



UNIVERZITA PALACKÉHO V OLOMOUCI
PŘÍRODOVĚDECKÁ FAKULTA
Katedra organické chemie

Design a syntéza nových inhibitorů mykobakteriální ATP synthasy

Diplomová práce

Autor práce:

Studijní program:

Vedoucí práce:

Jan CHASÁK

Bioorganická chemie a chemická biologie

RNDr. Lucie BRULÍKOVÁ, Ph.D.

PROHLÁŠENÍ:

Čestně prohlašuji, že jsem závěrečnou diplomovou práci na téma „Design a syntéza nových inhibitorů mykobakteriální ATP synthasy“ zpracoval samostatně pod vedením RNDr. Lucie Brulíkové, Ph.D. a s použitím informačních zdrojů a literatury, které dále cituji v seznamu zdrojů. Dále souhlasím, aby tato diplomová práce byla zpřístupněna v knihovně Katedry organické chemie Univerzity Palackého.

V Olomouci dne 28. 4. 2022

.....
Jan CHASÁK

PODĚKOVÁNÍ:

V první řadě bych rád poděkoval své vedoucí práce, RNDr. Lucii Brulíkové, Ph.D., za vedení mé diplomové práce a za příležitost být součástí její výzkumné skupiny. Díky také patří všem členům výzkumné skupiny za cenné rady, vzájemnou pomoc a výbornou atmosféru v laboratoři. Děkuji RNDr. Adamu Příbylkovi, Ph.D. a Mgr. Davidu Profousovi za provedení veškerých potřebných analytických experimentů. Za realizaci biologických testů proti *M. tuberculosis* děkuji Dr. Daviemu Cappoenovi a jeho týmu (Laboratory for Microbiology, Parasitology and Hygiene, University of Antwerp). Za pomoc s *in silico* testy a návrhem derivátů děkuji pánům doc. RNDr. Karlu Berkovi, Ph.D. a Mgr. Ing. Václavu Bazgierovi, Ph.D. z Katedry fyzikální chemie PřF UP.

Mé díky bych chtěl dále směřovat ke své přítelkyni Tereze Šlitrové za podporu během celého probíhajícího studia. V neposlední řadě děkuji své rodině, díky jejichž podpoře a financím mi bylo studium umožněno.

Tato závěrečná práce vznikla za finanční podpory grantu UP (JG_2019_002) a Interní Grantové Agentury Univerzity Palackého (IGA_PrF_2021_024 a IGA_PrF_2022_022).

BIBLIOGRAFICKÁ KLASIFIKACE:

JMÉNO A PŘÍJMENÍ AUTORA: Jan Chasák

NÁZEV PRÁCE: Design a syntéza nových inhibitorů mykobakteriální ATP synthasy

TYP PRÁCE: Diplomová

PRACOVNÍŠTĚ: Katedra organické chemie

VEDOUcí PRÁCE: RNDr. Lucie Brulíková, Ph.D.

ROK OBHAJOBY PRÁCE: 2022

ABSTRAKT:

Předložená diplomová práce je zaměřena na návrh a syntézu nových derivátů squaramidu cílících na mykobakteriální ATP synthasu. Teoretická část je členěna do dvou hlavních kapitol. První z nich se zabývá stavbou mykobakteriální ATP synthasy a uvádí přehled nejvýznamnějších publikovaných inhibitorů tohoto enzymu. V druhé kapitole je diskutováno zavedení aromatického substituentu na squarový kruh pomocí couplingových reakcí. Experimentální část práce soustředí svou pozornost na návrh a syntézu nových cyklobutendionových derivátů jako inhibitorů mykobakteriální ATP synthasy. Práce se v tomto ohledu zabývá dvěma strukturálními typy squaramidů, u kterých je diskutován návrh syntézy a optimalizace jednotlivých reakčních kroků. Závěrem práce je rozebírána biologická aktivita připravených látek.

KLÍČOVÁ SLOVA: cyklobutendiony, squaramidy, Liebeskind-Srogl coupling, antimykobakteriální aktivita, mykobakteriální ATP synthasa

POČET STRAN: 134

POČET PŘÍLOH: 1

JAZYK: čeština

BIBLIOGRAPHICAL IDENTIFICATION:**AUTHOR'S NAME A SURNAME:** Jan Chasák**TITLE:** Design and synthesis of novel mycobacterial ATP synthase inhibitors**TYPE OF THESIS:** Master**DEPARTMENT:** Department of Organic Chemistry**ADVISOR:** RNDr. Lucie Brulíková, Ph.D.**THE YEAR OF PRESENTATION:** 2022**ABSTRACT:**

The present thesis focuses on the design and synthesis of novel squaramide derivatives targeting mycobacterial ATP synthase. The theoretical part is divided into 2 main chapters. The first part is focused on the structure of mycobacterial ATP synthase and reviews recently published inhibitors of this enzyme. In the second one, the implementation of an aromatic substituent on the squaramide ring via coupling reactions is discussed. The experimental part of the work focuses its attention on the design and synthesis of new cyclobutendione derivatives as inhibitors of mycobacterial ATP synthase. In this case, the thesis deals with two structural types of squaramides, for which the design of the synthesis and the optimization of the individual reaction steps are discussed. Finally, the biological activity of the prepared compounds is summarized.

KEYWORDS: cyclobutenediones, squaramides, Liebeskind-Srogl coupling, antimycobacterial activity, mycobacterial ATP synthase**NUMBER OF PAGES:** 134**NUMBER OF APPENDIXES:** 1**LANGUAGE:** Czech

OBSAH

OBSAH	6
ÚVOD.....	8
CÍLE PRÁCE.....	10
TEORETICKÁ ČÁST	11
1 Inhibitory mykobakteriální ATP synthasy.....	11
1.1 Mykobakteriální ATP synthasa	12
1.2 Bedaquiline a jeho analoga.....	13
1.3 Nové inhibitory mykobakteriální ATP synthasy	15
2 Cross couplingové reakce na squaramidech	20
2.1 Suzuki-Miyaura coupling	22
2.2 Negishi coupling.....	24
2.3 Liebeskind-Srogl coupling	26
2.4 Stilleho coupling.....	33
VÝSLEDKY A DISKUZE	36
3 Návrh nových derivátů na základě molekulového dokování.....	36
4 Aminové deriváty squaramidu.....	41
4.1 Syntéza aminových derivátů.....	42
5 Arylové deriváty squaramidu.....	44
5.1 Syntéza arylových derivátů squaramidu pomocí reakční cesty A	46
5.2 Syntéza arylových derivátů squaramidu pomocí reakční cesty B	52
5.3 Syntéza arylových derivátů squaramidu pomocí reakční cesty C	55
5.4 Syntéza arylových derivátů squaramidu pomocí reakční cesty D	58
5.5 Syntéza arylových derivátů squaramidu pomocí reakční cesty E	66
6 Biologická aktivita finálních derivátů.....	75
ZÁVĚR	78
EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST.....	79
7 Obecné informace	79
8 Příprava aminových derivátů squaramidu	80
8.1 Převedení kyseliny squarové na její dimethoxy derivát	80
8.2 Reakce dimethoxy derivátu kyseliny squarové s 2-aminomethylpyridinem 80	

8.3	Substituce methoxy skupiny 2-aminobenzoxazolem	81
9	Příprava arylových derivátů squaramidu	84
9.1	Syntéza arylových derivátů squaramidu s využitím reakce Friedel-Craftsova typu (reakční cesta A).....	84
9.2	Syntéza arylových derivátů squaramidu s využitím Liebeskind-Srogl couplingu (reakční cesta E)	87
	SEZNAM ZKRATEK	94
	SEZNAM POUŽITÝCH ZDROJŮ.....	96
	PŘÍLOHY.....	107

ÚVOD

Mykobakteriální ATP syntasa je klíčovým enzymem mykobakterie, který zajišťuje tvorbu adenosin trifosfátu (ATP).¹ ATP buňce slouží jako univerzální energetické platidlo, kterým hradí některé ze svých životně důležitých procesů. Inhibicí mykobakteriální ATP synthasy je zapříčiněno to, že mykobakterium přichází o svůj primární zdroj energie. Tím je narušen celý mykobakteriální metabolismus, což ústí ve smrt patogenní buňky. Díky tomuto nekompromisnímu účinku jsou inhibitory mykobakteriální ATP synthasy velmi účinné.

Výhodou inhibitorů mykobakteriální ATP synthasy je také to, že mezi mykobakteriální a savčí ATP syntasou existuje poměrně značné množství strukturálních rozdílů.² Díky tomu je možné jejich účinek směřovat selektivně pouze na mykobakteriální enzym. Inhibitory mykobakteriální ATP synthasy tak neovlivňují procesy přirozeně probíhající v lidském organismu.

Obě zmíněné vlastnosti, tj. účinnost a selektivita, z inhibitorů mykobakteriální ATP synthasy činí velmi efektivní antituberkulotika a mykobakteriální ATP syntasu tak pasují do pozice vhodného biologického cíle.

Jedna z prvních látek vyvinutá jako inhibitor mykobakteriální ATP synthasy je bedaquiline (BDQ).³ Jedná se o vůbec první schválený inhibitor mykobakteriální ATP synthasy (FDA schválila roku 2012). Ačkoli je BDQ velice účinným antituberkulotikem, jeho aplikace s sebou přináší poměrně velké množství vedlejších účinků, jako je např. bolest hlavy a kloubů, nevolnost, poškození ledvin nebo prodloužení QT srdeční fáze.⁴ To otevírá možnosti pro optimalizaci jeho struktury, popř. syntézu strukturálně úplně nových inhibitorů mykobakteriální ATP synthasy, jejichž terapeutický efekt bude výhodnější.

Z tohoto důvodu je předložená diplomová práce zaměřena na vývoj nových inhibitorů mykobakteriální ATP synthasy založených na struktuře squaramidu. Squaramidy, někdy také nazývané jako cyklobutendiony, jsou deriváty kyseliny squarové. Jedná se o látky s poměrně širokým spektrem především biologických,⁵⁻¹⁰ ale i syntetických^{5,7,8,10-16} využití, díky čemuž se v poslední době dostaly do popředí zájmu vědců.

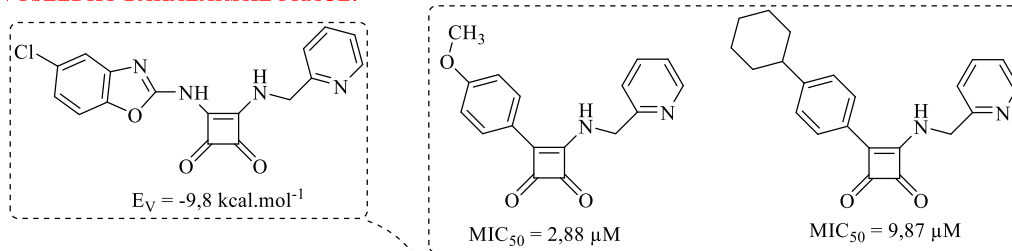
Předložená práce přímo navazuje na výsledky uvedené v mé bakalářské práci, která popisovala dvě série squarových derivátů. První z knihoven bakalářské práce obsahovala deriváty, u kterých byl squarový kruh substituován různými alifatickými, alicyklickými,

aromatickými i heterocyklickými aminy. Druhá série poté zahrnovala deriváty, u kterých byl centrální squarový skelet substituován přímo aromatickým kruhem za vzniku nové C-C vazby. Diplomová práce si obě tyto knihovny klade za cíl rozšířit.

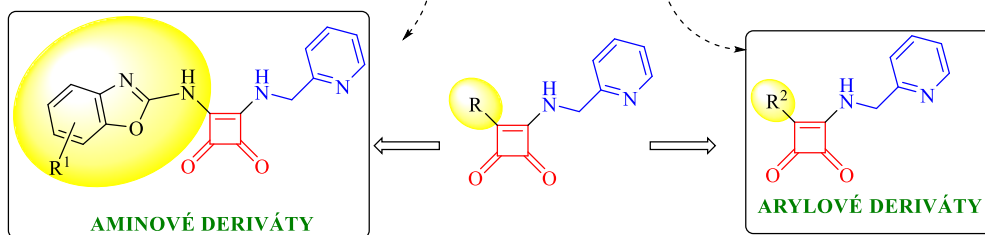
Jednou z látek zmíněných v mé bakalářské práci byl squaramid substituovaný 5-chlorobenzo[*d*]oxazol-2-aminem (Obr. 1). Tato struktura byla dokována do vazebného místa squaramidů na mykobakteriální ATP synthase s výsledkem poměrně slibné hodnoty vazebné energie, konkrétně $-9,8 \text{ kcal}\cdot\text{mol}^{-1}$. Na základě tohoto teoretického zjištění byla navržena série dalších benzoxazolových derivátů (dále uváděny jako „aminové deriváty“), která se stala předmětem výzkumu předložené diplomové práce.

Dále se bakalářská práce zabývala deriváty squaramidu modifikovanými aromatickými substituenty (dále uváděny jako „arylové deriváty“). Některé z nich vykázaly velmi slibné výsledky biologické aktivity (Obr. 1), na základě nichž byly navrženy nové squaramidy tohoto strukturálního typu, které jsou již předmětem předložené diplomové práce.

VÝSLEDKY BAKALÁŘSKÉ PRÁCE:



NAVAZUJÍCÍ TÉMA DIPLOMOVÉ PRÁCE:



Obr. 1: Navržená témata diplomové práce a jejich návaznost na práci bakalářskou.

CÍLE PRÁCE

Cílem předložené diplomové práce je návrh, syntéza a studium biologické aktivity nových derivátů squaramidu cílicích na mykobakteriální ATP syntasu. Na základě publikované SAR studie z roku 2017¹⁷ a závěru vyplývajícího z biologických testů látek připravených v bakalářské práci¹⁸ byly ve spolupráci s kolegy z Katedry fyzikální chemie PřF UP pomocí molekulového dokování navrženy nové deriváty squaramidu s vysokým potenciálem inhibovat mykobakteriální ATP syntasu. Navrženy takto byly celkem 2 série látek: aminové a arylové deriváty. Aminové deriváty oproti arylovým disponují ve své struktuře jednou rotovatelnou vazbou navíc. To jim dává větší prostorovou volnost a možnost většímu přizpůsobení se tvaru vazebného místa na mykobakteriální ATP syntase.

Práce si vedle přípravy navržených finálních derivátů jako jeden ze svých cílů klade také optimalizaci syntetického přístupu vedoucího k přípravě arylových derivátů squaramidu, popř. otevření úplně nové syntetické cesty, která bude poskytovat tento strukturální typ squarových derivátů. V bakalářské práci byla pro tyto účely využívána reakce Friedel-Craftsova typu. Ta se ale ukázala jako poměrně málo univerzální a poskytující pouze velmi malé výtěžky. Pro syntézu tohoto typu látek tedy není příliš vhodná. Předložená práce se v tomto ohledu zabývá couplingovými reakcemi, které by Friedel-Craftsov krok v reakční sekvenci mohly nahradit.

Jednotlivé dílčí cíle práce:

- Vypracování literární rešerše na dané téma.
- Návrh nových látek a syntetického postupu.
- Syntéza derivátů a optimalizace reakčních podmínek.
- Příprava série cílových sloučenin.
- Odeslání finálních derivátů na testování biologické aktivity.
- Zpracování získaných výsledků.

TEORETICKÁ ČÁST

Teoretická část předložené diplomové práce je členěna do dvou hlavních kapitol. V první je zmíněna stavba mykobakteriální ATP synthasy a přehled nejvýznamnějších publikovaných inhibitorů tohoto enzymu. Druhá kapitola je zaměřena na popis vybraných cross-couplingových reakcí, které přímo souvisí s experimentální částí diplomové práce.

1 Inhibitory mykobakteriální ATP synthasy

Tuberkulóza (TBC) je infekční onemocnění, jehož původcem je aerobní bakterie *Mycobacterium tuberculosis*. Ta obvykle napadá plíce, může však postihovat i další části těla, jako jsou např. kosti (kostní tuberkulóza)¹⁹ nebo kůže (kožní tuberkulóza).²⁰ Aktivní formou TBC onemocní zhruba 10 % infikovaných osob. Zbylá část je nakažena tzv. latentní (asymptomatickou, dormantní) formou TBC, kdy nakažený jedinec nevykazuje žádné známky nemoci.²¹ Významné narušení imunitního systému osob s latentní infekcí však může znamenat riziko vzplanutí aktivního onemocnění. Fatální důsledky na organismus má především spojení TBC s nákazou virem HIV, které je poměrně časté, především v rozvojových zemích.²² Oba patogeny si totiž vzájemně poměrně notují – virus HIV způsobuje výrazné oslabení imunitního systému organismu, což *M. tuberculosis* dává potřebný prostor pro přechod z latentní fáze do aktivní formy. Tuberkulóza je dokonce u pacientů nakažených virem HIV vůbec nejčastější příčinou úmrtí. Dle WHO je počet latentně infikovaných jedinců odhadován na 1,7 miliardy lidí, tedy zhruba čtvrtinu celosvětové populace.²³

Hlavními důvody závažnosti tohoto onemocnění není jen schopnost bakterie přežít v latentním stádiu, ale i poměrně dlouhý a složitý léčebný režim v případě aktivní formy TBC a rovněž čím dál častější rezistence *M. tuberculosis* na současná léčiva. Nejvíce se v tomto ohledu hovoří o multilékově rezistentní (MDR) a extenzivně rezistentní (XDR) formě TBC.²⁴

Současná léčba nákazy drug-rezistentními kmeny TBC se zakládá na užívání antituberkulotik v určitých kombinacích (tzv. kombinovaná terapie). Vhodná „sestava“ medikamentů se volí pomocí proporčního testu, na jehož základě je zjištěna citlivost daného kmenu mykobakterie proti určitým antituberkulotikům, která jsou pro léčbu následně v určitém poměru užitá.²⁵

Aktuálně používaná léčiva mohou zasahovat na úrovni samotné bakterie a ovlivňovat např. syntézu buněčné stěny bakterie, proteosyntézu nebo tvorbu nukleových kyselin, popř. mohou zasahovat do energetického metabolismu mykobakterie. Jedna z doposud nejúčinnějších látek proti rezistentním kmenům je tzv. bedaquiline (BDQ), působící jako inhibitor mykobakteriální ATP synthasy.²⁶

Bedaquiline a další významné publikované inhibitory mykobakteriální ATP synthasy budou rozebrány v této kapitole. Pro úplnost tématu je v krátkosti zmíněna i stavba mykobakteriální ATP synthasy. Jelikož toto téma bylo již součástí mé bakalářské práce, bude zde rozebráno pouze stručně a doplněno o nejnovější data z literatury.

1.1 Mykobakteriální ATP synthasa

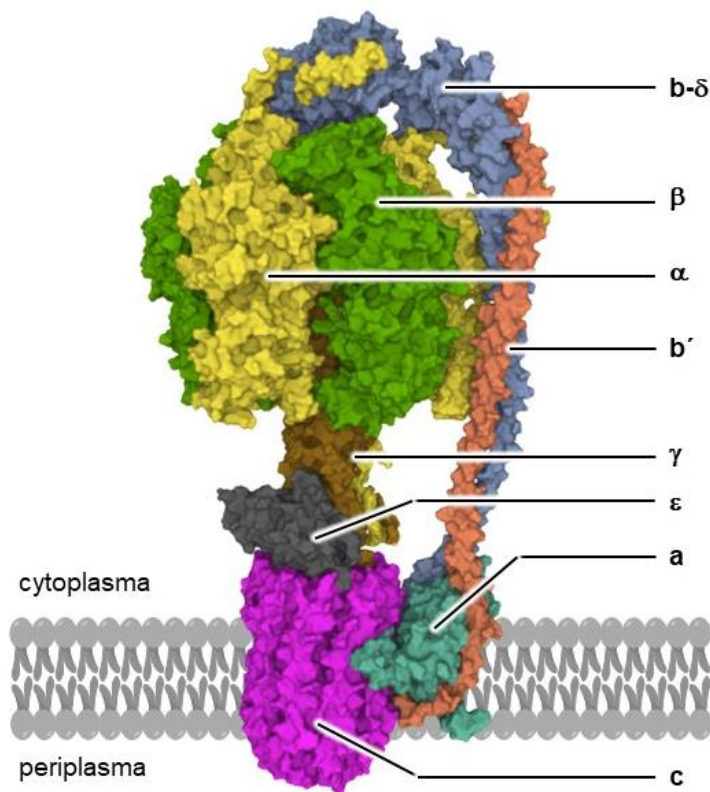
ATP synthasa je základním enzymem energetického metabolismu (mykobakteriálních) buněk.²⁷ Představuje hydrofilní průchod membránou mykobakteria, kterým je umožněn vstup protonů po směru elektrochemického gradientu. Energie uvolněná při tomto průchodu je buňkou využívána k reakci pyrofosfátu (P_i) s ADP za vzniku ATP (popř. při proudění protonů opačným směrem i pro reakci opačnou). Molekuly ATP buňce slouží jako univerzální energetické platidlo.

Jak již bylo zmíněno v úvodu, mykobakteriální ATP synthasa je dnes z pohledu medicíně chemie jedním z nejatraktivnějších molekulárních cílů.² To je zapříčiněno především dvěma faktory. Tím prvním je, že inhibice mykobakteriální ATP synthasy vede k rozvrácení energetického metabolismu mykobakteria, které ústí v jeho smrt. Jedná se tedy o velice účinný mechanismus ve smyslu eliminace patogenu. Druhý pak spočívá v tom, že lidská a mykobakteriální ATP synthasa se strukturně liší, díky čemuž se nabízí možnost selektivního působení pouze na mykobakteriální enzym. Neměly by tak být ovlivněny přirozeně probíhající procesy v lidském organismu.

Mykobakteriální ATP synthasa sestává ze dvou základních částí (Obr. 2).²⁸⁻³⁰ Jedná se o proton-translokační část F_0 skládající se z podjednotek a a c_9 a část F_1 obsahující katalytické centrum tvořené podjednotkami α_3 a β_3 . F_1 část zahrnuje i tzv. centrální stonek (tvořen podjednotkami γ a ϵ), který společně s periferním stonkem (podjednotky b' a $b-\delta$) obě F -části propojuje.

Podjednotka $b-\delta$, někdy nazývaná také jako fúzní protein, je velmi specifickým rysem mykobakteriální ATP synthasy.^{31,32} Jedná se o strukturní odlišnost mykobakteriálního enzymu oproti ATP synthasám jiných organismů, u kterých vystupují obě b podjednotky jako

rovnocenné (tvoří podjednotku b_2). Experimenty odhalily, že strukturní odlišnost obou b podjednotek umožňuje jejich určitou specializaci a ve srovnání s lidskou nebo bakteriální ATP synthasou je pro mykobakterium výhodou. Různost obou b podjednotek podle všeho totiž mykobakteriím umožňuje lepší vazbu prekurzorů ATP na $\alpha_3\beta_3$ hexamer (to zajišťuje především fúzovaná b - δ podjednotka). Volná b' podjednotka zvyšuje tuhost stonku statoru, čímž dochází k efektivnějšímu přenosu energie v rámci komplexu ATP synthasy.

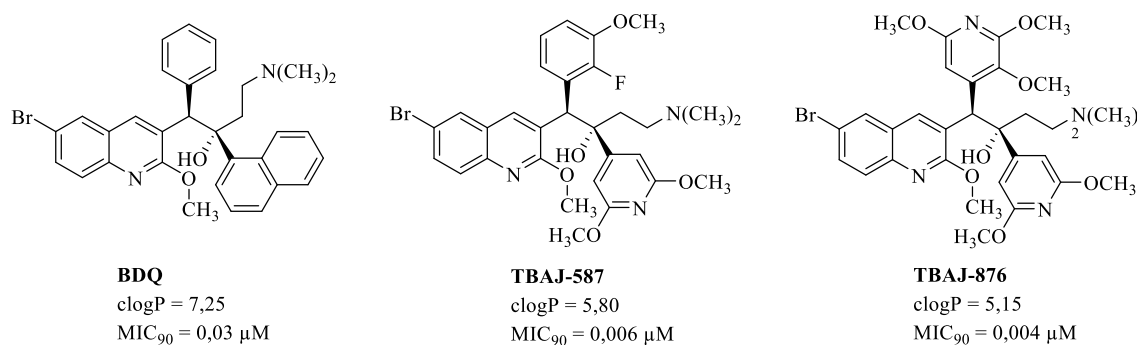


Obr. 2: Stavba mykobakteriální ATP synthasy *M. smegmatis* (obrázek vytvořen pomocí Mol*Viewer a PDB: 7NJP).

1.2 Bedaquiline a jeho analoga

Bedaquiline (BDQ) je diarylchinolinový derivát a jeden z nejvýznamnějších inhibitorů mykobakteriální ATP synthasy.³ Jedná se o aktuálně jediné schválené antituberkulotikum působící tímto mechanismem účinku.^{26,33} Ačkoli se jedná o látku velmi efektivní, jeho užívání s sebou nese řadu možných vedlejších efektů. Jako příklad můžeme zmínit nevolnost nebo bolest hlavy a kloubů, těmi nejzávažnějšími jsou poté možná dysfunkce ledvin a prodloužení QT srdeční fáze.^{4,33}

Příčinou přispívající k těmto rizikům je jeho velmi dlouhý poločas rozpadu v buňkách a jeho poměrně vysoká lipofilicita. Oba tyto faktory vedou k jeho možné akumulaci v tkáních.³⁴ Z tohoto důvodu jsou poměrně intenzivně vyvíjena jeho analoga, která by vykazovala v tomto ohledu vhodnější vlastnosti. Publikací, které se zabývají bedaquilinovými analogy, je mnoho.^{např.35–38} Jedna z nejaktuálnějších se zabývá látkami označovanými jako TBAJ-587 a TBAJ-876 (Obr. 3).³⁷ Ty jsou oproti BDQ o poznání hydrofilnější (viz clogP; Obr. 3) a dokonce účinnější (viz MIC₉₀; Obr. 3). Obě tyto látky vstoupily v roce 2020 do klinického hodnocení a v současné době jsou ve fázi I.



Obr. 3: Struktury BDQ, TBAJ-587 a TBAJ-876 a srovnání jejich clogP a MIC₉₀.³⁷

Principem mechanismu účinku bedaquilinu a jeho analog je vazba na *c* podjednotku mykobakteriální ATP synthasy, která brání průchodu protonů touto podjednotkou a tím syntéze ATP.³⁹

Vazebné místo včetně konkrétních interakcí, kterými se molekuly bedaquilinu na podjednotku *c* mykobakteriální ATP synthasy vážou, bylo zjištěno na základě kokystalizace podjednotky *c* s navázaným bedaquilinem.³⁹ Vazebné místo bylo identifikováno jako *c*₉ podjednotka rotačního prstence mykobakteriální ATP synthasy. V oblasti mykobakteriální ATP synthasy, kde došlo k vazbě bedaquilinu, byla detekována výrazně vyšší elektronová hustota a anomální výskyt atomů bromu, který ve své struktuře bedaquiline obsahuje. Bylo zjištěno, že jedna molekula BDQ pokrývá asi 135 Å² povrchu *c* podjednotky mykobakteriální ATP synthasy a vytváří zde poměrně velké množství van der Waalsových interakcí s celkem devíti aminokyselinovými zbytky (Gly⁶², Leu⁶³, Glu⁶⁵, Ala⁶⁶, Ala⁶⁷, Tyr⁶⁸, Phe⁶⁹, Ile⁷⁰ a Leu⁷²), které jsou součástí sousedních *c* podjednotek. Mimo to hydroxylová skupina BDQ vytváří vodíkovou vazbu skrze molekulu vody, která specificky interaguje s karboxylovými skupinami Glu⁶⁵. Velmi zásadní interakci poté tvoří dimethylamino skupina, která proniká přímo do místa vazby iontů podjednotky *c* mykobakteriální ATP synthasy, kde vytváří iontovou

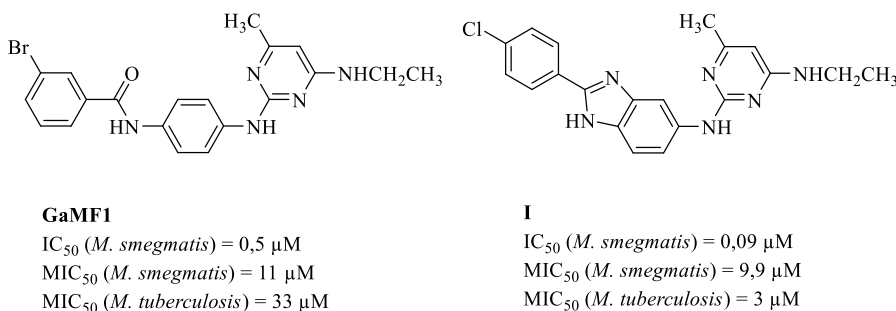
intermolekulární vodíkovou vazbu opět s Glu⁶⁵.⁴⁰ Na základě tohoto komplexního interakčního profilu bedaquilinu je jeho působení naprosto selektivní a zasahuje pouze mykobakteriální ATP synthasu, což je pro jeho použití klíčové.

Přestože užívání bedaquilinu s sebou nese mnoho vedlejších účinků, je při nákaze MDR kmeny *M. tuberculosis* v kombinaci s dalšími přípravky (např. s Moxifloxacinem, Pretomanidem, Pyrazinamidem, popř. Linezolidem) značně používán.

1.3 Nové inhibitory mykobakteriální ATP synthasy

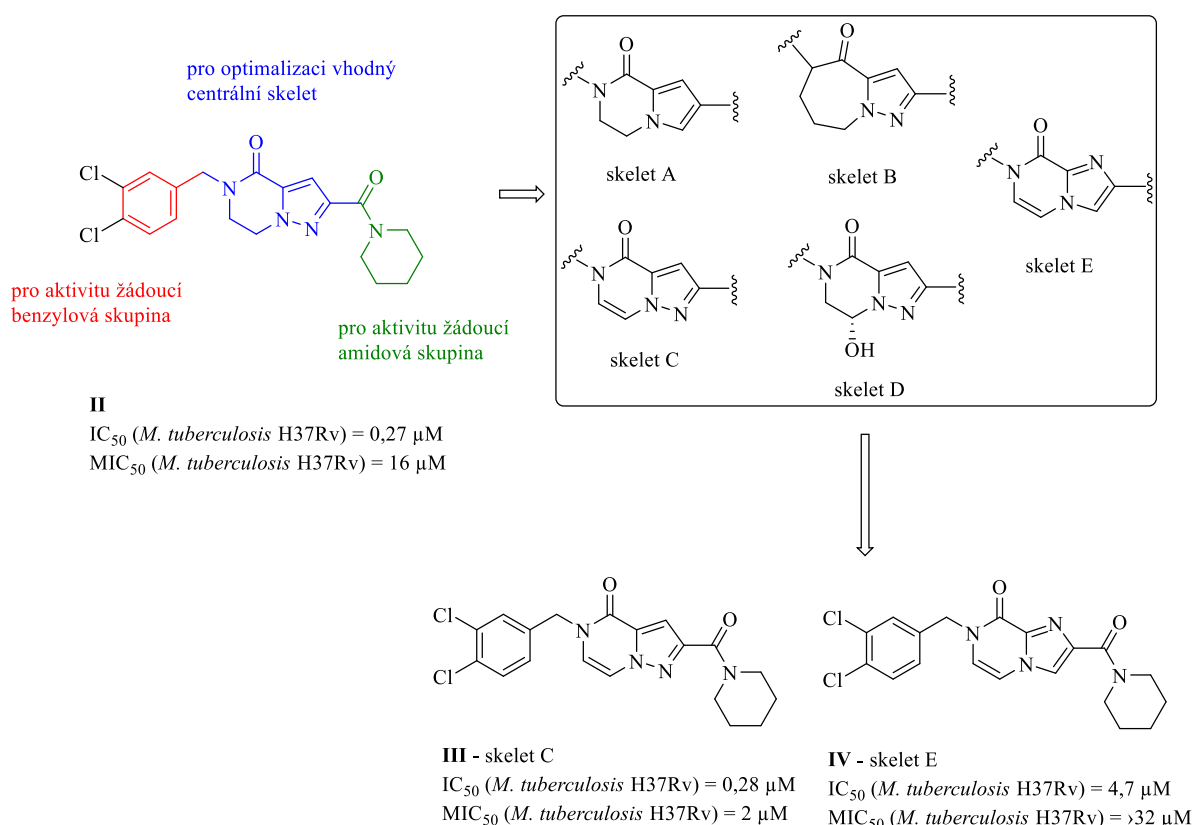
Objev BDQ a objasnění mechanismu jeho působení odstartovaly velmi intenzivní výzkum v oblasti inhibitorů mykobakteriální ATP synthasy. Ta se, jak již bylo zmíněno, jeví jako vhodný biologický cíl, protože se liší od ATP synthasy savců,⁴¹ a zároveň je naprosto zásadním proteinovým komplexem pro energetický metabolismus buňky.

Publikace autorů Hotra a kol. uvádí novou skupinu inhibitorů mykobakteriální ATP synthasy odvozených od derivátu GaMF1, který byl navržen na základě *in silico* testů (Obr. 4).⁴² Molekulárním cílem těchto látek je γ podjednotka mykobakteriální ATP synthasy, na kterou se molekula GaMF1 a od ní odvozené deriváty vážou. Vazbou na γ podjednotku mykobakteriální ATP synthasy dochází k narušení správné interakce mezi podjednotkami *a* a *c*, v důsledku čehož je inhibována syntéza ATP. Obrovským přínosem těchto látek může být to, že si zachovávají svou aktivitu i proti kmenům rezistentním na BDQ. To je způsobeno nejspíše odlišným mechanismem jejich působení oproti diarylchinolinovým derivátům, které se váží přímo na *c* podjednotku mykobakteriální ATP synthasy. Velmi pozitivní zprávou v souvislosti s těmito látkami je také to, že jejich kombinace s BDQ vedla ke zvýšení jejich hodnot IC₅₀ i MIC, aniž by došlo k jakémukoli narušení životaschopnosti a pluripotence lidských buněk. Tím se otevírá i jejich možná budoucí aplikace v kombinované terapii s BDQ. Strukturu derivátu GaMF1 a odvozené neaktivnější molekuly **I** uvádí Obrázek 4 níže.



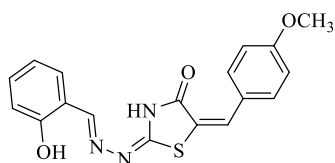
Obr. 4: Struktura látky GaMF1 a od ní odvozeného neaktivnějšího publikovaného derivátu.⁴²

Publikace z roku 2017 autorů Surase a kol. uvádí knihovnu látek odvozených od derivátu **II**, které také vykazují zajímavé hodnoty biologické aktivity jako inhibitory mykobakteriální ATP synthasy (Obr. 5).⁴³ Součástí článku je podrobná SAR studie, která poukazuje na důležitost benzylové a amidové skupiny ve struktuře **II**. Prostor pro možnou optimalizaci tedy nabízí spíše centrální skelet. Celkem publikace uvádí 5 různých alternativ centrální skeletů, pomocí kterých byla struktura modifikována. Jsou jimi 3,4-dihydropyrrolo[1,2-*a*]pyrazin-1(2*H*)-on (**skelet A**), 5,6,7,8-tetrahydro-4*H*-pyrazolo[1,5-*a*][1,4]diazepin-4-on (**skelet B**), pyrazolo[1,5-*a*]pyrazin-4(5*H*)-on (**skelet C**), 7-hydroxy-6,7-dihydropyrazolo[1,5-*a*]pyrazin-4-on (**skelet D**), imidazo[1,2-*a*]pyrazin-8(7*H*)-on (**skelet E**). Na základě biologických testů byl vyhodnocen jako nejvhodnější skelet C, možností může být také využití skeletu E, ostatní skelety vedly k výraznému snížení biologické aktivity testovaných molekul. Testované molekuly vykazovaly středně vysokou aktivitu, nicméně vzhledem k tomu, že neinhibují žádný z enzymů cytochromu P450, mohly by být dobrým výchozím bodem pro další výzkum. Optimalizaci centrálního skeletu molekul a neaktivnější deriváty uvádí Obrázek 5 níže.⁴³

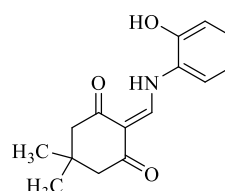


Obr. 5: Výchozí derivát **II**, optimalizace centrálního skeletu a neaktivnější struktury uváděné v publikaci Surase a kol.⁴³

Další publikací zabývající se novými inhibitory mykobakteriální ATP synthasy je článek z roku 2018.⁴⁴ Ten uvádí screeningovou studii, ze které vzešly dvě velmi zajímavé molekuly **V** a **VI** vykazující vysoké hodnoty biologické aktivity a indexu selektivity proti mykobakteriální ATP synthase (Obr. 6).⁴⁴ Jejich velkým přínosem může být to, že si svou aktivitu zachovávají i proti rezistentním kmenům, a to jak proti *M. smegmatis*, tak *M. tuberculosis*.



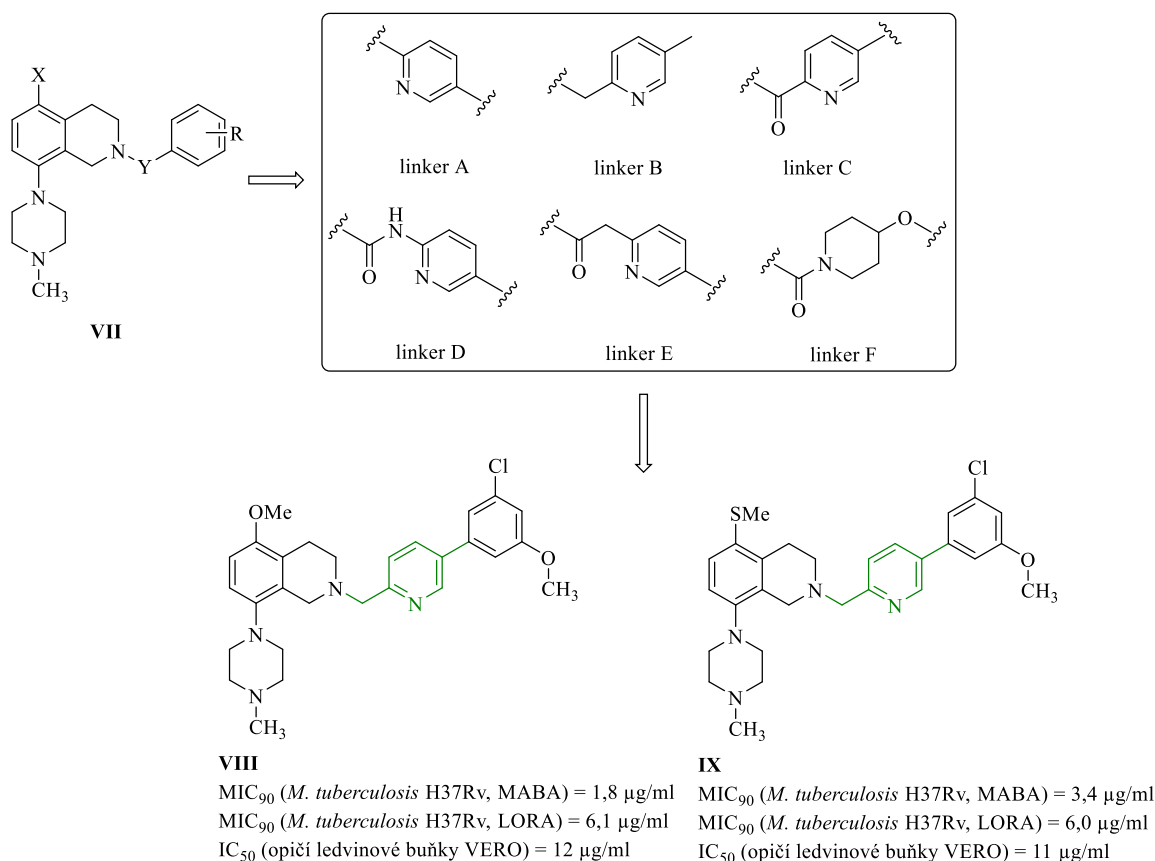
V
 IC_{50} (*M. smegmatis*) = 0,312 μ M
 MIC_{90} (*M. tuberculosis* H37Rv) = 0,5/1,0 (μ g/ml)/ μ M
 CC_{50} > 40
 safety index (savčí buněčná linie) > 80



VI
 IC_{50} (*M. smegmatis*) = 4,0 μ M
 MIC_{90} (*M. tuberculosis* H37Rv) = 2,0/7,0 (μ g/ml)/ μ M
 CC_{50} > 40
 safety index (savčí buněčná linie) > 20

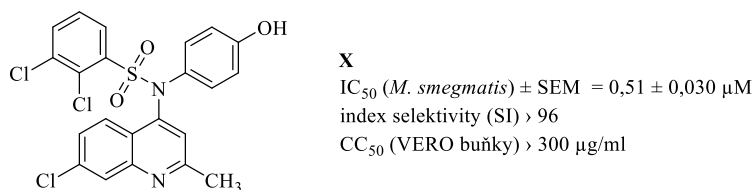
Obr. 6: Neaktivnější struktury uvedené v publikaci s parametry popisujícími jejich biologickou aktivitu.⁴⁴

Publikace z roku 2020 uvádí jako nové inhibitory mykobakteriální ATP synthasy tetrahydroisochinolinové deriváty (Obr. 7).⁴⁵ V článku je diskutována rozsáhlá SAR studie tohoto typu látek, z níž vyplývá, že substituent X sloučenin **VII** na aktivitu nemá výrazný vliv, nicméně může sloužit pro regulaci lipofilicity a rozpustnosti sloučenin; naopak pro aktivitu těchto látek je naprosto zásadní jejich linker Y. Pro vysokou biologickou aktivitu se jako vhodné ukázaly aromatické linkery bez -CO- a -CONH₂- skupin (tj. linker A a linker B). Zároveň platí, že sloučeniny obsahující ve své struktuře linker B vykazují mírně vyšší biologickou aktivitu oproti těm s linkerem A. Pravděpodobně je to díky jejich vyšší lipofilicitě. Pro substituent R sloučenin **VII** platí, že je poměrně dobře tolerován, pokud je dostatečně velký (např. Bn), malé substituenty snižují biologickou aktivitu látek. Jednotlivé sloučeniny byly testovány proti replikujícím (MABA; tj. Microplate alamar blue assay) a nereplikujícím (LORA; tj. Low-oxygen-recovery assay) se zástupcům *M. tuberculosis* H37Rv. Cytotoxicita látek byla posuzována na základě IC_{50} vůči opičím buňkám ledvin (VERO). Obecnou strukturu sloučenin, linkery užitá při SAR studii a neaktivnější deriváty včetně jejich hodnot biologických aktivit uvádí Obrázek 7 dále.



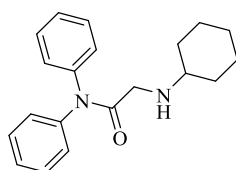
Obr. 7: Obecná struktura, linkery a neaktivnější zástupci tetrahydroisochinolinových derivátů jako inhibitorů mykobakteriální ATP synthasy uvedené v publikaci.⁴⁵

Článek z roku 2015 se zabývá syntézou a biologickou aktivitou dalších celkem 18 nových inhibitorů mykobakteriální ATP synthasy u *M. smegmatis*.⁴⁶ Jako nejlepší z testovaných molekul se jeví molekula **X**, která má vedle své zajímavé hodnoty IC₅₀ také velmi vysoký index selektivity (Obr. 8). Ten navíc *in vivo* ještě stoupá (SI > 200) a jeho *in vivo* aktivita je dvojnásobná oproti standardně užívanému antituberkulotiku ethambutolu (0,1007 µM). Potenciální výhodou látky **X** může také být její dlouhý poločas rozpadu (4,2 h) a dobrá biologická dostupnost, díky čemuž je tato struktura považována za velmi zajímavé kandidátní léčivo.



Obr. 8: Publikovaný derivát **X** se svými hodnotami biologické aktivity.⁴⁶

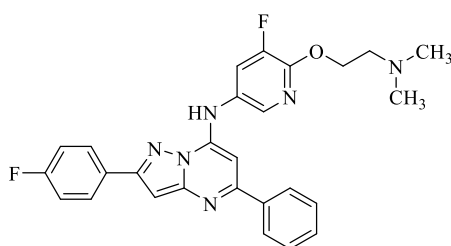
Další aktuální a velmi zajímavou skupinou inhibitorů mykobakteriální ATP synthasy jsou deriváty odvozené od fenothiazinů.⁴⁷ Jako nejaktivnější z publikované knihovny derivátů byl vyhodnocen derivát **XI** (Obr. 9), který dosahuje hodnot MIC = 6,25 µg/ml proti *M. tuberculosis* H37Rv a IC₅₀ = 10,4 µM proti vezikulám s invertovanou membránou *M. smegmatis*. Velkou výhodou této látky je její naprostá selektivita. Klíčovou interakci při jejím působení totiž sehrává Phe⁶⁹, nacházející se na rozhraní podjednotek *a* a *c* mykobakteriální ATP synthasy, který u tohoto enzymu u eukaryot chybí.



XI
 MIC (*M. tuberculosis* H37Rv) = 6,25 µg/ml
 IC₅₀ (*M. smegmatis*) = 10,4 µM

Obr. 9: Nejaktivnější derivát uvedený v publikaci a hodnoty jeho biologické aktivity.⁴⁷

Článek autorů Tantry a kol. uvádí další novou skupinu potenciálních inhibitorů mykobakteriální ATP synthasy, kterými jsou deriváty pyrazolopyrimidinů.^{17,48} Nejaktivnější látkou z připravené knihovny je struktura **XII** s hodnotou IC₅₀ = 0,5 µM a MIC = 6,2 µM proti *M. tuberculosis* H37Rv (Obr. 10). Výhodou těchto látek je to, že jsou aktivní i proti mykobakteriálním kmenům rezistentním na BDQ. Je to dáno tím, že ačkoli se vážou do podobného vazebného místa jako bedaquiline (tj. na podjednotku *c* mykobakteriální ATP synthasy), vytváří zde jiné interakce.



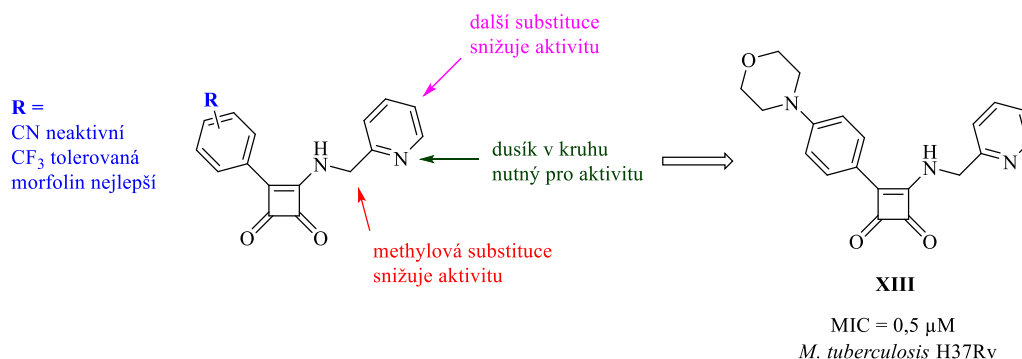
XII
 MIC (*Mtb.*H37Rv) = 6,2 µM
 IC₅₀ (*M. tuberculosis*) = 0,5 µM
 SI = 20

Obr. 10: Nejaktivnější publikovaná molekula ze skupiny pyrazolopyrimidinů.⁴⁸

Stejný tým autorů se také zabýval squaramidy s významnou antituberkulotickou aktivitou.¹⁷ Součástí publikované práce je i SAR studie (Obr. 11), ze které vyplývá, že pro biologickou

aktivitu látek je naprosto esenciální substituce squarového kruhu na jedné jeho straně pomocí 2-aminomethylpyridinu. Další substituce pyridinového kruhu dle dostupných výsledků již není nutná. Jako zásadní se pro biologickou aktivitu těchto látek jeví dusíkový heteroatom pyrimidinového kruhu, který by měl vytvářet klíčovou interakci ve vazebném místě s Arg¹⁸⁶ na podjednotce *a* mykobakteriální ATP synthasy. Druhá strana squarového cyklu nabízí možnost zavedení poměrně širokého množství potenciálně vhodných substituentů. Jako nejlepší volba se jeví substituce squarového cyklu různými arylly, které jsou podle SAR studie pro biologickou aktivitu molekul výhodnější než případné alkylové substituenty.

Jako neaktivnější struktura je v publikaci označen derivát **XIII** substituovaný 2-aminomethylpyridinem na jedné straně squarového kruhu a fenylmorfolinem na straně druhé (Obr. 11). Autoři článku jako klíčovou definují přítomnost kyslíkového atomu morfolinu, který se v dokovacím modelu pomocí vodíkové interakce přes molekulu vody váže na Phe⁶⁹, nacházející se na rozhraní podjednotek *a* a *c* mykobakteriální ATP synthasy. Interakce pyridinového kruhu v aktivním místě byly popsány již výše. Tak dojde k „vmezeření“ molekuly mezi obě funkční podjednotky mykobakteriální ATP synthasy a blokaci syntézy adenosintrifosfátu.



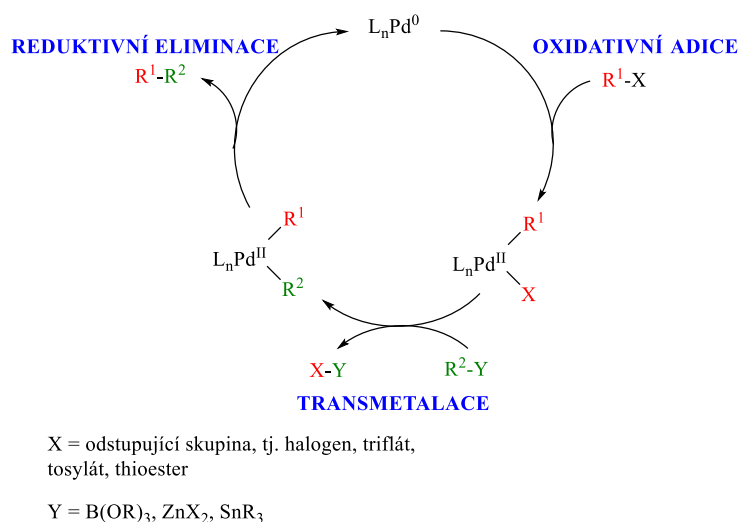
Obr. 11: Výsledky SAR studie a struktura neaktivnějšího derivátu uvedené v publikaci.¹⁷

2 Cross couplingové reakce na squaramidech

Jako cross-couplingové reakce označujeme kovem katalyzované organické reakce, u kterých dochází ke spojení dvou fragmentů (organických molekul), obvykle vazbou uhlík-uhlík.⁴⁹ Jedná se o velice významnou skupinu reakcí, jejich důležitost v dnešní chemii dokládá fakt, že v roce 2010 byla za rozvoj tohoto chemického odvětví udělena Nobelova cena za chemii. Jejými držiteli se stali Richard F. Heck, Ei-ichi Negishi a Akira Suzuki.⁵⁰

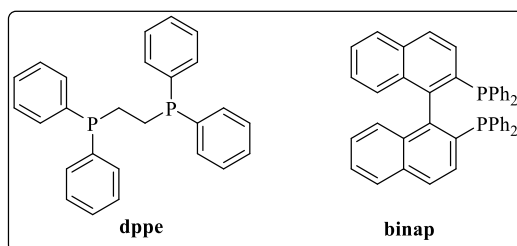
Vybrané cross-couplingové reakce byly studovány jako součást teoretické části této práce za účelem otevření nové univerzální syntetické cesty, která by vedla k přípravě arylových derivátů squaramidu. Níže v práci jsou rozebrány celkem 4 typy couplingových reakcí. Každý z couplingů je nejprve představen obecně, poté je diskutována jeho průmyslová uplatnitelnost a na závěr je rozebírána jeho aplikace na squaramidech (s výjimkou Negishi couplingu, u nějž nejsou dostupné žádné publikace, které by se touto tematikou zabývaly).

Všechny ze zmíněných couplingových reakcí za katalýzy palladnatými sloučeninami dodržují stejný katalytický cyklus (Obr. 12).⁵¹⁻⁵⁴ Prvním krokem je oxidativní adice, při které se Pd⁰ aduje na elektrofilní reakční komponentu. Vzniklá organopalladnatá sloučenina (Pd^{II}) dále podstupuje transmetalaci reakci s druhou z reagovaných molekul (tj. organoboronová, organozinečnatá nebo organocínatá sloučenina). Transmetalovaný meziproduct (Pd^{II}) dokončuje katalytický cyklus fází nazývanou jako reduktivní eliminace, při které vzniká konečný produkt reakce a obnovuje se katalyticky aktivní Pd⁰.



Obr. 12: Katalytický cyklus couplingových reakcí zmíněných v teoretické části práce za katalýzy Pd⁰.⁵¹⁻⁵⁴

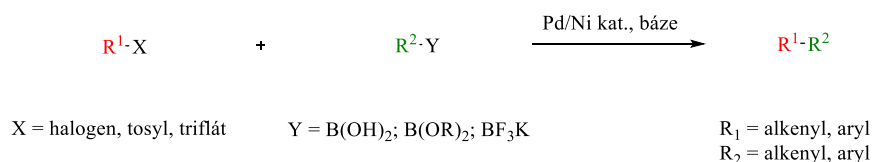
Aktivita katalytického systému je velmi výrazně ovlivněna ligandem. Mezi ty nejčastěji užívané patří PPh₃, popř. pak i P(tolyl)₃, P(*t*Bu)₃.⁵⁵ U některých reakcí lze využít i bidentálních ligandů ve formě difosfinů, např. 1,2-bis(difenylfosfanyl)ethan známý pod zkratkou dppe nebo 2,2'-bis(difenylfosfanyl)binaftalen známý jako binap (Obr. 13).⁵⁶ Někdy se jako ligandy využívají i dusíkaté heterocykly. Velmi neobvyklé, avšak u některých reakcí možné, je použití tzv. bezligandových katalyzátorů (tj. Pd/C nebo Ni/C).⁵⁷



Obr. 13: Struktury vybraných difosfinových ligandů užívaných především pro Suzuki-Miyaura coupling.

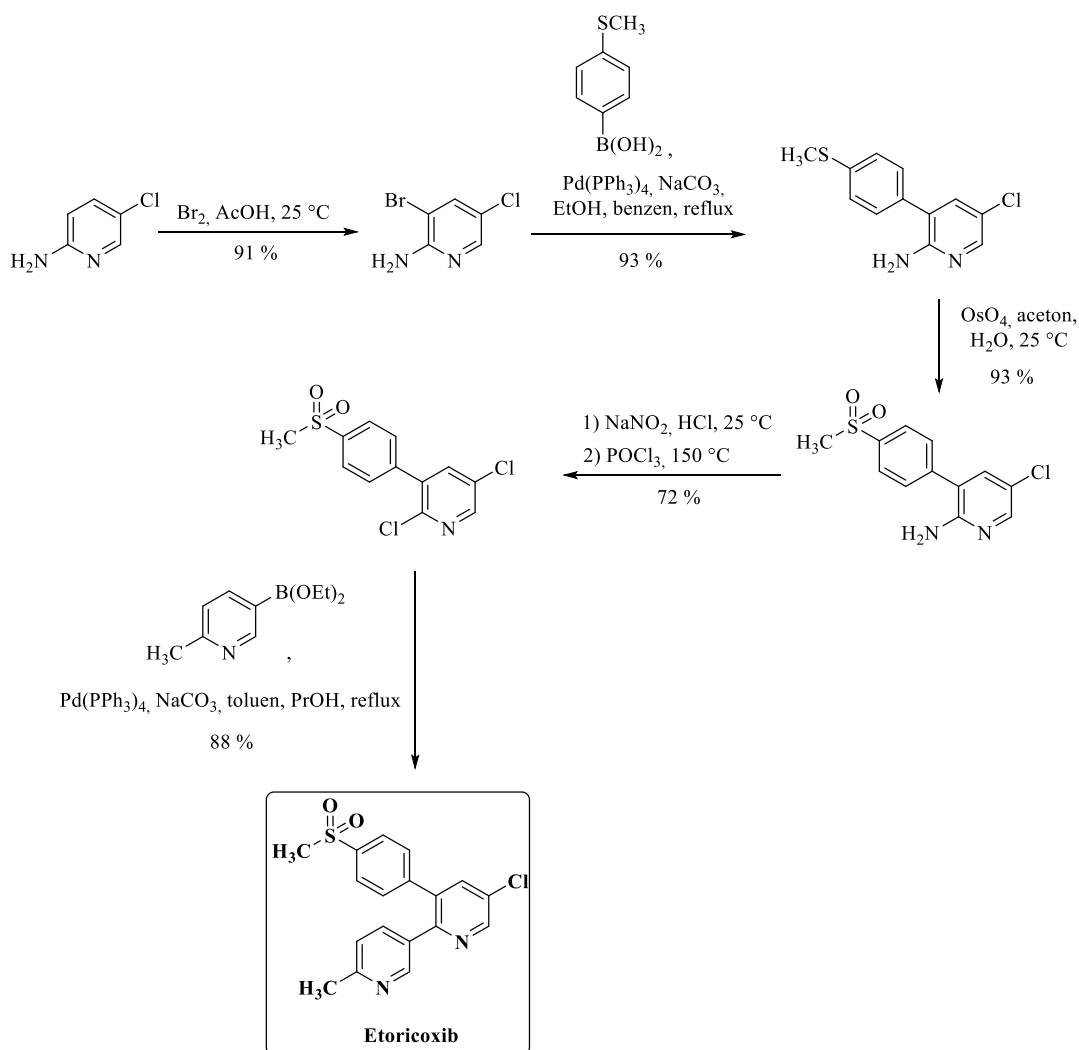
2.1 Suzuki-Miyaura coupling

Suzuki-Miyaura coupling je jednou ze základních couplingových organických reakcí, jejímiž reakčními komponentami jsou sloučeniny boru (boronová kyselina či její estery⁵⁸ nebo organotrifluoroborátové soli⁵⁹), halogen derivát (mimo halogenů lze využívat i jiných skupin jako jsou např. trifláty⁶⁰ nebo tosyláty⁶¹) a potřebný katalyzátor (Obr. 14). Jako prekatalyzátory reakce se obvykle používají sloučeniny palladia (typicky např. Pd(PPh₃)₄, Pd(PPh₃)₂Cl₂, PdCl₂ atd.), které v reakci poskytují potřebné katalyticky aktivní Pd⁰.^{62–64} Alternativou k užití palladnatého prekatalyzátoru jsou deriváty niklu (např. NiCl₂, Ni(PPh₃)₂Br₂).^{65,66}



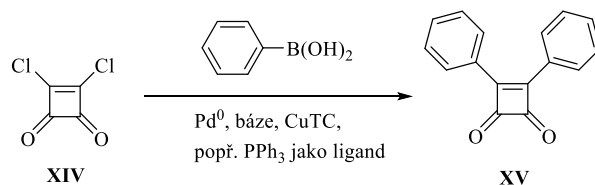
Obr. 14: Obecné schéma Suzuki-Miyaura couplingu.⁶²

Suzukiho reakce je aplikovatelná nejen laboratorně, ale i průmyslově. Příkladem průmyslového uplatnění Suzuki couplingu je příprava farmaceutického produktu Etoricoxibu (Obr. 15).⁶⁷ Etoricoxib je látkou působící jako selektivní COX-2 inhibitor.⁶⁸ Látka se využívá jako analgetikum, popř. pro léčbu různých typů artritidy.



Obr. 15: Syntéza Etoricoxibu.⁶⁷

Co se týče Suzuki-Miyaura couplingu ve spojení s deriváty kyseliny squarové, nebylo toto téma prozatím předmětem velkého zájmu. Dostupná je pouze jedna publikace, která se touto problematikou zabývá.⁶⁹ Ta navíc neposkytuje žádné pozitivní výsledky a obsahuje jen velmi malou škálu optimalizací. Suzuki-Miyaura coupling v článku je prováděn pomocí fenyloboronové kyseliny a dichlor derivátu kyseliny squarové **XIV** za přídavku Pd-katalyzátoru, báze, popř. ligandu a CuTC (Obr. 16). Fenyloboronová kyselina byla do reakce nasazována vždy v množství 0,5 mmol, násady ostatních reakčních komponent pro jednotlivé reakce uvádí Tabulka 1 dále. Celkem publikace uvádí tři pokusy o optimalizaci Suzukiho reakce, všechny s nulovým výtěžkem.



Obr. 16: Uspořádání publikované reakce Suzuki couplingu pomocí dichloridu kyseliny squarové **XIV** a fenyloboronové kyseliny.⁶⁹

Tab. 1: Suzuki-Miyaura coupling dichlor derivátu kyseliny squarové **XIV** s fenyloboronovou kyselinou.⁶⁹

opt. č.	XIV [ekv.] ^a	[Pd ^{II}] [mol%] ^b	ligand [mol%] ^b	báze [ekv.] ^a	CuTC [ekv.] ^a	t [°C]	rozp.
1	2,5	Pd(OAc) ₂ ; 1,0	-	Na ₂ CO ₃ ; 3,4	-	60	H ₂ O/PEG (1:1)
2	2,4	PdCl ₂ (PPh ₃) ₂ ; 2,0	-	K ₃ PO ₄ . nH ₂ O; 6,0	-	110	toluen
3	4,0	Pd(dba) ₂ ; 5,0	PPh ₃ ; 10		1,0	RT	Et ₂ O

^apočet ekvivalentů reakční komponenty vůči výchozí boronové kyselině

^bpočet molárních procent prekatalyzátoru/ligandu vůči výchozí boronové kyselině

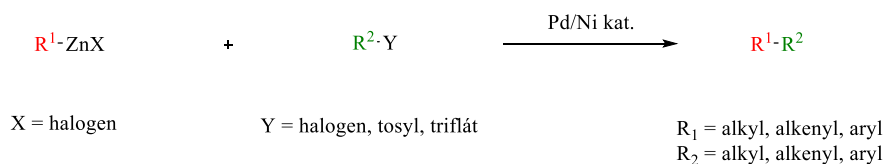
Na základě ¹H NMR surové reakční směsi bylo zjištěno, že pokud je součástí reakční směsi voda (optimalizace č. 1; Tab. 1), dochází k okamžité hydrolyze dichloridu kyseliny squarové **XIV**, díky čemuž reakce neproběhne. Při užití bezvodých podmínek dochází k velmi podobnému jevu, nicméně tentokrát je ztráta výchozí reakční komponenty **XIV** způsobena její blíže nespecifikovanou dekompozicí (optimalizace č. 2 a 3; Tab. 1).

Ačkoli Suzuki-Miyaura coupling na cyklobutendionech nebyl doposud úspěšně proveden, mohla by tato reakce na derivátech kyseliny squarové být určitým příslibem do budoucna. Úspěšnou realizací reakce by byla umožněna syntéza nejrůzněji substituovaných cyklobutendionových kruhů.

2.2 Negishi coupling

Negishi coupling je vedle Suzuki couplingu další z velmi rozšířených cross-couplingových reakcí. Probíhá mezi organozinečnatými sloučeninami a halogen deriváty (Obr. 17).⁷⁰ Stejně

jako tomu bylo u Suzuki couplingu (viz kap. 2.1) i zde lze mimo halogenovaných sloučenin využít jako jednu z reakčních komponent trifláty nebo tosylované deriváty. Jako katalytické komponenty se opět využívají nejčastěji sloučeniny Pd, popř. i Ni, které byly zmíněné v předchozí kapitole, tj. např. Pd(PPh₃)₄, Pd(PPh₃)₂Cl₂, PdCl₂, resp. NiCl₂, Ni(PPh₃)₂Br₂.

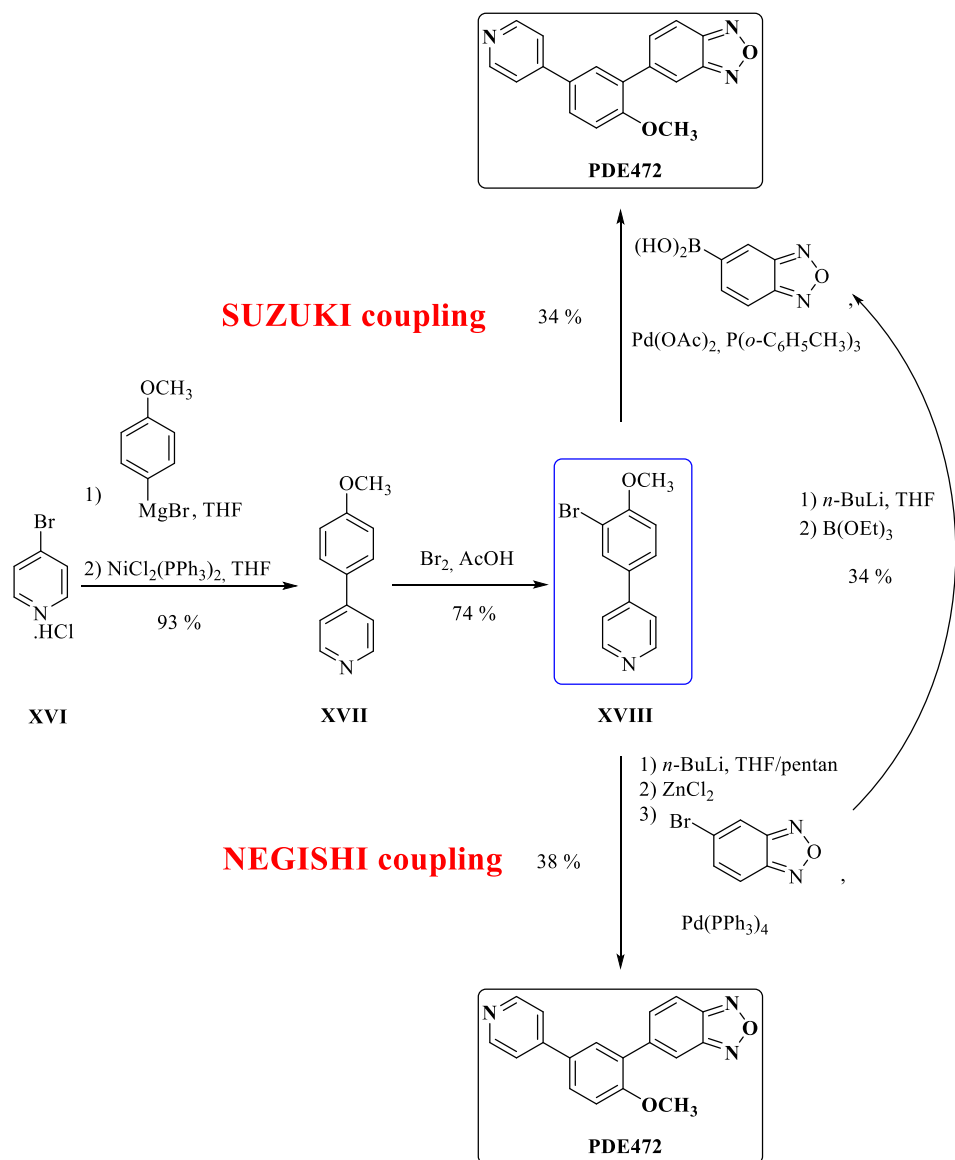


Obr. 17: Obecné schéma Negishi couplingu.⁷¹

Výhodou Negishi couplingu je poměrně vysoká reaktivita organozinečnatých sloučenin, díky čemuž Negishi coupling často nachází uplatnění tam, kde Suzuki coupling selhává. Lze jej využít pro couplingové reakce alkylů, alkenylů i arylových derivátů.⁷¹ Naopak nevýhodou této reakce je nutnost striktně aprotického prostředí, které je Suzukiho reakcí velmi dobře tolerováno, naopak Suzukiho reakce jsou často prováděny i ve vodných směsích.^{72,73} Proto jsou u Negishiho couplingu kladeny daleko větší nároky na bezvodé a inertní reakční podmínky, než je tomu třeba právě u Suzuki couplingu.

Organozinečnaté sloučeniny se obvykle připravují transmetalací pomocí bezvodého roztoku ZnCl₂ (např. v THF) a jiné organokovové sloučeniny, která je schopna podstoupit transmetalaci. Pro tento účel se dají využít Grignardova činidla, popř. i organolithné sloučeniny, které jsou reaktivnější. Organozinečnatou sloučeninu lze však získat i pomocí alkyhalogenidů (nejčastěji bromidů) reakcí přímo se Zn⁰.⁷⁴ Pro tyto účely se nejčastěji používá aktivovaný Riekeho zinek.⁷⁵

Vysoké nároky Negishiho couplingu na aprotické podmínky tuto reakci do jisté míry znevýhodňují oproti Suzuki reakci v rozsahu jeho užití v průmyslu. Přesto jeho průmyslovou aplikaci můžeme najít hned u několika farmaceutických přípravků. Jako příklad lze zmínit přípravu látky s názvem PDE472 (Obr. 18). Tato látka je patentovaná firmou Novartis a je určena pro léčbu astmatu.⁷⁶ Zajímavostí je, že původně byla pro klíčovou formaci C-C vazby v reakční sekvenci užívána Suzukiho reakce. Ta byla až na základě optimalizačních postupů nahrazena Negishiho couplingem. Hlavním důvodem změny couplingové reakce v reakčním sledu byl výtěžek, který v tomto případě Negishi coupling poskytuje vyšší.^{76,77}



Obr. 18: Syntéza farmaceutického přípravku PDE472.⁷⁶

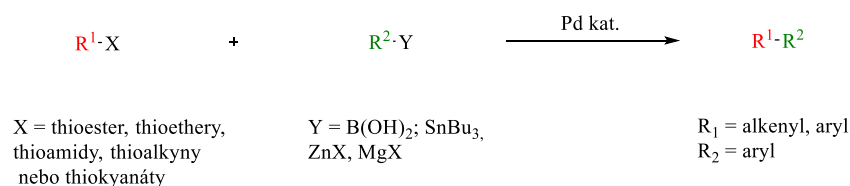
Negishi coupling ve spojení se squaramidy doposud nebyl publikován, v tomto ohledu tedy nejsou k dispozici žádné experimentální výsledky. Nicméně na základě substrátové všestrannosti tohoto couplingu lze soudit, že by tato reakce mohla být vhodnou volbou pro zavedení aromatického substituentu na squarový kruh. To je hlavním důvodem, proč je Negishi coupling tématem této práce.

2.3 Liebeskind-Srogl coupling

Liebeskind-Srogl coupling je couplingovou reakcí, která se uplatňuje mezi thioestery a boronovými kyselinami (Obr. 19).⁷⁸ Reakce nese jméno po svých objevitelích – profesoru

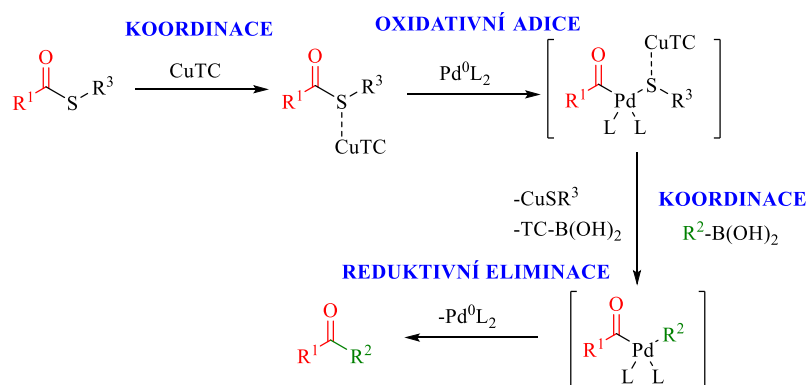
Lanny S. Liebeskindovi z Emory University v Atlantě a Ing. Jiřím Šroglovi z Akademie věd ČR.

Dnes jsou již dostupné publikace, které uvádí, že místo thioesterů lze jako elektrofilní složku pro reakci použít i thioethery, thioamidy, thioalkyny nebo thiokyanáty.⁷⁹ I boronová kyselina může být nahrazena, a to organocínatými, organozinečnatými nebo Grignardovými sloučeninami.⁷⁹ Možná je aplikace i organokovových sloučenin india nebo křemíku.



Obr. 19: Obecné schéma Liebeskind-Srogl couplingu.⁷⁸

Aktuálně jsou známy již celkem 3 generace této reakce. Každá z nich se liší ve svém reakčním uspořádání a katalytickém sledu (Obr. 20-22). Reakční uspořádání první generace obsahuje jako součást reakční směsi katalytické množství Pd-katalyzátoru a CuTC (Obr. 20). Nutností je reakci provádět bez přístupu vzduchu a s nadbytkem boronové kyseliny.⁷⁸ Jedná se o původní uspořádání Liebeskind-Srogl couplingu.



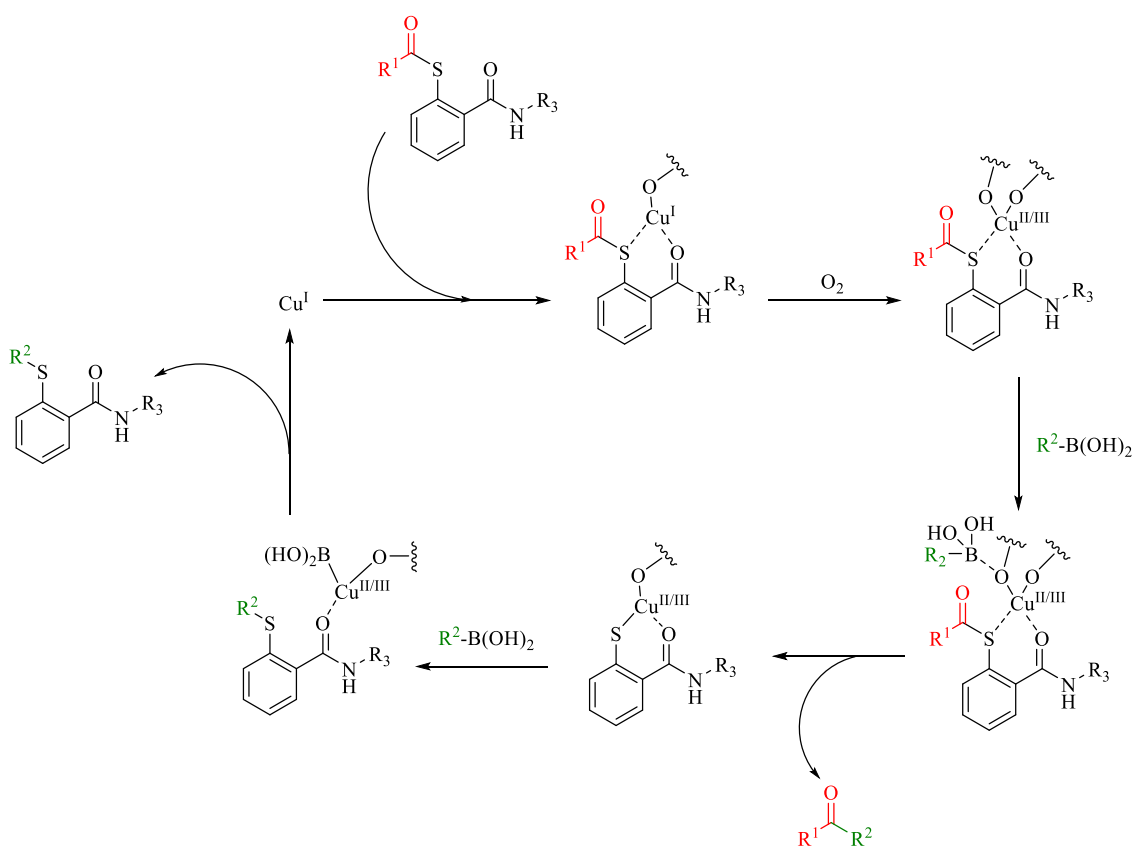
Obr. 20: Katalytický sled první generace Liebeskind-Srogl couplingu.⁷⁸

Pro druhou generaci této reakce je charakteristické užití katalytického množství sloučeniny mědi místo Pd-katalyzátoru (Obr. 21). Reakce se podle druhé generace provádí za přístupu vzduchu, jedná se o tzv. aerobní cross-coupling.⁸⁰ Žádoucí je stejně jako u první generace nadbytek přidávané boronové kyseliny. Ten je potřebný, protože se při reakci mj. podílí na regeneraci Cu-katalyzátoru.⁷⁹ Na základě experimentů bylo navrženo, že k aerobnímu cross-

couplingu thioesteru a boronové kyseliny dochází prostřednictvím vznikajícího $\text{Cu}^{\text{II/III}}$ komplexu.

V první fázi navrženého mechanismu se měďný katalyzátor koordinuje na thioester s jeho následnou aerobní oxidací. Tím dochází ke vzniku zmiňovaného $\text{Cu}^{\text{II/III}}$ komplexu. Ten zajišťuje nejen aktivaci thioesteru, ale zároveň se podílí i na přístupu boronové sloučeniny. Obě komponenty spolu na základě toho podstupují cross-couplingovou reakci za vzniku ketonu. Katalytický cyklus je poté dokončen reakcí $\text{Cu}^{\text{II/III}}$ komplexu s druhým ekvivalentem sloučeniny boru, který regeneruje měďný katalyzátor.

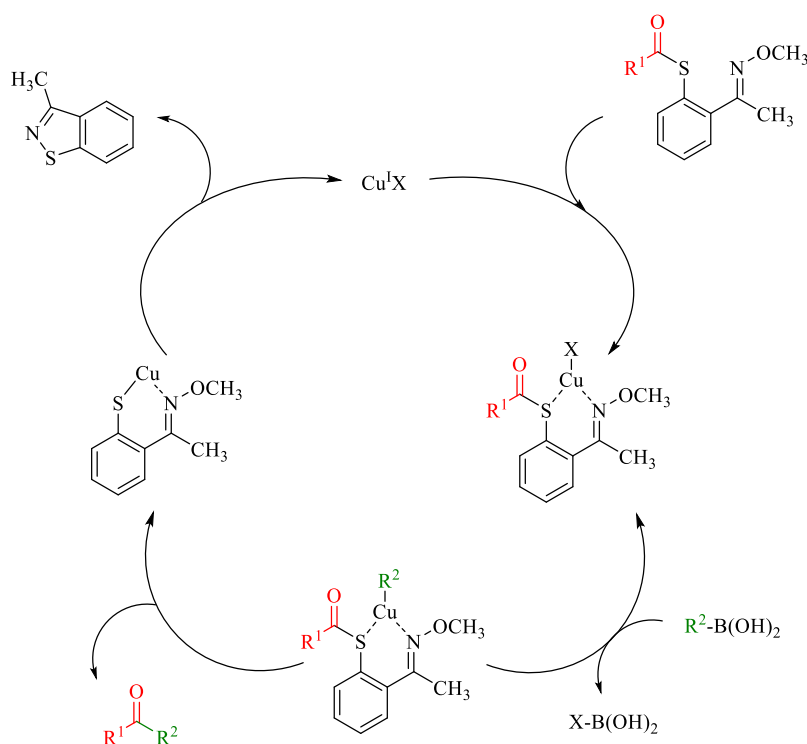
Přestože katalýza reakce probíhá pomocí Cu^{I} iontů, jako klíčové se při kontrolních experimentech ukázalo použití Cu^{II} prekatalyzátoru, který nese kyslíkatý protiiont, např. karboxylát.⁸⁰ Při užití měďnatých halogenidů jako prekatalyzátorů reakce neprobíhá. Význam kyslíkatého protiiontu spočívá v *in situ* redukci Cu^{II} prekatalyzátoru na katalyticky aktivní Cu^{I} pomocí organoboronové sloučeniny. Zatímco v přítomnosti kyslíkatého protiiontu tento proces probíhá velmi snadno, s halogenidovými protiionty nikoli.



Obr. 21: Katalytický sled druhé generace Liebeskind-Srogl couplingu.⁸⁰

Nadbytek boronové kyseliny není nutný až při uspořádání podle třetí generace (Obr. 22).^{79,81} Ta totiž pro svůj katalytický cyklus využívá specifických thioesterů (thioester-oximů), které jsou schopny samovolně vyvazovat měď zainkorporovanou do své struktury. Díky tomu je udržena životaschopnost katalyzátoru a nemusí pro tento účel být „obětována“ část násady boronové kyseliny. Reakce dle uspořádání třetí generace opět mohou probíhat i za přístupu vzduchu.

Předpokládá se, že katalytický cyklus začíná koordinací Cu^{I} na thioester-oxim.⁸¹ Následuje transmetalace organoboronové (popř. i organocínaté) sloučeniny. Na základě elektrofilní aktivace thioesteru a navázání transmetalované komponenty na koordinovaný iont mědi probíhá cross-couplingová reakce za vzniku ketonu. Katalytický cyklus je zakončen samovolnou regenerací Cu^{I} katalyzátoru a vzniku benzoisothiazolu.

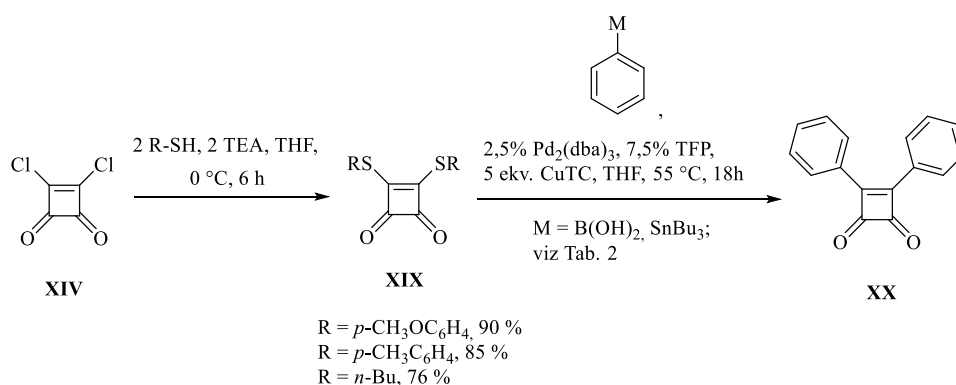


Obr. 22: Katalytický cyklus třetí generace Liebeskind-Srogl couplingu.⁸¹

Průmyslově není Liebeskind-Srogl coupling příliš využíván. Jeho praktická aplikace je známa pouze u totálních syntéz některých látek, jako je např. Goniandomin A⁸² (polyether izolovaný z obrněnek) nebo Viridin⁸³ (furanosteroid izolovaný z houby *Gliocladium virens*).

Aplikace Liebeskind-Srogl couplingu na deriváty kyseliny squarové je již publikovaným tématem. Zabývá se jím např. článek z roku 2007, který nastiňuje vhodnou substituci thioesteru pro Liebeskind-Srogl coupling (Obr. 23).⁸⁴ V článku nejprve dichlor

derivát kyseliny squarové **XIV** podstupuje reakci s dvěma ekvivalenty thiolu za přídavku triethylaminu (TEA) v THF. Výsledkem reakce je pseudodithioester kyseliny squarové **XIX**, který poté podléhá reakci buď s boronovou kyselinou, nebo organocínatou sloučeninou za katalýzy $\text{Pd}_2(\text{dba})_3$ a přídavku CuTC opět v THF. Produktem reakce je bisarylcyklobutendion **XX**. Výtěžky reakcí a přehled reaktantů uvádí Tabulka 2 níže.

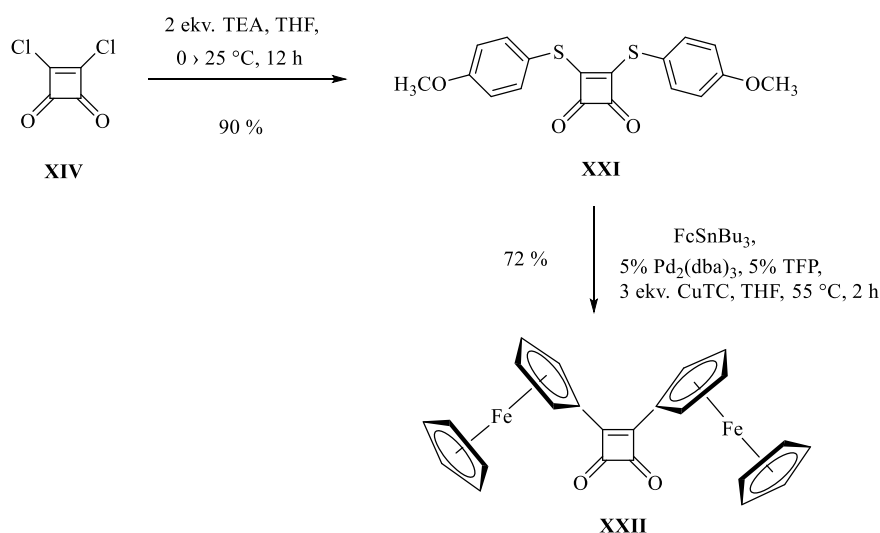


Obr. 23: Liebeskind-Srogl coupling cyklobutendionových derivátů.⁸⁴

Tab. 2: Konkrétní přehled reaktantů a výtěžků při Liebeskind-Sroglově couplingu.⁸⁴

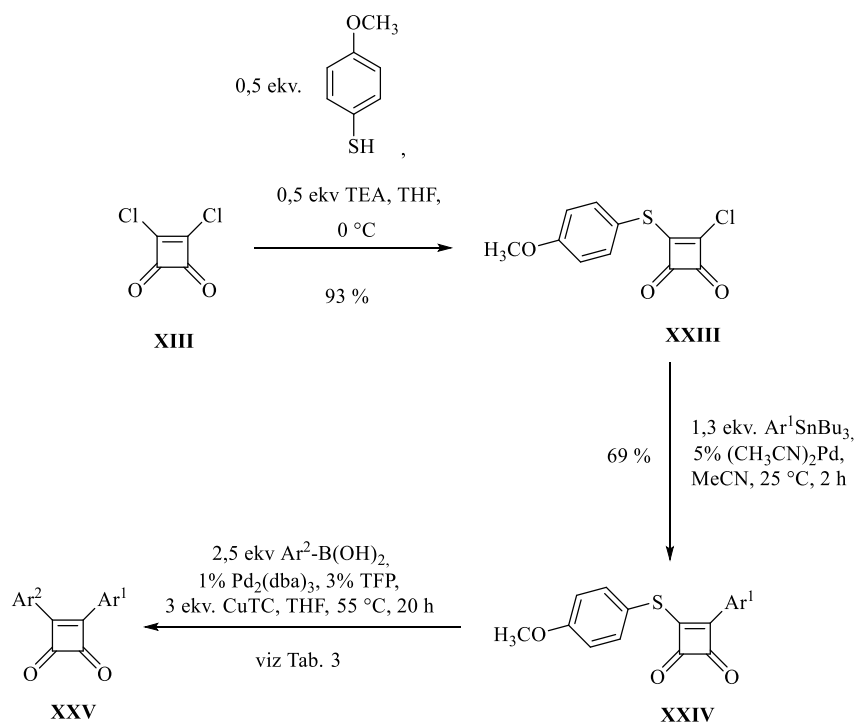
reakce č.	M	R	výtěžek [%]
1	$\text{B}(\text{OH})_2$	$p\text{-CH}_3\text{OC}_6\text{H}_4$	70
2	$\text{B}(\text{OH})_2$	$p\text{-CH}_3\text{C}_6\text{H}_4$	62
3	$\text{B}(\text{OH})_2$	$n\text{-Bu}$	stopové množství
4	SnBu_3	$p\text{-CH}_3\text{OC}_6\text{H}_4$	61
5	SnBu_3	$p\text{-CH}_3\text{C}_6\text{H}_4$	51
6	SnBu_3	$n\text{-Bu}$	stopové množství

Velmi podobný reakční postup je uveden i v publikaci z roku 2004, kde byl pomocí Liebeskind-Srogl couplingu syntetizován squarylferrocen (Obr. 24).⁸⁵ Prvním krokem je opět konverze dichlor derivátu kyseliny squarové **XIV** na pseudodithioester **XXI**, který následně podstupuje couplingový reakční krok s ferrocenyltributylstannanem za vzniku finálního squarylferrocenu **XXII**.



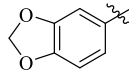
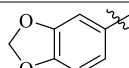
Obr. 24: Syntéza bisferrocenylcyclobutendionu pomocí Liebeskind-Srogl couplingu.⁸⁵

Velmi zajímavý postup je poté uveden v publikaci stejných autorů z roku 2007 (Obr. 25).⁸⁶ Tématem publikace je kombinace Liebeskind-Sroglůva a Stilleho couplingu. Užitím dvou různých couplingových reakcí můžeme docílit selektivní substituce jedné a druhé strany squarového kruhu. V publikaci je nejprve dichlor derivát kyseliny squarové **XIV** ponechán reakci s *p*-methoxythiofenolem, nicméně za takových podmínek, že výsledkem reakce je pouze monosubstituovaný derivát **XXIII**. Tím je narušena symetrie cyclobutendionového kruhu, na kterém jsou nyní dvě reakční centra schopna podstupovat selektivně Liebeskind-Srogl nebo Stilleho coupling. Oba couplingy jsou postupně realizovány za vzniku různými arylly substituovaného squarového derivátu **XXV**. Schéma reakce je znázorněno níže na Obrázku 25, kompletní přehled substituentů s výtěžky finálních derivátů poté shrnuje Tabulka 3 dále.



Obr. 25: Syntéza různými aryls substituovaného cyklobutendionového kruhu pomocí Liebeskind-Srogl a Stilleho couplingu.⁸⁶

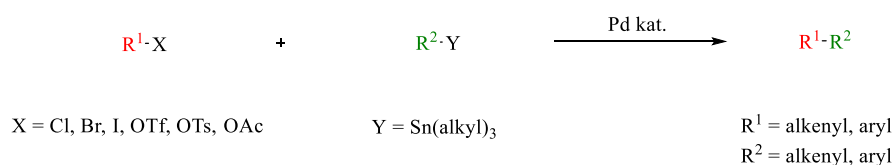
Tab. 3: Přehled aromatických substituentů navázaných na cyklobutendionový kruh pomocí Stilleho a Liebeskind-Srogl couplingu s uvedeným výtěžkem finální struktury.⁸⁶

reakce č.	Ar ¹	Ar ²	výtěžek [%]
1	<i>p</i> -CH ₃ OC ₆ H ₄ -	<i>p</i> -CH ₂ =CHC ₆ H ₄ -	74
2	<i>p</i> -CH ₃ OC ₆ H ₄ -	<i>p</i> -(CH ₃) ₂ NC ₆ H ₄ -	44
3	<i>p</i> -CH ₃ C ₆ H ₄ -	6-methoxy-2-naftyl-	50
4	<i>p</i> -CH ₃ C ₆ H ₄ -	3,4-dimethoxyfenyl-	58
5	<i>p</i> -ClC ₆ H ₄ -	4-formylfenyl-	76
6	<i>p</i> -ClC ₆ H ₄ -	4-bromofenyl-	47
7		3-thienyl-	56
8		2-furyl-	90

2.4 Stilleho coupling

Stilleho coupling je další z velmi široce užívaných cross-couplingových reakcí. Reakčními komponentami jsou v tomto případě organocínatá sloučenina a organická sloučenina obsahující halogen, popř. opět triflát, tosylát nebo i acetyl apod. (Obr. 26).^{87,88} Reakce je vhodná zejména pro cross-couplingy aryl a alkenylstannanů s aryl či alkenylhalogenidy. Nevýhoda Stilleho reakce spočívá v toxicitě stannanů a sterické náročnosti substituentů na cínu.

Katalyzátory u Stilleho couplingu nejčastěji bývají sloučeniny Pd. Do reakce se však ještě někdy jako kokatalyzátor přidává CuI,^{89,90} popř. LiCl.^{87,91} Jak jodid měďný, tak chlorid lithný za určitých podmínek výrazně zvyšují výtěžky Stilleho reakce a obvykle také zkracují reakční čas.



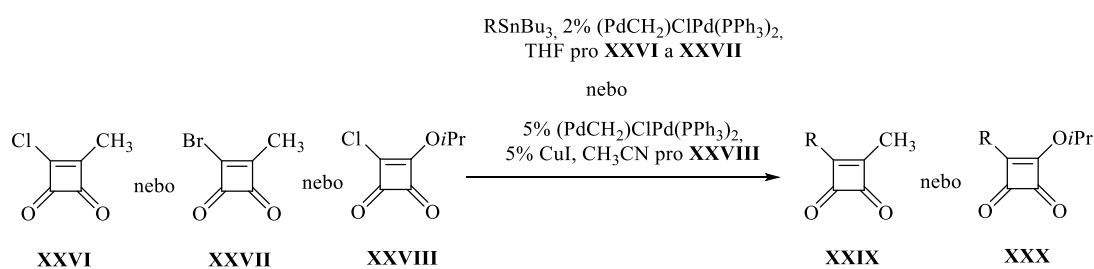
Obr. 26: Obecné schéma Stilleho couplingu.⁸⁸

Průmyslové využití Stilleho reakce je velmi omezené vzhledem k toxicitě organostannanů. Přesto průmyslovou aplikaci této reakce můžeme najít u syntézy různých polymerů,^{92,93} nebo v reakčních sekvencích totálních syntéz některých přírodních látek, např. Ircinalu A⁹⁴ (alkaloid izolovaný z *Haliclony*) nebo některých oxazolomycinů⁹⁵ (látky produkované *Streptomycetami*).

Publikací, které se v minulosti zabývaly možnostmi využití Stilleho couplingu na cyklobutendionech není mnoho. Navzdory tomu tato reakce byla se squarovými deriváty úspěšně realizována. Jeden z článků, které možnost substituce squarového kruhu aromátem pomocí Stilleho couplingu publikují, byl zmíněn už výše,⁸⁶ další jsou uvedeny dále.

První článek zabývající se možnostmi zavedení aromátu na squarový skelet pomocí Stilleho couplingu je z roku 1990 (Obr. 27).⁹⁶ Jako výchozí komponenty pro reakční sekvenci byly zvoleny 3-chloro-4-methylcyklobuten-1,2-dion **XXVI**, 3-bromo-4-methylcyklobuten-1,2-dion **XXVII** (oba připravené z 3-hydroxy-4-methylcyklobuten-1,2-dion pomocí oxalylhalidu) a 3-chloro-4-isoprpxocyklobuten-1,2-dion **XXVIII**. Oba methylové deriváty (tj. **XXVI** a **XXVII**) byly podrobeny Stilleho reakci za katalýzy 2% (PdCH₂)ClPd(PPh₃)₂ v THF s různými organostannany (Tab. 4). Obecným závěrem vyplynulo, že užití bromovaného derivátu **XXVII** je pro tuto reakci efektivnější

a poskytuje vyšší výtěžky. Provedení Stilleho couplingu za těchto podmínek s isopropoxidovým derivátem **XXVIII** nebylo úspěšné. Nicméně optimalizací podmínek (5% (PdCH₂)ClPd(PPh₃)₂, 5% CuI v acetonitrilu za zahřevu reakční směsi na 70 °C) bylo i u něj docíleno velmi vysokých výtěžků reakce. Kompletní přehled užitých organostannanů, reakčních časů a výtěžků nabízí Tab. 4.



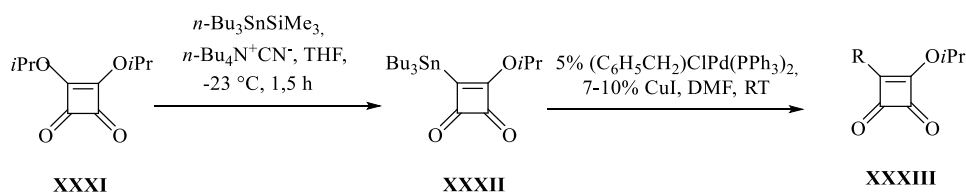
Obr. 27: Reakční podmínky pro Stilleho coupling s cyklobutendiony uvedené v publikaci.⁹⁶

Tab. 4: Přehled organostannanů, reakčních časů a výtěžků pro Stilleho coupling s cyklobutendiony uvedené v publikaci.⁹⁶

reakce č.	R	reakční čas [h]; výtěžek produktu [%]		
		XXVI	XXVII	XXVIII
1	Ph-	20 h; 70	6 h; 85	20 h; 87
2	4-CH ₃ -Ph-	20 h; 81	10 h; 83	20 h; 76
3	4-Cl-Ph-	-	15 h; 81	-
4	2-thienyl-	15 h; 65	13 h; 73	-
5	TMS-C≡C-	20 h; 56	20 h; 57	10 h; 57
6	<i>n</i> -Bu- C≡C-	20 h; 50	20 h; 55	10 h; 58
7		10 h; 62	-	20 h; 70
8		20 h; 61	-	20 h; 49

Ve stejném roce vyšla publikace stejné výzkumné skupiny, která uvádí možnost opačného uspořádání reakce.⁸⁹ Tedy tvorbu organocínaté sloučeniny z cyklobutendionové komponenty, která poté podstupuje reakci s různými organickými sloučeninami substituovanými jódem (Obr. 28). Jako výchozí molekula pro reakční sekvenci byl zvolen diisopropoxidový derivát **XXXI**, který reaguje s trimethyl(tributylstannyl)silanem za přídavku katalytického *n*-Bu₄N⁺CN⁻ v THF. Produktem reakce je organocínatá sloučenina **XXXII**, který je schopna

podstupovat samotný Stilleho coupling za formace finálních derivátů **XXXIII** (podmínky couplingu viz Obr. 28). Přehled výchozích jodidů s výtěžky produktů je uveden v Tab. 5.



Obr. 28: Stilleho coupling s užitím cyklobutendionového derivátu jako organostannanu uvedený v publikaci.⁸⁹

Tab. 5: Kompletní přehled aryljodidů s výtěžky Stilleho couplingu s využitím cyklobutendionového derivátu jako organostannanu uvedené v publikaci.⁸⁹

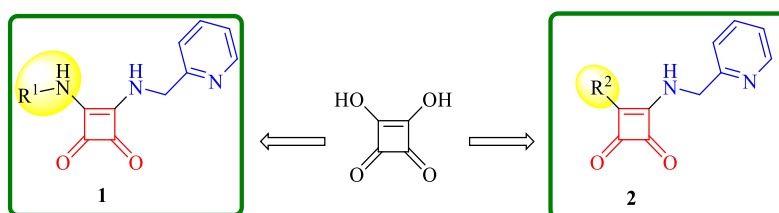
reakce č.	aryljodid RI	výtěžek [%]
1		99
2		80
3		68
4		57
5		75
6		66
7		57

VÝSLEDKY A DISKUZE

Jak již bylo popsáno v úvodní části diplomové práce, cílem tohoto projektu je návrh, syntéza a studium biologické aktivity nových derivátů odvozených od kyseliny squarové jako potenciálních antituberkulotik. S ohledem na tyto cíle je následující kapitola rozdělena do několika částí. V první z nich je stručně popsán návrh nových derivátů na základě molekulového dokování. Hlavním těžištěm práce je pak syntéza jednotlivých derivátů, včetně návrhu možných nových syntetických přístupů a optimalizací jednotlivých syntetických kroků. Závěrečná část diskuze je poté věnována biologické aktivitě připravených derivátů.

3 Návrh nových derivátů na základě molekulového dokování

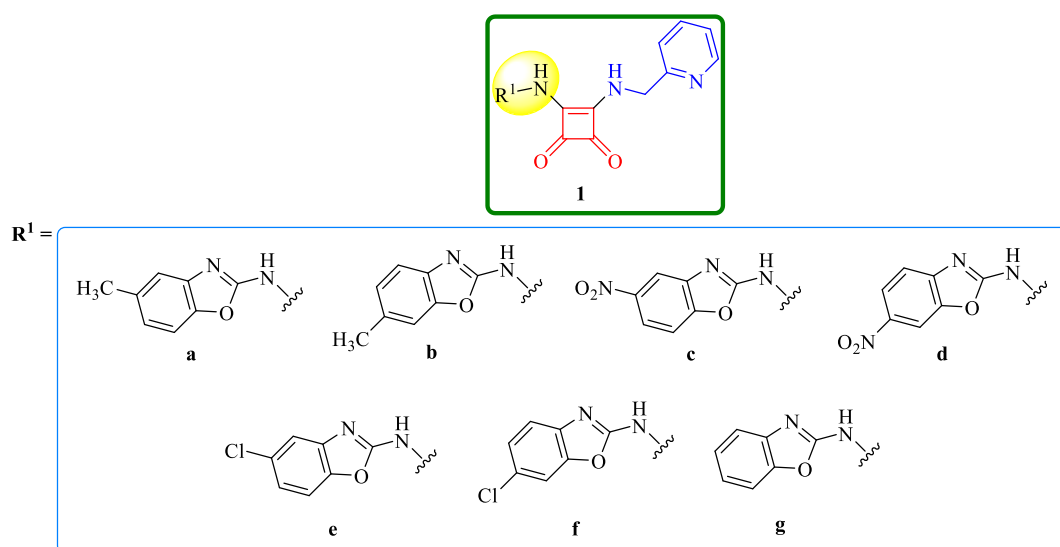
Původní inspirací pro návrh derivátů kyseliny squarové jako inhibitorů mykobakteriální ATP synthasy byla v této práci opakovaně zmiňovaná publikace autorů Tantry a kol. z roku 2017.¹⁷ Na základě výsledků SAR studie uvedené v tomto článku byly navrženy dvě knihovny squaramidových derivátů (Obr. 29). Deriváty aminové **1**, u kterých je centrální squarový skelet substituován aminy a deriváty arylové **2**, u kterých je na centrální squarový skelet přímo zaveden aromatický substituent.



Obr. 29: Dva navržené strukturní typy squarových derivátů.

Aminovými deriváty squaramidu **1** se z velké části zabývala již má bakalářská práce.¹⁸ Ta uvádí celkem čtrnáct aminových derivátů. Nicméně z jejich biologických testů vyplývá, že jsou obecně méně aktivní než arylové deriváty **2**. To je hlavním důvodem, proč se aminovým derivátům **1** diplomová práce již tak intenzivně nevěnuje a svou pozornost směřuje především

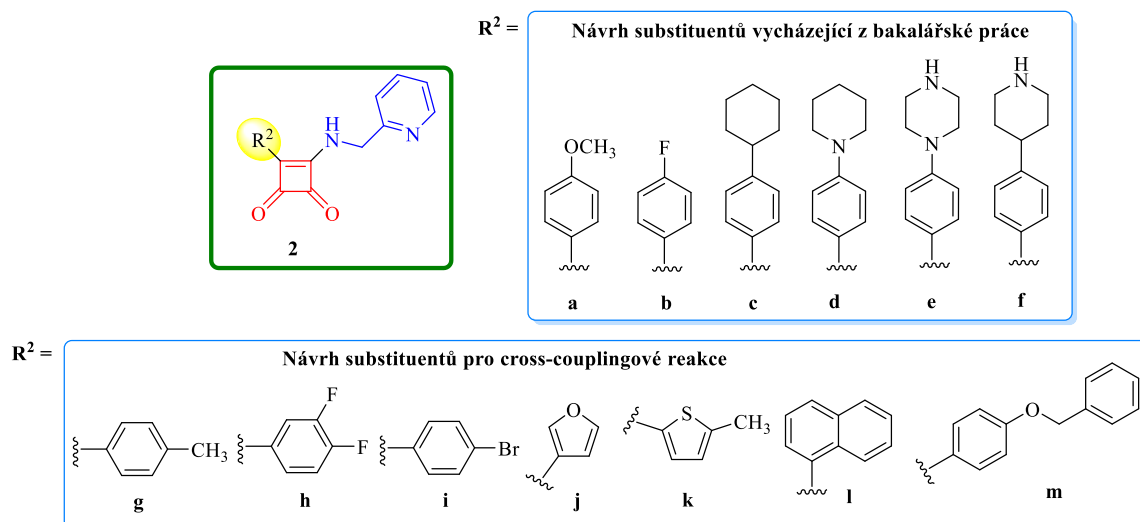
na deriváty **2** substituované přímo aromatickým kruhem. Přesto bylo na základě molekulového dokování navrženo celkem sedm aminových derivátů (Obr. 30). Strukturně se jedná o „konjugáty“ různě substituovaných benzoxazolů právě se squarovým kruhem. Tyto látky vykazovaly poměrně zajímavé hodnoty vazebné energie při vazbě do aktivního místa podjednotky *a* mykobakteriální ATP synthasy. Na základě toho se jejich příprava a biologická evaluace staly jednou z priorit této práce. Přehled navržených derivátů s jejich hodnotami vazebných energií je uveden na závěr této kapitoly v Tabulce 6.



Obr. 30: Přehled navržených aminových derivátů squaramidu **1**.

Arylové squaramidy **2** (Obr. 31) byly navrženy s vizí rozšíření řady derivátů uvedených v publikaci Tantry a kol.¹⁷ Na základě molekulového dokování bylo zpočátku navrženo celkem šest substituentů **a-f** (Obr. 31), které by mohly vést k derivátům vykazujícím významnou biologickou aktivitu. Dvěma z nich, deriváty **2a** a **2c**, se již zabývala má bakalářská práce. Nicméně k jejich syntéze byl využíván postup dle Tantry a kol., který se ukázal jako nevhodný, protože poskytoval finální produkty pouze ve velmi nízkých výtěžcích.

Z tohoto důvodu byla jedním z cílů diplomové práce také optimalizace publikovaných reakčních podmínek, popř. pak i otevření alternativního syntetického přístupu pro syntézu squarových derivátů arylového typu **2**. Pozornost je v tomto ohledu věnována především couplingovým reakcím.



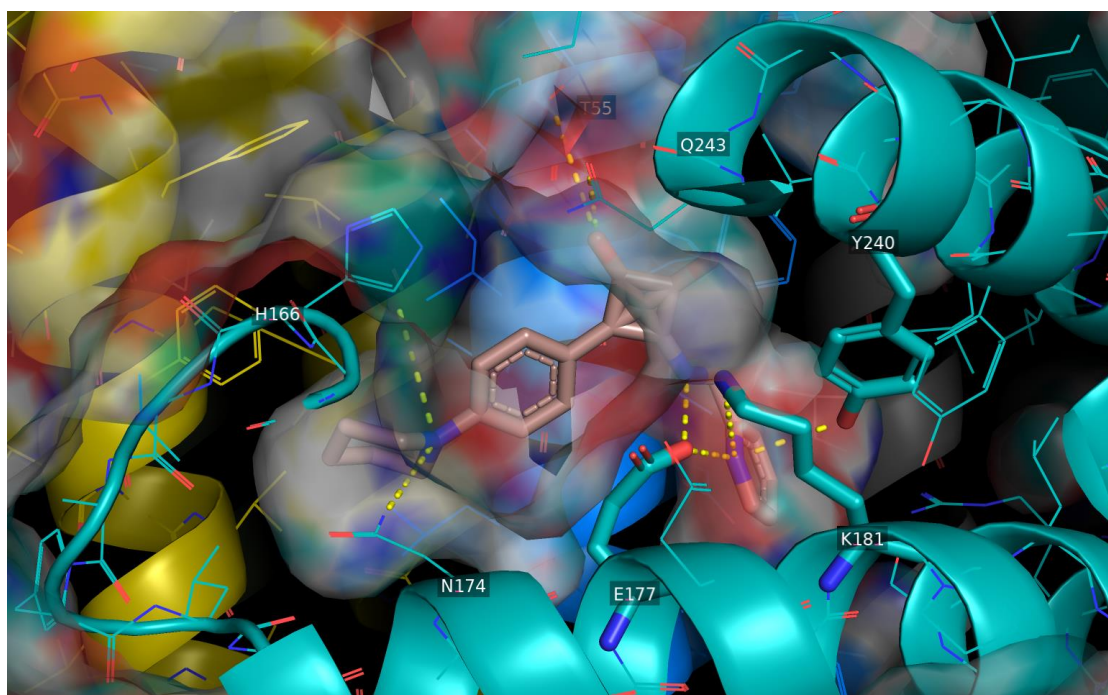
Obr. 31: Přehled původně navržených arylových derivátů.

Knihovny derivátů squaramidu byly navrženy na základě molekulového dokování látek do modelu ATP synthasy ve spolupráci s kolegy z Katedry fyzikální chemie (doc. RNDr. Karlem Berkou, Ph.D. a Mgr. Ing. Václavem Bazgierem, Ph.D.). Vhodný experimentální model ATP synthasy *M. tuberculosis* však pro účely dokování nebyl v žádné adekvátní databázi dostupný. Proto byl pro dokovací experimenty využit homologický model ATP synthasy *M. smegmatis* sestavený pomocí serveru SwissModel. ATP synthasy obou mykobakterií si ve své sekvenci odpovídají z více než 75 %, použití modelu ATP synthasy *M. smegmatis* bylo proto považováno za relevantní.

Squarové deriváty **1** a **2** byly postupně dokovány pomocí programu Autodock Vina do mykobakteriální ATP synthasy *M. smegmatis* v jejich různých stavech. Na základě tohoto experimentu bylo zjištěno, že squaramidy specificky interagují s podjednotkou *a* ATP synthasy (produkt exprese genu *atpB*). Přesněji řečeno se vážou do dutiny mezi podjednotky *a* a *c* (*c* podjednotka je kódována genem *atpE*). Nicméně pouze ve stavu 2 ATP synthasy. Jednotlivé stavy 1-3 ATP synthasy se totiž liší vzájemnou polohou obou podjednotek a tím i relativní vzdáleností aminokyselinových zbytků a jejich „sterickým odkrytím“. Ve stavu 2 ATP synthasy dochází ke specifickému natočení aminokyselinového zbytku Glu¹⁷⁷ (odpovídající Glu¹⁷⁵ na ATP synthase *M. tuberculosis*; kódován genem *atpB*) pro interakci s Lys¹⁸¹ (odpovídající Lys¹⁷⁹). Díky této malé konformační změně je umožněna interakce squaramidů s Glu¹⁷⁷ (resp. Glu¹⁷⁵ u *M. tuberculosis*). Ty zde vytváří interakce oběma svými dusíkovými atomy 2-aminomethylpyridinového substituentu. Druhá strana squarového kruhu má tendenci interagovat s aminokyselinovým zbytkem Asn¹⁷⁴ u *M. smegmatis* (odpovídající Asn¹⁷² u *M. tuberculosis*) za podmínek, že ve své struktuře squaramid obsahuje skupinu vystupující

jako akceptor vodíkové vazby, nejlépe dusík. S podjednotkou *c* ATP synthasy squaramidy vytváří především nepolární interakce, např. s Ile⁵⁹ (resp. Ile⁵⁵ u *M. tuberculosis*). Squaramidy přesně vyplňují prostor mezi oběma podjednotkami (Obr. 32). Na základě interakce s Glu¹⁷⁷ (Glu¹⁷⁵ u *M. tuberculosis*) pak účinně blokují pohyb rotující podjednotky a tím syntézu ATP.

Velmi důležité je zmínit, že vazebné místo squaramidových derivátů se liší od vazebného místa BDQ, díky čemuž squaramidy pravděpodobně působí i na BDQ-rezistentní kmeny.

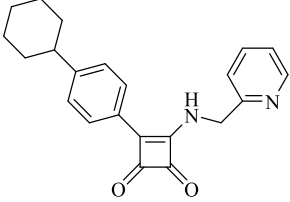
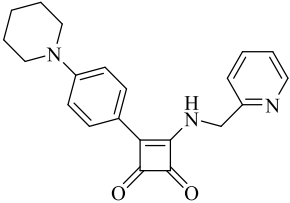
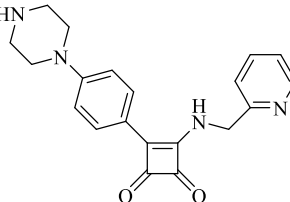
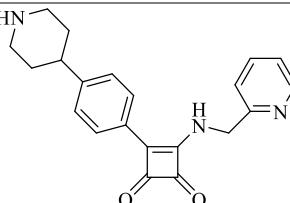


Obr. 32: Grafické znázornění dokované molekuly **2d** se zobrazením jejich interakcí ve vazebném místě ATP synthasy *M. smegmatis*.

Výjimkou v návrhu squaramidových derivátů byl výběr substituentů pro couplingové reakce (**2g-m**; Obr. 31). Ty jako jediné nebyly vybírány na základě *in silico* testů. Primárním cílem u couplingových reakcí bylo najít nový syntetický přístup vedoucí k požadovaným arylovým derivátům **2** a ověřit jeho schůdnost. Substituenty byly proto vybírány především na základě jejich dostupnosti ve formě boronových kyselin. Jejich potenciální přínos co do biologické aktivity finálních derivátů zde byl až druhotným hlediskem jejich výběru. Substituenty pro couplingové reakce proto nejsou ani součástí přehledové Tabulky 6 níže, která uvádí jednotlivé navržené deriváty knihoven **1** a **2** s hodnotami jejich vazebných energií.

Tab. 6: Dokované struktury s hodnotami jejich vazebné energie.

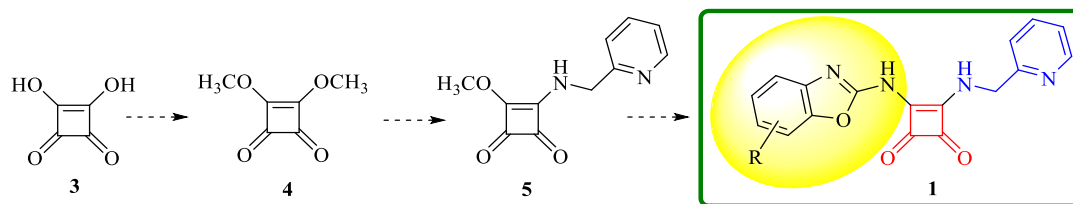
kód	struktura	hodnota vazebné energie [kcal.mol ⁻¹]
1a		- 10,6
1b		- 9,8
1c		- 9,4
1d		- 9,4
1e		- 9,8
1f		- 9,9
1g		- 10,1
2a		- 9,5
2b		- 9,6

2c		- 11,5
2d		- 11,0
2e		- 10,6
2f		- 11,1

4 Aminové deriváty squaramidu

První kapitola syntetické části diplomové práce se zabývá aminovými deriváty squaramidu **1** (Obr. 33). Přípravě aminových squaramidů se podrobně věnovala již má bakalářská práce, která uvádí čtrnáct finálních látek tohoto strukturálního typu. Součástí bakalářské práce byla i optimalizace jejich syntézy. Diplomová práce v tomto ohledu na tu bakalářskou tedy přímo navazuje a rozšiřuje knihovnu již připravených látek z důvodů uvedených výše.

Reakční sekvence vychází z komerčně dostupné kyseliny squarové **3**, která je převedena na svůj dimethoxy derivát **4**. Ten je poté na jedné straně selektivně substituován 2-aminomethylpyridinem. Druhá methoxy skupina je následně substituována 2-aminobenzoxazolem za vzniku finálního produktu **1**. Pro přípravu výchozích 2-aminobenzoxazolů jako substituentů aminových derivátů squaramidu bylo využito optimalizovaného syntetického postupu publikovaného naší výzkumnou skupinou v roce 2019.⁹⁷ Jednotlivé reakční kroky jsou podrobněji diskutovány dále.

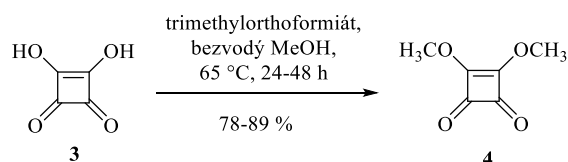


Obr. 33: Navržená reakční cesta pro syntézu aminových derivátů squaramidu **1**.

4.1 Syntéza aminových derivátů

4.1.1 Převod kyseliny squarové na její dimethoxy derivát

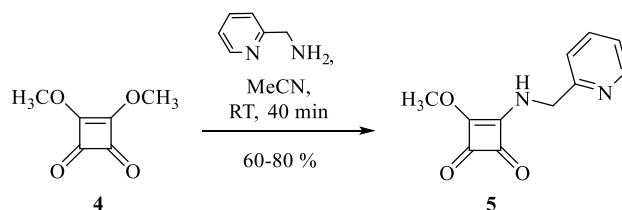
Prvním krokem reakční sekvence bylo převedení kyseliny squarové **3** na její dimethoxy derivát **4** (Obr. 34). Reakce byla provedena pomocí trimethylorthoformiátu v bezvodém MeOH za stálého ohřevu reakce na 65 °C po dobu 24-48 h. Reakce byla monitorována pomocí TLC a v případě neúplného odreagování výchozí látky **3** po 24 hodinách byl do reakční směsi přidán jeden další ekvivalent trimethylorthoformiátu. Po úplném zreagování kyseliny squarové **3** bylo z reakční směsi odpařeno rozpouštědlo a produkt byl purifikován pomocí sloupcové kapalinové chromatografie s užitím mobilní fáze Hex/EtOAc 6:4 po sorpci látky na silikagel.



Obr. 34: Převedení kyseliny squarové **3** na její dimethoxy derivát **4**.

4.1.2 Substituce methoxy skupiny 2-aminomethylpyridinem

Jedna za dvou vzniklých methoxy skupin dimethoxy derivátu kyseliny squarové **4** byla selektivně substituována komerčně dostupným 2-aminomethylpyridinem za vzniku intermediátu **5** (Obr. 35). Vysrážený podíl **5** byl po uplynutí reakčního času odsán a promyt na filtru za získání čistého produktu reakce, který nevyžadoval žádnou další purifikaci.

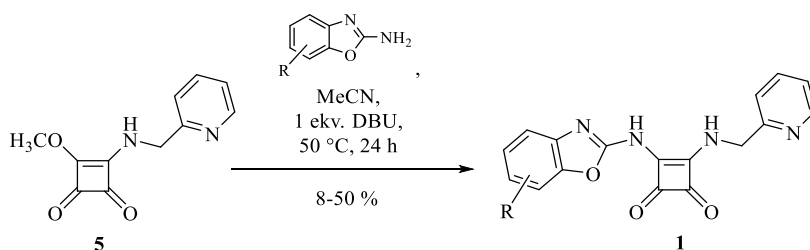


Obr. 35: Reakční schéma substituce methoxy skupiny za 2-aminomethylpyridin.

4.1.3 Substituce druhé methoxy skupiny aminem

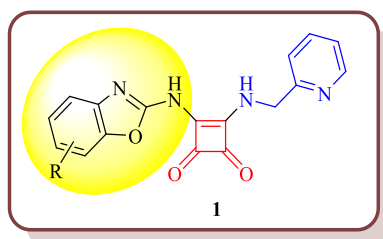
Finálním krokem této reakční sekvence je substituce druhé methoxy skupiny na squarovém centrálním skeletu pomocí 2-aminobenzoxazolu za formace finálního produktu **1** (Obr. 36). Reakce probíhá v acetonitrilu za přídavku jednoho ekv. 1,8-diazabicyklo[5.4.0]undec-7-enu (DBU) a záhřevu reakční směsi na 50 °C po dobu 24 hodin.

Výtěžky některých finálních látek nejsou ideální (Tab. 7). Nicméně je třeba zmínit, že nízký výtěžek není způsobený průběhem reakce. Naopak, konverze reakce odhadem z UV/VIS spektra LC-MS byla vždy téměř 100%. Problém je se zpracováním reakce, resp. purifikací získaných vzniklých produktů **1**. Ty jsou totiž velmi špatně rozpustné. Díky tomu nebylo pro čištění finálních derivátů **1** možno využít klasické kapalinové chromatografie. Pro purifikaci byla využívána pouze krátká kolonka s malým množstvím silikagelu (SiO₂), přes který byla reakční směs přefiltrována. Jako eluční činidlo byl využit 2% roztok MeOH v DCM. Produkt **1** byl získán srážením získaného eluentu za chladu. Vzniklá sraženina byla odsáta a promyta na filtru.



Obr. 36: Substituce druhé methoxy skupiny na squarovém kruhu pomocí 2-aminobenzoxazolu.

Tab. 7: Přehled připravených produktů **1**.



sloučenina	R	výtěžek [%] ^a
1a	H	50
1b	5-Cl	47
1c	6-Cl	36
1d	5-CH ₃	21
1e	6-CH ₃	8
1f	5-NO ₂	33
1g	6-NO ₂	32

^aIzolovaný výtěžek po LC.

5 Arylové deriváty squaramidu

Druhým strukturálním typem derivátů kyseliny squarové, kterými se zabývá tato práce, jsou arylové squaramidy **2**. Pro jejich přípravu bylo postupně navrženo několik syntetických postupů (Obr. 37).

První z nich (reakční cesta A; Obr. 37), publikovaný autory Tantry a kol.,¹⁷ vychází z komerčně dostupné kyseliny squarové **3**, která je převedena na odpovídající dichlor derivát **6**. Ten je následně podroben reakci Friedel-Craftsova typu za odstoupení prvního z atomů chloru na squarovém centrálním skeletu. Posledním krokem této reakční sekvence je substituce druhého chloru pomocí 2-aminomethylpyridinu za zisku finálního produktu **2**.

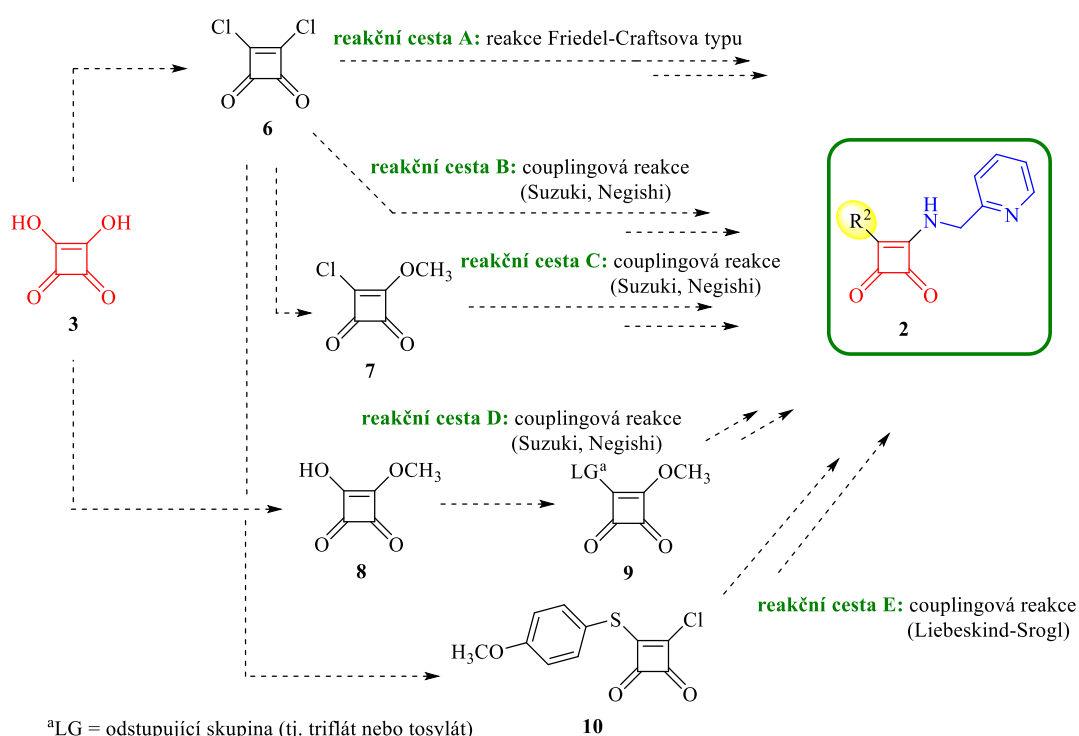
Další navržené syntetické sekvence zahrnují cross-couplingovou reakci. Pro realizaci Suzuki nebo Negishi couplingu se nabízí použití dichlor derivátu kyseliny squarové **6**. Coupling je teoreticky možné realizovat přímo na něm (reakční cesta B; Obr. 37) za předpokladu, že bude vznikat pouze monosubstituovaný intermediát. Popřípadě je možné provést methanolýzu jednoho z atomů chloru na centrálním skeletu (reakční cesta C; Obr. 37). Tím je zajištěn průběh couplingové reakce pouze „na jedné straně“ squarového cyklu.

Posledním krokem obou těchto navržených sekvencí (reakční cesta B i C; Obr. 37) je substituční reakce se zavedením 2-aminomethylpyridinového substituentu.

Nicméně pro provedení Suzuki nebo Negishi couplingu není nutné pracovat pouze s chlorem jako odstupující skupinou. Možností je i využití triflátu nebo tosylátu (reakční cesta D; Obr. 37). Prvním krokem této reakční sekvence je převedení kyseliny squarové **3** na její monomethoxy derivát **8**. Druhá hydroxylová skupina je následně konvertována na triflát/tosylát, který je uplatněn pro couplingovou reakci. Finálně probíhá substituce methoxy skupiny pomocí 2-aminomethylpyridinu.

Poslední z navržených reakčních cest (reakční cesta E; Obr. 37) využívá přeměny dichlor derivátu kyseliny squarové **6** na pseudothioester kyseliny squarové **10**, který podstupuje Liebeskind-Srogl coupling. Finálním krokem je opět zavedení 2-aminomethylpyridinového substituentu za formace finálního produktu **2**.

Všechny navržené reakční postupy byly prakticky realizovány a na následujících stranách budou podrobně diskutovány.



^aLG = odstupující skupina (tj. triflát nebo tosylát)

pozn.: Znázorněné chemické přeměny klíčových intermediátů jednotlivých reakčních sekvencí **6**, **7**, **9** a **10** na finální produkty **2** zahrnují vždy dvě v tomto pořadí po sobě jdoucí reakce: zavedení aromatického substituentu na squarový centrální skelet a substituci 2-aminomethylpyridinem.

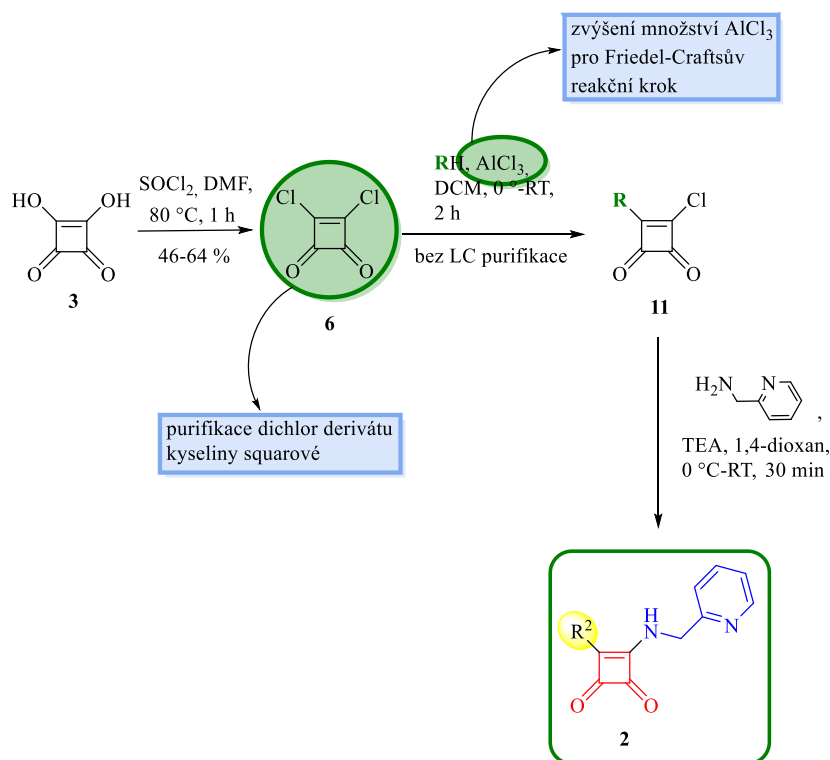
Obr. 37: Přehledové schéma uvádějící možnosti syntetických přístupů pro přípravu arylových squaramidů **2**.

5.1 Syntéza arylových derivátů squaramidu pomocí reakční cesty A

Syntetická cesta vedoucí k arylovým derivátům squaramidu **2**, která využívá reakci Friedel-Craftsova typu jako klíčového kroku pro zavedení aromatického substituentu, vychází z publikace od Tantry a kol. z roku 2017.¹⁷ Celý syntetický přístup byl již podrobně rozebrán v mé bakalářské práci.¹⁸ Proto je zde zmíněn pouze stručně, podrobněji je diskutován jen klíčový krok tvorby C-C vazby a pokusy o jeho optimalizaci.

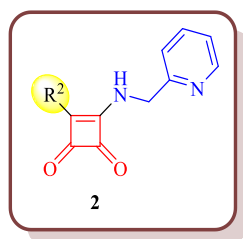
Výchozí látkou této syntetické sekvence (Obr. 38) byla kyselina squarová **3**. Ta byla pomocí SOCl_2 s přídavkem DMF převedena na odpovídající dichlor derivát **6**. K dichlor derivátu **6** rozpuštěném v DCM a ochlazeném na $0\text{ }^\circ\text{C}$ byl konsektivně přidán ekvivalent příslušného aromátu a 0,25 ekvivalentu AlCl_3 . Reakční směs byla takto ponechána reagovat po dobu 1,5 hodiny za RT. Po uplynutí reakčního času byl obsah baňky nalit na led a po jeho rozpuštění extrahován do DCM s následným odpařením získaného roztoku. Odparek byl po důkladném vysušení dále rozpuštěn v dioxanu a takto připravený roztok byl ochlazen na $0\text{ }^\circ\text{C}$. Při této teplotě byl přidán 2-aminomethylpyridin a TEA. Baňka s reakční směsí byla ponechána na míchačce za RT po dobu 30 minut. Následně byla reakční směs odpařena a odparek byl rozmíchán v H_2O . Pevná fáze vzniklé suspenze byla odsáta. Produkty **2** byly poté purifikovány pomocí kapalinové chromatografie.

Z důvodu získání finálních produktů **2** pouze v nízkých výtěžcích byl Friedel-Craftsov reakční krok optimalizován (Obr. 38). Optimalizace spočívala nejprve v purifikaci dichlor derivátu **6**. Ačkoliv je tato látka poměrně reaktivní, podařilo se ji úspěšně krystalizovat za horka z hexanu. Dále bylo zvýšeno množství Lewisovy kyseliny (AlCl_3) pro Friedel-Craftsov reakční krok, a to z 0,25 ekvivalentu na 2. Přestože optimalizační zásah do reakční sekvence není nijak mohutný, výtěžky získaných finálních produktů **2** jím byly markantně zvýšeny. Přehled finálních produktů **2** s jejich výtěžky uvádí Tabulka 8 dále.



Obr. 38: Syntéza arylových derivátů squaramidu **2** pomocí reakční cesty A se zeleně zaznačenou optimalizací reakční sekvence.

Tab. 8: Přehled připravených finálních arylových squaramidů **2** pomocí reakční sekvence A.



sloučenina	R ²	výtěžek	výtěžek
		před optimalizací	po optimalizaci
		[%] ^a	[%] ^a
2a		11	64
2b		5	53
2c		1	73
2d		1	14

^aIzolovaný výtěžek po LC.

Obě dílčí optimalizace se podílí na zvýšení výtěžků finálních produktů **2**. Jakým poměrem přispívají, bylo analyzováno na derivátu **2a**, u kterého je substituentem „levé strany“ squarového skeletu anisol (Tab. 9). Analýza zahrnuje celkem čtyři reakce. U dvou z nich je výchozí látkou purifikovaný dichlor derivát kyseliny squarové **6**, u druhých dvou je s tímto intermediátem pracováno pouze *in situ*. Jak purifikovaný dichlor derivát **6**, tak jeho surová směs jsou nasazeny pro Friedel-Craftsov reakční krok – vždy jednou s 0,25 ekv. Lewisovy kyseliny, podruhé s jejími dvěma ekvivalenty.

Z výtěžků finálního produktu **2a** u čtveřice reakcí vyplývá, že parciálně obě optimalizace přispívají svým dílem. Větší vliv na zvýšení získávaného podílu finálního derivátu **2** pomocí optimalizovaného postupu má však množství Lewisovy kyseliny, purifikace intermediátu **6** přispívá o něco méně. Další navýšení množství AlCl₃ ve Friedel-Craftsově kroku již nemá na výtěžek reakce vliv. Přehled výtěžků získaného finálního derivátu **2a** při jednotlivých nasadách reakce uvádí Tabulka 9.

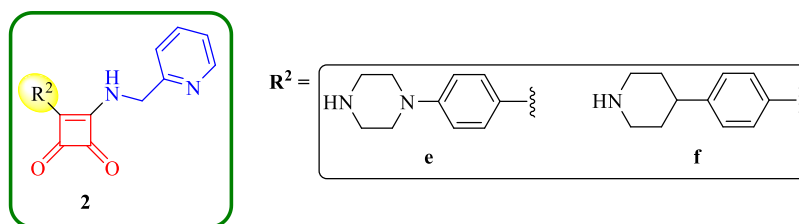
Tab. 9: Porovnání příspěvků obou dílčích optimalizací reakční sekvence využívající reakce Friedel-Craftsova typu jako klíčového kroku pro syntézu arylového derivátu squaramidu **2a**.

reakce č.	purifikace dichlor derivátu kyseliny squarové 6	množství AlCl ₃ pro Friedel-Craftsov reakční krok vůči 6 [ekv.]	výtěžek [%] ^a
1	nepurifikovaný	0,25	11
2	nepurifikovaný	2	47
3	purifikovaný	0,25	15
4	purifikovaný	2	64

^aIzolovaný výtěžek po LC.

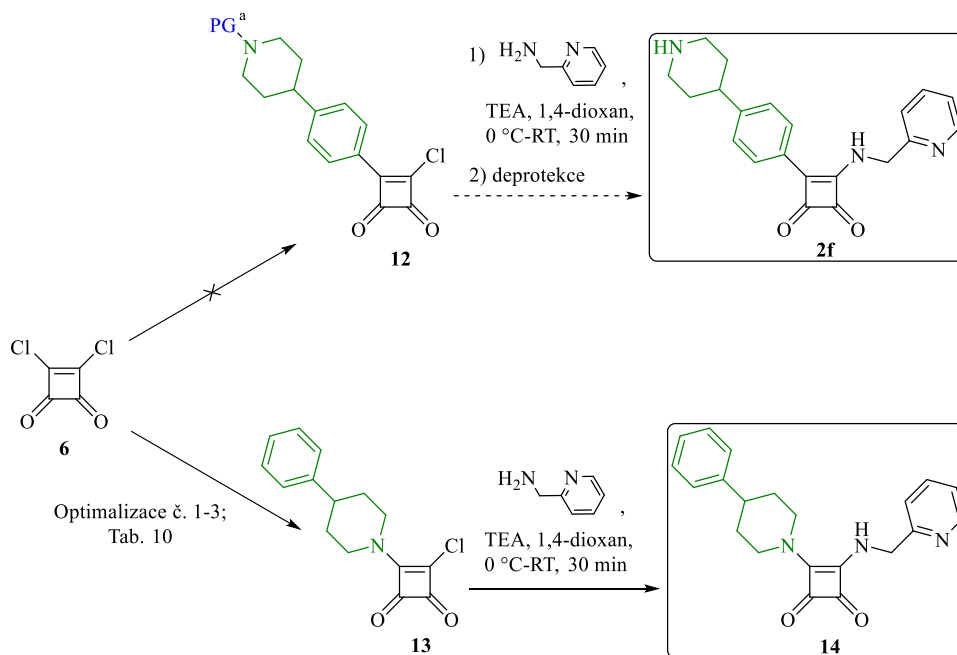
Nicméně ani přes provedenou optimalizaci se pomocí výše uvedeného postupu nepodařilo připravit některé z navržených derivátů (Obr. 39). Substituenty, které ve své struktuře obsahují NH skupinu, reakci Friedel-Craftsova typu nepodstupují, a to ani přes protekci sekundárního aminu. Jako protektivní skupiny byly na amin zaváděny *tert*-butyloxykarbonyl (Boc; ve formě svého anhydridu), fluorenylmethoxykarbonyl (Fmoc; jako chlorid) a acetyl (Ac; také ve formě anhydridu). Molekulou, na které byla prováděna optimalizace reakce Friedel-Craftsova typu s protekcí výchozí látky byl 4-fenylpiperidin **f** (Obr. 39). Každou

ze zmíněných chránicích skupin byla amino skupina 4-fenylpiperidinu úspěšně protekována. Průběh reakce Friedel-Craftsova typu byl vyhodnocován pomocí LC-MS.



Obr. 39: Navržené arylové deriváty squaramidu **2**, které se nepodařilo připravit pomocí sekvence využívající reakci Friedel-Craftsova typu jako klíčový reakční krok.

Boc protektivní skupina se pro účely provedení reakce Friedel-Craftsova typu ukázala jako příliš labilní a při reakci často docházelo k deprotekcí výchozí komponenty a vzniku produktu **13** s opačně navázaným 4-fenylpiperidinem (Obr. 40). Produkt s tímto „obráceným“ substituentem byl následně dokázán i pomocí NMR. Literatura uvádí, že deprotekcí výchozí látky chráněné Boc skupinou může způsobovat jak Lewisova kyselina⁹⁸ (optimalizace č. 1; Tab. 10), tak i vysoká teplota reakční směsi^{99,100} (optimalizace. č. 2 a 3; Tab. 10). Jako možná příčina deprotekcce byla brána v úvahu i eventuální přítomnost kyselých reziduí z thionyl chloridu, který byl uplatňován jako chlorační činidlo pro konverzi kyseliny squarové **3** na její dichlor derivát **6** (předešlý krok reakční sekvence; Obr. 38). Tato možnost však byla vyvrácena přidávkem TEA do reakční směsi pro reakce Friedel-Craftsova typu v dalších optimalizacích. Aby tedy nedocházelo k deprotekcí výchozí látky chráněné *tert*-butyloxykarbonylem, musely být pro Friedel-Craftsova reakční krok voleny poměrně mírné reakční podmínky bez užití Lewisovy kyseliny jako katalyzátoru (optimalizace. č. 4 v Tab. 10). Za takových podmínek však nedochází ke konverzi výchozích komponent na produkt **12**.



^aPG = chránicí skupina

Obr. 40: Schéma znázorňující průběh reakce Friedel-Craftsova typu s užitím 4-fenylpiperidinu chráněného Boc protektivní skupinou za reakčních podmínek optimalizací č. 1-3 v Tab. 10.

Užití Fmoc chránicí skupiny by oproti Boc protekci mělo umožňovat použití Lewisovy kyseliny jako katalyzátoru reakce a zvýšení reakční teploty. Tyto dva faktory se pro průběh reakce Friedel-Craftsova typu ukázaly jako esenciální. Navzdory jejich užití (minimální teplota $80\text{ }^\circ\text{C}$, nadbytek AlCl_3) ke konverzi výchozí látky **6** na produkt **12** při chránění Fmoc chránicí skupinou u žádné z reakcí (optimalizace č. 5-7; Tab. 10) nedošlo.

Poslední z testovaných chránicích skupin byl acetyl. Nicméně ani při jeho zavedení jako chránicí skupiny požadovaný produkt **12** nebyl získán. Nejnadějněji se jevila optimalizační reakce č. 10 (Tab. 10), tedy průběh reakce Friedel-Craftsova typu za přídavku 2 ekv. Lewisovy kyseliny a záhřevu reakční směsi na $100\text{ }^\circ\text{C}$. Za těchto podmínek byl produkt **2f** na UV/VIS spektru LC-MS detekován, nicméně vznikalo ho natolik malé množství, že se jej ani po finální substituci 2-aminomethylpyridinem nepodařilo izolovat.

Přehled protekcí a reakčních podmínek pro Friedel-Craftsovův reakční krok uvádí tabulka č. 10 níže. Výsledek reakce byl vyhodnocován za základě LC-MS analýzy.

Tab. 10: Přehled zkoušených reakčních podmínek pro reakce Friedel-Craftsova typu s chráněným 4-fenylpiperidinem.

opt. č.	protektce	rozpouštědlo	katalýza [ekv.] ^a	báze [ekv.] ^a	reakční teplota	reakční čas [h]	výsledek reakce
1	Boc	DCM	AlCl ₃ ; 0,25	-	RT	22	deprotektce VL ^c
2	Boc	toluen	-	-	80° C	22	deprotektce VL
3	Boc	toluen	-	1,5 ekv. TEA	80° C	21	deprotektce VL
4	Boc	DCM	-	1,5 ekv. TEA	RT	21	ND ^b
5	Fmoc	toluen	AlCl ₃ ; 0,25	-	80° C	20	ND
6	Fmoc	toluen	AlCl ₃ ; 2	-	80° C	20	ND
7	Fmoc	toluen	AlCl ₃ ; 2	-	100° C	20	ND
8	Ac	toluen	AlCl ₃ ; 0,25	-	80° C	20	ND
9	Ac	toluen	AlCl ₃ ; 2	-	80° C	20	ND
10	Ac	toluen	AlCl ₃ ; 2	-	100° C	20	P ^d detekovaný, neizolovatelný

^amnožství ekvivalentů katalyzátoru/báze vůči výchozí látce **6**

^bND = nereaguje (neprobíhá žádná reakce)

^cVL = výchozí látka

^dP = produkt

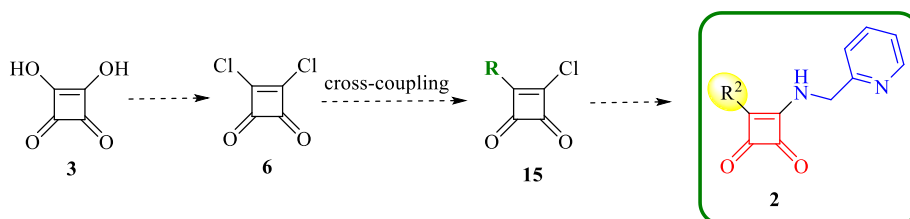
Zavedení aromatického substituentu, který ve své struktuře obsahuje volnou NH skupinu tedy ani přes její různé protektce nebylo úspěšné. Možným vysvětlením nezdařilého provedení Friedel-Craftsova reakčního kroku s těmito typy výchozích sloučenin je jejich pravděpodobná komplexace s Lewisovou kyselinou (AlCl₃). Ta by reakci teoreticky výrazně zpomalovala a zhoršovala tak její průběh.

5.2 Syntéza arylových derivátů squaramidu pomocí reakční cesty B

Protože zavedení některých substituentů na squarový centrální cyklus pomocí reakce Friedel-Craftsova typu nebylo úspěšné, byly hledány nové syntetické cesty, které by v reakční sekvenci Friedel-Craftsov krok nahradily. Vzhledem k faktu, že se při reakci formuje nová C-C vazba, intuitivně se nabízela možnost využití cross-couplingových reakcí.

Pozornost byla směřována na takové typy couplingů, u kterých jako odstupující skupina může vystupovat atom chloru (Obr. 41). Důvodem byla již optimalizovaná příprava snadno dostupného dichlor derivátu kyseliny squarové **6** (kap. 5.1). Prvními z vybraných couplingových reakcí pro zavedení aromatického substituentu na squarový kruh byly Suzuki coupling a Negishi coupling.

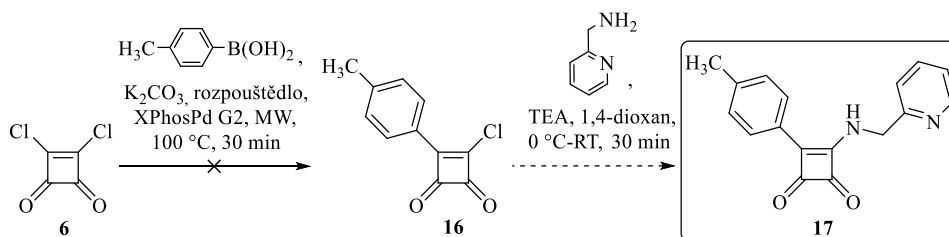
Dichlor derivát kyseliny squarové **6** nabízí celkem dvě reaktivní místa jak pro Suzuki, tak pro Negishi coupling. Proto základní podmínkou tohoto reakčního postupu je, že coupling bude co možná nejselektivněji poskytovat pouze monosubstituovaný derivát **15** (disubstituovaný produkt je nežádoucí).



Obr. 41: Návrh reakční sekvence pro přípravu arylových derivátů squaramidu **2** pomocí cross-couplingové reakce.

5.2.1 Suzuki coupling dichlor derivátu kyseliny squarové

Dichlor derivát kyseliny squarové **6** byl ve smyslu Suzukiho reakce reagován s komerčně dostupnou tolylboronovou kyselinou (Obr. 42). Ta byla do reakční směsi nasazována v 1,2 ekv. množství vůči dichlor derivátu **6**. Jako báze byl do reakční směsi přidáván uhličitán draselný (K_2CO_3 ; ¼ ekv. vůči dichlor derivátu **6**), jako prekatalyzátor pak XPhosPd G2 (2,5 mol% vůči dichlor derivátu **6**). Vhodné rozpouštědlo pro reakci bylo hledáno pomocí optimalizačních reakcí popsaných dále. Výsledek reakce byl vyhodnocován pomocí TLC a LC-MS analýzy.



Obr. 42: Reakční schéma znázorňující postup přípravy arylového derivátu squaramidu **17** s využitím Suzuki couplingu na dichlor derivátu kyseliny squarové **6**.

Provedeny byly celkem tři optimalizační reakce, které se lišily použitým rozpouštědlem. V první z optimalizačních reakcí jako rozpouštědlo figurovala směs dioxan/voda v poměru 5:1, ve druhé pak směs toluen/voda v poměru 10:1, ve třetí poté samotný toluen.

U prvních dvou optimalizačních reakcí bylo pomocí LC-MS detekováno majoritní zastoupení kyseliny squarové **3**, produkt **16** detekován nebyl. To značí, že došlo k hydrolyze výchozího dichlor derivátu **6**. Proto byl pro třetí z optimalizačních reakcí použit jako rozpouštědlo čistý toluen a reakce byla prováděna za inertních podmínek. Nicméně i bez přístupu vzduchu a s užitím čistého organického rozpouštědla nebyla ve směsi detekována žádná konverze výchozí látky **6** na produkt **16**.

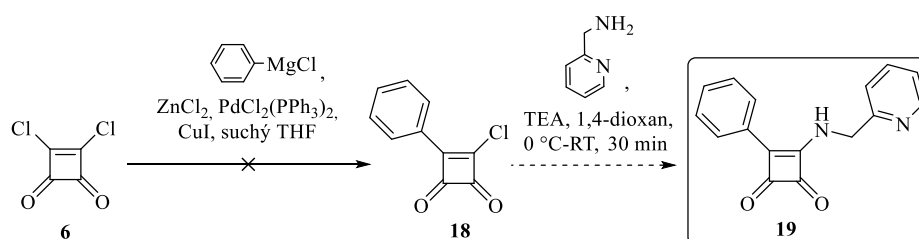
Z experimentálně získaných výsledků lze tedy soudit, že pokud je součástí reakční směsi voda, dochází k hydrolyze výchozího derivátu **6** na kyselinu squarovou **3** a reakce neprobíhá. Za bezvodých podmínek reakce by sice mělo být zabráněno hydrolyze dichlor derivátu kyseliny squarové **6**, nicméně ten ani přesto couplingovou reakci nepodstupuje.

Touto krátkou optimalizací Suzukiho reakce s cyklobutendionovými deriváty byly ověřeny výsledky uváděné v publikaci autorů Ohishi a kol.⁶⁹ V té je aplikován Suzuki coupling na squaramidy při velmi podobném složení reakční směsi jako je v předložené práci. Jako výsledek publikace uvádí prakticky totožné výsledky, které byly stanoveny výše, tj. že při užití směsi rozpouštědel, ve které figuruje voda, dochází k hydrolyze dichlor derivátu kyseliny squarové **6**. Při použití bezvodých podmínek pak dochází k blíže nespecifikované dekompozici výchozí látky **6**. Ačkoli jsou tedy výše stanovené výsledky již publikované, bylo z mého pohledu žádoucí ověření průběhu Suzukiho reakce na dichlor derivátu **6** vzhledem k pouze velmi malému množství experimentálních dat, které jsou autory publikace uváděny.

5.2.2 Negishi coupling dichlor derivátu kyseliny squarové

Pro Negishi coupling na dichlor derivátu kyseliny squarové **6** byl jako druhá výchozí reakční komponenta zvolen komerčně dostupný fenylmagnesium chlorid (užíván vždy v množství

dvou ekv. vůči dichlor derivátu **6**; Obr. 43). Ten do reakce sice vstupuje jako organohořečnatá sloučenina, nicméně v přítomnosti ZnCl_2 je transmetalován na organozinečnatou sloučeninu, která by poté měla podstupovat Negishi coupling. Chlorid zinečnatý byl do reakční směsi přidáván ve formě svého 1M roztoku v THF nebo jako pevná látka v 3 ekv. množství vůči výchozímu dichlor derivátu kyseliny squarové **6**. Součástí reakční směsi byl vedle obou výchozích látek a ZnCl_2 také prekatalyzátor ($\text{PdCl}_2(\text{PPh}_3)_2$) a CuI . Prekatalyzátor byl do reakční směsi přidáván v množství 0,02 ekv. vůči výchozí látce **6**, CuI pak v množství 0,04 ekv. vůči **6**. Výsledek reakce byl vyhodnocován na základě TLC a LC-MS analýzy.



Obr. 43: Reakční schéma znázorňující postup přípravy arylového derivátu squaramidu **19** s využitím Negishi couplingu na dichlor derivátu kyseliny squarové **6**.

Podobně jako tomu bylo u Suzuki couplingu, ani pomocí Negishi couplingu nebylo dosaženo úspěšného zavedení aromatického substituentu na squarový centrální skelet. LC-MS analýzy všech čtyř optimalizačních reakcí uvedených níže v Tabulce 11 odhalily po uplynutí reakčního času vždy pouze hydrolyzovaný výchozí dichlor derivát **6**. To značí, že v reakční směsi pravděpodobně nedochází k žádné reakci, a to ani za MW podmínek (optimalizace č. 3 a 4; Tab. 11).

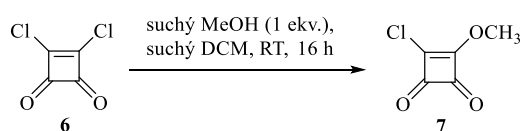
Tab. 11: Tabulka uvádějící konkrétní reakční parametry pro Negishi coupling na dichlor derivátu kyseliny squarové **6**.

opt.č.	transmetalací čínidlo	reakční podm.	reakční čas [min]	výsledek
1	1 M roztok ZnCl ₂ v THF	RT	90	ND ^a
2	ZnCl ₂ (s)	RT	90	ND
3	1 M roztok ZnCl ₂ v THF	MW, 50 °C	30	ND
4	ZnCl ₂ (s)	MW, 50 °C	30	ND

^aND = nedetekovaná konverze výchozí látky na produkt

5.3 Syntéza arylových derivátů squaramidu pomocí reakční cesty C

Současně s couplingy na dichlor derivátu **6** byly tyto reakce testovány i na monochlor-monomethoxy derivátu kyseliny squarové **7**. Ten byl připraven z dichlor derivátu **6** pomocí 1 ekv. suchého MeOH v suchém DCM (Obr. 44). Reakce probíhala po dobu 16 hodin za RT. Po uplynutí reakčního času byla reakční směs odfoukána a bez další purifikace byl produkt **7** použit pro couplingový reakční krok. Zisk požadovaného produktu byl ověřen pomocí ¹H NMR. Postup pro přípravu sloučeniny **7** byl převzat z patentu z roku 1999.¹⁰¹



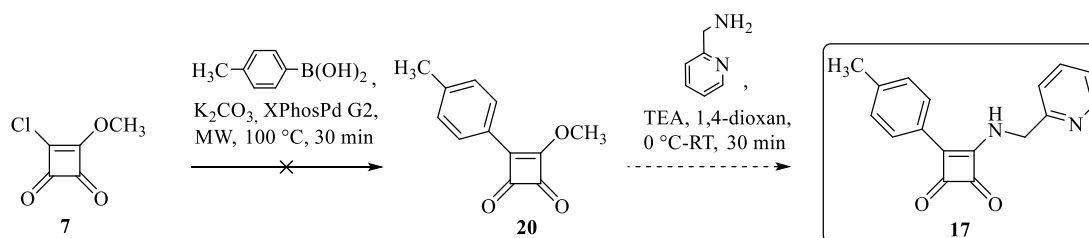
Obr. 44: Převod dichlor derivátu kyseliny squarové **6** na její monochlor-monomethoxy derivát **7**.

Výhodou monochlor-monomethoxy derivátu **7** jako výchozí komponenty pro coupling oproti dichlor derivátu kyseliny squarové **6** by měla být blokáce jedné z původních dvou reaktivních poloh ve struktuře. Díky tomu by měl coupling probíhat vždy pouze „na jedné straně“

squarového kruhu a methoxy skupina by měla být substituována až v posledním reakčním kroku, a to 2-aminomethylpyridinem za zisku finálního produktu **2**.

5.3.1 Suzuki coupling monochlor-monomethoxy derivátu kyseliny squarové

Pro Suzuki coupling na monochlor-monomethoxy derivátu kyseliny squarové **7** byla opět jako druhá reakční komponenta využita tolylboronová kyselina (Obr. 45). Ta byla do reakční směsi nasazována v množství 1,2 ekv. vůči monochlor-monomethoxy derivátu **7**. Jako báze v reakční směsi byl užit uhličitan draselný (K_2CO_3 ; 0,25 ekv. vůči výchozí látce **7**), jako prekatalyzátor pak XPhosPd G2 (2,5 mol% vůči **7**). Vhodné rozpouštědlo pro reakci bylo hledáno pomocí optimalizačních reakcí popsaných níže. Výsledek reakce byl vyhodnocován pomocí TLC a LC-MS analýzy.



Obr. 45: Reakční schéma znázorňující postup přípravy arylového derivátu squaramidu **17** s využitím Suzuki couplingu na monochlor-monomethoxy derivátu kyseliny squarové **7**.

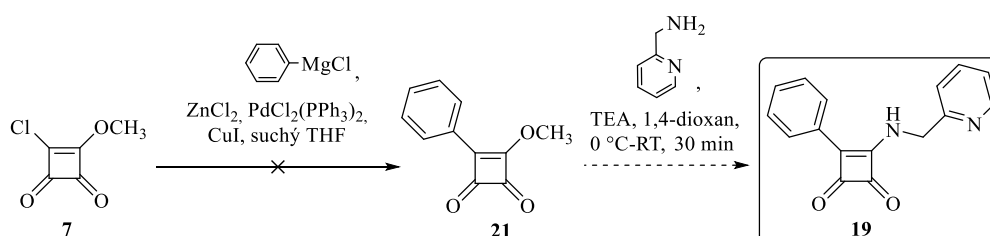
Provedeny byly opět celkem tři optimalizační reakce, které se lišily rozpouštědlem použitým pro reakci. V první z optimalizačních reakcí jako rozpouštědlo figuruje směs dioxan/voda v poměru 5:1, ve druhé pak směs toluen/voda v poměru 10:1, ve třetí poté samotný toluen.

Bohužel ani u jedné z nasazených optimalizačních reakcí, obdobně jako tomu bylo u Suzuki couplingu na dichlor derivátu kyseliny squarové **6** (kap. 5.2.1), nebyla detekována konverze výchozí látky **7** na požadovaný produkt **20**. Za přítomnosti vody (jako součásti rozpouštědla) pravděpodobně dochází k hydrolyze výchozí látky **7**, nicméně ani za bezvodých reakčních podmínek cross-couplingová reakce neprobíhá. Ani v jedné z optimalizačních reakcí nebyl detekován produkt **20**.

5.3.2 Negishi coupling monochlor-monomethoxy derivátu kyseliny squarové

Vedle Suzuki couplingu byla na monochlor-monomethoxy derivátu kyseliny squarové **7** testována také Negishiho cross-couplingová reakce (Obr. 46). Reakčními komponentami byly zmíněný monochlor-monomethoxy derivát **7** a fenylmagnesium chlorid (do reakce nasazované

v poměru 1:2). Jako transmetalaciční činidlo byl do reakce přidáván ZnCl_2 (buď pevný, nebo ve formě svého 1 M roztoku v THF, a to v množství 3 ekv. vůči monochlor-monomethoxy derivátu **7**). Katalýza reakce byla zajištěna přídatkem $\text{PdCl}_2(\text{PPh}_3)_2$ (0,02 ekv. vůči výchozí látce **7**) a CuI (0,04 ekv. vůči **7**). Výsledek reakce byl vyhodnocován na základě TLC a LC-MS analýzy.



Obr. 46: Reakční schéma znázorňující postup přípravy arylového derivátu squaramidu **19** s využitím Negishi couplingu na monochlor-monomethoxy derivátu kyseliny squarové **7**.

Bohužel stejně jako u předešlých couplingových experimentů ani zde nebyla u žádné z optimalizačních reakcí pozorována konverze výchozí látky **7** na produkt **21** (Tab. 12). LC-MS analýzy optimalizačních reakcí uvedených v Tab. 12 odhalily po uplynutí reakčního času pouze hydrolyzovanou výchozí látku **7**. To značí, že v reakční směsi pravděpodobně nedochází k žádné reakci, a to ani za MW podmínek (optimalizace č. 3 a 4; Tab. 12).

Tab. 12: Tabulka uvádějící konkrétní reakční parametry pro Negishi coupling na monochlor-monomethoxy derivátu kyseliny squarové **7**.

opt.č.	transmetalaciční činidlo	reakční podm.	reakční čas [min]	výsledek
1	1 M roztok ZnCl_2 v THF	RT	90	ND ^a
2	ZnCl_2 (s)	RT	90	ND
3	1 M roztok ZnCl_2 v THF	MW, 50 °C	30	ND
4	ZnCl_2 (s)	MW, 50 °C	30	ND

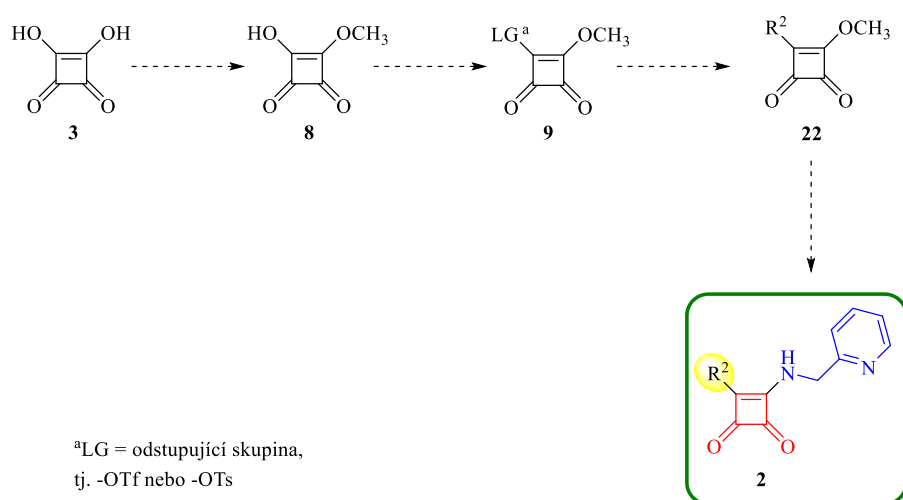
^aND = nedetekovaná konverze výchozí látky na produkt

Příčinou neúspěšné realizace Suzuki a Negishi couplingu na dichlor derivátu kyseliny squarové **6**, resp. na monochlor-monomethoxy derivátu **7**, může být nedostatečná reaktivita atomu chloru na výchozích komponentách **6** a **7**. Pokud by se podařilo na squarový skelet zavést reaktivnější skupinu (tj. lépe odstupující), šance na úspěšnou realizaci cross-couplingové reakce by se bezesporu zvýšily. Zavedením velmi dobře odstupujících skupin na squarový skelet se zabývá následující kapitola (kap. 5.4).

5.4 Syntéza arylových derivátů squaramidu pomocí reakční cesty D

Mimo halogenů lze jak pro Suzuki, tak pro Negishi coupling využít i triflátů a tosylátů. Pro zavedení těchto skupin na centrální squarový skelet s následnou cross-couplingovou reakcí byla navržena následující reakční sekvence (Obr. 47).

Jejím prvním krokem je převedení kyseliny squarové **3** na její monomethoxy derivát **8**. Následuje zavedení odstupující skupiny, díky které může být v dalším kroku realizována cross-couplingová reakce. Na závěr dochází k substituci methoxy skupiny 2-aminomethylpyridinem za vzniku finálního produktu **2**.



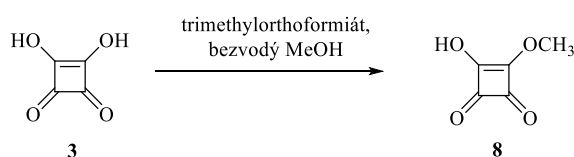
Obr. 47: Navržená reakční sekvence pro realizaci Suzuki nebo Negishi couplingu s intermediátem odvozeným od kyseliny squarové **3** se zavedenou tosylovou nebo triflylovou skupinou.

5.4.1 Převedení kyseliny squarové na její monomethoxy derivát

Monomethylace kyseliny squarové **3** je první reakcí navržené syntetické cesty. Jedná se o syntetický krok, který má vést především ke konverzi jednoho z hydroxylů na pseudoester,

který je možné v posledním kroku reakční sekvence snadno substituovat 2-aminomethylpyridinem. Zároveň úspěšná monomethylace kyseliny squarové **3** usnadňuje průběh následující tosylyace intermediátu **8** (reakce nemůže probíhat na bistosylovaný produkt).

Syntéza monomethyl squarátu **8** z kyseliny squarové **3** byla nejprve realizována pomocí trimethylorthoformiátu v suchém methanolu (Obr. 48). Tato metodika byla užita pro přípravu dimethoxy derivátu kyseliny squarové **4** při syntéze aminových derivátů squaramidu **1** (kap. 4). Při přípravě dimethoxy derivátu z kyseliny squarové bylo z TLC analýzy patrné, že vedle dimethoxysquarátu **4** se v reakční směsi formuje ještě vedlejší produkt, který svou polaritou odpovídal právě monomethoxy derivátu kyseliny squarové **8**. Pro účely optimalizace jeho syntézy bylo nasazeno celkem pět reakcí. Všechny s mírnějšími podmínkami, než které vedou ke známé přípravě dimethyl squarátu **4** (tj. 2 ekv. trimethylorthoformiátu, 65 °C, 24 h), aby byl zajištěn co možná nejselektivnější vznik pouze monosubstituovaného produktu **8**. Výsledek reakce byl vyhodnocován na základě TLC analýzy.



Obr. 48: Reakční schéma znázorňující přípravu monomethoxy derivátu kyseliny squarové **8** pomocí trimethylorthoformiátu v suchém methanolu.

Z výsledků TLC analýz optimalizačních reakcí plyne, že pokud reakce probíhá za RT (optimalizace č. 1-3; Tab. 13), nevzniká disubstituovaný produkt **4**, nicméně odreagovává pouze malé množství výchozí kyseliny squarové **3**. Ani prodloužení reakčního času (optimalizace č. 3; Tab. 13) nebo nadbytek trimethylorthoformiátu (optimalizace č. 2 a 3; Tab. 13) konverzi výchozí látky **3** nezvyšují. Při zahřevu reakční směsi je konverze z pohledu výchozí kyseliny squarové **3** lepší, nicméně vzniká značné množství disubstituovaného produktu **4** (optimalizace č. 4 a 5; Tab. 13). Jako nejvhodnější reakční podmínky byly nakonec vyhodnoceny ty odpovídající optimalizaci č. 4 (Tab. 13).

Syntéza byla za těchto podmínek nasazena z většího množství výchozí látky **3** a po uplynutí reakčního času a odpaření reakční směsi byl produkt izolován pomocí LC. Nicméně purifikace byla opakovaně neúspěšná. Eluován z chromatografické kolony byl vždy pouze dimethyl squarát **4** a při promytí LC kolony polárním rozpouštědlem (MeOH) poté kyselina squarová **3**. Produkt, který svou polaritou odpovídal monomethyl squarátu **8**, se

při žádné z LC purifikací nepodařilo izolovat. Kompletní přehled násad optimalizačních reakcí a reakčních podmínek uvádí Tabulka 13 níže.

Tab. 13: Násady reakčních komponent a reakční podmínky pro přípravu monomethoxy derivátu kyseliny squarové **8** pomocí trimethylorthoformiátu v suchém methanolu.

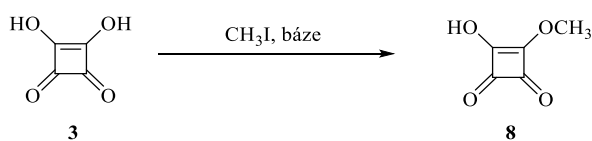
opt. č.	množství trimethylorthoformiátu	reakční teplota	reakční čas	výsledek reakce
1	1 ekv. vůči kys. squarové	RT	24 h	Většina VL ^a , monosubst. P ^b detekovatelný, disubst. P ^c nevzniká
2	2 ekv. vůči kys. squarové	RT	24 h	Většina VL, monosubst. P detekovatelný, disubst. P nevzniká
3	2 ekv. vůči kys. squarové	RT	50 h	Většina VL, monosubst. P detekovatelný, disubst. P nevzniká
4	1 ekv. vůči kys. squarové	55 °C	24 h	Cca 50 % VL odreagováno, monosubst. P detekovatelný, disubst. P minoritně
5	2 ekv. vůči kys. squarové	40 °C	24 h	VL téměř odreagovaná, ale majoritně vzniká disubst. P

^aVL = výchozí látka

^bmonosubst. P = monomethyl squarát

^cdisubst. P = dimethyl squarát

Jako alternativní možnost pro dosažení syntetické přeměny kyseliny squarové **3** na její monomethoxy derivát **8** byl využit methyljodid (CH₃I; Obr. 49). Prakticky byla reakce realizována vždy rozpuštěním výchozí kyseliny squarové **3** a ochlazením získaného roztoku na 0 °C. Při této teplotě byla přidána báze a reakční směs byla ponechána cca 5-10 minut za stálého míchání. Následně byl do reakční směsi po kapkách přidán methyljodid (1 ekv. vůči kyselině squarové **3**). Výsledek reakce byl vyhodnocován na základě TLC analýzy.



Obr. 49: Reakční schéma znázorňující přípravu monomethoxy derivátu kyseliny squarové **8** pomocí methyljodidu.

Zpočátku byl jako báze pro reakci užíván triethylamin (TEA). Nicméně v jeho přítomnosti jako báze produkt **8** vznikal jenom minoritně, a pouze za zvýšené teploty (optimalizace č. 4-6; Tab. 14), za RT (optimalizace č. 1-3; Tab. 14) nebyla pozorována žádná konverze výchozí látky **3** na produkt **8**. Proto byly testovány jiné báze, které by pro průběh reakce mohly být vhodnější – konkrétně uhličitan draselný (optimalizace č. 7; Tab. 14) a DBU (optimalizace č. 8; Tab. 14). Pouze za přídavku DBU jako báze byla detekována vyhovující konverze výchozí kyseliny squarové **3** na její monomethoxy derivát **8**.

Při přídavku methyljodidu do roztoku kyseliny squarové **3** a DBU v THF docházelo k okamžitému vzniku sraženiny. Proto byl reakční čas u dalších optimalizací poměrně výrazně zkrácen, kompletní konverze byla zjištěna již po 5 minutách průběhu reakce (optimalizace č. 9; Tab. 17). Problém nastal při purifikaci vzniklého produktu **8**. Ten totiž vznikal ve formě své soli s DBU. Z tohoto důvodu další snažení směřovalo k možnému snížení množství DBU přidávaného do reakce (optimalizace č. 10; Tab. 17), nicméně neúspěšně, za těchto podmínek nebyla pozorována žádná konverze výchozí látky **3** na produkt **8**.

Ve většině pokusů o purifikaci vzniklého produktu **8** pomocí LC nedošlo vůbec k jeho eluci. Nejlepší výsledek byl získán pomocí LC purifikace s využitím mobilní fáze DCM/MeOH 9:1 s přídavkem AcOH. Za těchto podmínek byl produkt z LC kolony alespoň částečně eluován. Nicméně i přes průchod kolonou zůstal ve formě soli s DBU (potvrzeno pomocí ^1H NMR). Ani pomocí methyljodidu příprava monomethyl squarátu **8** nebyla úspěšná a navržená reakční cesta D proto byla ukončena již ve svém prvním kroku.

Tab. 14: Tabulka uvádějící konkrétní reakční podmínky optimalizačních reakcí pro přípravu monomethyl squarátu **8** z kyseliny squarové **3** pomocí methyljodidu.

opt. č.	báze [ekv] ^a	rozp.	reakční teplota	reakční čas	výsledek [VL:P; %] ^c
1	TEA; 1	MeCN	RT	2 h	ND ^b
2	TEA; 1	DCM	RT	2 h	ND
3	TEA; 1	THF	RT	2 h	ND
4	TEA; 1	MeCN	50 °C	3 h	90:10
5	TEA; 1	DCM	50 °C	3 h	ND
6	TEA; 1	THF	50 °C	3 h	80:20
7	K ₂ CO ₃ ; 1	THF	RT	3 h	ND
8	DBU; 1	THF	RT	3 h	0:100
9	DBU	THF	RT	5 min	0:100
10	DBU; 0,1	THF	RT	5 min	ND

^amnožství báze uvedené v ekvivalentech vůči výchozí látce **3**

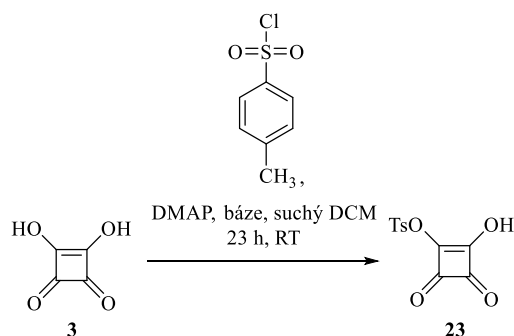
^bND = nereaguje (neprobíhá žádná reakce)

^cpoměr VL (výchozí látky) a P (produktu) v reakční směsi byl odhadován na základě TLC analýzy

5.4.2 Tosylace/triflace kyseliny squarové

Paralelně s monomethylací kyseliny squarové **3** byl testován i druhý krok navržené reakční sekvence, tj. vytvoření triflátu nebo tosylátu na squarovém skeletu (Obr. 47; strana 58). Přestože triflát/tosylát by měl být zaveden až na monomethyl squarát **8**, byly tyto reakce testovány již na molekule kyseliny squarové **3**, která byla na rozdíl od squarátu **8** k dispozici. Předpokladem v tomto ohledu bylo, že vhodné reakční podmínky pro tosylaci/triflaci kyseliny squarové **3** by byly vyhovující i pro její odpovídající monomethoxy derivát **8**.

Pro tosylaci kyseliny squarové **3** byl použit tosylchlorid (v 1 ekv. množství vůči výchozí kyselině squarové **3**) za přítomnosti báze a DMAP (0,1 ekv. vůči výchozí kyselině squarové **3**) v bezvodém DCM (Obr. 50). Reakce probíhala po dobu 23 h za RT. Výsledek reakce byl vyhodnocován na základě LC-MS analýzy.



Obr. 50: Tosylace kyseliny squarové **3**.

Optimalizace tosylace kyseliny squarové **3** se zabývala především výběrem vhodné báze pro reakci, testovány byly konkrétně TEA, K_2CO_3 a DBU (optimalizace č. 1-3, Tab. 15). Jedinou reakcí, u které byl na UV/VIS spektru LC-MS analýzy detekován produkt **23** byla optimalizace č. 2 (s K_2CO_3 jako bází), nicméně jeho obsah v reakční směsi byl nevyhovující (odhadem z UV/VIS spektra LC-MS do 5 %). U optimalizačních reakcí č. 1 a 3 produkt **23** nebyl detekován vůbec. Poslední z optimalizačních reakcí (optimalizace č. 4, Tab. 15) sloužila k vyhodnocení, jestli na průběh reakce bude mít vliv množství přidávané báze. Reakce byla proto nasazena s dvěma ekvivalenty TEA. Nicméně ani s nadbytkem báze nebyla v reakci detekována konverze výchozí látky **3** na produkt **23**. Přehled optimalizačních reakcí pro tosylaci kyseliny squarové **3** s jejich výsledky uvádí tabulka níže (Tab. 15).

Tab. 15: Parametry optimalizačních reakcí pro tosylaci kyseliny squarové **3**.

opt. č.	báze [ekv] ^a	rozpouštědlo	výsledek [VL:P] ^c
1	TEA; 1	suchý DCM	ND ^b
2	K_2CO_3 ; 1	suchý DCM	95:5
3	DBU; 1	suchý DCM	ND
4	TEA; 2	suchý DCM	ND

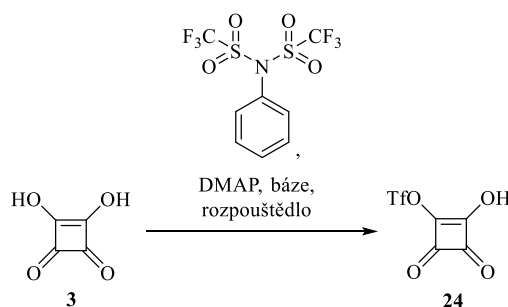
^amnožství báze uvedené v ekvivalentech vůči výchozí látce **3**

^bND = nereaguje (neprobíhá žádná reakce)

^cpoměr VL (výchozí látky) a P (produktu) v reakční směsi byl odhadován na základě TLC analýzy

Triflace kyseliny squarové **3** byla realizována pomocí *N*-fenylbis-trifluormethansulfonimidu jako triflačního činidla za přídavku báze a DMAP (0,1 ekv. vůči výchozí kyselině squarové **3**;

Obr. 51). Jako rozpouštědla reakce byly užívány buď suchý DCM, suchý DMF nebo suchý THF. Výsledek reakce byl vyhodnocován na základě LC-MS analýzy.



Obr. 51: Triflace kyseliny squarové **3**.

První tři z optimalizačních reakcí (optimalizace č. 1-3; Tab. 16) využívají jako báze pro reakci TEA. Nicméně ani v jeho nadbytku a za záhřevu reakční směsi nedošlo k výraznější konverzi výchozí látky **3** na produkt **24**. Z tohoto důvodu byla při dalších optimalizačních reakcích věnována pozornost nalezení vhodné báze pro reakci. Zkoušeny byly K₂CO₃ (optimalizace č. 4; Tab. 16) a hydrid sodný (NaH; optimalizace č. 5 a 6; Tab. 16). LC-MS analýza jak optimalizační reakce 5, tak i 6 odhalovala vznik produktu **24** ve vyhovujícím poměru k výchozí látce **3**. Za přítomnosti dvou ekvivalentů triflačního činidla byla konverze téměř úplná (optimalizace č. 6; Tab. 16). Problematické se však ukázalo zpracování reakce. Pro reakci s hydridem sodným byl totiž jako rozpouštědlo použit suchý DMF. Pro jeho odstranění byla reakce vytřepána s vodou. Po provedení extrakce však nebyl produkt **24** v organické fázi detekován. Produkt **24** pravděpodobně díky své polaritě, popř. kyselosti své hydroxylové skupiny a tvorbě soli přešel do vodné fáze.

Další optimalizační reakce se proto zabývala možnou náhradou DMF jiným rozpouštědlem. Testována byla možnost použití suchého THF (optimalizace č. 7; Tab. 16). Při použití suchého THF místo DMF však za stejných reakčních podmínek reakce prakticky neprobíhá.

Proto byla pozornost dále věnována možnostem náhrady NaH jako báze v reakční směsi. Z předešlých optimalizačních reakcí vyplývá, že je třeba užití poměrně silné zásady. Testováno bylo konkrétně DBU (optimalizace č. 8-10; Tab. 16). V přítomnosti DBU produkt **24** vznikal v solidním množství. Záhřev reakční směsi (optimalizace č. 9; Tab. 16) a delší reakční čas nevedly ke zvýšení konverze výchozí látky **3** na produkt **24**. Průběh reakce v poslední optimalizaci byl proto podpořen nadbytkem triflačního činidla (optimalizace č. 10; Tab. 16). To vedlo k úplnému odreagování výchozí látky **3**. Ačkoli se za těchto podmínek

v reakční směsi formoval i nspecifikovaný vedlejší produkt, byly tyto reakční podmínky vyhodnoceny jako nejvhodnější pro provedení reakce.

Problém přišel s purifikací vzniklého produktu **25**. Ten bylo třeba z reakční směsi izolovat, protože odreagované triflační činidlo, DBU a vedlejší produkty ve směsi by narušovaly průběh následujících reakcí v sekvenci, především pak cross-couplingové reakce. Bohužel se daný produkt **24** ani krystalizačně (DCM/Hex; EtOAc/Hex), ani pomocí LC purifikace nepodařilo získat. Přehled optimalizačních reakcí pro triflaci kyseliny squarové **3** s jejich výsledky uvádí Tabulka 16 níže.

Tab. 16: Parametry optimalizačních reakcí pro triflaci kyseliny squarové **3**.

opt. č.	triflační činidlo [ekv.] ^a	báze [ekv.] ^b	rozpouštědlo	reakční teplota	reakční čas [h]	výsledek [VL:P] ^c
1	1	TEA; 1	suchý DCM	RT	3	95:5
2	1	TEA; 3	suchý DCM	RT	22	80:20
3	1	TEA; 3	suchý DCM	50 °C	3	80:20
4	1	K ₂ CO ₃ ; 1	suchý DCM	RT	22	83:17
5	1	NaH; 1	suchý DMF	RT	22	34:66
6	2	NaH; 1	suchý DMF	RT	22	5:95
7	1	NaH; 1	suchý THF	RT	3	95:5
8	1	DBU; 1	suchý DCM	RT	3	23:77
9	1	DBU; 1	suchý DCM	50 °C	22	60:40
						0:90 +
10	2	DBU; 1	suchý DCM	RT	22	vedlejší produkt

^amnožství báze uvedené v ekvivalentech vůči výchozí látce **3**

^bmnožství triflačního činidla (*N*-fenylbis-trifluormethansulfonimidu) v ekvivalentech vůči výchozí látce **3**

^cpoměr VL (výchozí látky) a P (produktu) v reakční směsi byl odhadován na základě LC-MS analýzy

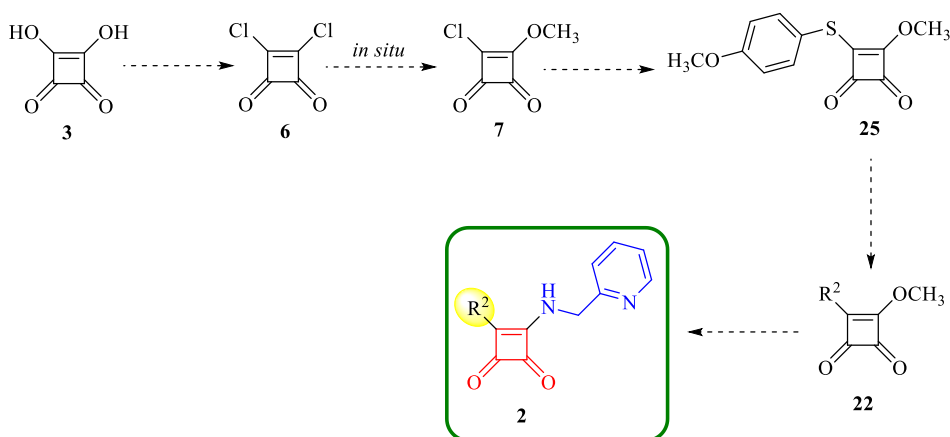
Ani jedna z dílčích optimalizovaných reakcí reakční cesty D nenaznačovala, že by navržená reakční sekvence měla být úspěšná. Z tohoto důvodu byly snahy o otevření nové syntetické cesty, která by vedla k přípravě arylových derivátů squaramidu **2** Suzuki nebo Negishi couplingem, ukončeny. Po důkladné rešerši byl místo nich pro klíčový reakční krok zavedení

aromatického substituentu na squarový skelet vybrán Liebeskind-Srogl coupling. Podle toho se odvíjel celý návrh nového reakčního sledu.

5.5 Syntéza arylových derivátů squaramidu pomocí reakční cesty E

Následující kapitola se týká přípravy arylových derivátů squaramidu **2** s využitím Liebeskind-Srogl couplingu. Tato cross-couplingová reakce využívá jako odstupující skupiny thioesteru (zde konkrétně pseudothioesteru kyseliny squarové). Tomu byl uzpůsoben celý návrh reakční sekvence, který znázorňuje Obr. 52 níže.

Prvním krokem je v práci již zmiňovaná reakce týkající se převedení kyseliny squarové **3** na její dichlor derivát **6**, druhým krokem je poté methanolýza jednoho ze zavedených chlorů. Třetí reakcí v sekvenci je substituce druhého atomu chloru pomocí *p*-methoxythiofenolu. Následuje samotná cross-couplingová reakce a celý reakční sled je zakončen substitucí methoxy skupiny pomocí 2-aminomethylpyridinu za vzniku finálního produktu **2**.

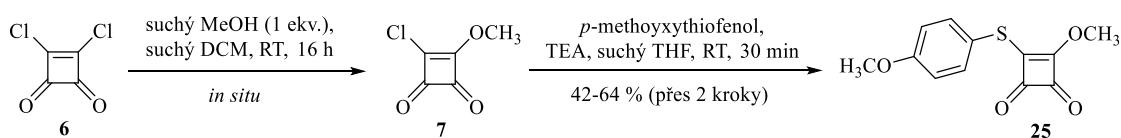


Obr. 52: Navržená reakční sekvence pro přípravu arylových derivátů squaramidu **2** s využitím Liebeskind-Srogl couplingu.

První dva kroky navržené reakční cesty E zde nebudou již rozebírány, dopodrobna byly diskutovány již na předchozích stranách předložené práce (konkrétně v kapitolách 5.1 a 5.3). První podkapitola související s reakčním sledem E se tedy bude týkat až třetího reakčního kroku, tj. substituce atomu chloru pomocí *p*-methoxythiofenolu.

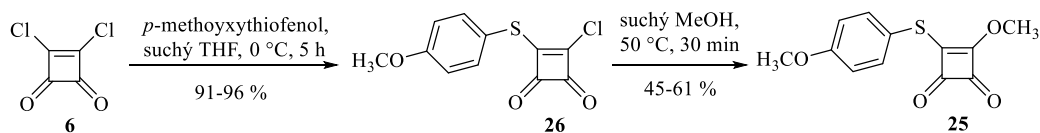
5.5.1 Zavedení *p*-methoxythiofenolu na squarový skelet

Zavedení *p*-methoxythiofenolu na squarový centrální kruh bylo realizováno rozpuštěním výchozího derivátu **7** v suchém THF a ochlazením připraveného roztoku na 0 °C (Obr. 53). Při této teplotě byl k výchozí komponentě **7** po kapkách přidán *p*-methoxythiofenol a TEA. Takto připravená reakční směs byla ponechána na míchačce za RT po dobu 30 minut. Po uplynutí reakčního času byla vysrážená triethylamoniová sůl odsáta. Ze získaného filtrátu byl následně pomocí LC purifikován produkt **25**. Výtěžek produktu byl stanovován přes dva reakční kroky, tzn. od dichlor derivátu kyseliny squarové **6**.



Obr. 53: Příprava klíčového intermediátu **25** reakční cesty E.

Substituce atomů chloru na squarovém skeletu pomocí MeOH a *p*-methoxythiofenolu lze provádět i v opačném pořadí, než je znázorněno na reakčním schématu výše (Obr. 53), tzn. nejprve lze provést substituci *p*-methoxythiofenolem s následnou methanolýzou druhého atomu chloru (Obr. 54). Substituce atomu chloru na dichlor derivátu kyseliny squarové **6** *p*-methoxythiofenolem je dokonce publikovanou reakcí.⁸⁶ Ta probíhá víceméně v kvantitativních výtěžcích, nicméně do reakce vstupuje pouze 0,5 ekvivalentu *p*-methoxythiofenolu, ke kterému je publikovaný výtěžek vztažen. Reálně je tak při reakci „ztraceno“ poměrně vysoké množství dichlor derivátu kyseliny squarové **6**. Methanolýzu pak lze provést rozpuštěním intermediátu **26** v bezvodém methanolu a záhřevem roztoku na 50 °C po dobu 30 minut.



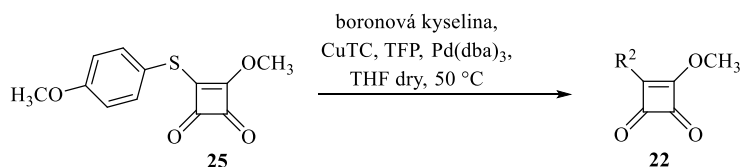
Obr. 54: Možnost záměny pořadí substitučních kroků pro přípravu intermediátu **25** reakční cesty E.

Testovány byly obě možnosti pořadí substitučních kroků. Pro finální syntézu knihovny arylových derivátů **2** byla užita první zmíněná varianta, tj. ta znázorněná na Obr. 53. Z mého pohledu je praktické provedení sekvence v tomto pořadí méně manuálně náročné, protože

reakční intermediát **7** není třeba izolovat. Reakční směs po methanolýze stačí odfoukat. Zároveň je syntetický přístup znázorněný na Obr. 53 i o něco málo ekonomicky výhodnější.

5.5.2 Liebeskind-Srogl coupling

Úspěšnou přípravou pseudothioesteru kyseliny squarové **25** byl získán klíčový reakční intermediát pro realizaci Liebeskind-Srogl couplingu. Odrasovým můstkem pro volbu reakčních podmínek cross-couplingové reakce byla publikace od autorů Aguilar-Aguilar a kol. zmíněná již v teoretické části předložené práce (Obr. 55).⁸⁶ Publikace pro coupling využívá nadbytku boronové kyseliny (2,5 ekv. vůči výchozímu pseudothioesteru **25**) a katalýzu Pd⁰, jehož zdrojem v reakci je Pd(dba)₃ (v množství 1 mol% vůči výchozí látce **25**). Jako ligand pro reakci vystupuje tri(2-furyl)fosfin (TFP; 1 mol%) a jako kokatalyzátor reakce thiofenkarboxylát měďný (CuTC; 3 ekv. vůči **25**). Jako rozpouštědlo je v publikaci užíván bezvodý THF. Reakce probíhá 20 h za stálého ohřevu reakční směsi na 50 °C a bezvodých podmínkách.



Obr. 55: Liebeskind-Srogl coupling pseudothioesteru squarové kyseliny **25** za podmínek uvedených v publikaci.⁸⁶

Za převzatých reakčních podmínek (Obr. 55) při couplingu deaktivovaných boronových kyselin reakce poskytovala pouze nízké výtěžky (resp. bylo dosahováno nízké konverze výchozí látky **25** na produkt **22**). Proto bylo třeba reakční podmínky couplingové reakce optimalizovat.

Společně s optimalizací bylo také důležitým cílem zjistit, zda je možné místo boronových kyselin pro coupling použít i jejich estery. Pro tyto účely byla provedena studie, jejíž výsledky shrnuje Tabulka 17 dále. Pro její uskutečnění byli vybráni různí zástupci boronových kyselin, jak systémy aktivované (tj. vstup č. 1; Tab. 17), tak neaktivované (vstup č. 2 a 3; Tab. 17) i deaktivované (vstup č. 4 a 5; Tab. 17), popř. i jejich esterů – pinakolových (vstup č. 6 a 7; Tab. 17) i MIDA esterů (vstup č. 8; Tab. 17). Jednotlivé boronové kyseliny a jejich estery byly vybírány především na základě jejich dostupnosti ve formě boronových sloučenin. Potenciální přínos substituentu co do biologické aktivity finálního derivátu **2** byl až druhotným hlediskem.

Biologická aktivita látek by byla prioritou až po potvrzení možnosti realizace této syntetické cesty s uspokojivými výtěžky finálních derivátů **2**.

Pro optimalizaci couplingu byly navrženy celkem čtyři různé reakční podmínky, za kterých byly boronové kyseliny, popř. jejich estery, nechány s výchozí látkou **25** reagovat. Testován byl průběh reakce za různé teploty i MW podmínek. Jako rozpouštědlo byl pro reakci využíván suchý THF při nižší teplotě (tj. 50 °C), pro průběh reakce za 100 °C bylo třeba sáhnout k výše vroucímu rozpouštědlu, vybrán byl 1,4-dioxan. Výsledek reakce byl vyhodnocován na základě LC-MS analýzy. Výjimkou je vstup č. 4 (Tab. 17), u kterého byl výsledek reakce vyhodnocován pomocí TLC z důvodu shody retenčních časů výchozí látky **25** a produktu **22** na UV/VIS spektru LC-MS analýzy.

Z optimalizačních reakcí (Tab. 17 níže) vyplývá, že boronové kyseliny, které jsou elektronově aktivovanými systémy podstupují Liebeskind-Srogl coupling za velmi dobré konverze výchozí látky **25** i za záhřevu reakční směsi na 50 °C (vstup č. 1; Tab. 17). Záhřev reakční směsi s aktivovanými boronovými kyselinami na vyšší teplotu konverzi výchozí látky **25** na produkt **22** již nemá kam dále posunout (konverze je úplná), nicméně zároveň ani nezpůsobuje rozklad produktu **22** a nijak průběh reakce negativně neovlivňuje. Naopak u boronových kyselin, které jsou elektronově deaktivované, je záhřev reakce na 100 °C potřebný a pouze při takto vysoké teplotě bylo dosaženo vyhovující konverze výchozí látky **25** na produkt **22**. Provedení reakce za MW podmínek při kratším reakčním čase se ukázalo jako nežádoucí. Za takových podmínek není dosahováno alespoň stejných chemických konverzí jako tomu je v případě záhřevu reakční směsi na 100 °C po dobu 20 hodin.

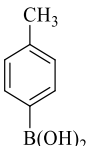
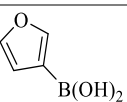
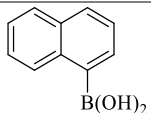
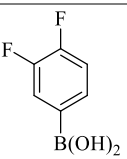
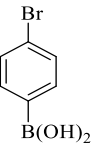
Tyto reakční podmínky (100° C; 20 h za užití bezvodého 1,4-dioxanu jako rozpouštědla) byly z důvodu nejvyšších detekovaných konverzí výchozí látky **25** na produkt **22** vybrány pro praktické realizace couplingových reakcí. Jevily se jako univerzální pro všechny boronové kyseliny.

Co se týče esterů boronových kyselin, u pinakolů byla pozorována konverze pouze u 4,4,5,5-tetramethyl-2-(5-methylthiofen-2-yl)-1,3,2-dioxaborolanu (vstup č. 6; Tab. 17), u *N*-(4-(4,4,5,5-tetramethyl-1,3,2-dioxaborolan-2-yl)fenyl)acetamidu (vstup č. 7; Tab. 17) nikoli. Coupling druhého zmiňovaného boronového esteru pravděpodobně může do jisté míry narušovat VEP na atomu dusíku, nicméně v literatuře je možné dohledat realizace Liebeskind-Sroglva couplingu i s výchozími látkami, které obsahují obdobně chráněnou primární aminoskupinu.¹⁰² Stejně tak je i publikováno provedení Liebeskind-Sroglva couplingu s některými pinakolovými estery boronových kyselin. Ty by tedy na základě experimentálních i známých publikovaných výsledků mohly

být vhodnými výchozími komponentami pro Liebeskind-Srogl coupling vedle samotných boronových kyselin.¹⁰³ Příčinu toho, proč reakce konkrétně s *N*-(4-(4,4,5,5-tetramethyl-1,3,2-dioxaborolan-2-yl)fenyl)acetamidem neprobíhala těžko přesně určit, zvláště z takto úzkého počtu testovaných pinakolových esterů boronových kyselin.

Na rozdíl od těch pinakolových, MIDA estery jako výchozí látky Liebeskind-Srogl couplingu žádná dostupná publikace neuvádí. Testovaná reakce s 4-pyridyl boronovým MIDA esterem (vstup č. 8; Tab. 17) byl proveden především pro úplnost analýzy možných výchozích látek couplingové reakce. Ke konverzi výchozí látky **25** na produkt **22** nedochází. Kompletní přehled testovaných boronových sloučenin s výsledkem reakce za daných podmínek uvádí Tabulka 17 níže.

Tab. 17: Tabulka uvádějící přehled různých boronových kyselin a jejich esterů s výsledkem průběhu Liebeskind-Srogl couplingu za daných reakčních podmínek.

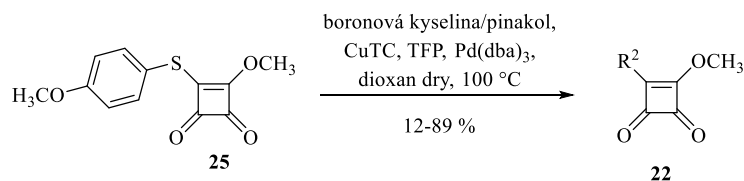
vstup č.	struktura	50 °C;	100 °C;	MW; 50 °C;	MW; 100 °C;
		20 h; suchý dioxan ⁸⁶ [VL:P] ^b	20 h; suchý dioxan [VL:P]	1 h; 200 W; suchý THF [VL:P]	1 h; 200 W; suchý dioxan [VL:P]
1		0:100	0:100	50:50	0:100
2		NT ^a	0:100	NT	60:40
3		NT	0:100	NT	0:100
4		90:10	60:40	NT	NT
5		70:30	0:100	NT	60:40

6		NT	20:80	NT	nereaguje
7		nereaguje	nereaguje	NT	nereaguje
8		NT	nereaguje	NT	NT

^aNT = nebylo testováno

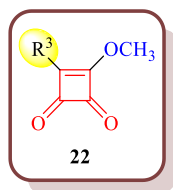
^bpoměr VL (výchozí látky) a P (produktu) v reakční směsi byl odhadován na základě LC-MS, popř. TLC analýzy

Za optimalizovaných reakčních podmínek (Obr. 56) a výběru vyhovujících boronových reakčních komponent pro Liebeskind-Srogl coupling byla připravena série intermediátů **22** (Tab. 18). Výtěžky, v jakých byly jednotlivé produkty **22** získány odpovídají elektronové aktivaci výchozích boronových kyselin. Všechny produkty uvedené v Tabulce 18 dále byly plně charakterizovány pomocí NMR a HRMS.



Obr. 56: Průběh Liebeskind-Srogl couplingu pseudothioesteru **25** za optimalizovaných reakčních podmínek.

Tab. 18: Přehled produktů **22** připravených pomocí Liebeskind-Srogl couplingu pseudothioesteru **25**.



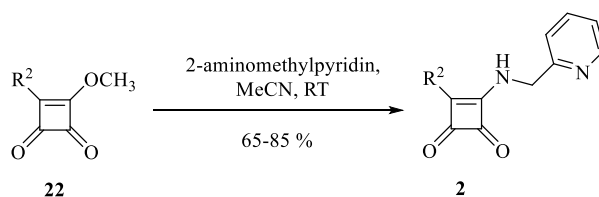
sloučenina	R ²	výtěžek [%] ^a
22a		89
22b		12
22c		12
22d		88
22e		42
22f		61
22g		59

^aVýtěžek čisté látky po LC.

5.5.3 Substituce methoxy skupiny 2-aminomethylpyridinem

Posledním krokem navržené reakční cesty E je substituce methoxy skupiny na squarovém kruhu pomocí 2-aminomethylpyridinu (Obr. 57). Ten byl do reakce přidáván v ekvivalentním

množství vůči výchozí látce **22**. Reakce byla prováděna v acetonitrilu (MeCN) po dobu 30 minut za RT.

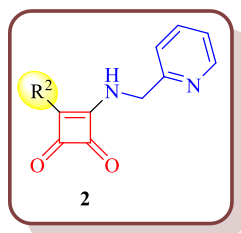


Obr. 57: Substituce methoxy skupiny 2-aminomethylpyridinem za formace finálního produktu **2**.

V průběhu reakce se produkt **2** v reakční směsi srážel. Izolace byla proto vždy provedena odsáním finálního derivátu **2** s následným promytím na filtru. Pokud to bylo žádoucí, byla poté ještě provedena LC purifikace produktu **2**.

Všechny produkty **2** byly získány v poměrně vysokých výtěžcích (Tab. 19). Jedinou látkou, u které nebyla úspěšně provedena substituce 2-aminomethylpyridinem na squarovém kruhu, je derivát **22f**. Při reakci s ním nedocházelo k vysrážení produktu, jako tomu bylo u ostatních derivátů **22**. Proto byla reakce zpracovávána odpařením rozpouštědla a purifikací odpovídajícího produktu **21** pomocí LC. Produkt **21** byl vždy pomocí TLC bezprostředně po eluci při kapalinové chromatografii detekován jako čistý. Nicméně už krátkodobým stáním eluované frakce, ve kterých byl produkt **21** obsažen, měnily barvu – z původní žluté na hnědou. Po spojení a odpaření frakcí byla vždy provedena ^1H NMR analýza, která sice jednoznačně detekovala produkt **21**, avšak poměrně značně znečištěný. Stejně tak i TLC analýza provedena s určitým časovým odstupem od LC purifikace. Rozklad produktu **21** naznačuje i jeho vzhled. Zatímco všechny ostatní finální deriváty **2** byly získány jako bílé/žluté pevné látky, derivát **21** při substituci 2-aminomethylpyridinem tvořil hnědou viskózní kapalinu. Možnost rozkladu finálního derivátu **21** při jeho odpaření za zvýšené teploty byla vyloučena. Přehled připravených derivátů **2** i s výtěžky substituce 2-aminomethylpyridinem uvádí Tabulka 19 níže.

Tab. 19: Přehled připravených finálních produktů **2** s výtěžky substituce 2-aminomethylpyridinem.



sloučenina	R ²	výtěžek [%] ^a
2g		85
2h		81
2i		79
2j		60
2k		82
2l		produkt se rozkládá
2m		87

^aVýtěžek čisté látky po LC.

Celkem bylo reakční cestou E pomocí Liebeskind-Srogl couplingu připraveno a plně charakterizováno šest finálních derivátů **2** (a celkem sedm jejich prekurzorů **22**). Tím, alespoň z mého pohledu, byla dokázána praktická realizovatelnost reakční sekvence a byl tak otevřen

nový přístup pro přípravu arylových derivátů squaramidu **2**. Ačkoli výtěžky Liebeskind-Srogl couplingu s deaktivovanými boronovými kyselinami nejsou vždy velmi vysoké, pro účely medicínální chemie jsou dostačující. Vyvinutá metodika se i díky tomu zdá poměrně univerzální a mohla by nabídnout možnost přípravy nejrůzněji substituovaných squaramidů.

6 Biologická aktivita finálních derivátů

Připravené finální produkty ze série **1** a **2** byly testovány na svou *in vitro* antimykobakteriální aktivitu proti *M. tuberculosis* H37Ra. Biologické testy derivátů **2g-m** připravených reakční cestou E pomocí Liebeskind-Srogl couplingu bohužel nestihly být včas dokončeny, a proto nejsou součástí předložené práce. Testy byly prováděny na belgickém pracovišti v Antverpách (Laboratory for Microbiology, Parasitology and Hygiene, University of Antwerp).

Při posuzování aktivity jednotlivých derivátů byl nejprve proveden základní screening všech látek proti *M. tuberculosis* H37Ra (ATCC® 25177™). Na základě tohoto experimentu byly určeny primární hity. Detekční hranice byla determinována na základě redukce množství jedinců mykobakteria v buněčné kultuře a byla stanovena na 60 % při 10 µM množství látky při sedmidenní inkubaci s mykobakteriální kulturou.

Jako primární hity byly ve všech případech identifikovány arylové deriváty squaramidu **2**, u kterých na základě toho byla stanovena i hodnota MIC. Žádný z připravených aminových derivátů **1a-g** nevykazoval výraznější biologickou aktivitu. Pravděpodobnou příčinou nízké biologické aktivity připravených aminových derivátů **1** je jejich špatná rozpustnost.

Z výsledků stanovení MIC vyplývá, že nejaktivnější z testovaných látek je derivát **2d**, u kterého byla naměřena submikromolární hodnota MIC proti *M. tuberculosis* H37Ra. Velmi pozitivním zjištěním také bylo, že látka **2d** je aktivní i proti intracelulárním replikujícím se mykobakteriím. To bylo potvrzeno pomocí experimentu s makrofágy RAW264.7. Ty pro účely testu byly infikovány *M. tuberculosis* H37Ra. Způsobená infekce byla následně „lčena“ podáváním derivátu **2d** s výsledkem 90% redukce mykobakteriální intracelulární nálože po čtyřech dnech podávání látky.

Důležité je zmínit, že u žádného z arylových derivátů squaramidu nebyla zjištěna akutní cytotoxicita. Ta byla testována v rozmezí do 128 µM proti plicním fibroblastům MRC-5, hepatocytům HepG2 a makrofágům RAW264.7. Stejně tak u squarových derivátů byla vyloučena jejich genotoxicita, opět testovaná v rozsahu do 128 µM. Přehled aktivních derivátů s jejich hodnotami MIC nabízí Tabulka 20 níže.

Tab. 20: *In vitro* antimykobakteriální aktivita proti *M. tuberculosis* H37Ra nejaktivnějších z testovaných derivátů **1** a **2**.

sloučenina	MIC ₅₀ [μM]
2a	9,87
2b	2,88
2c	9,44
2d	0,73
isoniazid	0,18 ¹⁰⁴

Pomocí nejaktivnější z testovaných látek **2d** bylo potvrzeno vazebné místo squaramidů na mykobakteriální ATP synthase. Podáváním látky **2d** v její desetinásobné MIC koncentraci byli generováni spontánní mutanti. Jejich genotypizací byl zjištěn vznik dominantní mutace v oblasti genu *atpB*, konkrétně Asn¹⁷⁹ (AAT) → Lys¹⁷⁹ (AAG), tedy mutace thyminu na guanin (Obr. 58). Vzniklá mutace vede k rezistenci mykobakteriálních buněk proti squarovým derivátům. Expresí genu *atpB* vzniká podjednotka *a*. Ta tedy mohla být spolehlivě určena jako molekulární cíl squaramidů.



Obr. 58: Detekovaná změna v genetickém kódu rezistentních mutantů.

Velice důležitým faktem pro potenciál squaramidů jako inhibitorů mykobakteriální ATP synthasy je, že jejich vazebné místo na cílovém enzymu se liší od vazebného místa bedaquilinu (BDQ). Díky tomu jsou squaramidy aktivní i proti BDQ-rezistentním kmenům.

Na závěr biologické evaluace byly u neaktivnějších derivátů provedeny metabolické studie. Všechny z testovaných látek vykazovaly náchylnost k metabolizaci myšími enzymy metabolické fáze I (tj. pomocí cytochromu P 450; CYP450), v menší míře pak enzymy myší metabolické fáze II (tj. UDP-glykuronosyltransferasou; UGT). Jako nejstabilnější byl určen fluorovaný derivát **2b**, u nějž bylo detekováno 41 % parentální sloučeniny po 30 minutách od jejího podání. Daleko vyšší stabilitu pak derivát **2b** vykazoval při opakovaném metabolickém testu s lidskými enzymy CYP450 a UGT. V takovém případě bylo po 30 minutách vystavení látky působení metabolických enzymů detekováno 85, resp. 95 % parentální sloučeniny.

ZÁVĚR

Předložená diplomová práce se zabývá návrhem, syntézou a biologickou aktivitou nových derivátů squaramidu cílících na mykobakteriální ATP synthasu. V teoretické části práce byla pozornost věnována nejvýznamnějším publikovaným inhibitorům mykobakteriální ATP synthasy. Dále byly diskutovány vybrané cross-couplingové reakce, které by mohly být využity pro přípravu cyklobutendionových derivátů substituovaných aromáty.

Diskuzní část předložené práce je členěna do několika částí. První z nich uvádí návrh nových derivátů odvozených od kyseliny squarové **3**, které by mohly být vhodnými inhibitory mykobakteriální ATP synthasy. Tato část práce je založena na úzké spolupráci s kolegy z Katedry fyzikální chemie PřF UP, kteří návrh struktur podpořili jejich dokováním do aktivního místa cílového mykobakteriálního enzymu.

Následuje syntetická část práce, která uvádí přípravu celkem sedmnácti finálních derivátů kyseliny squarové. Prvních sedm spadá do squaramidů „aminového typu“ **1**. Pro jejich přípravu bylo využito synteticky poměrně snadné a univerzální metody. Zbýlých deset derivátů je „arylového typu“ **2**. Ty byly připraveny buď pomocí reakce Friedel-Craftsova typu nebo Liebeskind-Srogl couplingu. Součástí této kapitoly je poměrně rozsáhlá optimalizační část zabývající se přípravou arylových squaramidů **2** pomocí couplingových reakcí.

Některé z připravených finálních sloučenin již byly, jiné teprve budou testovány na svou antimykobakteriální aktivitu proti *M. tuberculosis* H37Ra. U některých z testovaných finálních derivátů byla detekována poměrně vysoká hodnota biologické aktivity. Jedná se především o deriváty **2b** ($MIC_{50} = 2,88 \mu M$) a **2d** ($MIC_{50} = 0,73 \mu M$). Pomocí nejaktivnějšího derivátu **2d** bylo následně experimentálně zjištěno vazebné místo squaramidů na mykobakteriální ATP synthase, které bylo určeno jako podjednotka *a* mykobakteriálního enzymu.

Hodnoty biologické aktivity testovaných derivátů budou dále využity pro SAR studii a návrh potenciálně ještě aktivnějších derivátů. Obě nejaktivnější látky navíc nabízejí možnost pro další optimalizaci jejich struktury. Vzhledem k zajímavým výsledkům antimykobakteriální aktivity bude tato práce v nejbližší době rozšířena o další látky a kompletní výsledky poté publikovány v impaktovaném časopise.

EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

7 Obecné informace

Rozpouštědla a chemikálie byly zakoupeny od firmy Sigma-Aldrich (St. Louis, Missouri, USA) nebo Fluorochem (US).

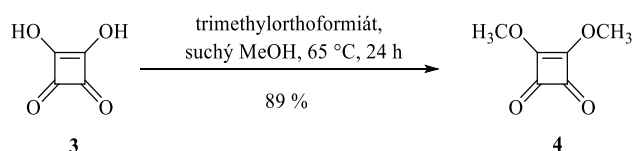
LC-MS analýzy byly provedeny na UHPLC-MS systému (Waters) složeného z UHPLC chromatografu Acquity s PDA detektorem a hmotnostního spektrometru s kvadrupólem. Byla použita Nucleodur Gravity C18 kolona (rozměry 1,8 μm , 2,1 x 50 mm) při 30 °C a rychlosti průtoku 600 $\mu\text{l}/\text{min}$. Mobilní fáze byla (A) 0,1% octan amonný ve vodě a (B) 0,1% octan amonný v acetonitrilu, lineárně naprogramovaná od 10 do 80 % B po 2,5 minuty, udržováno po dobu 1 minuty. Kolona byla reekvilibrována pomocí 10% roztoku B po dobu 1 minuty. ESI zdroj operoval pod proudem 5 μA s odpařovací teplotou 350 °C a kapilární teplotou 200 °C.

^1H a ^{13}C NMR spektra byla měřena na přístroji JEOL ECA400II (400 MHz) spektrometru za magnetické indukce 9,39 T (s užívanými frekvencemi 399,78 MHz pro ^1H a 100,53 MHz pro ^{13}C). Všechna NMR spektra byla pořízena za laboratorní teploty (21 °C) v rozpouštědlech DMSO-*d*₆. ^1H a ^{13}C signály byly kalibrovány na signál těchto rozpouštědel. Chemické posuny δ jsou uvedeny v ppm (parts per million) a interakční konstanty (*J*) v hertzech (Hz).

HRMS analýza byla provedena na systému tvořeném kapalinovým chromatografem (Dionex UltiMate 3000, Thermo Fischer Scientific, MA, USA) a hmotnostním spektrometrem Exactive Plus Orbitrap high-resolution (Thermo Fischer Scientific, MA, USA). Jako ionizační zdroj byl použit elektrosprej a snímána byla spektra v kladném módu v rozmezí 100-1000 m/z. Chromatografická separace byla prováděna na koloně Phenomenex Gemini (C18, 50 x 2 mm, 3 μm částice), eluce byla izokratická, MF obsahovala 95 % MeOH a 5 % vody + 0,1 % HCOOH. Vzorky byly připraveny rozpuštěním látek v počáteční mobilní fázi.

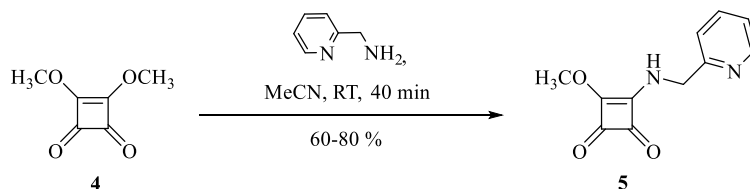
8 Příprava aminových derivátů squaramidu

8.1 Převedení kyseliny squarové na její dimethoxy derivát



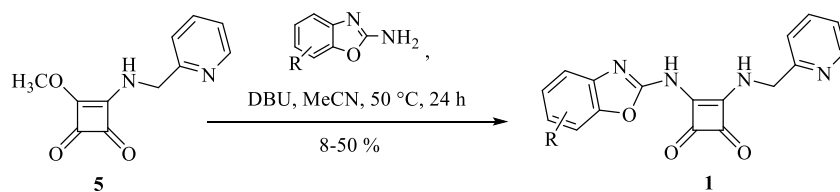
Kyselina squarová **3** (2,053 g; 18 mmol) byla rozsuspensována v bezvodém methanolu (18 ml) a ke vzniklé suspenzi byl následně přidán trimethylorthoformát (4 ml; 36,5 mmol). Takto připravená reakční směs byla ponechána 24 hodin na magnetické míchačce pod zpětným chladičem za stálého ohřevu na 65 °C. Po uplynutí této doby bylo ze směsi odpařeno rozpouštědlo. Produkt **4** byl ze získaného odparku purifikován pomocí sloupcové kapalinové chromatografie (SiO₂, MF Hex/EtOAc 1:2) a dosušen na lyofilizátoru. Produkt **4** byl získán jako světle žlutá pevná látka ve výtěžku 2,558 g (89 %). Analytická data produktu **4** korespondují s literaturou.¹⁰⁵

8.2 Reakce dimethoxy derivátu kyseliny squarové s 2-aminomethylpyridinem



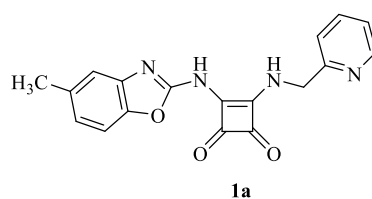
Dimethoxy derivát kyseliny squarové **3** (1,84 g; 13 mmol) byl rozpuštěn v MeCN (15 ml). Do vzniklého roztoku byl pomalu za stálého míchání a chlazení přidán 2-aminomethylpyridin (1,33 ml; 13 mmol). Baňka s reakční směsí byla poté umístěna na magnetickou míchačku za RT na 40 minut. Po ochlazení reakční směsi v ledové lázni byla vzniklá sraženina odsáta, promyta MeCN a dosušena na lyofilizátoru. Produkt **5** byl získán jako bílá pevná látka ve výtěžku 2,25 g (80 %). ¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ 8.94 (br. s, 1H), 8.54 (d, *J* = 4.7 Hz, 1H), 7.79 (td, *J* = 7.7, 1.8 Hz, 1H), 7.36 (d, *J* = 7.8 Hz, 1H), 7.30 (ddd, *J* = 7.7, 4.8, 1.1 Hz, 1H), 4.69 (br. s, 2H), 4.28 (s, 3H). ¹³C NMR (101 MHz, DMSO-*d*₆) δ 188.98, 182.50, 177.26, 172.52, 156.86, 148.84, 136.57, 122.22, 121.05, 59.67, 48.41. HRMS: *m/z* vypočteno pro C₁₁H₁₁N₂O₃⁺: 219.0764 [M+H]⁺; nalezeno: 219.0765.

8.3 Substituce methoxy skupiny 2-aminobenzoxazolem



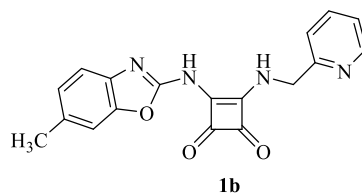
Prekurzor **5** (200 mg; 0,916 mmol) byl rozpuštěn v MeCN (10 ml). Do vzniklého roztoku byl přidán 2-aminobenzoxazol (0,916 mmol) a DBU (137 μ l; 0,916 mmol). Takto připravená reakční směs byla ponechána na míchačce po dobu 20 h za stálého ohřevu na 50 °C. Po uplynutí reakčního času bylo z reakce odpařeno rozpouštědlo. Produkt byl ze získaného odparku izolován filtrací přes malou stříkačku naplněnou silikagelem (SiO₂) s využitím 2% roztoku MeOH v DCM jako eluentu. Produkt **1** byl získán krystalizací z obdržených eluovaných podílů.

3-((5-Methylbenzo[d]oxazol-2-yl)amino)-4-((pyridin-2-ylmethyl)amino)cyclobut-3-en-1,2-dion (**1a**)



Produkt **1a** byl získán jako bílá pevná látka ve výtěžku 64.4 mg (21 %). ¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ 12.48 (br. s, 1H), 9.49 (br. s, 1H), 8.63 (d, *J* = 4.3 Hz, 1H), 7.84 (td, *J* = 7.7, 1.7 Hz, 1H), 7.46 (t, *J* = 8.8 Hz, 2H), 7.38 – 7.29 (m, 2H), 7.07 – 6.99 (m, 1H), 5.02 (d, *J* = 5.9 Hz, 2H), 2.39 (s, 3H). ¹³C NMR (101 MHz, DMSO-*d*₆) δ 187.73, 181.09, 170.65, 163.74, 156.85, 156.30, 149.11, 148.45, 137.08, 134.12, 131.45, 123.83, 122.60, 121.38, 114.79, 109.48, 48.09, 21.00. HRMS: *m/z*: vypočteno pro C₁₈H₁₅N₄O₃⁺: 335.1139 [M+H]⁺; nalezeno: 335.1137.

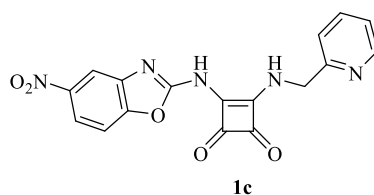
3-((6-Methylbenzo[d]oxazol-2-yl)amino)-4-((pyridin-2-ylmethyl)amino)cyclobut-3-en-1,2-dion (**1b**)



Produkt **1b** byl získán jako bílá pevná látka ve výtěžku 33.3 mg (8 %). ¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ 12.43 (br. s, 1H), 9.48 (br. s, 1H), 8.63 (d, *J* = 4.3 Hz, 1H), 7.83 (td, *J* = 7.7, 1.7

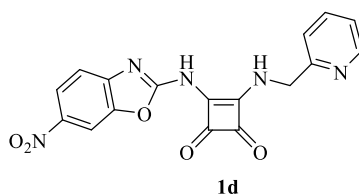
Hz, 1H), 7.46 (d, $J = 7.8$ Hz, 1H), 7.42 – 7.37 (m, 2H), 7.37 – 7.31 (m, 1H), 7.11 (d, $J = 8.1$ Hz, 1H), 5.01 (d, $J = 5.9$ Hz, 2H), 2.39 (s, 3H). ^{13}C NMR (101 MHz, DMSO- d_6) δ 187.73, 181.55, 170.91, 160.42, 156.74, 155.83, 149.08, 148.23, 137.79, 137.06, 132.96, 125.55, 122.59, 121.41, 116.67, 110.23, 48.04, 21.08. HRMS: m/z : vypočteno pro $\text{C}_{18}\text{H}_{15}\text{N}_4\text{O}_3^+$: 335.1139 $[\text{M}+\text{H}]^+$; nalezeno: 335.1139.

3-((5-Nitrobenzo[d]oxazol-2-yl)amino)-4-((pyridin-2-ylmethyl)amino)cyklobut-3-en-1,2-dion (1c)



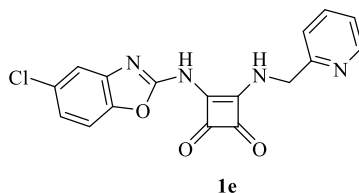
Produkt **1c** byl získán jako bílá pevná látka ve výtěžku 71.4 mg (33 %). ^1H NMR (400 MHz, DMSO- d_6) δ 9.41 (br. s., 1H), 8.57 (d, $J = 4.5$ Hz, 1H), 8.03 (d, $J = 2.1$ Hz, 1H), 7.92 (dd, $J = 8.7, 2.4$ Hz, 1H), 7.81 (td, $J = 7.7, 1.7$ Hz, 1H), 7.49 (d, $J = 8.7$ Hz, 1H), 7.44 (d, $J = 7.8$ Hz, 1H), 7.31 (dd, $J = 7.0, 5.1$ Hz, 1H), 4.97 (d, $J = 6.3$ Hz, 2H). ^{13}C NMR (101 MHz, DMSO- d_6) δ 188.80, 188.28, 175.35, 172.24, 166.49, 158.37, 153.03, 148.98, 144.08, 143.86, 136.98, 122.31, 121.15, 116.86, 109.72, 108.44, 48.06. HRMS: m/z : vypočteno pro $\text{C}_{17}\text{H}_{12}\text{N}_5\text{O}_5^+$: 366.0833 $[\text{M}+\text{H}]^+$; nalezeno: 366.0833.

3-((6-Nitrobenzo[d]oxazol-2-yl)amino)-4-((pyridin-2-ylmethyl)amino)cyklobut-3-en-1,2-dion (1d)



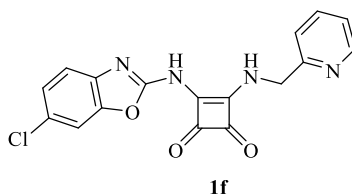
Produkt **1d** byl získán jako bílá pevná látka ve výtěžku 68.7 mg (32 %). ^1H NMR (400 MHz, DMSO- d_6) δ 12.99 (br. s., 1H), 9.38 (t, $J = 5.9$ Hz, 1H), 8.64 (d, $J = 4.8$ Hz, 1H), 8.49 (d, $J = 2.4$ Hz, 1H), 8.25 (dd, $J = 8.7, 2.4$ Hz, 1H), 7.84 (td, $J = 7.7, 1.9$ Hz, 1H), 7.67 (d, $J = 8.8$ Hz, 1H), 7.48 (d, $J = 7.9$ Hz, 1H), 7.35 (dd, $J = 7.5, 4.9$ Hz, 1H), 5.03 (d, $J = 6.0$ Hz, 2H). ^{13}C NMR (101 MHz, DMSO- d_6) δ 189.02, 188.12, 182.62, 172.17, 160.71, 157.37, 149.60, 148.11, 147.65, 142.99, 137.65, 123.14, 121.94, 117.16, 106.83, 105.44, 48.63. HRMS: m/z : vypočteno pro $\text{C}_{17}\text{H}_{12}\text{N}_5\text{O}_5^+$: 366.0833 $[\text{M}+\text{H}]^+$; nalezeno: 366.0833.

3-((5-Chlorobenzodioxazol-2-yl)amino)-4-((pyridin-2-ylmethyl)amino)cyclobut-3-en-1,2-dion (1e)



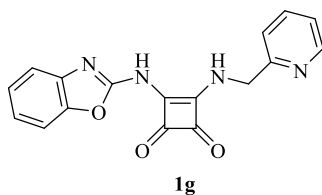
Produkt **1e** byl získán jako bílá pevná látka ve výtěžku 179.4 mg (47 %). ^1H NMR (400 MHz, DMSO- d_6) δ 12.67 (br. s, 1H), 9.33 (t, $J = 6.2$ Hz, 1H), 8.61 – 8.58 (m, 1H), 7.83 (td, $J = 7.7$, 1.8 Hz, 1H), 7.61 (d, $J = 8.6$ Hz, 1H), 7.59 (d, $J = 2.1$ Hz, 1H), 7.46 (d, $J = 7.8$ Hz, 1H), 7.34 (ddd, $J = 12.2$, 4.9, 0.7 Hz, 1H), 7.26 (dd, $J = 8.6$, 2.2 Hz, 1H), 5.01 (d, $J = 6.2$ Hz, 2H). ^{13}C NMR (101 MHz, DMSO- d_6) δ 187.96, 181.59, 171.10, 160.00, 157.43, 157.06, 149.04, 147.02, 141.82, 137.07, 128.77, 122.77, 122.58, 121.31, 117.10, 111.28, 48.14. HRMS: m/z : vypočteno pro $\text{C}_{17}\text{H}_{12}\text{ClN}_4\text{O}_3^+$: 355.0592 $[\text{M}+\text{H}]^+$; nalezeno: 355.0592.

3-((6-Chlorobenzodioxazol-2-yl)amino)-4-((pyridin-2-ylmethyl)amino)cyclobut-3-en-1,2-dion (1f)



Produkt **1f** byl získán jako bílá pevná látka ve výtěžku 105.2 mg (36 %). ^1H NMR (400 MHz, DMSO- d_6) δ 12.62 (br. s, 1H), 9.40 (t, $J = 5.9$ Hz, 1H), 8.67 – 8.59 (m, 1H), 7.83 (td, $J = 7.7$, 1.8 Hz, 1H), 7.78 (d, $J = 1.9$ Hz, 1H), 7.51 (d, $J = 8.4$ Hz, 1H), 7.47 (d, $J = 7.9$ Hz, 1H), 7.36 (d, $J = 1.8$ Hz, 1H), 7.35 – 7.31 (m, 1H), 5.02 (d, $J = 6.0$ Hz, 2H). ^{13}C NMR (101 MHz, DMSO- d_6) δ 187.93, 181.51, 171.03, 160.01, 157.22 156.76, 149.06, 148.44, 139.46, 137.08, 126.96, 125.01, 122.59, 121.39, 118.15, 110.71, 48.06. HRMS: m/z : vypočteno pro $\text{C}_{17}\text{H}_{12}\text{ClN}_4\text{O}_3^+$: 355.0592 $[\text{M}+\text{H}]^+$; nalezeno: 355.0592.

3-(Benzo[d]oxazol-2-ylamino)-4-((pyridin-2-ylmethyl)amino)cyklobut-3-en-1,2-dion (**1g**)



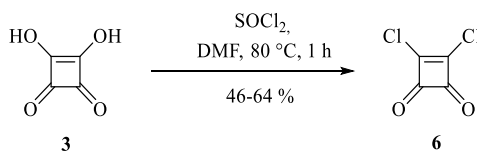
Produkt **1g** byl získán jako bílá pevná látka ve výtěžku 108.7 mg (50 %). ^1H NMR (400 MHz, DMSO- d_6) δ 12.52 (br. s, 1H), 9.50 (br. s, 1H), 8.64 (d, $J = 4.6$ Hz, 1H), 7.84 (td, $J = 7.7, 1.8$ Hz, 1H), 7.58 (d, $J = 7.9$ Hz, 1H), 7.54 (d, $J = 7.7$ Hz, 1H), 7.48 (d, $J = 7.8$ Hz, 1H), 7.37 – 7.34 (m, 1H), 7.33 – 7.29 (m, 1H), 7.24 (td, $J = 7.8, 1.2$ Hz, 1H), 5.03 (d, $J = 6.0$ Hz, 2H). ^{13}C NMR (101 MHz, DMSO- d_6) δ 187.83, 181.55, 171.09, 170.89, 160.32, 156.75, 156.25, 149.10, 148.03, 140.25, 137.07, 124.78, 123.15, 122.60, 121.41, 110.04, 48.06. HRMS: m/z : vypočteno pro $\text{C}_{17}\text{H}_{13}\text{N}_4\text{O}_3^+$: 321.0982 $[\text{M} + \text{H}]^+$; nalezeno: 321.0979.

9 Příprava arylových derivátů squaramidu

Experimentální část zabývající se arylovými deriváty squaramidu **2** je řazena chronologicky podle kapitoly Výsledky a diskuze, nikoli podle číselného označení derivátů. Nejprve je tedy uvedena příprava arylových derivátů **2** pomocí reakce Friedel-Craftsova typu, poté je shrnuta příprava prekurzorové knihovny **22** připravené pomocí Liebeskind-Srogl couplingu. Až na závěr jsou poté uvedeny finální arylové deriváty **2** odvozené od prekurzorů **22**.

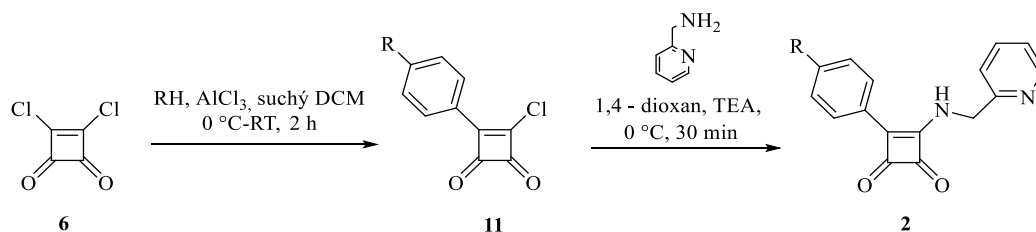
9.1 Syntéza arylových derivátů squaramidu s využitím reakce Friedel-Craftsova typu (reakční cesta A)

9.1.1 Převedení kyseliny squarové na její dichlor derivát



Kyselina squarová **3** (1 g; 8,77 mmol) byla po navážení do baňky přelita SOCl_2 (1,28 ml; 17,54 mmol). Ke směsi byl přikápnut DMF (katalytické množství). Takto připravená směs byla míchána pod zpětným chladičem za stálého ohřevu na 80°C po dobu 1 hodiny. Po uplynutí reakčního času byla reakční směs odpařena a produkt **6** byl získán krystalizací z horkého hexanu. ^{13}C NMR (101 MHz, Chloroform- d) δ 189.47, 188.16.

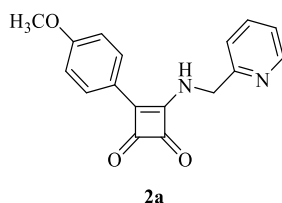
9.1.2 Reakce Friedel-Craftsova typu a substituce pomocí 2-aminomethylpyridinu



Dichlor derivát kyseliny squarové **6** (500 mg, 3.31 mmol) byl rozpuštěn v suchém DCM (10 ml). Vzniklý roztok byl ochlazen na 0 °C a při této teplotě byl k roztoku přidán AlCl₃ (883 mg, 6.62 mmol) a příslušná aromatická komponenta (3,31 mmol). Po přidání všech reagentů byla reakční směs míchána za RT po dobu 1,5 h. Po uplynutí této doby byl obsah baňky nalit na led a produkt **11** byl po rozpuštění ledu extrahován do DCM (2 x 20 ml). Spojené organické extrakty byly poté promyty solankou (10 ml) a vodou (10 ml) a vysušeny pomocí bezvodého MgSO₄. Finálně bylo odpařeno rozpouštědlo. Získaný surový produkt **11** byl nasazen pro další reakční krok bez purifikace.

Získaný surový produkt **11** (3,31 mmol teor.) byl rozpuštěn v 1,4-dioxanu (10 ml) a získaný roztok byl ochlazen na 0 °C. Za této teploty byl k roztoku přidán TEA (461 µl, 3,31 mmol) a 2-aminomethylpyridin (512 µl, 4,97 mmol). Takto připravená reakční směs byla 30 minut míchána za RT. Po uplynutí reakčního času bylo odpařeno rozpouštědlo a odparek byl rozsuspendován v 5 ml vody za vzniku suspenze. Pevný podíl suspenze byl odfiltrován a promyt na filtru vodou. Produkt **2** byl z odfiltrovaného podílu purifikován pomocí sloupcové kapalinové chromatografie (SiO₂, MF: Hex/EtOAc grad.).

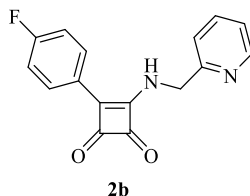
3-(4-Methoxyfenyl)-4-((pyridin-2-ylmethyl)amino)cyklobut-3-en-1,2-dion (**2a**)



Produkt **2a** byl získán jako bílá pevná látka ve výtěžku 624 mg (64 %). ¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ 9.50 (t, *J* = 6.1 Hz, 1H), 8.56 (ddd, *J* = 4.8, 1.7, 0.9 Hz, 1H), 8.05 – 8.02 (m, 2H), 7.81 (td, *J* = 7.7, 1.8 Hz, 1H), 7.45 (d, *J* = 7.8 Hz, 1H), 7.32 (ddd, *J* = 7.5, 4.9, 0.9 Hz, 1H), 7.14 – 7.09 (m, 2H), 5.02 (d, *J* = 6.2 Hz, 2H), 3.84 (s, 3H). ¹³C NMR (101 MHz, DMSO-*d*₆) δ 192.48, 188.85, 178.54, 162.14, 161.13, 157.20, 149.24, 137.03, 128.27, 122.68, 122.08, 121.61,

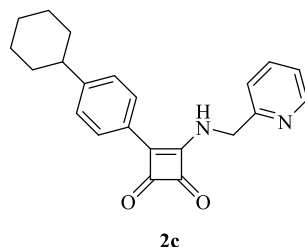
114.56, 55.44, 48.82. HRMS: m/z: vypočteno pro $C_{17}H_{15}N_2O_3^+$: 295.1077 $[M+H]^+$; nalezeno: 295.1079.

3-(4-Fluorofenyl)-4-((pyridin-2-ylmethyl)amino)cyklobut-3-en-1,2-dion (2b)



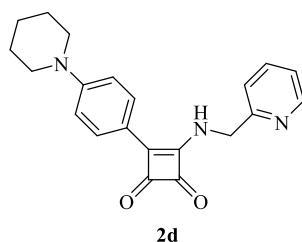
Produkt **2b** byl získán jako bílá pevná látka ve výtěžku 496 mg (53 %). 1H NMR (400 MHz, DMSO- d_6) δ 9.68 (t, $J = 6.1$ Hz, 1H), 8.56 (ddd, $J = 4.8, 1.6, 0.8$ Hz, 1H), 8.14 – 8.08 (m, 2H), 7.82 (td, $J = 7.7, 1.8$ Hz, 1H), 7.46 (d, $J = 7.8$ Hz, 1H), 7.45 – 7.37 (m, 2H), 7.33 (ddd, $J = 7.5, 4.9, 0.9$, 1H), 5.02 (d, $J = 6.2$ Hz, 2H). ^{13}C NMR (101 MHz, DMSO- d_6) δ 193.11, 188.67, 178.98, 162.96 (d, $J = 250.2$ Hz), 160.50, 156.96, 149.26, 137.05, 128.71 (d, $J = 8.7$ Hz), 125.96 (d, $J = 2.9$ Hz), 122.74, 121.69, 116.24 (d, $J = 21.9$ Hz), 48.88. HRMS: m/z: vypočteno pro $C_{16}H_{12}FN_2O_2^+$: 283.0877 $[M+H]^+$; nalezeno: 283.0871.

3-(4-Cyklohexylfenyl)-4-((pyridin-2-ylmethyl)amino)cyklobut-3-en-1,2-dion (2c)



Produkt **2c** byl získán jako bílá pevná látka ve výtěžku 838 mg (73 %). 1H NMR (400 MHz, DMSO- d_6) δ 9.56 (t, $J = 6.1$ Hz, 1H), 8.57 – 8.52 (m, 1H), 7.9 (d, $J = 8.3$ Hz, 2H), 7.81 (td, $J = 7.7, 1.9$ Hz, 1H), 7.44 (d, $J = 7.9$ Hz, 1H), 7.40 (d, $J = 8.3$ Hz, 2H), 7.32 (dd, $J = 7.6, 4.8$ Hz, 1H), 5.01 (d, $J = 5.9$ Hz, 2H), 2.62 – 2.52 (m, 1H), 1.83 – 1.66 (m, 5H), 1.49 – 1.19 (m, 5H). ^{13}C NMR (101 MHz, DMSO- d_6) δ 193.13, 188.91, 179.10, 162.11, 157.13, 150.65, 149.26, 137.05, 127.34, 126.96, 126.39, 122.70, 121.60, 48.87, 43.87, 33.60, 26.22, 25.48. HRMS: m/z: vypočteno pro $C_{22}H_{23}N_2O_2^+$: 347.1754 $[M+H]^+$; nalezeno: 347.1753.

3-(4-(Piperidin-1-yl)fenyl)-4-((pyridin-2-ylmethyl)amino)cyklobut-3-en-1,2-dion (2d)

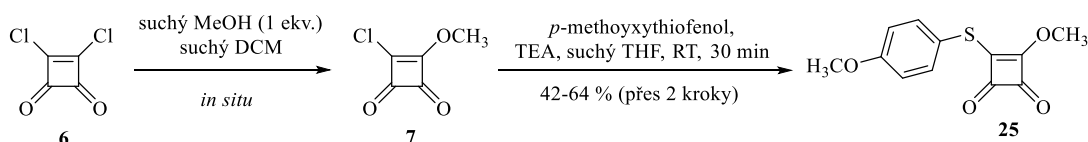


Produkt **2d** byl získán jako bílá pevná látka ve výtěžku 161 mg (14 %). ^1H NMR (400 MHz, DMSO- d_6) δ 9.32 (t, $J = 6.2$ Hz, 1H), 8.55 (ddd, $J = 4.8, 1.6, 0.8$ Hz, 1H), 7.92 (d, $J = 9.0$ Hz, 2H), 7.81 (td, $J = 7.7, 1.8$ Hz, 1H), 7.42 (d, $J = 7.8$ Hz, 1H), 7.31 (ddd, $J = 7.5, 4.9, 0.8$ Hz, 1H), 7.02 (d, $J = 9.1$ Hz, 2H), 5.00 (d, $J = 6.2$ Hz, 2H), 3.36 (br. s, 4H), 1.59 (s, 6H). ^{13}C NMR (101 MHz, DMSO- d_6) δ 191.48, 189.00, 177.84, 163.18, 157.48, 152.28, 149.21, 137.01, 128.16, 122.61, 121.50, 118.03, 113.89, 48.75, 47.83, 24.87, 23.91. HRMS: m/z: vypočteno pro $\text{C}_{21}\text{H}_{22}\text{N}_3\text{O}_2^+$: 348.1707 $[\text{M}+\text{H}]^+$; nalezeno: 348.1707.

9.2 Syntéza arylových derivátů squaramidu s využitím Liebeskind-Srogl couplingu (reakční cesta E)

9.2.1 Substituce chloru methanolem s následnou substitucí pomocí

p-methoxythiofenolu

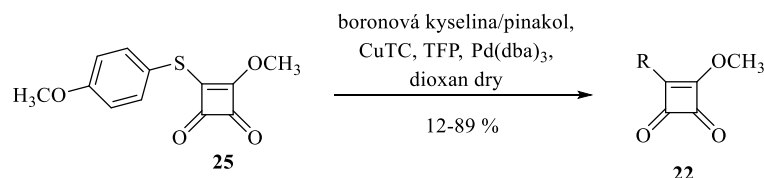


Dichlor derivát kyseliny squarové **6** (500 mg; 3,31 mmol) byl rozpuštěn suchým DCM (5 ml). Ke vzniklému roztoku byl následně přidán suchý MeOH (134 μl , 3,31 mmol). Takto připravená reakční směs byla ponechána na míchačce po dobu 16 hodin za RT. Po uplynutí reakčního času bylo rozpouštědlo z reakční směsi odfoukáno. Surový produkt **7** byl bez další purifikace použit pro další reakční krok.

Prekurzor **7** (3,31 mmol teor.) byl rozpuštěn v suchém THF (5 ml) a připravený roztok byl ochlazen na 0 °C. Při této teplotě byl po kapkách přidán *p*-methoxythiofenol (407 μl , 3,31 mmol) a TEA (461 μl , 3,31 mmol). Takto připravená reakční směs byla ponechána na míchačce za RT po dobu 30 minut. Po uplynutí reakčního času byla vzniklá triethylamoniová sůl odsáta a produkt **25** byl z filtrátu purifikován pomocí sloupcové kapalinové chromatografie (SiO_2 , MF: DCM). Produkt **25** byl získán jako žlutá pevná látka ve výtěžku 348-531 mg (42-64 %). ^1H NMR (400 MHz, Chloroform- d) δ 7.49 – 7.43 (m, 2H), 6.94 – 6.89 (m, 2H),

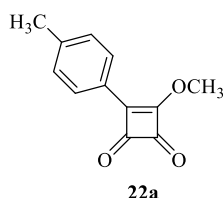
4.36 (s, 3H), 3.84 (s, 3H). ^{13}C NMR (101 MHz, Chloroform-*d*) δ 192.37, 189.50, 187.94, 177.55, 161.31, 135.51, 115.46, 114.93, 61.40, 55.54. HRMS: m/z : vypočteno pro $\text{C}_{12}\text{H}_{11}\text{O}_4\text{S}^+$: 251.0373 $[\text{M}+\text{H}]^+$; nalezeno: 251.0373.

9.2.2 Liebeskind-Srogl coupling



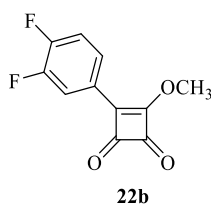
Prekurzor **25** (100 mg, 0,4 mmol) byl společně s boronovou kyselinou (2,5 ekv., tj. 1,0 mmol) rozpuštěn v suchém 1,4-dioxanu (8 ml). Po zavedení inertní atmosféry do baňky bylo k připravenému roztoku přidáno CuTC (457 mg, 2,4 mmol), TFP (2,8 mg, 3 mol%) a Pd(dba)₃ (3,7 mg, 1 mol%). Takto připravená reakční směs byla umístěna na míchačku po dobu 20 h za stálého ohřevu na 100 °C. Po uplynutí reakčního času bylo z reakce odpařeno rozpouštědlo. Získaný odparek byl rozsuspendován v cca 40 ml nasyceného roztoku NH₄Cl a extrahován do EtOAc (3 x 20 ml). Spojené organické fáze byly vysušeny pomocí bezvodého MgSO₄ a odpařeny. Produkt **3** byl ze získaného odparku purifikován pomocí sloupcové kapalinové chromatografie (SiO₂, MF: PE/EtAc grad. s přidavkem několika kapek TEA).

3-Methoxy-4-(*p*-tolyl)cyclobut-3-en-1,2-dion (**22a**)



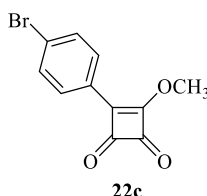
Produkt **22a** byl získán jako bledě žlutá pevná látka ve výtěžku 72,2 mg (89 %). ^1H NMR (400 MHz, Chloroform-*d*) δ 7.96 – 7.90 (m, 2H), 7.33 – 7.28 (m, 2H), 4.59 (s, 3H), 2.43 (s, 3H). ^{13}C NMR (101 MHz, Chloroform-*d*) δ 194.35, 192.95, 192.25, 174.07, 143.99, 129.96, 127.92, 125.09, 61.67, 22.08. HRMS: m/z : vypočteno pro $\text{C}_{12}\text{H}_{11}\text{O}_3^+$: 203.0703 $[\text{M}+\text{H}]^+$; nalezeno: 203.0707.

3-(3,4-Difluorofenyl)-4-methoxycyklobut-3-en-1,2-dion (22b)



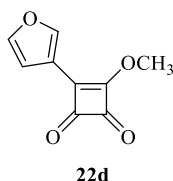
Produkt **22b** byl získán jako bledě žlutá pevná látka ve výtěžku 10,6 mg (12 %). ^1H NMR (400 MHz, Chloroform-*d*) δ 7.91 – 7.81 (m, 2H), 7.35 – 7.27 (m, 1H), 4.61 (s, 3H). ^{13}C NMR (101 MHz, Chloroform-*d*) δ 194.88, 192.06, 171.37, 153.20 (dd, $J = 230.6, 13.0$ Hz), 150.66 (dd, $J = 224.2, 13.0$ Hz), 125.05 (dd, $J = 6.9, 3.8$ Hz), 124.60 (dd, $J = 6.7, 4.3$ Hz), 118.60 (d, $J = 17.9$ Hz), 116.78 (d, $J = 18.1$ Hz), 62.17. HRMS: m/z : vypočteno pro $\text{C}_{11}\text{H}_5\text{F}_2\text{O}_3^-$: 223.0201 [M-H] $^-$; nalezeno: 209.0042 (odpovídá látce s hydroxylem místo methoxy skupiny).

3-(4-Bromofenyl)-4-methoxycyklobut-3-en-1,2-dion (22c)



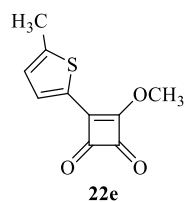
Produkt **22c** byl získán jako bledě žlutá pevná látka ve výtěžku 12,4 mg (12 %). ^1H NMR (400 MHz, Chloroform-*d*) δ 7.92 – 7.83 (m, 2H), 7.67 – 7.61 (m, 2H), 4.60 (s, 3H). ^{13}C NMR (101 MHz, Chloroform-*d*) δ 195.00, 192.42, 192.23, 172.54, 132.73, 129.12, 127.83, 126.49, 62.07. HRMS: m/z : vypočteno pro $\text{C}_{11}\text{H}_8\text{BrO}_3^+$: 266.9651 [M+H] $^+$; nalezeno: 266.9654.

3-(Furan-3-yl)-4-methoxycyklobut-3-en-1,2-dion (22d)



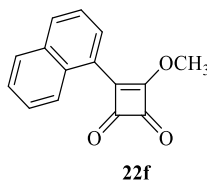
Produkt **22d** byl získán jako bílá pevná látka ve výtěžku 62,8 mg (88 %). ^1H NMR (400 MHz, Chloroform-*d*) δ 8.24 (dd, $J = 1.3, 0.8$ Hz, 1H), 7.58 (t, $J = 1.6$ Hz, 1H), 6.82 (dd, $J = 1.9, 0.6$ Hz, 1H), 4.55 (s, 3H). ^{13}C NMR (101 MHz, Chloroform-*d*) δ 199.52, 193.38, 191.78, 191.30, 168.69, 145.04, 113.59, 107.71, 61.56. HRMS: m/z : vypočteno pro $\text{C}_9\text{H}_7\text{O}_4^+$: 179.0339 [M+H] $^+$; nalezeno: 179.0341.

3-Methoxy-4-(5-methylthiofen-2-yl)cyklobut-3-en-1,2-dion (22e)



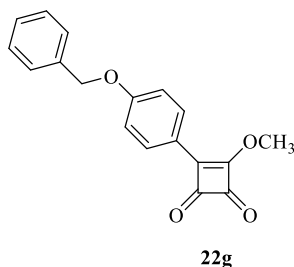
Produkt **22e** byl získán jako žlutá pevná látka ve výtěžku 34,6 mg (42 %). ^1H NMR (400 MHz, Chloroform-*d*) δ 7.72 (d, $J = 3.7$ Hz, 1H), 6.93 (dd, $J = 3.9, 1.2$ Hz, 1H), 4.57 – 4.55 (m, 3H), 2.60 (s, 3H). ^{13}C NMR (101 MHz, Chloroform-*d*) δ 190.85, 190.56, 190.03, 168.44, 150.84, 132.65, 127.96, 125.55, 61.64, 16.06. HRMS: m/z : vypočteno pro $\text{C}_{10}\text{H}_9\text{O}_3\text{S}^+$: 209.0267 $[\text{M}+\text{H}]^+$; nalezeno: 209.0266.

3-Methoxy-4-(naftalen-1-yl)cyklobut-3-en-1,2-dion (22f)



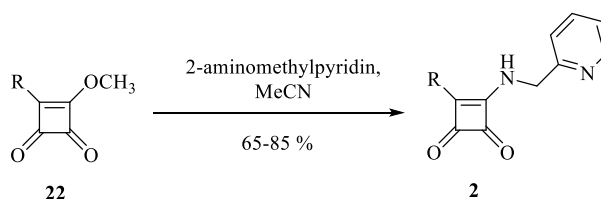
Produkt **22f** byl získán jako bledě žlutá pevná látka ve výtěžku 58,4 mg (61 %). ^1H NMR (400 MHz, Chloroform-*d*) δ 8.39 (dd, $J = 8.4, 0.9$ Hz, 1H), 8.16 (dd, $J = 7.3, 1.2$ Hz, 1H), 8.02 (d, $J = 8.2$ Hz, 1H), 7.93 – 7.88 (m, 1H), 7.67 – 7.62 (m, 1H), 7.61 – 7.55 (m, 2H), 4.65 (s, 3H). ^{13}C NMR (101 MHz, Chloroform-*d*) δ 194.79, 192.74, 192.45, 176.35, 133.99, 133.55, 130.35, 128.85, 128.47, 127.72, 126.91, 126.55, 125.61, 125.36, 62.00. HRMS: m/z : vypočteno pro $\text{C}_{15}\text{H}_{11}\text{O}_3^+$: 239.0703 $[\text{M}+\text{H}]^+$; nalezeno: 239.0705.

3-(4-(Benzyloxy)fenyl)-4-methoxycyklobut-3-en-1,2-dion (22g)



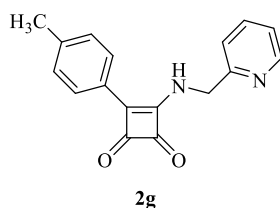
Produkt **22g** byl získán jako žlutá pevná látka ve výtěžku 69,1 (59 %). ^1H NMR (400 MHz, Chloroform-*d*) δ 8.07 – 7.97 (m, 2H), 7.47 – 7.32 (m, 5H), 7.12 – 7.03 (m, 2H), 5.14 (s, 2H), 4.57 (s, 3H). ^{13}C NMR (101 MHz, Chloroform-*d*) δ 193.48, 193.02, 191.66, 173.56, 162.53, 136.02, 130.13, 128.81, 128.42, 127.59, 120.90, 115.60, 70.32, 61.57. HRMS: m/z : vypočteno pro $\text{C}_{18}\text{H}_{15}\text{O}_4^+$: 295.0965 $[\text{M}+\text{H}]^+$; nalezeno: 295.0963.

9.2.3 Substituce methoxy skupiny 2-aminomethylpyridinem



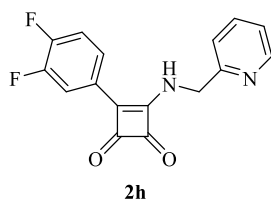
Prekurzor **3** (20 mg) byl rozpuštěn v MeCN a ke vzniklému roztoku byl po kapkách přidán 2-aminomethylpyridin (1 ekv.). Takto připravená reakční směs byla ponechána na magnetické míchačce za RT po dobu 30 min. Produkt **2** byl získán odfiltrováním vzniklé sraženiny a jejím promytím na filtru pomocí MeCN. Pokud to bylo žádoucí, byl produkt navíc přečištěn pomocí sloupcové kapalinové chromatografie (SiO₂, MF: DCM/MeOH 9:0,7 s přidavkem několika kapek TEA).

3-((Pyridin-2-ylmethyl)amino)-4-(*p*-tolyl)cyklobut-3-en-1,2-dion (**2g**)



Produkt **2g** byl získán jako bílá pevná látka ve výtěžku 23,4 mg (85 %). ¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ 9.56 (t, *J* = 6.0 Hz, 1H), 8.55 (ddd, *J* = 4.8, 1.6, 0.8 Hz, 1H), 7.95 (d, *J* = 8.2 Hz, 2H), 7.81 (td, *J* = 7.6, 1.8 Hz, 1H), 7.45 (d, *J* = 7.8 Hz, 1H), 7.37 (d, *J* = 8.0 Hz, 2H), 7.32 (ddd, *J* = 7.5, 4.8, 1.2 Hz, 1H), 5.02 (d, *J* = 6.1 Hz, 2H), 2.38 (s, 3H). ¹³C NMR (101 MHz, DMSO-*d*₆) δ 193.06, 188.90, 179.02, 162.00, 157.09, 149.25, 140.81, 137.04, 129.59, 126.57, 126.21, 122.70, 121.64, 48.88, 21.25. HRMS: *m/z*: vypočteno pro C₁₇H₁₅N₂O₂⁺: 279.1128 [M+H]⁺; nalezeno: 279.1125.

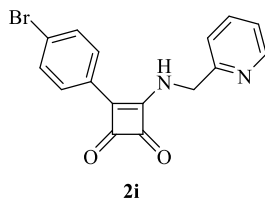
3-(3,4-Difluorofenyl)-4-((pyridin-2-ylmethyl)amino)cyklobut-3-en-1,2-dion (**2h**)



Produkt **2h** byl získán jako bílá pevná látka ve výtěžku 21,7 mg (81 %). ¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ 9.79 (s, 1H), 8.61 – 8.47 (m, 1H), 8.08 – 8.00 (m, 1H), 7.97 – 7.90 (m, 1H), 7.82 (td, *J* = 7.7, 1.8 Hz, 1H), 7.64 (dt, *J* = 10.7, 8.6 Hz, 1H), 7.47 (d, *J* = 7.9 Hz, 1H), 7.33 (ddd, *J*

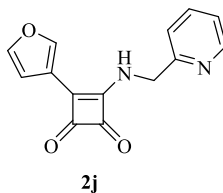
= 7.5, 4.8, 1.1 Hz, 1H), 5.02 (s, 2H). ^{13}C NMR (101 MHz, DMSO- d_6) δ 193.16, 188.45, 178.87, 158.79, 156.75, 150.19 (dd, $J = 251.6, 12.6$ Hz), 149.70 (dd, $J = 246.9, 13.1$ Hz), 149.29, 137.08, 126.59 (dd, $J = 6.8, 3.8$ Hz), 123.75 (dd, $J = 6.5, 3.3$ Hz), 122.80, 121.79, 118.50 (d, $J = 17.6$ Hz), 114.82 (d, $J = 18.1$ Hz), 48.96. HRMS: m/z : vypočteno pro $\text{C}_{16}\text{H}_{11}\text{F}_2\text{N}_2\text{O}_2^+$: 301.0783 $[\text{M}+\text{H}]^+$; nalezeno: 301.0782.

3-(4-Bromofenyl)-4-((pyridin-2-ylmethyl)amino)cyclobut-3-en-1,2-dion (2i)



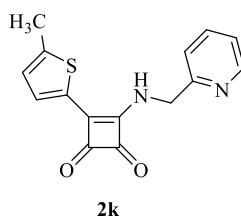
Produkt **2i** byl získán jako bílá pevná látka ve výtěžku 20,2 mg (79 %). ^1H NMR (400 MHz, DMSO- d_6) δ 9.70 (br. s, 1H), 8.54 (d, $J = 4.6$ Hz, 1H), 7.99 (d, $J = 8.5$ Hz, 2H), 7.80 (td, $J = 7.7, 1.9$ Hz, 1H), 7.73 (d, $J = 8.5$ Hz, 2H), 7.46 (d, $J = 7.8$ Hz, 1H), 7.31 (dd, $J = 7.6, 4.9$ Hz, 1H), 5.01 (s, 2H). ^{13}C NMR (101 MHz, DMSO- d_6) δ 195.58, 188.41, 178.57, 159.69, 157.80, 149.12, 136.91, 131.91, 128.93, 127.55, 123.04, 122.49, 121.67, 50.06. HRMS: m/z : vypočteno pro $\text{C}_{16}\text{H}_{12}\text{BrN}_2\text{O}_2^+$: 343.0077 $[\text{M}+\text{H}]^+$; nalezeno: 343.0075.

3-(Furan-3-yl)-4-((pyridin-2-ylmethyl)amino)cyclobut-3-en-1,2-dion (2j)



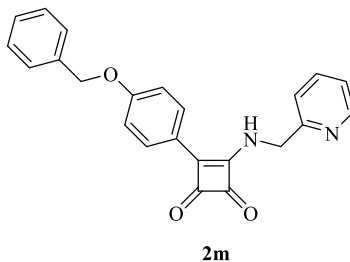
Produkt **2j** byl získán jako bílá pevná látka ve výtěžku 17,3 mg (60 %). ^1H NMR (400 MHz, DMSO- d_6) δ 9.40 (t, $J = 5.5$ Hz, 1H), 8.56 (d, $J = 4.7$ Hz, 1H), 8.49 (s, 1H), 7.96 – 7.88 (m, 1H), 7.82 (td, $J = 7.7, 1.9$ Hz, 1H), 7.45 (d, $J = 7.9$ Hz, 1H), 7.33 (dd, $J = 7.6, 4.6$ Hz, 1H), 7.15 – 7.11 (m, 1H), 4.99 (d, $J = 6.1$ Hz, 2H). ^{13}C NMR (101 MHz, DMSO- d_6) δ 192.22, 187.96, 178.43, 157.00, 156.66, 149.30, 145.07, 142.82, 137.10, 122.78, 121.73, 114.73, 107.46, 48.75. HRMS: m/z : vypočteno pro $\text{C}_{14}\text{H}_{11}\text{N}_2\text{O}_3^+$: 255.0764 $[\text{M}+\text{H}]^+$; nalezeno: 255.0764.

3-(5-Methylthiofen-2-yl)-4-((pyridin-2-ylmethyl)amino)cyklobut-3-en-1,2-dion (2k)



Produkt **2k** byl získán jako bledě žlutá pevná látka ve výtěžku 22,4 mg (82 %). ^1H NMR (400 MHz, DMSO- d_6) δ 9.49 (s, 1H), 8.56 (ddd, $J = 4.8, 1.7, 0.9$ Hz, 1H), 7.82 (td, $J = 7.7, 1.8$ Hz, 1H), 7.71 (d, $J = 3.9$ Hz, 1H), 7.44 (d, $J = 7.8$ Hz, 1H), 7.33 (ddd, $J = 7.5, 4.8, 1.2$ Hz, 1H), 7.06 (dd, $J = 3.7, 1.0$ Hz, 1H), 5.00 (s, 2H), 2.55 (s, 3H). ^{13}C NMR (101 MHz, DMSO- d_6) δ 190.70, 186.69, 176.61, 157.05, 157.00, 149.26, 145.95, 137.06, 128.92, 127.39, 127.02, 122.74, 121.68, 48.85, 15.25. HRMS: m/z : vypočteno pro $\text{C}_{15}\text{H}_{13}\text{N}_2\text{O}_2\text{S}^+$: 285.0692 $[\text{M}+\text{H}]^+$; nalezeno: 285.0691.

3-(4-(Benzyloxy)fenyl)-4-((pyridin-2-ylmethyl)amino)cyklobut-3-en-1,2-dion (2m)



Produkt **2m** byl získán jako bílá pevná látka ve výtěžku 21,9 mg (87 %). ^1H NMR (400 MHz, DMSO- d_6) δ 9.50 (s, 1H), 8.55 (ddd, $J = 4.7, 1.8, 0.9$ Hz, 1H), 8.07 – 8.00 (m, 2H), 7.81 (td, $J = 7.7, 1.8$ Hz, 1H), 7.49 – 7.38 (m, 5H), 7.37 – 7.30 (m, 2H), 7.23 – 7.17 (m, 2H), 5.21 (s, 2H), 5.01 (d, $J = 5.0$ Hz, 2H). ^{13}C NMR (101 MHz, DMSO- d_6) δ 192.49, 188.82, 178.55, 162.03, 160.19, 157.18, 149.24, 137.03, 136.53, 128.45, 128.24, 127.96, 127.80, 122.67, 122.25, 121.60, 115.40, 69.44, 48.82. HRMS: m/z : vypočteno pro $\text{C}_{23}\text{H}_{19}\text{N}_2\text{O}_3^+$: 371.1390 $[\text{M}+\text{H}]^+$; nalezeno: 371.1366.

SEZNAM ZKRATEK

Ac	acetyl
AcOH	kyselina octová
ADP	adenosindifosfát
ATP	adenosintrifosfát
BDQ	bedaquiline
binap	2,2'-bis(difenylfosfanyl)binaftalen
Boc	<i>tert</i> -butyloxykarbonyl
CuTC	thiofen-2-karboxylát měďný
DBU	1,8-diazabicyklo[5.4.0]undec-7-en
DCM	dichlormethan
DMAP	dimethylaminopyridin
DMF	dimethylformamid
DMSO	dimethylsulfoxid
dppe	1,2-bis(difenylfosfanyl)ethan
EtOAc	ethylacetát
EtOH	ethanol
Fmoc	fluorenylmethyloxykarbonyl
Hex	hexan
IC	inhibiční koncentrace
LC	kapalinová chromatografie
MDR	multilékově rezistentní (forma tuberkulózy)
MeCN	acetonitril
MeOH	methanol
MF	mobilní fáze
MIC	minimální inhibiční koncentrace
MS	hmotnostní spektrometrie
MW	mikrovlnné (záření)
NMR	nukleární magnetická rezonance
PE	petrolether

PEG	polyethylenglykol
PrOH	propanol
RT	laboratorní teplota
SAR	vztah mezi strukturou a aktivitou
TBC	tuberkulóza
TEA	trimethylamin
TFP	tri(2-furyl)fosfin
THF	tetrahydrofuran
THP	tetryhydropyran
TLC	tenkoverstevná chromatografie
UV	ultrafialové záření
VIS	viditelné záření
WHO	světová zdravotnická organizace
XDR	extenzivně rezistentní (forma tuberkulózy)

SEZNAM POUŽITÝCH ZDROJŮ

- (1) Urban, M.; Šlachtová, V.; Brulíková, L. Small Organic Molecules Targeting the Energy Metabolism of Mycobacterium Tuberculosis. *Eur. J. Med. Chem.* **2021**, *212*, 113139.
- (2) Lu, P.; Lill, H.; Bald, D. ATP Synthase in Mycobacteria: Special Features and Implications for a Function as Drug Target. *Biochim. Biophys. Acta - Bioenerg.* **2014**, *1837* (7), 1208–1218.
- (3) Lakshmanan, M.; Xavier, A. S. Bedaquiline - The First ATP Synthase Inhibitor against Multi Drug Resistant Tuberculosis. *J. Young Pharm.* **2013**, *5* (4), 112–115.
- (4) Diacon, A. H.; Pym, A.; Grobusch, M.; Patientia, R.; Rustomjee, R.; Page-Shipp, L.; Pistorius, C.; Krause, R.; Bogoshi, M.; Churchyard, G.; Venter, A.; Allen, J.; Palomino, J. C.; De Marez, T.; van Heeswijk, R. P. G.; Lounis, N.; Meyvisch, P.; Verbeeck, J.; Parys, W.; de Beule, K.; Andries, K.; Neeley, D. F. M. The Diarylquinoline TMC207 for Multidrug-Resistant Tuberculosis. *N. Engl. J. Med.* **2009**, *360* (23), 2397–2405.
- (5) Ian Storer, R.; Aciro, C.; Jones, L. H. Squaramides: Physical Properties, Synthesis and Applications. *Chem. Soc. Rev.* **2011**, *40* (5), 2330–2346.
- (6) Chasák, J.; Šlachtová, V.; Urban, M.; Brulíková, L. Squaric Acid Analogues in Medicinal Chemistry. *Eur. J. Med. Chem.* **2021**, *209*, 112872.
- (7) Han, X.; Zhou, H.-B.; Dong, C. Applications of Chiral Squaramides: From Asymmetric Organocatalysis to Biologically Active Compounds. *Chem. Rec.* **2016**, *16* (2), 897–906.
- (8) Wurm, F. R.; Klok, H. A. Be Squared: Expanding the Horizon of Squaric Acid-Mediated Conjugations. *Chem. Soc. Rev.* **2013**, *42* (21), 8220–8236.
- (9) Kovac, P.; Xu, P. Controlled and Highly Efficient Preparation of Carbohydrate-Based Vaccines: Squaric Acid Chemistry Is the Way to Go. *Carbohydr. Chem.* **2017**, *42*, 83–115.
- (10) Malerich, J. P.; Hagihara, K.; Rawal, V. H. Chiral Squaramide Derivatives Are Excellent Hydrogen Bond Donor Catalysts. *J. Am. Chem. Soc.* **2008**, *130* (44), 14416–14417.

- (11) Rouf, A.; Tanyeli, C. Squaramide Based Organocatalysts in Organic Transformations. *Curr. Org. Chem.* **2016**, *20* (28), 2996–3013.
- (12) Mukkanti, A.; Periasamy, M. Methods of Synthesis of Cyclobutenediones. *Ark.* **2005**, *11*, 48–77.
- (13) Lynch, D. E.; Hamilton, D. G. Microreview: Pyrrol-3-Yl Squaraines (Including Indol-3-Yl Squaraines). *J. Heterocycl. Chem.* **2018**, *55* (6), 1249–1262.
- (14) Karahan, S.; Tanyeli, C. Squaramide Catalyzed α -Chiral Amine Synthesis. *Tetrahedron Lett.* **2018**, *59* (42), 3725–3737.
- (15) Sopena, S.; Martin, E.; Escudero-Adán, E. C.; Kleij, A. W. Pushing the Limits with Squaramide-Based Organocatalysts in Cyclic Carbonate Synthesis. *ACS Catal.* **2017**, *7* (5), 3532–3539.
- (16) Chen, P. H.; Dong, G. Cyclobutenones and Benzocyclobutenones: Versatile Synthons in Organic Synthesis. *Chem. - A Eur. J.* **2016**, *22* (51), 18290–18315.
- (17) Tantry, S. J.; Markad, S. D.; Shinde, V.; Bhat, J.; Balakrishnan, G.; Gupta, A. K.; Ambady, A.; Raichurkar, A.; Kedari, C.; Sharma, S.; Mudugal, N. V.; Narayan, A.; Naveen Kumar, C. N.; Nanduri, R.; Bharath, S.; Reddy, J.; Panduga, V.; Prabhakar, K. R.; Kandaswamy, K.; Saralaya, R.; Kaur, P.; Dinesh, N.; Guptha, S.; Rich, K.; Murray, D.; Plant, H.; Preston, M.; Ashton, H.; Plant, D.; Walsh, J.; Alcock, P.; Naylor, K.; Collier, M.; Whiteaker, J.; McLaughlin, R. E.; Mallya, M.; Panda, M.; Rudrapatna, S.; Ramachandran, V.; Shandil, R.; Sambandamurthy, V. K.; Mdluli, K.; Cooper, C. B.; Rubin, H.; Yano, T.; Iyer, P.; Narayanan, S.; Kavanagh, S.; Mukherjee, K.; Balasubramanian, V.; Hosagrahara, V. P.; Solapure, S.; Ravishankar, S.; Hameed P, S. Discovery of Imidazo[1,2-a]Pyridine Ethers and Squaramides as Selective and Potent Inhibitors of Mycobacterial Adenosine Triphosphate (ATP) Synthesis. *J. Med. Chem.* **2017**, *60* (4), 1379–1399.
- (18) Chasák, J. Syntéza Nových Derivátů Sqaramidu Jako Potenciálních Inhibitorů Mykobakteriální ATP Synthasy, Univerzita Palackého v Olomouci, Přírodovědecká fakulta, 2020.
- (19) Pigrau-Serrallach, C.; Rodríguez-Pardo, D. Bone and Joint Tuberculosis. *Eur. Spine J.* **2013**, *22* (4), 556–566.
- (20) dos Santos, J. B.; Figueiredo, A. R.; Ferraz, C. E.; de Oliveira, M. H.; da Silva, P. G.; de Medeiros, V. L. S. Cutaneous Tuberculosis: Epidemiologic, Etiopathogenic and Clinical Aspects - Part I. *An. Bras. Dermatol.* **2014**, *89* (2), 219–228.

- (21) Shah, M.; Dorman, S. E. Latent Tuberculosis Infection. *N. Engl. J. Med.* **2004**, *38* (8), 13–14.
- (22) Pawlowski, A.; Jansson, M.; Sköld, M.; Rottenberg, M. E.; Källenius, G. Tuberculosis and HIV Co-Infection. *PLOS Pathog.* **2012**, *8* (2), e1002464.
- (23) World Health Organization. *Global tuberculosis report 2021*.
- (24) Seung, K. J.; Keshavjee, S.; Rich, M. L. Multidrug-Resistant Tuberculosis and Extensively Drug-Resistant Tuberculosis. *Cold Spring Harb. Perspect. Med.* **2015**, *5* (9), a017863–a017863.
- (25) Karabulut, N.; Bayraktar, B.; Bulut, Y. Comparison of Manual Mycobacteria Growth Indicator Tube and Epsilonometer Test with Agar Proportion Method for Susceptibility Testing of Mycobacterium Tuberculosis. *Indian J. Med. Microbiol.* **2014**, *32* (3), 281–284.
- (26) Ahmad, N.; Ahuja, S. D.; Akkerman, O. W.; Alffenaar, J. W. C.; Anderson, L. F.; Baghaei, P.; Bang, D.; Barry, P. M.; Bastos, M. L.; Behera, D.; Benedetti, A.; Bisson, G. P.; Boeree, M. J.; Bonnet, M.; Brode, S. K.; Brust, J. C. M.; Cai, Y.; Caumes, E.; Cegielski, J. P.; Centis, R.; Chan, P. C.; Chan, E. D.; Chang, K. C.; Charles, M.; Cirule, A.; Dalcolmo, M. P.; D’Ambrosio, L.; de Vries, G.; Dheda, K.; Esmail, A.; Flood, J.; Fox, G. J.; Fréchet-Jachym, M.; Fregona, G.; Gayoso, R.; Gegia, M.; Gler, M. T.; Gu, S.; Guglielmetti, L.; Holtz, T. H.; Hughes, J.; Isaakidis, P.; Jarlsberg, L.; Kempker, R. R.; Keshavjee, S.; Khan, F. A.; Kipiani, M.; Koenig, S. P.; Koh, W. J.; Kritski, A.; Kuksa, L.; Kvasnovsky, C. L.; Kwak, N.; Lan, Z.; Lange, C.; Laniado-Laborín, R.; Lee, M.; Leimane, V.; Leung, C. C.; Leung, E. C. C.; Li, P. Z.; Lowenthal, P.; Maciel, E. L.; Marks, S. M.; Mase, S.; Mbuagbaw, L.; Migliori, G. B.; Milanov, V.; Miller, A. C.; Mitnick, C. D.; Modongo, C.; Mohr, E.; Monedero, I.; Nahid, P.; Ndjeka, N.; O’Donnell, M. R.; Padayatchi, N.; Palmero, D.; Pape, J. W.; Podewils, L. J.; Reynolds, I.; Riekstina, V.; Robert, J.; Rodriguez, M.; Seaworth, B.; Seung, K. J.; Schnippel, K.; Shim, T. S.; Singla, R.; Smith, S. E.; Sotgiu, G.; Sukhbaatar, G.; Tabarsi, P.; Tiberi, S.; Trajman, A.; Trieu, L.; Udwardia, Z. F.; van der Werf, T. S.; Veziris, N.; Viikklepp, P.; Vilbrun, S. C.; Walsh, K.; Westenhouse, J.; Yew, W. W.; Yim, J. J.; Zetola, N. M.; Zignol, M.; Menzies, D. Treatment Correlates of Successful Outcomes in Pulmonary Multidrug-Resistant Tuberculosis: An Individual Patient Data Meta-Analysis. *Lancet* **2018**, *392* (10150), 821–834.

- (27) Kojima, K.; Nakajima, K.; Kurata, H.; Tabata, K.; Utsui, Y. Synthesis of a Piperidinomethylthiophene Derivative as H₂-Antagonist with Inhibitory Activity against Helicobacter Pylori. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **1996**, *6* (15), 1795–1798.
- (28) Wong, C.-F.; Lau, A.-M.; Harikishore, A.; Saw, W.-G.; Shin, J.; Ragunathan, P.; Bhushan, S.; Ngan, S.-F. C.; Sze, S. K.; Bates, R. W.; Dick, T.; Grüber, G. A Systematic Assessment of Mycobacterial F₁-ATPase Subunit ϵ 's Role in Latent ATPase Hydrolysis. *FEBS J.* **2021**, *288* (3), 818–836.
- (29) Harikishore, A.; Saw, W.-G.; Ragunathan, P.; Litty, D.; Dick, T.; Müller, V.; Grüber, G. Mutational Analysis of Mycobacterial F-ATP Synthase Subunit δ Leads to a Potent δ Enzyme Inhibitor. *ACS Chem. Biol.* **2022**, *17* (3), 529–535.
- (30) Guo, H.; Courbon, G. M.; Bueler, S. A.; Mai, J.; Liu, J.; Rubinstein, J. L. Structure of Mycobacterial ATP Synthase Bound to the Tuberculosis Drug Bedaquiline. *Nature* **2021**, *589* (7840), 143–147.
- (31) Pallen, M. J. Evolutionary Links between FliH/YscL-like Proteins from Bacterial Type III Secretion Systems and Second-Stalk Components of the FoF₁ and Vacuolar ATPases. *Protein Sci.* **2006**, *15* (4), 935–941.
- (32) Gajadeera, C. S.; Weber, J. Escherichia Coli F₁F_o-ATP Synthase with a b/ δ Fusion Protein Allows Analysis of the Function of the Individual b Subunits. *J. Biol. Chem.* **2013**, *288* (37), 26441–26447.
- (33) World Health Organization. *Model List Of Essential Medicines* **2019**.
- (34) Diacon, A. H.; Donald, P. R.; Pym, A.; Grobusch, M.; Patientia, R. F.; Mahanyele, R.; Bantubani, N.; Narasimooloo, R.; De Marez, T.; van Heeswijk, R.; Lounis, N.; Meyvisch, P.; Andries, K.; McNeeley, D. F. Randomized Pilot Trial of Eight Weeks of Bedaquiline (TMC207) Treatment for Multidrug-Resistant Tuberculosis: Long-Term Outcome, Tolerability, and Effect on Emergence of Drug Resistance. *Antimicrob. Agents Chemother.* **2012**, *56* (6), 3271–3276.
- (35) Tong, A. S. T.; Choi, P. J.; Blaser, A.; Sutherland, H. S.; Tsang, S. K. Y.; Guillemont, J.; Motte, M.; Cooper, C. B.; Andries, K.; Van Den Broeck, W.; Franzblau, S. G.; Upton, A. M.; Denny, W. A.; Palmer, B. D.; Conole, D. 6-Cyano Analogues of Bedaquiline as Less Lipophilic and Potentially Safer Diarylquinolines for Tuberculosis. *ACS Med. Chem. Lett.* **2017**, *8* (10), 1019–1024.
- (36) Priebbenow, D. L.; Barbaro, L.; Baell, J. B. New Synthetic Approaches towards Analogues of Bedaquiline. *Org. Biomol. Chem.* **2016**, *14* (40), 9622–9628.

- (37) Sutherland, H. S.; Tong, A. S. T.; Choi, P. J.; Blaser, A.; Franzblau, S. G.; Cooper, C. B.; Upton, A. M.; Lotlikar, M.; Denny, W. A.; Palmer, B. D. Variations in the C-Unit of Bedaquiline Provides Analogues with Improved Biology and Pharmacology. *Bioorganic Med. Chem.* **2020**, *28* (1), 115213.
- (38) Choi, P. J.; Sutherland, H. S.; Tong, A. S. T.; Blaser, A.; Franzblau, S. G.; Cooper, C. B.; Lotlikar, M. U.; Upton, A. M.; Guillemont, J.; Motte, M.; Queguiner, L.; Andries, K.; Van den Broeck, W.; Denny, W. A.; Palmer, B. D. Synthesis and Evaluation of Analogues of the Tuberculosis Drug Bedaquiline Containing Heterocyclic B-Ring Units. *Bioorganic Med. Chem. Lett.* **2017**, *27* (23), 5190–5196.
- (39) Preiss, L.; Langer, J. D.; Yildiz, Ö.; Eckhardt-Strelau, L.; Guillemont, J. E. G.; Koul, A.; Meier, T. Structure of the Mycobacterial ATP Synthase Fo Rotor Ring in Complex with the Anti-TB Drug Bedaquiline. *Sci. Adv.* **2015**, *1* (4), 1–9.
- (40) de Jonge, M. R.; Koymans, L. H. M.; Guillemont, J. E. G.; Koul, A.; Andries, K. A Computational Model of the Inhibition of Mycobacterium Tuberculosis ATPase by a New Drug Candidate R207910. *Proteins* **2007**, *67* (4), 971–980.
- (41) Guo, H.; Courbon, G. M.; Bueler, S. A.; Mai, J.; Liu, J.; Rubinstein, J. L. Structure of Mycobacterial ATP Synthase Bound to the Tuberculosis Drug Bedaquiline. *Nature* **2021**, *589* (7840), 143–147.
- (42) Hotra, A.; Ragunathan, P.; Ng, P. S.; Seankongsuk, P.; Harikishore, A.; Sarathy, J. P.; Saw, W. G.; Lakshmanan, U.; Sae-Lao, P.; Kalia, N. P.; Shin, J.; Kalyanasundaram, R.; Anbarasu, S.; Parthasarathy, K.; Pradeep, C. N.; Makhija, H.; Dröge, P.; Poulsen, A.; Tan, J. H. L.; Pethe, K.; Dick, T.; Bates, R. W.; Grüber, G. Discovery of a Novel Mycobacterial F-ATP Synthase Inhibitor and Its Potency in Combination with Diarylquinolines. *Angew. Chemie - Int. Ed.* **2020**, *59* (32), 13295–13304.
- (43) Surase, Y. B.; Samby, K.; Amale, S. R.; Sood, R.; Purnapatre, K. P.; Pareek, P. K.; Das, B.; Nanda, K.; Kumar, S.; Verma, A. K. Identification and Synthesis of Novel Inhibitors of Mycobacterium ATP Synthase. *Bioorganic Med. Chem. Lett.* **2017**, *27* (15), 3454–3459.
- (44) Kumar, S.; Mehra, R.; Sharma, S.; Bokolia, N. P.; Raina, D.; Nargotra, A.; Singh, P. P.; Khan, I. A. Screening of Antitubercular Compound Library Identifies Novel ATP Synthase Inhibitors of Mycobacterium Tuberculosis. *Tuberculosis* **2018**, *108* (March 2017), 56–63.

- (45) Lu, G. L.; Tong, A. S. T.; Conole, D.; Sutherland, H. S.; Choi, P. J.; Franzblau, S. G.; Upton, A. M.; Lotlikar, M. U.; Cooper, C. B.; Denny, W. A.; Palmer, B. D. Synthesis and Structure-Activity Relationships for Tetrahydroisoquinoline-Based Inhibitors of Mycobacterium Tuberculosis. *Bioorganic Med. Chem.* **2020**, *28* (22), 115784.
- (46) Singh, S.; Roy, K. K.; Khan, S. R.; Kashyap, V. K.; Sharma, A.; Jaiswal, S.; Sharma, S. K.; Krishnan, M. Y.; Chaturvedi, V.; Lal, J.; Sinha, S.; Dasgupta, A.; Srivastava, R.; Saxena, A. K. Novel, Potent, Orally Bioavailable and Selective Mycobacterial ATP Synthase Inhibitors That Demonstrated Activity against Both Replicating and Non-Replicating M. Tuberculosis. *Bioorg. Med. Chem.* **2015**, *23* (4), 742–752.
- (47) Sellamuthu, S.; Asseri, A. H.; Goojani, H. G.; Singh, G. N. and S. K. Preliminary Studies on Ligand-Based Design and Evaluation of New Mycobacterial ATP Synthase Inhibitors. *Current Drug Therapy.* **2018**, *1* (13), 56–73.
- (48) Tantry, S. J.; Shinde, V.; Balakrishnan, G.; Markad, S. D.; Gupta, A. K.; Bhat, J.; Narayan, A.; Raichurkar, A.; Jena, L. K.; Sharma, S.; Kumar, N.; Nanduri, R.; Bharath, S.; Reddy, J.; Panduga, V.; Prabhakar, K. R.; Kandaswamy, K.; Kaur, P.; Dinesh, N.; Guptha, S.; Saralaya, R.; Panda, M.; Rudrapatna, S.; Mallya, M.; Rubin, H.; Yano, T.; Mdluili, K.; Cooper, C. B.; Balasubramanian, V.; Sambandamurthy, V. K.; Ramachandran, V.; Shandil, R.; Kavanagh, S.; Narayanan, S.; Iyer, P.; Mukherjee, K.; Hosagrahara, V. P.; Solapure, S.; Hameed P, S.; Ravishankar, S. Scaffold Morphing Leading to Evolution of 2,4-Diaminoquinolines and Aminopyrazolopyrimidines as Inhibitors of the ATP Synthesis Pathway. *Medchemcomm* **2016**, *7* (5), 1022–1032.
- (49) King, A. O.; Yasuda, N. Palladium-Catalyzed Cross-Coupling Reactions in the Synthesis of Pharmaceuticals BT - Organometallics in Process Chemistry; Springer Berlin Heidelberg: Berlin, Heidelberg, **2004**, *6*, 205–245.
- (50) Johansson Seechurn, C. C. C.; Kitching, M. O.; Colacot, T. J.; Snieckus, V. Palladium-Catalyzed Cross-Coupling: A Historical Contextual Perspective to the 2010 Nobel Prize. *Angew. Chemie* **2012**, *51*, 5062–5085.
- (51) Matos, K.; Soderquist, J. A. Alkylboranes in the Suzuki–Miyaura Coupling: Stereochemical and Mechanistic Studies. *J. Org. Chem.* **1998**, *63* (3), 461–470.
- (52) Yu, Y.; Liebeskind, L. S. Copper-Mediated, Palladium-Catalyzed Coupling of Thiol Esters with Aliphatic Organoboron Reagents. *J. Org. Chem.* **2004**, *69* (10), 3554–3557.
- (53) Espinet, P.; Echavarren, A. M. The Mechanisms of the Stille Reaction. *Angew. Chemie Int. Ed.* **2004**, *43* (36), 4704–4734.

- (54) Casado, A. L.; Espinet, P. On the Configuration Resulting from Oxidative Addition of RX to Pd(PPh₃)₄ and the Mechanism of the Cis-to-Trans Isomerization of [PdRX(PPh₃)₂] Complexes (R = Aryl, X = Halide). *Organometallics* **1998**, *17* (5), 954–959.
- (55) Bellina, F.; Carpita, A.; Rossi, R. Palladium Catalysts for the Suzuki Cross-Coupling Reaction: An Overview of Recent Advances. *Synthesis (Stuttg)*. **2004**, *15*, 2419–2440.
- (56) Percec, V.; Golding, G. M.; Smidrkal, J.; Weichold, O. Arenesulfonates, and Halides with Arylboronic Acids. *J. Org. Chem.* **2004**, *69* (17), 3447–3452.
- (57) Leadbeater, N. E.; Marco, M. Ligand-Free Palladium Catalysis of the Suzuki Reaction in Water Using Microwave Heating. *Org. Lett.* **2002**, *4* (17), 2973–2976.
- (58) Hercouet, A.; Neu, A.; Peyronel, J. F.; Carboni, B. Suzuki Coupling Reactions in Heterocyclic Chemistry: Synthesis of 3-Substituted Pyrrolines and Pyrroles. *Synlett* **2002**, *5*, 829–831.
- (59) Molander, G. A.; Ellis, N. Organotrifluoroborates: Protected Boronic Acids That Expand the Versatility of the Suzuki Coupling Reaction. *Acc. Chem. Res.* **2007**, *40* (4), 275–286.
- (60) Molander, G. A.; Bernardi, C. R. Suzuki-Miyaura Cross-Coupling Reactions of Potassium Alkenyltrifluoroborates. *J. Org. Chem.* **2002**, *67* (24), 8424–8429.
- (61) Netherton, M. R.; Fu, G. C. Suzuki Cross-Couplings of Alkyl Tosylates That Possess β Hydrogen Atoms: Synthetic and Mechanistic Studies. *Angew. Chemie - Int. Ed.* **2002**, *41* (20), 3910–3912.
- (62) Miyaura, N.; Suzuki, A. Stereoselective Synthesis of Arylated (. *J. Chem. Soc. Chem. Commun.* **1979**, *866*, 866–867.
- (63) Miyaura, N.; Suzuki, A. Palladium-Catalyzed Cross-Coupling Reactions of Organoboron Compounds. *Chem. Rev.* **1995**, *95* (7), 2457–2483.
- (64) Miyaura, N.; Yamada, K.; Suzuki, A. Our Continuous Discovered. *Tetrahedron Lett.* **1979**, *20* (36), 3437–3440.
- (65) Patil, V. P.; Kashid, A. A.; Solanki, B. S.; Kharul, U. K.; Iyer, S. Bimetallic Nano Alloy Architecture on a Special Polymer: Ni or Cu Merged with Pd for the Promotion of the Mizoroki–Heck Reaction and the Suzuki–Miyaura Coupling. *J. Chem. Sci.* **2021**, *133* (1), 2–13.
- (66) Han, F. S. Transition-Metal-Catalyzed Suzuki-Miyaura Cross-Coupling Reactions: A Remarkable Advance from Palladium to Nickel Catalysts. *Chem. Soc. Rev.* **2013**, *42* (12), 5270–5298.

- (67) Friesen, R. W.; Brideau, C.; Chan, C. C.; Charleson, S.; Deschane, D.; Dub, D.; Ethier, D.; Fortin, R.; Gauthier, J. Y.; Girard, Y.; Gordon, R.; Greig, G. M.; Riendeau, D.; Savoie, C.; Wang, Z.; Wong, E.; Visco, D.; Xu, L. J.; Young, R. N. 2-Pyridinyl-3-(4-Methylsulfonyl)Phenylpyridines: **1998**, *8*, 2777–2782.
- (68) Clarke, R.; Derry, S.; Moore, R. A. Single Dose Oral Etoricoxib for Acute Postoperative Pain in Adults. *Cochrane Database Syst. Rev.* **2014**, *2017* (10), 1465–1858.
- (69) Ohishi, T.; Sone, T.; Oda, K.; Yokoyama, A. Synthesis and Characterization of Cyclobutenedione-Bithiophene π -Conjugated Polymers: Acetal-Protecting Strategy for Kumada-Tamao-Corriu Coupling Polymerization between Aryl Bromide and Grignard Reagents. *RSC Adv.* **2019**, *9* (70), 40863–40872.
- (70) King, A. O.; Okukado, N.; Negishi, E. I. Highly General Stereo-, Regio-, and Chemo-Selective Synthesis of Terminal and Internal Conjugated Enynes by the Pd-Catalyzed Reaction of Alkynylzinc Reagents with Alkenyl Halides. *J. Chem. Soc. Chem. Commun.* **1977**, *19*, 683–684.
- (71) Negishi, E.; King, A. O.; Okukado, N. Selective Carbon-Carbon Bond Formation via Transition Metal Catalysis. 3. A Highly Selective Synthesis of Unsymmetrical Biaryls and Diarylmethanes by the Nickel- or Palladium-Catalyzed Reaction of Aryl- and Benzylzinc Derivatives with Aryl Halides. *J. Org. Chem.* **1977**, *42* (10), 1821–1823.
- (72) Casalnuovo, A. L.; Calabrese, J. C. Palladium-Catalyzed Alkylations in Aqueous Media. *J. Am. Chem. Soc.* **1990**, *112* (11), 4324–4330.
- (73) Dolliver, D. D.; Bhattarai, B. T.; Pandey, A.; Lanier, M. L.; Bordelon, A. S.; Adhikari, S.; Dinsler, J. A.; Flowers, P. F.; Wills, V. S.; Schneider, C. L.; Shaughnessy, K. H.; Moore, J. N.; Raders, S. M.; Snowden, T. S.; McKim, A. S.; Fronczek, F. R. Stereospecific Suzuki, Sonogashira, and Negishi Coupling Reactions of N-Alkoxyimidoyl Iodides and Bromides. *J. Org. Chem.* **2013**, *78* (8), 3676–3687.
- (74) Huo, S. Highly Efficient, General Procedure for the Preparation of Alkylzinc Reagents from Unactivated Alkyl Bromides and Chlorides. *Org. Lett.* **2003**, *5* (4), 423–425.
- (75) Rieke, D. R. Preparation of Organometallic Compounds from Highly Reactive Metal Powders. *Science* (80-.). **1989**, *246* (4935), 1260–1264.
- (76) Manley, P. W.; Acemoglu, M.; Marterer, W.; Pachinger, W. Large-Scale Negishi Coupling as Applied to the Synthesis of PDE472, an Inhibitor of Phosphodiesterase Type 4D. *Org. Process Res. Dev.* **2003**, *7* (3), 436–445.

- (77) Torborg, C.; Beller, M. Recent Applications of Palladium-Catalyzed Coupling Reactions in the Pharmaceutical, Agrochemical, and Fine Chemical Industries. *Adv. Synth. Catal.* **2009**, *351* (18), 3027–3043.
- (78) Liebeskind, L. S.; Srogl, J. Thiol Ester-Boronic Acid Coupling. A Mechanistically Unprecedented and General Ketone Synthesis [18]. *J. Am. Chem. Soc.* **2000**, *122* (45), 11260–11261.
- (79) Cheng, H. G.; Chen, H.; Liu, Y.; Zhou, Q. The Liebeskind–Srogl Cross-Coupling Reaction and Its Synthetic Applications. *Asian J. Org. Chem.* **2018**, *7* (3), 490–508.
- (80) Villalobos, J. M.; Srogl, J.; Liebeskind, L. S. A New Paradigm for Carbon-Carbon Bond Formation: Aerobic, Copper-Templated Cross-Coupling. *J. Am. Chem. Soc.* **2007**, *129* (51), 15734–15735.
- (81) Zhang, Z.; Lindale, M. G.; Liebeskind, L. S. Mobilizing Cu(I) for Carbon-Carbon Bond Forming Catalysis in the Presence of Thiolate. Chemical Mimicking of Metallothioneins. *J. Am. Chem. Soc.* **2011**, *133* (16), 6403–6410.
- (82) Saito, T.; Fuwa, H.; Sasaki, M. Toward the Total Synthesis of Goniiodomin A, an Actin-Targeting Marine Polyether Macrolide: Convergent Synthesis of the C15-C36 Segment. *Org. Lett.* **2009**, *11* (22), 5274–5277.
- (83) Del Bel, M.; Abela, A. R.; Ng, J. D.; Guerrero, C. A. Enantioselective Chemical Syntheses of the Furanosteroids (-)-Viridin and (-)-Viridiol. *J. Am. Chem. Soc.* **2017**, *139* (20), 6819–6822.
- (84) Aguilar-Aguilar, A.; Liebeskind, L. S.; Peña-Cabrera, E. Pd-Catalyzed, Cu(I)-Mediated Cross-Couplings of Bisarylthiocyclobutenediones with Boronic Acids and Organostannanes. *J. Org. Chem.* **2007**, *72* (22), 8539–8542.
- (85) Aguilar-Aguilar, A.; Peña-Cabrera, E.; Liebeskind, L. S. Synthesis of Squaric Acid Ester-Containing Ferrocene Derivatives. *Arkivoc* **2004**, *2004* (1), 156–162.
- (86) Aguilar-Aguilar, A.; Peña-Cabrera, E. Selective Cross-Couplings. Sequential Stille-Liebeskind/Srogl Reactions of 3-Chloro-4-Arylthiocyclobutene-1,2-Dione. *Org. Lett.* **2007**, *9* (21), 4163–4166.
- (87) Farina, V.; Krishnamurthy, V.; Scott, W. J. The Stille Reaction. *Organic Reactions*. April 15, 2004, pp 1–652. <https://doi.org/https://doi.org/10.1002/0471264180.or050.01>.
- (88) Stille, J. K. The Palladium-Catalyzed Cross-Coupling Reactions of Organotin Reagents with Organic Electrophiles. *Angew. Chemie, Int. Ed.* **1986**, *25*, 508–524.

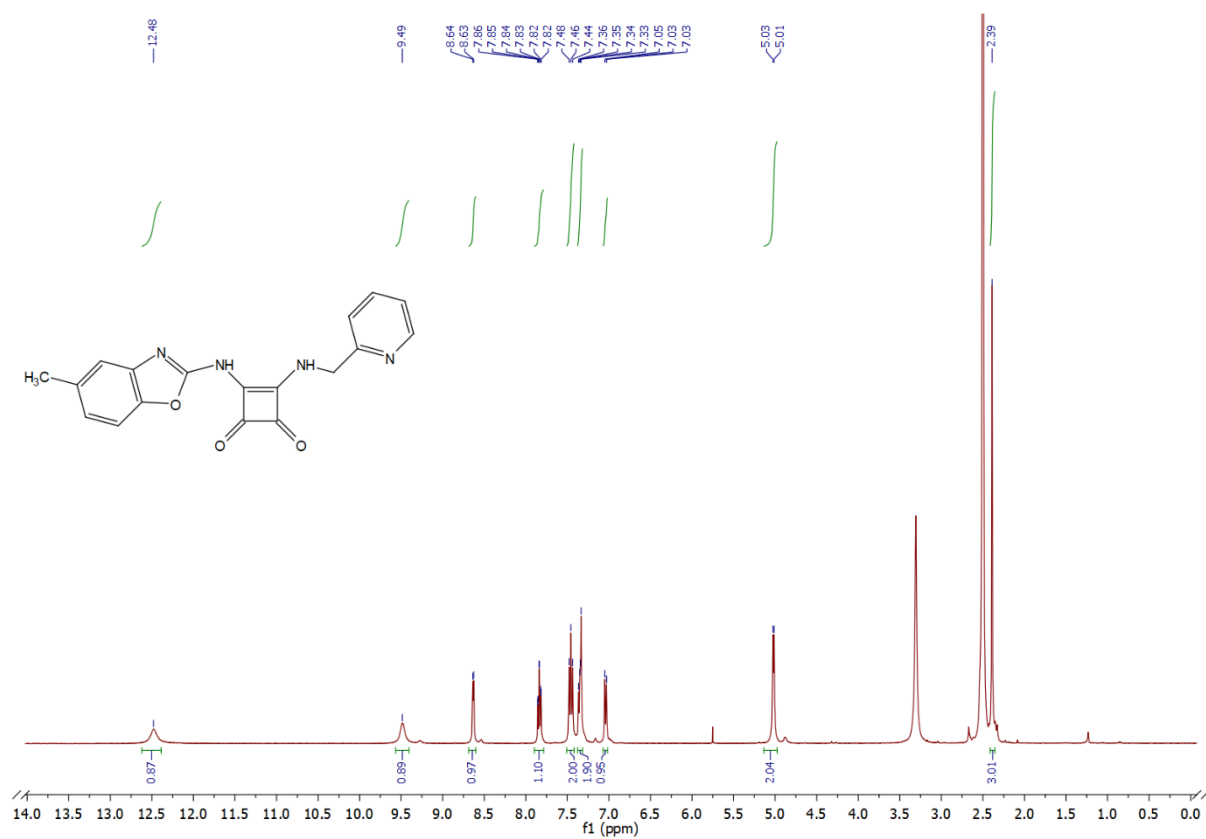
- (89) Liebeskind, L. S.; Fengl, R. W. 3-Stannylcyclobutenediones as Nucleophilic Cyclobutenedione Equivalents. Synthesis of Substituted Cyclobutenediones and Cyclobutenedione Monoacetals and the Beneficial Effect of Catalytic Copper Iodide on the Stille Reaction. *J. Org. Chem.* **1990**, *55* (19), 5359–5364.
- (90) Farina, V. New Perspectives in the Cross-Coupling Reactions of Organostannanes. *Pure Appl. Chem.* **1996**, *68* (1), 73–78.
- (91) Scott, W. J.; Stille, J. K. Palladium-Catalyzed Coupling of Vinyl Triflates with Organostannanes. Synthetic and Mechanistic Studies. *J. Am. Chem. Soc.* **1986**, *108* (11), 3033–3040.
- (92) Bao, Z.; Chan, W. K.; Yu, L. Exploration of the Stille Coupling Reaction for the Syntheses of Functional Polymers. *J. Am. Chem. Soc.* **1995**, *117* (50), 12426–12435.
- (93) Bao, Z.; Chan, W.; Yu, L. Synthesis of Conjugated Polymer by the Stille Coupling Reaction. *Chem. Mater.* **1993**, *5* (1), 2–3.
- (94) Humphrey, J. M.; Liao, Y.; Ali, A.; Rein, T.; Wong, Y. L.; Chen, H. J.; Courtney, A. K.; Martin, S. F. Enantioselective Total Syntheses of Manzamine A and Related Alkaloids. *J. Am. Chem. Soc.* **2002**, *124* (29), 8584–8592.
- (95) Kende, A. S.; Kawamura, K.; DeVita, R. J. Enantioselective Total Synthesis of Neooxazolomycin. *J. Am. Chem. Soc.* **1990**, *112* (10), 4070–4072.
- (96) Liebeskind, L. S.; Wang, J. Synthesis of Substituted Cyclobutenediones by the Palladium Catalyzed Cross-Coupling of Halocyclobutenediones with Organostannanes. *Tetrahedron Lett.* **1990**, *31* (30), 4293–4296.
- (97) Šlachťová, V.; Chasák, J.; Brulíková, L. Synthesis of Various 2-Aminobenzoxazoles: The Study of Cyclization and Smiles Rearrangement. *ACS Omega* **2019**, *4* (21), 19314–19323.
- (98) James, K. D.; Ellington, A. D. The Use of Aluminum Chloride for Removal of Boc Groups on 5'-Amino-2',5'-Dideoxyoligonucleotides during Solid-Phase Synthesis. *Tetrahedron Lett.* **1998**, *39* (3–4), 175–178.
- (99) Krakowiak, K. E.; Bradshaw, J. S. Thermal Removal of Boc-Protecting Groups During Preparation of Open-Chain Polyamines. *Synth. Commun.* **1996**, *26* (21), 3999–4004.
- (100) Li, B.; Li, R.; Dorff, P.; McWilliams, J. C.; Guinn, R. M.; Guinness, S. M.; Han, L.; Wang, K.; Yu, S. Deprotection of N-Boc Groups under Continuous-Flow High-Temperature Conditions. *J. Org. Chem.* **2019**, *84* (8), 4846–4855.
- (101) Garcia, P. P. et al. Squarylium Compounds, and Processes and Intermediates for the Synthesis of These Compounds. US5919950A: 1999, p. 25.

- (102) Prokopcová, H.; Kappe, C. O. The Liebeskind-Srogl C-C Cross-Coupling Reaction. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **2009**, *48* (13), 2276–2286.
- (103) Rajaguru, K.; Mariappan, A.; Manjusri, R.; Muthusubramanian, S.; Bhuvanesh, N. An Efficient Desulfitative C-C Cross Coupling of Fused Thiazolidine-2-Thione with Boronic Acids and Boronic Acid Pinacol Esters: Formation of Fused Thiazoles. *RSC Adv.* **2015**, *5* (105), 86832–86839.
- (104) Oliveira, P. F. M.; Guidetti, B.; Chamayou, A.; André-Barrès, C.; Madacki, J.; Korduláková, J.; Mori, G.; Orena, B. S.; Chiarelli, L. R.; Pasca, M. R.; Lherbet, C.; Carayon, C.; Massou, S.; Baron, M.; Baltas, M. Mechanochemical Synthesis and Biological Evaluation of Novel Isoniazid Derivatives with Potent Antitubercular Activity. *Molecules* . **2017**, *22* (9), 1457.
- (105) Bhunia, S.; Chaudhuri, S.; Bisai, A. Total Syntheses of Pyroclavine, Festuclavine, Lysergol, and Isolysergol via a Catalytic Asymmetric Nitro-Michael Reaction. *Chem. - A Eur. J.* **2017**, *23* (47), 11234–11238.

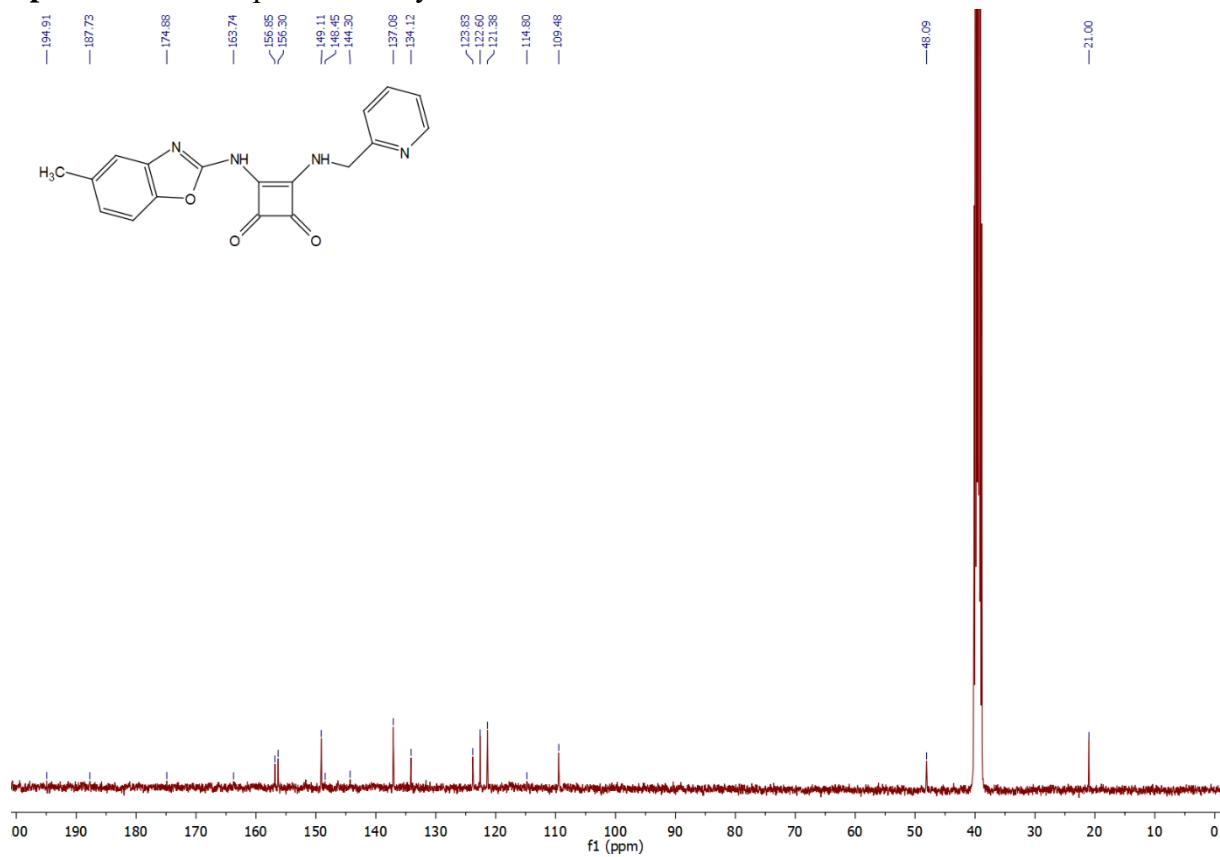
PŘÍLOHY



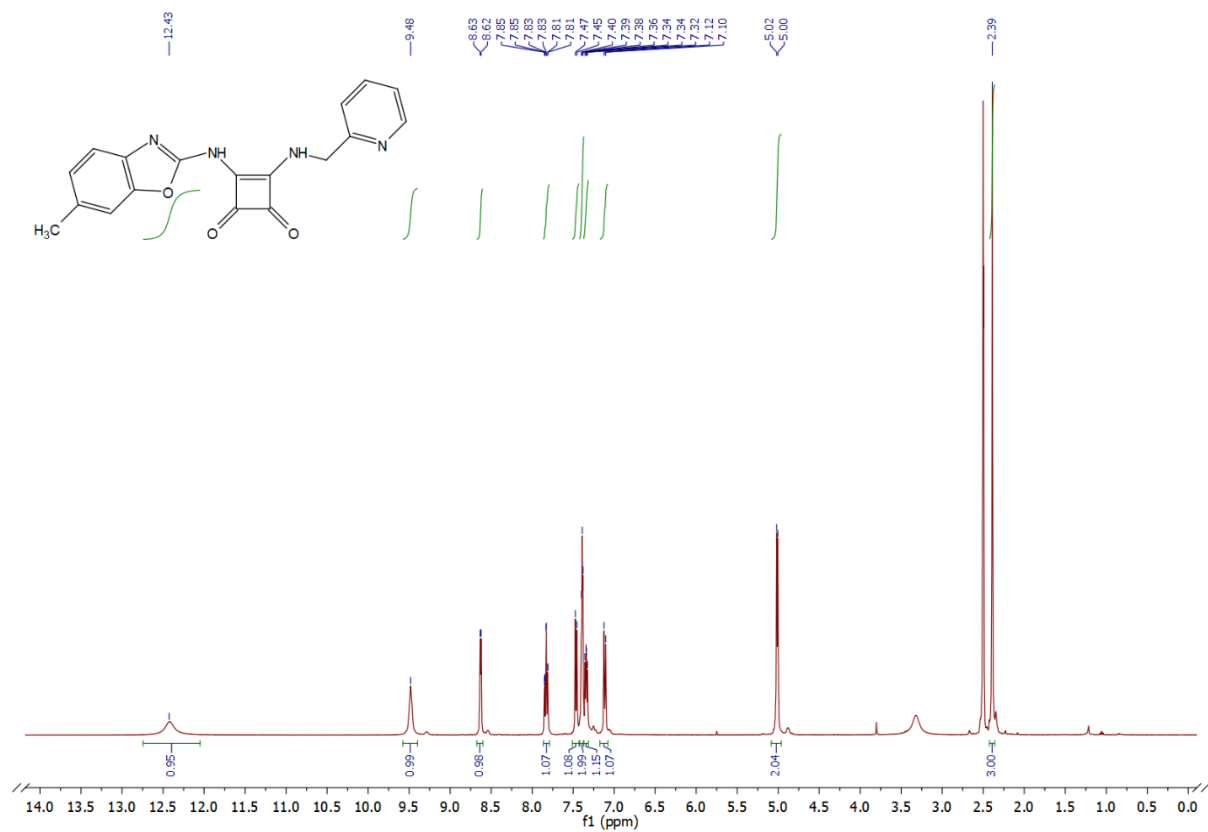
Spektrum 3: ¹H spektrum látky 1a



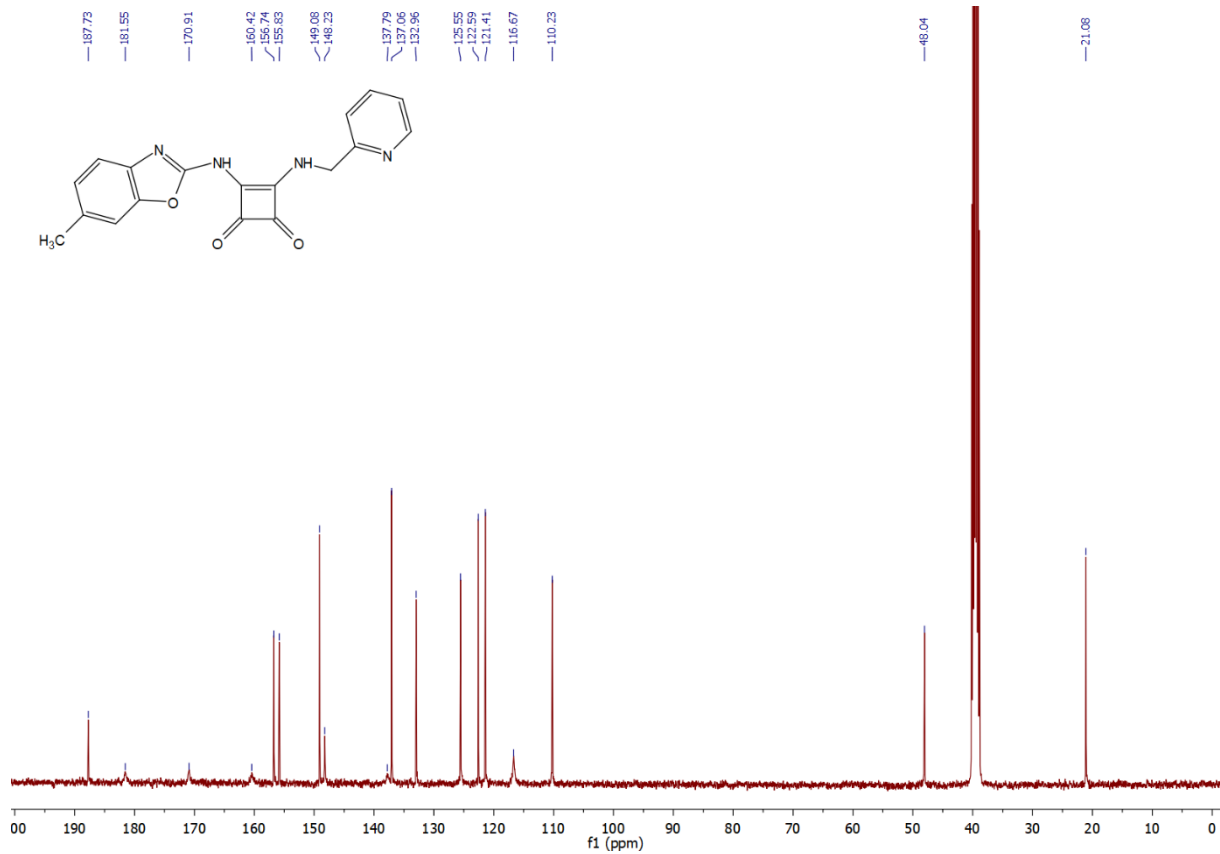
Spektrum 4: ¹³C spektrum látky 1a



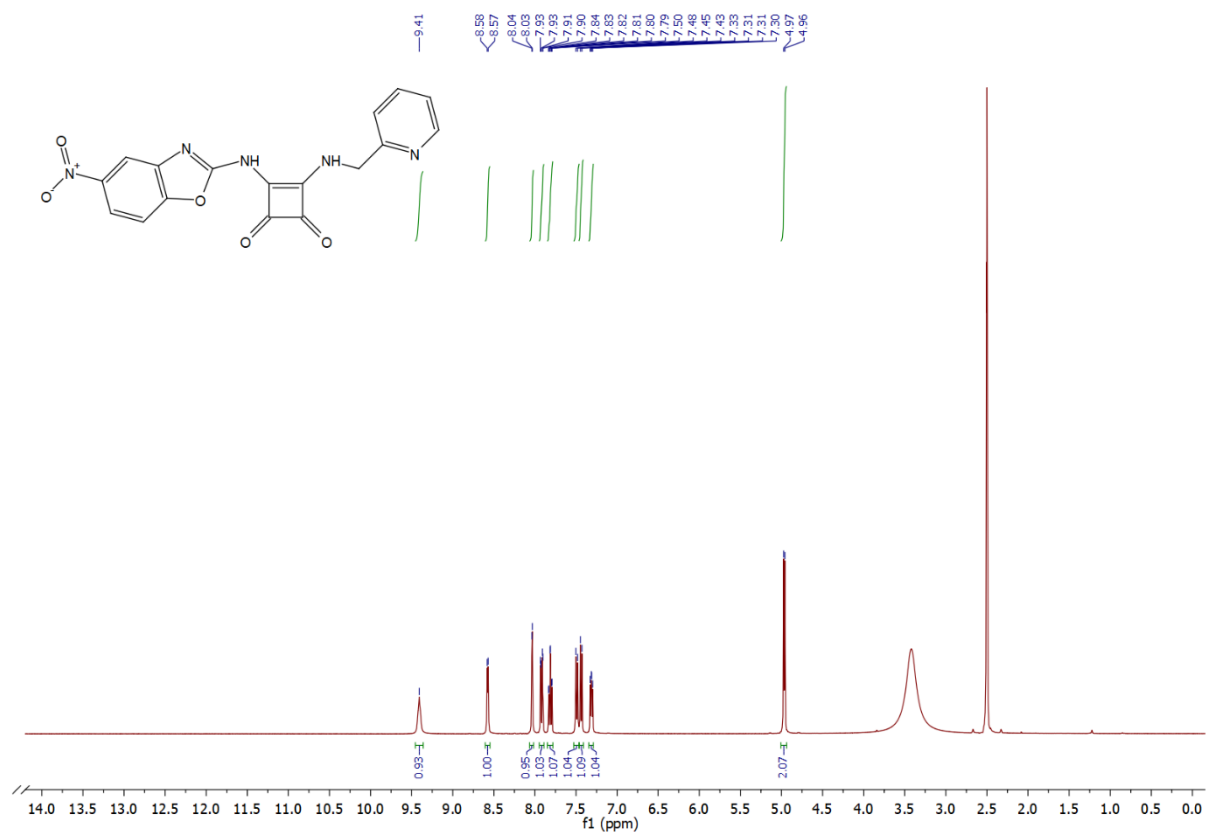
Spektrum 5: ¹H spektrum látky 1b



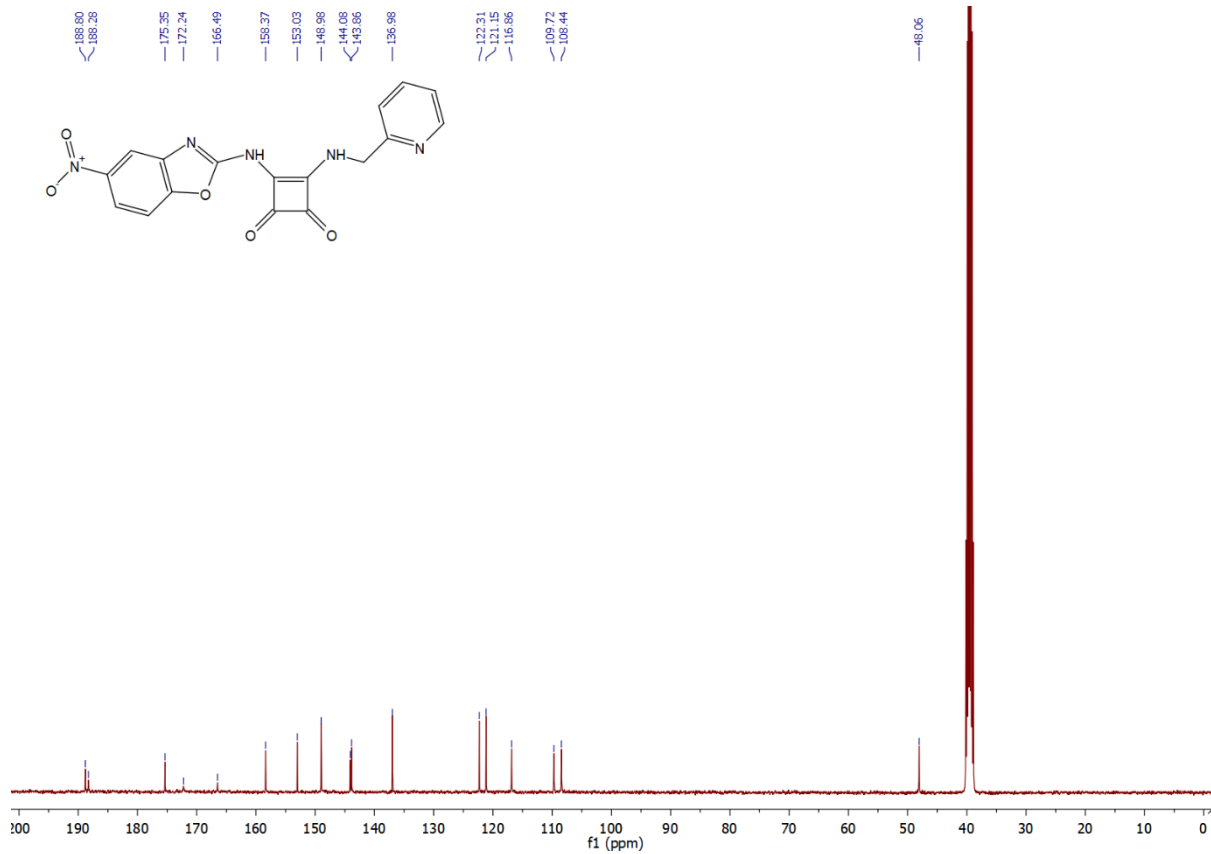
Spektrum 6: ¹³C spektrum látky 1b



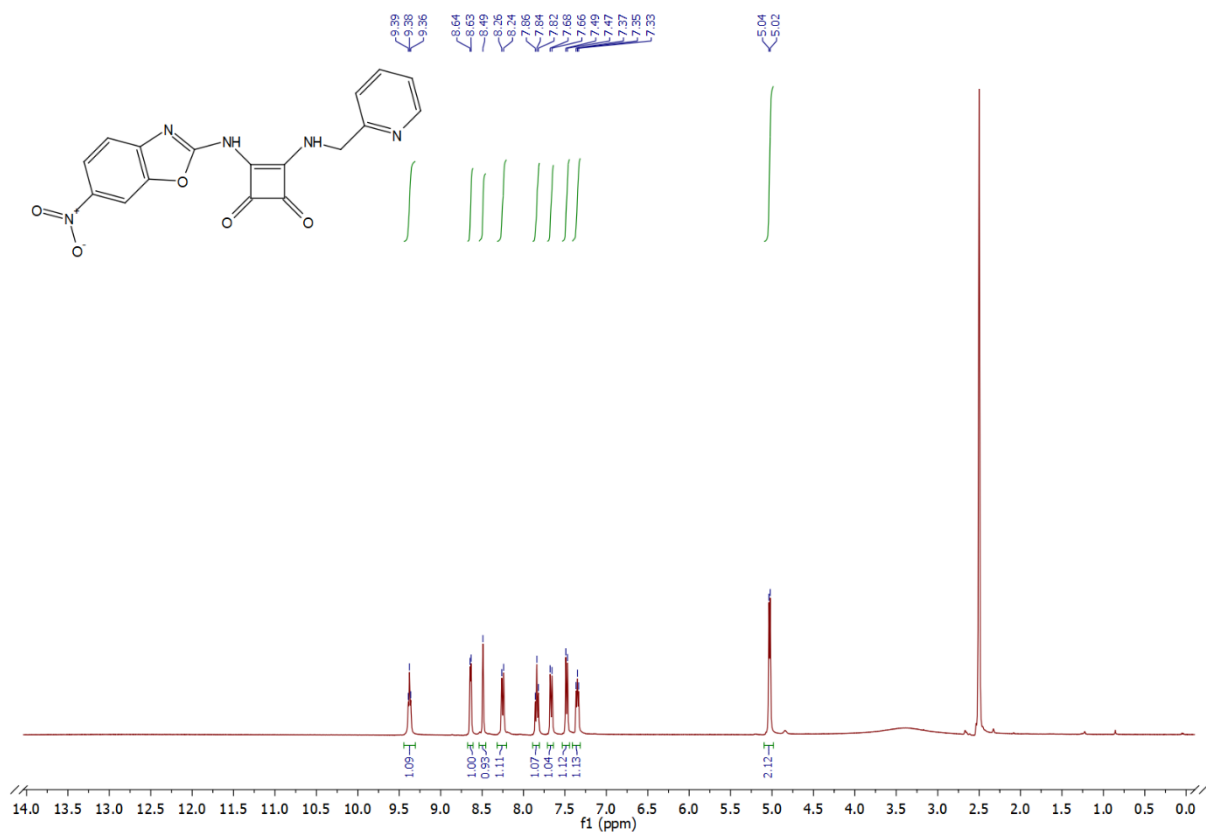
Spektrum 7: ^1H spektrum látky **1c**



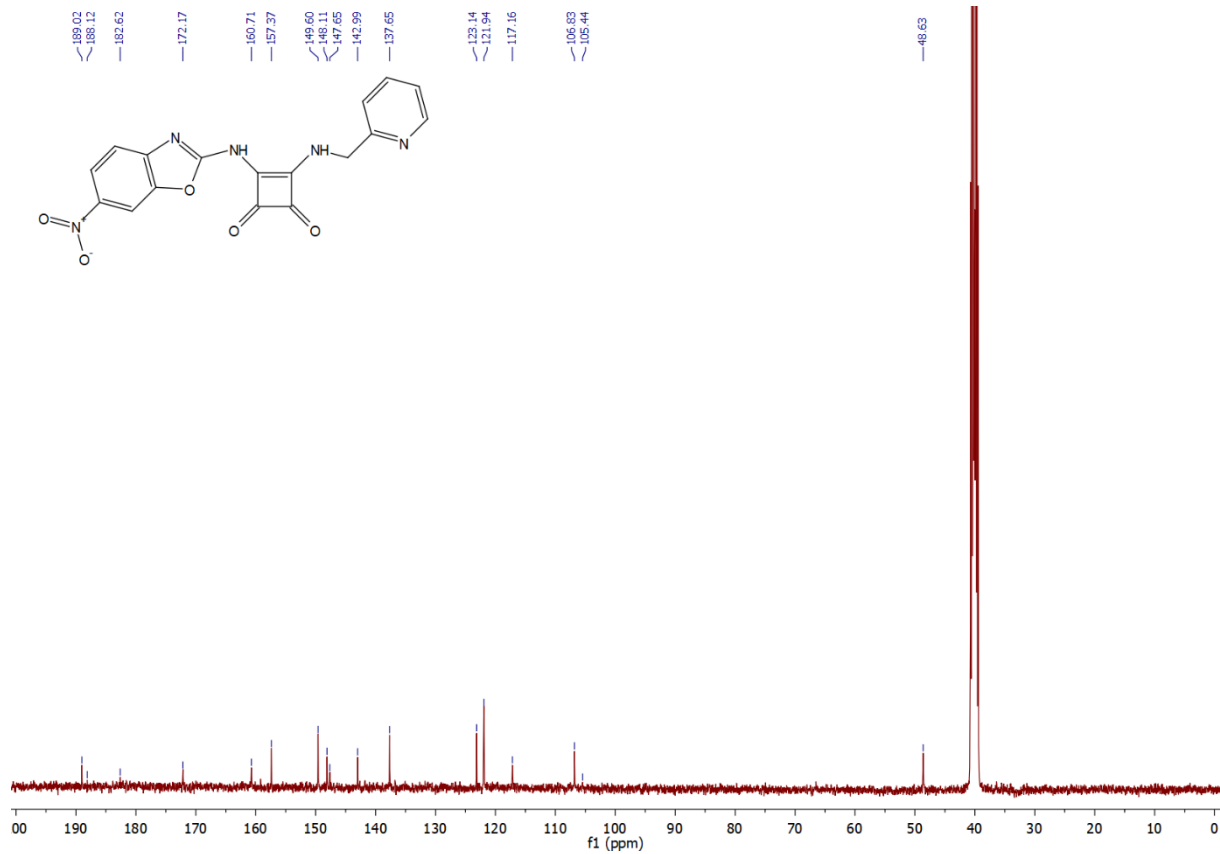
Spektrum 8: ^{13}C spektrum látky **1c**



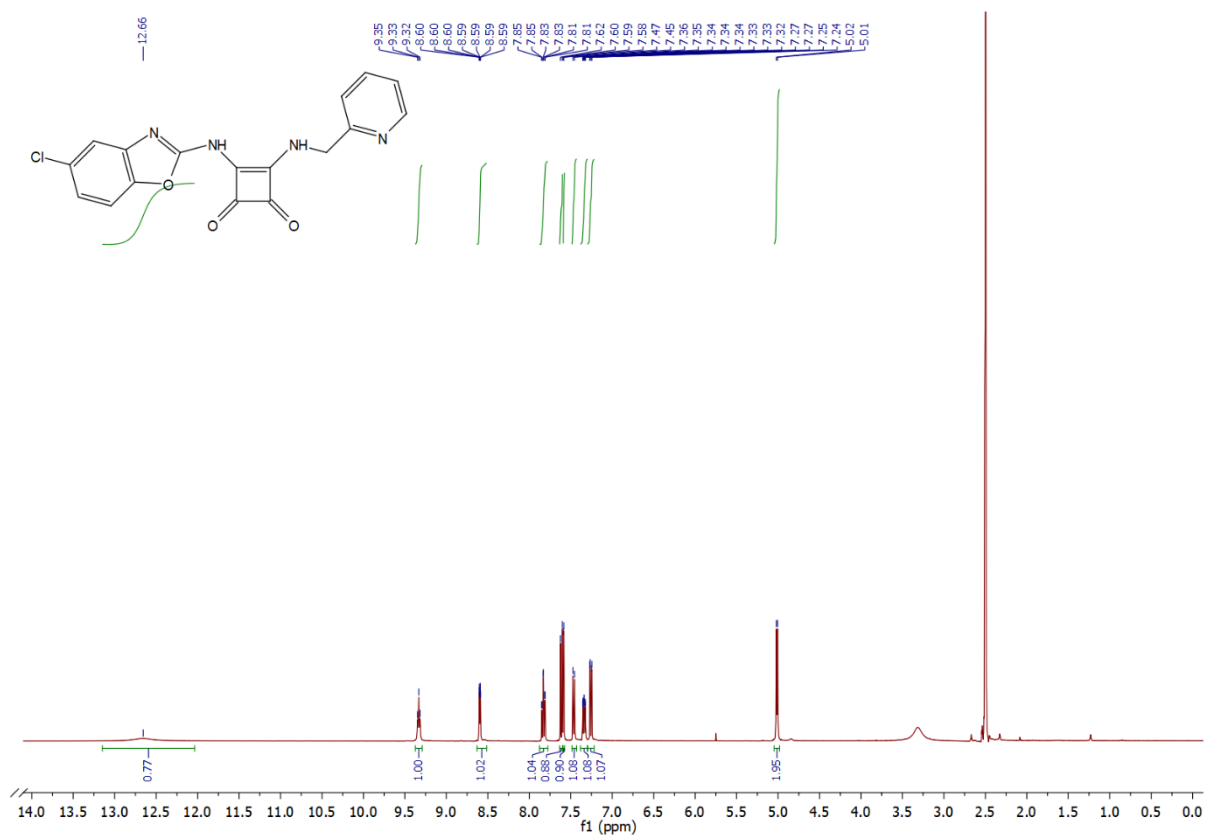
Spektrum 9: ^1H spektrum látky **1d**



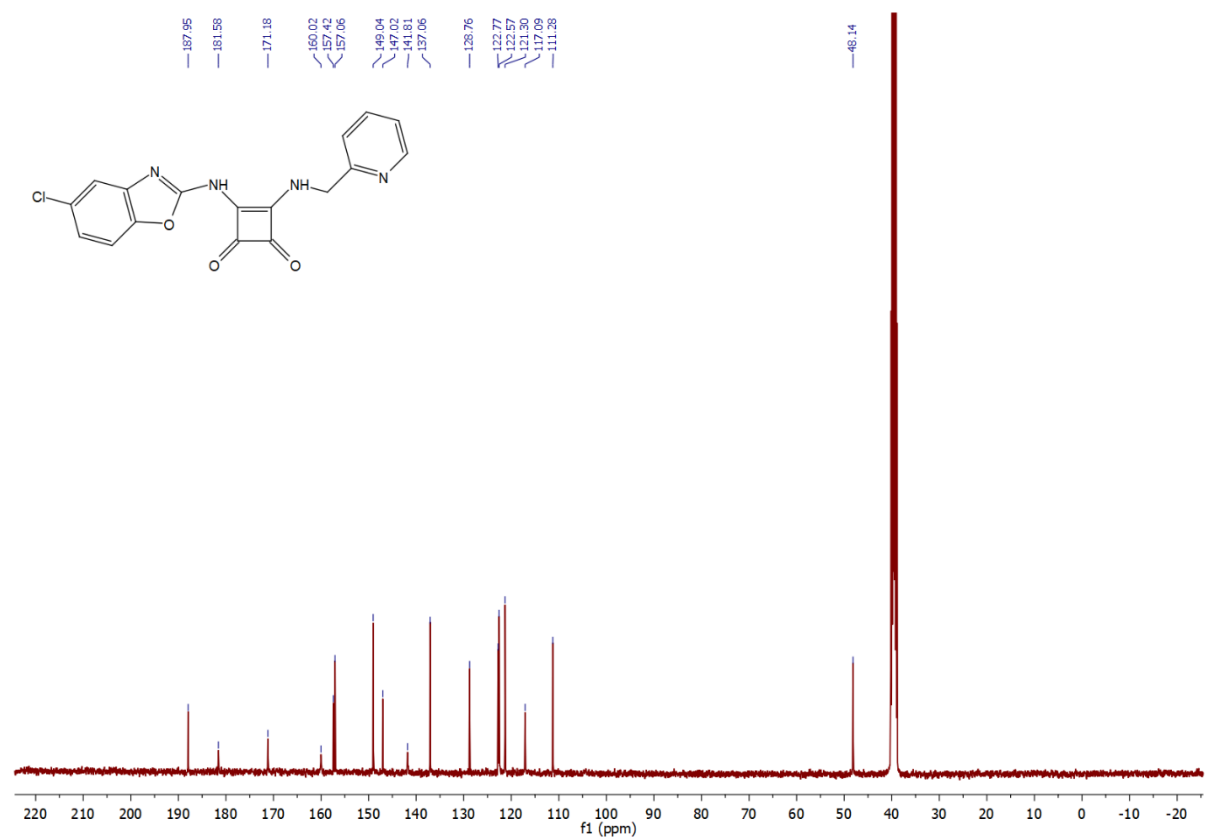
Spektrum 10: ^{13}C spektrum látky **1d**



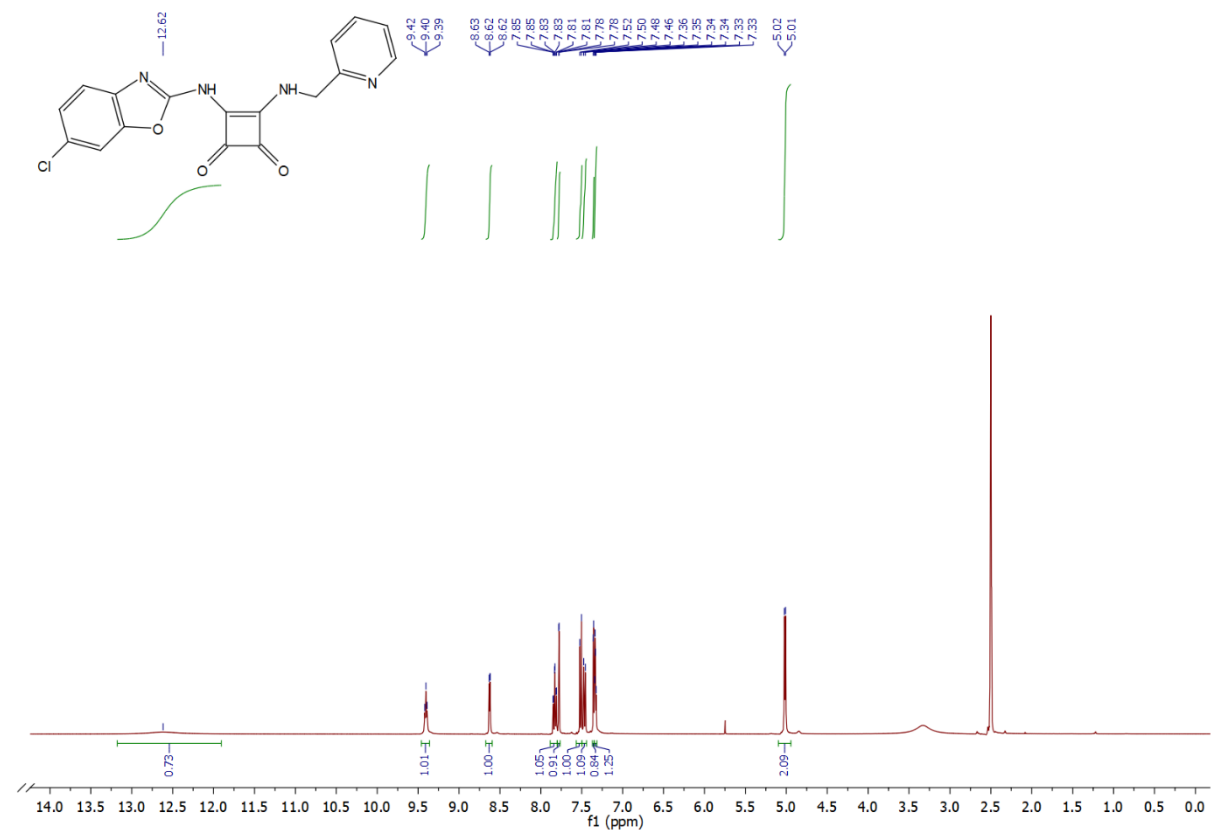
Spektrum 11: ^1H spektrum látky **1e**



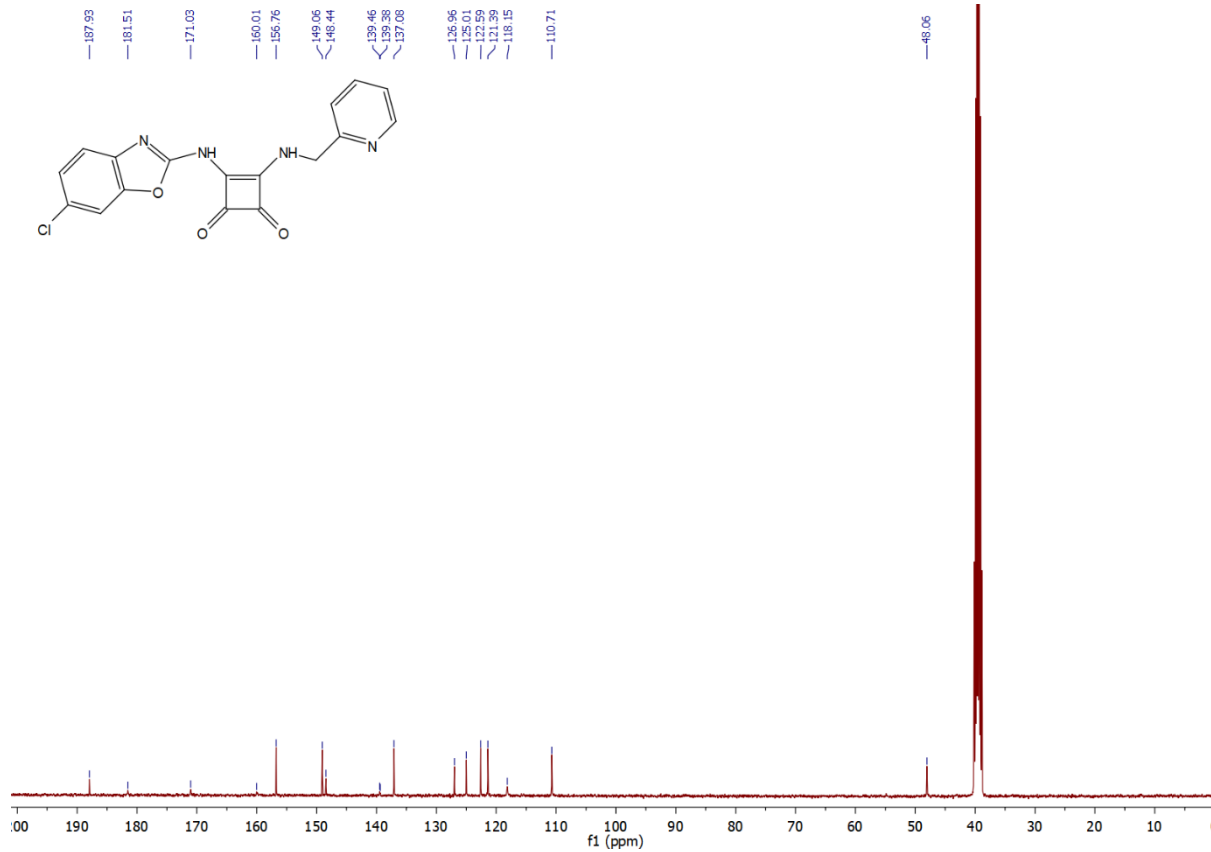
Spektrum 12: ^{13}C spektrum látky **1e**



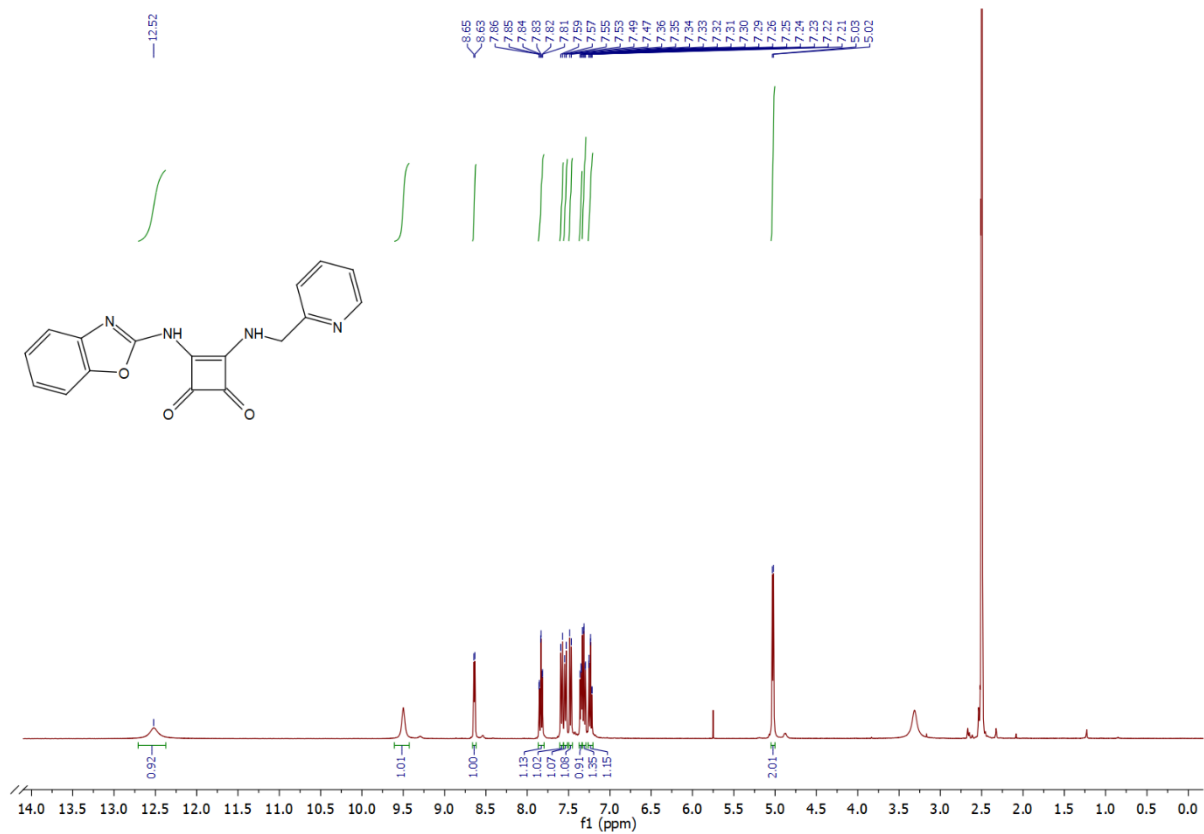
Spektrum 13: ^1H spektrum látky **1f**



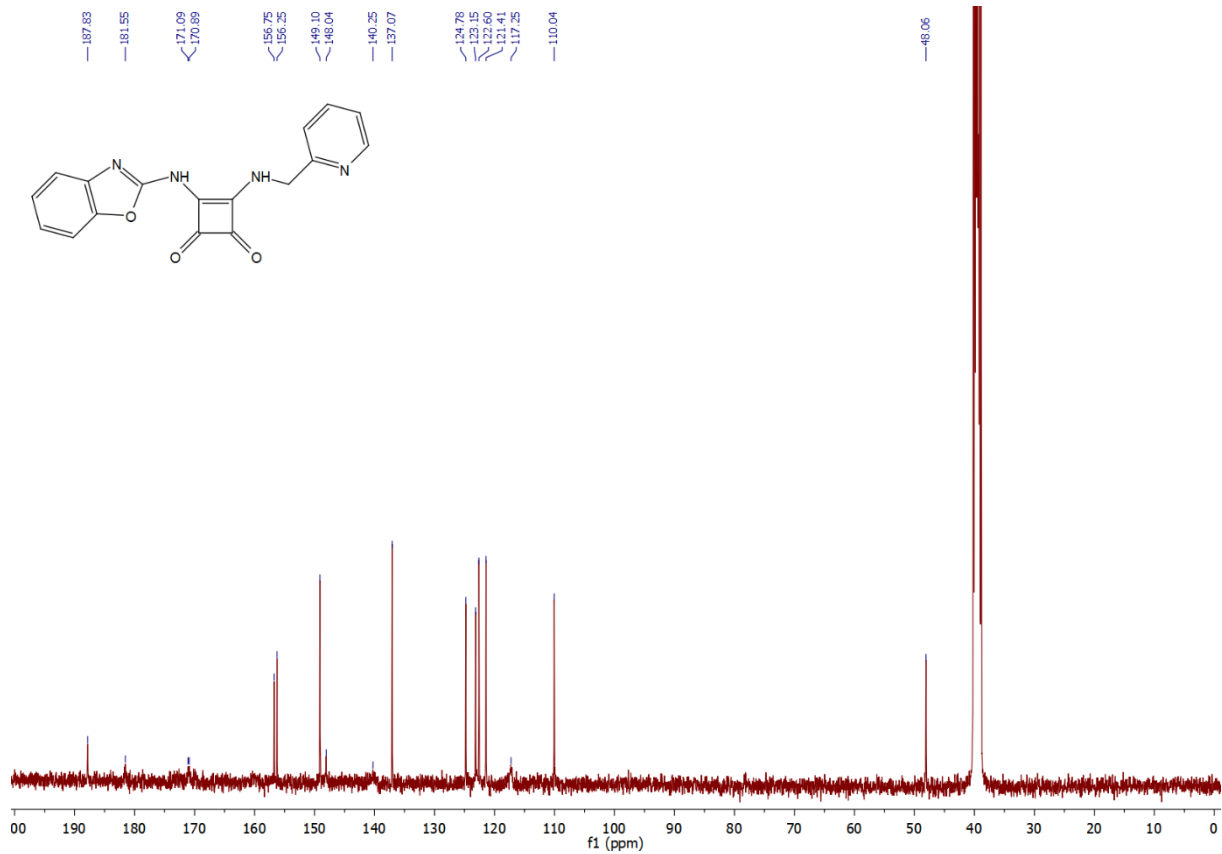
Spektrum 14: ^{13}C spektrum látky **1f**



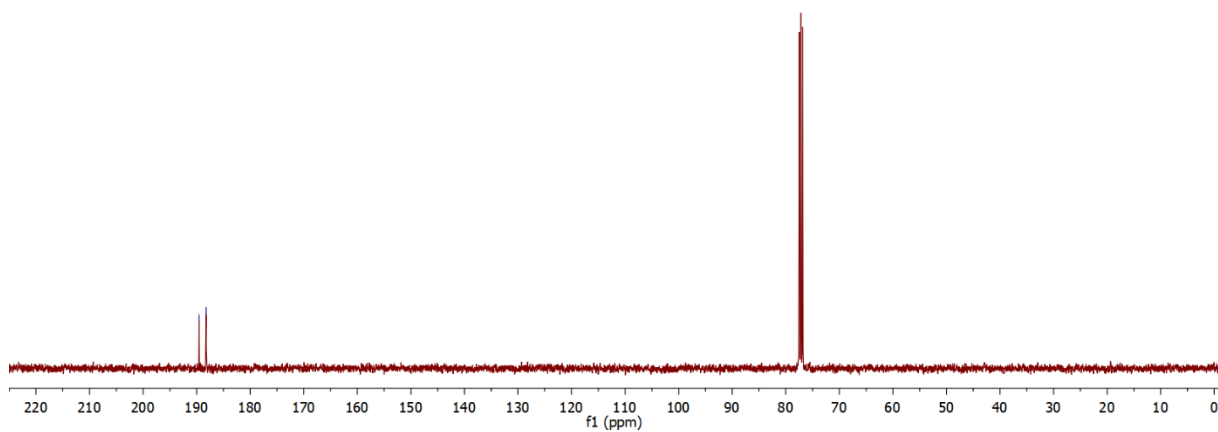
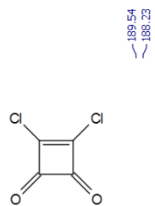
Spektrum 15: ¹H spektrum látky 1g



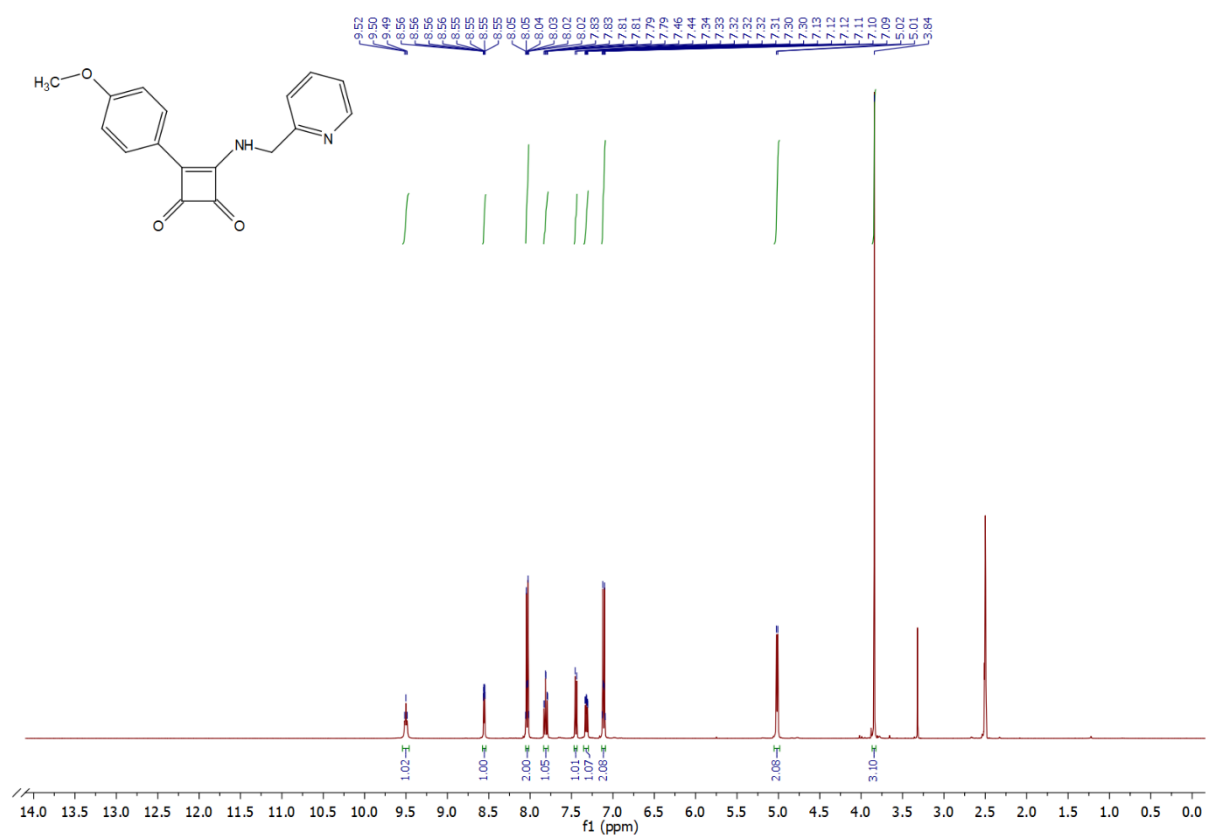
Spektrum 16: ¹³C spektrum látky 1g



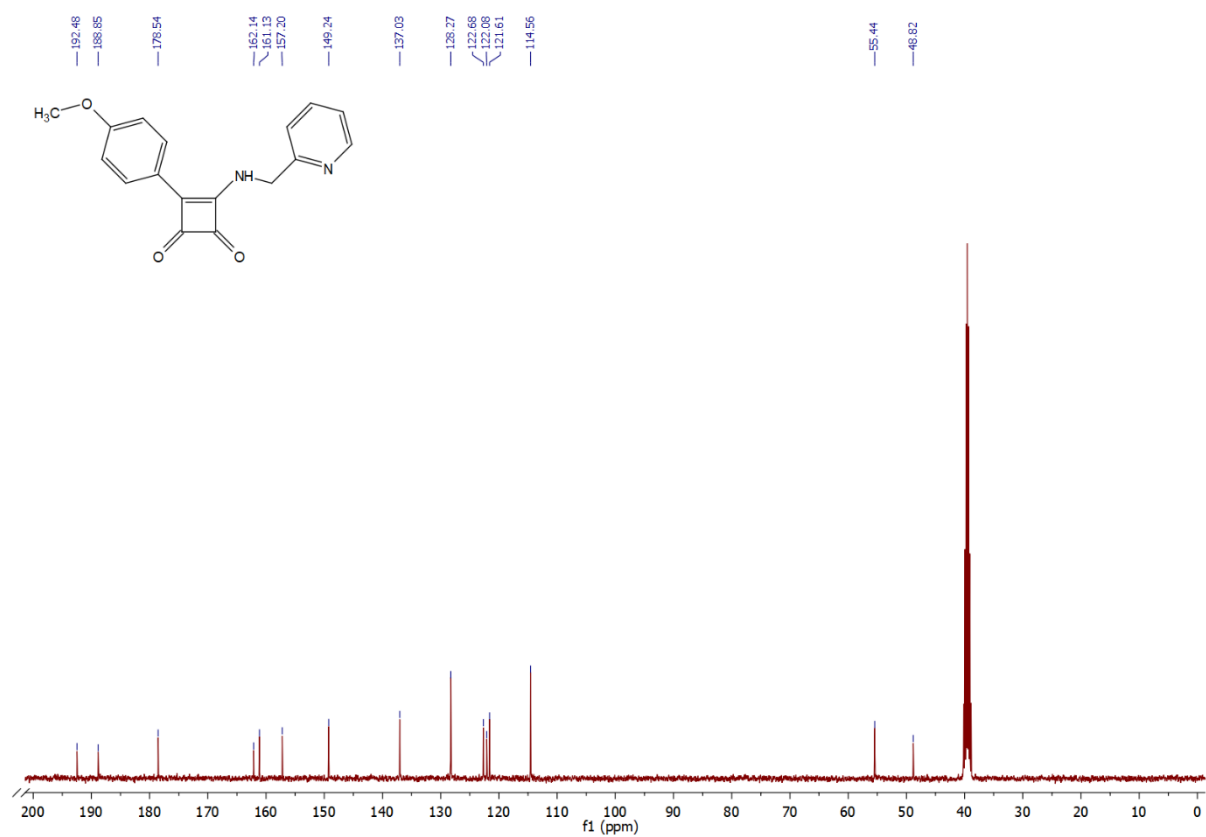
Spektrum 17: ^{13}C spektrum látky 6



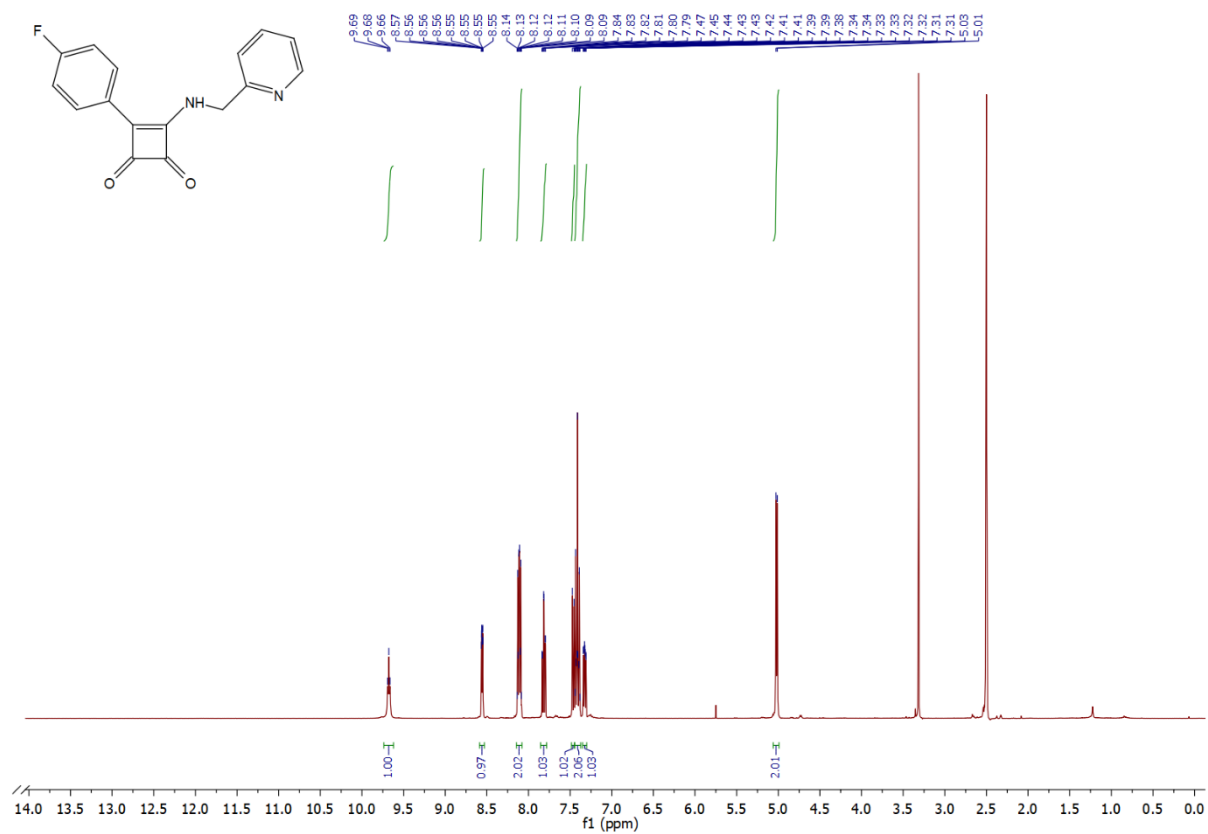
Spektrum 18: ^1H spektrum látky 2a



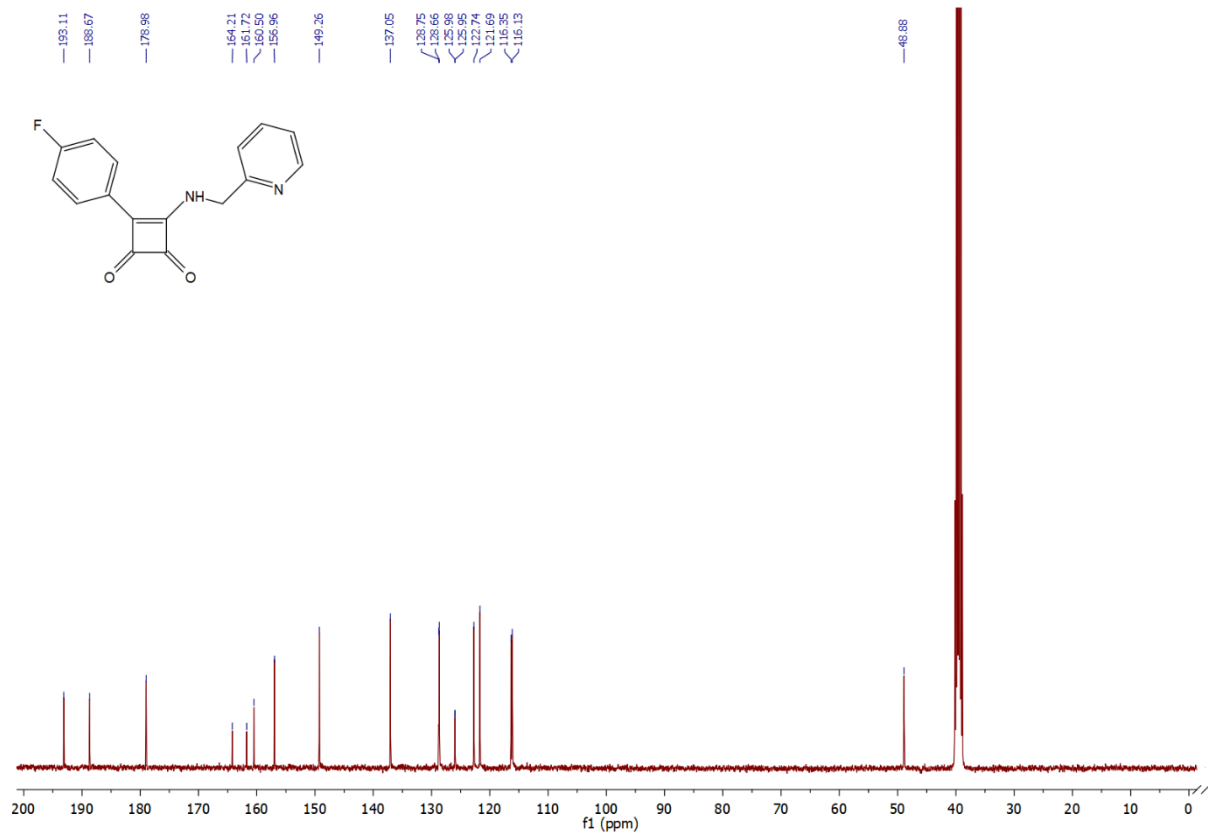
Spektrum 19: ^{13}C spektrum látky 2a



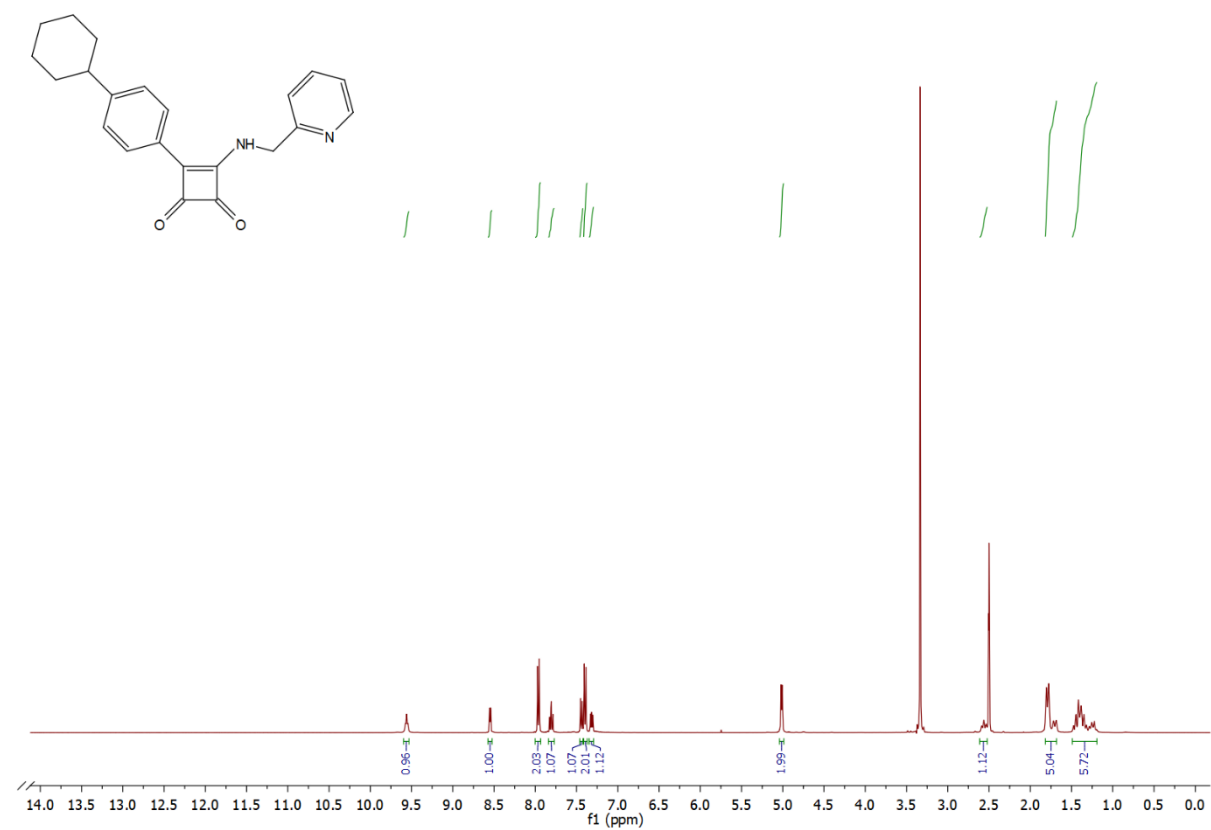
Spektrum 20: ^1H spektrum látky **2b**



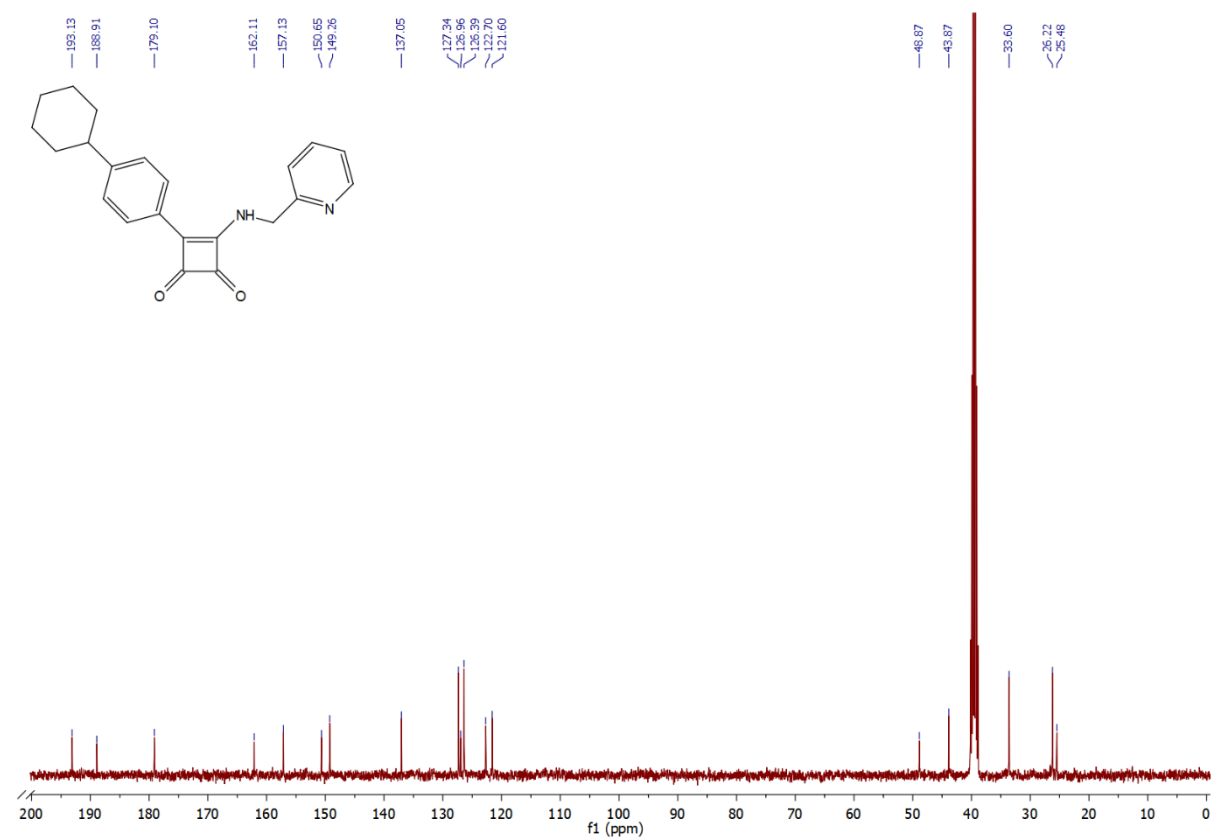
Spektrum 21: ^{13}C spektrum látky **2b**



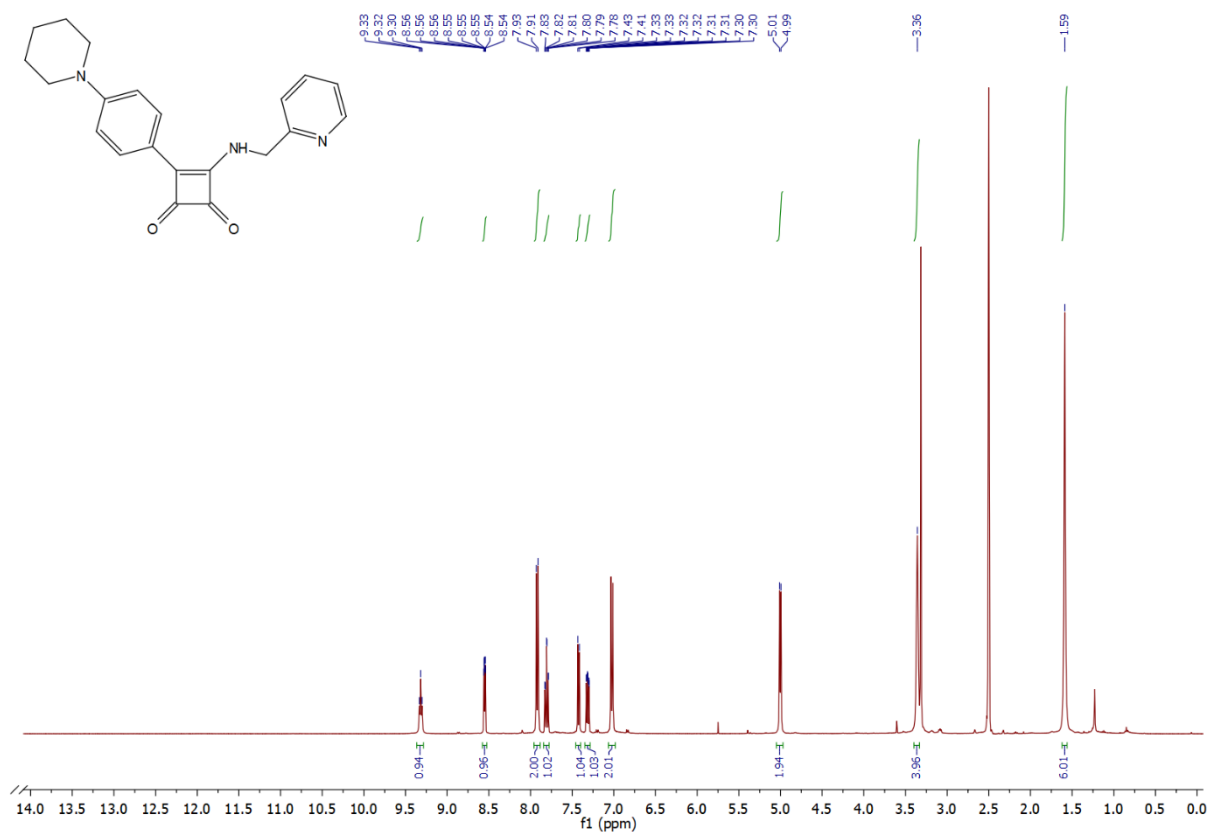
Spektrum 22: ^1H spektrum látky **2c**



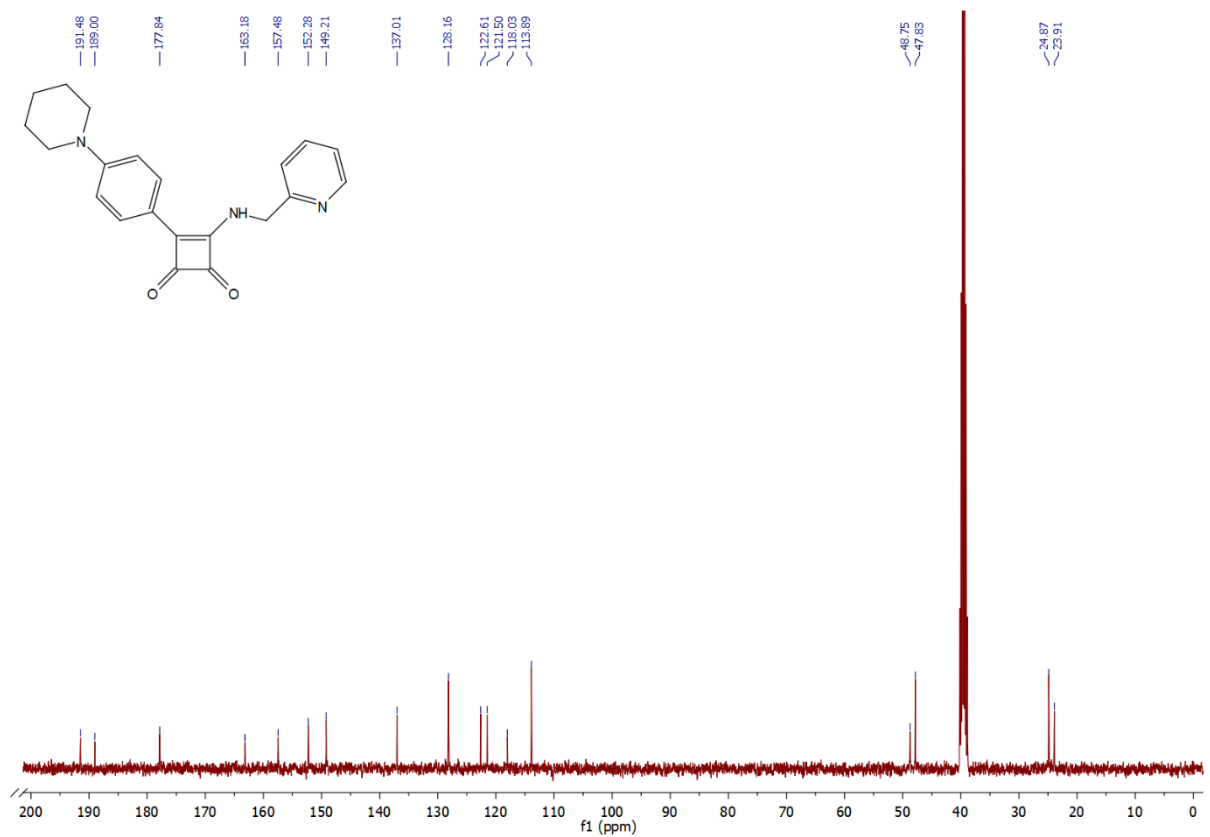
Spektrum 23: ^{13}C spektrum látky **2c**



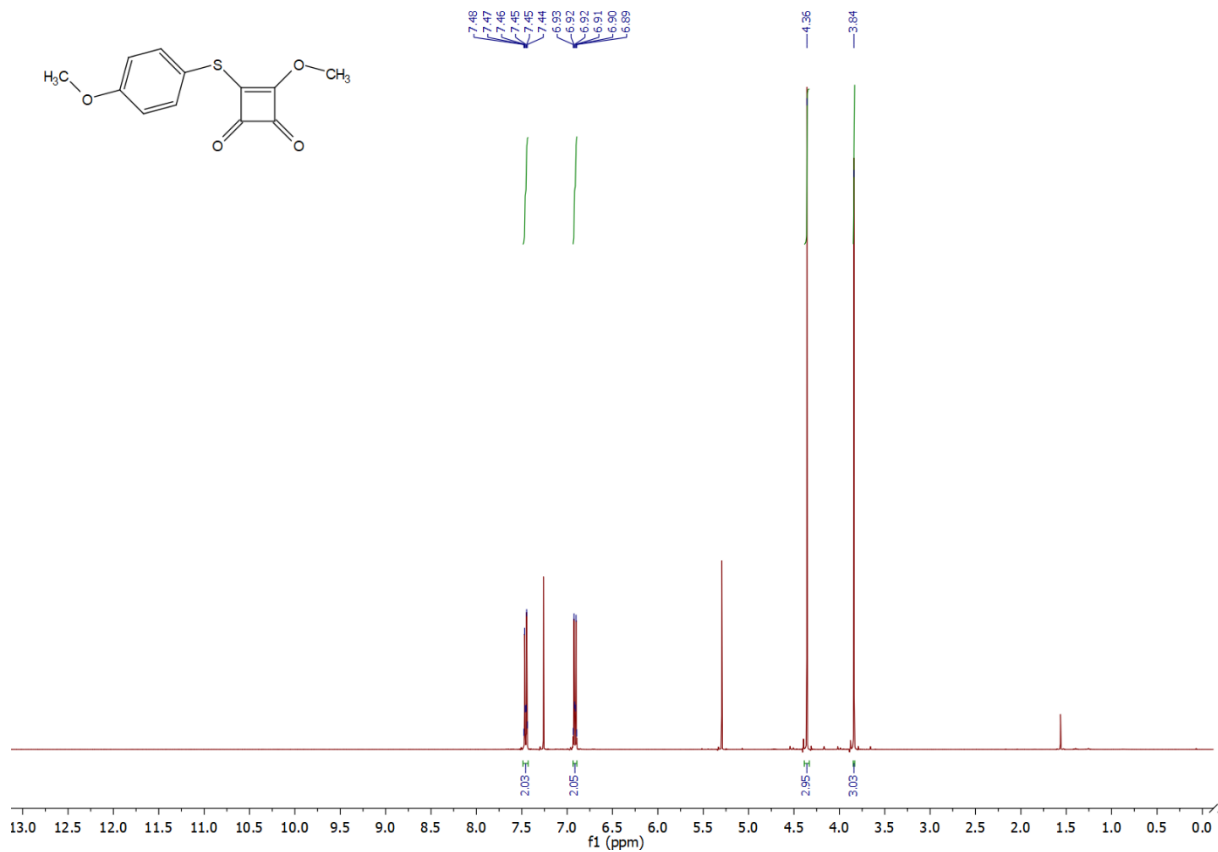
Spektrum 24: ¹H spektrum látky 2d



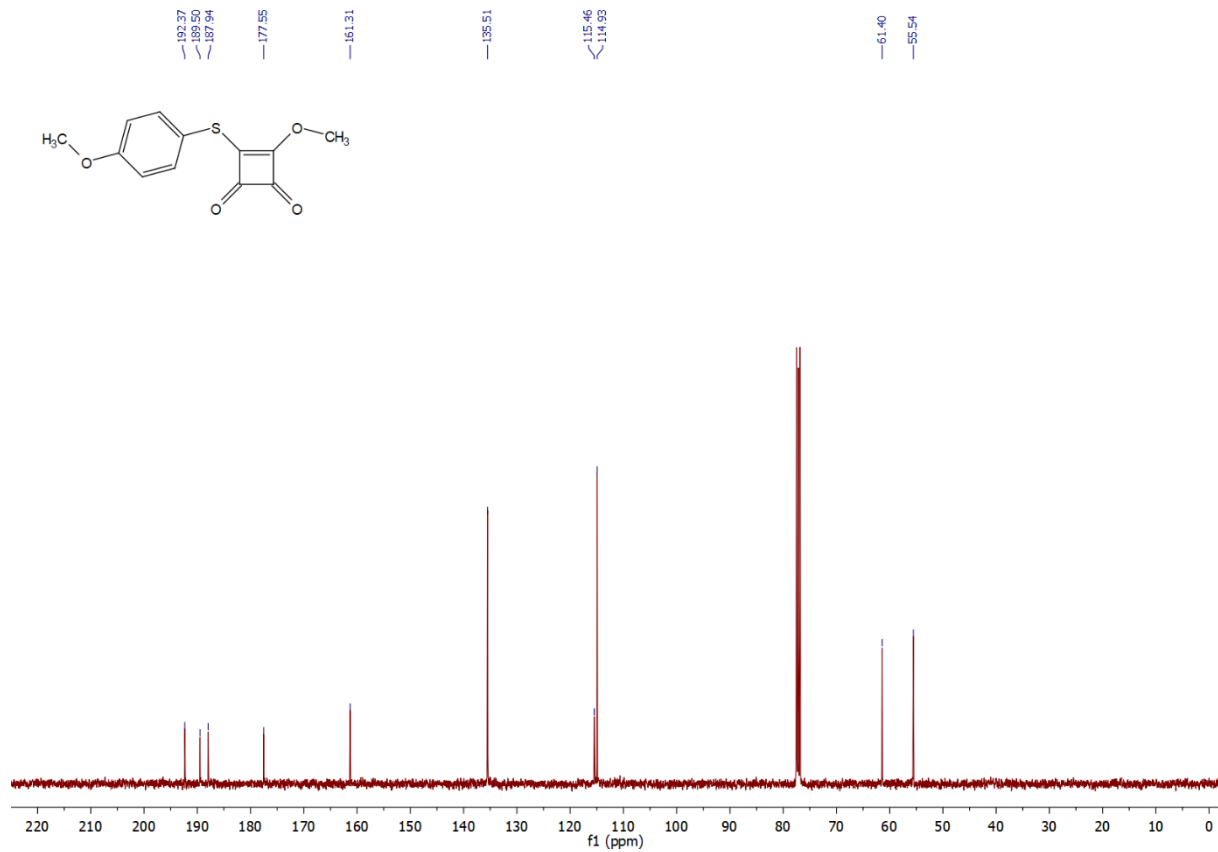
Spektrum 25: ¹³C spektrum látky 2d



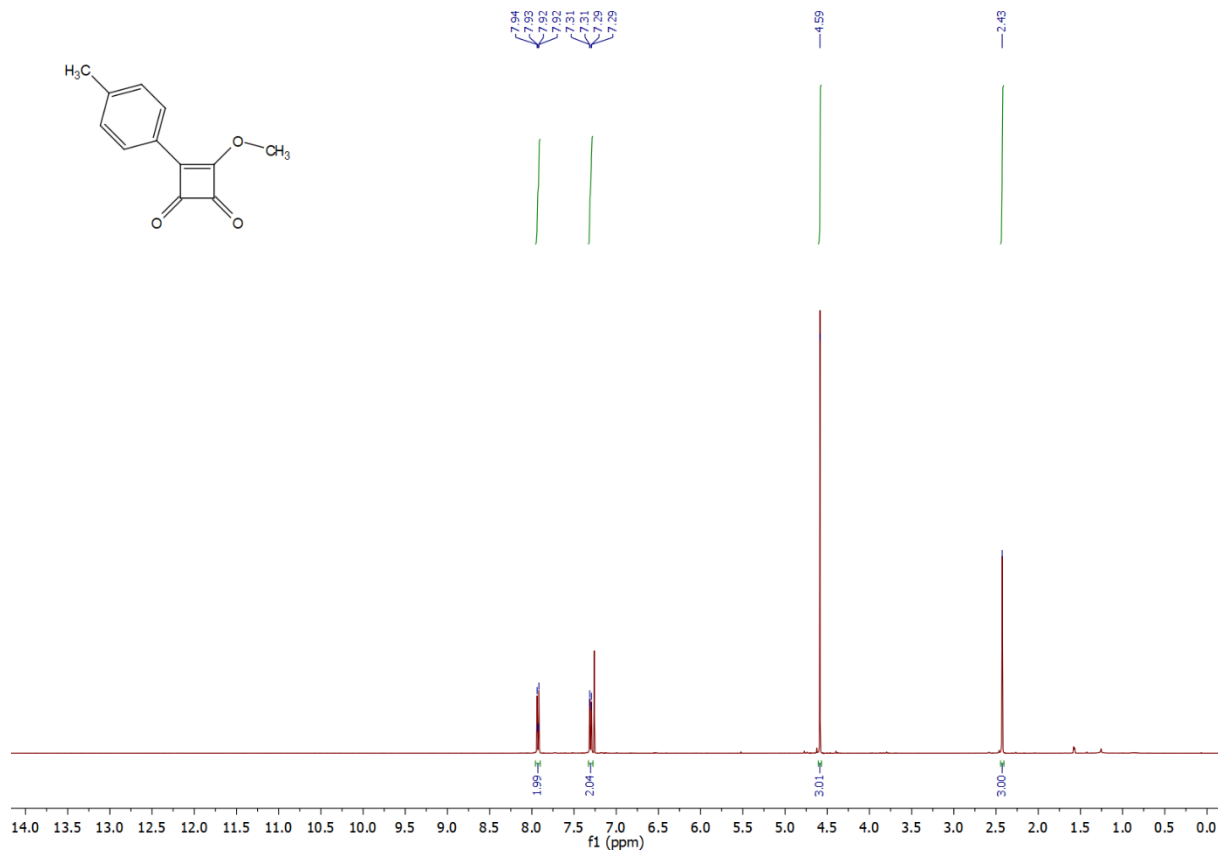
Spektrum 26: ^1H spektrum látky 25



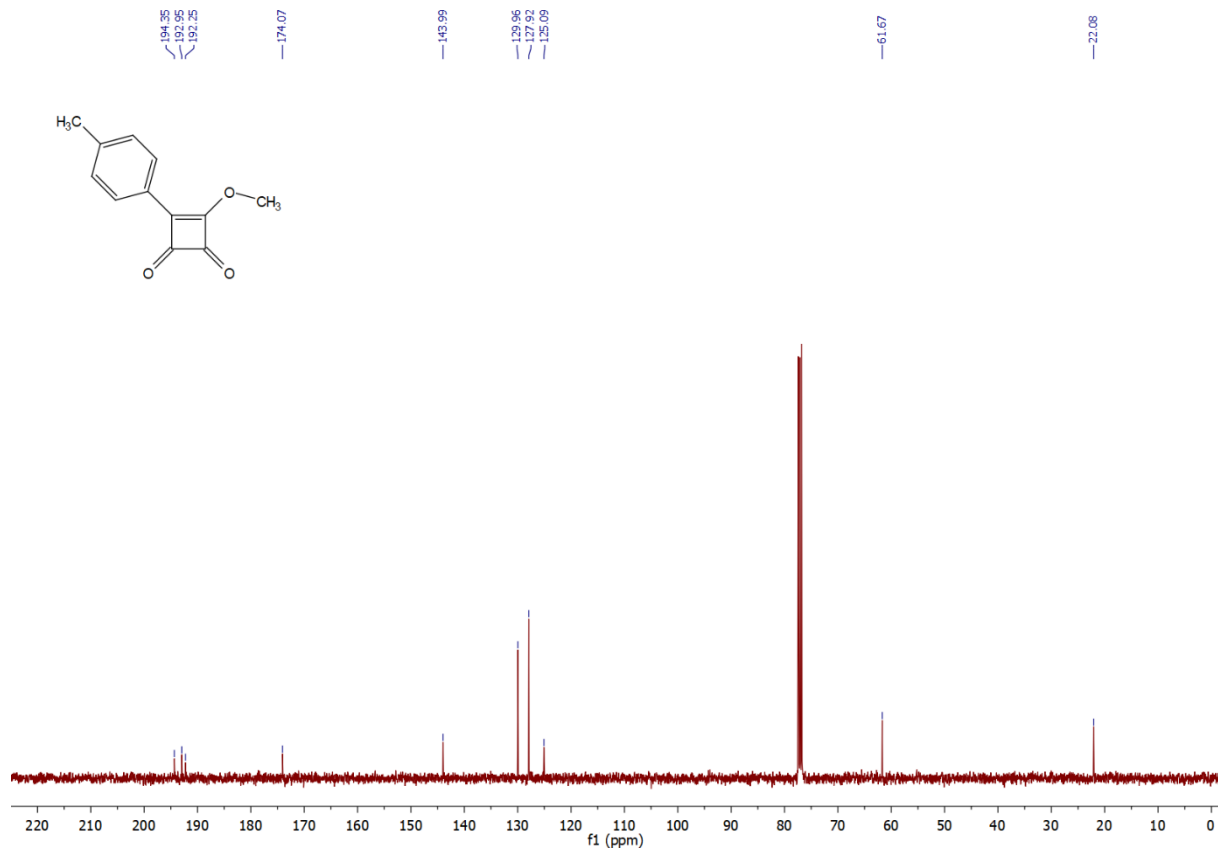
Spektrum 27: ^{13}C spektrum látky 25



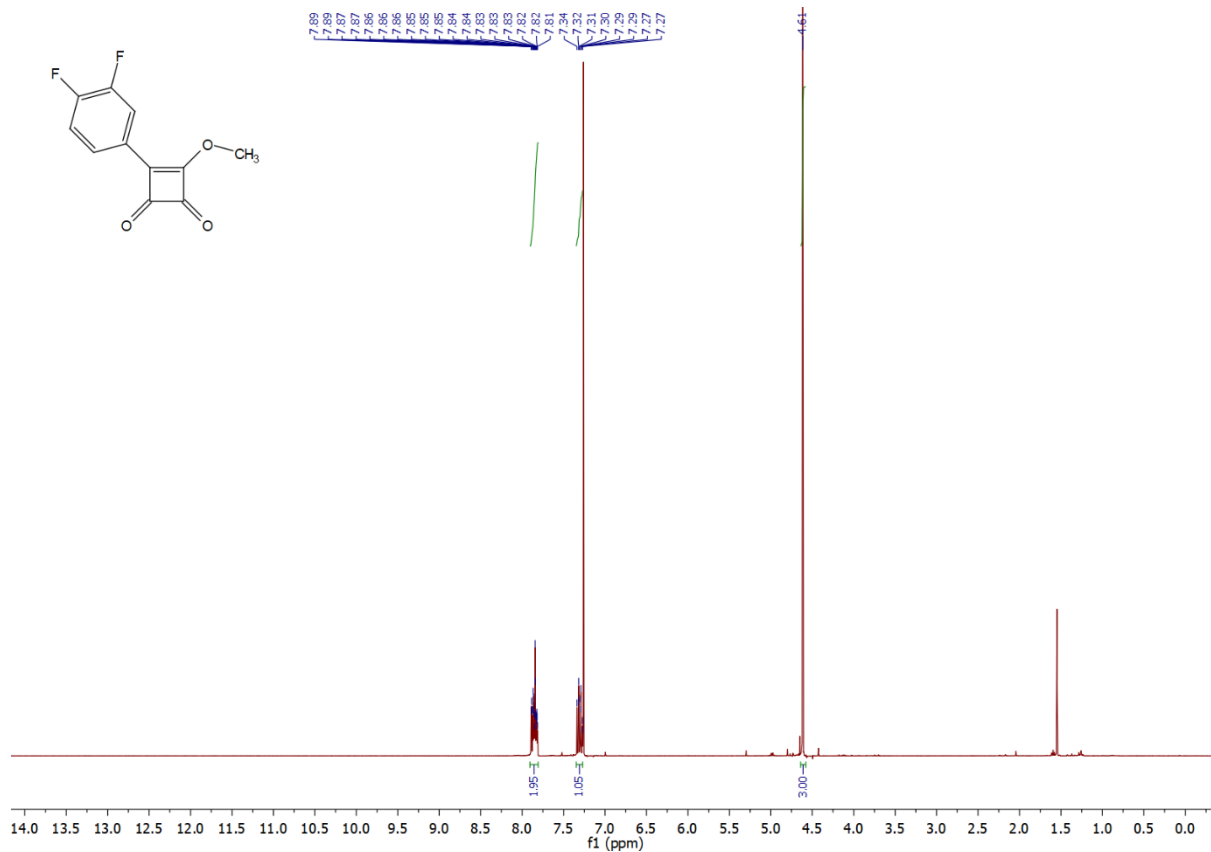
Spektrum 28: ^1H spektrum látky 22a



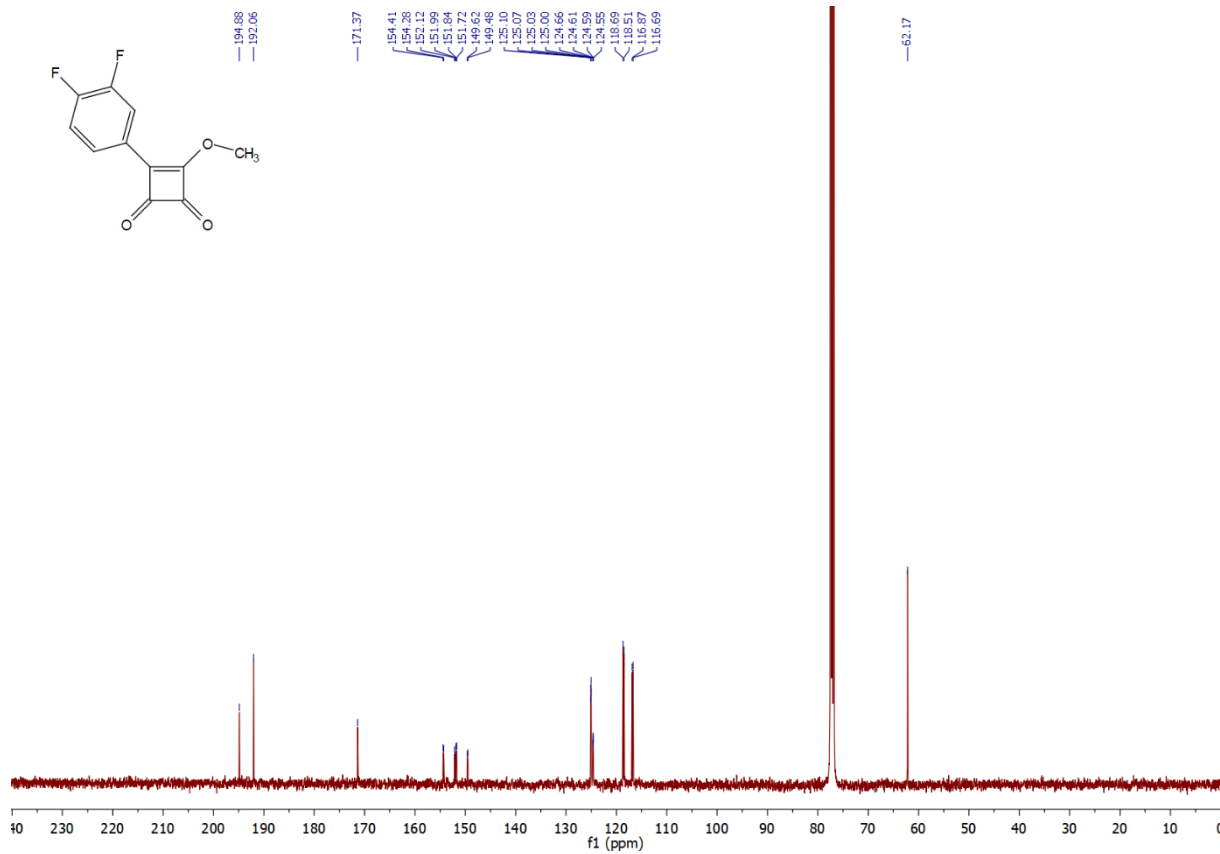
Spektrum 29: ^{13}C spektrum látky 22a



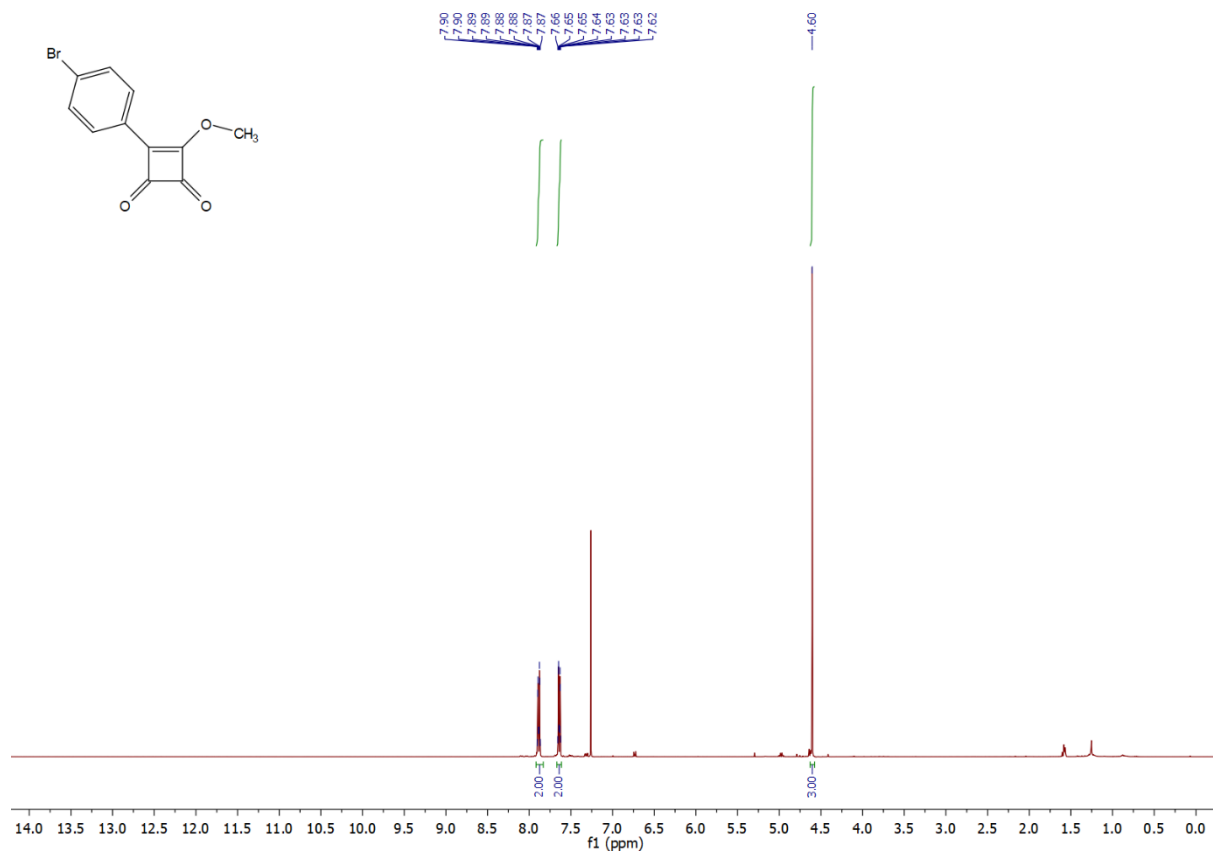
Spektrum 30: ^1H spektrum látky 22b



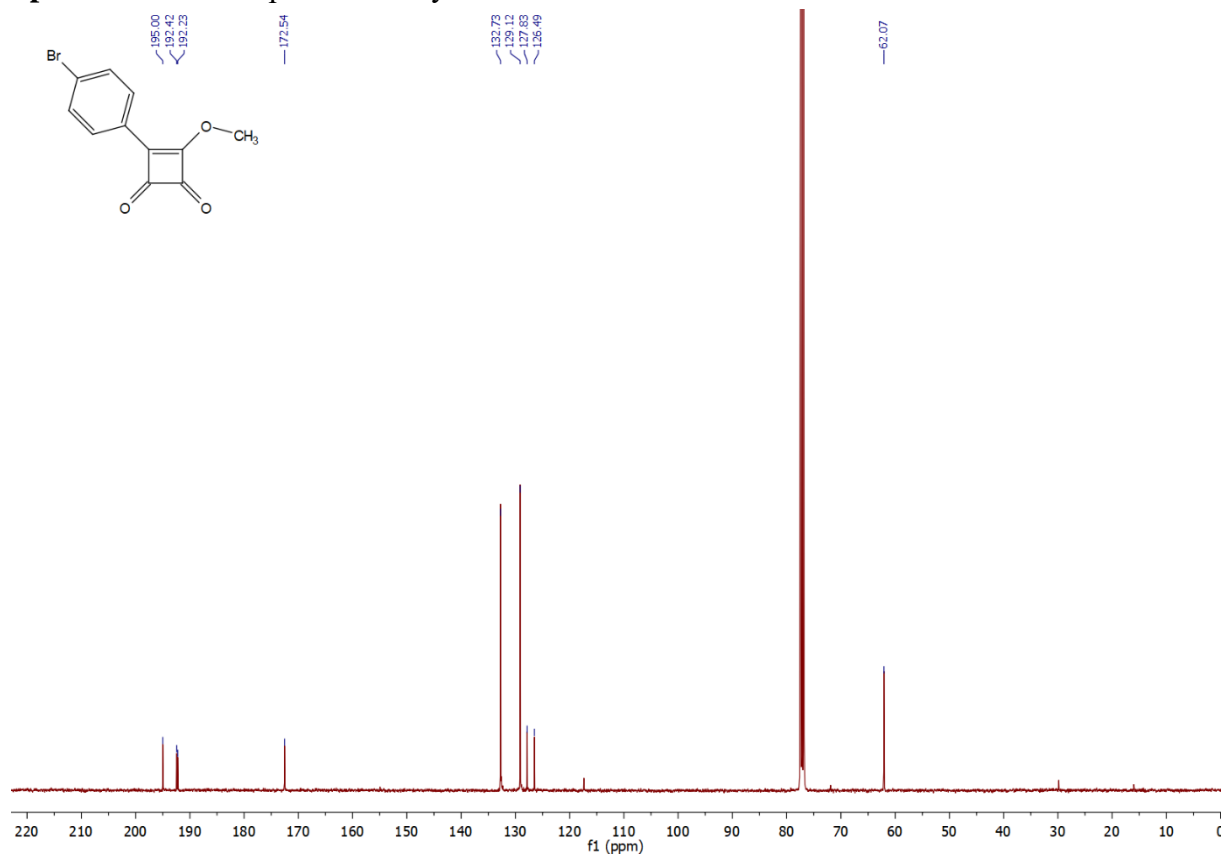
Spektrum 31: ^{13}C spektrum látky 22b



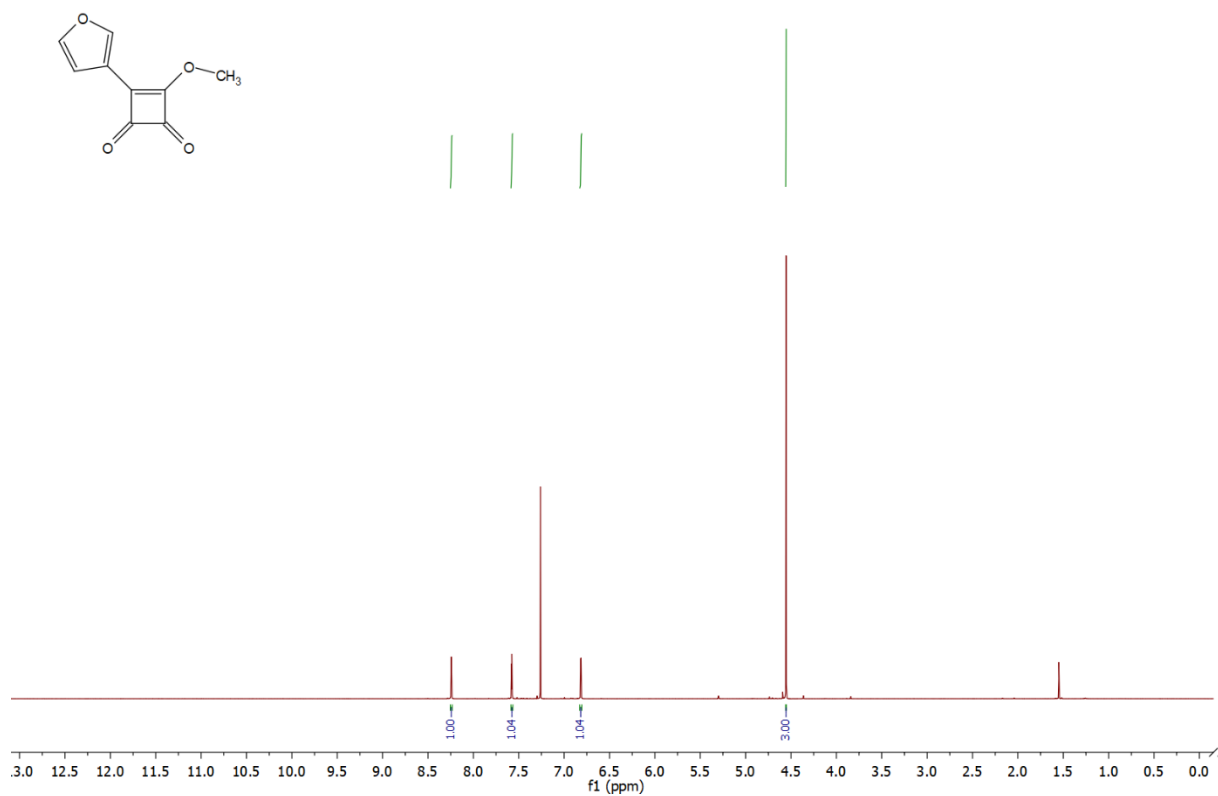
Spektrum 32: ^1H spektrum látky 22c



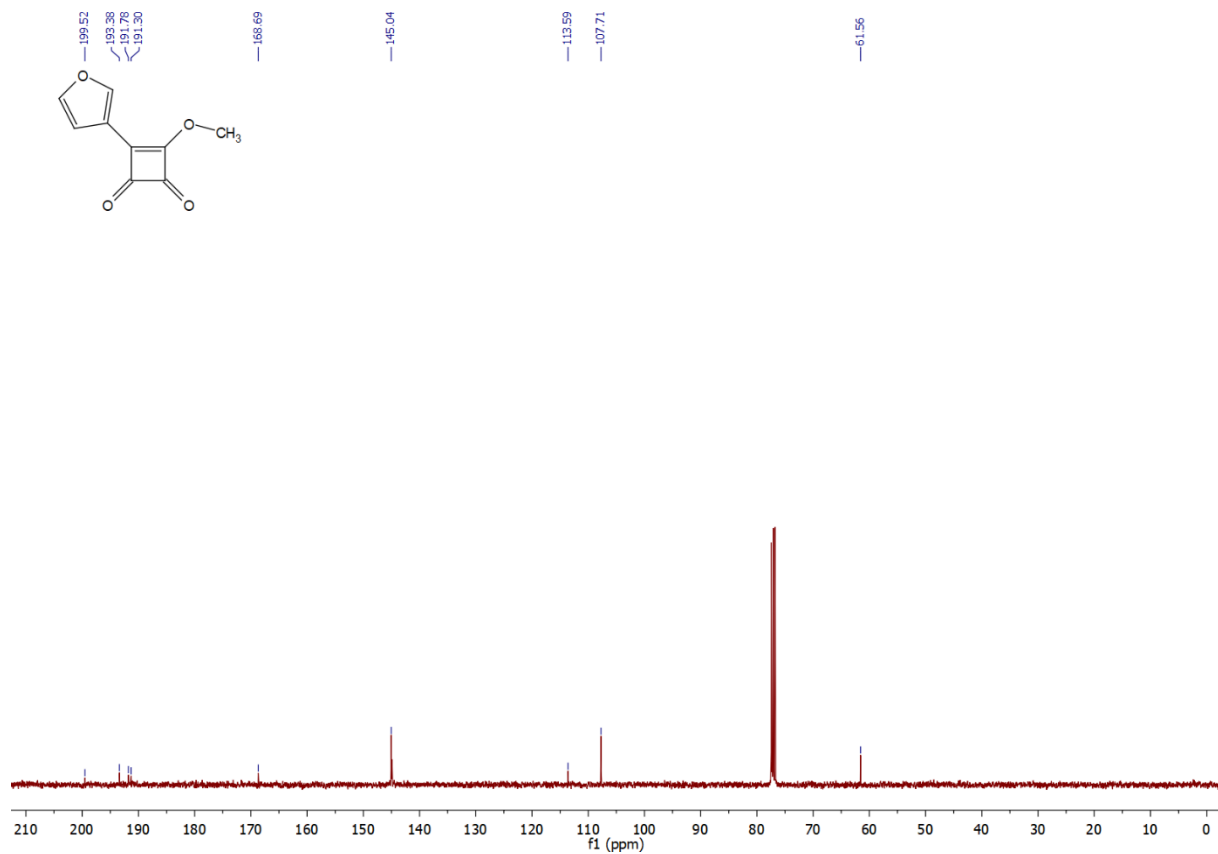
Spektrum 33: ^{13}C spektrum látky 22c



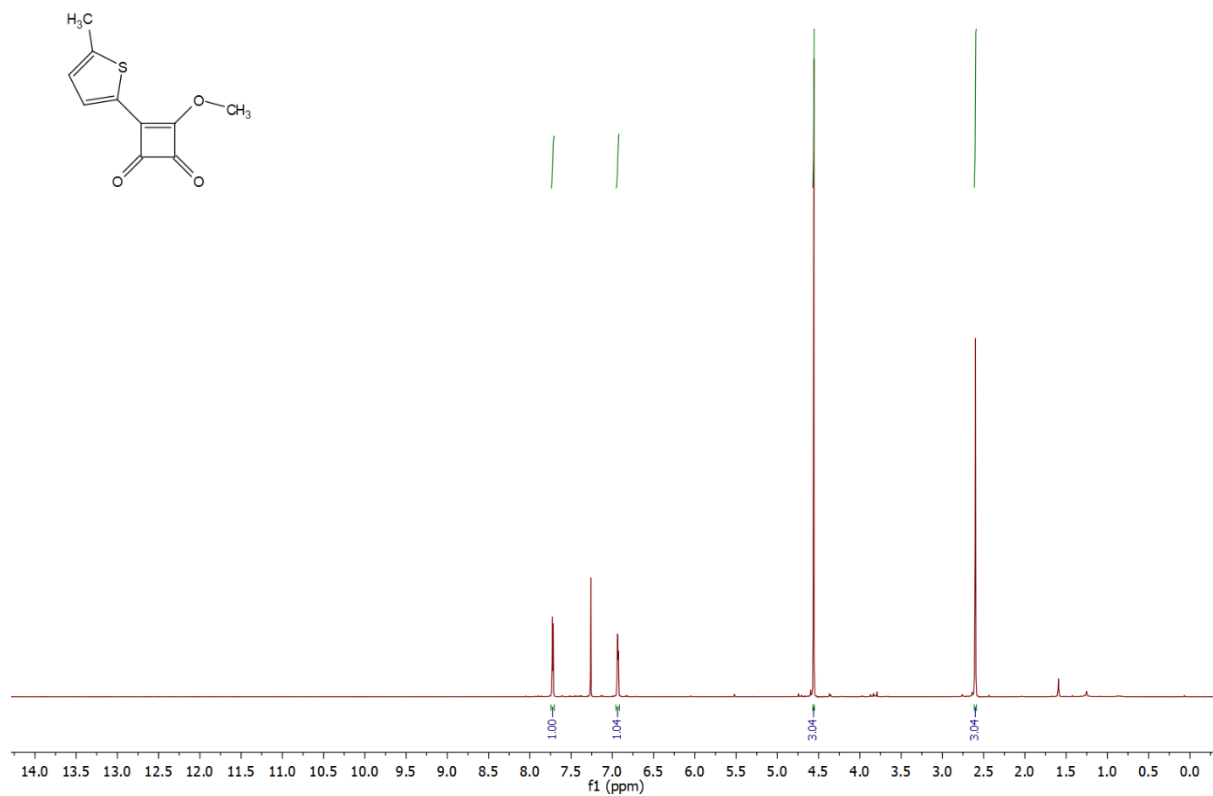
Spektrum 34: ^1H spektrum látky 22d



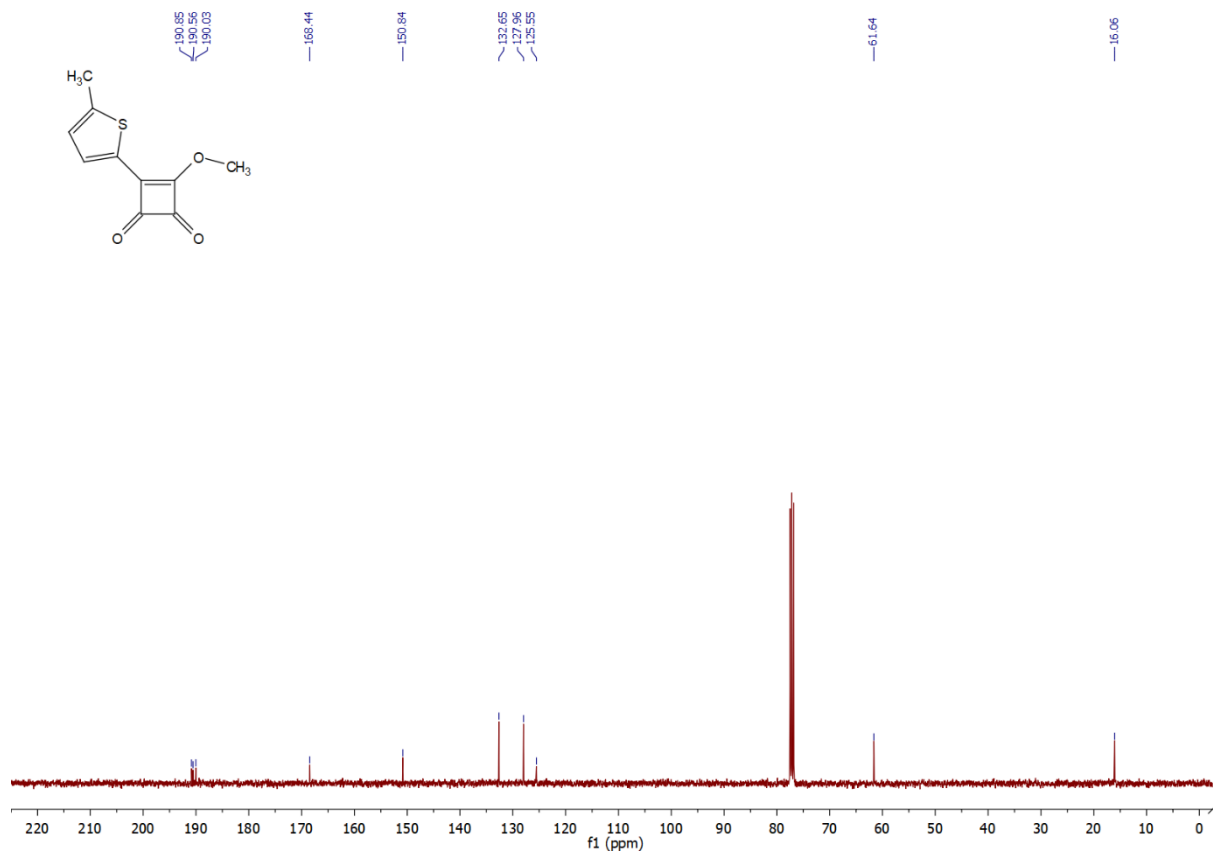
Spektrum 35: ^{13}C spektrum látky 22d



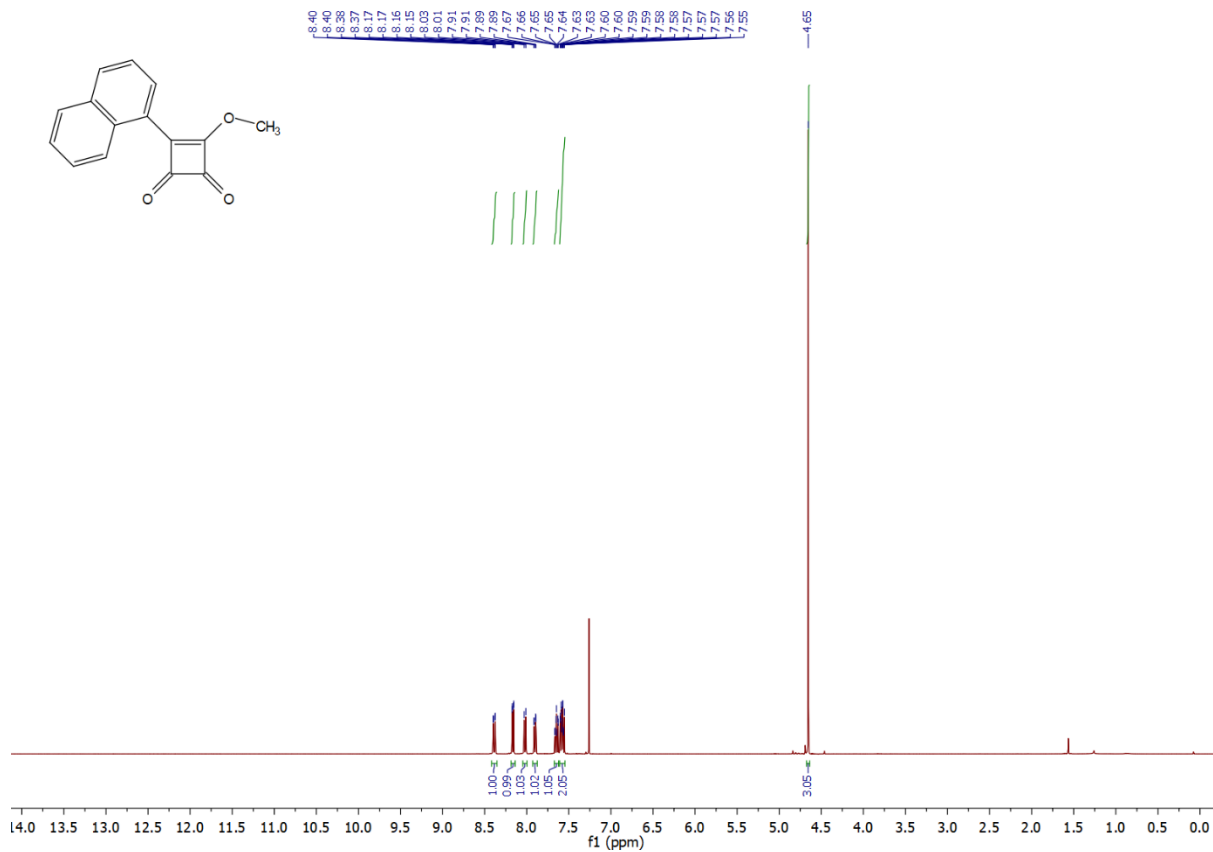
Spektrum 36: ^1H spektrum látky 22e



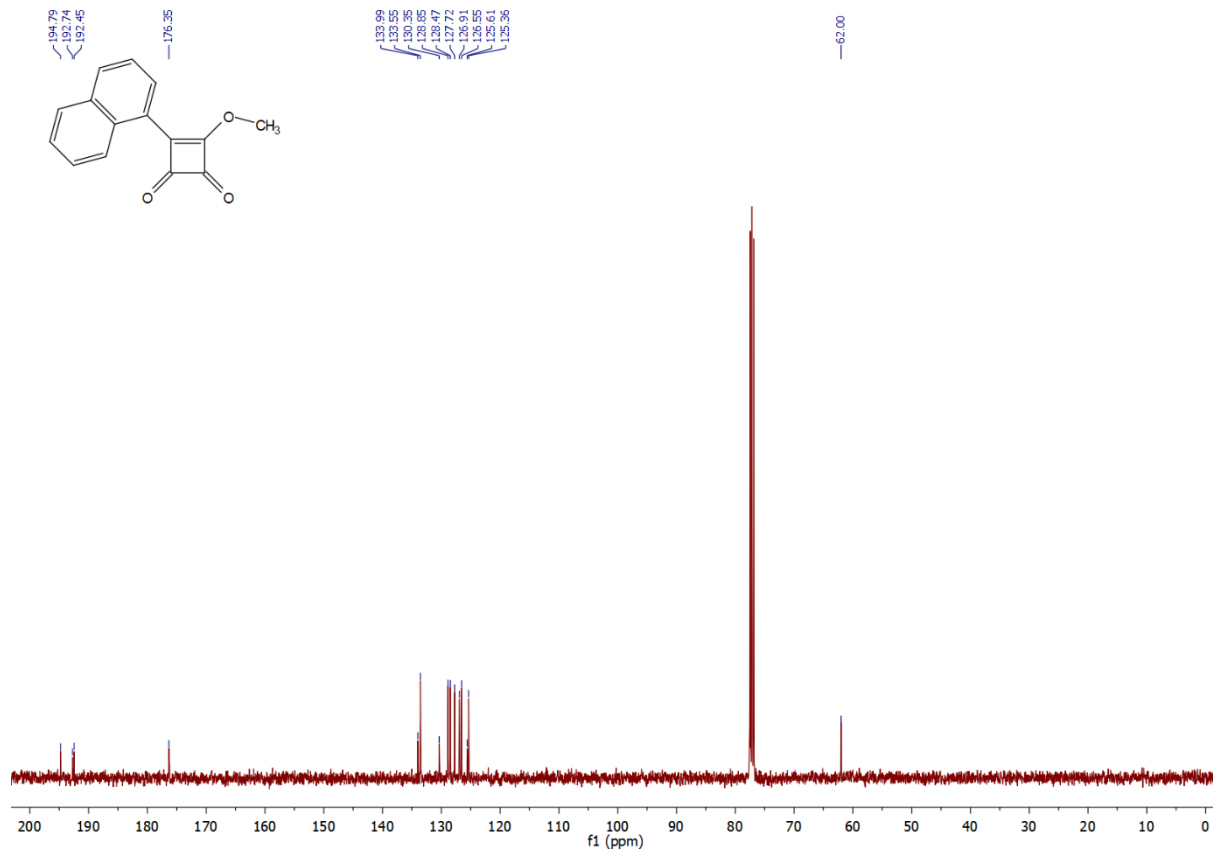
Spektrum 37: ^{13}C spektrum látky 22e



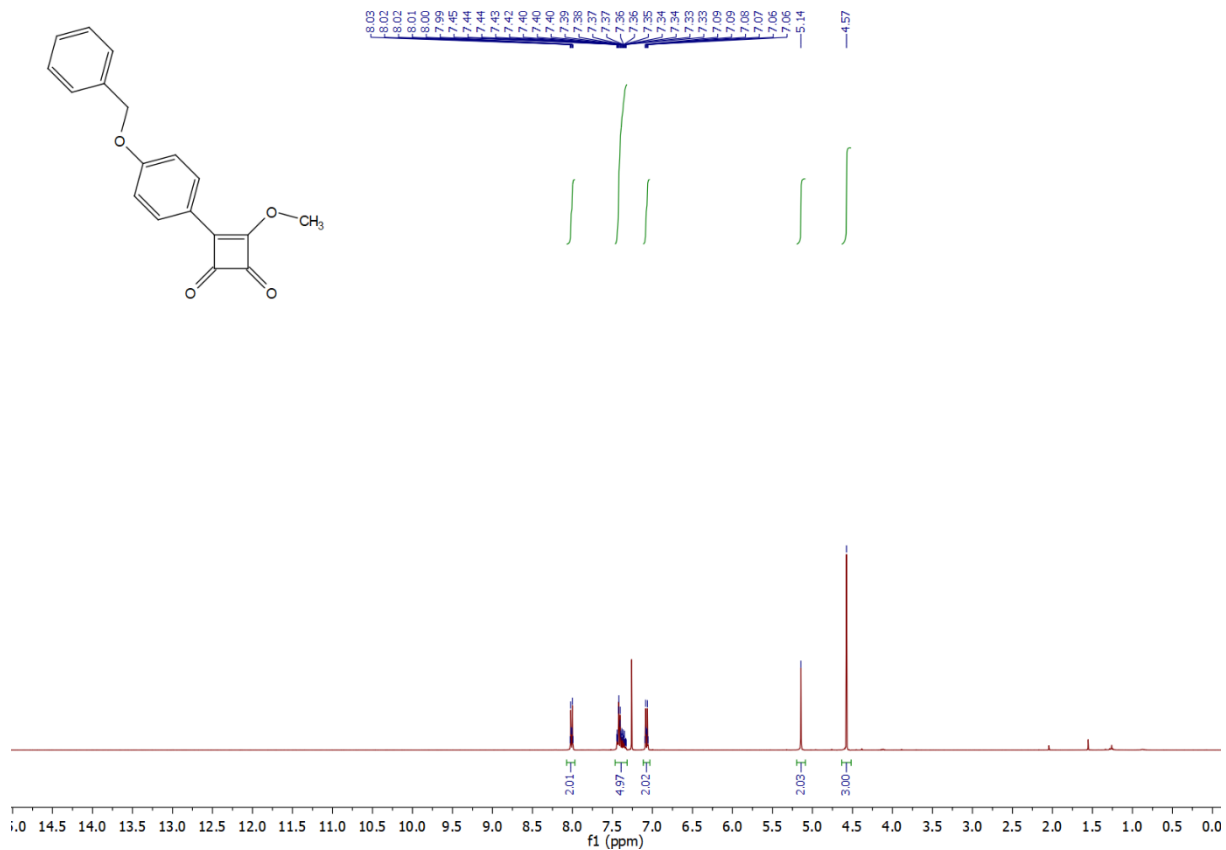
Spektrum 38: ^1H spektrum látky 22f



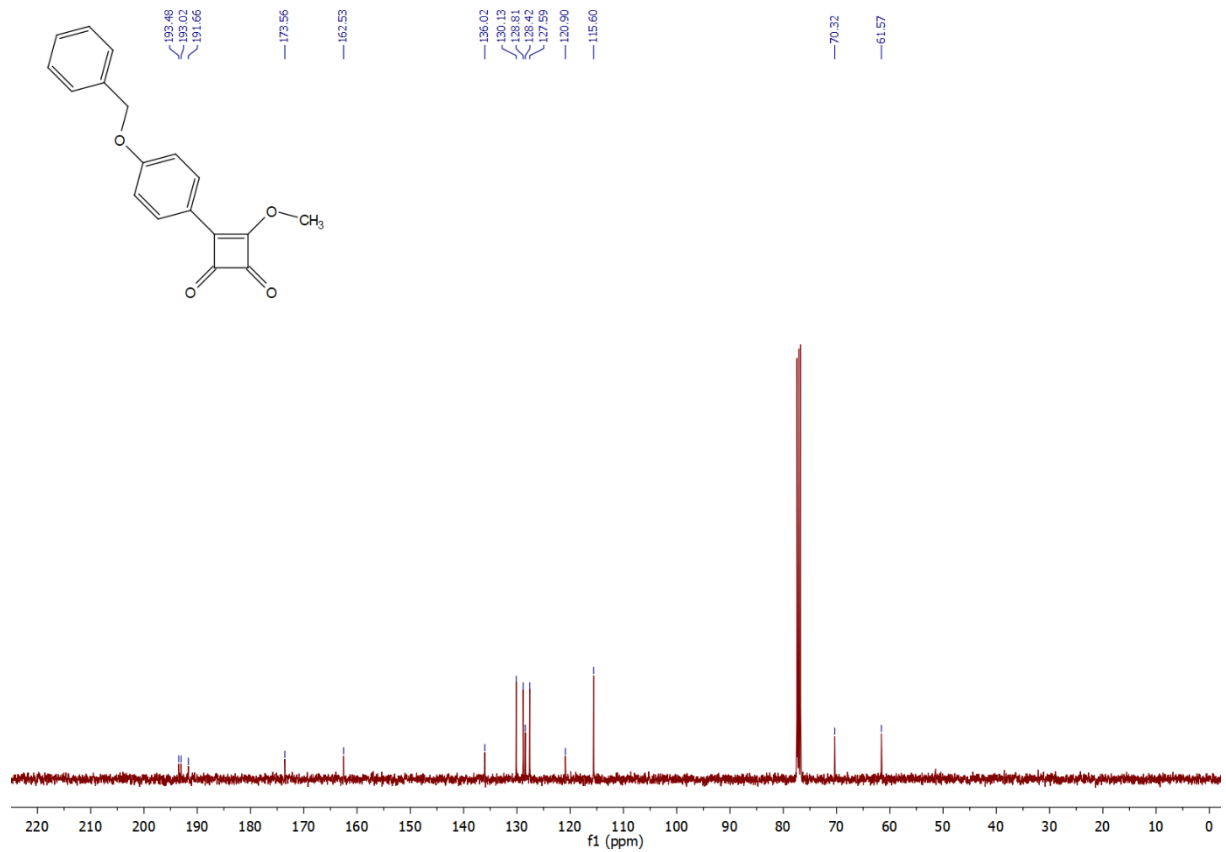
Spektrum 39: ^{13}C spektrum látky 22f



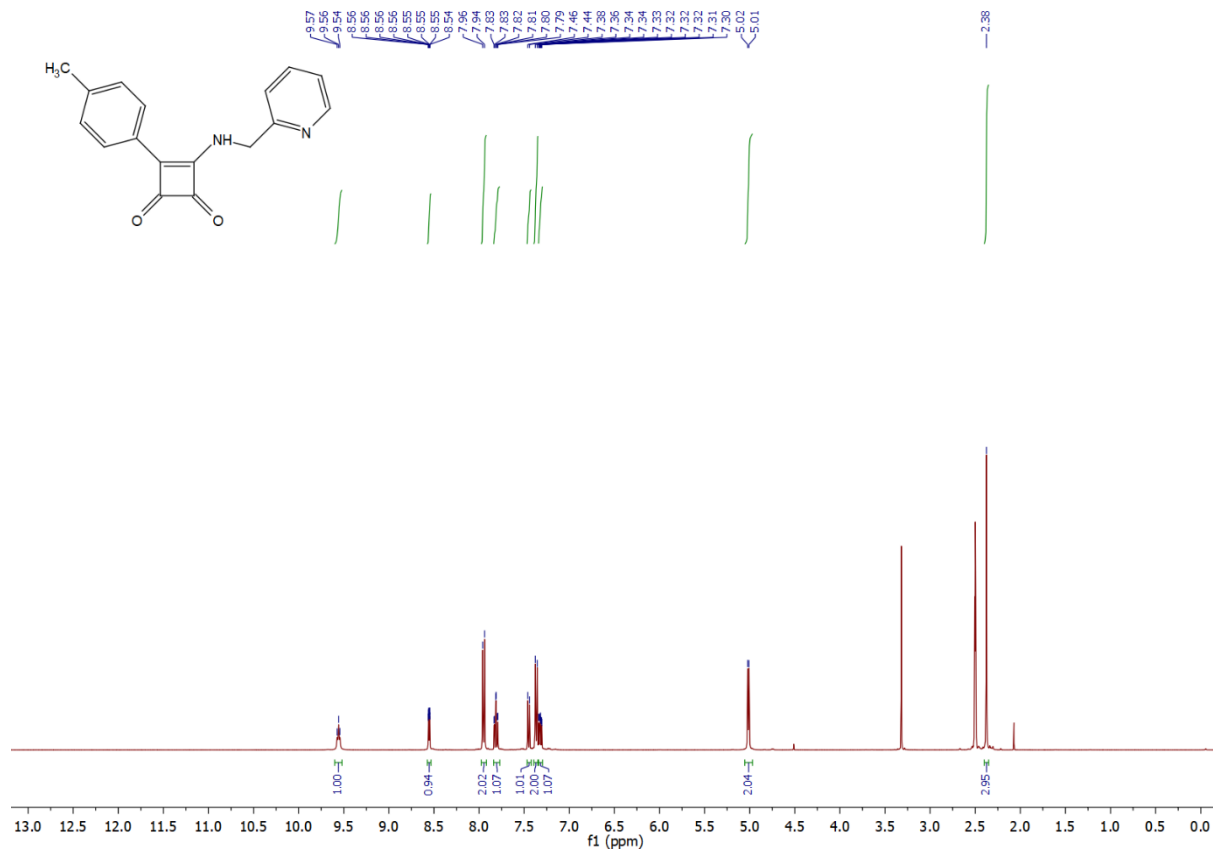
Spektrum 40: ^1H spektrum látky **22g**



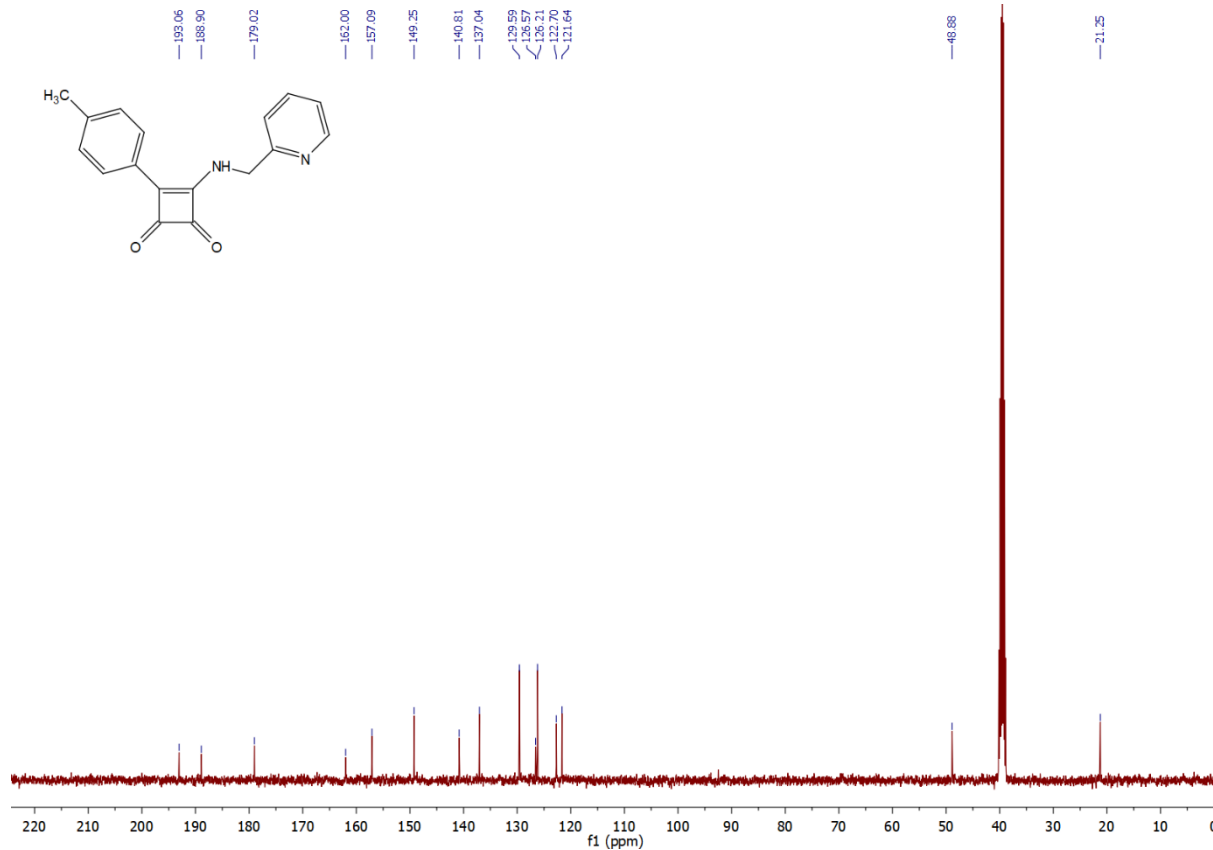
Spektrum 41: ^{13}C spektrum látky **22g**



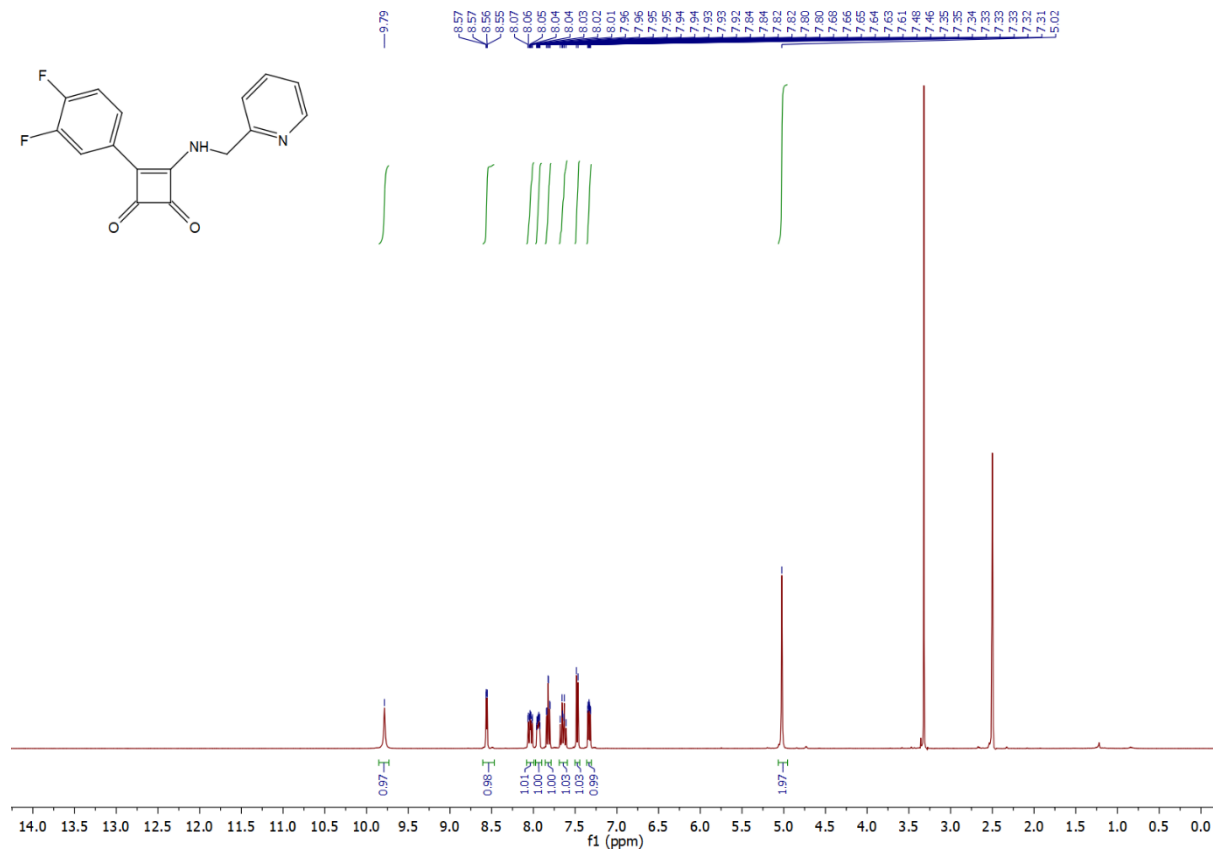
Spektrum 42: ¹H spektrum látky 2g



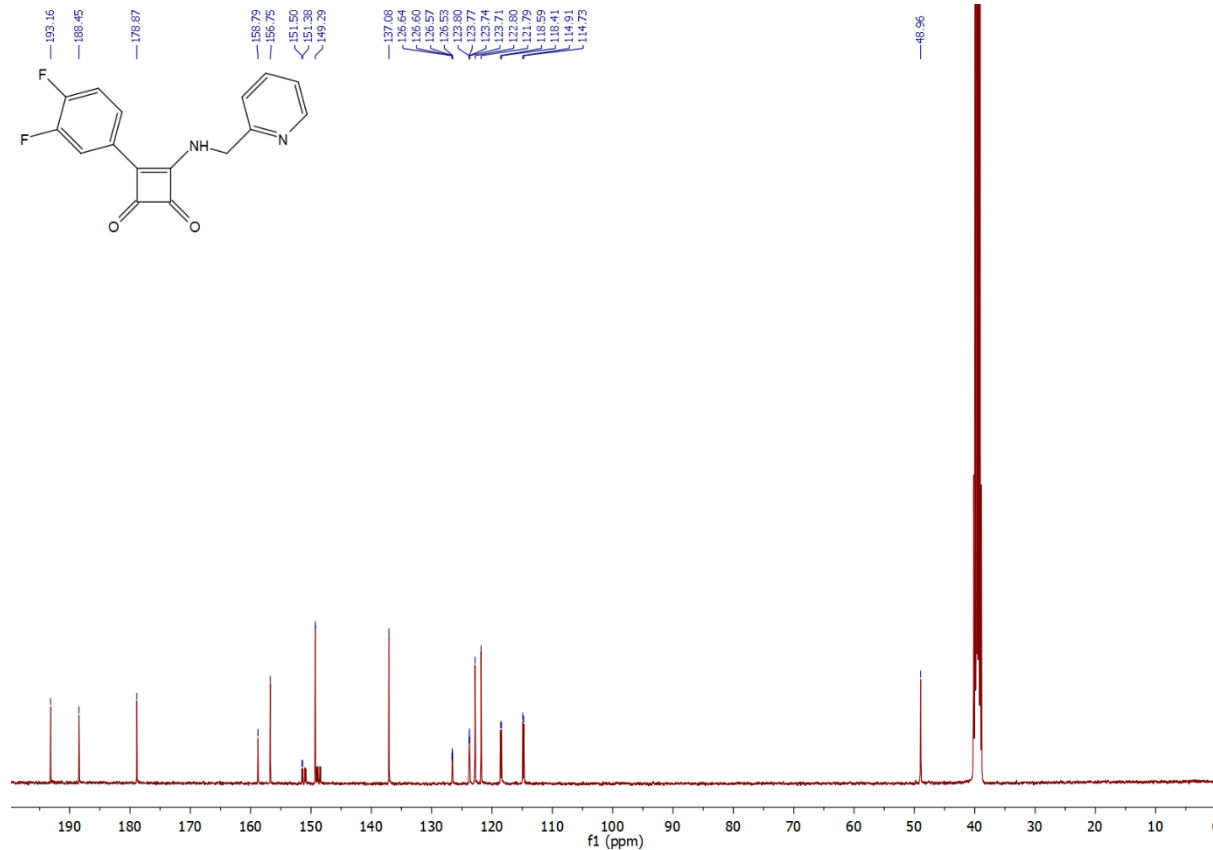
Spektrum 43: ¹³C spektrum látky 2g



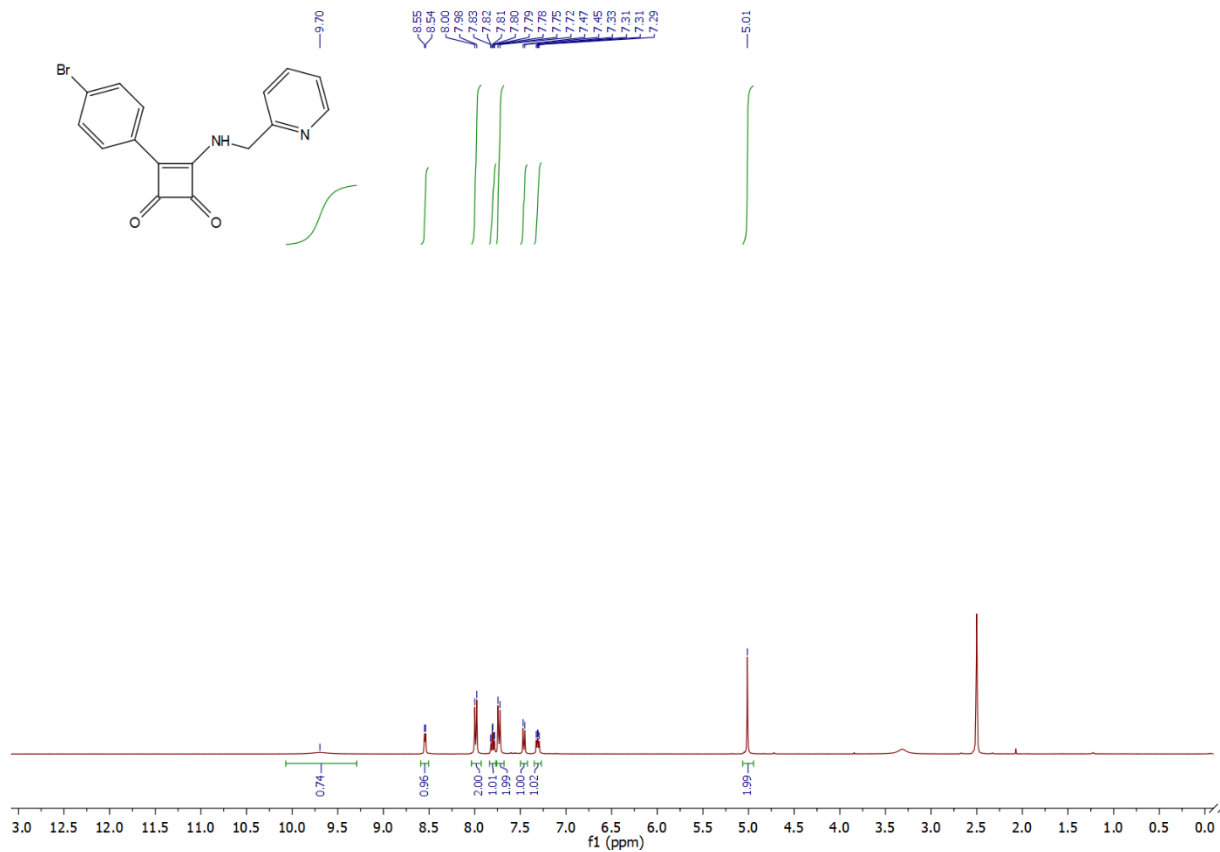
Spektrum 44: ¹H spektrum látky 2h



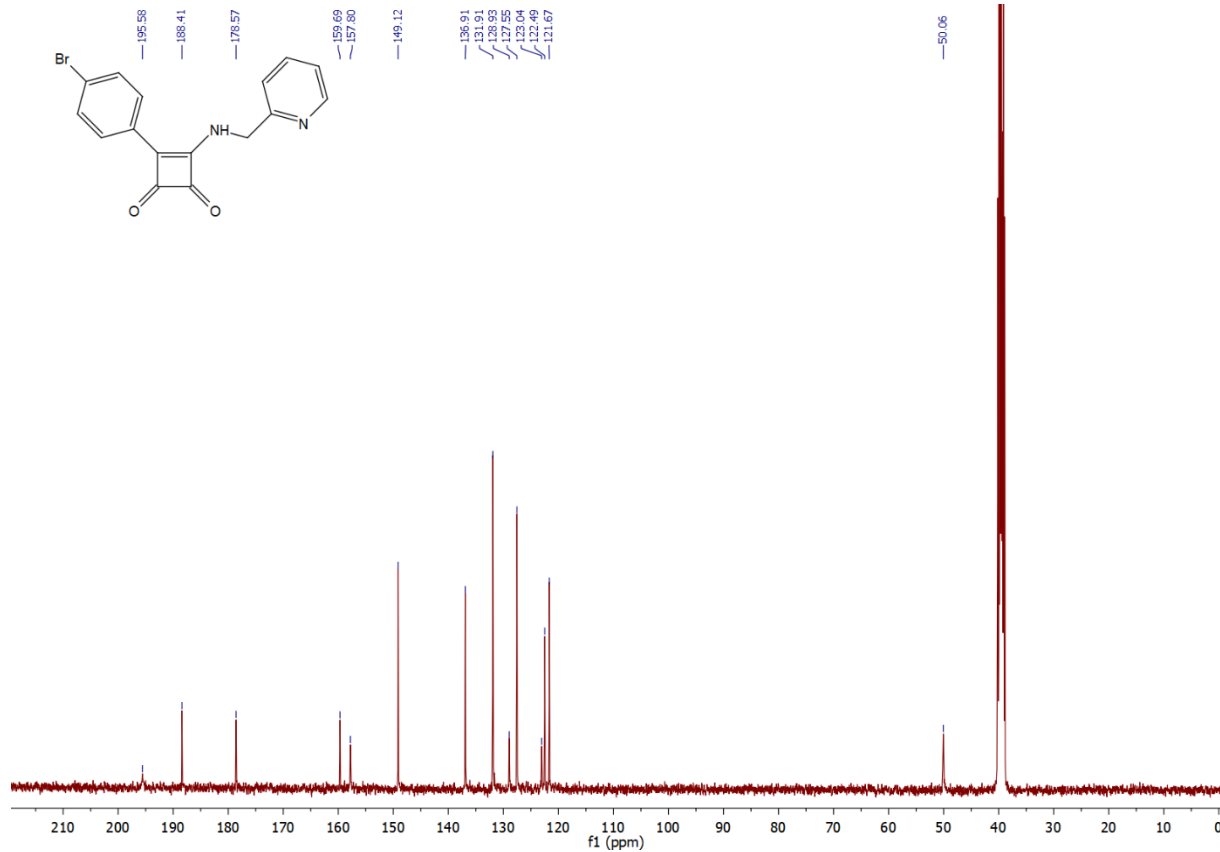
Spektrum 45: ¹³C spektrum látky 2h



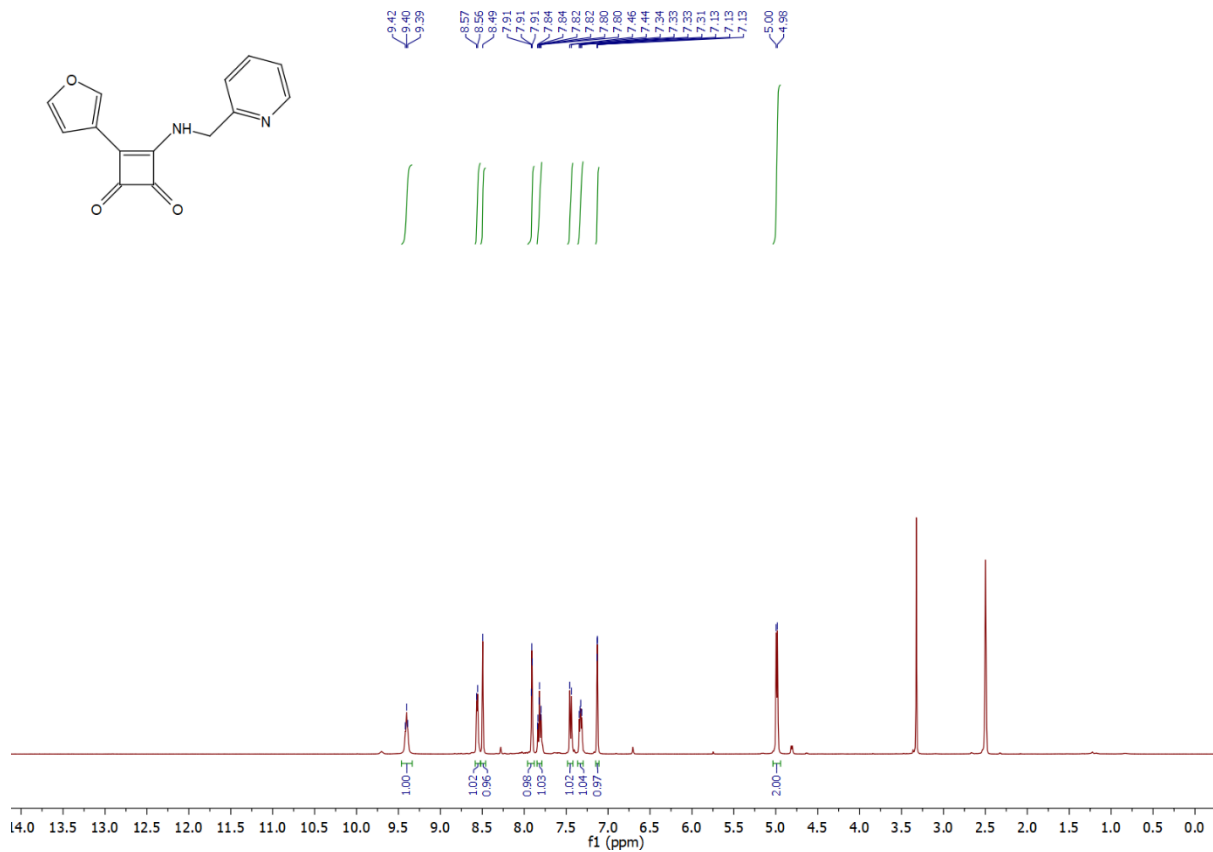
Spektrum 46: ^1H spektrum látky **2i**



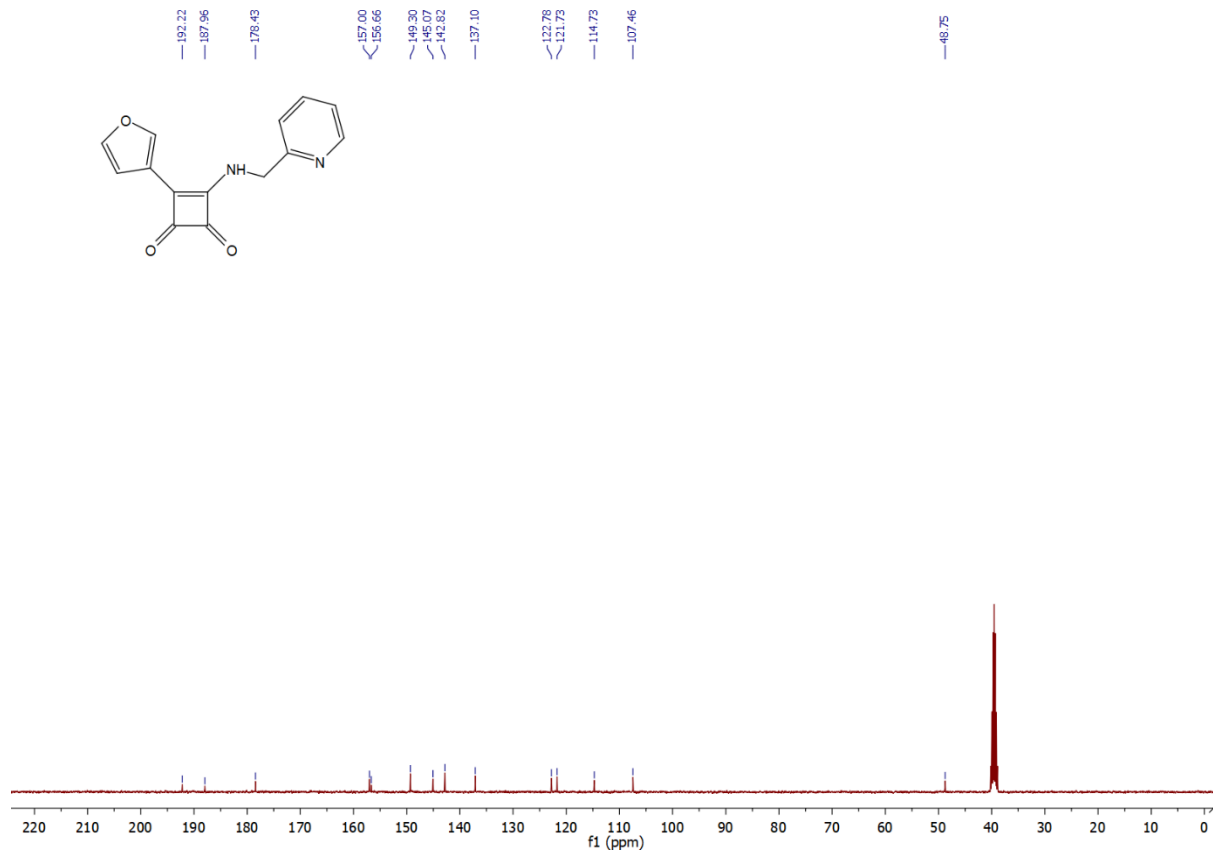
Spektrum 47: ^{13}C spektrum látky **2i**



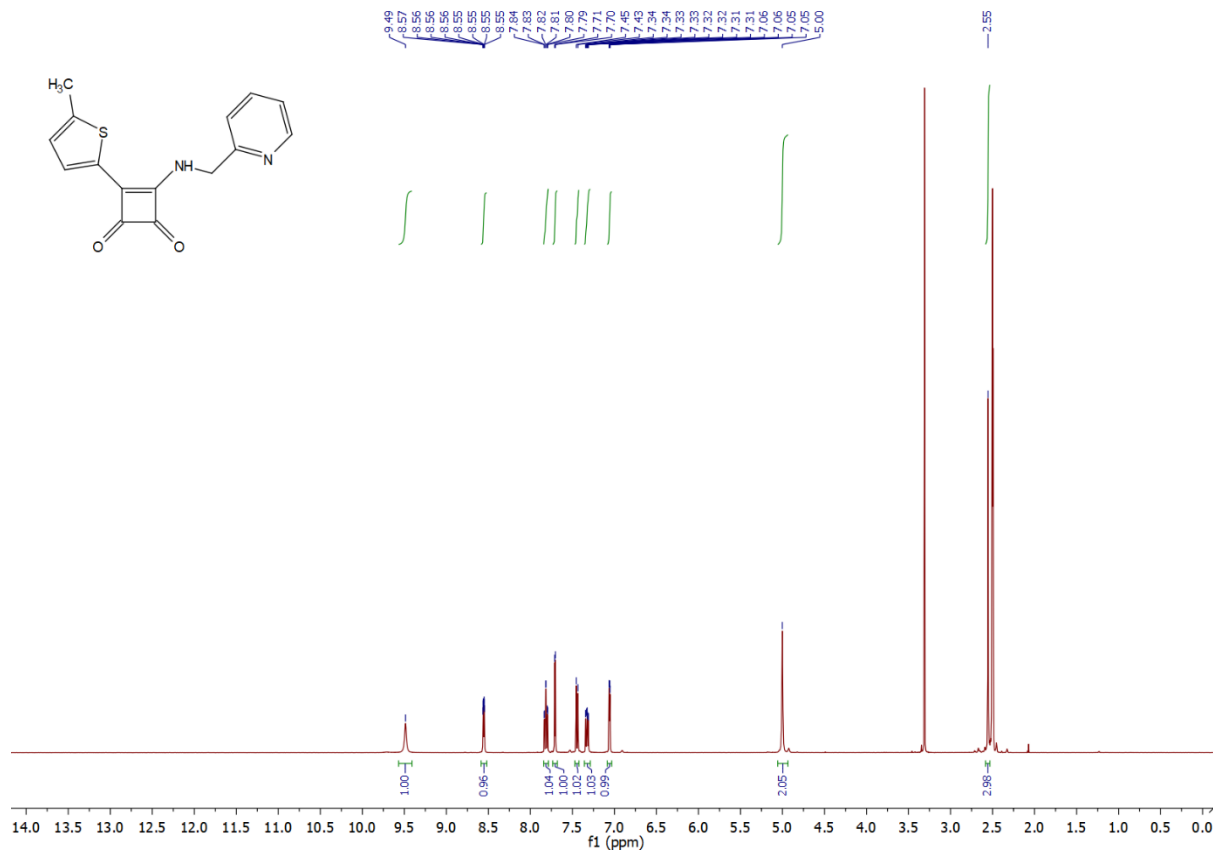
Spektrum 48: ^1H spektrum látky **2j**



Spektrum 49: ^{13}C spektrum látky **2j**



Spektrum 50: ^1H spektrum látky **2k**



Spektrum 51: ^{13}C spektrum látky **2k**

