

UNIVERZITA PARDUBICE  
FAKULTA CHEMICKO-TECHNOLOGICKÁ  
ÚSTAV ORGANICKÉ CHEMIE A TECHNOLOGIE

Potenciální inhibitory proteasomu založené na salicylamidech – syntéza a  
charakterizace

DIPLOMOVÁ PRÁCE

AUTOR: Bc. Petra BOHÁČOVÁ

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

2018

Univerzita Pardubice  
Fakulta chemicko-technologická  
Akademický rok: 2017/2018

## ZADÁNÍ DIPLOMOVÉ PRÁCE

(PROJEKTU, UMĚLECKÉHO DÍLA, UMĚLECKÉHO VÝKONU)

Jméno a příjmení: **Bc. Petra Boháčová**  
Osobní číslo: **C15511**  
Studijní program: **N2808 Chemie a technologie materiálů**  
Studijní obor: **Technologie organických specialit**  
Název tématu: **Potenciální inhibitory proteasomu založené na salicylamidech  
- syntéza a charakterizace**  
Zadávací katedra: **Ústav organické chemie a technologie**

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

1. Inhibitory proteasomu, jejich význam, popis se zaměřením na peptidické inhibitory a přístupy k syntéze peptidických řetězců.
2. Rozdělení a popis funkčních skupin peptidických inhibitorů proteasomu. Syntetické přístupy k jednotlivým skupinám a jejich porovnání.
3. Návrh syntézy meziproductů vedoucích k novým potenciálním inhibitorům proteasomu založených na vybraných funkčních skupinách.
4. Ověření syntéz meziproductů a finálních inhibitorů v laboratorním měřítku, v kvalitě a kvantitě vhodné pro biologické testování.
5. Výsledky sepsat formou diplomové práce.

Rozsah grafických prací:

Rozsah pracovní zprávy:

Forma zpracování diplomové práce: **tištěná**

Seznam odborné literatury:

**Všechna dostupná chemická literatura.**

Vedoucí diplomové práce:

**doc. Ing. Aleš Imramovský, Ph.D.**

Ústav organické chemie a technologie

Datum zadání diplomové práce:

**28. února 2018**

Termín odevzdání diplomové práce:

**11. května 2018**



prof. Ing. Petr Kalenda, CSc.  
děkan

L.S.



prof. Ing. Miloš Sedlák, DrSc.  
vedoucí katedry

V Pardubicích dne 28. února 2018

Prohlašuji:

Tuto práci 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., autorský zákon, zejména se skutečností, že Univerzita Pardubice má právo na uzavření licenční smlouvy o užití této práce jako školního díla podle § 60 odst. 1 autorského zákona, a s tím, že pokud dojde k užití této práce mnou nebo bude poskytnuta licence o užití jinému subjektu, je Univerzita Pardubice oprávněna ode mne požadovat přiměřený příspěvek na úhradu nákladů, které na vytvoření díla vynaložila, a to podle okolností až do jejich skutečné výše. Beru na vědomí, že v souladu s § 47b zákona č. 111/1998 Sb., o vysokých školách a o změně a doplnění dalších zákonů (zákon o vysokých školách), ve znění pozdějších předpisů, a směrnic Univerzity Pardubice č. 9/2012, bude práce zveřejněna v Univerzitní knihovně a prostřednictvím Digitální knihovny Univerzity Pardubice.

V Pardubicích dne:

.....  
Petra Boháčová

## **PODĚKOVÁNÍ**

Na tomto místě bych ráda poděkovala školiteli doc. Ing. Aleši Imramovskému, Ph.D. za odborné vedení, cenné rady a připomínky. Dále pak Ing. Karlu Paukovi, Ph.D. a Ing. Janu Duškovi za rady při realizaci mé diplomové práce. Díky patří i mé rodině, zejména svým rodičům a příteli, kteří mě podporovali ve všech směrech a umožnili mi studium dokončit. V neposlední řadě děkuji také kolektivu v laboratoři za příjemnou atmosféru.

## **ANOTACE**

Diplomová práce se zabývá popisem proteasomu a jeho peptidických inhibitorů. Následně jsou zde shrnuty jednotlivé funkční skupiny inhibitorů včetně jejich syntetických přístupů. Dále je zde zmíněna příprava peptidického řetězce. Poslední část teorie obsahuje popis již dříve připravených látek testovaných na biologickou aktivitu.

Experimentální část je věnována přípravě konkrétních potenciálních inhibitorů proteasomu s dikyanovinylenovou funkční skupinou a inhibitorů s aminokyselinou serin.

## **KLÍČOVÁ SLOVA**

proteasom, inhibitory, dikyanovinylen, peptidy, mnohočetný myelom

## **TITTLE**

Potential inhibitors of proteasome based on salicylamide moiety - synthesis and characterization

## **ANNOTATION**

Presented diploma work describes the proteasome and its peptidic inhibitors as well as their functional groups and synthetic routes. Further on the synthesis of peptidic chain is briefly mentioned. The last part of the theoretical section describes the compounds already prepared, biologically tested and already published within the scope of this topic.

Experimental part deals about synthesis of potential peptido-dicyanovinylene proteasome inhibitors and inhibitors with serin as part of the peptidic chain.

## **KEY WORDS**

proteasome, inhibitors, dicyanovinylene, peptides, multiple myeloma

# OBSAH

Úvod.....	11
1 Teoretická část.....	12
2 Syntéza peptidického řetězce .....	17
2.1 Příprava karboxylové komponenty protekcí aminoskupiny .....	18
2.2 Příprava aminové komponenty protekcí karboxylové skupiny.....	19
2.3 Protekce ostatních funkčních skupin.....	20
2.4 Aktivace karboxylové skupiny.....	21
2.5 Spojení aktivované formy s aminokomponentou - coupling .....	24
2.6 Deprotekce aminoskupiny.....	25
2.7 Deprotekce bočních řetězců, aminoskupin a karboxylových skupin za vzniku volného peptidu.....	28
3 Funkční skupiny peptidických inhibitorů proteasomu .....	30
3.1 Aldehydové inhibitory .....	31
3.2 Dichlorvinyl ethery .....	34
3.3 Boronáty.....	34
3.4 Epoxyketony .....	35
3.5 Sulfony .....	36
3.6 $\alpha$ -ketoamidy .....	38
3.7 $\alpha$ -ketoaldehydy.....	39
4 Biologicky testované látky připravené v rámci výzkumné skupiny.....	41
5 Experimentální část .....	43
5.1 Příprava 2-(benzyloxy)-5-chlorbenzoové kyseliny.....	45
5.2 Příprava (S)-methyl 2-(2-(benzyloxy)-5-chlorbenzamido)-3-fenylpropanoátu .....	46
5.3 Příprava 2-(2-(benzyloxy)-5-chlorbenzamido)-3-fenylpropanové kyseliny ...	48

5.4	Příprava	( <i>S</i> )-methyl	2-(( <i>S</i> )-2-(2-(benzyloxy)-5-chlorbenzamido)-3-fenylpropanamido)-3-fenylpropanoátu .....	49
5.5	Příprava	2-(benzyloxy)-5-chlor- <i>N</i> -(( <i>S</i> )-1-((( <i>S</i> )-1-(methoxy(methyl)amino)-1-oxo-3-fenylpropan-2-yl)amino)-1-oxo-3-fenylpropan-2-yl)benzamidu .....	51	
5.6	Příprava	2-(benzyloxy)-5-chlor- <i>N</i> -(( <i>S</i> )-1-oxo-1-((( <i>S</i> )-1-oxo-3-fenylpropan-2-yl)amino)-3-fenylpropan-2-yl)benzamidu .....	52	
5.7	Příprava	2-(benzyloxy)-5-chlor- <i>N</i> -(( <i>S</i> )-1-((( <i>S</i> )-4,4-dikyan-1-fenylbut-3-en-2-yl)amin)-1-oxo-3-fenylpropan-2-yl)benzamidu .....	54	
5.8	Příprava	( <i>S</i> )-5-chlor- <i>N</i> -(1,1-dikyano-5-methylhexan-3-yl)-2-hydroxybenzamidu .....	55	
5.9	Příprava	5-chlor-2-hydroxy- <i>N</i> -(( <i>S</i> )-1-((( <i>S</i> )-1-(methoxy(methyl)amino)-1-oxo-3-fenylpropan-2-yl)amino)-1-oxo-3-fenylpropan-2-yl)benzamidu .....	56	
5.10	Příprava	5-chlor-2-hydroxy- <i>N</i> -(( <i>S</i> )-1-oxo-1-((( <i>S</i> )-1-oxo-3-fenylpropan-2-yl)amino)-3-fenylpropan-2-yl)benzamidu .....	57	
5.11	Příprava	5-chlor- <i>N</i> -(( <i>S</i> )-1-((( <i>S</i> )-4,4-dikyano-1-fenylbut-3-en-2-yl)amino)-1-oxo-3-fenylpropan-2-yl)-2-hydroxybenzamidu .....	59	
5.12	Příprava	( <i>S</i> )-methyl	2-(( <i>S</i> )-2-(2-(benzyloxy)-5-chlorbenzamido)-3-fenylpropanamido)-4-methylpentanoátu .....	60
5.13	Příprava	2-(benzyloxy)-5-chlor- <i>N</i> -(( <i>S</i> )-1-((( <i>S</i> )-1-(methoxy(methyl)amino)-4-methyl-1-oxopentan-2-yl)amino)-1-oxo-3-fenylpropan-2-yl)benzamidu .....	61	
5.14	Příprava	2-(benzyloxy)-5-chlor- <i>N</i> -(( <i>S</i> )-1-((( <i>S</i> )-4-methyl-1-oxopentan-2-yl)amino)-1-oxo-3-fenylpropan-2-yl)benzamidu .....	63	
5.15	Příprava	2-(benzyloxy)-5-chlor- <i>N</i> -(( <i>S</i> )-1-((( <i>S</i> )-1,1-dikyano-5-methylhex-1-en-3-yl)amino)-1-oxo-3-fenylpropan-2-yl)benzamidu .....	64	
5.16	Příprava	( <i>S</i> )-methyl	2-(( <i>S</i> )-2-(( <i>tert</i> -butoxykarbonyl)amino)-3-hydroxypropanamido)-3-fenylpropanoátu .....	66
5.17	Příprava	( <i>R</i> )-methyl	2-(( <i>R</i> )-2-amino-3-hydroxypropanamido)-3-fenylpropanoátu .....	67
5.18	Příprava	( <i>S</i> )-methyl	2-(( <i>S</i> )-2-(( <i>S</i> )-2-(2-(benzyloxy)-5-chlorbenzamido)-3-fenylpropanamido)-3-hydroxypropanamido)-3-fenylpropanoátu .....	68



5.19	Příprava <i>N</i> -((5 <i>S</i> ,8 <i>S</i> ,11 <i>S</i> )-5-benzyl-8-(hydroxymethyl)-3-methyl-4,7,10-trioxo-12-fenyl-2-oxa-3,6,9-triazadodekan-11-yl)-2-(benzyloxy)-5-chlorbenzamidu.....	69
6	Výsledky a diskuze.....	71
7	Závěr.....	72
8	Literatura .....	73

## SEZNAM ZKRATEK

IP – inhibitor proteasomu

AK - aminokyselina

Ser – aminokyselina serin

Thr – aminokyselina threonin

Cys – aminokyselina cystein

Asp – kyselina asparagová

Glu – kyselina glutamová

IBCF – isobutyl chloroformiát

NMM - 4-methyl morfolin

rt – laboratorní teplota

DEA – diethanolamin

TFA – kyselina trifluoroctová

DBU - 1,8-diazabicyklo[5.4.0]undec-7-en, báze

DIPEA - *N,N*-diisopropylethylamin

DME – dimethylether

DAST - (diethylamino)trifluorsulfuran, fluorační činidlo

DCE – 1,2-dichlorethan

Bu<sub>4</sub>NI – tetrabutylamonium-jodid

MsCl – mesylchlorid

HBTU - *O*-(Benzotriazol-1-yl)-*N,N,N',N'*-tetramethyluronium hexafluorofosfát

## Úvod

Ihned po chorobách srdce a cév je rakovina druhým nejčastějším onemocněním. Rakovinná buňka se v našem těle vytvoří několikrát za život. Záleží na našem imunitním systému, zda ji rozpozná a zneškodní. Vznik rakoviny je podmíněn rizikovými faktory, mezi které patří nezdravý životní styl, především kouření cigaret. Statistiky říkají, že rakovinou onemocní každý třetí člověk. Díky zvyšujícímu se věku populace přímo úměrně stoupá i počet onkologických pacientů. Rakoviny se člověk zkrátka dožije.

Nelehkým úkolem vědeckých pracovníků z řad chemiků i biologů je nalezení léčiva, které by dokázalo nekontrolovatelné buněčné bujení inhibovat. Tento úkol však není jednoduchý, protože rakovina není jenom jedna, ale má několik druhů a každý druh má jiné vlastnosti a léčí se odlišným způsobem: některé operativně, jiné chemoterapií nebo biologickou léčbou. Proto nalezení jediného univerzálního léčiva není možné a je potřeba cílit na konkrétní druh.

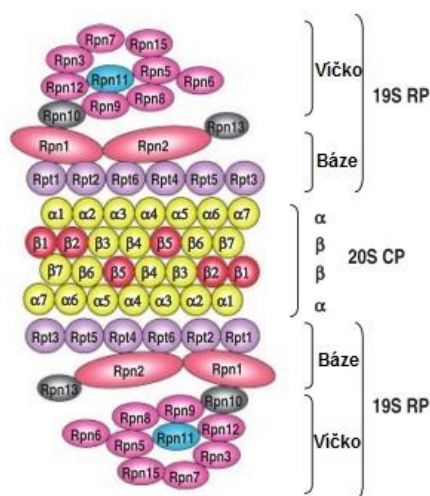
Tato práce se zabývá syntézou potenciálního léčiva pro mnohočetný myelom (MM). Léčba tohoto onemocnění je cílena na funkci proteasomu. Konkrétně na jeho inhibici, pomocí peptidických látek, kterou lze zastavit nekontrolovatelné buněčné bujení.

Struktura syntetizovaných potenciálních inhibitorů vychází z informací čerpaných z dostupné odborné literatury o proteasomu, ale také z poznatků pracovní skupiny doc. Imramovského. Důležité pro syntézu nového inhibitoru je mít dostatek informací o vnitřní struktuře a funkci proteasomu. V této práci budou převážně popsány peptidické inhibitory proteasomu (IP). Přípravení zástupci jednotlivých tříd čekají na testování *in vitro* a pokud budou testy úspěšné, předpokládáme testování *in vivo*.

# 1 Teoretická část

Inhibitory proteasomu jsou látky, které dokáží zastavit proteosyntézu a tím léčit některé nemoci zejména pak různé druhy rakoviny. Tato terapeutika moderní doby jsou stále ve vývoji. V poslední době bylo vyvinuto mnoho různých druhů inhibitorů, například pro léčbu vysokého krevního tlaku, AIDS, malárie, Alzheimerovy choroby, žloutenky a cukrovky.

Proteasom (26S) je proteinový komplex (**Obrázek 1**) sudovitého tvaru, který je zodpovědný za degradaci intracelulárních proteinů. Rozkládá proteiny, které obsahují chybu ve své struktuře nebo které jsou nadbytečné.<sup>1</sup> Příkladem je degradace neurotoxických proteinů, které v případě nahromadění způsobují neurodegenerativní onemocnění jako je například Alzheimerova choroba, Parkinsonova choroba, Amyotrofni laterální skleróza nebo Huntingtonova choroba.<sup>2</sup> Nežádoucí protein určený k recyklaci je označen kovalentně navázanými čtyřmi molekulami proteinu ubiquitinu, což zaručuje dostatečný signál pro proteasom.<sup>1</sup>



**Obrázek 1:** 26S eukaryotický proteasom – schématické rovinné zobrazení

Proteinový komplex (**Obrázek 1**) se skládá ze dvou hlavních částí, a to regulační jednotky (19S) a jádra (20S). Regulační jednotka má za úkol rozpoznat ubiquitinem označené proteiny a regulovat jejich vstup do jádra proteasomu. Jejím další úkolem je odstranit ubiquitiny a globulární protein rozvinout. Rozbalený protein vstupuje do jádra, kde dochází k degradaci. Jádro je složeno z 28 podjednotek, poskládaných do 4 kruhů, dvou vnějších ( $\alpha$ )

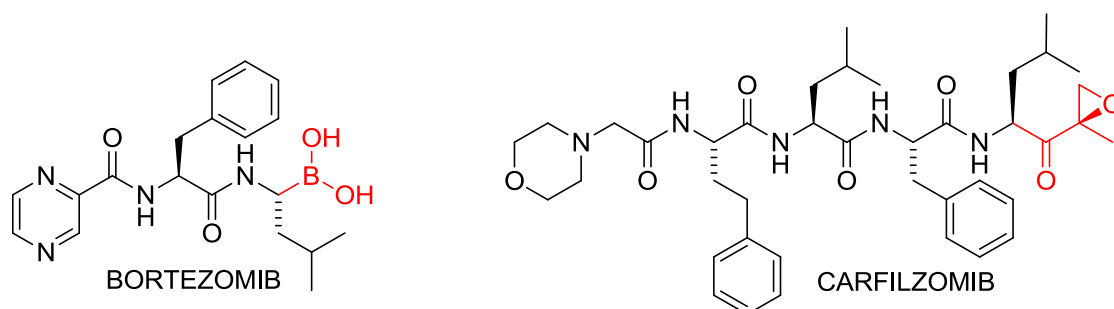
a dvou vnitřních ( $\beta$ ). V  $\beta$  kruzích se nachází threoninové proteázy. Konkrétně jsou to jednotky  $\beta$ 1 (kaspáza),  $\beta$ 2 (trypsin) a  $\beta$ 5 (chymotrypsin). Proteázy degradují proteiny na fragmenty o délce 3-15 zbytků aminokyselin (AK), které jsou dále hydrolyzovány na jednotlivé aminokyseliny pomocí oligopeptidáz nebo karboxypeptidáz. Tyto recyklované AK jsou pro buňku znovu využitelné.<sup>1</sup>

Proteázy jsou zásadní pro mnoho biologických procesů jak u člověka, tak u virů. Jejich funkce jsou spojeny s mnoha patogenními mechanismy, proto se jejich inhibitory nebo aktivátory staly cíli pro vývoj nových léčiv.<sup>3</sup> IP nejsou výhradně specifické pouze pro proteasom, ale mohou inhibovat i jiné proteázy. Příkladem jsou peptidové aldehydy a vinylsulfony, které jsou používány právě jako IP, ale v určitých koncentracích jsou schopné inhibovat také intracelulární cysteinové proteázy, jako jsou katepsiny a kalpainy.<sup>4</sup> Inhibicí proteasomu lze léčit některé nemoci, protože jsou často toxické pro jednotlivé buňky.<sup>5</sup> Bylo prokázáno, že maligní nádorové buňky jsou několikanásobně citlivější k proteasomové inhibici, než je tomu u zdravých diferencovaných buněk. Většina zdravých buněk je tolerantních vůči nahromadění proteinů, ale maligní buňky jsou nuceny zastavit svůj buněčný cyklus a navodit tak programovanou buněčnou smrt.<sup>6</sup> Apoptóza byla prokázána například u těchto druhů rakovinných buněk: Hodgkingův a Nehodgkingův lymfom, mnohočetný myelom, leukémie, karcinom prostaty, glioblastom, rakovina žaludku, kolorektální karcinom, rakovina vaječníků a rakovina plic.<sup>7</sup> Dále lze léčit například HIV pomocí inhibice HIV-1 proteázy. Ta má za úkol štěpit nově syntetizované polyproteiny za vzniku aktivních bílkovinných složek virionu HIV infekce. Bez tohoto štěpení jsou viriony neinfekční.<sup>8</sup>

Účinnost inhibitorů závisí na přiměřené propustnosti buněčných membrán. Funkce proteasomu se analyzuje po aplikaci různých koncentrací inhibitorů. Buněčné a živočišné kultury vyžadují, aby koncentrace byly co nejnižší. Účinek se testuje například na proteasomech izolovaných z HeLa buněk. V případě proteasomální inhibice se každý inhibitor testuje na kaspázovou, trypsinovou a chymotrypsinovou proteolytickou aktivitu.<sup>5</sup>

Prvním schváleným inhibitorem americkou FDA v roce 2003 se stal Bortezomib (obchodní název Velcade<sup>®</sup>, **Obrázek 2**). Nejprve byl schválen pro pacienty s relabovaným MM a o pár let později i pro nově diagnostikované pacienty. Jako všechna léčiva má i Bortezomib vedlejší účinky mezi které patří: vznik rezistence a následně relaps, periferní neuropatie - trvalé poškození nervů končetin v důsledku špatného dávkování, snížení počtu

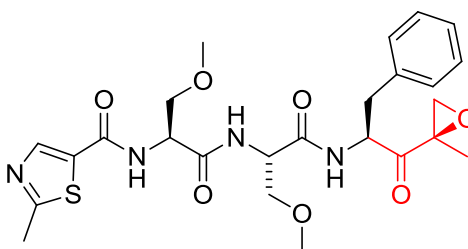
krevních elementů, únava nebo gastrointestinální potíže. Proto se hledají další nové struktury, které by tyto vedlejší účinky neměly.



**Obrázek 2:** Schválené inhibitory

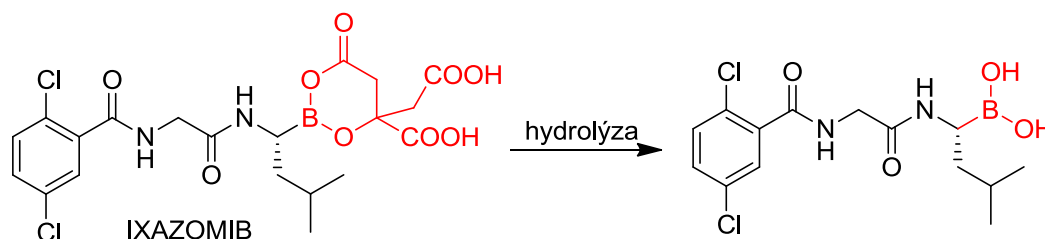
Dalším schváleným inhibitorem (**Obrázek 2**) se stal v roce 2012 Carfilzomib (obchodní název Kyprolis<sup>®</sup>), který patří do druhé generace inhibitorů. Obě tyto látky jsou podávány intravenózně, což způsobuje určitá omezení. Pacient musí dojíždět do nemocnice za lékařem, který mu látku podá. Nejen že je to nepříjemné pro pacienta a snižuje to kvalitu jeho života, ale celá léčba se prodražuje.<sup>9</sup>

Oprozomib (**Obrázek 3**) má také epoxyketonovou koncovou funkční skupinu. Jeho výhodou oproti Carfilzomibu je jeho perorální podání. Momentálně se nachází ve druhé fázi klinického testování.



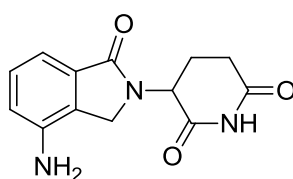
**Obrázek 3:** Zástupce epoxyketonů - Oprozomib

Ixazomib (**Obrázek 4**), který je známý pod obchodním názvem Ninlaro<sup>®</sup>, je prvním schváleným inhibitorem v US FDA, který se podává perorálně. Dříve schválené Bortezomib a Carfilzomib jsou podávány intravenózně. Tento inhibitor je také určený pro léčbu MM. Kombinací IP, imunomodulačních léčiv a autologní transplantací lze dosáhnout lepších terapeutických účinků. Mechanismus účinku spočívá v hydrolyze esteru kyseliny boronové na biologicky aktivní boronát.<sup>9</sup>



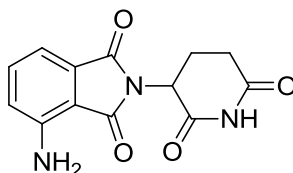
**Obrázek 4:** Zástupce boronátů

Lenalidomid (**Obrázek 5**) se prodává pod obchodním názvem Revlimid. Tento imunomodulační derivát thalidomidu byl registrován v České republice v roce 2008 a od roku 2009 je plně hrazen zdravotní pojišťovnou u relabovaného MM. Má akceptovatelný toxický profil a jeho velkou výhodou je perorální podání. Strukturně je podobný thalidomidu, proto lze předpokládat teratogenní účinky a je tedy nutné striktně dodržovat stanovený bezpečnostní program.<sup>10</sup>



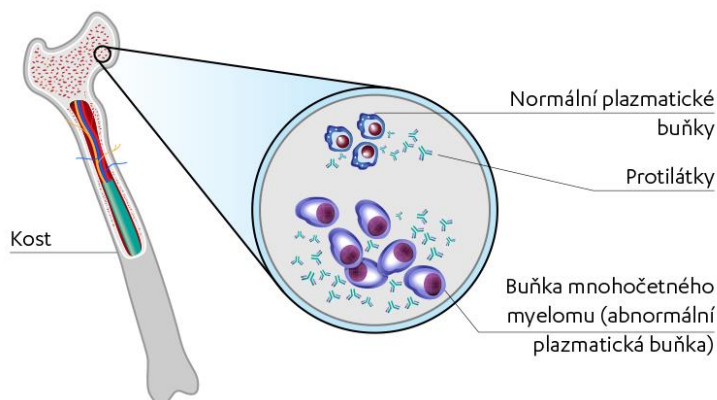
**Obrázek 5:** Lenalidomid

Pomalidomid (**Obrázek 6**) je chemicky příbuzný s thalidomidem a lenalidomidem s vylepšenými léčebnými účinky. Používá se k léčbě pacientů s MM, u kterých selhala léčba lenalidomidem a thalidomidem. Evropské léková agentura (EMA) jej schválila v roce 2013.<sup>11</sup>



**Obrázek 6:** Pomalidomid

MM (**Obrázek 7**) patří mezi vzácnější onemocnění, ale druhé nejčastější krevní onemocnění. V České republice jím v roce 2010 onemocnělo 1440 pacientů v roce 2016 už 2091.<sup>12</sup> Toto hematologické onemocnění plazmatických buněk je velmi obtížně léčitelné. Hledají se nové terapeutické možnosti, jak ovlivnit samotný plazmocyt, ale také mikroprostředí kostní dřeně, kde se plazmocyt tvoří. Mezi nové léčebné látky patří právě IP, ke kterým jsou klonální plazmocyt citlivé.<sup>13</sup>



**Obrázek 7:** Mnohočetný myelom



## 2 Syntéza peptidického řetězce

První jednoduché peptidy byly připraveny T. Curtiusem a E. Fischerem před více než sto lety. Od té doby byla metoda „vylepšena“ především B. Merrifieldem a jeho vynálezem metody syntézy na pevné fázi. Syntéza je založena především na vhodném použití protekčních skupin a vazebných činidel.<sup>14</sup>

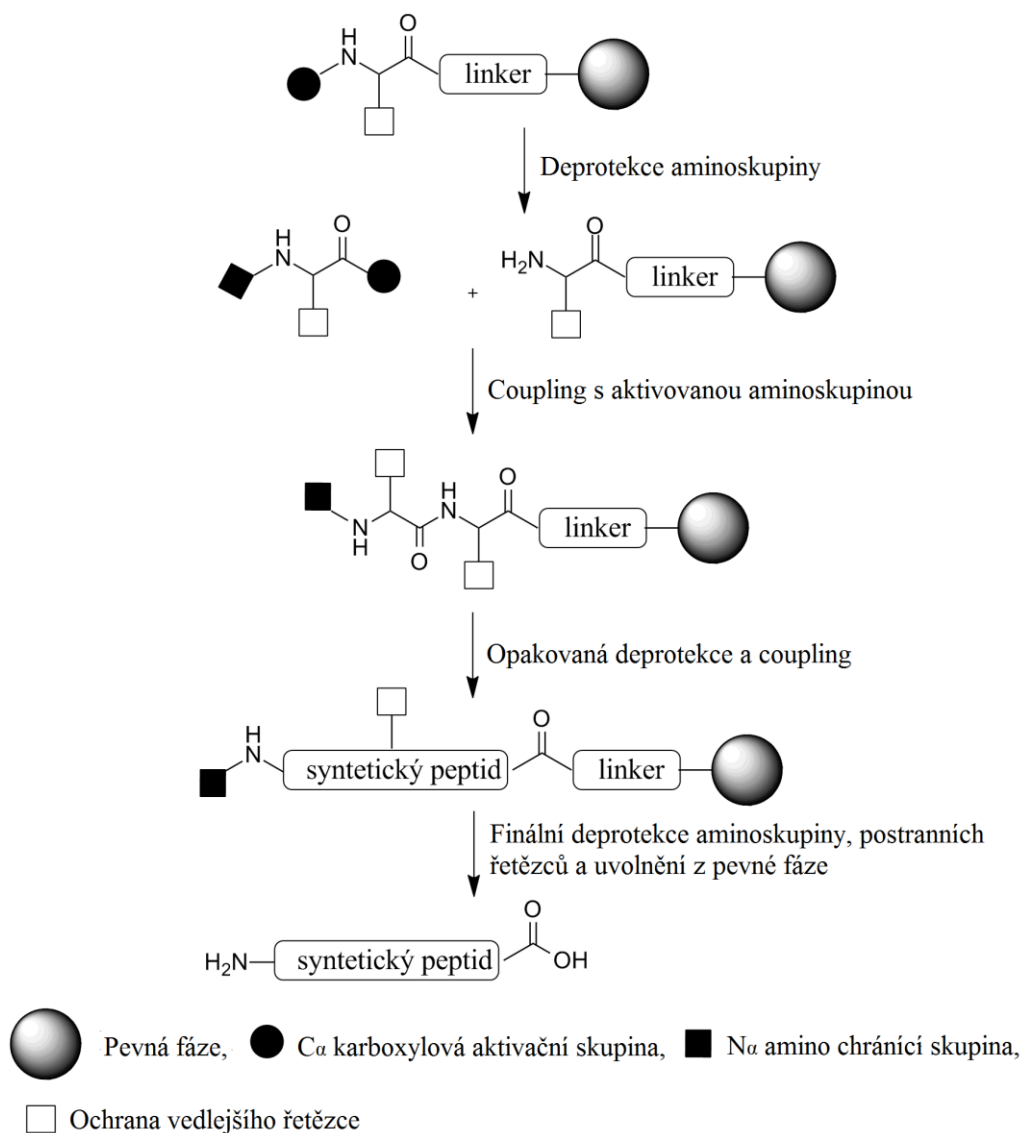
Základní stavební jednotkou peptidů jsou AK. Peptidová vazba vzniká reakcí mezi aminovou skupinou jedné AK a karboxylovou skupinou druhé AK ve směru od C konce k N konci. Pokud aminokyselina obsahuje na  $\alpha$ -uhlíku chirální centrum, může dojít k racemizaci. V syntéze peptidů je hlavním cílem vytvořit novou amidovou vazbu regioselektivně.<sup>15</sup> Výroba peptidů v komerčním měřítku potřebuje co nejuniverzálnější technologický postup, který umožňuje přístup ke všem možným sekvencím, včetně těch, které obsahují nepřírodní D-aminokyseliny nebo které jsou zcela syntetické, což není běžně možné pomocí metod založených na biotechnologii.<sup>16</sup>

Metoda syntézy peptidů musí být spolehlivá a účinná. Důležitým kritériem syntézy je zachování konfigurace především u  $\alpha$ -aminokyselin a vysoké výtěžky jednotlivých kroků.<sup>15</sup>

Syntézu peptidů lze provádět v roztoku nebo použitím pevného nosiče (**Schéma 1**). Metodou přípravy peptidů v roztoku se připravují spíše kratší až středně dlouhé řetězce. Hlavní výhodou syntézy v roztoku je, že meziprodukty mohou být izolovány a čištěny po každém kroku syntézy. Deprotekci lze tyto kratší řetězce rekombinovat a získat tak větší peptid s požadovanou sekvencí. Touto metodou se připravují například inhibitory ACE, aspartam, Oxytocin nebo inhibitory HIV proteázy.<sup>16</sup>

Syntéza peptidu na pevné fázi spočívá v ukotvení první AK na nosič, což nejčastěji bývá kopolymer styrenu a divinylbenzenu a následně se váží přes amidovou vazbu další AK. Tato vazba vzniká mezi karboxylovou skupinou příchozí AK a aminoskupinou AK dříve navázané na matrici. Proces se opakuje, dokud se nedosáhne požadované sekvence a délky řetězce. Nakonec se nosič odštěpí. Nevýhodou této metody je, že nelze provádět purifikaci během syntézy jako u syntézy v roztoku, ale až po odštěpení z nosiče, kdy současně dochází i ke štěpení vedlejších produktů a tím ke kontaminaci produktu. Použitím výkonnějších purifikačních metod založených zejména na vysokoúčinné kapalinové chromatografii s reverzní fází lze získat čistý produkt. Výhodou je, že tato metoda může být plně

automatizována, což umožňuje rychlou syntézu relativně složitých sekvencí.<sup>16, 17</sup> Průběh syntézy na pevné fázi je obecně rychlejší, čímž se minimalizuje ztráta konfigurace.<sup>14</sup>



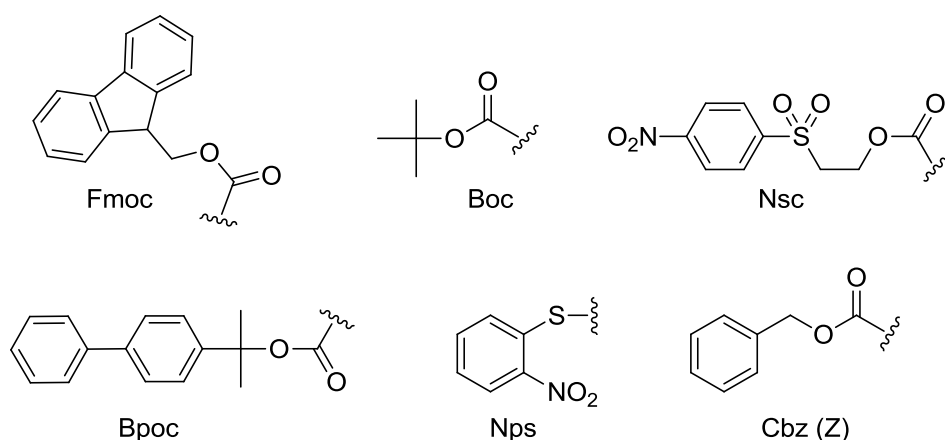
**Schéma 1:** Syntéza na pevné fázi

## 2.1 Příprava karboxylové komponenty protekcí aminoskupiny

Protekcce aminoskupiny v syntéze peptidů se provádí kvůli zabránění nežádoucí polymerizaci. Hlavními znaky protekční skupiny jsou: snadné navázání, stabilita v širokém rozmezí reakčních podmínek a jednoduchá deprotekcce na konci syntézy nebo, pokud je potřeba, kdykoliv během syntézy.<sup>18</sup>

Proteční skupiny „aminokomponenty“ (**Obrázek 8**) dočasně deaktivují aminoskupinu AK. Tyto proteční skupiny jsou několikrát během syntézy odstraňovány, proto musí být odstranitelné za mírných podmínek, které neovlivní ostatní proteční skupiny, které se odstraňují až na konci syntézy. Je také důležité, aby deprotece probíhala s co možná nejvyšším výtěžkem reakce a tím se eliminovaly ztráty produktu.<sup>18</sup>

Nejčastějšími protečními skupinami jsou: 9-fluorenylmethoxykarbonyl chlorid (Fmoc), di-*tert*-butyl dikarbonát (Boc), 2-(4-Nitrofenylsulfonyl)ethoxykarbonyl (Nsc), 2-nitrofenylsulfenyl (Nps), [2-(4-bifenyl)isopropoxykarbonyl] (Bpoc), benzyloxykarbonyl (Z, Cbz).<sup>18</sup>

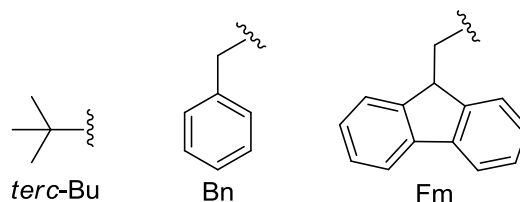


**Obrázek 8:** Proteční skupiny aminokomponenty

## 2.2 Příprava aminové komponenty protekcí karboxylové skupiny

Protece karboxylové skupiny na pevné fázi není potřeba, protože jako chránící skupina zde slouží linker s pevným nosičem. Protece karboxylové skupiny je potřeba pouze v případě syntézy v reverzním směru (N→C) nebo pokud připojení na pevnou fázi probíhá přes aminoskupinu.<sup>18</sup>

Karboxylová skupina se chrání především na vhodný ester. Mezi nejčastější protekční skupiny (**Obrázek 9**) patří: *tert*-Bu, Bn, Me, Et, 9-fluorenylmethyl (Fm)<sup>18, 16</sup>



**Obrázek 9:** Protekční skupiny karboxylové komponenty

### 2.3 Protekce ostatních funkčních skupin

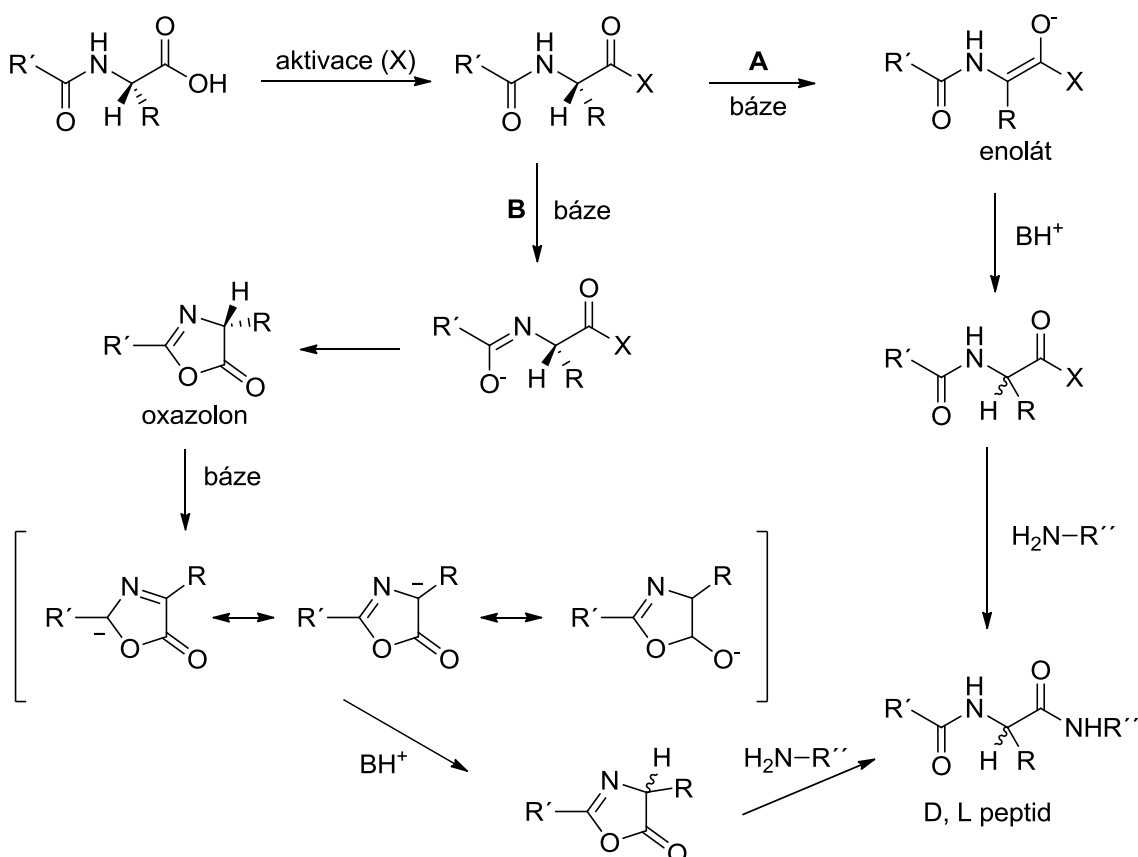
Ostatní funkční skupiny AK musí být také ve většině případů chráněny. Jedná se například o karboxylovou funkční skupinu Asp a Glu, která by po aktivaci mohla vést k větveným produktům. Nejčastěji se používá strategie protekce Fmoc/*tert*-Bu nebo Boc/cyklohexyl.<sup>18</sup>

AK obsahující OH skupinu jako je například Ser nebo Thr mohou také podléhat vedlejším reakcím. Hydroxylové skupiny těchto AK jsou s výhodou chráněny ve formě etherů. Nejběžnějšími protekčními strategiemi jsou Boc/Bn a Fmoc/*tert*-Bu.<sup>18</sup>

V posledních několika letech bylo navrženo více než 250 nových protekčních skupin. Díky přísným požadavkům jsou v praxi nejvíce využívány dvě protekční strategie a to *tert*-Boc/Bn a Fmoc/*tert*-Bu. Ve strategii *tert*-Boc/Bn se pro ochranu  $\alpha$ -aminoskupiny používá *tert*-butoxkarbonyl (Boc) a benzyl nebo cyklohexyl pro ochranu postranního řetězce. Ve strategii Fmoc/*tert*-Bu je Fmoc používána k protekci  $\alpha$ -aminoskupiny a *tert*-Bu k protekci postranního řetězce. Tyto ochranné skupiny jsou odstranitelné za odlišných podmínek.<sup>17</sup>

## 2.4 Aktivace karboxylové skupiny

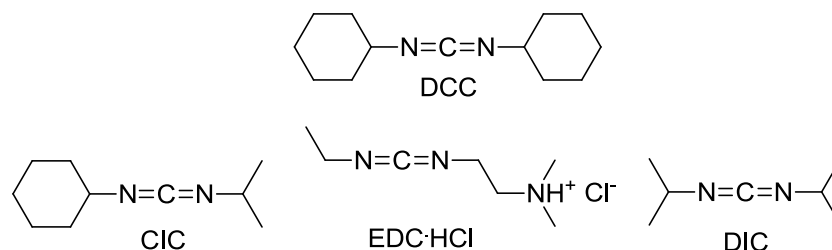
Aktivace karboxylové skupiny je důležitým krokem před couplingem. Při aktivaci kyseliny dochází ke vzniku derivátu s dobrou odstupující skupinou. Tato odstupující skupina má tendenci zvýšit kyselost  $\alpha$ -uhlíku a tím upřednostňuje vznik meziproductu enolátu či oxazolonu, čímž dochází ke ztrátě konfigurace (**Schéma 2**).<sup>14</sup>



**Schéma 2:** Mechanismus racemizace

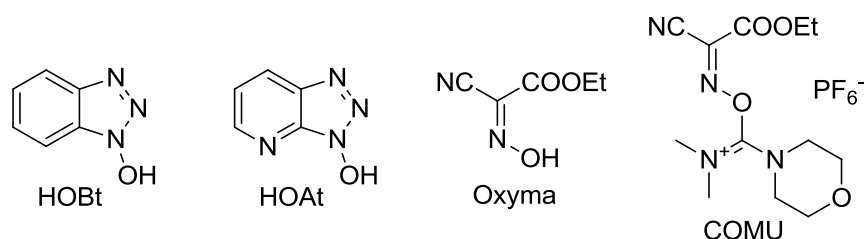
Aktivací karboxylového uhlíku karboxylové skupiny zvýšíme její reaktivitu a tím potlačíme vznik vedlejších produktů. Nejčastěji používaným činidlem, které aktivuje karboxylové skupiny, je dicyklohexyl karbodiimid (DCC). Jako vedlejší produkt vzniká *N,N'*-dicykloheylmočovina (DCU), která je rozpustná v kyselině trifluoroctové a je kompatibilní se syntézou na pevné fázi. Při syntéze v roztoku je DCU obtížně odstranitelná i při sloupcové chromatografii. DCC bylo proto nahrazeno jinými reakčními činidly (**Obrázek 10**). Například: DIC - diisopropylkarbodiimid, EDC·HCl – *N*-ethyl-*N'*-(3-dimethylaminopropyl) karbodiimid hydrochlorid, CIC – *N*-cyklohexyl-*N'*-

isopropylkarbodiimid, které jsou všechny rozpustné v DCM. EDC·HCl je „zelenější“ karbodiimid a také vhodný pro syntézu v roztoku, protože jak toto činidlo, tak vznikající močovina jsou rozpustné ve vodných rozpouštědlech a dobře odstranitelné po ukončení reakce.<sup>19</sup>

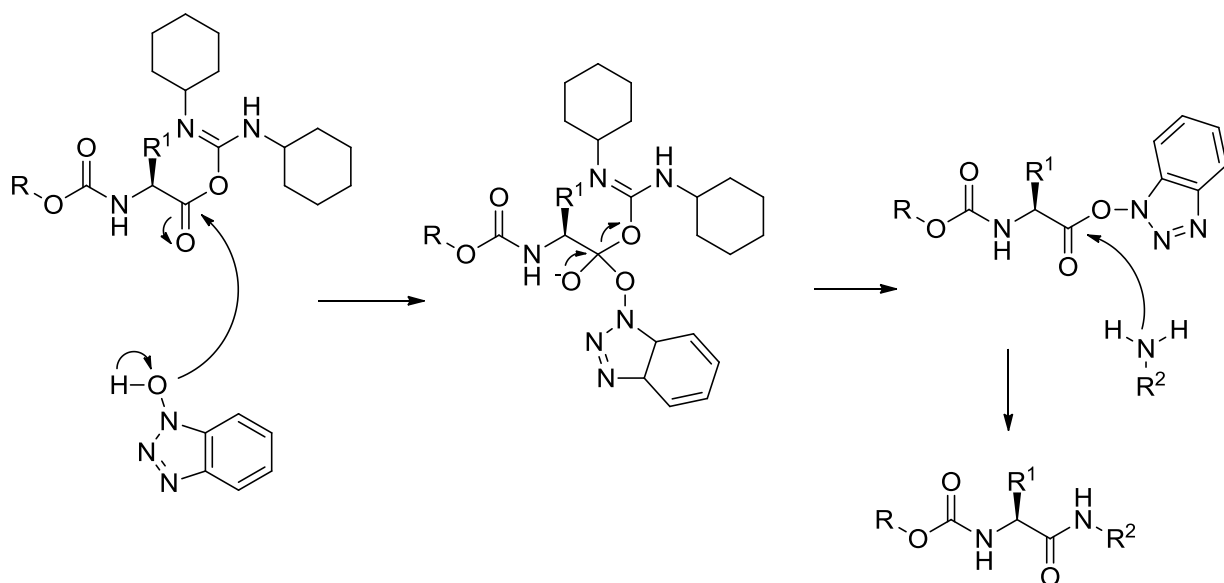


**Obrázek 10:** Aktivační činidla karboxylových kyselin

Reaktivita karbodiimidů se zvyšuje přidávkem *N*-hydroxyderivátů (HOXt). Tato činidla (**Obrázek 11**) potlačují tvorbu *N*-acylmočoviny a zabraňují intramolekulárním reakcím (vznik oxazolonu) vznikem odpovídajících esterů a tím snižují možnost racemizace (**Schéma 3**).<sup>19</sup> Jedním z nejnovějších činidel z této skupiny je ethyl 2-kyano-2-(hydroxyimino)acetát (Oxyma). Oxyma potlačuje téměř úplně racemizaci. Její účinky jsou lepší než HOBt a srovnatelné s HOAt.<sup>20</sup> Od Oxymy je odvozeno další činidlo COMU, které ve své struktuře obsahuje Oxymu a morfolínový substituent. Zajímavé při použití tohoto činidla je pozorovat změnu barvy reakce, která závisí na typu použité báze. Po skončení reakce se roztok stává bezbarvý, případně žlutý. Couplingové deriváty Oxymy jsou více reaktivní než hydroxybenztriazoly. COMU potlačuje racemizaci více než Oxyma.<sup>21</sup>



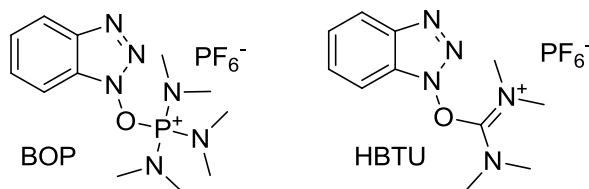
**Obrázek 11:** *N*-hydroxyderiváty



**Schéma 3:** Funkce HOBt při vzniku estru a následná amidace

Karboxylové kyseliny se obecně aktivují elektron akceptorními skupinami. Kromě karbodiimidů lze aktivovat například pomocí anhydridů, acylhalogenidů nebo azidů.<sup>19</sup>

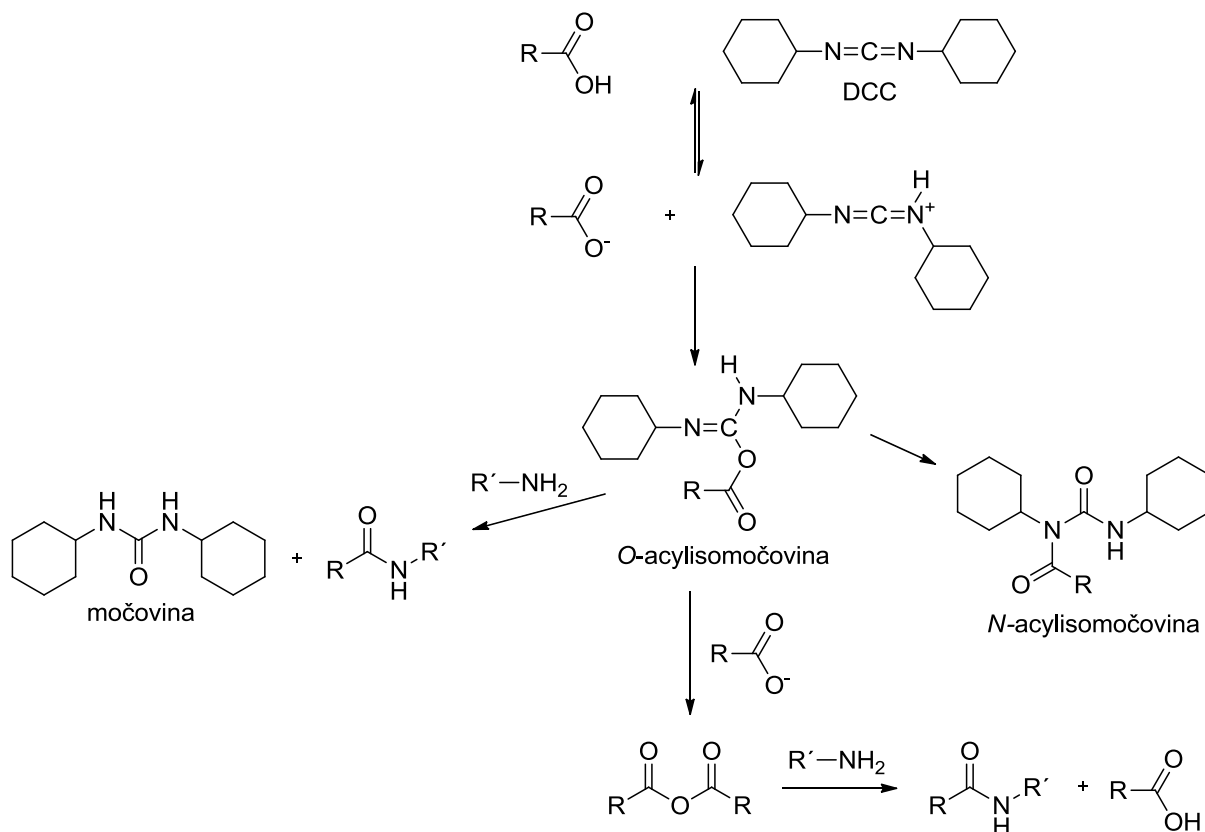
Aktivace karboxylové kyseliny použitím oniových solí (**Obrázek 12**) je rychlejší než při použití karbodiimidů. Tyto fosfoniové a amoniové soli jsou tvořeny fosfoniovým nebo iminovým kationtem navázaným na  $-OX$  skupinu derivátu hydroxylaminu. Nicméně karbodiimidy v přítomnosti činidel s  $X-OH$  skupinou hydroxylaminů jsou stále velmi používaná činidla. Nejpoužívanější fosfoniovou solí je benzotriazol-1-yl-*N*-oxytris(dimethylamino) fosfonium hexafluorofosfát (BOP). Amoniové soli mají podobnou strukturu jako fosfoniové a patří sem například HBTU nebo HATU.<sup>15</sup> U těchto derivátů se již karbodiimidy nepoužívají, protože jsou zabudovány přímo v činidle.<sup>21</sup>



**Obrázek 12:** Soli

## 2.5 Spojení aktivované formy s aminokomponentou - coupling

Tvorba amidové vazby zahrnuje dva kroky. Prvním je aktivace karboxylové skupiny jedné AK a druhým nukleofilní atak aminoskupinou druhé AK. Tento aktivační krok, ale vyvolává ztrátu konfigurace. Ke ztrátě konfigurace může dojít dvěma způsoby: vznikem enolátu nebo oxazolonu (**Schéma 2**).<sup>14</sup>



**Schéma 4:** Mechanismus aktivace pomocí karbodiimidů a vznik amidické vazby

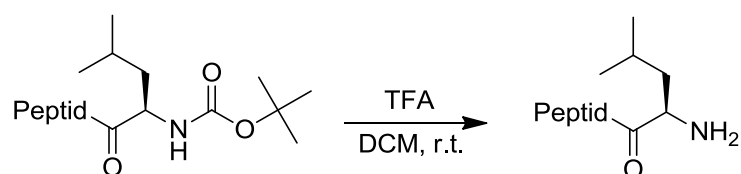
K aktivaci dochází například pomocí karbodiimidů (**Schéma 4**), které mají ve své struktuře dva slabě alkalické atomy dusíku. Uhlík mezi těmito dvěma dusíky je elektrofilní a atakuje nukleofilní kyslík karboxylové skupiny za vzniku aktivované *O*-acylisomočoviny karboxylové kyseliny (Steglichova esterifikace), která obsahuje dobře odstupující skupinu - močovinu. Tento meziprodukt je velmi reaktivní. Následně do reakce vstupuje druhá AK, která nemá blokovanou aminoskupinu. Adičně eliminačním mechanismem za odštěpení vedlejšího produktu – dialkylmočoviny vzniká požadovaná amidová vazba. V nadbytku karboxylové kyseliny se *O*-acylisomočovina podrobuje napadení druhou molekulou kyseliny za vzniku symetrického anhydridu. Reakcí s další aminokyselinou



vznikne amidická vazba. *O*-acylisomočovina může cyklizovat za vzniku oxazolonu, který také poskytuje peptid. Oxazonon je ale méně reaktivní, než jiné deriváty a podporuje racemizaci. Nežádoucí reakcí je přeskupení na *N*-acylisomočovinu, která je nereaktivní. Reakce je to nevratná, bez tvorby peptidu, a spotřebovává se výchozí kyselina.<sup>19</sup>

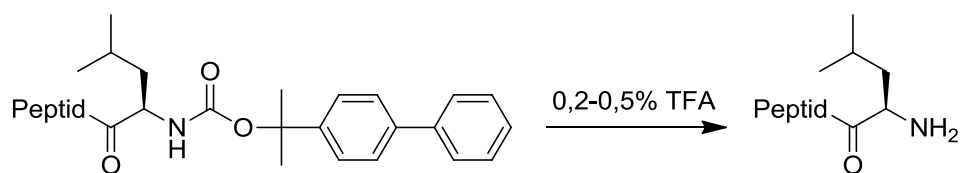
## 2.6 Deprotekce aminoskupiny

***tert*-Butyloxykarbonyl (Boc)** – tato protekční skupina se používá v Boc/Bn strategii. Pro deprotekci se používá 20-50% TFA v DCM (**Schéma 5**) nebo další kyseliny, například 4M HCl v dioxanu nebo 2M MeSO<sub>3</sub>H v dioxanu. Boc skupina je stabilní vůči bázím a nukleofilním činidlům.<sup>18</sup>



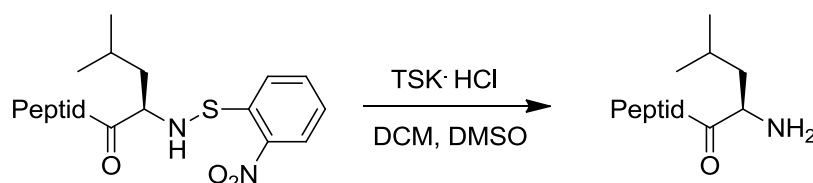
**Schéma 5:** Odstranění Boc

**2-(4-Bifenyloxy)isopropoxykarbonyl (Bpoc)** – je vysoce citlivá skupina vůči kyselinám. Pro její deprotekci postačí 0,2-0,5% TFA. (**Schéma 6**)<sup>18</sup>



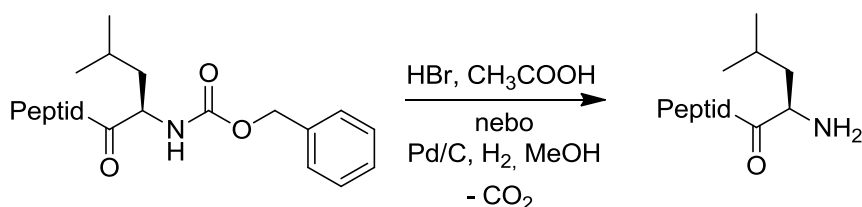
**Schéma 6:** Odstranění Bpoc

**2-nitrofenylsulfenyl (Nps)** – tato protekční skupina je odolná vůči bázím, ale méně odolná vůči některým nukleofilním činidlům (např.: 2-merkaptopyridin). Nejčastěji se odstraňuje zředěnými roztoky HCl v AcOH.<sup>18</sup> Český patent, který byl vydán v roce 1985, popisuje deprotekcí pomocí hydrochloridu thiosemikarbazidu (**Schéma 7**). Nps skupinu lze selektivně odštěpovat vedle jiných kyselinou odštěpitelných protekčních skupin. Tato výhoda je dána rozdílným mechanismem štěpení.<sup>22</sup>



**Schéma 7:** Odstranění Nps

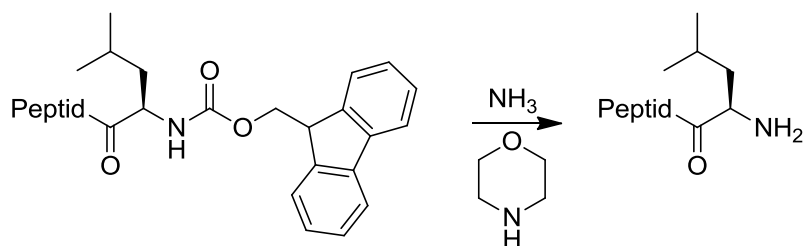
**Benzyloxykarbonyl (Z)** – nejčastěji používaná protekční skupina při syntéze peptidů v roztoku. Snadno zaveditelná a vysoce stabilní vůči bázím a slabým kyselinám, které se používají při odstraňování Boc. Odstraňuje se katalytickou hydrogenací nebo silnými kyselinami (**Schéma 8**). Například HBr v kyselině octové nebo TFA při vysoké teplotě. S výhodou se používá pro potlačení racemizace.<sup>18</sup>



**Schéma 8:** Odstranění Z

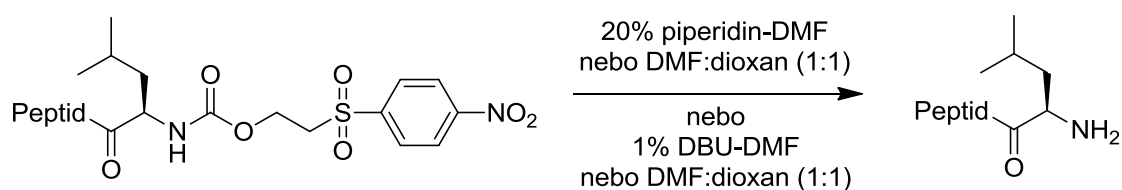
**9-Fluorenylmethoxykarbonyl (Fmoc)** – je stabilní vůči kyselinám, ale snadno odstranitelná pomocí bází. Nejčastěji se používají sekundární aminy. Není stabilní vůči katalytické hydrogenaci (odstranění benzyloxyesterů), kde se jako katalyzátor používá Pd-C nebo PtO<sub>2</sub>. Deprotekce se provádí kapalným NH<sub>3</sub> s přidávkem morfolinu (**Schéma 9**) nebo piperidinu, 10% diethylaminem nebo 20% piperidinem v DMF. Používá se ve strategii Fmoc/*tert*Bu. Ale některé deriváty jsou špatně rozpustné v nejčastěji

používaných organických rozpouštědlech, proto byly hledány nové protekční skupiny odstranitelné bázemi.<sup>18</sup>



**Schéma 9:** Odstranění Fmoc

**2-(4-nitrofenylsulfonyl)etoxykarbonyl (Nsc)** – alternativní varianta k Fmoc. Je lépe rozpustný v běžných rozpouštědlech a snadno odstranitelný 20% piperidinem nebo 1% DBU v DMF-dioaxan (1:1) (**Schéma 10**).<sup>18</sup>



**Schéma 10:** Odstranění Nsc

Po deproteci aminoskupiny dochází opět ke couplingu s aktivovanou kyselinou. Tento proces je opakován, dokud řetězec nedosáhne požadované délky.

## 2.7 Deprotekce bočních řetězců, aminoskupin a karboxylových skupin za vzniku volného peptidu

**tert-Butyl (<sup>t</sup>Bu)** – odstraňuje se koncentrovanou TFA nebo HCl v organickém rozpouštědle (Schéma 11).<sup>23</sup>



Schéma 11: Odstranění <sup>t</sup>Bu

**9-Fluorenylmethyl (Fm)** – odstraňuje se sekundárními aminy jako je piperidin a DEA v DCM nebo DMF nebo katalytickou hydrogenací v roztoku (Schéma 12).<sup>23</sup>

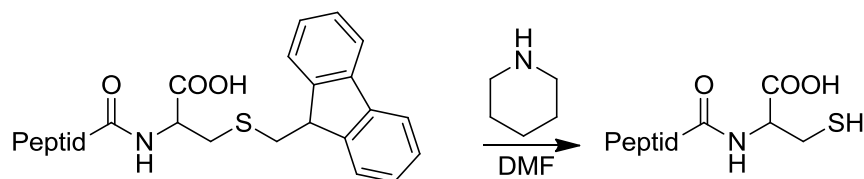


Schéma 12: Odstranění Fm

**Methyl (Me), Etyl (Et)** – methyl estery se odstraňují zmýdlením pomocí LiOH (Schéma 13), což může způsobit epimerizaci a degradaci Ser, Cys a Thr. I přes tuto komplikaci se používají při syntéze peptidů v roztoku.

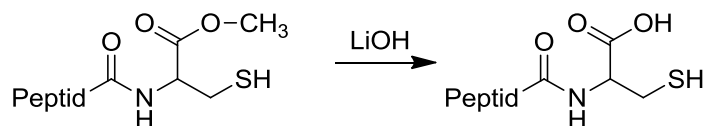
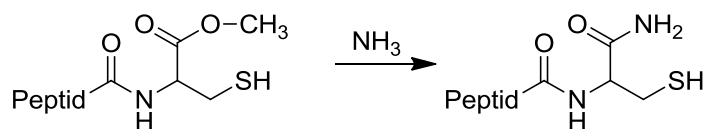


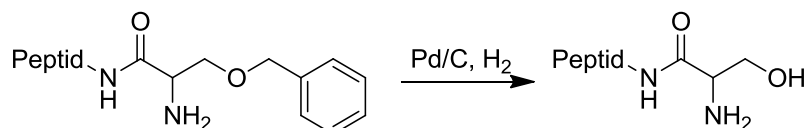
Schéma 13: Odstranění Me

Dále se používají pro získání amidů reakcí methylesteru s amoniakem (**Schéma 14**). Ethylestery se chovají podobně jako methylestery, ale jsou vůči bázím stabilnější.<sup>23</sup>



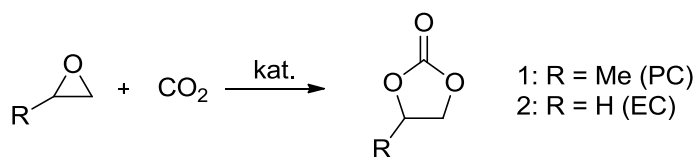
**Schéma 14:** Syntéza amidu

**Benzyl (Bn)** – používá se při syntéze peptidů v roztoku. Jeho odstranění je možné katalytickou hydrolyzou (**Schéma 15**), zmýdelněním nebo hydrazinolýzou. Pro úspěšnou deprotekcí za pomoci kyseliny je nutné použít extrémnějších podmínek.<sup>23</sup>



**Schéma 15:** Odstranění Bn

Syntéza peptidů se běžně provádí v toxických rozpouštědlech jako je DMF nebo DCM. Tato rozpouštědla mohou být nahrazena propylen karbonátem (PC) nebo etylen karbonátem (EC), což jsou „zelená“ polární aprotická rozpouštědla. Přípravují se z epoxidů reakcí s oxidem uhličitým.<sup>23</sup>

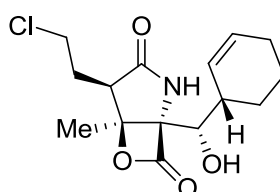


**Schéma 16:** Zelená rozpouštědla – PC, EC

### 3 Funkční skupiny peptidických inhibitorů proteasomu

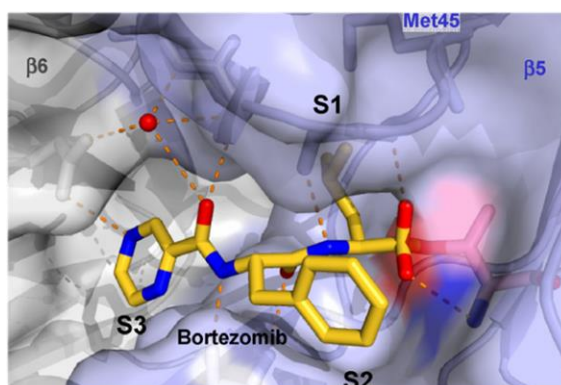
Různé peptidické ale i nepeptidické inhibitory jsou navrženy tak, aby jejich struktura co nejlépe interagovala s katalytickými jednotkami v jádře proteasomu.

Nepeptidický inhibitor, který se nachází v pokročilé fázi klinické studie, je Marizomib (**Obrázek 13**). Výhodné je jeho perorální podání.<sup>24</sup> Tento mikrobiální metabolit Salinosporamid A inhibuje všechna tři proteolytická místa, ale neovlivňuje jiné proteázy. Způsob působení je založen na ireverzibilním kovalentním připojení reaktivního  $\beta$ -laktonu na Thr podjednotku proteasomu. Bylo navrženo několik způsobů jeho syntézy.<sup>25</sup>



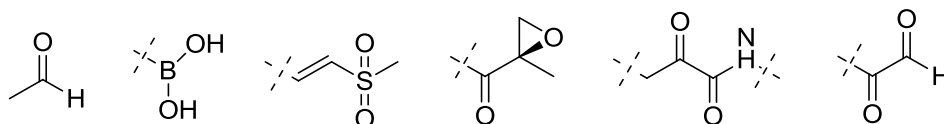
**Obrázek 13:** Marizomib

Dále popsané inhibitory jsou krátké peptidy se specifickým farmakoforem z pravidla umístěným na C-konci řetězce. Tento farmakofor specificky interaguje s katalytickým místem v proteasomu za vzniku kovalentní vazby (**Obrázek 14**). Dle síly interakce může být vazba reverzibilní nebo ireverzibilní. Peptidická část se specificky pojí s aktivními místy v proteasomu. Těchto aktivních míst má proteasom několik a ke snížení rozpadu proteinů není potřeba inhibovat všechna aktivní místa.<sup>7</sup>



**Obrázek 14:** Interakce Bortezomibu v jádře proteasomu

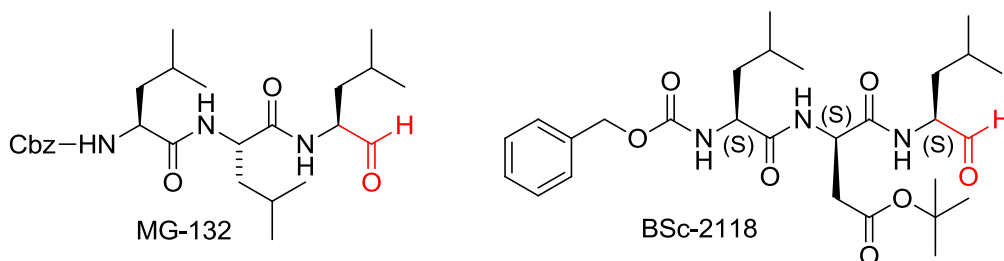
Inhibitor tedy obsahuje peptidickou a reaktivní farmakoforovou část. Dle těchto koncových funkčních skupin (**Obrázek 15**) je lze dělit na: aldehydy, boronáty, vinylsulfony, epoxyketony,  $\beta$ -laktony,  $\alpha$ -ketoamidy,  $\alpha$ -ketoaldehydy.<sup>7</sup> Dělit můžeme také dle navázání v proteasomu na kovalentní a nekovalentní nebo na reverzibilní a ireverzibilní. Dle způsobu získávání pak na přírodní a syntetické.



**Obrázek 15:** Koncové funkční skupiny

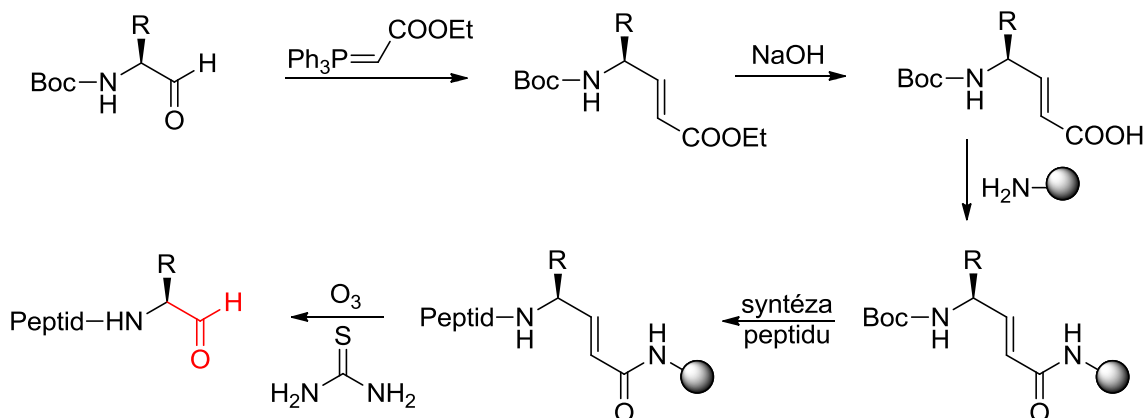
### 3.1 Aldehydové inhibitory

- Aldehydové inhibitory (**Obrázek 16**) patří mezi první identifikované proteasomové inhibitory. Jejich inhibiční účinek spočívá v reverzibilní tvorbě hemiacetalu s threoninovými konci  $\beta$ 5-podjednotky. Většina z nich je syntetická například ALLN nebo MG-132.<sup>26</sup> Mezi nejnověji syntetizované inhibitory patří ireverzibilní aldehyd BSc-2118, který prokazuje silnou protinádorovou aktivitu *in vivo* a *in vitro* proti MM. Růst nádorových buněk potlačuje zástavou G2/M fáze buněčného cyklu a tím indukuje apoptózu. V porovnání s Bortezomibem vykazuje širší bezpečnostní dávkovou oblast a vyšší protinádorovou účinnost u myšího modelu.<sup>27</sup> Přírodními aldehydy jsou Fellutamid A a B, které byly izolovány z mořských ryb. Nevýhodou aldehydových inhibitorů je jejich disociace, nízká metabolická stabilita a špatná biologická dostupnost.<sup>26</sup>



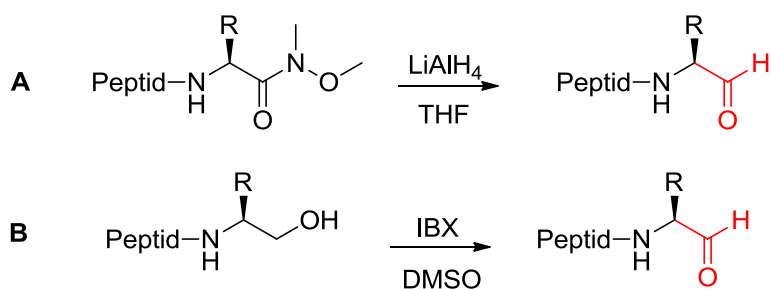
**Obrázek 16:** Aldehydové inhibitory

Syntéza aldehydů využívá strategii spojování peptidů v roztoku s použitím reakčních činidel, jako jsou fosfoniové soli nebo karbodiimidy v přítomnosti HOBt. Syntéza enantiomerně čisté aldehydové části je náročnější, protože  $\alpha$ -chirální aldehydy mají tendenci epimerizovat. Musí být použity mírné podmínky. První obecnou strategií je syntéza na pevné fázi (**Schéma 17**), kdy se aldehydová skupina ochrání Wittigovou reakcí na olefin, poté se syntetizuje peptidový řetězec a na konec se oxidací uvolní aldehyd.<sup>26</sup>



**Schéma 17:** Syntéza aldehydu na pevné fázi

Další možností je zavádění aldehydu v posledním kroku syntézy změnou oxidačního stavu koncové skupiny (**Schéma 18**). Nejčastějšími prekurzory jsou amidy - Weinrebův amid (**A**)<sup>28</sup>, estery nebo alkoholy (**B**).<sup>26</sup>



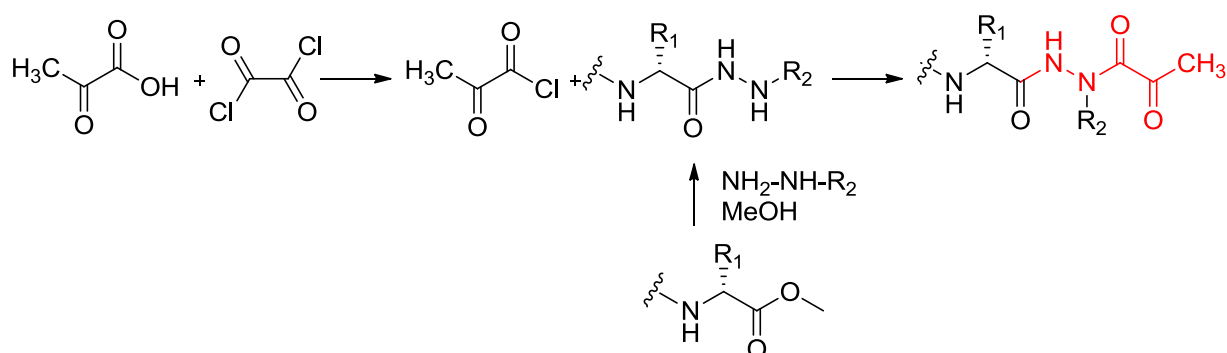
**Schéma 18:** Příprava aldehydu z Weinreb amidu (**A**) a z alkoholu (**B**)

- Aza-peptidové aldehydy a ketony mají na koncové aminokyselině nahrazený  $\alpha$ -uhlík atomem dusíku. Vazba N-CO na rozdíl od C-CO není schopna rotace a aza-peptidy jsou více rigidní než jejich peptidové analogy. Díky této vlastnosti se předpokládá větší



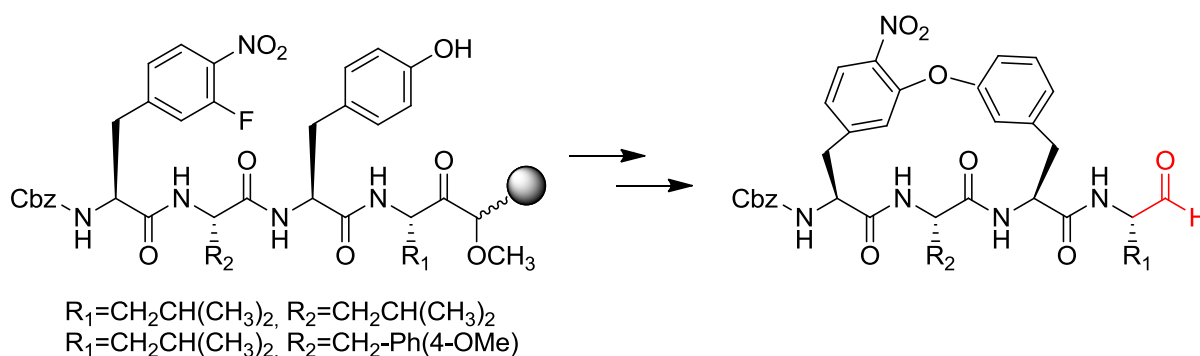
selektivita. Očekává se, že tyto sloučeniny budou reverzibilními kovalentními inhibitory. Toxicita reverzibilních inhibitorů je nižší než ireverzibilních, a proto jsou vhodnými kandidáty.

Syntéza peptidových hydrazidů (**Schéma 19**) vychází z methylesteru reakcí s hydrazinem v methanolu. Aza-peptidové ketony jsou syntetizovány z derivátu karboxylové kyseliny reakcí s oxalylchloridem. Vzniklý intermediát dále reaguje se substituovaným hydrazidem za vzniku ketoproduktu. Obdobně se připravují i aza-peptidové aldehydy.<sup>29</sup>



**Schéma 19:** Příprava aza-ketonu

- Makrocyclické aldehydy (**Obrázek 17**) vykazují selektivní účinky pro inhibici proteasomu. Struktura byla odvozena od přírodního produktu TMC-95, který patří mezi nekovalentní reverzibilní IP. Tyto biaryl ethery patří také mezi reverzibilní IP.<sup>30</sup>



**Obrázek 17:** Makrocyclické aldehydy

### 3.2 Dichlorvinyl ethery

Dichlorvinyl ethery jsou stálé v kyselém prostředí, ale snadno se hydrolyzují. Při pH=11 se převedou na  $\alpha$ -chloracetáty, které mohou reagovat s nukleofilním místem v proteasomu (Schéma 20).<sup>5</sup>

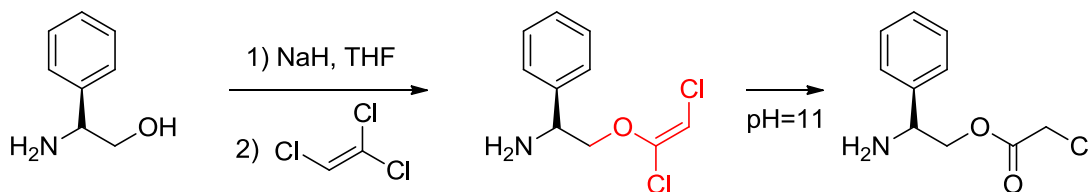
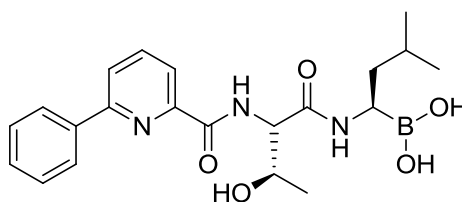


Schéma 20: Příprava dichlorvinyl etheru

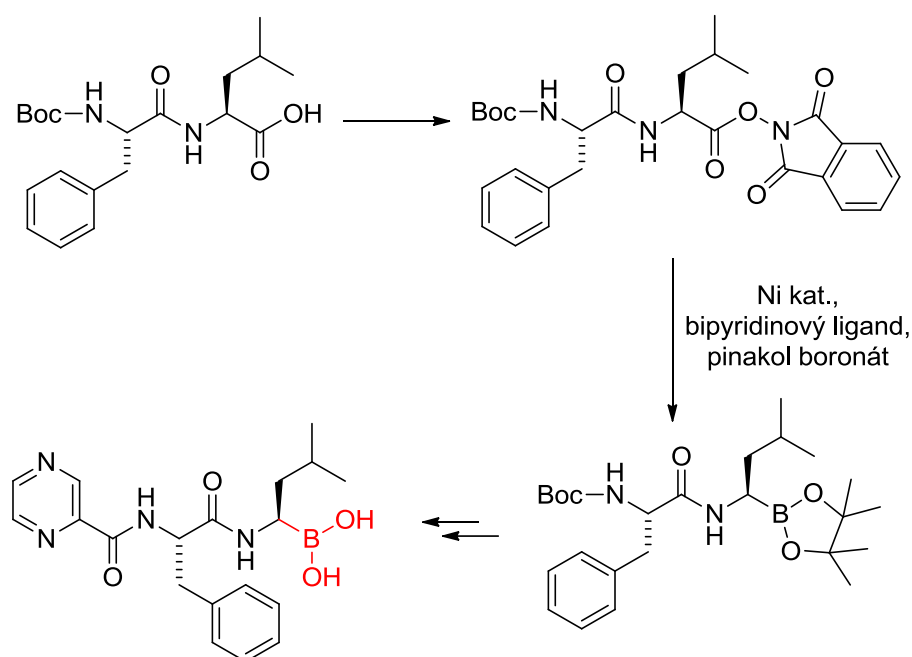
### 3.3 Boronáty

Prvním schváleným IP (v roce 2003) byl Bortezomib (obchodní název: Valcade®), který obsahuje boronátovou koncovou funkční skupinu.<sup>31</sup> Dalším významným zástupcem je Ixazomib Ninlaro® schválený v roce 2011.<sup>32</sup> V porovnání s aldehydy jsou boronáty více aktivní a selektivní.<sup>31</sup> Nejnovější boronátový inhibitor, který byl studován na lidech, je Delanzomib (Obrázek 18). I přes jeho kladné výsledky v I. fázi klinického testování se nakonec ukázal jako nevhodný, protože při testování v II. fázi pouze 9 % pacientů dosáhlo částečné odezvy.<sup>33</sup>



Obrázek 18: Delanzomib

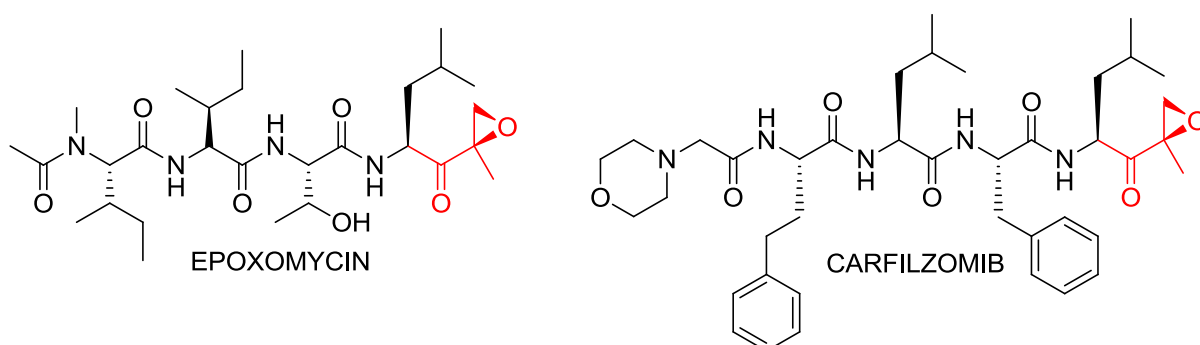
Boronáty se připravují dekarboxylační boronací (Schéma 21). V prvním kroku se připraví *N*-hydroxyftalimidový ester, který podléhá dekarboxylační boronaci v přítomnosti niklového katalyzátoru, bipyridinového ligandu a pinacol boronátu za vzniku esteru boronátu. Tento ester lze hydrolyzovat na odpovídající boronovou kyselinu. Metoda je velice selektivní a šetrná k ostatním funkčním skupinám.<sup>32</sup>



**Schéma 21:** Syntéza Bortezomibu – dekarboxylační boronace

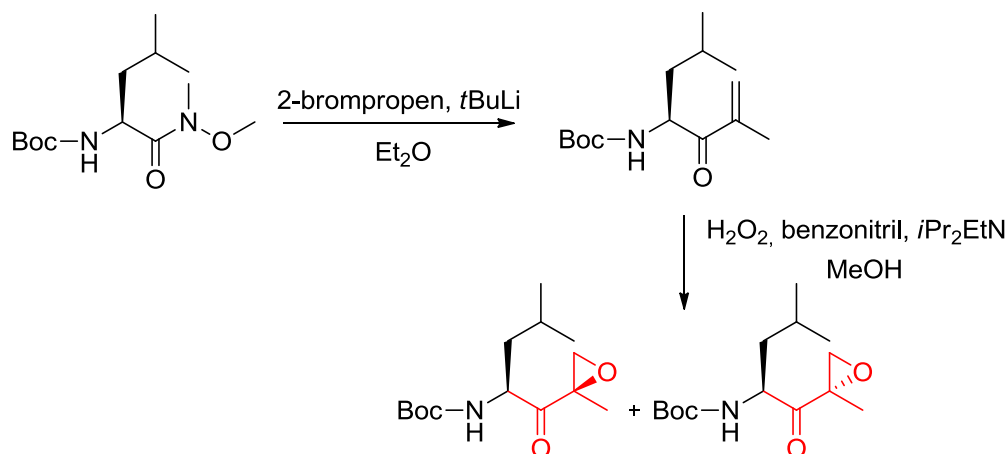
### 3.4 Epoxyketony

První deriváty epoxyketonů (**Obrázek 19**) byly izolovány v roce 2000 z mikrobiálních přírodních produktů. Patří mezi silné ireverzibilní IP. Syntetické inhibitory jsou inspirovány strukturou přírodního Epoxomycinu. Syntéza vedla k inhibitoru YU-101, který má výborné proliferáčnické a protizánětlivé vlastnosti a který byl prekurzorem pro Carfilzomib (obchodní název: Kyprolis®).<sup>31</sup> Tento IP druhé generace byl schválen americkou FDA v roce 2012. Evropskou lékovou agenturou (EMA) v roce 2015.<sup>34</sup>



**Obrázek 19:** Zástupci epoxyketonů

Syntéza základního řetězce Carfilzomibu probíhá obecným způsobem syntézy peptidu popsaným výše. Poslední aminokyselina je připojována již s funkční skupinou epoxidu, který se připravuje oxidací alkenů.<sup>26</sup>

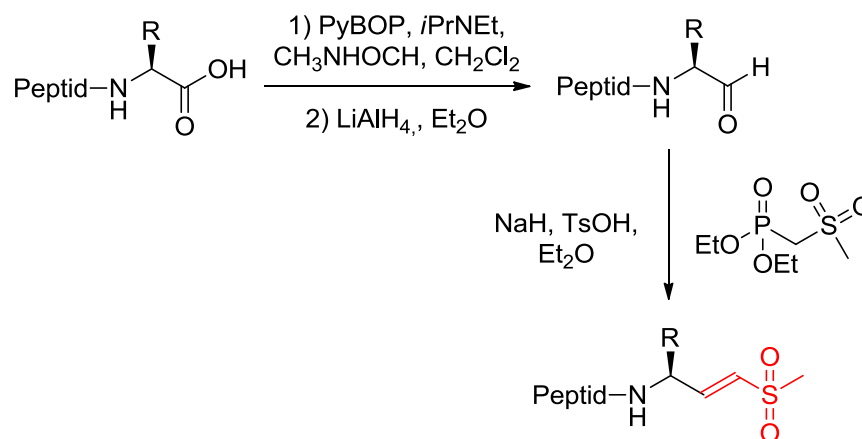


**Schéma 22:** Syntéza epoxyketonové funkční skupiny

### 3.5 Sulfony

- Vinyl sulfony interagují s proteasomovou Thr jednotkou Michaelovou adicí. Inhibiční aktivita je srovnatelná s aldehydy, ale předpokládá se, že vinyl sulfony jsou méně toxické.<sup>26</sup>

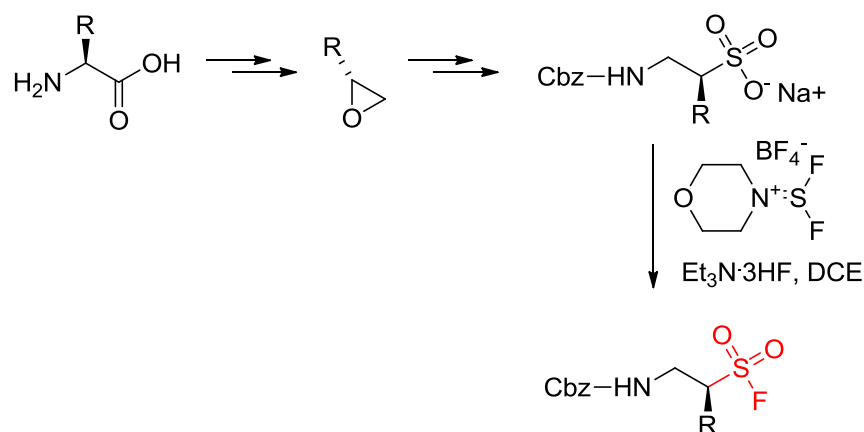
Syntéza vinyl sulfonů (**Schéma 23**) vychází z chráněné aminokyseliny, která je redukována na aldehyd přes Weinrebův amid. Následující Wittigova olefinace poskytne vinyl sulfonovou funkční skupinu. Pro syntézu vinyl sulfonů lze použít i 4-sulfamylbutyrylaminomethyl polystyrenovou pryskyřici jako pevnou fázi.<sup>26</sup>



**Schéma 23:** Syntéza vinyl sulfonové funkční skupiny

- $\alpha$ -substituovaný sulfonyl fluorid je elektrofilní uspořádání reagující s koncovým threoninovým proteolytickým místem v proteasomu.

Syntéza  $\alpha$ -substituovaných sulfonyl fluoridů (**Schéma 24**) je několika kroková a vede přes epoxidy kvůli posunutí postranního řetězce do  $\alpha$ -polohy vůči sulfonyl fluoridové skupině.



**Schéma 24:** Syntéza  $\alpha$ -substituovaných sulfonyl fluoridů

Špatná rozpustnost syntetizovaných inhibitorů, vyloučila prozatím tyto látky z biologického testování.<sup>35</sup>

- Vinyl sulfonyl fluoridy podobně jako epoxidy vykazují duální charakter a selektivitu při interakci s proteasomem. Díky této reaktivitě se předpokládá účinnější navázání na threoninové místo a tím vyšší inhibice proteasomu.<sup>36</sup>

Syntéza (**Schéma 25**) vychází z alkoholu, který se Swernovou oxidací oxiduje na odpovídající aldehyd. Následující Wittig-Hornerovou reakcí s ethyl diethylfosforyl methansulfonátem vznikne vinyl sulfonát ester, který se štěpí  $\text{Bu}_4\text{NI}$  za vzniku soli. Tuto sůl lze efektivně pomocí speciálního činidla XtalFluor v přítomnosti triethylaminu trihydrofluoridu převést na požadovaný vinyl sulfonyl fluorid.<sup>36</sup>

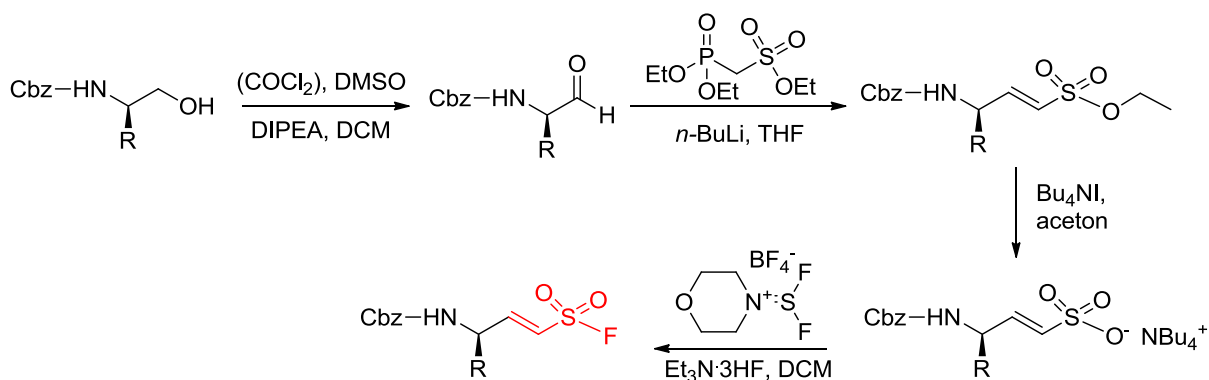


Schéma 25: Syntéza vinyl sulfony fluoridu

- Mírná reaktivita sulfonyl fluoridů způsobuje reaktivnost se serinovými proteázami (Schéma 26).<sup>37</sup>

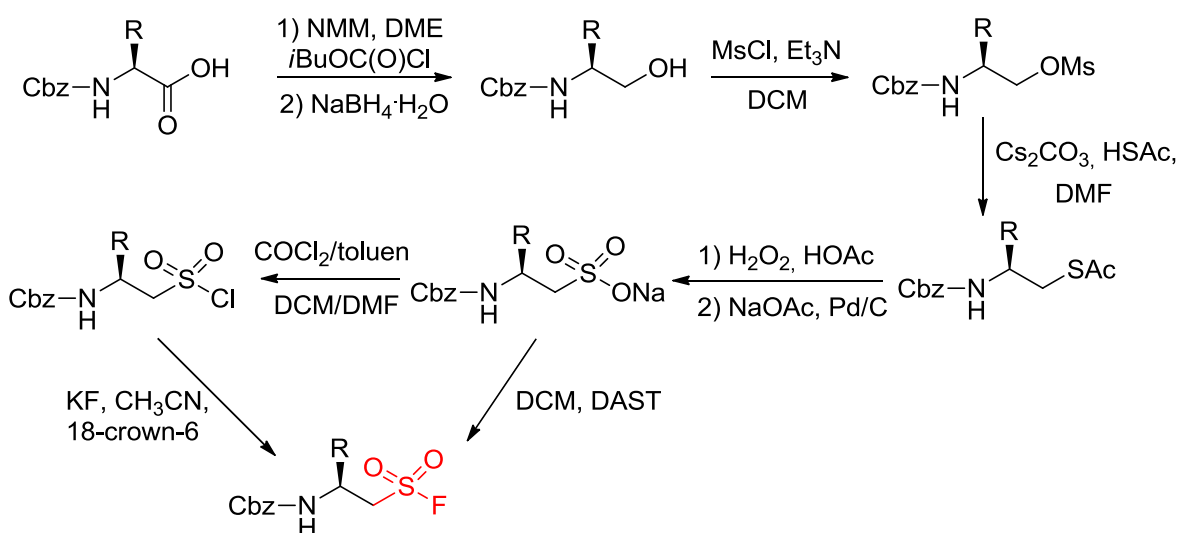
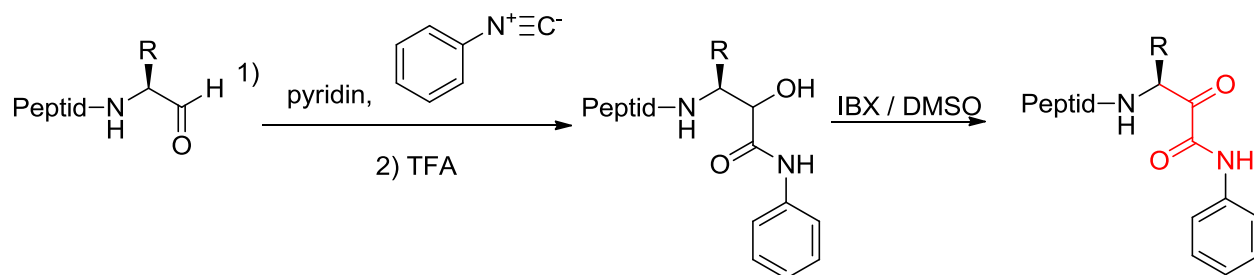


Schéma 26: Syntéza sulfonyl fluoridů

### 3.6 $\alpha$ -ketoamidy

Patří mezi nejsilnější reverzibilní inhibitory. Díky své struktuře jsou schopny proniknout hlouběji do tkáně a tím se stávají slibnými kandidáty.

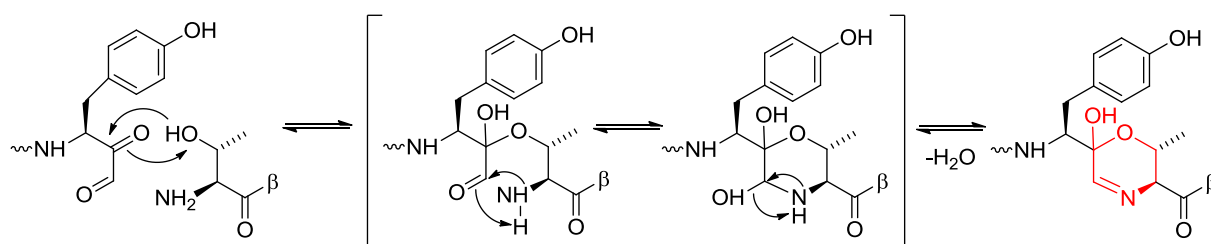
Syntéza vychází z aldehydu, který reaguje s fenylnitrilem v přítomnosti pyridinu. Vzniklý  $\alpha$ -alkoholový derivát se oxiduje IBX na  $\alpha$ -ketoamid (Schéma 27).<sup>38</sup>



**Schéma 27:** Syntéza  $\alpha$ -ketoamidu

### 3.7 $\alpha$ -ketoaldehydy

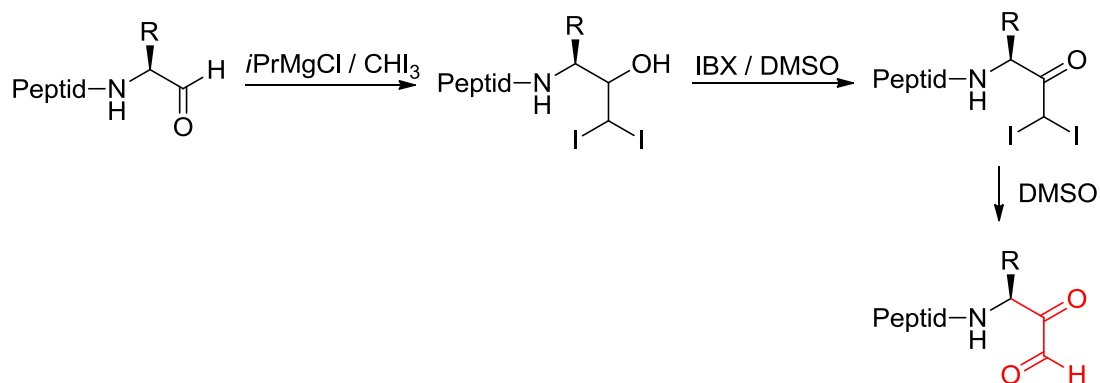
Interakcí  $\alpha$ -ketoaldehydů (glyoxalů) s proteasomovou Thr katalyticky aktivní jednotkou vzniká unikátní šestičlenný kruh, který obsahuje hemiketalový uhlík a Schiffovu bázi (**Schéma 28**). Tento katalytický mechanismus za vzniku reverzibilní Schiffovy báze a vysoká specifita dávají těmto látkám jedinečnost. Ostatní jsou buď ireverzibilní (epoxyketony,  $\beta$ -laktony) nebo reverzibilní, ale nespecifické (aldehydy).<sup>39</sup>



**Schéma 28:** Interakce  $\alpha$ -ketoaldehydu s katalyticky aktivní threoninovou jednotkou proteasomu

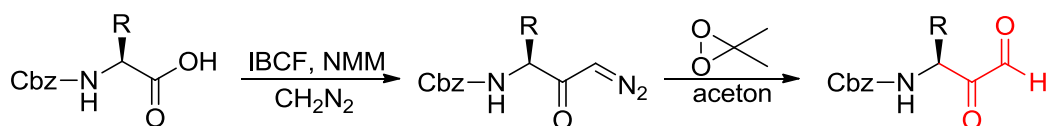
Předpokládalo se, že by  $\alpha$ -ketoaldehydy mohly nahradit peptidový aldehydový inhibitor MG-132.<sup>39</sup> Experimenty z roku 2014 však prokázaly sníženou cytotoxicitu proti rakovinným buňkám, a proto byly vyřazeny z budoucích klinických studií.<sup>38</sup>

Syntéza vychází z aldehydu, kdy reakcí s Grignardovým činidlem – *i*PrMgCl a jodoformem dochází ke vzniku  $\beta$ -dijodalkoholu, který je oxidován *o*-iodoxybenzoovou kyselinou (IBX) na  $\beta$ -dijodketon. Hydrolyzou tohoto intermediátu získáme požadovaný produkt (**Schéma 29**).<sup>38</sup>



**Schéma 29:** Syntéza  $\alpha$ -ketoaldehydu

Při přípravě  $\alpha$ -ketoaldehydů lze vycházet i z karboxylové kyseliny (**Schéma 30**). Reakcí s isobutyl chloroformiátem, *N*-methylmorfolinem a diazomethanem se získá intermediát s terminálním diazoketonem, který se oxiduje použitím dimethyldioxiranu v acetonu na glyoxal.<sup>40</sup>

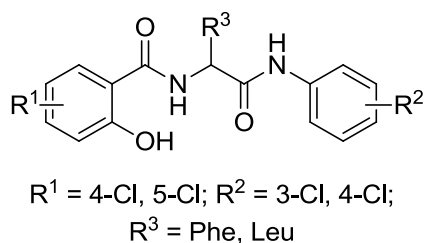


**Schéma 30:** Syntéza  $\alpha$ -ketoaldehydu



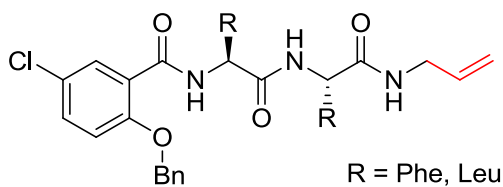
## 4 Biologicky testované látky připravené v rámci výzkumné skupiny

Myšlenka syntetizovat potenciální inhibitory proteasomu vznikla na základě cytotoxických vlastností dříve syntetizovaných diamidů (**Obrázek 20**).<sup>41</sup>



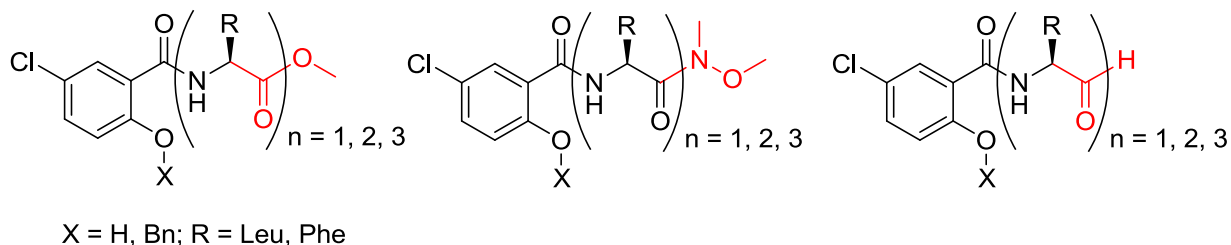
**Obrázek 20:** Struktura cytotoxického diamidu

V průběhu hledání dalších látek s antiproliferativními vlastnostmi byli navrženy salicylamidy s alifatickým řetězcem (**Obrázek 21**). Tyto allyl aminy byly testovány na cytotoxicitu.<sup>42</sup>



**Obrázek 21:** Allyl amin

U některých z těchto nových peptidových struktur (**Obrázek 22**) byly měřeny jejich antiproliferativní vlastnosti proti různým rakovinným buněčným liniím. Cílem bylo připravit aldehydovou funkční skupinu, ale měřeny byly i meziproducty ester a Weinreb amid.<sup>28</sup>



**Obrázek 22:** Nové struktury

S rostoucí délkou řetězce benzylovaných derivátů se aktivita u těchto látek neměnila. U derivátů s Weinrebovou koncovou funkční skupinou a deprotektovanou hydroxylovou skupinou byla naměřena vyšší aktivita u tripeptidů než u dipeptidů. Aldehydové tripeptidové deriváty vykazovaly z této skupiny nejlepší výsledky. Dle naměřených hodnot jsou aktivnější aldehydy s koncovou aminokyselinou fenylalanin než leucinové.<sup>28</sup>

## 5 Experimentální část

### Materiál a metody

Všechny komerčně dostupné chemikálie byly zakoupeny od firmy Sigma Aldrich, Acros Organics, TCI, Merck nebo Fluorochem.

Sloupcová chromatografie byla prováděna na silikagelu ( $\text{SiO}_2$  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 ( $\text{SiO}_2$  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.

$^1\text{H}$  a  $^{13}\text{C}$  NMR spektra 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  $^{13}\text{C}$ ) nebo na přístroji Bruker Ascend<sup>TM</sup> 500 při frekvencích 500.13 ( $^1\text{H}$ ) resp. 125.76 MHz (pro  $^{13}\text{C}$ ). Chemické posuny jsou uvedeny v jednotkách ppm vůči zbytkovému signálu rozpouštědla  $\text{CDCl}_3$  nebo  $\text{DMSO}-d_6$ . Interakční konstanty ( $J$ ) jsou uvedeny v Hz. Pozorované signály jsou popsány jako s (singlet), br (široký singlet), d (dublet), dd (dublet dubletu) t (triplet) a m (multiplet).

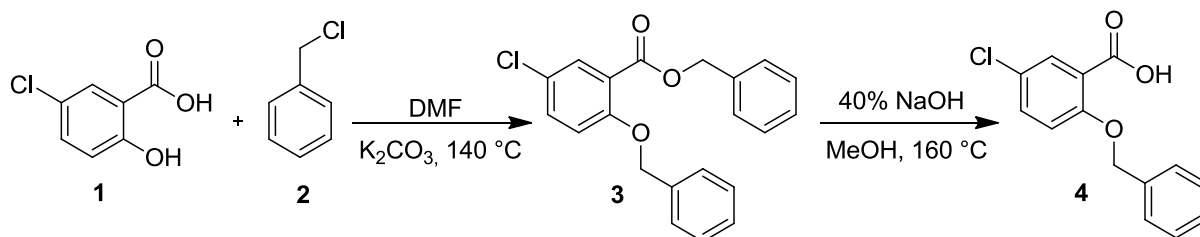
Body tání byly měřeny na kapilárním bodotávku Büchi B-545.

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-*terc*-

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.

## 5.1 Příprava 2-(benzyloxy)-5-chlorbenzoové kyseliny



	<b>1</b>	<b>2</b>	DMF	K <sub>2</sub> CO <sub>3</sub>	<b>3</b>	40% NaOH	MeOH	<b>4</b>
M [g/mol]	172,57	126,58	-	138,31	352,81	40	-	262,69
ekv	1	3,16	-	4,5	1	4,79	-	1
n [mmol]	57,9	183,1	-	260,6	57,9	277,34	-	57,9
m [g]	<b>10</b>	<b>23,176</b>	-	<b>36,017</b>	<b>20,43(teor.)</b>	-	-	<b>15,2</b>
V [ml]	-	21,06	<b>150</b>	-	-	<b>10</b>	<b>170</b>	-
ρ [g/ml]	-	1,1	-	-	-	-	-	-

### Pracovní postup:

Postup byl převzat a upraven z literatury.<sup>43</sup>

Do 500 ml baňky byla předložena 5-Cl-salicylová kyselina (**1**; 10 g; 57,9 mmol) a rozpuštěna v DMF (150 ml). Následně byl přisypán K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (36,017 g; 260,6 mmol) a přikapán benzylchlorid (**2**; 21 ml; 57,9 mmol). Směs byla refluxována 2,5 hod. při 140 °C. Následně byla RS nalita do kádinky se směsí led/voda (2 l) a po 30 min míchání se vyloučil meziprodukt (**3**), který byl odfiltrován na Büchnerově nálevce. Meziprodukt (**3**) byl rozpuštěn v DCM (260 ml) a byl extrahován vodou (1 x 100 ml), solankou (1 x 100 ml) a vodou (1 x 100 ml). Organická fáze byla usušena bezvodým Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>.

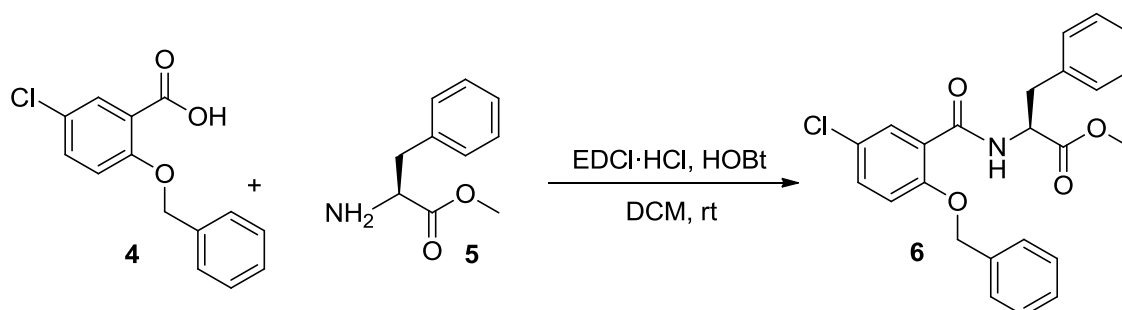
Po odfiltrování sušidla a oddestilování DCM byl získán žlutý meziprodukt (**3**) olejovité konzistence, který vykrytalizoval a byl použit do další reakce bez další purifikace.

Meziprodukt (**3**) byl rozpuštěn v MeOH (170 ml) za vzniku suspenze. Následně bylo přidáno 10 ml 40% NaOH a suspenze se rozpustila. Reakční směs (RS) byla refluxována při 160 °C po dobu 2,5 hod. Potom byla oddestilováním části rozpouštědla zahuštěna. Následně bylo přidáno cca 120 ml vody a RS okyselena pomocí HCl na pH = 1. Vzniklá sraženina byla přefiltrována na Büchnerově nálevce, promyta studenou vodou, vakuově vysušena a rekrystalizována ze směsi EtOAc/Hex.

#### Charakterizace produktu (4):

**Výtěžek:** 12,656 g (83 %; lit.<sup>43</sup> 95 %); bílá krystalická látka; teplota tání: 123,1-124,3 °C; **<sup>1</sup>H NMR:** (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ (ppm): 10.64 (s, 1H); 8.15 (dd, *J* = 2.7, 0.8 Hz, 1H); 7.50 (dd, *J* = 8.9, 2.8 Hz, 1H); 7.46 – 7.39 (m, 5H); 7.08 (d, *J* = 8.9 Hz, 1H); 5.29 (s, 2H); **<sup>13</sup>C NMR:** (101 MHz, DMSO) δ (ppm): 166.81; 156.38; 137.30; 132.93; 130.50; 129.04; 128.40; 127.77; 124.69; 124.28; 116.52; 70.56; **Elementární analýza:** pro C<sub>14</sub>H<sub>11</sub>ClO<sub>3</sub> vypočteno: C 64.01; H 4.22; nalezeno: C 63.78; H 4.26.

#### 5.2 Příprava (S)-methyl 2-(2-(benzyloxy)-5-chlorbenzamido)-3-fenylpropanoátu



	O-Me-L-Phe·HCl	K <sub>2</sub> CO <sub>3</sub>	5	4	EDC·HCl	HOBT	DCM	6
M [g/mol]	215,68	138,21	179,21	262,69	191,7	135	-	423,89
ekv	1	1	1	1	1	1	-	1
n [mmol]	20,9	20,9	19,5	19,5	19,5	19,5	-	19,5
m [g]	<b>4,5</b>	<b>2,89</b>	<b>3,5</b>	<b>5,12</b>	<b>3,74</b>	<b>2,63</b>	-	<b>8,27</b>
V [ml]	-	-	-	-	-	-	<b>130</b>	-

#### Pracovní postup:

Postup byl převzat a upraven z literatury.<sup>44</sup>

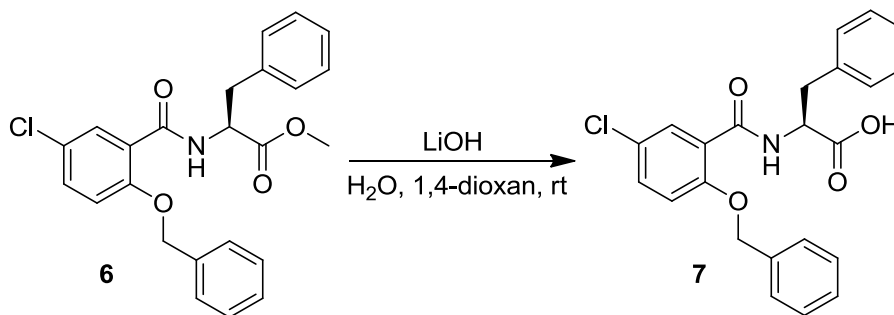
Do 100 ml baňky opatřené míchadlem byl předložen O-Me-L-Phe·HCl (4,5 g; 20,9 mmol) a rozpuštěn ve vodě (60 ml). Následně bylo přidáno K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (2,89 g; 20,9 mmol). Po 10 minutách míchání byl meziprodukt O-Me-L-Phe (5) extrahován do DCM (3 x 40 ml). Spojené organické frakce byly promyty vodou (2 x 30 ml). Nakonec byl meziprodukt (5) vysušen bezvodým Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>. Po odfiltrování sušidla a oddestilování organického rozpouštědla bylo získáno 3,5 g (93 %; teor.: 3,75 g) meziproduktu (5), který nebyl dále purifikován.

Do 250 ml baňky s míchadlem byla předložena kyselina (**4**; 5,12 g; 19,5 mmol – přepočteno na získané množství meziprojektu **5**) a rozpuštěna v DCM (50 ml). Následně bylo přidáno EDC·HCl (3,74 g; 19,5 mmol), HOBt (2,63 g; 19,5 mmol) a získaný meziprojekt (**5**; 3,5 g; 19,5 mol) rozpuštěný v DCM (80 ml). Reakce byla sledována pomocí tenkovrstvé kapalinové chromatografie (TLC) a po vymizení výchozí látky asi po dvou hodinách ukončena přilítím EtOAc (60 ml) a vody (60 ml). Směs byla rozdělena v děličce. Vodná fáze byla promyta EtOAc (3 x 40 ml) a spojené organické frakce nasyceným roztokem NaHCO<sub>3</sub> (1 x 40 ml), 5% roztokem kyseliny citronové (1 x 40 ml) a nakonec vodou (1 x 40 ml). Organická fáze byla vysušena bezvodým Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, následně bylo sušidlo odfiltrováno a organické rozpouštědlo oddestilováno. RS byla purifikována pomocí flash chromatografie.

Charakterizace produktu (**6**):

**Výtěžek:** 5,8 g (70 %); olej; **<sup>1</sup>H NMR:** (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ (ppm): 8.42 (d, *J* = 7.1 Hz, 1H); 8.19 (d, *J* = 2.8 Hz, 1H); 7.38 – 7.32 (m, 4H); 7.31 – 7.26 (m, 2H); 7.24 – 7.16 (m, 3H); 7.01 – 6.98 (m, 2H); 6.92 (d, *J* = 8.8 Hz, 1H); 5.11 (ABq, *J* = 11.6 Hz, 2H); 5.00 (dd, *J* = 12.8, 6.8 Hz, 1H); 3.62 (s, 3H); 3.15 (dd, *J* = 13.9, 5.6 Hz, 1H); 2.97 (dd, *J* = 13.9, 6.7 Hz, 1H); **<sup>13</sup>C NMR:** (126 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ (ppm): 171.86; 163.50; 155.41; 136.16; 135.09; 132.62; 132.15; 129.22; 128.92; 128.73; 128.48; 127.76; 127.01; 126.89; 122.47; 114.33; 71.49; 54.16; 52.23; 37.63; **Elementární analýza:** pro C<sub>24</sub>H<sub>22</sub>ClNO<sub>4</sub> vypočteno: C 68.00; H 5.23; N 3.30; nalezeno: C 68.74±0.01; H 5.33±0.02; N 3.30±0.08.

### 5.3 Příprava 2-(2-(benzyloxy)-5-chlorbenzamido)-3-fenylpropanové kyseliny



	<b>6</b>	LiOH	1,4-dioxan	H <sub>2</sub> O	<b>7</b>
M [g/mol]	423,88	125,56	-	-	409,86
ekv	1	3	-	-	1
n [mmol]	33,5	100,5	-	-	33,5
m [g]	<b>14,207</b>	<b>12,62</b>	-	-	<b>13,73</b>
V [ml]	-	-	<b>200</b>	<b>200</b>	-

#### Pracovní postup:

Postup byl převzat a upraven z literatury.<sup>28</sup>

Do 500 ml baňky opatřené míchadlem byl předložen výchozí methylester (**6**; 14,2 g; 33,5 mmol) a následně rozpuštěn ve směsi dioxan/voda (1/1; 400 ml). Poté byl přidán LiOH (12,6 g; 100,5 mmol) a reakce byla míchána 2 hod. při rt. Po dvou hodinách byla reakce vykyselena HCl do pH 1-2. Následně byla pomocí děličky směs rozdělena. Vodná fáze byla extrahována EtOAc (3 x 60 ml). Spojené org. frakce byly promyty vodou (2 x 30 ml). Nakonec byla organická fáze vysušena bezvodým Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, sušidlo odfiltrováno a rozpouštědlo oddestilováno. Surový produkt (**7**) byl dle provedených analýz získán v dostatečné čistotě, proto nebyl dále jinak purifikován.

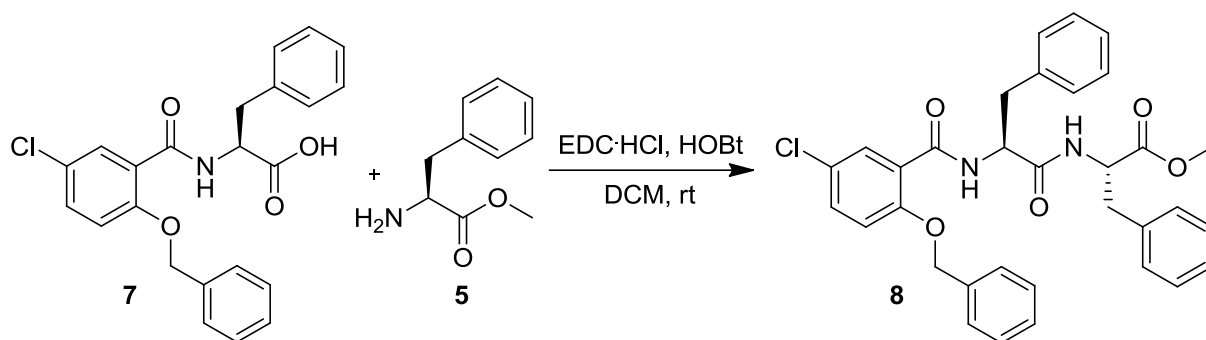
#### Charakterizace produktu (7):

**Výtěžek:** 13,7 g (100 %); olej; **<sup>1</sup>H NMR:** (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ (ppm): 10.00 (bs, 1H); 8.51 (d, *J* = 7.1 Hz, 1H); 8.26 (d, *J* = 2.8 Hz, 1H); 7.45 – 7.35 (m, 4H); 7.34 – 7.29 (m, 2H); 7.29 – 7.21 (m, 3H); 7.12 – 7.03 (m, 2H); 6.98 (d, *J* = 8.9 Hz, 1H); 5.20 – 5.09 (m, 2H); 5.09 – 5.02 (m, 1H); 3.31 (dd, *J* = 14.1, 5.3 Hz, 1H); 3.03 (dd, *J* = 14.1, 7.1 Hz, 1H); **<sup>13</sup>C NMR:** (101 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ (ppm): 175.52; 164.34; 155.72; 136.14; 135.06; 133.06; 132.33; 129.40; 129.10; 129.02; 128.72; 128.01; 127.25; 127.12; 114.56; 71.80; 67.23; 54.40; 37.30;



**HRMS m/z:** pro  $C_{23}H_{20}ClNO_4$  vypočteno: 410.11593  $[M+H]^+$ ; 432.09787  $[M+Na]^+$ ; 448.07181  $[M+K]^+$ ; nalezeno: 410.11536  $[M+H]^+$ ; 432.09731  $[M+Na]^+$ ; 448.07214  $[M+K]^+$ ;  
**Elementární analýza:** pro  $C_{23}H_{20}ClNO_4$  vypočteno: C 67.40; H 4.92; N 3.42; nalezeno: C 67.51; H 5.34; N 3.42

#### 5.4 Příprava (S)-methyl 2-((S)-2-(2-(benzyloxy)-5-chlorbenzamido)-3-fenylpropanamido)-3-fenylpropanoátu



	O-Me-L-Phe·HCl	K <sub>2</sub> CO <sub>3</sub>	5	7	EDC·HCl	HOBt	DCM	8
M [g/mol]	215,68	138,21	179,21	409,86	191,7	135	-	571,06
ekv	1	1	1	1	1	1	-	1
n [mmol]	57,3	57,3	54,3	54,3	54,3	54,3	-	54,3
m [g]	<b>12,36</b>	<b>7,91</b>	<b>9,74</b>	<b>20,94</b>	<b>9,78</b>	<b>6,89</b>	-	<b>31</b>
V [ml]	-	-	-	-	-	-	<b>450</b>	-

#### Pracovní postup:

Postup byl převzat a upraven z literatury.<sup>44</sup>

Do 200 ml baňky opatřené míchadlem byl předložen O-Me-L-Phe·HCl (12,36 g; 57,36 mmol) a rozpuštěn ve vodě (120 ml). Následně bylo přidáno K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (7,91 g; 57,3 mmol). Po 10 minutách míchání byl meziprodukt (**5**) extrahován do DCM (3 x 50 ml). Spojené organické fáze byly promyty vodou (2 x 40 ml). Nakonec byl meziprodukt vysušen bezvodým Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>. Po odfiltrování sušidla a oddestilování organického rozpouštědla bylo získáno 9,74 g (95 %; teor.: 10,3 g) meziproduktu (**5**), který nebyl dále purifikován.

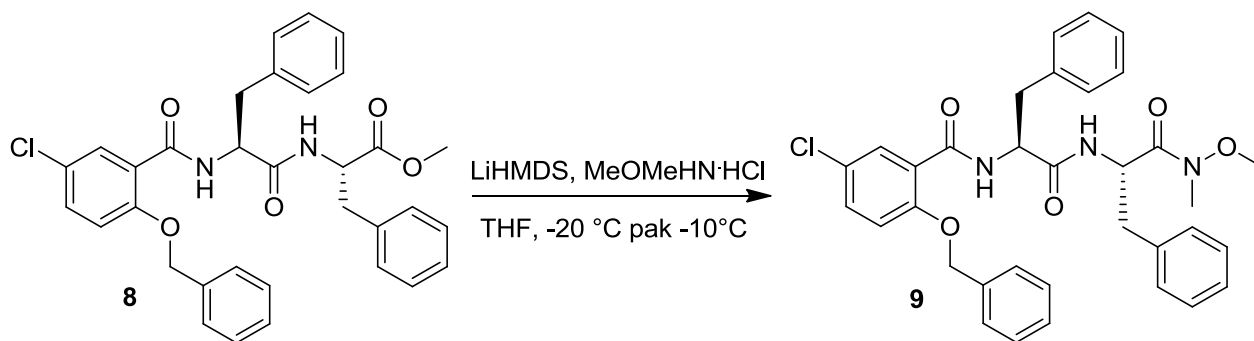
Do 1000 ml baňky s magnetickým míchadlem byla předložena kyselina (**7**; 20,94 g; 54,3 mmol – přepočteno na získané množství meziproduktu **5**) a rozpuštěna v DCM (350 ml). Následně bylo přidáno EDC·HCl (9,78 g; 54,3 mmol), HOBt (6,89 g; 54,3 mmol) a získaný

meziprodukt (**5**; 9,74 g; 54,3 mol) rozpuštěný v DCM (100 ml). Reakce byla sledována pomocí TLC. Po vymizení výchozí látky asi po dvou hodinách ukončena přilitím EtOAc (100 ml) a vody (100 ml). Směs byla rozdělena v děličce. Vodná fáze byla promyta EtOAc (3 x 50 ml) a spojené organické frakce nasyceným roztokem NaHCO<sub>3</sub> (1 x 100 ml), 5% roztokem kyseliny citronové (1 x 100 ml) a nakonec vodou (1 x 100 ml). Organická fáze byla vysušena bezvodým Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, následně bylo sušidlo odfiltrováno a organické rozpouštědlo oddestilováno. RS byla purifikována pomocí sloupcové chromatografie.

#### Charakterizace produktu (**8**):

Produkt je směs dvou diastereoisomerů A a B. **Výtěžek:** 11,2 g (36 %); bílá krystalická látka; teplota tání: 143,5-145,5 °C; **<sup>1</sup>H NMR:** (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ (ppm): 8.28 (d, *J* = 7.4 Hz, 1H); 8.15 – 8.11 (m, 1H); 7.45 – 7.28 (m, 6H); 7.21 – 7.10 (m, 3H); 7.10 – 7.04 (m, 3H); 7.03 – 6.95 (m, 4H); 6.92 (d, *J* = 8.8 Hz, 1H); 6.78 (d, *J* = 7.6 Hz, 1H); 5.15 – 5.03 (m, 2H); 4.85 – 4.75 (m, 2H); 3.69 (s, 3H<sub>A+B</sub>); 3.66 (s, 3H<sub>A+B</sub>); 3.15 – 2.94 (m, 3H); 2.80 – 2.72 (m, 1H); **<sup>13</sup>C NMR:** (101 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ (ppm): 171.71; 170.71; 164.29; 155.55; 136.93; 135.98; 135.20; 132.92; 132.37; 129.44; 129.38; 129.30; 129.26; 129.14; 129.14; 128.74; 128.68; 128.58; 128.00; 127.96; 127.25; 127.10; 127.06; 126.93; 122.46; 114.49; 71.80; 55.42; 54.91; 53.54; 53.07; 52.51; 52.42; 38.05; 37.98; 37.56; 36.95; **HRMS m/z:** pro C<sub>33</sub>H<sub>31</sub>ClN<sub>2</sub>O<sub>5</sub> vypočteno: 571.19943 [M+H]<sup>+</sup>; 593.18137 [M+Na]<sup>+</sup>; 609.15531 [M+K]<sup>+</sup>; nalezeno: 571.20013 [M+H]<sup>+</sup>; 593.18195 [M+Na]<sup>+</sup>; 609.15601 [M+K]<sup>+</sup>; **Elementární analýza:** pro C<sub>33</sub>H<sub>31</sub>ClN<sub>2</sub>O<sub>5</sub> vypočteno: C 69.41; H 5.47; N 4.91; nalezeno: C 69.87±0.3; H 5.54±0.01; N 5.25±0.03.

## 5.5 Příprava 2-(benzyloxy)-5-chlor-N-((S)-1-(((S)-1-(methoxy(methyl)amino)-1-oxo-3-fenylpropan-2-yl)amino)-1-oxo-3-fenylpropan-2-yl)benzamidu



	<b>8</b>	MeOMeNH·HCl	LiHMDS (1M vTHF)	THF	<b>9</b>
M [g/mol]	571,06	97,54	-	-	600,10
ekv	1	2,5	7	-	1
n [mmol]	8,75	21,9	61,25	-	8,75
m [g]	<b>5</b>	<b>2,13</b>	-	-	<b>5,25</b>
V [ml]	-	-	<b>61,3</b>	<b>150</b>	-

### Pracovní postup:

Postup byl převzat a upraven z literatury.<sup>45</sup>

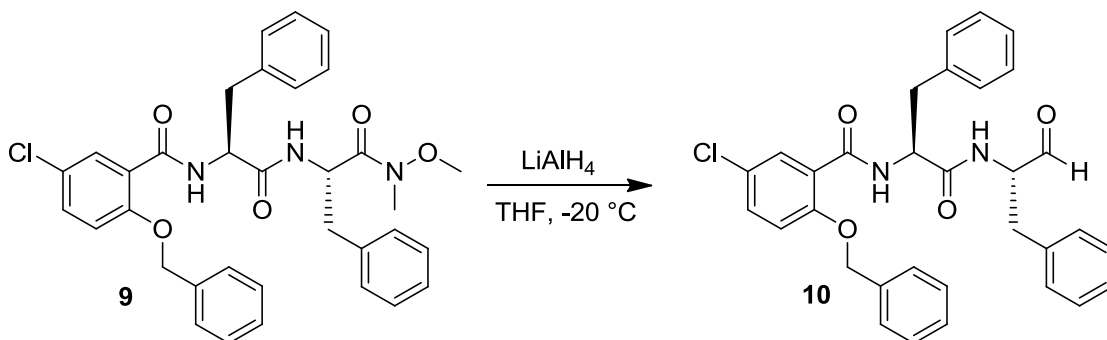
Reakce byla prováděna na lince vakuum-inert.

Do 500 ml baňky baňky opatřené míchadlem a teploměrem byl předložen MeOMeNH·HCl (2,13 g; 21,9 mmol). Po vysekurování baňky a pod nátokem dusíku byl přes septum nadávkován methylester (**8**; 5 g; 8,75 mmol) rozpuštěný v bezvodém tetrahydrofuranu (THF, 150 ml). Po vychlazení RS na -20 °C bylo pomocí syringe pump nadávkováno LiHMDS (61,3 ml; 61,25 mmol), tak aby teplota RS nepřekročila -20 °C. Dávkováno bylo asi hodinu a po té byla teplota zvýšena na -10 °C. Reakce byla po 2 hodinách ukončena nasyceným roztokem NH<sub>4</sub>Cl (50 ml). RS byla rozdělena pomocí děličky. Vodná fáze byla protřepána s Et<sub>2</sub>O (3 x 20 ml) a spojené organické frakce vodou (2 x 20 ml). Nakonec byla organická fáze vysušena bezvodým Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>. Surový produkt (**9**) byl purifikován pomocí sloupcové chromatografie.

### Charakterizace produktu (9):

Produkt je směs dvou diastereoisomerů A a B. **Výtěžek:** 4,441 g (85 %); nažloutlý amorf; **<sup>1</sup>H NMR:** (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ (ppm): 8.25 (d, *J* = 7.4 Hz, 1H); 8.15 (d, *J* = 2.8 Hz, 1H<sub>A+B</sub>); 8.13 (d, *J* = 2.8 Hz, 1H<sub>A+B</sub>); 7.45 – 7.27 (m, 6H); 7.21 – 7.00 (m, 8H); 7.00 – 6.93 (m, 2H); 6.93 – 6.82 (m, 2H); 5.25 – 5.14 (m, 1H); 5.15 – 5.01 (m, 2H); 4.87 – 4.75 (m, 1H); 3.77 (s, 3H<sub>A+B</sub>); 3.66 (s, 3H<sub>A+B</sub>); 3.33 (s, 1H<sub>A+B</sub>); 3.16 (s, 3H<sub>A+B</sub>); 3.09 – 2.99 (m, 2H); 2.94 – 2.84 (m, 1H); 2.81 – 2.71 (m, 1H); **<sup>13</sup>C NMR:** (101 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ (ppm): 170.58; 164.18; 155.53; 136.97; 136.84; 136.45; 135.38; 135.19; 132.90; 132.83; 132.41; 132.32; 129.69; 129.61; 129.49; 129.32; 129.23; 129.04; 128.71; 128.66; 128.58; 128.53; 128.43; 127.95; 127.91; 127.07; 126.91; 126.87; 122.57; 114.57; 114.48; 71.70; 61.76; 55.45; 55.01; 50.66; 50.48; 38.37; 37.23; 32.29; **HRMS m/z:** pro C<sub>34</sub>H<sub>34</sub>ClN<sub>3</sub>O<sub>5</sub> vypočteno: 600.22598 [M+H]<sup>+</sup>; 622.20792 [M+Na]<sup>+</sup>; 638.18186 [M+K]<sup>+</sup>; nalezeno: 600.22729 [M+H]<sup>+</sup>; 622.20856 [M+Na]<sup>+</sup>; 638.18201 [M+K]<sup>+</sup>; **Elementární analýza:** pro C<sub>34</sub>H<sub>34</sub>ClN<sub>3</sub>O<sub>5</sub> vypočteno: C 68.05; H 5.71; N 7.00; nalezeno: C 68.34±0.32 H 5.77±0.06; N 7.45±0.1.

### 5.6 Příprava 2-(benzyloxy)-5-chlor-*N*-((*S*)-1-oxo-1-(((*S*)-1-oxo-3-fenylpropan-2-yl)amino)-3-fenylpropan-2-yl)benzamidů



	9	LiAlH <sub>4</sub>	THF	10
M [g/mol]	600,1	37,95	-	541,04
ekv	1	1,25+0,5	-	1
n [mmol]	2,16	2,7+1,08	-	2,16
m [g]	<b>1,3</b>	<b>0,102+0,04</b>	-	<b>1,168</b>
V [ml]	-	-	<b>50</b>	-

### Pracovní postup:

Postup byl převzat a upraven z literatury.<sup>28</sup>

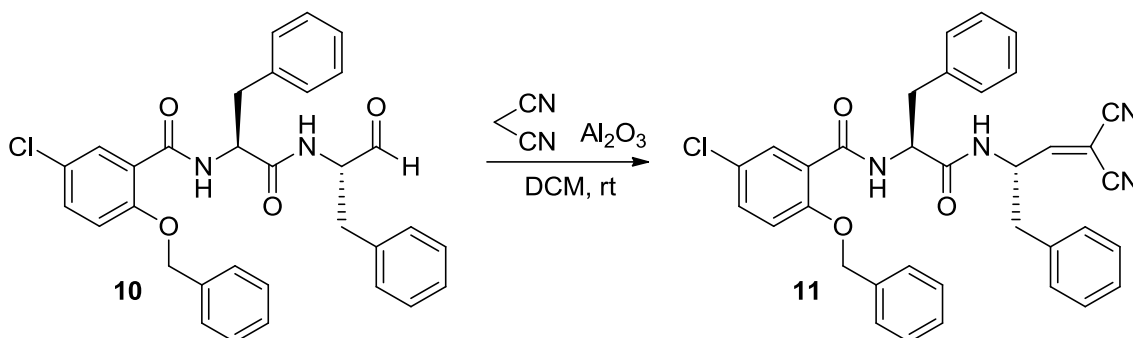
Reakce byla prováděna na lince vakuum-inert.

Do 100 ml vysekurované baňky opatřené magnetickým míchadlem a teploměrem byl pod inertní atmosférou dusíku pomocí injekční stříkačky přes septum předložen Weinreb amid (**9**; 1,3 g; 2,16 mmol) rozpuštěný v bezvodém THF (50 ml). RS byla vychlazena na -20 °C a následně byl po částech přidáván hydrid hlinito-lithný (LiAlH<sub>4</sub>, 0,102 g; 2,7 mmol) po dobu 10 minut. Reakce byla monitorována pomocí TLC. Po 1,5 hod byl přidán další podíl LiAlH<sub>4</sub> (0,04 g; 1,08 mmol). Po vymizení výchozí látky (2 hodiny) byla reakce ukončena přidavkem nasyceného roztoku NH<sub>4</sub>Cl (15 ml) a vodným roztokem 5% HCl (20 ml). RS byla extrahována EtOAc (3 x 30 ml) a spojené organické frakce vodou (1 x 20 ml). Organická fáze byla vysušena bezvodým Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>. Filtrací sušidla a oddestilováním organických rozpouštědel za sníženého tlaku byl získán požadovaný aldehyd (**10**). Surový produkt byl dle provedených analýz získán v dostatečné čistotě, proto nebyl dále jinak purifikován.

### Charakterizace produktu (**10**):

Produkt je směs dvou diastereoisomerů A a B. **Výtěžek:** 1,12 g (96 %); bílá pevná látka; teplota tání: 160,5-163,5 °C; **<sup>1</sup>H NMR:** (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ (ppm): 9.49 (s, 1H); 8.27 (d, *J* = 7.3 Hz, 1H); 8.14 (d, *J* = 2.8 Hz, 1H<sub>A+B</sub>); 8.09 (d, *J* = 2.8 Hz, 1H<sub>A+B</sub>); 7.44 – 7.34 (m, 4H); 7.35 – 7.28 (m, 2H); 7.23 – 7.13 (m, 3H); 7.13 – 7.06 (m, 3H); 7.06 – 7.00 (m, 2H); 7.00 – 6.96 (m, 2H); 6.95 – 6.92 (m, 1H); 6.82 (d, *J* = 6.6 Hz, 1H); 5.09 (q, *J* = 11.3 Hz, 2H); 4.81 (dd, *J* = 14.4, 7.5 Hz, 1H); 4.52 (dd, *J* = 13.7, 6.6 Hz, 1H); 3.14 – 2.91 (m, 3H); 2.78 (dd, *J* = 14.1, 7.8 Hz, 1H); **<sup>13</sup>C NMR:** (101 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ (ppm): 198.95; 171.35; 164.40; 155.57; 136.78; 135.81; 135.10; 133.03; 132.36; 129.46; 129.37; 129.28; 129.22; 129.03; 128.92; 128.80; 128.77; 128.06; 127.25; 127.16; 127.11; 127.08; 122.31; 114.46; 71.88; 59.92; 59.67; 55.29; 54.94; **HRMS m/z:** pro C<sub>32</sub>H<sub>29</sub>ClN<sub>2</sub>O<sub>4</sub> vypočteno: 541.18942 [M+H]<sup>+</sup>; 563.17136 [M+Na]<sup>+</sup>; nalezeno: 541.19049 [M+H]<sup>+</sup>; 563.17291 [M+Na]<sup>+</sup>; **Elementární analýza:** pro C<sub>32</sub>H<sub>29</sub>ClN<sub>2</sub>O<sub>4</sub> vypočteno: C 71.04; H 5.40; N 5.18; nalezeno: C 71.11±0.22; H 5.60±0.01; N 5.46±0.37.

**5.7 Příprava 2-(benzyloxy)-5-chlor-*N*-((*S*)-1-(((*S*)-4,4-dikyan-1-fenylbut-3-en-2-yl)amin)-1-oxo-3-fenylpropan-2-yl)benzamidu**



	<b>10</b>	CH <sub>2</sub> (CN) <sub>2</sub>	Al <sub>2</sub> O <sub>3</sub>	DCM	<b>11</b>
M [g/mol]	541,04	66,06	101,96	-	589,08
ekv	1	3,1	3,71	-	1
n [mmol]	0,924	2,86	3,43	-	0,924
m [g]	<b>0,5</b>	0,189	<b>0,349</b>	-	<b>0,544</b>
V [ml]	-	<b>0,180</b>	-	<b>25</b>	-
ρ [g/ml]	-	1,049	-	-	-

Pracovní postup:

Postup byl převzat a upraven z literatury.<sup>46</sup>

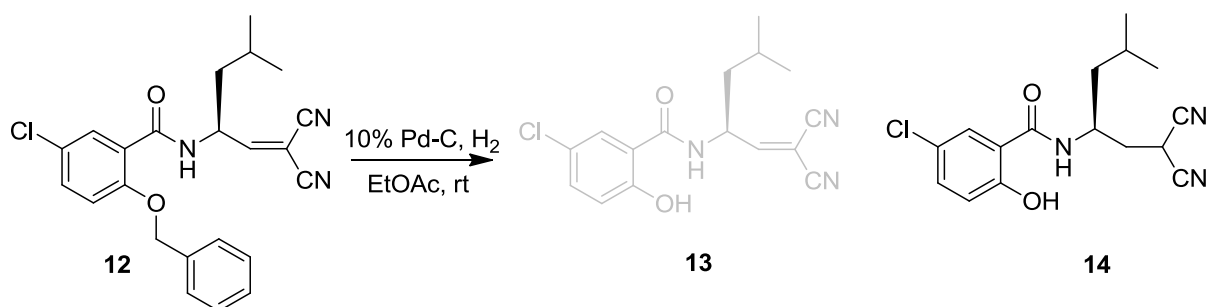
Do 50 ml baňky opatřené magnetickým míchadlem byl předložen aldehyd (**10**; 0,5 g; 0,924 mmol) a rozpuštěn v DCM (25 ml). Následně byl přidán malonitril (0,180 ml; 2,86 mmol) a přisypán Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub> (0,349 g; 3,48 mmol). Reakční směs byla míchána 24 hodin. Druhý den byla reakce ukončena nasyceným roztokem NH<sub>4</sub>Cl (10 ml) a extrahována DCM (3 x 20 ml) a vodou (1 x 20 ml). Organická fáze byla vysušena bezvodým Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>. Produkt (**11**) byl izolován sloupcovou chromatografií.

Charakteristika produktu (**11**):

Produkt je směs dvou diastereoisomerů A a B. **Výtěžek:** 0,13 g (24 %); světle oranžová sraženina; <sup>1</sup>H NMR: (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ (ppm): 8.39 - 8.32 (m, 1H); 8.11 (d, *J* = 2.7 Hz 1H<sub>A+B</sub>); 8.09 (d, *J* = 2.7 Hz, 1H<sub>A+B</sub>); 7.50 – 7.31 (m, 6H); 7.25 – 7.11 (m, 7H); 7.08 – 6.72 (m, 6H); 5.19 – 5.06 (m, 2H); 4.90 – 4.72 (m, 2H); 3.02 – 2.68 (m, 4H); <sup>13</sup>C NMR: (126 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ (ppm): 171.15; 166.81; 166.70; 164.49; 155.55; 155.51; 136.40; 136.38; 134.81; 134.69; 133.96; 133.17; 133.14; 132.02; 131.97; 129.26; 129.20; 129.17; 129.14; 129.06; 129.01; 128.66; 128.62; 128.10; 127.99; 127.81; 127.65; 127.07; 127.06; 126.92; 126.90;

121.73; 121.65; 114.36; 111.76; 111.73; 109.91; 109.88; 90.07; 89.98; 71.88; 71.73; 55.04; 54.66; 52.40; 52.30; 38.89; 38.84; 36.97; 36.86; **HRMS m/z**: pro  $C_{35}H_{29}ClN_4O_3$  vypočteno: 589.20010  $[M+H]^+$ ; 611.18204  $[M+Na]^+$ ; nalezeno: 589.20105  $[M+H]^+$ ; 611.18280  $[M+Na]^+$ ; **Elementární analýza**: pro  $C_{35}H_{29}ClN_4O_3$  vypočteno: C 71.36; H 4.96; N 9.51; nalezeno: C 69.77±0.02; H 4.86±0.02; N 9.92±0.21.

### 5.8 Příprava (S)-5-chlor-N-(1,1-dikyano-5-methylhexan-3-yl)-2-hydroxybenzamidů



	<b>12</b>	10% Pd-C	EtOAc	<b>13</b>	<b>14</b>
M [g/mol]	407,87	-	-	317,77	319,78
ekv	1	-	-	1	1
n [mmol]	0,49	-	-	0,49	0,49
m [g]	<b>0,2</b>	<b>0,05</b>	-	<b>0,156</b>	<b>0,157</b>
V [ml]	-	-	<b>55</b>	-	-

#### Pracovní postup:

Postup byl převzat a upraven z literatury.<sup>47</sup>

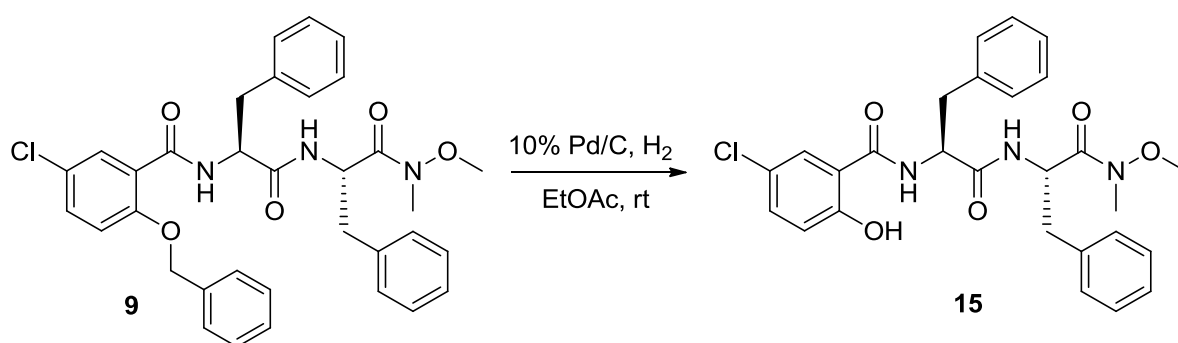
Do 250 ml baňky opatřené magnetickým míchadlem byl předložen dikyanovinylen (**12**; 0,2 g; 0,49 mmol) a rozpuštěn v EtOAc (55 ml). Následně byl přidán katalyzátor 10% Pd/C (0,05 g) a hydrogenátor s vodíkem. Reakční směs byla míchána 24 hodin. Druhý den byl katalyzátor odfiltrován přes skládaný filtr. Organické rozpouštědlo z filtrátu bylo oddestilováno.

#### Charakteristika produktu (**14**):

**Výtěžek:** 0,1 g (64 %); bílý prášek; teplota tání: 123,0-124,6 °C; **<sup>1</sup>H NMR:** (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ (ppm): 7.39 – 7.32 (m, 2H); 6.98 – 6.91 (m, 1H); 6.23 (d, *J* = 8.4 Hz, 1H); 4.42 (bs, 1H); 3.98 (dd, *J* = 8.7, 5.7 Hz, 1H); 2.42 – 2.30 (m, 1H); 2.27 – 2.16 (m, 1H); 1.75 – 1.58 (m,

3H); 1.52 – 1.41 (m, 1H); 0.97 (dd,  $J = 9.2, 6.4$  Hz, 6H);  $^{13}\text{C}$  NMR: (101 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  (ppm): 169.87; 160.36; 134.93; 125.34; 123.76; 120.60; 114.58; 112.97; 112.84; 46.41; 43.79; 37.47; 25.19; 23.02; 21.98, 20.63; **HRMS m/z**: pro  $\text{C}_{16}\text{H}_{18}\text{ClN}_3\text{O}_2$  vypočteno: 320.11603  $[\text{M}+\text{H}]^+$ ; 342.09798  $[\text{M}+\text{Na}]^+$ ; 358.07191  $[\text{M}+\text{K}]^+$ ; nalezeno: 320.11658  $[\text{M}+\text{H}]^+$ ; 342.09863  $[\text{M}+\text{Na}]^+$ ; 358.07260  $[\text{M}+\text{K}]^+$ ; **Elementární analýza**: pro  $\text{C}_{16}\text{H}_{18}\text{ClN}_3\text{O}_2$  vypočteno: C 60.09; H 5.07; N 13.14; vypočteno: C 60.32; H 5.76; N 12.82.

### 5.9 Příprava 5-chlor-2-hydroxy-*N*-((*S*)-1-(((*S*)-1-(methoxy(methyl)amino)-1-oxo-3-fenylpropan-2-yl)amino)-1-oxo-3-fenylpropan-2-yl)benzamidů



	<b>9</b>	10% Pd/C	EtOAc	<b>15</b>
M [g/mol]	600,1	-	-	509,98
ekv	1	-	-	1
n [mmol]	1,33	-	-	1,33
m [g]	<b>0,8</b>	<b>0,1</b>	-	<b>0,678</b>
V [ml]	-	-	<b>60</b>	-

#### Pracovní postup:

Postup byl převzat a upraven z literatury.<sup>47</sup>

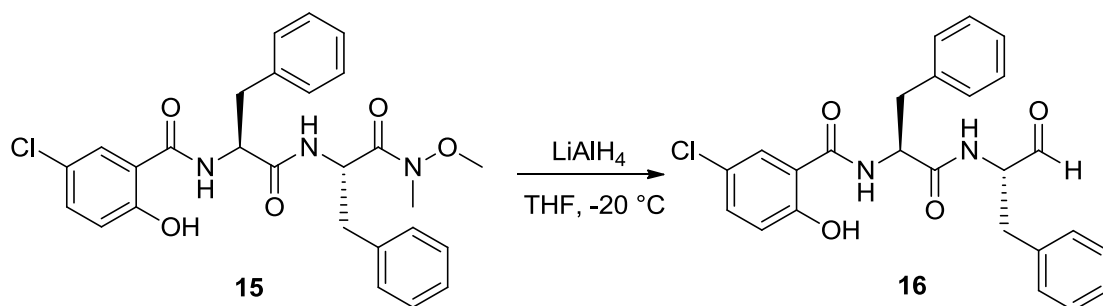
Do 250 ml baňky opatřené magnetickým míchadlem byl předložen Weinreb amid (**9**; 0,8 g; 1,33 mmol) a rozpuštěn v EtOAc (60 ml). Následně byl přidán katalyzátor 10% Pd/C (0,1 g) a hydrogenátor s vodíkem. Reakční směs byla míchána 24 hodin. Druhý den byl katalyzátor odfiltrován přes skládaný filtr. Organické rozpouštědlo z filtrátu bylo oddestilováno za vzniku tuhé amorfnní látky.



### Charakterizace produktu (**15**):

Produkt je směs dvou diastereoisomerů A a B. **Výtěžek:** 0,652 g (96 %); amorf;  
**<sup>1</sup>H NMR:** (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ (ppm): 12.12 (bs, 1H); 7.43 (d, *J* = 7.1 Hz, 1H); 7.37 (d, *J* = 2.2 Hz, 1H); 7.33 – 7.16 (m, 9H); 7.08 (d, *J* = 6.8 Hz, 2H); 6.88 (d, *J* = 8.8 Hz, 1H); 6.75 (d, *J* = 8.0 Hz, 1H); 5.24 (dd, *J* = 14.2, 7.0 Hz, 1H); 4.85 (q, *J* = 6.9 Hz, 1H); 3.74 (s, 3H<sub>A+B</sub>); 3.66 (s, 3H<sub>A+B</sub>); 3.23 (s, 3H<sub>A+B</sub>); 3.22 (s, 3H<sub>A+B</sub>); 3.17 – 3.08 (m, 3H); 2.95 – 2.87 (m, 1H);  
**<sup>13</sup>C NMR:** (126 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ (ppm): 171.08; 170.20; 168.45; 160.06; 136.13; 135.84; 135.79; 134.22; 134.15; 129.39; 129.35; 128.69; 128.63; 128.47; 127.21; 127.08; 125.58; 123.38; 119.91; 114.81; 61.62; 60.45; 54.42; 50.75; 38.26; 38.19; 32.20; 14.22; **HRMS m/z:** pro C<sub>27</sub>H<sub>28</sub>ClN<sub>3</sub>O<sub>5</sub> vypočteno: 510.17903 [M+H]<sup>+</sup>; 532.16097 [M+Na]<sup>+</sup>; 548.13491 [M+K]<sup>+</sup>; nalezeno: 510.17819 [M+H]<sup>+</sup>; 532.16022 [M+Na]<sup>+</sup>; 548.13422 [M+K]<sup>+</sup>; **Elementární analýza:** pro C<sub>27</sub>H<sub>28</sub>ClN<sub>3</sub>O<sub>5</sub> vypočteno: C 63.59; H 5.53; N 8.24; nalezeno C 63.14±0.20; H 5.65±0.05 N 7.71±0.30.

### 5.10 Příprava 5-chlor-2-hydroxy-*N*-((*S*)-1-oxo-1-(((*S*)-1-oxo-3-fenylpropan-2-yl)amino)-3-fenylpropan-2-yl)benzamidů



	<b>15</b>	LiAlH <sub>4</sub>	THF	<b>16</b>
M [g/mol]	509,98	37,95	-	450,91
ekv	1	1,25+0,5+0,5	-	1
n [mmol]	3,66	4,575+1,83+1,83	-	3,66
m [g]	<b>1,866</b>	<b>0,173+0,07+0,07</b>	-	<b>1,650</b>
V [ml]	-	-	<b>80</b>	-

### Pracovní postup:

Postup byl převzat a upraven z literatury.<sup>28</sup>

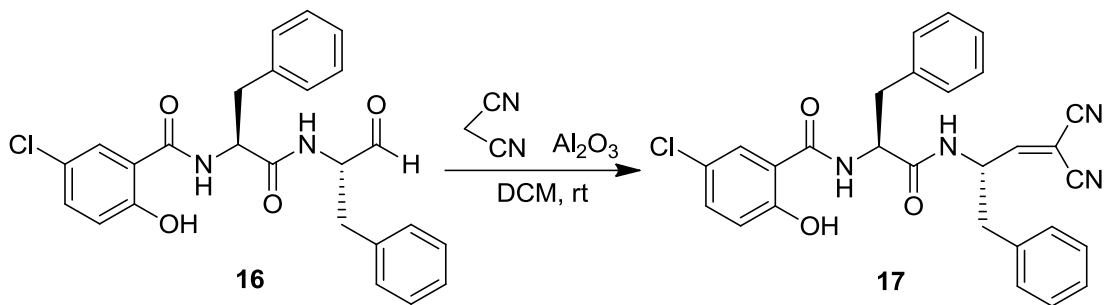
Reakce byla prováděna na lince vakuum-inert.

Do 250 ml vysekurované baňky opatřené magnetickým míchadlem a teploměrem byl pod inertní atmosférou dusíku pomocí injekční stříkačky přes septum předložen Weinreb amid (**15**; 1,866 g; 3,66 mmol) rozpuštěný v bezvodém THF (80 ml). RS byla vychlazena na -20 °C a následně byl po částech přidáván LiAlH<sub>4</sub> (0,173 g; 4,575 mmol) po dobu 15 minut. Reakce byla monitorována TLC. Po 1,5 hod byl přidán další podíl LiAlH<sub>4</sub> (0,07 g; 1,83 mmol). Po 2 hodinách od posledního přídavku byl přidán ještě další podíl LiAlH<sub>4</sub> (0,07 g; 1,83 mmol). Po vymizení výchozí látky byla reakce ukončena přídavkem nasyceného roztoku NH<sub>4</sub>Cl (20 ml) a vodným roztokem 5% HCl (20 ml). Vodná fáze byla extrahována EtOAc (3 x 30 ml) a spojené organické frakce vodou (1 x 40 ml). Organická fáze byla vysušena bezvodým Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>. Filtrací sušidla a oddestilováním organického rozpouštědla byl získán požadovaný aldehyd (**16**). Produkt byl purifikován sloupcovou chromatografií.

### Charakteristika produktu (16):

Produkt je směs dvou diastereoisomerů A a B. **Výtěžek:** 1,444 g (88 %); nažloutlý amorf; **<sup>1</sup>H NMR:** (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ (ppm): 11.90 – 11.61 (m, *J* = 28.2 Hz, 4H); 9.35 (s, 1H<sub>A+B</sub>); 9.31 (s, 1H<sub>A+B</sub>); 7.41 – 7.22 (m, 1H); 7.22 – 7.15 (m, 1H); 7.15 – 6.94 (m, 9H); 6.87 (dd, *J* = 9.0, 7.5 Hz, 2H<sub>A+B</sub>); 6.82 (dd, *J* = 10.4, 4.6 Hz, 2H<sub>A+B</sub>); 6.73 – 6.64 (m, 1H); 6.20 (d, *J* = 6.4 Hz, 1H<sub>A+B</sub>); 6.06 (d, *J* = 6.5 Hz, 1H<sub>A+B</sub>); 4.68 – 4.56 (m, 1H); 4.56 – 4.45 (m, *J* = 19.9, 6.7 Hz, 1H); 3.10 – 2.69 (m, 4H); **<sup>13</sup>C NMR:** (126 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ (ppm): 197.87; 170.90; 168.66; 168.64; 159.97; 159.92; 135.94; 135.88; 135.00; 134.86; 134.43; 134.39; 129.26; 129.21; 129.20; 128.97; 128.95; 128.88; 127.50; 127.43; 127.38; 125.60; 123.51; 119.98; 119.95; 114.57; 60.48; 59.80; 59.74; 54.91; 54.75; 38.30; 38.18; 35.02; 34.97; 21.12; 14.22; **HRMS m/z:** pro C<sub>25</sub>H<sub>23</sub>ClN<sub>2</sub>O<sub>4</sub> vypočteno: 451.14191 [M+H]<sup>+</sup>; 473.12386 [M+Na]<sup>+</sup>; nalezeno: 451.14282 [M+H]<sup>+</sup>; 473.12386 [M+Na]<sup>+</sup>; **Elementární analýza:** pro C<sub>25</sub>H<sub>23</sub>ClN<sub>2</sub>O<sub>4</sub> vypočteno: C 66.59; H 5.14; N 6.21; nalezeno: C 65.76±0.11; H 5.26±0.01; N 6.11±0.02.

### 5.11 Příprava 5-chlor-*N*-((*S*)-1-(((*S*)-4,4-dicyano-1-fenylbut-3-en-2-yl)amino)-1-oxo-3-fenylpropan-2-yl)-2-hydroxybenzamidů



	<b>16</b>	CH <sub>2</sub> (CN) <sub>2</sub>	Al <sub>2</sub> O <sub>3</sub>	DCM	<b>17</b>
M [g/mol]	450,91	66,06	101,96	-	498,96
ekv	1	3,1	3,71	-	1
n [mmol]	1,77	5,487	6,57	-	1,77
m [g]	<b>0,800</b>	0,362	<b>0,669</b>	-	<b>0,883</b>
V [ml]	-	<b>0,346</b>	-	<b>60</b>	-
ρ [g/ml]	-	1,049	-	-	-

#### Pracovní postup:

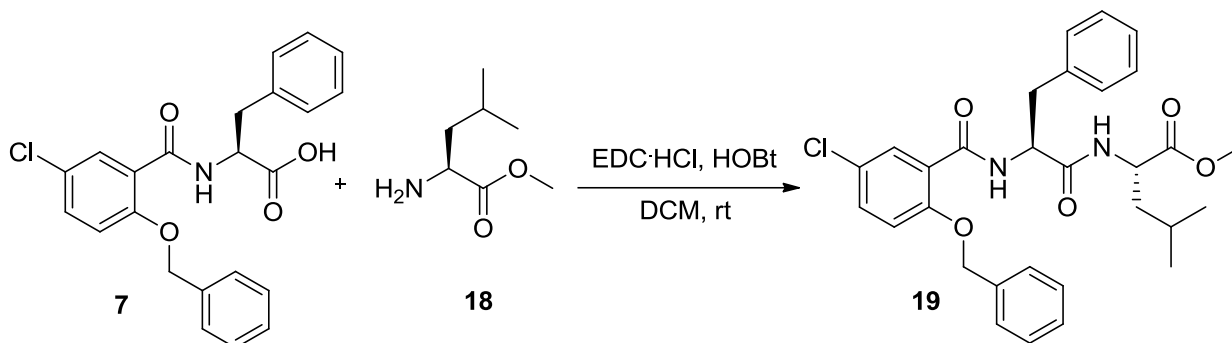
Postup byl převzat a upraven z literatury.<sup>46</sup>

Do 100 ml baňky opatřené magnetickým míchadlem byl předložen aldehyd (**16**; 0,800 g; 1,77 mmol) a rozpuštěn v DCM (60 ml). Následně byl přidán malonitril (0,346 ml; 5,487 mmol) a přisypán Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub> (0,669 g; 6,57 mmol). Reakční směs byla míchána přes víkend. Následně byla ukončena přilítím nasyceného roztoku NH<sub>4</sub>Cl (20 ml) a extrahována DCM (3 x 20 ml) a vodou (1 x 20 ml). Organická fáze byla vysušena bezvodým síranem sodným, rozpouštědlo oddestilováno a produkt (**17**) purifikován sloupcovou chromatografií.

#### Charakterizace produktu (**17**):

**Výtěžek:** 0,085 g (33 %); oranžová pevná látka; teplota tání: 86,0-88,3 °C; struktura byla potvrzena pouze **HRMS m/z**: pro C<sub>28</sub>H<sub>23</sub>ClN<sub>4</sub>O<sub>3</sub> vypočteno: 499.15314 [M+H]<sup>+</sup>; 521.13509 [M+Na]<sup>+</sup>; nalezeno: 499.15457 [M+H]<sup>+</sup>; 521.13654 [M+Na]<sup>+</sup>.

**5.12 Příprava (S)-methyl 2-((S)-2-(2-(benzyloxy)-5-chlorbenzamido)-3-fenylpropanamido)-4-methylpentanoátu**



	O-Me-L-Leu·HCl	K <sub>2</sub> CO <sub>3</sub>	<b>18</b>	<b>7</b>	EDC·HCl	HOBT	DCM	<b>19</b>
M [g/mol]	182,1	138,21	145,2	409,86	191,7	135	-	537,05
ekv	1	1	1	1	1	1	-	1
n [mmol]	9,33	9,33	7,32	7,32	7,32	7,32	-	7,32
m [g]	<b>1,7</b>	<b>1,289</b>	<b>1,062</b>	<b>3</b>	<b>1,403</b>	<b>0,988</b>	-	<b>3,931</b>
V [ml]	-	-	-	-	-	-	<b>80</b>	-

Pracovní postup:

Postup byl převzat a upraven z literatury.<sup>44</sup>

Do 100 ml baňky byl předložen O-Me-L-Leu·HCl (1,7 g; 9,33 mmol), který byl rozpuštěn ve 30 ml vody. Následně byl přidán K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (1,289 g; 9,33 mmol). Po 20 min míchání byla RS extrahována DCM (3 x 30 ml) a spojené organické frakce vodou (2 x 30 ml). Organická fáze byla vysušena Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>. Po odfiltrování sušidla a oddestilování rozpouštědla bylo izolováno 1,062 g (78 %) meziprojektu (**18**), který nebyl dále purifikován.

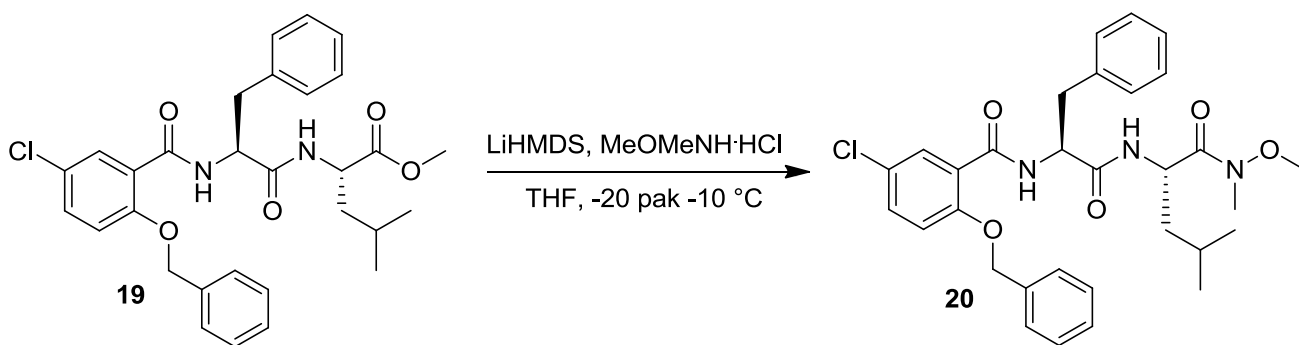
Výchozí kyselina (**7**; 3 g; 7,32 mmol - přepočteno na získané množství meziprojektu **18**) byla předložena do 250 ml baňky a rozpuštěna v DCM (40 ml). Následně bylo přidáno EDC·HCl (1,403 g; 7,32 mmol), HOBT (0,988 g; 7,32 mmol) a připravený meziprojekt (**18**; 1,062 g; 7,32 mmol) rozpuštěný v DCM (40 ml). Reakce byla sledována pomocí TLC a po vymizení výchozí látky asi po dvou hodinách ukončena přilitím EtOAc (50 ml) a vody (50 ml). Směs byla rozdělena v děličce. Vodná fáze byla promyta EtOAc (3 x 30 ml) a spojené organické frakce nasyceným roztokem NaHCO<sub>3</sub> (1 x 30 ml), 5% roztokem kyseliny citronové (1 x 30 ml) a nakonec vodou (1 x 30 ml). Organická fáze byla vysušena Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, následně bylo sušidlo odfiltrováno a organické rozpouštědlo oddestilováno. Reakční směs

byla purifikována pomocí flash chromatografie. Bylo izolováno 3,1 g žlutého, racemického, zakaleného oleje, který byl čištěn krystalizací ze směsi Hex/EtOAc (3/1).

Charakterizace produktu (19):

**Výtěžek:** 1,615 g (41 %) izomeru s 97% ee; olej; **<sup>1</sup>H NMR:** (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ (ppm): 8.39 (d, *J* = 7.4 Hz, 1H); 8.14 (d, *J* = 2.8 Hz, 1H); 7.47 – 7.31 (m, 6H); 7.24 – 7.13 (m, 3H); 7.08 – 7.01 (m, 2H); 6.93 (d, *J* = 8.9 Hz, 1H); 6.65 (d, *J* = 7.9 Hz, 1H); 5.15 (dd, *J* = 30.7, 11.6 Hz, 2H); 4.86 (q, *J* = 7.4 Hz, 1H); 4.59 – 4.47 (m, 1H); 3.70 (s, 3H); 3.08 (dd, *J* = 14.1, 6.5 Hz, 1H); 2.87 (dd, *J* = 14.1, 7.7 Hz, 1H); 1.64 – 1.43 (m, 3H); 0.86 (d, *J* = 6.2 Hz, 6H); **<sup>13</sup>C NMR:** (126 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ (ppm): 172.90; 170.68; 164.10; 155.31; 136.73; 135.04; 132.73; 132.04; 129.19; 129.07; 128.93; 128.49; 127.76; 126.87; 126.78; 122.33; 114.34; 71.53; 54.97; 52.29; 50.93; 41.31; 37.25; 24.78; 22.69; 21.97; **HRMS m/z:** pro C<sub>30</sub>H<sub>33</sub>ClN<sub>2</sub>O<sub>5</sub> vypočteno: 537.21508 [M+H]<sup>+</sup>; 559.19702 [M+Na]<sup>+</sup>; 575.17096 [M+K]<sup>+</sup>; nalezeno: 537.21619 [M+H]<sup>+</sup>; 559.19794 [M+Na]<sup>+</sup>; 575.17181 [M+K]<sup>+</sup>; **Elementární analýza:** pro C<sub>30</sub>H<sub>33</sub>ClN<sub>2</sub>O<sub>5</sub> vypočteno: C 67.09; H 6.19; N 5.22; nalezeno: C 67.36±0.06; H 6.27±0.02; N 5.18±0.02.

**5.13 Příprava 2-(benzyloxy)-5-chlor-*N*-((*S*)-1-(((*S*)-1-(methoxy(methyl)amino)-4-methyl-1-oxopentan-2-yl)amino)-1-oxo-3-fenylpropan-2-yl)benzamidu**



	<b>19</b>	MeOMeNH·HCl	LiHMDS (1M vTHF)	THF	<b>20</b>
M [g/mol]	537,05	97,54	167,33	-	566,08
ekv	1	2,5	7	-	1
n [mmol]	9,87	24,67	69,09	-	9,87
m [g]	<b>5,3</b>	<b>2,4</b>	-	-	<b>5,59</b>
V [ml]	-	-	<b>70</b>	<b>160</b>	-

### Pracovní postup:

Postup byl převzat a upraven z literatury.<sup>45</sup>

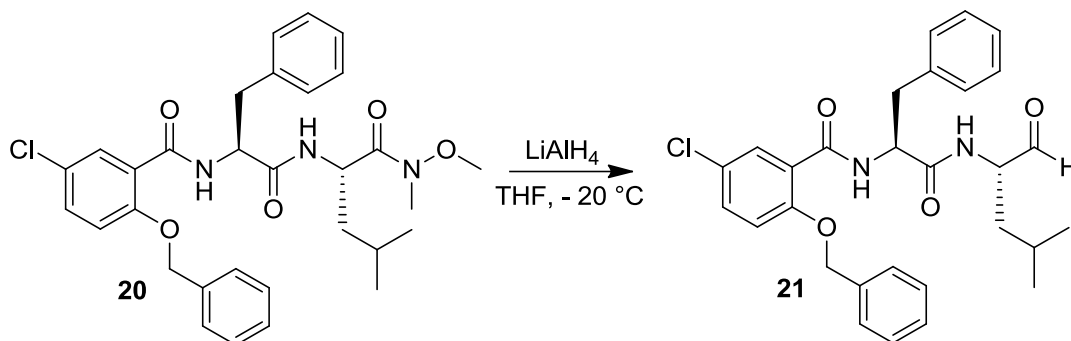
Reakce prováděna na lince inert-vakuum.

Do 500 ml trojhrdlé baňky opatřené magnetickým míchadlem a teploměrem byl předložen MeOMeNH·HCl (2,4 g; 24,67 mmol). Po vysekurování baňky a pod nátokem dusíku byl přidán přes septum methylester (**19**; 5,3 g; 9,87 mmol) rozpuštěný v bezvodém THF (160 ml). Po vychlazení reakční směsi na -20 °C bylo pomocí syringe pump nadávkováno LiHMDS (70 ml; 69,09 mmol) tak, aby teplota reakční směsi nepřekročila -20 °C. Dávkováno bylo asi hodinu a po té byla teplota zvýšena na -10 °C. Reakce byla po 2 hodinách ukončena nasyceným roztokem NH<sub>4</sub>Cl (50 ml). Reakční směs byla rozdělena pomocí děličky. Vodná fáze byla protřepána s Et<sub>2</sub>O (3 x 30 ml) a spojené organické frakce vodou (2 x 20 ml). Nakonec byla organická fáze vysušena bezvodým Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> a produkt byl purifikován sloupcovou chromatografií.

### Charakterizace produktu (**20**):

Produkt je směs dvou diastereoisomerů A a B. **Výtěžek:** 5,227 g (94 %); amorf; **<sup>1</sup>H NMR:** (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ (ppm): 8.38 – 8.30 (m, 1H); 8.14 (t, *J* = 4.9 Hz, 1H); 7.45 – 7.29 (m, 6H); 7.22 – 7.11 (m, 3H); 7.06 – 6.99 (m, 2H); 6.90 (d, *J* = 8.9 Hz, 1H); 6.71 (d, *J* = 8.6 Hz, 1H); 5.14 (dd, *J* = 32.4, 11.8 Hz, 2H); 5.02 (d, *J* = 5.3 Hz, 1H); 4.91 – 4.80 (m, 1H); 3.77 (s, 3H<sub>A+B</sub>); 3.71 (s, 3H<sub>A+B</sub>); 3.20 (s, 3H); 3.11 (dd, *J* = 14.2, 5.8 Hz, 1H); 2.88 (dd, *J* = 14.2, 8.0 Hz, 1H); 1.64 – 1.51 (m, 1H); 1.51 – 1.42 (m, 2H); 0.89 (dd, *J* = 15.6, 6.5 Hz, 6H); **<sup>13</sup>C NMR:** (101 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ (ppm): 170.83; 164.13; 155.46; 136.93; 135.39; 132.75; 132.30; 129.36; 129.17; 128.95; 128.62; 127.83; 127.07; 126.93; 122.79; 114.55; 71.64; 61.77; 55.24; 47.89; 41.97; 37.69; 32.32; 24.95; 23.41; 21.99; **HRMS m/z:** pro C<sub>31</sub>H<sub>36</sub>ClN<sub>3</sub>O<sub>5</sub> vypočteno: 566.24163 [M+H]<sup>+</sup>; 588.22357 [M+Na]<sup>+</sup>; 604.19751 [M+K]<sup>+</sup>; nalezeno: 566.24316 [M+H]<sup>+</sup>; 558.22491 [M+Na]<sup>+</sup>; 604.19879 [M+K]<sup>+</sup>; **Elementární analýza:** pro C<sub>31</sub>H<sub>36</sub>ClN<sub>3</sub>O<sub>5</sub> vypočteno: C 65.77; H 6.41; N 7.42; nalezeno: C 65.84±0.04; H 6.51±0.02; N 7.72±0.07.

#### 5.14 Příprava 2-(benzyloxy)-5-chlor-*N*-((*S*)-1-(((*S*)-4-methyl-1-oxopentan-2-yl)amino)-1-oxo-3-fenylpropan-2-yl)benzamidů



	<b>20</b>	$\text{LiAlH}_4$	THF	<b>21</b>
M [g/mol]	566,08	37,95	-	507
ekv	1	1,25+0,5+0,5	-	1
n [mmol]	2,79	3,49+1,39+1,39	-	2,79
m [g]	<b>1,58</b>	<b>0,13+0,053+0,053</b>	-	<b>1,415</b>
V [ml]	-	-	<b>80</b>	-

#### Pracovní postup:

Postup byl převzat a upraven z literatury.<sup>28</sup>

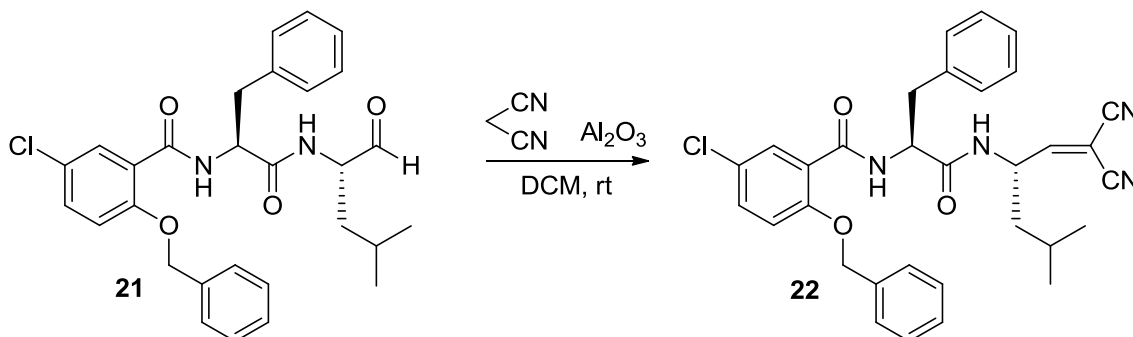
Reakce prováděna na lince inert-vakuum.

Do 250 ml vysekurované baňky opatřené magnetickým míchadlem a teploměrem byl pod inertní atmosférou dusíku přes septum předložen Weinreb amid (**20**; 1,58 g; 2,79 mmol) rozpuštěný v bezvodém THF (80 ml). RS byla vychlazena na  $-20\text{ }^\circ\text{C}$  a následně byl po částech přidáván  $\text{LiAlH}_4$  (0,13 g; 3,49 mmol) po dobu 10 minut. Reakce byla monitorována pomocí TLC. Po 1,5 hod byl přidán další podíl  $\text{LiAlH}_4$  (0,053 g; 1,39 mmol). Po 1 hodině od posledního přidavku byl přidán ještě další podíl  $\text{LiAlH}_4$  (0,053 g; 1,39 mmol). Po vymizení výchozí látky byla reakce ukončena přidavkem nasyceného roztoku  $\text{NH}_4\text{Cl}$  (15 ml) a vodným roztokem 5% HCl (20 ml). RS byla extrahována EtOAc (3 x 50 ml) a spojené organické frakce vodou (1 x 40 ml). Organická fáze byla vysušena bezvodým  $\text{Na}_2\text{SO}_4$ . Po oddestilování organického rozpouštědla byl získán produkt (**21**).

### Charakterizace produktu (**21**):

Produkt je směs dvou diastereoisomerů A a B. **Výtěžek:** 1,322 g (93 %); amorf;  
**<sup>1</sup>H NMR:** (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ (ppm): 9.44 (s, 1H<sub>A+B</sub>); 9.37 (s, 1H<sub>A+B</sub>); 8.41 (d, *J* = 7.2 Hz, 1H); 8.14 – 8.09 (m, 1H); 7.48 – 7.33 (m, 6H); 7.25 – 7.15 (m, 3H); 7.09 – 7.02 (m, 2H); 6.99 – 6.92 (m, 1H); 6.79 – 6.63 (m, 1H); 5.28 – 5.04 (m, 2H); 4.94 – 4.78 (m, 1H); 4.44 – 4.23 (m, 1H); 3.11 – 2.96 (m, 1H); 2.95 – 2.79 (m, 1H); 1.68 – 1.47 (m, 2H); 1.43 – 1.29 (m, 1H); 0.94 – 0.77 (m, 6H); **<sup>13</sup>C NMR:** (126 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ (ppm): 199.67; 171.25; 164.26; 155.36; 136.58; 134.94; 132.87; 132.03; 131.99; 129.38; 129.15; 129.10; 129.02; 129.00; 128.84; 128.60; 127.94; 127.88; 126.88; 126.94; 122.19; 114.37; 114.33; 71.70; 71.65; 57.34; 57.24; 55.12; 55.01; 37.51; 37.38; 37.28; 24.61; 24.47; 23.03; 22.98; 21.84; 21.78; **HRMS m/z:** pro C<sub>29</sub>H<sub>31</sub>ClN<sub>2</sub>O<sub>4</sub> vypočteno: 507.20451 [M+H]<sup>+</sup>; 529.18646 [M+Na]<sup>+</sup>; 545.16039 [M+K]<sup>+</sup>; nalezeno: 507.20523 [M+H]<sup>+</sup>; 529.18707 [M+Na]<sup>+</sup>; 545.16107 [M+K]<sup>+</sup>; **Elementární analýza:** pro C<sub>29</sub>H<sub>32</sub>ClN<sub>2</sub>O<sub>4</sub> vypočteno: C 68.70; H 6.16; N 5.53; nalezeno: C 68.58±0.20; H 6.32±0.02; N 5.28±0.01

### 5.15 Příprava 2-(benzyloxy)-5-chlor-*N*-((*S*)-1-(((*S*)-1,1-dicyano-5-methylhex-1-en-3-yl)amino)-1-oxo-3-fenylpropan-2-yl)benzamidů



	<b>21</b>	CH <sub>2</sub> (CN) <sub>2</sub>	Al <sub>2</sub> O <sub>3</sub>	DCM	<b>22</b>
M [g/mol]	507,02	66,06	101,96	-	555,07
ekv	1	3,1	3,71	-	1
n [mmol]	1,66	5,146	6,156	-	1,66
m [g]	<b>0,84</b>	0,339	<b>0,627</b>	-	<b>0,921</b>
V [ml]	-	<b>0,323</b>	-	<b>60</b>	-
ρ [g/ml]	-	1,049	-	-	-



### Pracovní postup:

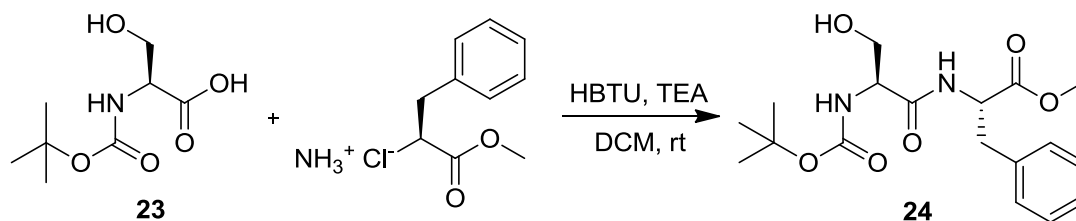
Postup byl převzat a upraven z literatury.<sup>46</sup>

Do 100 ml baňky opatřené magnetickým míchadlem byl předložen aldehyd (**22**; 0,84 g; 1,66 mmol) a rozpuštěn v DCM (60 ml). Následně byl přidán malonitril (0,323 ml; 5,146 mmol) a přisypán Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub> (0,627 g; 6,156 mmol). Po 24 hodinách byla reakce ukončena přilítím nasyceného roztoku NH<sub>4</sub>Cl (20 ml) a extrahována DCM (3 x 20 ml) a vodou (1 x 20 ml). Organická fáze byla vysušena bezvodým Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>. Produkt (**23**) byl purifikován sloupcovou chromatografií.

### Charakterizace produktu (**22**):

Produkt je směs dvou diastereoisomerů A a B. **Výtěžek:** 0,56 g (61 %); amorf; **<sup>1</sup>H NMR:** (400 MHz, DMSO) δ (ppm): 8.70 – 8.56 (m, 1H<sub>A+B</sub>); 8.56 – 8.42 (m, 1H<sub>A+B</sub>); 7.79 – 7.67 (m, 1H); 7.60 – 7.35 (m, 6H); 7.35 – 7.28 (m, 1H); 7.28 – 7.18 (m, 3H); 7.10 (d, *J* = 7.5 Hz, 2H); 5.40 – 5.25 (m, 2H); 4.86 – 4.73 (m, 1H); 4.69 – 4.50 (m, 1H); 3.11 – 2.95 (m, 1H<sub>A+B</sub>); 2.89 – 2.74 (m, 1H<sub>A+B</sub>); 1.79 – 1.24 (m, 3H); 1.01 – 0.75 (m, 6H); **<sup>13</sup>C NMR:** (101 MHz, DMSO) δ (ppm): 171.58; 171.45; 171.25; 170.50; 163.72; 163.53; 155.55; 137.61; 137.47; 136.55; 136.48; 132.70; 132.65; 130.64; 130.55; 129.76; 129.66; 129.21; 129.15; 128.92; 128.87; 128.79; 128.73; 128.60; 128.56; 127.18; 127.12; 125.45; 125.41; 124.56; 124.45; 116.51; 116.47; 113.12; 111.47; 111.44; 88.24; 87.96; 71.26; 54.94; 54.81; 49.81; 49.60; 41.12; 38.67; 38.28; 24.53; 24.37; 23.29; 23.10; 22.26; 21.98; **HRMS m/z:** pro C<sub>32</sub>H<sub>31</sub>ClN<sub>4</sub>O<sub>3</sub> vypočteno: 555.21575 [M+H]<sup>+</sup>; 577.19769 [M+Na]<sup>+</sup>; 593.17163 [M+K]<sup>+</sup>; nalezeno: 555.21735 [M+H]<sup>+</sup>; 577.19922 [M+Na]<sup>+</sup>; 593.17303 [M+K]<sup>+</sup>; **Elementární analýza:** pro C<sub>32</sub>H<sub>31</sub>ClN<sub>4</sub>O<sub>3</sub> vypočteno: C 69.24; H 5.63; N 10.09; nalezeno: 69.54±0.24; H 5.69±0.01; N 9.89±0.22.

**5.16 Příprava (S)-methyl 2-((S)-2-((tert-butoxykarbonyl)amino)-3-hydroxypropanamido)-3-fenylpropanoátu**



	<b>23</b>	O-Me-L-Phe·HCl	HBTU	TEA	DCM	<b>24</b>
M [g/mol]	205,21	215,68	379,24	101,19	-	366,41
ekv	1	1,2	1,2	2	-	1
n [mmol]	9,71	11,65	11,65	19,42	-	9,71
m [g]	<b>1,993</b>	<b>2,513</b>	<b>4,417</b>	1,965	-	<b>3,557</b>
V [ml]	-	-	-	<b>2,71</b>	<b>40</b>	-
ρ [g/ml]	-	-	-	0,7255	-	-

Pracovní postup:

Postup byl převzat a upraven z literatury.<sup>48</sup>

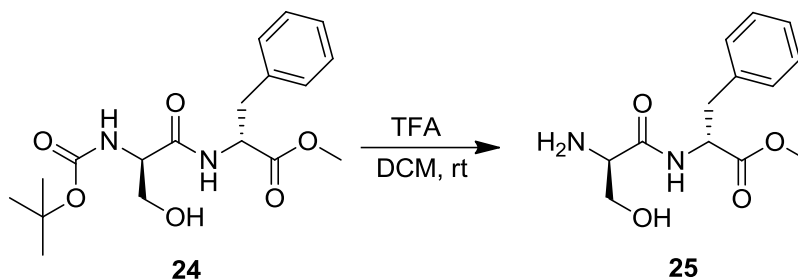
Do 100 ml baňky opatřené magnetickým míchadlem byla předložena aminokyselina serin (**23**; 1,993 g; 9,71 mmol) a rozpuštěna v DCM (40 ml). Následně byl přidán O-Me-L-Phe·HCl (2,513 g; 11,65 mmol), přikapán TEA (2,71 ml; 19,42 mmol) a přisypáno HBTU (4,417 g; 11,65 mmol). Reakce byla míchána přes noc. Druhý den bylo oddestilováno rozpouštědlo a destilační zbytek byl rozpuštěn v EtOAc (100 ml). Organická fáze byla extrahována nasyceným roztokem kyseliny citronové (3 x 50 ml) a nasyceným roztokem NaHCO<sub>3</sub>. (3 x 30 ml). Organická fáze byla vysušena Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>.

Charakterizace produktu (**24**):

**Výtěžek:** 3,21 g (90 %); bezbarvý olej; **<sup>1</sup>H NMR:** (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ (ppm): 7.39 – 7.26 (m, 3H); 7.22 – 7.15 (m, 2H); 7.10 (d, *J* = 5.4 Hz, 1H); 5.56 (d, *J* = 7.1 Hz, 1H); 4.96 – 4.85 (m, 1H); 4.28 – 4.17 (m, 1H); 4.04 (d, *J* = 9.9 Hz, 1H); 3.78 (s, 3H); 3.66 (dd, *J* = 11.2, 5.4 Hz, 1H); 3.23 (dd, *J* = 13.9, 5.6 Hz, 1H); 3.11 (dd, *J* = 13.9, 6.9 Hz, 1H); 2.92 (bs, 1H); 1.49 (s, 9H); **<sup>13</sup>C NMR:** (101 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ (ppm): 171.99; 171.24; 135.88; 129.37; 128.83; 127.42; 63.12; 55.13; 53.56; 52.70; 37.91; 28.45; **HRMS m/z:** pro C<sub>18</sub>H<sub>26</sub>N<sub>2</sub>O<sub>6</sub> vypočteno: 367.18636 [M+H]<sup>+</sup>; 389.16831 [M+Na]<sup>+</sup>; 405.14224 [M+K]<sup>+</sup>; nalezeno: 367.20975 [M+H]<sup>+</sup>;

389.16901 [M+Na]<sup>+</sup>; 405.14304 [M+K]<sup>+</sup>; **Elementární analýza:** pro C<sub>18</sub>H<sub>26</sub>N<sub>2</sub>O<sub>6</sub> vypočteno: C 59.00; H 7.15; N 7.65; nalezeno: C 59.24±0.03; H 7.45±0.05; N 7.57±0.03.

### 5.17 Příprava (R)-methyl 2-((R)-2-amino-3-hydroxypropanamido)-3-fenylpropanoátu



	24	DCM	TFA	25
M [g/mol]	366,41	-	114,02	266,13
ekv	1	-	3,8	1
n [mmol]	16,6	-	63,08	16,6
m [g]	<b>6,1</b>	<b>60</b>	7,192	<b>4,418</b>
V [ml]	-	-	<b>4,83</b>	-
ρ [g/ml]	-	-	1,49	-

#### Pracovní postup:

Postup byl převzat a upraven z literatury.<sup>48</sup>

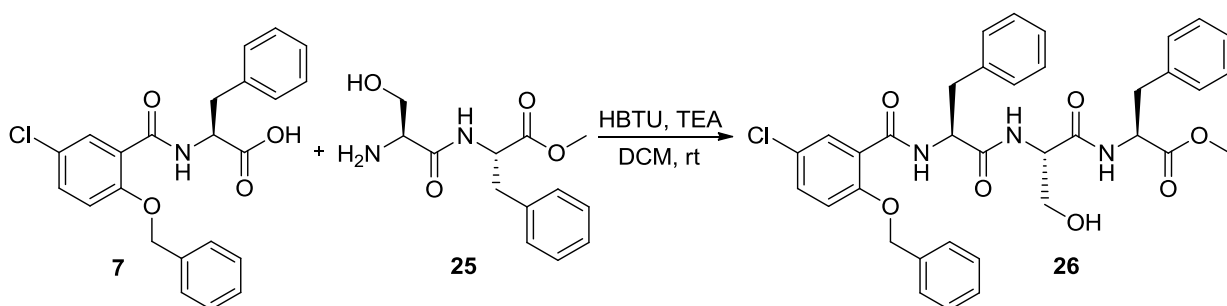
Do 50 ml baňky opatřené magnetickým míchadlem byla předložena výchozí látka (**24**; 6,1 g; 16,6 mmol). Následně bylo přilito rozpouštědlo DCM (60 ml) a RS ochlazena v ledové lázni na teplotu 0°C. Po vychlazení RS byla přikapána TFA (4,83 ml; 63,08 mmol). Reakce byla míchána při rt. 24 h. Druhý den bylo rozpouštědlo odpařeno a vzniklá pevná bílá látka rekrystalizována ze směsi Hex/EtOAc (2/1).

#### Charakterizace produktu (25):

**Výtěžek:** 3,045 g (69 %); bílá pevná látka; teplota tání: 167,8-168,9 °C; **<sup>1</sup>H NMR:** (400 MHz, DMSO) δ (ppm): 8.89 (d, *J* = 7.6 Hz, 1H); 8.13 (s, 2H); 7.34 – 7.26 (m, 2H); 7.26 – 7.18 (m, 3H); 5.55 (bs, 1H); 4.58 – 4.50 (m, 1H); 3.83 – 3.74 (m, 2H); 3.61 (s, 3H); 3.12 – 3.03 (m, 1H); 2.99 – 2.90 (m, 1H); **<sup>13</sup>C NMR:** (101 MHz, DMSO) δ (ppm): 171.94; 167.61; 137.46; 129.75; 129.01; 127.38; 60.94; 54.82; 54.60; 52.72; 37.07; **HRMS m/z:** pro

$C_{13}H_{18}N_2O_4$  vypočteno: 267.13393  $[M+H]^+$ ; 289.11588  $[M+Na]^+$ ; 305.08982  $[M+K]^+$ ;  
nalezeno: 267.13437  $[M+H]^+$ ; 289.11655  $[M+Na]^+$ ; 305.09055  $[M+K]^+$ ; **Elementární  
analýza:** pro  $C_{13}H_{18}N_2O_4$  vypočteno: C 47.37; H 5.04; N 7.37; nalezeno: C 47.69±0.13;  
H 5.02±0.02; N 7.16±0.16.

### 5.18 Příprava (S)-methyl 2-((S)-2-((S)-2-(2-(benzyloxy)-5-chlorbenzamido)-3-fenylpropanamido)-3-hydroxypropanamido)-3-fenylpropanoátu



	7	25	HBTU	TEA	DCM	26
M [g/mol]	409,86	266,13	379,24	101,19	-	658,14
ekv	1	1,2	1,2	2	-	1
n [mmol]	2,44	2,928	2,93	4,88	-	2,44
m [g]	<b>1,126</b>	<b>0,780</b>	<b>1,108</b>	0,493	-	<b>1,605</b>
V [ml]	-	-	-	<b>0,680</b>	<b>30</b>	-
$\rho$ [g/ml]	-	-	-	0,725	-	-

#### Pracovní postup:

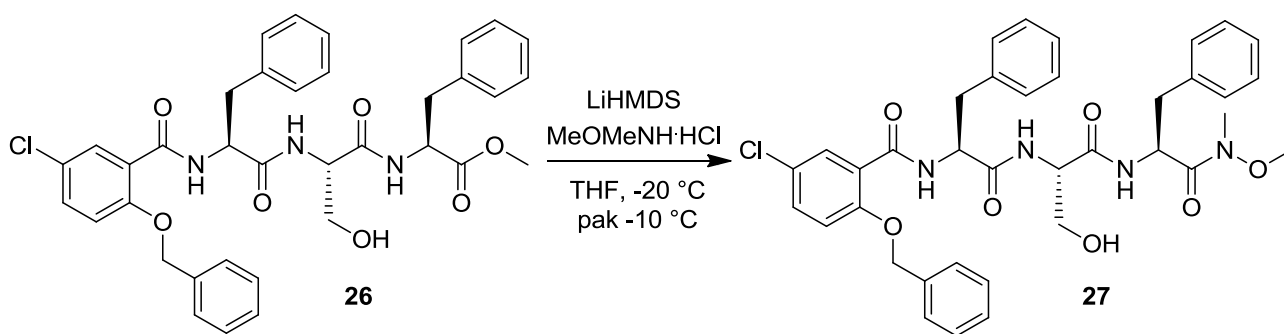
Postup byl převzat a upraven z literatury.<sup>48</sup>

Do 100 ml baňky opatřené magnetickým míchadlem byla předložena kyselina (**7**; 1,126 g; 2,44mmol) a rozpuštěna v DCM (30 ml). Následně byl přisypán methylester (**25**; 0,780 g; 2,928 mmol), přikapán TEA (0,680 ml; 4,88 mmol) a přisypán HBTU (1,108 g; 2,928 mmol). Reakce byla míchána přes víkend. Následně bylo rozpouštědlo oddestilováno a destilační zbytek byl rozpuštěn v EtOAc (30 ml). Extrahováno nasyceným roztokem  $NaHCO_3$  (3 x 30 ml) a vodou (2 x 30 ml). Organická fáze byla vysušena  $Na_2SO_4$ .

#### Charakterizace produktu (**26**):

Produkt je směs dvou diastereoizomerů A+B. **Výtěžek:** 0,885 g (55 %); amorf; **<sup>1</sup>H NMR:** (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ (ppm): 8.45 (d, *J* = 6.3 Hz, 1H<sub>A+B</sub>); 8.34 (d, *J* = 6.3 Hz, 1H<sub>A+B</sub>); 8.11 (d, *J* = 2.8 Hz, 1H<sub>A+B</sub>); 8.06 (d, *J* = 2.8 Hz, 1H<sub>A+B</sub>); 7.45 – 7.32 (m, 6H); 7.25 – 7.12 (m, 6H); 7.12 – 7.07 (m, 2H); 7.04 (d, *J* = 8.0 Hz, 1H); 7.01 – 6.90 (m, 4H); 5.19 – 5.06 (m, 2H); 4.85 – 4.77 (m, 1H); 4.75 – 4.69 (m, 1H); 4.42 – 4.36 (m, 1H); 3.92 (dd, *J* = 11.5, 3.5 Hz, 1H); 3.72 (s, 3H<sub>A+B</sub>); 3.60 (s, 3H<sub>A+B</sub>); 3.50 (dd, *J* = 11.5, 5.0 Hz, 1H); 3.17 (dd, *J* = 14.0, 5.6 Hz, 1H); 3.04 – 2.98 (m, 2H); 2.84 – 2.76 (m, 1H); 2.58 (bs, 1H); **<sup>13</sup>C NMR:** (126 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ (ppm): 171.76; 171.41; 171.16; 170.12; 170.03; 164.63; 164.52; 155.60; 155.44; 136.46; 136.30; 136.18; 135.98; 135.03; 135.01; 133.01; 132.95; 132.09; 132.06; 129.26; 129.19; 129.11; 129.01; 128.71; 128.68; 128.59; 128.47; 128.06; 127.83; 127.14; 127.07; 127.01; 126.93; 126.89; 121.96; 114.41; 114.32; 71.80; 71.65; 62.46; 56.74; 55.80; 54.43; 54.28; 53.74; 53.52; 52.54; 52.37; 37.63; 37.22; **HRMS m/z:** pro C<sub>36</sub>H<sub>36</sub>ClN<sub>3</sub>O<sub>7</sub> vypočteno: 658.23145 [M+H]<sup>+</sup>; 680.21340 [M+Na]<sup>+</sup>; 698.18734 [M+K]<sup>+</sup>; nalezeno: 658.23328 [M+H]<sup>+</sup>; 680.21567 [M+Na]<sup>+</sup>; 696.18970 [M+K]<sup>+</sup>; **Elementární analýza:** pro C<sub>36</sub>H<sub>36</sub>ClN<sub>3</sub>O<sub>7</sub> vypočteno: C 65.70; H 5.51; N 6.38; nalezeno: C 65.91±0.03; H 5.62±0.01; N 6.52±0.02.

### 5.19 Příprava *N*-((5*S*,8*S*,11*S*)-5-benzyl-8-(hydroxymethyl)-3-methyl-4,7,10-trioxo-12-fenyl-2-oxa-3, 6, 9-triazadodekan-11-yl)-2-(benzyloxy)-5-chlorbenzamidu



	26	MeOMeNH·HCl	LiHMDS (1M vTHF)	THF	27
M [g/mol]	658,14	97,54	167,33	-	687,18
ekv	1	2,5	7	-	1
n [mmol]	0,455	1,14	3,18	-	0,455
m [g]	<b>0,3</b>	<b>0,11</b>	-	-	<b>0,312</b>
V [ml]	-	-	<b>3</b>	<b>40</b>	-

Pracovní postup:

Postup byl převzat a upraven z literatury.<sup>45</sup>

Reakce byla prováděna na lince vakuum-inert.

Do 100 ml trojhrdlé baňky opatřené magnetickým míchadlem a teploměrem byl předložen MeOMeNH·HCl (0,11 g; 1,14 mmol). Po vysekurování baňky a pod nátokem dusíku byl přidán přes septum methylester (**26**; 0,3 g; 0,455 mmol) rozpuštěný v bezvodém THF (40 ml). Po vychlazení reakční směsi na -20 °C bylo pomocí syringe pump nadávkováno LiHMDS (3 ml; 3,18 mmol), tak aby teplota reakční směsi nepřekročila -20 °C. Dávkováno bylo asi 15 min. a po té byla teplota zvýšena na -10 °C. Reakce byla po 2 hodinách ukončena nasyceným roztokem NH<sub>4</sub>Cl (20 ml). RS měla být extrahována Et<sub>2</sub>O. Po přilítí Et<sub>2</sub>O se RS vysrážela za vzniku „želé“. Toto „želé“ bylo odfiltrováno na Büchnerově nálevce a filtrát byl znovu extrahován Et<sub>2</sub>O (2 x 20 ml) a následně vodou (1 x 10 ml). Izolovaná sraženina i zbytek z filtrátu byly charakterizovány.

Charakterizace produktu (**27**):

**Výtěžek:** 0,032 g (10 %); zbytek z filtrátu, olej; struktura byla potvrzena pouze **HRMS**  
**m/z:** pro C<sub>37</sub>H<sub>39</sub>ClN<sub>4</sub>O<sub>7</sub> vypočteno: 687.25800 [M+H]<sup>+</sup>; 709.23995 [M+Na]<sup>+</sup>; 725.21389 [M+K]<sup>+</sup>; nalezeno: 687.25775 [M+H]<sup>+</sup>; 709.23956 [M+Na]<sup>+</sup>; 752.21375 [M+K]<sup>+</sup>.

## 6 Výsledky a diskuze

Experimentální část této práce navazuje na již ověřené syntézy v rámci výzkumné skupiny. Příprava dikyanovinolenových (DCV) inhibitorů proteasomu byla inspirována inhibitory proteinkináz, konkrétně molekulou s kyanoethylacetátovou koncovou funkční skupinou. Zda tato úvaha byla správným směrem, nám potvrdí nebo vyvrátí až biologické testy.

Přípravě DCV předcházela reprodukce již známých syntetických kroků. Při přípravě meziprojektu **19** byla zjištěna racemizace, kterou lze u tohoto meziprojektu řešit krystalizací. Zajímavé je, že produkt přechází do filtrátu a enantiomerní přebytek u krystalického podílu je asi 10 %. Racemizace podobného meziprojektu **8** krystalizací řešit nelze, protože oba diastereoizomery jsou krystalické.

U cílové molekuly **17** není interpretováno NMR z důvodu nepřehlednosti ve spektru kvůli vysoké racemizaci, která je nejvíce viditelná na hydroxylovém vodíku fenolu. Zřejmé ale je, že výchozí látka **16** zreagovala, protože v oblasti výskytu aldehydických vodíků se žádný pík nenachází. Struktura byla potvrzena HRMS.

Weinreb amid **27** se podařilo jednoznačně charakterizovat pouze pomocí HRMS. Bylo zjištěno, že produkt se nachází ve zbytku filtrátu a ne ve sraženině. Tento experiment nelze považovat za ukončený a bude předmětem dalšího zkoumání.

Deprotekce benzylové skupiny, pro zvýšení reaktivnosti inhibitoru, byla vyzkoušena na lépe dostupné vzorové molekule **12**. U očekávaného produktu **13** došlo k redukci dvojné vazby na produkt **14**, což bylo potvrzeno HRMS i NMR. Tento pokus prokázal redukci dvojné vazby DCV na jednoduchou, proto bylo přistoupeno k deprotekcii již u meziprojektu s Weinreb amidovou koncovou funkční skupinou, čímž jsme získali další ochráněné meziprojekty vhodné k testování **15**, **16**.

Všechny použité AK mají na  $\alpha$ -uhlíku chirální centrum, proto byla většina připravených sloučenin diastereoizomerní směs. Tento problém je obtížně řešitelný, protože činidlo HOBT ani HOAt racemizaci úplně nezabránilo. Za vyzkoušení by ovšem stálo použití činidla jiné struktury. Alespoň dle literární rešerše se COMU jeví jako jeden z vhodných kandidátů.

## 7 Závěr

Celkem bylo připraveno dvacet jedna látek, které byly charakterizovány dostupnými metodami. Dvě z těchto látek již byly připraveny a testovány v rámci výzkumné skupiny dříve. Konkrétně to byl Weinreb amid **9** a aldehyd **10**. Aldehyd vykazoval vyšší antiproliferativní a aniproteasomální aktivity než Weinreb amid. Osm z těchto nově připravených látek bude v nejbližší době testováno. Dvě látky se bohužel nepodařilo připravit v dostatečném množství a čistotě pro biologické testování a to odchráněný DCV **17** a Weinreb amid **27**.

Aplikací funkčních skupin z kapitoly 4 na tyto salicylamidové struktury by mohly být získány další nové sloučeniny s požadovanými biologickými vlastnostmi. Přístup k syntéze peptidického řetězce by byl shodný s našimi diamidy a doplněn pomocí postupů syntézy funkčních skupin z literatury. Tato úvaha je předmětem dalšího zkoumání.



## 8 Literatura

- (1) Tanaka, K. The proteasome : Overview of structure and functions. *Proc. Jpn. Acad, Ser. B. Phys. Biol. Sci.* **2009**, 85(1), 12-36.
- (2) Sulistio, Y. A.; Heese, K. The Ubiquitin-Proteasome System and Molecular Chaperone Deregulation in Alzheimer's Disease. *Mol. Neurobiol.* **2016**, 53, 905–931.
- (3) Hamada, Y.; Kiso, Y. New Directions for Protease Inhibitors Directed Drug Discovery. *Biopolymers.* **2016**, 106, 563–579.
- (4) Groll, M.; Huber, R. Inhibitors of the eukaryotic 20S proteasome core particle: a structural approach. *Biochim. Biophys. Acta - Mol. Cell Res.* **2004**, 1695, 33–44.
- (5) Braun, H. A.; Umbreen, S.; Groll, M.; et al. Tripeptide Mimetics Inhibit the 20 S Proteasome by Covalent Bonding to the Active Threonines. *J. Biol. Chem.* **2005**, 280, 28394–28401.
- (6) McConkey, D. J.; Zhu, K. Mechanisms of proteasome inhibitor action and resistance in cancer. *Drug Resist. Updat.* **2008**, 11, 164–179.
- (7) Jung, T.; Catalgol, B.; Grune, T. The proteasomal system. *Mol. Aspects Med.* **2009**, 30, 191–296.
- (8) Adamson, C. S. Protease-Mediated Maturation of HIV: Inhibitors of Protease and the Maturation Process. *Mol. Biol. Int.* **2012**.
- (9) Muz, B.; Ghazarian, R. N.; Ou, M.; et al. Spotlight on ixazomib: potential in the treatment of multiple myeloma. *Drug Des. Devel. Ther.* **2016**, 10, 217–226.
- (10) Česká myelomová skupina. Mnohočetný myelom - léčba : Lenalidomid (Revlimid) [online]. [cit. 2018-4-11]. Dostupné z: <http://www.myeloma.cz/index.php?pg=mnohocetny-myelom--lecba--lenalidomid-revlimid>.
- (11) Imnovid. Česká myelomová skupina. [online]. **2016** [cit. 2018-4-14]. Dostupné z: <http://www.myeloma.cz/res/file/brozury/brozura-immnovid-2016.pdf>.

- (12) Zdravotnický deník. Mnohočetný myelom: do ČR míří léky, které prodlouží život o roky. Za cenu, kterou si asi nebudeme moci dovolit. [online]. **2017** [cit. 2018-4-11]. Dostupné z: <http://www.zdravotnickydenik.cz/2017/02/mnohocetny-myelom-do-cr-miri-leky-ktere-prodlouzi-zivot-o-roky-za-cenu-kterou-si-asi-nebudeme-moci-dovolit/>.
- (13) Kubiczková, L.; Matějčková, J.; Sedlářiková, L.; et al. Inhibitory proteazomu v léčbě mnohočetného myelomu *Klin. Onkol.* **2013**, 26, 11–18.
- (14) Al-Warhi, T. I.; Al-Hazimi, H. M. A.; El-Faham, A. Recent development in peptide coupling reagents. *J. Saudi Chem. Soc.* **2012**, 16, 97–116.
- (15) Taylor, P.; Albeicicio, F.; Chinchilla, R.; Dodsworth, D. J. New Trends in Peptide Coupling Reagents. *Org. Prep. Proced. Inc.* **2001**, 33, 205–282.
- (16) Andersson, L.; Blomberg, L.; Flegel, M.; Lepsa, L.; et al. Large-Scale Synthesis of Peptides. *Biopolymers.* **2000**, 55, 227–250.
- (17) Guzmán, F.; Barberis, S.; Illanes, A. Peptide synthesis: chemical or enzymatic. *Electron. J. Biotechnol.* **2007**, 10, 279–314.
- (18) Isidro-Llobet, A.; Álvarez M.; Albericio, F. Amino Acid-Protecting Groups. *Chem. Rev.* **2009**, 109, 2455–2504.
- (19) El-Faham, A.; Albericio, F. Peptide Coupling Reagents, More than a Letter Soup. *Chem. Rev.* **2011**, 111, 6557–6602.
- (20) Jad, Y. E.; Khattab, S. N.; Torre, B. G.; et al. EDC·HCl and Potassium Salts of Oxyma and Oxyma-B as Superior Coupling Cocktails for Peptide Synthesis. *European J. Org. Chem.* **2015**, 3116–3120.
- (21) El-Faham, A.; Funosas, R. S.; Prohens, R.; Albericio, F. COMU: A Safer and More Effective Replacement for Benzotriazole-Based Uronium Coupling Reagents. *Chem. Eur. J.* **2009**, 15, 9404–9416.
- (22) Gut, V.; Flégel, M. Způsob přípravy peptidů odštěpováním *N*-alfa-o-nitrobenzensulfenylové skupiny chránící alfa-aminokyseliny příslušné aminokyseliny. Česká republika. CS221620B1. 15. 5. **1985**.

- (23) Lawrenson, S. B.; Arav, R.; North, M. The greening of peptide synthesis. *Green Chem.* **2017**, *19*, 1685–1691.
- (24) Cromm, P. M.; Crews, C. M. The Proteasome in Modern Drug Discovery: Second Life of a Highly Valuable Drug Target. *ACS Cent. Sci.* **2017**, *3*, 830–838.
- (25) Sosič, I.; Gobec, M.; Brus, B.; Knez, D.; et al. Nonpeptidic Selective Inhibitors of the Chymotrypsin-Like ( $\beta 5i$ ) Subunit of the Immunoproteasome. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2016**, *55*, 5745–5748.
- (26) Rentsch, A.; Landsberg, D.; Brodmann, T.; et al. Synthesis and Pharmacology of Proteasome Inhibitors. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2013**, *52*, 5450–5488.
- (27) Zang, M.; Li, Z.; Liu, L.; Li, F.; et al. Anti-tumor activity of the proteasome inhibitor BSc2118 against human multiple myeloma. *Cancer Lett.* **2015**, *366*, 173–181.
- (28) Jorda, R.; Dušek, J.; Řezníčková, E.; Pauk, K.; et al. Synthesis and antiproteasomal activity of novel *O*-benzyl salicylamide-based inhibitors built from leucine and phenylalanine. *Eur. J. Med. Chem.* **2017**, *135*, 142–158.
- (29) Kasper, K. Aza-peptide Aldehydes and Ketones: A New Class of Inhibitors for Proteases. Research Thesis. The Ohio State University. **2017**.
- (30) Wilson, D. L.; Meininger, I.; Strater, Z.; et al. Synthesis and Evaluation of Macrocyclic Peptide Aldehydes as Potent and Selective Inhibitors of the 20S Proteasome. *ACS Med. Chem. Lett.* **2016**, *7*, 250–255.
- (31) Genin, E.; Reboud-Ravaux, M.; Vidal, J. Proteasome inhibitors : Recent Advances and New Perspectives In Medicinal Chemistry. *Curr. Top. Med. Chem.* **2010**, *10*, 232–256.
- (32) Li, C.; Wang, J.; Barton, L. M.; et al. Decarboxylative borylation. *Science.* **2017**, *356*.
- (33) Vogl, D. T.; Martin, T. G.; Vij, R. et al. Phase I/II study of the novel proteasome inhibitor delanzomib (CEP-18770) for relapsed and refractory multiple myeloma. *Leuk. Lymphoma.* **2017**, *58*, 1872–1879.
- (34) Pharmacodia. Carfilzomib. [online] [cit. 2018-4-25]. Dostupné z: [http://en.pharmacodia.com/web/drug/1\\_229.html#onlineretailersRoute](http://en.pharmacodia.com/web/drug/1_229.html#onlineretailersRoute).

- (35) Álvarez, N. H.; van de Langemheen, H.; Brouwer, A. J.; Liskamp, R. M. J. Potential peptidic proteasome inhibitors by incorporation of an electrophilic trap based on amino acid derived  $\alpha$ -substituted sulfonyl fluorides. *Bioorganic Med. Chem.* **2017**, *25*, 5055–5063.
- (36) Brouwer, A. J.; Álvarez, N. H.; Ciaffoni, A.; et al. Proteasome inhibition by new dual warhead containing peptido vinyl sulfonyl fluorides. *Bioorganic Med. Chem.* **2016**, *24*, 3429–3435.
- (37) Brouwer, A. J.; Ceylan, T.; Jonker, A. M.; et al. Synthesis and biological evaluation of novel irreversible serine protease inhibitors using amino acid based sulfonyl fluorides as an electrophilic trap. *Bioorganic Med. Chem.* **2011**, *19*, 2397–2406.
- (38) Stein, M. L.; Cui, H.; Beck, P.; Dubiella, C.; et al. Systematic Comparison of Peptidic Proteasome Inhibitors Highlights the  $\alpha$ -Ketoamide Electrophile as an Auspicious Reversible Lead Motif. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2014**, *53*, 1679–1683.
- (39) Kisselev, A. F.; van der Linden, W. A.; Overkleeft, H. S. Proteasome Inhibitors : An Expanding Army Attacking a Unique Target. *Chem. Biol.* **2012**, *19*, 99–115.
- (40) Groarke, M.; Hartzoulakis, B.; Mckerverey, M. A.; at al. Synthesis of Ketomethylene Amino Pseudopeptide Analogues via Reductive Amination of Glyoxals Derived from  $\alpha$ -Amino Acids. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2000**, *10*, 153–155.
- (41) Imramovský, A.; Jorda, R.; Pauk, K.; et al. Substituted 2-hydroxy-N-(arylalkyl)benzamides induce apoptosis in cancer cell lines. *Eur. J. Med. Chem.* **2013**, *68*, 253–259.
- (42) Dušek, J.; Imramovský, A.; Pauk, K.; et al. Synthesis and Antiproliferative Activities of Novel *O*-Benzyl Salicylamide Derivatives. *Lett. Drug Des. Discov.* **2017**, *14*, 662–671.
- (43) Gaudioso, L. A.; Weglarz, M. A. Process for the synthesis of exochelins. US6063919A. 14. 8 **1998**.
- (44) Kitagawa, T.; Asada, M. Preparation and Root Growth-Inhibitory Activity of *N*-Substituted 2-(2-Chloroacetamido)-3-(furan-2-yl)propanamides. *Chem. Pharm. Bull.* **2005**, *53*, 1183–1189.

(45) Ley, S. V.; Tackett, M. N.; Maddess, M. L.; et al. Total Synthesis of Rapamycin. *Chem. Eur. J.* **2009**, *15*, 2874–2914.

(46) Texier-Boullet, F.; Foucaud, A. Knoevenagel condensation catalysed by aluminium oxide. *Tetrahedron Lett.* **1982**, *23*, 4927–4928.

(47) Abergel, R. J.; Warner, J. A.; Shuh, D. K.; Raymond, K. N. Enterobactin Protonation and Iron Release: Structural Characterization of the Salicylate Coordination Shift in Ferric Enterobactin. *J. Am. Chem. Soc.* **2006**, *128*, 8920–8931.

(48) Wang, P.; Zhang, S.; Meng, Q.; et al. Site-specific Chemical Modification of Peptide and Protein by Thiazolidinediones. *Org. Lett.* **2015**, *17*, 1361–1364.