

UNIVERZITA PARDUBICE  
FAKULTA CHEMICKO-TECHNOLOGICKÁ  
ÚSTAV ORGANICKÉ CHEMIE A TECHNOLOGIE

**Syntéza 2-hydroxy-*N*-[1-(2-hydroxyfenylamino)-  
1-oxoalkan-2-yl]benzamidů**

DIPLOMOVÁ PRÁCE

AUTOR: Bc. Jan DUŠEK

VEDOUCÍ PRÁCE: Ing. Aleš IMRAMOVSKÝ, Ph.D.

2012

UNIVERSITY OF PARDUBICE  
FACULTY OF CHEMICAL TECHNOLOGY  
DEPARTMENT OF ORGANIC CHEMISTRY AND TECHNOLOGY

**Synthesis of 2-hydroxy-*N*-[1-(2-hydroxyphenylamino)-  
1-oxoalkan-2-yl]benzamides**

AUTHOR: Bc. Jan DUŠEK

SUPERVISOR: Ing. Aleš IMRAMOVSKÝ, Ph.D.

2012

## ZADÁNÍ DIPLOMOVÉ PRÁCE

(PROJEKTU, UMĚLECKÉHO DÍLA, UMĚLECKÉHO VÝKONU)

Jméno a příjmení: **Bc. Jan Dušek**  
Osobní číslo: **C10828**  
Studijní program: **N1407 Chemie**  
Studijní obor: **Organická chemie**  
Název tématu: **Syntéza 2-hydroxy-N-[1-(2-hydroxyfenylamino)-1-oxoalkan-2-yl]benzamidů**  
Zadávající katedra: **Ústav organické chemie a technologie**

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

1. Na základě literární rešerše popsat vlastnosti a využití 2-hydroxy-N-[1-(2-hydroxyfenylamino)-1-oxoalkan-2-yl]benzamidů.
2. Provést retrosyntetickou analýzu cílové molekuly, na jejím základě navrhnout možné syntetické cesty, eventuelně komentovat již publikované syntézy.
3. Činidla využívaná ke tvorbě amidů a esterů.
4. Provést syntézu vybraných substitučních derivátů 2-hydroxy-N-[1-(2-hydroxyfenylamino)-1-oxoalkan-2-yl]benzamidů v množství a čistotě dostačující pro testování biologické aktivity.
5. Charakterizovat připravené látky včetně prekurzorů cílových molekul (bod tání, Retenčním faktorem  $R_f$  pro dvě různé soustavy, nukleární magnetickou rezonancí, infračervenou spektroskopií, elementární analýzou, a dle možností hmotnostní spektrometrií).
6. V závěru práce porovnat jednotlivé použité syntetické přístupy, použitá činidla pro syntézu amidů, s již publikovanými postupy.
7. Výsledky zpracujte formou závěrečné zprávy.

Rozsah grafických prací:

Rozsah pracovní zprávy:

Forma zpracování diplomové práce: **tištěná**

Seznam odborné literatury:

**Všechna dostupná chemická literatura.**

Vedoucí diplomové práce:

**Ing. Aleš Imramovský, Ph.D.**

Ústav organické chemie a technologie

Datum zadání diplomové práce: **24. února 2012**

Termín odevzdání diplomové práce: **25. května 2012**



prof. Ing. Petr Lošťák, DrSc.

děkan

L.S.



prof. Ing. Miloš Sedlák, DrSc.

vedoucí katedry

V Pardubicích dne 24. února 2012

## **PROHLÁŠENÍ**

Tuto práci jsem vypracoval samostatně. Veškeré literární prameny a informace, které jsem v práci využil, jsou uvedeny v seznamu použité literatury.

Byl jsem seznámen s tím, že se na moji práci vztahují práva a povinnosti vyplývající ze zákona č. 121/2000 Sb., autorský zákon, zejména se skutečností, že Univerzita Pardubice má právo na uzavření licenční smlouvy o užití této práce jako školního díla podle § 60 odst. 1 autorského zákona, a s tím, že pokud dojde k užití této práce mnou nebo bude poskytnuta licence o užití jinému subjektu, je Univerzita Pardubice oprávněna ode mne požadovat přiměřený příspěvek na úhradu nákladů, které na vytvoření díla vynaložila, a to podle okolností až do jejich skutečné výše.

Souhlasím s prezenčním zpřístupněním své práce v Univerzitní knihovně.

V Pardubicích dne 4. 5. 2012

.....  
Bc. Jan Dušek

## **PODĚKOVÁNÍ**

Na tomto místě bych rád poděkoval školiteli Ing. Aleši Imramovskému, Ph.D. za odborné vedení, cenné rady a užitečné připomínky při realizaci diplomové práce. Dále bych rád poděkoval kolektivu na pracovišti a přátelům za příjemnou atmosféru, kterou vytvářeli jak v laboratoři a ve škole, tak i mimo ně. Díky patří mé rodině a zejména mým rodičům, kteří mě podporovali ve všech směrech a umožnili mi studium dokončit.

## SOUHRN

Diplomová práce se zabývá cílenou syntézou 2-hydroxy-*N*-[1-(2-hydroxyfenylamino)-1-oxoalkan-2-yl]benzamidů. Je zde uveden přehled již popsanych příprav vedoucích na cílové molekuly, dále pak přehled karbodiimidů, činidel, která se používají pro tvorbu amidů a esterů.

V experimentální části práce jsou uvedeny tři možné syntetické cesty vedoucí k cílovým látkám.

### Klíčová slova

salicylanilidy, 2-hydroxy-*N*-[1-(2-hydroxyfenylamino)-1-oxoalkan-2-yl]benzamidy, karbodiimidy, organická syntéza

## SUMMARY

This diploma work is focused on the targeted synthesis of 2-hydroxy-*N*-[1-(2-hydroxyphenylamino)-1-oxoalkan-2-yl]benzamides. An overview of already described methods of target molecules synthesis is presented. Next, there is an overview of carbodiimides, which are used to form ester or amide bond.

In the experimental part of this work are presented three synthetic paths to obtain target molecules.

### Keywords

salicylanilides, 2-hydroxy-*N*-[1-(2-hydroxyphenylamino)-1-oxoalkan-2-yl]benzamides, carbodiimides, organic synthesis

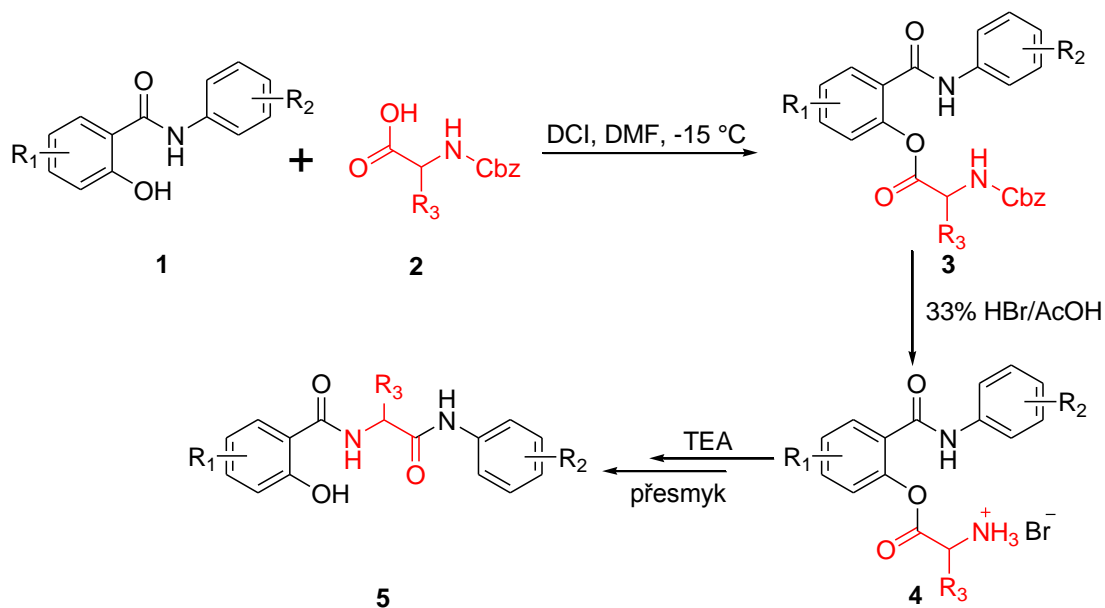


## OBSAH

Obsah .....	8
1 Úvod .....	9
2 Teoretická část .....	12
2.1 Literární rešerše možnosti cílené přípravy 2-hydroxy- <i>N</i> -[1-(2-hydroxyfenylamino)-1-oxoalkan-2-yl]benzamidů .....	12
2.1.1 Studie vodíkových vazeb a jiných vztahů na modelovém pseudopeptidu .....	12
2.1.2 Inhibitory angiogeneze .....	12
2.1.3 Inhibitory transkripčního faktoru AP-1 a NFAT (US 2006/0100257 A1) .....	13
2.1.4 Diamidy jako ligandy při stereospecifické katalýze .....	14
2.2 Využití a vlastnosti diamidů .....	15
2.2.1 Činidlo při přípravě Ranirestatu .....	15
2.2.2 Katalytická hydroxylace $\alpha$ -alkoxamidů .....	17
2.2.3 Reakce Mannichova typu .....	18
2.3 Retrosyntetická analýza - náznak syntetických cest pro přípravu diamidů .....	20
2.3.1 Retrosyntetická analýza A .....	20
2.3.2 Retrosyntetická analýza B .....	21
2.4 Karbodiimidy .....	22
2.4.1 Karbodiimidy obecně .....	22
2.4.2 Problematika vedlejších produktů a její řešení .....	25
2.4.3 Konkrétní využití karbodiimidů .....	26
3 Cíle práce .....	48
4 Experimentální část .....	49
4.1 Syntéza substituovaných 2-hydroxy- <i>N</i> -[1-(2-hydroxyfenylamino)-1-oxoalkan-2-yl]benzamidů navržená na základě retrosyntetické analýzy A .....	49
4.3 Syntéza substituovaných 2-hydroxy- <i>N</i> -[1-(2-hydroxyfenylamino)-1-oxoalkan-2-yl]benzamidů navržená na základě retrosyntetické analýzy B .....	62
5 Výsledky a diskuze .....	67
6 Závěr .....	69
Použité zkratky .....	71
Použitá literatura .....	72

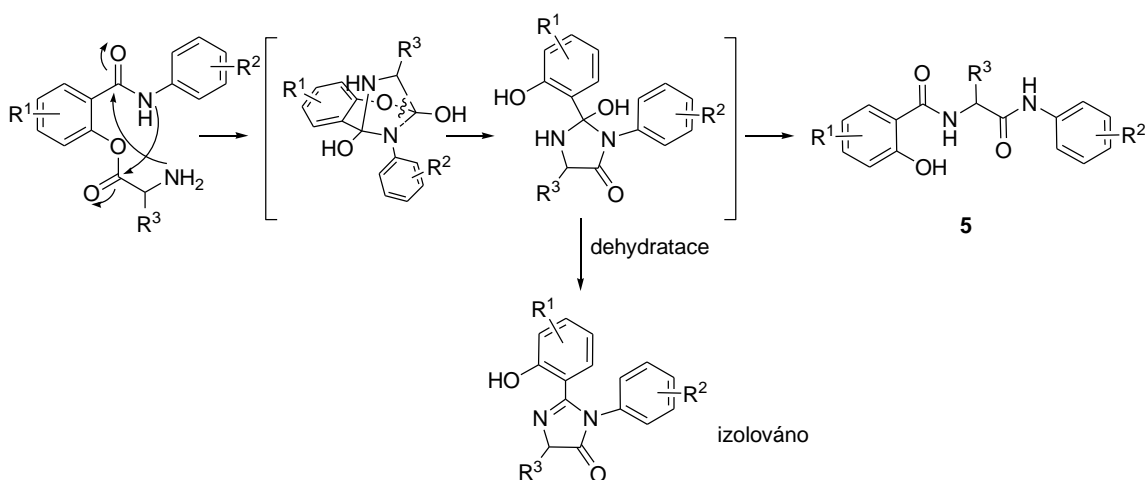
## 1 Úvod

Různě substituované 2-hydroxy benzamidy (salicylanilidy, SALy) **1** jsou organické sloučeniny s celou řadou zajímavých biologických aktivit.<sup>1,2,3,4</sup> Ve snaze vylepšit jejich biologické a fyzikální vlastnosti byla připravena celá řada látek odvozených od salicylanilidů jako jsou např., substituční deriváty,<sup>5</sup> benzyl salicylanilidy<sup>6</sup> nebo benzoxaziny.<sup>7</sup> Byla provedena syntéza malé série *O*-acetylovaných derivátů salicylanilidů (první skupinou tzv. *O*-substitučních derivátů salicylanilidů), u kterých byly prokázány dobré antimikrobiální aktivity, zejména proti antifungálním a atypickým mykobakteriálním kmenům.<sup>8</sup> Na základě slibných výsledků bylo rozhodnuto o přípravě rozsáhlejší série esterů aminokyselin s nejaktivnějšími salicylanilidy. Z důvodu reaktivity amino skupiny byla tato skupina chráněna vhodnou chránicí skupinou, a to buď benzyloxykarbonylem (Cbz) nebo *tert*-butyloxykarbonylem (Boc) Esterifikace *N*-chráněných aminokyselin (**2**) SALy (**1**) byla prováděna metodou přejatou z peptidické chemie v DMF za přítomnosti DCC při  $-15^{\circ}\text{C}$ <sup>9</sup> a vedla k úspěšné izolaci požadovaných esterů (**3**). Deprotekce aminoskupiny esteru vodíkem na Pd/C katalyzátoru není vhodnou metodou, protože dochází ke štěpení nejen vazby chránicí skupiny, ale také esterové vazby připravené v předcházejícím reakčním stupni. Z toho důvodu byla jako alternativa použita acidolýza 33% HBr/AcOH, která poskytla hydrobromidovou sůl odpovídajícího esteru (**4**). Pro uvolnění aminoskupiny byl jako báze použit triethylamin v chloroformu za laboratorní teploty. Neočekávaným přesmykem došlo ke vzniku majoritního produktu 2-hydroxy-*N*-[1-(2-hydroxyfenylamino)-1-oxoalkan-2-yl]benzamidu (**5**) (dále diamid).<sup>10</sup> Později bylo prokázáno, že tato metoda je obecná jak pro širokou paletu substitucí aromatického jádra kyseliny a aminu, tak i pro nejrůznější aminokyseliny. Popsaným přesmykem byla připravena série 49 derivátů diamidu **5**.<sup>11</sup> Průběh reakce je uveden na **Schématu 1**.



**Schéma 1:** Reakční schéma znázorňující vznik diamidů<sup>10</sup>, TEA - triethylamin

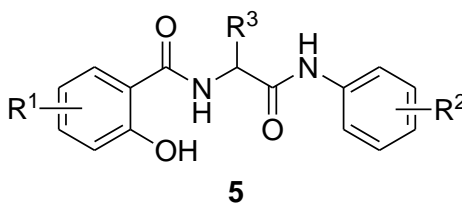
Průběh přesmyku není zcela objasněn. Návrh průběhu mechanismu byl vytvořen na základě izolace dehydratované formy reakčního intermediátu při pozmeněných podmínkách přesmyku. Struktura intermediátu byla potvrzena RTG difrakcí. Mechanismus je naznačen na **Schématu 2**.



**Schéma 2:** Návrh mechanismu přesmyku na diamidy<sup>12</sup>

U některých z připravených derivátů 2-hydroxy-*N*-[1-(2-hydroxyfenylamino)-1-oxoalkan-2-yl]benzamidů (**5**) byly popsány antimykobakteriální (*Mycobacterium tuberculosis*, *M. avium*, *M. kansasii*) a antifungální aktivity (*Candida tropicalis*, *C. krusei*, *Trichophyton mentagrophytes*). Dále byly doloženy aktivity proti methicilin-rezistentnímu *Staphylococcus aureus*, *S. epidermidis* nebo proti různým *Enterococcus sp.*<sup>13</sup>

Výše popsanou metodou využívající přesmyku hydrobromidu esteru byla připravena celá řada derivátů. Samotný přesmyk na diamidy (**5**) probíhá s velmi solidními výtěžky. Výtěžky celé syntézy jsou však silně ovlivněny možností připravit výchozí ester *N*-chráněné aminokyseliny (**3**). Vysokých výtěžků bylo dosaženo pro klasické neutrální aminokyseliny jako L- nebo D-valin a fenylalanin. Esterifikace glycinu a některých atypických aminokyselin (cyklohexylalanin, *tert*-butylglycin, ...) probíhala s mnohem nižšími výtěžky. Surový ester aminokyseliny je navíc po reakci znečištěn zbytky výchozích látek a *N,N'*-dicyklohexylmočoviny (DCU). Díky jeho labilitě dochází při čištění kolonovou chromatografií k rozkladu esterové vazby. Purifikace je možná pouze opakovanou krystalizací, což má za následek výrazné snížení výtěžku esterifikace. Z těchto důvodů vznikla nutnost vypracování nové syntetické metody přípravy 2-hydroxy-*N*-[1-(2-hydroxyfenylamino)-1-oxoalkan-2-yl]benzamidů. Metoda by měla poskytovat stejnou nebo větší flexibilitu jako původní syntetická cesta při potřebě změny substituentů  $R^1$ ,  $R^2$  a  $R^3$  na obecném vzorci 2-hydroxy-*N*-[1-(2-hydroxyfenylamino)-1-oxoalkan-2-yl]benzamidů (**Obrázek 1**). Meziprodukty ležící na cestě k diamidům by měly být stabilní s možností čistit je pouze jednoduchou krystalizací nebo též kolonovou chromatografií. Syntéza by měla vycházet z ekonomicky snadno dostupných chemikálií.



**Obrázek 1:** Obecný vzorec 2-hydroxy-*N*-[1-(2-hydroxyfenylamino)-1-oxoalkan-2-yl]benzamidů (**5**)

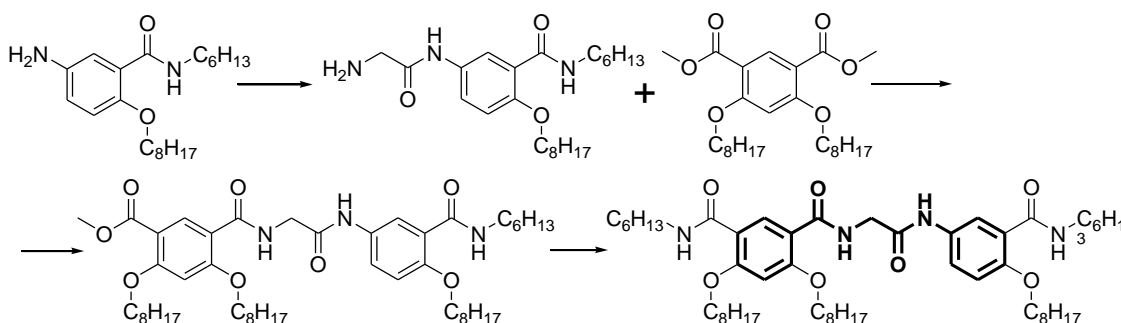
## 2 Teoretická část

### 2.1 Literární rešerše možnosti cílené přípravy 2-hydroxy-*N*-[1-(2-hydroxyfenylamino)-1-oxoalkan-2-yl]benzamidů

Hledání zdrojů pro literární rešerši bylo zahájeno na portálech REAXYS a Scifinder Scholar. Pozornost byla zaměřena na hledání substitučních izomerů látek uvedených na **Obrázku 1**, eventuálně jejich heteroanalogů.

#### 2.1.1 Studie vodíkových vazeb a jiných vztahů na modelovém pseudopeptidu

V dostupné literatuře byla popsána příprava diamidu podobného základního skeletu. Cílem práce bylo charakterizovat vodíkové vazby a prostorové vztahy existující mezi jednotlivými řetězci modelu bílkoviny ve formě  $\beta$ -skládaného listu. Jednotlivé komponenty byly k sobě spojovány za použití *N*-ethyl-*N'*-(3-dimethylaminopropyl)karbodiimidu (EDC), který se snadno odstraňuje z reakční směsi.<sup>14</sup>

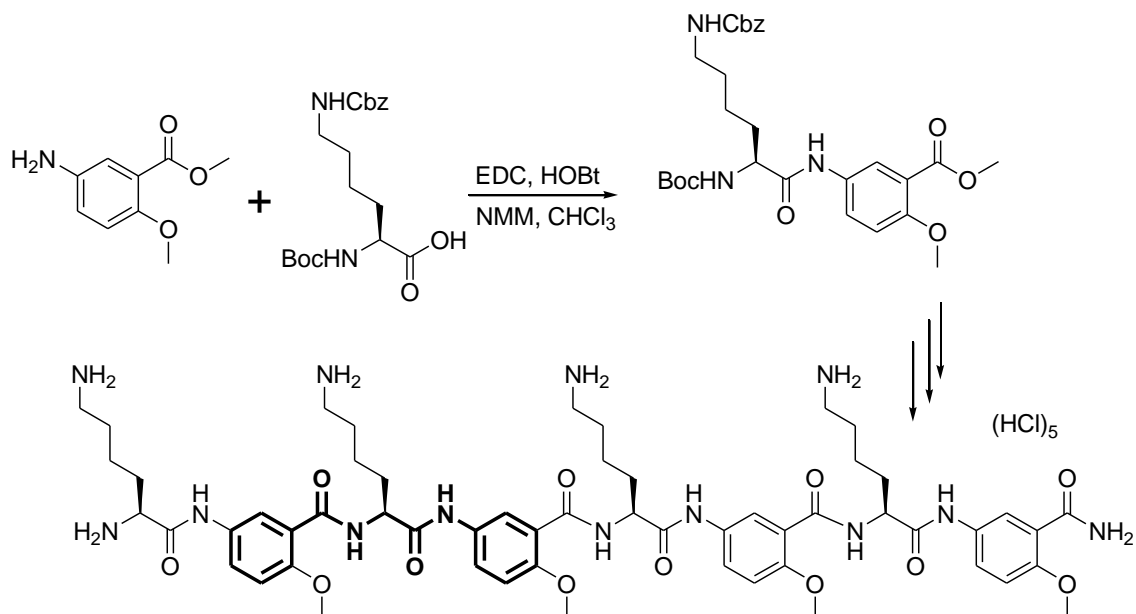


**Schéma 3:** Metodika přípravy pseudopeptidu

#### 2.1.2 Inhibitory angiogeneze

Diamidový skelet se nachází i v polymerním salicylamidu, který je připraven sérií kroků z methyl 5-amino-2-methoxybenzoátu a  $N_{\alpha}$ -Boc- $N_{\epsilon}$ -Cbz-L-lysinu vhodně kombinovanými ochranami a odchranami funkčních skupin (viz **Schéma 4**). Polymerní salicylamid nachází uplatnění jako inhibitor angiogeneze, což je sám o sobě přirozený a nezbytný proces růstu a tvorby sítě kapilárních cév například při hojení. V případě nádorových onemocnění je však tato aktivita krajně nežádoucí, poněvadž tímto způsobem si nádor zajišťuje přísun živin.

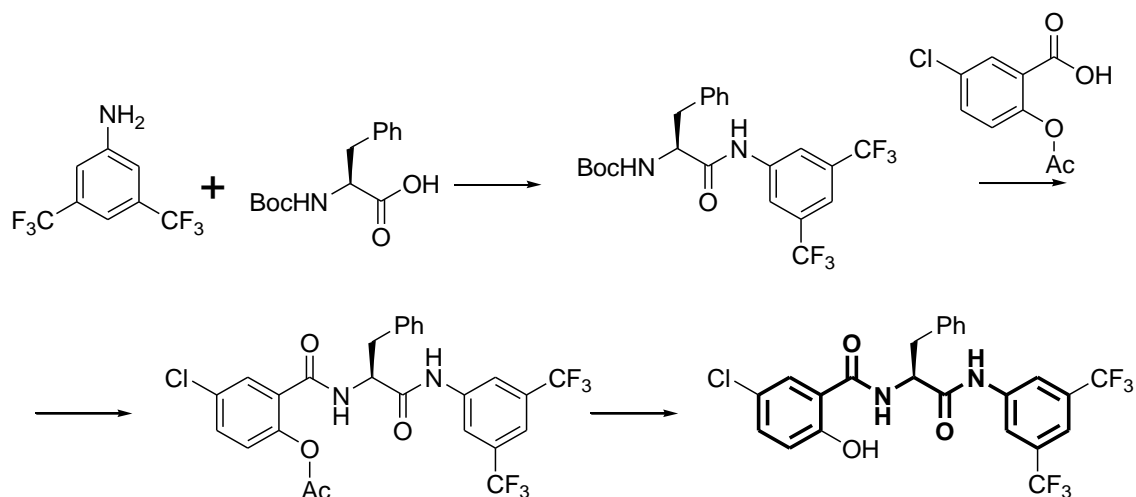
Připravený skelet se cílovým diamidům podobá jen částečně. Základní monomer je tvořen amidem kyseliny 5-aminosalicylové a L-lysinu a opakovaně se ve formě amidu řetězí.<sup>15,16</sup>



**Schéma 4:** Metodika přípravy polymerního salicylamidu sledem reakcí z methyl 5-amino-2-methoxybenzoátu a  $N_{\alpha}$ -Boc- $N_{\epsilon}$ -Cbz-L-lysinu

### 2.1.3 Inhibitory transkripčního faktoru AP-1 a NFAT (US 2006/0100257 A1)

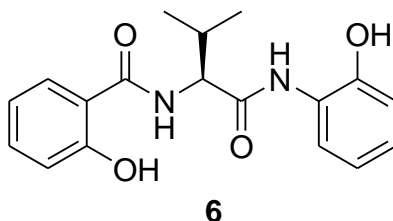
Předmětem zmíněného patentu je prezentovat rozsáhlou sérii salicylamidů a několik diamidů, popsat jejich přípravu a poukázat na jejich aktivitu při inhibici transkripčního faktoru AP-1, který se uplatňuje při přepisu DNA.<sup>17</sup>



**Schéma 5:** Metodika přípravy inhibitoru transkripčního faktoru na bázi diamidu

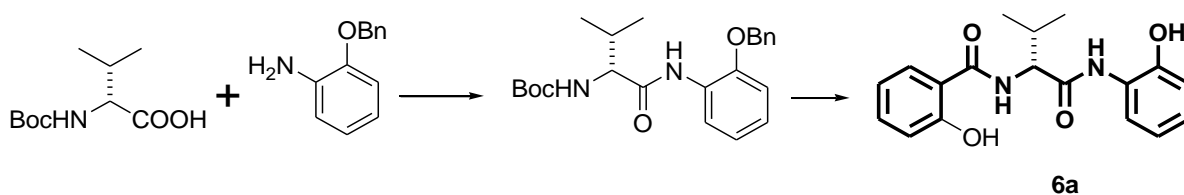
### 2.1.4 Diamidy jako ligandy při stereospecifické katalýze

(2-Hydroxy-*N*-{(1*S*)-1-[(2-hydroxyfenyl)karbamoyl]-2-methylpropyl}benzamid) ((*R*)-**6a**) (**Obrázek 2**) se svou stavbou zcela shoduje s diamidy, které jsou předmětem této práce.



**Obrázek 2:** L-Val-(2'-hydroxyfenyl)-SAL diamid ((*R*)-**6a**)

Postup přípravy je uveden na **Schématu 6**. Boc-chráněný D-valin reagoval v dichlormethanu s *O*-benzyloxy-2-aminofenolem za přítomnosti 1-hydroxybenzotriazolu (HOBtu), *N*-ethyl-*N'*-(3-dimethylaminopropyl)karbodiimid hydrochloridu (EDCI·HCl) a TEA na meziprodukt (*R*)-*N*-(2-benzyloxyfenyl)-2-(*tert*-butoxykarbonylamino)-valinamid. Reakční směs byla míchána 1 hodinu při 0 °C a 12 hodin při laboratorní teplotě. K meziproductu, u kterého byla kysele odstraněna ochranná skupina, byl přidán *O*-acetylsalicyloyl chlorid. Reakce byla prováděna v dichlormethanu za míchání po dobu 30 minut při 0 °C a 3,5 hodiny při laboratorní teplotě. Na závěr byly odstraněny zbývající ochranné skupiny (acetyl působením K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> a benzyloxyhydrogenolýzou na Pd/C katalyzátoru). Produkt (*R*)-*N*-(2-hydroxyfenyl)-2-salicyloylaminoisovaleramidu ((*R*)-**6a**) byl izolován ve formě bezbarvé látky.



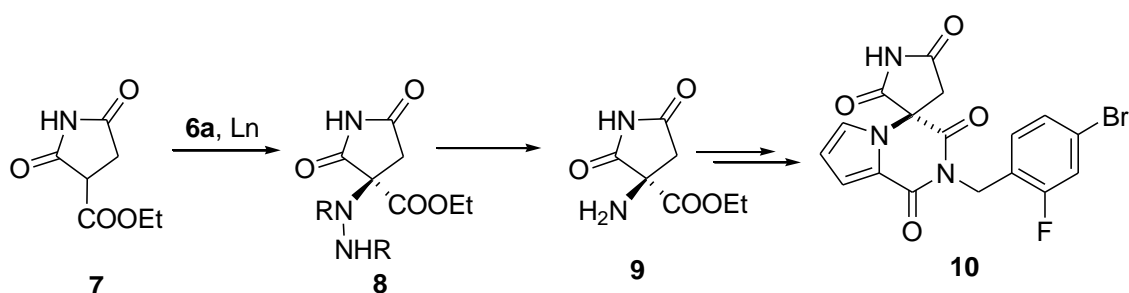
**Schéma 6:** Postup přípravy diamidu (*S*)-**6a**.<sup>18</sup>

## 2.2 Využití a vlastnosti diamidů

Diamidy jsou velmi nadějná skupina látek nacházející uplatnění při stereospecifické katalýze nebo jako biologicky aktivní látky. Práce výzkumné skupiny prof. Masakatsu Shibasakiho z Institutu mikrobiální chemie v Tokiu se v současné době soustředí na využití diamidů (**6a-h**, **9a-d**, **10**, **11** na **Obrázku 3**) jako ligandů ve stereospecifické katalýze ve spojení s lanthanoidy. Diamidy výzkumné skupiny Ing. Aleše Imramovského, Ph.D. prokázaly široké spektrum zajímavých antimikrobiálních aktivit. Látky obsahující diamidový skelet mají potenciál stát se nástrojem při léčbě nádorových onemocnění, protože fungují jako inhibitory angiogeneze, nebo jako inhibitory AP-1.

### 2.2.1 Činidlo při přípravě Ranirestatu

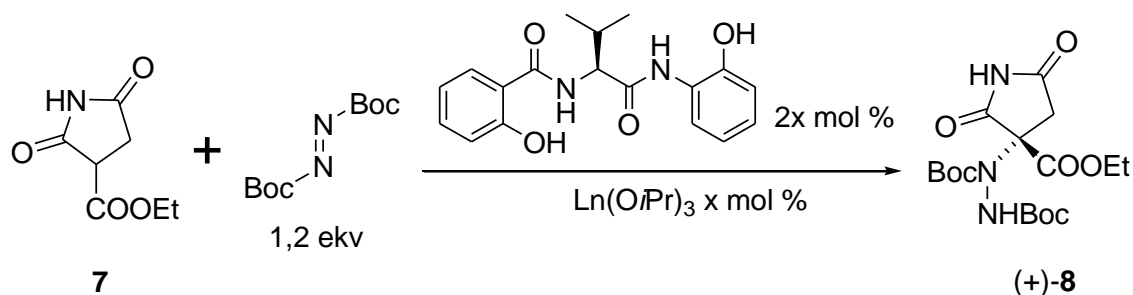
Při jednom z kroků přípravy léčiva Ranirestat (**10**) vznikla potřeba generovat definovaně konfigurovaný kvarterní uhlík. Syntéza Ranirestatu vychází z ethyl 2,5-dioxopyrrolidin-3-karboxylátu (**7**), který je v prvním kroku asymetricky aminován azodikarboxylátem na produkt (**8**). Tento meziprodukt může být snadno transformován na meziprodukt (**9**).



**Schéma 7:** Příprava léčivé látky Ranirestat (**10**)

Za tímto účelem jednoznačné  $\beta$ -aminace bylo využito katalyzátorů na bázi lanthanoidů, ve kterých vystupoval 2-hydroxy-*N*-{(1*S*)-1-[(2-hydroxyfenyl)karbamoyl]-2-methylpropyl}benzamid) (L-Val-(2'-hydroxyfenyl)-SAL diamid, **6a**) jako ligand. Při asymetrické aminaci byly zkoumány různé kombinace lanthanoidů, rozpouštědel, reakční doby a množství katalyzátoru na výtěžky a enantiomerní přebytek. Poměr diamidu k soli kovu byl molárně 2:1. (**Schéma 8**, **Tabulka 1**)<sup>18</sup>





**Schéma 8:** Asymetrická aminace ethyl 2,5-dioxopyrrolidin-3-karboxylátu

**Tabulka 1:** Vliv kombinací lanthanoidů, rozpouštědel, délky reakční doby a množství katalyzátoru na výtěžek produktu (+)-8 a enantiomerní přebytek

Test lanthanoidů (x = 10) <sup>a</sup>					
	Výtěžek (%)	ee (%)		Výtěžek (%)	ee (%)
La	66	43	Dy	8	5
Gd	11	28	Sm	21	0
Nd	15	16	Er	88	3

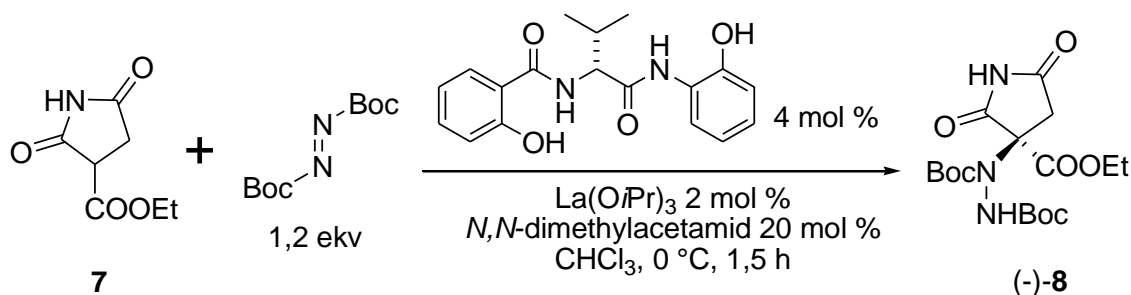
Test rozpouštědel (x = 10) <sup>b</sup>					
	Výtěžek (%)	ee (%)		Výtěžek (%)	ee (%)
THF	66	43	CHCl <sub>3</sub>	96	57
Tol	31	31	Ether	64	46
DMF	85	7	EtAc	86	76

Test množství katalyzátoru a reakční doby <sup>c</sup>					
	v EtAc		v CHCl <sub>3</sub>		
x = 10			x = 10		
24 h	86	76	24 h	96	57
x = 1			x = 1		
57 h	96	89	32	99	68

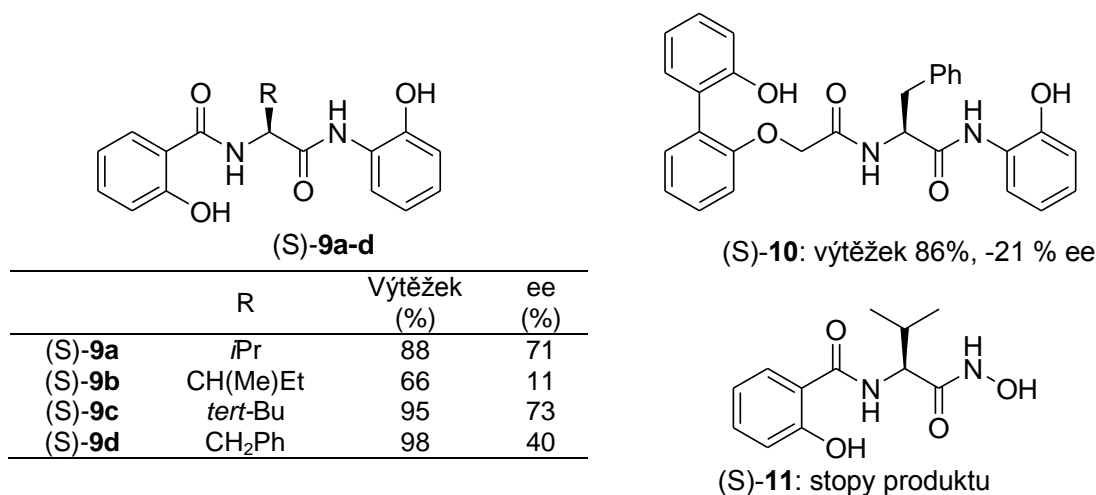
<sup>a</sup> Reakce provedena v THF při  $-40\text{ }^{\circ}\text{C}$  během 24 hodin. <sup>b</sup> Reakce provedena s Ln = La při  $-40\text{ }^{\circ}\text{C}$  během 24 hodin. <sup>c</sup> Reakce provedena s Ln = La při  $-40\text{ }^{\circ}\text{C}$

Pro přípravu Ranirestatu je ale zapotřebí druhého izomeru (–)-8, proto byly reakční podmínky dále upravovány, aby bylo dosaženo přebytku žádaného izomeru. Toho bylo dosaženo přidáním *N,N*-dimethylacetamidu do reakční směsi. Reakce probíhala v chloroformu 1,5 hodiny při  $0\text{ }^{\circ}\text{C}$  za použití diamidového ligandu (R)-6a (4 mol %), La(OiPr)<sub>3</sub> (2 mol %) a *N,N*-dimethylacetamidu (20 mol %). Bylo dosaženo 99% výtěžku a 92% ee. (Schéma 9)



**Schéma 9:** Asymetrická aminace ethyl 2,5-dioxopyrrolidin-3-karboxylátu

Reakční podmínky byly dále upravovány změnami rozpouštědel (EtAc), různou reakční dobou, poměry katalyzátorů nebo obměnami použitých lanthanitých solí. Byly připraveny i některé další diamidy ((S)-**9a-d**, (S)-**10**, (S)-**11**), žádný z nich ale nedosáhl tak zajímavých výtěžků a enantiomerních přebytků jako již používané (R)-**6a** a (S)-**6a**. Poměr diamidu k soli kovu byl 2:1.<sup>19,20</sup>

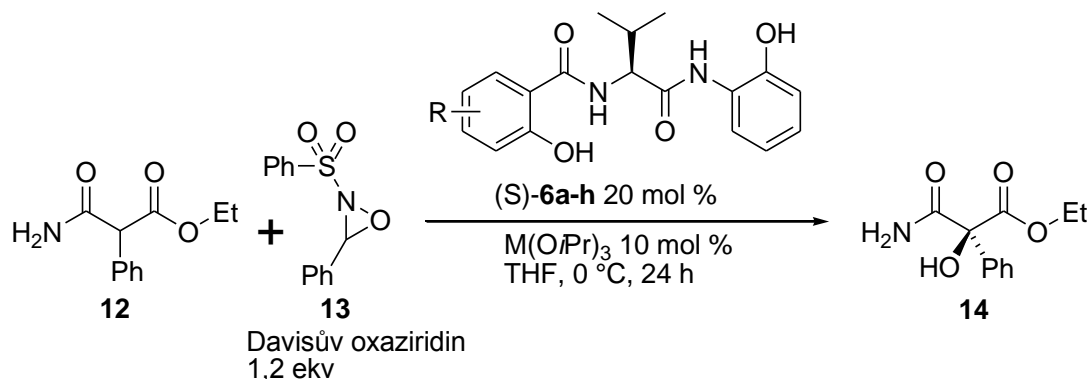


**Obrázek 3:** Přehled připravených diamidů a jejich účinnost při katalýze

### 2.2.2 Katalytická hydroxylace $\alpha$ -alkoxamidů

Katalytická hydroxylace  $\alpha$ -alkoxamidů byla zkoumána skupinou profesora Masakatsu Shibasakiho za účelem ověření schopnosti katalyzátoru (diamid/kov) moderovat tuto reakci. Cílem bylo připravit terciární alkohol na 1,3-dikarbonylové sloučenině (**12**) (ethyl 3-amino-3-oxo-2-fenylpropanoát) s přesně definovanou a snadně kontrolovatelnou konfigurací. Jako oxidační činidlo byl zvolen Davisův oxaziridin (**13**), jako centrální atomy byly používán skandium, yttrium a lanthanoidy. Vedle již používaného diamidu **6a** bylo při reakcích využito i sedmi nově připravených strukturně podobných diamidů (**6b-h**, viz **Schéma 10** a **Tabulka 2**). Na benzenovém jádře salicylové kyseliny byly do různých poloh zavedeny halogeny. Nové diamidy byly

připraveny až na drobné rozdíly v ochraně hydroxidových skupin stejným způsobem jako diamid **6a**. Hydroxylová skupina na skeletu kyseliny salicylové je chráněna výhodněji benzylem. Tato náhrada acetylu zkracuje přípravu o jeden krok. Odchrana obou benzylů je provedena současně.



**Schéma 10:** Reakce popisující asymetrickou hydroxylaci  $\alpha$ -alkoxamidů

**Tabulka 2:** Přehled použitých činidel, kovů, výtěžků a enantiomerních přebytků

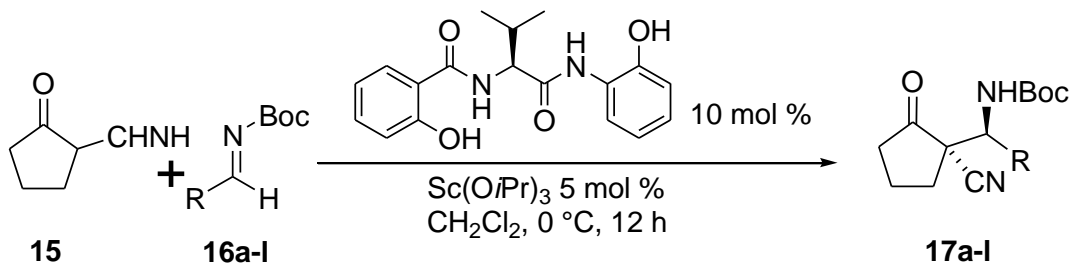
Diamid	R	M	Výtěžek (%)	ee (%)	Diamid	R	M	Výtěžek (%)	ee (%)
(S)- <b>6a</b>	H	Sc	32	9	(S)- <b>6b</b> <sup>b</sup>	5-F	Pr	88	91
(S)- <b>6a</b>	H	Y	82	48	(S)- <b>6c</b>	5-Cl	La	81	80
(S)- <b>6a</b>	H	La	88	76	(S)- <b>6c</b> <sup>b</sup>	5-Cl	Pr	84	75
(S)- <b>6a</b>	H	Pr	85	75	(S)- <b>6d</b> <sup>b</sup>	5-Br	La	87	81
(S)- <b>6a</b>	H	Nd	81	51	(S)- <b>6d</b> <sup>b</sup>	5-Br	Pr	86	91
(S)- <b>6a</b>	H	Sm	65	30	(S)- <b>6e</b>	5-I	La	78	69
(S)- <b>6a</b>	H	Gd	84	19	(S)- <b>6e</b> <sup>b</sup>	5-I	Pr	87	87
(S)- <b>6a</b>	H	Dy	76	51	(S)- <b>6f</b> <sup>b</sup>	3-F	Pr	34	13
(S)- <b>6a</b>	H	Er	86	35	(S)- <b>6g</b> <sup>b</sup>	4-F	Pr	82	88
(S)- <b>6b</b>	5-F	La	70	79	(S)- <b>6h</b> <sup>b</sup>	6-F	Pr	80	70

<sup>a</sup> Určeno <sup>1</sup>H NMR analýzou. <sup>b</sup> Bylo použito 1,5 ekv Davisova oxaziridinu; M - kov.<sup>21</sup>

### 2.2.3 Reakce Mannichova typu

Vlastnosti komplexu diamid **6a**/kov byly testovány na reakci Mannichova typu. Vodík v  $\alpha$  poloze 2-oxocyklopentankarbonitrilu (**15**) je v důsledku těsné blízkosti nitrilu a oxo skupiny značně kyselé. Uhlík v  $\alpha$  poloze tedy vystupuje jako nukleofil, který se za přítomnosti diamidu **6a** a skandité soli enantioselektivně aduje na molekulu iminu (**16a-l**). V literatuře je popsáno několik reakcí Mannichova typu 1,3-dikarbonylových sloučenin. U vzniklých  $\beta$ -aminoketonů byla pozorována jen *syn*-konfigurace, *anti* nebyla nikde zmíněna.<sup>22,23</sup> Poměr diamidu a kovu byl zachován 2:1. Na **Schématu 11** je

uvedena obecná reakce, v **Tabulce 3** je pak uveden seznam použitých iminů, dosažených výtěžků, poměru anti/syn izomerů a enantiomerního přebytku.<sup>24</sup>



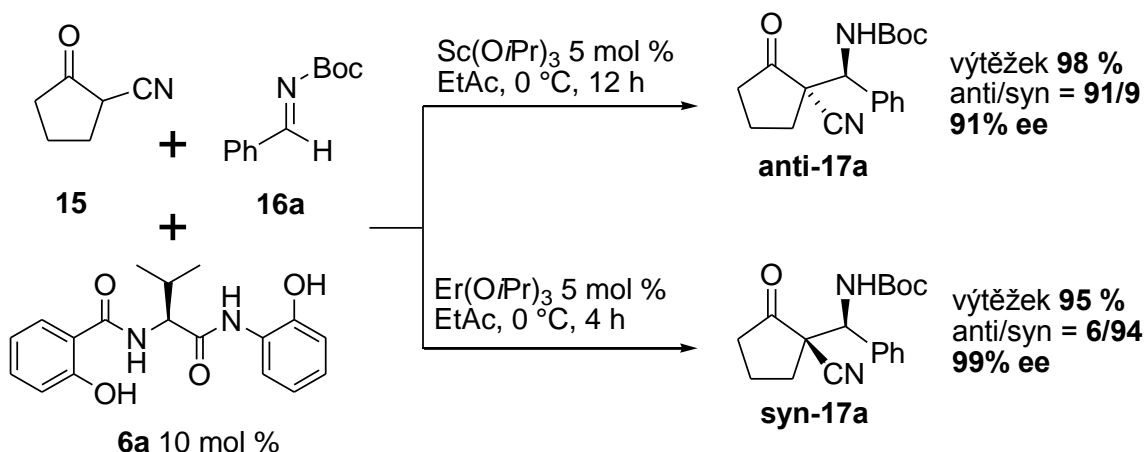
**Schéma 11:** Reakce Mannichova typu katalyzovaná komplexem Sc/**6a**

**Tabulka 3:** Přehled použitých iminů, výtěžků, poměru anti/syn izomerů a enantiomerního přebytku<sup>a</sup>

Imin					Imin				
kód	R	Výtěžek (%)	anti/syn <sup>b</sup>	ee (anti) (%)	kód	R	Výtěžek (%)	anti/syn <sup>b</sup>	ee (anti) (%)
<b>16a</b>	Ph	90	94/6	94	<b>16g</b>	2-FC <sub>6</sub> H <sub>4</sub>	88	90/10	96
<b>16b</b>	2-MeC <sub>6</sub> H <sub>4</sub>	90	91/9	93	<b>16h</b>	2-MeOC <sub>6</sub> H <sub>4</sub>	86	80/20	81
<b>16c</b>	4-MeC <sub>6</sub> H <sub>4</sub>	93	91/9	91	<b>16i</b>	4-MeOC <sub>6</sub> H <sub>4</sub>	97	85/15	77
<b>16d</b>	2-naftyl	97	90/10	94	<b>16j</b>	2-furyl	94	75/25	82
<b>16e</b>	2-ClC <sub>6</sub> H <sub>4</sub>	97	88/12	95	<b>16k</b>	3-thienyl	98	93/7	83
<b>16f</b>	4-ClC <sub>6</sub> H <sub>4</sub>	99	91/9	89	<b>16l</b>	Ph(CH <sub>2</sub> ) <sub>2</sub>	89	64/36	50

<sup>a</sup> **1a** a Sc(OiPr)<sub>3</sub> byly před přidáním ostatních složek 1 hodinu míchány společně při laboratorní teplotě. <sup>b</sup> Určeno pomocí <sup>1</sup>H NMR ze surového produktu.

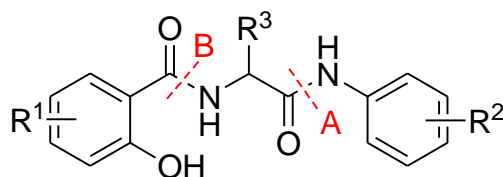
Změnou kovu je možné ovlivnit výslednou konformaci produktu (viz **Schéma 12**).<sup>25</sup>



**Schéma 12:** Vliv použitého kovu na poměr anti/syn vzniklého produktu **17a**

### 2.3 Retrosyntetická analýza cílové molekuly 2-hydroxy-*N*-[1-(2-hydroxyfenylamino)-1-oxoalkan-2-yl]benzamidů

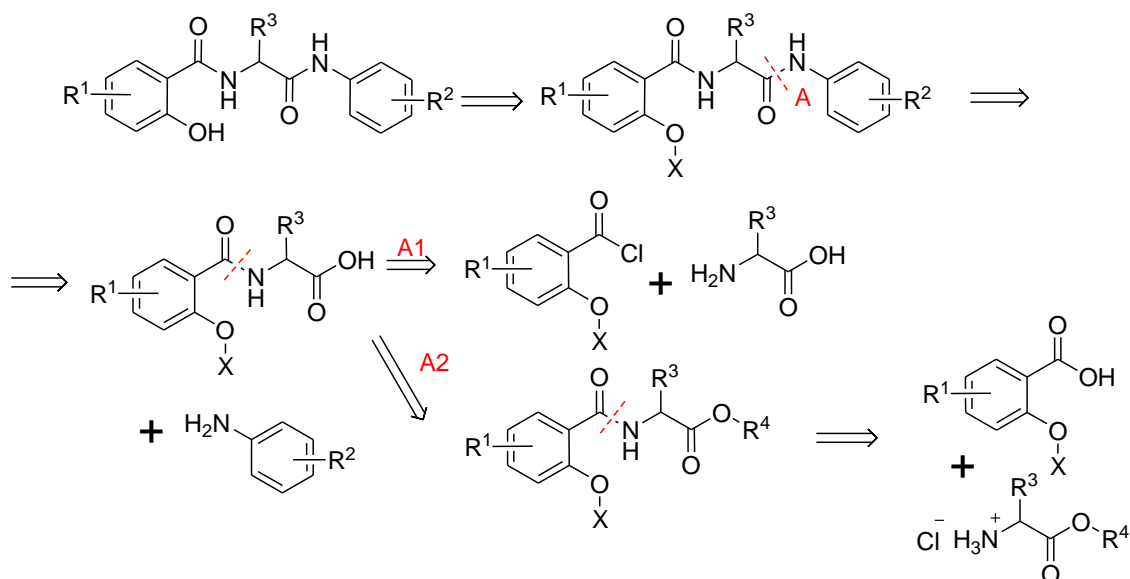
Cílem retrosyntetické analýzy je vhodnými diskonekcemi navrhnout logickou fragmentaci cílové molekuly ke snadno dostupným výchozím látkám. Jako vhodná místa diskonekce se na obecném vzorci diamidu (**Obrázek 4**) nabízejí vazby C-N obou amidických skupin. Je tak patrné, že molekula diamidu se skládá ze tří základních skeletů: ze substituované salicylové kyseliny, aminokyseliny a substituovaného anilinu. Zvolené pořadí diskonekcí pak určuje syntetickou cestu pro přípravu cílových molekul.



**Obrázek 4:** Obecný vzorec diamidu s naznačenými diskonekcemi

#### 2.3.1 Retrosyntetická analýza A

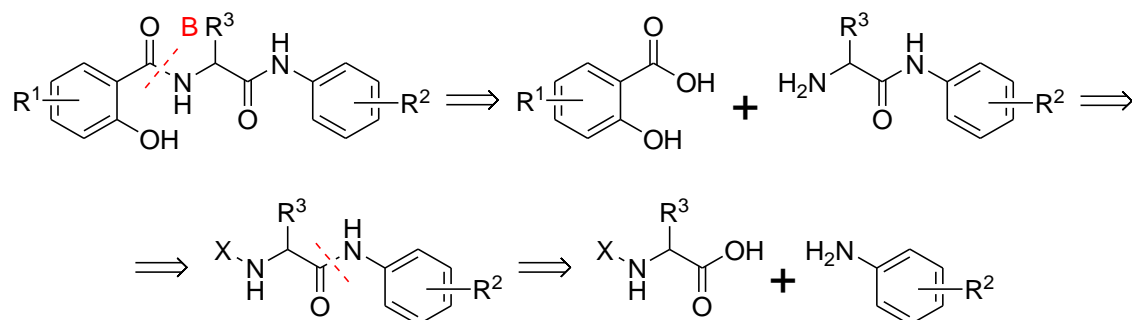
V případě, že jako první bude provedena diskonekce A, vychází syntetická cesta ze salicylové kyseliny. K té je v prvním kroku připojena aminokyselina za vzniku amidu. Cílová molekula je vytvořena reakcí amidu salicylové kyseliny-aminokyseliny se zvoleným anilinem za přítomnosti karbodiimidu. Retrosyntetická analýza je uvedena na **Schématu 13**.



**Schéma 13:** Retrosyntetická analýza cílové molekuly diamidu

### 2.3.2 Retrosyntetická analýza B

V případě, že jako první bude provedena diskonekce B, vychází syntetická cesta ze zvoleného substituovaného anilínu. Retrosyntetická analýza je uvedena na **Schématu 14**, z ní navržený postup syntézy byl již v podstatě popsán na **Schématu 6**.<sup>18</sup>



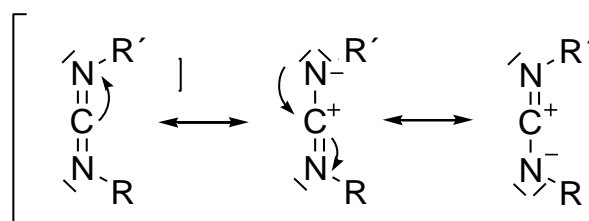
**Schéma 14:** Retrosyntetická analýza diamidu

## 2.4 Karbodiimidy

Karbodiimidy byly v této práci zvoleny jako aktivační činidla pro tvorbu amidické vazby. Na následujících stránkách je popsána jejich struktura, reaktivita, problematika vedlejších reakčních produktů na bázi močoviny a jsou uvedeny příklady jejich využití při formování nejen amidické, ale i esterové vazby.

### 2.4.1 Karbodiimidy obecně

Karbodiimidy patří do skupiny látek, které charakterizuje obecný vzorec  $R-N=C=N-R'$ . Na atomech dusíku se jako substituenty R mohou vyskytovat stejné nebo rozdílné alifatické i aromatické zbytky. Karbodiimidy našly největší uplatnění při tvorbě esterů a amidů. Esterifikace a tvorba amidů karboxylových kyselin jsou procesy často zatížené nízkými výtěžky z různých důvodů, nejčastějším důvodem bývají rovnováhy mezi reaktanty a produkty. Karbodiimidy zastávají roli činidel, díky kterým tyto reakce probíhají daleko rychleji s většími výtěžky.



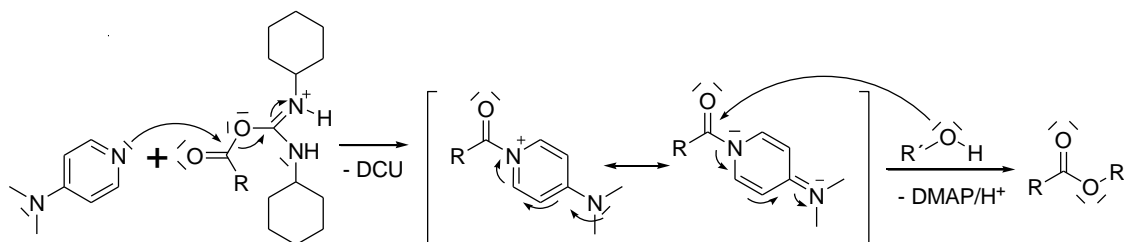
**Obrázek 5:** Rezonanční struktury karbodiimidů

Zobrazené rezonanční struktury (**Obrázek 5**) naznačují parciální náboje v obecné molekule karbodiimidu. Na atomech dusíku jsou parciální záporné náboje a budou tak centrem nukleofily, v průběhu reakce se na ně budou vázat protony. Atom uhlíku je oproti tomu elektrofilním centrem a jako takový bude cílem nukleofilního útoku disociované karboxylové kyseliny. Vznikne tak *O*-acylisomočovina, která se působením *O*-nukleofilu (alkoholátu nebo fenolátu) nebo *N*-nukleofilu (aminu) rozkládá na příslušný ester/amid a substituovanou močovinu.

Steglichova esterifikace byla jednou z prvních popsaných reakcí využívajících karbodiimid (*N,N'*-dicyklohexylkarbodiimid (**19**)) k přípravě esterů karboxylových kyselin (**18**) (**Schéma 15**). Tento druh esterifikací nemívá problém s rovnováhou, mohou se ale vyskytnout nežádoucí vedlejší reakce v případě nevratného přesmyku *O*-acylisomočoviny (**20**) na *N*-acylisomočovinu (**21**). Ve formě *N*-acylisomočoviny je karboxylová kyselina v nereaktivním stavu, čímž dochází ke ztrátám výchozí látky.

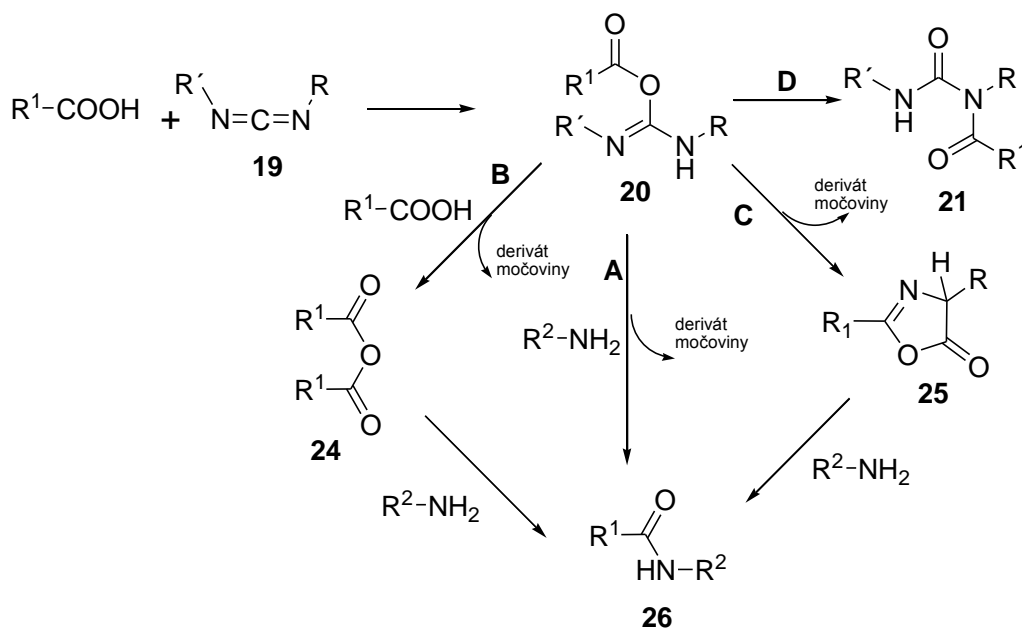






**Schéma 16:** Funkce DMAP při vzniku estera, *N,N'*-dicyklohexylmočovina (DCU) (5)

Tvorba amidů je směr, ve kterém našly karbodiimidy velmi významné uplatnění. Obdoby Steglichovy esterifikace pro amidy se hojně využívá při spojování vhodně chráněných aminokyselin do peptidů. Reakce probíhají v základě stejným mechanismem jako je demonstrováno na **Schématu 17**. Kromě přímé reakce *O*-acylisomočoviny (20) s aminem na amid (26, cesta A) se reakční průběh za určitých podmínek může ubírat jinými směry. Při nadbytku karboxylové kyseliny podléhá *O*-acylisomočovina reakci s druhou molekulou kyseliny a vzniká symetrický anhydrid (24, cesta B). Tento anhydrid pak reaguje s aminem na výsledný peptid. Další možností průběhu je cyklizace *O*-acylisomočoviny na oxazolón (25, cesta C), který se působením aminu opět rozkládá na výsledný amid. Nežádoucím směrem, kterým se reagující systém může ubírat, je jako u Steglichovy esterifikace přesmyk *O*-acylisomočoviny na stabilní a inertní *N*-acylmočovinu (21, cesta D). Tato reakce je ireverzibilní a spotřebovává výchozí kyselinu bez vzniku požadovaného amidu.<sup>26,27</sup>



**Schéma 17:** Průběh vzniku amidu za použití karbodiimidu

### 2.4.2 Problematika vedlejších produktů a její řešení

Při používání DCC vzniká jako vedlejší produkt neutrální *N,N'*-dicyklohexylmočovina (DCU, **22**), která je rozpustná v kyselině trifluoroctové, dimethylformamidu a velmi málo v ethylacetátu, což představuje problém při čištění produktů. Stopy DCU mohou u některých produktů zůstat například i po nákladném a zdlouhavém čištění kolonovou chromatografií. Nevýhodou je i to že DCU neabsorbuje UV a není tak detekovatelná při tenkovrstvé kapalinové chromatografii klasickou UV detekcí. Další možností je produkt opakovaně čistit rekrystalizací, což ale vede ke značnému snížení výtěžku. Z tohoto důvodu je DCC nahrazován například *N,N'*-diisopropylkarbodiimidem (DIC), *N*-cyklohexyl-*N'*-isopropylkarbodiimidem (CIC) nebo ve vodě rozpustnými *N*-ethyl-*N'*-(3-dimethylaminopropyl)karbodiimid hydrochloridem (EDCI·HCl) a *N*-cyklohexyl-*N'*-(β-[*N*-methylmorfolin]ethyl)karbodiimid *p*-toluensulfonátem (CMC). Ve vodě rozpustné karbodiimidy jako EDC (*N*-ethyl-*N'*-(3-dimethylaminopropyl)karbodiimid) a CMC mají tu výhodu, že jejich vedlejší močovinné produkty obsahují bazickou skupinu nebo atom nesoucí náboj a dají se odstranit promytím zředěnou kyselinou. Karbodiimid, který v sobě vhodně kombinuje reaktivitu a odstranitelnost vedlejších produktů, je bis{[4-(2,2-dimethyl-1,3-dioxolyl)methyl]}karbodiimid (BDDC).<sup>28</sup>

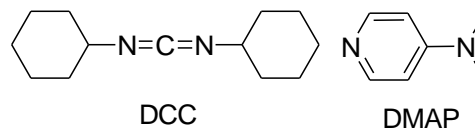
Ukotvení karbodiimidů na polymerní nosiče je další možností, jak usnadnit odstraňování vedlejších produktů. Ideou je vysrážení močovinných vedlejších produktů a přebytečného činidla po ukončení reakce rozpouštědlem, ve kterém není polymerní báze rozpustná. Jednoduchou filtrací se odstraní tuhá fáze, zatímco požadovaný produkt zůstává nadále rozpuštěn ve filtrátu. Z tohoto důvodu je nutné důkladně znát rozpustnosti polymerních bází.<sup>29</sup> Z literatury je jako příklady možné uvést použití polystyren-isopropylkarbodiimidu<sup>30</sup> nebo polystyren-*N*-benzyl-*N'*-cyklohexylkarbodiimidu<sup>31</sup>.

## 2.4.3 Konkrétní využití karbodiimidů

### 2.4.3.1 Esterifikace karboxylových kyselin

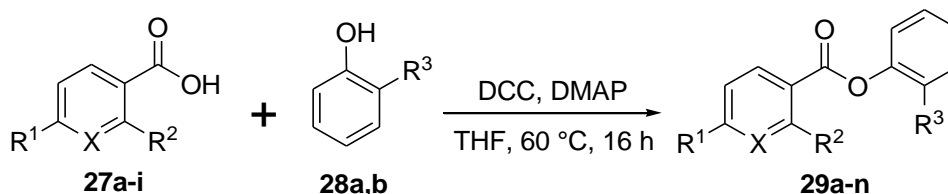
#### 2.4.3.1.1 *N,N'*-Dicyklohexylkarbodiimid (DCC) s DMAP

Steglichova esterifikace je velmi rozšířený a šetrný způsob tvorby esterů. Možnosti a omezení jsou ukázány ve **Schématu 18**

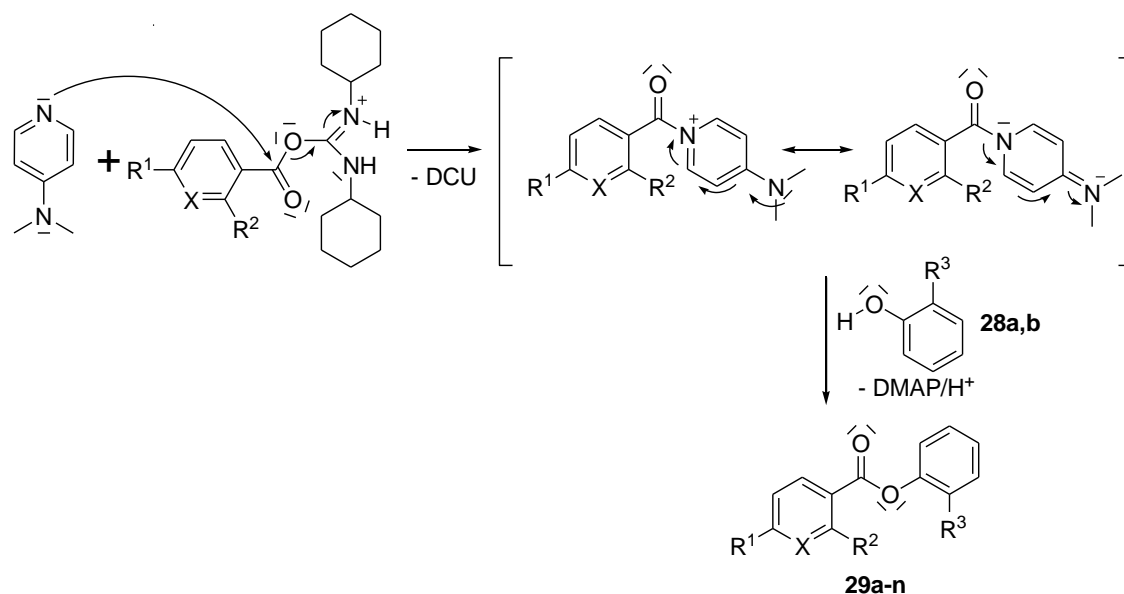


a **Tabulce 4**. 4-Dimethylaminopyridin (DMAP) funguje v reakční směsi jako silnější nukleofil než alkohol, proto reaguje s *O*-acylisomočovinou rychleji za vzniku reaktivního amidu. Ten následně reaguje s fenolem za vzniku esteru.<sup>32</sup> Funkce DMAP je uvedena na **Schématu 19**.

Obecný postup přípravy esterů **28a-n**: Benzoová kyselina (**27a-i**) (1,1 ekv), příslušný fenol (**28a,b**) (1 ekv) a DMAP (0,05-0,15 ekv) v katalytickém množství byly rozpuštěny v suchém THF (15-30 ml). DCC (1,5-2 ekv) bylo přidáno za laboratorní teploty. Směs byla míchána přes noc při teplotě 60 °C. Po ukončení reakce byla odfiltrována sraženina DCU a filtrát byl zkoncentrován za sníženého tlaku. Surový produkt byl přečištěn kolonovou chromatografií na silikagelu (mobilní fáze petrolether/EtAc).



**Schéma 18:** Esterifikace substituovaných karboxylových kyselin **27a-i** substituovanými fenoly **28a** a **28b** za podmínek Steglichovy esterifikace.

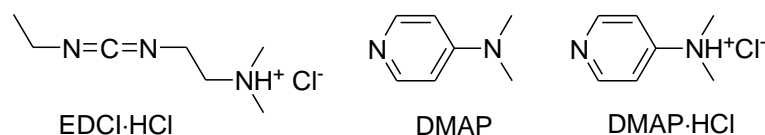
Schéma 19: Funkce DMAP při vzniku esterů **29a-n**

Tabulka 4: Přehled jednotlivých reaktantů, produktů a výtěžků

27	28	X	$R^1$	$R^2$	$R^3$	Produkt	Výtěžek (%)
a	a	CH	$\text{NO}_2$	H	I	<b>29a</b>	83
b	a	CH	$\text{NMe}_2$	H	I	<b>29b</b>	42
c	a	CH	I	H	I	<b>29c</b>	74
d	a	CH	OH	H	I	<b>29d</b>	39
e	a	CH	Me	H	I	<b>29e</b>	40
f	a	N	Br	H	I	<b>29f</b>	58
b	b	CH	$\text{NMe}_2$	H	$\text{PPh}_2$	<b>29g</b>	75
c	b	CH	I	H	$\text{PPh}_2$	<b>29h</b>	76
d	b	CH	OH	H	$\text{PPh}_2$	<b>29i</b>	73
e	b	CH	Me	H	$\text{PPh}_2$	<b>29j</b>	98
f	b	N	Br	H	$\text{PPh}_2$	<b>29k</b>	87
g	b	N	F	H	$\text{PPh}_2$	<b>29l</b>	21
h	b	N	H	Br	$\text{PPh}_2$	<b>29m</b>	76
i	b	N	H	F	$\text{PPh}_2$	<b>29n</b>	36

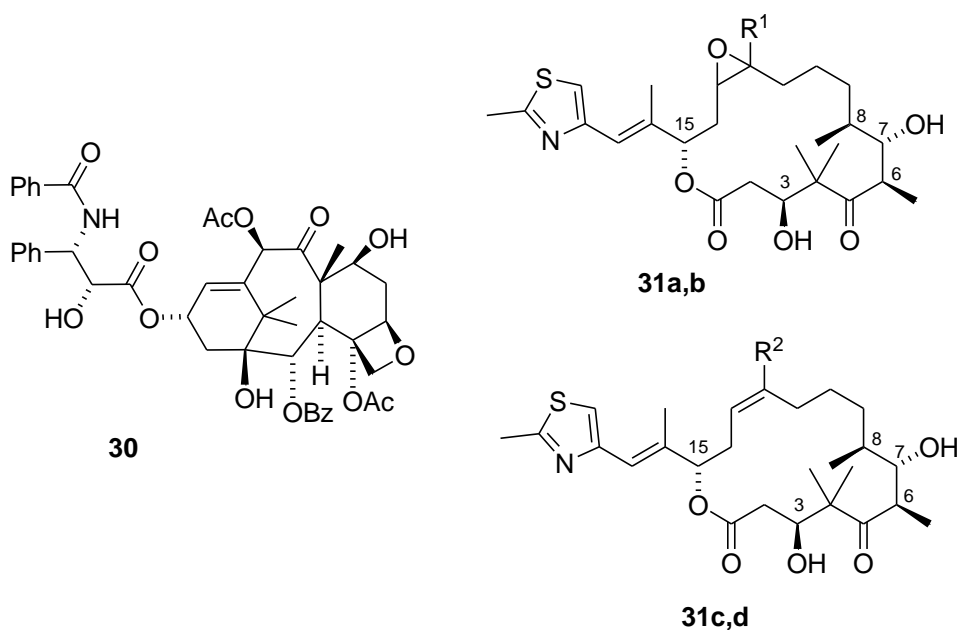
#### 2.4.3.1.2 *N*-Ethyl-*N'*-(3-dimethylaminopropyl)karbodiimid hydrochlorid (EDCI·HCl) s DMAP a DMAP·HCl

V současnosti je jednou z látek používaných k léčbě rakoviny



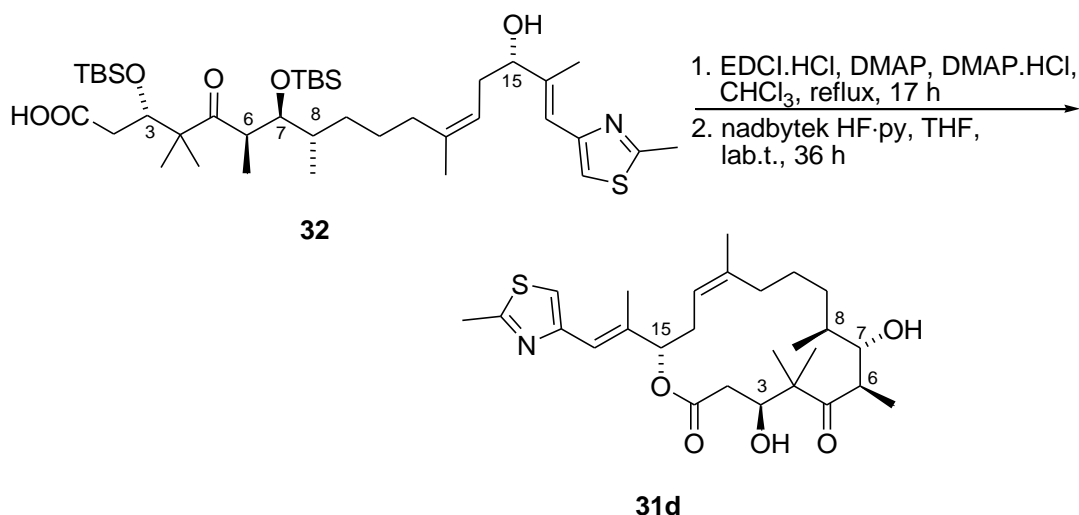
vaječníku paclitaxel (**30**), alkaloid izolovaný z kůry různých druhů tisů. I přes řadu nevýhod se tato látka ze skupiny cytostatik nachází ve fázi klinických testů proti rakovinám plic, krku a dalším. Mezi hlavní překážky v jejím širokém použití patří špatná dostupnost a vážné vedlejší účinky.<sup>33</sup> Z těchto důvodů bylo přistoupeno k hledání vhodnějších látek bez jmenovaných záporných vlastností. Jako nadějně se ukázaly látky

ze skupiny epothilonů, makrocyclických laktonů, které působí stejně jako paclitaxel jako inhibitory růstu nádorových buněk. Viz **Obrázek 7**. Jako nejperspektivnější se jeví epothilon D (**31d**), který při testech na myších prokázal nižší toxicitu a řádově lepší účinek v porovnání s druhým nejlepším epothilonem B (**31b**).<sup>34,35</sup>



**Obrázek 7:** Cytostatika v klinických testech: paclitaxel (**30**); epothilon A (**31a**) (R<sup>1</sup> = H); epothilon B (**31b**) (R<sup>1</sup> = CH<sub>3</sub>); epothilon C (**31c**) (R<sup>2</sup> = H); epothilon D (**31d**) (R<sup>2</sup> = CH<sub>3</sub>)

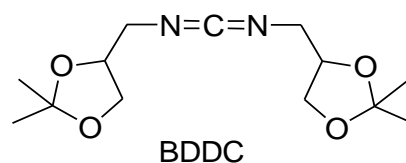
Příprava epothilonu D (**31d**) probíhala v několika krocích přípravou tří dílčích segmentů, které byly následně spojeny v meziprodukt **32**. Cyklizace tohoto meziproduktu pomocí EDCI·HCl, DMAP a DMAP·HCl byla provedena následujícím způsobem. Roztok EDCI·HCl (0,34 mmol, 2 ekv), DMAP (0,51 mmol, 3 ekv) a DMAP·HCl (0,34 mmol, 2 ekv) v suchém chloroformu (100 ml) byl refluxována (62 °C). Během 17 hodin byl přikapáván roztok meziproduktu **32** (0,17 mmol, 1 ekv) v suchém chloroformu (8 ml). Reakční směs byla ochlazená na laboratorní teplotu. Reakce byla ukončena přidáním nasyceného vodného roztoku NH<sub>4</sub>Cl (100 ml). Produkt byl po extrakci dichlormethanem usušen bezv. MgSO<sub>4</sub> a odpařen za sníženého tlaku. Odparek byl přečištěn flash kolonovou chromatografií (Hex/EtAc; 25/1). Bylo izolováno 84 mg (69 %) produktu. Posledním krokem bylo odstranění *tert*-butyldimethylsilylových chránících skupin pomocí směsi HF·pyridin.<sup>36</sup>



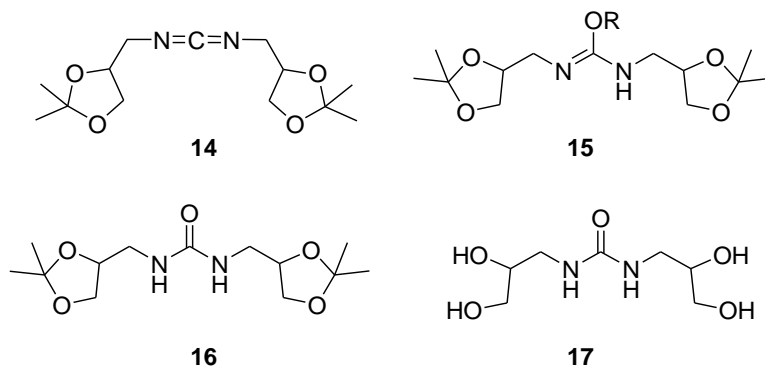
**Schéma 20:** Závěrečná část přípravy epothilonu D (**31d**) makrocyclizační reakcí za účasti EDCI·HCl

#### 2.4.3.1.3 Bis{[4-(2,2-dimethyl-1,3-dioxolyl)]methyl}karbodiimid (BDDC)

Karbodiimid, který dosahuje dobrých výtěžků při tvorbě jak amidů, tak esterů, a jeho močovina se dobře odstraňuje promytím zředěnou kyselinou, je bis{[4-(2,2-dimethyl-1,3-



dioxolyl)]methyl}karbodiimid (**BDDC**, **32**). V molekule močoviny vzniklé z BDDC (**34**) jsou zamaskovány čtyři hydroxylové skupiny, které po kyselé hydrolyze dodají molekule *N,N'*-bis(2,3-dihydroxyprop-1-yl)močoviny (**35**) značnou hydrofilitu a usnadní tak její extrakci do vodné fáze. Přehled jednotlivých forem je uveden na **Schématu 21**.

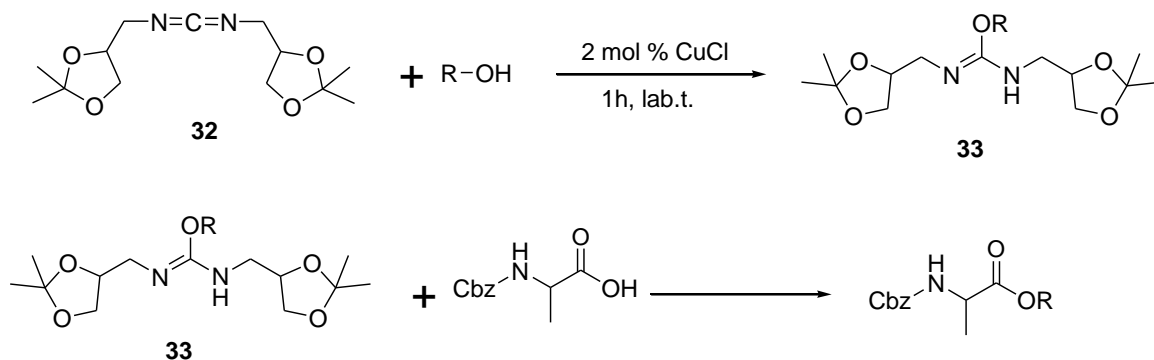


**Schéma 21:** Přehled forem, kterými BDDC prochází při esterifikaci/amidaci - BDDC (**32**), *O*-acylisomočovina (**33**), močovina (**34**) a močovina s ochráněnými hydroxylovými skupinami (**35**)

BDDC je možné využít na přípravu esterů, amidů i na dehydratace. Při přípravě esterů bylo netradičně přistoupeno nejdříve k tvorbě *O*-alkylisomočoviny **33**, která následně reagovala s *N*-chráněnou aminokyselinou za vzniku esteru. Postup přípravy esterů je uveden na **Schématu 22**. V **Tabulce 5** je přehled použitých aminokyselin a peptidů, reakčních podmínek a výtěžků.

Postup: BDDC (**32**) byla převedena při laboratorní teplotě s alkoholem (4 ekv) a  $\text{CuCl}_2$  (0,02 ekv) kvantitativně a bez vedlejších produktů na *O*-alkylisomočovinu (**33**). Reakce byla monitorována pomocí IČ. Ve spektrech byl na začátku reakce patrný absorpční pás karbodiimidu ( $2130\text{ cm}^{-1}$ ), který postupně slábl. Během reakce se začal objevovat pás *O*-alkylisomočoviny ( $1660\text{ cm}^{-1}$ ). Čistý produkt byl izolován pouhým odpařením přebytečného alkoholu.

*O*-Alkylisomočovina (3,5-4 ekv) (**33**) dále reagovala s Cbz-Ala (1 ekv) v suchém toluenu (10 ml). Reakce byla po přidání všech reaktantů a ohřátí na  $85\text{ }^\circ\text{C}$  prováděna 20 hodin. Reakční směs byla poté odpařena za sníženého tlaku dosucha. Odparek byl rozpuštěn v EtAc a nezreagovaná *O*-alkylisomočovina (**33**) a močovina (**34**) byly odstraněny dvojitým promytím roztokem 1M HCl a jedním promytím roztokem hydrogenuhličitanu. Po odpaření EtAc byl izolován čistý produkt esterifikace. Čistota byla ověřena TLC a NMR.



**Schéma 22:** Příprava esterů pomocí BDDC(**32**)

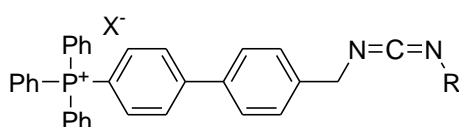
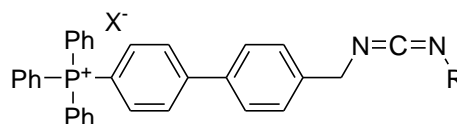
**Tabulka 5:** Přehled použitých aminokyselin/peptidů, reakčních podmínek a výtěžků při přípravě esterů<sup>28</sup>

Substrát	Reakční podmínky	R	Výtěžek (%)
Cbz-Ala	toluen, 85 °C, 20 h	<i>t</i> -Bu	94
Cbz-Ala	THF, 45 °C, 20 h	Bn	92
Cbz-Ala	THF, reflux, 16 h	<i>i</i> -Pr	87
Cbz-Ala	DMF, lab.t., 16 h	Et	81
Cbz-Ala	DMF, lab.t., 16 h	Me	93
Cbz-Ala-Phe	toluen, 85 °C, 20 h	<i>t</i> -Bu	87
Cbz-Ala-Phe	DMF, lab.t., 20 h	Me	82

#### 2.4.3.1.4 Tetraarylfosfoniumkarbodiimidy s DMAP

Zavedením tetraarylfosfoniové skupiny do molekuly lze ovlivňovat její polaritu a tím pozměňovat její rozpustnost. Tímto způsobem lze upravovat činidla pro dosažení homogenních

podmínek během reakce.<sup>37</sup> Za účelem zlepšení rozpustnosti karbodiimidů a jejich močovinových produktů (v CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, CH<sub>3</sub>CN, DMSO, PhCN, DMF) bylo přistoupeno ke spojení tetraarylfosfoniové skupiny s karbodiimidovým skeletem. Vedlejší produkty mohou být po reakci vysráženy přidávkem méně polárního rozpouštědla (hexan, diethylether, toluen) a následným odfiltrováním. Série připravených karbodiimidů (**Obrázek 4**) byla připravena obměňováním skupiny R.

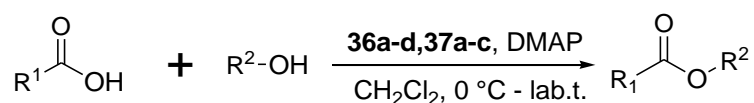


Látka	X <sup>-</sup>	R
<b>36a</b>	PF <sub>6</sub>	Et
<b>36b</b>	PF <sub>6</sub>	<i>i</i> -Pr
<b>36c</b>	PF <sub>6</sub>	<i>c</i> -Hex
<b>36d</b>	PF <sub>6</sub>	Bn
<b>37a</b>	OTf	Et
<b>37b</b>	OTf	<i>i</i> -Pr
<b>37c</b>	OTf	<i>c</i> -Hex

**Obrázek 8:** Obecný vzorec tetraarylfosfoniumkarbodiimidů (**36a-d**, **37a-c**)

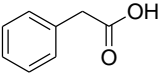
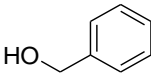
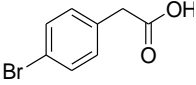

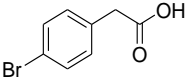
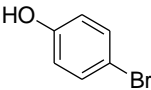
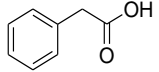
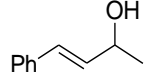


Připravené karbodiimidy (**36a-d**, **37a-c**) byly použity při sérii esterifikací s různými substráty (**Schéma 23**). Výchozí látky reagovaly v poměrech tetraarylfosfoniumkarbodiimid (1,1 ekv), karboxylová kyselina (1,0 ekv), alkohol (1,0 ekv) nebo fenol (3,0 ekv) a DMAP (0,1 ekv). Reakce probíhaly 3 hodiny a vedlejší močovinné produkty byly vysráženy přidávkem diethyletheru a následnou filtrací. Karbodiimidy byly posuzovány ze dvou hledisek. Prvním bylo porovnání výtěžku reakce s reakcí provedenou za přítomnosti DCC nebo EDCI·HCl/HOBt. Druhým bylo určení efektivity, s jakou jsou odstraňovány fosforové soli vysrážením a následnou filtrací. Oba faktory jsou uvedeny v **Tabulce 6**.



**Schéma 23:** Obecná reakce popisující přípravu esterů za použití tetraarylfosfoniumkarbodiimidů (**36a-d, 37a-c**)

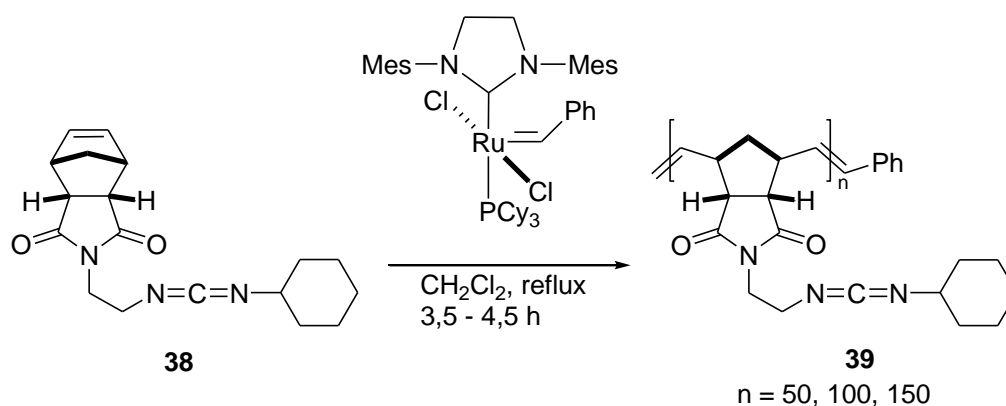
**Tabulka 6:** Přehled použitých karboxylových kyselin a alkoholů/fenolů, výtěžky a čistota produktů

Karboxylová kyselina	Alkohol/fenol	DCC nebo EDCI·HCl /HOBt	Výtěžek <sup>a</sup> /čistota <sup>b</sup> (%)						
			<b>36a</b>	<b>36b</b>	<b>36c</b>	<b>36d</b>	<b>37a</b>	<b>37b</b>	<b>37c</b>
		87	97 /98	92 /98	82	91 /98	90 /93	99 /95	77
		91 <sup>c</sup>	83 /98	84 /98	67	75 /92	51 /92	52 /98	41
		89 <sup>c</sup>	97	89	93	81	93	89	76
		92	88	-	-	-	-	-	-

<sup>a</sup> Výtěžky byly stanoveny pomocí NMR a izolací produktu reakce. <sup>b</sup> Čistota je vyjádřena (% očekávaného produktu) – (% zbytkové fosfoniové soli). <sup>c</sup> Při reakce bylo použito DCC (1,2 ekv).<sup>38</sup>

### 2.4.3.1.5 Polymerní karbodiimidy

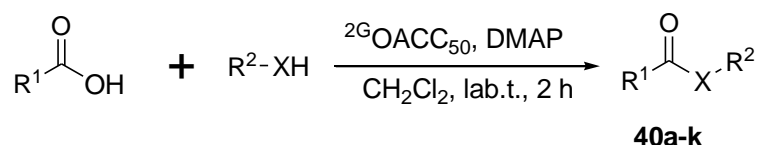
Polymerní karbodiimidy jsou známy již dlouhou dobu. Jejich použití je výhodné z důvodu snadné odstranitelnosti močovinných vedlejších produktů pouhým vysrážením a odfiltrváním. V nedávné době byly připraveny nové oligomerní alifatické cyklohexylkarbodiimidy ( ${}^2\text{G}\text{OACC}_n$ ) (**39**) ROM polymerizací s Grubbovými katalyzátory 2. generace na bázi ruthenia (**Schéma 24**). Délka polymeru je určována molárním poměrem použitého katalyzátoru vůči výchozímu monomeru, *N*-cyclohexyl-*N'*-(2-succinimidoethyl)carbodiimidu (**38**).



**Schéma 24:** Příprava  ${}^2\text{G}\text{OACC}_n$  ROM polymerizací (molární poměr katalyzátoru k monomeru 77:0; 67-2 ekv; výtěžky 90 – 98 %), Mes - 1,3,5-trimethylbenzen (mesitilen)

Činidla  ${}^2\text{G}\text{OACC}_n$  ( $n = 50, 100, 150$ ) jsou rozpustná v  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ , THF a DMSO a nerozpustná v  $\text{Et}_2\text{O}$ , EtAc a MeOH. Přebytek činidla a vedlejší močovinné produkty se vysráží a jsou odstraněny filtrací.

Účinnost činidla  ${}^2\text{G}\text{OACC}_{50}$  byla experimentálně ověřena na sérii modelových esterifikací karboxylových kyselin (aromatických i alifatických) se širokou škálou alkoholů, thiolů a fenolů. Esterifikace (**Schéma 25**) byla prováděna 2 hodiny při laboratorní teplotě v  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  za použití 1 ekvivalentu kyseliny, 1 ekv. alkoholu, thiolu nebo fenolu, 1,5 ekv.  ${}^2\text{G}\text{OACC}_{50}$  (za předpokladu 3,2 mmol/g) a DMAP. K reakční směsi byl na závěr přidán ether, pevný podíl byl odfiltrován a filtrát byl promyt vodou za účelem odstranění přebytečného DMAP. Organická fáze byla odpařena za sníženého tlaku a odparek byl na fritě s vrstvou silikagelu propláchnut EtAc. Thioestery a estery (**40a-k**) byly izolovány z EtAc ve formě olejů. Přehled produktů, výtěžků a čistoty je uveden v **Tabulce 7**.<sup>29</sup>



**Schéma 25:** Obecná reakce popisující přípravu esterů za použití  $^{2\text{G}}\text{OACC}_{50}$

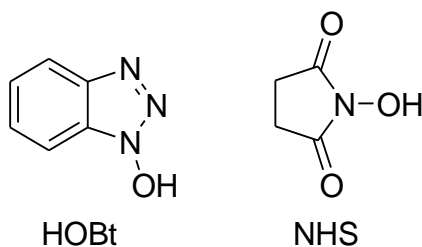
**Tabulka 7:** Přehled použitých reaktantů, výtěžky a čistota produktů

R <sup>1</sup>	R <sup>2</sup> XH	Produkt	Výtěžek (%) <sup>a</sup>	Čistota (%) <sup>b</sup>
Ph	BnOH	<b>40a</b>	95	97
Ph	CH <sub>2</sub> =CH(CH <sub>2</sub> ) <sub>2</sub> OH	<b>40b</b>	91	98
Br(CH <sub>2</sub> ) <sub>5</sub>	BnOH	<b>40c</b>	95	95
Br(CH <sub>2</sub> ) <sub>5</sub>	MeS(CH <sub>2</sub> ) <sub>3</sub> OH	<b>40d</b>	94	98
Br(CH <sub>2</sub> ) <sub>5</sub>	BnCH(OH)CH <sub>3</sub>	<b>40e</b>	99	95
Ph	<i>n</i> -BuSH	<b>40f</b>	98	97
Ph	CH <sub>3</sub> (CH <sub>2</sub> ) <sub>10</sub> SH	<b>40g</b>	95	98
Br(CH <sub>2</sub> ) <sub>5</sub>	<i>n</i> -BuSH	<b>40h</b>	81	97
Br(CH <sub>2</sub> ) <sub>5</sub>	CH <sub>3</sub> (CH <sub>2</sub> ) <sub>10</sub> SH	<b>40i</b>	85	96
Br(CH <sub>2</sub> ) <sub>5</sub>	PhOH	<b>40j</b>	97	97
Br(CH <sub>2</sub> ) <sub>5</sub>	C <sub>6</sub> F <sub>5</sub> OH	<b>40k</b>	98	98

<sup>a</sup> Výtěžek po promytí přes vrstvu silikagelu na fritě. <sup>b</sup> Stanoveno plynovou chromatografií a potvrzeno <sup>1</sup>H NMR.

#### 2.4.3.2 Tvorba amidů s využitím karbodiimidů

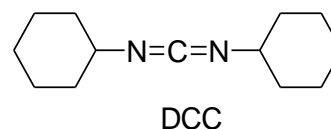
Tvorba amidů s využitím karbodiimidů probíhá stejným způsobem jako esterifikace (viz **Schéma 15**). Karboxylová kyselina nejdříve reaguje s karbodiimidem na *O*-acylisomočovinu (**20**), která dále reaguje s aminem na výsledný amid. Paralelně se ale *O*-acylisomočovina (**20**) může nevratně přesmykovat na nereaktivní *N*-acylisomočovinu (**21**), což vede ke ztrátám výchozí látky. Pomocné činidlo funguje v reakční směsi jako silnější nukleofil než amin a reaguje s *O*-acylisomočovinou rychleji za vzniku reaktivního amidu (meziprodukt). Intermediát nemůže intramolekulárně vytvářet nereaktivní vedlejší produkty, kvůli kterým by docházelo ke ztrátám. Navázané pomocné činidlo se ale následně velmi snadno odštěpuje a uvolňuje místo pro amin, který s reaktivním amidem (meziproduktem) dává žádaný výsledný amid. Při syntézách amidů se jako pomocná činidla používají 1-hydroxybenzotriazol (HOBt), *N*-hydroxysukcinimid (NHS) a další. Vzorce dvou jmenovaných činidel jsou uvedeny na **Obrázku 9**, přehled těchto a dalších je uveden v příloze v **Tabulce 17**. Mechanismus účinku pomocného činidla je uveden na **Schématu 28**.



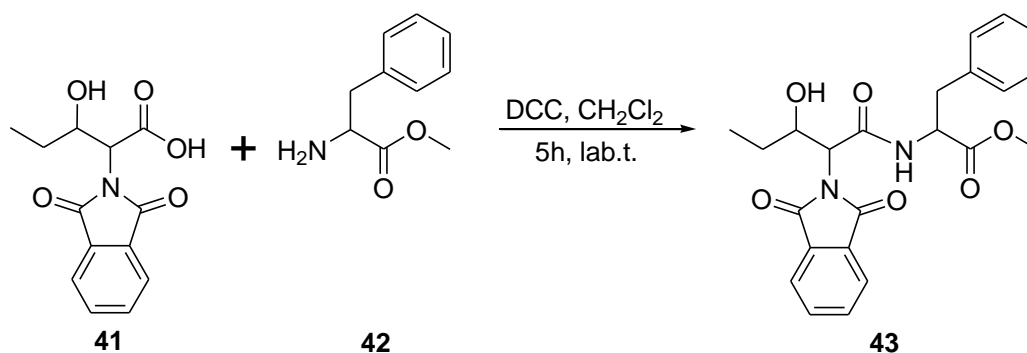
**Obrázek 9:** Vzorce často používaných pomocných činidel

#### 2.4.3.2.1 *N,N'*-Dicyklohexylkarbodiimid (DCC)

L-fenylalanin methylester (**42**) (20 mmol) byl přidán do roztoku *N*-ftaloyl-L-threoninu (**41**) (10 mmol) v  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  (40 ml). Následně byl přidán DCC (10 mmol), téměř okamžitě se v roztoku začala vytvářet sraženina



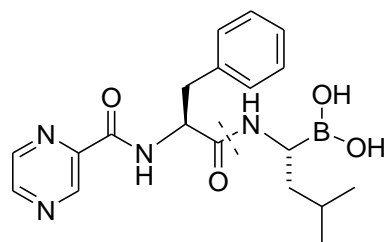
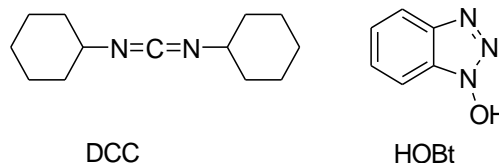
*N,N'*-dicyklohexylmočovina (DCU). Po pěti hodinách při laboratorní teplotě byla močovina odfiltrována a promyta  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  (20 ml). Roztok vzniklý spojením obou podílů  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  byl promyt roztokem 1M HCl (30 ml), roztokem 1M  $\text{KHCO}_3$  (30 ml) a vodou (30 ml). Byl usušen  $\text{MgSO}_4$  a odpařen do sucha za sníženého tlaku. Odparek byl rekrystalizován ze směsi aceton/ether. Byl izolován čistý peptid *N*-ftaloyl-L-threonyl-L-fenylalanin methylesteru (**43**) (91 %). Bod tání 149-152 °C. Příprava je znázorněna na **Schématu 26**.<sup>39</sup>



**Schéma 26:** příprava *N*-ftaloyl-L-threonyl-L-fenylalanin methylesteru (**43**)

### 2.4.3.2.2 *N,N'*-Dicyklohexylkarbodiimid (DCC) s HOBt

Bortezomib (**Obrázek 10**), známý též pod názvem Velcade, je léčivo účinkující proti nádorovému onemocnění krevních buněk (mnohočetný myelom) a lymfomu z plášťových buněk (mantle cell lymphoma).<sup>40</sup> V současné době se nachází ve 3. fázi klinických testů a jeví se velmi perspektivně.

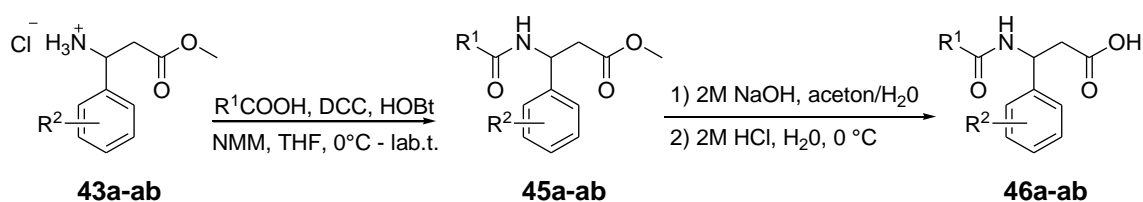


**Obrázek 10:** Vzorec bortezomibu

V této práci je popsána příprava knihovny dipeptidyl boronových kyselin se strukturou podobnou bortezomibu. Při syntéze jsou odděleně připraveny hydrochlorid ochráněné 2-amino boronové kyseliny a dipeptidová kyselina. V jednom z kroků přípravy dipeptidu je jako činidlo použito kombinace DCC/HOBt. Při spojení obou bloků peptidovou vazbou je využito kombinace EDCI·HCl/HOBt – více v kapitole 2.4.3.2.6. Posledním krokem je kyselá katalyzovaná hydrolyza obou hydroxylových skupin.

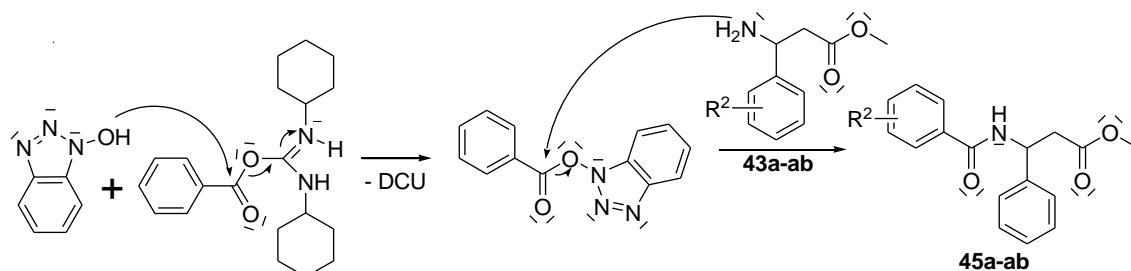
Postup přípravy 3-benzamido-3-(2-fluorofenyl)propanové kyseliny (**44a**) podle dostupné literatury (viz **Schéma 27**): Benzoová kyselina (0,64 g, 5,2 mmol) byla rozpuštěna v bezvodém THF (20 ml). Roztok byl vychlazen na 0° C. Byl přidán HOBt (0,84 g, 6,2 mmol) a DCC (1,07 g, 5,2 mmol). Předložené látky byly míchány 40 minut. Poté byla přidána směs NMM (0,7 ml, 6,2 mmol) a methyl 3-benzamido-3-(2-fluorofenyl)propanoát hydrochloridu (1,21 g, 5,2 mmol). Reakční směs byla pozvolna zahřáta na laboratorní teplotu a míchána 4 hodiny. Vysrážený pevný podíl byl odfiltrován a rozpouštědlo bylo odpařeno za sníženého tlaku. Bílý odparek byl rozpuštěn v EtAc (50 ml). Organická fáze byla promyta 10% roztokem kyseliny citronové, 5% roztokem NaHCO<sub>3</sub> a nasyceným roztokem NaCl. Roztok byl usušen bezvodým Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> a po filtraci a odpaření byl izolován surový produkt (**45a**), který byl bez dalších čištění použit do další reakce.

Připravený methylester (**45a**) (1 g, 3,32 mmol) byl rozpuštěn v acetonu (10 ml) a studené vodě (5 ml). Hydrolýza byla provedena přidavkem 2M roztoku NaOH (3 ml). Po 2 hodinách byl aceton odpařen za sníženého tlaku a reakční směs okyselena 2M roztokem HCl na pH 2. Produkt byl extrahován ethylacetátem, který byl následně usušen Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>. Po odpaření rozpouštědla byla získána bezbarvá látka (**46a**) (0,71 g, 74,6 %). Přípravy ostatních sloučenin byly provedeny stejným výše popsaným postupem z příslušných β-amino kyselin a karboxylových kyselin. Přehled připravených látek je uveden v **Tabulce 8**.



**Schéma 27:** Obecný postup přípravy dipeptidů (**46a-ab**)

Mechanismus účinku pomocného činidla je uveden na **Schématu 28**.



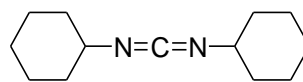
**Schéma 28:** Funkce HOBt při vzniku amidů **45a-ab**

**Tabulka 8:** Přehled připravených dipeptidů<sup>41</sup>

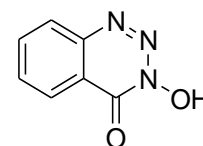
Číslo látky	R <sup>1</sup>	R <sup>2</sup>	Výtěžek sekvence (%)	Číslo látky	R <sup>1</sup>	R <sup>2</sup>	Výtěžek sekvence (%)
<b>46a</b>	Ph	2-F	74,6	<b>46o</b>	Ph	4-Me	80,4
<b>46b</b>	Ph	3-F	72,9	<b>46p</b>	Ph	H	80
<b>46c</b>	Ph	4-F	49,7	<b>46q</b>	3-pyridyl	2-F	62
<b>46d</b>	Ph	2-Cl	62,5	<b>46r</b>	3-pyridyl	3-F	48
<b>46e</b>	Ph	3-Cl	82,3	<b>46s</b>	3-pyridyl	4-F	74
<b>46f</b>	Ph	4-Cl	89,3	<b>46t</b>	3-pyridyl	2-Cl	69
<b>46g</b>	Ph	2-OMe	85,4	<b>46u</b>	3-pyridyl	3-Cl	81,7
<b>46h</b>	Ph	3-OMe	69,1	<b>46v</b>	3-pyridyl	2-OMe	68,4
<b>46i</b>	Ph	4-OMe	79,2	<b>46w</b>	3-pyridyl	3-OMe	68,4
<b>46j</b>	Ph	2-NO <sub>2</sub>	60,4	<b>46x</b>	3-pyridyl	2-NO <sub>2</sub>	44
<b>46k</b>	Ph	3-NO <sub>2</sub>	49,7	<b>46y</b>	3-pyridyl	3-NO <sub>2</sub>	72,3
<b>46l</b>	Ph	4-NO <sub>2</sub>	80,9	<b>46z</b>	3-pyridyl	4-NO <sub>2</sub>	59
<b>46m</b>	Ph	2-Me	49,1	<b>46aa</b>	3-pyridyl	2-Me	52
<b>46n</b>	Ph	3-Me	84,6	<b>46ab</b>	3-pyridyl	3-Me	70,2

### 2.4.3.2.3 *N,N'*-Dicyklohexylkarbodiimid (DCC) s DhbtOH

Peptidové nukleové kyseliny (PNA) je nová mladá a perspektivní skupina látek, která může najít uplatnění v biologii, biotechnologii, medicíně, molekulovém

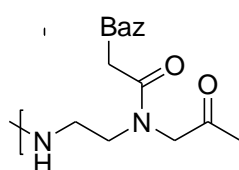


DCC



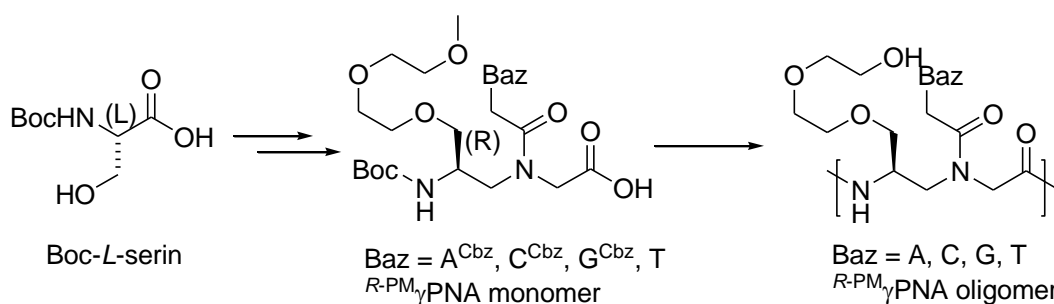
DhbtOH

inženýrství nebo výzkumu léčiv. Základní skelet (viz **Obrázek 11**) se skládá z monomerních jednotek *N*-(2-aminoethyl)-glycinu, které jsou spojeny peptidovou vazbou. K základní kostře jsou methylenkarbonylovou skupinou navázány rozdílné purinové a pyrimidinové báze.



**Obrázek 11:** Základní skelet peptidových nukleových kyselin (PNA), Baz – nukleová báze (thymin, cystein, adenin, guanin)

Pro zlepšení rozpustnosti ve vodě bylo přistoupeno k zavedení malé hydrofilní (R)-diethylen glykol skupiny („miniPEG“, R-MP) do polohy  $\gamma$  na základním skeletu. Tato úprava vedla k reorganizaci původně neuspořádané PNA do pravotočivé spirály. Idea přípravy R-MP $\gamma$ PNA oligomeru je naznačena na **Schématu 29**. Syntézu je možné provést sérií jednoduchých kroků a vychází komerčně dostupného Boc-L-serinu.

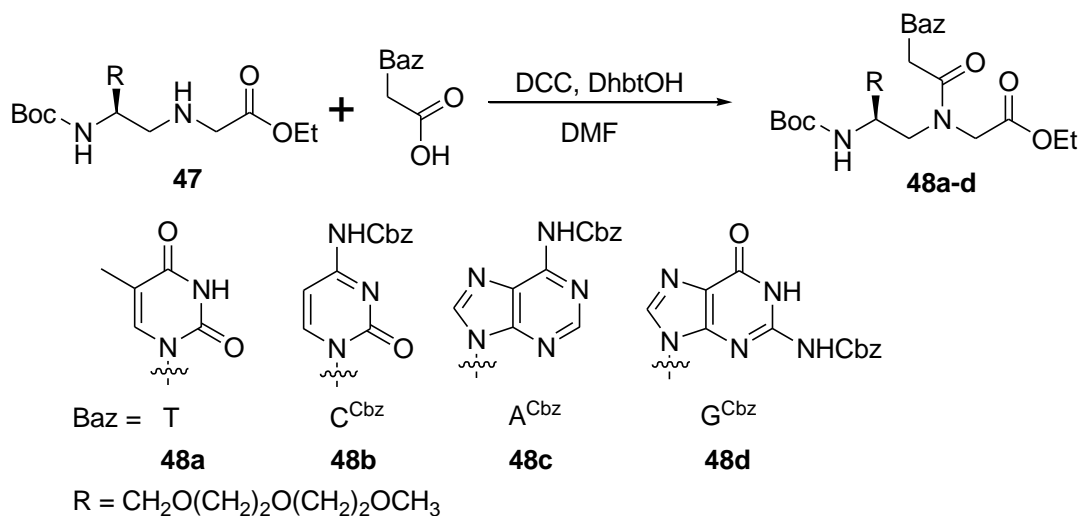


**Schéma 29:** Postup při přípravě  $R\text{-PN}_\gamma\text{PNA}$  oligomerů

Na **Schématu 30** je zobrazen stupeň, ve kterém je k základnímu skeletu připojena nukleová báze.

Postup přípravy Boc-(2-(2-methoxyethoxy)ethyl)-L-serine thymin ethylesteru (**48a**) podle dostupné literatury: K roztoku thymin octové kyseliny (0,287 g, 1,56 mmol) v suchém DMF (15 ml) pod inertní atmosférou bylo přidáno DCC (0,324 g, 1.56 mmol)

a DhbtOH (0,254 g, 1,56 mmol). Směs byla míchána 1 hodinu při laboratorní teplotě. Látka **47** (0,5 g, 1,32 mmol) rozpuštěná v DMF (10 ml) byla přidána do reakční směsi, která byla při 50 °C míchána 24 hodin. Rozpouštědlo bylo odpařeno za sníženého tlaku. Odparek byl rozpuštěn v EtAc (100 ml) a promyt nasyceným roztokem NaHCO<sub>3</sub> (100 ml), 10% KHSO<sub>4</sub> (100 ml), nasyceným roztokem NaCl (50 ml) a usušen bezvodým Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>. Rozpouštědlo bylo odpařeno za sníženého tlaku. Surový produkt byl přečištěn kolonovou chromatografií a bylo získáno 0,480 g bezbarvých krystalů (67 %). Deriváty s ostatními nukleovými bázemi **48b-d**) byly připraveny stejným postupem s výtěžky 67-85 %.



**Schéma 30:** Připojení nukleové báze navázané na kyselině octové na základní skelet, přehled použitých nukleových bází <sup>42</sup>

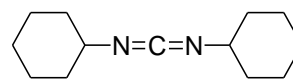
#### 2.4.3.2.4 Příprava amidů s polymerně navázaným substrátem za účasti *N,N'*-dicyklohexylkarbodiimidu (DCC) s DMAP

*N,N'*-dicyklohexylkarbodiimid nachází použití

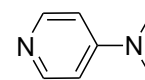
při syntézách, kde je substrát navázan na polymerním skeletu. Výhodou těchto syntéz je

snadné odstranění přebytečných výchozích

látek a vedlejších produktů jednoduchým promýváním vhodným rozpouštědlem, ve kterém polymer není rozpustný. Sraženina se odstraní jednoduchou filtrací. V tomto případě vystupuje jako pevná fáze 2-methylenindolin navázaný ve formě selenoetheru na polystyrenový skelet (**49**).



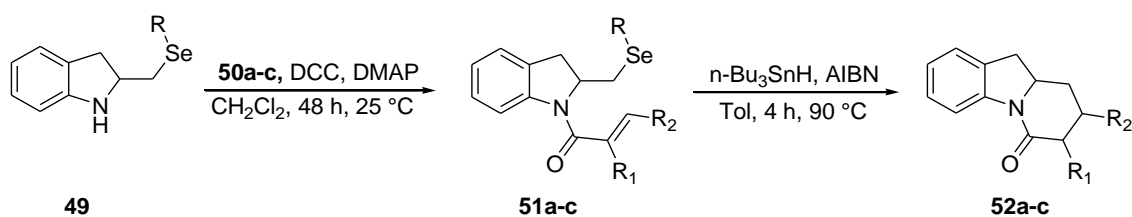
DCC



DMAP

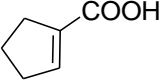
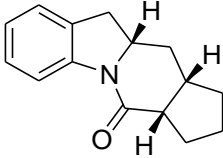
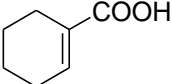
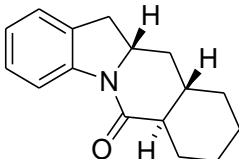
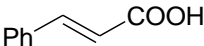
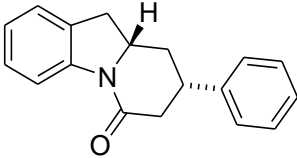


Postup přípravy: V prvním kroku reagovala suspenze 2-methylenindolinu navázaném na polymeru (0,15 mmol, 1 ekv) v dichlormethanu (5 ml) s  $\alpha,\beta$ -nenасыcenou kyselinou (**50a-c**) (1,5 mmol, 10 ekv) na amid (**51a-c**). Jako aktivační činidlo bylo použito DCC (1,5 mmol, 10 ekv) a DMAP (0,2 mmol, 1,3 ekv). Suspenze (**51a-c**) byla míchána při 25 °C po dobu 48 hodin. Suspenze byla zfiltrována přes fritu a následně byla promyta dichlormethanem (5x10 ml), metanolem (10x10 ml) a diethyletherem (5x10 ml). Polymerní báze byla suspendována v toluenu (4 ml) a zahřáta na 90 °C. Po dobu 4 hodin byl do suspenze amidu přikapáván roztok  $n\text{-Bu}_3\text{SnH}$  (0,6 mmol, 4 ekv) a azobisisobutyronitrilu (0,2 mmol, 1,3 ekv) v toluenu (1 ml). Sloučenina selenu tvoří v přítomnosti  $n\text{-Bu}_3\text{SnH}$  a azobisisobutyronitrilu (AIBN) uhlíkový radikál. V jeho dosahu se jako vhodný akceptor nachází dvojná vazba navázané nenасыcené kyseliny a cyklizací vznikne vedle 2-methylenindolinu další kruh. Po přidavku roztoku byla reakční směs ochlazena na 25 °C, pevná polystyrenová fáze byla odfiltrována a promyta dichlormethanem (2x10 ml). Filtrát byl odpařen a surový amid (**52a-c**) byl přečištěn kolonovou chromatografií. Obecná reakce je znázorněna na **Schématu 31**. Přehled použitých kyselin a připravených produktů je spolu s výtěžky uveden v **Tabulce 9**.<sup>43</sup>



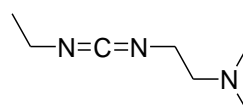
**Schéma 31:** Příklad použití DCC při syntéze na pevné fázi, polystyrenový skelet - R

**Tabulka 9:** Přehled použitých  $\alpha,\beta$ -nenasycených kyselin, produktů a výtěžků

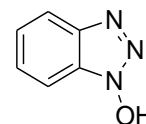
$\alpha,\beta$ -nenasycená kyselina	Produkt	Výtěžek (%)
<b>50a</b> 	<b>52a</b> 	26
<b>50b</b> 	<b>52b</b> 	36
<b>50c</b> 	<b>52c</b> 	13

#### 2.4.3.2.5 *N*-Ethyl-*N'*-(3-dimethylaminopropyl)karbodiimid hydrochlorid (EDC) s HOBT

EDC bylo použito při přípravě molekul ze dvou stejných Boc-chráněných aminokyselin (Lys, Ala, Gln, Phe, Cys, Trp) spojených 1,9-diaminononanem. Takto spojené



EDC

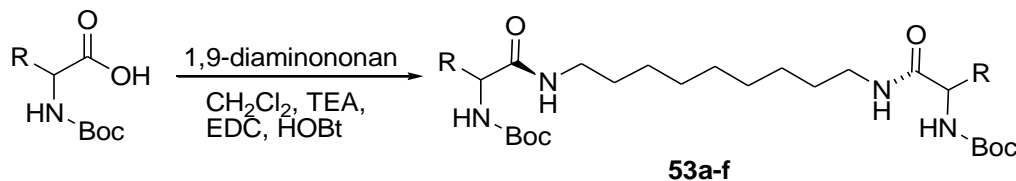


HOBT

aminokyseliny se v mikroskopickém měřítku intermolekulárními vazbami uspořádaly do vláknitých struktur a po rozpuštění v toluenu se pak chovaly jako gely s výjimkou alaninu, který nešel rozpustit a tvořil suspenzi. Přehled použitých aminokyselin je v **Tabulce 10**, podmínky reakce jsou uvedeny ve **Schématu 32**. 1,9-Diaminononan (1,0 ekv) byl suspendován v dichlormethanu, následně byl přidán triethylamin (2,8 ekv) a chráněná aminokyselina (2,6 ekv). Směs byla ochlazená na 0 °C a míchána pod dusíkovou atmosférou 30 minut. Poté byly současně přidány HOBT (5,8 ekv) a EDC (3,7 ekv). Reakční směs byla ohřívána na laboratorní teplotu a míchána 24 hodin. Po odfiltrování sraženiny byl filtrát promyt nasyceným roztokem NaHCO<sub>3</sub>, NaHSO<sub>4</sub>, opět NaHCO<sub>3</sub> a nakonec vodou. Roztok byl usušen bezvodým MgSO<sub>4</sub> a odpařen na bílou

pevnou látku. Sloučenina obsahující Trp byla navíc přečištěna kolonovou chromatografií na silikagelu s mobilní fází  $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$  (98/2) a 0,1% TEA.

U připravených gelů byly zkoumány tepelná stabilita a minimální koncentrace pro tvorbu gelu. K vizuálnímu porovnání struktur bylo použito rastrovacího elektronového mikroskopu (FEGSEM).



**Schéma 32:** Obecný postup přípravy produktů (**53a-f**)

**Tabulka 10:** Přehled připravených produktů<sup>44</sup>

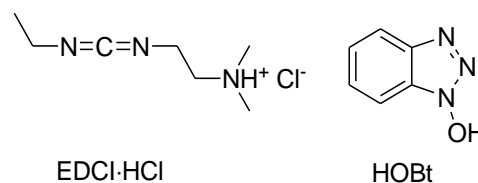
Látka	R	Použitá aminokyselina	Výtěžek (%)
<b>53a</b>	$(\text{CH}_2)_4\text{NHBoc}$	Boc-Lys	-
<b>53b</b>	$\text{CH}_3$	Boc-Ala	59
<b>53c</b>	$(\text{CH}_2)_2\text{CONH}_2$	Boc-Gln	72
<b>53d</b>	Bn	Boc-Phe	35
<b>53e</b>	$\text{CH}_2\text{SCH}_2\text{NHAc}$	Boc-Cys	55
<b>53f</b>	$\text{CH}_2(3'\text{-indol})$	Boc-Trp	56

#### 2.4.3.2.6 *N*-Ethyl-*N'*-(3-dimethylaminopropyl)karbodiimid hydrochlorid (EDCI·HCl) s HOBT

Rozsáhlá studie zkoumala vztah aktivita-struktura dipeptidyl boronových kyselin jako inhibitorů ubikvitin-proteáz. Součástí práce jsou i postupy přípravy dipeptidyl boronových

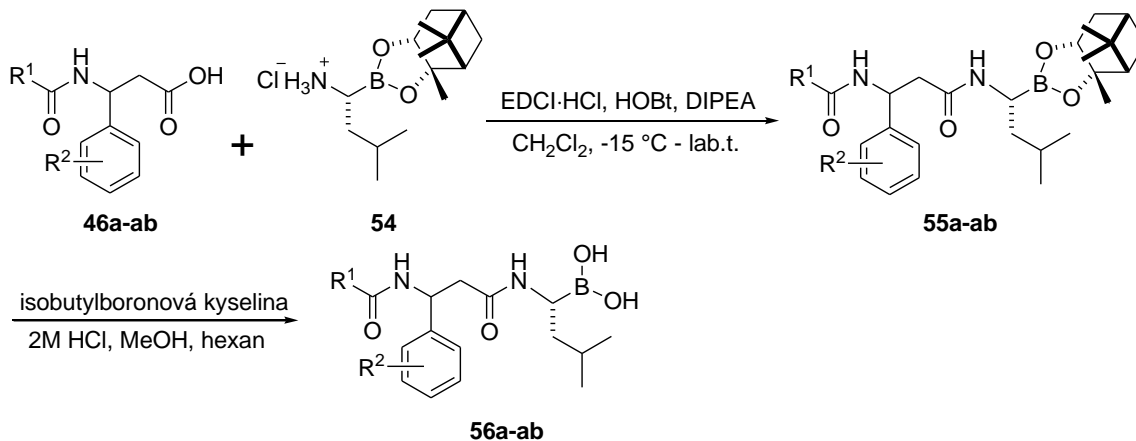
kyselin.<sup>41</sup> Ubikvitin je protein skládající se ze 76 aminokyselin a v eukaryotických buňkách zastává regulační funkci. Zásadním způsobem se podílí na řízení růstu, přežívání buňky, rozkladu a recyklaci nepotřebných proteinů. V roce 2004 byla Aaronu Ciechanoverovi, Avramu Hershkovi a Irwinu Roseovi za objevení a popsání degradace proteinů za účasti ubikvitinu udělena Nobelova cena za chemii.<sup>45</sup>

K vychlazenému roztoku ( $-5^\circ\text{C}$ ) dipeptidové kyseliny (**46a-ab**) (1,0 mmol) v bezvodém  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  (30 ml) byl přidán HOBT (1,2 mmol). Po 20 minutách byla reakční směs ochlazená na  $-15^\circ\text{C}$  a byl přidán EDCI·HCl (1,0 mmol). Následně byla přilita vychlazená směs ( $0^\circ\text{C}$ ) příslušného hydrochloridu 2-amino boronové kyseliny (**54**)



(1,00 mmol) a DIPEA (1,48 mmol) v bezvodém  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  (10 ml). Reakční směs byla míchána při  $-15^\circ\text{C}$  po dobu 1 hodiny a při laboratorní teplotě po dobu 2 hodin. Reakce byla ukončena přidáním vody. Vodná fáze byla extrahována  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  (3x100 ml). Organická fáze byla promyta 10% citronovou kyselinou, 5% roztokem  $\text{NaHCO}_3$  a nasyceným roztokem  $\text{NaCl}$ . Roztok byl usušen bezvodým  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  a po filtraci a odpaření byl izolován surový ester boronové kyseliny (**55a-ab**), který byl bez čištění použit do další reakce.

K roztoku příslušného esteru boronové kyseliny (**55a-b**) (1,0 mmol) a isobutylboronové kyseliny (5,0 mmol) v methanolu (20 ml) a hexanu (20 ml) byla přidána 1M  $\text{HCl}$  (2,5 ml). Reakční směs byla při laboratorní teplotě míchána 18 hodin. Methanoličká fáze byla promyta hexanem (3x15 ml) a hexanová vrstva byla extrahována metanolem (3 x 20 ml). Methanol ze sloučených metanolových podílů byl odpařen za sníženého tlaku, odparek byl rozpuštěn v  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  (40 ml). Roztok byl promyt 5% roztokem  $\text{NaHCO}_3$  (20 ml) a usušen bezvodým  $\text{Na}_2\text{SO}_4$ . Po filtraci a odpaření byl izolován produkt (**56a-ab**), který byl podle potřeby přečištěn kolonovou chromatografií s fázemi  $\text{MeOH}/\text{CH}_2\text{Cl}_2$  (1/15-1/3). Série reakcí vedoucí k produktům je uvedena na **Schématu 33**. Seznam připravených produktů a jejich výtěžků je uveden v **Tabulce 11**.



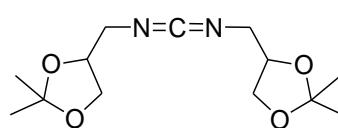
**Schéma 33:** Spojení dipeptidové kyseliny s hydrochloridem ochráněné 2-amino boronové kyseliny a následné odstranění chránící skupiny

**Tabulka 11:** Přehled připravených dipeptidyl boronových kyselin <sup>41</sup>

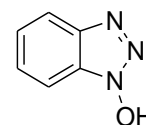
Číslo látky	R <sup>1</sup>	R <sup>2</sup>	Výtěžek sekvence (%)	Číslo látky	R <sup>1</sup>	R <sup>2</sup>	Výtěžek sekvence (%)
<b>56a</b>	Ph	2-F	54	<b>56o</b>	Ph	4-Me	50,9
<b>56b</b>	Ph	3-F	69	<b>56p</b>	Ph	H	52,4
<b>56c</b>	Ph	4-F	60	<b>56q</b>	3-pyridyl	2-F	53,6
<b>56d</b>	Ph	2-Cl	63,4	<b>56r</b>	3-pyridyl	3-F	39
<b>56e</b>	Ph	3-Cl	42,1	<b>56s</b>	3-pyridyl	4-F	62,6
<b>56f</b>	Ph	4-Cl	55,2	<b>56t</b>	3-pyridyl	2-Cl	47,2
<b>56g</b>	Ph	2-OMe	75	<b>56u</b>	3-pyridyl	3-Cl	44,7
<b>56h</b>	Ph	3-OMe	77,8	<b>56v</b>	3-pyridyl	2-OMe	63,1
<b>56i</b>	Ph	4-OMe	67,5	<b>56w</b>	3-pyridyl	3-OMe	43,2
<b>56j</b>	Ph	2-NO <sub>2</sub>	70,5	<b>56x</b>	3-pyridyl	2-NO <sub>2</sub>	41,3
<b>56k</b>	Ph	3-NO <sub>2</sub>	42,1	<b>56y</b>	3-pyridyl	3-NO <sub>2</sub>	56,4
<b>56l</b>	Ph	4-NO <sub>2</sub>	59,2	<b>56z</b>	3-pyridyl	4-NO <sub>2</sub>	43,3
<b>56m</b>	Ph	2-Me	77,1	<b>56aa</b>	3-pyridyl	2-Me	42,6
<b>56n</b>	Ph	3-Me	56	<b>56ab</b>	3-pyridyl	3-Me	46,5

#### 2.4.3.2.7 Bis[[4-(2,2-dimethyl-1,3-dioxolyl)methyl]methyl]karbodiimid (BDDC) s HOBt

BDDC (**32**) (viz **Schéma 20**, odstavec 3.3.3.1.3) byl navržen jako nový karbodiimid, který v sobě kombinuje dobrou reaktivitu se snadnou



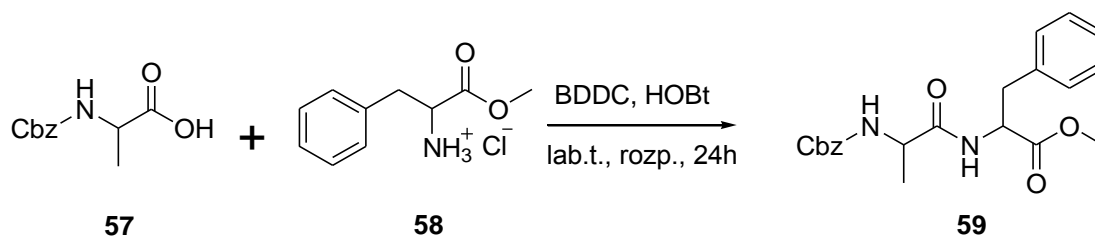
BDDC



HOBt

odstranitelností vedlejších produktů. V molekule močoviny vzniklé z BDDC (**16**) jsou zamaskovány čtyři hydroxylové skupiny, které po kyselé hydrolyze dodají molekule *N,N'*-bis(2,3-dihydroxyprop-1-yl)močoviny (**35**) značnou hydrofilitu a usnadní tak její extrakci do vodné fáze.

Postup přípravy peptidů: Dvě příslušně ochráněné složky reagovaly za přítomnosti BDDC a HOBt při laboratorní teplotě. Ve **Schématu 34** je ukázána vzorová reakce, kde reagoval Cbz-Ala (**57**) a Phe-OMe-HCl (**58**) v DMF a THF. Při reakci nedošlo k racemizaci a produkty (**59**) nebylo třeba čistit. Vedlejší produkty na bázi močoviny byly odstraněny promytím s 0,1M HCl. Přehled použitých reaktantů, reakční podmínky a výtěžky jsou uvedeny v **Tabulce 12**.



**Schéma 34:** Použití BDDC při tvorbě peptidů; THF - výtěžek 84 %, DMF - výtěžek 93%;

**Tabulka 12:** Přehled použitých výchozích látek, reakčních podmínek a výtěžků při přípravě amidů <sup>28</sup>

Substrát	Ester aminokyseliny	Rozpouštědlo, čas (h)	Výtěžek (%)
Cbz-Ala <b>39</b>	Phe-OMe·HCl <b>58</b>	THF, 24	84
Cbz-Ala <b>39</b>	Phe-OMe·HCl <b>58</b>	DMF, 24	93
Boc-Ile	Phe-OMe·HCl <b>58</b>	THF, 16	82
Boc-Ile	Phe-OMe·HCl <b>58</b>	DMF, 16	84
Cbz-Ala-Phe	Gly-OBn·TsOH	DMF, 4	81
Cbz-Ala-Phe	Gly-OBn·TsOH	DMF, 20	91

#### 2.4.3.2.8 Tetraarylfosfoniumkarbodiimidy

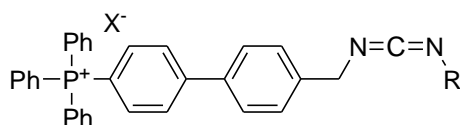
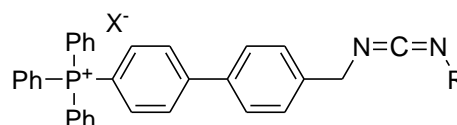
Byla připravena série karbodiimidů (**Obrázek 12**)

obměňováním skupiny R. Účelem zavedení

tetraarylfosfoniové skupiny bylo zlepšit

rozpuštěnost v polárních rozpouštědlech a zároveň umožnit odstranění vedlejších

močovinových produktů vysrážením přísadkem nepolárního rozpouštědla a následnou filtrací.

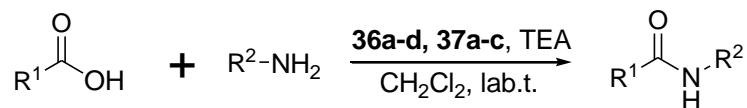


Látka	X <sup>-</sup>	R
<b>36a</b>	PF <sub>6</sub>	Et
<b>36b</b>	PF <sub>6</sub>	<i>i</i> Pr
<b>36c</b>	PF <sub>6</sub>	<i>c</i> Hex
<b>36d</b>	PF <sub>6</sub>	Bn
<b>37a</b>	OTf	Et
<b>37b</b>	OTf	<i>i</i> Pr
<b>37c</b>	OTf	<i>c</i> Hex

**Obrázek 12:** Obecný vzorec tetraarylfosfoniumkarbodiimidů (**36a-d**, **37a-c**)

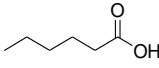
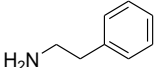
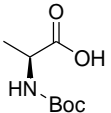
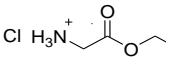
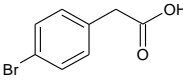
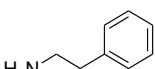
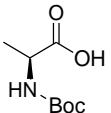
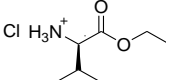
Připravené karbodiimidy (**36a-d**, **37a-c**) byly použity při sérii amidací s různými substráty (**Schéma 35**). Výchozí látky reagovaly vůči aminu v poměrech tetraarylfosfoniumkarbodiimid (1,2 ekv) a karboxylová kyselina (1,1 ekv). Reakce probíhaly 3 hodiny. Po kyselých a bazických extrakcích pro odstranění zbytků výchozích látek byla směs surového produktu rozpuštěna v CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>. Přísadkem

diethyletheru bylo docíleno vysrážení močovinnového vedlejšího produktu, který byl odstraněn filtrací. Karbodiimidy byly posuzovány ze dvou hledisek. Prvním bylo porovnání výtěžku reakce s reakcí provedenou za přítomnosti DCC nebo EDCI·HCl/HOBt. Druhým bylo určení efektivity, s jakou jsou odstraňovány fosforové soli přesrážením a následnou filtrací. Výsledky jsou uvedeny v **Tabulce 13**.



**Schéma 35:** Obecná reakce popisující přípravu amidů za použití tetraarylfosfoniumkarbodiimidů (**36a-d, 37a-c**)

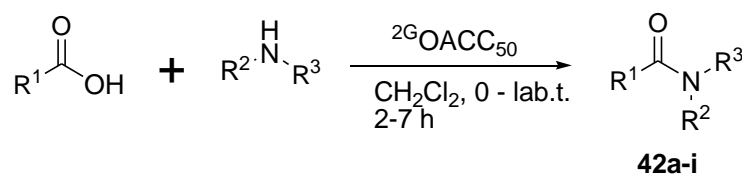
**Tabulka 13:** Přehled použitých karboxylových kyselin a aminů, výtěžky a čistota produktů

Karboxylová kyselina	Amin	DCC/DMAP nebo EDCI·HCl/ HOBt	Výtěžek <sup>a</sup> /čistota <sup>b</sup> (%)						
			36a	36b	36c	36d	37a	37b	37c
		77 <sup>c</sup>	93 /98	90 /98	81 /98	60 /98	60 /90	64 /92	56 /90
		79	70 /98	67 /98	61 /89	66 /94	62 /95	60 /95	60 /87
		85 <sup>c</sup>	85	82	81	81	52	51	60
		51 <sup>d</sup>	45	-	-	-	-	-	-

<sup>a</sup> Výtěžek po izolaci vedlejších produktů vysrážením a odfiltrováním. <sup>b</sup> Čistota je vyjádřena (% očekávaného produktu) – (% zbytkové fosfoniové soli) měřením <sup>1</sup>H NMR výsledného produktu. <sup>c</sup> RCOOH (1,0 ekv), RNH<sub>2</sub> (1,0 ekv), DCC (1,2 ekv), HOBt (1,0 ekv), DMAP (0,1 ekv), CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, 0 °C do lab.t. <sup>d</sup> Produkt byl znečištěn asi 5 % DCU, která nemohla být odstraněna vysrážením s EtAc.<sup>38</sup>

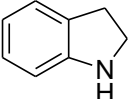
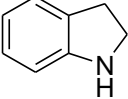
### 2.4.3.2.9 Polymerní karbodiimidy

Účinnost činidla  $^{2G}\text{OACC}_{50}$  byla experimentálně ověřena na sérii modelových amidací karboxylových kyselin (aromatických i alifatických) se širokou škálou primárních a sekundárních aminů. Amidace (**Schéma 36**) byla prováděna přidáním roztoku  $^{2G}\text{OACC}_{50}$  v  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  do vychlazeného roztoku karboxylové kyseliny (1 ekv) a aminu (1 ekv). Reakční směs byla temperována na laboratorní teplotu a míchána 7 hodin. Dále byla izolace amidů (**60a-i**) prováděna shodným způsobem jako při přípravě esterů a thioesterů (**40a-k**) (viz kapitola 2.4.3.1.5)<sup>29</sup>



**Schéma 36:** obecná reakce popisující přípravu amidů za použití polymerně vázaného karbodiimidu  $^{2G}\text{OACC}_{50}$

**Tabulka 14:** Přehled použitých reaktantů, výtěžky a čistota produktů

R <sup>1</sup>	Amin	Produkt	Výtěžek (%) <sup>a</sup>	Čistota (%) <sup>b</sup>
Ph	BnNH <sub>2</sub>	<b>60a</b>	90	98
Ph	Ph-N <sub>1</sub> (CH <sub>2</sub> ) <sub>6</sub> NH	<b>60b</b>	98	99
Ph	CH <sub>2</sub> =CHCH <sub>2</sub> ) <sub>2</sub> NH	<b>60c</b>	90	95
Ph	<i>n</i> -BuNH <sub>2</sub>	<b>60d</b>	85	91
Ph		<b>60e</b>	94	91
Br(CH <sub>2</sub> ) <sub>5</sub>	Ph-N <sub>1</sub> (CH <sub>2</sub> ) <sub>6</sub> NH	<b>60f</b>	94	98
Br(CH <sub>2</sub> ) <sub>5</sub>	<i>n</i> -BuNH <sub>2</sub>	<b>60g</b>	88	96
Br(CH <sub>2</sub> ) <sub>5</sub>	CH <sub>2</sub> =CHCH <sub>2</sub> ) <sub>2</sub> NH	<b>60h</b>	91	96
Br(CH <sub>2</sub> ) <sub>5</sub>		<b>60i</b>	95	93

<sup>a</sup> Výtěžek po promytí přes vrstvu silikagelu na fritě. <sup>b</sup> Stanoveno plynovou chromatografií a potvrzeno <sup>1</sup>H NMR.



### 3 Cíle práce

Cílem práce je na základě provedené literární rešerše popsat vlastnosti a využití 2-hydroxy-*N*-[1-(2-hydroxyfenylamino)-1-oxoalkan-2-yl]benzamidů a provedení retrosyntetické analýzy cílové molekuly za účelem navrhnout možné syntetické cesty. V případě, že některé přípravy jsou již popsány, je dalším úkolem tyto postupy komentovat, popřípadě srovnat s postupy námi navrženými. Součástí rešerše je také přehled činidel používaných k tvorbě amidů a esterů.

Cílem praktické části práce je podle navržených postupů provést syntézu vybraných 2-hydroxy-*N*-[1-(2-hydroxyfenylamino)-1-oxoalkan-2-yl]benzamidů v množství a čistotě, která postačuje pro testování biologických aktivit. Dále je nutné produkty a jejich prekurzory charakterizovat dostupnými metodami (TLC, NMR, IČ, CHN analýzou, případně GC-MS).

Meziprodukty potřebné pro přípravu zvolených cílových molekul by měly být stabilní a syntéza by měla vycházet z ekonomicky snadno dostupných chemikálií.

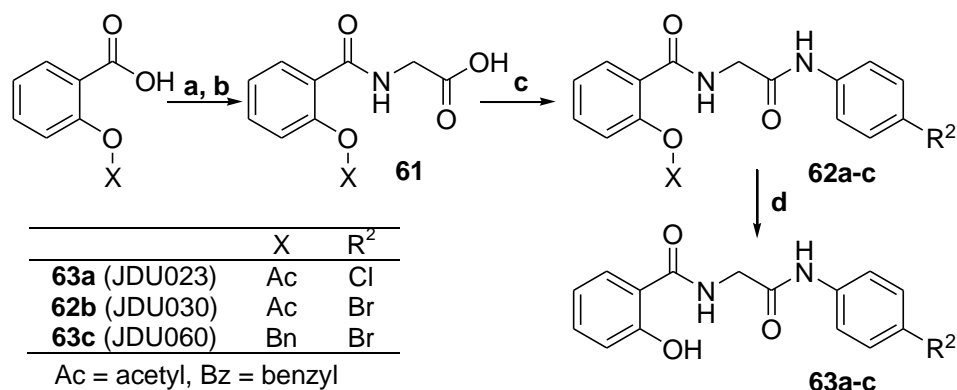
## 4 Experimentální část

Použitá rozpouštědla, činidla a jiné chemikálie, které byly k syntézám použity, byly od výrobců Sigma-Aldrich, Merck, AcrosOrganics a Lach-Ner CZ. Všechna komerční rozpouštědla byla použita bez další úpravy. Tenkovrstvá chromatografie (TLC) byla prováděna na chromatografickém papíře povrchově upraveném 0,2 mm vrstvou silikagelu 60 F<sub>254</sub> (Merck, Darmstadt, Německo). Vizualizace TLC byla uskutečňována pomocí UV záření (254 nm). Body tání byly stanoveny na přístroji Melting Point B-545 (Buchi, Německo). NMR spektra byla měřena v dimethylsulfoxidu (DMSO-*d*<sub>6</sub>) při laboratorní teplotě na spektrometru Bruker Avance III 400 MHz (Karlsruhe, Bruker, Německo, 400 MHz pro <sup>1</sup>H, 100 MHz pro <sup>13</sup>C. Chemické posuny protonu v DMSO-*d*<sub>6</sub> souvisí se středem multipletu rozpouštědla ( $\delta=2,50$ ). <sup>13</sup>C-NMR spektra byla měřena pomocí APT pulsních sekvencí. Chemické posuny uhlíku se vztahují ke středu multipletu rozpouštědla ( $\delta=39,5$  v DMSO-*d*<sub>6</sub>). Chemické posuny pro systémy AB byly vypočteny jako vážený průměr vážených pozic linie podle intenzity píků.

Názvy struktur byly vygenerovány v programu ChemDraw Ultra 8.0. Následně byly názvy přeloženy do českého jazyka.

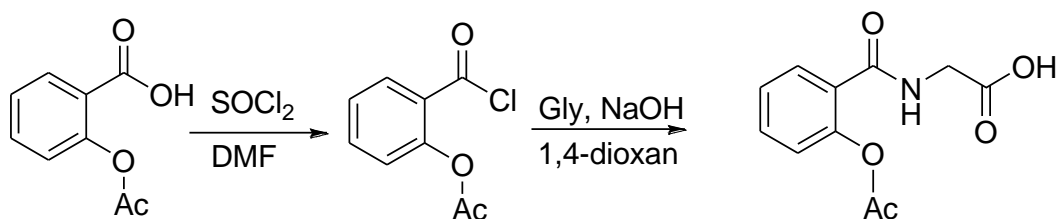
### 4.1 Syntéza substituovaných 2-hydroxy-*N*-[1-(2-hydroxyfenylamino)-1-oxoalkan-2-yl]benzamidů navržená na základě retrosyntetické analýzy A

Metoda vychází z ochráněné kyseliny salicylové, která je v prvním kroku aktivována a reakcí se zvolenou aminokyselinou, nebo jejím derivátem a poskytuje odpovídající amid. V dalším kroku syntézy následuje reakce volné karboxylové skupiny s vybraným substituovaným anilínem v přítomnosti karbodiimidu. Pokud v prvním kroku syntetické cesty reaguje *O*-chráněná aminokyselina, předchází reakci s karbodiimidem její deprotekce. Posledním krokem reakční cesty je deprotekce chránící skupiny fenolického hydroxyly. Možné syntetické cesty jsou schematicky uvedeny na **Schématech 37** a **38**.



**Schéma 37:** Návrh syntézy diamidů. **a** SOCl<sub>2</sub>, **b** Gly, NaOH<sub>aq</sub>, **c** anilín v přítomnosti DCC **d** deproteckce hydroxylové skupiny

#### 4.1.1 ((2-Acetoxybenzoyl)amino)octová kyselina



	kys. <i>O</i> -acetyl-salicylová	SOCl <sub>2</sub>	DMF	Acetylsalicyoyl chlorid	Gly	((2-acetoxybenzoyl)amino)octová kyselina (JDU021, 61)
M [g/mol]	180,1	118,97	73,1	198,61	75	237
n[mmol]	26	65 <sup>2,5x</sup>	kat	26/23,4 <sup>(90%)</sup>	30	2,4
m [g]	<b>4,7</b>	7,733	-	5,0/-	2,25	<b>teor. 5,546</b>
V [ml]	-	<b>4,7</b>	3 kap	-	-	-
ρ [g/ml]	-	1,64	-	-	-	-
b.v. [°C]	-	75,6	153	-	-	-
b.t. [°C]	136	-	-	-	-	121-122 <sup>46</sup>

#### Postup přípravy:

Navážka kyseliny *O*-acetylsalicylové, SOCl<sub>2</sub> a DMF byla zahřívána na vroucí vodní lázni pod zpětným chladičem do rozpuštění suspenze. Po 10 minutách míchání na lázni byla reakce ukončena a přebytečný SOCl<sub>2</sub> byl odpařen na RVO. Zbytky SOCl<sub>2</sub> byly dále odstraněny opakovaným vakuovým oddestilováním chloroformu (2x7 ml). Připravený chlorid byl poté přímo použit do dalšího reakčního kroku (počítáno bylo s cca 90% výtěžkem této reakce).

Acetylsalicyoyl chlorid byl rozpuštěn v 1,4-dioxanu (40 ml) a za laboratorní teploty k němu byl postupně přidán roztok glycínu v 19 ml NaOH (c = 1,58 mol/l). Reakční

směs byla míchána 16 hodin. Následně byla reakční směs vakuově zahuštěna. Byla přidána destilovaná voda (40 ml), koncentrovaná HCl (3 ml) a produkt byl extrahován ethyl acetátem (3x20 ml). Organická fáze byla následně protřepána vodou, usušena bezvodým Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> a odpařena do světlých krystalů. Po první rekrystalizaci z EtAc/Hex bylo izolováno 2,01 g bílé krystalické látky. Po druhé rekrystalizaci z EtAc/Hex bylo izolováno 1,73 g (31,2 %) bílé krystalické látky.

Charakterizace produktu:

Teplota tání: 148,8-150,6 °C;

CHN pro C<sub>11</sub>H<sub>11</sub>NO<sub>5</sub> (237,21):

Teor.: C 55,70; H 4,67; N 5,90;

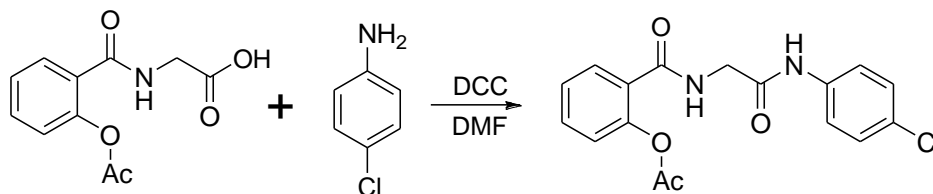
Exp.: C 55,99±0,08; H 5,89±0,09; N 6,12±0,10;

<sup>1</sup>H NMR (400,13 MHz, DMSO) δ: 2,29 (3H, s, CH<sub>3</sub>); 3,93 (2H, d, <sup>3</sup>J<sub>H,H</sub> = 6 Hz, CH<sub>2</sub>); 7,24 (1H, dd, <sup>4</sup>J<sub>H,H</sub> = 1 Hz, <sup>3</sup>J<sub>H,H</sub> = 8 Hz, Ar-H); 7,40 (1H, dt, <sup>4</sup>J<sub>H,H</sub> = 1 Hz, <sup>3</sup>J<sub>H,H</sub> = 7,6 Hz, Ar-H); 7,58 (1H, dt, <sup>4</sup>J<sub>H,H</sub> = 2 Hz, <sup>3</sup>J<sub>H,H</sub> = 7,6 Hz, Ar-H); 7,68 (1H, dd, <sup>4</sup>J<sub>H,H</sub> = 1,6 Hz, <sup>3</sup>J<sub>H,H</sub> = 7,6 Hz, Ar-H); 8,55 (1H, t, <sup>3</sup>J<sub>H,H</sub> = 6 Hz, NH); 12,69 (1H, brs, COOH).

<sup>13</sup>C NMR (100,62 MHz, DMSO) δ: 20,8; 41,1; 123,5; 125,9; 128,6; 129,2; 131,6; 148,0; 165,2; 169,0; 171,1.

IR (ATR). 3419; 2942; 2343; 1761,3 (C=O ester); 1702 (C=O karboxylová kyselina); 1648 (C=O amid); 1519; 1250 cm<sup>-1</sup>.

#### 4.1.2 2-((4-Chlorofenylkarbamoyl)methylkarbamoyl)fenyl acetát



	((2-acetoxybenzoyl)amino)octová kyselina (JDU021, <b>61</b> )	4-chloranilin	DCC	2-((4-chlorofenylkarbamoyl)methylkarbamoyl)fenyl acetát (JDU022, <b>62a</b> )
M [g/mol]	273	127,57	206	346,76
n [mmol]	1,83	1,83	2,013 <sup>1,1x</sup>	1,83
m [g]	<b>0,500</b>	<b>0,233</b>	<b>0,415</b>	<b>teor. 0,635</b>
b.t. [°C]	148,8-150,6	-	-	-

Postup přípravy:

Acetyl *N*-glycin-salicylamid byl rozpuštěn v DMF a vychlazen na  $-5\text{ }^{\circ}\text{C}$ , k němu byl najednou přidán 4-chloranilin a DCC ve třech dávkách po 20 minutách. Reakční směs byla 1 hodinu míchána na ledové lázni a 16 hodin za laboratorní teploty. Přilítím ethyl acetátu byla vysrážena a následně odfiltrována *N,N'*-dicyklohexylmočovina. Filtrát byl vakuově zahuštěn a rekrystalizován z ethyl acetátu. Bylo izolováno 380 mg (60 %) nažloutlých krystalů, které byly rekrystalizovány z ethyl acetátu. Bylo izolováno 240 mg (38 %) bílé krystalické látky.

Charakterizace produktu:

Teplota tání: 187-191  $^{\circ}\text{C}$ ;

Tol/EtAc; 4/1;  $\text{H}^+$ :  $R_f = 0,22$ ;

CHN pro  $\text{C}_{17}\text{H}_{15}\text{ClN}_2\text{O}_4$  (346,76):

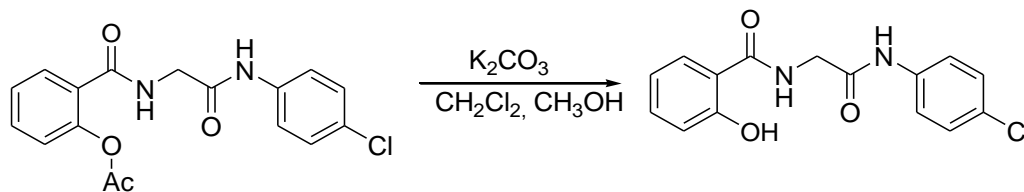
Teor.: C 58,88; H 4,36; N 8,08;

Exp.: C  $59,03 \pm 0,05$ ; H  $4,59 \pm 0,09$ ; N  $8,22 \pm 0,04$ ;

$^1\text{H NMR}$  (400,13 MHz, DMSO)  $\delta$ : 2,62 (3H, s,  $\text{CH}_3$ ); 4,03 (2H, d,  $^3J_{\text{H,H}} = 6\text{ Hz}$ ,  $\text{CH}_2$ ); 7,19-7,72 (8H, m, Ar-H); 8,51 (1H, t,  $^3J_{\text{H,H}} = 6\text{ Hz}$ , NH); 10,18 (1H, brs, NH).

$^{13}\text{C NMR}$  (100,62 MHz, DMSO)  $\delta$ : 20,9; 43,3; 120,7; 123,7; 126,1; 126,9; 127,3; 128,6; 128,7; 129,4; 131,6; 137,6; 148,2; 165,8; 167,9; 169,1.

**IR** (ATR): 3411; 1770 (C=O ester); 1702 (C=O amid); 1645 (C=O amid); 1614 1553,6; 1174; 829  $\text{cm}^{-1}$ .

4.1.3 *N*-((4-Chlorofenylkarbamoyl)methyl)-2-hydroxybenzamid

	2-((4-chlorofenylkarbamoyl)methylkarbamoyl)fenyl acetát ( <i>JDU022</i> , <b>62a</b> )	$K_2CO_3$	<i>N</i> -((4-chlorofenylkarbamoyl)methyl)-2-hydroxybenzamid ( <i>JDU023</i> , <b>63a</b> )
M [g/mol]	346,77	138	304,77
n [mmol]	0,29	0,485	0,29
m [g]	<b>0,100</b>	<b>0,067</b>	<b>teor. 0,088</b>

Postup přípravy:

Navážka 2-((4-chlorofenylkarbamoyl)methylkarbamoyl)fenyl acetátu byla rozpuštěna v diclormethanu (4 ml) a methanolu (4 ml). K roztoku byl přidán  $K_2CO_3$ . Po 30 minutách míchání byla reakce ukončena přilítím nasyceného roztoku  $NH_4Cl_{aq}$  (10 ml  $H_2O$ , 2 g). Organická rozpouštědla byla odstraněna za sníženého tlaku. Produkt byl z vodného roztoku extrahován ethyl acetátem. Organická fáze byla následně protřepána nasyceným vodným roztokem  $NaHCO_3$  (2x10 ml), usušena bezvodým  $Na_2SO_4$  a odpařena. Surový produkt byl čištěn kolonovou chromatografií s mobilní fází Tol/EtAc; 4/1.

První podíl byl izolován z frakcí 2,3 a 4 (několik mg; teplota tání 146,3-160 °C). Druhý podíl byl izolován z frakcí 8 až 13 (m = 32 mg, 36 %).

Charakterizace produktu:

Teplota tání: nad 210 °C tmavne, od 230 °C zvolna ztrácí objem, od 237-240,6 °C rychle taje;

Tol/EtAc; 3/2:  $R_f = 0,31$ ; Tol/EtAc; 4/1:  $R_f = 0,16$ ;

CHN pro  $C_{15}H_{13}ClN_2O_3$  (304,06):

Teor.: C 59,12; H 4,30; N 9,19;

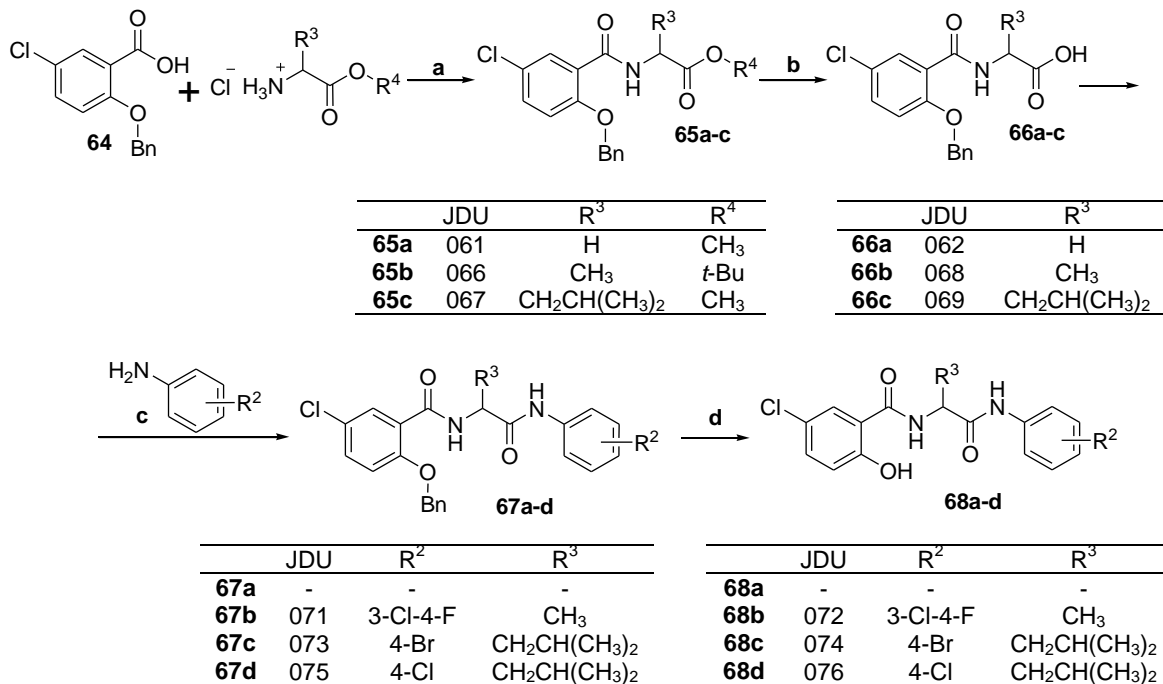
Exp.: C 59,31±0,12; H 4,57±0,12; N 8,81±0,10;

$^1H$  NMR (400,13 MHz, DMSO)  $\delta$ : 4,22 (2H, d,  $^3J_{H,H} = 5,6$  Hz,  $CH_2$ ); 7,02 (2H, t,  $^3J_{H,H} = 8$  Hz, Ar-H); 7,43-7,55 (3H, m, Ar-H); 7,72 (2H, dd,  $^4J_{H,H} = 2$  Hz,  $^3J_{H,H} = 8,8$  Hz, Ar-H); 8,00 (1H, dd,  $^4J_{H,H} = 1,2$  Hz,  $^3J_{H,H} = 8$  Hz, Ar-H); 9,28 (1H, t,  $^3J_{H,H} = 5,6$  Hz, NH); 10,38 (1H, s); 12,30 (1H, brs, NH).

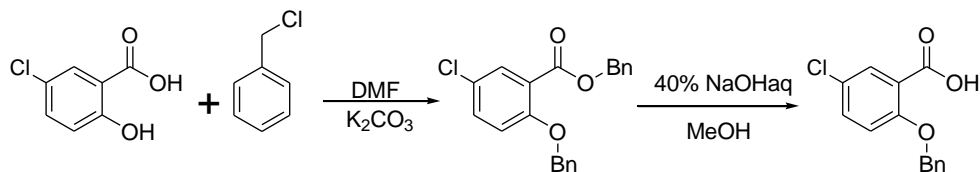
$^{13}C$  NMR (100.62 MHz, DMSO)  $\delta$ : 43,0; 115,5; 117,3; 118,8; 120,6; 126,8; 128,4; 128,7; 133,7; 137,8; 159,4; 167,5; 168,6.

**IR** (ATR): 3385 (O-H); 2920; 1710 (C=O amid); 1678(C=O amid); 1634; 1595; 1256  $\text{cm}^{-1}$ .

Z retrosyntetické analýzy A vychází i postup uvedený ve **Schématu 38**.



**Schéma 38:** Syntéza substituovaných 2-hydroxy-*N*-[1-(2-hydroxyfenylamino)-1-oxoalkan-2-yl]benzamidů navržená na základě retrosyntetické analýzy A s využitím derivátů zvolených aminokyselin. **a** EDCI·HCl, HOBT, TEA, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>; **b** LiOH, H<sub>2</sub>O; **c** EDCI·HCl, HOBT; **d** deprotektce hydroxylové skupiny.

4.1.4 Kyselina 2-(benzyloxy)-5-chlorbenzoová<sup>47</sup>

	kyselina 5-chlorosalicylová	benzylchlorid	DMF	K <sub>2</sub> CO <sub>3</sub>	benzyl 2-(benzyloxy)-5-chlorobenzoát	kyselina 2-(benzyloxy)-5-chlorobenzoová (JDU065, 64)
M [g/mol]	172,57	126,58	-	138,21	352,81	262,04
n [mmol]	57,9	183,1 3,16x	-	260,6 <sup>4,5x</sup>	57,9	57,9
m [g]	<b>10</b>	<b>23,176</b>	-	<b>36,017</b>	teor. 20,43	<b>teor. 15,22</b>
V [ml]	-	1,1	<b>180</b>	-	-	-
ρ [g/ml]	-	21,06	-	-	-	-
b.t. [°C]	-	-	-	-	-	117-118

## Postup přípravy:

Navážka kyseliny 5-chlorosalicylové, DMF (180 ml), benzylchlorid (21 ml) a K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (36,017 g) byla zahřívána pod zpětným chladičem na teplotu 135 °C po dobu 3 hodin. Po této době byla reakce ukončena a po zchladnutí byla reakční směs nalita na 2,5 l směsi voda/led. Během 30 minut míchání se vyloučila bílá sraženina, která byla odfiltrována a promyta studenou vodou (3x100 ml). Sraženina byla rozpuštěna v dichlormethanu (250 ml) a promyta vodou (1x100 ml), solankou (1x100 ml) a opět vodou (1x100 ml). Organická fáze byla usušena bezvodým Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> a odpařena do žlutého oleje, který ztuhl (15,28 g, 75 % meziprojektu).

Meziprojekt byl rozpuštěn v methanolu (40 ml). K roztoku byl přidán 40% roztok NaOH (7 ml). Reakční směs byla 2,5 hodiny refluxována. Následně byla reakční směs vakuově zahuštěna. Byla přidána H<sub>2</sub>O (65 ml) a směs byla okyselena koncentrovanou HCl na pH 1. Směs byla míchána 2,5 hodiny za chlazení v ledové lázni. Vyloučený bílý produkt byl odfiltrován a na fritě promyt vodou. Filtrační koláč byl rozpuštěn v ethyl acetátu (50 ml). Roztok byl usušen bezvodým Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> a odpařen za sníženého tlaku do sucha. Odparek byl rekrystalizován z ethyl acetátu. Bylo izolováno 7,604 g (50 %) bílého krystalického produktu.



Charakterizace produktu:

Teplota tání 121-125 °C (lit. 120,6-121,5 °C<sup>48</sup>)

RTG;

Hex/EtAc; 1/1: R<sub>f</sub> = 0,32;

CHN pro C<sub>14</sub>H<sub>11</sub>ClO<sub>3</sub> (262,04):

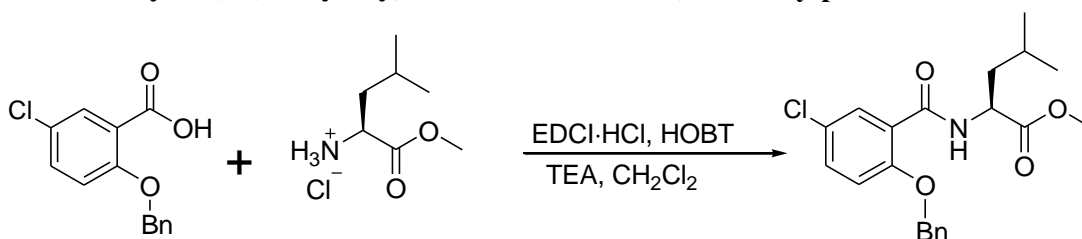
Teor.: C 64,01; H 4,22;

Exp.: C 63,99±0,07; H 4,41±0,03;

<sup>1</sup>H NMR (400,13 MHz, DMSO) δ: 5,20 (2H, s, CH<sub>2</sub>); 7,33-7,21 (2H, m, Ar-H); 7,40-7,37 (2H, m, Ar-H); 7,54-7,47 (3H, m, Ar-H); 7,64 (1H, d, J = 2.7 Hz, Ar-H); 13,02 (1H, brs, COOH).

<sup>13</sup>C NMR (100.62 MHz, DMSO) δ: 70,3; 116,2; 124,0; 124,4; 127,5; 128,1; 128,7; 130,2; 132,6; 137,0; 156,1; 166,5.

#### 4.1.5 Methyl 2-(2-(benzyloxy)-5-chlorobenzamido)-4-methylpentanoát



	kyselina 2-(benzyloxy)-5-chlorobenzoová (JDU065, 64)	L-Leu methylester hydrochlorid	EDCI·HCl	HOBT	TEA	methyl 2-(2-(benzyloxy)-5-chlorobenzamido)-4-methylpentanoát (JDU067, 65c)
M [g/mol]	262,69	181,68	191,7	135,13	101,19	389,14
n [mmol]	4,95	4,95	6,93 <sup>1,4x</sup>	4,95	4,95	4,95
m [g]	<b>1,3</b>	<b>0,99</b>	<b>1,37</b>	<b>0,669</b>	0,505	<b>teor. 1,93</b>
V [ml]	-	-	-	-	<b>0,692</b>	-
ρ [g/ml]	-	-	-	-	0,73	-
b.t. [°C]	121-125	-	-	-	-	-

Postup přípravy:

Navážky kyseliny 2-(benzyloxy)-5-chlorbenzoové, L-Leu methylester hydrochlorid, EDCI·HCl, HOBT byly rozpuštěny v dichlormethanu (100 ml), do kterého byl nakonec přidán TEA. Po 1 hodině míchání byla reakční směs nalita na směs led/voda (100 ml). Po roztátí ledu byla dvoufázová směs rozdělena. Vodná fáze byla extrahována

dichlormethanem (2x50 ml). Spojené organické fáze byly extrahovány nasyceným roztokem NaHCO<sub>3</sub> (2x50 ml), 5% kyselinou citronovou (2x50 ml), nasyceným roztokem NaCl (2x50 ml) a H<sub>2</sub>O (2x50 ml). Organická fáze byla usušena bezvodým Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> a odpařena za sníženého tlaku na RVO. Bylo izolováno 1,92 g (99 %) produktu ve formě oleje.

Charakterizace produktu:

CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/MeOH; 9/1: R<sub>f</sub> = 0,75;

CHN pro C<sub>21</sub>H<sub>24</sub>ClNO<sub>4</sub> (389,14):

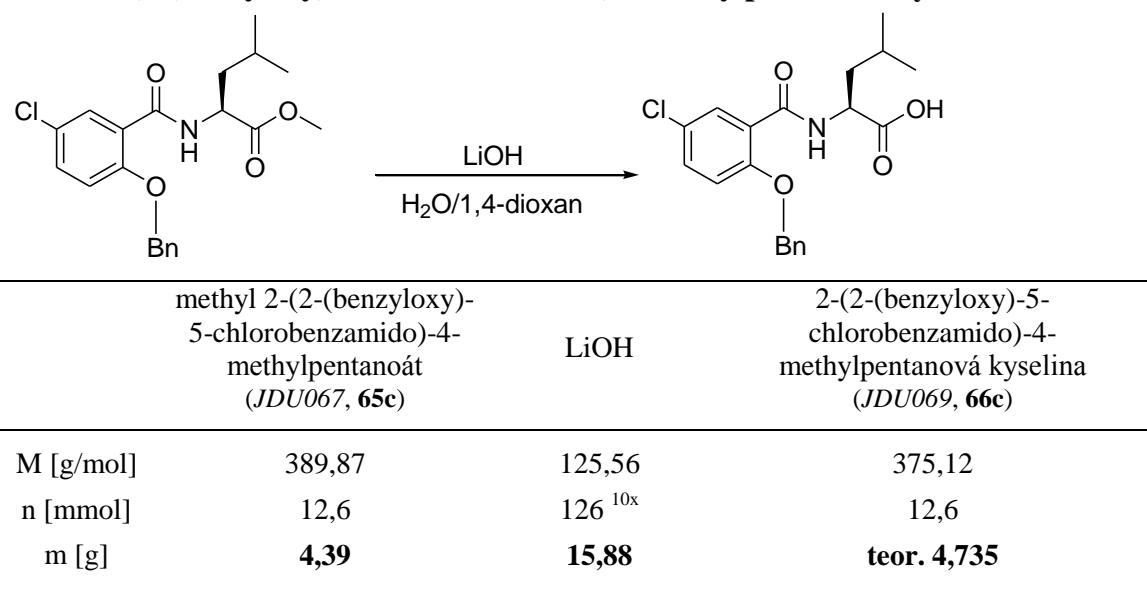
Teor.: C 64,69; H 6,20; N 3,59;

Exp.: C 64,48±0,17; H 6,01±0,08; N 3,87±0,08;

<sup>1</sup>H NMR (400,13 MHz, DMSO) δ: 0,64-0,80 (6H, m, 2xCH<sub>3</sub>); 1,30-1,50 (3H, m, CH<sub>2</sub>, CH); 3,61 (3H, s, CH<sub>3</sub>); 4,38-4,46 (1H, m, CH); 5,23 (2H, s, CH<sub>2</sub>); 7,33 (1H, d, <sup>3</sup>J<sub>H,H</sub> = 8,8 Hz, Ar-H); 7,36-7,44 (3H, m, Ar-H); 7,51 (2H, dd, <sup>4</sup>J<sub>H,H</sub> = 1,2 Hz, <sup>3</sup>J<sub>H,H</sub> = 8 Hz, Ar-H); 7,56 (1H, dd, <sup>4</sup>J<sub>H,H</sub> = 2,8 Hz, <sup>3</sup>J<sub>H,H</sub> = 8,8 Hz, Ar-H); 7,66 (1H, d, <sup>3</sup>J<sub>H,H</sub> = 2,8 Hz, Ar-H); 8,43 (1H, d, <sup>3</sup>J<sub>H,H</sub> = 7,6 Hz, NH).

<sup>13</sup>C NMR (100,62 MHz, DMSO) δ: 21,1; 22,6; 24,2; 50,7; 51,9; 70,7; 115,5; 124,3; 124,7; 128,2; 128,3; 128,5; 129,5; 131,9; 135,8; 154,9; 163,7; 172,5.

#### 4.1.6 2-(2-(Benzyloxy)-5-chlorobenzamido)-4-methylpentanová kyselina



## Postup přípravy:

Methyl 2-(2-(benzyloxy)-5-chlorobenzamido)-4-methylpentanoát byl rozpuštěn ve 100 ml směsi voda/1,4-dioxan (1:1). K roztoku byl přidán LiOH (126 g). Za laboratorní teploty byla směs míchána 45 minut. Reakční směs byla okyselena koncentrovanou HCl. Vzniklý olej byl z vodné fáze extrahován ethyl acetátem (3x80 ml). Organická fáze byla usušena bezvodým Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> a odpařena do oleje, který ztuhl. Surový produkt byl dvakrát rekrystalizován z ethyl acetátu. Bylo izolováno 3,062 g (65 %).

## Charakterizace produktu:

Teplota tání: 123-127 °C;

Hex/EtAc; 2/3; H<sup>+</sup>: R<sub>f</sub> = 0,39; Tol/EtAc; 4/1; H<sup>+</sup>: R<sub>f</sub> = 0,34;

CHN pro C<sub>20</sub>H<sub>22</sub>ClNO<sub>4</sub> (375,12):

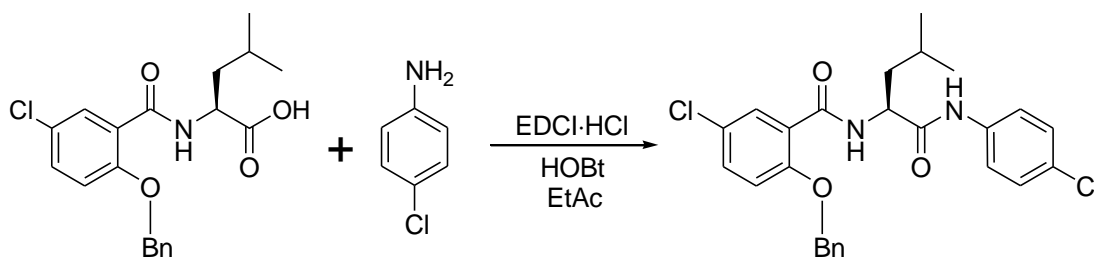
Teor.: C 63,91; H 5,9; N 3,73;

Exp.: C 64,01±0,05; H 6,02±0,03; N 3,81±0,04;

<sup>1</sup>H NMR (400,13 MHz, DMSO) δ: 0,75 (6H, dd, J<sub>H,H</sub> = 5,6 Hz, J<sub>H,H</sub> = 11,2 Hz, 2xCH<sub>3</sub>); 1,30-1,50 (3H, m, CH, CH<sub>2</sub>); 4,30-4,40 (1H, m, CH); 5,24 (2H, s, CH<sub>2</sub>); 7,28-7,45 (4H, m, Ar-H); 7,52 (2H, dd, <sup>4</sup>J<sub>H,H</sub> = 1,6 Hz, <sup>3</sup>J<sub>H,H</sub> = 8 Hz, Ar-H); 7,56 (1H, dd, <sup>4</sup>J<sub>H,H</sub> = 2,8 Hz, <sup>3</sup>J<sub>H,H</sub> = 8,8 Hz, Ar-H); 7,70 (1H, d, <sup>3</sup>J<sub>H,H</sub> = 2,8 Hz, Ar-H); 8,34 (1H, d, <sup>3</sup>J<sub>H,H</sub> = 8 Hz, NH); 12,70 (1H, brs, COOH).

<sup>13</sup>C NMR (100.62 MHz, DMSO) δ: 21,2; 22,7; 24,3; 50,7; 70,8; 115,5; 124,2; 124,7; 128,3; 128,3; 128,5; 129,7; 131,9; 135,7; 155,0; 163,5; 173,7.

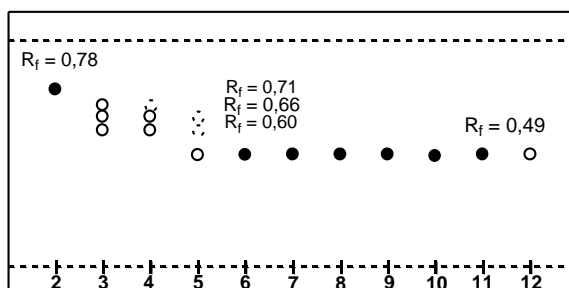
#### 4.1.7 *N*-(1-(4-Chlorofenylkarbamoyl)-3-methylbutyl)-2-(benzyloxy)-5-chlorobenzamid



	2-(2-(benzyloxy)-5-chlorobenzamido)-4-methylpentanová kyselina (JDU069, 66c)	4-chloranilin	EDCI·HCl	HOBt	EtAc	<i>N</i> -(1-(4-chlorofenylkarbamoyl)-3-methylbutyl)-2-(benzyloxy)-5-chlorobenzamid (JDU075, 67d)
M [g/mol]	375,87	127,57	191,7	135,13	-	485,4
n [mmol]	2,13	2,13	2,98 <sub>1,4x</sub>	2,13	-	2,13
m [g]	<b>0,8</b>	<b>0,272</b>	<b>0,571</b>	<b>0,288</b>	-	<b>teor. 1,034</b>
V [ml]	-	-	-	-	<b>50</b>	-
ρ [g/ml]	-	-	-	-	0,897	-

Postup přípravy:

Navážka 2-(2-(benzyloxy)-5-chlorobenzamido)-4-methylpentanové kyseliny, 4-chloranilinu, EDCI·HCl a HOBt byly suspendovány v ethyl acetátu (50 ml). DMF (10 ml) byl přidáván do úplného rozpuštění reaktantů. Reakční směs byla při laboratorní teplotě míchána 16 hodin a monitorována TLC. Reakční směs byla protřepána s H<sub>2</sub>O (2x40 ml). Organická fáze byla následně usušena bezvodým Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>. Surový produkt byl čištěn kolonovou chromatografií s mobilní fází Tol/EtAc; 4/1. Produkt byl získán na základě TLC jednotlivých frakcí z kolonové chromatografie a jejich následným odpařením. Bylo tak získáno 0,420 g (41 %) *N*-(1-(4-chlorofenylkarbamoyl)-3-methylbutyl)-2-(benzyloxy)-5-chlorobenzamidu. Průběh separace kolonovou chromatografií je schematicky znázorněn níže.



## Charakterizace produktu:

Tol/EtAc; 4/1:  $R_f = 0,49$ ; Hex/EtAc; 2/3:  $R_f = 0,42$ ; DCM/MeOH; 9/1:  $R_f = 0,84$ ;

CHN pro  $C_{26}H_{26}Cl_2N_2O_3$ (484,13):

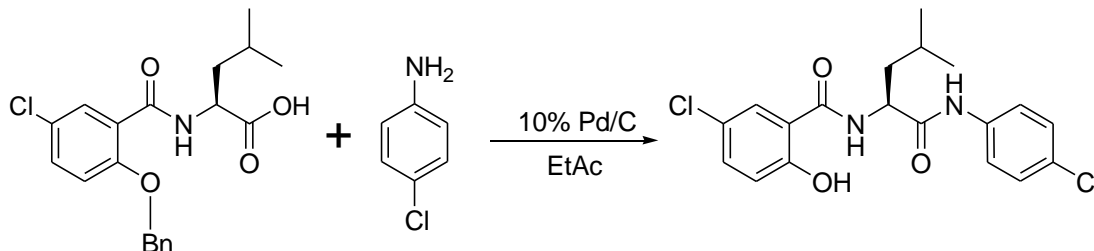
Teor.: C 64,33; H 5,40; N 5,77;

Exp.: C 64,46±0,08; H 5,38±0,06; N 5,55±0,01;

$^1H$  NMR (400,13 MHz, DMSO)  $\delta$ : 0,78 (6H, dd,  $^4J_{H,H} = 5,6$  Hz,  $^3J_{H,H} = 22,8$  Hz, 2xCH<sub>3</sub>); 1,30-1,50 (3H, m, CH, CH<sub>2</sub>); 4,50-4,65 (1H, m, CH); 5,26 (2H, s, CH<sub>2</sub>); 7,34-7,43 (6H, m, Ar-H); 7,51-7,60 (3H, m, Ar-H); 7,64 (2H, dt,  $^4J_{H,H} = 2$  Hz,  $^3J_{H,H} = 8,8$  Hz, Ar-H); 7,73 (1H, d,  $^3J_{H,H} = 2,8$  Hz, Ar-H); 8,40 (1H, d,  $^3J_{H,H} = 7,6$  Hz, NH); 10,31 (1H, s, NH).

$^{13}C$  NMR (100.62 MHz, DMSO)  $\delta$ : 21,4; 22,8; 24,3; 52,4; 70,9; 115,5; 120,8; 124,1; 124,7; 126,9; 128,3; 128,3; 128,5; 128,6; 129,8; 131,9; 135,7; 137,8; 155,0; 163,4; 170,9.

#### 4.1.8 *N*-(1-(4-Chlorofenylkarbamoyl)-3-methylbutyl)-2-(benzyloxy)-5-chloro-2-hydroxybenzamid



	<i>N</i> -(1-(4-chlorofenylkarbamoyl)-3-methylbutyl)-2-(benzyloxy)-5-chlorobenzamid (JDU075, <b>67d</b> )	10% Pd/C	EtAc	<i>N</i> -(1-(4-chlorofenylkarbamoyl)-3-methylbutyl)-2-(benzyloxy)-5-chloro-2-hydroxybenzamid (JDU076, <b>68d</b> )
M [g/mol]	485,4	-	-	485,4
n [mmol]	0,76	-	-	0,76
m [g]	<b>0,370</b>	<b>0,150</b>	-	<b>teor. 0,301</b>
V [ml]	-	-	<b>80 ml</b>	-
$\rho$ [g/ml]	-	-	0,897	-

## Postup přípravy:

*N*-(1-(4-chlorofenylkarbamoyl)-3-methylbutyl)-2-(benzyloxy)-5-chlorobenzamid byl rozpuštěn v ethyl acetátu (80 ml). Do roztoku byl přidán 10% Pd/C. Hydrogenolýza

probíhala při laboratorní teplotě 16 hodin. Po odfiltrování Pd/C katalyzátoru a oddestilováním rozpouštědla za sníženého tlaku bylo izolováno 0,160 g (50 %) bílé krystalické látky.

Charakterizace produktu:

Teplota tání: 78-82 °C;

Tol/EtAc; 4/1:  $R_f = 0,68$ ; Hex/EtAc; 3/2:  $R_f = 0,74$ ; Hex/EtAc; 2/3:  $R_f = 0,74$ ;

CHN pro  $C_{19}H_{20}Cl_2N_2O_3$  (394,09):

Teor.: C 57,73; H 5,10; N 7,09;

Exp.: C 58,01±0,09; H 5,20±0,07; N 6,92±0,05;

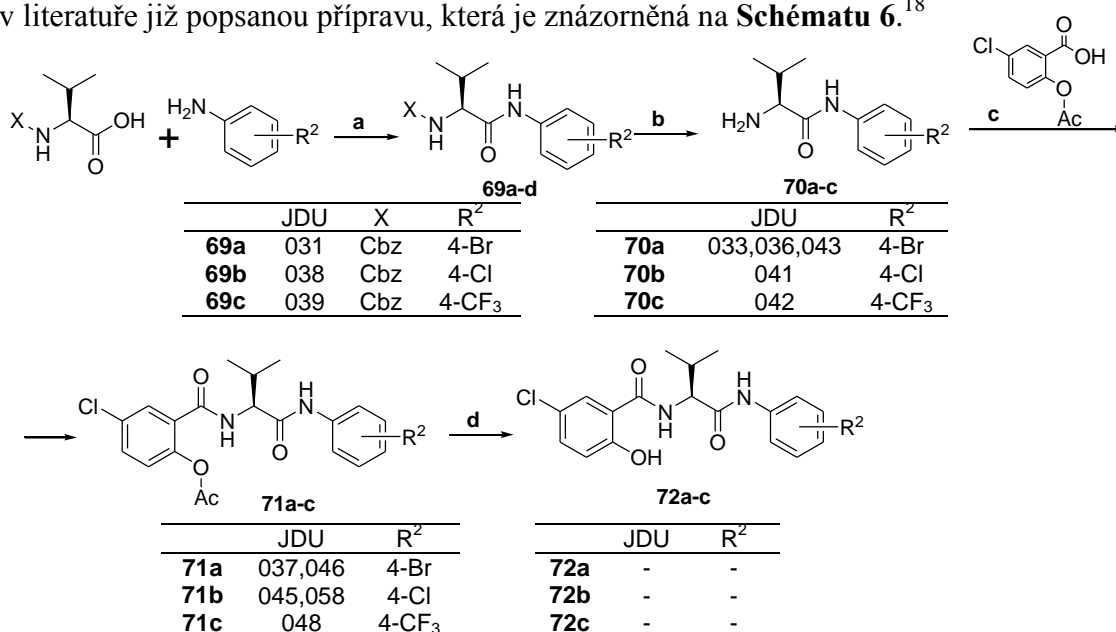
$^1H$  NMR (400,13 MHz, DMSO)  $\delta$ : 0,85-1,00 (6H, m, 2xCH<sub>3</sub>); 1,57-1,83 (3H, m, CH, CH<sub>2</sub>); 4,60-4,75 (1H, m, CH); 6,96 (1H, d,  $^3J_{H,H} = 8,8$  Hz, Ar-H); 7,36 (2H, dt,  $^4J_{H,H} = 2$  Hz,  $^3J_{H,H} = 8,8$  Hz, Ar-H); 7,45 (1H, dd,  $^4J_{H,H} = 2,4$  Hz,  $^3J_{H,H} = 8,8$  Hz, Ar-H); 7,65 (2H, dt,  $^4J_{H,H} = 2$  Hz,  $^3J_{H,H} = 6,8$  Hz, Ar-H); 8,06 (1H, d,  $^3J_{H,H} = 2,8$  Hz, Ar-H); 9,01 (1H, d,  $^3J_{H,H} = 7,6$  Hz, NH); 10,35 (1H, s, NH); 12,24 (1H, s, OH).

$^{13}C$  NMR (100.62 MHz, DMSO)  $\delta$ : 21,5; 23,0; 24,5; 52,5; 117,2; 119,1; 120,9; 122,6; 127,0; 128,2; 128,6; 133,3; 137,7; 157,7; 166,7; 170,8.

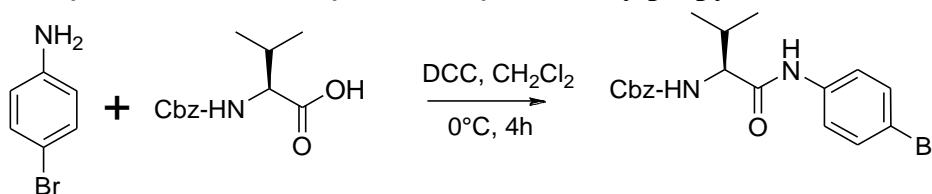
IR (ATR): 2926; 2359; 1710 (C=O amid); 1630 (C=O amid); 1536; 1492; 1493; 1358; 1225  $cm^{-1}$ .

## 4.2 Syntéza substituovaných 2-hydroxy-*N*-[1-(2-hydroxyfenylamino)-1-oxoalkan-2-yl]benzamidů navržená na základě retrosyntetické analýzy B

Metoda vychází ze substituovaného anilinu, který v prvním kroku reaguje s *N*-chráněnou aminokyselinou na amid v přítomnosti karbodiimidu. Následně probíhá deprotektace aminoskupiny, které je možné provádět hydrogenolyticky za přítomnosti Pd/C katalyzátoru nebo kyselé roztokem HBr v kyselině octové. Diamid vzniká reakcí kyseliny *O*-chráněné-5-chlorsalicylové a amidu anilin-aminokyseliny opět za přítomnosti karbodiimidu. Posledním krokem je ochránění fenolické skupiny na salicylanilidové části molekuly (viz **Schéma 39**). Postup syntézy v podstatě kopíruje v literatuře již popsanou přípravu, která je znázorněná na **Schématu 6**.<sup>18</sup>



**Schéma 39:** Návrh postupu přípravy vycházející z retrosyntetické analýzy B. **a** Karbodiimid; **b** deprotektace dusíku pocházející z aminokyseliny; **c** tvorba amidu za přítomnosti vhodného karbodiimidu; **d** deprotektace hydroxylové skupiny.

4.2.1 Benzyl (*S*) 1-(4-bromfenylkarbamoyl)-2-methylpropylkarbamát

	4-bromanilin	Cbz-L-valin	DCC	CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	benzyl ( <i>S</i> ) 1-(4-bromfenylkarbamoyl)-2-methylpropylkarbamát ( <i>JDU031</i> , <b>69a</b> )
M [g/mol]	172,03	251,28	206,33	84,9	405,29
n [mmol]	12,26	12,26	1,57 <sup>1,2x</sup>	-	12,26
m [g]	2,109	3,08	3	100 ml	4,969
ρ [g/cm <sup>3</sup> ]	-	-	-	1,325	-

## Postup přípravy:

Benzyloxykarbonyl-L-Valin byl rozpuštěn v dichlormethanu (100 ml) a vychlazen na  $-5\text{ }^{\circ}\text{C}$ , k němu byl najednou přidán 4-bromanilin. Dicyklohexyl karbodiimid byl přidán ve třech dávkách během 20 minut. Reakční směs byla 4 hodiny míchána na ledové lázni, poté byla 16 hodin uchována v lednici při  $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ . Vzniklá sraženina *N,N'*-dicyklohexylmočoviny byla odfiltrována, filtrační koláč byl promyt ethyl acetátem (2x15 ml). Ze spojených organických fází byla za sníženého tlaku oddestilována rozpouštědla. Odparek byl rozmíchan v dichlormethanu (50 ml) a rozpouštědlo bylo za sníženého tlaku oddestilováno. Bylo izolováno 3,445 g (85 %) bílé krystalické látky.

## Charakterizace produktu:

Teplota tání: 192-196  $^{\circ}\text{C}$ ;

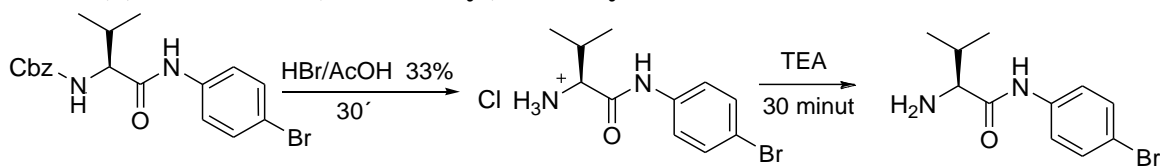
DCM/MeOH; 9/1:  $R_f = 0,33$ ; Hex/EtAc; 2/1:  $R_f = 0,72$ ; Tol/EtAc; 3/2):  $R_f = 0,65$ ;

<sup>1</sup>H NMR (400,13 MHz, DMSO)  $\delta$ : 0,88 (6H, dd,  $^4J_{\text{H,H}} = 4,4\text{ Hz}$ ,  $^3J_{\text{H,H}} = 6,8\text{ Hz}$ , 2xCH<sub>3</sub>); 1,6-2,15 (1H, m, CH); 3,95 (1H, t,  $^3J_{\text{H,H}} = 8\text{ Hz}$ , CH); 5,02 (2H, s, CH<sub>2</sub>); 7,32-7,60 (9H, m, Ar-H); 10,2 (1H, s, NH).

<sup>13</sup>C NMR (100,62 MHz, DMSO)  $\delta$ : 18,50; 19,17; 30,22; 61,14; 65,47; 114,91; 121,14; 127,14; 127,82; 128,36; 131,58; 138,15; 156,30; 170,76.



## 4.2.2 (S)-2-Amino-N-(4-bromfenyl)-3-methylbutanamid



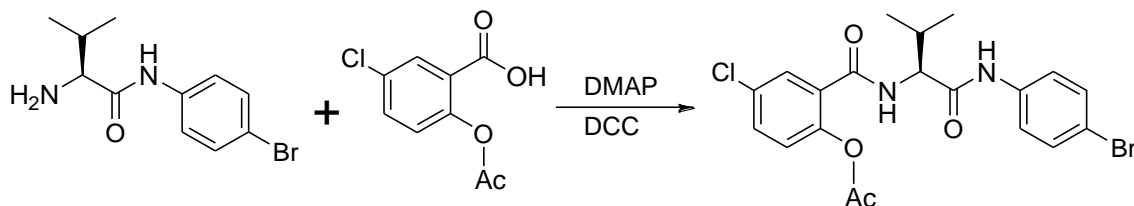
	benzyl (S) 1-(4-bromfenylkarbamoyl)-2-methylpropyl karbamát ( <i>JDU031</i> , <b>69a</b> )	HBr/AcOH 33%	Hydrobromid	TEA	(S)-2-amino-N-(4-bromfenyl)-3-methylbutanamid ( <i>JDU033,036,043</i> , <b>70a</b> )
M [g/mol]	405,29	-	352,05	101,19	271,15
n [mmol]	1,21	-	1,21	1,15 <sup>0,95x</sup>	1,21
m [g]	0,49	5 ml	-	159 µl	
b.v. [°C]	-	-	-	85,5	-
ρ [g/cm <sup>3</sup> ]	-	1,4	-	0,73	-

## Postup přípravy:

K navážce benzyl (S) 1-(4-bromfenylkarbamoyl)-2-methylpropylkarbamátu byl pomalu přilít 33% roztok HBr/AcOH. Reakční směs byla míchána 30 minut při laboratorní teplotě. Reakce byla ukončena přilítím diethyletheru (100 ml). Objem reakční směsi byl za sníženého tlaku zredukován na olej. Opakovaným rozpuštěním oleje v dichlormethanu (6x15 ml) a chloroformu (1x10 ml) a odpařením rozpouštědla za sníženého tlaku byly odstraněny zbytky kyselin.

Olejnatý produkt byl rozpuštěn v chloroformu (10 ml). Po přidavku TEA (159 µl) byla reakční směs míchána při laboratorní teplotě 30 minut. Následně bylo za sníženého tlaku oddestilováno rozpouštědlo a odparek byl rozpuštěn v ethyl acetátu. Organická fáze byla promyta H<sub>2</sub>O (2x30 ml), usušena bezvodým Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> a odpařena do oranžového oleje. Produkt nebyl dále charakterizován, ale přímo použit do dalšího stupně syntézy.

### 4.2.3 2-((*S*)-1-(4-Bromfenylkarbamoyl)-2-methylpropylkarbamoyl)-4-chlorofenyl acetát



	( <i>S</i> )-2-amino- <i>N</i> -(4-bromofenyl)-3-methylbutanamid ( <i>JDU033,036,04, 70a</i> )	5-chloroacetyl salicylová kys.	DMAP	DCC	2-(( <i>S</i> )-1-(4-bromofenylkarbamoyl)-2-methylpropylkarbamoyl)-4-chlorofenyl acetát ( <i>JDU037, 71a</i> )
M [g/mol]	271,15	214	-	206	467,74
n [mmol]	2,467	2,467	kat	2,714 <sup>1,ix</sup>	2,467
m [g]	-	0,528	-	0,559	teor. 1,154

#### Postup přípravy:

Navážka kyselina 5-chloroacetylsalicylové byla rozpuštěna v dichlormethanu (30 ml) a vychlazena na  $-5\text{ }^{\circ}\text{C}$ , k němu bylo najednou přidáno katalytické množství DMAP a DCC v průběhu 30 minut. Během dalších 30 minut byl pomalu přikapán roztok (*S*)-2-amino-*N*-(4-bromofenyl)-3-methylbutanamidu **70a** v dichlormethanu (20 ml). Bylo počítáno se 100 % výtěžností minulé reakce. Reakční směs byla 1 hodinu míchána na ledové lázni a 16 h za laboratorní teploty. Filtrací byla z reakční směsi odstraněna sraženina *N,N'*-dicyklohexylmočoviny. Surový produkt byl přečištěn kolonovou chromatografií s mobilní fází  $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$ ; 9/1. Bylo izolováno 189 mg (16 %) bílých krystalů.

#### Charakterizace produktu:

Teplota tání: 215-225  $^{\circ}\text{C}$ ;

DCM/MeOH; 9/1:  $R_f = 0,73$ ; Tol/EtAc; 4/1:  $R_f = 0,36$ ; Hex/EtAc; 4/1:  $R_f = 0,12$ ;

CHN pro  $\text{C}_{20}\text{H}_{20}\text{BrClN}_2\text{O}_4$  (466,03):

Teor.: C 51,36; H 4,31; N 5,99;

Exp.: C 51,37 $\pm$ 0,12; H 4,61 $\pm$ 0,10; N 6,27 $\pm$ 0,07;

$^1\text{H NMR}$  (400,13 MHz, DMSO)  $\delta$ : 0,95 (3H, d,  $^3J_{\text{H,H}} = 5,6$  Hz,  $\text{CH}_3$ ); 0,94 (3H, d,  $^3J_{\text{H,H}} = 5,6$  Hz,  $\text{CH}_3$ ); 2,05-2,15 (1H, m, CH); 2,50 (3H, s,  $\text{CH}_3$ ); 4,39 (1H, t,  $^3J_{\text{H,H}} = 8$  Hz, CH); 7,26 (1H, d,  $^3J_{\text{H,H}} = 8,4$  Hz, Ar-H); 7,50 (2H, d,  $^3J_{\text{H,H}} = 8,8$  Hz, Ar-H); 7,56-7,66 (4H, m, Ar-H); 8,59 (1H, d,  $^3J_{\text{H,H}} = 8,4$  Hz, NH); 10,31 (1H, s, NH).

**<sup>13</sup>C NMR** (100.62 MHz, DMSO)  $\delta$ : 18,63; 19,14; 20,67; 30,34; 59,52; 115,08; 121,24; 125,31; 128,91; 129,79; 130,50; 131,01; 131,61; 138,07; 146,71; 164,05; 168,68; 170,03.

## 5 Výsledky a diskuze

Syntéza navržená a provedená na základě diskonekce B je modifikovaný postup, který byl popsán v literatuře.<sup>18</sup> Přípravu amidu *N*-chráněné aminokyseliny a substituovaného anilinu za přítomnosti *N,N'*-dicyklohexylkarbodiimidu se dařilo provést relativně snadno, zato se značně rozdílnými výtěžky (**69a** 51 %, **69b** 81 %, **69c** 36 %). Komplikaci představovala *N,N'*-dicyklohexylmočovina, kterou bylo obtížné zcela odstranit. Po deprotekcí Cbz skupiny nebylo možné hydrobromidy volných aminů ani aminy (**70a-c**) izolovat v krystalické formě. Jednalo se o látky ve formě oleje, což značně ztěžovalo kvalitní čištění a následnou charakterizaci. Proto byly tyto látky do následující reakce s kyselinou 5-chloracetylsalicylovou použity v surovém stavu. Acetylované diamidy **71a-c** byly připraveny ve velmi malých výtěžcích a značně znečištěném stavu (16 – 7 %). K závěrečnému kroku, deacetylaci prekurzorů **71a-c**, nebylo přistoupeno, protože se je nepodařilo připravit v dostatečném množství a čistotě postačující úspěšnému provedení experimentu.

Tato metoda nevedla k úspěšné přípravě cílových molekul. Výše popsaný způsob přípravy nabízel možnost snadné obměny salicylového skeletu. Tato práce ale se salicylovou kyselinou počítala jako se základem molekuly a našemu záměru vyhovuje spíše větší flexibilita při obměnách anilinu a aminokyselin. Navíc bylo nutné použití chráněných aminokyselin, což se negativně projevilo na cenách výchozích látek.

Syntéza navržená a provedená na základě diskonekce A vycházela z kyseliny acetylsalicylové. Volba této výchozí látky se přímo nabízela pro již zavedenou chránící skupinu a její snadnou dostupnost. Z počátku bylo k aktivaci kyseliny acetylsalicylové používáno její převedení na chlorid. To ale představovalo jeden reakční stupeň navíc, jehož produkty se daly jen těžko charakterizovat a čistit. Chlorid se tedy do dalšího reakčního stupně používal v surovém stavu, což mělo za následek nadměrné znečištění amidu kyseliny acetylsalicylové a glycinu. Při čištění docházelo k velkým ztrátám (**61** 31 %). V zájmu snížení počtu reakčních kroků a zlepšení výtěžků bylo od přípravy amidu přes chlorid kyseliny salicylové odstoupeno. Touto cestou byly připraveny diamidy **63a,c**. Nově byla amidická vazba mezi substituovanou kyselinou salicylovou a aminokyselinou tvořena výhradně za využití karbodiimidů. Při použití *N,N'*-dicyklohexylkarbodiimidu (DCC) vznikal problém s těžko odstranitelným vedlejším produktem reakce *N,N'*-dicyklohexylmočovinou (DCU). Z tohoto důvodu byl

dále používán *N*-ethyl-*N'*-(3-dimethylaminopropyl)karbodiimid hydrochlorid (EDCI·HCl), jehož výtěžky jsou vyšší zejména kvůli snazší izolaci produktů.

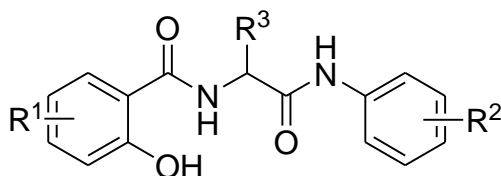
V průběhu experimentů docházelo ke komplikacím při závěrečné deacetylaci. Ochranná skupina byla tedy změněna na benzylovou. Nově se deprotektce prováděly vodíkem na Pd/C katalyzátoru, a to spolehlivě a s vysokými výtěžky čistého produktu.

Za použití EDCI·HCl a benzylu jako chránicí skupiny byly připraveny diamidy **68b** (46 %), **68c** (60 %) a **68d** (50 %).

## 6 Závěr

Literární řešerše se věnovala hledání postupu přípravy 2-hydroxy-*N*-[1-(2-hydroxyfenylamino)-1-oxoalkan-2-yl]benzamidů a molekul, které se jim svým skeletem blíží. Kvůli absenci postupu, který by vyhovoval našim potřebám, bylo přistoupeno k retrosyntetické analýze cílové molekuly. Na jejím základě byly navrženy dva možné postupy, které byly experimentálně ověřeny. Další část řešerše se věnovala popisu karbodiimidů a jejich použitelnosti při přípravě esterů a amidů. Jejich široká využitelnost, omezení a klady byly názorně doloženy na různých příkladech.

Výše popsanými postupy bylo připraveno 14 originálních a v literatuře doposud nepopsaných látek. Z tohoto počtu je 5 diamidů a 9 neodchráněných prekurzorů (Obrázek 13, Tabulka 15).



Obrázek 13: Obecný vzorec připravených diamidů

Tabulka 15: Přehled připravených látek

Diamidy					
Kód	JDU	R <sup>1</sup>	R <sup>2</sup>	R <sup>3</sup>	
<b>63a</b>	023	H	4-Cl	H	
<b>63c</b>	060	H	4-Br	H	
<b>68b</b>	072	5-Cl	3-Cl-4-F	CH <sub>3</sub>	
<b>68c</b>	074	5-Cl	4-Br	CH <sub>2</sub> CH(CH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub>	
<b>68d</b>	076	5-Cl	4-Cl	CH <sub>2</sub> CH(CH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub>	
Chráněné diamidy					
Kód	JDU	R <sup>1</sup>	R <sup>2</sup>	R <sup>3</sup>	Ochranná skupina
<b>62a</b>	022	H	4-Cl	H	Ac
<b>62b</b>	030	5-Cl	4-Br	H	Ac
<b>71a</b>	037	5-Cl	4-Br	CH(CH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub>	Ac
<b>71b</b>	045	5-Cl	4-Cl	CH(CH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub>	Ac
<b>71c</b>	048	5-Cl	4-CF <sub>3</sub>	CH(CH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub>	Ac
<b>62c</b>	059	5-Cl	4-Br	H	Bn
<b>67b</b>	071	5-Cl	3-Cl-4-F	CH <sub>3</sub>	Bn
<b>67c</b>	073	5-Cl	4-Br	CH <sub>2</sub> CH(CH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub>	Bn
<b>67d</b>	075	5-Cl	4-Cl	CH <sub>2</sub> CH(CH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub>	Bn

Jako nejvhodnější způsob přípravy 2-hydroxy-*N*-[1-(2-hydroxyfenylamino)-1-oxoalkan-2-yl]benzamidů se osvědčilo použití karbodiimidů, zejména těch, jejichž reakční zbytky na bázi močoviny lze snadno odstranit. V této práci byl s úspěchem využit *N*-ethyl-*N*'-

(3-dimethylaminopropyl)karbodiimid hydrochlorid (EDCI·HCl), jako perspektivní se jeví také použití polymerně vázaných karbodiimidů. Pro ochranu fenolického hydroxyly je výhodné použít benzylové skupiny. Výchozí látku (**64**) je možné připravit snadno a ve velkém výtěžku.

Cíle práce, jako literární analýza přípravy 2-hydroxy-*N*-[1-(2-hydroxyfenylamino)-1-oxoalkan-2-yl]benzamidů, jejich následné ověření a navržení vlastních syntetických postupů pro syntézu cílových molekul, byly splněny.

## Seznam použitých zkratek

Ac	acetyl
AIBN	azobisisobutyronitril
Baz	nukleová báze (thymin, cystein, Cbz-cystein, adenin, Cbz-adenin, guanin, Cbz-guanin)
BDDC	bis{[4-(2,2-dimethyl-1,3-dioxolyl)methyl]karbodiimid
Bn	benzyl
Boc	<i>tert</i> -butyloxykarbonyl
b.t.	bod tání
Cbz	benzyloxykarbonyl
CMC	<i>N</i> -cyklohexyl- <i>N'</i> -(β-[ <i>N</i> -methylmorfolin]ethyl)karbodiimid <i>p</i> -toluensulfonátem
DCE	1,2-dichlorethan
DCC	<i>N,N'</i> -dicyklohexylkarbodiimid
DCM	dichlormethan
DCU	<i>N,N'</i> -dicyklohexylmočovina
DhbtOH	3,4-dihydro-3-hydroxy-4-oxo-1,2,3-benzotriazin
DIC	<i>N,N'</i> -diizopropylkarbodiimid
DIPEA	<i>N,N</i> -diisopropylethylamin
DMAP	<i>N,N</i> -dimethyl-4-aminopyridin
DMAP·HCl	<i>N,N</i> -dimethyl-4-aminopyridin hydrochlorid HOBt-1-hydroxybenzotriazol
DMF	<i>N,N</i> -dimethylformamid
EDC	<i>N</i> -ethyl- <i>N'</i> -(3-dimethylaminopropyl)karbodiimid
EDCI·HCl	<i>N</i> -ethyl- <i>N'</i> -(3-dimethylaminopropyl)karbodiimid hydrochlorid
ee	enantiomerní přebytek
ekv	ekvivalent
Et	ethyl
EtAc	ethylacetát
EtOH	ethanol
Gly	glycin
Hex	hexan
cHex	cyklohexyl
<i>i</i> Pr	isopropyl
lab.t.	laboratorní teplota, 25 °C
Ln	lanthanoid
M	kov
Me	methyl
MeOH	methanol
Mes	mesitilen, 1,3,5-trimethylbenzen
<i>n</i> -Bu <sub>3</sub> SnH	tributylcín hydrid
NHS	<i>N</i> -hydroxysukcinimid
NMM	<i>N</i> -methylmaleiimid
Ph	fenyl
PNA	peptidové nukleové kyseliny
Py	pyridin
rozp.	rozpouštědlo
RS	reakční směs
RVO	rotační vakuová odparka
SALy	2-hydroxy benzamidy
TEA	triethylamin
THF	tetrahydrofuran
Tol	toluen



## Seznam použité literatury

- <sup>1</sup> Vinšová, J.; Imramovský, A. Salicylanilidy - Stále aktuální skupina s potenciální antibakteriální aktivitou. *Czech. Slov. Farm.* **2004**, *53* (5), 294–299.
- <sup>2</sup> Imramovský, A.; Pauk, K.; Pejchal, V.; Hanusek, J. Salicylanilides and Their Derivates as Perspective Anti-tuberculosis Drugs: Synthetic Routes and Biological Evaluations. *Mini-Reviews in Organic Chemistry* **2011**, *8* (2), 211–220.
- <sup>3</sup> Krátký, M.; Vinšová, J. Antiviral Activity of Substituted Salicylanilides – A Review. *Mini-Reviews in Medicinal chemistry* **2011**, *11*, 956–967.
- <sup>4</sup> Kuneš, J.; Balšánek, V.; Pour, M.; Waisser, K.; Kaustová, J. On the relationship between the substitution pattern of thiobenzanilides and their antimycobacterial activity. *Il Farmaco* **2002**, *57*, 777–782.
- <sup>5</sup> Waisser, K.; Bureš, O.; Holý, P.; Kuneš, J.; Oswald, R.; Jirásková, L.; Pour, M.; Klimešová, V.; Kubicová, L.; Kaustová, J. Relationship between the Structure and Antimycobacterial Activity of Substituted Salicylanilides. *Arch. Pharm. Pharm. Med. Chem.* **2003**, *1*, 53–71.
- <sup>6</sup> Waisser, K.; Peřina, M.; Boudová, I.; Kuneš, J.; Kaustová, J. Nová skupina potenciálních antituberkulotik: Antimykobakteriální *N*-benzylsalicylamidy. *Česká a slovenská farmacie* **2003**, *52* (6), 291–294.
- <sup>7</sup> Riss, B.; Meier, U. WO 2006/063821 A1, June 22, 2006.
- <sup>8</sup> Vinšová, J.; Imramovský, A.; Buchta, V.; Cecková, M.; Doležal, M.; Štaud, F.; Jampílek, J.; Kaustova, J. Salicylanilide Acetates: Synthesis and Antibacterial Evaluation. *Molecules* **2007**, *12*, 1–12.
- <sup>9</sup> M. Bodanszky, A. Bodanszky: The Practice of Peptide Synthesis, Springer-Verlag, New York, 1984, ISBN 0-387-13471-9
- <sup>10</sup> Imramovský, A.; Vinšová, J.; Ferriz, J. M.; Kuneš, J.; Pour, M.; Doležal, M. Salicylanilide esterification: unexpected formation of novel seven-membered rings. *Tetrahedron Lett.* **2006**, *47*, 5007–5011.
- <sup>11</sup> Imramovský, A.; Ferriz, J. M.; Pauk, K.; Krátký, M.; Vinšová, J. Synthetic Route for the Preparation of 2-Hydroxy-*N*-[1-(2-hydroxyphenylamino)-1-oxoalkan-2-yl]benzamides. *J. Comb. Chem.* **2010**, *12*, 414–416.
- <sup>12</sup> Vinšová, J.; Imramovský, A.; Krátký, M.; Ferriz, J. M.; Palát, K.; Lyčka, A.; Růžička, A. An unprecedented rearrangement of salicylanilide derivatives imidazolinone intermediate formation. *Tetrahedron Lett.* **2010**, *51*, 23–26.
- <sup>13</sup> Imramovský, A.; Pesko, M.; Králová, K.; Vejsová, M.; Stolaříková, J.; Vinšová, J.; Jampílek, J. Investigating Spectrum of Biological Activity of 4- and 5-Chloro-2-hydroxy-*N*-[2-(arylamino)-1-alkyl-2-oxoethyl]benzamides. *Molecules* **2011**, *16*, 2414–2430.
- <sup>14</sup> Zeng, H.; Yang, X.; Flowers, R. A.; Gong, B. A Noncovalent Approach to Antiparallel  $\beta$ -Sheet Formation. *J. Am. Chem. Soc.* **2002**, *124* (12), 2903–2910.
- <sup>15</sup> POLYMEDIX, INC. WO/2005/123660 Dec 29, 2005.
- <sup>16</sup> POLYMEDIX, INC. WO 2011/050162 April 28, 2011.

- <sup>17</sup> Muto, S.; Itai, A. US 2006/0100257 A1, June 05, 2002.
- <sup>18</sup> Mashiko, T.; Hara, K.; Tanaka, D.; Fujiwara, Y.; Kumagai, N.; Shibasaki, M. En Route to an Efficient Catalytic Asymmetric Synthesis of AS-3201. *J. Am. Chem. Soc.* **2007**, *129*, 11342–11343.
- <sup>19</sup> Mashiko, T.; Kumagai, N.; Shibasaki, M. An Improved Lanthanum Catalyst System for Asymmetric Amination: Toward a Practical Asymmetric Synthesis of AS-3201 (Ranirestat). *Org. Lett.* **2008**, *10* (13), 2725–2728.
- <sup>20</sup> Mashiko, T.; Kumagai, N.; Shibasaki, M. Managing Highly Coordinative Substrates in Asymmetric Catalysis: A Catalytic Asymmetric Amination with a Lanthanum-Based Ternary Catalyst. *J. Am. Chem. Soc.* **2009**, *131* (41), 14990–14999.
- <sup>21</sup> Takechi, S.; Kumagai, N.; Shibasaki, M. Catalytic asymmetric hydroxylation of  $\alpha$ -alkoxycarbonyl amides with a Pr(OiPr)<sub>3</sub>/amide-based ligand catalyst. *Tetrahedron Lett.* **2011**, *52*, 2140–2143.
- <sup>22</sup> Hamashima, Y.; Sasamoto, N.; Hotta, D.; Somei, H.; Umebayaashi, N.; Sodeoka, M. Catalytic Asymmetric Addition of  $\beta$ -Ketoesters to Various Imines by Using Chiral Palladium Complexes. *Angew. Chem.* **2005**, *44*, 1525–1529.
- <sup>23</sup> Ting, A.; Lou, S.; Schaus, S. E. Highly Diastereoselective Asymmetric Mannich Reactions of 1,3-Dicarbonyls with Acyl Imines. *Org. Lett.* **2006**, *8* (10), 2003–2006.
- <sup>24</sup> Nojiri, A.; Kumagai, N.; Shibasaki, M. Asymmetric Catalysis via Dynamic Substrate/Ligand/Rare Earth Metal Conglomerate. *J. Am. Chem. Soc.* **2008**, *130* (17), 5630–5631.
- <sup>25</sup> Nojiri, A.; Kumagai, N.; Shibasaki, M. Linking Structural Dynamics and Functional Diversity in Asymmetric Catalysis. *J. Am. Chem. Soc.* **2009**, *131* (10), 3779–3784.
- <sup>26</sup> Rich, D. H.; Singh, J. The carbodiimide method. In *The Peptides: Analysis, Synthesis, Biology*; Gross, E., Meienhofer, J., Eds.; Academic: New York, **1979**; Vol. 1, p 241.
- <sup>27</sup> El-Faham, A.; Albericio, F. Peptide Coupling Reagents, More than a Letter Soup. *Chem. Rev.* **2010**.
- <sup>28</sup> Gibson, S. F.; Park, M. S.; Rapoport, H. Bis[[4-(2,2-dimethyl-1,3-dioxolyl)lmethyl]carbodiimide (BDDC) and Its Application to Residue-Free Esterifications, Peptide Couplings, and Dehydrations. *J. Org. Chem.* **1994**, *59*, 7503–7507.
- <sup>29</sup> Zhang, M.; Vedantham, P.; Flynn, D. L.; Hanson, P. R. High-Load, Soluble Oligomeric Carbodiimide: Synthesis and Application in Coupling Reactions. *J. Org. Chem.* **2004**, *69*, 8340–8344.
- <sup>30</sup> Weinshenker, N. M.; Shen, C. M. Polymeric reagents II. Preparation of ketones and aldehydes utilizing an insoluble carbodiimide. *Tetrahedron Lett.* **1972**, *13*, 3285–3288.
- <sup>31</sup> Chou, T. S.; Lee, S. J.; Chang, L. J. *Bulletin of the Institute of Chemistry, Academia Sinica* **1987**, *34*, 27–33.
- <sup>32</sup> Mamat, C.; Franke, M.; Peppel, T.; Köckerling, M.; Steinbach, J. Synthesis, structure determination, and (radio-)fluorination of novel functionalized phosphanes suitable for the traceless Staudinger ligation. *Tetrahedron* **2011**, *67*, 4521–4529.

- <sup>33</sup> Nicolaou, K. C.; Roschangar, F.; Vourloumis, D. Chemical Biology of Epothilones. *Angew. Chem.* **1998**, (37), 2014–2045.
- <sup>34</sup> Muzler, J. Epothilone B and its Derivatives as Novel Antitumor Drugs: Total and Partial Synthesis and Biological Evaluation. *Monatsh. Chem.* **2000**, 131, 205–238.
- <sup>35</sup> Chou, T. Ch.; Zhang, X. G.; Harris, Ch. R.; Kuduk, S. D.; Balog, A.; Savin, K. A.; Bertino, J. R.; Danishefsky, S. J. Desoxyepothilone B is curative against human tumor xenografts that are refractory to paclitaxel. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **1998**, 95, 15798–15802.
- <sup>36</sup> Mulzer, J.; Mantoulidis, A.; Öhler, E. Total Syntheses of Epothilones B and D. *J. Org. Chem.* **2000**, 65, 7456–7467.
- <sup>37</sup> Poupon, J. C.; Boenio, A. A.; Charette, A. B. Tetraarylphosphonium Salts as Solubility-Control Groups: Phosphonium-Supported Triphenylphosphine and Azodicarboxylate Reagents. *Angew. Chem., Int. Ed.* **2006**, 45, 1415–1420.
- <sup>38</sup> Ginisty, M.; Roy, M.; Charette, A. Tetraarylphosphonium-Supported Carbodiimide Reagents: Synthesis, Structure Optimization and Applications. *J. Org. Chem.* **2008**, 73 (7), 2542–2547.
- <sup>39</sup> Bodanszky, M.; Bodanszky, A. *The Practice of Peptide Synthesis*; Springer-Verlag: New York, 1984. ISBN 0-387-13471-9
- <sup>40</sup> Friedman, J.; Jakubowiak, A. J. Velcade: A New Strategy Treating Multiple Myeloma. Cancer news. <http://www.cancernews.com/data/Article/278.asp> (accessed Jan 07, 2012).
- <sup>41</sup> Zhu, Y.; Wu, G.; Zhu, X.; Ma, Y.; Zhao, X.; Li, Y.; Yuan, Y.; Yang, J.; Yu, S.; Shao, F.; Lei, M. Synthesis, in Vitro and in Vivo Biological Evaluation, and Comprehensive Understanding of Structure-Activity Relationships of Dipeptidyl Boronic Acid Proteasome Inhibitors Constructed from  $\beta$ -Amino Acids. *J. Med. Chem.* **2010**, 53, 8619–8626.
- <sup>42</sup> Sahu, B.; Sacui, I.; Rapireddy, S.; Zanolli, K. J.; Bahal, R.; Armitage, B. A.; Ly, D. H. Synthesis and Characterization of Conformationally Preorganized, (R)-Diethylene Glycol-Containing  $\gamma$ -Peptide Nucleic Acids with Superior Hybridization Properties and Water Solubility. *J. Org. Chem.* **2011**, 76, 5614–5627.
- <sup>43</sup> Nicolaou, K. C.; Roecker, A. J.; Pfefferkorn, J. A.; Cao, G. Q. A Novel Strategy for the Solid-Phase Synthesis of Substituted Indolines. *J. Am. Chem. Soc.* **2000**, 122, 2966–2967.
- <sup>44</sup> Coates, I. A.; Hirst, A. R.; Smith, D. K. Optimizing Biomimetic Gelators Constructed from Amino Acid Building Blocks. *J. Org. Chem.* **2007**, 72, 3937–3940.
- <sup>45</sup> The Official Web Site of the Nobel Prize. [http://www.nobelprize.org/nobel\\_prizes/chemistry/laureates/2004/](http://www.nobelprize.org/nobel_prizes/chemistry/laureates/2004/) (accessed April 08, 2012).
- <sup>46</sup> Khalikov, S. K.; Kodirov, M.; Alieva, S. V. Synthesis and Anti-inflammatory Activity of Acetylsalicylamino Acids and Peptides. *Chem. Nat. Comp.* **2006**, 42 (2), 204–207.
- <sup>47</sup> Gaudioso, L. A.; Weglarz, M. A. WO 00/09547, Aug 11, 1999.

---

<sup>48</sup> Sluka, J.; Novák, J.; Buděšínský, Z. Ethers of 5-Halogenosalicylic and Thiosalicylic acids. *Collect. Czech. Chem. Commun.* **1976**, *41*, 3384–3390.

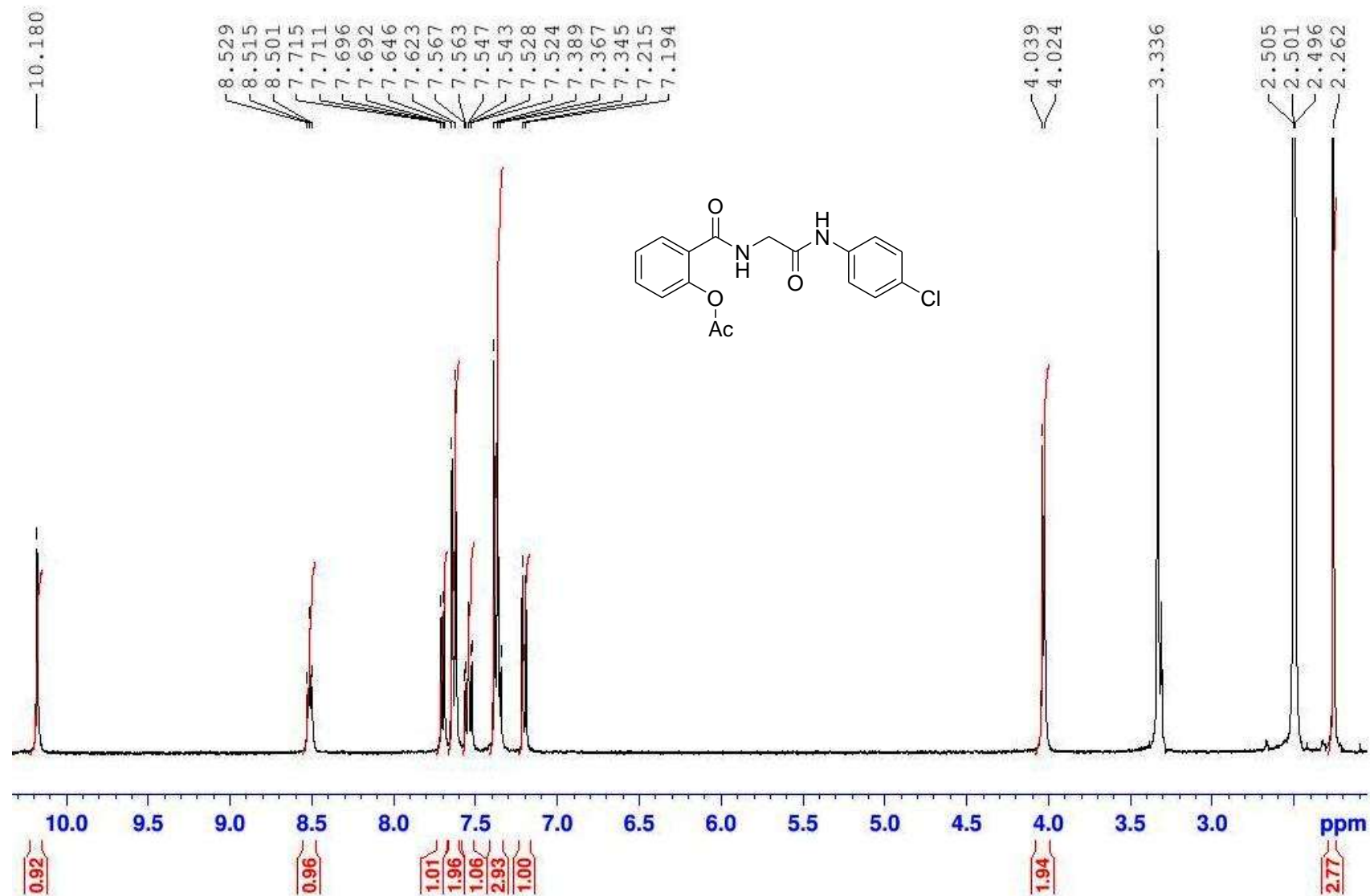
# **PŘÍLOHY**

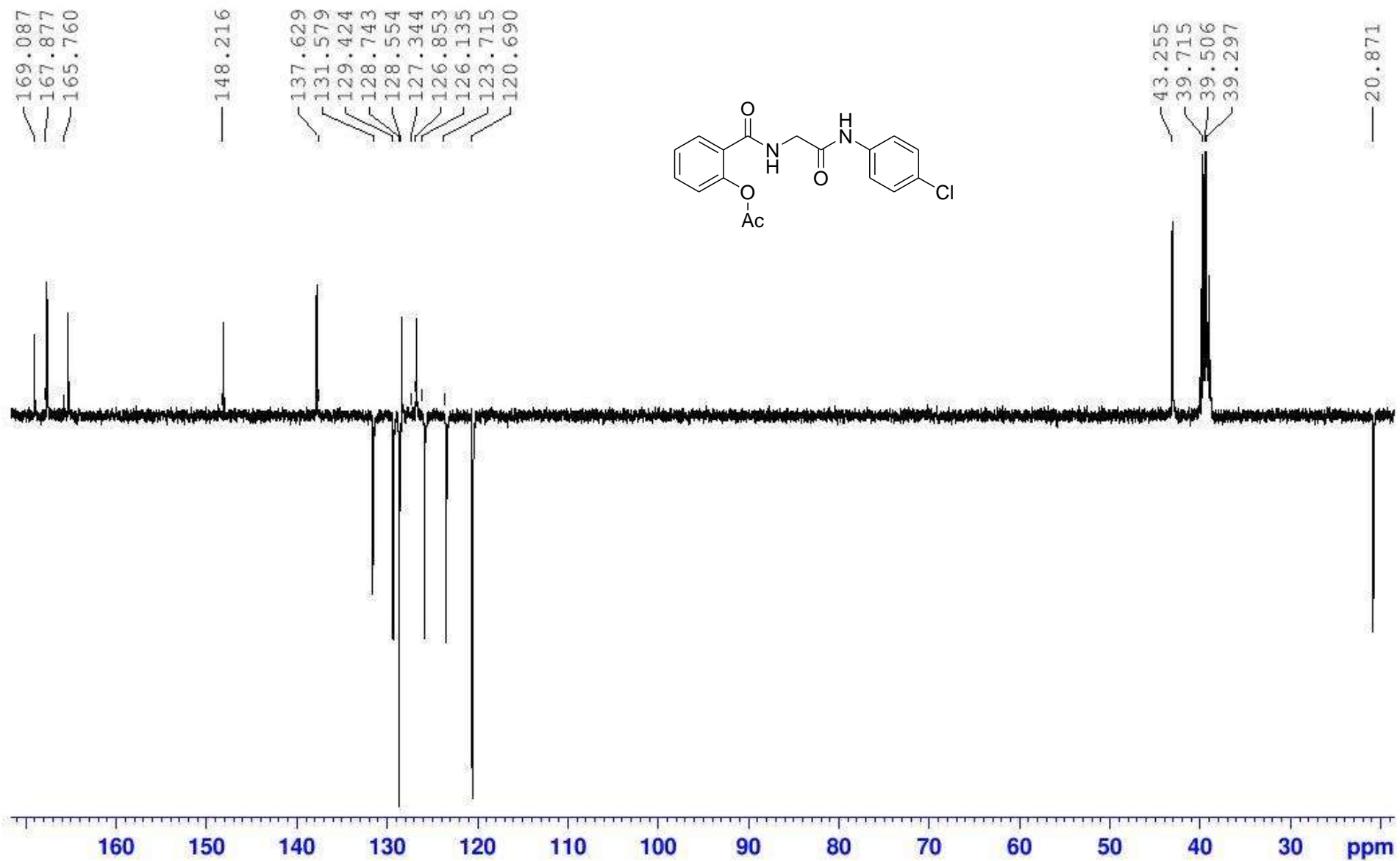
## Obsah

Obsah.....	P2
I $^1\text{H}$ a $^{13}\text{C}$ (APT) NMR spektra vybraných látek.....	P3
I.I 2-((4-Chlorofenylkarbamoyl) methylkarbamoyl)fenyl acetát ( <i>JDU022</i> , 62a) .....	P3
I.II <i>N</i> -((4-Chlorofenylkarbamoyl) methyl)-2-hydroxybenzamid ( <i>JDU023</i> , 63a).....	P5
I.III <i>N</i> -(1-(4-Chlorofenylkarbamoyl)-3-methylbutyl)-2-(benzyloxy)-5-chlorobenzamid .....	P7
( <i>JDU075</i> , 67d).....	
I.IV <i>N</i> -(1-(4-Chlorofenylkarbamoyl)-3-methylbutyl)-2-(benzyloxy)-5-chloro-2-hydroxybenzamid	
( <i>JDU076</i> , 68d).....	P9
I.V 2-(( <i>S</i> )-1-(4-Bromfenylkarbamoyl)-2-methylpropylkarbamoyl)-4-chlorofenyl acetát .....	
( <i>JDU037</i> , 71a).....	P11
II RTG .....	P13
II.I 2-(Benzyloxy)-5-chlorobenzoová kyselina ( <i>JDU065</i> , 64) .....	P13
II.II 2-(2-(Benzyloxy)-5-chlorobenzamido)octová kyselina ( <i>JDU062</i> , 66a).....	P13
II.III 2-(2-(Benzyloxy)-5-chlorobenzamido)propanová kyselina ( <i>JDU068</i> , 66b) .....	P14
III Vlastnosti použitých karbodiimidů.....	P14
III.I <i>N,N'</i> -dicyklohexylkarbodiimid .....	P14
III.II <i>N</i> -ethyl- <i>N'</i> -(3-dimethylaminopropyl)karbodiimid hydrochlorid .....	P15
III.III <i>N</i> -ethyl- <i>N'</i> -(3-dimethylaminopropyl)karbodiimid .....	P16
IV Přehled některých komerčně dostupných karbodiimidů.....	P17
V Přehled pomocných činidel .....	P18

# I $^1\text{H}$ a $^{13}\text{C}$ (APT) NMR spektra vybraných látek

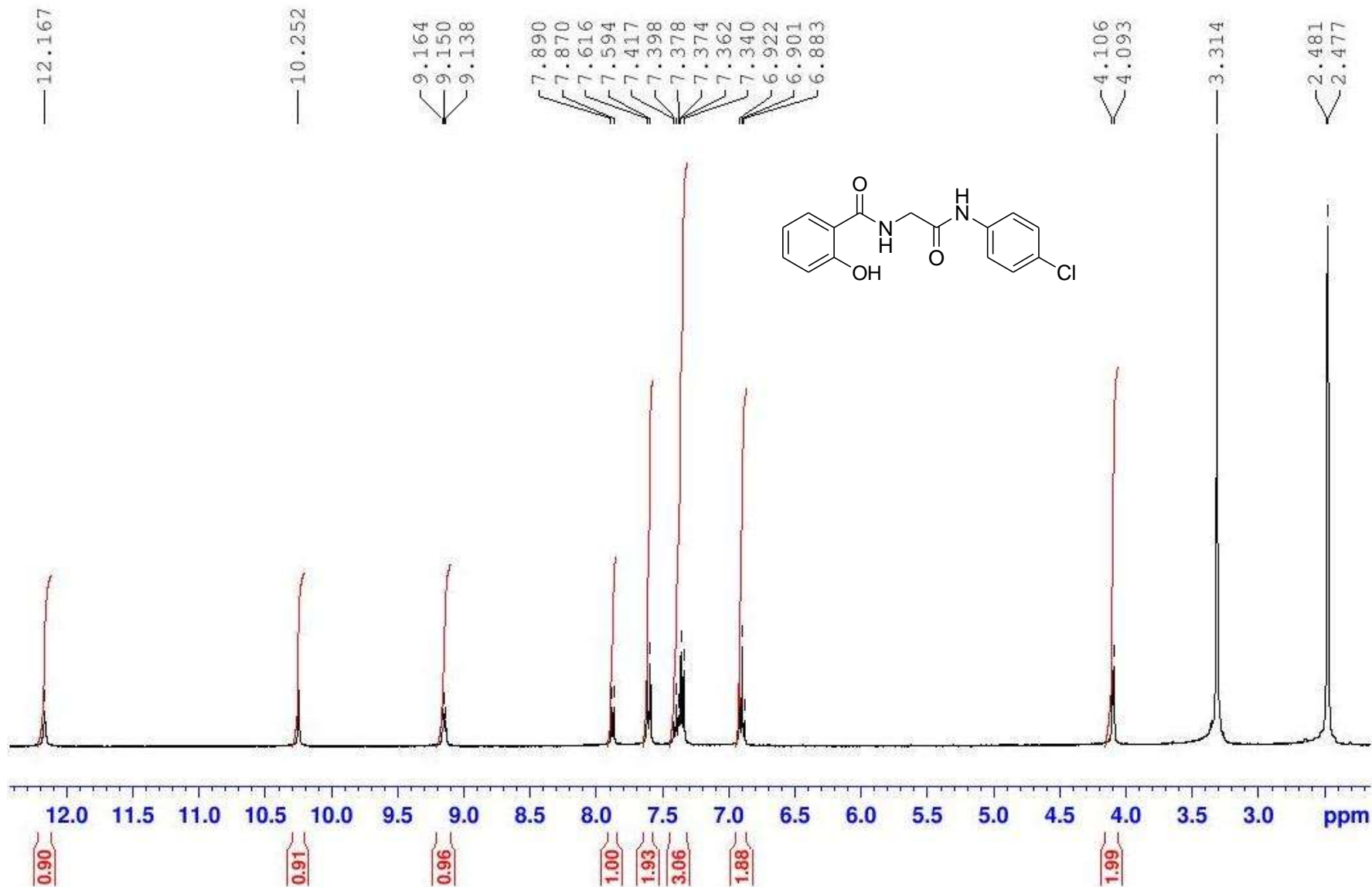
## I.I 2-((4-Chlorofenylkarbamoyl) methylkarbamoyl)fenyl acetát (*JDU022*, **62a**)

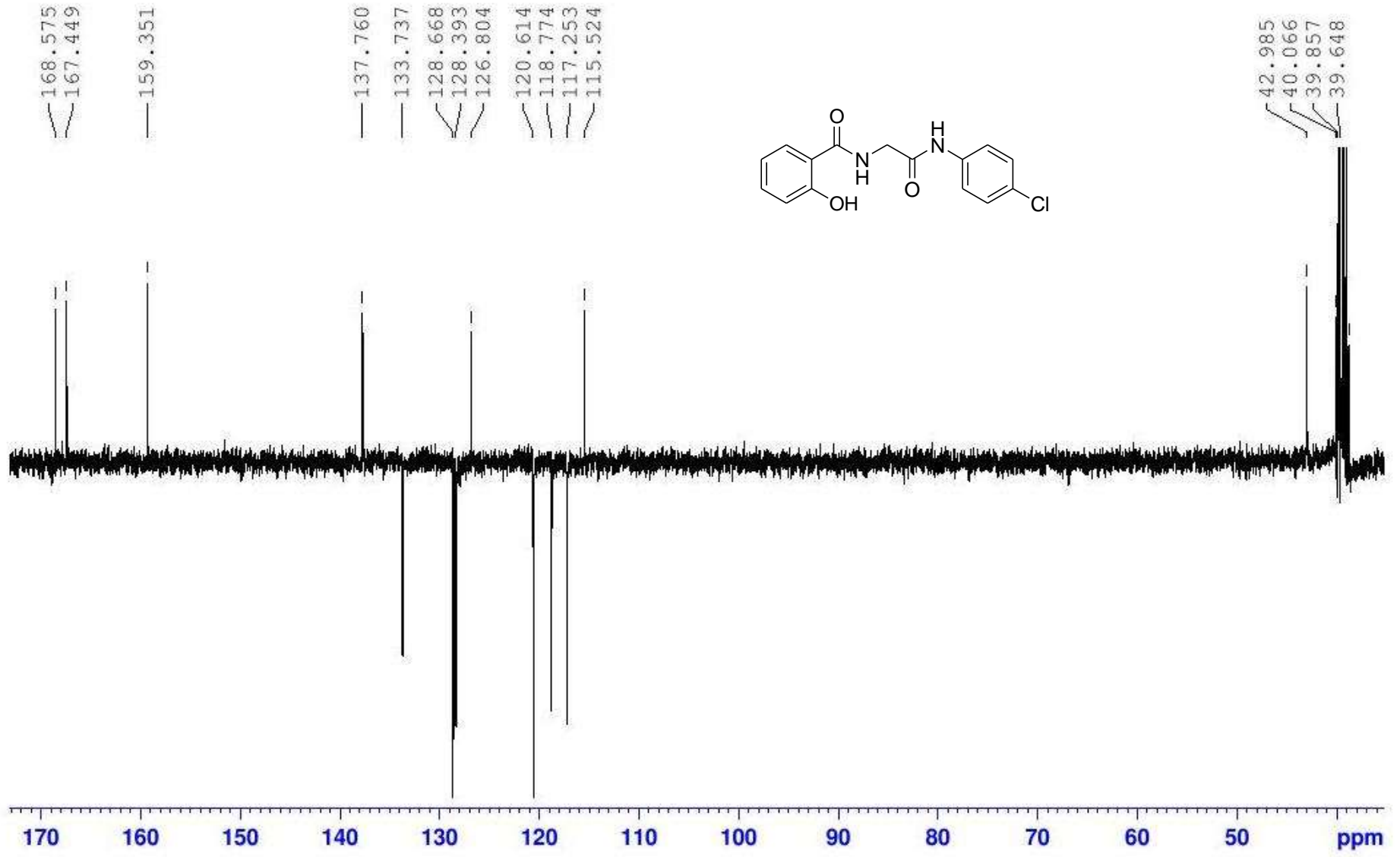




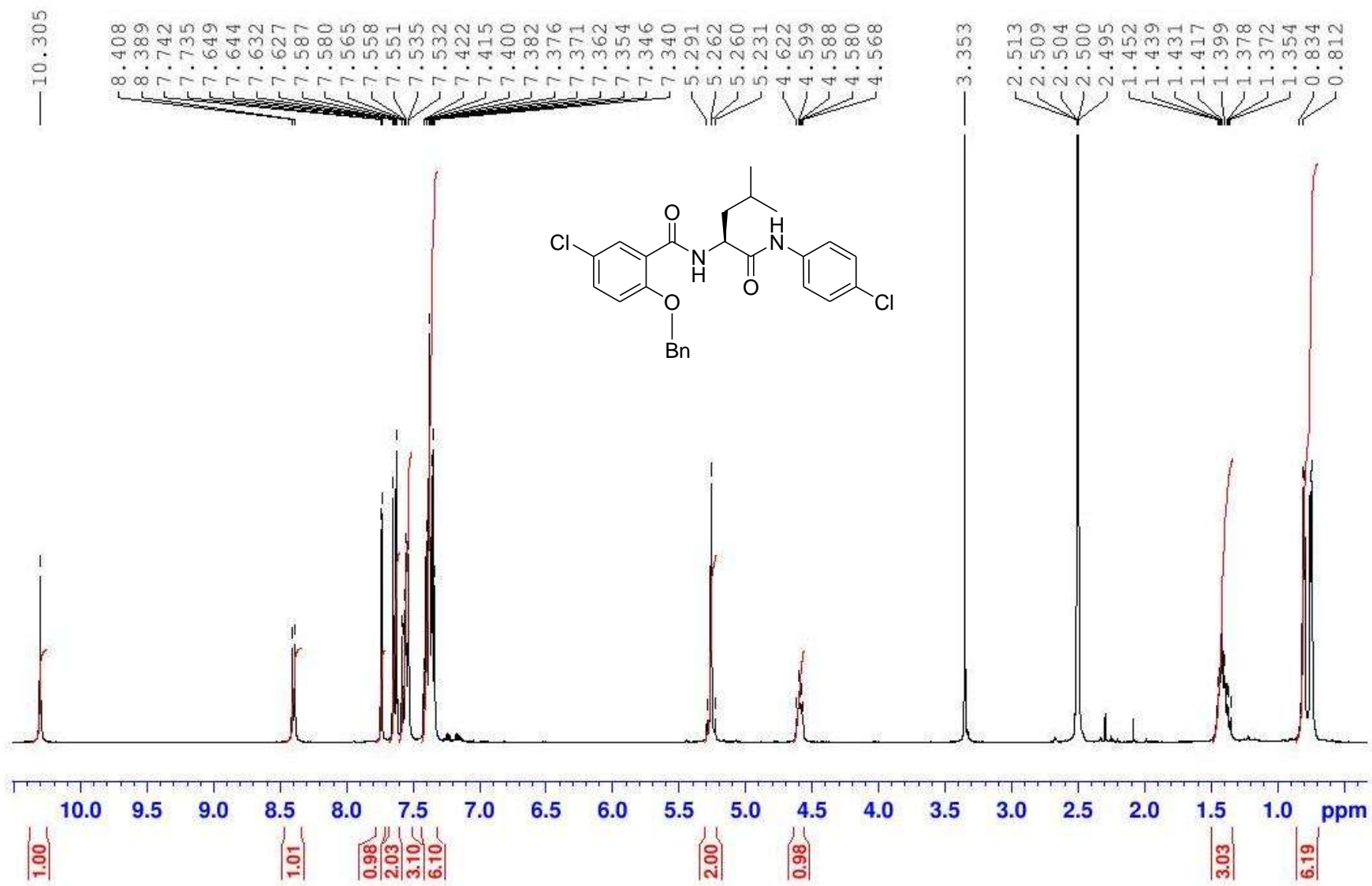


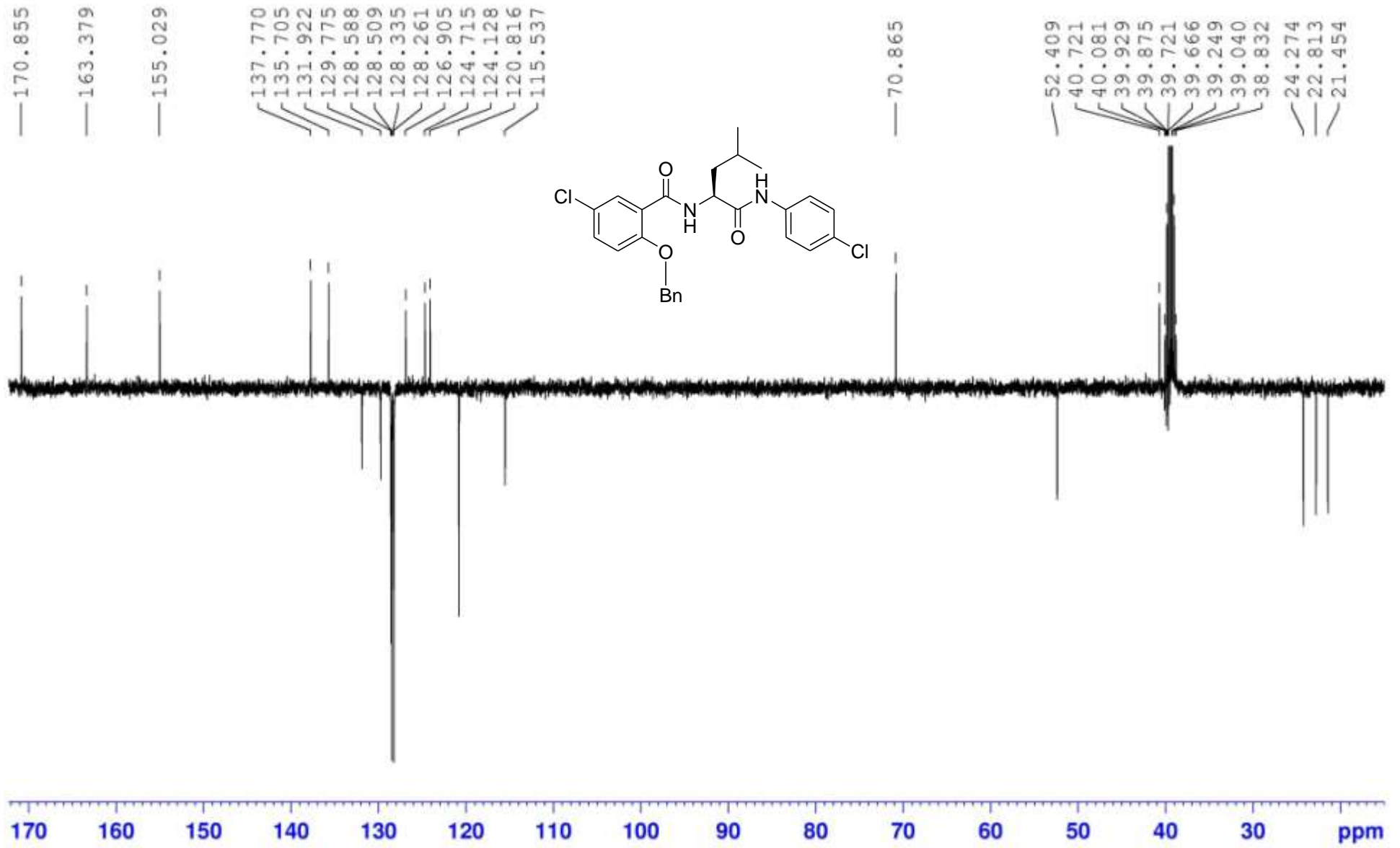
I.II *N*-((4-Chlorophenylkarbamoyl) methyl)-2-hydroxybenzamid (*JD*U023, **63a**)



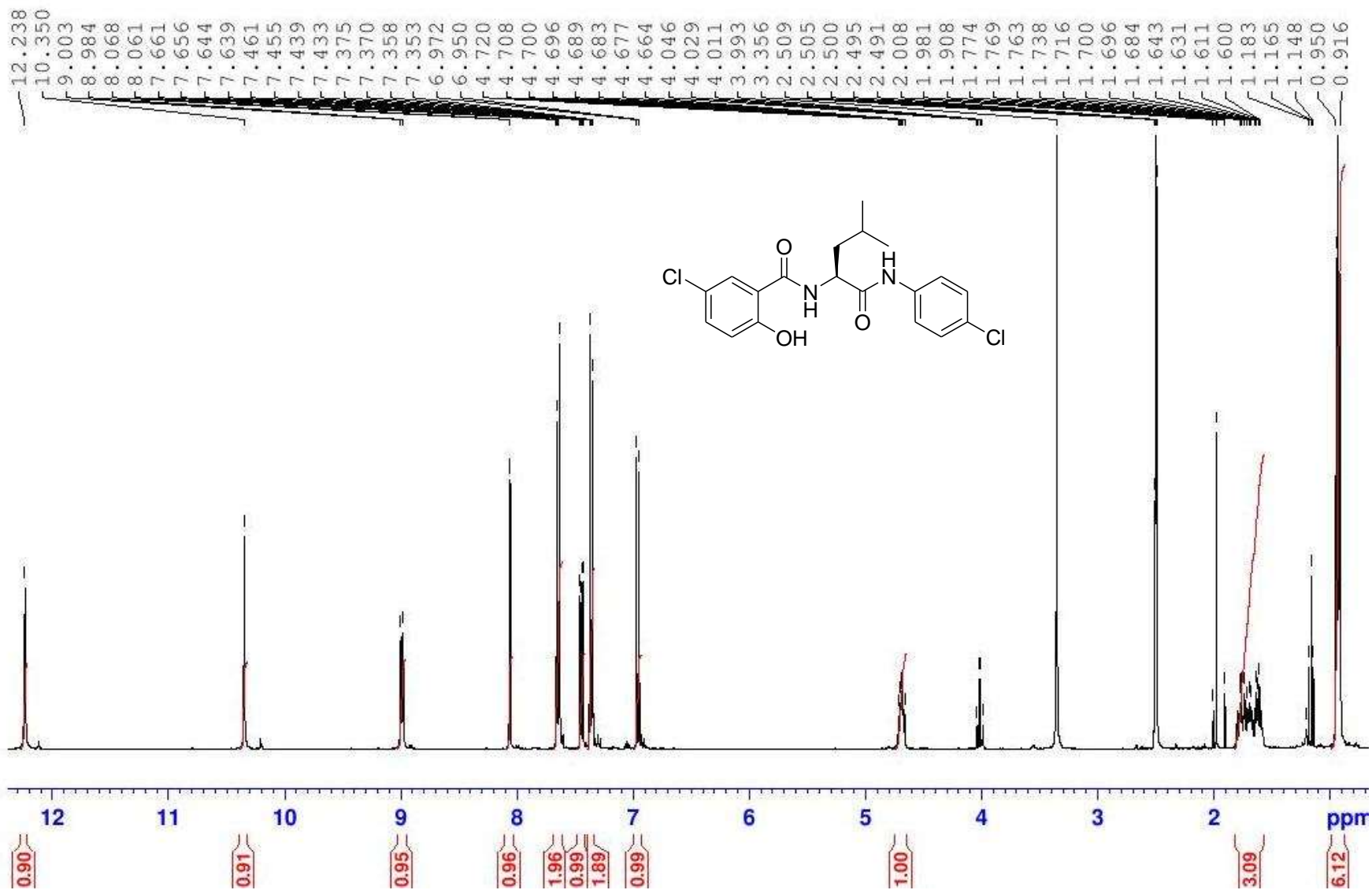


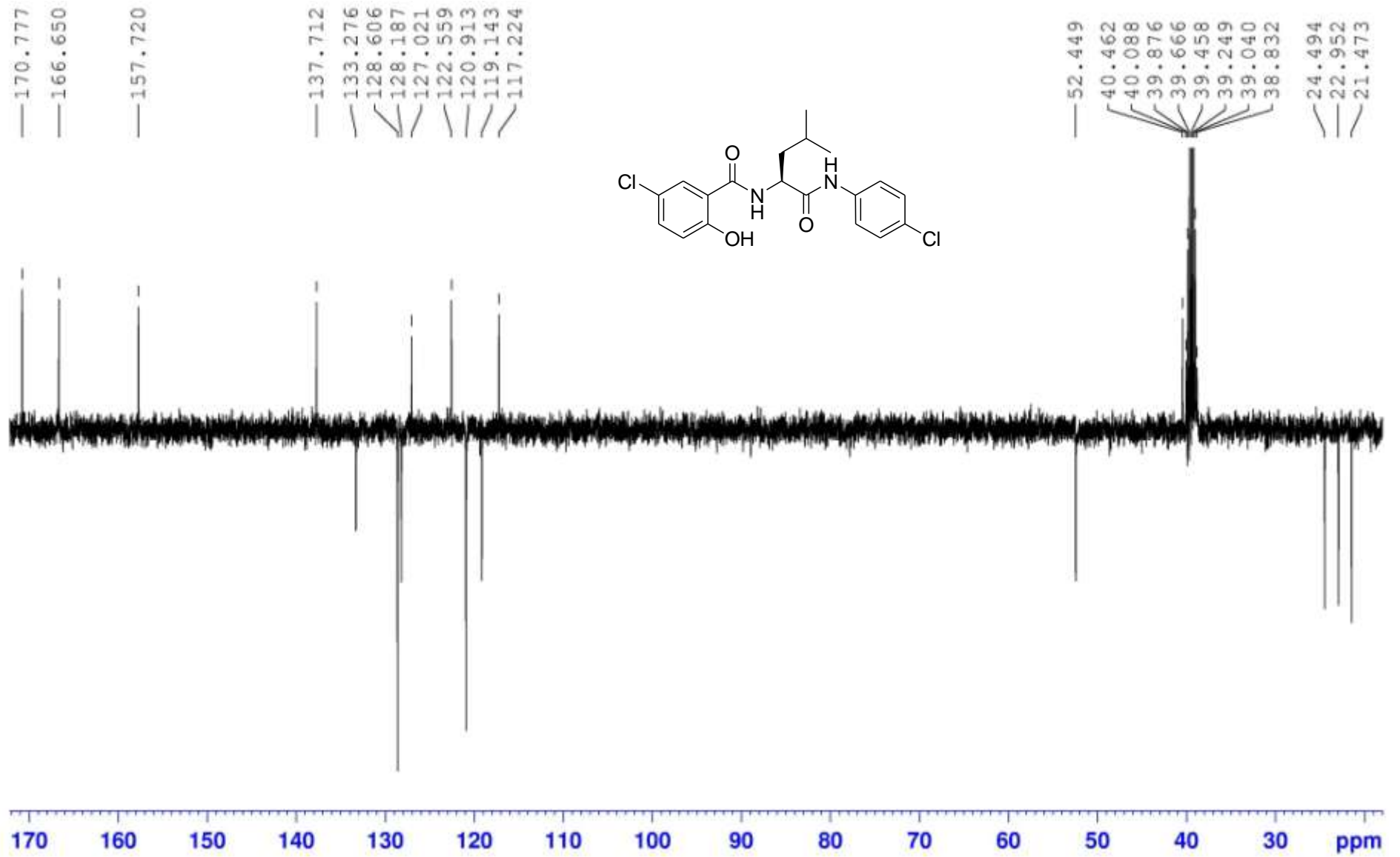
I.III *N*-(1-(4-Chlorofenylkarbamoyl)-3-methylbutyl)-2-(benzyloxy)-5-chlorobenzamid (JDU075, 67d)



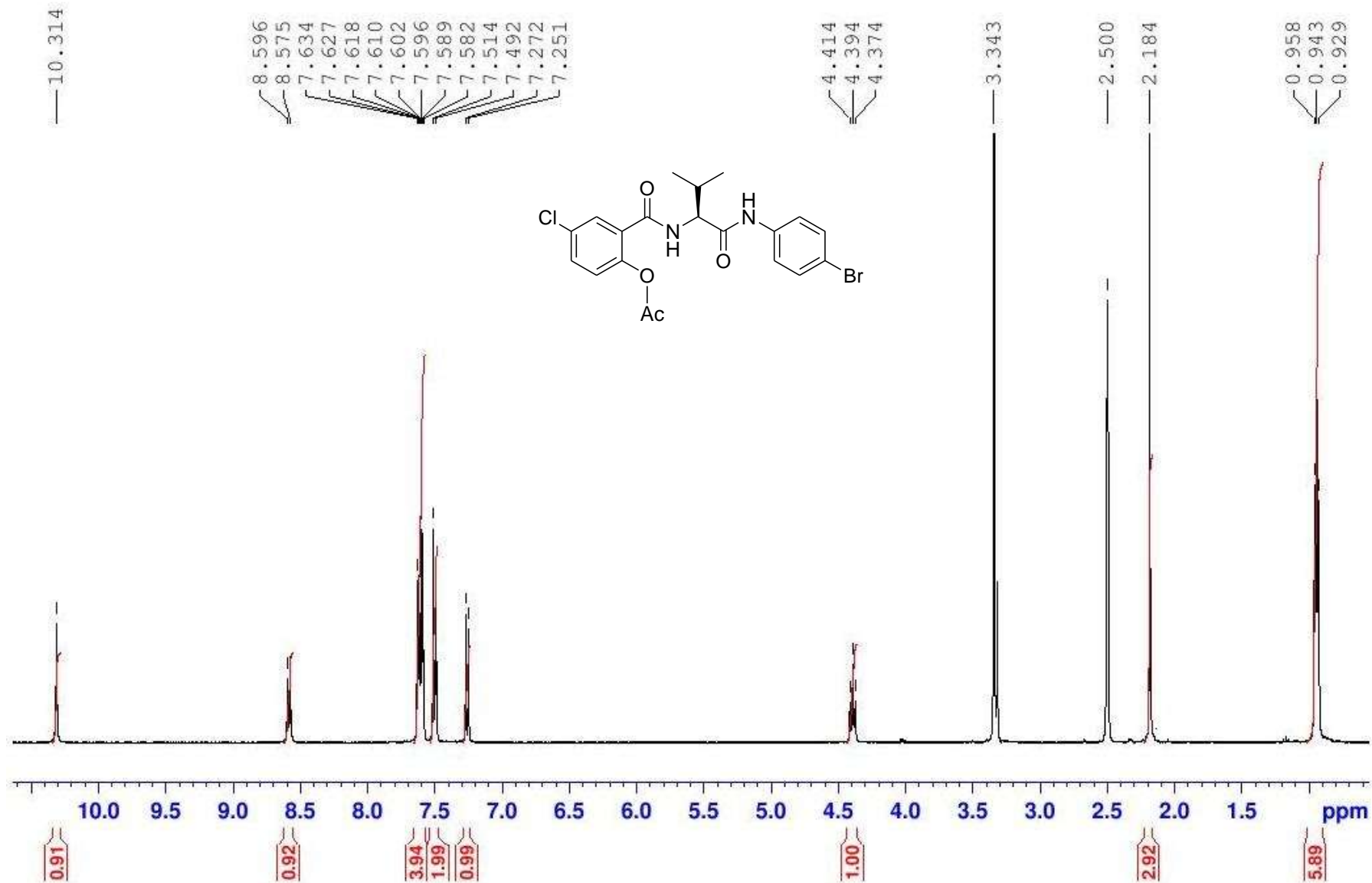


I.IV *N*-(1-(4-Chlorofenylkarbamoyl)-3-methylbutyl)-2-(benzyloxy)-5-chloro-2-hydroxybenzamid (*JDU076*, **68d**)

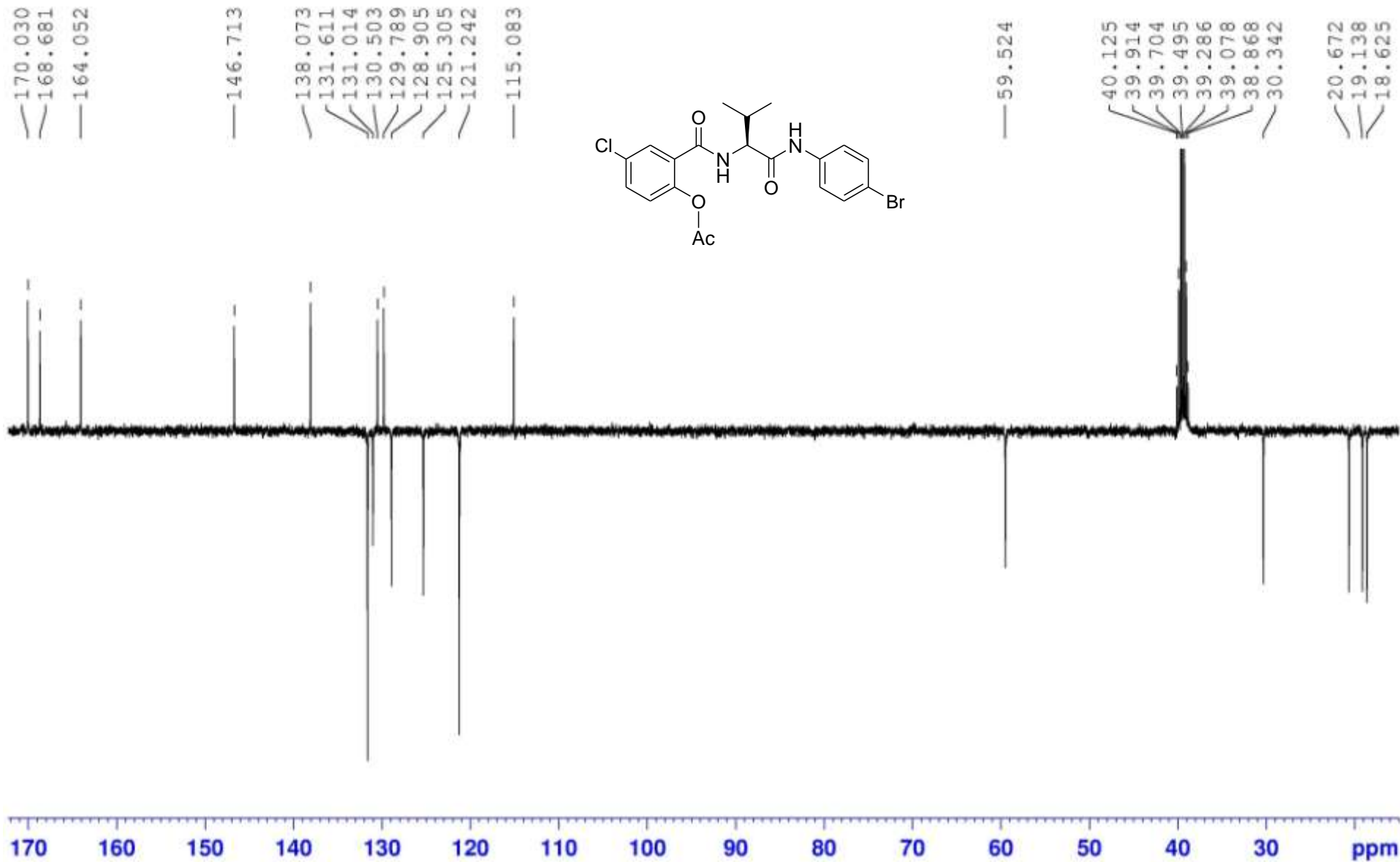




I.V 2-((S)-1-(4-Bromfenylkarbamoyl)-2-methylpropylkarbamoyl)-4-chlorofenyl acetát (JDU037, 71a)



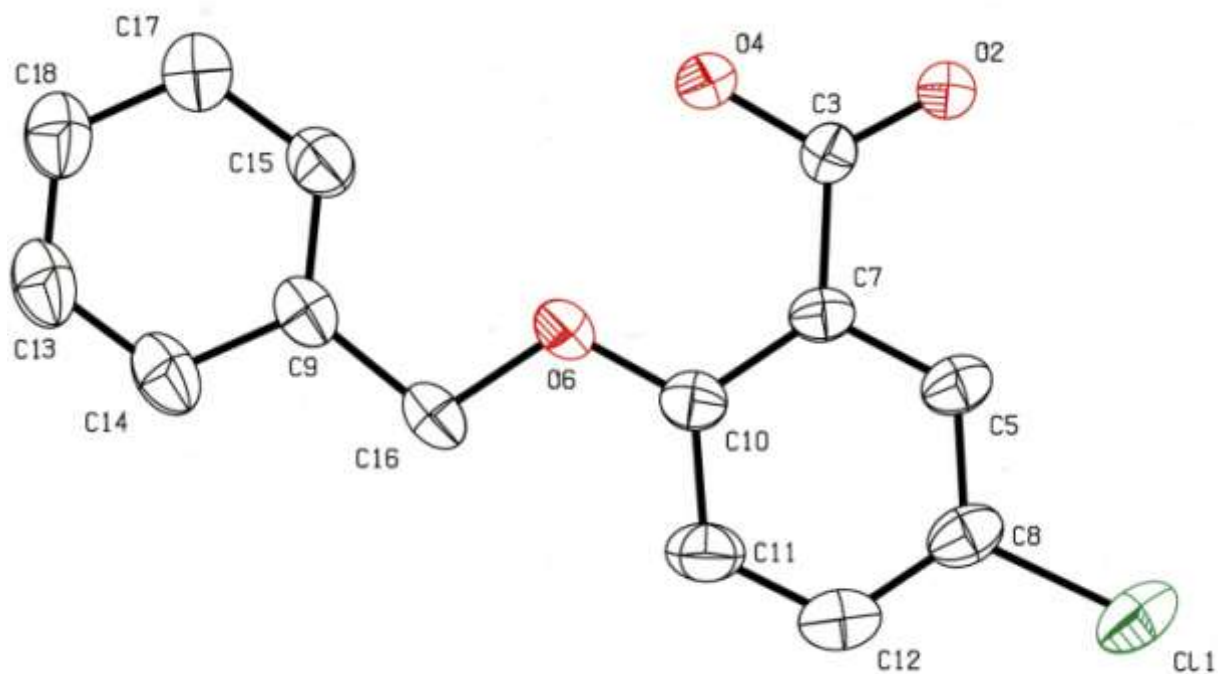




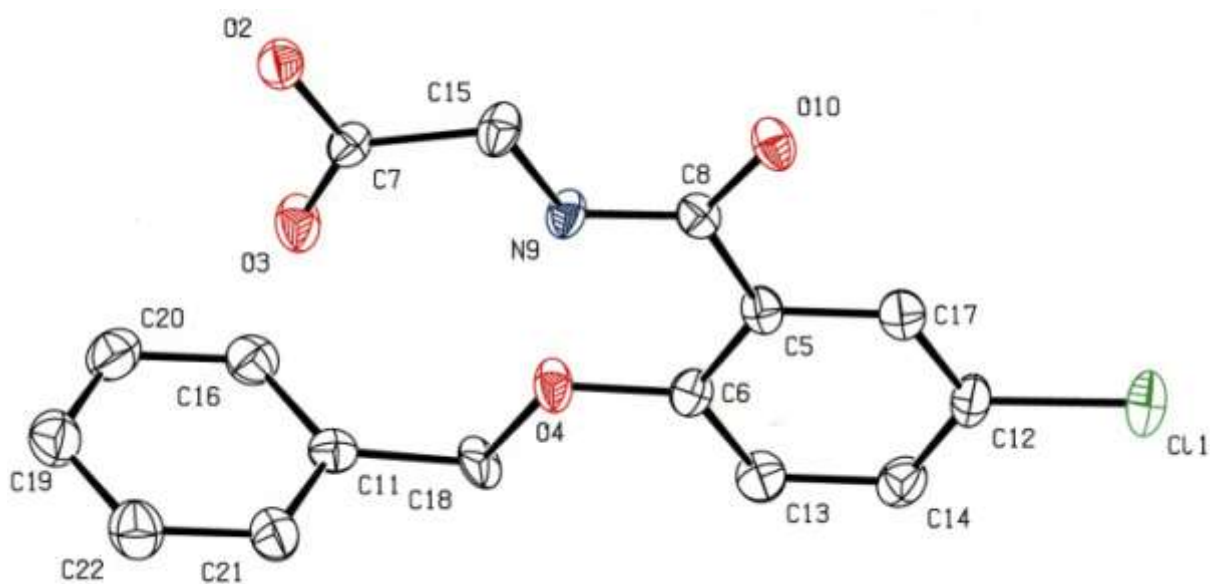


## II RTG

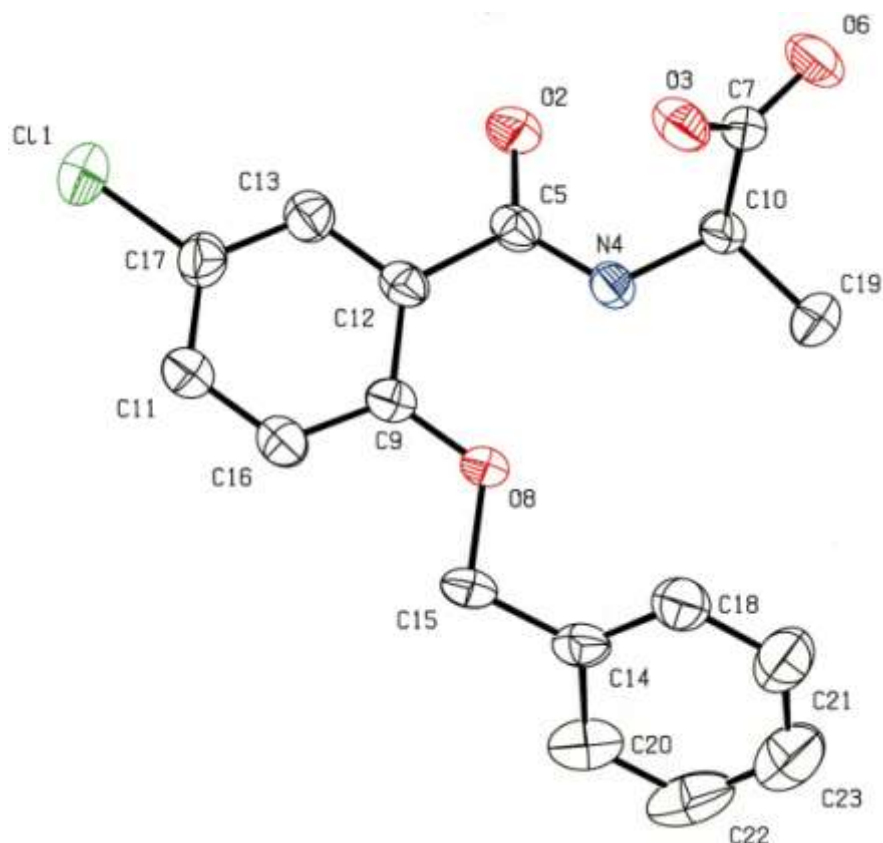
### II.I 2-(Benzyloxy)-5-chlorobenzoová kyselina (*JDU065*, **64**)



### II.II 2-(2-(Benzyloxy)-5-chlorobenzamido)octová kyselina (*JDU062*, **66a**)

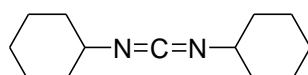


### II.III 2-(2-(Benzyloxy)-5-chlorobenzamido)propanová kyselina (JDU068, 66b)



## III Vlastnosti použitých karbodiimidů

### III.I *N,N'*-dicyklohexylkarbodiimid



IUPAC jméno	<i>N,N'</i> -dicyklohexyl karbodiimid	Poznámky
Zkratka	DCC	-
CAS číslo	538-75-0	-
Sumární vzorec	C <sub>13</sub> H <sub>22</sub> N <sub>2</sub>	-
Molární hmotnost (g.mol <sup>-1</sup> )	206,33	-
Molární objem (cm <sup>3</sup> .mol <sup>-1</sup> )	194,2 ± 7	20 °C, 101,325 kPa
Hustota (g.cm <sup>-3</sup> )	1,06 ± 0,1	20 °C, 101,325 kPa
Bod tání (°C)	35	101,325 kPa
Bod varu (°C)	277	101,325 kPa
Forma/barva	pevná/bezbarvá	-

DCC je silné dehydratační činidlo běžně užívané pro přípravu amidů, esterů a anhydridů. S DMSO se používá pro mírnou oxidaci alkoholů na aldehydy/ketony. Použití nachází při dehydrativní konverzi primárních amidů na nitrily, β-hydroxyketonů na α,β-nenasycené ketony a na stereochemickou inverzi sekundárních alkoholů.<sup>1</sup>

R věty – 22, 24, 41, 43;

S věty – 24, 26, 37/39, 45;

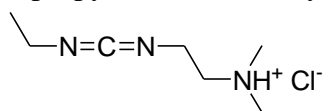
Potenciální akutní dopady na zdraví:

Látka působí obecně dráždivě. Nebezpečný je kontakt s kůží, okem, při požití nebo při vdechnutí. Zasažení kůže je doprovázeno svěděním, zčervenáním a otokem na postiženém místě. Příležitostně mohou být příznaky doprovázeny pálením. Zasažení oka je doprovázeno zarudnutím, svěděním a zvýšeným slzením.

Potenciální chronické dopady na zdraví:

Karcinogenní, mutagenní a teratogenní účinky nebyly potvrzeny. Opakované vystavování vysoce toxickým látkám má za následek celkové zhoršení zdravotního stavu.<sup>2</sup>

### III.II *N*-ethyl-*N'*-(3-dimethylaminopropyl)karbodiimid hydrochlorid



IUPAC jméno	<i>N</i> -ethyl- <i>N'</i> -(3-dimethylaminopropyl)karbodiimid hydrochlorid	Poznámky
Zkratka	EDCI·HCl	-
CAS číslo	25952-53-8	-
Sumární vzorec	C <sub>8</sub> H <sub>17</sub> N <sub>3</sub> ·HCl	-
Molární hmotnost (g·mol <sup>-1</sup> )	191,7	-
Bod tání (°C)	112	101,325 kPa
Forma/barva	krystaly/bílá	-

EDC je ve vodě rozpustná látka používaná k aktivaci karboxylu při reakcích s aminy na amidy. EDC je používáno při syntéze peptidů, sítování proteinů s nukleovými kyselinami nebo imobilizace peptidů, proteinů a cukrů do různých podkladů, např. polystyrenových struktur, gelů, biosenzorů.<sup>3</sup> Oproti ostatním karbodiimidům má EDC tu výhodu, že je rozpustný ve vodném prostředí stejně jako jeho močovina, která bývá vedlejším produktem. To zaručuje její snadné odstranění.

R věty – 37/38-41;

S věty – 26–36/37/39;

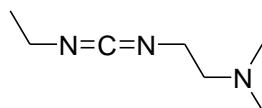
Potenciální akutní dopady na zdraví:

Látka působí dráždivě při kontaktu s okem, při požití nebo při vdechnutí. Při zasažení kůže se látka projevuje jako mírně dráždivá.

Potenciální chronické dopady na zdraví:

Karcinogenní, mutagenní a teratogenní účinky nebyly potvrzeny. Látka může být toxická při zasažení horních cest dýchacích, kůže a očí. Opakované nebo dlouhodobé vystavení působení látky může vést k trvalému poškození orgánů.<sup>2</sup>

### III.III *N*-ethyl-*N'*-(3-dimethylaminopropyl)karbodiimid



IUPAC jméno	<i>N</i> -ethyl- <i>N'</i> -(3-dimethylaminopropyl)karbodiimid	Poznámky
Zkratka	EDC	-
CAS číslo	1892-57-5	-
Sumární vzorec	C <sub>8</sub> H <sub>17</sub> N <sub>3</sub>	-
Molární hmotnost (g.mol <sup>-1</sup> )	155,24	-
Bod varu (°C)	66 – 68	133,322 Pa
Hustota (g.ml <sup>-1</sup> )	0,885	-
Index lomu n <sub>D</sub> <sup>20</sup>	1,4610	-
Forma/barva	čirá kapalina/světle žlutá	-

R věty – 34;

S věty – 26, 36/37/39, 45;<sup>2</sup>

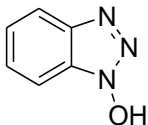
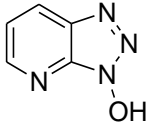
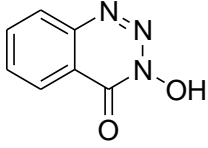
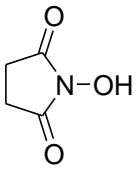
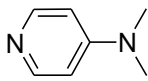
## IV Přehled některých komerčně dostupných karbodiimidů

Tabulka 16: Přehled často používaných karbodiimidů

Název CAS číslo	Zkratka	Vzorec	Cena Aldrich (EUR/1g)	Poznámka
<i>N,N'</i> - dicyklohexylkarbodiimid 538-75-0	DCC		0,12	-
<i>N,N'</i> - diisopropylkarbodiimid 693-13-0	DIC		1,80	-
<i>N</i> -ethyl- <i>N'</i> -(3- dimethylaminopropyl) karbodiimid hydrochlorid 25952-53-8	EDCI- HCl		21,04	močovina rozpustná ve vodě po H <sup>+</sup> propláchnutí
<i>N</i> -ethyl- <i>N'</i> -(3- dimethylaminopropyl) karbodiimid 141650-20-6	EDC		-	-
<i>N-tert</i> -butyl- <i>N'</i> - methylkarbodiimid 19411-70-2	BMC		-	-
<i>N-tert</i> -butyl- <i>N'</i> - ethylkarbodiimid 1433-27-8	BEC		54,6	-
<i>N,N'</i> - dicyklopentylkarbodiimid 13296-54-3	CPC		-	-
bis[[4-(2,2-dimethyl-1,3- dioxolyl)methyl]- karbodiimid 159390-26-8	BDDC		-	močovina se snadno odstraní propláchnutím kyselinou
<i>N</i> -ethyl- <i>N'</i> -fenyl karbodiimid 21002-18-6	PEC		-	-
<i>N</i> -fenyl- <i>N'</i> -isopropyl karbodiimid 14041-89-5	PIC		-	-
<i>N</i> -cyklohexyl- <i>N'</i> -(β-[ <i>N</i> - methylmorfolin]ethyl)karbo diimid <i>p</i> - toluensulfonát 2491-17-0	CMC		8,16	močovina rozpustná ve vodě
bis(trimethylsilyl)karbodiim idů 1000-70-0	-		16,32	-

## V Přehled pomocných činidel

Tabulka 17: Přehled používaných pomocných činidel

Název CAS číslo	Zkratka	Vzorec	Cena Aldrich (EUR/1g)	Poznámka
1-hydroxy benzotriazol 2592-95-2	HOBt		0,77	komerčně dostupný je HOBt hydrát (CAS 123333-53-9)
1-hydroxy-7- azabenzotriazol 39968-33-7	HOAt		4,01	0,6 M roztok v DMF, cena za ml
3,4-dihydro-3-hydroxy- 4-oxo-1,2,3-benzotriazin 28230-32-2	DhbtOH		1,62	25% roztok DMF, cena za ml
<i>N</i> -hydroxysukcinimid 6066-82-6	NHS		0,86	
<i>N,N</i> -dimethyl-4- aminopyridin 1122-58-3	DMAP		1,10	

4

<sup>1</sup> Wipf, P., Ed. *Handbook of Reagents for Organic Synthesis, Reagents for High-Throughput Solid-Phase and Solution-Phase Organic Synthesis*; Wiley, **2005**.

<sup>2</sup> <http://www.sigmaaldrich.com/catalog/DisplayMSDSContent.do>

<sup>3</sup> Burgener, M.; Sanger, M.; Candrian, U. Synthesis of a stable and specific surface plasmon resonance biosensor surface employing covalently immobilized peptide nucleic acids. *Bioconjugate Chem.* **2000**, *11*, 749–754.

<sup>4</sup> El-Faham, A.; Albericio, F. Peptide Coupling Reagents, More than a Letter Soup,. *Chem. Rev.* **2010**.