

**UNIVERZITA PARDUBICE**  
**FAKULTA CHEMICKO-TECHNOLOGICKÁ**

**DIZERTAČNÍ PRÁCE**

**2020**

**Ing. Jan Dušek**

**UNIVERZITA PARDUBICE**

**FAKULTA CHEMICKO-TECHNOLOGICKÁ**

Ústav organické chemie a technologie

**Návrh a syntéza nových potenciálně cytotoxicky  
aktivních salicylamidů**

Ing. Jan Dušek

Dizertační práce

2020

Studijní program: Organická chemie

Autor: **Ing. Jan Dušek**

Školitel: **doc. Ing. Aleš Imramovský, Ph.D.**

Rok obhajoby: **2020**

Prohlašuji:

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 28. 5. 2020

.....

Ing. Jan Dušek

Na prvním místě bych rád poděkoval své rodině, která mi umožnila studovat a finančně, morálně a psychicky mě při studiích podporovala. Velký dík patří mé partnerce Ing. Kateřině Nechvílové, Ph.D., která mi byla neocenitelnou oporou, sdílela se mnou to dobré i zlé a bez jejíž podpory a motivace bych dizertační práci pravděpodobně nedokončil.

Rád bych poděkoval školiteli doc. Ing. Aleši Imramovskému, Ph.D. nejen za vedení k vědeckému a kritickému myšlení, ale i za trpělivost a konstruktivní diskuzi jak v celém průběhu mého studia, tak i při finalizaci prezentované práce.

Cesta životem je spletitá a v jejím průběhu potkáte velkou spoustu lidí. Někteří se jen mihnou a odejdou bez zanechání větších stop, jiní se Vám do duše zapíší velkými písmeny a už si to bez nich dál neumíte představit. Během cesty doktorátem jsem měl to štěstí potkat několik dobrých lidí, kteří vytvořili tu správnou kolegiální a kamarádkou atmosféru a byli tam pro mě, když jich bylo potřeba. Rád bych poděkoval Ing. Karlu Paukovi, Ph.D. za mnohé praktické rady a za vytvoření dobré tvůrčí atmosféry na pracovišti, Ing. Petře Boháčové za vlídné lidské slovo, členům ParaDoto týmu za trpělivost s mojí absencí na trénincích, a Ing. Martinu Koutovi, Ph.D. za možnost sdílet všechny strasti a radosti studentského života. Všem těmto osobnostem patří můj velký vděk za to, že šli touto cestou se mnou.

Na závěr bych rád poděkoval grantovému programu Ministerstva školství, mládeže a tělovýchovy a Univerzitě Pardubice, za jejichž finanční podpory mohla předkládaná práce vzniknout.

Abych na získané životní lekce nezapomněl a mohl si je neustále připomínat, ponesu si je sebou ve formě Travel Bugu s trackovacím číslem GS3KFP ([www.geocaching.com](http://www.geocaching.com)).

**ABSTRAKT**

Byla provedena rozsáhlá literární rešerše zaměřená na metody syntézy a popsané biologické aktivity salicylamidů, na možnosti syntézy peptidů včetně použitých činidel, aditiv a aspektů racemizace substrátu, a na molekuly schopné inhibice proteasomu.

Bylo navrženo a experimentálně ověřeno několik možných přístupů ke konstrukci salicylamidů s peptidovým řetězcem, které navazují a rozšiřují současné znalosti v této oblasti. Byla vybrána nejvhodnější syntetická metoda, která byla dále optimalizována zejména za účelem omezení racemizace. Byla provedena syntéza série sloučenin odvozených od substituované kyseliny salicylové a dipeptidů, které byly vhodným způsobem charakterizovány ( $^1\text{H}$  a  $^{13}\text{C}$  NMR, IČ, HRMS v uspořádání MALDI-TOF, CHN analýza). Dále bylo provedeno testování jejich biologických aktivit (antiproliferativní aktivita vůči kmenům leukemie K562 a CEM a mnohočetného myelomu U266, proteasomální inhibice U266 včetně selektivity vůči jednotlivým podjednotkám  $\beta$  kruhu proteasomu 20S U266 a časovému průběhu inhibice v různých koncentracích připravených salicylamidů).

**KLÍČOVÁ SLOVA**

Alifatické salicylamidy, inhibice proteasomu, syntéza peptidů, amidační činidla, racemizace.

**TITLE**

Design and Synthesis of Novel Potentially Cytotoxic Active Salicylamides

**ABSTRACT**

Extensive literary review describing biological activities and methods of salicylamide synthesis, describing peptide synthesis including used reagents, additives and aspects of substrate racemization, and describing molecules able of proteasomal inhibition was carried out and is presented.

Several synthetical strategies for salicylamide containing a peptide chain was designed and experimentally verified. Proposed salicylamides are extending current state of knowledge about said topic. The most suitable synthetic method was chosen and further optimized with the aim of resolve the peptide racemisation issue which occurred during the synthesis. Series of salicylamides with peptide sidechain was synthesized and characterized ( $^1\text{H}$  and  $^{13}\text{C}$  NMR, IR, HRMS in the MALDI-TOF setting, CHN analysis). Furthermore, prepared compounds were tested for their biological activities (antiproliferative activity against leukemia cell lines K562 and CEM and multiple myeloma cell line U266, proteasomal inhibition of U266 including the selectivity towards proteolytic subunits of  $\beta$  ring of 20S proteasome U266, time progress of proteasomal inhibition at various salicylamide concentration levels).

**KEYWORDS**

Aliphatic salicylamides, inhibition of proteasome, peptide synthesis, amidation reagents, racemization.

## OBSAH

ÚVOD .....	15
1. TEORETICKÁ ČÁST .....	17
1.1 SALICYLAMIDY .....	17
1.1.1 Salicylanilidy.....	17
1.1.2 Alifatické salicylamidy .....	21
1.2 SYNTÉZY SALICYLAMIDŮ .....	25
1.2.1 Syntéza salicylanilidů.....	25
1.2.2 Syntéza alifatických salicylamidů.....	26
1.2.2.1 Obecné postupy .....	26
1.2.2.2 Metoda stavebního bloku .....	29
1.2.2.3 Syntéza alifatických salicylamidů přesmykem <i>N</i> -fenylsalicylamid-esterů vybraných aminokyselin .....	31
1.2.2.4 Cílená syntéza 2-hydroxy- <i>N</i> -(arylalkyl)benzamidů .....	33
1.3 SYNTÉZA PEPTIDŮ .....	36
1.3.1 Karbonyldiimidazol (CDI).....	39
1.3.2 Fosfoniové soli .....	40
1.3.3 Aminiové/uroniové soli.....	41
1.3.4 Syntéza v roztoku s využitím karbodiimidů.....	42
1.3.5 Syntéza na pevné fázi s využitím karbodiimidů.....	46
1.3.5.1 Imobilizace aminokyselin a linkery .....	46
1.3.5.2 Ochrana hlavních a vedlejších funkčních skupin .....	53
1.3.5.3 Technické zařízení SPPS a automatizace.....	54
1.3.6 Chiralita a racemizace v peptidové chemii .....	57
1.4 INHIBICE PROTEASOMU .....	62
1.4.1 Stavba a funkce proteasomu.....	64
1.4.2 Inhibitory proteasomu .....	65
1.4.2.1 Nekovalentní inhibitory proteasomu.....	65
1.4.2.2 Kovalentní inhibitory proteasomu.....	67
1.5 NÁVRH CÍLOVÝCH MOLEKUL .....	74
2. CÍLE PRÁCE.....	76
3. VÝSLEDKY A DISKUZE .....	77
3.1 SYNTÉZA SALICYL-(DI-/TRI-)AMIDŮ .....	79
3.1.1 Retrosyntetická analýza .....	79
3.1.2 Optimalizace racemizace při syntéze peptidového řetězce .....	79
3.1.3 Příprava salicyl-(di-/tri-)amidů s alifatickým zakončením .....	84
3.1.4 Biologické aktivity salicyl-(di-/tri-)amidů s alifatickým zakončením .....	85



---

3.2	PŘÍPRAVA AMIDŮ KYSELINY SALICYLOVÉ JAKO INHIBITORŮ PROTEASOMU .....	88
3.2.1	Retrosyntetická analýza .....	88
3.2.2	Metoda stavebního bloku .....	89
3.2.3	Metoda postupné výstavby peptidového řetězce.....	92
3.2.4	Porovnání syntetických přístupů .....	97
3.2.5	Biologické aktivity nových salicylamidů.....	97
3.3	ZÁKLADNÍ VZTAHY MEZI STRUKTUROU A BIOLOGICKOU AKTIVITOU.....	102
3.3.1	Porovnání salicylamidů sérií L, N a O .....	102
3.3.2	Salicylamidy jako inhibitory proteasomu .....	103
4.	ZÁVĚR.....	107
5.	EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST.....	111
5.1	OBECNÉ METODY .....	111
5.2	POSTUPY SYNTÉZY A CHARAKTERIZACE PŘIPRAVENÝCH SLOUČENIN .....	112
5.2.1	Základní molekuly .....	112
5.2.2	Optimalizace peptidové syntézy a ověření příčin racemizace .....	117
5.2.3	Příprava první série salicylamidů.....	130
5.2.4	Příprava Weinreb amidové a epoxidové funkční skupiny metodou stavebního bloku .....	138
5.2.5	Syntéza a optimalizace přípravy aldehydové funkční skupiny .....	151
5.2.6	Využití optimalizovaných postupů pro přípravu dipeptidových derivátů.....	158
5.2.7	Využití optimalizovaných postupů pro přípravu tripeptidových derivátů .....	166
6.	LITERATURA .....	190
7.	PŘÍLOHY .....	212

## SEZNAM OBRÁZKŮ, SCHÉMAT A TABULEK

## Obrázky

<b>Obrázek 1:</b> Příklady antifungálně aktivních salicylanilidů.....	18
<b>Obrázek 2:</b> Salicylanilidy užívané v praxi .....	18
<b>Obrázek 3:</b> Přehled vybraných biologicky aktivních salicylanilidů.....	20
<b>Obrázek 4:</b> Alifatické salicylamidy jako antagonisté dopaminových receptorů .....	22
<b>Obrázek 5:</b> Salicylamidy jako eckKAS III u <i>Escherichia coli</i> .....	22
<b>Obrázek 6:</b> Obecný vzorec alifatických salicylamidů s aminokyselinou .....	23
<b>Obrázek 7:</b> Salicylamidy jako inhibitory tyrosin protein kináz a polymerizace tubulinu .....	24
<b>Obrázek 8:</b> Salicylamidy jako inhibitory polymerizace tubulinu .....	24
<b>Obrázek 9:</b> Přehled biologicky aktivních salicylamidů .....	25
<b>Obrázek 10:</b> Izolovaný dehydratovaný reakční intermediát.....	32
<b>Obrázek 11:</b> Přehled používaných fosfoniových solí .....	40
<b>Obrázek 12:</b> Přehled používaných aminiových a uroniových solí.....	42
<b>Obrázek 13:</b> Přehled často používaných aditiv s karbodiimidu .....	45
<b>Obrázek 14:</b> Možnosti imobilizace první aminokyseliny.....	48
<b>Obrázek 15:</b> Způsoby ukotvení aminokyseliny C-koncem .....	49
<b>Obrázek 16:</b> Způsoby ukotvení aminokyseliny N-koncem.....	51
<b>Obrázek 17:</b> Syntéza peptidu strategií BAL (Backbone Amide Linker) .....	52
<b>Obrázek 18:</b> Ochranné skupiny pro postranní řetězec aminokyselin .....	54
<b>Obrázek 19:</b> SPPS automat Liberty Blue™ firmy CEM (vlevo), SYMPHONY® firmy Gyros Protein Technologies (vpravo).....	55
<b>Obrázek 20:</b> A Sestavený přístroj PepSy; B Detail reakční cely. ....	56
<b>Obrázek 21:</b> Chirální rozpouštědla a činidla .....	58
<b>Obrázek 22:</b> Eluční diagram tripeptidu Tyr-Lys-Trp při pH 2,0: <b>a)</b> bez, <b>b)</b> s 18C6H4. ....	61
<b>Obrázek 23:</b> Separace surového tripeptidu D-Tyr-L-Lys-L-Trp.....	61
<b>Obrázek 24:</b> Přehled používaných a testovaných inhibitorů pro léčbu mnohočetného myelomu .....	63
<b>Obrázek 25:</b> Struktura a funkce 26S proteasomu.....	65
<b>Obrázek 26:</b> Příklady nekovalentních inhibitorů proteasomu.....	66
<b>Obrázek 27:</b> Přehled kovalentních inhibitorů proteasomu .....	67
<b>Obrázek 28:</b> Peptidové β-laktonové inhibitory proteasomu .....	69
<b>Obrázek 29:</b> Strukturní návrh nových skupin salicylamidů ( <b>N</b> , <b>O</b> a <b>P</b> ) .....	75
<b>Obrázek 30:</b> Látky zakončené alifatickými, alicyklickými, aromatickými a heterocyklickými aminy.....	78
<b>Obrázek 31:</b> Látky zakončené esterovou, Weinreb amidovou nebo aldehydovou funkční skupinou.....	78
<b>Obrázek 32:</b> Porovnání spekter diamidů <b>5a-i-iv</b> s detailem signálů amidových vodíků v oblasti 8,65-8,4 ppm .....	81
<b>Obrázek 33:</b> Přehled látek připravených v rámci optimalizace podmínek syntézy amidů. ....	84
<b>Obrázek 34:</b> Připravené salicyl-(di-/tri-)amidy ( <b>10a-e</b> , <b>11a-d</b> ).....	85
<b>Obrázek 35:</b> Weinreb amid - užitečný nástroj pokročilé organické syntézy <sup>304</sup> ccciv .....	90
<b>Obrázek 36:</b> Látky připravené v rámci modelové řady pro testování zavádění Weinreb amidové a aldehydové funkční skupiny ( <b>18a,b</b> , <b>19</b> , <b>20a,b</b> , <b>21a,b</b> ) .....	94
<b>Obrázek 37:</b> Připravené dipeptidové Weinreb amidy a aldehydy ( <b>17a-d</b> , <b>23a-d</b> , <b>22a-d</b> , <b>24</b> ).....	95

<b>Obrázek 38:</b> Připravené tripeptidové Weinreb amidy, aldehydy a alkoholy ( <b>26a-f, 27a-i, 28a,b, 29a,b, 30a,b</b> ) .....	96
<b>Obrázek 39:</b> Časový průběh inhibice proteasomu .....	101
<b>Obrázek 40:</b> Inhibice ubiquitin-proteasomálního systému salicylamidem <b>27g (A)</b> a bortezomibem ( <b>B</b> ) .....	101

## Schémata

<b>Schéma 1:</b> Syntetické přípravy salicylanilidů .....	26
<b>Schéma 2:</b> Příprava alifatických salicylamidů z esteru .....	26
<b>Schéma 3:</b> Příprava alifatických salicylamidů s využitím karbonyldiimidazolu (CDI) .....	27
<b>Schéma 4:</b> Příprava alifatických salicylamidů s využitím ethylchloroformiátu .....	28
<b>Schéma 5:</b> Mechanismus amidace za využití ethylchloroformiátu .....	28
<b>Schéma 6:</b> Příprava alifatických salicylamidů za využití karbodiimidů .....	29
<b>Schéma 7:</b> Příprava diamidů dle Shibasakiho .....	30
<b>Schéma 8:</b> Využití alifatických salicylamidů při asymetrické katalýze .....	30
<b>Schéma 9:</b> Vznik alifatických salicylamidů s jednou aminokyselinou přesmykem .....	31
<b>Schéma 10:</b> Navržený mechanismus přesmyku .....	32
<b>Schéma 11:</b> Přímá příprava alifatických salicylamidů – ochrana pomocí benzyl skupiny .....	33
<b>Schéma 12:</b> Přímá příprava alifatických salicylamidů – ochrana pomocí acetyl skupiny .....	34
<b>Schéma 13:</b> Syntéza modelové série diamidů dle Pauka .....	35
<b>Schéma 14:</b> Syntéza modelové série diamidů dle Shibasakiho .....	36
<b>Schéma 15:</b> Vznik ketenu jako možný způsob racemizace .....	37
<b>Schéma 16:</b> Mechanismus amidace za přítomnosti CDI .....	40
<b>Schéma 17:</b> Mechanismus amidace za přítomnosti fosfoniových solí .....	41
<b>Schéma 18:</b> Reakce nežádoucí reakce na guanidinový vedlejší produkt .....	41
<b>Schéma 19:</b> Mechanismus amidace za účasti karbodiimidů .....	43
<b>Schéma 20:</b> Mechanismus bazicky katalyzované racemizace při aktivaci karbodiimidy .....	43
<b>Schéma 21:</b> Využití HOBt jako aditiv pro potlačení vedlejších reakcí při tvorbě amidů .....	44
<b>Schéma 22:</b> Schéma boční reakce DCC s HOBt .....	45
<b>Schéma 23:</b> Přehled často využívaných karbodiimidů .....	46
<b>Schéma 24:</b> Deprotekce Fmoc v bazickém prostředí .....	53
<b>Schéma 25:</b> Retrosyntetická analýza cílové molekuly .....	79
<b>Schéma 26:</b> Syntéza peptidového řetězce .....	80
<b>Schéma 27:</b> Záměna ochranných skupin při studiu příčiny racemizace .....	84
<b>Schéma 28:</b> Syntéza salicyl-(di-/tri-)amidů .....	85
<b>Schéma 29:</b> Retrosyntetická analýza cílové molekuly inhibitoru proteasomu .....	89
<b>Schéma 30:</b> Příprava stavebního bloku k zavedení epoxidové funkční skupiny a Weinreb amidu .....	92
<b>Schéma 31:</b> Postup pro zavedení aldehydové funkční skupiny na modelové skupině salicylamidů .....	93
<b>Schéma 32:</b> Příprava dipeptidových Weinrebamidů a aldehydů .....	94
<b>Schéma 33:</b> Příprava tripeptidových Weinreb amidů a aldehydů .....	96

## Tabulky

<b>Tabulka 1:</b> Vybrané linkery/pryskyřice využívané pro C-immobilizaci při Fmoc a Boc metodě ....	50
<b>Tabulka 2:</b> Zastoupení stereoisomerů v surovém produktu .....	62
<b>Tabulka 3:</b> Přehled používaných a testovaných inhibitorů proteasomu pro léčbu mnohočetného myelomu.....	63
<b>Tabulka 4:</b> Přehled nekovalentních inhibitorů proteasomu.....	66
<b>Tabulka 5:</b> Přehled $\alpha$ -diketonamidů s aktivitou vůči karcinomu tlustého střeva HCT116 .....	68
<b>Tabulka 6:</b> Přehled di-/tripeptidových prolin-boronových kyselin s aktivitou vůči rakovině žaludku kmene MGC 803 .....	70
<b>Tabulka 7:</b> Přehled testovaných tetrapeptid vinylsulfonů.....	71
<b>Tabulka 8:</b> Přehled analogů MG 132 a jejich aktivita při inhibici proteasomu a calpainu.....	72
<b>Tabulka 9:</b> Struktury a inhibiční aktivity epoxyketonů vůči $\beta$ 5 podjednotce proteasomu mnohočetného myelomu.....	73
<b>Tabulka 10:</b> Přehled dosažených enantiomerních přebytků u modelové látky <b>5a-i-iv/9</b> .....	84
<b>Tabulka 11:</b> Výsledky antiproliferativních aktivit připravených salicylamidů, série <b>N</b> .....	86
<b>Tabulka 12:</b> Výsledky antiproliferativních aktivit připravených salicylamidů, série <b>O</b> .....	87
<b>Tabulka 13:</b> Antiproliferativní a antiproteasomální aktivity připravených salicylamidů, série <b>P98</b>	
<b>Tabulka 14:</b> Antiproteasomální aktivity nových salicylamidů .....	100

## SEZNAM ZKRATEK

Acm	acetamidometyl
AcOH	kyselina octová
Ala	alanin
AMK	aminokyselina
Arg	arginin
Asp	kyselina aspargová
ATP	adenosin trifosfát
BAL	Backbone Amide Linker – způsob napojení první aminokyseliny při syntéze peptidů na pevné fázi
BDDC	1,3-bis(2,2-dimethyl-1,3-dioxolan-4-ylmethyl)karbodiimid
BHA	benzhydrylamin
Bn	benzyl
Boc	<i>tert</i> -butyloxykarbonyl, ochranná skupina pro aminoskupinu
Bom	benzyloxymetyl
2-Br-Z	2-brombenzyloxykarbonyl
<i>t</i> -Bu	<i>tert</i> -butyl, ochranná skupina pro aminoskupinu
Bzl	benzoyl
Cbz	benzyloxycarbonyl, ochranná skupina pro aminoskupinu
2-Cl-Z	2-chlorbenzyloxykarbonyl
CDI	1,1'-karbonyldiimidazol
COCl <sub>2</sub>	fosgen, dichlorid karbonylu
Cy	cyklohexyl
Cys	cystein
DCC	<i>N,N'</i> -dicyklohexylkarbodiimid
DCM	dichlormethan
DCU	<i>N,N'</i> -dicyklohexylmočovina
DIC	<i>N,N'</i> -diisopropylkarbodiimid
DMAP	4-dimethylaminopyridin
DMF	<i>N,N</i> -dimethylformamid
DMSO	dimethylsulfoxid
Dnb	2,4-dinitrofenol
ecKAS III	$\beta$ -ketoacyl-acyl carrier protein syntetáza III
EDCI·HCl	1-ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)karbodiimid
EGFR	receptory epidermálního růstového faktoru
Ekv.	ekvivalent
Et	ethyl
EtOAc	ethylacetát
EtOH	ethanol
Fmoc	9-fluorenylmetoxykarbonyl, ochranná skupina pro aminoskupinu
For	formyl
Glu	glutamin
Gly	glycin
HBr	kyselina bromovodíková
HCl	kyselina chlorovodíková
His	histidin
HMBA	4-hydroxylmethylbenzoylaminometyl
HMBC 2D NMR	Heteronuclear Multiple Bond Correlation, metoda nukleární magnetické rezonance

HOBt	1-hydroxybenzotriazol
HVC	virus hepatitidy C
Hyp	hydroxyprolin
Ile	isoleucin
<i>in situ</i>	v místě vzniku
<i>in vitro</i>	test byl proveden „ve skle“, např. na buněčném médiu v Petriho miskách
<i>i</i> Pr	isopropyl
Leu	leucin
Lys	lysin
MBPA	4-[ $\alpha$ -( <i>S</i> -acetyl) merkaptobenzyl] fenoxycetyl aminometyl
4-MeBzl	4-methylbenzoyl
MeOH	methanol
Met	methionin
Mts	mesitylen-2-sulfonyl
Mtr	4-metoxy-2,3,6-trimethyl-benzensulfonyl
MRSA	methicilin rezistentní <i>Staphylococcus aureus</i>
MW	mikrovlnná iniciace
Orn	ornitin
PAM	4-hydroxylmethylfenylacetamidometyl
Pbf	2,2,4,6,7-pentamethyl-dihydrobenzofuran-5-sulfonyl
PEG	polyetylen glykol
PEGA	polyetylen glykol-akrylamid
PEG-PS	polyetylen glykol-polystyren
PE-PS	polyetylen-polystyren
PG	protecting group – ochranná skupina
Phe	fenylalanin
Pmc	2,2,5,7,8-pentamethylchroman-6-sulfonyl
Pro	prolin
SA	<i>Staphylococcus aureus</i>
SARS	těžký akutní respirační syndrom, Severe Acute Respiratory Syndrome
Ser	serin
SPPS	Solid Phase Peptide Synthesis – syntéza pepzidů na pevné fázi
SOCl <sub>2</sub>	thionylchlorid
TCS	dvoukomponentní regulační systém
TEA	triethylamin
TFA	trifluoroctová kyselina
THF	tetrahydrofuran
Thr	threonin
Tos	tosyl
Trp	tryptofan
Trt	trityl
Tyr	tyrosin
Val	valin

## ÚVOD

Řadu nemocí neumí současná věda a medicína z různých příčin úspěšně léčit. Jak se rozvíjejí a zpřesňují metody diagnózy, jsou objevovány zcela nové nemoci, nebo nové způsoby léčby již známých nemocí. Dalším důvodem pro hledání nové aktivní látky je návrat nemoci, která získala rezistenci nebo byla již považována za vymýcenou. Možnou příčinou vzniku rezistence u virů a bakterií může být chybné předepisování nevhodných léků, např. používání antibiotik při virovém onemocnění, nebo plošné preventivní používání antibiotik u dobytka. Pacienti mohou být nezodpovědní, neřídí se nařízením doktorů a řádně nedokončí zahájenou léčbu. Výsledkem jsou rezistentní kmeny virů a bakterií odolávající klasické léčbě, které bez vyvinutí nových léků a strategií léčby mohou představovat riziko pro celé lidstvo. Léčba rakoviny je kapitolou sama pro sebe. Tím, že rakovina je pouze souhrnné označení podobně se projevujících nemocí, které se od sebe navzájem liší původem, spouštěčem i průběhem, nemůže existovat jeden univerzální lék pro všechny typy. Některé typy rakoviny odolávají klasickým způsobům léčby, některé druhy se vracejí, jiné získají v průběhu léčby rezistenci. Jako potenciálně léčivá látka se může projevit zcela nová sloučenina objevená v rostlinách, plísních nebo bakteriích, nebo již známá sloučenina, u které je pozorován nový atypický mechanismus, který účinkem přesahuje v současnosti používaná léčiva. Je morálním a profesním imperativem vědců a lékařů neustávat ve svých snahách při hledání nových účinných látek, vývoji nových léků a testování nových strategií podání. Je to nikdy nekončící závod se samotnou přírodou. Toto je hlavní úkol bioorganické chemie.

Salicylamidy je jedna ze skupin sloučenin, které stojí za to syntetizovat a zkoumat jejich biologickou aktivitu, protože skrývají značný potenciál. Pro své antihelmintické a moluskocidní aktivity nachází uplatnění v klinické humánní i veterinární praxi již od 70. let 20. století jako léčiva proti hlísticím, tasemnicím a motolicím (oxyclozanid, rafoxanid, klosantel a niklosmaid). V posledních letech se zejména salicylanilidům dostalo pozornosti díky objevení jejich schopnosti inhibovat histidin protein kinázu ve dvoukomponentním regulačním systému u bakterií. Mezi další pozorované vlastnosti salicylamidů patří zjištěné aktivity při inhibici mykobakterií, acetylcholinesteráz, viru Zika, bakteriálních a virových infekcí, revmatické artritidy, diabetu II. typu nebo pro inhibici nádorových růstových faktorů. Salicylanilidy jsou v současnosti důkladně

prozkoumány. Alifatické salicylamidy, ačkoliv je jejich potenciál nemalý, stály prozatím v ústraní zájmu. Řada vědeckých studií z poslední dekády ukazuje, že právě alifatické salicylamidy stojí za to dále zkoumat, protože mají nesporný potenciál stát se vítaným nástrojem při léčení řady onemocnění zejména nádorového typu.

Předkládaná práce pojednává zejména o alifatických salicylamidech, jejich návrhu a optimalizaci syntézy.



# 1. TEORETICKÁ ČÁST

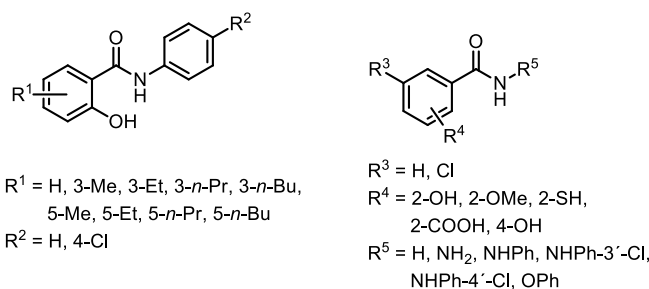
## 1.1 SALICYLAMIDY

Salicylamidy jsou široká skupina derivátů kyseliny salicylové, které mají bohaté spektrum biologických aktivit a dlouhou historii využití ve veterinární i klinické praxi. Dle povahy amidové části jsou pro přehlednější orientaci rozlišovány na aromatické, tzv. salicylanilidy, nebo alifatické. Spolu se změnou amidového skeletu dochází také ke změnám pozorovaných biologických aktivit.

Salicylanilidy jsou vědecké veřejnosti známy od 60. let 20. století a ve veterinární a humánní praxi jsou využívány od 70. let. Objev jejich schopnosti inhibovat histidin protein kinázu ve dvoukomponentním regulačním systému u bakterií v roce 1998 vedl k rozmachu studia této skupiny látek. Vzápětí následovaly objevy aktivit salicylanilidů při inhibici řady mykobakterií, acetylcholinesteráz nebo viru Zika. Niklosamid je testován jako léčivo bakteriálních a virových infekcí, revmatické artritidy, diabetu II. typu nebo pro inhibici nádorových růstových faktorů. V současnosti jsou salicylanilidy intenzivně prozkoumány, oproti tomu alifatickým salicylamidům se nedostává zdaleka takové pozornosti a nejsou tak důkladně prozkoumány. Několik publikací zaměřených na studium alifatických salicylamidů z poslední doby ale naznačuje, že tato prozatím opomíjená skupina látek v sobě skrývá značný potenciál. Biologickým aktivitám i syntéze obou skupin se podrobněji věnují následující kapitoly

### 1.1.1 Salicylanilidy

Salicylamidy, kdy je na karboxylovou skupinu kyseliny salicylové navázán ve formě amidu aromatický amin, jsou označovány jako salicylanilidy. Jedná se o skupinu látek s řadou biologických aktivit zkoumanou již od 60. let 20. století, které byly původně vyvíjeny jako fungicidy pro topickou aplikaci a antimikrobiální činidla v mýdlech. Salicylanilidů bylo úspěšně využito při léčbě plísňové (mykotické) infekce pokožky hlavy (*Tinea capitis*). Onemocnění postihuje zejména děti a je způsobováno houbami z rodu *Trichophyton* a *Microsporum*. Zdrojem infekce jsou nejčastěji psi a kočky. Série *n*-alkylsalicylanilidů a *p*-chloranilidů (viz **Obrázek 1**) byly úspěšně testovány vůči *Pythium ultimum*, *Monilia fructigena*, *Verticillium alboatrum*, *Alternaria solani*, *Aspergillus niger*, *Botrytis cinerea* a *Trichophyton mentagrophytes* 183. <sup>1-3</sup>

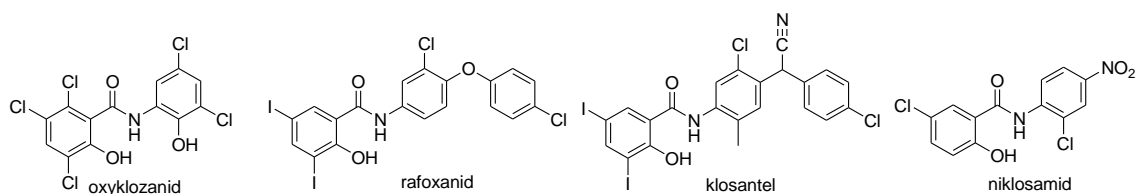


**Obrázek 1:** Příklady antifungálně aktivních salicylanilidů

Později byly zejména u halogenovaných salicylanilidů prokázány významné antihelmintické a moluskocidní aktivity, které vedly k jejich využití v klinické a veterinární praxi.<sup>4-7</sup> Při léčbě se hojně používá oxyclozanid, rafoxanid, klosantel a niklosamid, viz **Obrázek 2**, pro své účinky proti hlísticím, jaterním motolicím, tasemnicím a myiázám a jimi způsobovaným nemocem u spárkaté zvěře, skotu, ovcí a koz.<sup>4,8,9</sup> Zatímco niklosamid našel uplatnění při léčbě tasemnic u lidí, klosantel, oxyclozanid a rafoxanid se staly klíčové zejména ve veterinární praxi. Navzdory poznatkům o částečné rezistenci některých motolic a přes několik publikací popisujících částečnou rezistenci některých hlístic, jsou tyto látky v současnosti nadále používány.

10–12

Hlavním mechanismem účinku salicylanilidů je narušení přenosu elektronů při oxidativní fosforylaci v mitochondriích napadením několika enzymů, což má za následek narušení výroby adenosin trifosfátu (ATP) a následně odříznutí buňky od jejího běžného zdroje energie a od komunikace s okolním prostředím. Narušení přenosu elektronů bylo potvrzeno *in vitro* testy oxyklozanidu, rafoxanidu a klosantelu na *Fasciola hepatica* a *Ascaris lumbricoides*.<sup>13–19</sup> *In vitro* testy na *Fasciola hepatica* bylo podrobněji určeno, že dochází k inhibici sukcinát dehydrogenázy a fumarát reduktázy. Oba enzymy se podílejí na oxidativní fosforylaci.<sup>20,21</sup>



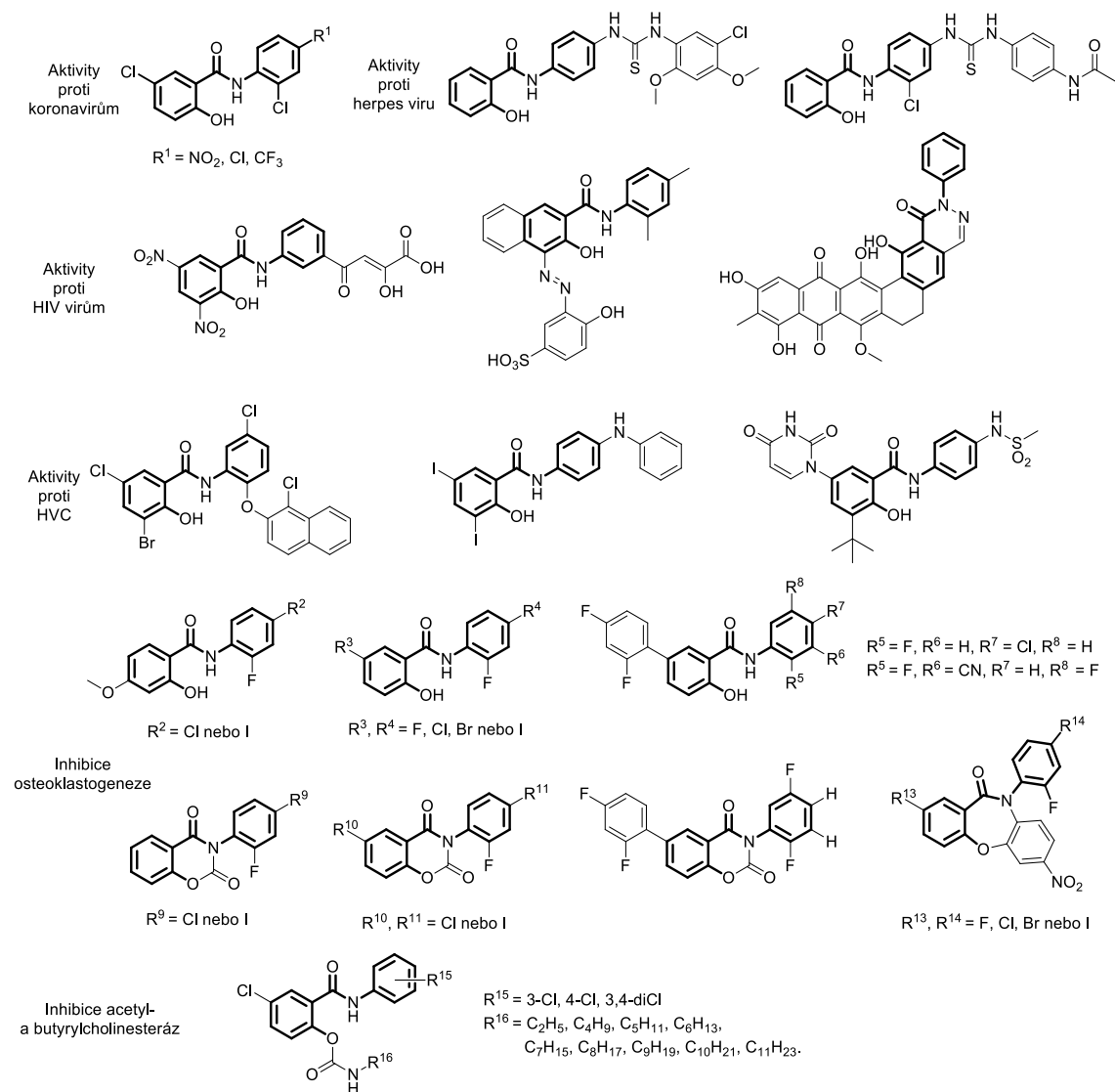
**Obrázek 2:** Salicylanilidy užívané v praxi

U salicylanilidů byla v roce 1998 nově popsána schopnost inhibovat dvoukomponentní regulační systém (TCS) bakterií rodu *Mycobacterium tuberculosis* doposud neznámým mechanismem. TCS slouží bakterii ke komunikaci s okolím, reakci

a adaptaci na změny vnějších podnětů jako jsou přítomnost živin, antibiotik, chemického okolí, pH, teploty, osmolarity a další stimuly. Inhibice TCS umožňuje bakterii odříznout od interakce s vnějším prostředím, čímž se stává citlivější na léčbu běžnými látkami. K inhibici dochází navázáním fenolické hydroxylové skupiny salicylanilidu na signální protein histidin kinázu. Tak dojde k zabránění její fosforylace a přerušení přenosu interakce.<sup>22–26</sup> Podobný mechanismus inhibice TCS nebyl u antituberkulotik doposud popsán, proto se na salicylanilidy začalo nahlížet jako na nové potenciální prostředky pro boj s tuberkulózou. Důsledkem objevu byla syntéza rozsáhlých knihoven originálních různě substituovaných salicylanilidů za účelem studia jejich antituberkulotických aktivit. Bylo potvrzeno, že nové deriváty salicylanilidů mají významné výsledky při inhibici běžných i rezistentních kmenů *M. tuberculosis* nebo *M. avium*, avšak jejich vysoká cytotoxicita limituje širší praktické použití.<sup>27,28</sup> Lipofilita molekul je zásadním parametrem, který je ovšem snižován polárním charakterem hydroxylové skupiny salicylanilidu. Jako vhodné řešení se nabízí úprava molekuly zakomponováním alifatických motivů, dočasné maskování polárních skupin, které se po průchodu buněčnou stěnou vhodně odstraní, nebo kombinace obou jmenovaných způsobů. Provedení těchto úprav na acetátech<sup>29</sup>, esterech *N*-chráněných aminokyselin (*N*-Cbz, *N*-Ac)<sup>30</sup> salicylanilidů, karbamátech<sup>31</sup> a substituovaných benzoátech<sup>32</sup> mělo ve většině případů za výsledek zlepšení aktivity a snížení cytotoxicity.

Od 60. do 90. let byly u salicylanilidů popsány germicidní<sup>33</sup>, antibakteriální<sup>34</sup>, protizánětlivé<sup>35</sup> a antimikrobiální aktivity.<sup>36–38</sup> Objevení inhibice TCS salicylanilidy v roce 1998 však bylo impulzem k podrobnějšímu prozkoumání jak nově připravených, tak v praxi již běžně používaných salicylanilidů vůči řadě bakterií, virům a jimi způsobovaným nemocem. Některé salicylamidy a salicylanilidy jsou schopné inhibovat virus HIV cílením na HIV-1 integrázu nebo reverzní transkriptázu. Pro inhibici HIV-1 integrázy sloužící k retrovirální replikaci a množení virů způsobujících HIV se jako velmi potenciální látkou ukázala kyselina (*Z*)-2-hydroxy-4-(3-(2-hydroxy-3,5-dinitrobenzamido)fenyl)-4-oxobut-2-enoová ( $IC_{50} = 8,0 \mu M$ ).<sup>39</sup> Dalšími molekulami úspěšně inhibujícími HIV-1 integrázu v rozmezí  $IC_{50} = 0,41 - 14,0 \mu M$  jsou polycyklické molekuly obsahující salicylanilidový skelet, viz **Obrázek 3**. Ve všech uvedených případech je patrná volná skupina fenolického hydroxylylu, která je pro požadovaný účinek klíčová. Deriváty uvedených látek s chráněným fenolickým hydroxylyem dosahují inhibiční aktivity řádově horší.<sup>40,41</sup> Dalšími viry, u kterých byly

potvrzeny inhibiční aktivity salicylanilidů, jsou viry způsobující hepatitidu typu C (HVC). Mezi nejnověji pozorované aktivity salicylanilidů patří schopnost inhibice osteoklastogeneze<sup>42,43</sup> nebo inhibice acetyl- a butyrylcholinesteráz, která se v současné době jeví jako klíčová pro léčbu pacientů s Alzheimerovou nemocí.<sup>44,45</sup>



**Obrázek 3:** Přehled vybraných biologicky aktivních salicylanilidů

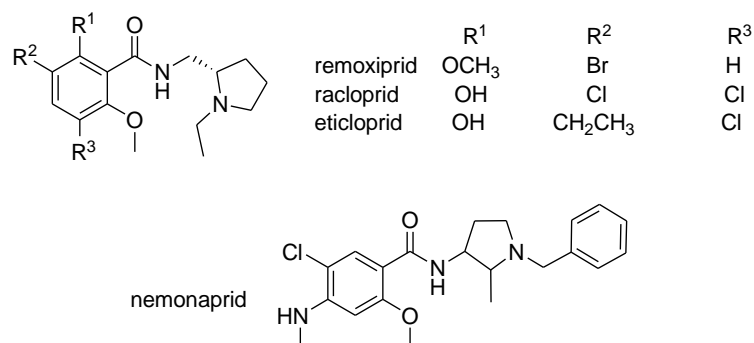
Niklosamid nachází široké uplatnění v léčbě bakteriálních nebo virových infekcí (např. adenoviry<sup>46</sup>, viru Zika<sup>47</sup>, koronavirům způsobujícím SARS<sup>48–50</sup> viry způsobující HIV) revmatické artritidy, diabetu II. typu nebo zužování cév.<sup>51</sup> Těžiště nově pozorovaných aktivit niklosamidu leží v jeho schopnostech inhibovat různými mechanismy rozdílné druhy rakoviny.<sup>52–54</sup> Receptory epidermálního růstového faktoru (EGFR) hrají důležitou roli při vývoji nádoru, v jejich úspěšné inhibici je spatřován způsob léčby některých nádorových onemocnění a deriváty *p*-*O*-alkyl salicylanilidů prokázaly dobré inhibiční aktivity právě vůči EGFR.<sup>55</sup> Strukturně příbuznými deriváty

salicylanilidů, u kterých byly také potvrzeny protirakovinné aktivity, jsou hydroxynaftanilidy s nitro substitucí.<sup>56</sup> Salicylanilidy mají dále efekt na řadu bakteriálních enzymů jako je transglycosylyáza<sup>57</sup>, sortáza A<sup>58</sup> a D-alanin-D-alanin ligáza.<sup>59</sup> Ačkoliv jsou salicylanilidy zkoumány intenzivně od 60. let 20. století, i v posledních letech vzniká řada kvalitních studií, které opakovaně potvrzují široký rozměr aktivit salicylanilidů - antihelmintické<sup>21</sup>, antifungální (*Trichosporon asahii*<sup>60</sup>, *Candida albicans*<sup>61</sup>) nebo antibakteriální (*Helicobacter pylori*<sup>62</sup>, *Pseudomonas aeruginosa*<sup>63</sup>, SA a MRSA<sup>60,64</sup> *M. tuberculosis*<sup>65-68</sup>).

### 1.1.2 Alifatické salicylamidy

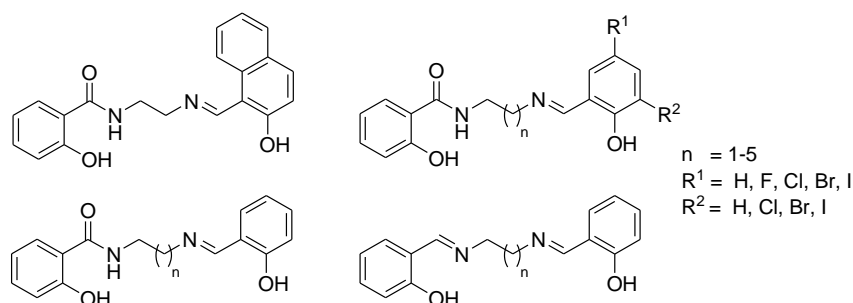
Pod termínem alifatické salicylamidy jsou zahrnuty látky, kde dusík není substituován uhlíkem aromatického skeletu. Vyjimku z tohoto pravidla představují benzylsalicylamidy. Ačkoliv dusík není substituován aromatickým uhlíkem a tyto látky by měly být řazeny k alifatickým salicylamidům, svou příbuzností, podobným postupem přípravy a pozorovanými vlastnostmi jsou benzylsalicylamidy tematicky řazeny k salicylanilidům. I když byla u alifatických salicylamidů popsána řada zajímavých biologických aktivit, nacházejí prozatím jen užší uplatnění než několik dekád zkoumané salicylanilidy. Někteří zástupci alifatických salicylamidů se využívají v medicíně, jiné jsou předmětem intenzivních výzkumů, jak za účelem nalezení nových aplikací, tak za účelem výzkumu centrální nervové soustavy, zejména funkce dopaminových receptorů, jejich inhibice, center vyvolávajících pocit odměny a s nimi související vznik a léčba závislosti.

Alifatické salicylamidy známé pod jmény nemonaprid, racloprid a eticloprid se pro svou vysokou afinitu k sigma receptorům v mozku používají jako atypická antipsychotika při léčbě schizofrenie a akutní mánie. Fungují jako antagonisté dopaminových receptorů.<sup>69</sup> Remoxiprid se tak také využíval a měl podobné aktivity, avšak byl stažen z prodeje z důvodu nežádoucích účinků jako nespavost, třes, tardivní dyskinezie nebo aplastická anemie.<sup>70-72</sup> Ve výzkumu jsou tyto látky používány nadále.<sup>73</sup> V současnosti je těžiště prací soustředěno na podrobnější studium centrální nervové soustavy, zejména dopaminergních drah, které hrají zásadní roli ve vzniku motivací, potěšení, odměn a pocitu štěstí.<sup>74,75</sup> Dopamin způsobuje vznik příjemných pocitů v důsledku oblíbené činnosti nebo události, nebo konzumace alkoholu či jiných drog. Pochopení funkce dopaminu a inhibitorů jeho receptorů se může ukázat klíčové při boji s drogovou závislostí, viz **Obrázek 4**.<sup>71,76</sup>



**Obrázek 4:** Alifatické salicylamidy jako antagonisté dopaminových receptorů

Antibakteriální aktivity, přesněji schopnost inhibovat nosiče  $\beta$ -ketoacyl-acyl proteinyntetázy III (ecKAS III) u *Escherichia coli*, byly pozorovány u alifatických salicylamidů, viz **Obrázek 5**.<sup>77</sup>

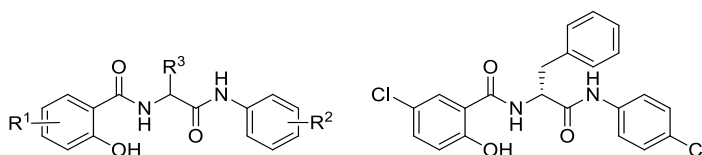


**Obrázek 5:** Salicylamidy jako ecKAS III u *Escherichia coli*

Alifatické salicylamidy s aminokyselinou v alifatické části potvrdily stejně jako salicylanilidy, ze kterých je odvozován jejich původ,<sup>78</sup> antimykobakteriální (*Mycobacterium tuberculosis*, *M. avium*, *M. kansasii*, *M. smegmatis*, *M. marinum*), antibakteriální (běžný a methicilin rezistentní *Staphylococcus aureus*, *S. epidermis*, *Enterococcus sp.*, *Bacillus cereus*, *Pasteurella multocida*, *Clostridium perfringens*, *Desulfovibrio piger* a *Desulfomicrobium sp.*) a antifungální (*Trichophyton mentagrophytes*, *Candida tropicalis*, *C. krusei*) aktivity.<sup>79-83</sup>

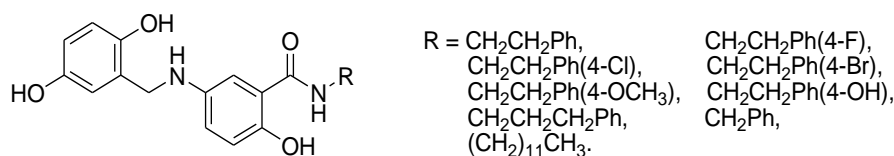
Salicylamidy s aminokyselinou jsou krom řady výše zmíněných aktivit schopné inhibovat proliferaci a ovlivňovat životaschopnost lidských rakovinových kmenů (leukémie K562, adenokarcinom prsu MCF-7). Efekt těchto látek byl pleiotropní, tzn. že inhibovaly jak průběh buněčného cyklu, tak přímo způsobovaly buněčnou apoptózu. Mechanismus účinku nebyl dále zkoumán. Mezi další zajímavé účinky alifatických salicylamidů patří jejich efekt na kmen G-361 maligního melanomu kdy buňky melanomu vystavené působení salicylamidu (**Obrázek 6**, vpravo) vykazovaly snížení regulace buněčného cyklu regulátory CDK4, cyklinu A a B a snížení hodnot

aktivní MAP kinázy ERK. Současně byly zaznamenány zvýšené hodnoty fosfatidylethanolaminového (PE)-konjugátu s mikrotubulárním proteinem 1A/AB-light chain 3 (LC3-II), který je považován za spolehlivý marker autofagie buněk.<sup>84-87</sup> Autofagie je buněčný mechanismus krizového řízení umožňující buňkám přežití nepříznivých období pomocí lysozomálního rozkladu a recyklace nepotřebných nebo poškozených proteinů a organel. Zhoubné buňky využívají autofagie pro přežití léčby, proto by objev inhibitorů autofagie představoval užitečný nástroj pro léčbu odolných, regresivních a agresivních forem zhoubného bujení mezi než melanomy zajisté patří. Páchníková et. al. ve své práci potvrzuje, že vystavení buněk zhoubného melanomu (A-375, IPC-298, Sk-Mel-30) salicylamidu (**Obrázek 6**, vpravo) má nepříznivý vliv na cytoskeleton testovaných buněk, narušuje jejich proliferaci, migraci, vezikulární transport a inhibuje autofagii, čímž vystavuje zhoubné buňky nadměrnému metabolickému stresu znemožněním recyklačních procesů. Látky typu salicylamidů zvyšují citlivost melanomových buněk vůči metabolickému stresu a mají potenciál být klinicky využívány proti nádorům, viz **Obrázek 6**.<sup>86</sup>



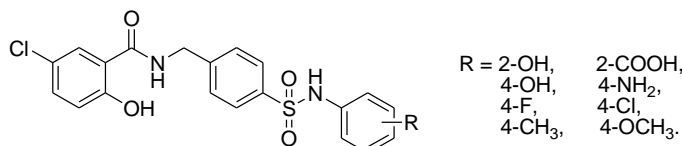
**Obrázek 6:** Obecný vzorec alifatických salicylamidů s aminokyselinou

Salicylamidy (**Obrázek 7**) prokázaly aktivity při inhibici tyrosin protein kináz, které jsou klíčové při buněčných signálních procesech, např. řízení buněčného růstu, diferenciace buněk, mitóza nebo buněčná smrt. Inhibice tyrosin protein kináz se proto jeví jako klíčová při léčbě nemocí, které jsou charakteristické nekontrolovatelnou buněčnou proliferací, jako je rakovina nebo autoimunitní onemocnění psoriáza. V tomto případě byly testovány kmeny rakoviny krve, plic, tlustého střeva, kůže, vaječníků, ledvin, prostaty a rakoviny prsu. Další pozorovanou aktivitou těchto látek je významná inhibice polymerizace tubulinu, který se přirozeně polymerizuje do mikrotubulů. V této formě se uplatňuje v buněčných signálních procesech, například při mitóze. Ve zdravé buňce je to přirozený proces, v případě rakovinné buňky je inhibice polymerizace možným způsobem léčby.<sup>88,89</sup>



**Obrázek 7:** Salicylamidy jako inhibitory tyrosin protein kináz a polymerizace tubulinu

Stejně jako salicylamidy v minulém odstavci, tak i u dalších látek (**Obrázek 8**) byly potvrzeny aktivity při inhibici polymerizace tubulinu u buněčných linií rakoviny střev a prsu.<sup>90</sup>

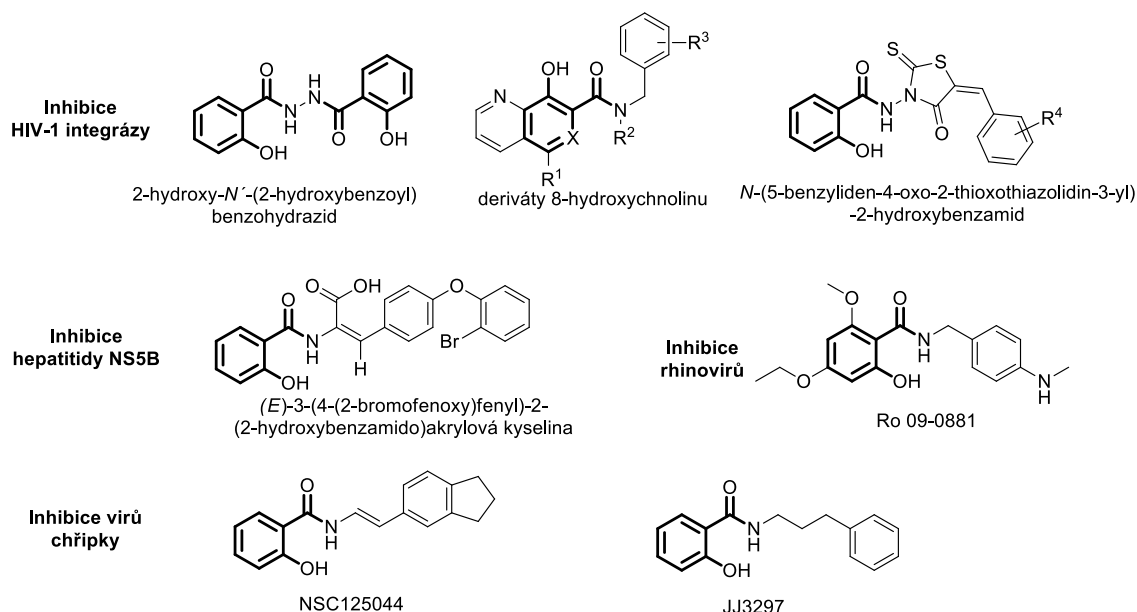


**Obrázek 8:** Salicylamidy jako inhibitory polymerizace tubulinu

Bylo zjištěno, že 2-hydroxy-*N'*-(2-hydroxybenzoyl)benzohydrazid je účinný při inhibici rekombinované HIV-1 integrázy, přičemž dosahuje pouze omezené cytotoxicity. Na základě těchto poznatků byla série hydrazidů připravena a otestována na CEM buňkách nakažených virem HIV-1 se slibnými výsledky. Pro správnou inhibiční aktivitu se jako klíčové parametry jeví zejména délka linkeru a přítomnost obou 2-hydroxylových skupin. Odstranění obou nebo aspoň jedné vede ke ztrátě aktivity.<sup>91,92</sup> Mezi další látky schopné inhibovat HIV-1 integrázu a současně obsahující salicylamidový skelet jsou deriváty 8-hydroxychinolinu a sloučeniny kombinující motivy salicylamidu a rhodaninu (*N*-(5-benzyliden-4-oxo-2-thioxothiazolidin-3-yl)-2-hydroxybenzamid), viz **Obrázek 9**.<sup>93–95</sup>

U benzamidů obsahujících karboxylovou funkční skupinu byly popsány inhibiční vlastnosti vůči polymeráze viru hepatitidy kmene NS5B již v množství  $IC_{50} = 0,08 \mu M$ .<sup>96</sup> Salicylamidy NSC125044 a JJ3297 jsou účinné proti viru chřipky NS1A, kde inhibují proteiny umožňující odvrácení imunitní reakce hostitelského organismu.<sup>95,97–99</sup> *N*-Benzylsalicylamid Ro 09-0881 je vysoce aktivní inhibitor lidských rhinovirů, které jsou nositeli nachlazení ( $IC_{50} \geq 0,01 \mu M$ ).<sup>100</sup>





**Obrázek 9:** Přehled biologicky aktivních salicylamidů

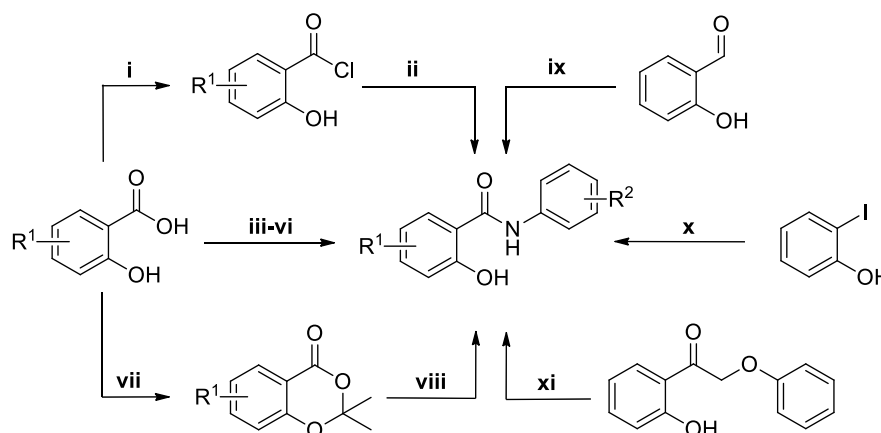
Alifatické salicylamidy nejsou oproti salicylanilidům zdaleka tak důkladně prozkoumány. Několik publikací zaměřených na studium alifatických salicylamidů z poslední doby ale naznačuje, že tato prozatím opomíjená skupina látek v sobě skrývá značný potenciál.

## 1.2 SYNTÉZY SALICYLAMIDŮ

### 1.2.1 Syntéza salicylanilidů

Salicylanilidy je možné připravit řadou metod, které spočívají v aplikaci postupů zmíněných níže s příslušnými substráty, viz **Schéma 1**. Klasickou metodou je dvoustupňová syntéza **i** a **ii**, kdy je v prvním stupni připraven chlorid kyseliny salicylové, který ve druhém stupni reaguje s příslušným substituovaným anilinem. Nevýhodou těchto běžně vedených reakcí je dlouhá reakční doba.<sup>101</sup> Velmi praktickým způsobem přípravy je využití „one-pot“ metody s mikrovlnnou iniciací **iii**, která zkracuje reakční dobu z 5-8 hodin na 10-15 minut.  $\text{PCl}_3$  funguje jako činidlo pro tvorbu chloridu kyseliny, který pak *in situ* dále reaguje se substituovaným anilinem na finální produkt. Jako rozpouštědlo je možné použít řadu rozpouštědel jako toluen, chlorbenzen nebo 5,5-dimethyl-1,3-cyklohexadien.<sup>78,102–105</sup> Amidace za podmínek **iv** probíhá přímo z kyseliny bez další aktivace.<sup>106</sup> Syntéza za podmínek **vi** je srovnatelná s metodou **iii** s tím rozdílem, že zde není použito iniciace mikrovlnným zářením. Reakční doba se tomu pak úměrně prodlužuje.<sup>23</sup> Salicylanilid byl z kyseliny salicylové vytvořen také dvoustupňovou reakcí za podmínek **vii** a **viii**.<sup>107</sup> Trendem moderní doby je v duchu tzv. green chemistry vývoj nových nebo úprava stávajících syntetických

technik takovým způsobem, aby měly co nejmenší ekologický dopad, bylo spotřebováno co nejméně rozpouštědel, bylo možné opakovaně recyklovat katalyzátor, bylo dosaženo energetické úspory tím, že reakce bude vedena bez ohřevu apod. Do tohoto trendu zcela zapadají přípravy salicylanilidů za podmínek **v**<sup>108</sup>, **ix**<sup>109</sup>, **x**<sup>110</sup> a **xi**<sup>111</sup>, viz **Schéma 1** převzaté a upravené z literatury.



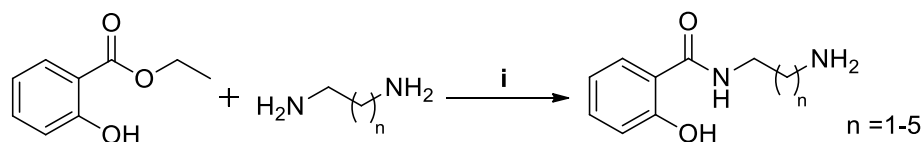
**Schéma 1:** Syntetické přípravy salicylanilidů

**i** SOCl<sub>2</sub>, DMF, 50 °C, 2 h; **ii** R<sup>2</sup>PhNH<sub>2</sub>, pyridin, DMAP, DCM, od 0 °C do RT, 12 h; **iii** R<sup>2</sup>PhNH<sub>2</sub>, PCl<sub>3</sub> nebo SOCl<sub>2</sub>, 5,5-dimethyl-1,3-cyklohexadien nebo tol nebo PhCl, 10-30', MW; **iv** R<sup>2</sup>PhNH<sub>2</sub>, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, reflux, 8 h; **v** R<sup>2</sup>PhNH<sub>2</sub>, nano MgO, bez rozpouštědla, 70 °C; **vi** R<sup>2</sup>PhNH<sub>2</sub>, SOCl<sub>2</sub>, benzen, 60 °C nebo COCl<sub>2</sub>, DMF (kat.), THF, reflux; **vii** TFA-TFAA, aceton; **viii** R<sup>2</sup>PhNH<sub>2</sub>, nBuLi, DMPU, THF/hexan/H<sub>2</sub>O, 80 °C, 2 h; **ix** R<sup>2</sup>PhNH<sub>2</sub>, [{(CH<sub>2</sub>SiMe<sub>2</sub>)<sub>2</sub>{(2,6-*i*Pr<sub>2</sub>C<sub>6</sub>H<sub>3</sub>)N<sub>2</sub>}<sub>2</sub>}Y {N(SiMe<sub>3</sub>)<sub>2</sub>}] (THF)], toluen, 20 °C, 2 h, inert; **x** R<sup>2</sup>PhNH<sub>2</sub>, 1 hm% Pd na silikagelu, K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>, bez rozpouštědla, 80 °C, 24 h reakce v zatavené ampuli; **xi** R<sup>2</sup>PhNH<sub>2</sub>, (Cu)/O<sub>2</sub>, DMSO, 120 °C.<sup>112</sup>

## 1.2.2 Syntéza alifatických salicylamidů

### 1.2.2.1 Obecné postupy

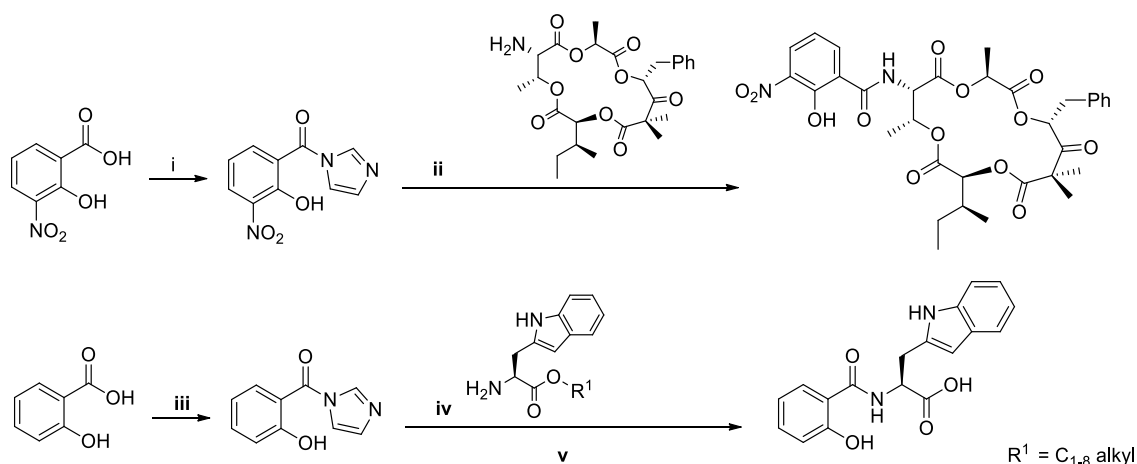
Syntéza uvedená níže (**Schéma 2**) je přímou amidací ethyl esteru kyseliny salicylové za poměrně drsných podmínek. Metoda je vhodná pro jednoduché aminy.<sup>77,113</sup>



**Schéma 2:** Příprava alifatických salicylamidů z esteru  
**i** 110 °C, 5 h.

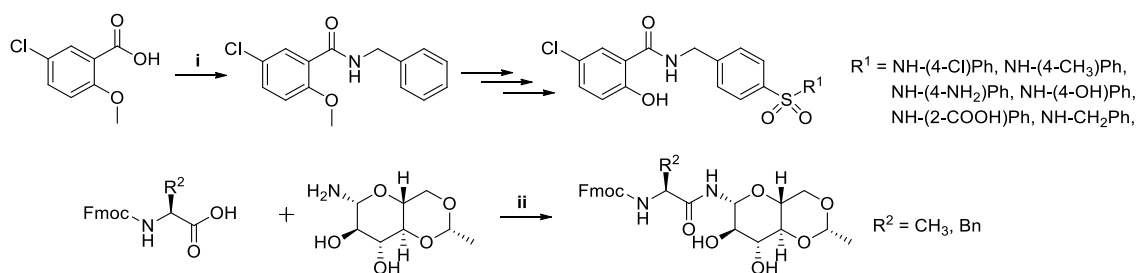
Často používaným a velmi šetrným amidačním činidlem je karbonyldiimidazol (CDI). Nachází časté využití při syntézách peptidů, kdy je nutné zachovat mírné reakční podmínky. Podrobnější popis mechanismu jeho reakce je uveden v kapitole **1.3.1**. Syntézy uvedené níže uvádějí použití karbonyldiimidazolu při syntéze alifatických salicylamidů, viz **Schéma 3**. Na modelových reakcích probíhá amidace kyseliny za

účasti CDI pomaleji než obdobná reakce na shodný produkt využívající thionyl chlorid k přípravě acyl chloridu kyseliny. Výhodou použití CDI je bezpečnější provedení, šetrnější prostředí pro případný složitý nebo drahý amin a snížené riziko probíhání vedlejších reakcí spojených s použitím thionyl chloridu. Racemizace je v případě aminokyselin minimální. První reakce popisuje klíčovou část totální syntézy (+)-prunostatinu A, látky s popsanou protinádorovou aktivitou vůči buňkám hypoxivního fibrosarkomu. Druhá reakce popisuje přípravu série alifatických salicylamidů s popsanými aktivitami při inhibici  $\gamma$ -butyrobetain hydroxylázy, která se uplatňuje při léčbě kardiovaskulárních nemocí a diabetu.<sup>114-117</sup>



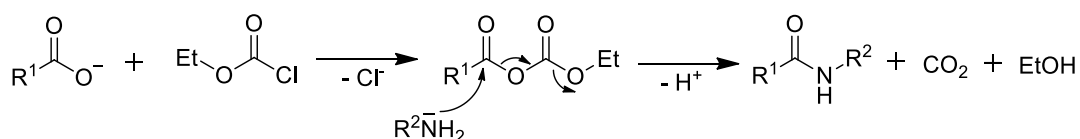
**Schéma 3:** Příprava alifatických salicylamidů s využitím karbonyldiimidazolu (CDI)  
**i** CDI (1,5 ekv), THF, 6 min, reflux; **ii** 40 min, 25 °C; **iii** CDI (1,2 ekv), DMF, 10 min; **iv** L-tryptofan alkylester (1,2 ekv), TEA (1,05 ekv), DMF, 20 h, 25 °C; **v** LiOH (5 ekv), THF/H<sub>2</sub>O, 12 h, 25 °C.

Syntézy alifatických salicylamidů s využitím ethylchloroformiátu uvádí **Schéma 4**. První reakce uvádí dílčí krok z přípravy série nových derivátů 5-chloro-*N*-(4-sulfamoylbenzyl) salicylamidů, u kterých byla úspěšně potvrzena aktivita při inhibici růstu buněk prsního adenokarcinomu. Předpokládaným mechanismem jejich účinku je zabránění polymerizace tubulinu v mikrotubuly, které se podílejí mimo jiné na mezibuněčném transportu živin a iontů nebo mitotickém dělení buněk.<sup>90</sup> Druhá reakce uvádí dílčí krok ze syntézy série glykokonjugátů aminokyselin za účelem testování jejich protizánětlivých a analgetických účinků.<sup>118</sup> Ethylchloroformiát nejdříve reaguje se substrátem na směsný anhydrid, který je následně rozložen aminem za vzniku alkoholu, oxidu uhličitého a cílového amidu. Pro eliminaci vznikajícího chlorovodíku jsou využívány terciární aminy, nejčastěji je používán trimethylamin. Triethylamonium hydrochlorid je z reakční směsi odstraněn ve formě nerozpustné sraženiny filtrací. Mechanismus amidace uvádí **Schéma 5**.<sup>119</sup>



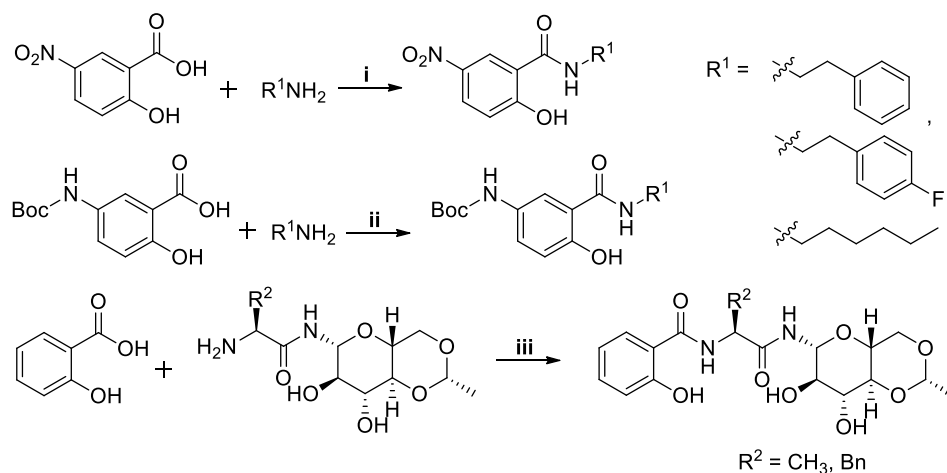
**Schéma 4:** Příprava alifatických salicylamidů s využitím ethylchloroformiátu

**i**  $\text{BnNH}_2$  (1 ekv), ethyl chloroformiát (1 ekv), TEA (1 ekv), DCM, 3 h, 25 °C; **ii** ethylchloroformiát (1 ekv), TEA (1 ekv), dioxan, 10 °C.



**Schéma 5:** Mechanismus amidace za využití ethylchloroformiátu

**Schéma 6** uvádí syntézu alifatických salicylamidů za využití různých karbodiimidů. První dvě reakce popisují přípravu *N*-alkylamidových analogů lavendustinu A za účelem testování jejich schopnosti inhibovat epidermální růstový faktor tyrosin kinázy.<sup>88,89</sup> Třetí reakce uvádí dílčí krok ze syntézy série glykokonjugátů aminokyselin za účelem testování jejich protizánětlivých a analgetických účinků. Výsledkem uvedené reakce je derivát, který je možné označit za alifatický salicylamid stejně jako ostatní látky v této kapitole.<sup>118,120</sup> Pro aktivaci karboxylových kyselin pro amidace je zejména v peptidové chemii často používanou metodou využití karbodiimidů. Postup, i když byl popsán již před padesáti lety, se těší velké oblibě, stále se vyvíjí a dále se optimalizuje, hledají se nové karbodiimidy a aditiva pro potlačení nežádoucí racemizace.<sup>121</sup> Karbodiimidy jsou s oblibou používány jak při klasické syntéze v roztoku, tak i při moderní syntéze peptidů na pevné fázi. Karbodiimidy reagují rychle a za šetrných podmínek, což umožňuje práci s citlivými, drahými nebo komplexními aminy. Bližší pozornost je amidaci s využitím karbodiimidů věnována v kapitole **1.3.4**.

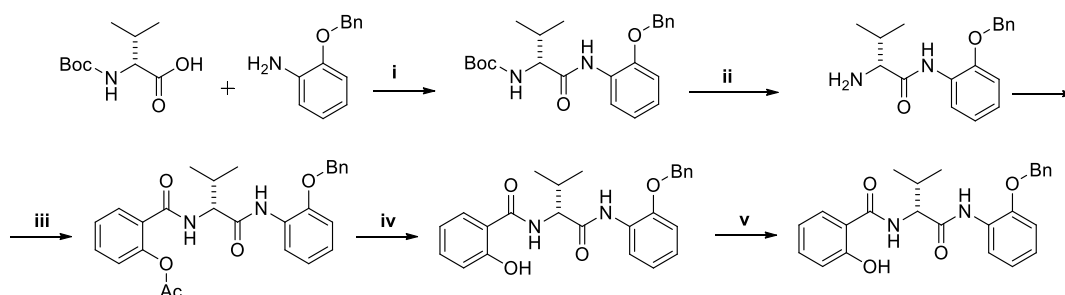


**Schéma 6:** Příprava alifatických salicylamidů za využití karbodiimidů

**i** DCC (1,2 ekv), pyridin; **ii** EDCI·HCl (1,5 ekv), HOBt (1,5 ekv), TEA (2 ekv), suché DMF; **iii** EDCI·HCl (1,12 ekv), HOBt (0,9 ekv), TEA (1,2 ekv), suché DMF.

### 1.2.2.2 Metoda stavebního bloku

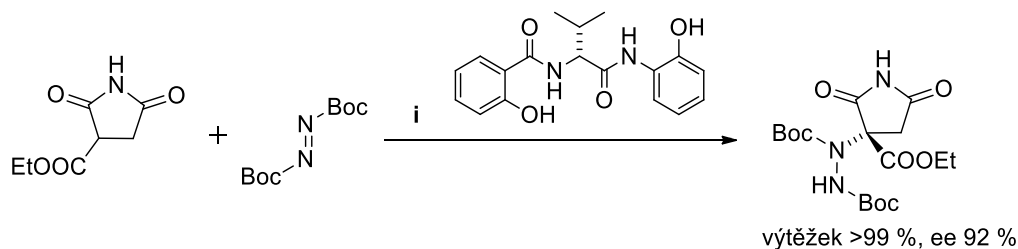
Speciálním způsobem přípravy alifatických salicylamidů s jednou aminokyselinou je metoda popsaná profesorem Shibasakim a jeho kolektivem v řadě publikací. Ačkoliv syntéza využívá karbodiimidů, je pro svůj význam zařazena do samostatné kapitoly. Studie jsou zaměřeny na přípravu knihovny látek a testování jejich katalytické aktivity při asymetrické aminaci sukcinimidu za účelem stereospecifické syntézy. Snahou bylo co nejefektivněji připravit řadu strukturně příbuzných látek lišících se pouze v rozdílné substituci na jednotlivých aromatických kruzích. Strategie přípravy spočívala v přípravě tzv. building bloků spojením různě substituovaných anilinů s *N*-Boc aminokyselinou za využití karbodiimidů (**i**). Po deprotekcí aminoskupiny v kyselém prostředí (**ii**) následovala přímá amidace s různě substituovaným *O*-acetylsalicyloyl chloridem (**iii**). Příslušnými deprotekcemi (**iv**, **v**) bylo poté dosaženo cílového alifatického salicylamidu. Byla vytvořena knihovna látek, které se od sebe lišily alifatickým zakončením dle použité aminokyseliny a substitucí na salicylové a anilinové části molekuly, viz **Schéma 7**. Z kombinatoriálního hlediska je možné dosáhnout vysokého počtu derivátů, avšak jako prvek s největší potenciální variabilitou se jeví substituovaný anilin, nejméně variabilním prvkem je naopak substituovaná kyselina salicylová. Postup popsany v pracích kolektivu profesora Shibasakiho je méně flexibilní.<sup>122</sup>



**Schéma 7:** Příprava diamidů dle Shibasakiho

**i** EDCI·HCl, HOBt, TEA, DCM, od 0 °C do 25 °C, výtěžek 87 %; **ii** 4M HCl/dioxan, od 0 °C do 25 °C; **iii** *O*-acetylsalicyloyl chlorid, TEA, DCM, od 0 °C do 25 °C; **iv** K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>, MeOH/DCM, 25 °C; **v** Pd/C, H<sub>2</sub>.

Studie využívají alifatických salicylamidů jako ligandů v katalýze z prvotních pokusů při asymetrické aminaci sukcinimidu při přípravě ranirestatu na další reakce Mannichova typu (**Schéma 8**). Ranirestat nachází uplatnění při léčbě diabetické neuropatie. Toto léčivo bylo doposud syntetizováno ve formě racemátu, který bylo nutné následně dělit opakovanou krystalizací s pomocným rezolučním činidlem. Z praktických důvodů úspory času a financí byl výrobní proces optimalizován využitím asymetrické katalýzy. Molekula alifatického salicylamidu se díky své struktuře koordinuje jako ligand na atom kovu, čímž vtiskne okolí reakčního centra tvar, který musí substrát, činidlo a ostatní účastníci reakce respektovat. Alifatický salicylamid je kombinován s různými kovy (La, Gd, Nd, Dy, Sm, Er) jako katalytický komplex a v různých rozpouštědlech (THF, tol, DMF, CHCl<sub>3</sub>, diethylether, EtOAc). Pro modelovou reakci se nejvíce osvědčila kombinace s lanthanem (La(O*i*Pr)<sub>3</sub>) v CHCl<sub>3</sub>.<sup>123–129</sup> Dalším cílem výzkumu Shibasakiho kolektivu je zjednodušení recyklace katalyzátoru a ligandů jejich ukotvením na uhlíkové nanotrubičky jako na pevnou fázi a převedení uspořádání výše popsaných reakcí do kapilárního průtokového reaktoru.<sup>130</sup>



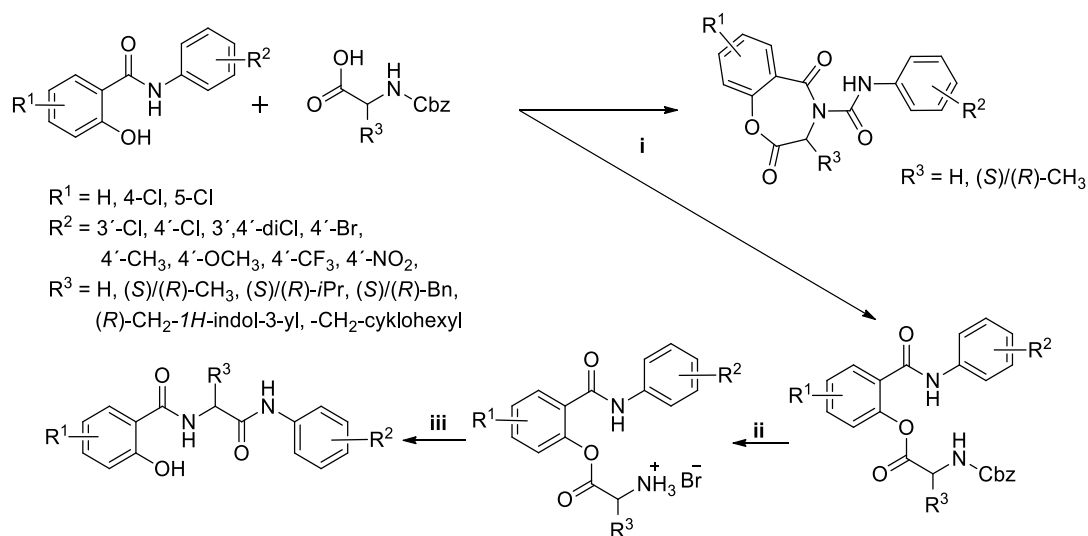
**Schéma 8:** Využití alifatických salicylamidů při asymetrické katalýze

**i** alifatický salicylamid (0,04 ekv), La(O*i*Pr)<sub>3</sub> (0,02 ekv), *N,N*-dimethylacetamid (0,2 ekv), CHCl<sub>3</sub>, 0 °C, 90 min.

### 1.2.2.3 Syntéza alifatických salicylamidů přesmykem *N*-fenylsalicylamid-esterů vybraných aminokyselin

Alifatické salicylamidy s jednou aminokyselinou (tzv. diamidy) byly izolovány jako produkty při neočekávaném přesmyku při syntéze salicylanilidových proléčiv za účelem vylepšení jejich cytotoxických aktivit vůči mykobakteriím.

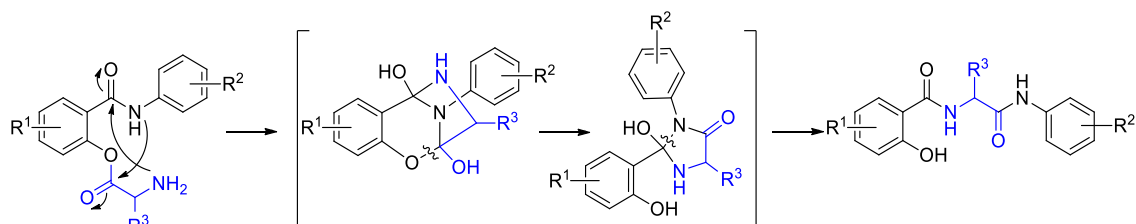
Prvním krokem víceetapové syntézy byla Steglichova esterifikace *N*-chráněné aminokyseliny salicylanilidem za přítomnosti karbodiimidů (**i**). Připravený *N*-chráněný ester byl zbaven chránicí skupiny v kyselém prostředí 33% HBr v kyselině octové téměř kvantitativně za vzniku amonium hydrobromidu esteru aminokyseliny (**ii**). Molekula esteru byla ve formě soli stabilní, izolovatelná a analyzovatelná, avšak při další reakci ve snaze o neutralizaci a uvolnění aminoskupiny docházelo k přesmyku v literatuře prozatím nepopsanému, kdy došlo k vsunutí aminokyseliny mezi motiv kyseliny salicylové a anilinu (**iii**), viz **Schéma 9** převzaté a upravené z publikace Imramovský, A. et al. *Tetrahedron Lett.* **2006**, 47 (29) 5007-5011 a Vinšová, J. et al. *Tetrahedron Lett.* **2010**, 51 (1) 23-26.



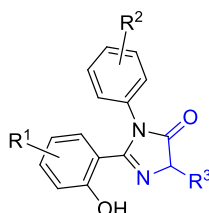
**Schéma 9:** Vznik alifatických salicylamidů s jednou aminokyselinou přesmykem **i** DCC, DMF,  $-10\text{ }^\circ\text{C}$ , 12 h; **ii** 33% HBr/AcOH; **iii** TEA,  $\text{CHCl}_3$ ,  $25\text{ }^\circ\text{C}$ , 30 min.<sup>78,131,132</sup>

Strukturní motiv diamidů se objevoval v několika jiných pracích, v těch byla ale struktura diamidu připravena odlišnými postupy. Přesmyk platí obecně pro všechny estery aminokyselin bez ohledu na elektron-donorní/-akceptorní povahu substituentů na salicylovém nebo anilinovém motivu molekuly, aminokyseliny nebo použité *N*-chránicí skupiny (Boc, Cbz). K návrhu a prokázání mechanismu přesmyku (**Schéma 10**) významně přispěla izolace a identifikace dehydratované varianty předpokládaného

intermediátu, viz **Obrázek 10**. Její struktura byla potvrzena HMBC 2D NMR experimenty a rentgenovou difrakční analýzou.<sup>132</sup>



**Schéma 10:** Navržený mechanismus přesmyku



**Obrázek 10:** Izolovaný dehydratovaný reakční intermediát

Za použití popsaného přesmyku bylo připraveno 49 diamidů.<sup>133</sup> Přesmykem připravené diamidy vykázaly v *in vitro* testech antimykobakteriální aktivity v rozmezí 62,5-8  $\mu\text{mol/L}$  vůči *Mycobacterium tuberculosis* a vůči několika dalším netuberkulotickým kmenům, jako například *M. kansasii* a *M. avium*. Diamidy byly také testovány *in vitro* vůči plísním a kvasinkám. Pouze několik zástupců vykázalo účinnost proti *Trichophyton mentagrophytes* (0,49  $\mu\text{mol/L}$  po 24/48 h pro diamid se substituenty  $R^1 = 4\text{-Cl}$ ,  $R^2 = 4'\text{-Cl}$ ,  $R^3 = (R)\text{-Bn}$ ) nebo *Candida krusei* (3,9/7,81  $\mu\text{mol/L}$  po 24/48 h pro diamid se substituenty  $R^1 = 4\text{-Cl}$ ,  $R^2 = 4'\text{-CH}_3$ ,  $R^3 = (R)\text{-CH}_2\text{-1H-indol-3-yl}$ ; 1,95/3,9  $\mu\text{mol/L}$  po 24/48 h pro diamid se substituenty  $R^1 = 4\text{-Cl}$ ,  $R^2 = 4'\text{-CF}_3$ ,  $R^3 = (S)\text{-iPr}$ ). Diamidy ztratily oproti původním salicylanilidům většinu antifungální aktivity. Testy bylo prokázáno, že diamidy mají schopnost zabraňovat fotosyntéze přerušením fotosyntetického transportu elektronů v chloroplastech špenátu (*Spinacia oleracea L.*).<sup>79</sup>

Ačkoliv je možné syntetizovat diamidy přesmykem bez omezení, je nutné nejdříve připravit příslušný *N*-chráněný ester aminokyseliny. Za podmínek Steglichovy esterifikace se to nepodařilo provést v případě glycinu nebo alaninu. Pravděpodobně díky malé sterické zábraně substituentu  $R^3$  (H nebo  $\text{CH}_3$ ) reakce po proběhnutí esterifikace pokračovala dále cyklizací substrátu za vzniku benzoxazepin-2,5-dionového kruhu. Další nevýhodu přípravy diamidů přesmykem představoval nízký výtěžek, který byl průměrně 57 % s velkým rozptylem mezi 23-93 %.<sup>133</sup>

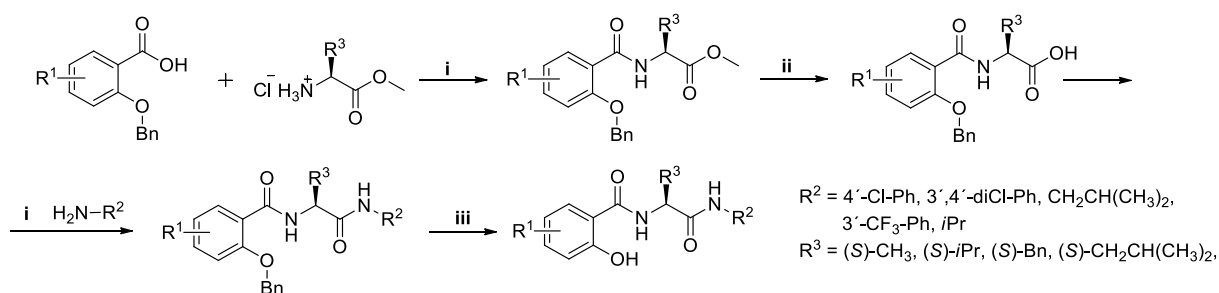


Vzhledem ke středně-mikromolárním antimykobakteriálním aktivitám a k výše uvedeným nedostatkům přípravy salicylamidů přesmykem, vznikla potřeba připravit diamidy efektivně s co nejvyššími výtěžky novou robustní metodou, bez ohledu na použitou aminokyselinu.<sup>84</sup> Bylo přistoupeno k cílené syntéze diamidů, které se věnuje následující kapitola.

#### 1.2.2.4 Cílená syntéza 2-hydroxy-*N*-(arylalkyl)benzamidů

V návaznosti na předcházející syntézy a zjištěná omezení v přípravě alifatických salicylamidů s jednou aminokyselinou (tzv. diamidy), bylo v rámci vědecké skupiny doc. Imramovského na ÚOCHT Univerzity Pardubice přistoupeno k návrhu a provedení cílené syntézy. Účelem objevení nové syntetické cesty bylo zajistit plynulý a rychlý způsob přípravy diamidů s co největší flexibilitou v možnosti obměny substituentů na salicylovém, anilinovém a aminokyselinovém motivu molekuly.

Reakce je zahájena amidací *O*-chráněné kyseliny salicylové s *O*-chráněným hydrochloridem aminokyseliny za přítomnosti EDCI·HCl v dichlormethanu (**i**). Po deprotekcii (**ii**) karboxylové skupiny aminokyseliny hydroxidem lithným ve směsi voda/1,4-dioxan (1:1) následuje druhá amidace s anilinem za podmínek shodných s první amidací (**i**). Posledním krokem je deprotektce fenolického hydroxyly (**iii**) na cílené diamidy. Uvedená syntéza, viz **Schéma 11** převzaté a upravené z literatury,<sup>84,131</sup> je dostatečně robustní, má vyšší výtěžky a je obecná pro všechny aminokyseliny a substituenty na salicylovém a anilinovém motivu.

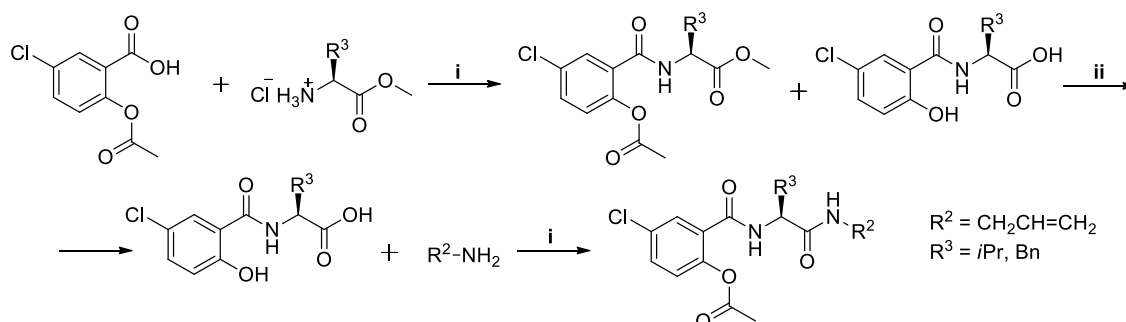


**Schéma 11:** Přímá příprava alifatických salicylamidů – ochrana pomocí benzyl skupiny

**i** EDCI·HCl, TEA, DCM, 16 h, 25 °C; **ii** LiOH, 1,4-dioxan:voda 1:1, 45 min, 50 °C; **iii** H<sub>2</sub>, Pd/C, EtOAc, 12 h, 25 °C.

Jako alternativní variantu cílené metody přípravy je možné provést změnu ve chránící skupině fenolického hydroxyly na kyselině salicylové. Namísto benzylu je hydroxylová skupina chráněna acetylovou skupinou. Vzhledem k vysoké labilitě acetylové chránící skupiny již v prvním stupni (**i**) syntézy, je této ochrany možné použít za cenu vysokých ztrát na výtěžku jen v případě, že je v molekule přítomný boční

řetězec s dvojnou vazbou, který by na závěr syntézy nepřežil deprotekcí fenolického hydroxyly v prostředí  $H_2$ , Pd/C. V dalším kroku, ochránění karboxylové kyseliny v bazickém prostředí (**ii**), je použita směs obou ne/chráněných derivátů a dochází k úplné hydrolyze acetylové chránící skupiny. Následná amidace je provedena běžným způsobem (**i**).<sup>131</sup>



**Schéma 12:** Přímá příprava alifatických salicylamidů – ochrana pomocí acetyl skupiny  
**i** EDCI·HCl, TEA, DCM, 16 h, 25 °C; **ii** LiOH, 1,4-dioxan:voda 1:1, 45 min, 50 °C.

Z kombinatoriálního hlediska se jako prvek s největší potenciální variabilitou jeví substituovaný anilin, méně pozice aminokyseliny, nejméně variabilním prvkem je pak substituovaná kyselina salicylová. Cílená syntéza vyvinutá Karlem Paukem (**Schéma 11**) v dizertační práci využívá tohoto faktu beze zbytku. Nejdříve se v dostatečném množství připraví amid *O*-Bn kyseliny salicylové s vybraným methylester hydrochloridem aminokyseliny. Po deprotekcí karboxylové skupiny aminokyseliny pak následuje rutinní amidace s různými aminy, resp. substituovanými aniliny. Syntéza je zakončena deprotekcí fenolického hydroxyly. Syntéza postupuje zcela v souladu s principy správné kombinatoriální chemie, je rychlá, pružná a efektivní. Oproti tomu postup popsaný v pracích vědeckého kolektivu profesora Shibasakiho (**Schéma 7**) je řádově méně flexibilní a pomalejší. Molekula je budována „z druhého konce“, začíná amidací *N*-chráněné aminokyseliny s aminem/anilinem. Následuje reakce s chloridem kyseliny salicylové a konečná deprotekcí. Každá kombinace kyseliny salicylové, aminokyseliny a anilinu je připravována od začátku až do konce zvlášť. Pro přípravu stejné obsáhlé knihovny látek je tedy potřeba provést více syntéz.

Na následujícím modelu syntézy hypotetické knihovny diamidů je názorně patrný rozdíl v náročnosti a počtu nutných reakcí obou postupů. Úkolem je co nejefektivněji připravit všechny možné kombinace diamidů z jedné *O*-Bn chráněné kyseliny salicylové (**A**), tří aminokyselin (**B**, **C**, **D**) a pěti různě substituovaných anilinů (**E**, **F**, **G**, **H**, **I**), které již nevyžadují žádnou další deprotekcí. Reaktanty jsou označeny zeleně, produkty

reakcí modře. Písmeno s apostrofem značí provedenou deprotekcí na příslušné části molekuly. Přímá černá čára udává veškeré kombinace látek na dané úrovni. Šipka spojující jednotlivé prvky znázorňuje vlastní reakci. Přímá červená čára od sebe odděluje jednotlivé reakce. Oba postupy mají čtyři kroky: a) Pauk – amidace kyseliny salicylové s aminokyselinou, deprotekcí karboxylové kyseliny, druhá amidace s anilinem, konečná deprotekcí fenolického hydroxyly; b) Shibasaki – amidace *N*-chráněné aminokyseliny s anilinem, deprotekcí aminoskupiny, druhá amidace s chloridem kyseliny salicylové, deprotekcí fenolického hydroxyly. Příprava chloridu kyseliny salicylové není do celkového počtu reakcí započítána, ačkoliv se jedná o jednu nutnou reakci navíc. V celkovém počtu je již zanedbatelná. K syntéze navržené knihovny diamidů dle Pauka je třeba provést 36 reakcí (Schéma 13), dle Shibasakiho pak 60 reakcí (Schéma 14). Ačkoliv je v případě Paukovo prvních šesti syntéz třeba je provést ve větším měřítku, aby bylo dostatek výchozích látek pro následné syntézy, představuje to minimální komplikaci ve srovnání s nutností provést o 66 % více reakcí a separací v případě vedení syntézy dle Shibasakiho. Při návrhu komplexnější série diamidů by toto číslo dále narůstalo.

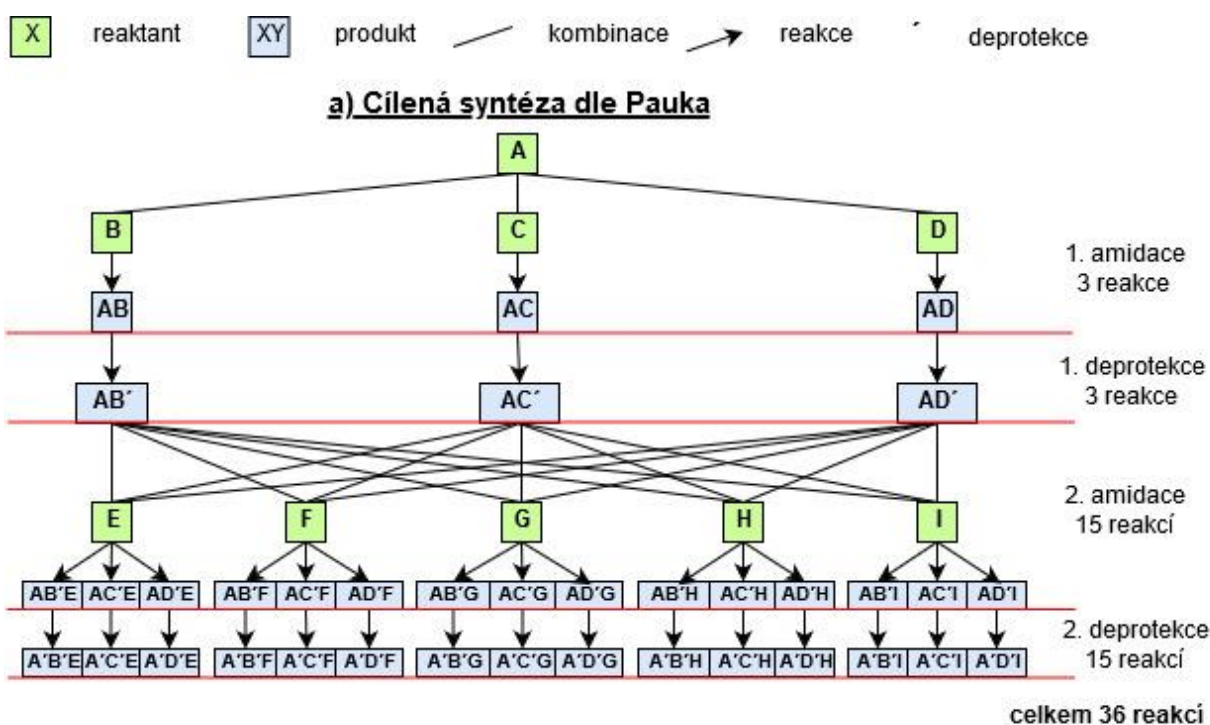


Schéma 13: Syntéza modelové série diamidů dle Pauka

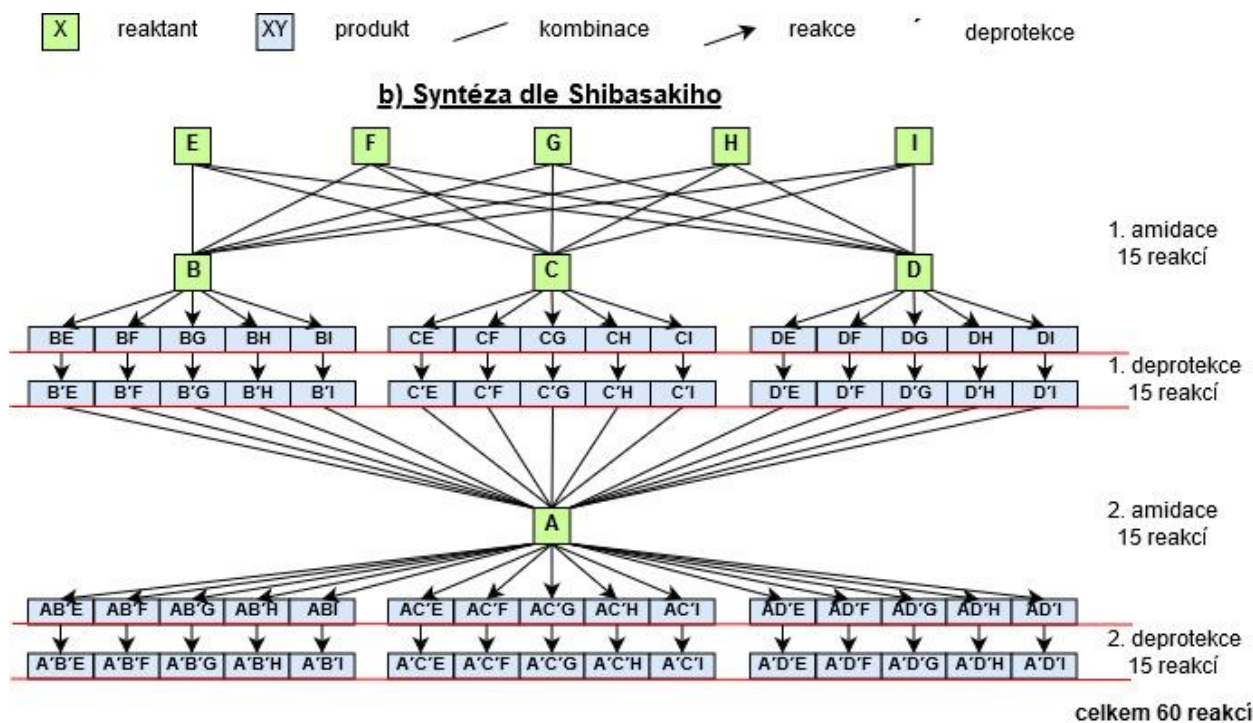


Schéma 14: Syntéza modelové série diamidů dle Shibasakiho

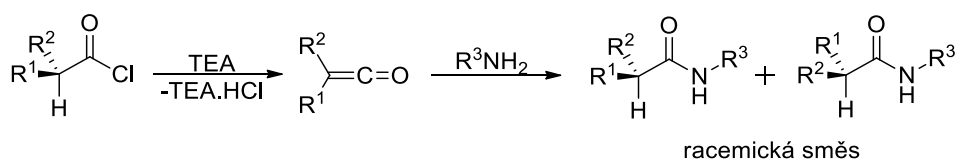
### 1.3 SYNTÉZA PEPTIDŮ

Celkem bylo popsáno přes 500 aminokyselin. Z nich se v přírodě vyskytuje 240 ve stabilní formě, ostatní se objevují pouze jako intermediáty při metabolických pochodech. Při stavbě bílkovin všech živých organismů nachází uplatnění z 240 jen 20 základních biogenních aminokyselin. Z nich 19 má primární aminoskupinu a jedna, prolin, má sekundární aminoskupinu. K 20 základním biogenním aminokyselinám je po objevech posledních dvou dekad možné přiřadit ještě selenocystein a pyrrolsin, které se vyskytují jen vzácně. Všechny výše jmenované aminokyseliny lze označit za  $\alpha$  aminokyseliny, protože jejich aminoskupina je navázaná na  $\alpha$  uhlíku. Běžně se vyskytující aminokyseliny se svojí unikátní konfigurací na  $\alpha$  uhlíku označují za L-kyseliny. Jejich enantiomery D se v přírodě nevyskytují často. Podle dělení aminokyselin dle optické otáčivosti (*R*)/(*S*) mají L amino kyseliny konfiguraci (*S*) krom cysteinu, který má (*R*), a krom glycinu, který je achirální.<sup>134–136</sup>

Peptidy představují v současnosti unikátní třídu farmaceutických sloučenin, které se svojí velikostí řadí mezi malé molekuly a proteiny, avšak biochemicky a terapeuticky se od obou liší. Peptidy představují příležitost pro provádění terapeutických zásahů způsobem, který se velmi blíží přirozeným přírodním pochodům. Jako příklad je možné uvést izolaci a první použití inzulínu u pacienta s cukrovkou, který si sám nebyl

schopen vyrobit dostatek tohoto hormonu.<sup>137</sup> Peptidy jsou selektivní a efektivní signální molekuly, které se váží na specifické receptory na povrchu buněk nebo na iontové kanály, kde spouštějí mezibuněčné interakce. Účinné peptidy byly původně identifikovány a izolovány z přírodních zdrojů, avšak řada z nich nebyla vhodná k přímé léčbě z důvodu nízké chemické stability a krátkého poločasu rozpadu v krevní plazmě. U některých perspektivních kandidátů se tyto nedostatky podařilo odstranit vhodnými strukturálními úpravami. Během poslední dekády získaly peptidy široké uplatnění v medicíně a biotechnologii, s čímž je také spojený rozvoj jejich trhu. Hlavní léčivou složkou léku Lupron od Abbott Laboratories je peptid leuprorelin složený z devíti aminokyselin. Lék dosáhl v roce 2011 tržeb 2,3 mld. dolarů. V současnosti je přes 70 léků na bázi peptidů schváleno Ústavem pro kontrolu potravin a léčiv Spojených států amerických (FDA)<sup>138</sup>, dalších 150 peptidových léčiv se nachází v klinické a přes 400 v pokročilé preklinické fázi vývoje. Peptidová léčiva jsou rychle se rozvíjejícím odvětvím medicíny.<sup>139–141</sup>

Ačkoli je amidy obecně možné připravit přímou reakcí acylchloridu s aminem za přítomnosti nenukleofilní terciární báze (TEA, DIPEA), pro syntézu peptidů je tato metoda krajně nevhodná z důvodu možné hydrolyzy, racemizace a štěpení ochranných skupin v bočních řetězcích. Tendence acylchloridů racemizovat v bazickém prostředí je ilustrována standardní metodou příprav ketenů.<sup>142</sup> Keteny se připravují reakcí acylchloridu s kyselým  $\alpha$ -vodíkem s TEA. Keten může dále reagovat s nukleofilem (aminem) ve smyslu adice na odpovídající produkt, u kterého dochází ke ztrátě chirální informace, viz **Schéma 15**.<sup>143</sup>



**Schéma 15:** Vznik ketenu jako možný způsob racemizace

K syntéze peptidů jsou používány dva postupy, které jsou v zásadě založené na shodných principech, liší se pouze v povaze ochranné skupiny karboxylové skupiny první aminokyseliny. Pokud je tato ochranná skupina nerozpustná, je postup syntézy nazýván syntézou na pevné fázi. V opačném případě se jedná o syntézu v roztoku.

Syntéza v roztoku je tradičním způsobem provádění chemických reakcí v organické chemii. Parametry rozpouštědla mají vliv na reaktivitu jednotlivých

reaktantů a jeho vhodnou volbou je možné reakci přednostně vést požadovaným směrem. Syntéza amidů a zejména peptidů nebyla dlouho výjimkou. Při syntéze peptidů v roztoku je na výběr celá řada činidel a scale up reakce je snadno proveditelný. Při budování peptidu od C-konce jsou jednotlivé amidace s *N*-chráněnými aminokyselinami následovány vhodným odstraněním chránicí skupiny. Takto je postupováno do té doby, než je vybudován požadovaný peptid. Při delším vedení reakce a nevhodné volbě aktivačního činidla existuje riziko racemizace. Jako hlavní nevýhoda je ale považováno zdlouhavé a pracné chromatografické čištění mezi jednotlivými reakčními kroky z důvodu nutnosti získat co nejčistší vstupní suroviny do dalšího kroku. V případě použití ne zcela čisté výchozí látky dochází ke vzniku vedlejších produktů, které mají s požadovaným produktem takřka stejné složení. S tím souvisí velmi podobné vlastnosti jednotlivých látek. Výsledkem je složité čištění a další ztráty na výtěžku. S objevy nových selektivnějších činidel a rozvojem moderních metod preparativní vysokotlaké kapalinové chromatografie byly v posledních letech negativní dopady výše zmíněných záporů metody odstraněny nebo aspoň významně zmírněny. V 70. letech, kdy byla syntéza peptidů na pevné fázi navržena a představena, šlo sice o drahou, ale zato velmi vítanou alternativu k zavedené a zdlouhavé syntéze peptidů v roztoku.<sup>144</sup>

Syntéza na pevné fázi má fakticky stejný průběh co do opakování amidace následované deprotekcí. Zásadní rozdíl spočívá v mechanismu čištění meziproductů. Peptid je budován postupně od C-konce navázaném na pórovitém zrně z nerozpustného polymeru. Po každé reakci je reakční směs opakovaně proplachována rozpouštědlem a filtrována, kterým jsou odplaveny rozpustné reaktanty a činidla, zatímco již vybudovaný peptid zůstává navázaný na nerozpustném polymerním zrně. Po vybudování požadovaného peptidu je vhodnou metodou současně provedeno vyvázání peptidu z polymerního nosiče a odstranění chránicích skupin v bočních řetězcích peptidu.

Nevýhodou syntézy na pevné fázi je její nevhodná ekonomičnost. Za účelem rychlé reakce jsou činidla aplikována ve vysokých přebytecích, aby byla následně odplavena jako odpad. Dříve byla metoda velmi nákladná z důvodu vysokých cen příslušně chráněných aminokyselin. Pro přípravu malého množství peptidu se do té doby jednalo o ideální postup, kdy byly vysoké náklady kompenzovány rychlostí, přesností a čistotou syntézy. Snaha o scale up této metody přípravy ale neúnosně zvyšovala náklady. Situace se změnila v posledních dvou dekáдах s uvedením peptidových léčiv

(eptifibatid<sup>145</sup>, enfuvirtid<sup>146</sup>, bivalirudin<sup>147</sup>) na trh, které bylo ale nutné připravit v průmyslovém měřítku. Se zvýšenou poptávkou po *N*-chráněných aminokyselinách se na trhu vyvinul nový segment, o který začali soupeřit již zavedení i noví dodavatelé. Konkurenční boj vedl k pádu cen, který měl za následek výrazné snížení nákladů a zpřístupnění metody syntézy peptidů na pevné fázi pro širší vědeckou veřejnost.

V případě přípravy peptidů o délce do 15ti aminokyselin a v množství větším než 100 kg je dáována přednost klasické syntéze v roztoku. Pokud se jedná o přípravu komplexnější nebo delší peptidové sekvence, je upřednostňována syntéza na pevné fázi. Peptidy, resp. miniproteiny, o velikosti 50 aminokyselin a větší jsou připravovány kombinací obou metod, kdy jsou na pevné fázi připraveny krátké fragmenty, které jsou následně v roztoku spojeny do větších celků.<sup>148</sup>

Činidel vhodných pro syntézu peptidů je celá řada, krom karbonyldiimidazolu (CDI) jsou to například fosfoniové, uroniové, immoniové soli, HOBt, HOAt nebo karbodiimidy. Následující kapitoly jsou věnovány výčtu často používaných zástupců a popisu reakčního mechanismu, kterým amidace probíhá.

### 1.3.1 Karbonyldiimidazol (CDI)

Karbonyldiimidazol (CDI) je běžně používaným a šetrným amidačním činidlem při syntézách peptidů, kdy je nutné zachovat mírné reakční podmínky. Syntézy dokládající jeho využití jsou uvedeny v kapitole 1.2.2.1. Obecně na modelových reakcích probíhá amidace kyseliny za účasti CDI pomaleji než obdobná reakce na shodný produkt využívající thionyl chlorid k přípravě acyl chloridu kyseliny. Výhodou použití CDI je však bezpečnější provedení, šetrnější prostředí pro případný složitý nebo drahý amin a snížené riziko probíhání vedlejších reakcí spojených s použitím thionyl chloridu. Racemizace je v případě aminokyselin minimální. **Schéma 16** uvádí mechanismus aktivace karboxylové kyseliny pro amidaci.<sup>143</sup>

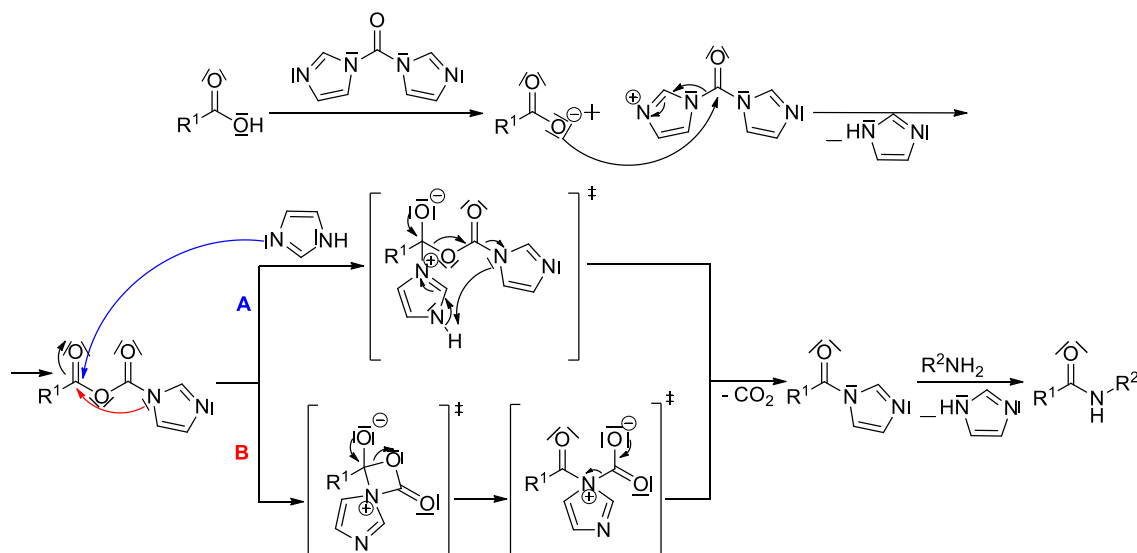
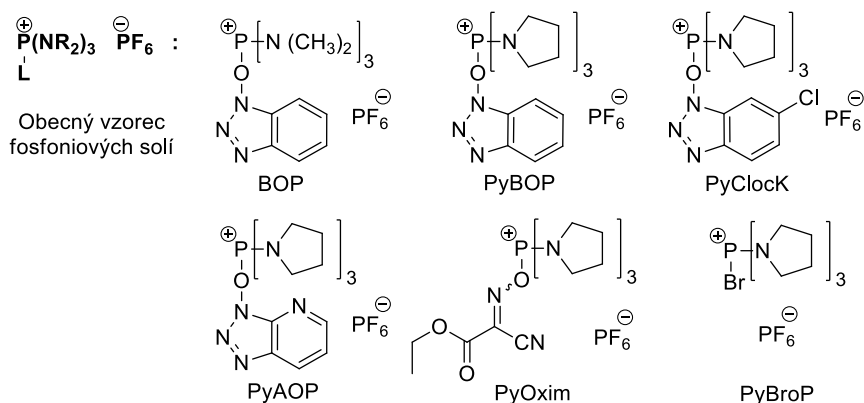


Schéma 16: Mechanismus amidace za přítomnosti CDI

### 1.3.2 Fosfoniové soli

Využití fosfoniových solí pro syntézu peptidů bylo poprvé popsáno koncem 70. let.<sup>149</sup> Amidace prováděná pomocí fosfoniových solí probíhá rychle a úroveň racemizace je nízná. V současnosti jsou nejčastěji používanými činidly BOP<sup>150</sup>, PyBOP, PyClocK<sup>151</sup>, PyAOP, PyOxim a PyBroP, viz **Obrázek 11**.

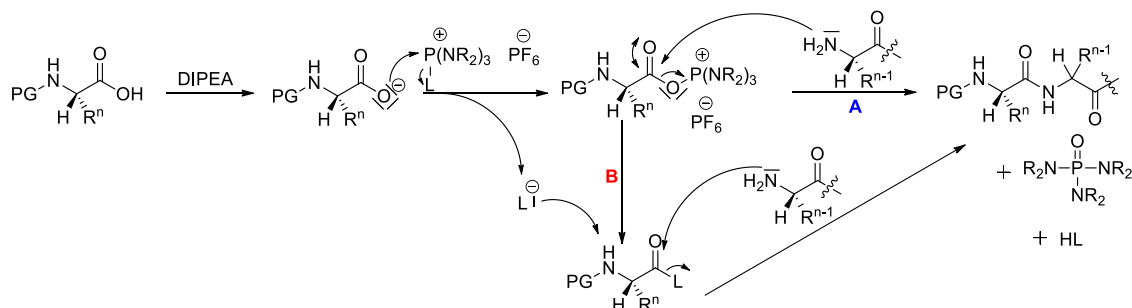


Obrázek 11: Přehled používaných fosfoniových solí

Podstatnou nevýhodu představuje při využití BOP vznik jedovatého hexamethylfosforotriamidu (HMPA), což využití strukturně pokročilého PyBOP výrazně omezuje. Amidace je zahájena neutralizací *N*-chráněné aminokyseliny terciárním aminem, (nejčastěji DIPEA) na karboxylát, který i jako slabý nukleofil napadá fosfoniovou sůl za vzniku acylfosfoniové soli a dobře odstupujícího a stabilního oxyaniontu L. Acylfosfoniová sůl je velmi reaktivní a může podléhat dvěma reakcím. První možností je přímý nukleofilní útok (A) koncové aminoskupiny již vybudovaného peptidu za vzniku konečného prodlouženého peptidu. Druhou reakční cestou (B) je nukleofilní útok oxyaniontu L na acylfosfoniovou sůl za vzniku aktivního esteru, který



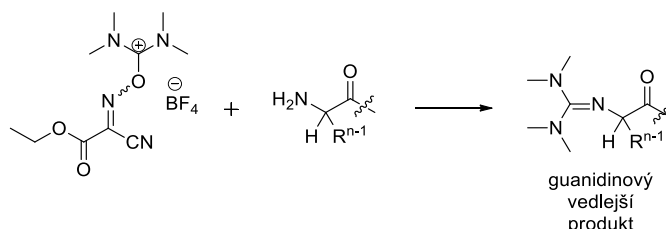
dále podléhá aminolýze na konečný prodloužený peptid. Reakční cesta **B** je dle dostupné literatury považována za převažující. Dalšími produkty reakce je hexaalkylfosforotriamid a HL. **Schéma 17** je převzaté a upravené z publikace Jaradat, D. M. M. *Amino Acids* **2017**, 50 (1), 39–68.<sup>149,150,152–156</sup>



**Schéma 17:** Mechanismus amidace za přítomnosti fosfoniových solí

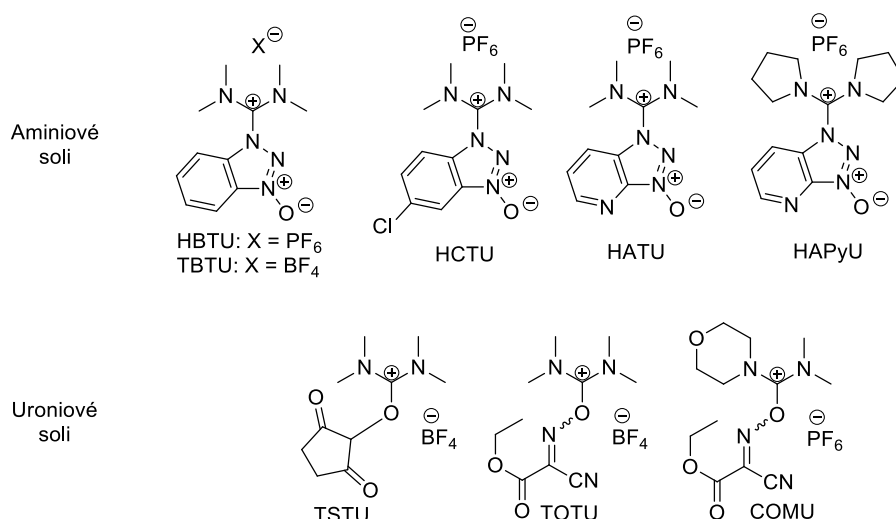
### 1.3.3 Aminiové/uroniové soli

Používání aminiových/uroniových solí skýtá oproti ostatním popsaným amidačním činidlům jednu nevýhodu spočívající v komplikovanějším technickém provedení. Činidla reagují přednostně s volnou aminoskupinou již vybudovaného peptidu na guanidinový vedlejší produkt, viz **Schéma 18**. Není tedy možné přidat činidlo přímo do směsi výchozích látek.<sup>156</sup>



**Schéma 18:** Reakce nežádoucí reakce na guanidinový vedlejší produkt

Před samotnou amidací je nutné provést aktivaci *N*-chráněné aminokyseliny a až poté do reakční směsi přidat částice s navázaným peptidem s volnou aminoskupinou. V porovnávacích studiích bylo zjištěno, že HATU spolu s nověji vyvinutým COMU poskytují produkty s vyššími výtěžky a menší mírou racemizace než HBTU, TBTU nebo PyBOP.<sup>156</sup> Mezi dále využívané zástupce aminiových solí patří HBTU<sup>157,158</sup>, TBTU, HCTU, HATU<sup>159,160</sup> a HAPyU.<sup>159</sup> Mezi využívané zástupce *O*-uroniových solí patří TSTU<sup>161,162</sup>, TOTU a COMU<sup>163</sup>, viz **Obrázek 12**.<sup>156</sup>



**Obrázek 12:** Přehled používaných aminiových a uroniových solí

### 1.3.4 Syntéza v roztoku s využitím karbodiimidů

Amidace s využitím karbodiimidů je spolehlivá a lety ověřená metoda přípravy amidů, která nachází široké využití zejména v peptidové chemii z důvodu šetrných podmínek, nízké teploty a vysoké konverze. Reakce je prováděna v ekvimolárním poměru karboxylové kyseliny, karbodiimidu a aminu. Reakce začíná velmi rychlou adicí karboxylové kyseliny na karbodiimid za vzniku reaktivní *O*-acylisomočoviny, která může dále reagovat několika způsoby, viz **Schéma 19**. Přímou reakcí *O*-acylisomočoviny s aminem (**A**) vzniká cílový amid spolu s vedlejším produktem, substituovanou močovinou, která má nízkou rozpustnost a je možné ji většinu odstranit prostou filtrací. V případě použití dichlohexylkarbodiimidu (DCC) vzniká dicyklohexylmočovina (DCU). Její majoritní část je díky její nízké rozpustnosti možné odstranit filtrací, avšak spolehlivé odstranění jejích stop z produktu je komplikované. Stopy DCU byly v některých případech patrné z <sup>1</sup>H a <sup>13</sup>C NMR spekter i po opakovaném čištění produktu kolonovou chromatografií. Záměnou aminu za alkohol je možné obdobným způsobem připravit estery.

*O*-Acylisomočovina je velmi reaktivní meziprodukt a v případě, že není amin přítomen okamžitě nebo ho v reakci zpomalují sterické efekty, dochází k vedlejším reakcím. Přijatelnou vedlejší reakcí vedoucí na požadovaný produkt je reakce *O*-acylisomočoviny s další molekulou karboxylové kyseliny (**B**). Vzniká močovina a symetrický anhydrid výchozí karboxylové kyseliny, který následně reakcí s aminem dává požadovaný produkt spolu s „recyklovanou“ výchozí karboxylovou kyselinou.

V rozpouštědlech s nízkou dielektrickou konstantou jako je chloroform nebo dichlormetan je vznik *O*-acylisomočoviny téměř okamžitý. Aktivace v polárních rozpouštědlech jako je DMF, které může být použito z nutnosti rozpuštění výchozích látek, je pomalejší, vznik *O*-acylisomočoviny není tak rychlý a je pravděpodobnější nástup nežádoucí vedlejší reakce (C). Tou je přesmyk *O*-acylisomočoviny na *N*-acylisomočovinu, která dále nereaguje na požadovaný produkt a jejíž vznik je příčinou snížení výtěžku a zkomplikováním čištění požadovaného produktu. Plynulost aktivace karbodiimidem je tedy velmi závislá na polaritě použitého rozpouštědla a jeho schopnost solvatovat reakční intermedie.

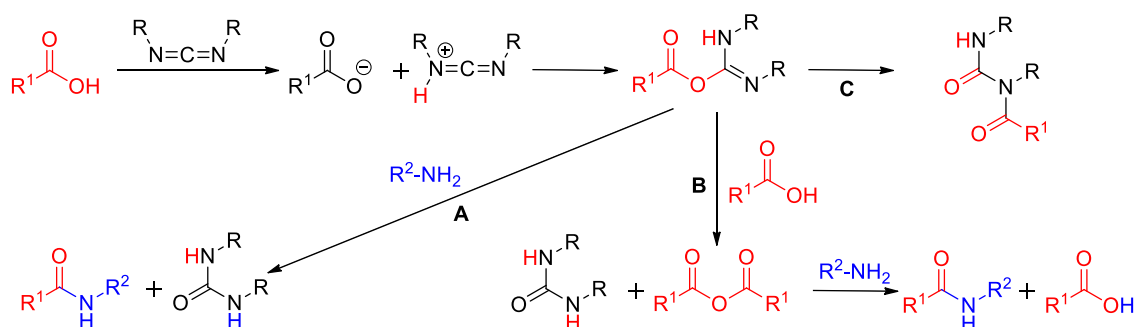


Schéma 19: Mechanismus amidace za účasti karbodiimidů

Další nežádoucí vedlejší reakcí je racemizace v důsledku keto-enol tautomerie aktivované kyseliny ve formě *O*-acylisomočoviny s  $\alpha$ -vodíkem (A), viz Schéma 20 převzaté a upravené z publikace Joullié Madeleine M. et al. *Arkivoc* 2010, 8, 189–250. V případě, že se jedná o *N*-substituovanou  $\alpha$ -aminokyselinu, dochází v bazickém prostředí k racemizaci také v důsledku cyklizace na substituovaný 5-(4H)-oxazolón (B).<sup>119,164,165</sup>

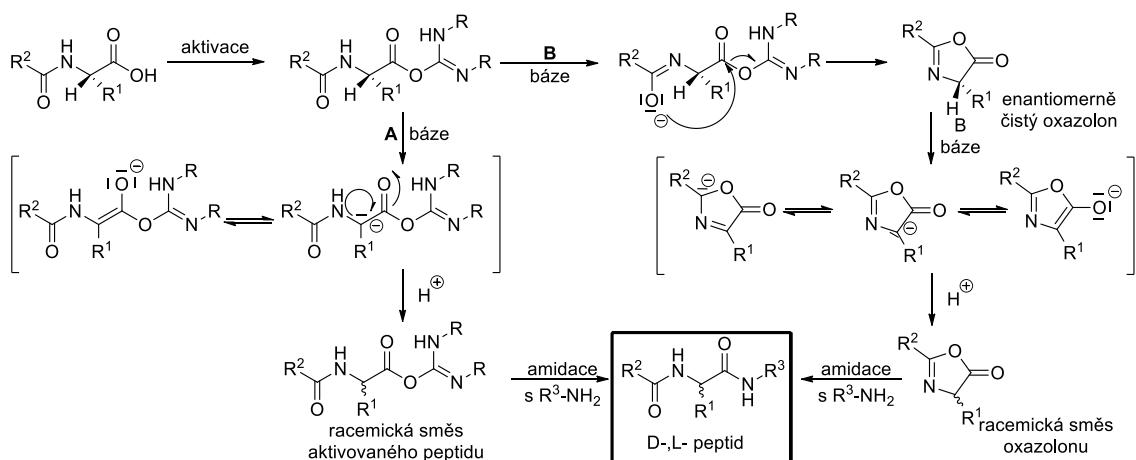
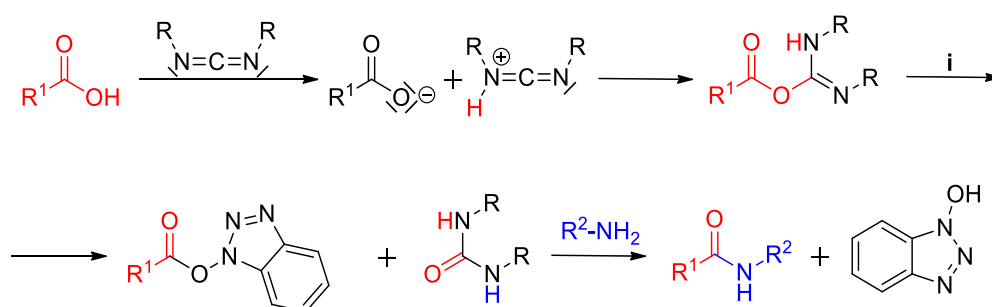


Schéma 20: Mechanismus bazicky katalyzované racemizace při aktivaci karbodiimidu

Tyto dvě nežádoucí reakce je možné významně omezit použitím vhodného aditiva, které v reakci funguje jako pomocný nukleofil, s *O*-acylisomočovinou reaguje

přednostně a následně dobře odstupuje ze substrátu. Převážně se jedná o konjugované aromatické systémy, které mají možnost dobře se stabilizovat vhodných rozprostřením náboje mezi jednotlivé rezonanční struktury. Mechanismus amidace za účasti 1-hydroxybenzotriozolu (HOBt) jako aditiva uvádí **Schéma 21**. Posunutí reakční rovnováhy přes naznačené reakce ve prospěch cílového amidu je tak výrazné, že dochází k potlačení obou nežádoucích vedlejších reakcí. Nevýhodou HOBt a jeho derivátů jsou jejich výbušné vlastnosti, při manipulaci s nimi je tedy nutné postupovat opatrně. S DCC se tradičně používá 4-dimethylaminopyridin (DMAP), od kterého je ale postupně upouštěno pro jeho vysokou toxicitu.<sup>119,143,166</sup>



**Schéma 21:** Využití HOBt jako aditiv pro potlačení vedlejších reakcí při tvorbě amidů i HOBt, případně jiná aditiva.

Za účelem redukce epimerizace při použití karbodiimidů jsou používána pomocná aditiva, např. DMAP, HOSu, HOAt nebo HOBt. Příkladem toho je amidace Z-Gly-Phe-OH s H-Val-OMe za účasti EDCI·HCl, kdy epimerizace klesla z 35 % bez aditiva na 1,5 % při použití HOBt. Jak uvádí **Schéma 21**, HOBt reaguje s *O*-acylmočovinou na aktivní ester, který následně reaguje s aminem na výsledný amid. Nevýhodou HOBt je boční reakce, kterou podstupuje karbodiimid na azetidin. Výsledkem je snížený výtěžek, protože karbodiimid se zpravidla nedávkuje v přebytku, viz **Schéma 22**. Jako náhrada byl otestován 1-hydroxy-7-azabenzotriazol (HOAt), který je ve srovnání s HOBt efektivnější co do výtěžků, kinetiky, tak i do snížení epimerizace.<sup>167–169</sup> Při amidaci Z-Val-OH s H-Val-OMe za účasti DCC se epimerizace snížila z 41,9% při použití HOBt na 14,9 % při použití HOAt. Při amidaci Z-Phe-Val-OH s H-Ala-OMe za účasti EDCI·HCl se epimerizace snížila z 4,1 % při použití HOBt pod 2 % při použití HOAt. Snaha o snížení epimerizace vedla k syntéze a testování izomerů HOAt (7-HOAt, 6-HOAt, 5-HOAt, 4-HOAt) při amidacích různých substrátů za účasti různých karbodiimidů avšak bez dalších úspěchů.<sup>170</sup> Dalším směrem výzkumu, který nevedl ke snížení epimerizace, byla snaha o zavádění elektron donorních nebo akceptorních skupin do struktury HOBt.<sup>166,168</sup>

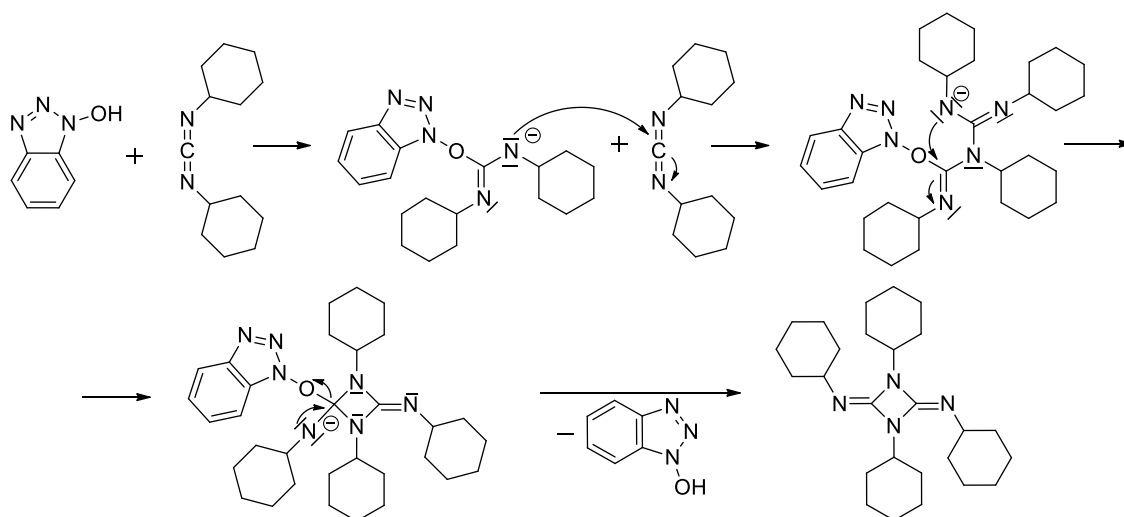
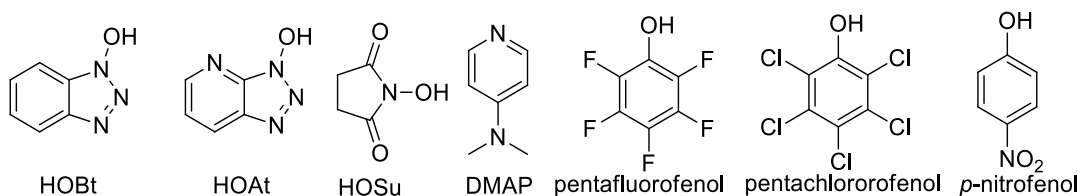


Schéma 22: Schéma boční reakce DCC s HOBT

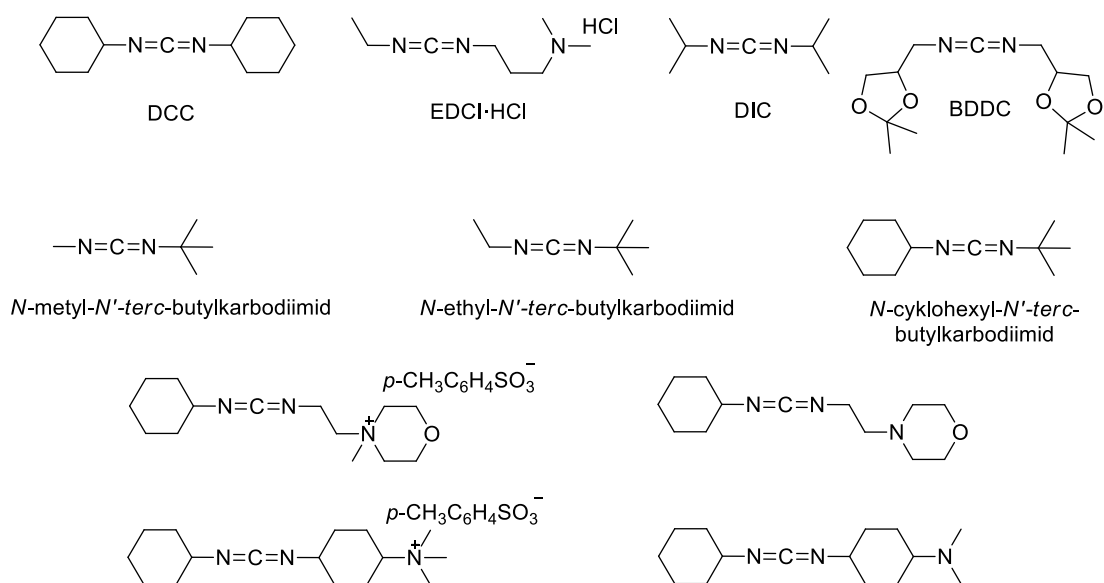
Obrázek 13 uvádí běžně používaná aditiva potlačující racemizaci při amidaci.



Obrázek 13: Přehled často používaných aditiv s karbodiimidy

Kromě dobré reaktivity, vysoké konverze a nízké racemizace substrátu je u karbodiimidů důležitým faktorem i snadnost odstranění při reakcích vznikající močoviny. Pokud je močovina rozpustná v rozpouštědle, nejčastěji dichlormetanu nebo dimethylformamidu, jde o nejjednodušší variantu. V opačném případě je možné močovinu, pokud je rozpustná ve vodě, odstranit při následných extrakcích. Úplné odstranění dicyklohexylmočoviny (DCU) vzniklé použitím dicyklohexylkarbodiimidu (DCC) je často komplikované. *N*-Ethyl-*N'*-dimethylaminopropylkarbodiimid hydrochlorid (EDCI·HCl) je velmi častou používanou alternativou pro DCC při syntézách peptidů v roztoku pro svou dobrou reaktivitu a vysokou konverzi. Jeho močovina je díky přítomnosti terciárního snadno protonovatelného dusíku lehce odstranitelná extrakcí do okyselené vodné fáze. Dalšími karbodiimidy tvořícími vodou snadno odstranitelné močoviny obsahují buď terciární nebo kvartérní amino skupinu. Karbodiimidy s terciární amino skupinou se jeví jako efektivnější.<sup>171,172</sup> *N,N'*-Diisopropylkarbodiimid (DIC) je velmi často používán zejména v syntéze peptidů na pevné fázi a z něj vzniklá močovina je v dichlormetanu dobře rozpustná. *N*-Methyl-*N'*-*tert*-butylkarbodiimid a *N*-ethyl-*N'*-*tert*-butylkarbodiimid byly také testovány, ale v porovnání s DIC jsou méně efektivní, poskytují nižší výtěžky a mají větší tendenci

tvořit nežádoucí *N*-acyl močoviny stejně jako nesymetrické karbodiimidy kombinující alifatické a aromatické substituenty.<sup>173</sup> Významně lepších výsledků dosahuje *N*-cyklohexyl-*N'*-*tert*-butylkarbodiimid, jehož močovina je v dichlormethanu dobře rozpustná a aktivita samotného karbodiimidu je srovnatelná nebo ještě lepší než DCC. Asi nejslibnějších výsledků dosahuje 1,3-bis(2,2-dimethyl-1,3-dioxolan-4-ylmethyl)karbodiimid (BDDC), který z výše jmenovaných dosahuje nejnižší epimerizace. Přehled běžně používaných karbodiimidů uvádí **Schéma 23**.  
119,143,166,174,175



**Schéma 23:** Přehled často využívaných karbodiimidů

### 1.3.5 Syntéza na pevné fázi s využitím karbodiimidů

Metoda syntézy peptidů na pevné fázi (SPPS – Solid Phase Peptide Synthesis), její strategie, použití, přednosti a omezení byla popsána v úvodu kapitoly 1.3. Na tomto místě je metoda rozvedena do podrobností ohledně druhů používaných pevných fází, linkerů, způsobů ochrany hlavních a vedlejších funkčních skupiny podle Boc/Bn nebo Fmoc/*t*-Bu protokolů, možností imobilizace první aminokyseliny nebo skrz možnosti technického provedení a automatizace procesu syntézy a čištění.

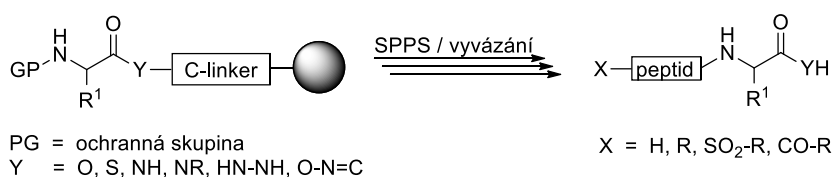
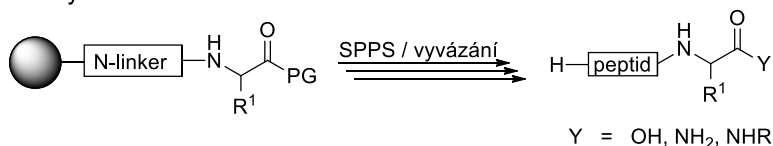
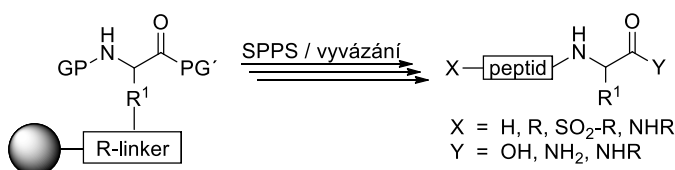
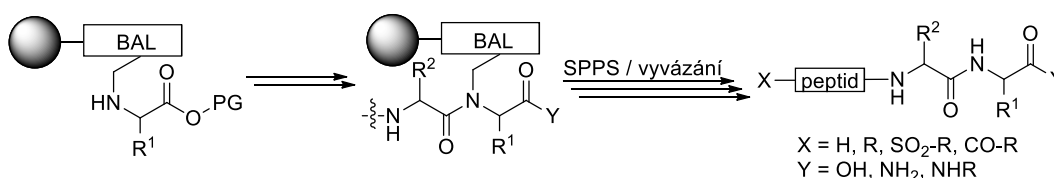
#### 1.3.5.1 Imobilizace aminokyselin a linkery

Smysl syntézy peptidů na pevné fázi spočívá v navázání první aminokyseliny na nerozpustný polymer a následném budování cílového peptidu. Aminokyselina není napojena přímo na makromolekulu nosiče ve schématech znázorněné jako kulička, ale na tzv. linker, který zajišťuje reverzní navázání peptidu. Nejčastěji používaným nosičem je sesíťovaný polystyren s 1-2% divinylbenzenu ve formě kuliček s průměrem okolo

50 mikronů.<sup>176–178</sup> Komerčně dostupný sesíťovaný polystyren je k dostání ve dvou hrubostech, 200-400 mesh (35–75 mikronů) a 100-200 mesh (75-150 mikronů). Mezi další používané nosiče patří polyetylen glykol (PEG)<sup>179</sup>, polyetylen glykol-polystyren (PEG-PS) ve formě hřebenového polymeru<sup>180</sup>, polyamid<sup>181–183</sup>, kopolymer polyetylen glycol-akrylamidu (PEGA)<sup>184</sup> nebo polyetylen-polystyrenový film (PE-PS).<sup>156,185</sup>

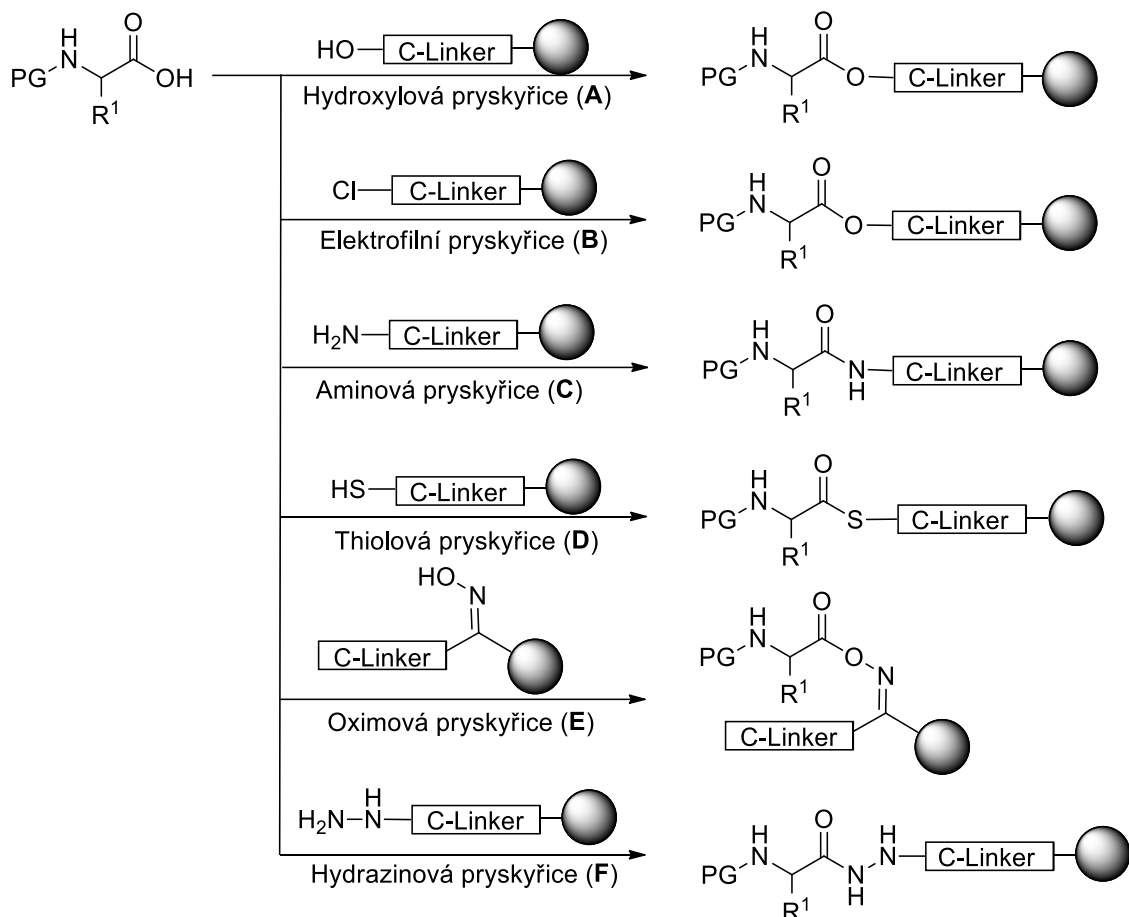
Aktivní místa pro navázání první aminokyseliny se nacházejí většinou uvnitř zrna nosiče, proto je důležité, aby byl polymer schopný co nejvíce nabotnat ve zvoleném rozpouštědle. Míra nabotnání je pro kinetiku syntézy peptidů na pevné fázi zásadní, protože difuze je rychlost určujícím krokem reakce. Botnání spočívá v pronikání molekul rozpouštědla mezi jednotlivá sesíťovaná vlákna pryskyřice, která se tímto od sebe vzdalují a zvětšují vstupní kanály pro difuzi reaktantů a činidel. Sesíťovaný polystyren je nerozpustný ve všech běžně dostupných rozpouštědlech krom aprotických rozpouštědel jako dichlorometan (DCM), *N,N*-dimethylformamid (DMF) a tetrahydrofuran (THF).<sup>186</sup>

Dobrý linker by měl krom pevné imobilizace kotvící aminokyseliny v průběhu reakce zároveň poskytnout i spolehlivé vyvázání již hotového peptidu s dobrým výtěžkem a bez výrazných vedlejších produktů.<sup>187</sup> Linkery je možné dělit do několika kategorií, například podle způsobu navázání první aminokyseliny k linkeru. Může jít o navázání přes *C*-konec (peptid se buduje od *C*- k *N*-konci), přes *N*-konec (peptid se buduje od *N*- k *C*-konci), přes boční řetězec (pokud má aminokyselina v bočním řetězci použitelnou funkční skupinu) nebo přímo navázáním linkeru na dusíkový atom peptidové vazby, viz **Obrázek 14** převzatý z literatury. Dalším kritériem dělení linkerů je způsob vyvázání hotového peptidu z nosiče. Linkery je možné dělit na fotolytické, kyselé, bazické nebo vhodné pro atak nukleofilní substitucí.<sup>156</sup>

**a - aminokyselina ukotvená C-koncem****b - aminokyselina ukotvená N-koncem****c - aminokyselina ukotvená postranním koncem****d - aminokyselina ukotvená přes hlavní řetězec****Obrázek 14:** Možnosti imobilizace první aminokyseliny**- Imobilizace první aminokyseliny přes C-konec**

Výstavba peptidu od C- k N- konci je originální ideou navrženou již v původní Merrifieldově práci. V současnosti jde o dominantní a nejvíce používanou strategii schematicky znázorněnou viz **Obrázek 14a**. N-Chráněná aminokyselina je na nosič navázána karboxylovou skupinou ve formě esteru (**Obrázek 15** převzatý z literatury) reakcí s hydroxylovou (**A**) nebo elektrofilní pryskyřicí (**B**), amidu reakcí s aminovou pryskyřicí (**C**), thioesteru reakcí s thiolovou pryskyřicí (**D**), O-substituovaného oximu reakcí s pryskyřicí nesoucí oximovou skupinu (**E**) nebo hydrazidu reakcí s pryskyřicí s hydrazinovou skupinou (**F**). Po navázání první aminokyseliny začíná vlastní syntéza.<sup>156</sup>



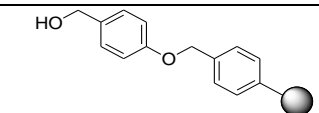
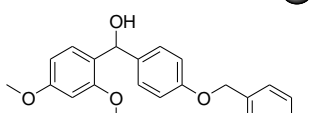
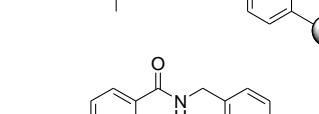
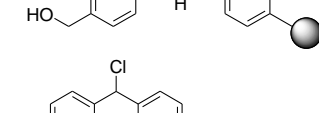
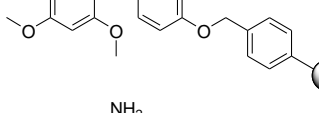
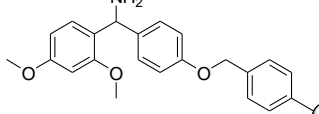


**Obrázek 15:** Způsoby ukotvení aminokyseliny C-koncem

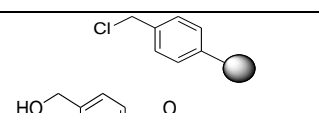
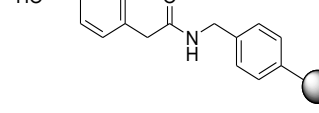
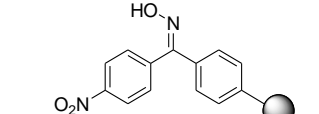
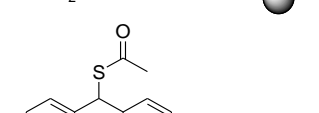
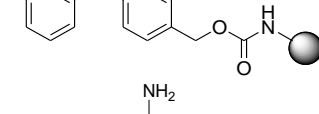
**Tabulka 1** uvádí stručný výběr linkerů a pryskyřic běžně používaných při výstavbě peptidu od C- k N-konci dle Fmoc/*t*-Bu nebo Boc/Bzl strategií. Detailnější přehled dalších linkerů je uveden ve zdrojové literatuře.<sup>156</sup>

Tabulka 1: Vybrané linkery/pryskyřice využívané pro C-immobilizaci při Fmoc a Boc metodě

## Linkery/pryskyřice pro C-immobilizaci při Fmoc metodě

Název	Vzorec	Typ	Vazba	C-konec po vyvázání	Ref.
Wangova pryskyřice		Hydroxy	Ester	Karbox. skup.	188
Rinkova kyselinová pryskyřice		Hydroxy	Ester	Karbox. skup.	189
HMBA pryskyřice		Hydroxy	Ester	Hydrazid, amid, ester, karbox. skup. nebo alkohol	182
Rinkova chloridová pryskyřice		Elektrofil.	Různé	Sulfonamid, amid, amin, thiol, alkohol nebo karboxy. skup.	190
Rinkova amidová pryskyřice		Benzhydryl amin	Amid	Amid	189
Fenylhydrazinová pryskyřice		Hydrazin	Hydrazid	Karboxy., ester, amid nebo thioester	191

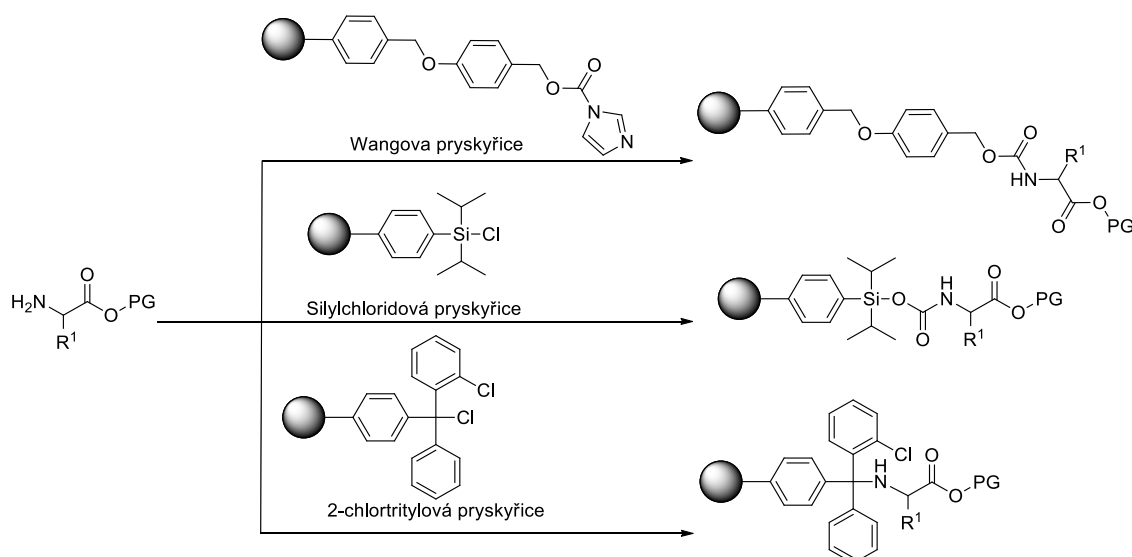
## Linkery/pryskyřice pro C-immobilizaci při Boc metodě

Název	Vzorec	Typ	Vazba	C-konec po vyvázání	Ref.
Merrifieldova pryskyřice		Elektrofilní	Ester	Karbox. skup.	144
PAM pryskyřice		Hydroxy	Ester	Karbox. skup.	192
Kaiserova oximová pryskyřice		Benzofenon oxim	Acyl oxim	Hydrazid / ester	193
MBPA pryskyřice		Thiol	Thioester	Thiokyselina	194,195
BHA		Benzhydryl amin	Amid	Amid	196

HMBA - 4-hydroxylmethylbenzoylaminometyl, PAM - 4-hydroxylmethylfenylacetamidometyl, MBPA - 4-[ $\alpha$ -(S-acetyl) merkaptobenzyl] fenoxiacetyl aminometyl, BHA - benzhydrylamin

### - Imobilizace první aminokyseliny přes *N*-konec

Obráceným (inverzním, reverzním) způsobem přípravy peptidů na pevné fázi je označován postup, kdy je *O*-chráněná aminokyselina navázána svojí amino skupinou na nosič a výstavba molekuly postupuje od *N*- k *C*-konci, viz **Obrázek 14b**. Strategie byla popsána záhy po původní Merrifieldově publikaci<sup>197,198</sup>, avšak není tak rozšířená a používána zejména kvůli vysokému riziku racemizace v důsledku tvorby oxazolonu.<sup>199</sup> Další rizikovou vedlejší reakcí je vznik diketopiperazinu. Pryskyřice použitelné pro tuto metodu jsou Wangova imidazolid karbamátová pryskyřice, která váže *O*-chráněnou aminokyselinu ve formě karbamátu<sup>200</sup>, silylchloridová pryskyřice, která tvoří silylkarbamát<sup>201</sup> a 2-chlorotrytylová pryskyřice, která tvoří amin, viz **Obrázek 16** převzány z literatury.<sup>156,202</sup>



**Obrázek 16:** Způsoby ukotvení aminokyseliny *N*-koncem

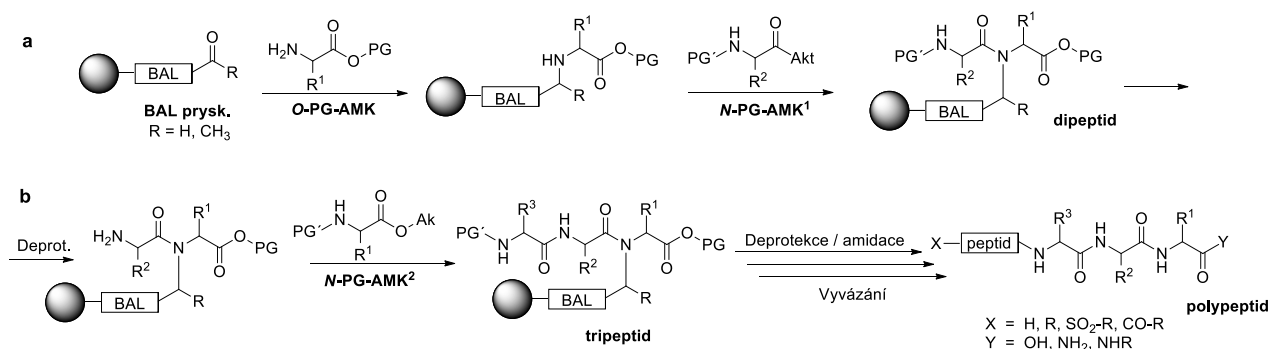
### - Imobilizace první aminokyseliny přes boční řetězec

Tato metoda ukotvení první aminokyseliny je použitelná pouze v případech, že daná aminokyselina má v postranním řetězci vhodnou funkční skupinu, viz **Obrázek 14c**. Vhodné aminokyseliny jsou následující: Asp, Glu (karboxylová skupina), Hyp, Ser, Tyr, Thr, (hydroxylová skupina), His, Orn, Trp, Lys (amino skupina), Cys (sulfanylová skupina), Arg (guanidinová skupina). Tento způsob imobilizace umožňuje vystavět peptid oběma strategiemi (od *C*- k *N*-konci nebo opačně).<sup>156,203</sup>

- **Imobilizace první aminokyseliny přes hlavní řetězec**

Smysl BAL (Backbone Amide Linker) metody je v ukotvení první *O*-chráněné aminokyseliny přes dusík aminoskupiny na linker, viz **Obrázek 14d**. Je zajímavé porovnat tuto metodu s ukotvením přes *N*-konec. Ačkoliv pracují obě metody s navázáním peptidu přes atom dusíku první aminokyseliny, v metodě BAL ukotvení je peptidový řetězec budován ve směru od *C*- k *N*-konci stejně jako při ukotvení první aminokyseliny na *C*-konci, což je metoda jen málo ohrožená nežádoucími bočními reakcemi jak je tomu u inverzní metody budování peptidu od *N*- k *C*-konci. Hlavními složkami linkerů používaných pro BAL metodu jsou acetofenon, fotosenzitivní aldehydové linkery, thiofen, benzaldehyd, naftalen nebo indol.<sup>156,204–209</sup>

**Obrázek 17**, převzatý z literatury, uvádí syntézu peptidu za použití BAL strategie obnášející nejprve navázání *O*-chráněné aminokyseliny (***O*-PG-AMK**) na BAL pryskyřici ve smyslu redukční aminace primární aminoskupiny kyseliny s karbonylovou skupinou pryskyřice za vzniku sekundárního aminu, který je následně acylován aktivovanou *N*-chráněnou aminokyselinou (***N*-PG-AMK<sup>1</sup>**) na dipeptid (**Obrázek 17a**). Následuje deprotektace aminoskupiny a reakce s další *N*-chráněnou aminokyselinou (***N*-PG-AMK<sup>2</sup>**) na tripeptid. Proces se opakuje do dosažení požadované délky řetězce, po které následuje vyvázání na volný polypeptid (**Obrázek 17b**). V závislosti na způsobu odtranění skupiny chránící *C*-konec je na něm možné získat hydroxylovou nebo amidovou skupinu. BAL strategie je podrobně rozpracována v citovaném review.<sup>156,210</sup>

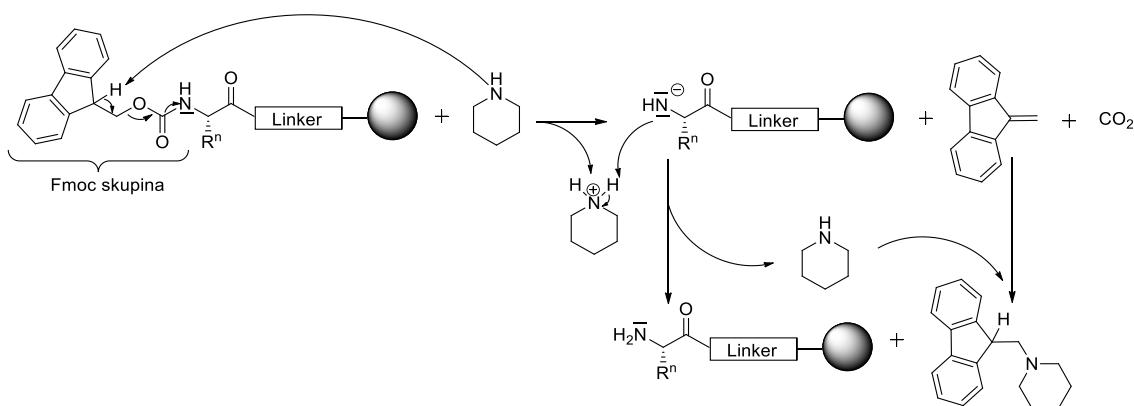


**Obrázek 17:** Syntéza peptidu strategií BAL (Backbone Amide Linker)

### 1.3.5.2 Ochrana hlavních a vedlejších funkčních skupin

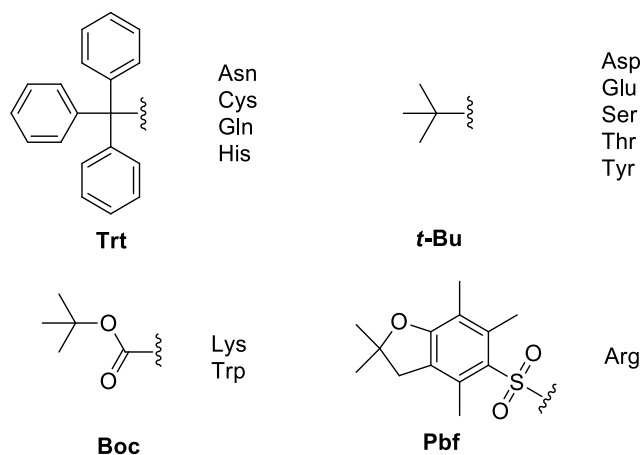
Pro vlastní syntézu a výstavbu peptidového řetězce existují dvě strategie, co se použitých ochranných skupin týče. Původní metoda popsaná Merrifieldem využívá k dočasné ochraně  $\alpha$ -amino skupiny *tert*-butyloxykarbonyl (Boc) a k ochraně aminoskupin ve vedlejších řetězci benzylovou skupinu (Bn). Odstranění Boc je prováděno kyselinou triflourooctovou (TFA) po každé amidaci za účelem uvolnění aminoskupiny pro napojení další aminoskupiny. Acidolýza s TFA probíhá sice rychle, avšak může ohrožovat některé citlivé vazby ve vedlejších řetězcích a vede ke vzniku nežádoucích vedlejších produktů. Deprotekce aminoskupin v bočních řetězcích je prováděna kyselinou fluorovodíkovou (HF) stejně jako vyvázání celého peptidu z linkeru. Nevýhodou tohoto postupu je krom nutnosti při posledním kroku pracovat ve speciálním teflonovém zařízení z důvodu vlastností HF i riziko pro citlivé peptidové sekvence, které působení HF nemusejí vydržet.  $t\text{-Bu}^+$  může po odštěpení navíc reagovat s nukleofilními skupinami v postranním řetězci Trp, Tyr, Met nebo His.

Modernější metodou vyvinutou na základě slabin strategie Boc/Bn je strategie Fmoc/*t*-Bu, kdy je dočasná ochrana  $\alpha$ -amino skupiny zajištěna 9-fluorenylmetoxykarbonylovou skupinou (Fmoc) a ochrana aminoskupin ve vedlejších řetězcích pomocí *tert*-butyl skupiny (*t*-Bu). Fmoc/*t*-Bu strategie je v současnosti přednostně používána jak pro průmyslové, tak pro laboratorní účely. Pro odstranění Fmoc skupiny postačují mírně bazické podmínky.<sup>211,212</sup> Mechanismus deprotekce s využitím piperidinu uvádí **Schéma 24**. Fmoc skupina je výhodná pro syntézu na pevné fázi, avšak při využití k syntéze v roztoku je krajně nevhodná zejména kvůli reakci dibenzofulvenu s ochráněnou amino skupinou.<sup>213</sup>



**Schéma 24:** Deprotekce Fmoc v bazickém prostředí

Aminokyseliny je možné rozdělit do tří skupin podle nutnosti ochrany skupin v jejich vedlejších řetězcích. První skupinou jsou aminokyseliny, kde ochrana není nutná: Ala, Gly, Ile, Leu, Met, Phe, Pro a Val. Druhou skupinou jsou aminokyseliny, kde je ochrana doporučena: Asn, Gln, His a Trp. Třetí skupinou jsou aminokyseliny, kde je ochrana nezbytná: Arg, Asp, Cys, Glu, Lys, Ser, Thr a Tyr. Ochranu postranních řetězců je nutné volit vhodně a v souladu se zvolenou strategií, resp. dočasnou ochrannou skupinou, viz **Obrázek 18**.<sup>138,156</sup>



bez PG: Ala, Gly, Ile, Leu, Met, Phe, Pro, Val

**Obrázek 18:** Ochranné skupiny pro postranní řetězec aminokyselin

### 1.3.5.3 Technické zařízení SPPS a automatizace

Hlavním cílem SPPS bylo urychlit, zlevnit a zejména umožnit automatizaci syntézy peptidů.<sup>214,215</sup> V roce 1985 byla popsána první paralelní syntéza rozdílných peptidů na polystyrenových kuličkách, které byly umístěny v balíčcích z polypropylenové síťoviny. Každý peptid byl umístěn ve vlastním „čajovém sáčku“. Amidace byla prováděna odděleně, ale deprotektce ochranných skupin a promývání byly prováděny pro všechny peptidy společně, což šetřilo čas, materiál a vedlo ke snížení množství odpadních rozpouštědel. Po vybudování peptidů o požadované délce byly z nosiče uvolněny samostatně.<sup>216,217</sup>

Merrifieldovou vizí bylo ale vytvoření automatického stroje, který by byl schopný skrz systém trubic dávkovat, mísit a filtrovat roztoky. Přístroj měl být osazen jednou hlavní reakční nádobou, pumpami a zásobníky s rozpouštědly, aminokyselinami a činidly, a měl být schopen vést syntézu zadaného peptidu. V roce 1965 byla popsána první zařízení tohoto typu.<sup>214</sup> Technologické pokroky, vývoj nových nosičů, linkerů, účinných amidačních činidel a Fmoc protokolů SPPS vedly od 70. let do současnosti

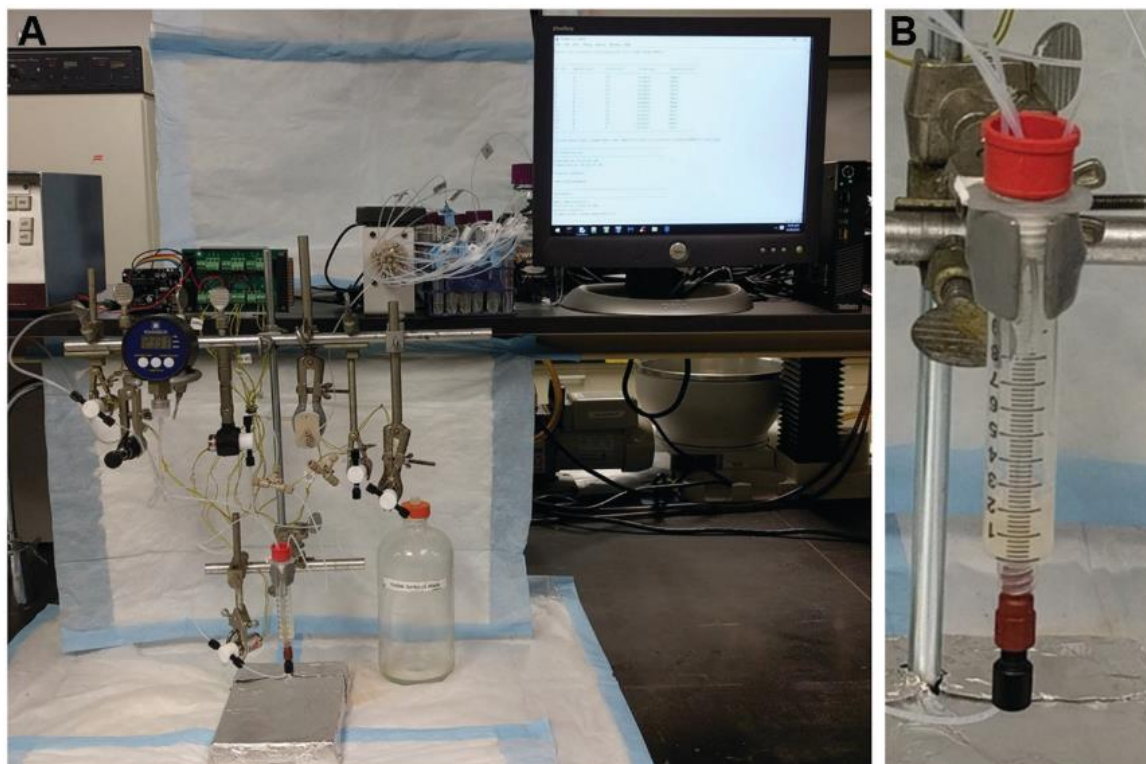
k významnému technologickému skoku.<sup>181,218</sup> V současnosti nabízí automaty pro syntézu peptidů na pevné fázi přes 15 firem.

Přístroje pro automatizovanou syntézu peptidů se liší zejména uspořádáním systému pro dávkování roztoků, způsobem mísení a reakční celou (klasicky míchaná reakční nádoba/statický směšovač), kapacitou výroby peptidů co do množství i možnosti paralelních syntéz, mikrovlnnou iniciací, systémem monitorujícím průběh reakce (chromofory<sup>219</sup>, vodivost<sup>220</sup>), možností použít inertní atmosféry nebo automatickým vyvázáním peptidu z nosiče.<sup>221</sup> Přístroj může pro dělení používat filtraci při sníženém/zvýšeném tlaku nebo centrifugu, může pracovat vsádkově nebo kontinuálně.<sup>222,223</sup> Podrobný přehled dostupných přístrojů pro plně automatizovanou Fmoc-SPPS je uveden v Pedersenově a Jensenově review.<sup>224</sup> Výběr přístroje by měl být podřízen délce plánovaného peptidu, jeho aplikaci a předpokládanému objemu výroby. Pro přípravu delších a složitějších peptidů byla v roce 1992 za účelem zkrácení reakční doby, omezení vedlejších reakcí, nežádoucí agregace a racemizace otestována mikrovlnná iniciace reakční směsi. Mikrovlny jsou schopné dodat molekulám s dipólmomentem potřebnou energii pro řádové urychlení reakce. Míra zahřátí reakční směsi je ovlivněna rozpouštědly, činidly, pracovními objemy a způsobem míchání a musí být přizpůsobena individuálně každé syntéze. V současnosti je mikrovlnný modul standardní součástí peptidových syntézátorů.<sup>225–228</sup>

**Obrázek 19:** SPPS automat Liberty Blue™ firmy CEM (vlevo), SYMPHONY® firmy Gyros Protein Technologies (vpravo)



Kromě komerčně dodávaných syntetických automatů, jejichž pořizovací náklady se pohybují nad \$ 30 000, existují i levnější varianty. Gali ve svém článku dává k dispozici návod na sestavení a používání open-source stavebnice peptidového syntezátoru PepSy, který je možné sestavit vlastními silami z komponentů dostupných na internetu s náklady pod \$ 4 000. Operační program je vytvořen v jazyce Python a v základní verzi umožňuje ovládat přístroj pomocí sady základních úkonů (botnění nosiče, proplach nosiče, jednoduchá/dvojitá amidace, Fmoc deprotektce, čištění dávkovacích tras apod.) potřebných k úspěšné syntéze peptidů do délky 30 aminokyselin v menších množstvích (do 0,1 mmol) dle Fmoc strategie. Jako reakční cela slouží 10ml injekční stříkačka, jako základní deska je používána Arduino UNO. Publikace obsahuje kromě schématu elektronického zapojení a diagramu znázorňující toky roztoků také seznam komponent včetně dodavatelů a katalogových čísel součástek. K sestavení a používání PepSy postačují základní znalosti programování a přirozená zručnost operátora.<sup>229</sup>



**Obrázek 20:** A Sestavený přístroj PepSy; B Detail reakční cely.



### 1.3.6 Chiralita a racemizace v peptidové chemii

Syntetické peptidy získávají na důležitosti pro své farmaceutické a biologické aplikace. S rozvojem syntézy peptidů na pevné fázi, jejíž základy položil Merrifield začátkem 70. let, došlo k nárůstu jak délky, tak i objemu naráz připravovaných peptidů. Nejčastěji se objevující nečistotou při SPPS jsou peptidy postrádající jednu nebo více aminokyselin z důvodu nedokonale vedené amidace nebo produkty nežádoucích reakcí v postranním řetězci. Racemizace aminokyselin je dalším často popisovaným problémem, který je v porovnání s předešlými obtížněji detekovatelný. Racemizace aminokyselin probíhá jak při syntéze v roztoku, tak i při syntéze na pevné fázi. Nejčastěji k ní dochází při aktivaci karboxylové kyseliny nebo při samotné amidaci. Deptorekce a vyvázání peptidu z nošice může také způsobovat racemizaci. Racemizaci je možné do značné míry omezit vhodnou volbou aktivačních činidel, zkrácením aktivačního kroku nebo změnou rozpouštědla.<sup>230-233</sup> Pro odhalení a určení míry racemizace byla navržena řada metod, například Weygandův test je založen na separaci diastomerů peptidu Val-Phe za využití plynové chromatografie a pracuje s detekčním limitem 0,1-1 %.<sup>234</sup> Andersonova metoda spočívá ve frakční krystalizaci peptidu Gly-Phe-Gly. Provedení testu není jednoduché a detekční limit je příliš vysoký (1-2 %).<sup>235</sup> Dalším způsobem určení enantiomerní čistoty je kyselá hydrolyza peptidu, derivatizace uvolněných aminokyselin a následná analýza plynovou chromatografií s chirální stacionární fází (např. Chirasil-Val).<sup>231,236</sup> Dalším metodám zjišťování racemizace u peptidů se podrobně věnuje následující kapitola.

#### Polarimetrie

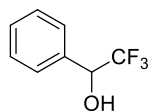
Využití polarimetrie pro změření optické otáčivosti peptidu nevede k objasnění, zda, do jaké míry a na které aminokyselině došlo k racemizaci. Výsledkem je pouze číslo, které je bez přesné znalosti optických otáčivostí všech ostatních izomerů ( $2^n$ , kde  $n$  je počet opticky aktivních center v molekule peptidu) bez vypovídající hodnoty.

#### NMR

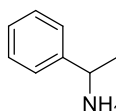
Vodíkové atomy na prochirálních centrech (např. methylenové skupiny ve fenylyalaninu) mohou být enantiotopické nebo diastereotopické. Pro jejich rozlišení jsou postupně oba pomyslně nahrazeny skupinou X. Pokud jsou vzniklé molekuly diastereoizomery, jsou oba vodíkové atomy diastereotopické a mohou v  $^1\text{H}$  NMR spektroskopii rezonovat odlišnými frekvencemi a dávat tak signály s odlišným chemickým posunem (např. vodíky methylenové skupiny v  $\beta$ -pozici

v aminokyselinách). Zda jsou tyto odlišné signály pozorovány, závisí na vzdálenosti od nejbližšího chirálního centra. Pokud pomyslnou substitucí vzniknou enantiomery, vodíkové atomy jsou nazývány enantiotopickými. Enantiomerní molekuly se od sebe navzájem nijak neliší fyzikálními vlastnostmi do té doby, než jsou umístěna do chirálního prostředí. To může být zprostředkováno v chirálních rozpouštědlech (2,2,2-trifluoro-1-fenylethanol, 1-fenylethylamin). Protože tato rozpouštědla nejsou deuterovaná, je třeba k měřenému vzorku přidat další činidla pro nakalibrování spektra na deuterium. Druhou možností měření enantiomerních molekul je jejich reakce s chirálními derivatizačními činidly, která do měřené molekuly zavedou druhé chirální centrum, čímž dojde k vzniku diastereoizomerních komplexů (lanthanoidová chirální činidla – např. EuFOD - europium tris[6,6,7,7,8,8,8-heptafluoro-2,2-di(methyl- $d_3$ )-3,5-oktanedion-1,1,1- $d_3$ -ato- $\kappa O, \kappa O'$ ], Pirkleho činidlo - 1-antracen-9-yl-2,2,2-trifluoroethanol) nebo kovalentních sloučenin (Mosherovo činidlo).<sup>237–241</sup> Původní Mosherova kyselina je v současnosti nahrazována chloridem Mosherovy kyseliny z důvodu rychlejší reakce se sekundárními alkoholy a aminy. Diastereoizomery jsou již pro klasické  $^1\text{H}$  NMR měření v nechirálním prostředí rozlišitelné. Míru racemizace je možné určit z poměru rozdílných intenzit charakteristických signálů.

#### Chirální rozpouštědla

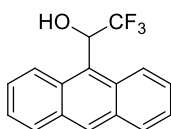


2,2,2-trifluoro-1-fenylethanol

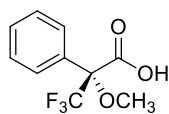


1-fenylethylamin

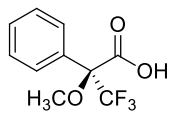
#### Chirální činidla



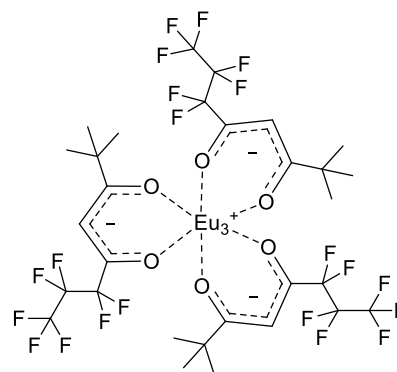
Pirkleho činidlo



(R) - Mosherova kyselina



(S) - Mosherova kyselina



EuFOD

**Obrázek 21:** Chirální rozpouštědla a činidla

V případě syntézy peptidů je situace složitější. Molekula již obsahuje řadu chirálních center, použití chirálních rozpouštědel a činidel tak není zapotřebí. S nárůstem počtu aminokyselin v peptidovém řetězci je spolehlivá analýza obtížná z důvodu splývání jednotlivých signálů. Spolehlivou metodou je  $^1\text{H}$  NMR spektroskopie v případě, že krátké *N*-acetyl di- a tripeptidy obsahují Ala nebo Phe. Methyllová skupina těchto aminokyselin má v jednotlivých diastereomerech jiný chemický posun v  $^1\text{H}$  NMR

spektru. Z poměru intenzit těchto signálů je pak možné odvodit poměrné zastoupení jednotlivých diasteromerů. Rozdílný chemický posun mají také signály methoxy skupin v případě, že C-konec peptidu je ve formě methylesteru.<sup>241–245</sup> Rozdíl mezi chemickými posuny jednotlivých izomerů je větší v případě, že se v molekule nachází objemné aromatické substituenty (Tyr, Phe). Důvodem je stínění, které tyto aromatické motivy poskytují. Upravená metodika měření <sup>1</sup>H NMR (<sup>1</sup>H iterative Full Spin Analysis - HiFSA) se ukázala jako velmi praktický nástroj pro sekvencování peptidů a identifikaci i drobných nečistot.<sup>246</sup> Zmínky o jejich využití pro určení optické čistoty peptidů a bílkovin nebyly zjištěny.

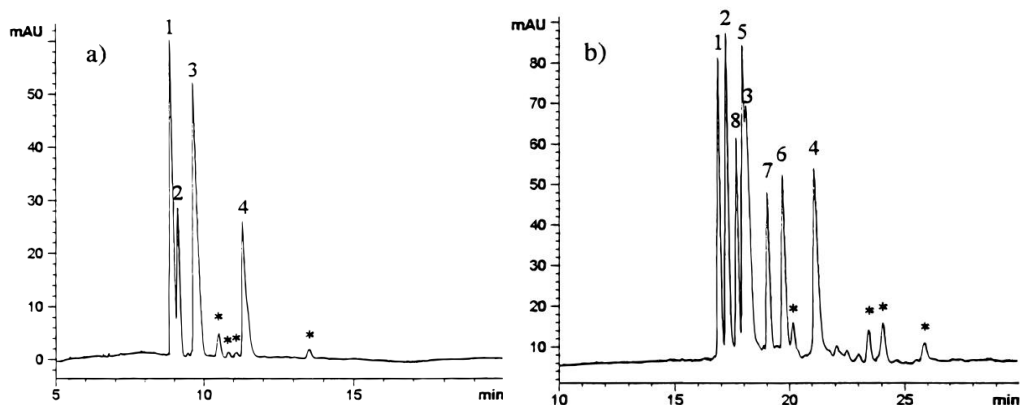
### HPLC

Chromatografie (HPLC) na reverzní fázi je časem prověřená metoda, která se ukázala jako vhodná pro analýzu krátkých peptidů. V literatuře jsou popsány studie, kdy jsou od sebe oddělovány jednotlivé izomery di- a tripeptidů. V případě tripeptidů jde o izolaci až 8 možných izomerů ( $2^n$ , kde  $n$  je počet opticky aktivních center v molekule peptidu) Optimalizace vhodných separačních podmínek jako pH pracovního pufru nebo výběr vhodného typu kolony (reverzní fáze osazená crown ethery, cyklodextriny nebo jinými chirálními činidly) je velmi složitý a zdlouhavý proces, ale výsledky jsou příznivé a potvrzují použitelnost metody.<sup>247–256</sup> Delší peptidy je pro zkoumání míry jejich racemizace nutné kyselé hydrolyzovat v deuterované kyselině chlorovodíkové a octové, následované derivatizací Marfeyho činidlem (1-fluoro-2,4-dinitrofenyl-5-L-alanin amid). Poté je směs rozdělena a analyzována na koloně s reverzní fází na HPLC s ionizací elektrosprejem a hmotnostní detekcí.<sup>257</sup> HPLC je v současnosti nejvhodnější metodou, kterou je možné analyzovat složení peptidů. Při studiu racemizace delších peptidů ale neposkytuje potřebné informace.

### Kapilární elektroforéza

Mezi nedestruktivní metody separace jednotlivých stereoizomerů peptidů patří kapilární elektroforéza. Vědecká skupina profesora Kuhna se ve svých publikacích věnovala syntéze, studiu racemizace a separaci všech přítomných izomerů tripeptidu D-Tyr-L-Lys-L-Trp (DLL), jehož čistota je analyzována právě pomocí kapilární elektroforézy. Metoda byla optimalizována do takové míry, že již při jednom provedení separace (10-15 minut) bylo možné rozdělit 6 z 8 stereizomerů zkoumaného tripeptidu. Metoda je krom jiných parametrů velmi citlivá na pH pracovního pufru, kdy i rozdíl 0,5 pH může mít za následek prodloužení elučního času jednotlivých izomerů o 30-50 %.<sup>231,258,259</sup> SPPS byla provedena za použití Fmoc strategie ochrany na

(*p*-benzyloxy)benzyl alkoholové pryskyřici (Wangova pryskyřice, viz **Tabulka 1**) v DMF. Postranní řetězce aminokyselin byly chráněny skupinou *t*-Bu (tyrosin) a Boc (lysin, L-tryptofan). Deprotekce Fmoc skupiny byla prováděna dvakrát piperidinem (40% v DMF) po dobu 3 a 12 minut následované sedmi promytími čistým DMF. Jako amidační činidlo byl použit DIC a HOBt v pětinásobném přebytku na aminokyselinami pro zajištění co největší konverze během 50 minutového amidačního stupně. Vyvázání hotového tripeptidu z pryskyřice bylo provedeno zároveň s deprotekcí chránících skupin vedlejších řetězců za použití trifluoroctové kyseliny s 5 % scavengeru (thioanisol/1,2-ethandithiol/fenol, 10:5:15, obj./obj./hm.). Za účelem separace tripeptidu Tyr-Lys-Trp byla zvolena jako chirální selektor kyselinou 18-crown-6-tetrakarboxylovou (18C6H4, CAS: 61696-54-6). Crown ethery jsou makrocyclické molekuly, jejichž středová kavita je schopná tvořit komplexy s draslíkem, amoniovým kationtem a protonovaným primárním aminem. V kapilární elektroforéze je kyselina 18C6H4 přidána do pracovního pufru, kde s protonovanými aminoskupinami aminokyselin vytvoří komplexy. Sekundární nebo terciární aminy ani jiné funkční skupiny neposkytují s 18C6H4 komplex dostatečné stability potřebné pro úspěšné chirální rozdělení. **Obrázek 22** převzatý z literatury znázorňuje eluční diagramy tripeptidu Tyr-Lys-Trp bez (**a**) a za použití crownetheru 18C6H4 (**b**) při pH 2,0. Izomery 3 a 5 se ani za pokročilých úprav separačních podmínek nepodařilo rozdělit a na diagramu **b**) jsou eluovány společně.<sup>231</sup> Obdobná separace izomerů tripeptidu (DL-Ala-DL-Ala-DL-Ala) za využití HPLC a crownetherů je popsána v pracích Esquivela et. al.<sup>255</sup>



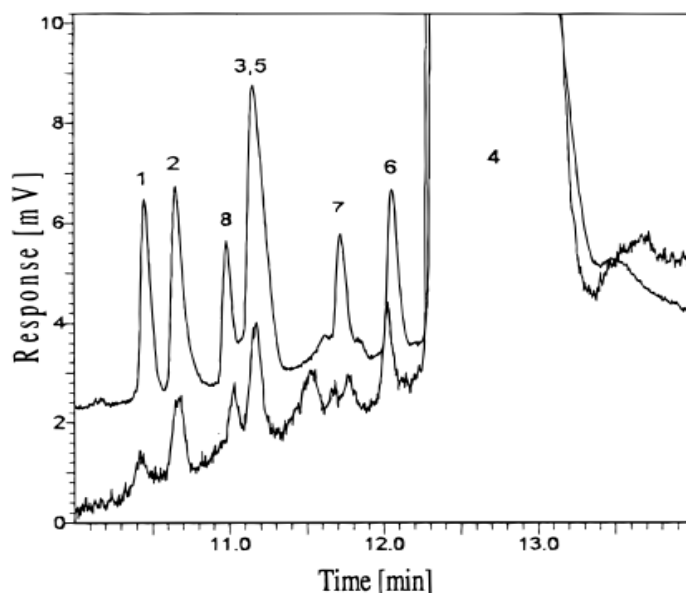
**Obrázek 22:** Eluční diagram tripeptidu Tyr-Lys-Trp při pH 2,0: **a)** bez, **b)** s 18C6H4.

**a)** píky (1) LLL/DDD; (2) LDL/DLD; (3) LLD/DDL; (4) DLL/LDD.

**b)** píky (1) LLL; (2) LLD; (3) LDL; (4) DLL; (5) DDL; (6) DLD; (7) LDD; (8) DDD.

Hvězdičkou jsou označeny vejší reakční produkty.

**Obrázek 23** převzatý z literatury zobrazuje záznam separace surového modelového tripeptidu D-Tyr-L-Lys-L-Trp připraveného výše zmíněnou metodou SPPS za přítomnosti HOBt za účelem snížení racemizace. Spodní linie zobrazuje surovou reakční směs, horní linie zobrazuje reakční směs obohacenou o 1 % od každého stereoisomeru pro názornější identifikaci jednotlivých píků. Během SPPS syntézy dochází i přes použití HOBt k částečné racemizaci, avšak celkový podíl nežádoucích izomerů je 1,2 % oproti 98,8 % modelového tripeptidu D-Tyr-L-Lys-L-Trp. Pro podrobnosti o zastoupení jednotlivých izomerů viz **Tabulka 2**. Tři malé píky (migrační časy 11,5; 11,75 a 13,5 min) nebyly identifikovány.<sup>231</sup>



**Obrázek 23:** Separace surového tripeptidu D-Tyr-L-Lys-L-Trp

**Tabulka 2:** Zastoupení stereoizomerů v surovém produktu<sup>a</sup> Izomery 3 a 5 byly eluovány společně. Zastoupení 0,38 je tak suma obou izomerů.<sup>231</sup>

Číslo	Izomer	Zastoupení (%)
1	LLL	0,05-0,2
2	LLD	0,31
3	LDL	0,38 <sup>a</sup>
4	DLL	98,8
5	DDL	0,38 <sup>a</sup>
6	DLD	0,35
7	LDD	0,0
8	DDD	0,2

Výhodami kapilární elektroforézy jsou minimální množství vzorku potřebného k provedení analýzy, možnost oddělovat diastereoizomery a enantiomery bez další potřebné derivatizace, vysoká citlivost metody (detekční limit 0,05 %), jednoduchost a rychlost provedení.

HPLC a kapilární elektroforéza zastávají při dělení peptidů nezastupitelné role. O volbě nejvhodnější metody rozhoduje účel jejich zamýšleného využití. Pokud jde o preparativní dělení většího množství vzorku, kde nerozhoduje rychlost provedení, je ideální volbou využití HPLC. Pokud je hlavním smyslem provádět rychlá a přesná měření malých množství peptidů, které mají stejnou stavbu a liší se pouze nábojem v řetězci, je ideálním řešením separace využití kapilární elektroforézy.<sup>231,258</sup>

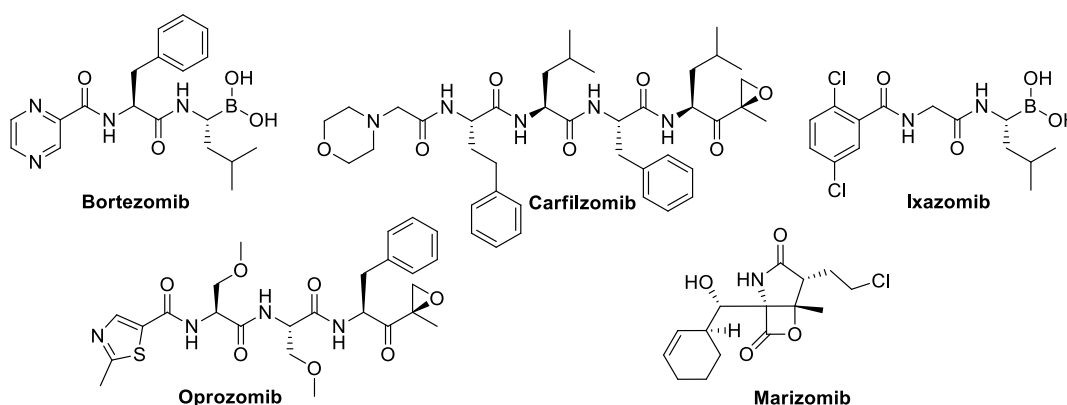
#### 1.4 INHIBICE PROTEASOMU

Inhibice proteasomu v eukaryotických buňkách je perspektivní metodou k léčbě nemocí spočívajících ve zhoubném tkáňovém bujení, například mnohočetného myelomu, leukémie, glioblastomu, karcinomu prostaty, Hodgkingova a Nehodgkingova lymfomu, rakoviny žaludku, vaječníků, plic a kolorektálního karcinomu.<sup>260</sup> Toto tvrzení je potvrzeno skupinou léků, které se za těmito účely již používají. **Tabulka 3** převzatá z publikace Hugria, V. et al. *Hematol. Transfus. Cell. Ther.* **2019**, *41* (1) 76-83 uvádí příklady inhibitorů proteasomu prozatím testovaných nebo již využívaných pro léčbu mnohočetného myelomu spolu s údajem o způsobu jejich podání, reverzibilitě inhibice nebo poločasu rozpadu.<sup>261–266</sup>

**Tabulka 3:** Přehled používaných a testovaných inhibitorů proteasomu pro léčbu mnohočetného myelomu MTD – maximální tolerovaná dávka, rev – reverzibilní, irev – ireverzibilní, IV – intravenózní, SC - subkutánní, OR - orální

Inhibitor	Skupina	Vazba	Podání	Poločas rozpadu (min)	IC <sub>50</sub> β5 (nM)	Maximální proteasomální inhibice při MTD (%)	Fáze testování / rok schválení
Bortezomib / Valcade®	boronát	rev	IV / SC	110	β5>β1>β2	7,9 ± 0,5	III / 2003 267
Carfilzomib / Kyprolis®	epoxyketon	irev	IV	<30	β5>β1/β2	<5	III / 2012 268
Ixazomib / Ninlaro®	boronát	rev	OR	18	β5>β1	3,4	III / 2015
Oprozomib	epoxyketon	irev	OR	30-90	β5	36/82	I/II 269
Marizomib	β-lakton	irev	IV / OR	10-15	β5>β2>β1	3,5 ± 0,3	II/III 270

Ačkoliv byl bortezomib schválen FDA jako léčivo mnohočetného myelomu již v roce 2003, měl jako zástupce první generace inhibitorů proteasomu řadu vedlejších účinků (trombocytopenie, nevolnost, periferní neuropatie), které značně komplikovaly zdravotní stav léčených pacientů. Za účelem překonání popsanych vedlejších účinků byl pro léčbu mnohačetného myelomu vyvinut a v roce 2012 schválen carfilzomib, který oproti bortezomibu přinesl sníženou periferní neurotoxicitu. Nevýhodou carfilzominu byla jeho nízká rozpustnost, která v praxi znamenala nutnost použití 3000 mg sulfobutylether β-cyklodextrinu (SBE-β-CD) jako pomocného rozpouštěcího činidla pro intravenózní podání 60 mg carfilzomibu. Dlouhodobé používání SBE-β-CD zvyšuje riziko selhání ledvin. Z výše zmíněných důvodů je návrh a vývoj nových inhibitorů proteasomu s minimem vedlejších účinků v souladu s potřebami klinické praxe nezbytný.<sup>271</sup>



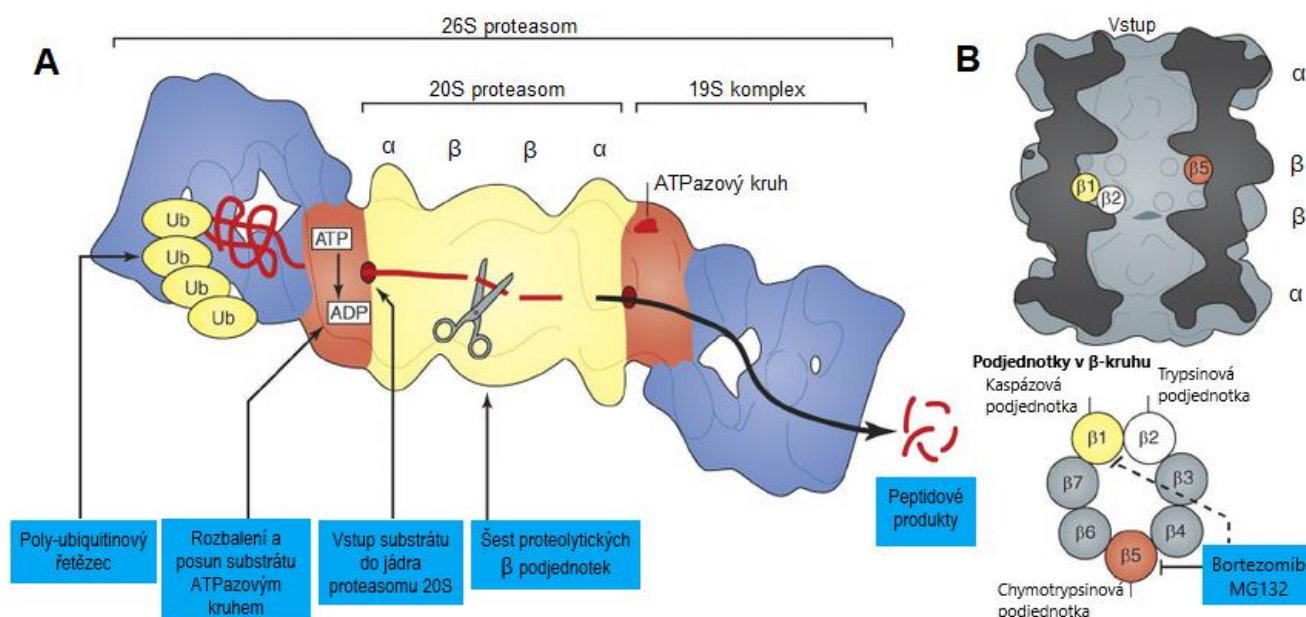
**Obrázek 24:** Přehled používaných a testovaných inhibitorů pro léčbu mnohočetného myelomu

### 1.4.1 Stavba a funkce proteasomu

Proteasom je bílkovinový komplex válcovitého tvaru, jehož hlavní funkcí je degradace nepotřebných proteinů. Proteasom štěpí proteiny, které jsou navázáním několika molekul ubiquitinu označeny jako nepotřebné, nebezpečné nebo chybně syntetizované a tudíž nefunkční. Zejména rakovinné buňky, které nemají zcela funkční mechanismy regulující správnou proteosyntézu, jsou na bezproblémovém fungování proteasomu závislé. Proteiny určené k rozložení představují pro rakovinou buňku vázanou zásobu aminokyselin použitelných k dalšímu fungování. Zablokováním proteasomu vhodným inhibitorem dochází k přerušení proteolýzy, v čehož důsledku se vnitřní prostor buňky zahltí zplodinami, nastane narušení homeostázy a dojde tak ke kolapsu buněčného metabolismu a smrti buňky.<sup>272</sup>

Proteasom (26S) se skládá ze tří částí, ze středové části (20S) a ze dvou regulačních jednotek (19S), které slouží jako vstup, resp. výstup, do středové části. Hlavní funkcí regulační jednotky je rozpoznání, rozvinutí a posunutí ubiquitinem označeného proteinu určeného k rozložení do středové části, kde probíhá vlastní proteolýza. Středová část proteasomu se skládá z dvacetiosmi podjednotek uspořádaných do čtyř na sebe postavených kruhů, dvou vnějších ( $\alpha$ ) a dvou vnitřních ( $\beta$ ). Na vnitřních  $\beta$  kruzích se nachází tři typy proteolyticky aktivních lokalit, tzv. proteázy ( $\beta 1$  – kapsáza,  $\beta 2$  – trypsin,  $\beta 5$  – chymotrypsin), na kterých dochází k samotnému štěpení proteinů. Lokality obsahují proteolyticky aktivní threonin, který nukleofilním atakem své hydroxylové skupiny v postranním řetězci štěpí vstupující rozvinutý protein na oligopeptidy o délce 3-15 aminokyselin, které z proteasomu vystupují a jsou dále hydrolyzovány na jednotlivé aminokyseliny za účasti karboxypeptidáz a oligopeptidáz.<sup>260,273</sup> Nákres proteasomu 26S uvádí **Obrázek 25** převzatý a upravený z literatury.<sup>274</sup>





**Obrázek 25:** Struktura a funkce 26S proteasomu

**A** Struktura a části proteasomu 26S. **B** Umístění proteolyticky aktivních lokalit uvnitř středové části 20S proteasomu. Každá  $\beta$ -podjednotka obsahuje tři typy aktivních míst. MG132 a bortezomib inhibují primárně lokalitu  $\beta 5$ . Ve vyšších koncentracích inhibují také  $\beta 1$ .

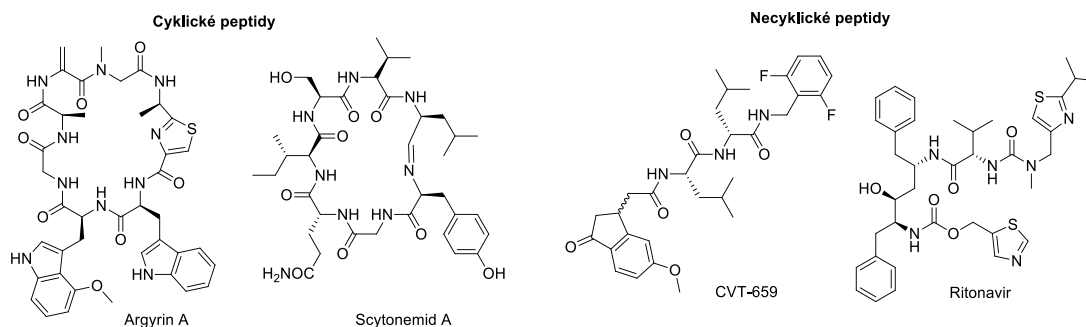
#### 1.4.2 Inhibitory proteasomu

Inhibitory je možné dělit podle potřeby dle různých kritérií. Nejčastěji jsou rozlišovány podle kinetiky inhibice (i/reverzibilní) nebo podle typu vazby, kterou probíhá navázání na proteasomu. Dalším kritériem dělení je syntetický nebo přírodní původ inhibitorů.

##### 1.4.2.1 Nekovalentní inhibitory proteasomu

Nekovalentní inhibitory se vyznačují objemnou strukturou, kde její významnou část tvoří peptidový motiv. Ten je díky přítomnosti peptidových vazeb přirozeně schopný tvořit vodíkové vazby s vnitřní stěnou proteasomu. Vodíkové vazby jsou klíčové pro kvalitní inhibici nejen u nekovalentních, ale také u kovalentních inhibitorů.

**Obrázek 26** uvádí základní přehled jednotlivých tříd nekovalentních inhibitorů na cyklické a necyklické peptidy, z nichž řada je přírodního původu (Argyirin A - myxobakterie *Archangium gephyra*<sup>275</sup>, Scytonemid A a B - sinice *Scytonema hofmanii*).<sup>265,276</sup>



**Obrázek 26:** Příklady nekovalentních inhibitorů proteasomu

**Tabulka 4** převzatá z literatury uvádí příklad nových piperazinových a piperidinových necyklických peptidů, u kterých byla popsána výrazná inhibiční aktivita proteasomu mnohočetného myelomu v porovnání vůči carfilzomibu. 15 sloučenin dosáhlo lepších aktivit než kontrolní vzorek.<sup>277</sup>

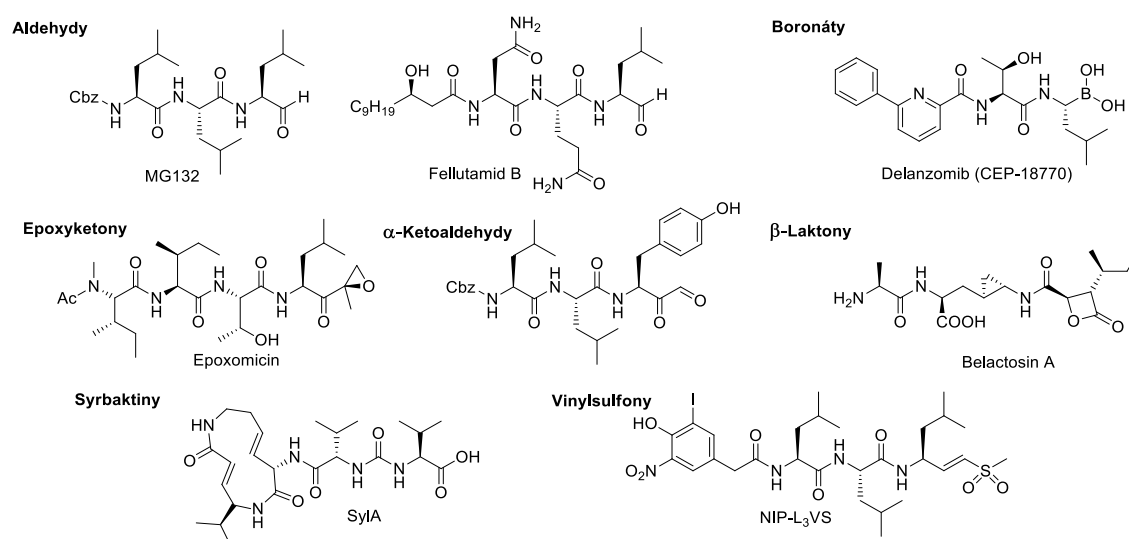
**Tabulka 4:** Přehled nekovalentních inhibitorů proteasomu

R <sup>1</sup>	X/Y/Z	R <sup>2</sup>	R <sup>3</sup>	IC <sub>50</sub> (nM) <sup>a</sup>
pyrazin-2-yl	CO/N/C	fenylethyl	2-chlorofenyl	2,4±0,1
4-fluorofenyl	CO/N/C	fenylethyl	2-chlorofenyl	2,6±0,1
pyrazin-2-yl	CO/N/N	fenylethyl	2-chlorofenyl	5,5±0,2
4-fluorofenyl	CO/N/N	fenylethyl	2-chlorofenyl	3,8±0,5
pyrazin-2-yl	CONH/C/N	Me	2-chlorofenyl	13,3±3,7
pyrazin-2-yl	NHCO/C/N	Me	2-chlorofenyl	19,7±3,9
pyrazin-2-yl	CONH/C/N	iso-butyl	2-chlorofenyl	21,±0,7
pyrazin-2-yl	NHCO/C/N	iso-butyl	2-chlorofenyl	11,6±0,4
pyrazin-2-yl	CONH/C/N	Bn	2-chlorofenyl	41,0±6,9
pyrazin-2-yl	NHCO/C/N	Bn	2-chlorofenyl	18,0±1,4
pyrazin-2-yl	CONH/C/N	fenylethyl	2-chlorofenyl	1,1±0,1
pyrazin-2-yl	NHCO/C/N	fenylethyl	2-chlorofenyl	0,6±0,1
pyrazin-2-yl	CONH/C/N	fenylethyl	2,4-difluorofenyl	10,8±0,6
pyrazin-2-yl	NHCO/C/N	fenylethyl	2,4-difluorofenyl	6,6±1,1
pyrazin-2-yl	CONH/C/N	fenylethyl	benzo[d][1,3]dioxol-5-yl	10,0±0,8
pyrazin-2-yl	NHCO/C/N	fenylethyl	benzo[d][1,3]dioxol-5-yl	2,9±0,5
4-fluorofenyl	CONH/C/N	fenylethyl	2-chlorofenyl	1,2±0,1
4-fluorofenyl	NHCO/C/N	fenylethyl	2-chlorofenyl	1,5±0,3
4-methoxyfenyl	NHCO/C/N	fenylethyl	2-chlorofenyl	25,7±1,8
4-trifluoromethyl fenyl	NHCO/C/N	fenylethyl	2-chlorofenyl	192,5±18,3
pyridin-3-yl	NHCO/C/N	fenylethyl	2-chlorofenyl	0,7±0,1
pyridin-3-yl	NHCO/C/N	fenylethyl	2-chlorofenyl	1,0±0,1
isoxazol-3-yl	NHCO/C/N	fenylethyl	2-chlorofenyl	7,0±1,3
thiazol-2-yl	NHCO/C/N	fenylethyl	2-chlorofenyl	0,9±0,
thiazol-2-yl-methyl	NHCO/C/N	fenylethyl	2-chlorofenyl	1,0±0,1
Carfilzomib				8,4±0,9

<sup>a</sup> Hodnota IC<sub>50</sub> je výsledkem průměru tří nezávislých měření

### 1.4.2.2 Kovalentní inhibitory proteasomu

Druhou, širší a podrobněji zkoumanou skupinou jsou kovalentní inhibitory. K vazbě na vnitřní stěnu proteasomu využívají kromě souběžného efektu tvaru molekuly a vazby vodíkovými můstky také kovalentní spojení elektronakceptorní funkční skupiny inhibitoru, která slouží jako cíl pro nukleofilní atak hydroxylové skupiny threoninové proteolytické podjednotky jádra proteasomu (20S). Mezi nejčastěji popisované a testované funkční skupiny patří aldehydy, boronáty, epoxyketony,  $\alpha$ -ketoaldehydy,  $\beta$ -laktony, vinylsulfony, syrbaktiny nebo  $\alpha$ -ketoamidy. Spolu s inhibitory (Obrázek 24) představují látky uvedené níže (Obrázek 27) zástupce nejdůležitějších skupin kovalentních inhibitorů proteasomu.<sup>265</sup>



Obrázek 27: Přehled kovalentních inhibitorů proteasomu

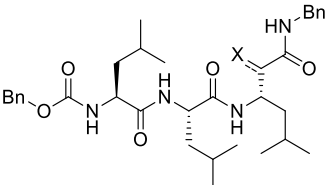
Výzkum kovalentních inhibitorů se souběžně soustředí na tři cíle. Prvním je návrh páteřního peptidového řetězce vhodného složení, který svým tvarem zapadá do vnitřních kavit proteasomu. S rozvojem metod počítačové simulace a s důkladnou znalostí tvaru vnitřního prostoru proteasomu jsou modelové studie návrhů ideálních tvarů molekul nebo ověřovací studie již připravených molekul častou součástí publikací o inhibitech proteasomu.<sup>278,279</sup> Druhým cílem výzkumu kovalentních inhibitorů je vývoj nových funkčních skupin, které se na proteasom váží reverzibilně tak, aby si po zpětném vyvázání zachovaly svou funkčnost a mohly tak v inhibici pokračovat v další nádorové buňce. Třetím je cílení inhibitoru do jedné nebo několika ze tří proteolytických aktivních lokalit ( $\beta$ 1,  $\beta$ 2,  $\beta$ 5) současně za účelem dosažení co nejkvalitnější inhibice. Následuje přehled klasických skupin kovalentních inhibitorů s výběrem perspektivních

sérií molekul publikovaných v posledních třech letech, které prokázaly aktivitu při inhibici proteasomu různých kmenů nádorového bujení.

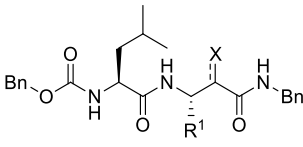
### $\alpha$ -Diketoamidy

Tripeptidové  $\alpha$ -diketoamidy jsou dle studie S. Pacifico, et. al ACS **2019**, *10*, 1086-1092 popsány jako schopné inhibitory proteasomu selektivní zejména na threoninovou podjednotku  $\beta 5$  ( $\beta 5$ :  $IC_{50} = 7$  nM;  $\beta 1$ :  $IC_{50} = 60$   $\mu$ M;  $\beta 2$ :  $IC_{50} > 100$   $\mu$ M). Tripeptidové 1-naftyl  $\alpha$ -diketoamidy jsou schopné inhibovat proliferaci a způsobují apoptózu buněk lidského karcinomu tlustého střeva kmene HCT116. Tripeptidová analoga (**Ja-e**, **Ka-e**) dosahují výrazně vyšších aktivit než dipeptidové varianty (**Ha-f**, **Ia-f**), viz **Tabulka 5** převzatá z literatury.<sup>280</sup>

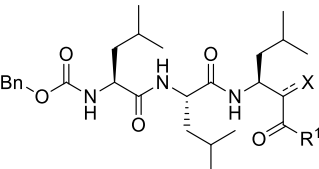
**Tabulka 5:** Přehled  $\alpha$ -diketonamidů s aktivitou vůči karcinomu tlustého střeva HCT116



analoga MG132  
Ga: X = =O  
Gb: X = -OH



dipeptidová analoga  
Ha-f: X = =O  
Ia-f: X = -OH



tripeptidová analoga  
Ja-e: X = =O  
Ka-e: X = -OH

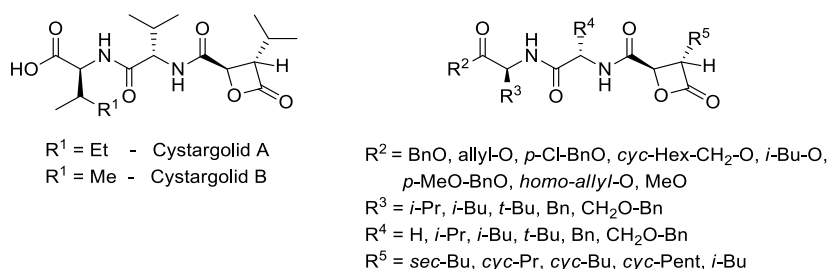
Název	R <sup>1</sup>	IC <sub>50</sub> ( $\mu$ M) – $\beta 1$	IC <sub>50</sub> ( $\mu$ M) – $\beta 2$	IC <sub>50</sub> ( $\mu$ M) – $\beta 5$	IC <sub>50</sub> ( $\mu$ M) – prolif. <sup>a</sup>
<b>MG132</b>	-	1,45±0,31	4,59±0,06	0,007±0,001	0,82±0,03
<b>Ga</b>	-	0,73±0,01	0,43±0,01	0,014±0,001	0,78±0,01
<b>Gb</b>	-	17,82±0,90	>100	0,53±0,04	NA
<b>Dipeptidová analoga</b>					
<b>Ha</b>	Bn	>100	57,98±4,38	>100	NA
<b>Ia</b>	Bn	82,36±6,72	17,61±1,18	51,09±3,34	NA
<b>Hb</b>	4-OH-Bn	>100	51,63±5,06	70,45±5,93	NA
<b>Ib</b>	4-OH-Bn	50,11±3,84	21,54±2,05	12,43±0,92	>100
<b>Hc</b>	1-naftyl	>100	>100	>100	NA
<b>Ic</b>	1-naftyl	73,22±5,91	>100	>100	NA
<b>Hd</b>	CH <sub>2</sub> CONH <sub>2</sub>	53,15±4,27	>100	>100	NA
<b>Id</b>	CH <sub>2</sub> CONH <sub>2</sub>	89,47±8,17	>100	>100	NA
<b>He</b>	<i>i</i> -Pr	30,57±2,76	>100	82,07±7,55	NA
<b>Ie</b>	<i>i</i> -Pr	15,45±1,21	2,11±0,24	63,34±6,13	NA
<b>Hf</b>	<i>i</i> -Bu	20,44±1,76	>100	50,21±4,33	NA
<b>If</b>	<i>i</i> -Bu	1,09±0,12	1,32±0,11	0,92±0,08	8,6±0,34
<b>Tripeptidová analoga</b>					
<b>Ja</b>	4-F-Bn-NH-	>100	>100	>100	NA
<b>Ka</b>	4-F-Bn-NH-	11,5±0,81	0,59±0,01	0,056±0,003	0,93±0,13
<b>Jb</b>	morfolin-4-yl	>100	>100	>100	NA
<b>Kb</b>	morfolin-4-yl	0,56±0,02	85,4±3,12	0,48±0,02	NA
<b>Jc</b>	1-naftyl-NH-	>100	>100	8,1	NA
<b>Kc</b>	<b>1-naftyl-NH-</b>	<b>57,5±4,06</b>	<b>&gt;100</b>	<b>0,007±0,001</b>	<b>&lt;0,1</b>
<b>Jd</b>	<i>i</i> -Bu-NH	>100	>100	>100	NA
<b>Kd</b>	<i>i</i> -Bu-NH	5,9±0,32	0,43±0,03	0,012±0,002	0,81±0,12
<b>Je</b>	tetrahydroisochinolin-2-yl	>100	>100	>100	NA
<b>Ke</b>	tetrahydroisochinolin-2-yl	>100	38,9±0,98	0,77±0,04	NA

<sup>a</sup> Hodnota IC<sub>50</sub> – proliferace vůči HCT116 je uvedena pro sloučeniny s nejvyšší inhibiční schopností.

NA – bez aktivity

## β-Laktony

Molekuly obsahující β-laktonový motiv Cystargolid A a B byly izolovány z aktinobakterie *Kitasatospora cystarginea* a při testech inhibice lidského proteasomu dosáhly aktivity v řádu jednotek μM.<sup>281</sup> Za účelem prozkoumání potenciálu těchto látek léčit buňky nádorového bujení byla vytvořena rozsáhlá SAR studie čítající 24 analogů cystargolidů publikovaná v článku D. Niroula, et al. *Eur. J. Med. Chem.* **2018**, *157*, 962-977. Při konstrukci molekuly je zachován β-laktonový cyklus klíčový pro kovalentní navázání na vnitřní stěnu proteasomu. Úpravy struktury se odehrávají na čtyřech pozicích molekuly (R<sup>2</sup>-R<sup>5</sup>) za účelem nalezení ideální kombinace vhodné ze sterického hlediska pro co nejkvalitnější navázání pomocí vodíkových můstků, viz **Obrázek 28** převzatý z literatury. β-Laktonový analog (R<sup>2</sup> = BnO, R<sup>3</sup> = CH<sub>2</sub>O-Bn, R<sup>4</sup> = *i*-Pr, R<sup>5</sup> = *sec*-Bu) dosáhl velmi slibných výsledků, jak při inhibici β5 podjednotky lidského proteasomu (IC<sub>50</sub> = 3,1 nM), tak při cytotoxicitě vůči kmenům rakoviny MCF-7 (IC<sub>50</sub> = 416 nM), MDA-MB-231 (IC<sub>50</sub> = 74 nM) a RPMI 8226 (IC<sub>50</sub> = 41 nM).<sup>282</sup>



**Obrázek 28:** Peptidové β-laktonové inhibitory proteasomu

## Peptidové boronové kyseliny

Níže uvedené di- a tripeptidové prolin-boronové kyseliny byly připraveny dle postupu publikovaném v článku L. Han et al., *Bioorganic and Medicinal Chemistry* **2017**, *25* 4031-4044 a byly testovány na cytotoxicitu vůči buňkám rakoviny žaludku kmene MGC 803, viz **Tabulka 6**. Výrazně lepších výsledků dosáhly tripeptidová analoga. Derivát s nejnižší cytotoxicitou (R<sup>1</sup> = BnO, R<sup>2</sup> = *i*-Bu, R<sup>3</sup> = (naftalen-2-yl)methyl, IC<sub>50</sub> = 0,009765 μM) byl svouji cytotoxicitou srovnatelný s výsledky bortezomibu, který byl použit jako kontrolní vzorek. Perspektivní derivát byl následně testován na samotnou inhibici proteasomu šesti kmenů rakovinného bujení (A549, 95D, HCT116, MDA-MB-231, HL-60, MGC803) s velmi dobrým výsledkem IC<sub>50</sub> < 70 nM u všech kmenů krom buněk kmene A549.<sup>278</sup> Mezi další varianty peptidových boronových kyselin testovaných pro inhibici proteasomu patří boronáty α-amino kyselin.<sup>279,283,284</sup>

**Tabulka 6:** Přehled di-/tripeptidových prolin-boronových kyselin s aktivitou vůči rakovině žaludku kmene MGC 803

R <sup>1</sup>	R <sup>2</sup>	IC <sub>50</sub> (μM) <sup>a</sup>
pyrazin-2-yl	Bn	>10
tetrahydroisochinolin-2-yl	Bn	>10
morfolin-4-yl	Bn	>10
tetrahydroisochinolin-2-yl	(naftalen-2-yl)methyl	5,362±0,422
BnMeN	(naftalen-2-yl)methyl	7,480±0,271
BnO	(naftalen-2-yl)methyl	>10

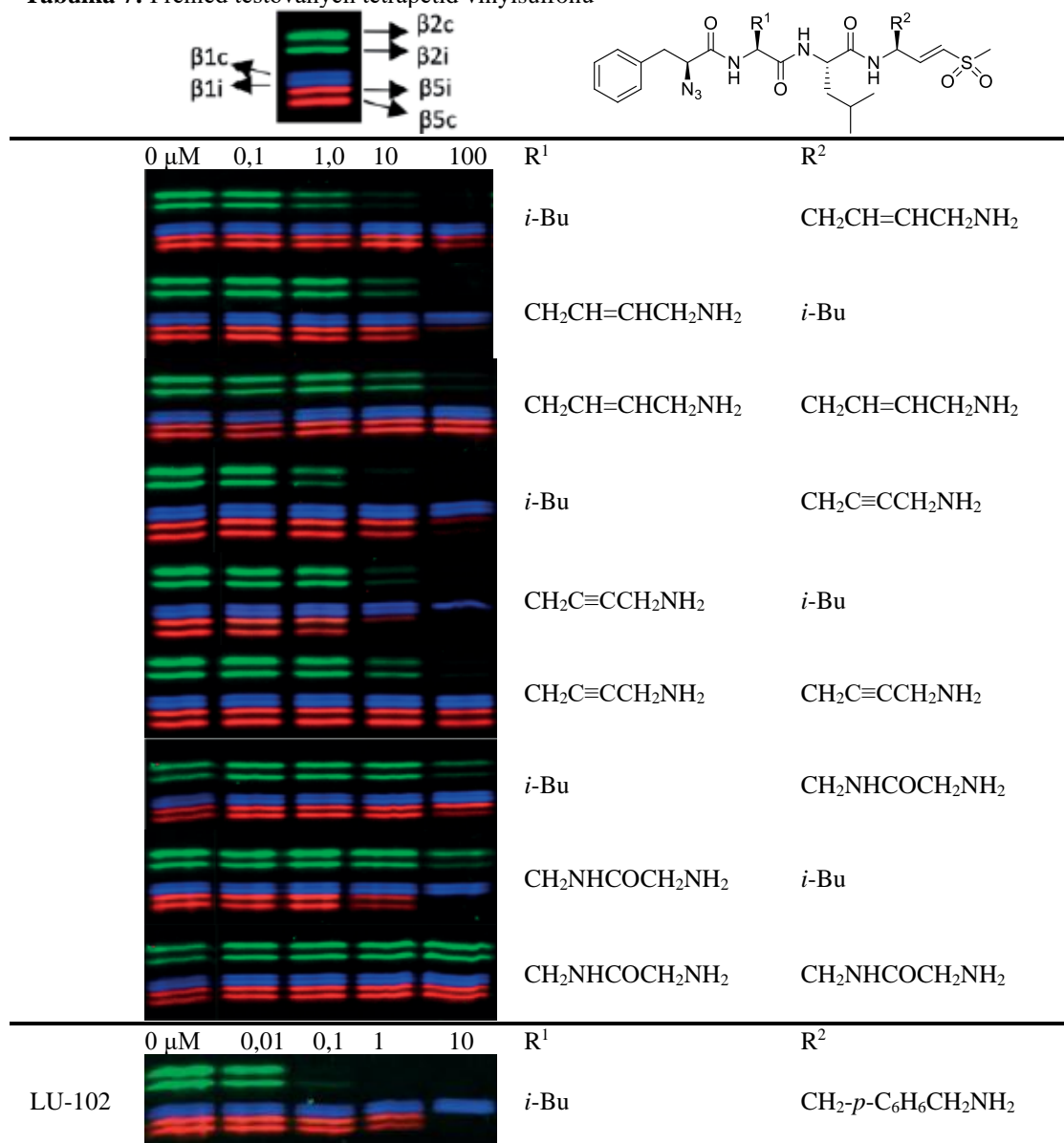
R <sup>1</sup>	R <sup>2</sup>	R <sup>3</sup>	IC <sub>50</sub> (μM) <sup>a</sup>
pyrazin-2-yl	<i>i</i> -Bu	(naftalen-2-yl)methyl	0,02958±0,000
pyrazin-2-yl	<i>i</i> -Bu	Bn	0,02724±0,002
pyrazin-2-yl	Bn	Bn	0,4777±0,002
pyrazin-2-yl	Bn	(naftalen-2-yl)methyl	0,1103±0,000
pyrazin-2-yl	<i>i</i> -Bu	<i>i</i> -Bu	4,426±0,055
BnO	Bn	(naftalen-2-yl)methyl	0,1495±0,001
<b>BnO</b>	<b><i>i</i>-Bu</b>	<b>(naftalen-2-yl)methyl</b>	<b>0,0098±0,000</b>
BnO	<i>i</i> -Bu	<i>i</i> -Bu	0,0109±0,001
tetrahydroisochinolin-2-yl	Bn	Bn	4,167±0,504
tetrahydroisochinolin-2-yl	Bn	(naftalen-2-yl)methyl	2,416±0,254
tetrahydroisochinolin-2-yl	Bn	4-OH-Bn	7,641±0,950
tetrahydroisochinolin-2-yl	Bn	<i>i</i> -Bu	>10
tetrahydroisochinolin-2-yl	<i>i</i> -Bu	(naftalen-2-yl)methyl	1,432±0,175
BnMeN	<i>i</i> -Bu	(naftalen-2-yl)methyl	1,654±0,251
Bortezomib			0,0133±0,000

### Tetrapeptid vinylsulfony s analogy lysinu

Na základě dostupných informací nemá přednostní inhibice β5 podjednotky proteasomu mnohočetného myelomu dostatečnou cytotoxicitu.<sup>285</sup> Pro požadovaný efekt vyvolání apoptózy v nádorové buňce je nutné, aby molekula inhibitoru aspoň částečně koinhibovala také podjednotky β1 a β2. Bortezomib i carfilzomib tuto podmínku částečně splňují, avšak za cenu vyššího dávkování, které ještě umocňuje už tak nepříjemné vedlejší efekty.<sup>286–288</sup> Prezentované tetrapeptid vinylsulfony jsou navrženy tak, aby byly používány v kombinaci s bortezomibem nebo carfilzomibem, selektivně inhibovaly β2 podjednotku a zvyšovaly tak účinek jmenovaných inhibitorů. To umožňuje snížení jejich dávek za současného zachování požadovaného efektu a zmírnění nežádoucích vedlejších účinků. Do peptidové struktury molekul jsou zakomponovány bazické aminokyseliny strukturně analogické s lysinem s pK<sub>a</sub> bližším fyziologickému pH za účelem zlepšení permeability molekuly inhibitoru skrz buněčnou stěnu. **Tabulka 7**, převzatá z literatury, shrnuje připravené deriváty tetrapeptid

vinylsulfonů s analogy lysinu v pozicích R<sup>1</sup> a R<sup>2</sup> včetně inhibiční aktivity jednotlivých β podjednotek v buňkách lidského B-lymfocytu po 1 h expozici při uvedených koncentracích.<sup>289</sup> Hranice barevné vizualizace udává přibližnou aktivitu v řádech 0, 0,1, 1, 10 a 100 μM. Aktivita připravených vinylsulfonů je porovnána s molekulou LU-102, u které je selektivní inhibice β2 podjednotek již potvrzena a je již ve studiích používána k zesilování účinku bortezomibu a carfilzomibu.<sup>287,290</sup>

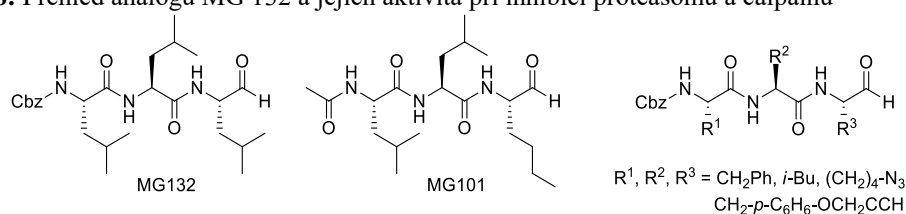
**Tabulka 7:** Přehled testovaných tetrapetid vinylsulfonů



## Aldehydy

Peptidové aldehydy patří spolu s epoxyketony mezi nejdéle studované skupiny látek s potenciálem inhibovat proteasom. Ačkoliv jsou díky tomu jednou z nejdůležitějších prozkoumaných skupin, stále se na ně soustředí zájem vědeckých kolektivů a jsou publikovány nové studie. **Tabulka 8** převzatá z literatury uvádí nově připravenou sérii peptidových aldehydů, analogů MG 132, u kterých je zkoumána selektivita a míra inhibice proteasomu a calpainu. Calpain je proteinový komplex, který podobně jako proteasom rozkládá bílkoviny na krátké peptidy. Panuje obecné mínění, že spolu s proteasomem hrají důležitou roli při rozvoji rakoviny, Alzheimerovy a Parkinsonovy nemoci.<sup>291–293</sup> Rozklíčování selektivity inhibitorů a jejich zaměření na proteasom nebo calpain je důležité pro pochopení mechanismu účinku a pro přesné cílení další léčby.<sup>294</sup>

**Tabulka 8:** Přehled analogů MG 132 a jejich aktivita při inhibici proteasomu a calpainu



R <sup>1</sup>	R <sup>2</sup>	R <sup>3</sup>	Calpain IC <sub>50</sub> (nM) <sup>a</sup>	Proteasom β5 IC <sub>50</sub> (nM) <sup>a</sup>	Selektivita <sup>b</sup> Calpain x Prot. β5
Bn	<i>i</i> -Bu	Bn	6	514	86
<i>i</i> -Bu	<i>i</i> -Bu	Bn	11	139	13
CH <sub>2</sub> - <i>p</i> -C <sub>6</sub> H <sub>4</sub> -OCH <sub>2</sub> CCH	<i>i</i> -Bu	Bn	13	189	14
<i>i</i> -Bu	CH <sub>2</sub> OH	<i>i</i> -Bu	99	269	2,7
<i>i</i> -Bu	<i>i</i> -Bu	<i>i</i> -Bu	4400	220	0,05
CH <sub>2</sub> - <i>p</i> -C <sub>6</sub> H <sub>4</sub> -OCH <sub>2</sub> CCH	<i>i</i> -Bu	(CH <sub>2</sub> ) <sub>4</sub> N <sub>3</sub>	1030	150	0,15
CH <sub>2</sub> - <i>p</i> -C <sub>6</sub> H <sub>4</sub> -OCH <sub>2</sub> CCH	CHCH <sub>3</sub> CH <sub>2</sub> CH <sub>3</sub>	(CH <sub>2</sub> ) <sub>4</sub> N <sub>3</sub>	390 <sup>c</sup>	20 <sup>c</sup>	0,05
<b>MG 132 - <i>i</i>-Bu</b>	<i>i</i> -Bu	<i>i</i> -Bu	311 <sup>c</sup>	1,2 <sup>c</sup>	0,004

<sup>a</sup> Hodnota IC<sub>50</sub> je výsledkem průměru tří nezávislých měření.

<sup>b</sup> Selektivita vyšší než 1 udává zvýšenou specifickou aktivitu calpainu nad proteasomem.

<sup>c</sup> Zdroj dat A. D. Peheré et al. *Chem Eur J.* **2013**;19 7975-7981.<sup>295</sup>

## Epoxyketony

Výzkum je na epoxyketony jako na inhibitory proteasomu soustředěn již od počátku výzkumu inhibice proteasomu a jejího možného využití při léčbě nádorových onemocnění. V současnosti patří dva z pěti inhibitorů proteasomu schválených nebo v pokročilém stádiu klinických testů pro léčbu mnohočetného myelomu právě do skupiny epoxyketonů (carfilzomib, oprozomib). Předkládaná série 36 nových tetrapeptidových epoxyketonů s velmi širokou variabilitou na pěti pozicích peptidového řetězce poskytuje dostatek materiálu pro studium vlivu struktury molekuly na výslednou aktivitu. Při testování aktivit připravených epoxyketonů vůči buňkám mnohočetného



myelomu kmene ARH77 byla sledována inhibice  $\beta 5$  threoninové podjednotky, viz **Tabulka 9**. Dosažené výsledky byly porovnávány s carfilzomibem. Několik derivátů dosáhlo srovnatelných výsledků, jeden derivát ( $R^1 = 5$ -methylisoxazol-3-yl,  $R^2 =$  thiazol-4-yl,  $R^3 = i$ -Bu,  $R^4 = Bn$ ,  $R^5 = i$ -Bu,  $IC_{50} = 20,6 \pm 4,1$  nM) dosáhl nižší cytotoxicity než carfilzomib. Celkem sedm derivátů bylo testováno proti dalším kmenům mohačného myelomu U226B1 a RPMI8226. Výše zmíněný tetrapeptidový epoxyketon s nejnižší aktivitou byl také testován spolu s carfilzomibem na kardiovaskulární cytotoxicitu, která byla odhalena jako jeden z vedlejších účinků carfilzomibu při léčbě mnohočetného myelomu.<sup>296</sup> Při testech na inhibici iontového kanálu hERG buněk kmene HEK293 nebyla u nového tetrapeptidového epoxyketonu zaznamenána žádná aktivita, zatímco carfilzomib vykázal  $IC_{50} = 92,1$   $\mu$ M.<sup>271</sup>

**Tabulka 9:** Struktury a inhibiční aktivity epoxyketonů vůči  $\beta 5$  podjednotce proteasomu mnohočetného myelomu

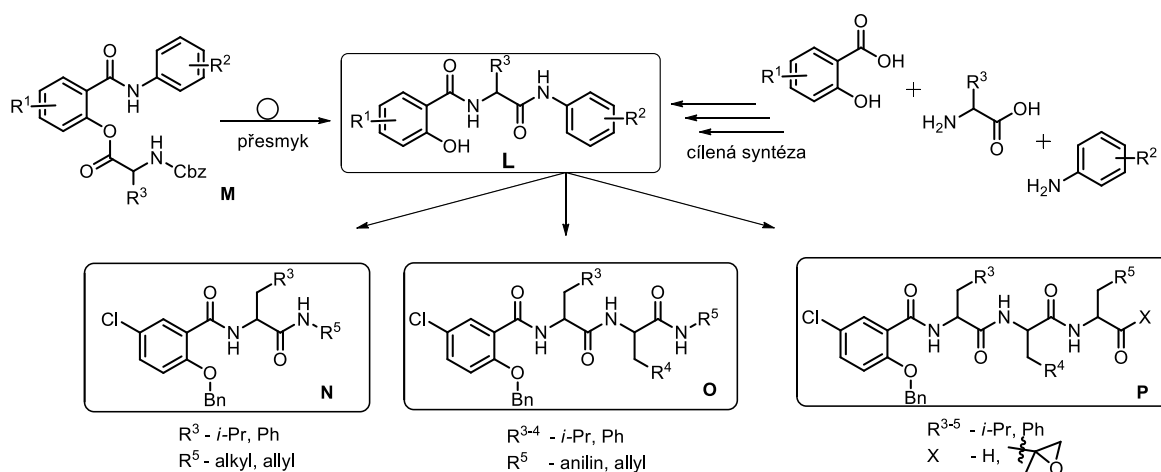
$R^1$	$R^2$	$R^3$	$R^4$	$R^5$	$IC_{50}$ (nM) <sup>a</sup>
(morfolin-4-yl)methyl	1-fenylethan-2-yl	<i>i</i> -Bu	Bn	Et	77,1±8,1
(morfolin-4-yl)methyl	1-fenylethan-2-yl	<i>i</i> -Bu	Bn	<i>n</i> -Bu	52,2±9,1
(morfolin-4-yl)methyl	1-fenylethan-2-yl	<i>i</i> -Bu	Bn	Bn	139,6±13,9
(morfolin-4-yl)methyl	1-fenylethan-2-yl	<i>i</i> -Bu	Bn	1-fenylethan-2-yl	729,0±34,2
(morfolin-4-yl)methyl	1-fenylethan-2-yl	<i>i</i> -Bu	H	<i>i</i> -Bu	NA
(morfolin-4-yl)methyl	1-fenylethan-2-yl	<i>i</i> -Bu	Et	<i>i</i> -Bu	98,2±10,5
(morfolin-4-yl)methyl	1-fenylethan-2-yl	<i>i</i> -Bu	<i>n</i> -Bu	<i>i</i> -Bu	162,2±12,1
(morfolin-4-yl)methyl	1-fenylethan-2-yl	<i>i</i> -Bu	thiazol-4-yl	<i>i</i> -Bu	26,8±4,0
(morfolin-4-yl)methyl	1-fenylethan-2-yl	<i>i</i> -Bu	benzothiofen-2-yl-methyl	<i>i</i> -Bu	37,5±2,1
5-methylisoxazol-3-yl	1-fenylethan-2-yl	methoxymethyl	Bn	<i>i</i> -Bu	50,9±3,4
5-methylisoxazol-3-yl	1-fenylethan-2-yl	ethanol-1-yl	Bn	<i>i</i> -Bu	48,3±1,1
5-methylisoxazol-3-yl	1-fenylethan-2-yl	Et	Bn	<i>i</i> -Bu	36,8±0,8
5-methylisoxazol-3-yl	1-fenylethan-2-yl	cyklopropyl	Bn	<i>i</i> -Bu	32,0±5,3
5-methylisoxazol-3-yl	1-fenylethan-2-yl	cyklopentylmethyl	Bn	<i>i</i> -Bu	36,6±8,4
5-methylisoxazol-3-yl	1-fenylethan-2-yl	cyklohexyl	Bn	<i>i</i> -Bu	30,8±7,6
5-methylisoxazol-3-yl	1-fenylethan-2-yl	thiazol-4-yl	Bn	<i>i</i> -Bu	NA
5-methylisoxazol-3-yl	1-fenylethan-2-yl	pyridin-2-yl-methyl	Bn	<i>i</i> -Bu	NA
(morfolin-4-yl)methyl	thiofen-3-yl-methyl	<i>i</i> -Bu	Bn	<i>i</i> -Bu	44,9±6,9
(morfolin-4-yl)methyl	benzothiofen-2-yl-methyl	<i>i</i> -Bu	Bn	<i>i</i> -Bu	34,1±3,4
(morfolin-4-yl)methyl	thiazol-4-yl	<i>i</i> -Bu	Bn	<i>i</i> -Bu	36,8±3,6
<b>5-methylisoxazol-3-yl</b>	<b>thiazol-4-yl</b>	<b><i>i</i>-Bu</b>	<b>Bn</b>	<b><i>i</i>-Bu</b>	<b>20,6±4,1</b>
5-methylisoxazol-3-yl	pyridin-2-yl-methyl	<i>i</i> -Bu	Bn	<i>i</i> -Bu	60,7±8,0
5-methylisoxazol-3-yl	1H-indol-2-yl-methyl	<i>i</i> -Bu	Bn	<i>i</i> -Bu	25,5±3,3
5-methylisoxazol-3-yl	H	<i>i</i> -Bu	Bn	<i>i</i> -Bu	56,5±5,5
5-methylisoxazol-3-yl	methoxymethyl	<i>i</i> -Bu	Bn	<i>i</i> -Bu	30,6±7,4
5-methylisoxazol-3-yl	<i>i</i> -Bu	<i>i</i> -Bu	Bn	<i>i</i> -Bu	41,5±3,3
5-methylisoxazol-3-yl	cyklopropyl	<i>i</i> -Bu	Bn	<i>i</i> -Bu	43,1±9,1
pyrazin-2-yl	thiazol-4-yl	<i>i</i> -Bu	Bn	<i>i</i> -Bu	38,8±8,2
1,4-dichlorbenzen-2-yl	thiazol-4-yl	<i>i</i> -Bu	Bn	<i>i</i> -Bu	64,8±12,9
hydroxymethyl	thiazol-4-yl	<i>i</i> -Bu	Bn	<i>i</i> -Bu	52,1±8,3
5-methylisoxazol-3-yl	methoxymethyl	H	Bn	<i>i</i> -Bu	NA
Carfilzomib					23,6±8,7

<sup>a</sup> Hodnota  $IC_{50}$  je výsledkem průměru tří nezávislých měření. NA – bez aktivity

## 1.5 NÁVRH CÍLOVÝCH MOLEKUL

V rámci předcházejících publikací vědeckého kolektivu Oddělení organické technologie Ústavu organické chemie a technologie byly podrobně zkoumány biologické aktivity salicyl-diamidů s jednou aminokyselinou a anilinovým zakončením (**L**). Strukturní motiv salicyl-diamidu s jednou aminokyselinou a anilinovým zakončením (**L**) byl důkladně prozkoumán přípravou a testováním biologických vlastností celé knihovny látek lišících se v rozdílné substituci na pozicích  $R^1$ - $R^3$ . Oproti originálním *N*-Cbz esterům aminokyselin se salicylanilidy (**M**), ze kterých byly tyto salicyl-diamidy získány nejprve přesmykem a následně připraveny cílenou syntézou, ztratily změnou struktury antitymukobakteriální aktivity. Současně u nich byly popsány nové cytotoxické aktivity vůči leukémii (K562) a adenokarcinomu prsu (MCF-7). Problematika jednotlivých příprav včetně jejich předností a záporů a důvodu vývoje metody cílené syntézy je podrobně diskutovaná v kapitolách **1.2.2.3** a **1.2.2.4**. Klíčová struktura **L** ale skýtá řadu dalších příležitostí, jak téma salicylamidů hlouběji rozpracovat. Jednoduchými úpravami základní struktury vznikají další série sloučenin s novými možnými aplikacemi, viz **Obrázek 29**.

Jednou z možností je nahradit anilinový motiv za alifatický (**N**) a porovnat, jakým způsobem se změní aktivity původních salicyl-diamidů (**L**). Další možností je zachování anilinu na současné pozici, vložení další aminokyseliny (**O**) a následné porovnání nových aktivit vůči původním (**L**) a novým (**N**) salicyl-diamidům. Další možností je zavedení jiné koncové skupiny za účelem nalezení nových aplikací salicylamidů. Hlavními rysy peptidových kovalentních inhibitorů proteasomu je nejčastěji tripeptidový řetězec složený z fenylyalaninu, leucinu nebo jejich kombinací a zakončený různými funkčními elektronakcepčními skupinami jako je aldehyd, epoxyketon, vinylsulfon nebo boronová kyselina (kapitola **1.4.2**). Nové salicylamidy zakončené jmenovanými skupinami by mohly prokázat nové cytotoxické a proteasom inhibující aktivity. Jako další směr výzkumu je tedy zvolena strukturní úprava spočívající ve vložení dalších dvou aminokyselin a zavedení aldehydové a epoxyketonové skupiny (**P**).



**Obrázek 29:** Strukturální návrh nových skupin salicylamidů (**N**, **O** a **P**)

Předmětem následujícího výzkumu je ověření, zda a jakým způsobem dojde ke změně pozorovaných aktivit při náhradě anilinového motivu (**L**) za alifatický (**N**). Další navrženou strukturální úpravou, jejíž vliv je plánováno sledovat, je prodloužení peptidového motivu na dvě aminokyseliny (**O**). Z důvodu rozsahu tématu je toto zadání rozděleno mezi autora předkládané dizertační práce a zbytek vědeckého kolektivu na pracovišti. Součástí práce je příprava série salicyl-diamidů s jednou aminokyselinou s alifatickým nebo allylovým amidovým motivem (**N**) a části série salicyl-triamidů se dvěma aminokyselinami s allylovým amidovým motivem (**O**). Pro vlastní syntézu navržených molekul **N** a **O** je možné využít dvou výše jmenovaných syntetických strategií. Postup syntézy salicyl-diamidu od anilinového motivu (dle Shibasakiho, **Schéma 7**) je vyhodnocen jako možný, ale zároveň zdlouhavý a nepraktický. Jako mnohem praktičtější se jeví ověřená metoda cílené syntézy (dle Pauka, **Schéma 11**), kdy je molekula budována od kyseliny salicylové nejprve napojením aminokyseliny a následným připojením anilinového motivu. Druhý jmenovaný postup je využít pro vlastní syntézu.

Předmětem dalšího výzkumu salicylamidů se stává příprava nové skupiny tripeptidových derivátů zakončených aldehydovou nebo epoxyketonovou skupinou a prověření jejich aktivit vůči buňkám nádorového bujení, případně jejich schopnosti inhibovat proteasom a způsobovat tak apoptózu. Pro vlastní syntézu se krom osvědčeného postupu budování peptidového motivu od kyseliny salicylové nabízí ještě možnost vytvořit funkční skupinu na poslední aminokyselině plánovaného peptidu a tu pak připojit k již vybudovanému zvytku plánované molekuly.

## 2. CÍLE PRÁCE

Bylo zjištěno, že salicylamidy mají perspektivní cytotoxické vlastnosti. Předkládaná práce navazuje na předcházející výzkum vědecké skupiny a dává si za cíl skupinu salicylamidů vhodně strukturně rozšířit a získat tak nové látky s významnou cytotoxicitou, případně dalšími biologickými vlastnostmi.

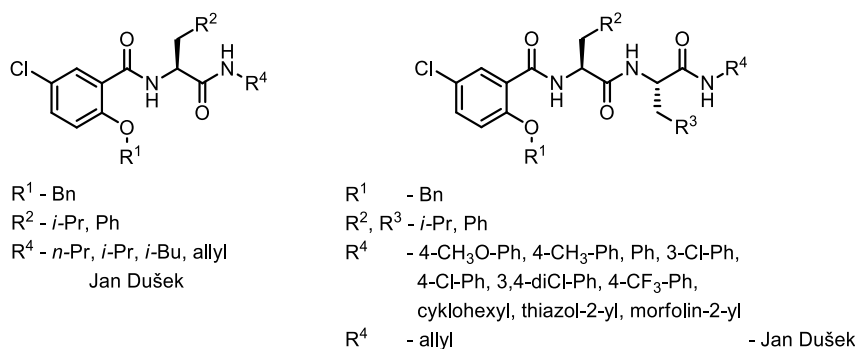
Hlavní cíle předkládané práce jsou následující:

- Vypracovat literární rešerši biologických aktivit a syntéz salicylamidů.
- Vypracovat literární rešerši zaměřenou na možnosti syntézy peptidů s důrazem na používaná činidla a aditiva a jejich efekt při racemizaci substrátu, možnosti mechanizace a automatizace syntézy, problematiku racemizace peptidů a metody jejich analýzy.
- Vypracovat literární rešerši zaměřenou na principy inhibice proteasomu a na současný stav jejího využití při léčbě nádorových onemocnění.
- Návrh a experimentální ověření možných syntetických cest pro přípravu cílových látek. Výběr a optimalizace nejvhodnějšího postupu následované vlastní syntézou salicylamidů obsahujících di-/tripeptidový řetězec včetně charakterizace připravených látek dostupnými analytickými metodami. Testování biologických aktivit bude zajištěno externím pracovištěm.
- Provedení základního popisu vztahů mezi strukturou připravených látek a pozorovanými biologickými aktivitami.

### 3. VÝSLEDKY A DISKUZE

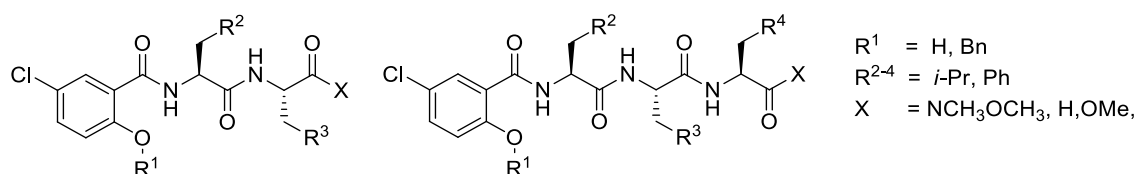
V rámci předkládané práce byly navrženy, připraveny a odpovídajícím způsobem charakterizovány sloučeniny tématicky navazující na předcházející studie biologických aktivit salicylanilidů a alifatických salicylamidů s jednou aminokyselinou zakončenou anilinem (tzv. diamidy) publikované pracovní skupinou doc. Imramovského. Připravované sloučeniny vhodným způsobem doplňují, rozšiřují a ucelují problematiku již dříve studovaných salicylamidů. Účelem této práce je prodloužení peptidového motivu molekuly složené z kombinací L-Leu a L-Phe, spolu se zavedením různých funkčních skupin na konec peptidového motivu a sledování vlivu těchto strukturních zásahů na výslednou cytotoxicitu vůči vybraným nádorovým buňkám (chronická myelogenní leukémie K562, akutní monocytická leukémie THP-1, akutní lymfoblastická leukémie CEM, mnohočetný myelom U266), případně na další biologické aktivity. Při designu cílových molekul bylo jako aminokyselin používáno výhradně L-Leu a L-Phe, protože alifatické salicylamidy z předcházejících studií obsahující právě tyto dvě aminokyseliny dosahovaly nejlepších výsledků v cytotoxicitě vůči chronické myelogenní leukémii K562.<sup>84</sup> Připravené látky s dipeptidickým/tripeptidickým uspořádáním na svém konci nesou různé funkční skupiny – alifatické amidy, aldehydy, Weinreb amidy, epoxidy.

Vědecké úsilí se nejprve soustředilo na syntézu alifatických salicylamidů s jednou a dvěma aminokyselinami (tzv. di- a triamidy) s alifatickým amidickým zakončením, viz **Obrázek 30**. Cílem této studie bylo vypracování obecného syntetického postupu pro dipeptidické deriváty kyseliny salicylové a jejich následná modifikace vybranými alifatickými aminy. Dalším cílem je pak následné porovnání jejich antiproliferativních aktivit vůči vybraným kmenům nádorového bujení se strukturně příbuznými látkami zakončenými anilinem, alicyklickou nebo heretocyklickou skupinou a s alifatickými salicylamidy s jednou aminokyselinou a anilinem z předcházejících prací vědeckého kolektivu pracoviště doc. Imramovského. Těžištěm syntetické části práce je optimalizace reakčních podmínek peptidové syntézy za účelem minimalizace probíhající racemizace, která byla v průběhu prací po zavedení druhé aminokyseliny do molekuly pozorována. Připravené látky jsou testovány vůči chronické myelogenní leukémii K562, akutní monocytické leukémii THP-1 a akutní lymfoblastické leukémii CEM.



**Obrázek 30:** Látky zakončené alifatickými, alicyklickými, aromatickými a heterocyklickými aminy

Další část práce je věnována alifatickým salicylamidům s postranním peptidovým řetězcem skládajícím se ze dvou nebo tří aminokyselin, které se jeví jako perspektivní pro inhibici proteasomu. Tohoto účinku se využívá při léčbě některých nádorových onemocnění, nejčastěji mnohočetného myelomu nebo rakoviny střev. Těžiště syntetické práce spočívá v hledání ideální metody pro jejich přípravu a vychází z poznatků o peptidové syntéze z předcházející práce. Dle retrosyntetické analýzy cílové molekuly se nabízí dvě možnosti přístupu k vlastní syntéze. Oba postupy byly prakticky testovány, ale k úspěšné přípravě cílových derivátů se osvědčil pouze jeden. Připravené látky jsou testovány na cytotoxicitu vůči chronické myelogenní leukémii K562, akutní lymfoblastické leukemii CEM a mnohočetnému myelomu U266, u kterého byla navíc pro vytipované látky testována inhibice proteasomu.



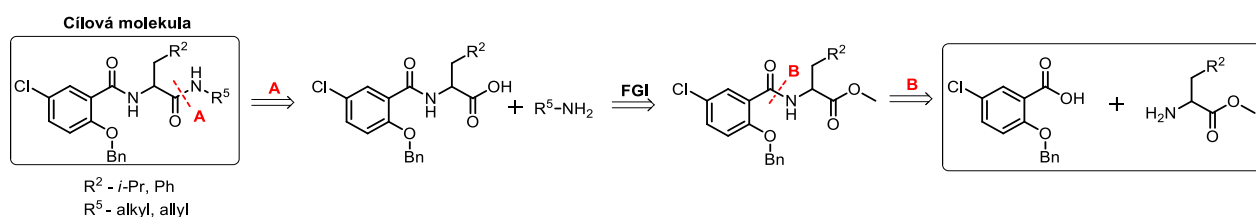
**Obrázek 31:** Látky zakončené esterovou, Weinreb amidovou nebo aldehydovou funkční skupinou

Veškeré naměřené biologické aktivity byly stanoveny v rámci spolupráce na půdě Laboratoří růstových regulátorů, pracoviště Univerzity Palackého v Olomouci a Ústavu experimentální botaniky AV ČR.

### 3.1 SYNTÉZA SALICYL-(DI-/TRI-)AMIDŮ

#### 3.1.1 Retrosyntetická analýza

Strukturně jsou připravované látky (**N**, **O**) téměř shodné s původní sérii salicyl-diamidů s jednou aminokyselinou a anilinovým motivem (**L**). Přímo pro jejich cílenou syntézu byla úspěšně vyvinuta metoda, kdy syntéza začíná napojením methylesteru aminokyseliny na salicylovou kyselinu. Po deprotekcí karboxylové funkční skupiny následuje druhá amidace zavádějící do struktury molekulu anilinu. Pro strukturně příbuzné salicyl-diamidy s jednou aminokyselinou s alifatickým nebo allylovým amidovým motivem (**N**) se použití osvědčené metody přípravy přímo nabízí. Retrosyntetická analýza cílové molekuly, **Schéma 25**, je provedena přesně v souladu s metodou postupného budování peptidového řetězce od kyseliny salicylové (dle Pauka). Nejprve je provedena diskonekce **A**, kterou je oddělena molekula alifatického aminu nebo allylaminu ( $R^5-NH_2$ ). Následuje změna funkční skupiny z karboxylu na methylester karboxylové kyseliny. Dále je provedena diskonekce **B**, kdy je oddělena kyselina salicylová od methylesteru aminokyseliny. Forma methylesteru je pro aminokyselinu vhodná z důvodu zabránění možným vedlejším reakcím při samotné amidaci. Shodný postup je úspěšně aplikován také pro sérii **O** s tím rozdílem, že se postupně zavádí dvě aminokyseliny.

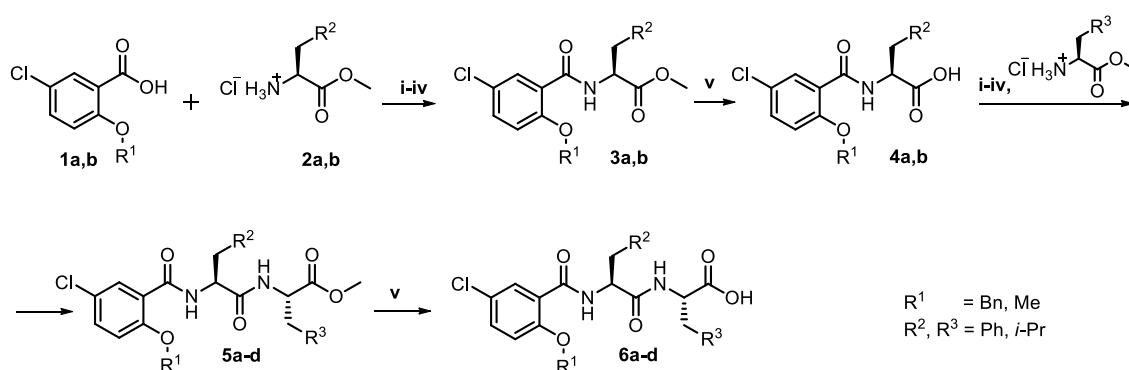


**Schéma 25:** Retrosyntetická analýza cílové molekuly

#### 3.1.2 Optimalizace racemizace při syntéze peptidového řetězce

Syntéza alifatických salicylamidů s jednou a dvěma aminokyselinami navazuje a vychází z předcházejícího výzkumu, který byl zpracován již v rámci diplomové práce autora. Syntéza začíná reakcí kyseliny připravené *O*-Bn-5-chlorosalicylové (**1a**)<sup>297</sup> s hydrochloridem methylesteru aminokyseliny (**2a** – L-Phe-O-Me hydrochlorid, **2b** - L-Leu-O-Me hydrochlorid), která do reakce vstupuje ve formě hydrochloridu methylesteru aminokyseliny. Do reakční směsi se přidává terciární amin (TEA), který *in situ* neutralizoval hydrochlorid methylesteru aminokyseliny a uvolňoval tak aminoskupinu pro vlastní amidaci. Amidace probíhala obecně známým mechanismem Steglichovy amidace za přítomnosti dicyklohexylkarbodiimidu (DCC). V původní

variantě byl DCC používán v mírném nadbytku (1,1 ekv) oproti ostatním reaktantům za účelem posunutí reakční rovnováhy ve směru produktů a urychlení reakce. Spolu s DCC byl používán 4-dimethylaminopyridin (DMAP), který sloužil jako pomocné činidlo omezující nežádoucí boční reakci *O*-acylisomočoviny na nereaktivní *N*-acylisomočovinu. Tato boční reakce vede ke ztrátě výchozí látky a tím i ke snižování celkového výtěžku amidace. **Schéma 19** je uvedené v kapitole **1.3.4** a podrobněji vysvětluje mechanismus amidace s využitím karbodiimidů. Produkt **3** je podroben bazické deprotekcí esterové funkční skupiny za účelem uvolnění karboxylové funkční skupiny (**4**). Opakováním amidací a deprotekcí je připraven peptidový řetězec o požadované délce a struktuře. **Schéma 26** uvádí postup výstavby peptidového řetězce.



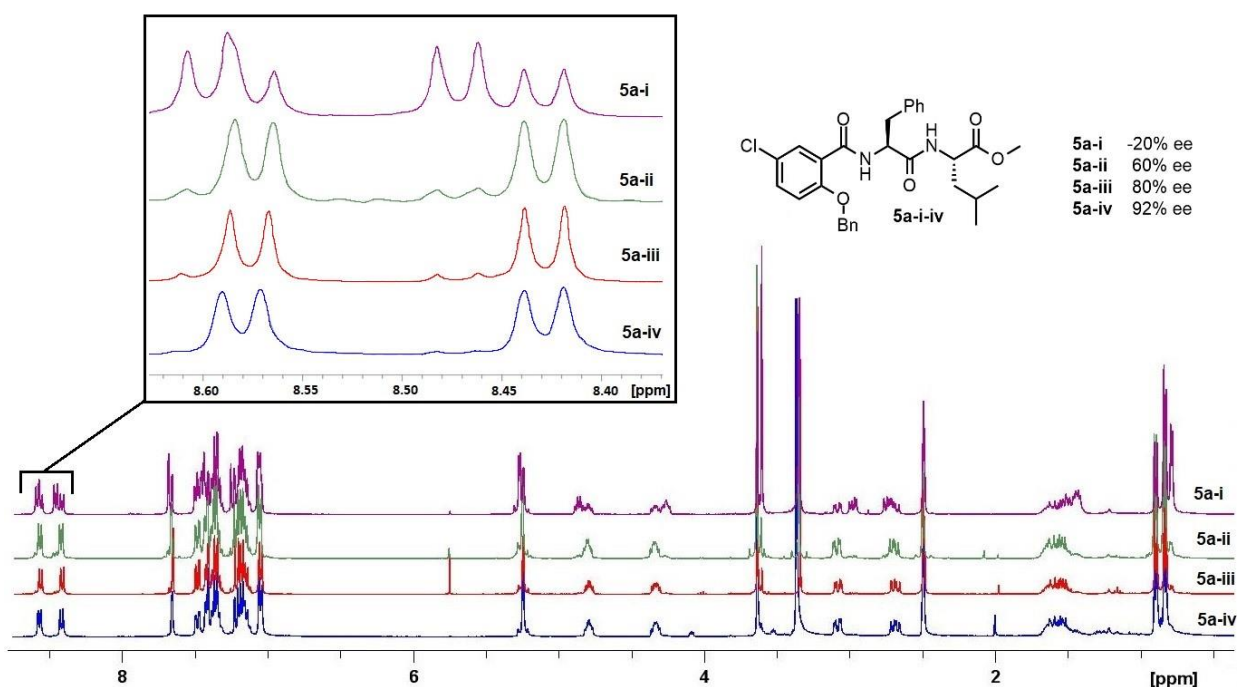
**Schéma 26:** Syntéza peptidového řetězce

**i** DCC (1,1 ekv.), kat. DMAP, DCM, 25 °C, 20 h; **ii** EDCI·HCl (1,4 ekv.), HOBT (1 ekv.), TEA (1 ekv.), DCM, 25 °C, 16 h; **iii** EDCI·HCl (1,4 ekv.), HOBT (1 ekv.), DIPEA (1 ekv.), DCM, 25 °C, 16 h; **iv** EDCI·HCl (1 ekv.), HOBT (1 ekv.), K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (1 ekv.), DCM, 25 °C, 2 h; **v** LiOH (10 ekv.), 1,4-dioxan/H<sub>2</sub>O (1/1), 50 °C, 1h.

V případě produktů **3** nebo **4** s jednou aminokyselinou nebyla případná racemizace v nechirálním prostředí patrná. Při zavedení další aminokyseliny do struktury produktu **5** došlo k vložení druhého stereogenního centra a vzniku diastereomerů, které jsou rozlišitelné i v nechirálním prostředí. Racemizace a přítomnost druhé sady signálů byla pozorována v <sup>1</sup>H NMR spektru produktu **5a-i** (methyl(2*S*)-2-((2*S*)-2-[(2-benzyloxy-5-chloro-benzoyl) amino]3-fenyl-propanoyl) amino) -4-methylpentanoát) na různých místech (**Obrázek 32**, fialová linka), zejména v signálech náležících alifatickým vodíkům (4,84-4,75 (1H, m, NH-CH-CHH-Ph), 4,38-4,30 (1H, m, NH-CH-CHH-CH-(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>), 3,09 (1H, dd, *J* = 4,4 Hz, *J* = 14 Hz, NH-CH-CHH-Ph), 2,70 (1H, dd, *J* = 9,2 Hz, *J* = 14 Hz, NH-CH-CHH-Ph), 1,7-1,48 (3H, m, NH-CH-CHH-CH-(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>), 0,90 (3H, d, *J* = 6,4 Hz, CH<sub>3</sub>-CH-CH<sub>3</sub>), 0,84 (3H, d, *J* = 6,4 Hz, CH<sub>3</sub>-CH-CH<sub>3</sub>). Ve spektru je patrné, že z důvodu blízkosti jednotlivých signálů dochází k častému překryvu a splynutí některých a střechování jiných signálů.



Tato skutečnost komplikuje přesnou integraci intenzit jednotlivých signálů a s tím související přesné určení míry racemizace. Racemizace je nejvíce patrná a rozluštitelná v oblasti vyšších hodnot ppm u signálu dvou amidových vodíků, které by se ideálně měly nacházet ve formě dvou dubletů, kde každý má intenzitu jedna a velmi malou interakční konstantu. V naměřeném spektru šlo ale o dva dublety dubletu. V případě jednoho signálu amidového vodíku došlo k částečnému splynutí signálů obou diastereomerů (**Obrázek 32**, výřez, fialová linka). Kvantifikace míry racemizace byla provedena porovnáním intenzit částí rozštěpeného dubletu a v případě produktu **5a-i** bylo dosaženo -20 % ee. Ačkoliv byla ve  $^{13}\text{C}$  NMR spektrech patrná druhá sada signálů některých uhlíků, k určení míry racemizace tento fakt nijak nepřispěl. Následující odstavce se věnují optimalizaci amidačních podmínek za účelem potlačení racemizace.



**Obrázek 32:** Porovnání spekter diamidů **5a-i-iv** s detailem signálů amidových vodíků v oblasti 8,65-8,4 ppm

### První úprava reakčních podmínek

DCC je tradiční karbodiimid ověřený lety praktického používání a nespočtem publikací s dobrou reaktivitou a vysokou konverzí. Ve své době šlo o průlomové činidlo, které umožnilo a urychlilo řadu syntéz. V současnosti je DCC pro některé jeho nedostatky překonán generacemi nových a účinnějších karbodiimidů. Jednou z nevýhod DCC je známý fakt, že při jeho použití dochází běžně k racemizaci substrátu. Další nevhodný aspekt jeho používání představuje dicyklohexylmočovina (DCU), vedlejší produkt amidace vznikající přirozeně. DCU je velmi málo rozpustná ve většině

rozpouštědel, po reakci je proto snadné její majoritní porci odstranit klasickou filtrací. Minoritní množství DCU avšak zůstává s produktem a často není možné se stop DCU zbavit ani po opakované rekrystalizaci produktu nebo přečištění sloupcovou chromatografií. Vhodnou náhradou DCC je 1-ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)karbodiimid (EDCI·HCl), který ve své struktuře nese atom terciárního dusíku.<sup>118,119,143</sup> Vznikající močovina je tak díky snadné protonovatelnosti terciárního dusíku lehce a beze zbytku odstranitelná z reakční směsi promytím mírně okyselenou vodou. Další změnou oproti původnímu amidačnímu protokolu je vyřazení toxického DMAP a jeho náhrada za HOBt (1 ekv.), který funguje na podobném principu.<sup>166,168,234</sup> Jako báze je používán trimethylamin (TEA, 1 ekv.), který *in situ* neutralizuje hydrochlorid methylesteru aminokyseliny a uvolňuje tak aminoskupinu pro vlastní amidaci. Dalším faktorem je zkrácení reakční doby z 20 hodin na 16 hodin. Modelová molekula **5a-ii** byla připravena s 60% ee (**Obrázek 32**, zelená linka).

#### Druhá úprava reakčních podmínek

Změnou karbodiimidu a pomocného činidla došlo k částečnému potlačení racemizace z -20% ee na 60% ee, což je výrazný posun, avšak zdaleka ne dostatečný pro zamýšlenou aplikaci cílových molekul. Dalším prvkem, který může mít pravděpodobně vliv na racemizaci, je přítomnost TEA. Ta je relativně malá a může tak napadat  $\alpha$ -vodík aminokyseliny. Možností snížení racemizace je náhrada TEA za prostorově objemnější DIPEA (1 ekv.), která se k  $\alpha$ -vodíku ze sterických důvodů nedostane tak snadno.<sup>164,165</sup> Modelová molekula **5a-iii** byla připravena s 80% ee (**Obrázek 32**, červená linka).

#### Třetí úprava reakčních podmínek

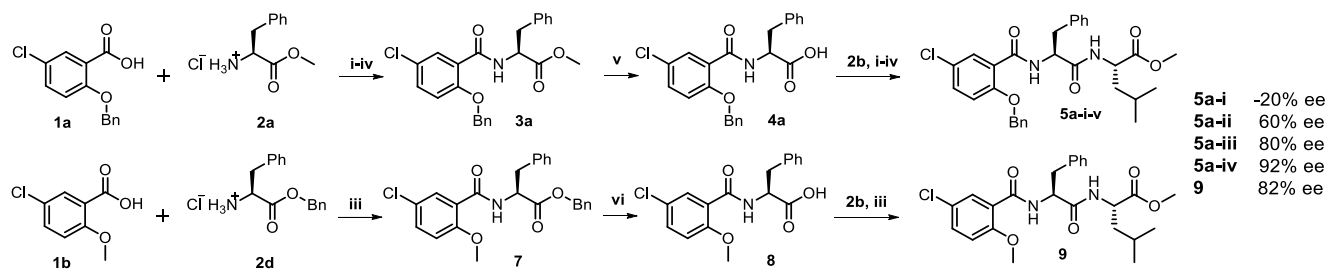
Náhradou báze TEA za DIPEA bylo dosaženo posunu z 60% ee na 80% ee, avšak ani to není dostatečné. Množství EDCI·HCl přítomného v reakci je sníženo z 1,4 ekv. na 1 ekv. Další možností potlačení racemizace je úplné vyloučení terciárního aminu jako báze a provést liberaci aminoskupiny odděleně od vlastní reakce slabou anorganickou bází, např.  $K_2CO_3$ . Po neutralizaci hydrochloridu methylesteru aminokyseliny je výchozí látka extrahována do dichlormethanu, promyta vodou, vysušena bezv.  $MgSO_4$  a přidána do vlastní reakce spolu s EDCI·HCl a HOBt. Reakční doba byla zkrácena na 1 hodinu. Modelová molekula **5a-iv** byla připravena s 92% ee (**Obrázek 32**, modrá linka).

### Závěr optimalizací

Popsanými optimalizacemi byly získány ideální reakční podmínky, vzájemné poměry činidel a vhodné reakční časy pro provádění amidace s minimální racemizací. Poměr jednotlivých diastereomerů je tak 96:4. 4 % druhého izomeru je už tak na hranici detekčních možností NMR měření jako takového. Optimalizací došlo k výraznému zkrácení reakční doby amidace z 20 hodin na 1 hodinu. Výměnou používaného karbodiimidu se podařilo zjednodušit čištění produktu amidace od stop DCU a ostatních vedlejších produktů. Dalším důsledkem výměny používaného karbodiimidu bylo zvýšení výtěžku amidace z průměrných 65% na 90 %. **Tabulka 10** shrnuje vývoj reakčních podmínek amidace a s nimi dosažené výsledky enantiomerních přebytků u modelových molekul **5a-i-iv**.

### Alternativní příčina racemizace

Souběžně s řešením výše zmíněné náhrady bázi TEA za DIPEA vznikla teorie, že se na racemizaci mohou kromě podmínek amidace podílet i jiné faktory. Jako takový rizikový faktor bylo označeno deprotektce karboxylové funkční skupiny v přítomnosti vysokého přebytku silné anorganické báze hydroxidu lithného (10 ekv.).<sup>298</sup> Byla navržena záměna ochranných skupin. Fenolický hydroxyl kyseliny salicylové byl při syntéze modelové molekuly dipeptidu chráněn ve formě methyletheru a aminokyselina ve formě benzylesteru. Při deprotektci bylo používáno šetrných podmínek reakce s vodíkem na palladiu ( $H_2$ , 10% Pd/C, 25 °C, 20 h). Modelová molekula **9** byla připravena za podmínek amidace shodnými s modelovou molekulou **5a-iii** (EDCI·HCl (1,4 ekv.), HOBt (1 ekv.), DIPEA(1 ekv.),  $CH_2Cl_2$ , 25 °C, 16 h). Úpravou ochranných skupin byl vyloučen vliv silné anorganické báze na modelovou molekulu **9**, přesto byla míra pozorované racemizace (82 % ee) srovnatelná s molekulou **5a-iii** (80 % ee), která byla podrobena deprotektci s LiOH. Tímto byl vyloučen negativní vliv deprotektce s LiOH na racemizaci substrátu při výstavbě peptidového řetězce.



**Schéma 27:** Záměna ochranných skupin při studiu příčiny racemizace

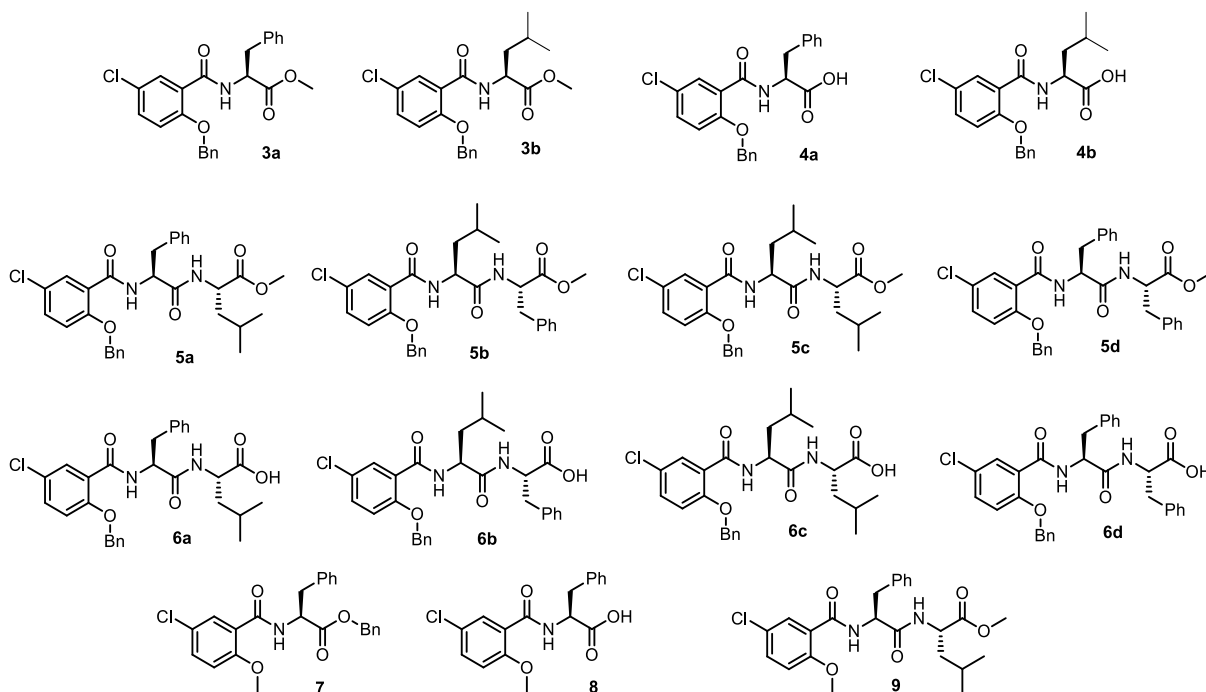
**i** DCC (1,1 ekv.), kat. DMAP, DCM, 25 °C, 20 h; **ii** EDCI·HCl (1,4 ekv.), HOBT (1 ekv.), TEA (1 ekv.), DCM, 25 °C, 16 h; **iii** EDCI·HCl (1,4 ekv.), HOBT (1 ekv.), DIPEA (1 ekv.), DCM, 25 °C, 16 h; **iv**-EDCI·HCl (1 ekv.), HOBT (1 ekv.), K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (1 ekv.), DCM, 25 °C, 2 h; **v** LiOH (10 ekv.), 1,4-dioxan/H<sub>2</sub>O (1/1), 50 °C, 1h; **vi** H<sub>2</sub>, 10% Pd/C, EtAc, 25 °C, 20 h.

**Tabulka 10:** Přehled dosažených enantiomerních přebytků u modelové látky **5a-i-iv/9**

Produkt	Podmínky reakce	ee (%)
<b>5a-i</b>	DCC (1,1 ekv.), kat. DMAP, DCM, 25 °C, 20 h	-20
<b>5a-ii</b>	EDCI·HCl (1,4 ekv.), HOBT (1 ekv.), TEA (1 ekv.), DCM, 25 °C, 16 h	60
<b>5a-iii</b>	EDCI·HCl (1,4 ekv.), HOBT (1 ekv.), DIPEA (1 ekv.), DCM, 25 °C, 16 h	80
<b>5a-iv</b>	EDCI·HCl (1 ekv.), HOBT (1 ekv.), K <sub>2</sub> CO <sub>3</sub> (1,3 ekv.), DCM, 25 °C, 1 h	92
<b>9</b>	EDCI·HCl (1,4 ekv.), HOBT (1 ekv.), DIPEA (1 ekv.), DCM, 25 °C, 16 h	82

V rámci optimalizace amidačních podmínek bylo připraveno 15 látek, viz

**Obrázek 33.**

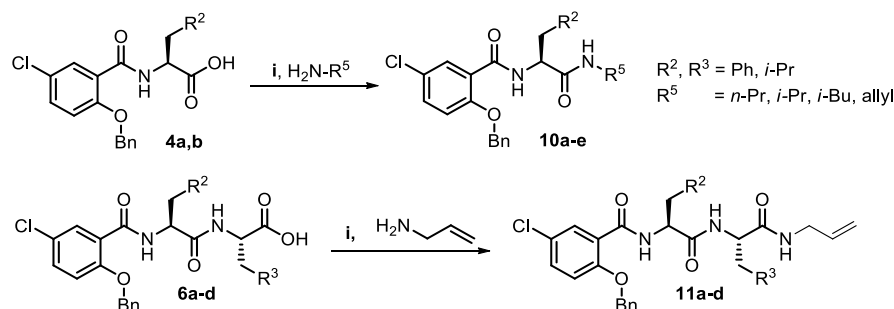


**Obrázek 33:** Přehled látek připravených v rámci optimalizace podmínek syntézy amidů.

### 3.1.3 Příprava salicyl-(di-/tri)-amidů s alifatickým zakončením

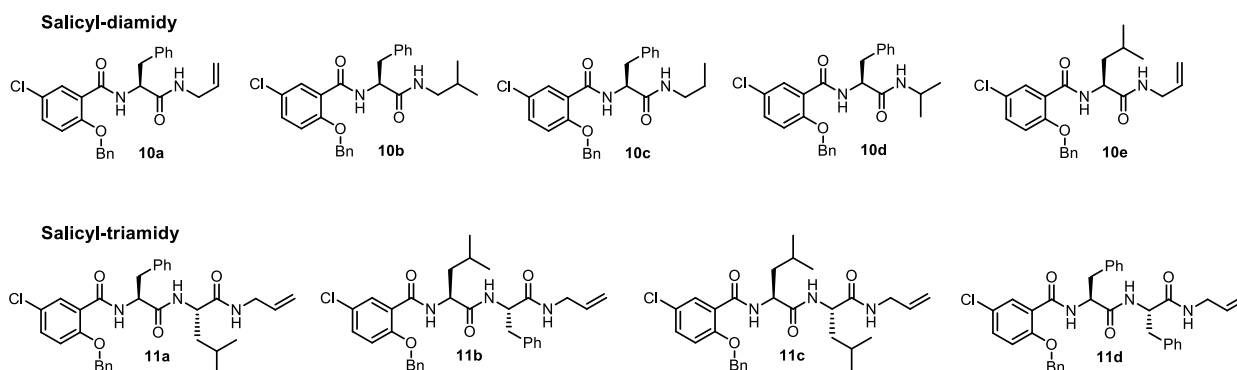
Získané poznatky a optimalizované reakční podmínky byly využity k vlastní syntéze skupiny alifatických salicylamidů s jednou (**10a-e**, salicyl-diamidy) a dvěma (**11a-d**, salicyl-triamidy) aminokyselinami zakončenými alifatickými aminy, viz **Schéma 28**. Amidace byla prováděna již za použití šetrných amidačních podmínek za

použití EDCI·HCl jako karbodiimidu a HOBT jako pomocného činidla pro potlačení nežádoucích vedlejších reakcí. Tyto látky byly syntetizovány za účelem porovnání biologické aktivity strukturně podobných alifatických salicylamidů v závislosti na délce peptidového řetězce a v alifatické nebo aromatické substituci na konci peptidového řetězce vůči vybraným kmenům nádorového bujení (chronická myelogenní leukémie K562, akutní monocytická leukémie THP-1 a akutní lymfoblastická leukemie CEM).



**Schéma 28:** Syntéza salicyl-(di-/tri-)amidů  
i EDCI·HCl (1 ekv.), HOBT (1 ekv.), DCM, 25 °C, 1 h.

V rámci syntézy první ucelené skupiny látek, alifatických di- a triamidů, bylo připraveno 9 látek, z toho 5 diamidů a 4 triamidy zakončených alifatickým aminem nebo allylem, viz **Obrázek 34**.



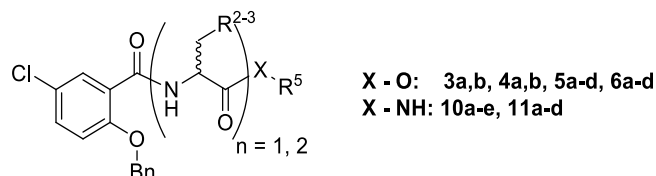
**Obrázek 34:** Připravené salicyl-(di-/tri-)amidy (**10a-e**, **11a-d**)

### 3.1.4 Biologické aktivity salicyl-(di-/tri-)amidů s alifatickým zakončením

Biologické aktivity byly stanoveny ve spolupráci s Laboratoří růstových regulátorů, pracoviště Univerzity Palackého v Olomouci a Ústavu experimentální botaniky AV ČR, viz **Tabulka 11**.<sup>299</sup> Připravené salicylamidy s jednou amikokyselinou zakončené alifatickým aminem (**10a-e**, salicyl-diamidy) nebo salicylamidy se dvěma aminokyselinami zakončené allylaminem (**11a-d**, salicyl-triamidy) dosahují středně mikromolárních hodnot antiproliferativních aktivit vůči K562 (chronická myelogenní leukémie), THP-1 (akutní monocytická leukémie) a CEM (akutní lymfoblastická leukemie). Nejlepší naměřené aktivity se u THP-1 pohybují v rozmezí 14,4-19,5  $\mu\text{M}$ ,

antiproliferativní aktivity ostatních se nacházejí v řádu vyšších desítek  $\mu\text{M}$ . Strukturně příbuzné látky, salicylamidy s jednou nebo dvěma aminokyselinami zakončenými anilinem, jsou vůči zmíněným kmenům leukémie mnohem aktivnější a dosahují aktivit v řádu jednotek  $\mu\text{M}$ .<sup>84, 300</sup> Nejnovější výsledky byly k tomuto tématu publikovány v únoru 2020 v *European Journal of Medicinal Chemistry* 188 (2020) 112036 a potvrzují, že délka peptidového řetězce není pro požadovanou aktivitu klíčová. Mnohem důležitější je přítomnost anilinového motivu na konci molekuly a uvolnění fenolického hydroxyly odstraněním chránící skupiny, viz **Tabulka 12**.

**Tabulka 11:** Výsledky antiproliferativních aktivit připravených salicylamidů, série N

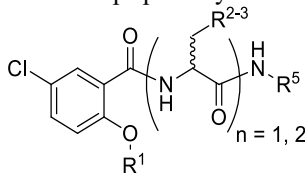


Prod.	n	Zabudované aminokyseliny	X	R <sup>5</sup>	GI <sub>50</sub> ( $\mu\text{M}$ )		
					K562	THP-1	CEM
<b>3a</b>	1	L-Phe	O	Me	70,6	39,1	53,0
<b>3b</b>	1	L-Leu	O	Me	68,1	32,4	43,0
<b>4a</b>	1	L-Phe	O	H	74,7	45,8	59,4
<b>4b</b>	1	L-Leu	O	H	85,7	38,0	53,0
<b>5a</b>	2	L-Phe-L-Leu	O	Me	55,0	<b>19,3</b>	44,2
<b>5b</b>	2	L-Leu-L-Phe	O	Me	69,1	<b>14,4</b>	45,5
<b>5c</b>	2	L-Leu-L-Leu	O	Me	59,5	32,8	49,9
<b>5d</b>	2	L-Phe-L-Phe	O	Me	76,4	24,2	59,9
<b>6a</b>	2	L-Phe-L-Leu	O	H	83,8	42,2	54,8
<b>6b</b>	2	L-Leu-L-Phe	O	H	80,7	36,8	56,8
<b>6c</b>	2	L-Leu-L-Leu	O	H	93,3	45,9	52,4
<b>6d</b>	2	L-Phe-L-Phe	O	H	65,3	45,4	56,5
<b>10a</b>	1	L-Phe	NH	allyl	81,4	40,5	55,4
<b>10b</b>	1	L-Phe	NH	<i>i</i> -Bu	81,3	44,0	41,8
<b>10c</b>	1	L-Phe	NH	<i>n</i> -Pr	89,4	42,4	57,3
<b>10d</b>	1	L-Phe	NH	<i>i</i> -Pr	52,7	<b>19,5</b>	37,1
<b>10e</b>	1	L-Leu	NH	allyl	65,9	32,6	37,9
<b>11a</b>	2	L-Phe-L-Leu	NH	allyl	76,3	27,4	55,8
<b>11b</b>	2	L-Leu-L-Phe	NH	allyl	49,5	37,3	62,1
<b>11c</b>	2	L-Leu-L-Leu	NH	allyl	63,3	31,3	39,8
<b>11d</b>	2	L-Phe-L-Phe	NH	allyl	73,0	30,9	49,9
Roscovitin					30,9	14,0	16,3

**Tabulka 12** převzaná z literatury shrnuje výsledky antiproliferativních aktivit nových salicylamidů vůči kmenům leukemie K562 a CEM.<sup>300</sup> Výsledky jsou uvedeny pro přímé porovnání dosažených aktivit látek sdílejících některé strukturní motivy. Vybrané látky s nejlepší pozorovanou aktivitou byly dále testovány na míru

antiproliferativní aktivity vůči kmenům G361 (lidský maligní melanom), MCF-7 (rakovina prsu) a HCT-116 (rakovina tlustého střeva), kde potvrdily své kvalitní inhibiční vlastnosti.

**Tabulka 12:** Výsledky antiproliferativních aktivit připravených salicylamidů, série O



n	R <sup>1</sup>	Zabudované aminokyseliny	R <sup>4</sup>	GI <sub>50</sub> (μM) <sup>a</sup>				
				K562	CEM	G361	MCF-7	HCT-116
2	Bn	L-Leu-L-Leu	4-CH <sub>3</sub> O-Ph	68,3	53,2	-	-	-
2	Bn	L-Leu-L-Leu	4-CH <sub>3</sub> -Ph	87,7	52,8	-	-	-
2	Bn	L-Leu-L-Leu	Ph	71,2	48,9	-	-	-
2	Bn	L-Leu-L-Leu	4-CF <sub>3</sub> -Ph	74,6	59,9	-	-	-
2	Bn	L-Leu-L-Leu	3,4-di-Cl-Ph	>100	56,4	-	-	-
2	Bn	L-Leu-L-Leu	cyklohexyl	19,8	9,8	-	-	-
2	Bn	L-Leu-L-Leu	thiazol-2-yl	79,2	34,4	-	-	-
2	Bn	L-Leu-L-Leu	morfolin-1-yl	21,0	20,1	-	-	-
2	Bn	L-Leu-L-Phe	3,4-diCl-Ph	57,5	45,4	-	-	-
2	Bn	L-Phe-L-Leu	3,4-diCl-Ph	63,5	55,9	-	-	-
2	Bn	L-Phe-L-Phe	3,4-diCl-Ph	9,9	32,8	-	-	-
2	Bn	L-Leu-L-Leu	4-CF <sub>3</sub> -Ph	73,3	48,1	-	-	-
2	Bn	L-Phe-L-Leu	4-CF <sub>3</sub> -Ph	61,7	56,7	-	-	-
2	Bn	L-Phe-L-Phe	4-CF <sub>3</sub> -Ph	12,7	11,3	-	-	-
2	H	L-Leu-L-Leu	4-CH <sub>3</sub> O-Ph	51,0	23,3	-	-	-
2	H	L-Leu-L-Leu	4-CH <sub>3</sub> -Ph	30,7	13,2	-	-	-
2	H	L-Leu-L-Leu	Ph	20,1	10,2	-	-	-
2	H	L-Leu-L-Leu	4-CF <sub>3</sub> -Ph	<b>7,5</b>	<b>6,2</b>	<b>11,5±3,1</b>	<b>5,3±0,1</b>	<b>5,8±0,2</b>
2	H	L-Leu-L-Leu	3,4-diCl-Ph	<b>3,2</b>	<b>2,6</b>	<b>5,2±0,9</b>	<b>4,1±1,5</b>	<b>4,0±0,3</b>
2	H	L-Leu-L-Leu	cyklohexyl	55,7	38,2	-	-	-
2	H	L-Leu-L-Leu	thiazol-2-yl	31,1	19,7	-	-	-
2	H	L-Leu-L-Leu	morfolin-1-yl	>50	54,9	-	-	-
2	H	L-Leu-L-Phe	3,4-diCl-Ph	<b>5,1</b>	<b>3,3</b>	<b>5,4±0,7</b>	<b>7,3±0,01</b>	<b>4,4±2,1</b>
2	H	L-Phe-L-Leu	3,4-diCl-Ph	<b>3,7</b>	<b>2,6</b>	<b>4,8±1,1</b>	<b>4,6±0,4</b>	<b>2,8±0,2</b>
2	H	L-Phe-L-Phe	3,4-diCl-Ph	<b>5,8</b>	<b>3,1</b>	<b>4,5±0,5</b>	<b>5,2±0,2</b>	<b>3,0±0,5</b>
2	H	L-Leu-L-Phe	4-CF <sub>3</sub> -Ph	<b>6,3</b>	<b>7,9</b>	<b>6,3±0,9</b>	<b>5,5±0,01</b>	<b>5,3±0,5</b>
2	H	L-Phe-L-Leu	4-CF <sub>3</sub> -Ph	<b>5,1</b>	<b>3,5</b>	<b>8,1±2,1</b>	<b>3,6±0,2</b>	<b>3,2±0,2</b>
2	H	L-Phe-L-Phe	4-CF <sub>3</sub> -Ph	<b>5,1</b>	<b>4,7</b>	<b>5,1±0,14</b>	<b>5,6±0,9</b>	<b>4,5±2,0</b>
1	Bn	L-Leu	4-CF <sub>3</sub> -Ph	>50	35,4	-	-	-
1	Bn	L-Phe	4-CF <sub>3</sub> -Ph	>50	31,5	-	-	-
1	H	L-Leu	4-CF <sub>3</sub> -Ph	<b>5,0</b>	<b>5,0</b>	-	-	-
1	H	L-Phe	4-CF <sub>3</sub> -Ph	<b>5,2</b>	<b>4,5</b>	-	-	-

<sup>a</sup> Hodnota je výsledkem minimálně tří měření.

## 3.2 PŘÍPRAVA AMIDŮ KYSELINY SALICYLOVÉ JAKO INHIBITORŮ PROTEASOMU

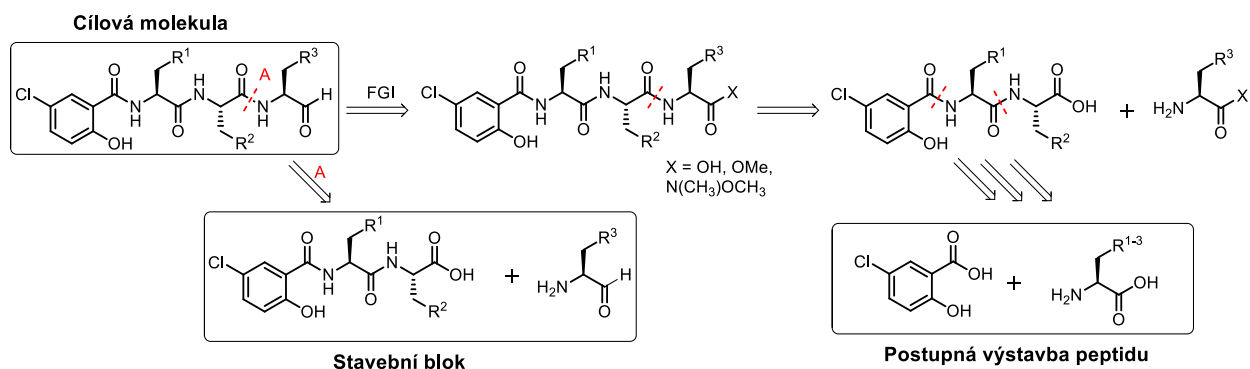
Jednou z možností, jak omezit růst a šíření nádorových buněk, je inhibice jejich schopnosti degradovat a recyklovat proteiny. Za degradaci proteinů je v buňkách zodpovědný proteasom, proteinový komplex provádějící proteolýzu. Jeho inhibice se ukázala jako velmi účinná při klinické léčbě řady nádorových onemocnění, nejperspektivněji se pak tento postup jeví v případě mnohočetného myelomu, rakoviny prsu nebo tlustého střeva. U salicylamidů byla již dříve prokázána cytotoxicita vůči některým typům nádorového bujení. Novou možností uplatnění alifatických salicylamidů s peptidovým motivem v boji proti nádorovým onemocněním je jejich využití jako inhibitorů proteasomu. Předmětem další části předkládané dizertace je návrh a syntéza alifatických salicylamidů se třemi aminokyselinami, které mají potenciál zařadit se se svými aktivitami po bok v praxi již používaných inhibitorů.

### 3.2.1 Retrosyntetická analýza

První možností syntézy cílových molekul je metoda stavebního bloku, viz **Schéma 29**. Jejím smyslem je v duchu diskonekce **A** provést přípravu cílové molekuly z aminokyseliny, na které je finální funkční skupina již předem odděleně připravena. Tato funkcionalizovaná aminokyselina je spojena ve smyslu amidace s dipeptidem, který je na svém *N*-konci zakončený kyselinou salicylovou. Použitý dipeptid je připraven postupem popsáním v předcházející kapitole za využití poznatků získaných při optimalizaci peptidové syntézy. Strategie napojení poslední aminokyseliny s již vybudovanou funkční skupinou nachází oporu v literatuře, poněvadž tímto způsobem byly připravovány již fungující inhibitory proteasomu s epoxidovou skupinou, např. carfilzomib.<sup>301–303</sup>

Druhá možnost syntézy cílových molekul vychází rovněž z předcházející práce a spočívá v postupném budování peptidového řetězce na požadovanou délku tří aminokyselin. Změna funkční skupiny je provedena až v úplném závěru reakční sekvence. Reakční podmínky zavádění funkční skupiny jsou testovány nejprve na derivátech s kratším peptidovým řetězcem a až po optimalizaci jsou tyto postupy aplikovány na deriváty s peptidovým řetězcem v plné délce.

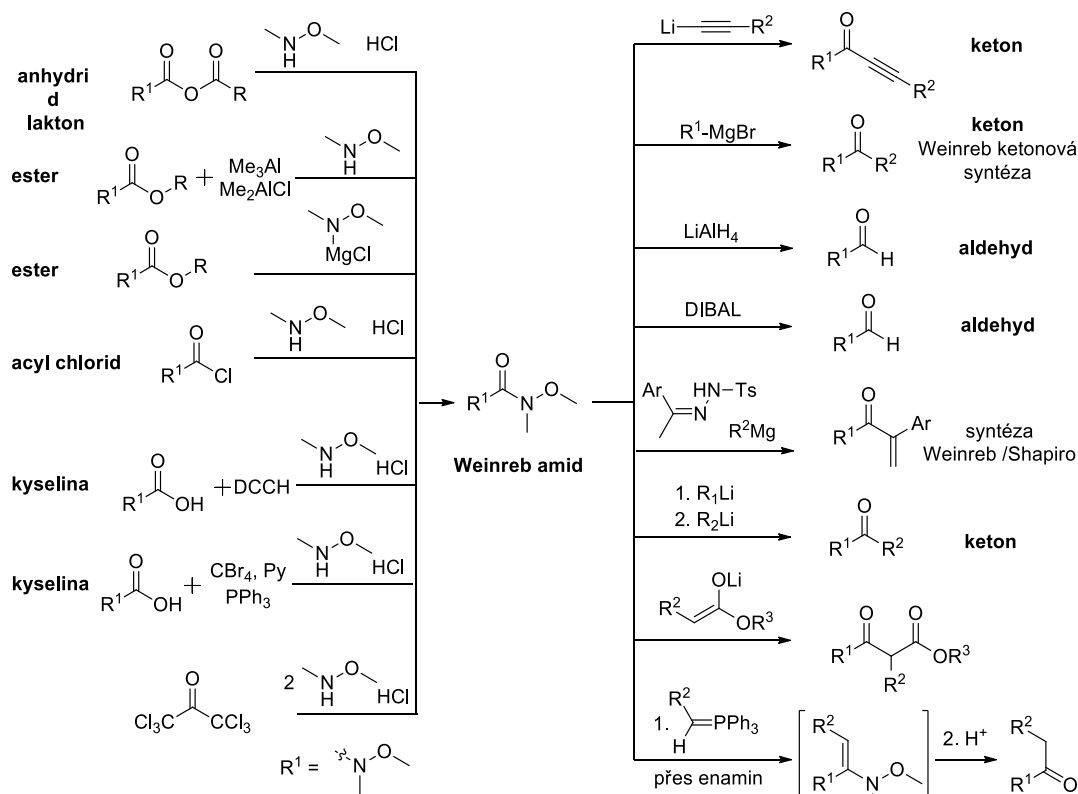




**Schéma 29:** Retrosyntetická analýza cílové molekuly inhibitoru proteasomu

### 3.2.2 Metoda stavebního bloku

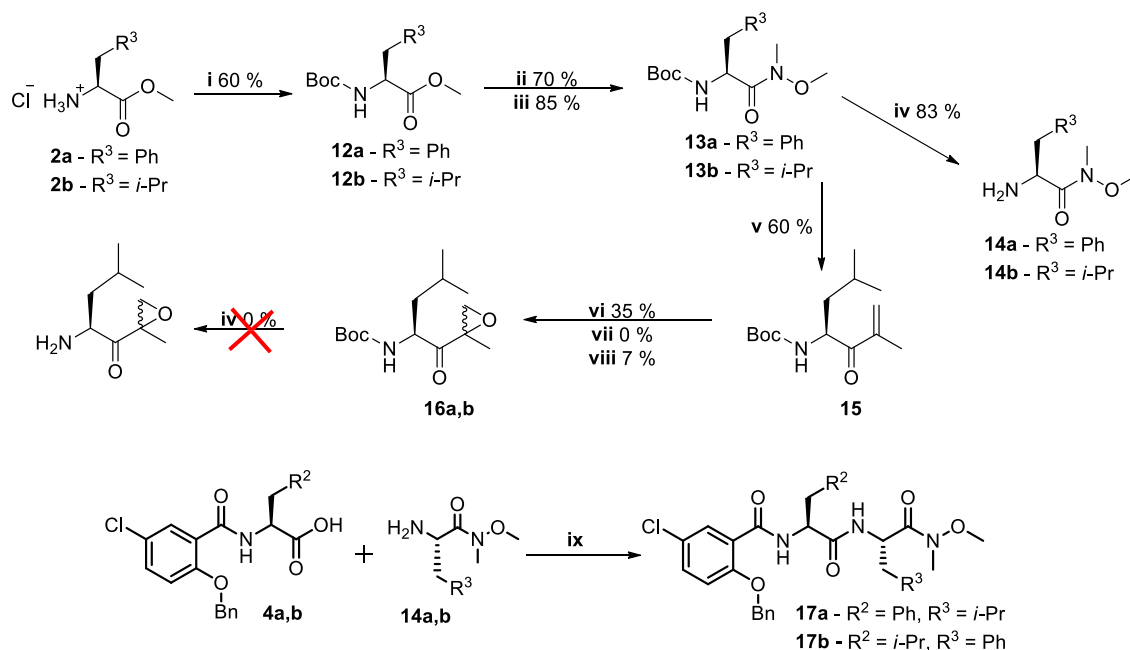
Návrh syntézy salicylamidů metodou stavebního bloku využívá velmi širokého potenciálu univerzální Weinreb amidové funkční skupiny, která sama o sobě představuje nejen nový typ funkční skupiny vhodný pro otestování inhibice proteasomu. Jde hlavně o důležitý intermediát pro přípravu epoxyketonové a aldehydické funkční skupiny. Weinreb amidová skupina je vybudována na *N*-Boc aminokyselině, kde je pak nahrazena propen-2-ylovou skupinou. Ta je následně mírně oxidována za vzniku požadované epoxyketonové funkční skupiny. Takto připravený stavební blok je po deprotekcí *N*-konce a přítomnosti TFA následně spojen s dipeptid salicylamidem. Různé metody přípravy a využití Weinreb amidu uvádí **Obrázek 35** převzatý z literatury.<sup>304</sup>



**Obrázek 35:** Weinreb amid - užitečný nástroj pokročilé organické syntézy <sup>304</sup> Chyba! Záložka není definována.

Syntéza univerzálního Weinreb amidového stavebního bloku (**13a,b**) vychází z hydrochloridu methylesteru aminokyseliny (**2a,b**), na kterém je provedena rutinní ochrana aminoskupiny. Z *N*-Boc methylesteru aminokyseliny (**12a,b**) je *N*-Boc Weinreb amid aminokyseliny (**13a,b**) připraven dvěma různými způsoby reakcí s *O,N*-dimethylhydroxylaminem a isopropylmagnesiumchloridem<sup>305</sup> nebo lithium bis(trimethylsilyl)amidem (LiHMDS, 1M roztok v THF).<sup>306</sup> Třetí způsob přípravy vychází přímo z *N*-Boc aminokyseliny a je popsán v experimentální části.<sup>307</sup> Nejvhodnějším způsobem přípravy je metoda využívající LiHMDS. Poskytuje nejvyšší výtěžky (nad 75 %), je dostatečně robustní, je proveditelná bez nutnosti hlubokého chlazení a nutnosti pracovat s inertním plynem, sušeným rozpouštědlem a ve vysekurované aparatuře. Pro zavedení aldehydu je z molekuly *N*-Boc Weinreb amidu (**13a,b**) za působení TFA odstraněna *tert*-butyloxykarbonylová chránící skupina. Z důvodu nutnosti zachování určité posloupnosti reakčních stupňů není možné provést okamžitě na stavebním bloku **14a,b** redukci funkční skupiny na aldehyd. Nejdříve je nutné napojit tento stavební blok na salicylamid (např **4a,b**) v duchu klasické amidace na dipeptid Weinreb amid (**17a,b**). Případná redukce na aldehyd je provedena jako finální stupeň syntézy, viz **Schéma 30**.

Weinreb amidová skupina představuje vhodný odstupující motiv, je proto v produktu **13a,b** výhodně nahrazen propen-2-ylouvou skupinou (*i*-propenylMgCl) na meziprodukt **15**, jehož dvojná vazba je dále za mírných podmínek oxidována za vzniku epoxyketonu **16**. Byly testovány tři způsoby mírné oxidace, ale konverze byla nízká a čištění směsi produktů a nezreagované výchozí látky bylo komplikované a zdlouhavé. Jednotlivé diastereoizomery měly velmi blízké retenční faktory. Pro detekci na běžném TLC postačovalo použití mobilní fáze hex/EtOAc – 6/1 ( $R_f$ -**16a** = 0,29,  $R_f$ -**16b** = 0,18). Pro kvalitní rozdělení obou látek za využití sloupcové chromatografie bylo nutné mobilní fázi zpomalit až na poměr hex/EtOAc – 19/1 ( $R_f$ -**16a** = 0,14,  $R_f$ -**16b** = 0,07). Nejlepšího úhrnného výtěžku pro oba diastereoizomery **16a,b** (35 %) bylo dosaženo při oxidaci *m*-CPBA po dobu čtyř dnů. Výtěžnost tohoto kroku srazila již nízký úhrnný výtěžek celé reakční sekvence, který se před posledním stupněm syntézy pohybuje okolo 9 %. Ačkoli je autorovi práce dobře známo, že epoxidová skupina je labilní v kyselém prostředí, nyní dle návrhu syntézy nezbytně následuje krok pro odstranění *tert*-butyloxykarbonylové chránicí skupiny z aminoskupiny. To obnáší vystavit substrát **16** kyselému prostředí kyseliny trifluoroctové. Ačkoli byla v dostupné literatuře tato reakce za těchto podmínek popisována, v praxi se tento experiment nepodařilo úspěšně zopakovat a ochráněný epoxyketon nebyl izolován.<sup>301,302</sup> Z důvodu nízkého množství výchozí látky **16a** jakož i druhého diastereoizomeru **16b**, a vzhledem ke složitosti a nehospodárnosti jejich příprav, byla optimalizace tohoto posledního reakčního kroku stejně jako celé reakční dráhy problematická a bylo od ní upuštěno. Nebyly prováděny další pokusy o optimalizaci a veškeré úsilí bylo soustředěno na metodu postupné výstavby, která byla v této fázi vývoje již do pokročilé míry optimalizována z předcházejících prací. Snaha o zavedení epoxyketonové funkční skupiny již nebyla obnovena z důvodu špatných reaktivit testovaných činidel i na jednoduchých substrátech.



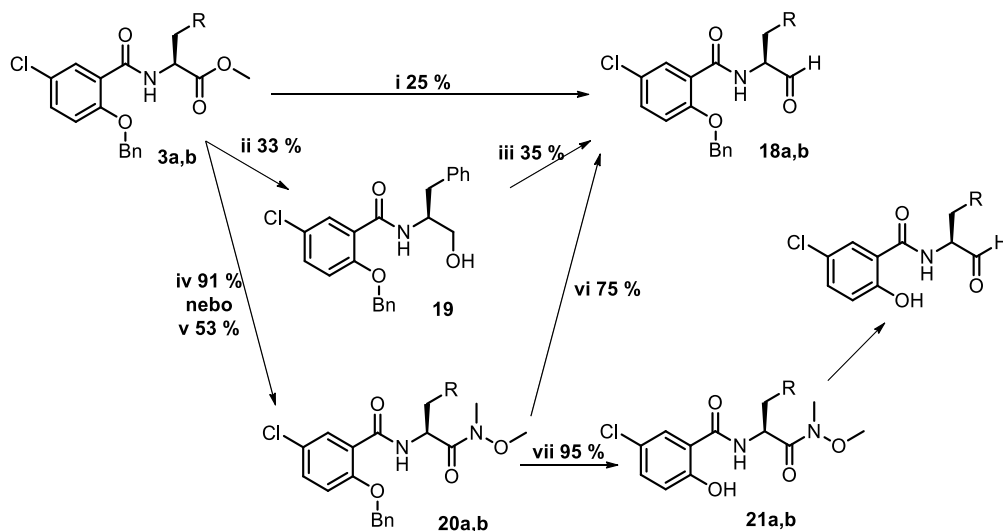
**Schéma 30:** Příprava stavebního bloku k zavedení epoxidové funkční skupiny a Weinreb amidu **i** pro **12a**: (Boc)<sub>2</sub>O, TEA, THF, 20 h, 0 °C po 25 °C; pro **12b**: (Boc)<sub>2</sub>O, EtOH, guanidin HCl, 35-40°C, **ii** *i*-PrMgCl, *O,N*-diethylhydroxylamin·HCl, suché THF, N<sub>2</sub>, -40-0°C – 3 h; **iii** LiHMDS, *O,N*-diethylhydroxylamin·HCl, suché THF, N<sub>2</sub>, -20 °C – 20 minut, -10 °C – 2 h; **iv** TFA, DCM, 25 °C - 45 minut; **v** *i*-propenylMgBr, THF, 0°C – 6 h, N<sub>2</sub>; **vi** *m*-CPBA, DCM, 25 °C – 4 dny; **vii** tetrahydrothiopyran-4-on, oxon = 2 KHSO<sub>5</sub>·KHSO<sub>4</sub>·K<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, NaHCO<sub>3</sub>, CH<sub>3</sub>CN, H<sub>2</sub>O, Na<sub>2</sub>EDTA, 25 °C – 24 h; **viii** oxon, NaHCO<sub>3</sub>, 1,1,1-trifluoroaceton, H<sub>2</sub>O, CH<sub>3</sub>CN, 0-25 °C – 5 h; **ix** EDCI·HCl, HOBt, DCM, 2 h, 25 °C.

### 3.2.3 Metoda postupné výstavby peptidového řetězce

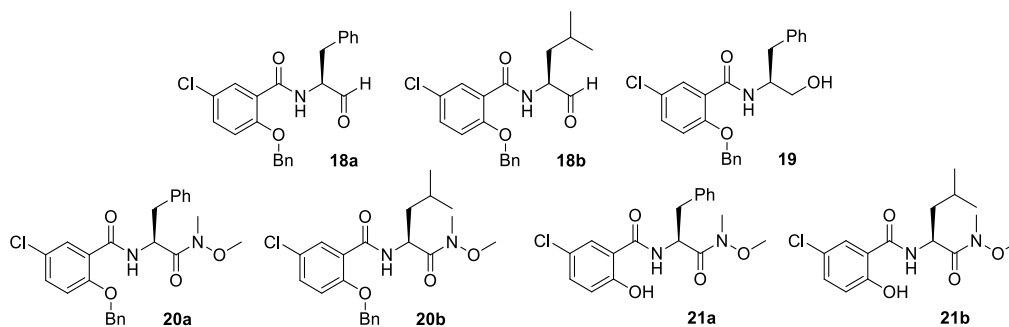
K vlastní syntéze peptidového řetězce jsou využity optimalizované podmínky postupné syntézy v roztoku z minulé kapitoly **3.1.2**. Testování nejvhodnějších reakčních podmínek pro zavedení aldehydové funkční skupiny na konec peptidového řetězce u di- a tripeptidových salicylamidů slouží následující reakční série uvedená ve **Schéma 31**.

Syntéza začíná u *O*-Bn salicylamidu methylesteru s jednou aminokyselinou (**3a,b**). Jeho částečná redukce pomocí DIBAL (1,2M roztok) v suchém tetrahydrofuranu (**i**) na *O*-Bn salicylamid aldehyd (**18a,b**) není vhodná. Redukce poskytuje hlavní produkt v nízkém výtěžku 25 % spolu se směsí různých vedlejších produktů. Druhou testovanou možností je úplná redukce pomocí NaBH<sub>4</sub> (**ii**) na *O*-Bn salicylamid alkohol (**19**, výtěžek 33 %) následovaná částečnou oxidací Dess-Martinovo periodnanem na požadovaný *O*-Bn salicylamid aldehyd (**18a**, výtěžek 35 %). Oba reakční stupně mají velmi nízké výtěžky a produkt poskytují v obtížně dělitelné směsi vedlejších produktů. Pro využití v peptidové chemii je nutné před vlastní redukcí nahradit methylesterovou skupinu Weinreb amidovou, která díky širším možnostem stabilizace představuje lepší

odstupující skupinu. *O*-Bn salicylamid Weinreb amid (**20a,b**) je připraven z **3a,b** za přítomnosti dvou možných sad činidel. Reakční podmínky využívající LiHMDS (**iv**, 91 %) poskytují oproti *i*-PrMgCl (**v**, 53 %) vyšší výtěžky, snadnější manipulaci s činidly a menší množství vedlejších produktů, které se následně jednodušeji odstraňují pomocí sloupcové chromatografie. Nároky na chlazení a reakční dobu jsou srovnatelné. Dosahování co nejvyšších možných výtěžků je při několikasupňové syntéze klíčové. Neméně důležitá je také snaha o dosažení surového produktu s co nejmenším množstvím vedlejších produktů k odstranění. U *O*-Bn salicylamid Weinreb amidu (**20a,b**) se syntetická cesta větví. Redukcí za přítomnosti LiAlH<sub>4</sub> (**vi**) je funkční skupina redukována za vzniku *O*-Bn salicylamid aldehydu (**18a,b**, výtěžek 75 %) v dobré čistotě a uspokojivém výtěžku. Pokud je na **20a,b** nejdříve provedeno odstranění benzylové skupiny chránící fenolický hydroxyl vodíkem za přítomnosti palladia na uhlíku (**vii**) na ochráněný salicylamid Weinreb amid (**21a,b**, výtěžek 95 %), byl by následně pomocí LiAlH<sub>4</sub> redukován až ochráněný salicylamid aldehyd. Tato poslední redukce nebyla u modelové řady s jednou aminokyselinou prováděna. Byla provedena až u cílových derivátů se třemi aminokyselinami za podmínek **vi** shodných s redukcí *O*-Bn salicylamid Weinreb amidů (**20a,b**) na *O*-Bn salicylamid aldehydy (**18a,b**).

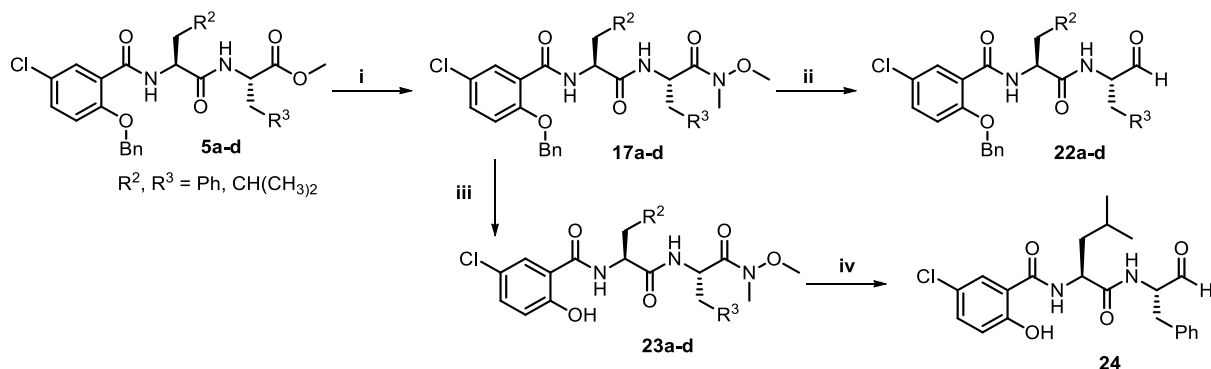


**Schéma 31:** Postup pro zavedení aldehydové funkční skupiny na modelové skupině salicylamidů  
**i** DIBAL (1,2M v THF), suché THF, 3 h, -78 °C, N<sub>2</sub>; **ii** NaBH<sub>4</sub>, THF/H<sub>2</sub>O – 3/1, 4 h; **iii** Dess-Martinův periodnan, NaHCO<sub>3</sub>, DCM, 1 h při 0 °C, 1 h při 25 °C; **iv** LiHMDS, *O,N*-dimethylhydroxylamin, suché THF, 1 h při -20 °C, pak 4 h při -10 °C; **v** *i*-PrMgCl, *O,N*-dimethyl hydroxylamin, suché THF, 1 h při -40 °C, během 3 h na 0 °C; **vi** LiAlH<sub>4</sub> (3 ekv.), suché THF, 3 h při -20 °C, pak 1 h při 25 °C; **vii** H<sub>2</sub>, 10% Pd/C, EtAc, 20 h, 25 °C.



**Obrázek 36:** Látky připravené v rámci modelové řady pro testování zavádění Weinreb amidové a aldehydové funkční skupiny (**18a,b**, **19**, **20a,b**, **21a,b**)

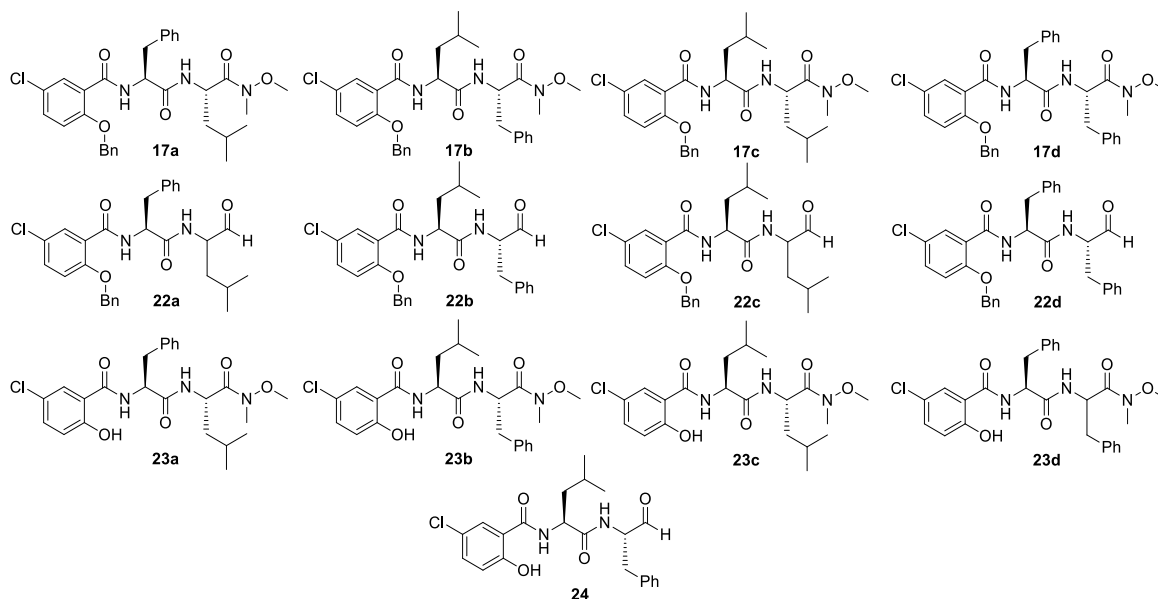
K syntéze dipeptidových derivátů byly použity postupy a podmínky získané ze syntéz na modelové řadě derivátů s jednou aminokyselinou bez výrazných optimalizací. V první fázi je z *O*-Bn dipeptidu methylester (**5a-d**) připraven *O*-Bn dipeptid Weinreb amid (**17a-d**). Zde se syntetická cesta větví. Redukcí  $\text{LiAlH}_4$  je funkční skupina redukována za vzniku *O*-Bn dipeptid aldehydu (**22a-d**). Pokud je na **17a-d** nejdříve provedeno odstranění benzylové skupiny chránící fenolický hydroxyl vodíkem za přítomnosti palladia na uhlíku (10% Pd/C), je pomocí  $\text{LiAlH}_4$  redukován až ochráněný dipeptid Weinreb amid (**23a-d**) na ochráněný dipeptidový aldehyd (**24**).



**Schéma 32:** Příprava dipeptidových Weinrebamidů a aldehydů

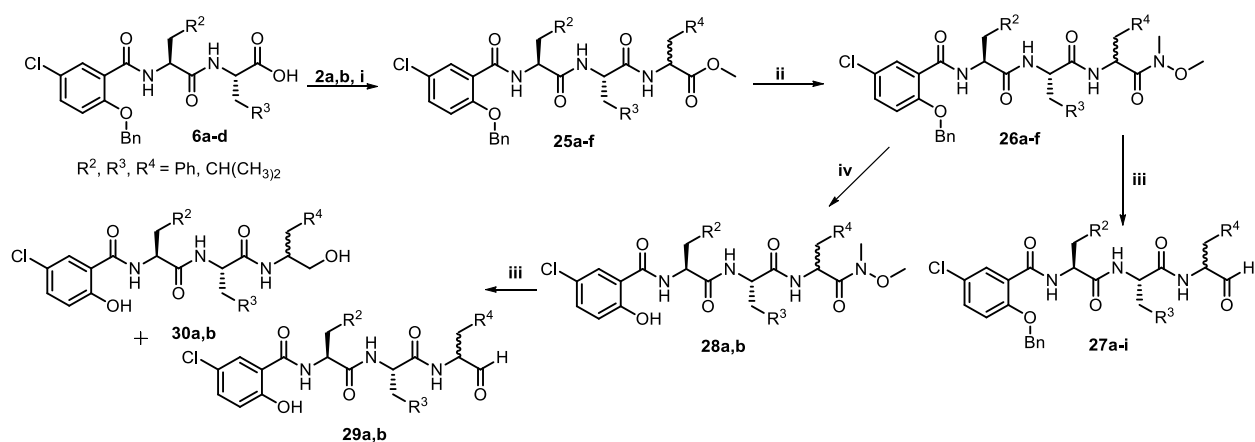
**i** LiHMDS, *O,N*-dimethylhydroxylamin, suché THF, 1 h při  $-20\text{ }^\circ\text{C}$ , pak 4 h při  $-10\text{ }^\circ\text{C}$ ; **ii**  $\text{LiAlH}_4$  (3 ekv), suché THF, 0,5 h při  $-8\text{ }^\circ\text{C}$ ; **iii**  $\text{H}_2$ , 10% Pd/C, EtAc, 20 h,  $25\text{ }^\circ\text{C}$ ; **iv**  $\text{LiAlH}_4$  (3 ekv), suché THF, 1,5 h při  $-8\text{ }^\circ\text{C}$ .

Celkem bylo připraveno 21 originálních dipeptidových salicylamidů, z nichž nesou 4 kyselinovou, 4 methylesterovou, 8 Weinrebamidovou a 5 aldehydovou funkční skupinu.



**Obrázek 37:** Připravené dipeptidové Weinreb amidy (**17a-d**, **23a-d**, **22a-d**, **24**)

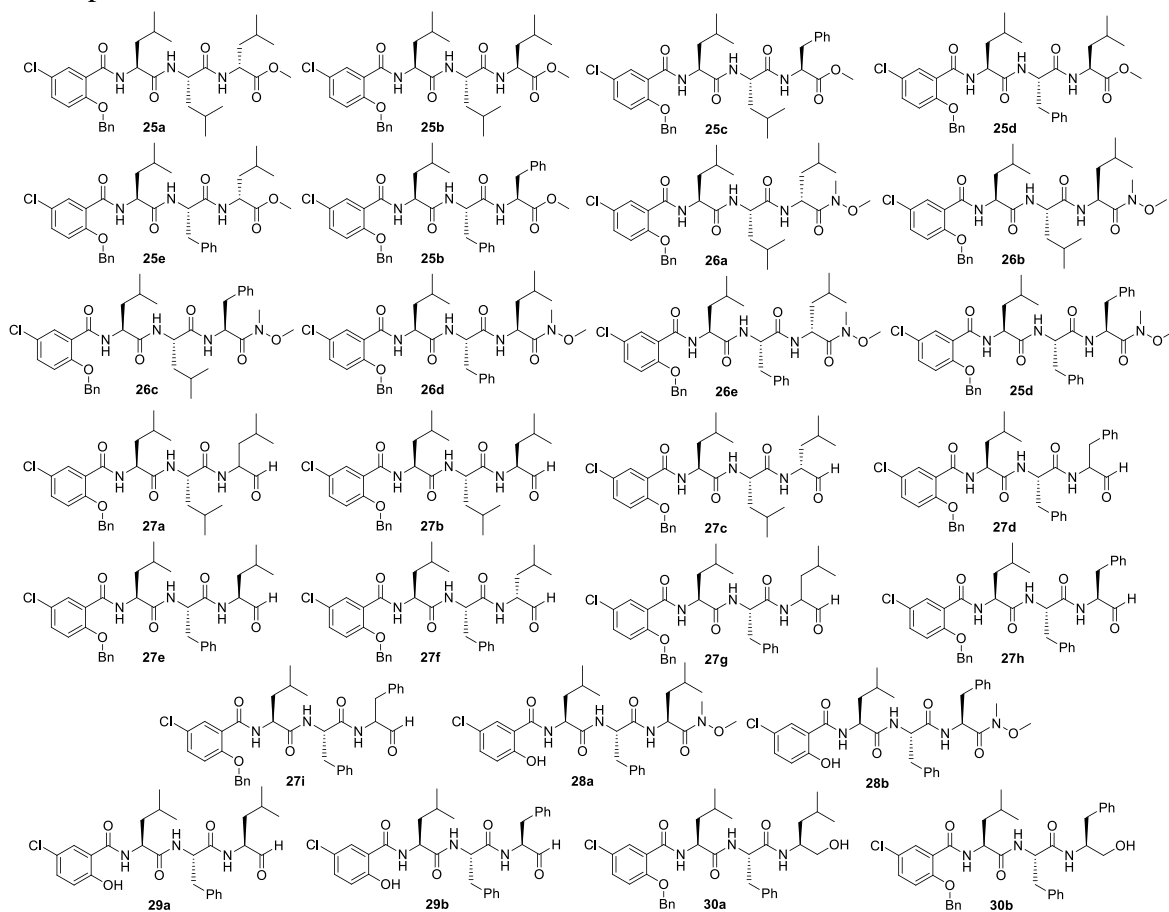
K syntéze tripeptidového skeletu bylo využito poznatků z optimalizace podmínek peptidové syntézy z předcházející kapitoly **3.1.2**. K zavedení funkčních skupin byly použity postupy a podmínky získané ze syntéz na modelové řadě derivátů s jednou aminokyselinou bez výrazných optimalizací. V první fázi je zavedením třetí aminokyseliny (**2a,b**) na *O*-Bn dipeptid kyselinu (**6a-d**) získán *O*-Bn tripeptid methylester (**25a-f**), ze kterého je dále připraven *O*-Bn tripeptid Weinreb amid (**26a-f**). Syntetická cesta se zde opět větví. Redukcí  $\text{LiAlH}_4$  je funkční skupina redukována za vzniku *O*-Bn tripeptid aldehydu (**27a-i**). Pokud je na **26a-f** nejdříve provedeno odstranění benzylové skupiny chránící fenolický hydroxyl vodíkem za přítomnosti palladia na uhlíku (10% Pd/C), je pomocí  $\text{LiAlH}_4$  redukován až ochráněný tripeptid Weinreb amid (**28a,b**) na ochráněný tripeptidový aldehyd (**29a,b**). Z reakční směsi se krom řady minoritních vedlejších produktů podařilo izolovat ještě příslušný ochráněný tripeptid alkohol (**30a,b**), který vznikl pravděpodobně nadbytkem redukčního činidla a příliš dlouhou reakční dobou.



**Schéma 33:** Příprava tripeptidových Weinreb amidů a aldehydů

**i** EDCI-HCl, HOBt,  $\text{K}_2\text{CO}_3$ , DCM, 2 h, 25 °C; **ii** LiHMDS, *O,N*-dimethylhydroxylamin, suché THF, 1 h při -20 °C, pak 2 h při -10 °C, 16 h – 25 °C; **iii**  $\text{LiAlH}_4$  (2 ekv), suché THF, 6 h při -8 °C; **iv**  $\text{H}_2$ , 10% Pd/C, EtAc, 3 h, 25 °C; **v**  $\text{LiAlH}_4$  (6 ekv), suché THF, 3 h při -8 °C;

Celkem bylo připraveno 27 originálních tripeptidových salicylamidů, z nichž nese 6 methylesterovou, 8 Weinreb amidovou, 11 aldehydovou a 2 alkoholovou funkční skupinu.



**Obrázek 38:** Připravené tripeptidové Weinreb amidy, aldehydy a alkoholy (26a-f, 27a-i, 28a,b, 29a,b, 30a,b).



### 3.2.4 Porovnání syntetických přístupů

Oba navržené postupy byly testovány, přičemž první popsaný postup, tzv. Metoda stavebního bloku, se příliš neosvědčil zejména z důvodu problematického posledního reakčního stupně a obecně nízkého úhrnného výtěžku. Bylo připraveno několik sloučenin, na kterých bylo prokázáno, že se kvalitativně neliší od stejných molekul připravených metodou postupné výstavby peptidového řetězce. Veškeré sloučeniny byly pro následné testování biologických aktivit připraveny druhou popsanou metodou spočívající v postupné výstavbě peptidového řetězce. Sérií vhodných optimalizací se podařilo zvýšit výtěžky jednotlivých syntetických stupňů této metody stejně jako zvětšit jejich objem na vyšší desítky gramů, což se pozitivně podepsalo na celkové rychlosti práce s minimem ztrát. Zvýšení výtěžků zároveň poskytlo dostatek materiálu pro přípravu kombinačně bohaté skupiny cílových molekul.

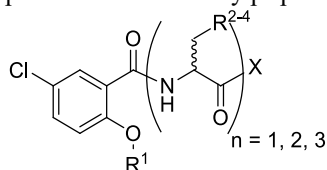
### 3.2.5 Biologické aktivity nových salicylamidů

#### Antiproliferativní aktivita

Nově přepravená série *O*-Bn salicylamidů s di-/tripeptidovým motivem, skládajících se z opticky čistého L-leucinu a L-fenylalaninu nebo jejich kombinace a zakončených esterovou (**25**), Weinreb amidovou (**17**, **20**, **21**, **23**, **26**, **28**) nebo aldehydovou skupinou (**22**, **24**, **27**, **29**), byla testována pro své antiproliferativní aktivity proti některým kmenům nádorového bujení (K562, CEM, U266). Výsledky pozorovaných aktivit uvádí **Tabulka 13**. Série esterů (**25**) a Weinreb amidů (**17**, **20**, **21**, **23**, **26**, **28**) si ve srovnání s předcházejícími publikacemi zachovaly aktivity  $GI_{50}$  ve středně-mikromolárním rozpětí.<sup>84,299</sup> V rámci série nově připravených Weinreb amidů jsou ale patrné lepší aktivity u derivátů s tripeptidovým řetězcem (**28a,b**,  $GI_{50} = 16,3-32,8 \mu M$ ), než u derivátů s mono- nebo dipeptidovým řetězcem (**21a,b**, **23a-d**,  $GI_{50} = 48,2-100 \mu M$ ). Obdobné aktivity byly pozorovány pro salicylamidy nesoucí aldehydovou funkční skupinu (**22**, **24**, **27**, **29**). Všechny aldehydy, obsahující v molekule tripeptidový motiv, dosahují středně-nanomolárních aktivit (**27a-i**,  $GI_{50} = 0,15-1,45 \mu M$ ). Oproti tomu aldehydy s dipeptidovým motivem dosahují aktivit pouze středně-mikromolárních hodnot (**22a-d**,  $GI_{50} = 11,0-37,0 \mu M$ ). Stejný trend je dle naměřených aktivit zjevný také u debenzylovaných derivátů (**24**, **29a,b**). Buněčný kmen mnohočetného myelomu U266 se vůči testovaným látkám projevil jako velmi citlivý. Látka **27g** vykázala proti kmenu U266 nejlepší aktivitu  $0,15 \mu M$ .

Výsledky ukazují, že délka peptidového řetězce aldehydových derivátů je důležitá pro zamýšlenou aktivitu. Dalším důležitým aspektem, který má dle naměřených výsledků prokazatelný vliv na GI<sub>50</sub>, je přítomnost fenylalaninu přímo vedle aldehydové funkční skupiny. Tyto deriváty dosahují vůči U266 vyšších GI<sub>50</sub> než ty, které na této pozici nesou leucin, viz porovnání aktivit derivátů **27h**, **27i** oproti **27e-g** nebo **27d** oproti **27a-c**. Stejná tendence je patrná také u debenzylovaných salicylamidů **29b** oproti **29a**.

**Tabulka 13:** Antiproliferativní a antiproteasomální aktivity připravených salicylamidů, série **P**



Prod.	n	R <sup>1</sup>	Zabudované aminokyseliny	X	GI <sub>50</sub> (μM) <sup>a</sup>			Proteasomální inhibice IC <sub>50</sub> (μM) <sup>a</sup>
					K562	CEM	U266	
<b>18a</b>	1	Bn	L-Phe	H	33,3	17,7	63,8	>1
<b>18b</b>	1	Bn	L-Leu	H	23,6	24,3	55,8	>1
<b>20a</b>	1	Bn	L-Phe	NCH <sub>3</sub> OCH <sub>3</sub>	50,9	65,2	92,3	NT
<b>20b</b>	1	Bn	L-Leu	NCH <sub>3</sub> OCH <sub>3</sub>	42,7	45,2	54,1	NT
<b>21a</b>	1	H	L-Phe	NCH <sub>3</sub> OCH <sub>3</sub>	99,1	55,5	72,4	NT
<b>21b</b>	1	H	L-Leu	NCH <sub>3</sub> OCH <sub>3</sub>	>100	58,6	>100	NT
<b>17a</b>	2	Bn	L-Phe-D-Leu	NCH <sub>3</sub> OCH <sub>3</sub>	25,8	32,2	67,4	NT
<b>17b</b>	2	Bn	L-Leu-L-Phe	NCH <sub>3</sub> OCH <sub>3</sub>	22,5	19,5	81,9	NT
<b>17c</b>	2	Bn	L-Leu-L-Leu	NCH <sub>3</sub> OCH <sub>3</sub>	33,2	22,2	35,2	NT
<b>17d</b>	2	Bn	L-Phe-L-Phe	NCH <sub>3</sub> OCH <sub>3</sub>	29,6	28,6	72,1	NT
<b>22a</b>	2	Bn	L-Phe-DL-Leu	H	17,3	15,1	17,7	>1
<b>22b</b>	2	Bn	L-Leu-L-Phe	H	16,3	11,0	14,8	>1
<b>22c</b>	2	Bn	L-Leu-DL-Leu	H	21,0	16,3	37,0	>1
<b>22d</b>	2	Bn	L-Phe-L-Phe	H	27,1	15,5	21,7	>1
<b>23a</b>	2	H	L-Phe-L-Leu	NCH <sub>3</sub> OCH <sub>3</sub>	90,9	64,1	71,6	NT
<b>23b</b>	2	H	L-Leu-L-Phe	NCH <sub>3</sub> OCH <sub>3</sub>	93,6	48,2	79,2	NT
<b>23c</b>	2	H	L-Leu-L-Leu	NCH <sub>3</sub> OCH <sub>3</sub>	98,1	63,0	69,0	NT
<b>23d</b>	2	H	L-Phe-DL-Phe	NCH <sub>3</sub> OCH <sub>3</sub>	79,5	54,2	68,7	NT
<b>24</b>	2	H	L-Leu-L-Phe	H	57,9	27,7	64,9	>1
<b>25a</b>	3	Bn	L-Leu-L-Leu-D-Leu	OMe	>100	51,0	82,0	NT
<b>25b</b>	3	Bn	L-Leu-L-Leu-L-Leu	OMe	87,5	48,4	84,9	NT
<b>25c</b>	3	Bn	L-Leu-L-Leu-L-Phe	OMe	70,3	31,4	72,2	NT
<b>25d</b>	3	Bn	L-Leu-L-Phe-L-Leu	OMe	58,5	48,5	83,7	NT
<b>25e</b>	3	Bn	L-Leu-L-Phe-D-Leu	OMe	100	68,2	88,5	NT
<b>25f</b>	3	Bn	L-Leu-L-Phe-L-Phe	OMe	72,0	48,0	82,1	NT
<b>26a</b>	3	Bn	L-Leu-L-Leu-D-Leu	NCH <sub>3</sub> OCH <sub>3</sub>	34,0	11,5	23,7	NT
<b>26b</b>	3	Bn	L-Leu-L-Leu-L-Leu	NCH <sub>3</sub> OCH <sub>3</sub>	55,6	30,6	55,2	NT
<b>26c</b>	3	Bn	L-Leu-L-Leu-L-Phe	NCH <sub>3</sub> OCH <sub>3</sub>	44,2	15,1	47,2	NT
<b>26d</b>	3	Bn	L-Leu-L-Phe-L-Leu	NCH <sub>3</sub> OCH <sub>3</sub>	16,4	19,0	48,6	NT
<b>26e</b>	3	Bn	L-Leu-L-Phe-D-Leu	NCH <sub>3</sub> OCH <sub>3</sub>	28,9	17,6	22,6	NT
<b>26f</b>	3	Bn	L-Leu-L-Phe-L-Phe	NCH <sub>3</sub> OCH <sub>3</sub>	34,7	35,7	56,3	NT
<b>27a</b>	3	Bn	L-Leu-L-Phe-DL-Leu	H	<b>0,61</b>	<b>0,49</b>	<b>0,2</b>	<b>0,099</b>
<b>27b</b>	3	Bn	L-Leu-L-Leu-L-Leu	H	<b>0,76</b>	<b>0,41</b>	<b>0,20</b>	<b>0,057</b>
<b>27c</b>	3	Bn	L-Leu-L-Leu-D-Leu	H	<b>0,98</b>	<b>0,58</b>	<b>0,38</b>	<b>0,182</b>
<b>27d</b>	3	Bn	L-Leu-L-Leu-DL-Phe	H	<b>1,05</b>	<b>0,79</b>	<b>0,54</b>	<b>0,197</b>
<b>27e</b>	3	Bn	L-Leu-L-Phe-L-Leu	H	<b>1,04</b>	<b>0,43</b>	<b>0,17</b>	<b>0,067</b>
<b>27f</b>	3	Bn	L-Leu-L-Phe-D-Leu	H	<b>0,73</b>	<b>0,40</b>	<b>0,21</b>	<b>0,075</b>

Pokračování tabulky na další straně

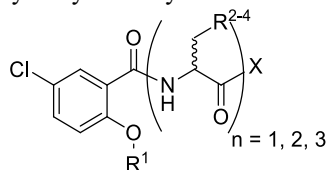
Tabulka 13 pokračování

<b>27g</b>	3	Bn	L-Leu-L-Phe-DL-Leu	H	<b>0,57</b>	<b>0,28</b>	<b>0,15</b>	<b>0,090</b>
<b>27h</b>	3	Bn	L-Leu-L-Phe-L-Phe	H	<b>1,45</b>	<b>0,44</b>	<b>0,40</b>	<b>0,110</b>
<b>27i</b>	3	Bn	L-Leu-L-Phe-DL-Phe	H	<b>1,28</b>	<b>0,40</b>	<b>0,46</b>	<b>0,168</b>
<b>28a</b>	3	H	L-Leu-L-Phe-L-Leu	NCH <sub>3</sub> OCH <sub>3</sub>	30,9	17,2	32,8	NT
<b>28b</b>	3	H	L-Leu-L-Phe-L-Phe	NCH <sub>3</sub> OCH <sub>3</sub>	22,2	16,3	24,1	NT
<b>29a</b>	3	H	L-Leu-L-Phe-L-Leu	H	<b>2,10</b>	<b>0,78</b>	<b>0,67</b>	<b>2,37</b>
<b>29b</b>	3	H	L-Leu-L-Phe-L-Phe	H	<b>6,90</b>	<b>2,30</b>	<b>2,23</b>	<b>0,740</b>
<b>30a</b>	3	H	L-Leu-L-Phe-L-Leu	CH <sub>2</sub> OH	22,4	8,45	11,8	NT
<b>30b</b>	3	H	L-Leu-L-Phe-L-Phe	CH <sub>2</sub> OH	27,3	10,8	18,9	NT
Bortezomib					0,007	0,001	0,001	0,004

<sup>a</sup> Hodnota je průměrným výsledkem nejméně dvou měření. NT – netestováno

### *In vitro* antiproteasomální a apoptotické aktivity

Z důvodu strukturní podobnosti připravených látek, s již používanými inhibitory proteasomu, a díky pozorovaným cytotoxickým aktivitám proti kmenu buněk U266, byly připravené salicyl aldehydy (**18a,b**, **22a-d**, **24**, **27a-i**, **29a,b**) testovány na inhibici 20S proteasomu. Testy byly prováděny luminiscentní analýzou (Proteasome-Glo™ assay) a byly zaměřeny na inhibici všech tří typů podjednotek ( $\beta$ 1,  $\beta$ 2 a  $\beta$ 5). Ačkoliv je alespoň minimální koinhibice všech proteolytických podjednotek nezbytná, majoritní ihibice  $\beta$ 5 podjednotky je stále považovaná za zásadní a právě na inhibici podjednotky  $\beta$ 5 byly prováděné testy soustředěny. Výsledky cytotoxicity uvedené v tabulce dokládají, že testované molekuly vykazují IC<sub>50</sub> ve středně-molární míře v rozmezí 57,0-197 nM, což je ve srovnání s aktivitou bortezomibu desetkrát vyšší, viz **Tabulka 13**. De/benzylované deriváty nesoucí fenylalanin vedle koncové aldehydové skupiny vykazují vyšší IC<sub>50</sub> aktivity než deriváty nesoucí na této pozici leucin. Buněčné testy využívající fluorogenních substrátů potvrzují, že testované látky projevují preferenci k chymotrypsinovým  $\beta$ 5 podjednotkám, viz **Tabulka 14**.

**Tabulka 14:** Antiproteasomální aktivity nových salicylamidů

Prod.	n	R <sup>1</sup>	Zabudované aminokyseliny	X	Reziduální aktivity (%) <sup>a</sup> 10μM při koncentraci		
					β1 kaspáza	β2 trypsin	β5 chymotrypsin
18a	1	Bn	L-Phe	H	53,0	70,2	70,8
18b	1	Bn	L-Leu	H	68,2	57,5	68,8
22a	2	Bn	L-Phe-DL-Leu	H	39,9	92,0	95,0
22b	2	Bn	L-Leu-L-Phe	H	67,8	85,9	85,2
22c	2	Bn	L-Leu-DL-Leu	H	35,3	88,1	84,3
22d	2	Bn	L-Phe-L-Phe	H	71,5	78,4	97,3
24	2	H	L-Leu-L-Phe	H	≥100	81,0	≥100
27a	3	Bn	L-Leu-L-Leu-DL-Leu	H	39,2	64,2	10,4
27b	3	Bn	L-Leu-L-Leu-L-Leu	H	34,6	54,2	11,8
27c	3	Bn	L-Leu-L-Leu-D-Leu	H	35,5	74,3	18,0
27d	3	Bn	L-Leu-L-Leu-DL-Phe	H	66,2	48,4	27,9
27e	3	Bn	L-Leu-L-Phe-L-Leu	H	40,2	42,5	10,6
27f	3	Bn	L-Leu-L-Phe-D-Leu	H	19,7	≥100	20,7
27g	3	Bn	L-Leu-L-Phe-DL-Leu	H	74,6	81,8	13,4
27h	3	Bn	L-Leu-L-Phe-L-Phe	H	≥100	47,2	25,8
27i	3	Bn	L-Leu-L-Phe-DL-Phe	H	≥100	62,3	29,1
29a	3	H	L-Leu-L-Phe-L-Leu	H	28,9	72,6	27,9
29b	3	H	L-Leu-L-Phe-L-Phe	H	73,5	84,2	71,7

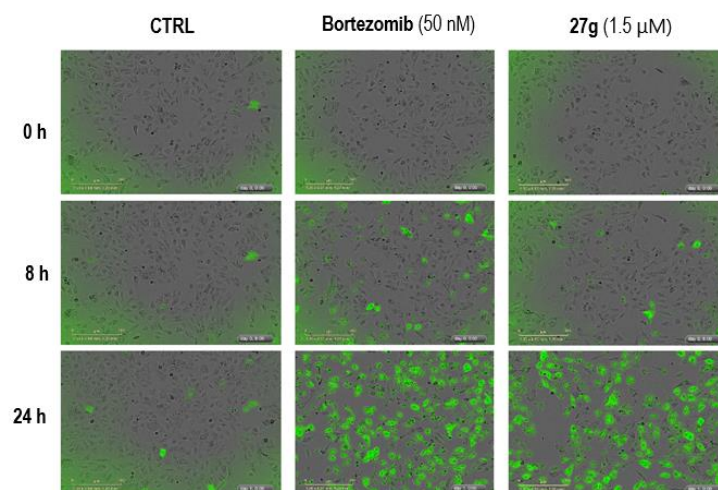
<sup>a</sup> Hodnota je průměrným výsledkem nejméně dvou měření.

K potvrzení cílení testovaných salicylamidů na proteasom a stanovení kinetiky inhibice byl připraven test za pomoci zeleně fluoreskujícího proteinu (GFP) spojeného s tzv. degronem.<sup>308</sup> Degron je krátký peptidový motiv, který je proteasomem rychle rozkládán.<sup>309–311</sup> Pokud proteasom funguje správně, je degron rozložen a GFP (zelené zbarvení) se neprojeví. Při vystavení buněk inhibitorům dochází k zablokování proteasomu, nerozložený komplex GFP-degron se nahromadí a zasažená buňka se zbarví zeleně. Test je monitorován a vyhodnocován pomocí metod zobrazení živých buněk (Incucyte ZOOM<sup>®</sup> live-cell imaging microscope), viz **Obrázek 39**. Výsledky měření jsou porovnány s dvěma kontrolními vzorky, s buňkami bez vystavení inhibitorům a s buňkami vystavenými bortezomibu. Všechny testované látky vykázaly první GFP signály po přibližně 9 hodinách po aplikaci inhibitorů, viz **Obrázek 40 (A - 27g, B – bortezomib) a Příloha 1**.

**Obrázek 40A** (vpravo) zobrazuje proliferaci buněk po dobu 72 hodin. Koncentrace 0,2 μM látky **27g** byla příliš nízká a neměla na životaschopnost testovaných buněk po celou dobu experimentu (72 hodin) žádný vliv. Nejnižší koncentrací, u které byla nejdříve pozorována apoptická aktivita, byla v čase 54 hodin

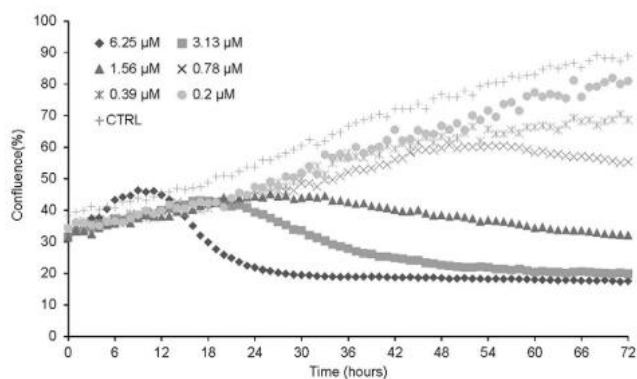
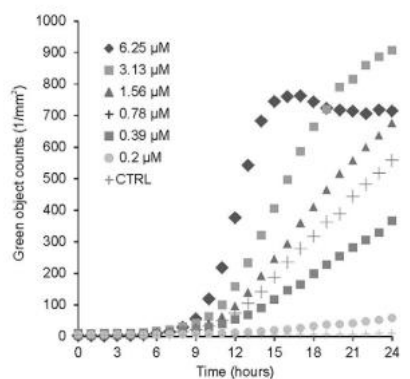
0,78  $\mu\text{M}$ . Z grafu je patrné, že látka **27g** (až do koncentrace 1,56  $\mu\text{M}$ ) po dobu prvních 24 hodin nevykazovala žádný vliv na proliferaci buněk substrátu. V průběhu následujících 48 hodin došlo u tohoto vzorku k přerušení proliferace u smrti buněk. Maximální použitá koncentrace (6,25  $\mu\text{M}$ ) se pro testované buňky stala po 16 hodinách toxickou, proto byl pravděpodobně pozorován pokles GFP signálu, viz **Obrázek 40A** (vlevo).

**Obrázek 39:** Časový průběh inhibice proteasomu

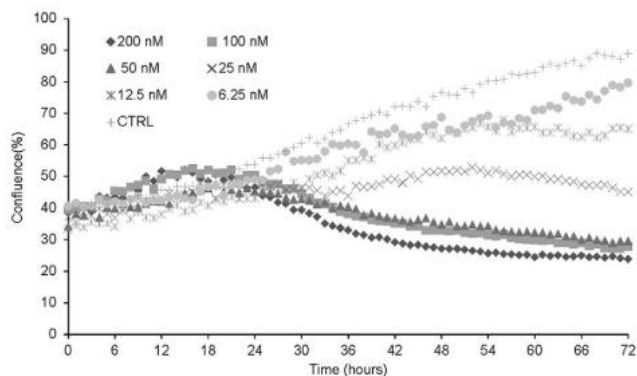
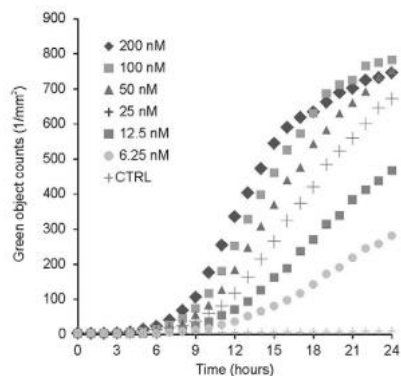


**Obrázek 40:** Inhibice ubiquitin-proteasomálního systému salicylamidem **27g** (A) a bortezomibem (B) Grafy vlevo udávají počet zelených objektů (buněk se zelenou odezvou nahromaděného GFP) na 1 mm<sup>2</sup>. Grafy vpravo udávají míru proliferace buněk po dobu 72 hodin.

A



B



### 3.3 ZÁKLADNÍ VZTAHY MEZI STRUKTUROU A BIOLOGICKOU AKTIVITOU

Ačkoli spolu připravené molekuly velmi blízce souvisí a strukturně ze sebe navzájem vycházejí, je možné je záměrem jejich přípravy zařadit do dvou skupin. Celkem bylo připraveno 64 originálních látek, které poskytují dostatečné množství údajů pro vyvození závěrů co do vztahu jejich struktury k pozorované aktivitě. Tyto poznatky jsou důležitým výsledkem předkládané práce, poněvadž mohou pomoci při dalším plánování a rozvoji tohoto vědeckého tématu, které skrývá značný potenciál.

#### 3.3.1 Porovnání salicylamidů sérií L, N a O

První skupinou posuzovaných sloučenin jsou salicylamidy s jednou nebo dvěma aminokyselinami zakončené alifatickým nebo allylovým amidem (**N** - **10a-e**, **O** - **11a-d**), které byly vytvořeny za účelem doplnění studie zkoumající vztah struktury a pozorované biologické aktivity u salicylamidů série **L** (jedna aminokyselina, anilin).

Středně mikro-molární antiproliferativní aktivity vůči kmenu leukemie K562 ( $IC_{50} = 2,5-5,9 \mu M$ ) a rakoviny prsu MCF-7 ( $IC_{50} = 1,9-8,8 \mu M$ ) se projeví zejména u derivátů bez ochranné benzylové skupiny, s pozicí 5 na salicylovém motivu substituovanou chlorem a s elektronakceptorní substitucí na anilinovém motivu (4-Cl, 4-Br, 4-CF<sub>3</sub>, 3-CF<sub>3</sub>, 3,4-diCl). Co do přítomné aminokyseliny (cyklohexylalanin, fenylyalanin, leucin, terc-leucin) je preferována stericky objemnější skupina před menšími (glycin, alanin).<sup>84</sup>

Série látek **O** připravená vědeckým kolektivem doc. Ing. Aleše Imramovského, Ph.D. (**Tabulka 12**) přinesla oproti původní sérii **L** strukturní úpravu spočívající v prodloužení peptidového motivu o jednu aminokyselinu. Připravené látky dosáhly srovnatelných středně-mikromolárních antiproliferativních aktivit vůči kmenům leukemie K562 ( $IC_{50} = 3,7-7,5 \mu M$ ) a leukemie CEM ( $IC_{50} = 2,6-7,9 \mu M$ ). Nejperspektivnějších osm látek bylo vybráno k dalším testům vůči kmenům kožního melanomu G361 ( $IC_{50} = 4,5-11,5 \mu M$ ), rakoviny prsu MCF-7 ( $IC_{50} = 3,6-7,3 \mu M$ ) a rakoviny střeva HCT-116 ( $IC_{50} = 2,8-5,8 \mu M$ ). Opět bylo potvrzeno, že pro dosažení nižších aktivit jsou vhodnější deriváty bez benzylové ochranné skupiny a s elektronakceptorními skupinami na anilinovém motivu (4-CF<sub>3</sub>, 3,4-diCl). Anilinový motiv byl v některých případech nahrazen heterocyklickými strukturami (thiazol-2-yl, morfolin-1-yl). Tyto deriváty ale nedosáhly požadovaných antiproliferativních aktivit.

Při konstrukci peptidového motivu bylo využito výhradně leucinu, fenylalaninu nebo jejich kombinací. Nižších aktivit dosahovaly látky, které měly na druhé pozici leucin. Přípravené deriváty série **O** dosáhly srovnatelných antiproliferativních aktivit s původní sérií **L**. Prodloužení peptidového řetězce o jednu aminokyselinu nevedlo k výraznému zlepšení pozorovaných aktivit.<sup>300</sup>

Salicylamidy s jednou nebo dvěma aminokyselinami a zakončené alifatickým nebo allylovým amidem (**Tabulka 11, N - 10a-e, O - 11a-d**) dosáhly vůči kmenům leukemie (K562, THP-1, CEM) středně-mikromolárních antiproliferativních aktivit v řádu vyšších desítek  $\mu\text{M}$  ( $\text{GI}_{50} = 14,4\text{--}93,3 \mu\text{M}$ ). To je přibližně o řád vyšší výsledek v porovnání s původní sérií **L** nebo sérií **O**. Náhrada anilinového motivu za alifatický nebo allylový není vhodnou strukturální úpravou pro zlepšení biologických aktivit za daným účelem.<sup>299</sup>

### 3.3.2 Salicylamidy jako inhibitory proteasomu

Inhibice proteasomu je perspektivní metodou léčení celé škály nádorových onemocnění. V současnosti existuje několik schválených prostředků, které se za tímto účelem již v klinické praxi využívají. Zároveň se u nich postupně objevují více či méně závažné vedlejší účinky, které komplikují pacientům léčbu, snižují kvalitu jejich života nebo mají za následek přerušování a nedokončení léčby a s tím spojené následné komplikace. Z těchto důvodů je objevování nových a schopnějších inhibitorů proteasomu s méně závažnými vedlejšími účinky komplikovaná a náročná, ale současně nezbytná činnost pro zvyšování kvality života lidí s rakovinou.

Druhou skupinou sloučenin jsou salicylamidy vytvořené za účelem studia jejich cytotoxických aktivit vůči kmenům nádorového bujení a jejich schopnosti inhibovat proteasom a způsobovat apoptózu (**17a-d, 18a,b, 19, 20a,b, 21a,b, 23a-d, 22a-d, 24, 26a-f, 27a-i, 28a,b, 29a,b, 30a,b**).

#### Vliv přítomnosti ochrany fenolického hydroxyly

Pro molekuly bez ohledu na koncovou funkční skupinu, délku nebo konfiguraci peptidového řetězce platí, že sloučeniny s přítomnou benzylovou ochrannou skupinou na fenolickém hydroxyly dosahují nižších antiproliferativních aktivit než ochráněná analoga těchto sloučenin. Příkladem je porovnání aktivit sloučenin **20a,b – 21a,b, 17a-d – 23a-d, 22b – 24, 26d,f – 28a,b, 27e,h – 29a,b**, viz **Tabulka 13**. Příčinou je pravděpodobně polární charakter uvolněné hydroxylové skupiny, který tvoří překážku

molekuly inhibitoru v nebráněném prostupu dovnitř proteasomu. V dřívějších publikacích bylo pro původní salicylanilidy zjištěno, že těžiště jejich antimykobakteriálních aktivit spočívá právě ve volné hydroxylové skupině.<sup>105,312</sup> Je patrné, že mechanismus účinku je v jednotlivých případech odlišný, což sebou nese rozdílné preference co do vlastností a strukturních motivů jednotlivých sloučenin.

### Vliv funkční skupiny a délky peptidového motivu

Hlavními strukturními aspekty, které mají nejzásadnější vliv na aktivitu prezentovaných sloučenin, je délka peptidového řetězce a funkční skupina. Aldehyd se bez překvapení ukázal jako nejvhodnější zakončení testovaných látek. V případě délky peptidového řetězce dosahují nejnižších aktivit deriváty s delším řetězcem. Nejnižších antiproliferativních aktivit dosahují aldehydy s tripeptidem (**27a-i**,  $GI_{50} = 0,15-1,45 \mu\text{M}$ ), aldehydy s dipeptidem dosahují vyšších aktivit (**22a-d**,  $GI_{50} = 11,0-21,1 \mu\text{M}$ ) a aldehydy pouze s jednou aminokyselinou dosahují aktivit srovnatelných s ostatními méně aktivními molekulami (**18a,b**,  $GI_{50} = 17,7-63,8 \mu\text{M}$ ).

Využití Weinreb amidu pro inhibici proteasomu nebylo v dostupné literatuře doposud popsáno, ačkoliv se k tomu elektronakceptorní povaha Weinreb amidové funkční skupiny přímo nabízí. Pro pozorované aktivity platí obě výše zmíněná pravidla o nižší aktivitě u derivátů s přítomnou benzylovou skupinou a o nižší aktivitě u derivátů s delším peptidovým řetězcem. Nejnižších antiproliferativních aktivit dosahují Weinreb amidy s tripeptidem (**26a-f**,  $GI_{50} = 11,5-56,3 \mu\text{M}$ ), deriváty s dipeptidem dosahují vyšších (**17a-d**,  $GI_{50} = 19,5-81,9 \mu\text{M}$ ) a deriváty pouze s jednou aminokyselinou nejvyšších aktivit (**20a,b**,  $GI_{50} = 42,7-92,3 \mu\text{M}$ ). Weinreb amidy bez benzylové chránící skupiny (**21a,b**, **23a-d**, **28a,b**) dosahují aktivit v rozmezí  $16,3->100 \mu\text{M}$ .

Methylesterové deriváty (**25a-f**,  $GI_{50} = 31,4->100 \mu\text{M}$ ) jsou bez aktivity z důvodu absence vhodné odstupující funkční skupiny, která by svou reaktivitou umožnila inhibovat proteasom popsáním mechanismem.

### Vliv aminokyseliny přítomné na poslední pozici

Posledním strukturním trendem, který má prokazatelně vliv na pozorovanou antiproliferativní aktivitu, je typ aminokyseliny přítomné na pozici přímo vedle funkční skupiny. Pokud je na pozici leucin, je aktivita sloučenin nižší než v případě, že je na této pozici fenylalanin. Za účelem ověření tohoto tvrzení byly cíleně připraveny deriváty nesoucí v dané pozici D-Leu a racemický DL-Leu. Vzhledem k předcházejícímu zjištění,



že deriváty s leucinem poskytují lepší aktivity, nebyly odpovídající molekuly s D-Phe syntetizovány. Ve skupině salicylamidů s tripeptidem a aldehydovou funkční skupinou (**27**) byly připraveny dvě trojice sloučenin o stejné konfiguraci aminokyselin lišící se pouze ve sterické orientaci leucinu na poslední pozici (**27a-c**, **27e-g**). V obou trojicích dosáhl nejnižších aktivit derivát s racemickým leucinem na poslední pozici (**27a**, **27g**). U dalších derivátů v rámci těchto trojic již není možné vyvodit jednoznačný závěr, protože v jednom případě (L-Leu-L-Leu-D/L-Leu) dosahuje nižších aktivit derivát s L-Leu (**27b**) oproti derivátu s D-Leu (**27c**). Ve druhém případě (L-Leu-L-Phe-D/L-Leu) je situace opačná a nižších aktivit dosahuje derivát s D-Leu (**27f**) oproti derivátu s L-Leu (**27e**). Důvodem je pravděpodobně tvar zbývající části peptidového řetězce, ale pro takové tvrzení by bylo potřeba připravit rozsáhlejší sérii možných kombinací. Aktivity těchto dvou trojic látek jsou mezi sebou srovnatelné, liší se pouze na úrovni desetin  $\mu\text{M}$  a pohybují se v rozmezí 0,15-1,04  $\mu\text{M}$ . Všech šest sloučenin patří mezi nejvíce aktivní a nejperspektivnější látky celé dizertační práce. U jiných dvojic molekul (methylestery **25a – 25b**, **25d – 25e**, Weinreb amidy **26a – 26b**, **26d – 26e**) lišících se sterickou konfigurací leucinu na poslední pozici nebylo možné vyvodit jednoznačný závěr ze vztahu jejich struktury a pozorované aktivity, ale poněvadž dosažené antiproliferativní aktivity těchto sloučenin jsou o dva řády vyšší než u série aldehydů **27**, není jim věnována další pozornost.

Dalším předmětem testovaným v rámci proteasomální inhibice bylo určení selektivity sloučenin vůči jednotlivým proteolytickým lokalitám na vnitřní straně proteasomu. Ačkoliv je podle současných znalostí nejdůležitější kvalitní inhibice chymotrypsionové  $\beta 5$  podjednotky, pro správný efekt je nutná alespoň minimální koinhibice kapsázové  $\beta 1$  a trypsinové  $\beta 2$  podjednotky. Pozorované reziduální aktivity (**Tabulka 14**) potvrdily, že testované látky jsou v souladu s obecně převládajícím názorem a při inhibici dávají přednost  $\beta 5$  podjednotce. Toto zjištění je v souladu s pozorovanými aktivitami již schválených inhibitorů proteasomu jako je bortezomib nebo carfilzomib.

Ačkoliv z připravených molekul dosáhla nejnižší aktivity v inhibici proteasomu látka **27e** ( $\text{IC}_{50} = 0,067 \mu\text{M}$ , bortezomib  $\text{IC}_{50} = 0,004 \mu\text{M}$ ), pro další testy byla vybrána molekula **27g** ( $\text{IC}_{50} = 0,090 \mu\text{M}$ ) z důvodu nejnižší dosažené antiproliferativní aktivity vůči mnohačetnému myelomu U266 ( $\text{GI}_{50} = 0,15 \mu\text{M}$ ). Látka **27g** dosahuje v koncentraci 1,5  $\mu\text{M}$  v čase 24 hodin stejné antiproteasomální aktivity jako bortezomib

v koncentraci 50 nM (**Obrázek 39**). Rozdíl dvou řádů v pozorované aktivitě je výrazný, pro látku **27g** nemusí být ale nutně negativní. V současnosti existuje několik sloučenin schválených pro léčbu mnohačetného myelomu metodou proteasomální inhibice, u kterých se postupně objevují více či méně závažné vedlejší účinky. Inhibice proteasomu je stále se rozvíjejícím způsobem terapie nádorových onemocnění, kde je neustálá potřeba nových látek.

## 4. ZÁVĚR

Rešeršní část předkládané dizertační práce se podrobně zaměřuje na několik témat, která svým průnikem vytváří důkladné informační podklady pro vlastní syntetickou práci a dávají jí účel a smysl. Literární rešerše se zaměřuje na popsání biologické vlastnosti, metody syntézy a perspektivu salicylamidů. Dalším podrobně popsaným tématem je syntéza peptidů zaměřená na používaná činidla a aditiva a jejich výhody a omezení. Kapitola dále popisuje příčiny, průběh a možnosti analýzy a kvantifikace racemizace při peptidové syntéze, stejně jako klasické a moderní přístupy k syntéze peptidů, tzn. syntéza v roztoku, na pevné fázi nebo automatizovaná syntéza. V poslední části se rešerše soustředí na funkci buněčného proteasomu a důsledky jeho inhibice, které je možné využít v terapii řady nádorových onemocnění, např. mnohočetného myelomu nebo karcinomu prsu nebo tlustého střeva. Součástí práce je také přehled tradičních a nově testovaných inhibitorů proteasomu.

V počátku syntetické práce bylo přípravou modelových sérií látek zjištěno, že pozorovaná racemizace aminokyselin není zapříčiněna využíváním silné anorganické báze v průběhu reakční. Pravou příčinou je kombinace používaných amidačních činidel a reakčních podmínek v průběhu amidace. Úspěšně provedenou sérií optimalizací byly získány ideální reakční podmínky, vzájemné poměry činidel a vhodné reakční časy pro provádění amidace s minimální racemizací. Poměr jednotlivých diastereomerů je tak 96:4. 4 % druhého izomeru je na hranici detekčních možností NMR měření. Optimalizací došlo k výraznému zkrácení reakční doby amidace z 20 hodin na 1 hodinu. Výměnou používaného karbodiimidu se podařilo zjednodušit čištění produktu amidace od stop DCU a ostatních vedlejších produktů. Dalším důsledkem výměny používaného karbodiimidu bylo zvýšení výtěžku amidace z průměrných 65 % na 90 %, jakož i možnost zvětšení násady reakce na vyšší desítky gramů. **Tabulka 10** shrnuje vývoj reakčních podmínek amidace a s nimi dosažené výsledky enantiomerních přebytků u modelových molekul **5a-i-iv**.

Příprava série salicylamidů zakončených alifatickým amidem nebo allylamidem (**N** - **10a-e**, **O** - **11a-d**) byla provedena metodou postupné výstavby. Při porovnání dosažených antiproliferativních aktivit vůči kmenům leukemie (K562, THP-1, CEM) s původní sérií **L** nebo sérií **O** připravenou v rámci vědeckého kolektivu, dosahují látky vyšších středně-mikromolárních aktivit v řádu vyšších desítek  $\mu\text{M}$  ( $\text{GI}_{50} = 14,4\text{-}93,3\text{-}\mu\text{M}$ ). Náhrada anilinového motivu za alifatický nebo allylový není

vhodnou úpravou, která by měla pozitivní vliv na antiproliferativní aktivitu vůči testovaným kmenům leukemie. Pro zamýšlené účely se nejlépe osvědčily salicylamidy s jednou nebo dvěma aminokyselinami, s leucinem na druhé pozici a s anilinem substituovaným silně elektronakceptorními skupinami (4-Cl, 4-Br, 4-CF<sub>3</sub>, 3-CF<sub>3</sub>, 3,4-diCl).

Pro přípravu druhé série salicylamidů byly navrženy a experimentálně ověřeny dva syntetické přístupy. První testovaná Metoda stavebního bloku, kdy je funkční skupina připravena separátně na poslední aminokyselině, aby ta byla následně napojena ve smyslu amidace na salicylamidový substrát, byla použita pro přípravu dvou dipeptidových Weinreb amidů (**17a,b**), ze kterých je dále možné připravit příslušné aldehydy redukcí funkční skupiny. Co do kvality připraveného Weinreb amidu jsou obě metody srovnatelné. Nízkým úhrným výtěžkem (**Schéma 30, 2a,b** → **14a,b**, 35 %) je ale metoda stavebního bloku velmi nevhodná. Hlavním účelem zvolené metody byla příprava epoxyketonové funkční skupiny, která se popsáním způsobem nezdařila. Poslední krok syntézy, ačkoliv byl v literatuře popsán, nevedl k úspěšné izolaci finálního stavebního bloku s epoxyketonovou funkční skupinou. I kdyby se tento reakční stupeň podařilo provést úspěšně, opět by se jako významný negativní faktor projevila nevhodnost celé metody (**Schéma 30, 2b** → **16**, 9 %). Od využívání Metody stavebního bloku bylo v důsledku popsáných problémů nadále upuštěno stejně jako od dalších pokusů o zavádění epoxyketonové funkční skupiny.

Druhá testovaná Metoda postupné syntézy spočívá ve výstavbě peptidového řetězce na kyselině salicylové, kdy je funkční skupina zavedena až na úplný závěr. Zásadním problémem metody byla racemizace pozorovaná po zavedení druhého stereogenního centra do molekuly u dipeptidových derivátů. Provedením rozsáhlých optimalizací podmínek amidace se podařilo racemizaci potlačit. Dalším efektem provedených úprav bylo výrazné zrychlení syntézy za současného zvýšení výtěžků jednotlivých syntetických stupňů. Úspěšně byl tak proveden scale-up jednotlivých kroků, kdy se objem připravovaných produktů zvýšil z jednotek gramů na vyšší desítky gramů. Zvýšení výtěžků poskytlo v reálném čase dostatek materiálu pro přípravu kombinačně bohaté skupiny cílových molekul.

Veškeré sloučeniny pro následné testování biologických aktivit byly syntetizovány metodou postupné syntézy. Tímto způsobem byla připravena sada 46 originálních salicylamidů s peptidovým řetězcem z leucinu, fenylalaninu nebo jejich

kombinací. Látky byly charakterizovány a testovány na aktivitu proti kmenům leukemie a mnohočetnému myelomu. Některé ze salicylamidů prokázaly antiproliferativní aktivitu proti proteasomu mnohočetného myelomu v nanomolárním rozsahu. Byla potvrzena souvislost mezi proteasomální inhibicí a antiproliferativní aktivitou u všech tří testovaných buněčných kmenů. Nejperspektivnější sloučeniny vykázaly buněčné efekty odpovídající proteasomální inhibici a indukci apoptózy u buněk mnohačetného myelomu.

Pro molekuly, bez ohledu na koncovou funkční skupinu, délku nebo konfiguraci peptidového řetězce platí, že sloučeniny s přítomnou benzylovou ochrannou skupinou na fenolickém hydroxyly dosahují nižších antiproliferativních aktivit než ochráněná analoga těchto sloučenin. Příčinou je pravděpodobně polární charakter uvolněné hydroxylové skupiny, který tvoří překážku molekuly inhibitoru v nebráněném prostupu dovnitř bílkovinného komplexu, proteasomu. Hlavními strukturálními aspekty, které mají nejzásadnější vliv na aktivitu prezentovaných sloučenin, je délka peptidového řetězce a funkční skupina. Aldehyd se bez překvapení ukázal jako nevhodnější zakončení. V případě délky peptidového řetězce dosahují nejnižších aktivit deriváty s delším řetězcem. Posledním strukturálním trendem, který má prokazatelně vliv na pozorovanou antiproliferativní aktivitu, je typ aminokyseliny přítomné na pozici přímo vedle funkční skupiny. Pokud je na pozici leucin, je aktivita sloučenin nižší než v případě, že je na této pozici fenylyalanin. Testované molekuly preferují při inhibici proteasomu chymotrypsinovou  $\beta 5$  podjednotku, což je v souladu s trendem, který je v současnosti pozorován u schválených inhibitorů proteasomu jako je brotezomib nebo carfilzomib. Látka **27g** dosahuje v koncentraci 1,5  $\mu\text{M}$  v čase 24 hodin stejné antiproteasomální aktivity jako bortezomib v koncentraci 50 nM. Rozdíl dvou řádů v aktivitě nemusí být pro látku **27g** nutně negativní. Inhibice proteasomu je stále se rozvíjející metodou léčení celé škály nádorových onemocnění, a ikdyž v současnosti existuje několik schválených prostředků, postupně se u nich objevují více či méně závažné vedlejší účinky. Ty komplikují léčbu, snižují kvalitu života pacientů nebo mají za následek nedokončení léčby, které může vést k relapsu nemoci nebo získání imunity vůči používané léčbě. Z těchto důvodů je objevování nových inhibitorů proteasomu s méně závažnými vedlejšími účinky důležitá činnost.

Všechny připravené sloučeniny byly plně charakterizovány za pomoci NMR, Maldi-TOF, elementární analýzy, IČ a, kde to povaha látky dovolila, změřením bodu tání. Celkem 73 látek publikovaných v této práci je originálních. Výsledky předkládané dizertační práce byly prezentovány na několika domácích i zahraničních konferencích a byly publikovány ve dvou vědeckých publikacích.

## 5. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

### 5.1 OBECNÉ METODY

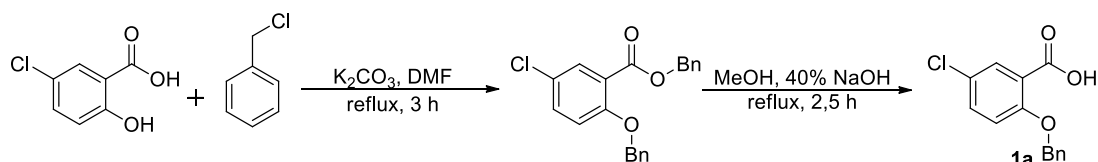
Rozpouštědla, chemikálie a činidla použita při syntéze byla zakoupena od firem Sigma-Aldrich, TCI Europe, Acros Organics, Fluorochem, Lach-Ner nebo Merck a byla použita bez dalšího čištění. Suchý THF byl vždy čerstvě destilován za sušení kovovým sodíkem a detekcí pomocí benzofenonu. Tenkovrstvá chromatografie byla prováděna na aluminiových destičkách potažených vrstvou silikagelu SiO<sub>2</sub> 60 F<sub>254</sub> o tloušťce 0,2 mm (Merck) s vizualizací pomocí UV lampy (254 nebo 360 nm). Vizualizace alifatických motivů molekuly byla prováděna pomocí 5% roztoku kyseliny fosfomolybdenové v ethanolu. Body tání byly stanoveny buď v kapilárách na přístroji Büchi B-540. Produkty byly čištěny klasickými laboratorními metodami jako krystalizace nebo kolonová chromatografie. <sup>1</sup>H a <sup>13</sup>C NMR spektra byla měřena v CDCl<sub>3</sub>, CD<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, d<sub>6</sub>-DMSO a D<sub>2</sub>O při 25 °C na přístroji Bruker Avance™ III 400 při frekvencích <sup>1</sup>H (400 MHz) a <sup>13</sup>C (100,26 MHz) nebo na přístroji Bruker Ascend™ 500 při frekvencích <sup>1</sup>H (500,13 MHz) a <sup>13</sup>C (125,76 MHz). Chemické posuny jsou uvedeny v jednotkách ppm relativně k signálu tetramethylsilanu (TMS, Me<sub>4</sub>Si). Reziduální signály rozpouštědel byly použity jako vnitřní standard (CDCl<sub>3</sub> – 7,25 a 77,25; d<sub>6</sub>-DMSO – 2,55 a 39,51; CD<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> – 5,32 a 54,00; D<sub>2</sub>O - 4,80 ppm pro <sup>1</sup>H-resp. <sup>13</sup>C-NMR spektra). Elementární analýza (C, H, N) byla prováděna na automatickém mikroanalyzátoru Flash 2000 Organic. IČ spektra byla měřena na přístroji Perkin Elmer FT-IR Spectrum BX s HATR nástavcem. Hmotnostní spektra s vysokým rozlišením byla měřena metodou „dried droplet“ pomocí MALDI hmotnostního spektrometru LTQ Orbitrap XL (Thermo Fisher Scientific) vybaveného dusíkovým UV laserem (337 nm, 60 Hz). Spektra byla měřena v režimu pozitivních iontů, v normálním hmotnostním rozsahu s rozlišením 100 000 při m/z = 400. Jako matrice byla použita 2,5-dihydroxybenzoová kyselina (DHB). Optická otáčivost byla měřena na přístroji Perkin Elmer Polarimeter Model 341 se sodíkovou a rtuťovou výbojkou, koncentrace c je uvedena v g/100 ml rozpouštědla.

## 5.2 POSTUPY SYNTÉZY A CHARAKTERIZACE PŘIPRAVENÝCH SLOUČENIN

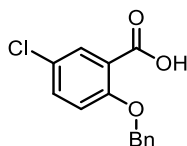
### 5.2.1 Základní molekuly

#### Obecný postup pro přípravu chráněné kyseliny salicylové **1a,b**

Postup pro přípravu látky **1a** byl převzat z literatury a upraven.<sup>297</sup> Do kulaté baňky (500 ml) byla předložena kyselina 5-chlorosalicylová (10 g, 57,9 mmol), DMF (180 ml), benzylchlorid (21,06 ml, 183,1 mmol), a K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (36,02 g, 260,6 mmol). Reakční směs byla refluxována (130 °C) po dobu 3 hodin, poté byla nechána volně zchladnout na 70 °C a následně byla nalita do míchané směsi led/voda (2,5 l). V průběhu 0,5 hodiny míchání se začala vylučovat bílá sraženina, která byla odfiltrována a na Büchnerově nálevce promyta studenou vodou (3 x 100 ml). Surový produkt byl rozpuštěn v DCM (100 ml) a promyt vodou (100 ml), nasyceným roztokem NaCl (100 ml) a vodou (100 ml). Organická fáze byla vysušena bezv. Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> a na RVO zahuštěna do žlutého oleje. Meziprodukt byl rozpuštěn v baňce (250 ml) v MeOH (40 ml). Po přilítí 40% NaOH ve vodě (7 ml) byla reakční směs refluxována 2,5 hodiny. MeOH byl poté oddestilován za sníženého tlaku. Odparek byl naředěn vodou (65 ml) a reakční směs byla okyselena konc. HCl na pH = 1. Vyloučený produkt byl odfiltrován, rozpuštěn v EtOAc (30 ml) a promyt vodou (1 x 50 ml). Organická fáze byla vysušena bezv. Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> a na RVO zahuštěna do konstantní váhy. Bylo izolováno 12,5 g (82 %) bílé látky **1a**.



#### Charakterizace kyseliny 2-benzyloxy-5-chlorobenzoové **1a**

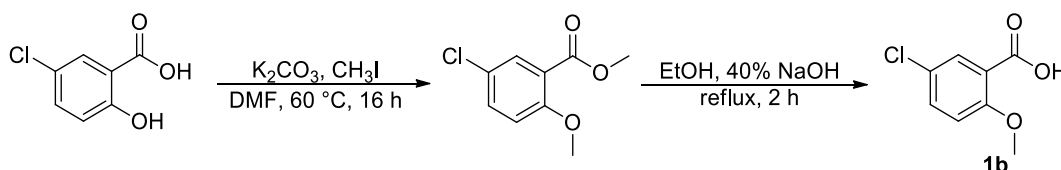


Bílá pevná látka; výtěžek 82 %; b.t. 122–125 °C.  $R_{f(\text{hex/EtOA-1/1})} = 0,33$ . **<sup>1</sup>H NMR** (400 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>):  $\delta$  12,94 (1H, brs, COOH), 7,68 (1H, d,  $J = 2,8$  Hz, Ar-*H*), 7,53 (1H, dd,  $J = 8,8$  Hz,  $J = 2,8$  Hz, Ar-*H*), 7,42–7,30 (5H, m, Ar-*H*), 7,14 (1H, d,  $J = 8,8$  Hz, Ar-*H*), 5,28–5,21 (2H, ABq,  $J = 12,4$  Hz, O-CH<sub>2</sub>-Ph). **<sup>13</sup>C NMR** (100,62 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>):  $\delta$  166,8; 157,6; 133,2; 130,3; 129,5; 129,1; 129,0; 128,8; 128,3; 127,4;

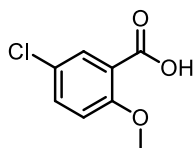


124,2; 123,5; 115,2; 56,7. **CHN analýza:** Vypočteno pro  $C_{14}H_{11}ClO_3$  (262,69): C, 64,01; H, 4,22. Nalezeno: C, 63,94±0,02; H, 4,26±0,03.

Postup pro přípravu látky **1b** byl převzat z literatury a upraven.<sup>297</sup> Do kulaté baňky (250 ml) byla předložena kyselina 5-chlorosalicylová (3 g, 17,4 mmol), DMF (60 ml), methyljodid (3,35 ml, 52,2 mmol, 3 ekv), a  $K_2CO_3$  (10,82 g, 78,3 mmol, 4,5 ekv). Reakční směs byla při 60 °C míchána 16 hodin. Poté byla reakční směsi přilita voda (60 ml) a produkt byl extrahován do diethyletheru (3 x 40 ml). Etherová fáze byla promyta vodou (2 x 50 ml), vysušena bezv.  $Na_2SO_4$  a na RVO zahuštěna do žlutého oleje. Meziprodukt byl rozpuštěn v baňce (250 ml) v EtOH (30 ml). Po přilítí 40% NaOH ve vodě (2,5 ml) byla reakční směs refluxována 2 hodiny. EtOH byl poté oddestilován za sníženého tlaku. Odparek byl naředěn vodou (30 ml) a reakční směs byla okyselená 10% HCl na pH = 1. Vyloučený produkt byl odfiltrován, rozpuštěn v EtOAc (30 ml) a promyt vodou (1 x 50 ml). Organická fáze byla vysušena bezv.  $Na_2SO_4$  a na RVO zahuštěna do konstantní váhy. Bylo izolováno 2,97 g (86 %) bílé látky **1b**.



#### Charakterizace kyseliny 5-chloro-2-methoxybenzoové **1b**

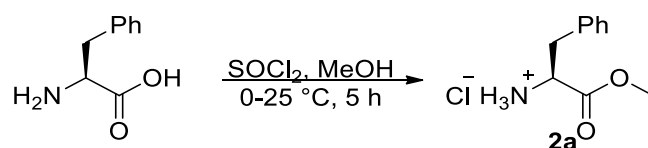


Bílá pevná látka; výtěžek 86 %; b.t. 96–99 °C.  $Rf_{(hex/EtOA-1/1)} = 0,5$ . **<sup>1</sup>H NMR** (400 MHz, DMSO- $d_6$ ):  $\delta$  12,97 (1H, brs, COOH), 7,6 (1H, d,  $J = 2,8$  Hz, Ar-H), 7,54 (1H, dd,  $J = 8,8$  Hz,  $J = 2,8$  Hz, Ar-H), 7,14 (1H, d,  $J = 8,8$  Hz, Ar-H), 3,81 (3H, s, OCH<sub>3</sub>). **<sup>13</sup>C NMR** (100,62 MHz, DMSO- $d_6$ ):  $\delta$  166,7; 157,5; 133,1; 130,4; 124,3; 123,6; 115,1; 56,8. **CHN analýza:** Vypočteno pro  $C_8H_7ClO_3$  (186,59): C, 51,49; H, 3,78. Nalezeno: C, 51,69±0,05; H, 3,80±0,04.

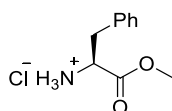
#### Obecný postup pro přípravu hydrochloridů esterů aminokyselin **2a-d**

Postup pro přípravu molekul **2a-c** byl převzat z literatury a upraven.<sup>313</sup> Zvolená aminokyselina (L-fenylalanin, 60,24 mmol) byla suspendována v bezvodém methanolu (100 ml) a vychlazena na 0 °C ve směsi led/NaCl. Thionyl chlorid (5,1 ml, 70,24 mmol)

byl do reakční směsi přidáván po kapkách po dobu 30 minut. Chladicí lázeň byla po dokončení příkupu odstraněna, směs byla pozvolna ohřáta na laboratorní teplotu a nechána za stálého míchání reagovat další 4 hodiny. Reakční směs byla zakonzentrována za sníženého tlaku. Bílý produkt byl suspendován v dichlormethanu (3 x 100 ml) a rozpouštědlo bylo oddestilováno za sníženého tlaku. Bílý produkt byl suspendován v ethyl acetátu (100 ml) a přefiltrován. Filtrační koláč byl promyt ethyl acetátem (3 x 20 ml). Bílý produkt byl usušen na rotační vakuové odparce (RVO) do konstantní hmotnosti.

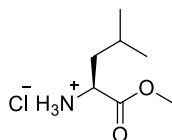


Charakterizace (2S)-1-methoxy-1-oxo-3-fenylpropan-2-amonium chloridu **2a**



Bílá pevná látka; výtěžek 96 %; b.t. 157-160 °C.  $^1\text{H NMR}$  (400 MHz,  $\text{D}_2\text{O}$ ):  $\delta$  7,43-7,35 (3H, m, Ar-H), 7,28-7,25 (2H, m, Ar-H), 4,44-4,40 (1H, m, NH-CH  $\text{CH}_2$ -Ph), 3,82 (3H, s, O-CH<sub>3</sub>), 3,35-3,20 (2H, m, NH-CH CH<sub>2</sub>-Ph).  $^{13}\text{C NMR}$  (100,79 MHz,  $\text{D}_2\text{O}$ ): 170,4; 136,2; 126,3; 125,3; 122,2; 119,5; 118,0; 67,6; 53,9; 36,5. **CHN analýza:** Vypočteno pro  $\text{C}_{10}\text{H}_{14}\text{ClNO}_2$  (215,68): C, 55,69; H, 6,54; N, 6,49. Nalezeno: C, 55,46±0,03; H 6,69±0,02; N, 6,66±0,02. **HRMS (MALDI-TOF, m/z):**  $[\text{M}+\text{H}]^+$  vypočten pro  $\text{C}_{10}\text{H}_{15}\text{ClNO}_2$ : 215,07858 Da, nalezeno: 215,07857 Da.

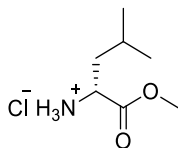
Charakterizace (2S)-1-methoxy-4-methyl-1-oxopentan-2-amonium chloridu **2b**



Bílá pevná látka; výtěžek 94 %; b.t. 149,5-151,2 °C;  $[\alpha_D^{20}] = +12,9^\circ$  (c 1  $\text{H}_2\text{O}$ ).  $^1\text{H NMR}$  (400 MHz,  $\text{D}_2\text{O}$ ):  $\delta$  4,12 (1H, t,  $J = 8$  Hz, NH-CH-CHH-CH-( $\text{CH}_3$ )<sub>2</sub>), 3,77 (3H, s, O-CH<sub>3</sub>), 1,84-1,78 (1H, m, NH-CH-CH-CH-( $\text{CH}_3$ )<sub>2</sub>), 1,74-1,63 (2H, m, NH-CH-CHH-CH-( $\text{CH}_3$ )<sub>2</sub>), NH-CH-CHH-CH-( $\text{CH}_3$ )<sub>2</sub>, NH-CH-CH<sub>2</sub>-CH-( $\text{CH}_3$ )<sub>2</sub>), 0,94-0,82 (6H, m, CH<sub>3</sub>-CH-CH<sub>3</sub>).  $^{13}\text{C NMR}$  (100,79 MHz,  $\text{D}_2\text{O}$ ):  $\delta$  171,7; 53,5; 51,3; 38,7; 24,0; 21,5; 21,1. **CHN analýza:** Vypočteno pro  $\text{C}_7\text{H}_{16}\text{ClN}_3\text{O}_2$  (181,66): C, 46,28; H, 8,88; N, 7,71. Nalezeno:

C, 46,20±0,02; H 9,01±0,02; N, 7,72±0,02. **HRMS (MALDI-TOF, m/z):** [M+H]<sup>+</sup> vypočteno pro C<sub>7</sub>H<sub>17</sub>ClN<sub>3</sub>O<sub>2</sub>: 182,09423 Da; nalezeno: 182,09421 Da.

Charakterizace (2*R*)-1-methoxy-4-methyl-1-oxopentan-2-amonium chloridu **2c**



Bílá pevná látka; výtěžek 92 %; b.t. 149,8-151,5 °C; [ $\alpha_D^{20}$ ] = -12,9° (c 1 H<sub>2</sub>O). **<sup>1</sup>H NMR** (400 MHz, D<sub>2</sub>O):  $\delta$  4,10 (1H, t,  $J$  = 8 Hz, NH-CH-CHH-CH-(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>), 3,79 (3H, s, O-CH<sub>3</sub>), 1,85-1,75 (1H, m, NH-CH-CHH-CH-(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>), 1,75-1,62 (2H, m, NH-CH-CHH-CH-(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>), NH-CH-CH<sub>2</sub>-CH-(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>), 0,96-0,87 (6H, m, CH<sub>3</sub>-CH-CH<sub>3</sub>). **<sup>13</sup>C NMR** (100,79 MHz, D<sub>2</sub>O):  $\delta$  171,5; 53,6; 51,6; 38,9; 24,1; 21,6; 21,1. **IR** (ATR): 2957, 2921, 2842, 2632, 1731, 1588, 1506, 1451, 1248, 1225, 1040 cm<sup>-1</sup>. **CHN analýza:** Vypočteno pro C<sub>7</sub>H<sub>16</sub>ClN<sub>3</sub>O<sub>2</sub> (181,66): C, 46,28; H, 8,88; N, 7,71. Nalezeno: C, 45,99±0,03; H 8,74±0,02; N, 7,69±0,02.

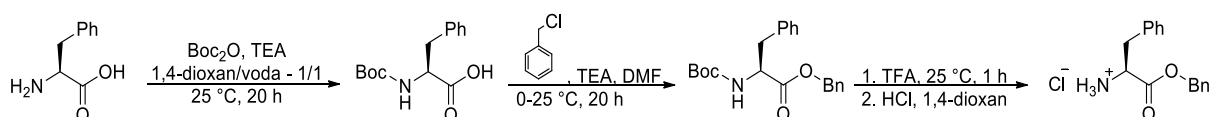
**HRMS (MALDI-TOF, m/z):** [M+H]<sup>+</sup> vypočteno pro C<sub>7</sub>H<sub>17</sub>ClN<sub>3</sub>O<sub>2</sub>: 182,09423 Da; nalezeno: 182,09421 Da.

Postup pro přípravu látky **2d** byl převzat z literatury a upraven.<sup>314</sup> K roztoku L-fenylalaninu (10 g, 60,5 mmol) ve vodě (100 ml) byl přidán TEA (9,28 ml, 66,6 mmol) a roztok Boc<sub>2</sub>O (15,84 g, 72,6 mmol) v 1,4-dioxanu (100 ml). Roztok byl při 25 °C nechán reagovat 20 hodin. Na RVO bylo za sníženého tlaku oddestilován 1,4-dioxan (100 ml). 1M roztokem HCl bylo pH upraveno na pH = 1-2. Vodná fáze byla promyta EtOAc (4 x 50 ml). Spojené organické fáze byly promyty nasyceným roztokem NaCl (2 x 50 ml) a vodou (2 x 50 ml). Organická fáze byla vysušena bezv. Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> a na RVO zahuštěna do konstantní váhy. Bylo izolováno 15,5 g Boc-L-fenylalaninu (97 %) ve formě čirého oleje.

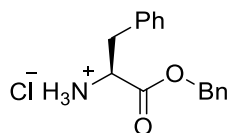
Boc-L-fenylalanin (18 g) byl rozpuštěn v DMF (120 ml) a vychlazen na 0 °C. K vychlazenému roztoku byl přidán TEA (33,7 ml, 242 mmol) a benzylchlorid (21 ml, 181,5 mmol). Reakční směs byla míchána při 25 °C 20 hodin. Bílá sraženina TEA·HCl byla odfiltrována. Do reakční směsi byla přidána voda (50 ml). Produkt byl extrahován do EtOAc (3 x 100 ml). Spojené organické fáze byly promyty 1M HCl (3 x 20 ml), vodou (3 x 100 ml), nasyceným roztokem NaCl (2 x 50 ml), vodou (2 x 50 ml) a

vysušeny bezv. Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>. Na RVO byla organická fáze zahuštěna. Surový produkt byl přečištěn sloupcovou chromatografií (300 g silikagelu, hex/EtOAc – 1/1, R<sub>f</sub> = 0,33). Bylo izolováno 19,8 g Boc-L-fenylalanin O-benzyl (92 %) ve formě bílé pevné látky.

Boc-L-fenylalanin O-benzyl (19,8 g, 55,7 mmol) bylo rozpuštěno v TFA (130 ml) a míchána při 25 °C 1 hodinu. TFA byla oddestilován a za sníženého tlaku, odparek byl rozpuštěn v roztoku 3M HCl v 1,4-dioxanu (40 ml). Po přilítí diethyletheru (100 ml) vznikla bílá sraženina, která byla odfiltrována a vysušena. Bylo izolováno 12,57 g bílé pevné látky **2d**.



Charakterizace (2S)-1-(benzyloxy)-1-oxo-3-phenylpropan-2-amonium chloridu **2d**



Bílá pevná látka; výtěžek 72 %; b.t. 199–202 °C. **<sup>1</sup>H NMR** (400 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>): δ 8,85 (3H, brs, CH-N<sup>+</sup>H<sub>3</sub>), 7,38-7,31 (3H, m, Ar-H), 7,30-7,22 (5H, m, Ar-H), 7,22-7,17 (2H, m, Ar-H), 5,12-5,11 (2H, ABq, J = 12,4 Hz, O-CH<sub>2</sub>-Ph), 4,32-4,25 (1H, m, NH-CH-CHH-Ph), 3,25 (1H, dd, J = 5,6 Hz, J = 14 Hz, NH-CH-CHH-Ph), 3,09 (1H, dd, J = 8 Hz, J = 14 Hz, NH-CH-CHH-Ph). **<sup>13</sup>C NMR** (100,62 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>): δ 169,5; 135,5; 135,3; 130,1; 129,2; 129,0; 128,98; 128,94; 127,8; 67,6; 53,9; 36,5. **CHN analýza:** Vypočteno pro C<sub>16</sub>H<sub>18</sub>ClNO<sub>2</sub> (291,77): C, 65,86; H, 6,22; N, 4,80. Nalezeno: C, 65,76±0,02; H, 6,19±0,01; N, 4,71±0,02. **HRMS (MALDI-TOF, m/z):** [M+H]<sup>+</sup> vypočteno pro C<sub>16</sub>H<sub>19</sub>ClNO<sub>2</sub>: 292,10988 Da, nalezeno: 292,10986 Da.

### 5.2.2 Optimalizace peptidové syntézy a ověření příčin racemizace

#### Obecný postup pro přípravu methylesterů **3a,b**

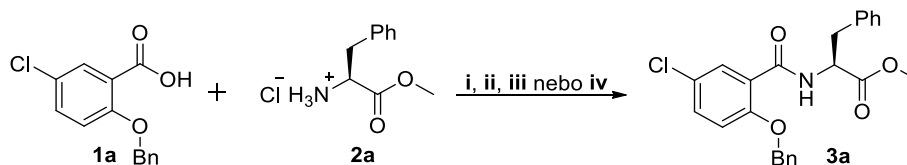
Sloučeniny **3a,b** byly syntetizovány ve smyslu Steglichovy amidace původně podle metody uvedené v literatuře.<sup>315</sup> Reakční podmínky byly průběžně optimalizovány. Sloučeniny **3a,b** byly postupně připravovány za čtyř různých sad podmínek (**i**, **ii**, **iii** a **iv**). Rozdíly mezi jednotlivými variantami jsou shrnuty v níže uvedené tabulce.

Produkt	Podmínky reakce
<b>i</b>	DCC (1,1 ekv.), kat. DMAP, DCM, 25 °C, 20 h
<b>ii</b>	EDCI·HCl (1,4 ekv.), HOBt (1 ekv.), TEA (1 ekv.), DCM, 25 °C, 16 h
<b>iii</b>	EDCI·HCl (1,4 ekv.), HOBt (1 ekv.), DIPEA (1 ekv.), DCM, 25 °C, 16 h
<b>iv</b>	EDCI·HCl (1 ekv.), HOBt (1 ekv.), K <sub>2</sub> CO <sub>3</sub> (1,3 ekv.), DCM, 25 °C, 1 h

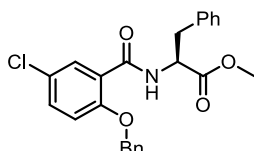
Uvedený postup popisuje přípravu za podmínek **ii** a je současně použitelný pro podmínky **i** a **iii**.

K suspenzi *O*-benzyl 5-chlorosalicylové kyseliny **1a** (2,5 g, 9,52 mmol) a hydrochloridu methylesteru aminokyseliny **2a-b** (9,52 mmol) v dichlormethanu (100 ml) byl přidán *N*-(3-dimethylaminopropyl)-*N'*-ethylkarbodiimid hydrochlorid (EDCI·HCl, 2,56 g, 13,33 mmol), 1-hydroxybenzotriazol (HOBt, 1,29 g, 9,52 mmol) a triethylamin (Et<sub>3</sub>N, 1,29 ml, 9,52 mmol). Reakční směs byla míchána při 25 °C 16 hodin, a poté zakoncentrována za sníženého tlaku. Surový produkt byl rozpuštěn v ethyl acetátu (50 ml) a promyt H<sub>2</sub>O (2 x 30 ml), nasyceným vodným roztokem NaHCO<sub>3</sub> (2 x 40 ml), 5% vodným roztokem kyseliny citronové (2 x 40 ml), solankou (1 x 40 ml) a H<sub>2</sub>O (1 x 40 ml). Organická fáze byla poté vysušena bezvodým Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>. Estery **3a-b** byly čištěny kolonovou chromatografií (silikagel 100 g, *n*-hexan/ethyl acetát (1:4) s 82% výtěžkem L-fenylalaninu (nažloutlá olejovitá látka) a 76% výtěžkem L-leucinu (žlutá olejovitá látka).

Provedení reakce za podmínek **iv** se metodologicky mírně liší. Z reakce je zcela vyloučen terciární amin (TEA, DIPEA). Sloučenina **2a,b** je rozpuštěna ve vodě (20 ml) s K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (1,32 g, 9,52 mmol, 1 ekv.) za účelem neutralizace hydrochloridu a uvolnění amino skupiny. Látka je následně z vodné fáze extrahována do CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (2 x 20 ml). Organická fáze je promyta vodou (1 x 25 ml) a usušena bezv. Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>. Roztok methylesteru aminokyseliny v CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> je následně přidán na začátku do reakční směsi k suspenzi *O*-benzyl 5-chlorosalicylové kyseliny **1a** v dichlormethanu (60 ml). Zbytek reakce probíhá výše popsaným postupem s jediným rozdílem ve zkrácení vlastní reakční doby ze 16 hodin na 1 hodinu. Estery **3a-b** byly čištěny kolonovou chromatografií (silikagel 100 g, *n*-hexan/ethyl acetát (1:4) s 93% výtěžkem L-fenylalaninu (nažloutlá olejovitá látka) a 92% výtěžkem L-leucinu (žlutá olejovitá látka).

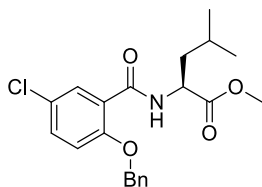


Charakterizace methyl-(2*S*)-2-[(2-benzyloxy-5-chloro-benzoyl)amino]-3-fenylpropanoátu **3a**



Žlutá olejovitá látka; výtěžek 93 %;  $[\alpha_D^{20}] = +17,4^\circ$  (c 1 EtOAc);  $R_f$  (hex/EtOAc – 1/1) = 0,56.  $^1\text{H NMR}$  (400 MHz, DMSO- $d_6$ ):  $\delta$  8,56 (1H, d,  $J = 7,2$  Hz,  $\text{NH-CH-CHH-Ph}$ ), 7,66 (1H, d,  $J = 2,8$  Hz, Ar- $\underline{H}$ ), 7,51 (1H, dd,  $J = 2,4$  Hz,  $J = 8,8$  Hz, Ar- $\underline{H}$ ), 7,42-7,30 (5H, m, Ar- $\underline{H}$ ), 7,27-7,17 (4H, m, Ar- $\underline{H}$ ), 7,07 (2H, d,  $J = 6,8$  Hz, Ar- $\underline{H}$ ), 5,28-5,21 (2H, ABq,  $J = 12,4$  Hz, O- $\underline{\text{CH}_2}$ -Ph), 4,80-4,65 (1H, m, NH- $\underline{\text{CH}}$ -CHH-Ph), 3,59 (3H, s, O $\underline{\text{CH}_3}$ ), 3,08 (1H, dd,  $J = 5,6$  Hz,  $J = 14$  Hz, NH-CH- $\underline{\text{CHH}}$ -Ph), 2,88 (1H, dd,  $J = 8,8$  Hz,  $J = 14$  Hz, NH-CH- $\underline{\text{CHH}}$ -Ph).  $^{13}\text{C NMR}$  (100,62 MHz, DMSO- $d_6$ ):  $\delta$  172,2; 164,1; 155,5; 137,3; 136,5; 132,7; 130,4; 129,6; 129,2; 129,0; 128,9; 128,4; 127,3; 125,4; 124,5; 116,5; 71,1; 54,6; 52,7; 37,2. **IR (ATR)**: 3390, 2929, 1729, 1654, 1512, 1499, 1272, 1024, 816, 766, 744, 717, 660  $\text{cm}^{-1}$ . **CHN analýza**: vypočteno pro  $\text{C}_{24}\text{H}_{22}\text{ClNO}_4$  (423,89): C, 68,00; H, 5,23; N, 3,30; nalezeno: C, 67,74 $\pm$ 0,02; H, 5,14 $\pm$ 0,04; N, 3,05 $\pm$ 0,09. **HRMS (MALDI-TOF, m/z)**:  $[\text{M}+\text{H}]^+$  vypočteno pro  $\text{C}_{24}\text{H}_{23}\text{ClNO}_4$ : 424,13101 Da; nalezeno: 424,13114 Da.

Charakterizace methyl-(2*S*)-2-[(2-benzyloxy-5-chloro-benzoyl)amino]-4-methylpentanoátu **3b**

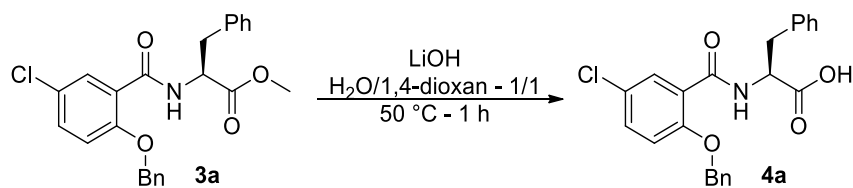


Žlutá olejovitá látka; výtěžek 92 %;  $[\alpha_D^{20}] = -13,3^\circ$  (c 1 EtOAc);  $R_f$  (hex/EtOAc – 1/1) = 0,6.  $^1\text{H NMR}$  (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  8,27 (1H, brs,  $\text{NH-CH-CHH-CH-(CH}_3)_2$ ), 8,26 (1H, d,  $J = 1,6$  Hz, Ar- $\underline{H}$ ), 7,58-7,52 (2H, m, Ar- $\underline{H}$ ), 7,52-7,43 (4H, m, Ar- $\underline{H}$ ), 7,8 (1H, d,  $J = 8,8$  Hz, Ar- $\underline{H}$ ), 5,26-5,18 (2H, ABq,  $J = 10,4$  Hz, O- $\underline{\text{CH}_2}$ -Ph), 4,76-4,68 (1H, m,

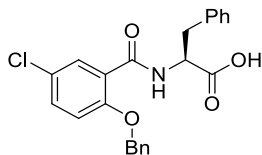
NH-CH-CHH-CH-(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>), 3,75 (3H, s, OCH<sub>3</sub>), 1,59-1,50 (1H, m, NH-CH-CHH-CH-(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>), 1,50-1,41 (1H, m, NH-CH-CHH-CH-(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>), 1,37-1,27 (1H, m, NH-CH-CHH-CH-(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>), 0,88 (3H, d, *J* = 6,4 Hz, CH<sub>3</sub>-CH-CH<sub>3</sub>), 0,80 (3H, d, *J* = 6,4 Hz, CH<sub>3</sub>-CH-CH<sub>3</sub>). <sup>13</sup>C NMR (100 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ 173,5; 163,9; 155,7; 135,1; 132,8; 132,4; 129,2; 129,1; 128,6; 127,2; 122,7; 114,2; 72,1; 52,3; 51,5; 41,1; 25,0; 22,9; 21,9. IR (ATR): 3392, 2954, 2871, 1743, 1655, 1595, 1524, 1481, 1271, 1223, 1205, 1121, 993, 809, 710, 695 cm<sup>-1</sup>. CHN analýza: vypočteno pro C<sub>21</sub>H<sub>24</sub>ClNO<sub>4</sub> (389,87): C, 64,69; H, 6,20; N, 3,59. Nalezeno: C, 64,39±0,02; H, 6,19±0,01; N, 3,41±0,01. HRMS (MALDI-TOF, m/z): [M+H]<sup>+</sup> vypočteno pro C<sub>21</sub>H<sub>25</sub>ClNO<sub>4</sub>: 390,14666 Da; nalezeno: 390,14722 Da.

#### Obecný postup přípravy kyselin 4a-b

Sloučeniny **4a-b** byly syntetizovány podle upraveného postupu z literatury.<sup>298</sup> Methyl ester **3** z předchozí syntézy (4,97 mmol) byl rozpuštěn ve směsi H<sub>2</sub>O/1,4-dioxan (35/35 ml). Byl přidán LiOH (6,24 g, 49,7 mmol). Reakční směs byla míchána při 50 °C, průběh reakce byl monitorován pomocí TLC. Když v reakční směsi nebyly detekovány stopy výchozí látky (obvykle 1 h), roztok byl zchlazen na laboratorní teplotu a okyselen přidavkem 36% HCl na pH = 2. Produkt byl extrahován do ethyl acetátu (2 x 50ml). Organická vrstva byla propláchnuta H<sub>2</sub>O (2 x 50 ml), sušena pomocí Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, zfiltrována a zakoncentrována za sníženého tlaku. Výsledná kyselina **4** byla izolována s 84 % výtěžkem pro **4a** a s 92 % výtěžkem pro **4b**.

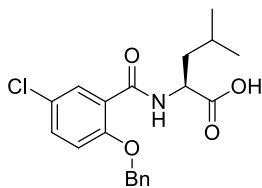


Charakterizace (2*S*)-2-[(2-benzyloxy-5-chloro-benzoyl)amino]-3-fenyl-propanové kyseliny **4a**



Nažloutlá olejová látka; výtěžek 84 %;  $[\alpha_D^{20}] = +11,4^\circ$  (c 1 EtOAc). **<sup>1</sup>H NMR** (400 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>):  $\delta$  12,95 (1H, brs, COOH), 8,47 (1H, d,  $J = 7,6$  Hz, NH-CH-CHH-Ph), 7,69 (1H, d,  $J = 2,8$  Hz, Ar-H), 7,51 (1H, dd,  $J = 2,8$  Hz,  $J = 8,8$  Hz, Ar-H), 7,40-7,30 (5H, m, Ar-H), 7,277,15 (4H, m, Ar-H), 7,09-7,05 (2H, m, Ar-H), 5,28-5,21 (2H, ABq,  $J = 12,2$  Hz, O-CH<sub>2</sub>-Ph), 4,26-4,13 (1H, m, NH-CH-CHH-Ph), 3,13 (1H, dd,  $J = 4,8$  Hz,  $J = 13,6$  Hz, NH-CH-CHH-Ph), 2,86 (1H, dd,  $J = 8,4$  Hz,  $J = 13,6$  Hz, NH-CH-CHH-Ph). **<sup>13</sup>C NMR** (100,62 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>):  $\delta$  173,2; 163,8; 155,5; 137,7; 136,5; 132,7; 130,6; 129,7; 129,2; 128,9; 128,8; 128,4; 127,2; 125,4; 124,4; 116,5; 71,1; 54,5; 37,2. **IR (ATR)**: 2962, 2926, 2854, 2361, 2342, 1647, 1541, 1456, 1263, 1105, 1031, 871, 811, 700 cm<sup>-1</sup>. **CHN analýza**: vypočteno pro C<sub>23</sub>H<sub>20</sub>ClNO<sub>4</sub> (409,86): C, 67,40; H, 4,92; N, 3,42. Nalezeno: C, 67,41±0,02; H, 4,97±0,04; N, 3,54±0,05. **HRMS (MALDI-TOF, m/z)**: [M<sup>+</sup>H]<sup>+</sup> vypočteno pro C<sub>23</sub>H<sub>21</sub>ClNO<sub>4</sub>: 410,11536 Da; nalezeno: 410,11593 Da.

Charakterizace (2*S*)-2-[(2-benzyloxy-5-chloro-benzoyl)amino]-4-methyl-pentanové kyseliny **4b**



Žlutá olejovitá látka; výtěžek 92 %;  $[\alpha_D^{20}] = -15,2^\circ$  (c 1 EtOAc). **<sup>1</sup>H NMR** (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>):  $\delta$  9,32 (1H, brs, COOH), 8,32 (1H, d,  $J = 7,6$  Hz, NH-CH-CHH-CH-(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>), 8,27 (1H, d,  $J = 2,8$  Hz, Ar-H), 7,60-7,4 (6H, m, Ar-H), 7,08 (1H, d,  $J = 8,8$  Hz, Ar-H), 5,23-5,16 (2H, ABq,  $J = 10,19$  Hz, O-CH<sub>2</sub>-Ph), 4,73-4,6 (1H, m, NH-CH-CHH-CH-(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>), 1,65-1,55 (1H, m, NH-CH-CHH-CH-(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>), 1,55-1,4 (1H, m, NH-CH-CHH-CH-(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>), 1,37-1,25 (1H, m, NH-CH-CHH-CH-(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>), 0,87 (3H, d,  $J = 6,4$  Hz, CH<sub>3</sub>-CH-CH<sub>3</sub>), 0,79 (3H, d,  $J = 6,4$  Hz, CH<sub>3</sub>-CH-CH<sub>3</sub>). **<sup>1</sup>H NMR** (400 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>):  $\delta$  9,93 (1H, brs, COOH), 8,39 (1H, d,  $J = 7,6$  Hz, NH-CH-CHH-CH-(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>), 7,79-7,74 (1H, m, Ar-H), 7,64- 7,53 (3H, m, Ar-H), 7,5-7,35 (4H, m, Ar-H),

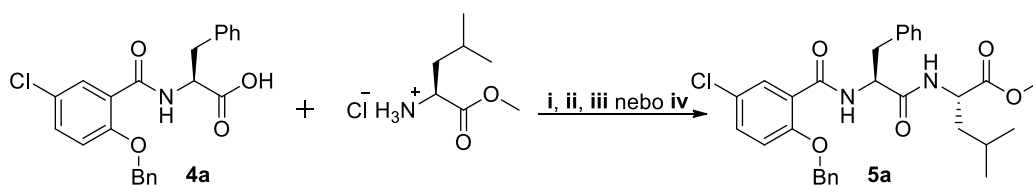


5,32-5,26 (2H, ABq,  $J = 11,4$  Hz, O-CH<sub>2</sub>-Ph), 4,47-4,37 (1H, m, NH-CH-CHH-CH-(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>), 1,55-1,35 (3H, m, NH-CH-CHH-CH-(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>), 0,81 (3H, d,  $J = 6$  Hz, CH<sub>3</sub>-CH-CH<sub>3</sub>), 0,78 (3H, d,  $J = 6,0$  Hz, CH<sub>3</sub>-CH-CH<sub>3</sub>). <sup>13</sup>C NMR (100 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>):  $\delta$  174,3; 164,1; 155,7; 136,4; 132,6; 130,4; 129,1; 129,0; 128,9; 125,4; 124,9; 116,2; 71,5; 67,0; 51,5; 25,0; 23,4; 21,9. **IR (ATR)**: 3385, 2962, 1731, 1625, 1551, 1481, 1227, 993, 828, 704 cm<sup>-1</sup>. **CHN analýza**: Vypočteno pro C<sub>20</sub>H<sub>22</sub>ClNO<sub>4</sub> (375,85): C, 63,91; H, 5,90; N, 3,73; nalezeno: C, 64,02±0,02; H, 5,87±0,01; N, 3,7±0,01. **HRMS (MALDI-TOF, m/z)**: [M<sup>+</sup>H]<sup>+</sup> vypočteno pro C<sub>20</sub>H<sub>23</sub>ClNO<sub>4</sub>: 376,13101 Da; nalezeno: 376,13130 Da.

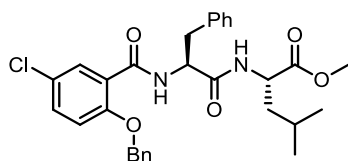
### Obecný postup přípravy salicyl-dipeptidů **5a-d**

Podmínky přípravy sloučeniny **5a-d** prošly stejným vývojem jako předcházející látky **3a,b** (**i**, **ii**, **iii** a **iv**). Uvedený postup popisuje přípravu za využití podmínek **ii**.

Vybraná kyselina **4** (10 mmol) a aminokyselina methylester hydrochloridu **2** (10 mmol) byly rozpuštěny v dichlormethanu (100 ml) při 25 °C. Byl přidán EDCI·HCl (2,3 g, 12 mmol), HOBT (1,53 g, 10 mmol) a Et<sub>3</sub>N (1,4 ml, 10 mmol). Reakční směs byla míchána při 25 °C po 16 hodin, a poté zakonzentrována pod sníženým tlakem. Surový produkt byl rozpuštěn v ethyl acetátu (50 ml) a promyt H<sub>2</sub>O (2 x 30 ml), nasyceným NaHCO<sub>3</sub> (2 x 40 ml), 5% kyselinou citronovou (2 x 40 ml), solankou (1 x 40 ml) a H<sub>2</sub>O (1 x 40 ml). Organická fáze byla vysušena bezvodým Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, filtrována a zahuštěna. Odparek byl přečištěn sloupcovou chromatografií za použití mobilní fáze ve složení n-hexan/ethyl acetát (1:4). Výsledné produkty **5a-d** byly izolovány jako žluté olejovité látky s výtěžkem 63-93 %.



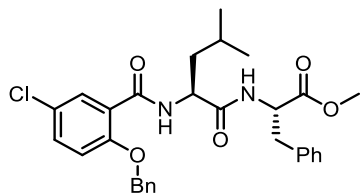
Charakterizace methyl-(2*S*)-2-((2*S*)-2-[(2-benzyloxy-5-chloro-benzoyl) amino]3-fenylpropanoyl)amino)-4-methylpentanoátu **5a**



Žlutá olejovitá látka; výtěžek 63 %;  $[a_D^{20}] = -32,1^\circ$  (c 1 EtOAc).  $R_{f(\text{hex}/\text{EtOAc}-2/1)} = 0,5$ . <sup>1</sup>H NMR (400 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>):  $\delta$  8,56 (1H, d,  $J = 7,6$  Hz, NH-CH-CHH-Ph), 8,41

(1H, d,  $J = 8$  Hz,  $\text{NH-CH-CHH-CH-(CH}_3)_2$ ), 7,66 (1H, d,  $J = 2,8$  Hz, Ar- $\underline{H}$ ), 7,49 (1H, dd,  $J = 2,4$  Hz,  $J = 8,8$  Hz, Ar- $\underline{H}$ ), 7,46-7,31 (5H, m, Ar- $\underline{H}$ ), 7,25-7,11 (4H, m, Ar- $\underline{H}$ ), 7,06 (2H, t,  $J = 7,2$  Hz, Ar- $\underline{H}$ ), 5,29-5,22 (2H, ABq,  $J = 12,6$  Hz, O- $\underline{\text{CH}_2}$ -Ph), 4,84-4,75 (1H, m, NH- $\underline{\text{CH}}$ -CHH-Ph), 4,38-4,30 (1H, m, NH- $\underline{\text{CH}}$ -CHH-CH-( $\text{CH}_3$ ) $_2$ ), 3,64 (3H, s, O $\underline{\text{CH}_3}$ ), 3,09 (1H, dd,  $J = 4,4$  Hz,  $J = 14$  Hz, NH-CH- $\underline{\text{CHH}}$ -Ph), 2,70 (1H, dd,  $J = 9,2$  Hz,  $J = 14$  Hz, NH-CH- $\underline{\text{CHH}}$ -Ph), 1,7-1,48 (3H, m, NH-CH- $\underline{\text{CHH}}$ - $\underline{\text{CH}}$ -( $\text{CH}_3$ ) $_2$ ), 0,90 (3H, d,  $J = 6,4$  Hz,  $\underline{\text{CH}_3}$ -CH- $\underline{\text{CH}_3}$ ), 0,84 (3H, d,  $J = 6,4$  Hz,  $\text{CH}_3$ -CH- $\underline{\text{CH}_3}$ ).  $^{13}\text{C NMR}$  (100,62 MHz, DMSO- $d_6$ ):  $\delta$  173,4; 171,5; 163,6; 155,5; 137,8; 136,5; 132,6; 130,6; 129,7; 129,2; 128,9; 128,7; 128,5; 127,0; 125,4; 124,6; 116,5; 71,1; 54,6; 52,5; 51,0; 38,3; 24,9; 23,3; 22,0. **IR (ATR)**: 3283, 3066, 2952, 2360, 2342, 1734, 1670, 1653, 1637, 1541, 1485, 1272, 1248, 1122, 1007, 807, 754, 697, 670  $\text{cm}^{-1}$ . **CHN analýza**: Vypočteno pro  $\text{C}_{30}\text{H}_{33}\text{ClN}_2\text{O}_5$  (537,05): C, 67,09; H, 6,19; N, 5,22. Nalezeno: C, 66,97 $\pm$ 0,01; H, 6,25 $\pm$ 0,07; N, 5,24 $\pm$ 0,03. **HRMS (MALDI-TOF, m/z)**: [ $\text{M}^+\text{H}$ ] $^+$  vypočteno pro  $\text{C}_{30}\text{H}_{34}\text{ClN}_2\text{O}_5$ : 537,21508 Da; nalezeno: 537,21552 Da.

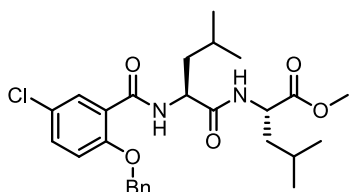
Charakterizace methyl-(2*S*)-2-((2*S*)-2-[(2-benzyloxy-5-chloro-benzoyl)amino]4-methyl-pentanoyl)amino)-3-fenylpropanoát **5b**



Žlutá olejovitá látka; výtěžek 93 %; [ $a_D^{20}$ ] = -12,2° (c 1 EtOAc).  $R_f(\text{hex/EtOAc-2/1}) = 0,4$ .  $^1\text{H NMR}$  (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  8,09 (1H, d,  $J = 2,8$  Hz,  $\text{NH-CH-CHH-CH-(CH}_3)_2$ ), 7,96 (1H, d,  $J = 7,2$  Hz,  $\text{NH-CH-CHH-Ph}$ ), 7,40-7,27 (6H, m, Ar- $\underline{H}$ ), 7,07-6,90 (6H, m, Ar- $\underline{H}$ ), 6,80 (1H, d,  $J = 8$  Hz, Ar- $\underline{H}$ ), 5,08- 5,01 (2H, ABq,  $J = 10,4$  Hz, O- $\underline{\text{CH}_2}$ -Ph), 4,62-4,69 (1H, m, NH- $\underline{\text{CH}}$ -CHH-CH-( $\text{CH}_3$ ) $_2$ ), 4,48-4,37 (1H, m, NH- $\underline{\text{CH}}$ -CHH-Ph), 3,64 (3H, s, O $\underline{\text{CH}_3}$ ), 3,06 (1H, dd,  $J = 4,4$  Hz,  $J = 14$  Hz, NH-CH- $\underline{\text{CHH}}$ -Ph), 2,92 (1H, dd,  $J = 9,2$  Hz,  $J = 14$  Hz, NH-CH- $\underline{\text{CHH}}$ -Ph), 1,45-1,32 (1H, m, NH-CH- $\underline{\text{CHH}}$ -CH-( $\text{CH}_3$ ) $_2$ ), 1,32-1,22 (1H, m, NH-CH-CHH- $\underline{\text{CH}}$ -( $\text{CH}_3$ ) $_2$ ), 1,11-1,01 (1H, m, NH-CH- $\underline{\text{CHH}}$ -CH-( $\text{CH}_3$ ) $_2$ ), 0,69 (3H, d,  $J = 6,4$  Hz,  $\underline{\text{CH}_3}$ -CH- $\underline{\text{CH}_3}$ ), 0,62 (3H, d,  $J = 6,4$  Hz,  $\text{CH}_3$ -CH- $\underline{\text{CH}_3}$ ).  $^{13}\text{C NMR}$  (100,62 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  171,8; 171,4; 164,1; 155,5; 135,9; 134,7; 132,8; 132,3; 129,2; 129,17; 129,13; 128,4; 128,3; 127,0; 126,9; 122,2; 113,9; 71,9; 53,2; 52,3; 51,8; 39,3; 37,8; 24,6; 22,9; 21,8. **IR (ATR)**: 3286, 2952, 1735, 1637, 1541, 1272, 1248, 753, 698  $\text{cm}^{-1}$ . **CHN analýza**: Vypočteno pro  $\text{C}_{30}\text{H}_{33}\text{ClN}_2\text{O}_5$

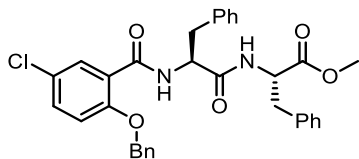
(537,05): C, 67,09; H, 6,19; N, 5,22. Nalezeno: C, 67,20±0,02; H, 6,24±0,01; N, 5,19±0,01. **HRMS (MALDI-TOF, m/z):**  $[M+H]^+$  vypočteno pro  $C_{30}H_{34}ClN_2O_5$ : 537,21508 Da; nalezeno: 537,21599 Da.

Charakterizace methyl-(2*S*)-2-((2*S*)-2-[(2-benzyloxy-5-chloro-benzoyl) amino]4-methyl-pentanoyl)amino)-4-methylpentanoátu **5c**



Bezbarvá olejovitá látka; výtěžek 91 %;  $[\alpha_D^{20}] = -25,2^\circ$  (c 1 EtOAc).  $R_{f(\text{hex/EtOAc} - 2/1)} = 0,3$ .  **$^1\text{H NMR}$**  (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  8,23 (1H, d,  $J = 2,8$  Hz,  $\text{NH-CH-CHH-CH-(CH}_3)_2$ ), 8,20 (1H, d,  $J = 7,6$  Hz,  $\text{NH-CH-CHH-CH-(CH}_3)_2$ ), 7,53-7,43 (6H, m, Ar- $\underline{H}$ ), 7,07 (1H, d,  $J = 8,8$  Hz, Ar- $\underline{H}$ ), 6,82 (1H, d,  $J = 6,8$  Hz, Ar- $\underline{H}$ ), 5,25-5,17 (2H, ABq,  $J = 10,8$  Hz, O- $\underline{CH}_2$ -Ph), 4,65-4,55 (2H, m, NH- $\underline{CH}$ -CHH-CH-( $\text{CH}_3$ ) $_2$ ), NH- $\underline{CH}$ -CHH-CH-( $\text{CH}_3$ ) $_2$ ), 3,78 (3H, s, O $\underline{CH}_3$ ), 1,72-1,54 (4H, m, NH-CH- $\underline{CHH}$ -CH-( $\text{CH}_3$ ) $_2$ , NH-CH- $\underline{CHH}$ - $\underline{CH}$ -( $\text{CH}_3$ ) $_2$ ), 1,54-1,45 (1H, m, NH-CH- $\underline{CHH}$ -CH-( $\text{CH}_3$ ) $_2$ ), 1,30-1,24 (1H, m, NH-CH-CHH- $\underline{CH}$ -( $\text{CH}_3$ ) $_2$ ), 0,94 (3H, d,  $J = 6$  Hz,  $\underline{CH}_3$ -CH- $\text{CH}_3$ ), 0,92 (3H, d,  $J = 6$  Hz,  $\underline{CH}_3$ -CH- $\text{CH}_3$ ), 0,87 (3H, d,  $J = 6$  Hz,  $\text{CH}_3$ -CH- $\underline{CH}_3$ ), 0,80 (3H, d,  $J = 6$  Hz,  $\text{CH}_3$ -CH- $\underline{CH}_3$ ).  **$^{13}\text{C NMR}$**  (100,62 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  173,4; 171,8; 164,3; 155,6; 134,9; 132,9; 132,3; 129,28; 128,5; 127,1; 122,6; 114,2; 72,0; 52,4; 52,2; 51,0; 41,5; 40,0; 25,0; 24,8; 23,0; 22,9; 22,10. **IR (ATR):** 3381, 3308, 2957, 2871, 2359, 2342, 1744, 1683, 1642, 1596, 1533, 1481, 1272, 1234, 1207, 1155, 1123, 995, 810, 749, 697, 669  $\text{cm}^{-1}$ . **CHN analýza:** Vypočteno pro  $\text{C}_{27}\text{H}_{35}\text{ClN}_2\text{O}_5$  (503,03): C, 64,47; H, 7,01; N, 5,57. Nalezeno: C, 64,55±0,02; H, 7,06±0,01; N, 5,59±0,01. **HRMS (MALDI-TOF, m/z):**  $[M+H]^+$  vypočteno pro  $\text{C}_{27}\text{H}_{36}\text{ClN}_2\text{O}_5$ : 503,23072 Da; nalezeno: 503,23172 Da.

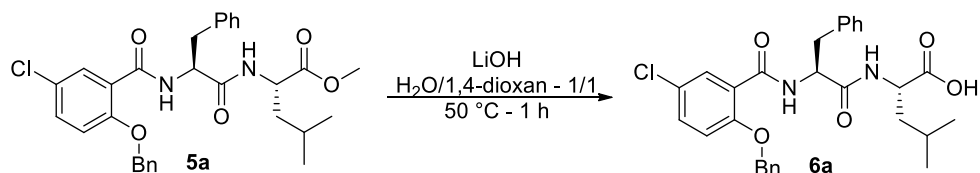
Charakterizace methyl-(2*S*)-2-((2*S*)-2-[(2-benzyloxy-5-chloro-benzoyl) amino]-3-fenyl-propanoyl)amino)-3-fenylpropanoátu **5d**



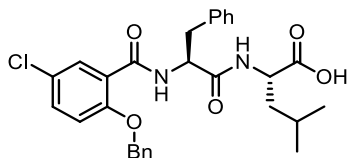
Žlutá voskovitá pevná látka; výtěžek 88 %;  $[\alpha_D^{20}] = -6,7^\circ$  (c 1 EtOAc).  $R_{f(\text{hex/EtOAc--2/1})} = 0,2$ . **<sup>1</sup>H NMR** (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>):  $\delta$  8,28 (1H, d,  $J = 7,6$  Hz,  $\text{NH-CH-CHH-Ph}$ ), 8,13 (1H, d,  $J = 2,8$  Hz,  $\text{NH-CH-CHH-Ph}$ ), 7,45-7,33 (4H, m, Ar- $\underline{H}$ ), 7,33-7,28 (2H, Ar- $\underline{H}$ ), 7,19-7,1 (3H, m, Ar- $\underline{H}$ ), 7,11-7,03 (3H, m, Ar- $\underline{H}$ ), 7,03-6,98 (2H, m, Ar- $\underline{H}$ ), 6,98-6,94 (2H, m, Ar- $\underline{H}$ ), 6,92 (1H, d,  $J = 9$  Hz, Ar- $\underline{H}$ ), 6,78 (1H, d,  $J = 7,5$  Hz, Ar- $\underline{H}$ ), 5,10 (2H, ABq,  $J = 11,2$  Hz, O- $\underline{\text{CH}_2}$ -Ph), 4,85-4,75 (2H, m, NH- $\underline{\text{CH}}-\text{CHH-Ph}$ , NH- $\underline{\text{CH}}-\text{CHH-Ph}$ ), 3,69 (3H, s, O- $\underline{\text{CH}_3}$ ), 3,15-3,08 (1H, m, NH-CH- $\underline{\text{CHH}}$ -Ph), 3,08-2,95 (2H, m, NH-CH- $\underline{\text{CHH}}$ -Ph, NH-CH- $\underline{\text{CHH}}$ -Ph), 2,80-2,70 (1H, m, NH-CH- $\underline{\text{CHH}}$ -Ph). **<sup>13</sup>C NMR** (125,76 MHz, CDCl<sub>3</sub>):  $\delta$  171,6; 170,5; 164,1; 155,4; 136,7; 135,8; 135,6; 135,0; 132,8; 132,2; 129,2; 129,1; 129,1; 129,0; 128,5; 128,4; 126,9; 126,8; 122,2; 114,3; 71,6; 54,7; 53,4; 52,4; 37,8; 36,7. **IR (ATR)**: 3287, 3032, 2950, 1737, 1638, 1539, 1305, 1276, 1247, 1125, 1030, 1012, 811, 752, 699 cm<sup>-1</sup>. **CHN analýza**: Vypočteno pro C<sub>33</sub>H<sub>31</sub>ClN<sub>2</sub>O<sub>5</sub> (571,06): C, 69,41; H, 5,47; N, 4,91. Nalezeno: C 69,39±0,02; H, 5,58±0,01; N, 4,94±0,02. **HRMS (MALDI-TOF, m/z)**: [M+H]<sup>+</sup> vypočteno pro C<sub>33</sub>H<sub>32</sub>ClN<sub>2</sub>O<sub>5</sub>: 571,19943 Da; nalezeno: 571,19950 Da.

#### Obecný postup pro přípravu kyselin **6a-d**

Sloučeniny **6a-d** byly syntetizovány podle upraveného postupu z literatury<sup>298</sup> shodně s přípravou kyselin **4a,b**. Methyl ester **5a-d** z předchozí syntézy (4,97 mmol) byl rozpuštěn ve směsi H<sub>2</sub>O/1,4-dioxan (35/35 ml). Byl přidán LiOH (6,24 g, 49,7 mmol). Reakční směs byla míchána při 50 °C, průběh reakce byl monitorován pomocí TLC. Když v reakční směsi nebyly detekovány stopy výchozí látky (obvykle 1 h), roztok byl zchlazen na laboratorní teplotu a okyselen použitím 36% HCl na pH = 2. Produkt byl extrahován do ethylacetátu (2 x 50ml). Organická vrstva byla propláchnuta H<sub>2</sub>O (2 x 50 ml), sušena pomocí Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, zfiltrována a zakoncentrována za sníženého tlaku. Výsledná kyselina **6 a-d** byla izolována s 77-96 % výtěžkem.

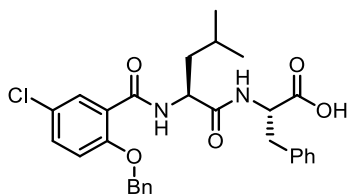


Charakterizace (2*S*)-2-((2*S*)-2-[(2-benzyloxy-5-chlorobenzoyl)amino]-3-fenylpropionyl) amino)-4-methylpentanoové kyseliny **6a**



Žlutá olejovitá látka; výtěžek 96 %;  $[\alpha_D^{20}] = -23.2^\circ$  (c 1 EtOAc). **<sup>1</sup>H NMR** (400 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>):  $\delta$  12,61 (1H, brs, COOH), 8,43 (1H, d,  $J = 10$  Hz, NH-CH-CHH-Ph), 8,42 (1H, d,  $J = 10$  Hz, NH-CH-CHH-CH-(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>), 7,67 (1H, d,  $J = 3,2$  Hz, Ar-H), 7,48 (1H, dd,  $J = 2,8$  Hz,  $J = 9$  Hz, Ar-H), 7,45-7,40 (2H, m, Ar-H), 7,40-7,32 (3H, m, Ar-H), 7,24-7,13 (4H, m, Ar-H), 7,09-7,03 (2H, m, Ar-H), 5,28-5,21 (2H, ABq,  $J = 12,4$  Hz, O-CH<sub>2</sub>-Ph), 4,45-4,76 (1H, m, NH-CH-CHH-Ph), 4,33-4,24 (1H, m, NH-CH-CHH-CH-(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>), 3,11 (1H, dd,  $J = 4$  Hz,  $J = 14$  Hz, NH-CH-CHH-Ph), 2,69 (1H, dd,  $J = 9,2$  Hz,  $J = 13,6$  Hz, NH-CH-CHH-Ph), 1,72-1,6 (1H, m, NH-CH-CHH-CH-(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>), 1,6-1,5 (2H, m, NH-CH-CHH-CH-(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>), 0,91 (3H, d,  $J = 6,4$  Hz, CH<sub>3</sub>-CH-CH<sub>3</sub>), 0,85 (3H, d,  $J = 6,4$  Hz, CH<sub>3</sub>-CH-CH<sub>3</sub>). **<sup>13</sup>C NMR** (100,62 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>):  $\delta$  174,6; 171,4; 163,5; 155,5; 137,9; 136,5; 132,6; 130,6; 129,8; 129,2; 128,9; 128,7; 128,5; 127,0; 125,4; 124,5; 116,5; 71,1; 67,0; 54,6; 50,9; 38,3; 24,9; 23,3; 22,0. **IR (ATR)**: 3367, 2959, 2360, 1684, 1526, 1481, 1273, 1224742, 698 cm<sup>-1</sup>. **CHN analýza**: Vypočteno pro C<sub>29</sub>H<sub>31</sub>ClN<sub>2</sub>O<sub>5</sub> (523,02): C, 66,60; H, 5,97; N, 5,36. Nalezeno: C, 66,87±0,02; H, 6,19±0,02; N, 5,24±0,05. **HRMS (MALDI-TOF, m/z)**: [M<sup>+</sup>H]<sup>+</sup> vypočteno pro C<sub>29</sub>H<sub>32</sub>ClN<sub>2</sub>O<sub>5</sub>: 523,19943 Da; nalezeno: 523,20019 Da.

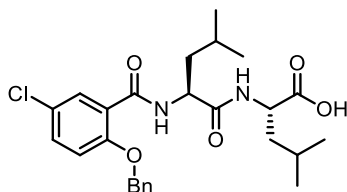
Charakterizace (2*S*)-2-((2*S*)-2-[(2-benzyloxy-5-chloro-benzoyl)amino]4-methylpentanoyl) amino)-3-fenyl-propionové kyseliny **6b**



Žlutá olejovitá látka; výtěžek 92 %;  $[\alpha_D^{20}] = -3,8^\circ$  (c 1 EtOAc). **<sup>1</sup>H NMR** (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>):  $\delta$  8,95 (1H, brs, COOH), 7,18 (1H, d,  $J = 7,6$  Hz, NH-CH-CHH-Ph), 8,14 (1H,

d,  $J = 2,8$  Hz,  $\text{NH-CH-CHH-CH-(CH}_3)_2$ ), 7,44-7,35 (6H,m, Ar- $\underline{H}$ ), 7,20-7,00 (7H, m, Ar- $\underline{H}$ ), 5,17-5,08 (2H, ABq,  $J = 10,4$  Hz, O- $\underline{\text{CH}_2}$ -Ph), 4,85-4,77 (1H, m, NH- $\underline{\text{CH}}$ -CHH-CH-( $\text{CH}_3$ ) $_2$ ), 4,64-4,55 (1H, m, NH- $\underline{\text{CH}}$ -CHH-Ph), 3,19 (1H, dd,  $J = 5,2$  Hz,  $J = 14$  Hz, NH- $\underline{\text{CH}}$ -CHH-Ph), 2,95 (1H, dd,  $J = 7,2$  Hz,  $J = 14$  Hz, NH-CH- $\underline{\text{CHH}}$ -Ph), 1,48-1,31 (2H, m, NH-CH- $\underline{\text{CHH-CH}}$ -( $\text{CH}_3$ ) $_2$ ), 1,19-1,10 (1H, m, NH-CH- $\underline{\text{CHH}}$ -CH-( $\text{CH}_3$ ) $_2$ ), 0,75 (3H, d,  $J = 6,4$  Hz,  $\underline{\text{CH}_3}$ -CH- $\underline{\text{CH}_3}$ ), 0,69 (3H, d,  $J = 6,4$  Hz,  $\text{CH}_3$ -CH- $\underline{\text{CH}_3}$ ).  $^{13}\text{C NMR}$  (100,62 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  174,3; 172,0; 164,6; 155,9; 136,2; 134,9; 133,2; 132,6; 129,7; 129,5; 129,4; 128,6; 127,2; 127,1; 122,2; 114,3; 72,2; 53,6; 52,2; 39,8; 37,8; 24,8; 23,0; 22,1. **IR (ATR)**: 3369, 2959, 2360, 1737, 1640, 1529, 1296, 1225, 1123, 995, 810, 699  $\text{cm}^{-1}$ . **CHN analýza**: Vypočteno pro  $\text{C}_{29}\text{H}_{31}\text{ClN}_2\text{O}_5$  (523,02): C, 66,60; H, 5,97; N, 5,36. Nalezeno: C, 66,81 $\pm$ 0,01; H, 6,19 $\pm$ 0,01; N, 5,31 $\pm$ 0,01. **HRMS (MALDI-TOF, m/z)**:  $[\text{M}^+\text{H}]^+$  vypočteno pro  $\text{C}_{29}\text{H}_{32}\text{ClN}_2\text{O}_5$ : 523,19943 Da; nalezeno: 523,19998 Da.

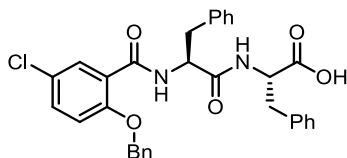
Charakterizace (2*S*)-2-((2*S*)-2-[(2-benzyloxy-5-chloro-benzoyl)amino]4-methyl-pentanoyl) amino)-4-methyl-pentanové kyseliny **6c**



Bílá pevná látka; výtěžek 85 %; b.t. 164–167 °C;  $[\alpha_D^{20}] = -23,2^\circ$  (c 1 EtOAc).  **$^1\text{H NMR}$**  (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  10,02 (1H, brs,  $\text{COOH}$ ), 8,31 (1H, d,  $J = 7,6$  Hz,  $\text{NH-CH-CHH-CH-(CH}_3)_2$ ), 8,14 (1H, d,  $J = 2,8$  Hz,  $\text{NH-CH-CHH-CH-(CH}_3)_2$ ), 7,50-7,36 (6H, m, Ar- $\underline{H}$ ), 7,15 (1H, d,  $J = 8$  Hz, Ar- $\underline{H}$ ), 7,02 (1H, d,  $J = 8,8$  Hz, Ar- $\underline{H}$ ), 5,21-5,11 (2H, ABq,  $J = 10,4$  Hz, O- $\underline{\text{CH}_2}$ -Ph), 4,68-4,52 (2H, m, NH- $\underline{\text{CH}}$ -CHH-CH-( $\text{CH}_3$ ) $_2$ , NH- $\underline{\text{CH}}$ -CHH-CH-( $\text{CH}_3$ ) $_2$ ), 1,72-1,62 (2H, m, NH-CH- $\underline{\text{CHH-CH}}$ -( $\text{CH}_3$ ) $_2$ ), 1,60-1,35 (3H, m, NH-CH- $\underline{\text{CHH-CH}}$ -( $\text{CH}_3$ ) $_2$ ), 1,27-1,15 (1H, m, NH-CH- $\underline{\text{CHH}}$ -CH-( $\text{CH}_3$ ) $_2$ ), 0,91 (3H, d,  $J = 6$  Hz,  $\underline{\text{CH}_3}$ -CH- $\underline{\text{CH}_3}$ ), 0,87 (3H, d,  $J = 6$  Hz,  $\text{CH}_3$ -CH- $\underline{\text{CH}_3}$ ), 0,78 (3H, d,  $J = 6$  Hz,  $\underline{\text{CH}_3}$ -CH- $\underline{\text{CH}_3}$ ), 0,74 (3H, d,  $J = 6$  Hz,  $\text{CH}_3$ -CH- $\underline{\text{CH}_3}$ ).  $^{13}\text{C NMR}$  (100,62 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  175,9; 172,1; 164,5; 155,7; 134,9; 133,1; 132,3; 129,3; 129,28; 128,6; 127,1; 122,2; 114,2; 72,1; 52,4; 50,9; 41,4; 40,2; 25,0; 24,7; 23,0; 22,8; 22,10; 21,9. **IR (ATR)**: 3349, 3309, 2958, 2872, 1721, 1672, 1638, 1597, 1529, 1482, 1272, 1237, 1124, 1001, 897, 810, 748, 696, 656  $\text{cm}^{-1}$ . **CHN analýza**: Vypočteno pro  $\text{C}_{26}\text{H}_{33}\text{ClN}_2\text{O}_5$  (489,0): C, 63,86; H, 6,80; N, 5,73. Nalezeno: C, 63,80 $\pm$ 0,02; H, 6,84 $\pm$ 0,01; N, 5,73 $\pm$ 0,02. **HRMS**

(MALDI-TOF,  $m/z$ ):  $[M^+H]^+$  vypočteno pro  $C_{26}H_{34}ClN_2O_5$ : 489,21508 Da; nalezeno: 489,21553 Da.

Charakterizace (2*S*)-2-((2*S*)-2-[(2-benzyloxy-5-chloro-benzoyl)amino]-3-fenylpropanoyl) amino)-3-fenyl-propanové kyseliny **6d**

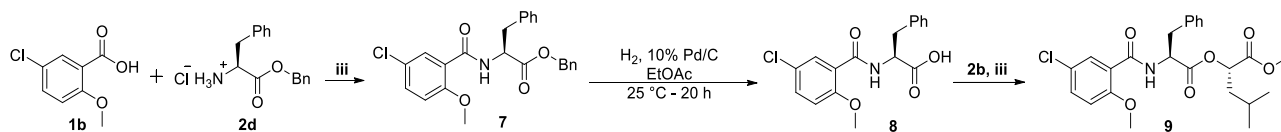


Žlutá olejovitá látka; výtěžek 77 %;  $[a_D^{20}] = +1,8^\circ$  (c 1 EtOAc).  $^1H$  NMR (400 MHz,  $CDCl_3$ ):  $\delta$  10,02 (1H, brs, COOH), 8,31 (1H, d,  $J = 7,6$  Hz, NH-CH-CHH-Ph), 8,01 (1H, d,  $J = 2,8$  Hz, NH-CH-CHH-Ph), 7,38-7,21 (6H, m, Ar-H), 7,13-6,89 (9H, m, Ar-H), 6,89-6,81 (3H, m, Ar-H), 5,06-4,97 (2H, ABq,  $J = 10,4$  Hz, O-CH<sub>2</sub>-Ph), 4,85-4,76 (1H, m, NH-CH-CHH-Ph), 4,76-4,68 (1H, m, NH-CH-CHH-Ph), 3,08 (1H, dd,  $J = 6$  Hz,  $J = 14$  Hz, NH-CH-CHH-Ph), 2,94 (1H, dd,  $J = 6$  Hz,  $J = 14$  Hz, NH-CH-CHH-Ph), 2,87 (1H, dd,  $J = 7,5$  Hz,  $J = 14$  Hz, NH-CH-CHH-Ph), 2,65 (1H, dd,  $J = 7,5$  Hz,  $J = 14$  Hz, NH-CH-CHH-Ph).  $^{13}C$  NMR (100,62 MHz,  $CDCl_3$ ):  $\delta$  174,1; 170,9; 164,4; 155,5; 136,5; 135,8; 134,9; 133,0; 132,2; 129,3; 129,13; 129,12; 129,0; 128,5; 128,4; 127,8; 126,9; 126,8; 126,8; 121,9; 114,3; 71,7; 54,7; 53,4; 37,4; 36,9. IR (ATR): 3275, 3031, 2931, 1722, 1670, 1646, 1527, 1228, 805, 747, 699  $cm^{-1}$ . CHN analýza: Vypočítáno pro  $C_{32}H_{29}ClN_2O_5$  (557,04): C, 69,00; H, 5,25; N, 5,03. Nalezeno: C, 68,83 $\pm$ 0,02; H, 5,29 $\pm$ 0,02; N, 4,89 $\pm$ 0,02. HRMS (MALDI-TOF,  $m/z$ ):  $[M^+H]^+$  vypočteno pro  $C_{32}H_{30}ClN_2O_5$ : 557,18378 Da; nalezeno: 557,18524 Da.

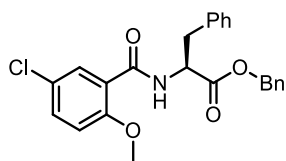
#### Příprava kontrolní série sloučenin (7-9) pro ověření příčiny racemizace

Postup přípravy benzylesteru **7** je shodný se syntézou methylesterů **3a,b** za podmínek **iii** s využitím DIPEA. K suspenzi *O*-methyl 5-chlorosalicylové kyseliny **1b** (2,5 g, 9,52 mmol) a hydrochloridu benzylesteru aminokyseliny **2d** (9,52 mmol) v dichlormethanu (100 ml) byl přidán *N*-(3-dimethylaminopropyl)-*N'*-ethylkarbodiimid hydrochlorid (EDCI·HCl, 2,56 g, 13,33 mmol), 1-hydroxybenzotriazol (HOBt, 1,29 g, 9,52 mmol) a diisopropylethylamin (DIPEA, 1,29 ml, 9,52 mmol). Reakční směs byla míchána při 25 °C 16 hodin, a poté zakoncentrována za sníženého tlaku. Surový produkt byl rozpuštěn v ethyl acetátu (50 ml) a promyt  $H_2O$  (2 x 30 ml), nasyceným vodným roztokem  $NaHCO_3$  (2 x 40 ml), 5% vodným roztokem kyseliny citronové (2 x 40 ml),

solankou (1 x 40 ml) a H<sub>2</sub>O (1 x 40 ml). Organická fáze byla poté vysušena bezvodým Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>. Benzylester **7** byl čištěn kolonovou chromatografií (silikagel 100 g, *n*-hexan/ethyl acetát (1:1) s 78% výtěžkem.



Charakterizace           benzyl           (2*S*)-2-[(2-methoxy-5-chloro-benzoyl)amino]-3-fenylpropanoátu **7**

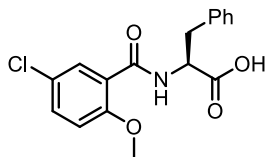


Čirá olejovitá látka; výtěžek 65 %;  $R_f$  (*hex*/EtOAc – 2/1) = 0,46. **<sup>1</sup>H NMR** (400 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>): δ 8,50 (1H, d,  $J = 7,2$  Hz, NH-CH-CHH-Ph), 7,62 (1H, d,  $J = 2,8$  Hz, Ar-H), 7,53 (1H, dd,  $J = 2,8$  Hz,  $J = 8,8$  Hz, Ar-H), 7,40-7,20 (10H, m, Ar-H), 7,17 (1H, d,  $J = 8,8$  Hz, Ar-H), 5,20-5,10 (2H, ABq, O-CH<sub>2</sub>-Ph), 4,82-4,73 (1H, m, NH-CH-CHH-Ph), 3,77 (3H, s, OCH<sub>3</sub>), 3,22-3,05 (2H, m, NH-CH-CHH-Ph). **<sup>13</sup>C NMR** (100,62 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>): δ 171,6; 164,1; 156,6; 137,4; 136,4; 132,8; 130,4; 129,9; 129,06; 129,02; 128,8; 128,6; 127,4; 125,1; 124,1; 115,1; 66,9; 57,0; 54,7; 37,0. **CHN analýza**: vypočteno pro C<sub>24</sub>H<sub>22</sub>ClNO<sub>4</sub> (423,89): C, 68,00; H, 5,23; N, 3,30; nalezeno: C, 67,72±0,02; H, 5,33±0,05; N, 3,20±0,04. **HRMS (MALDI-TOF, m/z)**: [M<sup>+</sup>H]<sup>+</sup> vypočteno pro C<sub>24</sub>H<sub>23</sub>ClNO<sub>4</sub>: 424,13101 Da; nalezeno: 424,13129 Da.

Deprotekce karboxylové funkční skupiny sloučeniny **7** (1,869 g, 4,4 mmol) byla provedena rozpuštěním látky v EtOAc (70 ml), přidavkem 10% Pd/C (0,18 g) a zavedením H<sub>2</sub> (1 atm). Reakce byla míchána při 25 °C po dobu 20 hodin. Poté byl Pd/C odfiltrován a roztok byl zahuštěn na RVO za sníženého tlaku do čirého oleje. Bylo izolováno 1,456 g (99 %) produktu **8** ve formě čirého oleje. Postup byl převzat a upraven z literatury.<sup>316</sup>



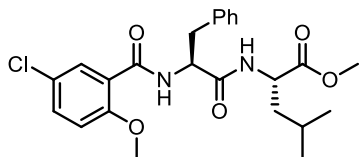
Charakterizace (2*S*)-2-[(2-methoxy-5-chloro-benzoyl)amino]-3-fenyl-propanové kyseliny **8**



Čirá olejová látka; výtěžek 99 %.  $^1\text{H NMR}$  (400 MHz, DMSO- $d_6$ ):  $\delta$  12,95 (1H, bs, COOH), 8,37 (1H, d,  $J = 7,6$  Hz, NH-CH-CHH-Ph), 7,69 (1H, d,  $J = 2,8$  Hz, Ar-H), 7,54 (1H, dd,  $J = 2,8$  Hz,  $J = 8,8$  Hz, Ar-H), 7,35-7,28 (2H, m, Ar-H), 7,28-7,22 (3H, m, Ar-H), 7,18 (1H, d,  $J = 8,8$  Hz, Ar-H), 4,7-4,62 (1H, m, NH-CH-CHH-Ph), 3,82 (3H, s, OCH<sub>3</sub>), 3,18 (1H, dd,  $J = 4,8$  Hz,  $J = 13,6$  Hz, NH-CH-CHH-Ph), 3,09 (1H, dd,  $J = 8$  Hz,  $J = 13,6$  Hz, NH-CH-CHH-Ph).  $^{13}\text{C NMR}$  (100,62 MHz, DMSO- $d_6$ ):  $\delta$  173,2; 163,7; 156,7; 137,8; 132,9; 130,5; 129,9; 129,0; 127,3; 125,2; 123,9; 115,1; 57,1; 54,5; 38,2. **CHN analýza:** vypočteno pro C<sub>17</sub>H<sub>16</sub>ClNO<sub>4</sub> (333,77): C, 61,18; H, 4,83; N, 4,20. Nalezeno: C, 61,10±0,04; H, 4,91±0,02; N, 4,11±0,02. **HRMS (MALDI-TOF, m/z):** [M<sup>+</sup>H]<sup>+</sup> vypočteno pro C<sub>17</sub>H<sub>17</sub>ClNO<sub>4</sub>: 334,08406 Da; nalezeno: 334,08411 Da.

Podmínky přípravy sloučeniny **9** jsou shodné s přípravou látek **3a,b** ve variantě **iii**. Kyselina **8** (4,1 mmol) a L-Leucin methylester hydrochlorid **2b** (4,1 mmol) byly rozpuštěny v dichlormethanu (500 ml). Bylo přidáno EDCI·HCl (0,687 g, 5,74 mmol), HOBt (0,553 g, 4,1 mmol) a DIPEA (0,71 ml, 4,1 mmol). Reakční směs byla míchána při 25 °C po 16 hodin, a poté zakoncentrována za sníženého tlaku. Surový produkt byl rozpuštěn v ethyl acetátu (50 ml) a promyt H<sub>2</sub>O (2 x 30 ml), nasyceným roztokem NaHCO<sub>3</sub> (2 x 40 ml), 5% kyselinou citronovou (2 x 40 ml), solankou (1 x 40 ml) a H<sub>2</sub>O (1 x 40 ml). Organická fáze byla vysušena bezvodým Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, filtrována a za sníženého tlaku zbavena rozpouštědla. Odparek byl přečištěn sloupcovou chromatografií za použití mobilní fáze ve složení n-hexan/ethyl acetát (1:1). Výsledný produkt **9** byl izolován ve formě mléčného oleje s výtěžkem 60 %.

Charakterizace methyl-(2*S*)-2-((2*S*)-2-[(5-chloro-2-methoxy-benzoyl) amino]-3-fenyl-propanoyl)amino)-4-methylpentanoátu **9**



Produkt je směsí dvou diastereomerů, A a B s 74% ee. Čirá olejová látka; výtěžek 81 %.

**<sup>1</sup>H NMR** (400 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>): δ 8,59-8,53 (1H, m, (NH-CH-CHH-CH(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>)<sub>A+B</sub>), 8,40-8,30 (1H, m, (NH-CH-CHH-Ph)<sub>A+B</sub>), 7,69-7,65 (1H, m, (Ar-H)<sub>A+B</sub>), 7,55-7,49 (1H, m, (Ar-H)<sub>A+B</sub>), 7,32-7,14 (6H, m, (Ar-H)<sub>A+B</sub>), 4,85-4,75 (1H, m, NH-CH-CHH-Ph)<sub>A+B</sub>), 4,37-4,29 (1H, m, NH-CH-CHH-CH(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>)<sub>A+B</sub>), 3,85-3,77 (3H, m, (Ar-OCH<sub>3</sub>)<sub>A+B</sub>), 3,67-3,61 (3H, m, (COOCH<sub>3</sub>)<sub>A+B</sub>), 3,18-3,08 (1H, m, (NH-CH-CHH-Ph)<sub>A+B</sub>), 3,01-2,92 (1H, m, (NH-CH-CHH-Ph)<sub>A+B</sub>), 1,70-1,50 (3H, m, (NH-CH-CHH-CH(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>)<sub>A+B</sub>), 0,93-0,87 (3H, m, ((CH<sub>3</sub>-CH-CH<sub>3</sub>)<sub>A+B</sub>), 0,87-0,79 (3H, m, ((CH<sub>3</sub>-CH-CH<sub>3</sub>)<sub>A+B</sub>).

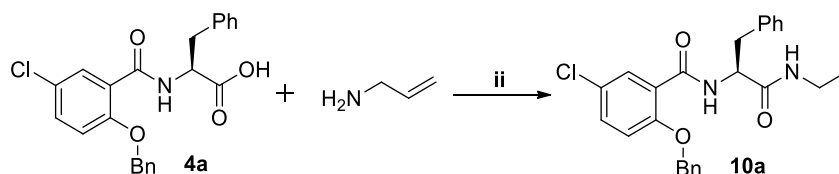
**<sup>13</sup>C NMR** (100,62 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>): δ 173,6; 171,3; 163,1; 155,7; 137,1; 136,4; 130,1; 129,2; 129,0; 128,4; 128,1; 127,1; 125,9; 124,7; 116,4; 71,2; 56,4; 52,4; 52,0; 39,7; 25,6; 27,6; 26,0. **CHN analýza:** vypočteno pro C<sub>24</sub>H<sub>29</sub>ClN<sub>2</sub>O<sub>5</sub> (460,95): C, 62,54; H, 6,34; N, 6,08. Nalezeno: C, 62,50±0,03; H, 6,32±0,03; N, 6,08±0,03. **HRMS (MALDI-TOF, m/z):** [M<sup>+</sup>H]<sup>+</sup> vypočteno pro C<sub>24</sub>H<sub>30</sub>ClN<sub>2</sub>O<sub>5</sub>: 461,18378 Da; nalezeno: 461,18381 Da.

### 5.2.3 Příprava první série salicylamidů

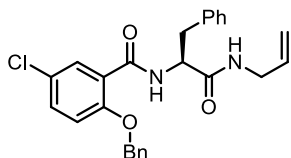
#### Obecný postup pro přípravu amidů **10a-e**

Sloučeniny **10a-e** byly syntetizovány za podmínek **ii** amidace shodnými s přípravou sloučenin **3a,b**. Chráněné amidy substituované kyseliny salicylové a základní aminokyseliny **4** (10 mmol) a vybraného aminu (10 mmol) byly rozpuštěny v DCM (60 ml). Roztok byl chlazen na -15 °C. EDCI·HCl (2,3 g, 12 mmol), HOBt (1,53 g, 10 mmol) a triethylamin (Et<sub>3</sub>N 1,95 m, 10 mmol) byly přidány do reakční směsi. Směs byla míchána 30 min při -15 °C. Směs se nechala spontánně zahřát na 25 °C a byla dále míchána po dobu 16 hodin. Poté byla reakční směs zahuštěna pod sníženým tlakem. Surový produkt byl zředěn ethyl acetátem (50 ml) a promyt H<sub>2</sub>O (2 x 30 ml), nasyceným vodným roztokem NaHCO<sub>3</sub> (2 x 40 ml), a 5% vodným roztokem kyseliny citronové (2x 40 ml), solankou (1 x 40 ml) a H<sub>2</sub>O (1 x 40 ml). Organická fáze byla vysušena bezvodým Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, přefiltrována a zahuštěna. Odparek

byl čištěn sloupcovou chromatografií za použití n-hexanu/ethyl acetátu (1:1) v mobilní fázi. Výťažky amidů **10a-e** se pohybovaly mezi 77-85 %.

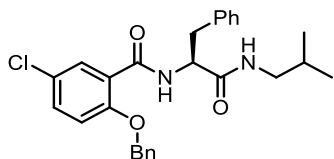


Charakterizace 2-benzyloxy-5-chloro-*N*-[(2*S*)-1-oxo-3-phenyl-1-(prop-2-en-1-ylamino)propan-2-yl]benzamidu **10a**



Bílá pevná látka; výtěžek 77 %; b.t. 146–149 °C;  $[\alpha_D^{20}] = -27,1^\circ$  (c 1 EtOAc).  $Rf_{(\text{hex/EtOA-2/1})} = 0,3$ . **<sup>1</sup>H NMR** (400 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>): δ 8,46 (1H, d,  $J = 8$  Hz, NH-CH-CHH-Ph), 8,29 (1H, t,  $J = 7.6$  Hz, NH-CH<sub>2</sub>-CH=CH<sub>2</sub>), 7,68 (1H, d,  $J = 2,8$  Hz, Ar-H), 7,54-7,44 (3H, m, Ar-H), 7,44-7,32 (3H, m, Ar-H), 7,28-7,11 (4H, m, Ar-H), 7,06-6,97 (2H, m, Ar-H), 7,81-5,68 (1H, m, NH-CH<sub>2</sub>-CH=CH<sub>2</sub>), 5,30-5,20 (2H, m, O-CH<sub>2</sub>-Ph), 5,09 (1H, dd,  $J = 1,6$  Hz,  $J = 17,2$  Hz, NH-CH<sub>2</sub>-CH=CHH), 5,03 (1H, dd,  $J = 1,6$  Hz,  $J = 11,6$  Hz, NH-CH<sub>2</sub>-CH=CHH), 4,77-4,67 (1H, m, NH-CH-CHH-Ph), 3,76-3,66 (2H, m NH-CH<sub>2</sub>-CH=CH<sub>2</sub>), 3,02 (1H, dd,  $J = 4,8$  Hz,  $J = 13,6$  Hz, NH-CH-CHH-Ph), 2,70 (1H, dd,  $J = 9,2$  Hz,  $J = 13,6$  Hz, NH-CH-CHH-Ph). **<sup>13</sup>C NMR** (100,62 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>): δ 171,1; 163,6; 155,6; 138,0; 136,5; 135,6; 132,6; 130,6; 129,6; 129,2; 129,0; 128,8; 128,6; 127,0; 125,4; 124,6; 116,4; 115,7; 71,2; 55,2; 41,5; 38,6. **IR (ATR):** 3292, 2358, 1640, 1523, 1481, 1271, 743, 698 cm<sup>-1</sup>. **CHN analýza:** Vypočteno pro C<sub>26</sub>H<sub>25</sub>ClN<sub>2</sub>O<sub>3</sub> (448,94): C, 69,56; H, 5,61; N, 6,24. Nalezeno: C, 69,51±0,04; H, 5,57±0,03; N, 6,18±0,03. **HRMS (MALDI-TOF, m/z):** [M<sup>+</sup>H]<sup>+</sup> vypočteno pro C<sub>26</sub>H<sub>26</sub>ClN<sub>2</sub>O<sub>3</sub>: 449,16265; nalezeno: 449,16372 Da.

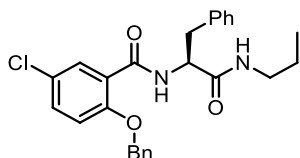
Charakterizace 2-benzyloxy-5-chloro-*N*-{(2*S*)-1-[(2-methylpropyl)amino]-1-oxo-3-phenylpropan-2-yl}benzamidu **10b**



Bílá pevná látka; výtěžek 78 %; b.t. 164,0–164,8 °C. **<sup>1</sup>H NMR** (400 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>): δ 8,45 (1H, d,  $J = 8$  Hz, NH-CH-CHH-Ph), 8,07 (1H, t,  $J = 6$  Hz, NH-CH<sub>2</sub>-CH-(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>),

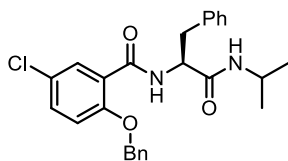
7,68 (1H, d,  $J = 2,8$  Hz, Ar-H), 7,53-7,45 (3H, m, Ar-H), 7,4 -7,33 (3H, m, Ar-H), 7,26 (1H, d,  $J = 8,8$  Hz, Ar-H), 7,2 -7,12 (3H, m, Ar-H), 7,08-7,02 (2H, m, Ar-H), 5,27 (2H, ABq,  $J = 12,8$  Hz, O-CH<sub>2</sub>-Ph), 4,77-4,67 (1H, m, NH-CH-CHH-Ph), 3,00 (1H, dd,  $J = 6,4$  Hz,  $J = 14,8$  Hz, NH-CHH-CH-(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>), 2,95-2,87 (1H, m, NH-CH-CHH-Ph), 2,87-2,78 (1H, m, NH-CH-CHH-Ph), 2,71 (1H, dd,  $J = 9,2$  Hz,  $J = 14$  Hz, NH-CHH-CH-(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>), 1,64 (1H, sep, NH-CHH-CH-(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>), 0,82-0,77 (6H, m, 2 x (CH<sub>3</sub>)). <sup>13</sup>C NMR (100,62 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>): δ 171,1; 163,6; 155,5; 138,0; 136,5; 132,5; 130,6; 129,6; 129,2; 128,9; 128,7; 128,6; 127,0; 125,4; 124,7; 116,4; 71,2; 55,1; 46,7; 38,7; 28,6; 20,7. **CHN analýza:** Vypočteno pro C<sub>27</sub>H<sub>29</sub>ClN<sub>2</sub>O<sub>3</sub> (464,98): C, 69,74; H, 6,29; N, 6,02. Nalezeno: C, 69,79±0,01; H, 6,31±0,01; N, 6,01±0,01. **HRMS (MALDI-TOF, m/z):** [M<sup>+</sup>H]<sup>+</sup> vypočteno pro C<sub>27</sub>H<sub>30</sub>ClN<sub>2</sub>O<sub>3</sub>: 465,19395 Da; nalezeno: 465,19513 Da.

Charakterizace 2-benzyloxy-5-chloro-*N*-[(2*S*)-1-oxo-3-phenyl-1-(propyl-amino)propan-2-yl]benzamidu **10c**



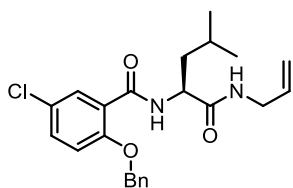
Bílá pevná látka; výtěžek 80 %; b.t. 139,5–141,5 °C. <sup>1</sup>H NMR (400 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>): δ 8,46 (1H, d,  $J = 8$  Hz, NH-CH-CHH-Ph), 8,08 (1H, t,  $J = 5,2$  Hz, NH-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-CH<sub>3</sub>), 7,69 (1H, d,  $J = 2,8$  Hz, Ar-H), 7,55-7,45 (3H, m, Ar-H), 7,45- 7,31 (4H, m, Ar-H), 7,30-7,12 (4H, m, Ar-H), 7,03 (1H, d,  $J = 7,2$  Hz, Ar-H), 5,27 (2H, s, O CH<sub>2</sub>-Ph), 4,75-4,64 (1H, m, NH-CH-CHH-Ph), 3,10-2,90 (3H, m, NH-CH-CHH-Ph, NH-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-CH<sub>3</sub>), 2,65-2,75 (1H, m, NH-CH-CHH-Ph), 1,45-1,29 (2H, m, NH-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-CH<sub>3</sub>), 0,80 (3H, t,  $J = 7,2$  Hz, NH-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-CH<sub>3</sub>). <sup>13</sup>C NMR (100,62 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>): δ 170,9; 163,5; 155,5; 138,0; 136,5; 132,6; 130,7; 129,7; 129,2; 128,9; 128,7; 128,6; 127,0; 125,4; 124,7; 116,4; 71,2; 55,1; 41,0; 38,7; 22,9; 12,0. **CHN analýza:** Vypočteno pro C<sub>26</sub>H<sub>27</sub>ClN<sub>2</sub>O<sub>3</sub> (450,96): C, 69,25; H, 6,03; N, 6,21. Nnalezeno: C, 68,98±0,02; H, 6,03±0,01; N, 6,17±0,02. **HRMS (MALDI-TOF, m/z):** [M<sup>+</sup>H]<sup>+</sup> vypočteno pro C<sub>26</sub>H<sub>28</sub>ClN<sub>2</sub>O<sub>3</sub>: 451,17830 Da; nalezeno: 451,17915 Da.

Charakterizace 2-benzyloxy-5-chloro-*N*-[(2*S*)-1-oxo-3-phenyl-1-(propan-2-ylamino)propan-2-yl]benzamidů **10d**



Bílá pevná látka; výtěžek 85 %; b.t. 147,6–149,1 °C.  $[a_D^{20}] = -51,8^\circ$  (c 1 EtOAc).  $^1\text{H NMR}$  (400 MHz, DMSO- $d_6$ ):  $\delta$  8,46 (1H, d,  $J = 8$  Hz,  $\text{NH-CH-CHH-Ph}$ ), 7,95 (1H, d,  $J = 7,6$  Hz,  $\text{NH-CH-(CH}_3)_2$ ), 7,70 (1H, d,  $J = 2,8$  Hz, Ar- $\underline{H}$ ), 7,53-7,45 (3H, m, Ar- $\underline{H}$ ), 7,43-7,32 (3H, m, Ar- $\underline{H}$ ), 7,26 (1H, d,  $J = 8,8$  Hz, Ar- $\underline{H}$ ), 7,23-7,13 (3H, m, Ar- $\underline{H}$ ), 7,09-7,03 (2H, m, Ar- $\underline{H}$ ), 5,32-5,25 (2H, ABq,  $J = 12,4$  Hz, O- $\underline{\text{CH}}_2$ -Ph), 4,75-4,65 (1H, m, NH- $\underline{\text{CH}}$ -CHH-Ph), 3,90-3,75 (1H, m, NH- $\underline{\text{CH}}$ -( $\text{CH}_3$ ) $_2$ ), 2,97 (1H, dd,  $J = 5,6$  Hz,  $J = 13,6$  Hz, NH-CH- $\underline{\text{CHH}}$ -Ph), 2,75 (1H, dd,  $J = 8,4$  Hz,  $J = 13,6$  Hz, NH-CH- $\underline{\text{CHH}}$ -Ph), 1,05 (3H, d,  $J = 6,4$  Hz,  $\underline{\text{CH}}_3$ -CH- $\underline{\text{CH}}_3$ ), 0,98 (3H, d,  $J = 6,4$  Hz,  $\text{CH}_3$ -CH- $\underline{\text{CH}}_3$ ).  $^{13}\text{C NMR}$  (100,62 MHz, DMSO- $d_6$ ):  $\delta$  169,9; 163,4; 155,5; 137,9; 136,5; 132,6; 130,6; 129,8; 129,2; 128,9; 128,7; 128,5; 127,0; 125,4; 124,7; 116,5; 71,2; 54,9; 41,1; 38,9; 22,9. **CHN analýza:** Vypočteno pro  $\text{C}_{26}\text{H}_{27}\text{ClN}_2\text{O}_3$  (450,96): C, 69,25; H, 6,03; N, 6,21. Nalezeno: C, 69,33 $\pm$ 0,01; H, 5,99 $\pm$ 0,02; N, 6,31 $\pm$ 0,01. **HRMS (MALDI-TOF, m/z):**  $[\text{M}^+\text{H}]^+$  vypočteno pro  $\text{C}_{26}\text{H}_{28}\text{ClN}_2\text{O}_3$ : 451,17830 Da; nalezeno: 451,17902 Da.

Charakterizace (2-benzyloxy-5-chloro-*N*-[(2*S*)-4-methyl-1-oxo-1-(prop-2-en-1-ylamino)pentan-2-yl]benzamidů **10e**

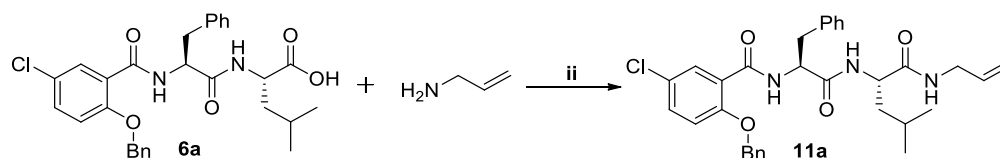


Bílá pevná látka; výtěžek 77 %; b.t. 117–119 °C;  $[a_D^{20}] = -13,4^\circ$  (c 1 EtOAc).  $R_{\text{f}}(\text{hex}/\text{EtOAc-1/2}) = 0,5$ .  $^1\text{H NMR}$  (400 MHz, DMSO- $d_6$ ):  $\delta$  8,31 (1H, d,  $J = 8$  Hz,  $\text{NH-CH-CHH-CH-(CH}_3)_2$ ), 8,19 (1H, t,  $J = 5,6$  Hz,  $\text{NH-CH}_2\text{-CH=CH}_2$ ), 7,76 (1H, d,  $J = 2,8$  Hz, Ar- $\underline{H}$ ), 7,59-7,51 (3H, m, Ar- $\underline{H}$ ), 7,44-7,32 (4H, m, Ar- $\underline{H}$ ), 5,83-5,70 (1H, m, NH- $\text{CH}_2$ - $\underline{\text{CH}}=\text{CH}_2$ ), 5,26 (2H, s, O- $\underline{\text{CH}}_2$ -Ph), 5,09 (1H, dd,  $J = 1,6$  Hz,  $J = 17,2$  Hz, NH- $\text{CH}_2$ - $\underline{\text{CH}}=\underline{\text{CHH}}$ ), 5,03 (1H, dd,  $J = 1,6$  Hz,  $J = 10$  Hz, NH- $\text{CH}_2$ - $\underline{\text{CH}}=\underline{\text{CHH}}$ ), 4,49-4,40 (1H, m, NH- $\underline{\text{CH}}$ -CHH-CH-( $\text{CH}_3$ ) $_2$ ), 3,76-3,60 (2H, m, NH- $\underline{\text{CH}}_2$ -CH=CH $_2$ ), 1,47-1,35 (2H, m, NH-CH- $\underline{\text{CHH}}$ - $\underline{\text{CH}}$ -( $\text{CH}_3$ ) $_2$ ), 1,35-1,23 (1H, m, NH-CH- $\underline{\text{CHH}}$ -CH-

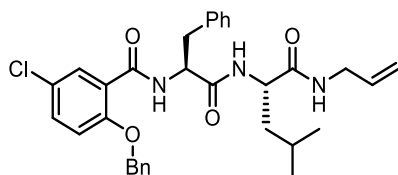
(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>), 0,78 (3H, d,  $J = 6$  Hz,  $\underline{\text{CH}}_3\text{-CH-CH}_3$ ), 0,72 (3H, d,  $J = 6$  Hz, CH<sub>3</sub>-CH- $\underline{\text{CH}}_3$ ). <sup>13</sup>C NMR (100 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>):  $\delta$  171,9; 163,7; 155,5; 136,2; 135,6; 132,3; 130,3; 129,0; 128,9; 128,8; 125,2; 124,8; 116,2; 115,3; 71,3; 52,1; 41,6; 41,2; 24,8; 23,3; 22,0. IR (ATR): 3371, 3294, 1651, 1632, 1544, 1247, 1008, 807, 756, 696 cm<sup>-1</sup>. CHN analýza: Vypočteno pro C<sub>23</sub>H<sub>27</sub>ClN<sub>2</sub>O<sub>3</sub> (414,93): C, 66,58; H, 6,56; N, 6,75. Nalezeno: C, 66,51±0,02; H, 6,54±0,01; N, 6,74±0,01. HRMS (MALDI-TOF, m/z): [M<sup>+</sup>H]<sup>+</sup> vypočteno pro C<sub>23</sub>H<sub>28</sub>ClN<sub>2</sub>O<sub>3</sub>: 415,17830 Da; nalezeno: 415,17842 Da.

### Obecný postup pro přípravu amidů **11a-d**

Sloučeniny **11a-d** byly syntetizovány za podmínek **ii** amidace shodnými s přípravou sloučenin **3a,b**. Intermediáty **6** (10 mmol) a allylamin (10 mmol) byly rozpuštěny v DCM (100 ml) za laboratorní teploty. EDCI·HCl (2,3 g, 12 mmol), HOBt (1,53 g, 10 mmol) a triethylamin (Et<sub>3</sub>N 1,95 ml, 10 mmol) byly přidány do reakční směsi. Směs byla míchána 16 h. Poté byla reakční směs zahuštěna pod sníženým tlakem. Surový produkt byl zředěn ethyl acetátem (50 ml) a promyt H<sub>2</sub>O (2 x 30 ml), nasyceným vodným roztokem NaHCO<sub>3</sub> (2 x 40 ml), a 5% vodným roztokem kyseliny citronové (2x 40 ml), solankou (1 x 40 ml) a H<sub>2</sub>O (1 x 40 ml). Organická fáze byla vysušena bezvodým Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, přefiltrována a zahuštěna. Odparek byl čištěn sloupcovou chromatografií za použití n-hexanu/ethyl acetátu (1:1) v mobilní fázi. Výtěžky amidů **11a-d** se pohybovaly mezi 47-81 %.



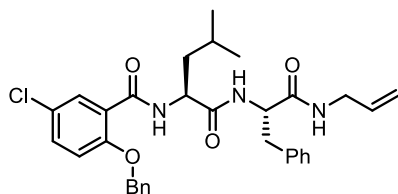
Charakterizace 2-benzyloxy-5-chloro-*N*-((2*S*)-1-oxo-3-phenyl-1- $\{N$ -[(2*S*)-1-oxo-4-methyl-1-(prop-2-en-1-ylamino)pentan-2-yl]})propan-2-yl)benzamidu **11a**



Bílá pevná látka; výtěžek 81 %; b.t. 145–149 °C;  $[\alpha_D^{20}] = -12,8^\circ$  (c 1 EtOAc).  $R_f(\text{hex/EtOAc} - 1/1) = 0,4$ . <sup>1</sup>H NMR (400 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>):  $\delta$  8,52 (1H, d,  $J = 7,6$  Hz,  $\underline{\text{NH}}\text{-CH-CHH-Ph}$ ), 8,28 (1H, d,  $J = 8,4$  Hz,  $\underline{\text{NH}}\text{-CH-CHH-CH-(CH}_3)_2$ ), 8,04 (1H, t,  $J = 6$  Hz,  $\underline{\text{NH}}\text{-CH}_2\text{-CH=CH}_2$ ), 7,68 (1H, d,  $J = 2,8$  Hz, Ar- $\underline{\text{H}}$ ), 7,55-7,3 (6H, m, Ar- $\underline{\text{H}}$ ), 7,28-7,12 (4H, m, Ar- $\underline{\text{H}}$ ), 7,05-6,95 (2H, m, Ar- $\underline{\text{H}}$ ), 5,85-5,73 (1H, m, NH-CH<sub>2</sub>-

$\underline{CH=CH_2}$ ), 5,30-5,20 (2H, m, O- $\underline{CH_2}$ -Ph), 5,13 (1H, dd,  $J = 1,6$  Hz,  $J = 17,2$  Hz, NH- $\underline{CH_2}$ -CH= $\underline{CHH}$ ), 5,06 (1H, dd,  $J = 1,6$  Hz,  $J = 10$  Hz, NH- $\underline{CH_2}$ -CH= $\underline{CHH}$ ), 4,8-4,7 (1H, m, NH- $\underline{CH}$ -CHH-Ph), 4,4-4,3 (1H, m, NH- $\underline{CH}$ -CHH-CH-( $\underline{CH_3}$ )<sub>2</sub>), 3,77-3,64 (2H, m NH- $\underline{CH_2}$ -CH=CH<sub>2</sub>), 3,08 (1H, dd,  $J = 4,4$  Hz,  $J = 14$  Hz, NH-CH- $\underline{CHH}$ -Ph), 2,70 (1H, dd,  $J = 8,8$  Hz,  $J = 13,6$  Hz, NH-CH- $\underline{CHH}$ -Ph), 1,64-1,38 (3H, m, NH-CH- $\underline{CH_2}$ - $\underline{CH}$ -( $\underline{CH_3}$ )<sub>2</sub>), 0,89 (3H, d,  $J = 6,4$  Hz,  $\underline{CH_3}$ -CH- $\underline{CH_3}$ ), 0,84 (3H, d,  $J = 6,4$  Hz,  $\underline{CH_3}$ -CH- $\underline{CH_3}$ ). <sup>13</sup>C NMR (100,62 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>):  $\delta$  172,2; 171,0; 163,7; 155,5; 137,8; 136,5; 135,7; 132,6; 130,6; 129,7; 129,2; 128,9; 128,7; 128,5; 127,0; 125,4; 124,5; 116,5; 115,6; 71,1; 55,0; 51,8; 41,7; 41,4; 38,2; 24,9; 23,6; 22,3. IR (ATR): 3290, 3068, 2928, 1634, 1537, 1271, 1007, 918, 807, 783, 745, 698 cm<sup>-1</sup>. CHN analýza: Vypočteno pro C<sub>32</sub>H<sub>36</sub>ClN<sub>3</sub>O<sub>4</sub> (562,10): C, 68,38; H, 6,46; Cl, 6,31; N, 7,48. Nalezeno: C, 68,51±0,03; H, 6,59±0,03; N, 7,29±0,04. HRMS (MALDI-TOF, m/z): [M<sup>+</sup>H]<sup>+</sup> vypočteno pro C<sub>32</sub>H<sub>37</sub>ClN<sub>3</sub>O<sub>4</sub>: 562,24671 Da; nalezeno: 562,24745 Da.

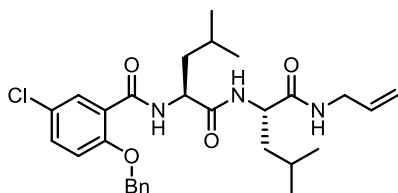
Charakterizace 2-benzyloxy-5-chloro-*N*-((2*S*)-1-oxo-4-methyl-1- $\{N$ -[(2*S*)-1-oxo-3-phenyl-1-(prop-2-en-1-ylamino)propan-2-yl]})pentan-2-yl)benzamidu **11b**



Bílá pevná látka; výtěžek 81 %; b.t. 168–171 °C; [ $\alpha_D^{20}$ ] = -31,0° (c 1 DCM). R<sub>f</sub> (hex/EtOAc - 1/1) = 0,3. <sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>):  $\delta$  8,09 (1H, d,  $J = 7,6$  Hz, NH-CH-CHH-Ph), 8,05 (1H, d,  $J = 2,8$  Hz, NH-CH-CHH-CH( $\underline{CH_3}$ )<sub>2</sub>), 7,50 (1H, t,  $J = 5$  Hz, NH-CH<sub>2</sub>-CH=CH<sub>2</sub>), 7,49-7,40 (5H, m, Ar- $\underline{H}$ ), 7,14-7,00 (6H, m, Ar- $\underline{H}$ ), 6,58 (1H, t,  $J = 5,6$  Hz, Ar- $\underline{H}$ ), 6,54 (1H, d,  $J = 5,6$  Hz, Ar- $\underline{H}$ ), 5,84-5,72 (1H, m, NH-CH<sub>2</sub>- $\underline{CH=CH_2}$ ), 5,21-5,07 (4H, m, O- $\underline{CH_2}$ -Ph, NH-CH<sub>2</sub>-CH= $\underline{CH_2}$ ), 4,79-4,62 (1H, m, NH- $\underline{CH}$ -CHH-CH( $\underline{CH_3}$ )<sub>2</sub>), 4,33-4,25 (1H, m, NH- $\underline{CH}$ -CHH-Ph), 3,97-3,87 (1H, m, NH-CH- $\underline{CHH}$ -Ph), 3,85-3,76 (1H, m, NH-CH- $\underline{CHH}$ -Ph), 3,13 (2H, dd,  $J = 4$  Hz,  $J = 7,2$  Hz, NH- $\underline{CH_2}$ -CH=CH<sub>2</sub>), 1,45-1,36 (1H, m, NH-CH- $\underline{CHH}$ -CH( $\underline{CH_3}$ )<sub>2</sub>), 1,28-1,16 (1H, m, NH-CH- $\underline{CHH}$ - $\underline{CH}$ ( $\underline{CH_3}$ )<sub>2</sub>), 1,09-1,10 (1H, m, NH-CH- $\underline{CHH}$ - $\underline{CH}$ ( $\underline{CH_3}$ )<sub>2</sub>), 0,72 (3H, d,  $J = 6,4$  Hz,  $\underline{CH_3}$ -CH- $\underline{CH_3}$ ), 0,65 (3H, d,  $J = 6,4$  Hz,  $\underline{CH_3}$ -CH- $\underline{CH_3}$ ). <sup>13</sup>C NMR (100,62 MHz, CDCl<sub>3</sub>):  $\delta$  171,6, 170,4, 164,9, 155,6, 136,6, 134,5, 133,8, 133,2, 132,4, 129,4, 129,2, 129,1, 128,5, 128,4, 127,1, 126,7, 121,5, 116,5, 113,8, 72,0, 53,8, 53,2, 42,0, 39,4, 37,2, 24,7, 22,8, 21,4. IR (ATR): 3385, 3303, 1681, 1645, 1632, 1545,

1270, 1232, 986, 832, 779, 756, 713, 698  $\text{cm}^{-1}$ . **CHN analýza:** Vypočteno pro  $\text{C}_{32}\text{H}_{36}\text{ClN}_3\text{O}_4$  (562,10): C, 68,38; H, 6,46; N, 7,48. Nalezeno: C, 68,41 $\pm$ 0,01; H, 6,62 $\pm$ 0,02; N, 7,39 $\pm$ 0,02 **HRMS (MALDI-TOF, m/z):**  $[\text{M}^+\text{H}]^+$  vypočteno pro  $\text{C}_{32}\text{H}_{37}\text{ClN}_3\text{O}_4$ : 562,24671 Da; nalezeno: 562,24731 Da.

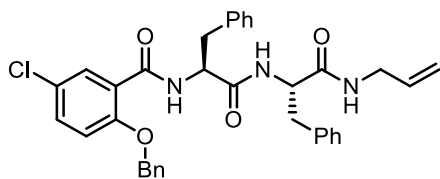
Charakterizace 2-benzyloxy-5-chloro-*N*-((2*S*)-1-oxo-4-methyl-1- $\{N$ -[(2*S*)-1-oxo-4-methyl-1-(prop-2-en-1-ylamino)pentan-2-yl]})pentan-2-yl)benzamidu **11c**



Bílá pevná látka; výtěžek 79 %; b.t. 166–169 °C;  $[\alpha]_D^{20} = -20,5^\circ$  (c 1 EtOAc).  $R_f$  (hex/EtOAc – 1/1) = 0,45.  **$^1\text{H NMR}$**  (400 MHz, DMSO- $d_6$ ):  $\delta$  8,32 (1H, d,  $J = 7,6$  Hz,  $\text{NH-CH-CHH-CH-(CH}_3)_2$ ), 8,07 (1H, d,  $J = 8,4$  Hz,  $\text{NH-CH-CHH-CH-(CH}_3)_2$ ), 8,01 (1H, t,  $J = 5,6$  Hz,  $\text{NH-CH}_2\text{-CH=CH}_2$ ), 7,75 (1H, d,  $J = 2,8$  Hz, Ar- $\underline{H}$ ), 7,60-7,51 (3H, m, Ar- $\underline{H}$ ), 7,43-7,32 (4H, m, Ar- $\underline{H}$ ), 5,84-5,72 (1H, m,  $\text{NH-CH}_2\text{-CH=CH}_2$ ), 5,27 (2H, s, O- $\underline{\text{CH}_2}$ -Ph), 5,12 (1H, dd,  $J = 1,6$  Hz,  $J = 17,2$  Hz,  $\text{NH-CH}_2\text{ CH=CHH}$ ), 5,05 (1H, dd,  $J = 1,6$  Hz,  $J = 10,4$  Hz,  $\text{NH-CH}_2\text{-CH=CHH}$ ), 4,47-4,39 (1H, m,  $\text{NH-CH-CHH-CH-(CH}_3)_2$ ), 4,36-4,28 (1H, m,  $\text{NH-CH-CHH-CH-(CH}_3)_2$ ), 3,74-3,63 (2H, m,  $\text{NH-CH}_2\text{-CH=CH}_2$ ), 1,63-1,59 (1H, m,  $\text{NH-CH-CHH-CH-(CH}_3)_2$ ), 1,59-1,43 (2H, m,  $\text{NH-CH-CHH-CH-(CH}_3)_2$ ), 1,43-1,33 (2H, m,  $\text{NH-CH-CHH-CH-(CH}_3)_2$ ), 1,31-1,20 (1H, m,  $\text{NH-CH-CHH-CH-(CH}_3)_2$ ), 0,89 (3H, d,  $J = 6,4$  Hz,  $\text{CH}_3\text{-CH-CH}_3$ ), 0,83 (3H, d,  $J = 6,4$  Hz,  $\text{CH}_3\text{-CH-CH}_3$ ), 0,76 (3H, d,  $J = 5,8$  Hz,  $\text{CH}_3\text{-CH-CH}_3$ ), 0,69 (3H, d,  $J = 5,8$  Hz,  $\text{CH}_3\text{-CH-CH}_3$ ).  **$^{13}\text{C NMR}$**  (100,62 MHz, DMSO- $d_6$ ):  $\delta$  172,0; 171,9; 163,8; 155,5; 136,2; 135,5; 132,4; 130,4; 129,0; 128,9; 128,8; 125,2; 124,8; 116,1; 115,4; 71,3; 52,3; 51,4; 41,28; 41,25; 41,21; 24,7; 24,6; 23,42; 23,40; 22,0; 21,9. **IR (ATR):** 3284, 2957, 2872, 2360, 1634, 1598, 1542, 1484, 1269, 1245, 1124, 1011, 919, 804, 726, 696  $\text{cm}^{-1}$ . **CHN analýza:** Vypočteno pro  $\text{C}_{29}\text{H}_{38}\text{ClN}_3\text{O}_4$  (528,08): C, 65,96; H, 7,25; N, 7,96. Nalezeno: C, 65,90 $\pm$ 0,01; H, 7,27 $\pm$ 0,02; N, 7,70 $\pm$ 0,02. **HRMS (MALDI-TOF, m/z):**  $[\text{M}^+\text{H}]^+$  vypočteno pro  $\text{C}_{29}\text{H}_{39}\text{ClN}_3\text{O}_4$ : 528,26236 Da; nalezeno: 528,26312 Da.

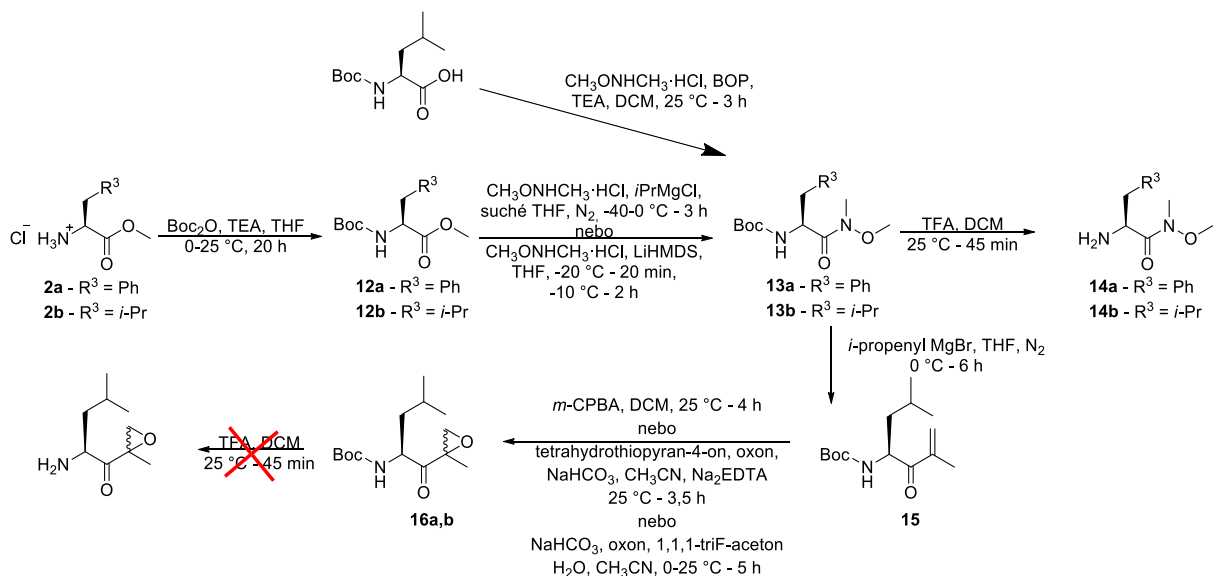


Charakterizace 2-benzyloxy-5-chloro-*N*-((2*S*)-1-oxo-3-phenyl-1- $\{N$ -[(2*S*)-1-oxo-3-phenyl-1-(prop-2-en-1-ylamino)propan-2-yl]})propan-2-yl)benzamidu **11d**



Bílá pevná látka; výtěžek 47 %; b.t. 165–172 °C;  $[\alpha_D^{20}] = -33,0^\circ$  (c 1 EtOAc).  $R_f(\text{hex/EtOAc} - 1/1) = 0,3$ .  **$^1\text{H NMR}$**  (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  8,25 (1H, d,  $J = 5,6$  Hz,  $\text{NH-CH-CHH-Ph}$ ), 7,95 (1H, d,  $J = 2,8$  Hz,  $\text{NH-CH-CHH-Ph}$ ), 7,48 (1H, t,  $J = 2,4$  Hz,  $\text{NH-CH}_2\text{-CH=CH}_2$ ), 7,48-7,33 (5H, m, Ar- $\underline{H}$ ), 7,25-7,15 (3H, m, Ar- $\underline{H}$ ), 7,08-6,85 (8H, m, Ar- $\underline{H}$ ), 6,49-6,37 (2H, m, Ar- $\underline{H}$ ), 5,81-5,70 (1H, m,  $\text{NH-CH}_2\text{-CH=CH}_2$ ), 5,22-5,05 (4H, m, O- $\underline{\text{CH}_2}$ -Ph,  $\text{NH-CH}_2\text{-CH=CH}_2$ ), 4,75-4,61 (2H, m,  $\text{NH-CH}_2\text{-CH=CH}_2$ ), 3,98-3,85 (1H, m,  $\text{NH-CH-CHH-Ph}$ ), 3,83-3,74 (1H, m,  $\text{NH-CH-CHH-Ph}$ ), 3,19 (1H, dd,  $J = 6,4$  Hz,  $J = 14$  Hz,  $\text{NH-CH-CHH-Ph}$ ), 3,02 (1H, dd,  $J = 5,6$  Hz,  $J = 14,4$  Hz,  $\text{NH-CH-CHH-Ph}$ ), 2,96 (1H, dd,  $J = 6,4$  Hz,  $J = 14$  Hz,  $\text{NH-CH-CHH-Ph}$ ), 2,79 (1H, dd,  $J = 5,6$  Hz,  $J = 14,4$  Hz,  $\text{NH-CH-CHH-Ph}$ ).  **$^{13}\text{C NMR}$**  (100,62 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  170,6; 170,4; 165,1; 155,6; 136,5; 136,4; 135,1; 133,9; 133,3; 132,4; 129,4; 129,3; 129,2; 128,9; 128,6; 128,0; 127,3; 127,2; 126,9; 121,8; 116,6; 114,5; 71,9; 56,1; 53,9; 42,2; 37,4; 36,8. **IR (ATR)**: 3282, 3066, 3032, 2360, 2342, 1641, 1597, 1534, 1498, 1487, 1455, 1273, 1253, 1229, 1127, 1011, 917, 806, 747, 697, 669  $\text{cm}^{-1}$ . **CHN analýza**: Vypočteno pro  $\text{C}_{35}\text{H}_{34}\text{ClN}_3\text{O}_4$  (596,12): C, 70,52; H, 5,75; N, 7,05. Nalezeno: C, 70,24 $\pm$ 0,02; H, 5,84 $\pm$ 0,02; N, 6,83 $\pm$ 0,02. **HRMS (MALDI-TOF, m/z)**:  $[\text{M}^+\text{H}]^+$  vypočteno pro  $\text{C}_{35}\text{H}_{35}\text{ClN}_3\text{O}_4$ : 596,23106 Da; nalezeno: 596,23193 Da.

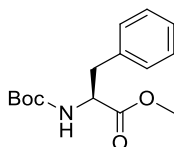
## 5.2.4 Příprava Weinreb amidové a epoxidové funkční skupiny metodou stavebního bloku



### Postupy pro ochranu aminové skupiny, **12a,b**

Příprava látky **12a** byla prováděna dle literatury.<sup>317</sup> L-Fenylalanin methylester hydrochlorid (**2a**, 17 g, 93,58 mmol) byl suspendován ve vysušeném tetrahydrofuranu (150 ml). Směs byla vychlazená na 0 °C. Postupně byly do reakční směsi přidány triethylamin (16,96 ml, 121,65 mmol) a roztok di-*tert*-butyl dikarbonátu (26,55 g, 121,65 mmol) v suchém tetrahydrofuranu (100 ml). Reakční směs byla míchána po dobu 20 hodin a postupně byla nechána ohřát na 25 °C. Objem reakční směsi byl na RVO zredukován na polovinu. Do reakční směsi byla přidána voda (80 ml) a reakční směs byla propláchnuta ethyl acetátem (4 x 40 ml). Sloučená organická fáze byla promyta vodou (3 x 30 ml) a vysušena bezv. Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>. Surový produkt byl přečištěn postupně dvěma sloupcovými chromatografiemi (310 g a 150 g silikagelu, *n*-hexan/ethyl acetát – 3/1). Výtěžek reakce (**12a**) je 63 %.

### Charakterizace (*S*)-methyl 2-(*tert*-butoxykarbonyl)amino)-3-fenylpropanoátu **12a**

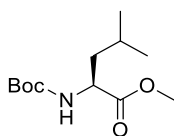


Bezbarvá olejovitá látka; výtěžek 63 %;  $R_f$  (hex/EtOAc-3/1) = 0,44. <sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>-d<sub>1</sub>): δ 7,30-7,15 (5H, m, Ar-H), 5,05-4,95 (1H, m, NH), 4,63-4,52 (1H, m, NH-CH-CH<sub>2</sub>-Ph), 3,70 (3H, s, O-CH<sub>3</sub>), 3,15-2,98 (2H, m, NH-CH-CH<sub>2</sub>-Ph), 1,51 (9H, s, C(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>). <sup>13</sup>C NMR (100,79 MHz, CDCl<sub>3</sub>-d<sub>1</sub>): δ 172,6; 155,3; 146,9; 136,2; 129,7;

129,5; 128,7; 127,2; 85,4; 54,6; 52,4; 38,5; 28,5. **CHN analýza:** Vypočteno pro  $C_{15}H_{21}NO_4$  (279,33): C, 64,50; H, 7,58; N, 5,01. Nalezeno: C, 63,49±0,02; H 7,91±0,02; N, 4,45±0,01. **HRMS (MALDI-TOF, m/z):**  $[M+Na]^+$  vypočteno pro  $C_{15}H_{21}NO_4Na$ : 302,13628 Da; nalezeno: 302,13659 Da.

Příprava látky **12b** byla prováděna dle literatury.<sup>318</sup> L-Leucin methylester hydrochlorid (**2b**, 1 g, 5,5 mmol) byl rozpuštěn ve vodě (10 ml) s  $K_2CO_3$  (0,83 g, 6,05 mmol). Směs byla míchána při 25 °C 10 minut. Reakční směs byla promyta DCM (3 x 10 ml). Zkombinované organické fáze byly vysušeny bezv.  $Na_2SO_4$ . Rozpouštědlo bylo na RVO oddestilováno za sníženého tlaku a L-leucin methylester s volnou amino skupinou byl izolován jako čirý olej. L-Leucin methylester byl rozpuštěn v absolutním EtOH (10 ml) a roztok byl zahřát na 35-40 °C. Byl přidán roztok di-*tert*-butyl dikarbonátu (1,44 g, 6,6 mmol) a guanidin hydrochloridu (0,078 g, 0,83 mmol) v absolutním EtOH (10 ml). Reakční směs byla při teplotě 35-40 °C míchána 1 hodinu. EtOH byl na RVO oddestilován za sníženého tlaku a odparek byl suspendován v EtOAc (20 ml). Nerozpuštěný katalyzátor byl odstraněn filtrací. Organická fáze byla promyta 5% roztokem kyseliny citronové ve vodě (3 x 15 ml), 10% roztokem HCl (4 x 15 ml) a vysušena bezv.  $Na_2SO_4$ . Za sníženého tlaku byl na RVO roztok produktu zahuštěn do konstantní váhy ve formě bezbarvého oleje. Surový produkt byl přečištěn sloupcovou chromatografií (70 g silikagelu, *n*-hexan/ethyl acetát – 6/1). Produkt **12b** byl izolován v 60% výtěžku.

Charakterizace (*S*)-methyl 2-((*tert*-butoxykarbonyl)amino)-4-methylpentanoát **12b**



Bezbarvá olejovitá látka; výtěžek 60 %. **<sup>1</sup>H NMR** (400 MHz,  $CDCl_3-d_1$ ):  $\delta$  5,02-4,93 (1H, m, NH), 4,40-4,30 (1H, m, NH-CH-CH<sub>2</sub>-CH-(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>), 3,76 (3H, s, O-CH<sub>3</sub>), 1,80-1,50 (3H, m, NH-CH-CH<sub>2</sub>-CH-(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>), 1,47 (9H, s, C(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>), 1,03-0,94 (6H, m, CH-(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>). **<sup>13</sup>C NMR** (100,79 MHz,  $CDCl_3-d_1$ ):  $\delta$  174,2; 156,2; 146,8; 86,1; 78,7; 52,4; 52,3; 28,8; 27,5; 24,2; 22,2; 20,9. **CHN analýza:** Vypočteno pro  $C_{12}H_{23}NO_4$  (245,32): C, 58,75; H, 9,45; N, 5,71. Nalezeno: C, 58,69±0,01; H 9,41±0,01; N, 5,67±0,01. **HRMS (MALDI-TOF, m/z):** vypočteno pro  $C_{12}H_{23}NO_4$ : 268,15193  $[M+Na]^+$ ; nalezeno: 268,15196  $[M+Na]^+$ .

Postupy zavedení Weinreb amidové funkční skupiny, **13a,b**

Pro přípravu Weinreb amidů byly postupně testovány tři postupy lišící se v reakčních podmínkách a použitých činidlech.

V prvním postupu převzatém a upraveném z literatury<sup>305</sup> byl *N*-Boc-L-leucin methylester (1 g, 4,08 mmol) rozpuštěn ve vysekurované trojhrdlé kulaté baňce v suspenzi *O,N*-dimethylhydroxylamin hydrochloridu ( $\text{CH}_3\text{ONHCH}_3\cdot\text{HCl}$ , 0,597 g, 6,12 mmol) v suchém tetrahydrofuranu (25 ml) pod inertní  $\text{N}_2$  atmosférou. Reakční směs byla vychlazena na  $-40\text{ }^\circ\text{C}$  a v průběhu 15 minut byl za pomoci syringe pumpy přikapán roztok isopropylmagnesium chloridu (*i*-PrMgCl, 2M v suchém THF, 6,12 ml, 12,24 mmol). Reakční směs byla míchána 3 hodiny za pozvolného ohřevu z  $-30$ – $0\text{ }^\circ\text{C}$ , poté byla ukončena přilítím nasyceného roztoku  $\text{NH}_4\text{Cl}$  v  $\text{H}_2\text{O}$  (10 ml). Produkt byl extrahován do EtOAc (3 x 20 ml). Kombinované organické fáze byly promyty  $\text{H}_2\text{O}$  (2 x 10 ml) a vysušeny bezv.  $\text{Na}_2\text{SO}_4$ . Surový produkt byl přečištěn sloupcovou chromatografií (70 g silikagelu, *n*-hexan/ethyl acetát - 3:1). Výsledný Weinreb amid **13b** byl izolován jako bezbarvý olej v 48% výtěžku.

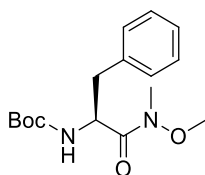
Druhý postup vedoucí na Weinreb amidy byl převzat a upraven z literatury.<sup>306</sup> *N*-Boc-L-Leucin methylester (1 g, 4,08 mmol) byl rozpuštěn ve vysekurované trojhrdlé kulaté baňce v suspenzi  $\text{CH}_3\text{ONHCH}_3\cdot\text{HCl}$  (0,994 g, 10,19 mmol) v suchém tetrahydrofuranu (30 ml) pod inertní  $\text{N}_2$  atmosférou. Reakční směs byla vychlazena na  $-20\text{ }^\circ\text{C}$  a v průběhu 20 minut byl za pomoci syringe pumpy přikapán roztok lithium *bis*(trimethylsilyl)amid (LiHMDS, 1M v suchém THF, 20,38 ml, 20,38 mmol). Reakční směs byla míchána 2 hodiny při  $-10\text{ }^\circ\text{C}$ , poté byla ukončena přilítím nasyceného roztoku  $\text{NH}_4\text{Cl}$  v  $\text{H}_2\text{O}$  (20 ml) a naředěna  $\text{Et}_2\text{O}$  (20 ml). Produkt byl extrahován do  $\text{Et}_2\text{O}$  (3 x 30 ml). Kombinované organické fáze byly promyty  $\text{H}_2\text{O}$  (2 x 20 ml) a vysušeny bezv.  $\text{Na}_2\text{SO}_4$ . Surový produkt byl přečištěn sloupcovou chromatografií (70 g silikagelu, *n*-hexan/ethyl acetát - 1:1). Výsledný Weinreb amid **13b** byl izolován jako bezbarvý olej v 75% výtěžku.

Třetí možnost pro zavedení Weinreb amidové funkční skupiny vychází přímo z *N*-Boc aminokyselin a využívá amidačního činidla BOP (benzotriazol-1-yl oxytris(dimethylamino) fosfonium hexafluorofosfát). Postup byl převzat a upraven z literatury.<sup>307</sup> *N*-Boc-L-leucin (0,523 g, 2,26 mmol) byl rozpuštěn v DCM (10 ml). Po první porci TEA (0,315 ml, 2,26 mmol) byl přidán BOP (1 g, 2,26 mmol) a roztok

směsi  $\text{CH}_3\text{ONHCH}_3\cdot\text{HCl}$  (0,243 g, 2,49 mmol) s druhou porcí TEA (0,347 ml, 2,49 mmol) v DCM (15 ml). Reakční směs byla při 25 °C míchána 3 hodiny. Reakce byla ukončena přilítím DCM (60 ml) a promytím 3M HCl (3 x 10 ml), nasyceným roztokem  $\text{NaHCO}_3$  (3 x 10 ml) a vodou (3 x 10 ml). Organická fáze byla vysušena bezv.  $\text{Na}_2\text{SO}_4$ . Surový produkt byl přečištěn sloupcovou chromatografií (70 g silikagelu, *n*-hexan/ethyl acetát – 1/1). Výsledný Weinreb amid **13b** byl izolován jako bezbarvý olej v 60% výtěžku.

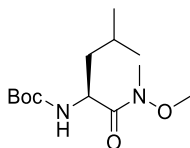
Jako nejvhodnější metodou přípravy Weinreb amidů se ukázal druhý popsany postup využívající LiHMDS, protože poskytuje nejvyšší výtěžky, je dostatečně robustní, je prováděn bez nutnosti hlubokého chlazení a nutnosti práce s inertním plynem, sušeným rozpouštědlem a ve vysekurované aparatuře. V případě zavádění Weinrebamidové skupiny do pokročilejších molekul bylo využíváno výhradně tohoto postupu.

Charakterizace (*S*)-*tert*-butyl (1-(methoxy(methyl)amino)-1-oxo-3-fenylpropan-2-yl) karbamátu **13a**



Bezbarvá olejovitá látka; výtěžek 85 %;  $R_f$  (*hex*/*EtOAc* – 1/1) = 0,43.  $^1\text{H NMR}$  (400 MHz,  $\text{CDCl}_3\text{-d}_1$ ):  $\delta$  7,40-7,18 (5H, m, Ar-*H*), 5,30-5,20 (1H, m, NH), 5,10-4,95 (1H, m, NH-*CH*-CHH-Ph), 3,71 (3H, s, N-*CH*<sub>3</sub>), 3,22 (3H, s, O-*CH*<sub>3</sub>), 3,15-3,05 (1H, m, NH-CH-*CH*H-Ph), 3,00-2,87 (1H, m, NH-CH-*CH*H-Ph), 1,44 (9H, s, C(*CH*<sub>3</sub>)<sub>3</sub>).  $^{13}\text{C NMR}$  (100,79 MHz,  $\text{CDCl}_3\text{-d}_1$ ):  $\delta$  172,5; 155,4; 136,8; 129,8; 128,2; 126,1; 79,8; 61,7; 51,7; 39,0; 32,2; 28,5. **CHN analýza:** Vypočteno pro  $\text{C}_{16}\text{H}_{24}\text{N}_2\text{O}_4$  (308,37): C, 62,32; H, 7,84; N, 9,08. Nalezeno: C, 62,78±0,02; H 7,83±0,01; N, 8,94±0,01. **HRMS (MALDI-TOF, m/z):**  $[\text{M}+\text{Na}]^+$  vypočteno pro  $\text{C}_{16}\text{H}_{24}\text{N}_2\text{O}_4\text{Na}$ : 331,16283 Da; nalezeno: 331,16317 Da.

Charakterizace (*S*)-*tert*-butyl (1-(methoxy(methyl)amino)-4-methyl-1-oxopentan-2-yl) karbamátu **13b**

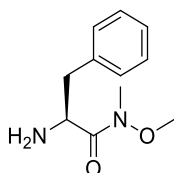


Bezbarvá olejovitá látka; výtěžek 75 %;  $R_f$  (hex/EtOAc – 1/1) = 0,51.  $^1\text{H NMR}$  (400 MHz,  $\text{CDCl}_3\text{-d}_1$ ):  $\delta$  5,07-5,02 (1H, m,  $\text{NH}$ ), 4,73-4,63 (1H, m,  $\text{NH-CH}$ ), 3,76 (3H, s,  $\text{N-CH}_3$ ), 3,17 (3H, s,  $\text{O-CH}_3$ ), 1,73-1,65 (1H, m,  $\text{CH}_3\text{-CH-CH}_3$ ), 1,45-1,33 (11H, m,  $\text{NH-CH-CH}_2\text{-CH-(CH}_3)_2$ ,  $\text{C(CH}_3)_3$ ), 0,95-0,85 (6H, m,  $\text{CH-(CH}_3)_2$ ).  $^{13}\text{C NMR}$  (100,79 MHz,  $\text{CDCl}_3\text{-d}_1$ ):  $\delta$  174,0; 155,8; 79,6; 61,8; 49,1; 42,2; 32,3; 29,9; 28,5; 24,9; 23,5. **CHN analýza:** Vypočteno pro  $\text{C}_{13}\text{H}_{26}\text{N}_2\text{O}_4$  (274,36): C, 56,91; H, 9,55; N, 10,21. Nalezeno: C, 56,73 $\pm$ 0,02; H 9,64 $\pm$ 0,02; N, 10,12 $\pm$ 0,02. **HRMS (MALDI-TOF, m/z):**  $[\text{M}+\text{Na}]^+$  vypočteno pro  $\text{C}_{13}\text{H}_{26}\text{N}_2\text{O}_4\text{Na}$ : 297,17848 Da; nalezeno: 297,17867 Da.

#### Obecný postup deprotektce amino skupiny, 14a,b

Deprotektce amino skupiny u Weinreb amidů **13a,b** vede na molekuly **14a,b**, které jsou využity při syntéze diamidových Weinreb amidů **17a-d**. Postup deprotektce byl převzat z literatury.<sup>319</sup> K roztoku *N*-Boc-*L*-leucin Weinreb amidu (**13b**, 3,5 g, 12,8 mmol) v dichlorometanu (50 ml) byla přidána kyselina trifluoroctová (19,6 ml, 256 mmol). Reakční směs byla při 25 °C míchána 45 minut a následně neutralizována na pH = 7 s 2M roztokem NaOH ve vodě. Oddělená organická fáze byla promyta nasyceným roztokem  $\text{NaHCO}_3$  (2 x 30 ml), vodou (2 x 30 ml) a byla vysušena bezv.  $\text{Na}_2\text{SO}_4$ . Oddestilováním rozpouštědla na RVO za sníženého tlaku byl izolován produkt **14b** ve výtěžku 68 %.

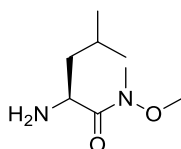
Charakterizace (*S*)-2-amino-*N*-methoxy-*N*-methyl-3-fenylpropanamidu **14a**



Bezbarvá olejovitá látka; výtěžek 98 %.  $^1\text{H NMR}$  (400 MHz,  $\text{CDCl}_3\text{-d}_1$ ):  $\delta$  7,40-7,20 (5H, m,  $\text{Ar-H}$ ), 4,20-4,10 (1H, m,  $\text{NH-CH}$ ), 3,67 (3H, s,  $\text{N-CH}_3$ ), 3,25 (3H, s,  $\text{O-CH}_3$ ), 3,20-3,10 (1H, m,  $\text{NH-CH-CHH-Ph}$ ), 2,85-2,75 (1H, m,  $\text{NH-CH-CHH-Ph}$ ). Signál  $\text{NH}_2$

není patrný.  $^{13}\text{C}$  NMR (100,79 MHz,  $\text{CDCl}_3\text{-d}_1$ ):  $\delta$  172,5; 155,4; 136,8; 129,8; 128,2; 126,1; 79,8; 61,7; 51,7; 39,0. **CHN analýza:** Vypočteno pro  $\text{C}_{11}\text{H}_{16}\text{N}_2\text{O}_2$  (208,26): C, 63,44; H, 7,74; N, 13,45. Nalezeno: C, 61,95 $\pm$ 0,02; H 7,88 $\pm$ 0,01; N, 12,79 $\pm$ 0,02. **HRMS (MALDI-TOF, m/z):**  $[\text{M}+\text{H}]^+$  vypočteno pro  $\text{C}_{11}\text{H}_{17}\text{N}_2\text{O}_2$ : 209,12845 Da; nalezeno: 209,12831 Da.

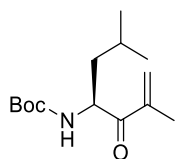
Charakterizace (*S*)-2-amino-*N*-methoxy-*N*,4-dimethylpentanamidu **14b**



Bezbarvá olejovitá látka; výtěžek 68 %.  $^1\text{H}$  NMR (400 MHz,  $\text{CDCl}_3\text{-d}_1$ ):  $\delta$  3,85-3,75 (1H, m, NH-CH-CHH-CH-( $\text{CH}_3$ )<sub>2</sub>), 3,73 (3H, s, N-CH<sub>3</sub>), 3,21 (3H, s, O-CH<sub>3</sub>), 1,90-1,78 (1H, m, NH-CH-CHH-CH-( $\text{CH}_3$ )<sub>2</sub>), 1,52-1,43 (1H, m, NH-CH-CHH-CH-( $\text{CH}_3$ )<sub>2</sub>), 1,40-1,31 (1H, m,  $\text{CH}_3$ -CH- $\text{CH}_3$ ), 0,95 (3H, d,  $J$  = 2,4 Hz, CH<sub>3</sub>), 0,93 (3H, d,  $J$  = 2,4 Hz, CH<sub>3</sub>). Signál NH<sub>2</sub> není patrný.  $^{13}\text{C}$  NMR (100,79 MHz,  $\text{CDCl}_3\text{-d}_1$ ):  $\delta$  61,5; 49,6; 44,1; 24,9; 23,6; 21,8. **CHN analýza:** Vypočteno pro  $\text{C}_8\text{H}_{18}\text{N}_2\text{O}_2$  (174,24): C, 55,15; H, 10,41; N, 16,08. Nalezeno: C, 51,67 $\pm$ 0,01; H 9,95 $\pm$ 0,02; N, 13,90 $\pm$ 0,02. **HRMS (MALDI-TOF, m/z):**  $[\text{M}+\text{H}]^+$  vypočteno pro  $\text{C}_8\text{H}_{19}\text{N}_2\text{O}_2$ : 175,14410 Da; nalezeno: 175,14432 Da.

#### Postup pro zavedení isopropenylového motivu, 15

Metoda zavedení dvojné vazby do molekuly byla převzata z literatury.<sup>307</sup> Ve vysekurované trojhrdlé kulaté baňce byl pod inertní atmosférou  $\text{N}_2$  k na 0 °C chlazenému roztoku isopropenylmagnesium bromidu (*i*-PropenylMgBr, 0,5M v suchém THF, 9,29 ml, 4,645 mmol) přikapán roztok *N*-Boc-L-leucin Weinreb amidu (**13b**, 0,607 g, 2,212 mmol) v suchém THF (20 ml). Reakční směs byla míchána 6 hodin při 0 °C. Reakce byla následně ukončena přilítím nasyceného roztoku  $\text{NH}_4\text{Cl}$  v  $\text{H}_2\text{O}$  (20 ml) a 20 g ledu. Po roztátí ledu bylo přidávkem 10% HCl upraveno pH reakční směsi na pH = 7. Produkt byl extrahován do EtOAc (3 x 20 ml). Kombinované organické fáze byly promyty  $\text{H}_2\text{O}$  (2 x 10 ml) a vysušeny bezv.  $\text{Na}_2\text{SO}_4$ . Surový produkt byl přečištěn sloupcovou chromatografií (70 g silikagelu, *n*-hexan/ethyl acetát - 3:1). Výsledný isopropenylový intermediát **15** byl izolován jako bezbarvý olej v 48% výtěžku.

Charakterizace *tert*-butyl [(4*S*)-2,6-dimethyl-3-oxohept-1-en-4-yl]karbamátu **15**

Bezbarvá olejovitá látka; výtěžek 60 %;  $R_f$  (hex/EtOAc – 3/1) = 0,63.

$^1\text{H NMR}$  (400 MHz,  $\text{CDCl}_3\text{-d}_1$ ):  $\delta$  6,14 (1H, s,  $\text{CH}_3\text{C}=\underline{\text{C}}\text{HH}$ ), 5,94 (1H, s,  $\text{CH}_3\text{C}=\underline{\text{C}}\text{HH}$ ), 5,25-5,17 (1H, m,  $\text{NH}\text{-}\underline{\text{C}}\text{H}\text{-CH}_2\text{-CH}(\text{CH}_3)_2$ ), 5,17-5,07 (1H, m,  $\text{NH}\text{-}\underline{\text{C}}\text{H}\text{-CH}_2\text{-CH}(\text{CH}_3)_2$ ), 1,96 (1H, s,  $\underline{\text{C}}\text{H}_3\text{C}=\text{CHH}$ ), 1,84-1,74 (1H, m,  $\text{NH}\text{-CH}\text{-CH}_2\text{-}\underline{\text{C}}\text{H}(\text{CH}_3)_2$ ), 1,57-1,44 (10H, m,  $\text{COO}(\underline{\text{C}}\text{H}_3)_3$ ,  $\text{NH}\text{-CH}\text{-}\underline{\text{C}}\text{H}\text{H}\text{-CH}(\text{CH}_3)_2$ ), 1,42-1,30 (1H, m,  $\text{NH}\text{-CH}\text{-}\underline{\text{C}}\text{H}\text{H}\text{-CH}(\text{CH}_3)_2$ ), 1,05 (1H, d,  $J = 2,4$  Hz,  $\text{CH}_3\text{-CH}\text{-}\underline{\text{C}}\text{H}_3$ ), 0,95 (1H, d,  $J = 2,4$  Hz,  $\underline{\text{C}}\text{H}_3\text{-CH}\text{-CH}_3$ ).  $^{13}\text{C NMR}$  (100,79 MHz,  $\text{CDCl}_3\text{-d}_1$ ):  $\delta$  201,8; 155,7; 149,5; 142,4; 126,3; 79,7; 52,7; 43,4; 28,5; 25,1; 23,6; 21,8; 18,1. **CHN analýza:** Vypočteno pro  $\text{C}_{14}\text{H}_{25}\text{NO}_3$  (255,35): C, 68,85; H, 9,87; N, 5,49. Nalezeno: C, 65,94 $\pm$ 0,02; H 9,98 $\pm$ 0,02; N, 5,32 $\pm$ 0,01. **HRMS (MALDI-TOF, m/z):**  $[\text{M}+\text{H}]^+$  vypočteno pro  $\text{C}_{14}\text{H}_{26}\text{NO}_3$ : 256,19072 Da; nalezeno: 256,19063 Da.

Epoxidace isopropenylového motivu, **16a,b**

Mírná oxidace dvojné vazby isopropenylového intermediátu **15** byla prováděna třemi postupy. Intermediát **15** (0,538 g, 2,1 mmol) byl rozpuštěn v DCM (50 ml). *m*-CPBA (1,27 g, 7,35 mmol) byl přidáván ve třech dávkách po 30 minutách. Při TLC kontrole (*n*-hexan/ethyl acetát – 6/1) se první skvrny produktu začaly objevovat až po 2 dnech. Reakční směs byla míchána při 25 °C 4 dny. Poté byla reakce ukončena a organická fáze byla promyta 30% roztokem  $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$  (3 x 20 ml), nasyceným roztokem  $\text{NaHCO}_3$  (3 x 20 ml), vodou (3 x 20 ml) a vysušena bezv.  $\text{Na}_2\text{SO}_4$ . Surový produkt obsahuje v této fázi nezreagovanou výchozí látku, rezidua *m*-CPBA. Produkt byl čištěn sloupcovou chromatografií (60 g silikagelu, *n*-hexan/ethyl acetát – 19/1). Podařilo se izolovat nezreagovanou výchozí látku **15** v množství 54 % a produkt ve dvou diastereoizomerech v úhrnném výtěžku 35 % (**16a,b**).<sup>320</sup>

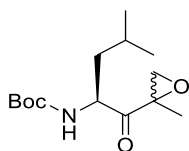
Druhý testovaný způsob mírné oxidace využívá kombinace tetrahydrothiopyran-4-onu a oxonu (směs 2  $\text{KHSO}_5 \cdot \text{KHSO}_4 \cdot \text{K}_2\text{SO}_4$ ). Intermediát **15** (0,29 g, 1,14 mmol) byl při 25 °C rozpuštěn v  $\text{CH}_3\text{CN}$  (15 ml) a  $4 \cdot 10^{-4}\text{M}$  roztoku EDTA ve vodě (9 ml). Do směsi byl přidán tetrahydrothiopyran-4-on (7 mg, 0,057 mmol),  $\text{NaHCO}_3$  (0,445 g, 5,3 mmol) a oxon (0,526 g, 1,71 mmol). Reakce probíhala 3,5 hodiny při 25 °C za mírného vývoje bublinek. Na TLC (*n*-hexan/ethyl acetát – 9/1) je vidět majoritní skvrna nezreagované výchozí látky ( $R_f = 0,45$ ) a minoritní protáhlá skvrna produktu ( $R_f = 0,25$ ). Reakce byla celkem nechána reagovat 24 hodin. TLC analýza byla stejná



bez výrazného posunu reakce ve prospěch produktu. Reakce byla ukončena, vodná fáze byla extrahována EtOAc (3 x 20 ml). Kombinovaná organická fáze byla promyta vodou (3 x 20 ml) a vysušena bezv. Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>. Surový produkt obsahuje podle <sup>1</sup>H NMR hlavně nezreagovanou výchozí látku a jen stopy produktu. Zpětně izolovaná výchozí látka (80 %) byla po přečištění sloupcovou chromatografií (70 g silikagel, *n*-hexan/ethyl acetát – 6/1) použita pro další syntézy. Nebyly izolovány ani stopy produktu.<sup>321</sup>

Třetí testovaný způsob mírné oxidace dvojné vazby využívá kombinace oxonu a trifluoroacetonu. NaHCO<sub>3</sub> (10,8 g, 128,7 mmol) bylo suspendováno ve vodě (14 ml). Suspenze byla vychlazená na 5 °C. Poté byl přidán 1,1,1-trifluoroaceton (12,2 ml, 136,5 mmol) a roztok intermediátu **15** (1 g, 3,9 mmol) v CH<sub>3</sub>CN (25 ml). Reakční směs byla vychlazená na 0 °C. Oxon byl přidán ve třech dávkách po 10 minutách. Reakce byla vedena po dobu 5 hodin za pozvolného ohřevu na 25 °C. Na TLC (*n*-hexan/ethyl acetát – 9/1) je vidět majoritní skvrna nezreagované výchozí látky (R<sub>f</sub> = 0,45) a minoritní protáhlá skvrna produktu (R<sub>f</sub> = 0,25). Reakce byla ukončena přilítím Et<sub>2</sub>O (100 ml) a vody (40 ml). Oddělená vodná fáze byla extrahována Et<sub>2</sub>O (3 x 50 ml). spojené organické fáze byly promyty vodou (3 x 20 ml) a vysušeny bezv. Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>. Surový produkt obsahuje podle <sup>1</sup>H NMR hlavně nezreagovanou výchozí látku a minoritní podíl dvou diastereomerních produktů. Sloupcovou chromatografií (150 g silikagelu, *n*-hexan/ethyl acetát – 19/1) bylo zpětně izolováno 70 % nezreagované výchozí látky (R<sub>f</sub> (hex/EtOAc – 19/1) = 0,18), 3 % prvního diastereoizomeru **16a** (R<sub>1f</sub> (hex/EtOAc-19/1) = 0,14) a 7 %; druhého diastereoizomeru **16b** (R<sub>2f</sub> (hex/EtOAc-19/1) = 0,07).<sup>307</sup>

Charakterizace obou diastereoizomerů *tert*-butyl [(2*S*)-4-methyl-1-(2-methyloxiran-2-yl)-1-oxopentan-2-yl] karbamátu **16a,b**

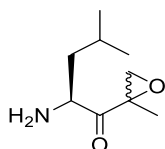


Bezbarvá olejovitá látka; úhrnný výtěžek 35 %; první diastereoizomer **16a** R<sub>1f</sub> (hex/EtOAc - 6/1) = 0,29; R<sub>1f</sub> (hex/EtOAc – 19/1) = 0,14. <sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>-d<sub>1</sub>): δ 4,96-4,89 (1H, m, NH-CH-CH<sub>2</sub>-CH-(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>), 4,40-4,32 (1H, m, NH-CH-CH<sub>2</sub>-CH-(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>), 3,33 (1H, d, J = 4,8 Hz, CH<sub>3</sub>(CCHHO)), 2,93 (1H, d, J = 4,8 Hz, CH<sub>3</sub>(CCHHO)), 1,81-1,72 (1H, m, NH-CH-CH<sub>2</sub>-CH-(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>), 1,56 (3H, s, CH<sub>3</sub>(CCHHO)), 1,54-1,51 (2H, m, NH-CH-CH<sub>2</sub>-CH-(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>), 1,49-1,43 (9H, m,

COO(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>), 1,05-0,95 (6H, m, NH-CH-CH<sub>2</sub>-CH-(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>). <sup>13</sup>C NMR (100,79 MHz, CDCl<sub>3</sub>-d<sub>1</sub>): δ 209,8; 156,2; 78,7; 59,6; 52,1; 51,9; 45,5; 38,4; 28,4; 27,5; 24,9; 23,8; 21,5; 18,2. **CHN analýza:** Vypočteno pro C<sub>14</sub>H<sub>25</sub>NO<sub>4</sub> (271,35): C, 61,97; H, 9,29; N, 5,16. Nalezeno: C, 61,69±0,02; H 9,34±0,02; N, 5,09±0,01. **HRMS (MALDI-TOF, m/z):** [M+H]<sup>+</sup> vypočteno pro C<sub>14</sub>H<sub>26</sub>NO<sub>4</sub>: 272,18564 Da; nalezeno: 272,18699 Da.

Druhý diastereoizomer **16b** R<sub>2f</sub> (hex/EtOAc - 6/1) = 0,18; R<sub>2f</sub> (hex/EtOAc - 19/1) = 0,07. <sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>-d<sub>1</sub>): δ 4,99-4,93 (1H, m, NH-CH-CH<sub>2</sub>-CH-(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>), 4,68-4,57 (1H, m, NH-CH-CH<sub>2</sub>-CH-(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>), 3,09 (1H, d, J = 4,8 Hz, CH<sub>3</sub>(CCHHO)), 2,90 (1H, d, J = 4,8 Hz, CH<sub>3</sub>(CCHHO)), 1,82-1,71 (1H, m, NH-CH-CH<sub>2</sub>-CH-(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>), 1,62 (3H, s, CH<sub>3</sub>(CCHHO)), 1,55-1,30 (11H, m, COO(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>, NH-CH-CH<sub>2</sub>-CH-(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>), 1,03 (3H, d, J = 6,4 Hz, CH<sub>3</sub>-CH-CH<sub>3</sub>), 0,98 (3H, d, J = 6,8 Hz, CH<sub>3</sub>-CH-CH<sub>3</sub>). <sup>13</sup>C NMR (100,79 MHz, CDCl<sub>3</sub>-d<sub>1</sub>): δ 206,8; 154,2; 79,8; 58,9; 53,1; 53,0; 41,2; 29,9; 28,5; 25,1; 23,5; 21,7; 17,8. **CHN analýza:** Vypočteno pro C<sub>14</sub>H<sub>25</sub>NO<sub>4</sub> (271,35): C, 61,97; H, 9,29; N, 5,16. Nalezeno: C, 63,42±0,01; H 9,26±0,02; N, 4,98±0,01. **HRMS (MALDI-TOF, m/z):** [M+H]<sup>+</sup> vypočteno pro C<sub>14</sub>H<sub>26</sub>NO<sub>4</sub>: 272,18564 Da; nalezeno: 272,19748 Da.

#### Příprava (2S)-2-amino-4-methyl-1-(2-methyloxiran-2-yl)pentan-1-onu



Postup deproteckce je shodný s postupem přípravy látek **14a,b** a byl převzat z literatury.<sup>319</sup> K roztoku intermediátu **16a** (0,09 g, 0,3 mmol) v dichlorometanu (20 ml) byla přidána kyselina trifluoroctová (0,115 ml, 1,5 mmol). Reakční směs byla při 25 °C míchána 45 minut a následně neutralizována na pH = 7 s 1M roztokem Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> ve vodě. Oddělená organická fáze byla promyta nasyceným roztokem NaHCO<sub>3</sub> (2 x 15 ml), vodou (2 x 15 ml) a byla vysušena bezv. Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>. Při TLC kontrole (*n*-hexan/ethyl acetát – 6/1) byla patrná směs asi pěti splývajících skvrn v rozmezí R<sub>f</sub> = 0,4-0,1. Čištění surové směsi (70 g silikagel, (*n*-hexan/ethyl acetát – 9/1) nevedlo k úspěšné izolaci žádného z produktů. <sup>1</sup>H NMR analýza nevedla k bližší identifikaci jednotlivých složek. Z důvodu nízkého množství výchozí látky **16a** jakož i druhého diastereoizomeru **16b** a vzhledem ke složitosti a nehospodárnosti jejich příprav byla optimalizace tohoto

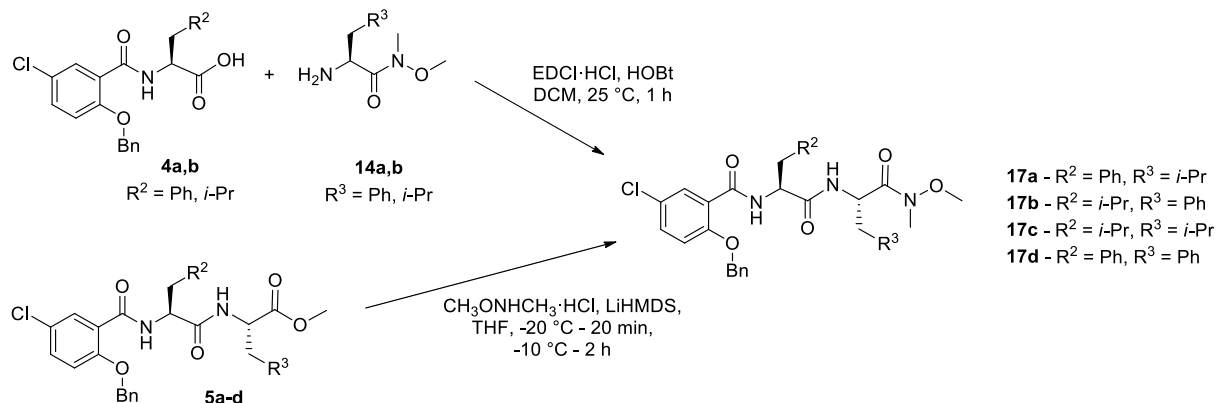
posledního reakčního kroku stejně jako celé reakční dráhy problematická a bylo od ní upuštěno.

#### Obecný postup přípravy Weinreb amidů 17a-d

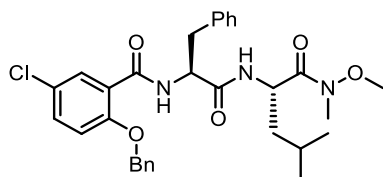
Dipeptidové salicylamidy zakončené Weinreb amidovou funkční skupinou (**17a-d**) byly připraveny dvojným způsobem. Prvním způsobem je metoda stavebního bloku vycházející ze separátního vybudování funkční skupiny na aminokyselině (**14a,b**) a následného spojení tohoto stavebního bloku se salicylamidem s již navázanou aminokyselonou (**4a,b**) ve smyslu Steglichovi amidace. Použité optimalizované podmínky amidace látek **3a,b** (**iv**) nevyužívají TEA, DIPEA nebo  $K_2CO_3$  z důvodu již volné aminoskupiny molekuly (**14a,b**), EDCI·HCl je používán v mírném podbytku (0,95 ekv) a reakční doba je snižena na 1 hodinu. Promývání surového produktu roztokem  $NaHCO_3$  a solankou je vyřazeno. Promytí vodou a čištění sloupcovou chromatografií postačuje k odstranění veškerých vedlejších produktů a nečistot a vede k získání velmi čistého produktu. K suspenzi kyseliny **4a** (1,078 g, 2,87 mmol) a L-Phe Weinreb amidu **14a** (0,598 g, 2,87 mmol) v dichlormethanu (50 ml) byl přidán EDCI·HCl (0,327 g, 2,73 mmol) a HOBt (0,387 g, 2,87 mmol). Reakční směs byla míchána při 25 °C 1 hodinu a poté zakoncentrována za sníženého tlaku. Surový produkt byl rozpuštěn v ethyl acetátu (50 ml), promyt  $H_2O$  (2 x 20 ml) a vysušen bezvodým  $Na_2SO_4$ . Surový produkt byl čištěn sloupcovou chromatografií (silikagel 150 g, *n*-hexan/ethyl acetát (1:1)). Výsledný Weinreb amid **17b** byl izolován jako bezbarvý olej v 51% výtěžku. Touto metodou byly připraveny látky **17a** a **17b**, které jsou kvalitativně shodné s ekvivalenty připravenými druhou metodou, metodou postupného budování.

Metoda postupného budování využívá optimalizovaných podmínek s LiHMDS pro zavádění Weinreb amidové skupiny na dipeptidový salicylamid s methylesterovou skupinou (**5a-d**).<sup>306</sup> Salicylamid methylester **5a** (3,48 g, 6,48 mmol) byl rozpuštěn ve vysekurované trojhrdlé kulaté baňce v suspenzi  $CH_3ONHCH_3 \cdot HCl$  (1,896 g, 19,44 mmol) v suchém tetrahydrofuranu (100 ml) pod inertní  $N_2$  atmosférou. Reakční směs byla vychlazená na -20 °C a v průběhu 20 minut byl za pomoci syringe pumpy přikapán roztok lithium *bis*(trimethylsilyl)amid (LiHMDS, 1M v suchém THF, 38,88 ml, 38,88 mmol). Reakční směs byla míchána 1,75 hodiny -20 °C a následně 2 hodiny při -10 °C, poté byla ukončena přilitím nasyceného roztoku  $NH_4Cl$  v  $H_2O$  (40 ml) a naředěna  $Et_2O$  (40 ml). Produkt byl extrahován do  $EtOAc$  (3 x 50 ml). Kombinované organické fáze byly promyty  $H_2O$  (2 x 20 ml) a vysušeny bezv.  $Na_2SO_4$ . Surový produkt byl přečištěn sloupcovou chromatografií (210 g silikagelu,

*n*-hexan/ethyl acetát - 1:1). Výsledný Weinreb amid **17a** byl izolován jako bezbarvý olej v 74% výtěžku. Touto metodou byly připraveny všechny čtyři deriváty (**17a-d**). Syntéza molekuly dipeptidu a zavedení funkční skupiny na závěr poskytuje koncové produkty ve vyšším úhrnném výtěžku, proto byla tato metoda nadále využívána pro přípravu všech pokročilejších peptidových salicylamidů.



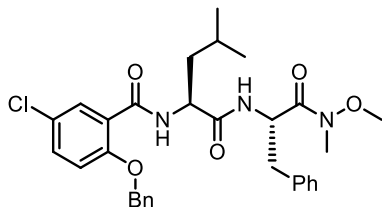
Charakterizace 2-benzyloxy-5-chloro-*N*-((2*S*)-1-(((2*S*)-1-(methoxy(methyl)amino)-4-methyl-1-oxopentan-2-yl)amino)-1-oxo-3-fenylpropan-2-yl)benzamidu **17a**



Bezbarvá olejovitá látka; výtěžek 74 %;  $[\alpha_D^{20}] = -15,0^\circ$  (c 1,00, EtOAc);  $R_f(\text{hex/EtOAc-1/1}) = 0,27$ .  $^1\text{H NMR}$  (400 MHz,  $\text{CDCl}_3\text{-d}_1$ ):  $\delta$  8,34 (1H, d,  $J = 7,2$  Hz,  $\text{NH-CH-CHH-CH-(CH}_3)_2$ ), 8,15 (1H, d,  $J = 2,8$  Hz,  $\text{NH-CH-CHH-Ph}$ ), 7,45-7,30 (6H, m, Ar- $\underline{H}$ ), 7,24-7,13 (3H, m, Ar- $\underline{H}$ ), 7,06-7,00 (2H, m, Ar- $\underline{H}$ ), 6,91 (1H, d,  $J = 8,8$  Hz, Ar- $\underline{H}$ ), 6,65 (1H, d,  $J = 8,4$  Hz, Ar- $\underline{H}$ ), 5,17-5,12 (2H, ABq,  $J = 16,2$  Hz, O- $\underline{\text{CH}_2}$ -Ph), 5,07-4,96 (1H, m, NH- $\underline{\text{CH}}$ -CHH-Ph), 4,90-4,82 (1H, m, NH- $\underline{\text{CH}}$ -CHH-CH-( $\text{CH}_3$ ) $_2$ ), 3,77 (3H, s, O- $\underline{\text{CH}_3}$ ), 3,20 (3H, s, N- $\underline{\text{CH}_3}$ ), 3,11 (1H, dd,  $J = 8$  Hz,  $J = 14$  Hz, NH-CH- $\underline{\text{CHH}}$ -Ph), 2,88 (1H, dd,  $J = 8$  Hz,  $J = 14$  Hz, NH-CH- $\underline{\text{CHH}}$ -Ph), 1,63-1,52 (1H, m, NH-CH- $\underline{\text{CHH}}$ -CH-( $\text{CH}_3$ ) $_2$ ), 1,51-1,43 (2H, m, NH-CH- $\underline{\text{CHH}}$ -CH-( $\text{CH}_3$ ) $_2$ ), 1,51-1,43 (2H, m, NH-CH- $\underline{\text{CHH}}$ -CH-( $\text{CH}_3$ ) $_2$ ), 0,91 (3H, d,  $J = 6,4$  Hz,  $\underline{\text{CH}_3}$ -CH- $\underline{\text{CH}_3}$ ), 0,87 (3H, d,  $J = 6,4$  Hz,  $\text{CH}_3$ -CH- $\underline{\text{CH}_3}$ ).  $^{13}\text{C NMR}$  (100,79 MHz,  $\text{CDCl}_3\text{-d}_1$ ):  $\delta$  170,6; 163,9; 155,3; 136,8; 135,2; 132,6; 132,1; 129,2; 129,0; 128,8; 128,4; 127,6; 126,9; 126,7; 122,6; 114,3; 71,5; 61,6; 55,1; 47,7; 41,8; 37,5; 32,1; 24,8; 23,2; 21,8. **IR (ATR)**: 3306, 2958, 2360, 2342, 1690, 1514, 1469, 1271, 1225, 988, 742, 698, 669  $\text{cm}^{-1}$ . **CHN analýza**: Vypočteno pro  $\text{C}_{31}\text{H}_{36}\text{ClN}_3\text{O}_5$  (566,09): C, 65,77; H, 6,41; N, 7,42. Nalezeno: C, 65,75 $\pm$ 0,01; H

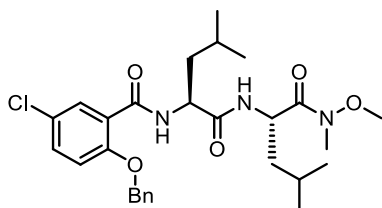
6,51±0,01; N, 7,36±0,02. **HRMS (MALDI-TOF, m/z):**  $[M+Na]^+$  vypočteno pro  $C_{31}H_{36}ClN_3O_5Na$ : 588,22357 Da; nalezeno: 588,22380 Da.

Charakterizace 2-benzyloxy-5-chloro-*N*-((2*S*)-1-(((2*S*)-1-(methoxy(methyl)amino)-1-oxo-3-fenylpropan-2-yl)amino)-4-methyl-1-oxopentan-2-yl)benzamid **17b**



Bezbarvá olejovitá látka; výtěžek 82 %;  $[\alpha_D^{20}] = -30,6^\circ$  (c 1,00, EtOAc);  $R_f$  (hex/EtOAc-1/1) = 0,38.  **$^1H$  NMR** (400 MHz,  $CDCl_3$ ):  $\delta$  8,21 (1H, d,  $J = 2,8$  Hz,  $NH-CH-CHH-CH-(CH_3)_2$ ), 8,03 (1H, d,  $J = 7,2$  Hz,  $NH-CH-CHH-Ph$ ), 7,45-7,37 (6H, m, Ar- $H$ ), 7,15-7,08 (5H, m, Ar- $H$ ), 7,02 (1H, d,  $J = 8,8$  Hz, Ar- $H$ ), 6,94 (1H, d,  $J = 8$  Hz, Ar- $H$ ), 5,23-5,17 (1H, m,  $NH-CH-CHH-Ph$ ), 5,17-5,14 (2H, ABq,  $J = 10,4$  Hz, O- $CH_2-Ph$ ), 4,56-4,47 (1H, m,  $NH-CH-CHH-CH-(CH_3)_2$ ), 3,69 (3H, s, O- $CH_3$ ), 3,18 (3H, s, N- $CH_3$ ), 3,12-3,05 (1H, m,  $NH-CH-CHH-Ph$ ), 2,95-2,85 (1H, m,  $NH-CH-CHH-Ph$ ), 1,50-1,41 (1H, m,  $NH-CH-CHH-CH-(CH_3)_2$ ), 1,40-1,32 (1H, m,  $NH-CH-CHH-CH-(CH_3)_2$ ), 1,21-1,12 (1H, m,  $NH-CH-CHH-CH-(CH_3)_2$ ), 0,78 (3H, d,  $J = 6,4$  Hz,  $CH_3-CH-CH_3$ ), 0,70 (3H, d,  $J = 6,4$  Hz,  $CH_3-CH-CH_3$ ).  **$^{13}C$  NMR** (100,62 MHz,  $CDCl_3$ ):  $\delta$  171,6; 164,2; 155,6; 136,5; 135,0; 132,8; 132,5; 129,6; 129,5; 129,3; 128,5; 128,4; 127,1; 126,9; 122,6; 114,1; 72,01; 72,00; 61,8; 52,2; 50,8; 40,0; 38,3; 32,3; 24,8; 23,1; 21,8. **IR (ATR):** 3296, 2926, 1643, 1544, 1481, 1247, 1226, 989, 700  $cm^{-1}$ . **CHN analýza:** Vypočteno pro  $C_{31}H_{36}ClN_3O_5$  (566,09): C, 65,77; H, 6,41; N, 7,42. Nalezeno: C, 65,81±0,02; H 6,40±0,01; N, 7,42±0,02. **HRMS (MALDI-TOF, m/z):**  $[M+Na]^+$  vypočteno pro  $C_{31}H_{36}ClN_3O_5Na$ : 588,22357 Da; nalezeno: 588,22384 Da.

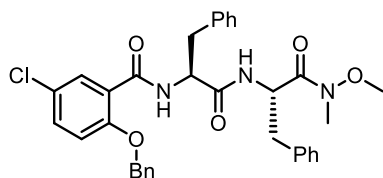
Charakterizace 2-benzyloxy-5-chloro-*N*-((2*S*)-1-(((2*S*)-1-(methoxy(methyl)amino)-4-methyl-1-oxopentan-2-yl)amino)-4-methyl-1-oxopentan-2-yl)benzamid **17c**



Bezbarvá olejovitá látka; výtěžek 51 %;  $[\alpha_D^{20}] = -20,4^\circ$  (c 1,00, EtOAc);  $R_f$  (hex/EtOAc-1/1) = 0,33.  **$^1H$  NMR** (400 MHz,  $CDCl_3-d_1$ ):  $\delta$  8,23 (1H, d,  $J = 2,8$  Hz,

$\underline{NH}$ -CH-CHH-CH-(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>), 8,17 (1H, d,  $J = 7,6$  Hz,  $\underline{NH}$ -CH-CHH-CH-(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>), 7,55-7,42 (6H, m, Ar- $\underline{H}$ ), 7,06 (1H, d,  $J = 8,8$  Hz, Ar- $\underline{H}$ ), 6,75 (1H, d,  $J = 8,4$  Hz, Ar- $\underline{H}$ ), 5,23-5,20 (2H, ABq,  $J = 12,2$  Hz, O- $\underline{CH}_2$ -Ph), 5,08-5,00 (1H, m, NH- $\underline{CH}$ -CHHCH-(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>), 4,67-4,57 (1H, m, NH- $\underline{CH}$ -CHH-CH-(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>), 3,83 (3H, s, O- $\underline{CH}_3$ ), 3,24 (3H, s, N- $\underline{CH}_3$ ), 1,72-1,62 (1H, m, NH-CH- $\underline{CHH}$ -CH-(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>), 1,62-1,52 (3H, m, 2 x NH- $\underline{CH}$ -CHH-CH-(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>, NH-CH- $\underline{CHH}$ -CH-(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>), 1,521,42 (1H, m, NH-CH- $\underline{CHH}$ -CH-(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>), 1,35-1,24 (1H, m, NH-CH- $\underline{CHH}$ -CH-(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>), 0,96 (3H, d,  $J = 6,4$  Hz,  $\underline{CH}_3$ -CH-CH<sub>3</sub>), 0,95 (3H, d,  $J = 6,4$  Hz, CH<sub>3</sub>-CH- $\underline{CH}_3$ ), 0,87 (3H, d,  $J = 6,4$  Hz,  $\underline{CH}_3$ -CH-CH<sub>3</sub>), 0,78 (3H, d,  $J = 6,4$  Hz, CH<sub>3</sub>-CH- $\underline{CH}_3$ ). <sup>13</sup>C NMR (100,79 MHz, CDCl<sub>3</sub>-d<sub>1</sub>):  $\delta$  172,0; 164,2; 155,6; 135,1; 132,8; 132,4; 129,2; 128,5; 127,1; 122,8; 114,1; 72,0; 61,8; 52,4; 47,9; 41,9; 40,5; 32,4; 24,9; 24,8; 23,5; 23,2; 21,9; 21,8. **IR (ATR):** 3306, 2958, 2360, 2342, 1643, 1526, 1480, 1272, 1228, 991, 698, 669 cm<sup>-1</sup>. **CHN analýza:** Vypočteno pro C<sub>28</sub>H<sub>38</sub>ClN<sub>3</sub>O<sub>5</sub> (532,07): C, 63,21; H, 7,20; N, 7,90. Nalezeno: C, 63,24±0,01; H 7,38±0,02; N, 7,89±0,02. **HRMS (MALDI-TOF, m/z):** [M+Na]<sup>+</sup> vypočteno pro C<sub>28</sub>H<sub>38</sub>ClN<sub>3</sub>O<sub>5</sub>Na: 554,23922 Da; nalezeno: 554,24014 Da.

Charakterizace 2-benzyloxy-5-chloro-*N*-((2*S*)-1-(((2*S*)-1-(methoxy(methyl)amino)-1-oxo-3-fenylpropan-2-yl)amino)-1-oxo-3-fenylpropan-2-yl)benzamidu **17d**

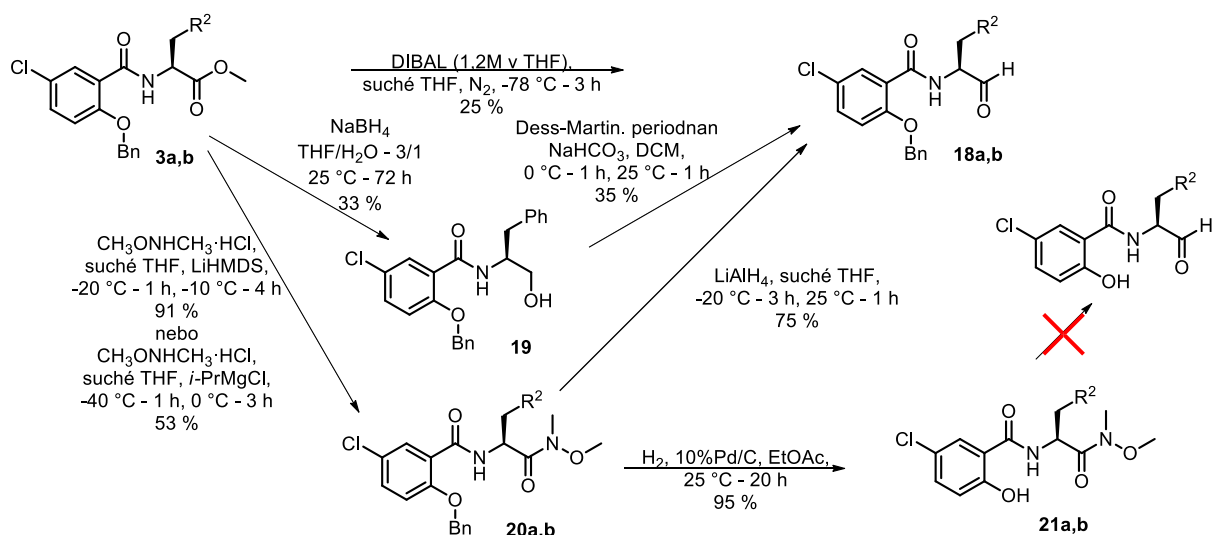


Bezbarvá olejovitá látka; výtěžek 54 %;  $[\alpha_D^{20}] = -26,2^\circ$  (c 1,00, EtOAc);  $R_f$  (hex/EtOAc-1/1) = 0,36. <sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>-d<sub>1</sub>):  $\delta$  8,32 (1H, d,  $J = 7,6$  Hz,  $\underline{NH}$ -CH-CHH-Ph), 8,22 (1H, d,  $J = 2,8$  Hz,  $\underline{NH}$ -CH-CHH-Ph), 7,50-7,35 (6H, m, Ar- $\underline{H}$ ), 7,27-7,10 (8H, m, Ar- $\underline{H}$ ), 7,06-6,95 (4H, m, Ar- $\underline{H}$ ), 5,30-5,21 (1H, m, NH- $\underline{CH}$ -CHH-Ph), 5,18-5,14 (2H, ABq,  $J = 16,2$  Hz, O- $\underline{CH}_2$ -Ph), 4,92-4,84 (1H, m, NH- $\underline{CH}$ -CHH-Ph), 3,71 (3H, s, O- $\underline{CH}_3$ ), 3,23 (3H, s, N- $\underline{CH}_3$ ), 3,15-3,06 (2H, m, NH-CH- $\underline{CHH}$ -Ph, NH-CH- $\underline{CHH}$ -Ph), 3,00-2,92 (1H, m, NH-CH- $\underline{CHH}$ -Ph), 2,84 (1H, dd,  $J = 8$  Hz,  $J = 14$  Hz, NH-CH- $\underline{CHH}$ -Ph). <sup>13</sup>C NMR (100,79 MHz, CDCl<sub>3</sub>-d<sub>1</sub>):  $\delta$  170,6; 164,2; 155,5; 137,0; 136,4; 135,3; 132,8; 132,4; 129,6; 129,2; 129,0; 128,6; 128,4; 127,9; 127,1; 126,9; 126,87; 122,6; 114,5; 71,72; 71,71; 61,8; 55,0; 50,7; 38,4; 37,2; 32,3. **IR (ATR):** 3397, 2360, 2342, 1646, 1521, 1508, 989, 742, 699 cm<sup>-1</sup>. **CHN analýza:** Vypočteno pro C<sub>34</sub>H<sub>34</sub>ClN<sub>3</sub>O<sub>5</sub> (600,10): C, 68,05; H, 5,71; N, 7,00. Nalezeno: C, 67,92±0,02; H

5,78±0,01; N, 6,90±0,01. **HRMS (MALDI-TOF, m/z):**  $[M+Na]^+$  vypočteno pro  $C_{34}H_{34}ClN_3O_5Na$ : 622,20792 Da; nalezeno: 622,20888 Da.

### 5.2.5 Syntéza a optimalizace přípravy aldehydové funkční skupiny

Zavedení aldehydové funkční skupiny bylo prováděno několika způsoby. Přímá redukce z methylesteru (**3a,b**) za přítomnosti DIBAL sice vedla k izolaci aldehydu (**18a,b**), výtěžek reakce byl ale nízký a čištění reakční směsi bylo komplikované. Mírná oxidace alkoholu (**19**) Dess-Martinovo periodnanem také vedla k přípravě aldehydu (**18a**), avšak výtěžek opět nebyl ideální. Nejvhodnější metodou přípravy aldehydové skupiny byla redukce Weinreb amidu (**20a,b**) za přítomnosti  $LiAlH_4$ . Alkohol (**19**) byl připraven úplnou redukcí esteru (**3a**) za přítomnosti  $NaBH_4$ . Pro přípravu Weinreb amidu (**20a,b**) byly testovány dva postupy, z nichž se lépe osvědčil postup zahrnující použití  $LiHMDS$ . V rámci přípravy aldehydové skupiny byla testována také stabilita *O*-Bn Weinreb amidu (**20a,b**) při deprotekcí fenolického hydroxylylu na ochráněný Weinreb amid (**21a,b**).



#### Obecné postupy pro přípravu aldehydů, **18a,b**

Aldehyd **18a,b** byl připravován třemi možnými způsoby. Prvním testovaným postupem byla přímá redukce methylesteru **3a,b** za přítomnosti DIBAL.<sup>322, 323</sup> Methylester **3a** (1,029 g, 2,43 mmol) byl ve vysekurované trojhrdlé kulaté baňce pod  $N_2$  atmosférou rozpuštěn v sušeném THF (20 ml). Roztok byl vychlazen na -78 °C. Během 30 minut byl přikapán DIBAL (1,2 M roztok v THF, 4,05 ml, 4,86 mmol). Reakční směs reagovala při -78 °C po dobu 3,5 hodin. Reakce byla ukončena přilítím směsi MeOH 1 ml, 5% HCl (8 ml) a EtOAc (25 ml), odstavením chlazení a 30 minutovým mícháním. Pro lepší dělení při extrakcích byl přidán vinan sodno-draselný (0,5 g).

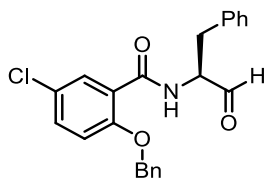
Nerozpuštěná suspenze byla odfiltrována, byla od sebe oddělena vodná a organická fáze. Vodná fáze byla promyta EtOAc (2 x 50 ml). Spojené organické fáze byly promyta vodou (3 x 50 ml) a vysušeny bezv. Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>. Surový produkt byl čištěn sloupcovou chromatografií (70 g silikagelu, *n*-hexan/ethyl acetát – 1/1). Aldehyd **18a** byl izolován ve výtěžku 25 %. V případě přípravy aldehydu **18b** byl výtěžek 18 %. Metoda nebyla použita u pokročilejších salicylamidů z důvodu složitějšího čištění a nízkého výtěžku.

Druhým testovaným postupem přípravy aldehydu **18a** je mírná oxidace alkoholu **19**.<sup>324</sup> Alkohol **19** (0,494 g, 1,2 mmol) byl rozpuštěn v DCM (30 ml) a roztok byl vychlazen na 0 °C a bylo přidáno Dess-Martinovo činidlo (0,763 g, 1,8 mmol) a NaHCO<sub>3</sub> (0,504 g, 6 mmol). Reakční směs byla míchána 1 hodinu při chlazení na 0 °C a následně 1 hodinu při volném ohřevu na 25 °C. Reakce byla ukončena přilítím roztoku Na<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>3</sub> (3 g v 10 ml vody) pro doreagování nadbytku činidla a následně nasyceným roztokem NH<sub>4</sub>Cl (10 ml). Oddělená organická fáze byla promyta vodou (3 x 15 ml) a usušena bezv. Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>. Produkt byl přečištěn sloupcovou chromatografií (70 g silikagelu, *n*-hexan/ethyl acetát – 1/1). Aldehyd **18a** byl izolován ve výtěžku 35 %. Metoda nebyla použita u pokročilejších salicylamidů z důvodu složitějšího čištění a nízkého výtěžku.

Třetím testovaným postupem, který se osvědčil a byl následně s úpravami používán pro zavádění aldehydové skupiny na pokročilejší salicylamidy, je redukce Weinreb amidu **20a,b** za přítomnosti LiAlH<sub>4</sub> na aldehyd **18a,b**.<sup>325</sup> Weinreb amid **20a** (0,5 g, 1,1 mmol) byl rozpuštěn ve vysekurované baňce v bezvodém THF (30 ml) a vychlazen na -20 °C. Poté byla přikapána suspenze LiAlH<sub>4</sub> (0,052 g, 1,38 mmol) v 10 ml THF. Po 3 hodinách byla reakce pozvolna ohřáta na 25 °C, kde byla míchána další 1 hodinu. Poté byla reakce ukončena přilítím EtOAc (30 ml) a promytím sloučených organických fází 0,1M roztokem HCl (3 x 15 ml). Spojené vodné frakce byly promyty EtOAc (3 x 15 ml). Spojené organické frakce byly promyty vodou (3 x 15 ml) a vysušeny bezv. Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>. Za sníženého tlaku bylo na RVO odstraněno rozpouštědlo do konstantní hmotnosti. Aldehyd **18a** byl izolován v dobré čistotě bez nutnosti provádět sloupcovou chromatografii ve výtěžku 75 %. V případě přípravy aldehydu **18b** byl výtěžek 46 %. Tato metoda přípravy aldehydové skupin byla používána pro další pokročilejší salicylamidy.

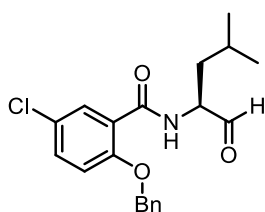


Charakterizace ((2*S*)-2-benzyloxy-5-chloro-*N*-(1-oxo-3-phenylpropan-2-yl)benzamidu  
**18a**



Bezbarvá olejovitá látka; výtěžek 78 %;  $[\alpha_D^{20}] = -1,5^\circ$  (c 1,00, EtOAc);  $R_f$  (hex/EtOAc-3/1) = 0,15. **<sup>1</sup>H NMR** (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>-d<sub>1</sub>):  $\delta$  9,53 (1H, s, CHO), 8,34 (1H, d,  $J = 6$  Hz, NH-CH-CHH-Ph), 8,11 (1H, d,  $J = 2,8$  Hz, Ar-H), 7,35-7,25 (4H, m, Ar-H), 7,20-7,10 (5H, m, Ar-H), 6,98-6,93 (2H, m, Ar-H), 6,87 (1H, d,  $J = 8,8$  Hz, Ar-H), 5,04-5,01 (2H, ABq,  $J = 10,6$  Hz, O-CH<sub>2</sub>-Ph), 4,72 (1H, q,  $J = 6,4$  Hz, NH-CH-CHH-Ph), 3,07 (1H, dd,  $J = 6,4$  Hz,  $J = 14,4$  Hz, NH-CH-CHH-Ph), 2,92 (1H, dd,  $J = 6,4$  Hz,  $J = 14,4$  Hz, NH-CH-CHH-Ph). **<sup>13</sup>C NMR** (100,79 MHz, CDCl<sub>3</sub>-d<sub>1</sub>):  $\delta$  198,8; 164,0; 155,5; 135,9; 135,0; 132,8; 132,1; 129,2; 129,0; 128,8; 128,7; 127,8; 127,1; 127,0; 122,2; 114,4; 71,7; 60,5; 34,8. **IR (ATR)**: 3376, 3063, 2924, 1730, 1645, 1520, 1478, 1270, 1224, 1124, 992, 808, 741 cm<sup>-1</sup>. **CHN analýza**: Vypočteno pro C<sub>23</sub>H<sub>20</sub>ClNO<sub>3</sub> (393,86): C, 70,14; H, 5,12; N, 3,56. Nalezeno: C, 69,89±0,03; H 5,17±0,02; N, 3,52±0,03. **HRMS (MALDI-TOF, m/z)**: [M+H]<sup>+</sup> vypočteno pro C<sub>23</sub>H<sub>21</sub>ClNO<sub>3</sub>: 394,12045 Da; nalezeno: 394,12090 Da.

Charakterizace (2*S*)-2-benzyloxy-5-chloro-*N*-(4-methyl-1-oxopentan-2-yl)benzamidu  
**18b**



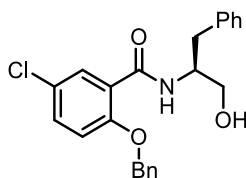
Bezbarvá olejovitá látka; výtěžek 46 %;  $R_f$  (hex/EtOAc-3/1) = 0,31. **<sup>1</sup>H NMR** (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>-d<sub>1</sub>):  $\delta$  9,51 (1H, s, CHO), 8,30-8,15 (2H, m, NH-CH-CHH-CH-(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>), Ar-H), 7,48-7,37 (6H, m, Ar-H), 7,04 (1H, d,  $J = 8,8$  Hz, Ar-H), 5,17-5,15 (2H, ABq,  $J = 8,4$  Hz, O-CH<sub>2</sub>-Ph), 4,58-4,50 (1H, m, NH-CH-CHH-CH-(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>), 1,56-1,47 (1H, m, NH-CH-CHH-CH-(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>), 1,46-1,37 (1H, m, NH-CH-CHH-CH-(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>), 1,17-1,07 (1H, m, NH-CH-CHH-CH-(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>), 0,82 (3H, d,  $J = 6,4$  Hz, CH<sub>3</sub>-CH-CH<sub>3</sub>), 0,74 (3H, d,  $J = 6,4$  Hz, CH<sub>3</sub>-CH-CH<sub>3</sub>). **<sup>13</sup>C NMR** (100,79 MHz, CDCl<sub>3</sub>-d<sub>1</sub>):  $\delta$  199,8; 164,1; 155,6; 134,8; 132,8; 132,2; 129,2; 129,1; 128,5; 127,1; 122,2; 114,0; 72,0; 57,7; 37,3; 24,7;

23,1; 21,7. **IR (ATR):** 3371, 2960, 1725, 1640, 1527, 1481, 1273, 1220, 990, 824, 744, 719  $\text{cm}^{-1}$ . **CHN analýza:** Vypočteno pro  $\text{C}_{20}\text{H}_{22}\text{ClNO}_3$  (359,85): C, 66,75; H, 6,16; N, 3,89. Nalezeno: C, 66,52 $\pm$ 0,02; H 6,21 $\pm$ 0,01; N, 3,81 $\pm$ 0,01. **HRMS (MALDI-TOF, m/z):**  $[\text{M}+\text{H}]^+$  vypočteno pro  $\text{C}_{20}\text{H}_{23}\text{ClNO}_3$ : 360,13610 Da; nalezeno: 360,13638 Da.

#### Příprava alkoholu **19** pro následnou oxidaci na **18a**

Methylester **3a** (1,7 g, 4,01 mmol) byl rozpuštěn v THF/ $\text{H}_2\text{O}$  – 3/1 (90 ml).<sup>326</sup> Po přidavku  $\text{NaBH}_4$  (0,174 g, 4,6 mmol) byla reakční směs při 25 °C míchána 72 hodin. Po TLC kontrole (*n*-hexan/ethyl acetát – 1/1) je výchozí látka zreagovaná přibližně z poloviny. Po přidavku další porce  $\text{NaBH}_4$  (0,073 g, 1,92 mmol) a po 4 hodinách došlo k posunu ve prospěch produktů. Reakce byla ukončena. Produkt byl extrahován do EtOAc (3 x 70 ml). Organická fáze byla promyta vodou (2 x 30 ml) a surový produkt byl přečištěn sloupcovou chromatografií (100 g silikagelu, *n*-hexan/ethyl acetát – 3/1). Alkohol **19** byl izolován ve 33% výtěžku. Postup nebyl dále optimalizován a využíván z důvodu složitého čištění a nízkého výtěžku.

Charakterizace 2-(benzyloxy)-5-chloro-*N*-[(2*S*)-1-hydroxy-3-fenylpropan-2-yl]benzamid **19**



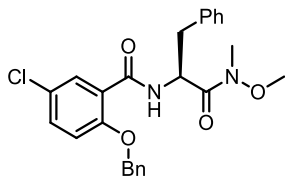
Bezbarvá olejovitá látka; výtěžek 5 %;  $R_f$  (*hex*/*EtOAc*-3/1) = 0,15.  **$^1\text{H NMR}$**  (400 MHz,  $\text{DMSO-}d_6$ ):  $\delta$  12,51 (1H, brs,  $\text{CH}_2\text{-OH}$ ), 8,56 (1H, d,  $J = 7,2$  Hz,  $\text{NH-CH-CHH-Ph}$ ), 7,66 (1H, d,  $J = 2,8$  Hz, Ar- $\underline{H}$ ), 7,51 (1H, dd,  $J = 2,4$  Hz,  $J = 8,8$  Hz, Ar- $\underline{H}$ ), 7,42-7,30 (5H, m, Ar- $\underline{H}$ ), 7,27-7,17 (5H, m, Ar- $\underline{H}$ ), 7,07 (1H, d,  $J = 6,8$  Hz, Ar- $\underline{H}$ ), 5,28-5,21 (2H, ABq,  $J = 12,4$  Hz, O- $\underline{\text{CH}}_2\text{-Ph}$ ), 4,80-4,65 (1H, m, NH- $\underline{\text{CH}}\text{-CHH-Ph}$ ), 3,95-3,87 (2H, m,  $\underline{\text{CH}}_2\text{-OH}$ ), 3,08 (1H, dd,  $J = 5,6$  Hz,  $J = 14$  Hz, NH-CH- $\underline{\text{CH}}\text{H-Ph}$ ), 2,88 (1H, dd,  $J = 8,8$  Hz,  $J = 14$  Hz, NH-CH- $\underline{\text{CH}}\text{H-Ph}$ ).  **$^{13}\text{C NMR}$**  (100,62 MHz,  $\text{DMSO-}d_6$ ):  $\delta$  172,0; 164,9; 155,1; 137,7; 136,1; 132,9; 130,1; 129,2; 129,4; 129,1; 128,2; 128,1; 127,9; 125,6; 124,8; 116,5; 71,1; 54,6; 52,7; 37,2. **CHN analýza:** Vypočteno pro  $\text{C}_{23}\text{H}_{22}\text{ClNO}_3$  (395,88): C, 69,78; H, 5,60; N, 3,54. Nalezeno: C, 69,59 $\pm$ 0,03; H 5,69 $\pm$ 0,02; N, 3,41 $\pm$ 0,01. **HRMS (MALDI-TOF, m/z):**  $[\text{M}+\text{H}]^+$  vypočteno pro  $\text{C}_{23}\text{H}_{23}\text{ClNO}_3$ : 396,13610 Da; nalezeno: 396,13601 Da.

Obecný postup pro přípravu Weinreb amidů, 20a,b

Weinreb amid **20a,b** byl připravován dvěma způsoby, které vycházejí z dříve testovaných postupů pro syntézu Weinreb amidu **13a,b**. V prvním postupu převzatém a upraveném z literatury<sup>305</sup> byl methylester **3b** (1,2 g, 3,08 mmol) rozpuštěn ve vysekurované trojhrdlé kulaté baňce v suspenzi *O,N*-dimethylhydroxylamin hydrochloridu ( $\text{CH}_3\text{ONHCH}_3\cdot\text{HCl}$ , 0,751 g, 7,7 mmol) v suchém tetrahydrofuranu (35 ml) pod inertní  $\text{N}_2$  atmosférou. Reakční směs byla vychlazena na  $-40\text{ }^\circ\text{C}$  a v průběhu 15 minut byl za pomoci syringe pumpy přikapán roztok isopropylmagnesium chloridu (*i*-PrMgCl, 2M v suchém THF, 4,62 ml, 9,24 mmol). Reakční směs byla míchána 3 hodiny za pozvolného ohřevu z  $-30$ – $0\text{ }^\circ\text{C}$ , poté byla ukončena přilitím nasyceného roztoku  $\text{NH}_4\text{Cl}$  v  $\text{H}_2\text{O}$  (10 ml). Produkt byl extrahován do EtOAc (3 x 20 ml). Kombinované organické fáze byly promyty  $\text{H}_2\text{O}$  (2 x 10 ml) a vysušeny bezv.  $\text{Na}_2\text{SO}_4$ . Surový produkt byl přečištěn sloupcovou chromatografií (100 g silikagelu, *n*-hexan/ethyl acetát - 2:1). Výsledný Weinreb amid **20b** byl izolován jako bezbarvý olej v 48% výtěžku. Weinreb amid **20a** byl izolován jako bezbarvý olej v 53% výtěžku.

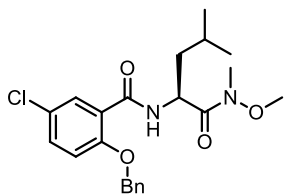
Druhý postup vedoucí na Weinreb amidy byl převzat a upraven z literatury.<sup>306</sup> Methylester **3b** (1,2 g, 3,08 mmol) byl rozpuštěn ve vysekurované trojhrdlé kulaté baňce v suspenzi  $\text{CH}_3\text{ONHCH}_3\cdot\text{HCl}$  (0,751 g, 7,7 mmol) v suchém THF (50 ml) pod inertní  $\text{N}_2$  atmosférou. Reakční směs byla vychlazena na  $-20\text{ }^\circ\text{C}$  a v průběhu 20 minut byl za pomoci syringe pumpy přikapán roztok lithium *bis*(trimethylsilyl)amid (LiHMDS, 1M v suchém THF, 15,4 ml, 15,4 mmol). Reakční směs byla míchána celkem 1 h při  $-20\text{ }^\circ\text{C}$  a následně 4 hodiny při  $-10\text{ }^\circ\text{C}$ , poté byla ukončena přilitím nasyceného roztoku  $\text{NH}_4\text{Cl}$  v  $\text{H}_2\text{O}$  (20 ml) a naředěna  $\text{Et}_2\text{O}$  (20 ml). Produkt byl extrahován do  $\text{Et}_2\text{O}$  (4 x 40 ml). Kombinované organické fáze byly promyty  $\text{H}_2\text{O}$  (2 x 20 ml) a vysušeny bezv.  $\text{Na}_2\text{SO}_4$ . Surový produkt byl přečištěn sloupcovou chromatografií (100 g silikagelu, *n*-hexan/ethyl acetát - 2:1). Výsledný Weinreb amid **20b** byl izolován jako bezbarvý olej v 91% výtěžku. Weinreb amid **20a** byl izolován jako bezbarvý olej v 69% výtěžku. Tento postup byl nadále s drobnými úpravami používán pro zavádění Weinreb amidové funkční skupiny na pokročilejší deriváty.

Charakterizace (2*S*)-2-benzyloxy-5-chloro-*N*-(1-(methoxy(methyl)amino)-1-oxo-3-fenylpropan-2-yl) benzamidu **20a**



Bezbarvá olejovitá látka; výtěžek 69 %;  $[\alpha_D^{20}] = -10,1^\circ$  (c 1,00, EtOAc);  $R_f$  (hex/EtOAc-1/1) = 0,40. **<sup>1</sup>H NMR** (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>-d<sub>1</sub>):  $\delta$  8,53(1H, d,  $J = 7,2$  Hz, NH-CH-CHH-Ph), 8,19 (1H, d,  $J = 2,8$  Hz, Ar-H), 7,56-7,46 (5H, m, Ar-H), 7,46-7,41 (1H, m, Ar-H), 7,38 (1H, dd,  $J = 2,8$  Hz,  $J = 8,8$  Hz, Ar-H), 7,30-7,20 (2H, m, Ar-H), 7,08 (1H, d,  $J = 8,8$  Hz, Ar-H), 7,03 (1H, d,  $J = 6,4$  Hz, Ar-H), 6,98 (1H, d,  $J = 8,8$  Hz, Ar-H), 5,47-5,37 (1H, m, NH-CH-CHH-Ph), 5,32-5,15 (2H, m, O-CH<sub>2</sub>-Ph), 3,83 (3H, s, O-CH<sub>3</sub>), 3,25 (3H, s, N-CH<sub>3</sub>), 3,10 (1H, dd,  $J = 5,6$  Hz,  $J = 13,6$  Hz, NH-CH-CHH-Ph), 2,81 (1H, dd,  $J = 8$  Hz,  $J = 13,6$  Hz, NH-CH-CHH-Ph). **<sup>13</sup>C NMR** (100,79 MHz, CDCl<sub>3</sub>-d<sub>1</sub>):  $\delta$  163,8; 155,6; 136,8; 135,5; 133,4; 132,6; 132,2; 129,4; 129,3; 129,2; 129,0; 128,5; 128,1; 127,0; 123,0; 114,5; 71,7; 61,7; 51,5; 38,0; 32,3. **IR (ATR)**: 3389, 3030, 2939, 2362, 2340, 1645, 1519, 1480, 1270, 1228, 1121, 989, 810, 749, 699 cm<sup>-1</sup>. **CHN analýza**: Vypočteno pro C<sub>25</sub>H<sub>25</sub>ClN<sub>2</sub>O<sub>4</sub> (452,93): C, 66,29; H, 5,56; N, 6,18. Nalezeno: C, 66,21±0,02; H 5,61±0,01; N, 5,97±0,02. **HRMS (MALDI-TOF, m/z)**:  $[M+Na]^+$  vypočteno pro C<sub>25</sub>H<sub>25</sub>ClN<sub>2</sub>O<sub>4</sub>Na: 475,13951 Da; nalezeno: 475,14011 Da.

Charakterizace (2*S*)-2-benzyloxy-5-chloro-*N*-(1-(methoxy(methyl)amino)-4-methyl-1-oxopentan-2-yl)benzamidu **20b**



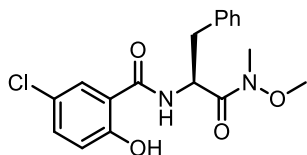
Bezbarvá olejovitá látka; výtěžek 91 %;  $[\alpha_D^{20}] = -6,5^\circ$  (c 1,00, EtOAc);  $R_f$  (hex/EtOAc-1/1) = 0,47. **<sup>1</sup>H NMR** (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>-d<sub>1</sub>):  $\delta$  8,32 (1H, d,  $J = 8$  Hz, NH-CH-CHH-CH-(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>), 8,23 (1H, d,  $J = 2,8$  Hz, Ar-H), 7,60-7,52 (2H, m, Ar-H), 7,51-7,40 (4H, m, Ar-H), 7,05 (1H, d,  $J = 8,8$  Hz, Ar-H), 5,30-5,10 (3H, m, O-CH<sub>2</sub>-Ph, NH-CH-CHH-CH-(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>), 3,91 (3H, s, O-CH<sub>3</sub>), 3,25 (3H, s, N-CH<sub>3</sub>), 1,55-1,40 (2H, m, NH-CH-CHH-CH-(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>, NH-CH-CH<sub>2</sub>-CH-(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>), 1,37-1,26 (1H, m, NH-CH-CHH-CH-(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>), 0,92 (3H, d,  $J = 6,4$  Hz, CH<sub>3</sub>-CH-CH<sub>3</sub>), 0,79 (3H, d,  $J = 6,4$  Hz, CH<sub>3</sub>-CH-CH<sub>3</sub>).

$\text{CH}_3$ ).  $^{13}\text{C NMR}$  (100,79 MHz,  $\text{CDCl}_3\text{-d}_1$ ):  $\delta$  173,3; 164,0; 155,7; 135,2; 132,6; 132,3; 129,1; 129,0; 128,5; 127,0; 123,0; 114,3; 71,9; 61,7; 48,5; 41,2; 32,3; 25,0; 23,4; 21,7. **IR (ATR)**: 3396, 2957, 1651, 1524, 1481, 1467, 1386, 1271, 1226, 1121, 988, 810, 751, 706  $\text{cm}^{-1}$ . **CHN analýza**: Vypočteno pro  $\text{C}_{22}\text{H}_{27}\text{ClN}_2\text{O}_4$  (418,91): C, 63,08; H, 6,50; N, 6,69. Nalezeno: C, 62,95 $\pm$ 0,02; H 6,44 $\pm$ 0,02; N, 6,61 $\pm$ 0,02. **HRMS (MALDI-TOF, m/z)**:  $[\text{M}+\text{Na}]^+$  vypočteno pro  $\text{C}_{22}\text{H}_{27}\text{ClN}_2\text{O}_4$ : 441,15516 Da; nalezeno: 441,15505 Da.

### Obecný postup deprotektce fenolického hydroxyly, 21a,b

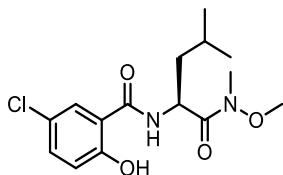
Deprotektce  $^{316}$  hydroxylové funkční skupiny sloučeniny **20b** (0,66 g, 1,58 mmol) byla provedena rozpuštěním látky v EtOAc (90 ml), přidavkem 10% Pd/C (0,1 g) a zavedením  $\text{H}_2$  (1 atm). Reakce byla míchána při 25 °C po dobu 20 hodin. Poté byl Pd/C odfiltrován a roztok byl zahuštěn na RVO za sníženého tlaku do čirého oleje. Produkt **20b** byl izolován ve výtěžku 95 %. Produkt **20a** byl izolován ve výtěžku 81 %.

Charakterizace (2*S*)-5-chloro-2-hydroxy-*N*-(1-(methoxy(methyl)amino)-1-oxo-3-fenylpropan-2-yl)benzamidu **21a**



Bílá pevná látka; výtěžek 81 %; b.t. 106-109 °C;  $[\alpha_D^{20}] = -31,8^\circ$  (c 1,00, EtOAc);  $R_f$  (hex/EtOAc-1/1) = 0,50.  $^1\text{H NMR}$  (400 MHz, DMSO- $\text{d}_6$ ):  $\delta$  12,10 (1H, brs, Ar-OH), 9,10 (1H, d,  $J = 8$  Hz, NH-CH-CHH-Ph), 8,03-7,98 (1H, m, Ar-H), 7,43 (1H, dd,  $J = 2,4$  Hz,  $J = 8,8$  Hz, Ar-H), 7,34-7,16 (5H, m, Ar-H), 6,93 (1H, d,  $J = 8,8$  Hz, Ar-H), 5,22-5,10 (1H, m, NH-CH-CHH-Ph), 3,77 (3H, s, O-CH<sub>3</sub>), 3,14 (3H, s, N-CH<sub>3</sub>), 3,10-2,94 (2H, m, NH-CH-CH<sub>2</sub>-Ph).  $^{13}\text{C NMR}$  (100,79 MHz, DMSO- $\text{d}_6$ ):  $\delta$  167,0; 160,2; 158,3; 138,0; 134,1; 134,0; 129,7; 129,0; 128,8; 128,2; 127,3; 123,2; 119,8; 117,8; 52,0; 37,0. **IR (ATR)**: 3448, 3294, 3065, 2942, 1821, 1630, 1588, 1558, 1541, 1486, 1474, 1365, 1296, 1232, 984  $\text{cm}^{-1}$ . **CHN analýza**: Vypočteno pro  $\text{C}_{18}\text{H}_{19}\text{ClN}_2\text{O}_4$  (362,80): C, 59,59; H, 5,28; N, 7,72. Nalezeno: C, 59,20 $\pm$ 0,02; H 5,20 $\pm$ 0,02; N, 7,40 $\pm$ 0,02. **HRMS (MALDI-TOF, m/z)**:  $[\text{M}+\text{Na}]^+$  vypočteno pro  $\text{C}_{18}\text{H}_{19}\text{ClN}_2\text{O}_4\text{Na}$ : 385,09256 Da; nalezeno: 385,09324 Da.

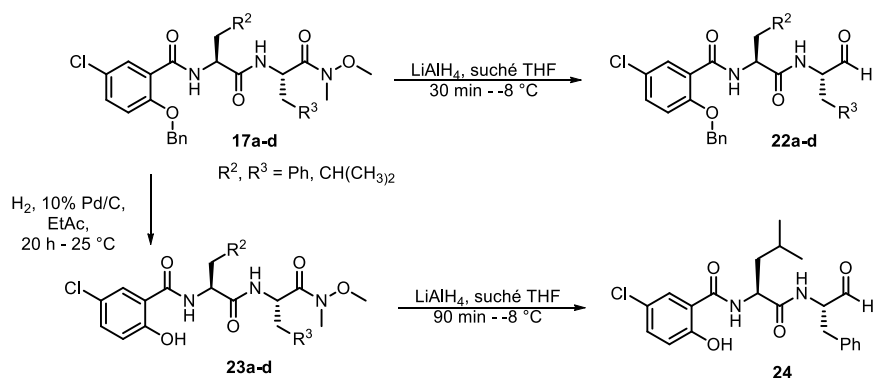
Charakterizace (2*S*)-5-chloro-2-hydroxy-*N*-(1-(methoxy(methyl)amino)-4-methyl-1-oxopentan-2-yl)benzamidů **21b**



Bílá pevná látka; výtěžek 95 %; b.t. 108,6-112,7 °C;  $[\alpha_D^{20}] = +28,6^\circ$  (c 1,00, EtOAc);  $R_f$  (hex/EtOAc-1/1) = 0,45. **<sup>1</sup>H NMR** (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>-d<sub>1</sub>): δ 12,26 (1H, brs, Ar-OH), 8,31 (1H, d,  $J = 8$  Hz, NH-CH-CHH-CH-(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>), 7,55 (1H, d,  $J = 2,4$  Hz, Ar-H), 7,26 (1H, dd,  $J = 2,4$  Hz,  $J = 8,8$  Hz, Ar-H), 6,74 (1H, d,  $J = 8,8$  Hz, Ar-H), 5,35-5,26 (1H, m, NH-CH-CHH-CH-(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>), 4,00 (3H, s, O-CH<sub>3</sub>), 3,37 (3H, s, N-CH<sub>3</sub>), 1,91-1,79 (2H, m, NH-CH-CHH-CH-(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>), 1,67-1,56 (1H, m, NH-CH-CH<sub>2</sub>-CH-(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>), 1,10-0,98 (6H, m, CH<sub>3</sub>-CH-CH<sub>3</sub>). **<sup>13</sup>C NMR** (100,79 MHz, CDCl<sub>3</sub>-d<sub>1</sub>): δ 173,6; 169,2; 160,1; 134,0; 126,1; 123,3; 119,7; 114,8; 61,9; 48,2; 40,9; 32,4; 25,1; 23,5; 21,6. **IR (ATR)**: 3279, 3073, 2959, 2871, 2360, 2342, 1639, 1592, 1551, 1477, 1366, 1296, 1232, 820, 719 cm<sup>-1</sup>. **CHN analýza**: Vypočteno pro C<sub>15</sub>H<sub>21</sub>ClN<sub>2</sub>O<sub>4</sub> (328,79): C, 54,79; H, 6,44; N, 8,52. Nalezeno: C, 54,82±0,02; H 6,52±0,01; N, 8,57±0,02. **HRMS (MALDI-TOF, m/z)**: [M+Na]<sup>+</sup> vypočteno pro C<sub>15</sub>H<sub>21</sub>ClN<sub>2</sub>O<sub>4</sub>Na: 351,10821 Da, nalezeno: 351,10863 Da.

### 5.2.6 Využití optimalizovaných postupů pro přípravu dipeptidových derivátů

Postupy zavádění Weinreb amidové a aldehydové skupiny testované a optimalizované v minulém oddíle byly použity u derivátů s delším peptidovým řetězcem s drobnými úpravami reakčních podmínek.

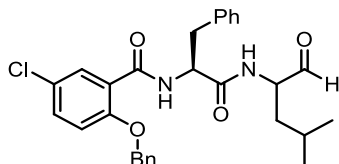


#### Obecný postup pro přípravu aldehydů, **22a-d**

Redukce dipeptidového Weinreb amidu **17a-d** na aldehyd **22a-d** je prováděn za podobných podmínek jako redukce Weinreb amidu **20a,b** s jednou aminokyselinou na

aldehydy **18a,b** s následujícími rozdíly.<sup>325</sup> Reakční směs byla chlazená pouze na  $-8\text{ }^{\circ}\text{C}$  oproti  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ . Při této teplotě reakce probíhala pouze 30 minut oproti původním 4 hodinám. Reakce nebyla prováděna pod inertní atmosférou  $\text{N}_2$ . Weinreb amid **17b** (1,669 g, 2,95 mmol) byl rozpuštěn ve v bezvodém THF (100 ml) a vychlazen na  $-8\text{ }^{\circ}\text{C}$ . Poté bylo najednou přidáno  $\text{LiAlH}_4$  (0,190 g, 5,015 mmol). Reakce byla po 30 minutách míchání při  $-8\text{ }^{\circ}\text{C}$  ukončena přilitím nasyceného roztoku  $\text{NH}_4\text{Cl}$  (20 ml), THF (50 ml), vody (50 ml) a 10%  $\text{HCl}$  (2 ml). Oddělená vodná frakce byla promyta  $\text{EtOAc}$  (3 x 30 ml). Spojené organické frakce byly promyty vodou (2 x 20 ml) a vysušeny bezv.  $\text{Na}_2\text{SO}_4$ . Za sníženého tlaku bylo na RVO odstraněno rozpouštědlo do konstantní hmotnosti. Aldehyd **22b** byl izolován v dobré čistotě bez nutnosti provádět sloupcovou chromatografii ve výtěžku 97 %. V případě čištění aldehydu sloupcovou chromatografií dochází k racemizaci na poslední aminokyselině v řetězci. Z tohoto důvodu je třeba důkladnými extrakcemi odstranit veškeré vedlejší produkty a nečistoty, aby nebylo třeba sloučeninu čistit chromatograficky.

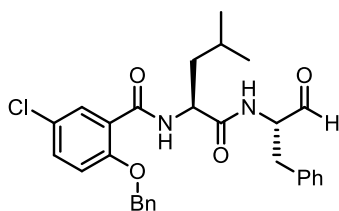
Charakterizace 2-benzyloxy-5-chloro-*N*-((2*S*)-1-((4-methyl-1-oxopentan-2-yl)amino)-1-oxo-3-fenylpropan-2-yl)benzamidu **22a**



Produkt je směsí dvou diastereomerů, A a B. Bezbarvá olejovitá látka; výtěžek 84 %;  $[\alpha_D^{20}] = -5,2^{\circ}$  (c 0,667,  $\text{EtOAc}$ );  $R_f$  ( $\text{hex/EtOAc-1/1}$ ) = 0,51.  $^1\text{H NMR}$  (400 MHz,  $\text{CDCl}_3\text{-d}_1$ ):  $\delta$  9,45-9,35 (1H, m, ( $\text{CHO}$ )<sub>A+B</sub>), 8,44-8,40 (1H, m, ( $\text{NH-CH-CHH-CH-(CH}_3)_2$ )<sub>A+B</sub>), 8,13 (1H, m, ( $\text{NH-CH-CHH-Ph}$ )<sub>A+B</sub>), 7,48-7,33 (6H, m, ( $\text{Ar-H}$ )<sub>A+B</sub>), 7,23-7,14 (3H, m, ( $\text{Ar-H}$ )<sub>A+B</sub>), 7,08-7,00 (2H, m, ( $\text{Ar-H}$ )<sub>A+B</sub>), 6,98-6,92 (1H, m, ( $\text{Ar-H}$ )<sub>A+B</sub>), 6,82-6,67 (1H, m, ( $\text{Ar-H}$ )<sub>A+B</sub>), 5,24-5,07 (2H, m, ( $\text{O-CH}_2\text{-Ph}$ )<sub>A+B</sub>), 4,93-4,84 (1H, m, ( $\text{NH-CH-CHH-CH-(CH}_3)_2$ )<sub>A+B</sub>), 4,38-4,24 (1H, m, ( $\text{NH-CH-CHH-Ph}$ )<sub>A+B</sub>), 3,07-2,95 (1H, m, ( $\text{NH-CH-CHH-Ph}$ )<sub>A+B</sub>), 2,90-2,82 (1H, m, ( $\text{NH-CH-CHH-Ph}$ )<sub>A+B</sub>), 1,63-1,50 (1H, m, ( $\text{NH-CH-CHH-CH-(CH}_3)_2$ )<sub>A+B</sub>), 1,50-1,40 (1H, m, ( $\text{NH-CH-CHH-CH-(CH}_3)_2$ )<sub>A+B</sub>), 1,40-1,29 (1H, m, ( $\text{NH-CH-CHH-CH-(CH}_3)_2$ )<sub>A+B</sub>), 0,90-0,80 (6H, m, ( $\text{CH}_3\text{-CH-CH}_3$ )<sub>A+B</sub>).  $^{13}\text{C NMR}$  (100,79 MHz,  $\text{CDCl}_3\text{-d}_1$ ):  $\delta$  199,90; 199,82; 136,80; 136,78; 135,17; 135,14; 133,02; 132,20; 132,18; 129,34; 129,30; 129,27; 129,18; 129,16; 128,76; 128,12; 128,05; 127,11; 127,08; 122,47; 122,44; 114,57; 114,55; 71,90; 71,85;

57,52; 57,41; 55,30; 55,18; 37,71; 37,69; 37,63; 37,58; 24,78; 24,65; 23,19; 23,15; 22,02; 21,97; 14,39. **IR (ATR):** 3297, 2957, 2360, 2342, 1734, 1636, 1539, 1271, 1003, 810, 747, 698  $\text{cm}^{-1}$ . **CHN-analýza:** Vypočteno pro  $\text{C}_{29}\text{H}_{31}\text{ClN}_2\text{O}_4$  (507,02): C, 68,70; H, 6,16; N, 5,53. Nalezeno: C, 68,60 $\pm$ 0,02; H 6,39 $\pm$ 0,02; N, 5,31 $\pm$ 0,02. **HRMS (MALDI-TOF, m/z):**  $[\text{M}+\text{Na}]^+$  vypočteno pro  $\text{C}_{29}\text{H}_{31}\text{ClN}_2\text{O}_4\text{Na}$ : 529,18646 Da; nalezeno: 529,18675 Da.

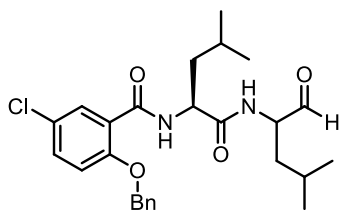
Charakterizace 2-benzyloxy-5-chloro-*N*-((2*S*)-4-methyl-1-oxo-1-(((2*S*)-1-oxo-3-fenylpropan-2-yl)amino)pentan-2-yl) benzamidu **22b**



Bílá pevná látka; výtěžek 97 %; b.t. 161-165 °C;  $[\alpha_D^{20}] = -51,8^\circ$  (c 0,4, EtOAc);  $R_f$  (hex/EtOAc-1/1) = 0,36.  **$^1\text{H NMR}$**  (400 MHz,  $\text{CD}_2\text{Cl}_2\text{-d}_2$ ):  $\delta$  9,64 (1H, s,  $\text{CHO}$ ), 8,19 (1H, d,  $J = 2,8$  Hz,  $\text{NH-CH-CHH-CH-(CH}_3)_2$ ), 8,08 (1H, d,  $J = 7,2$  Hz,  $\text{NH-CH-CHH-Ph}$ ), 7,56 (1H, dd,  $J = 2,8$  Hz,  $J = 8,8$  Hz, Ar- $\underline{H}$ ), 7,53-7,46 (5H, m, Ar- $\underline{H}$ ), 7,25-7,13 (6H, m, Ar- $\underline{H}$ ), 6,97 (1H, d,  $J = 4,8$  Hz, Ar- $\underline{H}$ ), 5,22-5,21 (2H, ABq,  $J = 1,6$  Hz, O- $\underline{\text{CH}_2}$ -Ph), 4,60-4,50 (2H, m, NH- $\underline{\text{CH}}$ - $\text{CH}_2$ -Ph, NH- $\underline{\text{CH}}$ -CHH-CH-( $\text{CH}_3$ ) $_2$ ), 3,23 (1H, dd,  $J = 5,6$  Hz,  $J = 14$  Hz, NH-CH- $\underline{\text{CHH}}$ -Ph), 3,03 (1H, dd,  $J = 5,6$  Hz,  $J = 14$  Hz, NH-CH- $\underline{\text{CHH}}$ -Ph), 1,56-1,49 (1H, m, NH-CH- $\underline{\text{CHH}}$ -CH-( $\text{CH}_3$ ) $_2$ ), 1,25-1,15 (1H, m, NH-CH- $\underline{\text{CHH}}$ -CH-( $\text{CH}_3$ ) $_2$ ), 1,11-1,01 (1H, m, NH-CH-CHH- $\underline{\text{CH}}$ -( $\text{CH}_3$ ) $_2$ ), 0,85 (3H, d,  $J = 6,4$  Hz,  $\underline{\text{CH}_3}$ -CH- $\text{CH}_3$ ), 0,79 (3H, d,  $J = 6,4$  Hz,  $\text{CH}_3$ -CH- $\underline{\text{CH}_3}$ ).  **$^{13}\text{C NMR}$**  (100,62 MHz,  $\text{CD}_2\text{Cl}_2\text{-d}_2$ ):  $\delta$  199,2; 172,1; 164,3; 155,8; 136,3; 135,1; 133,0; 132,1; 129,4; 129,3; 129,2; 128,6; 128,6; 126,9; 126,8; 122,4; 114,3; 72,1; 59,9; 52,0; 38,9; 34,8; 24,7; 22,8; 21,6. **IR (ATR):** 3356, 3068, 2965, 2828, 1732, 1688, 1656, 1644, 1530, 1514, 1278, 1242, 1219, 987, 757, 741, 715, 700  $\text{cm}^{-1}$ . **CHN analýza:** Vypočteno pro  $\text{C}_{29}\text{H}_{31}\text{ClN}_2\text{O}_4$  (507,02): C, 68,70; H, 6,16; N, 5,53. Nalezeno: C, 68,53 $\pm$ 0,02; H 6,41 $\pm$ 0,01; N, 5,48 $\pm$ 0,02. **HRMS (MALDI-TOF, m/z):**  $[\text{M}+\text{Na}]^+$  vypočteno pro  $\text{C}_{29}\text{H}_{31}\text{ClN}_2\text{O}_4\text{Na}$ : 529,18646 Da; nalezeno: 529,18719 Da.

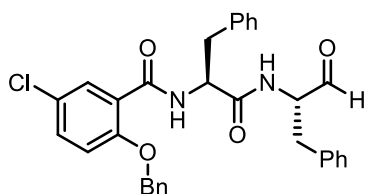


Charakterizace 2-benzyloxy-5-chloro-*N*-(2*S*)-4-methyl-1-((4-methyl-1-oxopentan-2-yl)amino) -1-oxopentan-2-yl)benzamid **22c**



Produkt je směsí dvou diastereomerů, A a B. Bezbarvá olejovitá látka; výtěžek 88 %;  $[\alpha_D^{20}] = -9,3^\circ$  (c 0,667, EtOAc);  $R_f$  (hex/EtOAc-1/1) = 0,51.  **$^1\text{H NMR}$**  (400 MHz,  $\text{CDCl}_3\text{-d}_1$ ):  $\delta$  9,60-9,54 (1H, m, ( $\text{CHO}$ )<sub>A+B</sub>), 8,28-8,15 (2H, m, (2 x  $\text{NH-CH-CHH-CH-(CH}_3)_2$ )<sub>A+B</sub>), 7,50-7,40 (6H, m, ( $\text{Ar-H}$ )<sub>A+B</sub>), 7,15-7,06 (1H, m, ( $\text{Ar-H}$ )<sub>A+B</sub>), 7,04-6,92 (1H, m, ( $\text{Ar-H}$ )<sub>A+B</sub>), 5,30-5,13 (2H, m, ( $\text{O-CH}_2\text{-Ph}$ )<sub>A+B</sub>), 4,69-4,59 (1H, m, ( $\text{NH-CH-CHH-CH-(CH}_3)_2$ )<sub>A+B</sub>), 4,52-4,41 (1H, m, ( $\text{NH-CH-CHH-CH-(CH}_3)_2$ )<sub>A+B</sub>), 1,83-1,67 (2H, m, (2 x  $\text{NH-CH-CHH-CH-(CH}_3)_2$ )<sub>A+B</sub>), 1,66-1,56 (1H, m, ( $\text{NH-CH-CHH-CH-(CH}_3)_2$ )<sub>A+B</sub>), 1,56-1,41 (2H, m, (2 x  $\text{NH-CH-CHH-CH-(CH}_3)_2$ )<sub>A+B</sub>), 1,32-1,21 (1H, m, ( $\text{NH-CH-CHH-CH-(CH}_3)_2$ )<sub>A+B</sub>), 1,06-0,91 (6H, m, ( $\text{CH}_3\text{-CH-CH}_3$ )<sub>A+B</sub>), 0,90-0,83 (3H, m, ( $\text{CH}_3\text{-CH-CH}_3$ )<sub>A+B</sub>), 0,83-0,75 (3H, m, ( $\text{CH}_3\text{-CH-CH}_3$ )<sub>A+B</sub>).  **$^{13}\text{C NMR}$**  (100,79 MHz,  $\text{CDCl}_3\text{-d}_1$ ):  $\delta$  199,8; 172,47; 172,35; 164,68; 164,58; 155,68; 155,64; 134,86; 133,07; 133,04; 132,34; 132,28; 131,25; 130,50; 129,66; 129,38; 129,33; 128,57; 128,52; 127,28; 122,40; 114,25; 114,20; 72,18; 72,12; 57,51; 57,47; 52,20; 42,29; 39,88; 39,77; 37,85; 24,96; 24,90; 24,88; 24,85; 23,24; 23,19; 22,98; 22,04; 21,96. **IR (ATR)**: 3380, 3312, 2955, 2930, 2870, 1638, 1505, 1480, 1466, 1295, 1227, 1121, 995, 809, 744, 696  $\text{cm}^{-1}$ . **CHN analýza**: Vypočteno pro  $\text{C}_{26}\text{H}_{33}\text{ClN}_2\text{O}_4$  (473,00): C, 66,02; H, 7,03; N, 5,92. Nalezeno: C, 66,20 $\pm$ 0,02; H 7,12 $\pm$ 0,01; N, 5,93 $\pm$ 0,03. **HRMS (MALDI-TOF, m/z)**:  $[\text{M}+\text{Na}]^+$  vypočteno pro  $\text{C}_{26}\text{H}_{33}\text{ClN}_2\text{O}_4\text{Na}$ : 495,20211 Da; nalezeno: 495,20256 Da.

Charakterizace 2-benzyloxy-5-chloro-*N*-((2*S*)-1-oxo-1-(((2*S*)-1-oxo-3-fenylpropan-2-yl)amino) -3-fenylpropan-2-yl)benzamid **22d**



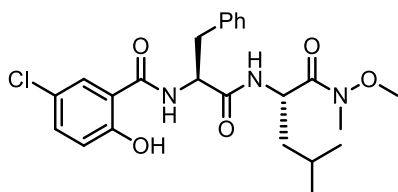
Bílá pevná látka; výtěžek 55 %; b.t. 152-154 °C;  $[\alpha_D^{20}] = -54,8^\circ$  (c 0,25, EtOAc);  $R_f$  (hex/EtOAc-2/3) = 0,58.  **$^1\text{H NMR}$**  (500 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  9,49 (1H, s,  $\text{CHO}$ ), 8,28 (1H, d,

$J = 5,6$  Hz,  $\text{NH-CH-CHH-Ph}$ ), 8,09 (1H, d,  $J = 2,4$  Hz,  $\text{NH-CH-CHH-Ph}$ ), 7,45-7,36 (4H, m, Ar- $\underline{H}$ ), 7,34-7,28 (2H, m, Ar- $\underline{H}$ ), 7,22-7,15 (3H, m, Ar- $\underline{H}$ ), 7,13-7,07 (3H, m, Ar- $\underline{H}$ ), 7,06-7,00 (2H, m, Ar- $\underline{H}$ ), 6,99-6,92 (3H, m, Ar- $\underline{H}$ ), 6,84 (1H, d,  $J = 5,2$  Hz, Ar- $\underline{H}$ ), 5,10-5,08 (2H, ABq,  $J = 8,2$  Hz, O- $\underline{\text{CH}_2}$ -Ph), 4,81 (1H, q,  $J = 5,4$  Hz, NH- $\underline{\text{CH}}$ -CHH-Ph), 4,52 (1H, q,  $J = 5,4$  Hz, NH- $\underline{\text{CH}}$ -CHH-Ph), 3,09 (1H, dd,  $J = 6$  Hz,  $J = 11,2$  Hz, NH-CH- $\underline{\text{CHH}}$ -Ph), 3,01 (1H, dd,  $J = 6$  Hz,  $J = 11,6$  Hz, NH-CH- $\underline{\text{CHH}}$ -Ph), 2,96 (1H, dd,  $J = 6$  Hz,  $J = 11,6$  Hz, NH-CH- $\underline{\text{CHH}}$ -Ph), 2,77 (1H, dd,  $J = 6$  Hz,  $J = 11,2$  Hz, NH-CH- $\underline{\text{CHH}}$ -Ph).  $^{13}\text{C}$  NMR (125,78 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  198,9; 171,2; 164,2; 155,4; 136,6; 135,6; 134,9; 132,9; 132,2; 129,2; 129,12; 129,09; 129,08; 129,07; 128,63; 128,60; 127,9; 126,94; 129,91; 122,0; 114,2; 71,7; 59,8; 54,7; 36,8; 34,9. **IR (ATR):** 3290, 1738, 1633, 1535, 1243, 1004, 756, 698  $\text{cm}^{-1}$ . **CHN analýza:** Vypočteno pro  $\text{C}_{32}\text{H}_{29}\text{ClN}_2\text{O}_4$  (541,04): C, 71,04; H, 5,40; N, 5,18. Nalezeno: C, 71,02 $\pm$ 0,02; H 5,42 $\pm$ 0,01; N, 5,18 $\pm$ 0,01. **HRMS (MALDI-TOF, m/z):**  $[\text{M}+\text{Na}]^+$  vypočteno pro  $\text{C}_{32}\text{H}_{29}\text{ClN}_2\text{O}_4\text{Na}$ : 563,17081 Da; nalezeno: 563,17087 Da.

#### Obecný postup deprotektce fenolického hydroxidu, 23a-d

Deprotekce  $^{316}$  **17b** (1,2 g, 2,12 mmol) byla provedena rozpuštěním látky v EtOAc (100 ml), přidavkem 10% Pd/C (0,15 g) a zavedením  $\text{H}_2$  (1 atm). Reakce byla míchána při 25 °C po dobu 20 hodin. Poté byl Pd/C odfiltrován a roztok byl zahuštěn na RVO za sníženého tlaku do čirého oleje. Produkt **23b** byl izolován ve výtěžku 78 %.

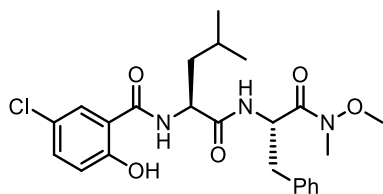
Charakterizace 5-chloro-2-hydroxy-*N*-(((2*S*)-1-(((2*S*)-1-(methoxy(methyl)amino)-4-methyl-1-oxopentan-2-yl)amino)-1-oxo-3-fenylpropan-2-yl)benzamidu **23a**



Bílá pevná látka; výtěžek 32 %; b.t. 221,7-224,4 °C;  $[\alpha_D^{20}] = -42,3^\circ$  (c 1,00, EtOAc);  $R_f$  (hex/EtOAc-1/1) = 0,43.  $^1\text{H}$  NMR (400 MHz,  $\text{CDCl}_3\text{-d}_1$ ):  $\delta$  12,20 (1H, brs, Ar- $\underline{\text{OH}}$ ), 7,96 (1H, d,  $J = 7,6$  Hz,  $\text{NH-CH-CHH-CH-(CH}_3)_2$ ), 7,51 (1H, d,  $J = 2,4$  Hz,  $\text{NH-CH-CHH-Ph}$ ), 7,33-7,21 (6H, m, Ar- $\underline{H}$ ), 7,19 (1H, d,  $J = 8,8$  Hz, Ar- $\underline{H}$ ), 6,84 (1H, d,  $J = 8,8$  Hz, Ar- $\underline{H}$ ), 5,25-5,15 (1H, m, NH- $\underline{\text{CH}}$ -CHH-Ph), 5,06-4,99 (1H, m, NH- $\underline{\text{CH}}$ -CHH- $\text{CH-(CH}_3)_2$ ), 3,81 (3H, s, O- $\underline{\text{CH}_3}$ ), 3,31 (3H, s, N- $\underline{\text{CH}_3}$ ), 3,20 (2H, d,  $J = 6,4$  Hz, NH-CH- $\underline{\text{CH}_2}$ -Ph), 1,75-1,65 (1H, m, NH-CH- $\underline{\text{CHH}}$ - $\text{CH-(CH}_3)_2$ ), 1,65-1,55 (2H, m, NH-CH-

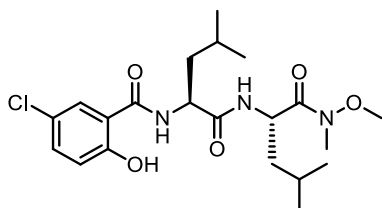
$\underline{\text{CHH}}\text{-}\underline{\text{CH}}\text{-(CH}_3\text{)}_2$ , 1,00 (3H, d,  $J = 6,4$  Hz,  $\underline{\text{CH}}_3\text{-CH-CH}_3$ ), 0,92 (3H, d,  $J = 6,4$  Hz,  $\text{CH}_3\text{-CH-}\underline{\text{CH}}_3$ ).  $^{13}\text{C NMR}$  (100,79 MHz,  $\text{CDCl}_3\text{-d}_1$ ):  $\delta$  173,1; 171,3; 168,6; 160,1; 136,5; 134,2; 129,5; 128,7; 127,3; 126,0; 123,5; 119,9; 115,1; 61,9; 54,6; 48,2; 42,0; 38,7; 32,5; 25,0; 23,4; 21,8. **IR (ATR)**: 3345, 3253, 3069, 2970, 2359, 2341, 1616, 1596, 1552, 1477, 1224, 827, 820, 743, 717, 698  $\text{cm}^{-1}$ . **CHN analýza**: Vypočteno pro  $\text{C}_{24}\text{H}_{30}\text{ClN}_3\text{O}_5$  (475,97): C, 60,56; H, 6,35; N, 8,83. Nalezeno: C, 60,79 $\pm$ 0,01; H 6,43 $\pm$ 0,01; N, 8,79 $\pm$ 0,01. **HRMS (MALDI-TOF, m/z)**:  $[\text{M}+\text{Na}]^+$  vypočteno pro  $\text{C}_{24}\text{H}_{30}\text{ClN}_3\text{O}_5\text{Na}$ : 498,17662 Da; nalezeno: 498,17758 Da.

Charakterizace 5-chloro-2-hydroxy-*N*-((2*S*)-1-(((2*S*)-1-(methoxy(methyl)amino)-1-oxo-3-fenylpropan-2-yl)amino)-4-methyl-1-oxopentan-2-yl)benzamidu **23b**



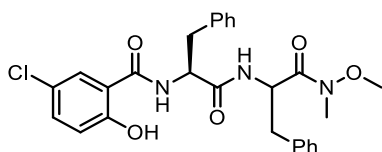
Bílá pevná látka; výtěžek 78 %; b.t. 222-226 °C;  $[\alpha_D^{20}] = -15,3^\circ$  (c 1,00, EtOAc);  $R_f(\text{hex/EtOAc-1/1}) = 0,33$ .  $^1\text{H NMR}$  (400 MHz,  $\text{CDCl}_3\text{-d}_1$ ):  $\delta$  12,33 (1H, brs, Ar- $\underline{\text{OH}}$ ), 7,60 (1H, d,  $J = 8$  Hz,  $\underline{\text{NH}}\text{-CH-CHH-CH-(CH}_3\text{)}_2$ ), 7,55 (1H, d,  $J = 2$  Hz,  $\underline{\text{NH}}\text{-CH-CHH-Ph}$ ), 7,37-7,32 (1H, m, Ar- $\underline{\text{H}}$ ), 7,32-7,17 (5H, m, Ar- $\underline{\text{H}}$ ), 7,08 (1H, d,  $J = 8,4$  Hz, Ar- $\underline{\text{H}}$ ), 6,91 (1H, d,  $J = 8,8$  Hz, Ar- $\underline{\text{H}}$ ), 5,41-5,33 (1H, m,  $\text{NH-}\underline{\text{CH}}\text{-CHH-CH-(CH}_3\text{)}_2$ ), 4,80-4,70 (1H, m,  $\text{NH-}\underline{\text{CH}}\text{-CHH-Ph}$ ), 3,77 (3H, s, O- $\underline{\text{CH}}_3$ ), 3,29 (3H, s, N- $\underline{\text{CH}}_3$ ), 3,22 (1H, dd,  $J = 5,6$  Hz,  $J = 13,6$  Hz,  $\text{NH-CH-}\underline{\text{CHH}}\text{-Ph}$ ), 3,05 (1H, dd,  $J = 5,6$  Hz,  $J = 13,6$  Hz,  $\text{NH-CH-}\underline{\text{CHH}}\text{-Ph}$ ), 1,79-1,66 (2H, m,  $\text{NH-CH-}\underline{\text{CHH}}\text{-CH-(CH}_3\text{)}_2$ ),  $\text{NH-CH-CH}_2\text{-}\underline{\text{CH}}\text{-(CH}_3\text{)}_2$ , 1,65-1,55 (1H, m,  $\text{NH-CH-}\underline{\text{CHH}}\text{-CH-(CH}_3\text{)}_2$ ), 0,98-0,89 (6H, m,  $\underline{\text{CH}}_3\text{-CH-}\underline{\text{CH}}_3$ ).  $^{13}\text{C NMR}$  (100,79 MHz,  $\text{CDCl}_3\text{-d}_1$ ):  $\delta$  172,1; 170,1; 168,9; 160,3; 136,8; 134,2; 129,7; 128,6; 127,2; 125,9; 123,1; 120,0; 114,8; 61,8; 52,0; 50,9; 45,1; 43,2; 32,3; 24,9; 23,2; 21,9. **IR (ATR)**: 3337, 3251, 3071, 2947, 2360, 2341, 2360, 2341, 1638, 1590, 1552, 1479, 1368, 1261, 1231, 903, 829, 716  $\text{cm}^{-1}$ . **CHN analýza**: Vypočteno pro  $\text{C}_{24}\text{H}_{30}\text{ClN}_3\text{O}_5$  (475,97): C, 60,56; H, 6,35; N, 8,83. Nalezeno: C, 60,79 $\pm$ 0,01; H 6,39 $\pm$ 0,02; N, 8,83 $\pm$ 0,03. **HRMS (MALDI-TOF, m/z)**:  $[\text{M}+\text{Na}]^+$  vypočteno pro  $\text{C}_{24}\text{H}_{30}\text{ClN}_3\text{O}_5\text{Na}$ : 498,17662 Da; nalezeno: 498,17737 Da.

Charakterizace 5-chloro-2-hydroxy-*N*-((2*S*)-1-(((2*S*)-1-(methoxy(methyl)amino)-4-methyl-1-oxopentan-2-yl)amino)-4-methyl-1-oxopentan-2-yl)benzamidu **23c**



Bílá pevná látka; výtěžek 78 %; b.t. 244,5-248,1 °C;  $[\alpha_D^{20}] = -4^\circ$  (c 0,5, EtOAc);  $R_f$  (hex/EtOAc-1/1) = 0,56.  **$^1\text{H NMR}$**  (400 MHz,  $\text{CDCl}_3\text{-d}_1$ ):  $\delta$  12,33 (1H, brs, Ar-OH), 7,89 (1H, d,  $J = 6$  Hz, NH-CH-CHH-CH-( $\text{CH}_3$ )<sub>2</sub>), 7,57 (1H, d,  $J = 2,4$  Hz, NH-CH-CHH-CH-( $\text{CH}_3$ )<sub>2</sub>), 7,32 (1H, dd,  $J = 2$  Hz,  $J = 8,4$  Hz, Ar-H), 6,94 (1H, d,  $J = 7,6$  Hz, Ar-H), 6,86 (1H, d,  $J = 8,8$  Hz, Ar-H), 5,71-5,60 (1H, m, NH-CH-CHH-CH-( $\text{CH}_3$ )<sub>2</sub>), 4,85-5,75 (1H, m, NH-CH-CHH-CH-( $\text{CH}_3$ )<sub>2</sub>), 3,87 (3H, s, O-CH<sub>3</sub>), 3,30 (3H, s, N-CH<sub>3</sub>), 1,82-1,70 (3H, m, NH-CH-CHH-CH-( $\text{CH}_3$ )<sub>2</sub>), 1,70-1,58 (3H, m, NH-CH-CHH-CH-( $\text{CH}_3$ )<sub>2</sub>), 1,07-0,90 (12H, m, 4 x CH<sub>3</sub>).  **$^{13}\text{C NMR}$**  (100,79 MHz,  $\text{CDCl}_3\text{-d}_1$ ):  $\delta$  173,0; 172,7; 168,8; 160,1; 134,1; 126,0; 123,5; 119,9; 115,1; 61,8; 52,0; 48,3; 41,9; 41,8; 32,5; 25,0; 24,9; 23,5; 23,2, 21,9; 21,6. **IR (ATR)**: 3335, 3245, 3076, 2958, 2360, 1636, 1590, 1549, 1474, 1370, 1233, 903, 826, 758, 719, 699  $\text{cm}^{-1}$ . **CHN analýza**: Vypočteno pro  $\text{C}_{21}\text{H}_{32}\text{ClN}_3\text{O}_5$  (441,95): C, 57,07; H, 7,30; N, 9,51. Nalezeno: C, 57,35±0,03; H, 7,50±0,02; N, 9,42±0,03. **HRMS (MALDI-TOF, m/z)**:  $[\text{M}+\text{Na}]^+$  vypočteno pro  $\text{C}_{21}\text{H}_{32}\text{ClN}_3\text{O}_5\text{Na}$ : 464,19227 Da; nalezeno: 464,19309 Da.

Charakterizace 5-chloro-2-hydroxy-*N*-((2*S*)-1-((1-(methoxy(methyl)amino)-1-oxo-3-fenylpropan-2-yl)amino)-1-oxo-3-fenylpropan-2-yl)benzamidu **23d**



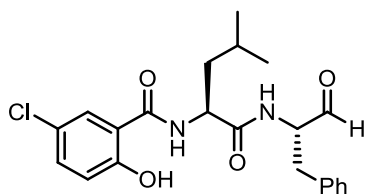
Produkt je směsí dvou diastereomerů, A a B. Bílá pevná látka; výtěžek 42 %; b.t. 197,8-200,2 °C;  $[\alpha_D^{20}] = -51,0^\circ$  (c 0,4, EtOAc);  $R_f$  (hex/EtOAc-1/1) = 0,22.  **$^1\text{H NMR}$**  (400 MHz,  $\text{CDCl}_3\text{-d}_1$ ):  $\delta$  12,19-12,16 (1H, m, (Ar-OH)<sub>A+B</sub>), 7,62-7,52 (1H, m, (NH-CH-CHH-Ph)<sub>A+B</sub>), 7,48-7,38 (1H, m, (NH-CH-CHH-Ph)<sub>A+B</sub>), 7,40-7,18 (9H, m, (Ar-H)<sub>A+B</sub>), 7,18-7,09 (2H, m, (Ar-H)<sub>A+B</sub>), 6,95-6,82 (2H, m, (Ar-H)<sub>A+B</sub>), 5,37-5,25 (1H, m, (NH-CH-CHH-Ph)<sub>A+B</sub>), 4,98-4,33 (1H, m, (NH-CH-CHH-Ph)<sub>A+B</sub>), 3,75-3,60 (3H, m, (N-CH<sub>3</sub>)<sub>A+B</sub>), 3,32-3,25 (3H, m, (O-CH<sub>3</sub>)<sub>A+B</sub>), 3,24-2,90 (4H, m, 2 x (NH-CH-CH<sub>2</sub>-Ph)<sub>A+B</sub>).  **$^{13}\text{C NMR}$**  (100,79 MHz,  $\text{CDCl}_3\text{-d}_1$ ):  $\delta$  170,9; 170,5; 168,6; 160,2; 136,4;

136,0; 134,4; 129,6; 129,5; 128,8; 128,6; 127,4; 127,3; 125,8; 123,5; 120,1; 115,0; 61,8; 54,6; 50,9; 38,5; 38,4; 32,4. **IR (ATR):** 3305, 3067, 2939, 2352, 2341, 1657, 1633, 1592, 1547, 1493, 1227, 823, 748, 720, 699, 669  $\text{cm}^{-1}$ . **CHN analýza:** Vypočteno pro  $\text{C}_{27}\text{H}_{28}\text{ClN}_3\text{O}_5$  (509,98): C, 63,59; H, 5,53; N, 8,24. Nalezeno: C, 63,58 $\pm$ 0,01; H, 5,55 $\pm$ 0,01; N, 8,24 $\pm$ 0,01. **HRMS (MALDI-TOF, m/z):**  $[\text{M}+\text{Na}]^+$  vypočteno pro  $\text{C}_{27}\text{H}_{28}\text{ClN}_3\text{O}_5\text{Na}$ : 532,16097 Da; nalezeno: 532,16205 Da.

#### Obecný postup pro přípravu aldehydů, 24

Odchráněný Weinreb amid **23b** (0,166 g, 0,349 mmol) byl rozpuštěn ve v bezvodém THF (40 ml) a vychlazen na  $-8\text{ }^\circ\text{C}$ . Poté bylo najednou přidáno  $\text{LiAlH}_4$  (0,039 g, 1,03 mmol). Reakce byla po 90 minutách míchání při  $-8\text{ }^\circ\text{C}$  ukončena přilitím nasyceného roztoku  $\text{NH}_4\text{Cl}$  (20 ml), THF (20 ml), vody (10 ml) a 10%  $\text{HCl}$  (2 ml). Oddělená vodná frakce byla promyta  $\text{EtOAc}$  (3 x 40 ml). Spojené organické frakce byly promyty vodou (2 x 20 ml) a vysušeny bezv.  $\text{Na}_2\text{SO}_4$ . Za sníženého tlaku bylo na RVO odstraněno rozpouštědlo do konstantní hmotnosti. Aldehyd **24** byl izolován v dobré čistotě bez nutnosti provádět sloupcovou chromatografii ve výtěžku 83 %. V případě čištění aldehydu sloupcovou chromatografií dochází k racemizaci na poslední aminokyselině v řetězci. Z tohoto důvodu je třeba důkladnými extrakcemi odstranit veškeré vedlejší produkty a nečistoty, aby nebylo třeba sloučeninu čistit chromatograficky.<sup>325</sup>

Charakterizace                      5-chloro-2-hydroxy-*N*-((2*S*)-4-methyl-1-oxo-1-(((2*S*)-1-oxo-3-fenylpropan-2-yl)amino)pentan-2-yl)benzamidu **24**

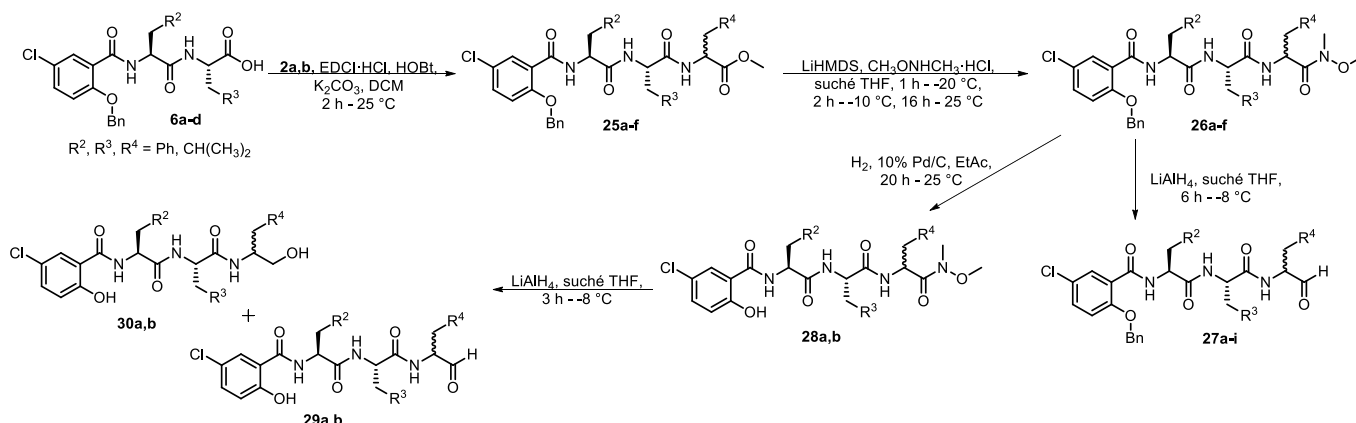


Bezbarvá olejovitá látka; výtěžek 83 %;  $[\alpha_D^{20}] = -25,8^\circ$  (c 1,00,  $\text{EtOAc}$ );  $R_f$  (hex/ $\text{EtOAc}$ -1/1) = 0,38.  **$^1\text{H-NMR}$**  (400 MHz,  $\text{CDCl}_3\text{-d}_1$ ):  $\delta$  12,11 (1H, s, Ar-OH), 9,72 (1H, s, CHO), 7,62 (1H, d,  $J = 8\text{ Hz}$ , NH-CH-CHH-CH-(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>), 7,52 (1H, d,  $J = 2,8\text{ Hz}$ , NH-CH-CHH-Ph), 7,33-7,18 (6H, m, Ar-H), 6,90 (1H, d,  $J = 7,2\text{ Hz}$ , Ar-H), 6,70 (1H, d,  $J = 6,8\text{ Hz}$ , Ar-H), 4,84 (1H, q,  $J = 6,4\text{ Hz}$ , NH-CH-CHH-Ph), 4,74-4,63 (1H, m, NH-CH-CHH-CH-(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>), 3,33-3,15 (2H, m, NH-CH-CH<sub>2</sub>-Ph), 1,85-1,68 (3H, m, NH-CH-CH<sub>2</sub>-CH-(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>), 1,05-0,80 (6H, m, CH<sub>3</sub>-CH-CH<sub>3</sub>).  **$^{13}\text{C NMR}$**  (100,79

MHz, CD<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>-d<sub>2</sub>): δ 198,2; 172,7; 169,1; 160,1; 135,1; 134,5; 129,5; 129,0; 127,5; 125,9; 123,6; 120,1; 114,8; 60,1; 52,0; 40,9; 35,2; 25,0; 23,1; 22,1. **IR (ATR):** 3302, 3066, 2958, 2928, 1736, 1640, 1593, 1536, 1485, 1366, 1290, 1255, 1228, 1114, 823, 750, 721, 701 cm<sup>-1</sup>. **CHN analýza:** Vypočteno pro C<sub>22</sub>H<sub>25</sub>ClN<sub>2</sub>O<sub>4</sub> (416,90): C, 63,38; H, 6,04; N, 6,72. Nalezeno: C, 63,68±0,02; H, 7,15±0,02; N, 5,82±0,02. **HRMS (MALDI-TOF, m/z):** [M+Na]<sup>+</sup> vypočteno pro C<sub>22</sub>H<sub>25</sub>ClN<sub>2</sub>O<sub>4</sub>Na 439,13951 Da; nalezeno: 439,14021 Da.

### 5.2.7 Využití optimalizovaných postupů pro přípravu tripeptidových derivátů

Postupy zavádění Weinreb amidové a aldehydové skupiny testované a optimalizované v minulém a předminulém oddíle byly použity u derivátů s delším peptidovým řetězcem s drobnými úpravami reakčních podmínek.

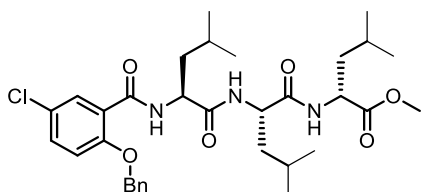


#### Obecný postup přípravy methyl esterů **25a-f**

Příprava tripeptid methylesterů **25a-f** byla prováděna podle šetrného amidačního protokolu (iv) použitého pro přípravu jednoduchých methylesterů **3a,b**. Sloučenina **2a** (1,343 g, 6,23 mmol) je rozpuštěna ve vodě (20 ml) s K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (0,861 g, 6,23 mmol, 1 ekv.) za účelem neutralizace hydrochloridu a uvolnění amino skupiny. Látka je po 10minutovém míchání z vodné fáze extrahována do CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (3 x 20 ml). Organická fáze je promyta vodou (2 x 10 ml) a usušena bezv. Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>. Roztok methylesteru aminokyseliny v CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> je následně přidán na začátku do reakční směsi k roztoku dipeptidové kyseliny **6c** (3,045 g, 6,23 mmol) v dichlormethanu (60 ml). Je přidán EDCI·HCl (1,194 g, 6,23 mmol) a HOBt (0,841 g, 6,23 mmol). Reakční směs byla míchána při 25 °C 2 hodiny, a poté zakoncentrována za sníženého tlaku. Surový produkt byl rozpuštěn v ethyl acetátu (75 ml) a vodě (75 ml). Oddělená vodná fáze byla promyta EtOAc (3 x 40 ml). Spojené organické fáze byly promyty vodou (2 x 20 ml), vysušeny

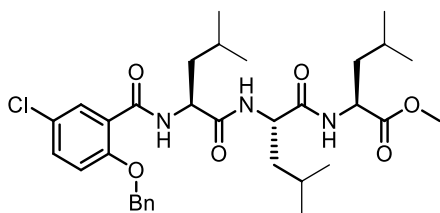
bezvodým Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> a na RVO za sníženého tlaku zredukovány do konstantní váhy na bezbarvý olej. Methylester **25c** byl čištěn sloupcovou chromatografií (silikagel 140 g, *n*-hexan/ethyl acetát (1:1) s 74% výtěžkem.

Charakterizace (2*R*)-methyl 2-((2*S*)-2-((2*S*)-2-(2-(benzyloxy)-5-chlorobenzamido)-4-methylpentanamido)-4-methylpentanoátu **25a**



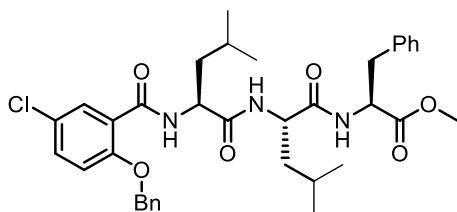
Bílá pevná látka; výtěžek 72%; b.t. 160,4-163,1 °C;  $[\alpha_D^{20}] = -16,3^\circ$  (c 1,00, EtOAc);  $R_f$  (hex/EtOAc 1/1) = 0,51. **<sup>1</sup>H NMR** (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>-d<sub>1</sub>): δ 8,22 (1H, d, *J* = 7,2 Hz, NH-CH-CHH-CH-(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>), 8,20 (1H, d, *J* = 2,8 Hz, NH-CH-CHH-CH-(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>), 7,54-7,47 (6H, m, NH-CH-CHH-CH-(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>, Ar-H), 7,12 (1H, d, *J* = 8,8 Hz, Ar-H), 6,92 (1H, t, *J* = 8 Hz, Ar-H), 6,49 (1H, t, *J* = 8,4 Hz, Ar-H), 5,23-5,21 (2H, ABq, *J* = 8,8 Hz, O-CH<sub>2</sub>-Ph), 4,65-4,57 (1H, m, NH-CH-CHH-CH-(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>), 4,56-4,48 (1H, m, NH-CH-CHH-CH-(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>), 4,45-4,38 (1H, m, NH-CH-CHH-CH-(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>), 3,73 (3H, s, O-CH<sub>3</sub>), 1,91-1,82 (1H, m, NH-CH-CHH-CH-(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>), 1,81-1,68 (3H, m, NH-CH-CHH-CH-(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>, NH-CH-CHH-CH-(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>), 1,66-1,50 (3H, m, NH-CH-CHH-CH-(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>, NH-CH-CHH-CH-(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>), 1,47-1,35 (1H, m, NH-CH-CHH-CH-(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>), 1,26-1,16 (1H, m, NH-CH-CHH-CH-(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>), 1,01 (3H, d, *J* = 6,4 Hz, CH<sub>3</sub>-CH-CH<sub>3</sub>), 0,99 (3H, d, *J* = 6,4 Hz, CH<sub>3</sub>-CH-CH<sub>3</sub>), 0,96 (3H, d, *J* = 6,4 Hz, CH<sub>3</sub>-CH-CH<sub>3</sub>), 0,91 (3H, d, *J* = 6,4 Hz, CH<sub>3</sub>-CH-CH<sub>3</sub>), 0,83 (3H, d, *J* = 6,4 Hz, CH<sub>3</sub>-CH-CH<sub>3</sub>), 0,77 (3H, d, *J* = 6,4 Hz, CH<sub>3</sub>-CH-CH<sub>3</sub>). **<sup>13</sup>C NMR** (100,62 MHz, CDCl<sub>3</sub>-d<sub>1</sub>): δ 173,5; 172,1; 171,9; 165,2; 155,8; 134,8; 133,3; 132,5; 129,6; 129,4; 128,7; 127,3; 122,1; 114,2; 72,2; 53,6; 52,3; 51,7; 51,0; 41,9; 40,3; 40,0; 25,1; 25,0; 24,9; 23,3; 23,1; 23,0; 21,9; 21,75; 21,68. **IR (ATR)**: 3262, 3077, 2956, 2930, 2870, 1731, 1621, 1541, 1303, 1247, 1216, 1125, 1023, 750, 732, 715, 700, 660 cm<sup>-1</sup>. **CHN analýza**: Vypočteno pro C<sub>33</sub>H<sub>46</sub>ClN<sub>3</sub>O<sub>6</sub> (616,19): C, 64,32; H, 7,52; N, 6,82. Nalezeno: C, 64,36±0,01; H 7,53±0,01; N, 6,82±0,01. **HRMS (MALDI-TOF, m/z)**: [M+Na]<sup>+</sup> vypočteno pro C<sub>33</sub>H<sub>46</sub>ClN<sub>3</sub>O<sub>6</sub>Na: 638,2973; nalezeno: 638,29778 Da.

Charakterizace (2*S*)-methyl 2-((2*S*)-2-((2*S*)-2-(2-(benzyloxy)-5-chlorobenzamido)-4-methylpentanamido)-4-methylpentanoátu **25b**



Bílá pevná látka; výtěžek 89 %; b.t. 139-143 °C;  $[\alpha_D^{20}] = -37,3^\circ$  (c 1,00, EtOAc);  $R_f$  (hex/EtOAc 1/1) = 0,53. **<sup>1</sup>H NMR** (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>-d<sub>1</sub>): δ 8,16 (1H, d,  $J = 2,8$  Hz,  $\text{NH-CH-CHH-CH-(CH}_3)_2$ ), 8,20 (1H, d,  $J = 6,8$  Hz,  $\text{NH-CH-CHH-CH-(CH}_3)_2$ ), 7,41\_7,47 (6H, m,  $\text{NH-CH-CHH-CH-(CH}_3)_2$ , Ar-H), 7,04 (1H, d,  $J = 8,8$  Hz, Ar-H), 6,81 (2H, t,  $J = 9,2$  Hz, Ar-H), 5,20-5,12 (2H, ABq,  $J = 10,4$  Hz, O-CH<sub>2</sub>-Ph), 4,60-4,51 (1H, m, NH-CH-CHH-CH-(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>), 4,49-4,35 (2H, m, NH-CH-CHH-CH-(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>, NH-CH-CHH-CH-(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>), 3,72 (3H, s, O-CH<sub>3</sub>), 1,78-1,70 (1H, m, NH-CH-CHH-CH-(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>), 1,67-1,44 (6H, m, NH-CH-CHH-CH-(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>, NH-CH-CHH-CH-(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>, NH-CH-CHH-CH-(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>), 1,44-1,31 (1H, m, NH-CH-CHH-CH-(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>), 1,21-1,11 (1H, m, NH-CH-CHH-CH-(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>), 0,95 (9H, m, 3xCH<sub>3</sub>), 0,85 (3H, d,  $J = 6,4$  Hz, CH<sub>3</sub>-CH-CH<sub>3</sub>), 0,79 (3H, d,  $J = 6,4$  Hz, CH<sub>3</sub>-CH-CH<sub>3</sub>), 0,72 (3H, d,  $J = 6,4$  Hz, CH<sub>3</sub>-CH-CH<sub>3</sub>). **<sup>13</sup>C NMR** (100,62 MHz, CDCl<sub>3</sub>-d<sub>1</sub>): δ 173,2; 172,1; 171,7; 164,7; 134,9; 133,1; 132,3; 129,4; 129,3; 128,8; 128,6; 127,3; 122,2; 114,1; 72,1; 52,7; 52,4; 51,9; 50,9; 41,5; 40,3; 39,9; 24,93; 24,87; 23,1; 23,0; 22,05; 22,03. **IR (ATR)**: 3293, 2957, 2361, 1744, 1638, 1533, 1470, 1272, 1244, 1159, 1009, 809, 697 cm<sup>-1</sup>. **CHN analýza**: vypočteno pro C<sub>33</sub>H<sub>46</sub>ClN<sub>3</sub>O<sub>6</sub> (616,19): C, 64,32; H, 7,52; N, 6,82; nalezeno: C, 64,28±0,02; H, 7,60±0,02; N, 6,78±0,02. **HRMS (MALDI-TOF, m/z)**: [M+H]<sup>+</sup> vypočteno pro C<sub>33</sub>H<sub>47</sub>ClN<sub>3</sub>O<sub>6</sub>: 616,31479 Da; nalezeno: 616,31586 Da.

Charakterizace (2*S*)-methyl-2-((2*S*)-2-((2*S*)-2-(2-(benzyloxy)-5-chlorobenzamido)-4-methyl pentanamido)-4-methylpentanamido)-3-fenylpropanoátu **25c**

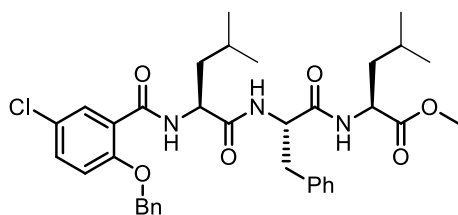


Bílá pevná látka; výtěžek 74 %; b.t. 161-163 °C;  $[\alpha_D^{20}] = -12,9^\circ$  (c 1,00; EtOAc);  $R_f$  (hex/EtOAc - 1/1) = 0,51. **<sup>1</sup>H NMR** (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>-d<sub>1</sub>): δ 8,17 (1H, d,  $J = 2,8$  Hz,



$\text{NH-CH-CHH-CH-(CH}_3)_2$ ), 8,13 (1H, d,  $J = 6,8$  Hz,  $\text{NH-CH-CHH-CH-(CH}_3)_2$ ), 7,47-7,39 (6H, m,  $\text{NH-CH-CHH-Ph}$ , Ar- $\underline{H}$ ), 7,30-7,19 (3H, m, Ar- $\underline{H}$ ), 7,13-7,08 (2H, m, Ar- $\underline{H}$ ), 7,04 (1H, d,  $J = 8,8$  Hz, Ar- $\underline{H}$ ), 6,68 (1H, d,  $J = 7,6$  Hz, Ar- $\underline{H}$ ), 6,63 (1H, d,  $J = 8$  Hz, Ar- $\underline{H}$ ), 5,19-5,12 (2H, ABq,  $J = 10,4$  Hz, O- $\underline{\text{CH}}_2\text{-Ph}$ ), 4,85-4,80 (1H, m, NH- $\underline{\text{CH}}\text{-CH}_2\text{-Ph}$ ), 4,50-4,43 (1H, m, NH- $\underline{\text{CH}}\text{-CHH-CH-(CH}_3)_2$ ), 4,38-4,30 (1H, m, NH- $\underline{\text{CH}}\text{-CHH-CH-(CH}_3)_2$ ), 3,70 (3H, s, O- $\underline{\text{CH}}_3$ ), 3,14 (1H, dd,  $J = 6$  Hz,  $J = 14$  Hz, NH-CH- $\underline{\text{CHH}}\text{-Ph}$ ), 3,08 (1H, dd,  $J = 6$  Hz,  $J = 14$  Hz, NH-CH- $\underline{\text{CHH}}\text{-Ph}$ ), 1,69-1,60 (1H, m, NH-CH- $\underline{\text{CHH}}\text{-CH-(CH}_3)_2$ ), 1,59-1,32 (4H, m, NH-CH- $\underline{\text{CHH}}\text{-CH-(CH}_3)_2$ , NH-CH- $\underline{\text{CHH}}\text{-CH-(CH}_3)_2$ ), 1,24-1,13 (1H, m, NH-CH- $\underline{\text{CHH}}\text{-CH-(CH}_3)_2$ ), 0,86 (3H, d,  $J = 6,4$  Hz,  $\underline{\text{CH}}_3\text{-CH-CH}_3$ ), 0,83-0,77 (6H, m, 2x $\underline{\text{CH}}_3$ ), 0,72 (3H, d,  $J = 6,4$  Hz,  $\text{CH}_3\text{-CH-CH}_3$ ).  $^{13}\text{C NMR}$  (100,62 MHz,  $\text{CDCl}_3\text{-d}_1$ ):  $\delta$  172,1; 171,8; 171,6; 164,7; 155,6; 136,0; 134,9; 133,1; 132,3; 129,44; 129,41; 129,3; 128,7; 128,6; 127,3; 122,3; 114,2; 72,1; 53,4; 52,5; 52,4; 52,0; 40,7; 39,7; 38,0; 24,87; 24,84; 23,1; 22,0; 21,9. **IR (ATR):** 3297, 2956, 1742, 1634, 1621, 1541, 1232, 1123, 996, 754, 736, 697  $\text{cm}^{-1}$ . **CHN analýza:** Vypočteno pro  $\text{C}_{36}\text{H}_{44}\text{ClN}_3\text{O}_6$  (650,20): C, 66,50; H, 6,82; N, 6,46. Nalezeno: C, 66,3 $\pm$ 0,02; H, 6,83 $\pm$ 0,02; N, 6,35 $\pm$ 0,02. **HRMS (MALDI-TOF, m/z):**  $[\text{M}+\text{H}]^+$  vypočteno pro  $\text{C}_{36}\text{H}_{45}\text{ClN}_3\text{O}_6$ : 650,29914 Da; nalezeno: 650,30049 Da.

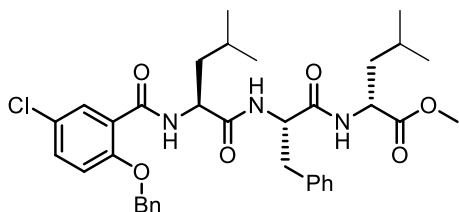
Charakterizace (2*S*)-methyl-2-((2*S*)-2-((2*S*)-2-(2-(benzyloxy)-5-chlorobenzamido)-4-methylpentanamido)-3-fenylpropanamido)-4-methylpentanoátu **25d**



Bílá pevná látka; výtěžek 94 %; b.t. 127–130 °C;  $[\alpha_D^{20}] = -54,0^\circ$  (c 1,00, EtOAc);  $R_f$  (hex/EtOAc-1/1) = 0,42.  $^1\text{H NMR}$  (400 MHz,  $\text{CDCl}_3\text{-d}_1$ ):  $\delta$  8,06 (1H, d,  $J = 6,8$  Hz,  $\text{NH-CH-CHH-CH-(CH}_3)_2$ ), 8,04 (1H, d,  $J = 2,8$  Hz,  $\text{NH-CH-CHH-CH-(CH}_3)_2$ ), 7,48 (1H, d,  $J = 2,8$  Hz,  $\text{NH-CH-CHH-Ph}$ ), 7,46-7,37 (5H, m, Ar- $\underline{H}$ ), 7,13-6,97 (6H, m, Ar- $\underline{H}$ ), 6,75-6,65 (2H, m, Ar- $\underline{H}$ ), 5,17-5,09 (2H, ABq,  $J = 10,4$  Hz, O- $\underline{\text{CH}}_2\text{-Ph}$ ), 4,68-4,62 (1H, m, NH- $\underline{\text{CH}}\text{-CH}_2\text{-Ph}$ ), 4,58-4,51 (1H, m, NH- $\underline{\text{CH}}\text{-CHH-CH-(CH}_3)_2$ ), 4,38-4,31 (1H, m, NH- $\underline{\text{CH}}\text{-CHH-CH-(CH}_3)_2$ ), 3,69 (3H, s, O- $\underline{\text{CH}}_3$ ), 3,7-3,03 (2H, m, NH-CH- $\underline{\text{CH}}_2\text{-Ph}$ ), 1,67-1,40 (4H, m, NH-CH- $\underline{\text{CH}}_2\text{-CH-(CH}_3)_2$ , NH-CH- $\underline{\text{CH}}_2\text{-CH-(CH}_3)_2$ ), 1,31-1,21 (1H, m, NH-CH- $\underline{\text{CHH}}\text{-CH-(CH}_3)_2$ ), 1,11-1,01 (1H, m, NH-CH-

CHH-CH-(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>), 0,91 (6H, d,  $J = 6$  Hz, 2xCH<sub>3</sub>), 0,72 (3H, d,  $J = 6,4$  Hz, CH<sub>3</sub>-CHCH<sub>3</sub>), 0,65 (3H, d,  $J = 6,4$  Hz, CH<sub>3</sub>-CH-CH<sub>3</sub>). <sup>13</sup>C NMR (100,62 MHz, CDCl<sub>3</sub>-d<sub>1</sub>): δ 173,0; 171,8; 170,8; 164,8; 155,8; 136,7; 134,7; 133,2; 132,4; 129,5; 129,4; 129,3; 128,6; 128,5; 127,2; 126,9; 121,9; 114,1; 72,2; 54,0; 52,9; 52,4; 51,1; 41,2; 39,5; 37,2; 24,85; 24,81; 23,1; 23,0; 21,9; 21,7. **IR (ATR):** 3292, 2956, 1744, 1645, 1525, 1272, 1226, 745, 701 cm<sup>-1</sup>. **CHN analýza:** Vypočteno pro C<sub>36</sub>H<sub>44</sub>ClN<sub>3</sub>O<sub>6</sub> (650,20): C, 66,50; H, 6,82; N, 6,46. Nalezeno: C, 66,34±0,02; H, 7,01±0,02; N, 6,35±0,02. **HRMS (MALDI-TOF, m/z):** [M+H]<sup>+</sup> vypočteno pro C<sub>36</sub>H<sub>45</sub>ClN<sub>3</sub>O<sub>6</sub>: 650,29914 Da; nalezeno: 650,30134 Da.

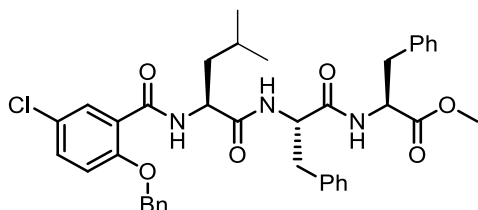
Charakterizace (2*R*)-methyl-2-((2*S*)-2-((2*S*)-2-(2-(benzyloxy)-5-chlorobenzamido)-4-methylpentanamido)-3-fenylpropanamido)-4-methylpentanoát **25e**



Bílá pevná látka; výtěžek 78 %; b.t. 171,4-174,2 °C; [ $\alpha_D^{20}$ ] = -28,7° (c 1,00, EtOAc); R<sub>f</sub> (hex/EtOAc-1/1) = 0,50. <sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>-d<sub>1</sub>): δ 8,07 (1H, d,  $J = 2,4$  Hz, NH-CH-CHH-CH-(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>), 8,05 (1H, d,  $J = 5,2$  Hz, NH-CHCHH-CH-(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>), 7,48 (1H, d,  $J = 2,8$  Hz, NH-CH-CHH-Ph), 7,46-7,38 (5H, m, Ar-H), 7,15-7,01 (6H, m, Ar-H), 6,79 (1H, d,  $J = 8$  Hz, Ar-H), 6,50 (1H, d,  $J = 8$  Hz, Ar-H), 5,13-5,12 (2H, ABq,  $J = 8,2$  Hz, O-CH<sub>2</sub>-Ph), 4,76-4,67 (1H, m, NH-CH-CH<sub>2</sub>-Ph), 4,60-4,52 (1H, m, NH-CH-CHH-CH-(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>), 4,28-4,21 (1H, m, NH-CH-CHH-CH-(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>), 3,69 (3H, s, O-CH<sub>3</sub>), 3,16 (1H, dd,  $J = 6,4$  Hz,  $J = 14,4$  Hz, NH-CH-CHH-Ph), 3,08 (1H, dd,  $J = 7,6$  Hz,  $J = 14,4$  Hz, NH-CH-CHH-Ph), 1,68-1,56 (3H, m, NH-CH-CH<sub>2</sub>-CH-(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>), NH-CH-CHH-CH-(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>), 1,39-1,30 (1H, m, NH-CH-CHH-CH-(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>), 1,23-1,14 (1H, m, NH-CH-CHH-CH-(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>), 1,03-0,96 (1H, m, NH-CH-CHH-CH-(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>), 0,95-0,87 (6H, m, 2xCH<sub>3</sub>), 0,69 (3H, d,  $J = 6,4$  Hz, CH<sub>3</sub>-CH-CH<sub>3</sub>), 0,63 (3H, d,  $J = 6,4$  Hz, CH<sub>3</sub>-CH-CH<sub>3</sub>). <sup>13</sup>C NMR (100,62 MHz, CDCl<sub>3</sub>-d<sub>1</sub>): δ 173,3; 171,7; 170,9; 165,1; 155,8; 136,8; 134,8; 133,3; 132,6; 129,6; 129,4; 129,2; 128,7; 128,6; 127,3; 126,8; 121,8; 114,0; 72,2; 53,6; 52,3; 51,1; 41,0; 39,7; 37,3; 24,8; 23,1; 22,9; 21,9; 21,6. **IR (ATR):** 3064, 2955, 2932, 2870, 1744, 1635, 1536, 1482, 1243, 1216, 1125, 1013, 802, 746, 720, 660 cm<sup>-1</sup>. **CHN analýza:** Vypočteno pro C<sub>36</sub>H<sub>44</sub>ClN<sub>3</sub>O<sub>6</sub> (650,20): C,

66,5; H, 6,82; N, 6,46. Nalezeno: C, 66,67±0,02; H 6,90±0,01; N, 6,45±0,02.  
**HRMS (MALDI-TOF, m/z):**  $[M+Na]^+$  vypočteno pro  $C_{36}H_{44}ClN_3O_6Na$ : 672,28108 Da; nalezeno: 672,28256 Da.

Charakterizace (2*S*)-methyl-2-((2*S*)-2-((2*S*)-2-(2-(benzyloxy)-5-chlorobenzamido)-4-methylpentanamido)-3-fenylpropanamido)-3-fenylpropanoátu **25f**



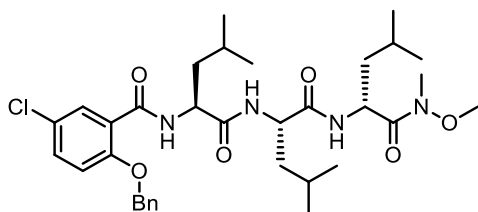
Bílá pevná látka; výtěžek 70 %; b.t. 157-160 °C;  $[\alpha_D^{20}] = -30,0^\circ$  (c 1,00, EtOAc);  $R_f$  (hex/EtOAc-1/1) = 0,42.  **$^1H$  NMR** (400 MHz,  $CDCl_3-d_1$ ):  $\delta$  8,19 (1H, d,  $J = 2,8$  Hz,  $NH-CH-CHH-CH-(CH_3)_2$ ), 8,08 (1H, d,  $J = 6,8$  Hz,  $NH-CH-CHH-Ph$ ), 7,54 (1H, d,  $J = 2,8$  Hz,  $NH-CH-CHH-Ph$ ), 7,52-7,42 (5H, m, Ar- $H$ ), 7,35-7,24 (3H, m, Ar- $H$ ), 7,18\_7,06 (8H, m, Ar- $H$ ), 6,88 (1H, d,  $J = 7,6$  Hz, Ar- $H$ ), 6,61 (1H, d,  $J = 8$  Hz, Ar- $H$ ), 5,20-5,14 (2H, ABq,  $J = 10$  Hz, O- $CH_2-Ph$ ), 4,91-4,83 (1H, m, NH- $CH-CH_2-Ph$ ), 4,72-4,64 (1H, m, NH- $CH-CH_2-Ph$ ), 4,46-4,39 (1H, m, NH- $CH-CHH-CH-(CH_3)_2$ ), 3,74 (3H, s, O- $CH_3$ ), 3,20-3,02 (4H, m, NH-CH- $CH_2-Ph$ , NH-CH- $CH_2-Ph$ ), 1,52-1,43 (1H, m, NH-CH- $CHH-CH-(CH_3)_2$ ), 1,41-1,30 (1H, m, NH-CH- $CHH-CH-(CH_3)_2$ ), 1,17-1,08 (1H, m, NH-CH- $CHH-CH-(CH_3)_2$ ), 0,80 (3H, d,  $J = 6,4$  Hz,  $CH_3-CH-CH_3$ ), 0,70 (3H, d,  $J = 6,4$  Hz,  $CH_3-CH-CH_3$ ).  **$^{13}C$  NMR** (100,62 MHz,  $CDCl_3-d_1$ ):  $\delta$  172,0; 171,6; 170,6; 164,6; 155,7; 136,8; 136,7; 136,1; 134,9; 134,8; 133,1; 132,5; 132,4; 129,5; 129,4; 129,3; 128,7; 128,6; 127,2; 126,8; 122,1; 114,1; 72,1; 54,2; 53,5; 52,5; 52,4; 39,3; 38,0; 37,5; 24,8; 23,0; 21,8. **IR (ATR):** 3283, 2957, 1638, 1529, 1216, 743, 702  $cm^{-1}$ . **CHN analýza:** Vypočteno pro  $C_{39}H_{42}ClN_3O_6$  (684,22): C, 68,46; H, 6,19; N, 6,14. Nalezeno: C, 68,42±0,02; H, 6,22±0,02; N, 6,15±0,02. **HRMS (MALDI-TOF, m/z):**  $[M+H]^+$  vypočteno pro  $C_{39}H_{43}ClN_3O_6$ : 684,28349 Da; nalezeno: 684,28561 Da.

#### Obecný postup přípravy Weinreb amidů 26a-f

Tripeptidové salicylamidy zakončené Weinreb amidovou funkční skupinou (**26a-f**) byly připraveny stejným způsobem za přítomnosti LiHMDS jako dipeptidové Weinreb amidy **17a-d**.<sup>306</sup> Salicylamid methylester **25c** (1,678 g, 2,58 mmol) byl rozpuštěn ve vysekurované trojhrdlé kulaté baňce v suspenzi  $CH_3ONHCH_3 \cdot HCl$

(0,629 g, 6,45 mmol) v suchém tetrahydrofuranu (50 ml) pod inertní N<sub>2</sub> atmosférou. Reakční směs byla vychlazená na -20 °C a v průběhu 20 minut byl za pomoci syringe pumpy přikapán roztok lithium *bis*(trimethylsilyl)amid (LiHMDS, 1M v suchém THF, 18 ml, 18,06 mmol). Reakční směs byla míchána 1 hodiny -20 °C a následně 2 hodiny při -10 °C, poté byla reakční směs odstavena z chlazení a za pozvolného ohřevu byla nechána reagovat 16 hodin. Následně byla ukončena přilítím nasyceného roztoku NH<sub>4</sub>Cl v H<sub>2</sub>O (40 ml) a naředěna Et<sub>2</sub>O (20 ml). Produkt byl extrahován do EtOAc (3 x 40 ml). Kombinované organické fáze byly promyty H<sub>2</sub>O (2 x 30 ml) a vysušeny bezv. Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>. Surový produkt byl přečištěn sloupcovou chromatografií (100 g silikagelu, *n*-hexan/ethyl acetát - 1:2). Výsledný Weinreb amid **26c** byl izolován jako bezbarvý olej v 72% výtěžku.

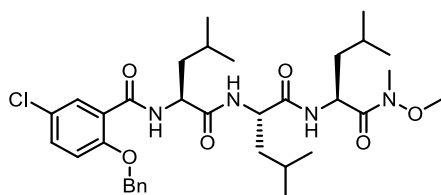
Charakterizace *N*-((5*R*,8*S*,11*S*)-5,8-diizobutyl-3,13-dimethyl-4,7,10-trioxo-2-oxa-3,6,9-triazatetradekan-11-yl)-2-benzyloxy-5-chlorobenzamidu **26a**



Bezbarvá olejovitá látka; výtěžek 83 %;  $[\alpha_D^{20}] = -18,0^\circ$  (c 1,00, EtOAc);  $R_f$  (hex/EtOAc-1/1) = 0,29. **<sup>1</sup>H NMR** (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>-d<sub>1</sub>):  $\delta$  8,24 (1H, d,  $J = 2,8$  Hz, NH-CH-CHH-CH-(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>), 8,20 (1H, d,  $J = 6$  Hz, NH-CH-CHH-CH-(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>), 7,55-7,43 (6H, m, NH-CH-CHH-CH-(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>, Ar-H), 7,09 (1H, d,  $J = 8,8$  Hz, Ar-H), 6,89 (1H, d,  $J = 8,4$  Hz, Ar-H), 6,78 (1H, d,  $J = 8$  Hz, Ar-H), 5,22-5,20 (2H, ABq,  $J = 10,4$  Hz, O-CH<sub>2</sub>-Ph), 5,05-4,93 (1H, m, NH-CH-CHHCH-(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>), 4,58-4,50 (1H, m, NH-CH-CHH-CH-(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>), 4,50-4,43 (1H, m, NH-CH-CHH-CH-(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>), 3,86 (3H, s, O-CH<sub>3</sub>), 3,23 (3H, s, N-CH<sub>3</sub>), 1,85-1,72 (2H, m, 2xNH-CH-CHH-CH-(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>), 1,70-1,63 (1H, m, NH-CH-CHH-CH-(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>), 1,62-1,51 (4H, m, 3xNH-CH-CHH-CH-(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>, NH-CH-CH<sub>2</sub>-CH-(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>), 1,47-1,37 (1H, m, NH-CH-CH<sub>2</sub>-CH-(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>), 1,27-1,18 (1H, m, NH-CH-CH<sub>2</sub>-CH-(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>), 1,01 (3H, d,  $J = 6,4$  Hz, CH<sub>3</sub>-CH-CH<sub>3</sub>), 1,00 (3H, d,  $J = 6,4$  Hz, CH<sub>3</sub>-CH-CH<sub>3</sub>), 0,95 (3H, d,  $J = 6,4$  Hz, CH<sub>3</sub>-CH-CH<sub>3</sub>), 0,91 (3H, d,  $J = 6,4$  Hz, CH<sub>3</sub>-CH-CH<sub>3</sub>), 0,84 (3H, d,  $J = 6,4$  Hz, CH<sub>3</sub>-CH-CH<sub>3</sub>), 0,78 (3H, d,  $J = 6,4$  Hz, CH<sub>3</sub>-CH-CH<sub>3</sub>). **<sup>13</sup>C NMR** (100,62 MHz, CDCl<sub>3</sub>-d<sub>1</sub>):  $\delta$  173,3; 172,3; 172,1; 165,0; 155,7; 134,9; 133,1; 132,5; 129,4; 129,3; 128,7; 127,2; 122,4; 114,1; 72,2; 61,7;

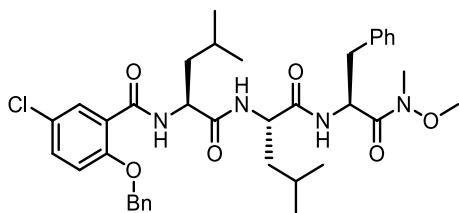
53,2; 51,8; 48,3; 41,2; 40,9; 40,0; 32,4; 25,1; 25,0; 24,9; 23,5; 23,3; 23,1; 21,8; 21,7.  
**IR (ATR):** 3379, 3297, 3067, 2956, 2935, 2870, 1620, 1521, 1467, 1271, 128, 988, 809, 750, 696, 534  $\text{cm}^{-1}$ . **CHN analýza:** Vypočteno pro  $\text{C}_{34}\text{H}_{49}\text{ClN}_4\text{O}_6$  (645,23): C, 63,29; H, 7,65; N, 8,68. Nalezeno: C, 63,08 $\pm$ 0,02; H 7,74 $\pm$ 0,02; N, 8,49 $\pm$ 0,02.  
**HRMS (MALDI-TOF, m/z):**  $[\text{M}+\text{Na}]^+$  vypočteno pro  $\text{C}_{34}\text{H}_{49}\text{ClN}_4\text{O}_6\text{Na}$ : 667,32328 Da; nalezeno: 667,32406 Da.

Charakterizace *N*-((5*S*,8*S*,11*S*)-5,8-diisobutyl-3,13-dimethyl-4,7,10-trioxo-2-oxa-3,6,9-triazatetradekan-11-yl)-2-benzyloxy-5-chlorobenzamidu **26b**



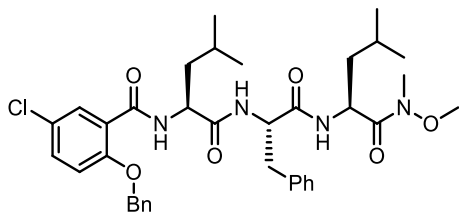
Bezbarvá olejovitá látka; výtěžek 75 %;  $[\alpha_D^{20}] = -39,7^\circ$  (c 1,00, EtOAc);  $R_f$  (hex/EtOAc-1/1) = 0,33.  **$^1\text{H NMR}$**  (400 MHz,  $\text{CDCl}_3\text{-d}_1$ ):  $\delta$  8,16 (1H, d,  $J = 2,8$  Hz,  $\text{NH-CH-CHH-CH-(CH}_3)_2$ ), 8,12 (1H, d,  $J = 7,2$  Hz,  $\text{NH-CH-CHH-CH-(CH}_3)_2$ ), 7,48-7,38 (6H, m,  $\text{NH-CH-CHH-CH-(CH}_3)_2$ , Ar- $\underline{H}$ ), 7,02 (1H, d,  $J = 8,8$  Hz, Ar- $\underline{H}$ ), 6,69 (1H, d,  $J = 8$  Hz, Ar- $\underline{H}$ ), 6,61 (1H, d,  $J = 8$  Hz, Ar- $\underline{H}$ ), 5,16-5,13 (2H, ABq,  $J = 10,4$  Hz, O- $\underline{\text{CH}_2}$ -Ph), 5,30-4,96 (1H, m, NH- $\underline{\text{CH}}$ -CHH-CH-( $\text{CH}_3$ ) $_2$ ), 4,53-4,46 (1H, m, NH- $\underline{\text{CH}}$ -CHH-CH-( $\text{CH}_3$ ) $_2$ ), 4,43-4,35 (1H, m, NH- $\underline{\text{CH}}$ -CHH-CH-( $\text{CH}_3$ ) $_2$ ), 3,78 (3H, s, O- $\underline{\text{CH}_3}$ ), 3,18 (3H, s, N- $\underline{\text{CH}_3}$ ), 1,70-1,45 (7H, m, 3xNH-CH- $\underline{\text{CH}_2}$ -CH-( $\text{CH}_3$ ) $_2$ , NH-CH- $\underline{\text{CH}_2}$ - $\underline{\text{CH}}$ -( $\text{CH}_3$ ) $_2$ ), 1,45-1,34 (1H, m, NH-CH- $\underline{\text{CH}_2}$ - $\underline{\text{CH}}$ -( $\text{CH}_3$ ) $_2$ ), 1,27-1,15 (1H, m, NH-CH- $\underline{\text{CH}_2}$ - $\underline{\text{CH}}$ -( $\text{CH}_3$ ) $_2$ ), 0,93 (3H, d,  $J = 6,8$  Hz,  $\underline{\text{CH}_3}$ -CH- $\underline{\text{CH}_3}$ ), 0,91 (3H, d,  $J = 6,8$  Hz,  $\text{CH}_3$ -CH- $\underline{\text{CH}_3}$ ), 0,87 (3H, d,  $J = 6,4$  Hz,  $\underline{\text{CH}_3}$ -CH- $\underline{\text{CH}_3}$ ), 0,83 (3H, d,  $J = 6,4$  Hz,  $\text{CH}_3$ -CH- $\underline{\text{CH}_3}$ ), 0,80 (3H, d,  $J = 6,4$  Hz,  $\underline{\text{CH}_3}$ -CH- $\underline{\text{CH}_3}$ ), 0,73 (3H, d,  $J = 6,4$  Hz,  $\text{CH}_3$ -CH- $\underline{\text{CH}_3}$ ).  **$^{13}\text{C NMR}$**  (100,62 MHz,  $\text{CDCl}_3\text{-d}_1$ ):  $\delta$  173,0; 172,0; 171,8; 164,5; 155,6; 134,9; 133,0; 132,3; 129,4; 129,3; 128,6; 127,2; 122,5; 114,2; 72,1; 61,7; 52,4; 51,9; 47,8; 41,9; 40,9; 39,3; 32,3; 24,9; 23,5; 23,2; 23,0; 22,0; 21,8. **IR (ATR):** 3293, 2957, 2360, 2342, 1640, 1527, 1468, 1272, 1234, 1122, 990, 809, 749, 696  $\text{cm}^{-1}$ . **CHN analýza:** Vypočteno pro  $\text{C}_{34}\text{H}_{49}\text{ClN}_4\text{O}_6$  (645,23): C, 63,29; H, 7,65; N, 8,68. Nalezeno: C, 63,02 $\pm$ 0,02; H 7,84 $\pm$ 0,02; N, 8,58 $\pm$ 0,02. **HRMS (MALDI-TOF, m/z):**  $[\text{M}+\text{Na}]^+$  vypočteno pro  $\text{C}_{34}\text{H}_{49}\text{ClN}_4\text{O}_6\text{Na}$ : 667,32328 Da; nalezeno: 667,32208 Da.

Charakterizace *N*-((5*S*,8*S*,11*S*)-5-benzyl-8-isobutyl-3,13-dimethyl-4,7,10-trioxo-2-oxa-3,6,9-triazatetradekan-11-yl)-2-benzyl-5-chlorobenzamidu **26c**



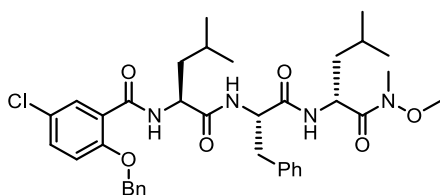
Bezbarvá olejovitá látka; výtěžek 72 %;  $[\alpha_D^{20}] = -29,7^\circ$  (c 1,00, EtOAc);  $R_f$  (hex/EtOAc-1/1) = 0,36. **<sup>1</sup>H NMR** (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>-d<sub>1</sub>): δ 8,18 (1H, d,  $J = 2,4$  Hz,  $\text{NH-CH-CHH-CH-(CH}_3)_2$ ), 8,15 (1H, d,  $J = 6$  Hz,  $\text{NH-CHCHH-CH-(CH}_3)_2$ ), 7,48-7,36 (6H, m,  $\text{NH-CH-CHH-Ph}$ , Ar- $\underline{H}$ ), 7,27-7,23 (2H, m, Ar- $\underline{H}$ ), 7,22-7,17 (1H, m, Ar- $\underline{H}$ ), 7,16-7,12 (2H, m, Ar- $\underline{H}$ ), 7,02 (1H, d,  $J = 7,2$  Hz, Ar- $\underline{H}$ ), 6,95-6,90 (1H, m, Ar- $\underline{H}$ ), 6,85-6,80 (1H, m, Ar- $\underline{H}$ ), 5,25-5,19 (1H, m,  $\text{NH-CH-CHH-Ph}$ ), 5,16-5,13 (2H, ABq,  $J = 7,6$  Hz, O- $\text{CH}_2$ -Ph), 4,56-4,49 (1H, m,  $\text{NH-CH-CHH-CH-(CH}_3)_2$ ), 4,43-4,36 (1H, m,  $\text{NH-CH-CHH-CH-(CH}_3)_2$ ), 3,63 (3H, s, O- $\text{CH}_3$ ), 3,15 (3H, s, N- $\text{CH}_3$ ), 3,10-3,04 (1H, m,  $\text{NH-CH-CHH-Ph}$ ), 2,97-2,91 (1H, m,  $\text{NH-CH-CHH-Ph}$ ), 1,62-1,43 (4H, m, 2 x  $\text{NH-CH-CH}_2\text{-CH-(CH}_3)_2$ ), 1,43-1,35 (1H, m,  $\text{NH-CH-CH}_2\text{-CH-(CH}_3)_2$ ), 1,27-1,18 (1H, m,  $\text{NH-CH-CH}_2\text{-CH-(CH}_3)_2$ ), 0,85 (3H, d,  $J = 5,2$  Hz,  $\text{CH}_3\text{-CH-CH}_3$ ), 0,80 (6H, d,  $J = 4,8$  Hz,  $\text{CH}_3\text{-CH-CH}_3$ ), 0,73 (3H, d,  $J = 5,2$  Hz,  $\text{CH}_3\text{-CH-CH}_3$ ). **<sup>13</sup>C NMR** (100,61 MHz, CDCl<sub>3</sub>-d<sub>1</sub>): δ 172,0; 171,5; 164,6; 155,6; 136,4; 134,9; 133,0; 132,4; 132,1; 129,6; 129,4; 129,3; 128,5; 127,2; 127,0; 122,4; 114,2; 72,1; 61,7; 52,3; 52,0; 50,4; 41,1; 39,7; 38,4; 32,3; 24,8; 23,2; 23,1; 22,0; 21,9. **IR (ATR)**: 3735, 3648, 3628, 3587, 3566, 3300, 2956, 2871, 2360, 2342, 1642, 1525, 1481, 1456, 1272, 1227, 990, 810, 750, 699, 669  $\text{cm}^{-1}$ . **CHN analýza**: Vypočteno pro C<sub>37</sub>H<sub>47</sub>ClN<sub>4</sub>O<sub>6</sub> (679,25): C, 65,42; H, 6,97; N, 8,25. Nalezeno: C, 65,38±0,02; H 6,92±0,01; N, 8,23±0,02. **HRMS (MALDI-TOF, m/z)**: [M+Na]<sup>+</sup> vypočteno pro C<sub>37</sub>H<sub>47</sub>ClN<sub>4</sub>O<sub>6</sub>Na: 701,30763 Da; nalezeno: 701,30860 Da.

Charakterizace *N*-((5*S*,8*S*,11*S*)-8-benzyl-5-isobutyl-3,13-dimethyl-4,7,10-trioxo-2-oxa-3,6,9-triazatetradekan-11-yl)-2-benzyloxy-5-chlorobenzamidu **26d**



Bílá pevná látka; výtěžek 74 %; b.t. 63,3-65,6 °C;  $[\alpha_D^{20}] = -43,9^\circ$  (c 1,00, EtOAc);  $R_f$  (hex/EtOAc-1/1) = 0,35. **<sup>1</sup>H NMR** (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>-d<sub>1</sub>): δ 8,29 (1H, d,  $J = 3$  Hz,  $\text{NH-CH-CHH-CH-(CH}_3)_2$ ), 8,20 (1H, d,  $J = 6,5$  Hz,  $\text{NH-CH-CHH-CH-(CH}_3)_2$ ), 7,67-7,55 (6H, m,  $\text{NH-CH-CHH-Ph}$ , Ar- $\underline{H}$ ), 7,32-7,27 (2H, m, Ar- $\underline{H}$ ), 7,34-7,17 (4H, m, Ar- $\underline{H}$ ), 7,06 (1H, d,  $J = 8$  Hz, Ar- $\underline{H}$ ), 6,84 (1H, d,  $J = 8,5$  Hz, Ar- $\underline{H}$ ), 5,31-5,29 (2H, ABq,  $J = 7,6$  Hz, O- $\text{CH}_2$ -Ph), 5,21-5,15 (1H, m, NH- $\text{CH-CHH-Ph}$ ), 4,88-4,80 (1H, m, NH- $\text{CH-CHH-CH-(CH}_3)_2$ ), 4,64-4,57 (1H, m, NH- $\text{CH-CHH-CH-(CH}_3)_2$ ), 3,96 (3H, s, O- $\text{CH}_3$ ), 3,37 (3H, s, N- $\text{CH}_3$ ), 3,32-3,29 (2H, m, NH-CH- $\text{CH}_2$ -Ph), 1,77-1,58 (4H, m, 2 x NH-CH- $\text{CH}_2$ -CH-(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>), 1,52-1,42 (1H, m, NH-CH-CH<sub>2</sub>- $\text{CH-(CH}_3)_2$ ), 1,29-1,22 (1H, m, NH-CH-CH<sub>2</sub>- $\text{CH-(CH}_3)_2$ ), 1,11 (3H, d,  $J = 6,5$  Hz,  $\text{CH}_3$ -CH-CH<sub>3</sub>), 1,08 (3H, d,  $J = 6,5$  Hz, CH<sub>3</sub>-CH- $\text{CH}_3$ ), 0,92 (3H, d,  $J = 6,5$  Hz,  $\text{CH}_3$ -CH-CH<sub>3</sub>), 0,84 (3H, d,  $J = 6,5$  Hz, CH<sub>3</sub>-CH- $\text{CH}_3$ ). **<sup>13</sup>C NMR** (125,77 MHz, CDCl<sub>3</sub>-d<sub>1</sub>): δ 172,6; 171,7; 170,5; 164,4; 155,5; 136,5; 134,5; 132,9; 132,3; 129,3; 129,2; 128,4; 128,3; 127,0; 126,6; 121,8; 113,8; 71,9; 61,6; 54,0; 52,1; 47,7; 41,5; 39,1; 37,3; 32,1; 24,7; 24,6; 23,3; 22,8; 21,6. **IR (ATR):** 3297, 3067, 2957, 2871, 2362, 1621, 1529, 1500, 1482, 1272, 1234, 1122, 989, 743, 699 cm<sup>-1</sup>. **CHN analýza:** Vypočteno pro C<sub>37</sub>H<sub>47</sub>ClN<sub>4</sub>O<sub>6</sub> (679,25): C, 65,42; H, 6,97; N, 8,25. Nalezeno: C, 65,60±0,02; H 7,00±0,01; N, 8,21±0,02. **HRMS (MALDI-TOF, m/z):** [M+Na]<sup>+</sup> vypočteno pro C<sub>37</sub>H<sub>47</sub>ClN<sub>4</sub>O<sub>6</sub>Na: 701,30763 Da; nalezeno: 701,30958 Da.

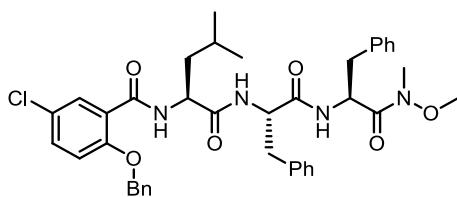
Charakterizace *N*-((5*R*,8*S*,11*S*)-8-benzyl-5-isobutyl-3,13-dimethyl-4,7,10-trioxo-2-oxa-3,6,9-triazatetradekan-11-yl)-2-benzyloxy-5-chlorobenzamidu **26e**



Bezbarvá olejovitá látka; výtěžek 91 %;  $[\alpha_D^{20}] = -27,0^\circ$  (c 1,00, EtOAc);  $R_f$  (hex/EtOAc-1/1) = 0,35. **<sup>1</sup>H NMR** (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>-d<sub>1</sub>): δ 8,23 (1H, d,  $J = 2,8$  Hz,

$\underline{NH}$ -CH-CHH-CH-(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>), 8,09 (1H, d,  $J = 5,6$  Hz,  $\underline{NH}$ -CH-CHH-CH-(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>), 7,53-7,43 (6H, m,  $\underline{NH}$ -CH-CHH-Ph, Ar- $\underline{H}$ ), 7,24-7,11 (5H, m, Ar- $\underline{H}$ ), 7,09 (1H, d,  $J = 8,8$  Hz, Ar- $\underline{H}$ ), 6,92 (1H, d,  $J = 8$  Hz, Ar- $\underline{H}$ ), 6,77 (1H, d,  $J = 8$  Hz, Ar- $\underline{H}$ ), 5,18-5,17 (2H, ABq,  $J = 8,8$  Hz, O- $\underline{CH}_2$ -Ph), 5,02-4,92 (1H, m, NH- $\underline{CH}$ -CHH-Ph), 4,84-4,75 (1H, m, NH- $\underline{CH}$ -CHH-CH-(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>), 4,44-4,36 (1H, m, NH- $\underline{CH}$ -CHH-CH-(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>), 3,87 (3H, s, O- $\underline{CH}_3$ ), 3,35-3,20 (4H, m, N- $\underline{CH}_3$ , NH-CH-CHH-Ph), 3,01 (1H, dd,  $J = 8,4$  Hz,  $J = 14$  Hz, NH-CH- $\underline{CHH}$ -Ph), 1,68-1,45 (3H, m, NH-CH- $\underline{CH}_2$ -CH-(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>, NH-CH- $\underline{CHH}$ -CH-(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>), 1,44-1,35 (1H, m, NH-CH- $\underline{CHH}$ -CH-(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>), 1,34-1,25 (1H, m, NH-CH-CH<sub>2</sub>- $\underline{CH}$ -(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>), 1,11-1,01 (1H, m, NH-CH-CH<sub>2</sub>- $\underline{CH}$ -(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>), 0,98 (3H, d,  $J = 6,4$  Hz,  $\underline{CH}_3$ -CH-CH<sub>3</sub>), 0,97 (3H, d,  $J = 6,4$  Hz, CH<sub>3</sub>-CH- $\underline{CH}_3$ ), 0,77 (3H, d,  $J = 6,4$  Hz,  $\underline{CH}_3$ -CH-CH<sub>3</sub>), 0,70 (3H, d,  $J = 6,4$  Hz, CH<sub>3</sub>-CH- $\underline{CH}_3$ ). <sup>13</sup>C NMR (100,79 MHz, CDCl<sub>3</sub>-d<sub>1</sub>):  $\delta$  173,1; 171,9; 171,1; 164,9; 155,7; 137,0; 134,8; 133,1; 132,7; 129,4; 129,32; 129,27; 128,64; 128,59; 127,2; 126,8; 122,2; 114,0; 72,1; 61,7; 54,1; 53,0; 48,4; 41,2; 39,7; 38,0; 32,4; 24,83; 24,78; 23,5; 23,0; 21,8; 21,7. IR (ATR): 3377, 3293, 3064, 2955, 2933, 2869, 1630, 1519, 1481, 1467, 1385, 1270, 1226, 987, 808, 744, 697, 534 cm<sup>-1</sup>. CHN analýza: Vypočteno pro C<sub>37</sub>H<sub>47</sub>ClN<sub>4</sub>O<sub>6</sub> (679,25): C, 65,42; H, 6,97; N, 8,25. Nalezeno: C, 65,63±0,02; H 7,01±0,01; N, 8,17±0,02. HRMS (MALDI-TOF, m/z): [M+Na]<sup>+</sup> vypočteno pro C<sub>37</sub>H<sub>47</sub>ClN<sub>4</sub>O<sub>6</sub>Na: 701,30763 Da; nalezeno: 701,30889 Da.

Charakterizace *N*-((5*S*,8*S*,11*S*)-5,8-dibenzyl-3,13-dimethyl-4,7,10-trioxo-2-oxa-3,6,9-triazatetradekan-11-yl)-2-benzyloxy-5-chlorobenzamidu **26f**



Bílá pevná látka; výtěžek 74 %; b.t. 72,8-76,5 °C;  $[\alpha_D^{20}] = -35,1^\circ$  (c 1,00, EtOAc);  $R_f$  (hex/EtOAc-1/1) = 0,38. <sup>1</sup>H NMR (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>-d<sub>1</sub>):  $\delta$  8,36 (1H, d,  $J = 2,5$  Hz,  $\underline{NH}$ -CH-CHH-CH-(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>), 8,19 (1H, d,  $J = 7$  Hz,  $\underline{NH}$ -CH-CHH-Ph), 7,67-7,55 (6H, m,  $\underline{NH}$ -CH-CHH-Ph, Ar- $\underline{H}$ ), 7,47-7,37 (3H, m, Ar- $\underline{H}$ ), 7,32-7,25 (4H, m, Ar- $\underline{H}$ ), 7,24-7,20 (4H, m, Ar- $\underline{H}$ ), 7,07 (1H, d,  $J = 7,5$  Hz, Ar- $\underline{H}$ ), 6,84 (1H, d,  $J = 8$  Hz, Ar- $\underline{H}$ ), 5,43-5,35 (1H, m, NH- $\underline{CH}$ -CHH-Ph), 5,31-5,29 (2H, ABq,  $J = 7,6$  Hz, O- $\underline{CH}_2$ -Ph), 4,83-4,77 (1H, m, NH- $\underline{CH}$ -CHH-Ph), 4,65-4,57 (1H, m, NH- $\underline{CH}$ -CHH-CH-(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>), 3,83 (3H, s, O- $\underline{CH}_3$ ), 3,34 (3H, s, N- $\underline{CH}_3$ ), 3,28-3,22 (2H, m, NH-CH- $\underline{CH}_2$ -Ph), 3,16-3,05 (2H, m,



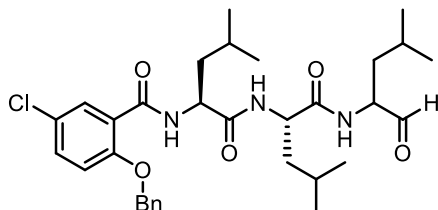
NH-CH-CH<sub>2</sub>-Ph), 1,65-1,57 (1H, m, NH-CH-CHH-CH-(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>), 1,54-1,43 (1H, m, NH-CH-CH<sub>2</sub>-CH-(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>), 1,32-1,25 (1H, m, NH-CH-CHH-CH-(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>), 0,94 (3H, d,  $J = 6,5$  Hz, CH<sub>3</sub>-CH-CH<sub>3</sub>), 0,86 (3H, d,  $J = 6,5$  Hz, CH<sub>3</sub>-CH-CH<sub>3</sub>). <sup>13</sup>C NMR (125,78 MHz, CDCl<sub>3</sub>-d<sub>1</sub>):  $\delta$  171,9; 171,2; 170,2; 164,4; 155,5; 136,5; 136,3; 134,6; 132,9; 132,4; 129,4; 129,24; 129,20; 129,16; 128,4; 128,3; 127,0; 126,9; 126,6; 122,0; 113,9; 71,9; 61,6; 54,1; 52,0; 50,3; 39,0; 38,2; 37,6; 32,0; 24,6; 22,9; 21,6. **IR (ATR):** 3307, 3064, 3031, 2955, 2360, 2342, 1645, 1522, 1272, 1230, 989, 810, 744, 699 cm<sup>-1</sup>. **CHN analýza:** Vypočteno pro C<sub>40</sub>H<sub>45</sub>ClN<sub>4</sub>O<sub>6</sub> (713,26): C, 67,21; H, 6,36; N, 7,86. Nalezeno: C, 67,21±0,01; H 6,31±0,01; N, 7,86±0,02. **HRMS (MALDI-TOF, m/z):** [M+Na]<sup>+</sup> vypočteno pro C<sub>40</sub>H<sub>45</sub>ClN<sub>4</sub>O<sub>6</sub>Na: 735,29198 Da; nalezeno: 735,29319 Da.

#### Obecný postup pro přípravu aldehydů, 27a-i

Redukce tripeptidového Weinreb amidu **26a-f** na aldehyd **27a-i** je prováděna za podobných podmínek jako redukce dipeptidového Weinreb amidu **17a-d** aldehydy **22a-d**.<sup>325</sup>

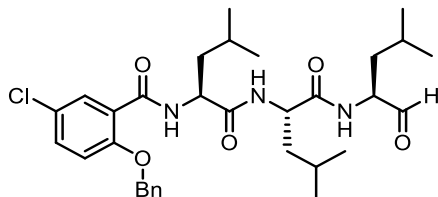
Weinreb amid **26c** (0,9 g, 1,3 mmol) byl rozpuštěn ve v bezvodém THF (60 ml) a vychlazen na -8 °C. Poté bylo najednou přidáno LiAlH<sub>4</sub> (0,089 g, 2,21 mmol). Reakce byla po 6 hodinách míchání při -8 °C ukončena přilitím nasyceného roztoku NH<sub>4</sub>Cl (20 ml), THF (40 ml), vody (30 ml) a 10% HCl (1 ml). Oddělená vodná frakce byla promyta EtOAc (3 x 30 ml). Spojené organické frakce byly promyty vodou (2 x 30 ml) a vysušeny bezv. Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>. Za sníženého tlaku bylo na RVO odstraněno rozpouštědlo do konstantní hmotnosti. Surový produkt nebyl po extrakcích dostatečně čistý, proto byl dále přečištěn sloupcovou chromatografií (40 g silikagelu, n-hexan/ethyl acetát-1/1). U aldehydu **27d** došlo v důsledku kontaktu se silikagelem k racemizaci na poslední aminokyselině peptidového řetězce, proto byl produkt izolován jako směs dvou diastereoizomerů ve výtěžku 69 %. Pokud aldehyd nebyl čištěn sloupcovou chromatografií, k racemizaci nedocházelo a produkt byl izolován jako čistý diastereoizomer.

Charakterizace 2-benzyloxy-5-chloro-*N*-((2*S*)-4-methyl-1-(((2*S*)-4-methyl-1-((4-methyl-1-oxopentan-2-yl)amino)-1-oxopentan-2-yl)amino)-1-oxopentan-2-yl)benzamidu **27a**



Produkt je směsí dvou diastereomerů, A a B. Bílá pevná látka; výtěžek 65 %; b.t. 62,6-66,2 °C;  $[\alpha_D^{20}] = -11,9^\circ$  (c 1,00, EtOAc);  $R_f$  (hex/EtOAc-1/1) = 0,53. **<sup>1</sup>H NMR** (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>-d<sub>1</sub>): δ 9,53-9,48 (1H, m, (CHO)<sub>A+B</sub>), 8,25-8,05 (2H, m, 2 x (NH-CH-CHH-CH-(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>)<sub>A+B</sub>), 7,55-7,35 (6H, m, (NH-CH-CHH-CH-(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>)<sub>A+B</sub>), (Ar-H)<sub>A+B</sub>), 7,1-7,05 (1H, m, (Ar-H)<sub>A+B</sub>), 7,05-6,90 (1H, m, (Ar-H)<sub>A+B</sub>), 6,60 (1H, m, (Ar-H)<sub>A+B</sub>), 5,24-5,06 (2H, m, (O-CH<sub>2</sub>-Ph)<sub>A+B</sub>), 4,50-4,20 (3H, m, 3 x (NH-CH-CH<sub>2</sub>-CH-(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>)<sub>A+B</sub>), 1,82-1,10 (9H, m 3 x (NH-CH-CH<sub>2</sub>-CH-(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>)<sub>A+B</sub>), 1,00-0,80 (12H, m, 4 x (CH<sub>3</sub>)<sub>A+B</sub>), 0,73-0,72 (3H, m, (CH<sub>3</sub>)<sub>A+B</sub>), 0,71-0,70 (3H, m, (CH<sub>3</sub>)<sub>A+B</sub>). **<sup>13</sup>C NMR** (100,62 MHz, CDCl<sub>3</sub>-d<sub>1</sub>): δ 200,35; 200,03; 172,47; 172,37; 172,23; 165,28; 165,00; 155,79; 155,75; 134,77; 133,43; 133,37; 132,4; 132,26; 132,07; 129,60; 129,55; 129,01; 128,88; 127,38; 127,35; 121,98; 121,91; 114,2; 72,26; 72,21; 57,52; 57,40; 53,64; 53,15; 52,03; 51,8; 40,13; 39,97; 39,91; 37,91; 37,44; 29,88; 25,17; 24,96; 24,89; 24,80; 23,31; 23,25; 23,16; 23,02; 22,99; 21,94; 21,88; 21,83; 21,74; 21,71. **IR (ATR):** 3289, 3069, 2957, 2871, 1733, 1635, 1537, 1483, 1468, 1272, 1245, 1123, 1007, 809, 752, 697 cm<sup>-1</sup>. **CHN analýza:** Vypočteno pro C<sub>32</sub>H<sub>44</sub>ClN<sub>3</sub>O<sub>5</sub> (586,16): C, 65,57; H, 7,57; N, 7,17. Nalezeno: C, 65,54±0,01; H 7,79±0,01; N, 7,24±0,01. **HRMS (MALDI-TOF, m/z):** [M+Na]<sup>+</sup> vypočteno pro C<sub>32</sub>H<sub>44</sub>ClN<sub>3</sub>O<sub>5</sub>Na: 608,28617 Da; nalezeno: 608,25668 Da.

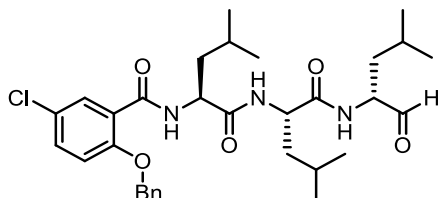
Charakterizace 2-benzyloxy-5-chloro-*N*-((2*S*)-4-methyl-1-(((2*S*)-4-methyl-1-(((2*S*)-4-methyl-1-oxopentan-2-yl)amino)-1-oxopentan-2-yl)amino)-1-oxopentan-2-yl)benzamidu **27b**



Bílá pevná látka; výtěžek 75 %; b.t. 60,6-65,2 °C;  $[\alpha_D^{20}] = -22,9^\circ$  (c 1,00, EtOAc);  $R_f$  (hex/EtOAc-1/1) = 0,53. **<sup>1</sup>H NMR** (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>-d<sub>1</sub>): δ 9,54 (1H, s, CHO), 8,24 (1H,

d,  $J = 5,6$  Hz,  $\text{NH-CH-CHH-CH-(CH}_3)_2$ ), 8,19 (1H, d,  $J = 2,8$  Hz,  $\text{NH-CH-CHH-CH-(CH}_3)_2$ ), 7,58-7,40 (6H, m,  $\text{NH-CH-CHH-CH-(CH}_3)_2$ , Ar- $\underline{H}$ ), 7,13 (1H, d,  $J = 8,8$  Hz, Ar- $\underline{H}$ ), 7,10-7,04 (1H, m, Ar- $\underline{H}$ ), 6,55 (1H, d,  $J = 7,6$  Hz, Ar- $\underline{H}$ ), 5,24-5,21 (2H, ABq,  $J = 9,2$  Hz, O- $\text{CH}_2$ -Ph), 4,55-4,38 (3H, m, 3 x NH- $\text{CH-CHH-CH-(CH}_3)_2$ ), 1,90-1,80 (1H, m, NH-CH- $\text{CHH-CH-(CH}_3)_2$ ), 1,80-1,70 (2H, m, NH-CH- $\text{CH}_2$ -CH-( $\text{CH}_3)_2$ ), 1,70-1,50 (4H, m, 3 x NH-CH- $\text{CHH-CH-(CH}_3)_2$ , NH-CH- $\text{CH}_2$ -CH-( $\text{CH}_3)_2$ ), 1,48-1,35 (1H, m, NH-CH- $\text{CH}_2$ -CH-( $\text{CH}_3)_2$ ), 1,26-1,16 (1H, m, NH-CH- $\text{CH}_2$ -CH-( $\text{CH}_3)_2$ ), 1,08-0,95 (9H, m, 3 x  $\text{CH}_3$ ), 0,92 (3H, d,  $J = 6,4$  Hz,  $\text{CH}_3$ ), 0,84 (3H, d,  $J = 6,4$  Hz,  $\text{CH}_3$ ), 0,78 (3H, d,  $J = 6,4$  Hz,  $\text{CH}_3$ ).  $^{13}\text{C NMR}$  (100,62 MHz,  $\text{CDCl}_3$ - $\text{d}_1$ ):  $\delta$  200,3; 172,4; 165,0; 155,7; 134,8; 133,4; 132,3; 129,6; 129,5; 129,4; 128,8; 128,7; 127,4; 122,0; 114,2; 72,2; 57,4; 53,2; 52,0; 40,1; 39,9; 37,7; 37,4; 29,9; 25,2; 25,1; 24,9; 24,8; 23,3; 23,2; 23,0; 21,9. **IR (ATR)**: 3289, 3069, 2957, 2871, 1733, 1635, 1537, 1483, 1468, 1272, 1245, 1123, 1007, 809, 752, 697  $\text{cm}^{-1}$ . **CHN analýza**: Vypočteno pro  $\text{C}_{32}\text{H}_{44}\text{ClN}_3\text{O}_5$  (586,16): C, 65,57; H, 7,57; N, 7,17. Nalezeno: C, 65,52 $\pm$ 0,01; H 7,69 $\pm$ 0,02; N, 7,14 $\pm$ 0,02. **HRMS (MALDI-TOF, m/z)**:  $[\text{M}+\text{Na}]^+$  vypočteno pro  $\text{C}_{32}\text{H}_{44}\text{ClN}_3\text{O}_5\text{Na}$ : 608,28617 Da; nalezeno: 608,25662 Da.

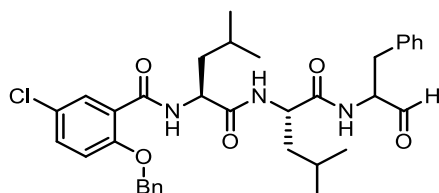
Charakterizace 2-benzyloxy-5-chloro-*N*-((2*S*)-4-methyl-1-(((2*S*)-4-methyl-1-(((2*R*)-4-methyl-1-oxopentan-2-yl)amino)-1-oxopentan-2-yl)amino)-1-oxopentan-2-yl)benzamidu **27c**



Bezbarvá olejovitá látka; výtěžek 52 %;  $[\alpha_D^{20}] = -13,5^\circ$  (c 1,00, EtOAc);  $R_f$  (hex/EtOAc-2/1) = 0,51.  $^1\text{H NMR}$  (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ - $\text{d}_1$ ):  $\delta$  9,54 (1H, s,  $\text{CHO}$ ), 8,25 (1H, d,  $J = 5,2$  Hz,  $\text{NH-CH-CHH-CH-(CH}_3)_2$ ), 8,15 (1H, d,  $J = 2,8$  Hz,  $\text{NH-CH-CHH-CH-(CH}_3)_2$ ), 7,58-7,40 (6H, m,  $\text{NH-CH-CHH-CH-(CH}_3)_2$ , Ar- $\underline{H}$ ), 7,13 (1H, d,  $J = 8,8$  Hz, Ar- $\underline{H}$ ), 7,07 (1H, d,  $J = 7,6$  Hz, Ar- $\underline{H}$ ), 6,55 (1H, d,  $J = 8,4$  Hz, Ar- $\underline{H}$ ), 5,23-5,21 (2H, ABq,  $J = 9,2$  Hz, O- $\text{CH}_2$ -Ph), 4,57-4,45 (2H, m, 2 x NH- $\text{CH-CHH-CH-(CH}_3)_2$ ), 4,44-4,36 (1H, m, NH- $\text{CH-CHH-CH-(CH}_3)_2$ ), 1,92-1,69 (3H, m, 3 x NH-CH- $\text{CHH-CH-(CH}_3)_2$ ), 1,65-1,50 (4H, m, 3 x NH-CH- $\text{CHH-CH-(CH}_3)_2$ , NH-CH- $\text{CH}_2$ -CH-( $\text{CH}_3)_2$ ), 1,43-1,35 (1H, m, NH-CH- $\text{CH}_2$ -CH-( $\text{CH}_3)_2$ ), 1,25-1,15 (1H, m, NH-CH- $\text{CH}_2$ -CH-( $\text{CH}_3)_2$ ), 1,03 (3H, d,  $J = 6,4$  Hz,  $\text{CH}_3$ -CH- $\text{CH}_3$ ), 1,00 (3H, d,  $J = 6,4$  Hz,  $\text{CH}_3$ -CH- $\text{CH}_3$ ),

0,97 (3H, d,  $J = 6,4$  Hz,  $\underline{\text{CH}}_3\text{-CH-CH}_3$ ), 0,92 (3H, d,  $J = 6,4$  Hz,  $\text{CH}_3\text{-CH-}\underline{\text{CH}}_3$ ), 0,83 (3H, d,  $J = 6,4$  Hz,  $\underline{\text{CH}}_3\text{-CH-}\underline{\text{CH}}_3$ ), 0,77 (3H, d,  $J = 6,4$  Hz,  $\text{CH}_3\text{-CH-CH}_3$ ).  $^{13}\text{C NMR}$  (100,62 MHz,  $\text{CDCl}_3\text{-d}_1$ ):  $\delta$  200,0; 172,5; 172,2; 165,3; 155,8; 134,8; 133,4; 132,3; 129,6; 129,4; 128,7; 127,4; 121,9; 114,2; 72,3; 57,5; 53,6; 51,8; 40,2; 40,0; 37,4; 25,2; 25,0; 24,9; 23,3; 23,2; 23,0; 21,9; 21,74; 21,70. **IR (ATR):** 3280, 3067, 3036, 2955, 2930, 2870, 1734, 1625, 1526, 1499, 1481, 1467, 1385, 1270, 1226, 1122, 1001, 808, 745, 696  $\text{cm}^{-1}$ . **CHN analýza:** Vypočteno pro  $\text{C}_{32}\text{H}_{44}\text{ClN}_3\text{O}_5$  (586,16): C, 65,57; H, 7,57; N, 7,17. Nalezeno: C, 65,46 $\pm$ 0,02; H 7,69 $\pm$ 0,02; N, 7,14 $\pm$ 0,02. **HRMS (MALDI-TOF, m/z):**  $[\text{M}+\text{Na}]^+$  vypočteno pro  $\text{C}_{32}\text{H}_{44}\text{ClN}_3\text{O}_5\text{Na}$ : 608,28617 Da; nalezeno: 608,28723 Da.

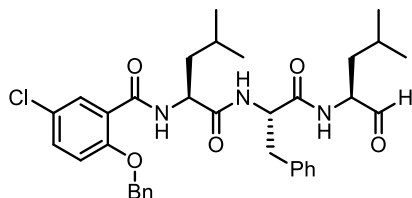
Charakterizace 2-benzyloxy-5-chloro-*N*-((*S*)-4-methyl-1-(((*S*)-4-methyl-1-oxo-1-((1-oxo-3-fenylpropan-2-yl)amino)pentan-2-yl)amino)-1-oxopentan-2-yl)benzamidu **27d**



Produkt je směsí dvou diastereomerů, A a B. Bílá pevná látka; výtěžek 69 %; b.t. 141,3 151,7 °C;  $[\alpha_D^{20}] = -13,9^\circ$  (c 1,00, EtOAc)  $R_f(\text{hex/EtOAc-1/1}) = 0,35$ .  $^1\text{H NMR}$  (400 MHz,  $\text{CDCl}_3\text{-d}_1$ ):  $\delta$  9,60-9,55 (1H, m, ( $\underline{\text{CHO}}$ )<sub>A+B</sub>), 8,70-8,08 (2H, m, 2 x ( $\underline{\text{NH}}\text{-CHH-CH-}(\text{CH}_3)_2$ )<sub>A+B</sub>), 7,50-7,39 (6H, m, ( $\underline{\text{NH}}\text{-CH-CH}_2\text{-Ph}$ )<sub>A+B</sub>, ( $\text{Ar-}\underline{\text{H}}$ )<sub>A+B</sub>), 7,30-7,12 (5H, m, ( $\text{Ar-}\underline{\text{H}}$ )<sub>A+B</sub>), 7,08-6,92 (2H, m, ( $\text{Ar-}\underline{\text{H}}$ )<sub>A+B</sub>), 6,70-6,58 (1H, m, ( $\text{Ar-}\underline{\text{H}}$ )<sub>A+B</sub>), 5,20-5,19 (2H, m, ( $\text{O-}\underline{\text{CH}}_2\text{-Ph}$ )<sub>A+B</sub>), 4,67-4,58 (1H, m, ( $\text{NH-}\underline{\text{CH}}\text{-CH}_2\text{-Ph}$ )<sub>A+B</sub>), 4,45-4,32 (2H, m, 2 x ( $\text{NH-}\underline{\text{CH}}\text{-CHH-CH-}(\text{CH}_3)_2$ )<sub>A+B</sub>), 3,24-3,03 (2H, m, ( $\text{NH-CH-}\underline{\text{CH}}_2\text{-Ph}$ )<sub>A+B</sub>), 1,75-1,61 (1H, m, ( $\text{NH-CH-CHH-CH-}(\text{CH}_3)_2$ )<sub>A+B</sub>), 1,55-1,30 (4H, m, ( $\text{NH-CH-}\underline{\text{CHH}}\text{-CH-}(\text{CH}_3)_2$ )<sub>A+B</sub>, ( $\text{NH-CH-}\underline{\text{CHH}}\text{-CH-}(\text{CH}_3)_2$ )<sub>A+B</sub>), 1,23-1,11 (1H, m, ( $\text{NH-CH-CHH-}\underline{\text{CH}}\text{-}(\text{CH}_3)_2$ )<sub>A+B</sub>), 1,00-0,65 (12H, m, 4 x ( $\underline{\text{CH}}_3$ )<sub>A+B</sub>).  $^{13}\text{C NMR}$  (100,79 MHz,  $\text{CDCl}_3\text{-d}_1$ ):  $\delta$  199,21; 199,16; 172,36; 172,26; 172,20; 165,03; 164,92; 155,74; 155,70; 136,19; 136,10; 134,82; 133,29; 132,31; 132,26; 129,5; 129,47; 129,43; 129,35; 128,87; 128,67; 128,62; 127,31; 127,17; 122,10; 122,07; 114,20; 72,19; 60,02; 59,75; 53,12; 52,81; 52,12; 51,81; 40,44; 39,86; 39,66; 35,14; 35,08; 25,15; 25,00; 24,99; 24,87; 23,11; 23,03; 21,89; 21,83. **IR (ATR):** 3292, 2957, 2360, 2341, 1652, 1646, 1539, 1522, 1272, 1232, 748, 699  $\text{cm}^{-1}$ . **CHN analýza:** Vypočteno pro  $\text{C}_{35}\text{H}_{42}\text{ClN}_3\text{O}_5$  (620,18): C, 67,78; H, 6,3; N, 6,78. Nalezeno: C, 67,57 $\pm$ 0,01; H 6,91 $\pm$ 0,01; N, 6,69 $\pm$ 0,01.

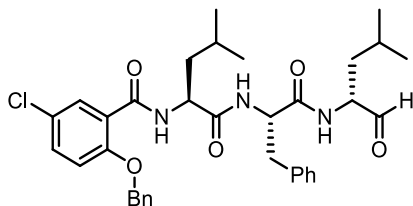
**HRMS (MALDI-TOF, m/z):**  $[M+Na]^+$  vypočteno pro  $C_{35}H_{42}ClN_3O_5Na$ : 642,27052 Da; nalezeno: 642,27215 Da.

Charakterizace 2-benzyloxy-5-chloro-*N*-((2*S*)-4-methyl-1-(((2*S*)-1-(((2*S*)-4-methyl-1-oxopentan-2-yl)amino)-1-oxo-3-fenylpropan-2-yl)amino)-1-oxopentan-2-yl)benzamidu **27e**



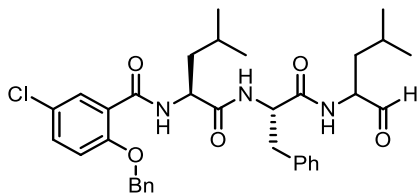
Bezbarvá olejovitá látka; výtěžek 20 %;  $[\alpha_D^{20}] = -50,7^\circ$  (c 1,00, EtOAc);  $R_f$  (hex/EtOAc-1/1) = 0,50.  **$^1H$  NMR** (400 MHz,  $CD_2Cl_2-d_2$ ):  $\delta$  9,50 (1H, s,  $\underline{CHO}$ ), 8,22 (1H, d,  $J = 4,8$  Hz,  $\underline{NH}$ -CH-CHH-CH-( $CH_3$ )<sub>2</sub>), 7,99 (1H, d,  $J = 2,8$  Hz,  $\underline{NH}$ -CH-CHH-CH-( $CH_3$ )<sub>2</sub>), 7,65-7,48 (6H, m,  $\underline{NH}$ -CH-CHH-Ph, Ar- $\underline{H}$ ), 7,25-6,95 (7H, m, Ar- $\underline{H}$ ), 6,49 (1H, d,  $J = 8$  Hz, Ar- $\underline{H}$ ), 5,28-5,25 (2H, ABq,  $J = 10,4$  Hz, O- $\underline{CH_2}$ -Ph), 4,73-4,63 (1H, m, NH- $\underline{CH}$ -CHH-Ph), 4,40-4,32 (1H, m, NH- $\underline{CH}$ -CHH-CH-( $CH_3$ )<sub>2</sub>), 4,30-4,20 (1H, m, NH- $\underline{CH}$ -CHH-CH-( $CH_3$ )<sub>2</sub>), 3,27-3,10 (2H, m, NH-CH- $\underline{CH_2}$ -Ph), 1,70-1,52 (3H, m, NH-CH- $\underline{CH_2}$ -CH-( $CH_3$ )<sub>2</sub>, NH-CH-CH $\underline{2}$ - $\underline{CH}$ -( $CH_3$ )<sub>2</sub>), 1,50-1,40 (1H, m, NH-CH- $\underline{CHH}$ -CH-( $CH_3$ )<sub>2</sub>), 1,35-1,25 (1H, m, NH-CH-C- $\underline{HH}$ -CH-( $CH_3$ )<sub>2</sub>), 1,20-1,11 (1H, m, NH-CH-CH $\underline{2}$ - $\underline{CH}$ -( $CH_3$ )<sub>2</sub>), 1,03 (3H, d,  $J = 6$  Hz,  $\underline{CH_3}$ -CH- $\underline{CH_3}$ ), 1,00 (3H, d,  $J = 6$  Hz,  $\underline{CH_3}$ -CH- $\underline{CH_3}$ ), 0,79 (3H, d,  $J = 6,4$  Hz,  $\underline{CH_3}$ -CH- $\underline{CH_3}$ ), 0,74 (3H, d,  $J = 6,4$  Hz,  $\underline{CH_3}$ -CH- $\underline{CH_3}$ ).  **$^{13}C$  NMR** (100,79 MHz,  $CD_2Cl_2-d_2$ ):  $\delta$  200,8; 171,5; 171,4; 165,1; 156,0; 136,5; 134,9; 133,5; 132,0; 129,6; 129,4; 129,1; 128,8; 128,6; 127,0; 125,6; 121,5; 114,3; 72,3; 57,5; 53,8; 39,6; 37,3; 36,8; 30,3; 24,8; 24,5; 23,2; 22,7; 21,4; 21,3 **IR (ATR):** 3276, 3066, 2957, 2871, 1734, 1635, 1598, 1541, 1271, 1246, 1124, 1008, 811, 750, 697  $cm^{-1}$ . **CHN analýza:** Vypočteno pro  $C_{35}H_{42}ClN_3O_5$  (620,17): C, 67,78; H, 6,83; N, 6,78. Nalezeno: C, 67,59 $\pm$ 0,01; H 6,89 $\pm$ 0,02; N, 6,69 $\pm$ 0,02. **HRMS (MALDI-TOF, m/z):**  $[M+Na]^+$  vypočteno pro  $C_{35}H_{42}ClN_3O_5Na$ : 642,27052 Da; nalezeno: 642,27185 Da.

Charakterizace 2-benzyloxy-5-chloro-*N*-((2*S*)-4-methyl-1-(((2*S*)-1-(((2*R*)-4-methyl-1-oxopentan-2-yl)amino)-1-oxo-3-fenylpropan-2-yl)amino)-1-oxopentan-2-yl)benzamidu **27f**



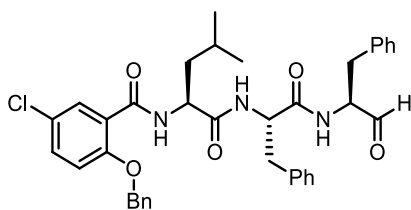
Bílá pevná látka; výtěžek 46 %; b.t. 147,5-151 °C;  $[\alpha_D^{20}] = -28,9^\circ$  (c 1,00, EtOAc);  $R_f$  (hex/EtOAc-1/1) = 0,46.  $^1\text{H NMR}$  (400 MHz,  $\text{CDCl}_3\text{-d}_1$ ):  $\delta$  9,52 (1H, s,  $\text{CHO}$ ), 8,16 (1H, d,  $J = 4,8$  Hz,  $\text{NH-CH-CHH-CH-(CH}_3)_2$ ), 8,02 (1H, d,  $J = 2,8$  Hz,  $\text{NH-CH-CHH-CH-(CH}_3)_2$ ), 7,58-7,438 (6H, m,  $\text{NH-CH-CHH-Ph}$ , Ar- $\underline{H}$ ), 7,27-7,22 (1H, m, Ar- $\underline{H}$ ), 7,20-7,11 (4H, m, Ar- $\underline{H}$ ), 7,10-7,05 (1H, m, Ar- $\underline{H}$ ), 7,04-7,00 (1H, m, Ar- $\underline{H}$ ), 6,56 (1H, d,  $J = 8,4$  Hz, Ar- $\underline{H}$ ), 5,22-5,19 (2H, ABq,  $J = 12,6$  Hz, O- $\text{CH}_2\text{-Ph}$ ), 4,81-4,72 (1H, m, NH- $\text{CH-CHH-Ph}$ ), 4,49-4,42 (1H, m, NH- $\text{CH-CHH-CH-(CH}_3)_2$ ), 4,32-4,25 (1H, m, NH- $\text{CH-CHH-CH-(CH}_3)_2$ ), 3,27-3,10 (2H, m, NH-CH- $\text{CH}_2\text{-Ph}$ ), 1,76-1,65 (2H, m, 2 x NH-CH- $\text{CHH-CH-(CH}_3)_2$ ), 1,65-1,53 (1H, m, NH-CH- $\text{CHH-CH-(CH}_3)_2$ ), 1,48-1,39 (1H, m, NH-CH- $\text{CHH-CH-(CH}_3)_2$ ), 1,30-1,20 (1H, m, NH-CH- $\text{CH}_2\text{-CH-(CH}_3)_2$ ), 1,13-1,03 (1H, m, NH-CH- $\text{CH}_2\text{-CH-(CH}_3)_2$ ), 1,03-0,97 (6H, m, 2 x  $\text{CH}_3$ ), 0,75 (3H, d,  $J = 6,4$  Hz,  $\text{CH}_3\text{-CH-CH}_3$ ), 0,69 (3H, d,  $J = 6,4$  Hz,  $\text{CH}_3\text{-CH-CH}_3$ ).  $^{13}\text{C NMR}$  (100,79 MHz,  $\text{CDCl}_3\text{-d}_1$ ):  $\delta$  199,8; 171,7; 171,4; 165,2; 155,8; 136,5; 134,7; 133,4; 132,5; 129,7; 129,4; 129,2; 128,8; 128,7; 127,4; 127,0; 121,5; 114,0; 72,3; 57,6; 53,7; 53,7; 39,7; 37,4; 37,1; 24,9; 24,7; 23,3; 23,0; 21,8; 21,6. **IR (ATR)**: 3279, 3065, 3033, 2956, 2929, 2869, 1733, 1635, 1531, 1498, 1482, 1466, 1384, 1270, 1243, 1006, 808, 746, 696  $\text{cm}^{-1}$ . **CHN analýza**: Vypočteno pro  $\text{C}_{35}\text{H}_{42}\text{ClN}_3\text{O}_5$  (620,17): C, 67,78; H, 6,83; N, 6,78. Nalezeno: C, 67,78 $\pm$ 0,02; H 6,87 $\pm$ 0,01; N, 6,71 $\pm$ 0,02. **HRMS (MALDI-TOF, m/z)**:  $[\text{M}+\text{H}]^+$  vypočteno pro  $\text{C}_{35}\text{H}_{43}\text{ClN}_3\text{O}_5$ : 620,28858 Da; nalezeno: 620,28986 Da.

Charakterizace 2-benzyloxy-5-chloro-*N*-((2*S*)-4-methyl-1-(((2*S*)-1-((4-methyl-1-oxopentan-2-yl)amino)-1-oxo-3-fenylpropan-2-yl)amino)-1-oxo-3-fenylpropan-2-yl)benzamidu **27g**



Produkt je směsí dvou diastereomerů, A a B. Bezbarvá olejovitá látka; výtěžek 30 %;  $[\alpha_D^{20}] = -25,2^\circ$  (c 1,00, EtOAc);  $R_f$  (hex/EtOAc-1/1) = 0,50.  **$^1\text{H NMR}$**  (400 MHz,  $\text{CD}_2\text{Cl}_2\text{-d}_2$ ):  $\delta$  9,51-9,49 (1H, m, ( $\text{CHO}$ )<sub>A+B</sub>), 8,25-8,17 (1H, m, ( $\text{NH-CH-CHH-CH-(CH}_3)_2$ )<sub>A+B</sub>), 8,05-7,95 (1H, m, ( $\text{NH-CH-CHH-CH-(CH}_3)_2$ )<sub>A+B</sub>), 7,65-7,44 (6H, m, ( $\text{NH-CH-CHH-Ph}$ )<sub>A+B</sub>), ( $\text{Ar-H}$ )<sub>A+B</sub>), 7,25-6,98 (7H, m, ( $\text{Ar-H}$ )<sub>A+B</sub>), 6,61-6,47 (1H, m, ( $\text{Ar-H}$ )<sub>A+B</sub>), 5,31-5,17 (2H, m, ( $\text{O-CH}_2\text{-Ph}$ )<sub>A+B</sub>), 4,75-4,62 (1H, m, ( $\text{NH-CH-CH}_2\text{-Ph}$ )<sub>A+B</sub>), 4,43-4,20 (2H, m, 2 x  $\text{NH-CH-CH}_2\text{-CH-(CH}_3)_2$ )<sub>A+B</sub>), 3,28-3,09 (2H, m, ( $\text{NH-CH-CH}_2\text{-Ph}$ )<sub>A+B</sub>), 1,76-1,11 (6H, m, 2 x ( $\text{NH-CH-CH}_2\text{-CH-(CH}_3)_2$ )<sub>A+B</sub>), 1,05-0,66 (12H, m, 4 x ( $\text{CH}_3$ )<sub>A+B</sub>).  **$^{13}\text{C NMR}$**  (100,79 MHz,  $\text{CD}_2\text{Cl}_2\text{-d}_2$ ):  $\delta$  200,84; 200,21; 171,58; 171,51; 171,40; 171,36; 165,16; 165,11; 156,02; 136,73; 136,50; 134,95; 133,44; 133,41; 132,06; 132,01; 129,36; 129,33; 129,18; 129,15; 128,85; 128,84; 121,63; 114,32; 72,28; 72,26; 57,61; 57,46; 53,69; 39,74; 37,28; 37,23; 37,10; 36,89; 24,85; 24,80; 24,60; 24,47; 23,19; 23,07; 22,75; 22,71; 22,26; 21,56; 21,48; 21,36; 21,31. **IR (ATR)**: 3276, 3066, 2957, 2871, 1734, 1635, 1598, 1541, 1271, 1246, 1124, 1008, 811, 750, 697  $\text{cm}^{-1}$ . **CHN analýza**: Vypočteno pro  $\text{C}_{35}\text{H}_{42}\text{ClN}_3\text{O}_5$  (620,17): C, 67,78; H, 6,83; N, 6,78. Nalezeno: C, 67,69 $\pm$ 0,02; H, 6,99 $\pm$ 0,02; N, 6,89 $\pm$ 0,01. **HRMS (MALDI-TOF, m/z)**:  $[\text{M}+\text{Na}]^+$  vypočteno pro  $\text{C}_{35}\text{H}_{42}\text{ClN}_3\text{O}_5\text{Na}$ : 642,27052 Da; nalezeno: 642,27105 Da.

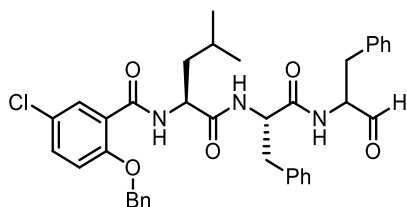
Charakterizace 2-benzyloxy-5-chloro-*N*-((2*S*)-4-methyl-1-oxo-1-(((2*S*)-1-oxo-1-(((2*S*)-1-oxo-3-fenylpropan-2-yl)amino)-3-fenylpropan-2-yl)amino)pentan-2-yl)benzamidu **27h**



Bezbarvá olejovitá látka; výtěžek 21 %;  $[\alpha_D^{20}] = -45,6^\circ$  (c 0,125, EtOAc);  $R_f$  (hex/EtOAc-1/1) = 0,33.  **$^1\text{H NMR}$**  (400 MHz,  $\text{CD}_2\text{Cl}_2\text{-d}_2$ ):  $\delta$  9,59 (1H, s,  $\text{CHO}$ ), 8,14 (1H, d,  $J = 5,6$  Hz,  $\text{NH-CH-CHH-Ph}$ ), 8,11 (1H, d,  $J = 2,8$  Hz,  $\text{NH-CH-CHH-CH-(CH}_3)_2$ ),

7,59 (1H, dd,  $J = 2,8$  Hz,  $J = 8,8$  Hz, Ar-H), 7,57-7,48 (7H, m, NH-CH-CHH-Ph, Ar-H), 7,40-7,25 (5H, m, Ar-H), 7,24-7,15 (3H, m, Ar-H), 7,07-6,97 (2H, m, Ar-H), 6,64 (1H, d,  $J = 6,2$  Hz, Ar-H), 5,24-5,22 (2H, ABq,  $J = 10,4$  Hz, O-CH<sub>2</sub>-Ph), 4,71-4,58 (2H, m, 2 x NH-CH-CHH-Ph), 4,35-4,25 (1H, m, NH-CH-CHH-CH-(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>), 3,30-3,20 (1H, m, NH-CH-CHH-Ph), 3,20-3,10 (1H, m, NH-CH-CHH-Ph), 3,10-3,00 (2H, m, NH-CH-CH<sub>2</sub>-Ph), 1,48-1,35 (1H, m, NH-CH-CHH-CH-(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>), 1,35-1,25 (1H, m, NH-CH-CHH-CH-(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>), 1,18-1,05 (1H, m, NH-CH-CH<sub>2</sub>-CH-(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>), 0,80 (3H, d,  $J = 6,4$  Hz, CH<sub>3</sub>-CH-CH<sub>3</sub>), 0,74 (3H, d,  $J = 6,4$  Hz, CH<sub>3</sub>-CH-CH<sub>3</sub>). <sup>13</sup>C NMR (100,79 MHz, CD<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>-d<sub>2</sub>): δ 199,2; 171,3; 171,0; 164,9; 156,0; 136,5; 135,0; 133,0; 132,1; 129,4; 129,3; 129,2; 128,7; 128,6; 127,0; 126,9; 125,6; 121,8; 121,7; 114,3; 72,2; 59,9; 53,9; 53,1; 39,4; 37,1; 34,8; 30,3; 24,8; 22,8; 21,4. IR (ATR): 3259, 3063, 2926, 2360, 2341, 1726, 1636, 1534, 1498, 1489, 1454, 1276, 1257, 803, 739, 728, 701 cm<sup>-1</sup>. CHN analýza: Vypočteno pro C<sub>38</sub>H<sub>40</sub>ClN<sub>4</sub>O<sub>5</sub> (654,19): C, 69,77; H, 6,16; N, 6,42. Nalezeno: C, 69,82±0,02; H, 6,30±0,02; N, 6,37±0,02. HRMS (MALDI-TOF, m/z): [M+Na]<sup>+</sup> vypočteno pro C<sub>38</sub>H<sub>40</sub>ClN<sub>3</sub>O<sub>5</sub>Na: 676,25487 Da; nalezeno: 676,25641 Da.

Charakterizace 2-benzyloxy-5-chloro-*N*-((2*S*)-4-methyl-1-oxo-1-(((2*S*)-1-oxo-1-((1-oxo-3-fenylpropan-2-yl)amino)-3-fenylpropan-2-yl)amino)pentan-2-yl)benzamidu **27i**



Produkt je směsí dvou diastereomerů, A a B. Bezbarvá olejovitá látka; výtěžek 24 %;  $[\alpha_D^{20}] = -22,5^\circ$  (c 0,125, EtOAc);  $R_f$  (hex/EtOAc-1/1) = 0,33. <sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CD<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>-d<sub>2</sub>): δ 9,61-9,55 (1H, s, (CHO)<sub>A+B</sub>), 8,16-8,06 (2H, m, 2 x NH-CH-CH<sub>2</sub>-CH-Ph)<sub>A+B</sub>, 7,62-7,57 (1H, m, (NH-CH-CH<sub>2</sub>-(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>)<sub>A+B</sub>), 7,56-7,48 (6H, m, (Ar-H)<sub>A+B</sub>), 7,40-7,05 (11H, m, (Ar-H)<sub>A+B</sub>), 6,75-6,62 (1H, m, (Ar-H)<sub>A+B</sub>), 5,29-5,16 (2H, m, (O-CH<sub>2</sub>-Ph)<sub>A+B</sub>), 4,74-4,65 (1H, m, (NH-CH-CH<sub>2</sub>-CH-(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>)<sub>A+B</sub>), 4,64-4,56 (1H, m, (NH-CH-CH<sub>2</sub>-Ph)<sub>A+B</sub>), 4,37-4,23 (1H, m, (NH-CH-CH<sub>2</sub>-Ph)<sub>A+B</sub>), 3,30-3,00 (4H, m, 2 x (NH-CH-CH<sub>2</sub>-Ph)<sub>A+B</sub>), 1,49-1,05 (3H, m, NH-CH-CH<sub>2</sub>-CH-(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>)<sub>A+B</sub>), 0,84-0,65 (6H, m, 2 x (CH<sub>3</sub>)<sub>A+B</sub>). <sup>13</sup>C NMR (100,79 MHz, CD<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>-d<sub>2</sub>): δ 199,2; 171,3; 171,0; 164,9; 156,0; 136,5; 135,0; 133,0; 132,1; 129,4; 129,3; 129,2; 128,7; 128,6; 127,0; 126,9; 125,6; 121,8; 121,7; 114,3; 72,2; 59,9; 53,9; 53,1; 39,4; 37,1; 34,8; 30,3; 24,8; 22,8; 21,4. IR (ATR): 3259, 3063, 2926, 2360, 2341, 1726, 1636, 1534, 1498, 1489,

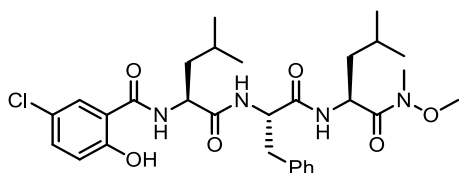


1454, 1276, 1257, 803, 739, 728, 701  $\text{cm}^{-1}$ . **CHN analýza:** Vypočteno pro  $\text{C}_{38}\text{H}_{40}\text{ClN}_3\text{O}_5$  (654,19): C, 69,77; H, 6,16; N, 6,42. Nalezeno: C, 69,80 $\pm$ 0,02; H, 6,20 $\pm$ 0,01; N, 6,31 $\pm$ 0,02. **HRMS (MALDI-TOF, m/z):**  $[\text{M}+\text{Na}]^+$  vypočteno pro  $\text{C}_{38}\text{H}_{40}\text{ClN}_3\text{O}_5\text{Na}$ : 676,25487 Da; nalezeno: 676,25649 Da.

#### Obecný postup deprotekce fenolického hydroxidu **28a,b**

Deprotekce **26d** (0,8 g, 1,18 mmol) byla provedena rozpuštěním látky v EtOAc (250 ml), přidavkem 10% Pd/C (0,2 g) a zavedením  $\text{H}_2$  (1 atm). Reakce byla míchána při 25  $^\circ\text{C}$  po dobu 20 hodin. Poté byl Pd/C odfiltrován a roztok byl zahuštěn na RVO za sníženého tlaku do čirého oleje. Produkt **28a** byl izolován ve výtěžku 77 %.<sup>316</sup>

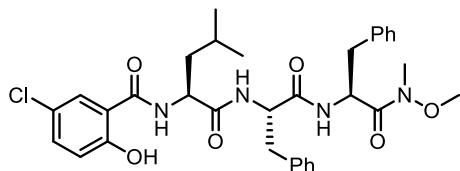
Charakterizace *N*-((5*S*,8*S*,11*S*)-8-benzyl-5-isobutyl-3,13-dimethyl-4,7,10-trioxo-2-oxa-3,6,9-triazatetradekan-11-yl)-5-chloro-2-hydroxybenzamidu **28a**



Bílá pevná látka; výtěžek 77 %; b.t. 130,4-134,6  $^\circ\text{C}$ ;  $[\alpha_D^{20}] = -31,5^\circ$  (c 1,00, EtOAc);  $R_f$  (hex/EtOAc-1/1) = 0,41.  **$^1\text{H NMR}$**  (400 MHz,  $\text{CDCl}_3\text{-d}_1$ ):  $\delta$  12,45 (1H, brs, Ar-OH), 8,08 (1H, d,  $J = 8$  Hz, NH-CH-CHH-CH-( $\text{CH}_3$ )<sub>2</sub>), 7,95 (1H, d,  $J = 8$  Hz, NH-CH-CHH-CH-( $\text{CH}_3$ )<sub>2</sub>), 7,69 (1H, d,  $J = 2$  Hz, NH-CH-CHH-Ph), 7,39 (1H, dd,  $J = 2,5$  Hz,  $J = 8,8$  Hz, Ar-H), 7,07-6,97 (5H, m, Ar-H), 6,97-6,91 (1H, m, Ar-H), 6,88 (1H, d,  $J = 8,4$  Hz, Ar-H), 5,30-5,20 (1H, m, NH-CH-CHH-CH-( $\text{CH}_3$ )<sub>2</sub>), 5,20-5,10 (1H, m, NH-CH-CHH-CH-( $\text{CH}_3$ )<sub>2</sub>), 4,84-4,72 (1H, m, NH-CH-CHH-Ph), 3,81 (3H, s, O-CH<sub>3</sub>), 3,28 (3H, s, N-CH<sub>3</sub>), 2,99 (2H, d,  $J = 7,2$  Hz, NH-CH-CH<sub>2</sub>-Ph), 1,82-1,58 (4H, m, NH-CH-CHH-CH-( $\text{CH}_3$ )<sub>2</sub>, NH-CH-CHH-CH-( $\text{CH}_3$ )<sub>2</sub>, 2 x NH-CH-CH<sub>2</sub>-CH-( $\text{CH}_3$ )<sub>2</sub>), 1,58-1,48 (2H, m, NH-CH-CHH-CH-( $\text{CH}_3$ )<sub>2</sub>, NH-CH-CHH-CH-( $\text{CH}_3$ )<sub>2</sub>), 0,97 (9H, d,  $J = 6,4$  Hz, 3 x CH<sub>3</sub>), 0,92 (3H, d,  $J = 6,4$  Hz, CH<sub>3</sub>).  **$^{13}\text{C NMR}$**  (100,79 MHz,  $\text{CDCl}_3\text{-d}_1$ ):  $\delta$  172,7; 171,7; 170,9; 169,0; 160,3; 136,9; 134,2; 129,5; 128,3; 127,0; 126,7; 123,3; 119,9; 115,6; 61,9; 54,1; 52,0; 47,3; 42,4; 41,2; 39,3; 32,5; 25,03; 25,01; 23,4; 23,0; 22,4; 22,2. **IR (ATR):** 3298, 3067, 2957, 2870, 2361, 2341, 1637, 1592, 1538, 1474, 1367, 1290, 1220, 824, 699  $\text{cm}^{-1}$ . **CHN analýza:** Vypočteno pro  $\text{C}_{30}\text{H}_{41}\text{ClN}_4\text{O}_6$  (589,12): C, 61,16; H, 7,01; N, 9,51. Nalezeno: C, 60,96 $\pm$ 0,02; H, 6,82 $\pm$ 0,02; N, 9,80 $\pm$ 0,02.

**HRMS (MALDI-TOF, m/z):**  $[M+Na]^+$  vypočteno pro  $C_{30}H_{41}ClN_4O_6Na$ : 611,26068 Da; nalezeno: 611,26186 Da.

Charakterizace *N*-((5*S*,8*S*,11*S*)-5,8-dibenzyl-3,13-dimethyl-4,7,10-trioxo-2-oxa-3,6,9-triazatetradekan-11-yl)-5-chloro-2-hydroxybenzamidu **28b**



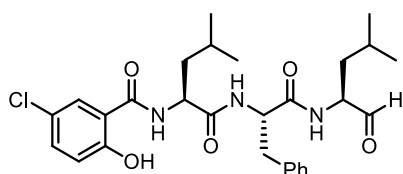
Bílá pevná látka; výtěžek 93 %; b.t. 130-133,7 °C;  $[\alpha_D^{20}] = -20,0^\circ$  (c 1,00, EtOAc);  $R_f$  (hex/EtOAc-1/1) = 0,37.  **$^1H$  NMR** (400 MHz,  $CDCl_3-d_1$ ):  $\delta$  12,50 (1H, brs, Ar-OH), 8,18-8,02 (2H, m, NH-CH-CHH-CH-(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>, NH-CH-CHH-Ph), 7,62 (1H, d,  $J = 2,4$  Hz, NH-CH-CHH-Ph), 7,33 (1H, dd,  $J = 2,5$  Hz,  $J = 8,8$  Hz, Ar-H), 7,26-7,05 (6H, m, Ar-H), 7,04-6,82 (6H, m, Ar-H), 5,35-5,22 (2H, m, 2 x NH-CH-CHH-Ph), 4,83-4,73 (1H, m, NH-CH-CHH-CH-(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>), 3,55 (3H, s, O-CH<sub>3</sub>), 3,14 (3H, s, N-CH<sub>3</sub>), 3,10-2,85 (4H, m, 2 x NH-CH-CH<sub>2</sub>-Ph), 1,78-1,65 (2H, m, NH-CH-CHH-CH-(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>, NHCH-CH<sub>2</sub>-CH-(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>), 1,61-1,50 (1H, m, NH-CH-CHH-CH-(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>), 0,96-0,85 (6H, m, 2 x CH<sub>3</sub>).  **$^{13}C$  NMR** (100,79 MHz,  $CDCl_3-d_1$ ):  $\delta$  171,9; 171,2; 170,9; 169,2; 160,5; 136,3; 136,1; 134,2; 129,6; 129,5; 128,5; 128,3; 127,1; 127,0; 126,6; 123,2; 120,0; 115,7; 61,8; 54,1; 51,9; 50,2; 41,1; 39,8; 39,2; 32,5; 25,1; 23,3; 22,1. **IR (ATR):** 3291, 3066, 2957, 2361, 2343, 1619, 1591, 1535, 1493, 1478, 1290, 1222, 824, 743, 699  $cm^{-1}$ . **CHN analýza:** Vypočteno pro  $C_{33}H_{39}ClN_4O_6$  (623,14): C, 63,61; H, 6,31; N, 8,99. Nalezeno: C, 63,81 $\pm$ 0,01; H, 6,49 $\pm$ 0,01; N, 8,75 $\pm$ 0,02. **HRMS (MALDI-TOF, m/z):**  $[M+Na]^+$  vypočteno pro  $C_{33}H_{39}ClN_4O_6Na$ : 645,24503 Da; nalezeno: 645,4582 Da.

#### Obecný postup pro přípravu aldehydů 29a,b a alkoholů 30a,b

Odchráněný tripeptidový Weinreb amid **28a** (0,2 g, 0,321 mmol) byl rozpuštěn ve v bezvodém THF (50 ml) a vychlazen na -8 °C. Poté bylo během 2 hodin v šesti stejných dávkách přidáno  $LiAlH_4$  (0,073 g, 1,926 mmol). Reakce byla po další 1 hodině míchání při -8 °C ukončena přilitím nasyceného roztoku  $NH_4Cl$  (20 ml), THF (20 ml), vody (10 ml) a 10% HCl (1 ml). Oddělená vodná frakce byla promyta EtOAc (3 x 40 ml). Spojené organické frakce byly promyty vodou (2 x 20 ml) a vysušeny bezv.

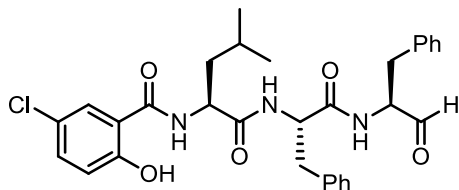
Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>. Za sníženého tlaku bylo na RVO odstraněno rozpouštědlo do konstantní hmotnosti. Ze surové reakční směsi byl sloupcovou chromatografií (20 g silikagelu, *n*-hexan/ethyl acetát – 1/1) získán aldehyd **29a** ve výtěžku 48 % a odpovídající alkohol **30a** ve výtěžku 44 %.<sup>325</sup> V důsledku přebytku redukčního činidla k přereagování funkční skupiny substrátu až na alkohol.

Charakterizace *N*-((2*S*)-4-methyl-1-(((2*S*)-1-(((2*S*)-4-methyl-1-oxopentan-2-yl)amino)-1-oxo-3-fenylpropan-2-yl)amino)-1-oxopentan-2-yl-5-chloro-2-hydroxybenzamidu **29a**



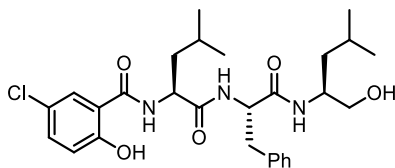
Bílá pevná látka; výtěžek 48 %; b.t. 145-148,2 °C; [ $\alpha_D^{20}$ ] = -44,3° (c 1,00, EtOAc)  $R_f$  (hex/EtOAc-1/1) = 0,47. **<sup>1</sup>H NMR** (400 MHz, CD<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>-d<sub>2</sub>):  $\delta$  12,01 (1H, s, Ar-OH), 9,44 (1H, s, CHO), 7,61 (1H, d, *J* = 8 Hz, NH-CH-CHH-Ph), 7,44 (1H, d, *J* = 2,8 Hz, NH-CH-CHH-CH-(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>), 7,42 (1H, d, *J* = 2,8 Hz, NH-CH-CHH-CH-(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>), 7,35-7,19 (5H, m, Ar-H), 7,12-7,03 (1H, m, Ar-H), 6,99 (1H, d, *J* = 8,8 Hz, Ar-H), 6,75-6,65 (1H, m, Ar-H), 4,88 (1H, q, *J* = 7,2 Hz, NH-CH-CHH-Ph), 4,80-4,72 (1H, m, NH-CH-CHH-CH-(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>), 4,47-4,39 (1H, m, NH-CH-CHH-CH-(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>), 3,25-3,12 (2H, m, NH-CH-CH<sub>2</sub>-Ph), 1,80-1,60 (5H, m, 2 x NH-CH-CH<sub>2</sub>-CH-(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>, NH-CH-CH<sub>2</sub>-CH-(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>), 1,45-1,30 (1H, m, NH-CH-CH<sub>2</sub>-CH-(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>), 1,00-0,87 (12H, m, 4 x CH<sub>3</sub>). **<sup>13</sup>C NMR** (100,79 MHz, CD<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>-d<sub>2</sub>):  $\delta$  199,5; 171,9; 171,1; 168,8; 159,9; 136,3; 134,4; 129,4; 128,8; 127,2; 126,3; 123,6; 120,0; 115,3; 57,5; 54,6; 52,1; 41,1; 38,3; 37,7; 25,0; 24,7; 22,9; 22,8; 21,9; 21,7. **IR (ATR)**: 3307, 3066, 2958, 2871, 2360, 2342, 1734, 1637, 1596, 1533, 1496, 1489, 1368, 1287, 1227, 1114, 824, 746, 700, 669 cm<sup>-1</sup>. **CHN analýza**: Vypočteno pro C<sub>28</sub>H<sub>36</sub>ClN<sub>3</sub>O<sub>5</sub> (530,06): C, 63,45; H, 6,85; N, 7,93. Nalezeno: C, 63,31±0,02; H, 6,86±0,01; N, 7,89±0,01. **HRMS (MALDI-TOF, m/z)**: [M+Na]<sup>+</sup> vypočteno pro C<sub>28</sub>H<sub>36</sub>ClN<sub>3</sub>O<sub>5</sub>Na: 552,22357 Da; nalezeno: 552,22415 Da.

Charakterizace *N*-((2*S*)-4-methyl-1-oxo-1-(((2*S*)-1-oxo-1-(((2*S*)-1-oxo-3-fenylpropan-2-yl)amino)-3-fenylpropan-2-yl)amino)pentan-2-yl)-5-chloro-2-hydroxybenzamidů **29b**



Bezbarvá olejovitá látka; výtěžek 30 %;  $R_f$  (hex/EtOAc-1/1) = 0,38. **<sup>1</sup>H NMR** (400 MHz, CD<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>-d<sub>2</sub>): δ 12,08 (1H, s, Ar-OH), 9,52 (1H, s, CHO), 7,65-7,58 (2H, m, 2 x NH-CH-CH<sub>2</sub>-Ph), 7,43-7,10 (12H, m, NH-CH-CH<sub>2</sub>-CH-(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>, Ar-H), 6,99-6,93 (1H, m, Ar-H), 6,85-6,70 (1H, m, Ar-H), 4,95-4,83 (1H, m, NH-CH-CH<sub>2</sub>-Ph), 4,82-4,70 (1H, m, NH-CH-CH<sub>2</sub>-Ph), 4,70-4,60 (1H, m, NH-CH-CH<sub>2</sub>-CH-(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>), 3,2-3,00 (4H, m, 2 x NH-CH-CH<sub>2</sub>-Ph), 1,79-1,70 (3H, m, NH-CH-CH<sub>2</sub>-CH-(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>), 1,00-0,88 (6H, m, 2 x CH<sub>3</sub>). **<sup>13</sup>C NMR** (100,79 MHz, CD<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>-d<sub>2</sub>): δ 198,5; 172,3; 171,0; 168,9; 159,9; 136,2; 135,8; 134,3; 129,45; 129,35; 128,9; 128,8; 127,3; 126,4; 123,5; 119,9; 60,0; 54,7; 52,1; 41,0; 38,6; 35,1; 25,0; 22,9; 21,8. **IR (ATR)**: 3289, 3065, 2960, 2925, 1633, 1593, 1537, 1494, 1258, 1081, 1017, 797, 708, 697, 649 cm<sup>-1</sup>. **CHN analýza**: Vypočteno pro C<sub>31</sub>H<sub>34</sub>ClN<sub>3</sub>O<sub>5</sub> (564,07): C, 66,01; H, 6,08; N, 7,45. Nalezeno: C, 65,97±0,02; H, 6,17±0,01; N, 7,29±0,01. **HRMS (MALDI-TOF, m/z)**: [M+Na]<sup>+</sup> vypočteno pro C<sub>31</sub>H<sub>34</sub>ClN<sub>3</sub>O<sub>5</sub>Na: 586,20792 Da; nalezeno: 586,20897 Da.

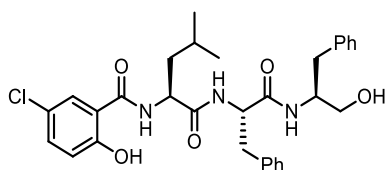
Charakterizace *N*-((2*S*)-1-(((2*S*)-1-(((2*S*)-1-hydroxy-4-methylpentan-2-yl)amino)-1-oxo-3-fenylpropan-2-yl)amino)-4-methyl-1-oxopentan-2-yl)-5-chloro-2-hydroxybenzamidů **30a**



Bezbarvá olejovitá látka; výtěžek 44 %;  $R_f$  (hex/EtOAc-1/1) = 0,18. **<sup>1</sup>H NMR** (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>-d<sub>1</sub>): δ 12,85 (1H, brs, Ar-OH), 9,38 (1H, brs, NH-CH-CH<sub>2</sub>-Ph), 7,44 (1H, brs, NH-CH-CH<sub>2</sub>-CH-(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>), 7,42 (1H, brs, NH-CH-CH<sub>2</sub>-CH-(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>), 7,50-7,23 (6H, m, Ar-H), 7,23-7,00 (2H, m, Ar-H), 5,40-5,20 (1H, m, NH-CH-CH<sub>2</sub>-Ph), 5,20-5,00 (1H, m, NH-CH-CH<sub>2</sub>-CH-(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>), 4,00-3,80 (1H, m, NH-CH-CH<sub>2</sub>-CH-(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>), 3,39 (2H, m, CH<sub>2</sub>-OH), 3,24 (1H, m, CH<sub>2</sub>-OH), 1,90-1,30 (8H, m, 2 x NH-CH-CH<sub>2</sub>-CH-(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>), NH-CH-CH<sub>2</sub>-Ph), 1,10-0,60 (12H, m, 4 x CH<sub>3</sub>). **<sup>13</sup>C NMR** (125,78 MHz, CDCl<sub>3</sub>-d<sub>1</sub>): δ 172,5; 172,2; 171,1; 168,2; 166,1; 135,6; 134,1; 133,5; 129,4; 128,8; 127,5; 126,9;

124,4; 64,4; 61,6; 51,1; 47,5; 42,3; 39,3; 31,4; 30,2; 29,7; 24,6; 23,3; 22,9; 22,4.  
**IR (ATR):** 3307, 3066, 2958, 2871, 2360, 2341, 1734, 1636, 1595, 1540, 1533, 1496, 1473, 1457, 1367, 1288, 1230, 1114, 1068, 1031, 903, 823, 745, 700, 669  $\text{cm}^{-1}$ .  
**CHN analýza:** Vypočteno pro  $\text{C}_{28}\text{H}_{38}\text{ClN}_3\text{O}_5$  (532,07): C, 63,21; H, 7,20; N, 7,90. Nalezeno: C, 63,32 $\pm$ 0,02; H, 7,29 $\pm$ 0,02; N, 7,82 $\pm$ 0,02. **HRMS (MALDI-TOF, m/z):**  $[\text{M}+\text{H}]^+$  vypočteno pro  $\text{C}_{28}\text{H}_{39}\text{ClN}_3\text{O}_5$ : 532,25728 Da; nalezeno: 532,25776 Da.

Charakterizace *N*-((2*S*)-1-(((2*S*)-1-(((2*S*)-1-hydroxy-3-fenylpropan-2-yl)amino)-1-oxo-3-fenylpropan-2-yl)amino)-4-methyl-1-oxopentan-2-yl)-5-chloro-2-hydroxybenzamidu  
**30b**



Bezbarvá olejovitá látka; výtěžek 40 %;  $R_f$  (hex/EtOAc-1/1) = 0,20.  **$^1\text{H NMR}$**  (400 MHz,  $\text{CD}_2\text{Cl}_2\text{-d}_2$ ):  $\delta$  12,10 (1H, s, Ar-OH), 7,80 (1H, d,  $J = 6$  Hz, NH-CH-CH<sub>2</sub>-Ph), 7,66 (1H, d,  $J = 2.4$  Hz, NH-CH-CH<sub>2</sub>-Ph), 7,47-7,35 (2H, m, NH-CH-CH<sub>2</sub>-CH-(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>, Ar-H), 7,35-7,15 (10H, m, Ar-H), 7,00 (1H, d,  $J = 8,8$  Hz, Ar-H), 6,68 (1H, d,  $J = 7,2$  Hz, Ar-H), 4,90-4,70 (2H, m, 2 x NH-CH-CH<sub>2</sub>-Ph), 4,20-4,10 (1H, m, NH-CH-CH<sub>2</sub>-CH-(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>), 3,50-3,40 (2H, m, CH<sub>2</sub>-OH), 3,20-3,05 (2H, m, NH-CH-CH<sub>2</sub>-Ph), 3,85-3,70 (2H, m, NH-CH-CH<sub>2</sub>-Ph), 2,31 (1H, m, CH<sub>2</sub>-OH), 1,80-1,60 (2H, m, NH-CH-CH-CH-(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>), 1,40-1,30 (1H, m, NH-CH-CH-CH-(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>), 1,00-0,85 (6H, m, 2 x CH<sub>3</sub>).  
 **$^{13}\text{C NMR}$**  (100,79 MHz,  $\text{CDCl}_3\text{-d}_1$ ):  $\delta$  173.5; 171.0; 168.8; 159.6; 137.5; 136.3; 135.9; 134.4; 129.5; 129.4; 129.3; 129.0; 128.9; 128.8; 126.8; 126.2, 123.9, 120.1, 63.0, 59.9, 55.4, 53.1, 52.2, 41.3, 38.8, 36.9, 35.3, 29.9, 25.0, 23.3, 22.1. **IR (ATR):** 3304, 3066, 2958, 2361, 2339, 1726, 1640, 1597, 1546, 1536, 1494, 1288, 1257, 1228, 1113, 1034, 903, 823, 744, 700, 669  $\text{cm}^{-1}$ . **CHN analýza:** Vypočteno pro  $\text{C}_{31}\text{H}_{36}\text{ClN}_3\text{O}_5$  (566,09): C, 65,77; H, 6,41; N, 7,42. Nalezeno: C, 64,49 $\pm$ 0,02; H, 6,45 $\pm$ 0,02; N, 6,62 $\pm$ 0,02. **HRMS (MALDI-TOF, m/z):**  $[\text{M}+\text{Na}]^+$  vypočteno pro  $\text{C}_{31}\text{H}_{36}\text{ClN}_3\text{O}_5\text{Na}$ : 588,22357 Da; nalezeno: 588,22440 Da.

## 6. LITERATURA

- (1) Topps, J. H.; Wain, R. L. Investigations on Fungicides. III . The Fungitoxicity of 3- and 5-Alkyl-Salicylanilides and Para-Chloranilidies. *Ann. Appl. Biol.* **1957**, *45* (3), 506–511.
- (2) Felsher, I. M. Salicylanilide Therapy in Tinea Capitis. *Arch. Derm. Syphilol.* **1948**, 56–63.
- (3) Baichwal, R. S.; Baxter, R. M.; Kandel, S. I.; Walker, G. C. Antifungal Action of Salicylanilide. *Can. J. Biochem. Physiol.* **1960**, *38*, 245–251.
- (4) Mohammed-Ali, N. A. K.; Bogan, J. A. The Pharmacodynamics of the Flukicidal Salicylanilides, Rafoxanide, Closantel and Oxyclosanide. *J. Vet. Pharmacol. Ther.* **1987**, *10* (2), 127–133. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2885.1987.tb00089.x>.
- (5) Singh, H.; Singh, A. K.; Sharma, S.; Iyer, R. N.; Srivastava, P. Synthesis of 5-Chloro-3'-Nitro-4'-Substituted Salicylanilides, a New Series. *J. Med. Chem.* **1977**, *20* (6), 826–829.
- (6) Benchaoui, H. A.; Mckellar, Q. A. Effect of Early Treatment with Rafoxanide on Antipyrine Clearance in Sheep Infected with Fasciola Hepatica. *Xenobiotica* **1993**, *23* (4), 439–448. <https://doi.org/10.3109/00498259309057032>.
- (7) Campbell, W. C.; Ostlind, D. A.; Yakstis, J. J. The Efficacy of 3,5-Diiodo-3'-Chloro-4'-(p-Chlorophenoxy)-Salicylanilide against Immature Fasciola Hepatica in Sheep. *Res. vet. Sci.* **1970**, *11*, 99–100.
- (8) Lee, G. G.; Cho, S. H.; Kim, J. T.; Lee, C. Y. Efficacy of Closantel against Fasciola Hepatica in Korean Native Goats. *Vet. Parasitol.* **1996**, *65* (3–4), 307–311. [https://doi.org/10.1016/S0304-4017\(96\)00972-7](https://doi.org/10.1016/S0304-4017(96)00972-7).
- (9) Dash, K. M. Control of Helminthosis in Lambs by Strategic Treatment with Closantel and Broad-spectrum Anthelmintics. *Aust. Vet. J.* **1986**, *63* (1), 4–8. <https://doi.org/10.1111/j.1751-0813.1986.tb02861.x>.
- (10) Sivaraj, S.; Dorny, P.; Vercruysse, J.; Pandey, V. S. Multiple and Multigeneric Anthelmintic Resistance on a Sheep Farm in Malaysia. *Vet. Parasitol.* **1994**, *55* (1–2), 159–165. [https://doi.org/10.1016/0304-4017\(94\)90068-X](https://doi.org/10.1016/0304-4017(94)90068-X).
- (11) Pandey, V. S.; Sivaraj, S. Anthelmintic Resistance in Haemonchus Contortus from Sheep in Malaysia. *Vet. Parasitol.* **1994**, *53* (1–2), 67–74. [https://doi.org/10.1016/0304-4017\(94\)90018-3](https://doi.org/10.1016/0304-4017(94)90018-3).
- (12) Hennessy, D. R. The Disposition of Antiparasitic Drugs in Relation to the Development of Resistance by Parasites of Livestock. *Acta Trop.* **1994**, *56* (2–3), 125–141. [https://doi.org/10.1016/0001-706X\(94\)90059-0](https://doi.org/10.1016/0001-706X(94)90059-0).
- (13) Wilson, D. F. The Stoichiometry and Site Specificity of the Uncoupling of Mitochondrial Oxidative Phosphorylation by Salicylanilide Derivatives. *Biochemistry* **1969**, *8* (6), 2475–2481. <https://doi.org/10.1021/bi00834a033>.
- (14) Terada, H. Uncouplers of Oxidative Phosphorylation. *Environmental Heal. Perspect.* **1990**, *87*, 213–218. [https://doi.org/10.1016/0076-6879\(79\)55060-5](https://doi.org/10.1016/0076-6879(79)55060-5).
- (15) Corbett, J. R.; Goose, J. A Possible Biochemical Mode of Action of the Fasciolicides Nitroxylin, Hexachlorophene and Oxyclozanide. *Pestic. Sci.* **1971**, *2* (3), 119–121. <https://doi.org/10.1002/ps.2780020307>.
- (16) Cornish, R. A.; Bryant, C. Changes in Energy Metabolism Due to Anthelmintics in Fasciola Hepatica Maintained in Vitro. *Int. J. Parasitol.* **1976**, *6* (5), 393–398. [https://doi.org/10.1016/0020-7519\(76\)90024-2](https://doi.org/10.1016/0020-7519(76)90024-2).

- (17) Cornish, R. A.; Behm, C. A.; Butler, R. W.; Bryant, C. The in Vivo Effects of Rafoxanide on the Energy Metabolism of *Fasciola Hepatica*. *Int. J. Parasitol.* **1977**, *7* (3), 217–220. [https://doi.org/10.1016/0020-7519\(77\)90050-9](https://doi.org/10.1016/0020-7519(77)90050-9).
- (18) Kane, H. J.; Behm, C. A.; Bryant, C. Metabolic Studies on the New Fasciolicidal Drug, Closantel. *Mol. Biochem. Parasitol.* **1980**, *1*, 347–355.
- (19) van der Bossche, H.; Verhoeven, H.; Vanparijs, O.; Lauwers, H.; Thienpont, D. Societe Belge de Biochimie Belgische Vereniging Voor Biochemie - Closantel, a New Antiparasitic Hydrogen Ionophore. *Arch. Physiol. Biochem.* **1979**, *87*, 775–869. <https://doi.org/10.3109/13813459209035285>.
- (20) Skuce, P. J.; Fairweather, I. The Effect of the Hydrogen Ionophore Closantel upon the Pharmacology and Ultrastructure of the Adult Liver Fluke *Fasciola Hepatica*. *Parasitol. Res.* **1990**, *76*, 241–250.
- (21) Swan, G. E. The Pharmacology of Halogenated Salicylanilides and Their Anthelmintic Use in Animals. *J. S. Afr. Vet. Assoc.* **1999**, *70* (2), 61–70. <https://doi.org/10.4102/jsava.v70i2.756>.
- (22) Hlasta, D. J.; Demers, J. P.; Foleno, B. D.; Fraga-Spano, S. A.; Guan, J.; Hilliard, J. J.; Macielag, M. J.; Ohemeng, K. A.; Sheppard, C. M.; Sui, Z.; et al. Novel Inhibitors of Bacterial Two-Component Systems with Gram Positive Antibacterial Activity: Pharmacophore Identification Based on the Screening Hit Closantel. *Bioorganic Med. Chem. Lett.* **1998**, *8* (14), 1923–1928. [https://doi.org/10.1016/S0960-894X\(98\)00326-6](https://doi.org/10.1016/S0960-894X(98)00326-6).
- (23) Macielag, M. J.; Demers, J. P.; Fraga-spano, S. A.; Hlasta, D. J.; Johnson, S. G.; Kanojia, R. M.; Russell, R. K.; Sui, Z.; Weidner-wells, M. A.; Werblood, H.; et al. Substituted Salicylanilides as Inhibitors of Two-Component Regulatory Systems in Bacteria. *J. Med. Chem.* **1998**, *41* (16), 2939–2945.
- (24) Wolanin, P. M.; Thomason, P. A.; Stock, J. B. Histidine Protein Kinases: Key Signal Transducers Outside the Animal Kingdom. *Genome Biol.* **2002**, *3* (10), REVIEWS3013. <https://doi.org/10.1186/gb-2002-3-10-reviews3013>.
- (25) Attwood, P. V.; Piggott, M. J.; Zu, X. L.; Besant, P. G. Focus on Phosphohistidine. *Amino Acids* **2007**, *32* (1), 145–156. <https://doi.org/10.1007/s00726-006-0443-6>.
- (26) Hilliard, J. J.; Goldschmidt, R. M.; Licata, L.; Baum, E. Z.; Bush, K. Multiple Mechanisms of Action for Inhibitors of Histidine Protein Kinases from Bacterial Two-Component Systems. *Antimicrob. Agents Chemother.* **1999**, *43* (7), 1693–1699. <https://doi.org/10.1007/978-3-642-39226-9>.
- (27) Paraskevopoulos, G.; Monteiro, S.; Vosátka, R.; Krátký, M.; Navrátilová, L.; Trejtnar, F.; Stolaříková, J.; Vinšová, J. Novel Salicylanilides from 4,5-Dihalogenated Salicylic Acids: Synthesis, Antimicrobial Activity and Cytotoxicity. *Bioorganic Med. Chem.* **2017**, *25* (4), 1524–1532. <https://doi.org/10.1016/j.bmc.2017.01.016>.
- (28) Lee, I. Y.; Gruber, T. D.; Samuels, A.; Yun, M.; Nam, B.; Kang, M.; Crowley, K.; Winterroth, B.; Boshoff, H. I.; Barry, C. E. Structure-Activity Relationships of Antitubercular Salicylanilides Consistent with Disruption of the Proton Gradient via Proton Shuttling. *Bioorganic Med. Chem.* **2013**, *21* (1), 114–126. <https://doi.org/10.1016/j.bmc.2012.10.056>.
- (29) Vinšová, J.; Imramovský, A.; Buchta, V.; Cecková, M.; Doležal, M.; Staud, F.; Jampílek, J.; Kaustová, J. Salicylanilide Acetates: Synthesis and Antibacterial Evaluation. *Molecules* **2007**, *12* (1), 1–12. <https://doi.org/10.3390/12010001>.
- (30) Imramovský, A.; Vinšová, J.; Ferriz, J. M.; Buchta, V.; Jampílek, J. Salicylanilide Esters of N-Protected Amino Acids as Novel Antimicrobial Agents. *Bioorganic Med. Chem. Lett.* **2009**, *19* (2), 348–351. <https://doi.org/10.1016/j.bmcl.2008.11.080>.

- (31) Imramovský, A.; Pesko, M.; Ferriz, J. M.; Králová, K.; Vinšová, J.; Jampílek, J. Photosynthesis—Inhibiting Efficiency of 4-Chloro-2-(Chlorophenylcarbamoyl)Phenyl Alkylcarbamates. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2011**, *21* (15), 4564–4567. <https://doi.org/10.1016/j.bmcl.2011.05.118>.
- (32) Krátký, M.; Vinšová, J.; Stolaříková, J. Antimycobacterial Assessment of Salicylanilide Benzoates Including Multidrug-Resistant Tuberculosis Strains. *Molecules* **2012**, *17* (11), 12812–12820. <https://doi.org/10.3390/molecules171112812>.
- (33) Lemaire, H.; Schrammt, C. H.; Cahn, A. Synthesis and Germicidal Activity of Halogenated Salicylanilides and Related Compounds. *J. Pharm. Sci.* **1961**, *50* (10), 831–837.
- (34) Taborsky, R. G.; Darker, G. D.; Kaye, S. Substitued Salicylanilides With Antimicrobial Activity. *J. Am. Pharm. Assoc.* **1959**, *48* (9), 503–507.
- (35) Stubbs, B. T.; Bole, G. G. Proceedings of the Ninth Interim Session of the American Rheumatism Association - Suppression Of Experimental Inflammatory Tissue Response By Salicylanilide Methylcarbamate. In *Arthritis & Rheumatism*; Wallace, S. L., Ed.; Hotel John Marshall, Richmond, Va., 1962; p 662. <https://doi.org/10.1002/art.1780050612>.
- (36) Hamada, Y.; Takeuchi, I.; Ito, Y.; Matsui, S.; Ito, T. On the Antimicrobial Activity and Syntheses of Salicylanilide Derivatives. *Yakugaku Zasshi* **1981**, *101* (7), 633–641.
- (37) Takeuchi, I.; Yamamoto, K.; Hamada, Y.; Ito, T. On the Antimicrobial Activity and Syntheses of Carbanilide and Salicylanilide Derivatives. *Yakugaku Zasshi* **1982**, *102* (11), 1023–1030.
- (38) Ghazi, I. M.; Mohamed, Z. A.; Ismail, S. A.; Kamal, A. Antibacterial Effect and Toxicity of Synthesized Salicylanilide Derivatives. *Zentralbl. Mikrobiol.* **1986**, *141*, 225–232. [https://doi.org/10.1016/s0232-4393\(86\)80062-2](https://doi.org/10.1016/s0232-4393(86)80062-2).
- (39) Li, H.; Wang, C.; Sanchez, T.; Tan, Y.; Jiang, C.; Neamati, N.; Zhao, G. Amide-Containing Diketoacids as HIV-1 Integrase Inhibitors: Synthesis, Structure-Activity Relationship Analysis, and Biological Activity. *Bioorganic Med. Chem.* **2009**, *17* (7), 2913–2919. <https://doi.org/10.1016/j.bmc.2009.01.077>.
- (40) Chen, I. J.; Neamati, N.; Nicklaus, M. C.; Orr, A.; Anderson, L.; Barchi, J. J.; Kelley, J. A.; Pommier, Y.; MacKerell, A. D. Identification of HIV-1 Integrase Inhibitors via Three-Dimensional Database Searching Using ASV and HIV-1 Integrases as Targets. *Bioorganic Med. Chem.* **2000**, *8* (10), 2385–2398. [https://doi.org/10.1016/S0968-0896\(00\)00180-2](https://doi.org/10.1016/S0968-0896(00)00180-2).
- (41) Marchand, C.; Beutler, J. A.; Wamiru, A.; Budihis, S.; Möllmann, U.; Heinisch, L.; Mellors, J. W.; Le Grice, S. F.; Pommier, Y. Madurahydroxylactone Derivatives as Dual Inhibitors of Human Immunodeficiency Virus Type 1 Integrase and RNase H. *Antimicrob. Agents Chemother.* **2008**, *52* (1), 361–364. <https://doi.org/10.1128/AAC.00883-07>.
- (42) Chen, C. L.; Lee, C. C.; Liu, F. L.; Chen, T. C.; Ahmed Ali, A. A.; Chang, D. M.; Huang, H. S. Design, Synthesis and SARs of Novel Salicylanilides as Potent Inhibitors of RANKL-Induced Osteoclastogenesis and Bone Resorption. *Eur. J. Med. Chem.* **2016**, *117*, 70–84. <https://doi.org/10.1002/jcp.25304>.
- (43) Lee, C.-C.; Liu, F. L.; Chen, C. L.; Chen, T. C.; Chang, D. M.; Huang, H. S. *Discovery of 5-(2',4'-Difluorophenyl)-Salicylanilides as New Inhibitors of Receptor Activator of NF- $\kappa$ B Ligand (RANKL)-Induced Osteoclastogenesis*; Elsevier Ltd, 2015; Vol. 98. <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2015.05.015>.
- (44) Imramovský, A.; Štěpánková, Š.; Vanco, J.; Pauk, K.; Ferriz, J. M.; Vinšová, J.; Jampílek, J. Acetylcholinesterase-Inhibiting Activity of Salicylanilide N-



- Alkylcarbamates and Their Molecular Docking. *Molecules* **2012**, *17*, 10142–10158. <https://doi.org/10.3390/molecules170910142>.
- (45) Krátký, M.; Štěpánková, Š.; Vorčáková, K.; Vinšová, J. Investigation of Salicylanilide and 4-Chlorophenol-Based N-Monosubstituted Carbamates as Potential Inhibitors of Acetyl- and Butyrylcholinesterase. *Bioorg. Chem.* **2018**, *80* (June), 668–673. <https://doi.org/10.1016/j.bioorg.2018.07.017>.
- (46) Marrugal-Lorenzo, J. A.; Serna-Gallego, A.; Berastegui-Cabrera, J.; Pachón, J.; Sánchez-Céspedes, J. Repositioning Salicylanilide Anthelmintic Drugs to Treat Adenovirus Infections. *Sci. Rep.* **2019**, *9* (1), 1–10. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-37290-3>.
- (47) Xu, M.; Lee, E. M.; Wen, Z.; Cheng, Y.; Huang, W. K.; Qian, X.; Tcw, J.; Kouznetsova, J.; Ogden, S. C.; Hammack, C.; et al. Identification of Small-Molecule Inhibitors of Zika Virus Infection and Induced Neural Cell Death via a Drug Repurposing Screen. *Nat. Med.* **2016**, *22* (10), 1101–1107. <https://doi.org/10.1038/nm.4184>.
- (48) Wen, C. C.; Kuo, Y. H.; Jan, J. T.; Liang, P. H.; Wang, S. Y.; Liu, H. G.; Lee, C. K.; Chang, S. T.; Kuo, C. J.; Lee, S. S.; et al. Specific Plant Terpenoids and Lignoids Possess Potent Antiviral Activities against Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus. *J. Med. Chem.* **2007**, *50* (17), 4087–4095. <https://doi.org/10.1021/jm070295s>.
- (49) Zhang, X. W.; Yap, Y. L. Old Drugs as Lead Compounds for a New Disease? Binding Analysis of SARS Coronavirus Main Proteinase with HIV, Psychotic and Parasite Drugs. *Bioorganic Med. Chem.* **2004**, *12* (10), 2517–2521. <https://doi.org/10.1016/j.bmc.2004.03.035>.
- (50) Wu, C. J.; Jan, J. T.; Chen, C. M.; Hsieh, H. P.; Hwang, D. R.; Liu, H. W.; Liu, C. Y.; Huang, H. W.; Chen, S. C.; Hong, C. F.; et al. Inhibition of Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus Replication by Niclosamide. *Antimicrob. Agents Chemother.* **2004**, *48* (7), 2693–2696. <https://doi.org/10.1128/AAC.48.7.2693-2696.2004>.
- (51) Chen, W.; Mook, R. A.; Premont, R. T.; Wang, J. Niclosamide: Beyond an Antihelminthic Drug. *Cell. Signal.* **2018**, *41* (April 2017), 89–96. <https://doi.org/10.1016/j.cellsig.2017.04.001>.
- (52) Wang, B.; Wang, Z.; Ai, F.; Tang, W. K.; Zhu, G. A Monofunctional Platinum(II)-Based Anticancer Agent from a Salicylanilide Derivative: Synthesis, Antiproliferative Activity, and Transcription Inhibition. *J. Inorg. Biochem.* **2015**, *142*, 118–125. <https://doi.org/10.1016/j.jinorgbio.2014.10.003>.
- (53) Xiang, M.; Chen, Z.; Yang, D.; Li, H.; Zuo, Y.; Li, J.; Zhang, W.; Zhou, H.; Jiang, D.; Xu, Z.; et al. Niclosamide Enhances the Antitumor Effects of Radiation by Inhibiting the Hypoxia-Inducible Factor-1 $\alpha$ /Vascular Endothelial Growth Factor Signal. *Oncol. Lett.* **2017**, *14*, 1933–1938. <https://doi.org/10.3892/ol.2017.6372>.
- (54) Wieland, A.; Trageser, D.; Gogolok, S.; Reinartz, R.; Höfer, H.; Keller, M.; Leinhaas, A.; Schelle, R.; Normann, S.; Klaas, L.; et al. Anticancer Effects of Niclosamide in Human Glioblastoma. *Clin. Cancer Res.* **2013**, *19* (15), 4124–4136. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-12-2895>.
- (55) Zhang, L.; Hou, L.; Sun, W.; Yu, Z.; Wang, J.; Gao, H.; Yang, G. Synthesis of P-O-Alkyl Salicylanilide Derivatives as Novel EGFR Inhibitors. *Drug Dev. Res.* **2016**, *77* (1), 37–42. <https://doi.org/10.1002/ddr.21290>.
- (56) Kauerova, T.; Kos, J.; Gonec, T.; Jampilek, J.; Kollar, P. Antiproliferative and Pro-Apoptotic Effect of Novel Nitro-Substituted Hydroxynaphthanilides on Human Cancer Cell Lines. *Int. J. Mol. Sci.* **2016**, *17* (8), 1–14. <https://doi.org/10.3390/ijms17081219>.
- (57) Cheng, T. J. R.; Wu, Y. T.; Yang, S. T.; Lo, K. H.; Chen, S. K.; Chen, Y. H.; Huang, W.

- I.; Yuan, C. H.; Guo, C. W.; Huang, L. Y.; et al. High-Throughput Identification of Antibacterials against Methicillin-Resistant Staphylococcus Aureus (MRSA) and the Transglycosylase. *Bioorganic Med. Chem.* **2010**, *18* (24), 8512–8529. <https://doi.org/10.1016/j.bmc.2010.10.036>.
- (58) Chenna, B. C.; Shinkre, B. A.; King, J. R.; Lucius, A. L.; Narayana, S. V. L.; Velu, S. E. Identification of Novel Inhibitors of Bacterial Surface Enzyme Staphylococcus Aureus Sortase A. *Bioorganic Med. Chem. Lett.* **2008**, *18* (1), 380–385. <https://doi.org/10.1016/j.bmcl.2007.10.051>.
- (59) Triola, G.; Wetzels, S.; Ellinger, B.; Koch, M. A.; Hübel, K.; Rauh, D.; Waldmann, H. ATP Competitive Inhibitors of D-Alanine-d-Alanine Ligase Based on Protein Kinase Inhibitor Scaffolds. *Bioorganic Med. Chem.* **2009**, *17* (3), 1079–1087. <https://doi.org/10.1016/j.bmc.2008.02.046>.
- (60) Krátký, M.; Bosze, S.; Baranyai, Z.; Szabó, I.; Stolaříková, J.; Paraskevopoulos, G.; Vinšová, J. Synthesis and in Vitro Biological Evaluation of 2-(Phenylcarbamoyl)Phenyl 4-Substituted Benzoates. *Bioorganic Med. Chem.* **2015**, *23* (4), 868–875. <https://doi.org/10.1016/j.bmc.2014.12.019>.
- (61) Garcia, C.; Burgain, A.; Chaillot, J.; Pic, É.; Khemiri, I.; Sellam, A. A Phenotypic Small-Molecule Screen Identifies Halogenated Salicylanilides as Inhibitors of Fungal Morphogenesis, Biofilm Formation and Host Cell Invasion. *Sci. Rep.* **2018**, *8* (1), 1–15. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-29973-8>.
- (62) Tharmalingam, N.; Port, J.; Castillo, D.; Mylonakis, E. Repurposing the Anthelmintic Drug Niclosamide to Combat Helicobacter Pylori. *Sci. Rep.* **2018**, No. 8, 1–12. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-22037-x>.
- (63) Imperi, F.; Massai, F.; Pillai, C. R.; Longo, F. New Life for an Old Drug : The Anthelmintic Drug Niclosamide Inhibits Pseudomonas Aeruginosa Quorum Sensing. *Antimicrob. Agents Chemother.* **2013**, *57* (2), 996–1005. <https://doi.org/10.1128/AAC.01952-12>.
- (64) Rajamuthiah, R.; Fuchs, B. B.; Conery, A. L.; Kim, W.; Jayamani, E.; Kwon, B.; Ausubel, F. M.; Mylonakis, E. Repurposing Salicylanilide Anthelmintic Drugs to Combat Drug Resistant Staphylococcus Aureus. *PLoS One* **2015**, *10* (4), 1–19. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0124595>.
- (65) Sun, Z.; Zhang, Y. Antituberculosis Activity of Certain Antifungal and Antihelmintic Drugs. *Tuber. Lung Dis.* **1999**, *79* (5), 319–320. <https://doi.org/10.1054/tuld.1999.0212>.
- (66) De Carvalho, L. P. S.; Darby, C. M.; Rhee, K. Y.; Nathan, C. Nitazoxanide Disrupts Membrane Potential and Intrabacterial PH Homeostasis of Mycobacterium Tuberculosis. *ACS Med. Chem. Lett.* **2011**, *2* (11), 849–854. <https://doi.org/10.1021/ml200157f>.
- (67) Iacobino, A.; Piccaro, G.; Giannoni, F.; Mustazzolu, A.; Fattorini, L. Mycobacterium Tuberculosis Is Selectively Killed by Rifampin and Rifapentine in Hypoxia at Neutral PH. *Antimicrob. Agents Chemother.* **2017**, *61* (3). <https://doi.org/10.1128/AAC.02296-16>.
- (68) Piccaro, G.; Giannoni, F.; Filippini, P.; Mustazzolu, A.; Fattorini, L. Activities of Drug Combinations against Mycobacterium Tuberculosis Grown in Aerobic and Hypoxic Acidic Conditions. *Antimicrob. Agents Chemother.* **2013**, *57* (3), 1428–1433. <https://doi.org/10.1128/AAC.02154-12>.
- (69) Halldin, C. Brain Dopaminergic Systems: Imaging with Positron Tomography, Proceedings of a Workshop Held in Caen, France within the Framework of the European Community Medical and Public Health Research. In *Radioligands for dopamine receptor PET studies: Benzamides and ligands for dopamine D1 receptors*; Baron, J. C., Comar, D., Farde, L., Martinot, J. L., Mazoyer, B., Eds.; Springer Science+Business

- Media Dordrecht: Caen, France, 1991; pp 23–38. <https://doi.org/10.1007/978-94-011-3528-3>.
- (70) Fischer, J.; Robin Ganellin, C. *Antidepressants, Antipsychotics, Anxiolytics From Chemistry and Pharmacology to Clinical Application*; Buschmann, H., Díaz, J. L., Holenz, J., Párraga, A., Torrens, A., Vela, J. M., Eds.; Wiley-VCH, 2007; Vol. 1. <https://doi.org/10.1002/3527608001>.
- (71) *Encyclopedia of Neuroscience*, 9th ed.; Binder, M. D., Nobutaka, H., Windhorst, U., Eds.; Springer-Verlag Berlin Heidelberg, 2009. [https://doi.org/10.1007/978-3-540-29678-2\\_6](https://doi.org/10.1007/978-3-540-29678-2_6).
- (72) Brown, T. M.; Stoudemire, A. *Psychiatric Side Effects of Prescription and Over-the-Counter Medications: Recognition and Management*, 1st ed.; American Psychiatric Press, 1998.
- (73) Claytor, R.; Lile, J. A.; Nader, M. A. The Effects of Eticlopride and the Selective D3-Antagonist PNU 99194-A on Food- and Cocaine-Maintained Responding in Rhesus Monkeys. *Pharmacol. Biochem. Behav.* **2006**, *83* (3), 456–464. <https://doi.org/10.1016/j.pbb.2006.03.007>.
- (74) van den Brink, W. J.; Wong, Y. C.; Gülave, B.; van der Graaf, P. H.; de Lange, E. C. M. Revealing the Neuroendocrine Response After Remoxipride Treatment Using Multi-Biomarker Discovery and Quantifying It by PK/PD Modeling. *AAPS J.* **2017**, *19* (1), 274–285. <https://doi.org/10.1208/s12248-016-0002-3>.
- (75) van den Brink, W. J.; Palic, S.; Kohler, I.; de Lange, E. C. M. Access to the CNS: Biomarker Strategies for Dopaminergic Treatments. *Pharm. Res.* **2018**, *35* (5). <https://doi.org/10.1007/s11095-018-2388-x>.
- (76) Vander, A. J.; Sherman, J.; Luciano, D. S. *Human Physiology: The Mechanisms of Body Function*, 9th editio.; McGraw-Hill Education - Europe, 2003.
- (77) Cheng, K.; Zheng, Q. Z.; Qian, Y.; Shi, L.; Zhao, J.; Zhu, H. L. Synthesis, Antibacterial Activities and Molecular Docking Studies of Peptide and Schiff Bases as Targeted Antibiotics. *Bioorganic Med. Chem.* **2009**, *17* (23), 7861–7871. <https://doi.org/10.1016/j.bmc.2009.10.037>.
- (78) 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* (29), 5007–5011. <https://doi.org/10.1016/j.tetlet.2006.05.110>.
- (79) Imramovský, A.; Pesko, M.; Králová, K.; Vejsova, 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* (3), 2414–2430. <https://doi.org/10.3390/molecules16032414>.
- (80) Pauk, K.; Zdražilová, I.; Imramovský, A.; Vinšová, J.; Pokorná, M.; Masaříková, M.; Čížek, A.; Jampílek, J. New Derivatives of Salicylamides: Preparation and Antimicrobial Activity against Various Bacterial Species. *Bioorganic Med. Chem.* **2013**, *21* (21), 6574–6581. <https://doi.org/10.1016/j.bmc.2013.08.029>.
- (81) Zdražilová, I.; Pospíšilová, Š.; Pauk, K.; Imramovský, A.; Vinšová, J.; Čížek, A.; Jampílek, J. In Vitro Bactericidal Activity of 4- and 5-Chloro-2-Hydroxy- N -[1-Oxo-1-(Phenylamino)Alkan-2-Yl]Benzamides against MRSA. *Biomed Res. Int.* **2015**, 1–8. <https://doi.org/10.1155/2015/349534>.
- (82) Mollaghan, A.; Vinšová, J.; Imramovský, A.; Cotter, L.; Lucey, B.; Mahony, J. O.; Costelloe, A.; Coffey, A. Antistaphylococcal Activity of Novel Salicylanilide Derivatives. *Curr. Drug Discov. Technol.* **2012**, *9* (1), 39–47. [https://doi.org/1875-6220/12 \\$58.00+.00](https://doi.org/1875-6220/12 $58.00+.00).

- (83) Kushkevych, I.; Kollar, P.; Luisa, A.; Palma, D.; Duarte, A.; Manuel, M.; Bartos, M.; Pauk, K. ScienceDirect Antimicrobial Effect of Salicylamide Derivatives against Intestinal Sulfate-Reducing Bacteria. *J. Appl. Biomed.* **2016**, 1–6. <https://doi.org/10.1016/j.jab.2016.01.005>.
- (84) Imramovský, A.; Jorda, R.; Pauk, K.; Řezníčková, E.; Dušek, J.; Hanusek, J.; Kryštof, V. Substituted 2-Hydroxy-N-(Arylalkyl)Benzamides Induce Apoptosis in Cancer Cell Lines. *Eur. J. Med. Chem.* **2013**, *68*, 253–259. <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2013.08.009>.
- (85) Klionsky, D. J. *Autophagy - Guidelines for the Use and Interpretation of Assays for Monitoring Autophagy*; Wiley, 2015. <https://doi.org/10.1080/15548627.2015.1100356>.
- (86) Páchníková, G.; Uldrijan, S.; Imramovský, A.; Kryštof, V.; Slaninová, I. Substituted 2-Hydroxy-N-(Arylalkyl)Benzamide Sensitizes Cancer Cells to Metabolic Stress by Disrupting Actin Cytoskeleton and Inhibiting Autophagic Flux Gabriela. *Toxicol. Vitr.* **2016**, *37*, 70–78. <https://doi.org/10.1016/j.tiv.2016.09.006>.
- (87) Mizushima, N.; Yoshimori, T. How to Interpret LC3 Immunoblotting. *Autophagy* **2007**, *3* (6), 542–545. <https://doi.org/10.4161/auto.4600>.
- (88) Mu, F.; Coffing, S. L.; Riese, D. J.; Geahlen, R. L.; Verdier-Pinard, P.; Hamel, E.; Johnson, J.; Cushman, M. Design, Synthesis, and Biological Evaluation of a Series of Lavendustin A Analogues That Inhibit EGFR and Syk Tyrosine Kinases, as Well as Tubulin Polymerization. *J. Med. Chem.* **2001**, *44* (3), 441–452. <https://doi.org/10.1021/jm000387g>.
- (89) Mu, F.; Lee, D. J.; Pryor, D. E.; Hamel, E.; Cushman, M. Synthesis and Investigation of Conformationally Restricted Analogues of Lavendustin A as Cytotoxic Inhibitors of Tubulin Polymerization. *J. Med. Chem.* **2002**, *45* (21), 4774–4785. <https://doi.org/10.1021/jm0202270>.
- (90) Galal, A. M. F.; Soltan, M. M.; Ahmed, E. R.; Hanna, A. G. Synthesis and Biological Evaluation of Novel 5-Chloro-N-(4-Sulfamoylbenzyl) Salicylamide Derivatives as Tubulin Polymerization Inhibitors. *Medchemcomm* **2018**, *9* (9), 1511–1528. <https://doi.org/10.1039/C8MD00214B>.
- (91) Neamati, N.; Hong, H.; Owen, J. M.; Sunder, S.; Winslow, H. E.; Christensen, J. L.; Zhao, H.; Burke, T. R.; Milne, G. W. A.; Pommier, Y. Salicylhydrazine-Containing Inhibitors of HIV-1 Integrase: Implication for a Selective Chelation in the Integrase Active Site. *J. Med. Chem.* **1998**, *41* (17), 3202–3209. <https://doi.org/10.1021/jm9801760>.
- (92) Neamati, N.; Sunder, S.; Pommier, Y. Design and Discovery of HIV-1 Integrase Inhibitors. *Drug Discov. Today* **1997**, *2* (11), 487–498. [https://doi.org/10.1016/S1359-6446\(97\)01105-7](https://doi.org/10.1016/S1359-6446(97)01105-7).
- (93) Cotellet, P. Patented HIV-1 Integrase Inhibitors (1998-2005). *Recent Pat. Antiinfect. Drug Discov.* **2006**, *1* (1), 1–15. <https://doi.org/10.2174/157489106775244082>.
- (94) Dayam, R.; Sanchez, T.; Clement, O.; Shoemaker, R.; Sei, S.; Neamati, N.  $\beta$ -Diketo Acid Pharmacophore Hypothesis. 1. Discovery of a Novel Class of HIV-1 Integrase Inhibitors. *J. Med. Chem.* **2005**, *48*, 111–120. <https://doi.org/10.1021/jm0496077>.
- (95) Krátký, M.; Vinšová, J. Antiviral Activity of Substituted Salicylanilides--a Review. *Mini Rev. Med. Chem.* **2011**, *11* (11), 956–967. <https://doi.org/BSP/MRMC/Epub/248> [pii].
- (96) Pfefferkorn, J. A.; Nugent, R.; Gross, R. J.; Greene, M.; Mitchell, M. A.; Reding, M. T.; Funk, L. A.; Anderson, R.; Wells, P. A.; Shelly, J. A.; et al. Inhibitors of HCV NS5B Polymerase. Part 2: Evaluation of the Northern Region of (2Z)-2-Benzoylamino-3-(4-Phenoxy-Phenyl)-Acrylic Acid. *Bioorganic Med. Chem. Lett.* **2005**, *15* (11), 2812–2818. <https://doi.org/10.1016/j.bmcl.2005.03.106>.

- (97) Luo, G.; Colonna, R.; Krystal, M. Characterization of a Hemagglutinin-Specific Inhibitor of Influenza A Virus. *Virology* **1996**, *226* (1), 66–76. <https://doi.org/10.1006/viro.1996.0628>.
- (98) Krug, R. M.; Aramini, J. M. Emerging Antiviral Targets for Influenza A Virus. *Trends Pharmacol. Sci.* **2009**, *30* (6), 269–277. <https://doi.org/10.1016/j.tips.2009.03.002>.
- (99) Basu, D.; Walkiewicz, M. P.; Frieman, M.; Baric, R. S.; Auble, D. T.; Engel, D. A. Novel Influenza Virus NS1 Antagonists Block Replication and Restore Innate Immune Function. *J. Virol.* **2009**, *83* (4), 1881–1891. <https://doi.org/10.1128/jvi.01805-08>.
- (100) Rollinger, J. M.; Schmidtke, M. The Human Rhinovirus: Human- Pathological Impact, Mechanisms Of Antirhinoviral Agents, And Strategies For Their Discovery. *Med. Res. Rev.* **2010**, *31* (1), 42–92. <https://doi.org/10.1002/med>.
- (101) Liu, B.; Qiu, Q.; Zhao, T.; Jiao, L.; Li, Y.; Huang, W. 6,7-Dimethoxy-2-{2-[4-(1H-1,2,3-Triazol-1-Yl)Phenyl]Ethyl}-1,2,3,4-Tetrahydroisoquinolines as Superior Reversal Agents for P-Glycoprotein-Mediated Multidrug Resistance. *Chem. Med. Chem.* **2015**, *10* (2), 336–344. <https://doi.org/10.1002/cmdc.201402463>.
- (102) Lu, C.-R.; Zhao, B.; Jiang, Y.; Ding, H. One-Pot Synthesis of Salicylanilides by Direct Amide Bond Formation from Salicylic Acid Under Microwave Irradiation. *Synth. Commun.* **2011**, *41*, 1257–1266. <https://doi.org/10.1080/00397911.2010.481745>.
- (103) Colombo, M.; Bossolo, S.; Aramini, A. Phosphorus Trichloride-Mediated and Microwave-Assisted Synthesis of a Small Collection of Amides Bearing Strong Electron-Withdrawing Group Substituted Anilines. *J. Comb. Chem.* **2009**, *11* (3), 335–337. <https://doi.org/10.1021/cc900011z>.
- (104) 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. (Weinheim)*. **2003**, *336* (1), 53–71. <https://doi.org/10.1002/ardp.200390004>.
- (105) Waisser, K.; Matyk, J.; Divišová, H.; Husáková, P.; Kuneš, J.; Klimešová, V.; Kaustová, J.; Möllmann, U.; Dahse, H. M.; Miko, M. The Oriented Development of Antituberculotics: Salicylanilides. *Arch. Pharm. (Weinheim)*. **2006**, *339* (11), 616–620. <https://doi.org/10.1002/ardp.200600093>.
- (106) Zhu, Z.-W.; Shi, L.; Ruan, X.-M.; Yang, Y.; Li, H.; Xu, S.; Zhu, Z.-W.; Shi, L.; Ruan, X.; Yang, Y.; et al. Synthesis and Antiproliferative Activities against Hep-G2 of Salicylanilide Derivatives : Potent Inhibitors of the Epidermal Growth Factor Receptor ( EGFR ) Tyrosine Kinase Synthesis and Antiproliferative Activities against Hep-G2 of Salicylanilide Derivative. *J. Enzym. Inhib. Med. Chem.* **2011**, *26* (1), 37–45. <https://doi.org/10.3109/14756361003671060>.
- (107) Yoshino, T.; Sato, I.; Hiram, M. Total Synthesis of Aspercyclides a and b via Intramolecular Oxidative Diaryl Ether Formation. *Org. Lett.* **2012**, *14* (16), 4290–4292. <https://doi.org/10.1021/ol3019727>.
- (108) Das, K. V.; Rekha, R.; Jyoti, A. Applied Catalysis A : General Recyclable , Highly Efficient and Low Cost Nano-MgO for Amide Synthesis under SFRC : A Convenient and Greener ‘ NOSE ’ Approach. *Applied Catal. A, Gen.* **2013**, *456*, 118–125. <https://doi.org/10.1016/j.apcata.2013.02.016>.
- (109) Wu, Y.; Wang, S.; Zhang, L.; Yang, G.; Zhu, X.; Zhou, Z.; Zhu, H.; Wu, S. Cyclopentadienyl-Free Rare-Earth Metal Amides [(CH<sub>2</sub>SiMe<sub>2</sub>){(2,6-IPr<sub>2</sub>C<sub>6</sub>H<sub>3</sub>N)}<sub>2</sub>]Ln{N(SiMe<sub>3</sub>)<sub>2</sub>}(THF)] as Highly Efficient Versatile Catalysts for C–C and C–N Bond Formation. *European J. Org. Chem.* **2010**, 326–332. <https://doi.org/10.1002/ejoc.200901015>.
- (110) Hu, Q.; Wang, L.; Wang, C.; Wu, Y.; Ding, Z.; Yuan, R. Ligand-Free Pd(0)/SiO<sub>2</sub>-

- Catalyzed Aminocarbonylation of Aryl Iodides to Amides under Atmospheric CO Pressure. *RSC Adv.* **2017**, 7 (59), 37200–37207. <https://doi.org/10.1039/c7ra04985d>.
- (111) Liu, X.; Zhang, H.; Wu, C.; Liu, Z.; Chen, Y.; Liu, Z. Copper-Catalyzed Synthesis of Benzanilides from Lignin Model Substrates 2-Phenoxyacetophenones under an Air Atmosphere. *New J. Chem.* **2018**, 42, 1223–1227. <https://doi.org/10.1039/c7nj02589k>.
- (112) Imramovský, A.; Pauk, K.; Pejchal, V.; Hanusek, J. Salicylanilides and Their Derivates as Perspective Anti-Tuberculosis Drugs : Synthetic Routes and Biological Evaluations. *Mini. Rev. Org. Chem.* **2011**, 8, 211–220.
- (113) Song, X. Q.; Liu, P. P.; Liu, Y. A.; Zhou, J. J.; Wang, X. L. Two Dodecanuclear Heterometallic [Zn<sub>6</sub>Ln<sub>6</sub>] Clusters Constructed by a Multidentate Salicylamide Salen-like Ligand: Synthesis, Structure, Luminescence and Magnetic Properties. *Dalt. Trans.* **2016**, 45 (19), 8154–8163. <https://doi.org/10.1039/c6dt00212a>.
- (114) Chojnacka, M. W.; Batey, R. A. Total Synthesis of (+)-Prunostatin A: Utility of Organotrifluoroborate-Mediated Prenylation and Shiina MNBA Esterification and Macrolactonization to Avoid a Competing Thorpe-Ingold Effect Accelerated Transesterification. *Org. Lett.* **2018**, 20 (18), 5671–5675. <https://doi.org/10.1021/acs.orglett.8b02396>.
- (115) Salim, A. A.; Cho, K.-J.; Tan, L.; Quezada, M.; Lacey, E.; Hancock, J. F.; Capon, R. J. Rare Streptomyces N-Formyl Amino-Salicylamides Inhibit Oncogenic K-Ras. *Org. Lett.* **2014**, 16 (19), 5036–5039. <https://doi.org/10.1586/14737175.2015.1028369>. Focused.
- (116) Armstrong, A.; Li, W. Carbonyl Diimidazole. In *Encyclopedia of Reagents of Organic Synthesis*; Poquette, L. A., Ed.; John Wiley and Sons, Ltd., 2007; Vol. 8. <https://doi.org/10.1002/047084289X>.
- (117) Schofield, C. J.; Rydzik, A.; McDonough, M.; Chowdhury, R. Chemical Compounds. WO 2015/092412 A1, 2015.
- (118) Soni, K.; Sah, A. K. The Synthesis of Amino Acid Derived Glycoconjugates and the Investigation of Their Anti-Inflammatory and Analgesic Properties. *RSC Adv.* **2014**, 4 (12), 6068–6073. <https://doi.org/10.1039/c3ra43201g>.
- (119) Joullié Madeleine M.; Lassen Kenneth M. Evolution of Amide Bond Formation. *Arkivoc* **2010**, 8, 189–250. <https://doi.org/10.3998/ark.5550190.0011.816>.
- (120) Davis, B. G. Synthesis of Glycoproteins. *Chem. Rev.* **2002**, 102 (2), 579–601. <https://doi.org/10.1021/cr0004310>.
- (121) Sheehan, J. C.; Hess, G. P. A New Method of Forming Peptide Bonds. *J. Am. Chem. Soc.* **1955**, 77 (4), 1067–1068. <https://doi.org/10.1021/ja01609a099>.
- (122) 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 (37), 11342–11343. <https://doi.org/10.1021/ja0752585>.
- (123) Takechi, S.; Kumagai, N.; Shibasaki, M. Catalytic Asymmetric Hydroxylation of ??-Alkoxy carbonyl Amides with a Pr(OiPr)<sub>3</sub>/Amide-Based Ligand Catalyst. *Tetrahedron Lett.* **2011**, 52 (17), 2140–2143. <https://doi.org/10.1016/j.tetlet.2010.11.064>.
- (124) Matsuzawa, A.; Nojiri, A.; Kumagai, N.; Shibasaki, M. Solvent-Dependent Self-Discrimination of Bis(2-Hydroxyphenyl)Diamides. *Chem. - A Eur. J.* **2010**, 16 (17), 5036–5042. <https://doi.org/10.1002/chem.201000321>.
- (125) Matsuzawa, A.; Mashiko, T.; Kumagai, N.; Shibasaki, M. La/Ag Heterobimetallic Cooperative Catalysis: A Catalytic Asymmetric Conia-Ene Reaction. *Angew. Chemie - Int. Ed.* **2011**, 50 (33), 7616–7619. <https://doi.org/10.1002/anie.201102114>.
- (126) Nojiri, A.; Kumagai, N.; Shibasaki, M. Linking Structural Dynamics and Functional

- Diversity in Asymmetric Catalysis. *J. Am. Chem. Soc.* **2009**, *131* (10), 3779–3784. <https://doi.org/10.1021/ja900084k>.
- (127) 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. <https://doi.org/10.1021/ja800326d>.
- (128) 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. <https://doi.org/10.1021/ol8008446>.
- (129) 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. <https://doi.org/10.1021/ja9052653>.
- (130) Hashimoto, K.; Kumagai, N.; Shibasaki, M. A Carbon Nanotube Confinement Strategy to Implement Homogeneous Asymmetric Catalysis in the Solid Phase. *Chemistry* **2015**, *21* (11), 4262–4266. <https://doi.org/10.1002/chem.201406402>.
- (131) Pauk, K. Syntéza a Biologická Aktivita N-Aryl/Alkyl-Salicylamidů a Jejich Prekurzorů, Univerzita Pardubice, 2013.
- (132) 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* (1), 23–26. <https://doi.org/10.1016/j.tetlet.2009.10.084>.
- (133) 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 - Support Info. *J. Comb. Chem.* **2010**, *5*, 1–111.
- (134) Wagner, I.; Musso, H. New Naturally Occurring Amino Acids. *Angew. Chemie Int. Ed. English* **1983**, *22* (11), 816–828. <https://doi.org/10.1002/anie.198308161>.
- (135) Srinivasan, G.; James, C. M.; Krzycki, J. A. Pyrrolysine Encoded by UAG in Archaea: Charging of a UAG-Decoding Specialized tRNA. *Science (80-. )*. **2002**, *296* (5572), 1459–1462. <https://doi.org/10.1126/science.1069588>.
- (136) Zhang, Y.; Gladyshev, V. N. High Content of Proteins Containing 21st and 22nd Amino Acids, Selenocysteine and Pyrrolysine, in a Symbiotic Deltaproteobacterium of Gutless Worm *Olavius Algarvensis*. *Nucleic Acids Res.* **2007**, *35* (15), 4952–4963. <https://doi.org/10.1093/nar/gkm514>.
- (137) Banting, F. G.; Best, C. H.; Collip, J. B.; Campbell, W. R.; Fletcher, A. A. Pancreatic Extracts in the Treatment of Diabetes Mellitus. *Can. Med. Assoc. J.* **1922**, *12*, 141–146. <https://doi.org/10.2337/diab.5.1.69>.
- (138) Mäde, V.; Els-Heindl, S.; Beck-Sickinger, A. G. Automated Solid-Phase Peptide Synthesis to Obtain Therapeutic Peptides. *Beilstein J. Org. Chem.* **2014**, *10*, 1197–1212. <https://doi.org/10.3762/bjoc.10.118>.
- (139) Kaspar, A. A.; Reichert, J. M. Future Directions for Peptide Therapeutics Development. *Drug Discov. Today* **2013**, *18* (17–18), 807–817. <https://doi.org/10.1016/j.drudis.2013.05.011>.
- (140) Fosgerau, K.; Hoffmann, T. Peptide Therapeutics: Current Status and Future Directions. *Drug Discov. Today* **2015**, *20* (1), 122–128. <https://doi.org/10.1016/j.drudis.2014.10.003>.
- (141) Lau, J. L.; Dunn, M. K. Therapeutic Peptides: Historical Perspectives, Current Development Trends, and Future Directions. *Bioorganic Med. Chem.* **2018**, *26* (10), 2700–2707. <https://doi.org/10.1016/j.bmc.2017.06.052>.

- (142) Luknitskii, F. I.; Vovsi, B. A. Ketens in Situ and Cycloaddition to Them. *Usp. Khim.* **1969**, 38 (6), 1072–1088.
- (143) Montalbetti, C. A. G. N.; Falque, V. Amide Bond Formation and Peptide Coupling. *Tetrahedron* **2005**, 61 (46), 10827–10852. <https://doi.org/10.1007/s12016-015-8469-8>.
- (144) Merrifield, R. B. Solid Phase Peptide Synthesis - The Synthesis Of a Tetrapeptide. *J Am Chem Soc* **1963**, 85 (14), 2149–2154. <https://doi.org/10.1021/ja00897a025>.
- (145) Greenberg, M. L.; Cammack, N. Resistance to Enfuvirtide , the First HIV Fusion Inhibitor. *J. Antimicrob. Chemother.* **2004**, 54 (2), 333–340. <https://doi.org/10.1093/jac/dkh330>.
- (146) Enders, D.; Ley, S. V; Mehta, G.; Nicolaou, K. C.; Noyori, R.; Overman, L. E.; Padwa, A.; Polanc, S. *Heterocyclic Scaffolds II: Indoles: Synthesis, Properties and Applications*; Maes, B. U. W., Gribble, G. W., Eds.; Springer-Verlag Berlin Heidelberg, 2010.
- (147) Anand, S. X.; Kim, M. C.; Kamran, M.; Sharma, S. K.; Kini, A. S.; Fareed, J.; Hoppensteadt, D. A.; Carbon, F.; Cavusoglu, E.; Varon, D.; et al. Comparison of Platelet Function and Morphology in Patients Undergoing Percutaneous Coronary Intervention Receiving Bivalirudin Versus Unfractionated Heparin Versus Clopidogrel Pretreatment and Bivalirudin. *Am. J. Cardiol.* **2007**, 100 (3), 417–424. <https://doi.org/10.1016/j.amjcard.2007.02.106>.
- (148) Thayer, A. M. Making Peptides At Large Scale. *Chem. Eng. News* **2011**, 89 (22), 21–25.
- (149) Gawne, G.; Kenner, G. W.; Sheppard, R. C. Acyloxyphosphonium Salts as Acylating Agents. A New Synthesis of Peptides. *J. Am. Chem. Soc.* **1969**, 91 (20), 5669–5671. <https://doi.org/10.1021/ja01048a057>.
- (150) Castro, B.; Dormoy, J. R.; Evin, G.; Selve, C. Reactifs de Couplage Peptidique IV (1) - L'Hexafluorophosphate de Benzotriazolyl N-Oxytrisdiméthylmino Phosphonium (BOP) 0. *Tetrahedron Lett.* **1975**, 14, 1219–1222.
- (151) Subirós-Funosas, R.; El-Faham, A.; Albericio, F. PyOxP and PyOxB : The Oxyma-Based Novel Family of Phosphonium Salts. *Org. Biomol. Chem.* **2010**, 8, 3665–3673. <https://doi.org/10.1039/c003719b>.
- (152) Lee, J. B. Preparation of Acyl Halides under Very Mild Conditions. *J. Am. Chem. Soc.* **1966**, 88 (14), 3440–3441.
- (153) Yamada, S.; Takeuchi, Y. A New Method for the Synthesis of Peptides Using the Adducts of Phosphorus Compounds and Tetrahalomethanes. *Tetrahedron Lett.* **1971**, 39, 3595–3598.
- (154) Bates, A. J.; Galpin, I. J.; Hallett, A.; Hudson, D.; Kenner, G. W.; Ramage, R. A New Reagent for Polypeptide Synthesis: P-Oxo-Bis-[Tris-(Dimethylamino)-Phosphonium]-Bis-Tetrafluoroborate. *Helv. Chim. Acta* **1975**, 58 (80), 688–696.
- (155) Hudson, D. Methodological Implications of Simultaneous Solid-Phase Peptide Synthesis. 1. Comparison of Different Coupling Procedures. *J. Org. Chem.* **1988**, 53, 617–624.
- (156) Jaradat, D. M. M. Thirteen Decades of Peptide Synthesis : Key Developments in Solid Phase Peptide Synthesis and Amide Bond Formation Utilized in Peptide Ligation. *Amino Acids* **2017**, 50 (1), 39–68. <https://doi.org/10.1007/s00726-017-2516-0>.
- (157) Dourtoglou, V.; Gross, B. O-Benzotriazolyl-N,N,N',N'-Tetramethyluronium Hexafluorophosphate as Coupling Reagent for the Synthesis of Peptides of Biological Interest. *Synthesis (Stuttg.)* **1984**, 572–574.
- (158) Dourtoglou, V.; Ziegler, J.; Gross, B.; Officielle, C.; Cedex, N. L'hexafluorophosphate De O-Benzotriazolyl-N,N-Tetramethyluronium: Un Réactif De Couplage Peptidique



- Nouveau Et Efficace. *Tetrahedron Lett.* **1978**, *15*, 1269–1272.
- (159) Carpino, L. A. 1-Hydroxy-7-Azabenzotriazole. An Efficient Peptide Coupling Additive. *J. Am. Chem. Soc.* **1993**, *115*, 4397–4398.
- (160) Albericio, F.; Bofill, J. M.; El-Faham, A.; Kates, S. A. Use of Onium Salt-Based Coupling Reagents in Peptide Synthesis. *J. Org. Chem.* **1998**, *63*, 9678–9683.
- (161) Knorr, R.; Trzeciak, A.; Bannwarth, W.; Gillissen, D. New Coupling Reagents In Peptide Chemistry. *Tetrahedron Lett.* **1989**, *30* (15), 1927–1930.
- (162) Bannwarth, W.; Schmidt, D.; Stallard, R. L.; Hornung, C.; Knorr, R.; Müller, F. Bathophenanthroline-Ruthenium(II) Complexes as Non-Radioactive Labels for Oligonucleotides Which Can Be Measured by Time-Resolved Fluorescence Techniques. *Helv. Chim. Acta* **1988**, *71*, 2085–2099.
- (163) El-Faham, A.; Funosas, S. R.; Prohens, R.; Albericio, F. COMU: A Safer and More Effective Replacement for Benzotriazole-Based Uronium Coupling Reagents. *Chem. – A Eur. J.* **2009**, *15*, 9404–9416. <https://doi.org/10.1002/chem.200900615>.
- (164) Grahl-Nielsen, O. Racemisation in Peptide Synthesis. *J. Chem. Soc. D Chem. Commun.* **1971**, No. 24, 1588–1589. <https://doi.org/10.1039/c29710001588>.
- (165) Slebioda, M.; St.Amand, M. A.; Chen, F. M. F.; Benoiton, N. L. Studies on the Kinetics of Racemization of 2,4-Disubstituted-5(4H)-Oxazolones. *Can. J. Chem.* **1988**, *66*, 2540–2544.
- (166) Valeur, E.; Bradley, M. Amide Bond Formation: Beyond the Myth of Coupling Reagents. *Chem. Soc. Rev.* **2009**, *38* (2), 606–631. <https://doi.org/10.1039/b701677h>.
- (167) König, W.; Geiger, R. Racemisierung Bei Peptidsynthesen. *Chem. Ber.* **1970**, *103* (7), 2024–2033. <https://doi.org/10.1002/cber.19701030704>.
- (168) König, W.; Geiger, R. Eine Neue Methode Zur Synthese von Peptiden: Aktivierung Der Carboxylgruppe Mit Dicyclohexylcarbodiimid Unter Zusatz von 1-Hydroxybenzotriazolonen. *Chem. Ber.* **1970**, *103* (3), 788–798. <https://doi.org/10.1002/cber.19701030319>.
- (169) Williams, A.; Ibrahim, I. T. Carbodiimide Chemistry: Recent Advances. *Chem. Rev.* **1981**, *81* (6), 589–636. <https://doi.org/10.1021/cr00046a004>.
- (170) Carpino, L. A.; Imazumi, H.; Foxman, B. M.; Vela, M. J.; Henklein, P.; El-Faham, A.; Klose, J.; Bienert, M. Comparison of the Effects of 5- and 6-HOAt on Model Peptide Coupling Reactions Relative to the Cases for the 4- and 7-Isomers. *Org. Lett.* **2000**, *2* (15), 2253–2256. <https://doi.org/10.1021/ol006013z>.
- (171) Sheehan, J. C.; Boshart, G. L.; Cruickshank, P. A. A Convenient Synthesis of Water-Soluble Carbodiimides. *J. Org. Chem.* **1961**, *26* (7), 2525–2528. <https://doi.org/10.1021/jo01351a600>.
- (172) Sheehan, J. C.; Hlavka, J. J. The Use of Water-Soluble and Basic Carbodiimides in Peptide Synthesis. *J. Org. Chem.* **1956**, *21*, 439–441.
- (173) Izdebski, J.; Kunce, D. Evaluation of Carbodiimides Using a Competition Method. *J. Pept. Sci.* **1997**, *3* (2), 141–144. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1099-1387\(199703\)3:2<141::AID-PSC93>3.0.CO;2-A](https://doi.org/10.1002/(SICI)1099-1387(199703)3:2<141::AID-PSC93>3.0.CO;2-A).
- (174) Al-Warhi, T. I.; Al-Hazimi, H. M. A.; El-Faham, A. Recent Development in Peptide Coupling Reagents. *J. Saudi Chem. Soc.* **2012**, *16* (2), 97–116. <https://doi.org/10.1016/j.jscs.2010.12.006>.
- (175) Gibson, F. S.; Park, M. S.; Rapoport, H. Bis[[4-(2,2-Dimethyl-1,3-Dioxolyl)]Methyl]-Carbodiimide (BDDC) and Its Application to Residue-Free Esterifications, Peptide Couplings, and Dehydrations. *J. Org. Chem.* **1994**, *59* (24), 7503–7507.

<https://doi.org/10.1021/jo00103a054>.

- (176) Vaino, A. R.; Janda, K. D. Solid-Phase Organic Synthesis: A Critical Understanding of the Resin. *J. Comb. Chem.* **2000**, *2* (6), 579–596.
- (177) Blackburn, C. Polymer Supports for Solid-Phase Organic Synthesis. *Biopolym. (Peptide Sci.)* **1998**, *47*, 311–351.
- (178) Kent, S. B. H. Chemical Synthesis of Peptides and Proteins. *Annu. Rev. Biochem.* **1988**, No. 57, 957–987.
- (179) García-Martín, F.; Quintanar-Audelo, M.; García-Ramos, Y.; Cruz, L. J.; Gravel, C.; Furic, R.; Coté, S.; Tulla-Puche, J.; Albericio, F. ChemMatrix, a Poly (Ethylene Glycol)-Based Support for the Solid-Phase Synthesis of Complex Peptides. *J. Comb. Chem.* **2006**, *8*, 213–220.
- (180) Zalipsky, S.; Chang, J. L.; Albericio, F.; Barany, G. Reactive Polymers Preparation and Applications of Polyethylene Glycol-Polystyrene Graft Resin Supports for Solid-Phase Peptide Synthesis. *React. Polym.* **1994**, *22*, 243–258.
- (181) Atherton, E.; Fox, H.; Harkiss, D.; Logan, C. J.; Sheppard, R. C.; Williams, B. J. A Mild Procedure for Solid Phase Peptide Synthesis: Use of Fluorenylmethoxycarbonylamino Acids. *J. Chem. Soc. Chem. Commun.* **1978**, 537–539.
- (182) Atherton, E.; Brown, E.; Sheppard, R. C. A Physically Supported Gel Polymer for Low Pressure, Continuous Flow Solid Phase Reactions. Application to Solid Phase Peptide Synthesis. *J. Chem. Soc. Chem. Commun.* **1981**, 1151–1152.
- (183) Wellings, D. A.; Atherton, E. Cleavage by Reduction: Synthesis of Peptide Alcohols. **1997**, *9*, 44–67.
- (184) Melda, M. P. Pega: A Flow Stable Polyethylene Glycol Dimethyl Acrylamide Copolymer For Solid Phase Synthesis. *Tetrahedron Lett.* **1992**, *33* (21), 3077–3080.
- (185) Berg, R. H.; Almdal, S. K.; Pedersen, W. B.; Holm, A.; Tam, J. P.; Merrifield, R. B. Long-Chain Polystyrene-Grafted Polyethylene Film Matrix: A New Support for Solid-Phase Peptide Synthesis. *J. Am. Chem. Soc.* **1989**, *111*, 8024–8026.
- (186) Wieland, T.; Birr, C.; Flor, F. Über Peptidsynthesen, XLI: Synthese von Antamanid Mit Der Merrifield-Technik. *Justus Liebigs Ann. Chem.* **1969**, *727*, 130–137.
- (187) Soral, M.; Hlaváč, J.; Krchňák, V. Linkers for Solid-Phase Peptide Synthesis. In *Amino Acids, Peptides and Proteins in Organic Chemistry. Vol.3 – Building Blocks, Catalysis and Coupling Chemistry*; Hughes, A. B., Ed.; Wiley-VCH: Weinheim, 2011; Vol. 3, pp 273–312.
- (188) Wang, S. P-Alkoxybenzyl Alcohol Resin and p-Alkoxybenzyloxycarbonylhydrazide Resin for Solid Phase Synthesis of Protected Peptide Fragments. *J. Am. Chem. Soc.* **1973**, *6*, 1328–1333.
- (189) Rink, H. Solid-Phase Synthesis Of Protected Peptide Fragments Using A Trialkoxy-Diphenyl-Methylester Resin. *Tetrahedron Lett.* **1987**, *28* (33), 3787–3790.
- (190) Garigipati, R. S. Reagents For Combinatorial Organic Synthesis: Preparation and Uses of Rink-Chloride. *Tetrahedron Lett.* **1997**, *38* (39), 6807–6810.
- (191) Semenov, A. N.; Gordeev, K. Y. A Novel Oxidation-Labile Linker for Solid-Phase Peptide Synthesis. *Int. J. Pept. Protein Res.* **1995**, *45*, 303–304.
- (192) Mitchell, A. R.; Erickson, B. W.; Ryabtsev, M. N.; Merrifield, R. B. Tert-Butoxycarbonylaminoacyl-4-(Xymethyl)-Phenylacetamidomethyl-Resin, a More Acid-Resistant Support for Solid-Phase Peptide Synthesis. *J. Am. Chem. Soc.* **1976**, *98* (23), 7357–7362.

- (193) DeGrado, W. F.; Kaiser, E. T. Polymer-Bound Oxime Esters as Supports for Solid-Phase Peptide Synthesis. Preparation of Protected Peptide Fragments. *J. Org. Chem.* **1980**, *45*, 1295–1300. <https://doi.org/10.1021/jo01295a026>.
- (194) Canne, L. E.; Walker, S. M.; Kent, S. B. H. A General Method for the Synthesis of Thioester Resin Linkers for Use in the Solid Phase Synthesis of Peptide- $\alpha$ -Thioacids. *Tetrahedron Lett.* **1995**, *36* (8), 1217–1220.
- (195) Gaertner, H.; Villain, M.; Botti, P.; Canne, L. Synthesis of a Thioester Linker Precursor for a General Preparation of Peptide C-Terminal Thioacids. *Tetrahedron Lett.* **2004**, *45*, 2239–2241. <https://doi.org/10.1016/j.tetlet.2003.12.160>.
- (196) Pietta, P. G.; Marshall, G. R. Amide Protection and JAtamide Supports in Solid-Phase Peptide Synthesis. *Chem. Commun.* **1970**, *4*, 650–651.
- (197) Letsinger, L. R.; Kornet, M. J.; Mahadevan, V.; Jerina, D. M. Reactions on Polymer Supports. *Org. Biol. Chem.* **1964**, *86*, 5163–5165.
- (198) Letsinger, L. R.; Kornet, M. J. Popcorn Polymer as a Support in Multistep Syntheses. *J. Am. Chem. Soc.* **1963**, *2149*, 3045–3046.
- (199) Henkel, B.; Zhang, L.; Bayer, E. Investigations on Solid-Phase Peptide Synthesis in N-to-C Direction (Inverse Synthesis). *Justus Liebigs Ann. Chem.* **1997**, 2161–2168.
- (200) Hauske, J. R.; Dorff, P. A Solid Phase Cbz Chloride Equivalent - A New Matrix Specific Linker. *Tetrahedron Lett.* **1995**, *36* (10), 1589–1592.
- (201) Lipshutz, B. H.; Shin, Y. A New Silyl Linker for Reverse-Direction Solid-Phase Peptide Synthesis. *Tetrahedron Lett.* **2001**, *42*, 5629–5633.
- (202) Thieriet, N.; Albericio, F. Solid-Phase Peptide Synthesis in the Reverse (N  $\rightarrow$  C) Direction. *Org. Lett.* **2000**, *2* (13), 1815–1817. <https://doi.org/10.1021/ol0058341>.
- (203) Cherkupally, P.; Acosta, G. A.; Ramesh, S.; De la Torre, B. G.; Govender, T.; Kruger, H. G.; Albericio, F. Solid-Phase Peptide Synthesis (SPPS), C-Terminal vs. Side-Chain Anchoring: A Reality or a Myth. *Amino Acids* **2014**, *46* (8), 1827–1838. <https://doi.org/10.1007/s00726-014-1746-7>.
- (204) Bourne, G. T.; Meutermans, W. D. F.; Alewood, P. F.; Mcgeary, R. P.; Scanlon, M.; Watson, A. A.; Smythe, M. L. A Backbone Linker for BOC-Based Peptide Synthesis and On-Resin Cyclization: Synthesis of Stylostatin 1. *J. Org. Chem.* **1999**, *64*, 3095–3101.
- (205) Estep, K. G.; Neipp, C. E.; Stramiello, L. M. S.; Adam, M. D.; Allen, M. P.; Robinson, S.; Roskamp, E. J. Indole Resin: A Versatile New Support for the Solid-Phase Synthesis of Organic Molecules. *J. Org. Chem.* **1998**, *63*, 5300–5301.
- (206) Sarantakis, D.; Bicksler, J. J. Solid Phase Synthesis of Sec-Amides and Removal from the Polymeric Support Under Mild Conditions. *Tetrahedron Lett.* **1997**, *38* (42), 7325–7328.
- (207) Swayze, E. E. Secondary Amide-Based Linkers for Solid Phase Organic Synthesis. *Tetrahedron Lett.* **1997**, *38* (49), 8465–8468.
- (208) Fivush, A. M.; Willson, T. M. AMEBA: An Acid Sensitive Aldehyde Resin for Solid Phase Synthesis. *Tetrahedron Lett.* **1997**, *38* (41), 7151–7154.
- (209) Booramra, C. G.; Burow, K. M.; Ellman, J. A. Expedient and High-Yielding Method for the Solid-Phase Synthesis of Diverse 1,4-Benzodiazepine-2,5-Diones. *J. Org. Chem.* **1996**, *60*, 5742–5743.
- (210) Boas, U.; Brask, J.; Jensen, K. J. Backbone Amide Linker in Solid-Phase Synthesis. *Chem. Rev.* **2009**, *109*, 2092–2118.
- (211) Carpino, L. A.; Han, G. Y. The 9-Fluorenylmethoxycarbonyl Amino-Protecting Group.

- J. Am. Chem. Soc.* **1972**, *37* (22), 3404–3409. <https://doi.org/10.1021/jo00795a005>.
- (212) Carpino, L. A. The 9-Fluorenylmethoxycarbonyl Family of Base-Sensitive Amino-Protecting Groups. *Acc. Chem. Res.* **1987**, *20*, 401–407.
- (213) Bodanszky, M.; Deshmane, S. S.; Martined, J. Side Reactions in Peptide Synthesis. 11. Possible Removal of the 9-Fluorenylmethoxycarbonyl Group by the Amino Components during Coupling. *J. Org. Chem.* **1979**, *44* (10), 1622–1625.
- (214) Merrifield, R. B. Automated Synthesis of Peptides. *Science* (80-. ). **1965**, *150* (9), 178–185. [https://doi.org/10.1295/kobunshi.16.9\\_790](https://doi.org/10.1295/kobunshi.16.9_790).
- (215) Merrifield, R. B. Solid Phase Synthesis (Nobel Lecture). *Angew. Chemie Int. Ed. English* **1985**, *24* (10), 799–810. <https://doi.org/10.1002/anie.198507993>.
- (216) Houghten, R. A. General Method for the Rapid Solid-Phase Synthesis of Large Numbers of Peptides: Specificity of Antigen-Antibody Interaction at the Level of Individual Amino Acids. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **1985**, *82* (9), 5131–5135. <https://doi.org/10.1073/pnas.82.15.5131>.
- (217) Jung, G.; Beck-Sickinger, A. G. Multiple Peptide Synthesis Methods and Their Applications. *Angew. Chem. Int. Ed.* **1992**, *31* (4), 367–486.
- (218) Carpino, L. A.; Han, G. Y. The 9-Fluorenylmethoxycarbonyl Function, a New Base-Sensitive Amino-Protecting Group. *J. Am. Chem. Soc.* **1970**, *92* (19), 5748–5749. <https://doi.org/10.1021/ja00722a043>.
- (219) Salisbury, S. A.; Tremeer, E. J.; Davies, J. W.; Owen, D. E. I. A. Acylation Monitoring in Solid Phase Peptide Synthesis by the Equilibrium Distribution of Coloured Ions. *J. Chem. Soc. Chem. Commun.* **1990**, No. 7, 538–540. <https://doi.org/10.1039/C39900000538>.
- (220) Fox, J. E.; Newton, R.; Stroud, C. H. A New Detector for Fully Automatic Peptide Synthesis. *Int. J. Pept. Protein Res.* **1991**, *38* (1), 62–65. <https://doi.org/10.1111/j.1399-3011.1991.tb01410.x>.
- (221) Frank, R. The SPOT-Synthesis Technique: Synthetic Peptide Arrays on Membrane Supports - Principles and Applications. *J. Immunol. Methods* **2002**, *267* (1), 13–26. [https://doi.org/10.1016/S0022-1759\(02\)00137-0](https://doi.org/10.1016/S0022-1759(02)00137-0).
- (222) Lebl, M.; Hachmann, J. High-Throughput Peptide Synthesis. *Methods Mol. Biol.* **2005**, *298*, 167–194. <https://doi.org/10.1385/1-59259-877-3:167>.
- (223) Lebl, M. Centrifugation Based Automated Synthesis Technologies. *JALA - J. Assoc. Lab. Autom.* **2003**, *8* (3), 30–35. [https://doi.org/10.1016/S1535-5535\(04\)00267-9](https://doi.org/10.1016/S1535-5535(04)00267-9).
- (224) Pederson, S. L.; Jensen, K. J. Instruments for Automated Peptide Synthesis. *Pept. Synth. Appl. Methods Mol. Biol.* **2013**, *1047*, 215–224. <https://doi.org/10.1007/978-1-62703-544-6>.
- (225) Collins, J. M.; Collins, M. J.; Steorts, R. C. Novel Method for Enhanced Solid-Phase Peptide Synthesis Using Microwave Energy. In *American Peptide Symposium*; Boston, MA, 2003; Vol. 71, pp 361–366.
- (226) Yu, H.-M.; Chen, S.-T.; Wang, K.-T. Enhanced Coupling Efficiency in Solid-Phase Peptide Synthesis by Microwave Irradiation. *J. Org. Chem.* **1992**, *57* (18), 4781–4784. <https://doi.org/10.1021/jo00044a001>.
- (227) Palasek, S. A.; Cox, Z. J.; Collins, J. M. Limiting Racemization and Aspartimide Formation in Microwave-Enhanced Fmoc Solid Phase Peptide Synthesis. *J. Pept. Sci.* **2007**, *13*, 143–148. <https://doi.org/10.1002/psc>.
- (228) Vainer, G. V. Microwave-Assisted Solid-Phase Peptide Synthesis Based on the Fmoc Protecting Group Strategy (CEM). In *Peptide Synthesis And Applications, Methods in*

- Molecular Biology*; Hensen, K. J.; Shelton, P. T.; Pedersen, S. L., Ed.; Humana Press, 2013; Vol. 1047, pp 235–249. <https://doi.org/10.1007/978-1-62703-544-6>.
- (229) Gali, H. An Open-Source Automated Peptide Synthesizer Based on Arduino and Python. *SLAS Technol.* **2017**, 22 (5), 493–499. <https://doi.org/10.1177/2472630316685844>.
- (230) Jia, C.; Qi, W.; He, Z.; Yang, H.; Qiao, B. Synthesis of Heptapeptides and Analysis of Sequence by Tandem Ion Trap Mass Spectrometry. *Cent. Eur. J. Chem.* **2006**, 4 (2), 285–298. <https://doi.org/10.2478/s11532-006-0004-6>.
- (231) Riester, D.; Wiesmu, K.; Stoll, D.; Kuhn, R. Racemization of Amino Acids in Solid-Phase Peptide Synthesis Investigated by Capillary Electrophoresis. *Anal. Chem.* **1996**, 68 (14), 2361–2365.
- (232) Angeletti, H. R.; Bibbs, L.; Bonewald, L. F.; Fields, B. G.; Kelly, W. J.; McMurray, S. J.; Moore, T. W.; Weintraub, T. S. Analysis of Racemization During " Standard " Solid Phase Peptide Synthesis : A Multicenter Study. *Tech. Protein Chem.* **1997**, 8, 875–890. [https://doi.org/10.1016/S1080-8914\(97\)80084-1](https://doi.org/10.1016/S1080-8914(97)80084-1).
- (233) Metzger, J. W.; Kempter, C.; Wiesmuller, K. H.; Jung, G. Electrospray Mass Spectrometry and Tandem Mass Spectrometry of Synthetic Multicomponent Peptide Mixtures: Determination of Composition and Purity. *Anal. Biochem.* **1994**, 219 (2), 261–277. <https://doi.org/10.1006/abio.1994.1266>.
- (234) Weygand, F.; Konig, W.; Prox, A. Racemisierung Bei Der Partial- Und Totalhydrolyse von Peptiden. *Chem. Ber.* **1966**, 99 (5), 1443–1445. <https://doi.org/10.1002/cber.19660990504>.
- (235) Anderson, G. W.; Callahan, F. M. Racemization by the Dicyclohexylcarbodiimide Method of Peptide Synthesis. *J. Am. Chem. Soc.* **1958**, 80 (11), 2902–2903. <https://doi.org/10.1021/ja01544a077>.
- (236) Frank, H.; Nicholson, G. J.; Bayer, E. Rapid Gas Chromatographic Separation of Amino Acid Enantiomers with a Novel Chiral Stationary Phase. *J. Chromatogr. Sci.* **1977**, 15 (5), 174–176. <https://doi.org/10.1093/chromsci/15.5.174>.
- (237) Dale, J. A.; Mosher, H. S. Nuclear Magnetic Resonance Enantiomer Reagents. Configurational Correlations via Nuclear Magnetic Resonance Chemical Shifts of Dias Tereomeric Mandelate, 0-Methylmandelate, and  $\alpha$ -Methoxy- $\alpha$ -Trifluoromethylphenylacetate (MTPA) Esters. *J. Am. Chem. Soc.* **1973**, 95 (2), 512–519.
- (238) Pirkle, W. H.; Sikkenga, D. L.; Pavlin, M. S. Nuclear Magnetic Resonance Determination of Enantiomeric Composition and Absolute Configuration of  $\gamma$ -Lactones Using Chiral 2,2,2-Trifluoro-1-(9-Anthryl)Ethanol. *J. Org. Chem.* **1977**, 42 (2), 384–387.
- (239) Hinckley, C. C. Paramagnetic Shifts in Solutions of Cholesterol and the Dipyrindine Adduct of Trisdipivalomethanatoeuropium(III). A Shift Reagent. *J. Am. Chem. Soc.* **1969**, 91 (18), 5160–5162.
- (240) Wenzel, T. J.; Ciak, J. M. Europium, Tris[6,6,7,7,8,8,8-Heptafluoro- 2,2-Di(Methyl-D3)-3,5-Octanedion-1,1,1- D3-Ato-KO,KO']. *Encyclopedia of Reagents for Organic Synthesis*; 2004. <https://doi.org/10.1002/047084289x.rm00449>.
- (241) Halpern, B.; Chew, L. F.; Weinstein, B. Measurement of Racemization in Peptide Synthesis by Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy. *J. Am. Chem. Soc.* **1967**, 89 (19), 1966–1967.
- (242) Benoiton, N. L.; Kuroda, K.; Chen, F. M. F. Racemization in Peptide Synthesis. *Int. J. Pept. Protein Res.* **1980**, 15, 475–479.
- (243) Wenzel, T. J. *Differentiation of Chiral Compounds Using NMR Spectroscopy*, 2nd ed.; John Wiley & Sons, 2018.

- (244) Weinstein, B.; Pritchard, A. Amino-Acids and Peptides. Part XXVIII . Determination of Racemization in Peptide Synthesis by Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy. *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 1* **1972**, 1015–1020. <https://doi.org/10.1039/P19720001015>.
- (245) Davies, J. S.; Mohammed, A. K. Assessment of Racemisation in N-Alkylated Amino-Acid Derivatives during Peptide Coupling in a Model Dipeptide System. *J. Chem. Soc. Perkin Trans. 1* **1981**, 2982–2990.
- (246) Choules, M. P.; Bisson, J.; Gao, W.; Lankin, D. C.; Mcalpine, J. B.; Niemitz, M.; Jaki, B. U.; Franzblau, S. G.; Pauli, G. F. Quality Control of Therapeutic Peptides by <sup>1</sup>H NMR HiFSA Sequencing. *J. Org. Chem.* **2019**, *84* (6), 3055–3073. <https://doi.org/10.1021/acs.joc.8b02704>.
- (247) Zukowski, J.; Pawlowska, M.; Nagatkina, M.; Armstrong, D. W. High-Performance Liquid Chromatographic Enantioseparation of Glycyl Di- and Tripeptides on Native Cyclodextrin Bonded Phases: Mechanistic Considerations. *J. Chromatogr. A* **1993**, *629* (2), 169–179. [https://doi.org/10.1016/0021-9673\(93\)87032-H](https://doi.org/10.1016/0021-9673(93)87032-H).
- (248) Armstrong, D. W.; Youbang, L.; Ekborgott, K. H. A Covalently Bonded Teicoplanin Chiral Stationary Phase for HPLC Enantioseparations. *Chirality* **1995**, *7* (6), 474–497. <https://doi.org/10.1002/chir.530070614>.
- (249) Hilton, M.; Armstrong, D. W. Evaluation of the Enantiomeric Separation of Dipeptides Using a Chiral Crown Ether LC Column. *J. Liq. Chromatogr.* **1991**, *14* (20), 3673–3683. <https://doi.org/10.1080/01483919108049485>.
- (250) Cram, D. J. The Design of Molecular Hosts, Guests, and Their Complexes. *Science* (80-.). **1988**, *240* (4853), 760–767. <https://doi.org/10.1126/science.3283937>.
- (251) Pirkle, W. H.; Alessi, D. M.; Hyun, M. H. O.; Pochapsky, T. C. Separation of Some Enantiomeric Chiral Stationary Phases Di- and Tripeptides On. *J. Chromatogr. A* **1987**, *398*, 203–209. [https://doi.org/10.1016/S0021-9673\(01\)96505-7](https://doi.org/10.1016/S0021-9673(01)96505-7).
- (252) Liang, C.; Behnam, M. A. M.; Sundermann, T. R.; Klein, C. D. Phenylglycine Racemization in Fmoc-Based Solid-Phase Peptide Synthesis : Stereochemical Stability Is Achieved by Choice of Reaction Conditions. *Tetrahedron Lett.* **2017**, *58*, 2325–2329. <https://doi.org/10.1016/j.tetlet.2017.04.047>.
- (253) Zbrozek, J.; Pumera, M.; Flegel, M. Chiral Analysis of Biogenic D,L-Amino Acids Derivatized by N-Fluorenylmethoxycarbonyl-Lalanyl N-Carboxyanhydride Using High-Performance Liquid Chromatography. *J. Chromatogr. Sci.* **2002**, *40*, 505–508.
- (254) Miyazawa, T.; Otomatsu, T.; Yamada, T.; Kuwata, S. Racemization Studies in Peptide Synthesis through the Separation of Protected Epimeric Peptides by Reversed-Phase High Performance Liquid Chromatography. *hit. J. Pepricle Proteiri Res.* **1992**, *39*, 229–236.
- (255) Esquivel, B.; Nicholson, L.; Peerey, L.; Fazio, M. Enantiomeric Resolution of Underivatized Small Peptides by HPLC with a Chiral Crown Ether Stationary Phase. *J. High Resolut. Chromatogr.* **1991**, *14* (12), 816–823. <https://doi.org/10.1002/jhrc.1240141208>.
- (256) Manning, J. M. Determination of D- and L-Amino Acid Residues in Peptides. Use of Tritiated Hydrochloric Acid to Correct for Racemization during Acid Hydrolysis. *J. Am. Chem. Soc.* **1970**, *92* (25), 7449–7454.
- (257) Goodlett, D. R.; Abuaf, P. A.; Savage, P. A.; Kowalski, K. A.; Mukherjee, T. K.; Tolan, J. W.; Corkum, N.; Goldstein, G.; Crowther, J. B. Peptide Chiral Purity Determination: Hydrolysis in Deuterated Acid, Derivatization with Marfey's Reagent and Analysis Using Spectrometry. *J. Chromatogr. A* **1995**, *707*, 233–244.
- (258) Gaus, H.; Beck-sickinger, A. G.; Bayer, E. Optimization of Capillary Electrophoresis of

- Mixtures of Basic Peptides and Comparison with HPLC. *Anal. Chem.* **1993**, *65* (10), 1399–1405. <https://doi.org/10.1021/ac00058a016>.
- (259) Kuhn, R.; Hoffstetter-Kuhn, S. *Capillary Electrophoresis: Principles and Practice*, 1st ed.; Springer-Verlag Berlin Heidelberg: Berlin, 1993. <https://doi.org/10.1007/978-3-642-78058-5>.
- (260) Jung, T.; Catalgol, B.; Grune, T. The Proteasomal System. *Mol. Aspects Med.* **2009**, *30* (4), 191–296. <https://doi.org/10.1016/j.mam.2009.04.001>.
- (261) Hungria, V. T. D. M.; Crusoé, E. D. Q.; Bittencourt, I. R.; Maiolino, A.; José, R.; Magalhães, P. R. J.; Sobrinho, J. do N.; Pinto, V. J.; Fortes, C. R.; Moreira, E. de S.; et al. New Proteasome Inhibitors in the Treatment of Multiple Myeloma. *Hematol. Transfus. Cell Ther.* **2019**, *41* (1), 76–83. <https://doi.org/10.1016/j.htct.2018.07.003>.
- (262) Manasanch, E. E.; Orlowski, R. Z. Proteasome Inhibitors in Cancer Therapy. *Nat. Rev. - Clin. Oncol.* **2017**, *14*, 417–433. <https://doi.org/10.1038/nrclinonc.2016.206>.
- (263) Kubiczková, L.; Pour, L.; Sedlářiková, L.; Hájek, R.; Ševčíková, S. Proteasome Inhibitors – Molecular Basis and Current Perspectives in Multiple Myeloma. *J. Cell. Mol. Med.* **2014**, *18* (6), 947–961. <https://doi.org/10.1111/jcmm.12279>.
- (264) Boccadoro, M. Second-Generation Proteasome Inhibition: What a Difference a Generation Makes. In *15th International Myeloma Workshop*; Elsevier Inc., 2015; Vol. 15, pp e13–e14. <https://doi.org/10.1016/j.clml.2015.08.029>.
- (265) Kisselev, A. F.; Linden, W. A. Van Der; Overkleeft, H. S. Proteasome Inhibitors : An Expanding Army Attacking a Unique Target. *Chem. Biol.* **2012**, *19* (1), 99–115. <https://doi.org/10.1016/j.chembiol.2012.01.003>.
- (266) Okazuka, K.; Ishida, T. Proteasome Inhibitors for Multiple Myeloma. *Japanese J. of Clinical Oncol.* **2018**, *48* (9), 785–793. <https://doi.org/10.1093/jjco/hyy108>.
- (267) International Myeloma Foundation Headquarters. Current FDA-approved Medications <https://www.myeloma.org/multiple-myeloma-drugs> (accessed Mar 20, 2020).
- (268) International Myeloma Foundation Headquarters. Clinical Trials Fact Sheets <https://www.myeloma.org/clinical-trials/clinical-trials-fact-sheets> (accessed Mar 20, 2020).
- (269) U.S. National Library of Medicine. ClinicalTrials.gov Search Results - oprozomib - 03/20/2020 <https://clinicaltrials.gov/ct2/results?term=oprozomib> (accessed Mar 20, 2020).
- (270) U.S. National Library of Medicine. ClinicalTrials.gov Search Results - marizomib - 03/20/2020.
- (271) Lei, M.; Zhang, H.; Miao, H.; Du, X.; Zhou, H.; Wang, J.; Wang, X. Preparation and Biological Evaluation of Soluble Tetrapeptide Epoxyketone Proteasome Inhibitors. *Bioorg. Med. Chem.* **2019**, *27* (18), 4151–4162. <https://doi.org/10.1016/j.bmc.2019.07.044>.
- (272) Montagut, C.; Rovira, A.; Albanell, J. The Proteasome: A Novel Target for Anticancer Therapy. *Clin. Transl. Oncol.* **2006**, *8* (5), 313–317. <https://doi.org/10.1007/s12094-006-0176-8>.
- (273) Tanaka, K. The Proteasome : Overview of Structure and Functions. *Proc. Jpn. Acad, Ser. Bpn. Acad.* **2009**, *85*, 12–36. <https://doi.org/10.2183/pjab/85.12>.
- (274) Goldberg, A. L. Development of Proteasome Inhibitors as Research Tools and Cancer Drugs. *J. Cell Biol.* **2012**, *199* (4), 583–588. <https://doi.org/10.1083/jcb.201210077>.
- (275) Nিকেleit, I.; Zender, S.; Sasse, F.; Geffers, R.; Brandes, G.; Sörensen, I.; Steinmetz, H.; Kubicka, S.; Carlomagno, T.; Menche, D.; et al. Argyrin A Reveals a Critical Role for

- the Tumor Suppressor Protein P27kip1 in Mediating Antitumor Activities in Response to Proteasome Inhibition. *Cancer Cell* **2008**, *14* (1), 23–35.  
<https://doi.org/10.1016/j.ccr.2008.05.016>.
- (276) Kronic, A.; Vallat, A.; Mo, S.; Lantvit, D. D.; Swanson, S. M.; Orjala, J. Scytonemides A and B, Cyclic Peptides with 20S Proteasome Inhibitory Activity from the Cultured Cyanobacterium *Scytonema Hofmanii*. *J. Nat. Prod.* **2010**, *73* (11), 1927–1932.  
<https://doi.org/10.1021/np100600z>.
- (277) Zhuang, R.; Gao, L.; Lv, X.; Xi, J.; Sheng, L.; Zhao, Y. Exploration of Novel Piperazine or Piperidine Constructed Non-Covalent Peptidyl Derivatives as Proteasome Inhibitors. *Eur. J. Med. Chem.* **2017**, *126*, 1056–1070.  
<https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2016.12.034>.
- (278) Han, L.; Wen, Y.; Li, R.; Xu, B.; Ge, Z.; Wang, X.; Cheng, T.; Cui, J.; Li, R. Synthesis and Biological Activity of Peptide Proline-Boronic Acids as Proteasome Inhibitors. *Bioorg. Med. Chem.* **2017**, *25*, 4031–4044. <https://doi.org/10.1016/j.bmc.2017.05.049>.
- (279) Lei, M.; Feng, H.; Wang, C.; Li, H.; Shi, J.; Wang, J.; Liu, Z.; Chen, S.; Hu, S.; Zhu, Y. 3D-QSAR-Aided Design, Synthesis, in Vitro and in Vivo Evaluation of Dipeptidyl Boronic Acid Proteasome Inhibitors and Mechanism Studies. *Bioorganic Med. Chem.* **2016**, *24* (11), 2576–2588. <https://doi.org/10.1016/j.bmc.2016.04.025>.
- (280) Pacifico, S.; Ferretti, V.; Albanese, V.; Fantinati, A.; Gallerani, E.; Nicoli, F.; Gavioli, R.; Zamberlan, F.; Preti, D.; Marastoni, M. Synthesis and Biological Activity of Peptide A-Ketoamide Derivatives as Proteasome Inhibitors. *ACS* **2019**, *10*, 1086–1092.  
<https://doi.org/10.1021/acsmchemlett.9b00233>.
- (281) Gill, K. A.; Berru e, F.; Arens, J. C.; Carr, G.; Kerr, R. G. Cystargolides, 20S Proteasome Inhibitors Isolated from *Kitasatospora Cystarginea*. *J. Nat. Prod.* **2015**, *78* (4), 822–826.  
<https://doi.org/10.1021/np501060k>.
- (282) Niroula, D.; Hallada, L. P.; Le, C.; Ganegamage, S. K.; Dotson, D.; Rogelj, S.; Groll, M.; Tello-aburto, R. Design, Synthesis, and Evaluation of Cystargolide-Based b-Lactones as Potent Proteasome Inhibitors. *Eur. J. Med. Chem.* **2018**, *157*, 962–977.  
<https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2018.08.052>.
- (283) Zhu, Y.; Zhao, X.; Zhu, X.; Wu, G.; Li, Y.; Ma, Y.; Yuan, Y.; Yang, J.; Hu, Y.; Ai, L.; et al. Design, Synthesis, Biological Evaluation, and Structure-Activity Relationship (SAR) Discussion of Dipeptidyl Boronate Proteasome Inhibitors, Part I: Comprehensive Understanding of the SAR of  $\alpha$ -Amino Acid Boronates. *J. Med. Chem.* **2009**, *52* (14), 4192–4199. <https://doi.org/10.1021/jm9005093>.
- (284) Lei, M.; Feng, H.; Bai, E.; Zhou, H.; Wang, J.; Shi, J.; Wang, X.; Hu, S.; Liu, Z.; Zhu, Y. Design, Synthesis, in Vitro and in Vivo Evaluation, and Structure-Activity Relationship (SAR) Discussion of Novel Dipeptidyl Boronic Acid Proteasome Inhibitors as Orally Available Anti-Cancer Agents for the Treatment of Multiple Myeloma and Mechanism Stud. *Bioorganic Med. Chem.* **2018**, *26* (14), 3975–3981.  
<https://doi.org/10.1016/j.bmc.2018.06.020>.
- (285) Britton, M.; Lucas, M. M.; Downey, S. L.; Screen, M.; Pletnev, A. A.; Verdoes, M.; Tokhunts, R. A.; Amir, O.; Goddard, A. L.; Pelphrey, P. M.; et al. Selective Inhibitor of Proteasome’s Caspase-like Sites Sensitizes Cells to Specific Inhibition of Chymotrypsin-like Sites. *Chem. Biol.* **2009**, *16* (12), 1278–1289.  
<https://doi.org/10.1016/j.chembiol.2009.11.015>.
- (286) Altun, M.; Galardy, P. J.; Shringarpure, R.; Hideshima, T.; LeBlanc, R.; Anderson, K. C.; Ploegh, H. L.; Kessler, B. M. Effects of PS-341 on the Activity and Composition of Proteasomes in Multiple Myeloma Cells. *Cancer Res.* **2005**, *65* (17), 7896–7901.  
<https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-05-0506>.



- (287) Kraus, M.; Bader, J.; Geurink, P. P.; Weyburne, E. S.; Mirabella, A. C.; Silzle, T.; Shabaneh, T. B.; van der Linden, W. A.; De Bruin, G.; Haile, S. R.; et al. The Novel B2-Selective Proteasome Inhibitor LU-102 Synergizes with Bortezomib and Carfilzomib to Overcome Proteasome Inhibitor Resistance of Myeloma Cells. *Haematologica* **2015**, *100* (10), 1350–1360. <https://doi.org/10.3324/haematol.2014.109421>.
- (288) DeBruin, G.; Xin, B. T.; Kraus, M.; Van Der Stelt, M.; Van Der Marel, G. A.; Kisselev, A. F.; Driessen, C.; Florea, B. I.; Overkleeft, H. S. A Set of Activity-Based Probes to Visualize Human (Immuno)Proteasome Activities. *Angew. Chemie - Int. Ed.* **2016**, *55* (13), 4199–4203. <https://doi.org/10.1002/anie.201509092>.
- (289) De Bruin, G.; Rooden, E. J. Van; Ward, D.; Wesseling, C.; Driessen, C.; Kisselev, A. F.; Florea, B. I.; Stelt, M. Van Der; Overkleeft, H. S. Asymmetric Synthesis of Lysine Analogues with Reduced Basicity, and Their Incorporation into Proteasome Inhibitors. *European J. Org. Chem.* **2017**, 5921–5934. <https://doi.org/10.1002/ejoc.201701174>.
- (290) Geurink, P. P.; Van Der Linden, W. A.; Mirabella, A. C.; Gallastegui, N.; De Bruin, G.; Blom, A. E. M.; Voges, M. J.; Mock, E. D.; Florea, B. I.; Van Der Marel, G. A.; et al. Incorporation of Non-Natural Amino Acids Improves Cell Permeability and Potency of Specific Inhibitors of Proteasome Trypsin-like Sites. *J. Med. Chem.* **2013**, *56* (3), 1262–1275. <https://doi.org/10.1021/jm3016987>.
- (291) Li, C.; Chen, S.; Yue, P.; Deng, X.; Lonial, S.; Khuri, F. R.; Sun, S. Y. Proteasome Inhibitor PS-341 (Bortezomib) Induces Calpain-Dependent I KB $\alpha$  Degradation. *J. Biol. Chem.* **2010**, *285* (21), 16096–16104. <https://doi.org/10.1074/jbc.M109.072694>.
- (292) Briguet, A.; Erb, M.; Courdier-Fruh, I.; Barzaghi, P.; Santos, G.; Herzner, H.; Lescop, C.; Siendt, H.; Henneboehle, M.; Weyermann, P.; et al. Effect of Calpain and Proteasome Inhibition on Ca(2+) -Dependent Proteolysis and Muscle Histopathology in the Mdx Mouse. *FASEB J.* **2008**, *22* (12), 4190–4200. <https://doi.org/10.1096/fj.07-099036>.
- (293) Storr, S. J.; Carragher, N. O.; Frame, M. C.; Parr, T.; Martin, S. G. The Calpain System and Cancer. *Nat. Rev. Cancer* **2011**, *11* (5), 364–374. <https://doi.org/10.1038/nrc3050>.
- (294) Pehere, A. D.; Nguyen, S.; Garlick, S. K.; Wilson, D. W.; Hudson, I.; Sykes, M. J.; Morton, J. D.; Abell, A. D. Tripeptide Analogues of MG132 as Protease Inhibitors. *Bioorg. Med. Chem.* **2019**, *27* (2), 436–441. <https://doi.org/10.1016/j.bmc.2018.12.022>.
- (295) Pehere, A. D.; Pietsch, M.; Gütschow, M.; Neilsen, P. M.; Pedersen, D. S.; Nguyen, S.; Zvarec, O.; Sykes, M. J.; Callen, D. F.; Abell, A. D. Synthesis and Extended Activity of Triazole-Containing Macrocyclic Protease Inhibitors. *Chem. - A Eur. J.* **2013**, *19* (24), 7975–7981. <https://doi.org/10.1002/chem.201204260>.
- (296) Bringhen, S.; Milan, A.; Ferri, C.; Wäsch, R.; Gay, F.; Larocca, A.; Salvini, M.; Terpos, E.; Goldschmidt, H.; Cavo, M.; et al. Cardiovascular Adverse Events in Modern Myeloma Therapy - Incidence and Risks. A Review from the European Myeloma Network (EMN) and Italian Society of Arterial Hypertension (SIIA). *Haematologica* **2018**, *103* (9), 2–12. <https://doi.org/10.3324/haematol.2018.191288>.
- (297) Gaiba, A.; Healy, M. P.; Price, H. S.; Stanway, S. J.; Swarbrick, M. E. Novel EP4 Receptor Agonist Compounds. WO 2009/147165 A1, 2009.
- (298) Dodge, J. A.; Lugar, C. W. Growth Hormone Secretagogues. US6828331B1, 2004.
- (299) Dusek, J.; Imramovsky, A.; Pauk, K.; Jorda, R.; Reznickova, E.; Krystof, V. Synthesis and Antiproliferative Activities of Novel O-Benzyl Salicylamide Derivatives. *Lett. Drug Des. Discov.* **2016**, *14* (6), 662–671. <https://doi.org/10.2174/1570180813666161020113827>.
- (300) Jorda, R.; Magar, P.; Hendrychová, D.; Pauk, K.; Dibuš, M.; Pilařová, E.; Imramovský, A.; Kryštof, V. Novel Modified Leucine and Phenylalanine Dipeptides Modulate

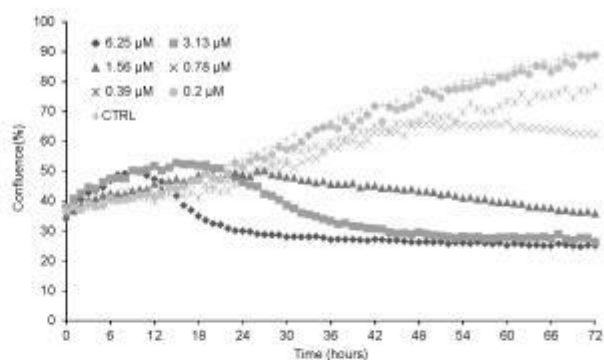
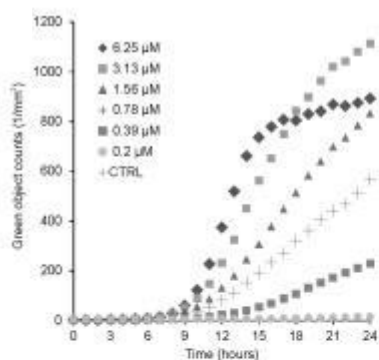
- Viability and Attachment of Cancer Cells. *Eur. J. Med. Chem. J.* **2020**, *188*, 1–13.  
<https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2020.112036>.
- (301) Ravishanker, K.; Jayaramn, K.; Ramu, V.; Prasad, A. L.; Chowdary, T. B.; Kulkarni, G.; Ahmed, S.; Bobbili, V. R.; Dusanapudi, N. V. R.; Mantri, A. V. Methods of Making Carfilzomib and Intermediates Thereof. WO 2016/069479 A1, 2016.
- (302) Sin, N.; Kim, B. K.; Eloffsson, M.; Meng, L.; Auth, H.; Kwok, B. H. B.; Crews, C. M. Total Synthesis of the Potent Proteasome Inhibitor Epoxomicin: A Useful Tool for Understanding Proteasome Biology. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **1999**, *9*, 2283–2288.
- (303) Boháčová, P. Potenciální Inhibitory Proteasomu Založené Na Salicylamidech – Syntéza a Charakterizace, Univerzita Pardubice, 2018.
- (304) Valiulin, R. A. Weinreb Amide - 100 Must Know Reagents  
<https://cheminfographic.wordpress.com/2018/06/17/4-weinreb-amide-1981/> (accessed Mar 14, 2020).
- (305) Druais, V.; Hall, M. J.; Corsi, C.; Wendeborn, S. V.; Meyer, C.; Cossy, J. A Convergent Approach toward Phoslactomycins and Leustroducsins. *Tetrahedron* **2010**, *66* (33), 6358–6375. <https://doi.org/10.1016/j.tet.2010.05.050>.
- (306) Ley, S. V.; Tackett, M. N.; Maddess, M. L.; Anderson, J. C.; Brennan, P. E.; Cappi, M. W.; Heer, J. P.; Helgen, C.; Kori, M.; Kouklovsky, C.; et al. Total Synthesis of Rapamycin. *Chem. - A Eur. J.* **2009**, *15* (12), 2874–2914.  
<https://doi.org/10.1002/chem.200801656>.
- (307) Pereira, A. R.; Kale, A. J.; Fenley, A. T.; Byrum, T.; Debonsi, H. M.; Gilson, M. K.; Valeriotte, F. a.; Moore, B. S.; Gerwick, W. H. The Carmaphycins: New Proteasome Inhibitors Exhibiting an ??-Epoxyketone Warhead from a Marine Cyanobacterium. *ChemBioChem* **2012**, *13* (6), 810–817. <https://doi.org/10.1002/cbic.201200007>.
- (308) Bence, N. F.; Sampat, R. M.; Kopito, R. R. Impairment of the Ubiquitin-Proteasome System by Protein Aggregation. *Science (80-. )*. **2001**, *292*, 1552–1555.
- (309) Lavelin, I.; Beer, A.; Kam, Z.; Rotter, V.; Oren, M.; Navon, A.; Geiger, B. Discovery of Novel Proteasome Inhibitors Using a High-Content Cell-Based Screening System. *PLoS One* **2009**, *4* (12). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0008503>.
- (310) Andreatta, C.; Nahreini, P.; Hovland, A. R.; Kumar, B.; Edwards-Prasad, J.; Prasad, K. N. Use of Short-Lived Green Fluorescent Protein for the Detection of Proteasome Inhibition. *Biotechniques* **2001**, *30* (3), 656–660. <https://doi.org/10.2144/01303dd03>.
- (311) Dantuma, N. P.; Lindsten, K.; Glas, R.; Jellne, M.; Masucci, M. G. Short-Lived Green Fluorescent Proteins for Quantifying Ubiquitin/Proteasome-Dependent Proteolysis in Living Cells. *Nat. Biotechnol.* **2000**, *18* (5), 538–543. <https://doi.org/10.1038/75406>.
- (312) Waisser, K.; Pesina, M.; Holy, P.; Pour, M.; Bures, O.; Kunes, J.; Klimesova, V. V.; Buchta, V.; Kubanova, P.; Kaustova, J. Antimycobacterial and Antifungal Isosters of Salicylamides. *Arch Pharm.(Weinheim)* **2003**, *336* (6–7), 322–335.  
<https://doi.org/10.1002/ardp.200300725>.
- (313) Davies, S. G.; Sanganee, H. J.; Szolcsanyi, P. The “SuperQuat” (R)-4-Phenyl-5,5-Dimethyl OxazoHdin-2-One as an Effective Chiral Auxiliary for Conjugate Additions: Asymmetric Synthesis of (-).Aplysillamide B. *Tetrahedron* **1999**, *55*, 3337–3354.
- (314) Huffman, G. W.; Gesellchen, P. D.; Turner, J. R.; Rothenberger, R. B.; Osborne, H. E.; Miller, F. D.; Chapman, J. L.; Queener, S. W. Substrate Specificity of Isopenicillin N Synthase. *J. Med. Chem.* **1992**, *35* (10), 1897–1914.  
<https://doi.org/10.1021/jm00088a028>.
- (315) Neises, B.; Steglich, W. Simple Method for the Esterification of Carboxylic Acids.

- Angew. Chemie Int. Ed. English* **1978**, *17* (7), 522–524.  
<https://doi.org/10.1002/anie.197805221>.
- (316) Cristau, H. J.; Hervé, A.; Loiseau, F.; Virieux, D. Synthesis of New Arylhydroxymethylphosphinic Acids and Derivatives. *Synthesis (Stuttg)*. **2003**, No. 14, 2216–2220. <https://doi.org/10.1055/s-2003-41045>.
- (317) Sturrock, E.; Nichinda, A.; Chibale, K. Angiotensin I - Converting Enzyme (ACE) Inhibitors. WO 2006/126086 A2, 2006.
- (318) Jahani, F.; Tajbakhsh, M.; Golchoubian, H.; Khaksar, S. Guanidine Hydrochloride as an Organocatalyst for N-Boc Protection of Amino Groups. *Tetrahedron Lett.* **2011**, *52* (12), 1260–1264. <https://doi.org/10.1016/j.tetlet.2011.01.023>.
- (319) Shendage, D. M.; Fröhlich, R.; Haufe, G. Highly Efficient Stereoconservative Amidation and Deamidation of  $\alpha$ -Amino Acids. *Org. Lett.* **2004**, *6* (21), 3675–3678. <https://doi.org/10.1021/ol048771l>.
- (320) Porto, R. S.; Vasconcellos, M. L. A. A.; Ventura, E.; Coelho, F. Diastereoselective Epoxidation of Allylic Diols Derived from Baylis-Hillman Adducts. *Synthesis (Stuttg)*. **2005**, No. 14, 2297–2306. <https://doi.org/10.1055/s-2005-872091>.
- (321) Yang, D.; Yip, Y.-C.; Jiao, G.-S.; Wong, M.-K. In Situ Catalytic Epoxidation of Olefins with Tetrahydrothiopyran-4-One and Oxone: Trans-2-Methyl-2,3-Diphenyloxirane. *Org. Synth. Coll.* **2004**, *10*, 537. <https://doi.org/10.15227/orgsyn.078.0225>.
- (322) Li, W.; Fishkin, N.; Zhao, R.; Miller, M.; Chari, R. Novel Benzodiazepine Derivatives. US 2010/0203007 A1, 2010.
- (323) Peng, H.; Carrico, D.; Thai, V.; Blaskovich, M.; Bucher, C.; Pusateri, E. E.; Sebti, S. M.; Hamilton, A. D. Synthesis and Evaluation of Potent, Highly-Selective, 3-Aryl-Piperazinone Inhibitors of Protein Geranylgeranyltransferase-I. *Org. Biomol. Chem.* **2006**, *4* (9), 1768–1784. <https://doi.org/10.1039/b517572k>.
- (324) Meyer, S. D.; Schreiber, S. L. Acceleration of the Dess-Martin Oxidation by Water. *J. Org. Chem.* **1994**, *59* (24), 7549–7552. <https://doi.org/10.1021/jo00103a067>.
- (325) Conroy, T.; Guo, J. T.; Hunt, N. H.; Payne, R. J. Total Synthesis and Antimalarial Activity of Symplostatins 4. *Org. Lett.* **2010**, *12* (23), 5576–5579. <https://doi.org/10.1021/ol1024663>.
- (326) Rao, D. R.; Kankan, R. N.; Gangrade, M. G.; Birari, D. R. Rao2005 - WO2005019175A1.Pdf. WO2005019175A1, 2005.

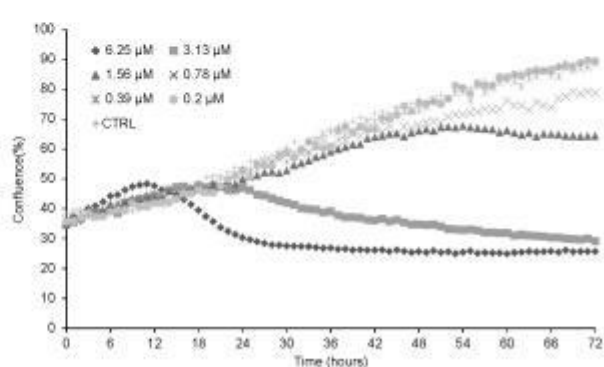
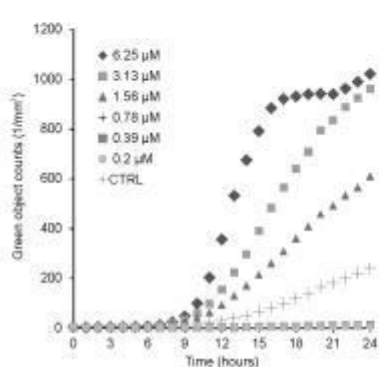
## 7. PŘÍLOHY

Příloha 1: Grafy průběhu inhibice proteasomu U266 vybranými salicylamidy a bortezomibem

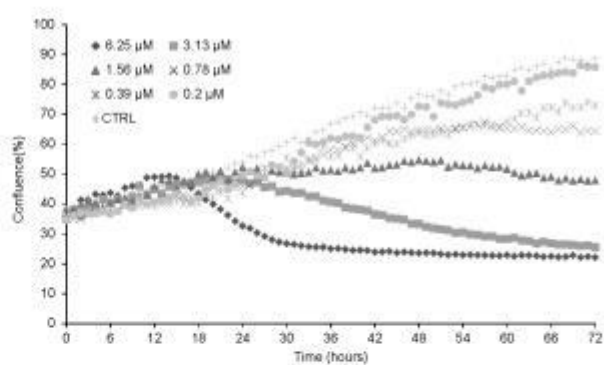
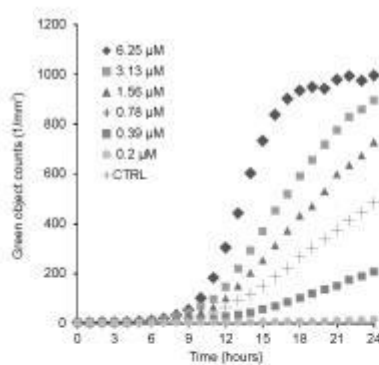
27a



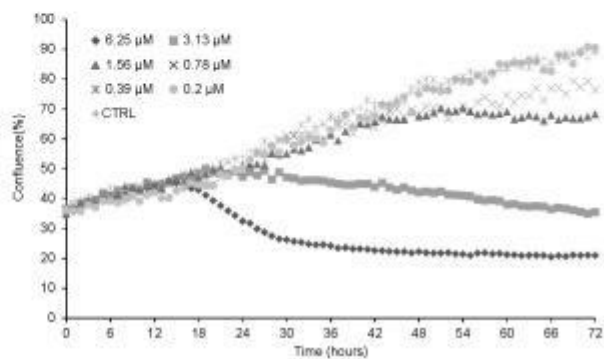
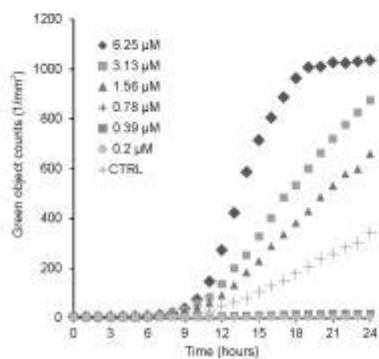
27d



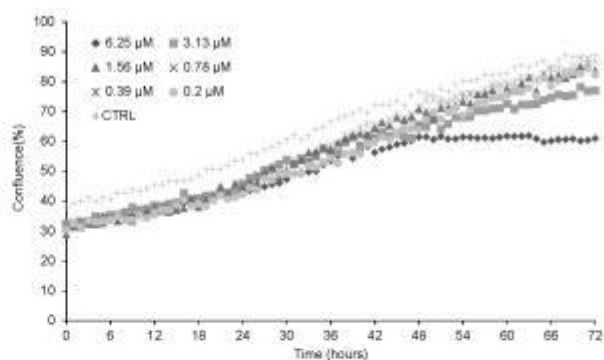
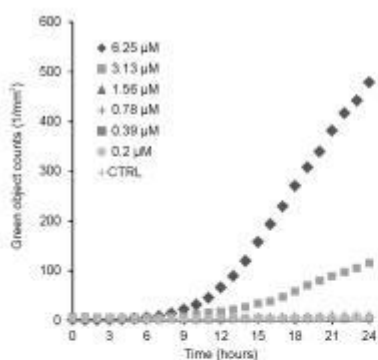
27e



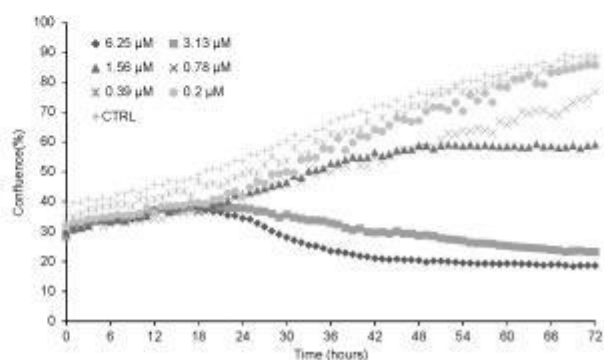
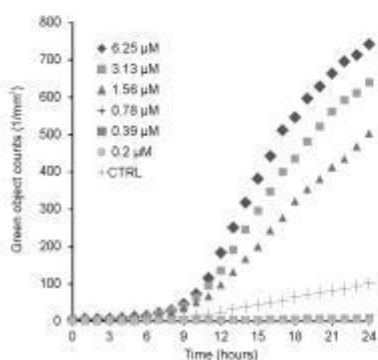
27h



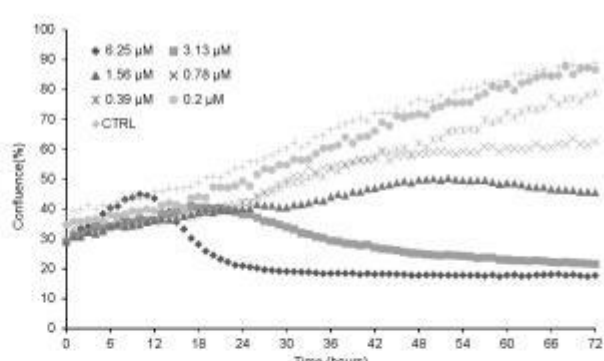
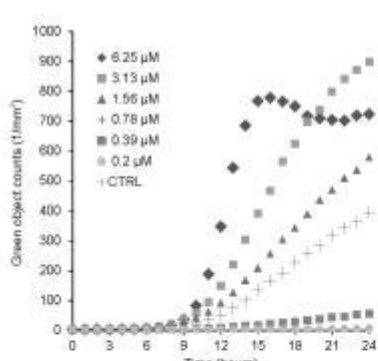
29b



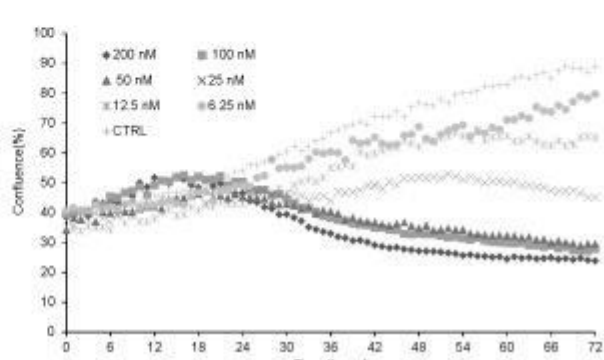
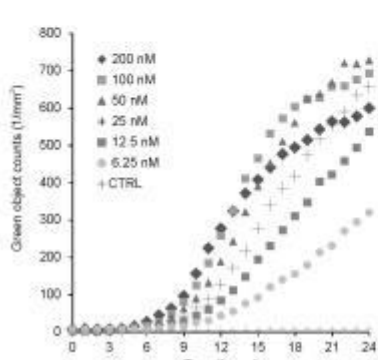
29a



27i



bortezomib



**SEZNAM PUBLIKOVANÝCH PRACÍ****Publikace související s dizertační prací**

- DUŠEK, Jan, IMRAMOVSKÝ, Aleš, PAUK, Karel, JORDA, Radek, ŘEZNÍČKOVÁ, Eva, KRYŠTOF, Vladimír. Synthesis and antiproliferative activities of novel *O*-benzyl salicylamide derivatives. *Letters in Drug Design & Discovery*, **2017**, 14, 6, 662-671.
- JORDA, Radek, DUŠEK, Jan, ŘEZNÍČKOVÁ, Eva, PAUK, Karel, MAGAR, Pratibha, IMRAMOVSKÝ, Aleš, KRYŠTOF, Vladimír. Synthesis and antiproteasomal activity of novel *O*-benzyl salicylamide-based inhibitors built from leucine and phenylalanine, *European Journal of Medicinal Chemistry*, **2017**, 135, 142–158.

**Publikace nesouvisející s dizertační prací**

- IMRAMOVSKÝ, Aleš, JORDA, Radek, PAUK, Karel, ŘEZNÍČKOVÁ, Eva, DUŠEK, Jan, HANUSEK, Jiří, KRYŠTOF, Vladimír. Substituted 2-hydroxy-*N*-(arylalkyl)benzamides induce apoptosis in cancer cell lines. *European Journal of Medicinal Chemistry*. **2013**, 68, 253–259.
- MATELOVÁ, Alena, HUERTA-ANGELES, Gloria, ŠMEJKALOVÁ, Daniela, BRŮNOVÁ, Zdislava, DUŠEK, Jan, VÍCHA, Robert, VELEBNÝ, Vladimír. Synthesis of novel amphiphilic hyaluronan containing-aromatic fattyacids for fabrication of polymeric micelles. *Carbohydrate Polymers*, **2016**, 151, 1175–1183.

**Postery na konferencích**

- DUŠEK, Jan, IMRAMOVSKÝ, Aleš, JORDA, Radek, ŘEZNÍČKOVÁ, Eva, KRYŠTOF, Vladimír, SEDLÁK, Miloš. Syntéza nových potenciálních inhibitorů proteasomu na bázi tripeptidu. 65. Zjazd chemikov, 9.–13. září **2013**, Vysoké Tatry, Slovensko. ChemZi 9/1, page 196, ISSN 1336-7242.
- DUŠEK, Jan, IMRAMOVSKÝ, Aleš, JORDA, Radek, ŘEZNÍČKOVÁ, Eva, KRYŠTOF, Vladimír, PAUK, Karel, SEDLÁK, Miloš. Synthesis of novel potential proteasome inhibitors based on tripeptide backbone, 17th International Electronic Conference on Synthetic Organic Chemistry. 1.-30. listopad **2013**. [www.sciforum.net/conference/ecsoc-17/](http://www.sciforum.net/conference/ecsoc-17/), sekce Bioorganic, Medicinal and Natural Products, strana b006, doi:10.3390/ecsoc-17-b006.
- DUŠEK, Jan, IMRAMOVSKÝ, Aleš. Novel potential proteasome inhibitors based on tripeptide scaffold, BOSS XIV - 14th Belgian Organic Synthesis Symposium, 13.-18. červenec **2014**, Louvain-la-Neuve, Belgium. BOSS XIV Programme & Book of Abstracts, strana 144.
- DUŠEK, Jan, IMRAMOVSKÝ, Aleš, PAUK, Karel. Inovace studijních předmětů Intermediáty chemických výrob a Výroba léčiv v magisterském stupni studia specializace Technologie organických specialit v rámci projektu IRS2015/034, 67. Zjazd chemikov, 7.-11.září **2015**, Vysoké Tatry, Slovensko. Sborník ChemZi, Sekce 4 – Vyučovanie a história chémie, strana 166, ISSN 1336-7242.
- DUŠEK, Jan, IMRAMOVSKÝ, Aleš, PAUK, Karel, JORDA, Radek, KRYŠTOF, Vladimír. Novel Potential Proteasomal Inhibitors Based on Salicylamides – Synthesis,

Biological Activities and Cytotoxicity, BOSS XV – 15th Belgian Organic Synthesis Symposium, 10.-15. červenec **2016**, P093, Antwerp, Belgium.

### **Přednášky na konferencích**

- DUŠEK, Jan, IMRAMOVSKÝ, Aleš. Novel potential proteasome inhibitors based on tripeptide scaffold, Students Scientific Conference 2014, 6. 5. **2014**, Ostrava, Česká republika. Almanach, sekce Věda má budoucnost, oddíl Chemie a příbuzné obory, ISBN 978-80-7464-359-0.
- DUŠEK, Jan, IMRAMOVSKÝ, Aleš. Novel potential proteasome inhibitors based on tripeptide scaffold, 4th Meeting of the Paul Ehrlich MedChem Euro-PhD Network, Hradec Králové, Česká republika. 20.-22. červen **2014**, sborník strana 38.

ÚDAJE PRO KNIHOVNICKOU DATABÁZI

Název práce	Návrh a syntéza nových potenciálně cytotoxicky aktivních salicylamidů
Autor práce	Ing. Jan Dušek
Obor	Organická chemie
Rok obhajoby	2020
Vedoucí práce	doc. Ing. Aleš Imramovský, Ph.D.
Anotace	<p>Byla provedena rozsáhlá literární rešerše zaměřená na metody syntézy a popsání biologické aktivity salicylamidů, na možnosti syntézy peptidů včetně činidel, aditiv a aspektů racemizace substrátu, a na molekuly schopné inhibice proteasomu. Bylo navrženo a experimentálně ověřeno několik možných přístupů ke konstrukci salicylamidů s peptidovým řetězcem, které navazují a rozšiřují současné znalosti v této oblasti. Byla vybrána nejvhodnější syntetická metoda, která byla dále optimalizována zejména za účelem omezení racemizace. Byla provedena syntéza série sloučenin odvozených od substituované kyseliny salicylové a dipeptidů, které byly vhodným způsobem charakterizovány (1H a 13C NMR, IČ, HRMS v uspořádání MALDI-TOF, CHN analýza). Dále bylo provedeno testování jejich biologických aktivit (antiproliferativní aktivita vůči kmenům leukemie K562 a CEM a mnohočetného myelomu U266, proteasomální inhibice U266 včetně selektivity vůči jednotlivým podjednotkám <math>\beta</math> kruhu proteasomu 20S U266 a časovému průběhu inhibice v různých koncentracích připravených salicylamidů).</p>
Klíčová slova	alifatické salicylamidy, inhibice proteasomu, syntéza peptidů, amidační činidla, racemizace