

UNIVERZITA PALACKÉHO V OLMOUCI

Přírodovědecká fakulta

Katedra organické chemie



**Syntéza nových derivátů benzoxazolu a
pyrimidinu s potenciální antibakteriální aktivitou**

DIPLOMOVÁ PRÁCE

Autor: Bc. Romana Machníková

Studijní program: N1407 - Chemie

Studijní obor: Bioorganická chemie a chemická biologie

Forma: prezenční

Vedoucí práce: RNDr. Lucie Brulíková, Ph.D.

Olomouc 2019

Prohlášení

Prohlašuji, že jsem diplomovou práci na téma „Syntéza nových derivátů benzoxazolu a pyrimidinu s potenciální antibakteriální aktivitou“ vypracovala samostatně pod vedením RNDr. Lucie Brulíkové, Ph.D., a že všechny použité zdroje a literatura byly řádně citovány. Tato práce nebyla využita jako závěrečná práce k získání jiného, nebo obdobného druhu vysokoškolské kvalifikace.

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

V Olomouci, 10.5.2019

.....

Bc. Romana Machníková

Poděkování

Na prvním místě bych ráda poděkovala své vedoucí práce, RNDr. Lucii Brulíkové, Ph.D. za zodpovědné vedení diplomové práce, za příležitost podílet se na zajímavých projektech a možnost získat spoustu zkušeností. Za přátelskou atmosféru v laboratoři a rady děkuji Mgr. Veronice Šlachtové. Můj vděk si dále zaslouží David Bon, Ph.D. za neustálou podporu, nápady a pomoc při řešení syntetických problémů. Také chci poděkovat RNDr. Jiřímu Pospíšlovi, Ph.D. za velice užitečné tipy a rady.

Ráda bych také poděkovala Mgr. Soně Krajčovičové za měření NMR spekter, RNDr. Sandře Benické za změření HRMS spekter a RNDr. Lucii Janovské, Ph.D. za biologické testování připravených látek.

Tato závěrečná práce vznikla za finanční podpory grantů IGA_LF_2019_19 a IGA_PrF_2019_27.

Bibliografická identifikace

Jméno a příjmení autora:	Bc. Romana Machníková
Název práce:	Syntéza nových derivátů benzoxazolu a pyrimidinu s potenciální antibakteriální aktivitou
Typ práce:	diplomová
Pracoviště:	Katedra organické chemie Přírodovědecká fakulta Univerzity Palackého, Olomouc
Školitel:	RNDr. Lucie Brulíková, Ph.D.
Rok obhajoby práce:	2019
Abstrakt:	

Předložená diplomová práce je zaměřena na design a syntézu nových derivátů benzoxazolu nebo pyrimidinu, a studium jejich antibakteriální aktivity, zejména pak aktivity antimykobakteriální. Práce je členěna do dvou částí dle zvoleného farmakoforu. První část se zabývá deriváty odvozenými od pyrimidinu, pro jejichž přípravu bylo využito rychlé a efektivní syntézy na pevné fázi. Celkem bylo v této fázi diplomové práce připraveno 27 nových látek, které byly testovány na biologickou aktivitu. Jedna z připravených látek vykazovala mírnou aktivitu proti *M. tuberculosis* (MIC = 32 µg/ml). Další z této série látek ukázala aktivitu proti *P. aeruginosa* (MIC = 2 µg/ml) srovnatelnou se standardem (gentamicin, MIC = 4 µg/ml). Druhá část diplomové práce popisuje syntézu benzoxazolových derivátů odvozených od látky Q203 vykazující vysokou antimykobakteriální aktivitu, a která je nyní klinicky testována. V této části práce byly pomocí klasické syntézy v roztoku doposud připraveny dva finální deriváty, které budou v nejbližší době testovány z hlediska jejich biologických vlastností.

Klíčová slova:	antibakteriální, antimykobakteriální, benzoxazoly, pyrimidiny, syntéza na pevné fázi
Počet stran:	85
Počet příloh:	1
Jazyk:	čeština

Bibliographical identification

Author's first name and surname: Bc. Romana Machníková

Title: Synthesis of new benzoxazole and pyrimidine derivatives with potent antibacterial activity

Type of thesis: diploma

Department: Department of organic chemistry
Faculty of Science, Palacký University, Olomouc

Advisor: RNDr. Lucie Brulíková, Ph.D.

The year of presentation: 2019

Abstract:

The submitted thesis is focused on the design and synthesis of new derivatives of benzoxazole or pyrimidine, and their antibacterial activity, especially antimycobacterial activity. The work is divided into two parts according to the chosen pharmacophore. The first part deals with derivatives derived from pyrimines, for which fast and efficient solid phase synthesis was used. In total, 27 new substances were prepared at this stage of the thesis, which were tested for biological activity. One of the prepared substances showed mild activity against *M. tuberculosis* (MIC = 32 µg / ml). Another of this series showed activity against *P. aeruginosa* (MIC = 2 µg / ml) comparable to the standard (gentamicin, MIC = 4 µg / ml). The second part of the thesis describes the synthesis of benzoxazole derivatives derived from Q203 exhibiting high antimycobacterial activity and which is now clinically tested. In this part of the thesis, two final derivatives have been prepared using classical synthesis in solution phase and will be tested in the near future for their biological properties.

Keywords: antibacterial, antimycobacterial, benzoxazoles, pyrimidines, solid phase synthesis

Number of pages: 85

Number of appendixes: 1

Language: Czech

Obsah

1	Seznam použitých zkratk	8
2	Úvod	11
3	Cíle práce	13
4	Teoretická část	15
4.1	Syntéza benzoxazolů	15
4.1.1	Syntetické přístupy v roztoku	15
4.1.2	Syntetické přístupy na pevné fázi	26
4.2	Biologická aktivita benzoxazolových derivátů	30
4.3	Biologická aktivita pyrimidinových derivátů	32
5	Výsledky a diskuse	36
5.1	Deriváty odvozené od pyrimidinu	36
5.1.1	5-Nitropyrimidiny	37
5.1.2	Acylované 5-aminopyrimidiny	42
5.2	Deriváty odvozené od benzoxazolu	46
5.2.1	Nukleofilní substituce 4-fluorobenzonitrilu	46
5.2.2	Mitsunobu reakce	46
5.2.3	Redukce nitrilové skupiny	50
5.2.4	Pokusy o přípravu benzoxazol-2-karboxylové kyseliny a jejího funkčního derivátu	51
5.2.5	Alternativní cesta k finálním produktům	56
6	Experimentální část	58
6.1	Obecné informace	58
6.2	Příprava pyrimidinových derivátů	59
6.2.1	Postup přípravy vzorku pro LC-MS analýzu	59
6.2.2	Postup stanovení loadingu pryskyřice	59
6.2.3	Acylace Wangovy pryskyřice	59

6.2.4	Odstranění Fmoc chránící skupiny a reakce s 4,6,-dichloro-5-nitropyrimidinem.....	60
6.2.5	Reakce s aminy	60
6.2.6	Redukce nitro skupiny.....	60
6.2.7	Acylace karboxylovými kyselinami.....	61
6.2.8	Štěpení z pryskyřice	61
6.2.9	Analytická data	61
6.3	Příprava benzoxazolových derivátů	72
6.3.1	Nukleofilní substituce	72
6.3.2	Mitsunobu reakce	73
6.3.3	Redukce nitrilové skupiny	75
6.3.4	Acylace aminu bromoctovou kyselinou	77
6.3.5	Substituce benzoxazol-2-thiolem.....	78
7	Závěr	80
8	Seznam použité literatury	82
	Přílohy – NMR spektra.....	86

1 Seznam použitých zkratek

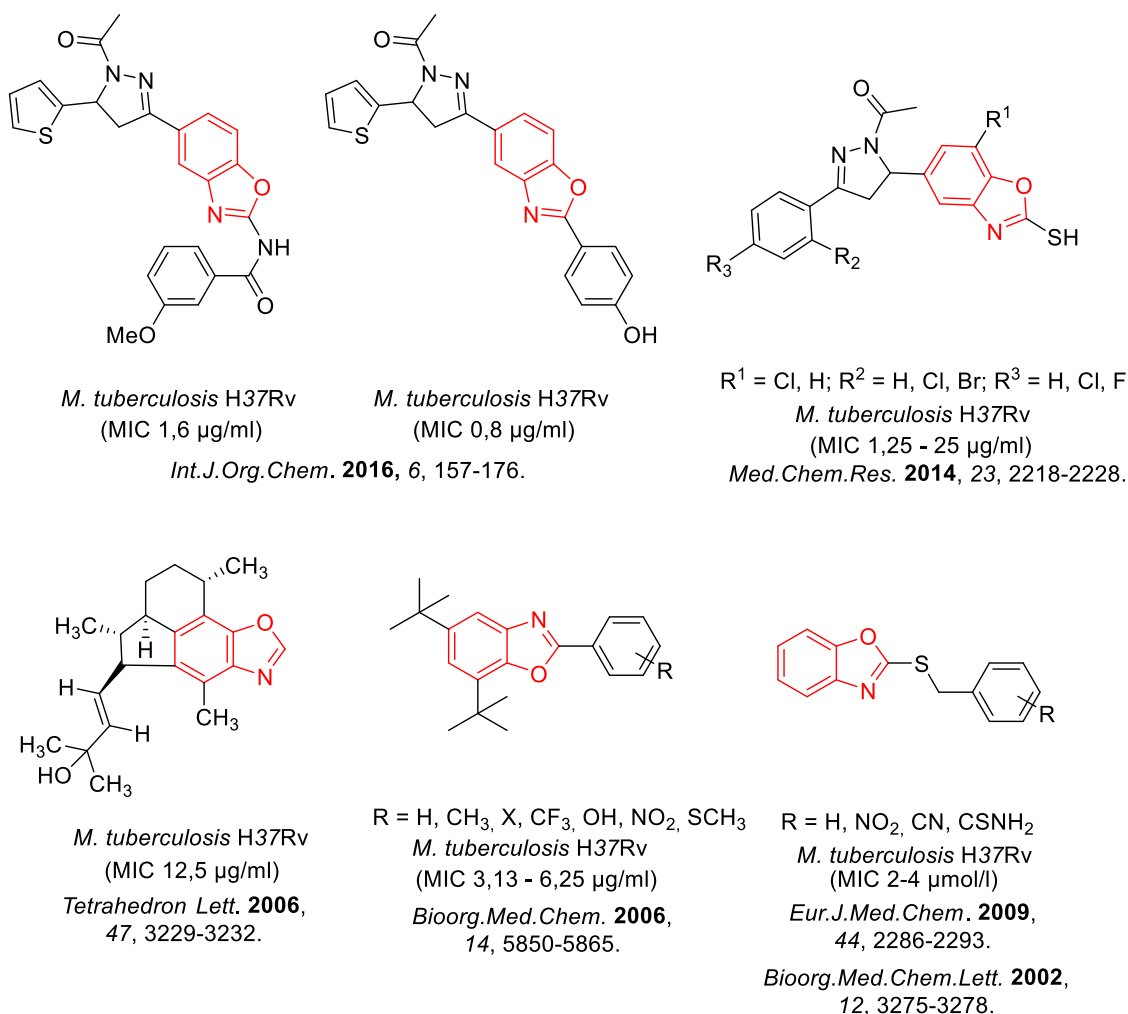
ABM	animal bone meal
ACN	acetonitril
AcOH	kyselina octová
ADDP	1,1'-(azodikarbonyl)dipiperidin
Ala	alanin
BINAM	2,2'-bis(difenylfosfinoamino)-1,1'-binaftyl
DCC	<i>N,N'</i> -dicyklohexylkarbodiimid
DCM	dichlormethan
DEAD	diethylazodikarboxylát
DIAD	diisopropylazodikarboxylát
DIC	<i>N,N'</i> -diisopropylkarbodiimid
DIEA	<i>N,N</i> -diisopropylethylamin
DMAP	4-dimethylaminopyridin
DMEDA	1,2-dimethylethylendiamin
DMF	dimethylformamid
DMSO	dimethylsulfoxid
EDC	1-ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)karbodiimid
ekv.	ekvivalent
EtOAc	ethylacetát
Fmoc	fluorenylmethoxykarbonyl
hex	<i>n</i> -hexan
HOBt	<i>N</i> -hydroxybenzotriazol
HPLC	vysokoúčinná kapalinová chromatografie

HRMS	hmotnostní spektrometrie s vysokým rozlišením
INH	isoniazid
LC-MS	kapalinová chromatografie-hmotnostní spektrometrie
LC-UV	kapalinová chromatografie s ultrafialovou detekcí
mCPBA	kyselina <i>m</i> -chlorperoxybenzoová
MCR	multikomponentní reakce
MeCN	acetonitril
MeOH	methanol
Met	methionin
MF	mobilní fáze
MIC	minimální inhibiční koncentrace
MW	mikrovlnné záření
NMR	nukleární magnetická rezonance
PDAIS	poly[4-diacetoxyjodo]styren
PEG	polyethylen glykol
Ph	fenyl
Phe	fenylalanin
PPA	kyselina polyfosforečná
Pro	prolin
PTSA	kyselina <i>p</i> -toluensulfonová
QcrB	gen kódující b podjednotku ubichinol-cytochrom <i>c</i> reduktázy
<i>o</i> -DCB	<i>o</i> -dichlorbenzen
rt	laboratorní teplota
RVO	rotační vakuová odparka

TBAF	tetra- <i>n</i> -butylammonium fluorid
TBAHS	hydrogensíran tetrabutylamonný
TBAI	tetra- <i>n</i> -butylammonium jodid
TEA	triethylamin
TFA	kyselina trifluoroctová
TFE	2,2,2-trifluoroethanol
THF	tetrahydrofuran
TLC	tenkovrstevná chromatografie
Ts	tosyl
Val	valin

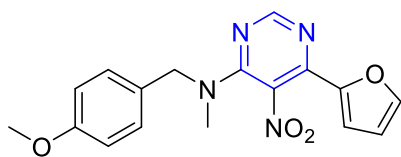
2 Úvod

Deriváty odvozené od heterocyklů pyrimidinu a benzoxazolu představují významnou skupinu látek se značným potenciálem využití díky svým biologickým vlastnostem¹⁻³. Zásadou dlouhodobého výzkumu sloučenin obsahujících benzoxazolový skelet bylo zjištěno, že některé z nich vykazují antimikrobiální⁴⁻⁶, protizánětlivé⁷, protinádorové^{8,9} a analgetické¹⁰ účinky. Jiné z nich působí jako inhibitory HIV reverzní transkriptázy¹¹. Naši výzkumnou skupinu zaujaly zejména vlastnosti antimykobakteriální (proti *M. tuberculosis*) (**Obr. 1**)¹²⁻¹⁷.

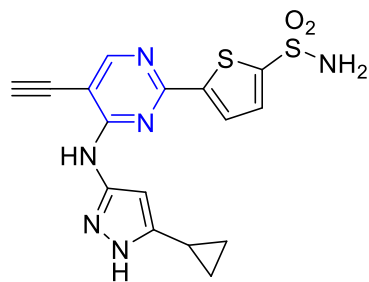


Obr. 1: Příklady derivátů odvozených od benzoxazolu s antimykobakteriální aktivitou

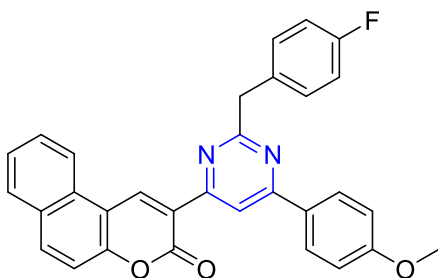
Rovněž studium derivátů pyrimidinu odhalilo zajímavé biologické vlastnosti některých sloučenin majících tento skelet. Byly popsány účinky antibakteriální¹⁸⁻²⁷, protinádorové²⁸, protizánětlivé²⁹ a antidiabetické³⁰. Působí také proti hepatitidě³¹ a v neposlední řadě i proti *M. tuberculosis* (**Obr. 2**)^{18,23,26,27}.



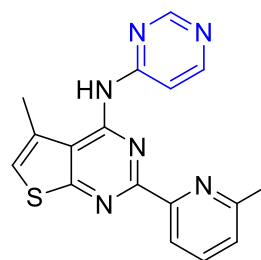
M. tuberculosis H37Rv
(IC₉₀ 13 µg/ml; 38,2 µM)
Bioorg. Med. Chem. **2010**,
18, 3885-3897.



M. tuberculosis H37Ra
(MIC 1,82 µg/ml; 4,7 µM)
ACS Med. Chem. Lett. **2017**,
8, 1224-1229.



M. tuberculosis H37Rv
(MIC 0,05 µg/ml; 0,1 µM)
Eur. J. Med. Chem. **2015**,
101, 705-715.



M. tuberculosis H37Rv
(MIC 0,25 µg/ml; 0,76 µM)
ChemMedChem. **2013**,
8, 313-321.

Obr. 2: Příklady derivátů odvozených od pyrimidinu s antimykobakteriální aktivitou

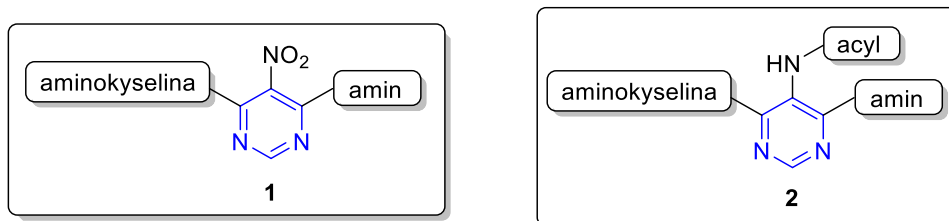
Výsledky výše zmíněných vědeckých prací nás inspirovaly pro tuto diplomovou práci zaměřenou na syntézu a studium biologické aktivity nových derivátů benzoxazolu a pyrimidinu.

3 Cíle práce

Cílem předložené diplomové práce je syntéza a studium biologické aktivity nových derivátů pyrimidinu a benzoxazolu. Dle zvoleného heterocyklického farmakoforu je práce členěna do dvou částí. První se zabývá pyrimidiny a druhá benzoxazoly.

Pro účely první části práce byly navrženy dvě série derivátů s pyrimidinovým jádrem (**Obr. 3**). V první sérii látek **1** jsou substituovány dvě pozice na 5-nitropyrimidinovém skeletu. Pro tento kombinatoriální přístup bylo vybráno pět různých aminokyselin a čtyři různé aminy (**Obr. 5**, viz 5 Výsledky a diskuse).

Nitro skupina na pyrimidinovém jádře látek **1** nabízí možnost další modifikace prostřednictvím redukce a následné acylace amino skupiny různými karboxylovými kyselinami pro tvorbu druhé série derivátů **2**.

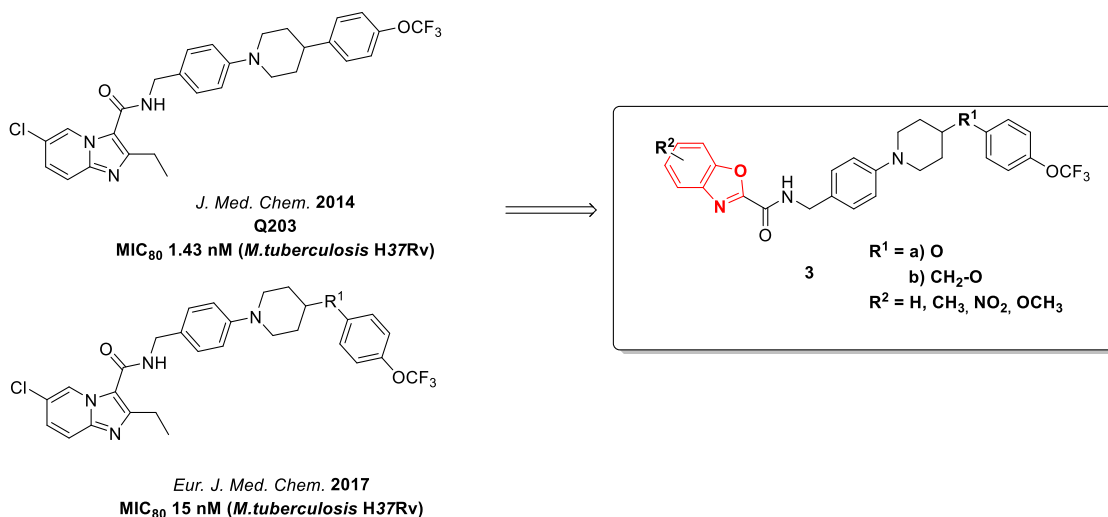


Obr. 3: Navržené série pyrimidinových derivátů

Pro přípravu těchto derivátů byl zvolen přístup syntézy na pevné fázi, který je rychlý a efektivní a bez potřeby izolace jednotlivých intermediátů.

V druhé části práce byly navrženy dva typy derivátů benzoxazolu **3** odvozené od látky Q203³² náhradou imidazopyridinové části za různě substituované benzoxazoly (**Obr. 4**). Látka Q203, popsaná v literatuře z roku 2014, je účinná proti *M. tuberculosis* a cílí na její *QcrB*, kódující b podjednotku ubichinol-cytochrom *c* reduktázy elektronového transportního řetězce. V současnosti je ve fázi klinického testování. Tři roky na to byl publikován článek, ve kterém jsou představeny analogy Q203 modifikované na postranním řetězci³³. Z těchto sloučenin pramení naše inspirace.

Navržené dva typy cílových struktur **3** se vzájemně liší linkerem mezi piperidinovou částí a aromatickým cyklem. Pro dosažení těchto finálních látek byla zvolena strategie klasické syntézy v roztoku.



Obr. 4: Design benzoxazolových derivátů

Jednotlivé dílčí cíle práce jsou následující:

- Vypracování literární rešerše na zadané téma.
- Vytvoření návrhu syntetického plánu a cílových struktur.
- Optimalizace reakčních podmínek syntézy, která vede k požadovaným produktům.
- Příprava série cílových sloučenin.
- Odeslání cílových derivátů na testování biologické aktivity (antibakteriální, antimykobakteriální a cytotoxické).
- Získané výsledky zpracovat ve formě manuscriptu a publikovat.

4 Teoretická část

Tato kapitola je rozdělena do dvou hlavních částí – syntetické a biologické. První podkapitola se zabývá různými metodami syntézy benzoxazolů, které vychází převážně ze snadno dostupných aminofenolů. Dále je členěna dle zvoleného přístupu na syntézu v roztoku a syntézu na pevné fázi.

Metody syntézy pyrimidinů zde uváděny nejsou, jelikož pro účely diplomové práce nebyly nijak využity. Důvodem je komerční dostupnost pyrimidinů, takže nebylo potřeba je připravovat uzavíráním cyklu.

Druhá a třetí podkapitola se věnuje biologickým vlastnostem některých derivátů benzoxazolu a pyrimidinu.

4.1 Syntéza benzoxazolů

Klasické přístupy vedoucí k syntéze různě substituovaných benzoxazolů zahrnují převážně cyklokondenzaci derivátů karboxylové kyseliny, jako jsou estery a acylchloridy s *o*-aminofenoly prostřednictvím iniciálního nukleofilního ataku anilinového segmentu na aktivovanou karboxylovou skupinu, nebo oxidativní cyklokondenzaci s aldehydy. S méně elektrofilními karboxylovými kyselinami lze kondenzaci provést v koncentrovaných organických, nebo minerálních kyselinách, což vyžaduje drsnější reakční podmínky. Proto byly hledány alternativní způsoby, které by mohly probíhat i za mírnějších podmínek (např. za použití katalyzátorů)³⁴.

Starší metody syntézy benzoxazolů jsou přehledně shrnuty v review z roku 2004³⁵ a nebudou zde více rozebírány. Pozornost bude věnována nověji vyvinutým metodám.

4.1.1 Syntetické přístupy v roztoku

Pod tradiční metody syntéz benzoxazolů spadá kondenzace *o*-aminofenolů s aldehydy, nebo karboxylovými kyselinami. Jak bylo uvedeno výše, cyklokondenzační reakce často vyžadovaly drsné podmínky, proto různé výzkumné skupiny vynalezly rozličné katalytické i nekatalytické systémy pro syntézu benzoxazolů.

Kaul a kol. v roce 2007 publikovali one-pot syntézu benzoxazolů kondenzací *o*-aminofenolu s karboxylovou kyselinou za použití *N,N*-dimethylchlorosulfitemethaniminium chloridu jako kondenzačního činidla (**Schéma I**)³⁶.

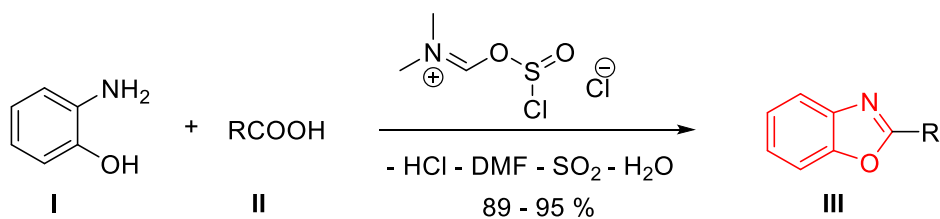


Schéma I: Kondenzace *o*-aminofenolu s karboxylovými kyselinami

Wang a kol. uvedli v roce 2010 přípravu nových benzoxazolových derivátů reakcí substituovaných *o*-aminofenolů s acylchloridy za přítomnosti katalytického množství $\text{In}(\text{OTf})_3$ jako Lewisovy kyseliny bez použití rozpouštědla v dobrých až vynikajících výtěžcích (55 – 95 %) (**Schéma II**)³⁷.

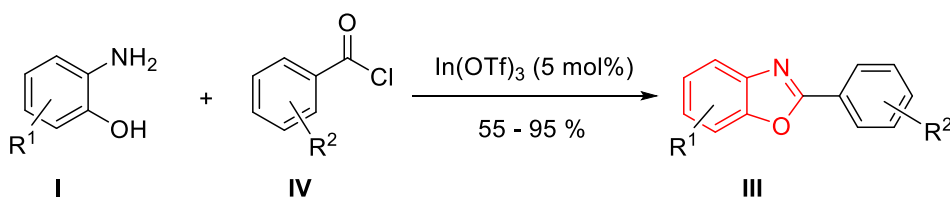


Schéma II: Reakce *o*-aminofenolů s acyl chloridy

Později Wynne a kol. připravili sérii nových 2-arylbenzoxazolů kondenzací *o*-aminofenolu a karboxylové kyseliny s kyselinou polyfosforečnou, nebo acylchloridu v 1,4-dioxanu za účasti mikrovlnného záření (**Schéma III**)³⁸. V porovnání s klasickými metodami je reakce s pomocí mikrovlnného záření rychlejší a vykazuje lepší výtěžky (84 – 95 %).

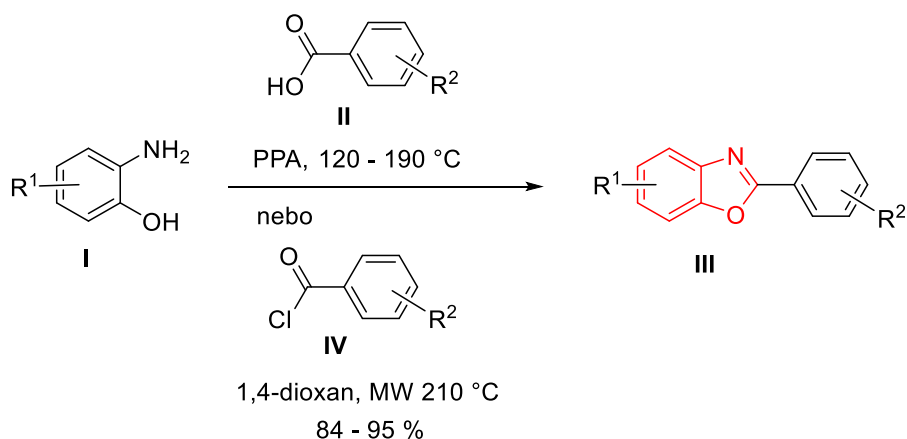


Schéma III: Syntéza benzoxazolů s pomocí mikrovlnného záření

Kumar a kol. v roce 2009 vyvinuli pro syntézu benzoxazolů hypervalentní jodový reagent, poly[4-diacetoxyjodo]styren (PDAIS), vázaný na pevný nosič. PDAIS

se účastní kondenzace *o*-aminofenolu s aldehydem tím, že urychluje oxidaci *in situ* generovaného intermediátu. PDAIS je vysoce selektivní a neoxiduje aldehyd přítomný v reakční směsi (**Schéma IV**)³⁹. Výhodou polymerního nosiče je, že může být snadno odfiltrován, obnoven a znovu použit, což je ekologicky výhodné.

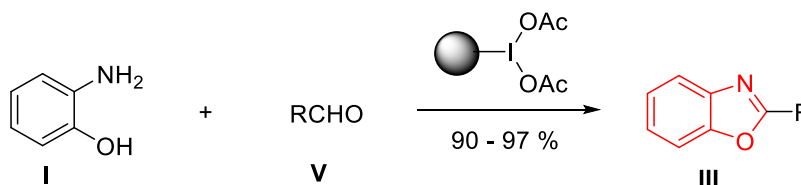


Schéma IV: Kondenzace *o*-aminofenolu s aldehydy za účasti PDAIS

V roce 2011 Guillaumet a kol. vyvinuli novou metodu syntézy benzoxazolů kondenzací *o*-aminofenolu s aromatickými aldehydy v přítomnosti katalytického množství Animal Bone Meal (ABM) a Lewisovými kyselinami obohaceného ABM ($ZnCl_2/ABM$, $ZnBr_2/ABM$, $CuCl_2/ABM$) (**Schéma V**)⁴⁰. Výhody této metody jsou krátký reakční čas, čistý reakční profil a nízká toxicita katalyzátoru. Navíc aktivita katalyzátoru zůstává stejná i po pátém reakčním cyklu.



Schéma V: Kondenzace *o*-aminofenolu s aromatickými aldehydy za katalýzy ABM

Pasha a kol. provedli syntézu nových 2-substituovaných benzoxazolů reakcí *o*-aminofenolu s různými aromatickými aldehydy za katalýzy $Zn(OAc)_2 \cdot 2H_2O$ bez použití rozpouštědla (**Schéma VI**)⁴¹.

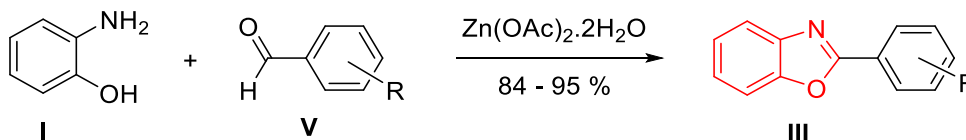


Schéma VI: Reakce *o*-aminofenolu s aromatickými aldehydy za katalýzy $Zn(OAc)_2 \cdot 2H_2O$

Baltork a kol. ukázali, že benzoxazoly lze syntetizovat z orthoesterů a *o*-aminofenolu za přítomnosti vlhku odolného a poměrně levného katalyzátoru $ZrOCl_2 \cdot 8H_2O$ bez použití rozpouštědla (**Schéma VII**)⁴². Mechanismus reakce zahrnuje

iniciační aktivaci orthoesteru katalyzátorem následovanou kondenzací s *o*-aminofenolem a dále cyklizací na výsledné benzoxazolové deriváty. Tato metoda je ekologicky přípustná díky využití poměrně levného, znovu použitelného katalyzátoru za mírných reakčních podmínek.

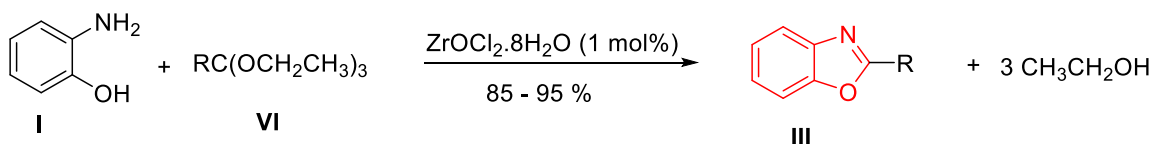


Schéma VII: Syntéza benzoxazolů z orthoesterů

Batey a kol. v roce 2008 vyvinuli dva přístupy pro syntézu benzoxazolů (**Schéma VIII**)⁴³. První z nich představuje intermolekulární cross-coupling 1,2-dihaloarenů s primárními amidy katalyzovaný mědí za tvorby Ar-N vazby, následovaný intramolekulární cyklizací usnadněnou měďným katalyzátorem za tvorby Ar-O vazby benzoxazolu. Nevýhodou této metody je omezená dostupnost 1,2-dihaloarenů a také nespécifická regioselektivita.

Aby se předešlo těmto nedostatkům, vyvinuli alternativní one-pot strategii, která zahrnuje reakci 2-bromoanilinů s acyl chloridy za použití CuI jako katalyzátoru a 1,10-fenantrolinu v přítomnosti Cs₂CO₃.

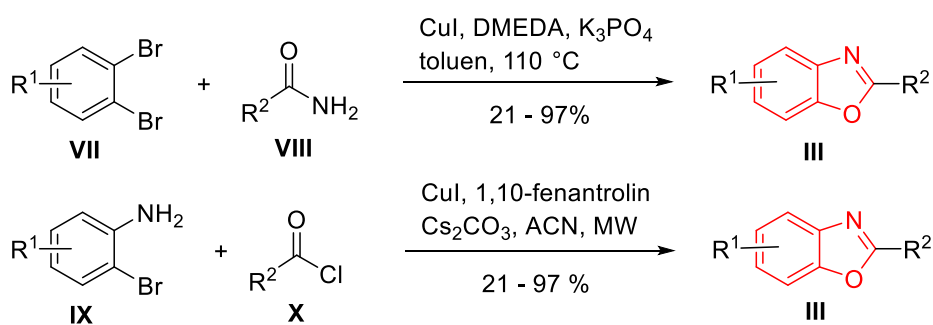


Schéma VIII: Syntéza vycházející z 1,2-dihaloarenů, či 2-bromoanilinů

2-Arylbenzoxazoly je možno připravit z anilidů za použití katalytického systému Cu(OTf)₂/O₂ podle Nagasawa a kol. (X = H)⁴⁴, nebo z *N*-(2-haloaryl)benzamidů prostřednictvím intramolekulární couplingové strategie Ullmannova typu za využití BINAM-Cu(II) katalyzátoru podle Sekara a kol. (X = I, Br, Cl)⁴⁵, či za katalýzy kolbaltnatého komplexu za aerobních podmínek podle Punniyamurthyho a kol. (X = I, Br)⁴⁶ (**Schéma IX**).

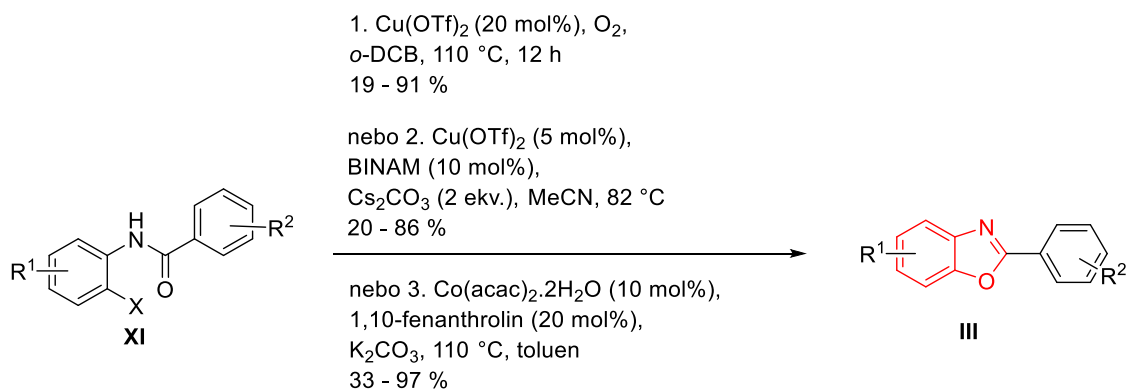


Schéma IX: Syntéza benzoxazolů z anlidů, či *N*-(2-haloaryl)benzamidů

Zhang a kol. objevili nový prekurzor pro syntézu benzoxazolů. Přímým couplingem 1,1-dibromoalkenů s *o*-aminofenolem za mírně bazických podmínek obdrželi různé deriváty benzoxazolu v dobrých výtěžcích (54 – 84 %) (Schéma X)⁴⁷. Jediným omezením této metody je použití 1,1-dibromoalkenů odvozených od arylaldehydů a glyoxalátu, nebo podobných aldehydů s elektron odtahujícím efektem, který podporuje nukleofilní atak *o*-aminofenolu.

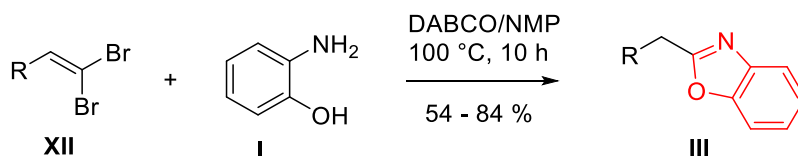


Schéma X: Příprava benzoxazolů z 1,1-dibromoalkenů

Fan a kol. syntetizovali benzoxazol ketony one-pot tandemovou reakcí 1,1-dibromoalkenů s *o*-aminofenoly za katalýzy TBAF·3H₂O a RuCl₃ (5%) za aerobních podmínek (Schéma XI)⁴⁸. Toto je první popsaná zmínka o přímé syntéze heteroaryl ketonů z 1,1-dibromoalkenů.

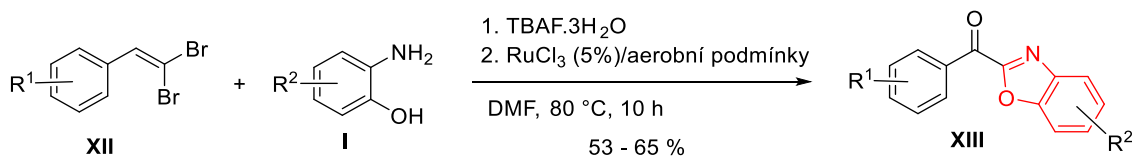


Schéma XI: Syntéza benzoxazol ketonů z 1,1-dibromoalkenů

Benzoxazolové deriváty lze také připravit ze Schiffových bází, např. paladiem katalyzovanou oxidativní cyklizací podle Panga a kol. z roku 2009 (Schéma XII)⁴⁹. Mechanismus této reakce spočívá v reakci iminové skupiny fenolické Schiffovy báze

s Pd(II), což poskytuje π -komplex. Následuje tvorba intermediátu s pětičlenným cyklem. Dalším krokem je β -eliminace za vzniku benzoxazolového derivátu a paladia v oxidačním stavu 0, který je pak oxidován molekulárním kyslíkem na oxidační stav 2.

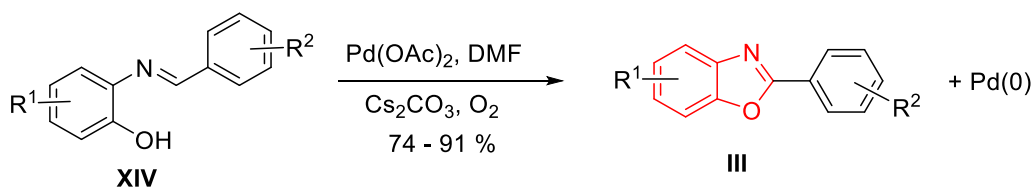


Schéma XII: Syntéza benzoxazolů ze Schiffových bází

V roce 2010 Liu a kol. efektivně vyvinuli syntézu benzoxazolových derivátů z *ortho*-substituovaných nitrobenzenových derivátů za použití Hantzschova esteru, 1,4-dihydropyridinu (HEH) jako biomimetického redukčního činidla a Pd/C jako katalyzátoru (Schéma XIII)⁵⁰. Mechanismus reakce zahrnuje aromatizaci HEH katalyzovanou Pd/C za tvorby paladium hydridu, který způsobuje redukci *ortho*-substituovaných nitrobenzenových derivátů na odpovídající *o*-aminofenyl benzoáty. Následná intramolekulární cyklizace aminů a odštěpení H₂O poskytuje benzoxazolové deriváty.

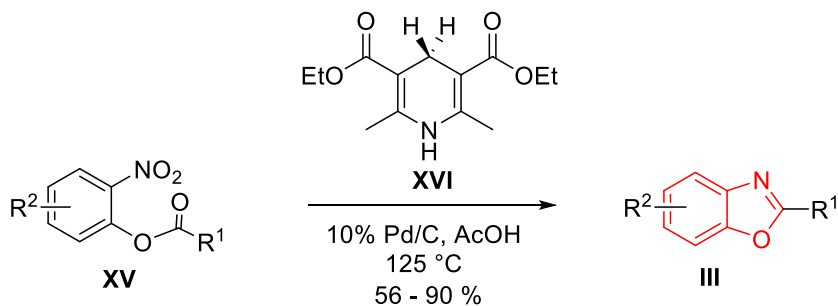


Schéma XIII: Syntéza benzoxazolů katalyzovaná Hantzschovým esterem

Cioffi a kol. v tom samém roce objevili dvě metody pro syntézu 2-aminobenzoxazolů za použití komerčně dostupných aminů, *o*-aminofenolů a tetramethyl orthokarbonátu, nebo 1,1-dichlorodifenoxyethanu (Schéma XIV)⁵¹. Klíčové výhody spojené s touto metodou jsou one-pot provedení, reagenty, se kterými se snadno zachází a mírné reakční podmínky s vysokým stupněm tolerance funkčních skupin.

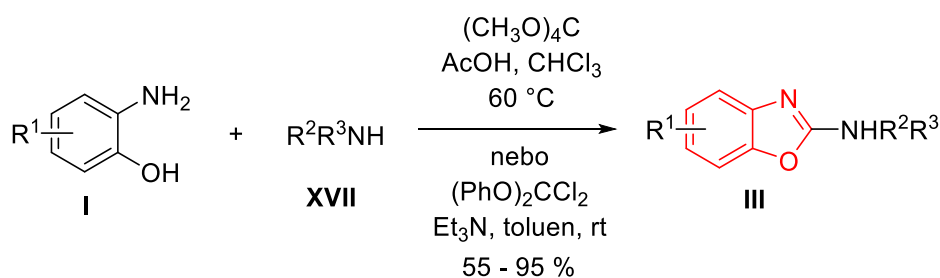


Schéma XIV: Syntéza 2-aminobenzoxazolů

Bhanage a kol. využili 2-nitrofenoly jako substráty pro syntézu benzoxazolových derivátů (**Schéma XV**)⁵². Tyto 2-nitrofenoly podléhají paladiem katalyzované hydrogenaci na 2-aminofenoly a následné nukleofilní substituci s triethylorthoformátem za vzniku benzoxazolových derivátů v dobrých výtěžcích (73 – 82 %).

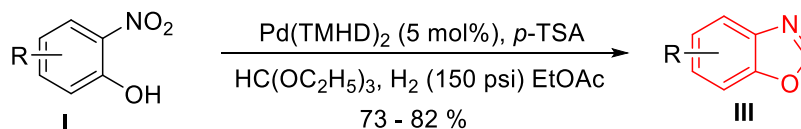


Schéma XV: Paladiem katalyzovaná syntéza benzoxazolů

V roce 2012 Wada a kol. připravili novou sérii benzoxazolových derivátů tandemovou migrací a karboalkoxylací *o*-isokyanofenyl acetalů s kombinací Lewisovy kyseliny ($\text{BF}_3 \cdot \text{OEt}_2$) a báze (2,4,6-trimethylpyridin) (**Schéma XVI**)⁵³. Bromo-substituované acetaly vyžadovaly delší reakční čas a nadbytek reagentů; methoxymethyl acetaly neposkytovaly žádné benzoxazolové deriváty kvůli stereoelektronickému efektu. Jak cyklické, tak bicyklické acetaly spolu se substituenty na aromatickém jádře neměly dopad na výsledek reakce.

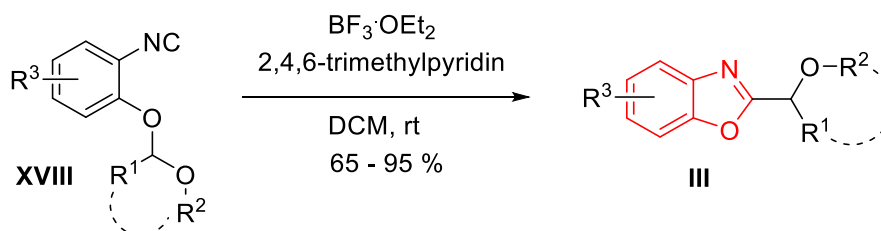


Schéma XVI: Syntéza benzoxazolových derivátů z *o*-isokyanofenyl acetalů za použití kombinace kyseliny a báze

Později Deng a kol. publikovali syntézu 2-arylbenzoxazolů z *o*-nitrofenolů a benzylických alkoholů v dobrých výtěžcích (23 – 88 %) za přítomnosti Fe katalyzátoru (**Schéma XVII**)⁵⁴. Mechanismus této reakce spočívá v oxidaci alkoholu, redukci nitro skupiny, kondenzaci a dehydrogenaci v jediném kroku bez jakéhokoli přídavku dalších oxidačních nebo redukčních činidel. Elektronodonní a elektronakceptorní skupiny na benzenovém jádře a také zvolené heterocyklické alkoholy neměly příliš velký vliv na výtěžek reakce.

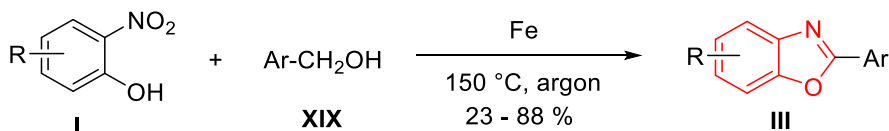


Schéma XVII: Syntéza benzoxazolů katalyzovaná železem

V roce 2014 Bao a kol. vyvinuli syntézu benzoxazolových derivátů kondenzací *o*-aminofenolů a β -diketonů za použití kombinované katalýzy Brønstedovy kyseliny a jodidu měďného (**Schéma XVIII**)⁵⁵. Nejprve *o*-aminofenol kondenzuje s β -diketonem v přítomnosti Brønstedovy kyseliny za vzniku intermediátu, který působením CuI a následnou nukleofilní adicí a dále štěpením vazby C-C poskytuje benzoxazolové deriváty.

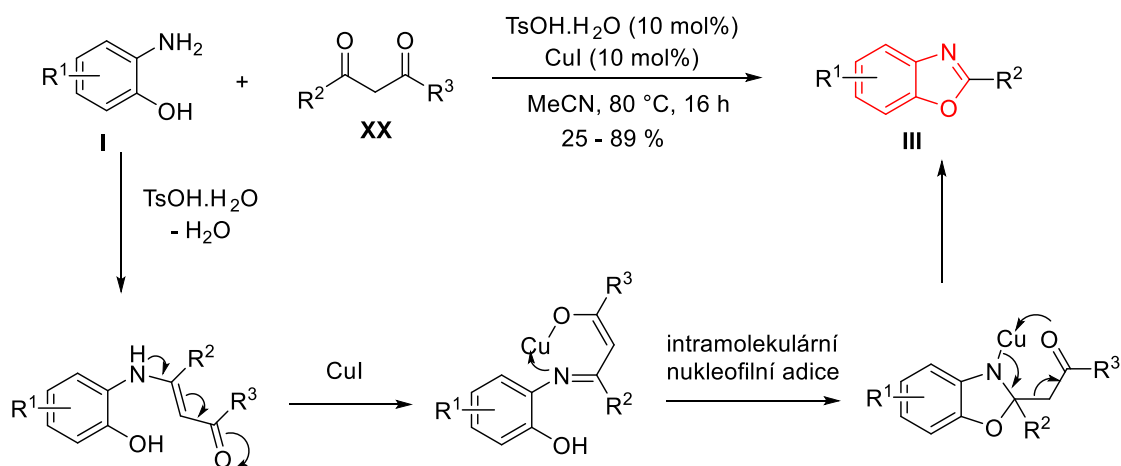


Schéma XVIII: Syntéza benzoxazolů z *o*-aminofenolů a β -diketonů

Pan a kol. ukázali možnost syntézy nových benzoxazolů z *o*-aminofenolů a diaryl acetylenů v přítomnosti katalytického množství PdCl₂ (**Schéma XIX**)⁵⁶. Reakce probíhá za štěpení trojné vazby C≡C v přítomnosti PhCl jako rozpouštědla za mírných podmínek. Výhody této metody jsou jednoduchá a rychlá izolace produktů, výborná stabilita na vzduchu a dobré výtěžky (69 – 93 %).

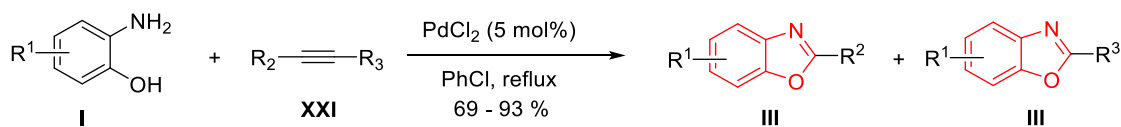


Schéma XIX: Paladiem katalyzovaná syntéza benzoxazolů

Wang a kol. předvedli one-pot syntézu derivátů 2-ketoarylbenzoxazolu oxidativní cyklizací za katalýzy tetra-*n*-butylammonium jodidu (TBAI) (**Schéma XX**)⁵⁷. Reakce struktury **XXII** s 10 mol% TBAI a 2 ekvivalenty H₂O₂ v THF za laboratorní teploty, následovaná adicí 1 ekvivalentu K₂CO₃ v methanolu poskytuje 2-ketoarylbenzoxazoly **XIII**.

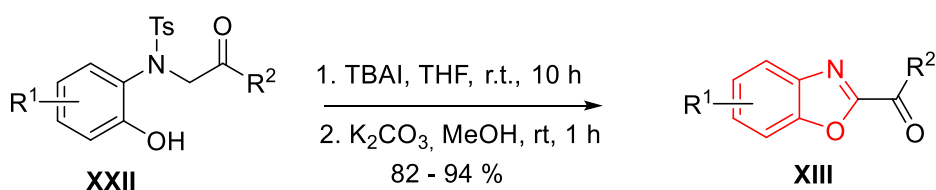


Schéma XX: Syntéza 2-ketoarylbenzoxazolových derivátů za katalýzy TBAI

V roce 2015 Garcia a kol. připravili nové deriváty benzoxazolů z aromatických nebo *N*-heterocyklických karbonitrilů (**Schéma XXI**)⁵⁸. Substituované karbonitrily byly vystaveny působení katalyzátoru [1,2-bis(diisopropylfosfino)ethan]Ni(H)₂ v methanolu za vzniku methyl imidátů. Tyto methyl imidáty reagovaly s *o*-aminofenoly v methanolu za vzniku benzoxazolových derivátů v dobrých výtěžcích (51 – 99 %).

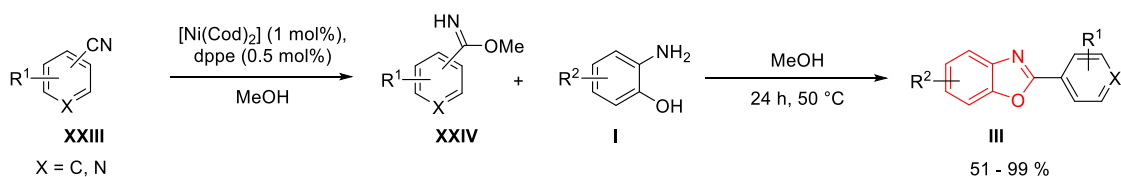


Schéma XXI: Syntéza benzoxazolů za katalýzy niklu v oxidačním stavu 0

Xiong a kol. objevili přesmyk Beckmannova typu *o*-hydroxyketiminů s hypervalentním jodovým reagentem, který působí jako oxidační činidlo pro [1,2]-aryl migraci za vzniku požadovaných benzoxazolů (**Schéma XXII**)⁵⁹. Výchozí ketiminy byly připraveny kondenzací amoniaku s odpovídajícími ketony.

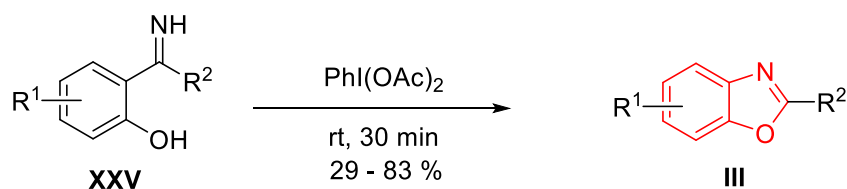


Schéma XXII: Syntéza benzoxazolů z *o*-hydroxy ketiminů

Wu a kol. syntetizovali 2-arylbenzoxazoly za katalýzy mědi tandemovou kondenzací/oxidativní reakcí *o*-aminofenolů s arylmethylchloridy (**Schéma XXIII**)⁶⁰. Arylmethylchloridy byly použity jako nový zdroj acylů společně s levným a bezpečným oxidačním činidlem KNO₃.

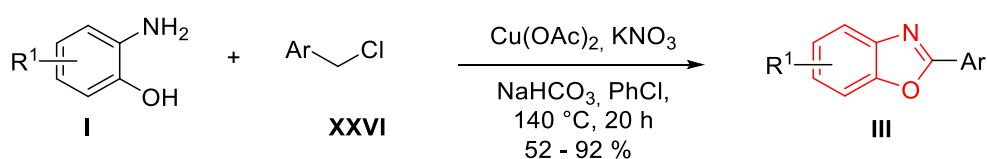


Schéma XXIII: Mědi katalyzovaná syntéza benzoxazolů

V roce 2016 He a kol. odhalili zajímavý protokol pro syntézu substituovaných 2-ketoaryl benzoxazolů za bazické katalýzy bez použití kovů (**Schéma XXIV**)⁶¹. α,α -Dihalokeytony při tom podstupují bazicky katalyzovanou reakci s *o*-aminofenoly za vzniku 2-ketoaryl benzoxazolových derivátů v dobrých výtěžcích (30 – 83 %).

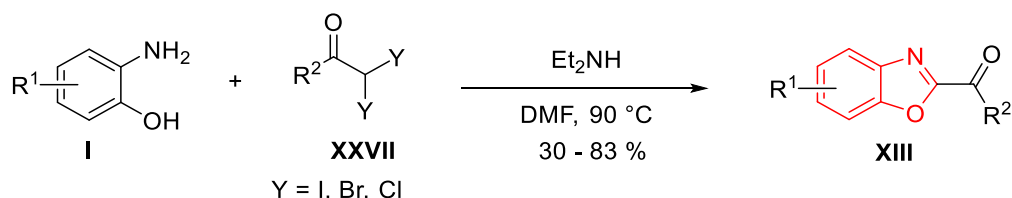


Schéma XXIV: Bazicky katalyzovaná syntéza 2-ketoaryl benzoxazolových derivátů

V roce 2007 Spatz a kol. provedli multikomponentní syntézu benzoxazolových derivátů pomocí Ugiho reakce (Ugi-MCR) následovanou cyklizací za katalýzy mědi (**Schéma XXV**)⁶². Při tomto procesu reaguje amin, aldehyd/keton, karboxylová kyselina a isokyanid v methanolu za vzniku intermediátu, který podléhá cyklizaci zahrnující intramolekulární C-O cross-coupling *o*-halofenylamidu vzniklého z isokyanidu prostřednictvím systému oxidativní inserce/reduktivní eliminace s Cu(I)/Cu(III).

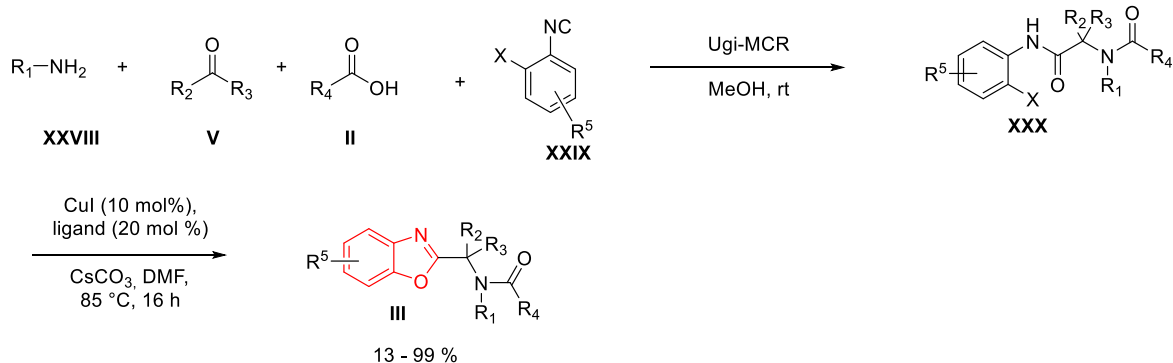


Schéma XXV: Ugiho multikomponentní reakce (Ugi-MCR) a mědi katalyzovaná cyklizace pro tvorbu substituovaných benzoxazolů

Lang a kol. představili syntézu substituovaných benzoxazolových derivátů pomocí tříkomponentního couplingu aryl halidu, isokyanidu a *o*-aminofenolu za katalýzy paladiem (**Schéma XXVI**)⁶³. Tato metoda nabízí několik výhod, jako například mírné reakční podmínky a snadné zpracování a možnost provedení za atmosférického tlaku bez použití toxického CO.

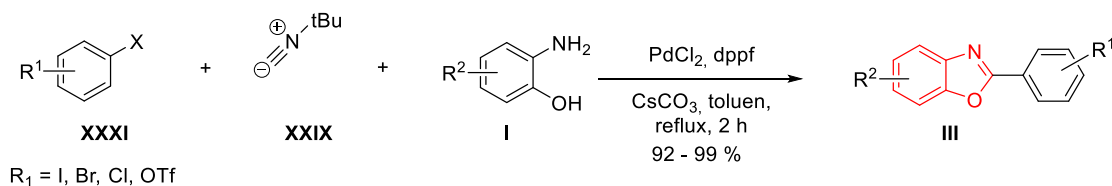


Schéma XXVI: Tříkomponentní paladiem katalyzovaný coupling pro tvorbu benzoxazolových derivátů

Majumdar a kol. v roce 2014 uvedli přístup pro syntézu benzoxazolových derivátů pomocí tříkomponentního couplingu (**Schéma XVII**)⁶⁴. Při této metodě reakce mezi ketonem, isokyanidem a *o*-aminofenolem poskytuje benzoxazinový intermediát prostřednictvím intramolekulárního ataku hydroxylové skupiny *o*-aminofenolu na nitrilový ion. Poté benzoxazinový intermediát podléhá otevírání kruhu s *o*-aminofenolem za vzniku požadovaných benzoxazolových derivátů.

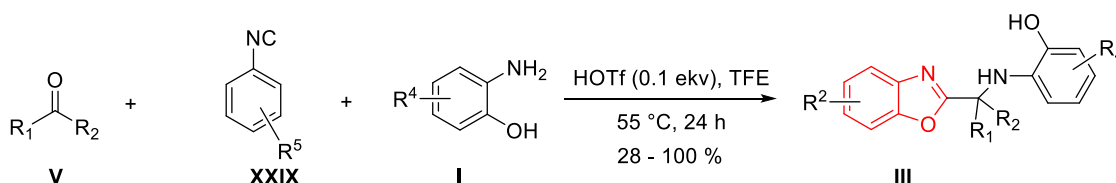


Schéma XVII: Tříkomponentní coupling pro tvorbu benzoxazolových derivátů

Liang a kol. syntetizovali C2-alkenylované benzoxazoly ze snadno připravitelných 2-propynolfenolů a trimethylsilyl azidu za použití $\text{BF}_3 \cdot \text{Et}_2\text{O}$ (**Schéma XXVIII**)⁶⁵. Tento proces zahrnuje štěpení vazby $\text{C}_{\text{sp}}-\text{C}_{\text{sp}^2}$ a poté tvorbu vazby C-N v dobrých výtěžcích (až 91 %) s tolerancí různorodých funkčních skupin.

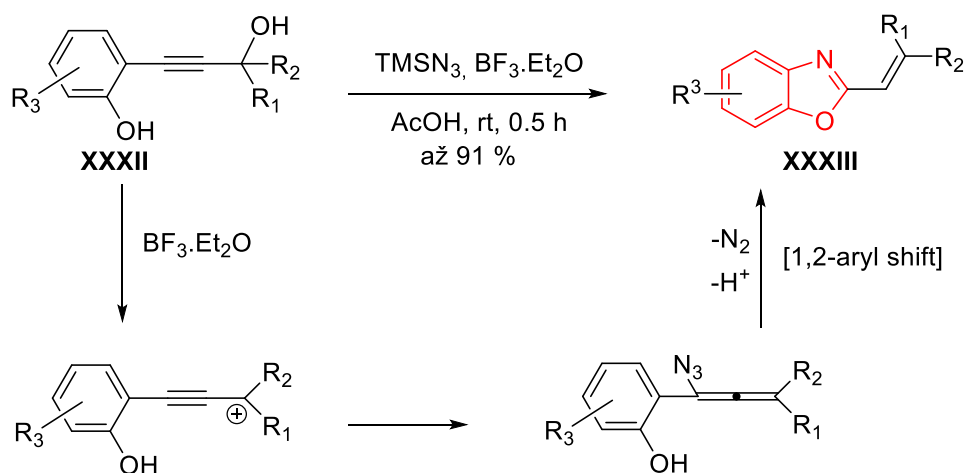


Schéma XXVIII: Syntéza C2-alkenylovaných benzoxazolů

4.1.2 Syntetické přístupy na pevné fázi

Kromě metod syntéz benzoxazolových derivátů v roztoku byly popsány i syntetické přístupy provedené na pevné fázi. Např. Wang v roce 1997 uvedl přeměnu *o*-amidofenolu, uchyceného na pevný nosič, na odpovídající benzoxazol za podmínek Mitsunobu reakce (**Schéma XXIX**)⁶⁶.

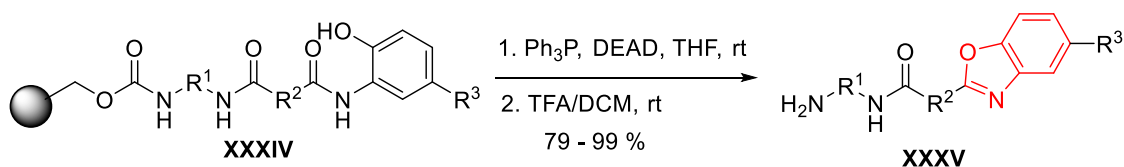


Schéma XXIX: Syntéza benzoxazolů na pevné fázi Mitsunobu reakcí

V roce 2001 Beebe a kol. popsali metodu syntézy benzoxazolů z 3-nitrotyrosinu na pevné fázi (**Schéma XXX**)⁶⁷. Nejprve dochází ke couplingu *N*-chráněného 3-nitrotyrosinu s polystyrenem přes linker Wangova typu. Následně je 3-nitrotyrosin ochráněn a vzniklý primární amin je přeměněn na terciární amin. Fenol je poté acylován a nitro skupina redukována za použití SnCl_2 . Výsledný amino ester cyklizuje a zároveň dehydratuje za vzniku benzoxazolu.

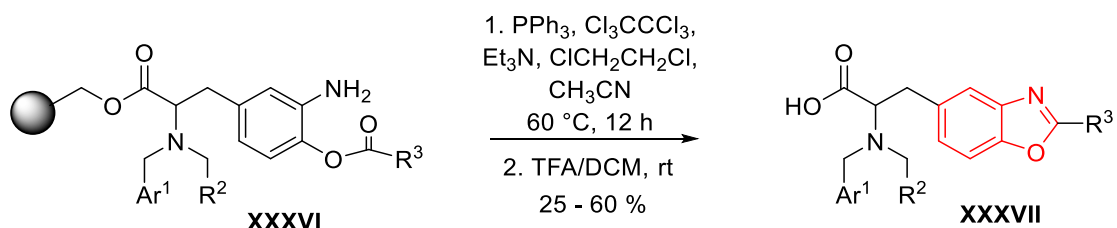


Schéma XXX: Syntéza benzoxazolů z 3-nitrotyrosinu na pevné fázi

V roce 2004 Chen a kol. představili postup pro syntézu benzoxazolových derivátů na PEG-5000 jakožto rozpustném nosiči (**Schéma XXXI**)⁶⁸. Tato strategie je započata syntézou tereftaloyl fluoridu z kyseliny tereftalové za použití HF-pyridinu a DCC. Následuje navázání na PEG-5000 rozpustný nosič. Tento intermediát pak reaguje se substituovaným *o*-aminofenolem za vzniku odpovídajícího polymerního konjugátu. Dále dochází k refluxu v 1,4-dioxanu s kyselinou octovou a vzniká odpovídající benzoxazolový derivát. Nakonec je PEG nosič odštěpen v roztoku NaOMe v methanolu za tvorby benzoxazolů v dobrých výtěžcích (22 – 62 %).

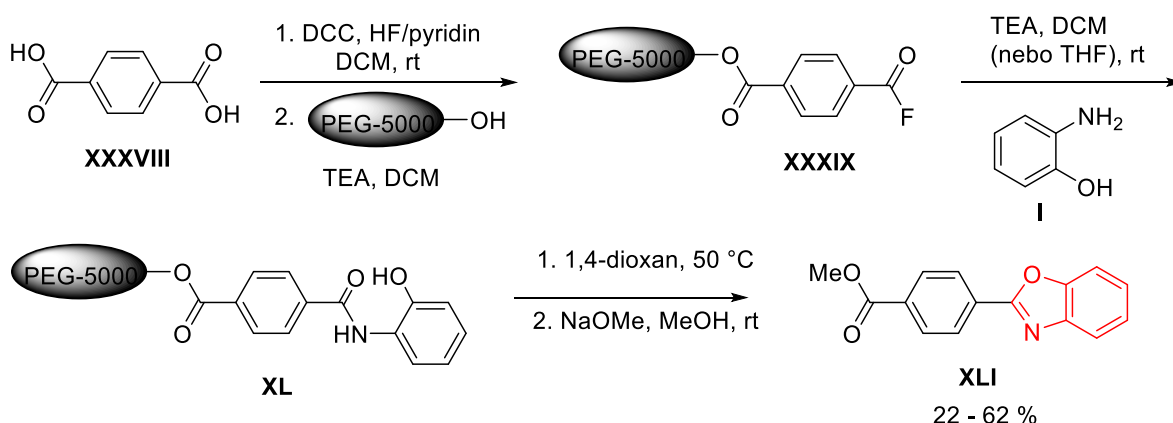


Schéma XXXI: Syntéza benzoxazolů za použití PEG rozpustného nosiče

Gong a kol. v roce 2005 popsali metodu syntézy 2-aminobenzoxazolů na pevné fázi (**Schéma XXXII**)⁶⁹. Klíčovým krokem je příprava polymerně vázaného 2-merkaptobenzoxazolu reakcí Merrifieldovy pryskyřice s 2-aminofenoly a CS₂ v přítomnosti DIC v MeCN. Následuje oxidace pomocí mCPBA v DCM a poté reakce se substituovanými aminy za vzniku požadovaných 2-aminobenzoxazolů v dobrých výtěžcích (46 – 86 %).

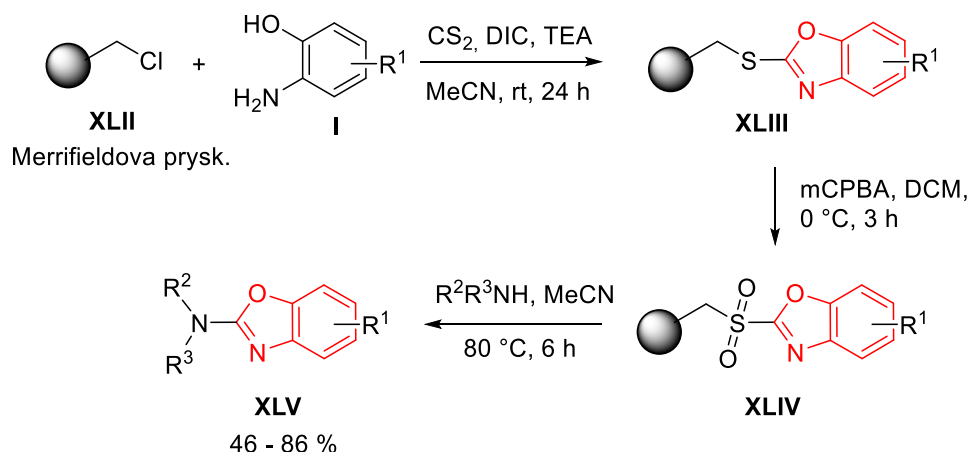


Schéma XXXII: Syntéza benzoxazolových derivátů na Merrifieldově pryskyřici

Hioki a kol. v roce 2007 navrhli novou metodu pro kombinatoriální syntézu benzoxazolů na pevné fázi s použitím 4-alkoxy-anilinového linkeru (**Schéma XXXIII**)⁷⁰. Oxidativní štěpení azomethinů vázaných na polymerní pryskyřici za použití *o*-aminofenolu poskytuje 2-substituované benzoxazoly. Štěpení se účastní aktivní uhlí (typ Darco® KB).

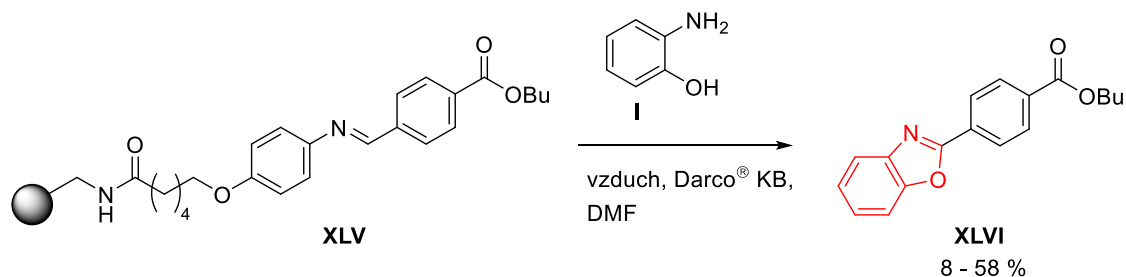


Schéma XXXIII: Syntéza benzoxazolů na pevné fázi využívající 4-alkoxy-anilinový linker

Botta a kol. v roce 2008 ukázali syntézu substituovaných benzoxazolů z acylačních činidel ukotvených na pevné fázi za účasti mikrovlnného záření ve vysoké čistotě a dobrých výtěžcích (24 – 94 %) (**Schéma XXXIV**)⁷¹.

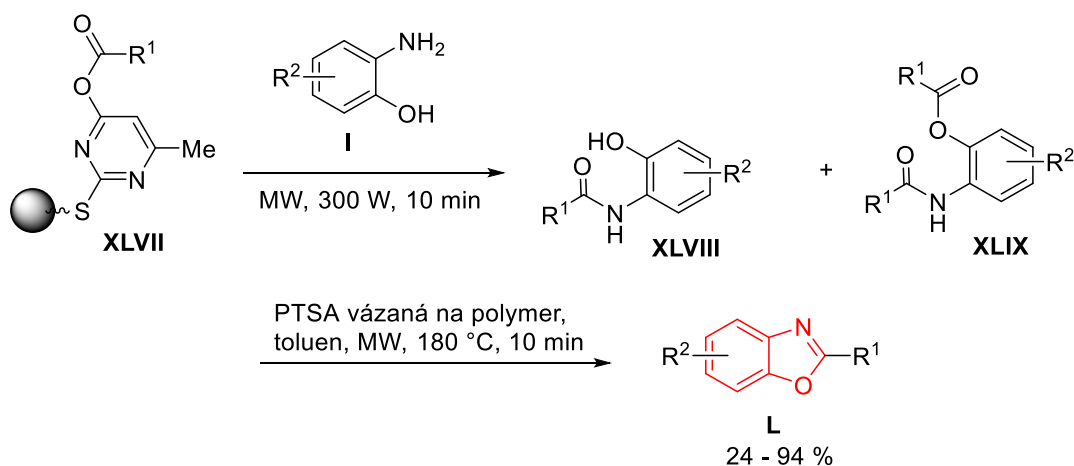


Schéma XXXIV: Syntéza benzoxazolů z reagentů ukotvených na pevné fázi

V tom samém roce Lim a kol. vyvinuli syntézu benzoxazolů z esterů vázaných na pryskyřici za účasti mikrovlnného záření (**Schéma XXXV**)⁷². Cyklokondenzační reakcí těchto esterů získaných z Wangovy pryskyřice s *o*-aminofenoly za mikrovlnného záření poskytly substituované benzoxazolové deriváty.

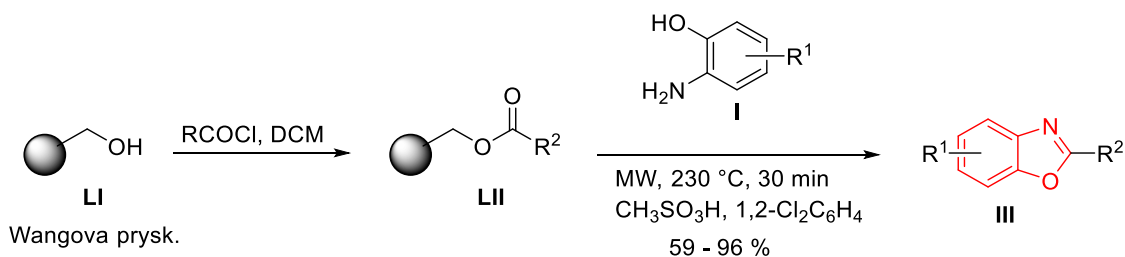


Schéma XXXV: Syntéza benzoxazolů z esterů vázaných na pryskyřici za účasti mikrovlnného záření

V roce 2011 Sun a kol. vyvinuli paralelní syntézu bisheterocyklických substituovaných benzimidazolylbenzoxazolů na rozpustném polymerním nosiči pomocí fokusovaného mikrovlnného záření (**Schéma XXXVI**)⁷³. Prvním krokem je acylace *o*-fenylendiaminového konjugátu vázaného na polymer 4-hydroxy-3-nitrobenzoovou kyselinou. Dále dochází k uzavření cyklu za kyselá katalýzy. Redukce nitro skupiny následovaná heterocyklizací s různými alkyl, aryl a heteroaryl isothiokyanáty a konečným štěpením z pryskyřice pomocí 1% KCN v methanolu po dobu 12 hodin dává vzniku benzimidazolylbenzoxazolů.

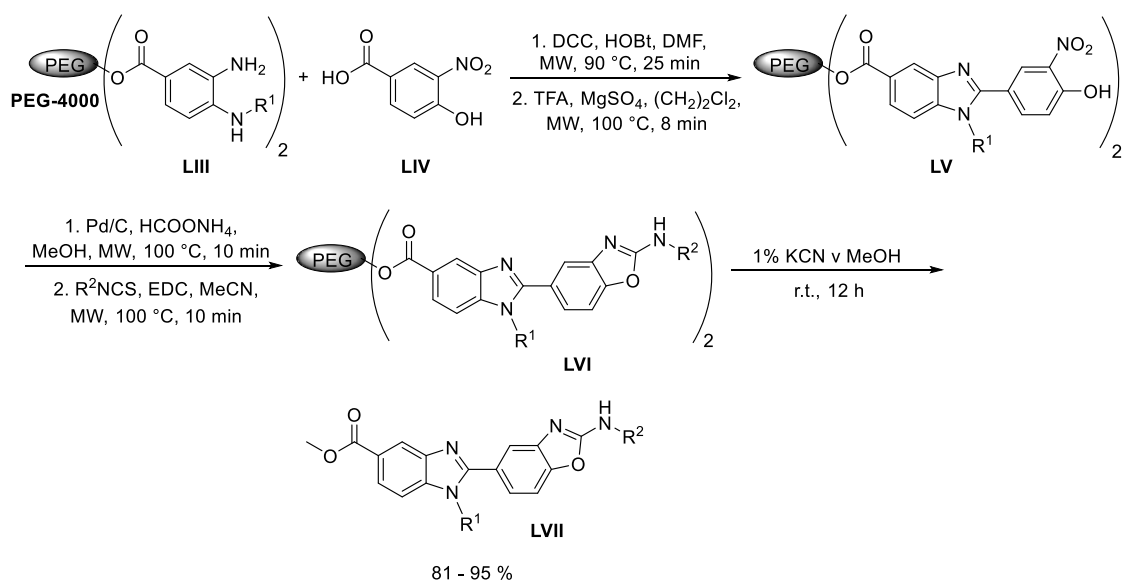
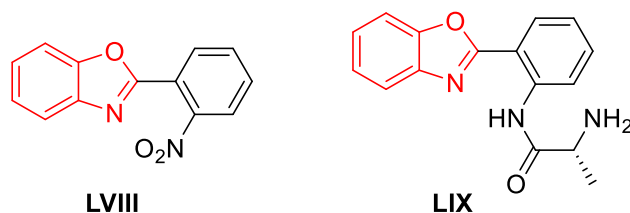


Schéma XXXVI: Syntéza benzimidazolylbenzoxazolových derivátů s využitím PEG-4000

4.2 Biologická aktivita benzoxazolových derivátů

Jak již bylo zmíněno v Úvodu, benzoxazolové deriváty vykazují celou řadu biologických vlastností^{2,3}. Zde je uvedeno několik konkrétních biologicky aktivních benzoxazolů.

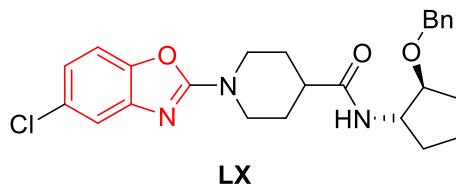
Stanforth a kol. syntetizovali 2-arylbenzoxazolové deriváty a použili je pro detekci nitroreduktázové aktivity v Gram negativních bakteriích⁴. Z těchto sloučenin pouze látka **LVIII** (**Obr. I**) ukázala slibné výsledky pro nitroreduktázovou aktivitu všech Gram negativních bakterií a *S. aureus*. Látka **LIX** (**Obr. I**) byla účinná pro stanovení L-alanyl aminopeptidázové aktivity.



Obr. I: Deriváty 2-arylbenzoxazolu s antimikrobiální aktivitou

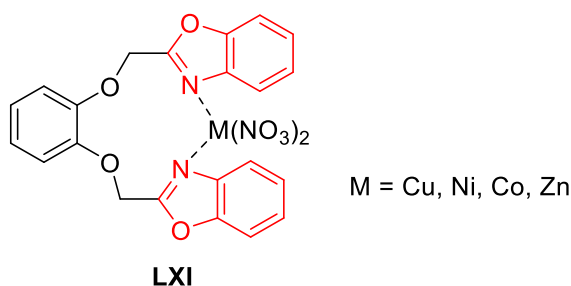
Nugent a kol. objevili novou sérii benzoxazolových derivátů a hodnotili je z hlediska inhibice mikrosomální prostaglandin E1 synthasy (mPGES-1) během zánětlivé reakce⁷. Sloučenina **LX** (**Obr. II**) vykazovala velmi vysokou účinnost v inhibici

mPGES-1 (0,018 μ M) a selektivitu nad COX-2 při testování na lidských fetálních fibroblastech.



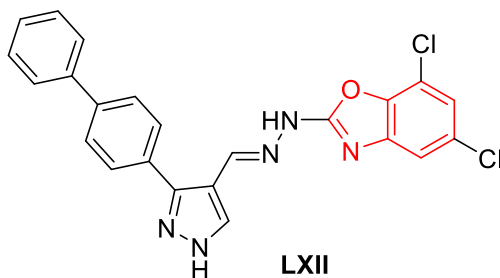
Obr. II: Derivát benzoxazolu s protizánětlivým účinkem

Liu a kol. připravili nový benzoxazolový ligand pro tvorbu cyklometalovaného komplexu **LXI** (**Obr. III**)⁸. Nasyntetizovaná knihovna byla testována na protinádorovou aktivitu proti čtyřem nádorovým liniím. Komplexy **LXI** se vážou na DNA interkalací. Jejich protinádorová aktivita klesá v pořadí: Cu-L > Ni-L \approx Co-L > Zn-L \gg L.



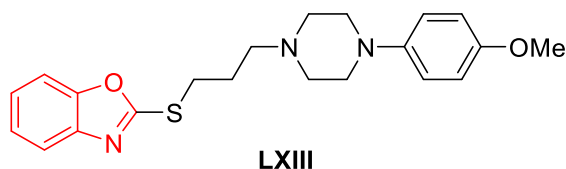
Obr. III: Cyklometalový komplex s protinádorovou aktivitou

Isloor a kol. vyvinuli deriváty benzoxazolu obsahující substituované pyrazoly pro analgetické použití¹⁰. Nově syntetizované sloučeniny byly hodnoceny z hlediska analgetické aktivity pomocí „tail-flick“ testu za použití pentazocinu jako standardu. Mezi připravenými sloučeninami vykázala látka **LXII** (**Obr. IV**) značnou analgetickou aktivitu.



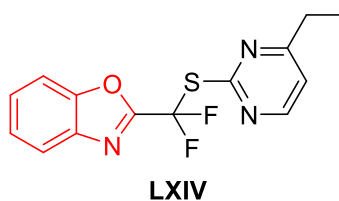
Obr. IV: Derivát benzoxazolu a pyrazolu s analgetickým účinkem

Siracusa a kol. připravili nové benzoxazoly připojené na arylpiperazin s různými thioalkylovými řetězci⁷⁴. U těchto sloučenin byla studována afinita k 5-HT_{1A} a 5-HT_{2A} serotonergním receptorům pomocí radioligandové vazebné metody. Zejména látka **LXIII** (**Obr. V**) ukázala velmi vysokou afinitu a selektivitu vůči 5-HT_{1A} receptoru.



Obr. V: Derivát benzoxazolu a arylpiperazinu s 5-HT_{1A} serotonergní aktivitou

Guillemont a kol. syntetizovali difluoromethylbenzoxazol pyrimidin thioetherové deriváty jako potenciální nenukleosidové inhibitory HIV-1 reverzní transkriptázy¹¹. Mezi připravenými látkami sloučenina **LXIV** (**Obr. VI**) ukázala značnou EC₅₀ hodnotu 6,4 nM proti HIV-1 IIB.

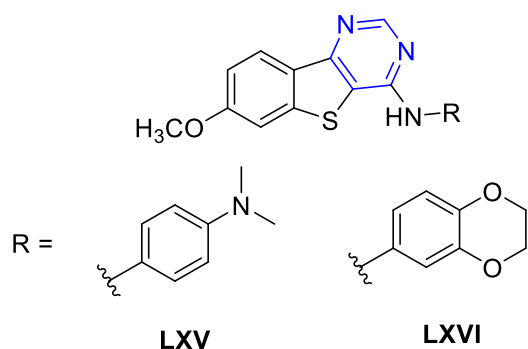


Obr. VI: Derivát difluoromethylbenzoxazol pyrimidin thioetheru s anti-HIV aktivitou

4.3 Biologická aktivita pyrimidinových derivátů

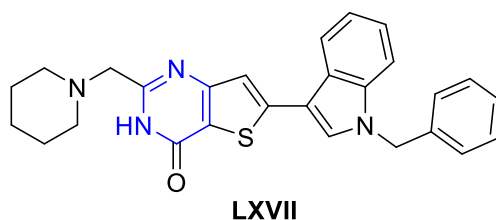
Také pyrimidinové deriváty disponují širokou škálou biologických vlastností¹.

Loidreau a kol. v roce 2013 syntetizovali dvě série nových *N*-aryl-7-methoxybenzo[*b*]furo[3,2-*d*]pyrimidin-4-aminů a jejich *N*-aryl-7-methoxybenzo[*b*]thieno[3,2-*d*]pyrimidin-4-aminových analogů⁷⁵. Sloučeniny byly testovány *in vitro* na inhibici pěti různých kináz (CDK5/p25, CK1δ/ε, GSK3α/β, DYRK1A a CLK1). Mezi těmito látkami předvedly deriváty **LXV** a **LXVI** (**Obr. VII**) zajímavou inhibici v sub-mikromolárních hodnotách a ukázaly selektivitu vůči CLK1 a DYRK1A kináze.



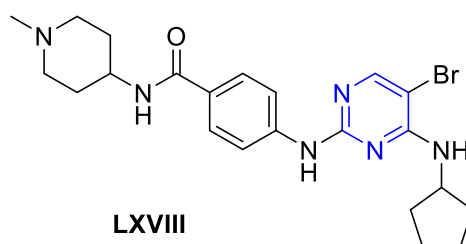
Obr. VII: Deriváty pyrimidinu s potenciálním účinkem proti Alzheimerově chorobě

Perspicae a kol. v roce 2013 navrhli, syntetizovali a biologicky testovali thieno pyrimidiny na jejich inhibiční aktivitu VEGFR-2⁷⁶. Ukázalo se, že sloučenina **LXVII** (**Obr. VIII**) inhibuje VEGFR-2 a HUVEC ve velmi nízkých koncentracích. Dále bylo při *in vitro* testování zjištěno, že sůl kyseliny vinné a látky **LXVII** ($EC_{50} = 31\text{nM}$) blokuje angiogenezi inhibicí tvorby trubic endotelových buněk, kterou indukuje VEGF. Sloučenina **LXVII** projevila větší účinnost než standard Sunitinib ($EC_{50} = 645\text{ nM}$), tudíž může být použita jako „lead compound“ pro další vývoj antiangiogenních látek.



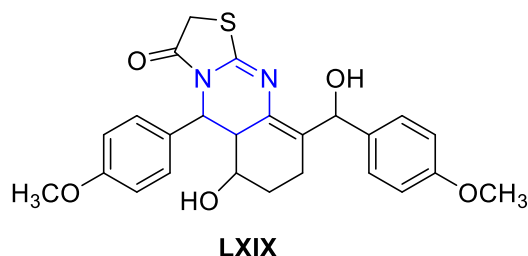
Obr. VIII: Derivát thieno pyrimidinu s potenciálním antiangiogenním účinkem

Qin a kol. v roce 2015 syntetizovali deriváty 2,4-diaminopyrimidinu a testovali je na biologické vlastnosti včetně antiproliferačních účinků, inhibice Aurora kináz a účinků na buněčný cyklus⁷⁷. Všechny připravené sloučeniny vykazaly silnější cytotoxicitu proti nádorovým buněčným liniím v porovnání se standardem VX-680. Sloučenina **LXVIII** (**Obr. IX**) ukázala nejvyšší cytotoxicitu ($IC_{50} = 0,5 - 4,0\ \mu\text{M}$). Navíc dokáže vyvolat zástavu G2/M buněčného cyklu v HeLa nádorových buněčných liniích.



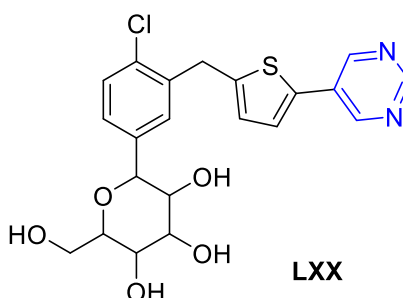
Obr. IX: Derivát 2,4-aminopyrimidinu s potenciálním protinádorovým účinkem

Amr a kol. v roce 2005 navrhli, syntetizovali a charakterizovali nové substituované pyrimidinové deriváty⁷⁸. Připravené deriváty byly testovány na jejich antikonvulzivní účinky (proti epilepsii). Sloučenina **LXIX** (**Obr. X**) z nich byla neúčinnější a ukázala dokonce lepší aktivitu než standard karbamazepin s relativní účinností 2,53. Stanovená hodnota ED₅₀ byla 11 mg/kg.



Obr. X: Pyrimidinový derivát s potenciálním antikonvulzivním účinkem

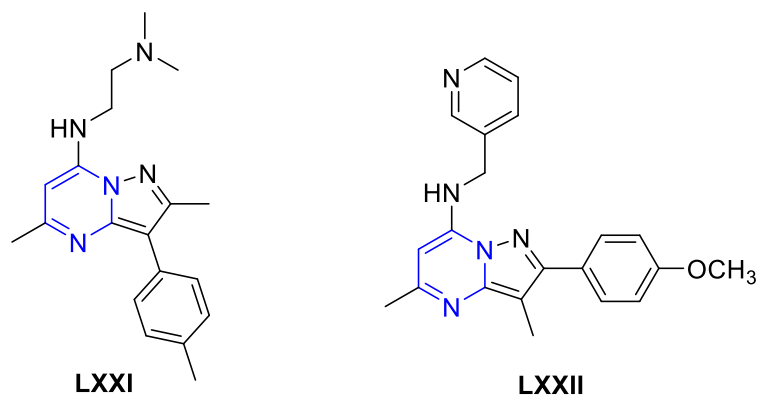
Koga a kol. v roce 2013 navrhli a připravili C-glukosidy obsahující heteroaromatický cyklus a testovali je na inhibiční aktivitu SGLT2 u KK myši na stravě s vysokým obsahem tuku (HF-KK)⁷⁹. Bylo zjištěno, že látka **LXX** (**Obr. XI**) je velmi účinný a selektivní inhibitor hSGLT2. Také byl pozorován antihyperglykemický efekt.



Obr. XI: Derivát C-glukosidu obsahující pyrimidinové jádro s antidiabetickým účinkem

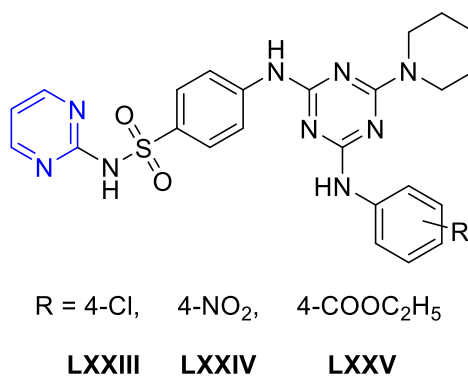
Hwang a kol. v roce 2012 připravili sérii 7-aminopyrazolo[1,5-*a*]pyrimidinů jakožto účinné inhibitory viru hepatitidy C⁸⁰. Bylo pozorováno, že připravené látky

zpomalují životní cyklus HCV. Zejména sloučeniny **LXXI** a **LXXII** (**Obr. XII**) ukázaly dobrý inhibiční účinek vůči HCV a také nízkou cytotoxicitu s vysokou hodnotou indexu selektivity (SI = 21, respektive 25).



Obr. XII: Deriváty 7-aminopyrazolo[1,5-*a*]pyrimidinu s potenciálním účinkem proti viru HCV

Desai a kol. v roce 2015 syntetizovali sérii 4-(4-(arylamino)-6-(piperidin-1-yl)-1,3,5-triazin-2-ylamino)-*N*-(pyrimidin-2-yl)benzensulfonamidů a testovali je z hlediska jejich antimikrobiální aktivity proti Gram-pozitivním bakteriím [*S. aureus* (MTCC 96), *S. pyogenes* (MTCC 442)], Gram-negativním bakteriím [*E. coli* (MTCC 443), *P. aeruginosa* (MTCC 1688)] a fungálním kmenům [*C. albicans* (MTCC 227), *A. niger* (MTCC 282) a *A. clavatus* (MTCC 1323)]⁸¹. Sloučeniny **LXXIII**, **LXXIV** a **LXXV** (**Obr. XIII**) vykázaly značnou antimikrobiální aktivitu na několik kmenů.



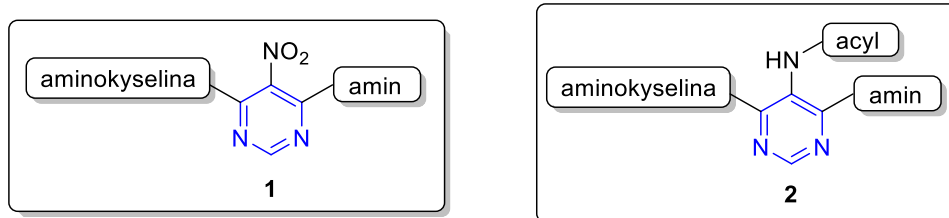
Obr. XIII: Deriváty pyrimidinu s antimikrobiálním účinkem

5 Výsledky a diskuse

5.1 Deriváty odvozené od pyrimidinu

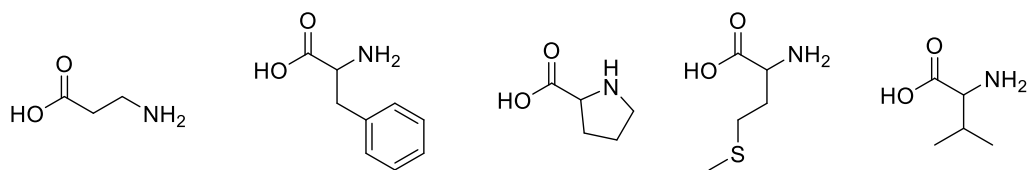
První část předložené diplomové práce je zaměřena na přípravu 4,5,6-trisubstituovaných pyrimidinů **1** a **2** (**Obr. 3**). 5-Nitropyrimidiny **1** zahrnují modifikaci ve dvou pozicích, které umožňují přípravu knihovny různorodých sloučenin. Pro tento kombinatoriální přístup bylo vybráno pět různých aminokyselin (**Obr. 5**) díky své schopnosti vyladit optimální farmakokinetické a farmakodynamické vlastnosti potenciálních léčiv⁸²⁻⁸⁴. Navíc na několika purinových derivátech byl popsán vliv aminokyselinového motivu na antimykobakteriální aktivitu^{85,86}. Protože naše nové sloučeniny byly navrženy primárně jako potenciální antimykobakteriální léčiva, postranní řetězce aminokyselin byly zvoleny s ohledem na lipofilní charakter buněčné stěny bakterie *Mycobacterium tuberculosis*. Druhá pozice na pyrimidinovém jádře byla substituována různými aminy, které také můžeme nalézt ve strukturách s antibakteriálními a antimykobakteriálními účinky^{87,88}. Pro tuto práci byly tedy vybrány reprezentativní příklady alifatických, aromatických, alicyklických a heterocyklických aminů (**Obr. 5**).

Druhá série pyrimidinových derivátů **2** navazuje na první sérii modifikací polohy 5. Redukce nitro skupiny nám dovoluje zavést další substituent následnou acylací amino skupiny různými karboxylovými kyselinami. Bylo vybráno deset karboxylových kyselin (**Obr. 5**), a to vzhledem k jejich výskytu v jiných biologicky aktivních látkách (např. deriváty s antibakteriální aktivitou^{18,23,25,27,89}) a snadné komerční dostupnosti.

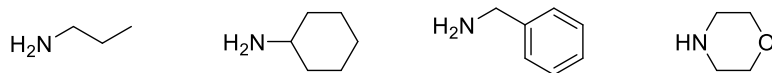


Obr. 3: Navržené série pyrimidinových derivátů

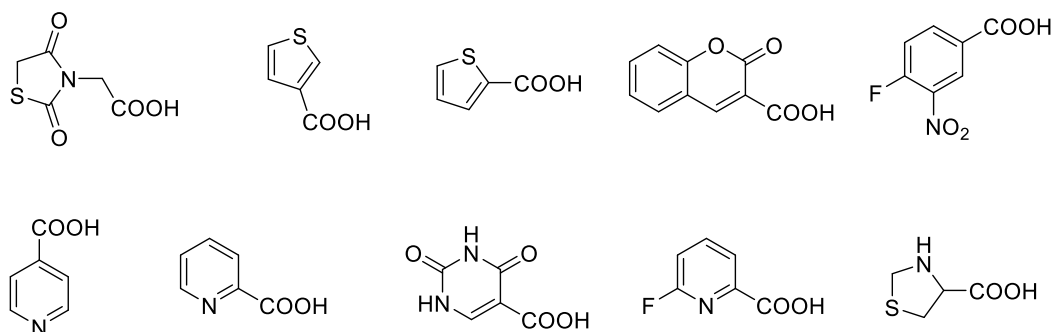
Aminokyseliny



Aminy



Karboxylové kyseliny



Obr. 5: Přehled zvolených building blocků

5.1.1 5-Nitropyrimidiny

5.1.1.1 Syntéza

Pro syntézu sloučenin **1** byla nejprve Wangova pryskyřice acylována pěti různými Fmoc-chráněnými aminokyselinami (Fmoc- β -Ala-OH, Fmoc-Phe-OH, Fmoc-Pro-OH, Fmoc-Met-OH, Fmoc-Val-OH) (**Schéma 1**). Následně byla Fmoc-protectivní skupina odstraněna reakcí s 50% piperidinem v DMF po dobu 15 min. Získaná volná amino skupina poté reagovala s komerčně dostupným 4,6-dichloro-5-nitropyrimidinem za vzniku látek **5**. Nukleofilní substitucí chloridů **5** čtyřmi různými aminy (propylamin, cyklohexylamin, benzylamin, morfolin) byly obdrženy pyrimidiny **6** vázané na pryskyřici. Standardním štěpením s 50% trifluoroctovou kyselinou v DCM bylo získáno 20 finálních derivátů pyrimidinu **1**, které představují první sérii pyrimidinových derivátů. Tyto látky byly čištěny pomocí semipreparativní vysokoúčinné kapalinové chromatografie (HPLC) a jejich čistota byla potvrzena NMR spektroskopií. Tato série látek byla poté biologicky testována na Ústavu mikrobiologie Lékařské fakulty Univerzity Palackého.

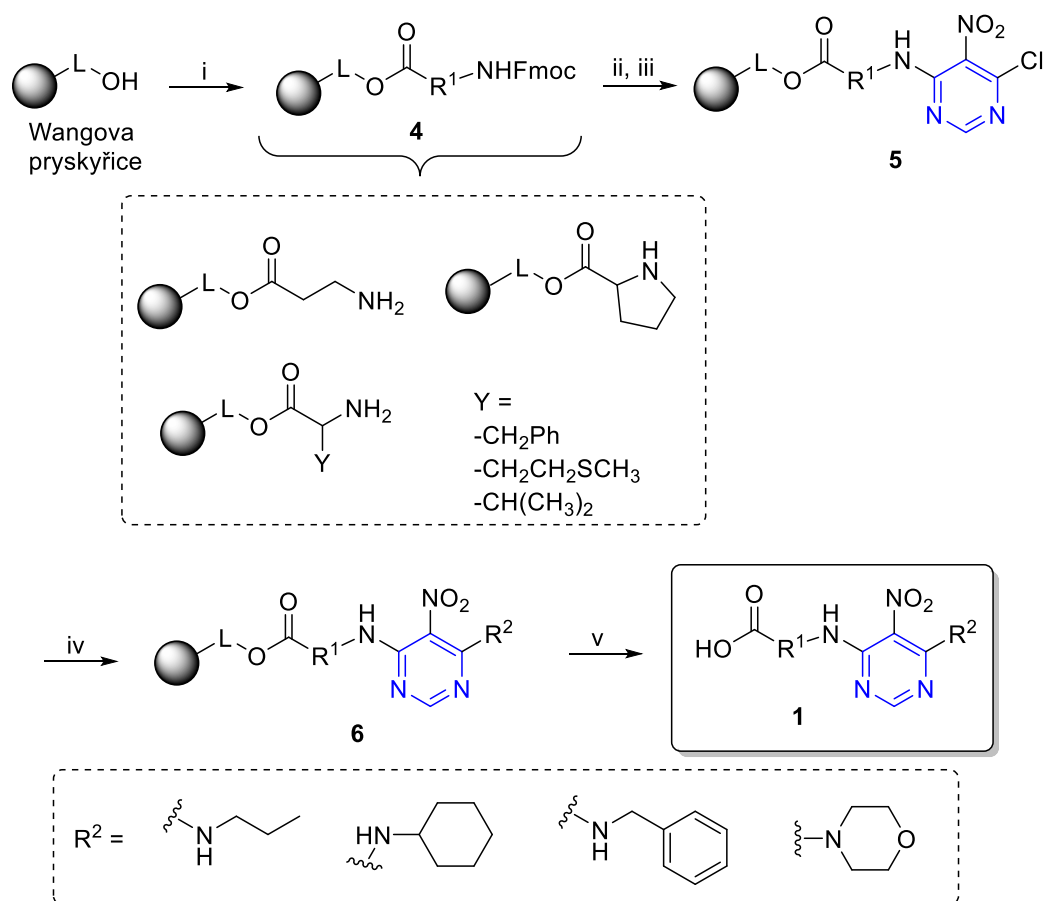
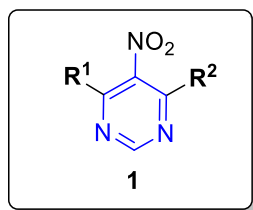


Schéma 1: Syntéza první série pyrimidinových derivátů **1** na pevné fázi

Reakční podmínky: i) Fmoc-aminokyselina, *N*-hydroxybenzotriazol (HOBt), DMAP, DIC, DMF/DCM (1:1), rt, 16 h; ii) 50% piperidin/DMF, rt, 15 min; iii) 4,6-dichloro-5-nitropyrimidin, DIEA, suchý DMF, rt, 2 h; iv) amin, DIEA, DMF, rt, 16 h; v) 50% TFA/DCM, rt, 1 h.

Všechny finální sloučeniny **1** byly získány ve vynikající surové čistotě v rozmezí od 74 do 92 % dle LC-UV měření mezi 210-500 nm. Výtěžky jsou zaznamenány v **Tabulce 1**. Nižší výtěžky v případě sloučenin **1h** a **1p** byly způsobeny ztrátami během HPLC purifikace.

Tabulka 1: Přehled připravených produktů **1** a jejich výtěžky



Sloučenina	R ¹	R ²	Výtěžek [%]
1a			80
1b			78
1c			80
1d			62
1e			70
1f			75
1g			50
1h			25
1i			90
1j			86
1k			85
1l			80

1m			50
1n			68
1o			66
1p			45
1q			57
1r			57
1s			79
1t			77

5.1.1.2 Biologická aktivita

Konečné produkty **1** byly testovány na jejich *in vitro* antibakteriální aktivitu proti *M. tuberculosis* H37Rv a několika Gram-pozitivním a Gram-negativním kmenům (*S. aureus*, *P. aeruginosa*, *E. coli* a *E. faecalis*) při koncentracích v rozmezí 1024 – 0,0312 µg/ml. Také byla zkoumána antifungální aktivita proti *C. albicans* a *A. niger*. Antimikrobiální aktivity byly určovány na základě jejich minimální inhibiční koncentrace (MIC)⁹⁰. Jako kontrola byl pro bakterie použit gentamicin, pro *M. tuberculosis* isoniazid (INH) a pro houby amfotericin B. Antimykobakteriální aktivita pyrimidinů **1** proti *M. tuberculosis* H37Rv (NCTC 7416) byla zhodnocena určením

jejich MIC a stanovena pomocí Resazurin mikrotitru^{91,92}. Výsledky antibakteriálních aktivit první série pyrimidinů **1** jsou shrnuty v **Tabulce 2**.

Tabulka 2: *In vitro* antibakteriální aktivita sloučenin **1** (MIC hodnoty v µg/ml)

Sloučenina	<i>Mycobacterium tuberculosis</i> H37Rv	<i>Staphylococcus aureus</i> CCM 3953	<i>Enterococcus faecalis</i> CCM 4224	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> CCM 3955
1a	NA*	NA	NA	NA
1b	512	NA	NA	2
1c	512	NA	NA	NA
1d	NA	NA	NA	NA
1e	1024	NA	NA	NA
1f	256	512	512	NA
1g	1024	NA	NA	NA
1h	NA	NA	NA	NA
1i	1024	NA	NA	NA
1j	1024	NA	NA	NA
1k	1024	NA	NA	NA
1l	NA	NA	NA	NA
1m	NA	NA	NA	NA
1n	512	512	1024	NA
1o	NA	NA	NA	NA
1p	NA	NA	NA	NA
1q	1024	NA	NA	NA
1r	256	NA	NA	NA
1s	256	NA	NA	NA
1t	512	NA	NA	NA
INH	0,25	-	-	-
gentamicin	-	16	64	4

*NA = neaktivní v rozmezí koncentrací 1024 – 0,0312 µg/ml.

Žádná z testovaných látek nevykazovala aktivitu vůči fungálním kmenům, ani *E. coli*. Na druhou stranu, látky **1f** a **1n** vykazovaly slabou antibakteriální aktivitu proti *S. aureus* a *E. faecalis*. Sloučenina **1b** se dokonce ukázala být značně aktivní proti *P.*

aeruginosa, která se svou MIC hodnotou (2 µg/ml) rovná MIC hodnotě standardu gentamicinu. Navíc několik z testovaných látek vykazaly slabou antimykobakteriální aktivitu v rozmezí 128 až 1024 µg/ml (**Tabulka 2**).

Výsledky biologického testování první série pyrimidinů **1** naznačují, že volba aminokyseliny nemá skoro žádný, nebo jen nepatrný vliv na antimykobakteriální aktivitu. Naopak se zdá, že výsledná aktivita je ovlivněna výběrem aminu. Nejlepších aktivit bylo dosaženo při substituci cyklohexylaminem.

5.1.2 Acylované 5-aminopyrimidiny

5.1.2.1 Syntéza

Syntéza druhé série pyrimidinů **2** navazuje na první sérii a první čtyři kroky syntézy jsou totožné. S ohledem na výsledky biologického testování a zjištění vlivu substituentů na biologickou aktivitu byl pro druhou sérii pyrimidinů **2** zvolen cyklohexylamin jako jeden ze substituentů na pyrimidinovém jádře. Druhá pozice byla substituována všemi pěti aminokyselinami (β -alanin, fenylalanin, prolin, methionin, valin). Po nukleofilní substituci chloridu **5** cyklohexylaminem za vzniku 5-nitropyrimidinu **6** následovala redukce nitro skupiny na odpovídající amino skupinu. Tento krok se ukázal jako problematický a bylo třeba hledat optimální podmínky.

První strategie využívá dithioničitan sodný za podmínek katalýzy fázového přenosu v systému DCM-voda. Jako katalyzátor fázového přenosu byl zkoumán hydrogensíran tetrabutylamonný (TBAHS) a ethyl viologen diiodid, přičemž reakce probíhala lépe s ethyl viologen diiodidem. Nicméně kvůli neúplné konverzi výchozí látky po reakci probíhající přes noc musela být redukce dvakrát opakována k dosažení uspokojivých výsledků. Proto jsme se rozhodli pro změnu redukčního činidla a zkusili jsme běžnější strategii využívající chlorid cínatý. Bohužel i v tomto případě musela být reakce opakována dvakrát pro úplnou konverzi výchozího nitro derivátu na amin. S přihlédnutím k výsledkům obdržených z těchto experimentů a k problematickému odstranění cínatých solí jsme se rozhodli vrátit se k použití kombinace dithioničitanu sodného a ethyl viologen diiodidu. Navíc redukce probíhala nejnázve u pyrimidinů substituovaných valinem, proto jsme zvolili tuto aminokyselinu jako druhý substituent na pyrimidinovém jádře a od dalších aminokyselin upustili.

Dalším krokem byla acylace aminu **7** deseti různými karboxylovými kyselinami za použití standardního HOBt/DIC protokolu. Bohužel některé z vybraných karboxylových kyselin (uracil-5-karboxylová kyselina, 6-fluoronikotinová kyselina a thiazolidine-4-karboxylová kyselina) byly velice špatně rozpustné v DMF, tudíž finální látky odvozené od těchto kyselin byly obdrženy ve velmi malých surových výtěžcích a nebyly tedy izolovány.

Nakonec bylo sedm finálních produktů odštěpeno z pryskyřice za použití 50% TFA/DCM a vyčištěno pomocí HPLC purifikace. Takto byla získána druhá série pyrimidinů **2**, která byla poté biologicky testována na Ústavu mikrobiologie Lékařské fakulty Univerzity Palackého.

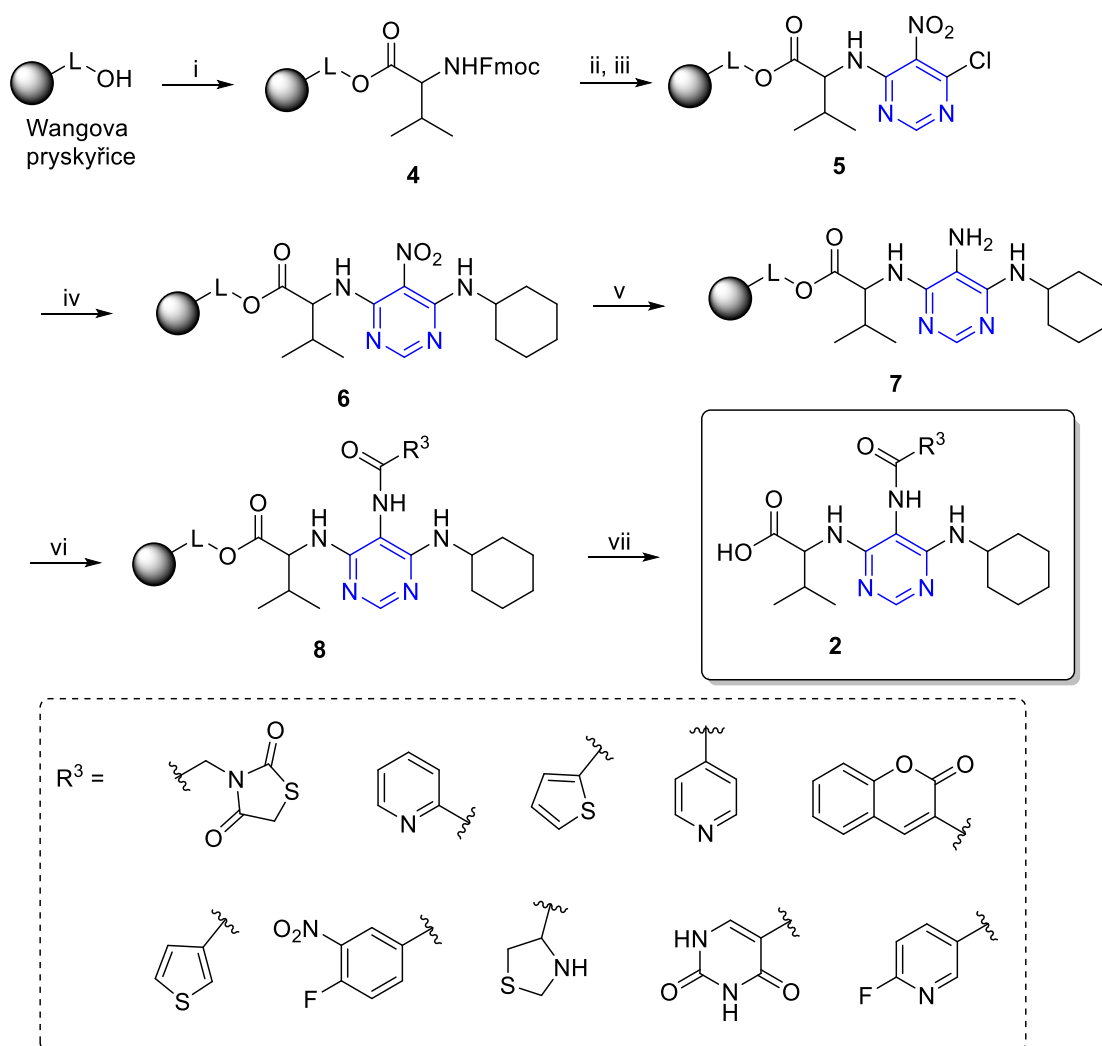
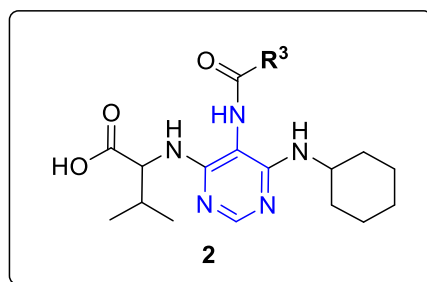


Schéma 2: Syntéza druhé série pyrimidinových derivátů **2** na pevné fázi

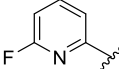

Reakční podmínky: i) Fmoc-valin, *N*-hydroxybenzotriazol (HOBt), DMAP, DIC, DMF/DCM (1:1), rt, 16 h; ii) 50% piperidin/DMF, rt, 15 min; iii) 4,6-dichloro-5-

nitropyrimidin, DIEA, suchý DMF, rt, 2 h; iv) cyklohexylamin, DIEA, DMF, rt, 16 h; v) Na₂S₂O₄, K₂CO₃, ethyl viologen dijodid, H₂O/DCM (1:1), rt, 16 h; vi) karboxylová kyselina, *N*-hydroxybenzotriazol (HOBt), DMAP, DIC, DMF/DCM (1:1), nebo DMF, rt, 16 h; vii) 50% TFA/DCM, rt, 1 h.

Tabulka 3: Přehled připravených produktů **2** a jejich výtěžky



Sloučenina	R ³	Výtěžek [%]
2a		43
2b		18
2c		14
2d		28
2e		26
2f		45
2g		47
2h		NI*

2i		<i>NI</i>
2j		<i>NI</i>

**NI* = neizolováno.

5.1.2.2 Biologická aktivita

Finální látky **2** byly testovány na jejich *in vitro* antibakteriální aktivitu proti *M. tuberculosis* H37Rv, Gram-pozitivní a Gram-negativní kmeny (*S. aureus*, *P. aeruginosa*, *E. coli* a *E. faecalis*) a proti dvěma fungálním kmenům *C. albicans* a *A. niger*.

Žádná z testovaných sloučenin **2** nevykazovala aktivitu vůči *S. aureus*, *P. aeruginosa*, *E. coli*, *E. faecalis*, ani vůči fungálním kmenům. Naproti tomu antimykobakteriální aktivity těchto látek byly docela slibné (**Tabulka 4**).

Tabulka 4: *In vitro* antimykobakteriální aktivita sloučenin **2** (MIC hodnoty v µg/ml)

Sloučenina	<i>Mycobacterium</i>
	<i>tuberculosis</i> H37Rv
2a	1024
2b	128
2c	256
2d	NA*
2e	NA
2f	32
2g	NA
INH	0.25

*NA = neaktivní v rozmezí koncentrací 1024 – 0,0312 µg/ml.

Některé z testovaných sloučenin vykazovaly nepatrnou až mírnou antimykobakteriální aktivitu vůči *M. tuberculosis* H37Rv. Sloučenina **2f** s 4-pyridinylovým substituentem ukázala mírnou antimykobakteriální aktivitu s MIC hodnotou 32 µg/ml. Zajímavým zjištěním je, že hetero-izomer pyrimidin **2g** se ukázal být neaktivním. Pozice heteroatomu a jeho vliv na antimykobakteriální aktivitu byl také

pozorován pro thiofenové deriváty **2b** a **2c**. Oba tyto příklady naznačují, že pozice heteroatomu hraje důležitou roli v biologické aktivitě.

5.2 Deriváty odvozené od benzoxazolu

Pro přípravu benzoxazolových derivátů **3** byla navržena syntetická cesta uvedená ve **Schématu 3**:

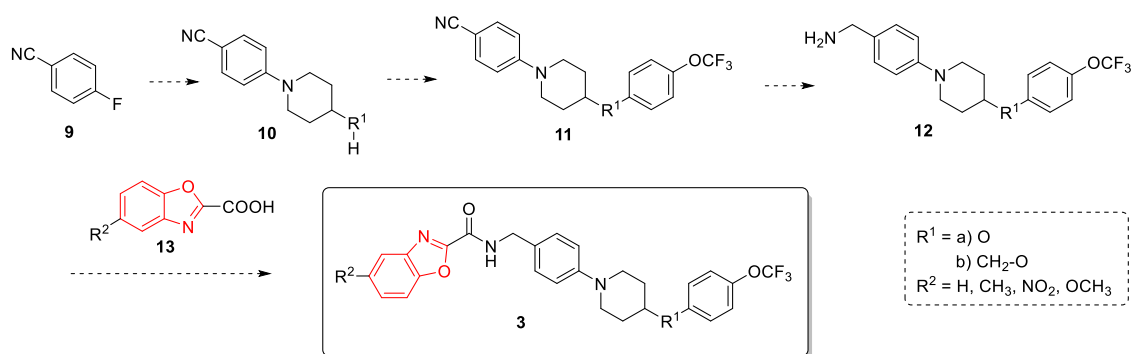


Schéma 3: Navržená syntetická cesta vedoucí k benzoxazolovým derivátům **3**

První tři kroky syntézy vycházejí z publikace od Kima a kol. z roku 2017³³. Dalším, a zároveň posledním krokem je acylace různě substituovanou benzoxazol-2-karboxylovou kyselinou v poloze 5. Jelikož benzoxazol-2-karboxylové kyseliny nejsou komerčně dostupné, součástí syntetického plánu byla rovněž příprava těchto derivátů.

5.2.1 Nukleofilní substituce 4-fluorobenzonitrilu

První krok je nukleofilní substituce 4-fluorobenzonitrilu 4-hydroxypiperidinem, respektive 4-piperidylmethanolem za vzniku sloučeniny **10a**, respektive **10b**. Tato reakce probíhá v DMSO za teploty 120 °C. Po 6 hodinách bylo možno izolovat tyto látky nalitím na led a odsátím vzniklé sraženiny. Produkty byly pokaždé obdrženy ve vysokých výtěžcích (až 90, respektive 95 %) a popsané podmínky nebylo nutné optimalizovat.

5.2.2 Mitsunobu reakce

Následovala reakce s 4-trifluoromethoxyfenolem za Mitsunobu podmínek. V publikaci od Kima a kol.³³ uvádí, že k roztoku 1,4 ekvivalentu PPh₃, 1 ekvivalentu fenolu v DCM bylo pomalu přidáno 1,2 ekvivalentu DIAD a reakční směs byla míchána přes noc. Pokusy zreprodukovat tuto reakci byly však neúspěšné a vedly k tvorbě vedlejších produktů. Bylo proto nutné tyto podmínky optimalizovat. Pro oba substráty **10a** a **10b** bylo vyzkoušeno několik podmínek, které jsou pro přehlednost shrnuty

v **Tabulce 5 a 6**. Bylo změněno rozpouštědlo, teplota, ekvivalenty činidel i koncentrace diisopropyl azodikarboxylátu. Všechny reakce a změny byly analyzovány po 1 hodině pomocí LC-MS. Některé změny byly monitorovány i po delší dobu (až 1 nebo 2 dny) a bylo zjištěno, že zastoupení jednotlivých látek se s časem příliš nemění. Z tohoto důvodu jsou v tabulkách uvedeny hodnoty z analýz provedených po 1 hodině od začátku reakce/změny podmínek.

Během těchto optimalizací bylo také zjištěno, že při reakci jako vedlejší produkt vzniká adukt výchozí látky **10a**, respektive **10b** s diisopropyl azodikarboxylátem. Zajímavé bylo také pozorování, že pouze při reakci látky **10a** vzniká ještě další nečistota s hodnotou $[M+H]^+$ 131 dle LC-MS, kterou se nepodařilo identifikovat.

Nejprve byla vyzkoušena reakce látky **10b** za podmínek uvedených v publikaci. Téměř veškerá výchozí látka zreagovala na nežádoucí produkt **14b**, proto byla tato reakce provedena znovu za teploty 0 °C. To vedlo pouze ke zpomalení reakce. Zkusili jsme tedy změnit rozpouštědlo na suchý THF. Výsledkem bylo, že vznik nežádoucího produktu **14b** již nebyl pozorován, nicméně v reakci stále zůstával nadbytek výchozí látky **10b**. Každopádně pro tuto reakci se jako rozpouštědlo osvědčil lépe suchý THF, proto byl používán i v reakci s látkou **10a**. Pro oba substráty zvýšení teploty na 60 °C, ani následné přidání 1 ekvivalentu fenolu nevedlo ke zvýšení podílu žádoucího produktu **11a** a **11b**. Pro výchozí látku **10a** byl ještě navíc testován vliv většího množství fenolu. Byly pro to použity dva ekvivalenty místo původního jednoho ekvivalentu. Reakční rovnováhu to směrem k žádoucímu produktu **11a** sice posunulo, ale stále to nebylo dostatečně uspokojující.

Přelomová pro tyto optimalizace byla idea vnuknutá RNDr. Jiřím Pospíšilem, Ph.D. použít zcela jiné podmínky: ekvivalenty PPh_3 a DIADu upravit na 1,5, reakci před přidáním DIADu zchladit na 0 °C a DIAD nepřidávat koncentrovaný, nýbrž přikapávat zředěný. Tyto podmínky byly vyzkoušeny pro substrát **10a** s příznivým výsledkem. Požadovaný produkt **11a** se v reakční směsi již nacházel v nadbytku. Snaha posunout tuto rovnováhu ještě dál úpravou ekvivalentů PPh_3 a DIADu na 2 vedlo sice k zreagování veškeré výchozí látky **10a**, nicméně s výskytem vedlejších produktů **14a** a **15**. Tyto podmínky (1,5 ekvivalentu PPh_3 a DIADu a zředěný DIAD a 2 ekvivalenty PPh_3 a DIADu a zředěný DIAD) byly také aplikovány na substrát **10b** s tím rozdílem, že se pracovalo za laboratorní teploty. Bohužel to mělo za následek vznik vedlejšího

produktu **14b** v nadbytku. To vedlo k nápadu vyzkoušet ADDP místo DIADu kvůli sterické náročnosti, která by mohla zamezit vzniku aduktu **14b**. Naneštěstí ani reakce s ADDP při různých teplotách (laboratorní teplota, 60 °C, 0 °C) téměř neběžela. Proto jsme se vrátili zpět k DIADu a původním poměrům jednotlivých komponent a postupně jsme zkoušeli měnit jejich poměry pro reakci substrátu **10a**. Postupné přidávky PPh₃ a DIADu vedly k mírným navýšením zastoupení žádaného produktu **11a**, nebylo to však stále dostačující. Pro reakci substrátu **10b** byla vyzkoušena úprava poměrů všech komponent na 1 ekvivalent. Rovnováha byla v tomto případě posunuta směrem k výchozí látce **10b**. Ve snaze tuto rovnováhu obrátit opačným směrem byly do reakce přidány další podíly DIADu, které ale nepomohly. Posledním pokusem byla reakce vycházející ze stejných ekvivalentů reagentů za laboratorní teploty, přičemž byl do reakční směsi přikapáván zředěný DIAD, který byl předtím 15 minut chlazen v mrazáku. Po 2 hodinách bylo do reakce přidáno po půl ekvivalentech PPh₃ i DIADu (opět zředěný a 15 minut chlazený v mrazáku). Výsledkem bylo uspokojivé zastoupení požadovaného produktu **11b** v 83 % dle porovnání ploch píků z HPLC analýzy. Totožné podmínky byly aplikovány i na substrát **10a** a v tomto případě požadovaný produkt **11a** vznikal v 78 % dle porovnání ploch píků z HPLC analýzy.

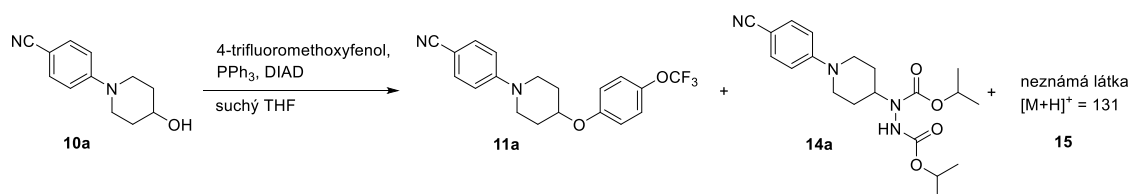


Schéma 4: Mitsunobu reakce látky **10a**

Tabulka 5: Optimalizace Mitsunobu reakce látky **10a**

Pokus	Teplota	Ekv. PPh ₃ ^a	Ekv. DIAD ^a	Konc./zřed. ^b DIAD ^b	Ekv. fenolu ^a	Produkt 11a [%] ^c	Vedlejší produkt 14a [%] ^c	Vedlejší produkt 15 [%] ^c	Výchozí látka 10a [%] ^c
1	rt	1,4	1,2	konc.	1	31	0	18	50
					+ 0,2 ^d	26	0	21	53
	60 °C				1,2	26	0	21	53
					+ 1	26	0	19	55
2	rt	1,4	1,2	konc.	2	41	0	9	49
3	0 °C, pak rt	1,5	1,5	zřed.	1	60	0	11	28
4	0 °C, pak rt	2	2	zřed.	1	68	15	17	0

5	rt	1,4	1,2	zřed'.	1	49	0	16	35
			+ 0,2	zřed'.		57	0	13	31
		+ 0,2	+ 0,2	zřed'.		59	0	15	26
		+ 0,5	+ 0,5	zřed'.		67	13	20	0
6	rt	1	1	zřed' + zchlaz. ^e	1	46	0	12	42
		+ 0,5	+ 0,5	zřed' + zchlaz.		78	0	22	0

^apočet ekvivalentů vůči výchozí látce **10a**

^bDIAD byl použit buď koncentrovaný, anebo zředěný na koncentraci 0,4516 mol/l

^cHPLC procentuální zastoupení látky získané z UV-spektra porovnáním ploch píků

^dpřídavek dalšího podílu po provedení LC-MS analýzy

^eroztok DIADu byl před použitím chlazen v mrazáku

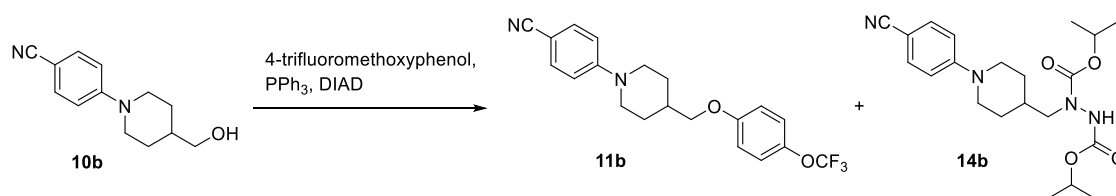


Schéma 5: Mitsunobu reakce látky **10b**

Tabulka 6: Optimalizace Mitsunobu reakce látky **10b**

Pokus	Roypouštědlo	Teplota	Ekv. PPh ₃ ^a	Ekv. DIAD ^a	Konc./zřed'. DIAD ^b	Ekv. fenolu ^a	Produkt 11b [%] ^c	Vedlejší produkt 14b [%] ^c	Výchozí látka 10b [%] ^c
1	suchý DCM	rt	1,4	1,2	konc.	1	7	93	0
2	suchý DCM	0 °C, pak rt	1,4	1,2	konc.	1	7	44	49
3	suchý THF	rt	1,4	1,2	konc.	1,2	29	0	71
		60 °C				1,2	14	0	86
						+ 1 ^d	2	0	98
4	suchý THF	rt	1,5	1,5	zřed'.	1	11	39	50
						+ 0,5	20	40	40
5	suchý THF	rt	2	2	zřed'.	1	26	74	0
6	suchý THF	rt	2	2	zřed'.	1	15	0	85
		60 °C					ADDP ^e	8	0
7	suchý THF	0 °C, pak rt	2	2	zřed'.	1	12	0	88
8	suchý THF	rt	1	1	zřed'.	1	25	0	75
				+ 0,5	zřed'.		39	0	60
				+ 0,5	zřed'.		43	0	57
9	suchý THF	rt	1	1	zřed' + zchlaz. ^f	1	41	1	58
			+ 0,5	+ 0,5	zřed' + zchlaz.		83	13	4

^apočet ekvivalentů vůči výchozí látce **10b**

^bDIAD byl použit buď koncentrovaný, anebo zředěný na koncentraci 0,4236 mol/l

^cHPLC procentuální zastoupení látky získané z UV-spektra porovnáním ploch píků

^dpřídavek dalšího podílu po provedení LC-MS analýzy

^emísto DIAD byl použit ADDP

^froztok DIADu byl před použitím chlazen v mrazáku

Nalezené optimální reakční podmínky byly použity pro oba substráty **10a** a **10b** a reakce byla ještě ponechána na míchačce do druhého dne. Následně byla reakční směs zakoncentrována na RVO a surový produkt byl čištěn pomocí sloupcové chromatografie. Produkty **11a** a **11b** byly poté obdrženy jako amorfnní pevné látky ve výtěžcích až 83 %.

5.2.3 Redukce nitrilové skupiny

Třetím krokem syntézy byla redukce nitrilové skupiny na odpovídající amin pomocí tří ekvivalentů LiAlH_4 , které byly přidány do roztoku výchozí látky **11a**, respektive **11b** v suchém THF za 0 °C. Poté byla směs 2 hodiny refluxována. Konec reakce byl indikován pomocí tenkovrstevné chromatografie. V literatuře³³ je popsáno zpracování ochlazením na laboratorní teplotu a přidáním vody. Poté byly nerozpustné částice odfiltrovány za použití křemeliny, filtrát byl zředěn nasyceným vodným roztokem Na_2CO_3 a extrahován EtOAc. Organická fáze byla promyta solankou, vysušena MgSO_4 a zakoncentrována pomocí vakua. Surový produkt byl pak použit pro další reakci bez dodatečné purifikace.

Zpracování tedy bylo provedeno stejným způsobem, jak je uvedeno v publikaci, výtěžek byl však nulový. Produkt s největší pravděpodobností zůstal ve vodné fázi, která byla bohužel již zlikvidována. Důvodem může být, že nasycený vodný roztok Na_2CO_3 nebyl dostatečně bazický na to, aby převedl protonizovaný produkt do neutrální formy, a tím do organické fáze.

To vedlo k myšlence zpracovat reakci bez provedení extrakce a bez rizika ztráty produktu ve vodné fázi. Po ochlazení reakční směsi na laboratorní teplotu byla přidána Glauberova sůl ($\text{Na}_2\text{SO}_4 \cdot 10\text{H}_2\text{O}$) a pár kapek vody. Jednotlivé molekuly vody mají takto za úkol rozložit přebytečný a nezreagovaný LiAlH_4 . Následně byl do směsi přidán bezvodý Na_2SO_4 , který na sebe navázal přebytečnou vodu a tím pádem nebylo potřeba provádět extrakci. Tato suspenze byla zfiltrována přes křemelinu a filtrát byl odpařen do

sucha. Ovšem následná ^1H NMR analýza ukázala, že počet protonů zcela neodpovídá požadované struktuře, zejména v aromatické oblasti, což by mohlo naznačovat, že na produktu zůstala nakoordinována Al sůl. Proto byl produkt přečištěn pomocí sloupcové chromatografie. ^1H NMR spektrum přečištěného produktu již bylo reprezentativní a odpovídalo žádané struktuře. Touto metodou bylo dosaženo výtěžků 73 % pro látku **12a** a 78 % pro látku **12b**.

Aby došlo k odstranění Al solí bez nutnosti čištění pomocí sloupcové chromatografie, bylo vyzkoušeno zpracování za použití NaOH. K reakční směsi bylo přidáno pár kapek 1M NaOH a bylo ponecháno 15 minut na míchačce. Poté byl přidán bezvodý Na_2SO_4 a suspenze byla zfiltrována přes křemelinu. Filtrát byl vysušen a bylo změřeno ^1H NMR spektrum surového produktu. Z analýzy bylo zjištěno, že Al soli zůstaly nakoordinovány.

Další odzkoušenou modifikací zpracování bylo při použití 1 mg LiAlH_4 přikapání 1 μl vody, poté 1 μl 15% vodného roztoku NaOH a nakonec 3 μl vody. Tato směs byla ponechána na míchačce přes noc a další den byl přidán bezvodý MgSO_4 , suspenze byla poté míchána ještě 15 minut a nakonec zfiltrována přes křemelinu. Filtrát byl vysušen na RVO a bylo změřeno ^1H NMR spektrum, které ukázalo, že tato metoda pro zpracování a odstranění Al solí byla úspěšná. Tímto způsobem bylo dosaženo výtěžků 90 % pro látku **12a** a 89 % pro látku **12b**.

5.2.4 Pokusy o přípravu benzoxazol-2-karboxylové kyseliny a jejího funkčního derivátu

V této chvíli už zbývalo jen připravit benzoxazol-2-karboxylové kyseliny, substituované v poloze 5 (CH_3 , NO_2 , OCH_3 , H) pro provedení posledního kroku syntézy za vzniku finálních produktů **3**. Zde ale nastal problém. Reakce uskutečněná podle podmínek uvedených v jediné publikaci⁹³ popisující přípravu benzoxazol-2-karboxylové kyseliny **13** z *o*-aminofenolu **16** (Schéma 6) neproběhla úspěšně.

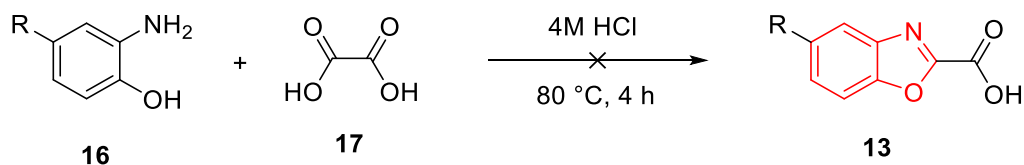


Schéma 6: Příprava benzoxazol-2-karboxylové kyseliny z *o*-aminofenolu dle Rajakumara a kol.⁹³

Dokonce i pokusy o optimalizace selhaly. Vyzkoušené reakční podmínky jsou shrnuty v **Tabulce 7**.

Tabulka 7: Neúspěšné pokusy o přípravu benzoxazol-2-karboxylové kyseliny z *o*-aminofenolu

R	Čas	Teplota	Ekvivalenty (COOH) ₂	Rozpouštědlo	Výsledek
H	2 h	80 °C	1	4M HCl	Nereaguje
H	24 h	80 °C	1	4M HCl	Nereaguje
H	1 h	100 °C	1	4M HCl	Nereaguje
H	24 h	100 °C	2	4M HCl	Nereaguje
H, NO ₂	24 h	80 °C	1,5	35% HCl	Nereaguje
H, NO ₂	24 h	120 °C	1,5	35% HCl	Nereaguje

Z toho poté vyvstal nápad místo benzoxazol-2-karboxylové kyseliny připravit její reaktivnější derivát, acylchlorid (**Schéma 7**). Pro tuto reakci se opět vycházelo z *o*-aminofenolu. Ten byl rozpuštěn v dioxanu a k němu byl přikapán oxalylchlorid **18**. Reakce byla zahřívána na 100 °C.

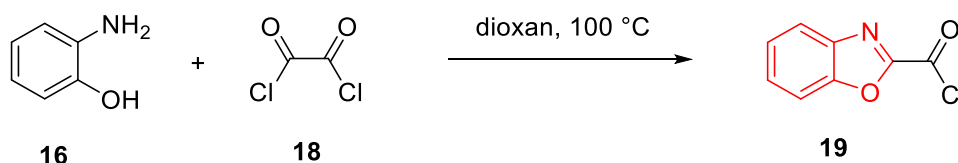
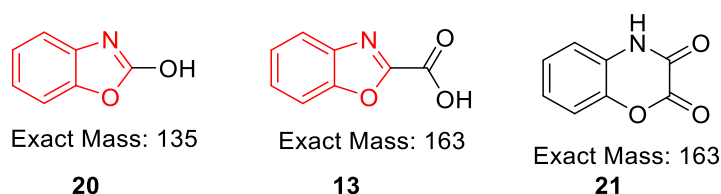


Schéma 7: Příprava benzoxazol-2-karbonyl chloridu z *o*-aminofenolu

Tento reaktivní benzoxazol-2-karbonyl chlorid ($M_r = 181$) je obtížné analyzovat, protože může snadno reagovat a měnit svou strukturu. Nicméně bylo změřeno LC-MS spektrum a bylo zjištěno, že se ve vzorku nacházely dvě látky s hodnotami $[M-H]^- = 134$ a 162 . První z nich by mohl odpovídat benzoxazol-2-olu **20** a druhý by mohl být benzoxazol-2-karboxylová kyselina **13** i izomerní 2*H*-1,4-benzoxazin-2,3(4*H*)-dion **21** (**Obr. 6**).



Obr. 6: Možné produkty cyklizační reakce s oxalylchloridem

V publikaci z roku 1985⁹⁴ se dokonce uvádí příprava 1,4-benzoxazin-2,3-dionu **21** z *o*-aminofenolu a oxalylchloridu, proto nemůžeme vznik tohoto produktu vyloučit.

Aby mohla být struktura produktu identifikována, byla provedena testovací reakce s benzylaminem (**Schéma 8**). Reakční směs s produktem **19** byla odpařena do sucha, poté rozpuštěna v suchém THF a k tomu byl přidán benzylamin **22** a nakonec TEA. Reakce byla uskutečněna za laboratorní teploty.

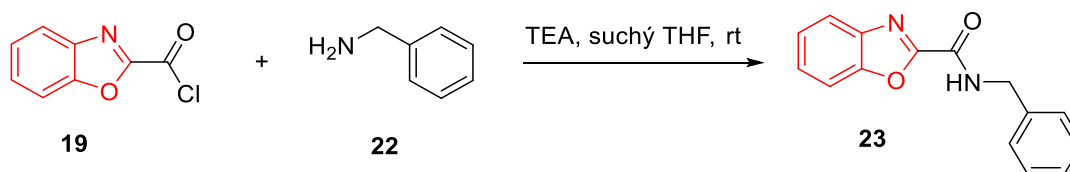
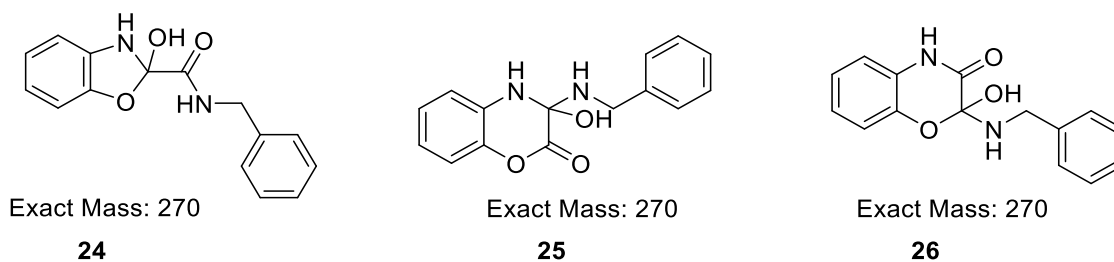


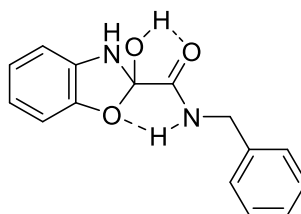
Schéma 8: Testovací reakce s benzylaminem

Další den LC-MS analýza ukázala tvorbu produktu s hodnotou $[M-H]^- = 269$, což je číslo o 18 vyšší, než by se dalo u produktu **23** ($M_r = 252$) očekávat. Pro tuto hodnotu teoreticky odpovídají struktury **24**, **25** a **26** (**Obr. 7**).



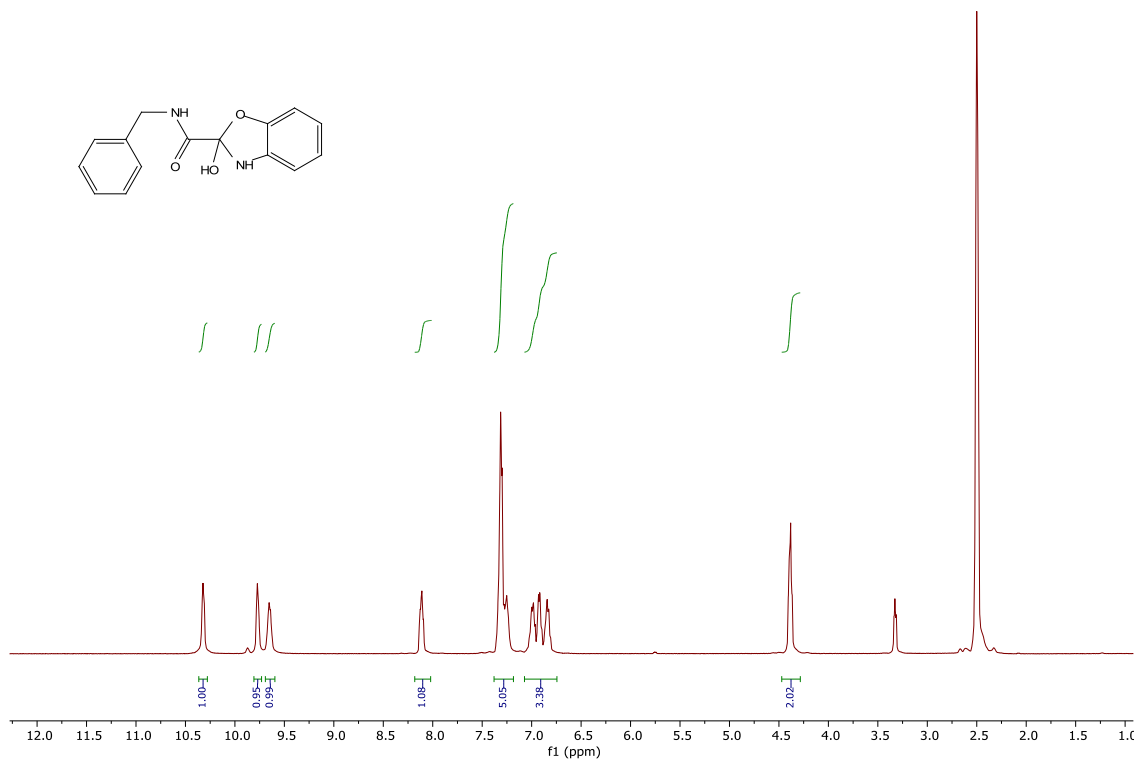
Obr. 7: Možné produkty reakce s benzylaminem

Pro všechny tři struktury by se dalo očekávat, že budou snadno eliminovat vodu a tudíž preferovat aromatický stav. Ovšem první z těchto zmíněných by mohla být stabilizována tvorbou vodíkových vazeb:

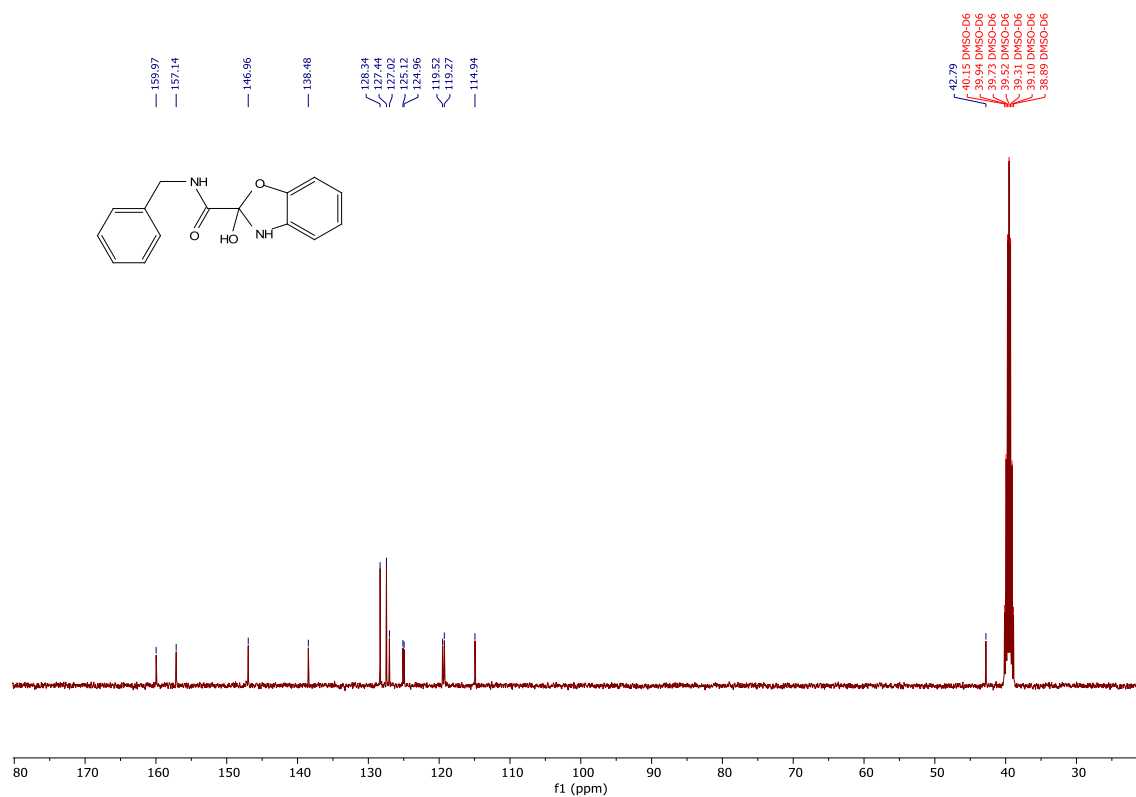


Obr. 8: Vodíkové vazby ve struktuře hypotetické látky **24**

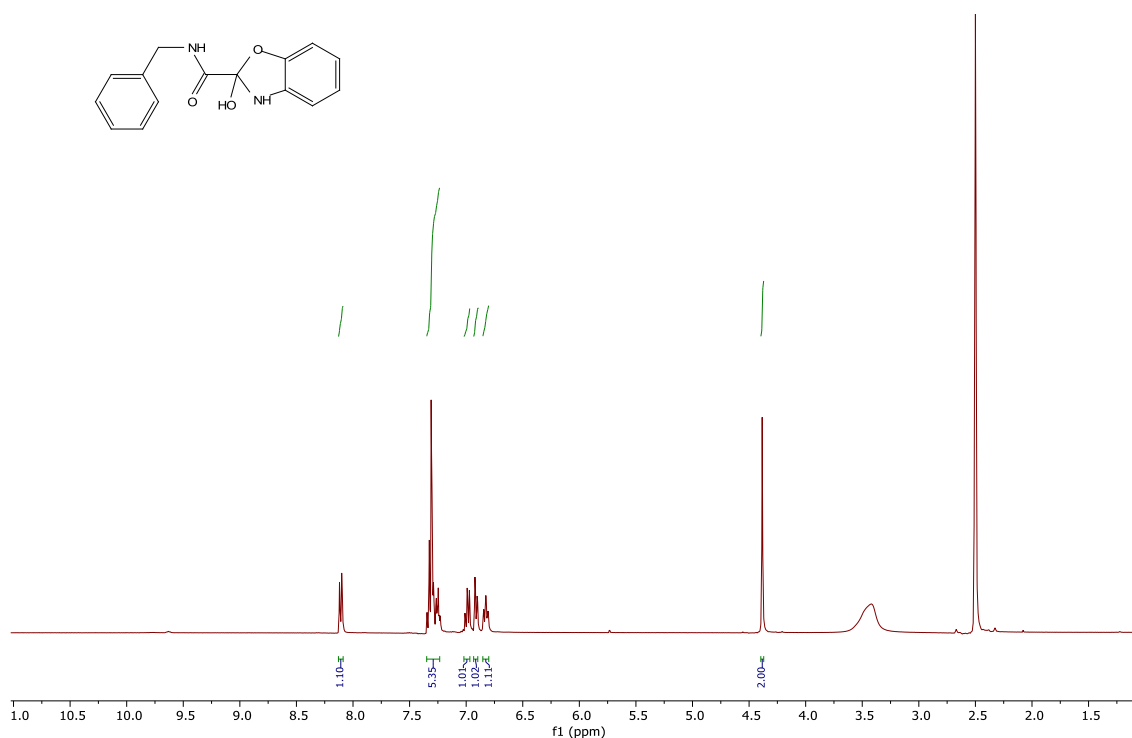
Tato látka byla izolována pomocí sloupcové chromatografie a analyzována s využitím NMR spektroskopie (**Spektrum 1, 2 a 3**).



Spektrum 1: ^1H NMR spektrum neznámé látky **24**, **25**, nebo **26**



Spektrum 2: ^{13}C NMR spektrum neznámé látky **24**, **25**, nebo **26**



Spektrum 3: ^1H NMR spektrum neznámé látky **24**, **25**, nebo **26** po přidavku D_2O

Počet protonů i uhlíků odpovídá látkám **24**, **25** i **26**, nicméně posuny v ppm neukazují jednoznačně na jednu z nich. Po přidavku deuterované vody zmizely v ^1H NMR spektru tři protony v oblasti kolem 10 ppm. To ovšem také neukazuje pouze na jednu možnost. Pozoruhodný je signál v 8,11 ppm v ^1H NMR (**Spektrum 1**), protože je výrazně posunutý k vyšším hodnotám ppm oproti ostatním aromatickým protonům. Bohužel nelze s jistotou říci, o kterou strukturu se jedná, každopádně ale můžeme konstatovat, že izolovaná látka neodpovídá požadované sloučenině **23**, proto bylo od této metody upuštěno.

Dalším studiem literatury se ukázalo, že v roce 2017 byl publikován článek, ve kterém byl porovnáván vznik benzoxazol-2-karboxylátu versus benzoxazin-3-onu/benzoxazin-2,3-dionu cyklokondenzací *o*-aminofenolu s ethyl glyoxalátem/diethyl oxalátem. Bylo zjištěno, že všeobecně je preferovaný vznik šestičlenného cyklu. S ethyl glyoxalátem vznikal vždy ve velkém nadbytku benzoxazin-3-on. Ovšem reakcí 4-nitro-2-aminofenolu s diethyl oxalátem byl získán benzoxazol-2-karboxylát v izolovaném výtěžku 93 % (**Schéma 9**)⁹⁵.

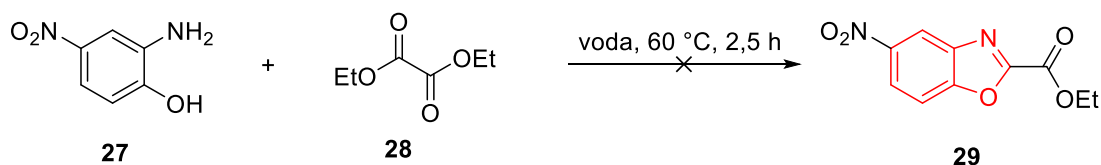


Schéma 9: Cyklizace na ethyl benzoxazol-2-karboxylát podle Chakrabortiho⁹⁵

S nadějí na úspěch byla reakce 4-nitro-2-aminofenolu s diethyloxalátem vyzkoušena dle podmínek uvedených v již zmíněné publikaci. Dle TLC po 2 hodinách i LC-MS po 3 dnech se ale ukázalo, že reakce neprobíhá.

Byla tedy zvolena jiná strategie k získání benzoxazol-2-karboxylové kyseliny, která nezahrnuje problematickou cyklokondenzaci. Vycházelo se při tom z 2-chlorobenzoxazolu. Myšlenkou bylo provést Grignardovu reakci, která se následně nechala probublávat CO_2 (**Schéma 10**).

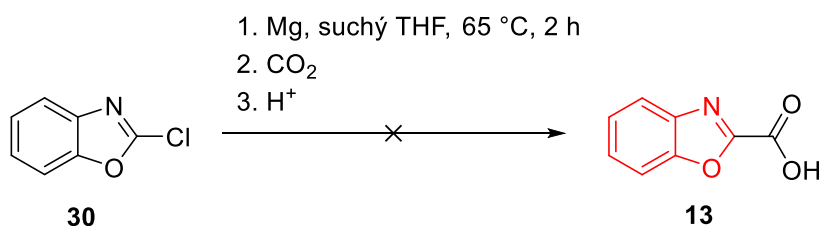


Schéma 10: Pokus o přípravu benzoxazol-2-karboxylové kyseliny z 2-chlorobenzoxazolu

Reakce byla provedena za inertních podmínek v suchém THF s krystalem jodu při teplotě 65 °C. Po dvou hodinách byl do reakce zaváděn plynný oxid uhličitý sublimací suchého ledu přes MgSO_4 jakožto sušicího činidla po dobu 20 minut. Poté byl odebrán vzorek, který byl podroben miniextrakci s vodným roztokem NH_4Cl a EtOAc. Organická fáze byla zanalyzována (LC-MS, NMR). Podle LC-MS analýzy byla ve vzorku přítomna látka s hodnotou $[\text{M}-\text{H}]^- = 225$ a $[\text{M}+\text{H}]^+ = 227$, což neodpovídá ani výchozí látce **30** ($M_r = 154$), ani kyselině **13** ($M_r = 163$), ani jejímu methyl esteru ($M_r = 177$). V ^{13}C NMR spektru zase nebyl pozorován karbonylový uhlík, tudíž reakce byla neúspěšná.

5.2.5 Alternativní cesta k finálním produktům

Po několika neúspěšných pokusech připravit benzoxazol-2-karboxylovou kyselinu, její acylchlorid, případně ethylester jsme se rozhodli zvolit jiný způsob

propojení benzoxazolového jádra s aminy **12a** a **12b**. Byl pro to použit benzoxazol-2-thiol a bromoctová kyselina (**Schéma 11** a **12**).

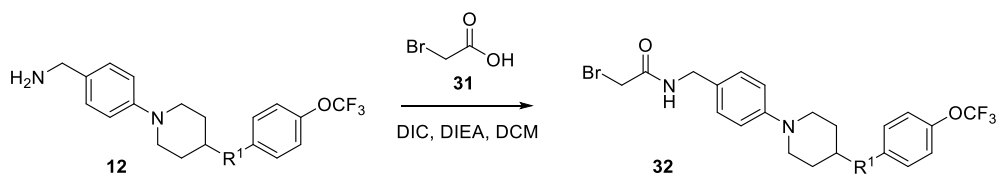


Schéma 11: Acylace aminů **12** bromoctovou kyselinou

Nejprve byla provedena acylace aminu **12** bromoctovou kyselinou za účasti DIC a DIEA v DCM (**Schéma 11**). Po hodině LC-MS analýza potvrdila vznik požadovaného produktu. Reakční směs byla poté zahuštěna na RVO a k surovému produktu byl přidán benzoxazol-2-thiol, TEA a DCM (**Schéma 12**).

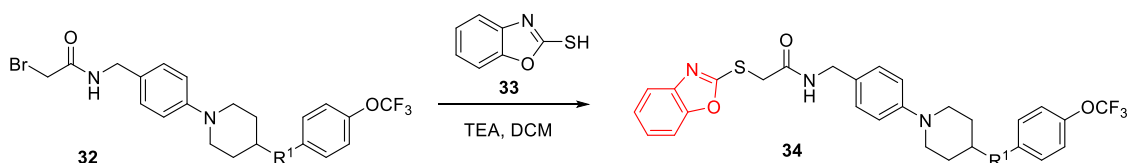


Schéma 12: Substituce benzoxazol-2-thiolem za tvorby finálních produktů

Po hodině dle LC-MS analýzy byl pozorován vznik finálního produktu **34**. Reakční směs byla tedy zahuštěna na RVO a surový produkt čištěn pomocí sloupcové chromatografie. Následně byl ještě přečištěn rozpuštěním v ACN a vysrážením vodou. Sraženina byla odsáta a vysušena na lyofilizátoru. Takto byly obdrženy bílé krystalické látky **34a** a **34b** ve výtěžcích 20 %, respektive 23 %. Kvůli časovým možnostem již však nebyla příležitost k optimalizaci reakčních podmínek, a tím ke zvýšení výtěžků.

Nakonec byla struktura finálních produktů **34a** a **34b** potvrzena pomocí NMR spektroskopie a ty pak byly připraveny pro biologické testování, které proběhne v nejbližší době.

6 Experimentální část

6.1 Obecné informace

Rozpouštědla, chemikálie a polystyrenové pryskyřice byly zakoupeny od firmy Sigma-Aldrich (St. Louis, Missouri, USA). Syntéza na pevné fázi (kapitola 6.2) byla provedena v polypropylenových stříkačkách opatřených porézními fritami za použití Domino block syntetizéru (Torviq, Niles, MI). Objem promývacího rozpouštědla byl 10 ml na 1 g pryskyřice. Při promývání byla pryskyřice třepána s čerstvým rozpouštědlem 1 minutu před změnou rozpouštědla. Po přidání reakční směsi byla pryskyřice třepána energicky tak, aby se rozbily potenciální shluky. Meziprodukty navázané na pryskyřici byly vysušeny proudem dusíku pro delší skladování a kvantitativní analýzu.

Všechny reakce probíhaly za laboratorní teploty (21 °C), pokud není uvedeno jinak.

LC-MS analýzy byly provedeny na UHPLC-MS systému složeného z UHPLC chromatografu Accela s PDA detektorem a hmotnostního spektrometru s trojitým kvadrupólem TSQ Quantum Access (Thermo Scientific, CA, USA). Byla použita Nucleodur Gravity C18 kolona (rozměry 1,8 μm , 2,1 x 50 mm) při 30 °C a rychlosti průtoku 800 $\mu\text{l}/\text{min}$ (Macherey-Nagel, Německo). Mobilní fáze byla (A) 0,1% octan amonný ve vodě a (B) 0,1% octan amonný v acetonitrilu, lineárně naprogramovaná od 10 do 80 % B po 2,5 minuty, udržováno po 1,5 minuty. Kolona byla reekvilibrována pomocí 10% roztoku B po dobu 1 minuty. APCI zdroj operoval pod proudem 5 μA s odpařovací teplotou 400 °C a kapilární teplotou 200 °C.

Čištění látek pomocí semipreparativní HPLC bylo provedeno za použití C18 kolony s reverzní fází (19 x 100 mm, 5 μm částice). Gradient byl tvořen od 10 mM octanu amonného ve vodě a acetonitrilu s průtokovou rychlostí 15 ml/min.

^1H a ^{13}C NMR spektra byla měřena na přístroji Varian Unity*Plus* (500 MHz, ^1H). Všechna NMR spektra byla pořízena za laboratorní teploty (21 °C) v rozpouštědlech DMSO- d_6 , CD_3OD , nebo CDCl_3 . ^1H a ^{13}C signály byly kalibrovány na signál těchto rozpouštědel. Chemické posuny δ jsou uvedeny v ppm (parts per million) a interakční konstanty (J) v hertzech (Hz).

HRMS analýza byla provedena na systému tvořeném kapalinovým chromatografem a hmotnostním spektrometrem Orbitrap high-resolution (Dionex

Ultimate 3000, Thermo Exactive plus, MA, USA). Jako ionizační zdroj byl použit elektrosprej (150 °C, zdroj napětí 3,6 kV) a snímána byla spektra v kladném módu v rozmezí 80 – 1200 m/z. Získaná data byla vnitřně kalibrována pomocí ftalátu jako kontaminantu v methanolu (m/z 297,15909). Vzorky byly zředěny na konečnou koncentraci 0,1 mg/ml v roztoku H₂O/ACN (1:1, v/v). Vzorky byly nastříkovány do hmotnostního spektrometru s následnou HPLC separací na Kinetex C18 koloně (2,6 μm, 100 Å, 50 x 3,0 mm) za použití izokratické mobilní fáze 0,01M ACN/octan amonný (80/20) s průtokovou rychlostí 0,3 ml/min.

6.2 Příprava pyrimidinových derivátů

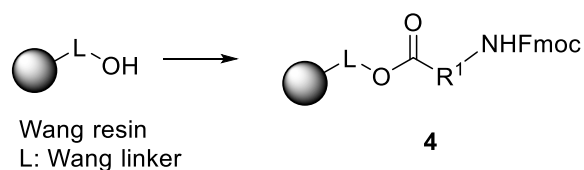
6.2.1 Postup přípravy vzorku pro LC-MS analýzu

Pro analýzu reakcí byl odebrán vzorek pryskyřice (5 mg) do Eppendorfovy zkumavky. K němu byl přidán 1 ml 50% TFA v DCM a směs byla třepána 30 minut za laboratorní teploty. Štěpicí koktejl byl poté odpařen proudem dusíku a odparek byl rozpuštěn v 1 ml H₂O/MeOH (1:1, v/v). Suspenze byla přefiltrována do vialky pro samotnou LC-MS analýzu.

6.2.2 Postup stanovení loadingu pryskyřice

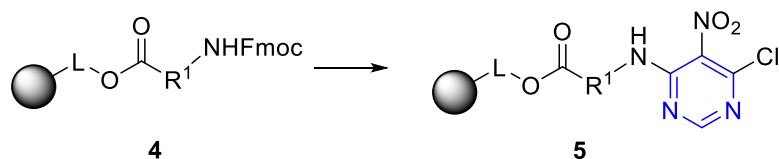
Vzorek pryskyřice (30 mg) byl promyt 2x MeOH. Poté byl vysušen proudem dusíku a následně z něj bylo dvakrát odváženo přesné množství (10 – 15 mg) do Eppendorfových zkumavek. Ke každému vzorku byly přidány 2 ml 50% TFA v DCM a ty pak byly třepány 30 minut za laboratorní teploty. Štěpicí koktejly byly poté odpařeny proudem dusíku a odparky byly rozpuštěny v 1 ml H₂O/MeOH (1:1, v/v). Z nich bylo odebráno 250 μl do nových Eppendorfových zkumavek a k těm bylo přidáno 750 μl H₂O/MeOH (1:1, v/v). Vzorky byly přefiltrovány do vialek a zanalyzovány na LC-MS. Signály pro Fmoc skupinu byly zintegrovány a porovnány se signálem Fmoc skupiny standardu (Fmoc-β-Ala).

6.2.3 Acylace Wangovy pryskyřice



Wangova pryskyřice (1 g, loading 0,9 mmol/g) byla promyta 3x DCM. K pryskyřici byl poté přidán roztok Fmoc-aminokyseliny (2 mmol), HOBt (2 mmol), DMAP (0,5 mmol) a DIC (2 mmol) v DMF/DCM (1:1, v/v, 10 ml). Reakční směs byla třepána 16 hodin při laboratorní teplotě. Následně byla pryskyřice promyta 3x DMF a 3x DCM.

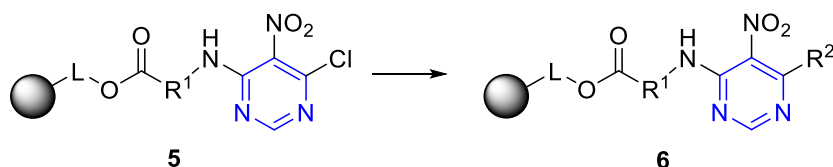
6.2.4 Odstranění Fmoc chránící skupiny a reakce s 4,6-dichloro-5-nitropyrimidinem



Fmoc chránící skupina byla odstraněna promytím Wangovy pryskyřice (1 g) 3x DMF a následným třepáním s 50% piperidinem v DMF (v/v, 10 ml) po dobu 15 minut za laboratorní teploty. Pryskyřice pak byla promyta 3x DMF a 3x DCM.

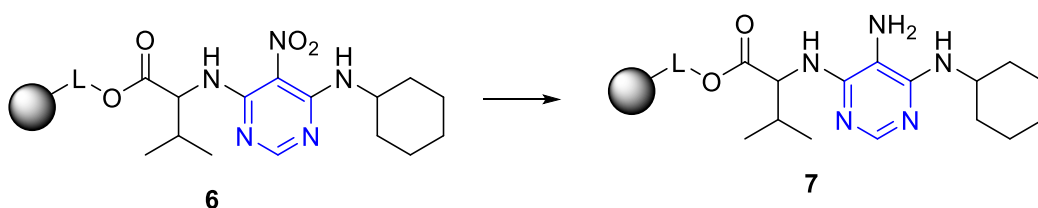
Wangova pryskyřice (1 g) byla promyta 3x suchým DMF a poté byl k ní přidán roztok 4,6-dichloro-5-nitropyrimidinu (5 mmol) a DIEA (5 mmol) v suchém DMF (10 ml). Směs byla třepána 2 hodiny při laboratorní teplotě. Pryskyřice pak byla promyta 5x DMF a 5x DCM.

6.2.5 Reakce s aminy



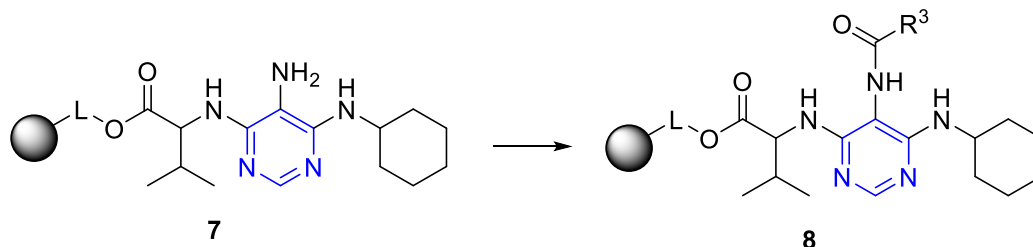
Wangova pryskyřice (250 mg) byla promyta 3x suchým DMF. K pryskyřici byl přidán roztok aminu (1,25 mmol, nebo 5 mmol) a DIEA (1,25 mmol, nebo 5 mmol) v DMF (2,5 ml, nebo 10 ml) a reakční směs pak byla třepána 16 hodin při laboratorní teplotě. Pryskyřice byla promyta 3x DMF a 3x DCM.

6.2.6 Redukce nitro skupiny



Pryskyřice (250 mg) byla promyta 3x DCM. K pryskyřici byl přidán roztok $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$ (2,5 mmol), K_2CO_3 (3,0 mmol) a ethylviologendijodidu (0,25 mmol) ve vodě (2,5 ml) a DCM (2,5 ml). Reakční směs byla třepána 16 hodin při laboratorní teplotě. Pryskyřice byla promyta 3x DCM/ H_2O (1:1, v/v), 3x DMF a 3x DCM.

6.2.7 Acylace karboxylovými kyselinami



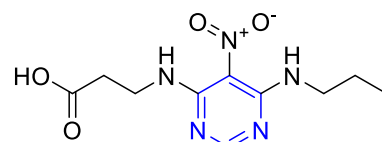
Pryskyřice (250 mg) byla promyta 3x DCM. K pryskyřici byl přidán roztok karboxylové kyseliny (0,75 mmol), HOBt (0,75 mmol) a DIC (0,75 mmol) v DMF/DCM (1:1, v/v, 2,5 ml). Reakční směs byla třepána 16 hodin při laboratorní teplotě. Pryskyřice byla následně promyta 3x DMF a 3x DCM.

6.2.8 Štěpení z pryskyřice

Pryskyřice (250 mg) byla promyta 5x DCM a poté třepána s 3 ml roztoku TFA/DCM (1:1, v/v) po dobu 1 hodiny za laboratorní teploty. Následně byl štěpicí koktejl ze stříkačky vypuštěn do lahvičky, pryskyřice byla ještě promyta 2 ml 50% TFA v DCM a nakonec 2 ml DCM. Tato směs pak byla odpařena proudem dusíku a surový produkt byl čištěn pomocí HPLC s obrácenými fázemi.

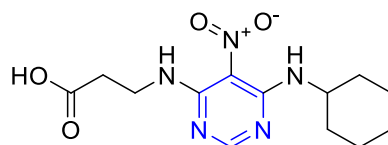
6.2.9 Analytická data

3-((5-Nitro-6-(propylamino)pyrimidin-4-yl)amino)propanová kyselina 1a



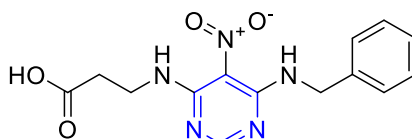
Žlutá amorfnní pevná látka. Výtěžek: 37,0 mg (80 %). ^1H NMR (500 MHz, $\text{DMSO}-d_6$): δ 9.52 (t, $J = 5.4$ Hz, 1H), 9.43 (t, $J = 5.7$ Hz, 1H), 8.08 (s, 1H), 3.75 (dd, $J = 12.8, 6.7$ Hz, 2H), 3.50 (dd, $J = 14.1, 6.2$ Hz, 2H), 2.57 (t, $J = 6.8$ Hz, 2H), 1.64 – 1.55 (m, 2H), 0.88 (t, $J = 7.4$ Hz, 3H). ^{13}C NMR (126 MHz, $\text{DMSO}-d_6$): δ 173.06, 159.35, 156.68, 111.99, 42.60, 36.84, 33.34, 21.99, 11.19. HRMS: m/z : vypočteno pro $\text{C}_{10}\text{H}_{16}\text{N}_5\text{O}_4^+$: 270.1197 $[\text{M}+\text{H}]^+$; nalezeno: 270.1197.

3-((6-(Cyklohexylamino)-5-nitropyrimidin-4-yl)amino)propanová kyselina 1b



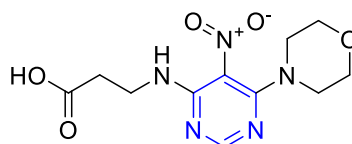
Žlutá amorfnní pevná látka. Výtěžek: 35,7 mg (78 %). ^1H NMR (500 MHz, DMSO- d_6): δ 12.35 (s, 1H), 9.53 (t, J = 5.8 Hz, 1H), 9.19 (d, J = 7.7 Hz, 1H), 8.09 (s, 1H), 4.15 (dt, J = 9.6, 8.0 Hz, 1H), 3.75 (dd, J = 12.8, 6.7 Hz, 2H), 2.57 (t, J = 6.7 Hz, 2H), 1.93 – 1.84 (m, 2H), 1.68 (dd, J = 9.3, 3.9 Hz, 2H), 1.61 – 1.53 (m, 1H), 1.45 – 1.29 (m, 4H), 1.28 – 1.15 (m, 1H). ^{13}C NMR (126 MHz, DMSO- d_6): δ 173.04, 159.50, 156.69, 155.91, 111.88, 49.50, 36.84, 33.31, 31.76, 24.95, 24.24. HRMS: m/z: vypočteno pro $\text{C}_{13}\text{H}_{20}\text{N}_5\text{O}_4^+$: 310.1510 [M+H] $^+$; nalezeno: 310.1509.

3-((6-(Benzylamino)-5-nitropyrimidin-4-yl)amino)propanová kyselina 1c



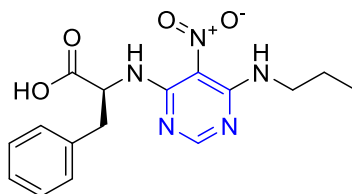
Žlutá amorfnní pevná látka. Výtěžek: 44,3 mg (80 %). ^1H NMR (500 MHz, DMSO- d_6): δ 12.36 (s, 1H), 9.82 (t, J = 6.0 Hz, 1H), 9.52 (t, J = 5.8 Hz, 1H), 8.07 (s, 1H), 7.35 – 7.28 (m, 4H), 7.23 (ddd, J = 8.5, 5.5, 2.6 Hz, 1H), 4.78 (d, J = 6.1 Hz, 2H), 3.76 (q, J = 6.6 Hz, 2H), 2.58 (t, J = 6.8 Hz, 2H). ^{13}C NMR (126 MHz, DMSO- d_6): δ 173.06, 159.38, 156.71, 156.65, 138.74, 128.30, 127.21, 126.85, 112.19, 44.15, 36.87, 33.33. HRMS: m/z: vypočteno pro $\text{C}_{14}\text{H}_{16}\text{N}_5\text{O}_4^+$: 318.1197 [M+H] $^+$; nalezeno: 318.1194.

3-((6-(Morfolino)-5-nitropyrimidin-4-yl)amino)propanová kyselina 1d



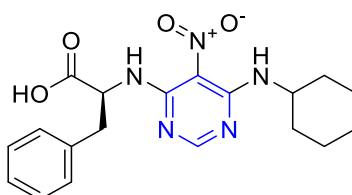
Žlutá amorfnní pevná látka. Výtěžek: 54,7 mg (62 %). ^1H NMR (500 MHz, DMSO- d_6): δ 8.97 (t, J = 4.9 Hz, 1H), 8.05 (s, 1H), 3.67 – 3.63 (m, 6H), 3.50 – 3.41 (m, 4H), 2.36 (t, J = 6.5 Hz, 2H). ^{13}C NMR (126 MHz, DMSO- d_6): δ 173.07, 157.36, 157.31, 156.44, 112.82, 65.84, 47.59, 37.03, 33.49. HRMS: m/z: vypočteno pro $\text{C}_{11}\text{H}_{16}\text{N}_5\text{O}_5^+$: 298.1146 [M+H] $^+$; nalezeno: 298.1145.

(5-Nitro-6-(propylamino)pyrimidin-4-yl)fenylalanin 1e



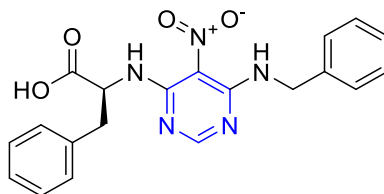
Žlutá amorfnní pevná látka. Výtěžek: 34,9 mg (70 %). ^1H NMR (500 MHz, DMSO- d_6): δ 9.42 (t, $J = 5.8$ Hz, 1H), 9.37 (d, $J = 7.1$ Hz, 1H), 8.09 (s, 1H), 7.31 – 7.26 (m, 2H), 7.25 – 7.15 (m, 3H), 5.03 (td, $J = 6.9, 5.3$ Hz, 1H), 3.50 (dd, $J = 14.1, 6.2$ Hz, 2H), 3.23 (ddd, $J = 20.7, 13.9, 6.0$ Hz, 2H), 1.64 – 1.52 (m, 2H), 0.88 (t, $J = 7.4$ Hz, 3H). ^{13}C NMR (126 MHz, DMSO- d_6): δ 171.94, 159.31, 156.45, 156.19, 136.46, 129.26, 128.36, 126.81, 112.08, 55.00, 42.67, 36.52, 21.96, 11.18. HRMS: m/z: vypočteno pro $\text{C}_{16}\text{H}_{20}\text{N}_5\text{O}_4^+$: 346.1510 [M+H] $^+$; nalezeno: 346.1510.

(6-(Cyklohexylamino)-5-nitropyrimidin-4-yl)fenylalanin 1f



Žlutá amorfnní pevná látka. Výtěžek: 48,5 mg (75 %). ^1H NMR (500 MHz, DMSO- d_6): δ 9.37 (d, $J = 7.2$ Hz, 1H), 9.14 (d, $J = 7.8$ Hz, 1H), 8.10 (s, 1H), 7.32 – 7.15 (m, 5H), 5.08 – 4.99 (m, 1H), 4.18 – 4.12 (m, 1H), 3.28 – 3.18 (m, 2H), 1.93 – 1.82 (m, 2H), 1.73 – 1.64 (m, 2H), 1.62 – 1.53 (m, 1H), 1.45 – 1.29 (m, 4H), 1.27 – 1.16 (m, 1H). ^{13}C NMR (126 MHz, DMSO- d_6): δ 171.89, 159.46, 156.19, 155.67, 136.45, 129.24, 128.36, 126.81, 111.97, 55.02, 49.65, 36.47, 31.70, 24.93, 24.25. HRMS: m/z: vypočteno pro $\text{C}_{19}\text{H}_{24}\text{N}_5\text{O}_4^+$: 386.1823 [M+H] $^+$; nalezeno: 386.1825.

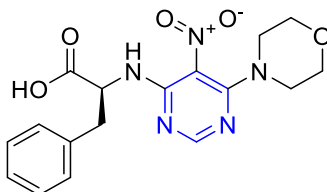
(6-(Benzylamino)-5-nitropyrimidin-4-yl)fenylalanin 1g



Žlutá amorfnní pevná látka. Výtěžek: 27,6 mg (50 %). ^1H NMR (500 MHz, DMSO- d_6): δ 9.81 (t, $J = 6.0$ Hz, 1H), 9.52 (d, $J = 6.8$ Hz, 1H), 8.06 (s, 1H), 7.32 – 7.30 (m, 4H), 7.25

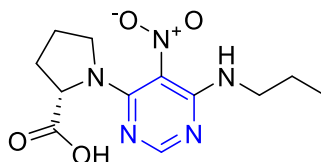
– 7.22 (m, 3H), 7.19 – 7.15 (m, 3H), 4.88 (dd, $J = 12.0, 5.9$ Hz, 1H), 4.77 (d, $J = 6.0$ Hz, 2H), 3.29 - 3.17 (m, 2H). ^{13}C NMR (126 MHz, DMSO- d_6): δ 171.82, 159.35, 156.59, 155.76, 138.68, 137.08, 129.36, 128.31, 128.11, 127.22, 126.86, 126.45, 112.11, 55.78, 44.17, 36.77. HRMS: m/z : vypočteno pro $\text{C}_{20}\text{H}_{20}\text{N}_5\text{O}_4^+$: 394.1510 $[\text{M}+\text{H}]^+$; nalezeno: 394.1512.

(6-Morfolino-5-nitropyrimidin-4-yl)fenylalanin 1h



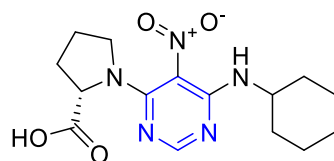
Žlutá amorfnní pevná látka. Výtěžek: 13,1 mg (25 %). ^1H NMR (500 MHz, DMSO- d_6): δ 8.69 (d, $J = 6.7$ Hz, 1H), 8.05 (s, 1H), 7.17 (dq, $J = 14.3, 7.1$ Hz, 3H), 7.10 (d, $J = 7.0$ Hz, 2H), 4.74 – 4.66 (m, 1H), 3.64 (t, $J = 4.7$ Hz, 4H), 3.51 (dt, $J = 13.0, 4.6$ Hz, 2H), 3.38 (dt, $J = 13.2, 4.6$ Hz, 2H), 3.25 (dd, $J = 13.5, 5.3$ Hz, 1H), 3.15 (dd, $J = 13.5, 5.6$ Hz, 1H). ^{13}C NMR (126 MHz, DMSO- d_6): δ 171.95, 157.37, 157.21, 155.42, 137.63, 129.34, 127.91, 126.17, 112.84, 65.82, 56.23, 47.53, 36.91. HRMS: m/z : vypočteno pro $\text{C}_{17}\text{H}_{20}\text{N}_5\text{O}_5^+$: 374.1459 $[\text{M}+\text{H}]^+$; nalezeno: 374.1459.

(5-Nitro-6-(propylamino)pyrimidin-4-yl)prolin 1i



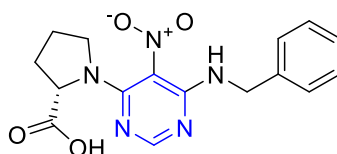
Žlutá amorfnní pevná látka. Výtěžek: 47,0 mg (90 %). ^1H NMR (500 MHz, DMSO- d_6): δ 8.37 (t, $J = 5.8$ Hz, 1H), 8.02 (s, 1H), 4.62 (t, $J = 7.0$ Hz, 1H), 3.44 (ddd, $J = 12.9, 7.0, 1.8$ Hz, 2H), 3.20 (d, $J = 5.8$ Hz, 1H), 3.04 (s, 1H), 2.34 – 2.24 (m, 1H), 2.06 – 1.95 (m, 1H), 1.94 – 1.83 (m, 2H), 1.65 – 1.49 (m, 2H), 0.87 (t, $J = 7.4$ Hz, 3H). ^{13}C NMR (126 MHz, DMSO- d_6): δ 172.71, 156.85, 155.61, 154.70, 113.54, 61.81, 50.12, 42.64, 28.40, 24.64, 22.19, 11.16. HRMS: m/z : vypočteno pro $\text{C}_{12}\text{H}_{18}\text{N}_5\text{O}_4^+$: 296.1353 $[\text{M}+\text{H}]^+$; nalezeno: 296.1356.

(6-(Cyklohexylamino)-5-nitropyrimidin-4-yl)prolin 1j



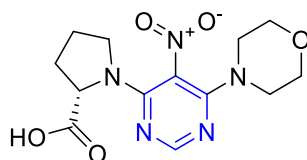
Žlutá amorfnní pevná látka. Výtěžek: 95 mg (86 %). ^1H NMR (500 MHz, DMSO- d_6): δ 8.03 (d, $J = 9.2$ Hz, 2H), 4.62 (dt, $J = 5.7, 4.7$ Hz, 1H), 4.08 (ddd, $J = 17.9, 10.2, 4.0$ Hz, 1H), 3.19 (s, 1H), 3.03 (s, 1H), 2.34 – 2.24 (m, 1H), 2.04 – 1.95 (m, 1H), 1.94 – 1.81 (m, 4H), 1.68 (dd, $J = 8.0, 3.8$ Hz, 2H), 1.62 – 1.54 (m, 1H), 1.36 (dq, $J = 14.7, 11.8, 3.0$ Hz, 4H), 1.26 – 1.15 (m, 1H). ^{13}C NMR (126 MHz, DMSO- d_6): δ 172.58, 157.05, 155.60, 154.79, 113.31, 61.83, 50.24, 49.56, 31.85, 24.98, 24.64, 24.40. HRMS: m/z : vypočteno pro $\text{C}_{15}\text{H}_{22}\text{N}_5\text{O}_4^+$: 336.1666 $[\text{M}+\text{H}]^+$; nalezeno: 336.1666.

(6-(Benzylamino)-5-nitropyrimidin-4-yl)prolin 1k



Žlutá amorfnní pevná látka. Výtěžek: 48,0 mg (85 %). ^1H NMR (500 MHz, DMSO- d_6): δ 12.58 (s, 1H), 8.79 (t, $J = 6.1$ Hz, 1H), 8.00 (s, 1H), 7.31 (d, $J = 4.4$ Hz, 4H), 7.25 – 7.20 (m, 1H), 4.71 (d, $J = 6.1$ Hz, 2H), 4.62 (t, $J = 7.0$ Hz, 1H), 3.25 – 3.19 (m, 1H), 3.05 (s, 1H), 2.34 – 2.24 (m, 1H), 2.05 – 1.95 (m, 1H), 1.94 – 1.82 (m, 2H). ^{13}C NMR (126 MHz, DMSO- d_6): δ 172.53, 156.92, 155.61, 154.56, 139.16, 128.27, 127.14, 126.78, 113.74, 61.79, 50.08, 44.09, 28.55, 24.65. HRMS: m/z : vypočteno pro $\text{C}_{16}\text{H}_{18}\text{N}_5\text{O}_4^+$: 344.1353 $[\text{M}+\text{H}]^+$; nalezeno: 344.1355.

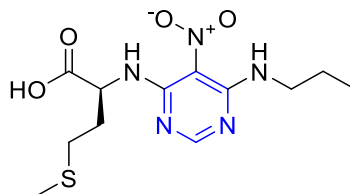
(6-Morfolino-5-nitropyrimidin-4-yl)prolin 1l



Žlutá amorfnní pevná látka. Výtěžek: 43,2 mg (80 %). ^1H NMR (500 MHz, DMSO- d_6): δ 7.96 (s, 1H), 4.65 (t, $J = 7.2$ Hz, 1H), 3.77 – 3.63 (m, 6H), 3.59 – 3.47 (m, 3H), 3.40 (dd, $J = 11.3, 6.1$ Hz, 1H), 2.38 – 2.27 (m, 1H), 2.06 – 1.83 (m, 3H). ^{13}C NMR (126 MHz, DMSO- d_6): δ 172.51, 158.27, 156.55, 155.89, 111.64, 66.18, 61.76, 51.00, 49.24,

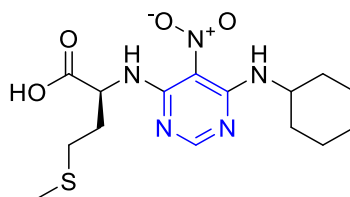
28.88, 24.42. HRMS: m/z: vypočteno pro $C_{13}H_{18}N_5O_5^+$: 324.1302 $[M+H]^+$; nalezeno: 324.1301.

(5-Nitro-6-(propylamino)pyrimidin-4-yl)methionin 1m



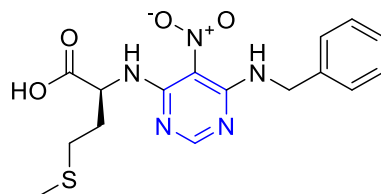
Žlutá amorfnní pevná látka. Výtěžek: 35,0 mg (50 %). 1H NMR (500 MHz, DMSO- d_6): δ 10.01 (d, $J = 6.2$ Hz, 1H), 9.44 (t, $J = 5.8$ Hz, 1H), 8.04 (s, 1H), 4.39 (dd, $J = 11.2, 5.4$ Hz, 1H), 3.55 – 3.43 (m, 2H), 2.47 – 2.35 (m, 2H), 2.17 – 2.01 (m, 2H), 1.99 (s, 3H), 1.59 (h, $J = 7.3$ Hz, 2H), 0.89 (t, $J = 7.4$ Hz, 3H). ^{13}C NMR (126 MHz, DMSO- d_6): δ 171.84, 159.36, 156.79, 155.25, 111.82, 55.55, 42.53, 31.89, 29.37, 22.00, 14.66, 11.22. HRMS: m/z: vypočteno pro $C_{12}H_{20}N_5O_4S^+$: 330.1231 $[M+H]^+$; nalezeno: 330.1234.

(6-(Cyklohexylamino)-5-nitropyrimidin-4-yl)methionin 1n



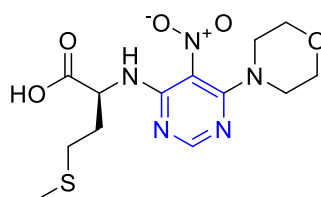
Žlutá amorfnní pevná látka. Výtěžek: 45,9 mg (68 %). 1H NMR (500 MHz, DMSO- d_6): δ 10.02 (d, $J = 6.2$ Hz, 1H), 9.22 (d, $J = 7.7$ Hz, 1H), 8.05 (s, 1H), 4.39 (dd, $J = 11.1, 5.4$ Hz, 1H), 4.20 - 4.09 (m, 1H), 2.47 2.39 (m, 2H), 2.15 – 2.00 (m, 2H), 1.99 (s, 3H), 1.92 - 1.86 (m, 2H), 1.72 – 1.63 (m, 2H), 1.58 – 1.53 (m, 1H), 1.45 – 1.30 (m, 4H), 1.28 – 1.19 (m, 1H). ^{13}C NMR (126 MHz, DMSO- d_6): δ 171.98, 159.49, 156.01, 155.24, 111.80, 55.59, 49.39, 43.38, 31.87, 29.36, 24.97, 24.25, 14.66. HRMS: m/z: vypočteno pro $C_{15}H_{24}N_5O_4S^+$: 370.1544 $[M+H]^+$; nalezeno: 370.1540.

(6-(Benzylamino)-5-nitropyrimidin-4-yl)methionin 1o



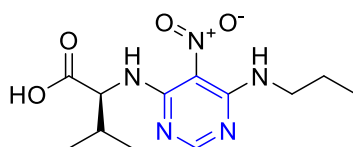
Žlutá amorfnní pevná látka. Výtěžek: 52,3 mg (66 %). ^1H NMR (500 MHz, DMSO- d_6): δ 10.08 (d, $J = 6.2$ Hz, 1H), 9.82 (t, $J = 6.1$ Hz, 1H), 8.03 (s, 1H), 7.37 – 7.28 (m, 4H), 7.25 – 7.21 (m, 1H), 4.84 – 4.71 (m, 2H), 4.33 (dd, $J = 11.6, 6.4$ Hz, 1H), 2.48 – 2.36 (m, 2H), 2.15 – 2.01 (m, 2H), 1.98 (s, 3H). ^{13}C NMR (126 MHz, DMSO- d_6): δ 172.08, 159.38, 156.84, 155.08, 138.80, 128.31, 127.25, 126.85, 112.07, 55.93, 44.10, 32.06, 29.37, 14.69. HRMS: m/z : vypočteno pro $\text{C}_{16}\text{H}_{20}\text{N}_5\text{O}_4\text{S}^+$: 378.1231 $[\text{M}+\text{H}]^+$; nalezeno: 378.1232.

(6-Morfolino-5-nitropyrimidin-4-yl)methionin 1p



Žlutá amorfnní pevná látka. Výtěžek: 33,9 mg (45 %). ^1H NMR (500 MHz, DMSO- d_6): δ 9.00 (d, $J = 6.4$ Hz, 1H), 8.05 (s, 1H), 4.47 (dd, $J = 11.7, 5.7$ Hz, 1H), 3.65 (t, $J = 4.8$ Hz, 4H), 3.51 – 3.42 (m, 4H), 2.47 – 2.43 (m, 2H), 2.12 – 2.02 (m, 2H), 2.00 (s, 3H). ^{13}C NMR (126 MHz, DMSO- d_6): δ 172.31, 157.37, 157.33, 155.48, 112.84, 65.83, 54.89, 47.55, 31.62, 29.38, 14.63. HRMS: m/z : vypočteno pro $\text{C}_{13}\text{H}_{20}\text{N}_5\text{O}_5\text{S}^+$: 358.1180 $[\text{M}+\text{H}]^+$; nalezeno: 358.1176.

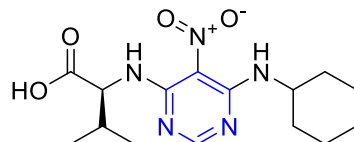
(5-Nitro-6-(propylamino)pyrimidin-4-yl)valin 1q



Žlutá amorfnní pevná látka. Výtěžek: 25,1 mg (57 %). ^1H NMR (500 MHz, DMSO- d_6): δ 9.90 (d, $J = 7.6$ Hz, 1H), 9.46 (t, $J = 5.8$ Hz, 1H), 8.02 (s, 1H), 4.46 (dd, $J = 7.7, 3.9$ Hz, 1H), 3.56 – 3.44 (m, 2H), 2.20 (dtd, $J = 13.8, 6.9, 4.1$ Hz, 1H), 1.64 – 1.54 (m, 2H), 0.95 (d, $J = 6.9$ Hz, 3H), 0.92 – 0.82 (m, 6H). ^{13}C NMR (126 MHz, DMSO- d_6): δ

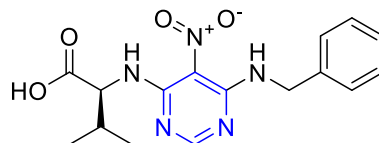
172.04, 159.56, 156.83, 155.69, 111.79, 60.73, 60.47, 42.55, 30.92, 21.99, 18.81, 11.24.
HRMS: m/z: vypočteno pro $C_{12}H_{20}N_5O_4^+$: 298.1510 $[M+H]^+$; nalezeno: 298.1508.

(6-(Cyklohexylamino)-5-nitropyrimidin-4-yl)valin 1r



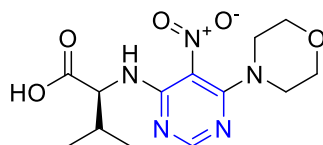
Žlutá amorfnní pevná látka. Výtěžek: 27,7 mg (57 %). 1H NMR (500 MHz, DMSO- d_6): δ 9.66 (d, $J = 7.7$ Hz, 1H), 9.21 (d, $J = 7.8$ Hz, 1H), 8.07 (s, 1H), 4.65 (dd, $J = 7.8, 4.3$ Hz, 1H), 4.21 – 4.12 (m, 1H), 2.30 – 2.21 (m, 1H), 1.93 – 1.85 (m, 2H), 1.70 – 1.67 (m, 2H), 1.61 – 1.53 (m, 1H), 1.46 – 1.30 (m, 4H), 1.28 – 1.18 (m, 1H), 0.97 (d, $J = 6.9$ Hz, 3H), 0.91 (d, $J = 6.9$ Hz, 3H). ^{13}C NMR (126 MHz, DMSO- d_6): δ 171.99, 159.48, 156.32, 155.85, 111.93, 59.39, 49.63, 49.47, 31.72, 30.42, 25.00, 24.28, 18.69, 18.08.
HRMS: m/z: vypočteno pro $C_{15}H_{24}N_5O_4^+$: 338.1823 $[M+H]^+$; nalezeno: 338.1821.

(6-(Benzylamino)-5-nitropyrimidin-4-yl)valin 1s



Žlutá amorfnní pevná látka. Výtěžek: 39,4 mg (79 %). 1H NMR (500 MHz, DMSO- d_6): δ 9.86 (t, $J = 6.1$ Hz, 1H), 9.60 (d, $J = 7.8$ Hz, 1H), 8.06 (s, 1H), 7.35 – 7.29 (m, 4H), 7.25 – 7.22 (m, 1H), 4.83 – 4.74 (m, 2H), 4.70 (dd, $J = 7.8, 4.4$ Hz, 1H), 2.31 – 2.22 (m, 1H), 0.98 (d, $J = 6.9$ Hz, 3H), 0.93 (d, $J = 6.9$ Hz, 3H). ^{13}C NMR (126 MHz, DMSO- d_6): δ 172.02, 159.49, 159.36, 156.60, 156.44, 138.66, 128.41, 128.17, 127.32, 127.09, 112.32, 59.10, 44.19, 30.35, 18.72, 18.02. HRMS: m/z: vypočteno pro $C_{16}H_{20}N_5O_4^+$: 346.1510 $[M+H]^+$; nalezeno: 346.1513.

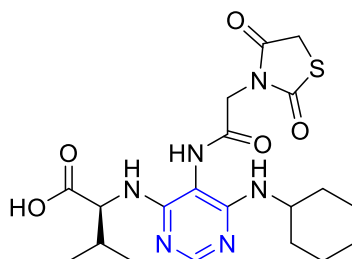
(6-Morfolino-5-nitropyrimidin-4-yl)valin 1t



Žlutá amorfnní pevná látka. Výtěžek: 36,4 mg (77 %). 1H NMR (500 MHz, DMSO- d_6): δ 8.98 (d, $J = 7.5$ Hz, 1H), 8.02 (s, 1H), 4.39 (dd, $J = 7.5, 3.9$ Hz, 1H), 3.64 (t, $J = 4.8$ Hz,

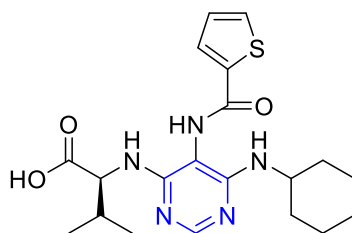
4H), 3.53 – 3.41 (m, 4H), 2.21 2.16 (m, 1H), 0.94 (d, $J = 6.9$ Hz, 3H), 0.84 (d, $J = 6.9$ Hz, 3H). ^{13}C NMR (126 MHz, DMSO- d_6): δ 172.06, 157.47, 155.66, 112.61, 65.85, 60.59, 47.56, 30.83, 18.78, 18.59. HRMS: m/z : vypočteno pro $\text{C}_{13}\text{H}_{20}\text{N}_5\text{O}_5^+$: 326.1459 $[\text{M}+\text{H}]^+$; nalezeno: 326.1461.

(6-(Cyklohexylamino)-5-(2-(2,4-dioxothiazolidin-3-yl)acetamido)pyrimidin-4-yl)valin 2a



Bílá amorfnní pevná látka. Výtěžek: 23,6 mg (43 %). ^1H NMR (500 MHz, DMSO- d_6): δ 9.20 (s, 1H), 7.91 (s, 1H), 5.62 (d, $J = 8.0$ Hz, 1H), 5.55 (d, $J = 8.3$ Hz, 1H), 4.51 – 4.47 (m, 1H), 4.37 – 4.28 (m, 4H), 3.86 – 3.76 (m, 1H), 2.08 (dq, $J = 13.5, 6.8$ Hz, 1H), 1.87 – 1.79 (m, 2H), 1.76 – 1.66 (m, 2H), 1.63 – 1.55 (m, 1H), 1.35 – 1.08 (m, 5H), 0.91 (dd, $J = 6.8, 1.1$ Hz, 6H). ^{13}C NMR (126 MHz, DMSO- d_6): δ 173.74, 172.43, 171.87, 165.57, 157.27, 157.20, 155.35, 94.65, 58.58, 48.78, 44.04, 34.13, 32.85, 30.03, 24.84, 19.12, 18.36. HRMS: m/z : vypočteno pro $\text{C}_{20}\text{H}_{27}\text{N}_6\text{O}_5\text{S}^-$: 463.1769 $[\text{M}-\text{H}]^-$; nalezeno: 463.1749.

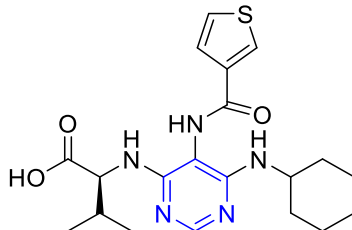
(6-(Cyklohexylamino)-5-(thiopen-2-karboxamido)pyrimidin-4-yl)valin 2b



Bílá amorfnní pevná látka. Výtěžek: 9,1 mg (18 %). ^1H NMR (500 MHz, DMSO- d_6): δ 9.31 (s, 1H), 8.03 – 7.94 (m, 2H), 7.83 (d, $J = 4.8$ Hz, 1H), 7.25 – 7.19 (m, 1H), 6.02 (br. s, 1H), 5.56 (br. s, 1H), 4.43 (dd, $J = 8.3, 5.7$ Hz, 1H), 3.87 (br. s, 1H), 2.09 (dq, $J = 13.1, 6.6$ Hz, 1H), 1.81 (br. s, 2H), 1.67 (br. s, 2H), 1.59 – 1.56 (m, 1H), 1.34 – 1.18 (m, 4H), 1.16 – 1.03 (m, 1H), 0.87 (dd, $J = 9.1, 7.0$ Hz, 6H). ^{13}C NMR (126 MHz, DMSO- d_6): δ 174.04, 161.05, 157.77, 155.49, 140.03, 131.76, 130.19, 128.46, 95.90, 58.73,

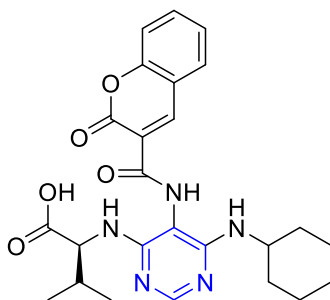
49.52, 33.26, 30.85, 25.88, 25.51, 19.40, 18.75. HRMS: m/z : vypočteno pro $C_{20}H_{28}N_5O_3S^+$: 418.1907 $[M+H]^+$; nalezeno: 418.1909.

(6-(Cyklohexylamino)-5-(thiofen-3-karboxamido)pyrimidin-4-yl)valin 2c



Bílá amorfnní pevná látka. Výtěžek: 7,2 mg (14 %). 1H NMR (500 MHz, DMSO- d_6): δ 9.12 (s, 1H), 8.33 (dd, $J = 2.8, 1.4$ Hz, 1H), 7.96 (s, 1H), 7.63 (qd, $J = 5.0, 2.1$ Hz, 2H), 5.86 (d, $J = 8.1$ Hz, 1H), 5.50 (d, $J = 8.3$ Hz, 1H), 4.41 (dd, $J = 8.3, 5.6$ Hz, 1H), 3.94 – 3.80 (m, 1H), 2.15 – 2.03 (m, 1H), 1.84 – 1.76 (m, 2H), 1.70 – 1.64 (m, 2H), 1.59 – 1.56 (m, 1H), 1.36 – 1.16 (m, 4H), 1.15 – 1.04 (m, 1H), 0.87 (t, $J = 6.5$ Hz, 6H). ^{13}C NMR (126 MHz, DMSO- d_6): δ 173.60, 161.32, 157.48, 157.20, 155.17, 137.43, 129.85, 127.62, 126.37, 95.67, 58.20, 48.84, 32.76, 30.35, 25.35, 24.96, 18.83, 18.26. HRMS: m/z : vypočteno pro $C_{20}H_{28}N_5O_3S^+$: 481.1907 $[M+H]^+$; nalezeno: 418.1909.

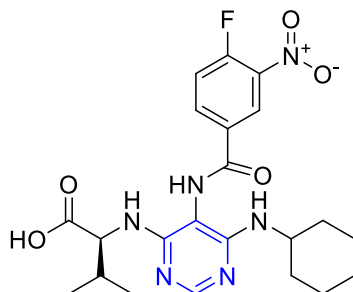
(6-(Cyklohexylamino)-5-(2-oxo-2H-chromen-3-karboxamido)pyrimidin-4-yl)valin 2d



Bílá amorfnní pevná látka. Výtěžek: 15,9 mg (28 %). 1H NMR (500 MHz, DMSO- d_6): δ 9.41 (s, 1H), 8.85 (s, 1H), 8.03 (dd, $J = 7.8, 1.5$ Hz, 1H), 7.97 (s, 1H), 7.81 – 7.75 (m, 1H), 7.56 (d, $J = 8.4$ Hz, 1H), 7.47 (td, $J = 7.6, 1.0$ Hz, 1H), 6.01 (t, $J = 8.2$ Hz, 2H), 4.41 (dd, $J = 8.3, 6.5$ Hz, 1H), 3.93 – 3.81 (m, 1H), 2.17 – 2.06 (m, 1H), 1.88 – 1.78 (m, 2H), 1.77 – 1.65 (m, 2H), 1.62 – 1.54 (m, 1H), 1.37 – 1.16 (m, 4H), 1.16 – 1.05 (m, 1H), 0.92 (dd, $J = 6.8, 3.4$ Hz, 6H). ^{13}C NMR (126 MHz, DMSO- d_6): δ 173.83, 161.48, 160.59, 157.15, 157.06, 155.44, 153.70, 145.99, 133.95, 130.13, 125.29, 121.17,

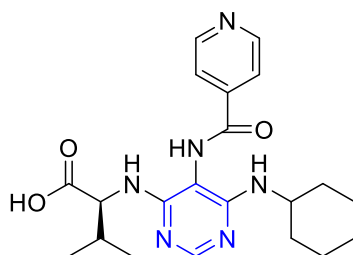
118.40, 116.16, 95.03, 58.64, 48.84, 32.87, 29.99, 25.39, 24.88, 19.15, 18.58. HRMS: m/z: vypočteno pro $C_{25}H_{30}N_5O_5^+$: 480.2241 $[M+H]^+$; nalezeno: 480.2242.

(6-(Cyklohexylamino)-5-(4-fluoro-3-nitrobenzamido)pyrimidin-4-yl)valin 2e



Bílá amorfnní pevná látka. Výtěžek: 14,3 mg (26 %). 1H NMR (500 MHz, DMSO- d_6): δ 8.78 (dd, $J = 7.3, 2.2$ Hz, 1H), 8.43 (ddd, $J = 8.7, 4.2, 2.3$ Hz, 1H), 7.95 (s, 1H), 7.76 (dd, $J = 11.0, 8.7$ Hz, 1H), 6.02 (d, $J = 8.1$ Hz, 1H), 5.77 (d, $J = 8.0$ Hz, 1H), 4.31 (dd, $J = 7.8, 5.8$ Hz, 1H), 3.92 – 3.82 (m, 1H), 2.07 (tq, $J = 14.0, 7.0$ Hz, 1H), 1.84 – 1.76 (m, 2H), 1.70 – 1.64 (m, 2H), 1.59 – 1.56 (m, 1H), 1.33 – 1.15 (m, 4H), 1.08 (dt, $J = 20.9, 7.5$ Hz, 1H), 0.85 (dd, $J = 6.8, 1.8$ Hz, 6H). ^{13}C NMR (126 MHz, DMSO- d_6) δ 173.74 (s), 162.75 (s), 157.39 (d, $J = 22.0$ Hz), 156.18 (d, $J = 265.9$ Hz), 155.39 (s), 136.50 (d, $J = 7.8$ Hz), 136.04 (d, $J = 9.7$ Hz), 131.46 (d, $J = 3.2$ Hz), 126.12 (s), 118.38 (d, $J = 21.0$ Hz), 95.19 (s), 58.52 (s), 48.94 (s), 32.82 (s), 30.18 (s), 25.38 (s), 25.06 (s), 18.98 (s), 18.57 (s). HRMS: m/z: vypočteno pro $C_{22}H_{28}FN_6O_5^+$: 475.2100 $[M+H]^+$; nalezeno: 475.2100.

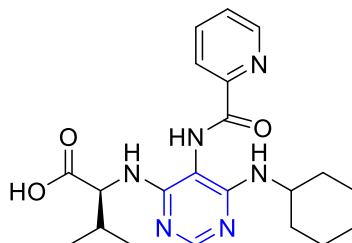
(6-(Cyklohexylamino)-5-(isonikotinamido)pyrimidin-4-yl)valin 2f



Bílá amorfnní pevná látka. Výtěžek: 22,5 mg (45 %). 1H NMR (500 MHz, DMSO- d_6): δ 9.54 (br. s, 1H), 8.77 (dd, $J = 4.5, 1.6$ Hz, 2H), 7.96 (s, 1H), 7.93 (dd, $J = 4.5, 1.6$ Hz, 2H), 5.98 (d, $J = 8.1$ Hz, 1H), 5.72 (d, $J = 7.9$ Hz, 1H), 4.31 (dd, $J = 7.7, 5.6$ Hz, 1H), 3.90 – 3.84 (m, 1H), 2.08 (dq, $J = 13.6, 6.8$ Hz, 1H), 1.84 – 1.76 (m, 2H), 1.70 – 1.64 (m, 2H), 1.59 – 1.56 (m, 1H), 1.34 – 1.16 (m, 4H), 1.15 – 1.02 (m, 1H), 0.85 (dd, $J = 6.8, 3.5$ Hz, 6H). ^{13}C NMR (126 MHz, DMSO- d_6): δ 174.20, 164.72, 157.90, 157.75,

155.97, 150.53, 141.85, 122.57, 95.60, 59.21, 49.41, 33.36, 30.90, 25.93, 25.58, 19.43, 19.08. HRMS: m/z : vypočteno pro $C_{21}H_{27}N_6O_3^-$: 411.2150 $[M-H]^-$; nalezeno: 411.2136.

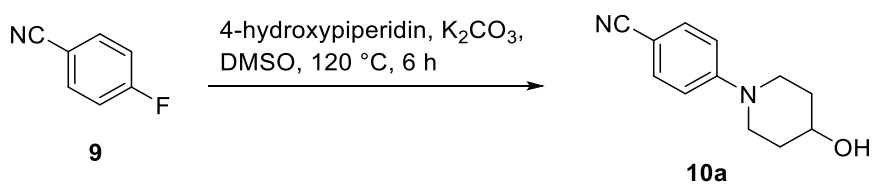
(6-(Cyklohexylamino)-5-(pikolinamido)pyrimidin-4-yl)valin 2g



Bílá amorfnní pevná látka. Výtěžek: 23,4 mg (47 %). 1H NMR (500 MHz, DMSO- d_6): δ 9.63 (s, 1H), 8.74 (ddd, $J = 4.8, 1.6, 0.9$ Hz, 1H), 8.11 – 8.07 (m, 1H), 8.03 (td, $J = 7.6, 1.7$ Hz, 1H), 7.97 (s, 1H), 7.66 (ddd, $J = 7.5, 4.8, 1.3$ Hz, 1H), 5.82 (d, $J = 8.0$ Hz, 1H), 5.60 (d, $J = 8.2$ Hz, 1H), 4.40 (dd, $J = 8.1, 5.8$ Hz, 1H), 3.85 (tdt, $J = 11.6, 7.6, 3.8$ Hz, 1H), 2.08 (dh, $J = 13.6, 6.8$ Hz, 1H), 1.85 – 1.76 (m, 2H), 1.72 – 1.62 (m, 2H), 1.59 – 1.52 (m, 1H), 1.33 – 1.14 (m, 4H), 1.13 – 1.02 (m, 1H), 0.86 (t, $J = 6.6$ Hz, 6H). ^{13}C NMR (126 MHz, DMSO- d_6): δ 173.58, 163.51, 157.30, 157.00, 155.13, 150.10, 148.34, 137.65, 126.57, 122.37, 95.63, 58.36, 48.88, 32.71, 30.30, 25.35, 24.93, 18.81, 18.42. HRMS: m/z : vypočteno pro $C_{21}H_{27}N_6O_3^-$: 411.2150 $[M-H]^-$; nalezeno: 411.2137.

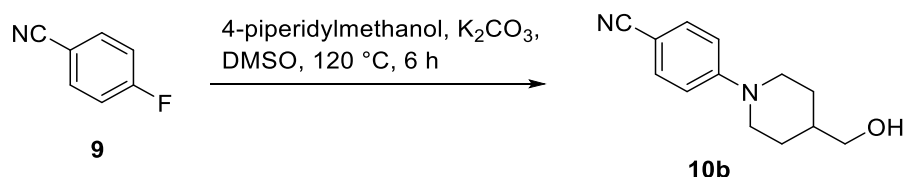
6.3 Příprava benzoxazolových derivátů

6.3.1 Nukleofilní substituce



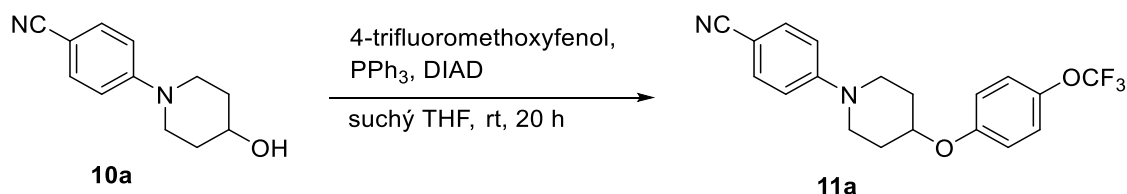
Suspenze 4-fluorobenzonitrilu **9** (4,15 mmol), 4-hydroxypiperidinu (4,55 mmol; 1,1 ekv.) a K_2CO_3 (12,4 mmol; 3 ekv.) v 5 ml DMSO opatřená magnetickým míchadlem byla míchána 6 hodin při 120 °C. Reakce byla monitorována pomocí tenkovrstevné chromatografie. Produkt byl izolován nalitím na led a odsátím vzniklé sraženiny. Následně byl přes noc lyofilizován. Produkt **10a** byl získán jako světle žlutá krystalická látka ve výtěžku 754,2 mg (90 %). 1H NMR (500 MHz, DMSO- d_6) δ 7.53 (d, $J = 9.1$ Hz, 2H), 6.99 (d, $J = 9.1$ Hz, 2H), 4.71 (s, 1H), 3.70 (dt, $J = 10.0, 4.2$ Hz, 3H), 3.06 (ddd, $J = 13.1, 9.8, 3.1$ Hz, 2H), 1.82 – 1.75 (m, 2H), 1.39 (dtd, $J = 12.9, 9.5,$

3.8 Hz, 2H). ^{13}C NMR (126 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) δ 152.77, 133.33, 120.12, 113.89, 97.24, 65.63, 44.39, 33.27. HRMS: m/z : vypočteno pro $\text{C}_{12}\text{H}_{15}\text{N}_2\text{O}^+$: 203.1179 $[\text{M}+\text{H}]^+$; nalezeno: 203.1180.



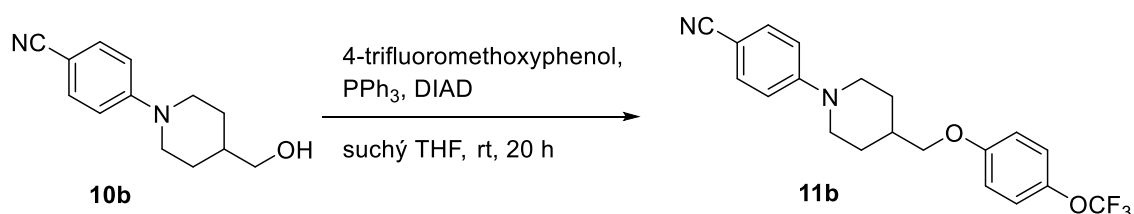
Suspenze 4-fluorobenzonitrilu **9** (4,15 mmol), 4-piperidylmethanolu (4,55 mmol; 1,1 ekv.) a K_2CO_3 (12,4 mmol; 3 ekv.) v 5 ml DMSO opatřená magnetickým míchadlem byla míchána 6 hodin při $120\text{ }^\circ\text{C}$. Reakce byla monitorována pomocí tenkovrstevné chromatografie. Produkt byl izolován nalitím na led a odsátím vzniklé sraženiny. Následně byl přes noc lyofilizován. Produkt **10b** byl získán jako bílá krystalická látka ve výtěžku 849,5 mg (95 %). ^1H NMR (500 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) δ 7.49 (d, $J = 9.1$ Hz, 2H), 6.95 (d, $J = 9.1$ Hz, 2H), 4.43 (t, $J = 5.2$ Hz, 1H), 3.92 – 3.86 (m, 2H), 3.23 (t, $J = 5.7$ Hz, 2H), 2.80 (td, $J = 12.7, 2.7$ Hz, 2H), 1.71 – 1.65 (m, 2H), 1.63 – 1.54 (m, 1H), 1.12 (qd, $J = 12.5, 4.1$ Hz, 2H). ^{13}C NMR (126 MHz, $\text{DMSO-}D_6$) δ 153.56, 133.89, 120.73, 114.46, 97.71, 66.13, 47.20, 38.77, 28.36. HRMS: m/z : vypočteno pro $\text{C}_{13}\text{H}_{17}\text{N}_2\text{O}^+$: 217.1335 $[\text{M}+\text{H}]^+$; nalezeno: 217.1334.

6.3.2 Mitsunobu reakce



Směs sloučeniny **10a** (2,23 mmol), PPh_3 (2,23 mmol; 1 ekv.) a 4-trifluoromethoxyfenolu (2,23 mmol; 1 ekv.) opatřená magnetickým míchadlem byla rozpuštěna v 18 ml suchého THF za inertních podmínek. Vzniklá reakční směs byla míchána za laboratorní teploty. Poté byl během 20 minut přes septum přikapáván roztok DIAD (2,23 mmol; 1 ekv.) v 4,5 ml suchého THF, který byl předtím 15 minut chlazen v mrazáku. Po 2 hodinách byl do reakční směsi přidán další PPh_3 (1,12 mmol; 0,5 ekv.) a roztok DIAD (1,12 mmol; 0,5 ekv.) v 2,5 ml suchého THF, který byl předtím 15 minut chlazen v mrazáku, byl opět přikapáván po dobu 20 minut. Reakce byla monitorována pomocí LC-MS. Po 18 hodinách od přidavku dalších reagentů už nebyla

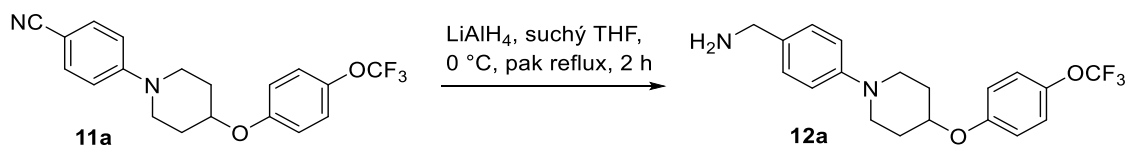
přítomna výchozí látka **10a**. Reakční směs byla poté zahuštěna na RVO. Odparek byl rozpuštěn v DCM, nasorbován na silikagel a čištěn pomocí sloupcové chromatografie (SiO₂, MF hex/EtOAc 7:1). Frakce obsahující produkt **11a** byly spojeny a odpařeny do sucha. Produkt **11a** byl ještě dosušen na lyofilizátoru do dalšího dne. Produkt **11a** byl získán jako světle žlutá amorfni pevná látka ve výtěžku 666,2 mg (83 %). ¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ 7.57 (d, *J* = 9.0 Hz, 2H), 7.28 (d, *J* = 8.8 Hz, 2H), 7.09 (d, *J* = 9.1 Hz, 2H), 7.05 (d, *J* = 9.0 Hz, 2H), 4.66 (tt, *J* = 7.8, 3.7 Hz, 1H), 3.71 (ddd, *J* = 12.8, 5.9, 3.8 Hz, 2H), 3.28 (ddd, *J* = 12.8, 8.9, 3.2 Hz, 2H), 2.01 (dq, *J* = 9.3, 3.1 Hz, 2H), 1.65 (dtd, *J* = 12.5, 8.5, 3.6 Hz, 2H). ¹³C NMR (101 MHz, DMSO-*d*₆) δ 155.84, 152.68, 141.76, 133.42, 122.59, 120.09, 117.05, 114.13, 97.77, 72.29, 43.93, 29.52. HRMS: *m/z*: vypočteno pro C₁₉H₁₈F₃N₂O₂⁺: 363.1315 [M+H]⁺; nalezeno: 363.1316.



Směs sloučeniny **10b** (2,08 mmol), PPh₃ (2,08 mmol; 1 ekv.) a 4-trifluoromethoxyfenolu (2,08 mmol; 1 ekv.) opatřená magnetickým míchadlem byla rozpuštěna v 18 ml suchého THF za inertních podmínek. Vzniklá reakční směs byla míchána za laboratorní teploty. Poté byl během 20 minut přes septum přikapáván roztok DIAD (2,08 mmol; 1 ekv.) v 4,5 ml suchého THF, který byl předtím 15 minut chlazen v mrazáku. Po 2 hodinách byl do reakční směsi přidán další PPh₃ (1,04 mmol; 0,5 ekv.) a roztok DIAD (1,04 mmol; 0,5 ekv.) v 2,5 ml suchého THF, který byl předtím 15 minut chlazen v mrazáku, byl opět přikapáván po dobu 20 minut. Reakce byla monitorována pomocí LC-MS. Po 18 hodinách od přidavku dalších reagentů už nebyla přítomna výchozí látka **10b**. Reakční směs byla poté zahuštěna na RVO. Surový produkt **11b** byl čištěn pomocí sloupcové chromatografie (SiO₂, MF petrolether/EtOAc 4:1). Frakce obsahující produkt **11b** byly spojeny a odpařeny do sucha. Produkt **11b** byl ještě dosušen na lyofilizátoru do dalšího dne. Produkt **11b** byl získán jako bílá amorfni pevná látka ve výtěžku 653,3 mg (83 %). ¹H NMR (400 MHz, Chloroform-*d*) δ 7.50 (d, *J* = 8.8 Hz, 2H), 7.14 (d, *J* = 8.7 Hz, 2H), 6.92 (d, *J* = 8.7 Hz, 2H), 6.87 (d, *J* = 9.2 Hz, 2H), 3.91 (d, *J* = 13.5 Hz, 2H), 3.83 (d, *J* = 6.3 Hz, 2H), 2.94 (td, *J* = 12.7, 2.7 Hz, 2H), 2.13 – 2.01 (m, 1H), 1.97 (dd, *J* = 14.3, 3.6 Hz, 2H), 1.58 – 1.45 (m, 2H). ¹³C NMR (101 MHz, Chloroform-*d*) δ 157.53, 153.38, 142.78, 133.58, 122.52, 120.64 (q, *J* =

256.0 Hz), 120.31, 115.21, 114.39, 99.50, 72.57, 47.47, 35.94, 28.35. HRMS: m/z: vypočteno pro $C_{20}H_{20}F_3N_2O_2^+$: 377.1471 $[M+H]^+$; nalezeno: 377.1472.

6.3.3 Redukce nitrilové skupiny



Do vysušené a argonem vyfoukané baňky opatřené magnetickým míchadlem byla navážena látka **11a** (1,82 mmol; nebo 0,98 mmol), která byla následně za inertních podmínek rozpuštěna v 11 ml suchého THF. Vzniklý roztok byl míchán a ochlazen na $0\text{ }^\circ\text{C}$. Poté byl přidán $LiAlH_4$ (5,47 mmol; nebo 2,93 mmol; 3 ekv.) a reakce přestala být chlazená. Po ohřátí na laboratorní teplotu byla reakce umístěna pod zpětný chladič a po dobu 2 hodin byla refluxována ($80\text{ }^\circ\text{C}$). Reakce byla monitorována pomocí tenkovrstevné chromatografie. Jakmile již výchozí látka **11a** nebyla přítomna, byla reakce odstavena z tepla a ukončena (byly vyzkoušeny dva různé postupy):

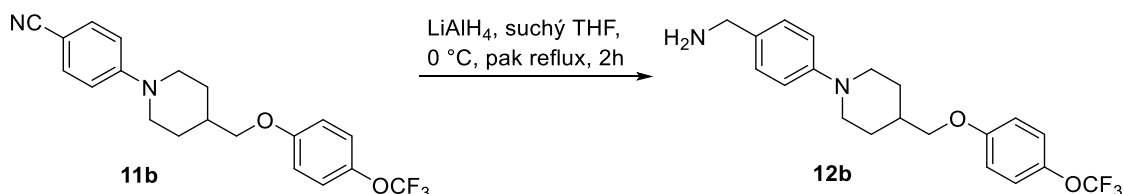
Izolace 1:

Do reakční směsi bylo opatrně přikapáno 208 μl vody, poté 208 μl 15% vodného roztoku NaOH a nakonec 624 μl vody. Směs byla ponechána na míchačce za laboratorní teploty přes noc a další den byl přidán bezvodý $MgSO_4$. Tato suspenze byla míchána ještě 15 minut a pak byla zfiltrována přes křemelinu. Filtrát s produktem **12a** byl zahuštěn na RVO a sušen na lyofilizátoru do dalšího dne. Produkt **12a** byl získán jako světle žlutá amorfnní pevná látka ve výtěžku 598,2 mg (90 %). ^1H NMR (400 MHz, Chloroform-*d*) δ 7.23 (d, $J = 8.6$ Hz, 2H), 7.14 (d, $J = 8.7$ Hz, 2H), 6.92 (t, $J = 9.0$ Hz, 4H), 4.43 (tt, $J = 7.6, 3.7$ Hz, 1H), 3.81 (s, 2H), 3.48 (ddd, $J = 11.4, 7.3, 3.8$ Hz, 2H), 3.09 (ddd, $J = 12.2, 8.2, 3.6$ Hz, 2H), 2.51 (s, 2H), 2.10 (ddt, $J = 11.1, 7.3, 3.8$ Hz, 2H), 1.93 (dtd, $J = 12.0, 7.8, 3.7$ Hz, 2H). ^{13}C NMR (101 MHz, Chloroform-*d*) δ 155.81, 150.15, 142.65, 134.30, 127.96, 122.39, 120.52 (q, $J = 256.6$ Hz), 116.76, 116.63, 72.80, 46.79, 45.72, 30.32. HRMS: m/z: vypočteno pro $C_{19}H_{22}F_3N_2O_2^+$: 367.1628 $[M+H]^+$; nalezeno: 367.1625.

Izolace 2:

Bylo přidáno asi 5 lžiček $Na_2SO_4 \cdot 10\text{ H}_2O$ a pár kapek vody, až šedé zbarvení zesvětlalo. Poté byly přidány asi 3 lžičky bezvodého Na_2SO_4 . Suspenze byla míchána 5

minut a poté zfiltrována přes křemelinu. Filtrát s produktem **12a** byl zahuštěn na RVO a sušen na lyofilizátoru do dalšího dne. Surový produkt byl čištěn pomocí sloupcové chromatografie (SiO₂, MF DCM/MeOH 7:3 + 1% TEA). Frakce obsahující produkt **12a** byly spojeny a odpařeny do sucha. Produkt **12a** byl získán jako světle žlutá amorfnní pevná látka ve výtěžku 262,3 mg (73 %). Naměřená analytická data odpovídají hodnotám uvedeným v postupu *Izolace 1*.



Do vysušené a argonem vyfoukané baňky opatřené magnetickým míchadlem byla navážena látka **11b** (1,70 mmol; nebo 0,54 mmol), která byla následně za inertních podmínek rozpuštěna v 11 ml suchého THF. Vzniklý roztok byl míchán a ochlazen na 0 °C. Poté byl přidán LiAlH₄ (5,10 mmol; nebo 1,61 mmol; 3 ekv.) a reakce přestala být chlazená. Po ohřátí na laboratorní teplotu byla reakce umístěna pod zpětný chladič a po dobu 2 hodin byla refluxována (80 °C). Reakce byla monitorována pomocí tenkovrstevné chromatografie. Jakmile již výchozí látka **11b** nebyla přítomna, byla reakce odstavena z tepla a ukončena (byly vyzkoušeny dva různé postupy):

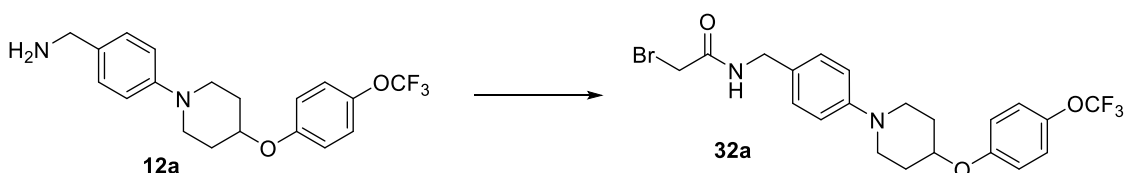
Izolace 1:

Do reakční směsi bylo opatrně přikapáno 194 µl vody, poté 194 µl 15% vodného roztoku NaOH a nakonec 582 µl vody. Směs byla ponechána na míchačce za laboratorní teploty přes noc a další den byl přidán bezvodý MgSO₄. Tato suspenze byla míchána ještě 15 minut a pak byla zfiltrována přes křemelinu. Filtrát s produktem **12b** byl zahuštěn na RVO a sušen na lyofilizátoru do dalšího dne. Produkt **12b** byl získán jako světle žlutá amorfnní pevná látka ve výtěžku 578 mg (89 %). ¹H NMR (400 MHz, Chloroform-*d*) δ 7.21 (d, *J* = 8.5 Hz, 2H), 7.14 (d, *J* = 8.8 Hz, 2H), 6.93 (d, *J* = 8.6 Hz, 2H), 6.88 (d, *J* = 9.1 Hz, 2H), 3.83 (d, *J* = 5.9 Hz, 2H), 3.79 (s, 2H), 3.71 (d, *J* = 12.9 Hz, 2H), 2.74 (td, *J* = 12.1, 2.3 Hz, 2H), 2.30 (s, 2H), 1.99 – 1.90 (m, 3H), 1.53 (qd, *J* = 12.9, 3.7 Hz, 2H). ¹³C NMR (101 MHz, Chloroform-*d*) δ 157.70, 151.08, 142.77, 132.63, 128.44, 122.56, 120.69 (q, *J* = 256,4 Hz), 116.92, 115.25, 72.99, 49.87, 45.44, 35.97, 29.02. HRMS: *m/z*: vypočteno pro C₂₀H₂₄F₃N₂O₂⁺: 381.1784 [M+H]⁺; nalezeno: 381.1783.

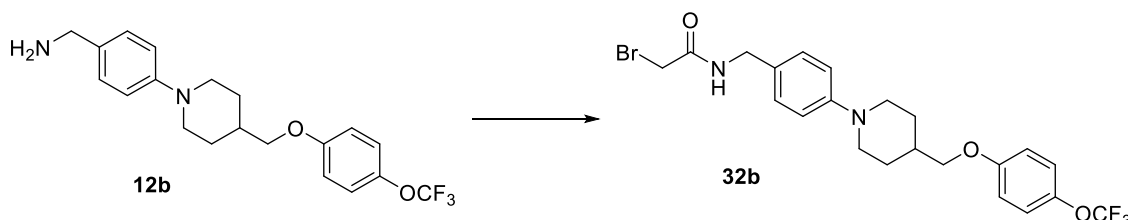
Izolace 2:

Bylo přidáno asi 5 lžiček $\text{Na}_2\text{SO}_4 \cdot 10 \text{H}_2\text{O}$ a pár kapek vody, až šedé zbarvení zesvětlalo. Poté byly přidány asi 3 lžičky bezvodého Na_2SO_4 . Suspenze byla míchána 5 minut a poté zfiltrována přes křemelinu. Filtrát s produktem **12b** byl zahuštěn na RVO a sušen na lyofilizátoru do dalšího dne. Surový produkt byl čištěn pomocí sloupcové chromatografie (SiO_2 , MF nejprve DCM/MeOH 18:1, $R_f = 0$, po vymytí nečistot změna MF na DCM/MeOH 7:3 + 5% TEA). Frakce obsahující produkt **12b** byly spojeny a odpařeny do sucha. Produkt **12b** byl získán jako světle žlutá amorfni pevná látka ve výtěžku 158,6 mg (78 %). Naměřená analytická data odpovídají hodnotám uvedeným v postupu *Izolace 1*.

6.3.4 Acylace aminu bromoctovou kyselinou



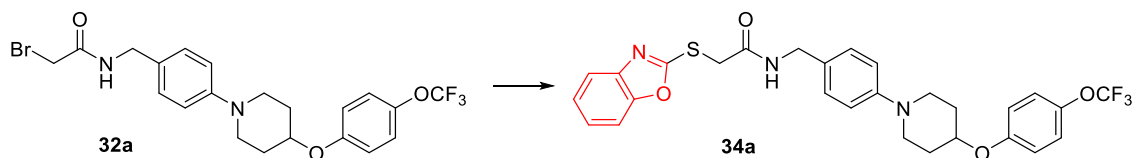
Do polypropylenové stříkačky opatřené fritou byla navážena kyselina bromoctová (0,55 mmol; 2 ekv.). Do stříkačky byl přidán roztok DIC (0,27 mmol; 1 ekv.) v 2 ml DCM. Reakční směs byla třepána 10 minut a poté byla suspenze zfiltrována do kádinky opatřené magnetickým míchadlem s naváženou látkou **12a** (0,27 mmol). K reakční směsi byl přidán DIEA (0,55 mmol; 2 ekv.). Směs byla ponechána na míchačce a byla monitorována pomocí LC-MS. Po hodině, kdy stupeň konverze dosáhl 60 % dle integrace z HPLC analýzy, byla reakční směs zahuštěna na RVO a surový produkt **32a** byl bez jakéhokoliv čištění použit pro další reakci.



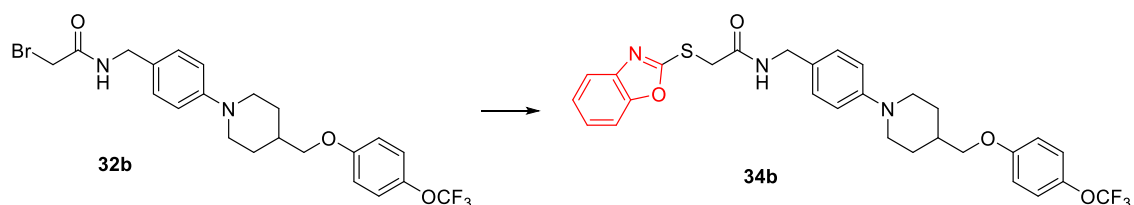
Do polypropylenové stříkačky opatřené fritou byla navážena kyselina bromoctová (0,27 mmol; 2 ekv.). Do stříkačky byl přidán roztok DIC (0,13 mmol; 1 ekv.) v 1 ml DCM. Reakční směs byla třepána 10 minut a poté byla suspenze zfiltrována do kádinky opatřené magnetickým míchadlem s naváženou látkou **12b** (0,13 mmol). K reakční směsi byl přidán DIEA (0,27 mmol; 2 ekv.). Směs byla ponechána na

míchače a byla monitorována pomocí LC-MS. Po hodině, kdy stupeň konverze dosáhl 100 % dle integrace z HPLC analýzy, byla reakční směs zahuštěna na RVO a surový produkt **32b** byl bez jakéhokoliv čištění použit pro další reakci.

6.3.5 Substituce benzoxazol-2-thiolem



K surovému produktu **32a** (0,27 mmol) bylo přidáno magnetické míchadlo, benzoxazol-2-thiol (0,32 mmol; 1,2 ekv.) a TEA (0,32 mmol; 1,2 ekv.). Směs byla rozpuštěna v 2 ml DCM a ponechána na míchače za laboratorní teploty. Reakce byla monitorována pomocí tenkovrstevné chromatografie. Po 1 hodině, kdy veškerá výchozí látka **32a** byla zreagována, byla reakční směs zahuštěna na RVO a surový produkt **34a** byl čištěn pomocí sloupcové chromatografie (SiO₂, MF hex/EtOAc 2:3). Frakce obsahující produkt **34a** byly spojeny a odpařeny do sucha. Produkt **34a** byl poté přečištěn rozpuštěním v ACN a vysrážením vodou. Sraženina byla odsáta a vysušena na lyofilizátoru do druhého dne. Produkt **34a** byl získán jako bílá krystalická látka ve výtěžku 30,3 mg (20 %). ¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ 8.70 (t, *J* = 5.8 Hz, 1H), 7.64 – 7.61 (m, 2H), 7.37 – 7.31 (m, 2H), 7.30 – 7.26 (m, 2H), 7.13 – 7.06 (m, 4H), 6.87 (d, *J* = 8.7 Hz, 2H), 4.57 (tt, *J* = 8.2, 3.8 Hz, 1H), 4.22 (d, *J* = 5.8 Hz, 2H), 4.17 (s, 2H), 3.47 (dt, *J* = 10.8, 4.5 Hz, 2H), 3.01 (ddd, *J* = 12.5, 9.2, 3.2 Hz, 2H), 2.07 – 1.99 (m, 2H), 1.70 (dtd, *J* = 12.6, 8.7, 3.6 Hz, 2H). ¹³C NMR (101 MHz, DMSO-*d*₆) δ 165.92, 163.86, 155.93, 151.29, 149.76, 141.70, 141.27, 128.91, 128.16, 124.61, 124.26, 122.52, 120.17 (q, *J* = 256.4 Hz), 118.21, 117.01, 115.69, 110.18, 72.64, 46.04, 42.13, 35.53, 29.85. HRMS: *m/z*: vypočteno pro C₂₈H₂₇F₃N₃O₄S⁺: 558.1669 [M+H]⁺; nalezeno: 558.1672.



K surovému produktu **32b** (0,13 mmol) bylo přidáno magnetické míchadlo, benzoxazol-2-thiol (0,16 mmol; 1,2 ekv.) a TEA (0,16 mmol; 1,2 ekv.). Směs byla rozpuštěna v 1 ml DCM a ponechána na míchače za laboratorní teploty. Reakce byla

monitorována pomocí tenkovrstevné chromatografie. Po 1 hodině, kdy veškerá výchozí látka **32b** byla zreagována, byla reakční směs zahuštěna na RVO a surový produkt **34b** byl čištěn pomocí sloupcové chromatografie (SiO₂, MF hex/EtOAc 2:3). Frakce obsahující produkt **34b** byly spojeny a odpařeny do sucha. Produkt **34b** byl poté přečištěn rozpuštěním v ACN a vysrážením vodou. Sraženina byla odsáta a vysušena na lyofilizátoru do druhého dne. Produkt **34b** byl získán jako bílá krystalická látka ve výtěžku 17,6 mg (23 %). ¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ 8.69 (t, *J* = 5.8 Hz, 1H), 7.64 – 7.61 (m, 2H), 7.38 – 7.30 (m, 2H), 7.29 – 7.25 (m, 2H), 7.12 – 7.08 (m, 2H), 7.03 (d, *J* = 9.1 Hz, 2H), 6.85 (d, *J* = 8.7 Hz, 2H), 4.21 (d, *J* = 5.9 Hz, 2H), 4.17 (s, 2H), 3.88 (d, *J* = 6.3 Hz, 2H), 3.72 – 3.63 (m, 2H), 2.65 (td, *J* = 12.2, 2.5 Hz, 2H), 1.95 – 1.88 (m, 1H), 1.87 – 1.80 (m, 2H), 1.46 – 1.33 (m, 2H). ¹³C NMR (101 MHz, DMSO-*d*₆) δ 165.90, 163.85, 157.59, 151.28, 150.36, 141.64, 141.26, 128.77, 128.10, 124.59, 124.24, 122.45, 120.17 (q, *J* = 256.0 Hz), 118.20, 115.77, 115.61, 110.17, 72.39, 48.64, 42.14, 35.53, 35.22, 28.05. HRMS: *m/z*: vypočteno pro C₂₉H₂₉F₃N₃O₄S⁺: 572.1825 [M+H]⁺; nalezeno: 572.1830.

7 Závěr

V rámci této diplomové práce byla věnována pozornost dvěma známým heterocyklickým farmakoforům - pyrimidinu a benzoxazolu. V závislosti na tom je práce rozdělena do dvou hlavních částí, každá z nich využívající jiný syntetický přístup.

V první části diplomové práce bylo připraveno 27 nových derivátů pyrimidinu s využitím rychlé a efektivní syntézy na pevné fázi. Zvolený přístup zavádí strukturní rozmanitosti z běžně se vyskytujících a komerčně dostupných výchozích materiálů s minimálním množstvím syntetických operací. Tento přístup může napomoci rychlé identifikaci vztahu mezi strukturou a aktivitou (SAR) a vývoji dalších medicíně chemických projektů založených na slibném pyrimidinovém jádře.

Dále byla testována jejich antimikrobiální aktivita proti *M. tuberculosis*, vybraným druhům Gram-pozitivních a Gram-negativních bakterií a dvěma fungálním kmenům. Sloučenina **2f** vykazovala mírnou antimykobakteriální aktivitu s MIC hodnotou 32 µg/ml, zatímco MIC hodnoty několika dalších látek se pohybovaly v rozmezí 128 – 1024 µg/ml a ukázaly se tedy být neaktivní. Vedle toho některé z testovaných sloučenin ukázaly nepatrnou antibakteriální aktivitu proti *S. aureus* a *E. faecalis* (MIC hodnota 512 µg/ml). Nejvyšší aktivita byla pozorována u látky **1b** proti *P. aeruginosa* s MIC hodnotou dokonce nižší (2 µg/ml) než MIC hodnota standardu gentamicinu (4 µg/ml). Tyto údaje naznačují, že třída pyrimidinů má značný potenciál, protože se strukturně odlišují od známých anti-TB léčiv a mohou mít dokonce jiný mechanismus účinku. Nicméně, je potřeba vyvinout další úsilí, abychom prokázali potenciál našich sloučenin a objevili nová léčiva proti tuberkulóze, která by mohla předejít vzniku rezistence.

Druhá část práce se věnuje syntéze derivátů benzoxazolu odvozených od látky Q203, vykazující vysokou antimykobakteriální aktivitu, a která je v současné době ve fázi klinického testování. Pro přípravu těchto derivátů byl zvolen klasický syntetický přístup v roztoku inspirovaný reakční sekvencí popsanou v literatuře. Bylo však nutné některé kroky optimalizovat, či modifikovat. Problém poté nastal ve chvíli, kdy bylo potřeba připravit benzoxazol-2-karboxylovou kyselinu, případně benzoxazol-2-karbonylchlorid, či ethyl benzoxazol-2-karboxylát pro reakci s amino skupinou struktury odvozené od látky Q203 za tvorby amidické vazby, což představuje poslední krok syntézy. Byly vyzkoušeny různé metody, bohužel ani jedna z nich nebyla úspěšná. Proto byla zvolena alternativní cesta použít benzoxazol-2-thiol, který je komerčně

dostupný a propojit ho s kostrou základní struktury pomocí bromoctové kyseliny. Tímto způsobem byly připraveny dvě finální látky, které budou v nejbližší době testovány z hlediska jejich biologických vlastností.

8 Seznam použité literatury

- (1) Sahu, M.; Siddiqui, N. *Int. J. Pharm. Pharm. Sci.* **2016**, *8*, 8.
- (2) Kale, M.; Chavan, V. *Mini-Rev. Org. Chem.* **2019**, *16*, 111.
- (3) Slachtova, V.; Brulikova, L. *ChemistrySelect* **2018**, *3*, 4653.
- (4) Cellier, M.; Fabrega, O. J.; Fazackerley, E.; James, A. L.; Orega, S.; Perry, J. D.; Salwatura, V. L.; Stanforth, S. P. *Bioorganic & Medicinal Chemistry* **2011**, *19*, 2903.
- (5) Braun, S.; Botzki, A.; Salmen, S.; Textor, C.; Bernhardt, G.; Dove, S.; Buschauer, A. *European Journal of Medicinal Chemistry* **2011**, *46*, 4419.
- (6) Kozic, J.; Novotná, E.; Volková, M.; Stolaříková, J.; Trejtnar, F.; Wsól, V.; Vinšová, J. *European Journal of Medicinal Chemistry* **2012**, *56*, 108.
- (7) Kablaoui, N.; Patel, S.; Shao, J.; Demian, D.; Hoffmaster, K.; Berlioz, F.; Vazquez, M. L.; Moore, W. M.; Nugent, R. A. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* **2013**, *23*, 907.
- (8) Jiang, J.; Tang, X.; Dou, W.; Zhang, H.; Liu, W.; Wang, C.; Zheng, J. *Journal of Inorganic Biochemistry* **2010**, *104*, 583.
- (9) Kamal, A.; Reddy, K. S.; Khan, M. N. A.; Shetti, R. V. C. R. N. C.; Ramaiah, M. J.; Pushpavalli, S. N. C. V. L.; Srinivas, C.; Pal-Bhadra, M.; Chourasia, M.; Sastry, G. N.; Juvekar, A.; Zingde, S.; Barkume, M. *Bioorganic & Medicinal Chemistry* **2010**, *18*, 4747.
- (10) Vijesh, A. M.; Isloor, A. M.; Shetty, P.; Sundershan, S.; Fun, H. K. *European Journal of Medicinal Chemistry* **2013**, *62*, 410.
- (11) Boyer, J.; Arnoult, E.; Médebielle, M.; Guillemont, J.; Unge, J.; Jochmans, D. *Journal of Medicinal Chemistry* **2011**, *54*, 7974.
- (12) Soni, H. M.; Patel, P. K.; Chhabria, M. T.; Patel, A. K.; Rana, D. N.; Brahmshatriya, P. S. *Int. J. Org. Chem.* **2016**, *6*, 157.
- (13) Rana, D. N.; Chhabria, M. T.; Shah, N. K.; Brahmshatriya, P. S. *Med. Chem. Res.* **2014**, *23*, 2218.
- (14) Rodriguez, I. I.; Rodriguez, A. D.; Wang, Y.; Franzblau, S. G. *Tetrahedron Lett.* **2006**, *47*, 3229.
- (15) Vinsova, J.; Cermakova, K.; Tomeckova, A.; Ceckova, M.; Jampilek, J.; Cermak, P.; Kunes, J.; Dolezal, M.; Staud, F. *Bioorg. Med. Chem.* **2006**, *14*, 5850.
- (16) Klimesova, V.; Koci, J.; Waisser, K.; Kaustova, J.; Moellmann, U. *Eur. J. Med. Chem.* **2009**, *44*, 2286.
- (17) Koci, J.; Klimesova, V.; Waisser, K.; Kaustova, J.; Dahse, H.-M.; Moellmann, U. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2002**, *12*, 3275.
- (18) Wang, T.; Bemis, G.; Hanzelka, B.; Zuccola, H.; Wynn, M.; Moody, C. S.; Green, J.; Locher, C.; Liu, A.; Gao, H.; Xu, Y.; Wang, S.; Wang, J.; Bennani, Y. L.; Thomson, J. A.; Müh, U. *ACS Medicinal Chemistry Letters* **2017**, *8*, 1224.
- (19) Bhuva, N. H.; Talpara, P. K.; Singala, P. M.; Gothaliya, V. K.; Shah, V. H. *Journal of Saudi Chemical Society* **2017**, *21*, 517.
- (20) Wilson, C. R.; Gessner, R. K.; Moosa, A.; Seldon, R.; Warner, D. F.; Mizrahi, V.; Soares de Melo, C.; Simelane, S. B.; Nchinda, A.; Abay, E.; Taylor, D.; Njoroge, M.; Brunschwig, C.; Lawrence, N.; Boshoff, H. I. M.; Barry, C. E.; Sirgel, F. A.; van Helden, P.; Harris, C. J.; Gordon, R.; Ghidelli-Disse, S.; Pflaumer, H.; Boesche, M.; Drewes, G.; Sanz, O.; Santos, G.; Rebollo-Lopez, M. J.; Urones, B.; Selenski, C.; Lafuente-Monasterio, M. J.; Axtman, M.; Lelièvre, J.; Ballell, L.; Mueller, R.; Street, L. J.; Ghorpade, S. R.; Chibale, K. *Journal of Medicinal Chemistry* **2017**, *60*, 10118.

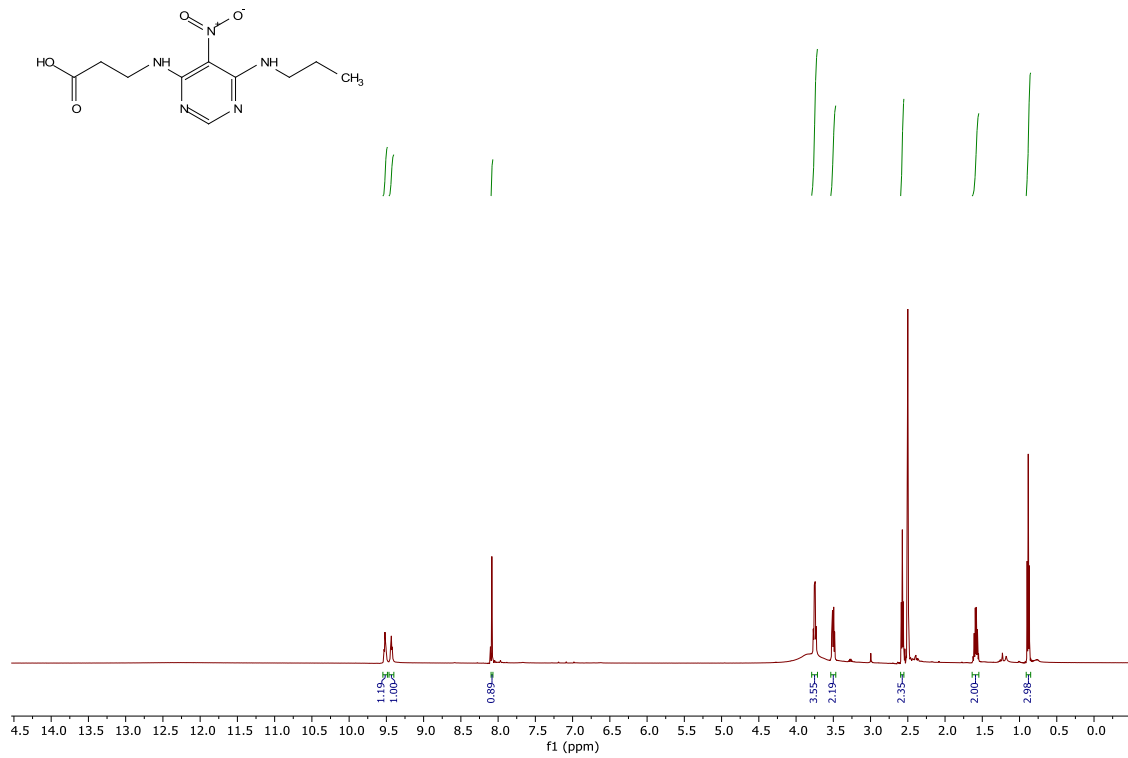
- (21) Verbitskiy, E. V.; Baskakova, S. A.; Kravchenko, M. A.; Skorniyakov, S. N.; Rusinov, G. L.; Chupakhin, O. N.; Charushin, V. N. *Bioorganic & Medicinal Chemistry* **2016**, *24*, 3771.
- (22) Seenaiah, D.; Reddy, P. R.; Reddy, G. M.; Padmaja, A.; Padmavathi, V.; Siva krishna, N. *European Journal of Medicinal Chemistry* **2014**, *77*, 1.
- (23) Ballell, L.; Bates, R. H.; Young, R. J.; Alvarez-Gomez, D.; Alvarez-Ruiz, E.; Barroso, V.; Blanco, D.; Crespo, B.; Escribano, J.; González, R.; Lozano, S.; Huss, S.; Santos-Villarejo, A.; Martín-Plaza, J. J.; Mendoza, A.; Rebollo-Lopez, M. J.; Remuiñan-Blanco, M.; Lavandera, J. L.; Pérez-Herran, E.; Gamo-Benito, F. J.; García-Bustos, J. F.; Barros, D.; Castro, J. P.; Cammack, N. *ChemMedChem* **2013**, *8*, 313.
- (24) Sura, M. R.; Peddiahgari, V. G. R.; Bhoomireddy, R. P. R.; Vadde, R. K. *Journal of Heterocyclic Chemistry* **2013**, *50*, 1395.
- (25) Kishor, C.; Arya, T.; Reddi, R.; Chen, X.; Saddanapu, V.; Marapaka, A. K.; Gumpena, R.; Ma, D.; Liu, J. O.; Adlagatta, A. *Journal of Medicinal Chemistry* **2013**, *56*, 5295.
- (26) Read, M. L.; Brændvang, M.; Miranda, P. O.; Gundersen, L.-L. *Bioorganic & Medicinal Chemistry* **2010**, *18*, 3885.
- (27) Reddy, D. S.; Hosamani, K. M.; Devarajegowda, H. C. *European Journal of Medicinal Chemistry* **2015**, *101*, 705.
- (28) Prachayasittikul, S.; Pingaew, R.; Worachartcheewan, A.; Sinthupoom, N.; Prachayasittikul, V.; Ruchirawat, S.; Prachayasittikul, V. *Mini-Rev. Med. Chem.* **2017**, *17*, 869.
- (29) Keche, A. P.; Hatnapure, G. D.; Tale, R. H.; Rodge, A. H.; Birajdar, S. S.; Kamble, V. M. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2012**, *22*, 3445.
- (30) Yang, Z.; Fang, Y.; Pham, T.-A. N.; Lee, J.; Park, H. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2013**, *23*, 1519.
- (31) Shakya, N.; VEDI, S.; Liang, C.; Yang, F.; Agrawal, B.; Kumar, R. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2014**, *24*, 1407.
- (32) Kang, S.; Kim, R. Y.; Seo, M. J.; Lee, S.; Kim, Y. M.; Seo, M.; Seo, J. J.; Ko, Y.; Choi, I.; Jang, J.; Nam, J.; Park, S.; Kang, H.; Kim, H. J.; Kim, J.; Ahn, S.; Pethe, K.; Nam, K.; No, Z.; Kim, J. *Journal of Medicinal Chemistry* **2014**, *57*, 5293.
- (33) Kang, S.; Kim, Y. M.; Kim, R. Y.; Seo, M. J.; No, Z.; Nam, K.; Kim, S.; Kim, J. *European Journal of Medicinal Chemistry* **2017**, *125*, 807.
- (34) Rajasekhar, S.; Maiti, B.; Chanda, K. *Synlett* **2017**, *28*, 521.
- (35) Kumar, R. V. *Asian J. Chem.* **2004**, *16*, 1241.
- (36) Kaul, S.; Kumar, A.; Sain, B.; Bhatnagar, A. K. *Synthetic Communications* **2007**, *37*, 2457.
- (37) Wang, B.; Zhang, Y.; Li, P.; Wang, L. *Chinese Journal of Chemistry* **2010**, *28*, 1697.
- (38) Chancellor, D. R.; Davies, K. E.; De Moor, O.; Dorgan, C. R.; Johnson, P. D.; Lambert, A. G.; Lawrence, D.; Lecci, C.; Maillol, C.; Middleton, P. J.; Nugent, G.; Poignant, S. D.; Potter, A. C.; Price, P. D.; Pye, R. J.; Storer, R.; Tinsley, J. M.; van Well, R.; Vickers, R.; Vile, J.; Wilkes, F. J.; Wilson, F. X.; Wren, S. P.; Wynne, G. M. *Journal of Medicinal Chemistry* **2011**, *54*, 3241.
- (39) Kumar, A.; Maurya, R. A.; Ahmad, P. *Journal of Combinatorial Chemistry* **2009**, *11*, 198.
- (40) Riadi, Y.; Mamouni, R.; Azzalou, R.; Haddad, M. E.; Routier, S.; Guillaumet, G.; Lazar, S. *Tetrahedron Letters* **2011**, *52*, 3492.
- (41) Madhusudana Reddy, M. B.; Nizam, A.; Pasha, M. A. *Synthetic Communications* **2011**, *41*, 1838.

- (42) Mohammadpoor-Baltork, I.; Khosropour, A. R.; Hojati, S. F. *Catalysis Communications* **2007**, *8*, 1865.
- (43) Viirre, R. D.; Evindar, G.; Batey, R. A. *The Journal of Organic Chemistry* **2008**, *73*, 3452.
- (44) Ueda, S.; Nagasawa, H. *The Journal of Organic Chemistry* **2009**, *74*, 4272.
- (45) Naidu, A. B.; Sekar, G. *Synthesis* **2010**, 2010, 579.
- (46) Saha, P.; Ali, M. A.; Ghosh, P.; Punniyamurthy, T. *Org. Biomol. Chem.* **2010**, *8*, 5692.
- (47) Tao, K.; Zheng, J.; Liu, Z.; Shen, W.; Zhang, J. *Tetrahedron Letters* **2010**, *51*, 3246.
- (48) Fan, X.; He, Y.; Zhang, X.; Guo, S.; Wang, Y. *Tetrahedron* **2011**, *67*, 6369.
- (49) Chen, W.-H.; Pang, Y. *Tetrahedron Letters* **2009**, *50*, 6680.
- (50) Xing, R.-G.; Li, Y.-N.; Liu, Q.; Meng, Q.-Y.; Li, J.; Shen, X.-X.; Liu, Z.; Zhou, B.; Yao, X.; Liu, Z.-L. *Eur. J. Org. Chem.* **2010**, 6627.
- (51) Cioffi, C. L.; Lansing, J. J.; Yuksel, H. *J. Org. Chem.* **2010**, *75*, 7942.
- (52) Bhor, M. D.; Bhanage, B. M. *Synth. Commun.* **2010**, *40*, 1743.
- (53) Okitsu, T.; Nagase, K.; Nishio, N.; Wada, A. *Org. Lett.* **2012**, *14*, 708.
- (54) Wu, M.; Hu, X.; Liu, J.; Liao, Y.; Deng, G.-J. *Org. Lett.* **2012**, *14*, 2722.
- (55) Mayo, M. S.; Yu, X.; Zhou, X.; Feng, X.; Yamamoto, Y.; Bao, M. *J. Org. Chem.* **2014**, *79*, 6310.
- (56) Xie, H.-Z.; Gao, Q.; Liang, Y.; Wang, H.-S.; Pan, Y.-M. *Green Chem.* **2014**, *16*, 2132.
- (57) Boominathan, S. S. K.; Hu, W.-P.; Senadi, G. C.; Vandavasi, J. K.; Wang, J.-J. *Chem. Commun. (Cambridge, U. K.)* **2014**, *50*, 6726.
- (58) Garduno, J. A.; Garcia, J. J. *ACS Catal.* **2015**, *5*, 3470.
- (59) Zhang, X.; Huang, R.; Marrot, J.; Coeffard, V.; Xiong, Y. *Tetrahedron* **2015**, *71*, 700.
- (60) Zhang, G.; Wang, P.; Yang, F.; Wu, Y. *Tetrahedron* **2015**, *71*, 57.
- (61) Jiang, J.; Zou, H.; Dong, Q.; Wang, R.; Lu, L.; Zhu, Y.; He, W. *J. Org. Chem.* **2016**, *81*, 51.
- (62) Spatz, J. H.; Bach, T.; Umkehrer, M.; Bardin, J.; Ross, G.; Burdack, C.; Kolb, J. *Tetrahedron Lett.* **2007**, *48*, 9030.
- (63) Boissarie, P. J.; Hamilton, Z. E.; Lang, S.; Murphy, J. A.; Suckling, C. J. *Org. Lett.* **2011**, *13*, 6256.
- (64) Varadi, A.; Palmer, T. C.; Notis, P. R.; Redel-Traub, G. N.; Afonin, D.; Subrath, J. J.; Pasternak, G. W.; Hu, C.; Sharma, I.; Majumdar, S. *Org. Lett.* **2014**, *16*, 1668.
- (65) Song, X.-R.; Qiu, Y.-F.; Song, B.; Hao, X.-H.; Han, Y.-P.; Gao, P.; Liu, X.-Y.; Liang, Y.-M. *J. Org. Chem.* **2015**, *80*, 2263.
- (66) Wang, F.; Hauske, J. R. *Tetrahedron Letters* **1997**, *38*, 6529.
- (67) Beebe, X.; Wodka, D.; Sowin, T. J. *Journal of Combinatorial Chemistry* **2001**, *3*, 360.
- (68) Chen, C.; Chen, Y.-J. *Tetrahedron Lett.* **2004**, *45*, 113.
- (69) Hwang, J. Y.; Gong, Y.-D. *Journal of Combinatorial Chemistry* **2006**, *8*, 297.
- (70) Hioki, H.; Matsushita, K.; Kubo, M.; Harada, K.; Kodama, M.; Fukuyama, Y. *Tetrahedron* **2007**, *63*, 11315.
- (71) Radi, M.; Saletti, S.; Botta, M. *Tetrahedron Lett.* **2008**, *49*, 4464.
- (72) Lim, H.-J.; Myung, D.; Lee, I. Y. C.; Jung, M. H. *J. Comb. Chem.* **2008**, *10*, 501.
- (73) Chanda, K.; Maiti, B.; Yellol, G. S.; Chien, M.-H.; Kuo, M.-L.; Sun, C.-M. *Org. Biomol. Chem.* **2011**, *9*, 1917.

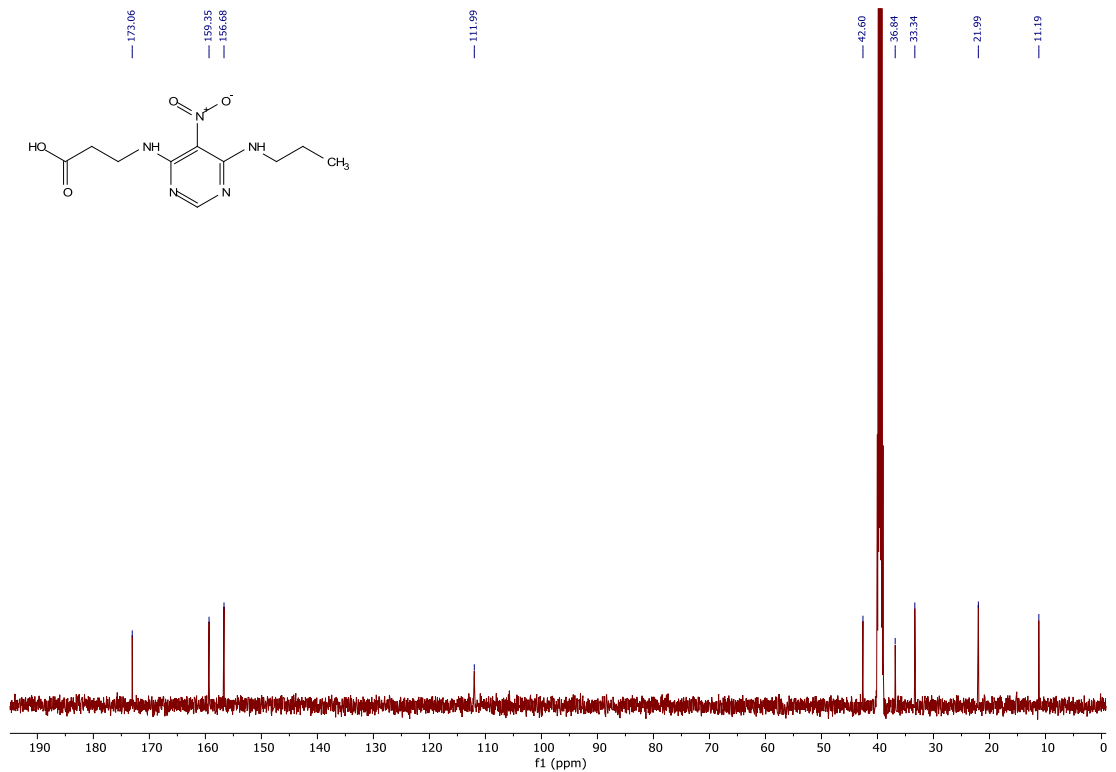
- (74) Siracusa, M. A.; Salerno, L.; Modica, M. N.; Pittalà, V.; Romeo, G.; Amato, M. E.; Nowak, M.; Bojarski, A. J.; Mereghetti, I.; Cagnotto, A.; Mennini, T. *Journal of Medicinal Chemistry* **2008**, *51*, 4529.
- (75) Loidreau, Y.; Marchand, P.; Dubouilh-Benard, C.; Nourrisson, M.-R.; Duflos, M.; Loaëc, N.; Meijer, L.; Besson, T. *European Journal of Medicinal Chemistry* **2013**, *59*, 283.
- (76) Perspicace, E.; Jouan-Hureaux, V.; Ragno, R.; Ballante, F.; Sartini, S.; La Motta, C.; Da Settimo, F.; Chen, B.; Kirsch, G.; Schneider, S.; Faivre, B.; Hesse, S. *Eur. J. Med. Chem.* **2013**, *63*, 765.
- (77) Qin, W.-W.; Sang, C.-Y.; Zhang, L.-L.; Wei, W.; Tian, H.-Z.; Liu, H.-X.; Chen, S.-W.; Hui, L. *Eur. J. Med. Chem.* **2015**, *95*, 174.
- (78) Amr, A. E. G. E.; Sayed, H. H.; Abdulla, M. M. *Archiv der Pharmazie: An International Journal Pharmaceutical and Medicinal Chemistry* **2005**, *338*, 433.
- (79) Koga, Y.; Sakamaki, S.; Hongu, M.; Kawanishi, E.; Sakamoto, T.; Yamamoto, Y.; Kimata, H.; Nakayama, K.; Kuriyama, C.; Matsushita, Y.; Ueta, K.; Tsuda-Tsukimoto, M.; Nomura, S. *Bioorg. Med. Chem.* **2013**, *21*, 5561.
- (80) Hwang, J. Y.; Windisch, M. P.; Jo, S.; Kim, K.; Kong, S.; Kim, H. C.; Kim, S.; Kim, H.; Lee, M. E.; Kim, Y.; Choi, J.; Park, D.-S.; Park, E.; Kwon, J.; Nam, J.; Ahn, S.; Cechetto, J.; Kim, J.; Liuzzi, M.; No, Z.; Lee, J. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2012**, *22*, 7297.
- (81) Desai, N. C.; Makwana, A. H.; Senta, R. D. *Journal of Saudi Chemical Society* **2016**, *20*, 686.
- (82) Majumdar, S.; Duvvuri, S.; Mitra, A. K. *Adv. Drug Delivery Rev.* **2004**, *56*, 1437.
- (83) Singh, V. K.; Subudhi, B. B. *Med. Chem. Res.* **2015**, *24*, 624.
- (84) Krylov, I. S.; Kashemirov, B. A.; Hilfinger, J. M.; McKenna, C. E. *Mol. Pharmaceutics* **2013**, *10*, 445.
- (85) Krasnov, V. P.; Vigorov, A. Y.; Musiyak, V. V.; Nizova, I. A.; Gruzdev, D. A.; Matveeva, T. V.; Levit, G. L.; Kravchenko, M. A.; Skorniyakov, S. N.; Bekker, O. B.; Danilenko, V. N.; Charushin, V. N. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2016**, *26*, 2645.
- (86) Voynikov, Y.; Valcheva, V.; Momekov, G.; Peikov, P.; Stavrakov, G. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2014**, *24*, 3043.
- (87) Beena; Rawat, D. S. *Med. Res. Rev.* **2013**, *33*, 693.
- (88) Poce, G.; Cocozza, M.; Consalvi, S.; Biava, M. *Eur. J. Med. Chem.* **2014**, *86*, 335.
- (89) Sucheta; Tahlan, S.; Verma, P. K. *Chem Cent J* **2017**, *11*, 130.
- (90) Ozdemir, Z.; Bildziukevich, U.; Saman, D.; Havlicek, L.; Rarova, L.; Navratilova, L.; Wimmer, Z. *Steroids* **2017**, *128*, 58.
- (91) Palomino, J.-C.; Martin, A.; Camacho, M.; Guerra, H.; Swings, J.; Portaels, F. *Antimicrob. Agents Chemother.* **2002**, *46*, 2720.
- (92) Nguyen, P. C.; Madani, A.; Santucci, P.; Martin, B. P.; Paudel, R. R.; Delattre, S.; Herrmann, J.-L.; Spilling, C. D.; Kremer, L.; Canaan, S.; Cavalier, J.-F. *Int. J. Antimicrob. Agents* **2018**, *51*, 651.
- (93) Maruthamuthu, D.; Rajam, S.; Stella, C. R.; Ranjith; Rajakumar *World J. Pharm. Res.* **2014**, *3*, 675.
- (94) Loev, B.; Jones, H.; Brown, R. E.; Huang, F. C.; Khandwala, A.; Leibowitz, M. J.; Sonnino-Goldman, P. *J. Med. Chem.* **1985**, *28*, 24.
- (95) Dhameliya, T. M.; Chourasiya, S. S.; Mishra, E.; Jadhavar, P. S.; Bharatam, P. V.; Chakraborti, A. K. *J. Org. Chem.* **2017**, *82*, 10077.

Přílohy – NMR spektra

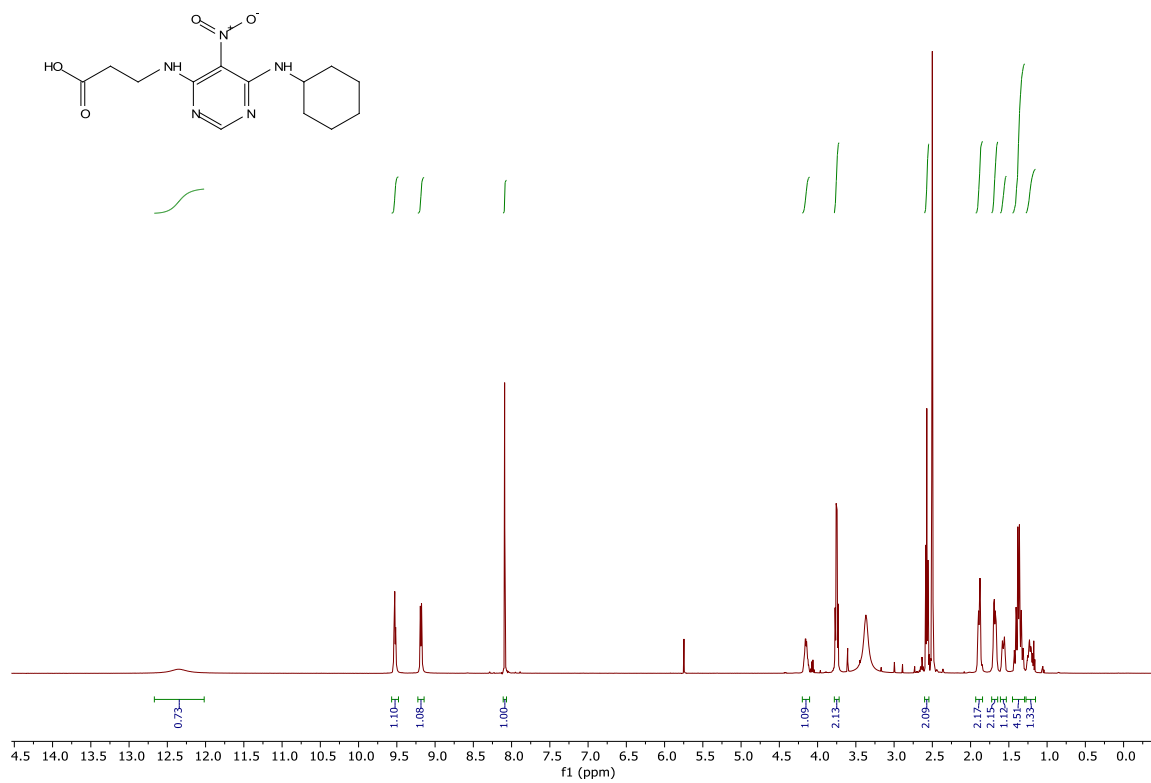
Spektrum 4: ^1H spektrum látky **1a**



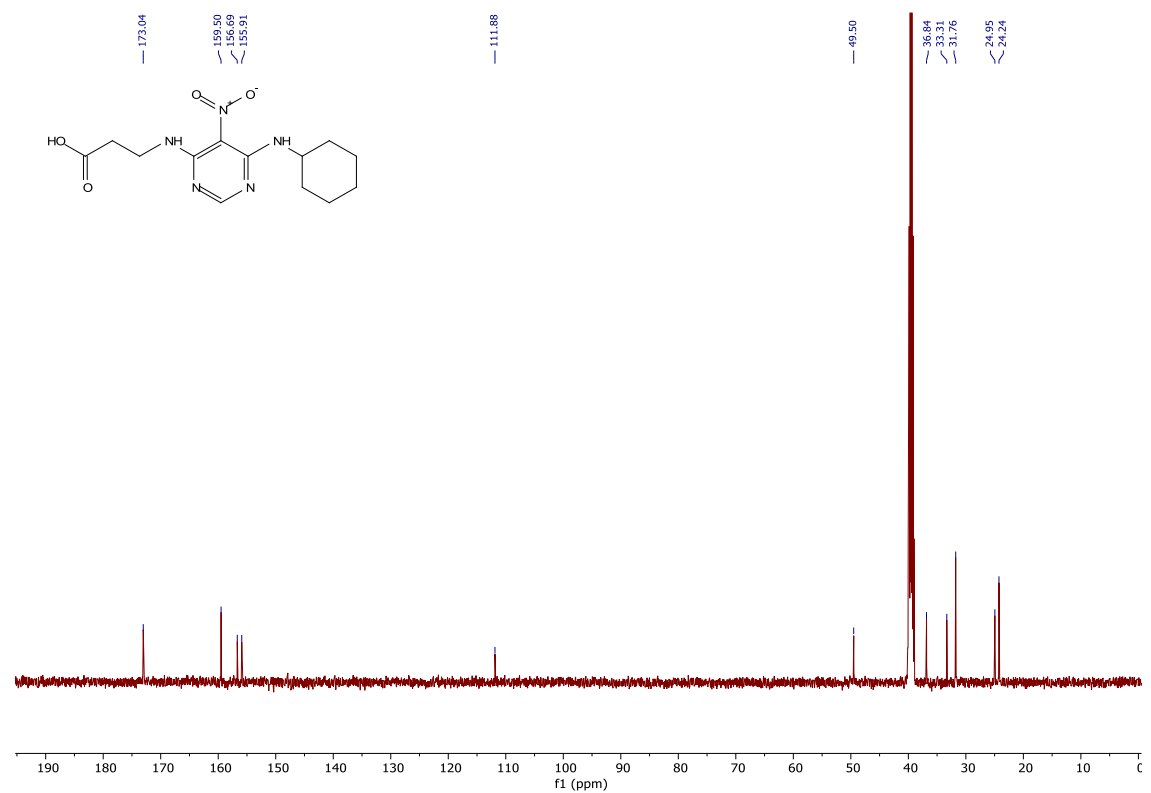
Spektrum 5: ^{13}C spektrum látky **1a**



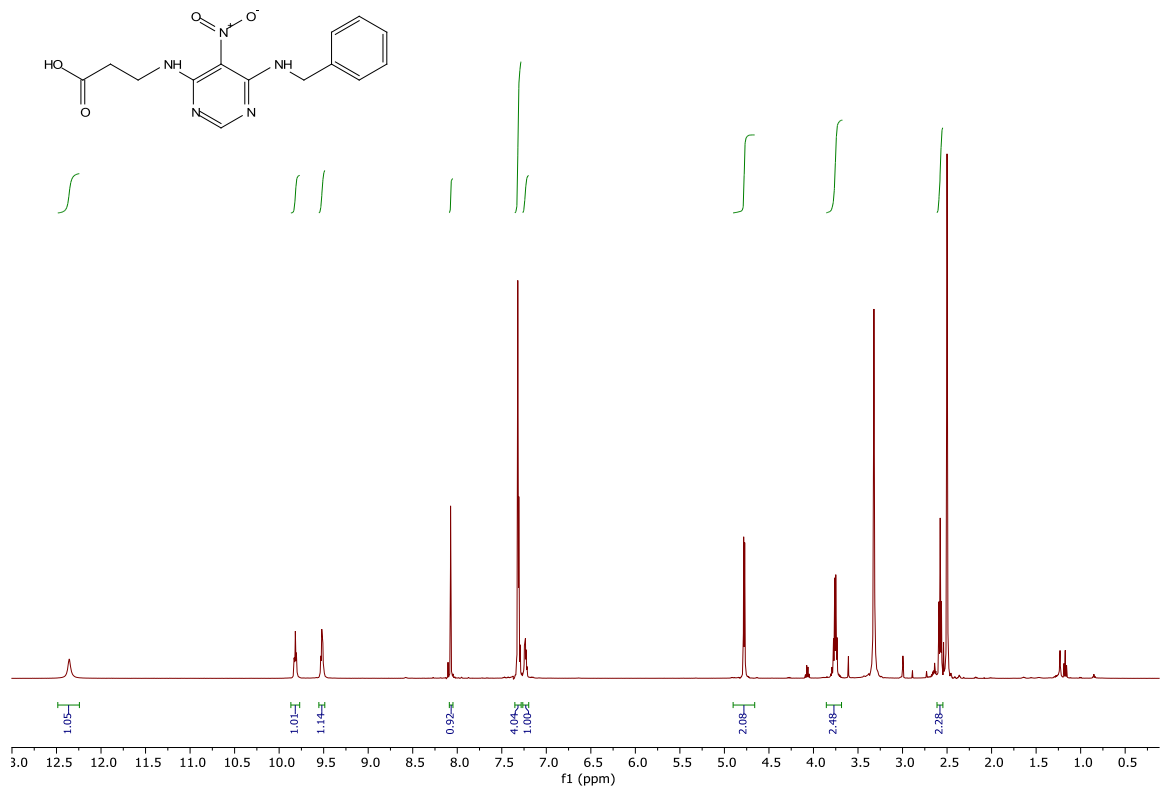
Spektrum 6: ^1H spektrum látky **1b**



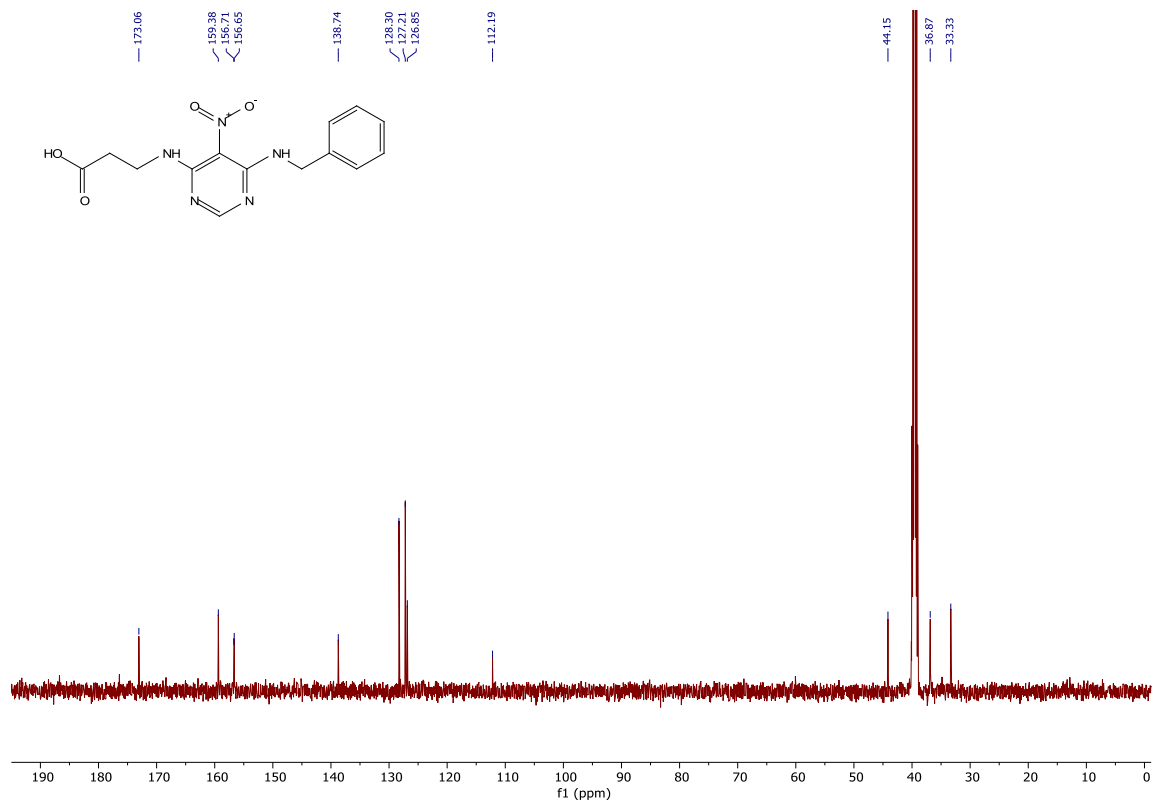
Spektrum 7: ^{13}C spektrum látky **1b**



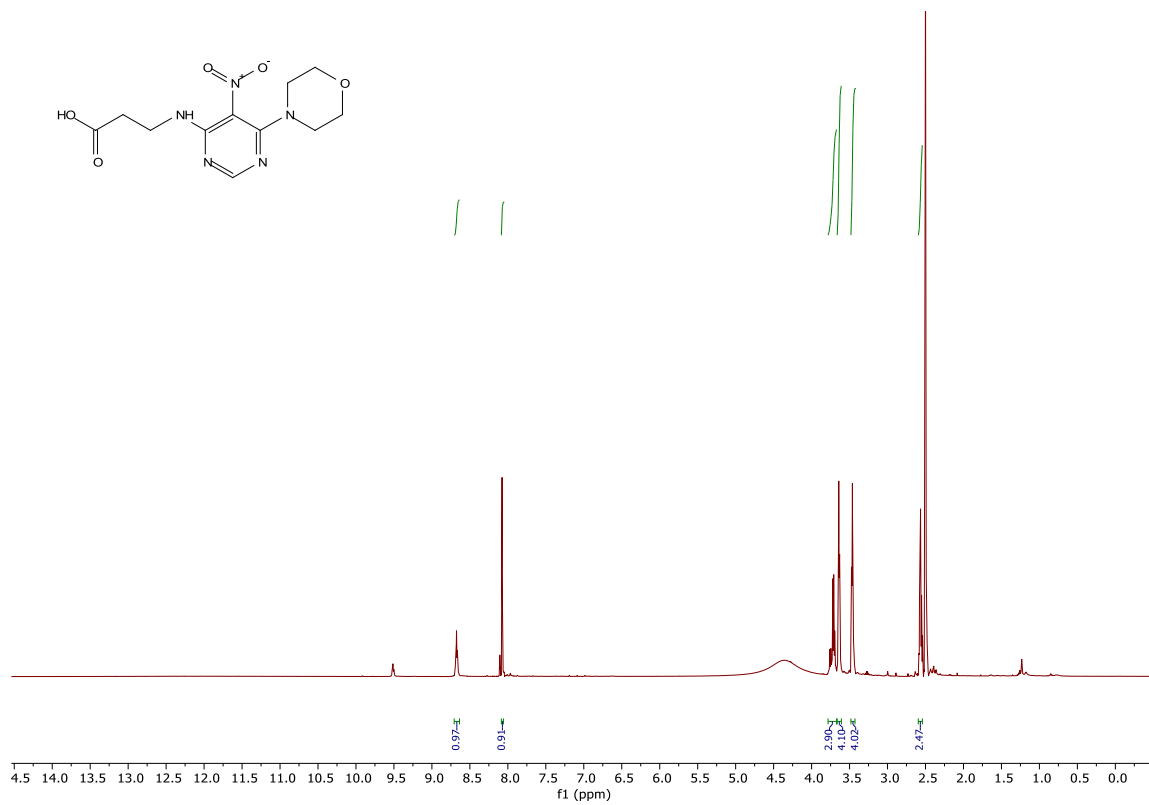
Spektrum 8: ¹H spektrum látky 1c



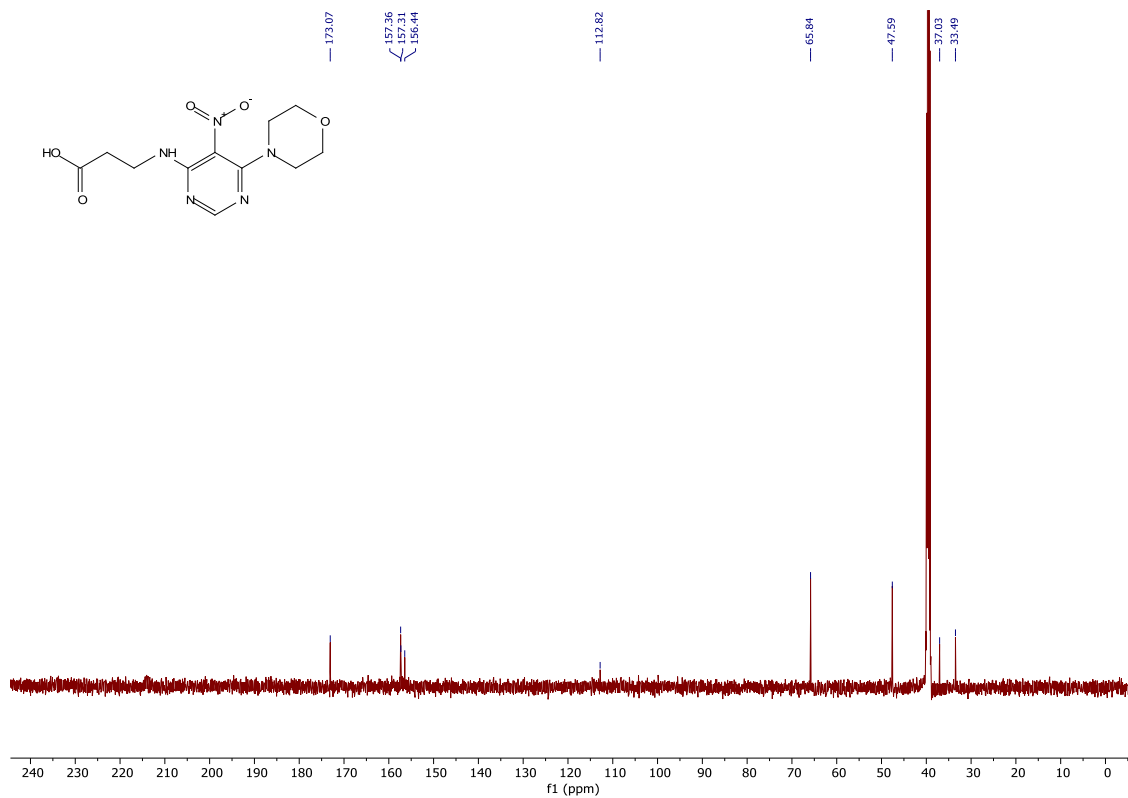
Spektrum 9: ¹³C spektrum látky 1c



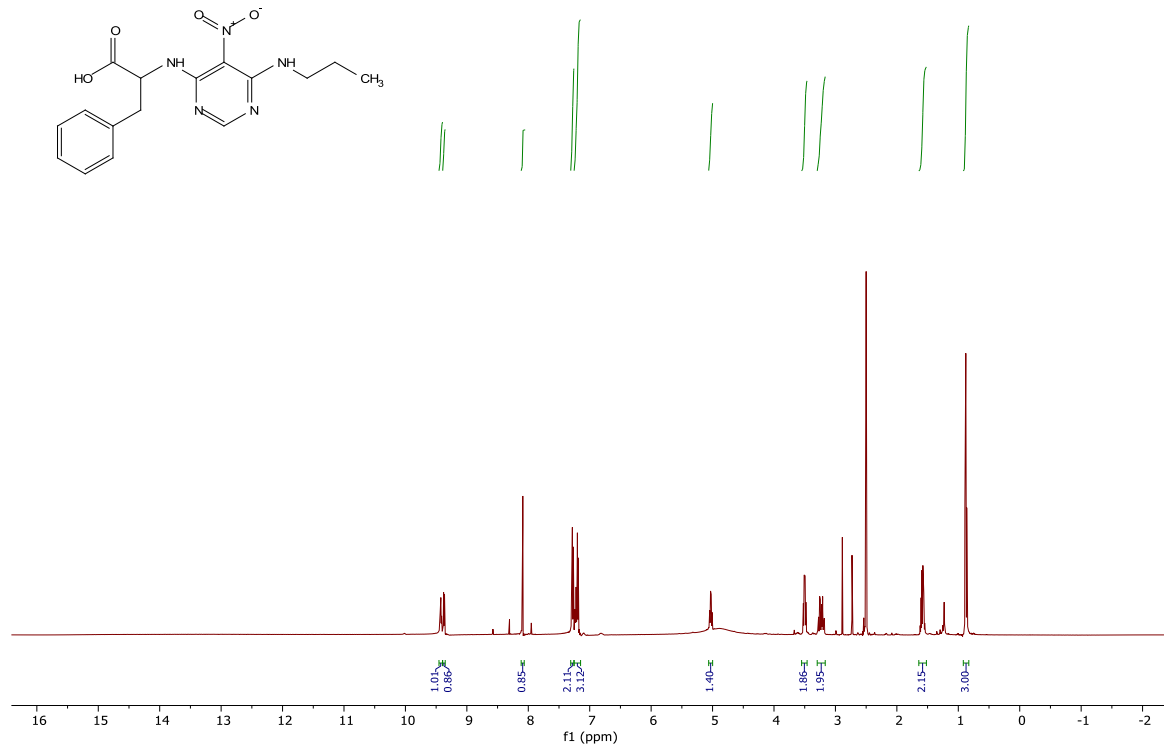
Spektrum 10: ^1H spektrum látky **1d**



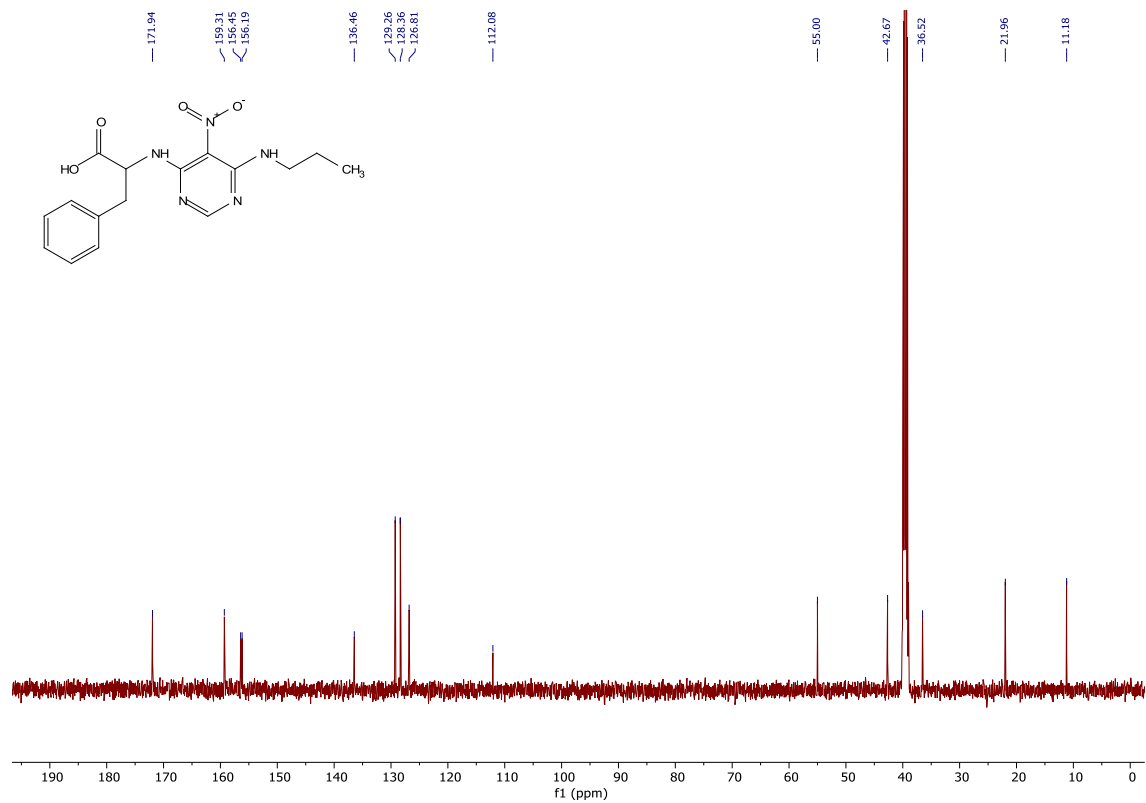
Spektrum 11: ^{13}C spektrum látky **1d**



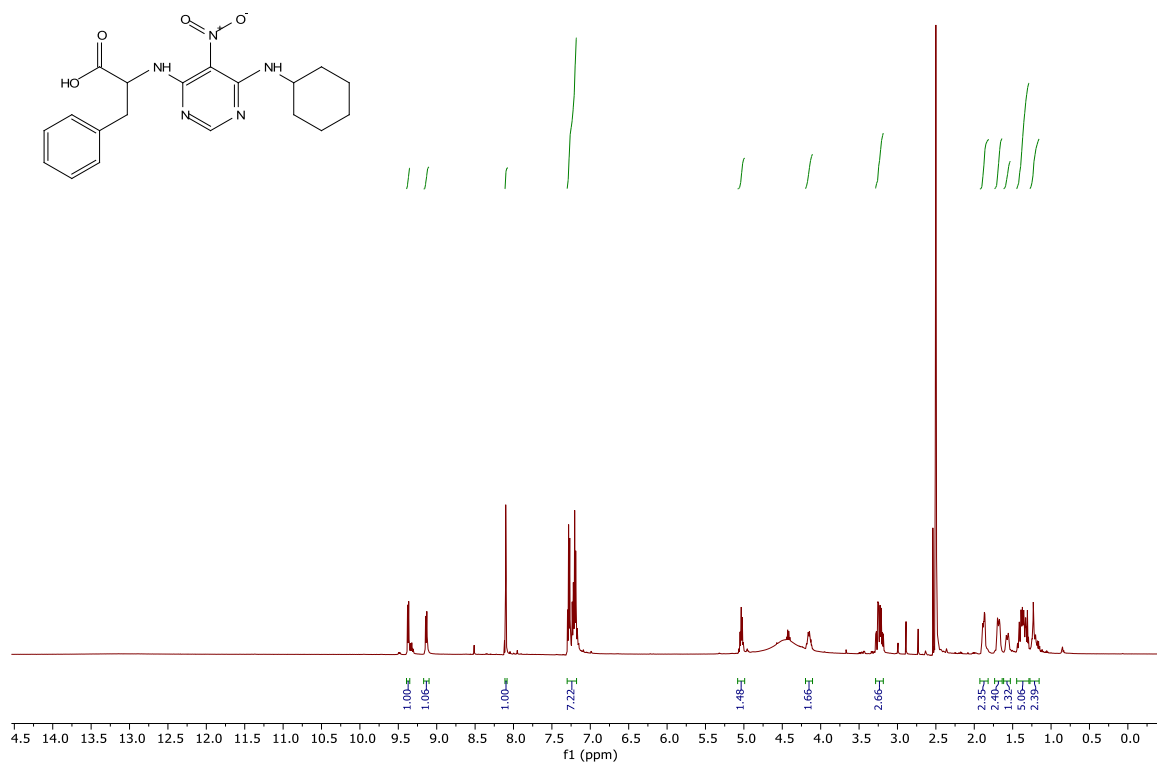
Spektrum 12: ^1H spektrum látky **1e**



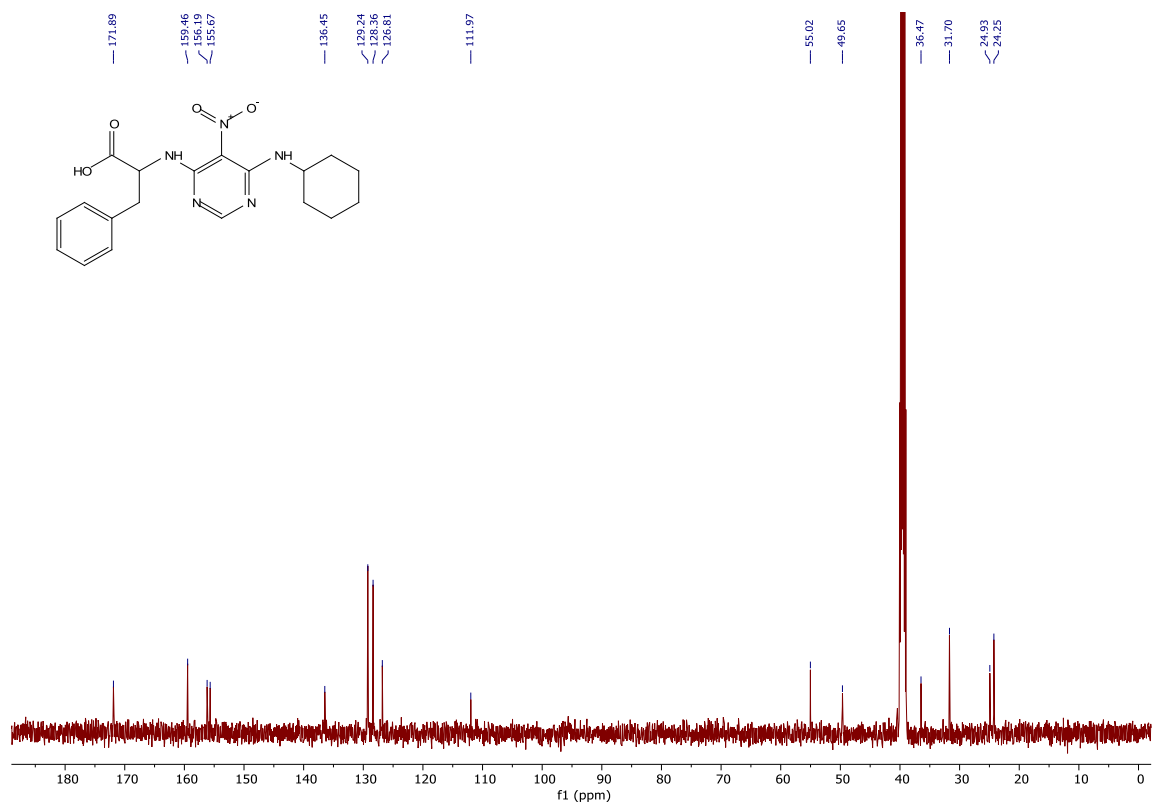
Spektrum 13: ^{13}C spektrum látky **1e**



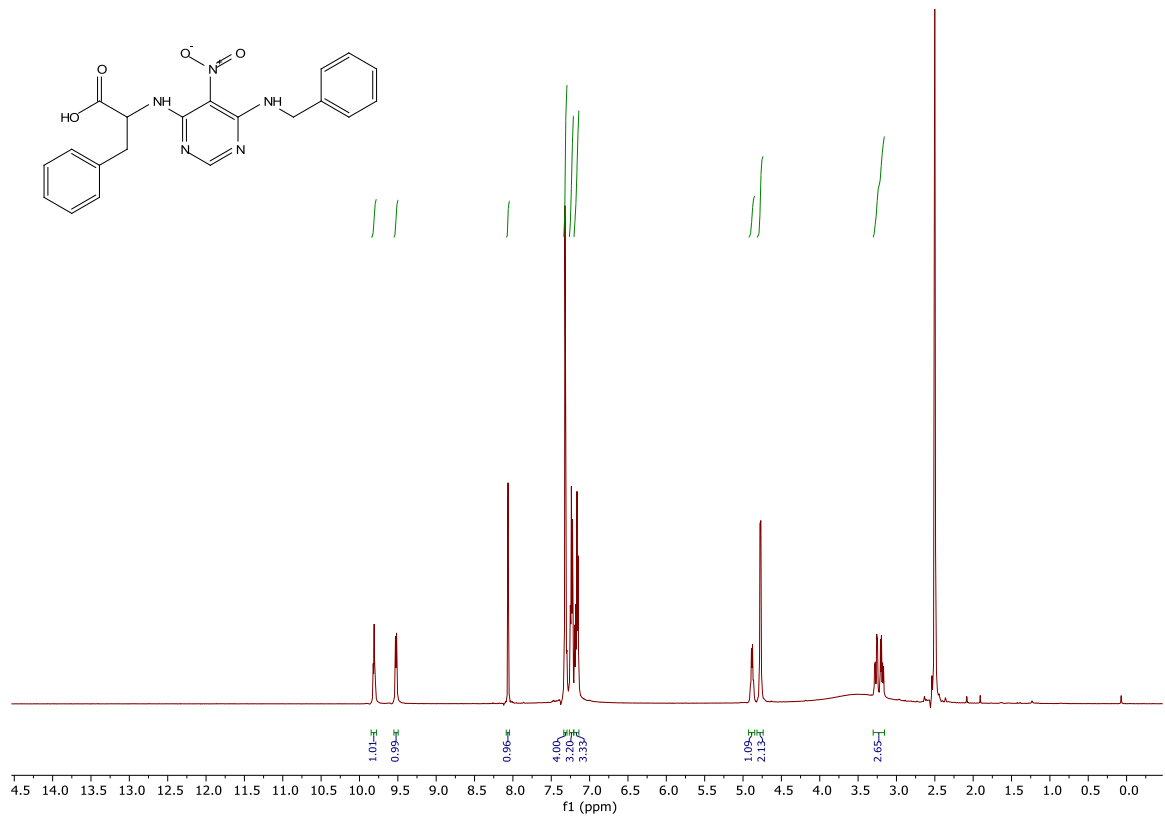
Spektrum 14: ¹H spektrum látky **1f**



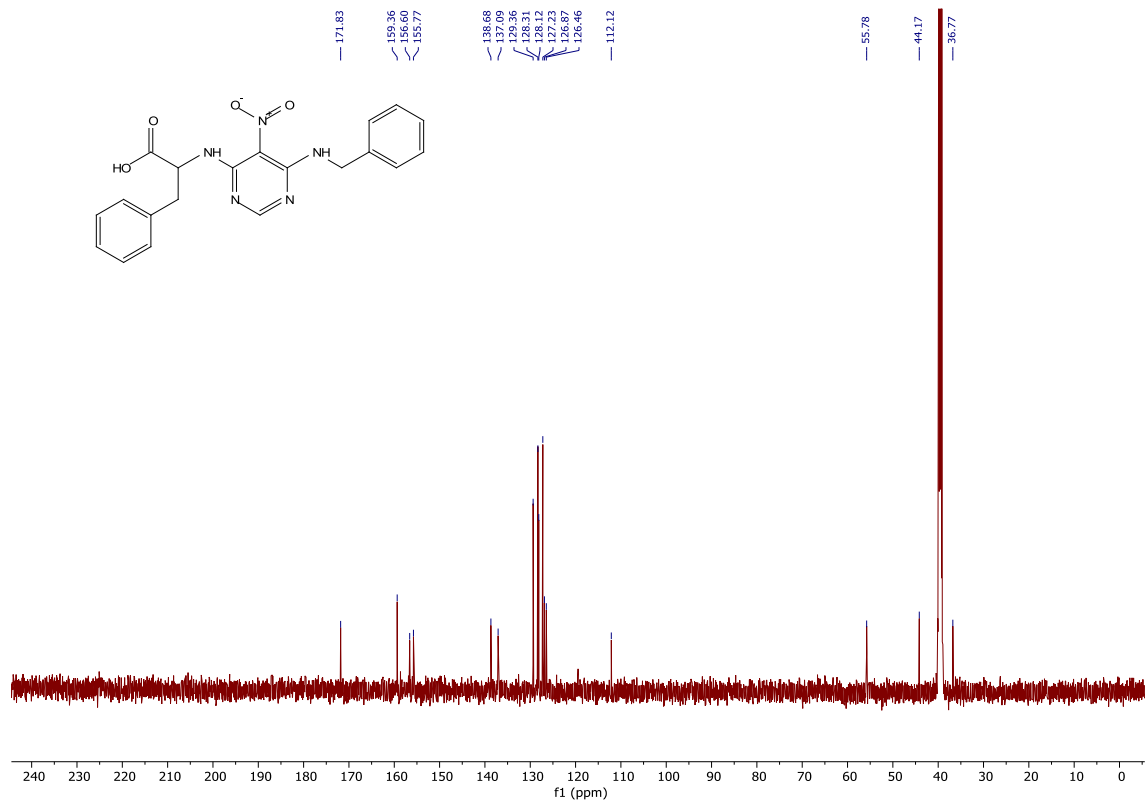
Spektrum 15: ¹³C spektrum látky **1f**



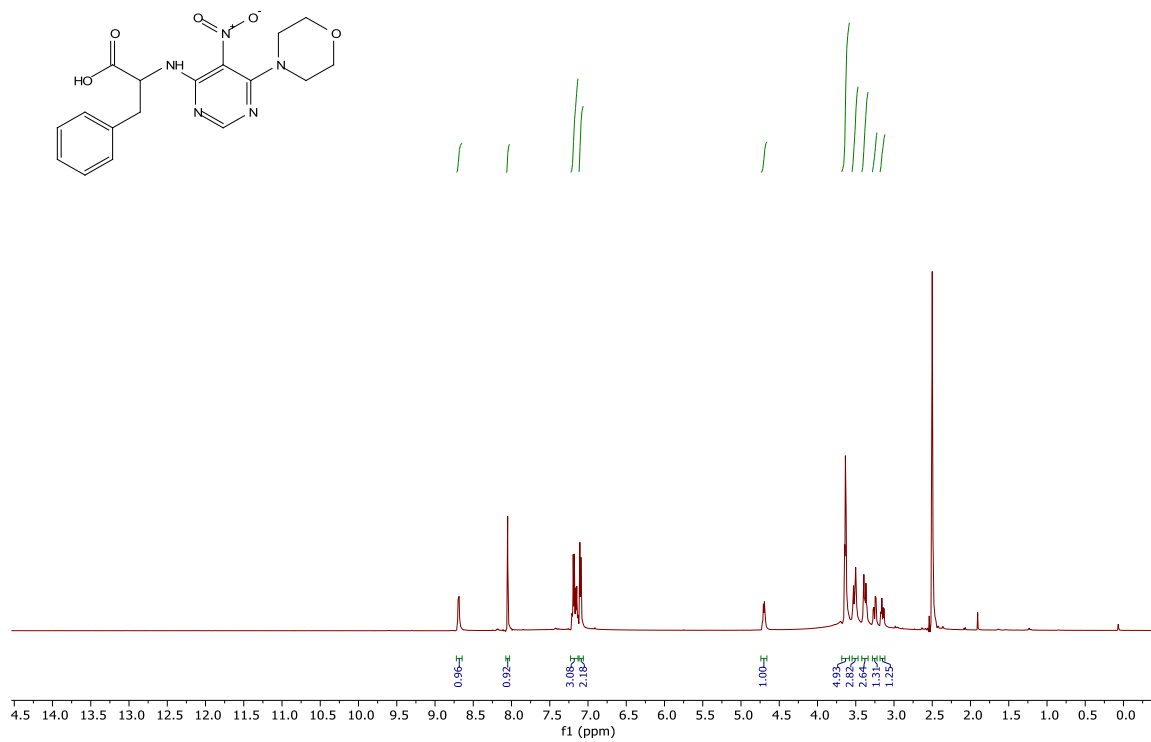
Spektrum 16: ¹H spektrum látky **1g**



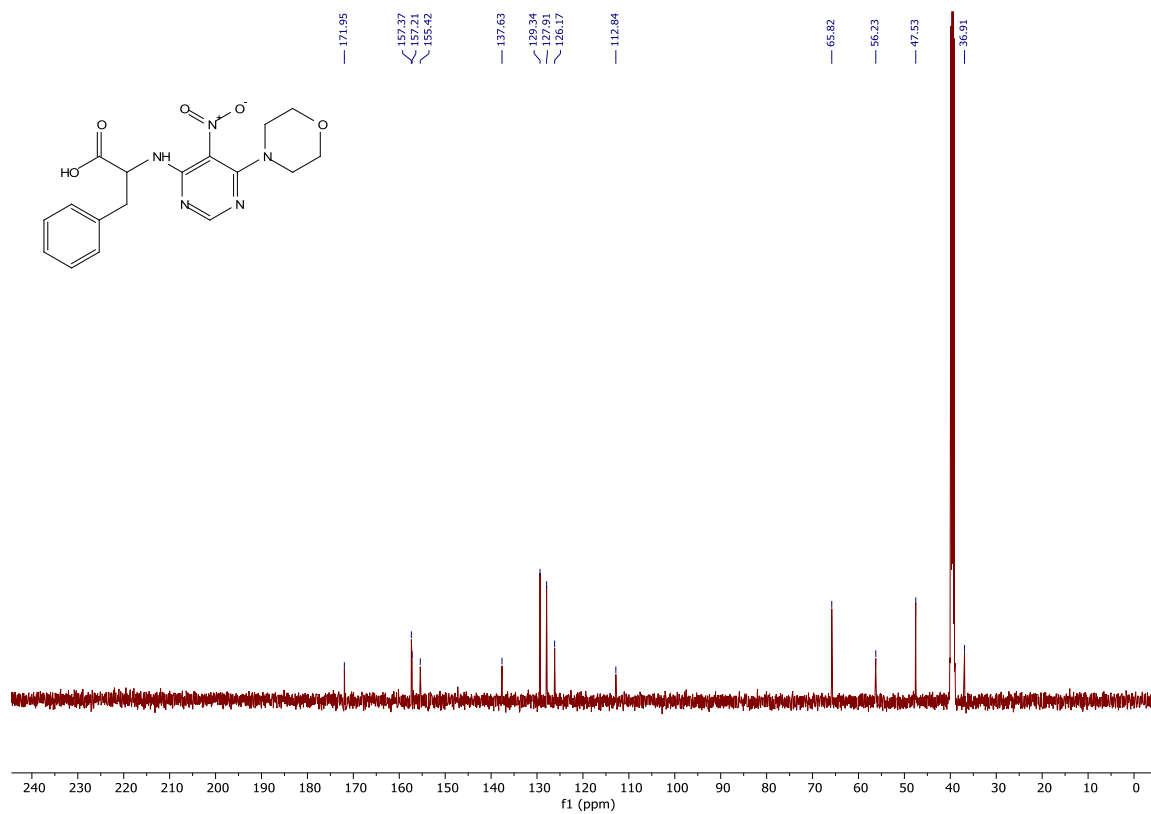
Spektrum 17: ¹³C spektrum látky **1g**



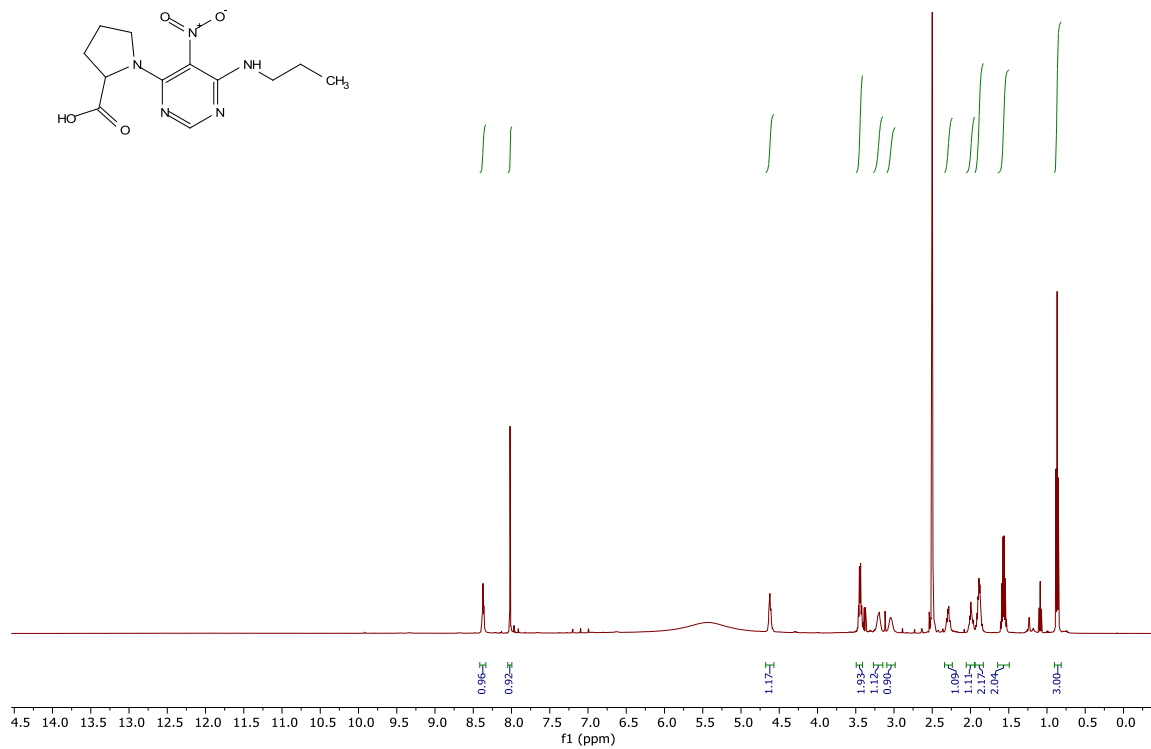
Spektrum 18: ^1H spektrum látky **1h**



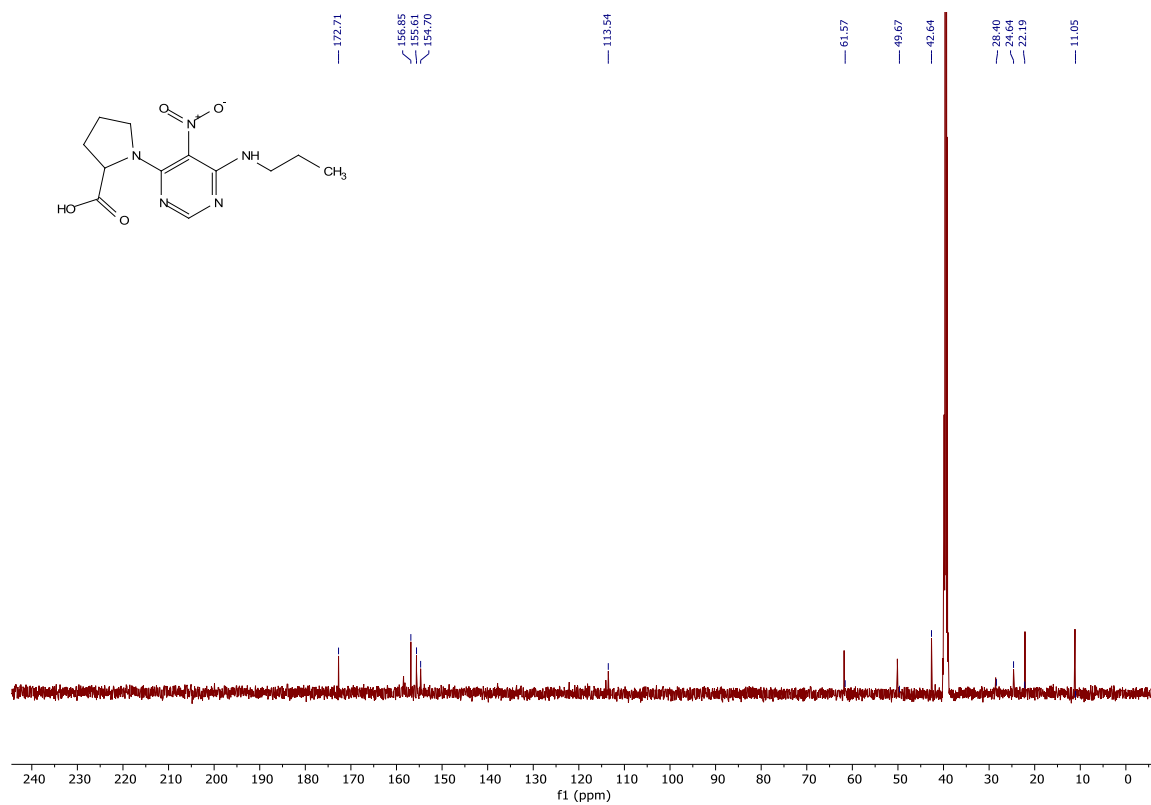
Spektrum 19: ^{13}C spektrum látky **1h**



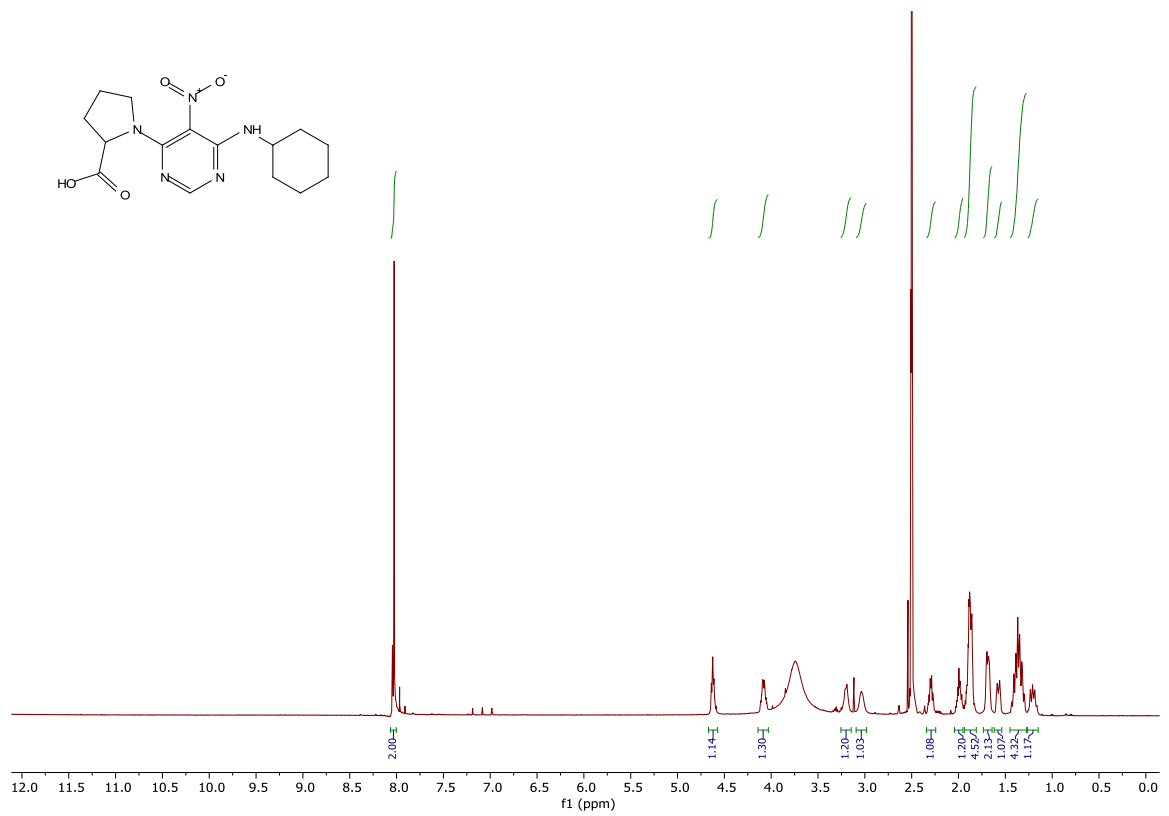
Spektrum 20: ^1H spektrum látky **1i**



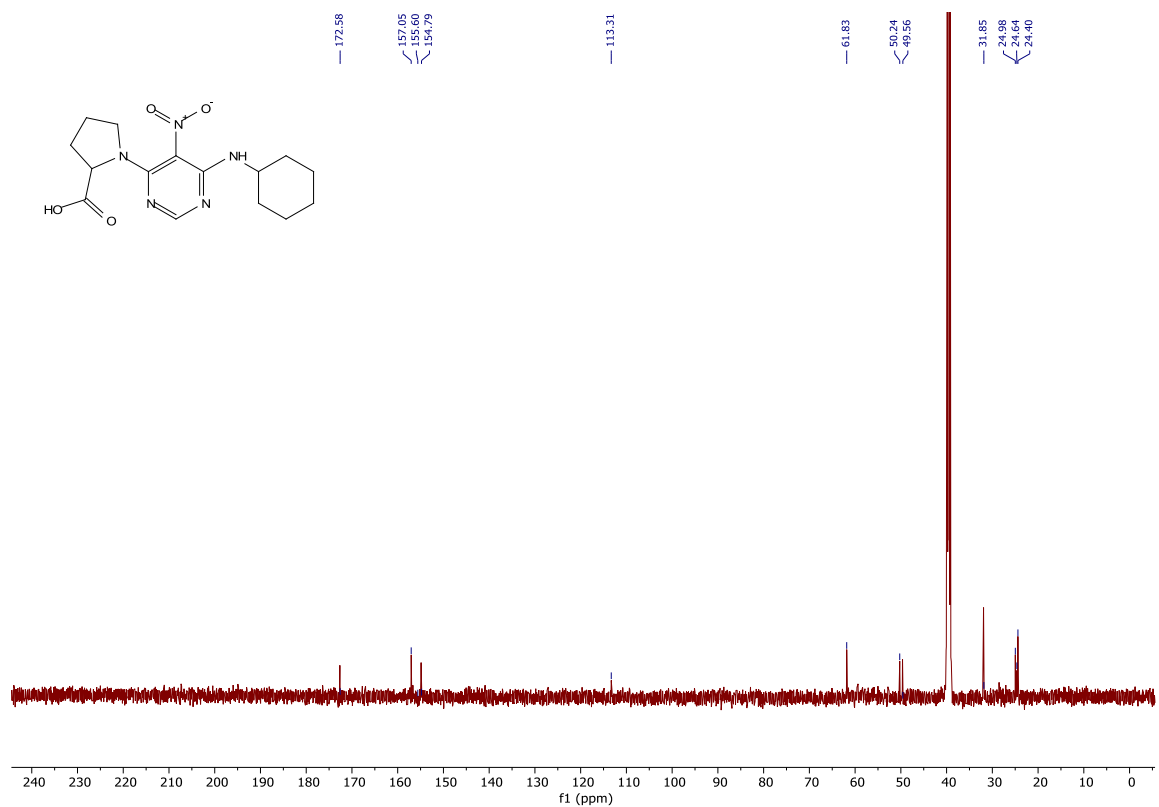
Spektrum 21: ^{13}C spektrum látky **1i**



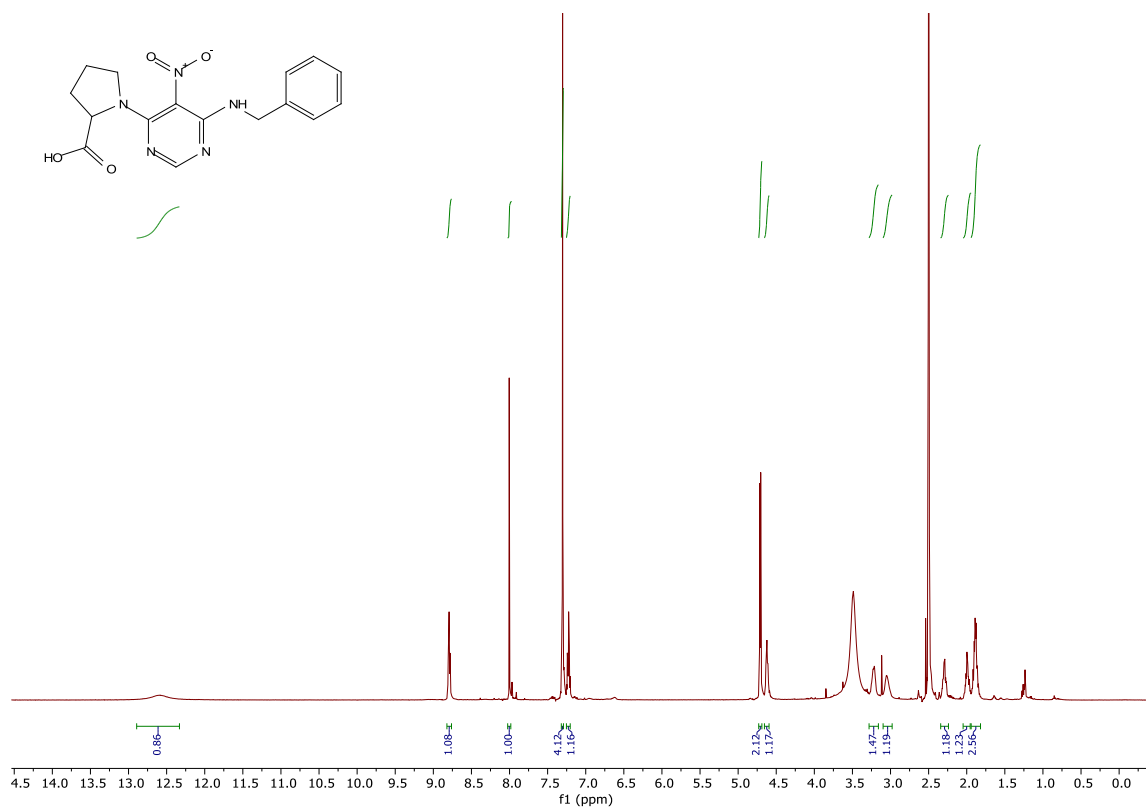
Spektrum 22: ^1H spektrum látky **1j**



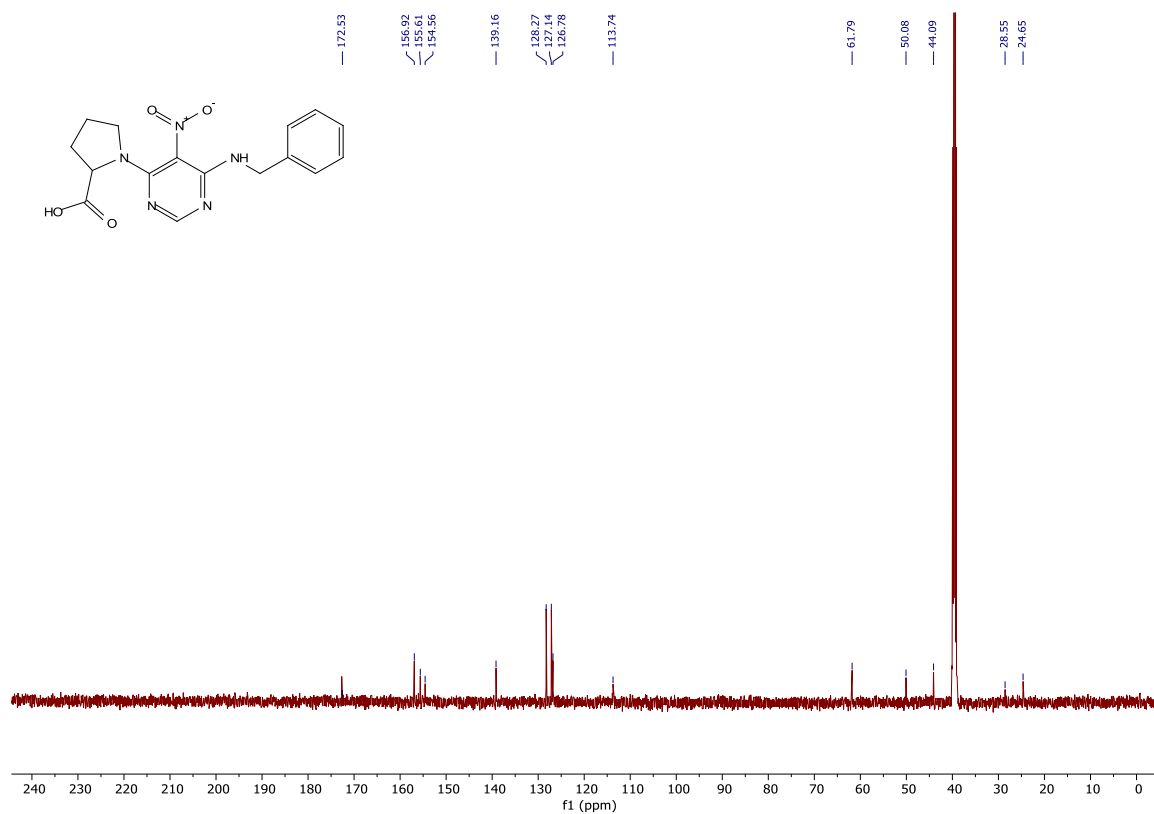
Spektrum 23: ^{13}C spektrum látky **1j**



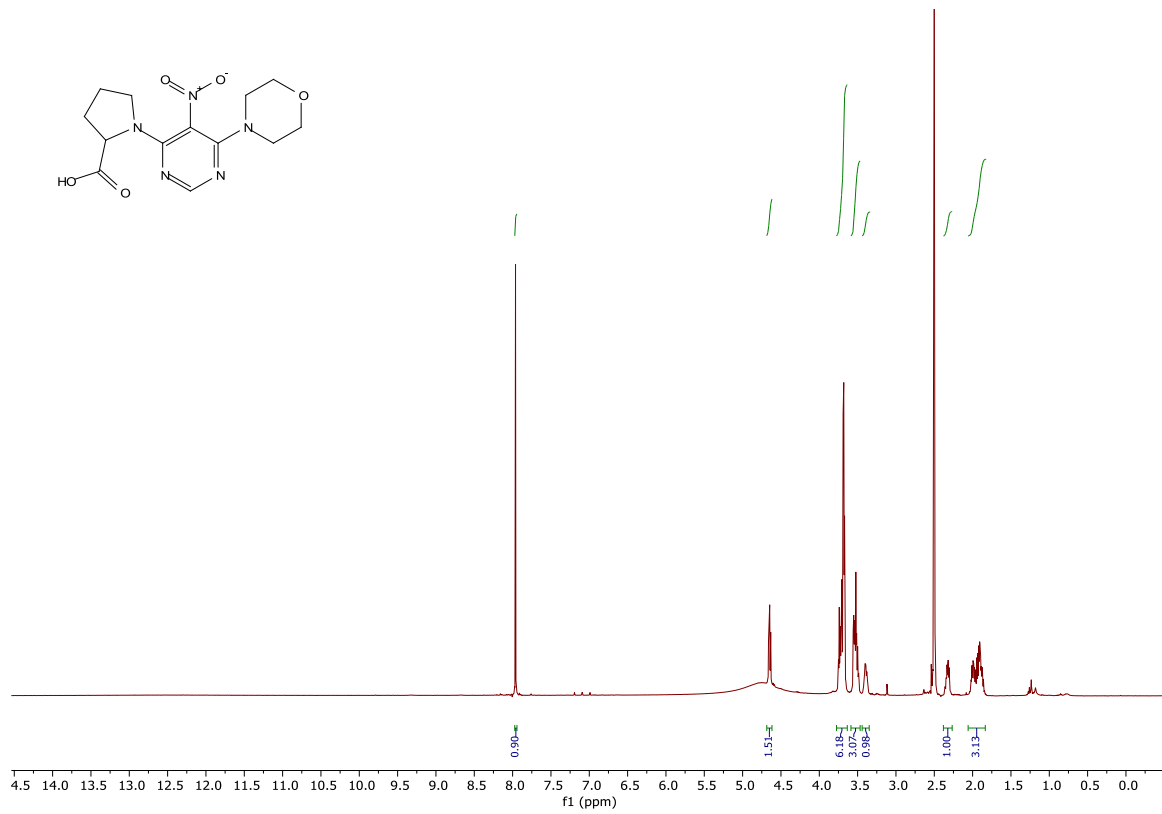
Spektrum 24: ^1H spektrum látky **1k**



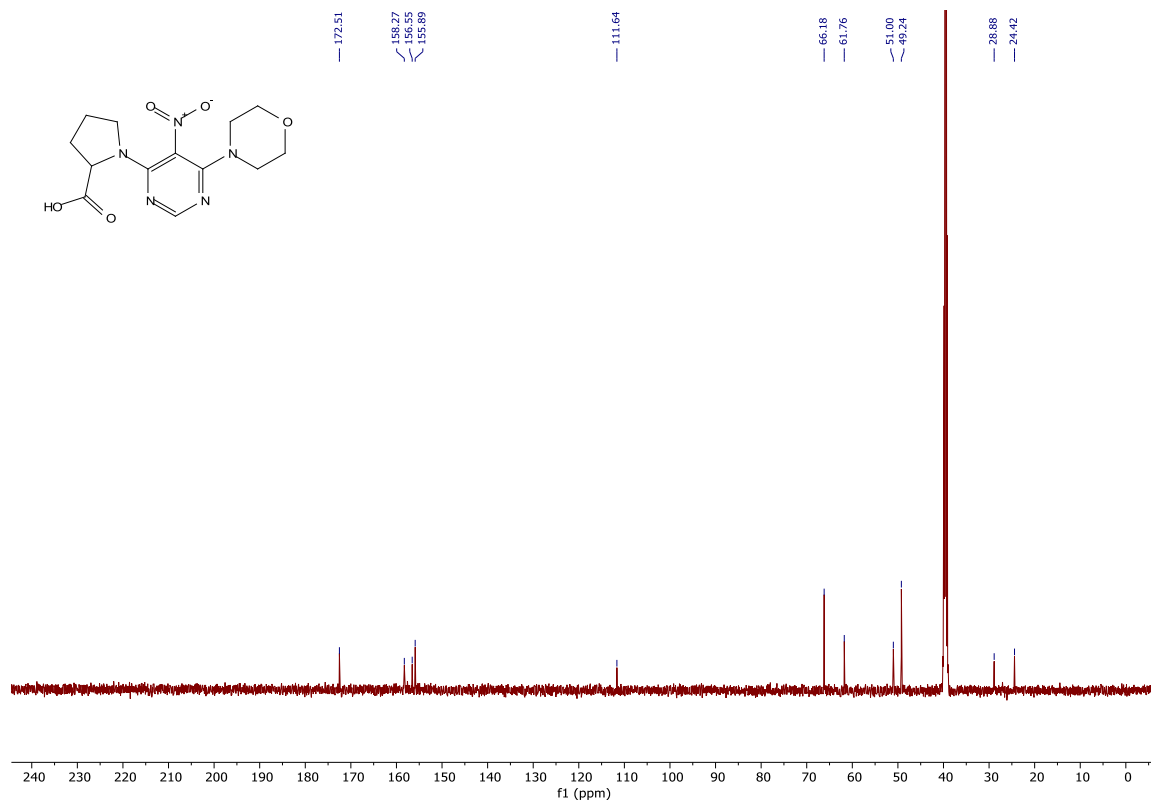
Spektrum 25: ^{13}C spektrum látky **1k**



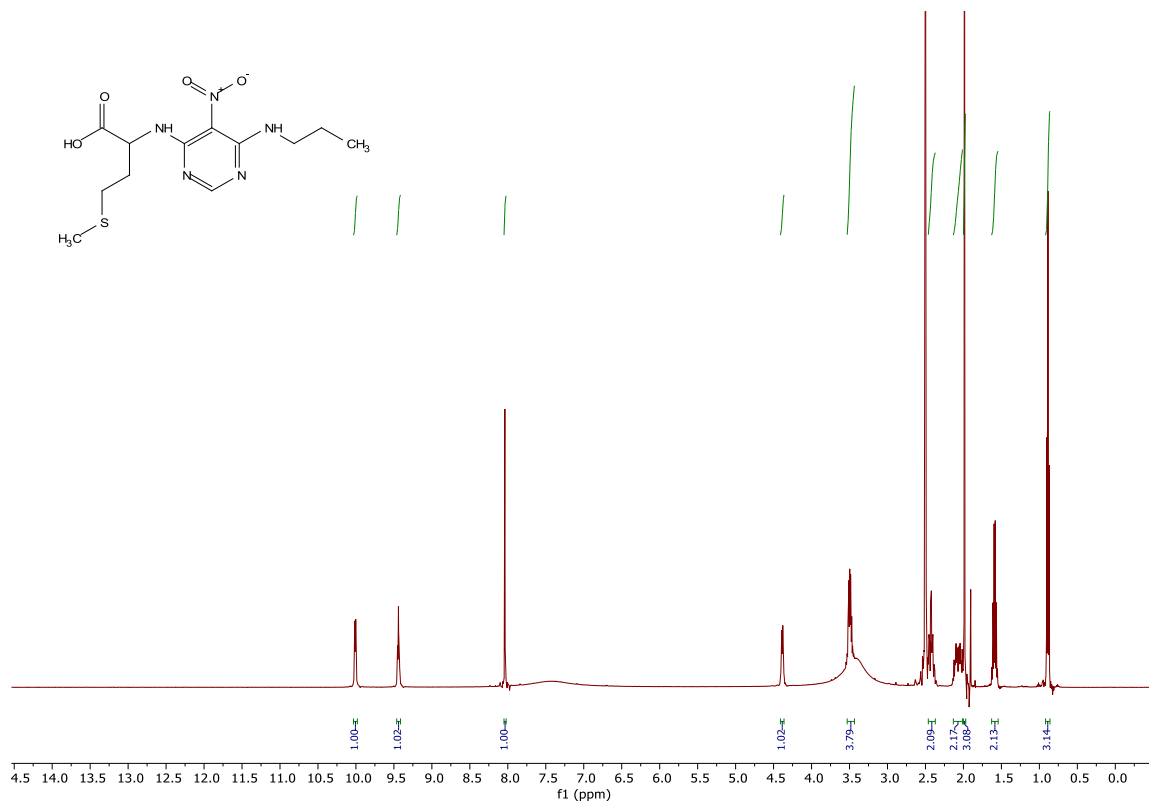
Spektrum 26: ^1H spektrum látky **11**



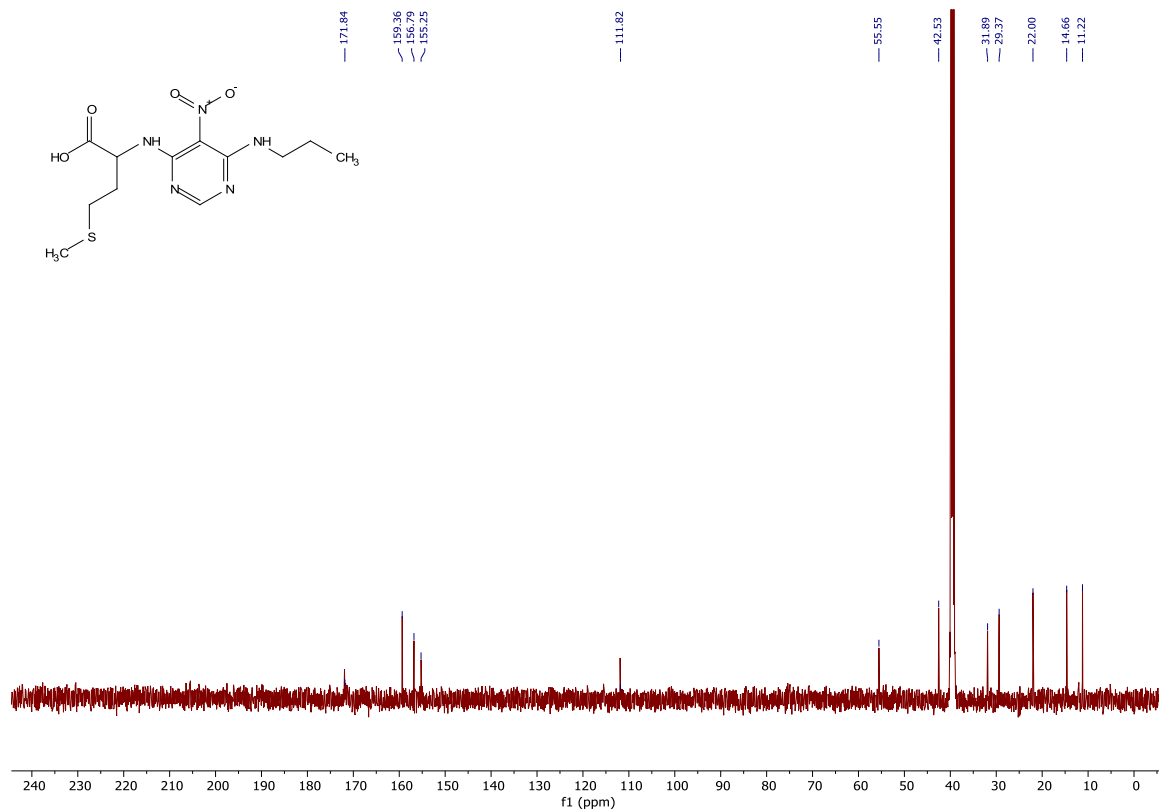
Spektrum 27: ^{13}C spektrum látky **11**



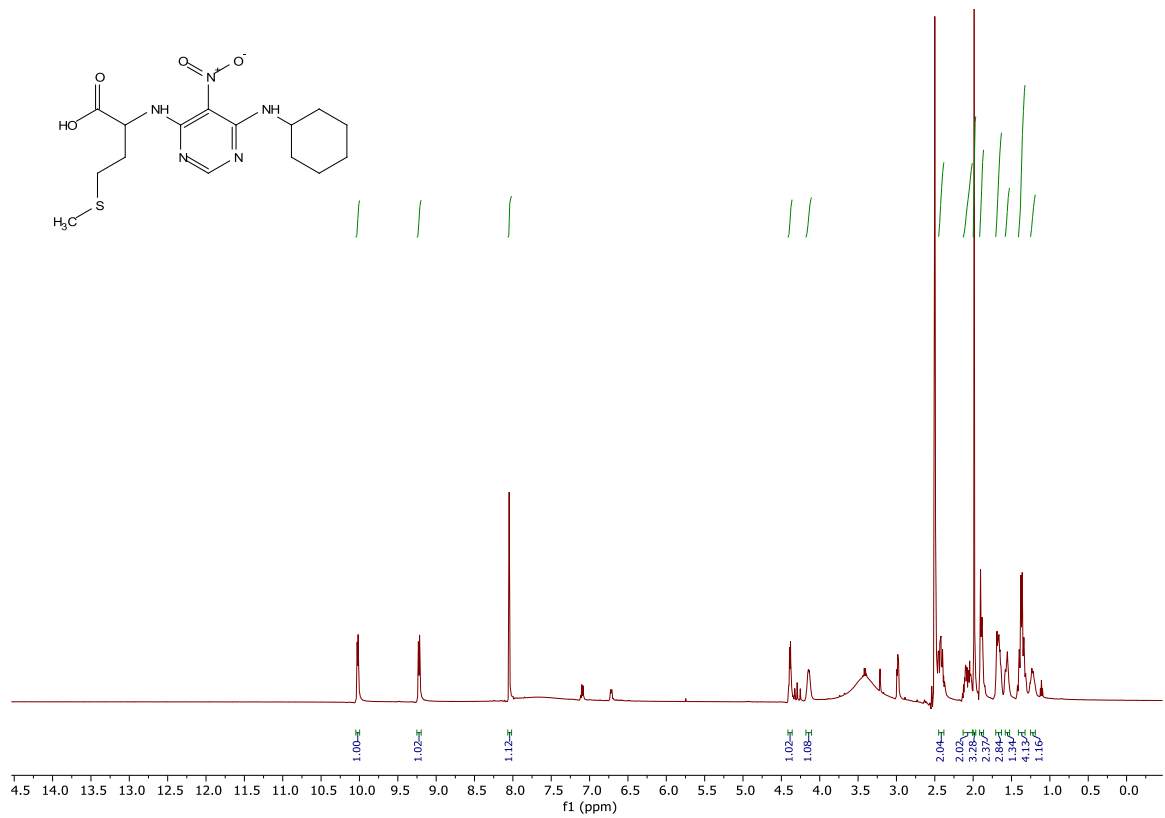
Spektrum 28: ^1H spektrum látky **1m**



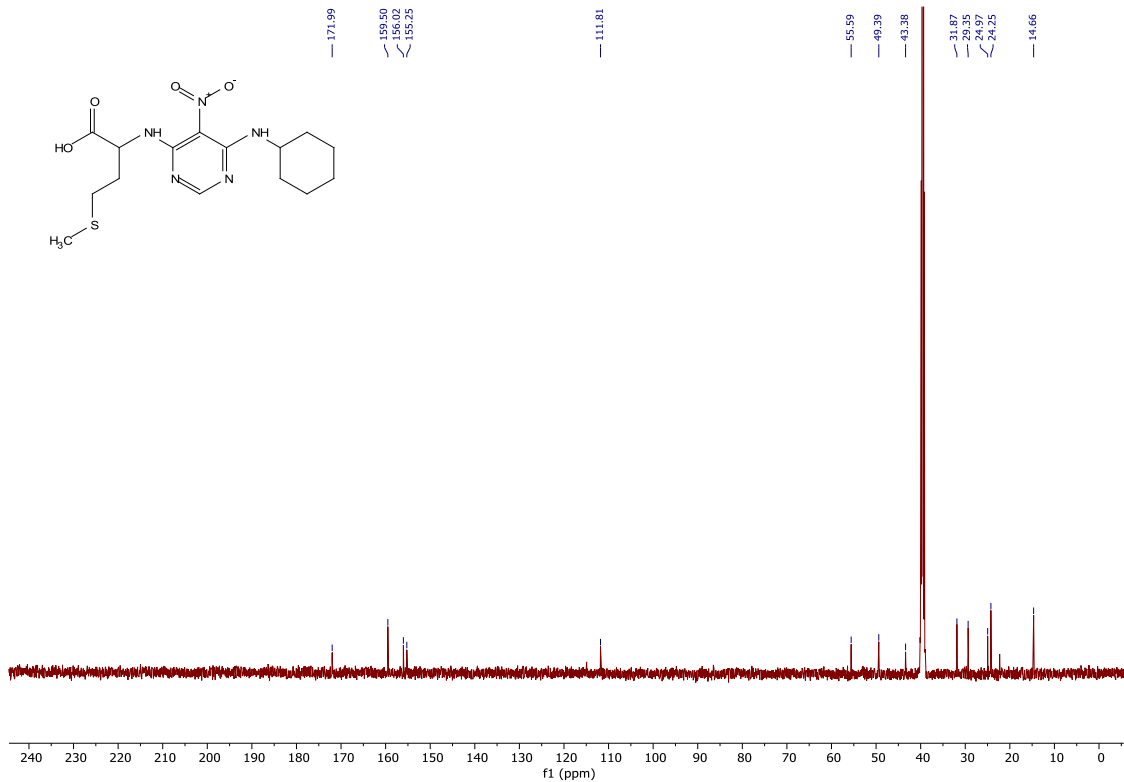
Spektrum 29: ^{13}C spektrum látky **1m**



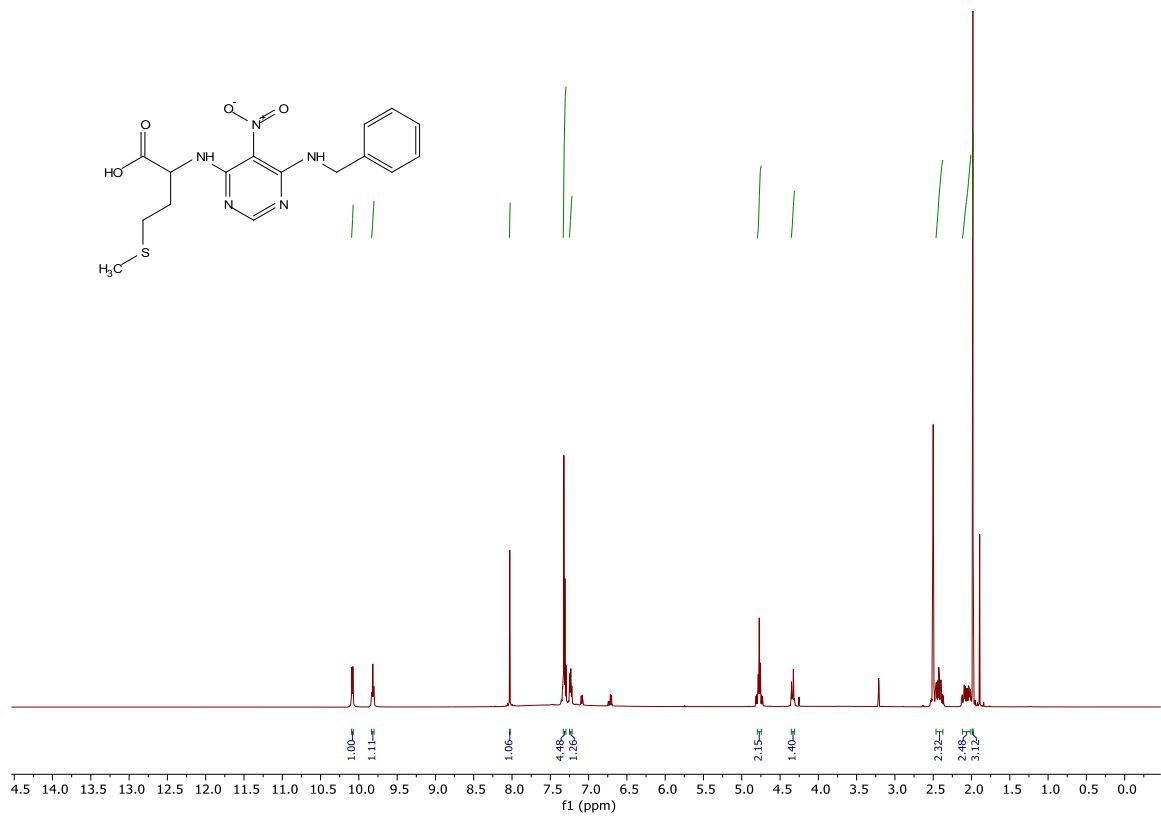
Spektrum 30: ^1H spektrum látky **1n**



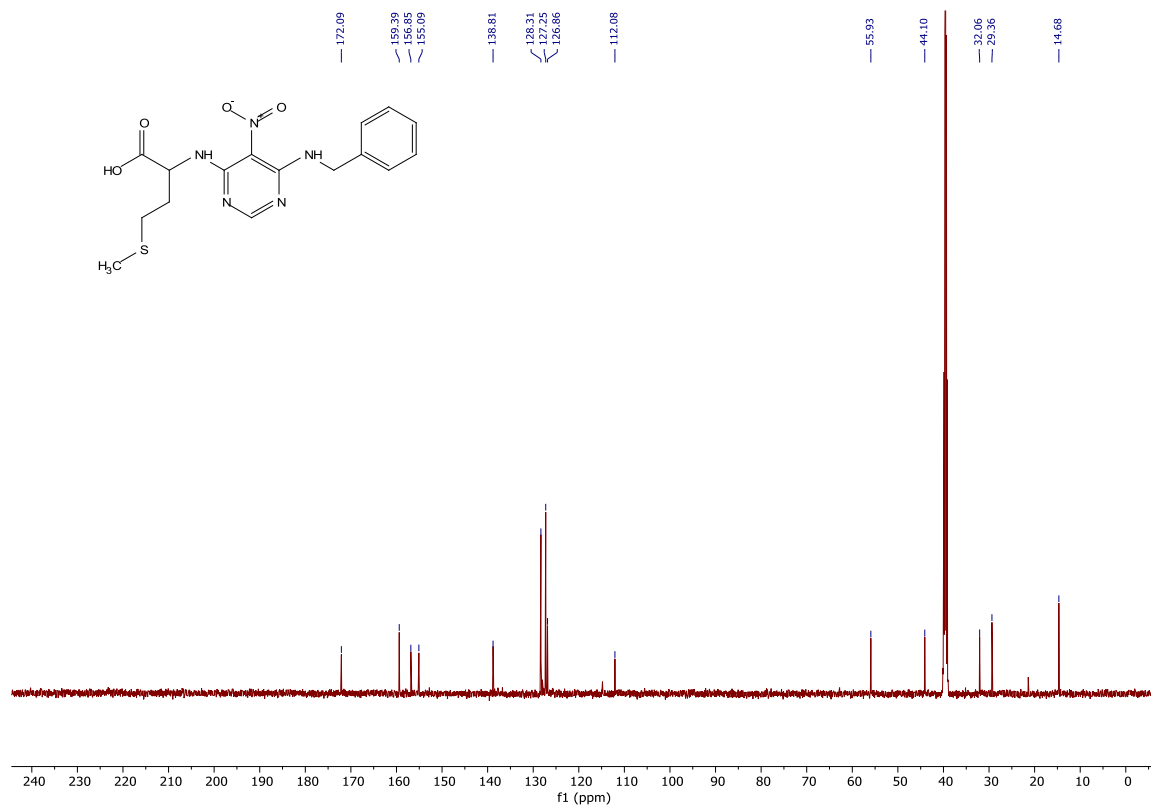
Spektrum 31: ^{13}C spektrum látky **1n**



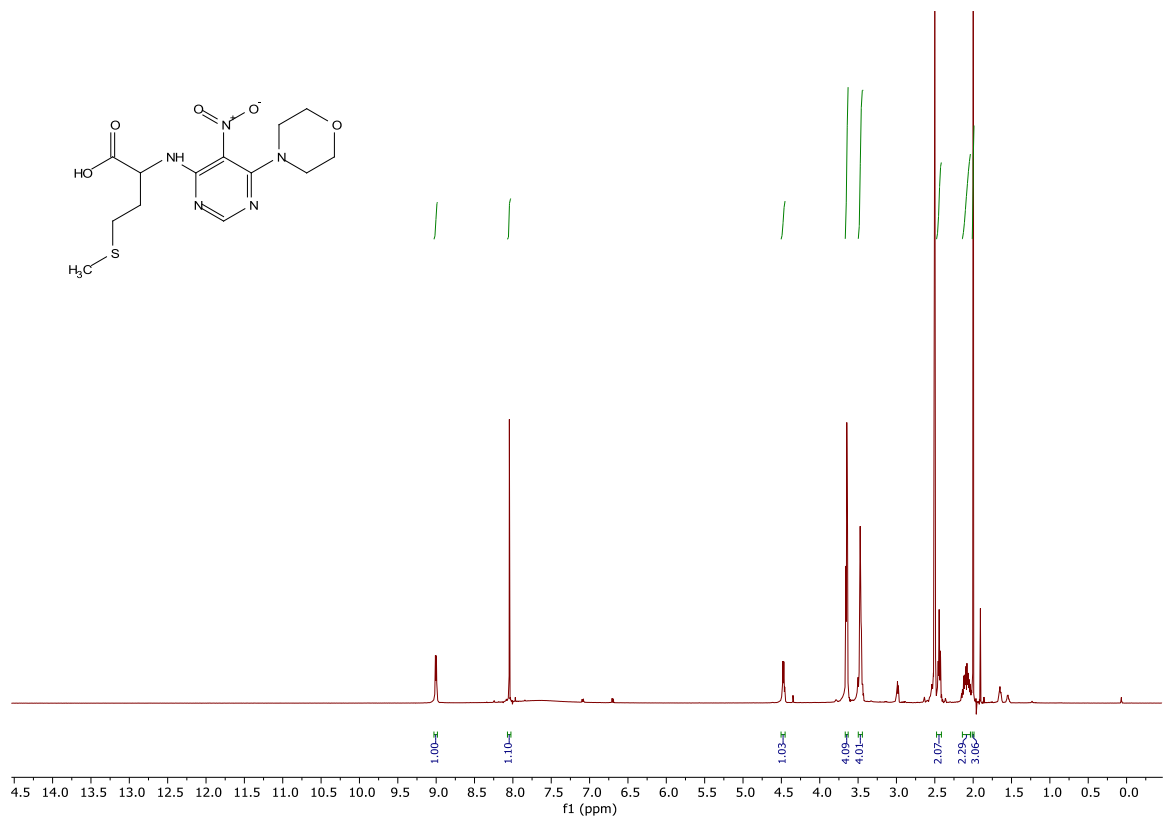
Spektrum 32: ^1H spektrum látky **1o**



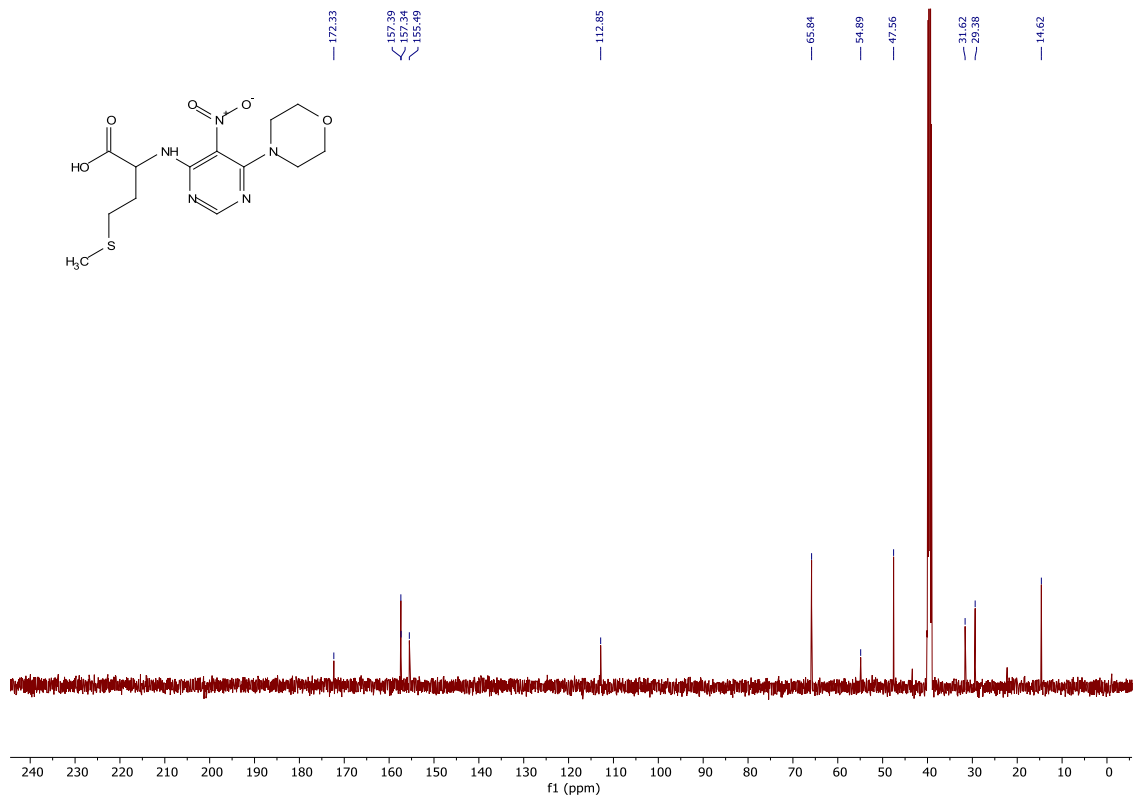
Spektrum 33: ^{13}C spektrum látky **1o**



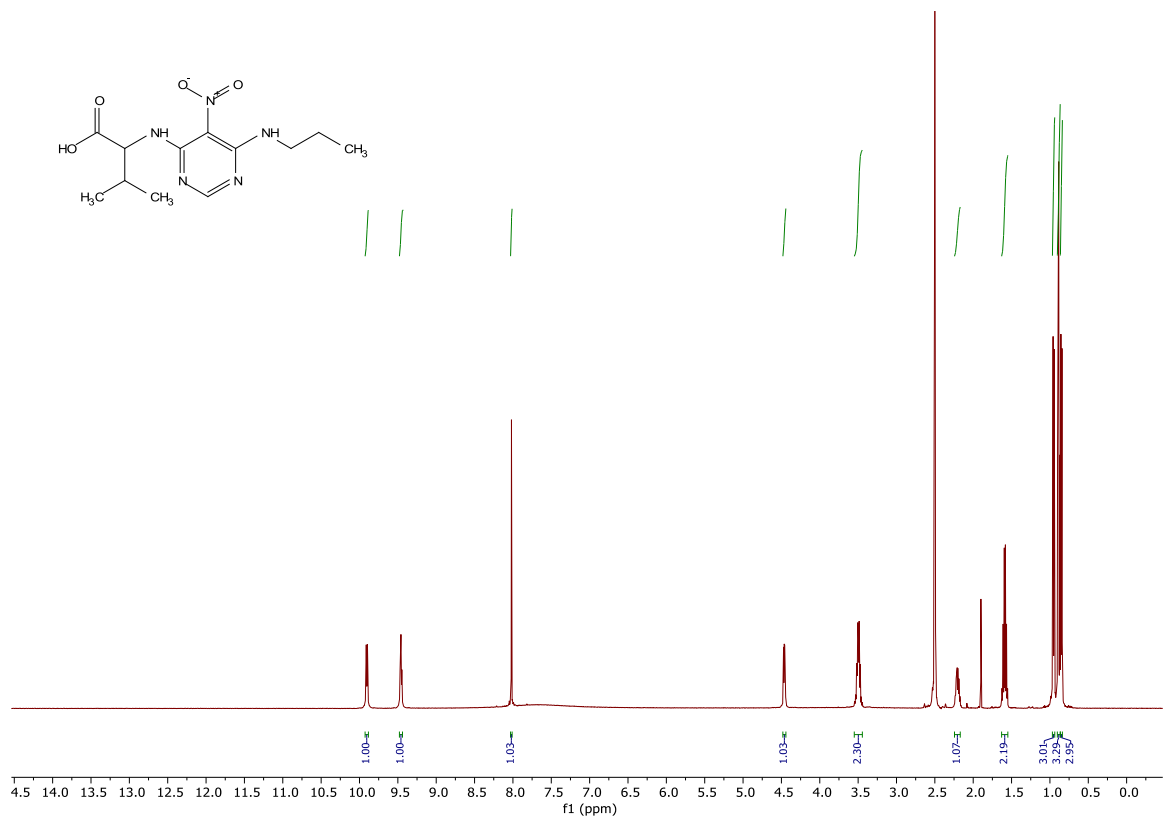
Spektrum 34: ^1H spektrum látky **1p**



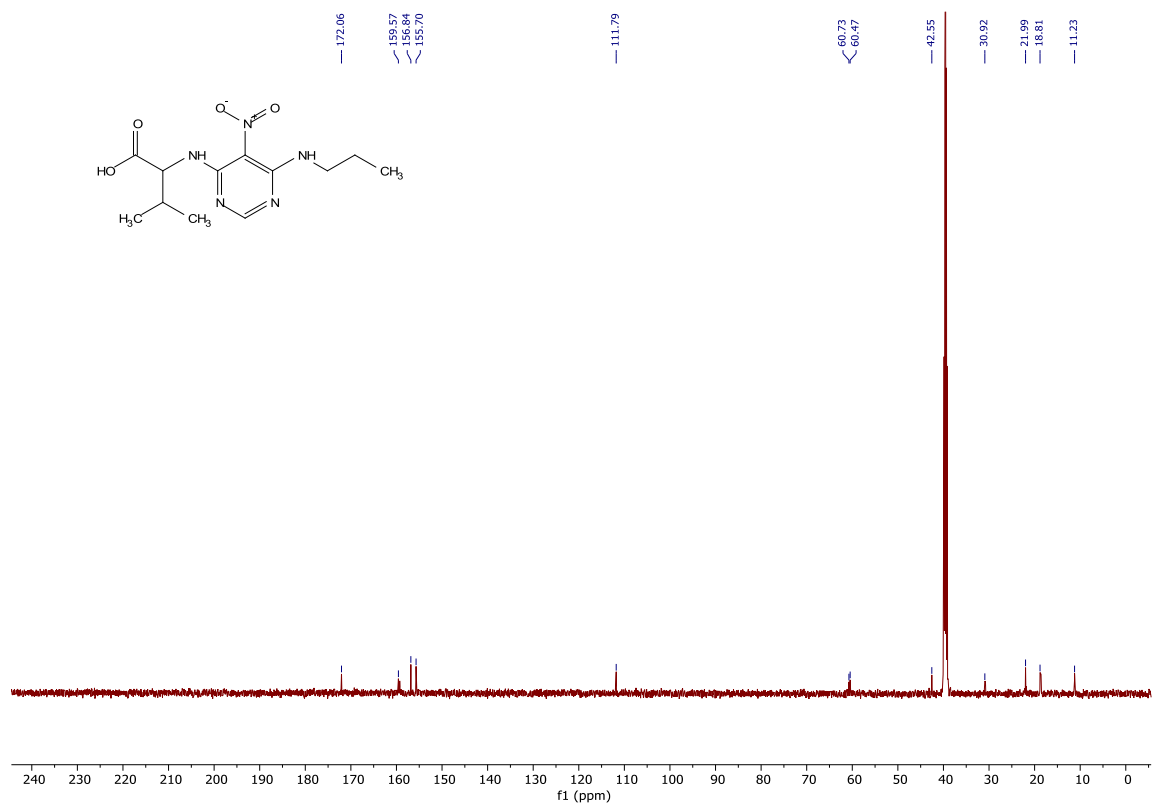
Spektrum 35: ^{13}C spektrum látky **1p**



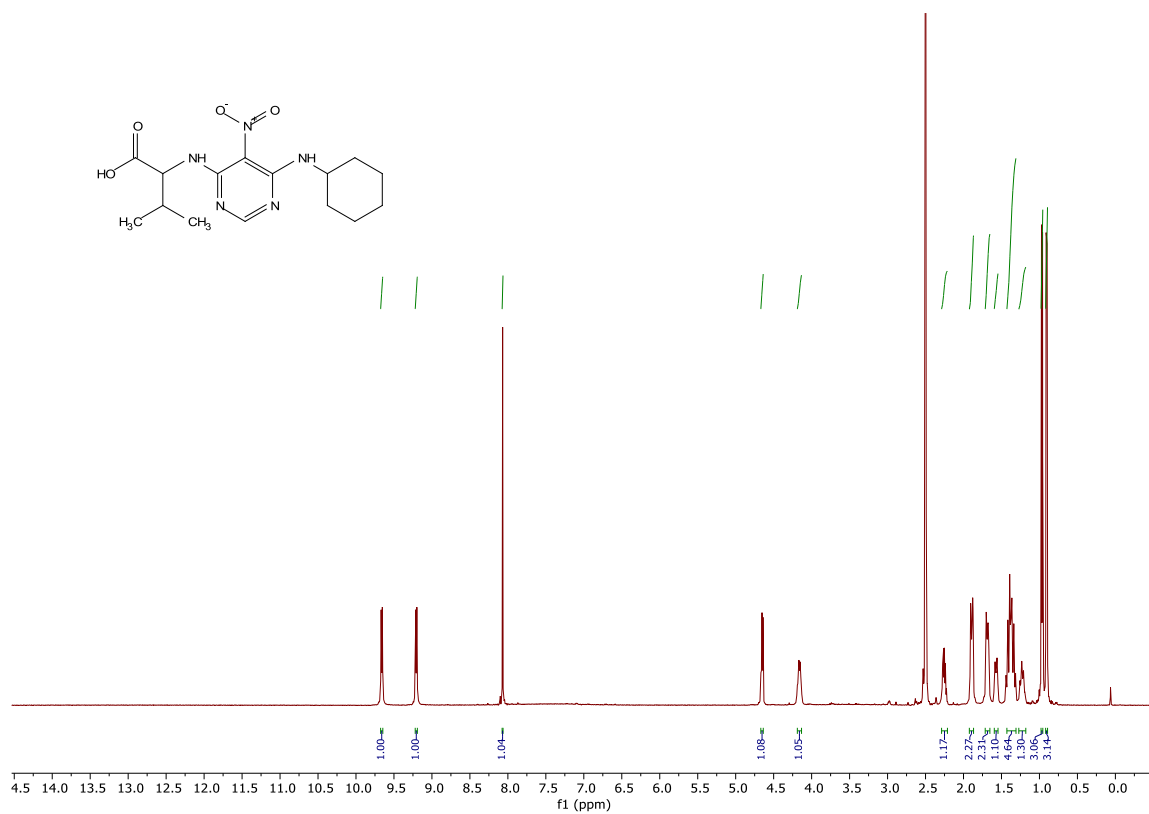
Spektrum 36: ¹H spektrum látky 1q



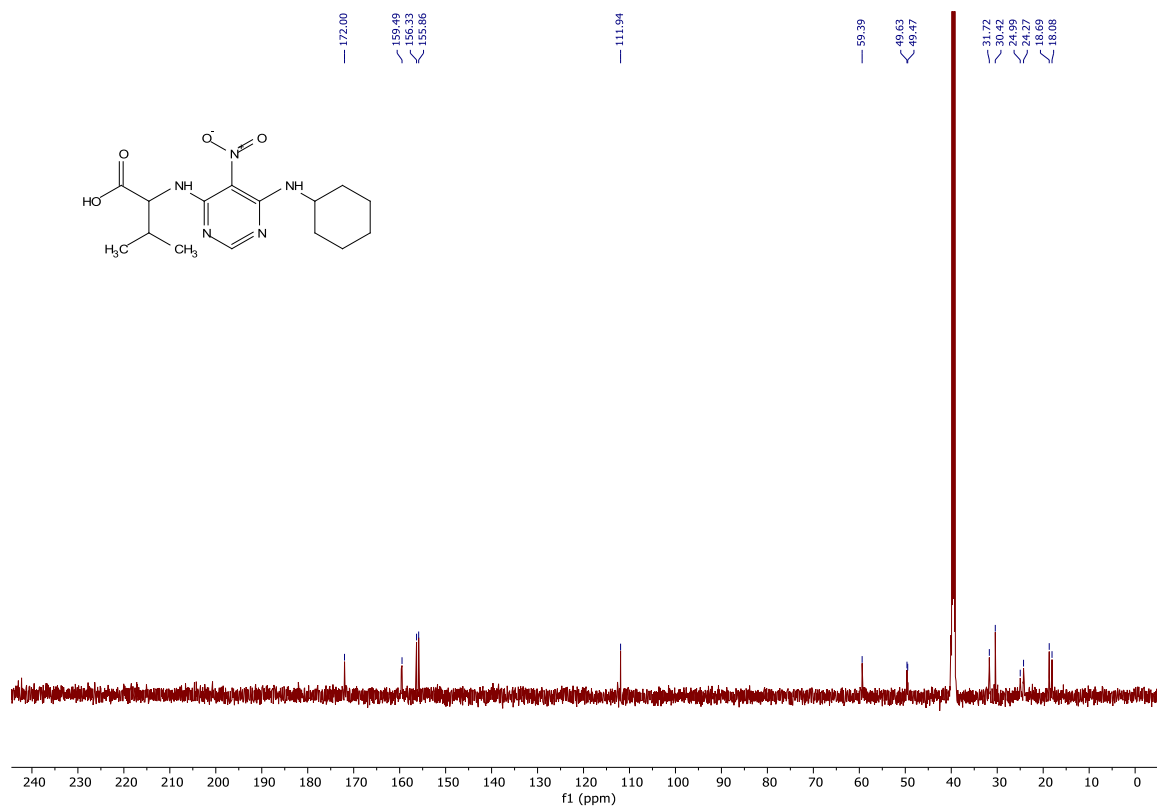
Spektrum 37: ¹³C spektrum látky 1q



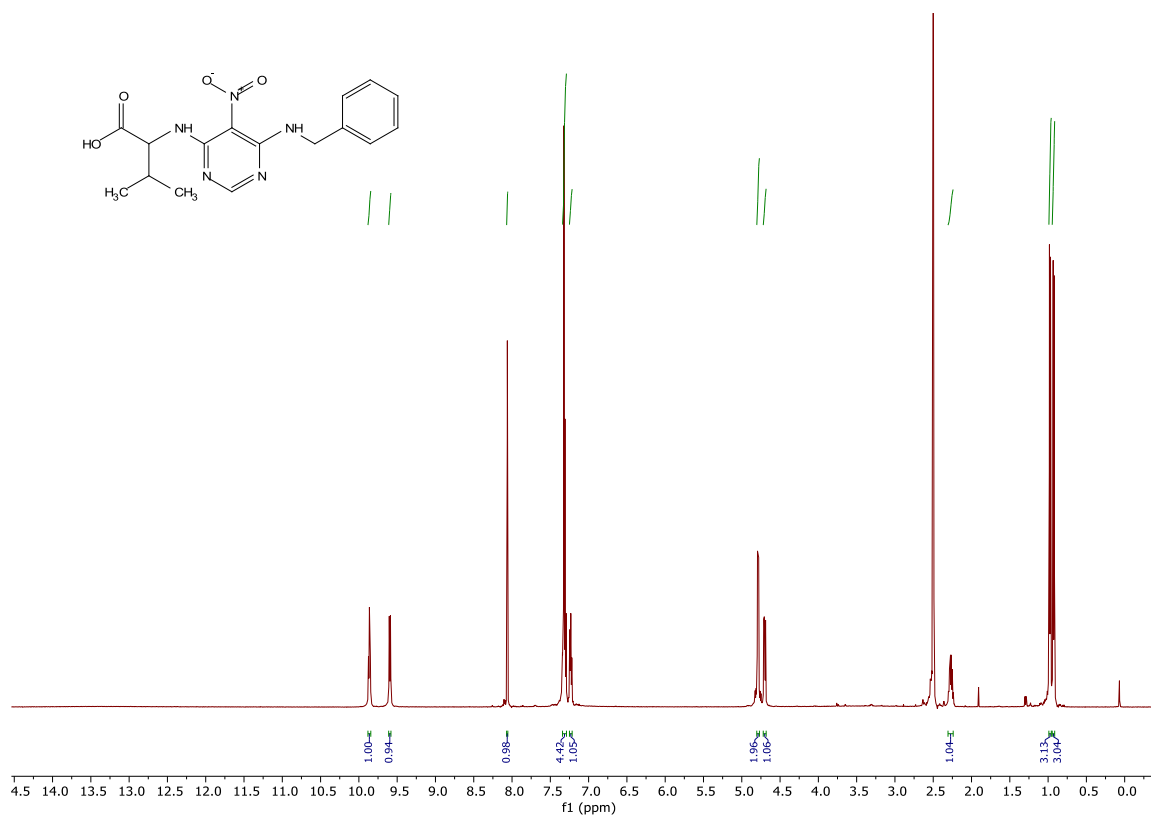
Spektrum 38: ^1H spektrum látky **1r**



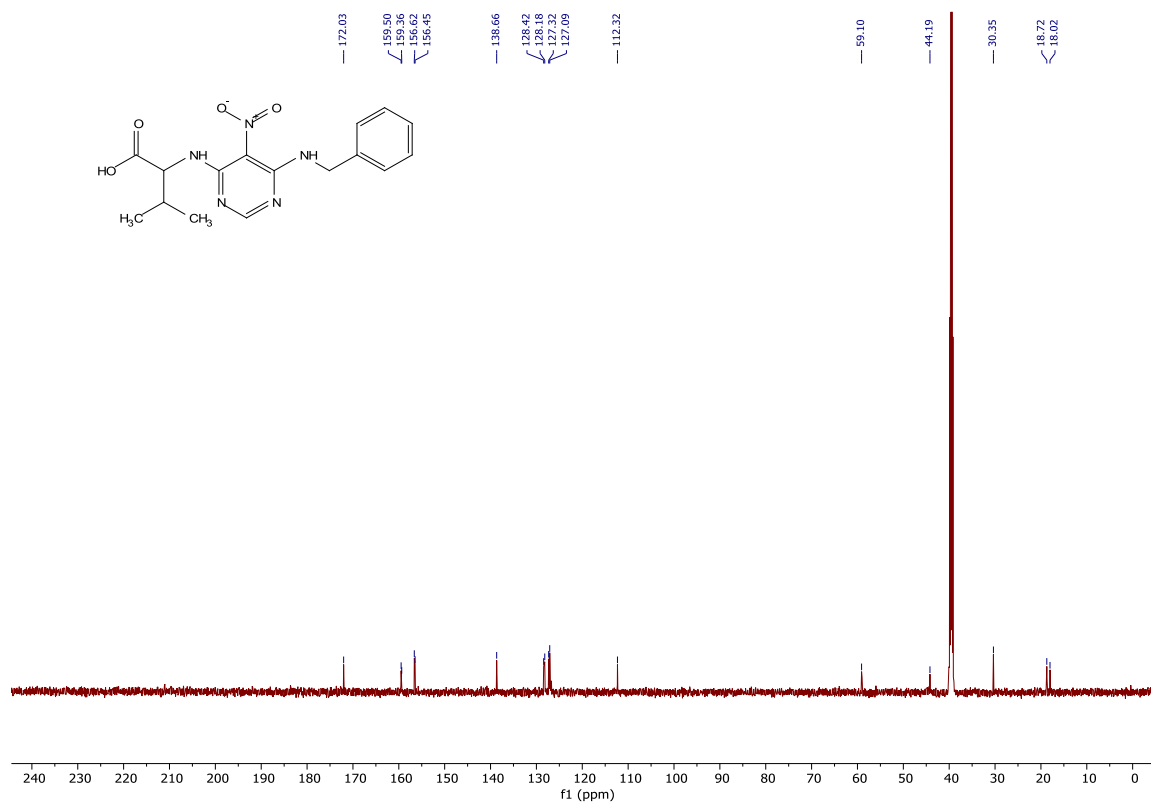
Spektrum 39: ^{13}C spektrum látky **1r**



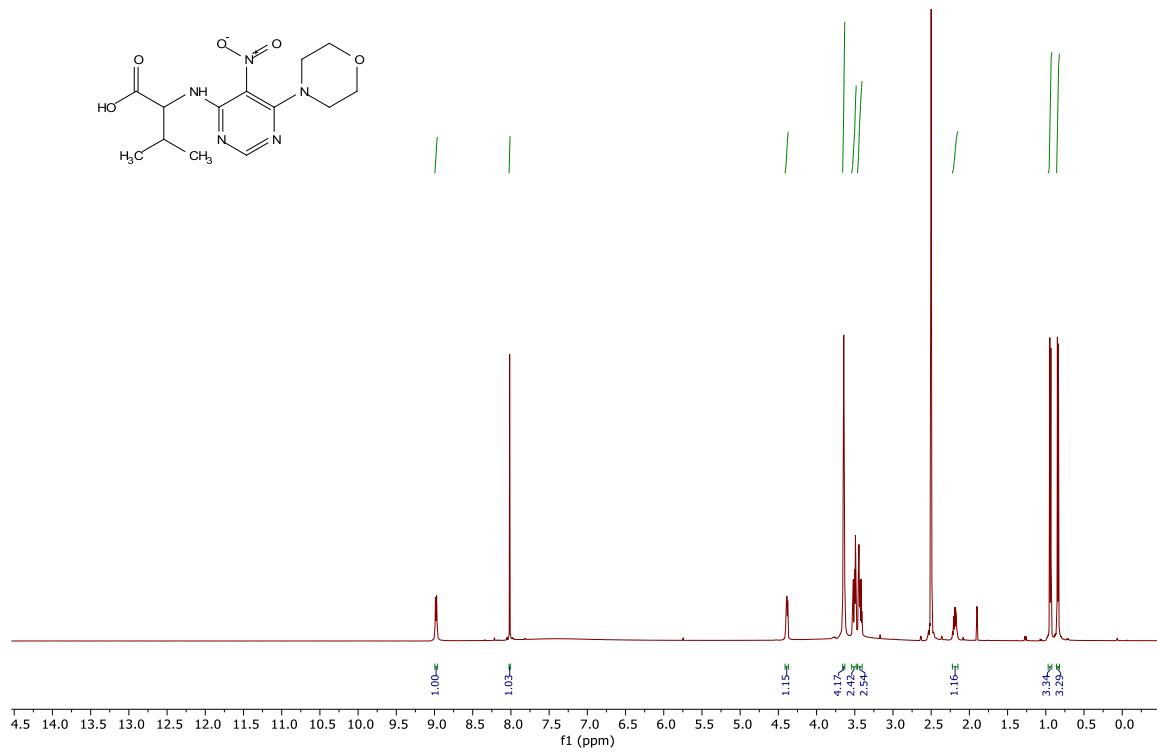
Spektrum 40: ^1H spektrum látky **1s**



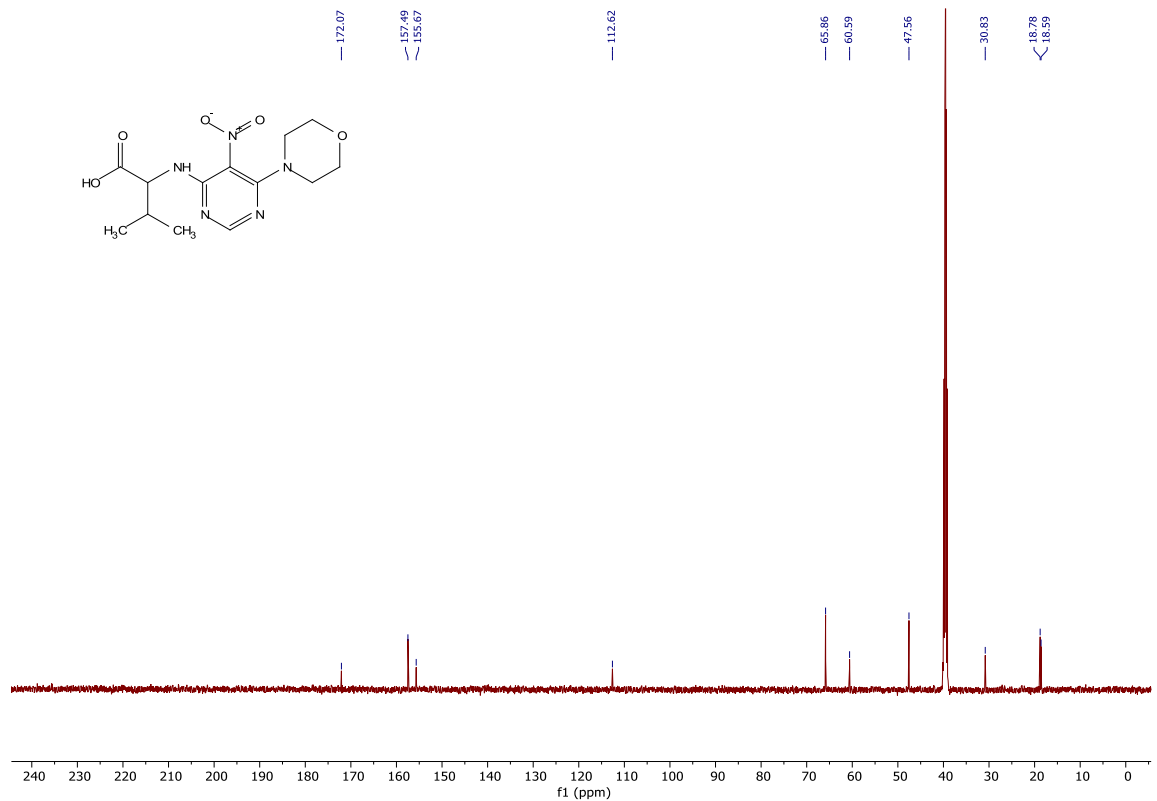
Spektrum 41: ^{13}C spektrum látky **1s**



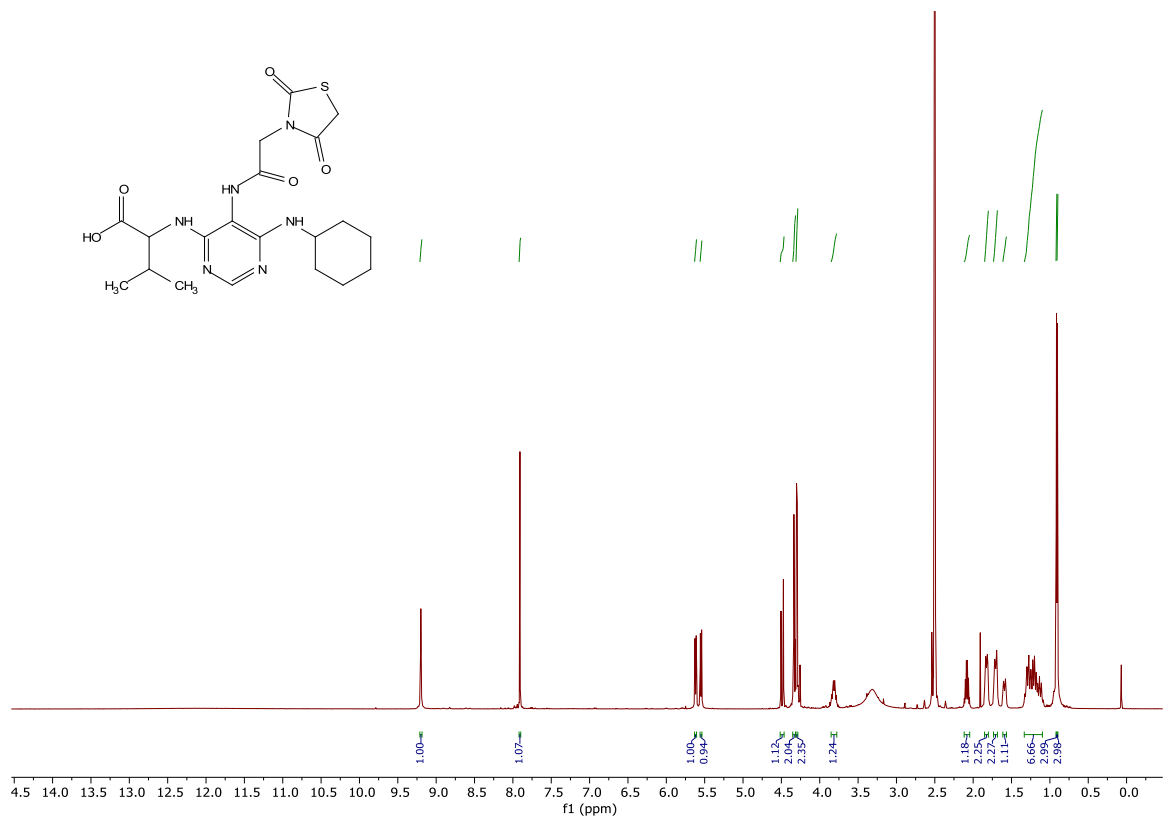
Spektrum 42: ^1H spektrum látky **1t**



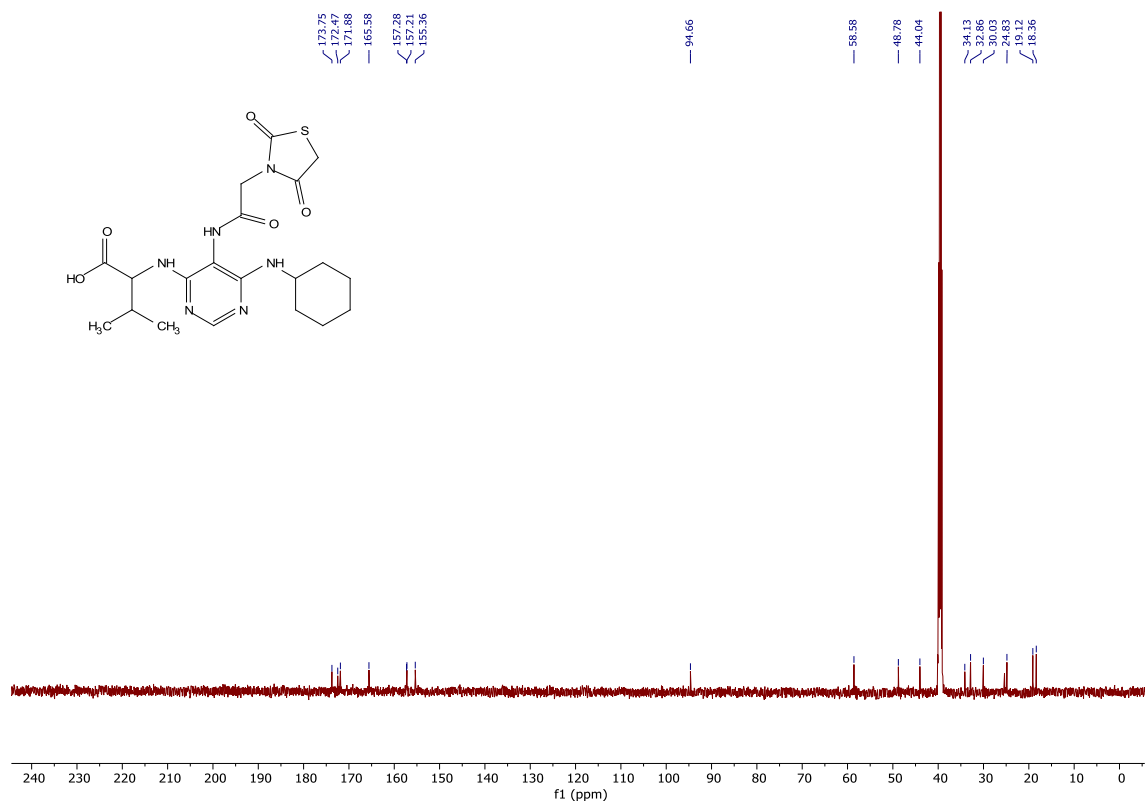
Spektrum 43: ^{13}C spektrum látky **1t**



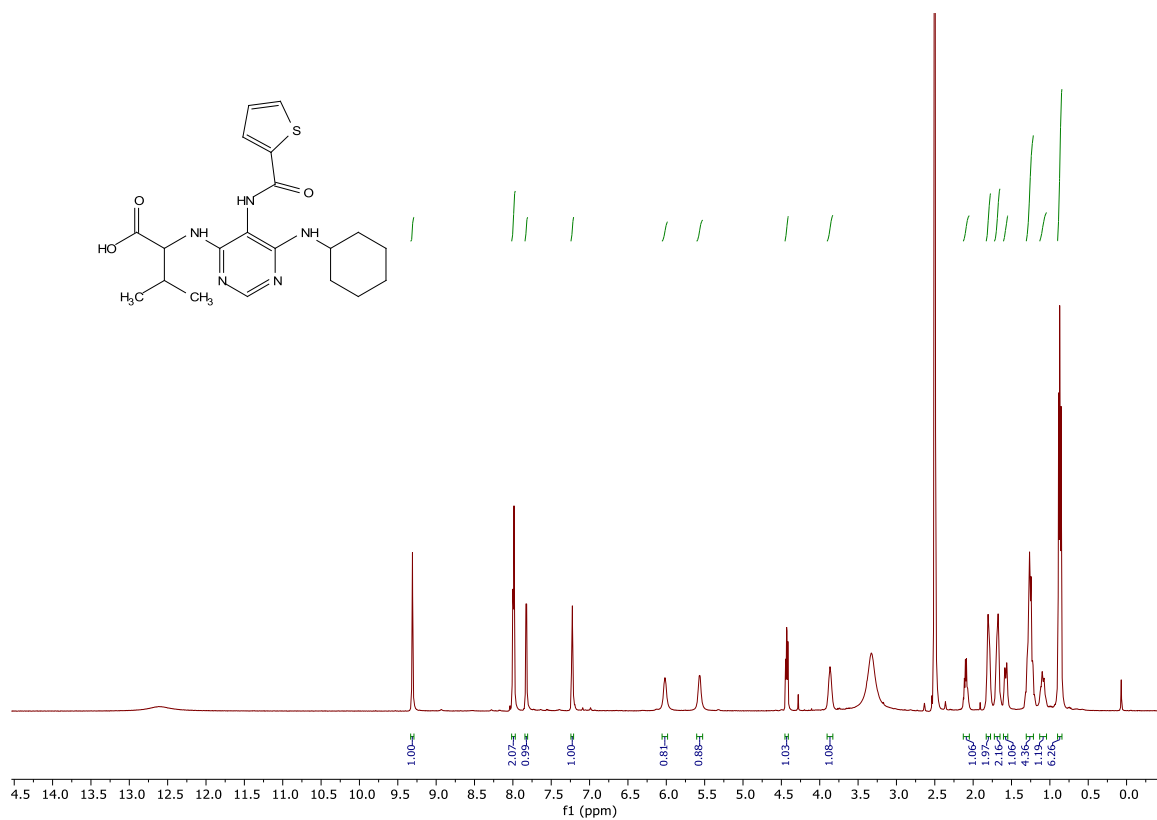
Spektrum 44: ^1H spektrum látky **2a**



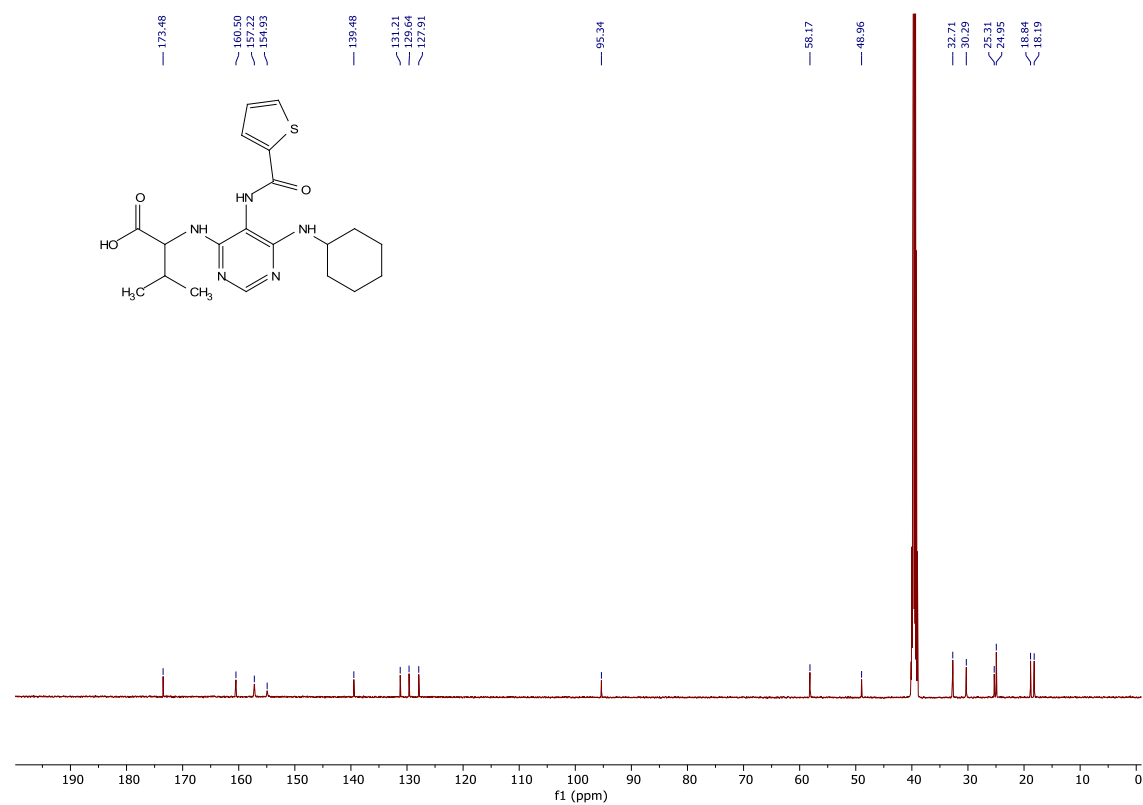
Spektrum 45: ^{13}C spektrum látky **2a**



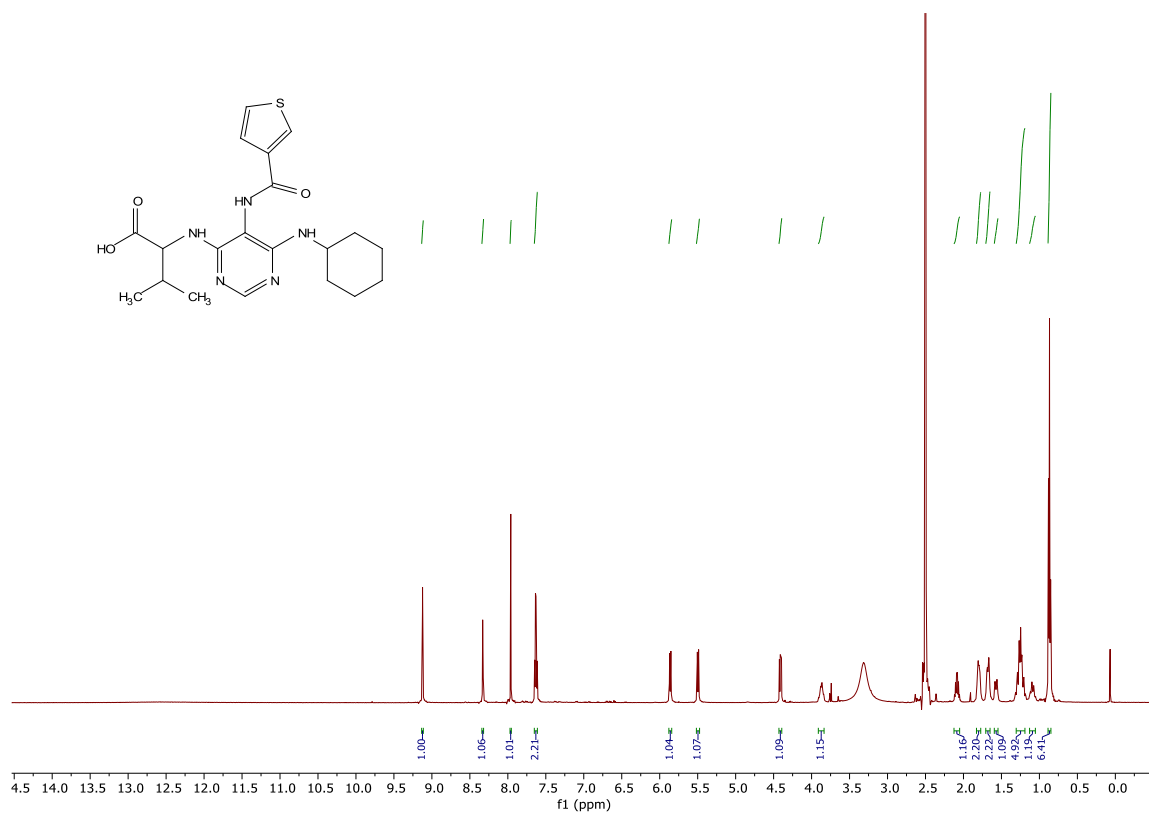
Spektrum 46: ^1H spektrum látky **2b**



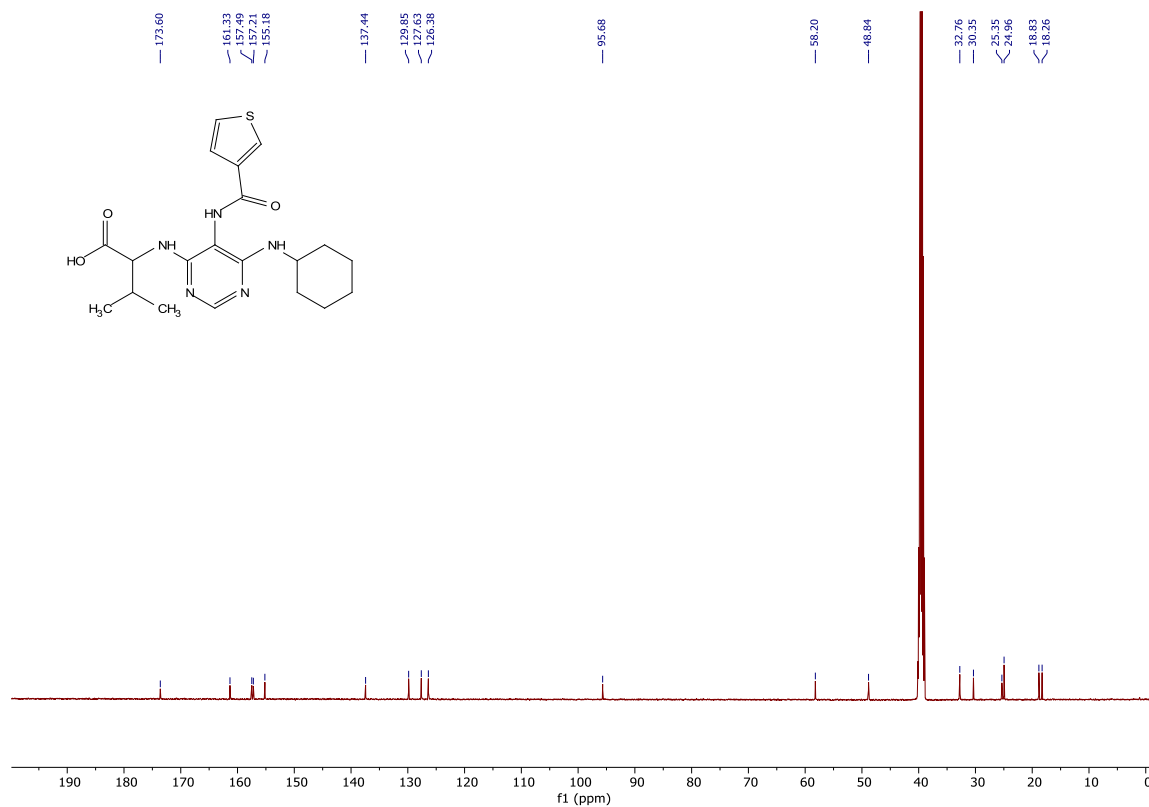
Spektrum 47: ^{13}C spektrum látky **2b**



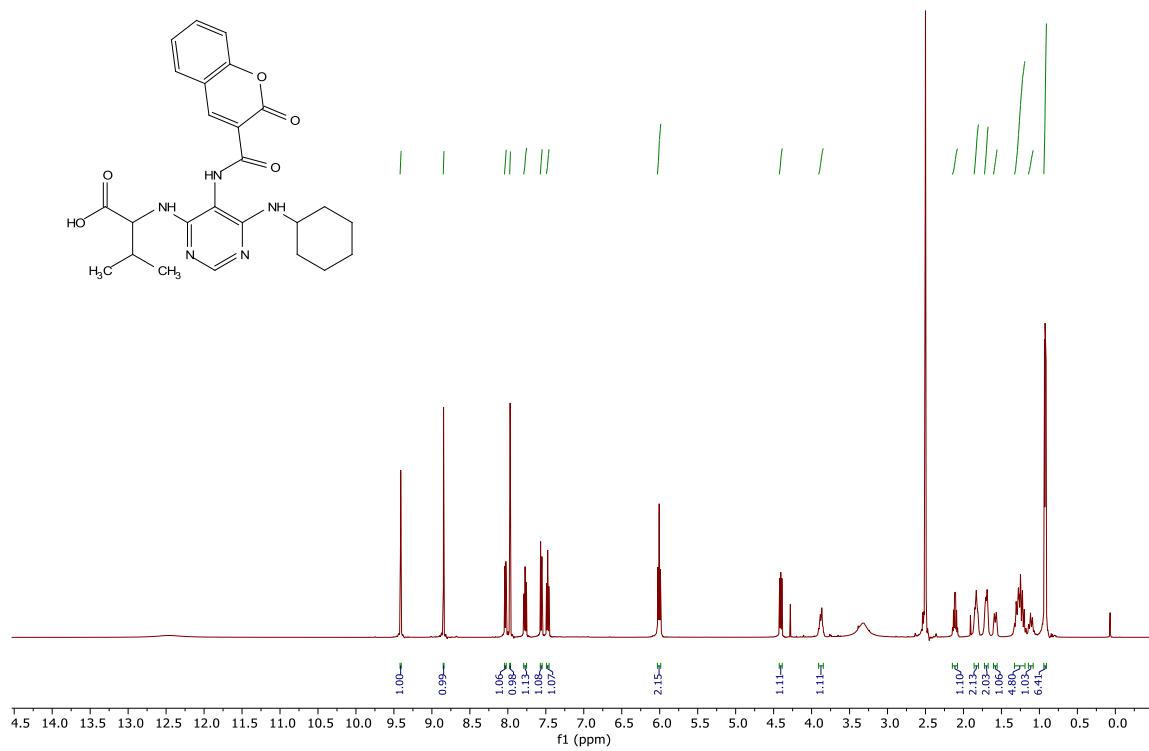
Spektrum 48: ^1H spektrum látky **2c**



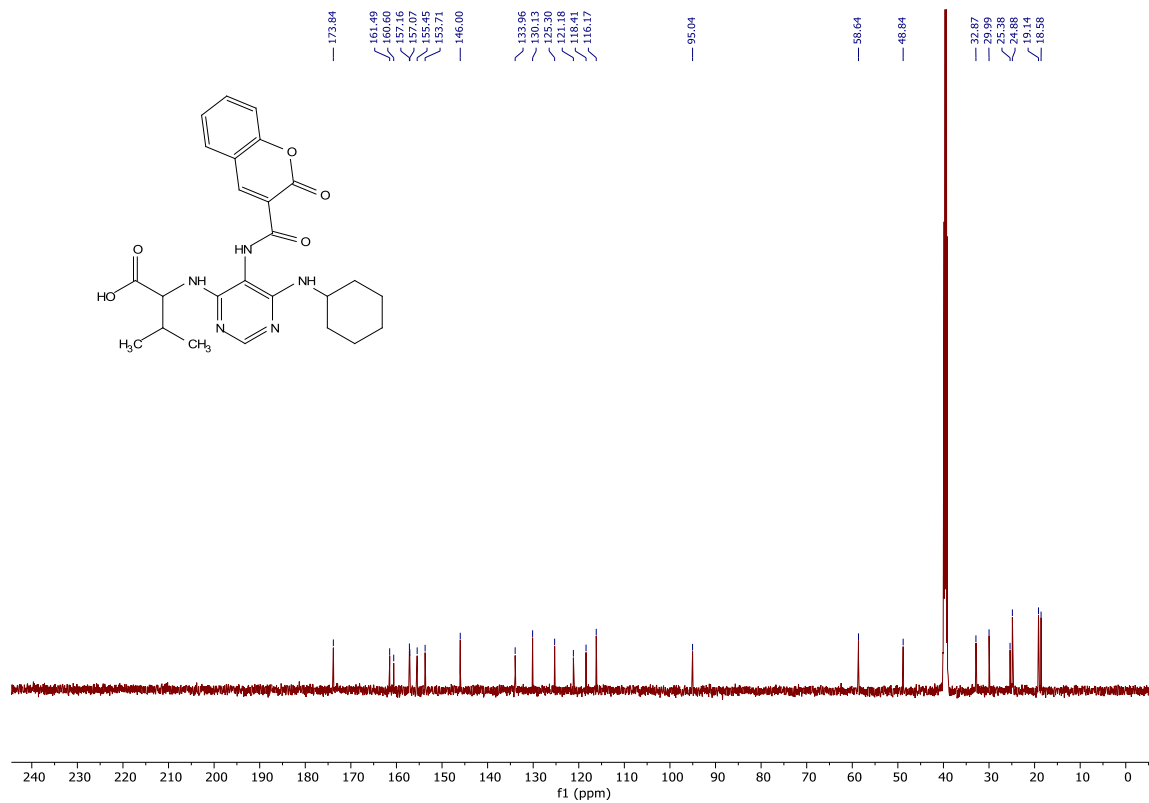
Spektrum 49: ^{13}C spektrum látky **2c**



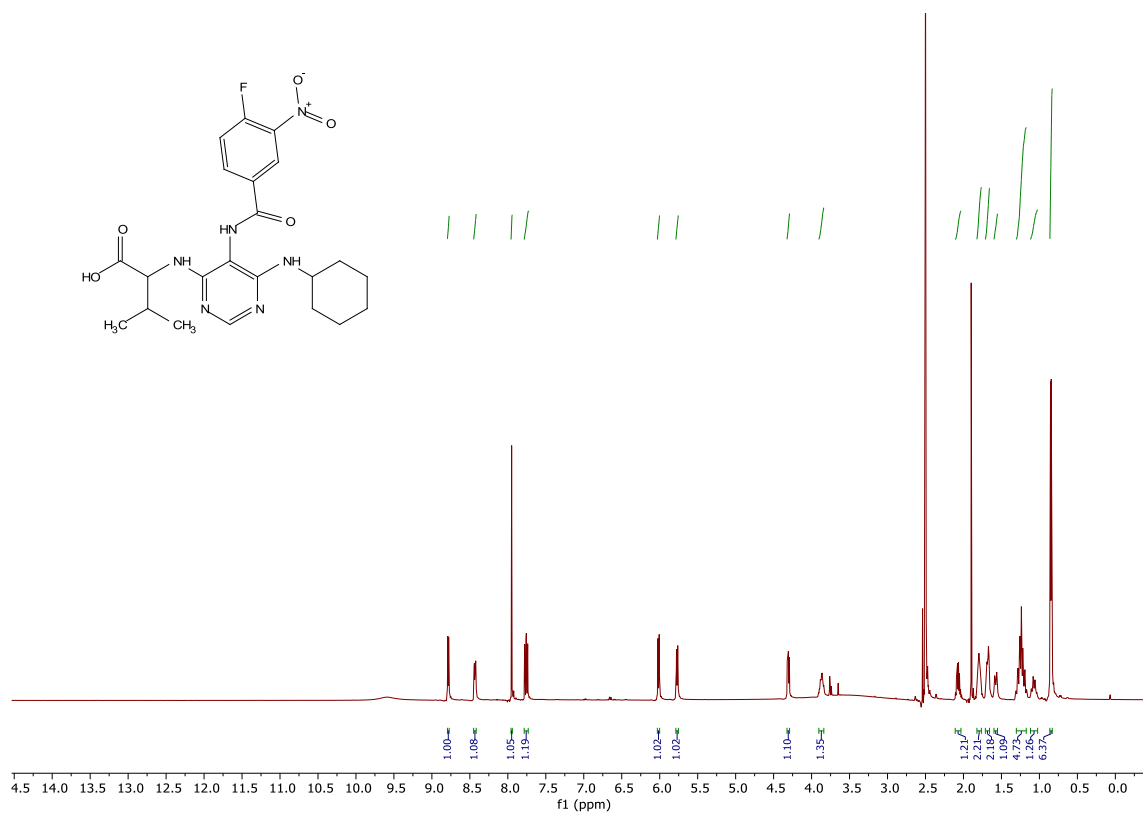
Spektrum 50: ^1H spektrum látky **2d**



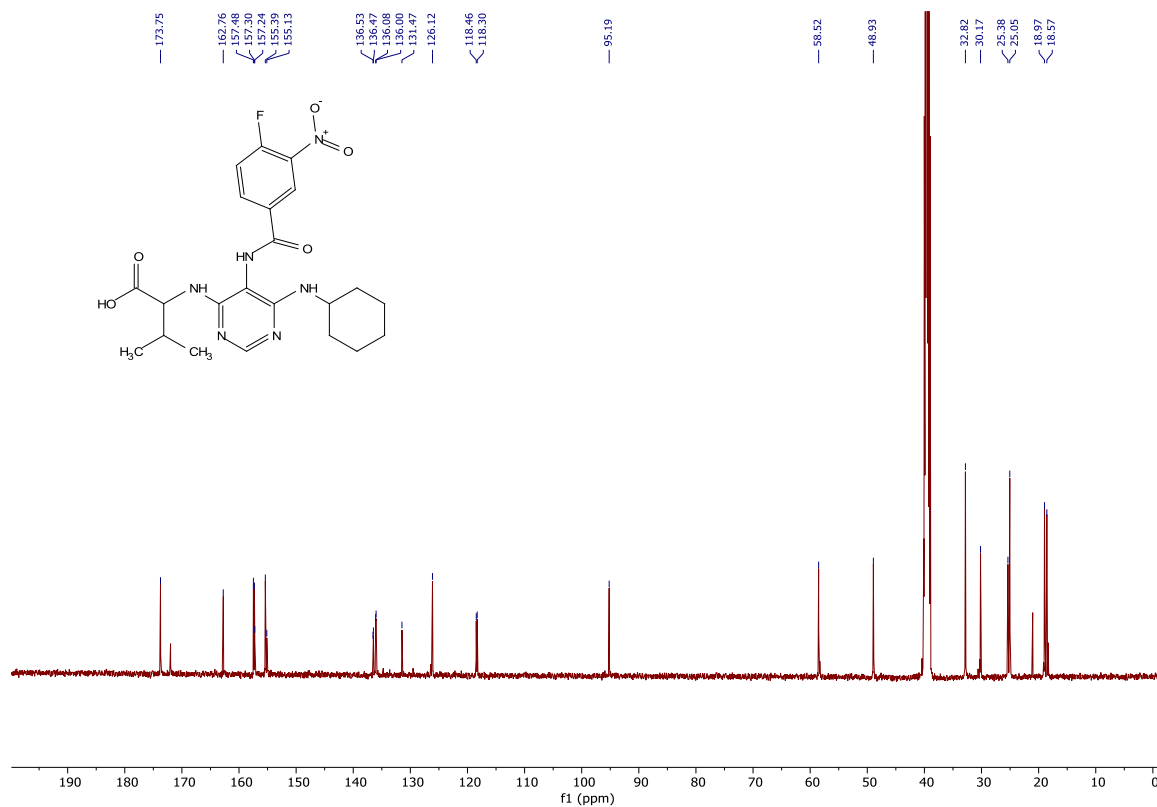
Spektrum 51: ^{13}C spektrum látky **2d**



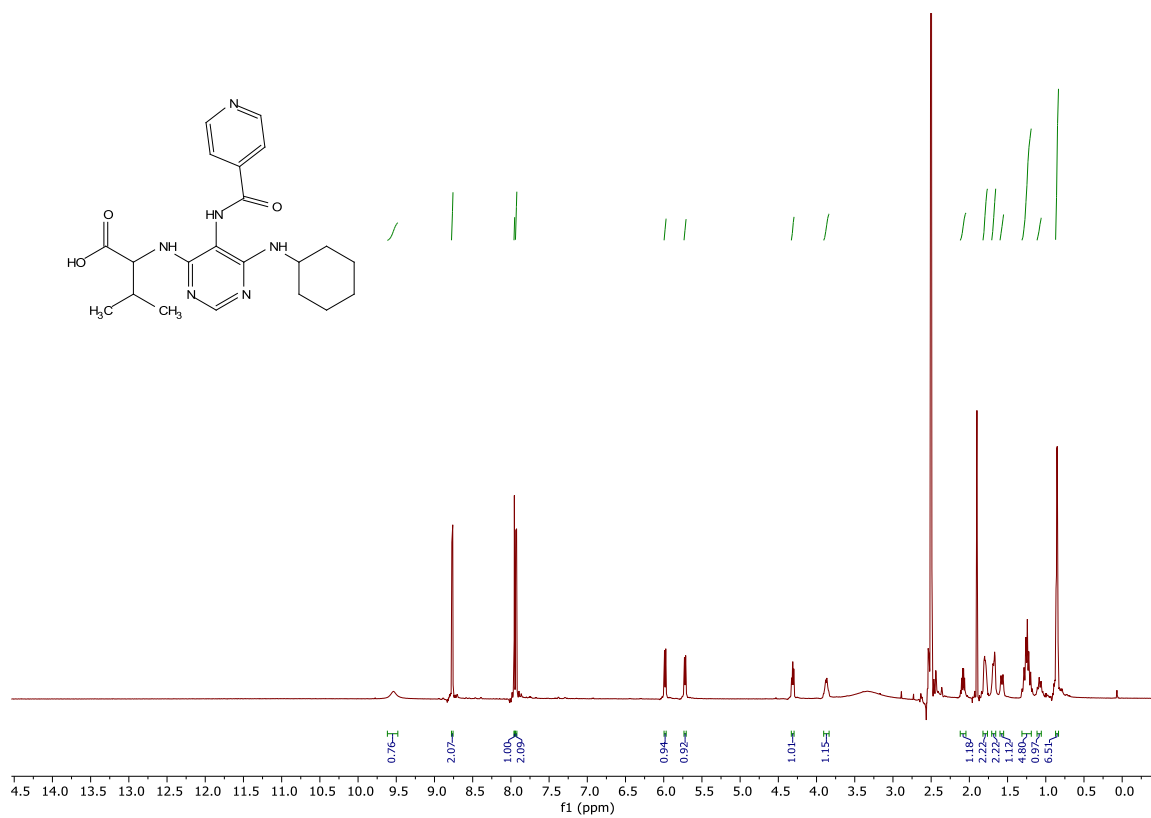
Spektrum 52: ^1H spektrum látky **2e**



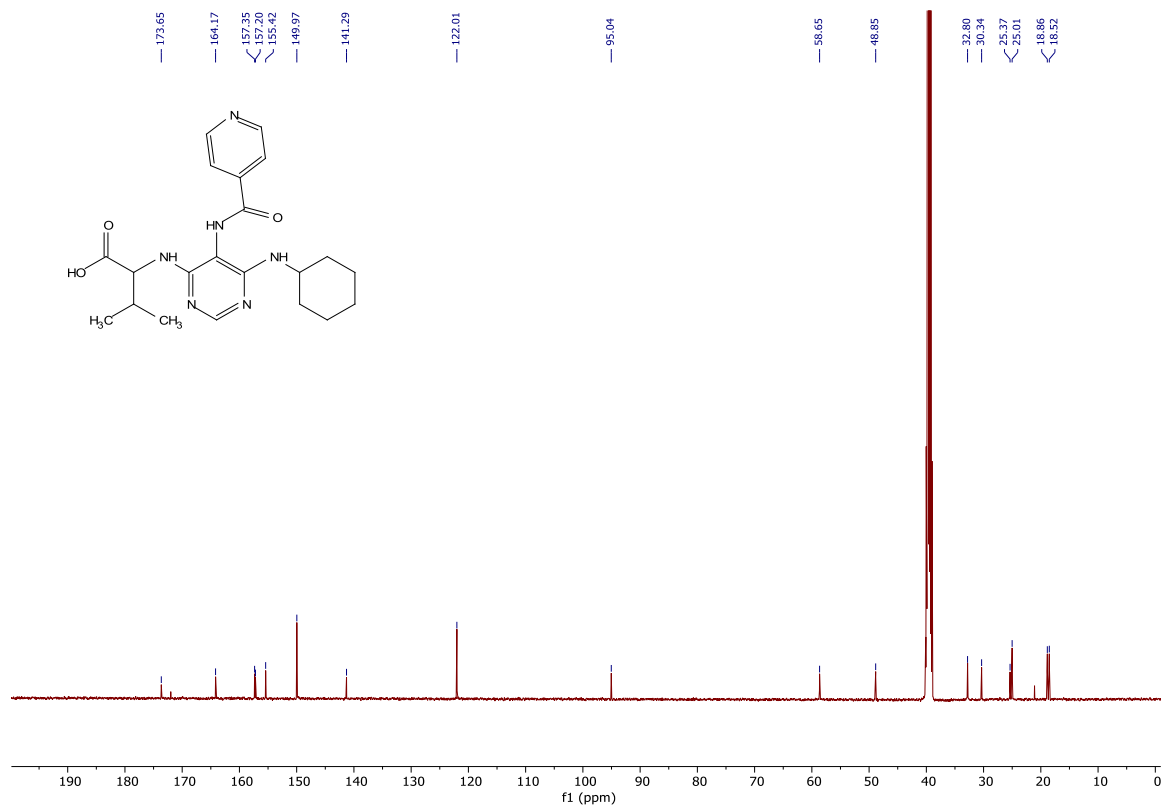
Spektrum 53: ^{13}C spektrum látky **2e**



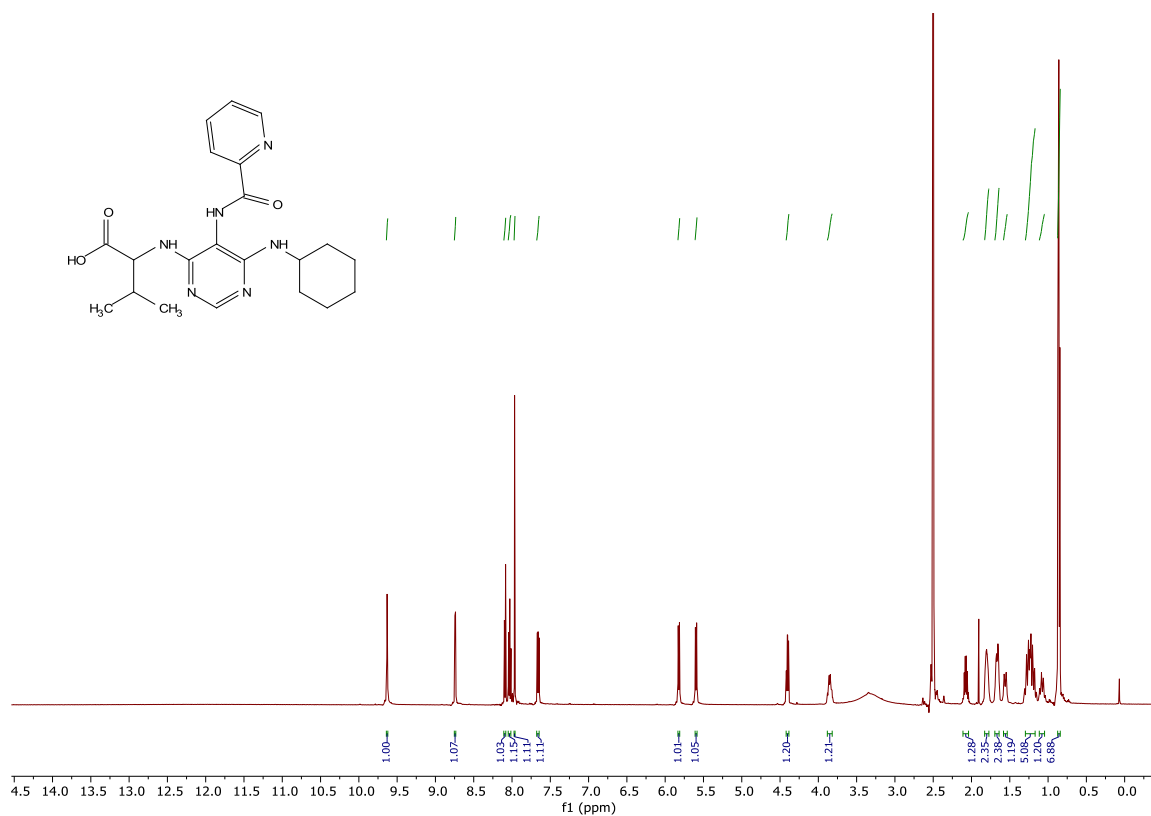
Spektrum 54: ^1H spektrum látky **2f**



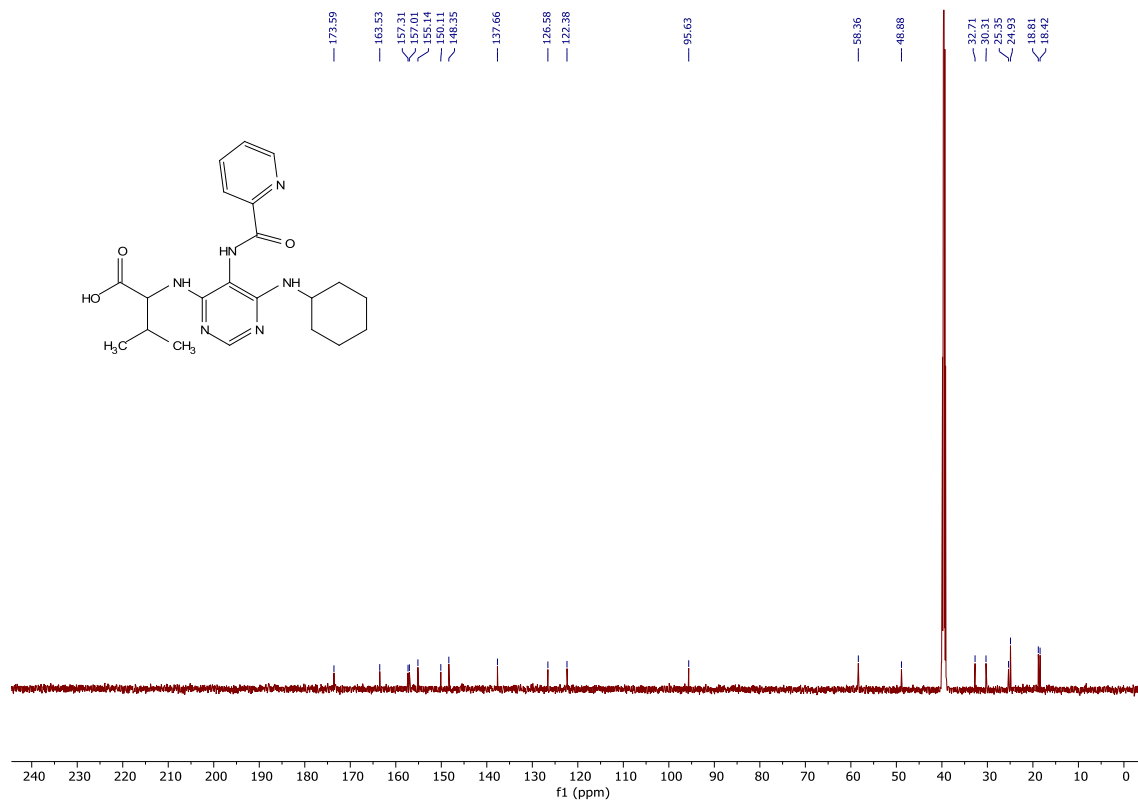
Spektrum 55: ^{13}C spektrum látky **2f**



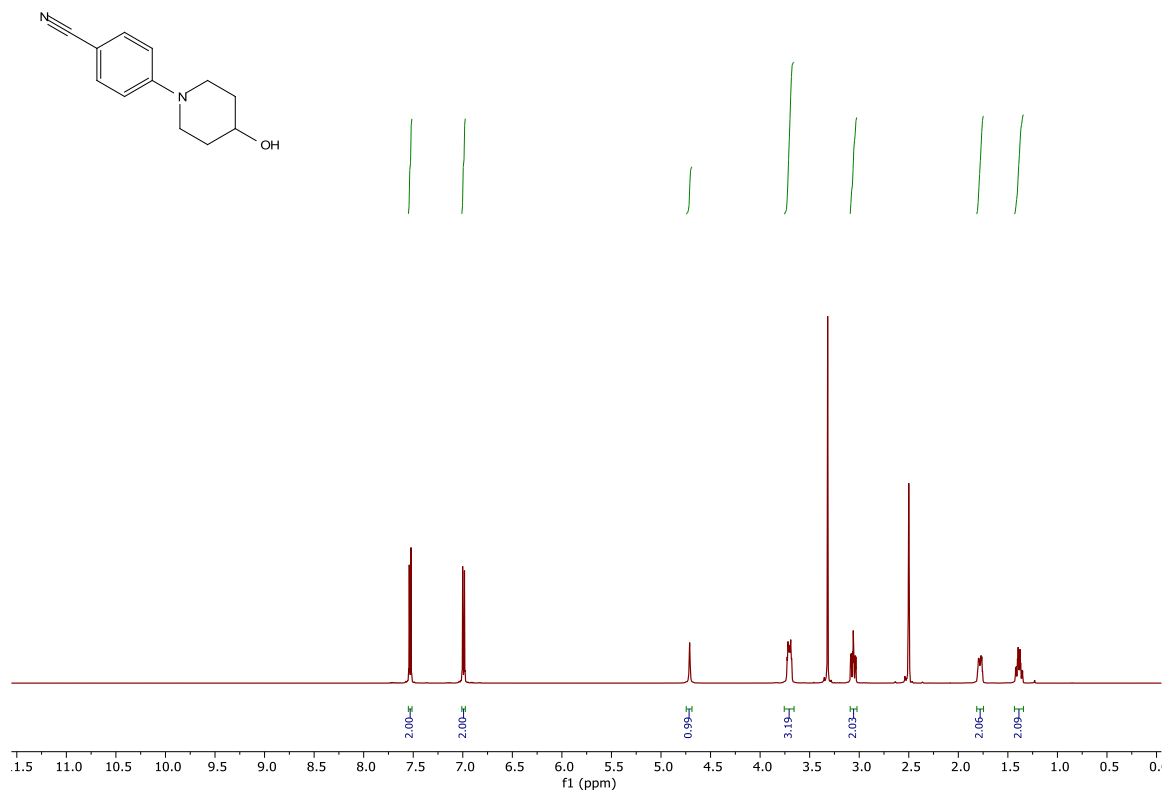
Spektrum 56: ^1H spektrum látky **2g**



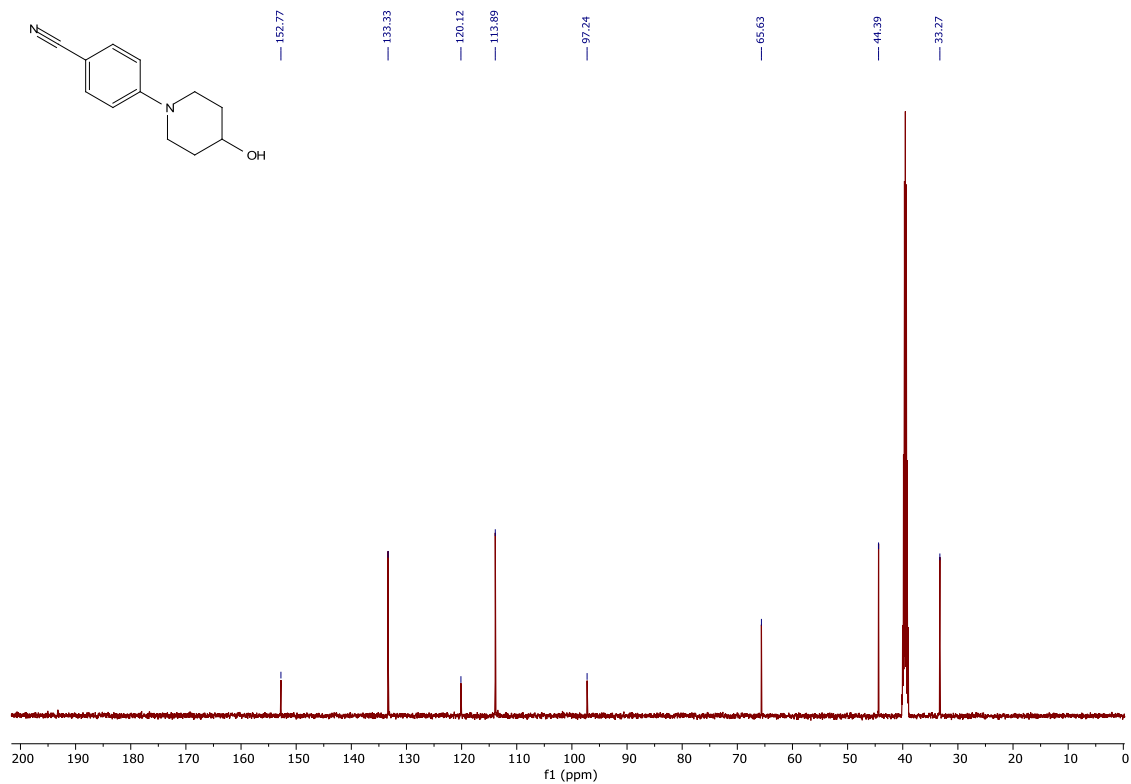
Spektrum 57: ^{13}C spektrum látky **2g**



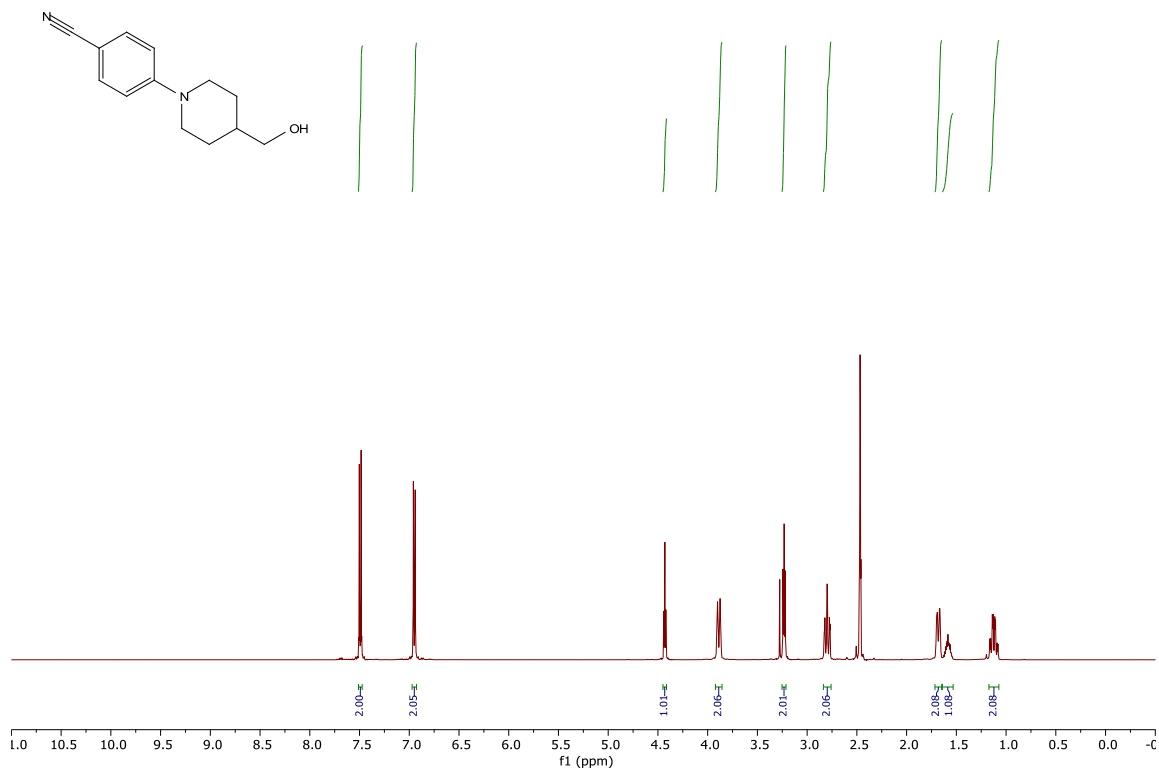
Spektrum 58: ^1H spektrum látky 10a



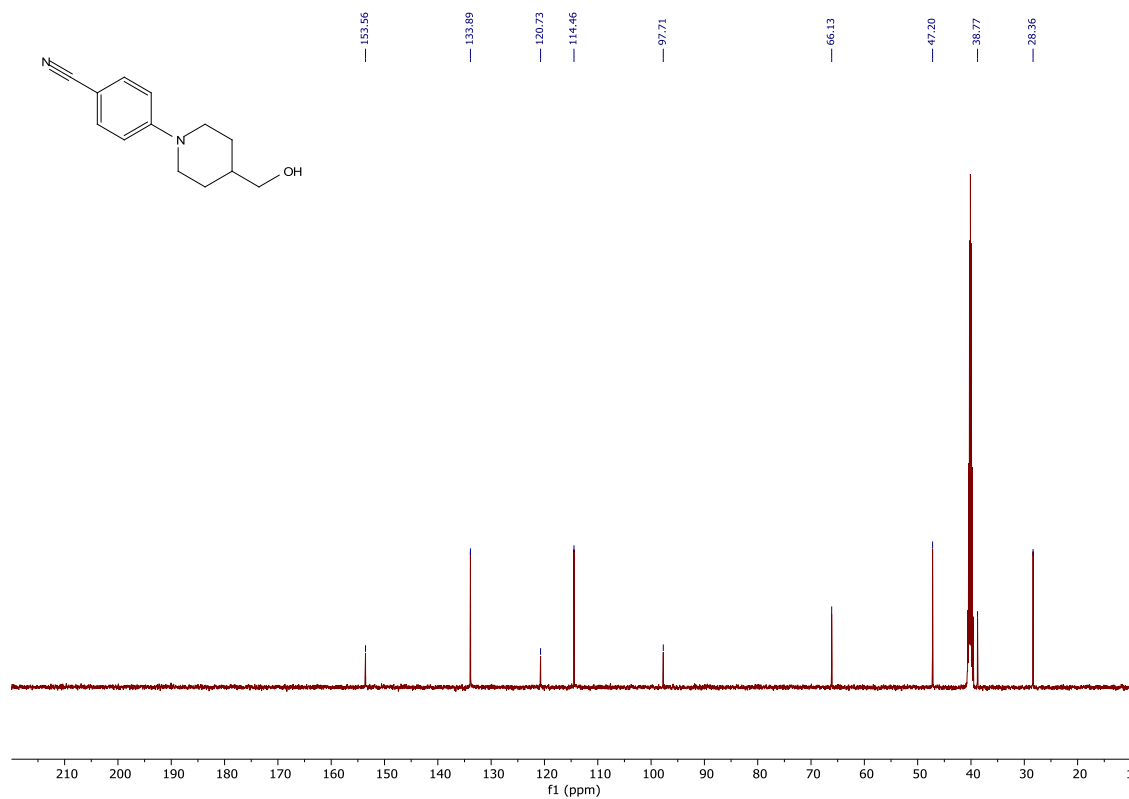
Spektrum 59: ^{13}C spektrum látky 10a



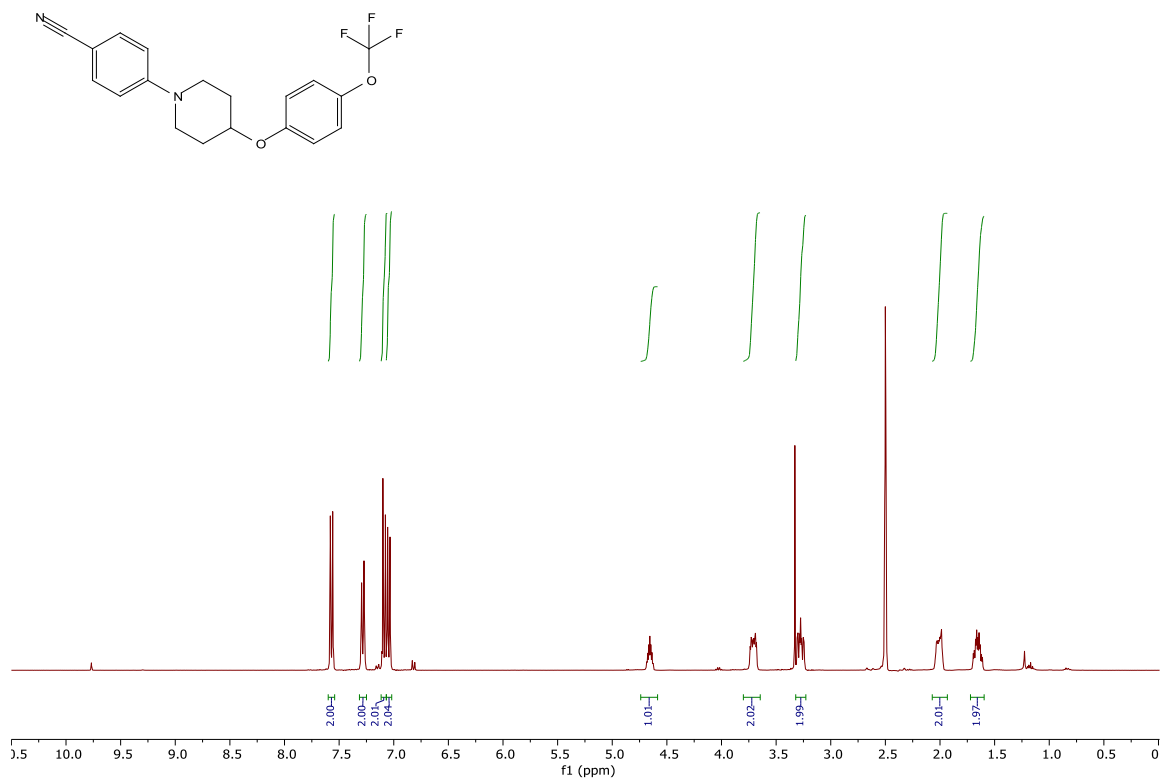
Spektrum 60: ^1H spektrum látky **10b**



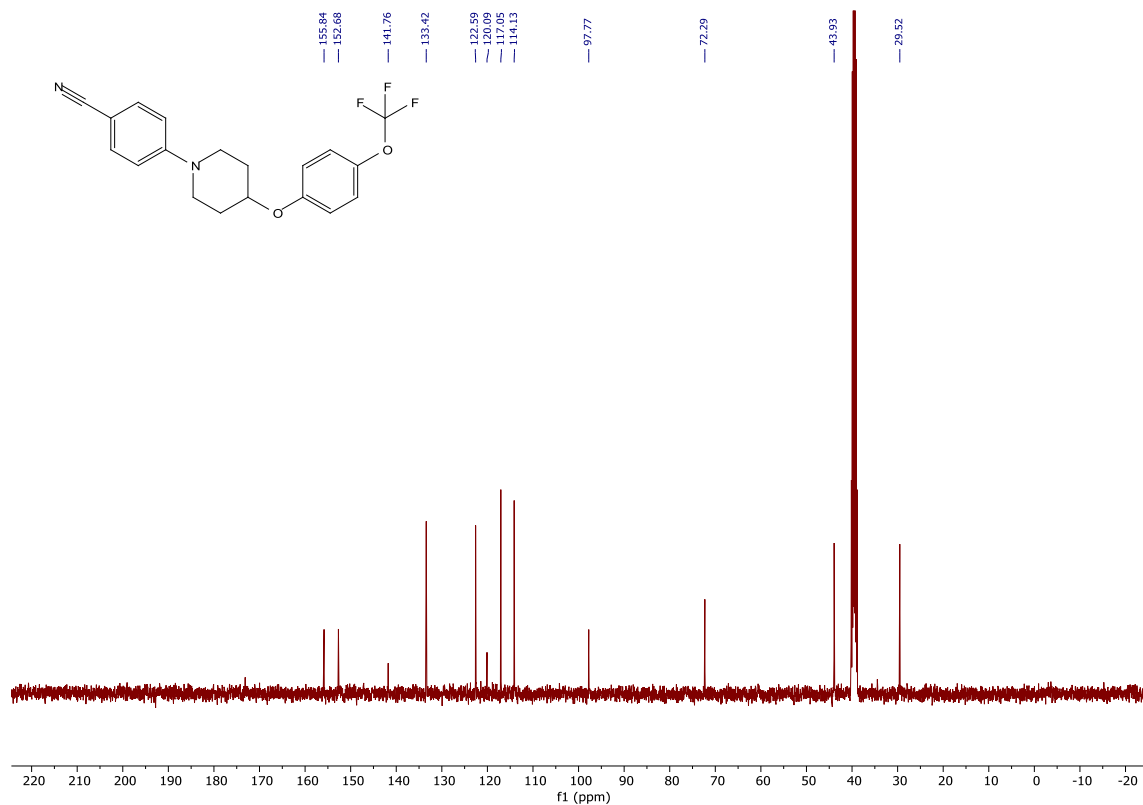
Spektrum 61: ^{13}C spektrum látky **10b**



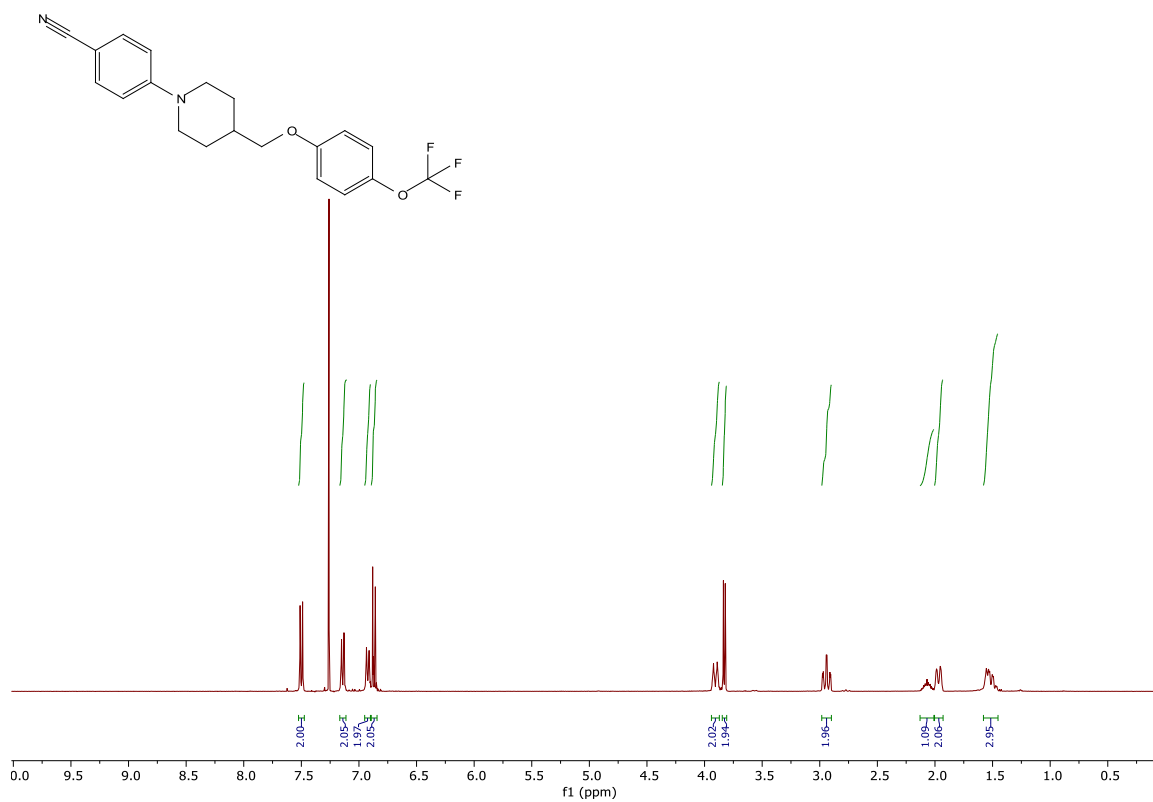
Spektrum 62: ^1H spektrum látky 11a



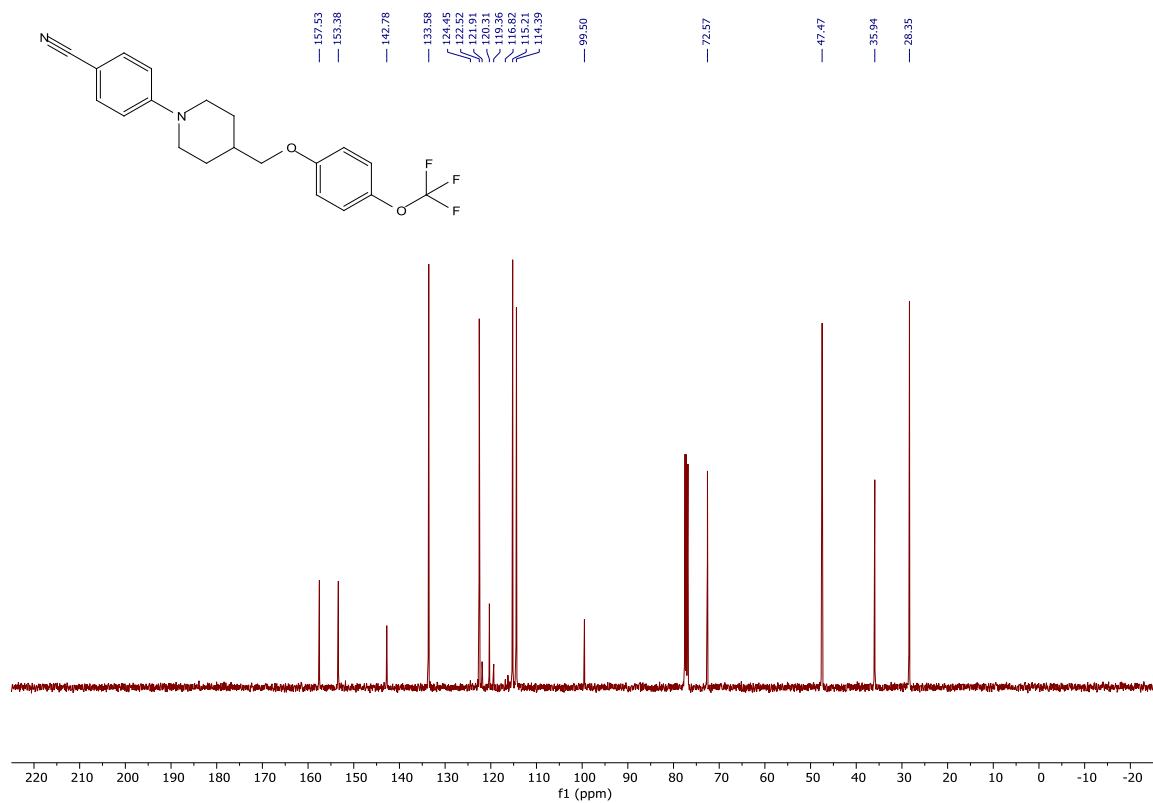
Spektrum 63: ^{13}C spektrum látky 11a



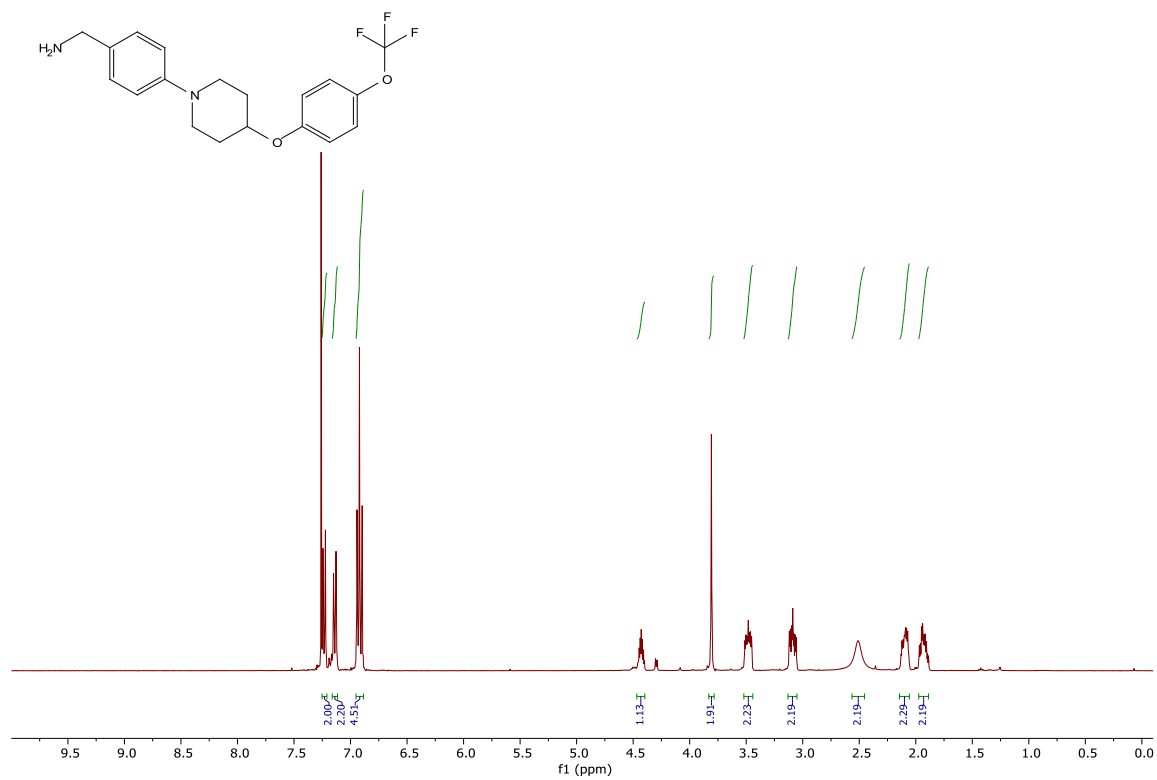
Spektrum 64: ^1H spektrum látky **11b**



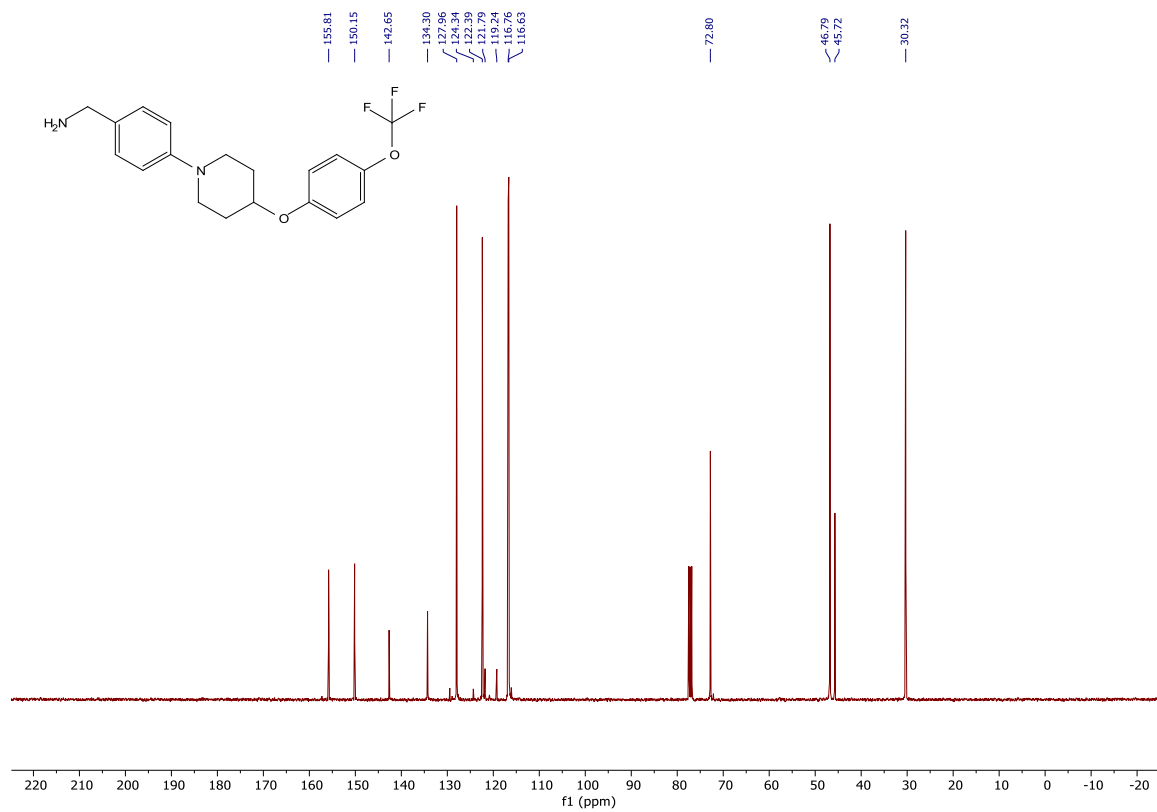
Spektrum 65: ^{13}C spektrum látky **11b**



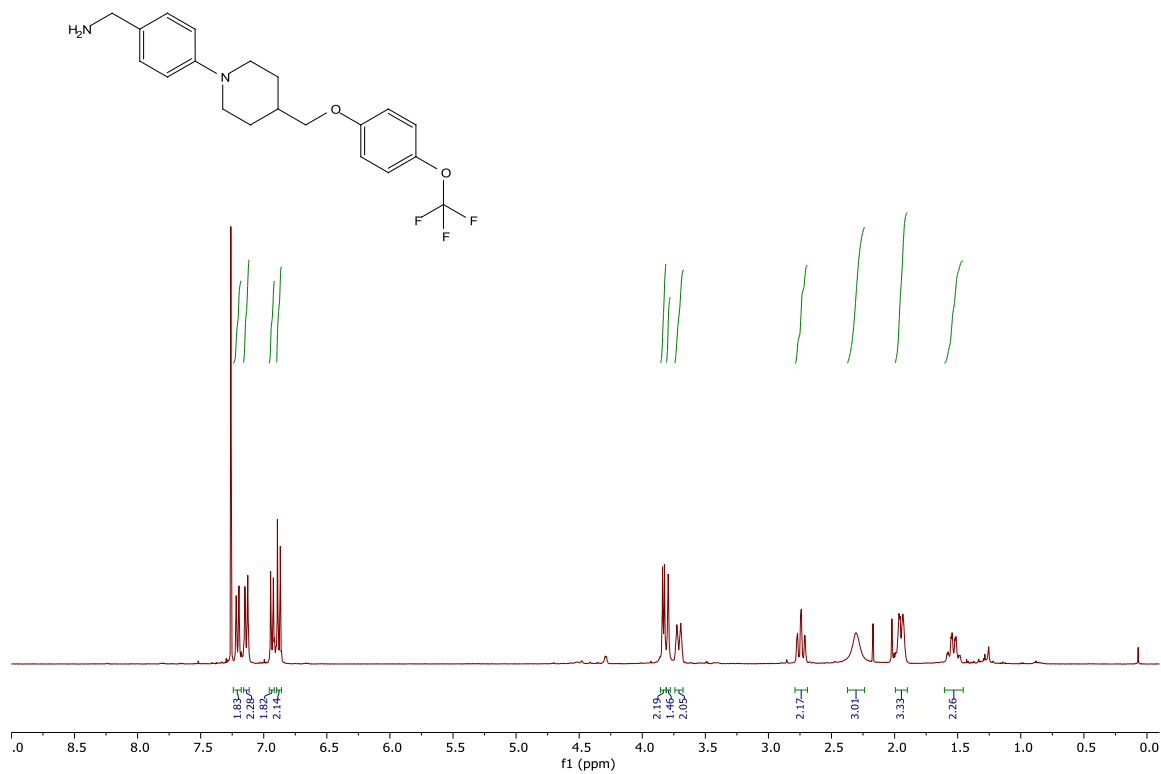
Spektrum 66: ^1H spektrum látky **12a**



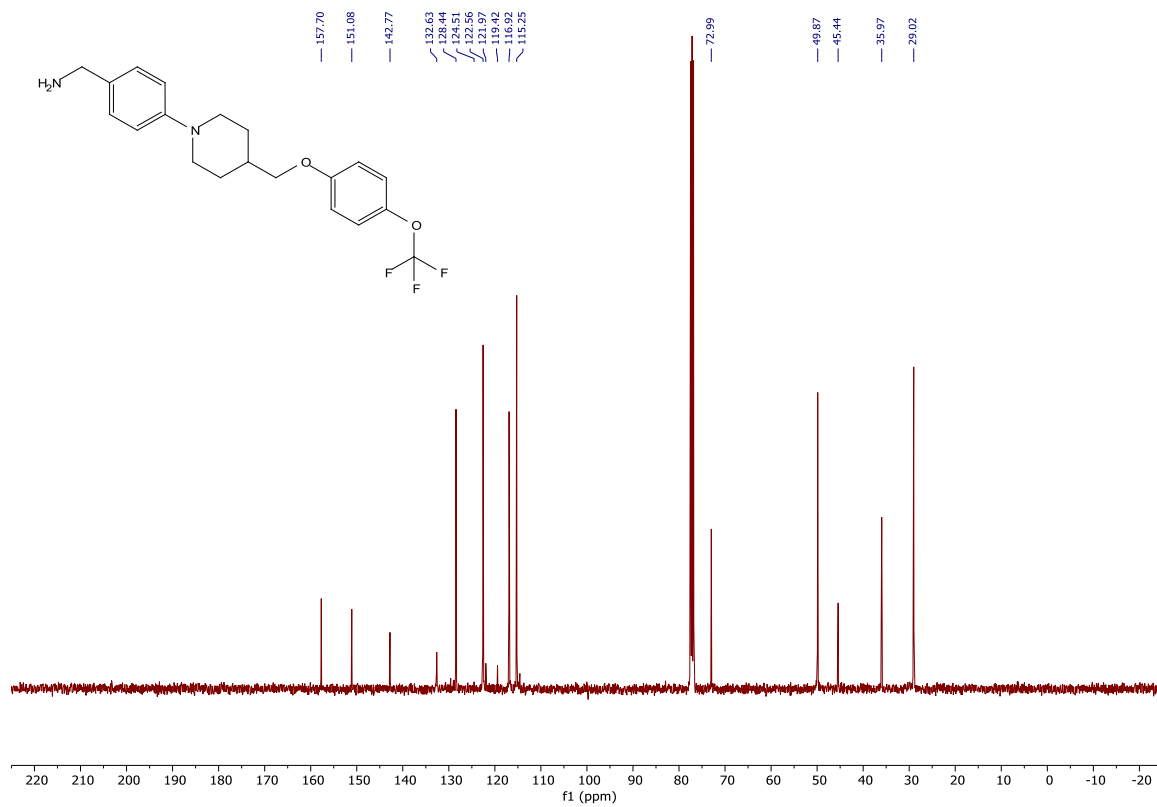
Spektrum 67: ^{13}C spektrum látky **12a**



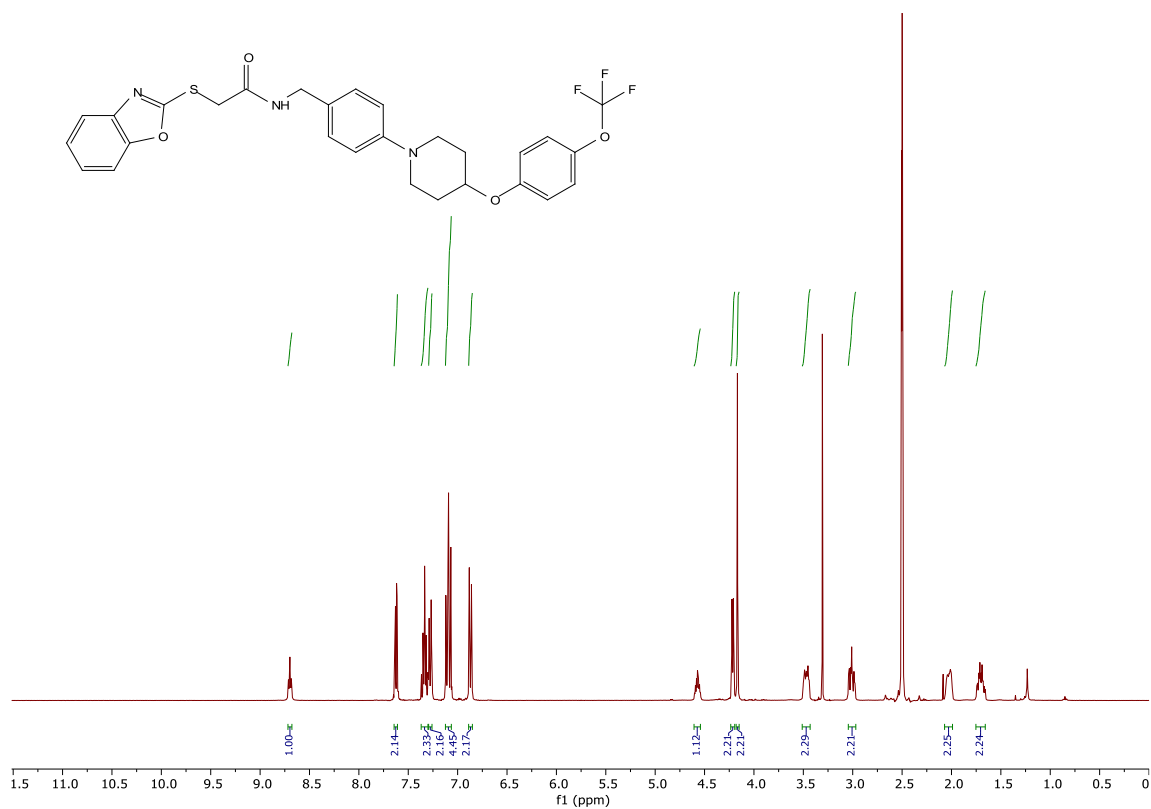
Spektrum 68: ^1H spektrum látky **12b**



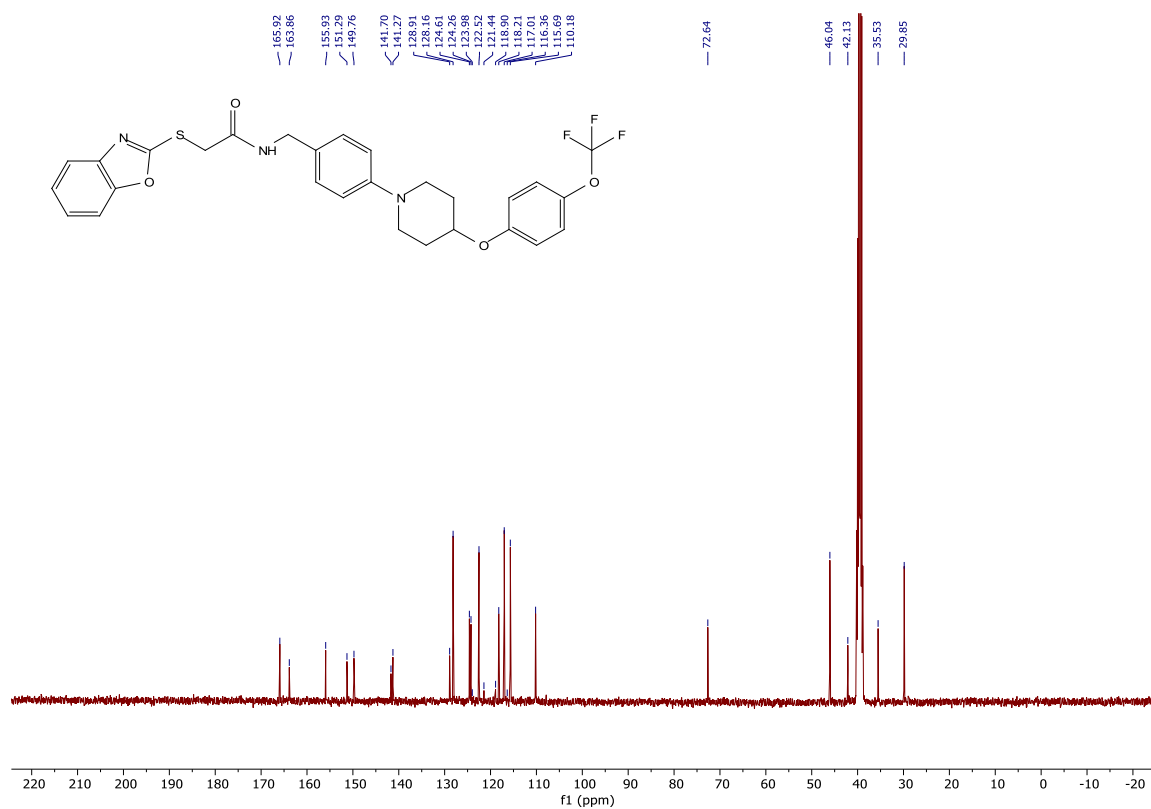
Spektrum 69: ^{13}C spektrum látky **12b**



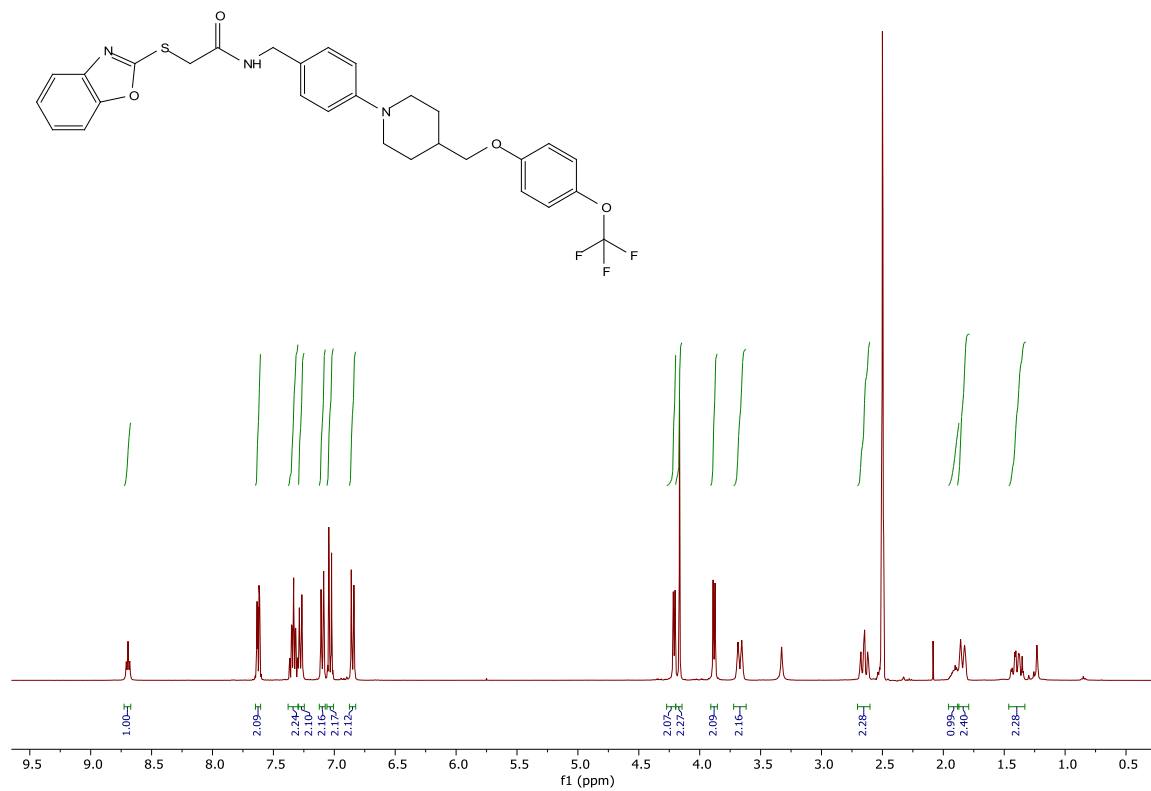
Spektrum 70: ^1H spektrum látky **34a**



Spektrum 71: ^{13}C spektrum látky **34a**



Spektrum 72: ^1H spektrum látky 34b



Spektrum 73: ^{13}C spektrum látky 34b

