

Katedra organické chemie Přírodovědecké fakulty Univerzity Palackého
v Olomouci



Diplomová práce

**Syntéza trisubstituovaných derivátů 4*H*-benzotriazolodiazepinonu
a jejich prekurzorů na pevné fázi s využitím α -aminokyselin.**

Autor:	Bc. Richard Hekele
Studijní program:	Chemie
Studijní obor:	Bioorganická chemie a chemická biologie
Vedoucí práce:	Mgr. Veronika Fülöpová, Ph.D.
Konzultant:	doc. RNDr. Miroslav Sural, Ph.D.

Olomouc 2016

Já, Richard Hekele, prohlašuji, že jsem tuto diplomovou práci vypracoval samostatně pod odborným dohledem Mgr. Veroniky Fülöpové, Ph.D. Veškerou použitou literaturu jsem uvedl na konci práce.

Souhlasím s tím, aby má práce byla zpřístupněna v knihovně Katedry organické chemie, Přírodovědecké fakulty, Univerzity Palackého v Olomouci.

V Olomouci dne

.....

Richard Hekele

Rád bych poděkoval vedoucí své diplomové práce, Mgr. Veronice Fülöpové, Ph.D. za skvělé vedení v celém průběhu vypracování diplomové práce, plné objasnění dané problematiky, pomoc při vyhodnocování NMR spekter a trpělivost, kterou se mnou měla. Dále bych chtěl poděkovat doc. RNDr. Miroslavu Suralovi, Ph.D. za konzultace ohledně optimalizací reakcí, Mgr. Igoru Popovi, CSc. za provedení NMR experimentů a interpretaci 2D spekter, dalším členům týmu ÚMTM, kteří zajišťují bezproblémový chod laboratoře. Tato závěrečná práce vznikla za podpory projektu studentské grantové soutěže na UP s reg. číslem IGA-PrF-2016-020.

Bibliografické údaje

Jméno a příjmení autora: Bc. Richard Hekele

Název práce: Syntéza trisubstituovaných derivátů 4*H*-benzotriazolodiazepinonu a jejich prekurzorů na pevné fázi s využitím α -aminokyselin

Typ práce: Diplomová

Pracoviště: Ústav molekulární a translační medicíny Lékařské fakulty Univerzity Palackého v Olomouci

Vedoucí práce: Mgr. Veronika Fülöpová, Ph.D.

Konzultant: doc. RNDr. Miroslav Sural, Ph.D

Abstrakt: Předložená diplomová práce je zaměřena na aplikaci známého postupu pro syntézu derivátů 4*H*-benzotriazolodiazepinonu a jejich prekurzorů na pevné fázi s využitím nových výchozích látek, α -aminokyselin ukotvených na čtyřech typech kyselých labilních linkerů. V teoretické části jsou popsány nejběžnější způsoby přípravy derivátů benzodiazepinonu s přikondenzovaným 1,3,4 a 1,2,3-triazolovým cyklem. Diskusní část je věnována optimalizacím reakcí vedoucích k sulfonamidovým intermediátům a následnému testování reakční sekvence, která měla poskytnout finální 4*H*-benzo[*f*][1,2,3]triazolo[1,5-*a*][1,4]diazepin-6(5*H*)-ony. Experimentální sekce je zaměřena na popis konkrétních postupů, které byly v práci použity, a je následována přehledem analytických dat připravených intermediátů, některých finálních látek a vedlejších produktů.

Klíčová slova: α -aminokyselina, 2-azidobenzoová kyselina, cykloadice, Fukuyama alkylace, propargyl alkohol, propargyl bromid, sulfonyl chlorid, syntéza na pevné fázi

Jazyk: Čeština

Počet stran: 78

Rok obhajoby práce: 2016

Bibliographic data

Author's first name and surname: Bc. Richard Hekele

Title: Solid-phase synthesis of trisubstituted 4*H*-benzotriazolodiazepinone derivatives and their precursors using α -amino acids

Type of thesis: Diploma

Department: Institute of molecular and translational medicine, Olomouc

Supervisor: Mgr. Veronika Fülöpová, Ph.D.

Consultant: doc. RNDr. Miroslav Soral, Ph.D.

Abstrakt: This diploma thesis is focused on the application of known procedure for solid-phase synthesis of 4*H*-benzotriazolodiazepinone derivatives and their precursors using new starting materials, α -amino acids anchored on four types of acid-labile linkers. Theoretical part describes the most used methods for preparation of benzodiazepinone derivatives with fused 1,3,4 and 1,2,3-triazole cycle. Discussion part is devoted to optimization of reactions giving the sulfonamide intermediates and testing of reaction sequence that should lead to the final 4*H*-benzo[*f*][1,2,3]triazolo[1,5-*a*][1,4]diazepin-6(5*H*)-ones. Experimental section is based on the description of specific used procedures followed by analytical data of prepared intermediates, some final compounds and side products.

Keywords: α -amino acid, 2-azidobenzoic acid, cycloaddition, Fukuyama alkylation, propargyl alcohol, propargyl bromide, sulfonyl chloride, solid-phase synthesis

Language: Czech

Number of pages: 78

The year of defense: 2016

Obsah

1. Úvod	8
2. Cíle práce	9
3. Teoretická část.....	10
3.1 Příprava derivátů benzotriazolodiazepinonu	10
3.1.1 Deriváty odvozené od 4 <i>H</i> -benzo[<i>b</i>][1,3,4]triazolo[1,5- <i>d</i>][1,4]diazepin-5(6 <i>H</i>)-onů	10
3.1.2 Deriváty odvozené od 4 <i>H</i> -benzo[<i>b</i>][1,2,3]triazolo[1,5- <i>d</i>][1,4]diazepin-5(6 <i>H</i>)-onů	14
3.1.3 Deriváty odvozené od 4 <i>H</i> -benzo[<i>f</i>][1,3,4]triazolo[1,5- <i>a</i>][1,4]diazepin-6(5 <i>H</i>)-onů	15
3.1.4 Deriváty odvozené od 4 <i>H</i> -benzo[<i>f</i>][1,2,3]triazolo[1,5- <i>a</i>][1,4]diazepin-6(5 <i>H</i>)-onů	18
4. Výsledky a diskuze	23
4.1 Reakce na Wang-piperazinovém/Wangově linkeru.....	25
4.1.1 Příprava Wang-piperazinového linkeru	25
4.1.2 Imobilizace Fmoc-alaninu na Wang-piperazinový linker.....	25
4.1.3 Odchránění Fmoc protektivní skupiny	27
4.1.4 Chránění/aktivace aminoskupiny 4-Nos-Cl	27
4.1.5 Alkylace derivátů sulfonamidu 3b(1,f) propargyl bromidem	28
4.1.6 Denosylace a následná acylace 2-azidobenzoovými kyselinami	32
4.2 Reakce na Wangově/Wang-piperazinovém linkeru s využitím 2-nitrobenzensulfonyl chloridu	38
4.3 Reakce na Rink-amidovém linkeru.....	41
4.3.1 Imobilizace Fmoc-alaninu na Rinkovu pryskyřici	41
4.3.2 Deprotekce Fmoc skupiny a reakce s 4-Nos-Cl	42
4.3.3 Alkylace sulfonamidu 3c(1,f) propargyl bromidem	43
4.4 Reakce na aminomethylové pryskyřici s BAL	44
4.4.1 Příprava pryskyřice s BAL.....	44
4.4.2 Imobilizace Fmoc-alaninu na BAL a kvantifikace pryskyřice.....	45
4.4.3 Odchránění Fmoc protektivní skupiny a následná reakce s 4-Nos-Cl.....	46
4.4.4 Alkylace sulfonamidu 3d(1,f) propargyl bromidem.....	46
4.4.5 Denosylace 4-Nos skupiny.....	47
5. Experimentální část	50
5.2 Proces standardního štěpení vzorku z pryskyřice	51
5.3 Příprava Wang-piperazinového linkeru (b)	51
5.4 Příprava Rinkovi pryskyřice (c).....	51

5.5 Příprava „Backbone“ amidového linkeru (d)	51
5.6 Imobilizace aminokyselin na pryskyřici: 1a-d(1-10)	52
5.7 Kvantitativní zhodnocení průběhu imobilizace aminokyselin	53
5.8 Deprotekční reakce a následná nosylace: 3a-d(1-10,e-f)	54
5.9 Alkylace sulfonamidů propargyl bromidem 4a-d(1-10,e-f,1)	54
5.10 Alkylace sulfonamidu deriváty propargyl bromidu 4b(1,f,2-4)	55
5.11 Alkylace sulfonamidu propargyl alkoholem – Mitsunobu reakce 4b(1,f,1).....	55
5.12 Denosylace sulfonamidů 5a-d(1-10,H,1-2)	55
5.13 Acylace 2-azidobenzoovými kyselinami 8a-d(1-10,1-2,1-5).....	56
5.14 Testování kvality skladovaných 2-azidobenzoových kyselin 11a(11,1,1).....	56
5.15 Sulfonylace 2-azidobenzensulfonyl chloridem 8b(1,1,6).....	56
6. Analytická data.....	57
7. Závěr	69
8. Literatura a zdroje.....	71
9. Přílohy.....	73

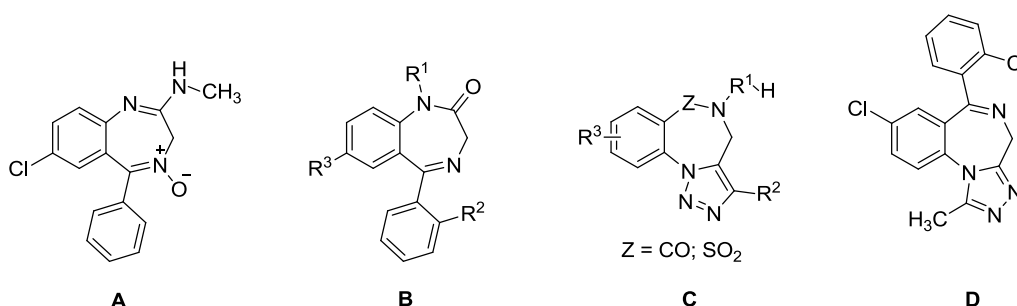
1. Úvod

Látky s 1,4-benzodiazepinovým skeletem patří mezi biologicky významné dusíkaté heterocykly, které jsou intenzivně zkoumány zejména pro své hypnotické a sedativní účinky. Počátek jejich výzkumu se datuje od poloviny 50. let, kdy bylo připraveno první syntetické psychofarmakum Chlordiazepoxid (**A**) (Obr. 1), které bylo zároveň komerčně velmi úspěšné.¹

Další pátrání v oblasti vztahů mezi strukturou a biologickou aktivitou příbuzných derivátů (**B**) prokázalo, že specifická substituce R^x určuje hlavní účinek 1,4-benzodiazepinonů (**B**). Například, je-li v poloze R^3 vázána nitro skupina, působí tyto látky především jako hypnotika,² naopak je-li v téže poloze vázán halogen, pak tyto látky vykazují převážně anxiolytický účinek.³ Současná problematika v oblasti benzodiazepinonů je zaměřena na řešení skutečnosti, že tyto látky působí v rámci centrální nervové soustavy (CNS) na více místech a mají tedy smíšenou aktivitu. Ta je sice v dnešní době omezována výše zmíněnými specifickými substitucemi, nicméně u některých derivátů stále přetrvávají výrazné vedlejší účinky.

Naší snahou bylo připravit takové deriváty 1,4-benzodiazepinonu, které byly doposud jen velmi málo zkoumány a které by případně působily specificky pouze jedním účinkem v závislosti na substituci. Za tímto účelem byla na Katedře organické chemie vyvinuta metodika syntézy na pevné fázi vedoucí k 1,4-benzotriazolodiazepinonům (**C**), strukturně podobným Triazolamu (**D**)⁴ s využitím β -alaninu jako výchozí látky.⁵ Předložená diplomová práce je zaměřena na aplikaci dříve vyvinuté procedury tentokrát na α -aminokyseliny a zároveň je věnována pozornost optimalizaci/modifikaci jednotlivých reakčních kroků.

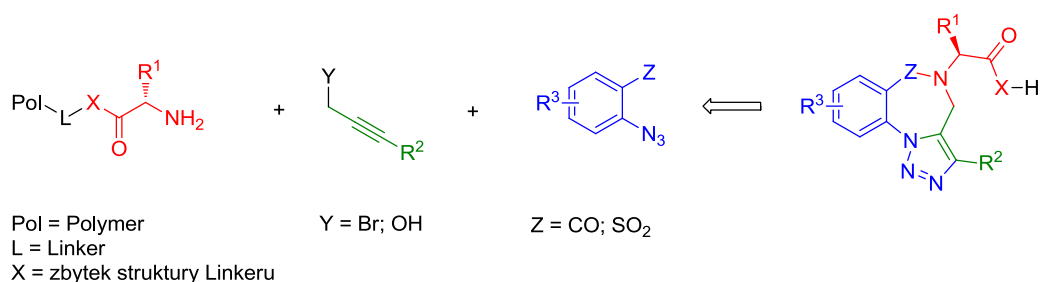
Obrázek 1. Diskutované deriváty 1,4-benzodiazepinu a 1,4-benzodiazepinonu.



2. Cíle práce

Záměrem diplomové práce bylo využití známého postupu⁵ na pevné fázi pro syntézu nových trisubstituovaných derivátů 4*H*-benzotriazolodiazepinonu a jejich prekurzorů za použití α -aminokyselin immobilizovaných na polymerním nosiči,³⁰ propargyl bromidu/propargyl alkoholu a 2-azidobenzoových kyselin jakožto výchozích látek (Obr. 2).

Obrázek 2. Retrospektivní syntéza nových derivátů 4*H*-benzotriazolodiazepinonu.



Naším prvním cílem bylo ověřit, zdali jsou jednotlivé reakční kroky zvolené syntézy schůdné pro α -Ala ukotvený na různých typech linkerů (L). V případě potíží měly být problémové úseky reakční sekvence optimalizovány/modifikovány a nově nalezené podmínky odzkoušeny na dalších α -aminokyselinách. Za účelem zvýšit skeletální diverzitu cílových látek měly být v syntéze dále vyzkoušeny různě substituované deriváty propargyl bromidu/alkoholu a 2-azidobenzoové kyseliny, přičemž měla být sledována jejich reaktivita v závislosti na struktuře dílčích intermediátů.

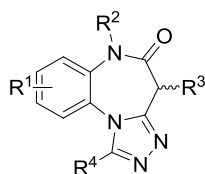
Jelikož měly být finální sloučeniny připraveny pomocí tzv. click reakce, kdy je hmota lineárního prekurzoru a cyklického produktu stejná (strukturu tedy nelze potvrdit pomocí HPLC-MS), měla být druhá část práce zaměřena na NMR studii N-nosylovaných-N-alkylovaných intermediátů, cílových sloučenin a případných vedlejších produktů.

3. Teoretická část

3.1 Příprava derivátů benzotriazolodiazepinonu

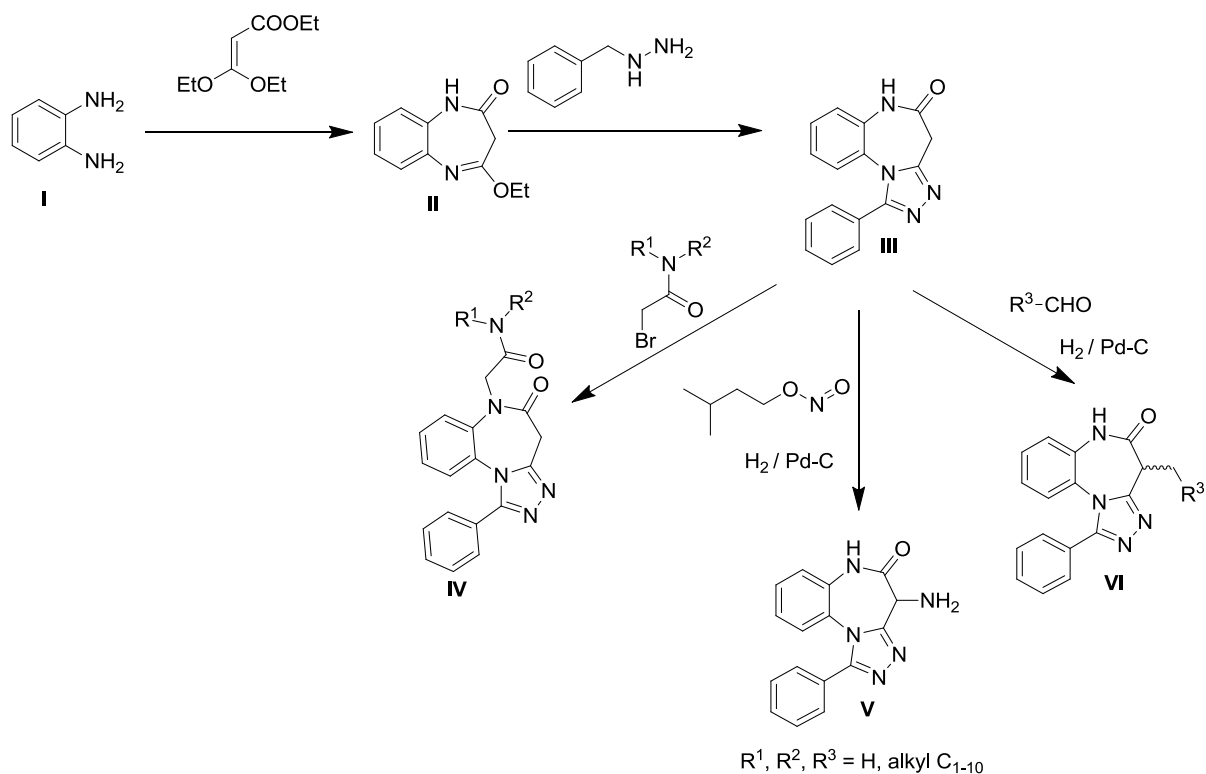
Tato část diplomové práce je věnována syntetickým postupům vedoucím k derivátům benzodiazepinonu s přikondenzovaným 1,3,4 a 1,2,3-triazolovým cyklem v polohách [b] a [f]. Jednotlivé skupiny sloučenin jsou v práci uváděny vzestupně od látek s nejméně podobnou až po analogickou strukturu s látkami, jež byly cílem experimentální části práce.

3.1.1 Deriváty odvozené od 4*H*-benzo[*b*][1,3,4]triazolo[1,5-*d*][1,4]diazepin-5(6*H*)-onů



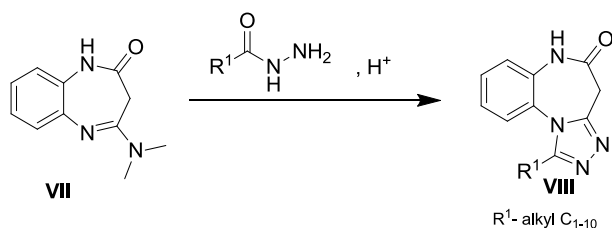
První z možných syntetických cest vedoucích k těmto derivátům je založena na reakci *o*-diaminobenzenu **I** s ethyl 3,3-ethoxyakrylátem za vzniku intermediátu **II** (Schéma 1).⁶ Ten byl následně podroben reakci s hydrazidem benzoové kyseliny poskytující sloučeninu **III**, kterou bylo možno dále modifikovat buďto interakcí s 2-bromoacetamidy (**IV**), nebo s izoamylnitritem za následné katalytické redukce vodíkem (**V**). Do skeletu finálních látek je také možné zavést alkylový řetězec pomocí Michaelovy adice s následnou redukcí vodíkem (**VI**).

Schéma 1: Syntéza derivátů **IV**, **V** a **VI** založená na reakci *o*-diaminobenzenu s ethyl 3,3-ethoxyakrylátem.



Následující postup je s předchozím velmi podobný. Autoři vycházeli z 4-(dimethylamino)-1*H*-benzo[*b*][1,4]diazepin-2(3*H*)-onu (**VII**), který byl reagován v kyselém prostředí s alkyldiazidy za vzniku derivátů 4*H*-benzo[*b*][1,3,4]triazolo[1,5-*d*][1,4]diazepin-5(6*H*)-onu (**VIII**)⁷ (Schéma 2). Tyto látky byly připraveny jako prekurzory tetracyklických sloučenin, které však nebyly předmětem rešerše.

Schéma 2: Syntéza derivátů **VIII** vycházející z 4-(dimethylamino)-1*H*-benzo[*b*][1,4]diazepin-2(3*H*)-onu.

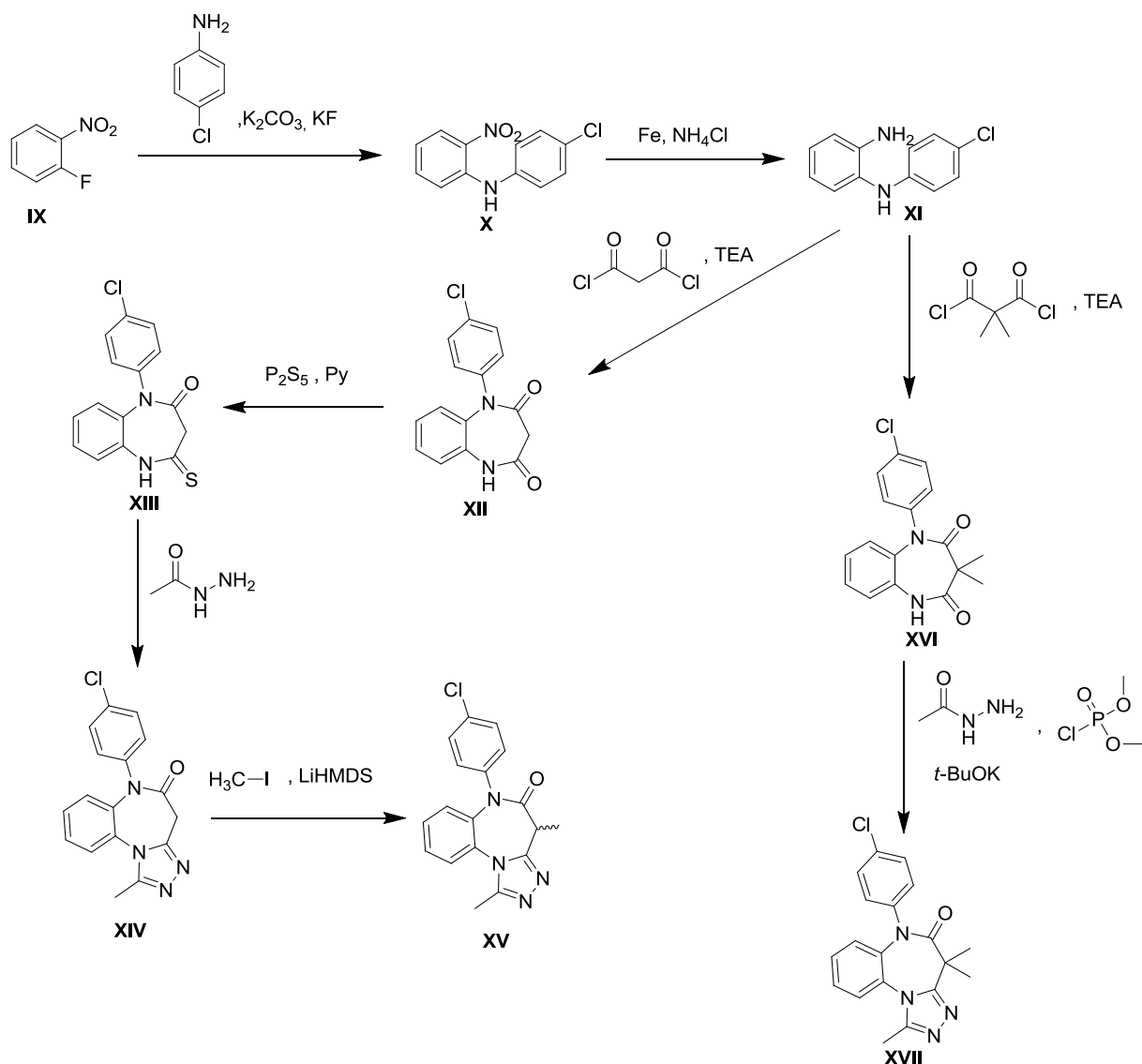


Další uvedené syntézy jsou založeny na reaktivitě derivátů nitrobenzenu. První dvě využívají 2-fluornitrobenzenu (**IX**), který podlehl reakci s *p*-chloranilinem za přítomnosti uhličitanu draselného a fluoridu draselného (Schéma 3).⁸ Výsledným meziproduktem byl *N*-(4-chlorfenyl)-2-nitrobenzenamin (**X**), který byl následně redukován směsí železa a chloridu amonného na *N*-(4-chlorfenyl)benzen-1,2-diamin (**XI**). Příslušný intermediát **XI** byl následně podroben dvěma reakčním cestám za vzniku odlišných produktů.

První modifikací byla reakce s malonyldichloridem za katalýzy triethylaminem (TEA) na odpovídající benzodiazepindion **XII**, ten byl působením sulfidu fosforečného v pyridinu (Py) převeden na thiolaktam **XIII**. V následujícím kroku byla provedena reakce s acetylhydrazidem za vzniku benzotriazolodiazepinonu **XIV**, který byl dále alkylován methyljodidem za katalýzy lithium bis(trimethylsilyl)amidu (LiHMDS)(**XV**).

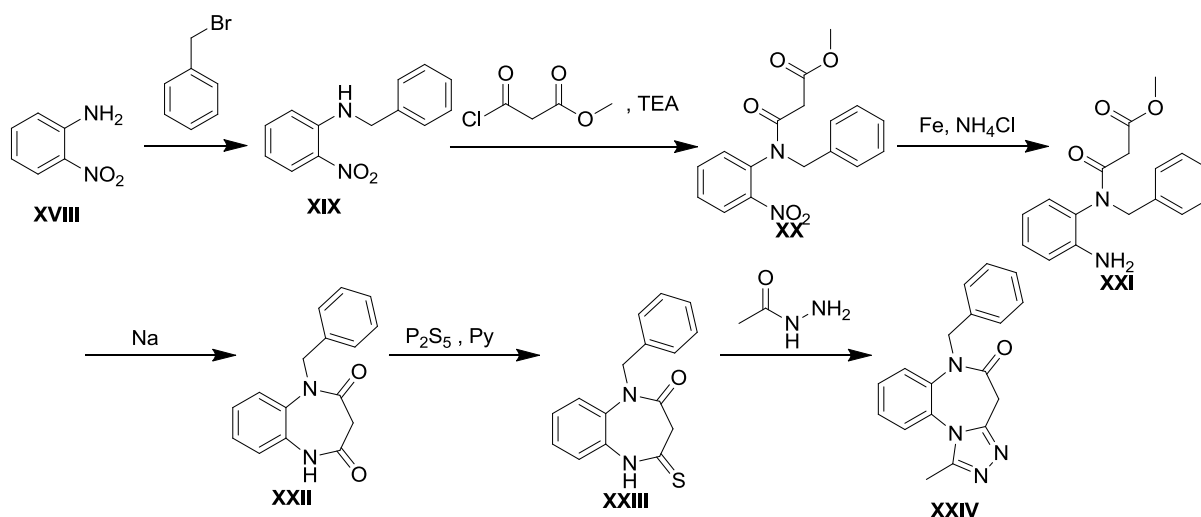
Druhá cesta byla založena na reakci *N*-(4-chlorfenyl)benzen-1,2-diaminu **IX** s 2,2-dimethylmalonyldichloridem za katalýzy TEA, kdy vznikl odpovídající benzodiazepindion **XVI**. Látka **XVI** byla následně podrobena reakci s acetylhydrazidem a dimethyl fosforochloridátem za katalýzy *tert*-butanolátem draselným, kdy došlo ke vzniku finálního benzotriazolodiazepinonu **XVII**.

Schéma 3: Dva přístupy k syntéze derivátů 6-(4-chlorophenyl)-4H-benzo[*b*][1,2,4]triazolo[4,3-*d*][1,4]diazepin-5(6*H*)-onu **XV** a **XVII**.



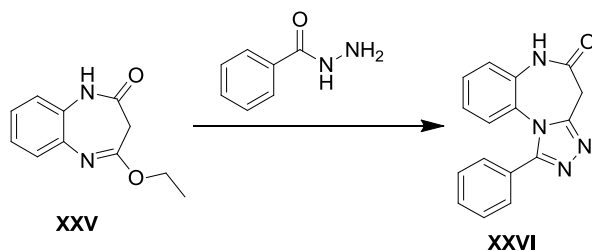
Další syntéza opět využívá 2-nitroaminobenzenu jako výchozí látky.⁸ Sloučenina **XVIII** byla reagována s benzylbromidem za vzniku *N*-benzyl-2-nitroanilínu (**XIX**) (Schéma 4). V dalším kroku reagoval vzniklý intermediát **XIX** s methyl 3-chlor-3-oxopropanoátem za katalýzy TEA, přičemž meziproduct **XX** byl dále redukován směsí železa a chloridu amonného na odpovídající aminoderivát **XXI**, ten byl posléze cyklizován přidávkou sodíku. Výsledný benzodiazepindion **XXII** byl nejdříve převeden na thiolaktam **XXIII** působením sulfidu fosforečného v Py a poté podroben reakci s acetylhydrazidem za vzniku finálního produktu **XXIV**.

Schéma 4: Syntéza derivátu **XXIV** vycházející z 2-nitroaminobenzenu.

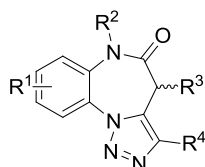


Poslední syntetická cesta popisuje vznik cílové struktury **XXVI** reakcí 4-ethoxy-1,3-dihydro-benzo[*b*][1,4]diazepin-2-onu (**XXV**) s benzoylhydrazinem (Schéma 5).⁹

Schéma 5: Příprava sloučeniny **XXVI** z 4-ethoxy-1,3-dihydro-benzo[*b*][1,4]diazepin-2-onu.

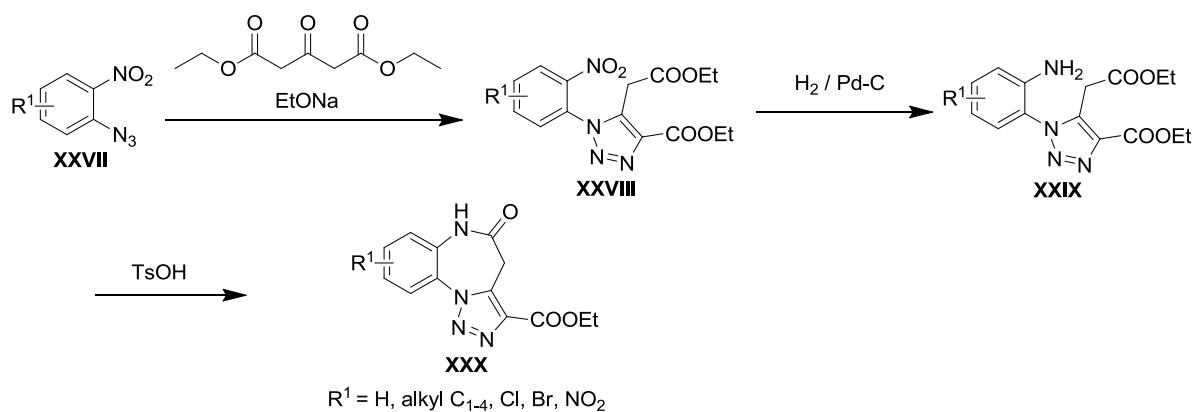


3.1.2 Deriváty odvozené od 4*H*-benzo[*b*][1,2,3]triazolo[1,5-*d*][1,4]diazepin-5(6*H*)-onů



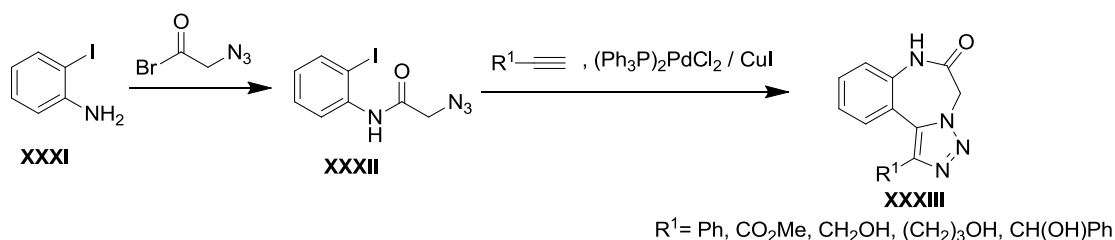
Jednou z možností, jak připravit benzo[1,2,3]triazolodiazepinony je reakce vycházející z 2-nitroazidobenzenu.¹⁰ V prvním kroku byl 2-nitro-azidobenzen **XXVII** reagován s diethyl-1,3-acetondikarboxylátem za přítomnosti ethanolátu sodného, kdy došlo ke vzniku triazolového cyklu (**XXVIII**) (Schéma 6). V dalším kroku byla nitroskupina látky **XXVIII** redukována vodíkem za přítomnosti Pd katalyzátoru. Vzniklý intermediát **XXIX** byl poté cyklizován použitím *p*-toluensulfonové kyseliny (TsOH) na finální produkty **XXX**.

Schéma 6: Syntéza produktů **XXX** z 2-nitroazidobenzenu.

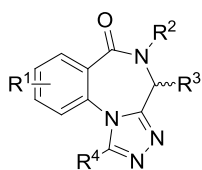


Poměrně nedávno popsal Molteni přípravu benzotriazolodiazepinonu z 2-jodoanilínu.¹¹ Výchozí látka **XXXI** byla nejdříve acylována 2-azidoacetyl bromidem a vzniklý intermediát **XXXII** byl následně reagován s různě substituovanými alkyne za katalýzy dichloridem bis(trifenylfosfin)palladnatým ((Ph₃P)₂PdCl₂) a jodidu mědného (**XXXIII**).

Schéma 7: Příprava derivátů **XXXIII** pomocí 1,3-dipolární cykloadice katalyzované (Ph₃P)₂PdCl₂ a CuI.

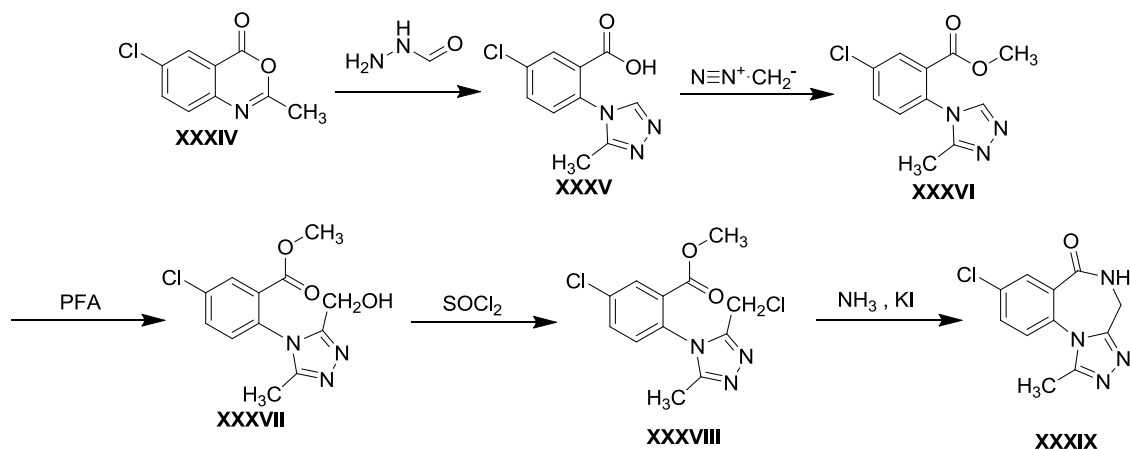


3.1.3 Deriváty odvozené od 4*H*-benzo[*f*][1,3,4]triazolo[1,5-*a*][1,4]diazepin-6(5*H*)-onů



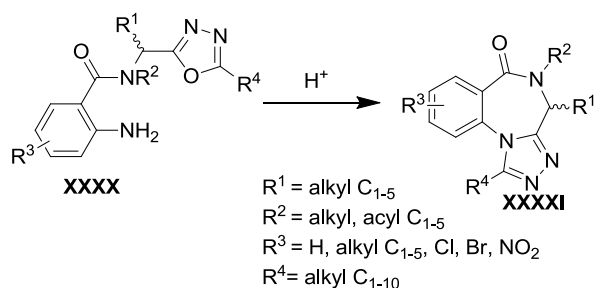
První uvedená syntéza je založena na reakci 7-chloro-3-methyl-1*H*-2,4-benzoxazin-1-onu (**XXXIV**) s hydrazidem kyseliny mravenčí za vzniku derivátu triazolobenzoové kyseliny **XXXV** (Schéma 8).¹² Tento intermediát byl posléze alkylován diazometanem za vzniku methylesteru **XXXVI**, který byl dále hydroxymethylován paraformaldehydem (PFA). Vzniklý hydroxy derivát **XXXVII** byl poté převeden na chlorid **XXXVIII** použitím thionyl chloridu. Posledním krokem byla cyklizace provedená přidavkem amoniaku za přítomnosti jodidu draselného.

Schéma 8: Syntéza sloučeniny **XXXIX** vycházející z 7-chloro-3-methyl-1*H*-2,4-benzoxazin-1-onu.



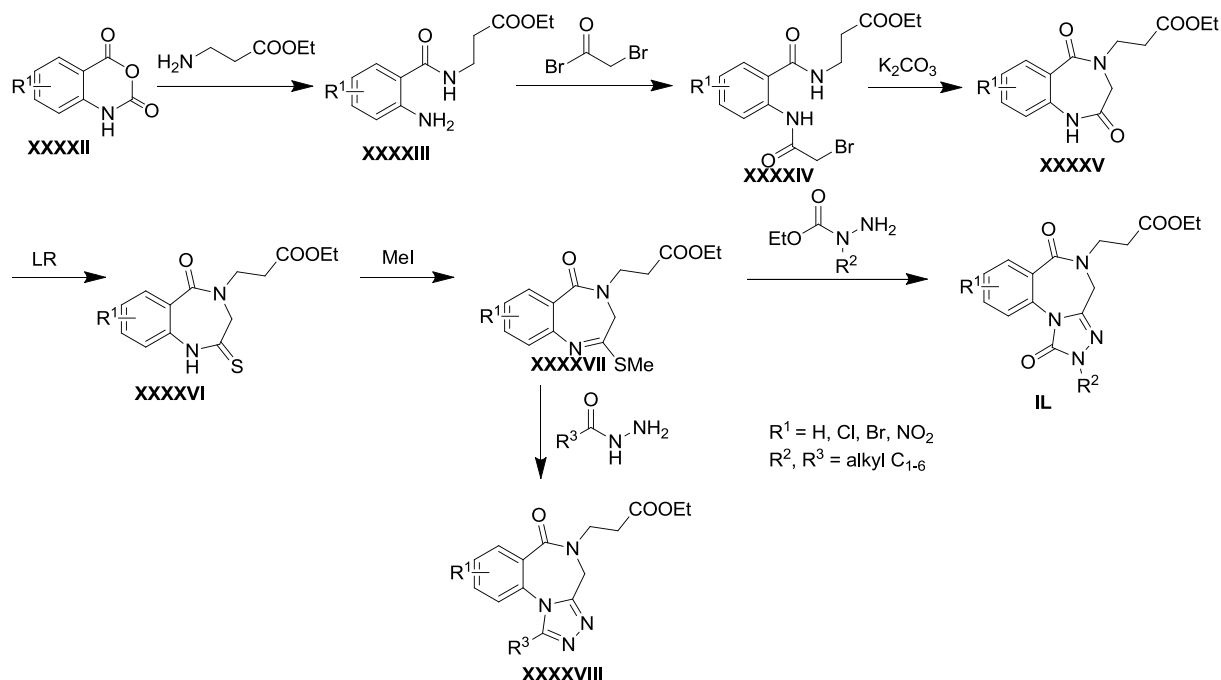
Další možností přípravy je intramolekulární cyklizační reakce *N*-((1,3,4-oxadiazol-2-yl)methyl)-2-aminobenzamidu **XXXX** a jeho substituovaných derivátů za podmínek kyselé katalýzy (Schéma 9).¹²

Schéma 9: Kyselé katalyzovaná intramolekulární cyklizace *N*-((1,3,4-oxadiazol-2-yl)methyl)-2-aminobenzamidu.



Následující syntetický postup vychází z anhydridu isatoové kyseliny **XXXXII**, který může být substituovaný na benzenovém kruhu.¹³ Tedy, anhydrid **XXXXII** byl reagován s ethylesterem β -alaninu za vzniku *N*-(2-aminobenzoyl)- β -alanin ethylesteru **XXXXIII** (Schéma 10). V dalším kroku byla provedena acylace 2-bromacetyl bromidem, přičemž vzniklý produkt **XXXXIV** po přidavku uhličitanu draselného podlehl intramolekulární alkylationi za vznikuna 3,4-dihydro-1*H*-1,4-benzodiazepin-2,5-dionu **XXXXV**. Tento intermediát byl následně převeden na thiolaktam **XXXXVI** použitím Lawessonova činidla (LR), který byl dále alkylován methyl jodidem. Meziprodukt **XXXXVII** umožnil diverzifikaci přikondenzovaných 5-ti čtých cyklů následnými reakcemi s hydrazidy kyselin nebo s deriváty ethyl hydrazinkarboxylátu.

Schéma 10: Příprava různě substituovaných derivátů **XXXXVIII** a **II** z anhydridu isatoové kyseliny.

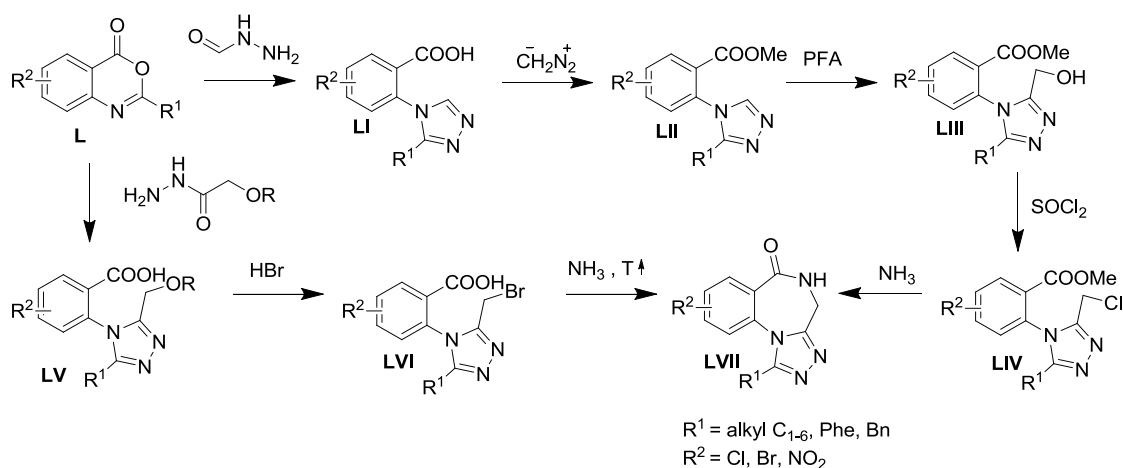


Další dvě popsané metodiky využívají 1*H*-2,4-benzoxazin-1-on nebo jeho deriváty jakožto výchozí látky (Schéma 11).¹⁴

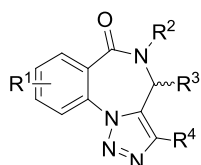
V prvním případě byl 1*H*-2,4-benzoxazin-1-on **L** reagován nejdříve s formylhydrazidem. Připravený derivát benzoové kyseliny **LI** byl dále alkylován diazometanem za vzniku methylesteru **LII**. V dalším reakčním kroku byla provedena hydroxymethylace PFA a poté byl vzniklý hydroxy derivát **LIII** převeden na chlorid **LIV** působením thionyl chloridu. Konečným krokem byla cyklizace za přidavku amoniaku.

Ve druhém případě byl 1*H*-2,4-benzoxazin-1-on **L** reagován s 2-alkoxyacetylhydrazidem za následné konverze intermediátu **LV** na sloučeninu **LVI** reakcí s bromovodíkem. Finální cyklizace bylo dosaženo přidávkem amoniaku za zvýšené teploty.

Schéma 11: Syntéza produktů **LVII** založená na reaktivitě 1*H*-2,4-benzoxazin-1-onu.

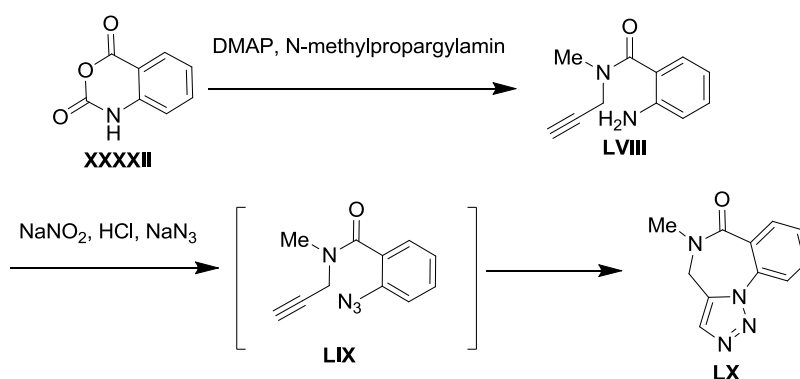


3.1.4 Deriváty odvozené od 4*H*-benzo[*f*][1,2,3]triazolo[1,5-*a*][1,4]diazepin-6(5*H*)-onů



Jednou z možností příprav těchto látek je reakce vycházející z anhydridu isoové kyseliny **XXXXII** (Schéma 12).¹⁵ Ta reagovala s 4-*N,N*-dimethylaminopyridinem (DMAP) a *N*-methylpropargylaminem za vzniku intermediátu **LVIII**, který byl následně podroben diazotaci. *In situ* připravená diazoniová sůl byla ihned substituována azidem sodným, přičemž meziproduct **LIX** okamžitě podlehl spontánní 1,3-dipolární cykloadici za vzniku finální struktury **LX**.

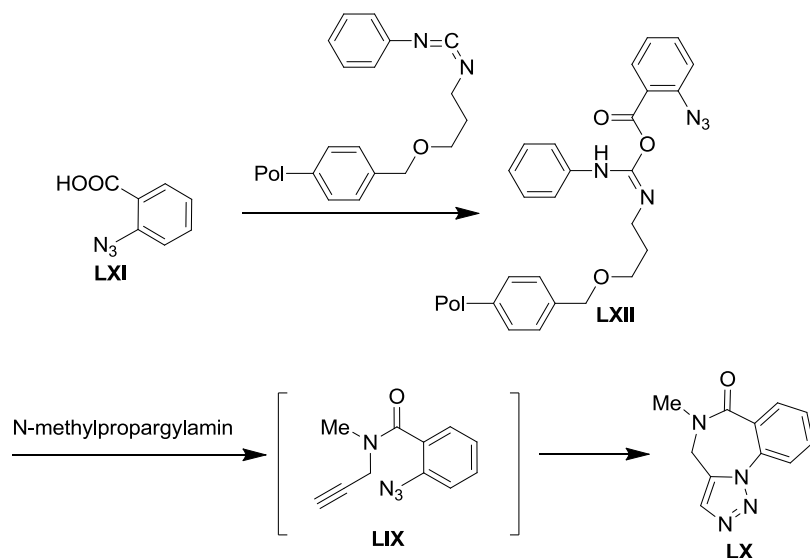
Schéma 12: Syntéza finálního produktu **LX** z anhydridu isoové kyseliny.



Další cesta vedoucí ke stejným derivátům benzodiazepinonu **LX** využívá jako výchozích látek přímo 2-azidobenzoové kyseliny bez předchozí substituce diazoniové soli azidem sodným. Tuto metodu přípravy lze rozdělit do dvou přístupů. V případě prvního,

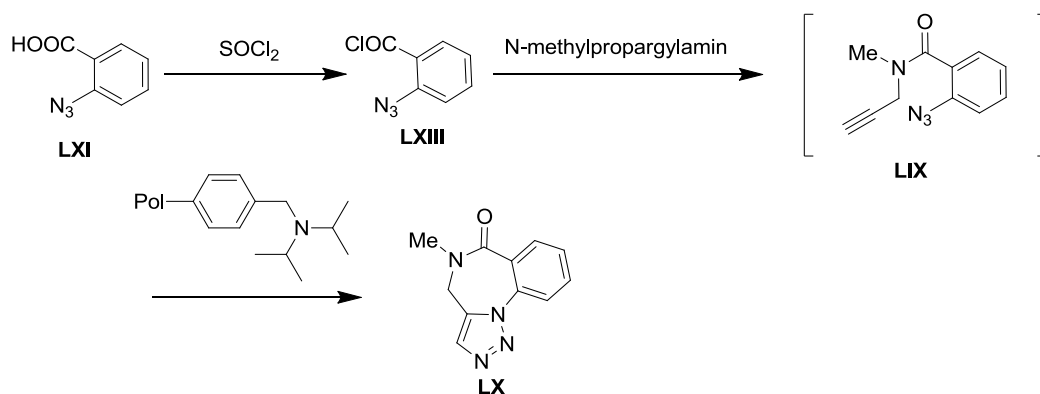
výchozí 2-azidobenzoová kyselina **LXI** nejdříve reagovala s karbodiimidem vázaným na polymeru za vzniku aktivního esteru **LXII** (Schéma 13).¹⁵ Ten byl následně podroben reakcí s N-methylpropargylaminem za vzniku lineárního prekursoru **LIX**, který stejně jako v předchozím případě samovolně cyklizoval na finální produkt **LX**.

Schéma 13: Syntéza derivátu **LX** z 2-azidobenzoové kyseliny.



Druhá metodika zahrnovala převedení 2-azidobenzoové kyseliny **LXI** na chlorid **LXIII** pomocí reakce s thionyl chloridem (Schéma 14).¹⁵ Takto připravený prekursor následně reagoval s N-methylpropargylaminem za vzniku intermediátu **LIX**. V tomto případě byla do reakční směsi přidávána báze imobilizovaná na polymeru, aby nedocházelo k vedlejším reakcím.

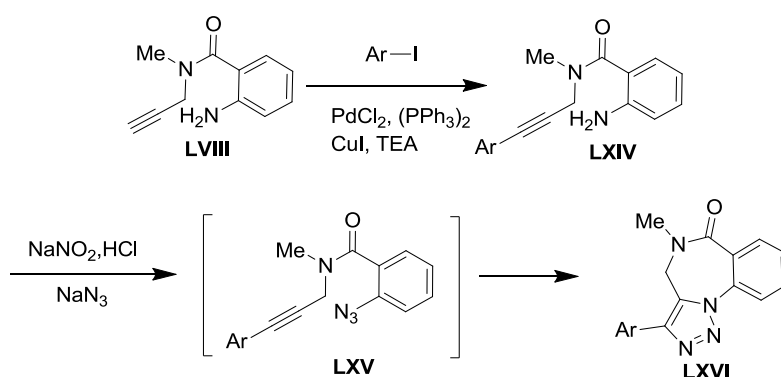
Schéma 14: Příprava sloučeniny **LX** z chloridu 2-azidobenzoové kyseliny.



Následující syntéza uvádí postup pro přípravu arylym substituovaných derivátů **LXVI**, kdy substituce byla vedena do polohy 4 na triazolovém cyklu.¹⁶ Výchozí látkou byl 2-amino-

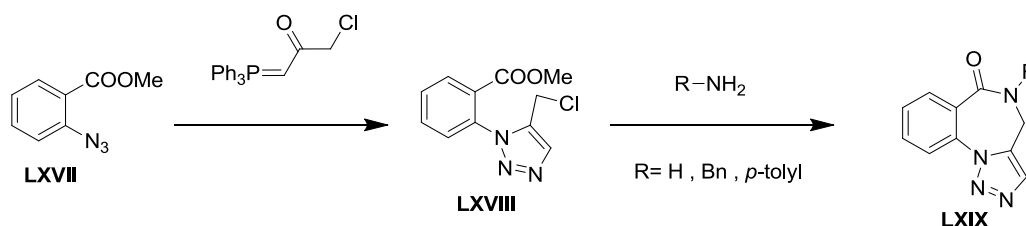
N-methyl-N-propargylbenzamid **LVIII** (Schéma 12), který byl intermediátem již v dříve zmíněné syntéze (Schéma 15). Tato výchozí látka následně reagovala s aryljodidem za vzniku odpovídajícího meziprojektu **LXIV**, dále následovala diazotace aminoskupiny a okamžitá substituce azidem sodným. Vzniklý intermediát **LXV** podlehl samovolné Huisgenově cykloadici za vzniku látky **LXVI**.

Schéma 15: Syntéza 4-substituovaných derivátů **LXVI** z 2-amino-N-methyl-N-propargylbenzamidů.



Další možností využívající derivátů 2-azidobenzoové kyseliny jako výchozích látek, je reakce methyl 2-azidobenzoátu **LXVII** s 1-chloro-3-(trifenyolphosphoranylidem)propan-2-onem (Schéma 16), která vedla ke vzniku 1,2,3-triazolu **LXVIII**, jenž posléze reagoval s příslušnými aminy (amoniakem, benzylaminem či *p*-aminotoluenem) za následné acylační cyklizace na benzotriazolodiazepinon **LXIX**.¹⁷

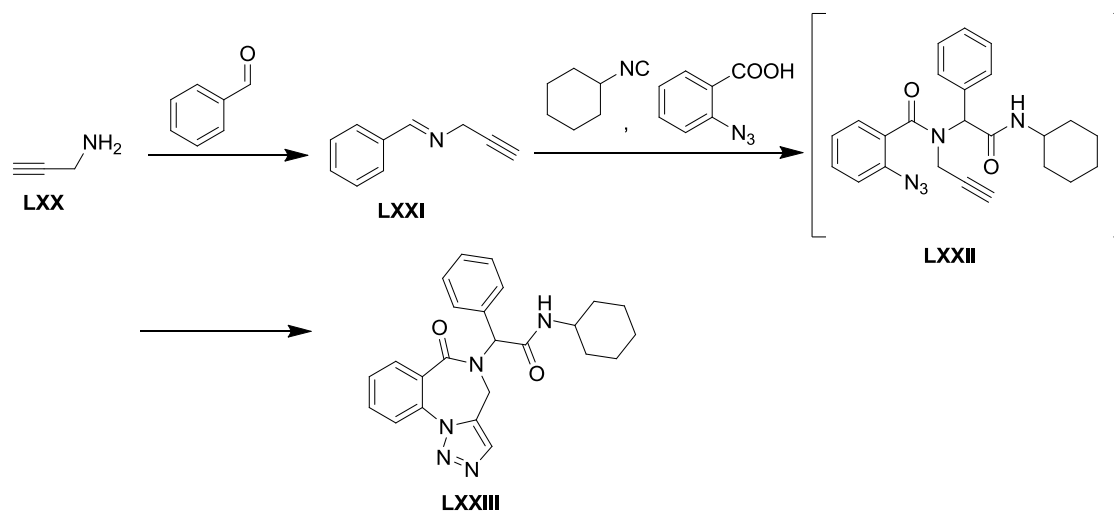
Schéma 16: Příprava derivátů **LXIX** přes methyl 2-(5-(chloromethyl)-1*H*-1,2,3-triazol-1-yl)benzoátový intermediát.



V roce 2004 publikoval Akritopoulou-Zanze syntézu založenou na Ugiho multikomponentní reakci s následnou intramolekulární cyklizací.¹⁸ V prvním kroku byl nejdříve připraven imid **LXXI** reakcí prop-2-yn-1-aminu **LXX** s benzaldehydem, který byl následně podroben reakci s cklopentylisonitridem a 2-azidobenzoovou kyselinou. *In situ*

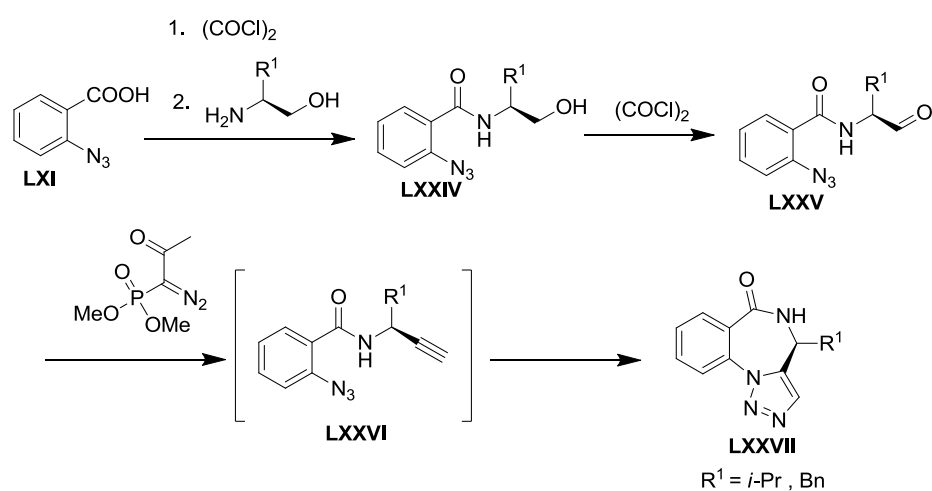
lineární prekurzor **LXXII** následně podlel samovolné Huisgenově cykloadici za vzniku produktu **LXXIII**.

Schéma 17: Příprava derivátu **LXXIII** za podmínek Ugiho multikomponentní reakce.



Následující syntéza vychází z reakce 2-azidobenzoové kyseliny **LXI** s oxalylchloridem a následně s β -aminoalkoholem za vzniku amidu **LXXIV**.¹⁹ V dalším kroku byl amid kyseliny **LXXIV** reagován opět s oxalylchloridem, přičemž byl vzniklý intermediát **LXXV** dále podroben reakci s dimethyl (1-diazo-2-oxopropyl)fosfonátem. Produkt této reakce **LXXVI** poté intramolekulárně cyklizoval Huisgenovou cykloadicí za vzniku látky **LXXVII**.

Schéma 18: Příprava derivátu **LXXVI** z 2-azidobenzoové kyseliny.

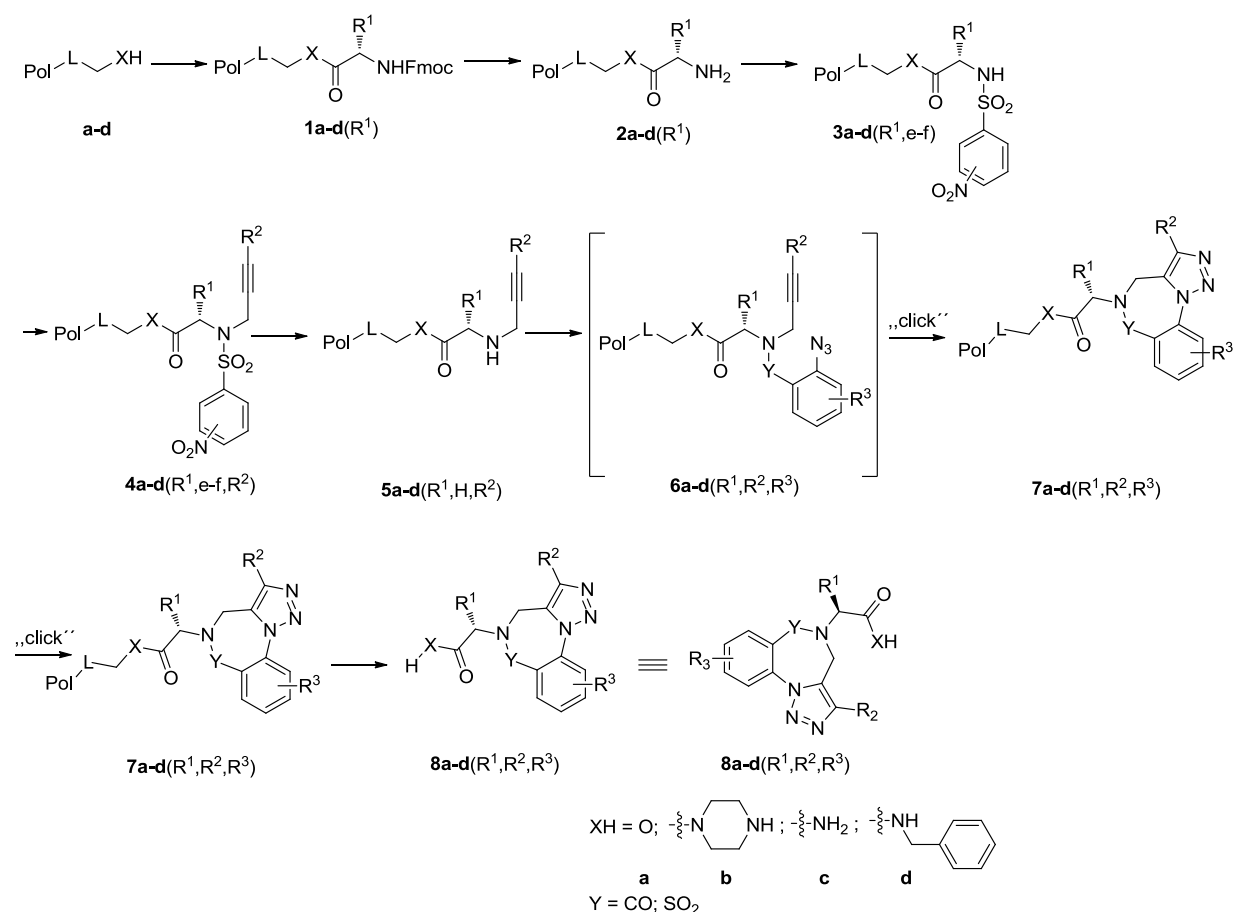


Kromě tradiční syntézy v roztoku, byla pro přípravu derivátů 4*H*-benzo[*f*][1,2,3]triazolo[1,5-*a*][1,4]diazepin-6(5*H*)-onu využita také syntéza na pevné fázi.⁵

4. Výsledky a diskuze

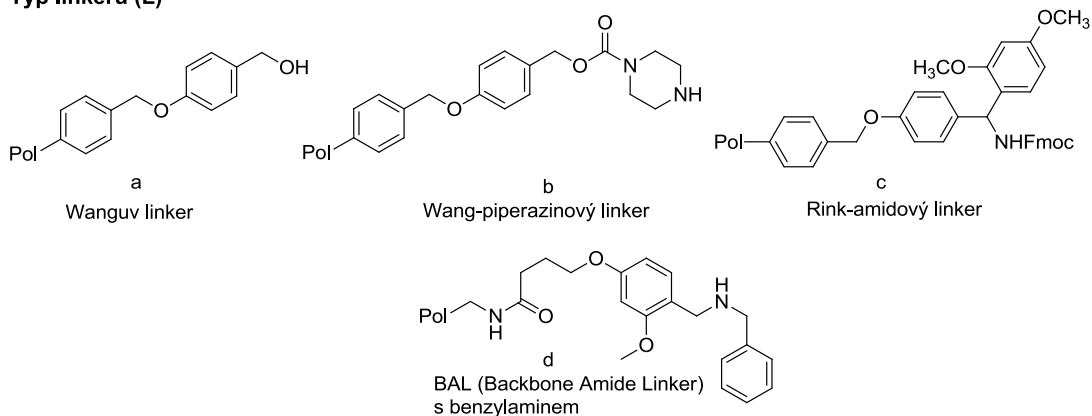
Tato část diplomové práce byla zaměřena na testování průběhu zvolené reakční sekvence v závislosti na použití α -aminokyselin jakožto výchozích synthonů (Schéma 20). Pro tento účel měla být vybraná α -Fmoc-aminokyselina (Obr. 3) ukotvena na pryskyřici přes kyselé labilní linker a následně deprotektována. Terminální aminoskupina derivátu **2a-d**(R¹) měla být dále ochráněna/aktivována 2/4-Nos-Cl, přičemž korespondující sulfonamid **3a-d**(R^{1,e-f}) by měl být dostatečně aktivní pro následující Fukuyama²⁰ monoalkylaci příslušným činidlem. Deprotekce 2/4-nitrobenzensulfonylové skupiny (2/4-Nos) následována acylací/sulfonylací 2-azidobenzoovou kyselinou nebo 2-azidobenzen-sulfonyl chloridem měla vést ke spontánní 1,3-dipolární (Huisgenově) cykloadici²¹ na finální 4*H*-benzotriazolodiazepinony.

Schéma 20: Obecná syntéza cílových derivátů 4*H*-benzotriazolodiazepinonu.

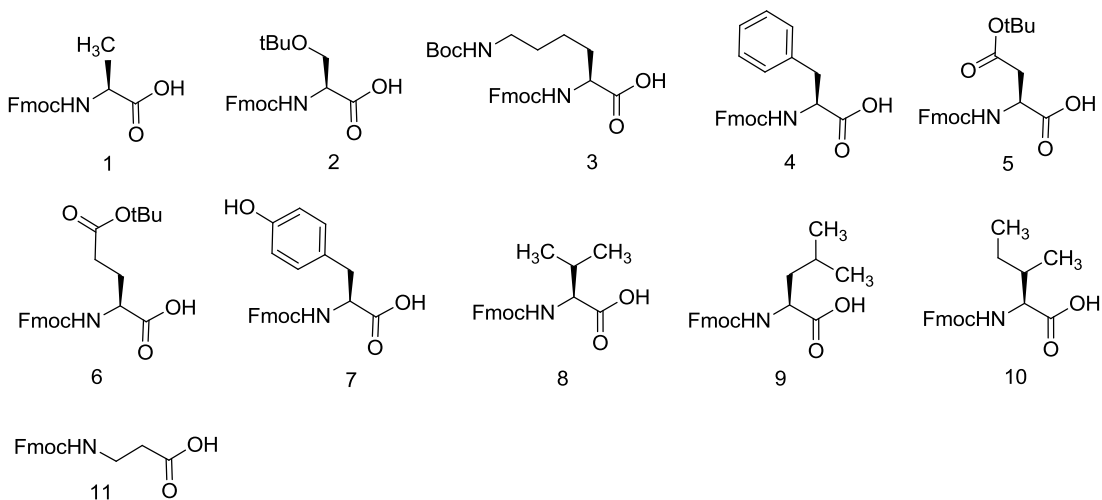


Obrázek 3. Výchozí linkery a látky testované pro substituci R¹, e, f, R² a R³.

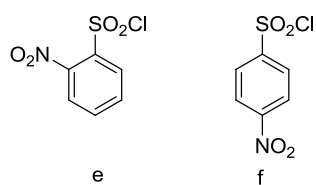
Typ linkeru (L)



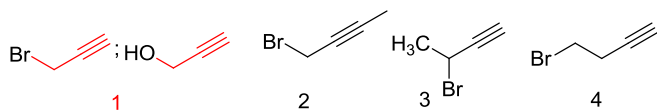
Fmoc-aminokyseliny (R¹)



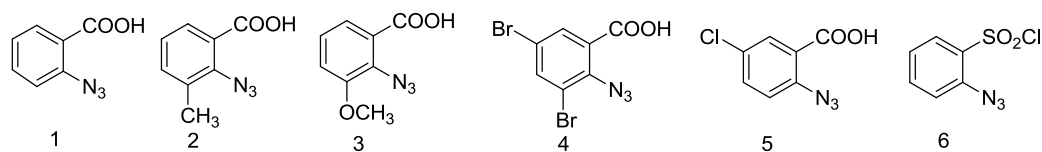
2/4-nitrobenzonsulfonyl chloridy (e-f)



Propargyl bromid a jeho deriváty (R²)



2-Azidobenzoové kyseliny (R³)



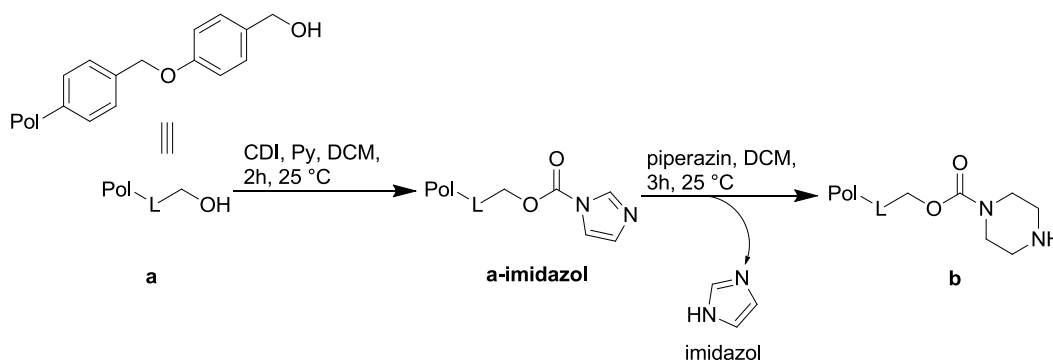
4.1 Reakce na Wang-piperazinovém/Wangově linkeru

Metoda syntézy cílových trisubstituovaných 4*H*-benzotriazolodiazepinonu byla nejdříve aplikována na Wangovu pryskyřici²⁸ s piperazinovým linkerem. První experimenty byly prováděny na imobilizovaném alaninu, přičemž bylo potřeba upravit podmínky alkylace příslušného sulfonamidu tak, abychom dosáhli co nejvyšší konverze. Po dosažení optimálního výsledku, byla následně testována reaktivita dalších α -aminokyselin ukotvených na polymerním nosiči.

4.1.1 Příprava Wang-piperazinového linkeru

Abychom mohli začít s prací na tomto typu linkeru, bylo nejprve zapotřebí si jej připravit v laboratoři. K tomuto účelu byla použita standardní Wangova pryskyřice (**a**), kterou bylo nutné nejdříve nabobtnat v DCM a zpřístupnit tak reakční místa (hydroxyskupiny) k navázání piperazinu přes karbonylovou vazbu. Dalším krokem byla aktivace terminální hydroxyskupiny Wangovy pryskyřice roztokem karbonyldiimidazolu (CDI) a Py v DCM (Schéma 21).²² Po 2 h vznikl 1*H*-imidazolkarboxylátový intermediát (**a-imidazol**), který byl ihned podroben reakci s piperazinem za odštěpení imidazolu a vzniku příslušného amidu **b**.

Schéma 21: Imobilizace piperazinového linkeru na Wangovu pryskyřici.

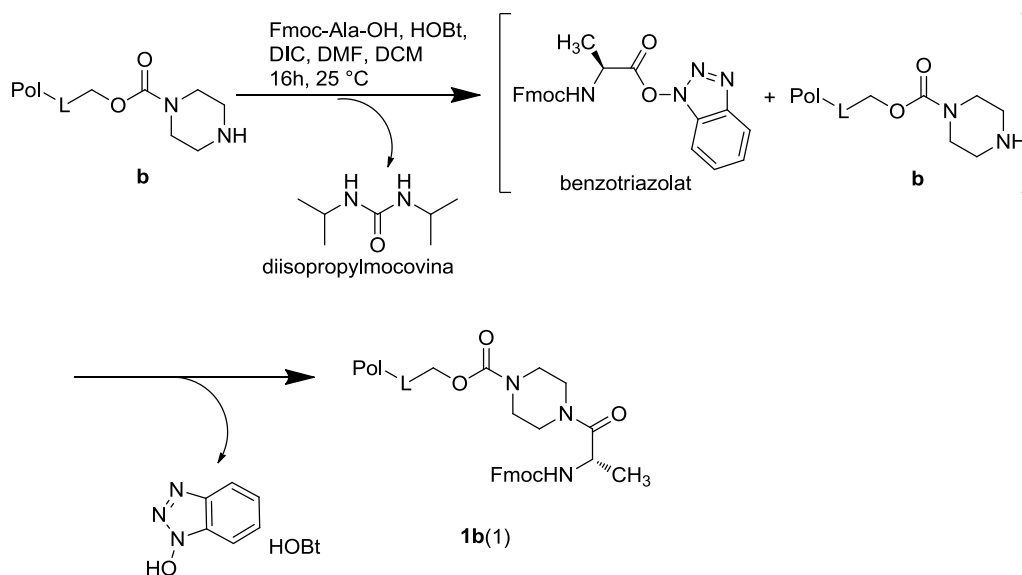


4.1.2 Imobilizace Fmoc-alaninu na Wang-piperazinový linker

K ukotvení alaninu na pryskyřici byla použita standardní metoda používaná pro syntézu peptidů na pevné fázi.²³ Polymer s navázaným piperazinovým linkerem (**b**) byl nejdříve klasicky nabobtnán v DCM a následně byla přidána reakční směs skládající se z Fmoc-alaninu, 1*H*-hydroxybenzotriazol hydrátu (HOBT) a *N,N*'-diisopropylkarbonyldiimidu (DIC) v 50% roztoku *N,N*-dimethylformamidu (DMF) a DCM (Schéma 22). Karboxylová kyselina nejdříve interagovala s DIC a poté s HOBT za odštěpení derivátu močoviny a

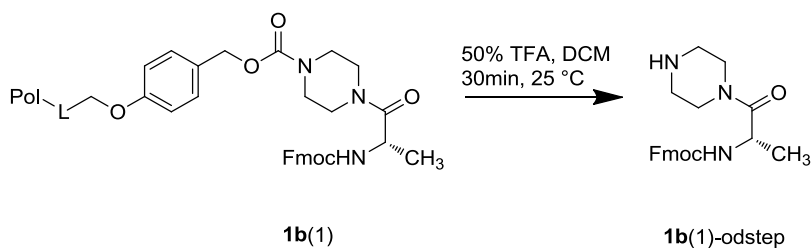
vytvoření 1*H*-benzotriazolylkarboxylátu (benzotriazolát). Tento *in situ* připravený aktivní intermediát následně podlehl nukleofilnímu ataku imobilizovaného piperazinu (**b**) za vzniku peptidové vazby látky **1b(1)** a opětovné regenerace HOBt. Reakce probíhala 16 h při laboratorní teplotě za stálého třepání.

Schéma 22: Imobilizace Fmoc-alaninu na Wang-piperazinový linker.



Pro kvantitativní zhodnocení imobilizační reakce byla odebrána malá část pryskyřice **1b(1)** (cca 30 mg), která byla následně vysušena pod proudem dusíku a z níž byly odváženy 2 vzorky o stejné hmotnosti (s přesností na 4 desetinná místa). Oba pečlivě zvážené vzorky byly podrobeny reakci s 50% TFA v DCM za odštěpení Fmoc-alaninu z pryskyřice (schéma 23). Produkty štěpení **1b(1)**-odstep byly následně analyzovány na HPLC-UV-MS, kdy z plochy píku vzorků a standardu (Fmoc-alanin) při vlnové délce 300 nm byl stanoven výtěžek reakce, tzv. loading pryskyřice na 0,64 mmol/g.

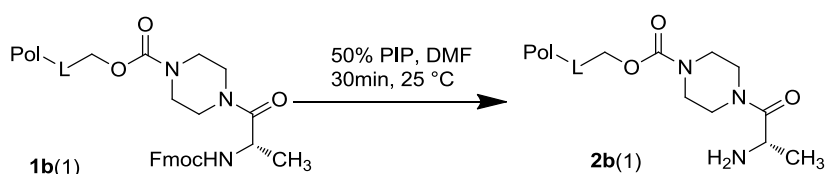
Schéma 23: Štěpení Wang-piperazinového linkeru v 50% TFA/DCM.



4.1.3 Odchránění Fmoc protektivní skupiny

V navržené syntéze jsme záměrně použili aminokyseliny, jejichž aminoskupina je opatřena *N*-(9-fluorenylmethoxykarbonyl)-sukcinimidem (Fmoc), který má protektivní funkci a obecně umožňuje selektivní navázání kyseliny na různé typy linkerů přes karboxylovou část. Za účelem provést další reakční krok bylo potřeba nejdříve odštěpit labilní Fmoc, k čemuž posloužil 50% roztok piperidinu (PIP) v DMF (Schéma 24). Po deprotekcí chránící skupiny byla získána koncová aminoskupina (**2b(1)**), která byla podrobena následné aktivaci.

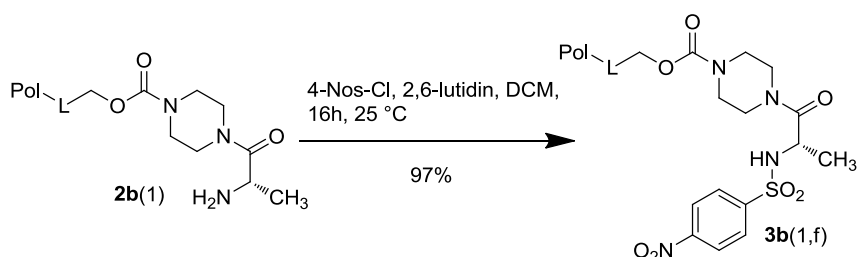
Schéma 24: Deprotekce aminoskupiny imobilizovaného Fmoc-alaninu.



4.1.4 Chránění/aktivace aminoskupiny 4-Nos-Cl

Primární aminoskupina sloučeniny **2b(1)** byla aktivována 4-Nos-Cl za vzniku odpovídajícího sulfonamidu **3b(1,f)** (Schéma 25).³¹ Tato aktivace zároveň posloužila k ochránění aminoskupiny vůči disubstituci alkylačními činidly použitými v následujícím kroku. Pro sulfonylační reakci byly použity standardní podmínky hojně aplikované pro přípravu sulfonamidů na pevné fázi. Pryskyřice **2b(1)** byla promyta DCM a následně byl přidán reakční roztok 4-Nos-Cl a 2,6-lutidinu v DCM. Reakce probíhala 16 h při laboratorní teplotě s konverzí 97%.

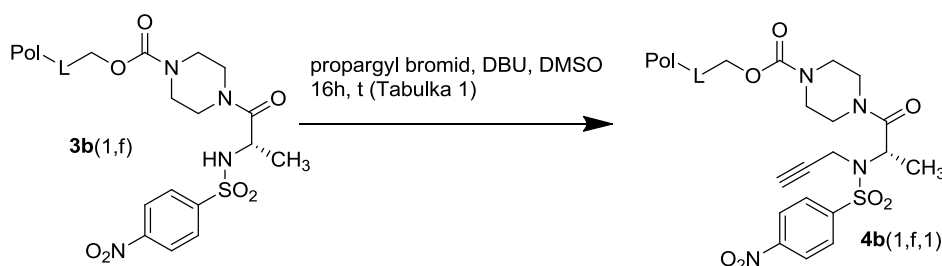
Schéma 25: Sulfonylace intermediátu **2b(1)** 4-Nos-Cl.



4.1.5 Alkylace derivátů sulfonamidu **3b(1,f)** propargyl bromidem

V dalším postupu následovalo zavedení propargylové jednotky na aminoskupinu příslušného sulfonamidu **3b(1,f)** (Schéma 26). K tomuto účelu posloužila tzv. Fukuyama²⁰ alkylace propargyl bromidem. Pryskyřice s navázaným meziproductem (**3b(1,f)**) byla nejdříve promyta DCM a následně dimethylsulfoxidem (DMSO), k polymeru byl poté přidán reakční roztok propargyl bromidu s 1,8-diazabicyklo[5.4.0]undec-7-enem (DBU) v DMSO a reakční směs byla ponechána třepání. Po 16 h byl pomocí HPLC-MS detekován produkt **4b(1,f,1)** v surové čistotě pouze 52%. Jelikož stejná reakce měla na imobilizovaném β -alaninu zcela bezproblémový průběh,⁵ nízkou konverzi přikládáme zvýšení sterické náročnosti systému **3b(1,f)** vůči struktuře použitého alkylačního činidla.

Schéma 26: Alkylace intermediátu **3b(1,f)** propargyl bromidem.



Protože dosažená konverze nebyla pro účely syntézy dostačující, bylo následně přistoupeno k optimalizačním reakcím (Tabulka 1, 3 a 4) zahrnujícím změnu teploty, reakční doby a posléze i změnu alkylačního činidla. Primárně bylo vyzkoušeno opakování alkylace za stejných podmínek, což vedlo ke zvýšení surové čistoty z 52% na 83% (Tabulka 1). Přestože byla dosažená konverze dostačující, z důvodu zkrácení reakčního času byla ve druhé fázi testování zvýšena teplota. Z Tabulky 1 je patrné, že nejlepších výsledků bylo dosaženo při teplotě 75 °C.

Tabulka 1: Optimalizace reakčních podmínek alkylace s propargyl bromidem.

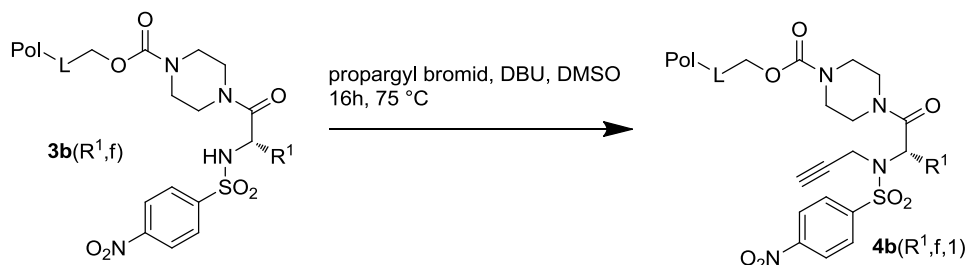
Výchozí látka	Teplota [°C]	Surová čistota 4b(1,f,1) [%] ^a
3b(1,f)	25	52
	25	83 ^{op}
	55	85
	75	92

	100	87
--	-----	----

^aHPLC-UV (205 – 400 nm); ^{op}opakování reakčního kroku pro zvýšení konverze reakce.

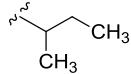
Zjištěné optimální podmínky alkylace byly následně testovány i pro další aminokyseliny imobilizované na Wang-piperazinovém linkeru (Schéma 27). Z uvedené tabulky 2 je patrné, že nalezený postup pro alkylation alaninu propargyl bromidem při 75°C je použitelný téměř univerzálně i pro ostatní α -aminokyseliny. Pouze valin, zřejmě v důsledku sterického bránění, za zvýšené teploty prakticky vůbec nereagoval. Z tohoto důvodu bylo přistoupeno k dalším optimalizacím parametrů alkylation reakce na valinu (Tabulka 3).

Schéma 27: Alkylation imobilizovaných sulfonamidů **3b**(R¹,f) propargyl bromidem při 75 °C.



Tabulka 2: Výsledky alkylation reakcí sulfonamidů **3b**(R¹,f) propargyl bromidem při 75 °C.

Výchozí látka	Aminokyselina	R ¹	Surová čistota 4b (R ¹ ,f,1) [%] ^a
3b (2,f)	Ser		87
3b (3,f)	Lys		72
3b (4,f)	Phe		72
3b (5,f)	Glu		82
3b (6,f)	Asp		78
3b (7,f)	Tyr		68 ^b
3b (8,f)	Val		2
3b (9,f)	Leu		68 ^b

3b(10,f)	Ile		68 ^b
-----------------	-----	---	-----------------

^aHPLC-UV (205 – 400 nm); ^b25% neznámé látky.

V první fázi jsme zkusili zvýšit teplotu na 100 °C, nicméně surová čistota žádaného intermediátu **3b(8,f)** byla stále velmi nízká (4%). Vhodnou alternativou se později ukázala kombinace vyšší teploty a mikrovln, kdy při 90 °C a výkonu 200 wattů bylo za 48 h dosaženo 83% konverze.

Tabulka 3: Optimalizace parametrů alkylační reakce pro valin-sulfonamidu **3b(8,f)**.

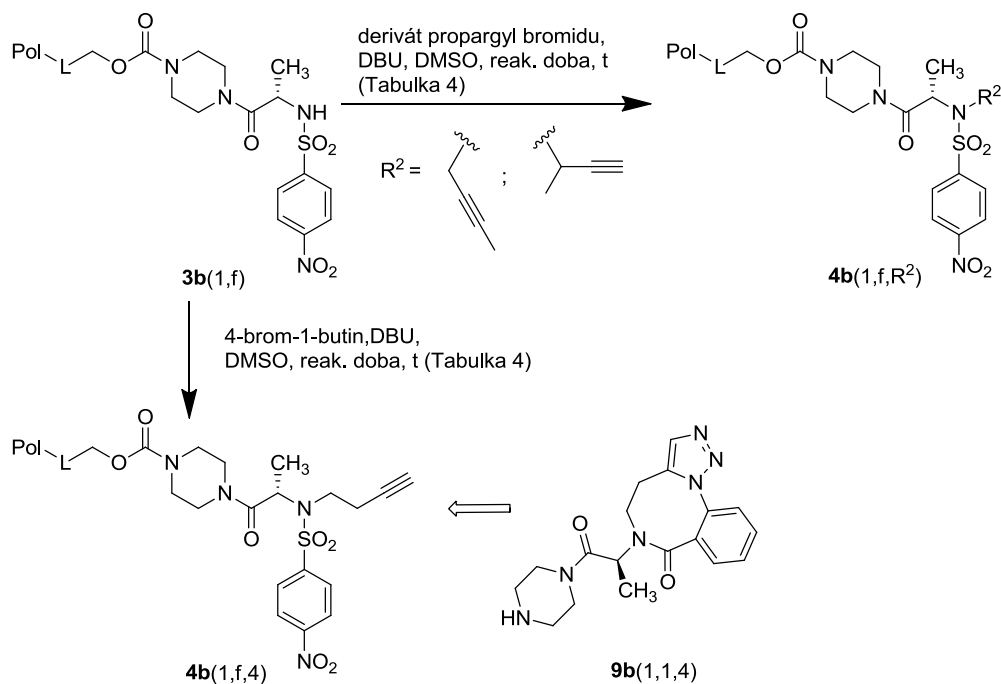
Teplota [°C]	Reakční doba	Surová čistota 4b(8,f,1) [%] ^a
100	16 h	4
MW – 120	5 m	40
MW – 120	1 h	60
MW – 120	2 h	68
MW – 120	18 h	0
MW – 90	18 h	40
MW – 90	48 h	83

^aHPLC-UV (205 – 400 nm).

4.1.5.1 Alkylace sulfonamidu **3b(1,f)** deriváty propargyl bromidu

Vzhledem k tomu, že alkylace s použitím propargyl bromidu byly poměrně úspěšné, rozhodli jsme se následně otestovat také deriváty propargyl bromidu typu 1-brom-2-butyln, 3-brom-1-butyln, ale i 4-brom-1-butyln, s jehož pomocí měl být následně ověřen vznik osmičlenného cyklu **9b(1,1,4)**, který by tak rozšířil navrženou knihovnu látek o další sloučeninu (Schéma 28). Testování započalo použitím dříve optimalizovaných podmínek alkylace, přičemž teplota 75 °C se ukázala pro vybrané deriváty jako nevhodná. V případě látky **4b(1,f,2)** dopomohlo k lepší konverzi další zvýšení teploty na 100 °C, nicméně surová čistota látek **4b(1,f,3)** a **4b(1,f,4)** zůstala při téže teplotě prakticky nezměněna (Tabulka 4). Z tohoto důvodu bylo přistoupeno k dalším experimentům v mikrovlnném reaktoru. V případě 4-brom-1-butylnu byla reakce testována po dobu 5 min, 1 h a 2 h, nicméně dosažené výsledky poukázaly na to, že tato metoda není opět vhodná. Při reakčním čase 5 min totiž výchozí látka nereagovala vůbec a při reakci po dobu 1 a 2 h vznikla směs neznámých produktů.

Schéma 28: Alkylace imobilizovaného alanin-sulfonamidu **3b(1,f)** deriváty propargyl bromidu.



Tabulka 4: Optimalizace parametrů alkylační reakce s deriváty propargyl bromidu.

Výchozí látka	R ²	Teplota [°C]	Reakční doba	Surová čistota 4b(1,f,R²) [%] ^a
3b(1,f)		75	16 h	30
		100	16 h	91
		75	16 h	8
		100	16 h	12
		75	16 h	6
		100	16 h	7
		MW 120	5 min	0 ^b
		MW 120	1 h	0 ^c
	MW 120	2 h	0 ^c	

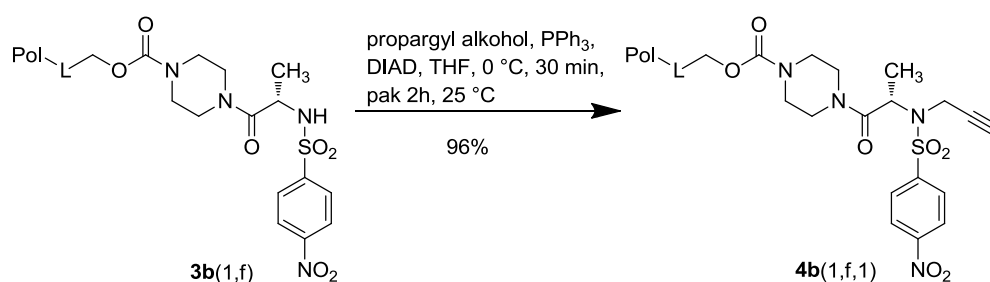
^aHPLC-UV (205 – 400 nm); ^bpouze výchozí látka; ^cpouze neznámé produkty.

4.1.5.2 Alkylace sulfonamidu **3b(1,f)** propargyl alkoholem – Mitsunobu reakce

Jelikož jsou deriváty propargyl bromidu poměrně drahé a variabilita substituentů značně omezená, zaměřili jsme se na hledání komerčně dostupnějších alkylačních činidel.

Jako nejschůdnější variantu jsme zvolili alkylyaci sulfonamidu **3b(1,f)** propargyl alkoholem za podmínek Mitsunobu reakce (Schéma 29). Jelikož je výtěžek reakce rapidně snižován s rostoucím obsahem vody v rozpouštědle, bylo nejdříve nutné pryskyřici důkladně promýt bezvodým tetrahydrofuranem (THF). K pryskyřici byl následně přidán roztok propargyl alkoholu a trifenyfosfinu (PPh₃) v bezvodém THF, do druhé stříkačky byl připraven roztok *N,N'*-diisopropylazodikarboxylátu (DIAD) v bezvodém THF, obě stříkačky byly propojeny spojkou a uloženy na 30 min do mrazáku. Po této operaci byl roztok DIAD přetlačen do stříkačky s pryskyřicí, reakční směs byla třepána 2 h za laboratorní teploty. Následná HPLC-MS analýza prokázala, že se výsledný meziprodukt podařilo připravit v 96% surové čistotě. Závěrem lze konstatovat, že by Mitsunobu alkylace mohla být velmi vhodnou alternativou Fukuyama alkylace, která byla v této práci užívána jako hlavní metoda. Z časových důvodů se bohužel nepodařilo vyzkoušet alkylace s jinými deriváty propargyl alkoholu.

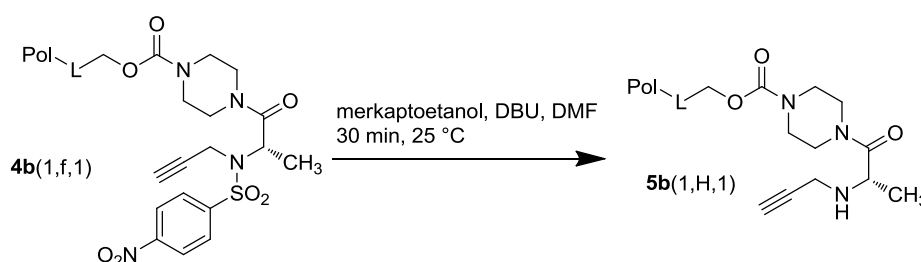
Schéma 29: Alkylace meziproduktu **3b(1,f)** propargyl alkoholem.



4.1.6 Denosylace a následná acylace 2-azidobenzoovými kyselinami

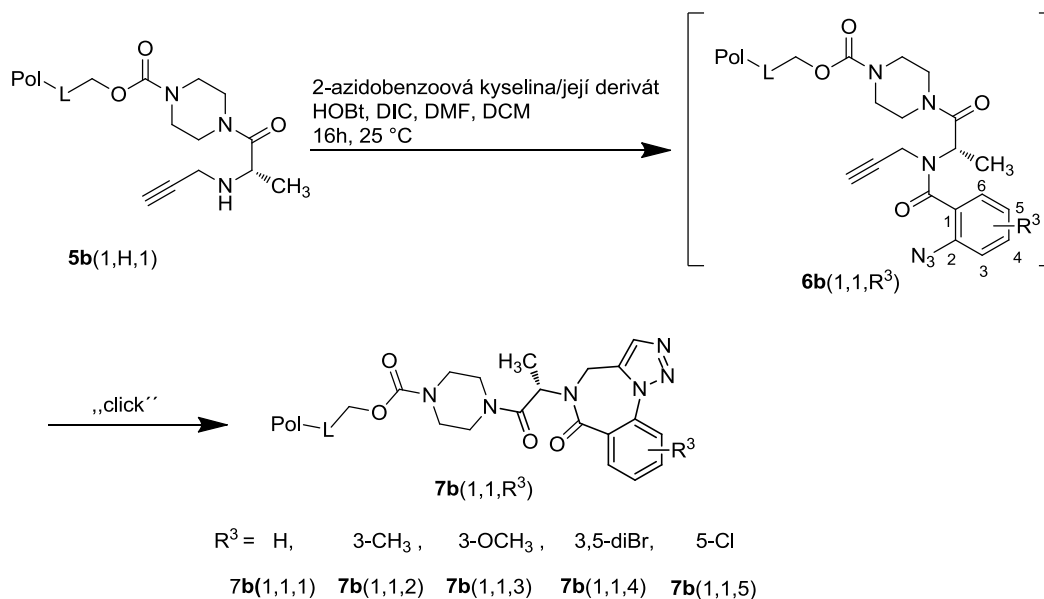
Jakmile byly zvládnuty optimalizace alkylačních reakcí, přistoupili jsme k dalším krokům syntézy. Tedy k tzv. denosylaci, během které působením merkaptoethanolu v DMF došlo k odštěpení 4-Nos protektivní skupiny a tím vzniku sekundárního aminu (**5b(1,H,1)**), který byl takto aktivován pro následující reakci (Schéma 30).

Schéma 30: Deprotekce 4-Nos skupiny.



Během práce jsme zjistili, že denosylované intermediáty nejsou příliš stabilní, proto bezprostředně po deprotekcí následovala acylace s použitím 2-azidobenzoové kyseliny nebo jejích derivátů (3-methyl-2-azidobenzoové kyseliny, 3-methoxy-2-azidobenzoové kyseliny, 3,5-dibrom-2-azidobenzoové kyseliny a 5-chlor-2-azidobenzoové kyseliny) za podmínek HOBt techniky (Schéma 31, Tabulka 5).

Schéma 31: Acylace 2-azidobenzoovou kyselinou nebo jejími deriváty.



Tabulka 5: Surová čistota produktů **7b(1,1,R³)**

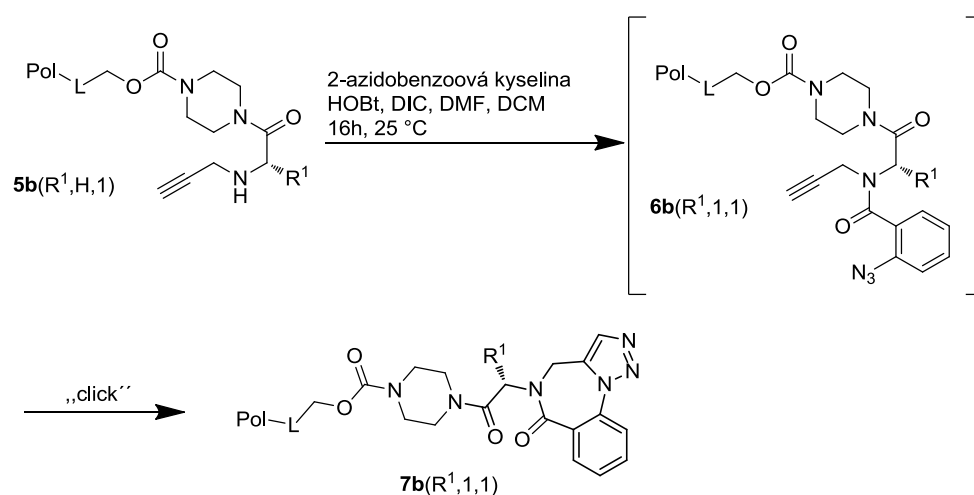
Výchozí látka	R ³	Surová čistota 7b(1,1,R³) [%] ^a
5b(1,H,1)	H	18
	3-CH ₃	36
	3-OCH ₃	0
	3,5-diBr	22
	5-Cl	48

^aHPLC-UV (205 – 400 nm).

Na základě výsledků uspořádaných v Tabulce 5 lze vidět, že požadované produkty **7b(1,1,R³)** nevznikly v dostatečné čistotě. Zatímco nejlepší konverze bylo dosaženo u derivátu **7b(1,1,5)** (48%), 2-azidobenzoová kyselina překvapivě poskytla jen 18% produktu **7b(1,1,1)**. Extrémní případ představuje reakce s 3-methoxy-2-azidobenzoovou kyselinou, kdy cílová sloučenina **7b(1,1,3)** nevznikla vůbec.

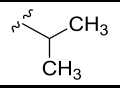
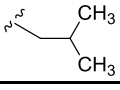
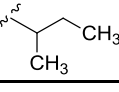
V další části práce jsme chtěli porovnat rozdíl v konverzi acylace alanin-sulfonamidu **7b**(1,1,1) s acylacemi dalších sulfonamidů připravených z příslušných α -aminokyselin s různou substitucí R^1 (Schéma 32, Tabulka 6). Původně jsme se domnívali, že délka či rozvětvení postranního řetězce (R^1) látek **5b**(R^1 ,H,1) zcela zabrání vzniku produktů **7b**(R^1 ,1,1). Nicméně, i když konverze těchto reakcí byla velmi nízká (15–22%), přesto byla srovnatelná se surovou čistotou produktu **7b**(1,1,1) (18%). Tento závěr nám poskytl naději na možnost nalezení optimálnějších podmínek či vhodnější kombinace výchozích synthonů (R^1 , R^2 a R^3) pro účely acylace.

Schéma 32: Acylace kyselin **5b**(R^1 ,H,1) 2-azidobenzoovou kyselinou.



Tabulka 6: Surová čistota acylace kyselin **5b**(R^1 ,H,1) 2-azidobenzoovou kyselinou.

Výchozí látka	Aminokyselina	R^1	Surová čistota 7b (R^1 ,1,1) [%] ^a
5b (2,H,1)	Ser		17
5b (3,H,1)	Lys		19
5b (4,H,1)	Phe		16
5b (5,H,1)	Glu		15
5b (6,H,1)	Asp		15
5b (7,H,1)	Tyr		22

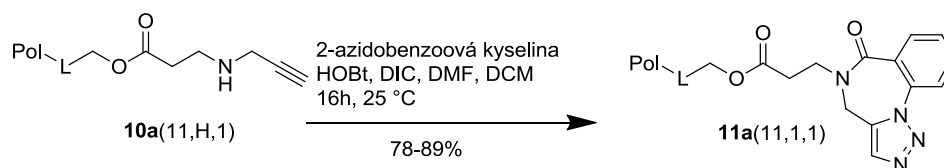
5b(8,H,1)	Val		20
5b(9,H,1)	Leu		19
5b(10,H,1)	Ile		17

^aHPLC-UV (205 – 400 nm).

4.1.6.1 Řešení problematiky acylačních reakcí

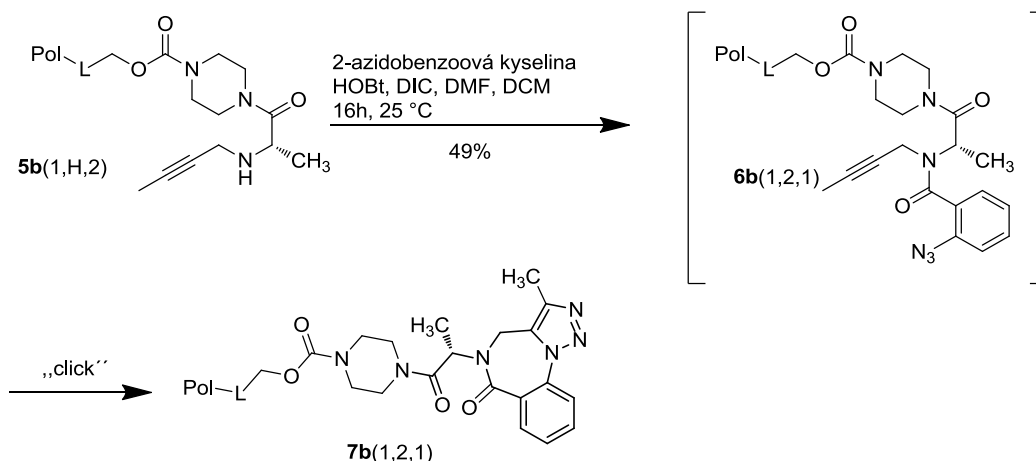
Jako první aspekt, který by mohl být příčinou neúspěchu acylačních reakcí, byl zvážen rozklad 2-azidobenzoové kyseliny při jejím delším skladování. Z tohoto důvodu jsme provedli jednoduchý test, kdy byl připraven již dříve popsáný derivát **10a(11,H,1)**,⁵ který byl následně acylován různými šaržemi 2-azidobenzoové kyseliny skladovaných v laboratoři (Schéma 33). Výsledné produkty **11a(11,1,1)** vznikaly v rozmezí surových čistot od 78 do 89%, což jasně poukazuje na to, že používané 2-azidobenzoové kyseliny byly v pořádku.

Schéma 33: Testování stability různých šarží 2-azidobenzoových kyselin.



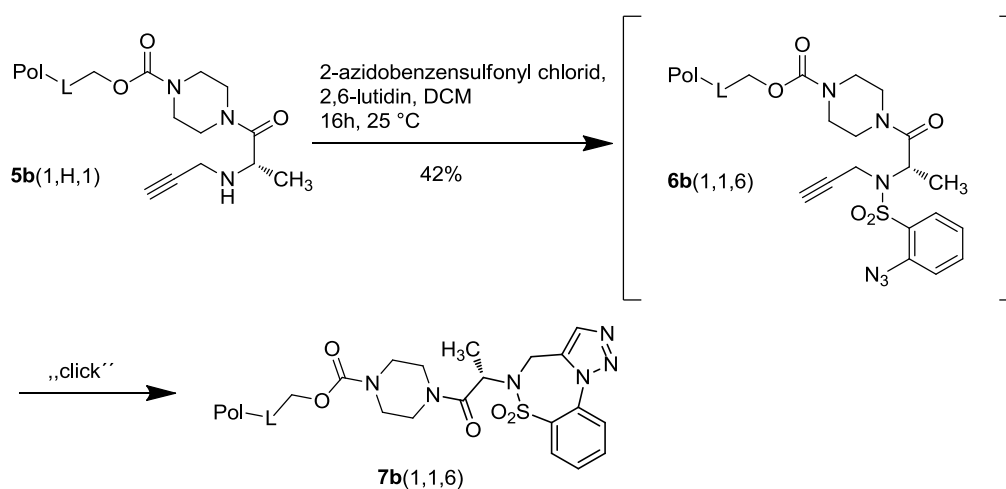
Další uvažovanou variantou byla nedostatečná aktivace sekundární aminoskupiny pro acylaci kyselinou. Tento problém jsme se pokusili vyřešit záměnou propargyl bromidu za 3-methylpropargyl bromid **5b(1,H,2)**. V tomto případě jsme předpokládali, že kladný indukční efekt methylové skupiny vyvolá tah elektronů směrem k aminoskupině, přičemž zvýší její nukleofilitu a acylace tak bude probíhat snadněji (Schéma 34). Náš závěr se tímto potvrdil, neboť jsme odpovídající produkt **7b(1,2,1)** získali ve 49% surové čistotě.

Schéma 34: Acylace látky **5b(1,H,2)** 2-azidobenzoovou kyselinou.



Paralelně byla také vyzkoušena substituce atomu dusíku za jiných podmínek, než vyžaduje HOBt acylace. Pro tento účel byla testována sulfonylace 2-azidobenzosulfonyl chloridem s tím, že uvedená reakce byla prováděna za stejných podmínek jako nosylace sloučenin **2b**(R¹) (Schéma 35), kdy jsme dosáhli 42% konverze.

Schéma 35: Reakce meziproductu **5b**(1,H,1) s 2-azidobenzosulfonyl chloridem.



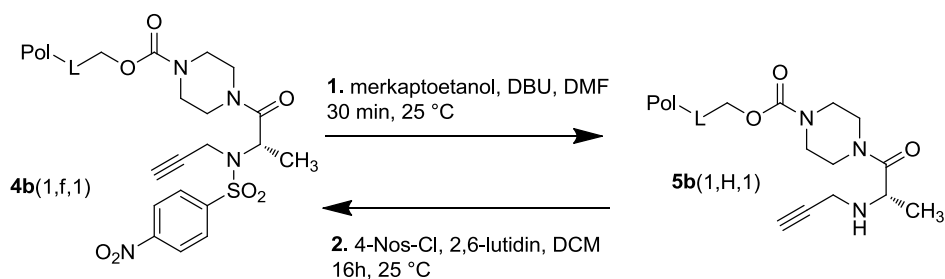
Poslední zváženu alternativou byla možnost nekvantitativního průběhu denosylace intermediátů **4b**(1,f,1), která měla za následek selhání acylace kyselinou. V následující části práce byly tedy podrobněji zkoumány produkty po deprotekcí 4-Nos skupiny. Protože látky **5b**(1,H,1) nejsou po ochránění aminoskupiny UV aktivní, přistoupili jsme nejdříve ke zhodnocení průběhu reakce pomocí Fmoc-OSu (Schéma 36). Získané výsledky bohužel nevněsly do dané problematiky jasnější pohled, neboť reakcí vznikla směs látek, z nichž prakticky všechny nesly Fmoc skupinu a žádná z nalezených hmot neodpovídala píku produktu.

Schéma 36: Reakce s Fmoc-Osu pro kvalitativní zhodnocení denosylace.



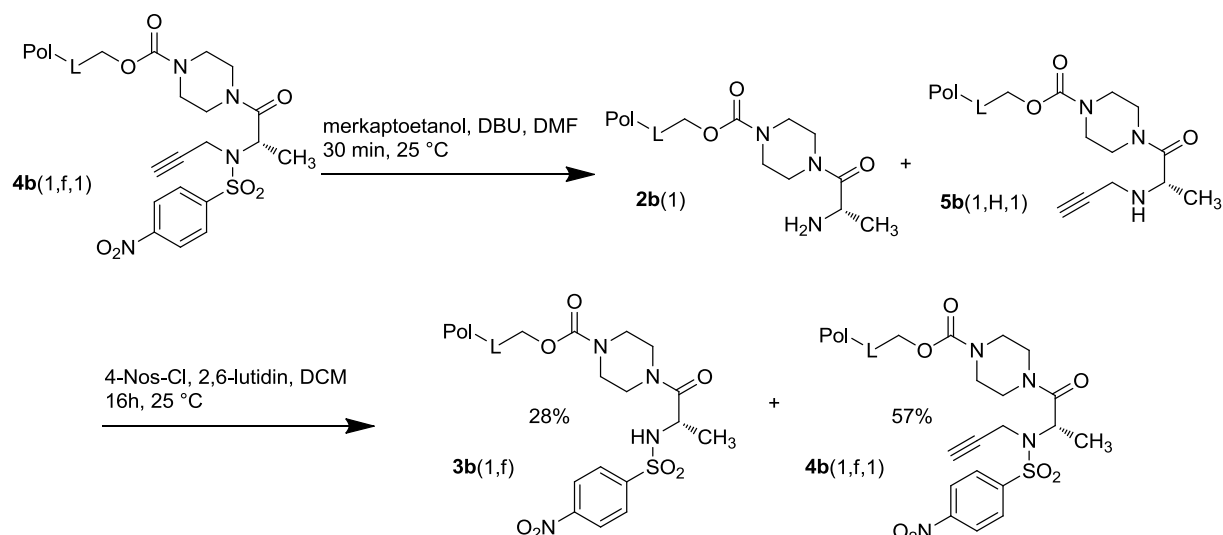
Jelikož jsme si v tomto bodě nebyli jistí, zdali má denosylace nežádoucí průběh, nebo došlo k degradaci intermediátu **5b(1,H,1)** během reakce s Fmoc-OSu, vyzkoušeli jsme další experiment. Výchozí látka **4b(1,f,1)** byla podrobena deprotekcí 4-Nos skupiny za vzniku příslušného produktu **5b(1,H,1)**, který byl následovně opětovně sulfonylován 4-Nos-Cl (Schéma 37).

Schéma 37: Denosylace a následná opětovná sulfonylace 4-Nos-Cl.



Z výsledků HPLC-MS analýzy bylo zjištěno, že kromě očekávaného produktu **4b(1,f,1)** (57%) došlo ke vzniku vedlejší látky, jejíž hmota odpovídala dealkylované sloučenině **3b(1,f)** (28%). Průběh denosylační reakce na Wang-piperazinovém linkeru popisuje následující Schéma 38.

Schéma 38: Průběh denosylační/re-sulfonylační reakce za vzniku vedlejšího produktu **2b(1)/3b(1,f)**.

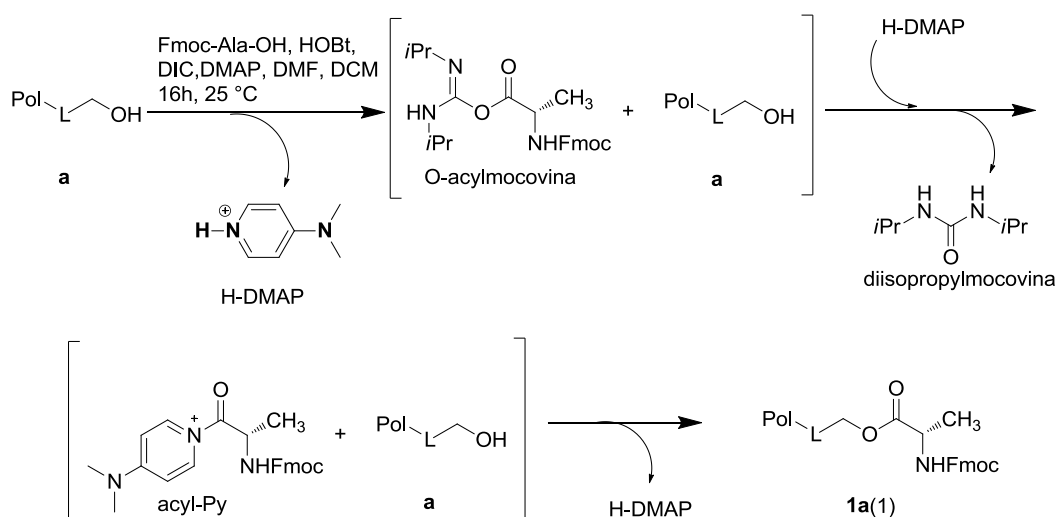


4.2 Reakce na Wangově/Wang-piperazinovém linkeru s využitím 2-nitrobenzensulfonyl chloridu

Za účelem vyhnout se vzniku dealkylovaného vedlejšího produktu **2b(1)**, byly připraveny nové deriváty na Wangově a Wang-piperazinovém linkeru tentokrát s využitím 2-nitrobenzensulfonyl chloridu (2-Nos-Cl). V následné reakční sekvenci pak byla testována deprotektce 2-Nos skupiny.

V první řadě bylo zapotřebí připravit Wangovu pryskyřici s vázaným alaninem přes esterovou vazbu. Pro tento účel byla použita komerční Wangova pryskyřice s koncovou hydroxyskupinou, která vystupuje v reakci Steglichova typu²⁴ jako slabší nukleofil (Schéma 39). Přídavek silné báze DMAP měl za následek odtržení protonu kyseliny a její navázání na DIC za vzniku O-acylmočoviny. Tento intermediát byl následně atakován protonizovanou bází (H-DMAP), ze které vzniká N-acylpyridinový derivát (acyl-Py), který dále interagoval s hydroxyskupinou Wangova linkeru a poskytl žádaný produkt **1a(1)**. HOBt se do reakce obvykle přidává jako lapač vysoce reaktivní O-acylmočoviny (tzv. scavenger), která podléhá vedlejšími reakcím a snižuje tak celkový výtěžek acylačního kroku.

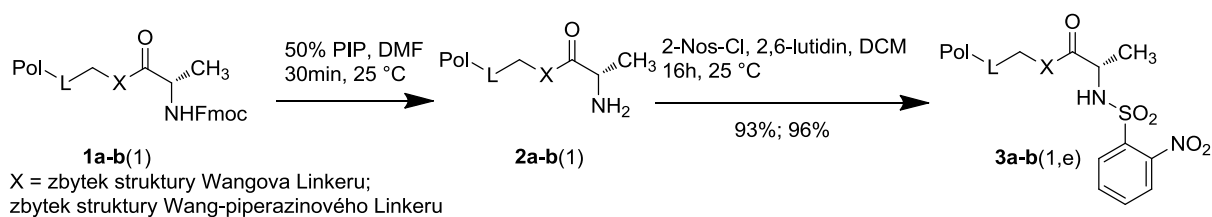
Schéma 39: Imobilizace Fmoc-alaninu na Wangovu pryskyřici.



Po navázání α -Fmoc-alaninu byla provedena kvantifikace pryskyřice metodou vnějšího standardu, přičemž byl stanoven loading pryskyřice na 0,59 mmol/g.

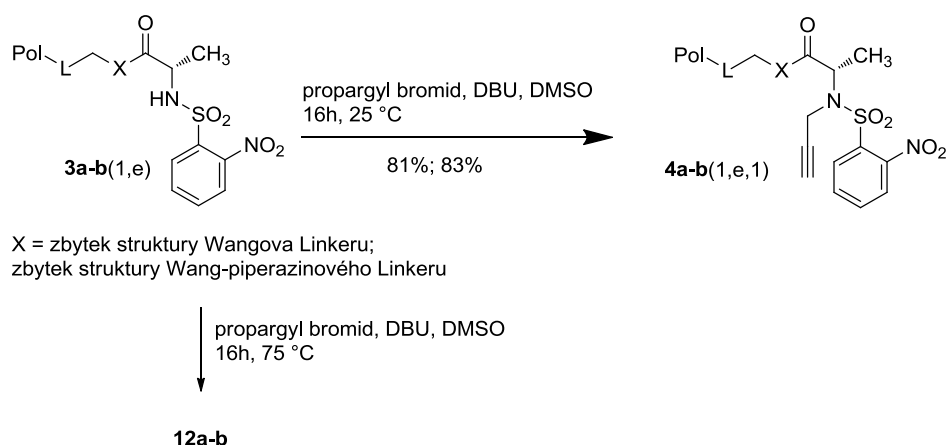
Další reakce byly následně prováděny paralelně jak na Wangově linkeru, tak Wang-piperazinovém linkeru připraveném v kapitole 4.1.1. Fmoc-aminoskupina výchozích látek byla standardně deprotekována 50% roztokem PIP v DMF (Schéma 40). Připravené intermediáty **2a(1)** a **2b(1)** s volnou primární aminoskupinou byly dále podrobeny reakcí s 2-Nos-Cl za stejných podmínek jako v případě 4-Nos-Cl, přičemž konverze této reakce byla 93% pro Wangův linker a 96% pro Wang-piperazinový linker.

Schéma 40: Deprotekce Fmoc skupiny a následná sulfonylace s 2-Nos-Cl.



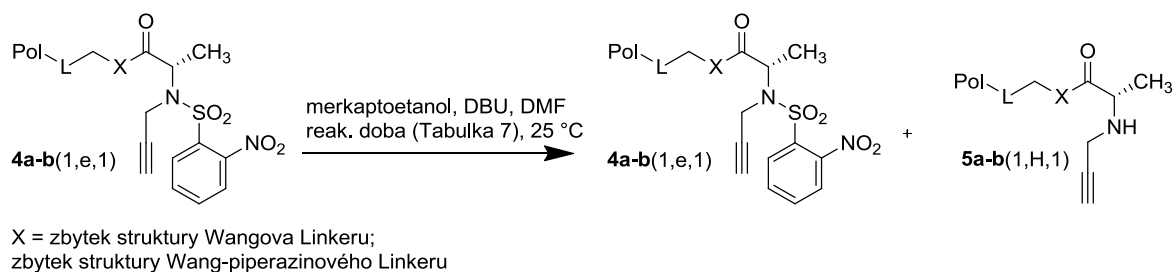
Dalším krokem byla Fukuyama alkylace s použitím propargyl bromidu provedená opět za stejných podmínek jako v případě reakce (Schéma 26, kapitola 4.1.5). V porovnání s 50% konverzí 4-nitrobenzensulfonamidu **3b(1,f)** (Kapitola 4.1.5, Schéma 26), vznikly intermediáty **4a(1,e,1)** a **4b(1,e,1)** v poměrně vysoké surové čistotě (>80%) (Schéma 41). Zvýšení reakční teploty překvapivě nevedlo k dalšímu zlepšení konverze reakce, ale naopak ke vzniku vedlejších produktů **12a** (95%) a **12b** (97%), které byly následně odštěpeny z pryskyřice, vyčištěny na semipreparativním HPLC a podrobeny NMR experimentům. Avšak přes veškerou snahu se doposud nepodařilo určit jejich strukturu.

Schéma 41: Syntéza derivátů **4a-b(1,e,1)** a **12a-b**(neznámé struktury).



Dalším krokem v reakční sekvenci byla deprotektce 2-Nos skupiny pomocí merkptoethanolu a DBU v DMF (Schéma 42). Při analýze produktů však bylo zjištěno, že denosylace téměř vůbec neprobíhá a ve směsi je přítomno více než 80% výchozí látky **4a-b(1,e,1)**. Na základě tohoto údaje bylo přistoupeno k optimalizaci časového parametru deprotektční reakce, kdy jsme nejdříve vyzkoušeli prodloužení reakčního času z 30 min postupně na 1, 2, 3 a 4 h. Surové čistoty výchozích látek jsou uvedeny v tabulce 7.

Schéma 42: Deprotektce 2-Nos skupiny.



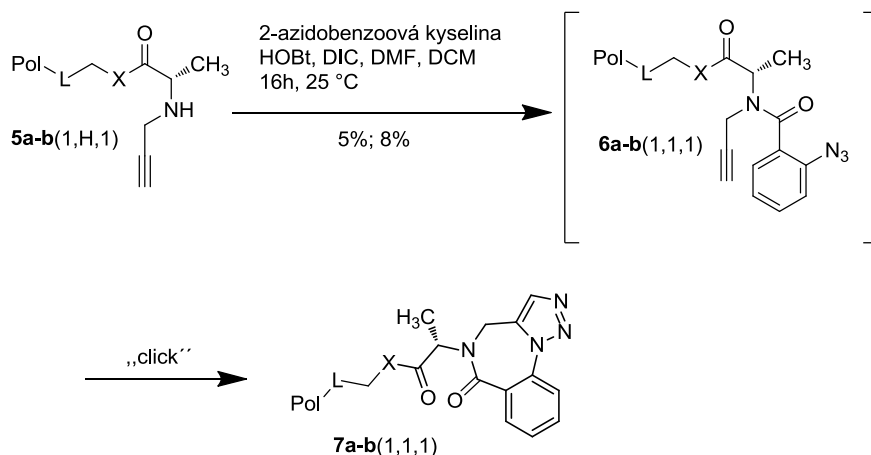
Tabulka 7: Výsledky optimalizací deprotektce.

Reakční doba	Surová čistota 4a(1,e,1) [%] ^a	Surová čistota 4b(1,e,1) [%] ^a
30 min	83	84
1h	64	67
2h	28	31
3h	8	9
4h	0	0

^aHPLC-UV (205 – 400 nm).

Po optimalizaci denosylační reakce bylo přistoupeno k testování acylačních reakcí s 2-azidobenzoovou kyselinou, kdy tato reakce byla provedena za podmínek popsanych ve Schématu 31 (kapitola 4.1.6). Bohužel i v případě látek **5a**(1,H,1) a **5b**(1,H,1) bylo dosaženo jen velmi nízké konverze na látky **7a**(1,1,1) (5%) a **7b**(1,1,1) (8%) (Schéma 43). Z časových důvodů bylo od dalšího testování upuštěno.

Schéma 43: Testování acylační reakce s 2-azidobenzoovou kyselinou.



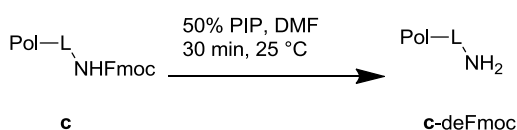
4.3 Reakce na Rink-amidovém linkeru

Ve snaze otestovat vliv linkerů na průběh reakcí v navržené sekvenci, byla v další fázi práce pro imobilizaci Fmoc-alaninu použita Rinkova pryskyřice.²⁹ Při alkylation příslušného sulfonamidu vzniklo značné množství vedlejšího produktu, který byl izolován a podroben NMR analýze, za účelem zjistit jeho strukturu.

4.3.1 Imobilizace Fmoc-alaninu na Rinkovu pryskyřici

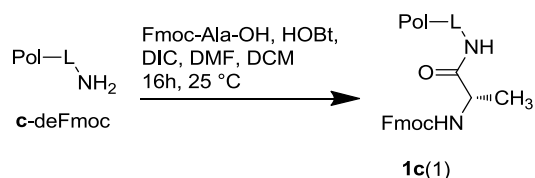
K syntéze byla použita komerčně dostupná pryskyřice s aminoskupinou chráněnou Fmocem. Pro účely imobilizace aminokyseliny, byla pryskyřice **c** opět nejdříve promyta DCM, dále DMF za následné deprotektce Fmoc skupiny 50% roztokem PIP v DMF (Schéma 44).

Schéma 44: Deprotektce Fmoc skupiny Rinkovy pryskyřice.



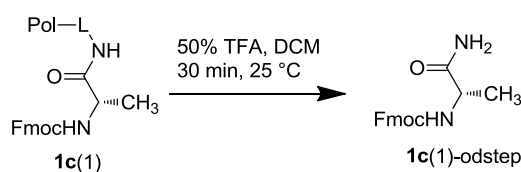
K pryskyřici byla poté přidána reakční směs Fmoc-alaninu, HOBt a DIC v 50% roztoku DMF a DCM (Schéma 45), přičemž reakce probíhala 16 h za laboratorní teploty. Alanin byl v tomto případě navázán na linker přes amidickou vazbu.

Schéma 45: Imobilizace Fmoc-alaninu na Rink-amidový linker.



Po ukotvení aminokyseliny na Rinkovu pryskyřici, byly odebrány dva vzorky polymeru o stejné hmotnosti, které byly následně standardně štěpeny (Schéma 46). Metodou vnějšího standardu byl následně zjištěn loading pryskyřice 0,58mmol/g.

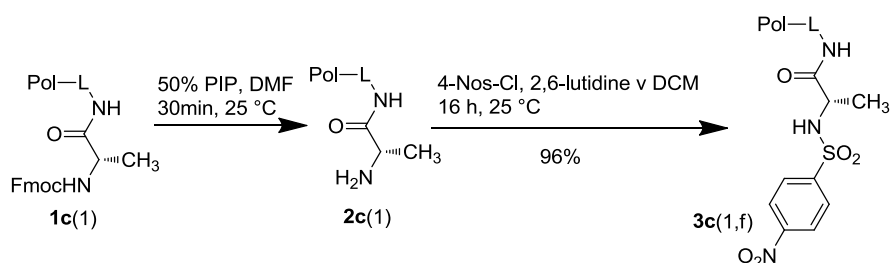
Schéma 46: Štěpení látky **1c(1)** z polymeru.



4.3.2 Deprotekce Fmoc skupiny a reakce s 4-Nos-Cl

Fmoc-alanin ukotvený na polymeru byl nejdříve zbaven Fmoc chránící skupiny dle standardního postupu a následně byl podroben reakci s 4-Nos-Cl opět za standardních podmínek při 25 °C popsaných ve Schématu 24 (kapitola 4.1.3). Na základě následné HPLC-MS analýzy byla zjištěna bezproblémová konverze reakce (96%).

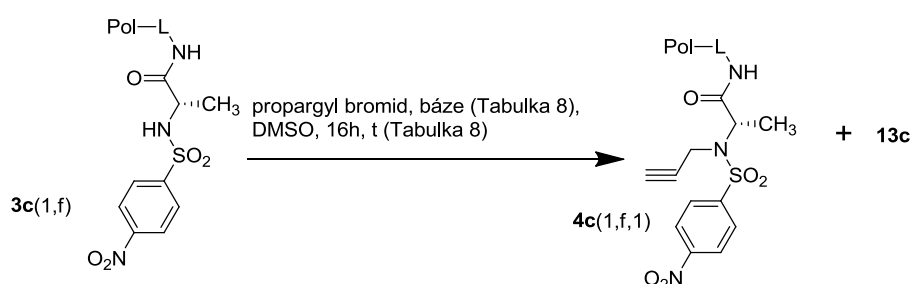
Schéma 47: Sulfonylace látky **2c(1)** 4-Nos-Cl.



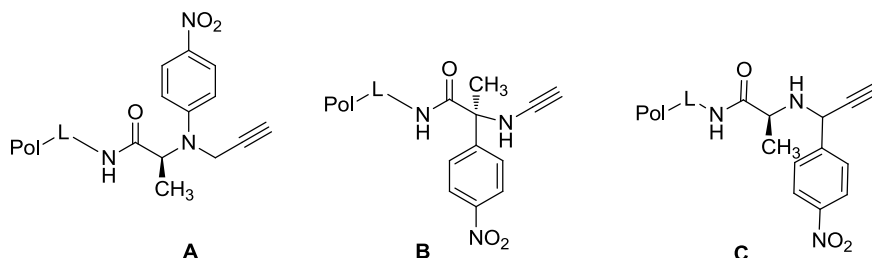
4.3.3 Alkylace sulfonamidu **3c(1,f)** propargyl bromidem

Po přípravě odpovídajícího sulfonamidu **3c(1,f)**, bylo přistoupeno k Fukuyama alkylationi propargyl bromidem (Schéma 48). K pryskyřici byla přidána reakční směs příslušného alkylačního činidla a DBU v DMSO. Po 16 h za laboratorní teploty vzniklo pouze 23% produktu **4c(1,f,1)** a vedlejší produkt **13c**, jehož předpokládané struktury (Obr. 4) byly navrženy na základě hmoty zjištěné z HPLC-MS záznamu a znalosti možných přesmyků sulfonamidů.²⁵

Schéma 48: Alkylace intermediátu **3c(1,f)** propargyl bromidem.



Obrázek 4: Navržené struktury vedlejšího produktu **13c**.



Vzhledem k tomu, že surová čistota produktu **4c(1,f,1)** byla poměrně nízká, byly dále vyzkoušeny optimalizace parametrů alkylační reakce zahrnující opakování alkylationi, zvýšení reakční teploty či změnu použité báze. Výsledky alkylačních reakcí shrnuje Tabulka 8.

Tabulka 8: Optimalizace parametrů alkylationi meziproductu **3c(1,f)**.

Báze	Teplota [°C]	Poměr 3c(1,f):4c(1,f,1):13c [%] ^a	Surová čistota 4c(1,f,1) [%] ^a
DBU	25	50:25:25	23
DBU	25	30:30:35	28 ^{op}
DBU	60	65:0:0	0
Protonová houba	25	60:0:0	0
DIEA	25	40:0:60	0

“HPLC-UV (205 – 400 nm); ^{op}opakování reakčního kroku pro zvýšení konverze reakce.

Provedené experimenty sice nevedly k pozitivnímu výsledku, nicméně při reakci s použitím DIEA vznikl vedlejší produkt **13c** ve větším množství (60%). Za účelem potvrdit jeho strukturu, byla látka izolována a přečištěna na semipreparativním HPLC. Pozdější NMR experimenty prokázaly, že se jedná o skelet **A** (Obr. 4) vznikající z produktu **4c**(1,f,1) N-arylací aminoskupiny za následné eliminace SO₂.

Vzhledem k tomu, že se nám nepodařilo vyřešit problematiku alkylace sulfonamidu **3c**(1,f) propargyl bromidem, bylo od dalších experimentů prováděných na Rink-amidovém linkeru upuštěno.

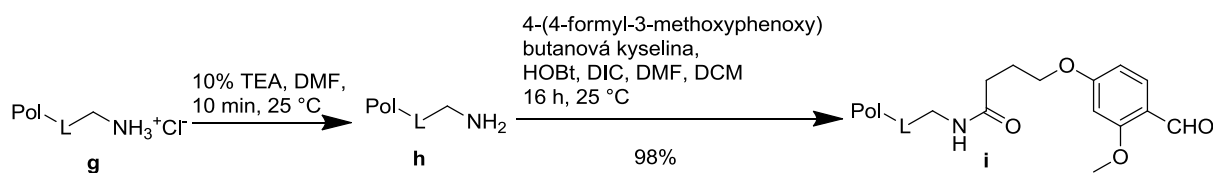
4.4 Reakce na aminomethylové pryskyřici s BAL

V poslední části práce jsme se věnovali aplikaci reakčního postupu na tzv. „backbone“ amidovém linkeru (BAL). V denosylačním kroku byla pozorována anomálie v podobě substituce nitroskupiny příslušného sulfonamidu merkptoethanolem. Nový produkt byl tedy izolován a analyzován pomocí NMR. Na základě NMR výsledků byly následně provedeny modifikace deprotektce 2/4-Nos skupiny.

4.4.1 Příprava pryskyřice s BAL

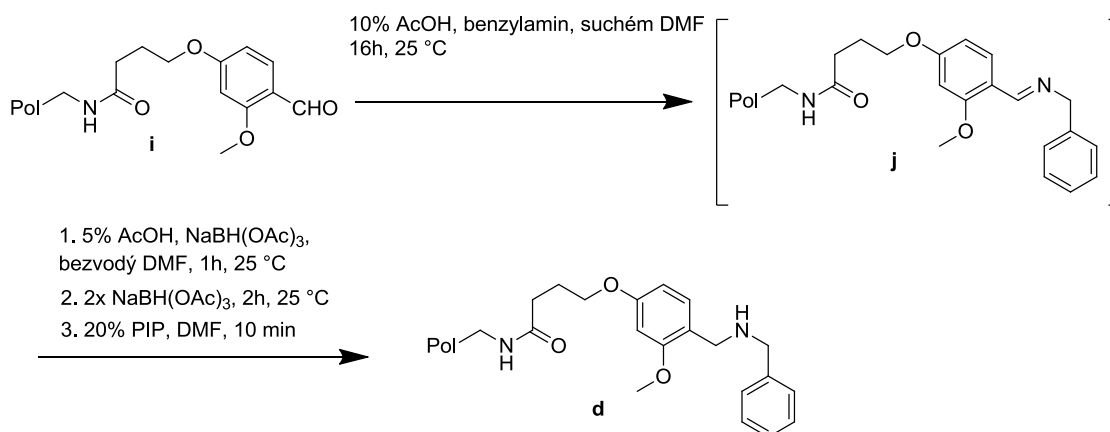
Jelikož je aminomethylová pryskyřice s vázaným BAL poměrně drahá, bylo potřeba pryskyřici připravit v laboratoři. Pro přípravu byla použita komerční aminomethylová pryskyřice ve formě hydrochloridu, který byl převeden na amin protřepáním pryskyřice s 10% roztokem triethylaminu (TEA) (Schéma 49). V dalším kroku byla na volnou aminoskupinu navázána 4-(4-formyl-3-methoxyphenoxy)butanová kyselina, která poskytla terminální aldehyd **i**. Po reakci byl proveden test na přítomnost primární aminoskupiny pomocí bromfenolové modře (BB-test), žluté zbarvení roztoku poukázalo na absenci primárního aminu.

Schéma 49: Příprava „backbone“ amidového linkeru (BAL).



K látce **i** byl následně přidán roztok benzylaminu v bezvodém DMF za vzniku Schiffovy báze **j**, která byla v dalším kroku podrobena reaktivní aminaci přidavkem roztoku $\text{NaBH}(\text{OAc})_3$ a octové kyseliny (AcOH) v bezvodém DMF (Schéma 50). V dalších 2 h byl ke směsi přisypán pevný $\text{NaBH}(\text{OAc})_3$ ve dvou porcích kvůli kompletní redukci dvojnás vazby. V poslední fázi přípravy linkeru byla přebytečná kyselina neutralizována 20% roztokem PIP v DMF po dobu 10 min.

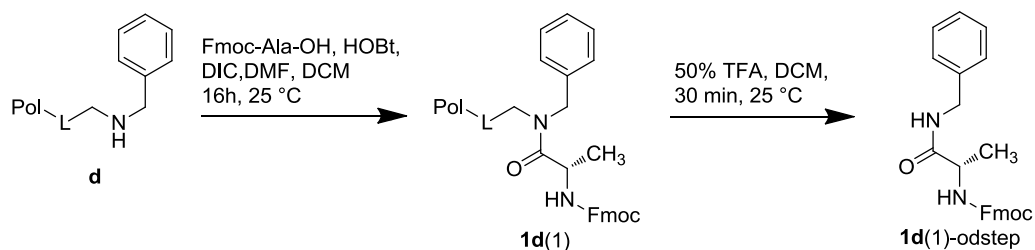
Schéma 50: Reduktivní aminace s benzylaminem.



4.4.2 Imobilizace Fmoc-alaninu na BAL a kvantifikace pryskyřice

K ukotvení Fmoc-alaninu přes amidovou vazbu byla i v tomto případě použita standardní metoda zmíněná v kapitole 4.1.2. Po imobilizaci Fmoc-aminokyseliny byla následně provedena kvantifikace pryskyřice metodou vnějšího standardu dle známého postupu (kapitola 5.7), přičemž loading polymeru byl spočítán na 0,56 mmol/g.

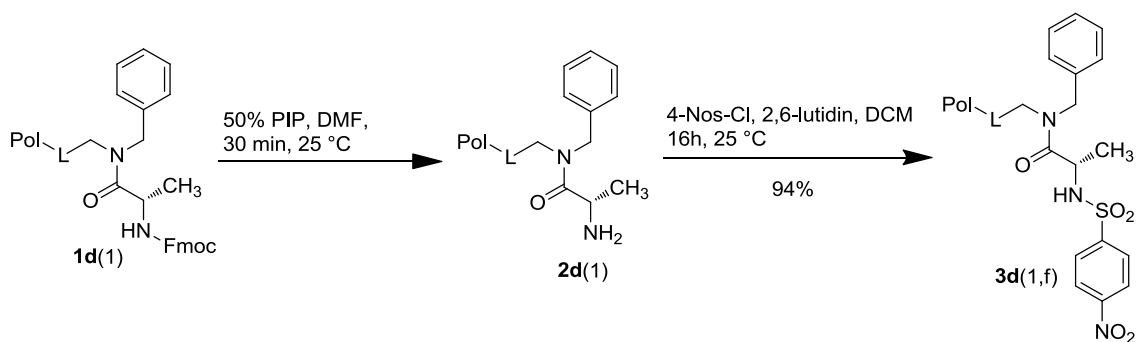
Schéma 51. Imobilizace Fmoc-alaninu a štěpení látky **1d(1)** z polymeru.



4.4.3 Odchránění Fmoc protektivní skupiny a následná reakce s 4-Nos-Cl

Po deprotekcí Fmoc skupiny následovala reakce s 4-Nos-Cl za vzniku sulfonamidu **3d(1,f)** (Schéma 52). Reakce probíhající za standardních podmínek při laboratorní teplotě poskytla požadovaný intermediát v surové čistotě 94%.

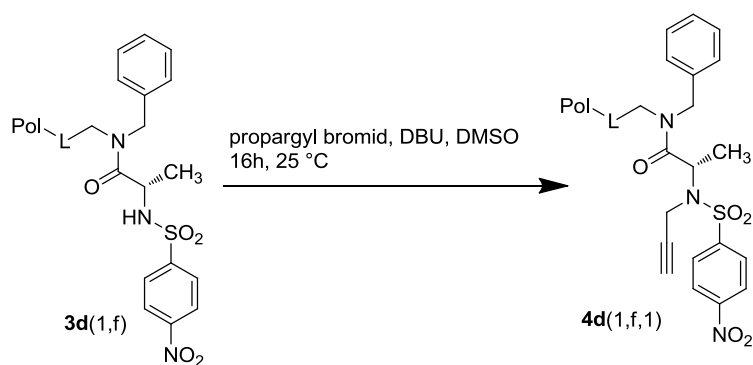
Schéma 52: Deprotekce Fmoc a následná sulfonylace s 4-Nos-Cl.



4.4.4 Alkylation sulfonamidu **3d(1,f)** propargyl bromidem

Příslušný sulfonamid **3d(1,f)** byl dále podroben reakci s roztokem propargyl bromidu v DMSO za laboratorní teploty (Schéma 53). Po 16 h bylo na základě HPLC-MS zjištěno, že alkylační reakce proběhla pouze s 45% konverzí. Problém nízké surové čistoty byl následně vyřešen opakováním alkylační reakce za stejných podmínek, kdy se konverze zvýšila na 85% (Tabulka 9), což bylo pro naše účely dostačující.

Schéma 53: Alkylation sloučeniny **3d(1,f)** propargyl bromidem.



Tabulka 9: Surová čistota produktu **4d(1,f,1)**.

Výchozí látka	Surová čistota 4d(1,f,1) [%] ^a
---------------	--

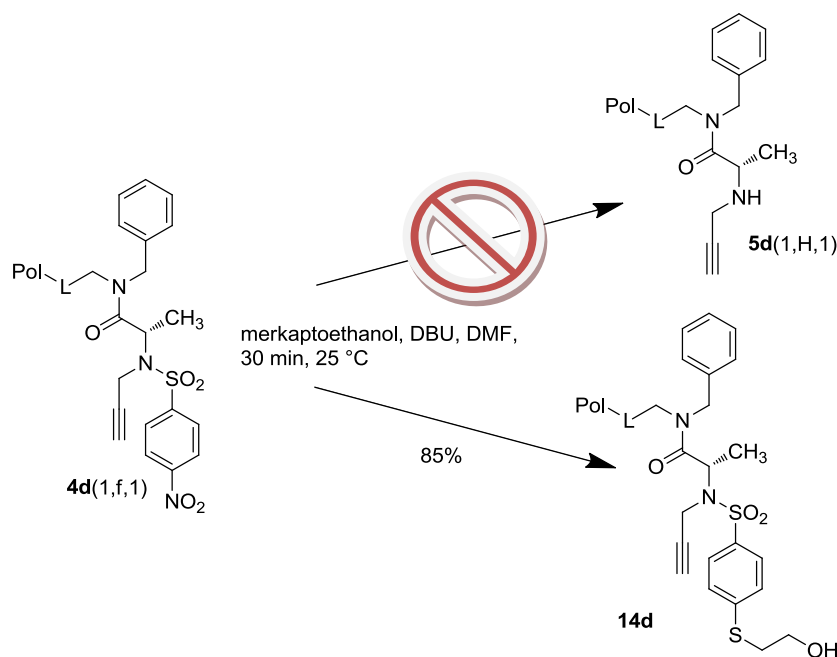
3d(1,f)	45
	85 ^{op}

^aHPLC-UV (205 – 400 nm); ^{op}opakování reakčního kroku pro zvýšení konverze reakce.

4.4.5 Denosylace 4-Nos skupiny

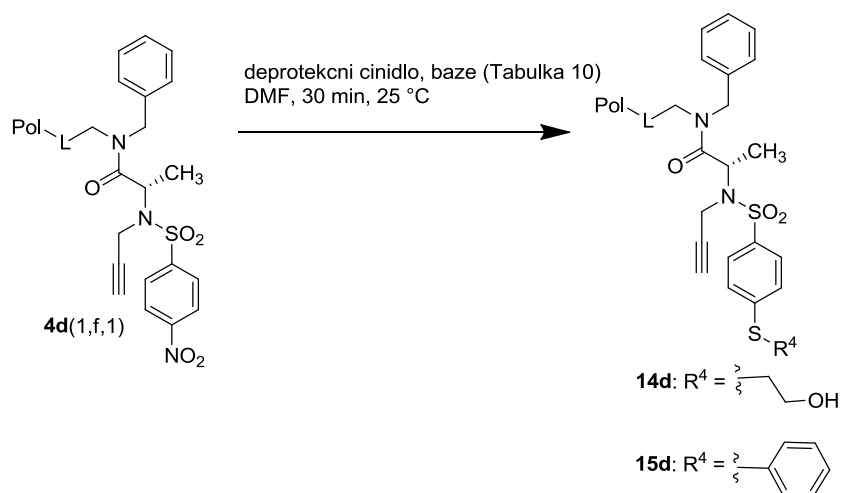
Abychom mohli pokračovat dále v syntéze, byla 4-Nos skupina látky **4d(1,f,1)** štěpena merkptoethanolem (Schéma 54). Následná HPLC-MS analýza prokázala, že požadovaný produkt **5d(1,f,1)** nevznikl vůbec, přičemž byla detekována pouze sloučenina **14d** v surové čistotě 85%. Pro potvrzení struktury byl vedlejší produkt **14d** připraven v preparativním množství, přečištěn na semipreparativním HPLC a následně podroben NMR analýze. Z výsledků bylo zjištěno, že při reakci došlo k substituci nitroskupiny merkptoethanolem přes atom síry. Podobný produkt byl již dříve popsán v literatuře.²⁶

Schéma 54: Deprotekce 4-Nos skupiny za vzniku vedlejšího produktu **14d**.



Na základě nových skutečností jsme se rozhodli obměnit podmínky denosylační reakce za účelem připravit cílový intermediát **5d(1,H,1)** a to záměnou DBU za propylamin a merkptoethanolu za thiofenol (Schéma 55). Z výsledků uvedených v Tabulce 10 plyne, že ani jeden z pokusů o přípravu produktu **5d(1,H,1)** nebyl úspěšný. Negativní výsledky optimalizačních reakcí nás vedly k vyzkoušení 2-Nos-Cl.

Schéma 55: Deprotekce 4-Nos skupiny s použitím jiného deprotečního činidla a báze.



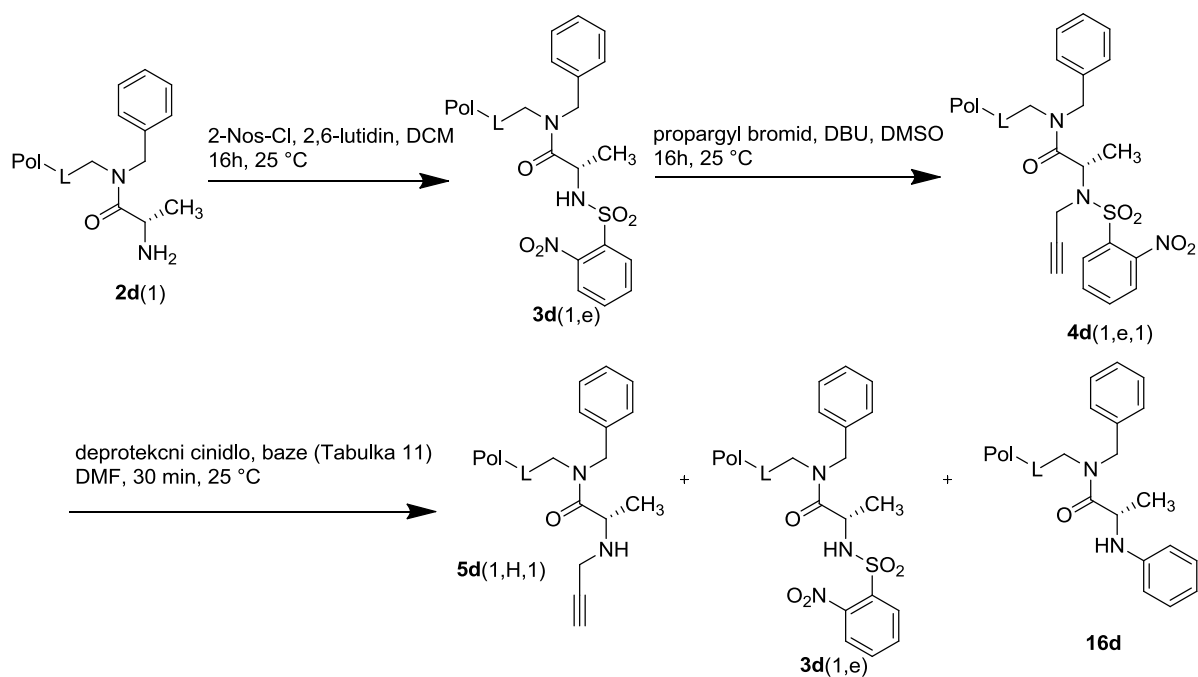
Tabulka 10: Surové čistoty látek **5d(1,H,1)**, **14d** a **15d** v závislosti na volbě deprotečního činidla a báze.

Deprotekční činidlo	Báze	Surová čistota 5d(1,H,1) [%] ^a	Surová čistota 14d [%] ^a	Surová čistota 15d [%] ^a
merkptoetanol	propylamin	0	92	-
thiofenol	DBU	0	-	74
thiofenol	propylamin	0	-	67

^aHPLC-UV (205 – 400 nm).

Meziprodukt **2d(1)** byl podroben reakci s 2-Nos-Cl a následné alkylaci s propargylbromidem (Schéma 56). Takto připravená sloučenina **4d(1,e,1)** byla dále reagována s příslušným deprotečním činidlem a bází. Po reakci s merkptoetanolem došlo k dealkylaci za opětovné tvorby intermediátu **3d(1,e)**, naopak při použití thiofenolu došlo ke vzniku zcela nového vedlejšího produktu s hmotou 254, jehož struktura sice nebyla prokázána pomocí NMR, ale mohla by odpovídat skeletu **16d**.

Schéma 56: Reakční postup na BAL s využitím 2-Nos-Cl



Tabulka 11: Surové čistoty výchozí látky **4d(1,e,1)** a vedlejších produktů **3d(1,e)** a **16d** v závislosti na použitém deprotekčním činidle a bázi.

Výchozí látka	Deprotekční činidlo	Báze	Surová čistota 4d(1,e,1) [%] ^a	Surová čistota 3d(1,e) [%] ^a	Surová čistota 16d [%] ^a
4d(1,e,1)	merkptoetanol	DBU	37	63	0
	merkptoetanol	propylamin	46	54	0
	thiofenol	DBU	48	0	52
	thiofenol	propylamin	53	0	47

^aHPLC-UV (205 – 400 nm).

5. Experimentální část

Pro syntézu na pevné fázi je nutností, aby byla pryskyřice dostatečně nabobtnaná a reaktanty měly snadný přístup k funkčním skupinám, na kterých probíhají reakce. Pro tento účel byly pryskyřice, umístěné v injekčních stříkačkách s polypropylenovou fritou, protřepávány v rozpouštědle s vysokou kapacitou bobtnání na laboratorním shakeru. Pro každou reakci byl použit desetinásobek objemu roztoku vůči navážce pryskyřice (pro 1 g pryskyřice bylo použito 10 ml reakčního roztoku).

5.1 Použité přístroje a metody

Acquility UHPLC-MS (Waters)

- hmotnostní spektrometr s jednoduchým kvadrupólem a PDA detektorem
- mobilní fáze : 0,1% octan amonný v H₂O:AcCN; lineární gradient z 20 % na 80 % AcCN po dobu 2,5 min, poté ekvilibrace kolony 20% AcCN po dobu 1 minuty
- průtok 0,6 ml/min
- X Select kolona (HSS T3; 2,5 mikronů)
- další parametry: odpařovací teplota 400 °C, kapilární teplota 200 °C

Semipreparativní HPLC Breeze

- separace na základě specifických absorbcí v UV-VIS oblasti
- mobilní fáze: 0,1% octan amonný v H₂O:AcCN
- průtok 20 ml/min
- YMC kolona (YMC Pack ODS-A, 5µm, 100x20 mm)

NMR JEOL (500 MHz), JEOL (400 MHz)

- měření spekter v d₆ DMSO (při 23 °C)
- chemický posun v ppm, interakční konstanty v Hz

Lyofilizátor SCANVAC

- k odstranění zbytků rozpouštědel (AcCN, H₂O, DMSO) z výsledného vzorku

Mikrovlnný reaktor

- Discover Benchmate (CEM Microwave Technology Ltd.)

5.2 Proces standardního štěpení vzorku z pryskyřice

Pro zhodnocení kvalitativního průběhu reakce bylo nutné provést HPLC-MS analýzu. Za tímto účelem byl produkt reakce odštěpen z polymerního nosiče pomocí 50% roztoku TFA v DCM. K analýzám byl odebrán malý vzorek pryskyřice (5 - 10 mg), ke kterému byla přidána štěpící směs (1 ml). Po 30 min třepání byl vzorek odpařen pod proudem dusíku a vzniklý odparek byl následně rozpuštěn v MeOH (1 ml). Methanolický roztok (0,5 ml) byl posléze přefiltrován do vialky určené pro autosampler HPLC-MS a naředěn vodou (0,5 ml).

5.3 Příprava Wang-piperazinového linkeru (b)

Do stříkačky byla odvážena Wangova pryskyřice **a** (1 g), která byla následně nabobtnána v DCM. Posléze byl k pryskyřici přidán roztok CDI (810 mg) a Py (400 μ l) v DCM (10 ml). Reakční směs byla třepána 2 h při teplotě 25 °C a po ukončení reakce byla pryskyřice promyta 5x DCM. Následně byl k pryskyřici přidán roztok piperazinu (431 mg) v DCM (10 ml). Reakční směs byla třepána 3 h při teplotě 25 °C, poté byla reakční směs vymyta 5x DCM.

5.4 Příprava Rinkovi pryskyřice (c)

Komerční Rinkova pryskyřice (1 g) chráněná Fmoc skupinou na aminoskupině byla odvážena do stříkačky, následně byla pryskyřice bobtnána v DCM a poté byl přidán 50% roztok PIP v DMF (10 ml). Reakční směs byla třepána 30 min při teplotě 25 °C, nakonec byla pryskyřice **c** promyta 3x DMF a 3x DCM.

5.5 Příprava „Backbone“ amidového linkeru (d)

Do stříkačky byla odvážena aminomethylová pryskyřice **g** ve formě hydrochloridu (1 g), ta byla nejdříve nabobtnána v DCM a následně byl přidán 10% roztok TEA v DMF (10 ml). Reakční směs byla třepána 10 min při teplotě 25 °C, poté byla pryskyřice promyta 3x DMF a 3x DCM. K pryskyřici **h** byl dále přidán roztok 4-(4-formyl-3-methoxyphenoxy)butanové kyseliny (371 mg), HOBt (239 mg) a DIC (420 μ l) v DMF (5 ml) a DCM (5 ml). Reakční směs byla třepána 16 h při teplotě 25 °C, posléze byla pryskyřice promyta 3x DMF a 3x DCM. Po reakci byl proveden test s bromfenolovou modří na přítomnost primární aminoskupiny: Vzorek pryskyřice (5 mg) byl umístěn do Eppendorfovy zkumavky a následně k němu byl přidán DCM (0,5 ml) a bromfenolová modř (10 μ l).

Absence modrého zbarvení potvrdila navázání kyseliny na polymer. Dále byla pryskyřice (**i**) promyta 3x bezvodým DMF a 3x bezvodým THF, následně byl přidán roztok 10% AcOH a benzylaminu (342 μ l) v bezvodém DMF (10 ml), přičemž reakční směs byla třepána 16 h při teplotě 25 °C. Na druhý den byl k pryskyřici (**j**) přidán roztok 5% AcOH a NaBH(OAc)₃ (212 mg) v bezvodém DMF (5 ml), reakční směs byla třepána ve vertikální poloze s jehlou umístěnou těsně pod pístem po dobu 1 h. Posléze byl do reakční směsi přisypán pevný NaBH(OAc)₃ (212 mg) a směs byla třepána opět 1 h. V poslední fázi byla přisypána poslední dávka NaBH(OAc)₃ (212 mg), přičemž směs byla třepána další 2 h. Po ukončení reakce byla pryskyřice promyta 3x DMF, dále k ní byl přidán 20% roztok PIP v DMF (10 ml) a reakční směs byla třepána 10 min při teplotě 25 °C. Nakonec byla pryskyřice **d** promyta 3x DMF a 3x DCM.

5.6 Imobilizace aminokyselin na pryskyřici: 1a-d(1-10)

Pryskyřice **a-d** (1 g) byla promyta 3x DCM, poté byl přidán roztok Fmoc- α -aminokyseliny 1-10 (2 mmol; Tabulka 12), HOBt (2 mmol; 306 mg), DIC (2 mmol; 310 μ l) v DMF (5 ml) a DCM (5 ml). Reakční směs byla třepána 16 h při teplotě 25 °C a poté byla promyta 3x DMF a 3x DCM. Pro imobilizaci kyselin na Wangovu pryskyřici **a** byl k reakční směsi přidán navíc DMAP (0,5 mmol; 60 mg).

Tabulka 12: Vypočtení navážka použitých Fmoc-aminokyselin.

Aminokyselina	Navážka [mg]
Ala	622
Ser	766
Lys	936
Phe	774
Glu	850
Asp	822
Tyr	918
Val	678
Leu	706
Ile	706

5.7 Kvantitativní zhodnocení průběhu imobilizace aminokyselin

Definované množství pryskyřice **1a-d**(1-10) (2x10 mg) bylo podrobena dříve popsanému standardnímu štěpení. Oba vzorky spolu s vnějším standardem Fmoc-Ala (0,5 mg/ml) byly podrobena HPLC-MS analýze. Na základě výsledků analýz a jednoduchého výpočtu (Obr. 5)²⁷ byl zjištěn loading pryskyřic (Tabulka 13).

Obrázek 5: Výpočet loadingu pryskyřice.

$$\eta(\%) = \frac{\left(n_{Fmoc.Ala} \cdot \frac{\bar{X}_{SP}}{X_{Fmoc.Ala}} \right) \cdot 100}{l_A}$$

$n_{Fmoc.Ala}$ látkové množství standardu Fmoc-Ala odpovídající 1 mg (mmol/mg)

\bar{X}_{SP} průměr ploch píku dvou měření 10 mg imobilizované pryskyřice

$X_{Fmoc.Ala}$ plocha píku 1 mg standardu Fmoc-Ala

l_A loading imobilizované pryskyřice za podmínky 100% výtěžku (mmol/g)

Tabulka 13: Vypočtený loading použitých pryskyřic.

Pryskyřice	Loading [mmol/g]
1a(1)	0,59
1b(1)	0,64
1b(2)	0,47
1b(3)	0,56
1b(4)	0,43
1b(5)	0,51
1b(6)	0,54
1b(7)	0,60
1b(8)	0,46
1b(9)	0,53
1b(10)	0,55
1c(1)	0,58
1d(1)	0,56

5.8 Deprotekční reakce a následná nosylace: **3a-d(1-10,e-f)**

Pryskyřice **1a-d(1-10)** (1 g) byla promyta 3x DMF, následně byl přidán 50% roztok PIP v DMF (10 ml). Reakční směs byla třepána 30 min při teplotě 25 °C a pryskyřice poté byla promyta 3x DMF a 3x DCM. K pryskyřicím **2a-d(1-10)** (250 mg) byl následně přidán roztok 2/4-Nos-Cl (0,75 mmol; 166 mg), 2,6-lutidinu (0,75 mmol; 95 µl) v DCM (2,5 ml). Reakční směs byla třepána 16 h při teplotě 25 °C a po ukončení reakce byla pryskyřice promyta 5x DCM.

5.9 Alkylace sulfonamidů propargyl bromidem **4a-d(1-10,e-f,1)**

Pryskyřice **3a-d(1-10,e-f)** (250 mg) byla promyta 3x DCM a 3x DMSO. Následně byl přidán roztok propargyl bromidu (2,50 mmol; 280 µl) a DBU (1,67 mmol; 375 µl) v DMSO (2,5 ml). Reakční směs byla třepána 16 h při teplotě 25°C, poté byla pryskyřice promyta 3x DMSO a 3x DCM.

Optimalizace reakčních podmínek:

Pro **3b(1,f)** – výše uvedený reakční postup byl nejdříve opakován, dále byla alkylační reakce provedena za zvýšené teploty při 55 °C, 75 °C a 100 °C, kdy nejlepších výsledků bylo dosaženo při reakční teplotě 75 °C (Tabulka 1). Tyto podmínky byly následně aplikovány na pryskyřice **3b(2-10,f)**, **3a(1,e)** a **3b(1,e)** (Tabulka 2).

Pro **3b(8,f)** – byla reakce provedena za zvýšené teploty při 100 °C, dále pak byla reakce provedena v mikrovlnném reaktoru za podmínek – 120 °C, 5 min; 120 °C, 1 h; 120 °C 2 h; 120 °C, 18 h; 90 °C, 18 h; 90 °C, 48 h při výkonu 200 wattů (Tabulka 3).

Pro **3c(1,f)** – byla alkylace opakována dle podmínek uvedených v kapitole (5.9), dále byla reakce provedena při 60 °C, nebo s použitím různých bází (Tabulka 14).

Tabulka 14: Vypočtený objem použitých bází.

Báze	Přídavek
DIEA	125 µl
Protonová houba	357 mg

Pro **3d(1,f)** - byla alkylace opakována dle podmínek uvedených v kapitole (5.9), (Tabulka 9).

5.10 Alkylace sulfonamidu deriváty propargyl bromidu 4b(1,f,2-4)

Pryskyřice **3b(1,f)** (450 mg) byla promyta 3x DCM a 3x DMSO a rozdělena na 9 dílů (50 mg). Následně byl přidán roztok derivátu propargyl bromidu (0,50 mmol; 63 μ l) a DBU (0,334 mmol; 75 μ l) v DMSO (0,5 ml). Reakční směs byla třepána 16 h při teplotě 75 °C, po ukončení reakce byla pryskyřice promyta 3x DMSO a 3x DCM. Reakce byla posléze optimalizována a provedena při teplotě 100 °C. Pro 4-brom-1-butyn byla reakce provedena také v mikrovlnném reaktoru při teplotě 120 °C a reakčním čase 5 min, 1 a 2 h (Tabulka 4).

5.11 Alkylace sulfonamidu propargyl alkoholem – Mitsunobu reakce 4b(1,f,1)

Pryskyřice **3b(1,f)** (250 mg) byla promyta 3x DCM, 3x THF a 3x bezvodým THF. K pryskyřici byl přidán roztok propargyl alkoholu (0,5 mmol; 36,5 μ l) a PPh₃ (0,5 mmol; 164 mg) v bezvodém THF (2,5 ml). Do druhé stříkačky byl připraven roztok DIAD (0,5 mmol; 123 μ l) v bezvodém THF (625 μ l). Obě stříkačky byly propojeny spojkou a vloženy na 30 min do mrazáku, roztok DIAD byl poté přetlačen do stříkačky s pryskyřicí a reakční směs byla třepána 2 h. Pryskyřice byla poté promyta 3x THF a 3x DCM.

5.12 Denosylace sulfonamidů 5a-d(1-10,H,1-2)

Pryskyřice **4a-d(1-10,e-f,1-2)** (250 mg) byla promyta 3x DCM a 3x DMF, následně byl přidán roztok merkaptoetanolu (1,80 mmol; 126 μ l) a DBU (0,60 mmol; 90 μ l) v DMF (3ml), reakční směs byla třepána 30 min při teplotě 25 °C. Poté byla pryskyřice promyta 3x DMF a 3x DCM.

Optimalizace denosylační reakce:

Pro **4a-b(1,e,1)** – byl reakční čas denosylace prodloužen na 1, 2, 3 až 4 h (Tabulka 7).

Pro **4d(1,e-f,1)** – byla denosylační reakce provedena také s použitím jiného deprotekčního činidla a báze (Tabulka 15).

Tabulka 15: Vypočtený objem použitého deprotekčního činidla a báze.

Deprotekční činidlo	Přídavek	Báze	Přídavek
Merkaptoetanol	126 μ l	DBU	90 μ l
Thiofenol	198 μ l	Propylamin	50 μ l

5.13 Acylace 2-azidobenzoovými kyselinami 8a-d(1-10,1-2,1-5)

K pryskyřici **5a-d**(1-10,H,1-2) byl následně přidán roztok 2-azidobenzoové kyseliny nebo jejího derivátu (0,75 mmol; Tabulka), HOBt (0,68 mmol; 103 mg) a DIC (0,75 mmol; 116 μ l) v DMF/DCM (2,5 ml), reakční směs byla třepána 16 h při teplotě 25 °C. Po ukončení reakce byla pryskyřice promyta 5x DCM.

Tabulka 16: Vypočítané navážky azidobenzoových kyselin.

Azidobenzoová kyselina	Navážka [mg]
2-azidobenzoová kyselina	122
3-methyl-2-azidobenzoová kyselina	133
3-methoxy-2-azidobenzoová kyselina	145
3,5-dibrom-2-azidobenzoová kyselina	240
5-chlor-2-azidobenzoová kyselina	148

5.14 Testování kvality skladovaných 2-azidobenzoových kyselin 11a(11,1,1)

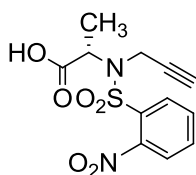
K pryskyřici **10a**(1,H,1) (250mg) byl přidán roztok 2-azidobenzoové kyseliny (0,75 mmol; 122 mg), HOBt (0,68 mmol; 103 mg) a DIC (0,75 mmol; 116 μ l) v DMF/DCM (2,5 ml), reakční směs byla třepána 16 h při teplotě 25 °C. Pryskyřice byla poté promyta 5x DCM.

5.15 Sulfonylace 2-azidobenzensulfonyl chloridem 8b(1,1,6)

K pryskyřici **5b**(1,H,1) byl následně přidán roztok 2-azidobenzensulfonyl chloridu (0,75 mmol; 163 mg), 2,6-lutidinu (0,75 mmol; 95 μ l) v DCM (2,5 ml). Reakční směs byla třepána 16 h při teplotě 25 °C a pryskyřice byla poté promyta 5x DCM.

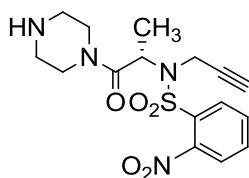
6. Analytická data

(S)-2-(2-nitrophenylsulfonamido)-N-(prop-2-yn-1-yl)propanová kyselina 4a(1,e,1)



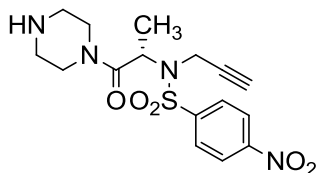
$[M + H]^+ = 313,30$; $rt = 1.35$; surová čistota 81%

(S)-2-nitro-N-(1-oxo-1-(piperazin-1-yl)propan-2-yl)-N-(prop-2-yn-1-yl)benzenesulfonamid 4b(1,e,1)



$[M + H]^+ = 381,42$; $rt = 1.79$; surová čistota 83%

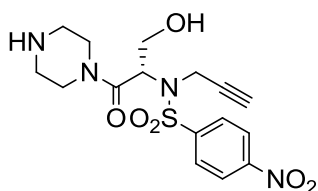
(S)-4-nitro-N-(1-oxo-1-(piperazin-1-yl)propan-2-yl)-N-(prop-2-yn-1-yl)benzenesulfonamid 4b(1,f,1)



$[M + H]^+ = 381,42$; $rt = 1.86$; surová čistota 96%; výtěžek 32,5 mg (53%)

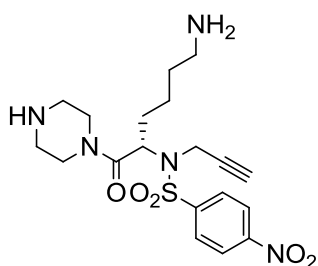
$^1\text{H NMR}$ (400 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) δ ppm 1.22 (d, $J=6.7$ Hz, 3 H), 2.65 (m, 4 H), 3.14 (t, $J=2.6$ Hz, 1 H), 3.36 (m, 4 H), 4.29 (ddd, $J=36.3, 17.6, 2.6$ Hz, 2 H), 5.02 (q, $J=7.3$ Hz, 1 H), 6.03 (br. s., 1 H), 8.14 (m, 2 H), 8.39 (m, 2 H). $^{13}\text{C NMR}$ ($\text{DMSO-}d_6$) δ ppm 15.86, 34.00, 42.29, 44.91, 45.56, 45.90, 51.45, 75.00, 80.32, 118.79, 124.45, 129.03, 145.12, 149.93, 158.05, 158.36, 168.16.

(S)-N-(3-hydroxy-1-oxo-1-(piperazin-1-yl)propan-2-yl)-4-nitro-N-(prop-2-yn-1-yl)benzenesulfonamid 4b(2,f,1)



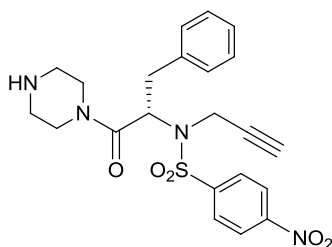
$[M + H]^+ = 397,42$; $rt = 1.66$; surová čistota 87%

(S)-N-(6-amino-1-oxo-1-(piperazin-1-yl)hexan-2-yl)-4-nitro-N-(prop-2-yn-1-yl)benzenesulfonamid 4b(3,f,1)



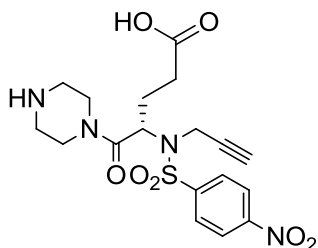
$[M + H]^+ = 437,91$; $rt = 1.78$; surová čistota 72%

(S)-4-nitro-N-(1-oxo-3-phenyl-1-(piperazin-1-yl)propan-2-yl)-N-(prop-2-yn-1-yl)benzenesulfonamid 4b(4,f,1)



$[M + H]^+ = 457,51$; $rt = 2.64$; surová čistota 72%

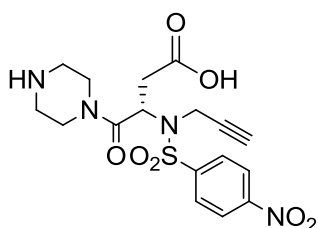
(S)-4-(4-nitro-N-(prop-2-yn-1-yl)phenylsulfonamido)-5-oxo-5-(piperazin-1-yl)pentanová kyselina 4b(5,f,1)



$[M + H]^+ = 439,45$; $rt = 3.12$ (pomalý gradient); surová čistota 82%; výtěžek 17,9 mg (32%)

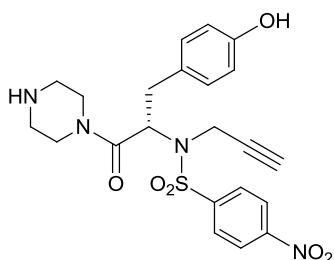
^1H NMR (400 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) δ ppm 1.70 - 1.89 (m, 2 H) 2.19 - 2.31 (m, 2 H) 2.54 - 2.76 (m, 4 H) 3.05 - 3.19 (m, 1 H) 3.22 (t, $J=2.60$ Hz, 1 H) 3.24 - 3.35 (m, 1 H) 3.41 - 3.64 (m, 2 H) 4.42 (ddd, $J=67.99, 19.72, 3.11$ Hz, 3 H) 4.91 (dd, $J=9.60, 5.45$ Hz, 1 H) 8.06 - 8.14 (m, 2 H) 8.35 - 8.42 (m, 2 H). ^{13}C NMR (100 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) δ ppm 21.28, 30.11, 33.98, 42.14, 44.95, 45.61, 45.86, 54.37, 75.04, 80.15, 124.43, 128.76, 128.87, 144.66, 149.85, 167.93.

(S)-5-(4-nitro-N-(prop-2-yn-1-yl)phenylsulfonamido)-6-oxo-6-(piperazin-1-yl)butanová kyselina 4b(6,f,1)



$[\text{M} + \text{H}]^+ = 424,43$; $rt = 3.08$ (pomalý gradient); surová čistota 78%

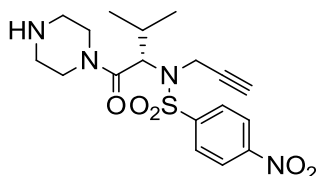
(S)-N-(3-(4-hydroxyphenyl)-1-oxo-1-(piperazin-1-yl)propan-2-yl)-4-nitro-N-(prop-2-yn-1-yl)benzenesulfonamid 4b(7,f,1)



$[\text{M} + \text{H}]^+ = 473,51$; $rt = 2.13$; surová čistota 68%; výtěžek 34,7 mg (49%)

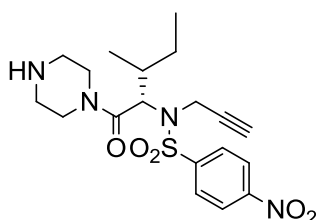
^1H NMR (400 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) δ ppm 2.30 (m, 1 H), 2.60 (m, 1 H), 2.69 (dd, $J=13.5, 5.7$ Hz, 1 H), 2.80 (m, 2 H), 3.02 (dd, $J=13.5, 9.3$ Hz, 1 H), 3.20 (t, $J=2.3$ Hz, 1 H), 3.29 (m, 2 H), 3.43 (m, 2 H), 4.47 (ddd, $J=96.0, 19.2, 2.6$ Hz, 2 H), 4.94 (dd, $J=9.3, 5.7$ Hz, 1 H), 6.62 (d, $J=8.8$ Hz, 2 H), 6.97 (d, $J=8.8$ Hz, 2 H), 8.08 (m, 2 H), 8.37 (m, 2 H), 9.36 (br. s., 1 H). ^{13}C NMR (100MHz, $\text{DMSO-}d_6$) δ ppm 34.04, 35.18, 40.43, 43.55, 43.80, 44.01, 55.66, 75.50, 79.90, 115.18, 124.45, 125.57, 128.87, 130.53, 144.78, 149.91, 156.41, 167.51.

(S)-N-(4-methyl-1-oxo-1-(piperazin-1-yl)butan-2-yl)-4-nitro-N-(prop-2-yn-1-yl)benzenesulfonamid 4b(8,f,1)



$[M + H]^+ = 409,47$; $rt = 2.43$; surová čistota 83%

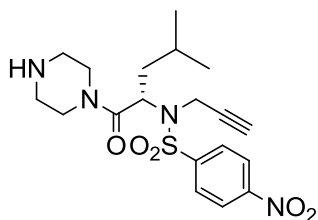
(N-((2S,3S)-3-methyl-1-oxo-1-(piperazin-1-yl)pentan-2-yl)-4-nitro-N-(prop-2-yn-1-yl)benzenesulfonamid 4b(9,f,1)



$[M + H]^+ = 423,50$; $rt = 2.47$; surová čistota 68%; výtěžek 22,4 mg (40%)

1H NMR (400 MHz, DMSO- d_6) δ ppm 0.76 (m, 6 H), 0.89 (m, 2 H), 1.43 (m, 1 H), 1.83 (m, 2 H), 3.04 (m, 4 H), 3.58 (m, 1 H), 3.78 (m, 1 H), 3.96 (m, 1 H), 4.33 (dd, $J=18.9, 2.3$ Hz, 1 H), 4.49 (d, $J=10.9$ Hz, 1 H), 4.73 (dd, $J=19.2, 2.1$ Hz, 1 H), 7.20 (br. s., 1 H), 8.14 (d, $J=8.8$ Hz, 2 H), 8.42 (d, $J=8.8$ Hz, 2 H). ^{13}C NMR (100 MHz, DMSO- d_6) δ ppm 10.66, 14.30, 24.71, 33.52, 35.18, 37.97, 42.64, 42.68, 43.15, 57.4, 74.94, 79.37, 124.41, 128.91, 144.87, 149.97, 158.17, 158.47, 168.83.

(S)-N-(4-methyl-1-oxo-1-(piperazin-1-yl)pentan-2-yl)-4-nitro-N-(prop-2-yn-1-yl)benzenesulfonamid 4b(10,f,1)

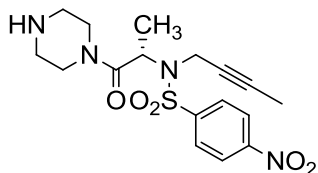


$[M + H]^+ = 423,50$; $rt = 2.49$; surová čistota 68%; výtěžek 26,3 mg (45%)

1H NMR (400 MHz, DMSO- d_6) δ ppm 0.87 (d, $J=6.7$ Hz, 6 H), 1.48 (m, 2 H), 1.69 (m, 1 H), 2.70 (m, 2 H), 2.87 (m, 2 H), 3.25 (m, 3 H), 3.47 (m, 2 H), 4.38 (ddd, $J=62.8, 18.7, 2.1$ Hz, 3 H), 4.73 (dd, $J=9.3, 5.2$ Hz, 1 H), 8.12 (d, $J=8.8$ Hz, 2 H), 8.41 (d, $J=8.8$ Hz, 2 H). ^{13}C NMR

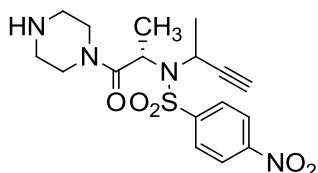
(100MHz, DMSO-*d*₆) δ ppm 22.93, 24.83, 34.64, 38.58, 41.23, 44.53, 45.09, 53.97, 75.12, 80.82, 124.97, 129.44, 144.86, 150.45, 158.40, 158.71, 168.41.

(S)-N-(but-2-yn-1-yl)-4-nitro-N-(1-oxo-1-(piperazin-1-yl)propan-2-yl)benzenesulfonamid
4b(1,f,2)



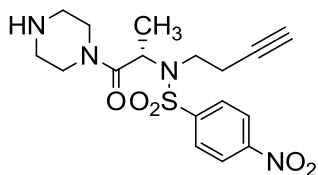
[M + H]⁺ = 395,45; rt = 2.05; surová čistota 91%

N-(but-3-yn-2-yl)-4-nitro-N-((S)-1-oxo-1-(piperazin-1-yl)propan-2-yl)benzenesulfonamid
4b(1,f,3)



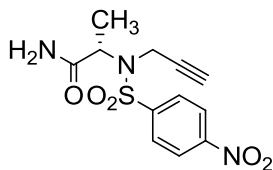
[M + H]⁺ = 395,45; rt = 2.20; surová čistota 12%

(S)-N-(but-3-yn-1-yl)-4-nitro-N-(1-oxo-1-(piperazin-1-yl)propan-2-yl)benzenesulfonamid
4b(1,f,4)



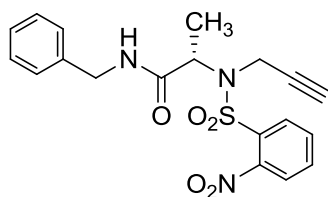
[M + H]⁺ = 395,45; rt = 2.35; surová čistota 7%

(S)-2-(4-nitro-N-(prop-2-yn-1-yl)phenylsulfonamido)propanamid 4c(1,f,1)



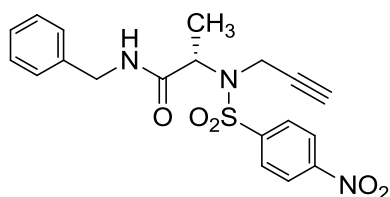
[M + H]⁺ = 312,31; rt = 2.06; surová čistota 30%

(S)-2-(2-nitro-N-(prop-2-yn-1-yl)phenylsulfonamido)-N-phenylpropanamid 4d(1,e,1)



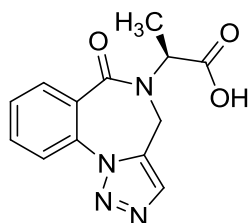
[M + H]⁺ = 402,44; rt = 2.98; surová čistota 82%

(S)-2-(4-nitro-N-(prop-2-yn-1-yl)phenylsulfonamido)-N-phenylpropanamid 4d(1,f,1)



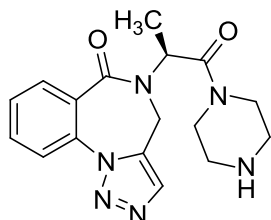
[M + H]⁺ = 402,44; rt = 3.03; surová čistota 85%

(S)-2-(6-oxo-4H-benzo[f][1,2,3]triazolo[1,5-a][1,4]diazepin-5(6H)-yl)propanová kyselina 8a(1,1,1)



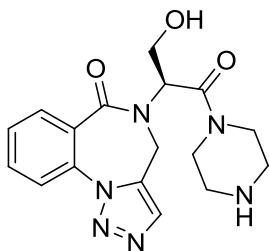
[M + H]⁺ = 273,26; rt = 2.45; surová čistota 5%

(S)-5-(1-oxo-1-(piperazin-1-yl)propan-2-yl)-4H-benzo[f][1,2,3]triazolo[1,5-a][1,4]diazepin-6(5H)-on 8b(1,1,1)



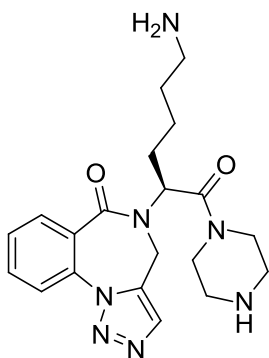
[M + H]⁺ = 341,38; rt = 2.8; surová čistota 18%

(S)-5-(3-hydroxy-1-oxo-1-(piperazin-1-yl)propan-2-yl)-4H-benzo[f][1,2,3]triazolo[1,5-a][1,4]diazepin-6(5H)-on 8b(2,1,1)



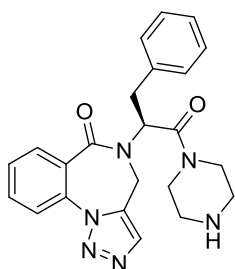
$[M + H]^+ = 357,38$; $rt = 3.22$; surová čistota 17%

(S)-5-(6-amino-1-oxo-1-(piperazin-1-yl)hexan-2-yl)-4H-benzo[f][1,2,3]triazolo[1,5-a][1,4]diazepin-6(5H)-on 8b(3,1,1)



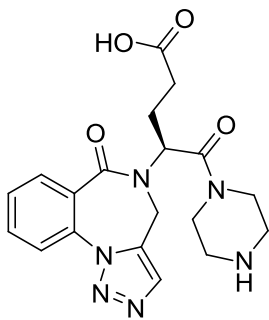
$[M + H]^+ = 398,47$; $rt = 3.98$; surová čistota 19%

(S)-5-(1-oxo-3-phenyl-1-(piperazin-1-yl)propan-2-yl)-4H-benzo[f][1,2,3]triazolo[1,5-a][1,4]diazepin-6(5H)-on 8b(4,1,1)



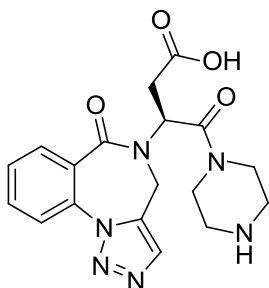
$[M + H]^+ = 417,48$; $rt = 3.23$; surová čistota 16%

(S)-5-oxo-4-(6-oxo-4H-benzo[f][1,2,3]triazolo[1,5-a][1,4]diazepin-5(6H)-yl)-5-(piperazin-1-yl)pentanová kyselina 8b(5,1,1)



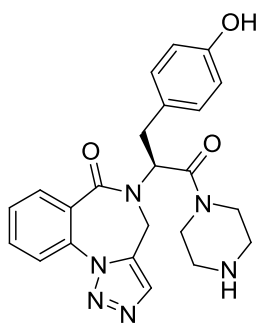
$[M + H]^+ = 399,42$; $rt = 3.00$ surová čistota 15%

(S)-4-oxo-3-(6-oxo-4H-benzo[f][1,2,3]triazolo[1,5-a][1,4]diazepin-5(6H)-yl)-4-(piperazin-1-yl)butanová kyselina 8b(6,1,1)



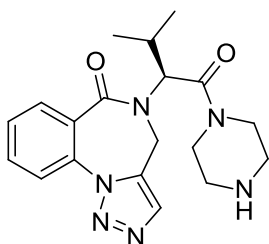
$[M + H]^+ = 385,39$; $rt = 3.21$; surová čistota 15%

(S)-5-(3-(4-hydroxyphenyl)-1-oxo-1-(piperazin-1-yl)propan-2-yl)-4H-benzo[f][1,2,3]triazolo[1,5-a][1,4]diazepin-6(5H)-on 8b(7,1,1)



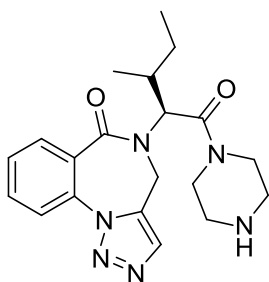
$[M + H]^+ = 433,48$; $rt = 3.51$; surová čistota 22%

(S)-5-(3-methyl-1-oxo-1-(piperazin-1-yl)butan-2-yl)-4H-benzo[f][1,2,3]triazolo[1,5-a][1,4]diazepin-6(5H)-on 8b(8,1,1)



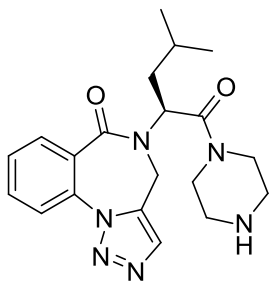
$[M + H]^+ = 369.43$; $rt = 3.46$; surová čistota 20%

5-((2*S*,3*R*)-3-methyl-1-oxo-1-(piperazin-1-yl)pentan-2-yl)-4*H*-benzo[*f*][1,2,3]triazolo[1,5-*a*][1,4]diazepin-6(5*H*)-on 8b(9,1,1)



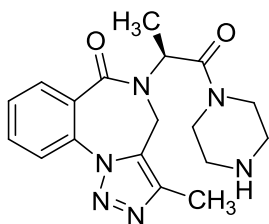
$[M + H]^+ = 383.46$; $rt = 3.35$; surová čistota 19%

(*S*)-5-(4-methyl-1-oxo-1-(piperazin-1-yl)pentan-2-yl)-4*H*-benzo[*f*][1,2,3]triazolo[1,5-*a*][1,4]diazepin-6(5*H*)-on 8b(10,1,1)



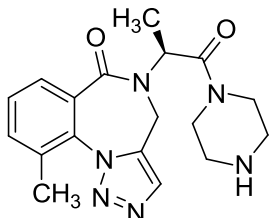
$[M + H]^+ = 383.46$; $rt = 3.32$; surová čistota 17%

(*S*)-3-methyl-5-(1-oxo-1-(piperazin-1-yl)propan-2-yl)-4*H*-benzo[*f*][1,2,3]triazolo[1,5-*a*][1,4]diazepin-6(5*H*)-on 8b(1,2,1)



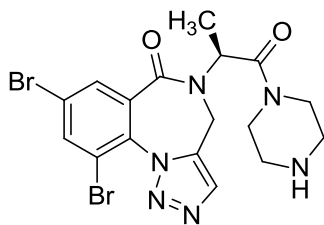
[M + H]⁺ = 355,41; rt = 3.46; surová čistota 49%

10-methyl-5-((S)-1-oxo-1-(piperazin-1-yl)propan-2-yl)-4H-benzo[f][1,2,3]triazolo[1,5-a][1,4]diazepin-6(5H)-on 8b(1,1,2)



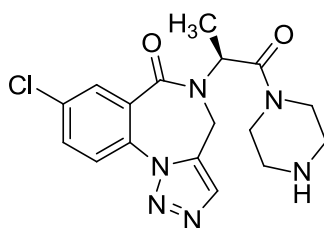
[M + H]⁺ = 355,41; rt = 3.14; surová čistota 36%

8,10-dibromo-5-((S)-1-oxo-1-(piperazin-1-yl)propan-2-yl)-4H-benzo[f][1,2,3]triazolo[1,5-a][1,4]diazepin-6(5H)-on 8b(1,1,4)



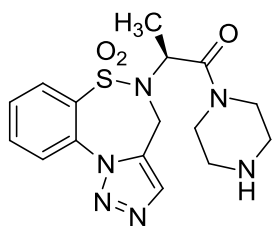
[M + H]⁺ = 499,17; rt = 3.72; surová čistota 22%

(S)-8-chloro-5-(1-oxo-1-(piperazin-1-yl)propan-2-yl)-4H-benzo[f][1,2,3]triazolo[1,5-a][1,4]diazepin-6(5H)-on 8b(1,1,5)



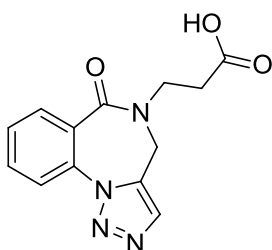
[M + H]⁺ = 375,82; rt = 3.33; surová čistota 48%

(S)-2-(6,6-dioxidobenzo[f][1,2,3]triazolo[5,1-d][1,2,5]thiadiazepin-5(4H)-yl)-1-(piperazin-1-yl)propan-1-on 8b(1,1,6)



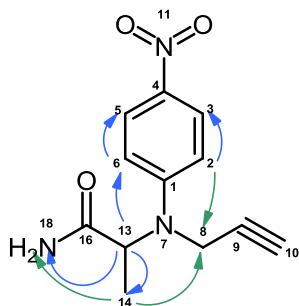
$[M + H]^+ = 377,43$; $rt = 1.02$; surová čistota 42%

3-(6-oxo-4H-benzo[f][1,2,3]triazolo[1,5-a][1,4]diazepin-5(6H)-yl)propanová kyselina 11a(11,1,1)



$[M + H]^+ = 273,26$; $rt = 3.42$; surová čistota 78-89%

(S)-2-((4-nitrophenyl)(prop-2-yn-1-yl)amino)propanamid 13c

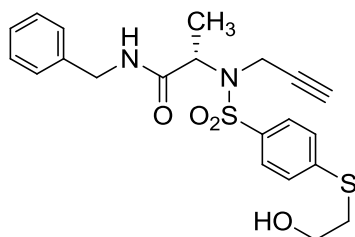


$[M + H]^+ = 248,25$; $rt = 2.18$; surová čistota 60%; výtěžek 13,1 mg (36%)

$^1\text{H-NMR}$ (500 MHz, $\text{DMSO-}d_6$), δ ppm 1.31 (d, $J=7.3$ Hz, 3H, HC^{14}), 3.13 (t, $J=2.5$ Hz, 1H, HC^{10}) 4.25 (dd, $J=18.9, 2.5$ Hz, 1H, H_aC^8) 4.32 (dd, $J=18.9, 2.5$ Hz, 1H, H_bC^8) 4.44 (q, $J=7.3$ Hz, 1H HC^{13}) 7.08 (br, 2H, $\text{H}_\perp\text{N}^{18}$) 7.33 (br, 1H, $\text{H}_\parallel\text{N}^{18}$) 8.08 (dt, $J=8.9, 2.0$ Hz, 1H, $\text{HC}^{2,6}$) 8.36 (dt, $J=8.9, 2.0$ Hz, 2H, $\text{HC}^{3,5}$) II a \perp - rovnoběžné a kolmé k $\text{C}_{16}=\text{O}$. $^{13}\text{C-NMR}$ (125 MHz, $\text{DMSO-}d_6$), δ ppm 17.27 (C_{14}), 34.64 (C_8), 55.24 (C_{13}), 75.63 (C_{10}), 80.88 (C_9), 124.87 ($\text{C}_3, 5$), 129.30 ($\text{C}_2, 6$), 145.70 (C_4), 150.32 (C_1), 172.59 (C_{16}). $^{15}\text{N-NMR}$ (125 MHz, $\text{DMSO-}d_6$), δ ppm 94.08^{4.44, s}, HC_{13} (v. int.); 4.32, *d*, 16.9, H_bC_8 (v. int.); 4.25, *d*, 16.9, H_aC_8 (v. int.); 3.13, *s*,

HC10 (n. int.); 1.31, s, HC14 (v. int.) N7; 101.04^{7.33, d, 86.8, HIIN18}; 7.08, d, 86.8, H¹N18 N18; 363.81^{8.36, s, HC3,5} (v. int.); 8.08, s, HC2,6 (n. int.) N11, v. int – vysoká intenzita., n. int. – nízká intenzita.

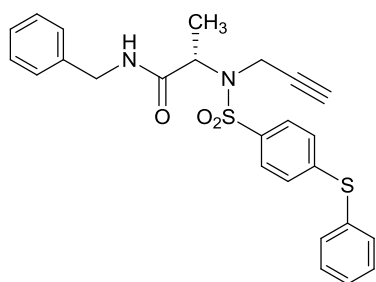
(S)-2-(4-((2-hydroxyethyl)thio)-N-(prop-2-yn-1-yl)phenylsulfonamido)-N-phenylpropanamid 14d



[M + H]⁺ = 433,56; rt = 2.56; surová čistota 85%; výtěžek 33,8 mg (56%)

¹H NMR (500 MHz, DMSO-*d*₆) δ ppm 1.31 (d, *J*=7.20 Hz, 3 H) 3.12 - 3.16 (m, 3 H) 3.59 - 3.65 (m, 2 H) 4.17 (d, *J*=5.91 Hz, 2 H) 4.23 - 4.39 (m, 2 H) 4.44 - 4.50 (m, 1 H) 5.01 - 5.05 (m, 1 H) 7.16 - 7.20 (m, 2 H) 7.21 - 7.27 (m, 1 H) 7.29 - 7.34 (m, 2 H) 7.39 - 7.43 (m, 2 H) 7.70 - 7.74 (m, 2 H) 8.41 (t, *J*=5.87 Hz, 1 H). ¹³C NMR (125 MHz, DMSO-*d*₆) δ ppm 16.60, 33.70, 33.76, 41.97, 54.28, 54.30, 59.45, 74.67, 80.84, 119.46, 126.16, 126.82, 127.11, 127.58, 128.29, 138.89, 170.53.

(S)-N-phenyl-2-(4-(phenylthio)-N-(prop-2-yn-1-yl)phenylsulfonamido)propanamid 15d



[M + H]⁺ = 465,60; rt = 2.68; surová čistota 74%

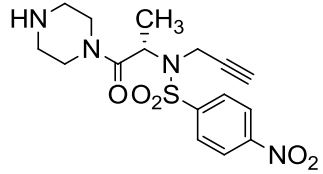
7. Závěr

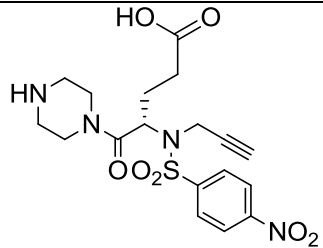
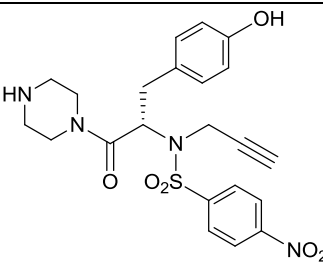
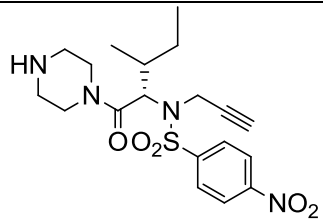
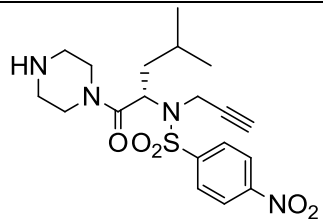
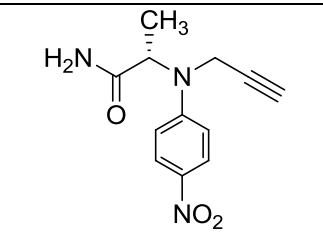
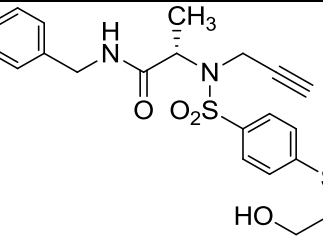
Hlavní náplň této práce, tedy syntéza trisubstituovaných derivátů 4*H*-benzotriazolodiazepinonu a jejich prekurzorů na pevné fázi s využitím α -aminokyselin, je podrobně rozebrána v části výsledky a diskuze.

Po navázání aminokyselin na pryskyřici s různými linkery **a-d** bylo provedeno odštěpení Fmoc-protectivní skupiny **2a-d**(1-10), následovala reakce s 2/4-Nos-Cl **3a-d**(1-10,e-f), poté byla provedena alkylace propargyl bromidem, potažmo jeho deriváty **4a-d**(1-10,e-f,1-5), přičemž alkylační reakce byla optimalizována pro dosažení co nejlepší konverze. Při alkylation derivátů **3c**(1,f) docházelo ke vzniku vedlejších produktů **13c**. Dále byla Nos protectivní skupina odštěpena působením merkptoetanolu nebo thiofenu za bazické katalýzy, v této části docházelo ke komplikacím, kdy jejich řešení je popsáno v kapitole 4, výsledky a diskuze. Vzniklé intermediáty byly acylovány 2-azidobenzoovou kyselinou nebo jejími deriváty **7a-b**(1-10,1-2,1-6), kdy ve většině případů docházelo k nízké konverzi na očekávané produkty reakce. Pro vyloučení vnější chyby bylo provedeno testování kvality užívaných 2-azidobenzoových kyselin, kdy dosažené výsledky vyvrátily nízkou konverzi vlivem rozkladu těchto kyselin. Připravené vedlejší produkty reakcí byly z pryskyřice odštěpeny působením trifluoroctové kyseliny, přečištěny na semipreparativním HPLC a charakterizovány pomocí NMR.

Experimentální část je věnována výsledkům laboratorní práce a detailnímu popisu pracovního postupu, zahrnuje navážky a objemy použitých reaktantů a rozpouštědel pro jednotlivé reakce, dále jsou zde uvedeny metody optimalizací použitých reakcí. Všechny připravené látky a intermediáty byly analyzovány pomocí LC-MS. Některé z nich pak byly charakterizovány také pomocí NMR. Následuje Tabulka 17 shrnující data izolovaných látek.

Tabulka 17: Přehled izolovaných látek.

Látka	Struktura	Surová čistota [%]	Výtěžek [%]
4b (1,f,1)		96	53

4b(5,f,1)		82	32
4b(7,f,1)		68	49
4b(9,f,1)		68	40
4b(10,f,1)		68	45
13c		60	36
14d		85	56

8. Literatura a zdroje

<http://www.sigmaaldrich.com/catalog/search?term=Propargyl+alcohol&interface=Product%20Name&N=0+&mode=mode%20matchpartialmax&lang=en®ion=CZ&focus=productN=0%20220003048%20219853286%20219853100> ;

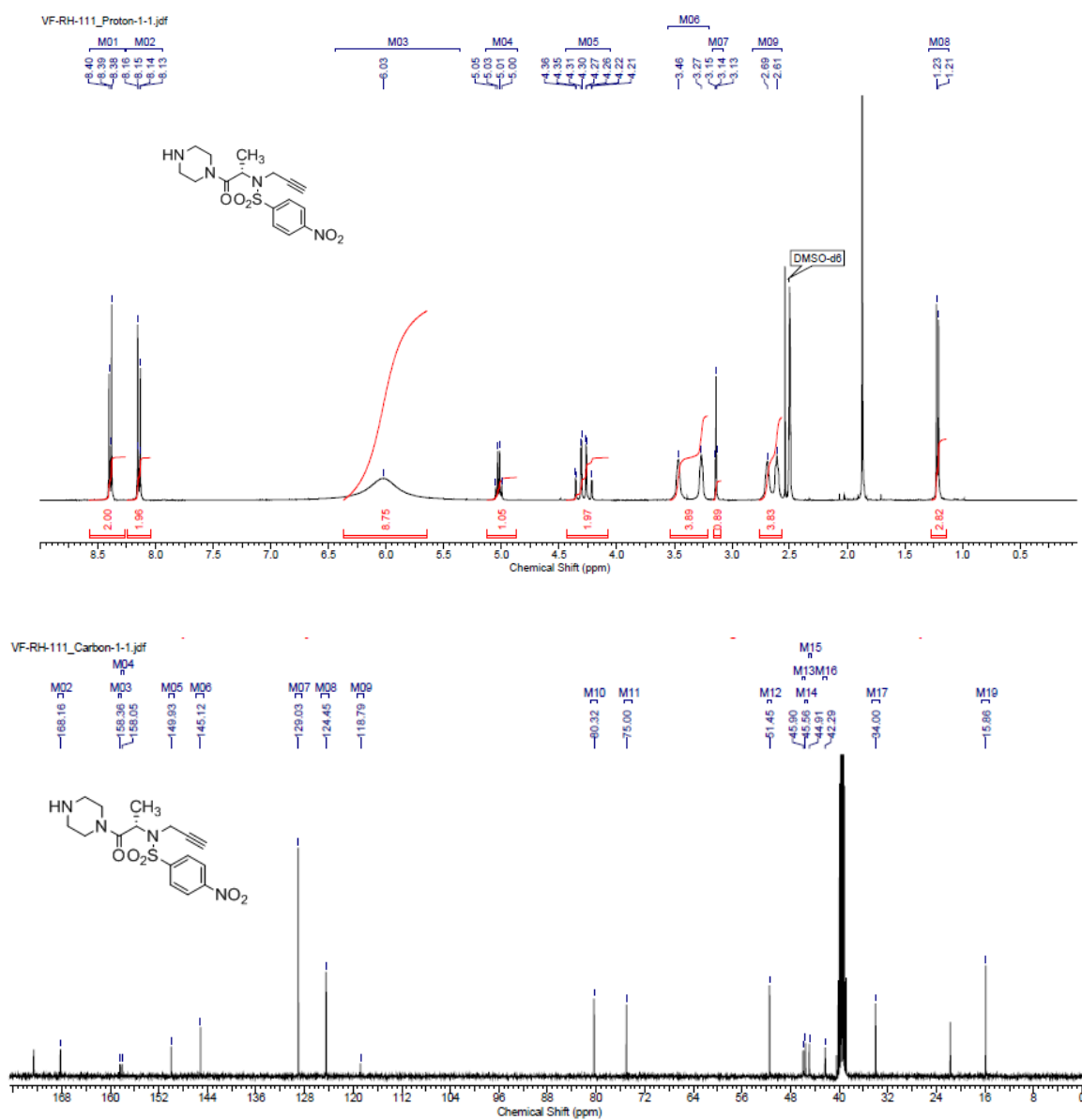
<http://www.sigmaaldrich.com/catalog/search?term=Propargyl+bromide+solution&interface=Product%20Name&N=0+&mode=mode%20matchpartialmax&lang=en®ion=CZ&focus=productN=0%20220003048%20219853286%20219853100> – ověření ceny/dostupnosti

1. Sternbach, Leo H. *J. Med. Chem.*, **1979**, 22, 1-7.
2. Ramakrishnan, K; Scheid, D.C., *Am. Fam. Physician*, **2007**, 76 (4), 517–26.
3. Fontaine, R; Annable, L; Beaudry, P; Mercier, P; Chouinard, G., *Psychopharmacology bulletin*, **1985**, 21 (1), 91–92.
4. Veldkamp, W.; Straw, R. N.; Metzler, C. M.; Demissianos, H. V., *J. Clin. Pharm.*, **1974**, 14 (2-3), 102-111.
5. Fülöpová, V.; Funk, P.; Popa, I.; McMaster, C.; Soral, M., *Eur. J. Org. Chem.*, **2015**, 2015 (16) 3551-3557.
6. Elliott, R. L. et al, *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **2010**, 20, 6797–6801.
7. Romal, G.; Grossil, G.C.; Di Bracciol, M.; Ghia, M.; Mattioli, F., *Eur. J. Med. Chem.*, **1991**, 26, 489-496.
8. Albrech, B. K.; Gehling, V.; Hewitt, M. C.; Taylor, A. M.; Harmange, J-Ch., *WO 2012/151512 A2* **2012**.
9. Elliott, R. L.; Cameron, K. O.; Hammond, M., *US 2005/0267100 A1* **2005**.
10. Smalley, K. R.; Mabrouk, T., *Synthesis*, **1990**, 8, 654-661.
11. Molteni, G., *Heterocycles*, **2013**, 87 (8), 1765-1773.
12. Jackson, B.; Hester, Jr.; VonVoigtlander P.; Evenson, G. N., *J. Med. Chem.*, **1980**, 23, 873-877
13. Blackburn, B. K.; Robarge, K.; Somers, T. C., *US 005705890A* **1998**.
14. Hester, J. B., *US 004180668A* **1979**.

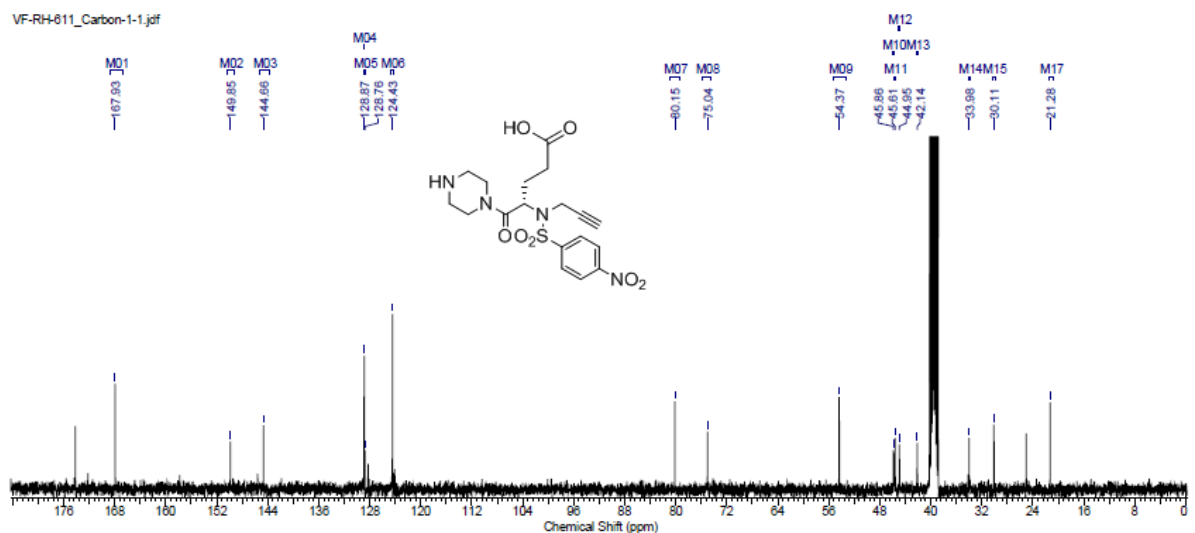
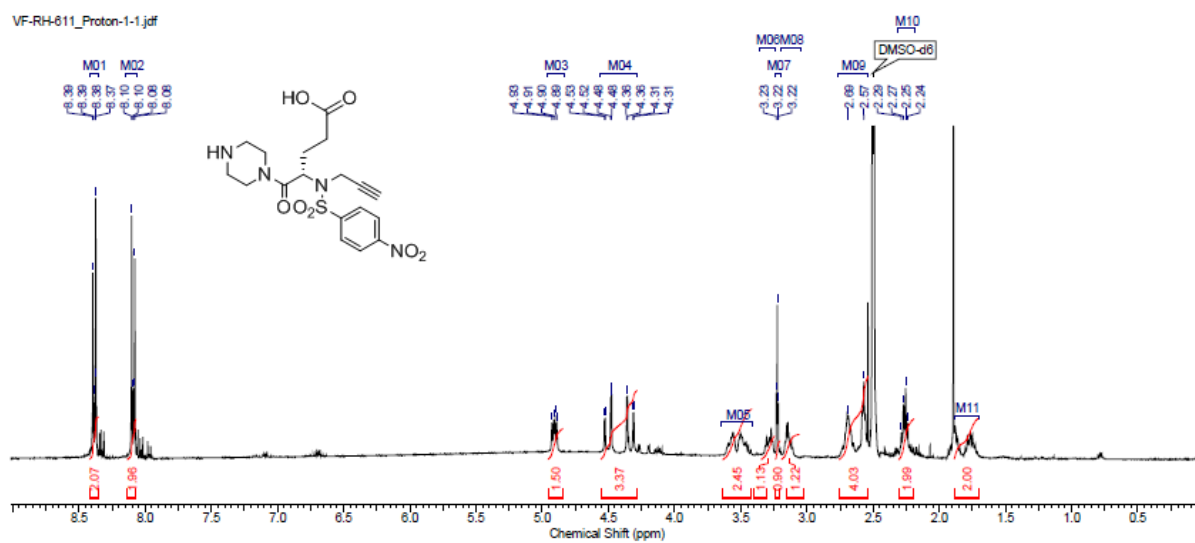
15. Thomas, A. W., *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **2002**, 12, 1881–1884.
16. Chowdhury, Ch.; Sasmal, A. K.; Achari, B., *Org. Biomol. Chem.*, **2010**, 8, 4971–4977
17. Alajarin, M. et al., *Tetrahedron Lett.*, **2007**, 48, 3495–3499.
18. Akritopoulou-Zanze, I.; Gracias, V.; Djuric, S. W., *Tetrahedron Lett.*, **2004**, 45, 8439–8441.
19. Chambers, C. S.; Patel, N.; Hemming, K., *Tetrahedron Lett.*, **2010**, 51, 4859–4861.
20. Fukuyama, T; *Tetrahedron Lett.*, **1995**, 36, 6373-6374.
21. Huisgen, R., Proceedings of the Chemical Society of London, **1961**, 357.
22. Fülöpová, V.; Lemrová, B.: Skriptum, UP Olomouc **2015**.
23. Merrifield, R. B., Beckman Report, **1972**, (1), 3-10.
24. Neises, B.; Steglich, W., *Angew. Chem. Int. Ed.*, **1978**, 17 (7), 522–524.
25. Smyslová, P.; Kissel'jova, K.; Krchňák, V., *ACS Comb. Sci.* **2014**, 16 (9), 500-505.
26. Stanger, J. K.; Krchňák, V., *J. Comb. Chem.*, **2006**, 8, 435 – 439.
27. Vaňková, B.: Diplomová práce, UP Olomouc **2009**.
28. Wang, S. S., *J. Am. Chem. Soc.*, **1973**, 95, 1328–1333.
29. Rink, H., *Tetrahedron Lett.*, **1987**, 28, 3787–3790.
30. Hlaváč, J.; Sural, M.; Krchňák, V. *Solid-Phase Organic Synthesis*, John Wiley & Sons, Inc.: 2011; pp 95-130.
31. Fülöpová, V.; Sural, M., *ACS Comb. Sci.*, **2015**, 17, 570–591.

9. Přílohy

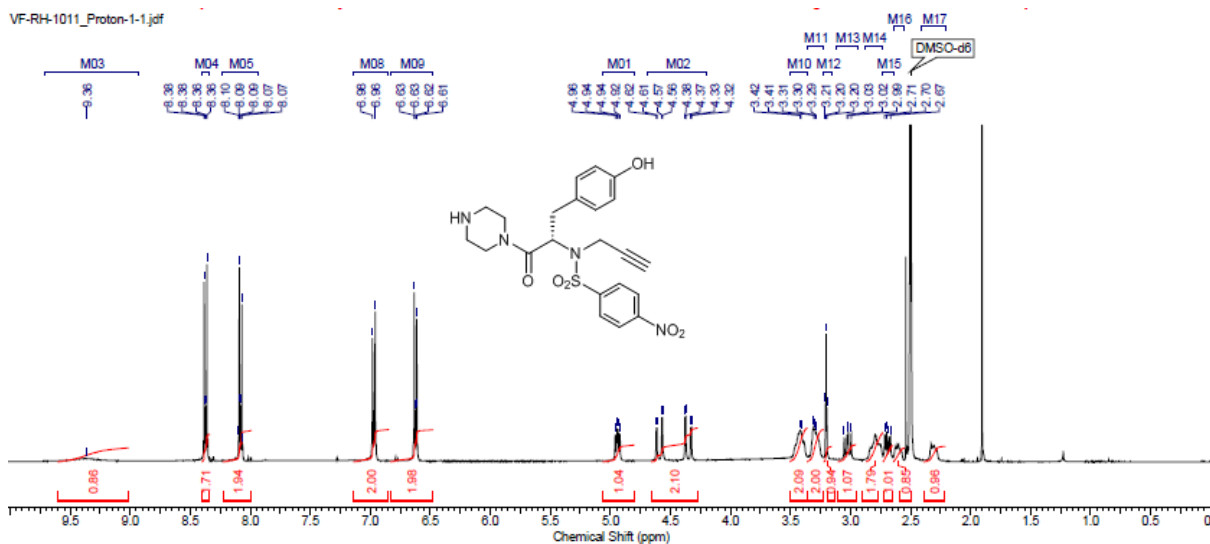
NMR spektra látky **4b**(1,f,1)



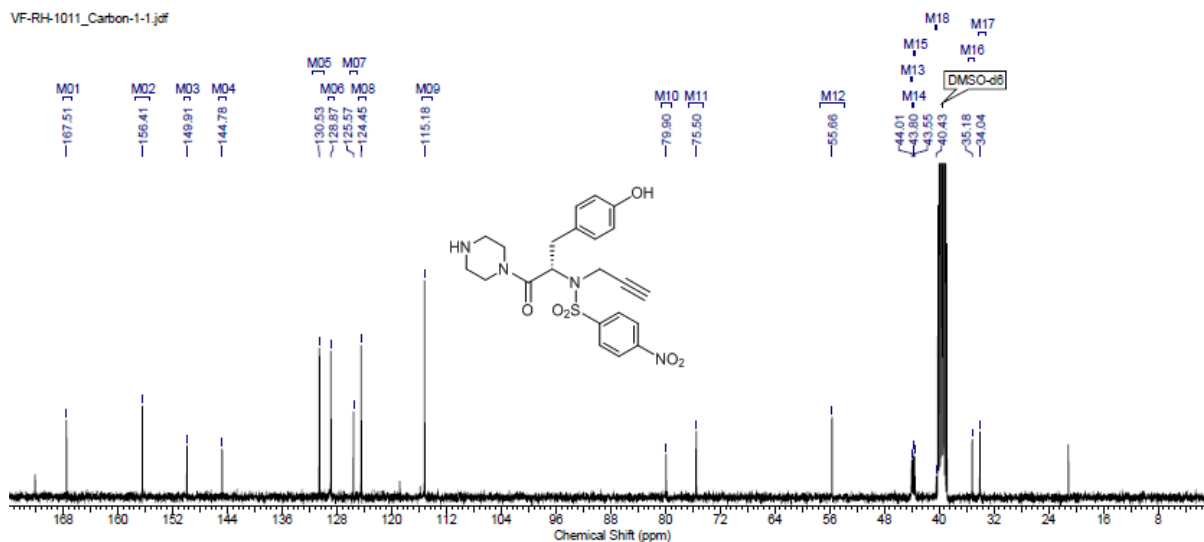
NMR spektra látky **4b**(5,f,1)



NMR spektra látky **4b**(7,f,1)

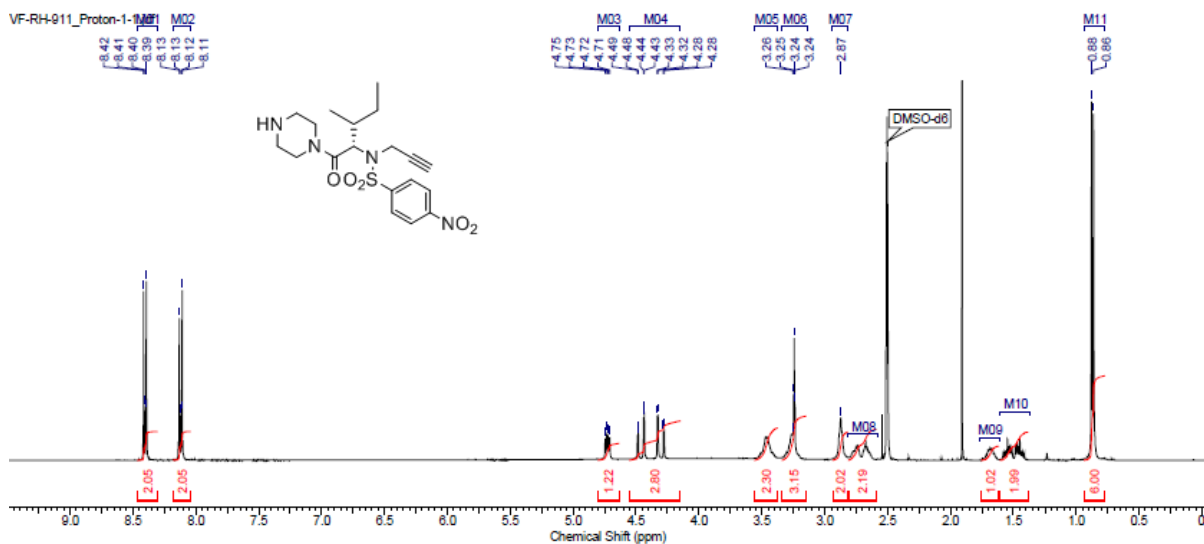


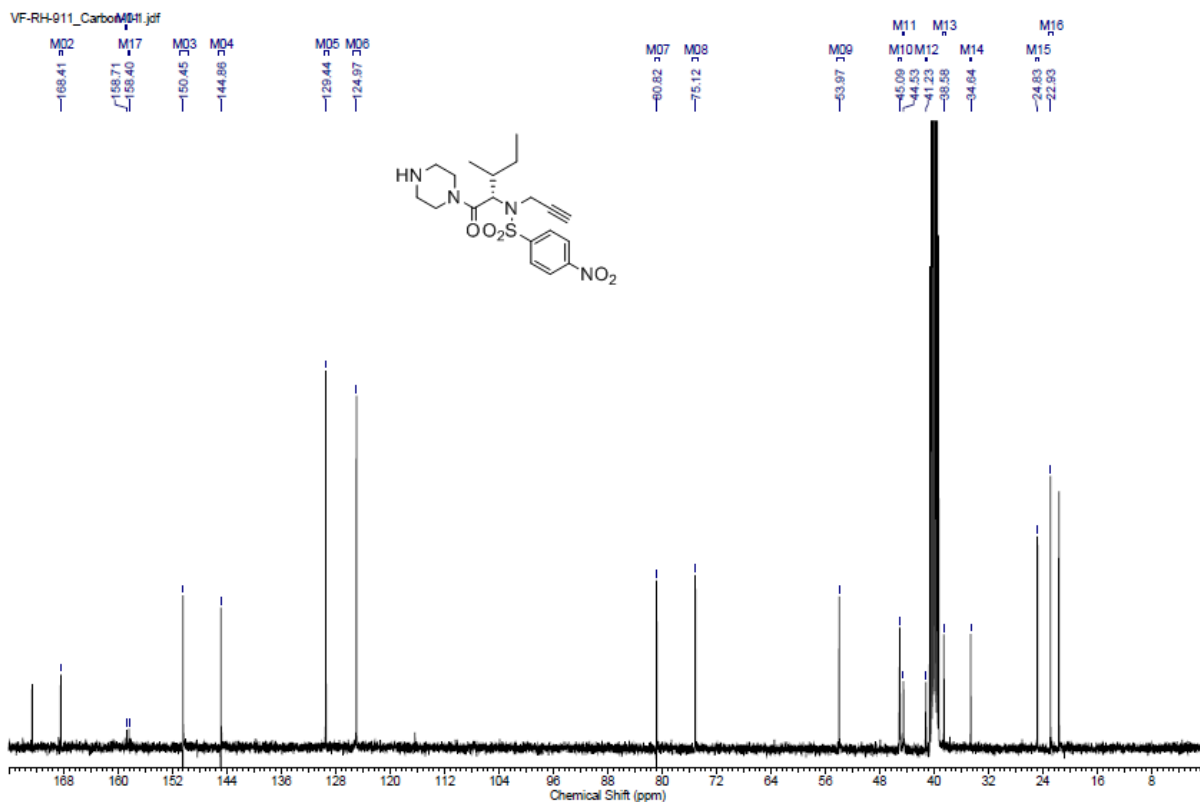
VF-RH-1011_Carbon-1-1.jcf



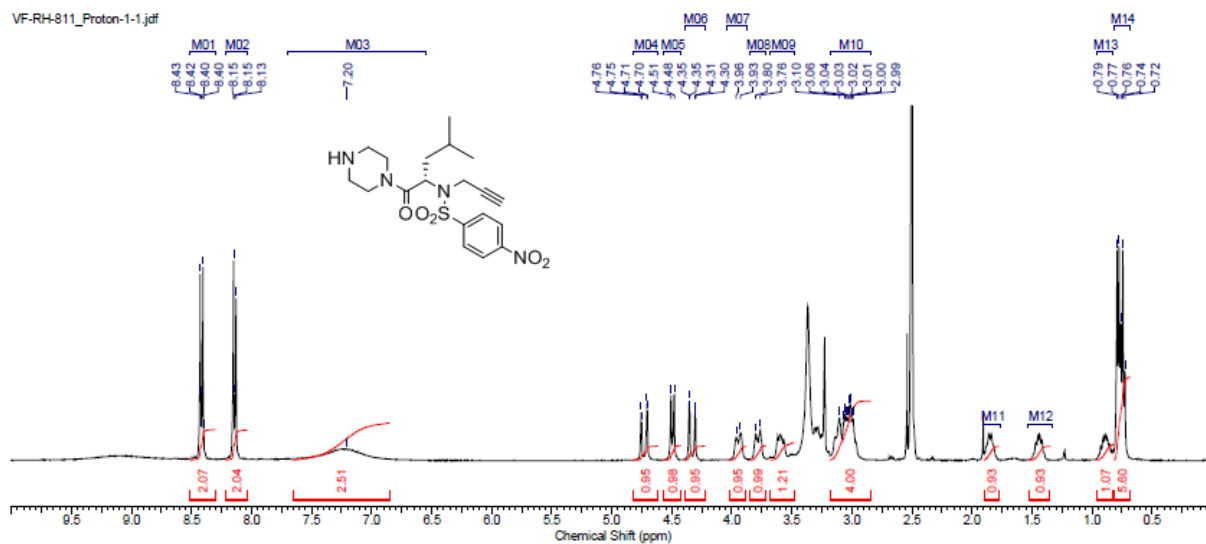
NMR spektra látky **4b**(9,f,1)

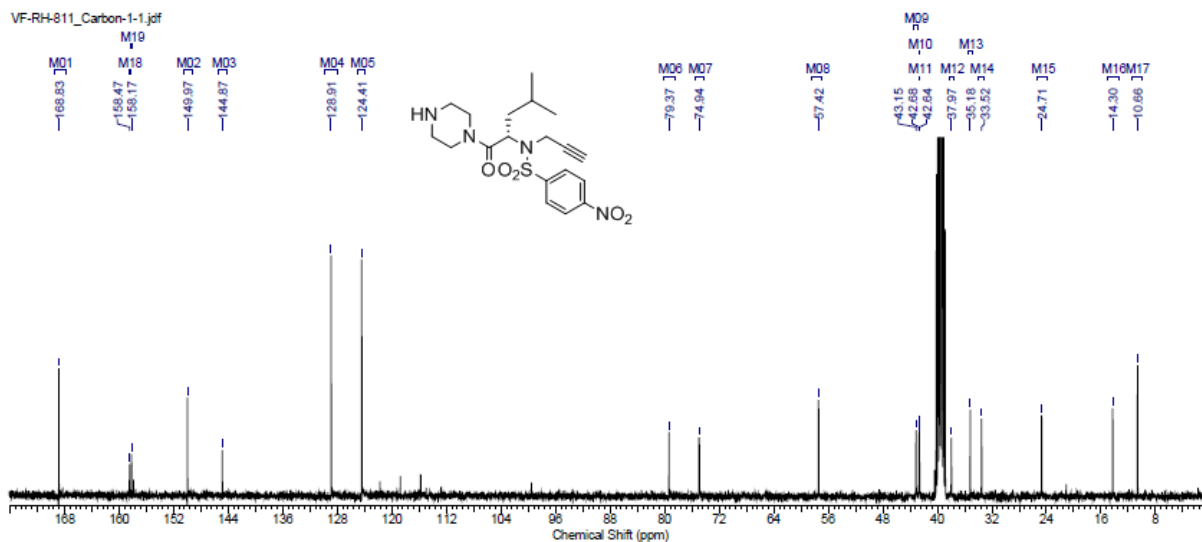
VF-RH-911_Proton-1-1.jcf



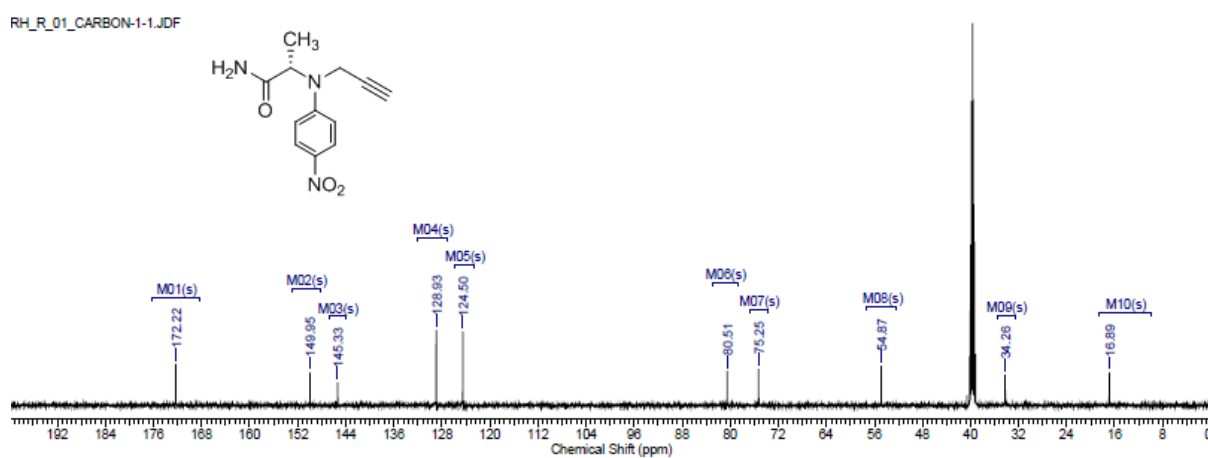
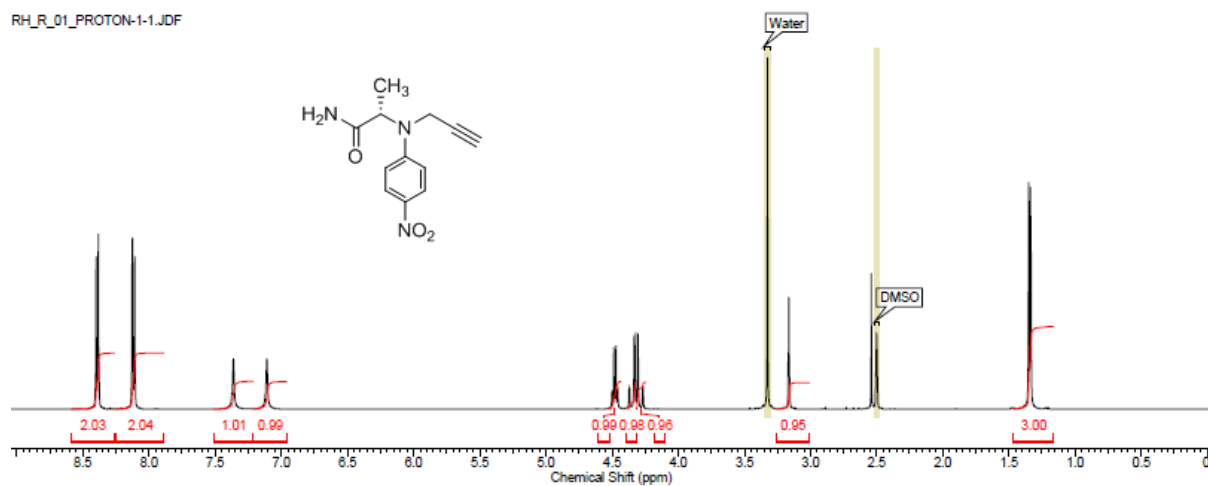


NMR spektra látky **4b**(10,f,1)



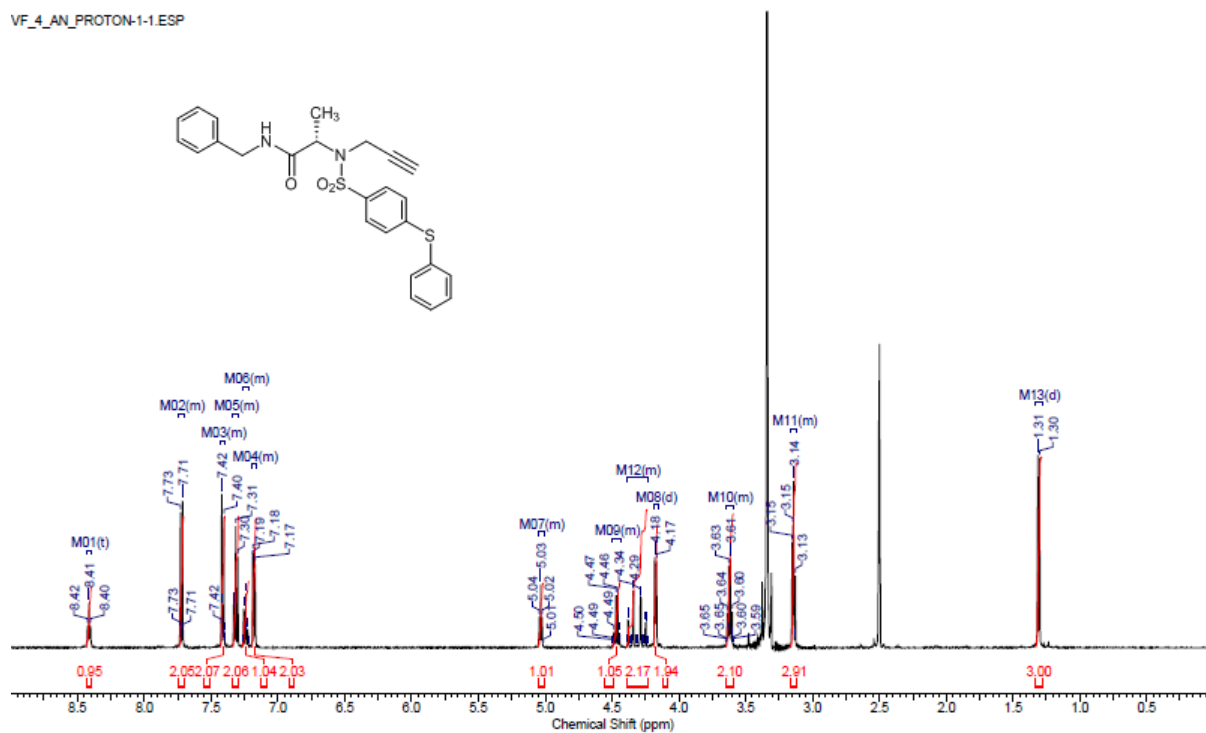


NMR spektra látky 13c



NMR spektra látky **14d**

VF_4_AN_PROTON-1-1.ESP



VF_4_AN_CARBON-1-1.ESP

