

STŘEDOŠKOLSKÁ ODBORNÁ ČINNOST

Obor č. 3: Chemie

Studium možností využití diazoniových solí aktivovaných esterů pro cyklizaci peptidů

**Lucie Ovčáčíková
Olomoucký kraj**

Olomouc 2025

STŘEDOŠKOLSKÁ ODBORNÁ ČINNOST

Obor č. 3: Chemie

Studium možností využití diazoniových solí aktivovaných esterů pro cyklizaci peptidů

Study of possibilities of using diazonium salts of activated esters of peptide cyclization

Autor: Lucie Ovčáčíková

Škola: Gymnázium, Olomouc-Hejčín Tomkova 45/314, 779 00 Olomouc 9

Kraj: Olomoucký kraj

Konzultant: prof. RNDr. Jan Hlaváč, Ph.D., MSc. David Miličević, Ph.D.

Olomouc 2025

Prohlášení

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

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

Nemám závažný důvod proti zpřístupňování 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 Olomouci dne 8. 4. 2025Lucie Ovčáčíková.....

Poděkování

Především bych chtěla poděkovat panu prof. RNDr. Janu Hlaváčovi, Ph.D., díky němuž mohl tento projekt vůbec vzniknout. Velmi si vážím příležitosti pracovat v laboratoři Katedry organické chemie Univerzity Palackého, stejně jako jeho času, cenných rad a velké trpělivosti.

Dále děkuji MSc. Davidu Miličevićovi, Ph.D., za veškerý čas, který mi věnoval v laboratoři i při opravách mých reportů, za praktické rady i za to, že mě naučil, jak se v laboratoři pracuje.

Mé poděkování patří také všem mým kamarádům a blízkým, kteří mě během práce na tomto projektu podporovali a projektu Badatel za finanční podporu.



Katedra Organické Chemie
Univerzita Palackého v Olomouci

Přírodovědecká fakulta Univerzity Palackého v Olomouci



Badatel

Anotace

Uvedená středoškolská práce se zabývá studiem stability aromatických diazoniových solí a jejich využití pro tvorbu reaktivních intermediátů vhodných pro tvorbu smyček na peptidových řetězcích. Cyklizace peptidů je intenzivně studované téma v oblasti chemické biologie, kde výsledky pak nacházejí praktické uplatnění ve studiu buněčného metabolismu či patogeneze nejrozličnějších onemocnění, vývoje léčiv či jejich nosičů.

Jedna z možností, která bude pro nové způsoby smyčkování peptidů zkoumána, je využití polohových izomerů aminobenzoové kyseliny, resp. diazoniových solí jejich aktivovaných esterů, které budou schopny reagovat selektivně s dvěma různými aminokyselinami v peptidovém řetězci. Smyslem práce je ověření možnosti využití této metody pro tvorbu peptidových smyček z pohledu reaktivity a selektivity.

Klíčová slova

Peptidy, aktivovaný ester, diazoniová sůl, cyklizace

Annotation

This thesis deals with the investigation of the stability of aromatic diazonium salts and their use for the preparation of reactive intermediates suitable for the formation of loops on peptide chains. Peptide cyclization is an intensively studied topic in the field of chemical biology, where the results find practical application in the study of cell metabolism or pathogenesis of various diseases, drug development or their carriers.

One possibility that will be examined for new ways of peptide cyclization is the use of regioisomers of aminobenzoic acid or diazonium salts of its activated esters, which will be able to react selectively with two different amino acids in peptide chain. The purpose of this work is to verify the possibility of using this method for the formation of protein loops in terms of reactivity and selectivity.

Keywords

Peptides, activated ester, diazonium salt, cyclization

Obsah

1	Úvod	7
2	Cíle práce	7
3	Peptidy	8
3.1	Historický kontext.....	9
3.2	Syntéza peptidů.....	10
3.3	Syntéza na pevné fázi.....	10
3.3.1	Princip syntézy na pevné fázi	11
3.3.2	Pryskyřice	11
3.3.3	Linkery	12
3.3.4	Reakční podmínky pro syntézu peptidů na pevné fázi.....	14
3.3.5	Chránicí skupiny	14
3.3.6	Reakční nádoby.....	15
3.3.7	Výhody a nevýhody syntézy na pevné fázi	16
4	Cyklické peptidy.....	17
4.1	Hlavní typy cyklizačních reakcí	18
4.1.1	Nativní chemická ligace (NCL)	18
4.1.2	Laktamizace	19
4.1.3	Tvorba disulfidových můstků	19
4.1.4	Tvorba thioetherů.....	20
4.1.5	Click reakce	21
4.1.6	Olefinová a alkynová metateze.....	23
4.1.7	Využití nepřírodních aminokyselin pro cyklizační reakce	24
4.1.8	Shrnutí kapitoly o cyklických peptidech	24

5	Výsledky a diskuze.....	25
5.1	Stabilita diazoniové soli	25
5.2	Příprava aktivovaného esteru a jeho diazoniové soli.....	28
5.3	Dvoustupňová cyklizační reakce	32
5.4	Testování různých peptidů	36
6	Závěr	38
7	Použitá literatura.....	39
8	Seznam obrázků	42
9	Seznam schémat	43
10	Seznam tabulek.....	44
11	Seznam grafů.....	44
12	Příloha	44
12.1	Experimentální část.....	44
12.2	Obecné reakční postupy	47
12.2.1	Imobilizace první aminokyseliny k pevné fázi	47
12.2.2	Odstranění Fmoc a prodloužení peptidové sekvence.....	47
12.2.3	Acetylace volného N-konce peptidové sekvence.....	47
12.2.4	Odštěpení cílové peptidové sekvence z pryskyřice a její purifikace.....	47
12.2.5	Syntéza aktivovaného esteru kyseliny 3-aminobenzoové	48
12.2.6	Obecný postup reakce peptidové sekvence s aktivovaným esterem, diazotace a azokopulace	48
12.3	Sloučeniny	49

1 ÚVOD

Peptidy a proteiny jsou nezbytnou součástí živých organismů, ve kterých zastávají mnoho biologických funkcí. Díky svým příznivým vlastnostem se také staly důležitou součástí moderní medicíny, farmaceutického průmyslu a řady dalších oborů. Za účelem zlepšit vlastnosti peptidů je možné je několika způsoby modifikovat. Jednou z možností modifikace je jejich cyklizace. Cyklické peptidy jsou totiž nejen stabilnější, takže vykazují zvýšenou odolnost vůči enzymatické degradaci, ale často jsou i biologicky dostupnější.

Existuje již mnoho ověřených metod využívaných k cyklizaci proteinů, avšak se všemi jsou kromě výhod spojené také určité limitace. Proto jsme se v této práci rozhodli navrhnout a ověřit zcela novou cyklizační metodu využívající reaktivity diazoniových solí odvozených od aktivovaných esterů aromatických kyselin, které by mohly selektivně reagovat s vybranými funkčními skupinami na hlavním či postranním řetězci aminokyselin zapojených do krátkých oligopeptidů. Zaměřili jsme se konkrétně na diazoniovou sůl derivátu kyseliny 3-aminobenzoové, jež může být využita jako reaktivní intermediát spojující dvě vybrané aminokyseliny v peptidu, zejména tyrosin a lysin.

První část práce tedy tvoří teoretický úvod, který se věnuje stručnému shrnutí současných poznatků o cyklických peptidech a některým již používaným cyklizačním metodám a shrnuje jejich výhody a nevýhody. Praktická část práce se zaměřuje na charakteristiku diazoniových solí, ověření jejich stability, syntézu modelových peptidů a studium jejich cyklizačních reakcí.

Výsledkem této práce by měl být tzv. *proof-of-concept* nové cyklizační metody peptidů neboli to, zda je tento návrh realizovatelný a zda má smysl zabývat se touto metodou i nadále ve všech nutných detailech. Tato práce by tedy mohla sloužit jako inspirace pro vývoj nových strategií využitelných zejména ve farmaceutickém či biotechnologickém průmyslu.

2 CÍLE PRÁCE

Cílem mé práce je navrhnout a prakticky ověřit novou metodu cyklizace peptidů, využívající tvorbu diazoniové soli odvozené od aktivovaného esteru aminobenzoové kyseliny ke spojení dvou aminokyselinových zbytků peptidu, zejména tyrosinu a lysinu (Schéma 1).

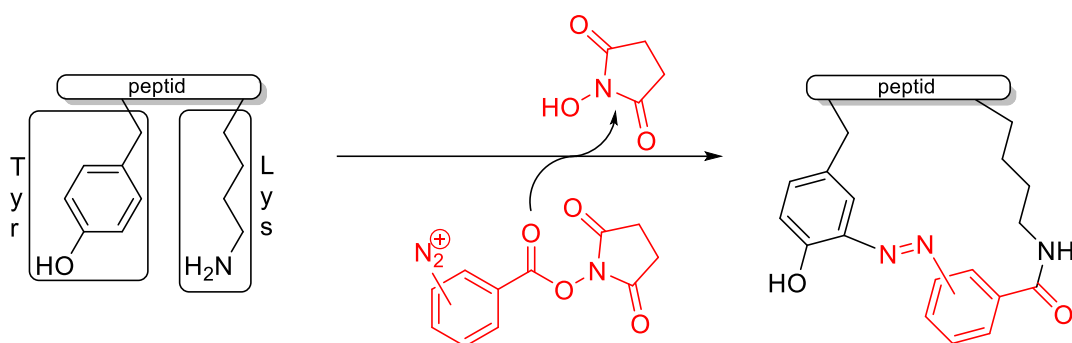


Schéma 1: Cyklizace peptidů pomocí diazoniové soli aktivovaného esteru aminobenzoové kyseliny.

Za tímto účelem bylo nutné splnit dílčí cíle:

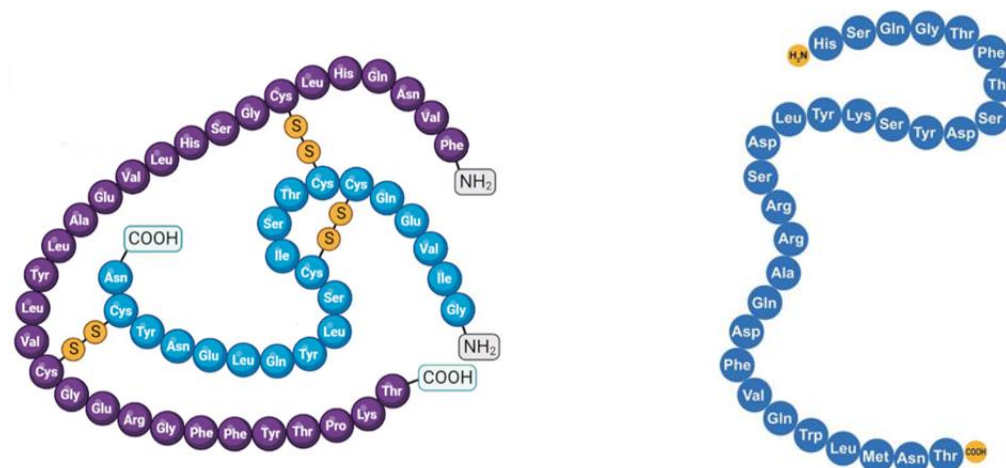
- prověřit stabilitu diazoniové soli tak, aby cyklizační reakce mohla probíhat nejen za chlazení, ale do budoucna i za fyziologické teploty
- prověřit reaktivitu aktivovaného esteru s postranním řetězcem lysinu vázaného v peptidovém řetězci
- prověřit reaktivitu diazoniové soli s tyrosinem vázaným v peptidovém řetězci
- prověřit reaktivitu vybraných konkurenčních skupin, jako je fenyl u fenylalaninu či koncové aminoskupiny peptidu.
- Nalézt obecný protokol pro přípravu cyklizovaných peptidů mezi tyrosinem a lysinem a ověřit ho na několika peptidech s různými aminokyselinovými sekvencemi.

Smyslem celého projektu je ověřit *proof-of-concept* nové cyklizace peptidů a otevřít tak nové možnosti smyčkování peptidů.

3 PEPTIDY

Peptidy jsou stejně jako proteiny látky složené z aminokyselin spojených do různě velkých molekul, na rozdíl od proteinů jsou to ale výrazně menší a jednodušší molekuly obsahující zpravidla 2 až cca 50 aminokyselin. Peptidy představují nezbytně důležité složky všech živých organismů, ve kterých na základě struktury zastupují několik zásadních funkcí. Některé, jako například insulin a glukagon (Obrázek 1), slouží jako hormony, jež vyvažují hladinu cukru v krvi, jiné jsou zase důležité pro správnou funkci imunitního systému a brání organismus proti patogenům. Neuropeptidy, například endorfiny, ovlivňují nervové procesy jako je bolest nebo nálada. Některé peptidy jako třeba nisin nebo gramicidin díky svým antimikrobiálním účinkům slouží jako přirozená antibiotika, jiné zase mají na starost vývoj a regeneraci tkání, transport látek, metabolické procesy a další.¹ Kromě své přirozené funkce ve zdravých buňkách mohou

přírodní i syntetické peptidy vykazovat mnoho dalších rozmanitých funkcí a terapeutických vlastností, díky čemuž se staly nepostradatelnou součástí moderní medicíny i jiných oborů, kde jsou využívány v širokém spektru aplikací.



Obrázek 1: Struktura inzulinu (vlevo), struktura glukagonu (vpravo).

3.1 Historický kontext

Peptid jako takový byl poprvé definován na konci 19. století německým chemikem Emilem Fischerem, za což později v roce 1902 dostal Nobelovu cenu.² Ve dvacátých letech minulého století byl do klinické praxe zaveden první terapeutický peptid, insulin, což znamenalo revoluci v léčbě diabetu.³ Rok 1931 s sebou přinesl objev neuropeptidu, tzv. substance P⁴ a v roce 1954 byl poprvé nasyntetizován peptidový hormon oxytocin, který se stal prvním syntetickým hormonem používaným v medicíně.⁵ Postupně se také vyvíjely nové analytické metody, jež umožnily detailní studium peptidů a proteinů. V roce 1963 představil Robert Bruce Merrifield novou metodu syntézy peptidů na nerozpustném polymeru, tzv. „syntézu na pevné fázi“.⁶ O tři roky později byl potvrzen výskyt cyklických peptidů v přírodních zdrojích, zejména v bakteriálních a houbových organismech, z nichž několik bylo biologicky aktivních a vykazovalo antibiotické nebo protinádorové účinky.⁷ V témže roce bylo oficiálně schváleno použití syntetických peptidů pro klinické účely. Druhá polovina 20. století znamenala pokrok v peptidové syntéze díky rozvoji automatických syntetizátorů, které umožnily jejich rychlejší a levnější produkci.⁸ V 80. a 90. letech téhož století se ve velkém začaly produkovat terapeutické peptidy díky zavedení rekombinantních technologií. V novodobé historii se pak do popředí začaly dostávat cyklopeptidy a více pozornosti se začalo soustředit na jejich potenciální využití.⁹

Když v roce 1949 Robert Bruce Merrifield (1921–2006) získal Ph.D. titul, začal se věnovat lékařskému výzkumu v oblasti peptidů. V té době se příprava peptidů prováděla tradiční metodou, tedy syntézou v roztoku. Ta byla ale velmi zdoluhavá a výtěžek reakcí malý. Proto se Merrifield zaměřil na vývoj mnohem efektivnějšího postupu přípravy peptidů a v roce 1963 publikoval průlomový článek,⁶ ve kterém se poprvé objevil pojem syntéza na pevné fázi. Díky této nenápadné publikaci se nová metoda začala rapidně šířit a rozvíjet nejen v oblasti peptidů, ale i v organické syntéze jiných typů sloučenin, určených zejména pro vývoj nových biologicky aktivních látek. Za tento velkolepý objev byla Robertu Bruce Merrifieldovi v roce 1984 udělena Nobelova cena.



Obrázek 2: Robert Bruce Merrifield.²⁹

3.2 Syntéza peptidů

Peptidy je buď možné izolovat z živých organismů, nebo chemicky syntetizovat. Výhodou syntetických peptidů je, že jejich struktura může být jednoduše modifikována podle potřeby. Nejefektivnější metodou přípravy peptidů je syntéza na pevné fázi (Solid-phase peptide synthesis), která svými výhodami významně převyšuje méně využívanou syntézu v roztoku (Liquid-phase peptide synthesis). Nespornou výhodou syntézy na pevné fázi je možnost její snadné automatizace.

3.3 Syntéza na pevné fázi

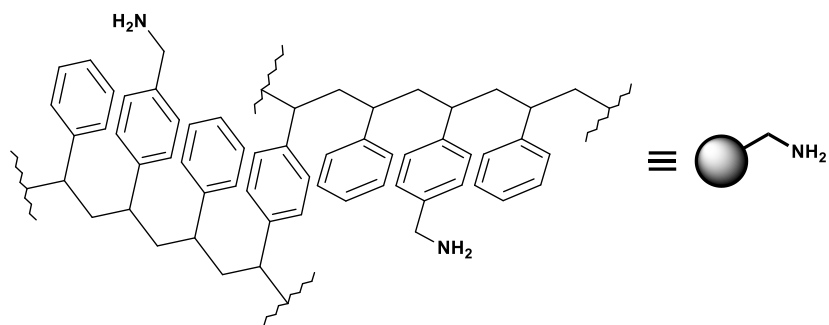
Syntéza na pevné fázi (solid-phase organic synthesis – SPOS) patří mezi významné principy přípravy organických molekul (zejména peptidů), kdy jednotlivé chemické reakce probíhají na nerozpustné matici tvořené organickým polymerem. Historie vzniku této metody je spojena se jménem amerického biochemika Roberta Bruce Merrifielda.

3.3.1 Princip syntézy na pevné fázi

Základem syntézy na pevné fázi je použití vhodného nerozpustného polymeru s linkerem nesoucím vhodnou funkční skupinu, která umožňuje navázání prvního reaktantu. Krom možnosti navázání prvního reaktantu (tzv. building block) má linker velmi důležitou roli spočívající v oddálení reakčního místa od povrchu polymeru a schopnost uvolnit finální látku na konci celého syntetického procesu.¹⁰ Vznikající meziprodukty a finální látka jsou pevně vázané na tento nerozpustný polymer (někdy označovaný jako matrice, nosič, pryskyřice či pevná fáze) a jejich izolace, spočívající v prostém promytí před dalším reakčním krokem, je tak velmi rychlá a jednoduchá. Samotný experimentální proces je velmi snadný; polymer musí být ze všeho nejdříve propláchnut vhodným rozpouštědlem, díky čemuž drobné kuličky pryskyřice nabobtnají a roztáhnou se jejich drobné póry, ve kterých je linker se svými reaktivními skupinami nejvíce zastoupen. Bobtnání je tak velice důležitou vlastností pryskyřice a má velký vliv na reaktivitu polymeru a výtěžek reakce. Kdyby pryskyřice nenabobtnala správně, aktivní místa na pryskyřici by zůstala skrytá a reagentie by se tak na ni neměly možnost navázat. Snižovala by se tak kapacita pryskyřice pro množství syntetizované sloučeniny. Poté je k připravenému polymeru přidán reakční roztok výchozí látky (tzv. building blocku) a dalších nutných reaktantů. Reakce probíhá za stálého třepání po dobu nutnou k jejímu kvalitnímu průběhu. Po uplynutí potřebné doby je od pryskyřice s ukotvenou výchozí látkou odfiltrován roztok reagentií a směs je několikrát promyta vhodnými rozpouštědly. Na takto ukotvenou látku poté můžeme navazovat další reaktanty (building blocky) a vytvářet tak libovolně velké molekuly. Syntéza je zakončena odštěpením výsledného produktu od pryskyřice za specifických podmínek daných typem použitého linkeru.

3.3.2 Pryskyřice

Důležitou částí syntézy na pevné fázi je výběr vhodné pryskyřice.¹⁰ Je důležité, aby byla schopna reaktanty rozprostřít rovnoměrně po celém svém povrchu, který by měl být po nabobtnání co největší, a byla odolná vůči různým fyzikálním a chemickým podmínkám. Od roku 1963, kdy byla nová metoda poprvé představena světu, bylo k syntéze použito mnoho typů polymerů vzniklých polymerizací různých látek a případnou následnou derivatizací. Dnes mezi nejčastěji používané patří kopolymery na bázi polystyrenů a 1–2% divinylbenzenu (Obrázek 3).

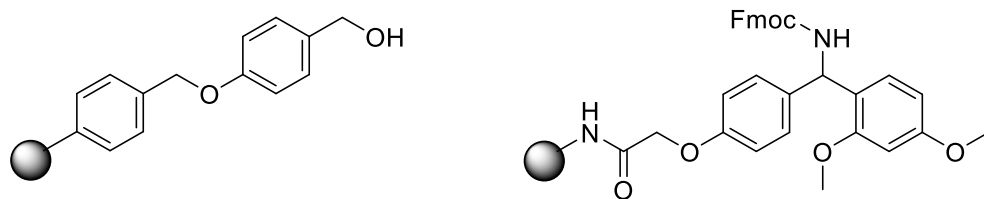


Obrázek 3: Chemická struktura polymeru.

3.3.3 Linkery

Jak již bylo napsáno výše, podstatnou součástí syntézy na pevné fázi je linker,¹¹ jenž slouží jako prostředník mezi polymerem a daným intermediátem; drží je u sebe a umožňuje jej, díky své struktuře, řízeně odštěpit. Stejně jako v případě pryskyřice je na trhu k dostání i celá řada linkerů. Ty se mezi sebou liší převážně funkčními skupinami, na které je možno navázat reaktanty. U linkeru je důležité, aby byl stabilní a odolný vůči všem zvoleným reakčním podmínkám, ale zároveň bylo možné z něj snadno a kvantitativně odštěpit požadovanou látku v poslední fázi syntézy za jiných, předem definovaných reakčních podmínek. Jeho hlavní funkcí je totiž udržovat reaktant navázaný na pryskyřici, dokud není dosažena požadovaná sekvence reakcí. Poté je pryskyřice vystavena specifickým podmínkám, při kterých se látky z linkeru štěpí a odpojuje tak produkt od pevné fáze. Jeho další funkcí je udržování imobilizované látky v dostatečné vzdálenosti od pryskyřice, což zvyšuje sterickou přístupnost pro reaktanty a eliminuje odpudivé síly mezi reaktantem a povrchem pryskyřice.

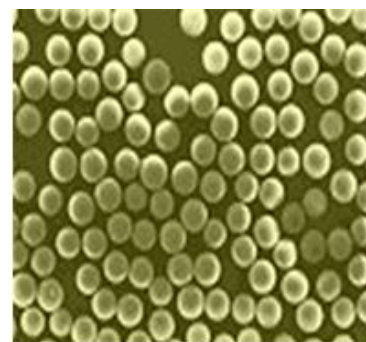
Druhy linkerů můžeme dělit obecně podle podmínek, při kterých dochází k jejich štěpení. Pro syntézu na pevné fázi, kdy se zpravidla první aminokyselina navazuje na pryskyřici C-koncem¹² jsou nejtýpčtější či nejčastěji používané linkery štěpitelné v kyselém prostředí, jako jsou například Wangův linker s koncovou hydroxy skupinou nebo Rinkův linker s amino skupinou (Obrázek 4). Je možné se ale setkat i s bazicky štěpitelnými linkery, linkery štěpitelnými pomocí UV záření a dalšími.



Obrázek 4: Příklad Wangova (vlevo) a Rinkova (vpravo) linkeru navázaného na pryskyřici.

Některé linkery jsou na trhu k dostání ve formě, kdy už jsou navázány na příslušnou pryskyřici. V mé práci jsem používala převážně tzv. Wangovu pryskyřici, tj. polystyrenovou matici s navázaným Wangovým linkerem.

Wangova pryskyřice je nejrozšířenější pryskyřicí používanou pro syntézu peptidů na pevné fázi. Její výhodou je navázání první aminokyseliny přes karboxylovou skupinu, která se pak, po výstavbě požadovaného peptidu, jako taková zase uvolní zpět (Schéma 2). Jako u ostatních pryskyřic je její struktura založena na bázi polystyrenu zesíťovaným divinylbenzenem, jenž poskytuje pryskyřici mechanickou pevnost a zabraňuje tak rozpadu během syntézy. Nejčastěji se používá Wangova pryskyřice ve formě kuliček (Obrázek 5) o průměru cca 100 μm , kdy na každé z nich je možné připravit cca 100 pmol látky. První aminokyselina je na Wangovu pryskyřici navázána pomocí esterové vazby, která je připojena k fenolické skupině linkeru. Výhodou této esterové vazby je, že je schopna ustát reakční podmínky při syntéze i dlouhých peptidových sekvencí aminokyselin, ale zároveň je snadno štěpitelná v kyselém prostředí. Pro štěpení se nejčastěji používá 50% kyselina trifluoroctová v dichloromethanu, jež nijak nepoškodí strukturu peptidu, ale spolehlivě jej uvolní od pryskyřice.



Obrázek 5: Wangova pryskyřice.¹¹

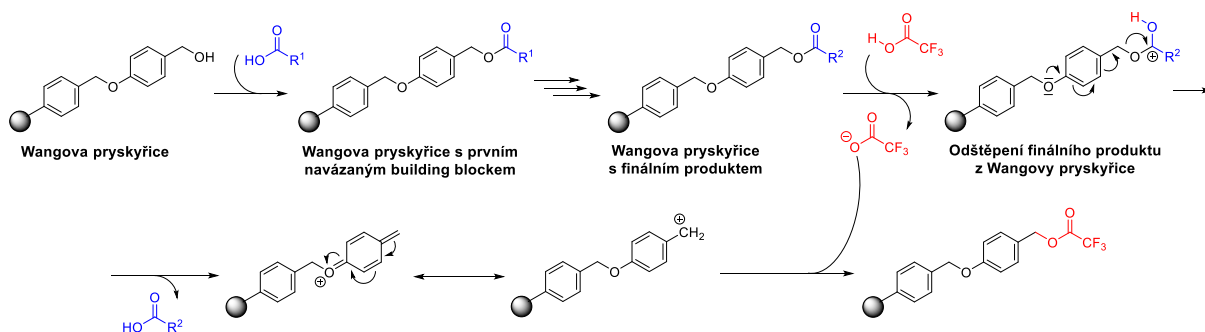


Schéma 2: Štěpení produktu z Wangovy pryskyřice.

3.3.4 Reakční podmínky pro syntézu peptidů na pevné fázi

Pro navázání první aminokyseliny na pryskyřici je samozřejmě nutné vytvořit vhodné reakční podmínky. Pro vytvoření takových podmínek se aminokyselina s ochráněnou aminoskupinou přidává k nabobtnané pryskyřici ve formě roztoku společně s DIC (*N,N*-diisopropylcarbodiimide), HOBt (1-hydroxybenzotriazol) a DMAP (4-dimethylaminopyridin) (Schéma 3). Reakce je zahájena interakcí karboxylové skupiny aminokyseliny s DIC za vzniku aktivovaného esteru. Posun volných elektronů způsobí na atomu uhlíku elektronový deficit, což vede k okamžité reakci s nukleofilní hydroxy skupinou HOBt. Následně pak takto aktivovaný ester reaguje s hydroxy skupinou Wangova linkeru a zůstává ukotven na polymeru. Pro kvantitativní průběh reakce se při imobilizaci první aminokyseliny přidává DMAP, jež zejména zvyšuje nukleofilitu linkeru. HOBt hraje důležitou roli při dodržování chiralidy syntetizovaných peptidů, resp. napojovaných aminokyselin, díky čemuž se v průběhu syntézy nevytváří různé izomery. Následně je nutné odchránit aminoskupinu navázané aminokyseliny a obdobným způsobem vytvořit peptidovou vazbu s další aminokyselinou. Celý proces se pak následně opakuje až do vytvoření finálního peptidu.

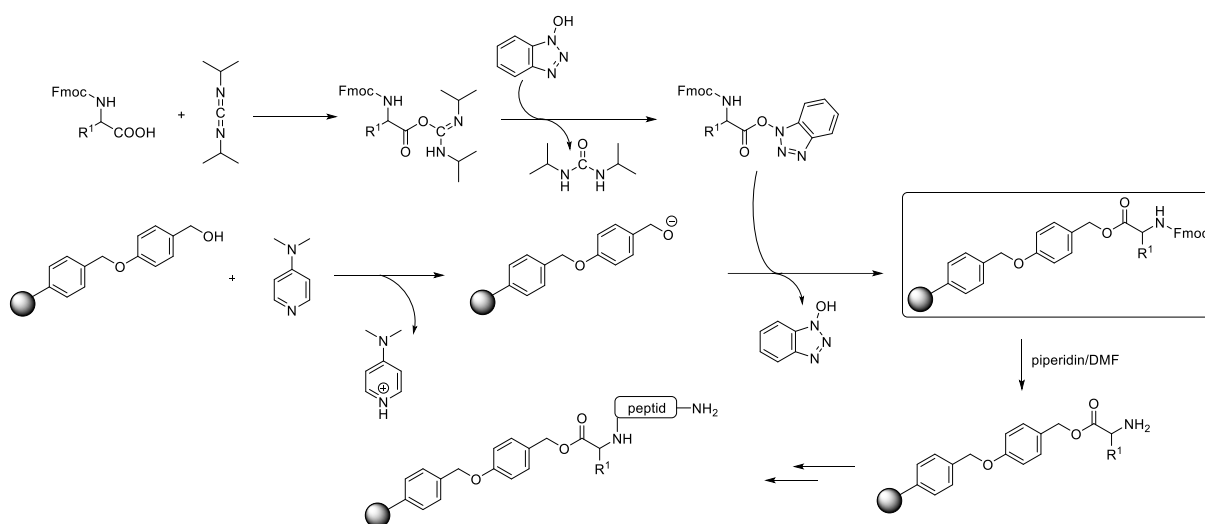


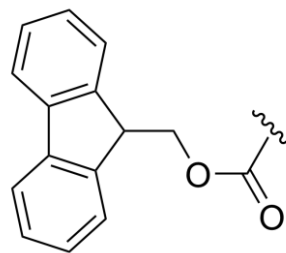
Schéma 3: Syntéza peptidu na pryskyřici s Wangovým linkerem.

3.3.5 Chránicí skupiny

Je známo, že všechny aminokyseliny obsahují nejméně jednu aminovou ($-NH_2$) a jednu karboxylovou ($-COOH$) koncovou skupinu. Obě tyto skupiny umožňují aminokyselinám vstupovat do různých reakcí, přičemž nejdůležitější z nich je vznik peptidové vazby. Při syntéze peptidů je ale nutné, aby jedna skupina byla dočasně zablokována chránicí skupinou a zároveň se zabránilo reakci jednotlivých molekul aminokyselin mezi sebou. Rovněž postranní řetězce

aminokyselin, např. u lysinu, cysteinu, threoninu apod. musí být při syntéze peptidového řetězce chráněny, aby samy nepodléhaly reakci.

Nejčastěji se při syntéze peptidů setkáme s tzv. Fmoc chránicí skupinou (9-fluorenylmethyloxycarbonyl)¹³ (Obrázek 6), která se používá k protekci α -aminoskupiny dané aminokyseliny. Při imobilizaci první aminokyseliny na pryskyřici C-koncem je to tedy vždy karboxylová skupina, co reaguje s linkerem. Před navazováním další látky do sekvence je nutné protektivní skupinu odstranit a umožnit tak dříve chráněné α -aminové skupině reagovat. Fmoc řadíme mezi bazicky labilní chránicí skupiny a jeho štěpení probíhá obvykle v 50% roztoku piperidinu v *N,N*-dimethylformamidu (DMF) (Schéma 4).



Obrázek 6: Protektivní skupina Fmoc.

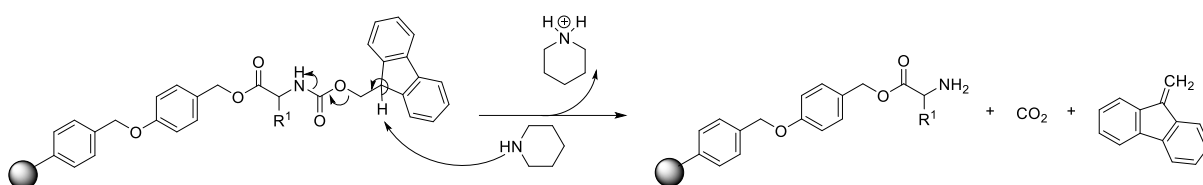


Schéma 4: Štěpení Fmoc skupiny piperidinem.

Jak již bylo řečeno, některé aminokyseliny mají ve své struktuře jiné funkční skupiny na postranním řetězci, např. aminovou skupinu, kterou je také nutné chránit, aby nedocházelo k nechtěným reakcím. K těmto účelům slouží protektivní skupiny jako například Boc (tert-butyloxycarbonyl) nebo Mtt (4-methyltrityl). Na rozdíl od Fmoc chránicí skupiny jsou obě tyto skupiny štěpitelné v kyselém prostředí, takže nedochází k jejich odstranění při deprotekcí α -aminoskupiny v bazickém prostředí. Naopak při odštěpení peptidu z pryskyřice za pomoci trifluoroctové kyseliny, jsou zároveň tyto protektivní skupiny odštěpeny.

3.3.6 Reakční nádoby

Na rozdíl od syntézy v roztoku, která obvykle probíhá ve skleněných reakčních nádobách, se pro syntézu na pevné fázi nejčastěji používají běžné polypropylenové stříkačky s porézní fritou uvnitř. Jejich výhodami je, že jsou cenově dostupné, odolné vůči prakticky všem chemikáliím a je možné zahřívat i na vyšší teploty. Díky snadné manipulaci se stříkačkami můžeme snadno

provádět i více reakcí zároveň (Obrázek 7). Stříkačky také umožňují snadné promývání polymeru v jednotlivých krocích reakce.



Obrázek 7: Paralelní syntéza většího počtu peptidů v polypropylenových stříkačkách.

3.3.7 Výhody a nevýhody syntézy na pevné fázi

Stejně jako tradiční syntéza v roztoku i syntéza na pevné fázi má své výhody i nevýhody. Při výběru strategie syntézy je vždy nutné se zamyslet nad tím, jaká z metod bude pro daný záměr výhodnější. Významnou výhodou syntézy na pevné fázi je, že nám může velmi ušetřit čas. Zatímco při syntéze v roztoku se musí izolovat každý meziprodukt, který se musí případně čistit a následně připravovat na další reakční krok (navazování, rozpouštění), u syntézy na pevné fázi můžeme celý tento proces přeskočit, díky čemuž ušetříme část produktu, o kterou bychom při izolaci mohli přijít a zejména čas potřebný pro přípravu intermediátu na další reakci. Další výhodou solid-phase syntézy je snadné odstranění rozpouštědel z reakční směsi promytím a jednoduchá automatizace reakční sekvence. Mezi nevýhody syntézy na pevné fázi patří například výrazně nadbytečné množství reagensů, nutné pro kvantitativní průběh reakce a také nutná optimalizace reakčních podmínek, která zabere více času než u syntézy v roztoku. Vysoká čistota každého reakčního kroku je důležitá s ohledem na konečnou čistotu finální látky a její výtěžek. Jednotlivé vedlejší produkty vzniklé na pryskyřici totiž nelze v průběhu syntézy odstranit, což ve finále může výrazně komplikovat čištění finální sloučeniny.

4 CYKlickÉ PEPTIDY

Struktura peptidu může být buď lineární nebo cyklická. Cyklické peptidy jsou oproti lineárním peptidům méně flexibilní, ale zato stabilnější, odolnější vůči degradaci enzymy, což přispívá k jejich bioaktivitě, a často mají schopnost snadněji pronikat buněčnými membránami.

Jak již bylo zmíněno, cyklické peptidy mají velký význam v přírodě, avšak díky jejich vlastnostem jsou čím dál více využívány v různých odvětvích průmyslu a rozličných oblastech výzkumu. Vysoká stabilita, větší selektivita, terapeutické vlastnosti a biologická dostupnost z nich dělají nepostradatelnou část moderní medicíny, kde hrají významnou roli ve vývoji nových léčiv a vakcín, diagnostice a léčbě nádorových i jiných onemocnění, léčbě neurologických poruch, hormonální terapii a v dalších odvětvích. V kosmetické průmyslu jsou cyklické peptidy důležitou složkou mnoha přípravků na pleť i vlasy, kde slouží jako hydratační a aktivní látky a v průmyslu potravinářském jsou využívány jako konzervanty, sladidla, zvýrazňovače chuti nebo doplňky stravy.

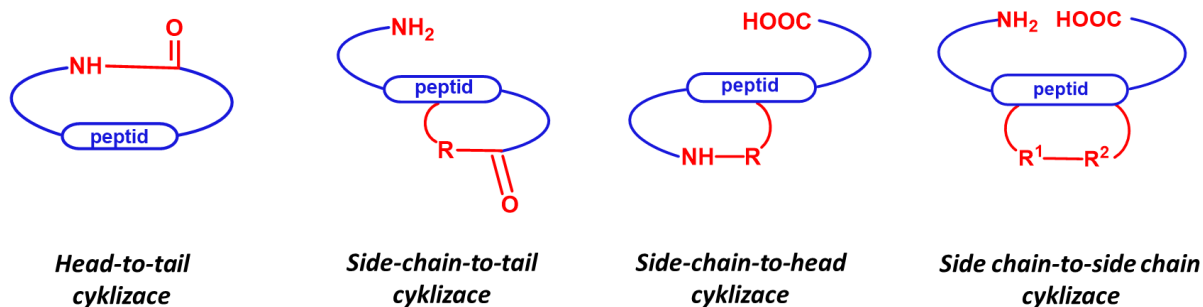
Obecně můžeme cyklické peptidy dělit na homodetní, obsahující pouze peptidové vazby, a heterodetní, v jejichž struktuře jsou přítomné i vazby jiného charakteru, jako třeba disulfidové nebo esterové. Dále je dělíme podle způsobu uzavření cyklu (Obrázek 8):

Head-to-Tail cyklické peptidy (backbone cyclization) – uzavření cyklu je způsobeno tvorbou peptidové vazby mezi koncovými aminokyselinami

Side-Chain-to-Tail cyklické peptidy – funkční skupina aminokyseliny na postranním řetězci peptidu reaguje s koncovou karboxylovou skupinou

Side-Chain-to-Side-Chain – vzniká reakcí postranních řetězců dvou aminokyselin

Head-to-Side Chain – vzniká reakcí postranních řetězců s aminoskupinou koncové aminokyseliny.



Obrázek 8: Znázornění jednotlivých typů cyklizace peptidů.

K uzavření peptidového cyklu může dojít několika různými typy reakcí. To, jaká reakce je pro konkrétní peptid vhodná závisí zejména na jeho struktuře, tedy na specifických aminokyselinách, ze kterých je peptid složen.

4.1 Hlavní typy cyklizačních reakcí

4.1.1 Nativní chemická ligace (NCL)

Nativní chemická ligace je reakce nejčastěji využívaná pro kondenzaci dvou kratších peptidů pro tvorbu dlouhých oligopeptidů nebo proteinů, avšak při správných podmínkách může tato metoda být aplikována i pro cyklizaci peptidů.¹⁴ Pro tuto reakci je potřebný peptid s thioesterem na jeho C-konci a cysteinem na N-konci. Reakce je zahájena transthioesterifikací, kdy thiolová skupina cysteinu atakuje thioester za vzniku thioesterového meziprojektu. Následuje acylový přesmyk thioesteru na amid, čímž je reakce dokončena a cyklus uzavřen (Schéma 5).¹⁵

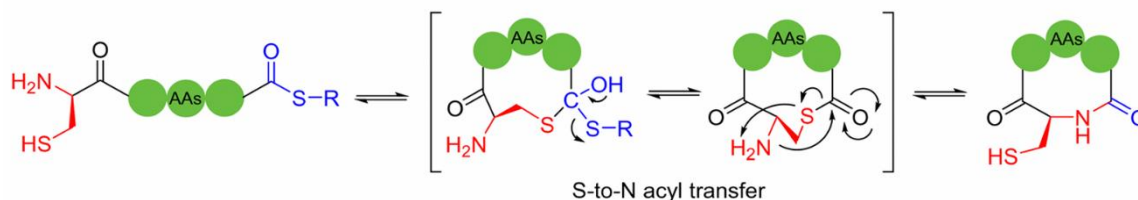


Schéma 5: Cyklizace peptidu NCL.¹⁴

Velkou výhodou této reakce je její specifická; probíhá pouze mezi cysteinem a thioesterem, díky čemuž není nutné chránit funkční skupiny aminokyselin na postranním řetězci. Další

výhodou je, že reakce probíhá za mírných podmínek ve vodném prostředí při neutrálním pH, což z ní dělá reakci velmi biokompatibilní.

4.1.2 Laktamizace

Jedná se o reakci, při které dochází k tvorbě cyklického aminu kondenzací aminové a karboxylové skupiny za použití aktivačního činidla jako například EDC nebo DCC. Tato metoda se dá aplikovat pro všechny způsoby uzavření cyklu, tj. head-to-tail, side chain-to-side chain, side chain-to-tail i head-to-side chain (Obrázek 6). V případě head-to-tail cyklizace, kdy spolu reagují aminová skupina na N-konci peptidu a karboxylová skupina na C-konci, je pro omezení nechtěných reakcí nutné všechny funkční skupiny na postranním řetězci pokrýt chránicí skupinou. side chain-to-side chain a side chain-to-tail cyklizace se dá dosáhnout, pokud jsou v postranním řetězci peptidu obsaženy bazické a kyselé aminokyselinové zbytky jako je například lysin a kyselina asparagová. Produkty reakce jsou velmi stabilní, ovšem výtěžky jsou často poněkud nízké. Tato metoda je stejně jako NCL biokompatibilní, a proto se využívá například pro tvorbu bioaktivních cyklických peptidů.¹⁶

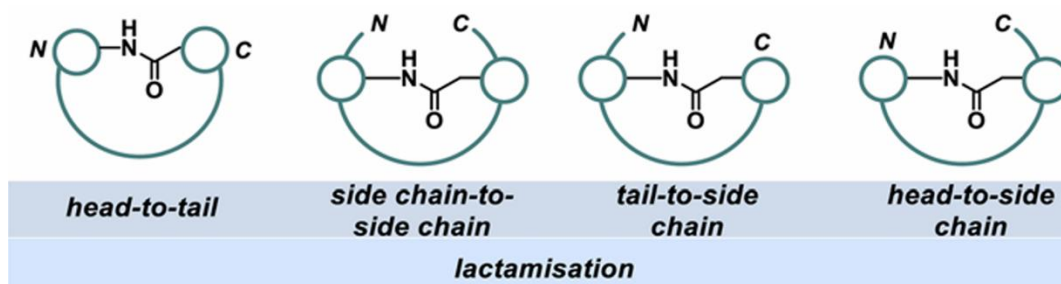


Schéma 6: Způsoby uzavření cyklu laktamizací.¹⁶

4.1.3 Tvorba disulfidových můstků

Disulfidovými můstky (disulfide bridges) se rozumí vazba mezi thiolovými skupinami na postranním řetězci dvou cysteinových zbytků vznikající obyčejnou oxidací (Schéma 7).

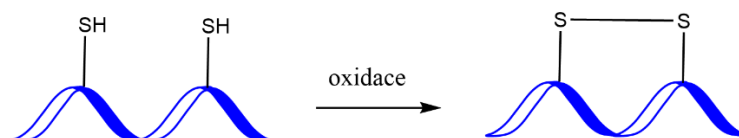
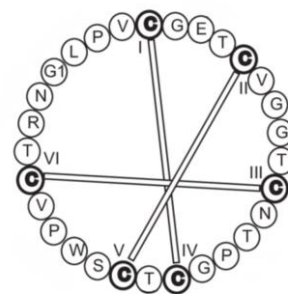


Schéma 7: Oxidace thiolů za tvorby disulfidové vazby.

Nejefektivněji probíhá tato reakce za mírně alkalického pH, jež zvyšuje nukleofilitu cysteinu. V případě, že peptid obsahuje více cysteinových zbytků, může být obtížné kontrolovat mezi kterými z nich vazba vznikne. Proto byla vyvinuta metoda¹⁷ využívající nepřirodní aminokyseliny penicillaminu (Pen), jež zabrání tvorbě nepreferovaných regionálních izomerů; při reakci je upřednostněná tvorba heterosulfidu Cys-Pen, než homosulfidu Cys-Cys/Pen-Pen.¹⁴ Mezi výhody peptidů cyklizovaných disulfidovými vazbami patří například jejich různorodá bioaktivita, schopnost pronikat do buněk, proteolytická stabilita a odolnost vůči nepříznivým podmínkám jako je kyselé pH nebo vysoká teplota.¹⁶ Příkladem peptidu s tímto druhem vazby je například peptidový hormon oxytocin, jehož cyklus je uzavřený právě jednou disulfidovou vazbou. Najdeme ale i složitější peptidy, jako například Kalata B1 vykazující antibakteriální aktivitu (Obrázek 9), obsahující až tři tyto vazby, které jim poskytují větší stabilitu.



Obrázek 9: Kalata B1.¹⁶

4.1.4 Tvorba thioetherů

Další metoda využívající cysteinových zbytků pro uzavření peptidového cyklu je tvorba thioetherů alkylačními a arylačními reakcemi. Příkladem je metoda založená na chemicky selektivních nukleofilních substitučních reakcích mezi thiolovou a bromoacetylovou skupinou. (Schéma 8).¹⁴

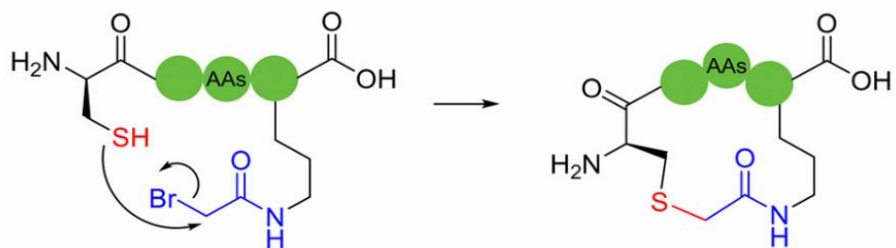


Schéma 8: Tvorba thioetherové vazby nukleofilní substitucí.¹⁴

Další způsob využívající tvorby thioetherů pro cyklizaci peptidů najdeme u přirozeně se vyskytujících antimikrobiálních peptidů jako lanthipeptidy a sektipectidy, obsahující serinové nebo threoninové zbytky, kde je tato vazba vytvořena jako důsledek jejich enzymatické dehydratace a následné Michaelově adici za vzniku lanthipeptidového můstku¹⁶ (Schéma 9).

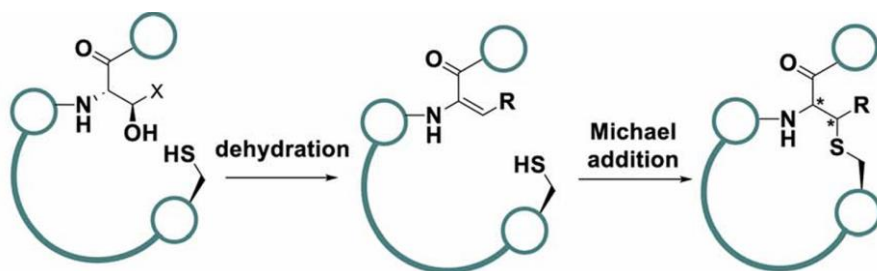


Schéma 9: Tvorba lanthipeptidového můstku.¹⁶

Výhodami těchto metod je jejich selektivita, stabilní produkty a vysoké výtěžky. Naopak nevýhodou může být potřeba chránit ostatní funkční skupiny, nebo možná oxidace thiolů.¹⁶

4.1.5 Click reakce

Když byl začátkem 21. století představen nový syntetický přístup zvaný „click reakce“^{18,19} došlo k významnému rozvoji organické syntézy, kde se začaly využívat katalyzátory na bázi přechodných kovů. Tyto katalyzátory se ukázaly být velmi účinné a našly uplatnění i při cyklizaci peptidů. Hlavním typem click reakcí je například azid-alkynová cykloadice.²⁰ U tohoto způsobu využití kov aktivuje reakci mezi modifikovanými aminokyselinami nesoucími alkynovou a azidovou skupinu za vzniku triazolového cyklu.

CuAAC – mědi katalyzovaná azido-alkynová cykloadice byla původně vyvinuta pro spojování kratších peptidů a vytváření tak delších sekvencí, v roce 2005 však byla poprvé aplikována pro cyklizaci peptidů.¹⁶ Využívá měď jako katalyzátor reakce, kdy dochází ke spojení azidové a alkynové funkční skupiny za vzniku 1,4-disubstituovaných 1,2,3-triazolů (Schéma 10). Reakce je vhodná pro všechny druhy cyklizace peptidů (head-to-tail, side-chain-to-side-chain, side-chain-to-tail i head-to-side chain). Její velkou výhodou je, že struktura vzniklého triazolového kruhu je velmi podobná struktuře peptidové vazby. Také je kompatibilní s nechráněnými funkčními skupinami, má vysokou selektivitu a může probíhat za mírných podmínek. Nevýhodou zase může být nutnost zavádění příslušných funkčních skupin do peptidu a obtížné kontrolování průběhu reakce, protože výchozí látka a produkt mají stejnou molekulovou hmotnost. Největším rizikem reakce je ale možná oxidace mědi ve fyziologickém prostředí, jež může vést i k degradaci peptidu. Pro snížení tohoto rizika se proto využívá ligandů založených na tris(triazolylmethyl)aminu, nebo se reakce provádí za anaerobních podmínek pro úplné zabránění oxidace.¹⁴ Dalším potenciálním nebezpečím je komplexace peptidů ionty mědi, čímž může docházet jednak ke změně jejich konformace a jednak k zanášení tohoto těžkého kovu do intracelulárního systému.

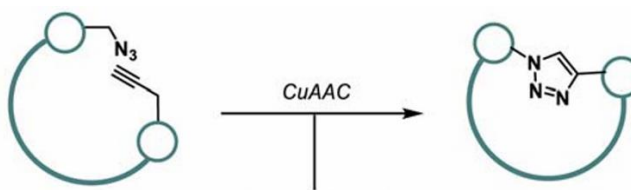


Schéma 10: Mědi katalyzovaná azido-alkynová cykloadice.¹⁶

Strain-promoted azido-alkynová cykloadice (SPAAC) představuje vhodnou a více biokompatibilní alternativu CuAAC, bez využití mědi. Je to [3+2] cykloadiční reakce mezi azidem a cykloalkynem, jež využívá kruhového pnutí cyklooktynového systému, které snižuje aktivační energii reakce a tím umožňuje její průběh za fyziologických podmínek.²¹ Pro průběh reakce musí být nejdříve na peptid selektivně zavedena azidová a cyklooktynová skupina a jejím produktem je stabilní triazolový kruh (Schéma 11). Reakce je vysoce selektivní, protože nezahrnuje žádné kovové ionty je biokompatibilní a může probíhat v živých systémech. Tyto vlastnosti z ní dělají skvělý nástroj pro značení biomolekul, modifikaci buněčného povrchu, syntézu biokonjugátů a také cyklizaci peptidů.¹⁶

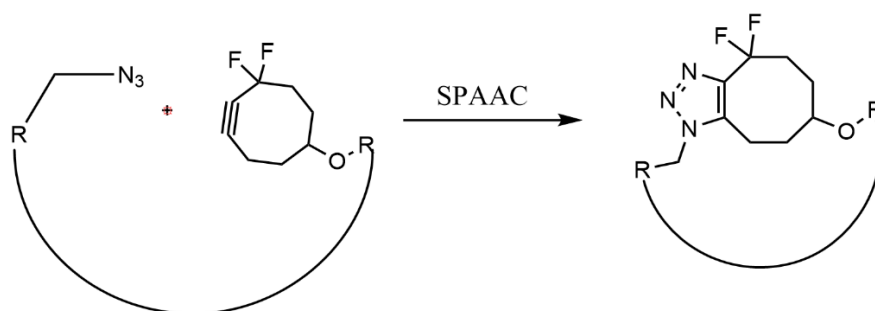


Schéma 11: Azido-alkynová cykloadice podporovaná pnutím cyklooktynového kruhu.

4.1.6 Olefinová a alkynová metateze

Tato metoda se stala velmi populární po objevení Grubbsových katalyzátorů první a druhé generace v 90. letech minulého století. V roce 2000 byla použita pro modifikaci a cyklizaci α -helikálních peptidů (RCM – Ring-closing metathesis) (Schéma 12), přičemž byl poprvé navržen koncept peptidového staplingu.²² Tato metoda je vhodná pro modifikaci relativně velkých a složitých molekul díky její toleranci k většině funkčních skupin, vysokému výtěžku a možnosti ji provádět jak na pevné, tak i v kapalně fázi.¹⁴ Pro cyklizaci peptidů pomocí RCM existuje několik strategií. Nejčastěji se používá Grubbsův katalyzátor obsahující ruthenium. Tento katalyzátor má však nežádoucí účinek – může způsobovat degradaci biologických molekul jako jsou DNA a proteiny.²³ Aby se tomuto problému předešlo, přidává se do reakční směsi velké množství hořečnatých iontů, které působí jako ochranné činidlo a zabráňují nežádoucímu rozpadu biomolekul. Alternativní strategií je použití katalyzátoru na bázi molybdenu, který ale vykazuje mnohem nižší aktivitu než Grubbsův katalyzátor, a proto se tato strategie využívá jen ojediněle.²⁴

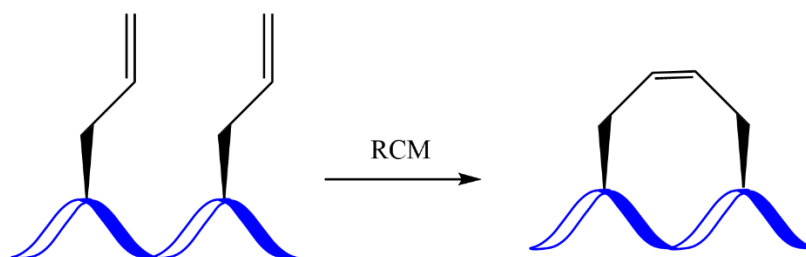


Schéma 12: RCM cyklizace.

4.1.7 Využití nepřírodních aminokyselin pro cyklizační reakce

Dalším moderním nástrojem pro syntézu a modifikaci peptidů je využití nepřírodních aminokyselin (Schéma 13). Mezi hlavní typy používaných nepřírodních aminokyselin patří například o-allyl-seriny nebo o-allyl-threoniny, azidohomoalanin, propargylglycin, lysinové deriváty s různými funkčními skupinami či aminokyseliny s dlouhými alkynovými řetězci. Takové aminokyseliny mají na svém postranním řetězci specifické reaktivní skupiny, jež poskytují aminokyselinám unikátní vlastnosti. Nejběžnější metodou je tzv. inkorporace aminokyselin s alkenovými skupinami, které umožňují následnou cyklizaci pomocí již zmíněné metateze (RCM).²⁵ Nepřírodní aminokyseliny s azidovými a alkynovými skupinami se zase využívají v click reakcích, kdy spolu reagují za vzniku triazolového kruhu. Výhodou jejich využití je zejména přesná kontrola místa cyklizace, vysoká selektivita a možnost různých typů spojení. Nevýhodou na druhou stranu zase může být jejich náročnější syntéza a s ní spojené vyšší náklady, nebo riziko ovlivnění biologické aktivity látek.²⁶ I přes tato omezení se ale nepřírodní aminokyseliny staly populárními jak v peptidové chemii, tak při vývoji nových léčiv.

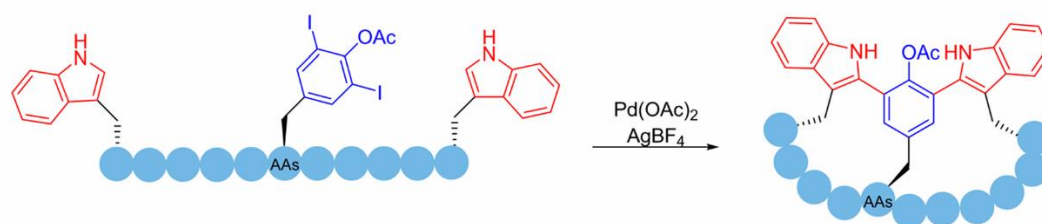


Schéma 13: Příklad cyklizace peptidu využívající nepřírodní aminokyseliny (diiodoacetyltyrosin a indolové jádro tryptofanu).¹⁴

4.1.8 Shrnutí kapitoly o cyklických peptidech

Dalších strategií pro cyklizaci peptidů je ještě celá řada. Mohli bychom se setkat například s různými velmi biokompatibilními enzymatickými metodami, nebo třeba s fotocykloadicí využívající fotoreaktivních skupin peptidu a dalšími.

Díky vysoké stabilitě, terapeutickým vlastnostem a dalším příznivým vlastnostem se staly cyklické peptidy významnou součástí tvorby nových léčiv. Proto bylo v průběhu posledních desetiletí objevováno spoustu metod pro cyklizaci peptidů, které se od sebe liší zejména požadovanými sekvencemi peptidů a reakčními podmínkami. Každá z těchto metod má své výhody, ale také určité nevýhody, což motivuje k objevování stále nových přístupů. Inspirací pro tuto Středoškolskou odbornou činnost bylo navržení nové metody cyklizace peptidů využívající reakce mezi lysinem a tyrosinem za pomoci diazoniové soli aminobenzoové

kyseliny. V rámci mé práce se nám podařilo tuto metodu nejen navrhnout, ale také prakticky ověřit. Náplní tohoto projektu je tedy představit tuto metodu, popsat její jednotlivé kroky, a nakonec zhodnotit její potenciál pro praktické využití.

5 VÝSLEDKY A DISKUZE

5.1 Stabilita diazoniové soli

Diazoniové soli jsou organické sloučeniny obsahující skupinu N_2^+ . Protože je tato skupina jednoduše nahraditelná jinými funkčními skupinami, dělá z diazoniových solí vysoce reaktivní sloučeniny často využívané jako meziprodukty v organické syntéze. Díky jejich iontovému charakteru jsou tyto soli velmi dobře rozpustné ve vodě. Diazoniové soli vznikají reakcí, tzv. diazotací, primárních aromatických aminů s kyselinou dusitou za nízké teploty ($0\text{--}5\text{ }^\circ\text{C}$) (Schéma 14). Protože je kyselina dusitá sama o sobě nestabilní, většinou se připravuje *in situ* reakcí dusitanu sodného se silnou minerální kyselinou, např. kyselinou chlorovodíkovou.

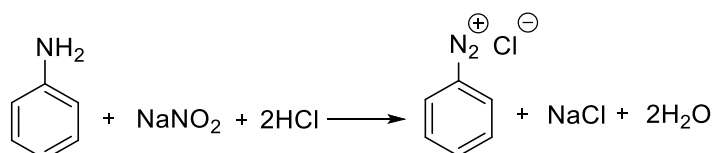


Schéma 14: Příklad diazotační reakce provedené u anilinu.

Stabilita diazoniových solí je ovlivněna zejména teplotou, typem dalších substituentů a prostředím. Je známo, že diazoniové soli jsou nejstabilnější při nízkých teplotách ($0\text{--}5\text{ }^\circ\text{C}$). Při vyšších teplotách dochází ve vodě k jejich rozkladu za uvolnění dusíku a vzniku fenolů. Jelikož teplotní stabilita roztoků diazoniových solí pro jednotlivé substituční deriváty není příliš prozkoumána a je známo, že je možné izolovat diazoniové soli i v pevném stavu, můžeme se domnívat, že některé diazoniové soli nemusí být ve vodných roztocích okamžitě hydrolyzovány ani při výrazně vyšších teplotách. Tato vlastnost by usnadnila reakci s peptidy, která by mohla být prováděna za laboratorní teploty a v budoucnu by se mohla využít při reakci peptidů s diazoniovými solemi za fyziologických podmínek. Pro naše účely, kdy chceme využít aktivovaných esterů diazoniových solí odvozených od aminobenzoových kyselin, jsme proto potřebovali nejprve ověřit stabilitu právě takovýchto nebo podobných derivátů.

Pro testování stability diazoniové soli jsme se rozhodli využít UV-VIS spektrofotometrii. Jako modelový substrát byla zvolena diazoniová sůl kyseliny anthranilové (**2**) (Schéma 15). Kyselina anthranilová (**1**) je levná a dostupná sloučenina a je možné se domnívat, že podobné látky, jako

je m- nebo p-aminobenzoová kyselina případně jejich estery budou mít stabilitu svých diazoniových solí obdobnou.

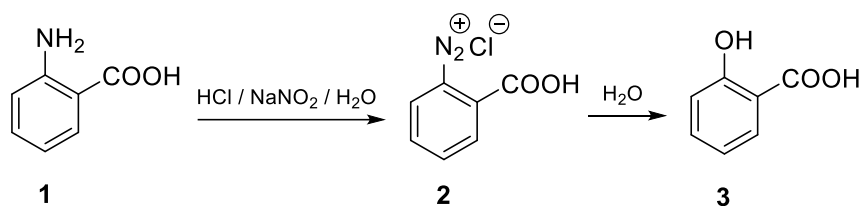
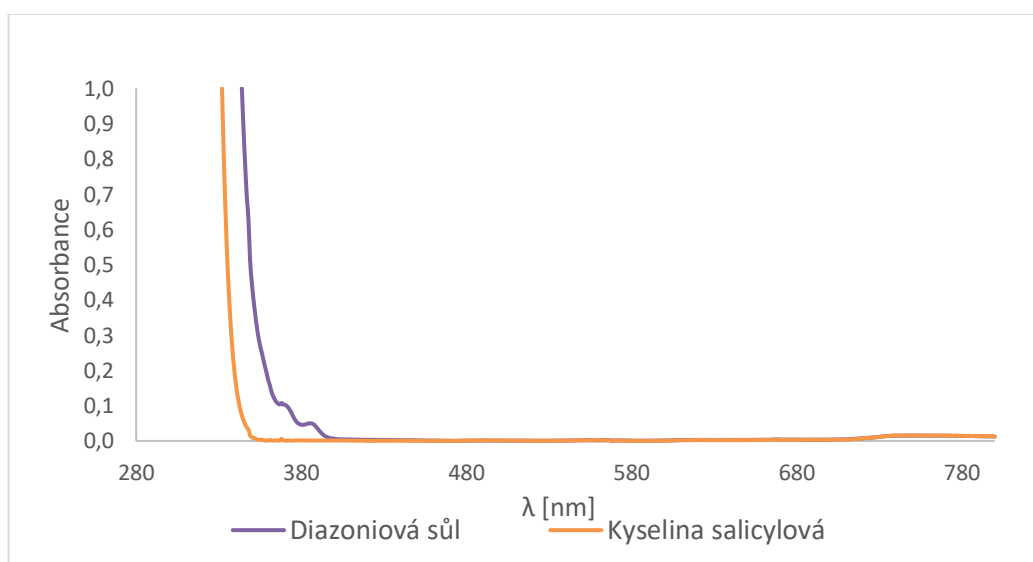


Schéma 15: Příprava diazoniové soli kyseliny anthranilové a její rozklad na kyselinu salicylovou.

Diazoniová sůl kyseliny anthranilové (**2**) byla připravena diazotační reakcí s dusitanem sodným v kyselině chlorovodíkové. Reakční směs byla naředěna ultračistou vodou a byla změřena absorbance v UV-VIS oblasti elektromagnetického spektra. Stejným způsobem byla naměřena i absorbance kyseliny salicylové (**3**), na kterou se diazoniová sůl (**2**) postupem času rozkládá. Předpokládalo se, že případný rozdíl absorpčního spektra může sloužit jako nástroj pro snadné odlišení kyseliny salicylové (**3**) diazoniové soli (**2**). Bohužel v UV-VIS spektrech nebyl pozorován žádný rozdíl absorpčního signálu pro diazoniovou sůl (**2**) ve srovnání se spektrem kyseliny salicylové (**3**), jako jejím rozkladným produktem, což činí tuto metodologii nevhodnou pro zjištění stability (Obrázek 10).

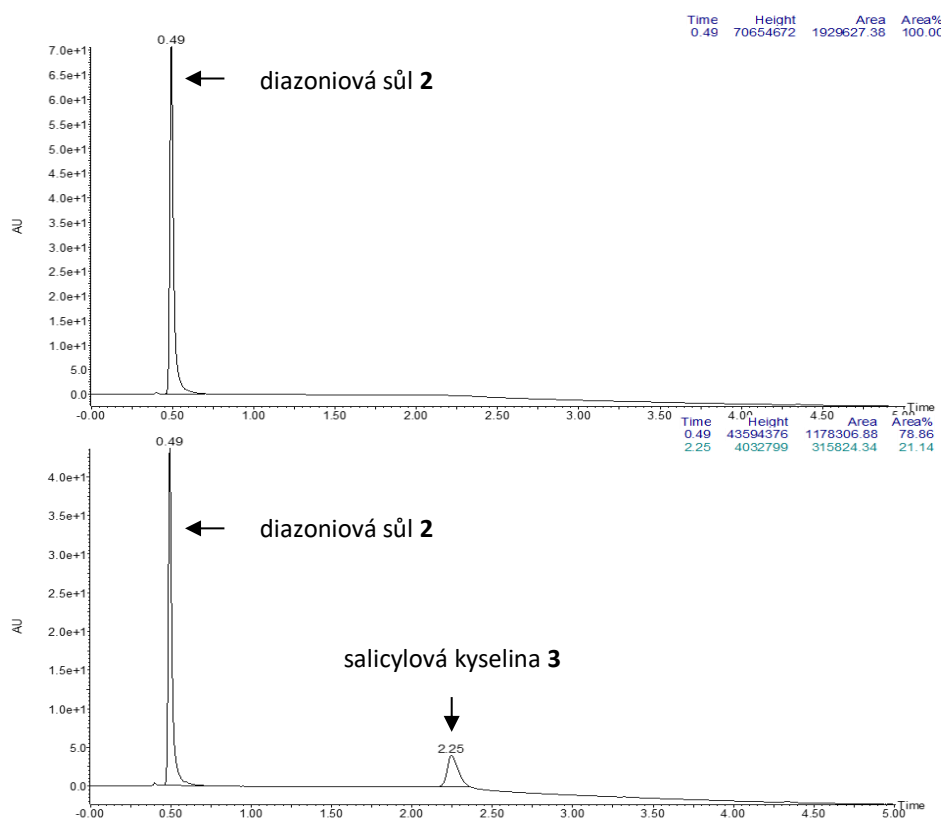


Obrázek 10: UV-VIS spektra diazoniové soli kyseliny anthranilové a kyseliny salicylové.

Měření stability pomocí UV-VIS spektrofotometru bylo tedy nahrazeno LC-MS analýzou. Bylo předpokládáno, že stabilita diazoniové soli by mohla být vyhodnocena opakovaným měřením

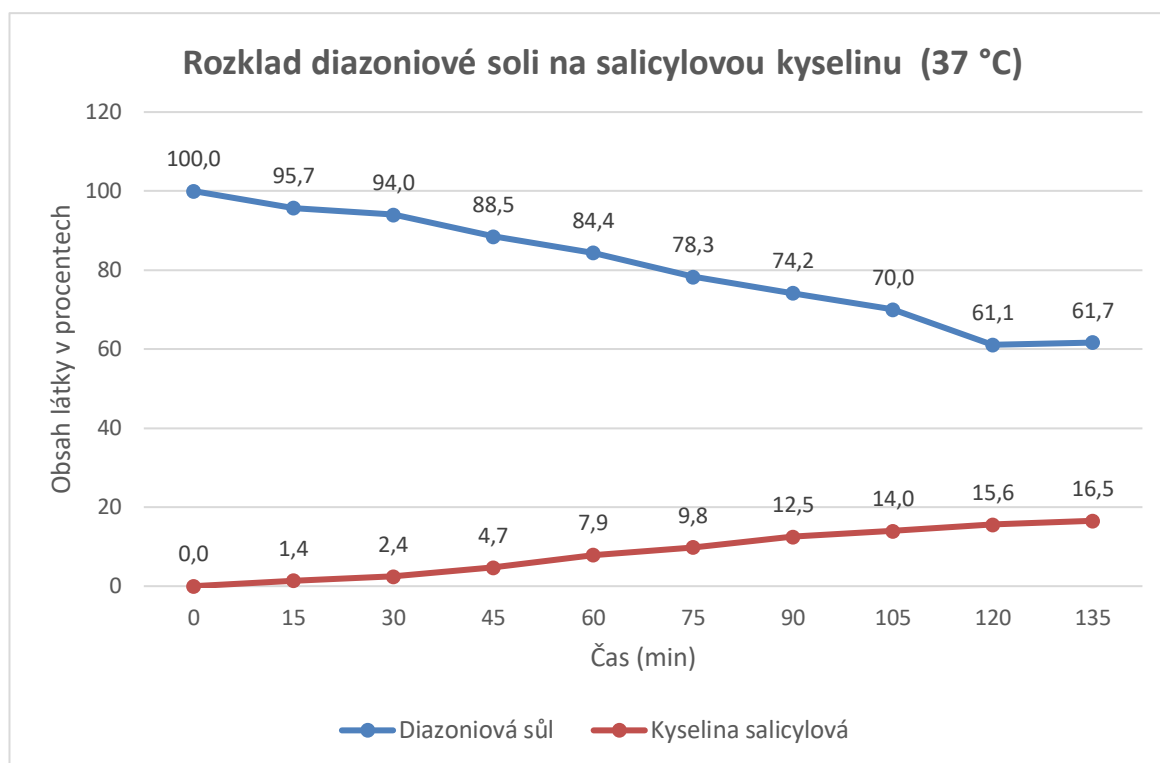
vzorků stejné koncentrace odebraných v definovaných časových intervalech. Podle očekávání by se plocha píku diazoniové soli měla časem postupně zmenšovat, a naopak plocha píku salicylové kyseliny postupně růst.

Diazoniová sůl **(2)** byla tedy připravena znovu analogickým způsobem jako v předchozím případě a byla zanalyzována pomocí LC-MS. Produkt byl poté vložen do inkubátoru s teplotou nastavenou na 37 °C pro simulaci fyziologické teploty. Následoval proces, kdy z inkubátoru byla každých 15 minut odebírána a analyzována alikvotní část směsi. Na obrázku 11 lze pozorovat rozdíl mezi obsahem diazoniové soli ve vzorku během prvního a posledního měření.



Obrázek 11: Přítomnost diazoniové soli ve vzorku v čase t=0 min a t=135 min.

Z Grafu 1 je vidět postupný úbytek diazoniové soli ve vzorku a její rozklad na kyselinu salicylovou.



Graf 1: Rozklad diazoniové soli kyseliny anthranilové v čase na kyselinu salicylovou.

Získané výsledky potvrdily, že během 30 minut dochází k rozkladu diazoniové soli pouze z 6 %. Tato doba a malá míra rozkladu by měla být dostatečná pro využití diazoniových solí odvozených od aminobenzoových kyselin pro naše cyklizační reakce.

5.2 Příprava aktivovaného esteru a jeho diazoniové soli

Po ověření stability diazoniové soli anthranilové kyseliny, díky níž může dojít k reakci s tyrosinem, jsme se věnovali přípravě aktivovaného esteru, který naopak má být schopen reagovat s aminoskupinou lysinu na jeho postranním řetězci. Uspořádáním diazoniové soli a aktivovaného esteru do jedné molekuly by pak mohl vzniknout spojovací prvek mezi dvěma aminokyselinami (typicky tyrosinem a lysinem), což by mohlo vést k cyklizaci peptidu. K přípravě tohoto esteru byla zvolena kyselina 3-aminobenzoová, jež se od anthranilové kyseliny, na níž byla zkoumána stabilita její diazoniové soli, liší pouze v poloze aminoskupiny. Aktivované estery jsou významné sloučeniny pro organickou syntézu. Na rozdíl od samotných karboxylových kyselin nebo neaktivovaných esterů jsou více reaktivní, a to zejména s nukleofilními činidly, například aminy. Jednou z běžných metod přípravy aktivovaných esterů je reakce s karbodiimidovými činidly. Protože je ester v této formě nestabilní a náchylný na hydrolýzu, je nutné jej převést na stabilnější derivát, např. reakcí s hydroxybenzotriazolem (HOBt) či *N*-hydroxysuccinimidem (NHS), který jsme také zvolili pro tuto práci (Schéma 16).

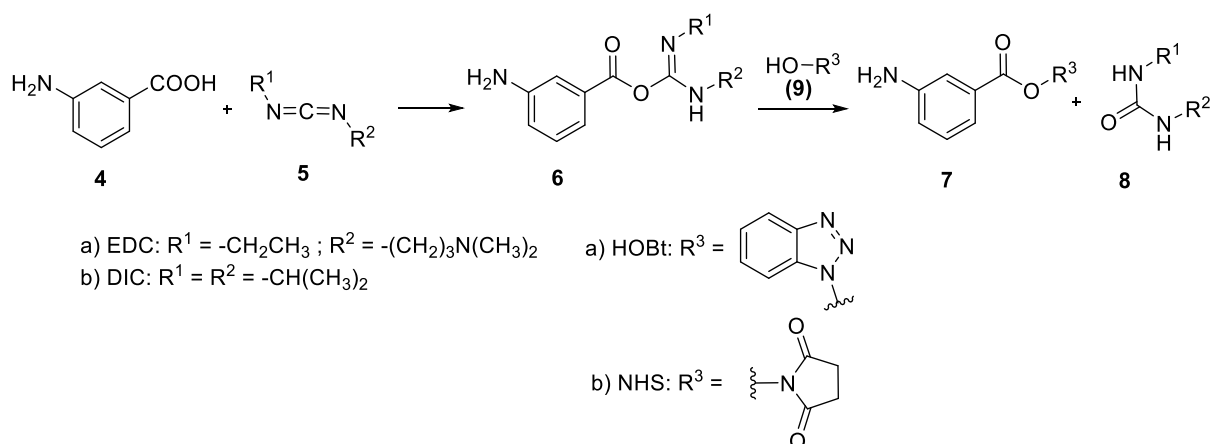


Schéma 16: Aktivace karboxylových kyselin karbodiimidy (EDC nebo DIC) a jejich následná reakce s HOBT nebo NHS.

Nejprve bylo nutné vybrat a ověřit vhodné karbodiimidové činidlo. Jako první experiment byl testován mírně upravený literární postup.²⁷ K roztoku 3-aminobenzoové kyseliny (**4**) a NHS (**9b**) v DCM byla přidána hydrochloridová sůl 1-ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)carbodiimide, tzv. EDC (**5a**). Touto reakcí se sice podařilo získat požadovaný produkt (**7b**) (Schéma 16), ale také se v jejím průběhu vytvořilo několik nečistot. Předpokládali jsme, že kyselina chlorovodíková tvořící s EDC sůl mohla způsobit nízkou rozpustnost tohoto reagentu v DCM a tím pádem i snížit reaktivitu, a proto byl v následujícím experimentu přidán triethylamin (Et_3N) jako zásada, která by měla tuto kyselinu chlorovodíkovou vázat a způsobit tak potenciální zvýšení reaktivity EDC. Výsledkem této reakce byl opět požadovaný produkt (**7b**), tentokrát ale s menším podílem nečistot.

Druhé testované aktivační činidlo byl diisopropylkarbodiimid (**5b**), tzv. DIC (Schéma 16), které se nakonec ukázalo být pro naše účely vhodnější, protože při jeho použití probíhala reakce kvalitněji. Reakcí tohoto aktivovaného esteru (**6b**) se sukcinimidem vznikl aktivovaný ester (**7b**) ve výtěžku 58 %.

Další reakční krok, který bylo potřeba prozkoumat, byla přeměna tohoto sukcinimidesteru kyseliny 3-aminobenzoové (**7b**) na diazoniovou sůl (**10**) (Schéma 17), která by mohla reagovat s tyrosinem díky přítomnosti diazoniové skupiny a s lysinem díky přítomnosti aktivovaného esteru.

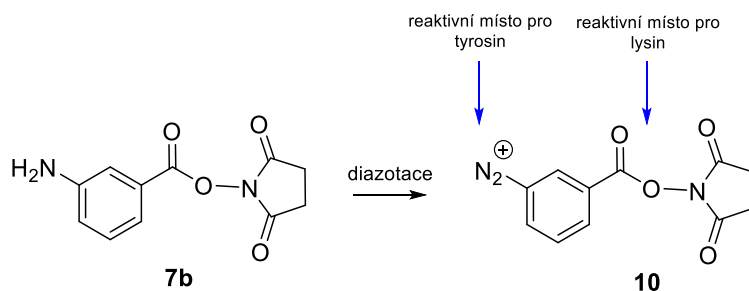


Schéma 17: Diazotace aktivovaného esteru kyseliny 3-aminobenzoové.

Bohužel ve spektru LC-MS nebyl pozorován žádný signál odpovídající požadovanému produktu, protože diazotizace aktivovaného esteru 3-aminobenzoové kyseliny (**7b**) byla neúspěšná. Vzhledem ke špatné ionizaci a vysoké polaritě sloučenin (několik píků na samém začátku chromatogramu) není identifikace jednotlivých sloučenin jednoznačná.

Peptidy jsou obecně citlivé na silně kyselé prostředí, které může způsobit jejich denaturaci. Rovněž stabilita esteru v silně kyselém prostředí bude nízká, což může být důvodem výše uvedeného rozkladu. Z tohoto důvodu jsme otestovali, zda je při diazotaci esteru možné nahradit dusičnan sodný v přítomnosti kyseliny chlorovodíkové dusitanem amylnatým. Při použití dusičnanu sodného je totiž nutné přidat kyselinu chlorovodíkovou, která vytváří kyselinu dusitou, jež následně umožní diazotaci esteru. Pokud bychom místo NaNO_2 použili amylnitrit, reakce by mohla proběhnout v organickém rozpouštědle při mírných reakčních podmínkách a riziko denaturace peptidu by se tak snížilo. Zároveň by bylo potenciálně možné připravit derivát (**10**) (Schéma 17) a uskutečnit obě reakce vedoucí k cyklizovanému peptidu v jednom kroku.

K ověření výše uvedené hypotézy jsme provedli reakci aktivovaného esteru kyseliny 3-aminobenzoové (**7b**) s amylnitritem ať už v THF nebo DMSO za přítomnosti katalytického množství kyseliny trichloroctové. Na základě LC-MS analýzy reakční směsi, provedené po 5 minutách míchání při laboratorní teplotě, byl s největší pravděpodobností získán 1,3-diaryltriazen (**11b**). Náš předpoklad ohledně vzniku 1,3-diaryltriazenů byl dále podpořen analogickou transformací, kde byla místo jejího aktivovaného esteru využita kyselina 3-aminobenzoová (**4**) (Schéma 18). Kromě toho byl velmi podobný syntetický postup již úspěšně použit pro přípravu řady farmaceuticky aktivních 1,3-diaryltriazenů, jak uvádí Cappoen a spol.²⁸ Stejným způsobem bylo dále testováno i použití tert-butylnitritu, které ale vedlo k podobnému výsledku jako v případě amylnitritu.

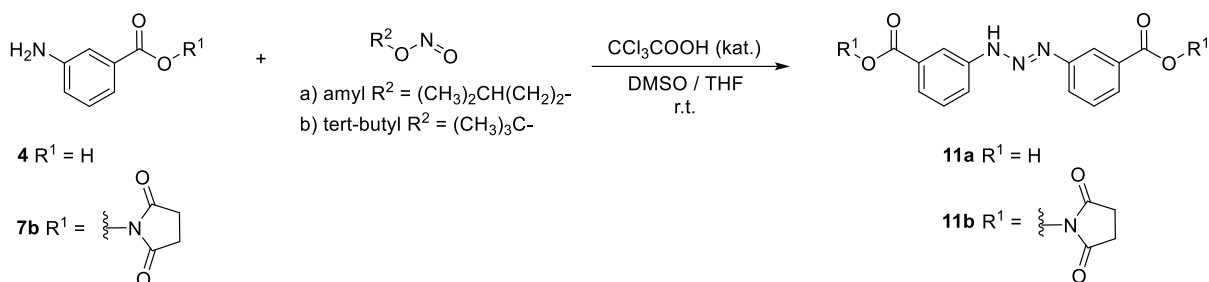


Schéma 18: Tvorba 1,3-diaryltriazenů v přítomnosti organických dusitanů.

Při dalším pokusu byl do suspenze kyseliny 3-aminobenzoové, tyrosinu a Et_3N v DMSO po kapkách přidán amylnitrit. Předpokládali jsme, že postupné přidávání organického dusitanu do reakční směsi by mohlo vést k postupné tvorbě odpovídající diazoniové soli, která by pak mohla být okamžitě spotřebována při následné azokopulaci s tyrosinem. Tato modelová reakce by měla simulovat přístup, kdy bude kyselina aminobenzoová již navázaná na lysin v peptidu a následnou diazotaci by došlo k reakci s přítomným tyrosinem dříve než k vedlejším reakcím. Tento postup by umožnil nepoužívat v tomto kroku silně kyselé prostředí. Bohužel, ani v tomto případě nebyl pozorován žádný požadovaný produkt. Na základě analýzy všech provedených reakcí jsme dospěli k závěru, že použití amylnitritu či tert-butylnitritu místo dusičnanu sodného není pro naše účely vhodné.

Na základě výše uvedených poznatků byla další pozornost zaměřena na dvoustupňový proces cyklizace, kdy záměrem bylo nechat nejprve zreagovat aminoskupinu postranního řetězce lysinu na příslušném peptidu s aktivovaným esterem m-aminobenzoové kyseliny (**7b**), následně provést diazotaci aminoskupiny (**13**) za vzniku diazoniové soli (**14**) a podstoupit reakci s tyrosinem za vzniku finálního produktu (**15**) (Schéma 19).

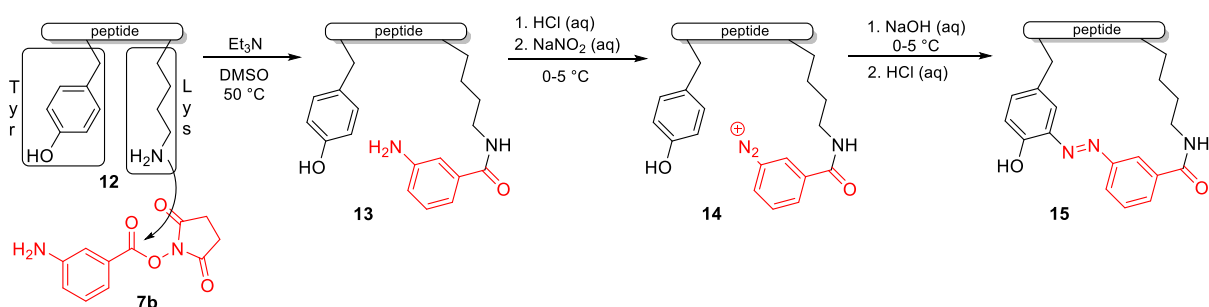


Schéma 19: Návrh dvoustupňového procesu cyklizace peptidu.

5.3 Dvoustupňová cyklizační reakce

Před samotným vývojem protokolu pro dvoustupňovou přípravu cyklizovaného peptidu bylo nutné nejprve otestovat, zda bude diazoniová sůl odvozená od derivátu 3-aminobenzoové kyseliny reagovat s fenolovou částí tyrosinu a osvojit si proces přípravy diazoniové soli a její kopulační reakce. Pro tyto účely jsme vybrali modelovou reakci kyseliny 3-aminobenzoové s p-kresolem, který by měl imitovat fenolickou část tyrosinu. K roztoku 3-aminobenzoové kyseliny ve vodném roztoku kyseliny chlorovodíkové byl při pH 0–1 a teplotě 0–5 °C přidán vodný roztok dusitanu sodného, což vedlo k tvorbě diazoniové soli. Následně byl k reakční směsi pomalu přidáván ochlazený roztok p-kresolu v 1 M NaOH. Reakční směs se okamžitě zbarvila do červena, což je typické pro tvorbu azosloučenin a nepřímě se tak potvrdila úspěšná azokopulace mezi diazoniovou solí a p-kresolem (Schéma 20).

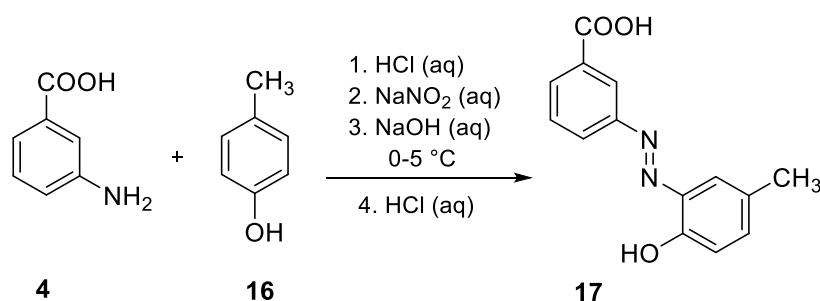
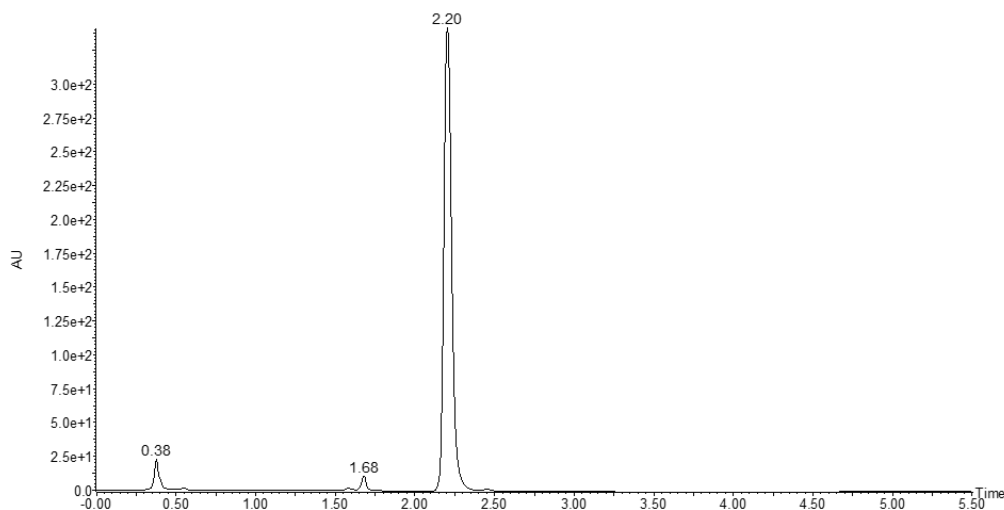


Schéma 20: Modelová diazotace a následná azokopulace kyseliny 3-aminobenzoové s p-kresolem.

O úspěchu této reakce svědčí i výsledek LC-MS analýzy (Obrázek 12).



Obrázek 12: LC-MS analýza ($m/z = 257 [M+H]^+$) látky **17** vzniklé azokopulací 3-karboxybenzodiazoniumchloridu s p-kresolem.

Poté, co byly ověřeny podmínky pro úspěšnou azokopulaci s kresolem, byly tyto podmínky aplikované přímo na tyrosin. Jejím výsledkem bylo opět úspěšné spojení fenolové části tyrosinu s diazoniovou solí aminobenzoové kyseliny (Schéma 21).

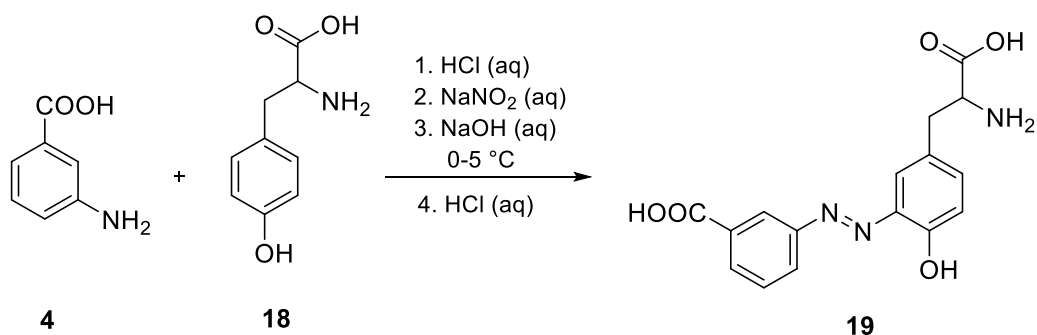


Schéma 21: Diazotace 3-aminobenzoové kyseliny a následná azokopulace s tyrosinem.

Dalším krokem bylo ověřit, zda je azokopulace diazoniové soli s tyrosinem možná i v případě, kdy je tyrosin vázaný mezi dalšími dvěma aminokyselinami. K tomuto účelu byl použit peptid složený ze tří aminokyselin s koncovou aminoskupinou chráněnou acylem HOOC-Ala-Tyr-Gly-NH-COCH₃ (**21**). Nejprve byla 3-aminobenzoová kyselina (**4**) rozpuštěna v DMSO a následně byla provedena diazotace přidáním HCl:H₂O (1:3 V/V) a vodného roztoku NaNO₂ při teplotě 0–5 °C, což vedlo k zabarvení reakční směsi do světle žluta. Do vzniklého roztoku byl přidán peptid (**21**) rozpuštěný v DMSO a pH bylo upraveno pomocí vodného roztoku NaOH

na hodnotu 9. Bezprostředně po úpravě pH bylo pozorováno zhoustnutí roztoku a změna zbarvení na tmavě červenou, což indikovalo průběh reakce. Úspěšnost azokopulace za vzniku azosloučeniny (**22**) (Schéma 22) byla následně potvrzena pomocí LC-MS analýzy.

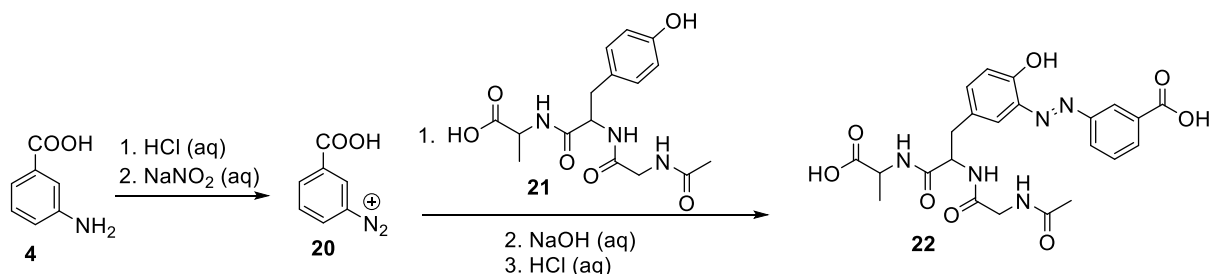


Schéma 22: Azokopulace 3-aminobenzoové kyseliny (**4**) s tripeptidem HOOC-Ala-Tyr-Gly-NH-COCH₃ (**21**).

Dále bylo nutné najít vhodné podmínky, při kterých bude aminoskupina lysinu reagovat s aktivovaným esterem. Tyto podmínky byly testovány ve čtyřech mikrozkušnicích. Reaktanty v první zkumavce tvořil pouze samotný aktivovaný ester rozpuštěný v DMSO a tripeptid HOOC-Tyr-Gly-Lys-NH-COCH₃ (**23a**), ve formě viskózního roztoku v DMSO. V druhé zkumavce probíhala zcela stejná reakce jako v předchozí, ale teplota byla po celou dobu nastavena na 50 °C. Reakce v třetí zkumavce probíhala opět při pokojové teplotě, ale od těch předchozích se lišila v přidání Et₃N. Poslední zkumavka byla opět vystavena teplotě 50 °C a bylo do ní přidáno Et₃N. Po uplynutí jedné hodiny od začátku reakcí byly zanalyzovány vzorky ze všech mikrozkušnic pomocí LC-MS analýzy.

Porovnáním všech čtyř chromatogramů se nám potvrdilo, že reakce mezi lysinem a esterem probíhá nejlépe v bazickém prostředí při teplotě 50 °C. Přidání báze totiž může zabránit vzniku pozitivního náboje na aminoskupině lysinu, která je poté schopna atakovat esterovou skupinu (Schéma 23).

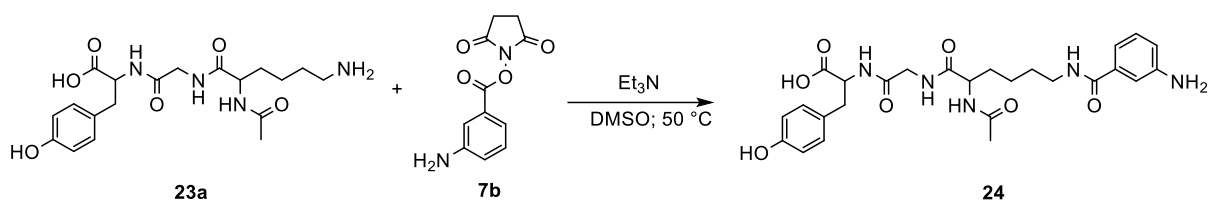


Schéma 23: Nukleofilní substituce tripeptidu HOOC-Tyr-Gly-Lys-NH-COCH₃ (**23a**) s aktivovaným esterem (**7b**).

Po tomto poznatku jsme se rozhodli vyzkoušet obě reakce (nukleofilní substituce (lysin) a azokopulace (tyrosin)) konsekutivně na stejném peptidu a tím vytvořit cyklus spojující peptid a ester (Schéma 24).

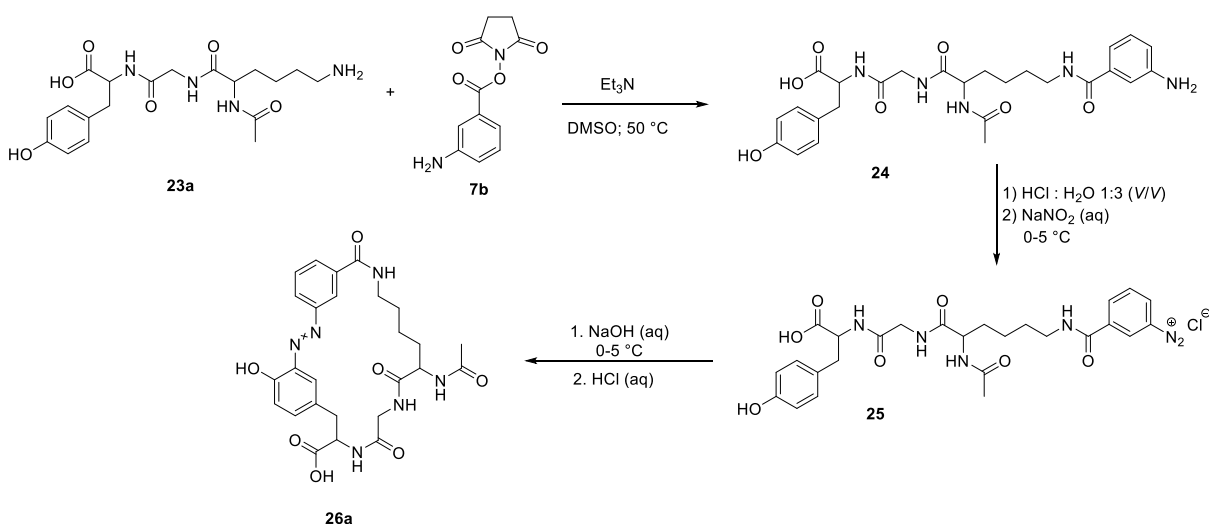


Schéma 24: Návrh dvoustupňové reakce pro cyklizaci modelového peptidu HOOC-Tyr-Gly-Lys-NH-COCH₃ (**23a**).

Prvním krokem reakce bylo navázání aktivovaného esteru 3-aminobenzoové kyseliny (**7b**) na lysin v peptidu (**23a**). K roztoku peptidu a aktivovaného esteru v DMSO byl přidán Et₃N a po 90 minutách byl zanalyzován vzorek produktu, což potvrdilo úspěšnou reakci a mohlo se tak dále pokračovat s diazotací vzniklého produktu (**24**) a následnou azokopulací s tyrosinem (Schéma 24). Reakční směs v DMSO byla nejprve zředěna vodným roztokem HCl a poté byl po kapkách přidán roztok dusitanu sodného v ultračisté vodě, přičemž reakční směs byla ochlazená na 0–5 °C. Po zhruba třech minutách pak bylo upraveno pH roztoku pomocí 1 M NaOH na hodnotu 9. Roztok se okamžitě zbarvil do tmavě červené barvy. Následná analýza potvrdila úspěšnou azokopulaci mezi tyrosinem a arylaminovou skupinou a tím pádem úspěšné uzavření cyklu za vzniku produktu (**26a**) (Schéma 24).

Úspěch této reakce byl pro tuto práci klíčový. Následně bylo nutné provést několik experimentů, aby se zjistilo, zda je reakce vhodná i pro různé peptidové sekvence.

5.4 Testování různých peptidů

Poté bylo na řadě otestovat selektivitu reakce neboli to, na jaké aminokyselinové sekvence je možné ji aplikovat. Bylo tedy nutné připravit několik modelových peptidů s různými kombinacemi aminokyselin a následně na nich cyklizační reakci vyzkoušet. Sekvence obsahovaly tři až pět aminokyselin. Seznam testovaných peptidů byl vložen do tabulky (Tabulka 1).

Označení výchozíh o peptidu	Peptidová sekvence	1. krok – Nukleofilní substituce	2. krok – Azokopula ce	Označení cyklického peptidu
23a	HOOC-Tyr-Gly-Lys-NH-COCH ₃	✓	✓	26a*
23b	HOOC-Tyr-Lys-NH-COCH ₃	✓	✓	26b
23c	H ₂ N-CO-Lys-Ala-Tyr-NH-COCH ₃	✓	✓	26c
23d	H ₂ N-CO-Tyr-Ala-Ala-Lys-NH-COCH ₃	✓	✓	26d
23e	HOOC-Tyr-Ala-Ala-Lys-NH-COCH ₃	✓	✓	26e
23f	H ₂ N-CO-Lys-Ala-Ala-Tyr-NH-COCH ₃	✓	✓	26f
23g	HOOC-Tyr-Ala-Ala-Ala-Lys-NH-COCH ₃	✓	✓	26g
23h	HOOC-Lys-Ala-Ala-Ala-Tyr-NH-COCH ₃	✓	✓	26h
23i	HOOC-Tyr-Val-Ala-Lys-NH-COCH ₃	✓	✓	26i
23j	HOOC-Tyr-Phe-Ala-Lys-NH-COCH ₃	✓	✓	26j
23k	HOOC-Tyr-Gly-Phe-Lys-NH-COCH ₃	✓	✓	26k
23l	HOOC-Tyr-Phe-Lys-NH-COCH ₃	✓	✓	26l
23m	HOOC-Tyr-Ala-βAla-NH ₂	✓	✓	26m
23n	HOOC-βAla-Tyr-Ala-Lys-NH-COCH ₃	✓	✓	26n
23o	HOOC-βAla-Tyr-Ile-NH ₂	✓	✗	-
23p	HOOC-Val-Tyr-Ala-Phe-NH ₂	✓○	✗	-
23q	HOOC-Tyr-Leu-Pro-NH	✓○	✗	-
23r	HOOC-Tyr-Ala-Cys-NH-COCH ₃	✗○	-	-
23s	HOOC-Tyr-Ala-Ser-NH-COCH ₃	✗	-	-
23t	HOOC-Tyr-Ala-Thr-NH-COCH ₃	✗	-	-

23u	HOOC-Tyr-Ala-His-NH-COCH ₃	X O	-	-
23v	HOOC-Phe-Ala-Arg-NH-COCH ₃	X	-	-

Tabulka 1: Seznam peptidových sekvencí testovaných pro cyklizační reakci.

* – Reakce byla provedena v analytickém množství. Její průběh byl sledován pomocí LC-MS. Konečný produkt nebyl izolován.

✓ – Reakce probíhá hladce

✓ O – Reakce probíhá podstatně pomaleji

X O – Reakce je velmi pomalá nebo poskytuje očekávaný produkt pouze ve stopovém množství.

X – Reakce neprobíhá vůbec nebo vzniká neidentifikovatelná směs produktů.

Na základě získaných výsledků lze říct, že nejvhodnější aminokyselinou pro nukleofilní substituci s aktivovaným esterem je lysin. V případě jiných aminokyselin, které by mohly rovněž podléhat reakci s aktivovaným esterem, jako je cystein, serin, threonin, histidin nebo arginin totiž reakce neprobíhá vůbec, nebo je jejím výsledkem jen malé množství požadovaného produktu. Tento jev je pravděpodobně způsoben tím, že postranní řetězce těchto aminokyselin nejsou dostatečně nukleofilní na to, aby reakce probíhala kvalitněji. V případě cysteinu, serinu a threoninu pak může být případný vzniklý odpovídající (thio)ester hydrolyzován vlivem kyselého a následně bazického reakčního prostředí.

Zajímavá je rovněž rozdílná reaktivita koncové aminoskupiny peptidů (**23m**) a (**23o**). Zatímco v prvním případě proběhla jak nukleofilní substituce s aktivovaným esterem (**7b**), tak i následná azokopulační reakce vedoucí k cílové sloučenině (**26m**), tak v případě peptidu (**23o**) probíhá jen první krok, tedy reakce s aktivovaným esterem (**7b**), ale azokopulační reakce už neprobíhá selektivně. Příčinou může být rozdílná vzdálenost reakčních center při druhém kroku cyklizační metody nebo je reaktivita závislá na konkrétních aminokyselinách nesoucích terminální aminoskupinu. Pro zodpovězení této otázky je do budoucna nutné připravit mnohem více peptidů s terminální aminoskupinou. Nicméně díky úspěšné cyklizaci peptidu (**23m**) je možné předpokládat, že navrhnutá metoda bude vhodná v některých případech i pro tvorbu cyklů mezi koncovou aminoskupinou peptidu a tyrosinem umístěným v jeho řetězci.

6 ZÁVĚR

Tato práce se zabývala možností využití aktivovaných esterů diazoniových solí odvozených od 3-aminobenzoové kyseliny pro cyklizaci peptidů obsahujících tyrosin a lysin ve své sekvenci. Metoda je založena na předpokladu, že ϵ -aminoskupina lysinu bude reagovat s esterovou skupinou za vzniku amidické vazby a fenolová část tyrosinu podlehně kopulaci s diazoniovou skupinou. Záměrem práce bylo ověřit tzv. *proof-of-concept* této metody, tj. navrhnout praktické provedení takovéto cyklizace a na několika modelových peptidech ověřit její schůdnost.

Nejdříve jsme se zaměřili na testování stability diazoniové soli kyseliny anthranilové, tak aby cyklizace mohla být prováděna za pokojové, či v budoucnu i za fyziologické teploty. Výsledky této studie potvrdily, že stabilita soli je pro další kroky výzkumu dostatečná. Na základě tohoto výsledku bylo možné předpokládat, že i diazoniové soli od jiných polohových izomerů aminobenzoové kyseliny budou dostatečně stálé. Pro další studium cyklizačních reakcí jsme vybrali kyselinu 3-aminobenzoovou. U této látky jsme se soustředili na přípravu vhodného intermediátu v podobně aktivovaného esteru, jež by mohl sloužit k navázání na volnou aminoskupinu lysinu. Několika experimenty jsme došli k závěru, že nejlepší kombinaci reakčních činidel pro syntézu tohoto esteru představuje diisopropylkarbodiimid (DIC) společně s *N*-hydroxysukcinimidem (NHS), jež zajistí nejefektivnější průběh reakce a nejvyšší výtěžek produktu.

V další části práce jsme se zaměřili na diazotaci připraveného aktivovaného esteru, a to pomocí jak klasické metody s využitím dusitanu sodného v kyselém prostředí, tak pomocí organických nitritů jako je amylnitrit nebo tert-butylnitrit. Žádná z těchto metod nevedla ke vzniku požadovaného produktu. Proto jsme se v další fázi zaměřili na cyklizaci peptidů prováděnou ve dvou krocích. První krok představoval reakci volné aminoskupiny na postranním řetězci lysinu s aktivovaným esterem 3-aminobenzoové kyseliny, druhý krok pak zahrnoval diazotaci arylaminové skupiny na vzniklém konjugátu a jeho následnou azokopulaci s fenolovou částí tyrosinu. Oba tyto kroky byly vyzkoušeny nejdříve samostatně na modelových substrátech.

Následující experimenty se pak soustředili na spojení obou kroků cyklizace, kdy nejdříve s aktivovaným esterem reagovala aminoskupina na postranním řetězci lysinu obsaženého v peptidové sekvenci a poté byla provedena diazotace aromatické aminoskupiny a následná azokopulace s tyrosinem. Pomocí tohoto postupu se nám podařilo dosáhnout úspěšného uzavření cyklu u čtrnácti různě dlouhých modelových peptidů složených z různých kombinací aminokyselin. Pozornost jsme rovněž věnovali i reaktivitě „konkurenčních“ aminokyselin, jako je cystein, serin, threonin, histidin a arginin, které by rovněž mohly podléhat reakci s aktivovaným esterem. Reakce s těmito aminokyselinami v peptidové sekvenci se ukázala být neúspěšná. Tento fakt je pravděpodobně způsoben tím, že postranní řetězce aminokyselin jako je cystein, threonin, serin, histidin nebo arginin nejsou dostatečně nukleofilní na to, aby reakce

probíhala kvalitněji či případnou hydrolyzou vzniklých esterů (serin, threonin) nebo thioesteru (cystein) v bazickém či kyselém prostředí. Na základě tohoto zjištění je možné předpokládat značnou selektivitu prvního kroku navržené metody pro postranní řetězec aminokyseliny lysin.

Menší pozornost byla věnována i možné cyklizaci mezi volnou terminální aminoskupinou peptidu a tyrosinem. Na čtyřech studovaných sekvencích se ukázalo, že tato cyklizace je možná, ale nebude probíhat vždy, a proto je tato otázka otevřená pro budoucí hlubší studium.

Druhý krok cyklizace je reakce diazotační a kopulační, která dobře probíhá v případě přítomnosti tyrosinu. Tyrosin jsme zkusili nahradit jinými aminokyselinami s aromatickým jádrem jako například fenylalaninem či histidinem. Opět se nám ale potvrdilo, že tyrosin je pro naši metodu ve srovnání s těmito aminokyselinami nejvhodnější. Do studie nebyly zařazeny peptidy obsahující ve své struktuře tryptofan, který by rovněž mohl podléhat kopulační reakci s diazoniovou solí. Důvodem byla obtížná příprava takovýchto peptidů. Proto tato otázka zůstává rovněž otevřená do budoucna.

Přínos této práce spočívá v navržení nové metody cyklizační reakce peptidů a její úspěšné praktické ověření na malé sérii modelových peptidových sloučenin. Díky úspěšnému ověření principu se podařilo otevřít nové možnosti pro výzkum zaměřený na optimalizaci dané metody a zejména definici rozsahu možnosti jejího použití s ohledem na vzdálenost reaktivních aminokyselin, primární strukturu peptidu, interferenci a selektivitu postranních řetězců aminokyselin apod.

7 POUŽITÁ LITERATURA

- (1) Martini, S.; Tagliazucchi, D. Bioactive Peptides in Human Health and Disease. *Int J Mol Sci* **2023**, 24 (6), 5837. <https://doi.org/10.3390/ijms24065837>.
- (2) V V Suresh Babu. One Hundred Years of Peptide Chemistry.
- (3) Vecchio, I.; Tornali, C.; Bragazzi, N. L.; Martini, M. The Discovery of Insulin: An Important Milestone in the History of Medicine. *Front Endocrinol (Lausanne)* **2018**, 9. <https://doi.org/10.3389/fendo.2018.00613>.
- (4) v. Euler, U. S.; Gaddum, J. H. An Unidentified Depressor Substance in Certain Tissue Extracts. *J Physiol* **1931**, 72 (1), 74–87. <https://doi.org/10.1113/jphysiol.1931.sp002763>.

- (5) Wieland, T.; Bodanszky, M. Syntheses of Peptides. The First Epoch. In *The World of Peptides*; Springer Berlin Heidelberg: Berlin, Heidelberg, 1991; pp 23–43. https://doi.org/10.1007/978-3-642-75850-8_2.
- (6) Merrifield, R. B. **Solid Phase Peptide Synthesis. I. The Synthesis of a Tetrapeptide.** *J Am Chem Soc* **1963**, 85 (14), 2149–2154. <https://doi.org/10.1021/ja00897a025>.
- (7) Breckenridge, A. Patient Opinions and Preferences in Drug Development and Regulatory Decision Making. *Drug Discov Today Technol* **2011**, 8 (1), e11–e14. <https://doi.org/10.1016/j.ddtec.2011.03.002>.
- (8) Tian, J.; Li, Y.; Ma, B.; Tan, Z.; Shang, S. Automated Peptide Synthesizers and Glycoprotein Synthesis. *Front Chem* **2022**, 10. <https://doi.org/10.3389/fchem.2022.896098>.
- (9) Liu, L.; Yang, L.; Cao, S.; Gao, Z.; Yang, B.; Zhang, G.; Zhu, R.; Wu, D. CyclicPepedia: A Knowledge Base of Natural and Synthetic Cyclic Peptides. *Brief Bioinform* **2024**, 25 (3). <https://doi.org/10.1093/bib/bbae190>.
- (10) Lemrová, B.; Fulopová, V. *Praktické Aspekty Syntézy Na Pevné Fázi*, 1st ed.; Univerzita Palackého: Olomouc, 2015.
- (11) Soural, M.; Hlaváč, J.; Krchňák, V. Linkry pro Syntézu Peptidů Na Pevné Fázi. *book chapter in Amino Acids, Peptides and Proteins in Organic Chemistry Vol.3-Building Blocks, Catalysis and Coupling Chemistry* **2010**.
- (12) Fields, G. B. Introduction to Peptide Synthesis. *Curr Protoc Protein Sci* **2001**, 26 (1). <https://doi.org/10.1002/0471140864.ps1801s26>.
- (13) Pires, D. A. T.; Bemquerer, M. P.; do Nascimento, C. J. Some Mechanistic Aspects on Fmoc Solid Phase Peptide Synthesis. *Int J Pept Res Ther* **2014**, 20 (1), 53–69. <https://doi.org/10.1007/s10989-013-9366-8>.
- (14) Fang, P.; Pang, W.-K.; Xuan, S.; Chan, W.-L.; Leung, K. C.-F. Recent Advances in Peptide Macrocyclization Strategies. *Chem Soc Rev* **2024**, 53 (24), 11725–11771. <https://doi.org/10.1039/D3CS01066J>.

- (15) Zhang, L.; Tam, J. P. Synthesis and Application of Unprotected Cyclic Peptides as Building Blocks for Peptide Dendrimers. *J Am Chem Soc* **1997**, *119* (10), 2363–2370. <https://doi.org/10.1021/ja9621105>.
- (16) He, J.; Ghosh, P.; Nitsche, C. Biocompatible Strategies for Peptide Macrocyclisation. *Chem Sci* **2024**, *15* (7), 2300–2322. <https://doi.org/10.1039/D3SC05738K>.
- (17) Zheng, Y.; Zhai, L.; Zhao, Y.; Wu, C. Orthogonal Cysteine–Penicillamine Disulfide Pairing for Directing the Oxidative Folding of Peptides. *J Am Chem Soc* **2015**, *137* (48), 15094–15097. <https://doi.org/10.1021/jacs.5b10779>.
- (18) Kolb, H. C.; Finn, M. G.; Sharpless, K. B. Click Chemistry: Diverse Chemical Function from a Few Good Reactions. *Angewandte Chemie International Edition* **2001**, *40* (11), 2004–2021. [https://doi.org/10.1002/1521-3773\(20010601\)40:11<2004::AID-ANIE2004>3.0.CO;2-5](https://doi.org/10.1002/1521-3773(20010601)40:11<2004::AID-ANIE2004>3.0.CO;2-5).
- (19) Tornøe, C. W.; Christensen, C.; Meldal, M. Peptidotriazoles on Solid Phase: [1,2,3]-Triazoles by Regiospecific Copper(I)-Catalyzed 1,3-Dipolar Cycloadditions of Terminal Alkynes to Azides. *J Org Chem* **2002**, *67* (9), 3057–3064. <https://doi.org/10.1021/jo011148j>.
- (20) Rivera, D. G.; Ojeda-Carralero, G. M.; Reguera, L.; Van der Eycken, E. V. Peptide Macrocyclization by Transition Metal Catalysis. *Chem Soc Rev* **2020**, *49* (7), 2039–2059. <https://doi.org/10.1039/C9CS00366E>.
- (21) Agard, N. J. and P. J. A. and B. C. R. A Strain-Promoted [3+ 2] Azide- Alkyne Cycloaddition for Covalent Modification of Biomolecules in Living Systems. *Journal of the American Chemical Society* **2004**, *126*.
- (22) Schafmeister, C. E.; Po, J.; Verdine, G. L. An All-Hydrocarbon Cross-Linking System for Enhancing the Helicity and Metabolic Stability of Peptides. *J Am Chem Soc* **2000**, *122* (24), 5891–5892. <https://doi.org/10.1021/ja000563a>.
- (23) Christianson, D. W.; Blank, P. N. Structural Biology of Template-Directed Catalysis by Terpene Synthases. In *Comprehensive Natural Products III*; Elsevier, 2020; pp 613–643. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-409547-2.14563-9>.

- (24) Gleeson, E. C.; Jackson, W. R.; Robinson, A. J. Ring-Closing Metathesis in Peptides. *Tetrahedron Lett* **2016**, 57 (39), 4325–4333. <https://doi.org/10.1016/j.tetlet.2016.08.032>.
- (25) Verdine, G. L.; Hilinski, G. J. Stapled Peptides for Intracellular Drug Targets; 2012; pp 3–33. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-396962-0.00001-X>.
- (26) Walensky, L. D.; Bird, G. H. Hydrocarbon-Stapled Peptides: Principles, Practice, and Progress. *J Med Chem* **2014**, 57 (15), 6275–6288. <https://doi.org/10.1021/jm4011675>.
- (27) Domaille, D. W.; Cha, J. N. Aniline-Terminated DNA Catalyzes Rapid DNA–Hydrazone Formation at Physiological PH. *Chem. Commun.* **2014**, 50 (29), 3831–3833. <https://doi.org/10.1039/C4CC00292J>.
- (28) Cappoen, D.; Vajs, J.; Uythethofken, C.; Virag, A.; Mathys, V.; Kočever, M.; Verschaeve, L.; Gazvoda, M.; Polanc, S.; Huygen, K.; Košmrlj, J. Anti-Mycobacterial Activity of 1,3-Diaryltriazenes. *Eur J Med Chem* **2014**, 77, 193–203. <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2014.02.065>.
- (29) Gutte, B. Robert Bruce Merrifield (1921–2006). *Angewandte Chemie International Edition* **2006**, 45 (33), 5412–5413. <https://doi.org/10.1002/anie.200602806>.

8 SEZNAM OBRÁZKŮ

Obrázek 1: Struktura inzulinu (vlevo), struktura glukagonu (vpravo).....	9
Obrázek 2: Robert Bruce Merrifield. ²⁹	10
Obrázek 3: Chemická struktura polymeru.....	12
Obrázek 4: Příklad Wangova (vlevo) a Rinkova (vpravo) linkeru navázaného na pryskyřici. 13	
Obrázek 5: Wangova pryskyřice. ¹¹	13
Obrázek 6: Protektivní skupina Fmoc.	15
Obrázek 7: Paralelní syntéza většího počtu peptidů v polypropylenových stříkačkách.	16
Obrázek 8: Znázornění jednotlivých typů cyklizace peptidů.	18

Obrázek 9: Kalata B1. ¹⁶	Chyba! Záložka není definována.
Obrázek 10: UV-VIS spektra diazoniové soli kyseliny anthranilové a kyseliny salicylové. ...	26
Obrázek 11: Přítomnost diazoniové soli ve vzorku v čase t=0 min a t=135 min.	27
Obrázek 12: LC-MS analýza ($m/z = 257 [M+H]^+$) látky 17 vzniklé azokopulací 3-karboxybezendiazoniumchloridu s p-kresolem.	33

9 SEZNAM SCHÉMAT

Schéma 1: Cyklizace peptidů pomocí diazoniové soli aktivovaného esteru aminobenzoové kyseliny.....	8
Schéma 2: Štěpení produktu z Wangovy pryskyřice.	13
Schéma 3: Syntéza peptidu na pryskyřici s Wangovým linkerem.....	14
Schéma 4: Štěpení Fmoc skupiny piperidinem.....	15
Schéma 5: Cyklizace peptidu NCL. ¹⁴	18
Schéma 6: Způsoby uzavření cyklu laktamizací. ¹⁶	19
Schéma 7: Oxidace thiolů za tvorby disulfidové vazby.	20
Schéma 8: Tvorba thioetherové vazby nukleofilní substitucí. ¹⁴	21
Schéma 9: Tvorba lanthipeptidového můstku. ¹⁶	21
Schéma 10: Mědí katalyzovaná azyd-alkynová cykloadice. ¹⁶	22
Schéma 11: Azido-alkynová cykloadice podporovaná pnutím cyklooktynového kruhu.	23
Schéma 12: RCM cyklizace.....	23
Schéma 13: Příklad cyklizace peptidu využívající nepřírodní aminokyseliny (diiodoacetyltyrosin a indolové jádro tryptofanu). ¹⁴	24
Schéma 14: Příklad diazotační reakce provedené u anilinu.	25
Schéma 15: Příprava diazoniové soli kyseliny anthranilové a její rozklad na kyselinu salicylovou.	26

Schéma 16: Aktivace karboxylových kyselin karbodiimidy (EDC nebo DIC) a jejich následná reakce s HOBt nebo NHS.	29
Schéma 17: Diazotace aktivovaného esteru kyseliny 3-aminobenzoové.	30
Schéma 18: Tvorba 1,3-diaryltriazenu v přítomnosti organických dusitanů.	31
Schéma 19: Návrh dvoustupňového procesu cyklizace peptidu.	31
Schéma 20: Modelová diazotace a následná azokopulace kyseliny 3-aminobenzoové s p-kresolem.	32
Schéma 21: Diazotace 3-aminobenzoové kyseliny a následná azokopulace s tyrosinem.	33
Schéma 22: Azokopulace 3-aminobenzoové kyseliny (4) s tripeptidem HOOC-Ala-Tyr-Gly-NH-COCH ₃ (21).	34
Schéma 23: Nukleofilní substituce tripeptidu HOOC-Tyr-Gly-Lys-NH-COCH ₃ (23a) s aktivovaným esterem (7b).	35
Schéma 24: Návrh dvoustupňové reakce pro cyklizaci modelového peptidu HOOC-Tyr-Gly-Lys-NH-COCH ₃ (23a).	35

10 SEZNAM TABULEK

Tabulka 1: Seznam peptidových sekvencí testovaných pro cyklizační reakci.	37
--	----

11 SEZNAM GRAFŮ

Graf 1: Rozklad diazoniové soli kyseliny anthranilové v čase na kyselinu salicylovou.	28
--	----

12 PŘÍLOHA

12.1 Experimentální část

Chemikálie a rozpouštědla byly získány z dostupných komerčních zdrojů a byly použity bez předčištění. Jednotlivé peptidové sekvence byly syntetizovány na polystyrenové pryskyřici

Wang (500 mg; 0.9 mmol/g, AAPPTec, Louisville, KY, USA) nebo na pryskyřici Rink Amide AM (500 mg; 0.6 mmol/g, AAPPTec, Louisville, KY, USA) v plastových stříkačkách o objemu 10 ml (B. Braun Melsungen AG, Melsungen, Germany) opatřených plastovými sintrovanými filtry (Torviq, Tucson, AZ, USA). Syntéza v pevné fázi probíhala na třepače mikrotitračních destiček (VWR, Vienna, Austria). Po každém kroku acylační reakce bylo analytické množství pryskyřice podrobena štěpení pomocí 50% TFA v DCM. Po odpaření těkavých látek pod proudem dusíku byl suchý nebo lepkavý zbytek zředěn 50% acetonitrem v H₂O, přefiltrován přes stříkačkový filtr (0.22 µm, J.T. Baker, Avantor, Pennsylvania, USA), a zanalyzován pomocí UHPLC chromatografu (Acquity) s detektorem s fotodiodovým polem a jednoduchým kvadrupólovým hmotnostním spektrometrem (Waters, Borehamwood, U.K.). Analýzy byly prováděny na koloně (Waters, Borehamwood, U.K.) s reverzní fází C-18 XSelect HSS T3 2.5 µm XP (50 × 3.0 mm). Jako mobilní fáze byl použit roztok octanu amonného (10 mM) nebo kyseliny mravenčí (0.1% V/V) v ultračisté vodě s acetonitrem (eluční gradient: 5–20% MeCN během 4.0 min, 5–60% MeCN během 4.0 min, 20–80% MeCN během 4.5 min, nebo 50–80% MeCN během 3.0 min).

Peptidové sekvence a konečné cyklické sloučeniny byly přečištěny na semipreparativním systému HPLC (2707 autosampler, 1525 binary HPLC pump, 2489 UV-VIS detector, III Fraction collector, Waters, Borehamwood, U.K.) vybaveným chromatografickou kolonou (YMC-Actus Pro C18, 100 mm × 20 mm I.D. S-5 µm, 12 nm, Dinslaken, Germany), za použití 0.1% TFA v ultračisté vodě (V/V) s acetonitrem jako mobilní fáze. Spojené frakce byly zkoncentrovány *in vacuo* (Buchi R-210 Rotavapor, Marshall Scientific, Flawil, Switzerland), následně zmrazeny v suchém ledu a lyofilizovány (Scanvac Coolsafe Freeze-Dryer, LaboGene, Lillerød, Denmark) po dobu 48–72 hodin. Získané suché cílové sloučeniny byly skladovány při teplotě –80 °C v mrazícím boxu (Arctiko, Esbjerg Kommune, Denmark) v plastových centrifugačních zkumavkách (VWR, Vienna, Austria). Syntetizovaný aktivovaný ester kyseliny 3-aminobenzoové byl přečištěn na silika gelu (60 Å, 230–400 mesh, Sigma-Aldrich, Milwaukee, WI, USA), zatímco výsledné spojené frakce byly do sucha odpařeny (Buchi R-210 Rotavapor, Marshall Scientific, Flawil, Switzerland) a uloženy při –20 °C.

Konečné sloučeniny byly charakterizovány pomocí HRMS (Thermo Exactive plus, Thermo Fischer Scientific, MA, USA) v režimu ESI+ (120,000 FWHM) a ¹H NMR (400MHz, ECA400II JEOL, Tokyo, Japan). Chemické posuny (δ) jsou uvedeny v ppm, zatímco interakční konstanty (J) jsou uvedeny v Hz. Spektra byla kalibrována na signál zbytkového nedeuterovaného rozpouštědla (DMSO-*d*₆; 2.50 ppm in ¹H NMR). Signály ¹H NMR byly označeny takto: s – singlet, bs – ‚broad‘ singlet, d – dublet, dd – dublet dubletu, ddd – dublet dubletu doubletu, t – triplet, m – multiplet.

Spektrofotometrická měření byla prováděna na UV-VIS spektrofotometru (Cary 300 UV-VIS, Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA) ve skleněných kyvetách (10×10 mm, Hellma

Analytics, Müllheim, Germany), zatímco vzorky byly inkubovány v inkubátoru (Heratherm, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA).

12.2 Obecné reakční postupy

12.2.1 Imobilizace první aminokyseliny k pevné fázi

Do plastové stříkačky o objemu 10 ml vybavené plastovým sintrovaným filtrem bylo naváženo 500 mg polystyrenové pryskyřice Rink nebo Wang, která byla následně promyta DCM (3× 5 ml). Poté byl do pryskyřice přidán roztok příslušné N-Fmoc chráněné aminokyseliny (1 mmol), HOBt (1 mmol), DIC (1 mmol) a DMAP (0,25 mmol) v DCM (2,5 ml) a DMF (2,5 ml) a reakce probíhala při laboratorní teplotě po dobu 2–16 hodin. Poté byla pryskyřice promyta DMF (5–10×) a DCM (5–10×).

12.2.2 Odstranění Fmoc a prodloužení peptidové sekvence

Po navázání první aminokyseliny byla pryskyřice podrobena reakci s 50% piperidinem v DMF (V/V) po dobu 20–30 min. Poté byla promyta DMF (5–10×) a DCM (5–10×). Takto získaná pryskyřicí imobilizovaná aminokyselina s volným N-koncem byla poté acylována vhodným Fmoc-AA-OH (1 mmol), HOBt (1 mmol) a DIC (1 mmol) v DCM (2,5 ml) a DMF (2,5 ml) po dobu 1–2 hodin, a nakonec promyta DMF (5–10×) a DCM (5–10×).

12.2.3 Acetylace volného N-konce peptidové sekvence

K peptidové sekvenci vázané na pryskyřici s volným N-koncem byl přidán acetanhydrid (94 μ l; 1 mmol) a pyridin (161 μ l; 2 mmol) nebo DMAP (244 mg; 2 mmol) v suchém DCM (5 ml) a reakční směs byla protřepávána při laboratorní teplotě po dobu 1–2 hodin. Poté byla pryskyřice promyta DCM (5–10×).

12.2.4 Odštěpení cílové peptidové sekvence z pryskyřice a její purifikace

Konečná peptidová sekvence byla odštěpena z pryskyřice pomocí 50% TFA v DCM (V/V) (2× 5 ml; 15–45 min). Rozpouštědla byla odpařena pod proudem dusíku. Bezbarvý až žlutý suchý nebo lepkavý zbytek byl zředěn THF nebo MeOH na objem 3–5 ml, přefiltrován přes stříkačkový filtr a přečištěn na semipreparativní HPLC. Jako mobilní fáze byla použita 0,1% TFA v ultračisté vodě (V/V) a acetonitril. Vlnové délky UV absorpce a eluční gradienty byly nastaveny na základě pozorovaných UV profilů a retenčních časů na analytické LC-MS.

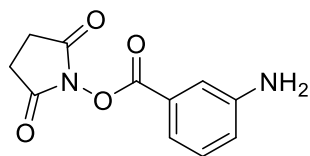
12.2.5 Syntéza aktivovaného esteru kyseliny 3-aminobenzoové

2,5-dioxopyrrolidin-1-yl 3-aminobenzoát byl připraven mírně modifikovaným syntetickým postupem.²⁷ Do baňky o objemu 250 ml byla přidána kyselina 3-aminobenzoová (1,646 g; 12 mmol), *N*-hydroxysukcinimid (2,072 g; 18 mmol) a DMAP (1,955 g; 16 mmol) v suchém DCM (100 ml). Poté byl během 1 min přidán DIC (2,192 ml; 14 mmol). Získaná reakční směs byla intenzivně míchána při laboratorní teplotě po dobu 2,5 hodiny. Poté byl obsah reakční nádoby zkoncentrován na rotační vakuové odparce a podroben čištění sloupcovou chromatografií na silikagelu s DCM jako mobilní fází. Proces čištění byl sledován tenkovrstvou chromatografií (UV; $\lambda = 254$ nm). Spojené frakce byly odpařeny na rotační odparce do sucha, čímž byl získán produkt ve formě bílé krystalické látky ve výtěžku 58 %.

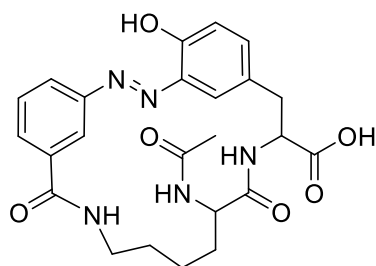
12.2.6 Obecný postup reakce peptidové sekvence s aktivovaným esterem, diazotace a azokopulace

Do 5 ml šroubovací V-lahvičky byla v DMSO (3 ml) rozpuštěna vhodná peptidová sekvence (0,1 mmol) a 2,5-dioxopyrrolidin-1-yl 3-aminobenzoát (41 mg; 0,175 mmol). Poté byl za intenzivního míchání přidán triethylamin (0,35-0,45 mmol). Získaná reakční směs byla míchána při 50 °C po dobu 1–6 hodin. Průběh reakce byl sledován pomocí LC-MS. Poté byla reakční směs přemístěna do 25 ml Erlenmeyerovy baňky, ponořena do ledové lázně, zředěna HCl:H₂O 1:3 (V/V) (4 ml) a ochlazená na 0–5 °C. Poté byl NaNO₂ (18 mg; 0,26 mmol) rozpuštěn v 0,5 ml vody, ochlazen na 0–5 °C a přidán po kapkách do reakční směsi za míchání po dobu 1 min. Po přibližně 5 min míchání na ledové lázni byl do reakční směsi po kapkách přidán vodný roztok NaOH (1 M) po dobu přibližně 3 min, aby se pH nastavilo na hodnotu 9. Změny pH byly sledovány pomocí pH papírků. Během tohoto procesu byly ve všech případech zjištěny barevné změny reakční směsi od mírně žluté po tmavě červenou. Poté, co byla tvorba cyklického peptidu potvrzena pomocí LC-MS, byla reakční směs zředěna kyselým vodným roztokem a následně extrahována EtOAc (3–10×). Organické frakce byly poté spojeny, vysušeny bezvodým MgSO₄, zfiltrvány a zkoncentrovány na rotační vakuové odparce za vzniku žlutého až oranžového viskózního oleje. Takto získaný surový produkt byl zředěn THF nebo MeOH na objem 3–5 ml, zfiltrván a přečištěn na semipreparativní HPLC. Jako mobilní fáze byla použita 0,1% TFA v ultračisté vodě (V/V) v acetonitrilu. Vlnové délky UV absorpce a eluční gradienty byly nastaveny na základě pozorovaných UV profilů a retenčních časů na analytické LC-MS.

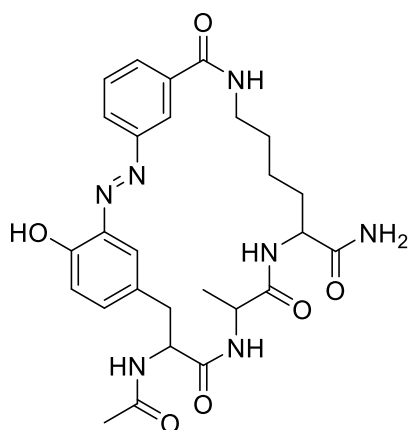
12.3 Sloučeniny



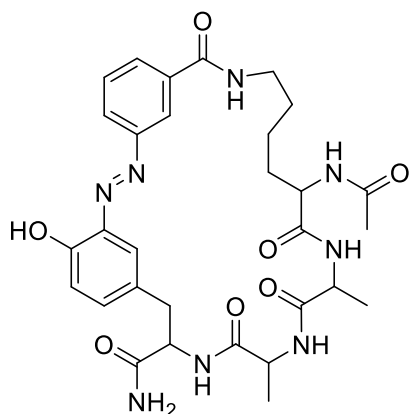
2,5-Dioxopyrrolidin-1-yl 3-aminobenzoate (7b); ^1H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ 7.29 – 7.23 (m, 2H), 7.18 (ddd, J = 7.6, 1.6, 1.2 Hz, 1H), 6.95 (ddd, J = 8.0, 2.4, 1.1 Hz, 1H), 5.60 (s, 2H), 2.87 (s, 4H); **HRMS** (ESI⁺): m/z calcd for C₁₁H₁₁N₂O₄ ([M+H]⁺) 235.0713; found 235.0715.



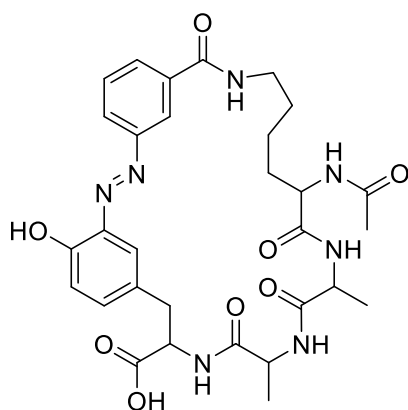
11-Acetamido-1⁶-hydroxy-5,12-dioxo-2,3,6,13-tetraaza-1,4(1,3)-dibenzenacyclopentadecaphan-2-ene-14-carboxylic acid (26b); ^1H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ 12.89 (bs, 1H), 11.50 (s, 1H), 8.30 (t, J = 5.2 Hz, 1H), 8.23 (d, J = 7.9 Hz, 1H), 8.13 – 8.07 (m, 1H), 7.98 (d, J = 8.6 Hz, 1H), 7.93 (d, J = 7.7 Hz, 1H), 7.86 – 7.76 (m, 2H), 7.69 (t, J = 7.7 Hz, 1H), 7.31 (dd, J = 8.4, 2.1 Hz, 1H), 6.99 (d, J = 8.4 Hz, 1H), 4.48 – 4.40 (m, 1H), 4.31 – 4.25 (m, 1H), 3.37 – 3.17 (m, 4H), 2.14 – 2.04 (m, 1H), 1.90 (s, 3H), 1.85 – 1.80 (m, 1H), 1.68 – 1.57 (m, 2H), 1.54 – 1.44 (m, 2H); **HRMS** (ESI⁺): m/z calcd for C₂₄H₂₈N₅O₆ ([M+H]⁺) 482.2034; found 482.2032.



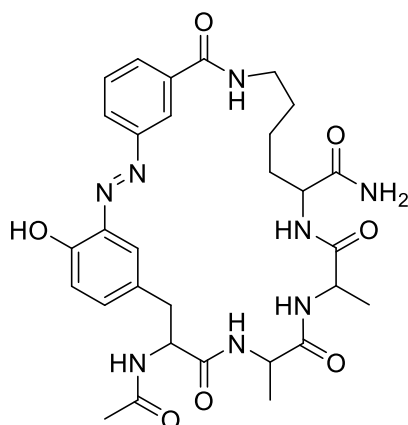
17-Acetamido-1⁶-hydroxy-14-methyl-5,13,16-trioxo-2,3,6,12,15-pentaaza-1,4(1,3)-dibenzenacyclooctadecaphan-2-ene-11-carboxamide (26c); ¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ 11.35 (s, 1H), 8.70 (t, *J* = 5.6 Hz, 1H), 8.24 – 8.16 (m, 3H), 8.10 (d, *J* = 7.8 Hz, 1H), 7.93 – 7.86 (m, 1H), 7.67 (t, *J* = 7.8 Hz, 1H), 7.42 (dd, *J* = 6.9, 4.9 Hz, 2H), 7.26 (s, 1H), 7.07 (dd, *J* = 8.4, 2.2 Hz, 1H), 6.97 (d, *J* = 8.4 Hz, 1H), 6.90 (s, 1H), 4.83 – 4.71 (m, 1H), 4.46 – 4.38 (m, 1H), 4.24 – 4.15 (m, 1H), 3.55 – 3.44 (m, 1H), 3.18 – 3.05 (m, 2H), 2.94 – 2.86 (m, 1H), 1.87 (s, 3H), 1.72 – 1.56 (m, 4H), 1.55 – 1.46 (m, 1H), 1.45 – 1.34 (m, 1H), 1.24 (d, *J* = 6.8 Hz, 3H); HRMS (ESI⁺): *m/z* calcd for C₂₇H₃₄N₇O₆ ([M+H]⁺) 552.2565; found 552.2575.



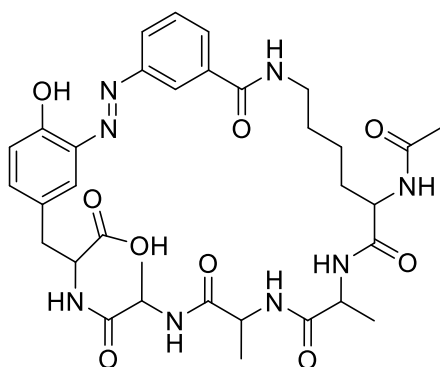
11-Aacetamido-1⁶-hydroxy-14,17-dimethyl-5,12,15,18-tetraoxo-2,3,6,13,16,19-hexaaza-1,4(1,3)-dibenzenacyclohenicosaphan-2-ene-20-carboxamide (26d); ¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ 11.05 (s, 1H), 8.58 (t, *J* = 5.5 Hz, 1H), 8.27 – 8.22 (m, 1H), 8.13 – 8.09 (m, 1H), 8.03 (d, *J* = 7.2 Hz, 1H), 7.95 – 7.85 (m, 3H), 7.83 (d, *J* = 6.5 Hz, 1H), 7.67 – 7.62 (m, 2H), 7.44 (s, 1H), 7.33 (dd, *J* = 8.5, 2.1 Hz, 1H), 7.15 (s, 1H), 6.98 (d, *J* = 8.4 Hz, 1H), 4.46 – 4.37 (m, 2H), 4.22 – 4.10 (m, 2H), 3.36 – 3.13 (m, 2H), 2.97 (dd, *J* = 13.7, 3.1 Hz, 1H), 2.88 – 2.79 (m, 1H), 1.82 (s, 3H), 1.63 – 1.49 (m, 4H), 1.46 – 1.32 (m, 2H), 1.16 (d, *J* = 6.9 Hz, 3H), 0.81 (d, *J* = 7.0 Hz, 3H); **HRMS** (ESI⁺): *m/z* calcd for C₃₀H₃₉N₈O₇ ([M+H]⁺) 623.2936; found 623.2931.



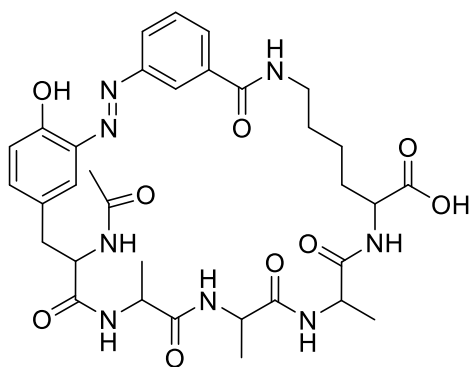
11-Acetamido-1⁶-hydroxy-14,17-dimethyl-5,12,15,18-tetraoxo-2,3,6,13,16,19-hexaaza-1,4(1,3)-dibenzenacyclohenicosaphan-2-ene-20-carboxylic acid (26e); ¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ 12.83 (bs, 1H), 11.04 (s, 1H), 8.59 (t, *J* = 5.4 Hz, 1H), 8.26 – 8.22 (m, 1H), 8.14 – 8.07 (m, 2H), 8.02 (d, *J* = 7.2 Hz, 1H), 7.94 – 7.91 (m, 1H), 7.87 (d, *J* = 7.9 Hz, 1H), 7.82 (d, *J* = 6.4 Hz, 1H), 7.68 – 7.62 (m, 2H), 7.30 (dd, *J* = 8.5, 2.2 Hz, 1H), 6.97 (d, *J* = 4.6 Hz, 1H), 4.51 – 4.38 (m, 2H), 4.21 – 4.11 (m, 2H), 3.30 – 3.17 (m, 2H), 3.04 (dd, *J* = 13.8, 3.3 Hz, 1H), 2.94 – 2.86 (m, 1H), 1.82 (s, 3H), 1.64 – 1.51 (m, 4H), 1.45 – 1.32 (m, 2H), 1.18 (d, *J* = 7.0 Hz, 3H), 0.79 (d, *J* = 7.0 Hz, 3H); **HRMS** (ESI⁺): *m/z* calcd for C₃₀H₃₈N₇O₈ ([M+H]⁺) 624.2776; found 624.2780.



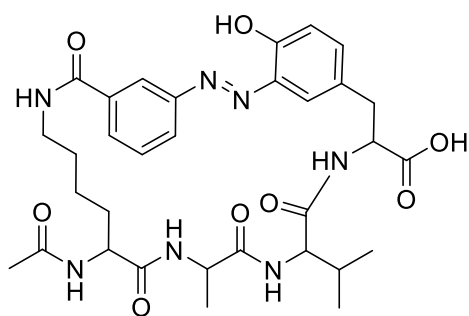
20-Acetamido-1⁶-hydroxy-14,17-dimethyl-5,13,16,19-tetraoxo-2,3,6,12,15,18-hexaaza-1,4(1,3)-dibenzenacyclohenicosaphan-2-ene-11-carboxamide (26f); ¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ 10.97 (s, 1H), 8.66 (t, *J* = 5.6 Hz, 1H), 8.46 – 8.40 (m, 1H), 8.18 – 8.13 (m, 1H), 8.08 (d, *J* = 7.5 Hz, 1H), 8.00 – 7.95 (m, 1H), 7.94 – 7.86 (m, 2H), 7.72 – 7.64 (m, 2H), 7.59 (d, *J* = 2.1 Hz, 1H), 7.25 – 7.21 (m, 1H), 7.19 (dd, *J* = 8.5, 2.2 Hz, 1H), 6.98 – 6.91 (m, 2H), 4.53 – 4.45 (m, 1H), 4.36 – 4.28 (m, 2H), 4.13 – 4.07 (m, 1H), 3.46 – 3.38 (m, 1H), 3.31 – 3.24 (m, 1H), 3.00 – 2.87 (m, 2H), 1.87 (s, 3H), 1.74 – 1.63 (m, 2H), 1.61 – 1.50 (m, 2H), 1.40 – 1.27 (m, 2H), 1.20 (d, *J* = 6.4 Hz, 3H), 1.09 (d, *J* = 7.1 Hz, 3H); **HRMS** (ESI⁺): *m/z* calcd for C₃₀H₃₉N₈O₇ ([M+H]⁺) 623.2936; found 623.2921.



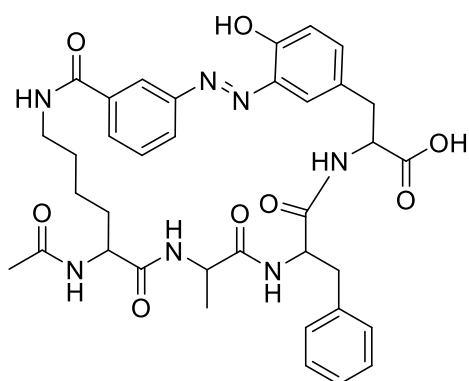
11-Acetamido-1⁶-hydroxy-14,17,20-trimethyl-5,12,15,18,21-pentaoxo-2,3,6,13,16,19,22-heptaaza-1,4(1,3)-dibenzenacyclotetracosaphan-2-ene-23-carboxylic acid (26g); ¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ 12.74 (bs, 1H), 10.97 (s, 1H), 8.54 (t, *J* = 5.4 Hz, 1H), 8.37 – 8.32 (m, 1H), 8.25 (d, *J* = 8.0 Hz, 1H), 8.15 – 8.07 (m, 2H), 7.99 – 7.93 (m, 2H), 7.71 – 7.63 (m, 4H), 7.29 (dd, *J* = 8.5, 2.2 Hz, 1H), 6.99 (d, *J* = 8.4 Hz, 1H), 4.41 – 4.28 (m, 2H), 4.24 – 4.12 (m, 3H), 3.33 – 3.29 (m, 2H), 3.10 – 3.03 (m, 1H), 2.96 – 2.88 (m, 1H), 1.83 (s, 3H), 1.69 – 1.53 (m, 4H), 1.38 – 1.30 (m, 2H), 1.18 – 1.11 (m, 6H), 1.01 (d, *J* = 7.0 Hz, 3H); **HRMS** (ESI⁺): *m/z* calcd for C₃₃H₄₃N₈O₉ ([M+H]⁺) 695.3148; found 695.3151.



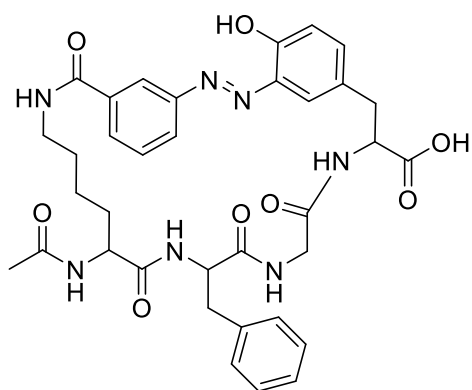
23-Acetamido-1⁶-hydroxy-14,17,20-trimethyl-5,13,16,19,22-pentaoxo-2,3,6,12,15,18,21-heptaaza-1,4(1,3)-dibenzenacyclotetracosaphan-2-ene-11-carboxylic acid (26h); ¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ 12.51 (bs, 1H), 10.55 (s, 1H), 8.81 (t, *J* = 5.7 Hz, 1H), 8.61 – 8.55 (m, 1H), 8.37 – 8.33 (m, 1H), 8.29 (d, *J* = 7.4 Hz, 1H), 8.18 – 8.11 (m, 2H), 8.03 – 8.00 (m, 1H), 7.93 (d, *J* = 6.7 Hz, 1H), 7.69 (d, *J* = 2.1 Hz, 1H), 7.66 – 7.62 (m, 1H), 7.45 (d, *J* = 7.6 Hz, 1H), 7.31 (dd, *J* = 8.5, 2.2 Hz, 1H), 6.98 – 6.95 (m, 1H), 4.50 – 4.44 (m, 1H), 4.42 – 4.35 (m, 1H), 4.34 – 4.29 (m, 1H), 4.15 – 4.09 (m, 2H), 3.56 – 3.49 (m, 1H), 3.17 – 3.08 (m, 1H), 2.94 (dd, *J* = 13.8, 3.5 Hz, 1H), 2.75 – 2.68 (m, 1H), 1.80 (s, 3H), 1.77 – 1.71 (m, 1H), 1.71 – 1.58 (m, 2H), 1.54 – 1.40 (m, 3H), 1.34 (d, *J* = 7.2 Hz, 3H), 1.21 (d, *J* = 6.9 Hz, 3H), 1.15 (d, *J* = 7.2 Hz, 3H); **HRMS** (ESI⁺): *m/z* calcd for C₃₃H₄₃N₈O₉ ([M+H]⁺) 695.3148; found 695.3154.



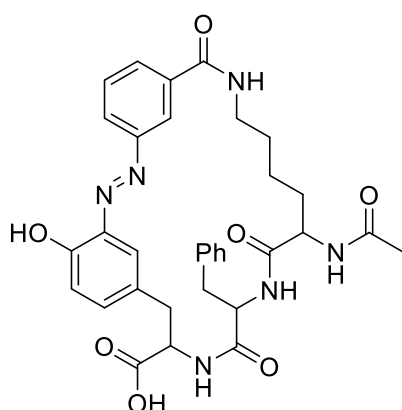
11-Acetamido-1⁶-hydroxy-17-isopropyl-14-methyl-5,12,15,18-tetraoxo-2,3,6,13,16,19-hexaaza-1,4(1,3)-dibenzenacyclohenicosaphan-2-ene-20-carboxylic acid (26i); ¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ 12.79 (bs, 1H), 11.12 (s, 1H), 8.74 – 8.67 (m, 1H), 8.38 (d, *J* = 8.8 Hz, 1H), 8.29 – 8.27 (m, 1H), 8.10 – 8.07 (m, 1H), 7.99 – 7.96 (m, 1H), 7.94 – 7.89 (m, 2H), 7.78 – 7.74 (m, 2H), 7.65 (t, *J* = 7.8 Hz, 1H), 7.32 (dd, *J* = 8.5, 2.2 Hz, 1H), 6.96 (d, *J* = 8.4 Hz, 1H), 4.45 – 4.37 (m, 2H), 4.20 – 4.12 (m, 2H), 3.72 – 3.66 (m, 1H), 3.09 (dd, *J* = 13.7, 2.9 Hz, 1H), 3.03 – 2.95 (m, 1H), 2.87 – 2.77 (m, 1H), 1.98 – 1.90 (m, 1H), 1.77 (s, 3H), 1.55 – 1.45 (m, 4H), 1.41 – 1.29 (m, 2H), 0.89 (d, *J* = 6.7 Hz, 3H), 0.82 (d, *J* = 6.8 Hz, 3H), 0.63 (d, *J* = 7.0 Hz, 3H); **HRMS** (ESI⁺): *m/z* calcd for C₃₂H₄₂N₇O₈ ([M+H]⁺) 652.3089; found 652.3092.



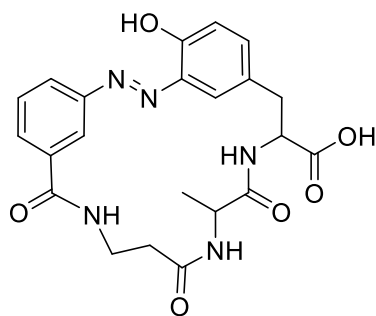
11-Acetamido-17-benzyl-1⁶-hydroxy-14-methyl-5,12,15,18-tetraoxo-2,3,6,13,16,19-hexaaza-1,4(1,3)-dibenzenacyclohenicosaphan-2-ene-20-carboxylic acid (26j); ¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ 12.90 (bs, 1H), 11.02 (s, 1H), 8.58 (t, *J* = 5.5 Hz, 1H), 8.29 (d, *J* = 8.7 Hz, 1H), 8.26 – 8.22 (m, 1H), 8.12 – 8.07 (m, 1H), 8.01 (d, *J* = 7.4 Hz, 1H), 7.95 – 7.90 (m, 1H), 7.87 – 7.80 (m, 2H), 7.73 (d, *J* = 2.2 Hz, 1H), 7.66 – 7.60 (m, 1H), 7.31 (dd, *J* = 8.5, 2.2 Hz, 1H), 7.25 – 7.21 (m, 2H), 7.18 – 7.11 (m, 3H), 6.97 (d, *J* = 8.4 Hz, 1H), 4.72 – 4.61 (m, 1H), 4.48 – 4.41 (m, 1H), 4.21 – 4.13 (m, 2H), 3.13 – 2.99 (m, 3H), 2.93 – 2.79 (m, 2H), 2.55 – 2.51 (m, 1H), 1.83 (s, 3H), 1.65 – 1.48 (m, 4H), 1.43 – 1.32 (m, 2H), 0.70 (d, *J* = 7.1 Hz, 3H); **HRMS** (ESI⁺): *m/z* calcd for C₃₆H₄₂N₇O₈ ([M+H]⁺) 700.3089; found 700.3108.



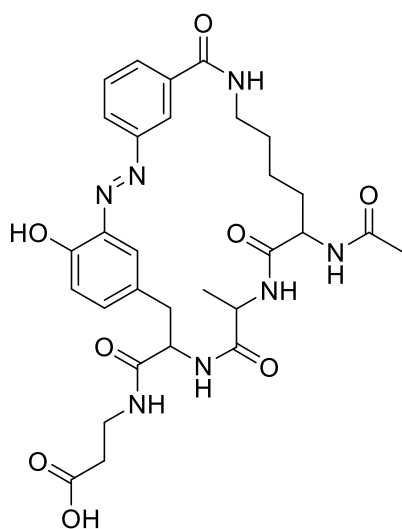
11-Acetamido-14-benzyl-1⁶-hydroxy-5,12,15,18-tetraoxo-2,3,6,13,16,19-hexaaza-1,4(1,3)-dibenzenacyclohenicosaphan-2-ene-20-carboxylic acid (26k); ¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ 12.90 (bs, 1H), 10.72 (s, 1H), 8.53 (t, *J* = 5.4 Hz, 1H), 8.37 – 8.33 (m, 1H), 8.27 (d, *J* = 8.2 Hz, 1H), 8.17 – 8.08 (m, 2H), 8.02 – 7.92 (m, 2H), 7.89 (d, *J* = 7.9 Hz, 1H), 7.67 – 7.59 (m, 2H), 7.29 (dd, *J* = 8.5, 2.2 Hz, 1H), 7.18 – 7.08 (m, 5H), 6.98 (d, *J* = 8.4 Hz, 1H), 4.47 – 4.38 (m, 2H), 4.30 – 4.22 (m, 1H), 3.96 (dd, *J* = 16.8, 5.9 Hz, 1H), 3.80 (dd, *J* = 16.9, 4.9 Hz, 1H), 3.29 – 3.18 (m, 2H), 3.06 (dd, *J* = 13.8, 3.9 Hz, 1H), 2.91 – 2.78 (m, 2H), 2.59 – 2.55 (m, 1H), 1.79 (s, 3H), 1.68 – 1.33 (m, 6H); **HRMS** (ESI⁺): *m/z* calcd for C₃₅H₄₀N₇O₈ ([M+H]⁺) 686.2933; found 686.2940.



11-Aacetamido-14-benzyl-1⁶-hydroxy-5,12,15-trioxo-2,3,6,13,16-pentaaza-1,4(1,3)-dibenzenacyclooctadecaphan-2-ene-17-carboxylic acid (26l); ¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ 12.97 (bs, 1H), 10.98 (s, 1H), 8.55 (t, *J* = 5.3 Hz, 1H), 8.44 (d, *J* = 7.6 Hz, 1H), 8.36 – 8.32 (m, 1H), 8.23 – 8.17 (m, 1H), 8.02 (d, *J* = 7.6 Hz, 1H), 7.92 – 7.88 (m, 1H), 7.73 – 7.69 (m, 1H), 7.64 (t, *J* = 7.8 Hz, 1H), 7.55 (d, *J* = 8.0 Hz, 1H), 7.28 (dd, *J* = 8.5, 2.2 Hz, 1H), 7.14 – 7.07 (m, 5H), 7.01 (d, *J* = 8.4 Hz, 1H), 4.66 – 4.59 (m, 1H), 4.58 – 4.52 (m, 1H), 4.33 – 4.24 (m, 1H), 3.49 – 3.41 (m, 1H), 3.17 – 3.10 (m, 1H), 3.09 – 2.97 (m, 3H), 2.88 – 2.78 (m, 1H), 1.84 (s, 3H), 1.81 – 1.69 (m, 1H), 1.62 – 1.43 (m, 2H), 1.42 – 1.27 (m, 3H); **HRMS** (ESI⁺): *m/z* calcd for C₃₃H₃₇N₆O₇ ([M+H]⁺) 629.2718; found 629.2714.



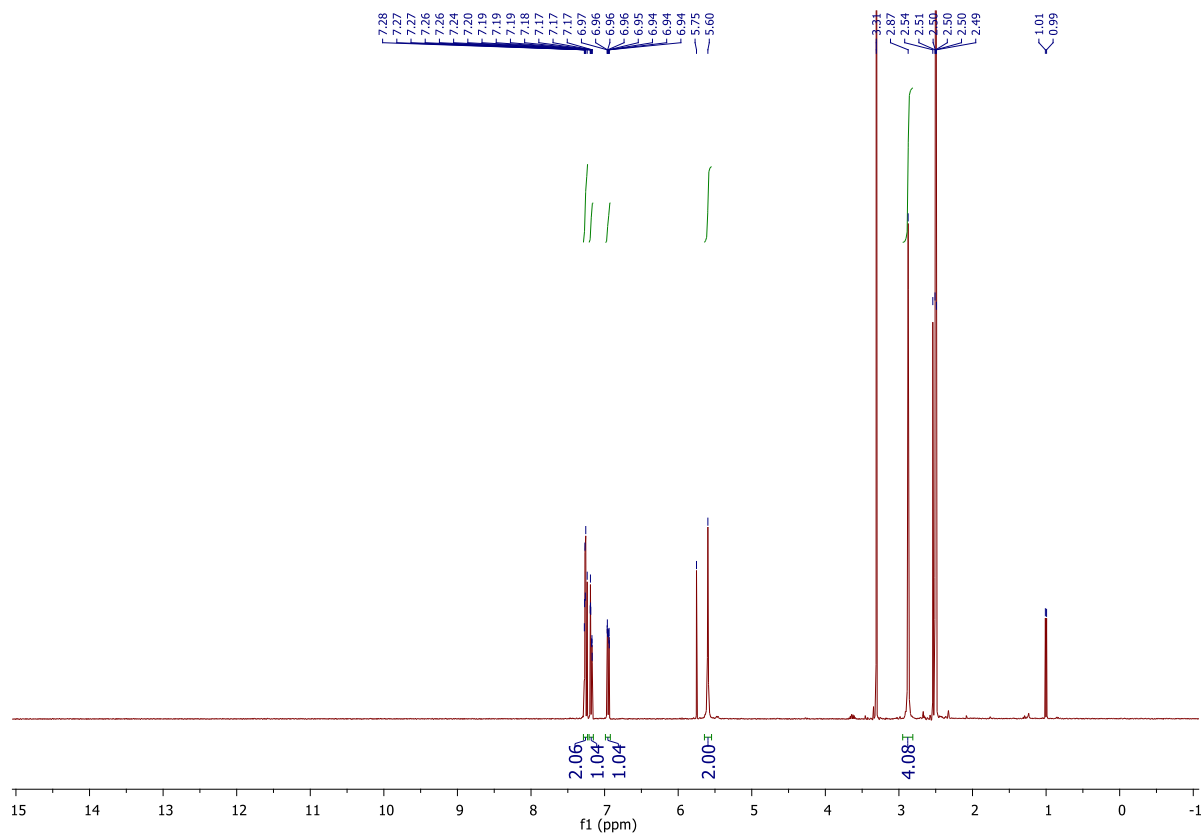
1⁶-Hydroxy-11-methyl-5,9,12-trioxo-2,3,6,10,13-pentaaza-1,4(1,3)-dibenzenacyclopentadecaphan-2-ene-14-carboxylic acid (26m); ¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ 12.85 (bs, 1H), 11.46 (s, 1H), 8.82 (d, *J* = 8.3 Hz, 1H), 8.54 (t, *J* = 5.0 Hz, 1H), 8.23 – 8.19 (m, 1H), 8.12 – 8.05 (m, 2H), 7.97 – 7.93 (m, 1H), 7.84 – 7.79 (m, 1H), 7.67 (t, *J* = 7.7 Hz, 1H), 7.36 (dd, *J* = 8.5, 2.4 Hz, 1H), 7.01 (d, *J* = 8.4 Hz, 1H), 4.64 – 4.53 (m, 2H), 3.59 – 3.46 (m, 2H), 3.22 – 3.15 (m, 1H), 3.12 – 3.01 (m, 1H), 2.61 – 2.53 (m, 1H), 2.41 – 2.34 (m, 1H), 1.30 (d, *J* = 6.9 Hz, 3H); **HRMS** (ESI⁺): *m/z* calcd for C₂₂H₂₄N₅O₆ ([M+H]⁺) 454.1721; found 454.1722.



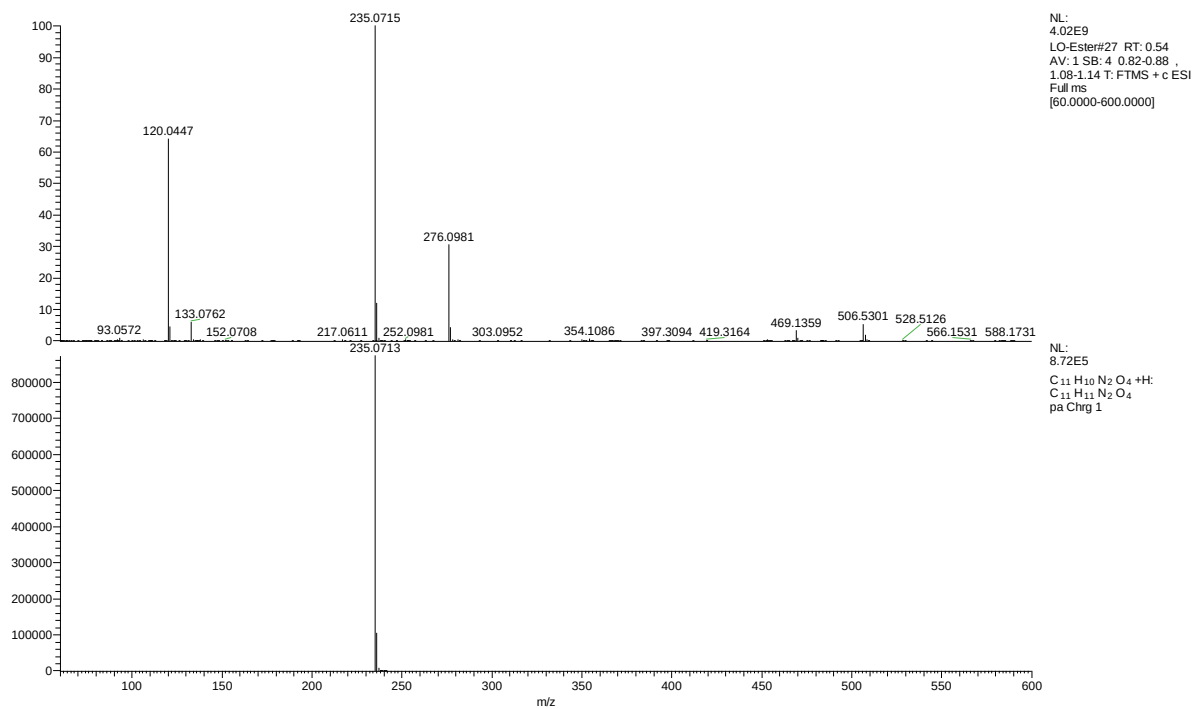
3-(11-Acetamido-1⁶-hydroxy-14-methyl-5,12,15-trioxo-2,3,6,13,16-pentaaza-1,4(1,3)-dibenzenacyclooctadecaphan-2-ene-17-carboxamido)propanoic acid (26n); ¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ 12.23 (bs, 1H), 11.01 (s, 1H), 8.60 (t, *J* = 5.2 Hz, 1H), 8.28 – 8.22 (m, 1H), 8.21 – 8.15 (m, 1H), 8.08 (d, *J* = 8.0 Hz, 1H), 8.05 – 7.98 (m, 2H), 7.90 – 7.85 (m, 1H), 7.68 – 7.61 (m, 3H), 7.21 (dd, *J* = 8.5, 2.2 Hz, 1H), 6.97 (d, *J* = 8.4 Hz, 1H), 4.44 – 4.38 (m, 1H), 4.37 – 4.28 (m, 2H), 3.52 – 3.48 (m, 1H), 3.36 – 3.30 (m, 1H), 3.27 – 3.20 (m, 1H), 3.17 – 3.09 (m, 1H), 3.05 – 2.91 (m, 2H), 2.45 – 2.35 (m, 2H), 1.86 (s, 3H), 1.84 – 1.75 (m, 1H), 1.66 – 1.49 (m, 3H), 1.48 – 1.35 (m, 2H), 1.17 (d, *J* = 6.9 Hz, 3H); **HRMS** (ESI⁺): *m/z* calcd for C₃₀H₃₈N₇O₈ ([M+H]⁺) 624.2776; found 624.2764.

Sloučenina 7b

^1H NMR

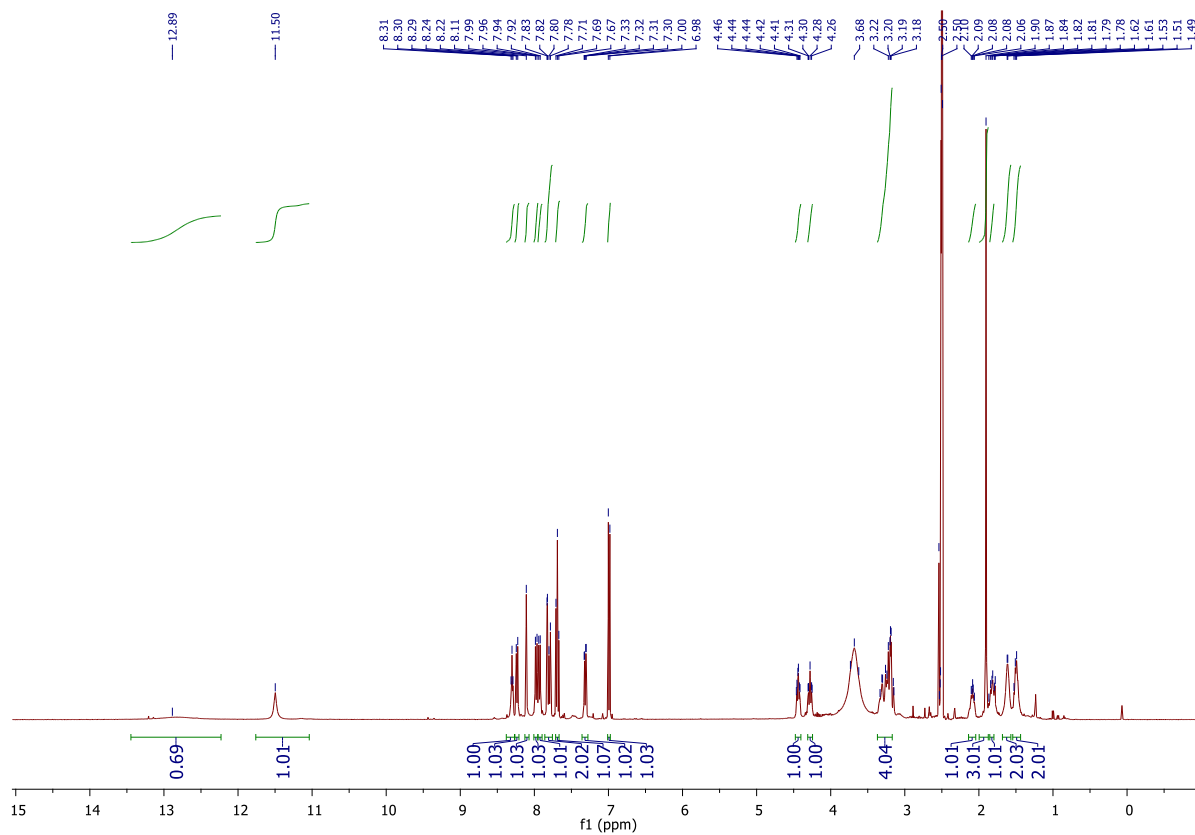


HRMS (ESI+)

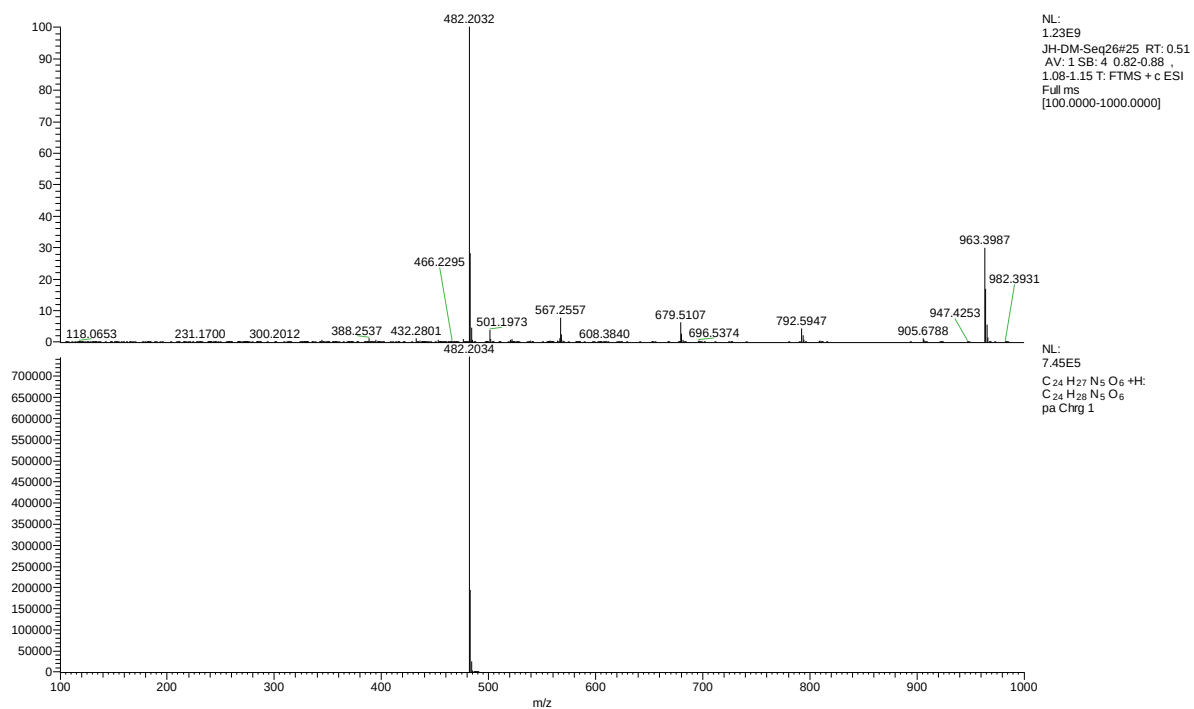


Sloučenina 26b

¹H NMR

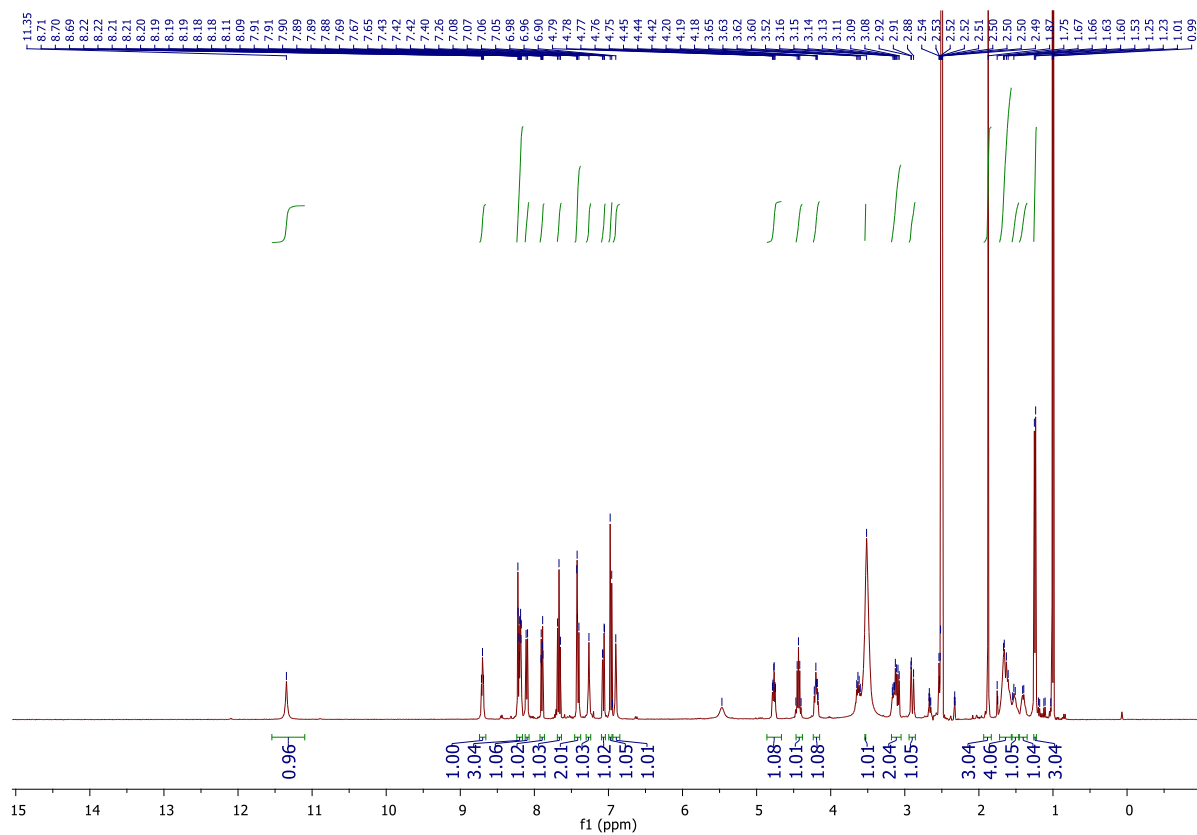


HRMS (ESI+)

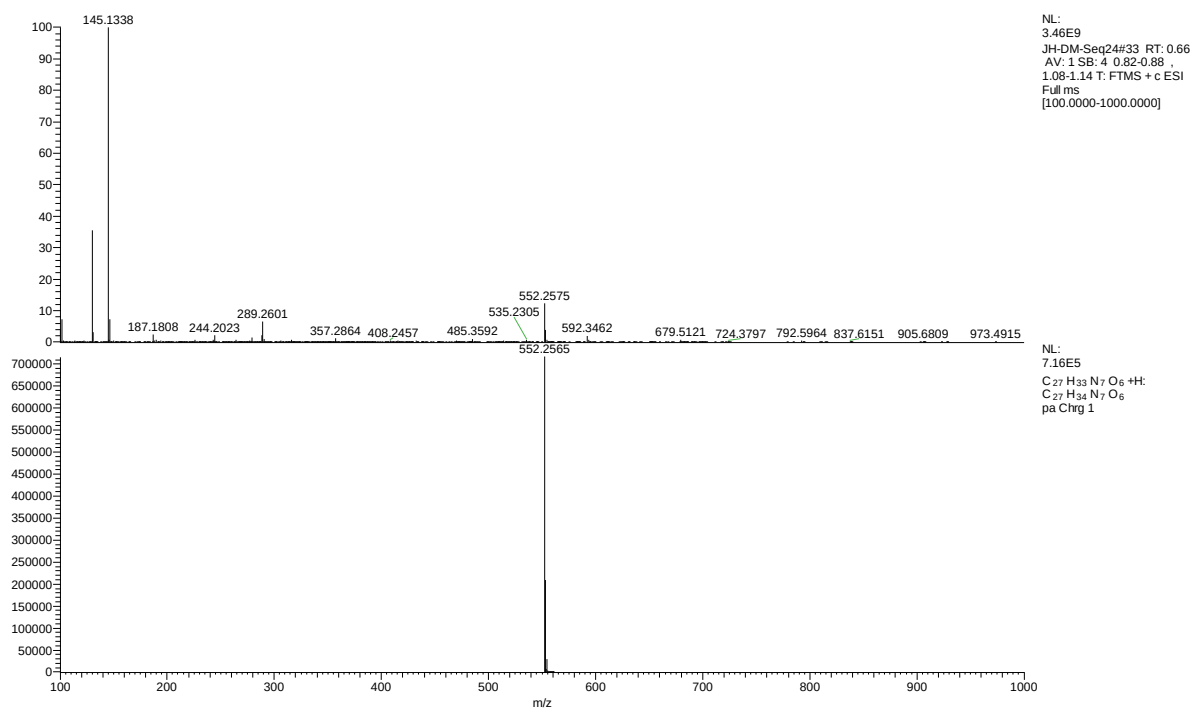


Sloučenina 26c

^1H NMR

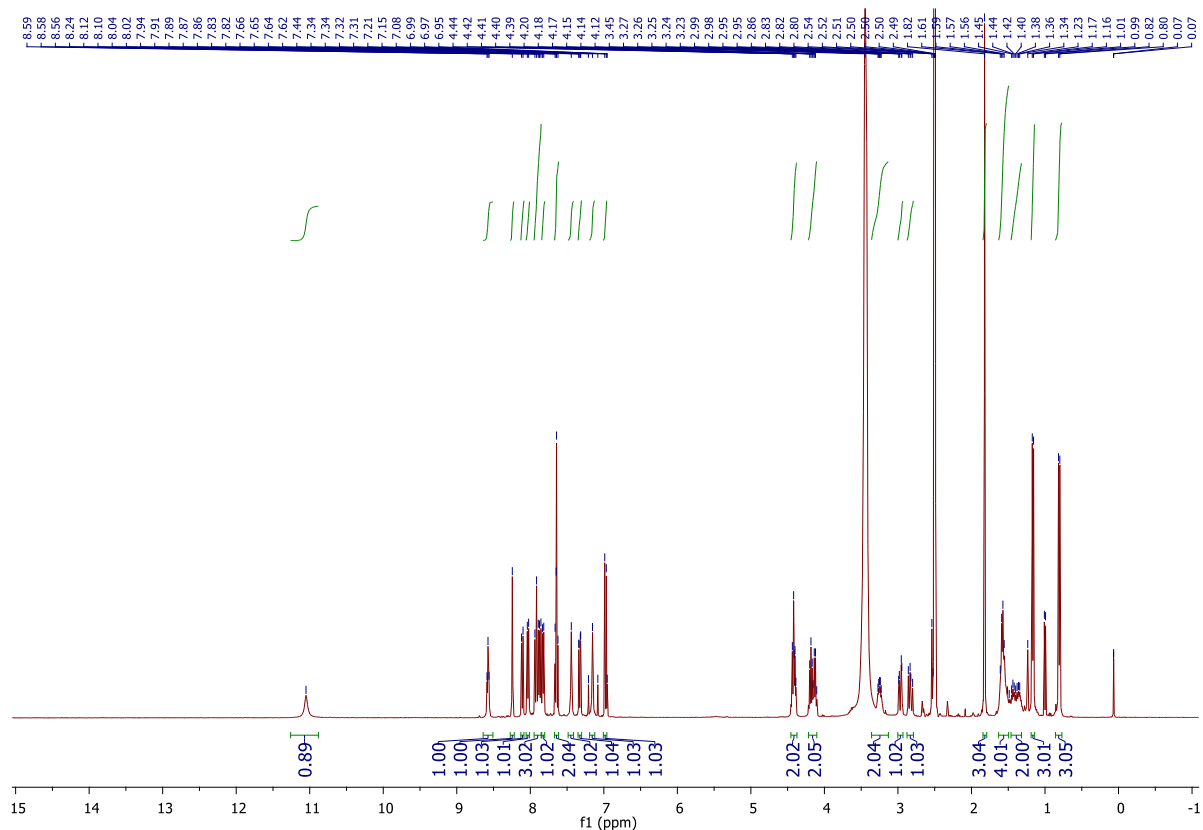


HRMS (ESI+)

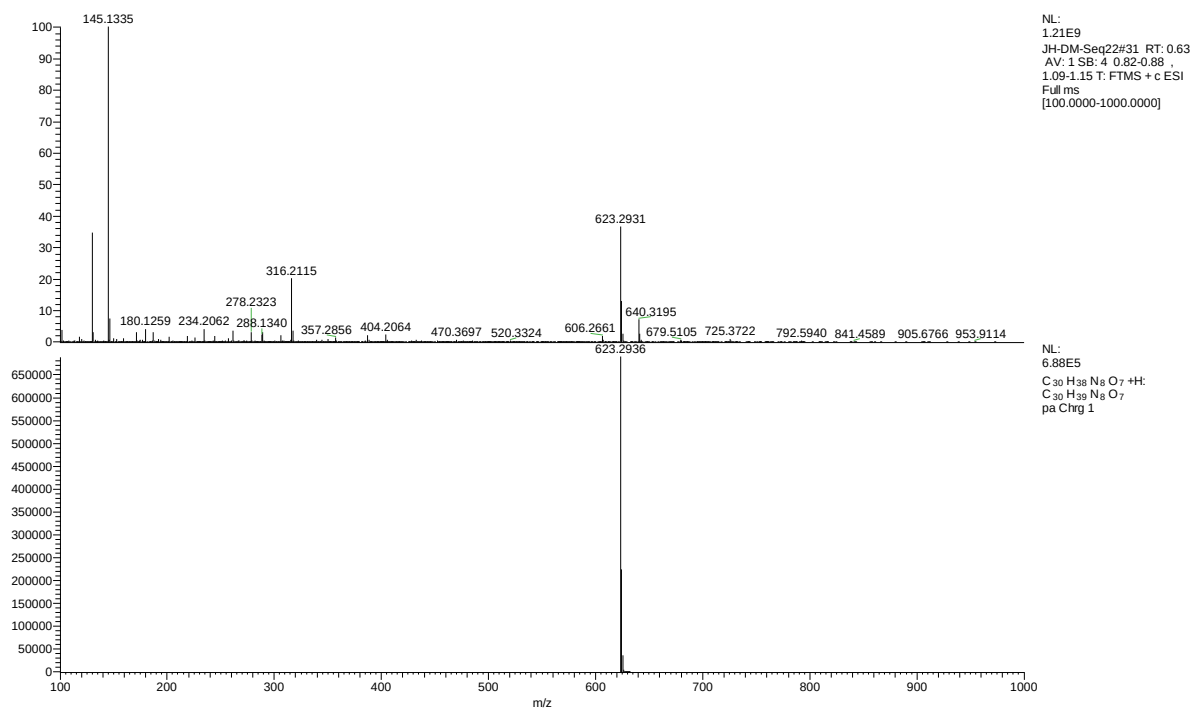


Sloučenina 26d

¹H NMR

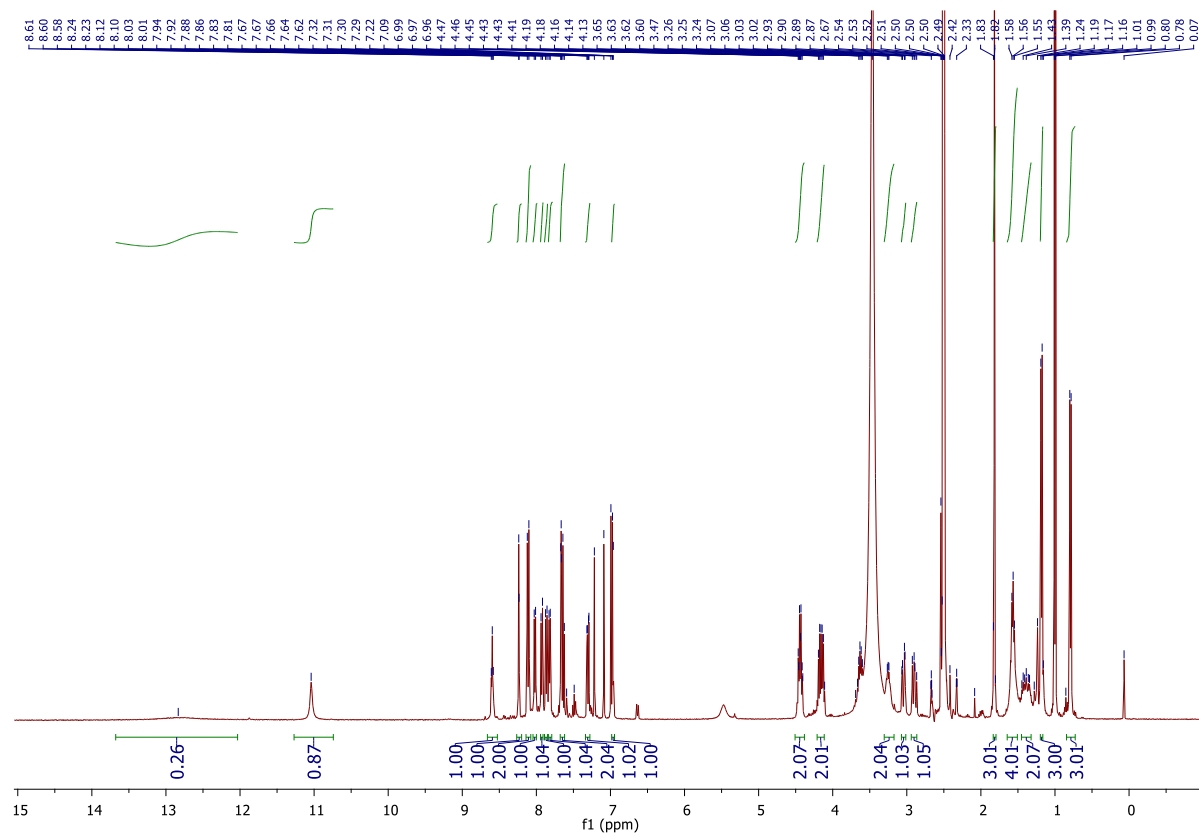


HRMS (ESI+)

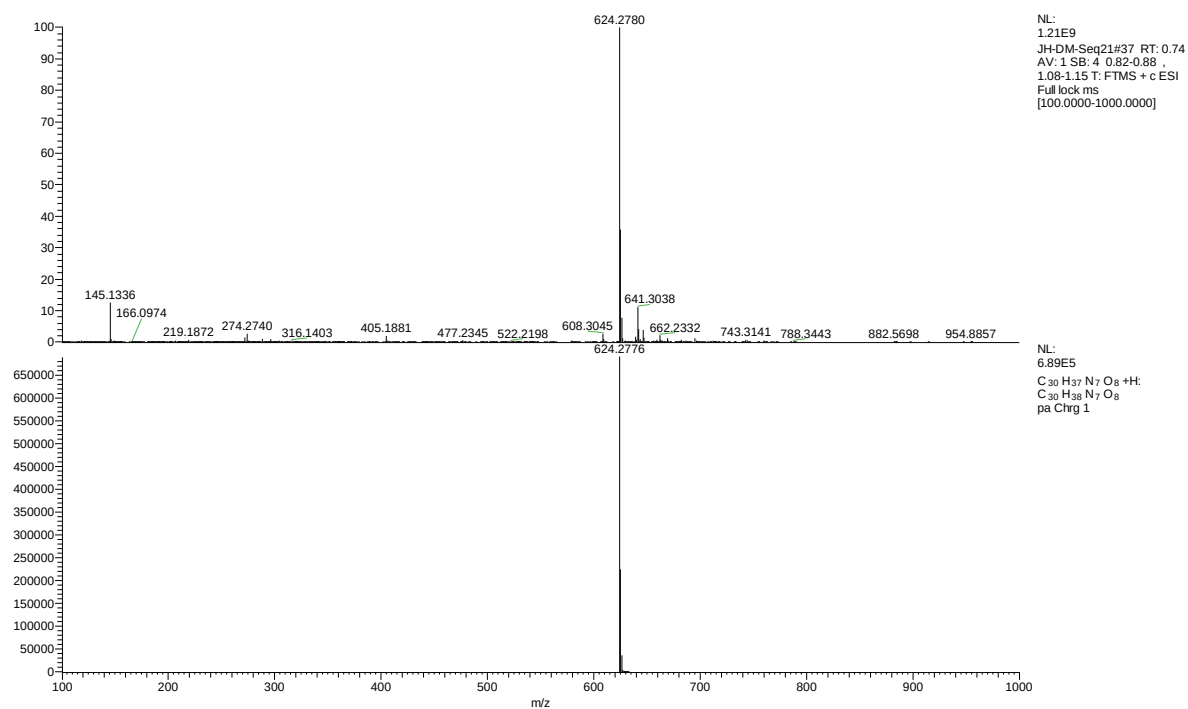


Sloučenina 26e

^1H NMR

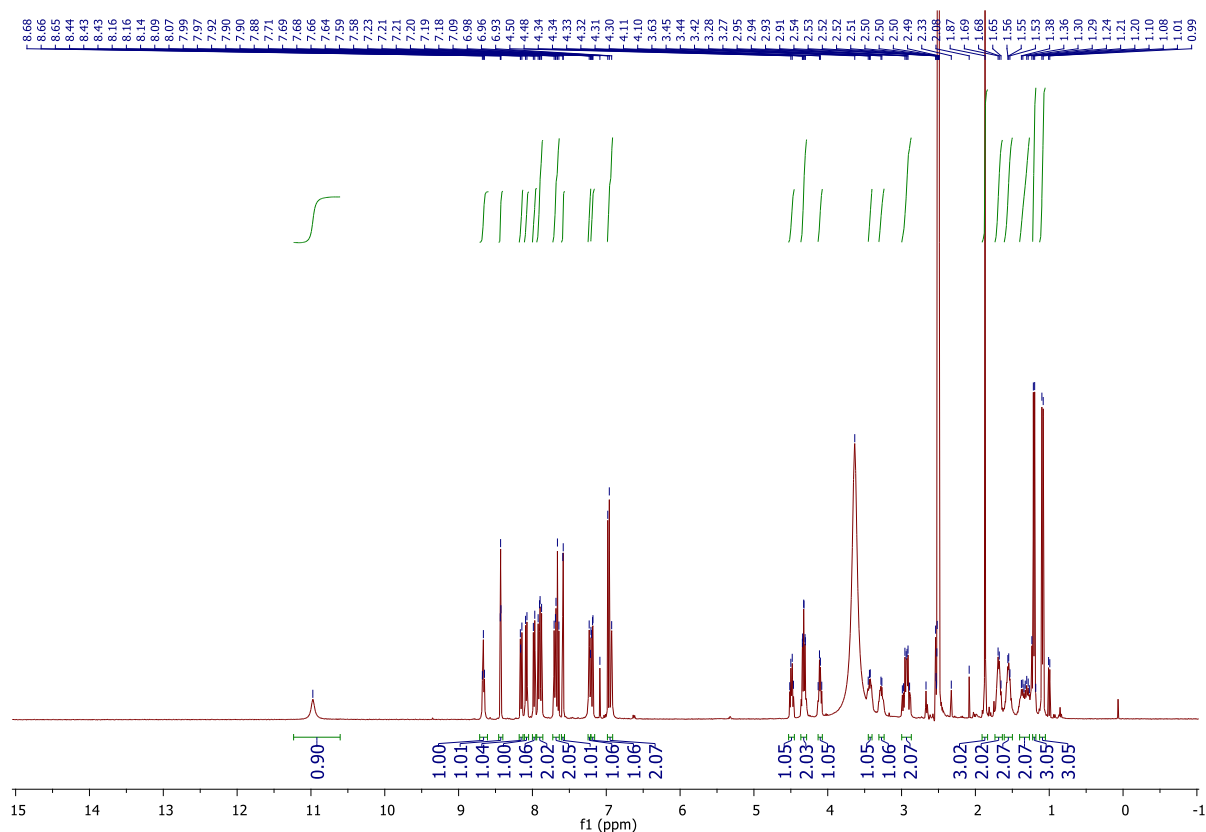


HRMS (ESI+)

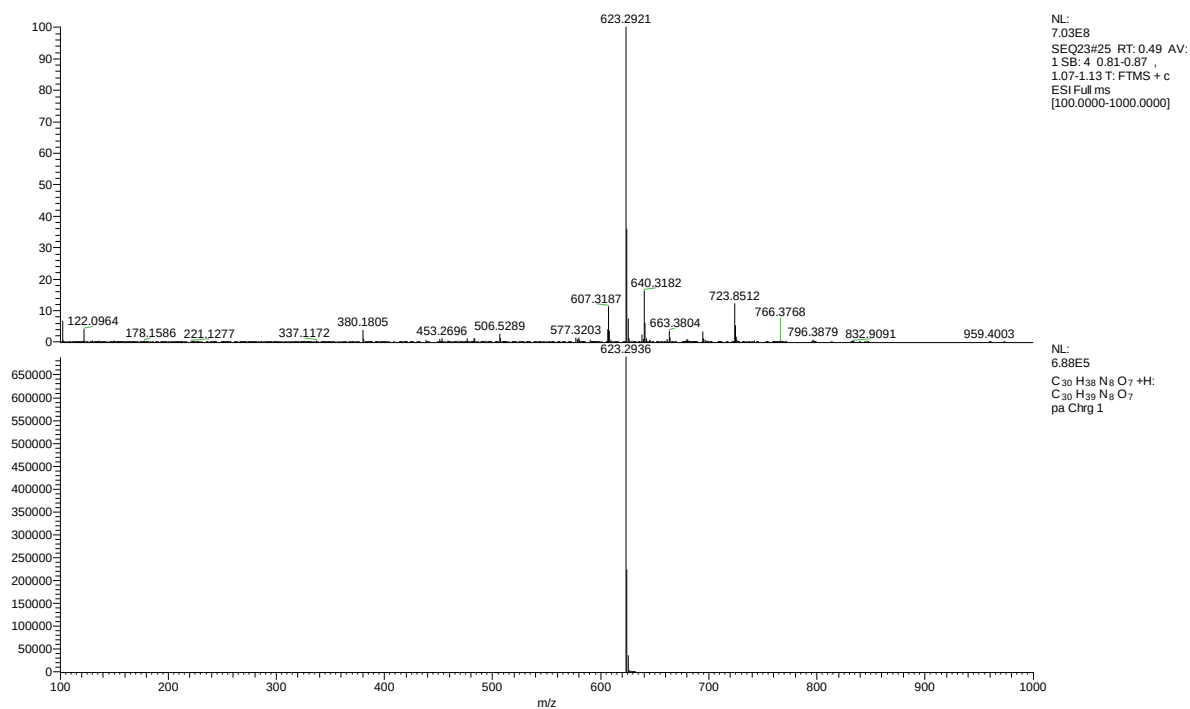


Sloučenina 26f

¹H NMR

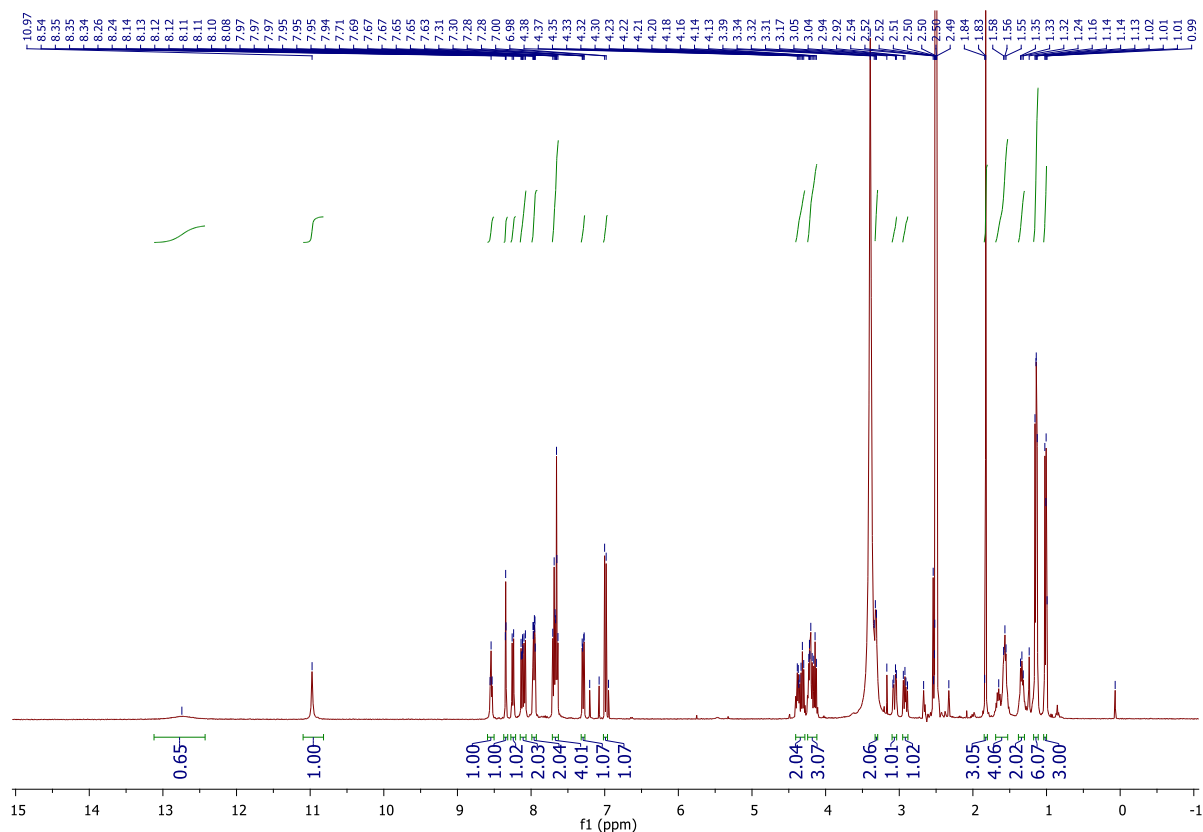


HRMS (ESI+)

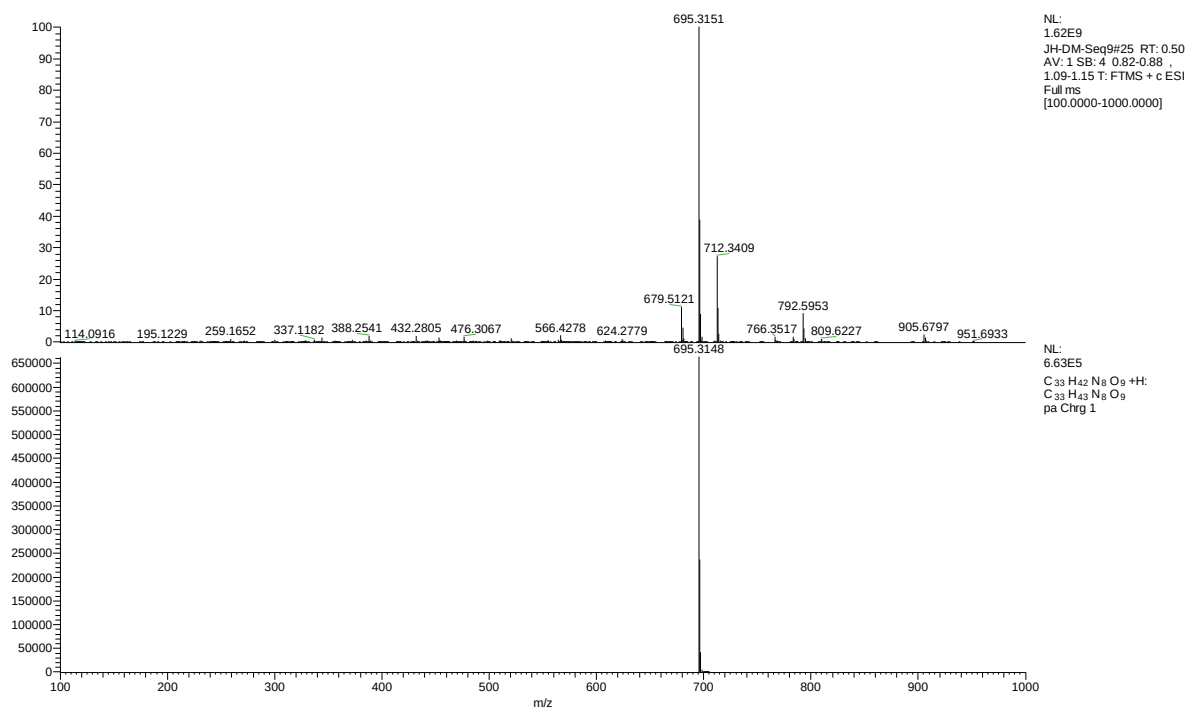


Sloučenina 26g

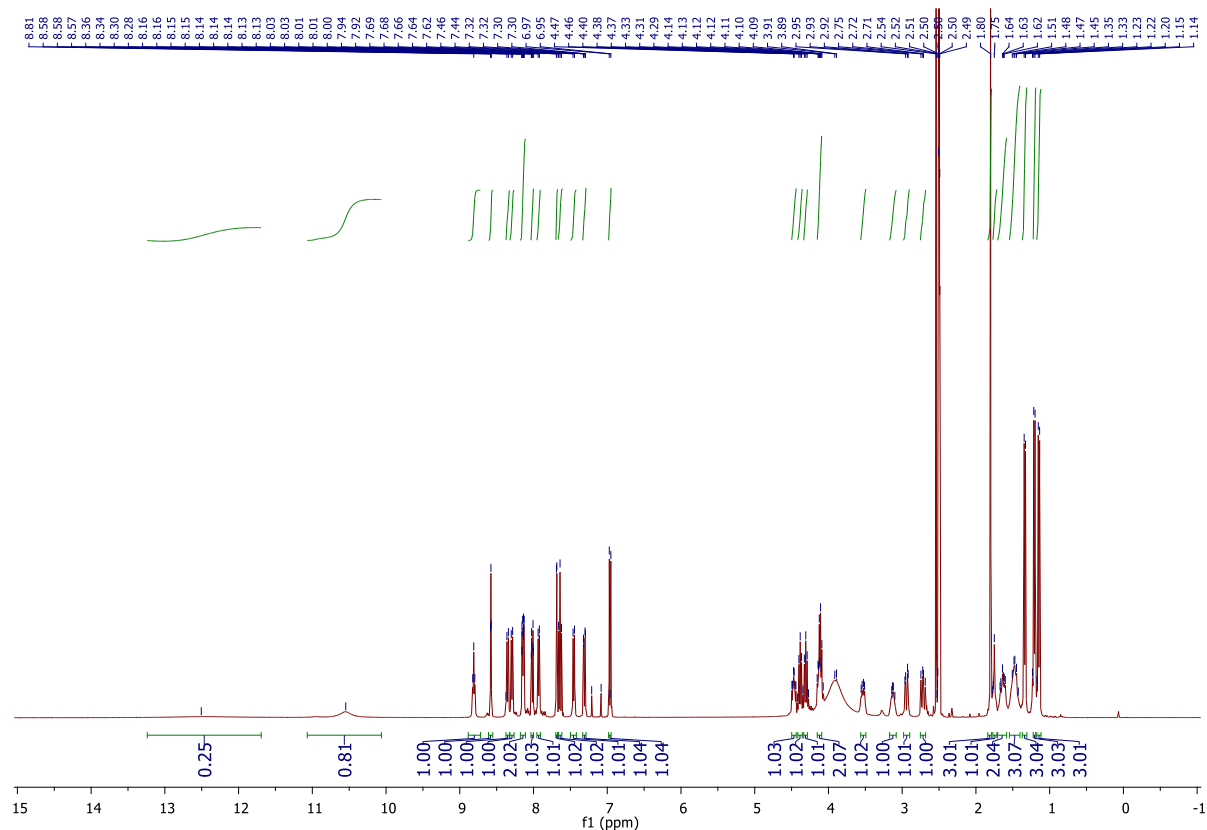
¹H NMR



HRMS (ESI+)



¹H NMR



Mass spectrum plot showing relative intensity (%) on the y-axis (0 to 100) versus m/z on the x-axis (100 to 1000). The base peak is at m/z 695.3154. Other labeled peaks include:

m/z	Relative Intensity (%)
114.0917	~1
245.1498	~5
259.1654	~15
272.1970	~5
358.2338	~5
372.2495	~15
385.2811	~10
441.3439	~5
485.3339	~10
554.4282	~5
598.4179	~5
667.5125	~5
695.3154	100
711.5009	~5
824.5854	~5
893.6804	~5
937.6707	~5

Metadata:

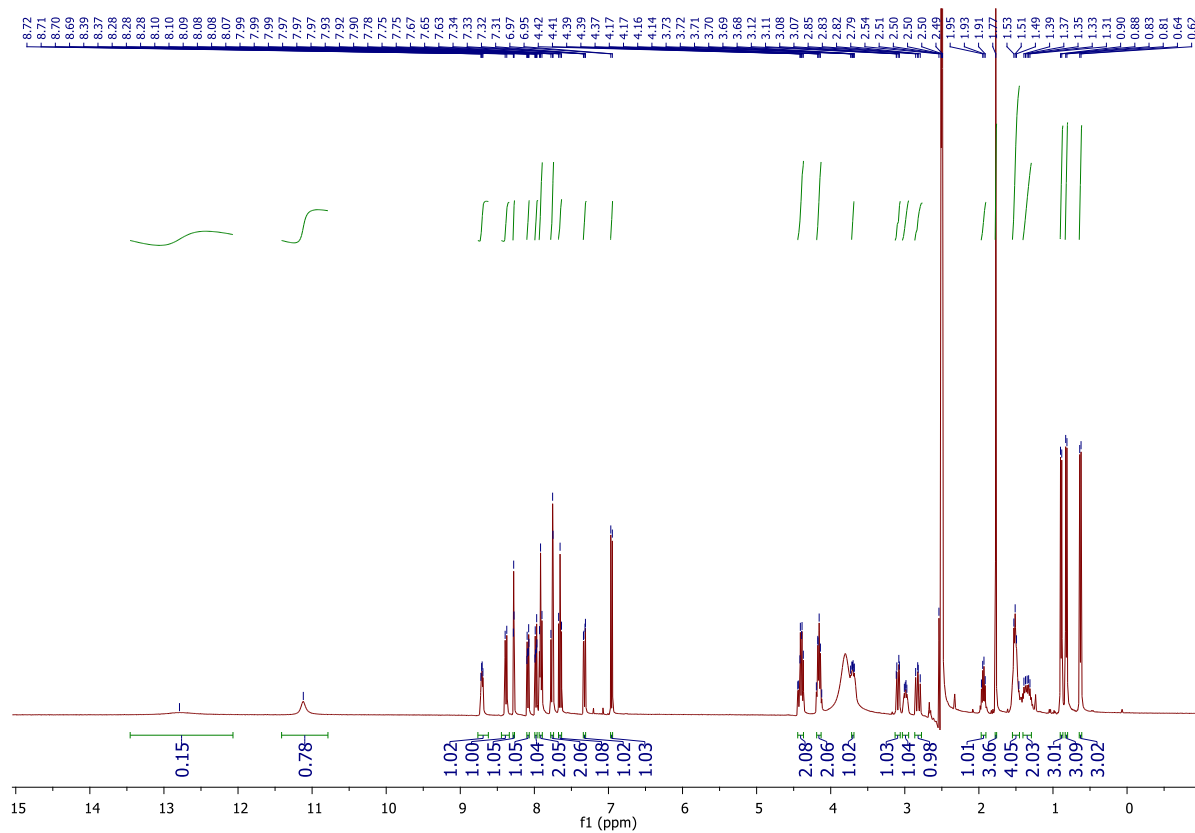
- NL: 1.87E9
- JH-DM-Seq29#25 RT: 0.50
- AV: 1 SB: 4 0.82-0.88
- 1.08-1.15 T: FTMS + c ESI
- Full ms
- [100.0000-1000.0000]

Chemical information:

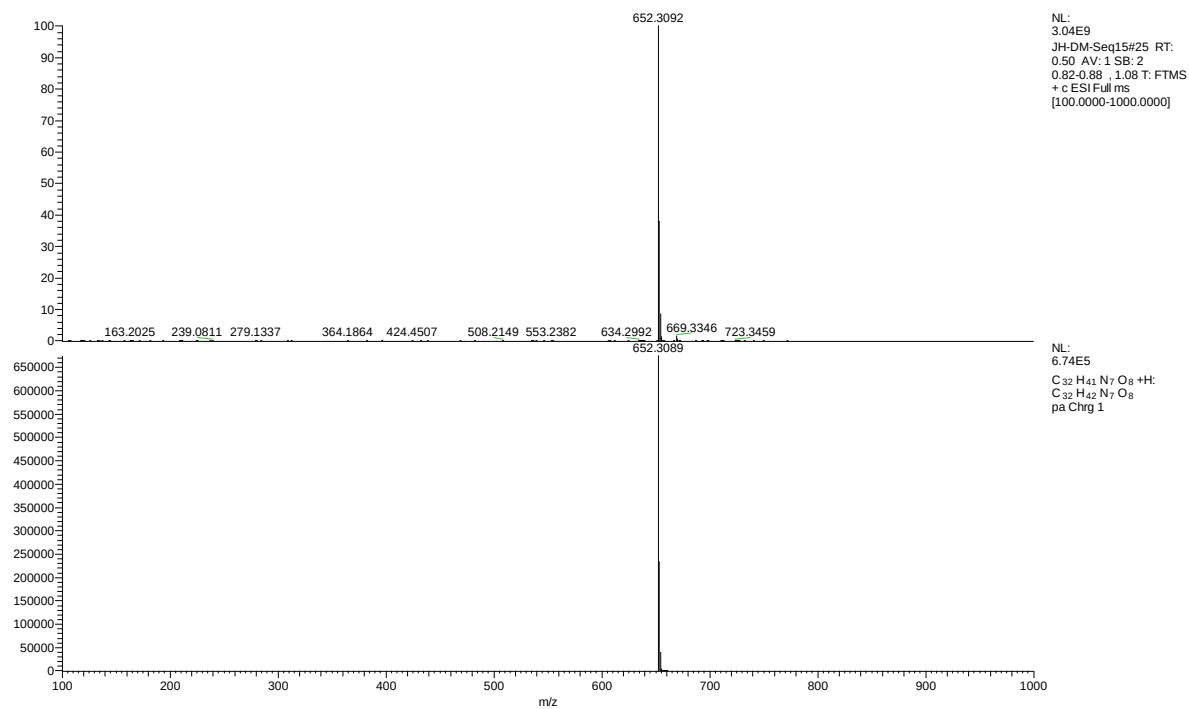
- NL: 6.63E5
- C₃₃H₄₂N₈O₉+H⁺
- C₃₃H₄₃N₈O₉
- pa Chrg 1

Sloučenina 26i

^1H NMR

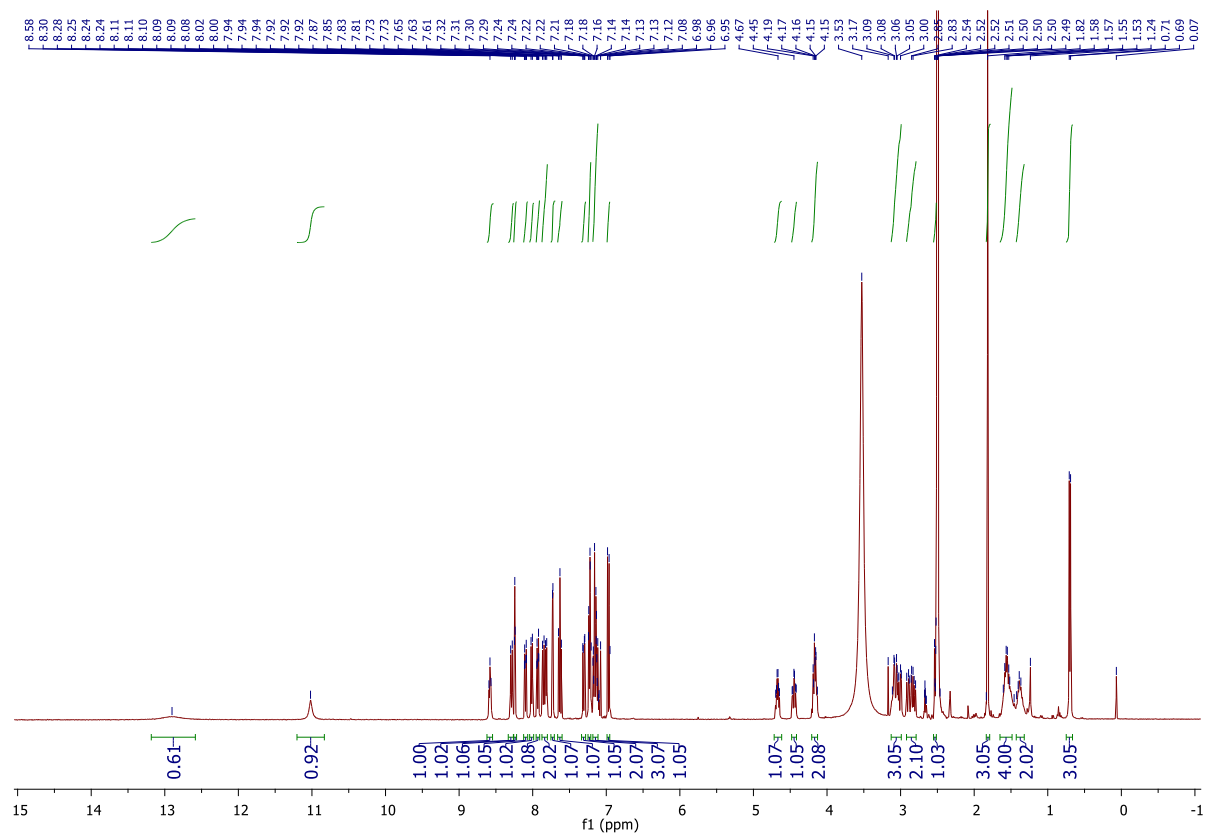


HRMS (ESI+)

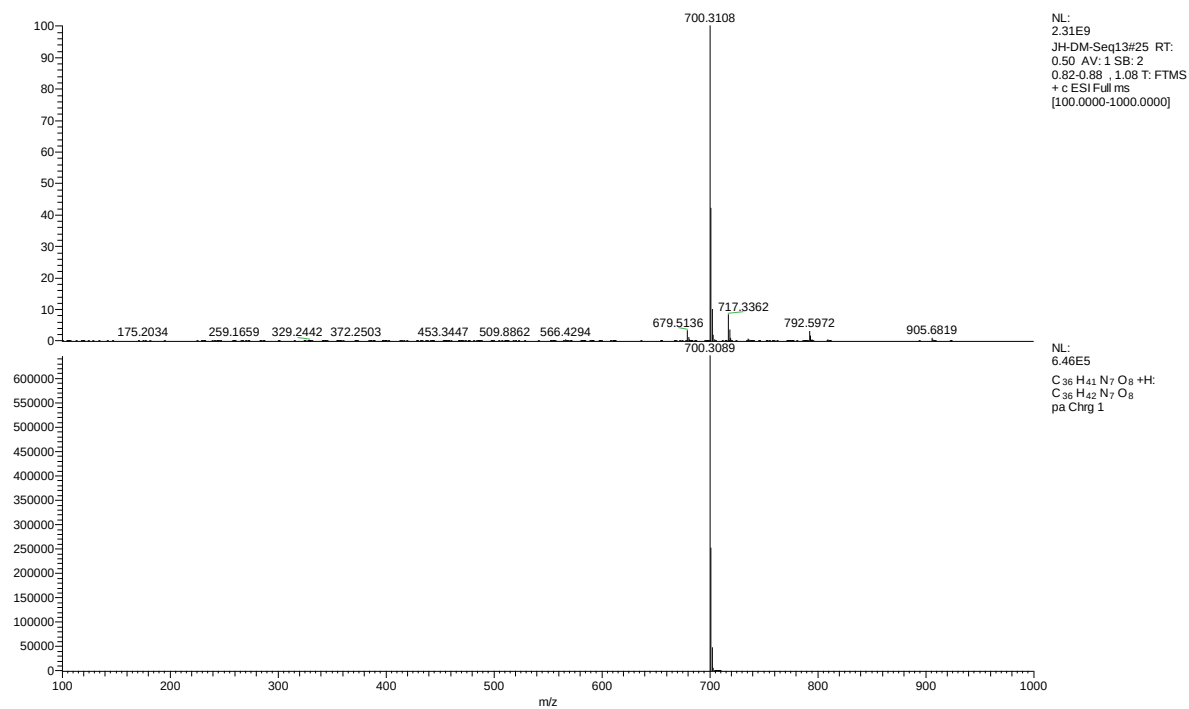


Sloučenina 26j

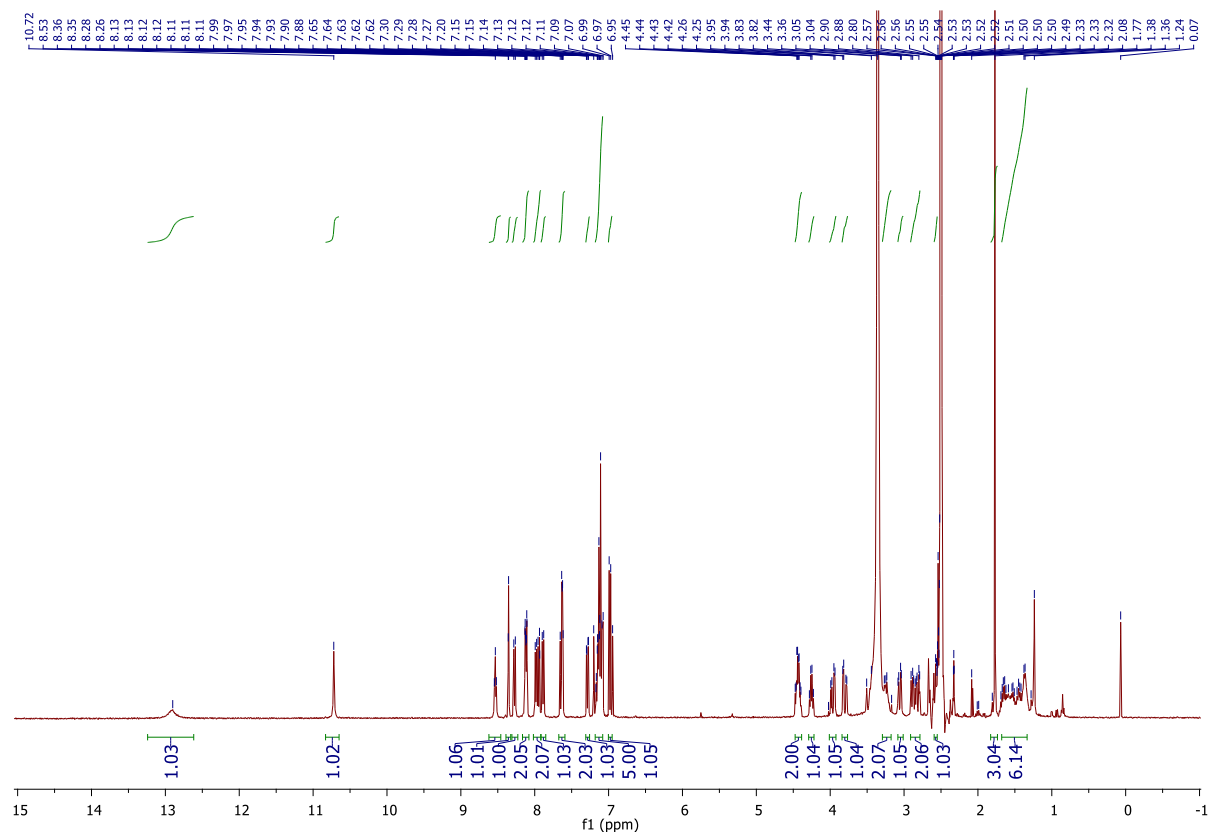
^1H NMR



HRMS (ESI+)



¹H NMR



NL:
1.31E9
JH-DM-Seq12#27 RT: 0.54
AV: 1 SB: 4 0.82-0.88 ,
1.07-1.13 T: FTMS + c ESI
Full ms
[100.0000-1000.0000]

686.2940
703.3193
731.3509
759.3821
816.4938
860.5189
948.5677

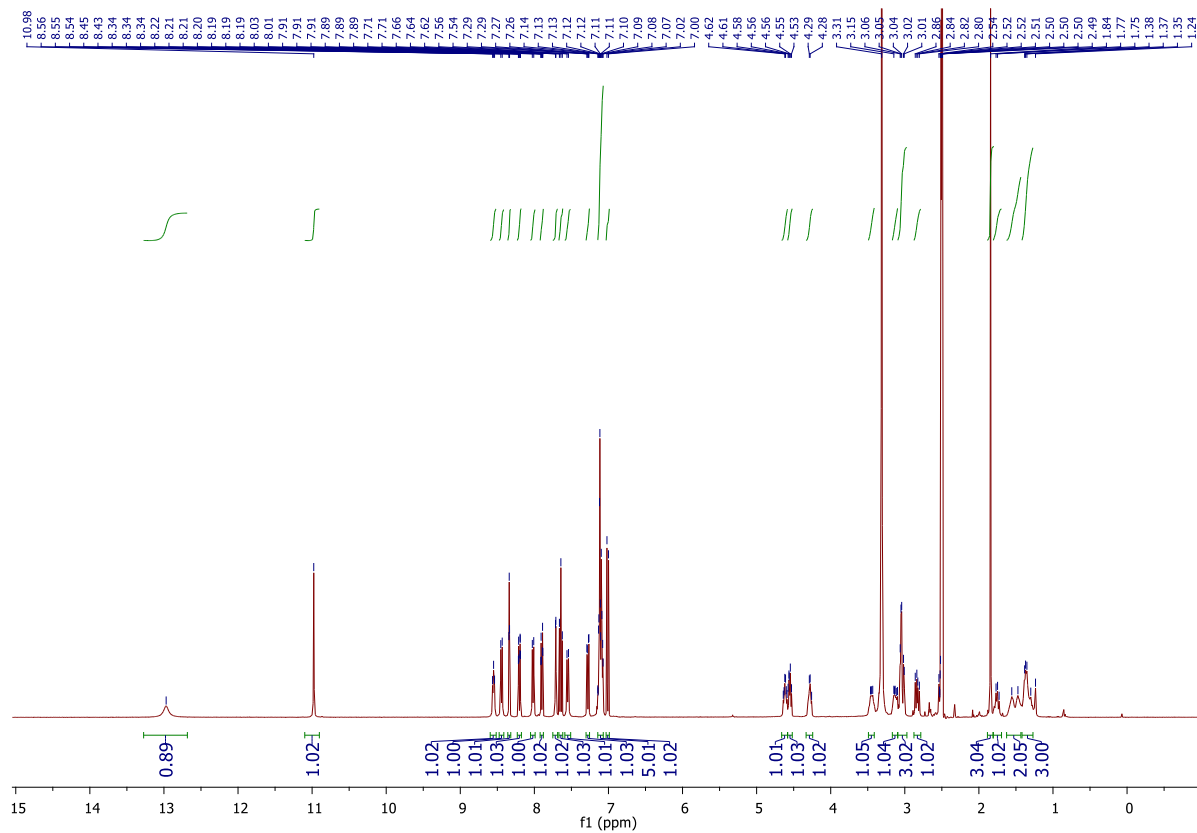
118.0866 221.1496 302.1961 344.2278 416.2278 476.3071 552.3373 596.3635 668.2823

686.2933

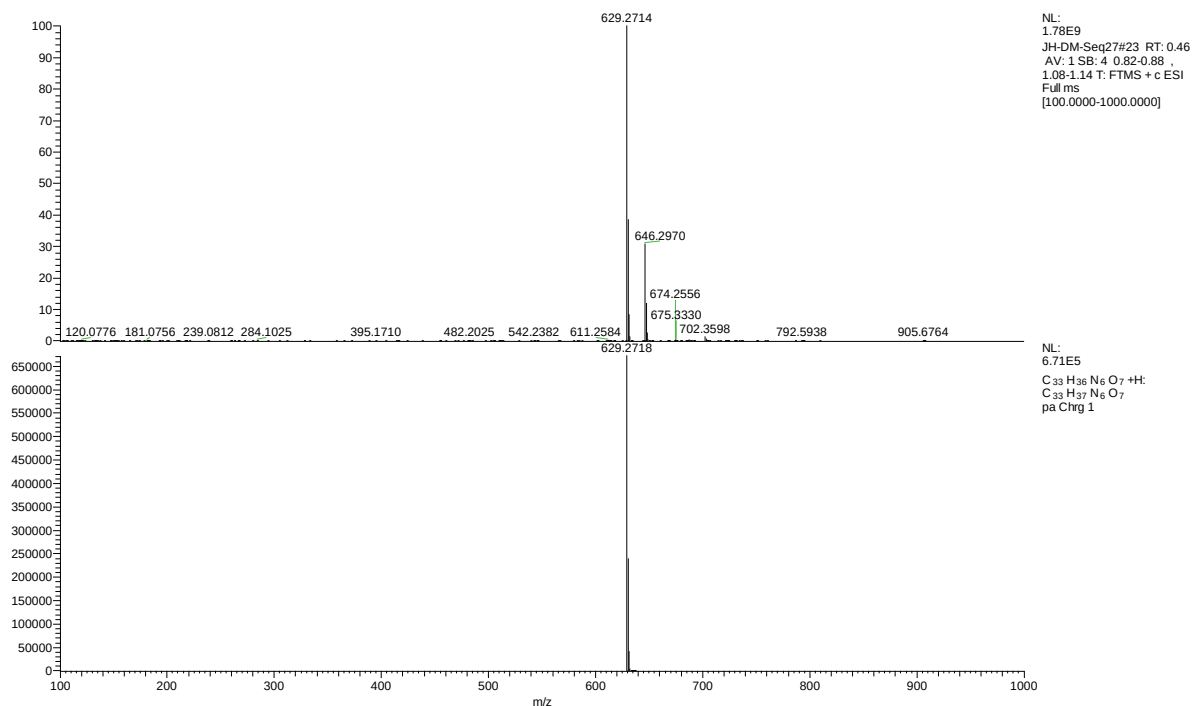
NL:
6.53E5
C₃₅H₃₉N₇O₈+H:
C₃₅H₄₀N₇O₈
pa Chrg 1

Sloučenina 26I

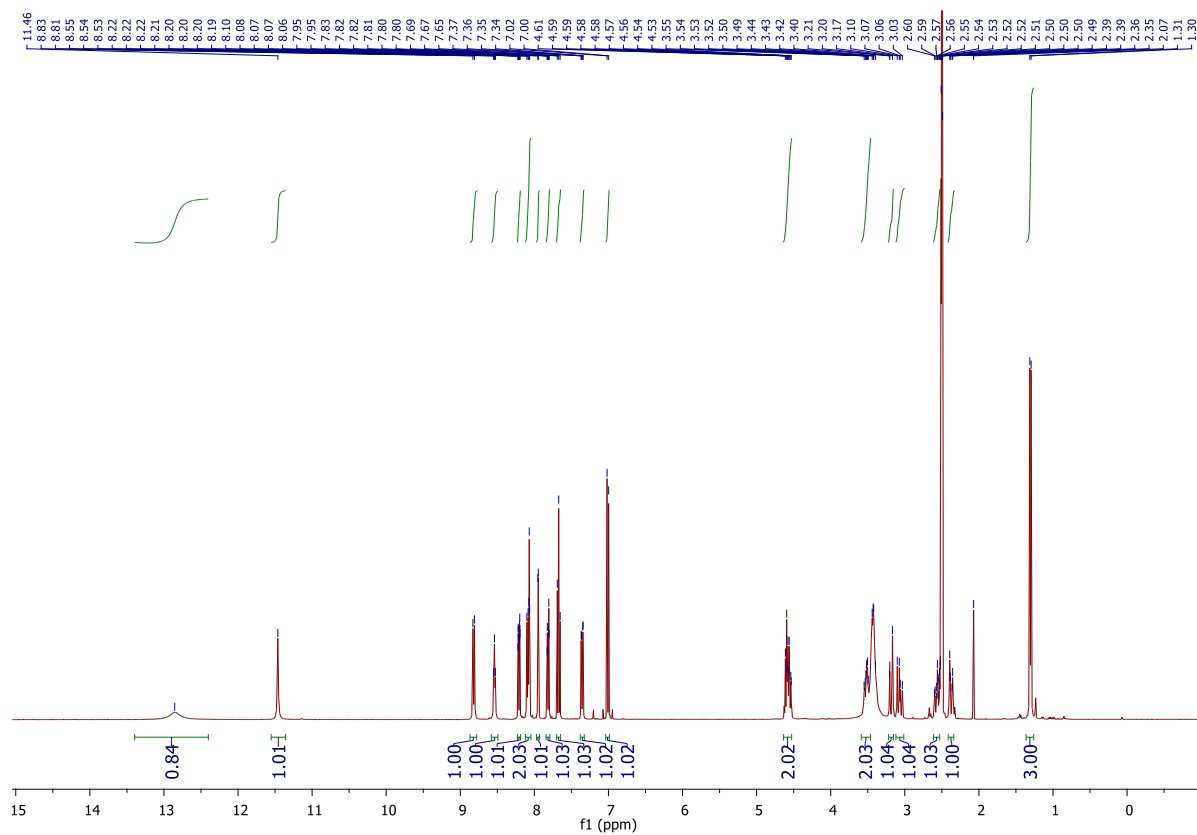
¹H NMR



HRMS (ESI+)



¹H NMR

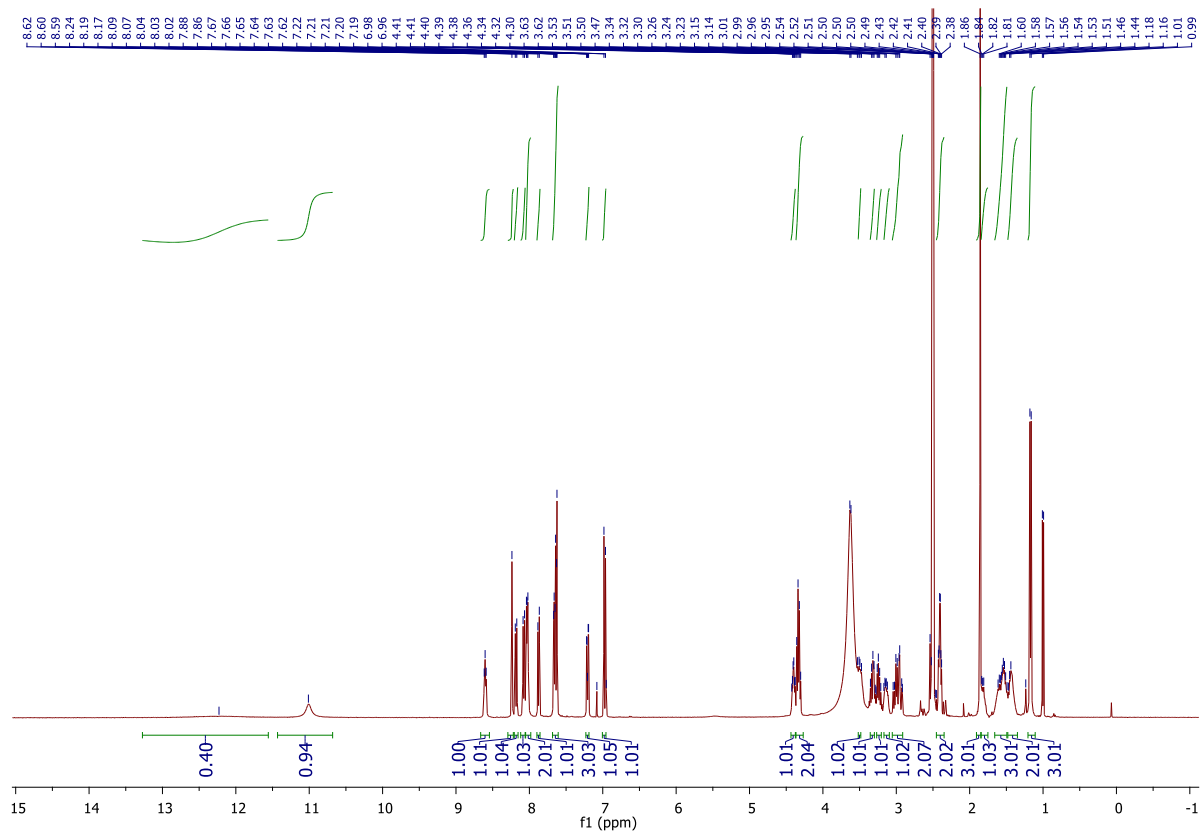


NL:
 1.49E9
 JH-DM-Seq28#27 RT: 0.54
 AV: 1 SB: 4 0.82-0.88
 1.08-1.15 T: FTMS + c ESI
 Full ms
 [100.0000-1000.0000]

NL:
 7.62E5
 C₂₂H₂₃N₅O₆ +H⁺
 C₂₂H₂₄N₅O₆
 pa Chrg 1

Sloučenina 26n

¹H NMR



HRMS (ESI+)

