

UNIVERZITA PARDUBICE
FAKULTA CHEMICKO-TECHNOLOGICKÁ
ÚSTAV ORGANICKÉ CHEMIE A TECHNOLOGIE

**Syntéza pseudopeptidických salicylamidů obsahující arylsulfonyl
hydrazidové uspořádání**

DIPLOMOVÁ PRÁCE

AUTOR PRÁCE: Bc. Klára Svobodová

VEDOUCÍ PRÁCE: doc. Ing. Aleš Imramovský, Ph.D.

2020

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

**Synthesis of pseudopeptidic salicylamides containing arylsulfonyl
hydrazide moiety**

DIPLOMA THESIS

AUTHOR: Bc. Klára Svobodová
SUPERVISOR: doc. Ing. Aleš Imramovský, Ph.D.

2020

Univerzita Pardubice
Fakulta chemicko-technologická
Akademický rok: 2018/2019

ZADÁNÍ DIPLOMOVÉ PRÁCE

(PROJEKTU, UMĚLECKÉHO DÍLA, UMĚLECKÉHO VÝKONU)

Jméno a příjmení: **Bc. Klára Svobodová**
Osobní číslo: **C17531**
Studijní program: **N2808 Chemie a technologie materiálů**
Studijní obor: **Technologie organických specialit**
Název tématu: **Syntéza pseudopeptidických salicylamidů obsahující arylsulfonfyl hydrazidové uspořádání**
Zadávací katedra: **Ústav organické chemie a technologie**

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

Na základě studia současné odborné literatury a Vaší experimentální činnosti vypracujte diplomovou práci s respektováním níže uvedených bodů:

1. Syntéza amidů odvozených od substituované kyseliny salicylové a aminokyselin - literární rešerše možností syntézy, izolace produktů.
2. Biologická aktivita sloučenin obsahující aminokyseliny případně di-peptidy a arylsulfonfyl hydrazidové uspořádání, přístupy k syntéze uvedených sloučenin.
3. Experimentálně ověřte možnosti syntézy molekul odvozených od substituované kyseliny salicylové aminokyselin či peptidů a arylsulfonfyl hydrazidového uspořádání.
4. Připravené sloučeniny charakterizujte dostupnými metodami, připravte je v dostatečném množství a čistotě vhodné pro testování biologické aktivity.
5. Sepište závěrečnou zprávu.

Rozsah grafických prací:

Rozsah pracovní zprávy:

Forma zpracování diplomové práce: **tištěná**

Seznam odborné literatury:

Všechna dostupná chemická literatura.

Vedoucí diplomové práce: **doc. Ing. Aleš Imramovský, Ph.D.**
Ústav organické chemie a technologie

Datum zadání diplomové práce: **28. února 2019**

Termín odevzdání diplomové práce: **10. května 2019**

prof. Ing. Petr Kalenda, CSc.
děkan

L.S.

prof. Ing. Miloš Sedlák, DrSc.
vedoucí katedry

V Pardubicích dne 28. února 2019

Prohlašuji:

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

Byla jsem seznámena 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. Beru na vědomí, že v souladu s § 47b zákona č. 111/1998 Sb., o vysokých školách a o změně a doplnění dalších zákonů (zákon o vysokých školách), ve znění pozdějších předpisů, a směrnic Univerzity Pardubice č. 9/2012, bude práce zveřejněna v Univerzitní knihovně a prostřednictvím Digitální knihovny Univerzity Pardubice.

V Pardubicích dne

.....
Bc. Klára Svobodová

Poděkování:

Na tomto místě bych ráda poděkovala mému školiteli doc. Ing. Aleši Imramovskému, Ph.D. za odborné vedení při vypracování diplomové práce, za připomínky, cenné rady i čas, který mi věnoval.

Dále bych ráda poděkovala celému kolektivu studentů a zaměstnanců pracujících ve stejné laboratoři, a to konkrétně za vytvoření příjemných pracovních podmínek a prostředí.

Mé poděkování též patří mé rodině za jejich trpělivost a podporu nejen během psaní této práce, ale po celou dobu mého studia.

Seznam použitých symbolů a zkratek

ACN	- acetonitril
AMK	- aminokyselina
CDCl ₃	- deuterovaný chloroform
CHCl ₃	- chloroform
DCM	- dichlormethan
DMF	- dimethylformamid
DMSO	- dimethylsulfoxid
EDC·HCl	- <i>N</i> -(3-dimethylaminopropyl)- <i>N'</i> -ethyl karbodiimid hydrochlorid
EtOAc	- ethyl-acetát
HOAt	- 1-hydroxy-7-azabenzotriazol
HOBt	- hydroxybenzotriazol
Leu	- leucin
LiOH	- hydroxid lithný
Phe	- fenylalanin
RS	- reakční směs
RVO	- rotační vakuová odparka
TEA	- triethylamin
THF	- tetrahydrofuran
TLC	- chromatografie na tenké vrstvě
5-Cl-O-Bn-Sal-OH	- kyselina 5-chlor- <i>O</i> -benzyl-salicylová

Souhrn

V této diplomové práci je věnována pozornost přípravě látek založených na benzen sulfonfyl hydrazidech odvozených od di-peptidů a substituované kyseliny salicylové.

Di-peptidický řetězec je tvořen vzájemnou kombinací aminokyselin L-fenylalaninu a L-leucinu.

Celkem bylo připraveno osm originálních sloučeniny benzen sulfonfyl hydrazidové řady. Čtyři deriváty mají hydroxylovou funkční skupinu chráněnou benzylem, aby v průběhu syntézy nedocházelo k nežádoucím reakcím. A u zbývajících čtyř derivátů je fenolická skupina uvolněna a představuje volnou hydroxylovou skupinu.

Klíčová slova

Salicylamidy, syntéza peptidů, aminokyseliny, biologická aktivita

Summary

This thesis is focused on the preparation of substances based on salicyl acid, amino acids – L-phenylalanine and L-leucine, as well as on their combination and on sulfone phenol hydrazide. Eight brand new compounds of the salicylamide series were prepared. Four compounds were benzylated, meaning the hydroxy group of the salicyl acid was protected with benzyl to prevent unwanted reactions, and four compounds were debenzylated, with free hydroxide group of salicyl acid.

Debenzylation was the final step of preparation of the final molecules. The benzylated compounds served as intermediates to obtain debenzylate compounds. Purification of the substances was accomplished through column chromatography or flash chromatography. All obtained molecules were in crystalline form, its purity was determined through CHN analysis and nuclear magnetic resonance (^1H and ^{13}C NMR spectroscopy). Melting points were also measured. All compounds were also put through MALDI analysis.

The obtained molecules were sent away for their biological activity to be studied. The results of their biological activity are not a part of the subject of this thesis.

Keywords

Salicylamides, synthesys of peptides, amino acids, biological activity.

Obsah

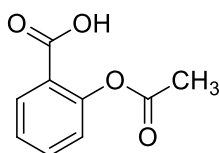
1.	Úvod	12
2.	Cíle práce	13
3.	Teoretická část	14
3.1.	Kyselina salicylová	14
3.2.	Salicylamidy	15
3.2.1.	Syntéza aromatických amidů kyseliny salicylové tzv. salicylanilidů	15
3.2.2.	Syntéza alifatických salicylamidů	17
3.2.3.	Syntéza alifatických amidů	20
3.3.	Peptidický řetězec	22
3.3.1.	Protektce α -aminoskupiny, příprava karboxylové komponenty	23
3.3.2.	Deprotektce chránících skupin α -aminokomponenty	24
3.3.3.	Protektce α -karboxylové skupiny, příprava aminové komponenty	25
3.3.4.	Deprotektce chránících skupin α -karboxylové komponenty	26
3.3.5.	Protektce ostatních funkčních skupin	27
3.3.6.	Aktivace karboxylové skupiny při syntéze peptidů v roztoku	27
3.3.7.	Coupling	28
3.4.	Biologická aktivita vybraných salicylamidů a arylsulfonyl hydrazidů	29
3.4.1.	Biologická aktivita salicylanilidů	30
3.4.2.	Biologická aktivita alifatických salicylamidů	30
3.4.3.	Biologická aktivita aminokyselin	31
3.4.4.	Biologická aktivita arylsulfonyl hydrazidů	32
3.5.	Návrh nových cytotoxycky aktivních molekul	33
4.	Výsledky a diskuze	35
4.1.	Ochrana fenolické hydroxylové skupiny kyseliny 5-chlor- <i>O</i> -benzyl- salicylové	
(4)	35	
4.2.	Příprava amidů methylesteru AMK a 5-Cl-O-Bn-Sal-OH	36

4.2.1.	Příprava amidů methylesteru (6, 8) s jednou AMK.....	37
4.2.2.	Příprava amidů methylesteru (10, 11, 13, 14) se dvěma AMK	38
4.3.	Příprava amidů kyselin AMK a 5-Cl-O-Bn-Sal-OH.....	39
4.3.1.	Příprava amidů kyselin (9, 12) s jednou AMK.....	40
4.3.2.	Příprava amidů kyselin (15, 16, 17, 18) se dvěma AMK	41
4.4.	Příprava <i>O</i> -Bn dipeptidických sulfonyl hydrazidů	41
4.5.	Příprava finálních dipeptidických sulfonyl hydrazidů s volnou fenolickou hydroxylovou skupinou	42
5.	Experimentální část	44
5.1.	Obecný postup syntézy methylesterů (6, 8, 10, 11, 13, 14) a kyselin (9, 12, 15, 16, 17, 18) 45	
5.2.	Příprava 2-(benzyloxy)-5-chlor- <i>N</i> -((<i>S</i>)-1-(((<i>S</i>)-4-methyl-1-oxo-1-(2-(fenylsulfonyl)hydrazinyl)pentan-2-yl)amino)-1-oxo-3-fenylpropan-2-yl)benzamidu (20)	46
5.3.	Příprava 2-(benzyloxy)-6-chlor- <i>N</i> -((<i>S</i>)-1-oxo-1-(((<i>S</i>)-1-oxo-3-fenyl-1-(2-(fenylsulfonyl)hydrazinyl)propan-2-yl)amino)-3-fenylpropan-2-yl)-benzamidu	48
5.4.	Příprava 2-(benzyloxy)-5-chlor- <i>N</i> -((<i>S</i>)-4-methyl-1-oxo-1-(((<i>S</i>)-1-oxo-3-fenyl-1-(2-(fenylsulfonyl)hydrazinyl)propan-2-yl)amino)pentan-2-yl)benzamidu.....	50
5.5.	Příprava 2-(benzyloxy)-5-chlor- <i>N</i> -((<i>S</i>)-4-methyl-1-(((<i>S</i>)-4-methyl-1-oxo-1-(2-(fenylsulfonyl)hydrazinyl)pentan-2-yl)amino)-1-oxopentan-2-yl)benzamidu.....	52
5.6.	Příprava 5-chlor-2-hydroxy- <i>N</i> -((<i>S</i>)-1-(((<i>S</i>)-4-methyl-1-oxo-1-(2-(fenylsulfonyl)hydrazinyl)pentan-2-yl)amino)-1-oxo-3-fenylpropan-2-yl)benzamidu.....	54
5.7.	Příprava 2-(benzyloxy)-5-chlor- <i>N</i> -((<i>S</i>)-1-oxo-1-(((<i>S</i>)-1-oxo-3-fenyl-1-(2-(fenylsulfonyl)hydrazinyl)propan-2-yl)amino)-3-fenylpropan-2-yl) benzenamidu	55
5.8.	Příprava 5-chlor-2-hydroxy- <i>N</i> -((<i>S</i>)-4-methyl-1-oxo-1-(((<i>S</i>)-1-oxo-3-fenyl-1-(2-(fenylsulfonyl)hydrazinyl)propan-2-yl)amino)pentan-2-yl)benzamidu.....	57
5.9.	Příprava 5-chlor-2-hydroxy- <i>N</i> -((<i>S</i>)-4-methyl-1-(((<i>S</i>)-4-methyl-1-oxo-1-(2-(fenylsulfonyl)hydrazinyl)pentan-2-yl)amino)-1-oxopentan-2-yl) benzamidu	58
6.	Závěr.....	60
7.	Seznam použité literatury	61

1. Úvod

Kyselina salicylová i její deriváty patří mezi sloučeniny vykazující pestrou škálu biologické aktivity. Už v dobách dávno minulých si naši předkové povšimli, že odvar z kůry vrbové tlumí bolest i zvýšenou teplotu. Tyto poznatky však byly na poměrně dlouhou dobu zapomenuty, aby následně mohly být znovu objeveny. Německý farmakolog Büchner jako první provedl extrakci vrbové kůry čímž získal žlutě zbarvenou látku, tzv. salicin, jak látku sám nazval. Vycházel z latinského slova *Salix*, což je rodové označení vrby.

Asi nejznámější a nejrozšířenější formou kyseliny salicylové je kyselina acetylsalicylová, systematickým názvoslovím 2-acetyloxybenzenkarboxylová kyselina (**Obrázek 1**). Pro širokou veřejnost známá pod obchodními názvy Aspirin, Acylpyrin, Anopyrin a další.



Obrázek 1: Kyselina acetylsalicylová.

Kyselina acetylsalicylová je bílá krystalická látka, která je mírně rozpustná ve vodě. Používá se k léčbě bolesti, řadí se tedy mezi analgetika. Dále také k potlačení horečky, což jsou léky označované jako antipyretika. Dále slouží k mírnění zánětu, protože snižuje tvorbu prostaglandinů, jenž jsou zodpovědné za vznik zánětu. Látky působící proti zánětům označujeme jako antiflogistika. Mimo jiné je též kyselina acetylsalicylová předepisována lidem, kteří trpí srdečně-cévním onemocněním a to proto, že snižuje tvorbu krevní sraženiny. Důvodem je snížení rizika vzniku srdečního a mozkového infarktu. Lze říct, že velikost dávkování ovlivňuje místo působení. Nižší dávky jsou podávány k prevenci před infarkty, vyšší dávky pak k tlumení bolesti a snížení horečky.

Tato diplomová práce navazuje na známé poznatky týkající se substituované kyseliny salicylové a snaží se je dále rozvíjet a modifikovat.

2. Cíle práce

Cílem teoretické části mé diplomové práce je stručně popsat amidy odvozené od substituované kyseliny salicylové s využitím dvou aminokyselin, jenž v molekule tvoří di-peptidický řetězec. Teoretická část se dále okrajově zaměřuje na samotnou kyselinu salicylovou a taky na to, jak byla a je syntetizována. Mimo jiné je teoretická část věnována popisu syntéz, které vedou k přípravě aromatických i alifatických amidů.

Dalším cílem této práce je popsat biologickou aktivitu týkající se sloučenin obsahující ve své struktuře substituovanou kyselinu salicylovou a aminokyseliny, konkrétně L-fenylalanin a L-leucin, tedy di-peptidické uspořádání. Teoretická část má také za cíl věnovat se biologické aktivitě u sloučenin obsahující arylsulfonfyl hydrazidové uspořádání.

Experimentální část diplomové práce si klade za cíl ověřit možnosti syntézy molekul odvozených od substituované kyseliny salicylové, di-peptidů a arylsulfonfyl hydrazidů.

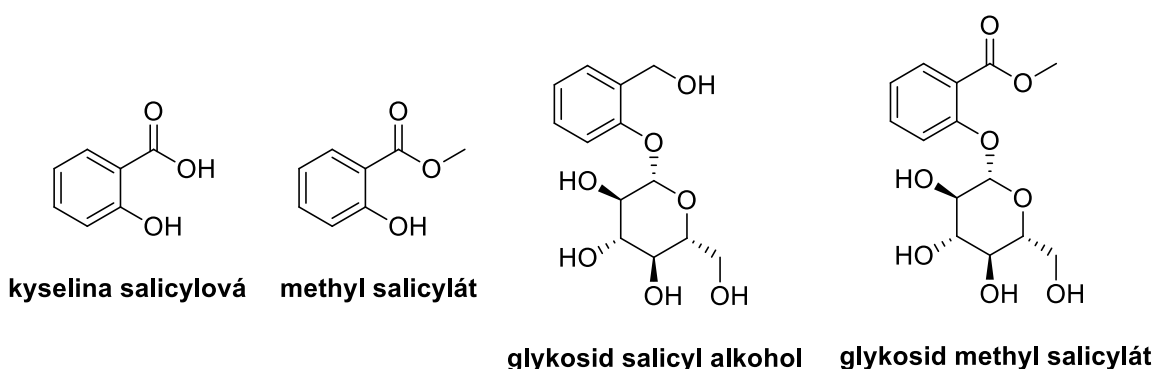
K čištění a izolaci připravených meziproductů a produktů by měla být využita sloupcová chromatografie, případně flash chromatografie anebo krystalizace. Vyizolované molekuly by měly být připraveny v dostatečném množství a čistotě, aby je bylo možné otestovat na biologickou aktivitu, podrobit je elementární analýze, nukleární magnetické rezonanci (^1H a ^{13}C NMR), hmotnostní spektroskopii s vysokým rozlišením a změřit body tání.

3. Teoretická část

Teoretická část diplomové práce poslouží k pochopení základních principů, ze kterých bylo vycházeno při přípravě sloučenin. V následujícím textu bude opíráno o již známé poznatky. Podrobněji se zaměřím na vysvětlení detailů, jenž souvisí s mou praktickou činností. Konkrétně se jedná o syntézu peptidického řetězce, která vychází z aminokyselin. Dále se budu okrajově věnovat ochraně funkčních skupin a následně k jejich zpětnému odchránění za získání požadovaných produktů.

3.1. Kyselina salicylová

Kyselina salicylová má charakter bílých krystalků. Na vzduchu je stálá, ale přímým slunečním světlem mění svou barvu na světle žlutou. Ve volné formě se v přírodě příliš nevyskytuje. Ve formě vázané ji nalezneme v mnoha rostlinách, v jejich kůře, plodech i kořenech. Konkrétně se jedná o methyl salicyláty, které jsou obsaženy v libavce a tužebníku, dále pak glykosidy salicyl alkoholů, tzv. saliciny, jež se nacházejí v topolech a ve vrbách, a nakonec lze hovořit o glykosidech methyl salicylátů (**Obrázek 2**) obsažených v břízách a bukách.¹



Obrázek 2: *Formy výskytu kyseliny salicylové.*

První syntetickou výrobu kyseliny salicylové uskutečnil Kolbe v roce 1859. Syntéza vycházela ze zahřívání fenolátu alkalického kovu s oxidem uhličitým pod tlakem. Další možností, jak tuto kyselinu vyrábět, bylo zmydelnění methyl salicylátu získaného z listů libavky či z březové kůry.

V současné době je kyselina salicylová vyráběna Kolbe-Schmidtovou reakcí (**Schéma 1**). Získaný produkt může být dále přečištěn sublimací nebo krystalizací.¹

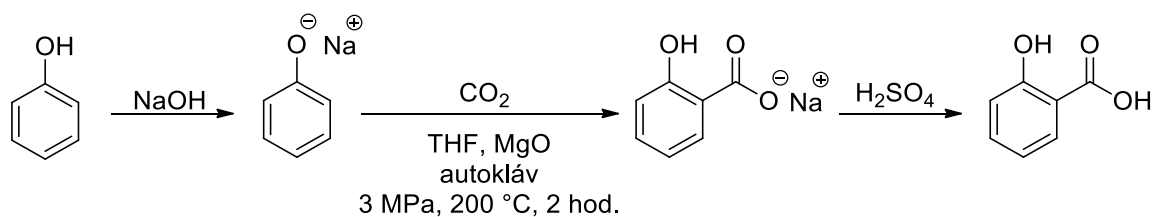


Schéma 1: Kolbe-Schmidtova metoda výroby kyseliny salicylové.

3.2. Salicylamidy

Salicylamidy lze považovat za deriváty kyseliny salicylové.

3.2.1. Syntéza aromatických amidů kyseliny salicylové tzv. salicylanilidů

Na samotném začátku této podkapitoly bych ráda zmínila, že níže uvedené syntetické cesty mohou k reakci využít jak substituovaný, tak i nesubstituovaný anilin, není-li v textu uvedeno jinak.

Klasickým případem, jak syntetizovat aromatické amidy, salicylanilidy, je reakce substituované kyseliny salicylové s thionylchloridem v prostředí DMF, za vzniku 2-hydroxybenzoyl chloridu. Tento chlorid kyseliny reaguje s vhodně substituovaným anilinem v prostředí toluenu nebo chlorbenzenu a během refluxu dojde ke vzniku požadovaného salicylanilidu (**Schéma 2**). Výtěžek reakce je 89 %.²

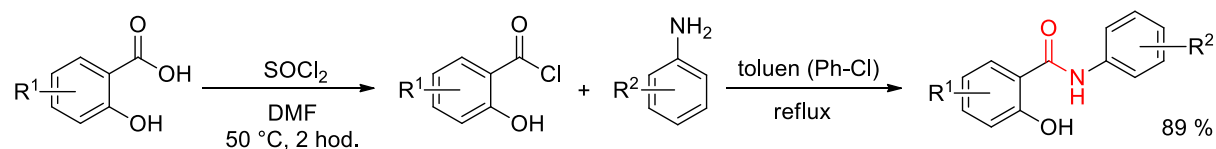


Schéma 2: Příprava salicylanilidů klasickým způsobem.

Další možností, pro přípravu salicylanilidů, je použití tzv. „one-pot“ metody, která využívá mikrovlnné záření (MW) jakožto zdroj iniciace (**Schéma 3**). Reakční doba je, oproti výše uvedené metodě, kratší. Co se týče výtěžku, odpovídá kratší reakční době. Pro přípravu halogenidu karboxylové kyseliny lze použít chlorid fosforitý, který *in situ* reaguje s vhodně substituovaným anilinem za vzniku požadovaného produktu.^{3, 4} „One-pot“ metodu je možno provádět v různých rozpouštědlech, jako nejvhodnější lze považovat xylen, chlorbenzen, toluen, THF, DMF a ACN.^{3, 5} Výtěžek reakce je závislý na době iniciace mikrovlnným zářením.³

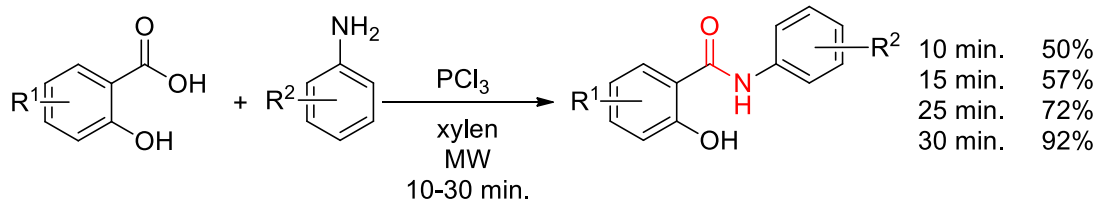


Schéma 3: Příprava salicylanilidů „one-pot“ metodou s použitím mikrovlnného záření.

Příprava salicylanilidů může probíhat i dvou krokově (**Schéma 4**). V prvním kroku probíhá reakce s trifluoroctovou kyselinou a anhydridem trifluoroctové kyseliny (TFA-TFAA) v prostředí acetonu, dochází ke vzniku meziprojektu. V kroku druhém probíhá reakce meziprojektu s vhodně substituovaným anilinem. Přičemž druhý reakční krok probíhá v přítomnosti butyllithia a *N,N'*-dimethylpropylenmočoviny (DMPU), v prostředí THF, hexanu nebo vody.^{5, 6} Výtěžky reakce závisí na podobě anilinu.⁷

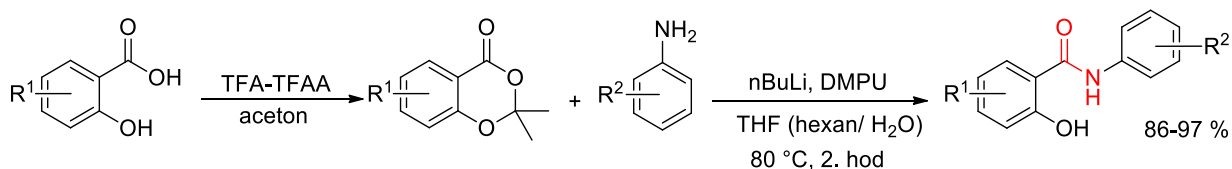


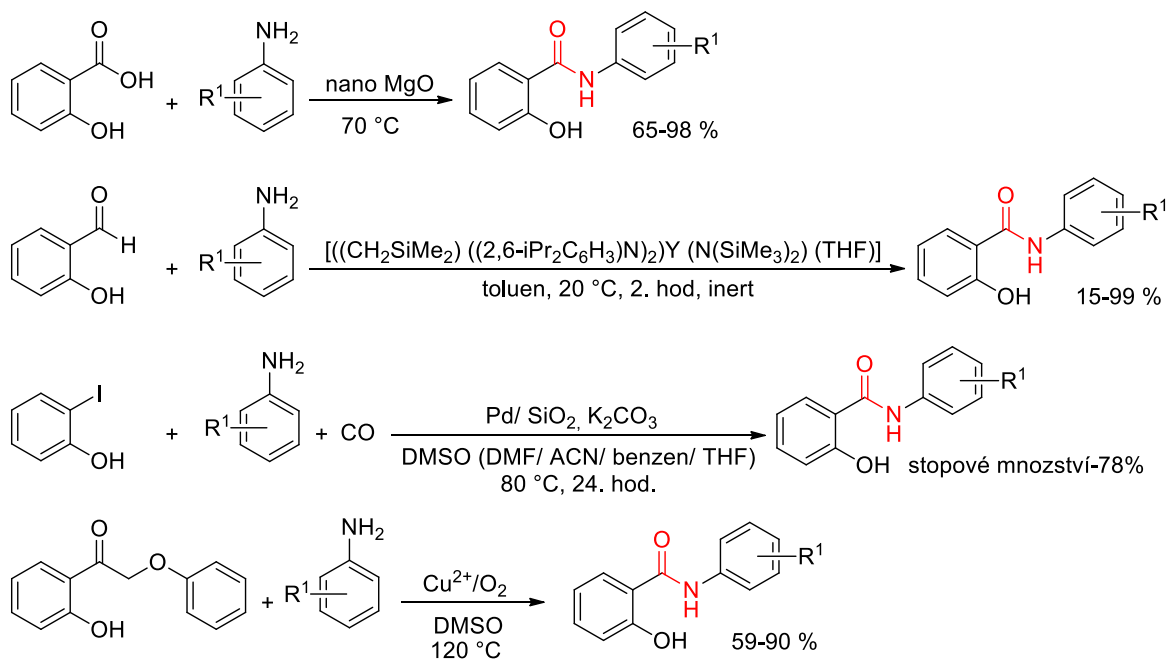
Schéma 4: Využití dvou krokové metody při přípravě salicylanilidů.

V současné době je obrovským trendem vyvíjet nové metody, případně upravovat ty stávající tak, aby měly co nejmenší dopad na ekologii a byly ekonomicky výhodné. Obrovský důraz se klade na to, aby bylo použito co možná nejmenší množství rozpouštědla, aby bylo možno použité katalyzátory opakovaně recyklovat, aby docházelo k úsporám energie apod. Dle mého je ovšem nutné být k těmto metodám lehce kritický. Literatura^{8,9,10,11} uvádí postupy, které jsou do tzv. „green chemistry“ řazeny (**Obrázek 3**), záleží však na každém, zdali použití např. palladia spadá do ekologičtějších metod.

- Reakce kyseliny salicylové s vhodně substituovaným anilinem s použitím nano oxidu hořečnatého. K reakci není použito žádné rozpouštědlo. Výtěžek závisí na substituentech výchozích látek a pohybuje se mezi 65-98 %.⁸
- Reakce 2-hydroxybenzaldehydu s anilinem v inertní atmosféře. V RS se dále nachází $[(\text{CH}_2\text{SiMe}_2)\{(2,6\text{-iPr}_2\text{C}_6\text{H}_3)\text{N}\}_2\text{Y}\{\text{N}(\text{SiMe}_3)_2\}]$ (THF). Literatura uvádí, že výtěžek je závislý na vzájemném poměru obou výchozích látek, výtěžek se pohybuje mezi 15-99 %.⁹
- Reakce 2-jodfenolu s anilinem v zatavené ampuli. Jako katalyzátor slouží 1 hm% paladium na silikagelu. Jako rozpouštědlo je zvoleno DMSO, DMF, ACN, benzen

nebo THF. Výtěžek této reakce závisí na použitém rozpouštědle a pohybuje se od stopových množství do 78 %. ¹⁰

- Reakce 1-(2-hydroxyfenyl)-2-fenoxyethanon s vhodně substituovaným anilinem v přítomnosti mědi a kyslíku. Jako rozpouštědlo je zvolen DMSO. Výtěžek je závislý na podobně substituovaného anilinu a pohybuje se mezi 59-90 %. ¹¹



Obrázek 3: Syntetické přípravy salicylanilidů řadící se mezi tzv. „green chemistry“.

3.2.2. Syntéza alifatických salicylamidů

Mezi alifatické salicylamidy lze řadit látky, které mají ve své amidové řadě alifatický řetězec.

Jednou z možných syntéz, jak alifatické salicylamidy připravit je, přímá amidace esteru kyseliny salicylové (**Schéma 5**). Reakce vyžaduje poměrně drastické podmínky a je vhodná spíše pro jednoduché aminy. ¹²

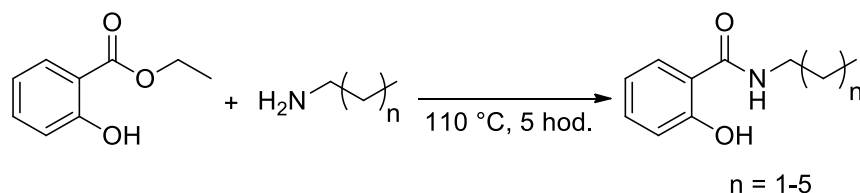


Schéma 5: Příprava alifatických salicylamidů z esteru.

Další způsob přípravy alifatických salicylamidů využívá karbonyldiimidazol (CDI) jakožto amidační činidlo (**Schéma 6**). CDI je hojně využíván i při syntéze peptidů. Manipulace s CDI vytváří šetrnější podmínky pro práci se složitějším aminem, mimo to také potlačuje tvorbu nežádoucích meziproductů a vedlejších reakcí.^{13, 14}

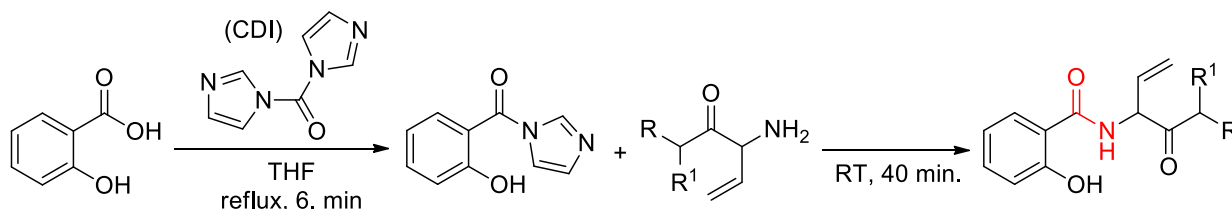


Schéma 6: Příprava alifatických salicylamidů využívající CDI.

Pro přípravu alifatických salicylamidů lze použít i činidla na bázi chloroformiátu (**Schéma 7**). V prvním kroku dochází k reakci mezi chloroformiátem a výchozí kyselinou, vzniklým meziproductem je směsný anhydrid, který dále reaguje s aminem.¹⁵ Současně dochází ke vzniku požadovaného amidu, alkoholu a oxidu uhličitého. Aby byl průběžně eliminován vznikající chlorovodík, přidává se do RS terciární amin, např. TEA, který způsobí vznik triethylamonium hydrochloridu (nerozpustná sraženina) jenž je z RS odstraněn odfiltrováním.^{16, 17}

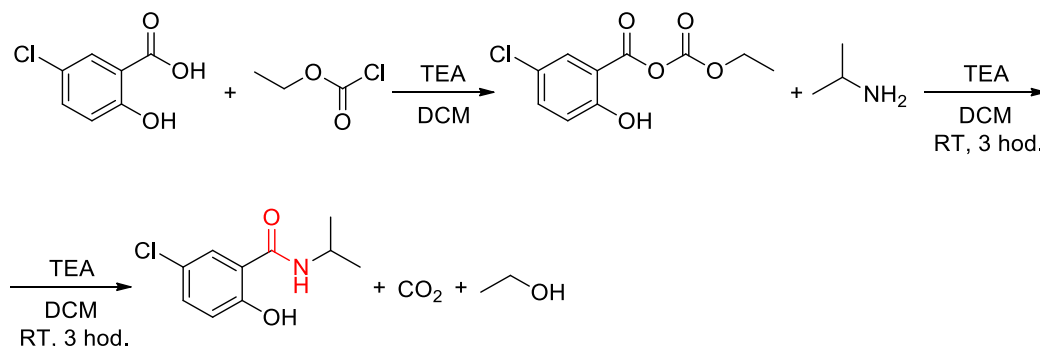
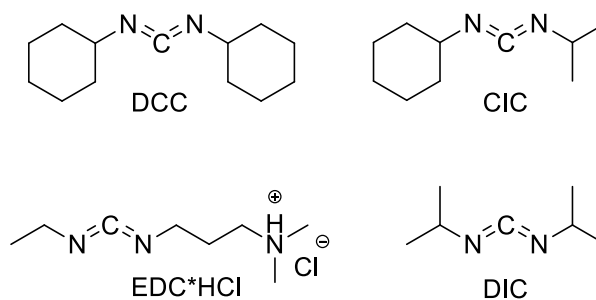


Schéma 7: Příprava alifatických salicylamidů využívající ethylchloroformiát.

Ve své experimentální práci využívám k přípravě salicylamidů karbodiimidy. Které znázorňuje **Obrázek 4**. Karbodiimidy jsou aktivátory karboxylové komponenty. Mezi používané aktivátory řadíme dicyklohexylkarbodiimid (DCC, CAS 538-75-0), diisopropylkarbodiimid (DIC, CAS 693-13-0), *N*-(3-dimethylaminopropyl)-*N'*-ethyl karbodiimid hydrochlorid (EDC·HCl, CAS 25952-53-8) a *N*-cyklohexyl-*N'*-isopropyl karbodiimid (CIC, CAS 3496-83-1).¹⁸



Obrázek 4: Aktivátory karboxylových kyselin na bázi karbodiimidů.

Mechanismus aktivace pomocí karbodiimidů je řazen mezi komplexní reakce. Mechanismus znázorňuje **Schéma 8**. Celý proces je velmi závislý na použitém rozpouštědle. Nejprve dochází k přenosu protonu, poté k připojení karboxylové kyseliny a následně ke vzniku *O*-acylisomočoviny. *O*-acylisomočovina je vysoce reaktivním meziproductem, který atakuje aminoskupinu další molekuly za vzniku požadované amidické vazby. Během reakce může dojít k přesmyku, kdy intermediát *O*-acylisomočovina přesmykne na *N*-acylmočovinu. Nově vzniklý meziproduct může napadat další karboxylovou skupinu, dalším meziproductem se pak stává anhydrid, který podléhá reakci s AMK za vzniku amidové vazby.¹⁹

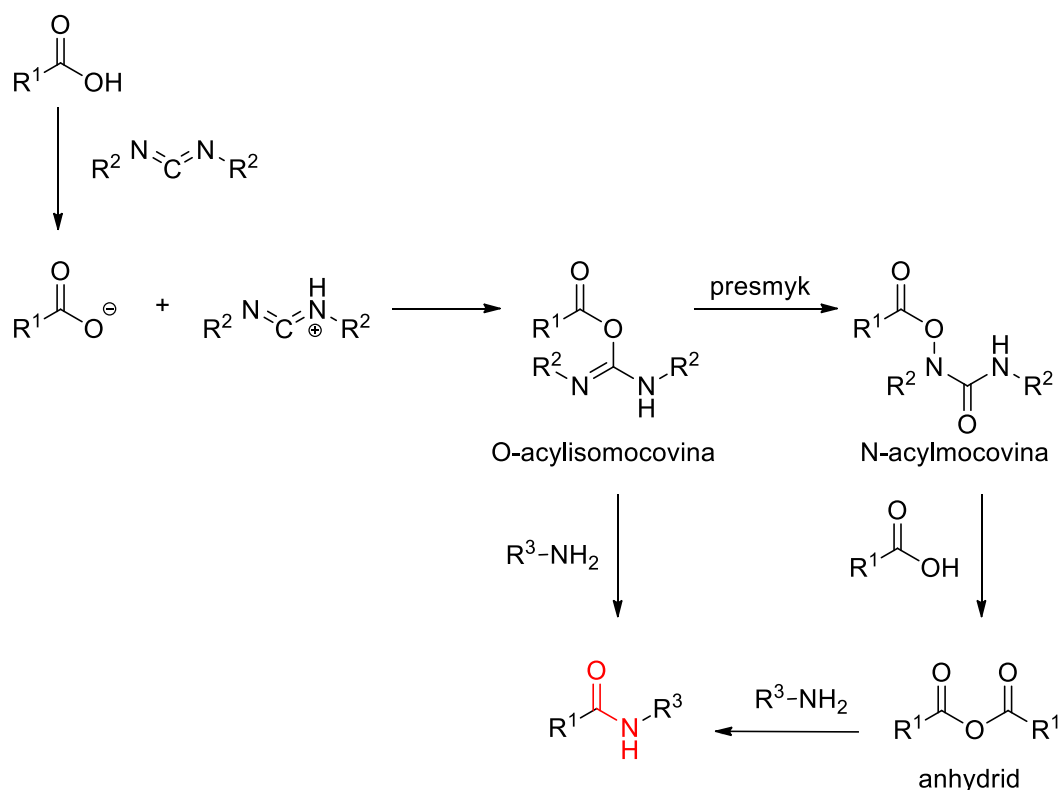
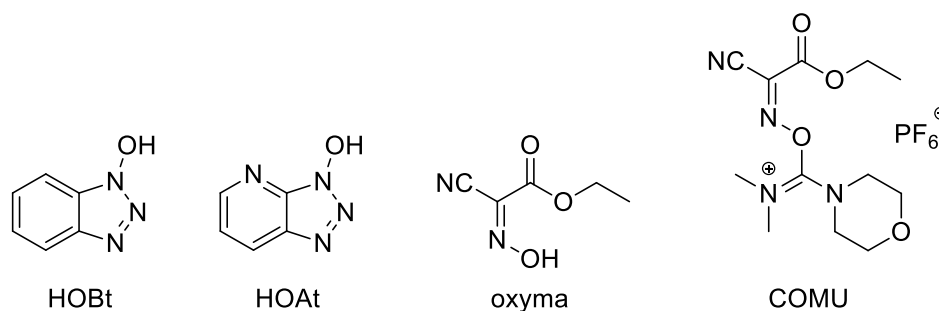


Schéma 8: Mechanismus reakce tvorby amidové vazby s použitím karbodiimidů.¹⁹

Aby nedocházelo k nežádoucím přesmykům a vedlejším reakcím, používají se navíc pomocná nukleofilní činidla (**Obrázek 5**), která reagují se vznikající *O*-acylisomočovinou přednostně. Těmito činidly jsou hydroxybenztriazol (HOBt, CAS 2592-95-2),

1-hydroxy-7-azabenzotriazol (HOAt, CAS 39968-33-7), ethyl-2-kyano-2-(hydroxyimino)acetát (oxyma, CAS 3849-21-6) a 1-[(1-(kyano-2-ethoxy-2-oxoethylidenaminooxy)dimethylaminomorfolino)]uronium hexafluorofosfát (COMU, CAS 1075198-30-9).¹⁹



Obrázek 5: Hydroxylaminové deriváty

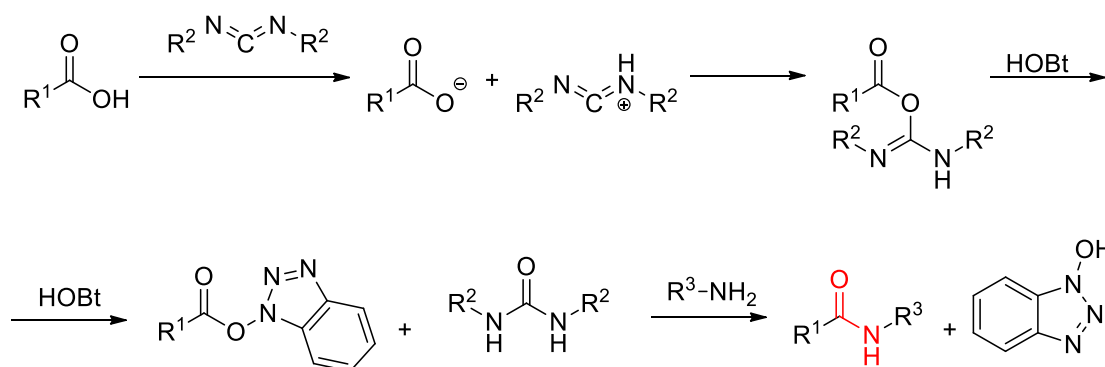


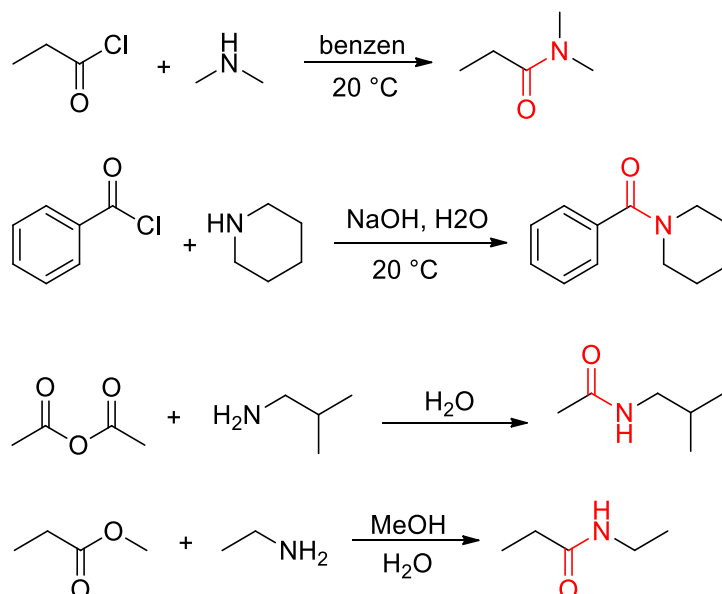
Schéma 9: Tvorba amidů s využitím HOBt, jakožto nukleofilu, který zamezuje přesmykům a vedlejším reakcím.

Oxyma téměř úplně potlačuje racemizaci a vykazuje lepší účinky než HOBt, účinky s HOAt jsou srovnatelné.²⁰ Dále lze říct, že deriváty aktivované oxymou jsou více reaktivní než deriváty odvozené od hydroxybenzotriazolů. Činidlo COMU zabraňuje racemizaci ještě více než oxyma.²¹

3.2.3. Syntéza alifatických amidů

Alifatické amidy lze připravit přímou metodou, která vychází z reakce amoniaku, primárních nebo sekundárních aminů s acylhalogenidy, anhydridy nebo estery odvozených od karboxylových kyselin (**Obrázek 6**). Podstatné je si uvědomit, že karboxylová skupina je sama o sobě málo reaktivní, ale reaguje s aminoskupinou druhé reakční komponenty za vzniku nežádoucí amoniové soli, a právě proto jsou pro reakce využívány funkční deriváty karboxylových kyselin. Použijeme-li halogenid kyseliny nebo anhydrid je nadbytek amoniaku (aminu) použit pro reakci s odstupující skupinou. Chceme-li pro reakci využít nějaký složitější amin, bývá nejčastěji využita nenukleofilní báze, buďto pyridin nebo TEA. V případě,

kdy je jako výchozí látka použit ester, bývá tento ester poměrně jednoduchý alkyl (ethyl, methyl).²²



Obrázek 6: Syntézy salicylamidů s použitím funkčních derivátů karboxylových kyselin.

Alifatické amidy mohou být připraveny i tzv. Beckmannovým přesmykem (**Schéma 10**). Jedná se o přesmyk ketoximu (oxim ketonu) působením silně kyselých činidel. Nejprve dochází k reakci ketonu s hydroxylaminem čímž vzniká ketoxim, který působením kyselé katalýzy přesmykuje na amid.

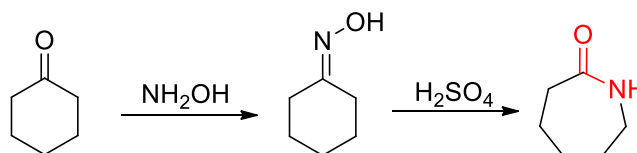
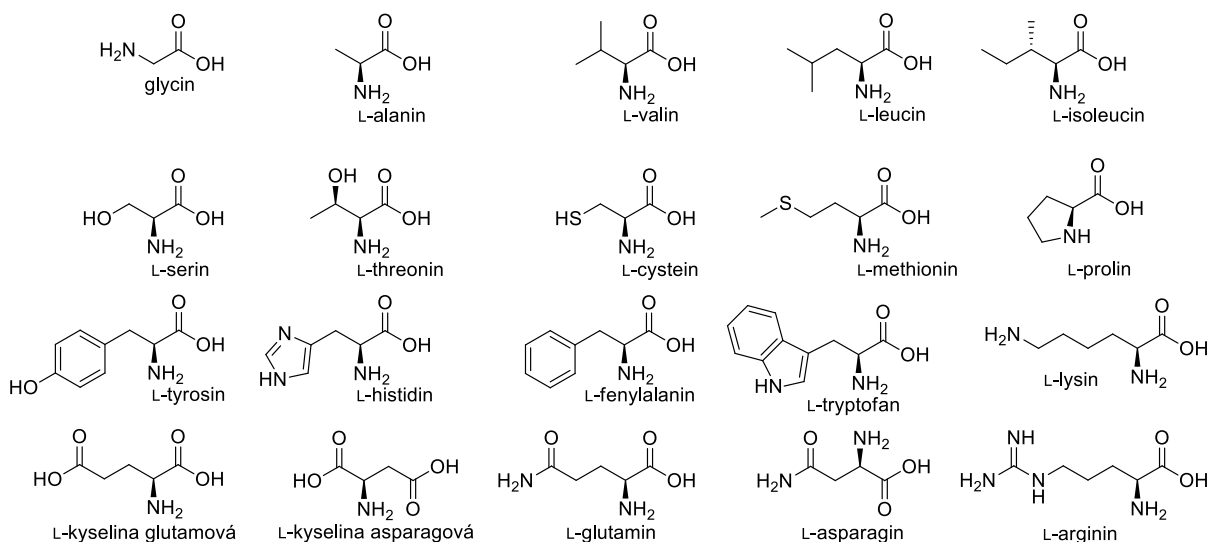


Schéma 10: Syntéza alifatických amidů pomocí Beckmannova přesmyku.

Vhodnou metodou pro příprava alifatických amidů je také využití amidačního činidla karboxyldiimidazolu (CDI) nebo použití reakčních činidel na bázi chloroformiátu, jak již bylo zmíněno výše při syntéze alifatických salicylamidů (viz.: kapitola 3.2.2 Syntéza alifatických salicylamidů).

3.3. Peptidický řetězec

Peptidický řetězec je nejlépe reprezentován spojením aminokyselin, pomocí amidové vazby, do dlouhých řetězců. V přírodě se vyskytuje dvacet základních α -aminokyselin (**Obrázek 7**), které jsou stavebním kamenem pro všechny peptidy i proteiny. Tyto aminokyseliny jsou v L-formě.



Obrázek 7: Přírodní L-aminokyseliny.

Vznik peptidové vazby (**Schéma 11**) je založen na reakci α -aminoskupiny jedné AMK a α -karboxylové skupiny druhé AMK, ve směru od C-konce k N-konci. Přičemž α -karboxylová skupina první AMK musí být chráněná, stejně jako musí být blokována α -aminoskupina druhé reakční komponenty, případně musí být ochráněny i další potenciálně reaktivní skupiny postranních řetězců. Všechny ochranné skupiny by měly být snadno převeditelné do původní podoby čili po skončení reakce musí být tyto chránicí skupiny snadno odstranitelné. Výjimku tvoří ochranné skupiny postranních řetězců. U těchto skupin je žádoucí, aby byly ochráněny až na samotném závěru reakce, až bude připraven finální peptidický řetězec. Tyto skupiny musí být stabilní a odolné vůči procesům ochrany koncových α -blokujících skupin. Obsahuje-li AMK na svém α -uhlíku chirální centrum, může při budování řetězce, dojít k racemizaci, což je nežádoucí proces. Cílem syntézy je vytvořit peptidickou vazbu, aniž by k racemizaci chirálních center docházelo.¹⁹

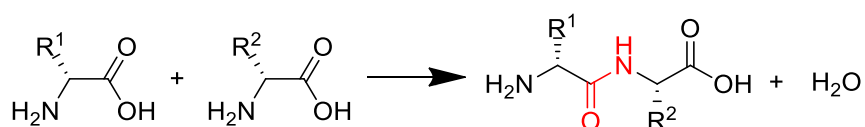


Schéma 11: Tvorba peptidické vazby.

Syntéza peptidů může být provedena v roztoku. Tato metoda je vhodná pro přípravu kratších, až středně dlouhých řetězců. Hlavní výhodou této metody je, že veškeré meziprodukty mohou být izolovány a podrobeny purifikaci. Případně může být u každého meziprojektu provedena deproteckce. Deprotekci lze docílit vhodné kombinace řetězců, které mohou vést k větším peptidům.²³

Druhou možnou cestou je syntéza na pevné fázi. Jedná se o nejrozšířenější metodu přípravy peptidických řetězců využívaných ve farmaceutickém průmyslu. Nejprve dochází k přichycení AMK na pevný nosič, který často tvoří kopolymer styrenu a divinylbenzenu, poté jsou přes amidovou vazbu navazovány další AMK. Na závěr je pevná fáze odštěpena. Nevýhodou této metody je, že není možná purifikace vznikajících meziprojektů. Purifikaci lze provést až tehdy, dojde-li k odštěpení finálního peptidu z pevného nosiče. Během toho však může docházet i ke štěpení vedlejších produktů.²⁴ Celková doba syntézy je poměrně rychlá, a proto nedochází k nežádoucí racemizaci a ke ztrátě požadované konfigurace.²²

Lze použít i kombinovanou techniku, kdy se nejprve syntézou v pevné fázi připraví velké, chráněné fragmenty a ty se dále sestavují buď opět metodou v pevné fázi anebo metodou v roztoku. Tento postup není zatím příliš rozšířen, ale může vést k výrobě velkých peptidů, zvláště v komerčním měřítku.²⁴

Tato diplomová práce je zaměřena pouze na syntézu v roztoku, a proto syntéze na pevné fázi a kombinované technice nebude více věnována pozornost.

3.3.1. Protekce α -aminoskupiny, příprava karboxylové komponenty

Protekce aminoskupiny (*Schéma 12*) vede k zamezení nežádoucí polymerace při aktivaci AMK. Mezi požadavky chránící skupiny se řadí její snadné zavedení, dobrá stabilita v široké škále reakčních podmínek, dobrá rozpustnost ve většině organických rozpouštědlech a také její snadná deproteckce, ať už na konci samotné syntézy nebo v jejím průběhu. Je-li ochrana prováděna během syntézy, měla by být prováděna za mírných podmínek, aby nedošlo k ovlivnění jiných chránících skupin, jež by měly být odstraněny až v úplném závěru syntézy. Samotné odstranění by mělo proběhnout rychle a bez vedlejších, nežádoucích reakcí, zejména pak bez racemizace chirálních center.²⁵

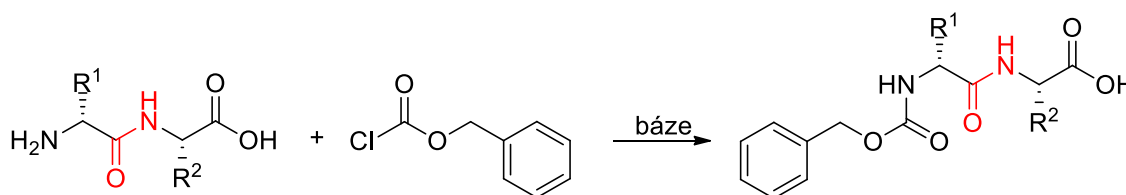
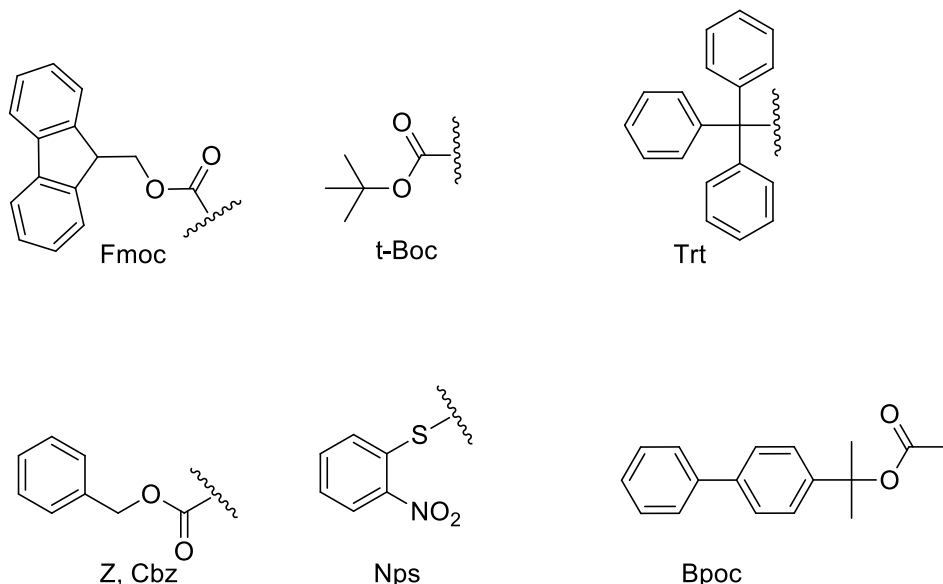


Schéma 12: Příklad ochrany α -aminoskupiny pomocí Cbz.

Protektce aminoskupiny vede k její dočasné deaktivaci. Mezi nejpoužívanější chránící skupiny řadíme 9-fluorenylmethoxykarbonyl (Fmoc), *tert*-butoxykarbonyl (*t*-Boc), trifenylmethyl (trityl, Trt)²⁶, benzyloxykarbonyl (Z, Cbz), 2-nitrofenylsulfenyl (Nps), 2-(4-bifenylyl)isopropoxykarbonyl (Bpoc), které lze vidět na **Obrázek 8**.²⁵



Obrázek 8: Chránící skupiny α -aminoskupiny.

3.3.2. Deprotektce chránících skupin α -aminokomponenty

V několika následujících řádcích se pokusím stručně popsat možnosti deprotektce použitých chránících komponent za získání požadovaného peptidu.

Chránící skupiny odstranitelné kyselinami

- Skupina *tert*-butyloxykarbonylová (*t*-Boc) je nejčastěji odstraněna přidávkem 25-50 % TFA v DCM, není však vyloučeno i použití jiných kyselin, např. 4M HCl v 1,4-dioxanu nebo 2M MeSO₃H v 1,4-dioxanu.²⁵
- Trityl (Trt) bývá nejběžněji odstraněn přidávkem 1 % TFA v DCM, případně lze použít 3 % TCA v DCM.²⁵
- Chránící skupina benzyloxykarbonyl (Z) bývá na konci syntézy odstraněna z molekuly pomocí katalytické hydrogenace nebo silnými kyselinami, např. HBr v kyselině octové nebo TFA za vysokých teplot.²⁵
- 2-Nitrofenylsulfenyl (Nps) bývá odstraněn přidávkem zředěných roztoků HCl v kyselině octové.²⁵ Deprotekci lze provést i použitím hydrochloridu thiosemikarbazidu. Zároveň lze tuto skupinu selektivně odštěpit vedle jiných chránících skupin, které lze ochránit kyselinami, důvodem toho je rozdílný mechanismus štěpení.²⁷

- Skupina 2-(4-bifenyloxy)isopropoxykarbonylová (Bpoc) je velice citlivá na kyselé prostředí. K jejímu odstranění postačí 0,2-0,5 % TFA.²⁵

Chránicí skupiny odstranitelné zásadami

- Jediný zástupce, kterého lze zařadit mezi chránicí skupiny, jež mohou být odstraněny zásadami, je 9-fluorenylmethoxykarbonylová skupina (Fmoc). Tato skupina bývá nejběžněji odstraněna pomocí sekundárních aminů. Při syntéze v roztoku se jedná o 10 % diethylamin, kapalným amoniakem s následným přidáním morfolinu nebo piperidinu nebo také dimethylacetamid. Je-li peptid připravován na pevné fázi, k odstranění Fmoc je využíván 20 % piperidin v DMF.²⁵

3.3.3. Protekce α -karboxylové skupiny, příprava aminové komponenty

Protekce karboxylové skupiny (*Schéma 13*) se provádí převážně jen u syntéz v roztoku. Při syntéze na pevné fázi není protekce nutná, neboť samotný pevný nosič slouží jako chránicí skupina. Možností ochrany je hned několik. Za zmínku určitě stojí reakce α -amino chráněné AMK s alkoholem v kyselém prostředí, dále pak reakce α -amino chráněné AMK s isobutenem v kyselém prostředí, také reakce α -amino chráněné AMK s halogenidy v bazickém prostředí a nesmíme zapomenout ani na reakci α -amino chráněné AMK s alkoholovými deriváty chránicích skupin v přítomnosti kondenzačních činidel, jako je třeba *N,N'*-dicyklohexylkarbodiimid.²⁵

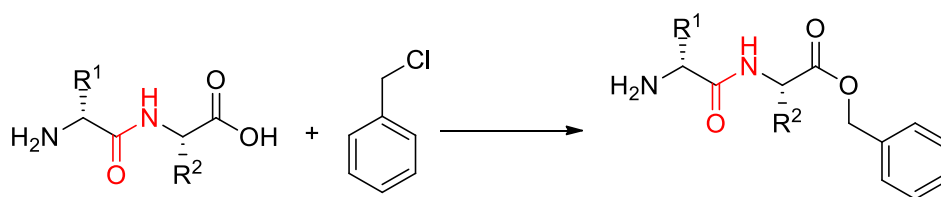
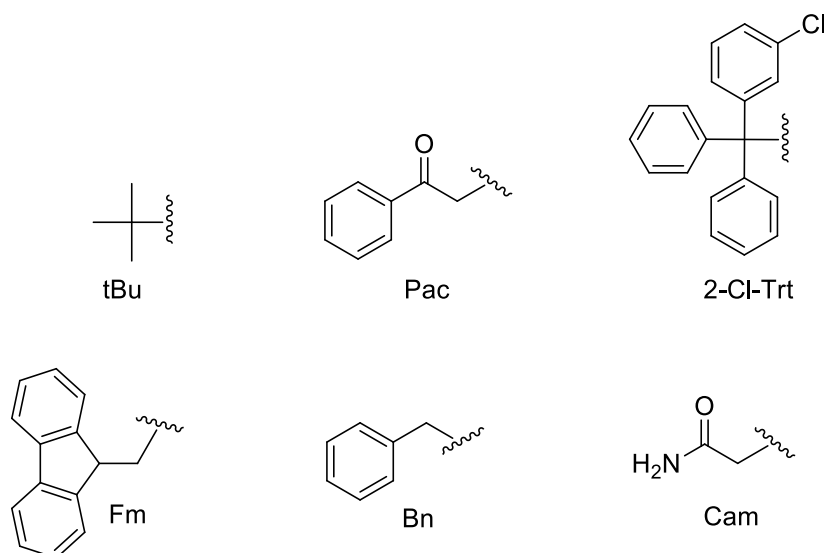


Schéma 13: Příklad ochrany α -karboxylové skupiny pomocí Bn.

Nejpoužívanějšími chránicími skupinami karboxylové skupiny jsou *tert*-butyl (*t*Bu), benzyl (Bn), 2-chlorotryl (2-Cl-Trt), 9-fluorenylmethyl (Fm), karbamoylmethyl (Cam) a fenacyl (Pac) (*Obrázek 9*).²⁵



Obrázek 9: Chránící skupiny α -karboxylové skupiny.

3.3.4. Deprotekce chránících skupin α -karboxylové komponenty

Chránící skupiny odstranitelné kyselinami

- Skupina *tert*-butyl (tBu) bývá odstraňována vysoce koncentrovanou TFA, lze také použít HCl v organickém rozpouštědle.²⁸
- Pro odstranění chránící skupiny 2-chlortrityl (2-Cl-Trt) je používán 1 % TFA v DCM.²⁵

Chránící skupiny odstranitelné bázemi

- 9-Fluorenylmethyl (Fm) může být z molekuly odstraněn pomocí sekundárních aminů (piperidin, diethylamin) v DCM nebo v DMF. Případně lze použít i katalytickou hydrogenaci v roztoku.²⁸
- Karbamoylmethyl (Cam) je odstraňován přidavkem NaOH, případně též přidavkem uhličitanu sodného v DMF.²⁵

Ostatní chránící skupiny

- Obvykle se chránící skupina benzyl (Bn) odstraňuje katalytickou hydrogenací, zmýdelněním či hydrazinolýzou. Odchranu lze provést i za použití kyselin, ale tato metoda vyžaduje náročnější reakční podmínky.²⁸
- Odstranění fenacylu (Pac) je jednoduché a provádí se přidáním nukleofilních činidel.²⁵

3.3.5. Protekce ostatních funkčních skupin

Aby nedocházelo k nežádoucím reakcím musí být chráněny i ostatní funkční skupiny AMK. Takovou skupinou je například karboxylová skupina v molekule kyseliny asparagové nebo v molekule kyseliny glutamové. Jako protekční skupina je využívána kombinace Fmoc/^tBu případně také Boc/cyklohexyl. Ochráněná musí být i vedlejší skupina hydroxylová, jedná-li se o reakce vycházející ze serotoninu nebo threoninu. Nejjednodušší možnost ochrany je převedení alkoholické skupiny na skupiny etherovou, chceme-li využít chránící činidla, nejčastěji se používá kombinace Boc/Bn anebo Fmoc/^tBu.²⁵

Nejvíce jsou využívány dvě strategie chránění funkčních skupin a skupin postranních řetězců, těmito strategiemi jsou Boc/Bn (Boc/cyklohexyl) a Fmoc/^tBu. V prvním případě je α -aminoskupina chráněná skupinou Boc a postranní řetězec benzylovou nebo cyklohexylovou skupinou. Druhý případ využívá kombinaci Fmoc/^tBu, kdy α -aminoskupina je chráněná skupinou Fmoc a pro ochranu vedlejšího řetězce je použit *tert*-butyl.²³

3.3.6. Aktivace karboxylové skupiny při syntéze peptidů v roztoku

Aby bylo dosaženo požadovaného couplingu je nejprve nutné provést aktivaci karboxylové skupiny, tedy nastartovat a zahájit samotný proces. Vznik amidové vazby je podmíněn nukleofilním atakem aminu na karboxylovou skupinu.¹⁹ Aktivace karboxylové skupiny vede ke zvýšení její reaktivity.¹⁸ Mezi výhody aktivujících látek patří jejich jednoduchá syntetická cesta a s tím související i komerční dostupnost, stabilita a zároveň snadná rozpustnost v mnoha rozpouštědlech a také to, že aktivace karboxylové skupiny je dostatečně rychlá a zároveň dochází jen k minimálnímu množství vedlejších reakcí.²⁹

Jedna z možností, jak aktivovat karboxylovou komponenty byla popsána výše (viz. kapitola 3.2.2 *Syntéza alifatických salicylamidů*)

Další možností, jak aktivovat karboxylovou skupinu je použití fosfoniových nebo amoniových solí (**Schéma 14**). Aby k aktivaci došlo, musí být karboxylová skupina převedena na karboxylátový anion, toho docílíme přidáním báze (HOBt). Vzniklý anion následně reaguje s fosfoniovou nebo amoniovou solí, respektive s jejich aktivní složkou – fosfoniovým nebo iminovým kationtem. Tento kationt je velice reaktivní a v kombinaci s dalšími karboxylátovými anionty poskytuje symetrický anhydrid jež může dále reagovat s AMK za vzniku nové peptidické vazby. Aby nedocházelo ke vzniku anhydridu, bývá do reakce přidáváno nukleofilní činidlo. V tomto případě dochází ke vzniku esteru, ke kterému je přidána AMK s volnou aminoskupinou, výsledkem je opět vznik amidové vazby.¹⁹

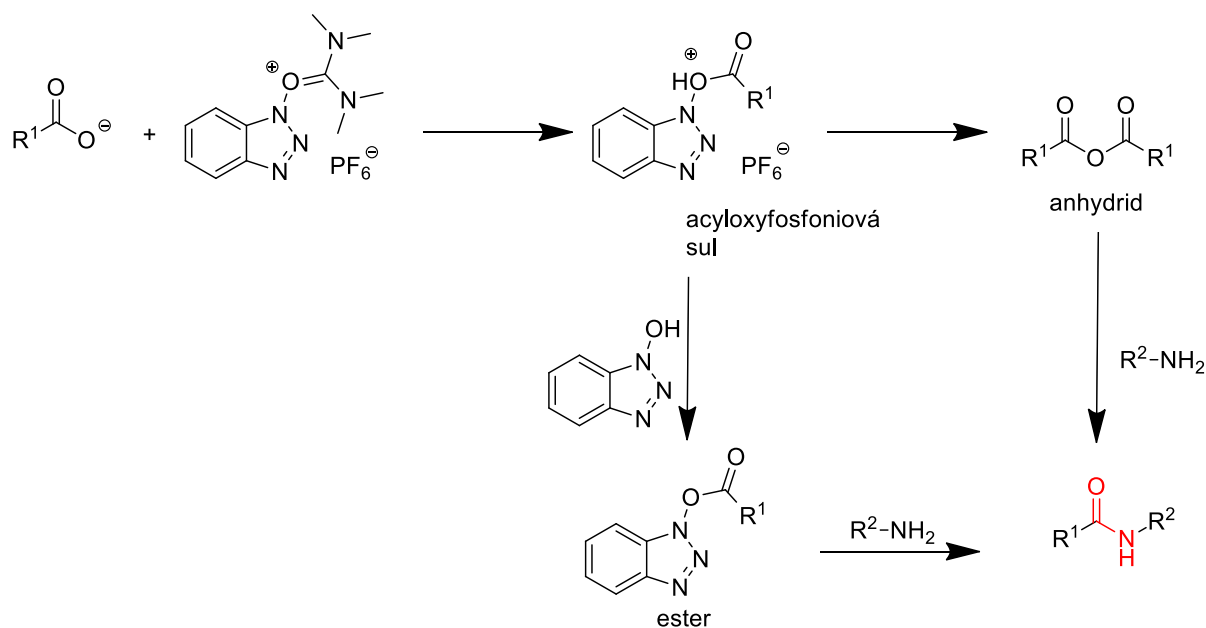
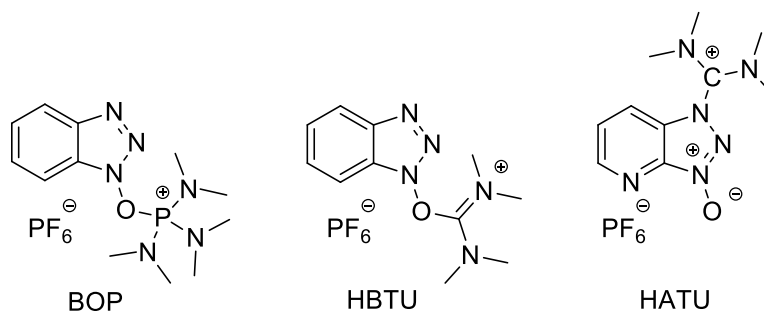


Schéma 14: Mechanismus reakce tvorby peptidické vazby s použitím fosfoniových solí a HOBt.¹⁹

Nejvíce používanou fosfoniovou solí je (benztriazol-1-yloxo)tris(dimethylamino) fosfonium hexafluorofosfát (BOP, CAS 56602-33-6). Mezi nejpoužívanější amoniové soli patří *N,N,N',N'*-tetramethyl-*O*-(1*H*-benztriazol-1-yl)uronium hexafluorofosfát (HBTU, CAS 94790-37-1) a 1-[bis(dimethylamino)methylen]-1*H*-1,2,3-triazolo[4,5-*b*]pyridinium-3-oxid hexafluorofosfát (HATU, CAS 148893-10-1) (**Obrázek 10**).



Obrázek 10: Oniové soli.

Obecně lze říct, že karboxylová skupina je aktivována elektron akceptorními skupinami. Kromě karbodiimidů, fosfoniových a amoniových solí lze k aktivaci též použít anhydridy, acylhalogenidy nebo azidy.¹⁸

3.3.7. Coupling

Vznik peptidové vazby je závislý na dvou krocích. Prvním krokem je aktivace karboxylové skupiny jedné AMK, druhý krok spočívá v nukleofilním ataku aminoskupiny

od druhé AMK. Aktivace karboxylové kyseliny vede ke ztrátě konfigurace dojde tedy k racemizaci a to proto, že vznikne enolát anebo oxazolón.²²

Vznik peptidové vazby probíhá adičně-eliminačním mechanismem, který znázorňuje **Schéma 15**. Odstupujícím vedlejším produktem je dialkylmočovina.¹⁸

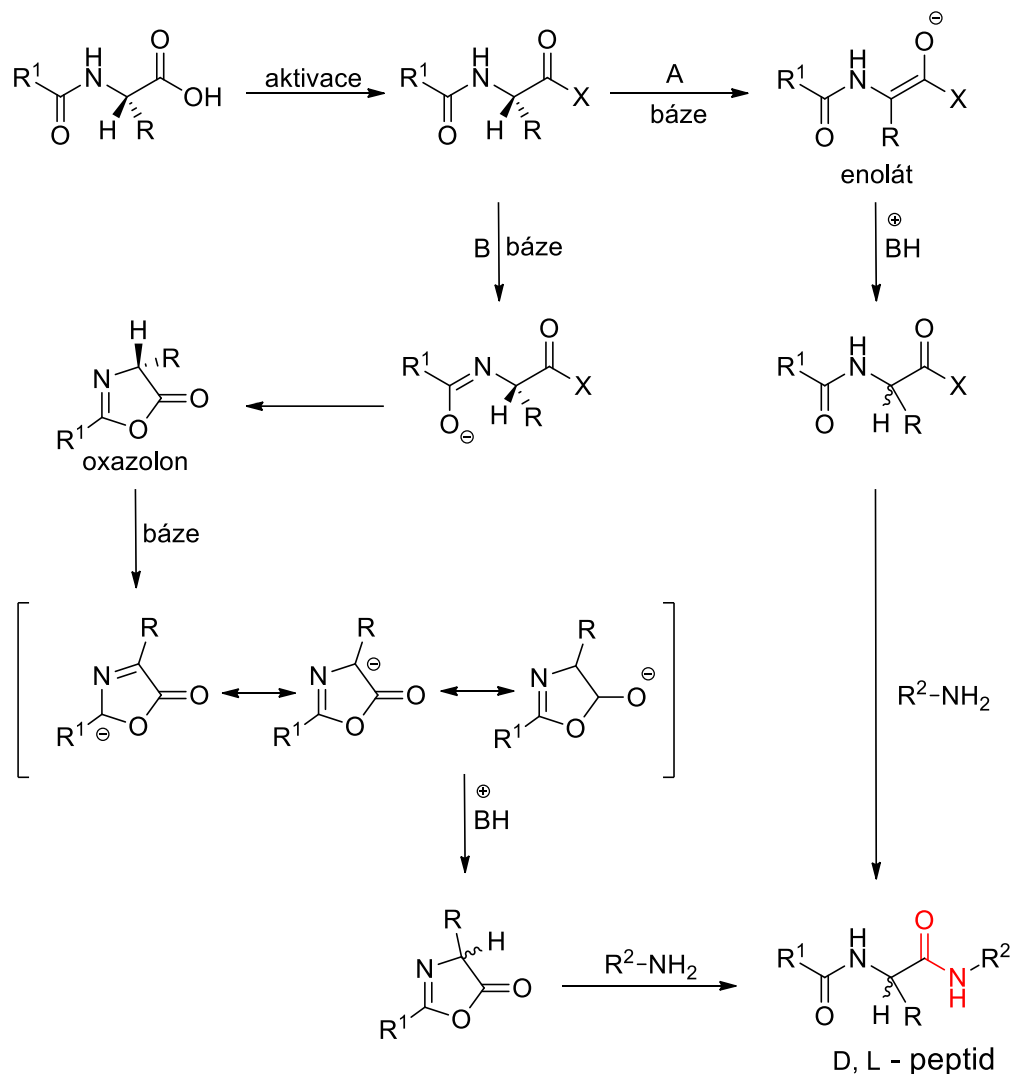


Schéma 15: Mechanismus racemizace.

3.4. Biologická aktivita vybraných salicylamidů a arylsulfonil hydrazidů

Biologická aktivita charakterizuje příznivé i nepříznivé účinky léčiva na lidský nebo zvířecí organismus. Biologická aktivita hraje roli v navrhovaném použití dané sloučeniny, co se klinické aplikace týče. Mnohé chemické sloučeniny mohou vykazovat nežádoucí až toxické účinky, jež mohou bránit v použití v klinické praxi.

Kyselina salicylová je známá pro své analgetické, antipyretické a protizánětlivé vlastnosti již řadu let. Nejvíce je využívána pro výrobu kyseliny acetylsalicylové, známou jako acylpyrin nebo též aspirin, což je komerčně dostupné léčivo.

3.4.1. Biologická aktivita salicylanilidů

Salicylanilidy jsou řazeny mezi látky vykazující širokou škálu biologické aktivity. Zejména lze hovořit o antimikrobiálním účinku³⁰, protiplísňové³¹, antifungální (působí proti houbám)³², antibakteriální³³ aktivitě a mimo jiné také působí proti hlístům.^{34, 35}

Obecně lze říct, že některé fyzikálně-chemické vlastnosti salicylanilidů, jako je např. nízká rozpustnost, zamezují jejich širokému využití v lékařské praxi. Modifikace hydroxylové skupiny může vést k potlačení nežádoucích fyzikálně-chemických vlastností, a tedy k zvýšení možností aplikace a použití v praxi.⁵

Salicylanilidy jsou schopny inhibovat regulační systém bakterií způsobující tuberkulózu. Regulační systém používá bakterie k vnímání a reakci na změny vnějších podmínek. Vyřazením tohoto systému lze docílit toho, že bakterie nebude nadále interagovat s vnějším prostředím, a proto se tato bakterie stává náchylnější k léčbě. Inhibici regulačního systému způsobuje navázání fenolické hydroxylové skupiny salicylanilidu na histidin kinázu, dojde k zabránění její fosforylace a výsledkem je přerušení přenosu interakce.^{36, 37, 38, 39, 40}

Studie⁵ hovoří o tom, že halogenované deriváty salicylanilidů vykazují srovnatelnou biologickou aktivitu, jakou vykazovaly výchozí salicylanilidové sloučeniny. Dále bylo zjištěno, že tyto deriváty vykazují mnohem lepší antituberkulotickou aktivitu proti atypickým mykobakteriálním kmenům než vykazuje isoniazid, který je považován za antituberkulostatikum první volby. Acetylované salicylanilidy též mají vysokou aktivitu, co se týče působení na mykobakteriální kmeny a zároveň vykazují menší toxicitu než léky první volby.⁵

Salicylanilidy vykazují též aktivitu proti viru Zika⁴¹ a jsou schopny inhibovat acetylcholinesterázu a butyrylcholinesterázu čehož lze využít při léčbě Alzheimerovy choroby.^{42, 43}

3.4.2. Biologická aktivita alifatických salicylamidů

Alifatické salicylamidy lze využít jako antipsychotika při léčbě schizofrenie a akutní mánie, dále to jsou antagonisté dopaminových receptorů.⁴⁴ Alifatické salicylamidy také vykazují antimikrobiální^{45, 46}, antimykobateriální⁴⁷ a fungicidní⁴⁸ aktivitu.

Je-li v molekule salicylamidu obsažena AMK, potom tento typ salicylamidu vykazuje antimykobakteriální, antibakteriální a antifungální vlastnosti.⁴⁹ Salicylamidy obsahující ve své molekule AMK jsou schopny ovlivňovat životnost rakovinných buněk a to tím, že inhibují buněčný cyklus nebo způsobují jejich apoptózu.⁵⁰

Svou experimentální práci zaměřuji na kombinaci AMK L-leucinu a L-fenylalaninu. Salicylamidy založené na těchto dvou AMK mají antiproliferativní a proapoptickou aktivitu na lidské rakovinné buňky, konkrétně hovoříme o buňkách způsobující chronickou myelogenní leukémii a o buňkách způsobující akutní monocytární leukémii. Buňky odpovědné za akutní monocytární leukémii jsou proti salicylamidům, obsahující ve své molekule leucin a fenylalanin, mnohem citlivější než buňky způsobující chronickou myelogenní leukémii. Jako nejúčinnější se prokázaly estery.⁵¹

Meziprodukty (estery, kyseliny a amidy) obsahující ve své struktuře jen jednu AMK vykazují biologickou aktivitu menší než sloučeniny se dvěma AMK v řetězci. Aktivita esterů a amidů je v rozmezí středních hodnot, účinky vykazující kyseliny byly ještě menší. Obsahuje-li sloučenina leucin nebo fenylalanin není podstatné, obě tyto AMK vykazují podobné hodnoty biologické aktivity.⁵¹

3.4.3. Biologická aktivita aminokyselin

Aminokyseliny tvoří základ všech bílkovin a peptidů, ale také enzymů a hormonů. Jsou součástí všech živých organismů a podílejí se na jeho správném fungování. AMK si je organismus schopen sám vyrábět, ty AMK, které si vyrobit neumí musí přijímat ve formě potravy.

Mnoho AMK má velký význam ve farmaceutickém průmyslu, protože AMK působí jako přírodní antioxidanty, exfoliační a omlazující činidla.⁵²

V několika následujících řádcích se budeme věnovat biologické aktivitě vykazující sloučeniny s molekulou fenylalaninu ve svém řetězci. Autoři článku⁵³ hodnotili biologickou aktivitu u 1,3,4-thiadiazolových a 1,2,4-triazolových derivátů mající ve své struktuře i fenylalaninovou skupinu. Konkrétně byla věnována pozornost toxicitě a protizánětlivým účinkům, které tyto látky vykazují. Bylo zjištěno, že protizánětlivá aktivita je srovnatelná s účinností nesteroidních léčiv jako jsou indometacin, fenylbutazon a samotná kyselina salicylová. Protizánětlivá aktivity by mohla být vysvětlena stabilitou lysozomu a též inhibicí biosyntézy prostaglandinů. Toxicita je u těchto látek snížena.⁵³

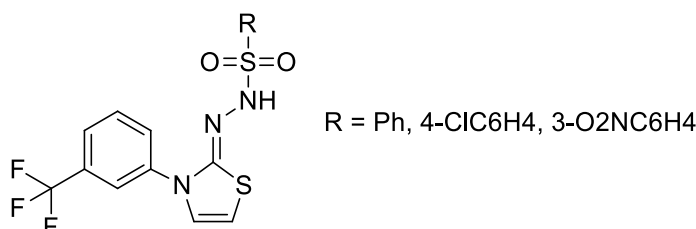
Leucin je AMK, která je důležitá pro správný růst svalů, zároveň je schopen stimulovat proteosyntézu, tedy tvorbu bílkovin. Leucin je významný i při stabilizaci glukózy v krvi, regulaci inzulínu a inhibici katabolických procesů.⁵⁴

Leucin byl také použit pro přípravu kvarterních amoniových povrchově aktivních látek. Tyto látky byly dále zkoumány z hlediska alternativy k doposud konvenčním antimikrobiálním

sloučeninám. Bylo zjištěno, že povrchově aktivní látky na bázi leucinu vykazují přijatelné antibakteriální a protiplísňové účinky. Dále mají dobré absorpční vlastnosti, nízkou toxicitu a jsou rychle biologicky rozložitelné. Jejich nevýhodou však je jejich vysoký hemolytický a dráždivý účinek na sliznici. Významným aspektem je ovšem antimikrobiální aktivita těchto látek, která je hojně uplatňována v dezinfekčních prostředcích a antisepticích. Jejich antimikrobiální aktivita je známá v širokém spektru jak proti gram pozitivním, gram negativním bakteriím tak i proti houbám.⁵⁵

3.4.4. Biologická aktivita arylsulfonfyl hydrazidů

Konkrétní sloučeniny založené na arylsulfonfyl hydrazidovém (**Obrázek 11**) uspořádání vykazují dobrou insekticidní účinnost proti roztočům pavouků. Tytéž molekuly mají i příznivou fungicidní aktivitu proti *Corynespora cassiicola*.⁵⁶

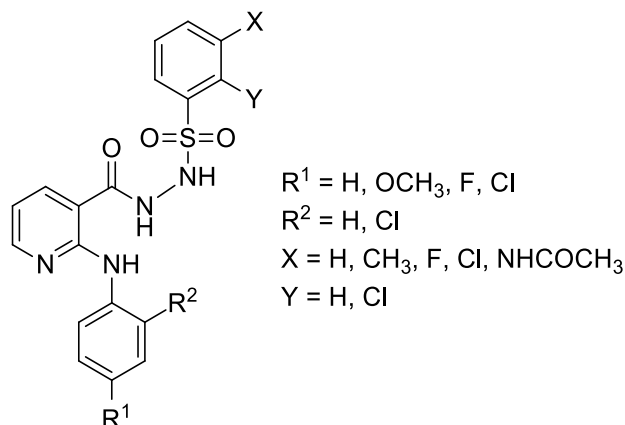


Obrázek 11: Molekula s arylsulfonfyl hydrazidovým uspořádáním.

Hydrazidové a sulfonfylhydrazidové uspořádání jsou schopny inhibovat kolagenázu, gelatinázu a metaloproteinázu při současném použití fluorimetrických substrátů odvozených od těchto enzymů. Arylsubstituované hydrazidové molekuly inhibují matricovou metaloproteinázu, ale velmi málo. Nehraje roli, zdali je na arylsubstituovaném hydrazidu navíc navázána elektrondonorní nebo elektronakceptorní skupina.⁵⁷

Molekuly obsahující *N*-arylsulfonfylhydrazidové uspořádání jsou považovány za inhibitory metalo- β -laktamáz. Jelikož je pozorována stále větší rezistence vůči β -laktamovým antibiotikům klade se důraz na vyvíjení nových β -laktamáz, která by podporovala účinek a používání již zmíněných β -laktamových antibiotik. Prozatím byly identifikovány čtyři základní třídy: A, B, C a D. Inhibitory mohou obsahovat trifluormethylalkoholy a ketony, hydroxamáty odvozené od AMK, thioly a thioesterové deriváty, cysteinylové deriváty, bifenylové tetrazoly, merkaptokarboxyláty, methylkarbapenemové deriváty a deriváty 2,3-disubstituované kyseliny jantarové. Také bylo prokázáno, že sulfonfylhydrazony jsou poměrně dost rychlé, co se týče inhibičního účinku, a s prodlužující se délkou testování již nedocházelo k výrazným změnám. Samotná inhibice spočívá ve specifických interakcích s aktivním místem napadaného enzymu.⁵⁸

Jiné molekuly (**Obrázek 12**), též obsahující arylsulfonyl hydrazidové uspořádání, byly testovány pro svou protinádorovou aktivitu. Bylo zjištěno, že takto uspořádané molekuly vykazují významnou protinádorovou aktivitu v primárním testování a dále jsou schopny z 50 % inhibovat růst u bakterií způsobující leukémii, rakovinu plic, tlustého střeva, ledvin a prsu. Tytéž sloučeniny byly testovány i na účinnost proti gram-pozitivním i gram-negativním bakteriím. Lze konstatovat, že většina použitých sloučenin vykazovala lepší inhibiční aktivitu ve srovnání se standardními léčivy.⁵⁹

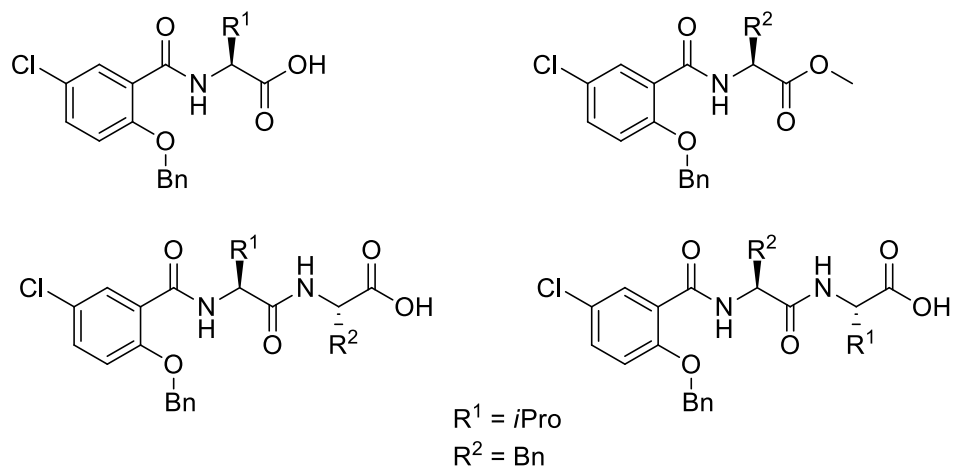


Obrázek 12: Molekuly s arylsulfonyl hydrazidovým uspořádáním vykazující protinádorovou aktivitu.

3.5. Návrh nových cytotoxycky aktivních molekul

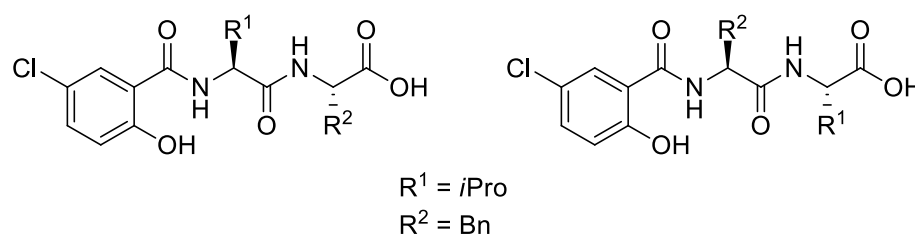
Na tomto místě bych ráda zmínila, že naše výzkumná skupina se již několik let zabývá syntézou látek založených na kyselině salicylové a L-aminokyselinách a následnému studiu biologické aktivity, konkrétně antiproliferativními a cytotoxickými vlastnostmi.

Testování látek prokázalo, že meziprodukty (jak kyseliny, tak i estery) obsahující ve své struktuře pouze jednu AMK, jsou méně aktivní než látky s di-peptidickou skupinou (**Obrázek 13**). U derivátů obsahující dva aminokyselinové zbytky bylo zjištěno, že sloučeniny s karboxylovou funkční skupinou jsou méně aktivní, s největší pravděpodobností kvůli přítomnosti kyselého vodíku a také kvůli omezení buněčného vylučování (způsobené karboxylovou skupinou). Nejsilnější deriváty pak obsahují esterovou funkční skupinu a vzájemnou kombinaci L-leucinu a L-fenylalaninu.⁵¹



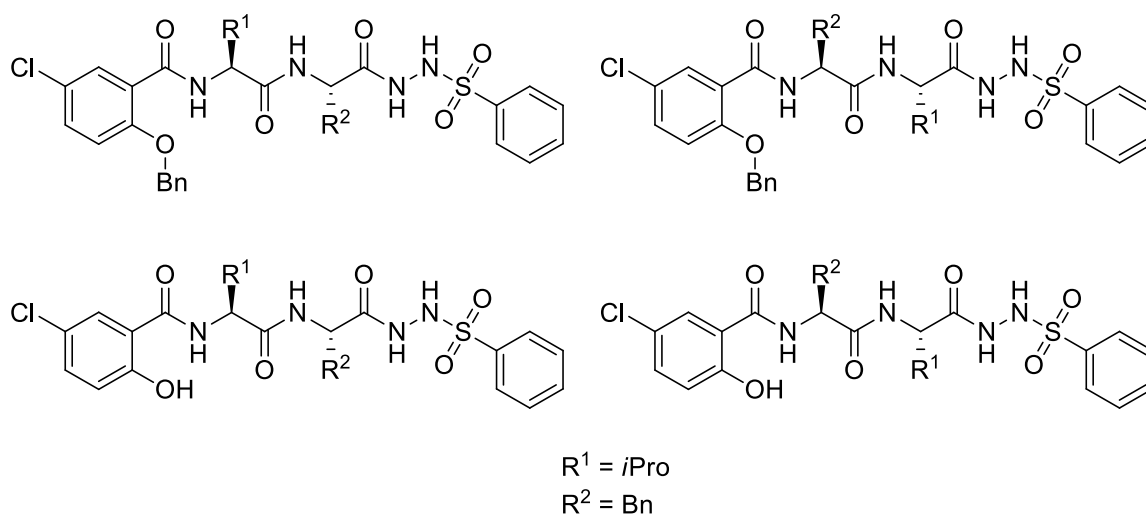
Obrázek 13: Látky vykazující antiproliferativní a cytotoxické vlastnosti.

U látek, kterým byla v posledním kroku chemické syntézy uvolněna fenolická skupina, lze pozorovat výrazné zlepšení antiproliferativních vlastností ve srovnání s látkami, jež měly fenolickou skupinu chráněnou benzylem (**Obrázek 14**).⁶⁰



Obrázek 14: Látky vykazující lepší vykazující antiproliferativní a cytotoxické vlastnosti.

Zavedení arylsulfonfyl hydrazidového uspořádání (**Obrázek 15**), do výše uvedených molekul, si kladlo za cíl vytvořit zcela nové potenciální cytotoxicky aktivní látky založené na substituované kyselině salicylové a dvou aminokyselinách.



Obrázek 15: Potenciální cytotoxicky aktivní látky.

4. Výsledky a diskuze

Nejprve se zaměřím na syntetické cesty vedoucí k meziproduktům, které budou následně využity pro přípravu požadovaných finálních produktů. Reakční cesty pro přípravu intermediátů jsou v naší laboratoři prováděny poměrně často a lze je svým způsobem považovat za rutinní záležitosti. Mnohé připravené meziproducty byly bez následné purifikace použity do dalších syntetických kroků. Některé intermediáty byly po přípravě purifikovány a až poté s nimi bylo přestoupeno do dalších reakčních stupňů. Všechny získané meziproducty byly podrobeny elementární analýze a ^1H NMR spektroskopii. Získané výsledky odpovídaly hodnotám uvedeným v literatuře^{61, 62, 63} a také výsledkům předchozích totožných experimentů, jež byly provedeny studenty v předchozích ročnících.

Následně bude věnována pozornost originálním molekulám, na kterých tato diplomová práce stojí. Jedná se o čtyři látky, které mají fenolickou hydroxylovou skupinu chráněnou benzylem. Pracovní postup přípravy těchto látek se opírá o poznatky v literatuře.⁶⁴ Benzylované látky byly čištěny sloupcovou chromatografií nebo krystalizací, charakterizovány byly ^1H a ^{13}C NMR spektroskopii, hmotnostní spektroskopii s vysokým rozlišením, elementární analýzou a bodem tání. Zároveň tyto benzylované látky slouží k přípravě molekul s volnou fenolickou hydroxylovou skupinou, k přípravě finálních molekul. Finální produkty byly připravovány na základně odborné literatury⁶⁵, byly charakterizovány ^1H a ^{13}C NMR spektroskopii, elementární analýzou, hmotnostní spektroskopii s vysokým rozlišením a body tání.

4.1. Ochrana fenolické hydroxylové skupiny kyseliny 5-chlor-*O*-benzylsalicylové (4)

Nejprve byla provedena ochrana fenolické hydroxylové skupiny substituované kyseliny salicylové. Ochrana sloužila k tomu, aby v molekule nedocházelo k nechtěným reakcím (viz. kapitola 3.3.5 *Protektce ostatních funkčních skupin*).

Syntéza ochráněné substituované kyseliny salicylové (*Schéma 16*), tedy 2-(benzyloxy)-5-chlorbenzenkarboxylové kyseliny (4) spočívala v rozpuštění 1 ekvivalentu 5-chlorsalicylové kyseliny (1) v DMF, následně bylo do RS přidáno 4,59 ekvivalentů K_2CO_3 a poté bylo postupně přikapáváno 3,16 ekvivalentů benzylchloridu (2). Poté byla RS refluxována po dobu 1,5 hodiny. Následně byla RS ochlazena na laboratorní teplotu a přelita do kádinky, ve které byla směs vody a ledu. Po 30 minutách míchání došlo k vyloučení meziproductu (3), který byl odfiltrován na Büchnerově nálevce a promyt 3x destilovanou

vodou. Meziprodukt (**3**) byl rozpuštěn v DCM a byl extrahován destilovanou vodou a solankou. Organická fáze byla vysušena bezvodým Na_2SO_4 , sušidlo bylo odfiltrováno přes vatičku a rozpouštědlo bylo odpařeno na RVO. Byly získány krystaly meziproduktu (**3**), které byly použity do dalšího kroku reakce bez jakékoliv úpravy a purifikace.⁶¹

V objemově dobře zvolené baňce byla vytvořena suspenze, kterou tvořil 1 ekvivalent meziprodukt (**3**) a MeOH. Poté bylo přidáno 4,79 ekvivalentů 40% roztoku NaOH, došlo k rozpuštění suspenze. RS byla refluxována po dobu 2,5 hodin. Následně byla RS ochlazena na laboratorní teplotu a oddestilováním části rozpouštědla bylo dosaženo jejího zahuštění. RS byla naředěna vodou a okyselena koncentrovanou HCl na pH = 1. Vzniklá sraženina byla vakuově přefiltrována na Büchnerově nálevce, promyta studenou destilovanou vodou, vakuově vysušena a rekrystalizována ze směsi EtOAc/hexan (1:3). Byl získán požadovaný produkt (**4**) ve formě bílých krystalů. Výtěžek reakce byl 55 %. Produkt (**4**) byl charakterizován ^1H NMR spektroskopií, elementární analýzou a bodem tání. Získané hodnoty byly ve shodě s literaturou.⁶¹

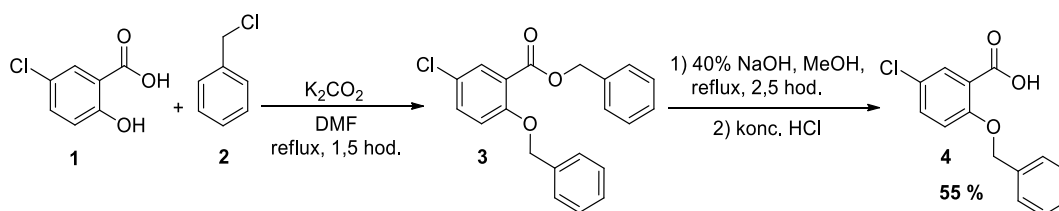


Schéma 16: Ochrana fenolické hydroxylové skupiny substituované kyseliny salicylové.

4.2. Příprava amidů methylesteru AMK a 5-Cl-O-Bn-Sal-OH

Příprava amidů methylesteru AMK a 5-Cl-O-Bn-Sal-OH, vychází ze substituované salicylové kyseliny a volné báze methylesteru AMK, která je bezprostředně před reakcí uvolněna z methylesteru AMK hydrochloridu, jak znázorňuje *Schéma 17*.

Do baňky vhodného objemu byl předložen 1 ekvivalent methylesteru hydrochloridu AMK, který byl rozpuštěn v destilované vodě. Poté byl postupně přidán 1 ekvivalent K_2CO_3 a RS byla míchána při pokojové teplotě po dobu 10 minut. Následně byla provedena extrakce DCM (3x), organické vrstvy byly spojeny a promyty destilovanou vodou (3x). Také bylo provedeno vysušení bezvodým Na_2SO_4 , sušidlo bylo odfiltrováno přes vatičku. Oddestilování rozpouštědla, byl získán meziprodukt představující methylester AMK, se kterým bylo postoupeno do samotné reakce.⁶²

Do dostatečné velké baňky byl předložen 1 ekvivalent výchozí kyseliny, která byla rozpuštěna v DCM. Následně byl přidán 1,1 ekvivalent HOBt a 1,2 ekvivalenty EDC·HCl. RS byla míchána při pokojové teplotě 30 minut, aby došlo k aktivaci výchozí kyseliny. Po uplynutí 30 minut byl do RS přidán roztok 1,2 ekvivalentů methyl esteru AMK, rozpuštěného v minimálním možném objemu DCM. RS byla monitorována pomocí TLC, po cca 2 hodinách bylo patrné, že došlo k vymizení výchozí kyseliny, a proto byla reakce ukončena, DCM byl odpařen na RVO a zbylý olej v baňce byl rozpuštěn v EtOAc a v destilované vodě. Byla provedena extrakce, organická vrstva byla oddělena a vodná vrstva byla extrahována EtOAc (3x). Získané organické vrstvy byly spojeny a extrahovány nasyceným roztokem NaHCO₃ (3x), 5 % roztokem kyseliny citronové (3x) a destilovanou vodou (3x). Organická vrstva byla vysušena bezvodým Na₂SO₄, sušidlo bylo odfiltrováno přes vatičku. Rozpouštědlo bylo odpařeno na RVO za získání požadovaného produktu.⁶²

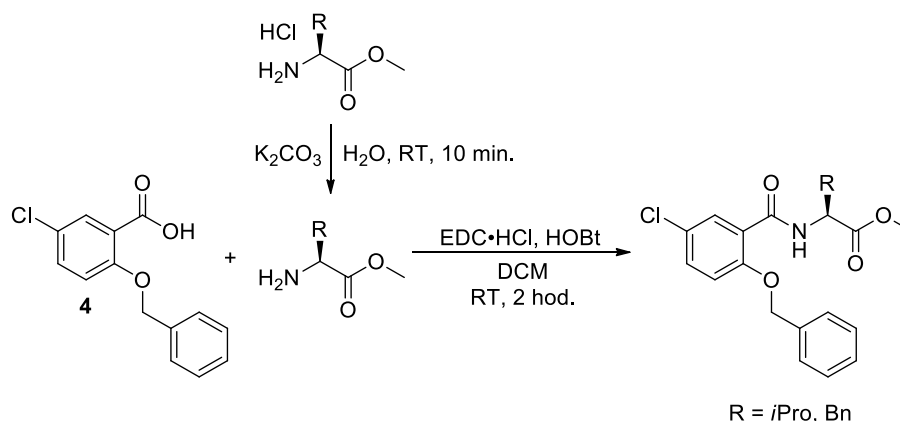


Schéma 17: Obecná příprava amidů methylesteru AMK a 5-Cl-O-Bn-Sal-OH.

4.2.1. Příprava amidů methylesteru (6, 8) s jednou AMK

Ve své diplomové práci pracuji se dvěma molekulami, jenž vycházejí ze substituované kyseliny salicylové a zároveň ve své struktuře obsahují pouze jednu AMK, buď L-leucin nebo L-fenylalanin.

Příprava těchto amidů methylesterů spočívá v reakci 5-Cl-O-Bn-Sal-OH (4) s methyl esterem L-leucinu (7) nebo s methyl esterem L-fenylalaninu (5). Pracovní postup vycházel z postupu uvedeného v kapitole 4.2 *Příprava amidů methylesteru AMK a 5-Cl-O-Bn-Sal-OH* a byl pouze převeden do praxe. Praktické výtěžky provedených reakcí znázorňuje **Schéma 18**. K charakterizaci posloužila ¹H NMR spektroskopie a elementární analýza. Získané údaje byly ve shodě s literaturou.⁶²

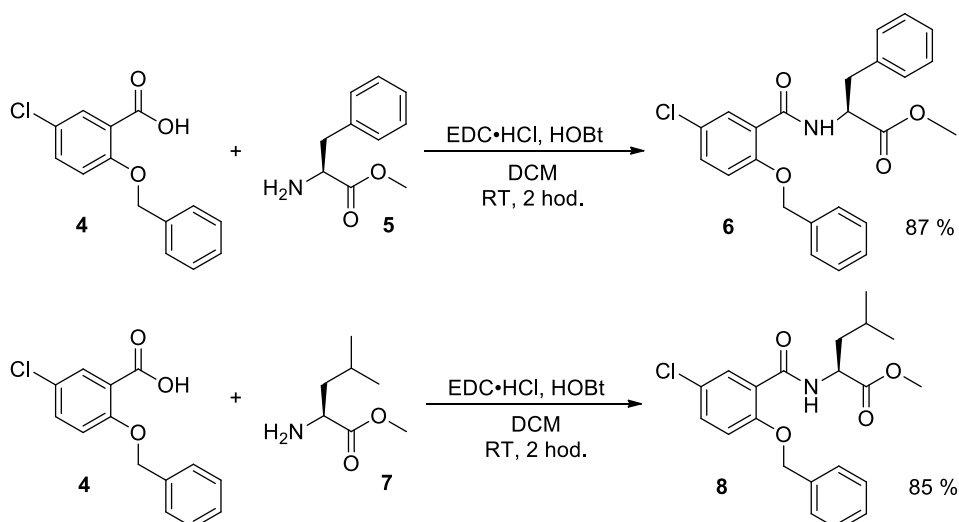


Schéma 18: Přípravy amidů methylesteru **6**, **8** obsahující ve své struktuře jednu AMK.

4.2.2. Příprava amidů methylesteru (**10**, **11**, **13**, **14**) se dvěma AMK

Má diplomová práce je založena na látkách, které ve své molekule obsahují dvě AMK, L-leucin nebo L-fenylalanin, případně jejich vzájemnou kombinaci. Aby bylo možné docílit přípravy finálních molekul, muselo tomu předcházet připravení požadovaných amidů methylesteru **10**, **11**, **13** a **14**, jak znázorňuje **Schéma 19**.

Pracovní postup vycházel z postupu popsaného v kapitole 4.2 *Příprava amidů methylesteru AMK a 5-Cl-O-Bn-Sal-OH*. Výchozí látkou byly amid karboxylové kyseliny **9** nebo **12**. Praktické výtěžky provedených reakcí lze vidět na **Schéma 19**. Byly provedeny charakterizace produktů **10**, **11**, **13** a **14** pomocí ^1H NMR spektroskopie a elementární analýzy. Získané údaje jsou ve shodě s literaturou.⁶²

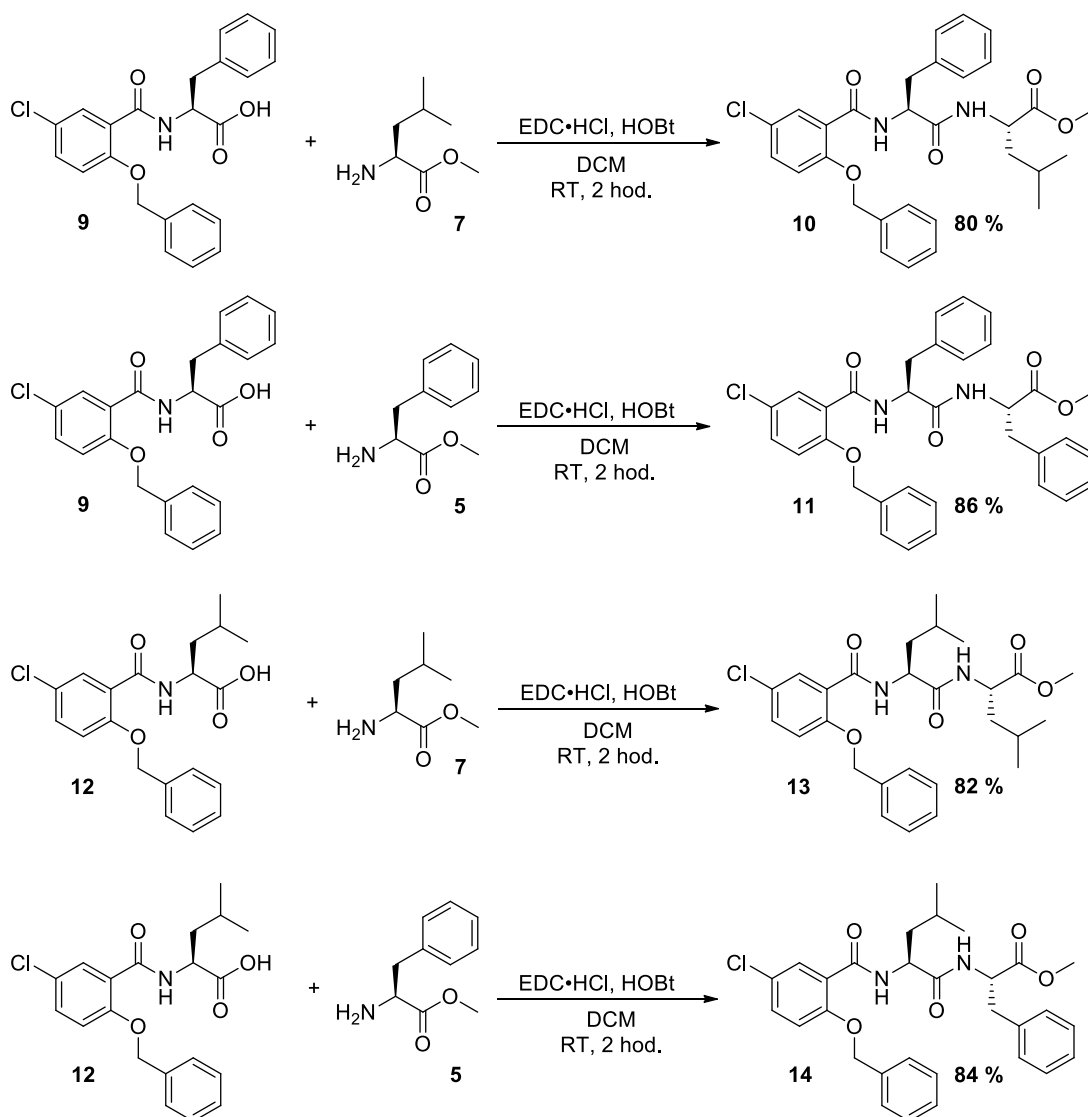


Schéma 19: Příprava amidů methylesteru **10**, **11**, **13** a **14**, které ve své struktuře obsahují dvě AMK.

4.3. Příprava amidů kyselin AMK a 5-Cl-O-Bn-Sal-OH

Příprava amidů kyselin AMK odvozených od substituované kyseliny salicylové, je poměrně jednoduchá, protože spočívá v pouhé hydrolyze amidů methylesteru AMK, jak znázorňuje **Schéma 20**.

Do baňky vhodného objemu byl předložen 1 ekvivalent výchozího amidu methylesteru AMK a k němu byla přilita destilovaná voda a dvojnásobný objem 1,4-dioxanu. Poté byly do směsi přidány 3 ekvivalenty LiOH. RS byla míchána při pokojové teplotě a byla monitorována pomocí TLC na výskyt výchozího amidu methylesteru AMK, po cca hodině, kdy se podle TLC již výchozí amid methylester AMK v RS nevyskytoval, byla směs okyselena koncentrovanou HCl až na pH = 1. RS byla extrahována EtOAc (1x). Vodná vrstva byla oddělena a znovu

extrahována EtOAc (2x). Organické fáze byly spojeny a extrahovány destilovanou vodou (2x). Následně byla organická fáze vysušena bezvodým Na₂SO₄, sušidlo bylo odfiltrováno přes vatičku a rozpouštědlo bylo vakuově odpařeno. Byly získány produkty v podobě amidů karboxylových kyselin.⁶³ K charakterizaci posloužila ¹H NMR spektroskopie a elementární analýza. Získané údaje byly ve shodě s literaturou.⁶³

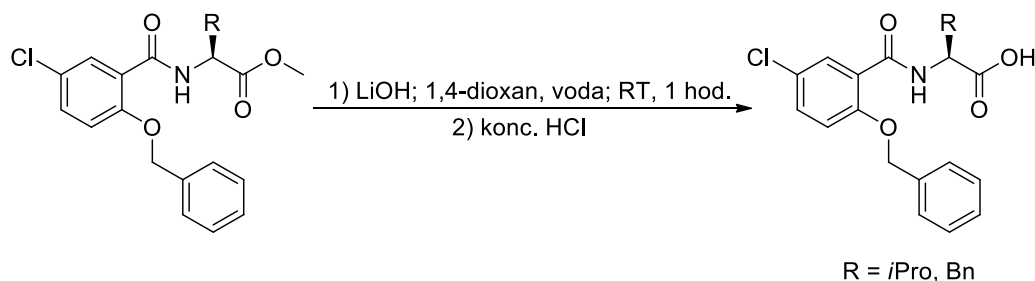


Schéma 20: Obecná příprava amid kyselin AMK a 5-Cl-O-Bn-Sal-OH.

4.3.1. Příprava amidů kyselin (9, 12) s jednou AMK

Příprava těchto kyselin spočívá v převedení amidu methylesteru s jednou AMK (6 a 8) na sůl pomocí LiOH a v následném okyselení RS koncentrovanou HCl.

Samotný pracovní postup vycházel z postupu uvedeném v kapitole 4.3 Příprava amidů kyselin AMK a 5-Cl-O-Bn-Sal-OH a byl pouze převeden do praxe. Praktické výtěžky provedených reakcí znázorňuje **Schéma 21**. K charakterizaci získaných kyselin (9 a 12) posloužila ¹H NMR spektroskopie a elementární analýza. Získané údaje byly ve shodě s literaturou.⁶³

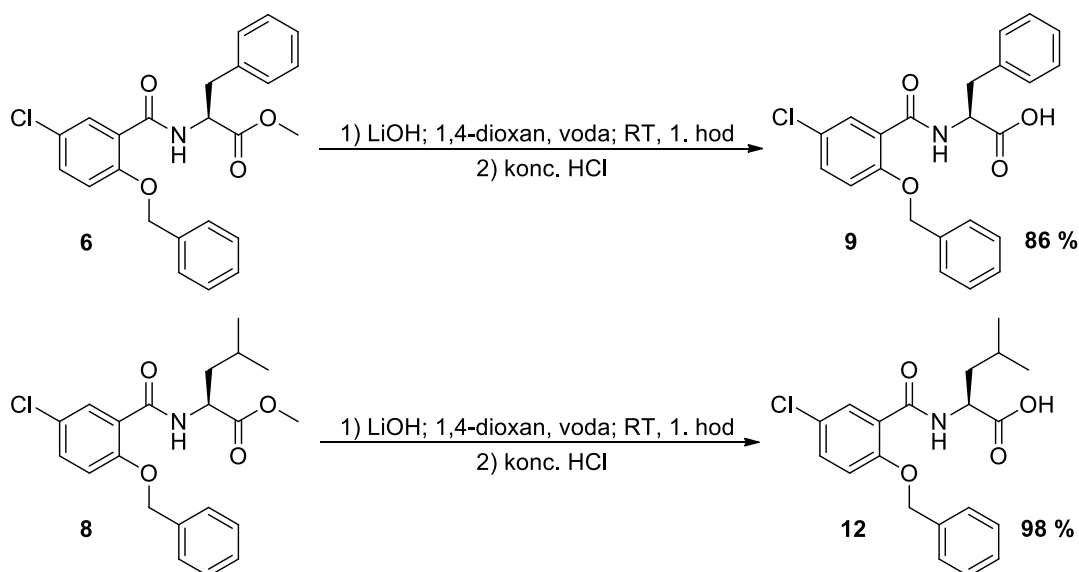


Schéma 21: Přípravy amid kyselin 9 a 12 obsahující ve své struktuře jednu AMK.

4.3.2. Příprava amidů kyselin (15, 16, 17, 18) se dvěma AMK

Příprava amidů kyselin se dvěma AMK vychází z amidů methylesteru se dvěma AMK (10, 11, 13 a 14). Nejprve dochází ke vzniku soli karboxylové kyseliny, která je následně okyselena koncentrovanou HCl.

Pracovní postup vychází z postupu popsánoho v kapitole 4.3 *Příprava amidů kyselin AMK a 5-Cl-O-Bn-Sal-OH*. Praktické výtěžky jednotlivých reakcí znázorňuje **Schéma 22**. Všechny získané amid kyseliny se dvěma AMK (15, 16, 17, 18) byly charakterizovány ^1H NMR spektroskopii a elementární analýzou. Získané hodnoty byly v souladu s literaturou.⁶³

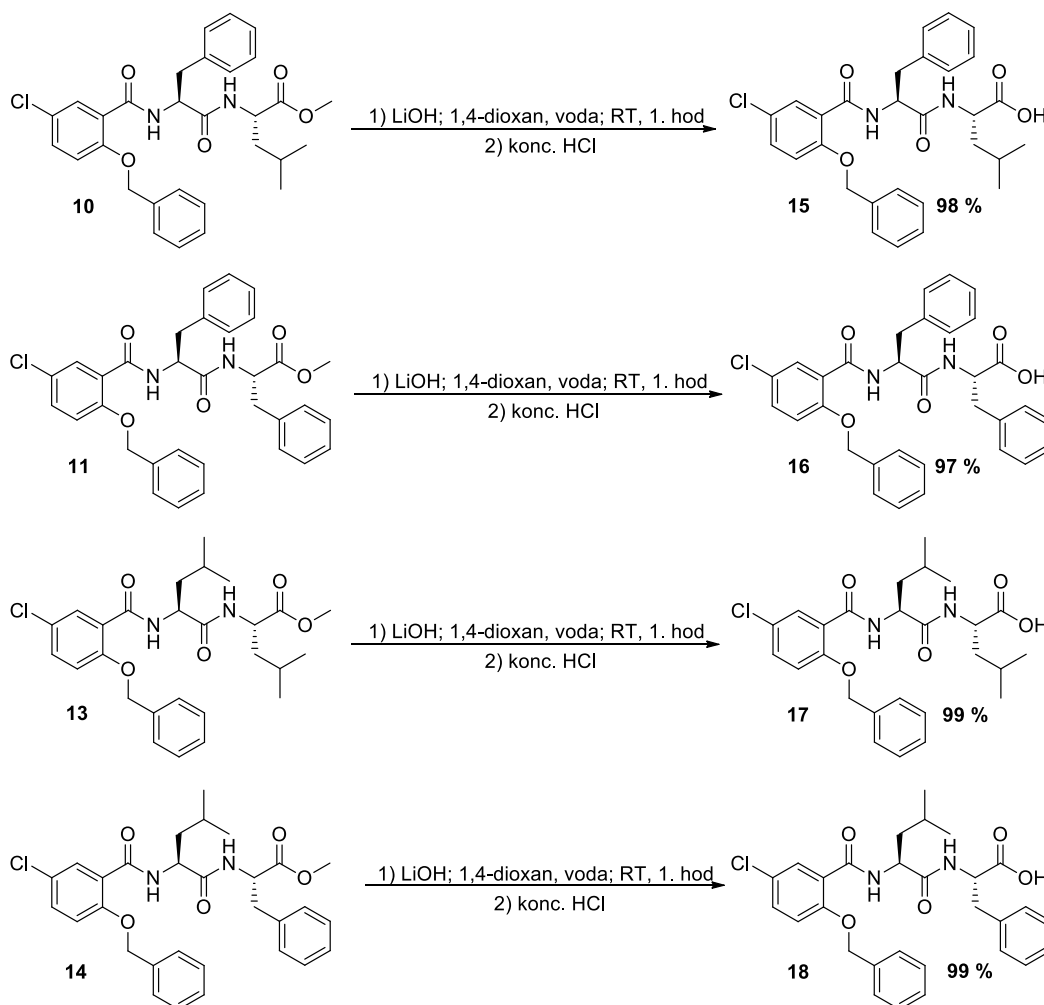


Schéma 22: Příprava amid kyselin 15, 16, 17 a 18, které ve své struktuře obsahují dvě AMK.

4.4. Příprava O-Bn di-peptidických sulfonyl hydrazidů (20, 21, 22, 23)

Amid kyseliny (15, 16, 17 a 18), získané výše uvedeným postupem (viz.: 4.3 *Příprava amidů kyselin AMK a 5-Cl-O-Bn-Sal-OH*), sloužily jako výchozí látky pro reakce s hydrazid sulfon fenolem (obecné **Schéma 23**).

Do baňky vhodného objemu byl předložen 1 ekvivalent výchozí amid karboxylové kyseliny (**15**, **16**, **17** a **18**). Baňka byla umístěna do DrySinu, byl na ni nasazen zpětný chladič a byla připojena k inertní atmosféře dusíku. Dále bylo do reakční baňky přidáno bezvodé rozpouštědlo ACN, takové množství, aby došlo k rozpuštění výchozí kyseliny (**15**, **16**, **17** a **18**). Poté bylo do RS přidáno 1,15 ekvivalentů HOAt a 1,25 ekvivalentů EDC·HCl rozpuštěných v bezvodém ACN, přidáno v roztoku pod nátokem inertního plynu. RS byla míchána 30 minut při pokojové teplotě. Po 30 minutách bylo provedeno kontrolní TLC, které prokázalo, že došlo k aktivaci výchozí karboxylové kyseliny (**15**, **16**, **17** a **18**). Do RS bylo přidáno 1,25 ekvivalentů hydrazid sulfon fenolu (**19**) rozpuštěného v minimálním objemu bezvodého ACN, přidáno v roztoku pod nátokem dusíku. RS byla zahřáta na 40°C. Při této teplotě, a stále v atmosféře inertního plynu, byla RS míchána 18 hodin. Po uplynutí 18ti hodin byla reakce ukončena. Rozpouštědlo bylo odpařeno na RVO. Zbytek v baňce byl rozpuštěn v EtOAc a destilované vodě. Byla provedena extrakce. Organická vrstva byla oddělena a vodná vrstva byla ještě 2x extrahována EtOAc. Získané organické vrstvy byly spojeny a 3x extrahovány 1% roztokem NaHCO₃ a znovu 3x destilovanou vodou. Na závěr byla organická fáze vysušena bezvodým Na₂SO₄, sušidlo bylo odfiltrováno přes vatičku a rozpouštědlo bylo odpařeno na RVO.⁶⁴

RS byla přečištěna sloupcovou chromatografií. Byl získán produkt, který představoval molekulu založenou na kyselině salicylové, L-fenylalaninu, L-leucinu a hydrazid sulfon fenolu, s tím, že hydroxylová skupina salicylové kyseliny byla chráněná benzylem. Získané produkty (**20**, **21**, **22**, **23**) byly ve formě bílých krystalů.⁶⁴ Praktické výtěžky jednotlivých reakcí jsou uvedeny u konkrétních molekul v kapitole 5. *Experimentální část*.

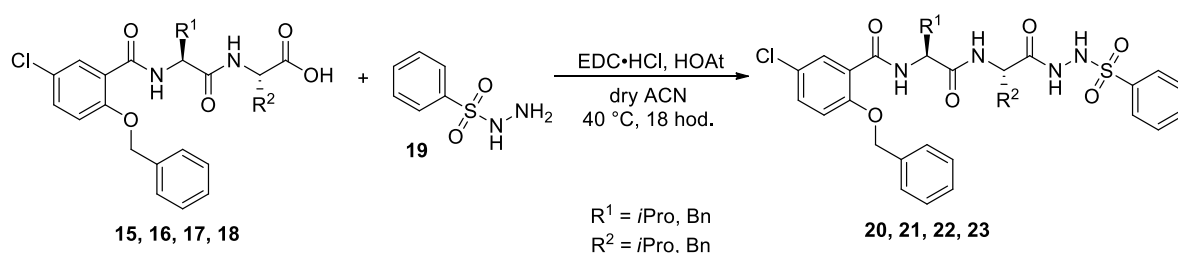


Schéma 23: Příprava O-Bn dipeptidických sulfonyl hydrazidů.

4.5. Příprava finálních dipeptidických sulfonyl hydrazidů s volnou fenolickou hydroxylovou skupinou (**24**, **25**, **26**, **27**)

Výchozí látkou, pro získání finálních molekul s volnou fenolickou hydroxylovou skupinou, byly molekuly chráněné (**20**, **21**, **22**, **23**) (viz. 4.4 Příprava O-Bn di-peptidických sulfonyl

hydrazidů). Posledním reakčním krokem byla hydrogenolýza, tedy uvolnění hydroxylové skupiny, nebo též debenzylace, jak znázorňuje obecné **Schéma 24**.

Nejprve byl jako hydrogenační rozpouštědlo zvolen EtOAc, důvodem byla rozpustnost látek v tomto rozpouštědle. Hydrogenace probíhala 18 hodin. Po provedení reakce v EtOAc a následné charakterizaci látek ^1H NMR spektroskopií a MALDI analýzou, bylo zjištěno, že k odstranění benzylu prakticky nedochází. Proces hydrogenace byl proveden znovu. Reakční doba setrvání RS v autoklávu byla zvýšena na 48 hodin. Následně byla látka znovu analyzována ^1H NMR spektroskopií. Opět bylo zjištěno, že debenzylace neprobíhá uspokojivě. Opět byl celý proces hydrogenace opakován, s tím rozdílem, že RS byla zahřívána na olejové lázni. Teplota ohřevu byla nastavena na $70\text{ }^\circ\text{C}$ a při této teplotě byla RS míchána 18 hodin. Poté byla reakce definitivně ukončena. ^1H NMR spektroskopie ukázala, že k uvolnění hydroxylové skupiny stále prakticky nedochází.

Při prostudování dostupné literatury ⁶⁵ obdobných reakcí bylo nalezeno, že vhodným hydrogenačním rozpouštědlem je THF, pravděpodobně z důvodu dobré rozpustnosti vodíku. Po reprodukování reakce se změnou rozpouštědla na THF bylo zjištěno, že k uvolnění hydroxylové skupiny dochází kvalitativně. Proto byl tento postup aplikován i k následným obdobným reakcím v této diplomové práci.

1 ekvivalent výchozí chráněné látky (**20**, **21**, **22**, **23**) byl rozpuštěn v 50 ml THF. Do vzniklého roztoku bylo přidáno katalytické množství 10% paladia na aktivním uhlí. V atmosféře vodíku byla RS míchána, při pokojové teplotě, 18 hodin. Po uplynutí reakční doby bylo provedeno kontrolní TLC, které ukázalo, že došlo ke zreagování VL a proto byla RS přefiltrována přes čtyři skládané filtry. Skládané filtry byly promyty THF. Získána rozpouštědla byla spojena. Rozpouštědlo bylo odpařeno na RVO.⁶⁵

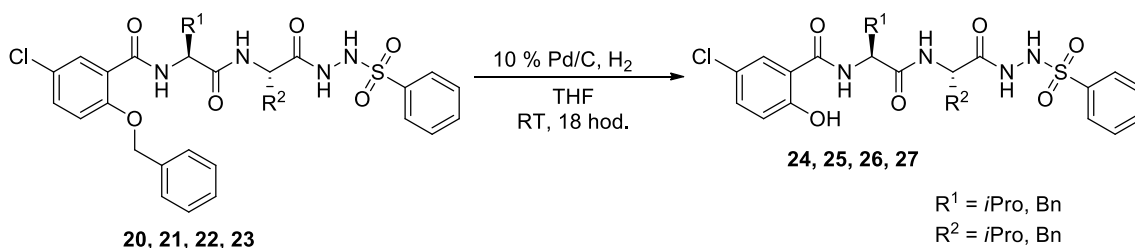


Schéma 24: Příprava finálních molekul s volnou fenolickou hydroxylovou skupinou.

5. Experimentální část

V této části diplomové práce se zaměřím na probrání jednotlivých experimentů, díky kterým mohla tato práce vůbec vzniknout. Podrobně popíšu syntetické cesty, které vedly k získání meziproduktů a finálních molekul.

Nejprve ve stručnosti shrnu materiál, metody a přístroje, které jsem v laboratoři využívala a které byly použity pro purifikaci a charakterizaci mnou připravených látek.

Všechna komerčně dostupná rozpouštědla, činidla a jiné chemikálie, která byla k syntézám použita, byla zakoupena u firmy Sigma-Aldrich, Acros Organics, TCI, Merck nebo Fluorochem a pro provedení reakcí byly použity bez purifikace.

Sloupcová kolonová chromatografie byla prováděna na silikagelu (SiO_2 60 Å, velikost částic 0,060-0,200 mm, Acros Organics). Použitým rozpouštědlem byla fáze EtOAc/hexan, nebo jejich regenerovaná směs, případně jiná komerčně dostupná rozpouštědla.

Flash chromatografie byla prováděna na automatizovaném flash chromatografu Reveleris X2 Flash (Büchi).

Chromatografie na tenké vrstvě byla prováděna na hliníkových destičkách potažených silikagelem (SiO_2 60 F254 (Merck)) s vizualizací pod UV lampou (254 nebo 360 nm). Látky, které nebyly pod UV světlem viditelné byly vizualizovány 5 % roztokem kyseliny fosfomolybdenové v ethanolu.

Body tání byly měřeny na kapilárním bodotávku Büchi B-545.

^1H a ^{13}C spektra nukleární magnetická rezonance (NMR) byla měřena vedoucím práce. Měření probíhalo při laboratorní teplotě a na přístroji Bruker AVANCE III 400 při frekvencích 400,13 resp. 100,62 MHz (^{13}C) nebo na přístroji Bruker Ascend™ 500 při frekvencích 500,13 MHz (^1H) resp. 125,76 MHz (^{13}C). Chemické posuny jsou uváděny v jednotkách ppm vůči zbytkovému signálu rozpouštědla CDCl_3 , $\text{DMSO}-d_6$ nebo D_2O . Interakční konstanty (J) jsou uváděny v Hz. Pozorované signály jsou popsány jako singlet (s), dublet (d), dublet dubletů (dd), triplet (t) a multiplet (m).

Elementární analýza byla prováděna servisním technikem pracujícím na přístroji Thermo Scientific Flash 2000 Organic elemental analyser.

Hmotnostní spektra byla měřena hmotnostním spektrometrem MALDI s vysokým rozlišením LTQ Orbitrap XL (Thermo Fisher Scientific, Bremen, Germany) a s dusíkovým UV laserem (337 nm, 60 Hz). K měření byla využita metoda „dried droplet“. Spektra byla měřena v režimu pozitivních nebo negativních iontů v normálním hmotnostním rozsahu (m/z 50-2000) s rozlišením 100 000 při $m/z = 400$. Pro volbu pozice laseru byla použita předdefinovaná

spirálová schémata pohybu. Jako matrice byl použit 0,2 M roztok 2,5-dihydroxybenzoové kyseliny (DHB) ve směsi MeCN:H₂O (95:5) nebo 2-[(2E)-3-(4-*tert*-butylfenyl)-2-methylprop-2-enyliden]malononitril (DCTB) v MeCN. Molární poměr matrice:vzorek byl vždy přibližně 40:1. Výsledné spektrum je průměrem celého měření.

5.1. Obecný postup syntézy methylesterů (6, 8, 10, 11, 13, 14) a kyselin (9, 12, 15, 16, 17, 18)

Postupem pro přípravu amidů methyl esteru (6, 8, 10, 11, 13 a 14) a amidů kyseliny (9, 12, 15, 16, 17 a 18) se zabývám výše v textu (kapitola 4.2 *Příprava amidů methylesteru AMK a 5-Cl-O-Bn-Sal-OH* a kapitola 4.3 *Příprava amidů kyselin AMK a 5-Cl-O-Bn-Sal-OH*). Na *Schéma 25* uvádím jen obecný postup přípravy. Tyto látky byly připraveny ve shodě s literaturou, též charakterizace byla ve shodě s literaturou.^{62, 63}

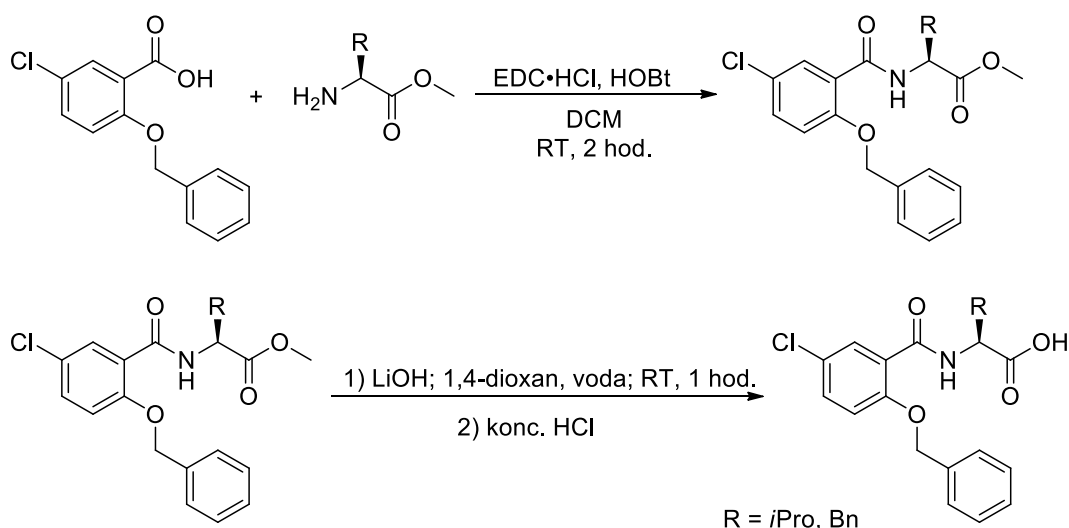


Schéma 25: Obecná příprava methylesterů 6, 8, 10, 11, 13, 14 a kyselin 9, 12, 15, 16, 17, 18.

Pracovní postup: Bylo postupováno dle literatury, pracovní postup byl modifikován.^{62, 63}

Do baňky vhodného objemu byl předložen 1 ekvivalent L-AMK (buď L-fenylalanin nebo L-leucin) methyl esteru hydrochloridu, který byl rozpuštěn v destilované vodě. Poté byl postupně přidán 1 ekvivalent K₂CO₃ a RS byla míchána po dobu 10 minut. Následně byla provedena extrakce DCM (3x), organické vrstvy byly spojeny a promyty vodou (3x). Bylo provedeno vysušení bezvodým Na₂SO₄ a po přefiltrování přes vatičku a oddestilování rozpouštědla, byl získán meziprodukt, se kterým bylo postoupeno do dalšího kroku.⁶²

Do dostatečné velké baňky byl předložen 1 ekvivalent výchozí kyseliny, která byla rozpuštěna v DCM. Následně byl přidán 1,1 ekvivalent HOBt a 1,2 ekvivalenty EDC·HCl. Po cca půl hodině bylo do reakční směsi přidáno 1,2 ekvivalentů meziprodukt rozpuštěného v minimálním možném objemu DCM. RS byla monitorována pomocí TLC, po cca 2 hodinách bylo patrné, že došlo k vymizení výchozí kyseliny, a proto byla reakce ukončena, DCM byl odpařen pomocí RVO a zbylý olej v baňce byl rozpuštěn v EtOAc (30 ml) a ve vodě (30 ml). Byla provedena extrakce, organická vrstva byla oddělena a vodná vrstva byla extrahována EtOAc (3x). Získané organické vrstvy byly spojeny a extrahovány nasyceným roztokem NaHCO₃ (3x), 5 % roztokem kyseliny citronové (3x) a vodou (3x). Organická vrstva byla vysušena bezvodým Na₂SO₄, roztok byl přefiltrován přes vatičku, rozpouštědlo bylo odpařeno na RVO, se získaným methyl esterem (**6**, **8**, **10**, **11**, **13** a **14**) bylo přestoupeno do dalšího kroku reakce.⁶²

Do baňky vhodného objemu byl předložen 1 ekvivalent výchozího methyl esteru (**6**, **8**, **10**, **11**, **13** a **14**) a k němu byla přilita voda a dvojnásobný objem 1,4-dioxanu. Poté byly do směsi přidány 3 ekvivalenty LiOH. RS byla monitorována pomocí TLC na výskyt výchozího methyl esteru (**6**, **8**, **10**, **11**, **13** a **14**), po cca hodině, kdy se podle TLC již výchozí methyl ester v RS nevyskytoval, byla směs vykyselena koncentrovanou HCl až na pH = 1. RS byla extrahována EtOAc (1x). Vodná vrstva byla oddělena a znovu extrahována EtOAc (2x). Organické fáze byly spojeny a extrahovány vodou (2x). Následně byla organická fáze vysušena bezvodým Na₂SO₄, přefiltrována přes vatičku a rozpouštědlo bylo vakuově odpařeno. Byl získán produkt v podobě karboxylové kyseliny (**9**, **12**, **15**, **16**, **17** a **18**).⁶³

5.2. Příprava 2-(benzyloxy)-5-chlor-N-((S)-1-(((S)-4-methyl-1-oxo-1-(2-(fenylsulfonyl)hydrazinyl)pentan-2-yl)amino)-1-oxo-3-fenylpropan-2-yl)benzamidu (**20**)

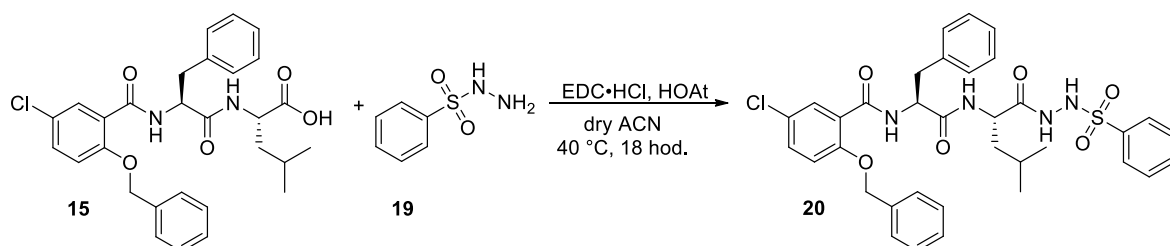


Schéma 26: Příprava

2-(benzyloxy)-5-chlor-N-((S)-1-(((S)-4-methyl-1-oxo-1-(2-(fenylsulfonyl)hydrazinyl)pentan-2-yl)amino)-1-oxo-3-fenylpropan-2-yl)benzamidu.

Tabulka použitých chemikálií:

látka	15	19	HOAt	EDC·HCl	ACN	20
M [g/ mol]	523,02	172,21	136,11	191,7	41,05	677,21
ekvivalent	1	1,25	1,15	1,25	-	1
n [mmol]	1,67	2,09	1,93	2,09	-	1,67
m [g]	0,88	0,36	0,26	0,40	-	1,13
V [ml]	-	-	-	-	55	-
ρ [g/ cm ³]	-	-	-	-	0,786	-

Pracovní postup: Bylo postupováno dle literatury, pracovní postup byl upraven.⁶⁴

Do 100 ml trojhrdlé baňky byla předložena výchozí látka (**15**; 0,88 g; 1,67 mmol). Baňka byla vložena do DrySinu, byl na ni nasazen zpětný chladič a byla připojena k inertní atmosféře dusíku. Výchozí látka (**15**) byla rozpuštěna ve 30 ml bezvodého ACN. Následně byl do baňky přidán roztok HOAt (0,26 g; 1,93 mmol) a EDC·HCl (0,40 g; 2,09 mmol) v 15 ml bezvodého ACN a pod nátokem dusíku. RS byla míchána 30. minut při teplotě místnosti, během této doby došlo k aktivaci výchozí kyseliny (**15**). Aktivace výchozí kyseliny byla ověřena pomocí TLC. Poté byl do RS přidán roztok látky (**19**; 0,36 g; 2,09 mmol) v 10 ml bezvodého ACN a pod nátokem inertního plynu. RS byla zahřáta na 40 °C. Při této teplotě byla RS míchána 18 hodin.

Po uplynutí 18ti hodin byla RS ochlazena na teplotu místnosti, rozpouštědlo bylo odpařeno na RVO. Zbytek v baňce byl rozpuštěn ve 30 ml EtOAc a 15 ml destilované vody. Byla provedena extrakce. Organická vrstva byla oddělena a vodná vrstva byla ještě 2x (10 ml) extrahována EtOAc. Získané organické vrstvy byly spojeny a 3x (25 ml) extrahovány 1% roztokem NaHCO₃ a znovu 3x (25 ml) destilovanou vodou. Organická fáze byla vysušena bezvodým Na₂SO₄, sušidlo bylo odfiltrováno přes vatičku a rozpouštědlo bylo odpařeno na RVO. RS byla přečištěna sloupcovou chromatografií s použitím regenerované fáze EtOAc/hexan. Byl získán produkt (**20**) ve formě bílé krystalické látky.

Charakterizace izolovaného produktu (**20**):

Výtěžek: 0,45 g (48 %); bílá krystalická látka.

Teplota tání: 165,0 - 170,6 °C.

¹H NMR: (400 MHz, CDCl₃) δ 0,78 (6H, dd, ⁴J_{H,H} = 6,3 Hz, ³J_{H,H} = 17,0 Hz, 2×(CH₃)₂); 1,16-1,25 (2H, m, CH₂-CH-(CH₃)₂); 1,31-1,35 (1H, m, CH-(CH₃)₂); 2,89-3,08 (2H, m, CH₂-Ar); 4,32 (1H, q, ³J_{H,H} = 7,7 Hz, NH-CH); 4,82 (1H, q, ³J_{H,H} = 7,7 Hz, NH-CH); 5,20 (2H, dd, ³J_{H,H} = 11,9 Hz, CH₂); 6,69 (1H, d, ³J_{H,H} = 7,6 Hz, NH); 6,99 (1H, d, ³J_{H,H} = 8,9 Hz, CH(Ar)); 7,04 (2H, dd, ⁴J_{H,H} = 2,4 Hz, ³J_{H,H} = 7,5 Hz, 2×CH(Ar)); 7,25 (3H, s, 3×CH(Ar)); 7,42 (3H, m, 3×CH(Ar)); 7,47 (3H, m, 3×CH(Ar)); 7,52 (3H, m, 3×CH(Ar)); 7,62 (1H, t, ³J_{H,H}

= 7,9 Hz, $\underline{CH}(\text{Ar})$); 7,91 (2H, d, ${}^3J_{\text{H,H}} = 7,9$ Hz, $2x\underline{CH}(\text{Ar})$); 8,17 (1H, d, ${}^3J_{\text{H,H}} = 4,4$ Hz, \underline{NH}); 8,45 (1H, d, ${}^3J_{\text{H,H}} = 4,9$ Hz, \underline{NH}); 9,12 (1H, d, ${}^3J_{\text{H,H}} = 4,8$ Hz, \underline{NH}).

${}^{13}\text{C}$ NMR: (100,62 MHz, CDCl_3) δ 21,95; 22,71; 24,48; 37,18; 39,88; 50,61; 55,73; 71,86; 114,54; 122,14; 127,16; 127,33; 128,02; 128,91; 128,94; 128,98; 129,19; 129,23; 129,26; 132,25; 133,23; 133,80; 135,13; 136,31; 136,58; 155,63; 165,08; 170,65; 171,75.

HRMS m/z: pro $\text{C}_{35}\text{H}_{37}\text{ClN}_4\text{O}_6\text{S}$ vypočteno: 677,22006 $[\text{M} + \text{H}]^+$; 699,20200 $[\text{M} + \text{Na}]^+$; 715,17594 $[\text{M} + \text{K}]^+$; nalezeno: 677,21951 $[\text{M} + \text{H}]^+$; 699,20145 $[\text{M} + \text{Na}]^+$; 715,17539 $[\text{M} + \text{K}]^+$.

Elementární analýza: pro $\text{C}_{35}\text{H}_{37}\text{ClN}_4\text{O}_6\text{S}$ vypočteno: C 62,07; H 5,51; N 8,27; S 4,73; nalezeno: C $61,94 \pm 0,26$; H $5,48 \pm 0,03$; N $8,22 \pm 0,03$; S $4,51 \pm 0,18$.

5.3. Příprava 2-(benzyloxy)-6-chlor-N-((S)-1-oxo-1-(((S)-1-oxo-3-fenyl-1-(2-(fenylsulfonyl)hydrazinyl)propan-2-yl)amino)-3-fenylpropan-2-yl)-benzamidu

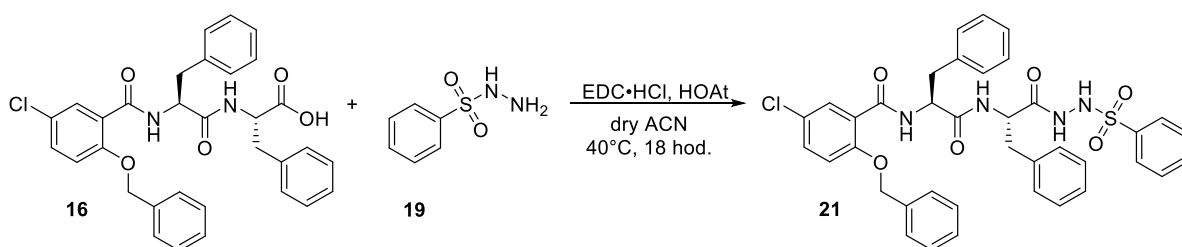


Schéma 27: Příprava

2-(benzyloxy)-6-chlor-N-((S)-1-oxo-1-(((S)-1-oxo-3-fenyl-1-(2-(fenylsulfonyl)hydrazinyl)propan-2-yl)amino)-3-fenylpropan-2-yl)-benzamidu.

Tabulka použitých chemikálií:

látka	16	19	HOAt	EDC·HCl	ACN	21
M [g/ mol]	557,04	172,21	136,11	191,7	41,05	711,23
ekvivalent	1	1,25	1,15	1,25	-	1
n [mmol]	1,80	2,24	2,06	2,24	-	1,80
m [g]	1	0,39	0,28	0,43	-	1,28
V [ml]	-	-	-	-	60	-
ρ [g/ cm^3]	-	-	-	-	0,786	-

Pracovní postup: Bylo postupováno dle literatury, pracovní postup byl modifikován.⁶⁴

Do 100 ml trojhrdlé baňky, opatřené magnetickým míchadlem, byla předložena výchozí kyselina (**16**; 1 g; 1,80 mmol). Baňka byla vložena do DrySinu, byl na ni nasazen zpětný chladič a byla připojena k inertní atmosféře dusíku. Výchozí látka (**16**) byla rozpuštěna v 35 ml bezvodého ACN. Následně byl do baňky přidán roztok HOAt (0,28 g; 2,06 mmol) a EDC·HCl

(0,43 g; 2,24 mmol) v 15 ml bezvodého ACN a pod nátokem inertního plynu. RS byla míchána 30. minut, během této doby došlo k aktivaci výchozí kyseliny (**16**). Aktivace výchozí kyseliny (**16**) byla ověřena TLC. Poté byl do RS přidán roztok hydrazidu (**19**; 0,39 g; 2,24 mmol) v 10 ml bezvodého ACN a pod nátokem dusíku. RS byla zahřáta na 40 °C. Při této teplotě byla RS míchána 18 hodin.

Po uplynutí 18ti hodin byla RS ochlazena na laboratorní teplotu, rozpouštědlo bylo odpařeno na RVO. Zbytek v baňce byl rozpuštěn ve 30 ml EtOAc a 15 ml destilované vody. Byla provedena extrakce. Organická vrstva byla oddělena a vodná vrstva byla ještě 2x (10ml) extrahována EtOAc. Získané organické vrstvy byly spojeny a extrahovány nasyceným roztokem NaHCO₃ (3x 30 ml), 5% roztokem kyseliny citronové (3x 30 ml) a destilovanou vodou (3x 30 ml). Organická fáze byla vysušena bezvodým Na₂SO₄, sušidlo bylo odfiltrováno přes vatičku a rozpouštědlo bylo odpařeno na RVO. Byl získán produkt (**21**), který byl přečištěn krystalizací z DCM. Krystalizace z EtOAc, hexanu a MeOH nebyla možná, protože v těch rozpouštědlech není produkt (**21**) rozpustný.

Charakterizace izolovaného produktu (**21**):

Výtěžek: 1,22 g (95 %); bílá krystalická látka.

Teplota tání: 141,4 - 144,0 °C.

¹H NMR: (500 MHz, DMSO) δ 2,48-2,62 (2H, m, CH₂-Ph); 2,80-2,91 (2H, m, CH₂-Ph); 4,51-4,56 (1H, dt, ³J_{H,H} = 4,8 Hz, ³J_{H,H} = 10,1 Hz, NH-CH-C=O); 4,63-4,67 (1H, dt, ³J_{H,H} = 4,8 Hz, ³J_{H,H} = 10,1 Hz, NH-CH-C=O); 5,19 (2H, s, CH₂-O-Ph); 6,92 (2H, dd, ³J_{H,H} = 2,3 Hz, ³J_{H,H} = 5,3 Hz, 2×CH(Ar)); 7,12-7,14 (4H, m, 4×CH(Ar)); 7,19-7,21 (4H, m, 4×CH(Ar)); 7,34 (2H, dd, ³J_{H,H} = 4,8 Hz, ³J_{H,H} = 10,1 Hz, 2×CH(Ar)); 7,36 (2H, t, ³J_{H,H} = 5,0 Hz, 2×CH(Ar)); 7,47 (2H, dd, ³J_{H,H} = 4,9 Hz, ³J_{H,H} = 9,8 Hz, 2×CH(Ar)); 7,51 (3H, t, ³J_{H,H} = 6,7 Hz, 3×CH(Ar)); 7,60 (2H, d, ³J_{H,H} = 6,2 Hz, 2×CH(Ar)); 7,80 (2H, d, ³J_{H,H} = 7,9 Hz, 2×CH(Ar)); 8,26 (1H, d, ³J_{H,H} = 4,7 Hz, NH); 8,35 (1H, d, ³J_{H,H} = 8,1 Hz, NH); 10,03 (1H, d, ³J_{H,H} = 6,1 Hz, NH); 10,40 (1H, d, ³J_{H,H} = 3,2 Hz, NH).

¹³C NMR: (125,79 MHz, DMSO) δ 38,18; 38,22; 52,58; 54,39; 70,83; 116,17; 124,19; 125,12; 126,74; 125,84; 128,16; 128,29; 128,50; 128,53; 128,70; 129,01; 129,26; 129,41; 129,61; 130,47; 132,40; 133,42; 136,28; 137,63; 137,65; 139,29; 139,38; 155,21; 163,17; 170,53; 170,99.

HRMS m/z: pro C₃₈H₃₅ClN₄O₆S vypočteno: 711,20441 [M + H]⁺; 733,18635 [M + Na]⁺; 749,16029 [M + K]⁺; nalezeno: 711,20386 [M + H]⁺; 733,18580 [M + Na]⁺; 749,15974 [M + K]⁺.

Elementární analýza: pro $C_{38}H_{35}ClN_4O_6S$ vypočteno: C 64,17; H 4,96; N 7,88; S 4,51; nalezeno: C 64,76 \pm 0,12; H 4,95 \pm 0,03; N 7,94 \pm 0,12; S 4,17 \pm 0,09.

5.4. Příprava 2-(benzyloxy)-5-chlor-N-((S)-4-methyl-1-oxo-1-(((S)-1-oxo-3-fenyl-1-(2-(fenylsulfonyl)hydrazinyl)propan-2-yl)amino)pentan-2-yl)benzamidů

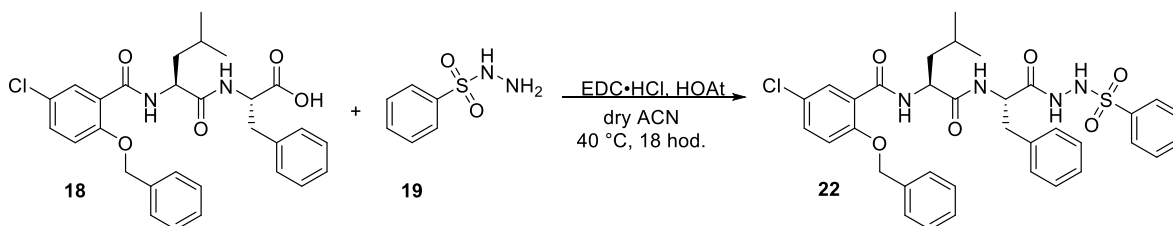


Schéma 28: Příprava

2-(benzyloxy)-5-chlor-N-((S)-4-methyl-1-oxo-1-(((S)-1-oxo-3-fenyl-1-(2-(fenylsulfonyl)hydrazinyl)propan-2-yl)amino)pentan-2-yl)benzamidů.

Tabulka použitých chemikálií:

látko	18	19	HOAt	EDC·HCl	ACN	22
M [g/ mol]	523,02	172,21	136,11	191,7	41,05	677,21
ekvivalent	1	1	1,15	1,25	-	1
n [mmol]	9,56	9,56	10,99	11,95	-	9,56
m [g]	5	1,65	1,50	2,29	-	6,5
V [ml]	-	-	-	-	220	-
ρ [g/ cm ³]	-	-	-	-	0,786	-

Pracovní postup: Bylo postupováno dle literatury, pracovní postup byl modifikován.⁶⁴

Do 500 ml trojhrdlé baňky, opatřené magnetickým míchadlem, byla předložena výchozí kyselina (**18**; 5 g; 9,56 mmol). Baňka byla vložena do DrySinu, byl na ni nasazen zpětný chladič a byla připojena k inertní atmosféře dusíku. Výchozí látka (**18**) byla rozpuštěna ve 150 ml bezvodého ACN. Následně byl do baňky přidán roztok HOAt (1,50 g; 10,99 mmol) a EDC·HCl (2,29 g; 11,95 mmol) v 50 ml bezvodého ACN a pod nátokem dusíku. RS byla míchána 30. minut při teplotě místnosti, během této doby došlo k aktivaci výchozí kyseliny (**18**). Poté byl do RS přidán roztok hydrazidu (**19**; 1,65 g; 9,56 mmol) ve 20 ml bezvodého ACN a pod nátokem inertní atmosféry. RS byla zahřáta na 40 °C. Při této teplotě byla RS míchána 18 hodin.

Po uplynutí 18ti hodin byla RS ochlazena na laboratorní teplotu. Rozpuštědlo bylo odpařeno na RVO. Zbytek v baňce byl rozpuštěn v 80 ml EtOAc a 50 ml destilované vody. Byla provedena extrakce. Organická vrstva byla oddělena a vodná vrstva byla ještě 2x (25 ml)

extrahována EtOAc. Získané organické vrstvy byly spojeny a extrahovány nasyceným roztokem NaHCO₃ (3x 50 ml), 5% roztokem kyseliny citrónové (3x 50 ml) a destilovanou vodou (3x 50 ml). Organická fáze byla vysušena bezvodým Na₂SO₄, sušidlo bylo odfiltrováno přes vatičku a rozpouštědlo bylo odpařeno na RVO. Byl získán produkt (**22**), který byl čištěn krystalizací ze směsi EtOAc/hexan (1:3).

Charakterizace izolovaného produktu (**22**):

Výtěžek: 6,13 g (94 %); bílá krystalická látka.

Teplota tání: 169,9 - 174,6 °C.

¹H NMR: (400 MHz, DMSO) δ 0,68 (3H, d, ³J_{H,H} = 4,2 Hz, CH₃); 0,75 (3H, d, ³J_{H,H} = 8,1 Hz, CH₃); 0,95-1,07 (2H, m, CH₂); 1,17-1,32 (2H, m, CH₂); 2,61-2,67 (1H, m, CH-(CH₃)₂); 2,82-2,88 (1H, m, NH-CH); 4,40-4,56 (2H, m, CH₂-O-Ph); 5,27 (1H, s, NH); 5,30 (1H, d, ³J_{H,H} = 4,1 Hz, NH-CH); 7,22-7,28 (5H, m, 5×CH(Ar)); 7,35-7,43 (5H, m, 5×CH(Ar)); 7,52-7,62 (5H, m, 5×CH(Ar)); 7,67 (1H, dt, ³J_{H,H} = 2,4 Hz, ³J_{H,H} = 4,6 Hz, CH(Ar)); 7,83 (1H, s, NH); 7,84-7,87 (1H, m, CH(Ar)); 8,15 (1H, t, ³J_{H,H} = 8,6 Hz, CH(Ar)); 10,03 (1H, d, ³J_{H,H} = 3,8 Hz, NH); 10,42 (1H, d, ³J_{H,H} = 7,9 Hz, NH).

¹³C NMR: (100,62 MHz, DMSO) δ 21,99; 23,57; 24,70; 38,26; 41,62; 52,00; 52,58; 71,45; 116,15; 124,99; 125,37; 126,93; 128,32; 128,63; 128,77; 128,77; 128,88; 128,98; 129,41; 129,77; 129,85; 130,59; 132,50; 133,56; 136,36; 137,88; 139,57; 155,56; 163,63; 170,69; 172,04.

HRMS m/z: pro C₃₅H₃₇ClN₄O₆S vypočteno: 677,22006 [M + H]⁺; 699,20200 [M + Na]⁺; 715,17594 [M + K]⁺; nalezeno: 677,21951 [M + H]⁺; 699,20145 [M + Na]⁺; 715,17539 [M + K]⁺.

Elementární analýza: pro C₃₅H₃₇ClN₄O₆S vypočteno: C 62,07; H 5,51; N 8,27; S 4,73; nalezeno: C 61,47 ± 0,02; H 5,47 ± 0,04; N 8,79 ± 0,13; S 5,33 ± 0,05.

5.5. Příprava 2-(benzyloxy)-5-chlor-N-((S)-4-methyl-1-(((S)-4-methyl-1-oxo-1-(2-(fenylsulfonyl)hydrazinyl)pentan-2-yl)amino)-1-oxopentan-2-yl)benzamidů

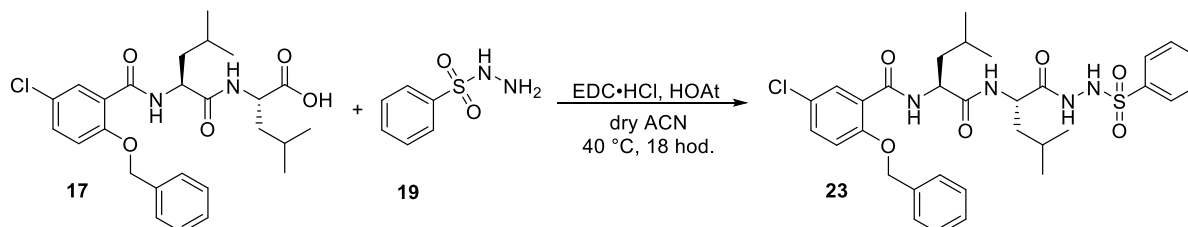


Schéma 29: Příprava

2-(benzyloxy)-5-chlor-N-((S)-4-methyl-1-(((S)-4-methyl-1-oxo-1-(2-(fenylsulfonyl)hydrazinyl)pentan-2-yl)amino)-1-oxopentan-2-yl)benzamidů.

Tabulka použitých chemikálií:

látko	17	19	HOAt	EDC·HCl	ACN	23
M [g/ mol]	489,00	172,21	136,11	191,7	41,05	643,19
ekvivalent	1	1,25	1,15	1,25	-	1
n [mmol]	2,05	2,56	2,35	2,56	-	2,05
m [g]	1	0,44	0,32	0,49	-	1,32
V [ml]	-	-	-	-	55	-
ρ [g/ cm ³]	-	-	-	-	0,786	-

Pracovní postup: Bylo postupováno dle literatury, pracovní postup byl modifikován.⁶⁴

Do 100 ml trojhrdlé baňky, opatřené magnetickým míchadlem, byla předložena výchozí kyselina (**17**; 1 g; 2,05 mmol). Baňka byla vložena do DrySinu, byl na ni nasazen zpětný chladič a byla připojena k inertní atmosféře dusíku. Výchozí látka (**17**) byla rozpuštěna ve 35 ml bezvodého ACN. Následně byl do baňky přidán roztok HOAt (0,32 g; 2,35 mmol) a EDC·HCl (0,49 g; 2,56 mmol) rozpuštěných v 10 ml bezvodého ACN (pod inertní atmosférou). RS byla míchána 30. minut při teplotě místnosti, během této doby došlo k aktivaci výchozí kyseliny (**17**). Poté byl do RS přidán roztok hydrazidu (**19**; 0,44 g; 2,56 mmol) rozpuštěného v 10 ml bezvodého ACN a pod nátokem inertní atmosféry. RS byla zahřáta na 40 °C. Při této teplotě byla RS míchána 18 hodin.

Po uplynutí 18ti hodin byla RS ochlazena na teplotu místnosti. Rozpouštědlo bylo odpařeno na RVO. Zbytek v baňce byl rozpuštěn ve 30 ml EtOAc a 20 ml destilované vody. Byla provedena extrakce. Organická vrstva byla oddělena a vodná vrstva byla ještě 2x (10 ml) extrahována EtOAc. Získané organické vrstvy byly spojeny a extrahovány nasyceným roztokem NaHCO₃ (3x 25 ml), 5% roztokem kyseliny citronové (3x 25 ml) a destilovanou

vodou (3x 25 ml). Na závěr byla organická fáze vysušena bezvodým Na₂SO₄, sušidlo bylo odfiltrováno přes vatičku. Rozpouštědlo bylo odpařeno na RVO. Získaný produkt (**23**) byl purifikován sloupcovou chromatografií za použití regenerovaných rozpouštědel EtOAc/hexan.

Charakterizace izolovaného produktu (**23**):

Výtěžek: 1,08 g (82 %); bílá krystalická látka.

Teplota tání: 183,2 - 186,5 °C.

¹H NMR: ¹H NMR (500 MHz, DMSO) δ 0,70 (6H, dd, ⁴J_{H,H} = 4,9 Hz, ³J_{H,H} = 39,8 Hz, 2×CH₃); 0,80 (6H, dd, ⁴J_{H,H} = 4,9 Hz, ³J_{H,H} = 39,8 Hz, 2×CH₃); 1,15-1,19 (2H, m, 2×CH); 1,22-1,27 (2H, m, diastereotopický CH₂-CH-(CH₃)₂); 1,33-1,51 (2H, m, diastereotopický CH₂-CH-(CH₃)₂); 4,23-4,27 (1H, m, NH-CH); 4,41-4,45 (1H, m, NH-CH); 5,24 (2H, s, CH₂-O-Ph); 7,33 (1H, d, ³J_{H,H} = 4,8 Hz, CH(Ar)); 7,36-7,40 (3H, m, 3×CH(Ar)); 7,48-7,53 (4H, m, 4×CH(Ar)); 7,56 (1H, dd, ⁴J_{H,H} = 4,9 Hz, ³J_{H,H} = 10,0 Hz, CH(Ar)); 7,60 (1H, t, ³J_{H,H} = 9,8 Hz, CH(Ar)); 7,71 (1H, d, ³J_{H,H} = 2,7 Hz, CH(Ar)); 7,77 (2H, d, ³J_{H,H} = 7,8 Hz, 2×CH(Ar)); 8,02 (1H, d, ³J_{H,H} = 8,1 Hz, NH); 8,22 (1H, d, ³J_{H,H} = 8,2 Hz, NH); 9,96 (1H, d, ³J_{H,H} = 4,8 Hz, NH); 10,29 (1H, d, ³J_{H,H} = 4,8 Hz, NH).

¹³C NMR: (100,62 MHz, DMSO) δ 21,82; 21,95; 22,18; 22,31; 23,48; 23,70; 41,26; 41,93; 49,69; 51,93; 71,44; 116,23; 125,00; 125,39; 128,38; 128,80; 128,89; 129,16; 129,30; 130,54; 130,61; 132,50; 132,59; 133,46; 133,51; 139,43; 139,58; 155,58; 163,69; 171,49; 172,01.

HRMS m/z: pro C₃₂H₃₉ClN₄O₆S vypočteno: 643,23571 [M + H]⁺; 665,21765 [M + Na]⁺; 681,19159 [M + K]⁺; nalezeno: 643,23516 [M + H]⁺; 665,21710 [M + Na]⁺; 681,19104 [M + K]⁺.

Elementární analýza: pro C₃₂H₃₉ClN₄O₆S vypočteno: C 59,76; H 6,11; N 8,71; S 4,99; nalezeno: C 59,88 ± 0,18; H 6,15 ± 0,01; N 8,33 ± 0,22; S 4,48 ± 0,05.

5.6. Příprava **5-chlor-2-hydroxy-N-((S)-1-(((S)-4-methyl-1-oxo-1-(2-(fenylsulfonyl)hydrazinyl)pentan-2-yl)amino)-1-oxo-3-fenylpropan-2-yl)benzamidu**

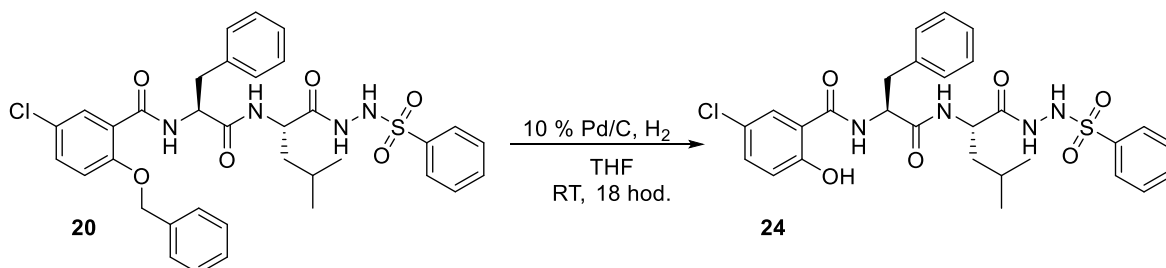


Schéma 30: Příprava

5-chlor-2-hydroxy-N-((S)-1-(((S)-4-methyl-1-oxo-1-(2-(fenylsulfonyl)hydrazinyl)pentan-2-yl)aminp)-1-oxo-3-fenylpropan-2-yl)benzamidu.

Tabulka použitých chemikálií:

látka	20	THF	24
M [g/ mol]	677,21	72,11	587,09
ekvivalent	1	-	1
n [mmol]	6,45	-	6,45
m [g]	0,44	-	0,38
V [ml]	-	50	-
ρ [g/ cm ³]	-	0,889	-

Pracovní postup: Bylo postupováno dle literatury, pracovní postup byl modifikován.⁶⁵

Výchozí látka (**20**; 0,44 g; 6,45 mmol) byla rozpuštěna v 50 ml THF a bylo k ní přidáno katalytické množství 10% paladia na aktivním uhlí. V atmosféře vodíku a při pokojové teplotě byla RS míchána 18 hodin. Po uplynutí 18ti hodin bylo provedeno kontrolní TLC, které prokázalo, že došlo k zreagování VL a proto byla RS přefiltrována přes čtyři skládané filtry. Skládané filtry byly promyty THF. Získána spojena rozpouštědla byla odpařena na RVO. Byl získán produkt (**24**) ve formě bílých krystalů, které byly čištěny krystalizací ze směsi EtOAc/hexan (1:3).

Charakterizace izolovaného produktu (**24**):

Výtěžek: 0,35 g (93 %); bílá krystalická látka.

Teplota tání: 154,5 - 161,0 °C.

¹H NMR: (400 MHz, DMSO) δ 0,85 (3H, d, $^3J_{H,H} = 4,4$ Hz, CH₃); 0,91 (3H, d, $^3J_{H,H} = 4,6$ Hz, CH₃); 1,28-1,31 (2H, m, CH₂); 1,32-1,33 (1H, m, CH); 2,93-3,06 (2H, m, CH₂); 4,35 (1H, t, $^3J_{H,H} = 7,7$ Hz, NH-CH); 4,79 (1H, t, $^3J_{H,H} = 7,4$ Hz, NH-CH); 5,05 (1H, s, OH); 6,96 (1H, d, $^3J_{H,H} = 11,9$ Hz, NH); 7,22 (1H, d, $^3J_{H,H} = 4,1$ Hz, CH(Ar)); 7,21-7,36 (5H, m,

$5 \times \underline{\text{CH}}(\text{Ar})$); 7,40 (1H, d, $^3J_{\text{H,H}} = 8,1$ Hz, $\underline{\text{NH}}$); 7,57 (2H, t, $^3J_{\text{H,H}} = 7,9$ Hz, $2 \times \underline{\text{CH}}(\text{Ar})$); 7,64-7,68 (2H, m, $2 \times \underline{\text{CH}}(\text{Ar})$); 7,86 (2H, dd, $^3J_{\text{H,H}} = 2,8$ Hz, $^3J_{\text{H,H}} = 12,1$ Hz, $2 \times \underline{\text{CH}}(\text{Ar})$); 7,91 (2H, dd, $^3J_{\text{H,H}} = 7,4$ Hz, $^3J_{\text{H,H}} = 8,1$ Hz, $2 \times \underline{\text{CH}}(\text{Ar})$); 10,02 (1H, d, $^3J_{\text{H,H}} = 2,7$ Hz, $\underline{\text{NH}}$); 10,37 (1H, d, $^3J_{\text{H,H}} = 3,2$ Hz, $\underline{\text{NH}}$).

^{13}C NMR: (100,62 MHz, DMSO) δ 21,96; 23,46; 24,65; 38,37; 41,79; 49,86; 54,76; 119,75; 124,39; 125,36; 127,00; 128,41; 128,50; 128,71; 129,22; 129,33; 129,76; 130,70; 132,56; 133,55; 137,94; 139,60; 155,43; 163,54; 166,76; 171,52.

HRMS m/z: pro $\text{C}_{28}\text{H}_{31}\text{ClN}_4\text{O}_6\text{S}$ vypočteno: 587,17311 $[\text{M} + \text{H}]^+$; 609,15505 $[\text{M} + \text{Na}]^+$; 625,12899 $[\text{M} + \text{K}]^+$; nalezeno: 587,17256 $[\text{M} + \text{H}]^+$; 609,15450 $[\text{M} + \text{Na}]^+$; 625,12844 $[\text{M} + \text{K}]^+$.

Elementární analýza: pro $\text{C}_{28}\text{H}_{31}\text{ClN}_4\text{O}_6\text{S}$ vypočteno: C 57,28; H 5,32; N 9,54; S 5,46; nalezeno: C $55,46 \pm 0,24$; H $5,92 \pm 0,0$; N $8,13 \pm 0,04$; S $4,79 \pm 0,04$.

5.7. Příprava 2-(benzyloxy)-5-chlor-N-((S)-1-oxo-1-(((S)-1-oxo-3-fenyl-1-(2-(fenylsulfonyl)hydrazinyl)propan-2-yl)amino)-3-fenylpropan-2-yl)benzenamidu

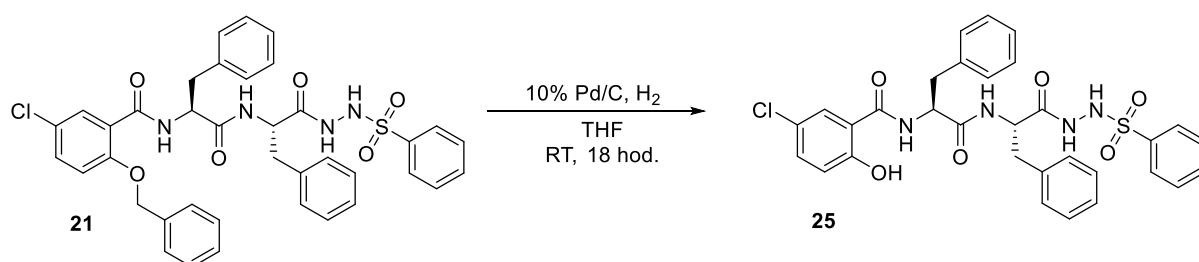


Schéma 31: Příprava

2-(benzyloxy)-5-chlor-N-((S)-1-oxo-1-(((S)-1-oxo-3-fenyl-1-(2-(fenylsulfonyl)hydrazinyl)propan-2-yl)amino)-3-fenylpropan-2-yl)benzenamidu.

Tabulka použitých chemikálií:

látka	21	THF	MeOH	25
M [g/ mol]	711,23	72,11	32,04	621,10
ekvivalent	1	-	-	1
n [mmol]	0,58	-	-	0,58
m [g]	0,41	-	-	0,36
V [ml]	-	50	10	-
ρ [g/ cm ³]	-	0,889	0,791	-

Pracovní postup: Bylo postupováno dle literatury, pracovní postup byl modifikován. ⁶⁵

Výchozí látka (**21**; 0,41 g; 0,58 mmol) byla rozpuštěna v 50 ml THF a 10 ml MeOH a bylo k ní přidáno katalytické množství 10% paladia na aktivním uhlí. V atmosféře vodíku byla RS míchána 18 hodin, při pokojové teplotě. Po uplynutí 18ti hodin byla RS přefiltrována přes čtyři skládané filtry, skládané filtry byly promyty THF. Získána spojená rozpouštědla byla odpařena na RVO. Byl získán produkt (**25**) ve formě bílých krystalů.

Charakterizace izolovaného produktu (**25**):

Výtěžek: 0,34 g (94 %); bílá krystalická látka.

Teplota tání: 220,5 - 223,4 °C.

¹H NMR: (400 MHz, DMSO) δ 2,23 (1H, s, OH); 2,65-2,91 (2H, m, diastereotopický CH-CH₂); 2,86-3,04 (2H, m, diastereotopický CH-CH₂); 4,55-4,61 (1H, m, NH-CH); 4,73-4,77 (1H, m, NH-CH); 6,91 (1H, d, $^3J_{H,H} = 8,1$ Hz, NH); 6,95 (1H, dd, $^3J_{H,H} = 4,0$ Hz, $^3J_{H,H} = 11,9$ Hz, CH(Ar)); 7,17-7,29 (10H, m, 10×CH(Ar)); 7,41-7,47 (1H, m, CH(Ar)); 7,59 (2H, t, $^3J_{H,H} = 8,2$ Hz, 2×CH(Ar)); 7,65-7,70 (2H, m, 2×CH(Ar)); 7,87 (1H, d, $^3J_{H,H} = 8,2$ Hz, NH); 8,43 (1H, dd, $^3J_{H,H} = 7,8$ Hz, $^3J_{H,H} = 19,7$ Hz, CH(Ar)); 8,83 (1H, dd, $^3J_{H,H} = 7,9$ Hz, $^3J_{H,H} = 27,6$ Hz, CH(Ar)); 10,07 (1H, d, $^3J_{H,H} = 3,8$ Hz, NH); 10,46 (1H, d, $^3J_{H,H} = 3,7$ Hz, NH).

¹³C NMR: (100,62 MHz, DMSO) δ 37,81; 38,38; 52,85; 54,59; 117,93; 119,72; 123,07; 125,56; 126,94; 126,98; 127,00; 128,36; 128,67; 128,74; 129,27; 129,45; 129,74; 129,80; 133,61; 133,81; 137,84; 138,21; 139,59; 158,22; 166,66; 170,71; 171,09.

HRMS m/z: pro C₃₁H₂₉ClN₄O₆S vypočteno: 621,15746 [M + H]⁺; 643,13940 [M + Na]⁺; 659,11334 [M + K]⁺; nalezeno: 621,15691 [M + H]⁺; 643,13885 [M + Na]⁺; 659,11279 [M + K]⁺.

Elementární analýza: pro C₃₁H₂₉ClN₄O₆S vypočteno: C 59,95; H 4,71; N 9,02; S 5,16; nalezeno: C 61,32 ± 0,42; H 5,35 ± 0,13; N 8,02 ± 0,04; S 4,12 ± 0,13.

5.8. Příprava 5-chlor-2-hydroxy-N-((S)-4-methyl-1-oxo-1-(((S)-1-oxo-3-fenyl-1-(2-(fenylsulfonyl)hydrazinyl)propan-2-yl)amino)pentan-2-yl)benzamidu

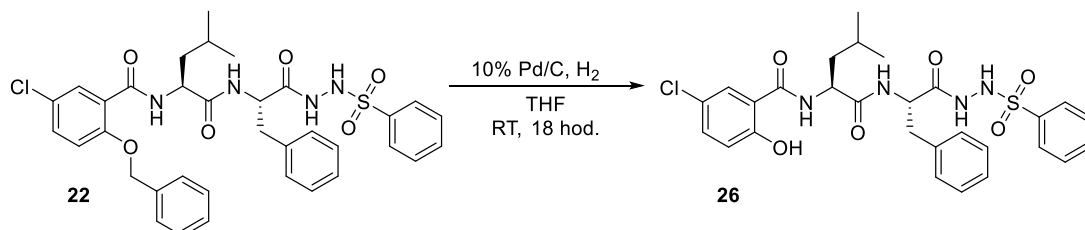


Schéma 32: Příprava

5-chlor-2-hydroxy-N-((S)-4-methyl-1-oxo-1-(((S)-1-oxo-3-fenyl-1-(2-(fenylsulfonyl)hydrazinyl)propan-2-yl)amino)pentan-2-yl)benzamidu.

Tabulka použitých chemikálií:

látka	22	THF	26
M [g/ mol]	677,21	72,11	587,09
ekvivalent	1	-	1
n [mmol]	0,74	-	0,74
m [g]	0,5	-	0,43
V [ml]	-	40	-
ρ [g/ cm ³]	-	0,889	-

Pracovní postup: Bylo postupováno dle literatury, pracovní postup byl modifikován.⁶⁵

Výchozí látka (**22**; 0,5 g; 0,74 mmol) byla rozpuštěna ve 40 ml THF a bylo k ní přidáno katalytické množství 10% paládia na aktivním uhlí. V atmosféře vodíku byla RS míchána 18 hodin, při teplotě místnosti. Po uplynutí 18ti hodin bylo provedeno kontrolní TLC, které prokázalo, že došlo ke zreagování výchozí látky (**22**) a proto byla RS přefiltrována přes čtyři skládané filtry. Skládané filtry byly promyty THF. Získána a spojena rozpouštědla byla odpařena na RVO. Byl získán produkt (**26**) ve formě bílých krystalů, které byly čištěny krystalizací ze směsi EtOAc/hexan (1:3).

Charakterizace izolovaného produktu (**26**):

Výtěžek: 0,421 g (97 %); bílá krystalická látka.

Teplota tání: 162,6 - 170,3 °C.

¹H NMR: (400 MHz, DMSO) δ 0,69 (3H, d, $^4J_{H,H} = 1,96$ Hz, $^3J_{H,H} = 6,08$ Hz, CH₃); 0,76 (3H, d, $^4J_{H,H} = 1,14$ Hz, $^3J_{H,H} = 6,40$ Hz, CH₃); 1,11-1,17 (1H, m, CH); 1,24-1,33 (2H, m, diastereotopický CH₂); 2,61-2,89 (2H, m, diastereotopický CH₂); 4,40-4,46 (1H, m, CH); 4,52-4,59 (1H, m, CH); 5,27 (1H, s, NH); 7,20-7,26 (5H, m, 5xCH(Ar)); 7,53-7,61 (4H, m,

4xCH(Ar)); 7,75 (1H, d, $^3J_{H,H} = 2,8$ Hz, NH); 7,83-7,85 (3H, m, 3xCH(Ar)); 8,16 (1H, t, $^3J_{H,H} = 8,04$ Hz, CH(Ar)); 8,26 (1H, d, $^3J_{H,H} = 8,00$ Hz, NH); 8,47 (1H, d, $^3J_{H,H} = 8,64$ Hz, NH); 10,41 (1H, bs, OH).

^{13}C NMR: (100,62 MHz, DMSO) δ 22,00; 23,58; 24,71; 38,28; 41,63; 52,01; 52,58; 116,16; 116,31; 125,02; 125,37; 126,92; 128,62; 128,87; 129,16; 129,78; 130,60; 132,48; 133,55; 137,90; 139,61; 155,56; 163,63; 170,69; 172,03.

HRMS m/z: pro $\text{C}_{28}\text{H}_{31}\text{ClN}_4\text{O}_6\text{S}$ vypočteno: 587,17311 [M + H] $^+$; 609,15505 [M + Na] $^+$; 625,12899 [M + K] $^+$; nalezeno: 587,17256 [M + H] $^+$; 609,15450 [M + Na] $^+$; 625,12844 [M + K] $^+$.

Elementární analýza: pro $\text{C}_{28}\text{H}_{31}\text{ClN}_4\text{O}_6\text{S}$ vypočteno: C 57,28; H 5,38; N 9,54; S 5,46; nalezeno: C $56,89 \pm 0,06$; H $5,42 \pm 0,02$; N $9,58 \pm 0,01$; S $5,06 \pm 0,01$.

5.9. Příprava 5-chlor-2-hydroxy-N-((S)-4-methyl-1-(((S)-4-methyl-1-oxo-1-(2-(fenylsulfonyl)hydrazinyl)pentan-2-yl)amino)-1-oxopentan-2-yl)benzamidů

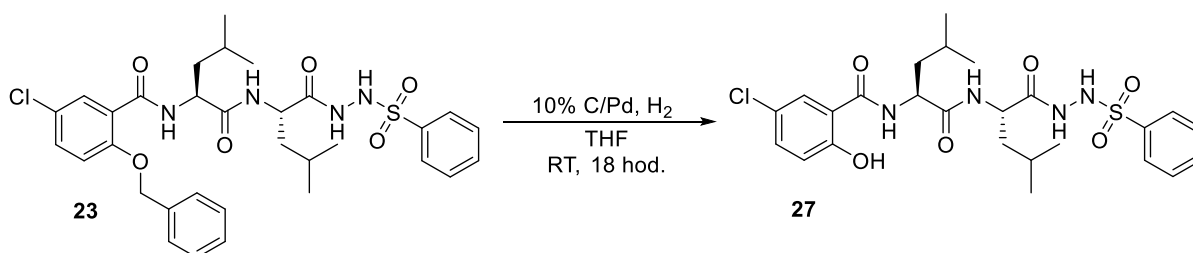


Schéma 33: Příprava

5-chlor-2-hydroxy-N-((S)-4-methyl-1-(((S)-4-methyl-1-oxo-1-(2-(fenylsulfonyl)hydrazinyl)pentan-2-yl)amino)-1-oxopentan-2-yl)benzamidů.

látka	23	THF	27
M [g/ mol]	643,19	72,11	553,07
ekvivalent	1	-	1
n [mmol]	1,58	-	1,58
m [g]	1,02	-	0,87
V [ml]	-	40	-
ρ [g/ cm 3]	-	0,889	-

Pracovní postup: Bylo postupováno dle literatury, pracovní postup byl modifikován.⁶⁵

Výchozí látka (**23**; 1,02 g; 1,58 mmol) byla rozpuštěna ve 40 ml THF a bylo k ní přidáno katalytické množství 10% paladia na aktivním uhlí. V atmosféře vodíku byla RS míchána 18 hodin při teplotě místnosti. Po uplynutí 18ti hodin byla RS přefiltrována přes čtyři skládané

filtry. Skládané filtry byly promyty THF. Získána a spojena rozpouštědla byla odpařena na RVO. Produkt (**27**) reakce byl navíc promyt DCM, rozpouštědlo bylo odpařeno na RVO a produkt byl vysušen.

Charakterizace izolovaného produktu (**27**):

Výtěžek: 0,87 g (100 %); bílá amorfnní látka.

¹H NMR: (400 MHz, DMSO) δ 0,77 (6H, d, $^3J_{H,H} = 4,1$ Hz, $2 \times \underline{CH}_3$); 0,84 (6H, d, $^3J_{H,H} = 4,2$ Hz, $2 \times \underline{CH}_3$); 1,17-1,23 (2H, m, diastereotopický \underline{CH}_2); 1,29-1,35 (2H, m, $2 \times \underline{CH}$); 1,44-1,61 (2H, m, diastereotopický \underline{CH}_2); 3,59 (1H, s, \underline{OH}); 4,23-4,27 (1H, m, $\underline{NH-CH}$); 4,43-4,50 (1H, m, $\underline{NH-CH}$); 5,23 (1H, s, \underline{NH}); 7,35-7,38 (1H, m, $\underline{CH}(\text{Ar})$); 7,49-7,53 (3H, m, $3 \times \underline{CH}(\text{Ar})$); 7,58-7,62 (1H, m, $\underline{CH}(\text{Ar})$); 7,76-7,79 (2H, m, $2 \times \underline{CH}(\text{Ar})$); 8,01 (1H, d, $^3J_{H,H} = 4,2$ Hz, \underline{NH}); 8,09-8,23 (1H, m, $\underline{CH}(\text{Ar})$); 9,93 (1H, d, $^3J_{H,H} = 4,0$ Hz, \underline{NH}); 9,93 (1H, d, $^3J_{H,H} = 4,1$ Hz, \underline{NH}).

¹³C NMR: (100,62 MHz, DMSO) δ 23,47; 24,61; 24,79; 24,99; 31,06; 41,28; 41,62; 49,78; 52,00; 116,24; 118,01; 123,13; 128,38; 128,79; 128,89; 129,16; 129,31; 133,52; 136,41; 139,59; 158,43; 163,69; 167,10; 172,00.

HRMS m/z: pro $\text{C}_{25}\text{H}_{33}\text{ClN}_4\text{O}_6\text{S}$ vypočteno: 553,18876 $[\text{M} + \text{H}]^+$; 575,17070 $[\text{M} + \text{Na}]^+$; 591,14464 $[\text{M} + \text{K}]^+$; nalezeno: 553,18821 $[\text{M} + \text{H}]^+$; 575,17015 $[\text{M} + \text{Na}]^+$; 591,14409 $[\text{M} + \text{K}]^+$.

Elementární analýza: pro $\text{C}_{25}\text{H}_{33}\text{ClN}_4\text{O}_6\text{S}$ vypočteno: C 54,29; H 6,01; N 10,13; S 5,80; nalezeno: C $55,57 \pm 0,05$; H $6,15 \pm 0,04$; N $9,80 \pm 0,06$; S $4,56 \pm 0,18$.

6. Závěr

Teoretická část diplomové práce je zaměřena na popis salicylamidů. Okrajově se věnuje aromatickým salicylamidům, tzv salicylanilidům. Větší pozornost je věnována alifatickým salicylamidům, protože na alifatických salicylamidech je postavena praktická část mé diplomové práce. Kromě popisu, a zmínce o biologické aktivitě, již zmíněných látek je také věnována pozornost jejich syntéze. Možností syntéz je hned několik, přičemž každá cesta má své výhody i nevýhody. Větší důraz je kladen na syntézu s využitím karbodiimidů, konkrétně *N*-(3-dimethylaminopropyl)-*N'*-ethyl karbodiimidu hydrochloridu (EDC·HCl), který posloužil k aktivaci karboxylové komponenty. Popsána jsou také další nukleofilní činidla použita při syntéze amidů/ peptidů. Tato činidla slouží k zabránění nežádoucích reakcí.

Literární rešerše se také zabývá základním popisem syntézy peptidického řetězce. Okrajově nařukává problémy a usnadnění při syntéze v roztoku, ale i při syntéze na pevné fázi. Peptidický řetězec je tvořen aminokyselinami, které jsou navzájem propojeny peptidickou vazbou. Literární rešerše se zaměřuje na možnosti ochrany jak karboxylové komponenty, tak i aminové komponenty, tedy jaké látky k ochraně mohou být použity. Po vzniku vazby je nutné provést zpětnou ochranu. O možnostech ochrany je v teoretické části diplomové práce také hovořeno. Okrajově je věnována pozornost ochraně a ochraně vedlejších funkčních skupin, které by mohly způsobovat nežádoucí vedlejší reakce. Zmínka je věnována i samotné aktivaci kyseliny a následnému couplingu.

Poslední část teoretické části je věnována biologické aktivitě. Nejprve je popsána biologická aktivita u salicylanilidů, poté u látek s alifatickým uspořádáním salicylamidů. Věnována je pozornosti také aminokyselinám. Konkrétně biologické účinky u leucinu a fenylalaninu, protože tyto dvě aminokyseliny jsou využívány při syntézách produktů. Není zapomenuto také na arylsulfonil hydrazidy, protože i tyto látky jsou z biologického hlediska zajímavé a byly pro nás značnou inspirací.

Praktická část nejprve popisuje přípravu meziproduktů. Konkrétně se jedná o přípravu substituované kyseliny salicylové, ochranu její hydroxylové skupiny. Pokračováno je přes syntézu methyl esterů odvozených od opticky čistého L-leucinu a opticky čistého L-fenylalaninu a jejich vzájemné kombinaci až k samotné syntéze požadovaných produktů.

Sloučeniny mající chtěné uspořádání a obsahující ve své struktuře chráněnou hydroxylovou skupinu byly získány v požadované čistotě i množství a byly poslány na měření biologické aktivity do externího pracoviště. Tyto sloučeniny byly podrobeny hydrogenolýze, která vedla k uvolnění fenolické hydroxylové skupiny.

7. Seznam použité literatury

¹ Imramovský, A. *8. týden – Fenolkarboxylové kyseliny, metody, typické produkty* [Přednáška]. Pardubice: Univerzita Pardubice, FCHT, Ústav organické chemie a technologie 02. 05. 2019.

² Liu, B.; Qiu, Q.; Zhao, T.; Jiao, L.; Li, Y.; Huang, W.; Qian, H. 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. *ChemMedChem*. **2015**, *10* (2), 336–344.

³ Lu, C.-R.; Zhao, B.; Jiang, Y.-P.; Ding, H.; Yang, S. One-Pot Synthesis of Salicylanilides by Direct Amide Bond Formation from Salicyclic Acid Under Microwave Irradiation. *Synthetic Communications*. **2011**, *41* (9), 1257–1266.

⁴ Imramovský, A.; Vinšová, J.; Monreal Ferriz, J.; Kuneš, J.; Pour, M.; Doležal, M. Salicylanilide esterification: unexpected formation of novel seven-membered rings. *Tetrahedron Letters*. **2006**, *47* (29), 5007–5011.

⁵ Imramovský, A.; Pauk, K.; Pejchal, V.; Hanusek, J. Salicylanilides and Their Derivates as Perspective Anti-tuberculosis Drug: Synthetic Routes and Biological Evaluations. *Mini-Reviews in Organic Chemistry*. **2011**, *8*, 211–220.

⁶ Yoshino, T.; Sato, I.; Hirama, M. Total Synthesis of Aspercyclides A and B via Intramolecular Oxidative Diaryl Ether Formation. *Organic Letters*. **2012**, *14* (16), 4290–4292.

⁷ Souto, J.A.; Conte, M.; Alvarez, R.; Nebbioso, A.; Carafa, V.; Altucci, L.; de Lera, A. Synthesis of Benzamides Related to Anacardic Acid and Their Histone Acetyltransferase (HAT) Inhibitory Activities. *ChemMedChem*. **2008**, *3* (9), 1435–1442.

⁸ Das, V. K.; Devi, R. R.; Thakur, A. J. Recyclable, highly efficient and low cost nano-MgO for amide synthesis under SFRC: A convenient and greener ‘NOSE’ approach. *Applied Catalysis A: General*. **2013**, *456*, 118–125.

⁹ Wu, Y.; Wang, S.; Zhang, L.; Yang, G.; Zhu, X.; Zhou, Z.; Zhu, H.; Wu, S. Cyclopentadienyl-Free rare-earth metal amides $[\{(CH_2SiMe_2)\{(2,6-iPr_2C_6H_3)N\}_2\}Ln\{N(SiMe_3)_2\}(THF)]$ as highly efficient versatile catalysts for C–C and C–N bond formation. *European Journal of Organic Chemistry*. **2010**, 326–332.

¹⁰ Hu, Q.; Wang, L.; Wang, Ch.; Wu, Y.; Ding, Z.; Yuan, R. Ligand-free Pd(0)/SiO₂-catalyzed aminocarbonylation of aryl iodides to amides under atmospheric CO pressure. *RSC Advances*. **2017**, *7* (59), 37200–37207.

- ¹¹ Liu, X.; Zhang, H.; Wu, C.; Liu, Z.; Chen, Y.; Yu, B.; Liu, Z. Copper-catalyzed synthesis of benzanilides from lignin model substrates 2-phenoxyacetophenones under an air atmosphere. *New Journal of Chemistry*. **2018**, *42* (2), 1223–1227.
- ¹² Dušek, J. *Syntéza a biologická aktivita alifatických salicylamidů*; Pardubice, 2019, Literární rešerše. Univerzita Pardubice. Fakulta chemicko-technologická. Ústav organické chemie a technologie.
- ¹³ 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. *Organic Letters*. **2018**, *20* (18), 5671–5675.
- ¹⁴ 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. *Organic Letters*. **2014**, *16* (19), 5036–5039.
- ¹⁵ Imramovský A.; Pejchal V.; Štěpánková Š.; Vorčáková K.; Jampílek J.; Vančo J.; Šimůnek P.; Královec K.; Brůčková L.; Mandíková J.; Trejtnar F. Synthesis and in vitro evaluation of new derivatives of 2-substituted-6-fluorobenzo[*d*]thiazoles as cholinesterase inhibitors. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*. **2013**, *21* (7), 1735–1748.
- ¹⁶ 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.
- ¹⁷ Joullié Madeleine M.; Lassen Kenneth M. Evolution of amide bond formation. *Arkivoc*. **2010**, *8*, 189–250.
- ¹⁸ El-Faham, A.; Albericio, F. Peptide Coupling Reagents, More than a Letter Soup. *Chemical Reviews*. **2011**, *111* (11), 6557–6602.
- ¹⁹ Albericio, F.; Chinchilla, R.; Dadsworth, D.; Najera, C. New Trends in Peptide Coupling Reagents. *Organic Preparations and Procedures International*. **2001**, *33* (3), 203–313.
- ²⁰ Jad, Y. E.; Khattab, S. N.; de la Torre, B. G.; Govender, T.; Kruger, H. G.; El-Faham, A.; Albericio, F. EDC·HCl and Potassium Salts of Oxyma and Oxyma-B as Superior Coupling Cocktails for Peptide Synthesis. *European Journal of Organic Chemistry*. **2015**, *14*, 3116–3120.
- ²¹ El-Faham, A.; Funosas, R. S.; Prohens, R.; Albericio, F. COMU: A safer and more effective replacement for benzotriazole-based uronium coupling reagents. *Chemistry: A European Journal*. **2009**, *15* (37), 9404–9416.

-
- ²² Svoboda, J. *Organická Syntéza I*; Praha: Vysoká škola chemicko-technologická, Fakulta chemické technologie, **2000**. ISBN 80-7080-385-1.
- ²³ Guzman, F.; Barberis, S.; Illanes, A. Peptide synthesis: chemical or enzymatic. *Electronic Journal of Biotechnology*. **2007**, *10* (2), 279-314.
- ²⁴ Andersson, L.; Blomberg, L.; Flegel, M.; Lepsa, L.; Nilsson, B.; Verlander, M. Large-scale synthesis of peptides. *Biopolymers – Peptide Science Section*. **2000**, *55* (3), 227-250.
- ²⁵ Isidro-Llobet, A.; Alvarez, M.; Albericio, F. Amino acid-protecting groups. *Chemical Reviews*. **2009**, *109* (6), 2455-2504.
- ²⁶ Albericio, F. Orthogonal protecting groups for *N*(alpha)-amino and C-terminal carboxyl functions in solid-phase peptide synthesis. *Biopolymers*. **2000**, *55* (2), 123-139.
- ²⁷ Gut, V.; Flégel, M. Způsob přípravy peptidů odštěpováním *N*-alfa-o-nitrobenzensulfenylové skupiny chránící alfa-aminokyselinu příslušné aminokyseliny. Česká republika. CS221620B1. 15. 5. **1985**.
- ²⁸ Lawrenson, S. B.; Arav, R.; North, M. The greening of peptide synthesis. *Green Chemistry*. **2017**, *19* (7), 1685–1691.
- ²⁹ Albericio, F. Developments in peptide and amide synthesis. *Current Opinion in Chemical Biology*. **2004**, *8* (3), 211-221.
- ³⁰ Lemaire, H.; Schrammt, C. H.; Cahn, A. Synthesis and Germicidal Activity of Halogenated Salicylanilides and Related Compounds. *Journal of Pharmaceutical Sciences*. **1961**, *50* (10), 831–837.
- ³¹ Waisser, K.; Pesina, M.; Holý, P.; Pour, M.; Bures, O.; Kunes, J.; Klimesova, V.; Buchta, V.; Kubanova, P.; Kaustova, J. Antimycobacterial and antifungal isosters of salicylamides. *Archiv Der Pharmazie*. **2003**, *336* (67), 322-335.
- ³² Topps, J. H.; Wain, R. L. Investigations on fungicides. III. The fungitoxicity of 3- and 5-alkyl-salicylanilides and para-chloranilidies. *Annals of Applied Biology*. **1957**, *45* (3), 506–511.
- ³³ Taborsky, R. G.; Darker, G. D.; Kaye, S. Substituted salicylanilides with antimicrobial activity. *Journal of the American Pharmaceutical Associatio*. **1959**, *48* (9), 503–507.
- ³⁴ Mohammed-Ali, N. A. K.; Bogan, J. A. The pharmacodynamics of the flukicidal salicylanilides, rafoxanide, closantel and oxyclosanide. *Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics*. **1987**, *10* (2), 127–133.

- ³⁵ Singh, H.; Singh, A. K.; Sharma, S.; Iyer, R. N.; Srivastava, P. Synthesis of 5-chloro-3'-nitro-4'-substituted salicylanilides, a new series of anthelmintic and antimicrobial agents. *Journal of Medicinal Chemistry*. **1977**, *20* (6), 826–829.
- ³⁶ 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.; Webb, G. C.; Weidner-Wells, M. A.; Werblood, H.; Barrett, J. F. Novel inhibitors of bacterial two-component systems with gram positive antibacterial activity: pharmacophore identification based on the screening hit closantel. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*. **1998**, *8* (14), 1923–1928.
- ³⁷ 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.; Foleno, B. D.; Goldschmidt, R. M.; Loeloff, M. J.; Webb, G. C.; Barrett, J. F. Substituted salicylanilides as inhibitors of two-component regulatory systems in bacteria. *Journal of Medicinal Chemistry*. **1998**, *41* (16), 2939–2945.
- ³⁸ Wolanin, P. M.; Thomason, P. A.; Stock, J. B. Histidine protein kinases: key signal transducers outside the animal kingdom. *Genome Biology*. **2002**, *3* (10).
- ³⁹ Attwood, P. V.; Piggott, M. J.; Zu, X. L.; Besant, P. G. Focus on phosphohistidine. *Amino Acids*. **2007**, *32* (1), 145–156.
- ⁴⁰ 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.
- ⁴¹ Xu, M.; Lee, E. M.; Wen, Z.; Cheng, Y.; Huang, W. K.; Qian, X.; Tcw, J.; Kouznetsova, J.; Ogden, S. C.; Hammack, C.; Jacob, F.; Nguyen, H. N.; Itkin, M.; Hanna, C.; Shinn, P.; Allen, C.; Michael, S. G.; Simeonov, A.; Huang, W.; Christian, K. M.; Goate, A.; Brennand, K. J.; Huang, R.; Xia, M.; Ming, G. L.; Zheng, W.; Song, H.; Tang, H. Identification of small-molecule inhibitors of Zika virus infection and induced neural cell death via a drug repurposing screen. *Nature Medicine*. **2016**, *22* (10), 1101–1107.
- ⁴² Imramovský, A.; Štěpánková, Š.; Vanco, J.; Pauk, K.; Monreal-Ferriz, J.; Vinšová, J.; Jampílek, J. Acetylcholinesterase-Inhibiting Activity of Salicylanilide *N*-Alkylcarbamates and Their Molecular Docking. *Molecules* **2012**, *17*, 10142–10158.
- ⁴³ 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. *Bioorganic Chemistry*. **2018**, *80*, 668–673.

- ⁴⁴ Halldin, C. Radioligands for Dopamine Receptor PET Studies: Benzamides and Ligands for Dopamine D-1 Receptors. In: Baron, J. C.; Comar, D., Farde, L., Martinot, J. L., Mazoyer, B. *Brain Dopaminergic Systems: Imaging with Positron Tomography*. Kluwer Academic Publishers, Netherlands: **1991**, 23-38. ISBN 978-94-011-3528-3.
- ⁴⁵ Kushkevych, I.; Kollar, P.; Ferreira, A. N.; Palma, D.; Lopes, M. M.; Bartos, M.; Pauk, K.; Imramovský, A.; Jampílek, J. Antimicrobial effect of salicylamide derivatives against intestinal sulfate-reducing bacteria. *Journal of Applied Biomedicine*, **2016**, *14* (2), 125-130.
- ⁴⁶ 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 & Medicinal Chemistry*. **2013**, *21* (21), 6574-6581.
- ⁴⁷ Petrlíková, E.; Waisser, K.; Palát, K.; Kuneš, J.; Kaustová, J. A new group of potential antituberculotics: *N*-(2-pyridylmethyl)salicylamides and *N*-(3-pyridylmethyl)salicylamides. *Chemical Papers*. **2011**, *65* (1), 52-59.
- ⁴⁸ Waisser, K.; Pešina, M.; Holý, P.; Pour, M.; Bureš, O.; Kuneš, J.; Klimešová, V.; Buchta, V.; Kubanová, P.; Kaustová, J. Antimycobacterial and Antifungal Isosters of Salicylamides. *Archiv der Pharmazie*. **2003**, *336* (67), 322-335.
- ⁴⁹ Imramovský, A.; Peško, 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.
- ⁵⁰ 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. *European Journal of Medicinal Chemistry*. **2013**, *68*, 253–259.
- ⁵¹ Dušek, J.; Imramovský, A.; Pauk, K.; Jorda, R.; Řezníčková, E.; Kryštof, V. Synthesis and Antiproliferative Activities of Novel *O*-Benzyl Salicylamide Derivatives. *Letters in Drug Design & Discovery*. **2017**, *14*, 662-671.
- ⁵² Sajna K. V.; Gottumukkala L. D.; Sukumaran R. K.; Panday A. Chapter 18 - White Biotechnology in Cosmetics. In: Pandey, A.; Höfer, R.; Taherzadeh, M.; Nampoothiri, K. M.; Larroche, Ch. *Industrial Biorefineries and White Biotechnology*. India: Elsevier, **2015**, 620-621. ISBN 978-0-444-63453-5.

⁵³ Moise, M.; Sunel, V.; Profire, L.; Popa, M.; Desbrieres, J.; Peptu, C. Synthesis and biological activity of some new 1,3,4-thiadiazole and 1,2,4-triazole compounds containing a phenylalanine moiety. *Molecules*. **2009**, *14*, 2621-2631.

⁵⁴ Aminokyseliny: L-leucin. aktin.cz [online]. Caha, J. Selltime s. r. o., **2019** [cit. 15. 05. 2019]. Dostupné z: <https://aktin.cz/3202-aminokyseliny-l-leucin>.

⁵⁵ Perinelli, D. R.; Petrelli, D.; Vitali, L. A.; Vllasaliu, D.; Caspi, M.; Giorgiono, G.; Elmowafy, E.; Bonacucina, G.; Palmieri, G. P. Quaternary ammonium surfactants derived from leucine and methionone: Novel challenging surface active molecules with antimicrobial activity. *Journal of Molecular Liquids*. **2019**, *283*, 249-256.

⁵⁶ Chen, Wei; Wang, Hao-An; Wei, Wei; Li, Yu-Xin; Hua, Xue-Wen; Song, Hai-Bin; Yu, Shu-Jing; Li, Zheng-Ming. Regioselective Synthesis, Crystal Structure and Biological Activity of Novel 2-Phenylsulfonylhydrazono-3-(3-trifluoromethylphenyl)-2(3H)-thiazolidine derivatives. *Chinese Journal of Structural Chemistry*. **2015**, *34* (4), 503-509.

⁵⁷ Ledour G., Moroy G., Rouffet M., Bourguet E., Guillaume D., Decarme M., Elmourabit H., Augé F., Alix A. J., Laroze J. Y., Bellon G., Hornebeck W., Sapi J. Introduction of the 4-(4-bromophenyl)benzenesulfonyl group to hydrazide analogs of Ilomastat leads to potent gelatinase B (MMP-9) inhibitors with improved selectivity. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*. **2008**, *16* (18), 8745-8759.

⁵⁸ Siemann S., Evanoff D. P., Marrone L., Clarke A. J., Viswanatha T., Dmitrienko G. I. *N*-arylsulfonyl hydrazones as inhibitors of IMP-1 metallo-beta-lactamase. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. **2002**, *46* (8), 2450–2457.

⁵⁹ Kamal A., Khan M. N., Srinivasa Reddy R., Rohini K. Synthesis of a new class of 2-anilino substituted nicotinyl arylsulfonylhydrazides as potential anticancer and antibacterial agents. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*. **2007**, *15* (2), 1004-1013.

⁶⁰ 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. *European Journal of Medicinal Chemistry*. **2020**, *188*, 112036.

⁶¹ Gaudioso, L. A.; Weglarz, M. A. Process for the synthesis of exochelins. US6063919A. **14. 8 1998**.

⁶² Kitagawa, T.; Asada, M. Preparation and Root Growth-Inhibitory Activity of *N*-Substituted 2-(2-Chloroacetamido)-3-(furan-2-yl)propanamides. *Chemical & Pharmaceutical Bulletin*. **2006**, *53* (9), 1183–1189.

⁶³ Jorda, R.; Dušek, J.; Řezníčková, E.; Pauk, K.; Maggar, P. P.; Imramovský, A.; Kryštof, V. 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.

⁶⁴ Voss A. K.; Baell J.; Nguyen H. N.; Leaver D. J.; Cleary B. L.; Lagiakos H. R.; Sheikh B. N.; Thomas T. J. Aryl sulfonylhydrazides. Univ Monash, The Walter and Eliza Hall inst of medical res, Voss Anne Kathrin. WO2016198507 (A1). 15. 12. 2015.

⁶⁵ Jia, J.-M.; Liu, F.; Xu, X.-L.; Guo, X.-K.; Jiang, F.; Huang, H.-Z.; Pan, Y.; Cherfaoui, B.; Sun, H.-P.; You, Q.-D. Hybrids of the Benzofuran Core from Natural Products and the 2,4-Dihydroxy-5-isopropylbenzene Fragment as Potent Hsp90 Inhibitors: Design, Synthesis and Bioevaluation. *Molecular informatics*. **2014**, *33*, 495-502.