

UNIVERZITA PALACKÉHO V OLOMOUCI
PŘÍRODOVĚDECKÁ FAKULTA

Katedra organické chemie



**Příprava 2,3-dihydrobenzo[*f*][1,2,5]thiadiazepin-4(5*H*)-on
1,1-dioxidů pomocí syntézy na pevné fázi**

Patricia TRAPANI

Bakalářská práce

Studijní program:	Chemie
Studijní obor:	Bioorganická chemie a chemická biologie
Typ studia:	Prezenční
Vedoucí práce:	doc. RNDr. Miroslav Soural, Ph.D.

Prohlášení:

Prohlašuji, že jsem závěrečnou práci zpracovala samostatně a že jsem uvedla všechny použité informační zdroje a literaturu. Tato práce ani její podstatná část nebyla předložena k získání jiného nebo stejného akademického titulu.

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

V Olomouci, 11.5.2016

.....

Patricia Trapani

Poděkování

Ráda bych poděkovala především doc. RNDr. Miroslavu Suralovi, Ph.D. za cenné rady, připomínky, velikou ochotu a trpělivost a příkladné vedení. Velice ráda bych mu poděkovala za poskytnutí možnosti vytvořit tuto práci, jejíž výsledky byly přijaty k publikování v impaktovaném časopise.

Dále bych ráda poděkovala Mgr. Tereze Volné za měření optické čistoty a HRMS spekter, Mgr. Igoru Popovi, CSc. za měření NMR spekter a Mgr. Veronice Fülöpové, Ph.D. za cenné rady.

Chtěla bych poděkovat i všem ostatním pracovníkům Katedry organické chemie PrF UP a Ústavu molekulární a translační medicíny v Olomouci. Děkuji Bc. Michalu Kriegelsteinovi za pomoc s hodnocením NMR spekter a za rady a připomínky. Děkuji samozřejmě i mé rodině za obrovskou podporu.

Tato závěrečná práce vznikla za podpory projektu studentské grantové soutěže na UP s regionálním číslem IGA-PrF-2016-020.

Bibliografická identifikace:

Jméno a příjmení autora: Patricia Trapani
Název práce: Příprava 2,3-dihydrobenzo[*f*][1,2,5]thiadiazepin-4(5*H*)-on 1,1-dioxidů pomocí syntézy na pevné fázi
Typ práce: bakalářská
Pracoviště: Ústav molekulární a translační medicíny
Přírodovědecká fakulta UP v Olomouci
Školitel: doc. RNDr. Miroslav Sural, Ph.D.
Rok obhajoby práce: 2016
Abstrakt:

Tato bakalářská práce se zabývá syntézou 2,3-dihydrobenzo[*f*][1,2,5]thiadiazepin-4(5*H*)-on 1,1-dioxidů pomocí syntézy na pevné fázi. Různé α -L-aminokyseliny imobilizované na Wangově pryskyřici byly sulfonylovány rozličnými 2-nitrobenzensulfonylchloridy. Výsledné 2-nitrobenzensulfonamidy byly poté alkylovány na dusíkovém atomu různými alkoholy za Fukuyama-Mitsunobu podmínek. Po redukci nitroskupiny následoval cyklizační krok. Právě nalezení optimálních podmínek pro finální cyklizaci je klíčovým bodem této práce. Z důvodu dostupnosti široké škály výchozích látek a možnosti rychlého a jednoduchého provedení byla pro syntézu zvolena metodika syntézy na pevné fázi.

Klíčová slova: aminokyseliny, syntéza na pevné fázi, sulfonamidy, benzothiadiazepiny
Počet stran: 73
Počet příloh: 0
Jazyk: čeština

Bibliographical identification:

Author's first name and surname: Patricia Trapani
Title: Preparation of
2,3-dihydrobenzo[f][1,2,5]thiadiazepine-4(5*H*)-one
1,1-dioxides using solid-phase synthesis
Type of thesis: bachelor
Department: Institute of Molecular and Translational Medicine
Faculty of Science at Palacky University, Olomouc
Advisor: doc. RNDr. Miroslav Soral, Ph.D.
The year of presentation: 2016
Abstract:

This bachelor thesis describes the solid-phase synthesis of new 2,3-dihydrobenzo[f][1,2,5]thiadiazepin-4(5*H*)-one 1,1-dioxides. Different α -L-amino acids immobilized on Wang resin were sulfonylated with various 2-nitrobenzenesulfonyl chlorides. The resulting 2-nitrobenzenesulfonamides were alkylated with alcohols *via* Fukuyama-Mitsunobu procedure, followed by the reduction of the nitro group and final cyclization. Finding optimal conditions for the final cyclization is a goal of this work. With respect to the broad scale of commercially available building blocks and simple performance, the solid-phase synthesis concept was chosen to prepare the target compounds.

Keywords: amino acids, solid-phase synthesis, sulfonamides,
benzothiadiazepines
Number of pages: 73
Number of appendixes: 0
Language: Czech

Seznam zkratek

DVB	divinylbenzen
DCM	dichlormethan
DBU	1,8-diazabicyklo[5.4.0]undec-7-en
DMF	<i>N,N</i> -dimethylformamid
MeOH	methanol
EtOH	ethanol
THF	tetrahydrofuran
DMSO	dimethylsulfoxid
NMP	<i>N</i> -methylpyrrolidon
MeCN	acetonitril
TFA	kyselina trifluoroctová
TEA	triethylamin
TBAHS	tetrabutylammonium hydrogensulfát
DMAP	4-(dimethylamino)pyridin
HOBt	<i>N</i> -hydroxybenzotriazol
DIC	<i>N,N'</i> -diisopropylkarbodiimid
DIAD	diisopropylazodikarboxylát
DEAD	diethylazodikarboxylát
DIEA	diisopropylethylamin
Boc ₂ O	di-terc-butyl dikarbonát
EDC.HCl, EDCI	1-ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)karbodiimid hydrochlorid
Fmoc	<i>N</i> -(9-fluorenylmetoxykarbonyloxy)-

Fmoc-Osu	<i>N</i> -(9-fluorenylmethoxykarbonyloxy)sukcinimid
tBu	terc-butyl
Boc	terc-butyloxykarbonyl
Ala	alanin
Pro	prolin
Glu	kyselina glutamová
His	histidin
Trt	trityl
Trp	tryptofan
Tyr	tyrosin
Ser	serin
Lys	lysin
Phe	fenylalanin
rt	laboratorní teplota
MW	mikrovlnný ohřev
<i>p</i> TSA	kyselina <i>p</i> -toluensulfonová
NMR	nukleární magnetická rezonance
HRMS	High-Resolution Mass Spectrometry
HPLC-MS	High-Performance Liquid Chromatography-Mass Spectrometry, vysokoúčinná kapalinová chromatografie – hmotnostní spektrometrie
UPLC-MS	Ultra High-Performance Liquid Chromatography-Mass Spectrometry

Obsah

1	Úvod a cíle práce	10
2	Teoretická část	11
2.1	Kombinatoriální chemie a syntéza na pevné fázi	11
2.1.1	Princip syntézy na pevné fázi	11
2.1.2	Polymerní nosiče.....	11
2.1.3	Linkery.....	12
2.1.4	Imobilizace výchozí látky, protektivní skupiny Fmoc a Boc	14
2.2	Syntéza derivátů 2,3-dihydrobenzo[f][1,2,5]thiadiazepin-4(5 <i>H</i>)-on 1,1-dioxidů 15	
2.3	Využití nitrobenzensulfonamidů v syntéze na pevné fázi.....	21
2.3.1	Nos jako protektivní skupina pro regioselektivní monoalkylace a deprotekce.....	21
2.3.2	Nos jako aktivující skupina pro alkylace bez následné deprotekce.....	22
2.4	Biologické vlastnosti derivátů 2,3-dihydrobenzo[f][1,2,5]thiadiazepin-4(5 <i>H</i>)- on 1,1-dioxidů	27
2.4.1	Antiarytmická aktivita	27
2.4.2	Anti-HIV aktivita.....	27
2.4.3	Protirakovinné vlastnosti.	28
3	Výsledky a diskuse	30
3.1	Popis navržené syntetické cesty	30
3.1.1	Imobilizace aminokyseliny	31
3.1.2	Deprotekce a sulfonylace.....	32
3.1.3	Alkylace dusíkového atomu.....	33
3.1.1	Redukce nitroskupiny	35
3.2	Neúspěšné pokusy o finální cyklizaci	38
3.2.1	Cyklické štěpení.....	39
3.2.2	Cyklizace v roztoku	40

3.2.1	Jiné ukotvení aminokyseliny	43
3.3	Optimalizovaná finální cyklizace.....	45
3.3.1	Aplikovatelnost cyklizační metody pomocí thionylchloridu.....	46
3.4	Připravené deriváty	48
3.4.1	Optická čistota	49
3.4.2	Testování biologické aktivity.....	51
4	Experimentální část	52
4.1	Přístroje a metody	52
4.2	Štěpení vzorku z pryskyřice a následná analýza	53
4.3	Syntéza intermediátu pro cyklizaci	54
4.3.1	Imobilizace aminokyseliny	54
4.3.2	Deprotekce Fmoc	55
4.3.3	Sulfonylace pomocí 2-nitrobenzensulfonylchloridů.....	55
4.3.4	Alkylace pomocí Fukuyama-Mitsunobu procedury	56
4.3.5	Redukce nitro skupiny	57
4.4	Finální cyklizace s SOCl ₂	59
4.4.1	Semipreparativní HPLC-MS a příprava vzorku pro NMR.....	60
4.4.2	Zavedení substituentu R ⁴ na derivát 6(3,1,1).....	60
4.4.3	Odstranění tetrabutylammoniové soli.....	60
4.4.4	Odstranění cínatých solí.....	61
4.5	Analytická data.....	62
5	Závěr.....	70
6	Seznam literatury	71

1 Úvod a cíle práce

Cyklické sulfonamidy založené na struktuře benzothiadiazepinu byly studovány jako látky účinné proti ventrikulární arytmii¹ či jako inhibitory HIV-1 reverzní transkriptázy², nově jsou také zkoumány jako inhibitory interakce proteinu p53 s onkoproteinem MDM2.³

Tato práce je zaměřena na vývoj nové syntetické metody umožňující jednoduchou a rychlou přípravu cílových derivátů s variabilní substitucí hlavního skeletu. Základní syntetický postup popisuje **Schéma 1**.

Jako výchozí látky byly vybrány snadno dostupné Fmoc- α -aminokyseliny, různě substituované 2-nitrobenzensulfonylchloridy a alkoholy. Vzhledem k velkému množství dostupných výchozích látek byla pro přípravu derivátů zvolena metodika syntézy na pevné fázi s využitím Wangovy pryskyřice jako polymerního nosiče.

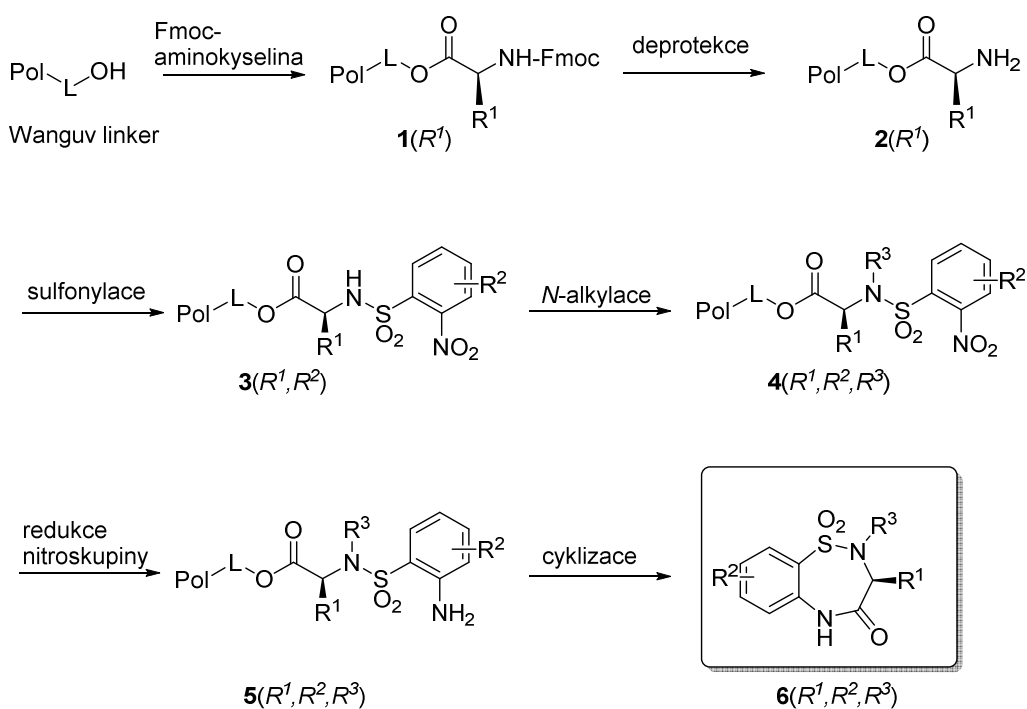


Schéma 1: Celkové reakční schéma.

2 Teoretická část

2.1 Kombinatoriální chemie a syntéza na pevné fázi

Principem kombinatoriální chemie je vzájemná kombinace výchozích látek, která vede ke vzniku souborů různých sloučenin – tyto soubory se nazývají chemické knihovny, jejich velikost může sahát od desítek až po miliony sloučenin. Syntéza na pevné fázi představuje vhodný způsob tvorby chemických knihoven díky jednoduché a univerzální izolaci meziproduktů umožňující provedení většího počtu reakcí současně, a proto je s výhodou v kombinatoriální chemii využívána.⁴

Jako počátek syntézy na pevné fázi se považuje rok 1963, kdy Robert Bruce Merrifield publikoval svou studii strategie přípravy peptidů⁵ – až o 20 let později mu byla udělena Nobelova cena za chemii.

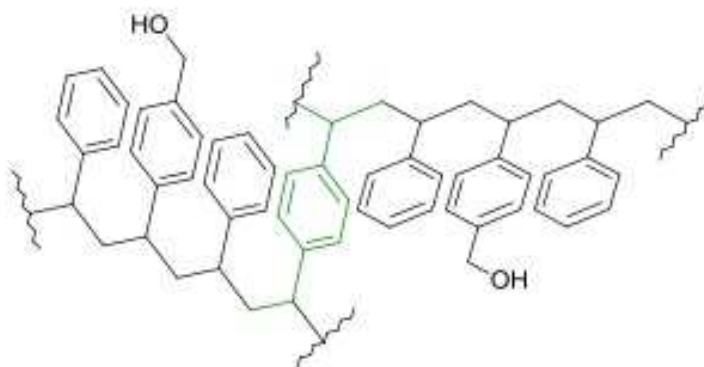
2.1.1 Princip syntézy na pevné fázi

Princip syntézy na pevné fázi spočívá v použití nerozpustného polymeru s reaktivní funkční skupinou, přes kterou poté vytvoříme kovalentní vazbu s vhodným reaktantem - dojde k ukotvení výchozí látky na polymer, tento krok lze také nazvat jako imobilizace výchozí látky. Na imobilizovanou výchozí látku můžeme dále připojit další reagenty – reakce se opakují, dokud nezískáme cílový produkt. Ten je poté z pryskyřice specificky odštěpen v závislosti na typu použitého linkeru.^{4,6}

2.1.2 Polymerní nosiče

Polymer musí splňovat určité požadavky - musí být stabilní a inertní vůči používaným reagentům, musí mít schopnost bobtnat v určitých rozpouštědlech (dojde tak k zvětšení jeho objemu a tím pádem mají molekuly snadnější přístup k funkční skupině polymeru) a musí obsahovat reaktivní funkční skupinu pro ukotvení výchozí látky.⁶

Nejčastěji používaný nepolární polymer v syntéze na pevné fázi je polystyren (PS) zesíťovaný divinylbenzenem (1-2% DVB), který nejlépe bobtná v aprotických rozpouštědlech typu DCM, DMF, THF a naopak se sráží v prostředí protických rozpouštědel, jako jsou methanol či voda.⁶ Na **Obrázku 1** je znázorněna struktura PS-DVB pryskyřice s hydroxymethylovými skupinami.



Obr. 1: Struktura hydroxymethylové pryskyřice na bázi polystyrenu zesíťovaného divinybenzenem. ⁶

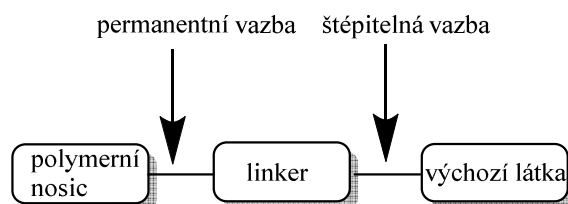
Další možností je použití také tzv. TentaGelu, vznikajícího kopolymerací polyethylenglykolu a polystyrenu. Patří mezi hydrofilní materiály, tím pádem bobtná v polárních rozpouštědlech, jako jsou voda či alkoholy. ⁷ Další používané polymery jsou odvozené například od polyethylenglykolu (PEG) či polyakrylamidu.

Množství aktivních míst závisí na použitém polymeru a vyjadřuje se jako tzv. loading - čím je jeho hodnota (udává se v mmol/g pryskyřice) vyšší, tím více aktivních míst polymer obsahuje. Příliš vysoké loadings ale mohou vést k negativnímu jevu, kdy se aktivní místa polymeru vyskytují příliš blízko sebe a stericky tak brání kvantitativnímu průběhu reakce. ⁶

2.1.3 Linkery

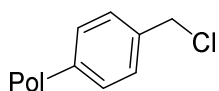
Linkerem nazýváme „spojnici“ mezi polymerním nosičem a výchozí látkou. Obsahuje dvě funkční skupiny – jedna vytvoří pevnou neštěpitelnou vazbu s funkční skupinou polymerního nosiče, druhá funkční skupina linkeru slouží k imobilizaci výchozí látky – tato vazba je štěpitelná za určitých specifických podmínek (použití kyseliny/zásady, UV záření, atd.). Obecná struktura je znázorněna na **Obrázku 2**. Linker musí splňovat určité podmínky – musí být chemicky stálý, rezistentní vůči všem reakčním podmínkám i vůči podmínkám štěpení, musí umožňovat kvantitativnost štěpení bez vedlejších ztrát. Při syntéze na pevné fázi se využívají nejčastěji kyselostěpitelné linkery (pro štěpení se používá nejčastěji kyselina trifluoroctová, někdy i kapalná kyselina fluorovodíková – obě kyseliny jsou těkavé, díky jejich nízkému bodu varu je lze snadno odstranit). V dnešní době se většina polymerních nosičů (pryskyřic) dodává s již navázaným linkerem. Konečná aktivní skupina linkeru se často stává

součástí finálních produktů (jako substituent či část hlavního skeletu vytvořeného produktu). Pokud se tak nestane, hovoříme o tzv. traceless (bezstopých) linkerech.^{6,8}

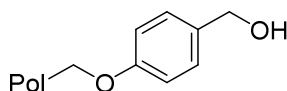


Obr. 2: Obecná struktura systému polymer – linker – výchozí látka.⁸

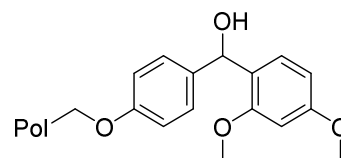
Nejpoužívanější pryskyřice jsou Merrifieldova (obsahující chlormethylovou skupinu), Wangova (obsahující hydroxymethylovou skupinu) a Rinkova esterová (obsahuje hydroxymethinovou skupinu) či Rinkova amidová (obsahuje aminoskupinu chráněnou Fmoc protektivní skupinou).⁸



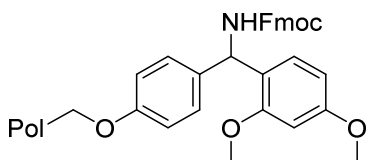
Merrifieldova pryskyřice



Wangova pryskyřice



Rinkova esterová pryskyřice



Rinkova amidová pryskyřice

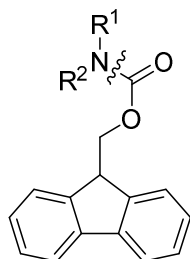
Obr. 3: Struktury nejpoužívanějších pryskyřic.

2.1.4 Imobilizace výchozí látky, protektivní skupiny Fmoc a Boc

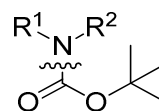
Reakční krok, při kterém dochází k tvorbě vazby mezi výchozí látkou a systémem polymer - linker, nazýváme imobilizace, nebo také ukotvení výchozí látky. Z historického pohledu se v syntéze na pevné fázi nejčastěji využívaly aminokyseliny jako stavební bloky peptidů. Imobilizace aminokyselin může být uskutečněna několika způsoby (imobilizace přes C-konec, N-konec, přes postranní řetězec)⁸. Nejčastějším způsobem je imobilizace přes C-konec (karboxylová skupina), zatímco N-konec (amino skupina) je chráněn určitou protektivní skupinou (nejčastěji skupiny Fmoc či Boc, viz **Obr. 4**). Možností, jak připravit chráněnou sloučeninu (či naopak provést její deprotekcii) je mnoho, proto byly vybrány pouze některé, nejčastěji využívané.

Protektivní skupina Fmoc je na aminokyselinu (resp. její N-konec) vnesena pomocí fluorenylmethoxykarbonylchloridu (Fmoc-Cl) nebo reakcí s *N*-(9-fluorenylmethoxykarbonyloxy)sukcinimidem (Fmoc-Osu). Štěpení probíhá selektivně pomocí roztoku aminu (nejčastěji piperidinu – typicky v 20% roztoku) v DMF.⁹

Protektivní skupina Boc (terc-butyloxykarbonyl) je zaváděna pomocí Boc₂O v THF za přítomnosti DMAP jako báze. Štěpení probíhá nejčastěji v prostředí silných kyselin (TFA, případně její roztok v DCM, roztok HCl).¹⁰



Fmoc protektivní skupina



Boc protektivní skupina

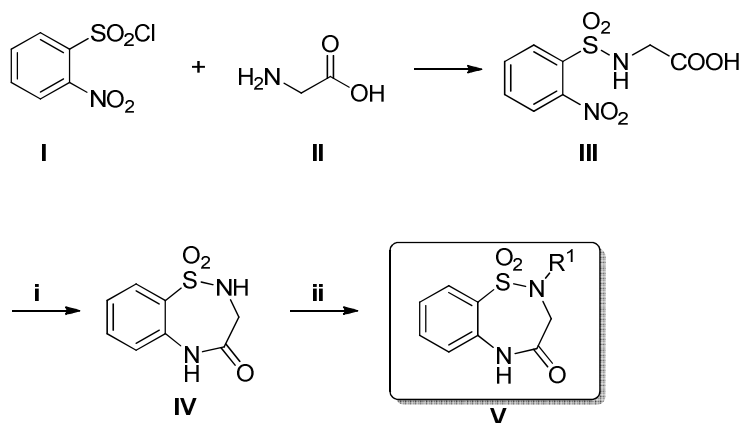
Obr. 4: Struktura protektivní skupiny Fmoc a Boc.

2.2 Syntéza derivátů 2,3-dihydrobenzo[*f*][1,2,5]thiadiazepin-4(5*H*)-on 1,1-dioxidů

Všechny dosud v literatuře popsané syntetické cesty byly realizovány pomocí tradiční syntézy v roztoku. Všechny mají podobný průběh - jako výchozí látka se používá různě substituovaný 2-nitrobenzensulfonylchlorid a funkční derivát aminokyseliny (ester) či volná aminokyselina.

První popsaná syntéza derivátu benzothiadiazepinu vycházející z 2-nitrobenzensulfonylchloridu **I** byla provedena v roce 1992. Cílem bylo připravit strukturně nové látky obsahující aromatický systém přikondenzovaný k sedmi- či osmičlennému kruhu – takové struktury byly považovány za aktivní vůči srdeční arytmii a navíc vykazovaly další biologické vlastnosti, jako například antiagregační aktivitu či neuroaktivitu (ovlivňují chování neurotransmiteru serotoninu)¹.

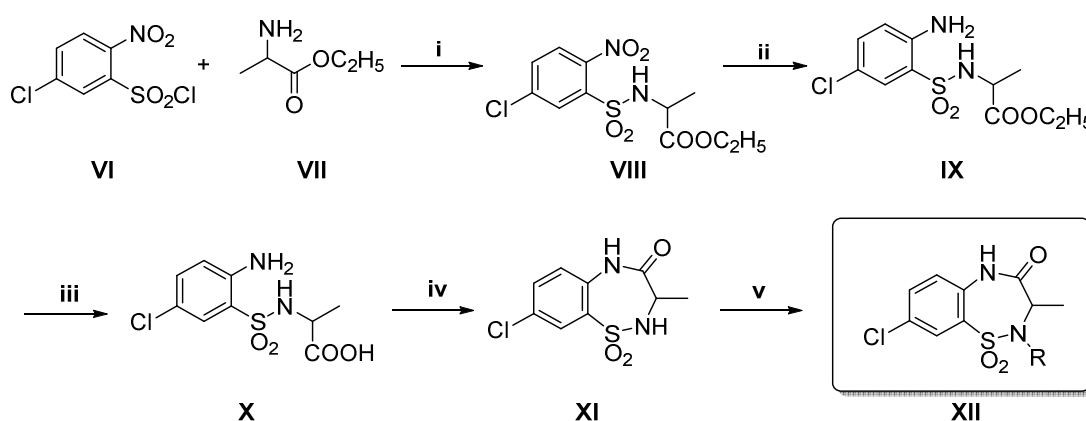
Prvním krokem této syntézy byla kondenzace 2-nitrobenzensulfonylchloridu **I** s glycinem **II** za vzniku *N*-(2-nitrobenzensulfonyl)glycinu **III**, který byl poté přeměněn reaktivní cyklizací s užitím práškového zinku v kyselině octové na 2,3-dihydro[1,2,5]benzothiadiazepin-4(5*H*)-on **IV**. Tato struktura byla poté selektivně alkylována na dusíku v poloze 2 pomocí příslušných alkylhalogenidů v DMF za přítomnosti K₂CO₃ za vzniku finálního produktu **V**.¹ Syntéza je popsána ve **Schématu 2**. Kromě *N*² alkylace byla dále popsána *N*⁵ alkylace, a to různými způsoby - aminoalkylhalogenidem, epichlorhydrinem, chloroacetylaminohalogenidem.¹



Podmínky: i) práškový Zn, CH₃COOH ii) R¹-X, K₂CO₃, DMF

Schéma 2: První popsaná příprava derivátu benzothiadiazepinu¹

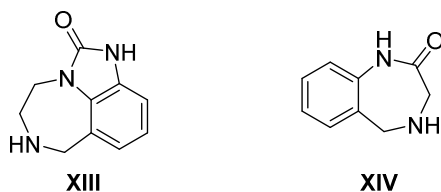
Další syntéza popsaná v roce 1998 vychází ze substituovaného 2-nitrobenzensulfonylchloridu (konkrétně 5-chloro-2-nitrobenzensulfonylchlorid **VI**), který reaguje s ethylesterem alaninu **VII**. Vzniklý nitroderivát **VIII** byl poté podroben redukci nitroskupiny práškovým železem v kyselině octové na aminoskupinu (struktura **IX**), poté následovala hydrolyza esterové skupiny za vzniku látky **X**, která po aktivaci karbodiimidem poskytla cyklický produkt **XI**. Ten byl poté alkylován na dusíkovém atomu v poloze 2 pomocí příslušného alkylhalogenidu za tvorby finálního derivátu **XII**. Jednotlivé kroky syntézy popisuje **Schéma 3**.²



Podmínky: i) TEA ii) Fe, CH₃COOH iii) NaOH iv) EDCI v) R-I, K₂CO₃

Schéma 3 : Syntéza derivátů benzothiadiazepinu v roztoku z roku 1998².

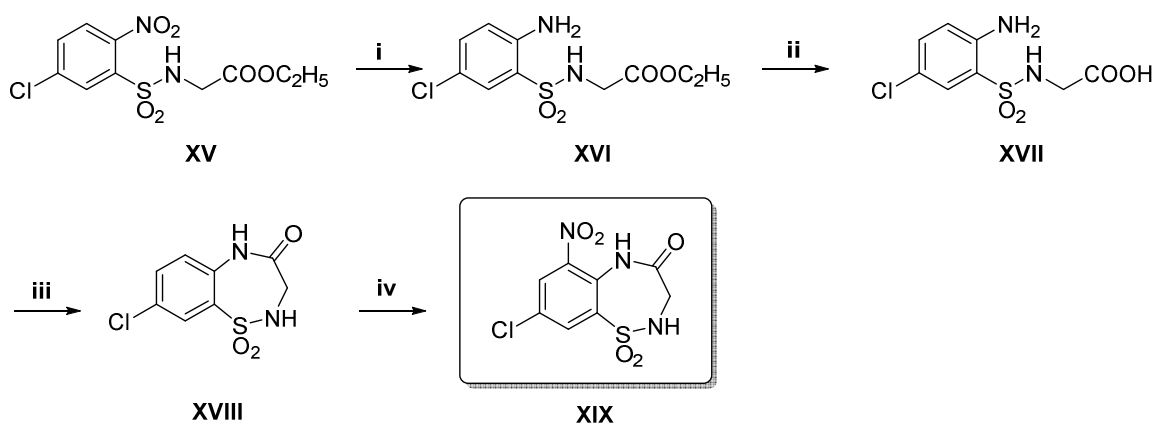
Jiný článek od stejných autorů z roku 2006 popisuje přípravu substituovaných benzothiadiazepinů navržených jako TBO analoga (tetrahydrobenzodiazepinon **XIV**) odvozených od TIBO (4,5,6,7-tetrahydroimidazo[4,5,1-*jk*][1,4]benzodiazepin-2(1*H*)-on **XIII** či -thion) působících jako inhibitory reverzní transkriptázy (tj. jsou anti-HIV aktivní). Základní struktury TBO a TIBO jsou vyobrazeny na **Obrázku 5**.¹¹



Obr. 5: Základní skelet TIBO a TBO.

Přípravu vybraných TBO analog popisují následující **Schémata 4 a 5**.

První tři reakční kroky jsou obdobné jako výše popsaná syntéza z roku 1998 (viz **Schéma 3**). Posledním syntetickým krokem je nitrace derivátu za vzniku finálního produktu **XIX**.¹¹

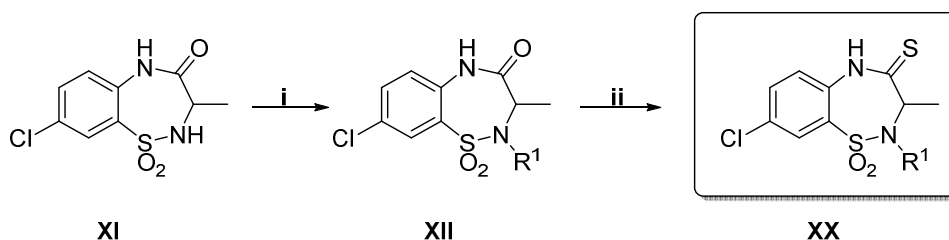


Podmínky: i) Fe, CH₃COOH ii) NaOH, THF/EtOH iii) EDCI, DMAP, THF
 iv) koncentrovaná HNO₃

Schéma 4: Syntéza nitro derivátu benzothiadiazepinu.¹¹

Obdobný postup byl použit již v roce 2002 k syntéze derivátů odvozených od 2,3-dihydroimidazo[1,5,4-ef][1,2,5]-benzothiadiazepin-6(4*H*,7*H*)-thion 1,1-dioxidu, taktéž jako TIBO analog.¹²

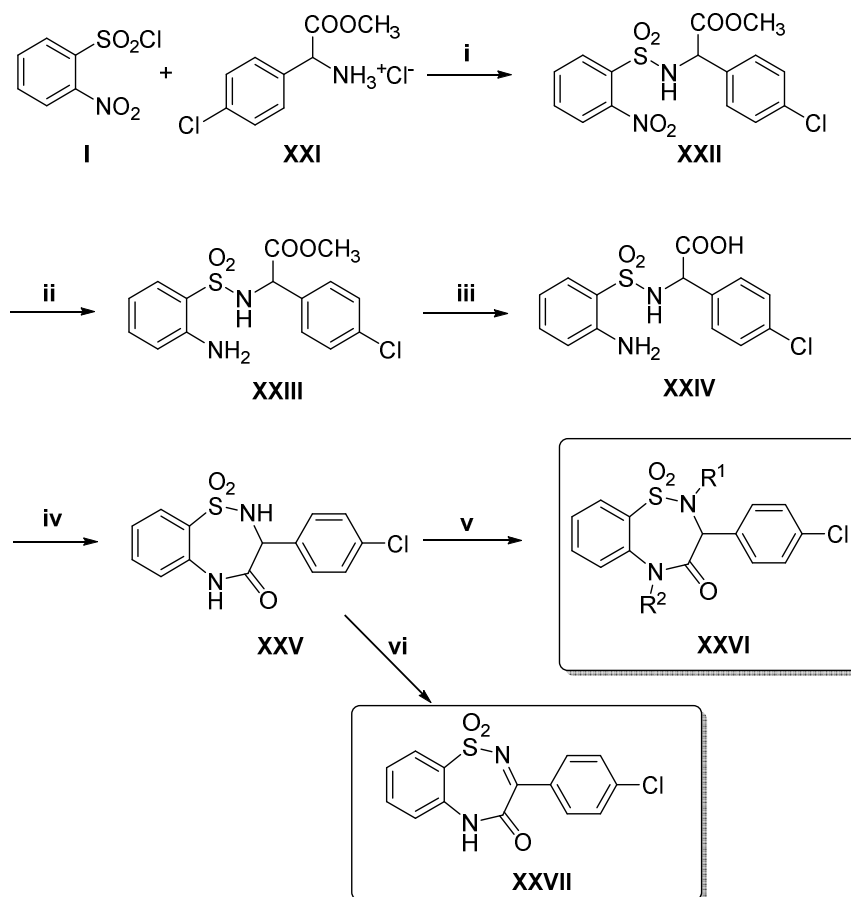
Následující **Schéma 5** ukazuje přípravu thionu vycházející opět z derivátu **XI** připraveného postupem z roku 1998 popsaným výše (**Schéma 3**).² Tento derivát byl alkylován za vzniku látky **XII** a poté podroben reakci s Lawessonovým činidlem za vzniku thionu **XX**.¹¹



Podmínky: i) R¹-X, K₂CO₃, DMF ii) Lawessonovo činidlo, xylén

Schéma 5: Syntéza thionu¹¹ vycházející z derivátu benzothiadiazepinu **XI** připraveného podle postupu z roku 1998.²

Publikace z roku 2014 popisuje syntézu vycházející z 2-nitrobenzensulfonylchloridu **I** a hydrochloridu methylamino(4-chlorofenyl)acetátu **XXI**. Vzniklá sloučenina **XXII** je podrobena redukci nitroskupiny na aminoskupinu (derivát **XXIII**), hydrolyze (**XXIV**) a intramolekulární cyklizaci (**XXV**), načež následuje buď alkylace dusíků v polohách 2 a 5 (finální produkt **XXVI**) či dehydrogenace (finální produkt **XXVII**). Jednotlivé kroky popisuje **Schéma 6**.³

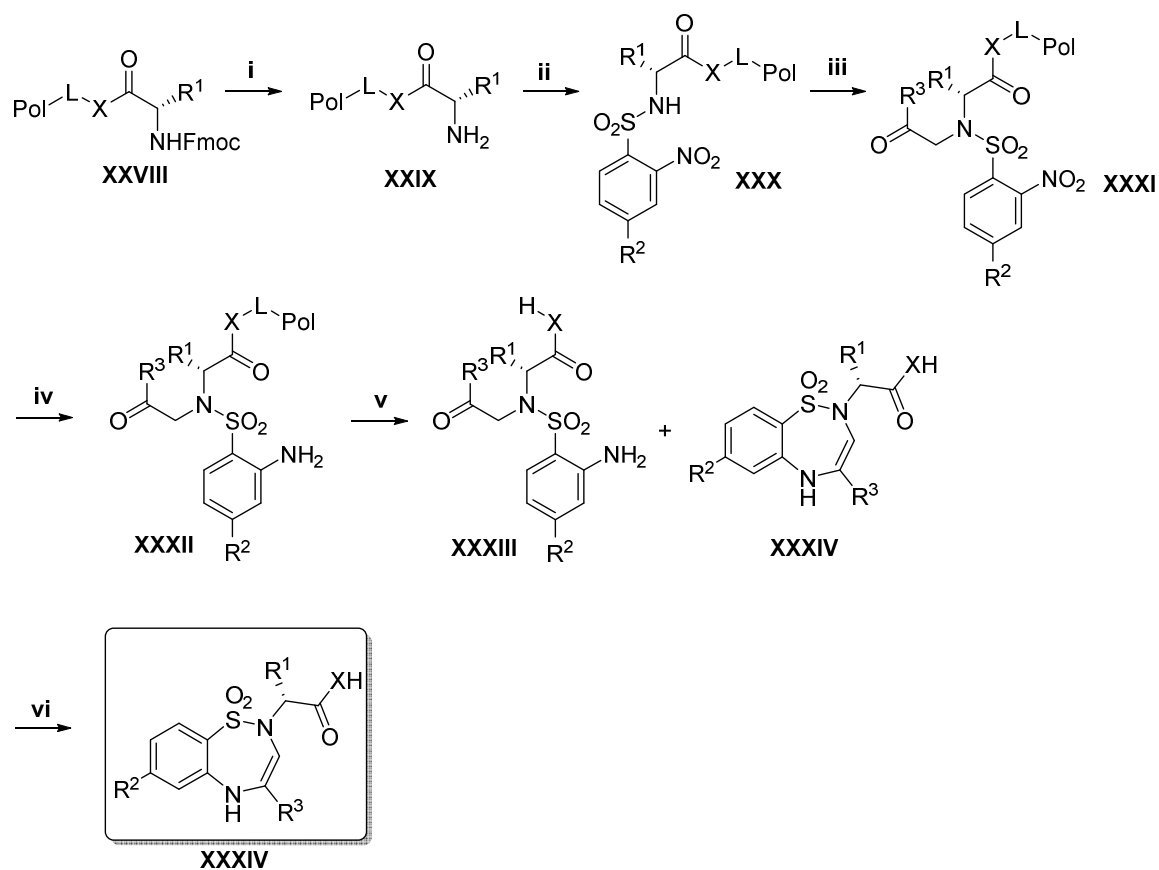


Podmínky: i) DIEA, DCM ii) Fe, CH₃COOH iii) LiOH, THF:MeOH:H₂O
 iv) EDC.HCl, DMAP v) MeCN, K₂CO₃, R-X
 vi) MeCN, K₂CO₃

Schéma 6 : Příprava derivátů benzothiadiazepinu³

Jediné příbuzné sloučeniny cílových benzothiadiazepinů připravené pomocí syntézy na pevné fázi jsou deriváty trisubstituovaných 2,5-dihydrobenzo-[f]-[1,2,5]thiadiazepin-1,1-dioxidů. Prvním krokem jejich syntézy byla imobilizace Fmoc- α či β -aminokyseliny na polymerní nosič (byla vyzkoušena Wangova i Rinkova amidová pryskyřice) pomocí ethanolaminového linkeru (zvýšení rozmanitosti struktur a umožnění studia efektu vznikající esterové skupiny) za vzniku derivátu **XXVIII**.¹³

Druhým krokem byla deprotektce Fmoc skupiny za vzniku sloučeniny **XXIX**, která byla poté sulfonylována různě substituovanými 2-nitrobenzensulfonylchloridy za vzniku látky **XXX**. Následujícím krokem byla Fukuyama alkylace za tvorby derivátu **XXXI**, který byl poté zredukován na derivát **XXXII**. Posledním krokem bylo štěpení z pryskyřice, přičemž vznikaly dva produkty – acyklický **XXXIII** a finální cyklický derivát **XXXIV**. Acyklická forma finálního produktu samovolně cyklizovala na produkt **XXXIV** v deuterovaném DMSO.¹³ Reakční sekvence je popsána ve **Schématu 7**.



Pol-L-XH = Pol-L-OH, Pol-L-NH₂, Pol-L-OOC-NH-CH₂CH₂OH

Podmínky: i) 50% piperidin v DMF ii) 2-NosCl, 2,6-lutidin, DCM

iii) bromoketon, DIEA, DMF

iv) Na₂S₂O₄, K₂CO₃, TBAHS, 50% H₂O/DCM

v) 50% TFA v DCM vi) DMSO-d₆

Schéma 7: Syntéza na pevné fázi vedoucí k derivátům dihydrobenzothiadiazepin-1,1-dioxidů. ¹³

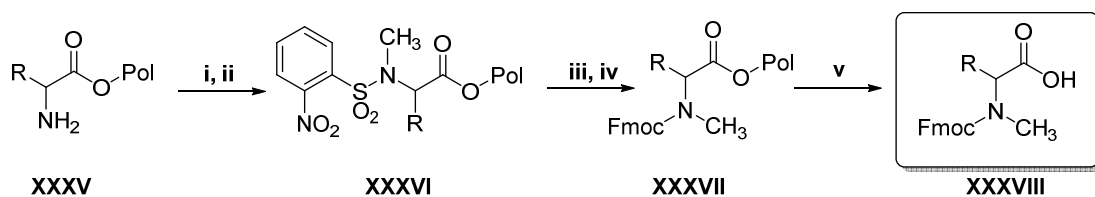
2.3 Využití nitrobenzensulfonamidů v syntéze na pevné fázi

V této kapitole jsou zevrubně rozebrány možnosti využití imobilizovaných nitrobenzensulfonamidů (tedy klíčových intermediátů pro syntézu cílových benzothiadiazepinů). V organické syntéze mají zásadní význam 2- či 4-nitrobenzensulfonamidy - jako výchozí látky pro jejich syntézu se často využívají 2- či 4-nitrobenzensulfonylchloridy (nosylchloridy, Nos-Cl).¹⁴ Na poli syntézy na pevné fázi se nosylchloridy využívají třemi základními způsoby - a) jako protektivní skupina pro monoalkylaci, přičemž následuje odštěpení nosylu, b) jako aktivující částice pro alkylaci, ale nosyl zůstává součástí struktury a není odštěpen a c) jako běžná výchozí látka pro syntézu bez využití alkylace.¹⁴

2.3.1 Nos jako protektivní skupina pro regioselektivní monoalkylace a deprotektce

Začlenění nosylové skupiny se obvykle provádí reakcí aminoskupiny imobilizované látky s 2- či 4- nosylchloridem v přítomnosti báze (collidin, diisopropylethylamin, triethylamin, 2,6-lutidin) v různých rozpouštědlech (např. DMF, THF, DCM). Vzniklý nitrobenzensulfonamid je poté podroben alkylaci – pomocí alkylhalogenidů, haloketonů, alkoholů, nenasycených ketonů nebo diazomethanu.¹⁴ Posledním krokem je deprotektce nosylové skupiny pomocí thiolů (thiofenol, merkptoethanol, merkptooctová kyselina atd.) v přítomnosti vhodné báze (K₂CO₃, DBU, collidin, propylamin apod.) a jako rozpouštědlo se typicky používá DMF či NMP. V syntéze na pevné fázi je obvyklá kombinace merkptoethanol + DBU + DMF.¹⁴ Příkladem může být Fukuyama alkylace využívaná v syntéze na pevné fázi k inkorporaci *N*-methylovaných aminokyselin do biologicky aktivních peptidů – *N*-methylované peptidové vazby vykazují vyšší rezistenci vůči proteolýze.

Jako základ této syntézy byla použita 2-Cl-tritylová pryskyřice, na kterou byla imobilizována výchozí aminokyselina (R = postranní řetězec použité aminokyseliny) za vzniku výchozí látky **XXXV**. Následovalo zavedení 2-nitrobenzensulfonylchloridu a alkylace za Mitsunobu podmínek^{15,16} za tvorby meziprojektu **XXXVI**. Dalším krokem bylo odstranění nosylové chránící skupiny a zavedení nové chránící skupiny Fmoc za tvorby látky **XXXVII**. Posledním krokem bylo odštěpení *N*-Fmoc-*N*-methylované aminokyseliny z polymeru za tvorby finálního produktu **XXXVIII**.^{17,18}



Podmínky: i) 2-NosCl, DIEA, THF či THF/DCM (2:1)

ii) MeOH, PPh₃, DEAD, suchý THF iii) PhSNa, DMF

iv) FmocCl, DIEA, DCM v) TFA/DCM (1:1)

Schéma 8: Syntéza *N*-Fmoc-*N*-methylovaných peptidů.

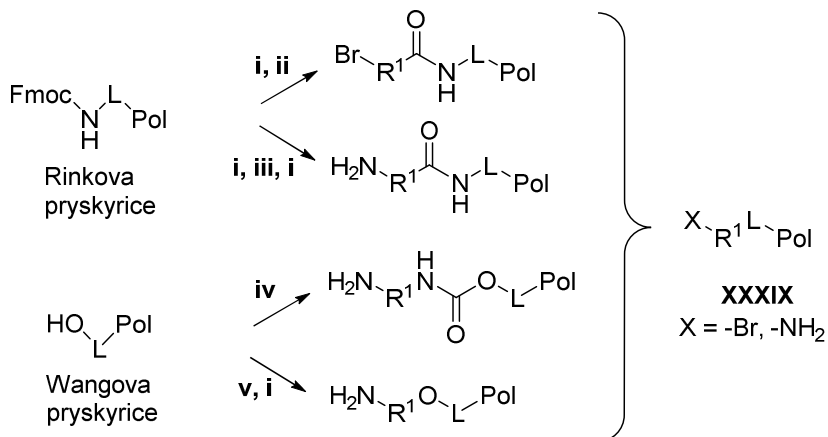
2.3.2 Nos jako aktivující skupina pro alkylace bez následné deprotektce

Využití nosylové skupiny je stejné jako v předchozím případě – využívá se při alkylačních procedurách. V tomto případě není ale nosylová skupina po alkylationi odštěpena a je ponechána jako součást struktury, ze které následně vzniká lineární či cyklický nitrobenzensulfonamid. Důvodů, proč bývá lineární nitrobenzensulfonamid (či alespoň jeho aromatická část) ponechán součástí struktury látky, je hned několik – může sloužit jako chromofor pro UV detekci, může zvyšovat strukturní rozmanitost látek či může poskytovat reaktivní interní nukleofil. K tvorbě cyklických nitrobenzensulfonamidů je využíván zejména 2-nitrobenzensulfonylchlorid – slouží jako prekurzor pro tvorbu tetrahydrobenzopyrazinothiadiazinon dioxidů **XLVI** či dihydrobenzothiadiazepin-1,1-dioxidů **XXXIV**.¹⁴ Jak již bylo uvedeno, lineární 2-nitrobenzensulfonamid lze pohodlně získat inkorporací 2-nitrobenzensulfonylchloridu do cílové struktury a může být tak dále využit pro tvorbu cyklických sulfonamidů – intra/intermolekulární cyklizací s aldehydy¹⁹, ketony¹³ či isothiokyanáty²⁰.

Cyklizace 2-nitrobenzensulfonamidu s ketony (příprava 2,5-dihydrobenzo[*f*][1,2,5]thiadiazepin-1,1-dioxidů¹³ jako jediných příbuzných derivátů syntetizovaných s použitím syntézy na pevné fázi) již byla popsána v **kapitole 3.2** zabývající se syntézou derivátů 2,3-dihydrobenzo[*f*][1,2,5]thiadiazepin-4(5*H*)-on 1,1-dioxidů.

Pomocí cyklizace s aldehydy byla popsána příprava 1,2,11,11a-tetrahydrobenzo[*e*]pyrazino[1,2-*b*][1,2,4]-thiadiazin-3(4*H*)on 6,6-dioxidů vycházející z Rinkovy či Wangovy pryskyřice. Imobilizaci výchozích látek na danou pryskyřici a

tvorbu výchozí struktury **XXXIX**, ze které vychází další syntetický postup, popisuje **Schéma 9**.¹⁹



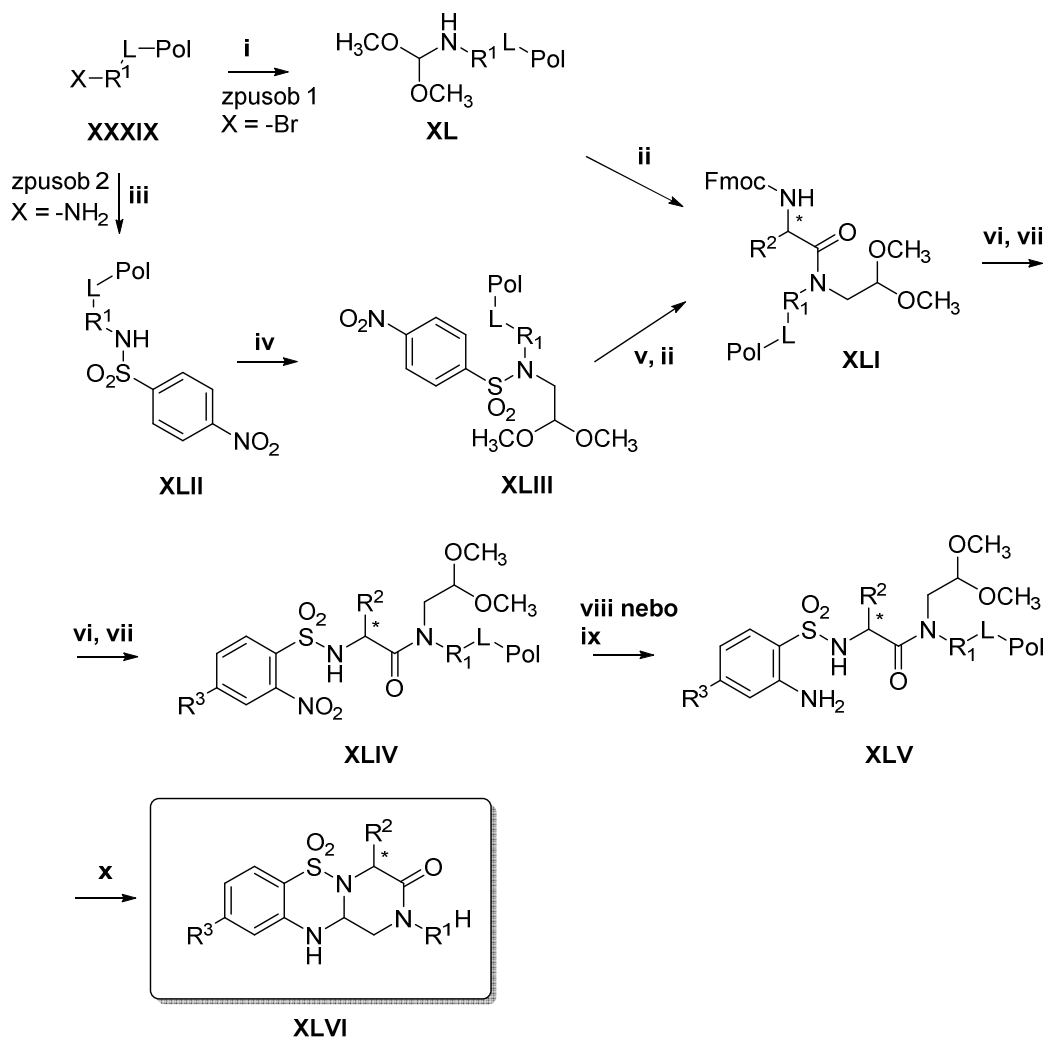
Podmínky: i) 50% piperidin v DMF ii) bromoctová kyselina, DIC, DCM, pak DIEA
 iii) Fmoc-aminokyselina, HOBT, DIC, DCM/DMF
 iv) CDI, pyridin, DCM, pak ethylendiamin, DCM
 v) CCl₃CN, DBU, DCM, pak 3-(Fmoc-amino)propanol, BF₃.Et₂O,
 bezvodý THF, pak Fmoc-β-Ala-OH, HOBT, DIC, DCM/DMF

Schéma 9: Imobilizace výchozí látky na Rinkovu či Wangovu pryskyřici¹⁹

K získání klíčového intermediátu **XLI** bylo možné využít dva syntetické způsoby. První vycházel z bromoctvé kyseliny ukotvené na Rinkově pryskyřici **XXXIX** (X = -Br, R¹ = -CH₂-). Brom byl substituován aminoacetaldehyd dimethylacetalem za vzniku imobilizovaného derivátu **XL**, který byl následně acylován různými Fmoc-aminokyselinami za tvorby intermediátu **XLI**.¹⁹ Druhý syntetický způsob poskytoval více možností strukturní rozmanitosti látek – řetězec R¹ nebyl omezen pouze na methylenovou skupinu jako v předešlém prvním způsobu, na Wangovu pryskyřici lze imobilizovat amidy, aminy či alkoholy za tvorby látky **XXXIX** (X = -NH₂). Tento derivát byl následně ochráněn 4-NosCl za tvorby látky **XLII**, která byla následně alkylována pomocí Mitsunobu reakce za tvorby sloučeniny **XLIII**. Po deprotekcí nosylové skupiny byl derivát acylován různými Fmoc-α-aminokyselinami za tvorby klíčového intermediátu **XLI**. Po deprotekcí Fmoc a následné nosylaci s 2-NosCl byl získán derivát **XLIV**, jehož nitroskupina byla v dalším kroku zredukována za vzniku derivátu **XLV**. Finální derivát **XLVI** byl získán při kyselé deprotekcí acetalu

doprovázené štěpením látky z pryskyřice. Celý syntetický postup popisuje **Schéma 10**.

19



L = Wangův či Rinkův linker

Podmínky: i) aminoacetaldehyd dimethylacetal, DIEA, DMF

ii) Fmoc- α -aminokyselina, HOBt, DIC, DCM/DMF

iii) 4-NosCl, 2,6-lutidin, DCM

iv) glykolaldehyd dimethylacetal, PPh₃, DIAD, bezvodý THF

v) 2-merkптоethanol, DBU, DMF vi) 50% piperidin v DMF

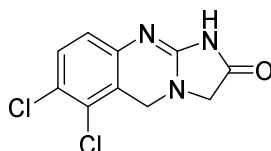
vii) 2-NosCl, 2,6-lutidin, DCM viii) SnCl₂·2H₂O, DIEA, DMF

ix) Na₂S₂O₄, TBAHS, K₂CO₃, DCM/H₂O x) 50% TFA v DCM

Schéma 10: Stereoselektivní syntéza tetrahydrobenzopyrazino-thiadiazinon dioxidů.

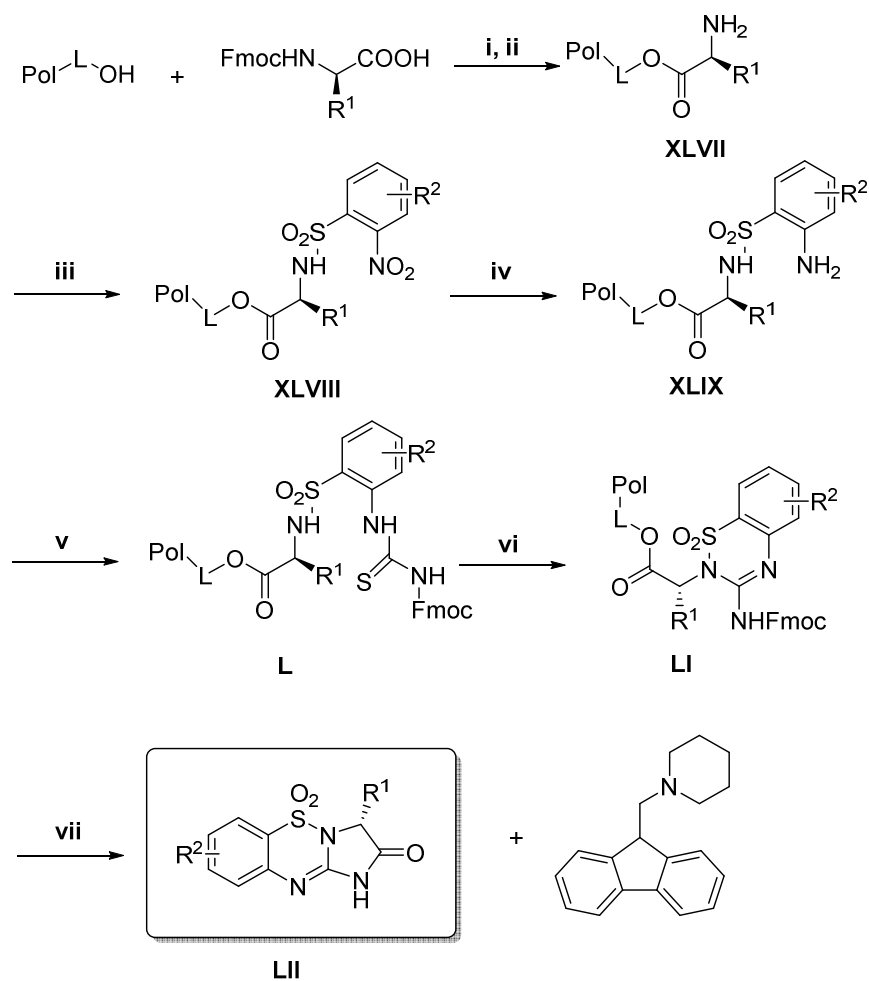
19

Cyklizace s isothiokyanáty byla využívána při syntéze analog Anagrelidu²⁰, léčiva používaného v hematologii pro léčbu esenciální trombocytózy^{21,22}, nadprodukce krevních destiček a chronické myeloidní leukémie²³. Jeho struktura je zobrazena na **Obrázku 6**. Část popsaného syntetického postupu byla využita pro experimentální část této práce.



Obr. 6: Struktura Anagrelidu.²¹

Prvním krokem syntézy je imobilizace Fmoc- α -aminokyseliny na Wangovu pryskyřici a následná deprotektce Fmoc za tvorby látky **XLVII**. Následuje nosylace pomocí 2-NosCl za tvorby **XLVIII**, jehož nitroskupina podléhá redukci a vzniká tak 2-nitrobenzensulfonamid **XLIX**. Po reakci s Fmoc-isothiokyanátem vzniká derivát Fmoc-thiomočoviny **L**. Reakcí s karbodiimidem vzniká derivát **LI**. Deprotektce Fmoc protektivní skupiny tohoto derivátu je doprovázena spontánní cyklizací za vzniku finální látky **LII**, která se uvolní z pryskyřice (tzv. cyclative cleavage, cyklické štěpení). Reakční sekvenci popisuje **Schéma 11**.²⁰



Podmínky: i) Fmoc- α -aminokyselina, DIC, HOBt, DMAP, DCM/DMF
 ii) piperidin, DMF iii) 2-NosCl, 2,6-lutidin, DCM
 iv) $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$, K_2CO_3 , TBAHS, DCM/ H_2O v) Fmoc-NCS, THF
 vi) DIC, DMF vii) piperidin, DMF

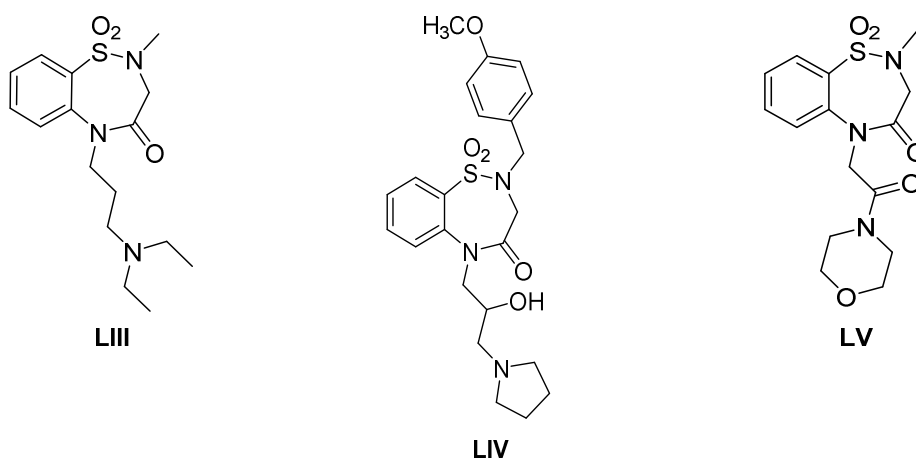
Schéma 11: Příprava analog Anagrelidu ²⁰

2.4 Biologické vlastnosti derivátů 2,3-dihydrobenzo[*f*][1,2,5]thiadiazepin-4(5*H*)-on 1,1-dioxidů

Benzothiadiazepiny patří z hlediska medicínální chemie mezi zajímavé látky pro své antiarytmické¹, anti-HIV^{2,11,12} a protirakovinné³ vlastnosti.

2.4.1 Antiarytmická aktivita

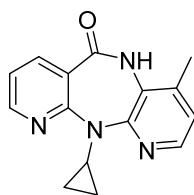
Vybrané deriváty¹ byly testovány na antiarytmickou aktivitu vyvolanou látkou zvanou ouabain (inhibitor sodíko-draslíkové pumpy) u morčat pod anestézií. Bylo zkoumáno, jak biologickou aktivitu ovlivňuje struktura substituentů v polohách 2 a 5. Vybrané nejúčinnější deriváty **LIII**, **LIV** a **LV** jsou zobrazeny na **Obrázku 7**.¹



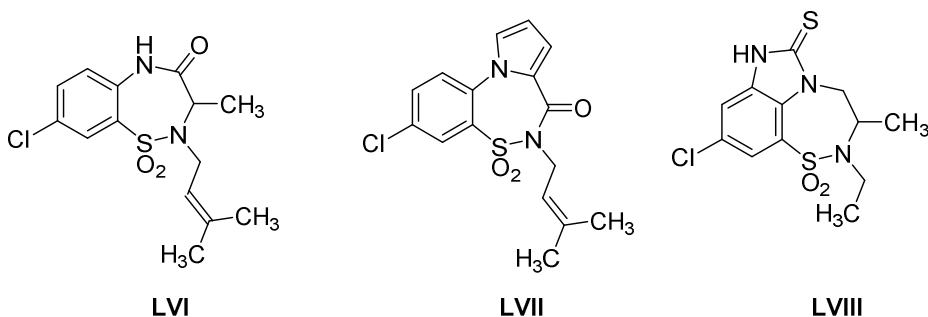
Obr. 7: Nejúčinnější deriváty benzothiadiazepinu proti srdeční arytmii.¹

2.4.2 Anti-HIV aktivita

Pro *in vitro* testování inhibice HIV-1 reverzní transkriptázy byla jako referenční látka zvolen nevirapin (jeho struktura je zobrazena na **Obrázku 8**), látka spadající do kategorie NNRTI (non-nucleoside reverse transcriptase inhibitor; inhibitory reverzní transkriptázy nenukleosidové povahy), která byla již schválena pro klinické použití. Studie SAR (structure-activity relationships) prokázaly, že pro anti-HIV 1 aktivitu je klíčová přítomnost alkylu či alkenylu na dusíku v poloze 2. Navíc bylo zjištěno, že připravené thiony vykazují nižší aktivitu oproti příslušným karbonylovým derivátům. Vybrané testované sloučeniny popisuje **Obrázek 9**.^{2,11,12}



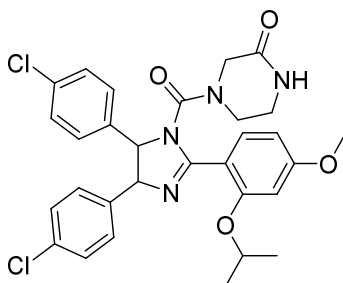
Obr. 8: Struktura nevirapinu.²⁴



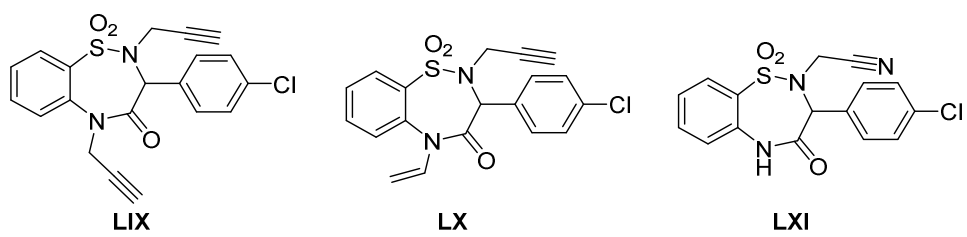
Obr. 9: Vybrané sloučeniny testované jako inhibitory HIV-1 reverzní transkriptázy.
2,11,12

2.4.3 Protirakovinné vlastnosti.

U vybraných derivátů byla testována jejich schopnost inhibovat interakci proteinů p53 a onkoproteinu MDM2 – tato vlastnost byla u alkylovaných derivátů **XXVI** potvrzena, ale nebyla u nich *in vitro* potvrzena antiproliferační aktivita (pravděpodobně kvůli špatné rozpustnosti ve vodě). Dehydrogenovaný derivát **XXVII** nevykazoval vůbec žádnou biologickou aktivitu. Jako referenční látka byl zvolen Nutlin-3 (jeho struktura viz **Obrázek 10**), komerčně dostupný inhibitor interakce p53-MDM2. Příklady některých konkrétních testovaných derivátů jsou vyobrazeny na **Obrázku 11**.³



Obr. 10: Struktura Nutlinu-3.²⁵



Obr. 11: Konkrétní příklady testovaných derivátů jako inhibitorů interakce p53-MDM2.³

3 Výsledky a diskuse

3.1 Popis navržené syntetické cesty

Pro syntézu intermediátů byla použita Wangova pryskyřice se substitucí 0,9 mmol/g. Pro testovací reakce byla použita Wangova pryskyřice se substitucí 0,52 mmol/g. Zahájení syntézy bylo provedeno imobilizací výchozí α -aminokyseliny chráněnou na svém N-konci Fmoc protektivní skupinou za vzniku látky **1**(R^1). Dalším krokem byla deprotektce pomocí 50% roztoku piperidinu v DMF za tvorby derivátu **2**(R^1). Následovala sulfonylace pomocí různě substituovaných 2-nitrobenzensulfonylchloridů – vznikla sloučenina **3**(R^1, R^2). Dalším krokem byla Mitsunobu alkylace dusíkového atomu za tvorby látky **4**(R^1, R^2, R^3). Posledním krokem přípravy intermediátu **5**(R^1, R^2, R^3) byla redukce nitroskupiny na aminoskupinu. Optimalizace tvorby finálního produktu **6**(R^1, R^2, R^3) je popsána v další části této práce. Jednotlivé reakční kroky popisuje následující **Schéma 12**.

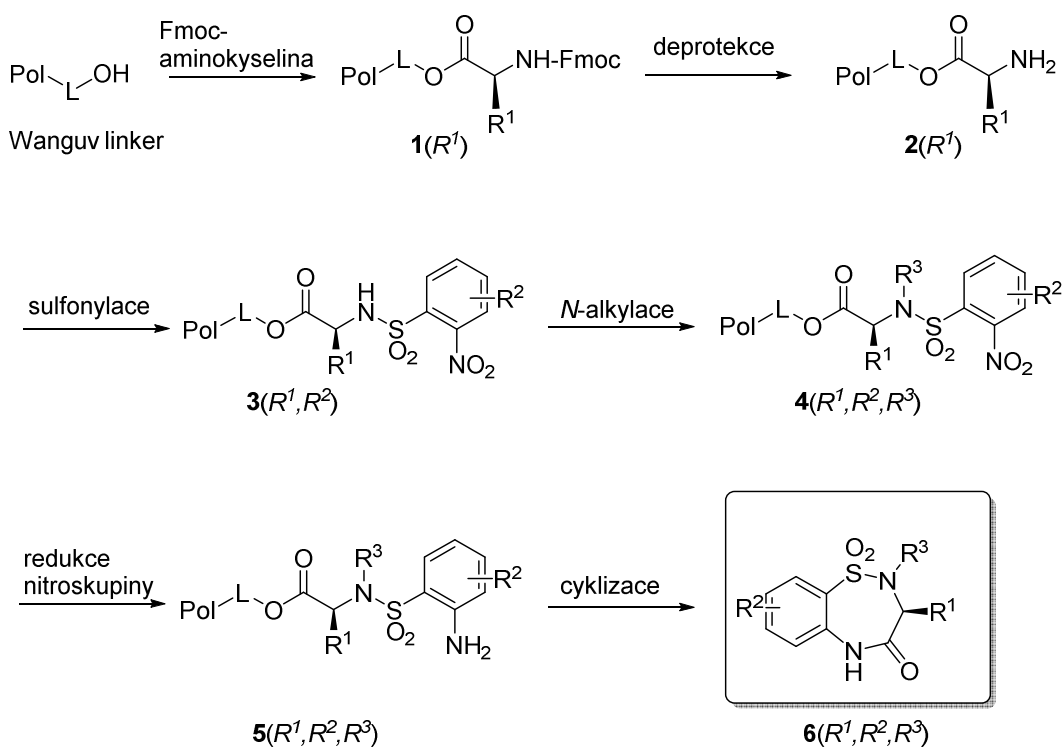


Schéma 12: Navržená syntetická cesta.

3.1.1 Imobilizace aminokyseliny

Prvním krokem reakční sekvence bylo navázání aminokyseliny přes její C-konec na polymerní nosič – Wangovu pryskyřici. Imobilizace byla provedena pomocí HOBt, DMAP a DIC v DCM/DMF. Úspěšnost tohoto kroku byla kvantifikována pomocí výpočtu loadingu metodou vnějšího standardu s použitím Fmoc-β-Ala-OH (postup je uveden v Experimentální části). První krok popisuje **Schéma 13**.

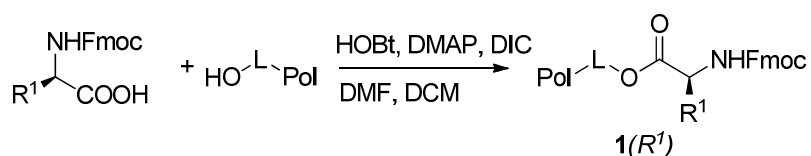


Schéma 13: Imobilizace výchozí aminokyseliny na Wangovu pryskyřici.

Připravené deriváty a použité aminokyseliny jsou vyobrazeny v následující

Tabulce 1:

Tab. 1: Přehled použitých aminokyselin a připravených derivátů včetně loadingu.

Derivát	Použitá aminokyselina	Loading
1(1)	Fmoc-Ala-OH	0,52
1(2)	Fmoc-Phe-OH	0,52
1(3)	Fmoc-Glu(OtBu)-OH	0,44
1(4)	Fmoc-Pro-OH	0,49
1(5)	Fmoc-His(Trt)-OH	0,26
1(6)	Fmoc-Lys(Boc)-OH	0,26
1(7)	Fmoc-Tyr-OH	0,48
1(8)	Fmoc-Trp(Boc)-OH	0,20
1(9)	Fmoc-Ser(tBu)-OH	0,46

3.1.2 Deprotekce a sulfonylace

Následovala deprotekce Fmoc skupiny pomocí 50% piperidinu v DMF za tvorby volné -NH_2 skupiny, která byla následně konvertována na odpovídající sulfonamid **3**(R^1 , R^2) (2-nitrobenzensulfonylchloridy, 2,6-lutidin, DCM). Úspěšnost sulfonylačního kroku byla ověřena reakcí s Fmoc-OSu, který byl použit pro vizualizaci a detekci výchozí aminokyseliny **2**(R^1) pomocí UPLC-UV (po odštěpení z polymerního nosiče). Tyto dva kroky popisuje **Schéma 14**.

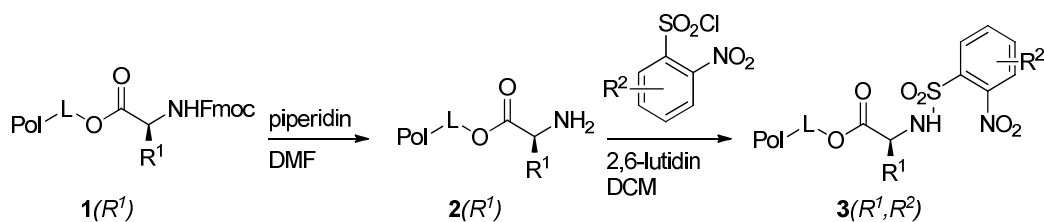


Schéma 14: Deprotekce a následná sulfonylace

Použité 2-nitrobenzensulfonylchloridy a výsledky jednotlivých reakcí shrnuje

Tabulka 2:

Tab. 2: Přehled použitých 2-NosCl.

Derivát	Použitý 2-NosCl	Čistota ^a [%]
3 (1,1)		94
3 (1,2)		78
3 (1,3)		88
3 (1,4)		75

^a procentuální surová čistota vypočítaná po odštěpení z polymerního nosiče ze spektra UPLC-UV porovnáním ploch pík

3.1.3 Alkylace dusíkového atomu

Dalším krokem byla *N*-alkylace za Fukuyama-Mitsunobu podmínek. Tento krok byl zařazen díky možnosti další substituce finálních látek. Vyzkoušené podmínky jsou shrnuty v kapitole neúspěšných pokusů o finální cyklizaci. Tento reakční krok popisuje **Schéma 15**.

Alkylace probíhala kvantitativně při použití primárních alkoholů (čistota vypočtená z UPLC-MS spektra porovnáním ploch píků byla v rozmezí 80-95 %), ze sekundárních byl vyzkoušen cyklohexanol, reakce však neprobíhala kvantitativně ani po 24 hodinách a při analýze tohoto kroku byl na UPLC-MS spektru stále patrná výchozí látka. Neúspěšná byla též aplikace methylglykolátu, která neposkytla požadovaný produkt v dostatečné čistotě. Přehled použitých alkoholů a připravených derivátů shrnuje **Tabulka 3**.

Byla vyzkoušena i klasická alkylace pomocí alkylhalogenidů (konkrétně byl vyzkoušen methyljodid a benzylbromid) v DMF za přítomnosti DBU, ale lepší výsledky poskytovala alkylace pomocí alkoholů – klasickou alkylací pomocí alkylhalogenidů bylo několikrát nutno opakovat za zvýšené teploty, aby reakce proběhla kvantitativně. Fukuyama-Mitsunobu alkylace probíhala kvantitativně za laboratorní teploty, navíc je pro tento způsob alkylace větší výběr výchozích látek (alkoholů) než u klasické alkylace alkylhalogenidy.

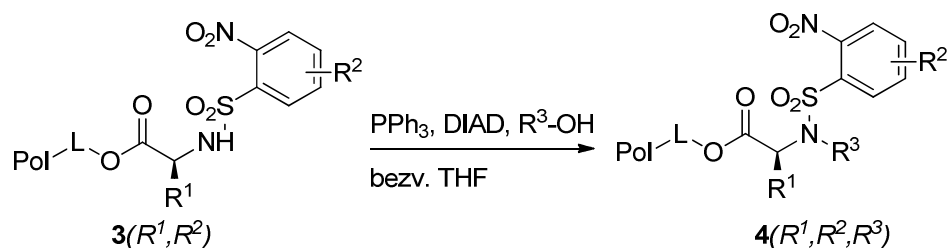
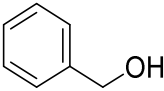

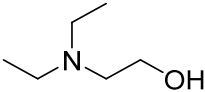
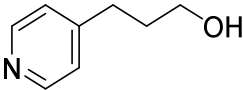
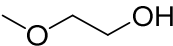

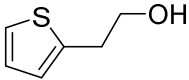
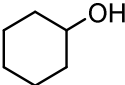
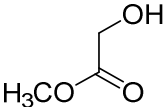


Schéma 15: *N*-alkylace pomocí Fukuyama-Mitsunobu procedury.

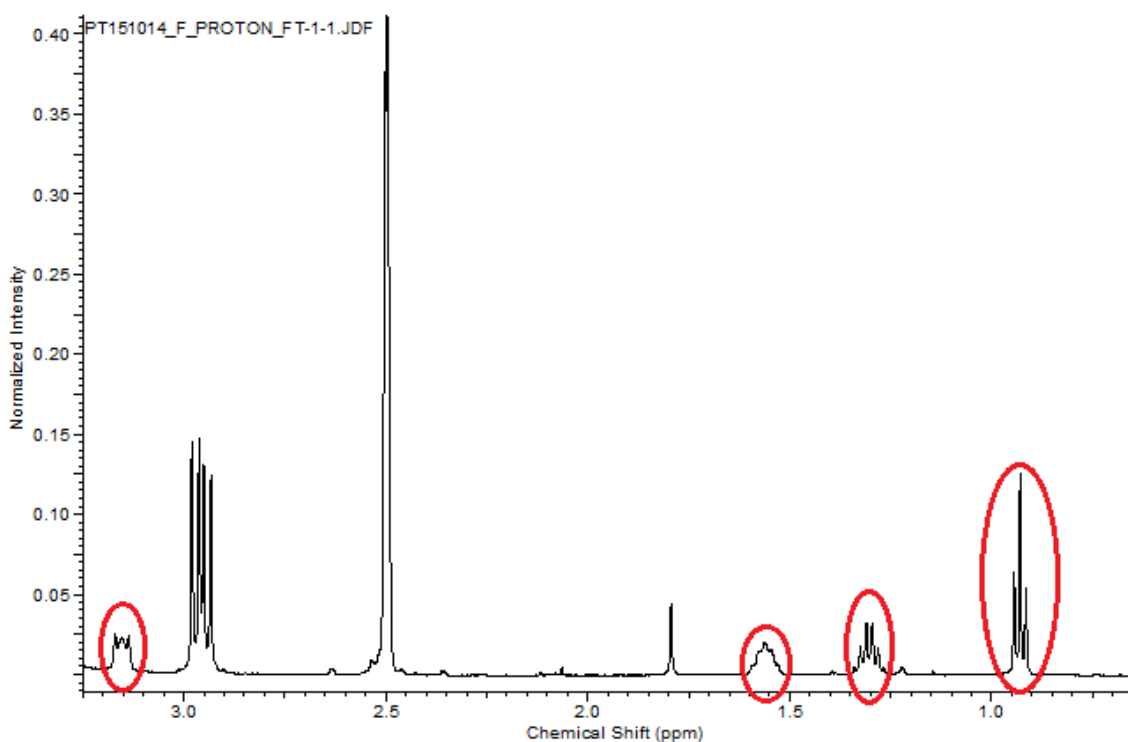
Tab. 3: Přehled testovaných alkoholů a připravených derivátů.

Derivát	Použitý alkohol	Čistota ^a [%]
4(1,1,1)		93
4(1,1,2)		81
4(1,1,3)		92
4(1,1,4)		84
4(1,1,5)		93
4(1,1,6)		95
4(1,1,7)		83
4(1,1,8)		9
4(1,1,9)		16

^a procentuální surová čistota vypočítaná po odštěpení z polymerního nosiče ze spektra UPLC-MS porovnáním ploch píků

3.1.1 Redukce nitroskupiny

Při přípravě prvních úspěšně připravených finálních derivátů byla použita redukce dithioničitanem sodným, s využitím TBAHS jako fázového přenašeče²⁶. Nicméně bylo z NMR spekter finálních derivátů zjištěno, že se TBAHS z pryskyřice po redukci nevymývá a způsobuje kontaminaci produktů i po chromatografickém čištění na reverzní fázi. Pro odstranění TBAHS bylo vyzkoušeno promývání pryskyřice po redukci DCM, DMF, MeOH, DCM/H₂O, DMSO, kombinace DCM/H₂O, MeOH/H₂O, DCM/MeOH, DMSO s přidavkem piperidinu či kyseliny octové. Tetrabutylammoniový kation byl však stále detekován v hmotnostním spektru po analýze redukce, finální cyklizace i během čištění na semipreparativním HPLC-MS a jeho signály byly stále detekovány i v NMR spektrech finálních látek. Následující **Obrázek 12** zobrazuje výseč NMR spektra již HPLC čištěné látky, přičemž signály kontaminace tetrabutylammoniovou solí jsou vyznačeny červeně.



Obr. 12: Výseč NMR spektra s vyznačenými signály kontaminace.

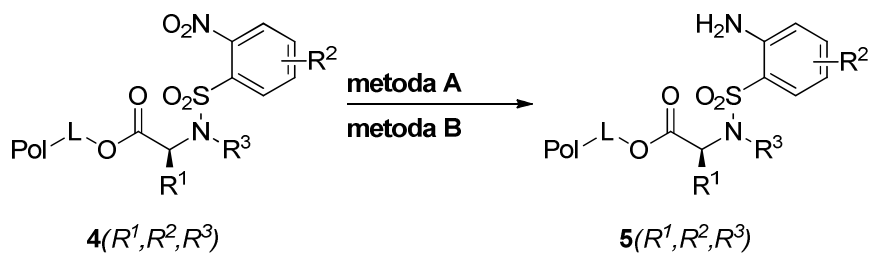
Byla tedy zvolena jiná redukční metoda - pomocí SnCl₂ · 2 H₂O v bazickém prostředí DIEA v odplyněném DMF. Samotná redukce fungovala dobře, ale objevily se problémy při následné cyklizaci u některých derivátů související pravděpodobně s přítomností solí cínu – konkrétně se jedná o deriváty **5(1,1,3)** a **5(1,1,4)**. Oba deriváty

byly předtím úspěšně připraveny, pokud byl pro redukci použit dithioničitan sodný. Dalším nevyhnutelným krokem po aplikaci redukce pomocí cínatých solí je zbavení se jejich zbytku před finální purifikací, aby nebyla zatížena preparativní kolona semipreparativního HPLC. Toto bylo provedeno pomocí SPE (extrakce pevnou fází) na kolonce reverzní fáze, procedura je ovšem zdlouhavá.

U derivátů, na kterých byly vyzkoušeny obě redukční metody, byla zaznamenána mírně vyšší čistota (vypočtená z UPLC-MS spektra porovnáním ploch píků) při aplikaci chloridu cínatého (čistota 60-90 %) – při aplikaci dithioničitanu sodného byla čistota derivátů v rozmezí 60-80 %.

Kvůli problémům finální cyklizace některých derivátů zredukovaných chloridem cínatým bylo nicméně vyhodnoceno jako účelnější použití dithioničitanu sodného, přičemž byla hledána alternativa pro odstranění kontaminace TBAHS z připravených derivátů. Testováno bylo použití flash chromatografie na silikagelu. Jako rozpouštědlo byl zvolen ethylacetát, který se ukázal jako ideální - produkt v ethylacetátu prošel kolonkou, přičemž tetrabutylammoniová sůl zůstala nasorbovaná a neeluovala společně s produktem. Nakonec byla kolonka promyta methanolem a frakce analyzována pomocí UPLC-MS – v hmotnostním spektru byl patrný tetrabutylammoniový kation, zatímco produkt nebyl v methanolvé frakci detekován, byl tedy kvantitativně vymyt ethylacetátem. Operace byla provedena na silikagelu (injekční stříkačka s fritou, sloupec cca 1x2 cm) a zabrala pouze několik minut.

Další alternativa byla nalezena a otestována na derivátech **5(1,1,3)**, **5(1,1,4)** a **5(5,1,1)**. Pryskyřice po redukci dithioničitanem sodným byla míchána přes noc v DMSO při 100°C, následně byla promyta 3x čistým DMSO. Množství tetrabutylammoniové soli se rapidně snížilo a při finálním čištění pomocí semipreparativní HPLC byl kontaminant zcela odstraněn. **Tabulka 4** popisuje přehled připravených derivátů včetně použité redukční metody (obě jsou popsány ve **Schématu 16**).



metoda A: $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$, K_2CO_3 , TBAHS, $\text{H}_2\text{O}/\text{DCM}$

metoda B: $\text{SnCl}_2 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$, DIEA, deoxygenovaný DMF

Schéma 16: Popis redukčních metod.

Tab. 4: Přehled použitých redukčních metod a připravených derivátů.

Derivát	Redukční metoda	Čistota ^a [%]
5(1,1,1)	A	80
5(2,1,1)	A, B	65; 60
5(3,1,1)	A	85
5(4,1,1)	A, B	67; 91
5(5,1,1)	A	62
5(6,1,1)	A	77
5(7,1,1)	A	78
5(8,1,1)	A	52
5(9,1,1)	A	85
5(1,2,1)	A	90
5(1,3,1)	A	75
5(1,4,1)	A	77
5(1,1,2)	A, B	60; 70
5(1,1,3)	A, B	55; 68

5(1,1,4)	A, B	70; 63
5(1,1,5)	A	72
5(1,1,6)	A	81
5(1,1,7)	A	30

^a procentuální surová čistota vypočítaná po odštěpení z polymerního nosiče ze spektra UPLC-MS porovnáním ploch píků

3.2 Neúspěšné pokusy o finální cyklizaci

První pokusy o získání finálního cyklického produktu byly vesměs neúspěšné – produkt nevznikal vůbec, nebo jako součást složité směsi a nemělo smysl jej izolovat.

Schéma 17 popisuje neúspěšné testovací reakce. Jako modelová sloučenina pro testování cyklizace byl použit derivát **5(1,1,*R*³)**.

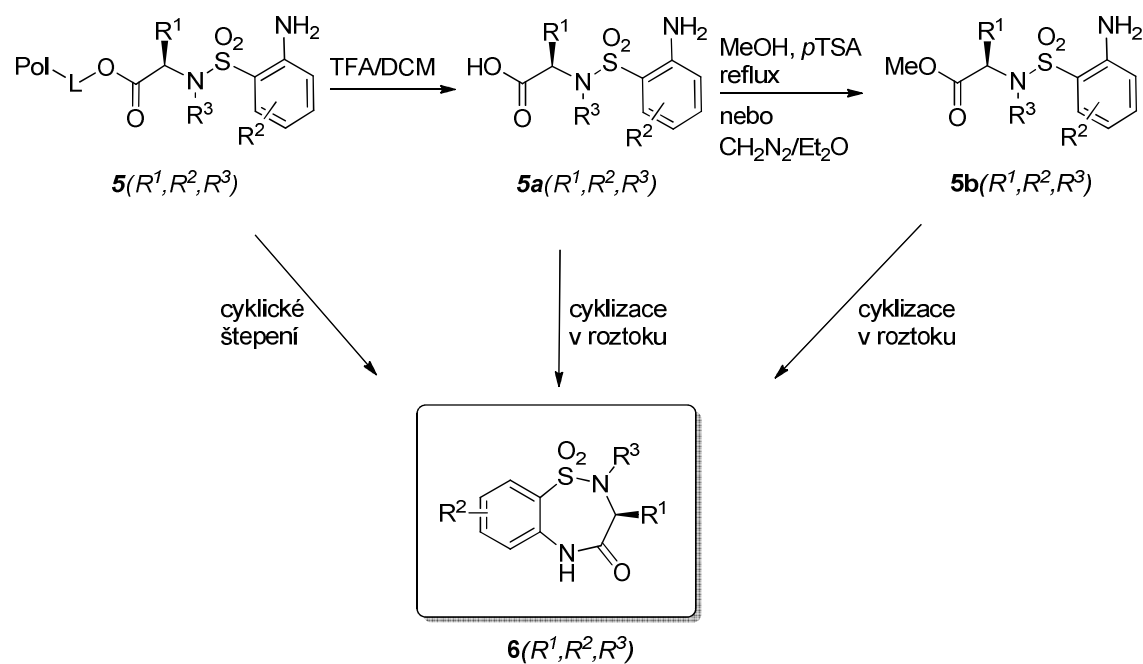


Schéma 17: Neúspěšné pokusy o finální cyklizaci.

3.2.1 Cyklické štěpení

První myšlenkou, jak zacyklit připravený lineární sulfonamid **5**(*1,1,R*³), bylo tzv. cyklické štěpení – vlivem vhodných podmínek by mohlo dojít k nukleofilní adici aminoskupiny na benzenovém jádře na karbonylový uhlík, čímž by vznikl finální produkt a samovolně se tak odštěpil z pryskyřice do reakčního roztoku. I přes mnoho pokusů za různých podmínek se nepodařilo tímto způsobem připravit finální produkt, případně ne v dostatečné čistotě.

Pro první pokusy byl použit meziprodukt bez alkylovaného dusíku. Následně byla použita pryskyřice substituovaná na dusíku methylovou skupinou. Pro většinu pokusů byla použita pryskyřice substituovaná na dusíku benzylem. Byla použita různá rozpouštědla a teploty. Bylo vyzkoušeno i zahřívání v mikrovlnném reaktoru (MW) či různé druhy katalýzy – kyselá (*p*TSA) i zásaditá (TEA). Přehled těchto pokusů shrnuje **Tabulka 5**.

Tab. 5: Neúspěšné pokusy o cyklické štěpení.

<i>R</i> ³	Rozpouštědlo	Teplota [°C]	Čas	Další podmínky	Čistota ^{a,b} [%]
-	DMSO	120	2 hod		ND
Me	DMSO	100	2 hod		ND
-	DMSO	100	10 min	MW	ND
-	DMSO	150	5 min	MW	ND
-	2-methoxy EtOH	150	5 min	MW	ND
-	NMP	150	5 min	MW	ND
-	NMP	200	10 min	MW	ND
-	DMSO	150	5 min	MW, TEA	ND
-	AcOH	100	1 hod		ND
Bn	DMSO	100	2 hod		ND
Bn	DMF	100	1 hod		ND
Bn	DMF	100	1 hod	<i>p</i> TSA	ND
Bn	DMF	150	15 min	MW, <i>p</i> TSA	ND

Bn	DMSO	150	15 min	MW, <i>p</i> TSA	ND
Bn	NMP	150	15 min	MW, <i>p</i> TSA	ND
Bn	DMF	150	2 hod	MW, <i>p</i> TSA	ND
Bn	DMF	200	2 hod	MW, <i>p</i> TSA	18
Bn	DMF	200	8 hod	MW, <i>p</i> TSA	rozložilo se
Bn	2-methoxy EtOH	100	15 min	MW	ND
Bn	2-methoxy EtOH	200	15 min	MW, <i>p</i> TSA	ND

^a procentuální surová čistota vypočítaná ze spektra UPLC-MS porovnáním ploch píků

^b ND = nedetekováno

3.2.2 Cyklizace v roztoku

Po sérii neúspěšných pokusů o cyklické štěpení bylo přistoupeno na jinou variantu – lineární sulfonamid byl nejprve odštěpen z Wangovy pryskyřice pomocí 50% TFA v DCM a finální cyklizace byla testována v roztoku po odpaření štěpícího koktejlu. Jako modelová sloučenina opět posloužil derivát **5**(*1,1,R*³). Nejprve byla vyzkoušena různá rozpouštědla, různé teploty (až do 200°C), různé reakční časy, mikrovlnný ohřev, kyselá i bazická katalýza. První úspěšná testovací reakce byla provedena za podmínek mikrovlnného ohřevu na 200°C po 2 hodiny, jako rozpouštědlo byl použit DMF a pro katalýzu *p*TSA. Produkt vznikal kvantitativně, nicméně následně se nepodařilo reakci provést i v preparativním množství a proto byla optimalizace vedena dál.

Další varianta, jak zlepšit reaktivitu uhlíkového atomu, byla tvorba methylesteru (jak esterifikací s methanolem, tak použitím diazomethanu) po odštěpení z polymeru a odpaření TFA/DCM. Obě esterifikační metody byly úspěšně aplikovány. Opět se reakce podařilo provést pouze v analytickém množství (byl použit meziprodukt odštěpený z 20 mg pryskyřice), zatímco v preparativním množství (200 mg pryskyřice) byla surová čistota požadovaného produktu velmi nízká.

Jako další schůdná varianta se jevílo použití meziprojektu **5a(1,1,1)** s volnou karboxylovou skupinou (viz **Schéma 17**) a příprava amidu pomocí diisopropylkarbodiimidu. Přestože tento způsob byl v literatuře u analogických derivátů popsán², v našem případě vedla reakce pouze k bohaté směsi látek a produkt byl detekován ve velmi malém obsahu.

Cyklizaci v roztoku se nakonec podařilo optimalizovat použitím thionylchloridu – viz následující kapitola.

Neúspěšné pokusy o cyklizaci v roztoku shrnuje **Tabulka 6** (intermediát **5a(1,1,1)**) a **Tabulka 7** (intermediát **5b(1,1,1)**).

Tab. 6: Neúspěšné pokusy vycházející z intermediátu **5a(1,1,1)**.

R³	Rozpouštědlo	Teplota [°C]	Čas	Další podmínky	Čistota^{a,b} [%]
-	MeOH	70	2 hod		ND
-	DMF	rt	1 hod	DIEA, DIC	ND
-	DMSO	120	1 hod		ND
-	AcOH	100	1 hod		ND
Bn	DMSO	100	15 min	MW	ND
Bn	DMSO	100	15 min	MW, AcOH	ND
Bn	DMSO	100	15 min	MW, <i>p</i> TSA	ND
Bn	DMSO	150	15 min	MW	ND
Bn	DMSO	150	15 min	MW, AcOH	ND
Bn	DMSO	150	15 min	MW, <i>p</i> TSA	30
Bn	DMF	150	15 min	MW, <i>p</i> TSA	18
Bn	NMP	150	15 min	MW, <i>p</i> TSA	23
Bn	DMF	150	2 hod	MW, <i>p</i> TSA	ND
Bn	DMSO	200	2 hod	MW, <i>p</i> TSA	32

Bn	DMF	200	2 hod	MW, <i>p</i> TSA	70
Bn	DMF	150	2 hod	DIEA	<1
Bn	DMF	150	4 hod	DIEA	<1
Bn	DMSO	150	4 hod	DIEA	ND
Bn	DMF	150	15 min	MW, DIEA	8
Bn	DMSO	150	15 min	MW, DIEA	2
Bn	DMF	200	15 min	MW, DIEA	24
Bn	DMSO	200	15 min	MW, DIEA	4
Bn	DMF	200	1 hod	MW, DIEA	36
Bn	NMP	200	15 min	MW, DIEA	20
Bn	DMF	200	3 hod	MW, DIEA	12

^a procentuální surová čistota vypočítaná ze spektra UPLC-MS porovnáním ploch píků

^b ND = nedetekováno

Tab. 7: Neúspěšné pokusy vycházející z intermediátu **5b**(*1,1,1*).

<i>R</i>³	Rozpouštědlo	Teplota [°C]	Čas	Další podmínky	Čistota^{a,b} [%]
Bn	2-methoxy EtOH	100	1 hod	MW	ND
Bn	2-methoxy EtOH	200	15 min	MW, <i>p</i> TSA	ND
Bn	diethylenglykol diethylether	150	1 hod	MW, <i>p</i> TSA	34
Bn	DMF	100	1 hod	MW, <i>p</i> TSA	ND
Bn	DMF	rt	16 hodin	DIC, DMAP, DIEA	10

^a procentuální surová čistota vypočítaná ze spektra UPLC-MS porovnáním ploch píků

^b ND = nedetekováno

3.2.1 Jiné ukotvení aminokyseliny

Do série neúspěšných pokusů patřila i snaha o zvýšení reaktivity esterové skupiny s pomocí jiného ukotvení na Wangovu pryskyřici. Záměrem bylo připravit esterové deriváty s vyšší elektronovou deficiencí na karbonylovém uhlíku, které by tak mohly snáze podléhat aminolýze. První způsob spočíval v použití jodoctové kyseliny, druhý v použití ethanolaminu (**Schéma 18**). Ani tato varianta však nevedla k uspokojivým výsledkům při cyklizaci příslušných intermediátů **5(1,1,1)** (v tomto případě opět pomocí cyklického štěpení). Vzhledem k tomu, že se v mezích podařilo vyvinout cyklizační metodu pomocí thionylchloridu, bylo od další optimalizace tohoto přístupu upuštěno.

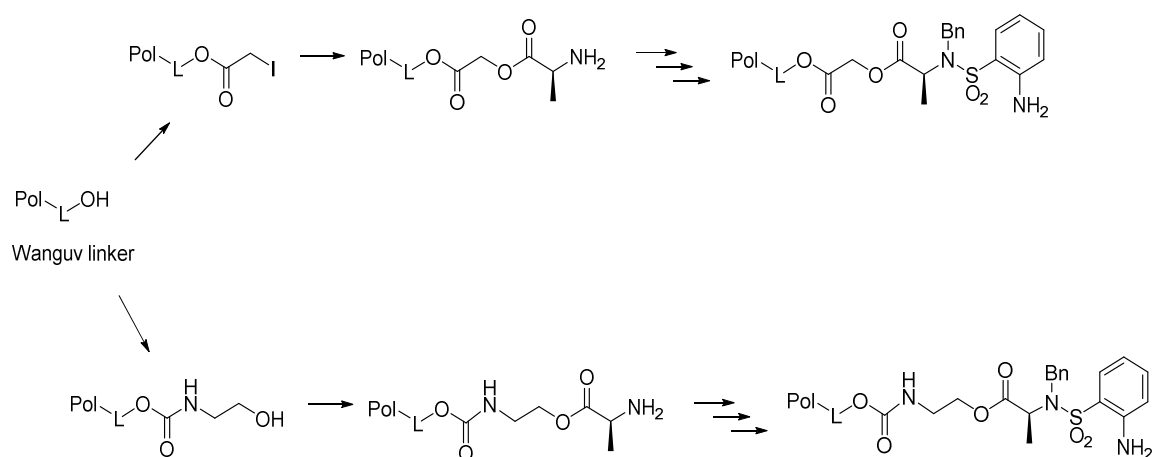


Schéma 18: Jiné způsoby ukotvení aminokyseliny na Wangův linker.

Neúspěšné testovací reakce provedené na pryskyřici s acetátovým linkerem shrnuje **Tabulka 8**, na pryskyřici s ethanolaminovým linkerem **Tabulka 9**.

Tab. 8 : Neúspěšné pokusy na pryskyřici s acetátovým linkerem.

Rozpouštědlo	Teplota [°C]	Čas	Další podmínky	Čistota ^a
DMSO	80	2 hod		ND
DMSO	80	přes noc		ND
DMF	150	2 hod		ND
DMF	150	6 hod		ND

DMF	100	15 min	MW	ND
DMSO	100	15 min	MW	ND
DMF	200	15 min	MW	<1
DMSO	200	15 min	MW	<1
2-methoxy EtOH	100	15 min	MW	ND
2-methoxy EtOH	200	15 min	MW, <i>p</i> TSA	ND

^a procentuální surová čistota vypočítaná ze spektra UPLC-MS porovnáním ploch píků

ND = nedetekováno

Tab. 9: Neúspěšné pokusy na pryskyřici s ethanolaminovým linkerem.

Rozpouštědlo	Teplota [°C]	Čas	Další podmínky	Čistota^a
DMSO	100	2 hod		ND
DMF	100	2 hod		ND
DMF	100	15 min	MW	ND
DMSO	100	15 min	MW	ND
DMF	200	15 min	MW	ND
DMSO	200	15 min	MW	ND
2-methoxy EtOH	100	15 min	MW	ND
2-methoxy EtOH	200	15 min	MW, <i>p</i> TSA	ND

^a procentuální surová čistota vypočítaná ze spektra UPLC-MS porovnáním ploch píků

ND = nedetekováno

3.3 Optimalizovaná finální cyklizace

Úspěch se dostavil při použití thionylchloridu – *in situ* vzniklý acylchlorid samovolně cyklizoval za tvorby finálního produktu. Lineární sulfonamid byl nejprve odštěpen z pryskyřice a po odpaření štěpícího koktejlu k němu byl přidán čistý thionylchlorid, přičemž produkt vznikal dostatečně čistý i v preparativním množství (80 %). Při použití 20%-ního thionylchloridu v chloroformu se za stejné teploty a reakční doby podařilo čistotu ještě zvýšit.

Po úspěšné cyklizaci v roztoku za použití thionylchloridu bylo testováno i přímé použití thionylchloridu na pryskyřici **4**(R^1, R^2, R^3) nicméně čistota odpovídajícího produktu byla dle spektra UPLC-MS výrazně nižší (27 %).

Thionylchlorid s chloroformem byly po ukončení reakce odpařeny dusíkem, odparek obsahující produkt rozpuštěn v acetonitrilu a přečištěn pomocí semipreparativního HPLC-MS. Aditivní flash chromatografie na silikagelu pro odstranění tetrabutylamoniových solí byla zařazena buďto před, nebo po čištění produktu na semipreparativním HPLC.

Reakce jsou popsány ve **Schématu 19**.

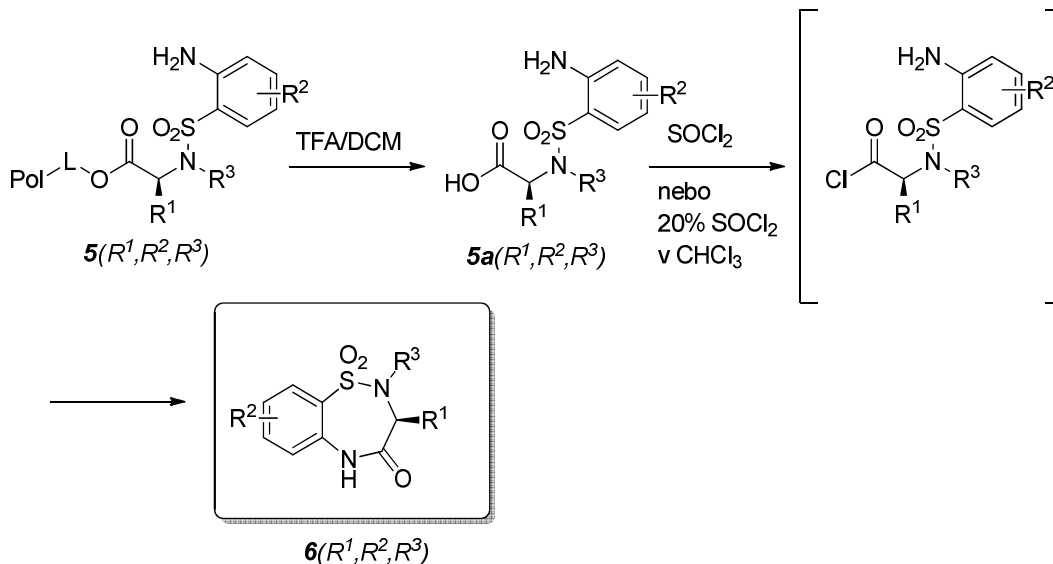


Schéma 19: Úspěšná cyklizační metoda.

3.3.1 Aplikovatelnost cyklizační metody pomocí thionylchloridu

Cyklizační metoda byla vyvinuta na derivátu **6(1,1,1)**, který byl připraven reakcí v čistém thionylchloridu. Po optimalizaci metody a použití 20% thionylchloridu v chloroformu byla metoda aplikována na sérii připravených intermediátů **5(R¹,R²,R³)**. Vzhledem k reaktivitě thionylchloridu projevila tato metoda dle očekávání určitá syntetická omezení, která jsou shrnuta v následující podkapitole.

3.3.1.1 Omezení aplikovatelnosti metody

Deriváty **6(9,1,1)** a **6(7,1,1)** se během cyklizace rozložily, problematická byla pravděpodobně přítomnost hydroxylové skupiny v postranním řetězci výchozích aminokyselin. Derivát **6(1,1,7)** nevznikal v dostatečné surové čistotě (pouze 20 %). U derivátů **6(6,1,1)** a **6(8,1,1)** reakcí vznikaly produkty neobjasněné struktury, nalezené hmotnosti ve spektru UPLC-MS popisuje **Tabulka 10**.

Tab. 10: Produkty neobjasněné struktury.

Derivát	Očekávaná hmotnost MS [M-H] ⁻	Nalezená hmotnost MS [M-H] ⁻	Čistota ^a [%]
6(6,1,1)	372	500	40
6(8,1,1)	431	462; 445	27; 12

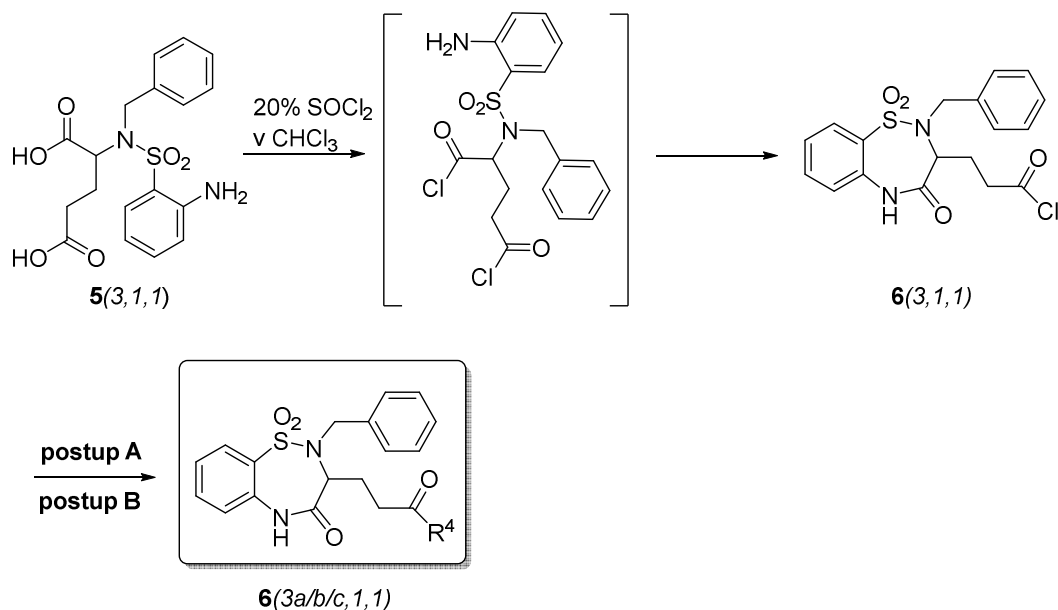
^a procentuální surová čistota vypočítaná ze spektra UPLC-MS porovnáním ploch integrovaných píků

Problémy s cyklizací dále nastaly u derivátů **6(1,1,3)** a **6(1,1,4)**, pokud byly zredukované chloridem cínatým (zmíněno již v pasáži popisující testované redukční metody). Derivát **6(1,1,3)** nezreagoval kvantitativně ani po 2 hodinách (dvojnásobná reakční doba). Derivát **6(1,1,4)** se během cyklizace rozložil. Klíčová zde byla pravděpodobně přítomnost zbytkových solí cínu ovlivňujících průběh cyklizace.

3.3.1.2 Možnost zavedení substituentu R⁴ u derivátu **6(3,1,1)**

Při přípravě derivátu **6(3,1,1)** bylo využito možnosti další reakce na karboxylové skupině postranního řetězce kyseliny glutamové k tvorbě modelových derivátů **6(3a,1,1)**, **6(3b,1,1)** a **6(3c,1,1)** – viz **Schéma 20** (postup je podrobněji popsán v Experimentální části). Při reakci s thionylchloridem se i na této karboxylové skupině

vytvořil acylchlorid, ze kterého byly poté jednoduše připraveny zmíněné deriváty reakcí s methanolem za tvorby methylesteru (derivát **6(3a,1,1)**) či reakcí s příslušným aminem za tvorby amidu (deriváty **6(3b,1,1)** – s propylaminem a **6(3c,1,1)** – s morfolinem) – viz **Tabulka 11**.



postup A: MeOH, 30 min stání

postup B: CHCl₃, R₁-NH-R₂, 30 min míchání za rt

Schéma 20: Příprava dalších derivátů odvozených od **6(3,1,1)**

Tab. 11: Deriváty odvozené od **6(3,1,1)**.

Derivát	R ⁴	Čistota ^a (%)
6(3a,1,1)		73
6(3b,1,1)		68
6(3c,1,1)		70

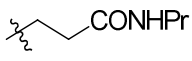
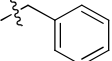
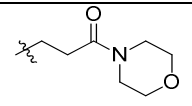
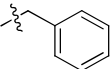
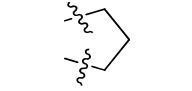
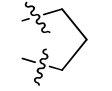
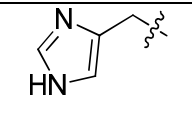
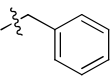
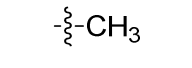
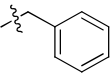
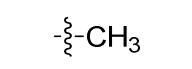
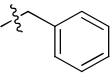
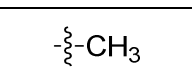
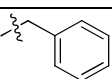
^a procentuální surová čistota derivátu vypočítaná ze spektra UPLC-MS porovnáním ploch pík

3.4 Připravené deriváty

Všechny připravené deriváty byly po přečištění na semipreparativním HPLC-MS zlyofilizovány a poté charakterizovány pomocí NMR. U většiny derivátů muselo být zařazeno aditivní čištění na silikagelu pro odstranění tetrabutylamoniových solí. Nutnost dvojího čištění se projevila na nižších výtěžcích některých látek. Přehled připravených derivátů včetně surové čistoty (určeno ze spektra UPLC-MS) a výtěžku (určeno z NMR spektra porovnáním se standardem - 1-methyl-2-amino tereftalát) shrnuje **Tabulka 12**.

Tab. 12: Přehled připravených derivátů.

Derivát	R ¹	R ²	R ³	surová čistota (%) ^a	čistota po čištění (%) ^b	výtěžek (%) ^c
6(1,1,1)	-CH ₃	H		80	99	35
6(1,1,2)	-CH ₃	H		60	95	52
6(1,1,3)	-CH ₃	H		60	99	12
6(1,1,4)	-CH ₃	H		70	90	8
6(1,1,5)	-CH ₃	H		70	99	25
6(1,1,6)	-CH ₃	H	-CH ₃	71	96	20
6(2,1,1)		H		70	99	21
6(3a,1,1)	-CH ₂ -COOMe	H		73	99	20

6(3b,1,1)		H		60	98	20
6(3c,1,1)		H		80	99	18
6(4,1,1)		H		74	97	16
6(5,1,1)		H		68 ^d	95	10
6(1,2,1)		7-CF ₃		75	99	26
6(1,3,1)		7-MeO		40	90	8
6(1,4,1)		7-Cl		70	92	41

^a procentuální surová čistota vypočítaná ze spektra UPLC-MS porovnáním ploch píků

^b procentuální čistota po vyčištění na semipreparativním HPLC-MS vypočítaná ze spektra UPLC-MS porovnáním ploch píků

^c výtěžek reakce vypočítaný z NMR spektra porovnáním se standardem (1-methyl-2-amino tereftalát)

^d pík odpovídající tritylovému radikálu nebyl do integrace zahrnut

3.4.1 Optická čistota

Vzhledem k tomu, že je ve všech připravených derivátech přítomno chirální centrum poskytující látkám optickou aktivitu, bylo testováno, zda se výchozí konfigurace (byly použity L-aminokyseliny) v průběhu přípravy finálních látek nemění. V literatuře byly již popsány případy, kdy se konfigurace chirálního uhlíku látek buď nezměnila²⁷, nebo došlo k úplně²⁸ či částečně²⁰ racemizaci.

Jako standard byla použita struktura derivátu **6(1,1,1)**, od kterého byla připravena racemická směs (byla použita směs D- a L-Fmoc-Ala-OH v poměru 1:1).

Na této látce byla vyvinuta metoda chirální separace, která byla poté aplikována na všechny připravené deriváty. Bylo zjištěno, že chirální centrum derivátu **6(1,1,1)** zůstává nedotčeno a jeho konfigurace se během reakční sekvence nezmění. Na druhou stranu, analýza ostatních derivátů danou metodou odhalila částečnou nebo úplnou racemizaci. K racemizaci α -aminokyselin typicky dochází při acylačních reakcích, v případě syntézy na pevné fázi tedy často během imobilizace na Wangovu pryskyřici. Z dosažených dat je však zřejmé, že sloučeniny připravené ze stejné šarže pryskyřice **1(1)** se liší výslednou optickou čistotou (např. deriváty **6(1,1,1)** a **6(1,1,2)** apod.). Ke změně konfigurace tedy v tomto případě nedochází během imobilizace aminokyseliny na Wangovu pryskyřici, nýbrž při finální cyklizaci za tvorby sedmičlenného cyklu. Zjištěné výsledky shrnuje **Tabulka 13**.

Tab. 13: Zjištěná optická čistota připravených derivátů.

Derivát	Poměr enantiomerů^a [%]
6(1,1,1)	99:1
6(1,1,2)	50:50
6(1,1,3)	NT
6(1,1,4)	57:43
6(1,1,5)	99:1
6(1,1,6)	69:31
6(2,1,1)	80:20
6(3a,1,1)	99:1
6(3b,1,1)	50:50
6(3c,1,1)	93:7
6(4,1,1)	99:1
6(5,1,1)	64:36
6(1,2,1)	83:17
6(1,3,1)	93:7
6(1,4,1)	50:50

NT = netestováno

^a optická čistota zjištěná porovnáním integrovaných píků ze spektra HPLC-UV s využitím chirální separace připravených derivátů

3.4.2 Testování biologické aktivity

Všechny připravené deriváty byly testovány na antimikrobiální aktivitu vůči bakteriálním kmenům *B. subtilis* a *M. luteus* s negativním výsledkem. Vybrané deriváty (**6(1,1,1)**, **6(1,1,2)**, **6(1,1,4)**, **6(2,1,1)**, **6(3a,1,1)**, **6(4,1,1)**, **6(1,4,1)**) byly testovány na cytotoxickou aktivitu na buněčných liniích CEM a K562-Tax, opět s negativním výsledkem.

4 Experimentální část

Pro syntézu intermediátů pro finální cyklizaci byly použity plastové stříkačky opatřené fritou z polypropylenu zajišťující prostupnost molekul rozpouštědla a reakčních roztoků, nikoli pryskyřice s navázanými látkami. K promývání a třepání byly použity laboratorní třepačky. Pro zahřev na 50°C během finální cyklizace byly užity skleněné vialky umístěné v topném hnízdě DrySyn®. Při použití mikrovlnného ohřevu byly použity speciální skleněné vialky opatřené septem. Míchání bylo vždy zajištěno pomocí magnetického míchadla.

Chemikálie a rozpouštědla byly zakoupeny od firmy Aldrich (Milwaukee, IL, www.sigmaaldrich.com), Wangova pryskyřice a imobilizované aminokyseliny od firmy AAPPTec (Louisville, KY, www.aapptec.com).

4.1 Přístroje a metody

Acquity UPLC-MS (Waters)

- hmotnostní spektrometr s jednoduchým kvadrupólem a PDA detektorem
- mobilní fáze: 0,1% octan amonný v H₂O, acetonitril, lineární gradient z 20% na 80% acetonitrilu po dobu 2,5 minut, poté ekvilibrace kolony 20% acetonitrilem 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

Lyofilizátor SCANVAC

- odstranění zbytkových rozpouštědel (acetonitril, voda, DMSO) ze vzorků

Semipreparativní HPLC-MS (Waters)

- reverzní kolona C18 (19x100 mm, částice 5 mikronů)
- mobilní fáze: 10 mM bezvodý octan amonný, acetonitril
- průtok 15 ml/min

Mikrovlnný reaktor CEM

- Discover Benchmate (CEM Microwave Technology Ltd.)

NMR JEOL – 500 MHz

- měření spekter v d_6 DMSO (23°C)
- chemický posun v ppm, interakční konstanty v Hz

HRMS (Thermo)

- Orbitrap Elite high-resolution hmotnostní spektrometr
- kladný full scan mode (120 000 FWHM) v rozsahu 200–900 m/z

4.2 Štěpení vzorku z pryskyřice a následná analýza

Pro získání informace o struktuře látky navázané na pryskyřici je nutno odebrat malé množství pryskyřice a látku z ní odštěpit a podrobit analýze. Pro kvantifikace bylo odebráno 2x 10 mg pryskyřice, pro běžné analýzy po jednotlivých reakčních krocích 5-10 mg pryskyřice. K pryskyřici byl přidán 1 ml 50% TFA v DCM a směs byla třepána 30 min na třepačce. Štěpení intermediátu k cyklizaci z pryskyřice trvalo 1 hodinu. Poté byl štěpící koktejl odfoukán dusíkem. Pro běžné analýzy byl k odparku přidán 1 ml směsi MeCN/voda. Roztok byl poté přefiltrován do vialky a analyzován pomocí UPLC-MS.

Kvantifikace – výpočet loadingu

Pro kvantifikaci byla použita metoda vnějšího standardu. K 2x10 mg dusíkem vysušené pryskyřice byl přidán štěpící koktejl. Po štěpení a odpaření štěpícího koktejlu byl k odparku přidán 1 ml směsi MeCN/H₂O (ředění 1:1 bylo poté zahrnuto do výpočtu loadingu – výsledná hodnota je zdvojnásobena). Jako standard byl použit roztok Fmoc-β-Ala o koncentraci 1,6752 mol/dm³. Po změření standardu byla provedena integrace píku při 300 nm a hodnota byla použita pro výpočet loadingu. Plochy píků obou změřených vzorků získané integrací při 300 nm byly zprůměrovány a dosazeny do výpočtu.

$$n_{vz} = \frac{S_{vz}}{S_{stand}} * \frac{c_{stand}}{M_{stand}} \quad L = \frac{n_{vz}}{m_{prysk}} * 2$$

n_{vz} = látkové množství vzorku [mol]; S_{vz} = plocha píku vzorku; S_{stand} = plocha píku standardu; c_{stand} = hmotnostní koncentrace standardu [mg/ml]; M_{stand} = molární hmotnost standardu [g/mol]; L = loading pryskyřice [mmol/g]; m_{prysk} = navážka pro vzorek pryskyřice [mg]

4.3 Syntéza intermediátu pro cyklizaci

4.3.1 Imobilizace aminokyselin

Do polypropylenové stříkačky opatřené fritou byla navážena Wangova pryskyřice (400 mg, 0,91 mmol/g). Pryskyřice byla následně promyta 3x DCM. Výchozí Fmoc- α -aminokyselina (0,72 mmol) byla rozpuštěna v DMF (4 ml), následně byly přidány HOBt (0,72 mmol, 110 mg), DMAP (0,18 mmol, 22 mg), DCM (4 ml) a DIC (0,72 mmol, 115 μ l). Tento roztok byl přidán k pryskyřici a směs byla třepána přes noc na třepačce. Pryskyřice **1**(R^I) byla promyta vždy 3x DMF, DCM, MeOH a následně byla vysušena pomocí dusíku. Poté byla provedena kvantifikace – výpočet loadingu. Přehled připravených derivátů včetně loadingu a výtěžku imobilizace popisuje

Tabulka 14.

Tab. 14: Přehled použitých aminokyselin a připravených derivátů.

Derivát	Použitá aminokyselina	Loading	Výtěžek ^a	MS [M-H] ⁻
1 (1)	Fmoc-Ala-OH	0,52	57	310
1 (2)	Fmoc-Phe-OH	0,52	57	386
1 (3)	Fmoc-Glu(OtBu)-OH	0,40	44	368
1 (4)	Fmoc-Pro-OH	0,49	54	337
1 (5)	Fmoc-His(Trt)-OH	0,51	56	377
1 (6)	Fmoc-Lys(Boc)-OH	0,26	29	369
1 (7)	Fmoc-Tyr(tBu)-OH	0,48	53	403
1 (8)	Fmoc-Trp(Boc)-OH	0,20	22	426
1 (9)	Fmoc-Ser(tBu)-OH	0,46	51	327

^a procentuální výtěžek získaný porovnáním loadingu s hodnotou nabití Wangovy pryskyřice (0,91 mmol/g)

4.3.2 Deprotekce Fmoc

K pryskyřici **1**(R^1) byl přidán roztok 50% piperidinu v DMF (4 ml), po 10 minutách třepání byla pryskyřice promyta 3x DMF a 3x DCM. Tento krok vede ke tvorbě látky **2**(R^1).

4.3.3 Sulfonylace pomocí 2-nitrobenzensulfonylchloridů

K pryskyřici **2**(R^1) (400 mg) byl přidán reakční roztok obsahující různě substituovaný 2-NosCl (1,2 mmol), DCM (4 ml) a 2,6-lutidin (1,32 mmol, 150 μ l). Reakční směs byla třepána přes noc a poté byla pryskyřice **3**(R^1, R^2) promyta 5x DCM.

Následně byla provedena analýza kvantitativnosti tohoto reakčního kroku. Ke vzorku pryskyřice (10 mg) byl přidán roztok Fmoc-OSu (165 mg) v DCM (1 ml). Po 30 minutách třepání byla pryskyřice promyta 5x DCM a následně štěpena 1 ml 50% TFA v DCM pro analýzu UPLC-MS. Přehled připravených derivátů je shrnut v **Tabulce 15**.

Tab. 15: Přehled použitých 2-nitrobenzensulfonylchloridů a připravených derivátů.

Derivát	Čistota [%] ^a	MS [M-H] ⁻
3 (1,1)	94	273
3 (2,1)	90	350
3 (3,1)	73	331
3 (4,1)	70	299
3 (5,1)	70 ^b	340
3 (6,1)	70	330
3 (7,1)	75	365
3 (8,1)	50	388
3 (9,1)	73	290
3 (1,2)	78	341
3 (1,3)	88	303
3 (1,4)	75	307

^a procentuální surová čistota vypočítaná po odštěpení z polymerního nosiče ze spektra UPLC-MS porovnáním ploch píků

^b pík odpovídající tritylovému radikálu nebyl do integrace zahrnut

4.3.4 Alkylace pomocí Fukuyama-Mitsunobu procedury

K pryskyřici **3**(R^1, R^2) (400 mg) v jedné stříkačce promyté 3x bezvodým THF byl přidán roztok PPh_3 (1,5 mmol, 400mg) a příslušného alkoholu (1,2 mmol) v bezvodém THF (4 ml). K této stříkačce byla spojkou připojena druhá stříkačka obsahující roztok DIAD (1,5 mmol, 290 μl) v bezvodém THF (2 ml). Spojené stříkačky byly vloženy do mrazáku na 15 minut, po vytažení zpět na pokojovou teplotu byly roztoky spojeny ve stříkačce obsahující pryskyřici a výsledná směs byla třepána přes noc. Poté byla pryskyřice **4**(R^1, R^2, R^3) promyta 3x THF a 3x DCM. Následně byla provedena analýza reakce. Prolinový derivát **3**(4,1,1) nebyl alkylován – jako jediný derivát obsahuje sekundární aminoskupinu. Přehled alkylovaných derivátů popisuje **Tabulka 16**.

Tab. 16: Přehled použitých alkoholů a připravených derivátů.

Derivát	Čistota [%] ^a	MS [M-H] ⁻
4 (1,1,1)	93	363
4 (2,1,1)	76	439
4 (3,1,1)	91	421
4 (5,1,1)	52 ^b	429
4 (6,1,1)	85	420
4 (7,1,1)	70	455
4 (8,1,1)	70	478
4 (9,1,1)	82	379
4 (1,2,1)	98	431
4 (1,3,1)	96	393
4 (1,4,1)	83	397
4 (1,1,2)	81	301
4 (1,1,3)	92	372
4 (1,1,4)	84	392

4(1,1,5)	93	331
4(1,1,6)	95	287
4(1,1,7)	83	383

^a procentuální surová čistota vypočítaná po odštěpení z polymerního nosiče ze spektra UPLC-MS porovnáním ploch píků

^b pík odpovídající tritylovému radikálu nebyl do integrace zahrnut

4.3.5 Redukce nitro skupiny

Pro redukci nitroskupiny byly vyzkoušeny dvě redukční metody – redukce dithioničitanem sodným a redukce chloridem cínatým.

4.3.5.1 Redukce dithioničitanem sodným

K pryskyřici **4**(R^1, R^2, R^3) (400 mg) byl přidán roztok obsahující $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (4 mmol, 840 mg), K_2CO_3 (1,4 mmol, 776 mg) a TBAHS (0,4 mmol, 136 mg) ve směsi vody (8 ml) a DCM (8 ml). Směs byla třepána přes noc. Poté byla pryskyřice **5**(R^1, R^2, R^3) promyta 3x DCM/ H_2O , 3x DMF, 3x MeOH a 3x DCM a zanalyzována. Přehled derivátů popisuje **Tabulka 17**.

Tab. 17: Přehled derivátů připravených redukcí dithioničitanem sodným.

Derivát	Čistota [%] ^a	MS [M-H]⁻
5(1,1,1)	45	333
5(2,1,1)	50	409
5(3,1,1)	60	391
5(4,1,1)	67	269
5(5,1,1)	62 ^b	399
5(6,1,1)	77	390
5(7,1,1)	78	425
5(8,1,1)	52	448
5(9,1,1)	85	349
5(1,2,1)	45	401
5(1,3,1)	75	363
5(1,4,1)	50	367
5(1,1,2)	60	271
5(1,1,3)	55	342
5(1,1,4)	70	362
5(1,1,5)	72	301
5(1,1,6)	81	257
5(1,1,7)	30	353

^a procentuální surová čistota vypočítaná po odštěpení z polymerního nosiče ze spektra UPLC-MS porovnáním ploch pík

^b pík odpovídající tritylovému radikálu nebyl do integrace zahrnut

4.3.5.2 Redukce chloridem cínatým

K pryskyřici **4**(R^1, R^2, R^3) (400 mg) promyté odplyněným DMF byl přidán roztok $\text{SnCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (4,8 mmol, 1080 mg) a DIEA (9,7 mmol, 1680 μl) v odplyněném DMF (6 ml) a reakční směs byla třepána přes noc. Poté byla pryskyřice **5**(R^1, R^2, R^3) promyta 10x DMF a 3x DCM a následně zanalyzována pomocí UPLC-MS. Přehled derivátů popisuje **Tabulka 18**.

Tab. 18: Přehled derivátů připravených redukcí SnCl_2 .

Derivát	Čistota ^a [%]	MS [M-H] ⁻
5 (2,1,1)	60	409
5 (4,1,1)	91	269
5 (1,1,2)	70	271
5 (1,1,3)	68	342
5 (1,1,4)	63	362

^a procentuální surová čistota vypočítaná po odštěpení z polymerního nosiče ze spektra UPLC-MS porovnáním ploch pík

4.4 Finální cyklizace s SOCl_2

Zredukovaný intermediát **5**(R^1, R^2, R^3) byl odštěpen z pryskyřice působením 50% TFA v DCM (3 ml) po 1 hodinu. Poté byl roztok ze stříkačky přenesen do skleněné vialky, pryskyřice byla promyta dalším 1 ml 50% TFA v DCM a tento podíl byl přidán do téže skleněné vialky. Štěpící koktejl byl odpařen pomocí dusíku. K odparku byl přidán 20% roztok thionylchloridu v chloroformu (750 μl SOCl_2 v 3 ml CHCl_3) a reakční směs byla zahřívána v kovovém bloku DrySyn® při 50°C po dobu 1 hodiny. Reakční roztok byl poté odpařen pomocí dusíku za vzniku olejovitého odparku.

4.4.1 Semipreparativní HPLC-MS a příprava vzorku pro NMR

Vzorek k čištění byl připraven následujícím způsobem: K odparku rozpuštěnému v 1 ml MeCN bylo přidáno pár kapek vody do vzniku opalescence. Po filtraci přes diskový mikrofiltr do plastové vialky bylo k roztoku přidáno ještě pár kapek acetonitrilu, čímž byl vzorek vyčereň a připraven k purifikaci.

Po vyčištění na semipreparativním HPLC-MS byly frakce obsahující produkt spojeny. Acetonitril byl ze vzorku odpařen pomocí rotační vakuové odparky a poté byla odstraněna vodná složka (acetátový pufr) pomocí lyofilizátoru. Vzorek byl následně rozpuštěn v deuterovaném DMSO (DMSO- d_6 , 600 μ l) a přenesen do NMR kyvety.

4.4.2 Zavedení substituentu R⁴ na derivát 6(3,1,1)

Derivát 6(3*a*,1,1) byl připraven tak, že byl odparek po odpaření 20% thionylchloridu v chloroformu ponechán stát 30 minut v methanolu. Deriváty 6(3*b*,1,1) a 6(3*c*,1,1) byly připraveny rozpuštěním odparku po cyklizaci v 800 μ l CHCl₃ a následným přidavkem 200 μ l příslušného aminu (pro derivát 3*b* propylamin, pro derivát 3*c* morfolin). Poté byla provedena kontrola bazicity pomocí pH papírku pro ověření, zda nebyl přidán amin spotřebován zbytkovým thionylchloridem. Reakční roztok byl poté 30 minut míchán při laboratorní teplotě a poté odpařen pomocí dusíku. Odparek byl rozpuštěn v 1 ml acetonitrilu a zanalyzován pomocí UPLC-MS.

4.4.3 Odstranění tetrabutylammoniové soli

4.4.3.1 Flash chromatografie

Produkty zredukované dithioničitanovou metodou byly kontaminovány zbytkovou tetrabutylammoniovou solí, která musela být z produktů odstraněna. Produkt byl tedy rozpuštěn v 1 ml ethylacetátu a přečištěn přes krátkou kolonku (plastová stříkačka s fritou) obsahující silikagelový sloupec (1x2 cm) oddělený z obou stran fritou. Silikagel byl nejprve aktivován ethylacetátem (3x promytí), poté byl nanesen vzorek. Po absorpci vzorku byl sloupec silikagelu promyt ethylacetátem a jednotlivé frakce byly spojeny a odpařeny pomocí rotační vakuové odparky, zbytkové rozpouštědlo bylo odstraněno pomocí lyofilizátoru.

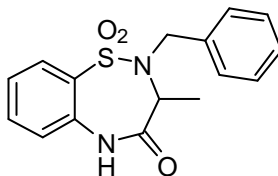
4.4.4 Odstranění cínatých solí

V případě, že byla látka redukována chloridem cínatým, je nutno zařadit před finální čištění na semipreparativním HPLC-MS předčištění látky přes silikagel C18, aby se odstranily zbytkové cínaté soli, které by zatěžovaly systém semipreparativního HPLC-MS.

Odstranění cínatých solí se provádí přes krátkou kolonu, kterou představuje injekční stříkačka o objemu 20 ml naplněná C18 silikagelem z obou stran odděleným polypropylenovou fritou. Nejprve je silikagel aktivován acetonitrilem (10 ml) a acetátovým pufrem (10 mM roztok octanu amonného ve vodě, 5 ml). Poté je nanesen vzorek rozpuštěný v DMSO (1 ml) a naředěný acetátovým pufrem (9 ml). Po absorpci vzorku na silikagel je vzorek selektivně vymýván přídatky acetonitrilu (5 ml), jednotlivé frakce jsou jímány zvlášť a následně zanalyzovány. Cínaté soli zůstávají vysrážené na vrchní fritě.

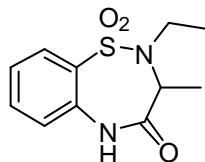
4.5 Analytická data

2-Benzyl-3-methyl-2,3-dihydrobenzo[*f*][1,2,5]thiadiazepin-4(5*H*)-on 1,1-dioxid 6(1,1,1)



Výtěžek 13 mg (35 %). ESI-MS $m/z = 315$ [M-H]⁻. ¹H NMR (500MHz, DMSO-d₆)
 δ (ppm) = 10.49 - 10.45 (br.s, 1 H), 7.77 (dd, $J = 1.4, 7.7$ Hz, 1 H), 7.59 (m, 1 H), 7.35 -
7.21 (m, 7 H), 4.48 (q, $J = 6.9$ Hz, 1 H), 4.30 - 4.17 (m, 2 H), 1.25 (d, $J = 6.9$ Hz, 3 H).
¹³C NMR (126MHz, DMSO-d₆) δ (ppm) = 172.1, 137.0, 134.9, 133.8, 129.3, 128.4,
127.7, 127.6, 127.5, 123.2, 121.6, 57.6, 50.9, 18.2. HRMS (ESI-TOF) m/z vypočteno
pro C₁₆H₁₆N₂O₃S [M-H]⁻ 315.0798, nalezeno 315.0789.

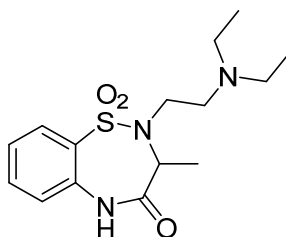
2-Ethyl-3-methyl-2,3-dihydrobenzo[*f*][1,2,5]thiadiazepin-4(5*H*)-on 1,1-dioxid 6(1,1,2)



Výtěžek 24 mg (52 %), ESI-MS $m/z = 253$ [M-H]⁻. ¹H NMR (500MHz, DMSO-d₆)
 δ (ppm) = 10.41 (s, 1 H), 7.73 (dd, $J = 1.4, 7.7$ Hz, 1 H), 7.58 - 7.54 (m, 1 H), 7.27 (dd,
 $J = 1.1, 8.0$ Hz, 1 H), 7.24 - 7.19 (m, 1 H), 4.45 (q, $J = 6.9$ Hz, 1 H), 3.16 - 3.08 (m, 1
H), 3.07 - 2.99 (m, 1 H), 1.44 (d, $J = 6.9$ Hz, 3 H), 1.09 - 1.05 (t, 3 H). ¹³C NMR
(126MHz, DMSO-d₆) δ (ppm) = 172.3, 134.8, 133.6, 129.6, 127.4, 123.1, 121.5, 56.7,
42.6, 18.2, 14.9. HRMS (ESI-TOF) m/z vypočteno pro C₁₁H₁₄N₂O₃S [M-H]⁻ 253.0641,
nalezeno 253.0635.

2-(2-(Diethylamino)ethyl)-3-methyl-2,3-dihydrobenzo[f][1,2,5]thiadiazepin-4(5H)-on 1,1-dioxid

6(1,1,3)

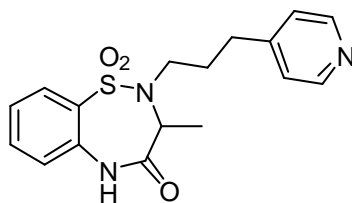


Výtěžek 4 mg (12 %). ESI-MS $m/z = 324$ $[M-H]^-$. 1H NMR (500MHz, DMSO- d_6) δ (ppm) = 10.41 (s, 1 H), 7.73 (d, $J = 8.0$ Hz, 1 H), 7.59 - 7.54 (m, 1 H), 7.28 (d, $J = 8.0$ Hz, 1 H), 7.22 (t, $J = 7.6$ Hz, 1 H), 4.51 (q, $J = 6.7$ Hz, 1 H), 3.11 (m, 1 H), 3.00 - 2.91 (m, 1 H), 2.41 (m, 4 H), 1.45 (d, $J = 6.6$ Hz, 3 H), 0.88 (t, $J = 7.0$ Hz, 6 H). Poznámka – dva vodíkové signály pocházející z methylenové skupiny jsou překryty signálem DMSO- d_6 .

^{13}C NMR (126MHz, DMSO- d_6) δ (ppm) = 172.3, 134.7, 133.6, 129.5, 127.4, 123.1, 121.6, 57.3, 52.3, 46.6, 46.0, 21.5, 20.4, 18.1, 11.7. HRMS (ESI-TOF) m/z vypočteno pro $C_{15}H_{23}N_3O_3S$ $[M+H]^+$ 326.1533, nalezeno 326.1535.

3-Methyl-2-(3-(pyridin-4-yl)propyl)-2,3-dihydrobenzo[f][1,2,5]thiadiazepin-4(5H)-on 1,1-dioxid

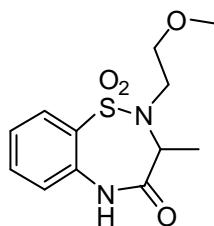
6(1,1,4)



Výtěžek 3 mg (8 %). ESI-MS $m/z = 344$ $[M-H]^-$. 1H NMR (500MHz, DMSO- d_6) δ (ppm) = 10.43 (br. s., 1 H), 8.43 (d, $J = 5.4$ Hz, 2 H), 7.74 - 7.70 (m, 1 H), 7.60 - 7.53 (m, 1 H), 7.30 - 7.16 (m, 4 H), 4.49 (q, $J = 6.6$ Hz, 1 H), 3.11 - 3.04 (m, 1 H), 2.97 (m, 1 H), 2.59 - 2.53 (m, 2 H), 1.84 (m, 2 H), 1.44 (d, $J = 6.9$ Hz, 3 H). ^{13}C NMR (126MHz, DMSO- d_6) δ (ppm) = 172.3, 150.1, 149.5, 134.8, 133.7, 129.4, 129.2, 127.6, 123.7, 123.1, 121.5, 115.1, 57.2, 47.3, 31.2, 29.7, 18.3. HRMS (ESI-TOF) m/z vypočteno pro $C_{17}H_{19}N_3O_3S$ $[M+H]^+$ 346.1220, nalezeno 346.1219.

2-(2-Methoxyethyl)-3-methyl-2,3-dihydrobenzo[f][1,2,5]thiadiazepin-4(5H)-on 1,1-dioxid

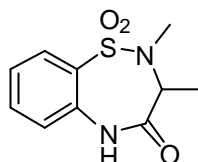
6(1,1,5)



Výtěžek 10 mg (25 %). ESI-MS $m/z = 283$ [M-H]⁻. ¹H NMR (500MHz, DMSO-d₆) δ (ppm) = 7.71 (dd, $J = 1.6, 7.9$ Hz, 1 H), 7.58 - 7.54 (m, 1 H), 7.27 (dd, $J = 0.7, 8.2$ Hz, 1 H), 7.23 - 7.18 (m, 1 H), 4.44 (q, $J = 6.9$ Hz, 1 H), 3.38 - 3.35 (m, 2 H), 3.26 - 3.20 (m, 1 H), 3.17 - 3.10 (m, 4 H), 1.45 (d, $J = 6.6$ Hz, 3 H). ¹³C NMR (126MHz, DMSO-d₆) δ (ppm) = 172.3, 135.1, 133.6, 129.5, 127.3, 122.9, 121.4, 70.5, 58.2, 58.0, 47.3, 18.4. HRMS (ESI-TOF) m/z vypočteno pro C₁₂H₁₆N₂O₄S [M+H]⁺ 285.0904, nalezeno 285.0902.

2,3-Dimethyl-2,3-dihydrobenzo[f][1,2,5]thiadiazepin-4(5H)-on 1,1-dioxid

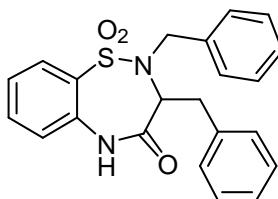
6(1,1,6)



Výtěžek 9 mg (20 %). ESI-MS $m/z = 239$ [M-H]⁻. ¹H NMR (500MHz, DMSO-d₆) δ (ppm) = 10.56 - 10.40 (br. s, 1 H), 7.76 (dd, $J = 1.7, 8.0$ Hz, 1 H), 7.62 - 7.57 (m, 1 H), 7.31 (dd, $J = 1.1, 8.0$ Hz, 1 H), 7.26 (dt, $J = 1.1, 7.7$ Hz, 1 H), 4.41 (q, $J = 6.5$ Hz, 1 H), 2.68 (s, 3 H), 1.38 (d, $J = 6.9$ Hz, 3 H). ¹³C NMR (126MHz, DMSO-d₆) δ (ppm) = 171.3, 134.2, 133.8, 128.5, 128.1, 123.5, 122.0, 56.0, 32.1, 15.8. HRMS (ESI-TOF) m/z vypočteno pro C₁₀H₁₂N₂O₃S [M-H]⁻ 239.0485, nalezeno 239.0479.

2,3-Dibenzyl-2,3-dihydrobenzo[*f*][1,2,5]thiadiazepin-4(5*H*)-on 1,1-dioxid

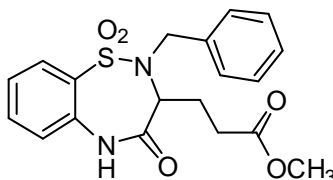
6(2,1,1)



Výtěžek 15 mg (21 %). ESI-MS $m/z = 391$ [M-H]⁻. ¹H NMR (500MHz, DMSO-d₆) δ (ppm) = 10.51 (s, 1 H), 7.75 (dd, $J = 1.7, 8.0$ Hz, 1 H), 7.58 (dt, $J = 1.7, 7.7$ Hz, 1 H), 7.28 (d, $J = 8.6$ Hz, 1 H), 7.25 - 7.13 (m, 7 H), 7.07 - 7.01 (m, 4 H), 4.67 (dd, $J = 5.7, 8.6$ Hz, 1 H), 4.32 (d, $J = 15.5$ Hz, 1 H), 3.93 (d, $J = 15.5$ Hz, 1 H), 3.33 - 3.28 (m, 1 H), 2.96 (dd, $J = 8.6, 14.3$ Hz, 1 H). ¹³C NMR (126MHz, DMSO-d₆) δ (ppm) = 171.2, 137.2, 135.6, 134.7, 133.8, 129.7, 129.3, 128.3, 128.2, 128.0, 127.5, 127.5, 126.2, 123.3, 121.6, 63.1, 51.5, 37.2. HRMS (ESI-TOF) m/z vypočteno pro C₂₂H₂₀N₂O₃S [M+H]⁺ 393.1267, nalezeno 393.1267.

Methyl-3-(2-benzyl-1,1-dioxido-4-oxo-2,3,4,5-tetrahydrobenzo[*f*][1,2,5]thiadiazepin-3-yl)propanoát

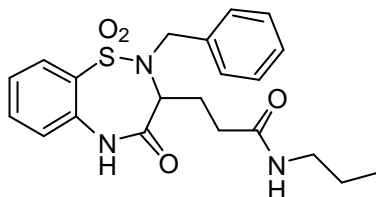
6(3a,1,1)



Výtěžek 10 mg (20 %). ESI-MS $m/z = 387$ [M-H]⁻. ¹H NMR (500MHz, DMSO-d₆) δ (ppm) = 10.53 (s, 1 H), 7.81 (dd, $J = 1.4, 8.0$ Hz, 1 H), 7.59 (m, 1 H), 7.34 - 7.23 (m, 7 H), 4.49 (dd, $J = 4.9, 8.9$ Hz, 1 H), 4.39 (d, $J = 15.8$ Hz, 1 H), 4.09 (d, $J = 15.8$ Hz, 1 H), 3.48 (s, 3 H), 2.25 - 2.14 (m, 2 H), 2.14 - 2.06 (m, 1 H), 1.87 - 1.76 (m, 1 H). ¹³C NMR (126MHz, DMSO-d₆) δ (ppm) = 172.5, 171.2, 136.5, 134.1, 133.8, 129.5, 128.4, 128.1, 128.0, 127.7, 123.5, 121.8, 59.9, 51.2, 50.8, 29.0, 25.4. HRMS (ESI-TOF) m/z vypočteno pro C₁₉H₂₀N₂O₅S [M+H]⁺ 389.1166, nalezeno 389.1164.

**3-(2-Benzyl-1,1-dioxido-4-oxo-2,3,4,5-tetrahydrobenzo[f][1,2,5]thiadiazepin-3-yl)-
N-propylpropanamid**

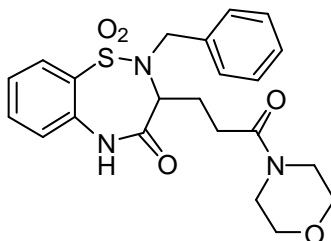
6(3b,1,1)



Výtěžek 12 mg (20 %). ESI-MS $m/z = 414$ $[M-H]^-$. 1H NMR (500MHz, DMSO- d_6) δ (ppm) = 10.47 (s, 1 H), 7.80 (dd, $J = 1.4, 7.7$ Hz, 1 H), 7.68 (t, $J = 5.4$ Hz, 1 H), 7.58 (m, 1 H), 7.31 - 7.24 (m, 7 H), 4.48 - 4.43 (m, 2 H), 4.10 (d, $J = 15.5$ Hz, 1 H), 2.95 - 2.89 (m, 2 H), 2.14 - 2.04 (m, 3 H), 1.79 - 1.72 (m, 1 H), 1.34 (sxt, $J = 7.2$ Hz, 2 H), 0.79 (t, $J = 7.4$ Hz, 3 H). ^{13}C NMR (126MHz, DMSO- d_6) δ (ppm) = 171.2, 171.0, 136.6, 134.0, 133.7, 129.8, 128.3, 128.0, 128.0, 127.6, 123.5, 121.8, 60.0, 50.5, 30.8, 25.9, 22.3, 14.1, 11.3. HRMS (ESI-TOF) m/z vypočteno pro $C_{21}H_{25}N_3O_4S$ $[M+H]^+$ 416.1639, nalezeno 416.1638.

**2-Benzyl-3-(3-morfolino-3-oxopropyl)-2,3-dihydrobenzo[f][1,2,5]thiadiazepin-
4(5H)-on 1,1-dioxid**

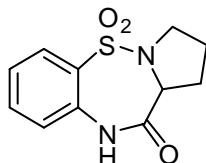
6(3c,1,1)



Výtěžek 12 mg (22 %). ESI-MS $m/z = 442$ $[M-H]^-$. 1H NMR (500MHz, DMSO- d_6) δ (ppm) = 10.52 (s, 1 H), 7.82 (dd, $J = 1.1, 8.0$ Hz, 1 H), 7.62 - 7.57 (m, 1 H), 7.37 - 7.24 (m, 7 H), 4.48 (dd, $J = 4.6, 8.9$ Hz, 1 H), 4.36 (d, $J = 15.8$ Hz, 1 H), 4.09 (d, $J = 15.8$ Hz, 1 H), 3.53 - 3.42 (m, 4 H), 3.38 - 3.26 (m, 3 H), 3.11 (t, $J = 4.4$ Hz, 1 H), 2.19 - 2.06 (m, 2 H), 2.06 - 1.99 (m, 1 H), 1.84 - 1.75 (m, 1 H). ^{13}C NMR (126MHz, DMSO- d_6) δ (ppm) = 171.5, 169.8, 136.7, 134.3, 133.8, 129.4, 128.4, 128.2, 128.0, 127.7, 123.4, 121.8, 66.0, 65.9, 60.7, 50.9, 45.0, 41.3, 27.9, 25.9. HRMS (ESI-TOF) m/z vypočteno pro $C_{22}H_{25}N_3O_5S$ $[M+H]^+$ 444.1588, nalezeno 444.1588.

1,2,3,11a-Tetrahydrobenzo[f]pyrrolo[1,2-b][1,2,5]thiadiazepin-11(10H)-on 5,5-dioxid

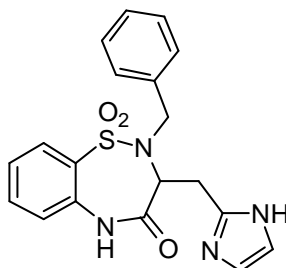
6(4,1,1)



Výtěžek 7 mg (16 %). ESI-MS $m/z = 251$ $[M-H]^-$. 1H NMR (500MHz, DMSO- d_6) δ (ppm) = 10.43 (s, 1 H), 7.74 (dd, $J = 1.4, 7.7$ Hz, 1 H), 7.64 - 7.59 (m, 1 H), 7.28 - 7.22 (m, 2 H), 4.36 (t, $J = 7.2$ Hz, 1 H), 3.36 - 3.32 (m, 1 H), 2.87 - 2.79 (m, 1 H), 2.38 - 2.30 (m, 1 H), 1.97 - 1.84 (m, 2 H), 1.75 (m, 1 H). ^{13}C NMR (126MHz, DMSO- d_6) δ (ppm) = 173.0, 135.4, 134.3, 128.4, 128.1, 123.1, 121.9, 64.1, 48.6, 31.8, 24.1. HRMS (ESI-TOF) m/z vypočteno pro $C_{11}H_{12}N_2O_3S$ $[M-H]^-$ 251.0485, nalezeno 251.0480.

3-((1H-Imidazol-2-yl)methyl)-2-benzyl-2,3-dihydrobenzo[f][1,2,5]thiadiazepin-4(5H)-on 1,1-dioxid

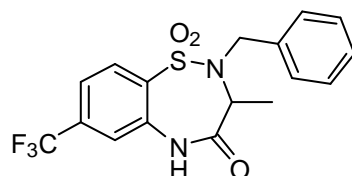
6(5,1,1)



Výtěžek 4 mg (10 %). ESI-MS $m/z = 381$ $[M-H]^-$. 1H NMR (500MHz, DMSO- d_6) δ (ppm) = 10.48 (s, 1 H), 7.77 (d, $J = 7.7$ Hz, 1 H), 7.59 (m, 2 H), 7.28 - 7.19 (m, 5 H), 7.11 - 7.06 (m, 2 H), 6.72 (s, 1 H), 4.68 (dd, $J = 5.9, 7.9$ Hz, 1 H), 4.38 (d, $J = 15.8$ Hz, 1 H), 4.03 - 3.95 (d, $J = 16.04$ Hz, 1 H), 3.24 (dd, $J = 5.7, 14.9$ Hz, 1 H), 2.93 (dd, $J = 8.2, 15.0$ Hz, 1 H). ^{13}C NMR (126MHz, DMSO- d_6) δ (ppm) = 171.0, 136.5, 134.8, 134.7, 134.0, 130.0, 128.3, 128.2, 127.7, 127.6, 123.6, 121.9, 61.5, 51.3, 29.4, 22.1, 21.2. HRMS (ESI-TOF) m/z vypočteno pro $C_{19}H_{18}N_4O_3S$ $[M+H]^+$ 383.1172, nalezeno 383.1172

2-Benzyl-3-methyl-7-(trifluormethyl)-2,3-dihydrobenzo[f][1,2,5]thiadiazepin-4(5H)-on 1,1-dioxid

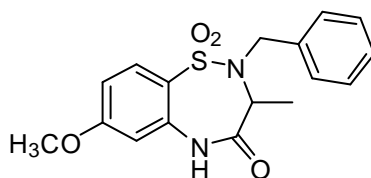
6(1,2,1)



Výtěžek 16 mg (26 %). ESI-MS $m/z = 383$ [M-H]⁻. ¹H NMR (500MHz, DMSO-d₆) δ (ppm) = 10.68 (br. s., 1 H), 7.97 (d, $J = 8.1$ Hz, 1 H), 7.65 (br. s., 1 H), 7.60 - 7.52 (m, 1 H), 7.37 - 7.24 (m, 5 H), 4.62 (dd, $J = 2.1, 6.8$ Hz, 1 H), 4.38 - 4.22 (m, 2 H), 1.28 (dd, $J = 2.0, 6.8$ Hz, 3 H). ¹³C NMR (126MHz, DMSO-d₆) δ (ppm) = 172.2, 136.4, 135.9, 132.7, 129.2, 128.4, 127.8, 127.6, 119.2, 118.3, 118.2, 58.0, 51.0, 40.4, 18.3. HRMS (ESI-TOF) m/z vypočteno pro C₁₇H₁₅F₃N₂O₃S [M-H]⁻ 383.0672, nalezeno 383.0657.

2-Benzyl-7-methoxy-3-methyl-2,3-dihydrobenzo[f][1,2,5]thiadiazepin-4(5H)-on 1,1-dioxid

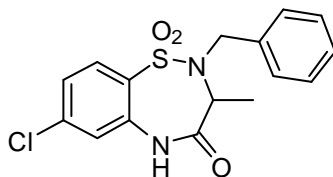
6(1,3,1)



Výtěžek 6 mg (8 %). ESI-MS $m/z = 345$ [M-H]⁻. ¹H NMR (500MHz, DMSO-d₆) δ (ppm) = 10.38 (s, 1 H), 7.70 (d, $J = 8.6$ Hz, 1 H), 7.34 - 7.25 (m, 5 H), 6.86 (d, $J = 2.3$ Hz, 1 H), 6.83 (dd, $J = 2.3, 8.6$ Hz, 1 H), 4.47 - 4.41 (q, $J = 6.9$ Hz, 1 H), 4.25 - 4.14 (q, $J = 16$ Hz, 2 H), 3.81 (s, 3 H), 1.24 (d, $J = 6.9$ Hz, 3 H). ¹³C NMR (126MHz, DMSO-d₆) δ (ppm) = 172.2, 162.9, 137.1, 136.8, 129.6, 128.4, 127.7, 127.5, 121.7, 109.0, 106.3, 57.7, 55.7, 50.9, 18.3. HRMS (ESI-TOF) m/z vypočteno pro C₁₇H₁₈N₂O₄S [M+H]⁺ 347.1060, nalezeno 347.1060.

2-Benzyl-7-chlor-3-methyl-2,3-dihydrobenzo[f][1,2,5]thiadiazepin-4(5H)-on 1,1-dioxid

6(1,4,1)



Výtěžek 24 mg (41 %). ESI-MS $m/z = 349$ $[M-H]^-$. 1H NMR (500MHz, DMSO- d_6) δ (ppm) = 10.56 (br. s., 1 H), 7.77 (d, $J = 8.6$ Hz, 1 H), 7.37 - 7.25 (m, 7 H), 4.58 - 4.51 (q, $J = 6.9$ Hz, 1 H), 4.31 - 4.19 (q, $J = 15.5$ Hz, 2 H), 1.28 - 1.23 (d, $J = 6.9$ Hz 3 H). ^{13}C NMR (126MHz, DMSO- d_6) δ (ppm) = 172.2, 137.9, 136.6, 136.5, 129.5, 128.4, 128.3, 128.2, 127.8, 127.6, 122.8, 120.7, 57.9, 51.0, 18.3. HRMS (ESI-TOF) m/z vypočteno pro $C_{16}H_{15}ClN_2O_3S$ $[M-H]^-$ 349.0408, nalezeno 349.0397.

5 Závěr

Tato bakalářská práce se zabývá syntézou derivátů 2,3-dihydrobenzo[*f*][1,2,5]thiadiazepin-4(5*H*)-on 1,1-dioxidů. Vyvinuli jsme novou metodu pro jejich přípravu, jejímž principem je syntéza lineárního sulfonamidového intermediátu pomocí syntézy na pevné fázi a následná finální cyklizace po odštěpení z polymerního nosiče. Výhodou této metody je velmi jednoduché provedení umožněné rutinní izolací imobilizovaných meziproductů z reakční směsi. Metoda je tedy využitelná pro rychlou přípravu libovolně velké chemické knihovny cílových derivátů z komerčně snadno dostupných výchozích látek s pomocí paralelní nebo kombinatoriální syntézy. Přestože poslední krok sekvence musel být proveden až po odštěpení z polymerního nosiče, těkavost všech činidel pro finální cyklizaci je plně kompatibilní s potenciální (polo)automatizací syntézy.

Vyvinutá metoda však vykazuje i určitá omezení: (i) *N*-alkylace pomocí Fukuyama-Mitsunobu procedury neumožnila zavedení sekundární alkylové skupiny do pozice N²; (ii) Thionylchlorid není tolerantní vůči všem funkčním skupinám a jeho použití vedlo k dekompozici některých funkcionalizovaných intermediátů; (iii) Nutnost dvoustupňové purifikace cílových sloučenin ovlivnila celkové výtěžky.

Navzdory výše uvedeným omezením byla metodika úspěšně otestována pro pět různých přírodních α -aminokyselin, čtyři 2-nitrobenzensulfonylchloridy a šest alkoholů. Jejich vzájemná kombinace tedy teoreticky umožňuje přípravu chemické knihovny čítající $5 \times 4 \times 6 = 120$ sloučenin. V rámci bakalářské práce bylo připraveno 15 reprezentativních derivátů, které byly plně charakterizovány pomocí NMR a HRMS. Kromě konstituce produktů byla dále studována i konfigurace jejich chirálního centra a bylo prokázáno, že finální cyklizace ovlivňuje optickou čistotu látek, která může být sledována pomocí metody chirální HPLC.

Všechny připravené deriváty byly testovány na antimikrobiální účinky proti dvěma bakteriálními kmenům. Testována byla rovněž cytotoxicita vybraných látek proti dvěma nádorovým buněčným liniím, přičemž nebyla nalezena žádná aktivita. Testování jiných typů biologických účinků (např. anti-HIV aktivity, která byla pro skeletálně příbuzné látky v nedávné době popsána) nebylo dosud provedeno.

6 Seznam literatury

1. Ogawa, K.; Matsushita, Y. Synthesis and antiarrhythmic activity of 2,5-disubstituted 2,3-dihydro-1,2,5-benzothiadiazepin-4(5H)-one 1,1-dioxides. *Chem. Pharm. Bull.* **1992**, *40* (9), 2442-2447.
2. Di Santo, R.; Costi, R.; Artico, M.; Massa, S.; Marongiu, M. E.; Loi, A. G.; De Montis, A.; La Colla, P. 1,2,5-benzothiadiazepine and pyrrolo[2,2-d]-[1,2,5]benzothiadiazepine derivatives with specific anti-human immunodeficiency virus type 1 activity. *Antiviral Chem. Chemother.* **1998**, *9* (2), 127-137.
3. Yu, Z.; Zhuang, C.; Wu, Y.; Guo, Z.; Li, J.; Dong, G.; Yao, J.; Sheng, C.; Miao, Z.; Zhang, W. Design, synthesis and biological evaluation of sulfamide and triazole benzodiazepines as novel p53-MDM2 inhibitors. *Int. J. Mol. Sci.* **2014**, *15* (9), 15741-15753.
4. Soral Miroslav; Hlaváč Jan; Krchňák Viktor Practical Aspects of Combinatorial Solid-Phase Synthesis. In *Solid-Phase Organic Synthesis: Concepts, Strategies, and Applications*, 1 ed.; **2012**; 95-121.
5. Merrifield, R. B. Solid phase peptide synthesis. I. The synthesis of a tetrapeptide. *J. Am. Chem. Soc.* **1963**, *85* (14), 2149-2154.
6. Lemrová Barbora; Fülöpová Veronika *Praktické aspekty syntézy na pevné fázi*; 1 ed.; Univerzita Palackého v Olomouci: **2015**.
7. Quarrell, R.; Claridge, T. D. W.; Weaver, G. W.; Lowe, G. Structure and properties of TentaGel resin beads: implications for combinatorial library chemistry. *Mol. Diversity* **1996**, *1* (4), 223-232.
8. Soral Miroslav; Hlaváč Jan; Krchňák Viktor Linkers for Solid-Phase Peptide Synthesis. In *Amino Acids, Peptides and Proteins in Organic Chemistry: Building Blocks, Catalysis and Coupling Chemistry*, **2011**; 273-306.
9. Wuts Peter G.M.; Greene Theodora W. *Greene's Protective Groups in Organic Chemistry*. 4 ed.; **2006**; 711-713.
10. Wuts Peter G.M.; Greene Theodora W. *Greene's Protective Groups in Organic Chemistry*. 4 ed.; **2006**; 725-732.
11. Di Santo, R.; Costi, R.; Artico, M.; Ragno, R.; Lavecchia, A.; Novellino, E.; Gavuzzo, E.; La Torre, F.; Cirilli, R.; Cancio, R.; Maga, G. Design, synthesis, biological evaluation, and molecular modeling studies of

TIBO-like cyclic sulfones as non-nucleoside HIV-1 reverse transcriptase inhibitors. *ChemMedChem* **2006**, *1* (1), 82-95.

12. Costi, R.; Di Santo, R.; Artico, M.; Massa, S. Derivatives of 2,3-dihydroimidazo[1,5,4-ef][1,2,5]benzothiadiazepine-6(4H,7H)-thione 1,1-dioxide, a new heterocyclic system related to TIBO. *J. Heterocycl. Chem.* **2002**, *39* (1), 81-90.
13. Fulopova, V.; Krchnak, V. Solid-Phase Synthesis of Trisubstituted 2,5-Dihydrobenzo[f][1,2,5]thiadiazepine 1,1-Dioxide Derivatives. *ACS Comb. Sci.* **2014**, *16* (8), 412-420.
14. Fulopova, V.; Soral, M. Mining the Chemical Space: Application of 2/4-Nitrobenzenesulfonamides in Solid-Phase Synthesis. *ACS Comb. Sci.* **2015**, *17* (10), 570-591.
15. Krchnak, V.; Flegelova, Z.; Weichsel, A. S.; Lebl, M. Polymer-supported Mitsunobu ether formation and its use in combinatorial chemistry. *Tetrahedron Lett.* **1995**, *36* (35), 6193-6196.
16. Rano, T. A.; Chapman, K. T. Solid phase synthesis of aryl ethers via the Mitsunobu reaction. *Tetrahedron Lett.* **1995**, *36* (22), 3789-3792.
17. Fukuyama, T.; Jow, C. K.; Cheung, M. 2- and 4-nitrobenzenesulfonamides: exceptionally versatile means for preparation of secondary amines and protection of amines. *Tetrahedron Lett.* **1995**, *36* (36), 6373-6374.
18. Yang, L.; Chiu, K. Solid phase synthesis of Fmoc N-methyl amino acids: application of the Fukuyama amine synthesis. *Tetrahedron Lett.* **1997**, *38* (42), 7307-7310.
19. Cankarova, N.; La Venia, A.; Krchnak, V. Polymer-Supported Stereoselective Synthesis of Tetrahydrobenzopyrazino-thiadiazinone Dioxides via N-Sulfonyl Iminiums. *ACS Comb. Sci.* **2014**, *16* (6), 293-302.
20. McMaster, C.; Fulopova, V.; Popa, I.; Grepl, M.; Soral, M. Solid-Phase Synthesis of Anagrelide Sulfonyl Analogues. *ACS Comb. Sci.* **2014**, *16* (5), 221-224.
21. Reilly, J. T. Anagrelide for the treatment of essential thrombocythemia: a survey among European hematologists/oncologists. *Hematology (Leeds, U. K.)* **2009**, *14* (1), 1-10.

22. Pescatore, S. L.; Lindley, C. Anagrelide: a novel agent for the treatment of myeloproliferative disorders. *Expert Opin. Pharmacother.* **2000**, *1* (3), 537-546.
23. Trapp, O. M.; Beykirch, M. K.; Petrides, P. E. Anagrelide for treatment of patients with chronic myelogenous leukemia and a high platelet count. *Blood Cells, Mol. Dis.* **1998**, *24* (1), 9-13.
24. Zhu, W.; Chen, H.; Hu, Y. Synthesis of nevirapine. *Zhongguo Yiyao Gongye Zazhi* **2012**, *43* (6), 411-413.
25. Davis, T. A.; Johnston, J. N. Catalytic, enantioselective synthesis of stilbene cis-diamines: A concise preparation of (-)-Nutlin-3, a potent p53/MDM2 inhibitor. *Chem. Sci.* **2011**, *2* (6), 1076-1079.
26. Kaplanek, R.; Krchnak, V. Fast and effective reduction of nitroarenes by sodium dithionite under PTC conditions: application in solid-phase synthesis. *Tetrahedron Lett.* **2013**, *54* (21), 2600-2603.
27. Ganesan, A. Cyclative cleavage as a solid-phase strategy. John Wiley & Sons Ltd.: **2009**; 135-149.
28. Vanda, D.; Jorda, R.; Lemrova, B.; Volna, T.; Krystof, V.; McMaster, C.; Soral, M. Synthesis of Novel N9-Substituted Purine Derivatives from Polymer Supported +-Amino Acids. *ACS Comb. Sci.* **2015**, *17* (7), 426-432.