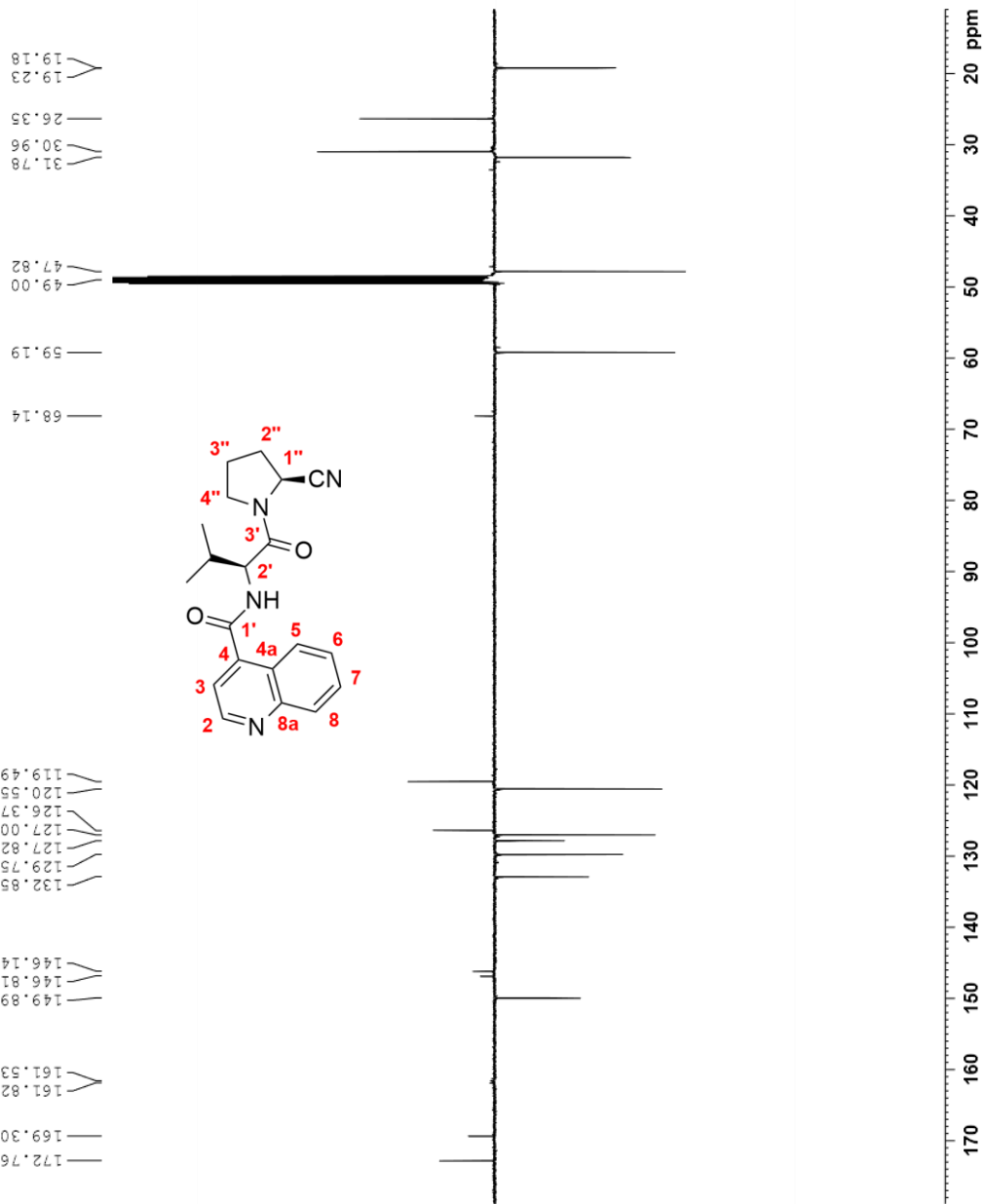
Spektrum 17 – N-Chin-Gly-Pyrr ¹H



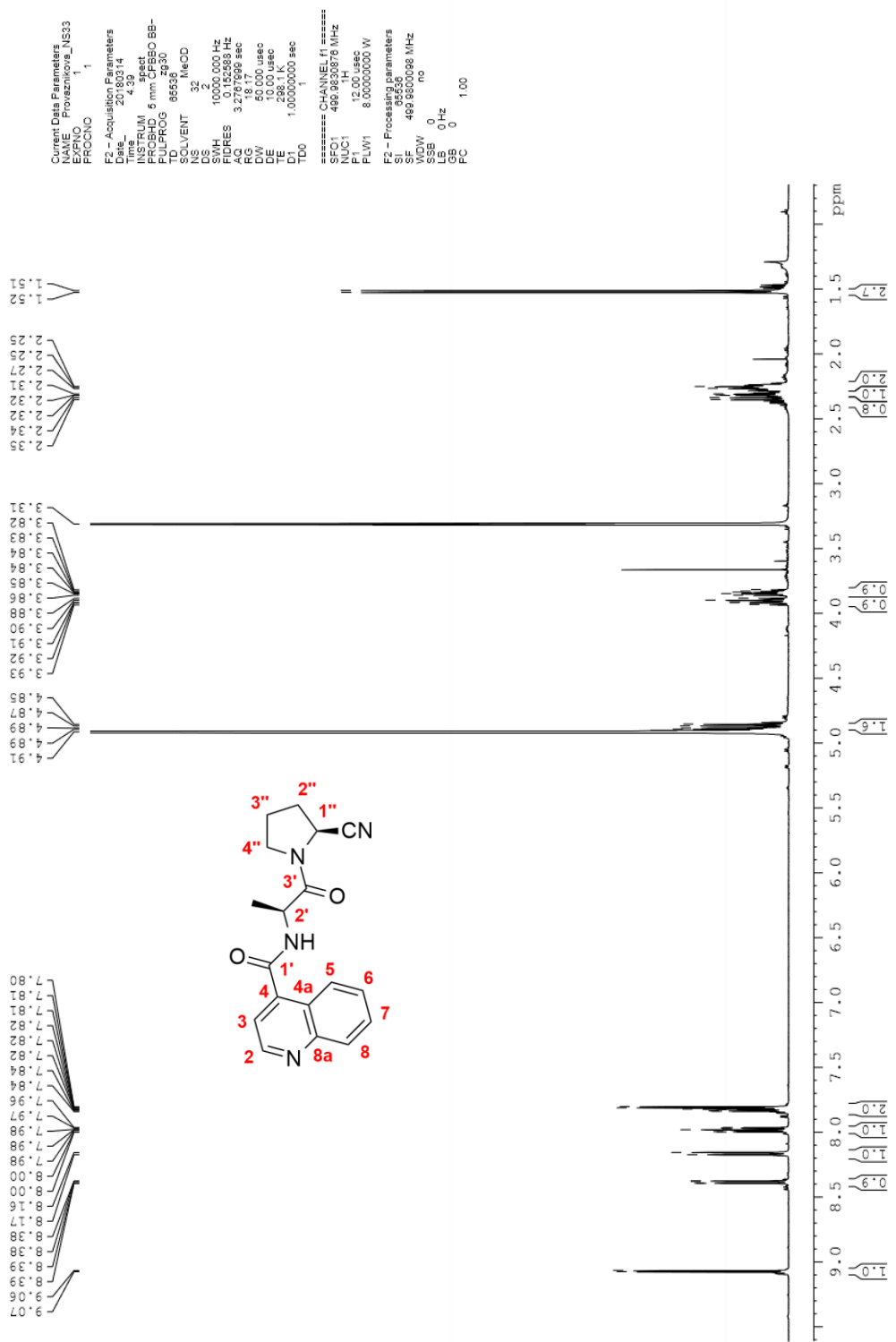
Spektrum 18 – N-Chin-Gly-Pyrr APT



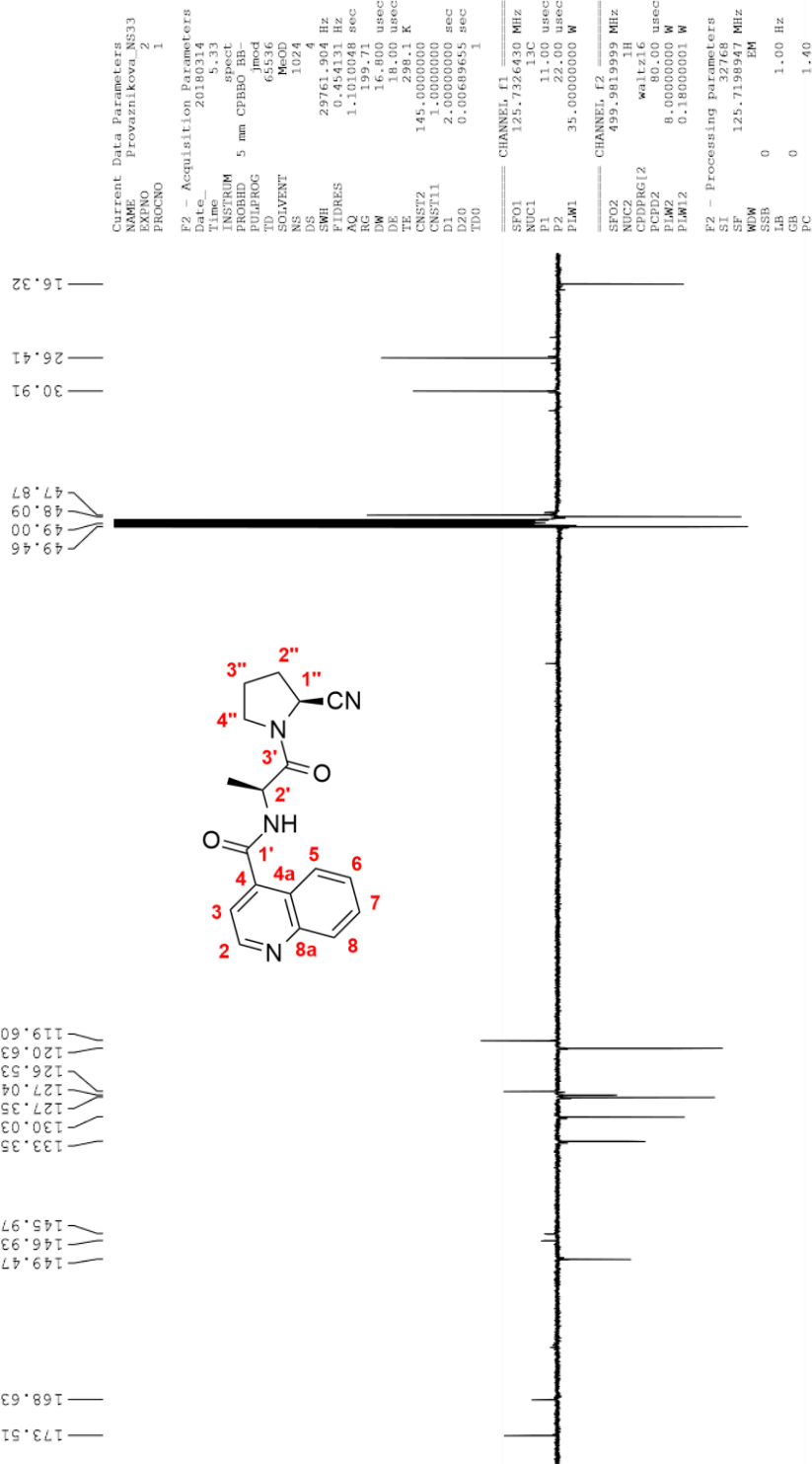
Spektrum 19 - N-Chin-L-Val-ProCN ¹H



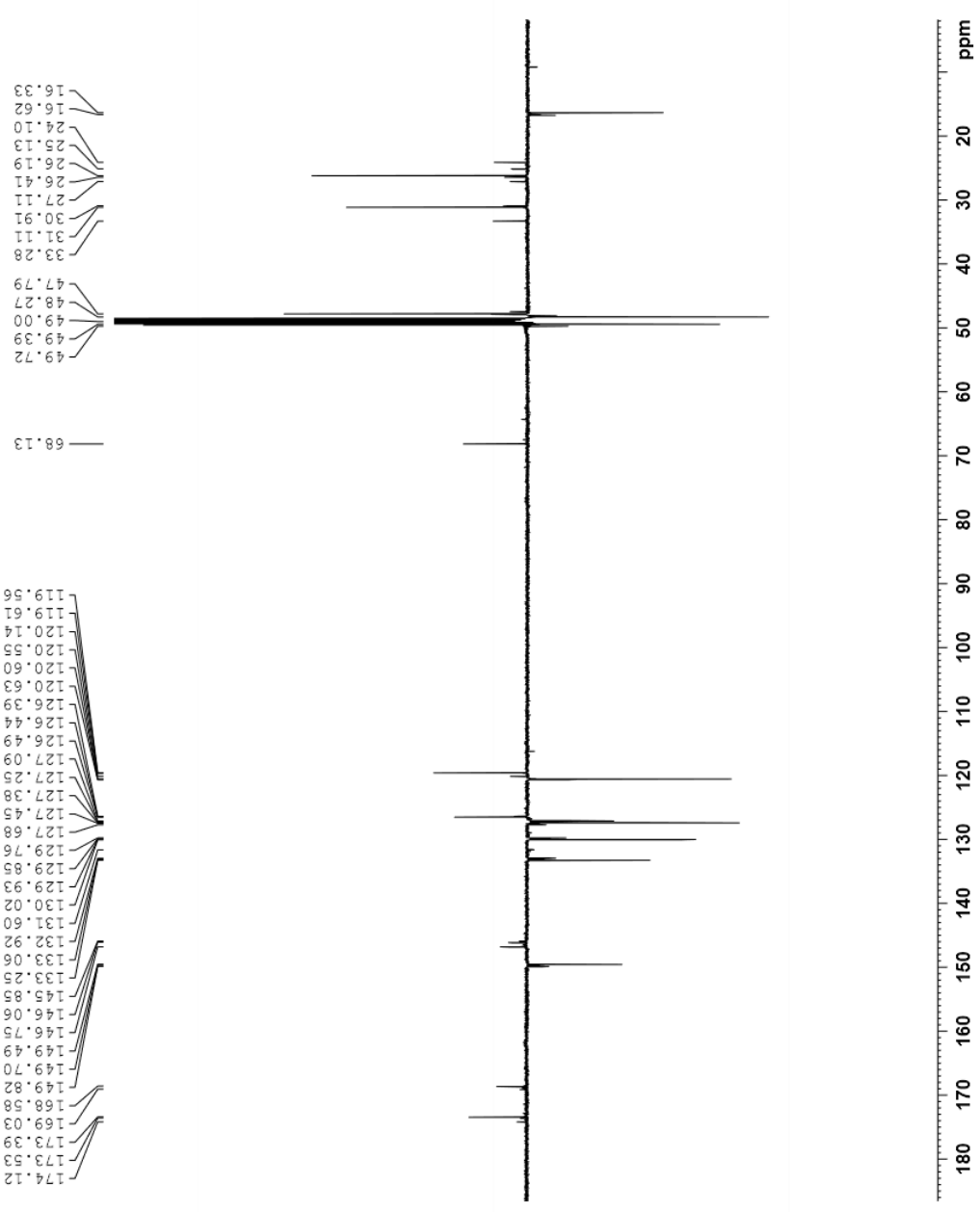
Spektrum 20 - N-Chin-L-Val-ProCN APT



Spektrum 21 - N-Chin-L-Ala-ProCN ¹H



Spektrum 22 - N-Chin-L-Ala-ProCN APT



Current Data Parameters
 NAME Provaznikova_NE34
 EXPNO 2
 PROCNO 1

F2 - Acquisition Parameters
 Date_ 20180314
 Time 7.39
 INSTRUM spect
 PROBED 5 mm CPBBO BB-
 PULPROG jmod
 TD 65536
 SOLVENT MeOD
 NS 1024
 DS 4
 SWH 29761.904 Hz
 FIDRES 0.454131 Hz
 AQ 1.1010048 sec
 RG 199.71
 DW 16.800 usec
 DE 18.00 usec
 TE 298.15 K
 CEST2 145.000000 sec
 CEST1 1.00000000
 CNST11 2.000000000 sec
 D1 0.000000000 sec
 D20 0.00689655 sec
 TD0 1

CHANNEL F1
 SFO1 125.7326430 MHz
 NUQ1 11.00 usec
 P1 22.00 usec
 PLW1 35.000000000 W

CHANNEL F2
 SFO2 499.9819999 MHz
 NUC2 1H
 P2 11.00 usec
 PLW2 8.000000000 W
 PLW12 0.180000001 W

F2 - Processing parameters
 SI 32768
 SF 125.7198953 MHz
 EM
 WDW 0
 SSB 0
 GB 0
 PC 1.40

Spektrum 24 - N-Chin-D-Ala-ProCN APT