

**Univerzita Karlova**  
**Přírodovědecká fakulta**

Studijní program: Chemie

Studijní obor: Chemie



**Tereza Gistrová**

**Příprava, syntéza a aktivita nových inhibitorů cysteinových proteáz  
z *Porphyromonas gingivalis***

**Preparation, synthesis and activity of new inhibitors of cysteine proteases  
from *Porphyromonas gingivalis***

Bakalářská práce

Vedoucí bakalářské práce: prof. RNDr. Jan Konvalinka, CSc.

Konzultant: Mgr. Martin Hadzima

Praha, 2021

**Prohlášení:**

Prohlašuji, že jsem závěrečnou práci zpracovala samostatně a že jsem uvedla všechny použité informační zdroje a literaturu. Tato práce ani její podstatná část nebyla předložena k získání jiného nebo stejného akademického titulu.

V Praze, dne

Podpis

## **Poděkování**

Chtěla bych poděkovat svému školiteli, panu prof. RNDr. Janu Konvalinkovi, CSc., za vedení mé práce, podnětná doporučení a dlouhodobou podporu. Dále bych ráda poděkovala svému konzultantovi Mgr. Martinu Hadzimovi, za obrovskou trpělivost, přínosné konzultace a cenné rady nejen při vypracovávání této práce. Rovněž bych chtěla poděkovat RNDr. Pavlu Majerovi, CSc., za kvalitní laboratorní zázemí a příjemné prostředí pro vypracování mé bakalářské práce. Také bych ráda poděkovala pracovníkům servisních laboratoří ÚOChB AV ČR, za měření MS spekter. Další poděkování patří Mgr. Kateřině Radilové za přínosné konzultace ke krystalovým strukturám a vytvoření názorných ilustrací a Mgr. Adéle Marcalíkové za biochemické otestování aktivit mých inhibitorů. Následně bych chtěla poděkovat kolegům z laboratoře za každodenní pomoc a přátelskou atmosféru na pracovišti. Na závěr bych ráda poděkovala svým blízkým za jejich podporu po dobu studia.

## Abstrakt

Tato bakalářská práce se zabývá modifikací známého inhibitoru KYT-36 proteázy gingipain (Kgp) bakterie *Porphyromonas gingivalis*.<sup>1</sup> Navrhovaná modifikace oligoethylenglykolovou spojkou na vybraném místě umožní využití derivátu při přípravě iBodies.<sup>2</sup> Jedná se o funkční makromolekuly na bázi polymerního nosiče, které mohou nahrazovat protilátky v biochemických experimentech pro studium enzymů.

Ústředním tématem práce je naplánování efektivní syntetické strategie a její provedení. Součástí práce je analýza krystalové struktury enzymu Kgp s inhibitorem KYT-36 (PDB ID: 6I9A),<sup>3</sup> jež umožnila výběr vhodného místa napojení spojky. Vybraný fragment byl doplněn o adekvátní funkční skupinu, díky čemuž mohl být inhibitor opatřen spojkou. Návrh spojky zohledňuje požadavky pro použití v rámci iBodies. Mezi tyto vlastnosti patří například vhodné zakončení spojky zajišťující připojení k polymernímu nosiči. Na základě retrosyntetické analýzy byla navržena strategie syntézy skeletu inhibitoru založená na Passeriniho reakci.

Klíčová slova: *Porphyromonas gingivalis*, *gingipain*, *inhibitor*, *KYT-36*, *iBodies*, *Passerini*

## Abstract

This bachelor thesis deals with modification of known inhibitor KYT-36 specific for the *Porphyromonas gingivalis* protease called gingipain (Kgp).<sup>1</sup> Proposed modification with an oligoethylenglycole linker in suitable position will enable the use of the derivative in the iBodies concept.<sup>2</sup> These polyfunctional macromolecules based on a polymer backbone are capable of replacing antibodies in biochemical experiments in the study of enzymes.

The main aim of the thesis is to propose and perform an effective synthetic strategy. This thesis includes an analysis of a crystal structure of enzyme Kgp with the inhibitor KYT-36 (PDB ID: 6I9A).<sup>3</sup> The analysis enabled a choice of an appropriate modification site. A suitable functional group was added to the selected fragment allowing attachment of the linker. The linker's design was based on requirements for the intended use within the iBodies concept. One of them being a suitable functional group at the end of the chain ensuring an effortless conjugation with polymer backbone. Based on a retrosynthetic analysis, a synthetic strategy of the inhibitor core was proposed. This strategy builds upon the Passerini reaction.

Key words: *Porphyromonas gingivalis*, *gingipain*, *inhibitor*, *KYT-36*, *iBodies*, *Passerini*

## Použité zkratky

Boc	<i>t</i> -Butyloxykarbonyl
bs	Široký singlet
d	Dublet
dd	Dublet dubletu
DCM	Dichlormethan
DIBAH	Diisobutylaluminium hydrid
DIPEA	<i>N,N</i> -Diisopropylethylamin
DMF	Dimethylformamid
DMP	Dess-Martinovo činidlo na bázi hypervalentního jodu (Dess-Martin Periodinane)
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Deoxyribonukleová kyselina (Deoxyribonucleic acid)
ELISA	Imunologická metoda využívaná ke kvantitativnímu stanovení antigenů (Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay)
ESI MS	Hmotnostní spektrometrie s ionizací ESI
EtOAc	Ethyl-acetát
FAP	Protein aktivující fibroblast (Fibroblast Activation Protein)
FCC	Flash chromatografie (Flash Column Chromatography)
Fmoc	Fluorenylmethyloxykarbonyl
GABA	$\gamma$ -Aminomáselná kyselina ( <i>gamma</i> -Aminobutyric acid)
GCP-II	Glutamátcarboxypeptidáza II
HATU	(1-[Bis(dimethylamino)methylen]-1 <i>H</i> -1,2,3-triazolo[4,5- <i>b</i> ]pyridinium 3-oxid hexafluorofosfát
HBTU	(2-(1 <i>H</i> -Benzotriazol-1-yl)-1,1,3,3-tetramethyluronium hexafluorofosfát
HIV	Virus lidské imunitní nedostatečnosti (Human Immunodeficiency virus)
HPMA	Kopolymer na bázi <i>N</i> -(2-hydroxypropyl)methakrylamidových jednotek
HPLC	Vysokoúčinná kapalinová chromatografie
HR ESI MS	Hmotnostní spektroskopie s vysokým rozlišením s ionizací ESI
<i>i</i> PrOH	Propan-2-ol
kgp	Gen kódující gingipain specifický pro lysin
Kgp	Gingipain specifický pro lysin
LCMS	Kapalinová chromatografie spojená s hmotnostní spektrometrií

m	Multiplet
MeCN	Acetonitril
MeOH	Methanol
NHS	<i>N</i> -Hydroxysukcinimidyl
NMR	Nukleární magnetická rezonance
NPD	N-koncová prodoména
p	Pentet
<i>P. gingivalis</i>	<i>Porphyromonas gingivalis</i>
PADAM	Passeriniho reakce následovaná odstraněním chránící skupiny aminu a intramolekulární migrací acylu (Passerini reaction – Amine Deprotection – Acyl Migration)
PEG	Polyethylenglykol
PyBOP	(Benzotriazol-1-yloxy)tripyrrolidinofosfonium hexafluorofosfát
q	Kvartet
Rgp	Gingipain specifický pro arginin
<i>rgpA</i>	Gen kódující gingipain s hemaglutininovou/adhesivní doménou specifický pro arginin
RgpA	Gingipain s hemaglutininovou/adhesivní doménou specifický pro arginin
<i>rgpB</i>	Gen kódující gingipain bez hemaglutininové/adhesivní domény specifický pro arginin
RgpB	Gingipain bez hemaglutininové/adhesivní domény specifický pro arginin
rt	Pokožová (laboratorní) teplota
s	Singlet
t	Triplet
td	Triplet dubletu
tdd	Triplet dubletu dubletu
TFA	Kyselina trifluoroctová
THF	Tertrahydrofuran
TLC	Chromatografie na tenké vrstvě (Thin Layer Chromatography)
TSTU	<i>N,N,N',N'</i> -Tetramethyl- <i>O</i> -( <i>N</i> -sukcinimidyl)uronium tetrafluoroborát
UPLC-MS	Vysokoúčinná kapalinová chromatografie spojená s hmotnostní spektrometrií
ÚMCH	Ústav makromolekulární chemie AV ČR
ÚOChB	Ústav organické chemie a biochemie AV ČR

## Obsah

1. Úvod.....	9
2. Cíle práce .....	10
3. Teoretická část .....	11
3.1 <i>Porphyromonas gingivalis</i> a její role v parodontóze.....	11
3.2 Proteázy <i>Porphyromonas gingivalis</i> (gingipainy).....	13
3.2.1 Známé inhibitory gingipainů.....	14
3.2.2 Inhibitory KYT.....	16
3.3 Koncept iBodies .....	18
4. Výsledky a diskuse.....	21
4.1 Strukturní popis interakce inhibitoru KYT-36 s enzymem Kgp .....	21
4.2 Návrh syntézy cílové molekuly.....	25
4.3 Příprava benzylaminového fragmentu opatřeného spojkou .....	28
4.4 Příprava skeletu inhibitoru .....	32
4.5 Syntéza cílové molekuly .....	34
4.6 Testování připravené sloučeniny.....	37
5. Experimentální část.....	39
5.1 Použité přístroje a chemikálie .....	39
5.2 Pracovní postupy .....	40
6. Závěr .....	52
7. Literatura .....	53



## 1. Úvod

Lidský mikrobiom dutiny ústní je nadmíru rozmanitý a komplexní systém, složený z mikroorganismů různého typu. Obvyklý komenzální stav (při kterém přítomné mikroby svému hostiteli nijak nevadí) se však může zvrátit v dysbiotický i drobnou změnou jeho složení, kdy převládá přítomnost vůči hostiteli nepříznivě působících mikrobu.<sup>4</sup> Těmi jsou především anaerobní bakterie, způsobující zubní kazy a záněty parodontu.<sup>5</sup> Zásadní role je v tomto ohledu přisuzována bakterii *Porphyromonas gingivalis*.<sup>6</sup> Hostitele je schopná si podmanit rozmanitostí virulentních faktorů, z nichž se jako hlavní jeví její cysteinové proteázy.

Ačkoli bylo dříve předpokládáno, že zhoubné působení *P. gingivalis* je lokalizováno v dutině ústní, byly objeveny důkazy její přítomnosti i mimo tuto oblast. Konkrétně se jedná o nálezy její DNA v mozku a mozkomíšni tekutině pacientů s Alzheimerovou chorobou.<sup>7,8</sup> Prof. Potempa z Jagellonské univerzity v Krakově představil hypotézu, že přítomnost *P. gingivalis* v mozkomíšni tekutině by mohla sloužit jako diagnostický marker rozvoje této nemoci.<sup>9</sup> Ke zobrazování by bylo možné použít například specifické inhibitory proteáz *P. gingivalis* procházející mozkovou bariérou.

Nezastupitelnou vizualizační i izolační roli v biochemickém výzkumu sehrávají specifické protilátky, na nichž je postavena řada esejí a analýz. Jejich nevýhodou je například nízká modularita a stabilita. V experimentech je lze nahradit syntetickými analogy na bázi polymerních nosičů. Jednou z možností je platforma iBodies ze skupiny prof. Konvalinky.<sup>2</sup> Tento typ mimetik protilátek lze použít v biochemických esejích nebo i ke zviditelnění cílové biomolekuly (díky přítomnosti fluoroforu) *in vitro* či *in vivo*. Hlavní myšlenkou této práce je propojení konceptu iBodies s výše zmíněným záměrem vizualizace *P. gingivalis*.

V teoretickém úvodu práce se čtenář seznámí s *Porphyromonas gingivalis*, bakterií, jež je z velké části zodpovědná za rozvoj parodontózy. Dále jsou přiblíženy cysteinové proteázy produkované touto bakterií, označované jako gingipainy, a souhrn známých inhibitorů těchto enzymů. Následně je uveden koncept syntetických protilátek iBodies a je přiblížen výběr místa modifikace zvoleného inhibitoru. V navazujících kapitolách jsou prezentovány a diskutovány dosažené výsledky tohoto projektu.

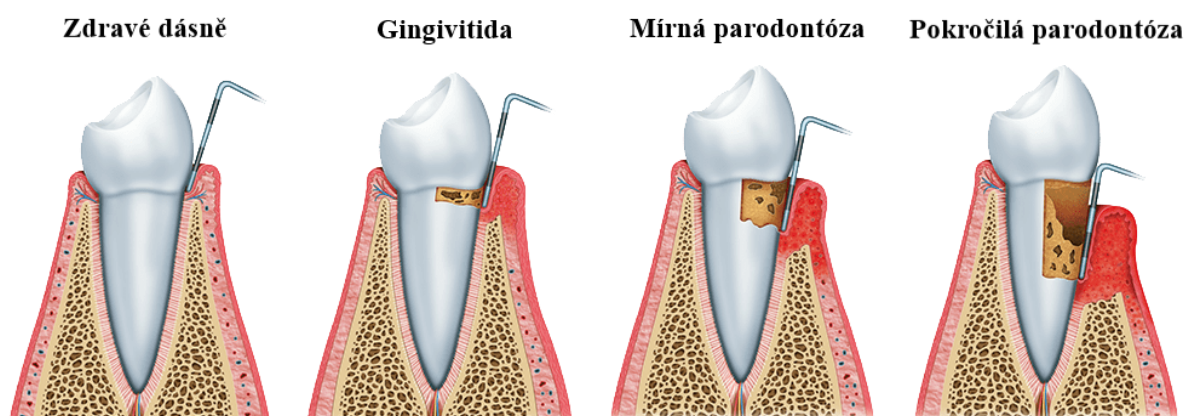
## 2. Cíle práce

- Analyzovat krystalovou strukturu enzymu Kgp s inhibitorem KYT-36 za účelem výběru vhodného místa pro zavedení spojky
- Navrhnout efektivní syntetický postup přípravy derivátu opatřeného oligoethylenglykolovou spojkou
- Navrhnout strukturu spojky splňující všechny požadavky pro použití v konceptu iBodies
- Syntetizovat výsledný derivát v dostatečném množství a kvalitě pro použití v biochemických experimentech

### 3. Teoretická část

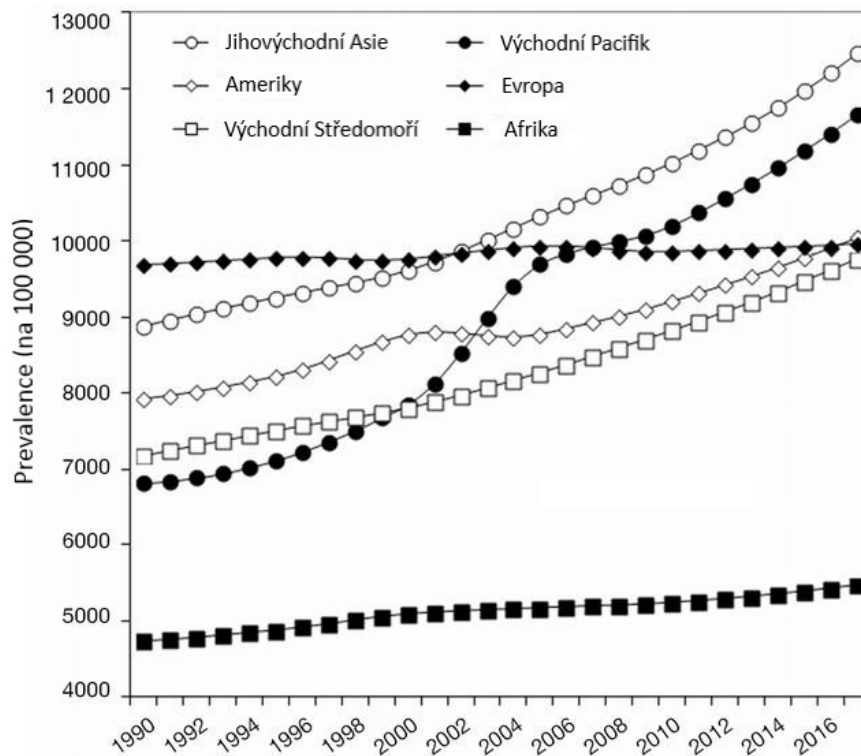
#### 3.1 *Porphyromonas gingivalis* a její role v parodontóze

Onemocnění parodontu, zánět dásní (gingivitida) či samotná parodontóza, jsou běžná zánětlivá onemocnění dutiny ústní. Závažnost se různí s ohledem na stádium onemocnění (Obrázek 3.1). Projevuje se nejdříve krvácením z dásní a jejich otékáním, které postupně přechází v obnažení zubních krčků za tvorby drobných váčků. Zatímco gingivitida spojená se zánětem dásní je mírná a vratná, pokročilá parodontóza vede k nevratné erozi zubního nervu a alveolární kosti. Následný úbytek dásní i podpůrné zubní tkáně (obklopujícího vaziva a alveolární kosti) může vést k uvolnění až ztrátě zubu.



Obrázek 3.1 Stádia parodontózy – převzato a upraveno z<sup>10</sup>

Prevalence těchto onemocnění za poslední dekády roste ve všech částech světa (Obrázek 3.2).<sup>11</sup> Vzhledem k tomuto nárůstu se parodontóza zařadila mezi 12 nejčastějších onemocnění v lidské populaci. Nejvyšší prevalence i procentuální nárůst byly za tuto dobu pozorovány v jihovýchodní Asii a západním Pacifiku. S rozvojem parodontózy bývá spojována řada dalších chorob: roztroušená skleróza<sup>12</sup>, diabetes<sup>13</sup>, ateroskleróza<sup>14</sup> a v posledních letech i rozvoj Alzheimerovy choroby<sup>9</sup>.



**Obrázek 3.2** Vývoj prevalence parodontózy v jednotlivých částech světa za poslední tři dekády, převzato a upraveno z<sup>11</sup>

Rozvoj zánětu parodontu je spojen s neadekvátní reakcí na mikrobiom dutiny ústní způsobenou přítomností bakterií tzv. „červeného komplexu“.<sup>4,15</sup> Jedná se o tři úzce související bakterie: *Tannarella forysthia*, *Treponema denticola* a *Porphyromonas gingivalis* obývající oblast mezi povrchem zubu a okrajem dásně. Jejich výskyt s postupujícím onemocněním časem převažuje nad běžnými symbiotickými či komenzálními bakteriemi běžně přítomnými v ústech, čímž vzniká dysbiotický vztah s hostitelem. Všechny tři bakterie jsou gramnegativní (díky složení své buněčné stěny se v Gramově barvení zbarvují růžově), anaerobní, asacharolytické a disponují mnoha faktory virulence, typicky proteolytickými enzymy.

Hlavní roli z výše zmíněných bakterií sehrává *Porphyromonas gingivalis*.<sup>16</sup> Jedná se o asacharolytickou bakterii (není závislá na štěpení sacharidů pro získávání energie), jež energii pro metabolické procesy čerpá ze štěpení proteinů hostitele. Proteolytická schopnost zároveň zajišťuje zdroj živin (tj. aminokyselin pro tvorbu vlastních proteinů) i železa, které bakterie také musí získávat od hostitele degradací hemoproteinů.<sup>17</sup> Jsou dokumentovány případy, kdy kultivace kolonií *P. gingivalis* v kulturách bez hemu vedla ke ztrátě virulence na myších modelech.<sup>18</sup>

Mezi faktory virulence *P. gingivalis* se řadí například hemaglutininy, proteiny vnější membrány, lipopolyproteiny, IgA a IgG proteázy či cysteinové peptidázy.<sup>19</sup> Především zmíněné peptidázy se podílí na ovlivnění imunitní obrany hostitele a omezení obranných zánětlivých reakcí, což vede k neschopnosti potlačení infekce ze strany hostitele. Za většinu proteolytické aktivity této bakterie zodpovídají peptidázy zvané gingipainy.<sup>20</sup>

### 3.2 Proteázy *Porphyromonas gingivalis* (gingipainy)

Označení „gingipain“ vzniklo kombinací názvů *P. gingivalis* a klostripain (proteáza štěpící peptidovou vazbu u argininu).<sup>21</sup> Tento termín popisuje hlavní cysteinové proteázy produkované *P. gingivalis* považované za její zásadní virulentní faktory. Gingipain štěpící peptidy za karboxylovou skupinou lysinu se označuje jako Kgp (dříve také Lys-gingipain nebo proteáza trypsinového typu specifická pro lysin), analogicky enzym štěpící za karboxylovou skupinou argininu se označuje Rgp (dříve Arg-gingipain, argingipain či proteáza trypsinového typu specifická pro arginin).<sup>22</sup> Zatímco Kgp je kódován pouze jedním genem, *kgp*, gingipainy specifické pro arginin jsou produkovány dvěma příbuznými geny: *rgpA* tvořící RgpA a *rgpB* vedoucí k RgpB. Poslední zmíněný je přenášěn do periplazmy v podobě proproteinu složeného z N-koncové prodomény, proteázové domény a C-koncové domény. Kgp a RgpA mají mezi proteázovou a C-koncovou doménu navíc vloženu hemaglutininovou/adhesivní doménu.

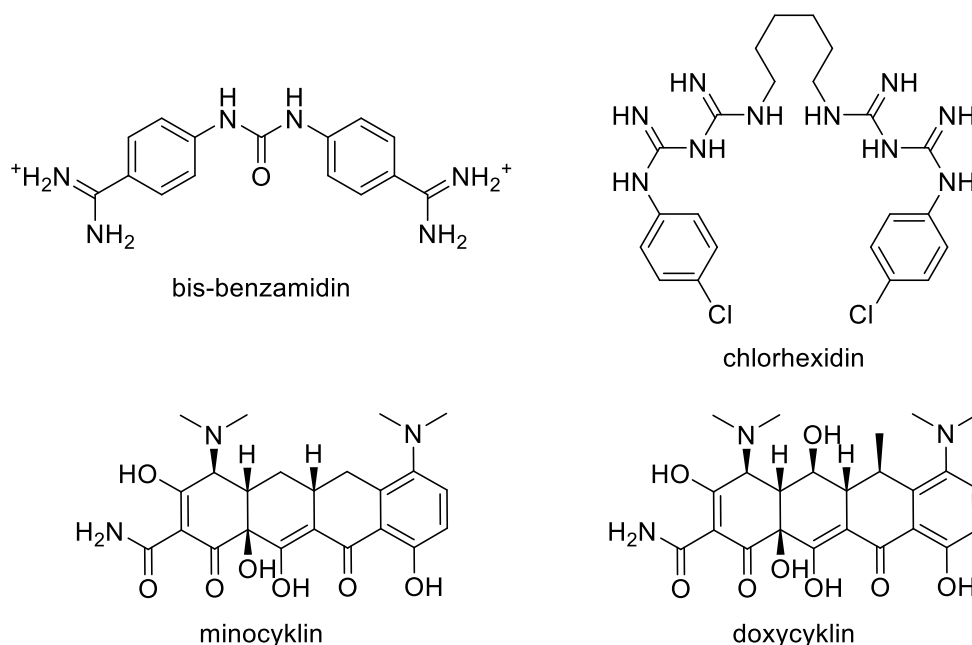
Gingipainy pomáhají bakterii také deregulovat cytokinovou síť hostitele, čímž účinně manipulují imunitním systémem a obchází jej.<sup>23</sup> Změna cytokinového profilu byla popsána rovněž u pacientů trpících Alzheimerovou chorobou.<sup>24</sup> Ve studii Ideho a kolektivu z roku 2016 došlo u pacientů s diagnózou obou onemocnění během 6 měsíců k pozorovanému zhoršení stavu oproti pacientům bez diagnostikované parodontózy.<sup>25</sup> Následná identifikace lipopolysacharidů *P. gingivalis* v mozcích pacientů s Alzheimerovou chorobou vedla ke vzniku hypotézy, že infekce *P. gingivalis* může mít negativní vliv na rozvoj Alzheimerovy choroby.<sup>7,8</sup> Výsledky studie prof. Potempy z roku 2019 potvrdily přítomnost DNA *P. gingivalis* v mozcích a mozkomíšní tekutině pacientů s Alzheimerovou chorobou.<sup>9</sup> Zároveň bylo na myším modelu potvrzeno zmírnění degradace nervové tkáně po podávání inhibitorů gingipainů. Použití vhodných inhibitorů gingipainů procházejících hematoencefalickou bariérou by tedy mohlo vést ke zlepšení budoucího stavu pacientů s Alzheimerovou chorobou.

### 3.2.1 Známé inhibitory gingipainů

Endogenní inhibitory proteáz (serpiny, cystatiny, ...) mají na aktivitu gingipainů velmi malý vliv, díky čemuž *P. gingivalis* úspěšně uniká imunitnímu systému hostitele.<sup>26</sup> Pro vývoj efektivního způsobu léčby komplikací vyplývajících z působení *Porphyromonas gingivalis* je potřeba identifikovat klíčové faktory virulence. Výsledky výzkumů profesora Potempy přisuzují gingipainům až 85 % z celkového proteolytického působení této bakterie.<sup>20</sup> Názory se liší, zdali významnější roli hrají Kgp<sup>27</sup>, RgpB či RgpA<sup>28</sup>. V ideálním případě by měl zvolený způsob léčby (nebo prevence) parodontózy cílit na všechny gingipainy.

Nejběžnějším způsobem dočasné kontroly proteázové aktivity *in vivo* je syntéza samotných proteáz v podobě proenzymu.<sup>29</sup> Pro-sekvence bývá zařazena na N-konci, z něž musí být posttranslačně odštěpena, aby se protein stal aktivním. Gingipainy *P. gingivalis* jsou rovněž aktivovány až po vyloučení z buňky bakterie a následné degradaci jejich N-koncové prodomény, dále jako NPD. NPD samotná účinně inhibuje aktivní Rgp.<sup>30</sup> Rekombinantní varianty (tj. syntetické analogy) NPD jsou schopné inhibovat aktivitu *P. gingivalis* po delší časový úsek, čímž lze zabránit rozvoji parodontózy.<sup>31</sup>

*Schéma 3.1* Struktury nízkomolekulárních antibiotik cílících na gingipainy



Inhibice bakteriálních proteáz lze docílit také nízkomolekulárními antibiotiky. Bis-benzamidin s močovinnovou spojkou byl popsán jako velmi efektivní inhibitor Rgp.<sup>32</sup>

Chlorhexidin a deriváty tetracyklinu minocyklin a doxycyklin rovněž inhibují Rgp, byť jen slabě.<sup>33</sup> V koncentraci 100  $\mu\text{M}$  potlačují tetracykliny veškerou peptidolytickou aktivitu. Vůči Kgp jsou ovšem tyto deriváty výrazně méně efektivní.<sup>34</sup>

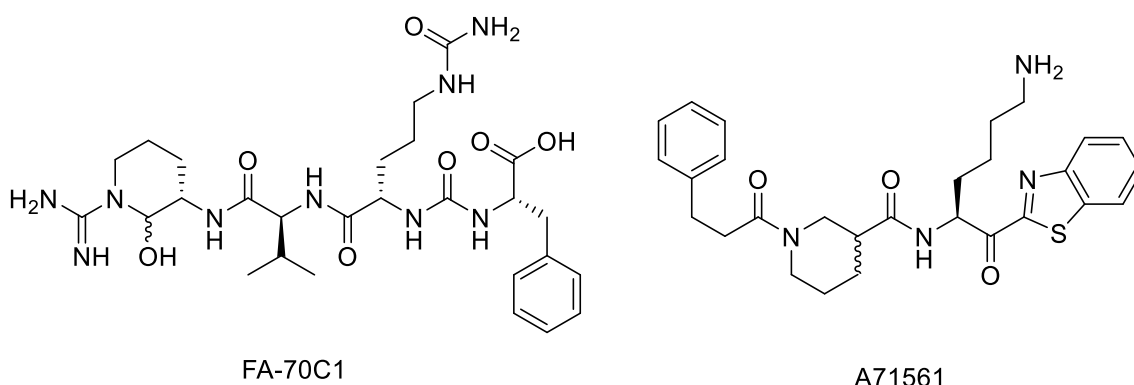
Byly popsány rovněž přínosy vakcinace proti infekci *P. gingivalis*, přičemž nejlepších výsledků bylo dosaženo použitím celých buněk *P. gingivalis*, případně izolovaného RgpA.<sup>35</sup> Použitím DNA vakcíny obsahující plasmid s genem pro syntézu RgpA na myším modelu byla získána imunita vůči infekci a bylo také zabráněno úbytku alveolární kosti.<sup>36,37</sup> Byly provedeny též studie zaměřené na pasivní imunizaci monoklonálními protilátkami, které úspěšně zabránily znovuosídlení léčených míst v dutině ústní.<sup>38</sup>

Bílkovinné inhibitory gingipainů byly izolovány z rýže seté.<sup>39</sup> Proteiny interagující s Rgp byly zahrnuty do čeledi I6, jež sdružuje nezařazené homology peptidázových inhibitorů.<sup>40</sup> Kromě rýže seté jsou proteiny z této čeledi hojně zastoupeny i v dalších obilovinách, například v pšenici seté, ječmenu setém, žitu setém, kukuřici seté nebo čiroku dvoubarevném. Pokud by se po izolaci proteinů z těchto rostlin prokázala jejich schopnost inhibice, mohly by být vytvořeny potravinové doplňky cílící na prevenci či zmírnění průběhu parodontózy.<sup>41</sup> Z dalších proteinů byla inhibice proteolytické aktivity *P. gingivalis* doložena u lactoferrinu<sup>42</sup>, histatinu<sup>43</sup> nebo  $\kappa$ -caseinu<sup>44</sup>.

Z některých rostlinných zdrojů lze izolovat i nebílkovinné složky disponující inhibiční aktivitou vůči gingipainům. Extrakt o vysoké molekulové hmotnosti z brusinkové šťávy je schopný inhibovat aktivitu proteáz celého „červeného komplexu“.<sup>45</sup> U proanthokyanidinů odvozených z tohoto koncentráту byla popsána neutralizace virulence *P. gingivalis*, ovšem nebylo zamezeno růstu bakterií.<sup>46</sup> Příznivý vliv je připisován i catechinům a polyfenolům pocházejícím ze zeleného čaje, jedná se ovšem o nedostatečně charakterizované inhibitory.<sup>47</sup>

Bylo vyvinuto také několik inhibitorů peptidového typu. Za zmínku stojí například peptidylové chlormethylketony používané ke studiu specifity vazebního místa gingipainů.<sup>48</sup> V klinické praxi se tento typ reaktivní skupiny nepoužívá často. Tvorba ireverzibilní kovalentní vazby nemusí být vhodná, jelikož se inhibitor může rovněž navázat do aktivního místa proteázy hostitele. Dalšími sloučeninami jsou například analog antipainu, FA-70C1, inhibující Rgp s nanomolárními hodnotami  $K_i$ <sup>49</sup>, nebo A71561, specifický reverzibilní inhibitor Kgp.<sup>50</sup> Poslední zmíněný analog sice inhibuje Kgp s  $K_i$  v nanomolárních hodnotách, tento efekt se však neprojevil na buňkách samotné *P. gingivalis*. Za nejúspěšnější syntetické inhibitory gingipainů se považují molekuly KYT, jimž se věnuje blíže následující oddíl.

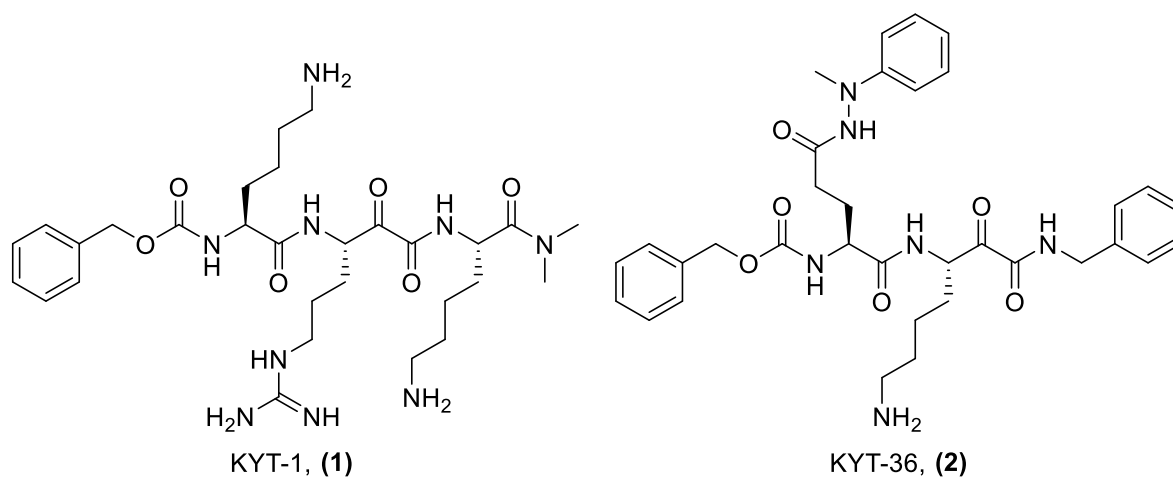
Schéma 3.2 Struktury peptidových analog FA-70C1 a A71561



### 3.2.2 Inhibitory KYT

Obecným problémem jakéhokoli proteázového inhibitoru je interference s aktivitou proteáz hostitele. Vysoká specifita vůči gingipainu, společně s nízkou cytotoxicitou, jsou tudíž žádoucí, aby se mohla sloučenina stát klinickým kandidátem. V tomto ohledu excelují molekuly připravené v laboratoři Kenji Yamamota.<sup>1</sup> Základem pro návrh specifických inhibitorů Rgp a Kgp bylo určení štěpícího místa histatinů jednotlivými enzymy. Histatiny jsou polypeptidy bohaté na histidin, které jsou vylučovány slinnými žlázami primátů. Předpokládá se, že tyto polypeptidy jsou důležitou součástí neimunitního obranného systému ústní dutiny.<sup>51</sup> Z analýz míst štěpení vyplynula důležitost přítomnosti lysinu v pozicích P1' a P2 (značení vycházející z definice štěpení substrátů<sup>52</sup>) a argininu na pozici P1 v navrhovaném inhibitoru Rgp.<sup>1</sup> Nejúspěšnějším inhibitorem Rgp z této série byl KYT-1 s  $IC_{50} = 0,8$  nM, struktura uvedena na Schématu 3.3 jako sloučenina (1).

Schéma 3.3 Struktury inhibitorů KYT-1 (1) a KYT-36 (2)





V případě designu inhibitoru Kgp se ukázal přínos bazické skupiny na pozici P1' a výměna lysinu na pozici P2 za glutamát. První pokus o přípravu specifického inhibitoru Kgp skončil neúspěchem, jelikož molekula s navrhovanou strukturou Cbz-Glu-Lys-CO-Lys-N(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub> byla z neznámých důvodů nestabilní ve vodě, MeOH i DMSO. Byly tedy připraveny analogy s obměněnými funkčními motivy ve struktuře inhibitoru. Výsledkem optimalizace návrhu byl inhibitor KYT-36 s IC<sub>50</sub> = 2,0 nM (Schéma 3.3 výše, sloučenina **(2)**) vůči Kgp.

U výsledných inhibitorů byly následně stanoveny inhibiční konstanty  $K_i$  vůči gingipainům i dalším běžným lidským proteázám (trypsin, katepsiny B, L a H). Výsledky jsou uvedeny v Tabulce 3.1 níže. Z dat je zřejmé, že vyvinuté inhibitory mají vysokou specifitu vůči gingipainům oproti jiným hostitelským proteázám. V kombinaci s velmi nízkými hodnotami inhibičních konstant lze konstatovat, že sloučeniny **(1)**, resp. **(2)** jsou efektivní a vysoce selektivní inhibitory Rgp, resp. Kgp.

**Tabulka 3.1** Stanovené hodnoty inhibiční konstanty ( $K_i$ ) inhibitorů KYT-1 a KYT-36 vůči vybraným proteázám

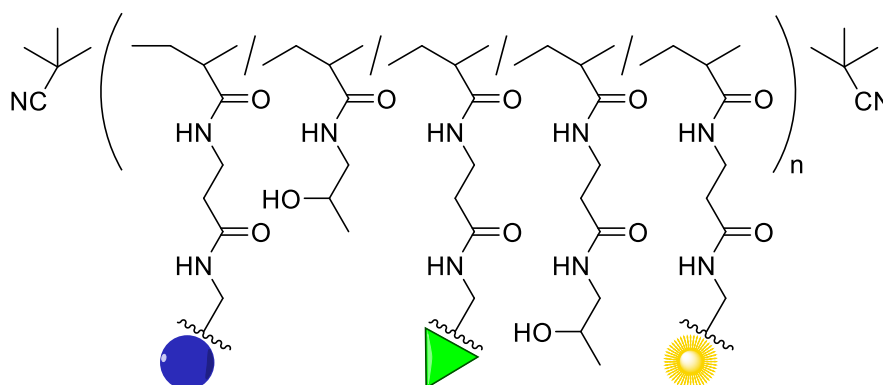
proteáza	$K_i$ [mol/dm <sup>3</sup> ]	
	KYT-1	KYT-36
Rgp	$1,3 \cdot 10^{-10}$	$> 10^{-4}$
Kgp	$2,6 \cdot 10^{-6}$	$7,5 \cdot 10^{-11}$
trypsin	$1,2 \cdot 10^{-6}$	$1,3 \cdot 10^{-7}$
katepsin B	$3,4 \cdot 10^{-8}$	$3,7 \cdot 10^{-9}$
katepsin L	$1,2 \cdot 10^{-8}$	$7,0 \cdot 10^{-8}$
katepsin H	$1,5 \cdot 10^{-4}$	$1,6 \cdot 10^{-4}$

Také bylo zjištěno, že KYT-1 a především KYT-36 způsobuje výraznou inhibici růstu *P. gingivalis*. Při podání obou inhibitorů byl bakteriální růst téměř úplně potlačen. Toto pozorování potvrdilo závislost růstu *P. gingivalis* na Kgp i Rgp. Pro úspěšné potlačení infekce je tedy nutné cílit na oba enzymy kombinací více inhibitorů. Posledním zmíněným přínosem KYT inhibitorů je jejich nízká toxicita. Nebyla pozorovaná žádná buněčná toxicita až do hodnot  $10^{-5}$  M *in vivo*, a  $10^{-4}$  M *in vitro*.

### 3.3 Koncept iBodies

Protilátky jsou hojně využívány v molekulární biologii i biochemii. Jejich nevýhodou však bývá nízká stabilita, obtížná modifikovatelnost a neposledně také vysoká výrobní cena. Skupina prof. Konvalinky ve spolupráci s Ústavem makromolekulární chemie AV ČR přišla v roce 2016 s myšlenkou vytvoření alternativy, která by byla finančně nenáročná, univerzálnější a umožnila snadnou modifikaci.<sup>2</sup> Kombinací hydrofilního kopolymeru s nízkomolekulárními sloučeninami o různé funkci (ligandy, afinitní kotvy či fluorescenční značky) vznikl koncept syntetických protilátek, tzv. iBodies. Tyto sloučeniny mimikují klasické protilátky a umožňují studovat receptory či enzymy. Nalézají využití v různých biochemických metodách jako ELISA (Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay), imunoprecipitace, imunocytochemie nebo průtoková cytometrie.

*Schéma 3.4 Schéma obecné struktury iBody – ligandy mohou být například inhibitor, afinitní kotva či fluorofor*

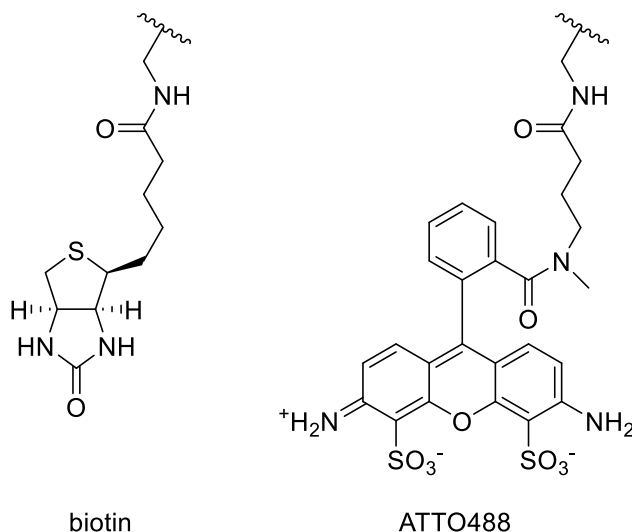


Páteř tohoto konjugátu tvoří kopolymer na bázi *N*-(2-hydroxypropyl)methakrylamidových jednotek (HPMA). Díky jeho nízké toxicitě a dobré rozpustnosti ve vodě je tento polymer využíván pro doručování biologicky aktivních látek na místo účinku už přes 40 let.<sup>53</sup> Polymer o podobném složení, poly(2-hydroxyethyl)methakrylát, se léta využívá pro výrobu měkkých kontaktních čoček či hydrofilních gelů (známý jako HemaGel).<sup>54,55</sup> Kopolymer HPMA lze opatřit různými funkčními skupinami v postranních řetězcích, díky nimž je možné následné připojení dalších molekul.<sup>56</sup> Právě tato zaměnitelnost ligandů propůjčuje iBodies jejich specifitu a variabilitu – teoreticky je možné vytvořit specifickou syntetickou „protilátku“ pro libovolnou cílovou biomolekulu se známým ligandem.<sup>2</sup> Pro cílení konjugátu můžeme použít například inhibitor zkoumaného enzymu. Další možností je připojení derivátu

nitriloctové kyseliny k iBodies, čímž lze získat specifický polymer cílící na polyhistidinovou značku, tzv. „His-tag“. Tento typ ligandu je schopný komplexovat nikelnaté nebo kobaltnaté ionty. Takové iBody lze využít k detekci, izolaci či purifikaci proteinů obsahující His-tag. Pro zachování afinity ligandu k proteinu, je nutné jej od samotného polymeru oddělit vhodnou spojkou, aby nedocházelo ke sterickému bránění vzájemné interakce. Nejčastěji se k tomuto účelu využívá polyethylenglykolových spojek (PEG) díky jejich polárnímu charakteru. Pro snadné připojení ligandu k polymeru je žádoucí zakončit spojku reaktivní funkční skupinou. Může se jednat o amin či azid, v závislosti na struktuře ligandu.

Dalšími součástmi nacházejícími se na konjugátu bývají typicky fluorescenční značka a afinitní kotva. Přítomnost fluoroforu umožňuje vizualizaci cílového proteinu, případně buněk exprimujících daný protein. V původní práci byla jako fluorofor použita sloučenina ATTO488. Jako kotva byl zvolen biotin, jež se vyznačuje vysokou afinitou k streptavidinu.<sup>57</sup> Síly a specifity této nekovalentní interakce se využívá k imobilizaci, detekci nebo označení sledovaného proteinu, typicky v biochemických metodách ELISA či Western blot.

*Schéma 3.5* Struktury afinitní kotvy a fluoroforu použitých na iBody



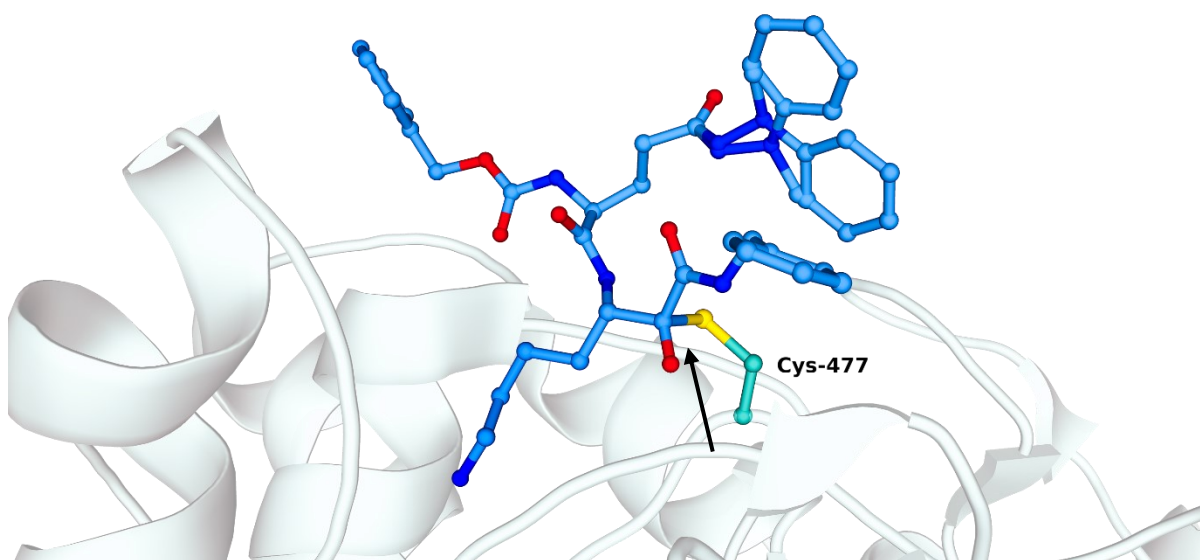
Koncept iBodies byl úspěšně otestován ve skupině prof. Konvalinky na modelových proteinech: GCP-II (glutamátcarboxypeptidáza II), HIV-1 proteáza, pepsin, FAP (Fibroblast Activation Protein) a výše zmíněných proteinech s polyhistidinovou značkou.<sup>2,58</sup> V případě GCP-II bylo po připojení inhibitoru na iBody pozorováno výrazné snížení inhibiční konstanty konjugátu oproti její hodnotě u samotného inhibitoru:  $K_{i, \text{inhibitor}} = 2,0 \text{ nM}$  vs.  $K_{i, \text{iBody}} = 4,3 \text{ pM}$ .

Tento rozdíl tří řádů lze interpretovat zvýšením lokální koncentrace inhibitoru v místě účinku díky přítomnosti více molekul inhibitoru na jedné molekule polymeru. V případě FAP se tento trend nepotvrdil. Inhibitory opatřené oligoethylenglykolovou spojkou o délce 5, resp. 15 PEG jednotek si afinitu k proteinu zachovaly. Po připojení inhibitoru s delší spojkou na kopolymer ovšem došlo ke snížení afinity, inhibiční konstanta  $IC_{50}$  se zvýšila cca pětkrát oproti volnému inhibitoru:  $IC_{50, \text{inhibitor}} = 0,23 \text{ nM}$  vs.  $IC_{50, \text{iBody}} = 1,1 \text{ nM}$ .<sup>58,59</sup>

## 4. Výsledky a diskuse

### 4.1 Strukturní popis interakce inhibitoru KYT-36 s enzymem Kgp

První informace o mechanismu inhibice Kgp inhibitorem KYT-36 představili Guevara s kolegy.<sup>3</sup> Získáním krystalové struktury sloučeniny (**2**) s Kgp (PDB ID: 6I9A) o vysokém rozlišení 1,20 Å dokázali určit a popsat interakce zajišťující subnanomolární inhibici tohoto enzymu inhibitorem (**2**). Z krystalové struktury lze vyhodnotit, že inhibitor je v aktivním místě enzymu pevně vázaný prostřednictvím devíti hydrofobních interakcí, čtrnácti vodíkových vazeb a jedním solným můstkem. Postranní řetězec modifikovaného lysinu je zanořen hluboko v dutině katalytické domény a mimikuje štěpné místo substrátu enzymu. Karbonylová skupina modifikovaného lysinu se v krystalové struktuře nachází ve vzdálenosti 2,02 Å od SH skupiny Cys-447 z katalytické triády enzymu Kgp (Obrázek 4.1).

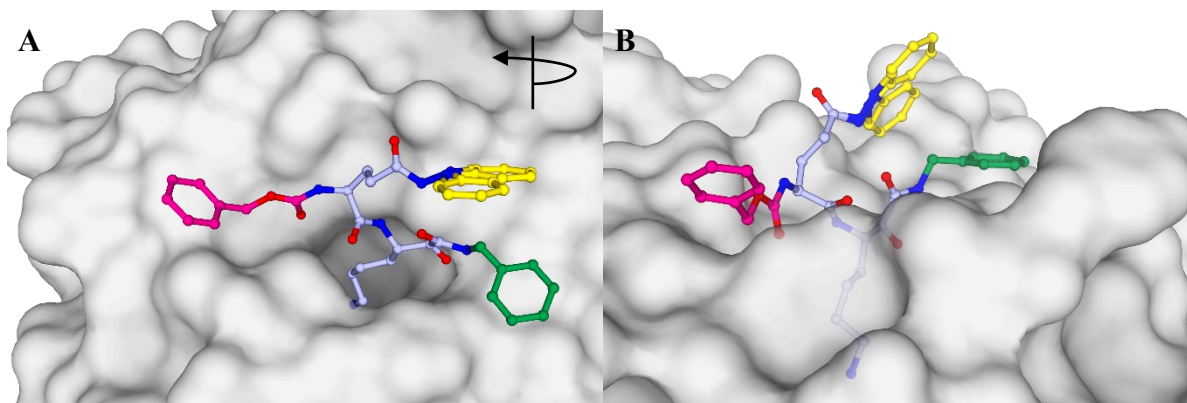


**Obrázek 4.1** Detailní pohled na kovalentní vazbu inhibitoru KYT-36 s Cys-447 Kgp (PDB: 6I9A)

Modifikace inhibitoru za účelem jeho připojení na iBody s sebou nese potřebu určit místo napojení spojky. Výběr místa napojení má významný dopad na afinitu výsledného derivátu. Spojka by měla být zavedena ideálně tak, aby co nejméně ovlivňovala interakci inhibitoru s enzymem.

Z publikované krystalové struktury enzymu Kgp s inhibitorem (**2**) lze identifikovat tři možnosti napojení spojky (ramena znázorněna zeleně, žlutě a růžově na Obrázcích 4.2 a 4.3).

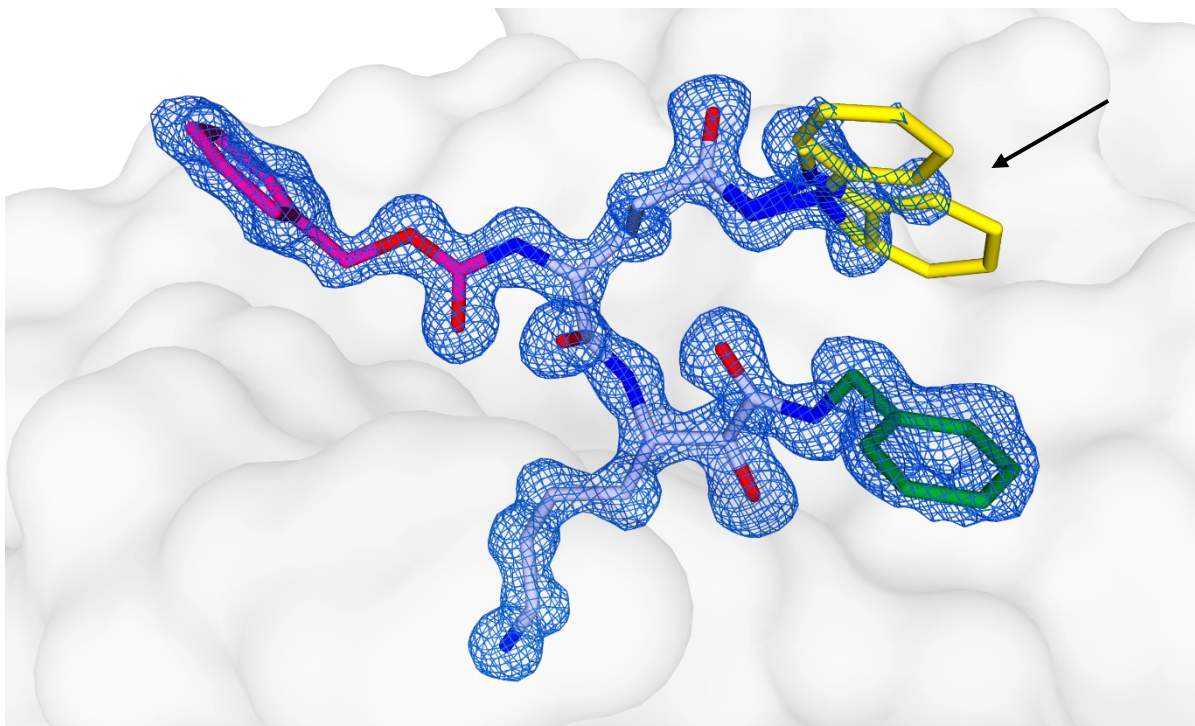
Aminoskupinou zakončený postranní řetězec derivátu lysinu by bylo možné snadno synteticky modifikovat. Jelikož je ale zanořený hluboko v dutině enzymu (Obrázek 4.2A), nebylo by vhodné zavádět na toto místo spojku k polymeru. Pokud by byl postranní řetězec derivátu lysinu modifikován, pravděpodobně by to vedlo k fatálnímu zhoršení afinity inhibitoru.



**Obrázek 4.2** Krystalová struktura inhibitoru KYT-36 s enzymem Kgp (PDB: 6I9A)

Benzylamidový fragment (zeleně) je přístupný na povrchu enzymu. Je ovšem v těsné blízkosti ketonu, jež vytváří reverzibilní kovalentní vazbu v aktivním místě enzymu. Jelikož není žádoucí zasahovat do klíčových míst zodpovědných za účinnost inhibice, tato varianta byla zavržena. Zbylé dvě výše uvedené možnosti působily srovnatelně. Nacházejí se ve větší vzdálenosti od aktivního místa enzymu i jeho povrchu a zavedení spojky by tedy nemělo výrazně ovlivnit afinitu ligandu.

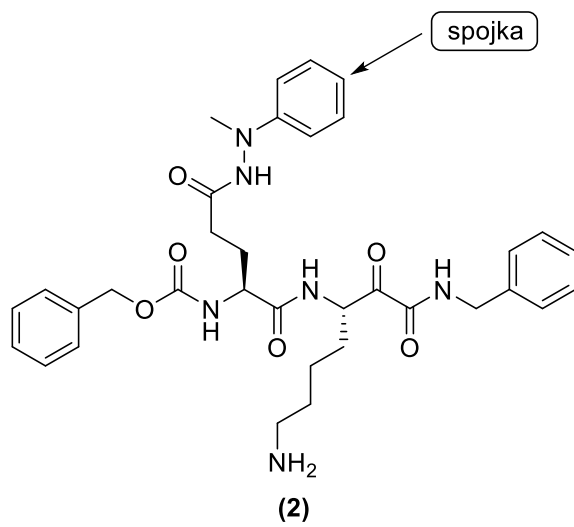
První z těchto možností je benzyloxykarbamátové rameno (růžově), jež kopíruje profil povrchu enzymu (Obrázek 4.2B). Autoři článku<sup>3</sup> naznačují možnou stabilizaci ramene v této hydrofobní kapse  $\pi$ - $\pi$  interakcemi s blízkými aromatickými aminokyselinami (Trp-391, His-575). Ze struktury enzymu uvedeného na Obrázcích 4.1 – 4.3 jsou patrné dvě konformace hydrazidového fragmentu (žlutě). Toto aromatické jádro nemá silné interakce s enzymem, které by zajišťovaly jednu stabilní konformaci. To podkládá i neúplná mapa elektronových hustot tohoto fragmentu na Obrázku 4.3, ve srovnání se zbytkem ligandu, jež je v mapě dobře definovaný.



**Obrázek 4.3** Mapa elektronových hustot inhibitoru KYT-36 ve struktuře s enzymem Kgp; konstruováno na  $1,5 \sigma$  (PDB: 6I9A)

Zmíněná flexibilita hydrazidového ramene naznačuje výhodu oproti předešlým možnostem. Vzhledem k flexibilitě lze předpokládat, že i po modifikaci spojkou dokáže zmíněná část molekuly zaujmout výhodnou konformaci pro interakci s enzymem. Amidovou skupinu lze zavést v libovolné části syntézy. Bylo by tedy možné nejdříve spojku připojit k *N*-fenyl-*N*-methylhydrazinovému fragmentu a posléze celý fragment napojit na skelet inhibitoru pomocí amidového couplingu s karboxylovou skupinou postranního řetězce glutamátu. Na základě těchto úvah bylo tedy určeno místo pro zavedení spojky, jak je naznačeno šipkou na Schématu 4.1. V případě, že by první výsledky biochemických experimentů naznačovaly výrazný pokles schopnosti inhibice (nevhodně zvolené místo navázání spojky), lze využít alternativního přístupu v podobě modifikace benzyloxykarbamátového fragmentu.

*Schéma 4.1* Zvolené místo pro zavedení spojky

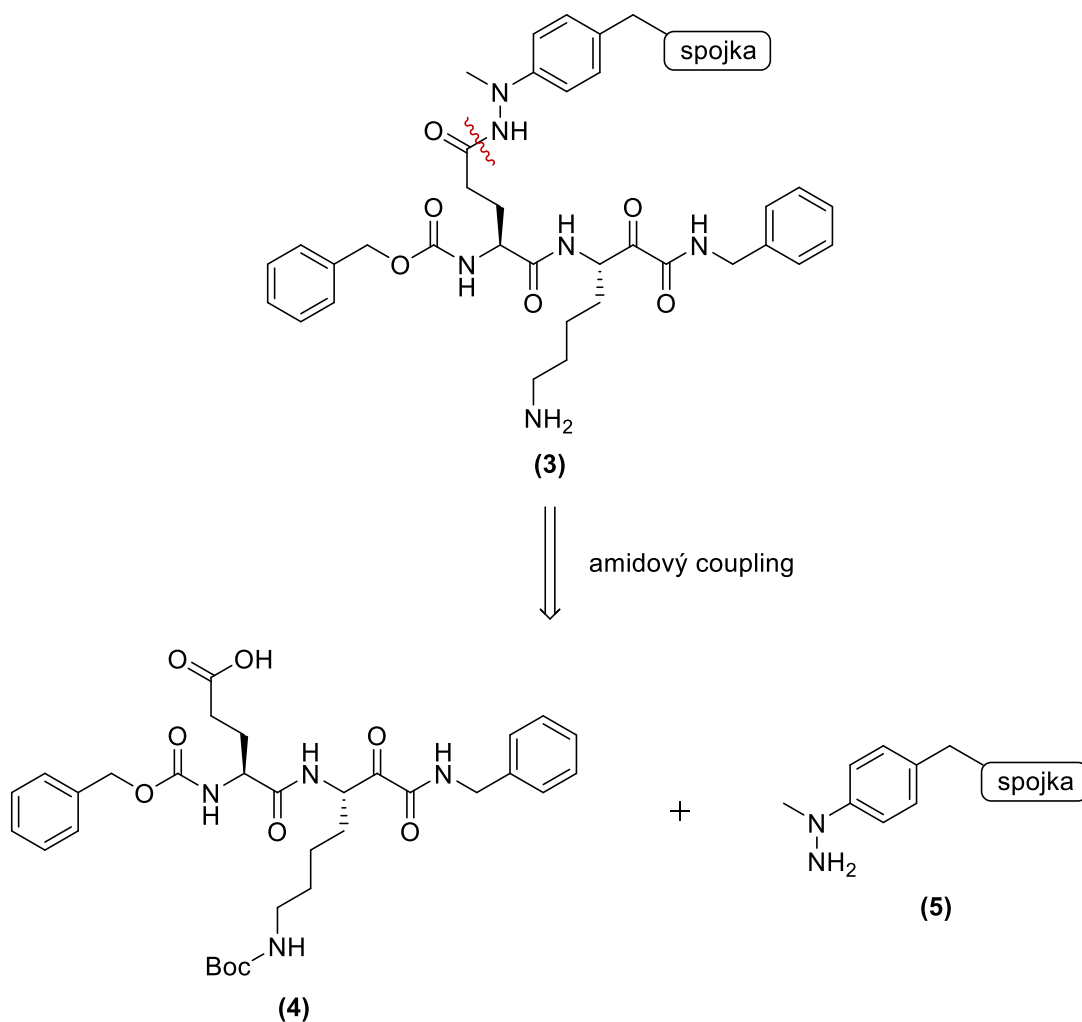




## 4.2 Návrh syntézy cílové molekuly

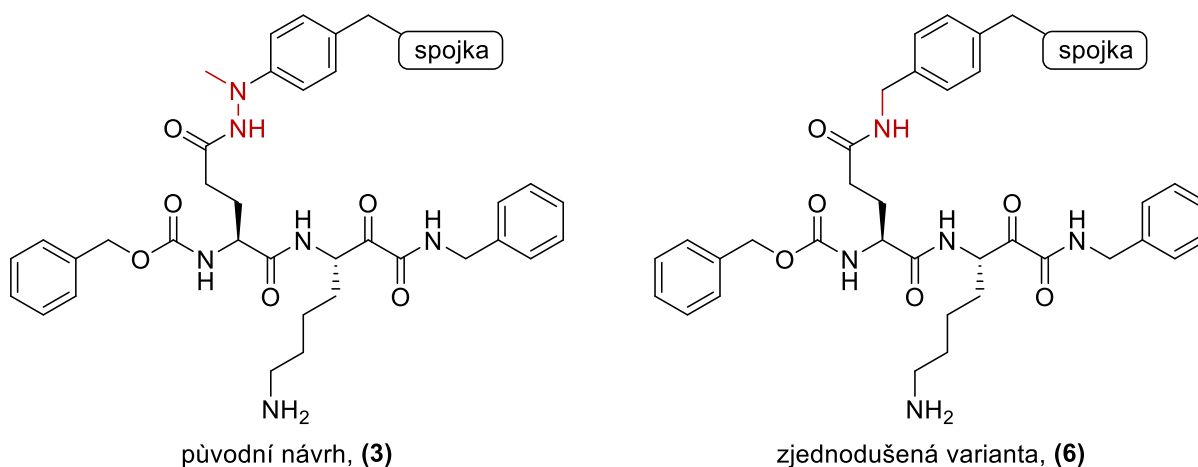
Prvním krokem designu cílové molekuly bylo určení místa napojení oligoethylenglykolové spojky. V předchozím oddíle bylo vybráno rameno s *N*-fenyl-*N*-methylhydrazinovou skupinou. Jelikož oligoethylenglykolové řetězce bývají často nejnákladnějšími výchozími chemikáliemi, je žádoucí připojit intermediát obsahující spojku co nejpozději v reakční sekvenci. Logické rozpojení se nabízí v místě amidové vazby u postranního řetězce glutamátu za myšlenkového vzniku skeletu inhibitoru (4) a spojkou opatřeného hydrazinu (5).

Schéma 4.2 Návrh finální části syntézy cílové molekuly



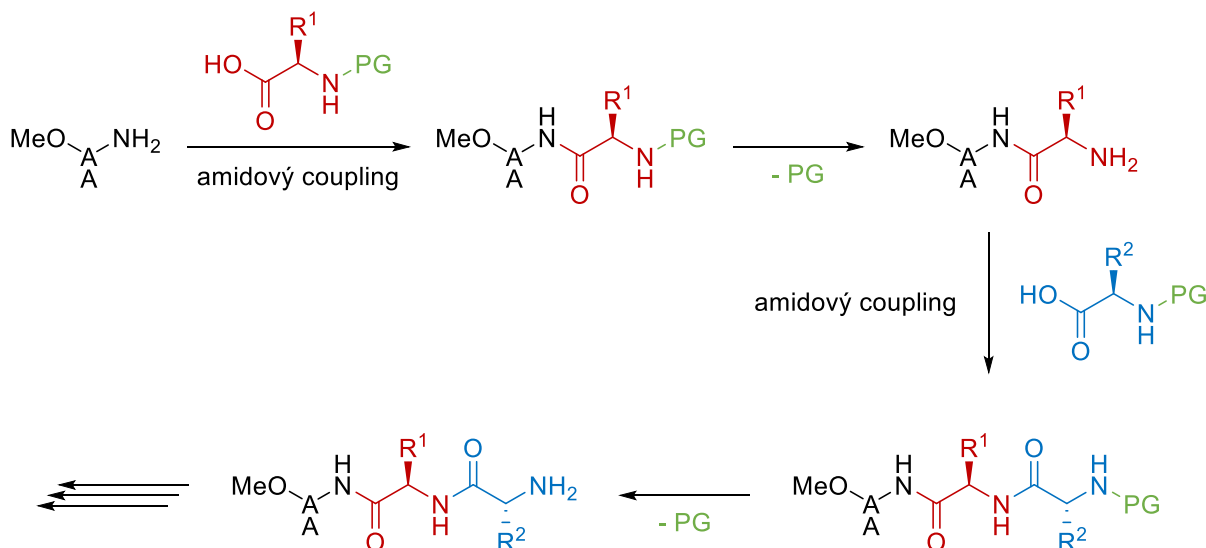
Hydrazinový fragment je poměrně komplexní svou hustou funkcionalizací. Stejný atom dusíku je dvakrát substituovaný: fenylem a methylem. Obávali jsme se možných problémů při syntéze, které by mohlo způsobit *N*-fenyl-*N*-methylhydrazinové uspořádání (např. náročnější čištění kvůli přítomnosti protonovatelné skupiny). Rešerší bylo potvrzeno, že komerční dostupnost derivátů tohoto typu je malá, přemýšleli jsme tedy nad možným zjednodušením tohoto motivu. Rozhodli jsme se pro vynechání jednoho atomu dusíku (a jeho nahrazení CH<sub>2</sub> skupinou), čímž získáme benzylaminový motiv, u nějž byl mnohem větší výběr mezi komerčními deriváty. *N*-Fenyl-*N*-methylhydrazinový fragment byl tedy nahrazen fragmentem benzylaminového typu. Předpokládali jsme, že tato drobná změna (zvýrazněná červeně na Schématu 4.3) by neměla mít na afinitu inhibitoru vliv, jelikož se nejedná o část molekuly s významnou interakcí s enzymem. Tímto rozhodnutím jsme ušetřili několik kroků syntézy části se spojkou, čímž se opět podpořila snaha snížit spotřebu „drahých“ intermediátů. Přípravou fragmentu nesoucího spojku se zabývá následující oddíl.

**Schéma 4.3** Zjednodušení designu cílové molekuly



Ačkoli se o inhibitoru KYT-36 zmiňuje několik článků<sup>1,3,9</sup>, samotná syntéza sloučeniny (2) nebyla navzdory její důležitosti dosud publikována. Skelet inhibitoru se skládá ze několika podjednotek spojených amidovými vazbami. Syntéza peptidů na pevné fázi je velmi efektivní metoda, zejména v případě delších peptidů. U kratších sekvencí je vhodnější využití peptidové syntézy v roztoku. Standardní postup opakovaného připojování aminokyselinových derivátů by představoval zdoluhavý a náročný proces, jak lze vidět ze Schématu 4.4 níže.

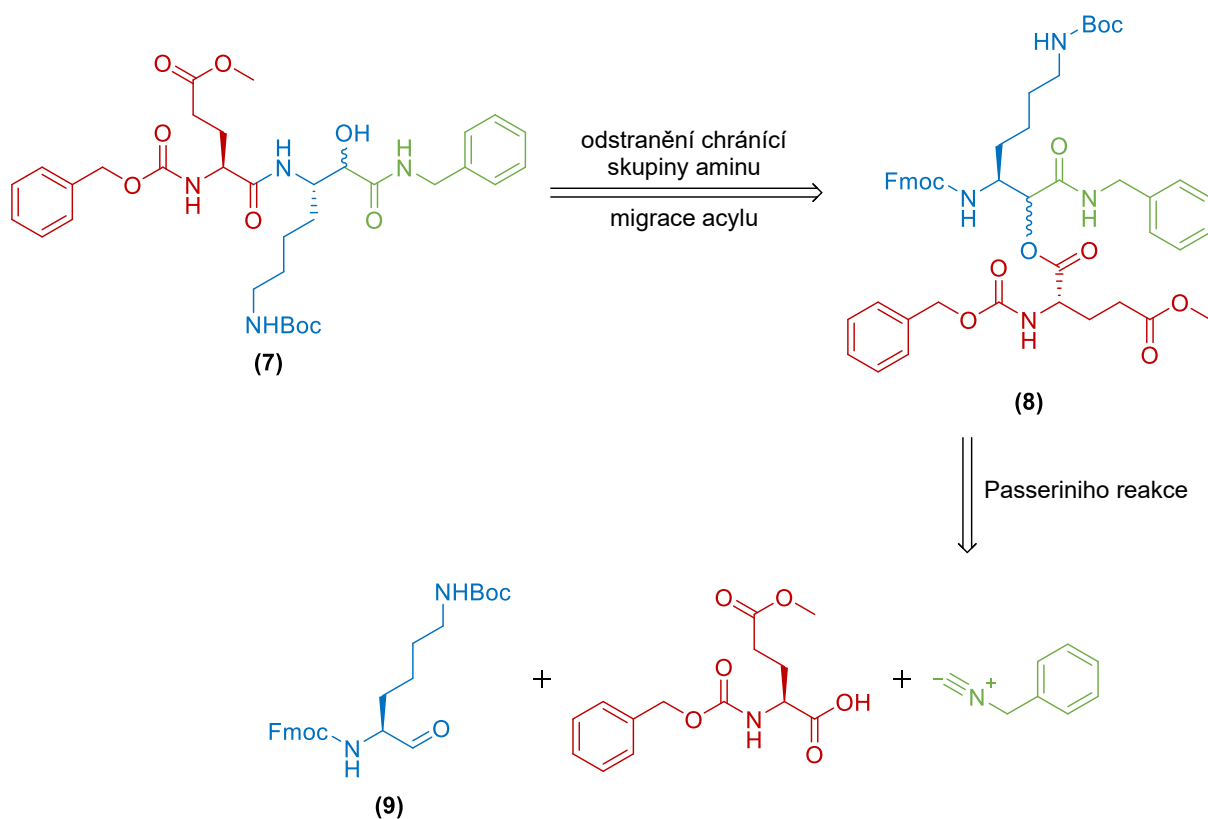
**Schéma 4.4** Obecné schéma peptidové syntézy v roztoku (PG představuje chránící skupinu, AA libovolnou aminokyselinu)



Dlouhá série kroků s sebou nese i nutnost většího počtu čistících operací, což vede k nevyhnutelným ztrátám materiálu. Také je nutné vzít do úvahy ortogonalitu použitých chránících skupin: hydrogennačně labilní benzyloxykarbamát je součástí skeletu inhibitoru, karboxylovou skupinu postranního řetězce glutamátu je žádoucí mít ochráněnou až do fáze připojení fragmentu se spojkou (například bazicky labilním esterem) a  $\epsilon$ -aminoskupinu na konci postranního řetězce modifikovaného lysinu je nutné odlišit od aminoskupiny na N konci (například kyselé labilním karbamátem). Další obtíží této sekvence je přítomnost  $\alpha$ -ketoamidové skupiny. Tento typ derivátu aminokyselin, nadto ještě se specifickým chráněním, není běžně komerčně dostupný, což opět zvyšuje počet potřebných kroků syntézy.

Pro přípravu  $\alpha$ -hydroxyamidových motivů se často používá PADAM sekvence (z anglického Passerini reaction – Amine Deprotection – Acyl Migration).<sup>60,61</sup> Následnou oxidací produktu této sekvence lze získat pokročilý intermediát, jež je blízký cílové molekule. Použití této reakce vedlo ke značnému zjednodušení reakční cesty oproti výše navrhované fragmentové syntéze (Schéma 4.5 níže). Je pravděpodobné, že původní inhibitor (**2**) byl připraven právě s využitím tohoto postupu. Část reaktantů pro tuto sekvenci byla komerčně dostupná: benzyloxykarbamid a Cbz-Glu(OMe)-OH. Kýžený aldehyd (**9**) bylo možné připravit ve dvou krocích z komerčně dostupné kyseliny Fmoc-Lys(Boc)-OH.

**Schéma 4.5** Návrh syntézy skeletu inhibitoru s využitím PADAM sekvence



### 4.3 Příprava benzylaminového fragmentu opatřeného spojkou

Obecné pravidlo pro optimální délku spojky pro iBody zatím nebylo nalezeno. Osvědčilo se nám začít s oligoethylenglykolovým řetězcem o délce 4 až 6 jednotek, byl tedy zvolen řetězec o délce pěti ethylenglykolových jednotek. Původní inhibitor (2) má molekulovou hmotnost  $M_i = 630,75$  g/mol, jedná se tedy o poměrně velkou molekulu. Připojením delší spojky (např. PEG-10) by vznikla sloučenina, s níž by se pracovalo obtížněji, zejména při čištění. Delší peptidy, které mohou posloužit jako analog pro tuto situaci, se více rozmyšávají při chromatografii na silikagelu a standardní HPLC kolony mají velikost pórů do 120 Å; efektivnost čištění molekul o molekulové hmotnosti  $M_i \geq 1200$  g/mol se tak výrazně zhoršuje.<sup>62</sup> V naší skupině máme (zatím neopublikovanou) zkušenost, že přítomnost spojky není vždy nutná, pokud je molekula inhibitoru dostatečně velká. Přesto je vhodné s oligoethylenglykolovou spojkou začít (v případě vzniknuvších problémů lze od spojky upustit později).

Aby bylo možné jednoznačně stanovit koncentraci jak samotného inhibitoru v roztoku, tak i průměrný počet molekul inhibitoru navázaných na výsledný polymer (iBody), byla cílová

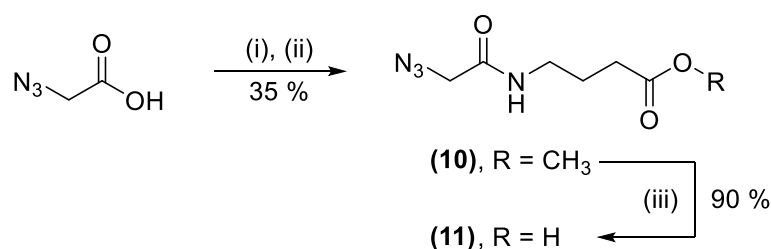
molekula přizpůsobena zvolené metodě stanovení. Vzhledem k tomu, že ligand i polymer jsou složeny z atomů C, H, N a O, nepřipadala v úvahu elementární analýza. Pro stanovení byla vybrána aminokyselinová analýza. Vhodným interním standardem pro tuto metodu je  $\gamma$ -aminomáselná kyselina (zkráceně GABA) obsažena přímo v molekule derivátu inhibitoru. Z naší zkušenosti se GABA při aminokyselinové analýze vyskytuje na LCMS chromatogramu ve specifické oblasti – nepřekrývá se s dalšími látkami (vedlejší produkty rozkladu polymeru atd.) a lze tedy jasně stanovit koncentraci inhibitoru ve vzorku.

Nejjednodušší způsob pro zavedení této modifikace je zařadit GABA derivát za oligoethylenglykolový řetězec. Jedná se o méně polární motiv v porovnání s PEG řetězcem, je tedy vhodnější jej umístit dále od inhibitoru a povrchu enzymu. Zároveň bylo potřeba zajistit jednoduché připojení finální molekuly na iBody. Zavedený způsob našich spolupracovníků na ÚMCH AV ČR je připojení ligandu zakončeného aminoskupinou pomocí reakce s aktivním esterem, nebo využití azidové skupiny ke „click“ reakci. Inhibitor (**2**) má ve struktuře volnou aminoskupinu, nebylo tedy možné využít této varianty s aminoskupinou na konci spojky. Bylo zvoleno zakončení spojky azidovou skupinou připojením kyseliny 2-azidooctové k aminoskupině GABA. Přítomnost pentaethylenglykolového řetězce způsobuje nižší efektivitu extrakce a nutnost častého čištění, což vedlo k vyšším ztrátám pro nás cenného intermediátu.

Testovací experimenty couplingu s kyselinou 2-azidooctovou (Schéma 4.6) dosahovaly velmi nízkých výtěžků, kvůli malé absorpci v UV spektru bylo obtížné též čištění. Optimalizace tohoto kroku a syntéza benzylaminového derivátu probíhaly souběžně. Toto paralelní řešení vedlo ke zefektivnění syntézy.

Pro aktivaci kyseliny 2-azidooctové byla vyzkoušena činidla HATU a TSTU, obojí v přítomnosti báze DIPEA. Experimenty za použití činidla HATU nevedly ke vzniku produktu. Pro přípravu methylesteru (**10**) byly použity podmínky za použití činidla TSTU. Po přidání hydrochloridu methylesteru kyseliny  $\gamma$ -aminomáselné byla reakční směs ponechána za laboratorní teploty přes noc. Hnědá olejovitá látka získaná extrakcí byla následně přečištěna pomocí preparativního HPLC. Pro převedení methylesteru (**10**) na karboxylovou kyselinu (**11**) byly použity standardní hydrolytické podmínky NaOH ve směsi MeOH a H<sub>2</sub>O. Derivát GABA zakončený azidovou skupinou (**11**) byl připraven ve větším množství samostatně před připojením na benzylaminový fragment opatřený spojkou.

**Schéma 4.6** Příprava derivátu  $\gamma$ -aminomáselné kyseliny (**11**)

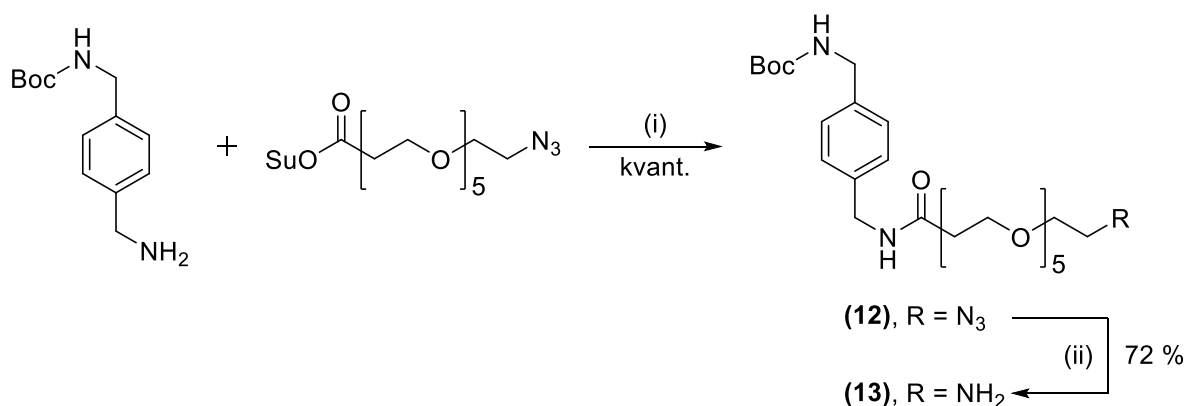


- (i) TSTU, DIPEA, DMF, rt, 1 h; (ii) hydrochlorid kyseliny  $\gamma$ -aminomáselné, rt, 16 h;  
(iii) NaOH, MeOH:H<sub>2</sub>O 1:1, rt, 2 h

Prvním krokem přípravy benzylaminového fragmentu bylo spojení komerčně dostupných sloučenin *tert*-butyl-4-(aminomethyl)benzylkarbamátu a pentaethylenglykolového derivátu, SuOOC-(PEG)<sub>5</sub>-N<sub>3</sub>. Díky komerční dostupnosti aktivovaného NHS esteru odpadla nutnost aktivace kyseliny předem pomocí couplingového činidla. Výhodou této reakce byla její rychlost a čistota, produkt (**12**) nemusel být po extrakci dále čištěn. Následně byl azid (**12**) převeden na amin (**13**). Selektivní redukce azidu lze dosáhnout například Staudingerovou redukcí, jejíž nevýhoda ovšem spočívá v nutnosti oddělit vzniklý trifenylfosfin oxid od produktu. Další možnost, která se nabízí, je katalytická hydrogenace. Je obecně známo, že benzylaminové uspořádání je méně hydrogenačně labilní než uspořádání benzyletherové. Naopak azidová skupina bývá redukována pomocí H<sub>2</sub> velmi rychle, proto jsme předpokládali možnost selektivně redukovat azidovou skupinu za zachování benzylaminové skupiny. Byl tedy proveden testovací experiment katalytické hydrogenace, který potvrdil naši hypotézu. Výhodou tohoto postupu oproti Staudingerově redukcí je jednoduchost reakce. Po dokončení katalytické hydrogenace umožní filtrace oddělit katalyzátor od produktu.

Amin na druhém konci molekuly bylo potřeba ochránit jiným typem chránicí skupiny. Byla zvolena chránicí skupina Boc, jak kvůli komerční dostupnosti výchozí sloučeniny, tak kvůli snadnému odstranění chránicí skupiny v kyselém prostředí na konci syntézy benzylaminového fragmentu. Amidy i azidy nacházející se v molekule jsou v kyselém prostředí stabilní, což tvoří z Bocu ideální chránicí skupinu pro tento případ.

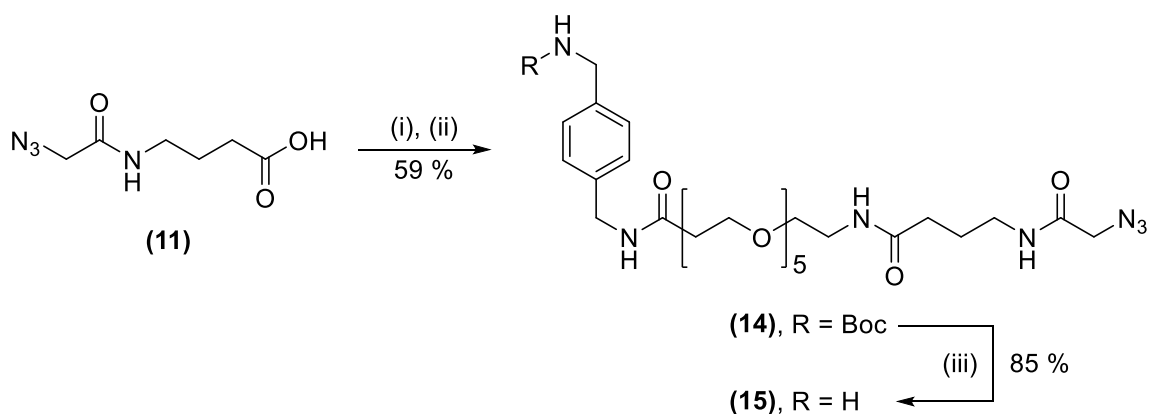
**Schéma 4.7** Příprava benzylaminového derivátu opatřeného pentaethylenglykolovou spojkou (**13**)



(i) DIPEA, DMF, rt, 1 h; (ii) H<sub>2</sub>, Pd/C, THF, rt, 1 h

Testovací experiment couplingu derivátu GABA (**11**) s nepřečištěným intermediátem aminu (**13**) probíhal s nízkým výtěžkem. Před provedením experimentu ve větším měřítku byl tudíž vzniklý amin (**13**) po redukci nejdříve přečištěn. Pro aktivaci kyseliny (**11**) bylo zvoleno činidlo HBTU, jehož aktivita se pohybuje mezi HATU a TSTU. Coupling aminu (**13**) s kyselinou (**11**) probíhal s průměrným výtěžkem. Vzniklá sloučenina (**14**) byla po extrakci získána ve vysoké čistotě a použita do následujícího kroku. Chránící skupina byla odstraněna pomocí TFA a v této fázi byla sloučenina přečištěna pomocí reverzní chromatografie. Vzniklý amin (**15**) byl dále použit do amidového couplingu se skeletem inhibitoru (**4**).

**Schéma 4.8** Příprava benzylaminového fragmentu opatřeného spojkou (**15**)

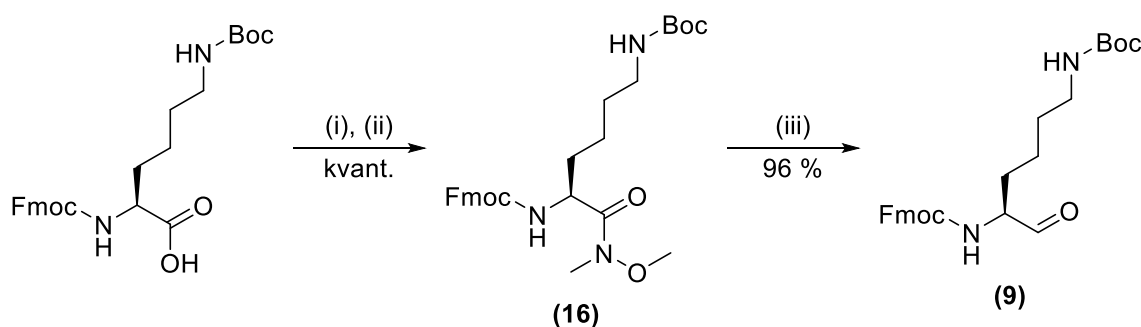


(i) HBTU, DIPEA, DMF, 0 °C, 10 min; (ii) sloučenina (**13**), 0 °C → rt, 2 h; (iii) TFA, DCM, rt, 30 min

## 4.4 Příprava skeletu inhibitoru

Pro provedení Passeriniho reakce bylo potřeba připravit aldehyd odvozený od kyseliny Fmoc-Lys(Boc)-OH. Redukce kyseliny na aldehyd je obecně obtížně kontrolovatelná. Běžně používaná redukční činidla (například  $\text{LiAlH}_4$  či DIBALH) mohou být příliš reaktivní a redukovat vzniklý aldehyd dále na alkohol. Místo obtížně kontrolovatelné parciální redukce kyseliny byl zvolen přístup přes Weinrebův amid.<sup>63,64</sup> Přestože se jedná o dvoukrokou sekvenci, její výtěžnost bývá vyšší než u přímé redukce výchozí kyseliny. Vznikající aldehyd lze po rozložení reakční směsi, extrakci a odpaření rozpouštědla izolovat ve vysoké čistotě. Prvním krokem tedy bylo vytvoření Weinrebova amidu za využití *N,O*-dimethylhydroxylaminu a činidla HATU.<sup>65</sup> Vzniklý produkt (**16**) nebylo po extrakci potřeba dále čistit. Sloučenina (**16**) byla následně redukována za nízké teploty pomocí  $\text{LiAlH}_4$  v THF. Aldehydy odvozené od  $\alpha$ -aminokyselin podléhají racemizaci z důvodu snadné enolizace. Vzhledem k přítomnosti jediného stereogenního centra ve vzniklém aldehydu (**9**) by nebylo snadné sledovat, zda k tomuto jevu dochází. Aldehyd (**9**) tudíž nebyl čištěn pomocí sloupcové chromatografie a byl použit přímo do Passeriniho reakce.

Schéma 4.9 Příprava aldehydu (**9**) pro Passeriniho reakci



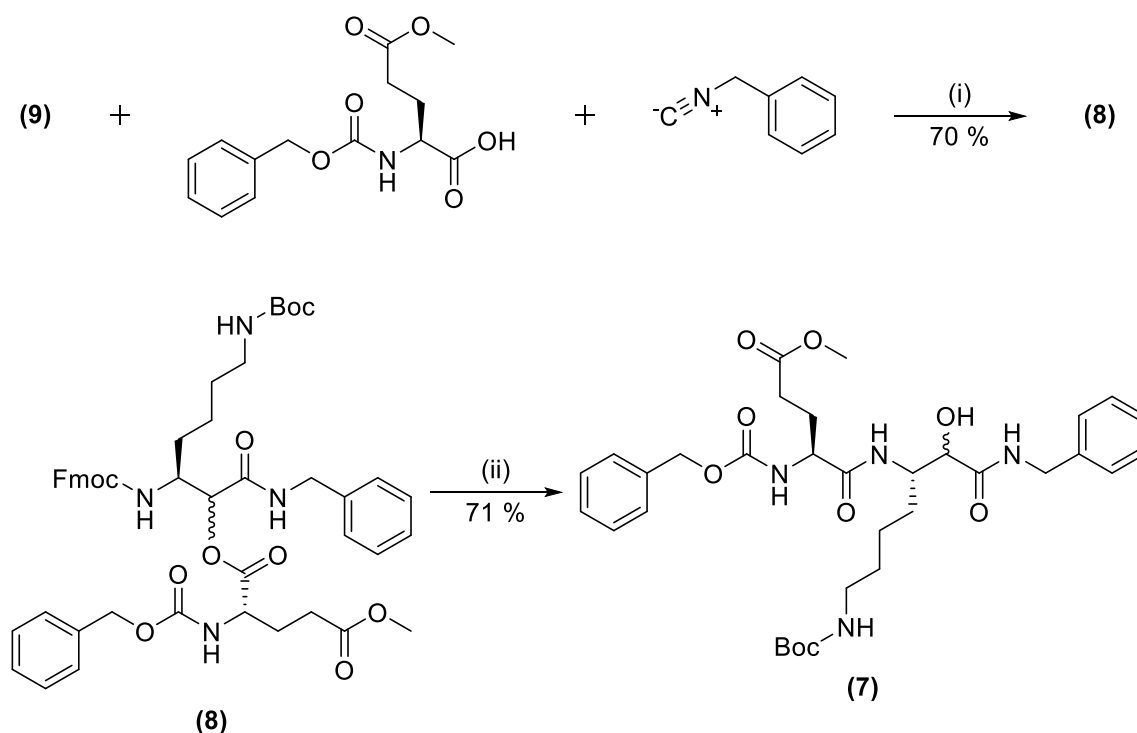
(i) HATU, DIPEA, DMF, 0 °C, 10 min; (ii) *N,O*-dimethylhydroxylamin hydrochlorid, 0 °C → rt, 90 min; (iii)  $\text{LiAlH}_4$ , THF, - 78 °C, 3 h

Za využití Passeriniho reakce lze jedním reakčním krokem připravit pokročilý  $\alpha$ -acyloxyamidový motiv.<sup>61,66</sup> Kondenzací kyseliny Cbz-Glu(OMe)-OH, benzyl izokyanidu a chráněného  $\alpha$ -aminoaldehydu (**9**) lze připravit dříve zmíněný  $\alpha$ -acyloxyamidový motiv. Při následném odstranění chránící skupiny aminu a intramolekulární migraci acylového fragmentu vzniká  $\beta$ -acylamino- $\alpha$ -hydroxy motiv přítomný ve sloučenině (**8**). Tento motiv, případně jeho



oxidovaná forma ( $\beta$ -acylamino- $\alpha$ -keto), je zajímavý z farmaceutického hlediska, jelikož se vyskytuje ve struktuře inhibitorů různých proteáz.<sup>67,68</sup> Jako chránící skupina aminu u výchozího aldehydu (**9**) byl zvolen Fmoc, což umožňuje odstranění chránící skupiny a migraci acylu v jednom kroku. Přidáním nadbytku piperidinu ke sloučenině (**8**) byl získán  $\alpha$ -hydroxyamid (**7**), jež byl následně přečištěn pomocí reverzní chromatografie. Směsi diastereoizomerů sloučenin (**8**) a (**7**) nebylo možné chromatograficky oddělit, ale jejich existence byla pozorovatelná v NMR spektrech. Štěpení signálů v <sup>13</sup>C NMR se projevilo výrazněji než u <sup>1</sup>H NMR spekter a tudíž znemožňovalo jejich interpretaci.

**Schéma 4.10** Příprava  $\beta$ -acylamino- $\alpha$ -hydroxy derivátu (**7**) za použití PADAM sekvence

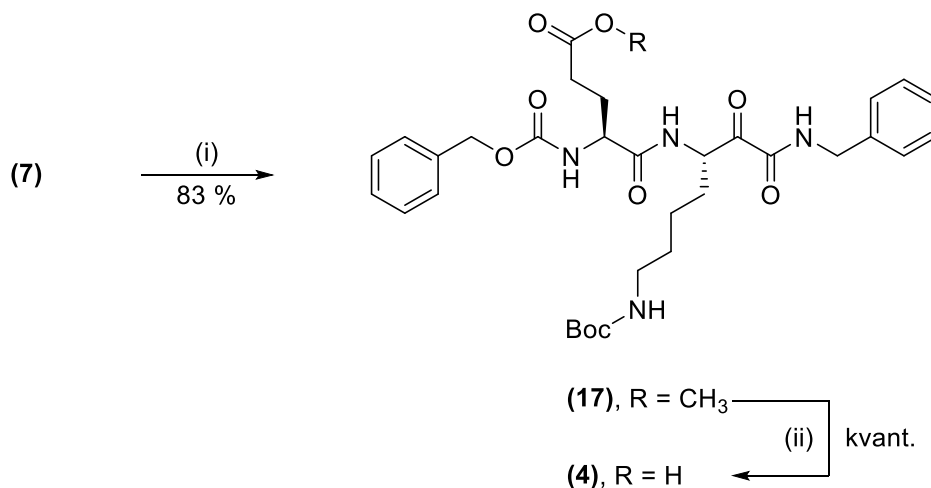


(i) DCM, rt, 16 h; (ii) piperidin, DCM, rt, 16 h

Směs diastereoizomerů (**8**) i (**7**) nebylo nutné separovat, jelikož dalším krokem syntézy byla oxidace  $\alpha$ -hydroxyamidu (**7**) na  $\alpha$ -ketoamid (**17**), čímž stereogenní centrum zaniklo. Bylo použito činidlo na bázi hypervalentního jodu: DMP (Dess-Martin Periodinane). Jedná se o jemné oxidační činidlo, jež se kromě oxidace sekundárních alkoholů na ketony využívá především na oxidaci primárních alkoholů na aldehydy.<sup>69</sup> Po provedení reakce byla sloučenina přečištěna pomocí reverzní chromatografie. Methylester (**17**) byl převeden na volnou

kyselinu (**4**) v bazickém prostředí NaOH, jež nebyla dále čištěna před amidovým couplingem s aminem (**15**).

*Schéma 4.11 Příprava skeletu inhibitoru (**4**) pro amidový coupling*

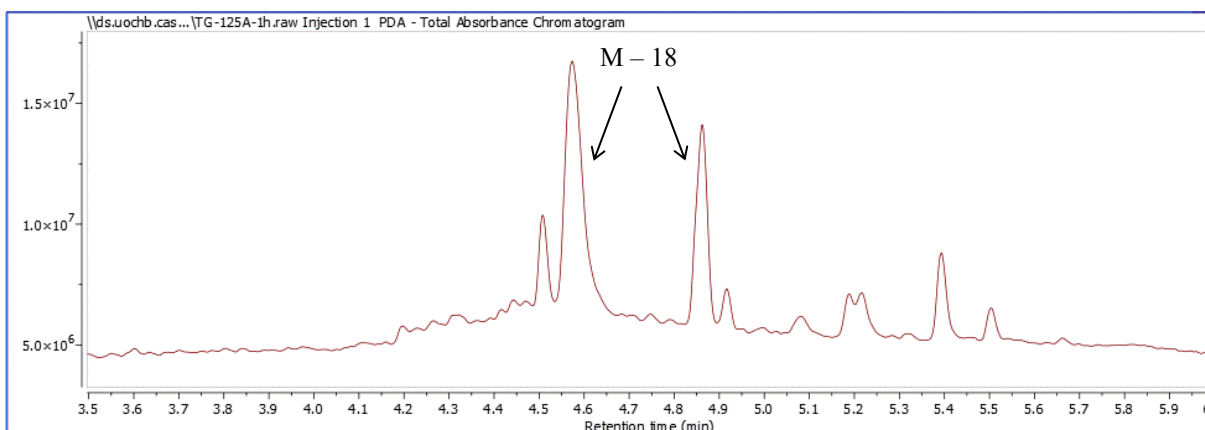


(i) DMP, DCM, rt, 2,5 h; (ii) NaOH, MeOH:H<sub>2</sub>O 3:1, rt, 2 h

#### 4.5 Syntéza cílové molekuly

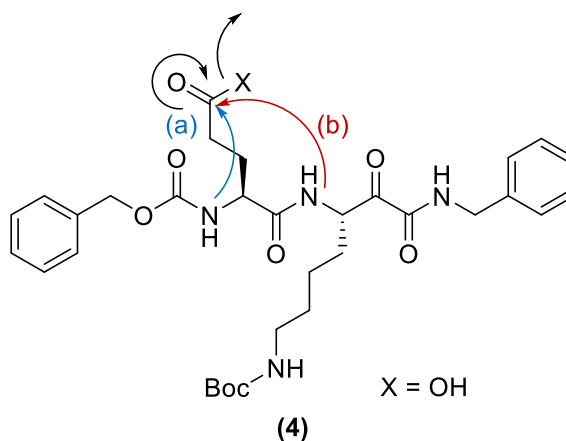
Klíčovým krokem syntézy bylo spojení skeletu inhibitoru (**4**) se spojkou opatřeným benzylaminovým fragmentem (**15**) pomocí amidového couplingu. Testovací experiment couplingu kyseliny (**4**) s modelovým aminem H-Phe-OtBu neposkytl předpokládaný produkt. Z analýzy UPLC-MS chromatogramu bylo zřetelné, že amin zůstal v reakční směsi, kdežto kyselina byla spotřebována. Byly tedy provedeny testovací experimenty, kdy byl pozorován průběh aktivace kyseliny a její stabilita za použití různých aktivačních činidel. V přítomnosti HATU a báze DIPEA bylo po necelé hodině pozorováno spotřebování výchozí kyseliny (**4**) za vzniku neznámého produktu. Na UPLC-MS chromatogramu bylo možné pozorovat vznik nových sloučenin, jež se nacházely, oproti původní kyselině, v méně polární oblasti. Jejich hmotnostní spektrum naznačovalo úbytek pozorované molekulové hmotnosti o 18 jednotek (Obrázek 4.4).

**Obrázek 4.4** HPLC analýza intramolekulární cyklizace s UV detekcí: reakční směs aktivace kyseliny (4) s použitím HATU a DIPEA



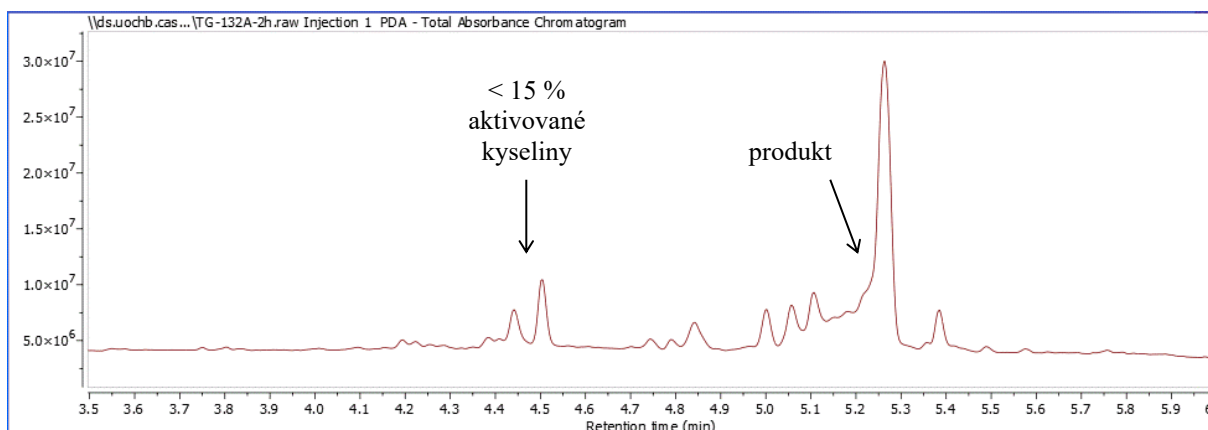
Vzniklé sloučeniny dále nereagovaly ani po přidání aminu. Úbytek pozorované hmotnosti o 18 jednotek může znamenat ztrátu molekuly vody. Tyto skutečnosti naznačovaly, že neznámým produktem není žádaný aktivovaný ester kyseliny, nýbrž se jedná o produkt intramolekulární cyklizace. Pokud předpokládáme vznik cyklů běžné velikosti, jsou patrné dvě možnosti cyklizace, za vzniku pěti-, či šestičlenného cyklu, jak je naznačeno na Schématu 4.12 níže. Tyto dvě možnosti by mohly vysvětlovat vznik dvou různých sloučenin o stejné molekulové hmotnosti. Stejná situace se opakovala při použití TSTU v přítomnosti báze DIPEA (i za chlazení ledovou lázní), pouze se změnil poměr vznikajících produktů.

**Schéma 4.12** Schéma intramolekulární cyklizace kyseliny (4)



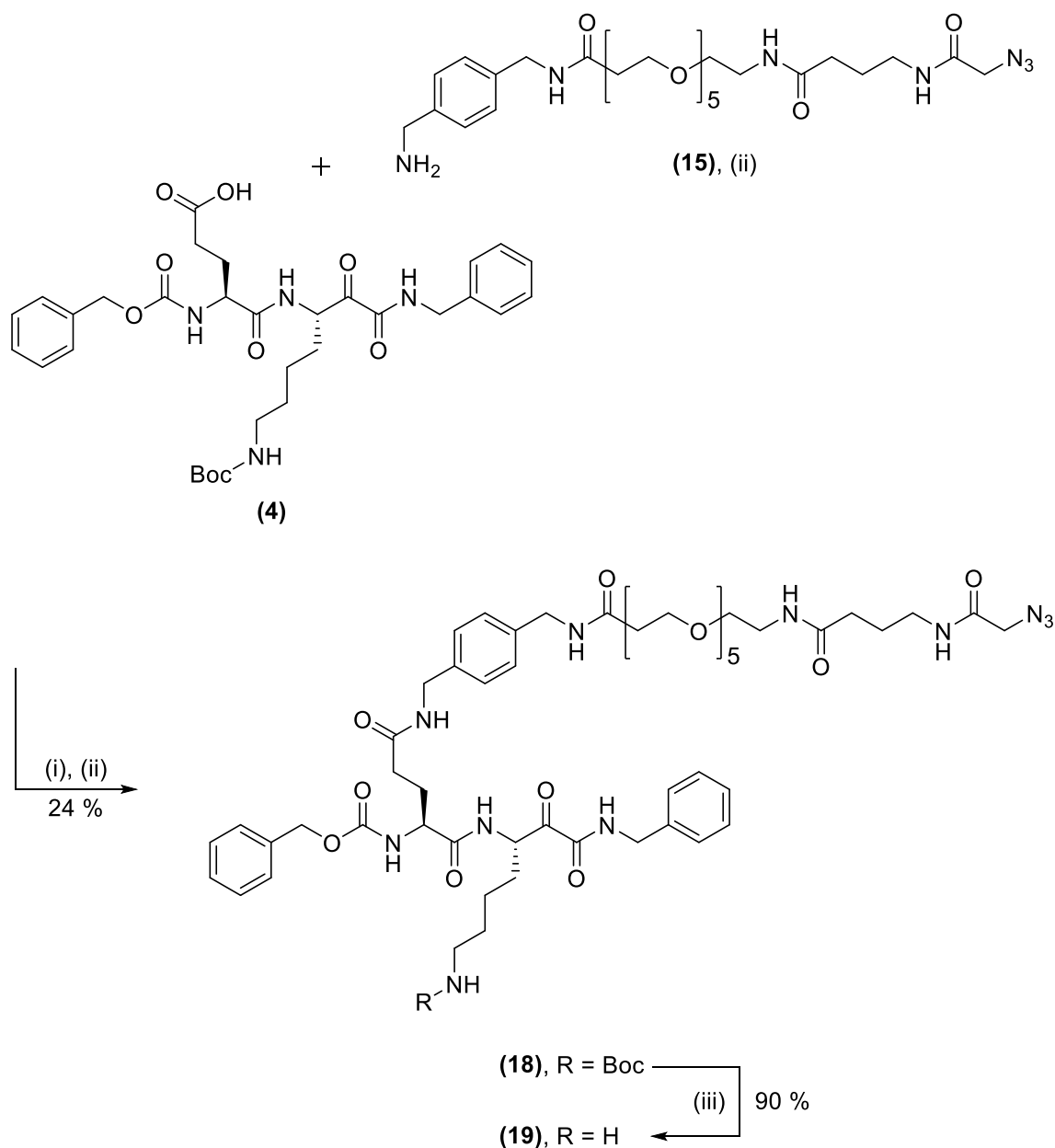
Fenomén cyklizace amidů derivátů glutamátu při aktivaci  $\gamma$ -karboxylové kyseliny byl zkoumán v řadě studií. Autoři článku<sup>70</sup> z roku 2009 doporučují k omezení cyklizace použití slabší báze. Při použití 2,4,6-kolidinu se míra cyklizace výrazně snížila. I v případě aktivnějšího HATU bylo po jedné hodině pozorováno jen malé množství produktu cyklizace. Po třech hodinách byl poměr cyklizované formy vůči aktivované formě kyseliny zhruba 1:1. Dalším krokem po výběru vhodné báze bylo provedení testovacích experimentů s modelovou aminokyselinou H-Phe-OtBu (připravený benzylaminový fragment se spojkou byl příliš cenný intermediát pro použití v optimalizaci podmínek). Pro tyto pokusy byla vybrána činidla HBTU a PyBOP. V případě HBTU byl po 15 minutách aktivace v přítomnosti 2,4,6-kolidinu přidán amin H-Phe-OtBu. Činidlo PyBOP nereaguje s aminy a tudíž mohly být reaktanty smíchány bez předešlé aktivace. Po dvou hodinách v případě PyBOPu nezreagovalo přes 20 % výchozí kyseliny (**4**), u HBTU činil tento podíl oproti produktu pouze necelých 15 % (Obrázek 4.5).

**Obrázek 4.5** HPLC analýza testovacího experimentu amidového couplingu za použití 2,4,6-kolidinu a HBTU s UV detekcí



Pro amidový coupling skeletu inhibitoru (**4**) s benzylaminovým fragmentem (**15**) byly vybrány podmínky aktivace s HBTU v přítomnosti 2,4,6-kolidinu. Kyselina byla aktivována po dobu 10 minut za současného chlazení ledovou lázní, po přidání aminu (**15**) byla reakční směs ponechána za laboratorní teploty přes noc. Výtěžek po přečištění preparativním HPLC byl 24 %. Jedná se o poměrně velké molekuly reagující v malé koncentraci, cyklizace tedy mohla částečně probíhat kvůli prodlouženému reakčnímu času, což mohlo mít vliv na výtěžek. Posledním krokem syntézy bylo odstranění chránící skupiny Boc ve sloučenině (**18**) za použití TFA. Následnou preparativní HPLC chromatografií byla získána cílová molekula (**19**).

Schéma 4.13 Příprava cílové sloučeniny (19)



(i) HBTU, 2,4,6-kolidin, DMF, 0 °C, 10 min; (ii) sloučenina (15), 0 °C → rt, 16 h; (iii) TFA, DCM, rt, 30 min

#### 4.6 Testování připravené sloučeniny

Sloučenina (19) byla předána kolegům z biochemického oddělení. Pro určení aktivity gingipainu v přítomnosti (19) byl použit postup enzymatické eseje dle Potempy et. al.<sup>71</sup> Tato esej je založena na enzymatické hydrolýze syntetického substrátu peptidového typu, který má lysinové reziduum v pozici P1 a zároveň nese chromogenní nebo fluorogenní skupinu. Štěpení

substrátu vede k zabarvení roztoku či emisi fluorescence, jejichž intenzita je přímo úměrná aktivitě enzymu. *P. gingivalis* navíc neprodukuje další proteázy specifické pro lysin, a tak je možné pro měření použít jak purifikovaný rekombinantní enzym, tak přímo bakteriální kultury.<sup>72</sup> Přestože je měření aktivity pomocí fluorogenních substrátů obecně citlivější, chromogenní substráty na bázi *p*-nitroanilinu jsou v tomto případě preferovány. Při použití surových kultur totiž nedochází ke zhášení fluorescence roztokem média a jsou navíc i cenově dostupnější.

Stanovení inhibiční koncentrace  $IC_{50}$  a inhibiční konstanty  $K_i$  bylo provedeno chromogenní esejí se substráty na bázi *p*-nitroanilinu dle zmíněného protokolu.<sup>71</sup> Inhibiční koncentrace sloučeniny (**19**) byla stanovena na  $IC_{50} = 4,5$  nM. Hodnota inhibiční konstanty ( $K_i$ ) sloučeniny (**19**) byla stanovena v kvadruplikátu na  $K_i = 70 \pm 65$  pM, což se velmi dobře shoduje s hodnotou  $K_i$  původního inhibitoru ( $K_{i, KYT-36} = 75$  pM).

## 5. Experimentální část

### 5.1 Použité přístroje a chemikálie

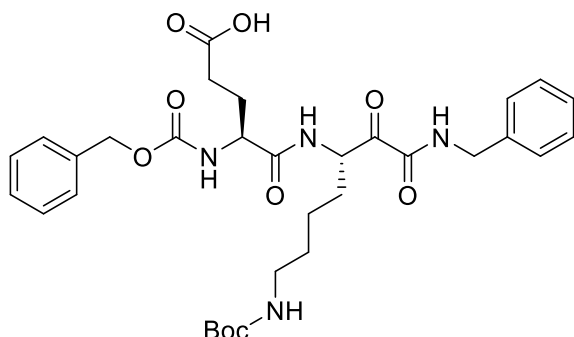
Výchozí reaktanty a všechna rozpouštědla byly použity ve stavu, v jakém byly získány z komerčních zdrojů (Fluorochem, TCI, Merck). Reakční směsi byly analyzovány metodou UPLC-MS za použití UPLC přístroje Waters UPLC H-Class Core System na koloně s reverzní fází Waters Acquity UPLC BEH C18, 1.7  $\mu\text{m}$ , 2.1 x 100 mm s detekcí Waters Acquity UPLC PDA diodového pole v oblasti 190 – 800 nm v kombinaci s přístrojem pro hmotnostní spektrometrii Waters SQD2 Mass spectrometer řízeném pomocí softwaru MassLynx. Pro sledování průběhu hydrogenace a sloupcové chromatografie byly použity TLC hliníkové desky s vrstvou silikagelu 60 F<sub>254</sub> od firmy Merck. Detekce byla prováděna za využití UV lampy ( $\lambda = 254 \text{ nm}$ ).

Pro separace sloupcovou chromatografií byl použit silikagel 60 (0,040 – 0,063 mm; Fluka). Separace za použití reverzní stacionární fáze C18 na koloně byly prováděny na zařízení Isco Teledyne pro FCC chromatografii, při vlnových délkách detektoru 210 nm a 254 nm po dobu 18 – 30 minut za průtoku 25 – 40 ml/min (v závislosti na množství separované směsi a velikosti použité kolony). Čištění pomocí preparativního HPLC probíhalo za použití přístroje od firmy Jasco Inc. (průtok 10 ml/min, délka programu 60 minut) na koloně s reverzní stacionární fází Reprosil 100 C18, 5  $\mu\text{m}$ , 250 mm  $\times$  4 mm s UV detekcí při  $\lambda = 210 \text{ nm}$ .

NMR spektra  $^1\text{H}$  a  $^{13}\text{C}$  byla naměřena na přístroji Bruker Avance III<sup>TM</sup> HD 400 MHz Prodigy s kryosondou ( $^1\text{H}$  při 400 MHz,  $^{13}\text{C}$  při 100 MHz). Byla použita rozpouštědla  $\text{CDCl}_3$  a  $\text{CD}_3\text{OD}$ . Hmotnostní spektra o nízkém rozlišení byla měřena pomocí kvadrupólového ortogonálního zrychlení doby letu tandemovým hmotnostním spektrometrem Q-TOF Micro (Waters), spektra o vysokém rozlišení na přístroji ZS Micromass Mass Spectrometer (Waters) vybaveném vícemódovým zdrojem iontů ESCi a řízeném pomocí softwaru MassLynx.

## 5.2 Pracovní postupy

### Kyselina (S)-5-(((S)-1-(benzylamino)-7-((*tert*-butoxykarbonyl)amino)-1,2-dioxoheptan-3-yl)amino)-4-(((benzyloxy)karbonyl)amino)-5-oxopentanová (4)



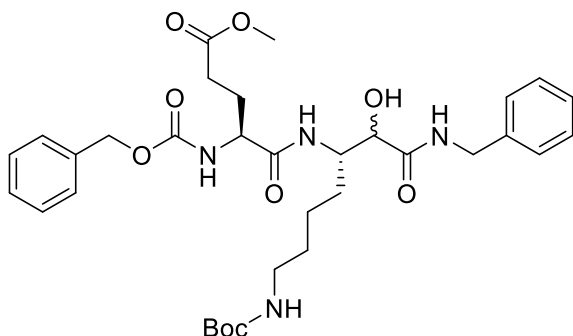
K roztoku sloučeniny (**17**) (60 mg; 93,6  $\mu\text{mol}$ ; 1,0 ekv.) v MeOH:H<sub>2</sub>O / 3:1 (5 ml) byl přidán 1M vodný roztok hydroxidu sodného (280  $\mu\text{l}$ ; 0,28 mmol; 3,0 ekv.). Reakční směs byla míchána za laboratorní teploty po dobu 2 hodin, konverze byla sledována pomocí UPLC–MS. Následně bylo pH reakční směsi upraveno na hodnotu 2 přidávkem 10% vodného roztoku KHSO<sub>4</sub>, byla přidána solanka (10 ml) a produkt byl extrahován DCM (4 x 15 ml). Organický extrakt byl následně sušen bezvodým MgSO<sub>4</sub>, suspenze byla poté přefiltrována a rozpouštědlo odpařeno. Bylo získáno 58 mg (kvant.) bílé amorfni látky.

**ESI MS:** 625 ([M – H]<sup>–</sup>). **HR ESI MS:** vypočteno pro C<sub>32</sub>H<sub>41</sub>O<sub>9</sub>N<sub>4</sub><sup>–</sup> 625,28790; nalezeno 625,28760. **<sup>1</sup>H NMR:** (400 MHz, CD<sub>3</sub>OD)  $\delta$  1,21 – 1,53 (m, 6H); 1,42 (s, 9H); 1,82 – 2,12 (m, 2H); 2,34 – 2,46 (m, 2H); 2,88 – 3,07 (m, 2H); 3,99 – 4,24 (m, 2H); 4,35 – 4,47 (m, 2H); 5,01 – 5,18 (m, 2H); 7,19 – 7,25 (m, 2H); 7,25 – 7,39 (m, 10H).

Z důvodu existence rotamerů a možných hemiacetalů, které způsobovaly výrazné rozštěpení signálů ve spektru <sup>13</sup>C, nebylo naměřené spektrum interpretováno.



**Methyl-(4*S*)-5-(((3*S*)-1-(benzylamino)-7-((*tert*-butoxykarbonyl)amino)-2-hydroxy-1-oxoheptan-3-yl)amino)-4-(((benzyloxy)karbonyl)amino)-5-oxopentanoát (7)**

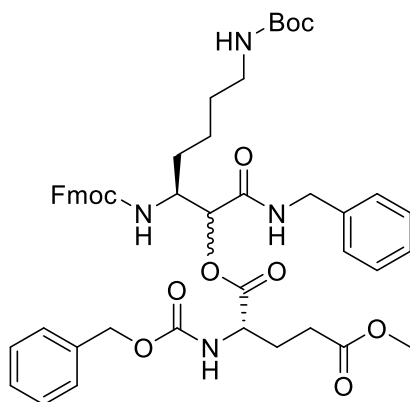


K roztoku sloučeniny **(8)** (0,64 g; 0,74 mmol 1,0 ekv.) v DCM (8 ml) byl přidán piperidin (0,80 ml; 7,4 mmol; 10,0 ekv.). Reakční směs byla míchána přes noc za laboratorní teploty. Následně bylo rozpouštědlo odpařeno a odparek byl sušen na vysokém vakuu. Reverzní chromatografie odparku (C18 reverzní silikagel, gradient H<sub>2</sub>O (0,1 % TFA):MeCN 98:2 → 0:100) poskytla po následné lyofilizaci 340 mg (71 %) bílé amorfnní látky.

**ESI MS:** 665 ([M + Na]<sup>+</sup>). **HR ESI MS:** vypočteno pro C<sub>33</sub>H<sub>46</sub>O<sub>9</sub>N<sub>4</sub>Na<sup>+</sup> 665,31570; nalezeno 665,31476. **<sup>1</sup>H NMR:** (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 1,19 – 1,50 (m, 4H); 1,41 (s, 9H); 1,50 – 1,77 (m, 2H); 1,78 – 2,13 (m, 2H); 2,28 – 2,48 (m, 2H); 3,00 (m, 2H); 3,62 (s, 3H); 4,09 – 4,29 (m, 3H); 4,31 – 4,46 (m, 2H); 4,69 – 4,94 (m, 1H); 4,99 – 5,12 (m, 2H); 6,02 (bs, 1H); 7,11 (m, 1H); 7,20 – 7,34 (m, 10H); 7,35 – 7,46 (m, 2H).

Z důvodu existence diastereoisomerů, které způsobovaly výrazné rozštěpení signálů ve spektru <sup>13</sup>C, nebylo naměřené spektrum interpretováno.

**1-((3*S*)-3-(((9*H*-Fluoren-9-yl)methoxy)karbonyl)amino)-1-(benzylamino)-7-((*tert*-butoxykarbonyl)amino)-1-oxoheptan-2-yl)-5-methyl-((benzyloxy)karbonyl)-*L*-glutamát (8)**

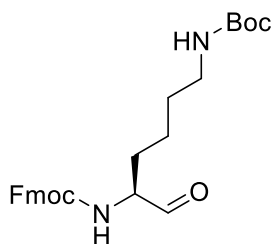


K roztoku kyseliny Cbz-Glu(OMe)-OH (0,56 g; 1,88 mmol; 1,0 ekv.) a aldehydu (9) (0,85 g; 1,88 mmol; 1,0 ekv.) v bezvodém DCM (15 ml) pod ochrannou atmosférou dusíku byl přidán benzyl isokyanid (252  $\mu$ l; 2,07 mmol; 1,1 ekv.). Reakční směs byla míchána pod ochrannou atmosférou dusíku za laboratorní teploty přes noc. Poté byl přidán 10% vodný roztok KHSO<sub>4</sub> (10 ml) a směs byla intenzivně míchána po dobu 30 minut. Následně byl přidán DCM (80 ml), organická vrstva byla promyta 10% vodným roztokem KHSO<sub>4</sub> (2 x 80 ml), nasyceným roztokem NaHCO<sub>3</sub> (2 x 80 ml) a solankou (1 x 50 ml). Organický extrakt byl následně sušen bezvodým MgSO<sub>4</sub>, suspenze byla poté přefiltrována a rozpouštědlo odpařeno. Sloupcová chromatografie odparku (300 ml silikagel, mobilní fáze DCM:MeOH / 40:1 poté 15:1) poskytla 1,14 g (70 %) žluté amorfnní látky.

**ESI MS:** 887 ([M + Na]<sup>+</sup>). **HR ESI MS:** vypočteno pro C<sub>48</sub>H<sub>56</sub>O<sub>11</sub>N<sub>4</sub>Na<sup>+</sup> 887,38378; nalezeno 887,38328. **<sup>1</sup>H NMR:** (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$  1,35 – 1,80 (m, 6H); 1,41 (m, 9H); 1,98 – 2,36 (m, 2H); 2,37 – 2,56 (m, 2H); 2,90 – 3,23 (m, 2H); 3,61 (s, 0,9H); 3,66 (s, 2,1H); 4,01 – 4,25 (m, 2H); 4,28 – 4,43 (m, 2H); 4,44 – 4,65 (m, 2H); 4,67 – 5,00 (m, 2H); 5,26 – 5,45 (m, 1H); 5,81 – 5,94 (m, 0,7H); 6,23 – 6,32 (m, 0,3H); 7,12 – 7,17 (m, 1H); 7,17 – 7,34 (m, 12H); 7,35 – 7,43 (m, 2H); 7,51 – 7,64 (m, 2H); 7,67 (m, 1H); 7,71 – 7,79 (m, 2H).

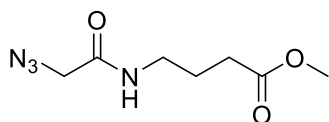
Z důvodu existence diastereoisomerů, které způsobovaly výrazné rozštěpení signálů ve spektru <sup>13</sup>C, nebylo naměřené spektrum interpretováno.

### (9*H*-Fluoren-9-yl)methyl-*tert*-butyl-(6-oxohexan-1,5-diyl)(*S*)-dikarbamat (9)



Roztok sloučeniny (**16**) (1,00 g; 1,96 mmol; 1,0 ekv.) v bezvodém THF (10 ml) byl vychlazen na  $-78\text{ }^{\circ}\text{C}$  pod ochrannou atmosférou dusíku. Následně byl k reakční směsi během 20 minut postupně přikapán 1M roztok  $\text{LiAlH}_4$  v THF (4,00 ml; 4,00 mmol; 2,0 ekv.). Reakční směs byla míchána pod ochrannou atmosférou dusíku za teploty  $-78\text{ }^{\circ}\text{C}$  po dobu 3 hodin, konverze byla sledována pomocí UPLC–MS. Poté byla reakční směs rozložena přidávkem nasyceného roztoku vinanu draselno-sodného (70 ml) a produkt byl extrahován DCM (3 x 80 ml). Spojené organické extrakty byly sušeny bezvodým  $\text{MgSO}_4$ , suspenze byla poté přefiltrována a rozpouštědlo odpařeno. Bylo získáno 850 mg (96 %) bílé amorfnní látky, která byla dále použita bez čištění.

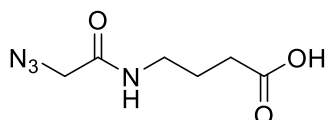
### Methyl-4-(2-azidoacetamido)butanoát (10)



K roztoku kyseliny 2-azidoctové (0,20 g; 1,98 mmol; 1,0 ekv.) a TSTU (0,60 g; 1,98 mmol; 1,0 ekv.) v bezvodém DMF (5 ml) byla za míchání přidána DIPEA (1,03 ml; 5,93 mmol; 3,0 ekv.). Po 1 hodině byl přidán hydrochlorid methyl esterukyseliny  $\gamma$ -aminomáselné (304 mg; 1,98 mmol; 1,0 ekv.) a reakční směs byla míchána přes noc za laboratorní teploty. Následně bylo rozpouštědlo odpařeno. Odparek byl rozpuštěn ve směsi DCM:*i*PrOH / 10:1 (10 ml) a nasyceného roztoku  $\text{NaHCO}_3$  (10 ml) a směs byla intenzivně míchána po dobu 15 minut. Organická vrstva byla poté oddělena, produkt byl z vodné vrstvy extrahován tímto způsobem celkem čtyřikrát. Spojené organické extrakty byly sušeny bezvodým  $\text{MgSO}_4$ , suspenze byla poté přefiltrována a rozpouštědlo odpařeno. Preparativní HPLC odparku (C18 reverzní silikagel, gradient  $\text{H}_2\text{O}$  (0,1 % TFA):MeCN 98:2  $\rightarrow$  70:30) poskytlo po následné lyofilizaci 140 mg (35 %) hnědé olejovité látky.

**ESI MS:** 223 ( $[M + Na]^+$ ). **HR ESI MS:** vypočteno pro  $C_7H_{13}O_3N_4^+$  201,09822; nalezeno 201,09824.  **$^1H$  NMR:** (400 MHz,  $CDCl_3$ )  $\delta$  1,86 (p,  $J = 7,0$  Hz, 2H); 2,37 (t,  $J = 7,2$  Hz, 2H); 3,33 (td,  $J = 6,9; 5,8$  Hz, 2H); 3,68 (s, 3H); 3,96 (s, 2H); 6,58 (s, 1H).  **$^{13}C$  NMR:** (100 MHz,  $CDCl_3$ )  $\delta$  24,5; 31,5; 39,0; 51,9; 52,8; 166,9; 173,8.

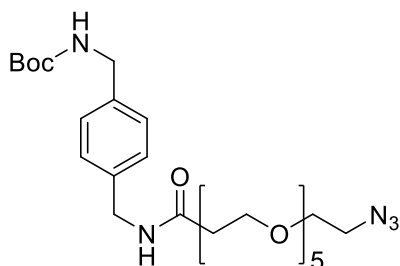
#### Kyselina 4-(2-azidoacetamido)butanová (11)



K roztoku sloučeniny (10) (50 mg; 0,25 mmol; 1,0 ekv.) v  $MeOH:H_2O / 1:1$  (2 ml) byl přidán 1M vodný roztok hydroxidu sodného (1,00 ml; 1,00 mmol; 4,0 ekv.). Reakční směs byla míchána za laboratorní teploty po dobu 2 hodin, konverze byla sledována pomocí UPLC–MS. Následně bylo pH reakční směsi upraveno přidávkem 10% vodného roztoku  $KHSO_4$  (15 ml), byla přidána směs  $DCM:iPrOH / 10:1$  (10 ml) a vzniklá směs byla intenzivně míchána po dobu 15 minut. Organická vrstva byla poté oddělena, produkt byl z vodné vrstvy extrahován tímto způsobem celkem šestkrát. Spojené organické extrakty byly sušeny bezvodým  $MgSO_4$ , suspenze byla poté přefiltrována a rozpouštědlo odpařeno. Bylo získáno 42 mg (90 %) čiré olejovité látky, která byla dále použita bez čištění.

**ESI MS:** 209 ( $[M + Na]^+$ ). **HR ESI MS:** vypočteno pro  $C_6H_{10}O_3N_4Na^+$  209,06451; nalezeno 209,06449.  **$^1H$  NMR:** (400 MHz,  $CD_3OD$ )  $\delta$  1,81 (p,  $J = 7,2$  Hz, 2H); 2,33 (t,  $J = 7,4$  Hz, 2H); 3,27 (t,  $J = 7,0$  Hz, 2H); 3,87 (s, 2H).  **$^{13}C$  NMR:** (100 MHz,  $CD_3OD$ )  $\delta$  25,7; 32,1; 39,8; 53,0; 170,2; 176,8.

#### *tert*-Butyl-(4-(20-azido-3-oxo-6,9,12,15,18-pentaoxa-2-azaikosyl)benzyl)karbamát (12)

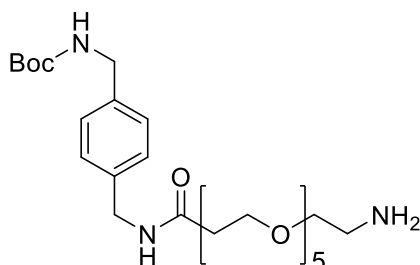


K roztoku  $SuOOC-(PEG)_5-N_3$  (180 mg; 0,42 mmol; 1,0 ekv.) a *tert*-butyl-4-(aminomethyl)benzylkarbamátu (98 mg; 0,42 mmol; 1,0 ekv.) v bezvodém DMF (5 ml) byla

za míchání přidána DIPEA (220  $\mu$ l; 1,25 mmol; 3,0 ekv.). Reakční směs byla míchána za laboratorní teploty po dobu 1 hodiny, konverze byla sledována pomocí UPLC–MS. Následně bylo rozpouštědlo odpařeno. Odparek byl rozpuštěn v DCM (15 ml), organická vrstva byla promyta 10% vodným roztokem KHSO<sub>4</sub> (2 x 15 ml), vodné vrstvy byly spojeny a extrahovány DCM (15 ml). Organické extrakty byly spojeny a promyty nasyceným roztokem NaHCO<sub>3</sub> (2 x 30 ml), vodné vrstvy byly spojeny a promyty DCM (30 ml). Organické extrakty byly následně sušeny bezvodým MgSO<sub>4</sub>, suspenze byla poté přefiltrována a rozpouštědlo odpařeno. Bylo získáno 227 mg (kvant.) nažloutlé olejovité látky, která byla dále použita bez čištění.

**ESI MS:** 576 ([M + Na]<sup>+</sup>). **HR ESI MS:** vypočteno pro C<sub>26</sub>H<sub>44</sub>O<sub>8</sub>N<sub>5</sub><sup>+</sup> 554,31844; nalezeno 554,31838. **<sup>1</sup>H NMR:** (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$  1,45 (s, 9H); 2,51 (t,  $J$  = 5,7 Hz, 2H); 3,36 (dd,  $J$  = 5,6; 4,6 Hz, 2H); 3,55 – 3,68 (m, 18H); 3,74 (t,  $J$  = 5,7 Hz, 2H); 4,27 (d,  $J$  = 6,0 Hz, 2H); 4,42 (d,  $J$  = 5,9 Hz, 2H); 4,91 (s, 1H); 6,88 (t,  $J$  = 6,3 Hz, 1H); 7,20 – 7,25 (m, 4H). **<sup>13</sup>C NMR:** (100 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$  28,5; 37,1; 43,1; 44,5; 50,8; 67,4; 70,2; 70,4; 70,4; 70,6; 70,6; 70,6; 70,7; 70,8; 70,8; 70,8; 79,6; 127,8; 127,9; 137,9; 138,1; 156,0; 171,7.

#### ***tert*-Butyl-(4-(20-amino-3-oxo-6,9,12,15,18-pentaoxa-2-azaikosyl)benzyl)karbamát (13)**

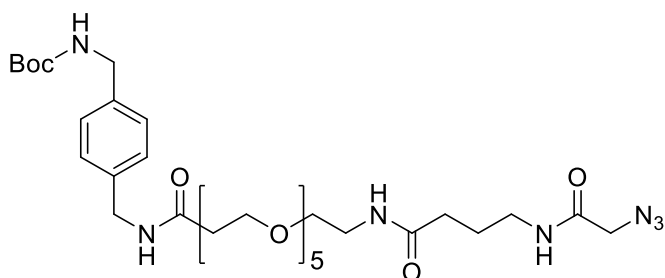


K roztoku sloučeniny (**12**) (60 mg; 0,11 mmol) v bezvodém THF (10 ml) bylo přidáno Pd/C (6 mg; 10% *m/m*). Reakční směs byla probublávána vodíkem za laboratorní teploty po dobu 1 hodiny, konverze byla sledována pomocí TLC. Reakční směs byla následně přefiltrována a rozpouštědlo odpařeno. Preparativní HPLC odparku (C18 reverzní silikagel, gradient H<sub>2</sub>O (0,1 % TFA):MeCN 90:10 → 60:40) poskytlo po následné lyofilizaci 41 mg (72 %) žluté olejovité látky.

**ESI MS:** 528 ([M + H]<sup>+</sup>). **HR ESI MS:** vypočteno pro C<sub>26</sub>H<sub>45</sub>O<sub>8</sub>N<sub>3</sub>Na<sup>+</sup> 550,30989; nalezeno 550,30964. **<sup>1</sup>H NMR:** (400 MHz, CD<sub>3</sub>OD)  $\delta$  1,45 (s, 9H); 2,51 (t,  $J$  = 5,9 Hz, 2H); 3,09 (t,  $J$  = 5,0 Hz, 2H); 3,58 – 3,73 (m, 18H); 3,77 (t,  $J$  = 5,9 Hz, 2H); 4,20 (s, 2H); 4,37 (s,

2H); 7,21 – 7,27 (m, 4H).  $^{13}\text{C}$  NMR: (100 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ )  $\delta$  28,8; 37,4; 40,5; 43,8; 44,7; 67,9; 68,3; 70,9; 71,0; 71,2; 71,2; 71,3; 71,4; 80,2; 128,3; 128,6; 138,7; 140,0; 158,5; 173,9.

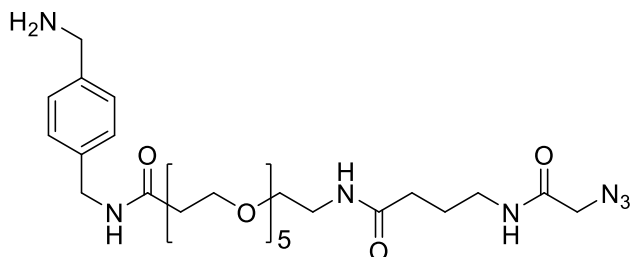
***tert*-Butyl-(4-(28-azido-3,22,27-trioxo-6,9,12,15,18-pentaoxa-2,21,26-triazaoktakosyl)benzyl)karbamát (14)**



Roztok kyseliny (**11**) (16 mg; 86  $\mu\text{mol}$ ; 1,1 ekv.) a HBTU (32 mg; 86  $\mu\text{mol}$ ; 1,1 ekv.) v DMF (1 ml) byl vychlazen ledovou lázní pod ochrannou atmosférou dusíku. Za míchání byla následně přidána DIPEA (40  $\mu\text{l}$ ; 0,23 mmol; 3,0 ekv.). Po 10 minutách byl přidán roztok aminu (**13**) (41 mg; 78  $\mu\text{mol}$ ; 1,0 ekv.) v DMF (1 ml). Chladicí lázeň byla odstraněna a reakční směs byla míchána po dobu 2 hodin za laboratorní teploty, konverze byla sledována pomocí UPLC–MS. Následně bylo rozpouštědlo odpařeno. Odparek byl rozpuštěn v DCM (15 ml), organická vrstva byla promyta 10% vodným roztokem  $\text{KHSO}_4$  (2 x 15 ml), vodné vrstvy byly spojeny a extrahovány DCM (15 ml). Organické extrakty byly spojeny a promyty nasyceným roztokem  $\text{NaHCO}_3$  (2 x 30 ml), vodné vrstvy byly spojeny a promyty DCM (30 ml). Organické extrakty byly následně sušeny bezvodým  $\text{MgSO}_4$ , suspenze byla poté přefiltrována a rozpouštědlo odpařeno. Bylo získáno 32 mg (59 %) čiré olejovité látky, která byla dále použita bez čištění.

**ESI MS:** 718 ( $[\text{M} + \text{Na}]^+$ ). **HR ESI MS:** vypočteno pro  $\text{C}_{32}\text{H}_{54}\text{O}_{10}\text{N}_7^+$  696,39267; nalezeno 696,39258.  $^1\text{H}$  NMR: (400 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ )  $\delta$  1,45 (s, 9H); 1,80 (p,  $J = 7,2$  Hz, 2H); 2,23 (t,  $J = 7,5$  Hz, 2H); 2,49 (t,  $J = 6,0$  Hz, 2H); 3,20 – 3,28 (m, 2H); 3,35 (m, 2H); 3,53 (t,  $J = 5,5$  Hz, 3H); 3,57 – 3,65 (m, 16H); 3,75 (t,  $J = 6,1$  Hz, 2H); 3,87 (s, 2H); 4,20 (s, 2H); 4,35 – 4,40 (m, 2H); 7,21 – 7,28 (m, 4H); 8,02 (t,  $J = 5,6$  Hz, 1H); 8,12 (bs, 1H); 8,35 (t,  $J = 5,6$  Hz, 1H);  $^{13}\text{C}$  NMR: (100 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ )  $\delta$  26,6; 28,8; 34,3; 37,7; 39,9; 40,4; 43,8; 44,7; 53,0; 68,3; 70,5; 71,2; 71,4; 71,5; 71,5; 71,5; 71,5; 80,2; 128,3; 128,6; 138,7; 139,9; 158,5; 170,2; 173,9; 175,5.

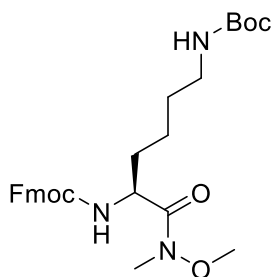
***N*-(4-(Aminomethyl)benzyl)-1-(4-(2-azidoacetamido)butanamido)-3,6,9,12,15-pentaoxaoktadekan-18-amid (15)**



K roztoku sloučeniny (**14**) (32 mg; 46  $\mu$ mol) v DCM (1 ml) byla přidána kyselina trifluoroctová (1 ml). Reakční směs byla míchána za laboratorní teploty po dobu 30 minut následně bylo rozpouštědlo odpařeno a odparek byl sušen na vysokém vakuu. Preparativní HPLC odparku (C18 reverzní silikagel, gradient H<sub>2</sub>O (0,1 % TFA):MeCN 98:2 → 70:30) poskytlo po následné lyofilizaci 23 mg (85 %) čiré olejovité látky.

**ESI MS:** 596 ([M + H]<sup>+</sup>). **HR ESI MS:** vypočteno pro C<sub>27</sub>H<sub>45</sub>O<sub>8</sub>N<sub>7</sub>Na<sup>+</sup> 618,32212; nalezeno 618,32218. **<sup>1</sup>H NMR:** (400 MHz, CD<sub>3</sub>OD)  $\delta$  1,80 (p, *J* = 7,2 Hz, 2H); 2,22 (t, *J* = 7,4 Hz, 2H); 2,51 (t, *J* = 6,0 Hz, 2H); 3,23 (t, *J* = 7,0 Hz, 2H); 3,34 (t, *J* = 5,5 Hz, 2H); 3,53 (t, *J* = 5,5 Hz, 2H); 3,58 – 3,65 (m, 16H); 3,76 (t, *J* = 6,0 Hz, 2H); 3,87 (s, 2H); 4,11 (s, 2H); 4,41 (s, 2H); 7,38 (d, *J* = 8,3 Hz, 2H); 7,42 (d, *J* = 8,3 Hz, 2H). **<sup>13</sup>C NMR:** (100 MHz, CD<sub>3</sub>OD)  $\delta$  26,6; 34,3; 37,7; 39,9; 40,4; 43,6; 44,1; 53,0; 68,3; 70,6; 71,2; 71,3; 71,4; 71,5; 71,5; 71,5; 129,1; 130,2; 133,2; 141,4; 170,2; 174,1; 175,5.

**(9*H*-Fluoren-9-yl)methyl-*terc*-butyl-(6-(methoxy(methyl)amino)-6-oxohexan-1,5-diyl)(*S*)-dikarbamat (16)**

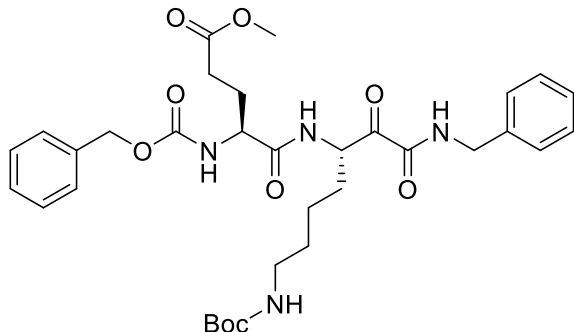


Roztok kyseliny Fmoc-Lys(Boc)-OH (1,00 g; 2,13 mmol; 1,0 ekv.) a HATU (0,81 g; 2,13 mmol; 1,0 ekv.) v DMF (7 ml) byl vychlazen ledovou lázní pod ochrannou atmosférou dusíku. Za míchání byla následně přidána DIPEA (1,11 ml; 6,39 mmol; 3,0 ekv.). Po 10 minutách byl přidán *N,O*-dimethylhydroxylamin hydrochlorid (0,23 g; 2,35 mmol;

1,1 ekv.). Chladicí lázeň byla odstraněna a reakční směs byla míchána 90 minut za laboratorní teploty, konverze byla sledována pomocí UPLC–MS. Následně bylo rozpouštědlo odpařeno. Odparek byl rozpuštěn v EtOAc (80 ml), organická vrstva byla promyta 10% vodným roztokem KHSO<sub>4</sub> (2 x 80 ml), vodou (1 x 80 ml), nasyceným roztokem NaHCO<sub>3</sub> (2 x 80 ml) a solankou (1 x 50 ml). Organický extrakt byl následně sušen bezvodým MgSO<sub>4</sub>, suspenze byla poté přefiltrována a rozpouštědlo odpařeno. Bylo získáno 1,10 g (kvant.) žluté amorfni látky.

**ESI MS:** 534 ([M + Na]<sup>+</sup>). **HR ESI MS:** vypočteno pro C<sub>28</sub>H<sub>37</sub>O<sub>6</sub>N<sub>3</sub>Na<sup>+</sup> 534,25746; nalezeno 534,25739. **<sup>1</sup>H NMR:** (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 1,35 – 1,55 (m, 4H); 1,43 (s, 9H); 1,56 – 1,82 (m, 2H); 3,06 – 3,17 (m, 2H); 3,22 (s, 3H); 3,77 (s, 3H); 4,24 (t, J = 7,0 Hz, 1H); 4,37 (d, J = 7,2 Hz, 2H); 4,58 (bs, 1H); 4,74 (m, 1H); 5,55 (d, J = 9,0 Hz, 1H); 7,31 (tdd, J = 7,5; 2,9; 1,2 Hz, 2H); 7,40 (m, 2H); 7,57 – 7,64 (m, 2H); 7,76 (m, 2H). **<sup>13</sup>C NMR:** (100 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 27,0; 28,6; 29,7; 32,2; 32,6; 40,4; 47,3; 50,9; 61,8; 67,1; 79,2; 120,1; 125,3; 127,2; 127,8; 141,4; 143,9; 144,1; 156,1; 156,3.

**Methyl-(S)-5-(((S)-1-(benzylamino)-7-((*tert*-butoxykarbonyl)amino)-1,2-dioxoheptan-3-yl)amino)-4-(((benzyloxy)karbonyl)amino)-5-oxopentanoát (17)**



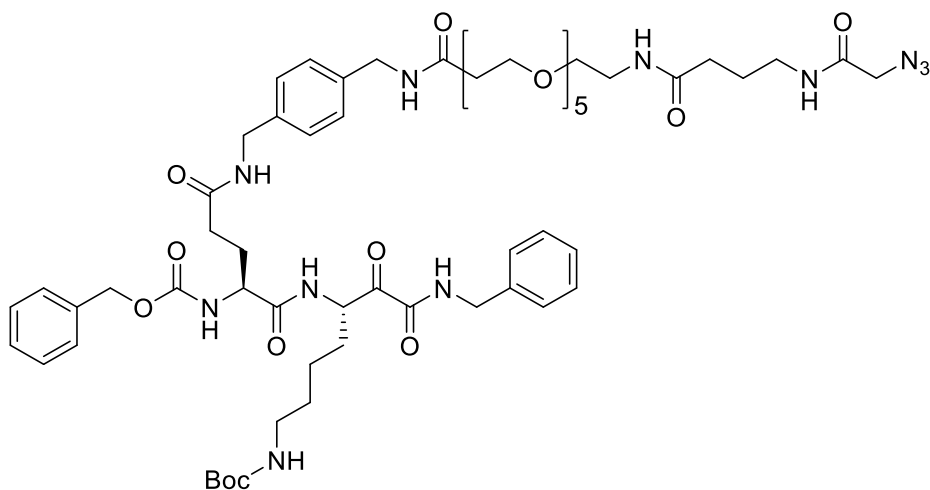
K roztoku sloučeniny (7) (150 mg; 0,23 mmol; 1,0 ekv.) v bezvodém DCM (20 ml) bylo za míchání přidáno DMP (148 mg; 0,35 mmol; 1,5 ekv.). Reakční směs byla míchána za laboratorní teploty po dobu 2,5 hodin, konverze byla sledována pomocí UPLC–MS. Následně bylo rozpouštědlo odpařeno. K odparku byl přidán DMF (2 ml), nasycený roztok Na<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>3</sub> (0,5 ml), směs byla intenzivně míchána po dobu 10 minut. Rozpouštědlo bylo poté odpařeno. Reverzní chromatografie odparku (C18 reverzní silikagel, gradient H<sub>2</sub>O (0,1 % TFA):MeCN 100:0 → 0:100) poskytla po následné lyofilizaci 125 mg (83 %) bílé amorfni látky.

**ESI MS:** 663 ([M + Na]<sup>+</sup>). **HR ESI MS:** vypočteno pro C<sub>33</sub>H<sub>44</sub>O<sub>9</sub>N<sub>4</sub>Na<sup>+</sup> 663,30005; nalezeno 663,29994. **<sup>1</sup>H NMR:** (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 1,34 – 1,55 (m, 2H); 1,44 (s, 9H); 1,55 –



1,72 (m, 2H); 1,88 – 2,23 (m, 4H); 2,34 – 2,58 (m, 2H); 3,00 – 3,18 (m, 2H); 3,61 – 3,71 (m, 3H); 4,30 (t,  $J = 8,8$  Hz, 1H); 4,41 – 4,53 (m, 2H); 4,72 (bs, 1H); 5,10 (d,  $J = 2,9$  Hz, 2H); 5,30 (bs, 1H); 5,68 (t,  $J = 7,4$  Hz, 1H); 6,93 – 7,09 (m, 1H); 7,20 (t,  $J = 5,9$  Hz, 1H); 7,27 – 7,40 (m, 10H).  $^{13}\text{C}$  NMR: (100 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  22,8; 28,6; 29,5; 30,1; 30,8; 40,1; 43,6; 52,1; 54,5; 54,6; 67,2; 79,4; 128,1; 128,1; 128,2; 128,2; 128,3; 128,7; 129,0; 136,8; 156,3; 159,0; 171,3; 174,1; 195,8.

**Benzyl-((6*S*,9*S*)-1-(4-(28-azido-3,22,27-trioxo-6,9,12,15,18-pentaoxa-2,21,26-triazaoktosyl)fenyl)-9-(2-(benzylamino)-2-oxoacetyl)-17,17-dimethyl-3,7,15-trioxo-16-oxa-2,8,14-triazaoktadekan-6-yl)karbamát (18)**



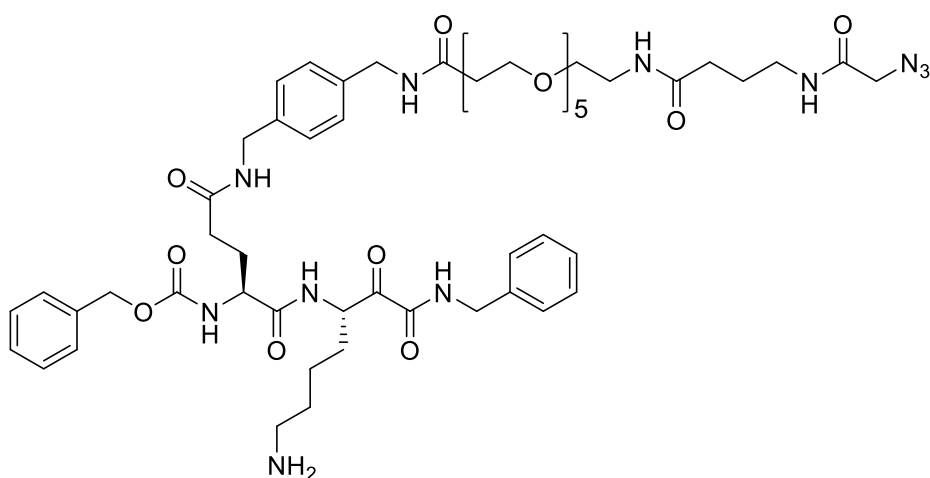
Roztok kyseliny (**4**) (24 mg; 38,5  $\mu\text{mol}$ ; 1,0 ekv.) a HBTU (14,6 mg; 38,5  $\mu\text{mol}$ ; 1,0 ekv.) v DMF (0,5 ml) byl vychlazen ledovou lázní pod ochrannou atmosférou dusíku. Za míchání byl následně přidán 2,4,6-kolidin (15  $\mu\text{l}$ ; 115,5  $\mu\text{mol}$ ; 3,0 ekv.). Po 10 minutách byl přidán roztok aminu (**15**) (23 mg; 38,5  $\mu\text{mol}$ ; 1,0 ekv.) v DMF (0,5 ml). Chladicí lázeň byla odstraněna a reakční směs byla míchána přes noc za laboratorní teploty. Následně bylo rozpouštědlo odpařeno a odparek byl sušen na vysokém vakuu. Preparativní HPLC odparku (C18 reverzní silikagel, gradient  $\text{H}_2\text{O}$  (0,1 % TFA):MeCN 70:30  $\rightarrow$  20:80) poskytlo po následné lyofilizaci 11 mg (24 %) nažloutlé olejovité látky.

**ESI MS:** 1259 ( $[\text{M} + \text{MeOH} + \text{Na}]^+$ ). **HR ESI MS:** vypočteno pro  $\text{C}_{59}\text{H}_{85}\text{O}_{16}\text{N}_{11}\text{Na}^+$  1226,60680; nalezeno 1226,60595.  $^1\text{H}$  NMR: (400 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ )  $\delta$  1,33 – 1,48 (m, 4H); 1,42 (s, 9H); 1,49 – 1,68 (m, 2H); 1,79 (p,  $J = 7,2$  Hz, 2H); 1,86 – 2,14 (m, 2H); 2,21 (t,  $J = 7,5$  Hz, 2H); 2,29 – 2,41 (m, 2H); 2,48 (t,  $J = 6,1$  Hz, 2H); 2,93 – 3,05 (m, 2H); 3,23 (q,  $J = 6,7$  Hz, 2H); 3,32 – 3,37 (m, 2H); 3,52 (t,  $J = 5,4$  Hz, 2H); 3,55 – 3,64 (m, 16H); 3,74 (t,  $J = 6,1$  Hz,

2H); 3,86 (s, 2H); 4,19 (dd,  $J=9,2; 5,1$  Hz, 1H); 4,30 – 4,38 (m, 4H); 4,42 (dd,  $J=6,4; 4,8$  Hz, 2H); 5,09 (s, 2H); 5,10 – 5,21 (m, 1H); 7,17 – 7,39 (m, 14H); 8,00 (bs, 1H); 8,10 (bs, 1H); 8,25 – 8,36 (m, 3H); 8,95 – 9,06 (m, 1H).

Z důvodu existence rotamerů a možných hemiacetalů, které způsobovaly výrazné rozštěpení signálů ve spektru  $^{13}\text{C}$ , nebylo naměřené spektrum interpretováno.

**Benzyl-((*S*)-1-(((*S*)-7-amino-1-(benzylamino)-1,2-dioxoheptan-3-yl)amino)-5-((4-(28-azido-3,22,27-trioxo-6,9,12,15,18-pentaoxa-2,21,26-triazaoktakosyl)benzyl)amino)-1,5-dioxopentan-2-yl)karbamát (19)**



K roztoku sloučeniny (**18**) (11 mg; 28  $\mu\text{mol}$ ) v DCM (1,5 ml) byla přidána kyselina trifluoroctová (1,5 ml). Reakční směs byla míchána za laboratorní teploty po dobu 30 minut, následně bylo rozpouštědlo odpařeno a odparek byl sušen na vysokém vakuu. Preparativní HPLC odparku (C18 reverzní silikagel, gradient  $\text{H}_2\text{O}$  (0,1 % TFA):MeCN 80:20  $\rightarrow$  40:60) poskytlo po následné lyofilizaci 9 mg (90 %) čiré olejovité látky.

**ESI MS:** 1137 ( $[\text{M} + \text{MeOH} + \text{H}]^+$ ). **HR ESI MS:** vypočteno pro  $\text{C}_{54}\text{H}_{78}\text{O}_{14}\text{N}_{11}^+$  1104,57242; nalezeno 1104,57224.  **$^1\text{H}$  NMR:** (400 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ )  $\delta$  1,18 – 1,73 (m, 6H); 1,79 (p,  $J=7,2$  Hz, 2H); 1,86 – 2,15 (m, 2H); 2,22 (t,  $J=7,4$  Hz, 2H); 2,29 – 2,42 (m, 2H); 2,49 (td,  $J=6,0; 1,5$  Hz, 2H); 2,72 – 2,99 (m, 2H); 3,23 (t,  $J=7,0$  Hz, 2H); 3,35 (t,  $J=5,4$  Hz, 2H); 3,49 – 3,55 (m, 2H); 3,55 – 3,65 (m, 16H); 3,74 (td,  $J=6,0; 1,1$  Hz, 2H); 3,87 (s, 2H); 3,98 – 4,22 (m, 1H); 4,28 – 4,37 (m, 4H); 4,38 – 4,48 (m, 2H); 5,03 – 5,13 (m, 2H); 5,14 – 5,27 (m, 1H); 7,16 – 7,41 (m, 14H).

Z důvodu existence rotamerů a možných hemiacetalů, které způsobovaly výrazné rozštěpení signálů ve spektru  $^{13}\text{C}$ , nebylo naměřené spektrum interpretováno.

## 6. Závěr

Cílem této bakalářské práce bylo připravit derivát inhibitoru KYT-36 specifického pro lysinový gingipain (Kgp), jež si zachová svou afinitu a bude jej možné využít k detekci gingipainu s využitím iBodies. Bylo vybráno vhodné místo napojení oligoethylenglykolové spojky na základě analýzy krystalové struktury enzymu Kgp s inhibitorem KYT-36. Přestože syntéza původního inhibitoru není publikovaná, byl navržen a potvrzen efektivní syntetický postup využívající PADAM sekvenci.

Hydrazidový fragment nacházející se ve struktuře původního inhibitoru byl nahrazen fragmentem benzylaminového typu. Tento fragment byl opatřen pentaethylenglykolovým řetězcem. Prodloužení spojky o derivát  $\gamma$ -aminomáselné kyseliny (**11**) poskytlo požadovaný fragment (**15**) zakončený azidem zajišťující snadné připojení ke kopolymeru iBody pomocí „click“ reakce.

Připravený aldehyd (**9**) vstupoval spolu s komerčně dostupnými sloučeninami do vícetřížkové Passeriniho kombinované s intramolekulární migrací acylu. Následnou oxidací  $\beta$ -acylamino- $\alpha$ -hydroxy sloučeniny (**7**) a hydrolýzou methylesteru byl připraven skelet inhibitoru (**4**).

Aktivace kyseliny (**4**) s sebou nesla obtíže v podobě intramolekulární cyklizace. Optimalizací reakce byla tvorba nežádoucího produktu potlačena. S využitím optimalizovaných podmínek byly spojeny kyselina (**4**) s fragmentem (**15**). Cílová sloučenina (**19**) byla předána kolegům z biochemického oddělení (ÚOChB AV ČR), kde bylo potvrzeno zachování afinity inhibitoru. Hodnota  $IC_{50}$  sloučeniny (**19**) byla stanovena na  $IC_{50} = 4,5$  nM; hodnota inhibiční konstanty na  $K_i = 70 \pm 65$  pM. Příprava syntetické protilátky připojením sloučeniny (**19**) k polymeru je stále předmětem výzkumu (ÚOChB AV ČR, ÚMCH AV ČR).

## 7. Literatura

- (1) Kadowaki, T.; Baba, A.; Abe, N.; Takii, R.; Hashimoto, M.; Tsukuba, T.; Okazaki, S.; Suda, Y.; Asao, T.; Yamamoto, K. Suppression of Pathogenicity of *Porphyromonas Gingivalis* by Newly Developed Gingipain Inhibitors. *Mol. Pharmacol.* **2004**, *66* (6), 1599–1606. <https://doi.org/10.1124/mol.104.004366>.
- (2) Šácha, P.; Knedlík, T.; Schimer, J.; Tykvart, J.; Parolek, J.; Navrátil, V.; Dvořáková, P.; Sedlák, F.; Ulbrich, K.; Strohalm, J.; Majer, P.; Šubr, V.; Konvalinka, J. IBodies: Modular Synthetic Antibody Mimetics Based on Hydrophilic Polymers Decorated with Functional Moieties. *Angew. Chemie - Int. Ed.* **2016**, *55* (7), 2356–2360. <https://doi.org/10.1002/anie.201508642>.
- (3) Guevara, T.; Rodríguez-Banqueri, A.; Lasica, A. M.; Ksiazek, M.; Potempa, B. A.; Potempa, J.; Gomis-Rüth, F. X. Structural Determinants of Inhibition of *Porphyromonas Gingivalis* Gingipain K by KYT-36, a Potent, Selective, and Bioavailable Peptidase Inhibitor. *Sci. Rep.* **2019**, *9* (1), 1–8. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-41354-3>.
- (4) Mohanty, R.; Asopa, S. J.; Joseph, M. D.; Singh, B.; Rajguru, J. P.; Saidath, K.; Sharma, U. Red Complex: Polymicrobial Conglomerate in Oral Flora: A Review. *J. Fam. Med. Prim. Care* **2019**, *8* (11), 3840–3846. <https://doi.org/10.4103/jfmpc.jfmpc>.
- (5) Fitzpatrick, R. E.; Wijeyewickrema, L. C.; Pike, R. N. The Gingipains: Scissors and Glue of the Periodontal Pathogen, *Porphyromonas Gingivalis*. *Future Microbiol.* **2009**, *4* (4), 471–487. <https://doi.org/10.2217/fmb.09.18>.
- (6) Potempa, J.; Pike, R.; Travis, J. The Multiple Forms of Trypsin-like Activity Present in Various Strains of *Porphyromonas Gingivalis* Are Due to the Presence of Either Arg-Gingipain or Lys-Gingipain. *Infect. Immun.* **1995**, *63* (4), 1176–1182. <https://doi.org/10.1128/iai.63.4.1176-1182.1995>.
- (7) Poole, S.; Singhrao, S. K.; Kesavalu, L.; Curtis, M. A.; Crean, S. J. Determining the Presence of Periodontopathic Virulence Factors in Short-Term Postmortem Alzheimer's Disease Brain Tissue. *J. Alzheimer's Dis.* **2013**, *36* (4), 665–677. <https://doi.org/10.3233/JAD-121918>.
- (8) Singhrao, S. K.; Harding, A.; Poole, S.; Kesavalu, L.; Crean, S. J. *Porphyromonas Gingivalis* Periodontal Infection and Its Putative Links with Alzheimer's Disease.

- Mediators Inflamm.* **2015**, 1–10. <https://doi.org/10.1155/2015/137357>.
- (9) Dominy, S. S.; Lynch, C.; Ermini, F.; Benedyk, M.; Marczyk, A.; Konradi, A.; Nguyen, M.; Haditsch, U.; Raha, D.; Griffin, C.; Holsinger, L. J.; Arastu-Kapur, S.; Kaba, S.; Lee, A.; Ryder, M. I.; Potempa, B.; Mydel, P.; Hellvard, A.; Adamowicz, K.; Hasturk, H.; Walker, G. D.; Reynolds, E. C.; Faull, R. L. M.; Curtis, M. A.; Dragunow, M.; Potempa, J. Porphyromonas Gingivalis in Alzheimer’s Disease Brains: Evidence for Disease Causation and Treatment with Small-Molecule Inhibitors. *Sci. Adv.* **2019**, *5* (1), 1–22. <https://doi.org/10.1126/sciadv.aau3333>.
- (10) Laser Gum Surgery in West Palm Beach, FL | Treat Gum Disease <https://www.perio-implant.com/lanap-laser-gum-surgery-west-palm-beach-fl/> (cit. 30.5.2021).
- (11) Nocini, R.; Lippi, G.; Mattiuzzi, C. Periodontal Disease: The Portrait of an Epidemic. *J. Public Heal. Emerg.* **2020**, *4* (10), 1–6. <https://doi.org/10.21037/jphe.2020.03.01>.
- (12) Shapira, L.; Ayalon, S.; Brenner, T. Effects of Porphyromonas Gingivalis on the Central Nervous System: Activation of Glial Cells and Exacerbation of Experimental Autoimmune Encephalomyelitis. *J. Periodontol.* **2002**, *73* (5), 511–516. <https://doi.org/10.1902/jop.2002.73.5.511>.
- (13) Teng, Y. T. A.; Taylor, G. W.; Scannapieco, F.; Kinane, D. F.; Curtis, M.; Beck, J. D.; Kogon, S. Periodontal Health and Systemic Disorders. *J. Can. Dent. Assoc.* **2002**, *68* (3), 188–192.
- (14) Beck, J. D.; Pankow, J.; Tyroler, H. A.; Offenbacher, S. Dental Infections and Atherosclerosis. *Am. Heart J.* **1999**, *138* (5 II). [https://doi.org/10.1016/s0002-8703\(99\)70293-0](https://doi.org/10.1016/s0002-8703(99)70293-0).
- (15) Rôças, I. N.; Siqueira, J. F.; Santos, K. R. N.; Coelho, A. M. A. “Red Complex” (Bacteroides Forsythus, Porphyromonas Gingivalis, and Treponema Denticola) in Endodontic Infections: A Molecular Approach. *Oral Surg. Oral Med. Oral Pathol. Oral Radiol. Endod.* **2001**, *91* (4), 468–471. <https://doi.org/10.1067/moe.2001.114379>.
- (16) Hajishengallis, G.; Liang, S.; Payne, M. A.; Hashim, A.; Jotwani, R.; Eskan, M. A.; McIntosh, M. L.; Alsam, A.; Kirkwood, K. L.; Lambris, J. D.; Darveau, R. P.; Curtis, M. A. Low-Abundance Biofilm Species Orchestrates Inflammatory Periodontal Disease through the Commensal Microbiota and Complement. *Cell Host Microbe* **2011**, *10* (5), 497–506. <https://doi.org/10.1016/j.chom.2011.10.006>.

- (17) Lamont, R. J.; Jenkinson, H. F. Life Below the Gum Line: Pathogenic Mechanisms of Porphyromonas Gingivalis. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **1998**, *62* (4), 1244–1263. <https://doi.org/10.1128/membr.62.4.1244-1263.1998>.
- (18) Mckee, A. S.; Mcdermid, A. S.; Baskerville, A.; Dowsett, A. B.; Ellwood, D. C.; Marshlt, P. D. Effect of Hemin on the Physiology and Virulence of Bacteroides Gingivalis W50. *Infect. Immun.* **1986**, *52* (2), 349–355. <https://doi.org/10.1128/iai.52.2.349-355.1986>.
- (19) O’Brien-Simpson, N. M.; Veith, P. D.; Dashper, S. G.; Reynolds, E. C. Antigens of Bacteria Associated with Periodontitis. *Periodontol. 2000* **2004**, *35*, 101–134. <https://doi.org/10.1111/j.0906-6713.2004.003559.x>.
- (20) Potempa, J.; Pike, R.; Travis, J. Titration and Mapping of the Active Site of Cysteine Proteinases from Porphyromonas Gingivalis (Gingipains) Using Peptidyl Chloromethanes. *Biol. Chem.* **1997**, *378* (3–4), 223–230. <https://doi.org/10.1515/bchm.1997.378.3-4.223>.
- (21) Potempa, J.; Sroka, A.; Imamura, T.; Travis, J. Gingipains, the Major Cysteine Proteinases and Virulence Factors of Porphyromonas Gingivalis: Structure, Function and Assembly of Multidomain Protein Complexes. *Curr. Protein Pept. Sci.* **2003**, *4* (6), 397–407. <https://doi.org/10.2174/1389203033487036>.
- (22) Curtis, M. A.; Kuramitsu, H. K.; Lantz, M.; Macrina, F. L.; K., N.; Potempa, J.; Aduse-Opoku, J. Molecular Genetics and Nomenclature of Proteases of Porphyromonas Gingivalis. *J. Periodontal Res.* **1999**, *34* (40), 464–472.
- (23) Wilson, M.; Seymour, R.; Henderson, B. Bacterial Perturbation of Cytokine Networks. *Infect. Immun.* **1998**, *66* (6), 2401–2409. <https://doi.org/10.1128/iai.66.6.2401-2409.1998>.
- (24) Wyss-Coray, T.; Rogers, J. Inflammation in Alzheimer Disease-A Brief Review of the Basic Science and Clinical Literature. *Cold Spring Harb. Perspect. Med.* **2012**, *2* (1), 1–23. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a006346>.
- (25) Ide, M.; Harris, M.; Stevens, A.; Sussams, R.; Hopkins, V.; Culliford, D.; Fuller, J.; Ibbett, P.; Raybould, R.; Thomas, R.; Puenter, U.; Teeling, J.; Perry, V. H.; Holmes, C. Periodontitis and Cognitive Decline in Alzheimer’s Disease. *PLoS One* **2016**, *11* (3), 1–9. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0151081>.

- (26) Kadowaki, T.; Yoneda, M.; Okamoto, K.; Maeda, K.; Yamamoto, K. Purification and Characterization of a Novel Arginine-Specific Cysteine Proteinase (Argingipain) Involved in the Pathogenesis of Periodontal Disease from the Culture Supernatant of *Porphyromonas Gingivalis*. *J. Biol. Chem.* **1994**, *269* (33), 21371–21378. [https://doi.org/10.1016/s0021-9258\(17\)31972-5](https://doi.org/10.1016/s0021-9258(17)31972-5).
- (27) Pathirana, R. D.; O'Brien-Simpson, N. M.; Brammar, G. C.; Slakeski, N.; Reynolds, E. C. RgpB and RgpA, but Not RgpA, Are Important for *Porphyromonas Gingivalis* Virulence in the Murine Periodontitis Model. *Infect. Immun.* **2007**, *75* (3), 1436–1442. <https://doi.org/10.1128/IAI.01627-06>.
- (28) Wilensky, A.; Polak, D.; Houry-Haddad, Y.; Shapira, L. The Role of RgpA in the Pathogenicity of *Porphyromonas Gingivalis* in the Murine Periodontitis Model. *J. Clin. Periodontol.* **2013**, *40* (10), 924–932. <https://doi.org/10.1111/jcpe.12139>.
- (29) Kodíček, M.; Valentová, O.; Radovan, H. *Biochemie: Chemický Pohled Na Biologický Svět*, 1. vydání.; VŠCHT Praha, 2015; ISBN: 978-80-7080-927-3.
- (30) Veillard, F.; Sztukowska, M.; Mizgalska, D.; Ksiazek, M.; Houston, J.; Potempa, B.; Enghild, J. J.; Thogersen, I. B.; Gomis-Rüth, F. X.; Nguyen, K. A.; Potempa, J. Inhibition of Gingipains by Their Profragments as the Mechanism Protecting *Porphyromonas Gingivalis* against Premature Activation of Secreted Proteases. *Biochim. Biophys. Acta* **2013**, *1830* (8), 4218–4228. <https://doi.org/10.1016/j.bbagen.2013.04.005>.
- (31) Huq, N. L.; Seers, C. A.; Toh, E. C. Y.; Dashper, S. G.; Slakeski, N.; Zhang, L.; Ward, B. R.; Meuric, V.; Chen, D.; Cross, K. J.; Reynolds, E. C. Propeptide-Mediated Inhibition of Cognate Gingipain Proteinases. *PLoS One* **2013**, *8* (6). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0065447>.
- (32) Krauser, J. A.; Potempa, J.; Travis, J.; Powers, J. C. Inhibition of Arginine Gingipains (RgpB and HRgpA) with Benzamidine Inhibitors: Zinc Increases Inhibitory Potency. *Biol. Chem.* **2002**, *383* (7–8), 1193–1198. <https://doi.org/10.1515/BC.2002.131>.
- (33) Sela, M. N.; Babitski, E.; Steinberg, D.; Kohavi, D.; Rosen, G. Degradation of Collagen-Guided Tissue Regeneration Membranes by Proteolytic Enzymes of *Porphyromonas Gingivalis* and Its Inhibition by Antibacterial Agents. *Clin. Oral Implants Res.* **2009**, *20* (5), 496–502. <https://doi.org/10.1111/j.1600->



0501.2008.01678.x.

- (34) Imamura, T.; Matsushita, K.; Travis, J.; Potempa, J. Inhibition of Trypsin-like Cysteine Proteinases (Gingipains) from *Porphyromonas Gingivalis* by Tetracycline and Its Analogues. *Antimicrob. Agents Chemother.* **2001**, *45* (10), 2871–2876. <https://doi.org/10.1128/AAC.45.10.2871-2876.2001>.
- (35) Gibson, F. C.; Genco, C. A. Prevention of *Porphyromonas Gingivalis*-Induced Oral Bone Loss Following Immunization with Gingipain R1. *Infect. Immun.* **2001**, *69* (12), 7959–7963. <https://doi.org/10.1128/IAI.69.12.7959-7963.2001>.
- (36) Yonezawa, H.; Ishihara, K.; Okuda, K. Arg-Gingipain a DNA Vaccine Induces Protective Immunity against Infection by *Porphyromonas Gingivalis* in a Murine Model. *Infect. Immun.* **2001**, *69* (5), 2858–2864. <https://doi.org/10.1128/IAI.69.5.2858-2864.2001>.
- (37) Miyachi, K.; Ishihara, K.; Kimizuka, R.; Okuda, K. Arg-Gingipain a DNA Vaccine Prevents Alveolar Bone Loss in Mice. *J. Dent. Res.* **2007**, *86* (5), 446–450. <https://doi.org/10.1177/154405910708600511>.
- (38) Booth, V.; Ashley, F. P.; Lehner, T. Passive Immunization with Monoclonal Antibodies against *Porphyromonas Gingivalis* in Patients with Periodontitis. *Infect. Immun.* **1996**, *64* (2), 422–427. <https://doi.org/10.1128/iai.64.2.422-427.1996>.
- (39) Taiyoji, M.; Shitomi, Y.; Taniguchi, M.; Saitoh, E.; Ohtsubo, S. Identification of Proteinaceous Inhibitors of a Cysteine Proteinase (an Arg-Specific Gingipain) from *Porphyromonas Gingivalis* in Rice Grain, Using Targeted-Proteomics Approaches. *J. Proteome Res.* **2009**, *8* (11), 5165–5174. <https://doi.org/10.1021/pr900519z>.
- (40) MEROPS - the Peptidase Database <https://www.ebi.ac.uk/merops/cgi-bin/famsum?family=I6> (cit. 18.5.2021).
- (41) Taiyoji, M.; Yamanaka, T.; Tsuno, T.; Ohtsubo, S. Potential Value of a Rice Protein Extract, Containing Proteinaceous Inhibitors against Cysteine Proteinases from *Porphyromonas Gingivalis*, for Managing Periodontal Diseases. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **2013**, *77* (1), 80–86. <https://doi.org/10.1271/bbb.120585>.
- (42) Dashper, S. G.; Pan, Y.; Veith, P. D.; Chen, Y. Y.; Toh, E. C. Y.; Liu, S. W.; Cross, K. J.; Reynolds, E. C. Lactoferrin Inhibits *Porphyromonas Gingivalis* Proteinases and Has Sustained Biofilm Inhibitory Activity. *Antimicrob. Agents Chemother.* **2012**, *56* (3),

- 1548–1556. <https://doi.org/10.1128/AAC.05100-11>.
- (43) Gusman, H.; Grogan, J.; Kagan, H. M.; Troxler, R. F.; Oppenheim, F. G. Salivary Histatin 5 Is a Potent Competitive Inhibitor of the Cysteine Proteinase Clostripain. *FEBS Lett.* **2001**, *489* (1), 97–100. [https://doi.org/10.1016/S0014-5793\(01\)02077-4](https://doi.org/10.1016/S0014-5793(01)02077-4).
- (44) Toh, E. C. Y.; Dashper, S. G.; Huq, N. L.; Attard, T. J.; O'Brien-Simpson, N. M.; Chen, Y. Y.; Cross, K. J.; Stanton, D. P.; Paolini, R. A.; Reynolds, E. C. Porphyromonas Gingivalis Cysteine Proteinase Inhibition by  $\kappa$ -Casein Peptides. *Antimicrob. Agents Chemother.* **2011**, *55* (3), 1155–1161. <https://doi.org/10.1128/AAC.00466-10>.
- (45) Bodet, C. C.; Piché, M.; Chandad, F.; Grenier, D. Inhibition of Periodontopathogen-Derived Proteolytic Enzymes by a High-Molecular-Weight Fraction Isolated from Cranberry. *J. Antimicrob. Chemother.* **2006**, *57* (4), 685–690. <https://doi.org/10.1093/jac/dkl031>.
- (46) La, V. D.; Howell, A. B.; Grenier, D. Anti-Porphyromonas Gingivalis and Anti-Inflammatory Activities of A-Type Cranberry Proanthocyanidins. *Antimicrob. Agents Chemother.* **2010**, *54* (5), 1778–1784. <https://doi.org/10.1128/AAC.01432-09>.
- (47) Hirasawa, M.; Takada, K.; Makimura, M.; Otake, S. Improvement of Periodontal Status by Green Tea Catechin Using a Local Delivery System: A Clinical Pilot Study. *J. Periodontal Res.* **2002**, *37* (6), 433–438. <https://doi.org/10.1034/j.1600-0765.2002.01640.x>.
- (48) Bialas, A.; Grembecka, J.; Krowarsch, D.; Otlewski, J.; Potempa, J.; Mucha, A. Exploring the Sn Binding Pockets in Gingipains by Newly Developed Inhibitors: Structure-Based Design, Chemistry, and Activity. *J. Med. Chem.* **2006**, *49* (5), 1744–1753. <https://doi.org/10.1021/jm0600141>.
- (49) Kadowaki, T.; Kitano, S.; Baba, A.; Takii, R.; Hashimoto, M.; Katunuma, N.; Yamamoto, K. Isolation and Characterization of a Novel and Potent Inhibitor of Arg-Gingipain from Streptomyces Sp. Strain FA-70. *Biol. Chem.* **2003**, *384* (6), 911–920. <https://doi.org/10.1515/BC.2003.102>.
- (50) Curtis, M. A.; Aduse Opoku, J.; Rangarajan, M.; Gallagher, A.; Sterne, J. A. C.; Reid, C. R.; Evans, H. E. A.; Samuelsson, B. Attenuation of the Virulence of Porphyromonas Gingivalis by Using a Specific Synthetic Kgp Protease Inhibitor. *Infect. Immun.* **2002**,

- 70 (12), 6968–6975. <https://doi.org/10.1128/IAI.70.12.6968-6975.2002>.
- (51) Oppenheim, F. G.; Xu, T.; McMillian, F. M.; Levitz, S. M.; Diamond, R. D.; Offner, G. D.; Troxler, R. F. Histatins, a Novel Family of Histidine-Rich Proteins in Human Parotid Secretion. Isolation, Characterization, Primary Structure, and Fungistatic Effects on *Candida Albicans*. *J. Biol. Chem.* **1988**, *263* (16), 7472–7477. [https://doi.org/10.1016/s0021-9258\(18\)68522-9](https://doi.org/10.1016/s0021-9258(18)68522-9).
- (52) PeptideCutter  
[https://web.expasy.org/peptide\\_cutter/peptidecutter\\_special\\_enzymes.html](https://web.expasy.org/peptide_cutter/peptidecutter_special_enzymes.html) (cit. 22.5.2021).
- (53) Kopeček, J.; Kopečková, P. HEMA Copolymers: Origins, Early Developments, Present, and Future. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **2010**, *62* (2), 122–149. <https://doi.org/10.1016/j.addr.2009.10.004>.
- (54) Wichterle, O.; Lím, D. *Nature* **1960**, *185* (117–118).
- (55) Labský, J.; Vacík, J.; Hošek, P. CZ 293419.
- (56) Šubr, V.; Kostka, L.; Strohalm, J.; Etrych, T.; Ulbrich, K. Synthesis of Well-Defined Semitelechelic Poly[N-(2-Hydroxypropyl) Methacrylamide] Polymers with Functional Group at the  $\alpha$ -End of the Polymer Chain by RAFT Polymerization. *Macromolecules* **2013**, *46* (6), 2100–2108. <https://doi.org/10.1021/ma400042u>.
- (57) Gibbs, A. C. Elements and Modulation of Functional Dynamics. *J. Med. Chem.* **2014**, *57* (19), 7819–7837. <https://doi.org/10.1021/jm500325k>.
- (58) Dvořáková, P.; Bušek, P.; Knedlík, T.; Schimer, J.; Etrych, T.; Kostka, L.; Stollinová Šromová, L.; Šubr, V.; Šácha, P.; Šedo, A.; Konvalinka, J. Inhibitor-Decorated Polymer Conjugates Targeting Fibroblast Activation Protein. *J. Med. Chem.* **2017**, *60* (20), 8385–8393. <https://doi.org/10.1021/acs.jmedchem.7b00767>.
- (59) Jansen, K.; Heirbaut, L.; Verkerk, R.; Cheng, J. D.; Joossens, J.; Cos, P.; Maes, L.; Lambeir, A. M.; De Meester, I.; Augustyns, K.; Van Der Veken, P. Extended Structure-Activity Relationship and Pharmacokinetic Investigation of (4-Quinolinoyl)Glycyl-2-Cyanopyrrolidine Inhibitors of Fibroblast Activation Protein (FAP). *J. Med. Chem.* **2014**, *57* (7), 3053–3074. <https://doi.org/10.1021/jm500031w>.
- (60) Banfi, L.; Basso, A.; Guanti, G.; Riva, R. Passerini Reaction - Amine Deprotection -

- Acyl Migration (PADAM): A Convenient Strategy for the Solid-Phase Preparation of Peptidomimetic Compounds. *Mol. Divers.* **2003**, *6* (3–4), 227–235.  
<https://doi.org/10.1023/B:MODI.0000006778.42751.7f>.
- (61) Chanduge, A. Multicomponent Reactions: Development, Scope, and Applications, University of Groningen, 2017.
- (62) Science, S. A. SGE Product Selection Guide | 50 Years Edition Welcome to the SGE Product. **2010**, 1–283.
- (63) Nahm, S.; Weinreb, S. M. N-Methoxy-n-Methylamides as Effective Acylating Agents. *Tetrahedron Lett.* **1981**, *22* (39), 3815–3818. [https://doi.org/10.1016/S0040-4039\(01\)91316-4](https://doi.org/10.1016/S0040-4039(01)91316-4).
- (64) Balasubramaniam, S.; Aidhen, I. S. The Growing Synthetic Utility of the Weinreb Amide. *Synthesis (Stuttg.)*. **2008**, *23*, 3707–3738. <https://doi.org/10.1055/s-0028-1083226>.
- (65) Said, A. M.; Hangauer, D. G. Binding Cooperativity between a Ligand Carbonyl Group and a Hydrophobic Side Chain Can Be Enhanced by Additional H-Bonds in a Distance Dependent Manner: A Case Study with Thrombin Inhibitors. *Eur. J. Med. Chem.* **2015**, *96*, 405–424. <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2015.03.059>.
- (66) Passerini, M.; Simone, L. G. *Chim. Ital.* **1921**, *51*, 126–2.
- (67) Otto, H. H.; Schirmeister, T. Cysteine Proteases and Their Inhibitors. *Chem. Rev.* **1997**, *97* (1), 133–171. <https://doi.org/10.1021/cr950025u>.
- (68) Whittaker, M. Discovery of Protease Inhibitors Using Targeted Libraries. *Curr. Opin. Chem. Biol.* **1998**, *2* (3), 386–396. [https://doi.org/10.1016/S1367-5931\(98\)80014-8](https://doi.org/10.1016/S1367-5931(98)80014-8).
- (69) Dess, D. B.; Martin, J. C. Readily Accessible 12-I-51 Oxidant for the Conversion of Primary and Secondary Alcohols to Aldehydes and Ketones. *J. Org. Chem.* **1983**, *48* (22), 4155–4156. <https://doi.org/10.1021/jo00170a070>.
- (70) Tofteng, A. P.; Sørensen, K. K.; Conde-Frieboes, K. W.; Hoeg-Jensen, T.; Jensen, K. J. Fmoc Solid-Phase Synthesis of C-Terminal Peptide Thioesters by Formation of a Backbone Pyroglutamyl Imide Moiety. *Angew. Chemie - Int. Ed.* **2009**, *48* (40), 7411–7414. <https://doi.org/10.1002/anie.200903710>.
- (71) Potempa, J.; Nguyen, K. A. Purification and Characterization of Gingipains. *Curr.*

*Protoc. protein Sci.* **2007**, Chapter 21 (August), 1–27.

<https://doi.org/10.1002/0471140864.ps2120s49>.

- (72) Shi, Y.; Ratnayake, D. B.; Okamoto, K.; Abe, N.; Yamamoto, K.; Nakayama, K. Genetic Analyses of Proteolysis, Hemoglobin Binding, and Hemagglutination of *Porphyromonas Gingivalis*: Construction of Mutants with a Combination of RgpA, RgpB, Kgp, and HagA. *J. Biol. Chem.* **1999**, 274 (25), 17955–17960.  
<https://doi.org/10.1074/jbc.274.25.17955>.