

Univerzita Pardubice
Fakulta chemicko-technologická

Pokročilé deriváty biologicky aktivních salicylamidů

Disertační práce

2023

Ing. Eliška Pilařová

Prohlašuji:

Práci s názvem Pokročilé deriváty biologicky aktivních salicylamidů jsem vypracovala samostatně. Veškeré literární prameny a informace, které jsem v práci využila, 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., o právu autorském, o právech souvisejících s právem autorským a o změně některých zákonů (autorský zákon), ve znění pozdějších předpisů, 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 směrnicí Univerzity Pardubice č. 7/2019 Pravidla pro odevzdávání, zveřejňování a formální úpravu závěrečných prací, ve znění pozdějších dodatků, bude práce zveřejněna prostřednictvím Digitální knihovny Univerzity Pardubice.

V Pardubicích dne 20.3.2023

Ing. Eliška Pilařová

PODĚKOVÁNÍ

Na tomto místě bych ráda poděkovala školiteli doc. Ing. Aleši Imramovskému, Ph.D. za odborné vedení a trpělivost při vytváření této disertační práce. Moje díky patří i za to, že mi umožnil pod jeho vedením tuto disertační práci vypracovat a sepsat. Dále děkuji Ing. Karlu Paukovi, Ph.D. za cenné rady a diskusi mých výsledků a také Ing. Janu Duškovi, Ph.D. za poskytnutí informací ohledně automatizace syntézy peptidických látek. Děkuji i celému kolektivu Imramovský research group za příjemnou atmosféru v laboratoři a přátelské prostředí, jmenovitě Kateřině Teichmanové a Kateřině Moravcové, které nešetřily podporou. V neposlední řadě patří poděkování i všem mým kamarádům, a to hlavně Ditě Jiráčkové a Honzovi Šimůnkovi, kteří byli vždy ochotni mě vyslechnout. Také bych ráda poděkovala i svému příteli Aleši Pilnému a rodině za podporu ve všech ohledech.



Foto Imramovský research group v roce 2022. Zleva: Daria Chernenko, Karel Pauk, Aleš Imramovský, Kateřina Moravcová, Kateřina Teichmanová, Eliška Pilařová, Lina Straihorodska

ANOTACE

Obsahem disertační práce je popis inhibitorů proteasomu včetně toho, co je vlastní proteasom a jak jeho inhibice funguje. Jsou zde také zmíněny klinicky využívané inhibitory proteasomu. V dalších kapitolách se diskutuje vlastní syntéza peptidů, která se provádí dvěma způsoby. Metodou v kapalně fázi a metodou v pevné fázi. Metoda v pevné fázi je poté diskutována i z technologického hlediska. Tuto metodu jsme využili pro přípravu některých našich meziproductů ve spolupráci s firmou Apigenex s.r.o. a v této kapitole je i detailněji popsána technologie syntézy těchto meziproductů.

Samostatná kapitola je i věnována současným trendům v proteasomální inhibici a také potenciálním inhibitorům proteasomu připravenými naší výzkumnou skupinou, kde se poté diskutuje i návrh nových látek. Tyto látky byly rozvrženy do 4 samostatných studií a byla navržena syntéza těchto látek. Připravené látky byly charakterizovány běžnými metodami a byla otestována jejich biologická aktivita.

KLÍČOVÁ SLOVA

Proteasom, inhibitory proteasomu, SPPS, technologie organických látek

TITLE

Advanced derivatives of biologically active salicylamides

ANNOTATION

The content of the dissertation is a description of proteasome inhibitors, including what proteasom is and how its inhibition works. There are also mentioned clinically used proteasome inhibitors. In the next chapters the synthesis of peptide sis discussed and it is performed in two ways. Liquid phase peptide synthesis and solid phase peptide synthesis (SPPS). The SPPS is then discussed from a technological point of view. We used this method to prepare some of our intermediates in cooperation with Apigenex s.r.o. And in this chapter, the technology of the synthesis of these intermediates is described in more details.

The separate chapter is also devoted to current trends in proteasomal inhibition and potential proteasome inhibitors prepared by our research group, where the design of new substances is then discussed. These substances were divides into 4 separate studies and the

synthesis of these substances was designed. The prepared substances were characterized by common methods and their biological activity was tested.

KEYWORDS

Proteasome, proteasome inhibitors, solid phase peptide synthesis, technology of organic compounds

Obsah

PODĚKOVÁNÍ	3
ANOTACE	4
KLÍČOVÁ SLOVA	4
TITLE.....	4
ANNOTATION	4
KEYWORDS.....	5
SEZNAM ZKRATEK.....	10
ÚVOD	12
1 Teoretická část.....	13
1.1 Proteasom.....	13
1.1.1 Jádro 20S	13
1.1.2 Regulační komplex 19S	14
1.2 Ubiquitin-proteasomový systém (UPS).....	15
1.3 Inhibitory proteasomu.....	16
1.4 Mnohočetný myelom.....	16
1.5 Klinické inhibitory proteasomu.....	17
1.5.1 Bortezomib	17
1.5.2 Ixazomib.....	19
1.5.3 Delanzomib.....	19
1.5.4 Carfilzomib.....	20
1.5.5 Oprozomib.....	21
1.5.6 Marizomib	22
1.5.7 MG132	22
1.5.8 Vinylsulfony	22

1.6	Syntéza peptidického řetězce	24
1.7	Příprava v roztoku (SPS)	24
1.8	Příprava v pevné fázi (SPPS)	25
1.8.1	Nosiče.....	27
1.8.2	Linkery	27
1.9	Hybridní metody.....	29
1.10	Chránicí skupiny	29
1.10.1	Benzyl karbamát (CBZ, Z)	29
1.10.2	Terc-butyl karbamát (Boc)	30
1.10.3	9-fluorenylethyl karbamát (Fmoc).....	30
1.10.4	Acetamid.....	30
1.10.5	Trifluoroacetamid	30
1.10.6	p-toluensulfonamid (Ts).....	30
1.11	Tvorba peptidické vazby	31
1.12	Technologie syntézy peptidů.....	32
1.12.1	Zařízení pro přípravu metodou SPPS.....	34
1.12.2	Automatizace přípravy tripeptidických kyselin.....	36
1.13	Biologické testování potencionálních inhibitorů	37
1.14	Současné trendy v IP	38
1.15	Potenciální IP vyvinuté v rámci pracovní skupiny	46
1.16	Salicylanilidy jako antibakteriální látky.....	47
	CÍL PRÁCE.....	48
2	Výsledky a diskuze	50
	Experimentální část.....	62
2.1	Příprava tripeptidických aldehydů a vinyl sulfonů.....	64
2.1.1	Příprava diethyl ((methylsulfonyl)methyl)fosfonátu (49).....	64
2.1.2	Obecná příprava mono-peptidického aldehydu (48).....	65

2.1.3	Obecná příprava mono-peptidického vinyl sulfonu (51).....	66
2.1.4	Obecná příprava mono-peptidického amino vinyl sulfonu (52).....	69
2.1.5	Obecná příprava tri-peptidického vinyl sulfonu (53).....	70
2.1.6	Obecná příprava mono-peptidického Boc-weinreb amidu (45)	78
2.1.7	Obecná příprava ochráněného mono-peptidického weinreb amidu (46) .	80
2.1.8	Obecná příprava tri-peptidického weinreb amidu (54)	80
2.1.9	Obecná příprava tri-peptidického aldehydu (55)	88
2.2	Příprava tetra-peptidických aldehydů a vinyl sulfonů	96
2.2.1	Obecná příprava tetra-peptidického vinylsulfonu (57)	96
2.2.2	Obecná příprava tetra-peptidického weinreb amidu (58).....	98
2.2.3	Obecná příprava tetra-peptidického aldehydu (59).....	101
2.3	Příprava benzylovaných a debenzylovaných trifluorotoluidinů.....	103
2.3.1	Obecná příprava 5-chloro-O-benzyl-trifluoromethyl benzamidu (62a-f)	103
2.3.2	Obecná příprava 5-chloro-2-hydroxyl-trifluoromethyl benzamidu (63a-f)	107
2.4	Příprava akrylamidů	111
2.4.1	Příprava (S)-tert-butyl (4-methyl-1-((3-nitrophenyl)amino)-1-oxopentan- 2-yl)karbamátu (67).....	111
2.4.2	Příprava (S)-tert-butyl (1-((3-aminophenyl)amino)-4-methyl-1-oxopentan- 2-yl)karbamátu (68).....	112
2.4.3	Příprava (S)-tert-butyl (1-((3-akrylamidophenyl)amino)-4-methyl-1- oxopentan-2-yl)karbamátu (70).....	113
2.4.4	Příprava (S)-N-(3-akrylamidophenyl)-2-amino-4-methylpentanamidu (71)	114
2.4.5	Příprava N-((S)-1-(((S)-1-((3-akrylamidophenyl)amino)-4-methyl-1- oxopentan-2-yl)amino)-4-methyl-1-oxopentan-2-yl)-2-(benzyloxy)-5-chlorobenzamidu (73a)	115

2.4.6 Příprava N-((S)-1-(((S)-1-((3-akrylamidophenyl)amino)-4-methyl-1-oxopentan-2-yl)amino)-1-oxo-3-phenylpropan-2-yl)-2-(benzyloxy)-5-chlorobenzamidu (73b)	116
2.4.7 Příprava N-((S)-1-(((S)-1-(((S)-1-((3-akrylamidophenyl)amino)-4-methyl-1-oxopentan-2-yl)amino)-4-methyl-1-oxopentan-2-yl)amino)-4-methyl-1-oxopentan-2-yl)-2-(benzyloxy)-5-chlorobenzamidu (73c)	117
Závěr	118
3 Citace	120

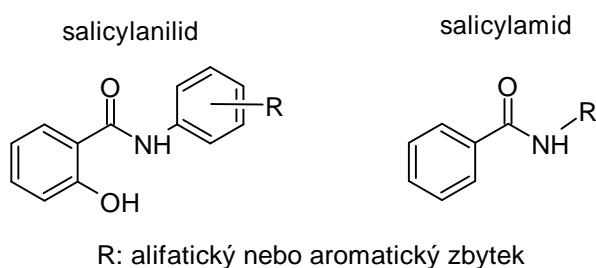
SEZNAM ZKRATEK

Boc	<i>Terc</i> -butyloxykarbonyl
AMK	Aminokyselina
C-L	Kaspáza
T-L	Trypsin
CHT-L	Chymotrypsin
DUBy	Deubiquitinační enzymy
Ub	Ubiquitin
UPS	Ubiquitin-proteasomový systém
NF- κ B	Nukleární faktor kappa B
IP	Inhibitor proteasomu
MM	Mnohočetný myelom
TBTU	2-(1 <i>H</i> -benzotriazol-1-yl)-1,1,3,3-tetramethylaminium tetrafluoroborát
DIPEA	Diisopropylethylamin
PyBop	benzotriazol-1-yloxytripyrrolidino-fosfonium hexafluorofosfát
Bn	Benzyl
Leu	Leucin
Phe	Fenylalanin
NLeu	Norleucin
Trp	Tryptofan
CHA	Cyklohexylalanin
Pro	Prolin
TFA	Trifluoroctová kyselina
CBZ	Benzyl karbamát
SPS	Syntéza peptidů v kapalně fázi
SPPS	Syntéza peptidů v pevně fázi
PG	Chránící skupina
PS	Polystyrenové
PS-PEG	Polystyren-funkcionalizované polyethylenglykolové
DCM	Dichlormethan
DMF	Dimethylformamid
THF	Tetrahydrofuran
Fmoc	9-fluorenylethyl karbamát

TEA	Triethylamin
Ts	<i>p</i> -toluensulfonamid
DCC	Dicyklohexylkarbodiimid
DIC	Diisopropylkarbodiimid
EDC/WSC	1-ethyl-3-(3'-dimethylaminopropyl)karbodiimid
HOBt	1-hydroxybenzotriazol
HOAt	1-hydroxy-7-azabenzotriazol
AMC	7-amino-4-methylkumarin
NA	2-naftylamin
MNA	4-methoxy-2-naftylamin
MCA	Methyl-kumaryl-7-amid
Tyr	Tyrosin
<i>n</i> -BuLi	<i>n</i> -butyllithium
DMSO	Dimethylsulfoxid
IC	Inhibiční koncentrace
IPA	Isopropylalkohol
PEG	Polyethylenglykol
PG	Chránicí skupina (z angl. protection group)
PEGA	poly(etylene glykol)-poly-(N,N-dimetylakrylamid)
WA	Weinreb amid
HWE	Horner–Wadsworth–Emmons
EtOAc	Ethylacetát
AMP	Ampicilin
INH	Isoniazid
NMR	Nukleární magnetická rezonance
DHB	2,3-dihydroxybenzoová kyselina
DCTB	trans-2-[3-(4-terc-butylfenyl)-2-methyl-2-propenyliden]malononitril
SAR	Vztah mezi strukturou a aktivitou
MCPBA	<i>m</i> -chlorperoxybenzoová kyselina
RT	Laboratorní teplota (z angl. room temperature)
NaHMDS	bis(trimethylsilyl)amid sodný
RVO	Rotační vakuová odparka
RS	Reakční směs
VS	Vinyl sulfon

ÚVOD

Za posledních několik desítek let lze pozorovat neuvěřitelný rozvoj medicíny a farmaceutického odvětví. Bylo objeveno spousta nových nemocí, a proto je kladen tlak i na vývoj nových léčiv, které by měly vykazovat co nejméně vedlejších účinků (v ideálním případě žádné) a terapeutické dávky by měly být co nejmenší. V dnešní době nejvíce se vyskytují nemoci jsou tzv. civilizační choroby. Patří sem například hypertenze, cukrovka (diabetes), obezita, deprese ale i rakovina, proto se klade důraz hlavně na léčiva těchto nemocí. Zaměříme-li se na rakovinu, jedním potenciálně možným způsobem, jak ji léčit, jsou salicylanilidy (**obrázek 1**).



Obrázek 1: Obecný vzorec salicylanilidů a salicylamidů

Salicylanilidy jsou látky s širokým využitím, které jsou odvozené od kyseliny salicylové. Jsou účinné vůči gram pozitivním kmenům včetně *Staphylococcus aureus* (zlatý stafylokok) a *Enterococcus faecium*. Tyto kmeny představují v dnešní době klinický problém, protože jsou rezistentní vůči některým běžně používaným antibiotikům. Aby tyto látky účinkovaly, je nutné, aby na aromatické části obsahovaly elektron-akceptorní skupinu a na anilidové části hydrofobní skupinu. Používají se také jako antifungální a antihelmintické látky a dále jsou používány, jak již bylo řečeno i jako inhibitory proteasomu.

Tato práce se zaměřuje především na inhibitory proteasomu, a to na jejich popis, rozdělení, výrobu a technologii. Při přípravě nových potenciálních IP naší výzkumnou skupinou se vychází ze salicylamidových intermediátů. V rámci naší výzkumné skupiny jsme také ověřili antibakteriální vlastnosti těchto látek, a proto se v této disertační práci zabývám i přípravou látek, které vykazují antibakteriální vlastnosti.

1 Teoretická část

1.1 Proteasom

Součástí každé eukaryotické buňky je složitý multikatalytický enzymový komplex proteasom 26S nacházející se v jádře a v cytoplazmě. Tento proteasom má sudovitý tvar a je velký přibližně 2,5 MDa. V průběhu let bylo zjištěno, že slouží nejen k rozkladu poškozených proteinů, ale má i zásadní význam pro buněčný cyklus. Ovšem primární funkcí je degradace bílkovin. Substráty proteasomu obsahují například nádorové supresory, signální molekuly, regulátory buněčného cyklu, transkripční faktory, inhibiční molekuly a jiné.¹

Proteasom 26S (**Obrázek 2**) je složen z komplexu proteolytického jádra sudovitého tvaru, který je označován jako 20S proteasom a toto jádro je ukončeno až už na jednom či na obou koncích regulačními komplexy 19S (někdy označovanými také jako PA700), které rozpoznávají proteiny označené ubiquitinem. Regulační komplexy 19S mají dále za úkol rozvinutí a translokaci peptidů otagovaných ubiquitinem do jádra, kde dochází k jejich degradaci.²

1.1.1 Jádro 20S

Proteasom 20S byl poprvé pozorován v roce 1968 pomocí elektronového mikroskopu v lysátu lidských erytrocytů a díky jeho tvaru připomínajícímu cylindr se mu také začalo přezdívat „cylindrin“.¹

Jádro se skládá z 28 podjednotek, které jsou rozděleny do 4 kruhů. A to konkrétně 2 vnějších označovaných jako α , kdy tyto podjednotky slouží jako vstup pro protein a 2 vnitřních označovaných jako β . Každý β kruh obsahuje 3 aktivní místa, která se liší svou specifitou a aktivitou, podle schopnosti štěpit peptidovou vazbu na C-konci kyselých, bazických a hydrofobních aminokyselinových (AMK) zbytků a která byla pojmenována podle enzymů, které vykazují podobnou specifitu či aktivitu. Proto se tato aktivní místa nazývají kaspázová β 1 (C-L z anglického výrazu caspase-like) označovaná také jako PGPH, trypsinová β 2 (T-L) a chymotrypsinová β 5 (CHT-L).^{1,3}

Proteasom 20S je tedy v buňkách latentní. Substrát se k aktivním místům v něm dostává až po průchodu úzkým středem α kruhů. Poté následuje vlastní degradace proteinu na oligopeptidy v délce 3-15 aminokyselin. Ty jsou následně hydrolyzovány na jednotlivé aminokyseliny pomocí oligopeptidáz a amino-karboxyl peptidáz, kdy tyto AMK jsou poté pro tělo dále znovu využitelné.²

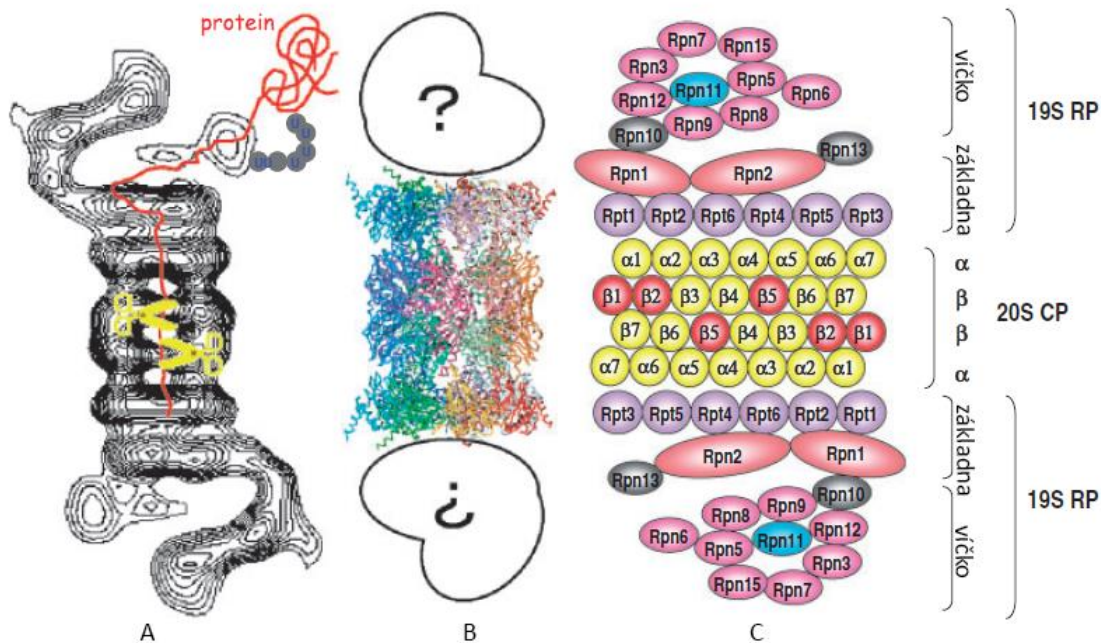
1.1.2 Regulační komplex 19S

Jak již bylo řečeno výše, regulační komplex 19S nebo-li PA700 uzavírá ať už na jednom nebo obou koncích proteasom 20S. Tento komplex slouží k rozpoznání proteinů označených ubiquitinem, kdy následně polyubiquitinový řetězec odstraní a protein rozvine. Následně otevře α kruh a rozvinutý protein vede do β kruhu, kde dochází k jeho degradaci.^{2,3}

Komplex 19S obsahuje přibližně 20 různých podjednotek, které mohou být rozděleny do dvou skupin, a to Rpt, což jsou regulační části podjednotek trojitě ATPázy (z anglického regulatory particle of triple-ATPase) a Rpn což jsou regulační části ne-ATPázových jednotek (regulatory particle of non-ATPase). Dále se tento komplex může dělit na dvě části, a to na víčko a základnu.³

Víčko je složeno minimálně z 9 Rpn jednotek, které jsou uspořádány do tvaru podkovy a jeho hlavní funkcí je deubiquitilizace zachyceného proteinu. Odstraněný ubiquitin je následně recyklován pomocí deubiquitinačních enzymů (tzv. DUBy). DUBy jsou thiolové proteázy, které štěpí amidové, esterové a thiolesterové vazby spojující karboxy-terminální Gly-79 Ub s AMK nebo proteiny.¹

Základna je složena z Rpt1-Rpt6 a Rpn1, Rpn2, Rpn10 a Rpn13 jednotek uspořádaných do kruhů a má tři hlavní funkce. Zachycení proteinu, jeho rozbalení a otevření kanálu v α kruhu proteasomu 20S.³



Obrázek 2: Obrázek A-Snímek proteasomu 26S izolovaného z krysí buňky pořízený pomocí elektronového mikroskopu, obrázek B-terciální struktura proteasomu 20S, kdy struktura 19S zatím nebyla určena (otazníky), obrázek C-schématické znázornění proteasomu 26S včetně jádra 20S a regulačního komplexu 19S obsahující základnu a víčko.³

1.2 Ubiquitin-proteasomový systém (UPS)

Ubiquitin-proteasomový systém rozloží celkově 80-90 % intracelulárních proteinů. Zbýlých 10-20 % proteinů je rozloženo pomocí lysozomů.⁴ Proteiny určené k degradaci jsou označeny neboli otagovány molekulou ubiquitinu, což je protein složený ze 76 aminokyselin, kdy 7 z nich jsou lysin. Ubiquitin (Ub) se k proteinu váže izopeptidickou kovalentní vazbou mezi karboxylovou skupinou glycinu Ub a obvykle ϵ -amino skupinou lysinu na daném proteinu. Podobná izopeptidická vazba se dále vytváří mezi karboxylovou skupinou Ub a mezi ϵ -amino skupinou lysinu jiného Ub a dojde k tvorbě polyubiquitinového řetězce. Tvorba izopeptidické vazby probíhá ve třech po sobě jdoucích reakcích, které jsou katalyzovány enzymem aktivujícím ubiquitin (E1), enzymem konjugujícím ubiquitin (E2) a ubiquitin-protein ligázou (E3).⁵ Bylo zjištěno, že existuje pouze jeden známý E1, naproti tomu je až desítky známých enzymů E2 a stovky enzymů E3. Tento vyšší počet enzymů E2 a E3 pravděpodobně umožňuje více specifických interakcí.^{6,7} Po vytvoření polyubiquitinového řetězce dostane proteasom 26S signál k degradaci otagovaného proteinu.⁵

UPS se podílí na mnoha pochodech. Reguluje například buněčný cyklus, kdy UPS zajišťuje, aby buňky opustily cyklus mitózy. Hraje také zásadní roli při regulaci NF- κ B (nukleární faktor kappa B) dráhy. NF- κ B je skupina transkripčních faktorů, které jsou důležité

pro imunitu, zánětlivou odpověď a buněčný vývoj a smrt. Při poškození těchto drah může dojít ke vzniku rakoviny, astmatu či různých srdečních onemocnění.⁴

UPS hraje roli také například v zánětlivých odpovědích, podílí se na degradaci špatně složených proteinů v endoplazmatickém retikulu atd.^{4,5}

1.3 Inhibitory proteasomu

Normální zdravé buňky vytvářejí proteiny a ty, které jsou poškozené nebo nepotřebné, se zase rozkládají v proteasomu.⁸ Inhibitory proteasomu (IP) nebo také inhibitory Ubiquitin-proteasomového systému jsou obecně látky schopné inhibovat aktivitu proteasomu a zvýšit díky tomu obsah proteinů v něm. Dlouhodobý stres způsobený inhibicí proteasomu vede k zástavě buněčného cyklu a hromadění proteinů v proteasomu, což má za následek porušení homeostázy a buňka je tak nucena indukovat apoptózu.^{7,9} Proteiny vytváří i rakovinné plazmatické buňky ale v mnohem větším množství, proto jsou tyto buňky mnohonásobně citlivější na proteasomální inhibici.⁸ Tohoto přístupu se využívá hlavně pro léčbu mnohočetného myelomu (MM).

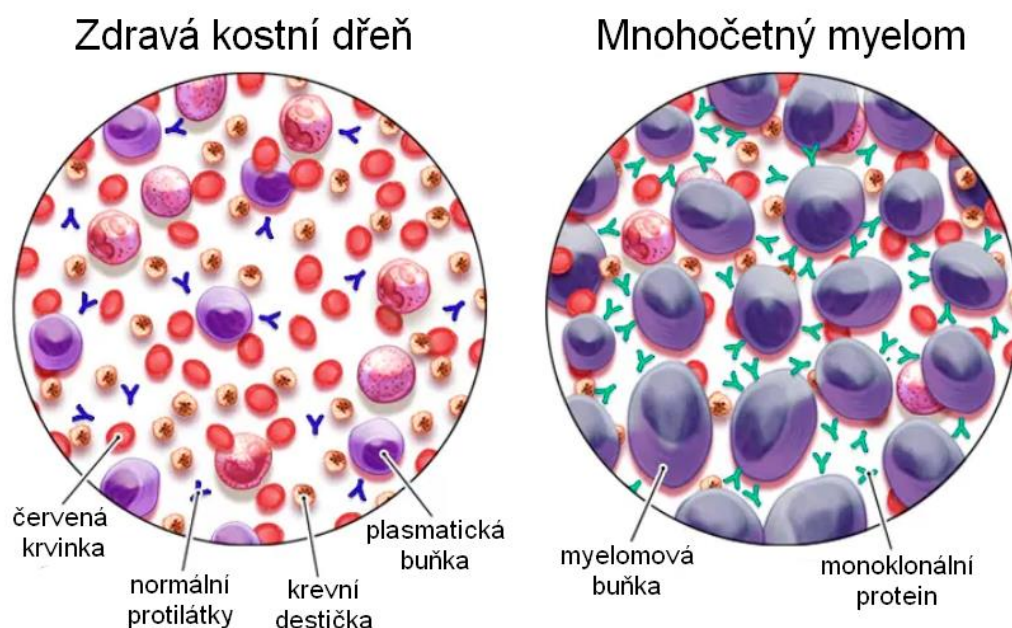
Největší skupinou IP jsou krátké peptidy zakončené funkční skupinou, pomocí které se vážou na aktivní místo v proteasomu a díky tomu tak zabraňují jeho správnému fungování.⁹ Vazba může být buď reverzibilní (bortezomib, ixazomib), kdy dochází k tvorbě jedné kovalentní vazby, které se ale po určitém čase přeruší a proteasom se tak vrátí k plnění své původní funkce, nebo ireverzibilní (carfilzomib, oprozomib), kdy dochází k tvorbě dvou kovalentních vazeb a inhibice zde trvá mnohem déle, kvůli obtížnému zpětnému uvolnění proteasomu. To nastane až tehdy, když dojde k vyloučení carfilzomibu (či jiného ireverzibilního IP) z těla a vytvoří se nový proteasom.⁸

Poměrně novým trendem jsou také inhibitory DUBů, kdy první generace těchto inhibitorů je v klinickém testování.¹⁰ Dalšími takovými jsou například i inhibitory USP7/HAUSP, které jsou studovány díky své úloze při obnově funkce p53, což je protein, který funguje jako transkripční faktor a v buňce plní roli senzoru poškození DNA.⁴

1.4 Mnohočetný myelom

Mnohočetný myelom (**Obrázek 3**) je maligní nádorové onemocnění diferencovaných plazmatických buněk, kdy je kostní dřev infiltrována klonálními plazmatickými buňkami a monoklonálním proteinem v séru a v moči. Je to druhé nejčastější nádorové hematologické onemocnění po non-Hodkinově lymfomu. Průměrný věk postižených lidí je okolo 65 let.

Mnohočetný myelom (MM) vykazuje hodně různorodých příznaků, které se u spousty pacientů liší. Nejčastějším příznakem jsou bolesti kostí, kdy nejvíce bolestivé místo bývá místo v oblasti bederní páteře. Dále se může MM projevit i osteolýzou (úbytek kostní tkáně) některé kosti v těle, což má za následek hyperkalcémii, kdy dochází ke zvýšení hladiny vápníku v séru. Dalšími projevy je i porucha imunity, anémie nebo renální insuficience (narušení funkce ledvin, které nejsou schopné v dostatečné míře očistit krev od nepotřebných látek).^{11,12,13}

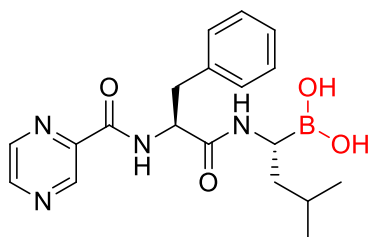


Obrázek 3: Porovnání zdravé kostní dřeně a dřeně s mnohočetným myelomem¹⁴

1.5 Klinické inhibitory proteasomu

Za posledních několik desítek let bylo do klinické praxe uvedeno široké spektrum peptidických i dalších inhibitorů proteasomu. Ať už se jedná o peptidické boronáty, kam patří například bortezomib, delanzomib a ixazomib, dále peptidické epoxyketony, které zastupují carfilzomib a oprozomib, peptidické aldehydy (MG132), nepeptidické β -lactony (marizomib) a další. Jednotliví zástupci jsou více popsáni níže.⁴

1.5.1 Bortezomib



Bortezomib byl uveden jako první na trh pod obchodním názvem Velcade[®] firmou Millennium Pharmaceuticals a jeho kódové označení je PS-341. V USA byl schválen v roce 2003 a v Evropě o rok později pro léčbu

relapsu mnohočetného myelomu a lymfomu z pláštěvých buněk, což je agresivní a vzácná forma non-Hodkinova lymfomu. Ovšem nedávné výzkumy ukázaly, že bortezomib v kombinaci s dalšími protirakovinnými látkami dexamethasonem a ledalidomidem poskytují další benefity v léčbě.¹⁵ Pomocí něj dochází ke stabilizaci dvou důležitých negativních regulátorů buněčného cyklu p53 a p27^{KIP1}. Také potlačuje signalizaci NF-κB tím, že brání degradaci IκB a generování NF-κB podjednotek p50 a p52 z jejich prekurzorů p105 a p100.⁴

Při interakci s proteasomem (**Schéma 1**) tvoří bortezomib, a to konkrétně boronát, tetraedrální adukt s *N*-koncem Thr1 katalytické β podjednotky proteasomu. Ten je dále stabilizován vodíkovou vazbou, která se tvoří mezi OH skupinou bortezomibu a NH₂ skupinou Thr1. Proto, i přestože je bortezomib reverzibilní inhibitor, je rychlost disociace velmi malá.^{4,16}

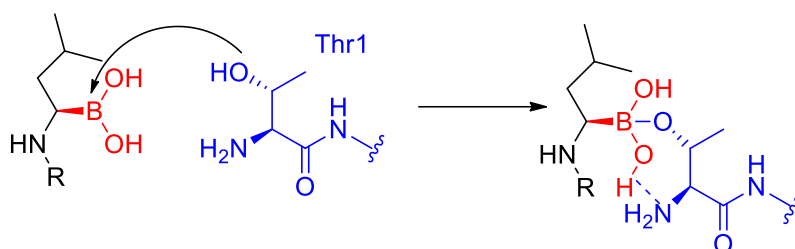


Schéma 1: Mechanismus reakce boronátu s Thr-1

Níže (**Schéma 2**) je uveden příklad syntézy bortezomibu popsán v patentu z roku 2020. Syntéza vychází z *L*-fenylalaninu (**1**), který je esterifikován na isopropylester (**2**) pomocí isopropylalkoholu (IPA) a thionylchloridu. Následuje couplingová reakce s pyrazin-2-karboxylovou kyselinou (**3**) za přítomnosti 2-(1*H*-Benzotriazol-1-yl)-1,1,3,3-tetramethylaminium tetrafluoroborátu (TBTU) a diisopropylethylaminu (DIPEy) a dále hydrolýza na kyselinu (**5**). Následuje další coupling se solí (**6**), kdy vzniká borol (**7**), který se podrobí finální reakci s isobutylboronovou kyselinou, což poskytne bortezomib.¹⁷

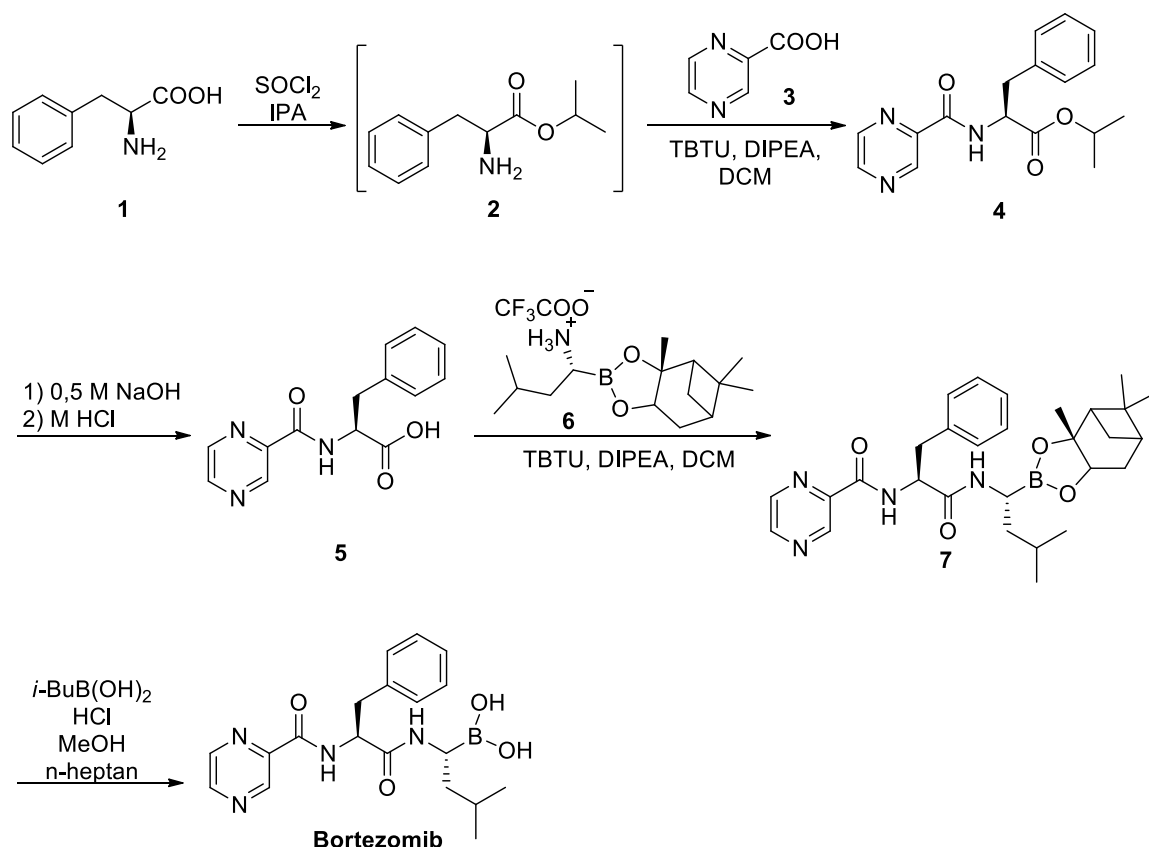
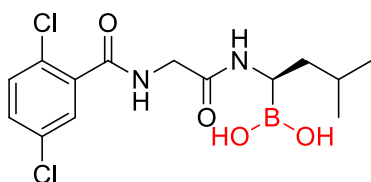


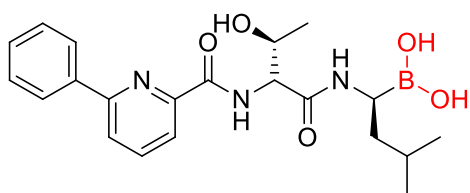
Schéma 2: Syntéza bortezomibu

1.5.2 Ixazomib



Ixazomib byl schválen v roce 2015 pod obchodním názvem Ninlaro[®] jako první orálně podávaný IP, na rozdíl od bortezomibu a carfilzomibu které jsou podávány intravenózně a subkutánně. Jeho účinek je srovnatelný s účinkem bortezomibu, kdy se váže reverzibilně na chymotrypsinová, trypsinová a kaspázová místa. Poločas rozpadu je ale ve srovnání s bortezomibem o poznání kratší (18 min. ixazomib, 110 min. bortezomib), což má za následek rychlejší obnovení proteasomové aktivity.¹⁸

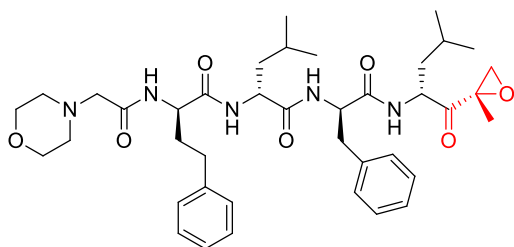
1.5.3 Delanzomib



Delanzomib označovaný také jako CEP18870 je další boronátový ireverzibilní orálně podávaný IP momentálně se nacházející ve 2. fázi klinického testování.¹⁹ Při testování prokázal lepší vazbu na $\beta 1$ a

$\beta 5$ podjednotky v porovnání s ekvivalentní dávkou bortezomibu, kdy došlo k 86% inhibici chymotrypsinové a kaspázové aktivity na rozdíl od 46% inhibice bortezomibu. Navíc opět v kombinaci s dexamethasonem a/nebo lenalidomidem dochází ke zpomalení růstu nádorů.²⁰

1.5.4 Carfilzomib



Carfilzomib (Kyprolis[®], PR-171) je druhý schválený IP obsahující epoxyketonovou skupinu. Ukázalo se, že je mnohem specifičtější než bortezomib s velmi malou až žádnou aktivitou mimo proteasom. Kromě cílení na $\beta 5$ podjednotku také cílí na $\beta 5i$ podjednotky v imunoproteasomu, které jsou zřejmě přednostně exprimovány u mnohočetného myelomu.⁴

Mechanismus účinku epoxyketonů (**Schéma 3**) je následující. V prvním kroku reaguje karbonylová skupina epoxyketonu s hydroxylovou skupinou Thr1 za vzniku hemiketalového meziproductu. Následně α -NH₂ nukleofilně atakuje C₂ na epoxidovém cyklu za vzniku stabilního morfolinového cyklu.^{4,16}

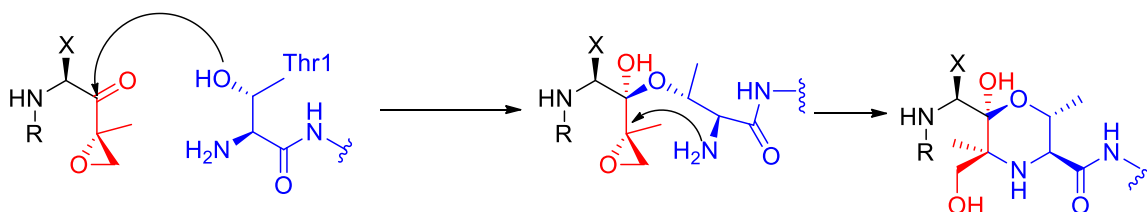


Schéma 3: Mechanismus reakce epoxyketonu s Thr-1

Syntéza carfilzomibu je znázorněna na **Schématu 4**. Jako výchozí látka je použit Boc-*L*-Leu (**8**), který se podrobí reakci s *O*-Bn-*L*-Phe (**9**) a následuje ochrání chránicí Boc skupiny pomocí trifluoroctové kyseliny (TFA). Na řadu přichází další reakce s *N*-Boc-homofenylalaninem (**12**) a opět ochrání Bocu. Předposlední coupling je s morfolinovým fragmentem (**15**), kdy se získá tripeptidický ester, který se pomocí H₂ a Pd/C převede na kyselinu a ve finálním kroku již zbývá jen reakce s leucinovým epoxyketonem (**18**), což poskytne žádaný carfilzomib. Leucinový epoxyketon (**18**) je připraven z 2-brompropenu a Boc-*L*-Leu weinrebamidu (**21**) a vzniklý vinylketon (**20**) je následně oxidován na epoxid (**19**). Tato reakce ovšem poskytne směs diastereoizomerů, které jsou od sebe izolovány sloupcovou chromatografií.²¹

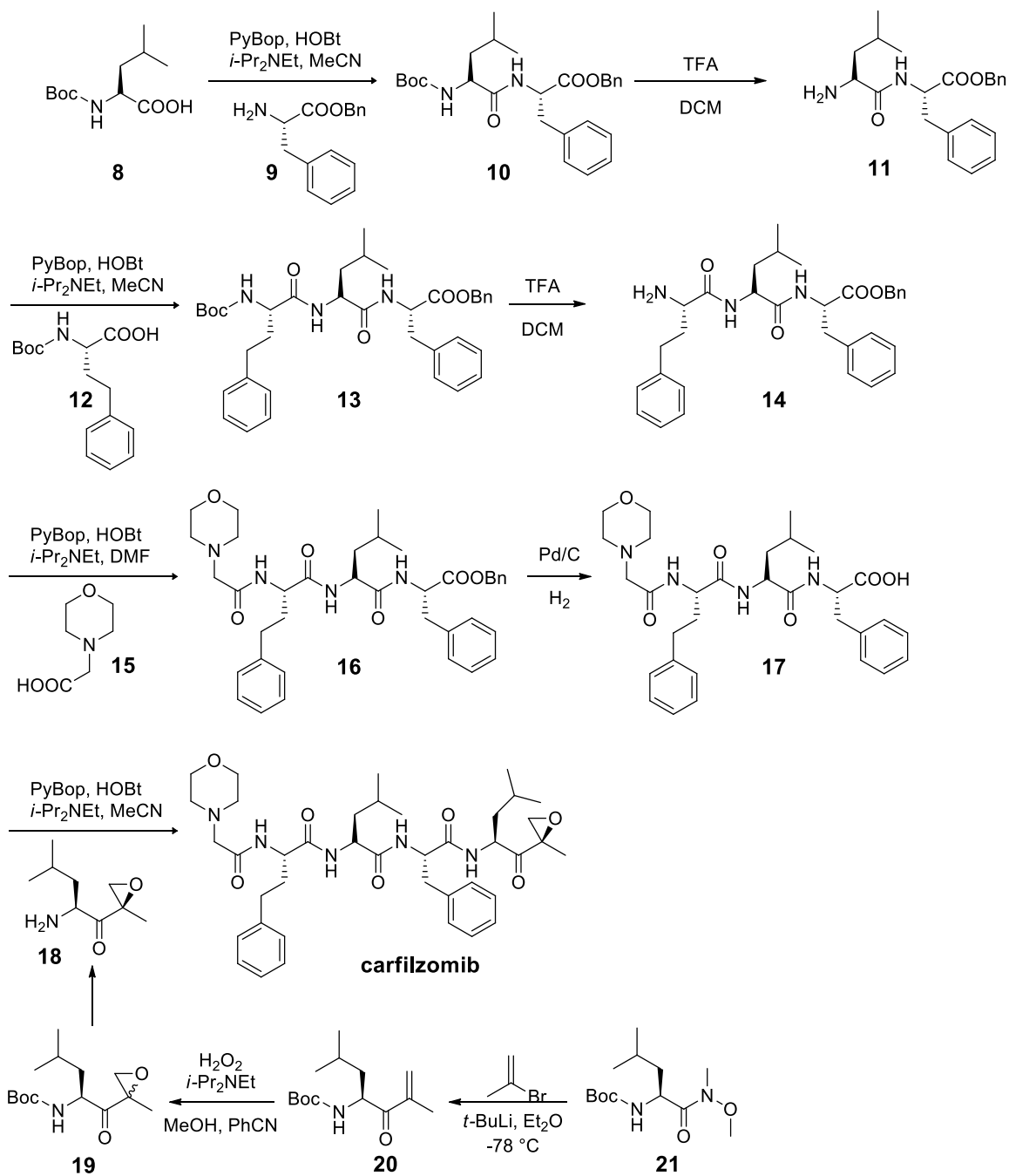
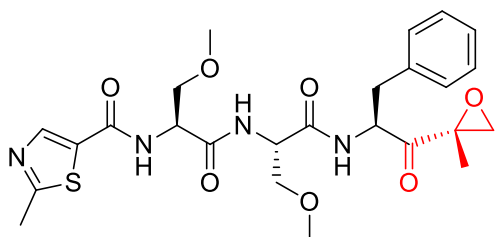


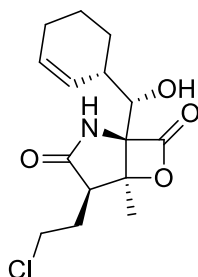
Schéma 4: Syntéza carfilzomibu

1.5.5 Oprozomib



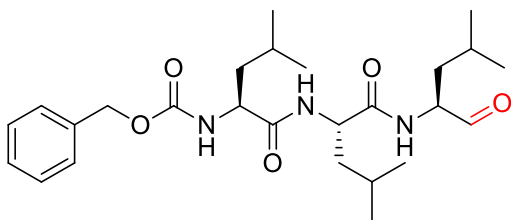
Oprozomib (ONX-0912, PR-047) je další peptidický epoxyketon, který se ale stále nachází v klinickém testování. Výhodou je, že se podává perorálně, a i přes to vykazuje ekvivalentní protinádorovou aktivitu jako intravenózně podávaný carfilzomib.^{4,22}

1.5.6 Marizomib



Marizomib nebo též také salinosporamid A je přírodní produkt izolovaný z mořských bakterií aktinomycet, a to konkrétně ze *Salinospora tropica* a nachází se stále ve fází testování jako nový potencionální orálně podávaný IP, který inhibuje ireverzibilně. Jeho struktura je ale zcela odlišná od ostatních zde uvedených zástupců. Obsahuje β -laktamový- γ -laktonový bicyklický kruh bez bočního peptidického řetězce. Marizomib v porovnání s bortezomibem efektivněji vyvolává apoptózu v rakovinných buňkách mnohočetného myelomu, zatímco jeho toxicita vůči zdravým buňkám je nižší. Naneštěstí se u něj prokázaly nežádoucí účinky, jako jsou například halucinace, zmatenost a nejistá chůze.¹⁸

1.5.7 MG132



MG132 je peptidický aldehyd původně extrahovaný z čínské rostliny. Velice účinně blokuje proteolytickou aktivitu proteasomu 26S, kde působí na chymotrypsinová aktivní místa.^{21, 22, 23, 24} Byl to první více používaný IP, ale nakonec byl nahrazen více specifickým, stabilnějším a účinnějším epoxyketonem.²⁵

U aldehydů (**Schéma 5**) dochází k ataku karbonylu hydroxylovou skupinou za vzniku poloacetalového uspořádání.¹⁶

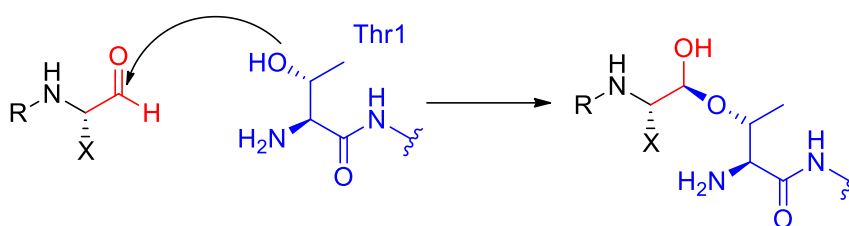
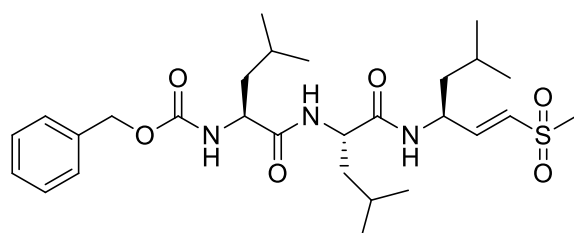


Schéma 5: Mechanismus reakce aldehydu s Thr-1

1.5.8 Vinylsulfony



Peptidické vinylsulfony jsou skupina látek, které inhibují proteasom ireverzibilně na rozdíl od aldehydů a boronových kyselin prostřednictvím Michaelovy reakce (**Schéma 6**). V roce 1997 byla popsána

sloučenina CBZ-L-Leu-L-Leu-L-Leu-VS, která interaguje v Thr1 a inhibuje tak aktivitu proteasomu. I přes to, že vinylosulfony nejsou používány v klinické praxi, stále slouží jako standart pro porovnávání aktivit s jinými látkami.²⁶

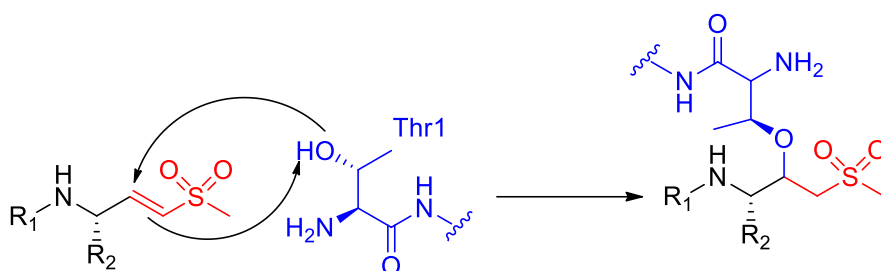


Schéma 6: Mechanismus účinku vinylosulfonu prostřednictvím Michaelovy adice

1.6 Syntéza peptidického řetězce

Inhibitory proteasomu můžeme rozdělit podle postranního řetězce na peptidické (bortezomib, oprozomib atd.) a nepeptidické (marizomib). V práci se zaměříme na peptidické inhibitory, a v této kapitole konkrétně na syntézu peptidického řetězce.

První peptid byl syntetizován v roce 1901 Emilem Fischerem, za což získal Nobelovu cenu. Jednalo se konkrétně o dipeptid glycin-glycin. Díky tomu zavedl termín jako „peptidová vazba“ a „peptid“, proto se považuje za zakladatele peptidické chemie. Dalším milníkem bylo o přibližně 30 let později objevení chránící benzyloxykarbonylové skupiny (CBZ).²⁷

Peptidický řetězec lze připravit dvěma způsoby z hlediska syntézy. V roztoku (SPS) anebo v pevné fázi (SPPS), kdy metoda v pevné fázi je již v dnešní době používána jako majoritní metoda při přípravě malých či středně velkých peptidů. Pro přípravu velkých peptidů anebo malých proteinů se používají hybridní metody.^{27,28}

1.7 Příprava v roztoku (SPS)

Tato metoda je založena na klasické reakci dvou aminokyselin v roztoku, kdy spolu reaguje NH_2 skupina jedné AMK s karboxylovou skupinou druhé AMK za vzniku peptidické vazby. Pro syntézu dlouhých peptidů je možné využít metodu fragmentů, kdy se nejprve syntetizují kratší fragmenty a ty se poté spojí za vzniku dlouhého peptidu. Hlavní výhodou této metody je, že jednotlivé meziprodukty mohou být odchráněny a purifikovány, čímž se dosáhne velice čistého finálního produktu. Další výhodou je, že SPS může být snadno převedena do větších reakčních objemů. Nevýhodou jsou dlouhé reakční časy.²⁸

Na **Schématu 7** je znázorněn obecný postup přípravy peptidů v roztoku, kdy spolu reagují dvě aminokyseliny. Jedna aminokyselina je na N-konci ochráněna chránicí (PG) skupinou a druhá AMK je ve formě esteru. Dochází ke vzniku peptidové vazby a následuje odchránění PG skupiny. Následuje opět reakce dipeptidu s N-ochráněnou AMK za vzniku tripeptidu. Tyto dva kroky, a to spojení AMK a odchránění PG skupiny, se opakují tak dlouho, dokud nezískáme peptid s požadovanou délkou řetězce.²⁹

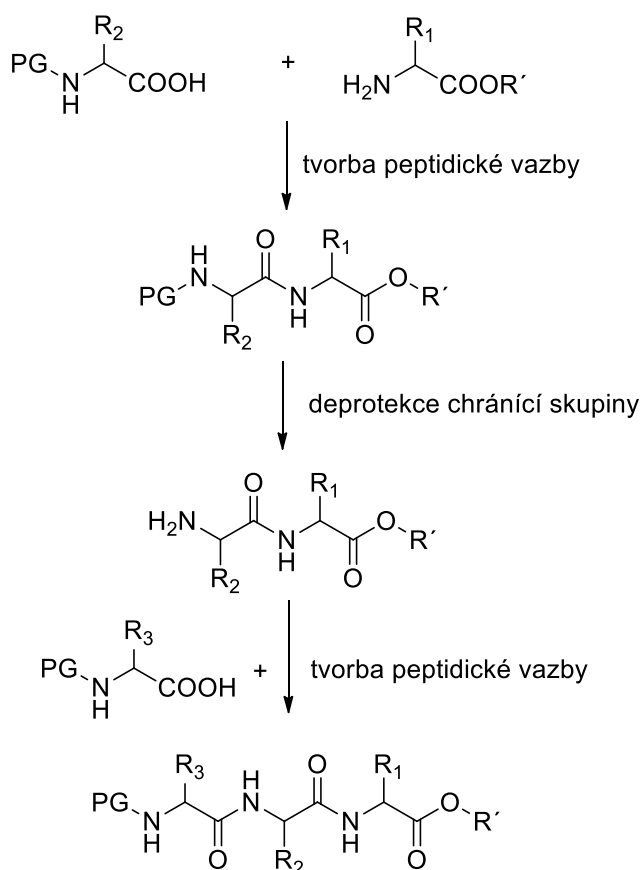


Schéma 7: Obecný postup přípravy peptidů v roztoku

Nejčastěji se tato metoda používá v technologii k produkci krátkých až středně dlouhých peptidů v produkci stovky kilogramů až tun ročně. Mezi takové produkty patří například inhibitory ACE, oxytocin, aspartam atd.²⁹

1.8 Příprava v pevné fázi (SPPS)

Tato metoda je v současnosti nejvyužívanější metodou pro syntézu peptidů jak v laboratoři, tak i v průmyslu díky její automatizaci. Poprvé ji představil profesor Bruce Merrifield, který za ni také o pár let později v roce 1984 obdržel Nobelovu cenu za rozvoj metodologie chemických reakcí na pevných matricích.^{27,30}

Syntéza peptidů touto metodou probíhá od C-konce k N-konci, naproti tomu syntéza ribozomových proteinů probíhá naopak od N-konce k C-konci. Na začátku je aminokyselina ukotvena na polymerním pevném nosiči. Ten je ve formě malých pevných kuliček velkých v řádech milimetrů, které na svém povrchu obsahují malé organické skupiny zvané „linkery“.

27,31

SPPS metoda je první volbou při přípravě peptidů, a to právě díky její automatizaci. Ačkoli i metoda přípravy peptidů v kapalné fázi může být také užitečná při tvorbě většího

množství daného peptidu. Tvorba peptidů metodou SPPS je ve většině případů ať už z části nebo kompletně zautomatizovaná. Protože syntéza peptidů zahrnuje spoustu opakujících se kroků, tato metoda má mnoho výhod. Může být použit velký přebytek činidel ve vysoké koncentraci při kopulačních reakcích. Nezareagovaná činidla a vedlejší produkty jsou poté odseparovány od nerozpustného peptidu filtrací a promytím a všechny kroky tak mohou být uskutečněny v jedné reakční nádobě, aniž by se reakční směs musela přenášet jinam.³¹

Princip metody je znázorněn na **schématu 8**. Nejprve probíhá ukotvení první AMK na linker pomocí kovalentní vazby mezi karboxylovou skupinou AMK a NH₂ skupinou linkeru. Tím je zároveň i ochráněna karboxylová skupina a nemůže tak dojít k nežádoucím reakcím. Následuje budování peptidického řetězce, kdy se střídá ochránění N-chránící skupiny a připojení další AMK až do požadované délky řetězce. Nosič je mezi každým krokem promýván. Ve finálním kroku dochází k uvolnění peptidu z nosiče vhodným činidlem (například kyselinou trifluoroctovou). Zároveň je nutné vychytávat vysoce reaktivní karbokationty, které vznikají při finální procesu štěpení a byly by odpovědné za vznik nežádoucích produktů.^{27,28,31}

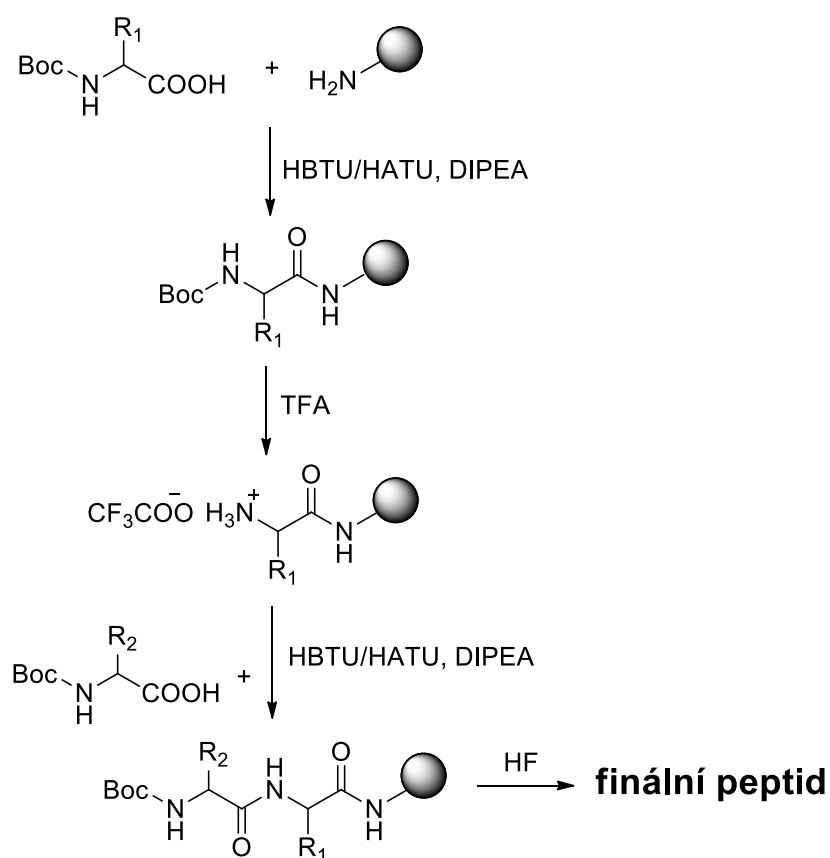


Schéma 8: Obecný postup metody SPPS

1.8.1 Nosiče

Rozlišujeme 3 základní typy nosičů podle typu polymeru.

- Polystyrenové nosiče (PS) – Tento nosič se také nazývá „Meffifield resin“ podle jeho vynálezce. Používají se při přípravě převážně krátkých a středně dlouhých peptidů. Tento nosič se většinou připravuje suspenzní polymerací styrenu za přítomnosti divinylbenzenu. Je to nepolární nosič a dobře bobtná v dichlormethanu (DCM), toluenu ale také i dimethylformamidu (DMF). Ovšem v případě syntéz zahrnující vysoce polární AMK či složité sekvence AMK je nutné použít hydrofilnější nosič.^{27,32}
- PS-funkcionalizované polyethylenglykolové nosiče (PS-PEG) – Do této skupiny patří například *TentaGel*, což je v posledních letech nejvíce studovaný PS-PEG nosič. Vyznačuje se vynikajícími bobtnajícími vlastnosti jak v polárních, tak i v nepolárních rozpouštědlech, které jsou kompatibilní s PEG řetězcem.^{27,33}
- Čisté zesíťované PEG nosiče (PEG) – Volba tohoto nosiče je vhodná tehdy, chceme-li připravit středně dlouhé až dlouhé peptidy, či peptidy s „obtížnou sekvencí“ AMK. Tyto polymery jsou vysoce polární a zachovávají si své vynikající bobtnající vlastnosti v polárních rozpouštědlech jako je voda, methanol, tetrahydrofuran (THF), acetonitril atd. Hlavním zástupcem této kategorie je poly(etylene glykol)-poly-(N,N-dimethylakrylamid) kopolymer (PEGA) vyvinutý M. Meldalem.²⁷

1.8.2 Linkery

Linkery jsou navázané na nosič a slouží k ukotvení první AMK. Navíc také poskytuje ochranu C-konce AMK a tím tak zamezuje nežádoucím reakcím (výjimkou je použití linkerů, které se nevážou na α -C a nechávají ho tak volný pro další modifikace). Můžeme je rozdělit podle skupiny, která se účastní vazby s první AMK.^{34,35}

1.8.2.1 Ukotvení pomocí karboxylové skupiny

Tato metoda (**Schéma 9**) je nejpoužívanější, kdy se provádí postupně ukotvení N-chráněné AMK od C-konce k N-konci. Je zde také největší výběr linkerů (**L_C**), a pomocí tohoto způsobu lze získat jak kyseliny, tak i amidy nebo alkylamidy. Výhodou je, že N-konec

finálního peptidu může být derivatizován (alkylován, acylován atd.) zatímco je stále ukotven na nosiči.³⁵

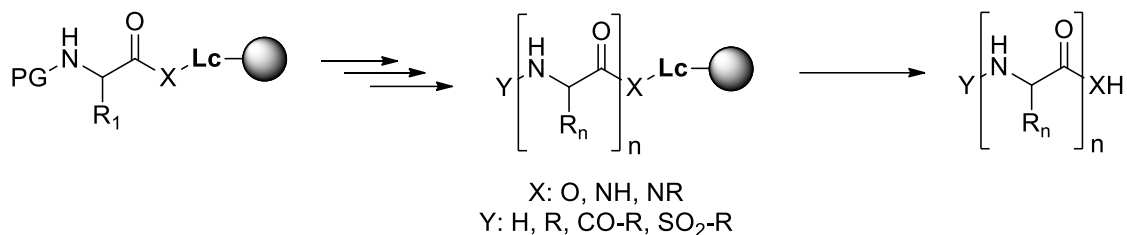


Schéma 9: Ukotvení pomocí karboxylové kyseliny

1.8.2.2 Ukotvení pomocí amino skupiny

Tento způsob ukotvení (Schéma 10) je méně běžný, někdy je označován také jako reverzní syntéza peptidů. Zde dochází k ukotvení esterů AMK pomocí aminoprotektivní skupiny karbamátového typu (L_N).³⁵

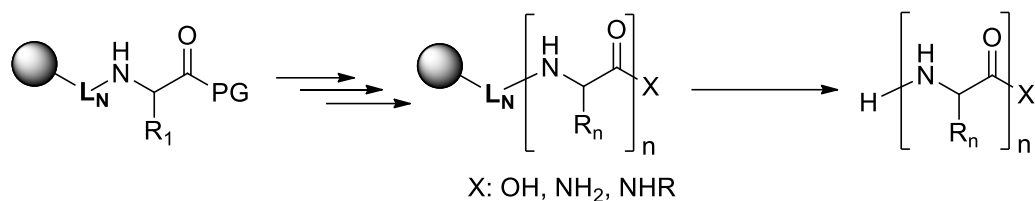


Schéma 10: Ukotvení pomocí amino skupiny

1.8.2.3 Ukotvení pomocí postranního řetězce AMK

Zvláštní způsob metody (Schéma 11), kde je vyžadována AMK s postranním řetězcem vhodným pro ukotvení.³⁵

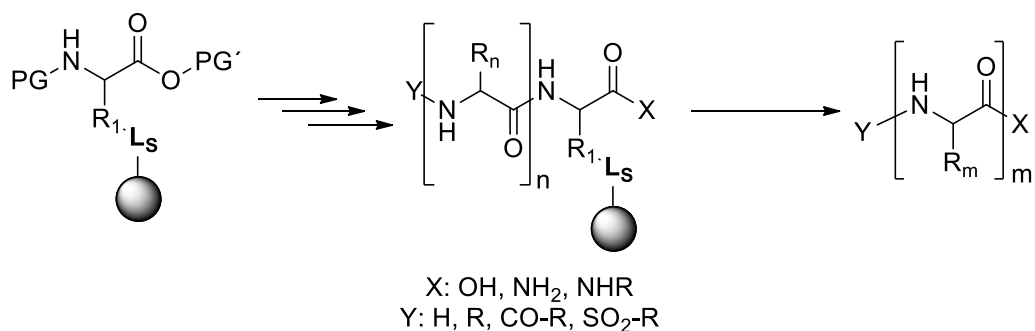


Schéma 11: Ukotvení pomocí postranního řetězce AMK

1.8.2.4 „Backbone“ ukotvení

Tento způsob (Schéma 12) umožňuje prodloužení peptidů v obou směrech. Využívá se pro přípravu peptidů s modifikovanými konci, cyklických peptidů či peptidů, které obsahují na svých koncích nepeptidickou část. Typickým zástupcem (L_B) je benzylová skupina bohatá na elektrony.³⁵

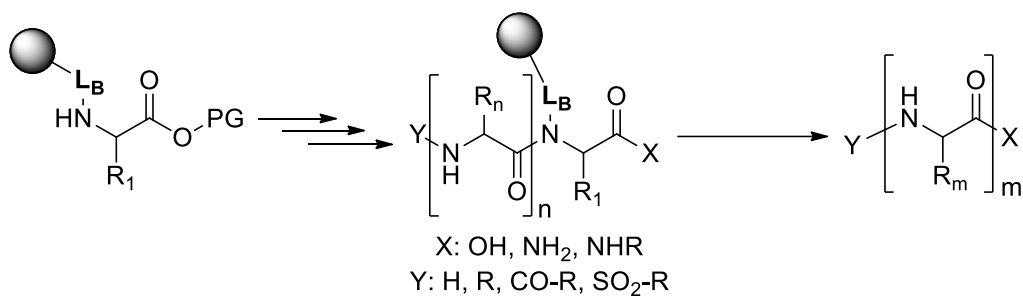


Schéma 12: "Backbone" ukotvení

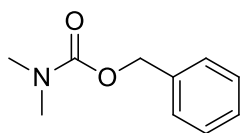
1.9 Hybridní metody

I přestože jak metoda SPS, tak SPPS jsou využitelné pro přípravu široké škály produktu, i tyto metody mají svoje limity. Ať už je to dlouhý reakční čas u SPS anebo obtížné převedení do velkého měřítka u SPPS. Proto byly vyvinuty tyto hybridní metody, které jsou založeny na nových nosičích, a to například 2-chlorotrytyl chlorid nebo SASRIN. Tyto nosiče umožňují syntetizovat fragmenty, které lze následně od nosiče oddělit bez porušení chránících skupin. Tyto fragmenty lze dále následně spojovat ať už v roztoku nebo opět v pevné fázi. Vyvinutí hybridních metod vedlo k vytvoření nového přístupu pro vývoj peptidů, který byl například úspěšně aplikován při výrobě Fuzeonu (inhibitoru fúze HIV), který se skládá ze sekvence 36 aminokyselin a vyrábí se v tunách. Obecně se prokázalo, že díky různým zlepšením je možné ekonomicky vyrábět i různé složitější peptidy v řádech stovek kilogramů nebo dokonce až v tunách.^{36,37}

1.10 Chránící skupiny

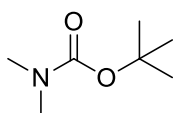
Při syntéza peptidů se hojně využívá skupin ochraňujících NH_2 skupinu před nežádoucími reakcemi. První taková chránící skupina byla objevena v roce 1932 a to karbobenzoxy skupina (CBZ nebo Z). V roce 1957 následoval objev *tert*-butyloxykarbonyl skupiny (Boc).^{27,28}

1.10.1 Benzyl karbamát (CBZ, Z)



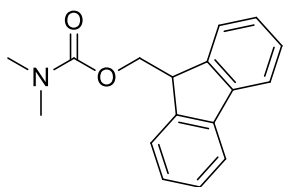
Je to jedna z nejčastěji používaných ochranných skupin i díky její snadné hydrogenolýze. Ochrana NH_2 skupiny se provádí pomocí benzyl chlorformátu za přítomnosti báze. Deprotekce je prováděna v přítomnosti H_2 za katalýzy Pd na C. Dalším možným způsobem je deprotekcí pomocí silné báze jako je například HBr v CH_3COOH .³⁸

1.10.2 Terc-butyl karbamát (Boc)



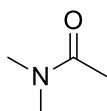
Opět jedna z nejběžněji používaných chránících skupin. Využívá se hlavně při syntéze peptidů a heterocyklů. Nejjednodušší protekce je pomocí $(\text{Boc})_2\text{O}$ v THF za mírného zahřívání na cca 40 °C. Další možností je použití opět $(\text{Boc})_2\text{O}$ za přítomnosti NaOH, toto lze ovšem využít pouze pro aminy, které nejsou stericly blokované. Deprotekce probíhá v přítomnosti silných kyselin ať už je to například 3M HCl anebo TFA.³⁸

1.10.3 9-fluorenylethyl karbamát (Fmoc)



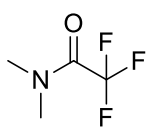
Výhodou Fmoc skupiny je, že je stabilní v kyselém prostředí, proto mohou být chránící skupiny jako Boc a skupiny na bázi benzylu odstraněny v její přítomnosti. Jedním způsobem ochrany je použití Fmoc-Cl a NaHCO_3 . Deprotekce se provádí za mírných podmínek za použití aminových bází ať už primárních (ethanolamin), sekundárních (piperidin, piperazin) anebo terciálních (TEA, DIPEA), kde ale uvolňování probíhá výrazně pomaleji. Deprotekce také probíhá výrazně rychleji v polárních rozpouštědlech jako je DMF na rozdíl od nepolárních rozpouštědel (DCM).^{38,39}

1.10.4 Acetamid



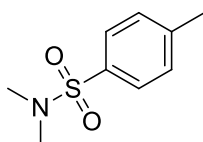
Nejjednodušší způsob ochrany je pomocí acetanhydridu nebo acetylchloridu ať už za přítomnosti báze nebo bez ní. Nevýhodou těchto reakcí je, že jsou neselektivní. Co se týče hydrolyzy, můžeme obecně říct, že alkylamidy a arylamidy jde obtížněji hydrolyzovat, proto je nutné zvolit náročnější podmínky. Lze použít například 1,2 M HCl a reakční směs refluxovat po dobu cca 9 hodin.³⁸

1.10.5 Trifluoroacetamid



Opět jedna z nejpoužívanějších chránících skupin, jejíž výhodou je stabilita vůči kyselému prostředí například při použití TFA. K protekci se používá například F_3CCOOEt , TEA v MeOH anebo $(\text{F}_3\text{CCO})_2\text{O}$, pyridin v DCM. Deprotekce probíhá za mírných podmínek z bazického prostředí například pomocí K_2CO_3 nebo Na_2CO_3 v MeOH.³⁸

1.10.6 p-toluensulfonamid (Ts)



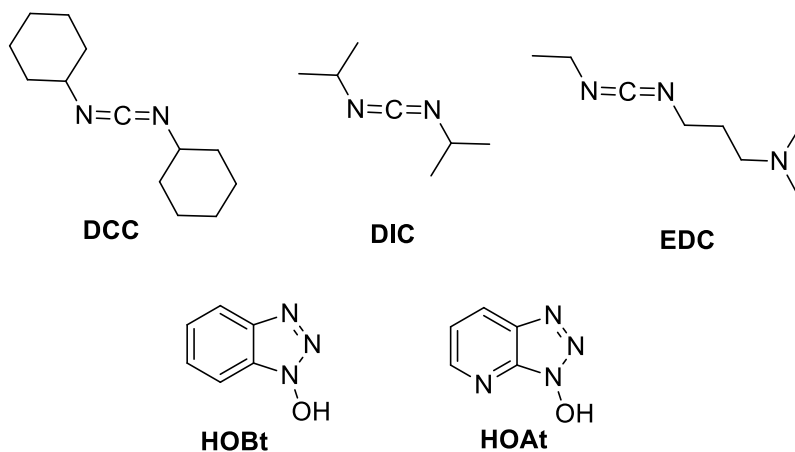
Sulfonamidy jsou obecně jedny z nejstabilnějších chránících skupin. p-toluensulfoamidová skupina je odolná vůči hydrogenaci, kyselému i

bazickému prostředí, což z ní dělá skvělou chránicí skupinu. Na druhou stranu je složité ji odstranit. K deprotekcí se často používá roztok Na nebo Li v NH₄OH. Dalším způsobem je použití LiAlH₄ v toluenu.⁴⁰

1.11 Tvorba peptidické vazby

Peptidická vazba vzniká reakcí amino skupiny jedné AMK s karboxylovou skupinou druhé AMK. Aby ovšem tato reakce proběhla, je nutné kyselinu aktivovat. Budování řetězce se provádí dvěma způsoby, a to buď postupným připojováním aminokyselin nebo spojováním větších „building“ bloků.³⁶

Nejčastějšími činidly (**Obrázek 4**) pro aktivaci kyselin jsou sloučeniny na bázi karbodiimidů, kam patří například dicyklohexylkarbodiimid (DCC), diisopropylkarbodiimid (DIC) nebo 1-ethyl-3-(3'-dimethylaminopropyl)karbodiimid (EDC). DIC je například preferovaný karbodiimid při SPPS metodě, jelikož vznikající močovina je dobře rozpustná v organických rozpouštědlech, jako je DCM. Abychom se vyhnuli vedlejším reakcím (*N*-acylmočovina, epimerizace atd.) je nutné přidat do směsi ještě nukleofil, a to například 1-hydroxybenzotriazol (HOBt) nebo 1-hydroxy-7-azabenzotriazol (HOAt). Tyto látky (HOBt, HOAt atd.) také vytváří s *O*-acylmočovinou aktivovaný ester, který následně reaguje s daným aminem při laboratorní teplotě (vedlejší produkt je močovina). Přídavek jedné z těchto látek také minimalizuje racemizaci daného produktu.^{27,29}



Obrázek 4: Přehled činidel používaných pro aktivaci kyselin

Při tvorbě peptidické vazby (**Schéma 13**) nejprve dochází k reakci chráněné AMK s karbodiimidem (**23**) za vzniku *O*-acylmočoviny (**25**) a následuje reakce s HOBtem (**24**) (případně jiným nukleofilním činidlem zabraňujícím racemizaci), což poskytne aktivovaný

ester (27). S posledním krokem dochází již k reakci s NH_2 skupinou další AMK (28), za vzniku finálního produktu (29).

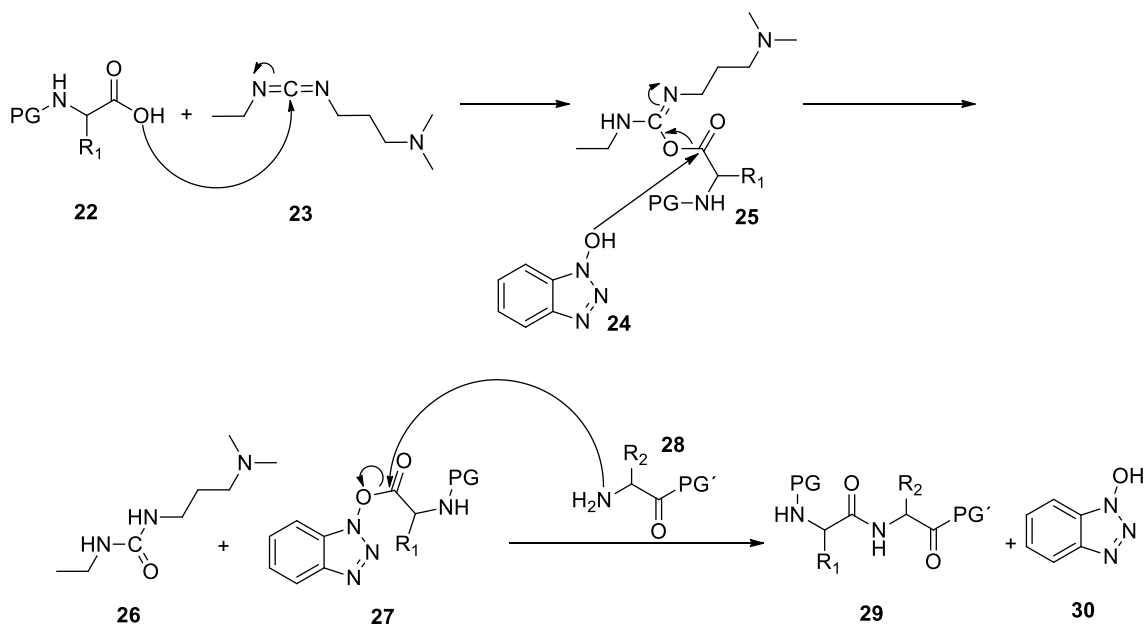


Schéma 13: Obecné schéma aktivace kyseliny pomocí EDC a HOBt a reakce s aminem

1.12 Technologie syntézy peptidů

Malé množství daného peptidu využitého pro toxikologické testy a rané fáze klinických studií se ve většině případů připravuje metodou v pevné fázi. Po provedení všech testů (včetně klinických testů fáze 2) a po stanovení optimální dávky dochází k tzv. scale-upu, tzn. k převedení syntézy do většího měřítka. Pokud převedení do většího měřítka neumožňuje po celou dobu použití metody na pevné fázi, je nutné, aby výrobní strategie zahrnovala zohlednění požadavků, které kladou jak regulační úřady, tak i zohlednění technologických problémů, které mohou nastat při scale-upu. Tato strategie musí poskytovat produkt, který je chemicky i biologicky ekvivalentní s produktem připraveným na pevné fázi a musí splňovat bezpečnostní profil stanovený jak v toxikologické, tak i klinické oblasti.^{31,36,41}

Při scale-upu nejprve dochází ke zvážení, kterou strategii přípravy využít. To znamená, jestli peptidický řetězec budovat postupně anebo přistoupit k metodě building bloků. Dále je nutné zvážit různé technické, chemické, ekonomické a bezpečnostní aspekty a jak již bylo řečeno i požadavky mající regulační úřady, které musí být zohledněny ve farmaceutické výrobě. I přes to, že všechny tyto požadavky mohou být v laboratorním měřítku opomíjeny, jakýkoliv z nich se nakonec může stát značně omezujícím při převedení do většího měřítka.³⁶

Podle délky peptidického řetězce se volí strategie jeho přípravy. U peptidů majících řetězec složený z 5 a méně AMK se volí metoda lineární (postupné budování řetězce). U delších peptidů se již přistupuje k metodě building bloků, kdy se připraví menší fragmenty a ty se pak spojují. Navíc i výběr rozpouštědla je značně limitující u dlouhých peptidů.³⁶

Při více krokové syntéze by se měla volit taková cesta, která obsahuje méně reakčních kroků a tím pádem poskytne větší výtěžky než cesta s více kroky (a stejnými výtěžky v každém kroku). Ovšem existují i výjimky, kdy vícekroková syntéza poskytuje ve finálně lepší celkový výtěžek než méně kroková syntéza. Zde je ovšem třeba zvážit celkový ekonomický dopad z důvodu větší náročnosti ať už časové či materiální.³⁶

Jak již bylo řečeno výše, při přípravě peptidů se vybírá ze dvou přístupů. Metoda building bloků se volí u složitějších a delších peptidů. A to proto, že je snadnější udělat více chyb při vytváření takto dlouhého řetězce. Proto udělá-li se chyba při přípravě krátkého building bloku, je to menší ekonomická ztráta, než pokud by se udělala chyba například v posledním kroku dlouhého peptidu a celá šarže by tak byla ztracena.^{36,41}

U large scale syntéz by se měly také volit vhodné podmínky. Například chlazení reakčních směsí na teploty $-30 - -70$ °C vyžaduje další vybavení pro chlazení a ohřev, které je drahé. Navíc se prodlužují reakční doby, což omezuje zařízení pro použití v dalších reakcích. Takové podmínky se ale naštěstí při syntéze peptidů moc nevyužívají. Běžné reakční teploty bývají od -20 do $+100$ °C. I další podmínky jako suchá rozpouštědla, práce pod inertem, dlouhé reakční časy atd. vyžadují speciální zařízení. Ale ani ty se při těchto reakcích moc nevyskytují.³⁶

Dalším problémem může být izolace meziproduktů, které jsou upřednostňovány spíše ve formě krystalů než olejů. Izolace se provádí dvěma způsoby. Tím prvním je krystalizace, která má řadu výhod. Je snadno převeditelná z malého do velkého měřítka, je rychlá a méně pracná i přes to, že najít vhodnou metodu vyžaduje často hodně práce. Druhým způsobem je chromatografie, která je pracná a náročná na množství použitých chemikálií. Ovšem v některých případech je vhodné tuto metodu zvolit z důvodu vysoké čistoty výsledného produktu, která je jinak těžko dosažitelná jinými metodami.

Dále při scale-upu mohou nastat tyto problémy:

- Použití kovových reaktorů, kdy do reaktoru není příliš vidět na rozdíl od skleněných aparatur v laboratorním měřítku

- Použití vysoušedla (bezvodého Na_2SO_4) vyžaduje další operace, jako je filtrace a manipulace s dalšími rozpouštědly
- Vysrážené či zahuštěné produkty se hůře převádí z reaktoru než z baňky
- Jelikož jsou některé operace časově náročnější ve velkém měřítku (např. odpařování na RVO), může zde docházet i k vedlejším reakcím z důvodu delší časové náročnosti, které jsme jinak v laboratorním měřítku nepozorovali.³⁶

1.12.1 Zařízení pro přípravu metodou SPPS

Klasický reaktor pro přípravu peptidů metodou SPPS se skládá pouze z válcovité nádoby opatřené fritou a víčkem s míchadlem. Pryskyřici lze míchat také probubláváním dusíku, ale to vyžaduje složitější zařízení. Při volbě velikosti reaktoru je nutné vzít v úvahu bobtnání pryskyřice, kde platí pravidlo, čím delší peptid, tím větší nabobtnání. Na **obrázku 5** je zobrazeno zařízení SPPS pro syntézu peptidů v malém měřítku, **obrázek 6** naopak ukazuje metodu SPPS za použití velkých objemů látek sloužící pro produkci až kilogramů produktu.³⁶

Na začátku každého cyklu spojování AMK, uvolnění peptidu z nosiče či promývání, musí být pryskyřice a roztok důkladně promíchány, poté následuje pomalé míchání nebo třepání po zbytek procesu. Je třeba dávat pozor na kuličky nosiče ulpívající na stěně nádoby a v případě potřeby je ze stěny spláchnout malým množstvím rozpouštědla. Rozpouštědlo se poté odfiltruje mírným odsáváním nebo za použití malého tlaku inertního plynu.³⁶

Při kontinuálním způsobu je pevný nosič umístěn uvnitř kolony a činidla a rozpouštědla se dovnitř čerpají čerpadlem. Použité pryskyřice musí být odolné vůči danému tlaku, který vytváří čerpadlo a zároveň si udržet konstantní objem. Standartní pryskyřice na bázi polystyrenu není vhodná kvůli jejímu již výše zmíněnému bobtnání, ale byly vyvinuty kontinuální reaktory, které berou v úvahu bobtnání pryskyřice. Komerčně dostupné jsou také plně automatizované SPPS reaktory (viz **obrázek 5**).³⁶



Obrázek 5: Automatizované SPPS pro syntézu peptidů v menším měřítku



Obrázek 6: Reaktor SPPS pro produkci v řádu až kilogramů finálního peptidu

1.12.2 Automatizace přípravy tripeptidických kyselin

V rámci této disertační práce byly připravovány takové sloučeniny, při jejichž přípravě byly použity pokročilé intermediáty. Výrobu těchto intermediátů jsme byli schopni natolik zdokonalit, aby racemizace těchto látek byla co nejmenší (molekuly obsahují více chirálních míst) a tím ji také převést do technologického měřítka ve spolupráci s firmou Apigenex s.r.o., která se zabývá přípravou peptidů metodou SPPS (**obrázek 7**). Tato firma nám připravovala tripeptidické kyseliny s řetězcem složeným z *L*-Leu a *L*-Trp napojeným na kyselinu 5-Cl-*O*-Bn salicylovou (která ji byla dodána). Tyto tripeptidické kyseliny byly následně použity na přípravu tetrapeptidických aldehydů a vinylsulfonů.

Syntéza vycházela z Fmoc-Leu-CTC resin nebo Fmoc-Trp-CTC resin s loadingem okolo 0,6 mmol/g. Couplinky probíhaly na stroji Symphony X (**obrázek 8**) běžným protokolem (0,3M roztoku aminokyseliny v DMF + oxyma; 1,5M roztok DIC v DMF; 1,5M roztok collidinu v DMF). Jeden coupling trval 2 h při RT a bylo používáno 10 ekvivalentů aminokyseliny. Stejným způsobem byl nakonec připojena i kyselina 5-Cl-*O*-Bn-salicylová. Deprotekce Fmoc chránící skupiny se prováděla 20% piperidinem v DMF. Peptid byl z resinu odštipnut směsí TFA/TIS/H₂O (V/V/V – 92,5/5/2,5). Do roztoku peptidu byla přidána čistá voda bez endotoxinů, která vysrážela peptid. Vše ostatní (ochranné skupiny...) zůstaly ve vodě. Surový peptid se rozpustil v 50% ACN/voda a čištění produktu bylo provedeno preparativním HPLC na koloně s reverzní C18 fází.



Obrázek 7: Syntéza peptidů metodou SPPS



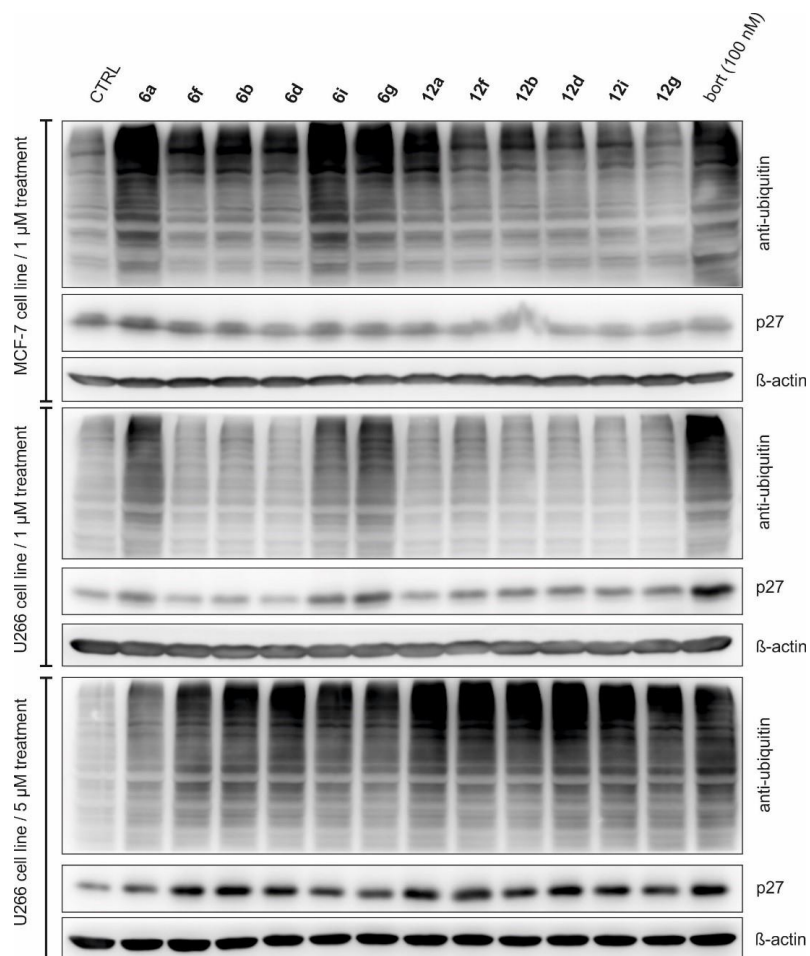
Obrázek 8: Symphony X (ilustrativní obrázek)

1.13 Biologické testování potencionálních inhibitorů

Důležitou součástí přípravy potencionálních IP je zjištění jejich biologické aktivity, tzn. do jaké míry je schopen inhibovat proteasom vůči standartu (nejčastěji se používá bortezomib). Nejvíce používanou metodou pro toto testování je použití fluorescenčně značených substrátů, které bývají použity ke sledování proteasomální aktivity v buněčných extraktech, plazmě i celých buňkách. Fluorescence je nejprve zhasena v dané molekule a uvolňuje se až při štěpení substrátu specifickým proteasomálním aktivním místem. Proto zde platí přímá úměra. Čím větší je fluorescence, tím větší je proteasomální aktivita. Již zmíněný substrát se skládá ze tří až čtyř aminokyselin připojených k fluorescenční molekule, nejčastěji 7-amino-4-methylkumarinu (AMC), 2-naftylaminu (NA), 4-methoxy-2-naftylaminu (MNA) nebo methyl-kumaryl-7-amidu (MCA). Nejvíce používaný je v tomto případě AMC, protože vykazuje největší fluorescenci. Pro měření různých katalytických aktivit (β 1, β 2, β 5) existují i různé substráty, což umožňuje měření těchto aktivit odděleně.^{42, 43}

Na **obrázku 9** je příklad měření látek publikovaných v *Bioorganic chemistry* v roce 2021. Docházelo zde k monitorování množství polyubiquitinových proteinů v buňkách MCF-7 (karcinom prsu) a U266 (mnohočetný myelom), kdy se látky aplikovaly na buňky

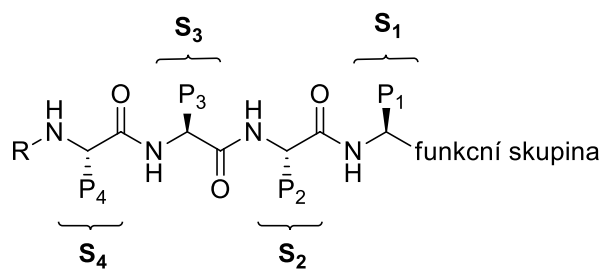
v koncentraci 1 μ M po dobu 24 hodin. Z obrázku je zřejmé, že největší aktivitu vykazovaly látky 6a, 6i a 6g.⁴⁴



Obrázek 9: Příklad biologického testování

1.14 Současné trendy v IP

Proteasom 20S obsahuje aktivní místa tzv. kapsy, kde se váže daný inhibitor. Lze tedy odvodit určité strukturální rysy, které byly použity pro návrh látek v minulosti a tyto poznatky aplikovat na nové sloučeniny. Aktivní místa (kapsy) (**Obrázek 10**) se označují písmenem „S“ a číslovají se z prava do leva od funkční skupiny, naproti tomu aminokyselinové zbytky se označují písmenem „P“ a číslování je stejné.⁴⁵



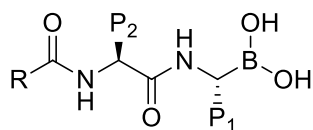
Obrázek 10: Obecná struktura peptidického inhibitoru a rozmístění aktivních míst (kapes)

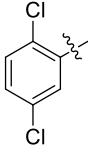

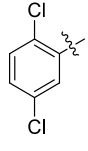

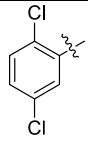

S₁ místo je umístěno hned vedle threoninu, kde probíhá vazba funkční skupiny. S₂ bývá většinou vystaveno rozpouštědlu a je to místo, pomocí kterého se dá ovlivnit rozpustnost látky či stabilita látky. Následuje aktivní místo S₃ a S₄. Ovšem místo S₁ a S₃ mají velmi odlišné katalytické vlastnosti, proto i různé zbytky P₁ a P₃ mohou výrazně změnit podjednotkovou specifitu a afinitu. Například β5c preferuje v P₁ malou hydrofóbní skupinu (např. *L*-alanin) a velkou hydrofóbní skupinu (např. *L*-tryptofan, *L*-fenylalanin) v P₃, zatímco u β5i je tomu naopak. Tak se tedy velikostí hydrofóbní skupiny ovlivňuje selektivita vůči β5c a β5i podjednotkám.⁴⁵

Jedním z přístupů při tvorbě nových molekul je modifikace již známé molekuly. Tu lze modifikovat trojím způsobem, kdy lze zvolit pouze jeden přístup či jejich kombinaci.

- Změnou funkční skupiny/zcela nová elektrofilní funkční skupina
- Změny v peptidickém řetězci
- Změny na *N*-konci molekuly

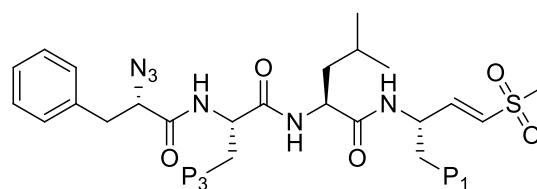
Prvním takovým příkladem je modifikace molekuly bortezomibu, kdy dochází k modifikaci jak v pozici P₁ i P₂, tak i na *N*-konci. Nejaktivnější zástupci z této série mají v pozici P₁ malý hydrofóbní zbytek *L*-Leu a v pozici R se nachází 2,5-dichlorobenzyl. Mění se tedy jen substituent P₂ (**tabulka 1**), kde jde o různě substituovaný benzyl fluorem. Tito tři nejúčinnější kandidáti vykazují o něco lepších CHT-L aktivit v porovnání v bortezomibem.⁴⁶



Látka	R	P ₁	P ₂	CHT-L IC ₅₀ μM
8f		L-Leu		1,2
8g		L-Leu		1,3
8h		L-Leu		0,9
Bortezomib				7,0

Tabulka 1: Nejaktivnější boronátové deriváty a jejich inhibiční aktivity

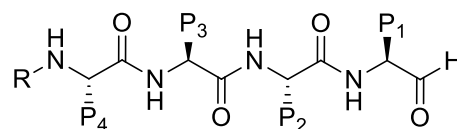
Jako další příklad lze uvést modifikaci molekuly carfilzomibu. Byla popsána studie tripeptidických látek obsahujících epoxyketonovou případně vinyl sulfonovou (VS) funkční skupinu. Jako standardy byly použity tripeptidy obsahující v P₁ a P₃ arginin. Nahrazením argininu v těchto pozicích nepřirodními deriváty fenylalaninu (**tabulka 2**) došlo ke zvýšení aktivity vůči CHT-L jednotkám. Zároveň zavedením vinyl sulfonové skupiny namísto epoxyketonové dojde ke zvýšení selektivity vůči těmto jednotkám.^{47,48}



	P ₁	P ₃	IC ₅₀ (T-L) [μM]	IC ₅₀ (CHT-L) [μM]
10			0,012	1,05
12			0,0066	8,9
13			0,0063	0,19
15			0,18	0,005
16			24	<0,004
17			24	0,01

Tabulka 2: Substituenty modifikované molekuly carfilzomibu

Nových poznatků bylo dosaženo i u peptidických aldehydů, které jsou stále velice diskutovanou kapitolou díky látce MG132 (**obrázek 11**). Bylo zjištěno, že nejvíce aktivní jsou aldehydy obsahující v místě P₃ a P₁ L-Leu nebo L-NLeu. Do místa P₂ je vhodné zavést velký aromatický zbytek jako je například L-Phe a do místa P₄ například tyrosin (Tyr).⁴⁹



Obrázek 11: MG132

Jiným přístupem je zavedení zcela nové funkční skupiny. Ta by měla být elektrofilní, aby mohla reagovat s threoninem (**schéma 14**), nacházejícím se v aktivním místě proteasomu. Tou je například furylketonová skupina, která by měla interagovat s β5 podjednotkami.⁵⁰

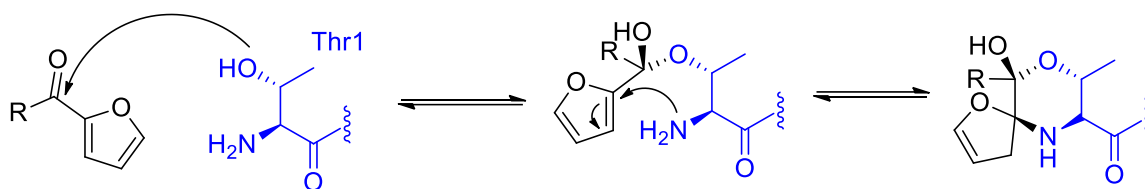
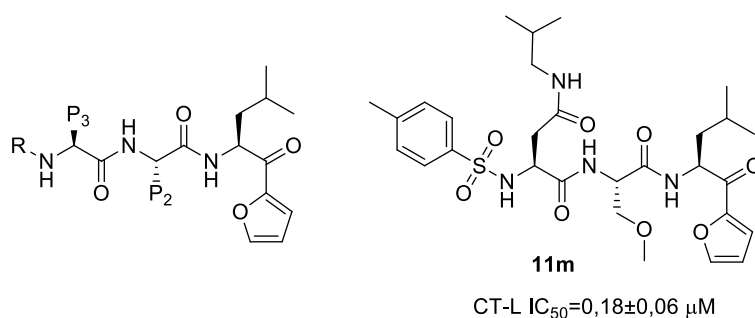


Schéma 14: Mechanismus účinku furylketonové skupiny

Pomocí studie vztahu mezi strukturou a aktivitou bylo zjištěno, že neaktivnější jsou látky (**obrázek 12**) mající v P₁ malou hydrofobní molekulu (většinou *L*-Leu), v P₂ středně velký zbytek (v případě neaktivnější molekuly **11m** CH₃-O-CH₂) a v P₃ dlouhý nerozvětvený zbytek.⁵⁰



Obrázek 12: Obecná furylketonová struktura a neaktivnější derivát 11m

Při přípravě furylketonové skupiny (**schéma 15**) se vychází z Boc-AMK-kyseliny (**31**), která se reakcí s *N,O*-dimethylhydroxylamin hydrochloridem (**32**) převede na weinreb amid (WA) (**33**) a ten následně reaguje s *n*-BuLi a furanem na Boc-AMK-furylketon (**34**). V posledním kroku dochází již pouze k deprotekcí chránící skupiny.⁵⁰

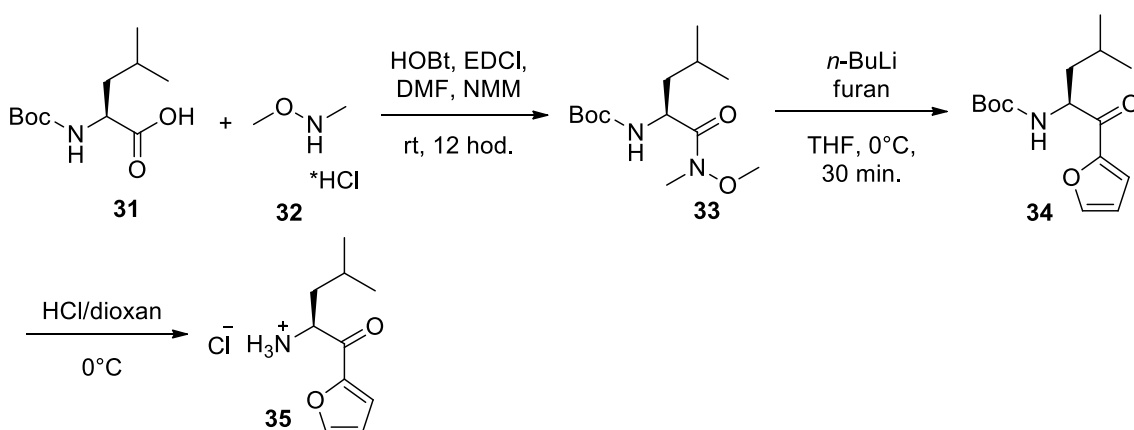
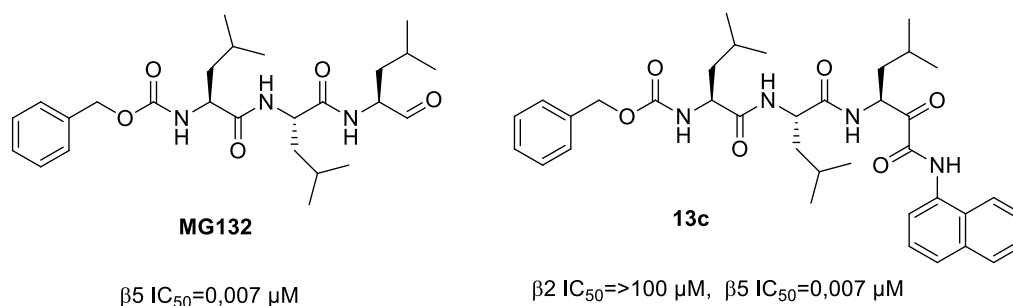


Schéma 15: Příprava furylketonového building bloku

Velice zajímavou novou funkční skupinou je i α -ketoamidická skupina. Ta je schopná vyvolat silnou reverzibilní inhibici. Modifikace byly prováděny jak v peptidickém řetězci, tak i v substituentech funkční skupiny. Nejlepší výsledky, co se týče peptidického řetězce, vykazovala látka mající v P₁-P₃ L-Leu. Substituenty α -ketoamidu jsou následně seřazeny podle jejich vlivu na aktivitu od nejvyššího po nejnižší: 1-naphthyl-NH > isobutyl-NH \approx Bn-NH > 4-F-benzyl-NH > morpholin-4-yl > tetrahydroisoquinolin-2-yl. Látka **13c** vykazuje v tomto případě největších aktivit a jedná se o modifikaci MG132 (**obrázek 13**). Její naměřené inhibiční hodnoty byly pro β 2 IC₅₀=>100 μ M, β 5 IC₅₀=0,007 μ M, kdy tato hodnota byla stejná jako pro MG132. Měření inhibiční aktivity bylo provedeno i u dipeptidické látky, ale zde došlo k jejímu výraznému snížení.⁵¹



Obrázek 13: Porovnání aktivit MG132 a neaktivnějšího α -ketoamidu 13c

Při přípravě α -ketoamidů (**schéma 16**) se vychází z ochráněné aminokyseliny (**36**), která reaguje s *N,O*-dimethylhydroxylaminem za vzniku Weinreb amidu a ten se poté redukuje na aldehyd (**37**). Následuje reakce aldehydu (**37**) a isokyanidu (**38**) ve smyslu Passeriniho reakce, která poskytuje α -hydroxyl amid. V dalším kroku dochází k deprotekcí chránící Fmoc skupiny (**39**). Následuje reakce s CBZ-aminokyselinou a v posledním kroku oxidace na finální produkt (**41**)

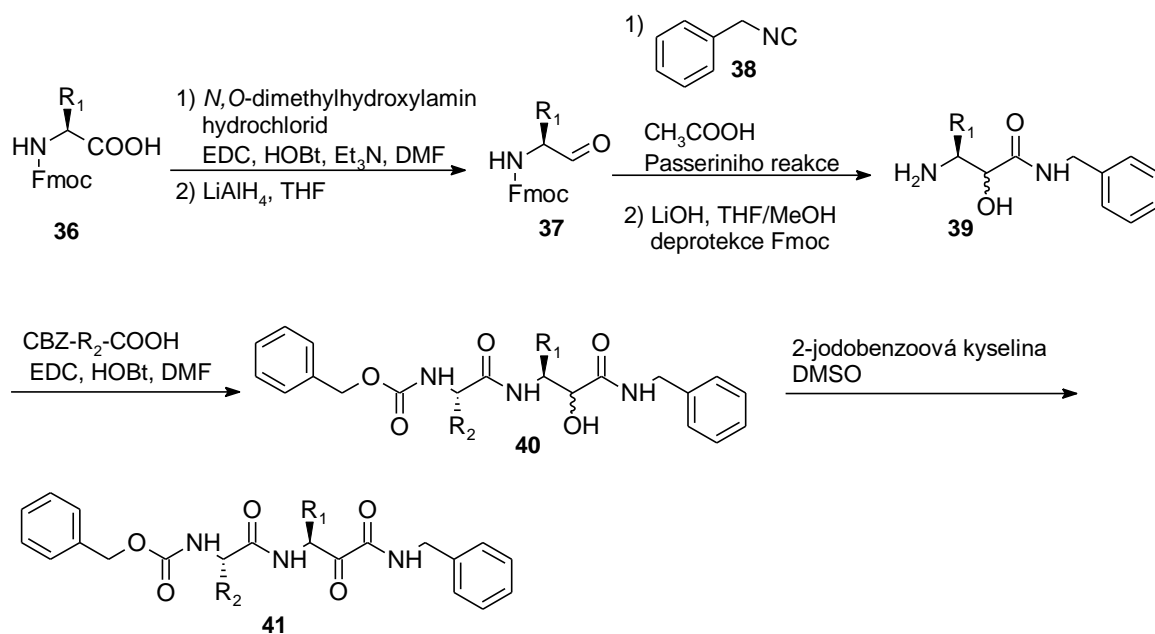


Schéma 16: Obecné schéma přípravy α -ketoamidu

Za zmínku stojí také akrylamid. Jelikož je tato skupina elektrofilní, může reagovat ve smyslu Michaelovi adice (**schéma 17**) s cysteinovým zbytkem v proteinu a vytvářet tak kovalentní vazbu. Ta má výhodu v tom, že zvyšuje trvání účinku, což umožňuje použití nižších dávek a také se tím minimalizují vedlejší účinky, které mohou vznikat působením na jiných aktivních místech.⁵²

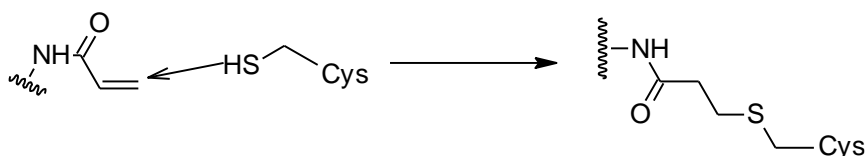
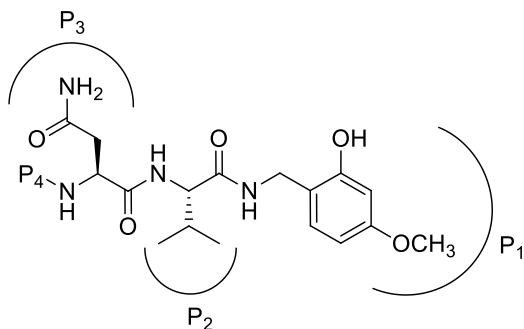


Schéma 17: Reakce akrylamidové skupiny s SH skupinou cysteinu

V dnešní době jsou schváleni 4 inhibitory proteinových kináz s touto akrylamidovou skupinou (afitinib, osimertinib, neratinib, ibrutinib). Inhibitory proteinových kináz mají za úkol blokovat přenos signálu na další molekulu tím, že blokují specifickou kinázu. Při použití těchto inhibitorů dochází tak například k blokaci prorůstových signálů, kdy dochází k zastavení růstu buňky. Blokáda může být také cílena na nádorové buňky.⁵²

Posledním přístupem je modifikace molekuly na N-konci. Zde lze zmínit studii z roku 2021, kde byla připravena série dipeptidických látek. Z celé této série 9 látek vykazovalo výraznou inhibiční aktivitu vůči chymotrypsinovým aktivním místům s hodnotami IC_{50} na submikromolární úrovni (**tabulka 3**). Změny byly prováděny jak na P_1 , P_3 i P_4 . U sloučenin **8-22** se měnil pouze P_4 substituent. Z článku vyplývá, že pokud se v této pozici nacházel pouze fenyl nebo naftyl, došlo k výraznému poklesu aktivity (sloučeniny **8-10**). Naopak dva

fenylové kruhy jsou v této pozici velmi výhodné a jedná se o jedny z neaktivnějších látek z celé série (**11,12,13**, kdy látka **12** je neaktivnější).⁵³



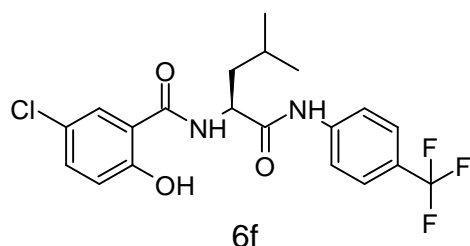
	P₄	IC₅₀ CT-L
8		5.10
9		17.2
10		1.40
11		0.84
12		0.17
13		0.53

Tabulka 3: Neaktivnější látky z dipeptidické série

1.15 Potenciální IP vyvinuté v rámci pracovní skupiny

Inhibitorům proteasomu se v naší výzkumné skupině věnujeme již spoustu let. Základní látkou, u které vše začalo, jsou salicylamidy. Ty vznikly díky přesmyku jako neočekávaný produkt ze salicylanilidových proléčiv. Tomuto přesmyku se později naše výzkumná skupina začala věnovat a popsala ho jak z hlediska obecnosti, tak z hlediska mechanismu a biologických aktivit, kdy došlo k objevení cytotoxického účinku látek na nádorové buněčné linie a neovlivnění proliferace nenádorových buněk. Přesmyk byl popsán za použití několika různých chráněných aminokyselin. Tento objev znamenal návrh dalších molekul s cílem ještě více vylepšit stávající biologické aktivity, a to pomocí změny struktury zkoumaných molekul.⁵⁴

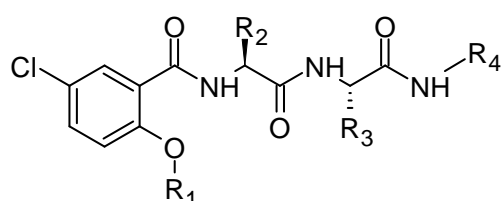
Tato studie byla později doplněna o další sloučeniny s různými substituenty, kdy byl



zkoumán vliv jednotlivých substituentů na biologickou aktivitu. Ve studovaných látkách byly měněny substituenty na obou jádrech a také byly použity různé aminokyseliny. Nejaktivnější látkou s 5-Cl substituentem byla sloučenina **6f** mající v pozici R₂ 4-trifluormetylovou skupinu. Později bylo zjištěno, že

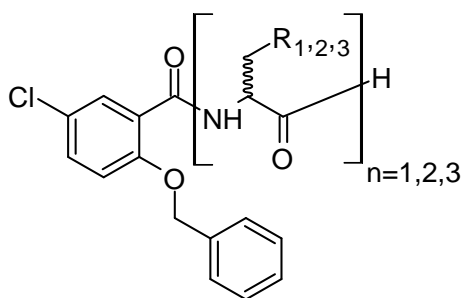
látky s touto skupinou vykazují antibakteriální aktivitu a jsou více diskutované v kapitole 1.16.⁵⁴

Jelikož látka s touto substitucí dosahovala lepších biologických aktivit než použité standarty, navrhly a syntetizovaly se další látky. U těchto látek byl zachován substituent 5-Cl



na jádře, což vychází z předchozí studie a měnily se použité AMK, kdy se vytvářely již dipeptidické látky a také se použily různé substituenty na NH skupině. Měřily se biologické aktivity jak benzylovaných tak i odpovídajících debenzylovaných sloučenin.

Z naměřených hodnot je zřejmé, že sloučeniny s volnou OH skupinou mají vyšší biol. aktivity než ty benzylované.⁵⁵



Cílem výzkumu těchto látek bylo dosáhnout zvýšení biologických aktivit, a to změnou ve struktuře, kdy přicházely v úvahu dvě změny, a to v anilidové části molekuly, anebo změna střední části molekuly, a to konkrétně za použití různých ať už přírodních, tak i atypických AMK. Tím došlo k návrhu a syntéze nových sloučenin, u kterých byla měněna střední část (různé AMK) a na základě literatury a podobnosti s klinicky používanými IP byla zavedena aldehydická funkční skupina. Následně byla střední část molekuly rozšířena na dipeptidickou a následně i tripeptidickou. Z naměřených hodnot je jasné, že nejvyššími biologickými aktivitami disponují tripeptidické aldehydy. Na základě toho je část experimentální práce zaměřena na rozšíření této série tripeptidických aldehydů, pro jejich přípravu byly použity další atypické AMK.⁵⁶

Jelikož jsme doposud zkoumali pouze látky s aldehydickou skupinou a tato skupina je poněkud nestabilní, nabízí se zavedení i jiné skupiny, která by problém se stabilitou řešila. Takovou skupinou může být například vinyl sulfonová skupina, která byla uvedena výše v kapitole 1.14.^{47,48}

1.16 Salicylanilidy jako antibakteriální látky

Ve výše zmíněných kapitolách byly diskutovány inhibitory proteasomu, mezi které se řadí i salicylanilidy, které jsou součástí experimentální části této práce. V literatuře jsou ale popsány také jako látky s dobrými antibakteriálními vlastnostmi (např. stafylokoky a *Mycobacterium tuberculosis*) a to například i látky obsahující mimo jiné halogen. Podle literatury vykazovaly nejlepší vlastnosti látky obsahující fluor a je pravděpodobné, že elektronegativita přímo souvisí s antibakteriální aktivitou (F>Cl>Br>I). Většinou jsou tyto látky účinnější proti gram-pozitivním bakteriím než proti gram-negativním.

Při přípravě těchto látek jsme navazovaly na našem výsledky získané v roce 2013, kdy se připravovaly 5-Cl-O-Bn-(4-CF₃)toluidiny a některé z těchto látek vykazovaly velmi dobrý účinek proti čtyřem kmenům bakterií jako je *Staphylococcus aureus*, *methicillin-resistantní S. aureus*, *Bacillus cereus* a *Clostridium perfringens*.⁵⁶

I přes to, že se tato dizertační práce zabývá převážně IP, v experimentální části jsou popsány i právě tyto 4-CF₃-toluidiny, při jejichž přípravě se vychází ze stejné mono-peptidické kyseliny jako při přípravě IP.

CÍL PRÁCE

Tato práce si klade za cíl v teoretické části popsat podrobněji co je to proteasom a z jakých částí se skládá včetně jeho funkce v buňkách. Dále se zaměřuje na proteasomální inhibici. Popisuje, jak taková inhibice probíhá a jak fungují vlastní inhibitory proteasomu včetně jejich klinických zástupců a popsání mechanismu účinku jednotlivých kategorií.

Další kapitola se již věnuje přípravě peptidického řetězce, popisuje dvě metody, a to v pevné fázi a v kapalné fázi, kdy následně je větší pozornost věnována metodě v pevné fázi. Je popsán princip této metody s uvedením zástupců nosičů a linkerů.

Dále se teoretická část zabývá vlastní technologií přípravy peptidů, a to konkrétně řešením scale-upu (převedení syntézy do většího měřítka) a problémy, které při něm mohou nastat. Následně se v této kapitole řeší výběr strategie připravovaného peptidu. Je zde popsána i automatizace výroby pokročilých intermediátů, které byly použity pro přípravu některých finálních sloučenin. Tyto intermediáty se připravovaly ve spolupráci s firmou Apigenex s.r.o. metodou SPPS. Další kapitola se zabývá testováním biologické aktivity. Jsou zde zmíněny i poslední trendy ve vývoji inhibitorů proteasomu včetně příkladů různých zajímavých funkčních skupin a jejich příprava. A dále je uveden souhrn jednotlivých studií publikovaných naší výzkumnou skupinou v minulosti a jak na tyto studie navazuje tato disertační práce. Jako poslední se teoretická část věnuje salicylanilidům jako antibakteriálním látkám.

Experimentální část se zabývá tripeptidickými aldehydy, jelikož bylo zjištěno, že vykazují vyšší biologické aktivity než dipeptidické.^{55,56} Proto zde dochází k doplnění této studie o další tripeptidické aldehydy obsahující ve svém řetězci nové atypické aminokyseliny. Tyto aldehydy jsou následně doplněny o odpovídající vinyl sulfonové deriváty, přičemž tato skupina by dle literatury měla vykazovat vyšší stabilitu než aldehydy.^{47,48} Dochází také k rozšíření na tetrapeptidické aldehydy a vinyl sulfony s cílem zjistit, jaký vliv má prodlužující se řetězec na biologickou aktivitu. V další studii jsou popsány tripeptidické a tetrapeptidické aldehydy a vinyl sulfony mající v řetězci pouze *L*-Leu a *L*-Trp. U látek s *L*-Tryptofanem bylo zjištěno, že jsou potencionálními inhibitory proteasomu patogenů.⁵⁷

Jelikož se při přípravě těchto látek vychází z mono-peptidických kyselin a tento derivát je velice zajímavý z hlediska biologických aktivit, rozhodli jsme se připravit i sérii trifluoroluidinů vycházejících z těchto meziproductů. Tomu předcházela série jednoduchých diamidů, u kterých se měnila substituce na anilidové části a zjišťovalo se tak, který substituent

nejvíce zvyšuje biologickou aktivitu. Takovým substituentem se ukázala být CF_3 skupina, a proto byla vytvořena série látek s různými aminokyselinami a s CF_3 substitucí, jejíž cílem bylo zjistit, která aminokyselina ovlivňuje biologickou aktivitu nejvíce.

V teoretické části je popsáno, jakým způsobem lze získat nové látky, které mohou být potencionálně biologicky aktivní. Jedním takovým způsobem je i zavedení nové funkční skupiny do molekuly, která může interagovat s proteasomem. Proto poslední studií diskutované v této práci jsou sloučeniny s akrylamidovou částí. Podobné látky byly publikovány⁵² a v literatuře jsou označeny jako potenciální inhibitory protein kináz. V této literatuře je uvedeno i pár komerčních zástupců. Cíle této práce bylo připravit látky, které obsahují kyselinu 5-Cl-*O*-Bn salicylovou (a která je součástí látek ve všech diskutovaných studiích v této práci) a dále peptidický řetězec složený z jedné nebo dvou aminokyselin zakončený akrylamidovou funkční skupinou.

2 Výsledky a diskuze

Připravené látky byly navrženy na základě literární rešerše a na základě předchozího výzkumu naší pracovní skupiny Imramovský research group. Cílem bylo doplnit některé stávající série o další látky a použít i další atypické aminokyseliny. První série obsahovala aldehydy a vinylsulfony s tripeptidickým řetězcem složeným z *L*-Leu, *L*-Phe, *L*-CHA, *L*-NLeu, *L*-Pro a *L*-Trp. Nejlepší proteasomální inhibiči vykazovaly látky obsahující tryptofan. Díky tomu jsme připravili další sérii aldehydů a VS, které mají tryptofan umístěný v pozici S1, S2 nebo S3. Další deriváty obsahovaly více než jeden Trp, kdy tyto látky byly připravovány nejen na základě našeho předchozího výzkumu, ale i na základě literatury.⁵⁷

Na **schématu 18** je znázorněn obecný postup přípravy těchto aldehydů a vinylsulfonů a v **tabulce 4** jsou uvedeny konkrétní substituenty. Při přípravě se vychází z dipeptidické kyseliny (**42**) jejíž příprava byla již dříve popsána v naší odborné publikaci.^{55,56} Tato kyselina se podrobí couplingové reakci za přítomnosti EDC*HCl a HOBt s daným vinyl sulfonem (**51**) na vzniku finálního tripeptidického vinyl sulfonu (**52**), případně s weinreb amidem (WA) (**45**) za vzniku tripeptidického WA (**53**), který se ve finálním kroku zredukuje LAHem na aldehyd (**54**). Weinreb amid (**45**) se získá reakcí chráněné kyseliny (**43**) s *N,O*-dimethylhydroxylamin hydrochloridem a následnou deprotekcí chránící skupiny. V případě vinyl sulfonu (**51**) je syntéza složitější. Jako výchozí látka je zde také použit weinreb amid (**46**), který se podrobí redukci a vzniklý aldehyd (**47**) se nechá zreagovat se sulfonyl fosfonátem (**48**) (který se připravil oxidací) ve smyslu Horner–Wadsworth–Emmonsovy (HWE) reakce. Vzniklý chráněný vinyl sulfon (**50**) se v posledním kroku podrobí už jen deprotekcí chránící skupiny (**51**).

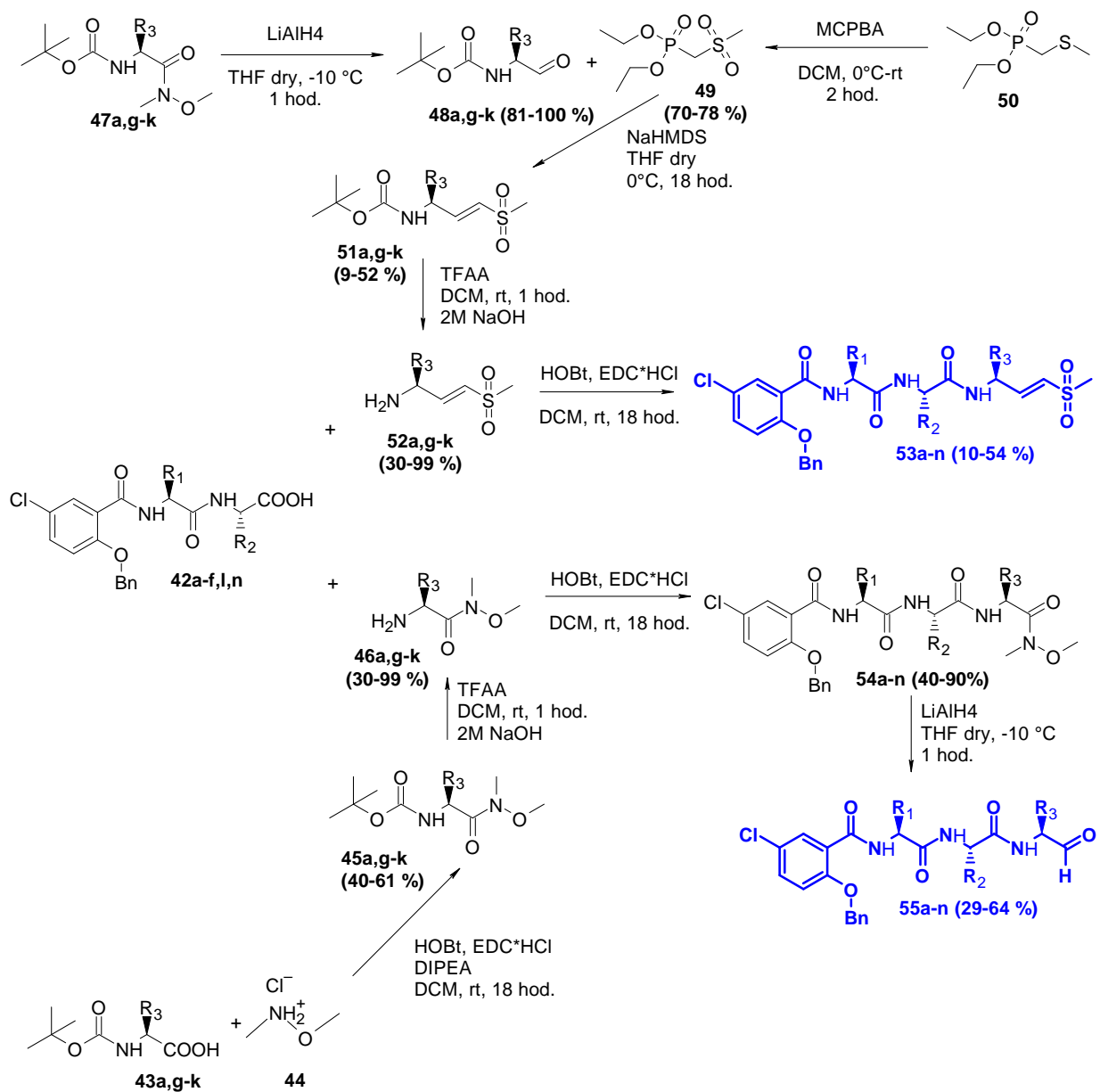


Schéma 18: Celkové schéma přípravy aldehydů a vinylsulfonů

	R₁	R₂	R₃
a	<i>i</i> -bu	<i>i</i> -bu	<i>i</i> -bu
b	benzyl	<i>i</i> -bu	<i>i</i> -bu
c	<i>i</i> -bu	butyl	<i>i</i> -bu
d	<i>i</i> -bu	cyklohexylmethyl	<i>i</i> -bu
e	<i>i</i> -bu	Pro	<i>i</i> -bu
f	<i>i</i> -bu	1 <i>H</i> -indol-3-yl	<i>i</i> -bu
g	<i>i</i> -bu	<i>i</i> -bu	benzyl
h	<i>i</i> -bu	<i>i</i> -bu	butyl
i	<i>i</i> -bu	<i>i</i> -bu	cyklohexylemthyl
j	<i>i</i> -bu	<i>i</i> -bu	Pro
k	<i>i</i> -bu	<i>i</i> -bu	1 <i>H</i> -indol-3-yl
l	1 <i>H</i> -indol-3-yl	<i>i</i> -bu	<i>i</i> -bu
m	1 <i>H</i> -indol-3-yl	<i>i</i> -bu	1 <i>H</i> -indol-3-yl
n	1 <i>H</i> -indol-3-yl	1 <i>H</i> -indol-3-yl	1 <i>H</i> -indol-3-yl

Tabulka 4: Přehled jednotlivých substituentů

Sloučenina	R ₁	R ₂	R ₃	MCF-7 buněčná linie			MCF-7	U2OS-PI-GFP
				Kaspáza (β1)	Trypsin (β2)	Chymotrypsin (β5)	Chymotrypsin	
				20 μM			IC ₅₀ (μM)	
				% of ctrl± SD	% of ctrl± SD	% of ctrl± SD	data±SD	data
55a	<i>i</i> -bu	<i>i</i> -bu	<i>i</i> -bu	45.2±1.0	91.1±1.0	10.0±0.1	0.37±0.03	1,6
55b	benzyl	<i>i</i> -bu	<i>i</i> -bu	75.4±3.6	≥100	9.4±0.1	1.75±0.01	4
55c	<i>i</i> -bu	butyl	<i>i</i> -bu	40.0±0.7	96.1±1.6	7.3±0.0	0.27±0.02	1,6
55d	<i>i</i> -bu	cyklohexylmethyl	<i>i</i> -bu	48.3±1.1	87.6±2.4	8.7±0.1	2.34±0.00	3,2
55e	<i>i</i> -bu	Pro	<i>i</i> -bu	≥100	≥100	90.6±4.3	>20	>5
55f	<i>i</i> -bu	1 <i>H</i> -indol-3-yl	<i>i</i> -bu	26.2±1.4	87.6±1.5	7.0±0.2	0.61±0.02	1,6
55g	<i>i</i> -bu	<i>i</i> -bu	benzyl	≥100	≥100	30.8±1.3	6.22±0.60	>5
55h	<i>i</i> -bu	<i>i</i> -bu	butyl	86.5±1.3	≥100	16.2±0.3	3.27±0.07	>5
55i	<i>i</i> -bu	<i>i</i> -bu	cyklohexylemethyl	82.7±1.1	≥100	35.8±1.7	7.58±0.08	>5
55j	<i>i</i> -bu	<i>i</i> -bu	Pro	95.4±3.8	96.6±6.8	≥100	>20	>5
55k	<i>i</i> -bu	<i>i</i> -bu	1 <i>H</i> -indol-3-yl	63.5±0.1	94.4 ±1.4	11.1±0.9	2.22±0.06	>5
55l	1 <i>H</i> -indol-3-yl	<i>i</i> -bu	<i>i</i> -bu	-	-	-	-	-
55m	1 <i>H</i> -indol-3-yl	<i>i</i> -bu	1 <i>H</i> -indol-3-yl	93,7	99,8	96,8	>20	-
55n	1 <i>H</i> -indol-3-yl	1 <i>H</i> -indol-3-yl	1 <i>H</i> -indol-3-yl	94,2	102,1	47,9	17,86	-
bortezomib 1000 nM				27.5±6.5	85.9±2.0	7.3±1.2	0.008±0.00	netestováno

Tabulka 5: Naměřené IC₅₀ připravených tripeptidických aldehydů; ^a-minimální koncentrace látky vyžadované pro >30% zvýšení fluorescence ve srovnání s neošetřenými buňkami

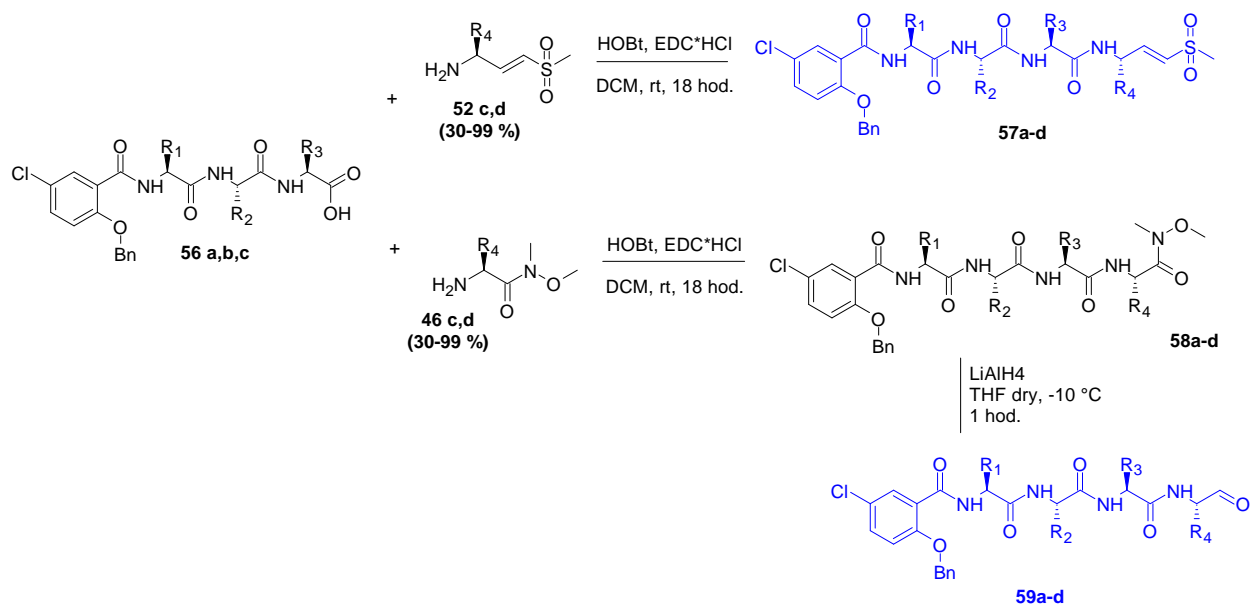
Sloučenina	R ₁	R ₂	R ₃	MCF-7 buněčná linie			MCF-7	U2OS-PI-
				Kaspáza (β1)	Trypsin (β2)	Chymotrypsin (β5)	Chymotrypsin	GFP
				20 μM			IC ₅₀ (μM)	c (μM) ^a
				% of ctrl± SD	% of ctrl± SD	% of ctrl± SD	data±SD	data
53a	<i>i</i> -bu	<i>i</i> -bu	<i>i</i> -bu	76.7±1.3	≥100	11.2±0.1	2.27±0.10	2,5
53b	benzyl	<i>i</i> -bu	<i>i</i> -bu	77.5±0.9	≥100	21.0±0.5	3.38±0.03	5
53c	<i>i</i> -bu	butyl	<i>i</i> -bu	63.1±1.0	89.1±0.7	8.7±0.2	3.26±0.07	3,2
53d	<i>i</i> -bu	cyklohexylmethyl	<i>i</i> -bu	75.8±2.2	93.8±4.3	44.2±1.3	5.58±0.57	>5
53e	<i>i</i> -bu	Pro	<i>i</i> -bu	≥100	≥100	93.0±1.2	>20	>5
53f	<i>i</i> -bu	1 <i>H</i> -indol-3-yl	<i>i</i> -bu	73.9±0.3	95.7±1.9	19.0±0.3	5.31±0.30	5
53g	<i>i</i> -bu	<i>i</i> -bu	benzyl	52.5±0.8	89.5±0.4	5.9±0.3	1.71±0.01	2,5
53h	<i>i</i> -bu	<i>i</i> -bu	butyl	70.2±3.4	≥100	11.2±0.5	3.97±0.14	4
53i	<i>i</i> -bu	<i>i</i> -bu	cyklohexylemethyl	74.9±2.3	96.2± 0.4	69.6±2.7	>20	>5
53j	<i>i</i> -bu	<i>i</i> -bu	Pro	≥100	≥100	94.8±0.1	>20	>5
53k	<i>i</i> -bu	<i>i</i> -bu	1 <i>H</i> -indol-3-yl	54.8±0.2	88.1± 1.6	7.9±0.2	1.77±0.33	3,2
53l	1 <i>H</i> -indol-3-yl	<i>i</i> -bu	<i>i</i> -bu	-	-	-	-	-
53m	1 <i>H</i> -indol-3-yl	<i>i</i> -bu	1 <i>H</i> -indol-3-yl	-	-	-	-	-
53n	1 <i>H</i> -indol-3-yl	1 <i>H</i> -indol-3-yl	1 <i>H</i> -indol-3-yl	96,4	93,2	95,8	>20	-
bortezomib 1000 nM				27.5±6.5	85.9±2.0	7.3±1.2	0.008±0.00	netestováno

Tabulka 6: Naměřené IC₅₀ připravených tripeptidických vinylsulfonů; ^a-minimální koncentrace látky vyžadované pro >30% zvýšení fluorescence ve srovnání s neošetřenými buňkami

Výsledky naměřených inhibičních koncentrací (IC) aldehydů a vinylsulfonů (**tabulka 5 a 6**) jasně ukazují, že aldehydy mají obecně vyšší biologickou aktivitu. Ovšem IC standartu, kdy jako standart byl v tomto případě zvolen bortezomib, jsou mnohem nižší. Bortezomib, ale vykazuje spoustu vedlejších účinků, mezi které patří i poměrně rychlá tvorba resistance organismu vůči této látce. Proto je vytvářen tlak na syntézu nových potencionálních inhibitorů proteasomu postrádající tyto vedlejší účinky i přes to, že nemusí dosahovat takových inhibičních koncentrací jako právě zmiňovaný bortezomib. V případě aldehydů se podařilo syntetizovat pár zástupců se vysokými biologickými aktivitami. Konkrétně se jedná o látky **55a**, **55c** a **55f**, kdy sloučenina **55a** obsahuje ve svém řetězci pouze *L*-leuciny, látky **55c** a **55f** jsou aldehydy mající v pozici R₁ a R₃ opět *L*-Leu, na pozici R₂ se nachází *L*-norleucin v případě látky **55c** a *L*-tryptofan v případě látky **55f**. Lze tedy říci, že látky mající v pozici R₃ *L*-leucin jsou aktivnější než látky s jinou AMK v této poloze.

K aldehydům byly připraveny odpovídající vinyl sulfony. Tato funkční skupina byla zvolena kvůli její vyšší stabilitě oproti aldehydům. Ze všech připravených zástupců je jedním z neaktivnějších opět derivát se třemi *L*-leuciny (**53a**), dále je zde ovšem trend opačný na rozdíl od aldehydů. Neaktivnější látky mají v pozici R₂ *L*-leucin a v pozici R₃ jinou aminokyselinu. A to látka **53g** s *L*-fenylalaninem a látka **53k** s *L*-tryptofanem. Naměřené hodnoty byly publikovány v časopise *Bioorganic Chemistry* (IF₂₀₂₁ = 5,307).⁴⁴

Doposud byl zkoumán pouze vliv funkčních skupin a použitých aminokyselin u tripeptidů. Další studií byly tetrapeptidické sloučeniny obsahující stejně jako předchozí látky tryptofan v kombinaci s leucinem. Porovnávali jsme zde vliv prodlužujícího se řetězce na biologickou aktivitu. Na základě literatury navržené molekuly obsahují v R₄ *L*-Trp nebo *L*-Leu, v R₃ *L*-Leu a v R₂ a R₁ kombinaci *L*-Leu a *L*-Trp. Výchozí tripeptidické kyseliny byly dodány firmou Apigenex s.r.o. Pro porovnání aktivit byl připraven i tetrapeptidický aldehyd a vinyl sulfon obsahující 4 *L*-Leu. Postup přípravy je stejný jako na **schématu 18** s tím rozdílem, že kromě výchozí dipeptidické kyseliny (**42a-f,l,n**), je použita tripeptidická kyselina (**56**). V **tabulce 7** je opět uveden seznam substituentů.



Při přípravě aldehydů a VS se postupně upravoval ekvivalent použitých činidel. Naším cílem bylo dosáhnout takového poměru, díky kterému by docházelo k co nejmenší racemizaci. U některých meziproductů bylo možné pro purifikaci produktu použít krystalizaci ve směsi EtOAc/*n*-hexan. Ovšem většina finálních produktů byly olejovité látky, proto se zde pro separaci využila sloupcová chromatografie.

	R₁	R₂	R₃	R₄
a	<i>i</i> -bu	<i>i</i> -bu	<i>i</i> -bu	1 <i>H</i> -indol-3-yl
b	1 <i>H</i> -indol-3-yl	<i>i</i> -bu	<i>i</i> -bu	1 <i>H</i> -indol-3-yl
c	<i>i</i> -bu	1 <i>H</i> -indol-3-yl	<i>i</i> -bu	1 <i>H</i> -indol-3-yl
d	<i>i</i> -bu	<i>i</i> -bu	<i>i</i> -bu	<i>i</i> -bu

Tabulka 7: Seznam substituentů u tetrapeptidických látek

Dále bylo při charakterizaci těchto látek zjištěno, že pokud molekula obsahuje více jak 1 tryptofan ve svém peptidickém řetězci, dochází při měření elementární analýzy u těchto látek k odchýlkám. To je způsobeno pravděpodobně absorpcí CO₂, čehož je příčinou právě Trp. U těchto látek je obtížné změřit i NMR. Jedná se o velké molekuly, které nelze rozpustit v běžně dostupných deuterovaných rozpouštědlech. Také se jedná o látky, které svým chováním připomínají už spíše peptidy, proto i naměřená spektra obsahují spoustu signálů a vyhodnocují se pouze jednotlivé balíčky signálů (alifatická a aromatická část). Níže je **tabulka 8** naměřených biologických aktivit tetrapeptidických aldehydů (**59a-d**) a vinyl sulfonů (**57a-d**).

látka	IC ₅₀ (μM)-MCF-7			% residuální-MCF-7			GI ₅₀ (μM)	
	Kaspáza (β1)	Trypsin (β2)	Chymotrypsin (β5)	Kaspáza (β1)	Trypsin (β2)	Chymotrypsin (β5)	K562	MCF-7
57a	>20	>20	0,86	73,7	58,5	3,9	1,67	3,17
57b	>20	>20	>20	81,1	95,8	108,3	12,5	12,5
57c	>20	>20	>20	82,4	94,8	97,8	12,5	12,5
57d	>20	>20	>20	-	-	-	-	-

59a	>20	>20	1,87	63,2	73,7	5,7	5,4	4,88
59b	>20	>20	6,51	92,1	111,5	21,3	12,5	12,5
59c	>20	>20	3,68	77,4	74,0	12,4	7,86	12,5
59d	>20	>20	3,1	32,8	59,0	5,4	-	-

Tabulka 8: Biologické aktivity tetrapeptidických aldehydů a vinylsulfonů

Výsledky v **tabulce 8** jasně ukazují, že nejvyšší biologické aktivity dosahuje látka s pořadím aminokyselin Leu-Leu-Leu-Trp a to ať už aldehyd anebo vinyl sulfon. V **tabulce 9** níže, je také provedeno srovnání tripeptidických a tetrapeptidických aldehydů a vinyl sulfonů mající peptidický řetězec složený pouze z *L*-Leucinu (**schéma 19**). Je zřejmé, že u tetrapeptidického aldehydu došlo ke snížení IC₅₀ u některých buněčných linií v porovnání s tripeptidickým aldehydem. U tetrapeptidického sulfonu je tomu přesně naopak. To znamená, že u aldehydů dochází ke zvýšení biologické aktivity s prodlužujícím se řetězcem, naopak v případě vinyl sulfonů postrádá smysl připravovat je delší jak tripeptidické. I přes to ale lepších výsledků dosahují látky s *L*-Trp vedle funkční skupiny.

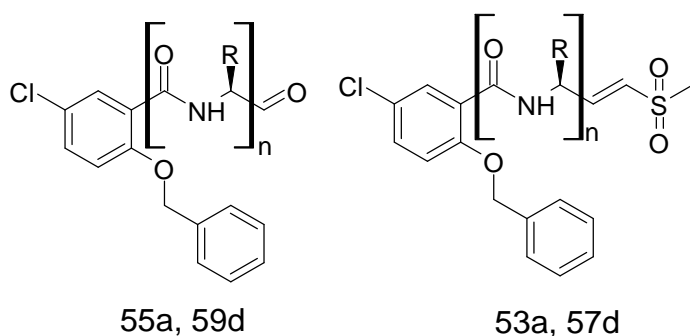


Schéma 19: Obecné struktury aldehydů a vinyl sulfonů

R: <i>i</i> -bu		IC ₅₀ (μM)					
		Aldehyd (55a,59d)			Vinylsulfon (53a,57d)		
n	látka	K562	U266	MCF-7	K562	U266	MCF-7
3	a	1,39	0,20	3,38	2,32	1,99	1,93
4	d	0,68	0,47	0,95	25	25	25

Tabulka 9: Naměřené hodnoty tri a tetrapeptidických L-leucinových aldehydů a vinylsulfonů

Monopeptidické kyseliny jsou velmi zajímavým meziproduktem. Využili jsme je proto i do dalších reakcí, a to například pro přípravu p-trifluortoludinových derivátů, které by dle literatury měly vykazovat dobré antibakteriální vlastnosti. Opět byla vytvořena skupina látek obsahující různé aminokyseliny. Biologickému testování se podrobily jak benzylované, tak i debenzylované produkty.

Při přípravě (schéma 20) docházelo nejprve k reakci monopeptidické kyseliny (60a-f) s 4-trifluoromethylanilinem (61). Nevýhodou tohoto benzylovaného p-trifluortoluidinu (62a-f) byla jeho špatná rozpustnost v mnoha rozpouštědlech. Pro izolaci takového produktů se použila metoda „pseudokrystalizace“, kdy se krystaly částečně rozpustily v EtOAc a následně odfiltrovaly. Tím došlo k odplavení nečistot, ovšem na úkor výtěžku, protože touto metodou dochází k větší ztrátě produktu. V tabulce 10 jsou uvedeny jednotlivé substituenty.

Následně byla provedena debenzylace za katalýzy Pd-C. Tuto reakci jsme nejprve zkusili dělat v autoklávu při vyšším tlaku, později jsme ale zjistili, že podmínky jsou natolik přísné, že kromě debenzylace docházelo také k dehalogenaci chloru. Proto se reakce prováděla probubláváním vodíku v baňce, kde byly podmínky mírnější. Aby nám v reakční směsi nevznikal produkt bez chloru (64a-f), bylo použito i menší množství katalyzátoru a kratší reakční doba i na úkor nezreagování veškeré výchozí látky. Reakční směsi se dělily pomocí sloupcové chromatografie za použití mobilní fáze EtOAc/*n*-hexan 1:5 a za použití co nejdelšího sloupce.

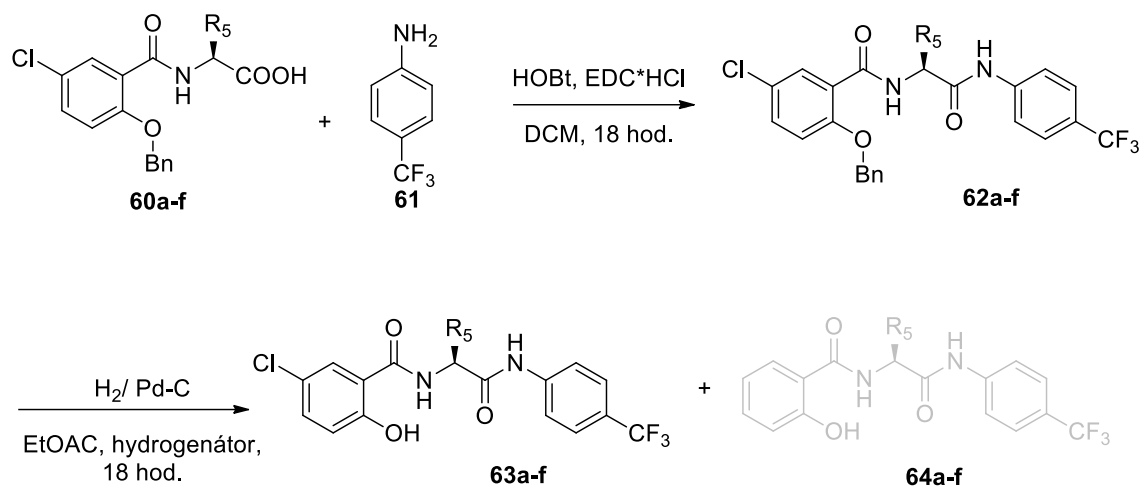


Schéma 20: Příprava p-trifluorotoluidinových sloučenin

kód	R ₅	výtěžek
62a	methyl	75%
62b	isopropyl	67%
62c	propyl	59%
62d	butyl	4%
62e	cyklohexylmethyl	56%
62f	2-(methylthio)ethyl	22%
63a	methyl	76%
63b	isopropyl	61%
63c	propyl	28%
63d	butyl	40%
63e	cyklohexylmethyl	39%
63f	2-(methylthio)ethyl	51%

Tabulka 10: Přehled připravených finálních trifluoromethyltoluidinů včetně jednotlivých výtěžků

číslo	MIC [μ M]										IC ₅₀ [μ M] THP-1@10% FBS 24h	
	SA	MRSA1	MRSA2	MRSA3	EF	VRE1	VRE2	VRE3	MT	MS		
63a	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	>10
63b	2.41 4.82	4.82 4.82	4.82 4.82	4.82 9.64	38.6 38.6	38.6 38.6	38.6 38.6	38.6 38.6	77.1 -	77.1 -	-	>10
63c	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	7.3±1.2
63d	0.583 1.17	2.33 2.33	2.33 4.66	4.66 4.66	-	-	-	-	-	-	-	4.5±1.2
63e	1.07 1.07	1.07 1.07	1.07 2.13	2.13 2.13	546 -	546 -	546 -	546 -	-	-	-	1.4±1.1
63f	2.24 2.24	8.95 8.95	4.48 8.95	8.95 8.95	17.9 35.8	35.8 35.8	17.9 35.8	35.8 35.8	35.8 -	35.8 -	-	>10
<i>L</i> - Leu*	1.17 1.17	1.17 1.17	1.17 1.17	0.070 0.070	4.66 9.33	4.66 18.7	9.33 18.7	4.66 37.3	18.7 -	18.7 -	-	1.9±1.1
<i>L</i> - Phe*	1.08 2.16	2.16 2.16	1.08 2.16	0.270 0.270	277 -	277 -	277 -	277 -	-	-	-	3.3±1.0
APM	5.72 >5.72	45.8 >45.8	45.8 >45.8	45.8 >45.8	2.81 2.81	11.5 11.5	11.5 11.5	11.5 11.5	-	-	-	-
INH	-	-	-	-	-	-	-	-	36.6 -	117 -	-	-

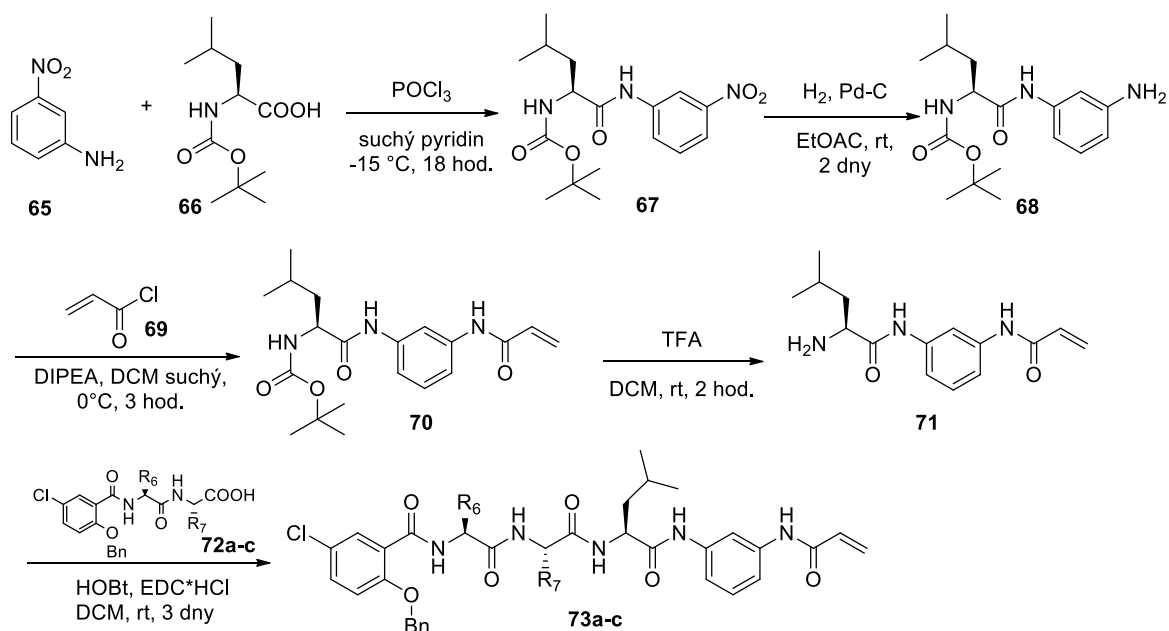
Tabulka 11: Naměřené hodnoty IC₅₀ debenzylovaných trifluortoluidinů

V **tabulce 11** jsou uvedené naměřené inhbiční koncentrace vůči daným patogenům (SA = *Staphylococcus aureus* ATCC 29213; MRSA1–3 = klinické izoláty methicillin-resistantního *S. aureus* SA 3202, SA 630 a 63718; EF = *Enterococcus faecalis* ATCC 29213, a vancomycin-resistantní *enterococci* VRE1–3 = VRE 342B, VRE 368, VRE 725B, MT = *Mycobacterium tuberculosis* H37Ra/ATCC 25177; MS = *M. smegmatis* ATCC 700084; FSB = fetální hovězí sérum; pomlčka „-“, = žádná aktivita). Jedná se o hodnoty pouze debenzylovaných látek, jelikož bylo zjištěno, že benzylované látky tyto patogeny neinhbují. Dále je tabulka rozšířena o další dva deriváty obsahující *L*-Leu a *L*-Phe, kdy tyto látky byly připraveny již dříve*.⁵⁶ Pokud se zaměříme na jednotlivé látky, sloučeniny **63f** s *L*-Leu mají aktivitu srovnatelnou nebo vyšší než je tomu u daných standardů (AMP-ampicilin, INH-isoniazid), látka **63c** má vyšší aktivitu pouze u některých kmenů a látky **63f** s *L*-Phe vykazují antistafylokokový efekt. Naměřené hodnoty byly publikovány v časopise *International Journal of Molecular Sciences* (IF₂₀₂₁ = 6,208).⁵⁸

Jako poslední zde zmíníme přípravu látek zakončených akrylamidovou skupinou, která by mohla sloužit jako potencionální nová funkční skupina IP. Problém při syntézách těchto látek nastával při deprotekcí Boc skupiny obsahující již zmíněnou akrylovou skupinu. Některé takové látky jsme nebyli schopni izolovat z reakční směsi z důvodu velice špatné rozpustnosti ve spoustě běžně používaných organických činidlech. Nakonec se nám podařilo

připravit pouze dva dipeptidické akrylamidy a jeden tripeptidický, avšak tyto látky nevykazovaly žádnou biologickou aktivitu. Proto jsme se následně zaměřovali na přípravu jiných látek. Těmi byly i třeba deriváty kyseliny boronové, kde se nám podařilo relativně snadno připravit meziprodukt. Další reakce mohou být předmětem navazujícího výzkumu.

Při syntéze těchto látek (**schéma 21**) se vycházelo z 3-nitroanilinu (**65**), který se podrobil reakci s Boc-*L*-Leucinem (**66**). Následně došlo k redukci nitrosloučeniny (**67**) na aminosloučeninu (**68**). Následovala opět reakce, ale tentokrát s akryloylchloridem (**69**). Vzniklý ochráněný derivát (**70**) se podrobil deprotekcí chránicí skupiny a v posledním kroku již docházelo pouze k reakci s dipeptidickou kyselinou (**72a-c**) za vzniku finálního produktu (**73a-c**). Jak již byl řečeno, otestované sloučeniny **73a-c** nedosahovaly žádných biologických aktivit, proto se tato studie prozatím uzavřela.



	R₆	R₇	výtěžek
73a	-	isopropyl	43 %
73b	-	phenylmethyl	8 %, 20 %
73c	isopropyl	isopropyl	8,6 %

Schéma 21: Příprava akrylamidů

Experimentální část

Všechny komerčně dostupné chemikálie byly zakoupeny od firmy Sigma Aldrich, Acros Organics, TCI, Merck, Fluorochem. Tripeptidické kyseliny dodány firmou Apigenex s.r.o. Sloupcová chromatografie byla prováděna na silikagelu (SiO_2 60 Å, velikost částic 0,060 - 0,200 mm, Acros Organics) za použití komerčně dostupných rozpouštědel. Flash chromatografie byla prováděna na automatizovaném flash chromatografu Reveleris X2 Flash (Büchi). Tenkovrstvá chromatografie byla prováděna na hliníkových destičkách potažených silikagelem (SiO_2 60 F254 (Merck) s vizualizací pomocí UV lampy (254 nebo 360 nm), látky s nízkou absorpcí UV záření byly vizualizovány pomocí 5% roztoku kyseliny fosfomolybdenové v ethanolu. ^1H a ^{13}C spektra nukleární magnetické rezonance (NMR) byla měřena v rámci servisní činnosti školitelem práce a to při laboratorní teplotě na přístroji Bruker AVANCE III 400 při frekvencích 400.13 resp. 100.62 MHz (pro ^{13}C) nebo na přístroji Bruker Ascend™ 500 při frekvencích 500.13 (^1H) resp. 125.76 MHz (pro ^{13}C). Chemické posuny jsou uvedeny v jednotkách ppm vůči zbytkovému signálu rozpouštědla CDCl_3 , CD_2Cl_2 , D_2O nebo $\text{DMSO-}d_6$. Interakční konstanty (J) jsou uvedeny v Hz. Pozorované signály jsou popsány jako s (singlet), br (široký singlet), d (dublet), t (triplet) a m (multiplet). Body tání byly měřeny na kapilárním bodotávku Büchi B-545. K další charakterizaci bylo využito servisního pracoviště elementární analýzy pracující s přístrojem Thermo Scientific Flash 2000 Organic elemental analyser. Hmotnostní spektra byla měřena pomocí MALDI hmotnostního spektrometru s vysokým rozlišením LTQ Orbitrap XL (Thermo Fisher Scientific, Bremen, Germany) vybaveného dusíkovým UV laserem (337 nm, 60 Hz) metodou „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 využita předdefinovaná spirálová schémata pohybu. Jako matrice byly použity 0,2M roztoky 2,5-dihydroxybenzoové kyseliny (DHB) ve směsi $\text{MeCN}:\text{H}_2\text{O}$ (95:5) nebo 2-[(2*E*)-3-(4-*tert*-butylfenyl)-2-methylprop-2-enyliden]malononitrilu (DCTB) v MeCN , přičemž molární poměr matrice: vzorek byl vždy přibližně 40:1. Výsledné spektrum tvoří průměr z celého měření.

Disertační práce navazuje na předchozí práci naší výzkumné skupiny. Připravené látky byly navrhnuty na základě literární rešerše (viz.kapitola 1.14.), kdy jsme se rozhodli zaměřit se na aldehydickou a vinyl sulfonovou funkční skupinu (která by podle literatury sice měla vykazovat menší proteasomální inhibici, ale zase je naopak stabilnější oproti daným aldehydům) připojenou k tripeptidickým látkám, které na svém N-konci obsahovaly kyselinu 5-Cl-O-Bn salicylovou. Uspořádání jednotlivých aminokyselin jsme volili dle dostupných studií vztahů mezi strukturou a aktivitou (SAR). Pro tvorbu peptidického řetězce byly použity tyto aminokyseliny: *L*-Leu, *L*-Pro, *L*-NLeu, *L*-CHA, *L*-Phe, *L*-Trp, kdy jsme sledovali vliv umístění jednotlivých AMK na aktivitu v kombinaci s danými funkčními skupinami. Navrženými aldehydy jsme také chtěli docílit rozšíření studie tripeptidických látek, která byla připravena naší výzkumnou skupinou, ale tyto látky obsahovaly ve svém peptidickém řetězci pouze kombinaci dvou AMK a to *L*-Leu a *L*-Phe, Nové tripeptidické aldehydy obsahovaly další výše zmíněné AMK. A k těmto aldehydům byly připraveny odpovídající vinyl sulfony, které sloužily pro porovnání biologických aktivit.

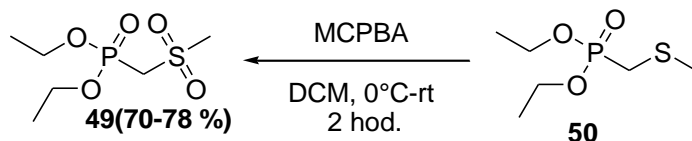
Dále byla na základě literatury připravena i tetrapeptidická studie. Připravovaly se opět aldehydy i vinyl sulfony, ale při tvorbě peptidického řetězce byly použity už pouze *L*-Leu a *L*-Trp.⁵⁷ Tato studie měla za cíl zjistit jaký vliv má prodlužující se řetězec na biologickou aktivitu a také jaký vliv má umístění těchto AMK v řetězci.

Předposlední studií jsou trifluortoluidiny. Zde bylo cílem opět rozšíření již stávající studie naší pracovní skupiny.^{55,56} Pro tyto látky jsme se rozhodli díky tomu, že se při jejich přípravě využívá stejný pokročilejší intermediát jako při přípravě tripeptidických sloučenin, a to konkrétně mono-peptidická kyselina. Tyto látky s CF₃ substitucí by dle našich předchozích zjištění ale také podle literatury měly vykazovat antibakteriální efekt (např. proti *S.Aureus*).

Jelikož jsme se chtěli zaměřit také na zcela nové funkční skupiny, připravili jsme studii látek obsahující akrylamidovou funkční skupinu, která interaguje s cysteinem v proteasomu pomocí Michaelovy adice.⁵² Pro přípravu těchto látek jsme využili opět dvě AMK a to *L*-Leu a *L*-Phe.

2.1 Příprava tripeptidických aldehydů a vinyl sulfonů

2.1.1 Příprava diethyl ((methylsulfonyl)methyl)fosfonátu (49)

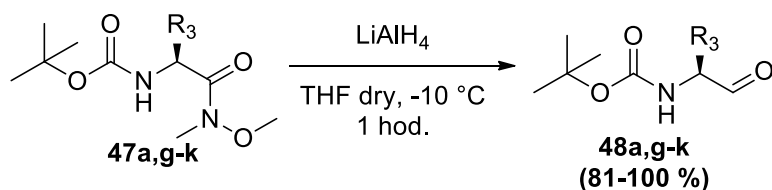


Thiofosfonát (49) (3g, 15,13 mmol, 1 ekv) byl rozpuštěn v baňce v 80 ml DCM a ochlazen pomocí ledové lázně na 0 °C. Poté byl opatrně nadávkován roztok MCPBA (7,83 g, 45,39 mmol, 3 ekv) v DCM (40 ml) a reakční směs se nechala míchat při RT (laboratorní teplota) 2 hodiny, kdy po této době bylo detekováno vymizení výchozí látky. Reakce byla ukončena přidávkem nasyceného roztoku Na₂S₂O₃ (30 ml) a byly odděleny vrstvy rozpouštědel. Vodná fáze byla ještě extrahována DCM (3x20 ml) a spojené organické fáze se extrahovaly nasyceným roztokem NaHCO₃ (3x20 ml) a roztokem NaCl (20 ml). Organická fáze byla vysušena bezvodým Na₂SO₄, sušidlo bylo odfiltrováno a roztok se zahustil na RVO. Reakční směs byla krystalizována ze směsi EtOAc/*n*-hexan.

2.1.1.1 Charakterizace produktu 50

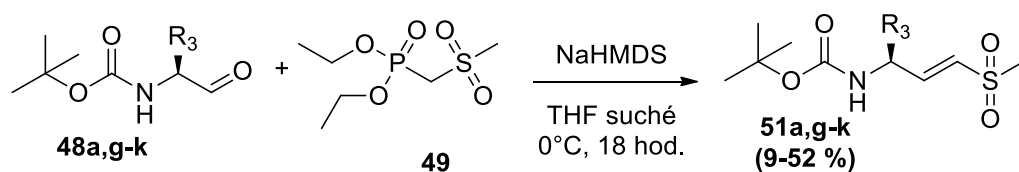
Výtěžek 75 %; bílá krystalická látka; R_f = 0,155 (ethylacetát/*n*-hexan 1:1). **¹H NMR** (400 MHz, CDCl₃): δ 4,31-4,25 (m, 4H, 2xCH₂-O), 3,65 (d, J=16,4 Hz, 2H, P-CH₂-S), 3,25 (s, 3H, CH₃-S), 1,42 (t, J=7,1 Hz, 2xCH₃-CH₂). **³¹P NMR** (160 MHz, CDCl₃): δ 11,74 (s). **CHN analýza:** vypočteno pro C₆H₁₅O₃PS (230,22): C, 31,30; H, 6,57; S, 13,93. Nalezeno: C, 31,83±0,06; H, 6,49±0,01; S, 13,87±0,25. **HRMS:** m/z vypočteno pro C₆H₁₅O₃PS: 477,11928 [M+H]⁺, 499,10122 [M+Na]⁺, 515,07516 [M+K]⁺; Nalezeno: 477,11873 [M+H]⁺, 499,10068 [M+Na]⁺, 515,07461 [M+K]⁺.

2.1.2 Obecná příprava mono-peptidického aldehydu (48)



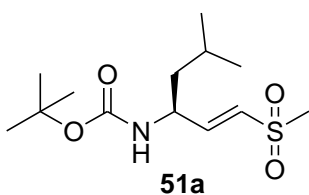
Do trojhrdlé baňky bylo předloženo 1,41 g LiAlH₄ (37,18 mmol, 1,7 ekv) a atmosféra v baňce byla nahrazena inertní atmosférou. LiAlH₄ bylo suspendováno v 80 ml suchého THF a směs byla ochlazená na 0 °C. Po vychlazení se do suspenze LiAlH₄ v THF nadávkoval roztok 6 g Weinreb amidu (**47a,g-k**) (21,87 mmol, 1 ekv) ve 40 ml DCM. Průběh reakce byl sledován pomocí TLC a reakce se ukončila po vymizení výchozí látky přidávkem nasyceného roztoku NH₄Cl (30 ml) a byly provedeny extrakce EtOAc (30 ml), vodou (30 ml) a 10% HCl (30 ml). Vodná fáze byla ještě extrahována EtOAc (2x30 ml) a spojené organické fáze vodou (30 ml). Produkt (**48a,g-k**) se neizoloval ani necharakterizoval a přistoupilo se s ním jako se surovým do dalšího kroku.

2.1.3 Obecná příprava monopeptidického vinyl sulfonu (51)



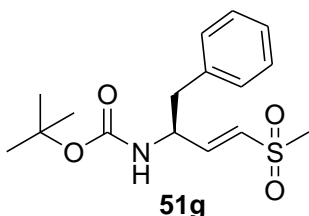
Do baňky bylo předloženo fosfonát (49) (1,2 ekv) a atmosféra v baňce byla nahrazena inertní atmosférou. Fosfonát (49) byl rozpuštěn v suchém THF (80 ml) a směs se ochladila na 0 °C. Poté byl po kapkách nadávkován roztok 1M NaHMDS (1,2 ekv) v suchém THF (30 ml) a směs byla při 0 °C míchána 30 minut. Poté byl nadávkován roztok aldehydu (48a,g-k) (1 ekv) a reakční směs se nechala míchat při RT 18 hodin. Následující den byla reakce ukončena nasyceným roztokem NH₄Cl (40 ml), oddělila se organická a vodná fáze a byly provedeny extrakce EtOAc (3x30 ml) a solankou (30 ml). Organická fáze byla vysušena bezvodým Na₂SO₄ a produkt byl izolován sloupcovou chromatografií.

2.1.3.1 Charakterizace produktu 51a



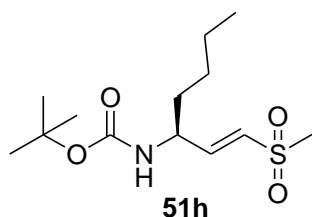
Výtěžek 35 %; lehce žlutá olejovitá látka; R_f = 0,395 (ethylacetát/*n*-hexan 1:1, vizualizace kys.fosfomolybdenovou). ¹H NMR (400 MHz, DMSO): δ 7,10 (d, J=8,4 Hz, 1H, NH), 6,64 (s, 2H, CH=CH), 4,23 (s, 1H, NH-CH-C=O), 2,99 (s, 3H, CH₃-S), 1,58-1,56 (m, 1H, CH), 1,38 (s, 11H, (CH₃)₂-C, CH₂-CH), 0,88-0,85 (m, 6H, (CH₃)₂-CH). ¹³C NMR (100 MHz, DMSO): δ 155,67, 147,50, 130,15, 78,69, 49,43, 42,90, 42,84, 28,80, 24,93, 23,37, 22,26. **CHN analýza:** vypočteno pro C₁₃H₂₅NO₄S (291,15): C, 53,58; H, 8,65; N, 4,81. Nalezeno: C, 54,47±0,32; H, 8,91±0,07; N, 4,52±0,07. **HRMS:** m/z vypočteno pro C₁₃H₂₅NO₄S: 314,13965 [M+Na]⁺; Nalezeno: 314,14035 [M+Na]⁺.

2.1.3.2 Charakterizace produktu 51g



Výtěžek 21 %; žlutá amorfnní látka; R_f = 0,377 (ethylacetát/*n*-hexan 1:1). ¹H NMR a ¹³C NMR charakterizace viz článek J.org.chem, 68(13), 5075-5083- sloučenina 6db δ. **CHN analýza:** vypočteno pro C₁₆H₂₃NO₄S (325,42): C, 59,05; H, 7,12; N, 4,30. Nalezeno: C, 60,56±0,24; H, 7,36±0,05; N, 4,26±0,08. **HRMS:** m/z vypočteno pro C₁₆H₂₃NO₄S: 348,12400 [M+Na]⁺; Nalezeno: 348,12466 [M+Na]⁺.

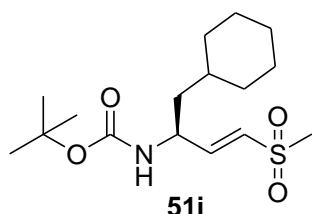
2.1.3.3 Charakterizace produktu 51h



Výtěžek 52 %; lehce žlutá olejovitá látka;
 $R_f = 0,388$ (ethylacetát/*n*-hexan 1:1, vizualizace

kys.fosfomolybdenovou). $^1\text{H NMR}$ (500 MHz, CDCl_3): δ 7,10 (d, $J=8,4$ Hz, 1H, NH), 6,64 (s, 2H, $\text{CH}=\text{CH}$), 4,23 (s, 1H, $\text{NH}-\text{CH}-\text{C}=\text{O}$), 2,99 (s, 3H, CH_3-S), 1,58-1,56 (m, 1H, CH), 1,38 (s, 11H, (CH_3)₃-C, CH_2-CH), 0,88-0,85 (m, 6H, (CH_3)₂-CH). $^{13}\text{C NMR}$ (100 MHz, CDCl_3): δ 155,67, 147,50, 130,15, 78,69, 49,43, 42,90, 42,84, 28,80, 24,93, 23,37, 22,26. **CHN analýza:** vypočteno pro $\text{C}_{13}\text{H}_{25}\text{NO}_4\text{S}$ (291,15): C, 53,58; H, 8,65; N, 4,81. Nalezeno: C, 54,47±0,1; H, 8,85±0,04; N, 4,77±0,09. **HRMS:** m/z vypočteno pro $\text{C}_{13}\text{H}_{25}\text{NO}_4\text{S}$: 314,13965 $[\text{M}+\text{Na}]^+$; Nalezeno: 314,14035 $[\text{M}+\text{Na}]^+$.

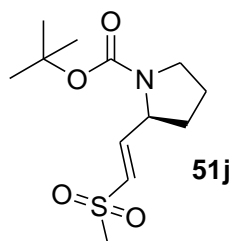
2.1.3.4 Charakterizace produktu 51i



Výtěžek 46 %; lehce žlutá olejovitá látka;
 $R_f = 0,422$ (ethylacetát/*n*-hexan 1:1, vizualizace

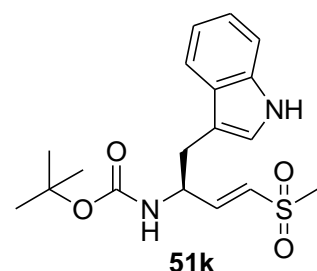
kys.fosfomolybdenovou). $^1\text{H NMR}$ (400 MHz, CDCl_3): δ 6,85-6,80 (m, 1H, $\text{CH}=\text{CH}$), 6,47 (d, $J=15,0$ Hz, 1H, $\text{CH}=\text{CH}$), 4,55 (d, $J=8,3$ Hz, 1H, NH), 4,44 (s, 1H, $\text{NH}-\text{CH}-\text{C}=\text{O}$), 2,93 (s, 3H, CH_3-S), 1,80-1,64 (m, 6H, $\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{CH}_2$), 1,44 (s, 9H, (CH_3)₃), 1,25-1,15 (m, 4H, CH_2-CH_2), 0,97-0,86 (m, 2H, CH_2 -cyklohexyl). $^{13}\text{C NMR}$ (100 MHz, CDCl_3): δ 155,21, 148,98, 129,08, 48,96, 43,93, 43,08, 42,17, 34,21, 33,66, 32,79, 28,49, 26,50, 26,31, 26,16. **CHN analýza:** vypočteno pro $\text{C}_{16}\text{H}_{29}\text{NO}_4\text{S}$ (331,47): C, 57,98; H, 8,82; N, 4,23. Nalezeno: C, 57,28±0,02; H, 8,72±0,05; N, 3,96±0,04. **HRMS:** m/z vypočteno pro $\text{C}_{16}\text{H}_{29}\text{NO}_4\text{S}$: 354,17095 $[\text{M}+\text{Na}]^+$; Nalezeno: 354,17139 $[\text{M}+\text{Na}]^+$.

2.1.3.5 Charakterizace produktu 51j



Výtěžek 8 %; lehce žlutá amorf; $R_f = 0,3$ (ethylacetát/*n*-hexan 1:1, vizualizace kys.fosfomolybdenovou). **HRMS:** m/z vypočteno pro $\text{C}_{12}\text{H}_{21}\text{NO}_4\text{S}$: 298,10835 $[\text{M}+\text{Na}]^+$; Nalezeno: 298,10895 $[\text{M}+\text{Na}]^+$.

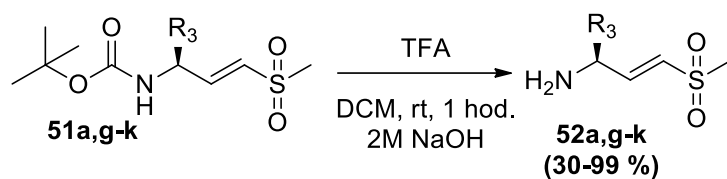
2.1.3.6 Charakterizace produktu 51k



Výtěžek 27 %; lehce žlutý amorf; $R_f = 0,222$ (ethylacetát/*n*-hexan 1:1, vizualizace kys.fosfomolybdenovou). $^1\text{H NMR}$ (400 MHz, CDCl_3): δ 8,36 (1H, s, NH), 7,67 (1H, d, $J=7,5$ Hz, $\text{CH}(\text{Ar})$),

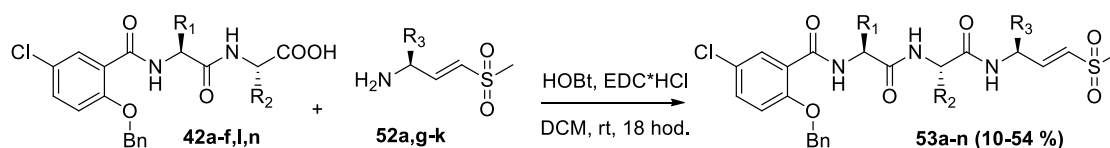
7,37 (1H, d, J=7,9 Hz, $\underline{\text{CH}}(\text{Ar})$), 7,23-7,13 (2H, m, $2\times\underline{\text{CH}}(\text{Ar})$), 7,00-6,93 (2H, m, $\underline{\text{CH}}(\text{Ar})$, $\underline{\text{CH}}=\text{CH}$), 6,31 (1H, d, J=15 Hz, $\text{CH}=\underline{\text{CH}}$), 4,79 (2H, m, $\underline{\text{NH}}-\underline{\text{CH}}$), 3,10 (2H, m, $\underline{\text{CH}}_2$), 2,73 (3H, s, $\underline{\text{CH}}_3-\text{S}$), 1,43 (9H, s, $3\times\underline{\text{CH}}_3$). ^{13}C NMR (100 MHz, CDCl_3): δ 155,24, 148,22, 136,44, 129,64, 127,59, 123,46, 122,52, 119,99, 118,85, 111,62, 109,80, 51,67, 42,73, 30,28, 28,49, 1,21. **CHN analýza:** vypočteno pro $\text{C}_{18}\text{H}_{24}\text{N}_2\text{O}_4\text{S}$ (364,46): C, 59,32; H, 6,64; N, 7,69. Nalezeno: C, $59,43\pm 0,04$; H, $6,90\pm 0,02$; N, $7,43\pm 0,01$. **HRMS:** m/z vypočteno pro $\text{C}_{18}\text{H}_{24}\text{N}_2\text{O}_4\text{S}$: 387,13490 $[\text{M}+\text{Na}]^+$; Nalezeno: 387,13620 $[\text{M}+\text{Na}]^+$.

2.1.4 Obecná příprava mono-peptidického amino vinyl sulfonu (52)



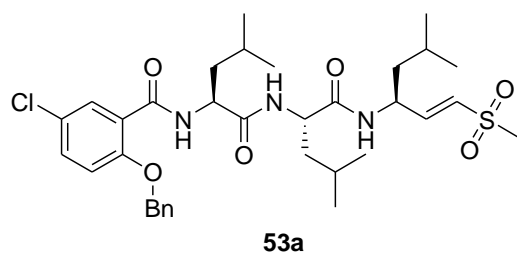
Do baňky byl předložen Boc-VS (**51a,g-k**, 1 ekv), který byl rozpuštěn v DCM. Dále bylo postupně přikapán kyselina trifluoroctová (TFA) (20 ekv) a reakční směs se nechala míchat 1 hodinu. Po této době byl průběh reakce zkontrolován pomocí TLC. Po vymizení výchozí látky se rozpouštědlo zahustilo pomocí RVO (za použití vodní vývěvy z důvodu agresivních rozpouštědel). Zbytek v baňce se ještě 3x promyl DCM. Následně byl rozpuštěn v malém množství DCM a zneutralizován na pH=7 pomocí 2M roztoku NaOH. Poté byly provedeny extrakce nasyceným roztokem NaHCO₃ a vodou. Organická fáze byla vysušena bezvodým Na₂SO₄. Produkt (**52a,g-k**) se neizoloval ani necharakterizoval a rovnou se s ním přistoupilo do další reakce.

2.1.5 Obecná příprava tripeptidického vinyl sulfonu (53)



Do baňky bylo předložena kyselina (**42a-f,l,n**) (1 ekv), která byla rozpuštěna v DCM. Následně byl nadávkován HOBt*H₂O (1,1 ekv) a EDC*HCl (0,95 ekv). RS se nechala míchat asi hodinu, čímž došlo k aktivaci kyseliny. Následně se nadávkoval roztok vinyl sulfonu (**52a,g-k**) (1 ekv) v DCM. Reakční směs se nechala míchat 18 hodin, kdy po této době došlo k vymizení výchozí látky. DCM se odpařil na RVO a zbytek v baňce se rozpustil v EtOAc. Následně byly provedeny extrakce nasyceným roztokem NaHCO₃ (3x), 5% kyselinou citronovou (3x) a solankou (1x). Organická fáze se vysušila bezvodým Na₂SO₄, který se následně odfiltroval a produkt (**53a-n**) se izoloval sloupcovou chromatografií.

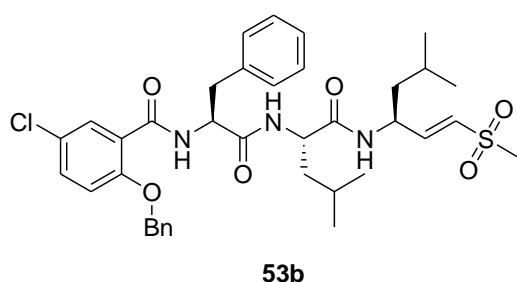
2.1.5.1 Charakterizace produktu 53a



Výtěžek 37 %; lehce žlutý amorf; R_f = 0,24

(1:1 ethylacetát/*n*-hexan). ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃, *d*₁): směs rotamerů δ 8,29-8,16 (1H, m, NH), 8,11-8,04 (1H, m, NH), 7,71-7,43 (7H, m, 7xCH(Ar)), 7,07 (1H, d, J=8,9 Hz, NH), 6,79-6,74 (1H, m, CH(Ar)), 6,58-6,40 (2H, m, CH=CH), 5,20-5,09 (2H, m, CH₂-O-Ph), 4,73-4,67 (1H, m, NH-CH-C=O), 4,31-4,27 (2H, m, 2xNH-CH-C=O), 2,89, 2,87 (3H, s, CH₃-S), 1,59-1,09 (9H, m, 3xCH₂-CH-(CH₃)₂), 0,95-9,82 (12H, m, 4xCH₃), 0,77-0,70 (6H, m, 2xCH₃). ¹³C NMR (400 MHz, CDCl₃): δ 167,12, 166,38, 160,28, 150,63, 142,53, 129,34, 128,50, 126,99, 125,83, 124,48, 124,15, 123,65, 122,22, 109,05, 67,27, 48,92, 47,30, 42,78, 37,81, 37,55, 34,70, 25,85, 24,60, 20,15, 19,88, 19,72, 18,13, 17,81, 17,77, 16,75, 16,38, 16,31. **CHN analýza:** vypočteno pro C₃₄H₄₈ClN₃O₆S (662,28): C, 61,66; H, 7,31; N, 6,34, nalezeno: C, 63,51±0,02; H, 7,95±0,04; N, 5,41±0,01. **HRMS:** m/z vypočteno pro C₃₄H₄₈ClN₃O₆S: 684,28446 [M+Na]⁺; Nalezeno: 684,28729 [M+Na]⁺.

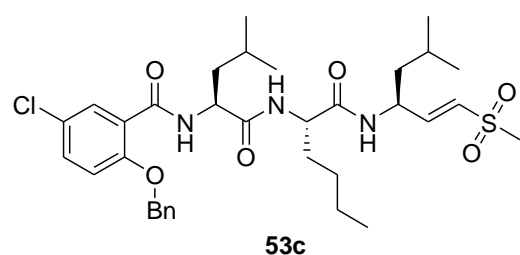
2.1.5.2 Charakterizace produktu 53b



Výtěžek 48 %; bílý amorf; R_f = 0,29 (1:1 ethylacetát/*n*-hexan). ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃): směs rotamerů δ 8,62, 8,34 (1H, d, J=4,5 Hz, NH),

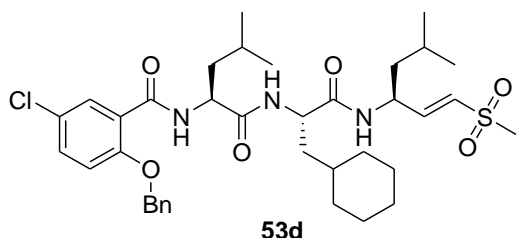
8,08, 8,04, 7,96 (1H, d, J=2,7 Hz, \underline{NH}), 7,49-7,33 (6H, m, 6x \underline{CH} (Ar)), 7,25-7,17 (3H, m, 3x \underline{CH} (Ar)), 7,04-6,95 (2H, m, 2x \underline{CH} (Ar)), 6,92-6,90 (1H, m, \underline{CH} (Ar)), 6,88-6,83 (1H, m, \underline{CH} (Ar)), 6,65-6,59, 6,37-6,33 (1H, m, $\underline{CH}=\underline{CH}$), 6,13, 5,97 (1H, d, J=7,4 Hz, $\underline{CH}=\underline{CH}$), 5,15 (2H, dd, J=11,7, 24,1 Hz, \underline{CH}_2 -O-Ph), 4,72-4,59 (2H, m, 2xNH- \underline{CH} -C=O), 4,36-4,31 (1H, m, NH- \underline{CH} -C=O), 3,05, 2,87 (2H, dd, J=5,4, 7,9 Hz, \underline{CH}_2 -Ph), 2,95, 2,74 (3H, s, \underline{CH}_3 -S), 1,76-1,69 (1H, m, CH- \underline{CH}_2 - \underline{CH}), 1,63-1,36 (5H, m, CH- \underline{CH}_2 - \underline{CH} , CH- \underline{CH}_2 -CH), 0,98-0,70 (12H, m, 4x \underline{CH}_3). ^{13}C NMR (400 MHz, CDCl_3): směs rotamerů δ 171,65, 171,35, 165,93, 155,73, 147,82, 135,99, 135,01, 133,74, 132,12, 129,51, 129,39, 129,24, 129,12, 129,05, 128,83, 127,94, 127,50, 127,42, 121,63, 114,82, 71,97, 58,04, 57,10, 52,84, 48,09, 43,06, 42,63, 40,14, 36,87, 25,08, 24,69, 23,34, 23,05, 21,99, 21,51. **CHN analýza:** vypočteno pro $\text{C}_{37}\text{H}_{46}\text{ClN}_3\text{O}_6\text{S}$ (696,30): C, 63,82; H, 6,66; N, 6,03; nalezeno: C, 64,51 \pm 0,27; H, 6,64 \pm 0,03; N, 5,62 \pm 0,06, **HRMS:** m/z vypočteno pro $\text{C}_{37}\text{H}_{46}\text{ClN}_3\text{O}_6\text{S}$: 718,26881 $[\text{M}+\text{Na}]^+$; nalezeno: 718,27075 $[\text{M}+\text{Na}]^+$.

2.1.5.3 Charakterizace produktu 53c



Výtěžek 73 %; žlutý amorf; $R_f = 0,43$ (ethylacetát/*n*-hexan 1:1, vyjeto 3x). ^1H NMR (400 MHz, CDCl_3): směs rotamerů δ 8,51, 5,38, 8,27 (1H, s, \underline{NH}), 8,21-8,16, 8,06-8,05 (1H, m, \underline{NH}), 7,62-7,46 (6H, m, 6x \underline{CH} (Ar)), 7,38-7,36, 7,07-7,06 (1H, m, \underline{NH}), 7,17-7,11, 6,94-9,89 (2H, m, 2x \underline{CH} (Ar)), 6,71-6,64 (1H, m, $\underline{CH}=\underline{CH}$), 6,41-6,38 (1H, m, CH=CH), 5,30-5,15 (2H, m, \underline{CH}_2 -O-Ph), 4,75 (1H, s, NH- \underline{CH} -C=O), 4,31, 4,14 (2H, s, 2x NH- \underline{CH} -C=O), 3,26, 3,24, 2,98, 2,80 (3H, s, \underline{CH}_3 -S), 1,80-1,18 (12H, m, 2x \underline{CH}_2 - \underline{CH} - $(\text{CH}_3)_2$, \underline{CH}_2 - \underline{CH}_2 - \underline{CH}_2 -CH $_3$), 1,06-0,75 (15H, m, 5x \underline{CH}_3). ^{13}C NMR (400 MHz, CDCl_3): směs rotamerů δ 172,38, 171,18, 165,63, 156,12, 148,00, 147,85, 134,90, 133,66, 131,88, 129,64, 129,35, 128,93, 127,08, 121,68, 114,50, 72,36, 54,54, 54,17, 47,91, 45,18, 43,70, 42,94, 42,66, 40,02, 30,95, 28,17, 24,93, 22,81, 22,44, 22,11, 21,36, 13,87. **CHN analýza:** vypočteno pro $\text{C}_{34}\text{H}_{48}\text{ClN}_3\text{O}_6\text{S}$ (662,28): C, 61,66; H, 7,31; N, 6,34, nalezeno: C, 61,39 \pm 0,07; H, 7,45 \pm 0,02; N, 6,04 \pm 0,01. **HRMS:** m/z vypočteno pro $\text{C}_{34}\text{H}_{48}\text{ClN}_3\text{O}_6\text{S}$: 684,28446 $[\text{M}+\text{Na}]^+$; Nalezeno: 684,28619 $[\text{M}+\text{Na}]^+$.

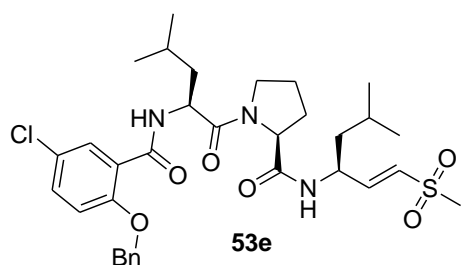
2.1.5.4 Charakterizace produktu 53d



Výtěžek 53 %; žlutý amorf; $R_f = 0,28$ (ethylacetát/*n*-hexan 1:1). ^1H NMR (500 MHz, CDCl_3): směs rotamerů δ 8,43-7,99 (2H, m, 2x \underline{NH}),

7,71-7,33 (7H, m, 7xCH(Ar)), 7,11-7,00 (1H, m, NH), 6,87-6,82 (1H, m, CH(Ar)), 6,62-6,58 (1H, m, CH=CH), 6,43-6,31 (1H, m, CH=CH), 5,23-5,08 (2H, m, CH₂-O-Ph), 4,70 (1H, s, NH-CH-C=O), 4,36-4,26 (2H, m, 2xNH-CH-C=O), 3,19, 2,92, 2,72 (3H, s, CH₃-S), 1,91-1,12 (19H, m, 2xCH₂-CH-(CH₃)₂, CH₂-cyclohexylalanine), 0,99-0,70 (12H, m, 4xCH₃). ¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃): směs rotamerů δ 172,29, 171,72, 165,50, 155,90, 147,85, 134,65, 133,75, 132,22, 129,43, 129,21, 129,07, 128,85, 127,49, 121,14, 114,33, 72,41, 54,04, 52,00, 48,03, 43,01, 42,77, 39,70, 38,37, 34,73, 33,97, 32,27, 29,86, 26,43, 26,15, 25,05, 24,98, 23,10, 22,95, 22,39, 21,95. **CHN analýza:** vypočteno pro C₃₇H₅₂ClN₃O₆S (702,34): C, 63,27; H, 7,46; N, 5,98; Nalezeno: C, 62,51±0,23; H, 7,95±0,01; N, 5,02±0,01. **HRMS: m/z** vypočteno pro C₃₇H₅₂ClN₃O₆S: 724,31630 [M+Na]⁺; Nalezeno: 724,31576 [M+Na]⁺.

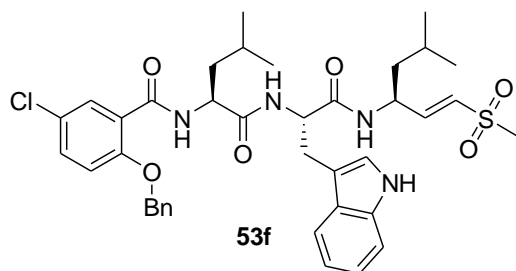
2.1.5.5 Charakterizace produktu 53e



Výtěžek 57 %; průhledný amorf; R_f = 0,29 (ethylacetát/*n*-hexan 4:1). ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃): směs rotamerů δ 8,25 (1H, d, J=6,3 Hz, NH), 8,13-8,08 (1H, m, NH), 7,53-7,32 (7H, m, 7xCH(Ar)), 7,07-7,00 (1H, m, CH(Ar)), 6,84-6,73 (1H, m, CH=CH), 6,53-6,46 (1H, m, CH=CH), 5,20-5,11 (2H, m, CH₂-O-Ph), 4,76-

4,58 (3H, m, 2xNH-CH-C=O, N-CH-C=O), 3,84-3,76 (1H, m, N-CHH), 3,52-3,48 (1H, m, N-CHH), 2,91, 2,77 (3H, s, CH₃-S), 2,32-2,31, 1,93-1,92 (2H, m, CH₂), 1,57-1,47 (1H, m, CH), 1,42-1,22 (6H, m, 3xCH₂), 0,98-0,94 (1H, m, CH), 0,92-0,83 (9H, m, 3xCH₃), 0,71 (3H, d, J=6,5 Hz, CH₃). ¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃): δ 168,12, 165,62, 158,90, 150,45, 142,65, 129,72, 127,71, 126,90, 124,04, 123,96, 123,91, 123,88, 123,43, 121,82, 116,97, 108,90, 66,75, 55,00, 45,42, 42,72, 42,37, 37,81, 37,73, 35,64, 21,63, 20,24, 19,57, 18,13, 17,83, 16,60, 16,34. **CHN analýza:** vypočteno pro C₃₃H₄₄ClN₃O₆S (646,24): C, 61,33; H, 6,86; N, 6,50; S, 4,96. Nalezeno: C, 60,29±0,15; H, 7,06±0,09; N, 5,65±0,04; S, 3,93±0,05. **HRMS: m/z** vypočteno pro C₃₃H₄₄ClN₃O₆S: 668,25370 [M+K]⁺; Nalezeno: 668,25647 [M+K]⁺.

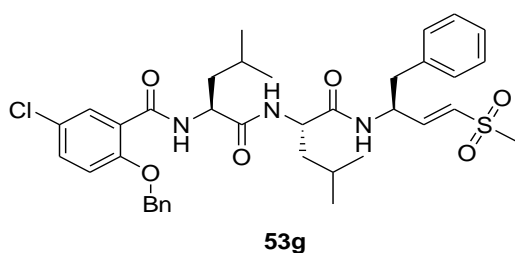
2.1.5.6 Charakterizace produktu 53f



Výtěžek 50 %; bílý amorf; R_f = 0,2 (ethylacetát/*n*-hexan 1:1, vyjeto 3x). ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃-d₁): směs rotamerů δ 8,21 (1H, s, NH), 7,92 (1H, d, J = 4,2 Hz, NH), 7,63 (1H, d, J = 2,7 Hz, NH), 7,51-7,38 (7H, m, 7xCH_{Ar}), 7,09-6,88 (6H, m, 6xCH_{Ar}), 6,75 (1H, dd, J = 4,0, 15,2 Hz, CH=CH), 6,59 (1H, d, J = 7,2 Hz,

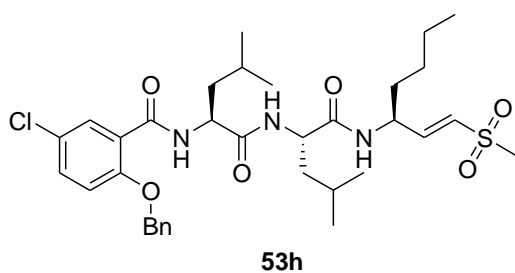
NH), 6,42 (1H, dd, $J = 1,6; 15,2$ Hz, $\text{CH}=\text{CH}$), 5,11-5,02 (2H, m, $\text{O}-\text{CH}_2\text{-Ar}$), 4,69-4,61 (2H, m, $2\times\text{CH}$), 4,12-4,07 (1H, m, $\text{NH}-\text{CH}-\text{C}=\text{O}$), 3,43-3,38 (1H, m, CHH-Trp), 3,19-3,12 (1H, m, CHH-Ar), 2,85 (3H, s, $\text{CH}_3\text{-S}$), 1,51-1,35 (4H, m, $2\times\text{CH}_2$), 1,17-1,05 (2H, m, $2\times\text{CH}$), 0,93 (6H, dd, $J = 6,8, 16$ Hz, $\text{CH}-(\text{CH}_3)_2$), 0,63 (6H, dd, $J = 6,0, 25,2$ Hz, $\text{CH}-(\text{CH}_3)_2$). $^{13}\text{C NMR}$ (400 MHz, CDCl_3): směs rotamerů δ 171,89, 171,33, 165,19, 155,81, 147,66, 136,14, 134,60, 133,36, 131,78, 129,71, 129,40, 129,31, 128,86, 127,35, 126,99, 123,39, 122,55, 122,28, 121,13, 119,82, 117,85, 114,12, 111,55, 109,45, 72,15, 54,59, 54,27, 48,20, 42,88, 42,38, 39,81, 26,44, 24,92, 24,63, 23,21, 23,06, 22,02, 21,36. **CHN analýza:** vypočteno pro $\text{C}_{39}\text{H}_{47}\text{ClN}_4\text{O}_6\text{S}$ (735,33): C, 63,70; H, 6,44; N, 7,62; S, 4,36. Nalezeno: C, $63,70\pm 0,1$; H, $6,50\pm 0,02$; N, $7,46\pm 0,03$; S, $4,04\pm 0,14$. **HRMS:** m/z vypočteno pro $\text{C}_{39}\text{H}_{47}\text{ClN}_4\text{O}_6\text{S}$: 757,28025 $[\text{M}+\text{Na}]^+$; Nalezeno: 757,28143 $[\text{M}+\text{Na}]^+$.

2.1.5.7 Charakterizace produktu 53g



Výtěžek 28 %; lehce žlutý amorf; $R_f = 0,35$ (ethylacetát/*n*-hexan 1:1, vyjeto 2x). $^1\text{H NMR}$ (400 MHz, CD_2Cl_2): směs rotamerů δ 8,45-8,09 (2H, m, $2\times\text{NH}$), 7,62-7,49 (6H, m, $6\times\text{CH}(\text{Ar})$), 7,35-7,16 (6H, m, $6\times\text{CH}(\text{Ar})$), 7,10 (1H, d, $J=8,5$ Hz, NH), 6,91-6,86 (1H, m, $\text{CH}(\text{Ar})$), 6,67-6,25 (2H, m, $\text{CH}=\text{CH}$), 5,26-5,16 (2H, m, $\text{CH}_2\text{-O-Ph}$), 5,00-4,91 (1H, m, $\text{NH}-\text{CH}-\text{C}=\text{O}$), 4,26-4,11 (2H, m, $2\times\text{NH}-\text{CH}-\text{C}=\text{O}$), 3,09-2,92 (2H, m, $\text{CH}_2\text{-Ph}$), 2,88, 2,59 (3H, s, $\text{S}-\text{CH}_3$), 1,79-1,14 (6H, m, $2\times\text{CH}_2-\text{CH}-(\text{CH}_3)_2$), 1,00-0,75 (12H, m, $4\times\text{CH}_3$). $^{13}\text{C NMR}$ (400 MHz, CD_2Cl_2): směs rotamerů δ 172,39, 171,47, 165,68, 156,12, 146,29, 137,00, 134,93, 133,66, 131,93, 130,48, 129,61, 129,34, 129,23, 129,06, 128,86, 128,64, 127,10, 126,96, 121,75, 114,55, 72,36, 54,42, 52,68, 50,50, 47,95, 42,89, 40,04, 39,96, 29,86, 25,12, 24,94, 22,95, 22,79, 21,39, 21,31. **CHN analýza:** vypočteno pro $\text{C}_{37}\text{H}_{46}\text{ClN}_3\text{O}_6\text{S}$ (696,30): C, 63,82; H, 6,66; N, 6,03; nalezeno: C, 63,24; H, $7,01\pm 0,16$; N, $4,91\pm 0,08$. **HRMS:** m/z vypočteno pro $\text{C}_{37}\text{H}_{46}\text{ClN}_3\text{O}_6\text{S}$: 696,28686 $[\text{M}+\text{H}]^+$; nalezeno: 696,28845 $[\text{M}+\text{H}]^+$.

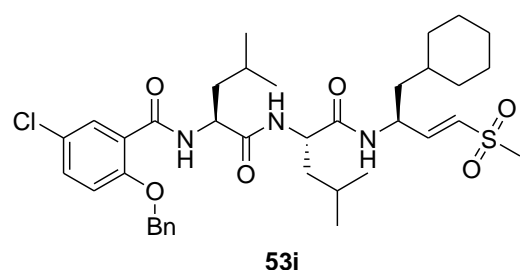
2.1.5.8 Charakterizace produktu 53h



Výtěžek 23 %; lehce žlutý amorf; $R_f = 0,22$ (ethylacetát/*n*-hexan 1:1). $^1\text{H NMR}$ (500 MHz, CD_2Cl_2): směs rotamerů δ 8,39-8,28 (1H, m, NH), 8,13-8,02 (1H, m, NH), 7,58-7,47 (5H, m,

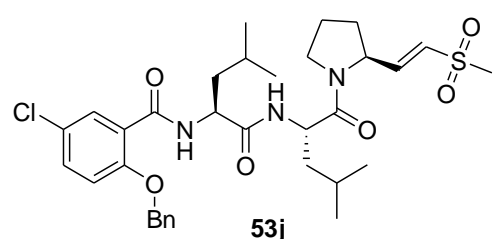
5xCH(Ar)), 7,39, 7,03 (1H, d, J=8 Hz, CH(Ar)), 7,16 (1H, dd, J=9, 25,5 Hz, CH(Ar)), 6,87, 6,68 (1H, dd, J=4, 15 Hz, CH=CH), 6,63, 6,37 (1H, d, J=15, NH), 6,47, 6,24 (1H, m, CH=CH), 5,36, 5,23 (2H, d, J=5,5 Hz, CH₂-O-Ph), 5,25–5,16 (1H, m, NH-CH-CH=CH), 4,33–4,29 (1H, m, NH-CH-C=O), 4,25–4,21 (1H, m, NH-CH-C=O), 4,15–4,11 (1H, m, NH-CH-C=O), 2,93, 2,64 (3H, s, CH₃-S), 1,88–1,58 (5H, m), 1,54–1,41 (6H, m), 1,23–1,15 (1H, m), 1,01–0,89 (9H, m, (CH₃)₂, CH₃-CH₂), 0,83–0,75 (6H, m, (CH₃)₂). ¹³C NMR (400 MHz, CD₂Cl₂): směs rotamerů δ 172,36, 171,56, 165,12, 156,10, 147,50, 134,89, 133,64, 131,90, 129,65, 129,33, 128,93, 127,07, 121,65, 114,44, 72,33, 54,54, 53,13, 52,54, 49,70, 42,95, 40,04, 39,45, 33,59, 28,31, 25,28, 24,93, 23,09, 22,80, 22,53, 22,17, 21,35, 13,89. **CHN analýza:** vypočteno pro C₃₄H₄₈ClN₃O₆S (662,28): C, 61,66; H, 7,31; N, 6,34; nalezeno: C, 62,07±0,24; H, 7,23±0,03; N, 6,17±0,12. **HRMS:** m/z vypočteno pro C₃₄H₄₈ClN₃O₆S: 662,30251 [M+H]⁺; nalezeno: 662,30365 [M+H]⁺.

2.1.5.9 Charakterizace produktu 53i



Výtěžek 44 %; bílý amorf; R_f = 0,25 (ethylacetát/*n*-hexan 1:1). ¹H NMR (500 MHz, CDCl₃): směs rotamerů δ 8,49-8,23 (1H, m, NH), 8,12-7,99 (1H, m, NH), 7,57-7,04 (8H, m, 8xCH(Ar)), 6,88-6,24 (2H, m, CH=CH), 5,25-5,09 (2H, m, CH₂-O-Ph), 4,74-4,69 (1H, m, NH), 4,34-4,33 (1H, m, NH-CH-C=O), 4,26-4,09 (1H, m, NH-CH-C=O), 2,93, 2,75 (3H, s, CH₃-S), 1,89-1,14 (19H, m, 2xCH₂-CH-(CH₃)₂, CH₂-cyklohexan), 0,99-0,86 (6H, m, 2xCH₃), 0,78-0,71 (6H, m, 2xCH₃). ¹³C NMR (400 MHz, CDCl₃): směs rotamerů δ 172,42, 171,97, 165,65, 155,94, 147,99, 134,66, 133,82, 132,24, 129,47, 129,27, 129,14, 128,87, 127,54, 121,56, 114,31, 72,39, 54,29, 52,74, 47,43, 43,08, 41,3, 40,38, 39,84, 34,42, 33,68, 32,63, 26,59, 26,36, 26,21, 25,43, 25,04, 23,36, 22,49, 21,64, 1,26. **CHN analýza:** vypočteno pro C₃₇H₅₂ClN₃O₆S (702,34): C, 63,27; H, 7,46; N, 5,98; nalezeno: C, 63,15±0,06; H, 7,65±0,01; N, 5,64±0,02. **HRMS:** m/z vypočteno pro C₃₇H₅₂ClN₃O₆S: 724,31576 [M+Na]⁺; nalezeno: 724,31775 [M+Na]⁺.

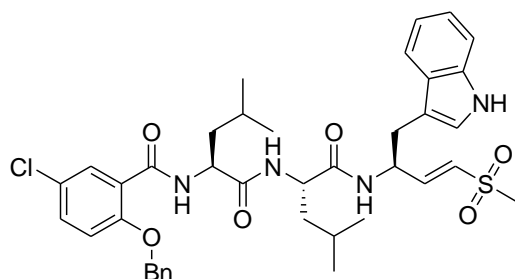
2.1.5.10 Charakterizace produktu 53j



Výtěžek 10 %; lehce žlutý amorf; R_f = 0,34 (ethylacetát/*n*-hexan 1:1, vyjeto 3x). ¹H NMR (400 MHz, CD₂Cl₂): směs rotamerů δ 8,15-8,08 (2H, m, 2xNH), 7,58-7,45 (6H, m, 6xCH(Ar)), 7,11-7,08 (1H, m, CH(Ar)), 6,79-6,70 (1H, m, CH(Ar)), 6,34-

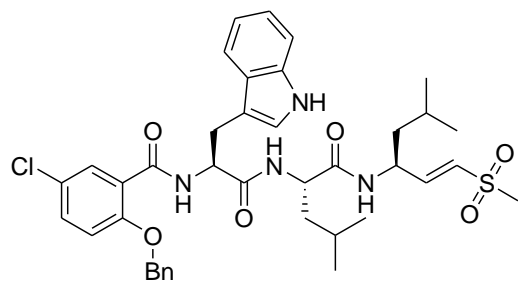
6,06 (2H, m, $\underline{CH=CH}$), 5,37-5,31 (1H, m, $\underline{N-CH}$), 5,23-5,16 (2H, m, $\underline{CH_2-O-Ph}$), 4,75-7,69 (1H, m, $\underline{NH-CH-C=O}$), 4,50-4,43 (1H, m, $\underline{NH-CH-C=O}$), 3,87-3,82, 3,57-3,46 (2H, m, $\underline{N-CH_2}$), 3,14-3,07 (3H, m, $\underline{CH_3-S}$), 2,36-1,13 (10H, m, $2 \times \underline{CH_2-CH-(CH_3)_2}$, $\underline{N-CH_2-CH_2-CH_2-CH}$), 0,95-0,89 (6H, m, $2 \times \underline{CH_3}$), 0,82-0,75 (6H, m, $2 \times \underline{CH_3}$). $^{13}\text{C NMR}$ (100 MHz, CD_2Cl_2): směs rotamerů δ 171,58, 163,98, 155,74, 148,31, 146,21, 135,26, 132,77, 131,96, 131,07, 129,17, 128,90, 128,56, 126,82, 122,79, 114,40, 72,02, 54,85, 52,56, 49,29, 47,55, 47,24, 43,13, 42,32, 40,43, 31,72, 25,28, 24,87, 23,22, 22,86, 21,89, 21,57. **CHN analýza:** vypočteno pro $\text{C}_{33}\text{H}_{44}\text{ClN}_3\text{O}_6\text{S}$ (646,24): C, 61,33; H, 6,86; N, 6,50; nalezeno: C, 61,06 \pm 0,05; H, 6,96 \pm 0,02; N, 5,94 \pm 0,08. **HRMS:** m/z vypočteno pro $\text{C}_{33}\text{H}_{44}\text{ClN}_3\text{O}_6\text{S}$: 668,25316 $[\text{M}+\text{Na}]^+$; nalezeno: 668,35476 $[\text{M}+\text{Na}]^+$.

2.1.5.11 Charakterizace produktu 53k



53k

Výtěžek 34 %; lehce žlutý amorf; $R_f = 0,42$ (1:1 ethylacetát/*n*-hexan, vyjeto 4x). $^1\text{H NMR}$ (400 MHz, CDCl_3): směs rotamerů δ 8,45 (1H, s, \underline{NH}), 8,19-8,11 (2H, m, $2 \times \underline{NH}$), 7,54-7,25 (8H, m, $8 \times \underline{CH(Ar)}$), 7,16-6,94 (6H, m, $5 \times \underline{CH(Ar)}$), \underline{NH}), 6,47 (1H, d, $J=15,1$ Hz, $\underline{CH=CH}$), 6,33-6,30 (1H, m, $\underline{CH=CH}$), 5,21-5,05 (3H, m, $\underline{CH_2-O-Ph}$, $\underline{NH-CH-C=O}$), 4,28-4,24 (2H, m, $2 \times \underline{NH-CH-C=O}$), 3,15-3,04 (2H, m, $\underline{CH_2-Trp}$), 2,74-2,57 (3H, m, $\underline{CH_3-S}$), 1,60-1,05 (6H, m, $2 \times \underline{CH_2-CH-(CH_3)_2}$), 0,85-0,63 (12H, m, $4 \times \underline{CH_3}$). $^{13}\text{C NMR}$ (100 MHz, CDCl_3): směs rotamerů δ 172,54, 171,67, 165,42, 155,89, 146,84, 136,35, 134,71, 133,67, 132,24, 129,96, 129,67, 129,42, 128,76, 127,71, 127,47, 123,41, 122,24, 121,72, 119,59, 118,76, 114,27, 111,64, 110,31, 72,28, 53,81, 52,34, 50,29, 42,74, 39,93, 39,78, 30,06, 25,16, 24,99, 23,26, 23,03, 21,63, 21,56. **CHN analýza:** Vypočteno pro $\text{C}_{39}\text{H}_{47}\text{ClN}_4\text{O}_6\text{S}$ (735,33): C, 63,70; H, 6,44; N, 7,62. Nalezeno: C, 64,49 \pm 0,01; H, 6,81 \pm 0,02; N, 6,46 \pm 0,05. **HRMS:** m/z vypočteno pro $\text{C}_{39}\text{H}_{47}\text{ClN}_4\text{O}_6\text{S}$: 757,27970 $[\text{M}+\text{Na}]^+$; nalezeno: 757,28009 $[\text{M}+\text{Na}]^+$.



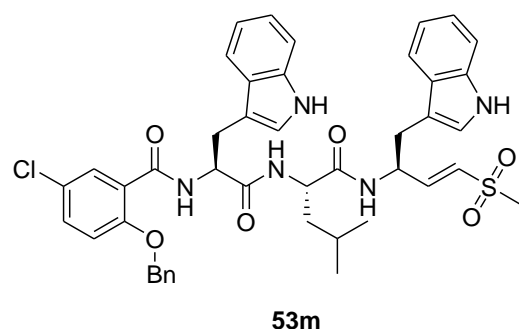
53l

2.1.5.12 Charakterizace produktu 53l

Výtěžek 56 %; lehce žlutý amorf; $R_f = 0,466$ (1:1 ethylacetát/*n*-hexan, vyjeto 4x). $^1\text{H NMR}$ (400 MHz, CDCl_3): směs rotamerů δ 8,51-8,45 (2H, m, $2 \times \underline{NH}$), 8,05 (1H, d, $J=2,4$ Hz, \underline{NH}), 7,56 (1H, d, $J=7,6$ Hz, \underline{NH}), 7,40-7,27 (7H, m, $7 \times \underline{CH(Ar)}$), 7,17-

7,06 (2H, m, 2xCH(Ar)), 7,01-6,94 (1H, m, CH(Ar)), 6,82-6,77 (2H, m, 2xCH(Ar)), 6,61-6,52 (2H, m, CH(Ar), CH=CH), 6,32 (1H, d, J=6,7 Hz, CH=CH), 5,05-4,97 (2H, m, CH₂-O-Ph), 4,82-4,77 (1H, m, NH-CH-CH=CH), 4,66-4,59 (1H, m, NH-CH-C=O), 4,33-4,28 (1H, m, NH-CH-C=O), 3,23-3,17 (1H, m, CHH-indol), 3,08-3,02 (1H, m, CHH-indol), 2,95 (s, 3H, CH₃-S), 1,70-1,63 (1H, m, CH₂-CH), 1,54-1,21 (5H, m, CH₂-CH, CH₂-CH), 0,89-0,83 (9H, m, 3xCH₃), 0,79-0,75 (3H, m, CH₃). ¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃): směs rotamerů δ 171,94, 171,77, 165,64, 155,66, 184,03, 136,34, 135,09, 133,53, 132,01, 129,29, 129,27, 128,99, 127,87, 127,26, 127,15, 123,67, 122,58, 121,93, 120,04, 118,65, 114,77, 111,76, 109,71, 71,76, 55,79, 51,91, 47,94, 43,00, 42,41, 40,30, 26,98, 25,04, 23,24, 22,97, 21,84, 21,50. **CHN analýza:** Vypočteno pro C₃₉H₄₇ClN₄O₆S (735,33): C, 63,70; H, 6,44; N, 7,62. Nalezeno: C, 63,29±0,02; H, 6,49±0,03; N, 7,47±0,09. **HRMS:** m/z vypočteno pro C₃₉H₄₇ClN₄O₆S: 757,27970 [M+Na]⁺; nalezeno: 757,28180 [M+Na]⁺.

2.1.5.13 Charakterizace produktu 53m

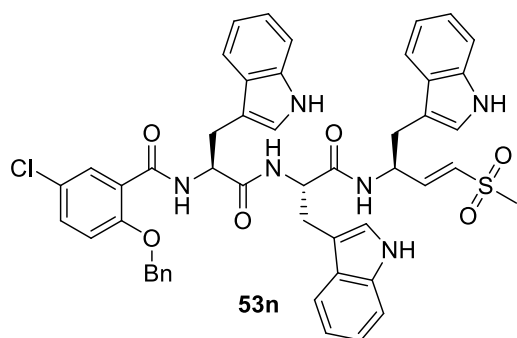


Výtěžek 14 %; lehce žlutý amorf;

R_f = 0,303 (2:1 ethylacetát/*n*-hexan, vyjeto 2x). ¹H NMR (500 MHz, DMSO): směs rotamerů δ 10,91 (1H, s, NH), 10,76 (1H, s, NH), 8,46 (1H, d, J=7,0 Hz, NH), 8,34 (2H, t, J=7,1 Hz, 2xNH), 7,72 (1H, d, J=2,7 Hz, CH(Ar)), 7,62 (1H, d, J=7,9 Hz, CH(Ar)), 7,52 (1H, d, J=7,9 Hz, CH(Ar)), 7,45 (1H, q, J=3,8

Hz, CH(Ar)), 7,34 (1H, d, J=8,0 Hz, CH(Ar)), 7,29-7,25 (7H, m, 7xCH(Ar)), 7,18-7,15 (2H, m, 2xCH(Ar)), 7,08-7,05 (1H, m, CH(Ar)), 7,03-6,97 (2H, m, 2xCH(Ar)), 6,91-6,88 (1H, m, CH(Ar)), 6,86-6,85 (1H, m, CH=CH), 6,81-6,76 (1H, m, CH=CH), 5,16 (2H, s, CH₂-O-Ph), 4,82-4,78 (2H, m, 2xNH-CH-C=O), 4,29-4,25 (1H, m, NH-CH-CH=CH), 3,21-3,17 (1H, m, CHH-indol), 3,12-3,06 (1H, m, CHH-indol), 2,94-2,88 (2H, m, CH₂-indol), 2,77 (3H, s, CH₃-S), 1,37-1,26 (3H, m, CH₂-CH), 0,81 (3H, d, J=5,9 Hz, CH₃), 0,75 (3H, d, J=6,0 Hz, CH₃). ¹³C NMR (100 MHz, DMSO): směs rotamerů δ 172,05, 171,68, 163,50, 155,20 146,60, 136,60, 136,48, 136,27, 132,44, 130,51, 130,34, 128,99, 128,61, 128,10, 127,74, 127,56, 125,25, 124,39, 124,17, 124,12, 121,36, 118,86, 118,80, 118,70, 116,40, 111,81, 111,73, 110,34, 109,82, 70,69, 54,32, 51,99, 50,66, 42,43, 29,56, 28,18, 24,43, 23,19, 22,25. **CHN analýza:** Vypočteno pro C₄₄H₄₆ClN₅O₆S (808,38): C, 65,37; H, 5,74; N, 8,66. Nalezeno: C, 64,93±0,12; H, 6,02±0,02; N, 8,53±0,07. **HRMS:** m/z vypočteno pro C₄₄H₄₆ClN₅O₆S: 830,25398 [M+K]⁺; nalezeno: 830,27710 [M+K]⁺.

2.1.5.14 Charakterizace produktu 53n



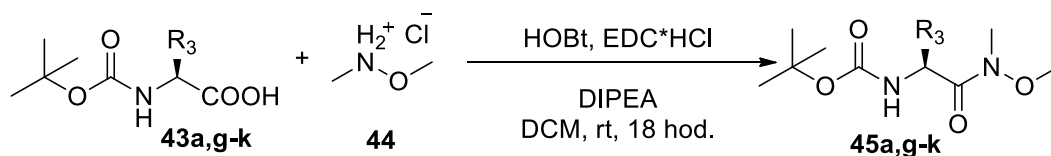
Výtěžek 55 %; lehce žlutý amorf; $R_f = 0,2$ (40:5 DCM/acetone, vyjeto 2x, vizualizace kyselinou fosfomolybdenovou). $^1\text{H NMR}$ (400 MHz, CDCl_3): směs rotamerů δ 8.62 – 8.01 (5H, m, 5xNH), 7.61 – 6.70 (21H, m, NH, 20xCH(Ar)), 6,88-6,85 (1H, m, CH=CH), 6,81-6,4 (1H, m, CH=CH), 6.49 (2H, dd, $J = 23.4, 9.5$ Hz,

2xCH(Ar)), 6.35 (1H, dt, $J = 13.4, 6.0$ Hz, CH(Ar)), 4.94 – 4.72 (3H, m, NH-CH-CH=O, CH₂-O-Ph), 4.71 – 4.52 (2H, m, 2xNH-CH-C=O), 3.28 – 2.71 (9H, m, 3xCH₂-indol, CH₃-S).

$^{13}\text{C NMR}$ (400 MHz, CDCl_3): směs rotamerů δ 171,51, 171,25, 171,03, 170,84, 170,50, 164,21, 155,41, 140,22, 139,15 136,09, 136,02, 135,39, 132,62, 131,53, 128,87, 128,63, 127,86, 127,65, 127,59, 127,33, 127,29, 126,42, 123,52, 122,01, 121,67, 119,43, 119,25 119,16, 118,76, 118,38, 114,63, 111,34, 111,02, 110,07, 109,68, 71,27, 61,53, 60,30, 59,24, 55,72, 54,84, 53,78, 53,42, 50,18, 49,89. **CHN analýza:** Vypočteno pro $\text{C}_{49}\text{H}_{45}\text{ClN}_6\text{O}_6\text{S}$ (881,43): C, 66,77; H, 5,15; N, 9,53. Nalezeno: C, 63,65±0,01; H, 6,07±0,01; N, 7,45±0,05.

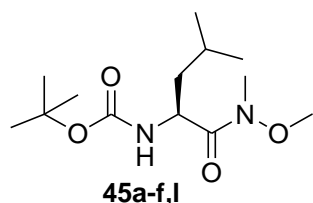
HRMS: m/z vypočteno pro $\text{C}_{49}\text{H}_{45}\text{ClN}_6\text{O}_6\text{S}$: 903,27020 $[\text{M}+\text{Na}]^+$; nalezeno: 903,27234 $[\text{M}+\text{Na}]^+$.

2.1.6 Obecná příprava mono-peptidického Boc-weinreb amidu (45)



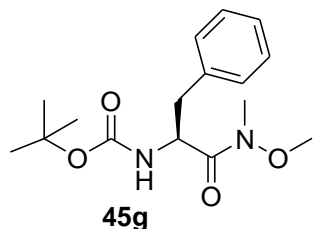
Do baňky byla předložena kyselina (**43a,g-k**) (1 mmol), která byla rozpuštěna v DCM (40 ml). Poté byl nadávkován HOBT (1,1 mmol) a EDC·HCl (1,2 mmol) a reakční směs byla míchána 1 hodinu. Poté byl přidán *N,O*-dimethylhydroxylamin hydrochlorid (**44**) a DIPEA (1,2 mmol) a reakční směs se nechala míchat 18 hodin. Následně bylo odpařeno rozpouštědlo pomocí RVO a zbytek v baňce se rozpustil v EtOAc. Následně byly provedeny extrakce nasyceným roztokem NaHCO₃ (3x), 5% kyselinou citronovou (3x) a solankou (1x). Organická fáze se vysušila bezvodým Na₂SO₄, který se následně odfiltroval a produkt (**45a,g-k**) se izoloval sloupcovou chromatografií.

2.1.6.1 Charakterizace produktu 45a



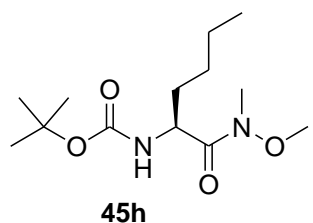
Komerčně dostupná látka.

2.1.6.2 Charakterizace produktu 45g



Komerčně dostupná látka.

2.1.6.3 Charakterizace produktu 45h

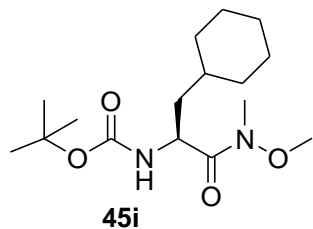


Výtěžek 45 %; čirý olej; $R_f = 0,488$ (1:1 ethylacetát/*n*-hexan). ¹H NMR (500 MHz, CDCl₃): δ 5,16 (1H, d, J = 8,2 Hz, NH), 4,65 (1H, d, J = 3,2 Hz, NH-CH-C=O), 3,77 (3H, s, CH₃-O), 3,20 (3H, s, CH₃-N), 1,60 (2H, m, CH₂), 1,44 (9H, d, J = 13,4 Hz, (CH₃)₃), 1,39 – 1,24 (4H, m, CH₂-CH₂), 0,88 (3H, t, J = 6,7 Hz, CH₃-CH₂).

¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃): δ 174,13, 156,29, 80,13, 62,30, 51,00, 33,30, 32,73, 29,05, 28,16, 23,05, 14,58. **CHN analýza:** Vypočteno pro C₁₃H₂₆N₂O₄ (274,36): C, 56,91; H, 9,55; N, 10,21. Nalezeno: C, 57,47±0,09; H, 9,73±0,02; N, 10,24±0,01.

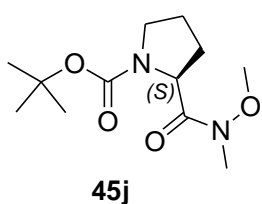
HRMS: m/z vypočteno pro $C_{13}H_{26}N_2O_4$: 313,15242 $[M+K]^+$; nalezeno: 313,21283 $[M+K]^+$.

2.1.6.4 Charakterizace produktu 45i



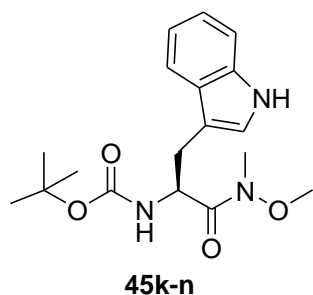
Výtěžek 40 %; čirý olej; $R_f = 0,444$ (1:1 ethylacetát/*n*-hexan, vizualizace kyselinou fosfomolybdenovou). **1H NMR** (500 MHz, $CDCl_3$): δ 5,05 (1H, d, $J = 8,8$ Hz, NH), 4,74 (1H, s, $NH-CH-C=O$), 3,77 (3H, s, CH_3-O), 3,18 (3H, s, CH_3-N), 1,89 (1H, d, $J = 12,6$ Hz, CH -cyklohexyl), 1,75 – 1,56 (4H, m, CH_2 , $CH_2-CH-NH$), 1,53 – 1,32 (12H, m, $(CH_3)_3$, CH_2 , CHH), 1,29 – 1,08 (3H, m, CHH , CH_2), 0,99 – 0,83 (2H, m, CH_2), **^{13}C NMR** (100 MHz, $CDCl_3$): δ 155,84, 79,62, 61,76, 48,50, 40,65, 34,20, 34,14, 32,37, 28,51, 26,64, 26,43, 26,21. **CHN analýza:** Vypočteno pro $C_{16}H_{30}N_2O_4$ (314,42): C, 61,12; H, 9,62; N, 8,91. Nalezeno: C, 61,98 \pm 0,01; H, 9,74 \pm 0,04; N, 8,78 \pm 0,01. **HRMS:** m/z vypočteno pro $C_{16}H_{30}N_2O_4$: 337,20978 $[M+Na]^+$; nalezeno: 337,21039 $[M+Na]^+$.

2.1.6.5 Charakterizace produktu 45j



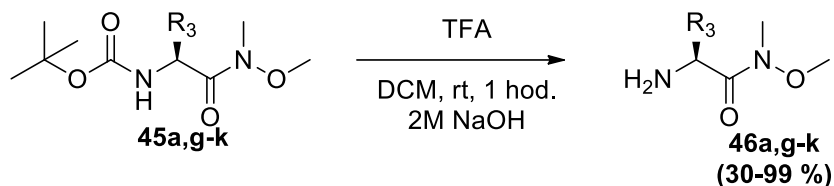
Výtěžek 60 %; čirý olej; $R_f = 0,3$ (1:1 ethylacetát/*n*-hexan). **1H NMR** (500 MHz, $CDCl_3$): δ 4,71 – 4,55 (1H, m, $N-CH-C=O$), 3,73 (3H, s, CH_3-O), 3,59 – 3,50 (1H, m, CHH), 3,48 – 3,35 (1H, m, CHH), 3,17 (3H, s, CH_3-N), 2,23 – 2,09 (1H, m, CHH), 2,03 – 1,77 (3H, m, CH_2 , CHH), 1,41 (9H, d, $J = 22,4$ Hz, $(CH_3)_3$). **CHN analýza:** Vypočteno pro $C_{12}H_{22}N_2O_4$ (258,31): C, 55,80; H, 8,58; N, 10,84. Nalezeno: C, 55,65 \pm 0,15; H, 8,78 \pm 0,01; N, 10,73 \pm 0,02. **HRMS:** m/z vypočteno pro $C_{12}H_{22}N_2O_4$: 298,10835 $[M+Na]^+$; nalezeno: 298,10895 $[M+Na]^+$.

2.1.6.6 Charakterizace produktu 45k-n



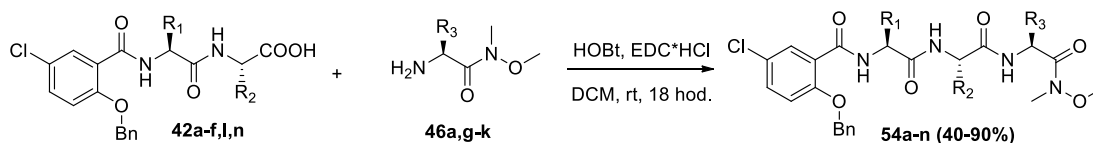
Výtěžek 45 %; bílá amorfnní látka; $R_f = 0,272$ (1:1 ethylacetát/*n*-hexan). **1H NMR** (400 MHz, $CDCl_3$): δ 8,41 (1H, s, NH), 7,60 (1H, d, $J = 7,7$ Hz, $CH(Ar)$), 7,33 (1H, d, $J = 8,0$ Hz, $CH(Ar)$), 7,21 – 7,09 (2H, m, 2x $CH(Ar)$), 7,01 (1H, s, $CH(Ar)$), 5,29 (1H, d, $J = 7,8$ Hz, NH), 5,03 (1H, s, $NH-CH-C=O$), 3,64 (3H, s, CH_3-O), 3,29 – 3,10 (5H, m, CH_3-N , CH_2 -indol), 1,42 (9H, s, $(CH_3)_3$). **CHN analýza:** Vypočteno pro $C_{18}H_{25}N_3O_4$ (374,41): C, 62,23; H, 7,25; N, 12,10. Nalezeno: C, 62,37 \pm 0,13; H, 7,35 \pm 0,01; N, 11,61 \pm 0,02. **HRMS:** m/z vypočteno pro $C_{18}H_{25}N_3O_4$: 298,10835 $[M+Na]^+$; nalezeno: 298,10895 $[M+Na]^+$.

2.1.7 Obecná příprava odchráněného mono-peptidického weinreb amidu (46)



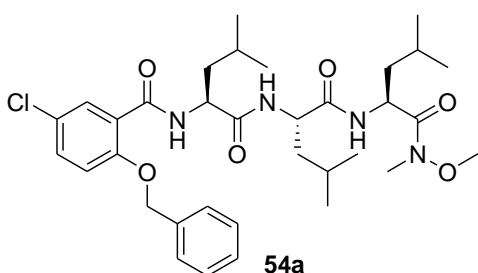
Do baňky byl předložen Boc-WA (**45a,g-k**) (1 ekv), který byl rozpuštěn v DCM. Dále bylo postupně přikapáno TFA (20 ekv) a reakční směs se nechala míchat 1 hodinu. Po této době byl průběh reakce zkontrolován pomocí TLC. Po vymizení výchozí látky se rozpouštědlo zahustilo pomocí RVO (za použití vodní vývěvy z důvodu použití agresivních rozpouštědel). Zbytek v baňce se ještě 3x promyl DCM. Následně byl rozpuštěn v malém množství DCM a zneutralizován na pH=7 pomocí 2M roztoku NaOH. Poté byly provedeny extrakce nasyceným roztokem NaHCO₃ a vodou. Organická fáze byla vysušena bezvodým Na₂SO₄. Produkt (**46a,g-k**) se neizoloval ani necharakterizoval a rovnou se s ním přistoupilo do další reakce.

2.1.8 Obecná příprava tripeptidického weinreb amidu (54)



Do baňky bylo předložena kyselina (**42a-f,l,n**) (1 ekv), která byla rozpuštěna v DCM. Následně byl nadávkován HOBT·H₂O (1,1 ekv) a EDC·HCl (0,95 ekv). RS se nechala míchat asi hodinu, čímž došlo k aktivaci kyseliny. Následně se nadávkoval roztok weinrebamidu (**46a,g-k**) (1 ekv) v DCM. Reakční směs se nechala míchat 18 hodin, kdy po této době došlo k vymizení výchozí látky. DCM se odpařil na RVO a zbytek v baňce se rozpustil v EtOAc. Následně byly provedeny extrakce nasyceným roztokem NaHCO₃ (3x), 5% kyselinou citronovou (3x) a solankou (1x). Organická fáze se vysušila bezvodým Na₂SO₄, který se následně odfiltroval a produkt (**54a-n**) se izoloval sloupcovou chromatografií.

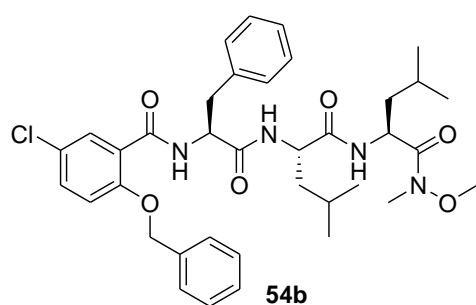
2.1.8.1 Charakterizace produktu 54a



Výtěžek 95 %; žlutý amorf; R_f = 0,232 (1:1 ethylacetát/*n*-hexan). ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃): směs rotamerů δ 8.32 – 8.17 (2H, m, 2xNH), 7.59 –

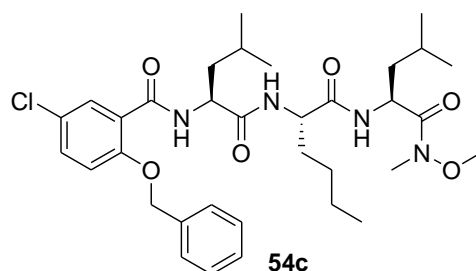
7.38 (7H, m, 7xCH(Ar)), 7.12 – 7.05 (1H, m, CH(Ar)), 6.77 (1H, dd, J = 45.5, 8.4 Hz, NH), 5.28 – 5.15 (2H, m m, CH₂-O-Ph), 5.07 (1H, d, J = 7.0 Hz, NH-CH-C=O), 4.62 – 4.53 (1H, m, NH-CH-C=O), 4.45 (1H, dd, J = 10.9, 6.0 Hz, NH-CH-C=O), 3.89, 3.84 (3H, s, CH₃-O), 3.25, 3.03 (3H, s, CH₃-N), 1.80 – 1.18 (9H, m, 3xCH₂-CH), 1.03 – 0.76 (18H, m, (CH₃)₆). ¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃): směs rotamerů δ 172.04, 171.83, 164.48, 155.64, 134.92, 132.98, 132.34, 129.29, 128.55, 127.21, 122.50, 114.18, 72.09, 61.79, 52.47, 52.03, 47.85, 41.84, 40.82, 40.00, 24.92, 24.87, 24.85, 24.83, 23.49, 23.17, 22.99, 22.03, 21.79. **CHN analýza:** Vypočteno pro C₃₄H₄₉ClN₄O₆ (645,23): C, 63,29; H, 7,65; N, 8,68. Nalezeno: C, 60,00±0,06; H, 8,25±0,01; N, 6,92±0,04. **HRMS:** m/z vypočteno pro C₃₄H₄₉ClN₄O₆: 645,34134 [M+H]⁺; nalezeno: 645,34113 [M+H]⁺.

2.1.8.2 Charakterizace produktu 54b



Výtěžek 93 %; nažloutlý amorf; R_f = 0,17 (1:1 ethylacetát/*n*-hexan). ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃): δ 8,32 (1H, d, J=7,0 Hz, NH), 8,12 (1H, d, J=2,8 Hz, NH), 7,38 (6H, m, 6xCH(Ar)), 7,17 (3H, m, 3xCH(Ar)), 6,99 (2H, m, 2xCH(Ar)), 6,90 (1H, d, J=8,9 Hz, CH(Ar)), 6,65 (1H, d, J=8 Hz, CH(Ar)), 6,56 (1H, d, J=8,7 Hz, NH), 5,12 (2H, dd, J=11,6; 30,5 Hz, CH₂-O-Ph), 5,0 (1H, m, NH-CH-C=O), 4,81 (1H, m, NH-CH-C=O), 4,41 (1H, m, NH-CH-C=O), 3,78 (3H, s, CH₃-O), 3,19 (3H, s, CH₃-O), 3,10 (1H, dd, J=5,6; 14,1 Hz, CHH-Ph), 2,84 (1H, m, CHH-Ph), 1,62 (2H, m, 2xCH), 1,52 (4H, m, 2xCH₂), 0,93 (6H, dd, J=6,4; 9,9 Hz, (CH₃)₂), 0,84 (6H, dd, J=2,88; 6,3 Hz, (CH₃)₂). ¹³C NMR (100,6 MHz, CDCl₃): δ 171,63, 171,04, 164,54, 155,48, 136,85, 136,30, 135,23, 132,95, 132,28, 129,26, 129,13, 128,73, 127,89, 127,14, 127,00, 122,46, 114,53, 71,74, 55,32, 52,13, 47,92, 41,87, 41,19, 37,08, 30,51, 24,97, 24,84, 23,50, 23,16, 22,04, 21,87, 1,53, 0,18. **CHN analýza:** Vypočteno pro C₃₇H₄₇ClN₄O₆ (679,32): C, 65,42; H, 6,97; N, 8,25. Nalezeno: C, 66,10±0,26; H, 7,29±0,02; N, 6,92±0,01. **HRMS:** m/z vypočteno pro C₃₇H₄₇ClN₄O₆: 701,30763 [M+Na]⁺; nalezeno: 701,30811 [M+Na]⁺.

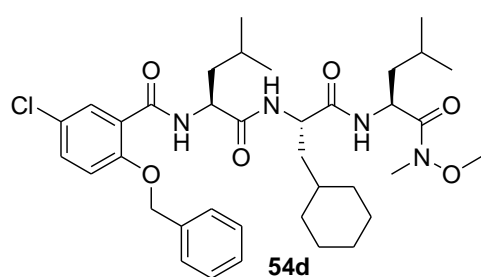
2.1.8.3 Charakterizace produktu 54c



Výtěžek 73 %; bílá krystalická látka; R_f = 0,272 (1:1 ethylacetát/*n*-hexan). ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃): δ 8,25 (1H, m, NH), 8,15 (1H, m, NH), 7,50-7,38 (7H, m, 7xCH_{Ar}), 7,05 (1H, m, CH_{Ar}), 6,75 (1H, m, NH), 5,15 (2H, m, Ar-CH₂-O), 4,95 (1H, m,

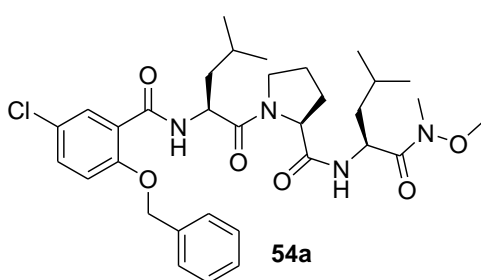
CH), 4,5-4,31 (2H, m, 2x*CH*), 3,75 (3H, s, *CH*₃-O), 3,13 (3H, s, *CH*₃-N), 1,87 (1H, m, *CH*), 1,67-1,14 (11H, m, 5x*CH*₂, *CH*), 0,90-0,84 (9H, m, 3x*CH*₃), 0,79 (3H, d, J = 6,4 Hz, *CH*₃), 0,70 (3H, d, J = 6,8 Hz, *CH*₃). ¹³C NMR (100,6 MHz, CDCl₃): δ 171,90, 171,59, 164,60, 155,82, 136,85, 135,01, 132,95, 132,37, 129,28, 128,72, 128,57, 127,07, 122,44, 114,19, 72,12, 61,70, 53,28, 52,78, 47,88, 41,59, 40,02, 32,31, 31,90, 27,73, 24,88, 24,83, 23,40, 22,94, 22,51, 22,02, 21,79, 14,09. **CHN analýza:** Vypočteno pro C₃₄H₄₉ClN₄O₆ (645,23): C, 63,29; H, 7,65; N, 8,68. Nalezeno: C, 63,51±0,36; H, 7,77±0,02; N, 8,32±0,09. **HRMS:** m/z vypočteno pro C₃₄H₄₉ClN₄O₆: 667,32328 [M+Na]⁺; nalezeno: 667,32501 [M+Na]⁺.

2.1.8.4 Charakterizace produktu 54d



Výtěžek 24 %; nažloutlý amorf; R_f = 0,377 (ethylacetát/*n*-hexan 2:3, vyjeto 4x). ¹H NMR (500 MHz, CDCl₃): δ 8,31-8,24 (1H, m, *NH*), 8,21-8,15 (1H, m, *NH*), 7,52-7,41 (6H, m, 6x*CH*(Ar)), 7,06-7,02 (1H, m, *CH*(Ar)), 6,81-6,79 (1H, m, *CH*(Ar)), 5,22-5,12 (2H, m, *CH*₂-O-Ph), 4,97-4,96 (1H, m, *NH*), 4,55-4,44 (2H, m, 2x*NH-CH-C=O*), 3,88-3,77 (3H, m, *CH*₃-O), 3,20-2,99 (3H, m, *CH*₃-N), 1,82-1,50 (10H, m, *CH*₂-*CH*₂-*CH*₂-*CH*₂-*CH*₂), 1,46-1,37 (2H, m, *CH-CH*₂-*CH*), 1,29-1,26 (1H, m, *CH-CH*₂-*CH*), 1,23-1,12 (4H, m, 2x*CH-CH*₂-*CH*), 0,99-0,90 (3H, m, *CH-CH*₂-*CH*, *CH-CH*₂-*CH*), 0,89-0,74 (12H, m, 4x*CH*₃). ¹³C NMR (100,6 MHz, CDCl₃): δ 171,92, 164,64, 155,86, 135,00, 133,01, 132,43, 129,29, 128,75, 128,59, 127,08, 122,36, 114,18, 72,17, 61,72, 52,93, 52,25, 51,20, 47,87, 41,85, 41,51, 39,97, 39,32, 34,31, 34,11, 34,02, 32,39, 26,58, 26,23, 24,88, 23,41, 22,82, 22,20, 21,81. **CHN analýza:** Vypočteno pro C₃₇H₅₃ClN₄O₆ (685,29): C, 64,85; H, 7,80; N, 8,18. Nalezeno: C, 64,44±0,32; H, 7,82±0,10; N, 8,33±0,14. **HRMS:** m/z vypočteno pro C₃₇H₅₃ClN₄O₆: 707,35513 [M+Na]⁺; nalezeno: 707,35458 [M+Na]⁺.

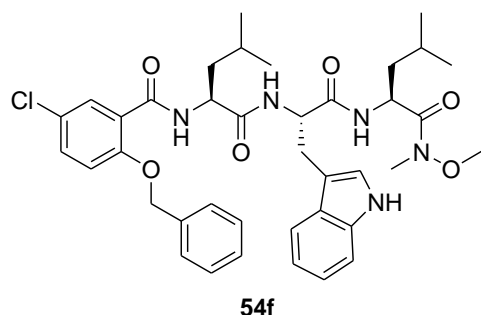
2.1.8.5 Charakterizace produktu 54e



Výtěžek 76 %; nažloutlý amorf; R_f = 0,360 (3:1 ethylacetát/*n*-hexan, vyjeto 3x). ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃): směs rotamerů δ 8,35 – 8,20 (1H, m, *NH*), 8,17 – 8,09 (1H, m, *NH*), 7,51 (2H, d, J = 7,1 Hz, 2x*CH*(Ar)), 7,47 – 7,34 (4H, m, 4x*CH*(Ar)), 7,10 (1H, d, J = 8,4 Hz, *CH*(Ar)), 7,00 (1H, d, J = 8,8 Hz, *CH*(Ar)), 5,25 – 5,07 (2H, m, *CH*₂-O-Ph), 4,97 (1H, d, J = 6,5 Hz, *NH-CH-C=O*), 4,87 (1H,

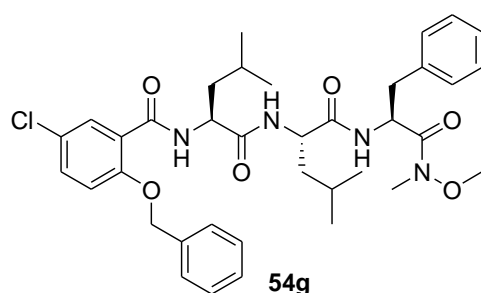
dd, $J = 14,4, 7,6$ Hz, NH- \underline{CH} -C=O), 4,58 (1H, dd, $J = 8,0, 2,2$ Hz, N- \underline{CH}), 3,92 – 3,76 (4H, m, \underline{CH}_3 -O, \underline{CHH} -N), 3,63 – 3,53 (1H, m, \underline{CHH} -N), 3,20, 3,09 (3H, s, \underline{CH}_3 -N), 2,34 – 2,25 (1H, m, \underline{CHH}), 2,20 – 2,08 (1H, m, \underline{CHH}), 2,08 – 1,98 (1H, m, \underline{CHH}), 1,96 – 1,85 (1H, m, \underline{CHH}), 1,67 – 1,55 (1H, m, \underline{CH}), 1,54 – 1,40 (3H, m, \underline{CH} , \underline{CH}_2), 1,38 – 1,30 (2H, m, \underline{CH}_2), 0,98 – 0,80 (9H, m, 3x \underline{CH}_3), 0,74 (3H, d, $J = 6,5$ Hz, \underline{CH}_3). ^{13}C NMR (100 MHz, CDCl_3): směs rotamerů δ 172,64, 171,18, 164,03, 155,68, 129,15, 129,05, 128,91, 128,57, 126,99, 122,90, 114,27, 71,97, 61,73, 59,88, 49,87, 47,92, 47,46, 41,67, 41,51, 32,33, 31,51, 29,88, 27,35, 25,39, 24,83, 23,62, 23,47, 21,81, 21,74. **CHN analýza:** Vypočteno pro $\text{C}_{33}\text{H}_{45}\text{ClN}_4\text{O}_6$ (629,18): C, 62,99; H, 7,21; N, 8,90. Nalezeno: C, 63,50 \pm 0,36; H, 7,57 \pm 0,09; N, 8,29 \pm 0,01. **HRMS:** m/z vypočteno pro $\text{C}_{33}\text{H}_{45}\text{ClN}_4\text{O}_6$: 146,11756 $[\text{M}+\text{H}]^+$; nalezeno: 146,11762 $[\text{M}+\text{H}]^+$.

2.1.8.6 Charakterizace produktu 54f



Výtěžek 53 %; nažloutlý amorf; $R_f = 0,404$ (3:1 ethylacetát/*n*-hexan). ^1H NMR (500 MHz, CDCl_3): δ 8,06 (1H, d, $J = 3$ Hz, \underline{NH}), 8,01 (1H, d, $J = 6,5$ Hz, \underline{NH}), 7,64 (1H, d, $J = 8$ Hz, \underline{NH}), 7,41 (7H, m, 7x $\underline{CH}_{\text{Ar}}$), 7,20 (1H, d, $J = 8$ Hz, \underline{CH}), 7,05 (5H, m, 5x $\underline{CH}_{\text{Ar}}$), 6,67 (1H, d, $J = 8$ Hz, \underline{NH}), 5,07 (2H, m, \underline{CH}_2 -O), 4,95 (1H, m, \underline{CH}), 4,72 (1H, m, \underline{CH}), 4,47 (1H, m, \underline{CH}), 3,73 (3H, s, \underline{CH}_3 -O), 3,27 (2H, m, \underline{CH}_2 -Trp), 3,16 (3H, s, \underline{CH}_3 -N), 1,52-1,12 (6H, m, 2x \underline{CH}_2 , 2x \underline{CH}), 0,88 (6H, dd, $J = 6, 14,5$ Hz, (\underline{CH}_3)₂), 0,75 (3H, d, $J = 6,5$ Hz, \underline{CH}_3 -CH- \underline{CH}_3), 0,67 (3H, d, $J = 6,5$ Hz, \underline{CH}_3 -CH- \underline{CH}_3). ^{13}C NMR (100,6 MHz, CDCl_3): δ 171,66, 170,93, 164,19, 155,48, 136,85, 136,08, 134,65, 132,70, 132,07, 129,17, 129,09, 129,05, 128,56, 128,42, 127,41, 126,78, 123,53, 122,09, 121,86, 119,41, 118,74, 113,94, 111,02, 110,22, 71,81, 61,54, 53,68, 52,89, 52,44, 47,75, 41,48, 39,72, 27,51, 24,63, 23,27, 22,90, 21,58. **CHN analýza:** Vypočteno pro $\text{C}_{39}\text{H}_{48}\text{ClN}_5\text{O}_6$ (718,28): C, 65,21; H, 6,74; N, 9,75. Nalezeno: C, 64,80 \pm 0,06; H, 6,70 \pm 0,01; N, 9,21 \pm 0,05. **HRMS(EP098-2019):** m/z vypočteno pro $\text{C}_{39}\text{H}_{48}\text{ClN}_5\text{O}_6$: 740.31853 $[\text{M}+\text{Na}]^+$; nalezeno: 740.32031 $[\text{M}+\text{Na}]^+$.

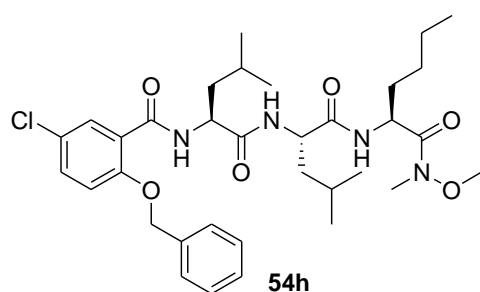
2.1.8.7 Charakterizace produktu 54g



Výtěžek 72 %; nažloutlý amorf; $R_f = 0,09$ (1:1 ethylacetát/*n*-hexan). ^1H NMR (400 MHz, CDCl_3): δ 7,52 – 7,35 (8H, m, \underline{CH} (Ar)), 7,25 – 7,09 (5H, m, \underline{CH} (Ar)), 7,00 (1H, d, $J = 8,8$ Hz, \underline{NH}), 6,88 (1H, d, $J =$

8,1 Hz, NH), 6,68 (1H, d, $J = 8,4$ Hz, NH), 5,24 – 5,04 (3H, m, Ar- CH_2 -O, CH), 4,42 (2H, m, CH , CH), 3,60 (3H, s, CH_3 -O), 3,07 (3H, s, CH_3 -N), 2,91 (2H, m, CH- CH_2 -Ar), 1,68 – 1,13 (6H, m, CH , CH , CH_2 , CH_2), 0,82 (12H, m, $2x(CH_3)_2$). ^{13}C NMR (100,6 MHz, $CDCl_3$): δ 171,90, 171,64, 164,74, 155,84, 136,65, 135,01, 132,97, 132,46, 129,64, 129,28, 128,93, 128,71, 128,46, 127,08, 126,92, 122,44, 114,18, 72,12, 61,68, 52,87, 51,93, 50,46, 41,10, 39,90, 38,39, 32,20, 29,89, 24,95, 24,82, 23,27, 22,92, 22,08, 21,83. **CHN analýza:** Vypočteno pro $C_{37}H_{47}ClN_4O_6$ (679,25): C, 65,42; H, 6,97; N, 8,25. Nalezeno: C, 65,10 \pm 0,02; H, 7,17 \pm 0,02; N, 7,95 \pm 0,04. **HRMS:** m/z vypočteno pro $C_{37}H_{47}ClN_4O_6$: 701,30763 $[M+Na]^+$; nalezeno: 701,30518 $[M+Na]^+$.

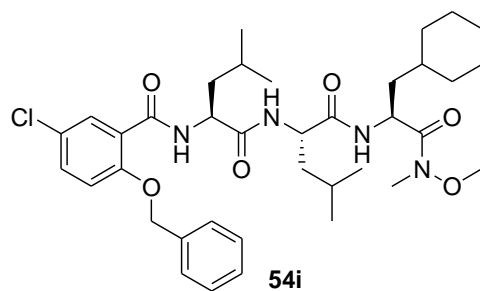
2.1.8.8 Charakterizace produktu 54h



Výtěžek 44 %; bílý amorf; $R_f = 0,377$ (1:1 ethylacetát/*n*-hexan). 1H NMR (500 MHz, $CDCl_3$): δ 8,26-8,11 (2H, m, $2xNH$), 7,50-7,40 (6H, m, $6xCH(Ar)$), 7,02 (1H, d, $J=8,8$ Hz, $CH(Ar)$), 6,90-6,76 (1H, m, $CH(Ar)$), 5,21-5,11 (2H, m, CH_2 -O-Ph), 4,90 (1H, d, $J=33,3$ Hz, NH), 4,55-4,26 (2H, m, CH- CH_2 - CH_2), 3,81-3,74 (3H, m, CH_3 -O), 3,20-3,14 (3H, m, CH_3 -N), 1,84-1,19 (13H, m, $CH-CH_2-CH$, $CH-CH_2-CH$, $CH-CH_2-CH_2-CH_2-CH_3$), 0,93-0,70 (15H, m, $5xCH_3$).

^{13}C NMR (100,6 MHz, $CDCl_3$): δ 172,05, 164,43, 155,61, 134,93, 132,94, 132,29, 129,26, 128,53, 127,13, 122,51, 114,17, 72,04, 61,75, 53,80, 53,07, 52,75, 52,41, 52,00, 51,65, 49,87, 49,63, 49,27, 40,98, 40,08, 32,33, 27,53, 24,83, 23,18, 23,02, 22,51, 22,01, 14,04. **CHN analýza:** Vypočteno pro $C_{34}H_{49}ClN_4O_6$ (645,22): C, 63,29; H, 7,65; N, 8,68. Nalezeno: C, 63,59 \pm 0,28; H, 7,74 \pm 0,05; N, 8,48 \pm 0,05. **HRMS:** m/z vypočteno pro $C_{34}H_{49}ClN_4O_6$: 667,32328 $[M+Na]^+$; nalezeno: 667,32538 $[M+Na]^+$.

2.1.8.9 Charakterizace produktu 54i

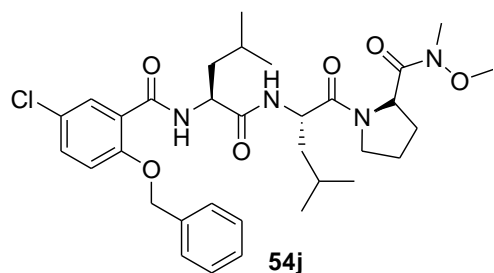


Výtěžek 57 %; bílý amorf; $R_f = 0,400$ (1:1 ethylacetát/*n*-hexan). 1H NMR (500 MHz, $CDCl_3$): δ 8,21-8,12 (2H, m, $2xNH$), 7,49-7,39 (6H, m, $6xCH(Ar)$), 7,00 (1H, d, $J=8,7$ Hz, $CH(Ar)$), 6,76-6,59 (1H, m, $CH(Ar)$), 5,19-5,09 (2H, m, CH_2 -O-Ph), 5,01-4,97 (1H, m, NH), 4,53-4,29 (2H, m, CH_2 -CHA), 3,79-

3,73 (3H, m, CH_3 -O), 3,17-3,11 (3H, m, CH_3 -N), 1,84-1,32 (12H, m, $CH-CH_2-CH-(CH_2)_5$), 1,27-1,04 (5H, m, $CH-CH_2-CH$, $CH-CH_2-CH$), 0,92-0,69 (15H, m, $CH-CH_2-CH$, $4xCH_3$).

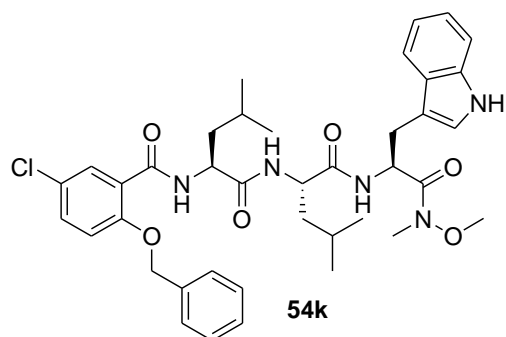
^{13}C NMR (100,6 MHz, CDCl_3): δ 172,00, 164,45, 155,61, 134,92, 132,96, 132,32, 129,27, 128,76, 128,53, 127,16, 122,49, 114,17, 72,05, 61,76, 53,77, 53,06, 52,42, 51,98, 47,18, 41,02, 40,29, 40,04, 34,12, 34,07, 32,41, 26,61, 26,36, 26,16, 24,84, 23,18, 23,07, 22,06, 21,96. **CHN analýza:** Vypočteno pro $\text{C}_{37}\text{H}_{53}\text{ClN}_4\text{O}_6$ (685,29): C, 64,85; H, 7,80; N, 8,18. Nalezeno: C, $65,01 \pm 0,10$; H, $7,80 \pm 0,06$; N, $8,50 \pm 0,02$. **HRMS:** m/z vypočteno pro $\text{C}_{37}\text{H}_{53}\text{ClN}_4\text{O}_6$: 707,35458 $[\text{M}+\text{Na}]^+$; nalezeno: 707,35645 $[\text{M}+\text{Na}]^+$.

2.1.8.10 Charakterizace produktu 54j



Výtěžek 40 %; nažloutlý amorf; $R_f = 0,288$ (2:1 ethylacetát/*n*-hexan). ^1H NMR (500 MHz, CDCl_3): δ 8,14-8,03 (2H, m, 2xNH), 7,47-7,34 (6H, m, 6xCH(Ar)), 7,15-6,86 (2H, m, 2xCH(Ar)), 5,21-5,09 (2H, m, CH₂-O-Ph), 4,86-4,74 (2H, m, 2xNH-CH-C=O), 4,58-4,50 (1H, m, N-CH-C=O), 3,82-3,80 (1H, m, N-CHH), 3,78-3,75 (3H, m, CH₃-O), 3,63-3,50 (1H, m, N-CHH), 3,16-3,10 (3H, m, CH₃-N), 2,22-2,06 (2H, m, N-CH₂-CH₂-CH₂), 1,89-1,84 (1H, m, N-CH₂-CH₂-CHH), 1,71-1,44 (4H, m, 2xCH-CH₂-CH), 1,40-1,35 (1H, m, N-CH₂-CH₂-CHH), 1,23-1,16 (1H, m, CH(CH₃)₂), 0,97-0,65 (13H, m, CH(CH₃)₂, 4xCH₃). ^{13}C NMR (100,6 MHz, CDCl_3): δ 172,03, 171,12, 164,22, 155,59, 135,07, 135,04, 132,77, 132,36, 129,22, 128,57, 128,52, 127,08, 122,74, 114,12, 71,95, 61,44, 56,87, 52,52, 49,20, 47,39, 41,75, 41,23, 40,61, 32,35, 28,88, 24,94, 24,84, 23,56, 23,21, 22,02, 21,72. **CHN analýza:** Vypočteno pro $\text{C}_{33}\text{H}_{45}\text{ClN}_4\text{O}_6$ (629,19): C, 62,99; H, 7,21; N, 8,90. Nalezeno: C, $62,32 \pm 0,09$; H, $7,25 \pm 0,01$; N, $8,40 \pm 0,03$. **HRMS:** m/z vypočteno pro $\text{C}_{33}\text{H}_{45}\text{ClN}_4\text{O}_6$: 667,26592 $[\text{M}+\text{K}]^+$; nalezeno: 667,26794 $[\text{M}+\text{K}]^+$.

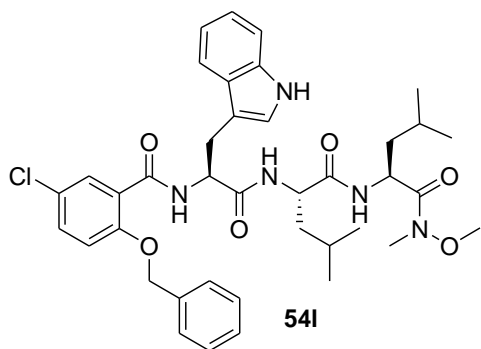
2.1.8.11 Charakterizace produktu 54k



Výtěžek 90 %; bílý amorf; $R_f = 0,288$ (1:1 ethylacetát/*n*-hexan, vyjeto 3x). ^1H NMR (500 MHz, CDCl_3): δ 8,24-8,20 (1H, m, NH), 8,16-8,10 (1H, m, NH), 7,58-7,51 (1H, m, CH(Ar)), 7,47-7,36 (7H, m, 7xCH(Ar)), 7,31-7,30 (1H, m, CH(Ar))m 7,14-7,10 (1H, m, CH(Ar)), 7,08-7,05 (1H, m, CH(Ar)), 7,02-6,96 (2H, m, 2xCH(Ar)), 6,69-6,59 (1H, m, NH), 5,19-5,06 (3H, m, NH, CH₂-O-Ph), 4,56-4,37 (2H, m, CH₂-Trp), 3,67 (3H, s, CH₃-O), 3,25-3,12 (3H, m, CH₃-N), 1,56-1,47 (3H, m, CH-CH₂), 1,44-1,35 (3H, m, CH-CH₂), 1,32-1,12

(3H, m, 3xCH), 0,84 (3H, d, J=6,3 Hz, CH₃), 0,79 (6H, t, J=6,6 Hz, 2xCH₂), 0,70 (3H, d, J=6,5 Hz, CH₃). ¹³C NMR (100,6 MHz, CDCl₃): δ 172,13, 171,49, 164,65, 155,68, 136,27, 134,92, 133,11, 132,30, 129,30, 128,57, 127,87, 127,22, 123,84, 123,56, 122,32, 121,94, 119,37, 118,50, 114,20, 111,51, 110,15, 72,05, 61,74, 52,66, 51,97, 50,17, 41,00, 40,85, 40,35, 34,72, 32,37, 28,01, 24,98, 23,15, 23,10, 22,02, 21,74. **CHN analýza:** Vypočteno pro C₃₉H₄₈ClN₅O₆ (717,28): C, 65,21; H, 6,74; N, 9,75. Nalezeno: C, 65,16±0,08; H, 6,93±0,02; N, 9,66±0,06. **HRMS:** m/z vypočteno pro C₃₇H₅₃ClN₄O₆: 740,31853 [M+Na]⁺; nalezeno: 740,32098 [M+Na]⁺.

2.1.8.12 Charakterizace produktu 54l

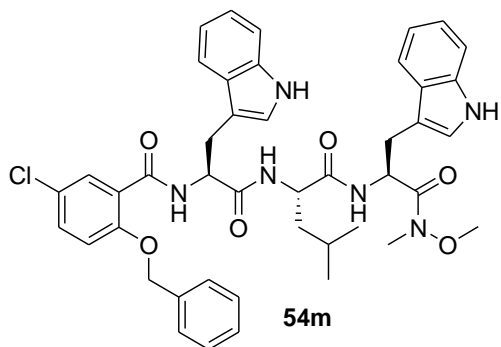


Výtěžek 41 %; nažloutlý amorf; R_f = 0,295

(1:1 ethylacetát/*n*-hexan, vyjeto 4x). ¹H NMR (500 MHz, CD₂Cl₂): směs rotamerů δ 8,53 – 8,46 (1H, m, NH), 8,45 – 8,38 (1H, m, NH), 8,12 – 8,08 (1H, m, NH), 7,59 – 7,48 (1H, m, NH), 7,41 – 7,26 (7H, m, 7xCH(Ar)), 7,13 (1H, dd, J = 11,2, 4,0 Hz, CH(Ar)), 7,07 – 7,02 (1H, m, CH(Ar)), 6,96 (1H, dd, J = 16,6,

8,9 Hz, CH(Ar)), 6,87 – 6,82 (1H, m, CH(Ar)), 6,67 (1H, dd, J = 25,2, 8,6 Hz, CH(Ar)), 6,50 (1H, dd, J = 77,5, 8,2 Hz, CH(Ar)), 5,09 – 4,90 (3H, m, CH₂-O-Ph, NH-CH-C=O), 4,86 (1H, q, J = 6,8 Hz, NH-CH-C=O), 4,41 – 4,35 (1H, m, NH-CH-C=O), 3,77, 3,74 (3H, s, CH₃-O), 3,26 – 3,10 (4H, m, CH₃-N, CHH-indol), 3,05 – 3,01 (1H, m, CHH-indol), 1,66 – 1,36 (6H, m, 2xCH₂-CH), 0,95 – 0,76 (12H, m, 4xCH₃). ¹³C NMR (100 MHz, CD₂Cl₂): směs rotamerů **CHN analýza:** Vypočteno pro C₃₉H₄₈ClN₅O₆ (718,28): C, 65,21; H, 6,74; N, 9,75. Nalezeno: C, 65,54±0,14; H, 6,96±0,02; N, 9,40±0,01. **HRMS:** m/z vypočteno pro C₃₉H₄₈ClN₅O₆: 740,31853 [M+Na]⁺; nalezeno: 740,32031 [M+Na]⁺.

2.1.8.13 Charakterizace produktu 54m



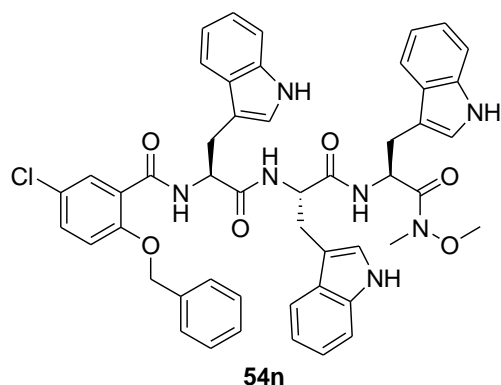
Výtěžek 43 %; žlutý amorf; R_f = 0,333 (2:1

ethylacetát/*n*-hexan, vyjeto 3x). ¹H NMR (500 MHz, CD₂Cl₂): směs rotamerů δ 8,56 (1H, d, J = 13,1 Hz, NH), 8,51 – 8,43 (2H, m, 2xNH), 8,32 (1H, d, J = 11,5 Hz, NH), 8,18 – 8,10 (H, 1H, NH), 7,62 – 7,47 (2H, m, 2xCH(Ar)), 7,43 – 7,23 (9H, m, 9xCH(Ar)), 7,08 (5H, m, 5xCH(Ar)), 6,91 (1H, d, J = 9,6 Hz,

CH(Ar)), 6,87 – 6,72 (1H, m, CH(Ar)), 5,19 (1H, m, NH-CH-C=O), 5,05 – 4,87 (3H, m, NH-

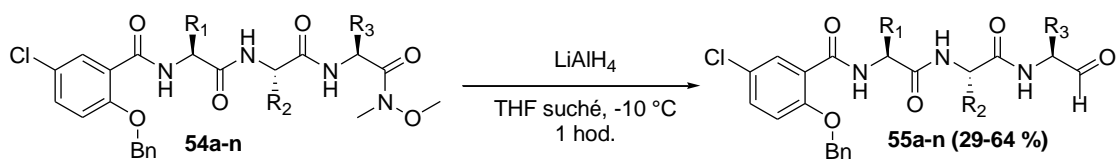
$\underline{CH}-C=O$, \underline{CH}_2-O-Ph), 4,39 – 4,32 (1H, m, $NH-\underline{CH}-C=O$), 3,72, 3,65 (3H, s, \underline{CH}_3-O), 3,28 – 2,96 (7H, m, \underline{CH}_3-N , $2x\underline{CH}_2-indol$), 1,39 (2H, m, \underline{CH}_2), 1,10 (1H, d, $J = 12,6$ Hz, \underline{CH}), 0,73 (6J, t, $J = 5,8$ Hz, $(\underline{CH}_3)_2$). ^{13}C NMR (100 MHz, CD_2Cl_2): směs rotamerů δ 171,31, 171,10, 155,43, 136,20, 136,06, 135,33, 132,69, 131,68, 128,90, 128,67, 127,92, 127,65, 127,61, 127,31, 126,56, 123,67, 123,38, 122,53, 122,00, 121,73, 119,43, 119,17, 118,69, 118,28, 114,60, 111,42, 111,33, 110,32, 71,32, 61,60, 54,61, 51,82, 50,02, 40,71, 32,05, 27,45, 24,47, 22,66, 21,48. **CHN analýza:** Vypočteno pro $C_{44}H_{47}ClN_6O_6$ (791,33): C, 66,78; H, 5,99; N, 10,62. Nalezeno: C, 63,11 \pm 0,05; H, 6,14 \pm 0,08; N, 9,77 \pm 0,02. **HRMS:** m/z vypočteno pro $C_{44}H_{47}ClN_6O_6$: 813,31378 $[M+K]^+$; nalezeno: 813,31604 $[M+K]^+$.

2.1.8.14 Charakterizace produktu 54n



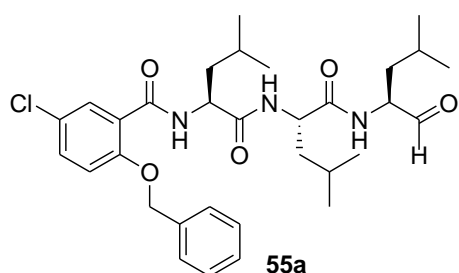
Výtěžek 60 %; žlutý amorf; $R_f = 0,320$ (2:1 ethylacetát/*n*-hexan, vyjeto 3x). 1H NMR (500 MHz, CD_2Cl_2): směs rotamerů δ 8.57 – 8.01 (5H, m, $5xNH$), 7.62 – 6.71 (21H, m, NH , $20xCH(Ar)$), 6.54 (2H, dd, $J = 23.4, 9.5$ Hz, $2xCH(Ar)$), 6.37 (1H, dt, $J = 13.4, 6.0$ Hz, $\underline{CH}(Ar)$), 5.24-5,16 (1H, m, NH), 4.95 – 4.76 (3H, m, $NH-\underline{CH}-C=O$, \underline{CH}_2-O-Ph), 4.74 – 4.55 (1H, m, $NH-\underline{CH}-C=O$), 3.76 – 3.61 (3H, m, \underline{CH}_3-O), 3.23 – 2.71 (6H, m, $3x\underline{CH}_2-indol$), 2.08 – 1.92 (3H, m, $N-\underline{CH}_3$). ^{13}C NMR (100 MHz, CD_2Cl_2): směs rotamerů δ 171,51, 171,25, 170,84, 170,50, 164,21, 155,41, 136,09, 136,02, 135,39, 132,62, 131,53, 128,87, 128,63, 127,86, 127,65, 127,59, 127,33, 127,29, 126,42, 123,52, 122,01, 121,67, 119,43, 119,16, 118,76, 118,38, 114,63, 111,34, 111,02, 110,07, 109,68, 71,27 61,53, 60,30, 55,72, 54,84, 53,78, 53,42, 50,18, 49,89, 31,99, 27,17, 26,96. **CHN analýza:** Vypočteno pro $C_{49}H_{46}ClN_7O_6$ (864,38): C, 68,09; H, 5,36; N, 11,34. Nalezeno: C, 65,71 \pm 0,06; H, 5,80 \pm 0,04; N, 9,79 \pm 0,01. **HRMS:** m/z vypočteno pro $C_{49}H_{46}ClN_7O_6$: 886,30903 $[M+Na]^+$; nalezeno: 886,31140 $[M+Na]^+$.

2.1.9 Obecná příprava tripeptidického aldehydu (55)



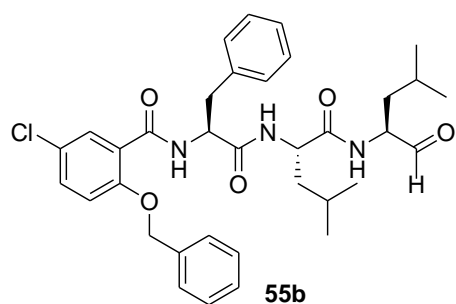
Do trojhrdlé baňky byl předloženo LiAlH_4 (1,7 ekv) a atmosféra v baňce byla nahrazena inertní atmosférou. LiAlH_4 bylo suspendováno v suchém THF a směs byla ochlazena na $0\text{ }^\circ\text{C}$. Po vychlazení se do suspenze LiAlH_4 v THF nadávkoval roztok weinreb amidu (**54a-n**) (1 ekv) v DCM. Průběh reakce byl sledován pomocí TLC a reakce se ukončila po vymizení výchozí látky přidávkem nasyceného roztoku NH_4Cl a byly provedeny extrakce EtOAc, vodou a 10% HCl. Vodná fáze byla ještě 2x extrahována EtOAc a spojené organické fáze vodou. Produkt (**55a-n**) se izoloval sloupcovou chromatografií.

2.1.9.1 Charakterizace produktu 55a



Výtěžek 60 %; nažloutlý amorf; $R_f = 0,51$ (1:1 ethylacetát/*n*-hexan). $^1\text{H NMR}$ (400 MHz, CD_2Cl_2): mixture of rotamers δ 9,74-9,45 (1H, m, $\text{CH}=\text{O}$), 8,19-7,98 (2H, m, 2xNH), 7,44 (6H, s, 6xCH(Ar)), 7,08-6,99 (2H, m, 2xCH(Ar)), 6,64-6,52 (1H, m, NH), 5,18-5,11 (2H, m, $\text{CH}_2\text{-O-Ph}$), 4,49-4,31 (2H, m, 2xNH-CH-C=O), 2,31-2,16 (1H, m, NH-CH-CH=O), 1,82-1,10 (9H, m, 3x $\text{CH}_2\text{-CH}(\text{CH}_3)_2$), 0,98-0,69 (18H, m, 6x CH_3). $^{13}\text{C NMR}$ (100 MHz, CD_2Cl_2): δ 172,54, 172,27, 165,27, 155,81, 134,79, 133,42, 132,33, 129,58, 129,36, 128,75, 127,37, 121,94, 114,23, 72,27, 57,56, 53,63, 53,18, 51,81, 40,17, 40,02, 37,46, 25,17, 24,92, 24,80, 23,33, 23,15, 23,03, 21,97, 21,83, 21,76. **CHN analýza:** Vypočteno pro $\text{C}_{32}\text{H}_{44}\text{ClN}_3\text{O}_5$ (586,16): C, 65,57; H, 7,57; N, 7,17. Nalezeno: C, 66,08 \pm 0,24; H, 7,83 \pm 0,02; N, 6,86 \pm 0,14. **HRMS:** m/z vypočteno pro $\text{C}_{32}\text{H}_{44}\text{ClN}_3\text{O}_5$: 586,30423 $[\text{M}+\text{H}]^+$; nalezeno: 586,28534 $[\text{M}+\text{H}]^+$.

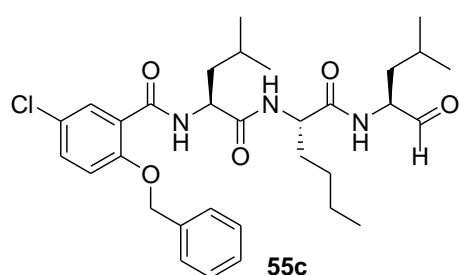
2.1.9.2 Charakterizace produktu 55b



Výtěžek 81 %; nažloutlý amorf; $R_f = 0,35$ (1:1 ethylacetát/*n*-hexan). $^1\text{H NMR}$ (400 MHz, CD_2Cl_2): mixture of rotamers δ 9,47 (1H, s, $\text{CH}=\text{O}$), 8,33 (1H, d, $J=5,1$ Hz, NH), 8,06 (1H, d, $J=2,6$ Hz, NH), 7,56-7,34 (6H, m, 6xCH(Ar)), 7,25-7,18 (4H, m, 4xCH(Ar)), 7,01-6,93 (3H, m, 3xCH(Ar)), 6,40 (1H, d, $J=7,6$ Hz, NH), 5,21-5,13 (2H, m, $\text{CH}_2\text{-O-Ph}$), 4,69-4,65 (1H, m, NH-CH-C=O), 4,42-4,37 (1H, m, NH-CH-

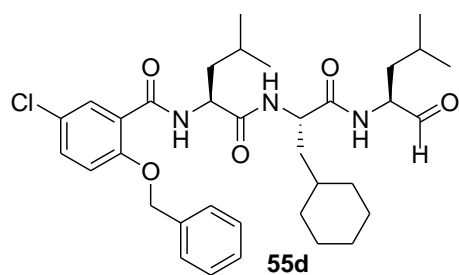
C=O), 4,31-4,26 (1H, m, NH-CH-C=O), 3,11-3,06, 2,85-2,79 (2H, m, CH₂-Ph), 1,73-1,60 (2H, m, CH-CH₂-CH), 1,54-1,43 (3H, m, CH-CH₂-CH), 1,29-1,21 (1H, m, CH-CH₂-CH), 0,95-0,86 (12H, m, 4xCH₃). ¹³C NMR (100 MHz, CD₂Cl₂): δ 200,51, 172,28, 171,03, 165,23, 155,77, 136,59, 135,36, 133,30, 131,88, 129,22, 129,20, 129,14, 128,81, 128,04, 127,18, 114,85, 71,68, 57,41, 56,40, 52,19, 40,41, 37,45, 37,03, 30,25, 29,88, 24,92, 24,78, 23,04, 22,96, 21,63, 21,47. **CHN analýza:** Vypočteno pro C₃₅H₄₂ClN₃O₅ (619,28): C, 67,78; H, 6,83; N, 6,78. Nalezeno: C, 67,57±0,54; H, 7,21±0,06; N, 5,53±0,03. **HRMS:** m/z vypočteno pro C₃₅H₄₂ClN₃O₅: 626,33553 [M+H]⁺; nalezeno: 626,33746 [M+H]⁺.

2.1.9.3 Charakterizace produktu 55c



Výtěžek 36 %; bílá krystalická látka; R_f = 0,41 (1:1 ethylacetát/*n*-hexan). ¹H NMR (400 MHz, CD₂Cl₂): směs rotamerů δ 9,54 (1H, m, CH=O), 8,26 (1H, d, J = 5,2 Hz, NH), 8,18 (1H, m, NH), 7,58-7,5 (6H, m, 6xCH(Ar)), 7,2 (1H, d, J = 8,8 Hz, CH(Ar)), 7,03 (1H, m, CH(Ar)), 6,62 (1H, d, J = 7,6 Hz, NH), 5,27 (2H, dd, J = 10, 16,4 Hz, Ph-CH₂-O), 4,44-4,35 (3H, m, 3xCH), 1,96 (1H, m, CH), 1,8-1,24 (11H, m, CH₂-CH₂, CH, 3xCH₂), 1,03 (3H, d, J = 2 Hz, CH₃), 0,99 (3H, d, J = 6 Hz, CH₃), 0,92 (3H, m, CH₃), 0,86 (3H, d, J = 6,4 Hz, CH₃), 0,81 (3H, d, J = 6,4 Hz, CH₃). ¹³C NMR (100 MHz, CD₂Cl₂): směs rotamerů δ 200,50, 172,07, 164,98, 155,95, 135,04, 133,30, 131,94, 129,45, 129,28, 128,78, 126,98, 122,09, 114,43, 72,22, 57,39, 53,47, 40,03, 37,46, 31,23, 27,97, 24,89, 24,75, 23,06, 22,77, 22,49, 21,60, 21,53, 13,84, Dva signály nebyly detekovány (C_q-Cl, NH-CH-C=O). **CHN analýza:** Vypočteno pro C₃₂H₄₄ClN₃O₅ (586,16): C, 65,57; H, 7,57; N, 7,17. Nalezeno: C, 65,75±0,06; H, 7,80±0,02; N, 6,98±0,02. **HRMS:** m/z vypočteno pro C₃₂H₄₄ClN₃O₅: 586,30423 [M+H]⁺; nalezeno: 586,30609 [M+H]⁺.

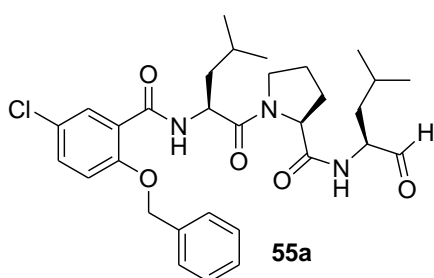
2.1.9.4 Charakterizace produktu 55d



Výtěžek 53 %; nažloutlý amorf; R_f = 0,333 (2:3 ethylacetát/*n*-hexan). ¹H NMR (500 MHz, CD₂Cl₂): směs rotamerů δ 9,52-9,36 (1H, m, CH=O), 8,30-8,24 (1H, m, NH), 8,16-8,05 (1H, m, NH), 7,56-7,41 (7H, m, 7xCH(Ar)), 7,16-7,11 (1H, m, CH(Ar)), 6,58-6,47 (1H, m, NH), 5,24-5,17 (2H, m, CH₂-O-Ph), 4,50-4,09 (3H, m, 3xNH-CH-C=O), 1,90-1,11 (19H, m, 2xCH₂-CH-(CH₃)₂, CH₂-cyklohexan), 0,97-0,76 (12H, m, 4xCH₃). ¹³C NMR (100 MHz, CD₂Cl₂): směs rotamerů δ 200,77, 172,68, 172,13,

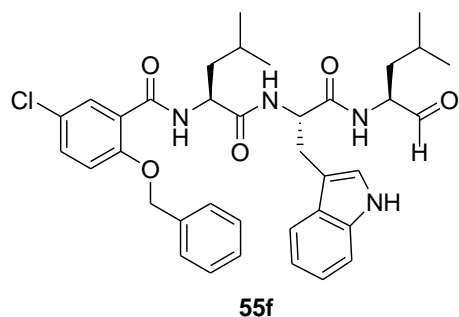
164,77, 156,08, 135,08, 133,23, 131,79, 129,37, 129,23, 128,90, 126,83, 121,85, 114,41, 72,25, 57,40, 54,09, 51,38, 39,76, 38,72, 37,24, 34,48, 34,09, 31,94, 26,59, 26,55, 26,24, 24,77, 24,73, 22,97, 22,69, 22,34, 21,68. **CHN analýza:** Vypočteno pro $C_{35}H_{48}ClN_3O_5$ (626,23): C, 67,13; H, 7,73; N, 6,71. Nalezeno: C, 66,73±0,05; H, 7,80±0,06; N, 6,63±0,07. **HRMS:** m/z vypočteno pro $C_{35}H_{48}ClN_3O_5$: 626,33553 $[M+H]^+$; nalezeno: 626,33521 $[M+H]^+$.

2.1.9.5 Charakterizace produktu 55e



Výtěžek 32 %; nažloutlý amorf; $R_f = 0,204$ (1:1 ethylacetát/*n*-hexan). **1H NMR** (400 MHz, $CDCl_3$): směs rotamerů δ 9,55-9,43 (1H, m, $\underline{CH=O}$), 8,27,8,21 (1H, m, \underline{NH}), 8,14, 8,02 (1H, d, $J=2,8$ Hz, \underline{NH}), 7,52-7,36 (7H, m, 7x $\underline{CH(Ar)}$), 7,03-6,99 (1H, m, $\underline{CH(Ar)}$), 5,20-5,07 (2H, m, $\underline{CH_2-O-Ph}$), 4,83-4,78 (1H, m, $\underline{NH-CH-C=O}$), 4,67-4,64 (1H, m, $\underline{NH-CH-C=O}$), 4,48-4,32 (1H, m, $\underline{N-CH-C=O}$), 3,89-3,83 (1H, m, $\underline{N-CHH}$), 3,60-3,50 (1H, m, $\underline{N-CHH}$), 2,42-2,36 (1H, m, \underline{CH}), 2,14-2,01 (2H, m, $\underline{CH_2}$), 1,93-1,56 (4H, m, 2x $\underline{CH_2}$), 1,44-1,22 (3H, m, \underline{CH} , $\underline{CH_2}$), 1,03-0,57 (12H, m, 4x $\underline{CH_3}$). **^{13}C NMR** (100 MHz, $CDCl_3$): směs rotamerů δ 200,23, 173,28, 171,65, 164,13, 155,74, 135,11, 132,87, 132,23, 129,13, 128,66, 114,22, 72,01, 61,16, 59,84, 58,38, 57,39, 52,20, 50,10, 47,58, 47,08, 41,30, 37,72, 31,73, 26,85, 25,45, 24,85, 23,43, 22,36, 21,72. **CHN analýza:** Vypočteno pro $C_{31}H_{40}ClN_3O_5$ (570,12): C, 65,31; H, 7,07; N, 7,37. Nalezeno: C, 65,01±0,20; H, 7,34±0,04; N, 6,81±0,07. **HRMS:**m/z vypočteno pro $C_{31}H_{40}ClN_3O_5$: 608,22936 $[M+K]^+$; nalezeno: 608,23004 $[M+K]^+$.

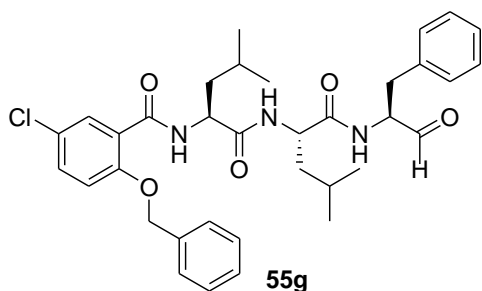
2.1.9.6 Charakterizace produktu 55f



Výtěžek 53 %; bílý amorf; $R_f = 0,404$ (3:1 ethylacetát/*n*-hexan). **1H NMR** (400 MHz, CD_2Cl_2): δ 9,34 (1H, m, $\underline{CH=O}$), 8,19 (1H, m, \underline{NH}), 7,94 (1H, m, \underline{NH}), 7,73 (1H, m, \underline{NH}), 7,54-7,37 (13H, m, 13x $\underline{CH(Ar)}$), 6,48 (1H, d, $J = 7,6$ Hz, \underline{NH}), 5,09 (2H, m, $\underline{Ar-CH_2-O}$), 4,84-4,63 (1H, m, \underline{CH}), 4,26-4,08 (2H, m, 2x \underline{CH}), 3,44-3,17 (2H, m, $\underline{CH_2-Trp}$), 1,56- 1,05 (6H, m, 2x \underline{CH} , 2x $\underline{CH_2}$), 0,95-0,85 (6H, m, $(\underline{CH_3})_2$), 0,69-0,60 (6H, m, $(\underline{CH_3})_2$). **^{13}C NMR** (100 MHz, CD_2Cl_2): δ 201,09, 172,04, 171,55, 165,07, 155,90, 136,20, 134,89, 133,26, 131,61, 129,51, 129,29, 129,19, 128,83, 127,46, 126,74, 123,30, 122,19, 121,41, 119,68, 118,64, 118,01, 114,31, 111,36, 109,77, 72,09, 57,49, 39,77,

37,24, 26,57, 24,82, 24,46, 23,17, 22,81, 21,54, 21,15. **CHN analýza:** Vypočteno pro $C_{39}H_{48}ClN_5O_6$ (718,28): C, 65,21; H, 6,74; N, 9,75. Nalezeno: C, $64,80 \pm 0,06$; H, $6,70 \pm 0,01$; N, $9,21 \pm 0,05$. **HRMS:** m/z vypočteno pro $C_{39}H_{48}ClN_5O_6$: 659,30003 $[M+H]^+$; nalezeno: 659,30188 $[M+H]^+$.

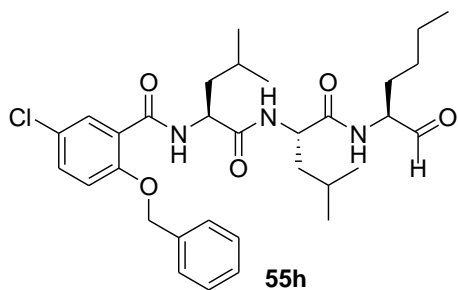
2.1.9.7 Charakterizace produktu 55g



55g

Výtěžek 58 %; nažloutlý amorf; $R_f = 0,32$ (1:1 ethylacetát/*n*-hexan). **1H NMR** (400 MHz, CD_2Cl_2): mixture of rotamers δ 9,42 (1H, s, $\underline{CH=O}$), 8,25 (1H, d, $J=4,7$ Hz, \underline{NH}), 7,92 (1H, d, $J=2,8$ Hz, \underline{NH}), 7,62 (1H, d, $J=7,6$ Hz, $\underline{CH(Ar)}$), 7,54-7,42 (6H, m, $6x\underline{CH(Ar)}$), 7,23-7,18 (4H, m, $4x\underline{CH(Ar)}$), 7,12-7,09 (2H, m, $2x\underline{CH(Ar)}$), 6,30 (1H, d, $J=8,4$ Hz, \underline{NH}), 5,18 (2H, dd, $J=10,2, 20,2$ Hz, $\underline{CH_2-O-Ph}$), 4,43-4,36 (2H, m, $2x \underline{NH-CH-C=O}$), 4,15-4,09 (1H, m, $\underline{NH-CH-C=O}$), 3,22-3,17, 3,01-2,96 (2H, m, $\underline{CH_2-Ph}$), 1,75-1,68 (2H, m, $\underline{CH-CH_2-CH}$), 1,63-1,56 (1H, m, $\underline{CH-CH_2-CH}$), 1,45-1,28 (2H, m, $\underline{CH-CH_2-CH}$), 1,17-1,10 (1H, m, $\underline{CH-CH_2-CH}$), 0,92-0,87 (6H, m, $2x\underline{CH_3}$), 0,81-0,75 (6H, m, $2x\underline{CH_3}$). **^{13}C NMR** (100 MHz, CD_2Cl_2): mixture of rotamers δ 199,52, 172,50, 172,03, 164,88, 156,06, 137,25, 135,08, 133,19, 131,76, 129,38, 129,26, 128,90, 128,50, 126,85, 126,61, 121,79, 114,40, 72,27, 60,09, 60,07, 54,08, 52,19, 40,36, 39,63, 34,54, 25,11, 24,77, 23,05, 22,41, 22,12, 21,13. **CHN analýza:** Vypočteno pro $C_{35}H_{42}ClN_3O_5$ (620,18): C, 67,78; H, 6,83; N, 6,78. Nalezeno: C, $67,32 \pm 0,01$; H, $6,85 \pm 0,03$; N, $6,48 \pm 0,02$. **HRMS:** m/z vypočteno pro $C_{35}H_{42}ClN_3O_5$: 620,28858 $[M+H]^+$; nalezeno: 620,29071 $[M+H]^+$.

2.1.9.8 Charakterizace produktu 55h

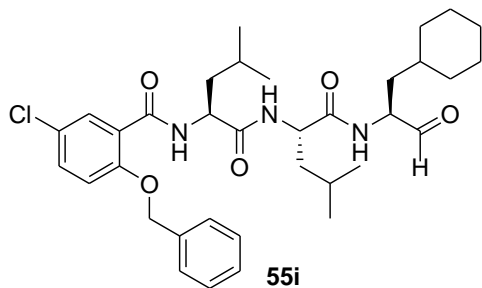


55h

Výtěžek 44 %; nažloutlý amorf; $R_f = 0,377$ (1:1 ethylacetát/*n*-hexan). **1H NMR** (400 MHz, CD_2Cl_2): směs rotamerů δ 9,54-9,37 (1H, m, $\underline{CH=O}$), 8,31-8,20 (1H, m, \underline{NH}), 8,13-8,04 (1H, m, \underline{NH}), 7,55-7,37 (6H, m, $6x\underline{CH(Ar)}$), 7,13 (1H, t, $J=8,3$ Hz, $\underline{CH(Ar)}$), 7,06-7,02 (1H, m, $\underline{CH(Ar)}$), 6,59-6,53 (1H, m, \underline{NH}), 5,24-5,16 (2H, m, $\underline{CH_2-O-Ph}$), 4,47-4,15 (3H, m, $3x\underline{NH-CH-C=O}$), 1,92-1,15 (12H, m, $\underline{CH-CH_2-CH_2-CH_2-CH_3}$, $2x\underline{CH-CH_2-CH}$), 0,98-0,74 (15H, m, $5x\underline{CH_3}$). **^{13}C NMR** (100 MHz, CD_2Cl_2): směs rotamerů δ 200,18, 172,10, 164,93, 155,93, 135,05, 133,26, 131,92, 129,41, 129,25, 128,73, 126,96, 122,13, 114,41, 72,19, 58,95, 54,07, 53,40, 51,92, 40,29, 40,11, 28,45, 28,28, 27,60,

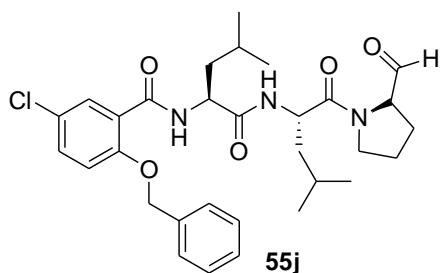
25,03, 24,88, 22,94, 22,74, 22,55, 21,52, 13,77. **CHN analýza:** Vypočteno pro C₃₄H₄₉ClN₄O₆ (645,22): C, 63,29; H, 7,65; N, 8,68. Nalezeno: C, 63,59±0,28; H, 7,74±0,05; N, 8,48±0,05. **HRMS:** m/z vypočteno pro C₃₄H₄₉ClN₄O₆: 586,30478 [M+H]⁺; nalezeno: 586,30563 [M+H]⁺.

2.1.9.9 Charakterizace produktu 55i



Výtěžek 57 %; bílý amorf; R_f = 0,400 (1:1 ethylacetát/*n*-hexan). **¹H NMR** (500 MHz, CD₂Cl₂): směs rotamerů δ 9,53-9,36 (1H, m, CH=O), 8,33-8,23 (1H, m, NH), 8,14-8,06 (1H, m, NH), 7,56-7,40 (6H, m, 6xCH(Ar)), 7,16-7,04 (2H, m, 2xCH(Ar)), 6,76-6,60 (1H, m, NH), 5,25-5,17 (2H, m, CH₂-O-Ph), 4,46-4,19 (3H, m, 3xNH-CH-C=O), 1,86-1,11 (19H, m, 2xCH₂-CH-(CH₃)₂, CH₂-*cyklon-hexan*), 0,99-0,76 (12H, m, 4xCH₃). **¹³C NMR** (100 MHz, CD₂Cl₂): směs rotamerů δ 200,62, 172,42, 172,11, 165,00, 155,97, 135,03, 133,31, 131,92, 129,44, 129,28, 128,75, 126,93, 122,10, 114,43, 72,19, 56,72, 53,47, 51,99, 40,31, 39,85, 36,05, 34,03, 33,83, 33,58, 32,51, 26,55, 26,21, 25,10, 24,93, 22,98, 22,85, 21,56, 21,52. **CHN analýza:** Vypočteno pro C₃₇H₅₃ClN₄O₆ (685,29): C, 64,85; H, 7,80; N, 8,18. Nalezeno: C, 65,01±0,10; H, 7,80±0,06; N, 8,50±0,02. **HRMS:** m/z vypočteno pro C₃₇H₅₃ClN₄O₆: 626,33553 [M+H]⁺; nalezeno: 626,33746 [M+H]⁺.

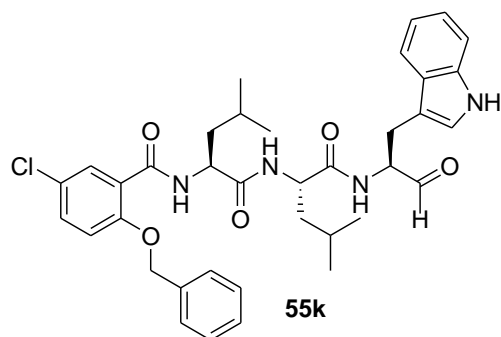
2.1.9.10 Charakterizace produktu 55j



Výtěžek 29 %; nažloutlý amorf; R_f = 0,15 (2:3 ethylacetát/*n*-hexan). **¹H NMR** (400 MHz, CDCl₃): směs rotamerů δ 9,53-9,40 (1H, m, CH=O), 8,27,8,21 (1H, m, NH), 8,14, 8,02 (1H, d, J=2,8 Hz, NH), 7,54-7,36 (7H, m, 7xCH(Ar)), 7,03-6,99 (1H, m, CH(Ar)), 5,21-5,07 (2H, m, CH₂-O-Ph), 4,83-4,78 (1H, m, NH-CH-C=O), 4,67-4,64 (1H, m, NH-CH-C=O), 4,48-4,32 (1H, m, N-CH-C=O), 3,89-3,83 (1H, m, N-CHH), 3,63-3,50 (1H, m, N-CHH), 2,42-2,36 (1H, m, CH), 2,14-2,01 (2H, m, CH₂), 1,93-1,56 (4H, m, 2xCH₂), 1,44-1,22 (3H, m, CH, CH₂), 1,03-0,57 (12H, m, 4xCH₃). **¹³C NMR** (100 MHz, CDCl₃): směs rotamerů δ 200,24, 173,27, 171,65, 164,15, 155,74, 135,12, 132,87, 132,24, 129,14, 128,68, 114,22, 72,01, 61,16, 59,84, 58,38, 57,39, 52,20, 50,10, 47,58, 47,08, 41,30, 37,72, 31,73, 26,85, 25,45, 24,85, 23,43, 22,36, 21,72. **CHN analýza:** Vypočteno pro C₃₁H₄₀ClN₃O₅ (570,12): C, 65,31; H, 7,07; N, 7,37. Nalezeno: C, 64,72±0,07; H, 7,46±0,08;

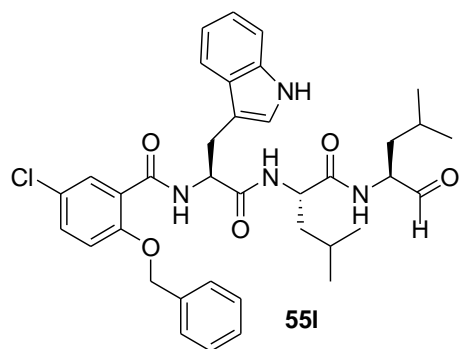
N, 6.56±0.20. **HRMS:** m/z vypočteno pro C₃₁H₄₀ClN₃O₅: 570.27348 [M+H]⁺; nalezeno: 570.27293 [M+H]⁺.

2.1.9.11 Charakterizace produktu 55k



Výtěžek 43 %; lehce oranžový amorf; R_f = 0,444 (1:1 ethylacetát/*n*-hexan). **¹H NMR** (500 MHz, CD₂Cl₂): směs rotamerů δ 9,59-9,46 (1H, m, CH=O), 8,62-8,43 (1H, m, NH), 8,25-8,00 (2H, m, 2xNH), 7,64-7,27 (9H, m, 9xCH(Ar)), 7,17-6,99 (4H, m, 4xCH(Ar)), 6,51-6,18 (1H, m, NH), 5,19-5,07 (2H, m, CH₂-O-Ph), 4,66-4,55 (1H, m, NH-CH-C=O), 4,44-4,32, 4,22,4,11 (2H, m, 2xNH-CH-C=O), 3,33-3,05 (2H, m, CH₂-Trp), 1,76-7,09 (6H, m, 2xCH₂-CH-(CH₃)₂), 0,91-0,70 (12H, m, 4xCH₃). **¹³C NMR** (400 MHz, CDCl₃): směs rotamerů δ 199,75, 172,56, 172,32, 172,11, 164,92, 164,68, 161,55, 136,38, 135,13, 133,30, 131,96, 129,28, 129,22, 128,80, 123,69, 121,99, 119,47, 118,58, 114,40, 111,54, 110,26, 72,18, 59,23, 51,90, 40,34, 40,19, 24,88, 24,72, 24,57, 23,10, 22,83, 22,51, 22,11, 21,55, 21,11. **CHN analýza:** Vypočteno pro C₃₇H₄₃ClN₄O₅ (659,21): C, 67,41; H, 6,57; N, 8,50. Nalezeno: C, 66,22±0,01; H, 6,68±0,01; N, 8,02±0,04. **HRMS:** m/z vypočteno pro C₃₇H₄₃ClN₄O₅: 681,28142 [M+Na]⁺; nalezeno: 681,28308 [M+Na]⁺.

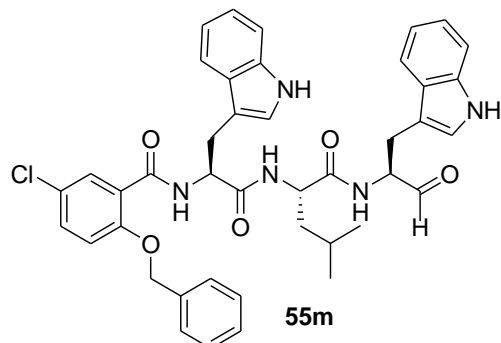
2.1.9.12 Charakterizace produktu 55l



Výtěžek 41 %; bílý amorf; R_f = 0,266 (1:1 ethylacetát/*n*-hexan, vyjeto 4x). **¹H NMR** (500 MHz, CD₂Cl₂): směs rotamerů δ 9,51 – 9,36 (1H, m, CH=O), 8,57 – 8,35 (2H, m, 2xNH), 8,14 – 7,99 (1H, m, NH), 7,61 – 6,68 (13H, m, 13xCH(Ar)), 6,54 – 6,39 (1H, m, NH), 5,14 – 4,93 (2H, m, CH₂-O-Ph), 4,84 – 4,74 (1H, m, NH-CH-C=O), 4,46 – 4,19 (2H, m, 2xNH-CH-C=O), 3,15 (2H, ddd, J = 22,5, 14,8, 6,8 Hz, CH₂-indol), 1,73 – 1,16 (6H, m, 2xCH₂-CH), 1,07 – 0,57 (12H, m, 4xCH₃). **¹³C NMR** (100 MHz, CD₂Cl₂): směs rotamerů δ 200,79, 172,47, 171,65, 165,33, 155,71, 136,46, 135,42, 133,21, 131,82, 129,13, 129,04, 127,88, 127,36, 126,85, 123,27, 122,39, 119,79, 118,77, 114,88, 111,51, 110,27, 71,61, 57,43, 55,81, 52,33, 40,38, 37,32, 24,96, 24,77, 23,05, 22,91, 21,61, 21,54. **CHN analýza:** Vypočteno pro C₃₇H₄₃ClN₄O₅ (659,21): C, 67,41; H, 6,57; N, 8,50. Nalezeno: C, 67,97±0,23; H, 6,77±0,01;

N, 7,96±0,12. **HRMS:** m/z vypočteno pro C₃₇H₄₃ClN₄O₅: 659,29947 [M+H]⁺; nalezeno: 659,30115 [M+H]⁺.

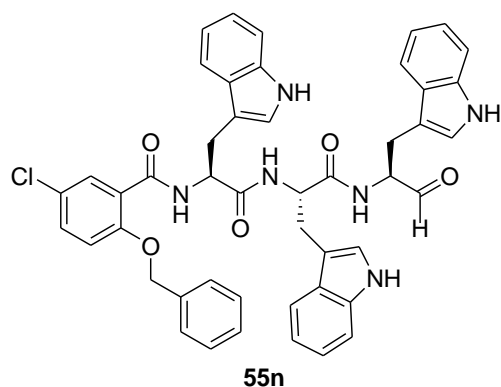
2.1.9.13 Charakterizace produktu 55m



55m

Výtěžek 43 %; nažloutlý amorf; R_f = 0,222 (3:1 ethylacetát/*n*-hexan, vyjeto 3x). **¹H NMR** (500 MHz, CD₂Cl₂): směs rotamerů δ 9,56 – 9,43 (1H, m, CH=O), 8,56 (1H, d, J = 13,1 Hz, NH), 8,51 – 8,43 (2H, m, 2xNH), 8,32 (1H, d, J = 11,5 Hz, NH), 8,18 – 8,10 (1H, m, NH), 7,62 – 7,47 (2H, m, 2xCH(Ar)), 7,43 – 7,23 (9H, m, 9xCH(Ar)), 7,08 (5H, m, 5xCH(Ar)), 6,91 (1H, d, J = 9,6 Hz, CH(Ar)), 6,87 – 6,72 (1H, m, CH(Ar)), 5,19 (1H, m, NH-CH-C=O), 5,05 – 4,87 (3H, m, NH-CH-C=O, CH₂-O-Ph), 4,39 – 4,32 (1H, m, NH-CH-C=O), 3,28 – 2,96 (4H, m, 2xCH₂-indol), 1,39 (2H, m, CH₂), 1,10 (1H, d, J = 12,6 Hz, CH), 0,73 (6H, t, J = 5,8 Hz, (CH₃)₂). **¹³C NMR** (100 MHz, CD₂Cl₂): δ 200,16, 172,32, 171,69, 164,52, 155,75, 136,36, 136,20, 135,2, 132,96, 131,53, 128,95, 128,89, 128,17, 127,66, 127,04, 126,64, 123,41, 123,30, 122,10, 121,88, 121,79, 119,53, 119,08, 118,50, 118,34, 114,57, 111,43, 110,24, 109,62, 71,75, 59,37, 56,11, 51,74, 39,66, 29,71, 27,29, 24,26, 24,06, 22,71, 20,83. **CHN analýza:** Vypočteno pro C₄₂H₄₂ClN₅O₅ (732,26): C, 68,89; H, 5,78; N, 9,56. Nalezeno: C, 67,25±0,32; H, 6,21±0,02; N, 8,33±0,07. **HRMS:** m/z vypočteno pro C₄₂H₄₂ClN₅O₅: 754,27667 [M+Na]⁺; nalezeno: 754,28638 [M+Na]⁺.

2.1.9.14 Charakterizace produktu 55n (EP-3-165-1)



55n

Výtěžek 38 %; nažloutlý amorf; R_f = 0,320 (2:1 ethylacetát/*n*-hexan, vyjeto 3x). **¹H NMR** (500 MHz, CD₂Cl₂): směs rotamerů δ 9,52-9,48 (1H, m, CH=O), 8,57 – 8,01 (5H, m, 5xNH), 7,62 – 6,70 (21H, m, NH, 20xCH(Ar)), 6,52 (2H, dd, J = 23,4, 9,5 Hz, 2xCH(Ar)), 6,37 (1H, dt, J = 13,4, 6,0 Hz, CH(Ar)), 4,95 – 4,72 (3H, m, NH-CH-CH=O, CH₂-O-Ph), 4,70 – 4,51 (2H, m, 2xNH-CH-C=O), 3,27 – 2,71 (6H, m, 3xCH₂-indol). **¹³C NMR** (100 MHz, CD₂Cl₂):směs rotamerů 200,25, 171,51, 171,25, 171,03, 170,84, 170,50, 164,21, 155,41, 136,09, 136,02, 135,39, 132,62, 131,53, 128,87, 128,63, 127,86, 127,65, 127,59, 127,33, 127,29, 126,42, 123,52, 122,01, 121,67, 119,43, 119,25 119,16, 118,76, 118,38, 114,63, 111,34, 111,02, 110,07, 109,68, 71,27 61,53,

60,30, 55,72, 54,84, 53,78, 53,42, 50,18, 49,89. **CHN analýza:** Vypočteno pro $C_{47}H_{41}ClN_6O_5$ (805,32): C, 70,10; H, 5,13; N, 10,44. Nalezeno: C, $66,77 \pm 0,12$; H, $5,46 \pm 0,03$; N, $9,21 \pm 0,01$. **HRMS:** m/z vypočteno pro $C_{47}H_{41}ClN_6O_5$: 827,27192 $[M+Na]^+$; nalezeno: 827,28168 $[M+Na]^+$.

2.2 Příprava tetrapeptidických aldehydů a vinyl sulfonů

Na základě článku ⁵⁷ pojednávajícím o aktivitách vinyl sulfonů obsahujících ve svém peptidickém řetězci více molekul tryptofanu, jsme připravili sérii tetrapeptidických látek složených z *L*-Trp a *L*-Leu v různém pořadí. Pořadí jednotlivých AMK bylo určeno na základě rešerše a SAR.

Jako výchozí látky (**schéma 21**) byly použity tripeptidické kyseliny (**56**), které byly dodány firmou Apigenex s.r.o. Příprava byla poměrně jednoduchá. V případě vinyl sulfonů se provedla pouze reakce tripeptidické kyseliny a NH₂-R₃-VS (jeho příprava i charakterizace jsou popsány výše) (**52a,g-k**) za vzniku tetrapeptidického vinyl sulfonu (**57**). Při přípravě aldehydů se nejprve připravil tetrapeptidický weinreb (**58**) amid opět pomocí reakces NH₂-R₃-WA (příprava i charakterizace popsána výše) (**46a,g-k**) a následně byla provedena redukce LiAlH₄ na odpovídající aldehyd (**59**).

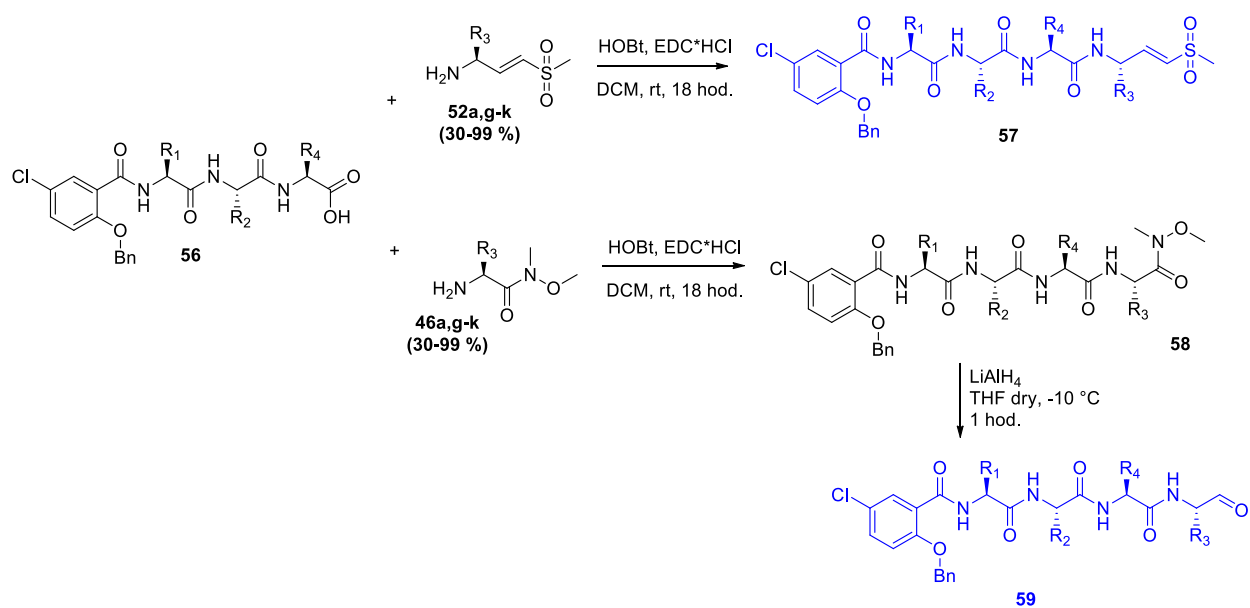
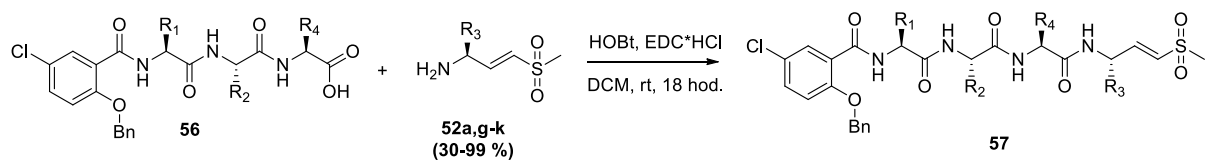


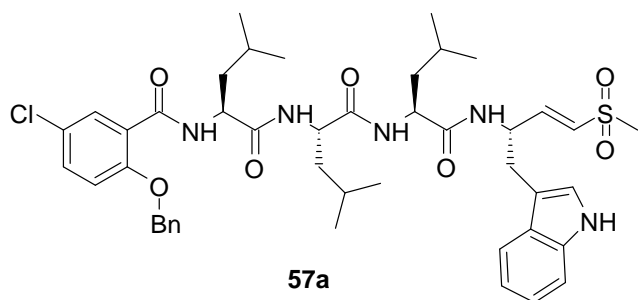
Schéma 21: Obecné schéma přípravy tetrapeptidických aldehydů a vinyl sulfonů

2.2.1 Obecná příprava tetrapeptidického vinylsulfonu (57)



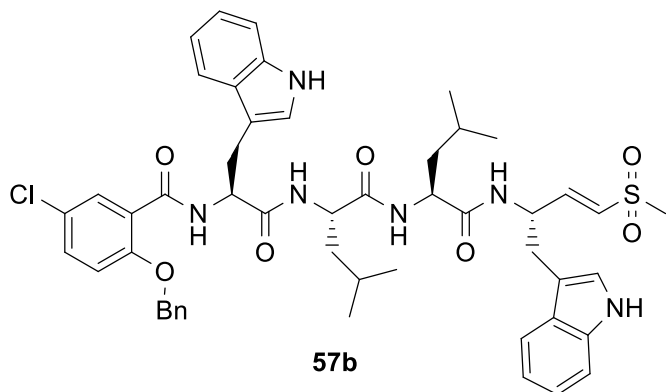
Obecný postup přípravy je shodný s přípravou tripeptidického vinyl sulfonu (**53**) viz. kapitola 2.1.5.

2.2.1.1 Charakterizace produktu 57a



Výtěžek 7 %; nažloutlá amorfní látka; $R_f = 0,380$ (2:1 ethylacetát/*n*-hexan, vyjeto 3x). $^1\text{H NMR}$ (500 MHz, CD_2Cl_2): směs rotamerů δ 8,50 – 8,35 (2H, m, 2xNH), 8,20 – 8,09 (1H, m, NH), 7,68 – 7,07 (14H, m, NH, 13xCH(Ar)), 6,93 (1H, dd, $J = 15,2, 4,1$ Hz, NH), 6,60 (1H, d, $J = 15,2$ Hz, CH=CH), 6,35 – 6,25 (1H, m, $J = 6,9$ Hz, CH=CH), 5,23 (2H, q, $J = 9,9$ Hz, CH₂-O-Ph), 5,05 – 4,97 (1H, m, NH-CH-C=O) 4,41 – 4,10 (3H, m, 3xNH-CH-C=O), 3,20 – 3,08 (2H, m, CH₂-indol), 3,00 – 2,77 (3H, m, CH₃-S), 1,81 – 1,10 (9H, m, 3xCH₂-CH), 1,06 – 0,68 (18H, m, 6xCH₃). **CHN analýza:** Vypočteno pro $\text{C}_{45}\text{H}_{58}\text{ClN}_5\text{O}_7\text{S}$ (848,48): C, 63,70; H, 6,89; N, 8,25. Nalezeno: C, 63,05±0,05; H, 7,04±0,01; N, 7,77±0,02. **HRMS:** m/z vypočteno pro $\text{C}_{45}\text{H}_{58}\text{ClN}_5\text{O}_7\text{S}$: 870,36377 $[\text{M}+\text{Na}]^+$; nalezeno: 870,36633 $[\text{M}+\text{Na}]^+$.

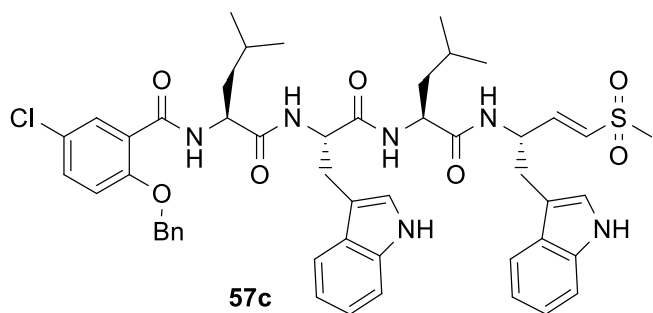
2.2.1.2 Charakterizace produktu 57b



Výtěžek 18 %; bílá amorfní látka; $R_f = 0,409$ (2:1 ethylacetát/*n*-hexan, vyjeto 3x). $^1\text{H NMR}$ ani $^{13}\text{C NMR}$ nezměřeno z důvodu nerozpustnosti látky v běžných deuterovaných rozpouštědlech. Látka byla charakterizována jinými metodami. **CHN analýza:** Vypočteno pro $\text{C}_{50}\text{H}_{57}\text{ClN}_6\text{O}_7\text{S}$ (921,54): C, 65,17; H, 6,23; N, 9,12.

Nalezeno: C, 63,18±0,13; H, 6,54±0,09; N, 7,20±0,08. **HRMS:** m/z vypočteno pro $\text{C}_{50}\text{H}_{57}\text{ClN}_6\text{O}_7\text{S}$: 943,35902 $[\text{M}+\text{Na}]^+$; nalezeno: 943,34479 $[\text{M}+\text{Na}]^+$.

2.2.1.3 Charakterizace produktu 57c

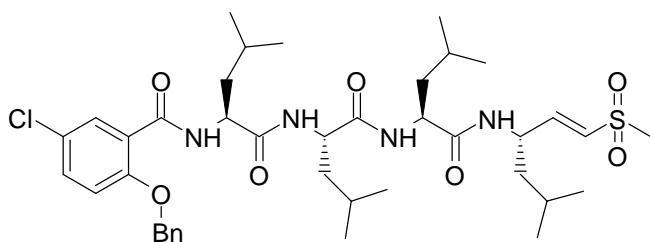


Výtěžek 24 %; $R_f = 0,288$ (1:1 ethylacetát/*n*-hexan, vyjeto 4x). $^1\text{H NMR}$ ani $^{13}\text{C NMR}$ nezměřeno z důvodu nerozpustnosti látky v běžných deuterovaných rozpouštědlech. Látka byla charakterizována jinými metodami. **CHN**

analýza: Vypočteno pro $\text{C}_{50}\text{H}_{57}\text{ClN}_6\text{O}_7\text{S}$ (921,54): C, 65,17; H, 6,23; N, 9,12. Nalezeno: C,

64,13±0,01; H, 6,49±0,04; N, 8,18±0,01. **HRMS:** m/z vypočteno pro C₅₀H₅₇ClN₆O₇S: 943,35902 [M+Na]⁺; nalezeno: 943,34548 [M+Na]⁺.

2.2.1.4 Charakterizace produktu 57d



57d

Výtěžek 14 %; bílá amorfní látka

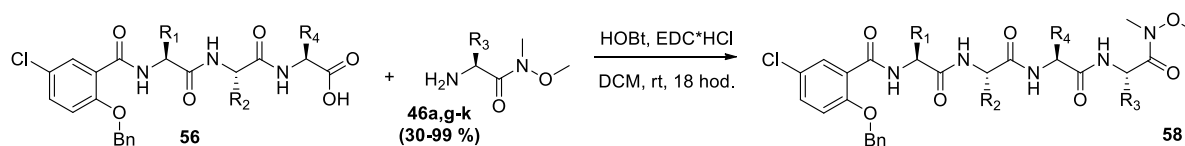
R_f = 0,5 (1:1 ethylacetát/*n*-hexan).

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃-*d*₁): směs rotamerů δ 8,25 (1H, d, J=4,8 Hz, NH), 8,15-8,13 (1H, m, NH), 7,51-7,41 (6H, m, 6xCH(Ar)), 7,14-6,99 (3H, m, 2xNH, CH(Ar)), 6,84-6,78 (1H, m, CH(Ar)), 6,69 (1H, dd, J=5, 15,1 Hz, CH=CH), 6,29 (1H, dd, J=1, 15,1 Hz, CH=CH), 5,22-5,10 (2H, m, CH₂-O-Ph), 4,72-4,68 (1H, m, NH-CH-C=O), 4,49-4,43 (1H, m, NH-CH-C=O), 4,28-4,21 (2H, m, 2xNH-CH-C=O), 2,86, 2,77, 2,69 (3H, s, CH₃-S), 1,83-1,12 (12H, m, 4xCH₂-CH-(CH₃)₂), 0,97 (3H, d, J=6,3 Hz, CH₃), 0,93-0,87 (15H, m, 5xCH₃), 0,74 (3H, d, J=6,4 Hz, CH₃), 0,68 (3H, d, J=6,4 Hz, CH₃).

¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃): mixture of rotamers δ 172,96, 172,45, 172,20, 165,29, 156,08, 148,13, 134,95, 133,26, 132,24, 129,46, 129,25, 128,93, 127,09, 122,00, 114,43, 72,21, 53,91, 52,55, 52,32, 48,08, 43,08, 42,70, 40,20, 40,10, 39,68, 25,18, 25,08, 24,96, 24,86, 23,33, 23,26, 23,08, 23,03, 22,06, 21,89, 21,73, 21,64, 1,21. **CHN analýza:** Vypočteno pro C₄₀H₅₉ClN₄O₇S (775,43): C, 61,96; H, 7,67; N, 7,23. Nalezeno: C, 61,81±0,27; H, 7,68±0,02; N, 6,69±0,03.

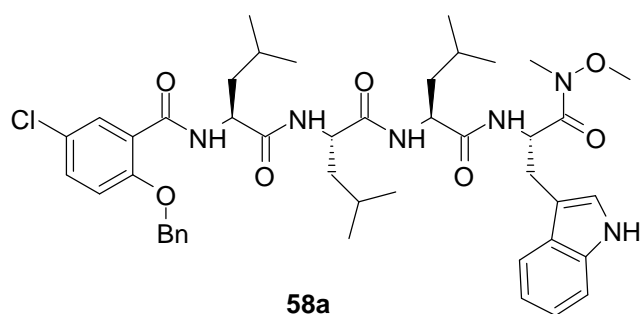
HRMS: m/z vypočteno pro C₄₀H₅₉ClN₄O₇S: 797,36852 [M+Na]⁺; nalezeno: 797,36945 [M+Na]⁺.

2.2.2 Obecná příprava tetrapeptidického weinreb amidu (58)



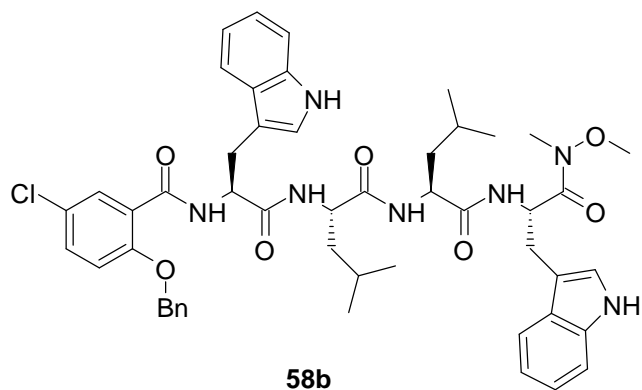
Obecný postup přípravy je shodný s přípravou tripeptidického weinreb amidu (54) viz. kapitola 2.1.8.

2.2.2.1 Charakterizace produktu 58a



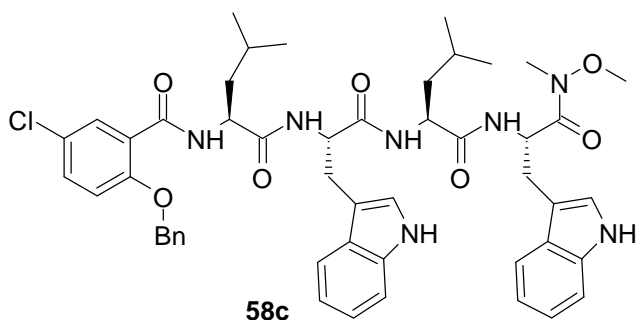
Výtěžek 38 %; $R_f = 0,188$ (2:1 ethylacetát/*n*-hexan). $^1\text{H NMR}$ (500 MHz, CD_2Cl_2): směs rotamerů δ 8,62 (1H, s, NH), 8,21 (2H, dd, $J = 43,1, 3,8$ Hz, $2 \times \text{NH}$), 7,60 – 6,93 (14H, m, NH , $13 \times \text{CH}(\text{Ar})$), 6,48 (1H, d, $J = 6,9$ Hz, NH), 5,18 (3H, q, $J = 10,2$ Hz, $\text{CH}_2\text{-O-Ph}$, NH-CH-C=O), 4,49 – 4,22 (3H, m, $3 \times \text{NH-CH-C=O}$), 3,70 (3H, s, $\text{CH}_3\text{-O}$), 3,31 – 3,03 (5H, m, $\text{CH}_3\text{-N}$, $\text{CH}_2\text{-indol}$), 1,81 – 1,10 (9H, m, $3 \times \text{CH}_2\text{-CH}$), 1,01 – 0,66 (18H, m, $6 \times \text{CH}_3$). $^{13}\text{C NMR}$ (100 MHz, CD_2Cl_2): směs rotamerů δ 172,36, 171,75, 171,33, 165,14, 155,86, 136,00, 134,78, 133,33, 131,80, 129,36, 129,13, 128,68, 127,70, 126,84, 123,68, 121,67, 121,53, 119,05, 118,37, 114,25, 111,14, 110,43, 72,07, 61,52, 53,78, 52,26, 51,68, 49,85, 40,16, 39,84, 27,49, 24,99, 24,75, 24,70, 22,93, 22,88, 22,63, 21,35, 21,29, 21,11. **CHN analýza:** Vypočteno pro $\text{C}_{45}\text{H}_{59}\text{ClN}_6\text{O}_7$ (381,44): C, 65,01; H, 7,15; N, 10,11. Nalezeno: C, 65,04 \pm 0,10; H, 7,53 \pm 0,03; N, 9,66 \pm 0,07. **HRMS:** m/z vypočteno pro $\text{C}_{45}\text{H}_{59}\text{ClN}_6\text{O}_7$: 853,40260 $[\text{M}+\text{Na}]^+$; nalezeno: 853,40479 $[\text{M}+\text{Na}]^+$.

2.2.2.2 Charakterizace produktu 58b



Výtěžek 43 %; nažloutlá amorfnní látka; $R_f = 0,204$ (2:1 ethylacetát/*n*-hexan, vyjeto 3x). $^1\text{H NMR}$ ani $^{13}\text{C NMR}$ nezměřeno z důvodu nerozpustnosti látky v běžných deuterovaných rozpouštědlech. Látka byla charakterizována jinými metodami. **CHN analýza:** Vypočteno pro $\text{C}_{50}\text{H}_{58}\text{ClN}_7\text{O}_7$ (904,49): C, 66,39; H, 6,46; N, 10,84. Nalezeno: C, 66,08 \pm 0,08; H, 6,51 \pm 0,08; N, 9,64 \pm 0,07. **HRMS:** m/z vypočteno pro $\text{C}_{50}\text{H}_{58}\text{ClN}_7\text{O}_7$: 926,39785 $[\text{M}+\text{Na}]^+$; nalezeno: 926,38312 $[\text{M}+\text{Na}]^+$.

2.2.2.3 Charakterizace produktu 58c

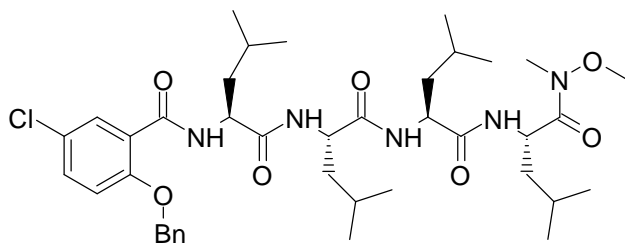


Výtěžek 20 %; nažloutlá amorfnní látka; $R_f = 0,212$ (2:1 ethylacetát/*n*-hexan, vyjeto 3x). $^1\text{H NMR}$ ani $^{13}\text{C NMR}$ nezměřeno z důvodu nerozpustnosti látky v běžných deuterovaných rozpouštědlech.

Látka byla charakterizována jinými metodami. **CHN analýza:** Vypočteno pro $C_{50}H_{58}ClN_7O_7$ (904,49): C, 66,39; H, 6,46; N, 10,84. Nalezeno: C, 66,94±0,19; H, 6,78±0,01; N, 10,35±0,09.

HRMS: m/z vypočteno pro $C_{50}H_{58}ClN_7O_7$: 926,39785 $[M+Na]^+$; nalezeno: 926,38379 $[M+Na]^+$.

2.2.2.4 Charakterizace produktu 58d



58d

Výtěžek 67 %; bílá amorfní látka

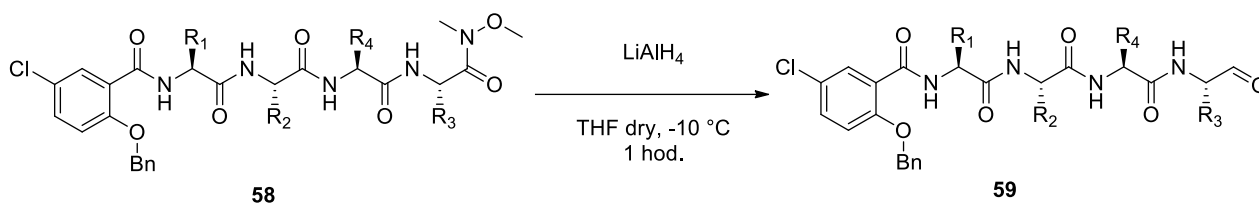
$R_f = 0,75$ (1:1 ethylacetát/*n*-hexan). **1H**

NMR (400 MHz, $CDCl_3$): δ 7,52 – 7,32 (8H, m, 8x \underline{CH} (Ar)), 7,13 (1H, d, $J = 8,7$ Hz, \underline{NH}), 7,02 (1H, m, \underline{NH}), 6,89 (1H, d, $J = 6,6$ Hz, \underline{NH}), 6,80 (1H, d, $J = 8$ Hz, \underline{NH}), 5,23 –

5,06 (2H, m, O- $\underline{CH_2}$ -Ar), 4,62 – 4,30 (4H, m, 4x \underline{CH}), 3,78 (3H, s, $\underline{CH_3}$ -O), 3,19 (3H, s, $\underline{CH_3}$ -N), 1,78 – 1,13 (12H, m, 4x $\underline{CH_2}$, 4x \underline{CH}), 0,99 – 0,64 (24H, m, 4x($\underline{CH_3}$)₂).

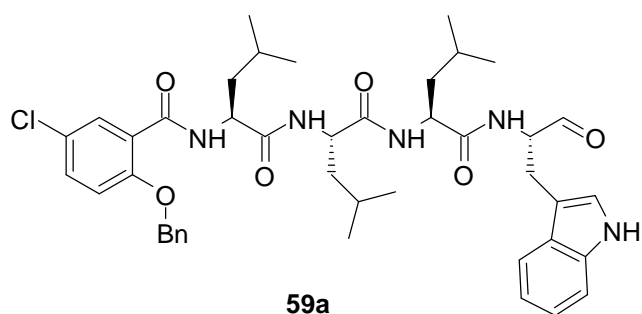
CHN analýza: Vypočteno pro $C_{40}H_{60}ClN_5O_7$ (758,39): C, 63,35; H, 7,97; N, 9,23. Nalezeno: C, 63,18±0,21; H, 7,69±0,03; N, 9,26±0,05. **HRMS:** m/z vypočteno pro $C_{40}H_{60}ClN_5O_7$: 780,40735 $[M+Na]^+$; nalezeno: 780,40845 $[M+Na]^+$.

2.2.3 Obecná příprava tetrapeptidického aldehydu (59)



Obecný postup přípravy je shodný s přípravou tripeptidického aldehydu (55) viz. kapitola 2.1.9.

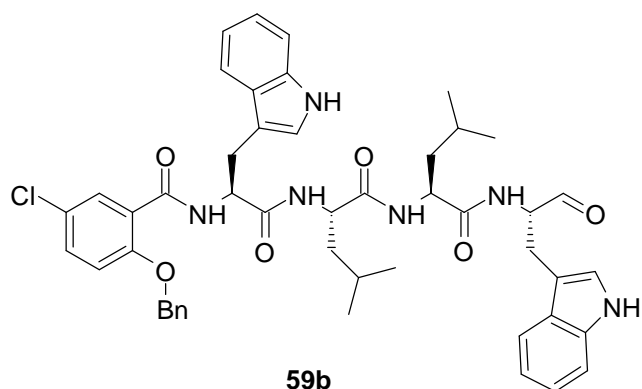
2.2.3.1 Charakterizace produktu 59a



Výtěžek 64 %; nažloutlý amorf;
 $R_f = 0,333$ (2:1 ethylacetát/*n*-hexan). ¹H NMR ani ¹³C NMR nezměřeno z důvodu nerozpustnosti látky v běžných deuterovaných rozpouštědlech. Látka byla charakterizována jinými metodami. **CHN**

analýza: Vypočteno pro C₄₃H₅₄ClN₅O₆ (772,37): C, 66,87; H, 7,05; N, 9,07. Nalezeno: C, 67,59±0,04; H, 7,67±0,01; N, 8,31±0,01. **HRMS:** m/z vypočteno pro C₄₃H₅₄ClN₅O₆: 794,36548 [M+Na]⁺; nalezeno: 794,36865 [M+Na]⁺.

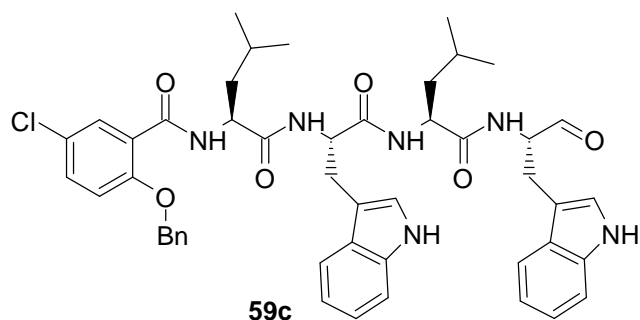
2.2.3.2 Charakterizace produktu 59b



Výtěžek 64 %; nažloutlá amorfní látka; $R_f = 0,231$ (2:1 ethylacetát/*n*-hexan). ¹H NMR ani ¹³C NMR nezměřeno z důvodu nerozpustnosti látky v běžných deuterovaných rozpouštědlech. Látka byla charakterizována jinými metodami. **CHN**

analýza: Vypočteno pro C₄₈H₅₃ClN₆O₆ (845,42): C, 68,19; H, 6,32; N, 9,94. Nalezeno: C, 66,79±0,04; H, 6,99±0,09; N, 7,54±0,02. **HRMS:** m/z vypočteno pro C₄₈H₅₃ClN₆O₆: 867,36073 [M+Na]⁺; nalezeno: 867,34851 [M+Na]⁺.

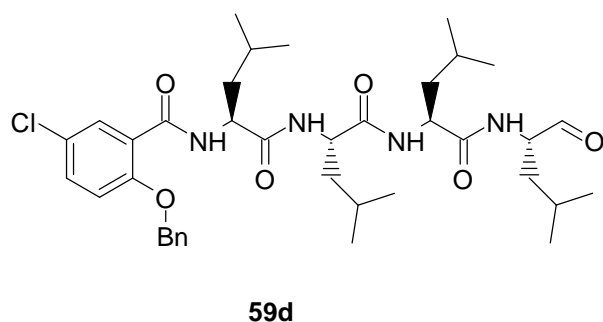
2.2.3.3 Charakterizace produktu 59c



Výtěžek 58 %; čirá amorfní látka;
 $R_f = 0,222$ (2:1 ethylacetát/*n*-hexan). ^1H NMR ani ^{13}C NMR nezměřeno z důvodu nerozpustnosti látky v běžných deuterovaných rozpouštědlech. Látka byla charakterizována jinými metodami. **CHN**

analýza: Vypočteno pro $\text{C}_{48}\text{H}_{53}\text{ClN}_6\text{O}_6$ (845,42): C, 68,19; H, 6,32; N, 9,94. Nalezeno: C, $64,42 \pm 0,31$; H, $6,73 \pm 0,09$; N, $7,64 \pm 0,02$. **HRMS:** m/z vypočteno pro $\text{C}_{48}\text{H}_{53}\text{ClN}_6\text{O}_6$: 867,36073 $[\text{M}+\text{Na}]^+$; nalezeno: 867,35571 $[\text{M}+\text{Na}]^+$.

2.2.3.4 Charakterizace produktu 59d

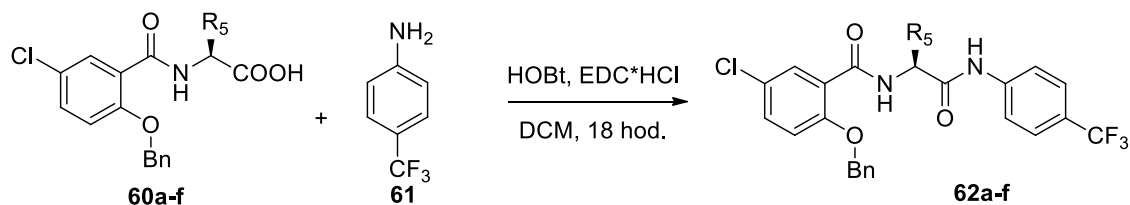


Výtěžek 23 %; žlutá amorfní látka
 $R_f = 0,32$ (2:1 ethylacetát/*n*-hexan). ^1H NMR (500 MHz, CD_2Cl_2): směs rotamerů δ 9,46-9,17 (1H, m, $\text{CH}=\text{O}$), 8,33-8,20 (1H, m, NH), 8,11-8,08 (1H, m, NH), 7,55-7,39 (6H, m, $6 \times \text{CH}(\text{Ar})$), 7,24-7,09 (3H, m, $2 \times \text{CH}(\text{Ar})$, NH), 6,95-6,81 (1H, m, NH), 5,22-5,16 (2H,

m, $\text{CH}_2\text{-O-Ph}$), 4,26-4,40 (1H, m, NH-CH-C=O), 4,19-4,06 (3H, m, $3 \times \text{NH-CH-C=O}$), 1,83-1,11 (12H, m, $4 \times \text{CH}_2\text{-CH}(\text{CH}_3)_2$), 1,02-0,69 (24H, m, $8 \times \text{CH}_3$). ^{13}C NMR (500 MHz, CD_2Cl_2): směs rotamerů δ 201,21, 173,29, 173,10, 171,72, 165,82, 156,02, 134,78, 134,59, 133,77, 131,72, 129,59, 129,20, 129,10, 128,87, 128,73, 127,00, 125,42, 121,14, 114,28, 72,24, 57,13, 54,95, 53,37, 52,10, 39,86, 36,84, 30,06, 29,70, 25,20, 24,66, 23,30, 22,90, 22,81, 21,16, 21,07, 20,64. **CHN analýza:** vypočteno pro $\text{C}_{38}\text{H}_{55}\text{ClN}_4\text{O}_6$ (699,32): C, 65,26; H, 7,93; N, 8,01, Nalezeno: C, 64,82; H, $8,87 \pm 0,25$; N, $6,29 \pm 0,22$, **HRMS:** m/z vypočteno pro: $\text{C}_{38}\text{H}_{55}\text{ClN}_4\text{O}_6$: 699,38829 $[\text{M}+\text{H}]^+$; nalezeno: 699,38855 $[\text{M}+\text{H}]^+$.

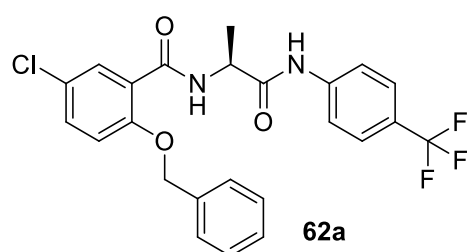
2.3 Příprava benzylovaných a debenzylovaných trifluorotoluidinů

2.3.1 Obecná příprava 5-chloro-O-benzyl-trifluoromethyl benzamidu (62a-f)



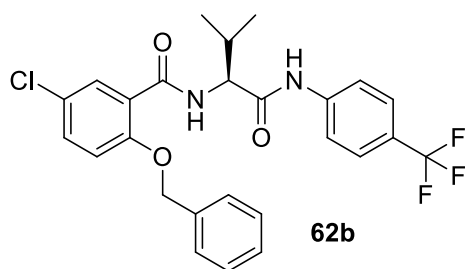
Do baňky bylo předložena kyselina (**60a-f**) (1 ekv), která byla rozpuštěna v DCM. Následně byl nadávkován HOBt*H₂O (1,1 ekv) a EDC*HCl (0,95 ekv). RS se nechala míchat asi hodinu, čímž došlo k aktivaci kyseliny. Následně se nadávkoval roztok 4-trifluoromethylanilinu (**61**) (1 ekv) v DCM. Reakční směs se nechala míchat 18 hodin, kdy po této době došlo k vymizení výchozí látky. DCM se odpařil na RVO a zbytek v baňce se rozpustil v EtOAc. Následně byly provedeny extrakce nasyceným roztokem NaHCO₃ (3x), 5% kyselinou citronovou (3x) a solankou (1x). Organická fáze se vysušila bezvodým Na₂SO₄, který se následně odfiltroval a produkt (**62a-f**) se izoloval „pseudokrystalizací“.

2.3.1.1 Charakterizace produktu 62a:



Výtěžek 75 %; bílá krystalická látka; b.t. = 140.9-143.2 °C; R_f = 0.633 (ethylacetát/*n*-hexan 1:1). ¹H NMR (500 MHz, DMSO): δ 10,48 (s, 1H, NH), 8,58 (d, J = 6,7 Hz, 1H, NH), 7,82 (d, J = 8,4 Hz, 2H, 2xCH(Ar)), 7,76 (d, J = 2,0 Hz, 1H, CH(Ar)), 7,69 (d, J = 8,5 Hz, 2H, 2xCH(Ar)), 7,56 (d, J = 7,8 Hz, 3H, 3xCH(Ar)), 7,37 (dt, J = 24,6, 8,1 Hz, 4H, 4xCH(Ar)), 5,33 – 5,26 (m, 2H, O-CH₂-Ph), 4,62 (p, J = 6,9 Hz, 1H, NH-CH-C=O), 1,28 (d, J = 7,0 Hz, 3H, CH₃). ¹³C NMR (100 MHz, DMSO): δ 172,15, 163,91, 155,69, 143,09, 136,54, 132,63, 130,48, 129,15, 128,90, 128,68, 126,73, 126,70, 125,45, 124,90, 124,09 (q, ¹J (¹⁹F, ¹³C)=32 Hz), 119,80, 116,39, 71,47, 50,38, 18,65. ¹⁹F NMR (400 MHz, CDCl₃): δ -60,34 (s). **CHN analýza:** vypočteno pro C₂₄H₂₀ClF₃N₂O₃ (476,88): C, 60,45; H, 4,23; N, 5,87. Nalezeno: C, 60,08±0,22; H, 4,15±0,12; N, 5,48±0,02. **HRMS:** m/z vypočteno pro C₂₄H₂₀ClF₃N₂O₃: 477,11928 [M+H]⁺, 499,10122 [M+Na]⁺, 515,07516 [M+K]⁺; Nalezeno: 477,11873 [M+H]⁺, 499,10068 [M+Na]⁺, 515,07461 [M+K]⁺.

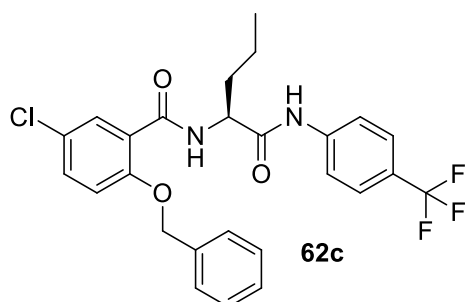
2.3.1.2 Charakterizace produktu 62b:



62b

Výtěžek 67 %; bílá krystalická látka, b.t. = 195,2-196,5 °C; R_f = 0,536 (ethylacetát/*n*-hexan 1:1). $^1\text{H NMR}$ (500 MHz, CDCl_3): δ 9,51 (s, 1H, NH), 8,54 (d, J = 7,7 Hz, 1H, NH), 8,15 (d, J = 2,8 Hz, 1H, $\text{CH}(\text{Ar})$), 7,57 (d, J = 8,5 Hz, 2H, $2\times\text{CH}(\text{Ar})$), 7,50 (dd, J = 7,8, 1,4 Hz, 2H, $2\times\text{CH}(\text{Ar})$), 7,46 – 7,39 (m, 6H, $6\times\text{CH}(\text{Ar})$), 7,07 (d, J = 8,9 Hz, 1H, $\text{CH}(\text{Ar})$), 5,21 (dd, J = 28,5, 10,5 Hz, 2H, O- CH_2 -Ph), 4,63 (t, J = 7,4 Hz, 1H, NH- CH -C=O), 2,05 – 1,96 (m, 1H, $\text{CH}(\text{CH}_3)_2$), 0,90 (d, J = 6,7 Hz, 3H, CH_3), 0,66 (d, J = 6,8 Hz, 3H, CH_3). $^{13}\text{C NMR}$ (100 MHz, CDCl_3): δ 170,03, 164,80, 155,71, 141,13, 134,49, 133,13, 131,94, 129,25, 129,13, 128,73, 126,93, 125,97, 125,54 (q, 1J (^{19}F , ^{13}C)=24 Hz), 125,4, 122,05, 119,26, 114,13, 72,05, 60,46, 30,34, 19,35, 18,01. $^{19}\text{F NMR}$ (400 MHz, CDCl_3): δ -62,15 (s). **CHN analýza:** vypočteno pro $\text{C}_{26}\text{H}_{24}\text{ClF}_3\text{N}_2\text{O}_3$ (504,93): C, 61,85; H, 4,79; N, 5,55. Nalezeno: C, 62,23 \pm 0,05; H, 4,75 \pm 0,03; N, 5,42 \pm 0,04. **HRMS:** m/z vypočteno pro $\text{C}_{26}\text{H}_{24}\text{ClF}_3\text{N}_2\text{O}_3$: 505,15058 $[\text{M}+\text{H}]^+$, 527,13252 $[\text{M}+\text{Na}]^+$, 543,10646 $[\text{M}+\text{K}]^+$; Nalezeno: 505,15036 $[\text{M}+\text{H}]^+$, 527,13226 $[\text{M}+\text{Na}]^+$, 543,10602 $[\text{M}+\text{K}]^+$.

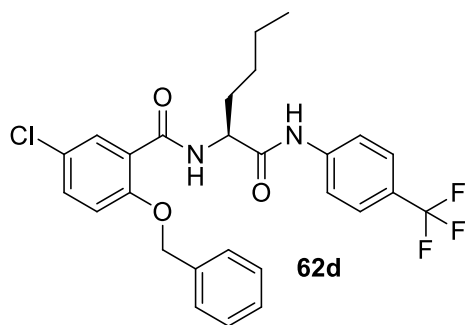
2.3.1.3 Charakterizace produktu 62c:



62c

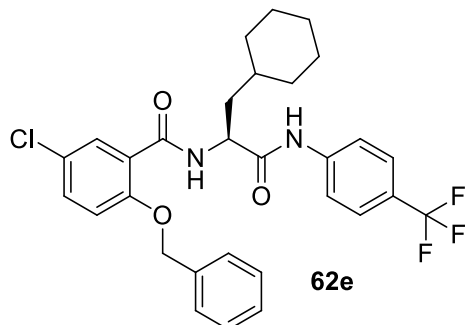
Výtěžek 59 %; bílá krystalická látka, b.t. = 160,3-161,6 °C; R_f = 0,636 (ethylacetát/*n*-hexan 1:1). $^1\text{H NMR}$ (400 MHz, DMSO): δ 10,50 (s, 1H, NH), 8,44 (d, J = 7,3 Hz, 1H, NH), 7,81 (d, J = 8,5 Hz, 2H, $2\times\text{CH}(\text{Ar})$), 7,75 (d, J = 2,0 Hz, 1H, $\text{CH}(\text{Ar})$), 7,67 (d, J = 8,4 Hz, 2H, $2\times\text{CH}(\text{Ar})$), 7,59 – 7,51 (m, 3H, $3\times\text{CH}(\text{Ar})$), 7,43 – 7,32 (m, 4H, $4\times\text{CH}(\text{Ar})$), 5,31 – 5,23 (m, 2H, O- CH_2 -Ph), 4,59 (dd, J = 13,1, 7,6 Hz, 1H, NH- CH -C=O), 1,63 (dt, J = 14,7, 5,9 Hz, 1H, CHH), 1,53 – 1,42 (m, 1H, CHH), 1,24 – 1,08 (m, 2H, CH_2), 0,76 (t, J = 7,3 Hz, 3H, CH_3). $^{13}\text{C NMR}$ (100 MHz, CDCl_3): δ 171,67, 164,08, 155,77, 143,04, 136,37, 132,65, 130,53, 129,17, 129,00, 128,96, 126,70, 126,67, 125,47, 124,78, 124,10 (q, 1J (^{19}F , ^{13}C)=31 Hz), 119,85, 116,30, 71,63, 54,51, 34,67, 19,07, 14,22. $^{19}\text{F NMR}$ (400 MHz, CDCl_3): δ -60,36 (s). **CHN analýza:** vypočteno pro $\text{C}_{26}\text{H}_{24}\text{ClF}_3\text{N}_2\text{O}_3$ (504,93): C, 61,85; H, 4,79; N, 5,55. Nalezeno: C, 61,51 \pm 0,29; H, 4,81 \pm 0,02; N, 5,54 \pm 0,02. **HRMS:** m/z vypočteno pro $\text{C}_{26}\text{H}_{24}\text{ClF}_3\text{N}_2\text{O}_3$: 505,15003 $[\text{M}+\text{H}]^+$, 527,13198 $[\text{M}+\text{Na}]^+$; Nalezeno: 505,15155 $[\text{M}+\text{H}]^+$, 527,13354 $[\text{M}+\text{Na}]^+$.

2.3.1.4 Charakterizace produktu 62d:



Výtěžek 4 %; bílá krystalická látka, b.t. = 141,4-142,4 °C; $R_f = 0,622$ (ethylacetát/*n*-hexan 1:1). $^1\text{H NMR}$ (500 MHz, DMSO): δ 10,53 (s, 1H, NH), 8,49 (d, $J = 7,3$ Hz, 1H, NH), 7,82 (d, $J = 8,4$ Hz, 2H, 2xCH(Ar)), 7,76 (d, $J = 2,7$ Hz, 1H, CH(Ar)), 7,68 (d, $J = 8,5$ Hz, 2H, 2xCH(Ar)), 7,57 (dd, $J = 11,4, 5,0$ Hz, 3H, 3xCH(Ar)), 7,42 – 7,32 (m, 4H, 4xCH(Ar)), 5,32 – 5,24 (m, 2H, O-CH₂-Ph), 4,58 (dd, $J = 13,2, 7,6$ Hz, 1H, NH-CH-C=O), 1,71 – 1,62 (m, 1H, CHH), 1,54 – 1,43 (m, 1H, CHH), 1,24 – 1,06 (m, 4H, CH₂-CH₂), 0,75 (t, $J = 6,6$ Hz, 3H, CH₃). $^{13}\text{C NMR}$ (100 MHz, DMSO): δ 171,49, 163,87, 155,55, 142,84, 136,21, 132,51, 130,34, 128,98, 128,82, 128,71, 126,57, 125,26, 124,80 (q, $^1J(^{19}\text{F}, ^{13}\text{C})=74$ Hz), 124,01, 123,75, 119,62, 116,08, 71,34, 54,52, 32,14, 27,76, 22,26, 14,21. $^{19}\text{F NMR}$ (100 MHz, DMSO): δ -60,37 (s). **CHN analýza:** vypočteno pro $\text{C}_{27}\text{H}_{26}\text{ClF}_3\text{N}_2\text{O}_3$ (518,96): C, 62,49; H, 5,05; N, 5,40. Nalezeno: C, 62,38±0,06; H, 4,92±0,05; N, 5,03±0,03. **HRMS:** m/z vypočteno pro $\text{C}_{27}\text{H}_{26}\text{ClF}_3\text{N}_2\text{O}_3$: 541,14763 $[\text{M}+\text{Na}]^+$; Nalezeno: 541,14899 $[\text{M}+\text{Na}]^+$.

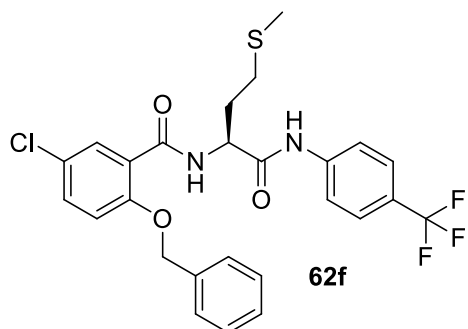
2.3.1.5 Charakterizace produktu 62e:



Výtěžek 56 %; bílá krystalická látka, b.t. = 166,4-167,4 °C; $R_f = 0,663$ (ethylacetát/*n*-hexan 1:1), $^1\text{H NMR}$ (500 MHz, DMSO): δ 10,53 (s, 1H, NH), 8,44 (d, $J = 7,5$ Hz, 1H, NH), 7,82 (d, $J = 8,6$ Hz, 2H, 2xCH(Ar)), 7,75 (d, $J = 2,8$ Hz, 1H, CH(Ar)), 7,68 (d, $J = 8,7$ Hz, 2H, 2xCH(Ar)), 7,59 – 7,53 (m, 3H, 3xCH(Ar)), 7,42 – 7,32 (m, 4H, 4xCH(Ar)), 5,32 – 5,25 (m, 2H, O-CH₂-Ph), 4,65 (ddd, $J = 9,8, 7,6, 5,2$ Hz, 1H, NH-CH-C=O), 1,68 (d, $J = 12,3$ Hz, 1H, CH-CH₂), 1,63 – 1,45 (m, 5H (cyklohexylalanin)), 1,41 – 1,33 (m, 1H (cyklohexylalanin)), 1,23 – 1,12 (m, 1H (cyklohexylalanin)), 1,09 – 0,97 (m, 3H (cyklohexylalanin)), 0,88 – 0,73 (m, 2H, CH₂-CH). $^{13}\text{C NMR}$ (100 MHz, DMSO): δ 172,02, 163,89, 155,55, 142,90, 136,27, 132,52, 130,32, 129,03, 128,84, 128,61, 126,55, 125,26, 124,81 (q, $^1J(^{19}\text{F}, ^{13}\text{C})=67$ Hz), 123,74, 119,67, 116,09, 71,30, 52,40, 34,10, 33,40, 32,17, 26,36, 26,10, 25,95. $^{19}\text{F NMR}$ (400 MHz, DMSO): δ -60,36 (s). **CHN analýza:** vypočteno pro $\text{C}_{30}\text{H}_{30}\text{ClF}_3\text{N}_2\text{O}_3$ (559,02): C, 64,46; H, 5,41; N, 5,01. Nalezeno: C, 64,53±0,06; H,

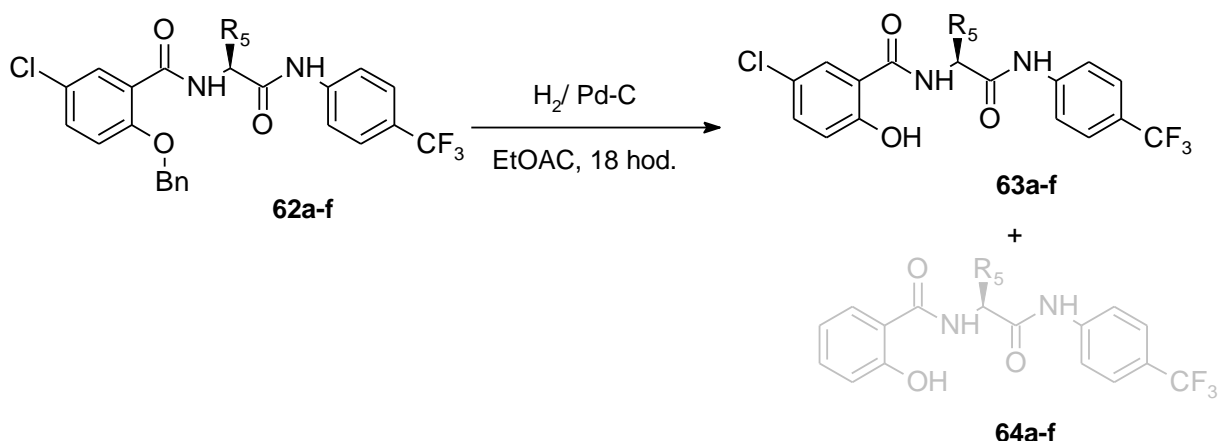
5,36±0,03; N, 5,24±0,02. **HRMS**:m/z vypočteno pro C₃₀H₃₀ClF₃N₂O₃: 581,17893 [M+Na]⁺; Nalezeno: 581,18066 [M+Na]⁺.

2.3.1.6 Charakterizace produktu 62f:



Výtěžek 23 %; bílá krystalická látka, b.t. = 171,6-173,2 °C; R_f = 0,688 (ethylacetát/*n*-hexan 1:1). **¹H NMR** (500 MHz, DMSO): δ 10,56 (s, 1H, NH), 8,58 (d, J = 7,5 Hz, 1H, NH), 7,82 (d, J = 8,5 Hz, 2H, 2xCH(Ar)), 7,73 – 7,66 (m, 3H, 3xCH(Ar)), 7,59 – 7,51 (m, 3H, 3xCH(Ar)), 7,36 (dt, J = 16,7, 8,0 Hz, 4H, 4xCH(Ar)), 5,31 – 5,23 (m, 2H, O-CH₂-Ph), 4,74 – 4,66 (m, 1H, NH-CH-C=O), 2,42 – 2,27 (m, 2H, CH₂), 2,03 – 1,93 (m, 4H, CH₃, CHH), 1,87 – 1,77 (m, 1H, CHH). **¹³C NMR** (100 MHz, DMSO): δ 170,93, 164,32, 155,42, 142,79, 136,35, 132,34, 130,17, 129,00, 128,77, 128,53, 126,56, 125,15, 125,03, 123,96 (q, ¹J (¹⁹F, ¹³C)=25 Hz), 123,84, 119,78, 116,05, 71,18, 53,81, 31,99, 29,84, 15,06. **¹⁹F NMR** (400 MHz, DMSO): δ -60,35 (s). **CHN analýza**: vypočteno pro C₂₆H₂₄ClF₃N₂O₃S (536,99): C, 58,15; H, 4,50; N, 5,22. Nalezeno: C, 58,62±0,15; H, 4,40±0,02; N, 5,20±0,06. **HRMS**: m/z vypočteno pro C₂₆H₂₄ClF₃N₂O₃S: 559,10405 [M+Na]⁺; Nalezeno: 559,10553 [M+Na]⁺.

2.3.2 Obecná příprava 5-chloro-2-hydroxyl-trifluoromethyl benzamidu (63a-f)



Do baňky byl předložen benzylovaný benzamid (**62a-f**) (1 ekv), který byl rozpuštěn v EtOAc. Dále bylo přidáno malé množství katalyzátoru Pd-C. RS se v baňce nechala probublávat vodíkem 18 hodin. Po této době se průběh reakce zkontroloval pomocí TLC. Byl detekován vznik produktu, ale v reakční směsi byla stále výchozí látka. I přes to byla reakce ukončena z důvodu zabránění vzniku nežádoucího vedlejšího produktu bez chloru (**64a-f**). Produkt (**63a-f**) se izoloval sloupcovou chromatografií s mobilní fází EtOAc/*n*-hexan 1:5.

2.3.2.1 Charakterizace produktu 63a:

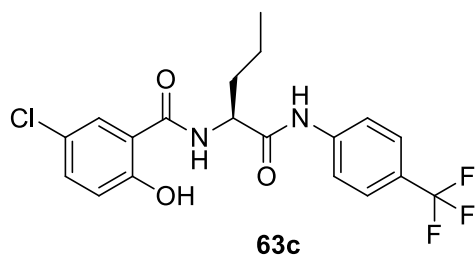
Výtěžek 29 %; bílá krystalická látka, b.t. = 240,3-241,2 °C; $R_f = 0,505$ (ethylacetát/*n*-hexan 1:3, vyjeto 3x). $^1\text{H NMR}$ (400 MHz, DMSO): δ 12,20 (s, 1H, OH), 10,52 (s, 1H, NH), 9,12 (d, $J = 6,5$ Hz, 1H, NH), 8,07 (d, $J = 2,2$ Hz, 1H, CH(Ar)), 7,84 (d, $J = 8,4$ Hz, 2H, 2xCH(Ar)), 7,69 (d, $J = 8,5$ Hz, 2H, 2xCH(Ar)), 7,45 (dd, $J = 8,8, 2,3$ Hz, 1H, CH(Ar)), 6,98 (d, $J = 8,8$ Hz, 1H, CH(Ar)), 4,68 (p, $J = 6,8$ Hz, 1H, NH-CH-C=O), 1,48 (d, $J = 7,0$ Hz, 3H, CH₃). $^{13}\text{C NMR}$ (100 MHz, DMSO): δ 172,09, 167,09, 158,43, 143,09, 133,95, 128,93, 126,74, 124,32, 124,13 (q, $^1J(^{19}\text{F}, ^{13}\text{C})=32$ Hz), 123,25, 119,90, 119,83, 117,94, 50,50, 18,57. $^{19}\text{F NMR}$ (400 MHz, DMSO): δ -60,38 (s). **CHN analýza:** vypočteno pro $\text{C}_{17}\text{H}_{14}\text{ClF}_3\text{N}_2\text{O}_3$ (386,75): C, 52,79; H, 3,65; N, 7,24. Nalezeno: C, 52,92±0,06; H, 3,67±0,03; N, 7,10±0,03. **HRMS:** m/z vypočteno pro $\text{C}_{17}\text{H}_{14}\text{ClF}_3\text{N}_2\text{O}_3$: 387,07178 $[\text{M}+\text{H}]^+$, 409,05373 $[\text{M}+\text{Na}]^+$; Nalezeno: 387,07315 $[\text{M}+\text{H}]^+$, 409,05508 $[\text{M}+\text{Na}]^+$.

2.3.2.2 Charakterizace produktu 63b:

Výtěžek 61 %; bílá krystalická látka, b.t. = 192,6-194,6 °C; $R_f = 0,716$ (ethylacetát/*n*-hexan

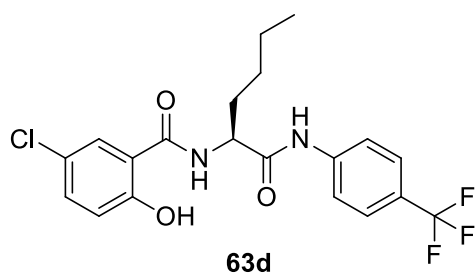
1:3, vyjeto 3x). **¹H NMR** (500 MHz, DMSO): δ 12,02 (s, 1H, OH), 10,61 (s, 1H, NH), 8,97 (d, J = 8,1 Hz, 1H, NH), 8,02 (d, J = 2,7 Hz, 1H, CH(Ar)), 7,84 (d, J = 8,5 Hz, 2H, 2xCH(Ar)), 7,69 (d, J = 8,6 Hz, 2H, 2xCH(Ar)), 7,44 (dd, J = 8,8, 2,7 Hz, 1H, CH(Ar)), 6,99 (d, J = 8,8 Hz, 1H, CH(Ar)), 4,59 (t, J = 7,5 Hz, 1H, NH-CH-C=O), 2,21 (dd, J = 13,6, 6,8 Hz, 1H, (CH₃)2-CH), 0,98 (dd, J = 6,7, 3,1 Hz, 6H, (CH₃)2-CH), **¹³C NMR** (100 MHz, CDCl₃): δ 170,86, 165,99, 157,15, 142,61, 133,49, 129,40, 126,60, 126,57, 124,00 (q, ¹J (¹⁹F, ¹³C)=26 Hz), 123,29, 119,68, 119,49, 118,84, 59,60, 31,14, 19,64, 18,82, **¹⁹F NMR** (400 MHz, DMSO): δ -60,36 (s). **CHN analýza:** vypočteno pro C₁₉H₁₈ClF₃N₂O₃ (414,81): C, 55,01; H, 4,37; N, 6,75. Nalezeno: C, 55,81±0,06; H, 4,86±0,06; N, 6,32±0,02. **HRMS:** m/z vypočteno pro C₁₉H₁₈ClF₃N₂O₃: 437,08503 [M+Na]⁺; Nalezeno: 437,08582 [M+Na]⁺.

2.3.2.3 Charakterizace produktu 63c:



Výtěžek 28 %; bílá krystalická látka, b.t. = 216,5-218,3 °C; R_f = 0,533 (ethylacetát/*n*-hexan 1:3, vyjeto 3x). **¹H NMR** (400 MHz, DMSO): δ 12,18 (s, 1H, OH), 10,56 (s, 1H, NH), 9,03 (d, J = 7,0 Hz, 1H, NH), 8,06 (d, J = 2,6 Hz, 1H, CH(Ar)), 7,83 (d, J = 8,4 Hz, 2H, 2xCH(Ar)), 7,67 (d, J = 8,4 Hz, 2H, 2xCH(Ar)), 7,44 (dd, J = 8,8, 2,6 Hz, 1H, CH(Ar)), 7,05 – 6,82 (m, 1H, CH(Ar)), 4,79 – 4,47 (m, 1H, NH-CH-C=O), 2,00 – 1,71 (m, 2H, CH₂), 1,58 – 1,28 (m, 2H, CH₂), 1,00 – 0,85 (m, 3H, CH₃). **¹³C NMR** (100 MHz, DMSO): δ 171,66, 167,19, 158,26, 142,99, 133,90, 128,99, 126,73, 126,70, 124,16 (q, ¹J (¹⁹F, ¹³C)=32 Hz), 123,28, 119,89, 119,80, 118,08, 54,59, 34,42, 19,43, 14,23. **¹⁹F NMR** (400 MHz, DMSO): δ -60,40 (s). **CHN analýza:** vypočteno pro C₁₉H₁₈ClF₃N₂O₃ (414,81): C, 55,01; H, 4,37; N, 6,75. Nalezeno: C, 55,20±0,02; H, 4,49±0,02; N, 6,68±0,02. **HRMS:** m/z vypočteno pro C₁₉H₁₈ClF₃N₂O₃: 415,10308 [M+H]⁺, 437,08503 [M+Na]⁺; nalezeno: 415,10428 [M+H]⁺, 437,08624 [M+Na]⁺.

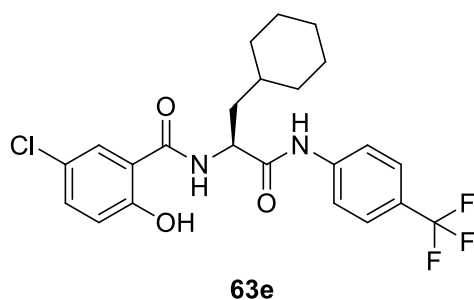
2.3.2.4 Charakterizace produktu 63d:



Výtěžek 40 %; bílá krystalická látka, b.t. = 201,9-203,8 °C; R_f = 0,496 (ethylacetát/*n*-hexan 1:5, vyjeto 2x). **¹H NMR** (500 MHz, DMSO): δ 12,20 (s, 1H, OH), 10,59 (s, 1H, NH), 9,05 (d, J=7,2 Hz, 1H, NH), 8,06 (d, J=2,5 Hz, 1H, CH(Ar)), 7,83 (d, J=8,5 Hz, 2H, 2xCH(Ar)), 7,68 (d, J=8,5 Hz, 2H, 2xCH(Ar)), 7,44 (dd, J=8,8, 2,5 Hz, 1H, CH(Ar)), 6,97 (d, J=8,8 Hz, 1H, CH(Ar)), 4,65 (q,

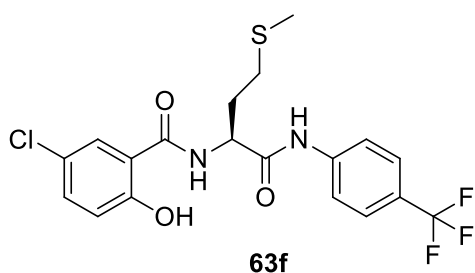
$J=7,0$ Hz, 1H, NH- \underline{CH} -C=O), 1,88-1,79 (m, 2H, \underline{CH}_2 -CH), 1,43-1,30 (m, 4H, \underline{CH}_2 - \underline{CH}_2), 0,86 (t, $J=6,8$ Hz, 3H, \underline{CH}_3). ^{13}C NMR (100 MHz, DMSO): δ 171,48, 166,92, 158,02, 142,80, 133,74, 128,83, 126,57, 126,55, 123,96 (q, 1J (^{19}F , ^{13}C)=25 Hz), 123,11, 119,67, 119,62, 117,89, 54,60, 31,93, 28,11, 22,35, 14,30. ^{19}F NMR (400 MHz, DMSO): δ -60,39 (s). **CHN analýza:** vypočteno pro $\text{C}_{20}\text{H}_{20}\text{ClF}_3\text{N}_2\text{O}_3$ (428,83): C, 56,02; H, 4,70; N, 6,53. Nalezeno: C, 56,29 \pm 0,01; H, 4,76 \pm 0,01; N, 6,28 \pm 0,03. **HRMS:** m/z vypočteno pro $\text{C}_{20}\text{H}_{20}\text{ClF}_3\text{N}_2\text{O}_3$: 429,11873 [M+H] $^+$; nalezeno: 429,11966 [M+H] $^+$.

2.3.2.5 Charakterizace produktu 63e:



Výtěžek 39 %; bílá krystalická látka, b.t. = 217,3-218,1 °C; R_f = 0,474 (ethylacetát/*n*-hexan 1:5, vyjeto 2x). ^1H NMR (500 MHz, DMSO): δ 12,25 (s, 1H, \underline{OH}), 10,58 (s, 1H, \underline{NH}), 9,02 (d, $J=7,5$ Hz, 1H, \underline{NH}), 8,07 (d, $J=2,5$ Hz, 1H, \underline{CH} (Ar)), 7,83 (d, $J=8,5$ Hz, 2H, 2x \underline{CH} (Ar)), 7,60 (d, $J=9,3$ Hz, 2H, 2x \underline{CH} (Ar)), 7,45 (dd, $J=8,8, 2,6$ Hz, 1H, \underline{CH} (Ar)), 6,97 (d, $J=8,8$ Hz, 1H, \underline{CH} (Ar)), 4,75-4,71 (m, 1H, NH- \underline{CH} -C=O), 1,79-1,71 (m, 3H, 3x \underline{H} -*cyclohexylalanin*), 1,68-1,62 (3H, m, 3x \underline{H} -*cyclohexylalanin*), 1,59 (s, 1H, *H*-*cyclohexylalanin*), 1,40-1,39 (m, 1H, \underline{CH} -*cyclohexylalanin*), 1,24-1,11 (m, 3H, 3x \underline{H} -*cyclohexylalanin*), 0,99-0,92 (m, 2H, \underline{CH}_2 -CH-*cyclohexylalanin*). ^{13}C NMR (100 MHz, DMSO): δ 171,96, 167,20, 158,23, 142,86, 133,84, 128,69, 126,58, 126,55, 123,93 (q, 1J (^{19}F , ^{13}C)=25 Hz), 123,08, 119,73, 119,68, 117,68, 52,44, 34,25, 32,22, 26,45, 26,21, 26,01. ^{19}F NMR (400 MHz, DMSO): δ -60,36 (s). **CHN analýza:** vypočteno pro $\text{C}_{23}\text{H}_{24}\text{ClF}_3\text{N}_2\text{O}_3$ (468,90): C, 58,91; H, 5,16; N, 5,97. Nalezeno: C, 59,46 \pm 0,18; H, 5,09 \pm 0,04; N, 5,72 \pm 0,02. **HRMS:** m/z vypočteno pro $\text{C}_{23}\text{H}_{24}\text{ClF}_3\text{N}_2\text{O}_3$: 469,15003 [M+H] $^+$; Nalezeno: 469, 15161 [M+H] $^+$.

2.3.2.6 Charakterizace produktu 63f:

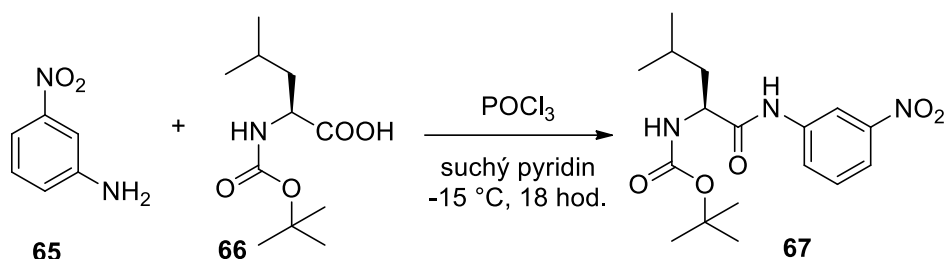


Výtěžek 51 %; bílá krystalická látka, b.t. = 153,9-155,2 °C; R_f = 0,588 (ethylacetát/*n*-hexan 1:1). ^1H NMR (500 MHz, DMSO): δ 12,21 (s, 1H, \underline{OH}), 10,61 (s, 1H, \underline{NH}), 9,11 (d, $J = 7,2$ Hz, 1H, \underline{NH}), 8,06 (d, $J = 2,5$ Hz, 1H, \underline{CH} (Ar)), 7,84 (d, $J = 8,5$ Hz, 2H, 2x \underline{CH} (Ar)), 7,69 (d, $J = 8,6$ Hz, 2H, 2x \underline{CH} (Ar)), 7,46 (dd, $J = 8,8, 2,6$ Hz, 1H, \underline{CH} (Ar)), 6,97 (d, $J = 8,8$ Hz, 1H, \underline{CH} (Ar)), 4,79 – 4,70 (m, 1H, NH- \underline{CH} -C=O), 2,66 – 2,51 (m, 2H, \underline{CH}_2), 2,18 – 2,03 (m, 5H, \underline{CH}_3 -S, \underline{CH}_2 -S), ^{13}C NMR

(100 MHz, CDCl₃): 170,88, 167,47, 158,29, 142,74, 133,86, 128,66, 126,56, 126,53, 124,02
(q, ¹J (¹⁹F, ¹³C)=26 Hz), 123,02, 119,82, 119,66, 117,67, 53,96, 31,70, 30,19, 15,12, ¹⁹F NMR
(400 MHz, DMSO): δ -60,38 (s). **CHN analýza:** vypočteno pro C₁₉H₁₈ClF₃N₂O₃S (446,87):
C, 51,07; H, 4,06; N, 6,27. Nalezeno: C, 50,93±0,34; H, 4,48±0,01; N, 5,64±0,18. **HRMS:**
m/z vypočteno pro C₁₉H₁₈ClF₃N₂O₃S: 469,05710 [M+Na]⁺; Nalezeno: 469,05844 [M+Na]⁺.

2.4 Příprava akrylamidů

2.4.1 Příprava (*S*)-*tert*-butyl (4-methyl-1-((3-nitrophenyl)amino)-1-oxopentan-2-yl)karbamátu (67)



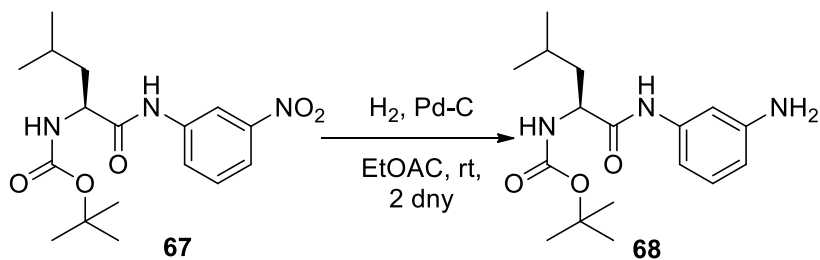
Do 500 ml baňky opatřené míchadlem byly předloženy 6,58 g Boc-*L*-Leu (**66**) (28,46 mmol, 1 ekv), které byly následně rozpuštěny ve 400 ml DCM. Následně byl nadávkován HOBt (4,23 g, 31,3 mmol, 1,1 ekv) a EDC*HCl (6,55 g, 34,15 mmol, 1,2 ekv). Směs se nechala míchat 1 hodinu a následně se přikápal roztok 3-nitroanilinu (**65**) (4,32 g, 31,3 mmol, 1,1 ekv) v DCM (30 ml). Reakce se míchala 2 dny a její průběh byl sledován pomocí TLC. Po zreagování veškeré výchozí látky se DCM z reakční směsi odpařil pomocí RVO (rotační vakuová odparka) a zbytek v baňce se rozpustil v EtOAc (200 ml). Byly provedeny extrakce nasyceným roztokem NaHCO₃ (3x70 ml), 5% kyselinou citronovou (3x70 ml), solankou (1x70 ml), 10% HCl (3x70 ml) a vodou (1x70 ml). Organická fáze se vysušila bezvodným Na₂SO₄. Ten se následně odfiltroval a produkt (**67**) se izoloval pomocí sloupcové chromatografie.

Reakce byla zopakována ještě 3x s různými navážkami a s výtěžky 31-66 %.

2.4.1.1 Charakterizace produktu 67:

Výtěžek 4,69 g (47 %); žlutá amorfnní látka; R_f = 0,545 (SiO₂; ethylacetát-*n*-hexan, 2:3); ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃, ppm): δ 9,43 (s, 1H, NH), 8,37 (s, 1H, CH(Ar)), 7,88-7,71 (m, 2H, 2xCH(Ar)), 7,33-7,29 (m, 1H, CH(Ar)), 5,27 (s, 1H, NH), 4,37 (s, 1H, NH-CH-C=O), 1,80-1,61 (m, 3H, CH₂-CH), 1,47 (s, 9H, (CH₃)₃-C), 0,98-0,90 (m, 6H, (CH₃)₂-CH). ¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃) δ 172,11, 148,25, 139,17, 129,41, 124,95, 118,41, 114,29, 81,01, 53,99, 40,77, 28,36, 24,76, 23,05, 21,52. **Elementární analýza** pro C₁₇H₂₅N₃O₅ (351,40) vypočteno: C 58,11; H 7,17; N 11,96. Nalezeno: C 57,84 ± 0,07; H 7,39 ± 0,02; N 12,10 ± 0,06. **HRMS**: m/z vypočteno pro C₁₇H₂₅N₃O₅: 374,16864 Da [M+Na]⁺, nalezeno: 374,16870 Da [M+Na]⁺.

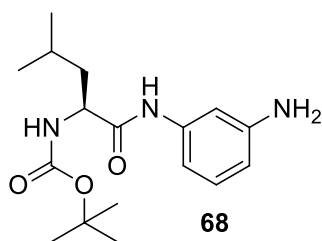
2.4.2 Příprava (S)-tert-butyl (1-((3-aminophenyl)amino)-4-methyl-1-oxopentan-2-yl)karbamátu (68)



Do autoklávu byla vložena skleněná vložka opatřená míchadlem, ve které se rozpustilo 6,43 g nitrolátky (**67**) (18,29 mmol, 1 ekv) v EtOAc (50 ml) přidavkem katalytického množství Pd-C. Reakční směs byla míchána při tlaku 12,5 baru přes noc. Následně se reakce zkontrolovala pomocí TLC a po vymizení prakticky veškeré výchozí látky se reakce ukončila. Katalyzátor byl odfiltrován přes trojitý skládaný filtr, pomocí RVO se odpařilo rozpouštědlo a produkt (**68**) byl izolován sloupcovou chromatografií.

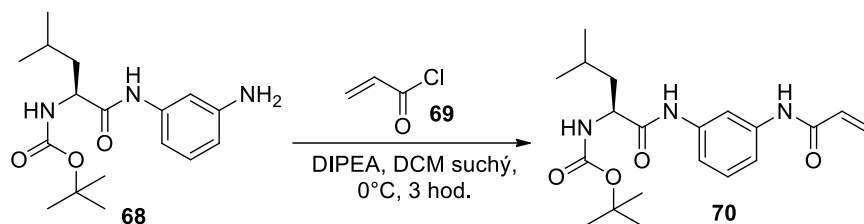
Reakce byla zopakována ještě 2x s různými navážkami a s výtěžky 57-88 %.

2.4.2.1 Charakterizace produktu 68:



Výtěžek 4,65 g (79 %); bílá amorfnní látka; $R_f = 0,143$ (SiO₂; ethylacetát/*n*-hexan, 2:3); ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃): δ 8,80 (s, 1H, NH), 7,02-6,96 (m, 2H, 2xCH(Ar)), 6,77 (d, J=6,9 Hz, 1H, CH(Ar)), 6,37 (d, J=7,5 Hz, 1H, CH(Ar)), 5,44 (s, 1H, NH), 4,35 (s, 1H, NH-CH-C=O), 4,06 (s, 2H, NH₂), 1,77-1,56 (m, 3H, CH₂-CH), 1,40 (s, 9H, (CH₃)₃), 0,95-0,91 (m, 6H, (CH₃)₂). ¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃) δ 171,63, 156,52, 146,97, 139,09, 129,73, 111,37, 110,46, 107,08, 54,07, 41,32, 28,52, 24,96, 23,18, 20,98. **Elementární analýza** pro C₁₇H₂₇N₃O₃ (321,41) vypočteno: C 63,53; H 8,47; N 13,07. Nalezeno: C 63,11 ± 0,03; H 8,51 ± 0,02; N 13,01 ± 0,02. **HRMS**: m/z vypočteno pro: C₁₇H₂₇N₃O₃: 344,19446 Da [M+Na]⁺, nalezeno: 344,19421 Da [M+Na]⁺.

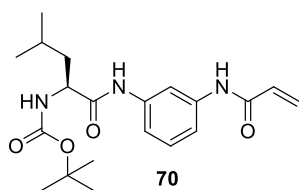
2.4.3 Příprava (S)-tert-butyl (1-((3-acrylamidophenyl)amino)-4-methyl-1-oxopentan-2-yl)karbamátu (70)



Do tříhrdlé baňky opatřené míchadlem a teploměrem bylo předloženo 6,602 g aminu (**68**) (20,54 mmol, 1 ekv). Vzduch v baňce byl nahrazen inertem a látka pod ním byla rozpuštěna v suchém DCM (80). Následně bylo po kapkách přidáno 3,94 ml DIPEy (22,59 mmol, 1,1 ekv) a směs byla vychlazena pomocí ledové lázně se solí na 0 °C. Poté byl pomocí syringe pumpy po kapkách nadávkován roztok akryloylchloridu (**69**) (1,67 ml, 20,54 mmol, 1 ekv) v suchém DCM (5 ml). Reakce se nechala míchat půl hodiny, kdy bylo po této době indikováno vymizení výchozí látky pomocí TLC. Reakce byla ukončena přidavkem malého množství roztoku NaCl a provedly se extrakce solankou (3x30 ml) a DCM (3x30 ml). Organická fáze byla vysušena bezvodým Na₂SO₄ a sušidlo bylo odfiltrováno. Filtrát se zahustil na RVO, kdy došlo ke vzniku gelu. Gelovitá látka byla rozpuštěna v acetonu a nanesená na silikagel. Celá tato směs se odpařila do sucha pomocí RVO a vzorek+silikagel byly následně naneseny na kolonu a produkt (**70**) se izoloval pomocí sloupcové chromatografie.

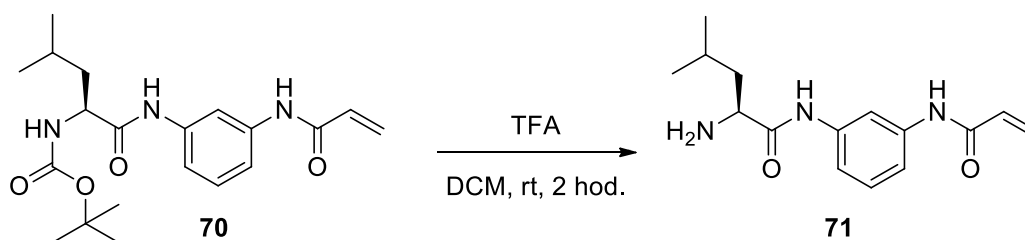
Reakce byla zopakována ještě 2x s různými navážkami a s výtěžky 63-91 %.

2.4.3.1 Charakterizace produktu 70:



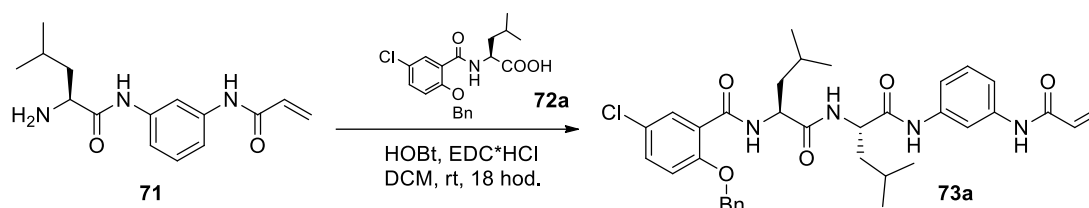
Výtěžek 5,702 g (74 %); bílá amorfnní látka; $R_f = 0,454$ (SiO₂; ethylacetát/*n*-hexan, 1:1); ¹H NMR (500 MHz, CDCl₃, ppm): δ 8,98 (s, 1H, NH), 8.15 (s, 1H, NH), 7,59 (s, 1H, CH(Ar)), 7,48 (s, 1H, CH(Ar)), 7,12 (s, 2H, 2xCH(Ar)), 6,41-6,25 (m, 2H, CH₂=CH), 5,69 (d, J=10,1 Hz, 1H, CH₂=CH), 5,46 (d, J=6,5 Hz, 1H, NH), 4,37 (s, 1H, NH-CH-C=O), 1,74-1,63 (m, 3H, CH₂-CH), 1,44 (s, 9H, (CH₃)₃), 0,94 (t, J=7,7 Hz, 6H, (CH₃)₂). ¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃) δ 171,88, 163,91, 156,47, 138,13, 131,27, 129,26, 127,68, 116,29, 115,97, 111,86, 80,51, 53,97, 40,97, 28,35, 24,77, 23,07, 21,72. **Elementární analýza** pro C₂₀H₂₉N₃O₄ (375,46) vypočteno: C 63,98; H 7,79; N 11,19. Nalezeno: C 63,84 ± 0,16; H 8,00 ± 0,03; N 10,94 ± 0,17. **HRMS**:m/z vypočteno pro: C₂₀H₂₉N₃O₄: 398,20503 Da [M+Na]⁺, nalezeno: 398,20737 Da [M+Na]⁺.

2.4.4 Příprava (S)-N-(3-akrylamidophenyl)-2-amino-4-methylpentanamidu (71)



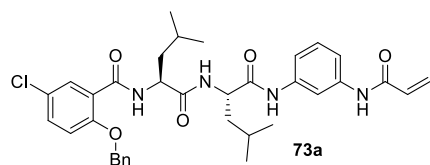
V baňce opatřené míchadlem bylo rozpuštěno 81,5 mg chráněného akrylamidu (**70**) (0,217 mmol, 1 ekv) v 10 ml DCM. Následně bylo po kapkách nadávkováno 0,6 ml TFA (7,814 mmol, 36 ekv) a reakční směs se nechala míchat dvě hodiny. Po této době se RS (reakční směs) zkontrolovala pomocí TLC, které detekovalo vymizení výchozí látky. Pomocí vodní vývěvy se odpařilo veškeré rozpouštědlo a zbytek v baňce byl rozpuštěn v EtOAc (10 ml) a vodě (10 ml). Provedly se extrakce a u vodné fáze se upravilo pH na 9-10 pomocí 1M NaOH. Následně se okyselila 10% HCl na pH=5. Opět se provedly extrakce ethylacetátem (3x7 ml). Organické fáze se spojily a vysušily bezvodým Na₂SO₄. Po odfiltrování sušidla se rozpouštědlo odpařilo a získal se surový produkt (**71**), který se již dále nijak neizoloval ani necharakterizoval a přistoupilo se s ním do dalšího kroku.

2.4.5 Příprava *N-((S)-1-(((S)-1-((3-akrylamidophenyl)amino)-4-methyl-1-oxopentan-2-yl)amino)-4-methyl-1-oxopentan-2-yl)-2-(benzyloxy)-5-chlorobenzamidu (73a)*



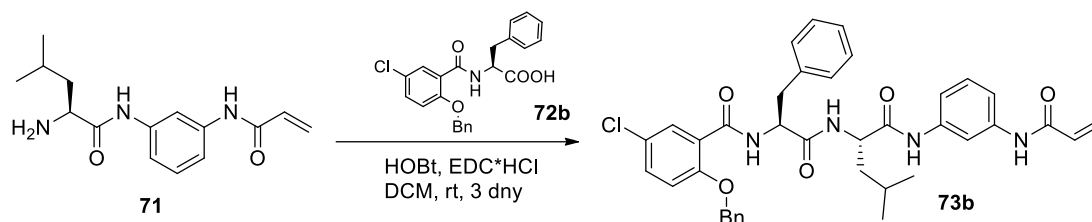
Do baňky bylo předloženo 1 g kyseliny (**72a**) (2,669 mmol, 1 ekv), která byla rozpuštěna v 70 ml DCM. Následně bylo nadávkováno 0,396 g HOBt*H₂O (2,936 mmol, 1,1 ekv) a 0,614 g EDC*HCl (3,202 mmol, 1,2 ekv). RS se nechala míchat asi hodinu, čímž došlo k aktivaci kyseliny. Následně se nadávkoval roztok 0,735 g akrylamidu (**71**) (2,669 mmol, 1 ekv) v 35 ml DCM. Reakční směs se nechala míchat 18 hodin, kdy po této době došlo k vymizení výchozí látky. DCM se odpařil na RVO a zbytek v baňce se rozpustil v EtOAc (100 ml). Následně byly provedeny extrakce nasyceným roztokem NaHCO₃ (3x25 ml), 5% kyselinou citronovou (3x25 ml) a solankou (25 ml). Organická fáze se vysušila bezvodým Na₂SO₄, který se následně odfiltraval a produkt (**73a**) se izoloval sloupcovou chromatografií.

2.4.5.1 Charakterizace produktu 73a:



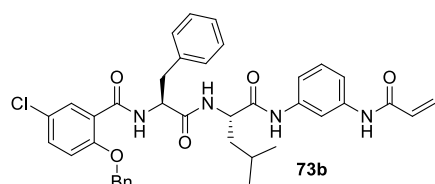
Výtěžek 0,7257 g (43 %); bílá amorfnní látka; $R_f = 0,284$ (SiO₂; ethylacetát/*n*-hexan, 1:1). **Elementární analýza** pro C₃₅H₄₁ClN₄O₅ (633,18) vypočteno: C 66,39; H 6,53; N 8,85. Nalezeno: C 65,27 ± 0,34; H 6,56 ± 0,04; N 7,89 ± 0,04. **HRMS:** m/z vypočteno pro: C₃₅H₄₁ClN₄O₅: 655,26577 Da [M+Na]⁺, nalezeno: 655,26617 Da [M+Na]⁺.

2.4.6 Příprava *N-((S)-1-(((S)-1-((3-akrylamidophenyl)amino)-4-methyl-1-oxopentan-2-yl)amino)-1-oxo-3-phenylpropan-2-yl)-2-(benzyloxy)-5-chlorobenzamidu (73b)*



Postup je shodný s postupem přípravy látky 73a. Na přípravu bylo použito 0,545 g kyseliny (72b) (1,334 mmol).

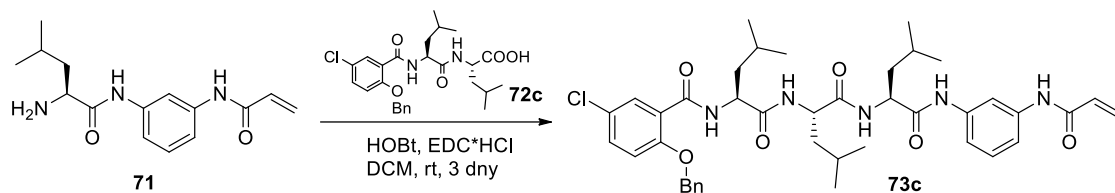
2.4.6.1 Charakterizace produktu 73b:



Výtěžek 0,216 g (24 %); lehce nažloutlá amorfní látka; $R_f = 0,240$ (SiO_2 ; ethylacetát/*n*-hexan, 1:1) $^1\text{H NMR}$ (500 MHz, CDCl_3): δ 9,19 (s, 1H, NH), 8,83 (s, 1H, NH), 8,59-8,44 (m, 1H, NH), 8,16-8,05 (m, 1H, NH), 7,77-7,76

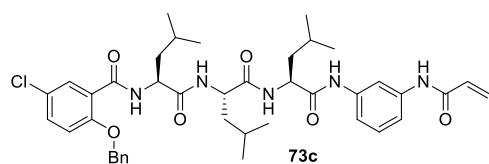
(m, 1H, $\text{CH}(\text{Ar})$), 7,62-7,60 (m, 1H, $\text{CH}(\text{Ar})$), 7,41-7,31 (m, 6H, 6x $\text{CH}(\text{Ar})$), 7,25-7,11 (m, 3H, 3x $\text{CH}(\text{Ar})$), 7,08-6,99 (m, 3H, 3x $\text{CH}(\text{Ar})$), 6,97-6,85 (m, 3H, 3x $\text{CH}(\text{Ar})$), 6,41-6,32 (m, 2H, $\text{CH}_2=\text{CH}$), 5,60-5,58 (m, 1H, $\text{CH}_2=\text{CH}$), 5,16-4,85 (m, 3H, O- CH_2 -Ph, NH- $\text{CH}-\text{C}=\text{O}$), 4,74-7,69 (m, 1H, NH- $\text{CH}-\text{C}=\text{O}$), 3,20-2,77 (m, 2H, CH_2 -Ph), 1,77-1,57 (m, 3H, $\text{CH}_2-\text{CH}(\text{CH}_3)_2$), 0,87-0,70 (m, 6H, $(\text{CH}_3)_2$). $^{13}\text{C NMR}$ (100 MHz, CDCl_3) δ 171,95, 170,72, 164,75, 164,24, 155,43 138,61, 138,02, 135,85, 135,00, 133,07, 133,04, 132,01, 131,84, 129,05, 128,90, 128,53, 127,73, 127,64, 126,85, 121,93, 115,86, 114,55, 114,42, 71,53, 55,77, 55,59, 53,06, 52,95, 37,75, 22,90, 22,85, 21,91, 21,88. **Elementární analýza** pro $\text{C}_{38}\text{H}_{39}\text{ClN}_4\text{O}_5$ (667,19) vypočteno: C 68,41; H 5,89; N 8,40. Nalezeno: C 68,36 \pm 0,16; H 6,02 \pm 0,13; N 8,25 \pm 0,24. **HRMS:** m/z vypočteno pro: $\text{C}_{38}\text{H}_{39}\text{ClN}_4\text{O}_5$: 689,25012 Da $[\text{M}+\text{Na}]^+$, nalezeno: 689,25500 Da $[\text{M}+\text{Na}]^+$.

2.4.7 Příprava *N*-((*S*)-1-(((*S*)-1-(((*S*)-1-((3-akrylamidophenyl)amino)-4-methyl-1-oxopentan-2-yl)amino)-4-methyl-1-oxopentan-2-yl)amino)-4-methyl-1-oxopentan-2-yl)-2-(benzyloxy)-5-chlorobenzamidu (73c)



Postup je shodný s postupem přípravy látky 73a. Na přípravu bylo použito 0,651 g kyseliny (72b) (1,33 mmol).

2.4.7.1 Charakterizace produktu 73c:



Výtěžek 89,3 mg (8,6 %); bílá amorfní látka;
 $R_f = 0,522$ (SiO₂; ethylacetát/*n*-hexan, 1:1). **HRMS:**
 m/z : [M+Na]⁺ vypočteno pro: C₄₁H₅₂ClN₅O₆:
 768,34983 Da [M+Na]⁺, nalezeno: 768,34991 Da

[M+Na]⁺.

Závěr

Cílem této dizertační práce bylo připravit 4 studie vycházející z předchozího výzkumu naší výzkumné skupiny a z literatury. Některé tyto studie sloužily k doplnění informací, které nám byly poskytnuty studiemi již dříve provedenými. Jednalo se konkrétně o tripeptidické a tetrapeptidické látky. V minulosti byly připraveny di a tripeptidické aldehydy u kterých byla měřena IC_{50} vybraných buněčných linií. V této dizertační práci byla tato studie rozšířena o tripeptidické aldehydy obsahující v peptidickém řetězci atypické aminokyseliny a dále byly připraveny i k nim odpovídající vinyl sulfony, kdy tato skupina vykazuje vyšší stabilitu oproti aldehydické skupině. I přes to, že tripeptidické vinyl sulfony nedosahovaly tak nízkých inhibičních koncentrací jako odpovídající aldehydy, je dobré se na tuto skupinu také zaměřit právě díky její vyšší stabilitě, což by mohlo vyřešit problém se skladováním daných látek (aldehydické sloučeniny podléhají snazšímu rozkladu i při skladování při nízké teplotě a pod inertní atmosférou). Nejaktivnější látky nedosahovaly tak dobrých hodnot jako použitý standart bortezomib, ale i tak jsou pro nás tyto hodnoty velice zajímavé. Naší snahou bylo připravit látky, které by postrádaly vedlejší účinky bortezomibu, i přes to, že by nebyly tolik aktivní.

Další studií a zároveň rozšířením tripeptidické série byla série tetrapeptidických aldehydů a vinyl sulfonů, jejichž řetězec byl složen z *L*-Leu a *L*-Trp. Tato studie nám sloužila k porovnání vlivu prodlužujícího se řetězce na biologickou aktivitu. Jelikož se jedná ale o látky, které se svým chováním podobají spíše složitým peptidům, bylo obtížné i tyto látky charakterizovat pomocí NMR. Navíc obsahovaly-li sloučeniny více jak 1 *L*-Trp v řetězci, nebylo již možné tyto látky rozpustit v běžně dostupných deuterovaných rozpouštědlech. Proto jsme tyto látky charakterizovali hlavně pomocí MALDI-TOF. Zároveň bylo obtížné určit i čistotu těchto látek, protože již zmíněný *L*-Trp absorbuje vzdušný CO_2 . Co se týče biologických aktivit, ze zatím dostupných dat jsme zjistili, že u aldehydů dochází ke zvýšení biologické aktivity u některých kmenů s prodlužujícím se řetězcem, a to v případě, kdy je jeho řetězec složen pouze z *L*-Leu. U vinyl sulfonů tomu bylo naopak. Nejaktivnější z celé studie ale byli aldehyd a vinyl sulfon mající v řetězci 3 *L*-Leu a vedle funkční skupiny *L*-Trp. Obsahuje-li molekula více *L*-Trp, biologická aktivita se snižuje.

Při přípravě tri a tetrapeptidických látek se používal pokročilý intermediát, a to mono-peptidická kyselina (opět složená z různých AMK). Tyto kyseliny byly použity pro přípravu potencionálních antibakteriálních látek, a to trifluor toluidinů. Studie obsahovala 6

benzylovaných a 6 debenzylovaných látek. Po změření inhibičních aktivit bylo zjištěno, že benzylované látky prakticky neinhibují, proto jsme se těmito látkami dále nezabývali. Zajímavé výsledky ale přinesly debenzylované látky, kdy někteří zástupci inhibovaly buněčné linie více než použité standarty.

V poslední studii byly připravovány dipeptidické a tripeptidické akrylamidy, kdy látky s tímto zakončením by se měly chovat jako potencionálními inhibitory proteinkináz. Byla navržena cílová obecná struktura a vytvořena syntetická cesta pro přípravu těchto látek. Při vlastní syntéze se vyskytlo ovšem pár překážek, které nám bránily cílové sloučeniny připravit. Jedním takovým problémem bylo i nemožná izolace pokročilejšího intermediátu z reakční směsi. Tento problém byl nakonec v některých případech vyřešen a podařilo se tak připravit dvě dipeptidické a jedna tripeptidická cílová sloučenina. Po otestování jejich biologických aktivit se ale ukázaly všechny jako inaktivní.

3 Citace

-
- ¹ D. Voges, P. Zwickl, W. Baumeister. The 26S proteasome: [A molecular machine designed for controlled proteolysis](#). *Annu. Rev. Biochem.* **1999**, 68, 1015–1068.
- ² I. Livneh, V. Cohen-Kaplan, Ch. Cohen-Rosenzweig, et al. [The life cycle of the 26S proteasome: from birth, through regulation and function, and onto its death](#). *Cell Research.* **2016**, 26, 869-885.
- ³ K. Tanaka. [The proteasome: Overview of structure and functions](#). *Proc. Jpn. Acad.* **2009**, 85, 12-36.
- ⁴ M. Shen, S. Schmitt, D. Buac, et al. [Targeting the ubiquitin-proteasome system for cancer therapy](#). *Expert Opin. Ther. Targets.* **2013**, 17 (9), 1-18.
- ⁵ D. Nandi, P. Tahiliani, A. Kumar, et al. [The ubiquitin-proteasome system](#). *J. Biosci.* **2006**, 31, 137-155.
- ⁶ J. Adams. [The proteasome: structure, function, and role in the cell](#). *Cancer treatment reviews.* **2003**, 29, 3-9.
- ⁷ A. Mikecz. [The nuclear ubiquitin-proteasome system](#). *Journal of Cell Science.* **2006**, 119, 1977-1984.
- ⁸ J. Omel. How Proteasome Inhibitors Work. <https://www.myelomacrowd.org/myeloma-101-proteasome-inhibitors-work/>.
- ⁹ L. Kubiczikova, L. Pour, L. Sedlarikova, et al. [Proteasome inhibitors – molecular basis and current perspectives in multiple myeloma](#). *J. Cell. Mol. Med.* **2014**, 18 (6), 947-961.
- ¹⁰ J. Harrigan, X. Jacq, N. Martin, et al. [Deubiquitylating enzymes and drug discovery: emerging opportunities](#). *Nature reviews drug Discovery.* **2018**, 17, 57-77.
- ¹¹ S. Kumar, V. Rajkumar, R. Kyle, et al. [Multiple Myeloma](#). *Disease Primers.* **2017**, 3 (17046), 1-20.
- ¹² Mnohočetný myelom-příznaky. <https://www.myeloma.cz/index.php?pg=mnohocetny-myelom--zakladni-udaje--priznaky>.
- ¹³ S. Rajkumar. [Treatment of multiple myeloma](#). *Nat. Rev. Clin. Oncol.* **2011**, 2, 479–491.
- ¹⁴ S. Rajkumar. A clear and simple guide for treating patients with multiple myeloma. <https://www.mayoclinic.org/medical-professionals/cancer/news/msmart-a-clear-and-simple-guide-for-treating-patients-with-multiple-myeloma/mqc-20506750>.
- ¹⁵ A. Rentsch, D. Landsberg, T. Brodmann, et al. [Synthesis and Pharmacology of Proteasome Inhibitors](#). *Angew. Chem. Int. Ed.* **2013**, 52, 5450-5488.
- ¹⁶ G. Sala, F. Agriesti, C. Mazzoccoli, et al. [Clogging the Ubiquitin-Proteasome Machinery with Marine Natural Products: Last Decade Update](#). *Mar. Drugs.* **2018**, 16 (467), 1-37.

-
- ¹⁷ W. Tseng, V. Soong, H. Chang, et al. [Process for preparing bortezomib intermediates, and crystalline forms thereof](#). US 2020/0140464 A1, **2020**.
- ¹⁸ J. Park, Z. Miller, Y. Jun, et al. [Next-generation proteasome inhibitors for cancer therapy](#). *Translational Research*. **2018**, 198, 1-16.
- ¹⁹ Crasto, A. Delanzomib. <https://newdrugapprovals.org/2015/11/08/cep-18770-delanzomib/>.
- ²⁰ D. Vogl, T. Martin, R. Vij, et al. [Phase I/II study of the novel proteasome inhibitor delanzomib \(CEP-18770\) for relapsed and refractory multiple myeloma](#). *Leukemia and lymphoma*. **2017**, 1-9.
- ²¹ D. Hughes. Patent [Review of Manufacturing Routes to Oncology Drugs: Carfilzomib, Osimertinib, and Venetoclax](#). *Org. Process Res. Dev.* **2016**, 20, 2028–2042.
- ²² P. Hari, J. Matous, P. Voorhees, et al. [Oprozomib in patients with newly diagnosed multiple myeloma](#). *Blood Cancer Journal*. **2019**, 9 (66), 1-4.
- ²³ N. Guo, Z. Peng, [MG132, a proteasome inhibitor, induces apoptosis in tumor cells](#). *Asia-Pacific Journal of Clinical Oncology*. **2013**, 9, 6-11.
- ²⁴ Y. Han, H. Moon, B. You, et al. [The effect of MG132, a proteasome inhibitor on HeLa cells in relation to cell growth, reactive oxygen species and GSH](#). *Oncology reports*. **2009**, 22, 215-221.
- ²⁵ A. Kisselev. [Site-Specific Proteasome Inhibitors](#). *Biomolecules*. **2022**, 12 (54), 1-21.
- ²⁶ Z. Miller. [The development of novel non-peptide proteasome inhibitors for the treatment of solid tumors](#). Dizertace, University of Kentucky, Lexington, Kentucky, 2018.
- ²⁷ Ch. Petrou, Y. Sarigiannis. [Peptide synthesis: Methods, trends, and challenges](#). *Peptide Applications in Biomedicine, Biotechnology and Bioengineering*. **2018**, 1-21.
- ²⁸ S. Chandrudu, P. Simerska, I. Toth. [Chemical Methods for Peptide and Protein Production](#). *Molecules*. **2013**, 18, 4373-4388.
- ²⁹ Y. Okada. [Synthesis of Peptides by Solution Methods](#). *Current Organic Chemistry*. **2001**, 5, 1-43.
- ³⁰ Lebl, M. [Syntéza peptidů na pevné fázi a kombinatoriální chemie](#).
- ³¹ M. Amblard, J-A. Fehrentz, J. Martinez, et al. [Methods and Protocols of Modern Solid Phase Peptide Synthesis](#). *Molecular Biotechnology*. **2006**, 33.
- ³² Merrifield Resins. <https://www.iris-biotech.de/global/products/resins/merrifield-resins.html>.
- ³³ TentaGel & Hypogel Resins. <https://www.iris-biotech.de/global/products/resins/tentagel-hypogel-resins.html>.
- ³⁴ P. Shelton, K. Jensen. [Linkers, Resins, and General Procedures for Solid-Phase Peptide Synthesis](#). *Peptide Synthesis and Applications, Methods in Molecular Biology*. **2013**, 1047, 23-41.

-
- ³⁵ M. Soural, J. Hlaváč, V. Krchňák. [Linkers for Solid-Phase Peptide Synthesis](#). *Amino Acids, Peptides and Proteins in Organic Chemistry*. **2011**, 3, 273-312.
- ³⁶ L. Andersson, L. Blomberg, M. Flegel, et al. [Large-Scale Synthesis of Peptides](#). *Biopolymers (Peptide Science)*. **2000**, 55, 227–250.
- ³⁷ M. Verlander. [Industrial Applications of Solid-Phase Peptide Synthesis – A Status Report](#). *International Journal of Peptide Research and Therapeutics*. **2007**, 13, 75–82.
- ³⁸ P. Wuts. [Greene's Protective Groups in Organic Synthesis. Fifth Edition](#). John Wiley & Sons, Inc.: 2014.
- ³⁹ W. Li, N. O'Brien-Simpson, M. Hossain, et al. [The 9-Fluorenylmethoxycarbonyl \(Fmoc\) Group in Chemical Peptide Synthesis – Its Past, Present, and Future](#). *Aust. J. Chem.* **2020**, 73, 271–276.
- ⁴⁰ E. Vellemae, O. Lebedev, U. Maeorg. [A mild method for cleavage of N-Tos protected amines using mischmetal and TiCl₄](#). *Tetrahedron Letters*. **2008**, 49, 1373–1375.
- ⁴¹ B. Bray. [Large-scale manufacture of peptide therapeutics by chemical synthesis](#). *Nature Reviews Drug Discovery*. **2003**, 2, 587-593.
- ⁴² A. Liggett, L. Crawford, B. Walker, et al. [Methods for measuring proteasome activity: Current limitations and future developments](#). *Leukemia Research*. **2010**, 34, 1403–1409.
- ⁴³ A. Melvin, G. Woss, J. Park, et al. [Measuring activity in the ubiquitin-proteasome system: From large scale discoveries to single cells analysis](#). *Cell Biochem Biophys*. **2013**, 67 (1), 1-24.
- ⁴⁴ R. Jorda, V. Molitorová, E. Pilařová, et al. [Pseudopeptides with aldehyde or vinylsulfone warheads: Synthesis and antiproteasomal activity](#). *Bioorganic Chemistry*. **2021**, 115, 1-12.
- ⁴⁵ T. Nazif, M. Bogyo. [Global analysis of proteasomal substrate specificity using positional-scanning libraries of covalent inhibitors](#). *PNAS*. **2001**, 98 (6), 2967–2972.
- ⁴⁶ M. Lei, H. Feng, E. Bai, et al. [Discovery of a novel dipeptidyl boronic acid proteasome inhibitor for the treatment of multiple myeloma and triple-negative breast cancer](#). *Organic & Biomolecular Chemistry*. **2019**, 17, 683–691.
- ⁴⁷ P. Geurink, W. Linden, A. Mirabella, et al. [Incorporation of Non-natural Amino Acids Improves Cell Permeability and Potency of Specific Inhibitors of Proteasome Trypsin-like Sites](#). *J. Med. Chem.* **2013**, 56, 1262–1275.
- ⁴⁸ B. Xin, E. Huber, G. Bruin, et al. [Structure-Based Design of Inhibitors Selective for Human Proteasome \$\beta\$ 2c or \$\beta\$ 2i Subunits](#). *J. Med. Chem.* **2019**, 62, 1626–1642.
- ⁴⁹ K. Patel, G. Zoysa, M. Kanamala, et al. [Novel Cell-Penetrating Peptide Conjugated Proteasome Inhibitors: Anticancer and Antifungal Investigations](#). *J. Med. Chem.* **2020**, 63, 334–348.

-
- ⁵⁰ Q. Sun, T. Zhou, D. Xi, et al. [Design and synthesis of tripeptidyl furylketones as selective inhibitors against the b5 subunit of human 20S proteasome](#). *European Journal of Medicinal Chemistry*. **2020**, 192, 1-17.
- ⁵¹ S. Pacifico, V. Ferretti, V. Albanese, et al. [Synthesis and Biological Activity of Peptide \$\alpha\$ -Ketoamide Derivatives as Proteasome Inhibitors](#). *ACS Med. Chem. Lett.* **2019**, 10, 1086–1092.
- ⁵² A. Chaikuad, P. Koch, S. A. Laufer, et al. [The Cysteine of Protein Kinases as a Target in Drug Development](#). *Angew. Chem. Int. Ed.* **2018**, (57), 4372–4385.
- ⁵³ Y. Yang, K. Wang, Y. Yang, et al. [Design, synthesis and biological evaluation of dipeptides as novel non-covalent 20S proteasome inhibitors](#). *Journal of Asian Natural Products Research*. **2021**, 23 (5), 436–451.
- ⁵⁴ K. Pauk, I. Zdražilová, A. Imramovský, et al. [New derivatives of salicylamides: Preparation and antimicrobial activity against various bacterial species](#). *Bioorganic & Medicinal Chemistry*. **2013**, 21, 6574–6581.
- ⁵⁵ A. Imramovský, R. Jorda, K. Pauk, et al. [Substituted 2-hydroxy-N-\(arylalkyl\)benzamides induce apoptosis in cancer cell lines](#). *European Journal of Medicinal Chemistry*. **2013**, 68, 253-259.
- ⁵⁶ R. Jorda, J. Dušek, E. Řezníčková, et al. [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.
- ⁵⁷ H. Li, A. O'Donoghue, W. van der Linden, et al. [Structure and function based design of Plasmodium-selective proteasome inhibitors](#). *Nature*. **2016**, 530, 233-236.
- ⁵⁸ D. Pindjaková, E. Pilařová, E. K. Pauk, K. Pauk, et al. Study of Biological Activities and ADMET-Related Properties of Salicylanilide-Based Peptidomimetics. *International Journal of Molecular Sciences*, **2022**, 23, 1-18.