

STŘEDOŠKOLSKÁ ODBORNÁ ČINNOST

Obor č. 3: Chemie

Příprava prekurzorů makrocyclických analogů pepstatinu A

Pavel Říkovský
Hlavní město Praha

Praha 4, 2022

STŘEDOŠKOLSKÁ ODBORNÁ ČINNOST

Obor č. 3: Chemie

Příprava prekurzorů makrocyclických analogů pepstatinu A

Preparation of precursors of Pepstatin A macrocyclic analogues

Autoři: Pavel Říkovský

Škola: Gymnázium, Praha 4, Na Vítězné pláni 1160; 140 00

Kraj: Hlavní město Praha

Konzultant: Mgr. Martin Hadzima, Bc. Tereza Gistrová

Praha 2022

Prohlášení

Prohlašuji, že jsem svou práci SOČ vypracoval samostatně a použil jsem výhradně prameny a literaturu uvedené v seznamu bibliografických záznamů.

Prohlašuji, že tištěná verze a elektronická verze soutěžní práce SOČ jsou shodné.

Nemám závažný důvod proti zpřístupnění této práce v souladu se zákonem č. 121/2000 Sb., o právu autorském, o právech souvisejících s právem autorským a o změně některých zákonů (autorský zákon) ve znění pozdějších předpisů.

V Praze dne 23.3.2022

Pavel Říkovský

Poděkování

Tímto bych chtěl poděkovat Mgr. Martinu Hadzimovi nejen za vedení celé syntézy a mé práce, ale především za neocenitelnou pomoc a trpělivost při jejím sepisování, interpretaci spekter a za ochotu věnovat se mi i přes všechny své povinnosti.

Dále bych chtěl poděkovat Bc. Tereze Gistrové za zaškolení, zavedení do práce v moderní laboratoři medicínální chemie a vstřícný přátelský přístup.

Taktéž bych rád projevils své díky panu prof. RNDr. Janu Konvalinkovi, CSc., za přijetí do jeho výzkumné skupiny a umožnění mé stáže, a RNDr. Pavlu Majerovi, CSc., za kvalitní laboratorní zázemí a příjemné prostředí na oddělení medicínální chemie.

V souvislosti s tím bych rád poděkoval i všem kolegům, kteří přátelské prostředí vytvářeli, a také pracovníkům servisních laboratoří ÚOCHB AV ČR, za měření HRMS a NMR spekter.

Mé velké díky patří též profesorům chemie Mgr. Janu Halíkovi a RNDr. Heleně Vondráčkové, kteří mi během studia vždy ochotně vyšli vstříc. Na závěr děkuji své rodině, přátelům a přítelkyni, že mi při studiu a práci stáli oporou.

Anotace

Tato práce se zabývá přípravou prekurzorů makrocyclických inhibitorů katepsinu D (CatD). Teoretická část rozebírá související látky, mechanismus funkce inhibitorů, vysvětluje čtenáři potřebné pojmy a tím ozřejmuje cíl i význam práce. První část experimentální práce zahrnuje přípravu analogu aminokyseliny statinu, který je součástí přírodního inhibitoru Pepstatin A. Druhá část se zaměřuje na přípravu vhodné spojky, komerčně nedostupné hydrofobní aminokyseliny, pro syntézu makrocyclických inhibitorů o žádané velikosti. Práce podrobně popisuje přípravu obou zmíněných prekurzorů. Identita všech připravených sloučenin byla potvrzena několika přístrojovými analytickými metodami.

Klíčová slova

organická syntéza; makrocyclické inhibitory; inhibitory lidského katepsinu D (CatD); biologicky aktivní látky; Pepstatin A

Annotation

This work deals with the preparation of precursors of macrocyclic cathepsin D (CatD) inhibitors. Theoretical part of the work discusses related substances, their mechanism of inhibition, explains necessary concepts and thus clarifies the purpose and meaning of this work. First part of the experimental work includes synthesis of a statine amino acid analogue. Statine is the most important component of a natural CatD inhibitor Pepstatin A. Second part focuses on the preparation of a suitable linker for synthesis of macrocyclic inhibitors of a desired cycle size. Preparation of both precursors is described in detail within the scope of this work. Structures of all the synthesized substances were reliably confirmed by several instrumental analytical methods.

Keywords

organic synthesis; macrocyclic inhibitors; inhibitors of human cathepsin D (CatD); biologically active compounds; Pepstatin A

SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK

Ac	acetyl
AcOH	kyselina octová
Boc	<i>tert</i> -butyloxykarbonyl
bs	široký singlet
CatD	katepsin D
d	dublet
DCC	N,N'-Dicyklohexylkarbodiimid
DCM	dichlormethan
DCU	N,N'-Dicyklohexylmočovina
dd	dublet dubletů
ddd	dublet dubletu dubletů
DIPEA	N,N-Diisopropylethylamin
DMAP	4-dimethylaminopyridin
DMF	N,N-Dimethylformamid
DMSO	dimethylsulfoxid
DMSO- <i>d</i> ₆	deuterovaný dimethylsulfoxid
DSC	N,N'-Disukcinimidyl karbonát
dt	dublet tripletů
ESI	<i>Electrospray ionization</i> elektrosprejová ionizace
Et	ethyl
EtOH	ethanol
EtOAc	ethyl-acetát
ekv.	ekvivalent (molární)
HATU	2-(7-Aza-1H-benzotriazol-1-yl)-1,1,3,3-tetramethyluronium hexafluorofosfát
HPLC	<i>High-Performance Liquid Chromatography</i> vysokoúčinná kapalinová chromatografie
IC ₅₀	poloviční maximální inhibiční koncentrace
m	multiplet

Me	methyl
MeOH	methanol
MeCN	acetonitril
neg	negativní
NMP	N-Methylpyrrolidin-2-on
NMR	<i>Nuclear Magnetic Resonance</i> nukleární magnetická rezonance
nas. roz.	nasycený roztok
p	pentet
Pal	pyridylalanin
Phe	fenylalanin
q	kvartet
roz.	roztok
RVO	rotační vakuová odparka
s	singlet
synt.	syntetické
t	triplet
td	triplet dubletů
TFA	kyselina trifluoroctová
TLC	<i>Thin-Layer Chromatography</i> tenkovrstvá chromatografie
UPLC–MS	<i>Ultra-Performance Liquid Chromatography–Mass Spectrometry</i> vysokoúčinná kapalinová chromatografie s hmotnostní spektrometrií
UV	ultrafialové záření
Val	valin
δ	chemický posun v ppm

OBSAH

1	Úvod.....	10
2	Teoretická část.....	11
2.1	Katepsiny.....	11
2.1.1	Katepsin D.....	11
2.2	Inhibitory katepsinu D.....	11
2.2.1	Pepstatin A.....	11
2.2.2	Syntetické analogy pepstatinu A.....	12
2.2.3	Cyklo[(Br)PheSta-Val-Atr].....	14
3	Cíle práce.....	15
4	Výsledky a diskuze.....	16
4.1	Prekurzory.....	16
4.1.1	Syntéza prekurzoru A.....	16
4.1.2	Syntéza prekurzoru B.....	17
4.2	Návrh syntézy cyklo[(Br)PheSta-Val-Atr].....	19
4.2.1	Cyklizace.....	19
4.2.2	Příprava analogů s využitím divergentní syntézy.....	20
4.3	Zajímavé chování připravovaných látek.....	21
4.3.1	Keto-enol tautomerie.....	21
4.3.2	Tautomerie látky A1.....	22
4.3.3	Tautomerie látky A2.....	22
4.3.4	Tautomerie látky B1.....	23
4.3.5	Tautomerie látky B2.....	23
5	Experimentální část.....	24
5.1	Chemikálie a přístrojové vybavení.....	24
5.2	Postup přípravy látek.....	25
5.3	Syntéza prekurzoru A.....	25
5.3.1	Příprava látky A1.....	26
5.3.2	Příprava látky A2.....	27
5.3.3	Příprava látky A3.....	28
5.3.4	Příprava látky A4.....	29
5.4	Syntéza prekurzoru B.....	30
5.4.1	Příprava látky B1.....	30

5.4.2	Příprava látky B2	31
5.4.3	Příprava látky B3	32
5.4.4	Příprava látky B4	32
5.4.5	Příprava látky B5	33
6	Závěr	34
7	Reference	35
8	Seznam obrázků.....	37
9	Příloha: NMR spektra synt. látek.....	38

1 ÚVOD

Medicinální chemie je vědní obor, který se zabývá syntézou biologicky aktivních sloučenin. Tyto sloučeniny mohou sloužit pro studium, diagnostiku nebo léčbu nemocí.

Častým cílem těchto látek bývají proteiny, ať už receptory či enzymy, jejichž funkci lze ovlivňovat s různým výsledným účinkem a úspěchem. Jedním takovým případem ovlivnění chování enzymu je například reverzibilní inhibice. Reverzibilní inhibice spočívá ve vratném uzamčení proteinu ve stavu neschopném vykonávat původní funkci. Zpravidla jej dosahujeme s pomocí molekuly o specifickém tvaru a interakcích, která zaplní aktivní místo proteinu, ze kterého těžko odchází. Molekuly takto biologicky aktivních látek přitom ani nemusí být příliš velké či složité v porovnání s cílovými proteiny, postačí krátký peptid, jenž se silně naváže na správné místo. Inhibitory na bázi peptidů však trpí řadou nedostatků, jako je třeba nízká stabilita v prostředí organismu nebo nízká dostupnost v cílové tkáni. Jedno z možných řešení je příprava makrocyclických analogů peptidů, které obecně vykazují vyšší stabilitu a lepší biodostupnost v porovnání se svými lineárními protějšky. [1] [2] [3] [4] [5] [6]

Teoretická část této práce se ve své první kapitole zabývá jedním konkrétním proteolytickým enzymem čili proteázou (peptidázou) s názvem katepsin D. Katepsin D (zkracováno CatD), zejména lidský katepsin D, je předmětem zájmu v již vícero publikacích, a to především kvůli jeho souvislosti se zhoubnými nádory rakoviny prsu, kterými je nadměrně produkován a sekretován. CatD je vhodným cílem pro syntetické inhibitory. [1] [7] [8] [9] [10] [11]

Dalším tématem teoretické části je pepstatin A, nejpotentnější známý přirozený inhibitor katepsinu D, a jeho syntetické makrocyclické analogy. Obecně řečeno, příprava vysoce potentních inhibitorů enzymů umožňuje do hloubky prozkoumat jejich roli v daném onemocnění. Mimo jiné lze tyto biologicky aktivní látky označit za potenciální léčiva. To je možná trochu nadsázka, ale často oprávněná, jelikož se opravdu jedná o látky s možným léčivým účinkem. Cesta k funkčnímu schválenému léčivu je velmi dlouhá a náročná a nelze s jistotou předpokládat, že by jediná látka z celé knihovny připravených analogů pepstatinu A kdy prošla všemi klinickými testy, přesto jsou však dvěma nejdůležitějšími vlastnostmi syntetických analogů pepstatinu míra neboli potence inhibice CatD a jejich biodostupnost v organismu. [1] [12] [13]

Snahy této práce se soustředí v experimentální části. Úkolem bylo připravit dva hlavní prekurzory makrocyclického analogu pepstatinu A, jež nejsou komerčně dostupné, z komerčně dostupných výchozích látek. Celý proces je popsán a vysvětlen ve výsledcích, detailní záznam obou syntéz se nachází v experimentální části. Za zmínku také stojí, že všechny připravované látky byly analyzovány moderními instrumentálními metodami a výpisy spekter jsou k nalezení též v experimentální části. NMR spektra jsou pak dále k nalezení v přílohách. Kromě toho práce uvádí plán dalšího postupu k syntéze zmíněného makrocyclického analogu, jenž je připravován právě jako prekurzor celé řady obdobných makrocyclických analogů.

Vzdáleným, avšak reálným cílem, je příprava další rozsáhlé knihovny těchto analogů, jež by vycházela z jedné molekuly, jejíž dva prekurzory jsou hlavní náplní této práce.

2 TEORETICKÁ ČÁST

2.1 Katepsiny

Katepsiny jsou skupinou podstatných proteolytických enzymů, přesněji proteáz či peptidáz. Jejich název je odvozen z řeckého slova „kathapsein“ čili v překladu „trávit“, jelikož původně se toto označení používalo pro širší skupinu proteáz podílejících se na katabolickém intracelulárním metabolismu v kyselém prostředí lysozomů savčích buněk. Pohled na katepsiny se však za poslední dvě desetiletí změnil. Byly totiž nalezeny i mimo lysozomy (v jádře, cytoplasmě a cytoplasmatické membráně buňky i v extracelulárním prostředí) a nyní se jedná o, z pohledu molekulární evoluce, stále heterogenní skupinu. Můžeme je rozdělit na tři nepřibuzné třídy proteáz dle mechanismu štěpení proteinů: aspartátové, cysteinové a serinové. Dále je lze dělit dle struktury. [1] [7] [9]

2.1.1 Katepsin D

Katepsin D (CatD) je aspartátová proteáza ze skupiny katepsinů vyskytující se napříč rozličnými organismy. Mimo svoji primární úlohu spočívající v lysozomálním trávení peptidů, plní i mnoho jiných konkrétních funkcí, kupříkladu prezentaci antigenů, aktivaci enzymatických prekurzorů, degradaci cytoskeletálních proteinů, remodeling matrixu, zpracování peptidových hormonů či regulaci a apoptózu. Nejdůležitější však je, že kromě výše zmíněného hraje nezanedbatelnou roli v rozvoji nádorů a jejich metastáz, kvůli čemuž byl předmětem studií ve spojitosti s různými typy zhoubných nádorů. Bylo zjištěno, že nádorové buňky rakoviny prsu vykazují jeho nadměrnou produkci a sekreci. Z toho důvodu se jedná o možný cíl pro léčbu rakoviny pomocí chemoterapie či na protilátkách založenými léky. [1] [7] [8] [9] [10] [11]

2.2 Inhibitory katepsinu D

Tato práce se zabývá kompetitivními inhibitory enzymu CatD, tedy látkami kompetitivně čili soutěživě inhibujícími enzym katepsin D navázáním do jeho aktivního místa.

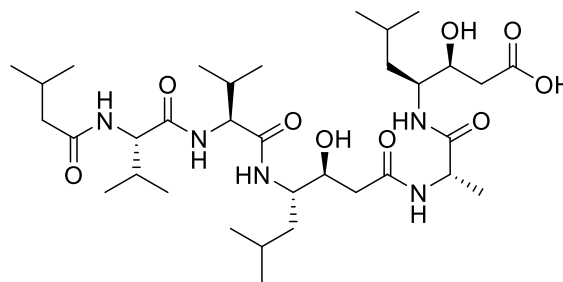
Zrovna kompetitivní inhibitory mohou mít obecně uplatnění jako léčiva různých onemocnění narozdíl od inhibitorů ireverzibilních. Klinické využití ireverzibilních, tedy nekompetitivních inhibitorů, je omezenější, jelikož mnohdy nechceme enzym úplně a navždy vyřadit z funkce.

2.2.1 Pepstatin A

Nejpotentnějším známým přírodně se vyskytujícím inhibitorem katepsinu D je pepstatin A (struktura 1). Jedná se o lineární pseudo-pentapeptid, který efektivně inhibuje mnoho aspartátových proteáz z třídy pepsinů již při nanomolárních koncentracích – včetně CatD ($IC_{50} 0,49 \pm 0,03$). [1] [12] [13]

Mechanismus inhibice spočívá v zaplnění enzymatické kavity CatD. Kavita je hydrofobního charakteru a pepstatin se při inhibici stáčí do tvaru U (obrázek 2). Velmi důležitou součástí je však hydroxylová (–OH) skupina přibližně uprostřed pepstatinu A, jež vytváří s katalytickou částí CatD vodíkové můstky a mimikuje tetraedrický intermediát vznikající při hydrolýze amidické vazby. Narozdíl od peptidů štěpených v amidické vazbě však CatD není schopen tuto napodobeninu intermediátu tvořenou pepstatinem A rozštěpit. Místo proteinové vazby C–N pepstatin na daném místě obsahuje silnější vazbu C–C. Pepstatin se tak nerozpadá a neuvolňuje kavitu enzymu jako v případě peptidu či proteinu a dochází k zastavení neboli inhibici funkce katepsinu. [1] [13]

Byť se jedná o potentní inhibitor, terapeutické využití pepstatinu A by bylo problematické kvůli špatnému vstřebávání a dostupnosti v organismu. Není totiž dostatečně rozpustný, nesplňuje žádné z Lipinského pravidel¹. Lze však použít jako předloha pro syntézu slibnějších látek s lepšími vlastnostmi pro farmaceutické využití.



Struktura 1: Pepstatin A

2.2.2 Syntetické analogy pepstatinu A

Umělé analogy pepstatinu již byly v odborné literatuře připravovány a zkoumány. Tato práce přímo vychází z článku s názvem *Biomimetic Macrocyclic Inhibitors of Human Cathepsin D* (zdroj [1]), kde bylo na základě krystalografické analýzy kavity proteázy CatD připraveno více jak třicet makrocyclických analogů, které byly i následně testovány pro stanovení míry inhibice CatD a dalších příbuzných enzymů.

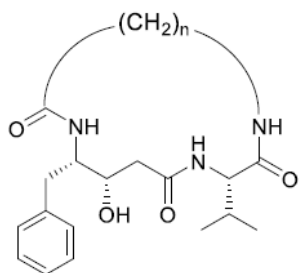
Makrocyclické analogy jsou jednou z možných skupin látek napodobujících strukturu, a především funkci pepstatinu A. Oproti pepstatinu A však vykazují výrazně lepší vlastnosti ovlivňující biodostupnost, skoro totiž splňují všech pět Lipinského pravidel používaných pro odhad vhodnosti léčiva k orálnímu podání – tj. struktura obsahuje méně jak 5 donorů vodíkových vazeb a zároveň obsahuje méně jak 10 akceptorů vodíkových vazeb. Molární hmotnost by měla být maximálně 500 g/mol – což zrovna cyklo[(Br)PheSta-Val-Atr]², ale i mnoho dalších analogů, překračuje (v případě cyklo[(Br)PheSta-Val-Atr] o necelých 81 g/mol kvůli atypickému atomu bromu), avšak udává se, že pro makrocyclické léčiva je tento parametr méně určující. Existuje již vícero publikací, jež se výjimečnými vlastnostmi makrocyclických zabývaly a uvádí nová možná rozmezí hodnot Lipinského pravidel pro tato atypická léčiva. Dostatečná biodostupnost byla pozorována u makrocyclických látek s molární hmotností 1 kDa³ i výše. [2] [3] [4] [5] [6]

¹ pět obecných pravidel pro zhodnocení či lepší odhad, zda je zkoumaná látka/léčivo vhodná k orálnímu podání

² dále v oddělení 2.2.3

³ Kilodalton je jednotka používaná v biochemii pro proteiny apod. velké molekuly; 1 kDa = 1000 g/mol

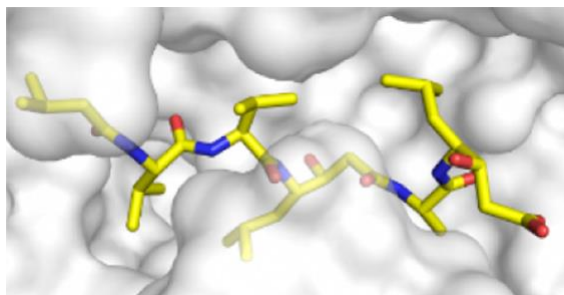
Dále by měl být rozdělovací koeficient (oktanol/voda) log P menší než 5, což zatím všechny testované makrocyclické analogy taktěž splňovali. Posledním pravidlem je, že by se



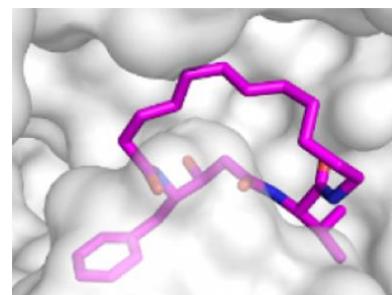
Compound	n	Ring size	IC ₅₀ (nM)
10	10	20	40 ± 9
9	11	21	5.8 ± 0.7
11	12	22	3.5 ± 0.5
12	13	23	11 ± 1
13	14	24	32 ± 4

Tabulka 1: tabulka s hodnotami IC₅₀ několika makrocycl. analogů pepstatinu A lišících se v délce alkylového řetězce, a tedy délky cyklu – zdroj [1]

o celé dva řády v IC₅₀. Význam tohoto hydroxylu se skrývá ve vodíkových vazbách, které vytváří s dvojicí aspartátových zbytků CatD. Tvorbou těchto H-vazeb zabírá místo vodě, která by jinak s dvojicí zbytků interagovala, čímž v podstatě napodobuje tetraedrický intermediát enzymatické reakce a enzym (CatD) inhibuje. Tento mechanismus inhibice je identický tomu pozorovanému u pepstatinu A.



Obr. 2: Pepstatin A v pomyslném tvaru U v komplexu s CatD (převzato ze zdroje 1)



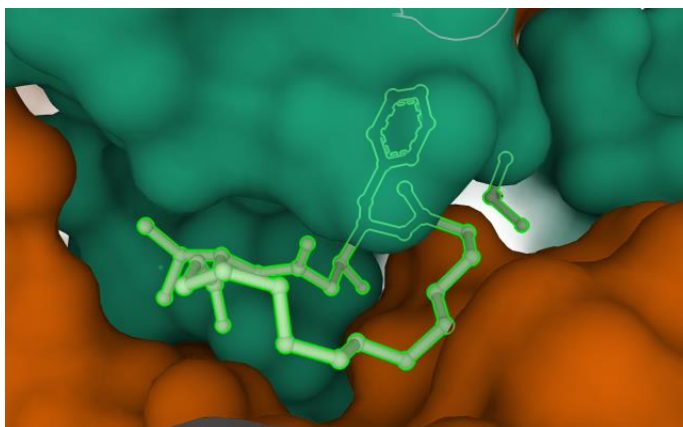
Obr. 1: Makrocyclický analog pepstatinu A v komplexu s CatD (převzato ze zdroje 1)

ve struktuře látky nemělo nalézat více jak 10 rotovatelných⁴ vazeb, a občas se ještě přidává, že topologický polární povrch by měl být menší než 140 Å². I zde makrocyclické analogy pravidlo splňují. Pepstatin A je mimo rozmezí a pravidlo nespĺňuje ve všech pěti případech. Již toto poukazuje na skutečnost, že pepstatin bude mít horší biodostupnost než synt. analogy, a již provedené a publikované experimenty to potvrzují. [1]

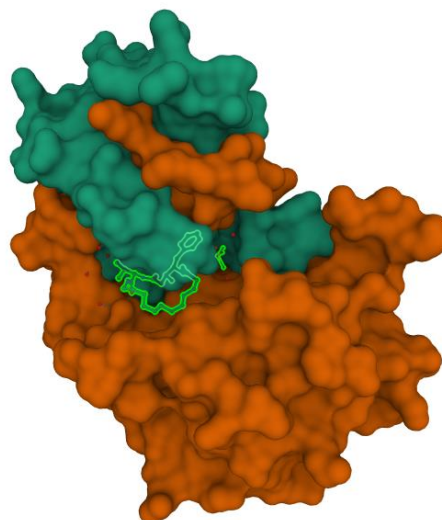
Funkčnost a potence těchto analogů spočívá tedy zaprvé v zaplnění hydrofobní kavity CatD vhodně dlouhým alkylovým řetězcem zatočeným a spojeným do (makro)cyklu, který tak simuluje tvar U vytvářený pepstatinem (obrázek 1 a 2). Největší potence v inhibici vykazovaly analogy vytvořené zacyklením přes třinácti-uhlíkatou kyselinu 13-aminotridekanovou, tedy analogy s celkovou délkou cyklu 22 atomů (tabulka 1). [1]

Druhou částí velmi důležitou pro inhibiční vlastnosti analogů je hydroxyl nalézající se na části původem z fenylalaninu. Dle uvedeného zdroje (zdroj [1]) došlo v případě jeho odstranění ze struktury k prudkému poklesu potence analogu

⁴ tedy vazeb C–C s možností rotace kolem své osy



Obr. 3: Detail kavity komplexu CatD se syntetickým makrocyclickým inhibítozem (sloučenina č. 9 z tabulky 1), obrázek vypůjčený z proteinové databanky (kód 6QCB)



Obr. 4: Komplex CatD se syntetickým makrocyclickým inhibítozem (sloučenina č. 9 z tabulky 1), obrázek vypůjčený z proteinové databanky (kód 6QCB)

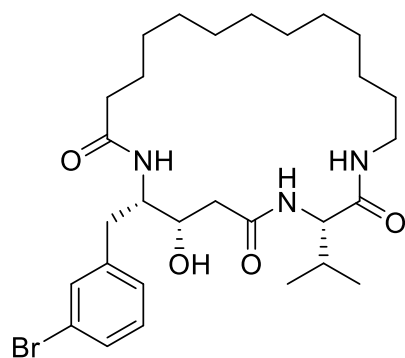
Pro ilustraci zaplnění kavity CatD makrocyclickým inhibítozem vloženy dva obrázky z proteinové databanky (kód 6QCB, převzato z publikace [1]).

Inhibitor, v tomto případě sloučenina s označením 9 z tabulky 1, velmi podobná cílové molekule cyklo[(Br)PheSta-Val-Atr] (struktura 2), vyplňuje kavitu proteázy a zároveň se váže vodíkovými vazbami ze své hydroxylové skupiny, jak bylo vysvětleno výše (kapitola 2.2.2).

2.2.3 Cyklo[(Br)PheSta-Val-Atr]

Látka znázorněná na struktuře 2, jež lze označit jako cyklo[(Br)PheSta-Val-Atr]⁵, je předmětem naší snahy a základem plánované divergentní syntézy. Systematický název zní:

(3*S*,7*S*,8*S*)-8-(3-Brombenzyl)-7-hydroxy-3-isopropyl-1,4,9-triazacyklodokosan-2,5,10-trion



Syntéza této sloučeniny není ničím výjimečná, vychází z již publikované studie (zdroj [1]). Pro cyklo[(Br)PheSta-Val-Atr] konkrétně se navíc nepředpokládá žádná nadprůměrná inhibiční aktivita, jde totiž především o prekurzor dalších makrocyclických analogů.

Je však záhodno zmínit, že design této sloučeniny vychází z poznatků získaných v předešlé studii pro dosažení co nejvyšší inhibiční aktivity cílových látek, jež z něj budou následně připravovány nahrazením atomu bromu.

Struktura 2: cyklo[(Br)PheSta-Val-Atr]

⁵ Atr = 13-aminotridekanová kyselina

3 CÍLE PRÁCE

- Připravit prekurzor makrocyclických analogů pepstatinu A, pracovně nazvaného bromofenylalanin statin (Br-PheSta), z komerčně dostupného Boc-3-bromo-*L*-Phe-OH
- Připravit druhý prekurzor makrocyclických analogů pepstatinu A, vhodný linker k makrocyclizaci, v podobě derivátu kyseliny Boc-13-amino-tridekanové, prodloužením komerčně dostupné kyseliny Boc-11-amino-undekanové

4 VÝSLEDKY A DISKUZE

Při vývinu syntézy jsme vycházeli v první řadě z postupů uvedených v hlavním zdroji [1] a dále ve zdrojích [14] a [15]. Základní myšlenkou bylo prodloužení obou látek o dva uhlíky pohodlnou reakcí s Meldrumovou kyselinou a následným termickým rozkladem aduktů. [1] [14] [15]

Jedinými rozdíly bylo, že u prekurzoru A jsme chtěli zachovat hydroxylovou skupinu v β -poloze vůči karboxylové kyselině, zatímco u prekurzoru B jsme chtěli zachovat pouze karboxylovou kyselinu v podobě methyl-esteru. Prekurzor A byl nejdříve podroben termickému rozkladu části vytvořené kondenzací s Meldrumovou kyselinou a poté redukcí oxoskupiny. Prekurzor B byl naopak nejprve redukován a až poté termicky rozložen. Syntéza A proběhla jinak než syntéza B také kvůli zacyklení intermediátu s aminoskupinou. Aminoskupina se u látek A totiž nachází ve vhodné poloze vůči karboxylové kyselině – v porovnání s látkami B, kde je jediná aminoskupina po celou dobu více jak 10 uhlíků dále na druhé straně řetězce. Kromě této skutečnosti bylo při syntéze B výhodnější předem počítat s přípravou methyl-esteru a rozložit derivát Meldrumovy kyseliny odlišným způsobem namísto přípravy esteru z volné kyseliny esterifikací.

4.1 Prekurzory

4.1.1 Syntéza prekurzoru A

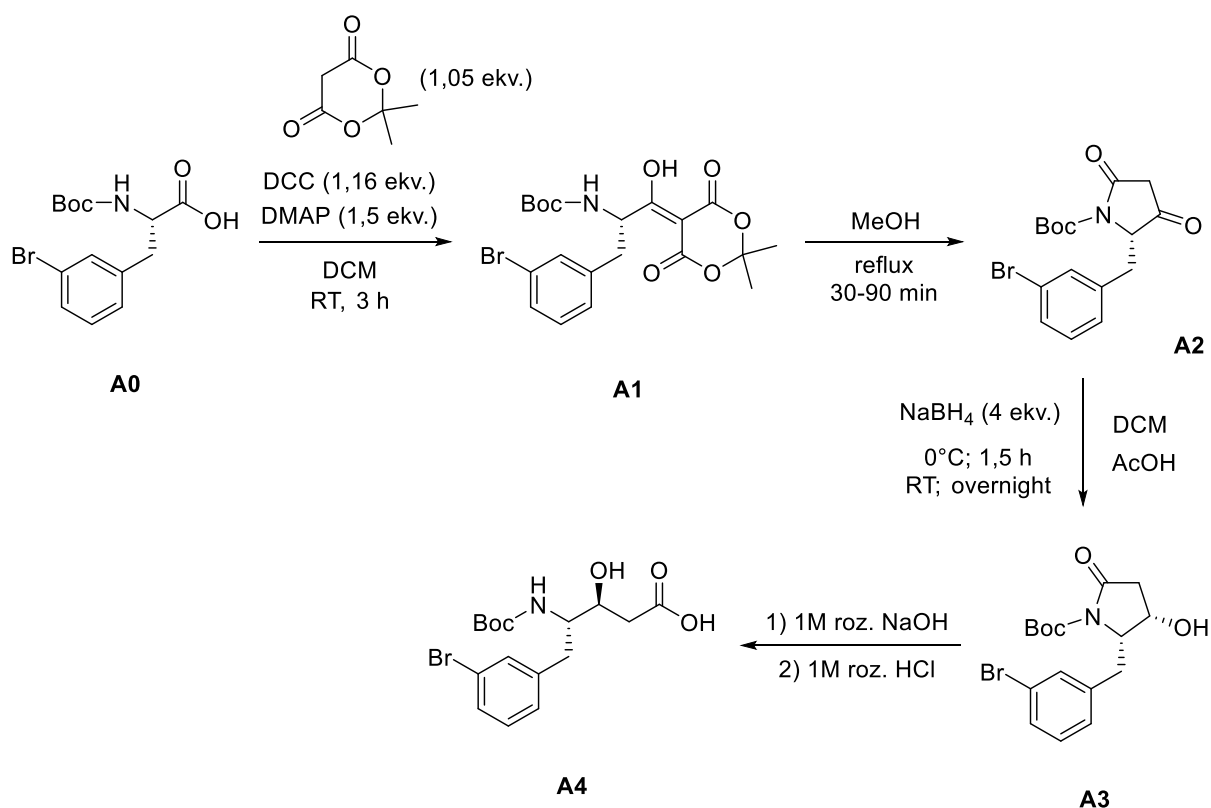


Schéma 1: Syntéza prekurzoru A (látka A0 až A4)

Syntéza započala reakcí výchozí látky A0 (zakoupené pod komerčním názvem Boc-3-bromo-L-Phe-OH) s Meldrumovou kyselinou¹ za vzniku aduktu vytvořeného kondenzací obou látek. Reakce probíhala za nezbytné pomoci činidel DCC a DMAP. Roztok vzniklého aduktu (látky A1) v methanolu byl následně zahříván k bodu varu, čímž došlo k jeho řízenému termickému rozkladu a jeho transformaci na cyklus s amidovou vazbou, látku A2. Keto-skupina látky A2 byla podrobena stereospecifické redukcí NaBH₄ za vzniku alkoholu A3 s danou S-konfigurací. Posledním krokem syntézy byl rychlá hydrolyzá amidové vazby látky A3 v bazickém prostředí 1M roztoku NaOH následovaná okyselením 1M roztokem HCl do neutrálního pH pro získání volné kyseliny.

Výsledkem syntézy je látka A4, karboxylová kyselina prodloužená o dva uhlíky oproti výchozí látce A0 s hydroxylovou skupinou v S-konfiguraci na původní pozici karboxylové kyseliny.

Systematické názvy látek A0 – A4 jsou uvedeny vždy v nadpisu jejich přípravy (níže v experimentální části).

4.1.2 Syntéza prekurzoru B

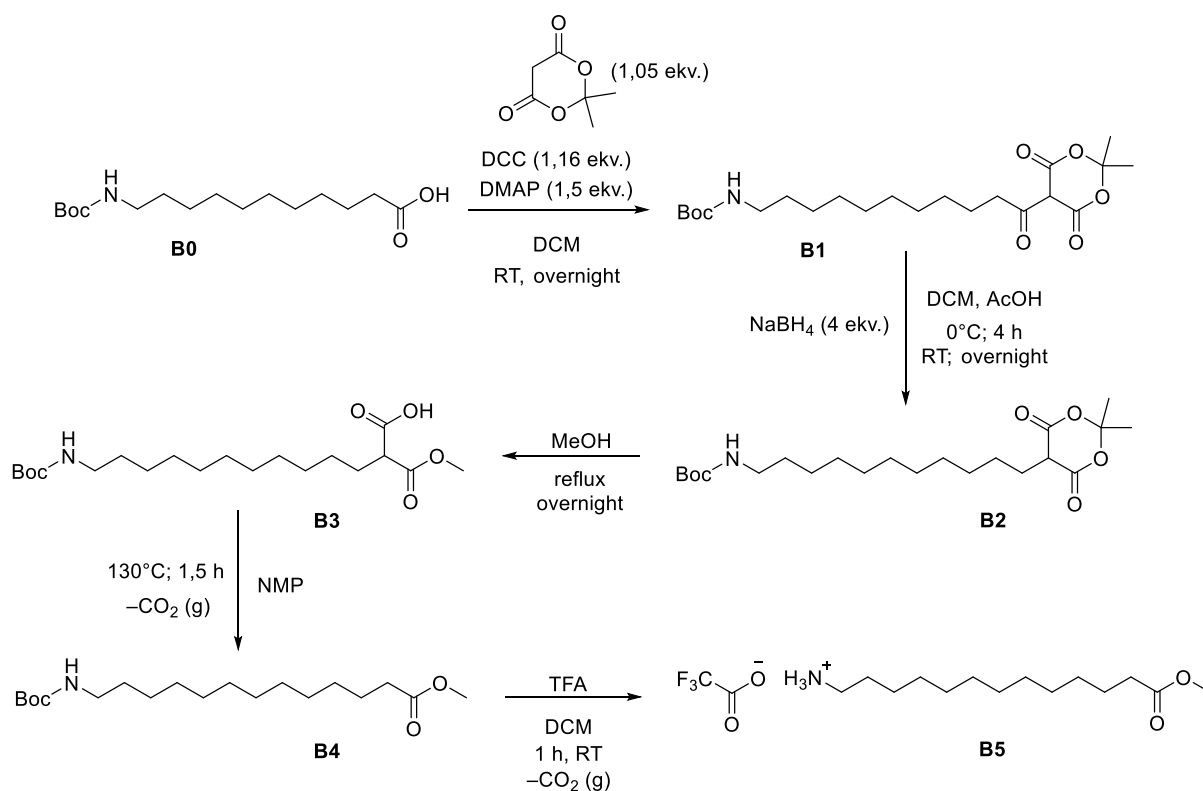


Schéma 2: Syntéza prekurzoru B (látky B0 až B5)

Syntéza prekurzoru B začínala stejnou reakcí jako syntéza A. Výchozí látka B0 (zakoupená pod názvem kyselina Boc-11-amino-undekanová) reagovala s Meldrumovou kyselinou v kondenzační reakci za vzniku aduktu, látky B1. Reakce probíhala opět za pomoci činidel DCC a DMAP. Připravená látka B1 byla však nejdříve podrobena redukcí NaBH₄, čímž došlo k zániku oxo-skupiny za vzniku látky B2. Následně byl termicky rozložen zbytek Meldrumovy kyseliny zahříváním látky B2 v methanolu. Vznikla látka B3 obsahující dvě karboxylové

skupiny (s jednou v podobě volné kyseliny a druhou v podobě methyl-esteru) byla podrobena zahřívání v NMP na 130 °C, přičemž došlo k dekarboxylaci a jedna karboxylová kyselina odešla v podobě oxidu uhličitého. Zůstává methyl-ester B4. Poslední reakcí ve schématu je odstranění chránicí skupiny Boc- (*tert*-butoxykarbonyl), jež bylo provedeno kyselinou trifluoroctovou. Působením kyseliny vznikla její kvartérní amoniová sůl B5.

Při syntéze byl zvolen lehce odlišný přístup oproti zdrojům [14] a [15] z důvodu přípravy methyl-esteru již při termickém rozkladu. Mnoho jiných pokusů selhalo a methyl-ester B4 byl úspěšně připraven v dostatečném výtěžku až teprve zahříváním na 130 °C ve vhodném rozpouštědle NMP. Nižší teploty a jiná rozpouštědla nefungovala zdaleka tak dobře.

Našemu snažení nepomohlo ani nečekaně problematické luštění struktury látky B3. Struktury jsme určovali převážně dle ^1H a ^{13}C -NMR spekter a původní předpoklad u látky B3 byl, že se bude jednat již o produkt dekarboxylace⁶, která proběhne za nižších teplot. Dekarboxylace však, jak již víme, za teploty 64 °C (bod varu methanolu) neproběhla. První problém spočíval v ^1H -NMR spektru. Signál vodíku z 2. uhlíku řetězce (tedy uhlíku, na kterém se u B3 nalézá druhá karboxylová kyselina) se překrývá signálem rozpouštědla, jelikož v tomto případě jsme vzorek měřili v deuterovaném methanolu, kterému ve spektru odpovídá signál na 3,31 ppm. Při malých koncentracích vzorku se pík skoro ztrácí, a tak nebylo možné spolehlivě určit jeho intenzitu, díky které bychom zjistili, že se jedná o signál pouze pro jeden atom ^1H místo dvou. Druhý problém spočíval v ^{13}C -NMR spektru, které bylo z neznámých důvodů⁷ příliš komplikované pro interpretaci. Bylo prakticky nečitelné⁸ až na dva malé signály. Na 170,5 a 171,5 ppm se totiž nalézají dva signály dvou uhlíků karboxylových kyselin. Skoro se ztrácí v šumu, dokonce i u lepšího spektra měřeného s vyšší koncentrací produktu (spektrum 1), ale díky nim jsme zjistili, že k dekarboxylaci nedošlo a tím určili strukturu látky B3.

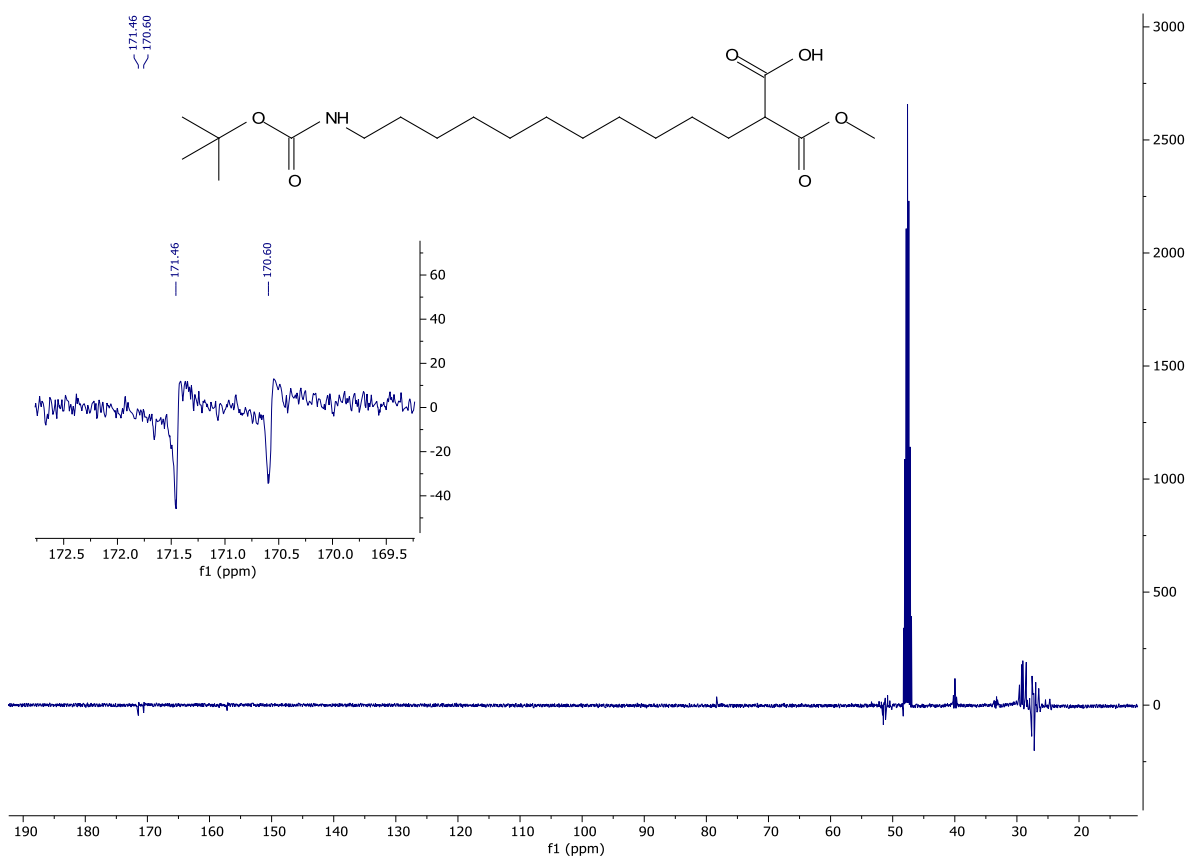
Výsledkem syntézy je látka B5, methyl-ester (a kvartérní amoniová sůl) karboxylové (amino)kyseliny prodloužené o dva uhlíky oproti výchozí látce B0.

Systematické názvy látek B0 – B5 jsou uvedeny vždy v nadpisu jejich přípravy (níže v experimentální části).

⁶ Dle výsledného značení je zde myšleným produktem dekarboxylace látka B4

⁷ Neurčité vyjádření, ale lepší než zavádějící odhady.

⁸ Z toho důvodu nemá výpis u přípravy látky B3 a ani ho neuvádím na konci práce v přílohách, ale pouze zde pro ilustraci problematiky.

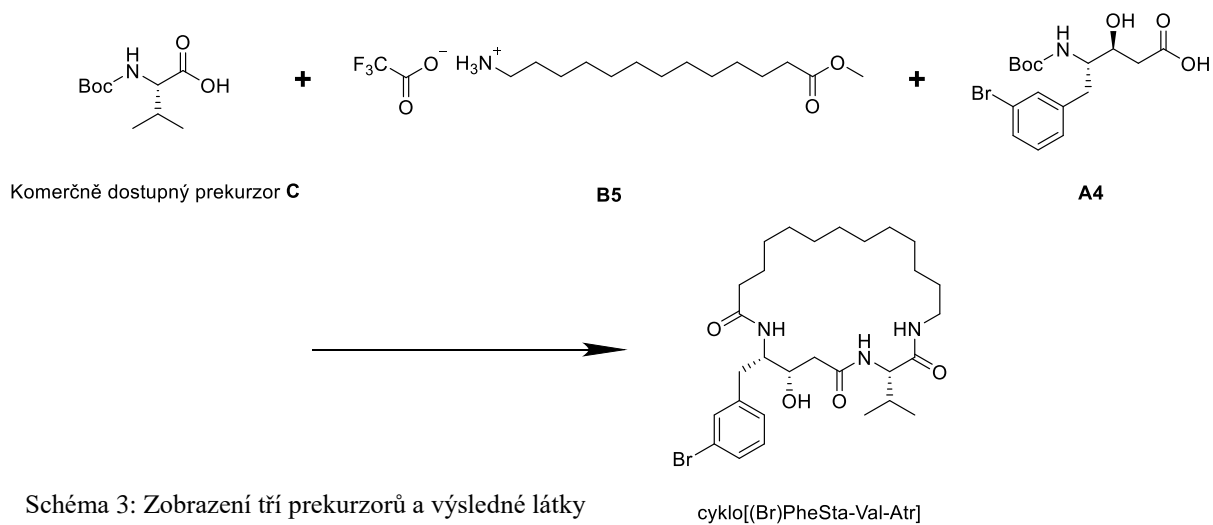


Spektrum 1 – ^{13}C -NMR spektrum látky B3, dva nejdůležitější signály přiblíženy

4.2 Návrh syntézy cyklo[(Br)PheSta-Val-Atr]

4.2.1 Cyklizace

Syntézy obou prekurzorů byly provedeny a popsány v minulých dvou kapitolách, nyní k plánované finální syntéze makrocyklu.



Výsledný makrocyklus cyklo[(Br)PheSta-Val-Atr] bude syntetizován ze tří prekurzorů. Prekurzory A a B byly připraveny, prekurzor C je komerčně dostupný, jedná se totiž pouze o aminokyselinu valin s chráněnou aminoskupinou.

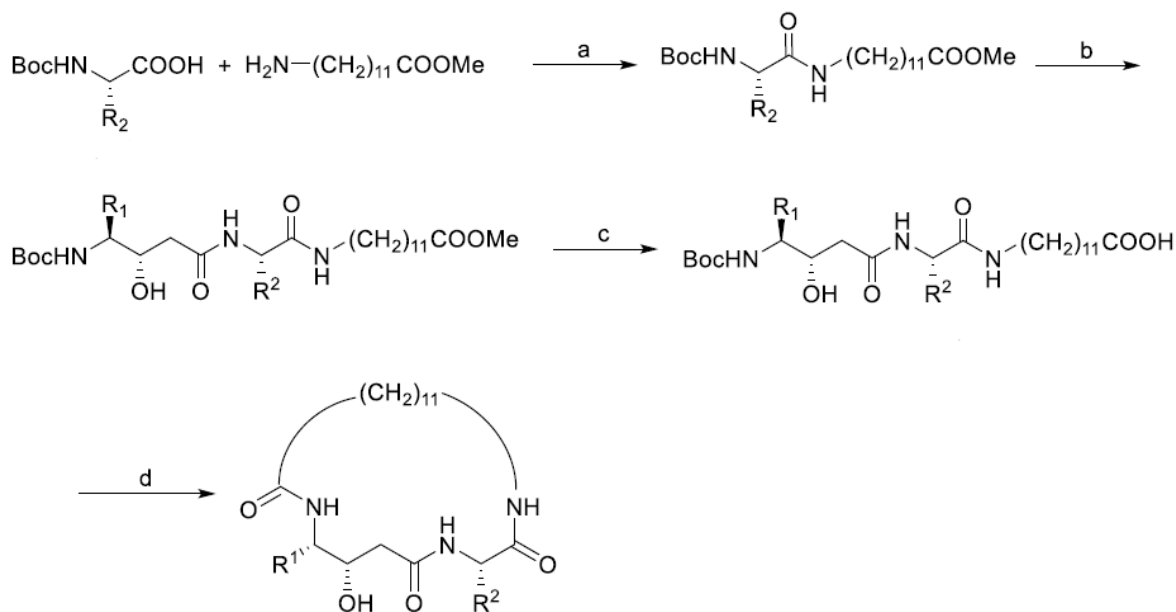


Schéma 4: Obecná syntéza makrocyklu u analogů pepstatinu, převzato z publikace [1]

Reagenty a podmínky na schématu: (a) HBTU, DIEA, DMF; (b) (1) TFA, DCM; (2) Boc-statine-OH, HBTU, DIEA, DMF; (c) LiOH, THF/H₂O; (d) (1) TSTU, DIEA, DMF; (2) TFA; (3) DIEA, DMF.

Na obecném reakčním schématu výše jsou shrnuty 4 plánované kroky. První krok spočívá v reakci prekurzoru C a B, vzniká amidová vazba. Druhým krokem je odstranění chránicí skupiny a následná reakce s prekurzorem A za vzniku druhé amidové vazby. Třetím krokem je rozložení methyl-esteru z karboxylové kyseliny z řetězce původního prekurzoru B. V rámci posledního čtvrtého kroku zbavujeme aminoskupinu chránicí skupiny a následně z právě uvolněné aminoskupiny vzniká makrocyklus zacyklením s karboxylovou kyselinou (uvolněna v třetím kroku), čímž vzniká poslední amidová vazba makrocyklu.

Výsledná látka je, zjednodušeně řečeno, hydrofobní makrocyklus se správně umístěnou hydroxylovou skupinou a s třemi amidovými vazbami, což z něj dělá jakýsi pseudo-peptid.

4.2.2 Příprava analogů s využitím divergentní syntézy

Nevýhodou předchozího postupu syntézy makrocyklických analogů, který byl zvolen v publikaci uvedené jako zdroj [1], a během které bylo syntetizováno více než třicet podobných látek, byla jeho časová náročnost. Postup spočíval v konvergentní syntéze, v rámci které se každý makrocyklický analog připravoval zvlášť, byť ze snáze připravených či dokonce komerčně dostupných prekurzorů. Efektivnějším přístupem se však zdá syntéza divergentní. Ta spočívá v přípravě jedné látky, ze které se následně připraví celá knihovna jejích derivátů.

Vhodnou výchozí látkou pro divergentní syntézu by měl být právě cyklo[(Br)PheSta-Val-Atr]. Poté, co budou oba prekurzory využity, spolu s třetím komerčně dostupným prekurzorem, k její přípravě v dostatečném množství⁹, bude tato makrocyclická látka využita k syntéze mnoha jejích derivátů v duchu divergentní syntézy. Zde má svou úlohu atom bromu na třetím uhlíku aromatického jádra fenylalaninu (v poloze meta vůči připojení zbytku pseudo-peptidu). Halogen, jakožto funkční skupina, byl zvolen právě kvůli jeho možné substituci za jiné funkční skupiny – například Suzukiho reakcí. [16]

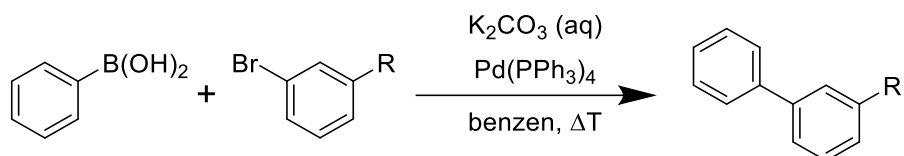


Schéma 5: Suzukiho-Miyaurova reakce s aromáty (obecné reakční schéma)

4.3 Zajímavé chování připravovaných látek

Při syntéze bylo u několika látek pozorováno méně obvyklé chování, které stojí za zmínku.

4.3.1 Keto-enol tautomerie

Ketony a aldehydy se vždy vyskytují v rovnováze mezi keto- a enol-formou. Keto-forma je však až na výjimky výrazně stabilnější a tudíž preferována. Jelikož však v našem případě pracujeme s molekulami, které mají oxo-skupinu na β -uhlíku vůči karboxylové kyselině, pravděpodobnost převahy enol-formy se zvyšuje, jelikož sousední α -uhlík je kyselejší z důvodu přítomnosti více karbonylových skupin.

Zejména u tří látek (A1, A2, B1, B2) byla uvažována tvorba tautomerů¹⁰. Převládající tautomer byl určen dle ¹³C-NMR spekter¹¹.

Je důležité zmínit, že poměr tautomerů je velmi závislý na rozpouštědle. Všechny zmíněné látky byly měřeny v deuterovaném chloroformu¹².

⁹ Již syntéza cyklo[(Br)PheSta-Val-Atr] však sahá nad rámec této práce.

¹⁰ Více látek mohlo tautomerizovat, ale pouze tyto čtyři látky byly vybrány jako zajímavé, jelikož jsme je zprvu měli tendenci zakreslovat jako enoly.

¹¹ Všechna spektra k nalezení na konci práce v příloze, níže uvedeny výpisy spekter.

¹² Můžeme předpokládat, že chloroform a dichlormethan, ve kterém byla většina reakcí prováděna, se budou chovat podobně (jedná se o velmi podobná rozpouštědla), je to ale pouhý nepodložený odhad.

4.3.2 Tautomerie látky A1

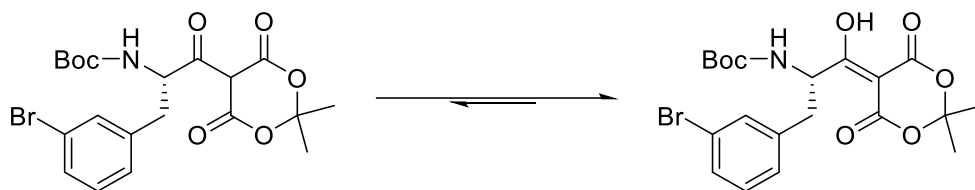


Schéma 6: Keto-enol tautomerie látky A1

$^1\text{H-NMR}$ (401 MHz; CDCl_3) δ 1,36 (s; 9H); 1,69 (s; 3H); 1,76 (s; 3H); 2,70 – 2,85 (m; 1H); 3,11 – 3,22 (m; 1H); 5,04 (d; $J = 7,4$ Hz; 1H); 5,82 (m; $J = 7,7$; 7,0 Hz; 1H); 7,19 (t; $J = 7,8$ Hz; 1H); 7,28 (d; $J = 8,1$ Hz; 1H); 7,38 (dt; $J = 7,8$; 1,5 Hz; 1H); 7,43 (bs; 1H); 15,60 (bs; 1H).

$^{13}\text{C-NMR}$ (101 MHz; CDCl_3) δ 26,9; 27,0; 28,3; 38,7; 54,2; 80,5; 91,2; 105,9; 122,7; 128,2; 130,3; 130,5; 132,5; 138,3; 159,7; 170,9; 194,5.

Látka A1 byla při měření zastoupena především v enol-formě, v $^{13}\text{C-NMR}$ spektru nalezen malý signál kvartérního 13 α -uhlíku na 91,2 ppm. Méně spolehlivý pík β -uhlíku svým chemickým posunem na 194,5 ppm také napovídá, že se jedná spíše o enol.

4.3.3 Tautomerie látky A2

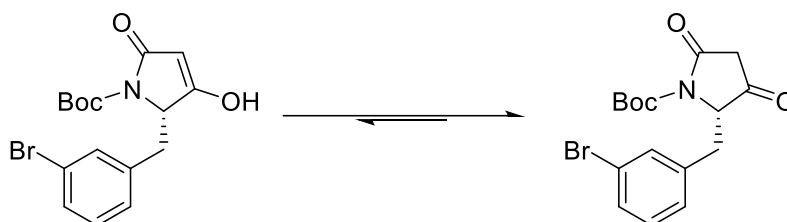


Schéma 7: Keto-enol tautomerie látky A2

$^1\text{H-NMR}$ (401 MHz; CDCl_3) δ 1,62 (s; 9H); 2,51 (dd; $J = 22,6$; 1,8 Hz; 1H); 2,98 (d; $J = 22,6$ Hz; 1H); 3,21 (dd; $J = 14,0$; 2,9 Hz; 1H); 3,37 (dd; $J = 14,0$; 5,8 Hz; 1H); 4,62 – 4,68 (m; 1H); 6,93 – 7,00 (m; 1H); 7,13 – 7,21 (m; 2H); 7,38 – 7,42 (m; 1H).

$^{13}\text{C-NMR}$ (101 MHz; CDCl_3) δ 28,2; 36,0; 43,4; 68,1; 84,8; 123,1; 128,3; 130,6; 131,0; 133,0; 136,5; 149,4; 167,1; 203,9.

Látka A2 byla při měření zastoupena především v keto-formě. Signály 4 atomů vodíku z dvou CH_2 skupin leží v $^1\text{H-NMR}$ v rozmezí 2,5 – 3,5 ppm (CH_2 v benzylové poloze na 3,21 a 3,37 ppm; CH_2 α -uhlíku na 2,51 a 2,98 ppm). Stejně CH_2 odpovídají v $^{13}\text{C-NMR}$ na píky nalézající se na 36,0 a 43,4 ppm.

13 Signály kvartérních uhlíků jsou obecně vždy výrazně menší oproti zbytku. Kromě toho jsou v tomto typu spektra směrem dolů stejně jako signály uhlíků CH_2

4.3.4 Tautomerie látky B1

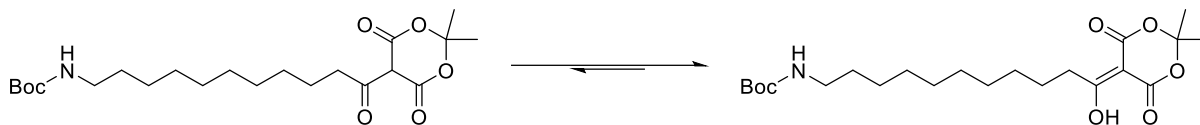


Schéma 8: Keto-enol tautomerie látky B1

$^1\text{H-NMR}$ (401 MHz; CDCl_3) δ 1,23 – 1,32 (m; 8H); 1,42 (m; 13H); 1,63 – 1,70 (m; 4H); 1,72 (s; 6H); 2,98 – 3,15 (m; 4H); 4,51 (bs; 1H); 15,28 (bs; 1H).

$^{13}\text{C-NMR}$ (101 MHz; CDCl_3) δ 25,1; 25,8; 26,2; 26,9; 28,5; 29,3; 29,4; 29,5; 29,6; 30,2; 35,9; 40,7; 79,1; 91,3; 104,9; 160,3; 170,7; 198,4.

Látka B1 byla při měření zastoupena především v enol-formě. Pík kvartérního (směrem dolů) α -uhlíku nalezen v $^{13}\text{C-NMR}$ na 91,3 ppm.

4.3.5 Tautomerie látky B2

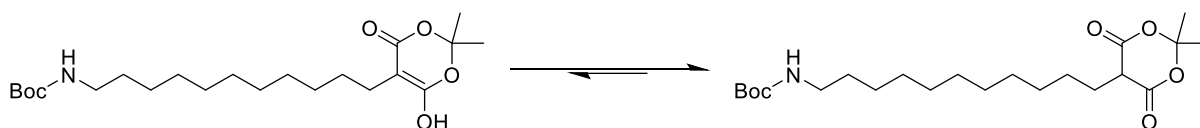


Schéma 9: Keto-enol tautomerie látky B2

$^1\text{H-NMR}$ (401 MHz; CDCl_3) δ 1,21 – 1,35 (m; 14H); 1,43 (m; 13H); 1,74 (s; 3H); 1,77 (s; 3H); 2,04 – 2,12 (m; 2H); 3,08 (m; 2H); 3,49 (t; $J = 5,0$ Hz; 1H); 4,50 (bs; 1H).

$^{13}\text{C-NMR}$ (101 MHz; CDCl_3) δ 26,6; 26,8; 26,9; 27,1; 28,6; 29,3; 29,4; 29,6; 29,6; 29,6; 29,6; 30,2; 40,8; 46,3; 79,1; 104,9; 156,1; 165,8.

Látka B2 byla při měření zastoupena především v keto-formě. Triplet pro jeden atom vodíku na α -uhlíku nalezen v $^1\text{H-NMR}$ spektru na 3,49 ppm. Signál α -uhlíku nalezen v $^{13}\text{C-NMR}$ směrem nahoru (potvrzení, že se jedná o uhlík s jedním atomem vodíku) na 46,3 ppm.

Obě látky se chovají v podstatě stejně. A1 a B1 tvoří za podmínek při měření převážně enol, A2 a B2 tvoří za stejných podmínek převážně keton.

5 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

5.1 Chemikálie a přístrojové vybavení

Výchozí reaktanty a všechna rozpouštědla byly použity ve stavu, v jakém byly zakoupeny z komerčních zdrojů (Fluorochem, TCI, Merck). Reakční směsi byly analyzovány metodou UPLC–MS za použití UPLC přístroje Waters UPLC H-Class Core System na koloně s reverzní fází Waters Acquity UPLC BEH C18; 1,7 μm ; 2,1 \times 100 mm s detekcí Waters Acquity UPLC PDA diodového pole v oblasti 190 – 800 nm v kombinaci s přístrojem pro hmotnostní spektrometrii Waters SQD2 Mass spectrometer řízeném pomocí softwaru MassLynx. Pro sledování průběhu hydrogenace a sloupcové chromatografie byly použity TLC hliníkové desky s vrstvou silikagelu 60 F₂₅₄ od firmy Merck. Detekce byla prováděna za využití UV lampy ($\lambda = 254 \text{ nm}$).

Pro separace sloupcovou chromatografií byl použit silikagel 60 (0,040 – 0,063 mm; Fluka). Separace za použití reverzní stacionární fáze C18 na koloně byly prováděny na zařízení Isco Teledyne pro FCC chromatografii, při vlnových délkách detektoru 210 nm a 254 nm po dobu 18 – 30 minut za průtoku 25 – 40 ml/min (v závislosti na množství separované směsi a velikosti použité kolony). Čištění pomocí preparativního HPLC probíhalo za použití přístroje od firmy Jasco Inc. (průtok 10 ml/min, délka programu 60 minut) na koloně s reverzní stacionární fází Reprosil 100 C18, 5 μm , 250 mm \times 4 mm s UV detekcí při $\lambda = 210 \text{ nm}$.

NMR spektra ¹H a ¹³C byla naměřena na přístroji Bruker Avance IIITM HD 400 MHz Prodigy s kryosondou (¹H při 400 MHz, ¹³C při 100 MHz). Byla použita rozpouštědla CDCl₃, CD₃OD a DMSO-*d*₆. Hmotnostní spektra o nízkém rozlišení byla měřena pomocí kvadrupólového ortogonálního zrychlení doby letu tandemovým hmotnostním spektrometrem Q-TOF Micro (Waters), spektra o vysokém rozlišení na přístroji ZS Micromass Mass Spectrometer (Waters) vybaveném vícemódovým zdrojem iontů ESCi a řízeném pomocí softwaru MassLynx.

5.2 Postup přípravy látek

Opatrnost je běžnou praxí, a při syntéze o více krocích tedy obvykle platí, že je každá látka připravována několikrát. Experiment je vždy nejprve proveden s malým množstvím výchozí látky¹⁴, často ve více variantách s odlišnými poměry reaktantů, v odlišných podmínkách či rozpouštědle. Teprve jakmile je požadovaný produkt úspěšně připraven v malém množství v dostatečné čistotě a výtěžku, přistupuje se k přípravě téže látky v množstvích větších¹⁵. Tímto postupem se minimalizuje riziko ztráty většiny látky v jednom nepovedeném experimentu.

Tato syntéza nebyla vůči běžné praxi žádnou výjimkou. Byť většina reakcí proběhla velmi pěkně, i zde se párkrát reakce nevydařila dle plánu. Například při přípravě prekurzoru B se reakce tzv. „zasekla“ po první části, a nebylo ji proto možné provést dle plánu v jediném kroku. Po několika pokusech a úvaze byl krok třetí nahrazen spolu s původním krokem čtvrtým dvěma jinými reakcemi (viz. 3.4.3 a 3.4.4), jež poskytly lepší výsledek.

V přípravě je vždy uveden pouze jeden postup přípravy dané látky, jež byl vybrán z mnoha uskutečněných na základě několika faktorů (výtěžek a čistota získané látky, jednoduchost/pohodlnost/rychlost dané přípravy etc.).

5.3 Syntéza prekurzoru A

Syntéza vychází ze zakoupené výchozí látky A0, jež je známá například pod systematickým názvem 3-Brom-*N*-(*terc*-butoxykarbonyl)-*L*-fenylalanin, či jeho používanější zkrácenou verzí Boc-3-bromo-*L*-Phe-OH.

Její systematický název vygenerovaný programem ChemDraw zní:

Kyselina (*S*)-3-(3-bromfenyl)-2-[(*terc*-butoxykarbonyl)amino]propanová

Název preferovaný organizací IUPAC zní:

3-Brom-*N*-{[(2-methyl-2-propanyl)oxy]karbonyl}-*L*-fenylalanin

Názvy dalších látek A1-4 jsou uvedeny vždy pod nadpisem u jejich přípravy.

¹⁴ tzn. pár desítek miligramů.

¹⁵ tzn. několik desítek až max. stovek miligramů; největší použité množství v jedné reakci byly 2 gramy výchozí látky (v prvním kroku přípravy prekurzoru A).

5.3.1 Příprava látky A1

tert-Butyl (*S*)-[3-(3-bromfenyl)-1-(2,2-dimethyl-4,6-dioxo-1,3-dioxan-5-yliden)-1-hydroxypropan-2-yl]karbamát

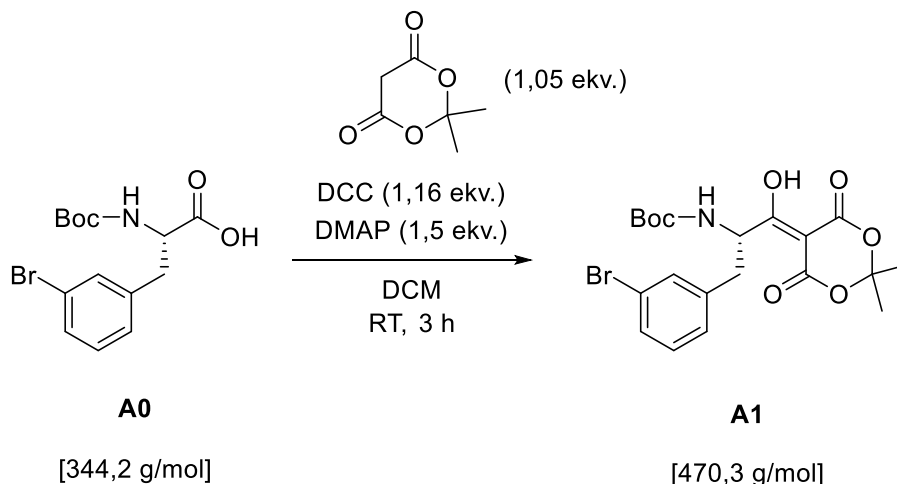


Schéma 10: Příprava látky A1 z výchozí látky A0

Postup: Výchozí látka A0 byla v množství 2,0 g (5,8 mmol) rozpuštěna v 50 ml DCM spolu s 0,87 g Meldrumovy kyseliny¹⁶ (6,04 mmol; 1,05 ekv.) a 1,04 g DMAP (8,56 mmol; 1,5 ekv.). Následně bylo přidáno 1,39 g DCC (6,76 mmol; 1,16 ekv.) a reakční směs byla ponechána míchat za RT po dobu 3 hodin. Reakční směs byla přefiltrována, pevný podíl (DCU) promyt DCM a filtrát zbaven rozpouštědla na RVO. Po odpaření DCM byl přidán vychlazený EtOAc a nerozpuštěný podíl (DCU) znovu odstraněn filtrací a promyt malým množstvím EtOAc. Filtrát byl následně promyt 2× 10% roz. KHSO₄ a 1× nas. roz. NaCl, vysušen bezvodým MgSO₄, zbaven sušidla filtrací a rozpouštědla na RVO. Produkt byl zbaven skoro všech zbytků rozpouštědel podtlakem a získaná látka byla podrobena analýze NMR. Výtěžek činil 2,75 g látky A1.

Látka byla použita v další reakci bez dalšího přečištění z důvodu kyselého charakteru látky, který by komplikoval standartní kolonovou chromatografii.

¹H-NMR (401 MHz; CDCl₃) δ 1,36 (s; 9H); 1,69 (s; 3H); 1,76 (s; 3H); 2,70 – 2,85 (m; 1H); 3,11 – 3,22 (m; 1H); 5,04 (d; *J* = 7,4 Hz; 1H); 5,82 (m; *J* = 7,7; 7,0 Hz; 1H); 7,19 (t; *J* = 7,8 Hz; 1H); 7,28 (d; *J* = 8,1 Hz; 1H); 7,38 (dt; *J* = 7,8; 1,5 Hz; 1H); 7,43 (bs; 1H); 15,60 (bs; 1H).

¹³C-NMR (101 MHz; CDCl₃) δ 26,9; 27,0; 28,3; 38,7; 54,2; 80,5; 91,2; 105,9; 122,7; 128,2; 130,3; 130,5; 132,5; 138,3; 159,7; 170,9; 194,5.

ESI MS: 492,1 [M + Na]⁺.

¹⁶ Meldrumova kyselina je triviální název pro sloučeninu s názvem 2,2-Dimethyl-1,3-dioxan-4,6-dion

HR ESI MS: vypočteno pro $C_{20}H_{24}O_7NBrNa^+$ 492,06284; nalezeno 492,06262.

5.3.2 Příprava látky A2

tert-Butyl (S)-2-(3-brombenzyl)-3,5-dioxopyrrolidin-1-karboxylát

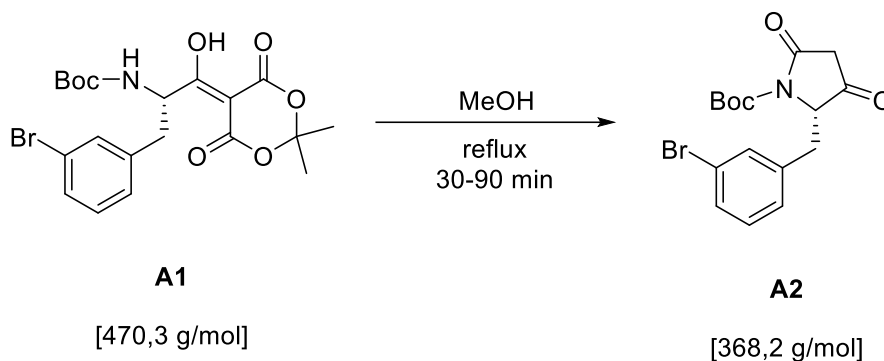


Schéma 11: Příprava látky A2 z látky A1

Postup: 0,7 g výchozí látky A1 (1,5 mmol) bylo rozpuštěno v 20 ml MeOH a vzniklý roztok ohříván k bodu varu pod zpětným chladičem do vymizení výchozí látky. Reakce byla monitorována každých 30 min pomocí TLC (mobilní fáze se skládala z 95 % EtOAc, 3 % MeOH a 2 % AcOH). Byla pozorována změna barvy roztoku z nažloutlé do bezbarvé. Po vychladnutí na pokojovou teplotu bylo z reakční směsi odstraněno rozpouštědlo (MeOH a vzniklý aceton) pomocí RVO a produkt byl zbaven zbytků rozpouštědel podtlakem. Získaná látka byla podrobena analýze NMR. Výtěžek činil 0,53 g (98 %) žluté olejovité látky A2.

Látka byla použita v následující reakci bez dalšího přečištění.

1H -NMR (401 MHz; $CDCl_3$) δ 1,62 (s; 9H); 2,51 (dd; $J = 22,6$; 1,8 Hz; 1H); 2,98 (d; $J = 22,6$ Hz; 1H); 3,21 (dd; $J = 14,0$; 2,9 Hz; 1H); 3,37 (dd; $J = 14,0$; 5,8 Hz; 1H); 4,62 – 4,68 (m; 1H); 6,93 – 7,00 (m; 1H); 7,13 – 7,21 (m; 2H); 7,38 – 7,42 (m; 1H).

^{13}C -NMR (101 MHz; $CDCl_3$) δ 28,2; 36,0; 43,4; 68,1; 84,8; 123,1; 128,3; 130,6; 131,0; 133,0; 136,5; 149,4; 167,1; 203,9.

ESI MS: 290,0 [M – Boc + H + Na] $^+$.

HR ESI MS: vypočteno pro $C_{16}H_{18}O_4NBrNa^+$ 390,03114; nalezeno 390,03135.

5.3.3 Příprava látky A3

tert-Butyl (2*S*,3*S*)-2-(3-brombenzyl)-3-hydroxy-5-oxopyrrolidin-1-karboxylát

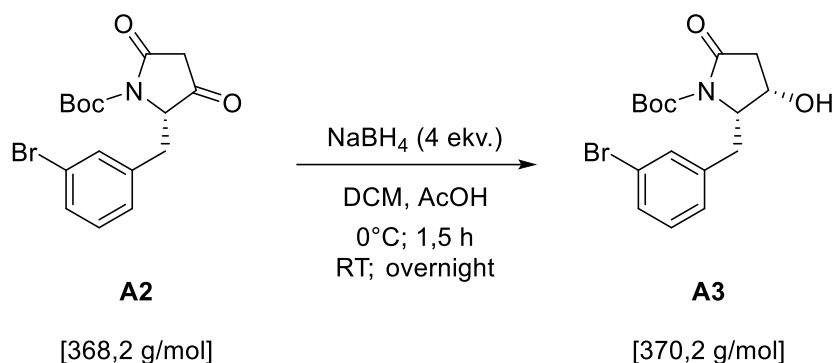


Schéma 12: Příprava látky A3 z látky A2

Postup: Výchozí látka A2 byla v množství 0,52 g (1,41 mmol) rozpuštěna v 15 ml DCM a do roztoku bylo přidáno 1,5 ml AcOH. Následně byl roztok za míchání ochlazen ledovou lázní na teplotu 0 °C a bylo přidáno 0,21 g NaBH₄ (5,65 mmol; 4 ekv.) během 1,5 hodiny, načež byla reakční směs vytažena z ledové lázně a ponechána reagovat za pokojové teploty do dalšího dne. Další den byla provedena analýza pomocí TLC (mobilní fáze se skládala z 95 % EtOAc, 3 % MeOH a 2 % AcOH; destička pozorována pod UV a následně vyvinuta KMnO₄) a UPLC–MS, která potvrdila požadovanou změnu v reakční směsi spočívající ve vymizení píku reaktantu ve prospěch píku produktu. Reakční směs byla nalita do několikanásobného objemu ledové vody, jež následně byla 3× extrahována DCM. Získané extrakty byly zkombinovány do jednoho, vysušeny promytím nas. roz. NaCl a práškovým bezvodým MgSO₄. Po filtraci pro zbavení sušidla bylo rozpouštědlo (DCM) odstraněno na RVO a jeho zbytky podtlakem. Látka byla přečištěna standardní kolonovou chromatografií (mobilní fáze EtOAc/cyklohexan v poměru 1:1), jejíž průběh byl monitorován pomocí TLC (pozorováno pod UV). Získaná látka byla podrobena analýze NMR. Výtěžek činil 0,36 g (69 %).

¹H-NMR (401 MHz; CDCl₃) δ 1,48 (s; 9H); 2,47 (dd; J = 17,2; 8,5 Hz; 1H); 2,64 (dd; J = 17,2; 7,6 Hz; 1H); 3,05 (dd; J = 13,7; 4,6 Hz; 1H); 3,15 (dd; J = 13,7; 7,8 Hz; 1H); 4,41 (ddd; J = 7,8; 6,9; 4,6 Hz; 1H); 4,52 (dt; J = 8,3; 7,2 Hz; 1H); 7,15 (t; J = 7,7 Hz; 1H); 7,22 (dt; J = 7,7; 1,4 Hz; 1H); 7,35 (ddd; J = 7,8; 2,1; 1,2 Hz; 1H); 7,48 (t; J = 1,8 Hz; 1H).

¹³C-NMR (101 MHz; CDCl₃) δ 28,1; 33,8; 40,2; 62,7; 65,5; 83,7; 122,6; 128,6; 129,8; 130,2; 133,0; 140,5; 149,8; 171,5.

ESI MS: 392,0 [M + Na]⁺.

HR ESI MS: vypočteno pro C₁₆H₂₀O₄NBrNa⁺ 392,04679; nalezeno 392,04670.

5.3.4 Příprava látky A4

Kyselina (3*S*,4*S*)-5-(3-bromfenyl)-4-[(*tert*-butoxykarbonyl)amino]-3-hydroxypentanová

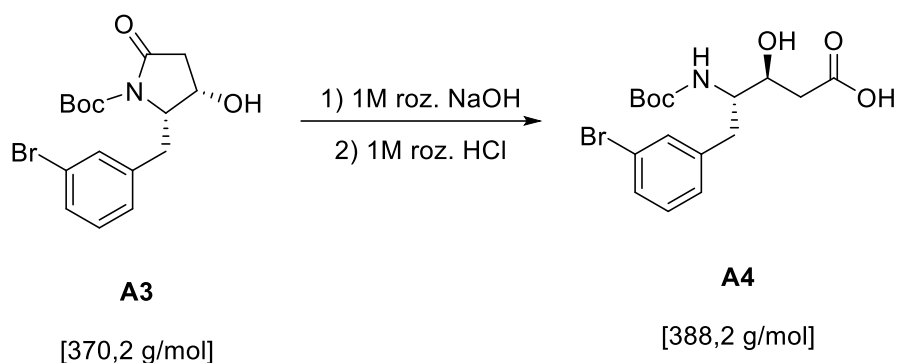


Schéma 13: Příprava látky A4 z látky A3

Postup: Východí látka A3 byla v množství 0,74 g (2 mmol) rozpuštěna v 15 ml acetonu a k roztoku byly přidány 4 ml 1M roz. NaOH (4 mmol; 2 ekv.) a 5 ml vody. Reakční směs byla ponechána reagovat za míchání při RT po dobu 2,5 h. Následně byla provedena analýza reakční směsi pomocí UPLC–MS. Po potvrzení úplného proběhnutí reakce byla část acetonu odstraněna na RVO a produkt vysrážen okyselením roztoku na pH 2-3 postupným přidávkem 4 ml 1M roz. HCl (stejně množství jako 1M roz. NaOH). Sraženina byla oddělena filtrací za sníženého tlaku přes filtrační papír v Büchnerově nálevce, kde byla i několikrát promyta vodou. Suchý produkt ve výborné čistotě byl získán rozpuštěním sraženiny v acetonu, odstraněním acetonu na RVO a zbavením zbytků acetonu a vody podtlakem. Čistota produktu byla potvrzena analýzou NMR. Výtěžek činil 0,65 g (84 %) látky A4 v podobě bílého prášku.

$^1\text{H-NMR}$ (401 MHz; DMSO- d_6) δ 1,29 (s; 9H); 2,17 (dd; $J = 15,5; 9,6$ Hz; 1H); 2,29 – 2,40 (m; 1H); 2,53 – 2,62 (m; 1H); 2,81 (dd; $J = 13,8; 4,6$ Hz; 1H); 3,65 (m; 1H); 3,90 (m; 1H); 6,55 (d; $J = 9,1$ Hz; 1H); 7,22 (m; 2H); 7,32 – 7,39 (m; 1H); 7,42 (s; 1H).

$^{13}\text{C-NMR}$ (101 MHz; DMSO- d_6) δ 28,2; 35,5; 39,9; 55,9; 68,5; 77,7; 121,3; 128,3; 128,7; 130,1; 131,8; 142,5; 155,4.

ESI MS: 386,1 $[\text{M} - \text{H}]^-$.

HR ESI MS: vypočteno pro $\text{C}_{16}\text{H}_{21}\text{O}_5\text{NBr}^-$ 386,06086; nalezeno 386,06055.

5.4 Syntéza prekurzoru B

Syntéza vychází ze zakoupené látky B0 nazývané kyselina boc-11-amino-undekanová. Systematický název této látky B0 (dle programu ChemDraw) zní:

Kyselina 11-[(*tert*-butoxykarbonyl)amino]undekanová

Název preferovaný organizací IUPAC zní:

Kyselina 11-[(2-methylpropan-2-yl)oxykarbonylamino]undekanová

Názvy dalších látek B1-4 jsou uvedeny vždy pod nadpisem u jejich přípravy.

5.4.1 Příprava látky B1

tert-Butyl [11-(2,2-dimethyl-4,6-dioxo-1,3-dioxan-5-yl)-11-oxoundecyl]karbamát

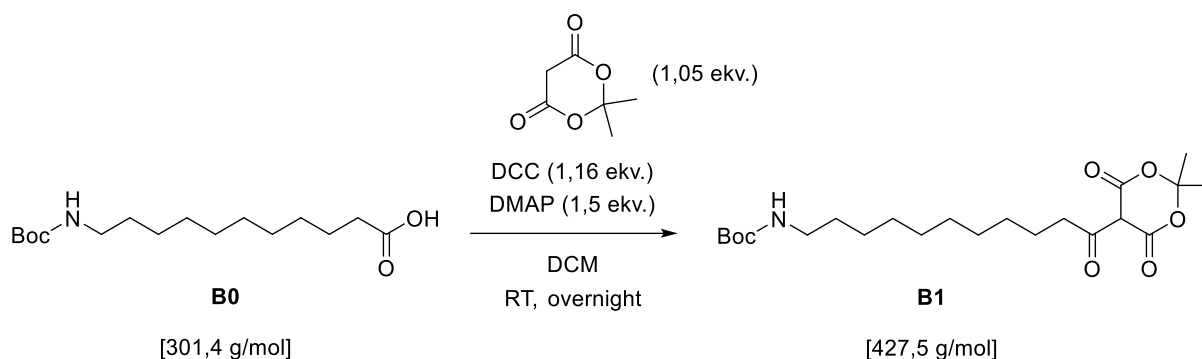


Schéma 14: Příprava látky B1 z výchozí látky B0

Postup: 1,0 g výchozí látky B0 (3,32 mmol) bylo rozpuštěno spolu s 0,5 g Meldrumovy kyseliny (3,48 mmol; 1,05 ekv.) a 0,61 g DMAP (4,98 mmol; 1,5 ekv.) ve 25 ml DCM. Za míchání bylo k roztoku přidáno a ponecháno rozpustit 0,79 g DCC (3,82 mmol; 1,16 ekv.). Bylo pozorováno postupné srážení DCU vznikající průběhem chtěné reakce. Reakční směs byla ponechána za míchání při RT do dalšího dne. Následně byla nejprve podrobena filtraci a zachycený pevný podíl (vzniklá DCU) promyt DCM a odstraněn. Filtrát byl zbaven rozpouštědla na RVO. Po odpaření DCM byl přidán vychlazený EtOAc, nerozpouštěný podíl (DCU) znovu odstraněn filtrací a promyt chladným EtOAc. Filtrát byl následně 2× promyt 10% roz. KHSO₄, 1× nas. roz. NaCl pro snížení obsahu vody, vysušen bezvodým MgSO₄, zbaven sušidla filtrací a rozpouštědla pomocí RVO. Látka byla přečištěna standardní kolonovou chromatografií (mobilní fáze DMC/MeOH v poměru 30:1), jejíž průběh byl monitorován pomocí TLC (pozorováno pod UV). Výtěžek byl kvantitativní (1,4 g).

¹H-NMR (401 MHz; CDCl₃) δ 1,23 – 1,32 (m; 8H); 1,42 (m; 13H); 1,63 – 1,70 (m; 4H); 1,72 (s; 6H); 2,98 – 3,15 (m; 4H); 4,51 (bs; 1H); 15,28 (bs; 1H).

^{13}C -NMR (101 MHz; CDCl_3) δ 25,1; 25,8; 26,2; 26,9; 28,5; 29,3; 29,4; 29,5; 29,6; 30,2; 35,9; 40,7; 79,1; 91,3; 104,9; 160,3; 170,7; 198,4.

ESI MS: 428,3 $[\text{M} + \text{H}]^+$.

HR ESI MS: vypočteno pro $\text{C}_{22}\text{H}_{38}\text{O}_7\text{N}^+$ 428,26428; nalezeno 428,26422.

5.4.2 Příprava látky B2

tert-Butyl [11-(2,2-dimethyl-4,6-dioxo-1,3-dioxan-5-yl)undecyl]karbamát

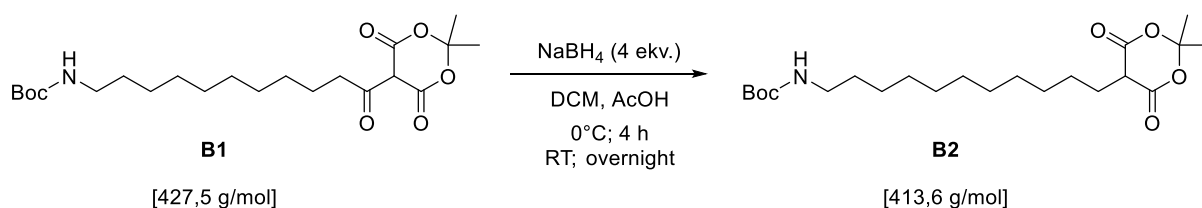


Schéma 15: Příprava látky B2 z látky B1

Postup: 0,19 g výchozí látky B1 (0,44 mmol) bylo rozpuštěno v 10 ml DCM a do roztoku byl přidán 1 ml AcOH. Poté byl získaný roztok za míchání ochlazen ledovou lázní na teplotu 0°C a bylo přidáno 67 mg NaBH_4 (1,78 mmol; 4 ekv.) během 15 minut. Ledová lázeň byla odstraněna krátce po přidání veškerého redukčního činidla. Reakce byla monitorována pomocí TLC (mobilní fáze se skládala z 95 % EtOAc, 3 % MeOH a 2 % AcOH; destička pozorována pod UV a následně vyvinuta roztokem KMnO_4) a jelikož nebyla úplná změna viditelná ani po 4 hodinách (nízká konverze), byla reakční směs ponechána míchat za RT do dalšího dne. Další den byla reakční směs analyzována pomocí UPLC–MS a po potvrzení vymizení reaktantu B1 byla reakční směs nalita do 50 ml ledové vody a 3× extrahována DCM. Získané extrakty byly sjednoceny, vysušeny nas. roz. NaCl a práškovým MgSO_4 . Po filtraci pro zbavení sušidla bylo rozpouštědlo odstraněno na RVO a jeho zbytky podtlakem. Analýza NMR potvrdila dostatečnou čistotu získané látky B2. Výtěžek činil 0,15 g (82 %) nazelenale bílého voskovitého produktu.

Látka byla dostatečně čistá, aby byla použita v následující reakci bez dalšího přečištění.

^1H -NMR (401 MHz; CDCl_3) δ 1,21 – 1,35 (m; 14H); 1,43 (m; 13H); 1,74 (s; 3H); 1,77 (s; 3H); 2,04 – 2,12 (m; 2H); 3,08 (m; 2H); 3,49 (t; $J = 5,0 \text{ Hz}$; 1H); 4,50 (bs; 1H).

^{13}C -NMR (101 MHz; CDCl_3) δ 26,6; 26,8; 26,9; 27,1; 28,6; 29,3; 29,4; 29,6; 29,6; 29,6; 29,6; 30,2; 40,8; 46,3; 79,1; 104,9; 156,1; 165,8.

ESI MS: 436,3 $[\text{M} + \text{Na}]^+$.

HR ESI MS: vypočteno pro $\text{C}_{22}\text{H}_{39}\text{O}_6\text{NNa}^+$ 436,26696; nalezeno 436,26732.

5.4.3 Příprava látky B3

Kyselina 13-[(*tert*-butoxykarbonyl)amino]-2-(metoxykarbonyl)tridekanová

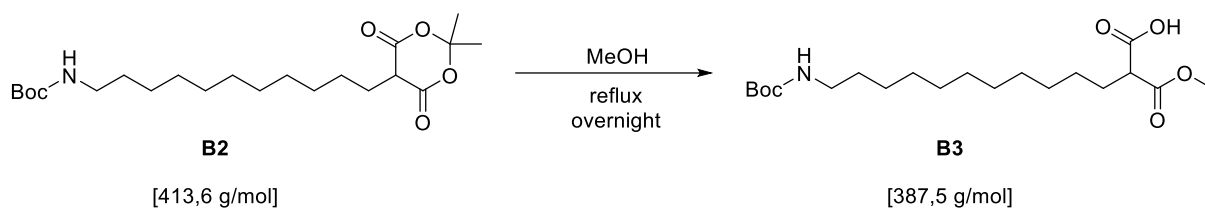


Schéma 16: Příprava látky B3 z látky B2

Postup: 0,66 g výchozí látky B2 (1,6 mmol) bylo rozpuštěno ve 20 ml MeOH. Po připojení zpětného chladiče byl roztok v baňce za míchání zahříván na teplotu varu MeOH, během čehož byl každých 60 min monitorován průběh reakce pomocí TLC (mobilní fáze cyklohexan/EtOAc v poměru 5:1). Ani po 3 h neproběhla reakce dostatečně (konverze odhadem 50 %), v zahřívání bylo pokračováno až do vymizení reaktantu (určeno analýzou TLC prováděnou jednou za několik hodin). Reakční směs byla nakonec analyzována metodou UPLC–MS, načež bylo rozpouštědlo odstraněno na RVO a získaná olejovitá látka podrobena analýze NMR. Výtěžek byl kvantitativní.

$^1\text{H-NMR}$ (401 MHz; CD_3OD) δ 1,31 (m; 16H); 1,43 (m; 11H); 1,81 – 1,86 (m; 2H); 3,01 (t; $J = 7,0$ Hz; 2H); 3,34 (t; $J = 7,5$ Hz; 1H); 3,72 (s; 3H).

ESI MS: 410,3 $[\text{M} + \text{Na}]^+$.

HR ESI MS: vypočteno pro $\text{C}_{20}\text{H}_{37}\text{O}_6\text{NNa}^+$ 410,25186; nalezeno 410,25095.

5.4.4 Příprava látky B4

Methyl 13-[(*tert*-butoxykarbonyl)amino]tridekanoát

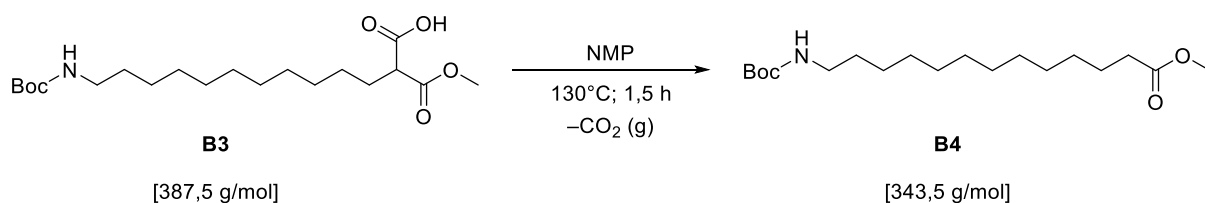


Schéma 17: Příprava látky B4 z látky B3

Postup: 0,4 g výchozí látky B3 (1,0 mmol) bylo rozpuštěno v 10 ml NMP. K baňce s roztokem byl připojen zpětný chladič a roztok byl zahříván na 130 °C po dobu 1,5 h. Průběh reakce byl monitorován pomocí TLC (mobilní fáze se skládala z DCM a MeOH v poměru 20:1; destička byla zbarvena roztokem ninhydrinu). Během reakce byl pozorován vznik bublinek CO_2 a změna barvy roztoku z nažloutlé přes tmavě žlutou na tmavě oranžovou až hnědou. Zahřívání bylo ukončeno 25 min od vzniku posledních bublinek CO_2 poté, co na TLC nebyla pozorována

přítomnost výchozí látky. Reakční směs byla ponechána zchladnout, zředěna přidavkem EtOAc a 3× promyta vodou pro odstranění NMP (ztráty EtOAc ve vodě doplňovány). Získaný roztok v EtOAc byl vysušen práškovým bezvodým MgSO₄, sušidlo odstraněno filtrací a EtOAc na RVO. Bylo získáno 0,4 g žluté olejovité látky, jež byla přečištěna standardní kolonovou chromatografií (mobilní fáze cyklohexan/EtOAc v poměru 5:1). Průběh chromatografie byl monitorován TLC (stejná mobilní fáze; destička vyvíjena ninhydrinem). Čistota získaného produktu potvrzena analýzou NMR a MS. Finální výtěžek činil 0,24 g bílé voskovité látky B4 (68 %).

¹H-NMR (401 MHz; CDCl₃) δ = 1,03 – 1,34 (m; 14H); 1,43 (m; 13H); 1,60 (m; 2H); 2,28 (t; J=7,5; 2H); 3,08 (m; 2H); 3,65 (s; 3H); 4,51 (bs; 1H).

¹³C-NMR (101 MHz; CDCl₃) δ 25,0; 26,8; 28,4; 29,1; 29,2; 29,3; 29,4; 29,5; 30,1; 34,1; 40,6; 51,4; 79,0; 156,0; 174,3.

ESI MS: 366,3 [M + Na]⁺.

HR ESI MS: vypočteno pro C₁₉H₃₇O₄NNa⁺ 366,26148; nalezeno 366,26119.

5.4.5 Příprava látky B5

13-Methoxy-13-oxotridekan-1-aminium 2,2,2-trifluoroacetát

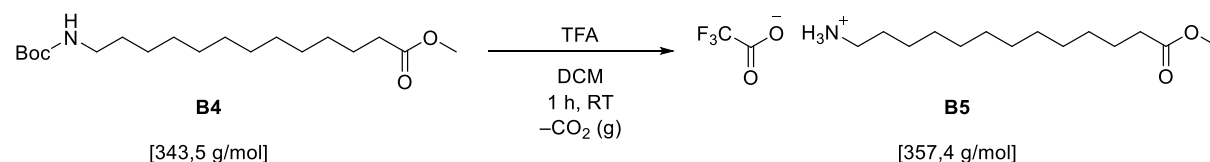


Schéma 18: Příprava látky B5 z látky B4

Postup: 74 mg výchozí látky B4 (0,215 mmol) bylo rozpuštěno ve 2 ml DCM. Následně byly za míchání přidány 2 ml TFA. Reakční směs byla ponechána za míchání při RT po dobu 1 hodiny, načež byla TFA i DCM odstraněny prouděním vzduchu do baňky v uzavřené digestoři. Poté byla látka znovu rozpuštěna ve 3 ml DCM a veškerá kapalina znovu odstraněna prouděním vzduchu. Tento postup byl opakován ještě dvakrát pro odstranění veškeré TFA. Nakonec byla látka rozpuštěna ve 3 ml EtOAc a přidaný EtOAc ihned odstraněn na RVO. Zbyl suchý bílý prášek, jenž byl podroben analýze NMR a MS. Výtěžek činil 74 mg látky B5 (96 %).

¹H-NMR (401 MHz; CDCl₃) δ = 1,12 – 1,39 (m; 16H); 1,61 (m; 4H); 2,29 (t; J=7,5; 2H); 2,87 (m; 2H); 3,65 (s; 3H); 7,88 (bs; 3H).

¹³C-NMR (101 MHz; CDCl₃) δ 24,9; 26,3; 27,5; 29,0; 29,1; 29,2; 29,3; 29,4; 29,4; 29,5; 34,1; 39,9; 51,4; 174,4.

ESI MS: 244,2 [M + H]⁺.

HR ESI MS: vypočteno pro C₁₄H₃₀O₂N⁺ 244,22711; nalezeno 244,22708.

6 ZÁVĚR

Práce zdokumentovala přípravu dvou komerčně nedostupných prekurzorů (označených A a B) cílové makrocyclické látky pojmenované cyklo[(Br)PheSta-Val-Atr] z komerčně dostupných látek.

Prekurzor A (látka A4) byl připraven čtyřmi reakcemi: prodloužením kondenzací výchozí látky A0 s Meldrumovou kyselinou, následným termickým rozkladem meziprojektu A1, redukcí ketonu A2 na alkohol A3 a hydrolýzou amidu na finální odchráněnou aminokyselinu A4. Syntéza byla relativně rychlá a bez problémů díky již existujícímu postupu, oproti kterému bylo provedeno minimum změn.

Prekurzor B (látka B5) byl připravován obdobně v pěti reakcích, také dle existujícího postupu. Idea prodloužení řetězce o dva uhlíky i zde vycházela z použití Meldrumovy kyseliny. První dvě reakce proběhly dle plánu, ale rozložení derivátu Meldrumovy kyseliny B2 na methyl-ester B4 (třetí a čtvrtá reakce; viz. 5.4.3 a 5.4.4) bylo docíleno jinak, než bylo původně zamýšleno. Uvedený postup byl tedy vyvinut až po vyzkoušení několika možností.

Oba získané prekurzory budou v několika následujících již navrhnutých krocích spojeny spolu s třetím (komerčně dostupným) prekurzorem za vzniku makrocyclického cyklo[(Br)PheSta-Val-Atr], čímž bude syntéza žádané látky dokončena.

Finální produkt, cyklo[(Br)PheSta-Val-Atr], bude vhodnou výchozí látkou k přípravě celé knihovny dalších analogů pepstatinu A, kupříkladu skrz Suzukiho-Miyauraovu reakci, které pak budou biochemicky testovány pro určení jejich schopnosti a míry inhibice lidského katepsinu D (CatD). Získaná data poté budou moci být porovnána s daty o již prozkoumaných analogích.

V případě uspokojivých výsledků v biochemických testech je možné tyto látky pokládat za potenciální léčiva s nenulovou šancí na uplatnění mimo výzkum. Uplatnění ve výzkumu je skoro jisté.

7 REFERENCE

1. **Radka Houštická, Martin Hadzima, Jindřich Fanfrlík, Jiří Brynda, Lenka Pallová, Iva Hánová, Helena Mertlíková-Kaiserová, Martin Lepšík, Martin Horn, Martin Smrčina, Pavel Majer, and Michael Mareš.** Biomimetic Macrocyclic Inhibitors of Human Cathepsin D: Structure–Activity Relationship and Binding Mode Analysis. *Journal of Medicinal Chemistry*. 2020, Vol. 63, 4, pp. 1576-1596.
2. **Sulejman Alihodžić, Mirjana Bukvić, Ivaylo J. Elenkov, Antun Hutinec, Sanja Koštrun, Dijana Pešić, Gordon Saxty, Linda Tomašković, Dinko Žiher.** Chapter Three - Current Trends in Macrocyclic Drug Discovery and beyond-Ro5. *Progress in Medicinal Chemistry*. 2018, Vol. 57, pp. 113-233.
3. **Elizabeth A Villar, Dmitri Beglov, Spandan Chennamadhavuni, John A Porco Jr, Dima Kozakov, Sandor Vajda & Adrian Whitty.** How proteins bind macrocycles. *Nature Chemical Biology*. September 2014, 10, pp. 723-731.
4. **Fabrizio Giordanetto, Jan Kihlberg.** Macrocyclic Drugs and Clinical Candidates: What Can Medicinal Chemists Learn from Their Properties? *Journal of Medicinal Chemistry*. 28 August 2013, Vol. 57, 2, pp. 278-295.
5. **Matthew R Naylor, Andrew T Bockus, Maria-Jesus Blanco, R Scott Lokey.** Cyclic peptide natural products chart the frontier of oral bioavailability in the pursuit of undruggable targets. *Current Opinion in Chemical Biology*. June 2017, Vol. 38, pp. 141-147.
6. **Björn Over, Patrick McCarren, Per Artursson, Michael Foley, Fabrizio Giordanetto, Gunnar Grönberg, Constanze Hilgendorf, Maurice D. Lee, Pär Matsson, Giovanni Muncipinto, Mélanie Pellisson, Matthew W. D. Perry, Richard Svensson, J. R. Duvall, J. Kihlberg.** Impact of Stereospecific Intramolecular Hydrogen Bonding on Cell Permeability and Physicochemical Properties. *Journal of Medicinal Chemistry*. 13 February 2014, Vol. 57, 6, pp. 2746-2754 .
7. **Martin Horn, Adéla Jilková, Michael Mareš.** Katepsiové proteázy v patologii. *Chemické Listy*. 2014, Sv. 108, 4, stránky 358-363.
8. **Emmanuelle Liaudet-Coopman, Mélanie Beaujouin, Danielle Derocq, Marcel Garcia, Murielle Glondu-Lassis, Valérie Laurent-Matha, Christine Prébois, Henri Rochefort, Françoise Vignon,.** Cathepsin D: newly discovered functions of a long-standing aspartic protease in cancer and apoptosis. *Cancer Letters*. 2006, Vol. 237, 2, pp. 167-179.
9. **Petr Benes, Vaclav Vetvicka, Martin Fusek.** Cathepsin D – Many functions of one aspartic protease. 2008, Vol. 68, 1, pp. 12-28.

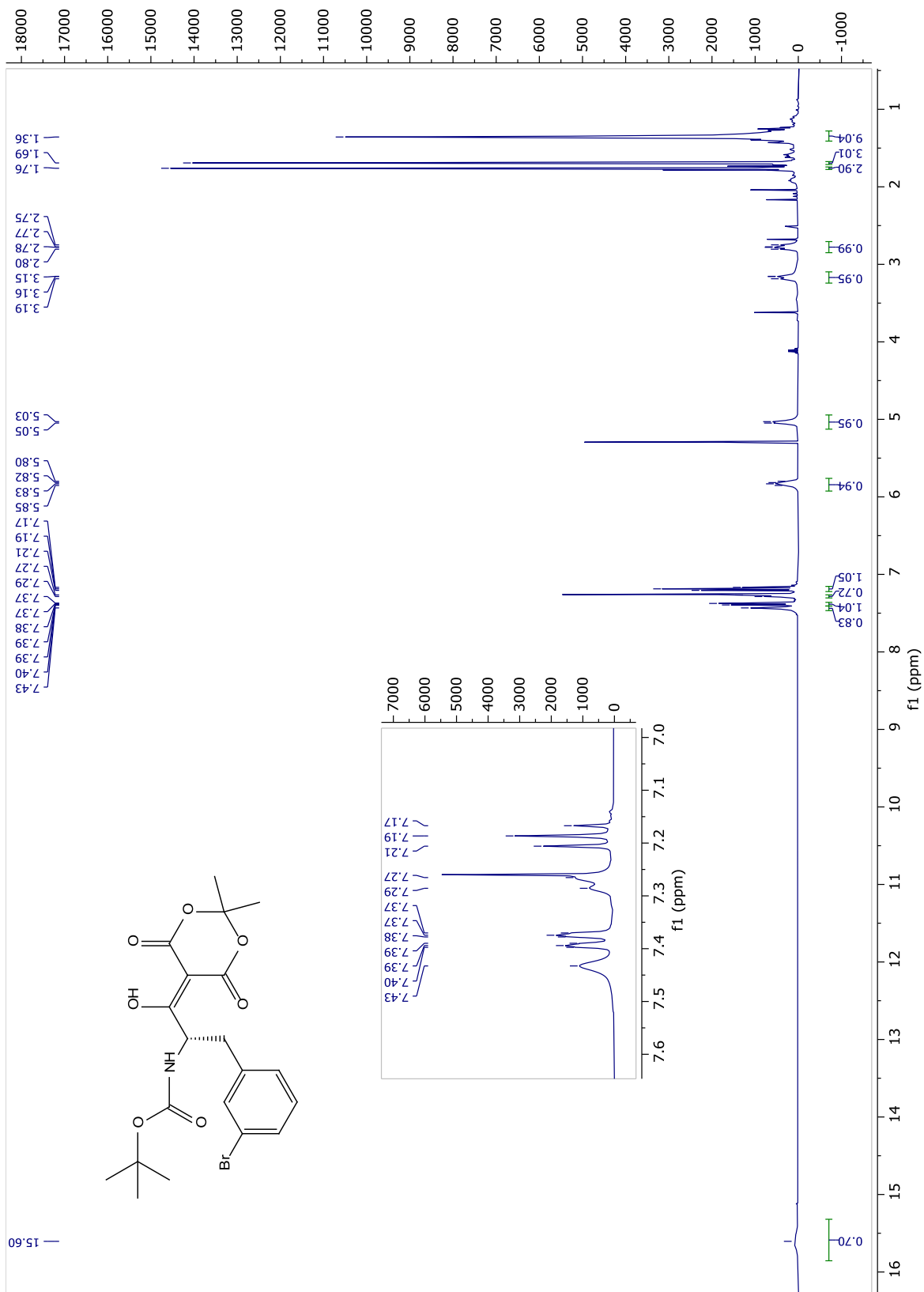
10. **G. Ferrandina, G. Scambia, F. Bardelli, P. Benedetti Panici, S. Mancuso & A. Messori.** relationship between cathepsin-D content and disease-free survival in node-negative breast cancer patients: a meta-analysis. *British Journal of Cancer*. 1997, Vol. 76, pp. 661-666.
11. **Olivier Masson, Anne-Sophie Bach, Danielle Derocq, Christine Prébois, Valérie Laurent-Matha, Sophie Pattingre, Emmanuelle Liaudet-Coopman.** Pathophysiological functions of cathepsin D: Targeting its catalytic activity versus its protein binding activity? *Biochimie*. 2010, Vol. 92, 11, pp. 1635-1643.
12. **H. Umezawa, T. Aoyagi, H. Morishima, M. Matsuzaki, M. Hamada, T. Takeuchi.** PEPSTATIN, A NEW PEPSIN INHIBITOR PRODUCED BY ACTINOMYCETES. *Antibiotics*. 1970, Vol. 23, 5, pp. 259-262.
13. **Rich, Daniel H.** Pepstatin-derived inhibitors of aspartic proteinases. A close look at an apparent transition-state analog inhibitor. *Journal of Medicinal Chemistry*. 1985, Sv. 28, 3, stránky 263-273.
14. **Patrick Jouin, Bertrand Castro and Dino Nisato.** Stereospecific synthesis of N-protected statine and its analogues via chiral tetramic acid. *Journal of the Chemical Society, Perkin Transactions 1*. January 1, 1987, pp. 1177-1182.
15. **Martin Smrcina, Pavel Majer, Eva Majerová, Tatiana A. Guerassina, Michael A. Eissenstat.** Facile stereoselective synthesis of γ -substituted γ -amino acids from the corresponding α -amino acids. *Tetrahedron*. September 22, 1997, Vol. 53, 38, pp. 12867-12874.
16. **Norio Miyaoura, Kinji Yamada, Akira Suzuki.** A new stereospecific cross-coupling by the palladium-catalyzed reaction of 1-alkenylboranes with 1-alkenyl or 1-alkynyl halides. *Tetrahedron Letters*. 1979, Vol. 20, 36, pp. 3437-3440.
17. **Stephen Hanessian, Robert Schaum.** 1,3-Asymmetric induction in enolate alkylation reactions of N-protected γ -amino acid derivatives. *Tetrahedron Letters*. 1997, Sv. 38, 2, stránky 163-166.
18. **Chiara Vidoni, Carlo Follo, Miriam Savino, Mariarosa A. B. Melone, Ciro Isidoro.** The Role of Cathepsin D in the Pathogenesis of Human Neurodegenerative Disorders. *Medicinal Research Reviews*. 2016, Vol. 36, 5, pp. 845-870.
19. **Ali A. Aghdassi, Daniel S. John, Matthias Sandler, F. Ulrich Weiss, Thomas Reinheckel.** Cathepsin D regulates cathepsin B activation and disease severity predominantly in inflammatory cells during experimental pancreatitis. *Journal of Biological Chemistry*. 2018, Vol. 293, 3, pp. 1018-1029.

8 SEZNAM OBRÁZKŮ

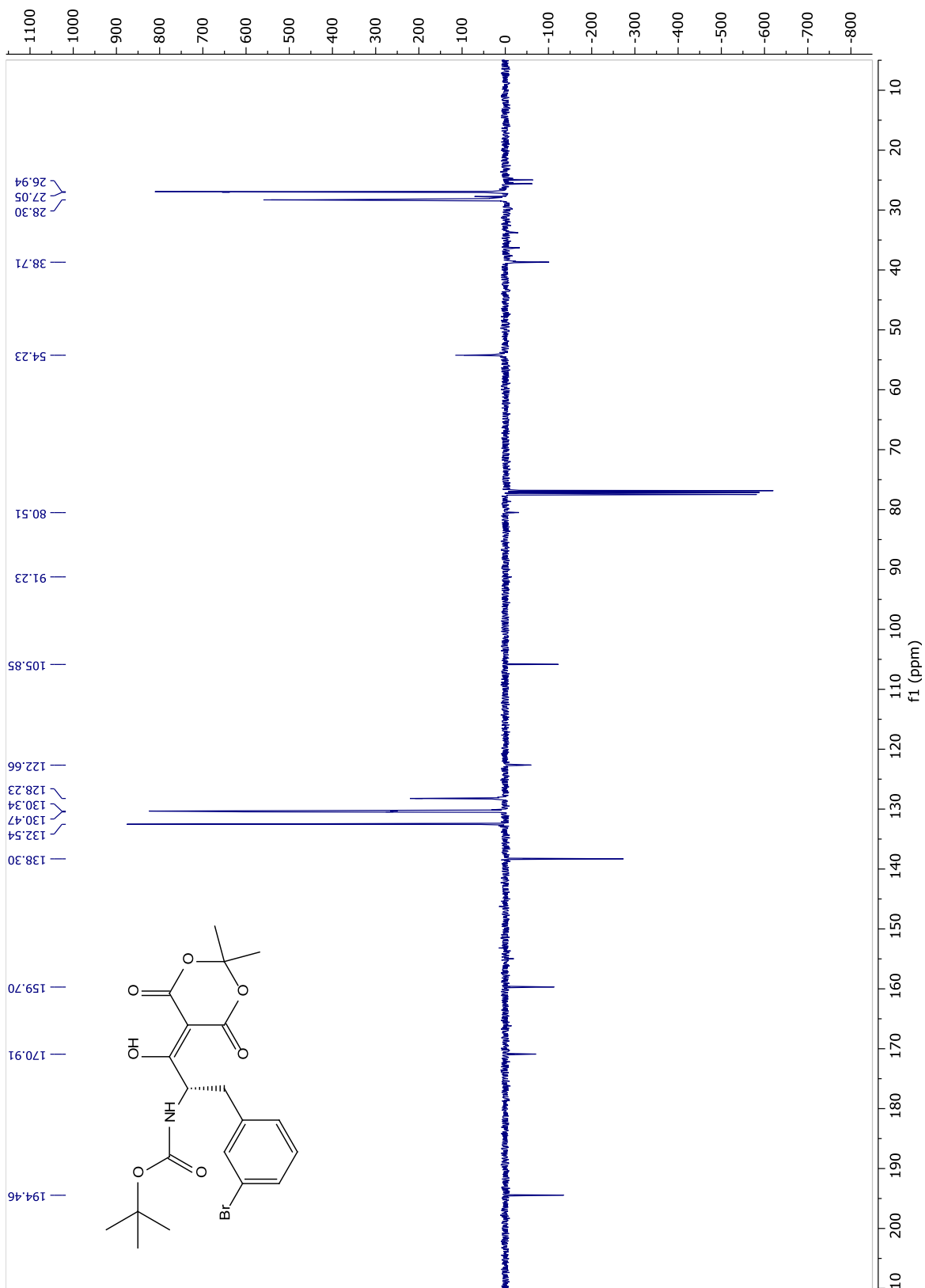
Schéma 1: Syntéza prekursoru A (látka A0 až A4).....	16
Schéma 2: Syntéza prekursoru B (látka B0 až B5)	17
Schéma 3: Zobrazení tří prekursorů a výsledné látky	19
Schéma 4: Obecná syntéza makrocyklu u analogů pepstatinu	20
Schéma 5: Suzukiho-Miyaurova reakce s aromáty (obecné reakční schéma).....	21
Schéma 6: Keto-enol tautomerie látky A1	22
Schéma 7: Keto-enol tautomerie látky A2.....	22
Schéma 8: Keto-enol tautomerie látky B1	23
Schéma 9: Keto-enol tautomerie látky B2	23
Schéma 10: Příprava látky A1 z výchozí látky A0	26
Schéma 11: Příprava látky A2 z látky A1	27
Schéma 12: Příprava látky A3 z látky A2.....	28
Schéma 13: Příprava látky A4 z látky A3.....	29
Schéma 14: Příprava látky B1 z výchozí látky B0	30
Schéma 15: Příprava látky B2 z látky B1	31
Schéma 16: Příprava látky B3 z látky B2	32
Schéma 17: Příprava látky B4 z látky B3	32
Schéma 18: Příprava látky B5 z látky B4	33
Struktura 1: Pepstatin A.....	12
Struktura 2: cyklo[(Br)PheSta-Val-Atr]	14
Tabulka 1: tabulka s hodnotami IC ₅₀ několika makrocykl. analogů pepstatinu A lišících se v délce alkylového řetězce, a tedy délky cyklu	13
Obr. 1: Pepstatin A v pomyslném tvaru U v komplexu s CatD.....	13
Obr. 2: Makrocyklický analog pepstatinu A v komplexu s CatD.....	13
Obr. 3: Komplex CatD se syntetickým makrocyklickým inhibitorem	14
Obr. 4: Detail kavity komplexu CatD se syntetickým makrocyklickým inhibitorem	14

9 PŘÍLOHA: NMR SPEKTRA SYNT. LÁTEK

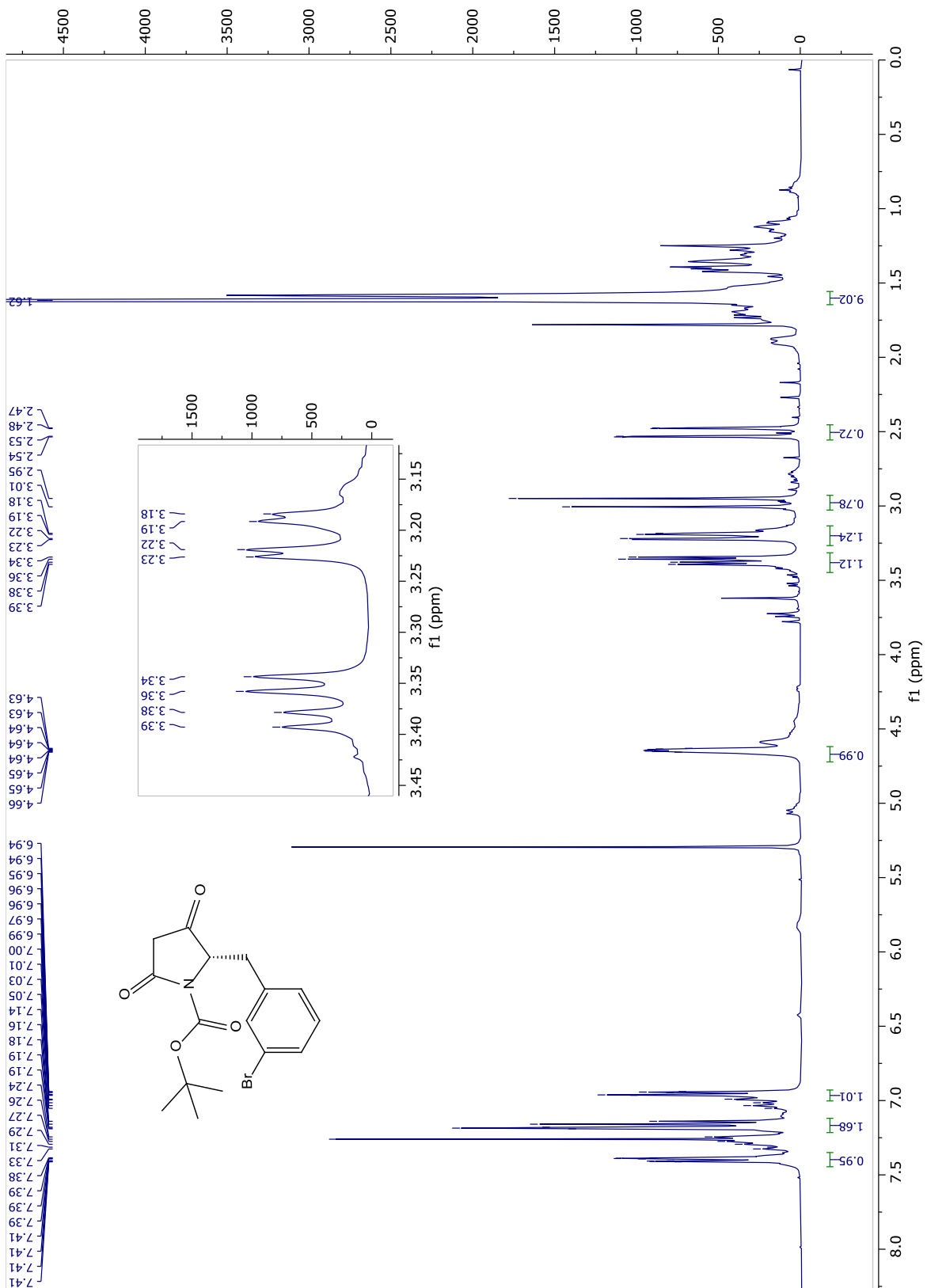
Spektrum 1 – ^{13}C -NMR spektrum látky B3, dva nejdůležitější signály přiblíženy.....	19
Spektrum 2 – ^1H -NMR látky A1	39
Spektrum 3 – ^{13}C -NMR látky A1	40
Spektrum 4 – ^1H -NMR látky A2	41
Spektrum 5 – ^{13}C -NMR látky A2	42
Spektrum 6 – ^1H -NMR látky A3	43
Spektrum 7 – ^{13}C -NMR látky A3	44
Spektrum 8 – ^1H -NMR látky A4	45
Spektrum 9 – ^{13}C -NMR látky A4	46
Spektrum 10 – ^1H -NMR látky B1.....	47
Spektrum 11 – ^{13}C -NMR látky B1	48
Spektrum 12 – ^1H -NMR látky B2.....	49
Spektrum 13 – ^{13}C -NMR látky B2	50
Spektrum 14 – ^1H -NMR látky B3.....	51
Spektrum 15 – ^1H -NMR látky B4.....	52
Spektrum 16 – ^{13}C -NMR látky B4	53
Spektrum 17 – ^1H -NMR látky B5.....	54
Spektrum 18 – ^{13}C -NMR látky B5	55



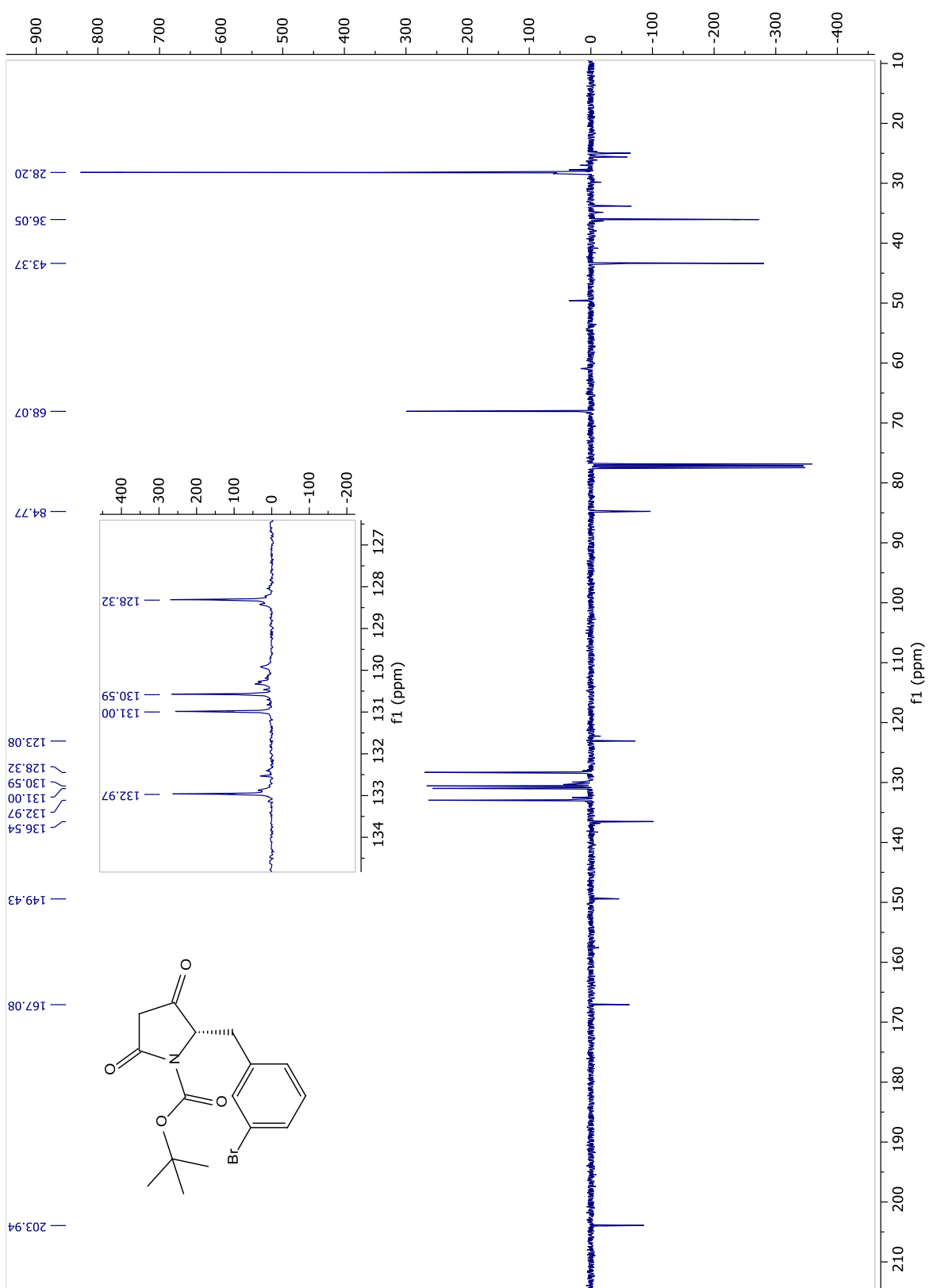
Spektrum 2 – ¹H-NMR látky A1



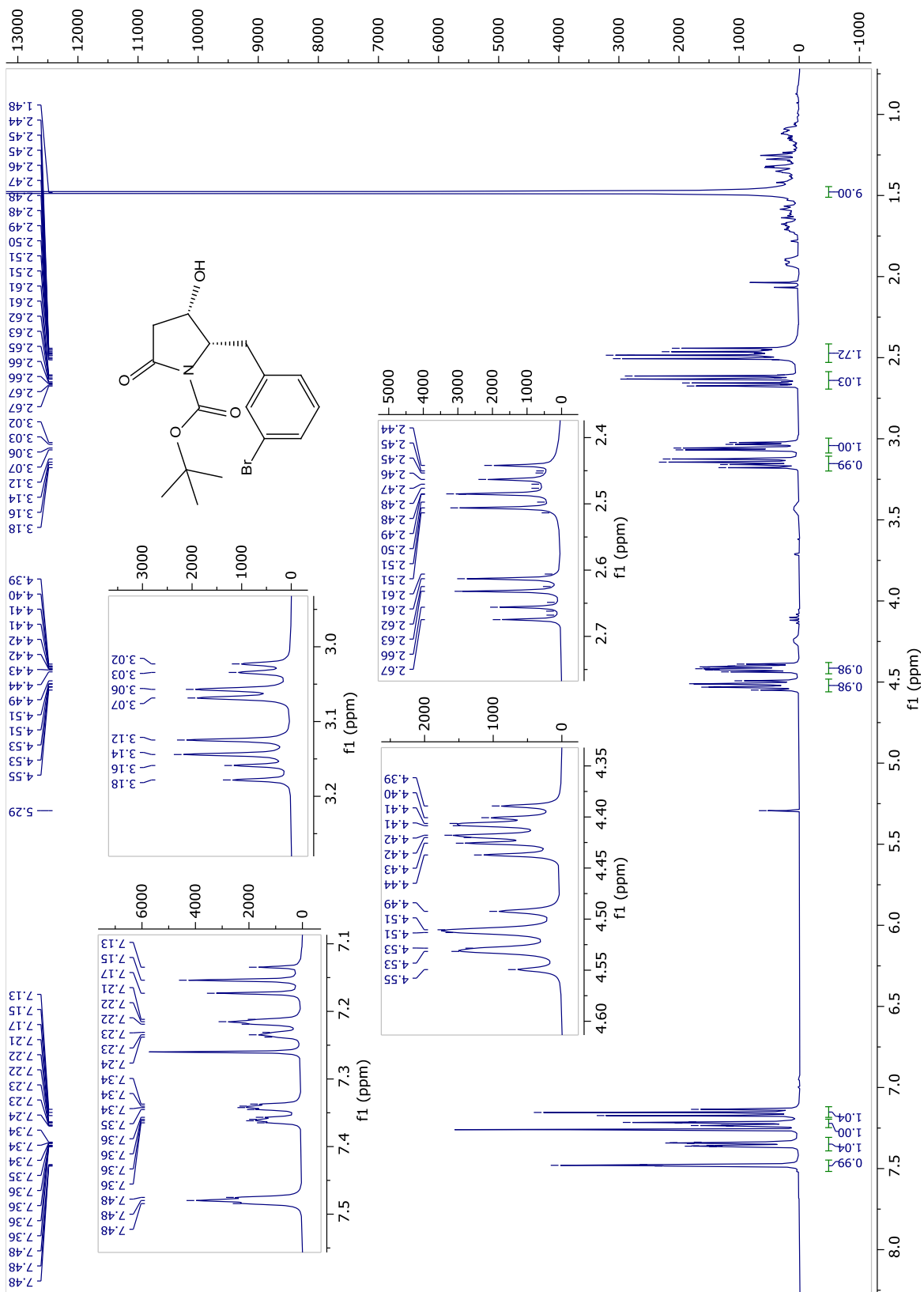
Spektrum 3 – ^{13}C -NMR látky A1



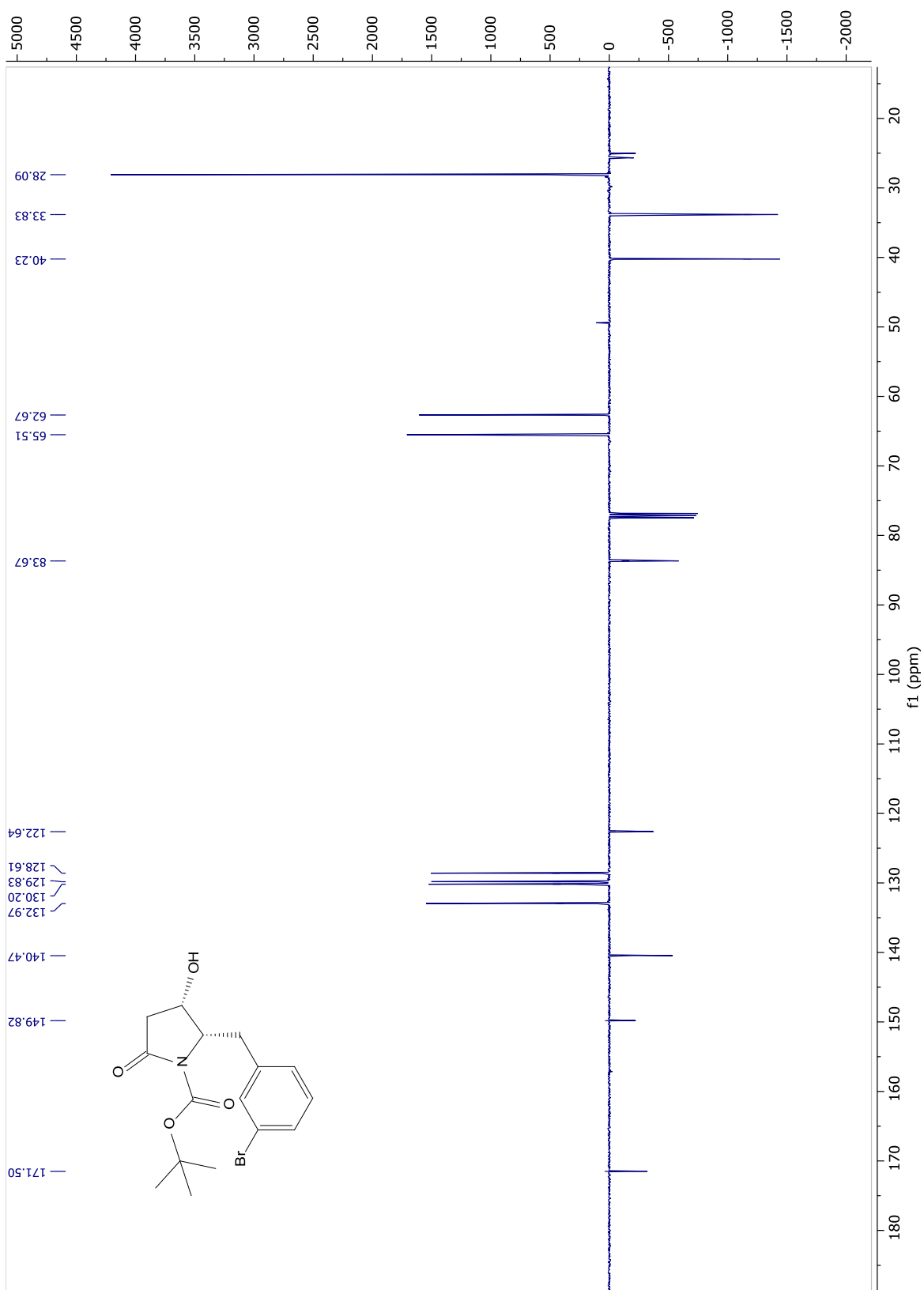
Spektrum 4 – ¹H-NMR látky A2



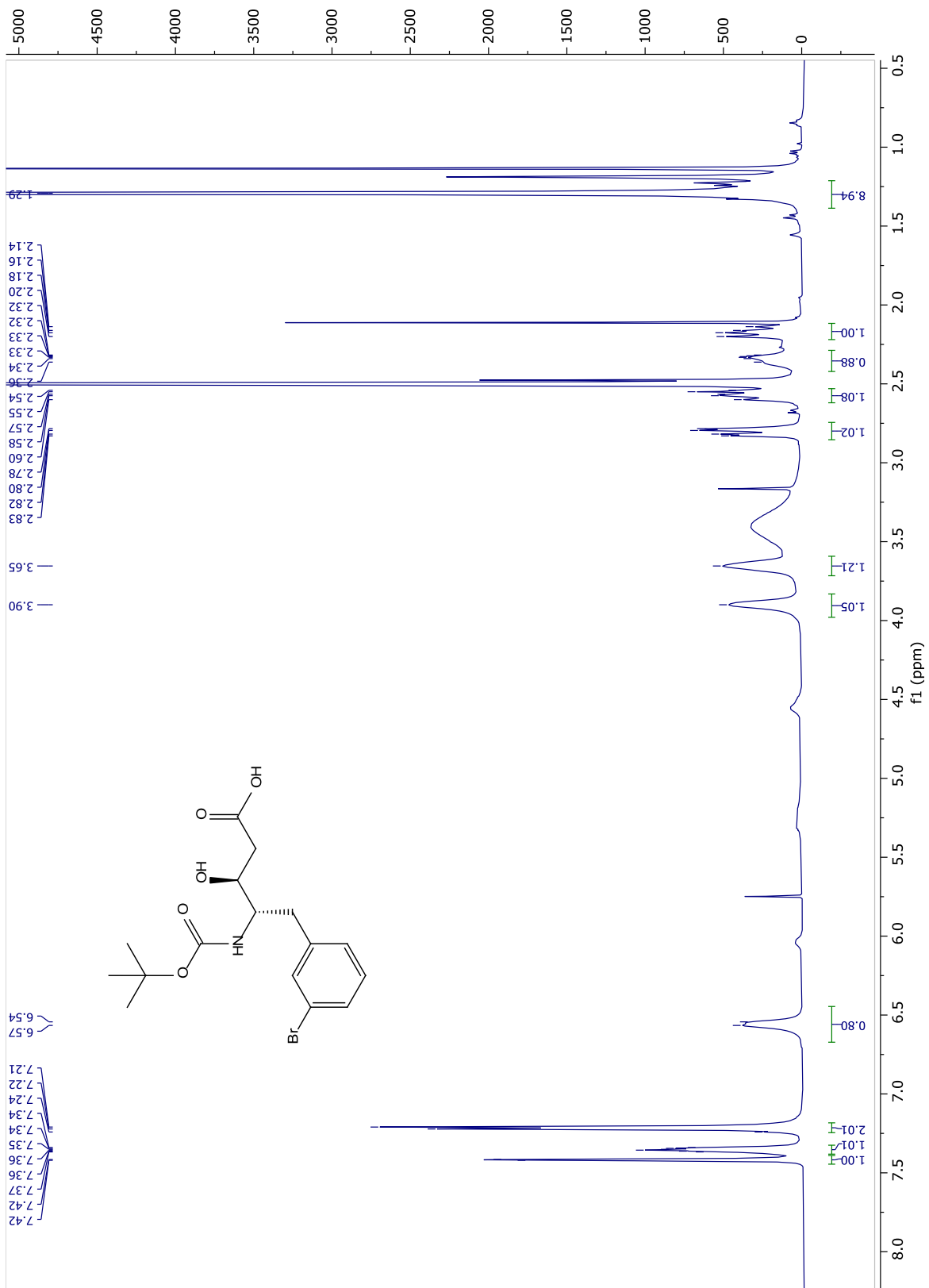
Spektrum 5 – ^{13}C -NMR látky A2



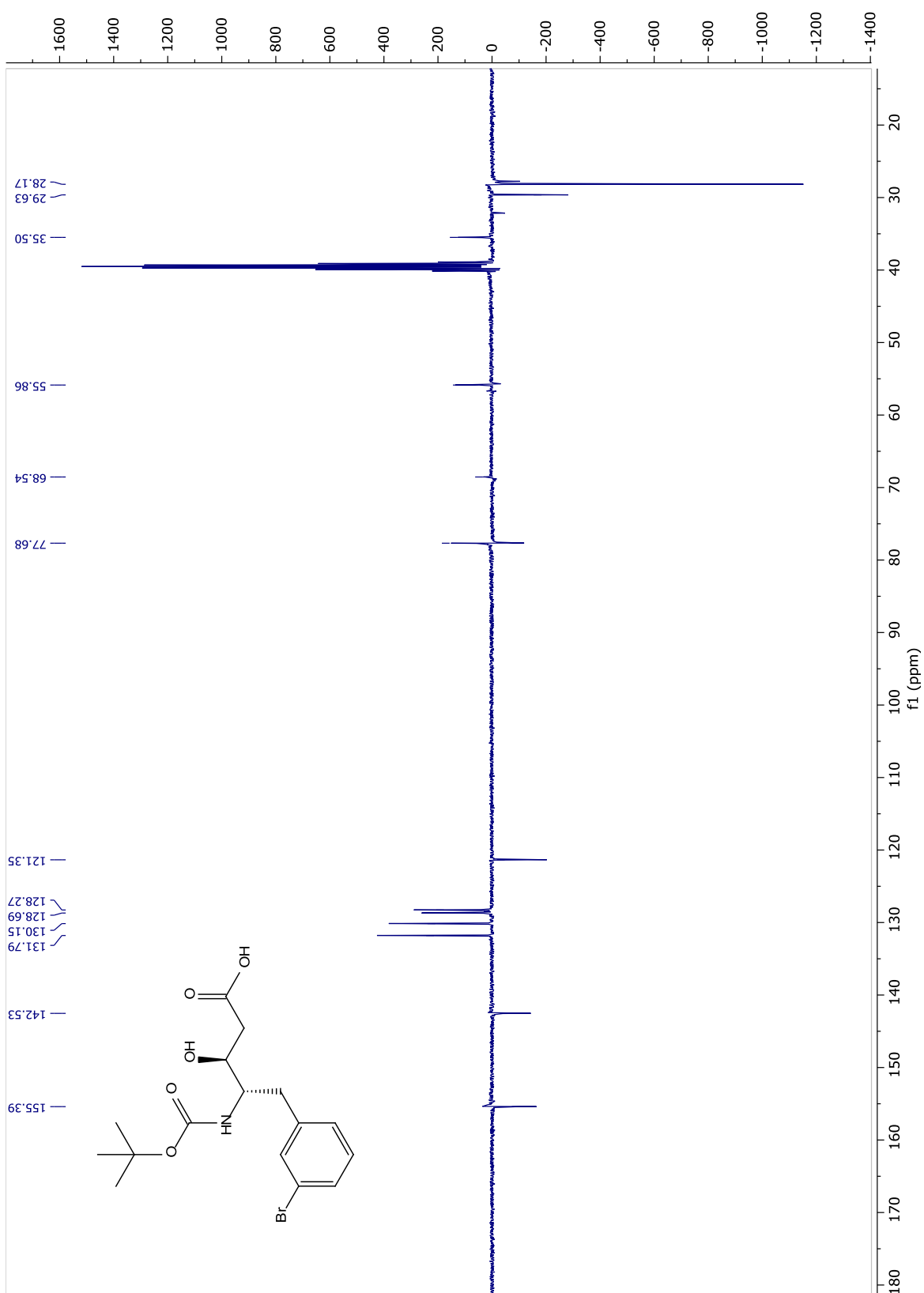
Spektrum 6 – ¹H-NMR látky A3



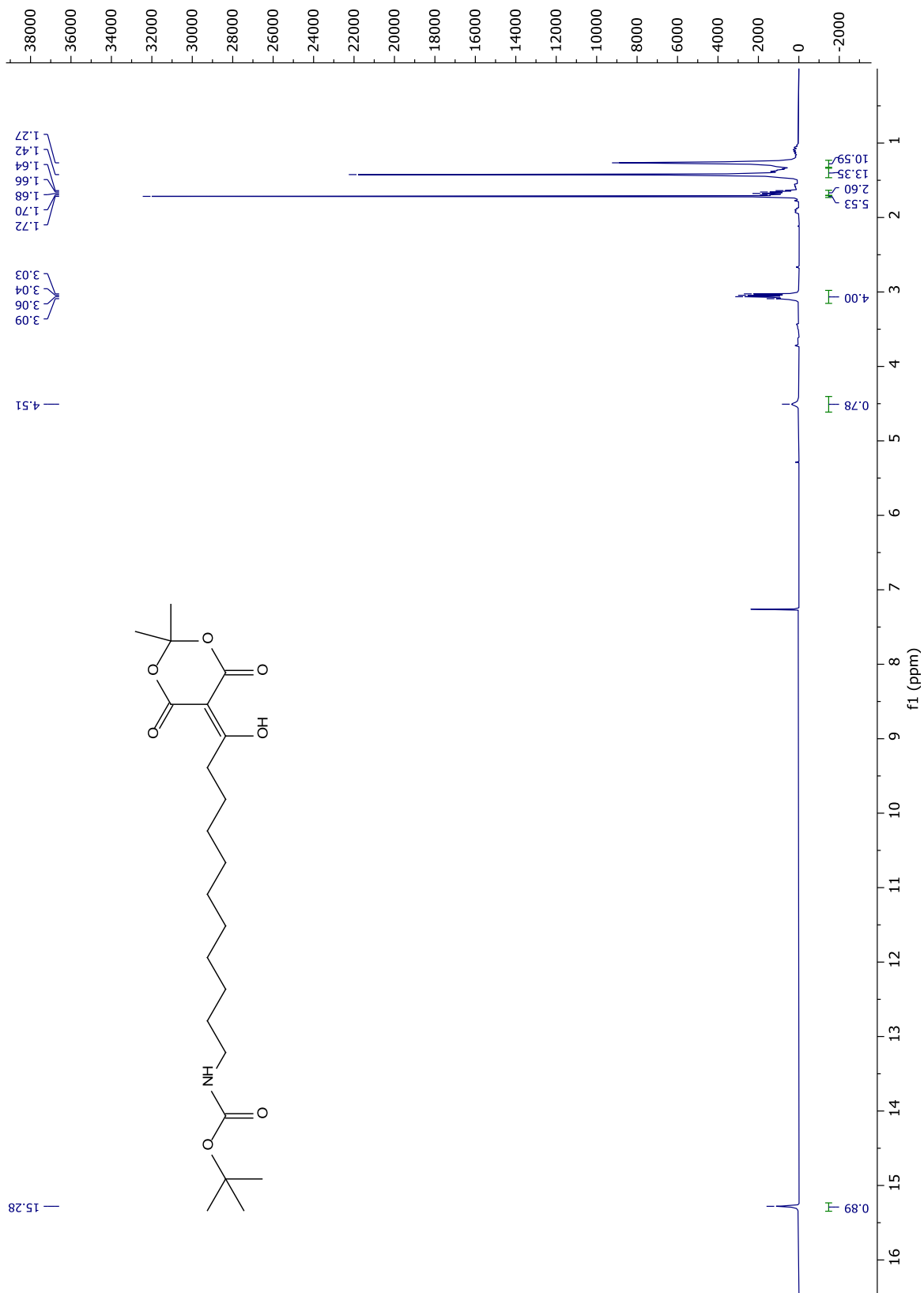
Spektrum 7 – $^{13}\text{C-NMR}$ látky A3



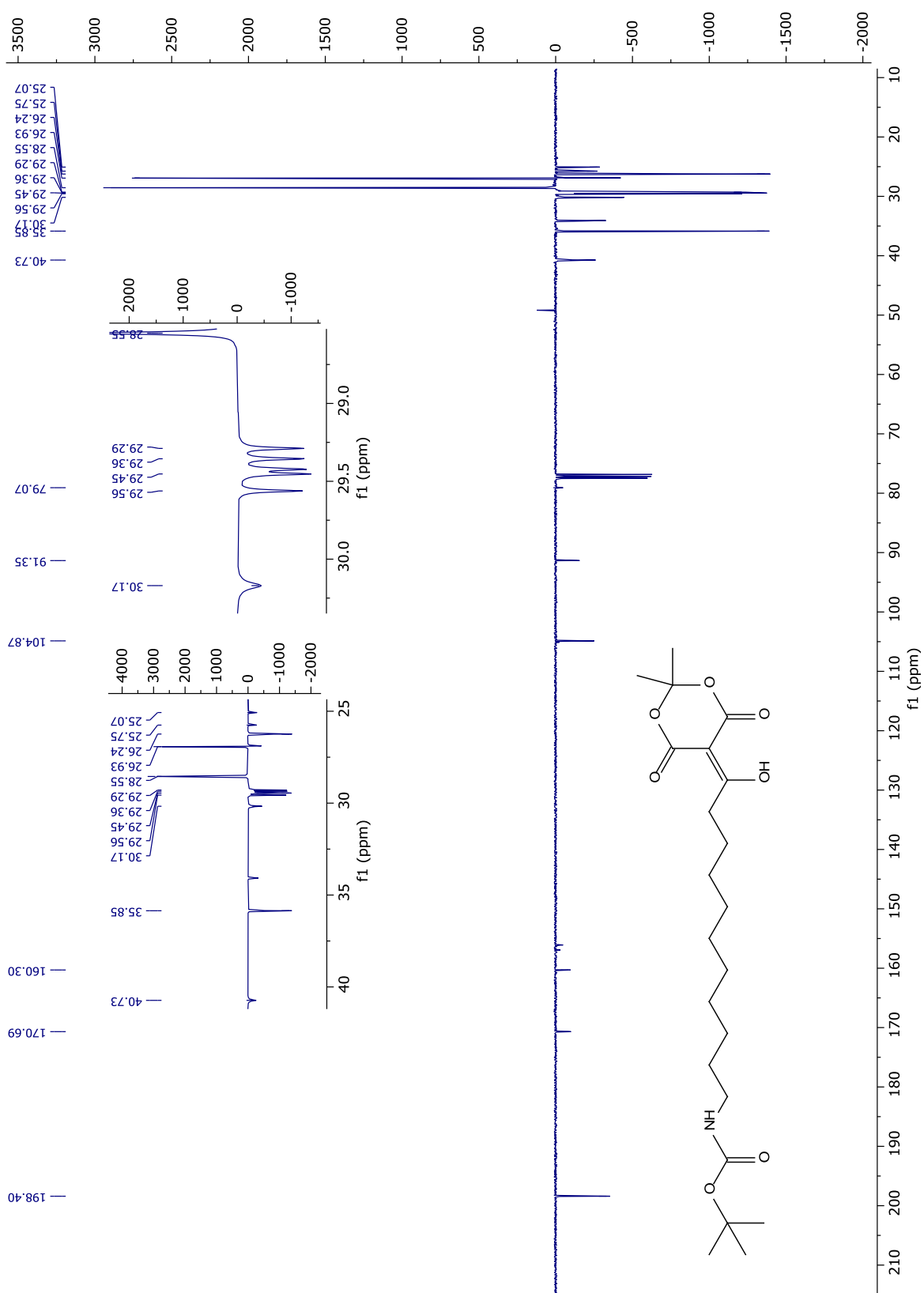
Spektrum 8 – $^1\text{H-NMR}$ látky A4



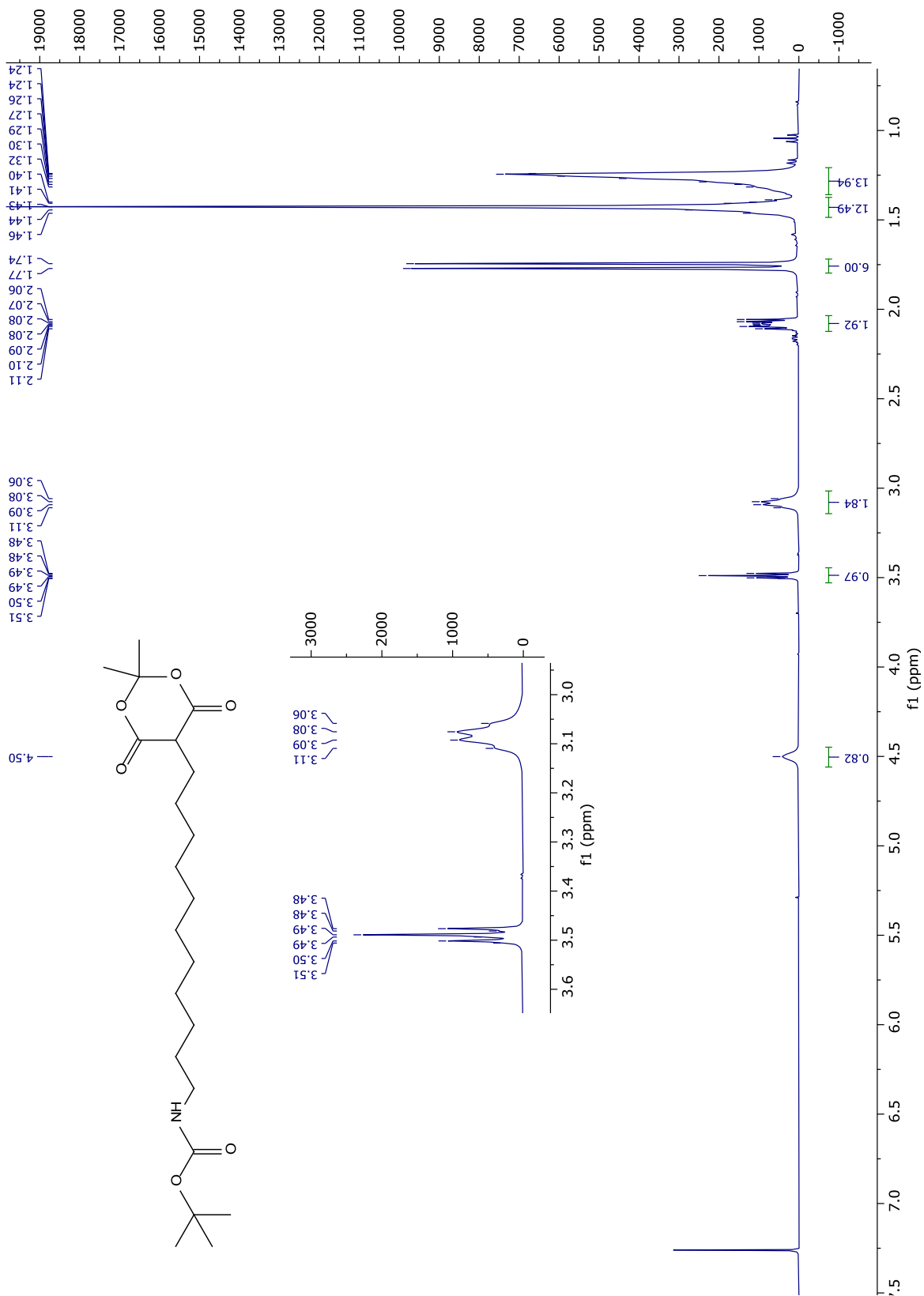
Spektrum 9 – ^{13}C -NMR látky A4



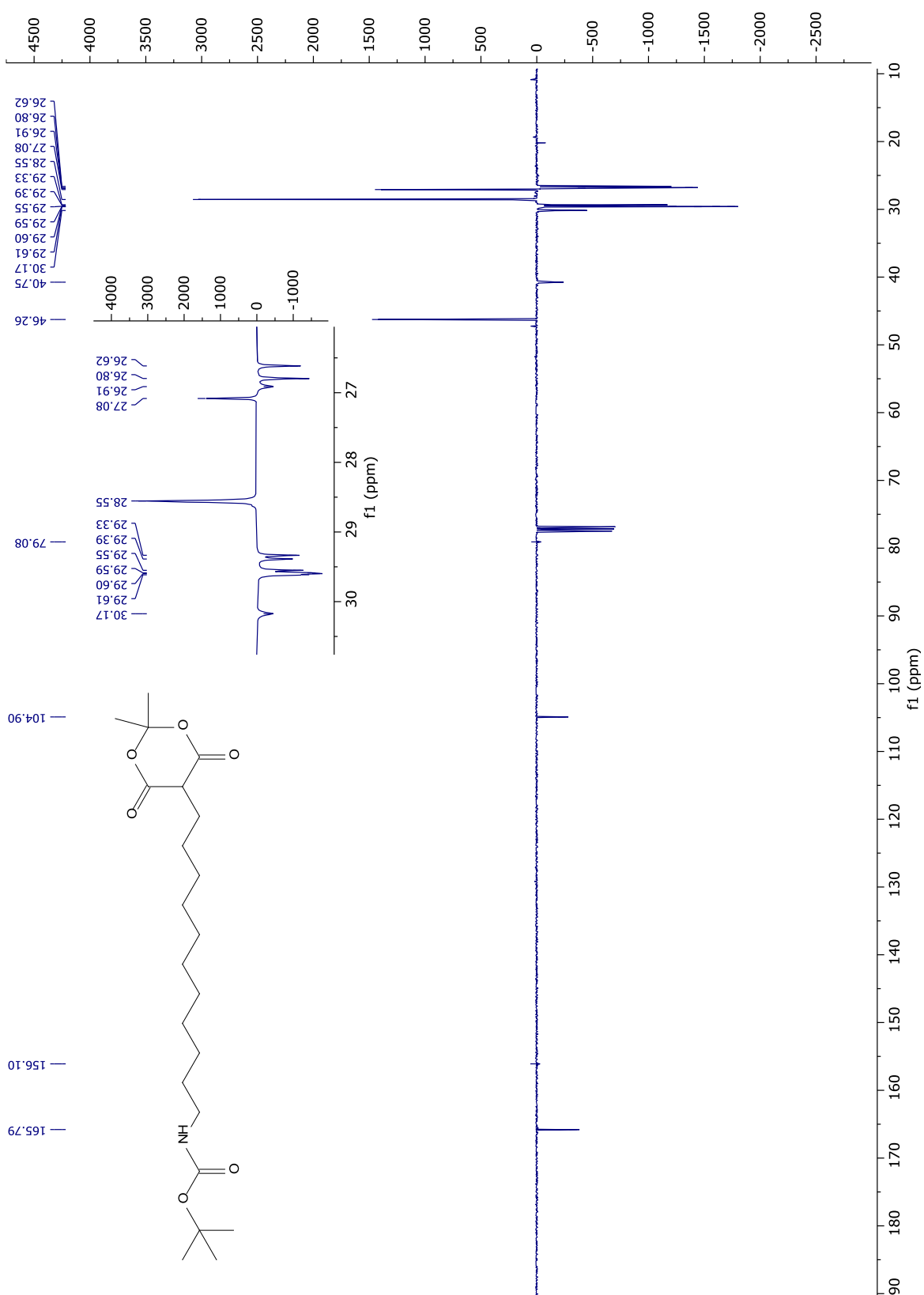
Spektrum 10 – ¹H-NMR látky B1



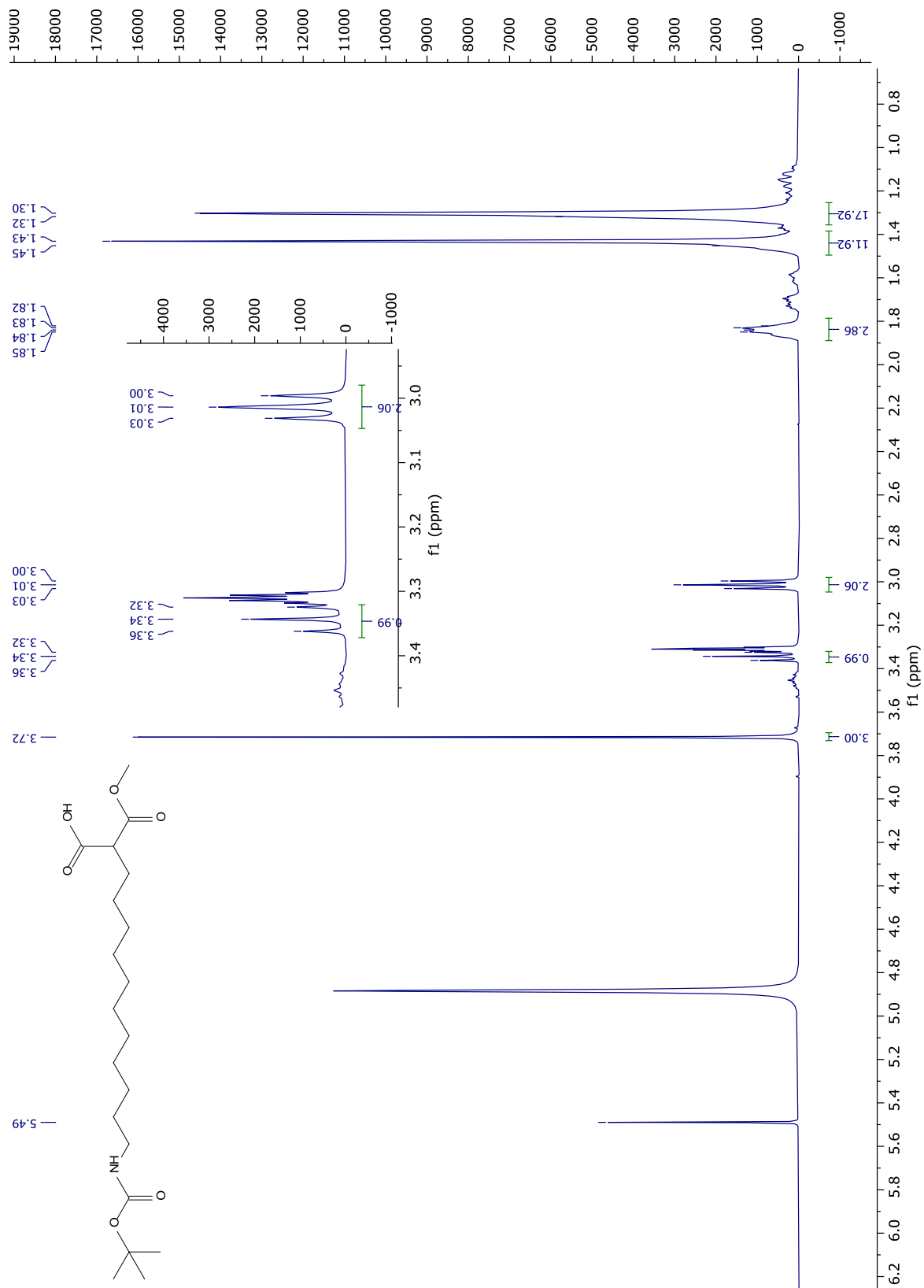
Spektrum 11 – ^{13}C -NMR látky B1



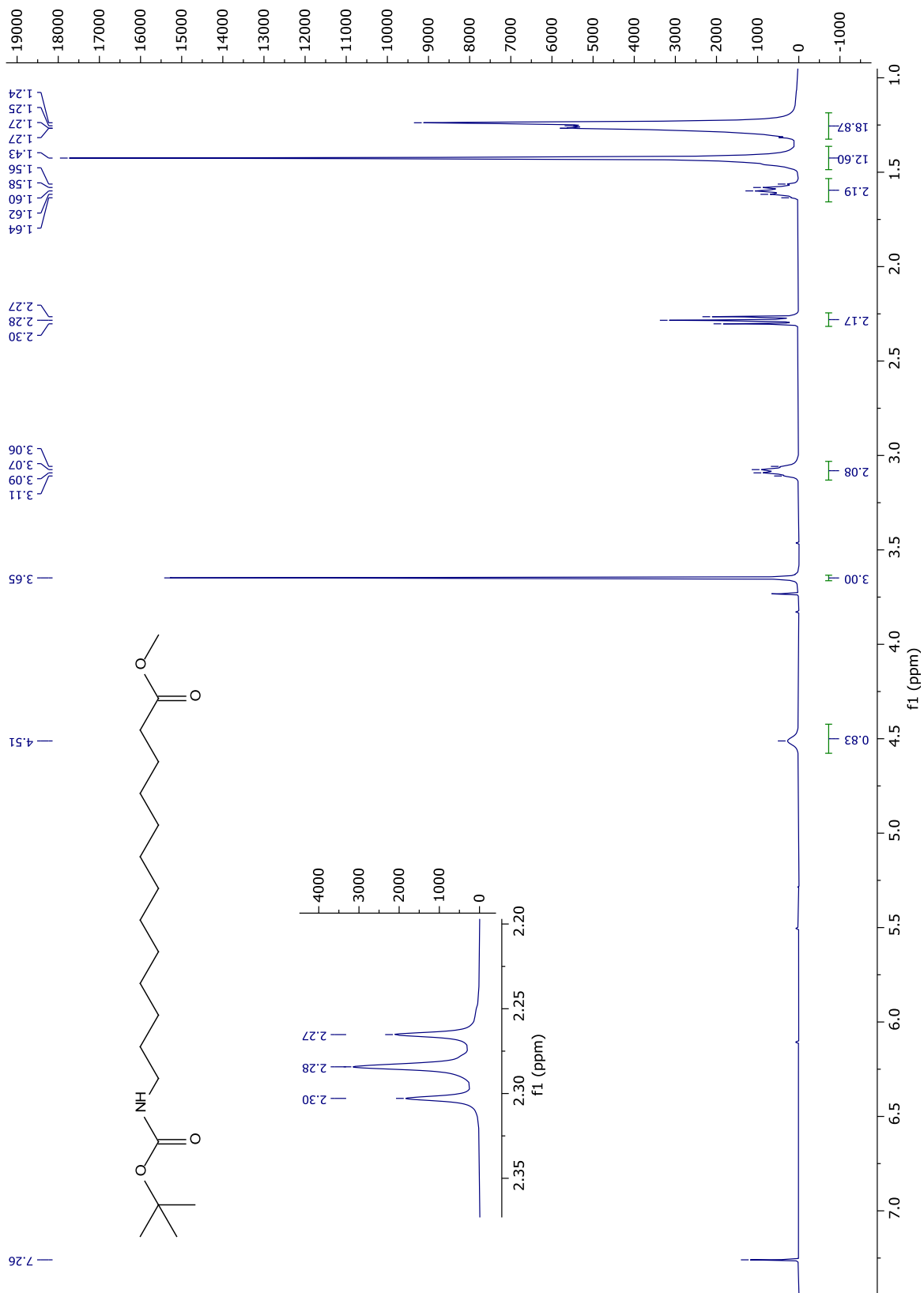
Spektrum 12 – $^1\text{H-NMR}$ látky B2



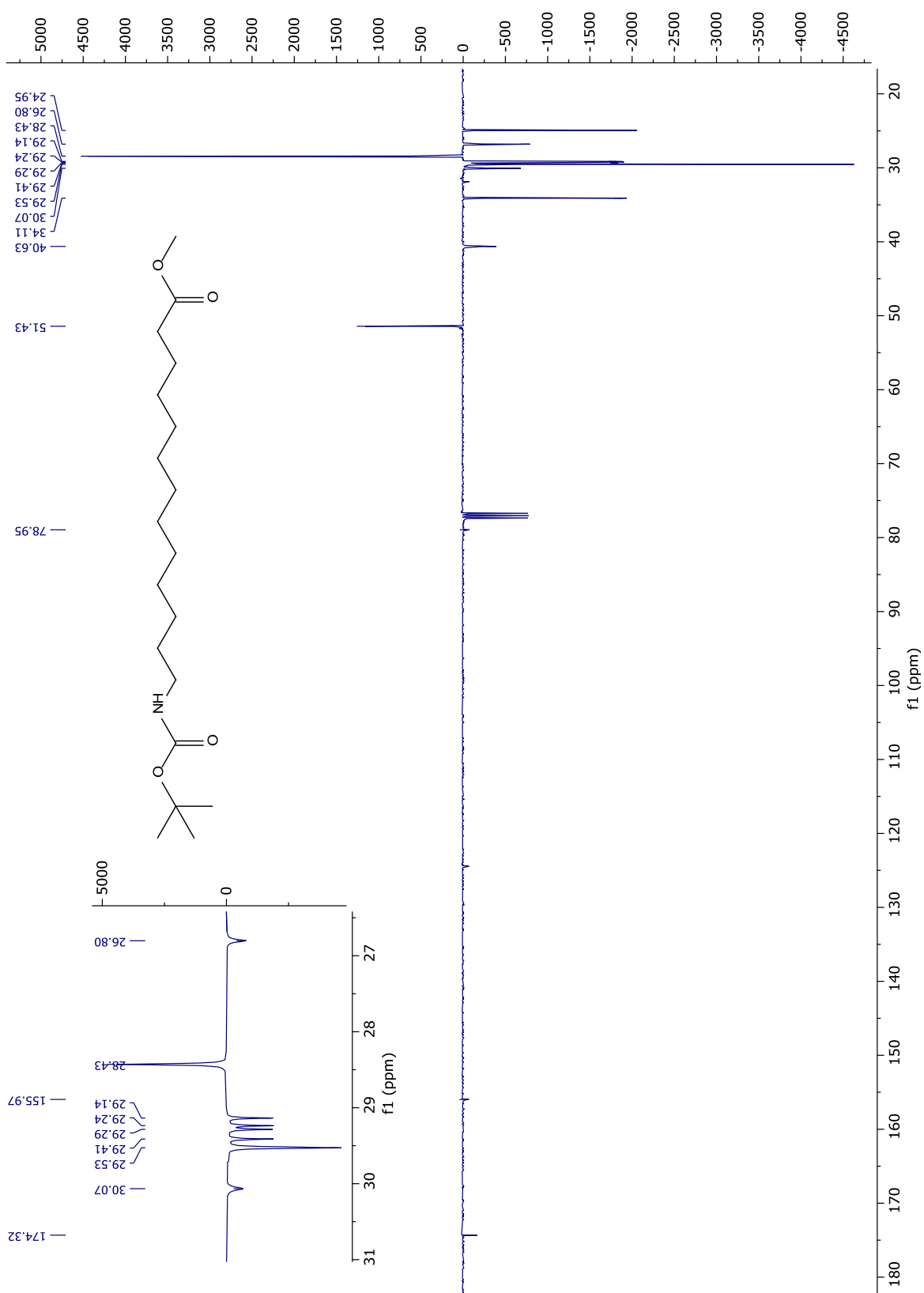
Spektrum ^{13}C -NMR látky B2



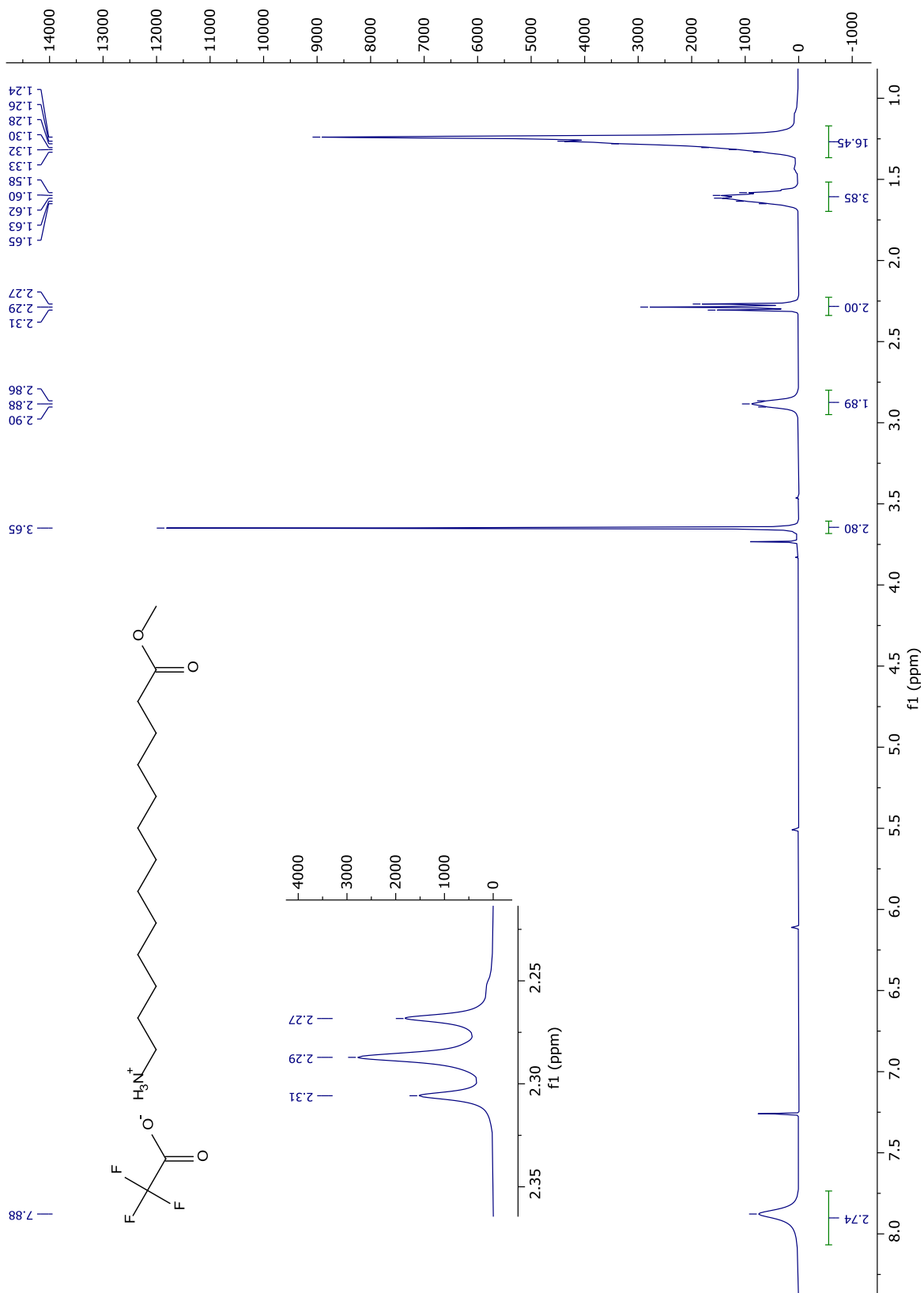
Spektrum 14 – $^1\text{H-NMR}$ látky B3



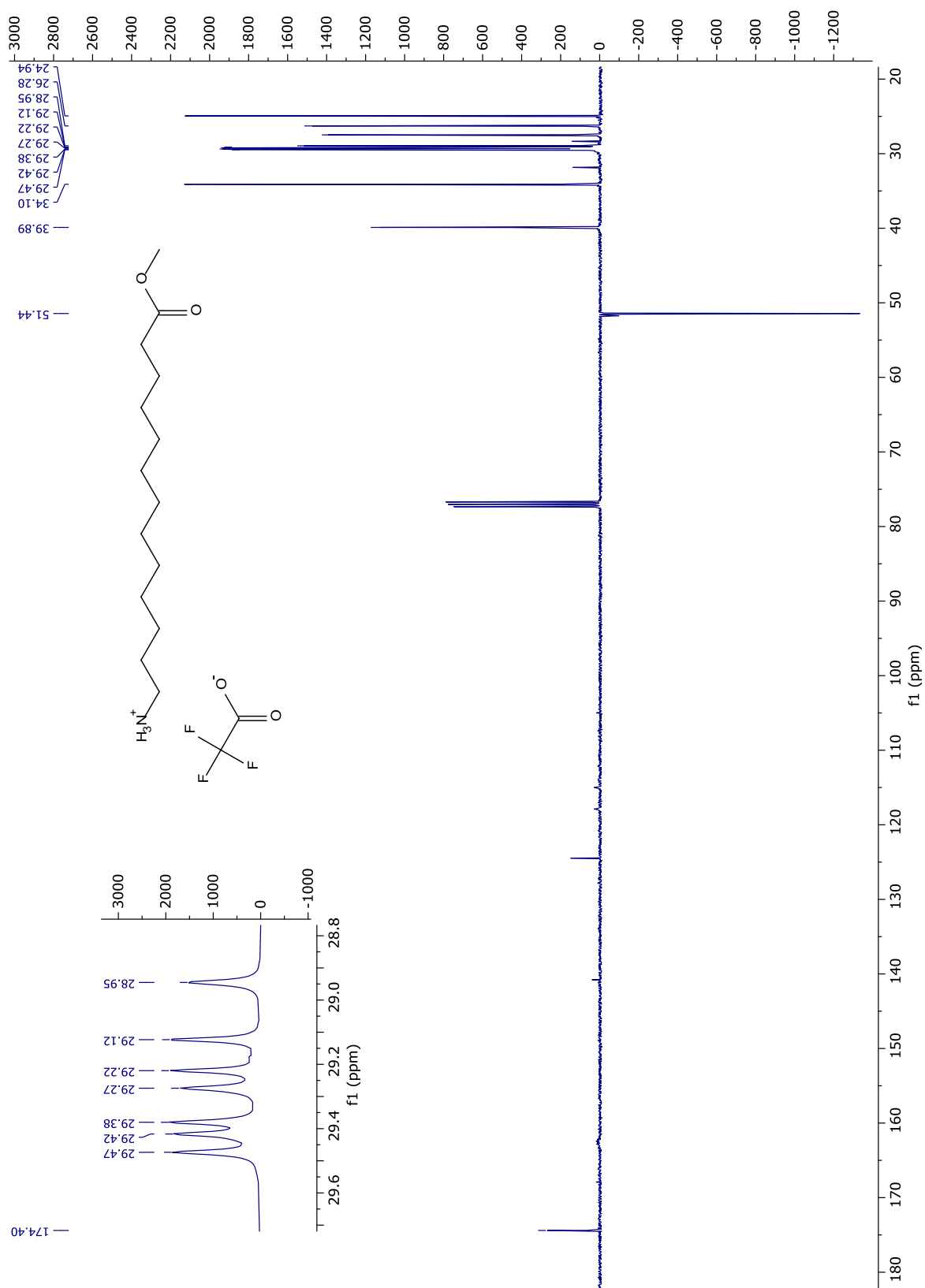
Spektrum 15 – $^1\text{H-NMR}$ látky B4



Spektrum 16 – ^{13}C -NMR látky B4



Spektrum 17– $^1\text{H-NMR}$ látky B5



Spektrum 18 – ^{13}C -NMR látky B5