

UNIVERZITA PALACKÉHO V OLOMOUCI
PŘÍRODOVĚDECKÁ FAKULTA
Katedra organické chemie



**Syntéza triazolo[1,5-*a*][1,4]diazepin-6-onů na pevné fázi
s využitím nekatalyzované Huisgenovy cykloadice**

Rigorózní práce

Autor: Mgr. Patricia Kriegelsteinová

Studijní obor: Organická chemie

Typ studia: Rigorózní

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

Prohlášení:

Prohlašuji, že jsem závěrečnou práci na téma „Syntéza triazolo[1,5-*a*][1,4] diazepin-6-onů na pevné fázi s využitím nekatalyzované Huisgenovy cykloadice“ zpracovala samostatně a že jsem uvedla všechny použité informační zdroje a literaturu. Tato práce ani její podstatná část nebyla předložena k získání jiného nebo stejného akademického titulu.

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

V Olomouci, 3. 3. 2021

.....

Mgr. Patricia Kriegelsteinová

Poděkování

V první řadě bych ráda poděkovala doc. RNDr. Miroslavu Suralovi, Ph.D. za cenné rady a pomoc v průběhu celé naší spolupráce, která trvala téměř 7 let. Díky jeho profesionálnímu přístupu a příkladnému vedení jsem se naučila nejen samostatné práci v laboratoři, ale i pokoře a trpělivosti, které jsou nedílnou součástí práce organického chemika. Jsem vděčná za veškeré příležitosti, které mi poskytl – účast na studentských vědeckých soutěžích, účast na odborných konferencích a zejména zahraniční stáž v Kanadě. Kromě jeho profesních rad si moc vážím i těch životních. Nejvíce oceňuji Mirkův nadhled, pragmatický přístup, přátelské vystupování, smysl pro humor a schopnost stát nohama pevně na zemi. Všechny tyto vlastnosti z něj dělají nejen skvělého vedoucího, ale i úžasného člověka a přítele. Věřím, že i když naše profesní spolupráce končí (minimálně na nějakou dobu), zůstaneme nadále v kontaktu.

Obrovské poděkování patří Barče Lemrové a Verče Ručilové, se kterými byla radost na projektu spolupracovat.

Děkuji i ostatním členům Katedry organické chemie i naší výzkumné skupiny, které jsem měla tu čest poznat i mimo pracovní sféru a které vždy moc ráda uvidím – Soňa Krajčovičová, David Vanda, Barča Lemrová, Milan Urban, Kristýna Vychodilová, Lucka Brulíková.

Chtěla bych poděkovat i analytikům a NMR operátorům působícím na KOCH a ÚMTM, bez jejichž pomoci by tato práce nevznikla. Děkuji i prof. RNDr. Janu Hlaváčovi, Ph.D. za poskytnuté zázemí a vzájemnou spolupráci na jiném projektu.

Speciální poděkování patří mému manželovi a rodině za podporu při nelehkých životních rozhodnutích.

Bibliografická identifikace:

Jméno a příjmení autora:	Mgr. Patricia Kriegelsteinová
Název práce:	Syntéza triazolo[1,5- <i>a</i>][1,4] diazepin-6-onů na pevné fázi s využitím nekatalyzované Huisgenovy cykloadice
Typ práce:	rigorózní
Pracoviště:	Katedra organické chemie
Konzultant:	doc. RNDr. Miroslav Soural, Ph.D.
Rok obhajoby práce:	2021
Abstrakt:	

Předložená rigorózní práce se zabývá syntézou triazolo[1,5-*a*][1,4] diazepin-6-onů s využitím syntézy na pevné fázi. Klíčovým syntetickým krokem je Huisgenova termální cykloadice. Pro získání strukturní rozmanitosti bylo otestováno celkem devět Fmoc-*L*-aminokyselin a osm strukturně různých alkynylderivátů. Celkem se podařilo připravit devatenáct finálních derivátů. Dále bylo na modelovém derivátu prozkoumáno chování substrátu pro cykloadici v prostředí báze. Aplikovatelnost vyvinuté metodiky pro syntézu modifikovaných peptidů byla demonstrována na přípravě modelového peptidomimetika. Dalším přínosem práce je optimalizace přípravy Fmoc-azidoalaninu, klíčové reakční komponenty, kterou se podařilo přenést až do měřítka několika desítek gramů. Výsledky výzkumu byly publikovány v impaktovaném časopise, publikace je součástí předložené práce.

Klíčová slova:	triazoly, syntéza na pevné fázi, Huisgenova cykloadice, click reakce, Fmoc-azidoalanin
Počet stran:	75
Počet volných příloh:	0
Jazyk:	čeština, angličtina

Bibliographic identification:

Author's first name and surname: Mgr. Patricia Kriegelsteinová
Title: Solid-phase synthesis of triazolo[1,5-*a*][1,4] diazepin-6-ones using non-catalyzed Huisgen cycloaddition
Type of thesis: RNDr. Thesis
Department: Department of Organic Chemistry
Consultant: doc. RNDr. Miroslav Sural, Ph.D.
Year of presentation: 2021

Abstract:

This thesis is devoted to the solid-phase synthesis of triazolo[1,5-*a*][1,4] diazepin-6-ones. The key synthetic step is Huisgen thermal cycloaddition. For structural diversification of final compounds, nine Fmoc-*L*-aminoacids and eight structurally diverse alkynyl derivatives were tested. In total, nineteen final derivatives were successfully prepared. In addition, the behaviour of a substrate for cycloaddition in base environment was investigated on a model compound. The applicability of developed methodology for the preparation of modified peptides was successfully demonstrated by the synthesis of a model peptidomimetic. Further contribution of this research is a successful scale-up of preparation of Fmoc-azidoalanine (dozens of grams). The outcome of this research was published in the impacted journal, the publication is also included in this thesis.

Keywords: triazoles, solid-phase synthesis, Huisgen cycloaddition, click reaction, Fmoc-azidoalanine
Number of pages: 75
Number of attached appendices: 0
Language: Czech, English

Obsah

Seznam zkratk	7
1 Úvod a cíle práce	9
2 Seznámení s problematikou	10
2.1 Click reakce a Huisgenova cykloadice	10
2.1.1 Mechanismus	11
2.2 Vybrané syntetické přístupy vedoucí k příbuzným derivátům	13
2.2.1 Syntéza benzotriazolodiazepinů s využitím Huisgenovy cykloadice	13
2.2.2 Další syntetické přístupy vedoucí k derivátům benzotriazolodiazepinů	15
2.2.3 Syntéza triazolodiazepinů pomocí Ugiho reakce.....	15
2.2.4 Syntéza triazolodiazepinů jako potenciálních peptidomimetik	17
2.3 Komentář k předložené publikaci	19
2.3.1 Příprava Fmoc-azidoalaninu	19
2.3.2 Optimalizace syntetické cesty.....	20
2.3.3 Příprava diketopiperazinů	26
2.3.4 Příprava heptapeptidu	27
2.4 Shrnutí	28
2.5 Přehled použité literatury	29
3 Publikace k předložené práci	33
4 Doplnující informace k publikaci	41

Seznam zkratek

AA	aminokyselina
ACN	acetonitril
Ala	alanin
bezv.	bezvodý
Boc	<i>tert</i> -butyloxykarbonyl
CuAAC	copper-catalyzed alkyne-azide cycloaddition (mědí katalyzovaná cykloadice alkyn-azid)
DIAD	diisopropyl azodikarboxylát
DCM	dichlormethan
DIC	<i>N,N'</i> -diisopropylkarbodiimid
deg.	degassed, odplyněný
DMAP	(4-dimethylamino)pyridin
DMF	dimethylformamid
DMSO	dimethylsulfoxid
eq	ekvivalent
EtOAc	ethylacetát
Fmoc	<i>N</i> -(9-fluorenylmetoxykarbonyloxy)
hex	<i>n</i> -hexan
HOBt	1-hydroxybenzotriazol
HRMS	hmotnostní spektrometrie s vysokým rozlišením
Me	methyl
MeOH	methanol
MF	mobilní fáze
NMR	nukleární magnetická rezonance
Ns	nitrobenzensulfonyl
on	přes noc (overnight)
PG	chránicí skupina (protecting group)
Ph	fenyl
PPh ₃	trifenylfosfin
PhI(OAc) ₂	jodosobenzen- <i>I,I</i> -diacetát, diacetoxyjódbenzen
rt	laboratorní teplota
SPS	solid-phase synthesis (syntéza na pevné fázi)

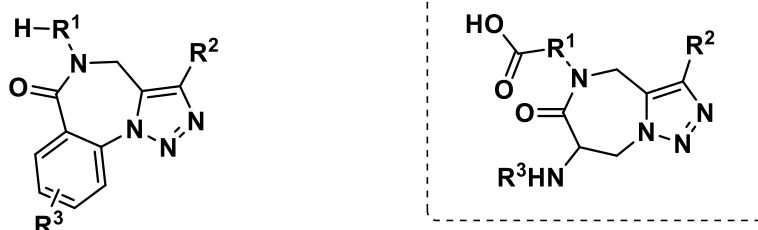
<i>tBu</i>	terc-butyl
TEA	triethylamin
TFA	trifluoroctová kyselina
THF	tetrahydrofuran
TLC	tenkovrstevná chromatografie
UPLC-MS	vysokoúčinná kapalinová chromatografie-hmotnostní spektrometrie

Zkratky použité v NMR zápisech:

s	singlet
d	dublet
dd	dublet dubletů
dt	dublet tripletů
t	triplet
m	multiplet
q	kvartet
ppm	parts per million

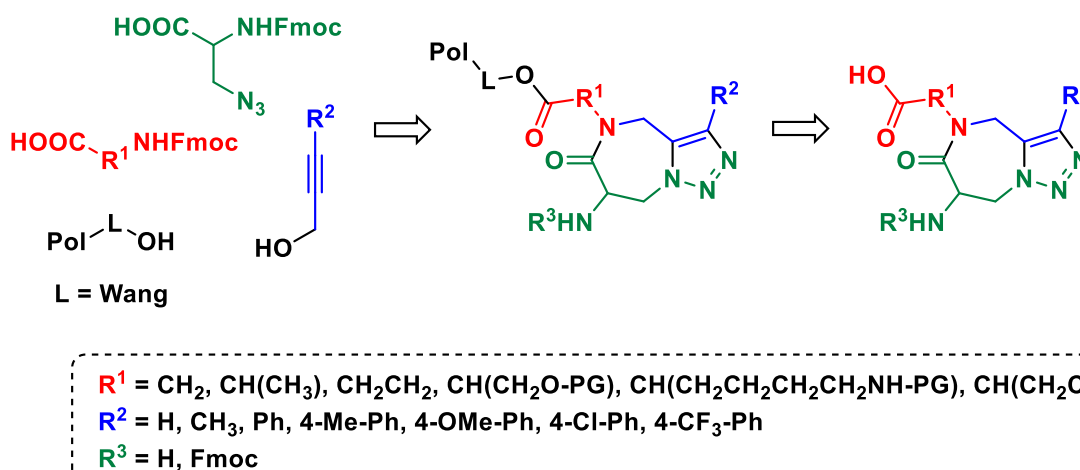
1 Úvod a cíle práce

Předložená rigorózní práce tematicky navazuje na předchozí práci ve výzkumné skupině doc. Sourala, která se zabývala využitím nekatalyzované Huisgenovy cykloadice pro přípravu benzotriazolodiazepinonů s využitím syntézy na pevné fázi.¹ Tato práce se zabývá přípravou strukturně příbuzných triazolodiazepinonů (**Obrázek 1**).



Obrázek 1: Struktura popsáných benzotriazolodiazepinonů (vlevo) a struktura navržených triazolodiazepinonů (vpravo)

Pro vývoj a testování použitelnosti metody byly navrženy Fmoc-*L*-aminokyseliny a různě substituované alkynoly jako diversifikující komponenty, přičemž klíčovou, společnou komponentou je Fmoc-azidoalanin (**Obrázek 2**). Vzhledem k velkému počtu dostupných výchozích látek se jako ideální strategie jevílo využití syntézy na pevné fázi, která umožňuje rychlou a snadnou paralelní přípravu sérií látek pomocí multistupňové syntézy. Jako polymerní nosič byla vybrána pryskyřice s Wangovým linkerem umožňující imobilizaci výchozích Fmoc-*L*-aminokyselin ve formě esterů.



Obrázek 2: Rámcové znázornění syntézy a struktury výchozích látek

Cílové deriváty jsou zajímavé i z pohledu biologické aktivity, jelikož jsou strukturně příbuzné triazolopiperazinům, u kterých byla popsána antivirotická² a antidiabetická³ aktivita. Další motivací k vývoji metodiky byla její potenciální aplikovatelnost v oblasti

peptidomimetik, tedy modifikovaných peptidů s výhodnými farmakologickými vlastnostmi.⁴ V tomto ohledu je nutné připomenout, že syntéza na pevné fázi představuje konvenční a nejrozšířenější způsob přípravy peptidů a jejich analogů, a to v laboratorním i průmyslovém měřítku.

Práce je rozdělena do několika částí. V kapitole Seznámení s problematikou je popsána Huisgenova cykloadice a její varianty, dále následuje popis některých současných přístupů k přípravě strukturně podobných látek. Obecný popis konceptu syntézy na pevné fázi není v této práci zahrnut, neboť tato problematika byla již zpracována v bakalářské práci uchazeče, resp. v rámci jiných závěrečných prací pracoviště.^{5,6,7} V podkapitole Komentář k předložené publikaci je popsána optimalizace publikované metodiky. Následují kapitoly Shrnutí a Přehled použité literatury. Poté následuje samostatná kapitola Publikace k předložené práci, kde je rovněž zahrnuta i experimentální část a použité postupy. Na závěr je zařazena kapitola Doplnující informace k publikaci, která obsahuje analytická data připravených derivátů (Supporting Information).⁸

Kapitola 2 obsahuje samostatné arabské číslování struktur. V kapitolách 3 a dále je použito také arabské číslování (pro větší přehlednost), číslování začíná opět od struktury č.1.

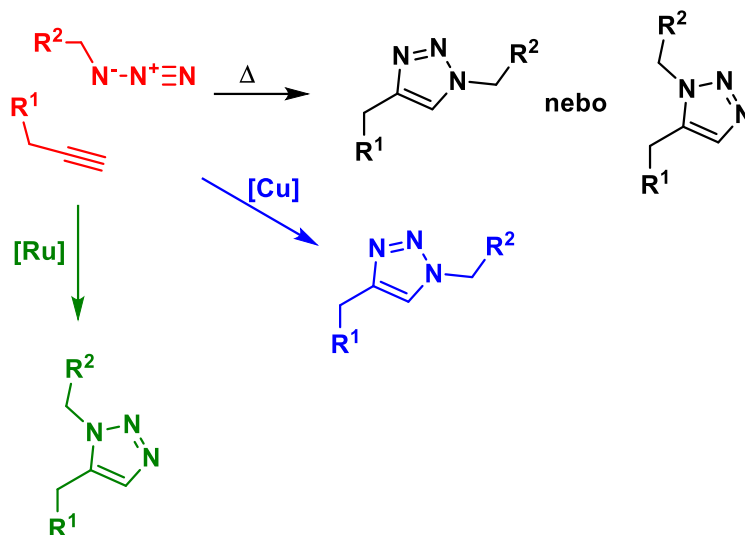
2 Seznámení s problematikou

2.1 Click reakce a Huisgenova cykloadice

Pojem „click chemie“ poprvé použil K. B. Sharpless v roce 2001 pro označení reakcí, které mají vysokou výtěžnost, jsou použitelné pro široké rozmezí reagentů, jsou jednoduše proveditelné, stereospecifické a vedou k tvorbě jediného meziprojektu, který lze odstranit bez nutnosti chromatografické separace. Obvykle se provádí v rozpouštědlech, která lze jednoduše odstranit.⁹

Huisgenova 1,3-dipolární cykloadice je jednou z reakcí, která splňuje výše uvedená kritéria a bývá často spojována s click chemií. Jedná se o reakci mezi alkynem a azidem, výsledkem je 1,2,3-triazol. Reakce může být katalyzována teplotou (termální Huisgenova cykloadice) – nevýhodou je použití vyšších reakčních teplot a rovněž může dojít ke vzniku regioisomerů. Druhou, často preferovanou variantou je použití katalýzy kovem, obvykle se používají měděné či rutheniové katalyzátory. Katalyzovanou Huisgenovu cykloadici je obvykle možno provádět za laboratorní teploty, průběh je regioselektivní v závislosti na typu použitého katalyzátoru, viz **Obrázek 3**. Mědí katalyzovaná cykloadice mezi azidem a

alkynem bývá obvykle označována zkratkou „CuAAC“ (copper-catalyzed azide-alkyne cycloaddition), v případě použití ruthenia RuAAC (ruthenium-catalyzed azide-alkyne cycloaddition).^{10,11,12}

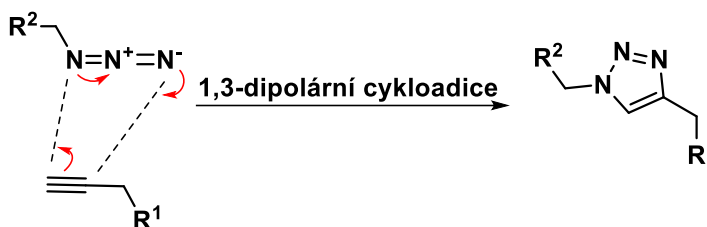


Obrázek 3: Rozdíl v regioselektivitě termální Huisgenovy cykloadice, CuAAC a RuAAC

2.1.1 Mechanismus

Huisgenova cykloadice je reakce dipolarofilu s 1,3-dipólem vedoucí k tvorbě pětičlenného cyklu. Typickými dipolarofily jsou alkeny a alkyne, 1,3-dipólem jsou obvykle molekuly obsahující jeden či více heteroatomů mající alespoň jednu mesomerní strukturu obsahující nabitý dipól – může se jednat například o nitriloxidy, azidy či diazoalkany.¹³

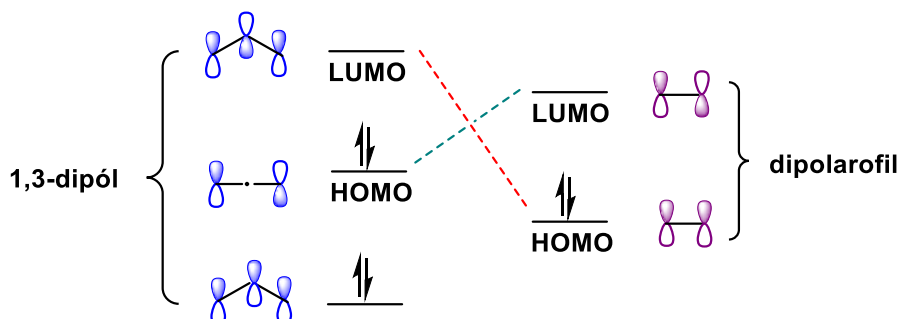
Principem je interakce dvou π elektronů dipolarofilu se čtyřmi π elektrony 1,3-dipólu – průběh reakce jednokrokový („concerted“), pericyklický, suprafaciální a je příbuzný klasické Diels-Alderově reakci, viz **Obrázek 4**. Správné označení reakce je [2s + 4s] cykloadice označující počet interagujících π elektronů, časté starší označení je [2+3] cykloadice – jedná se o počet interagujících atomů.



Obrázek 4: Mechanismus Huisgenovy 1,3-dipolární cykloadice

V případě, že dipolarofil obsahuje elektronakceptorní substituenty, LUMO dipolarofilu interaguje s HOMO dipólu. Pokud dipolarofil obsahuje elektrondonorní

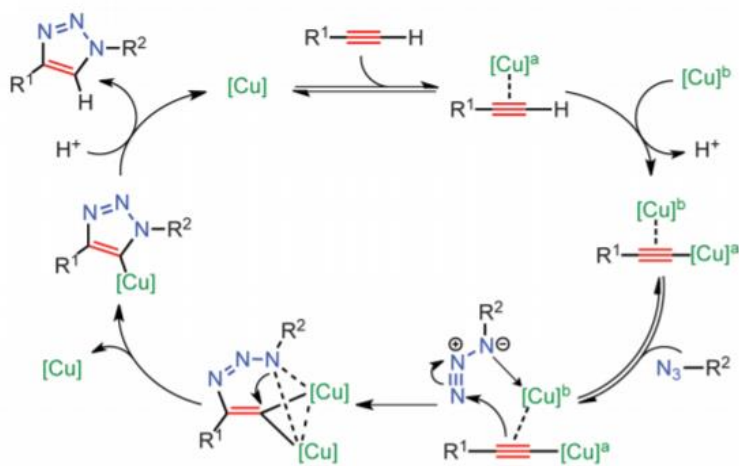
substituenty, je průběh interakce opačný (HOMO dipolarofilu, LUMO dipólu), viz **Obrázek 5**. Výsledkem je ale vždy pětičlenný cyklus, v případě interakce alkyne s azidem 1,2,3-triazol.¹⁴



Obrázek 5: Interakce molekulových orbitalů 1,3-dipólu a dipolarofilu

Regiosektivita reakce je závislá na elektronových a sterických efektech. V případě klasické termální Huisgenovy cykloadice alkyne – azid mohou vzniknout 2 regioisomery, jak ukazuje **Obrázek 3**.

Pokud je použita katalýza kovem (nejčastěji Cu^I), je mechanismus reakce odlišný a regiosektivita je vyšší – viz **Obrázek 6**.¹⁵



Obrázek 6: Navržený mechanismus CuAAC (převzato z B. T. Worrell et al., *Science*, **2013**, 340, 457-460)

Kromě tradiční roztokové syntézy našla CuAAC i široké uplatnění v syntéze na pevné fázi.¹⁶

2.2 Vybrané syntetické přístupy vedoucí k příbuzným derivátům

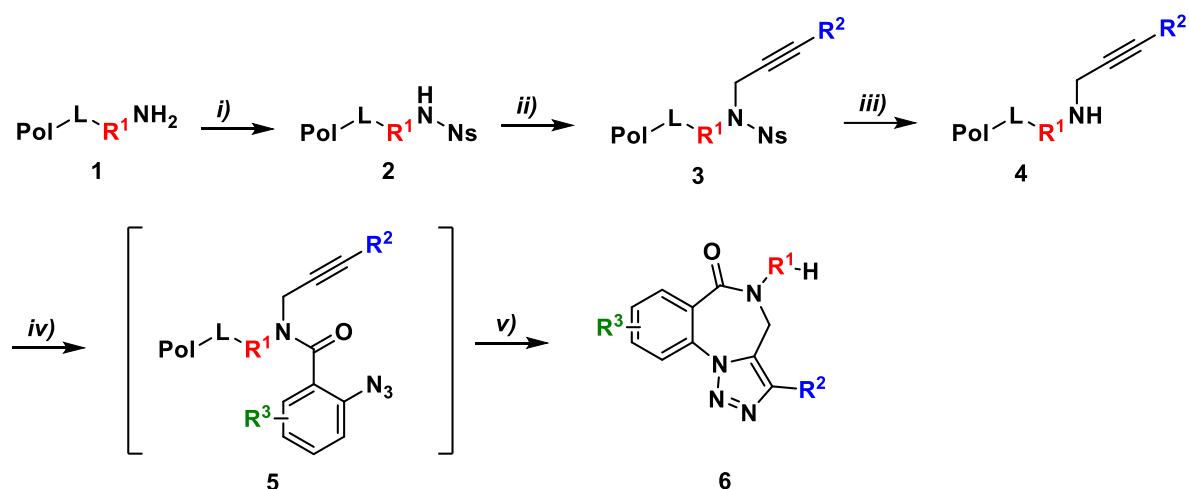
V následujících podkapitolách budou popsány tři přístupy k syntéze příbuzných derivátů. Nejprve bude popsána syntéza benzotriazolodiazepinonů pomocí syntézy na pevné fázi, ve které je klíčový krok spontánní Huisgenova cykloadice na finální derivát.¹ Poté budou popsány dva přístupy vedoucí k triazolodiazepinonům jako potenciálním peptidomimetikům,^{4,17} První přístup využíval Ugiho čtyřkomponentní reakci a následnou Huisgenovu cykloadici,¹⁷ druhý přístup využíval klasickou termální Huisgenovu cykloadici nebo RuAAC.⁴

2.2.1 Syntéza benzotriazolodiazepinonů s využitím Huisgenovy cykloadice

Předložená rigorózní práce tematicky navazuje na předchozí práci zabývající se přípravou 4*H*-benzo[*f*][1,2,3]triazolo[1,5-*a*][1,4]diazepin-6(5*H*)-onů s využitím Huisgenovy cykloadice. Syntéza těchto derivátů byla uskutečněna na pevné fázi, s využitím různých linkerů umožňující diverzifikaci cílových látek, viz **Obrázek 7**. Jako polymerní nosič byla použita polystyrenová pryskyřice s Wangovým linkerem umožňujícím ukotvení výchozích látek ve formě esteru, karbamátu nebo etheru; Rinkův amidický linker byl použit pro ukotvení výchozích látek ve formě nesubstituovaného amidu; aldehydický linker (BAL) umožnil imobilizaci výchozích látek ve formě *N*-substituovaného amidu. Postup imobilizace není ve zmíněné práci popsán, nicméně je uveden v jiných publikacích.^{1,18,19}

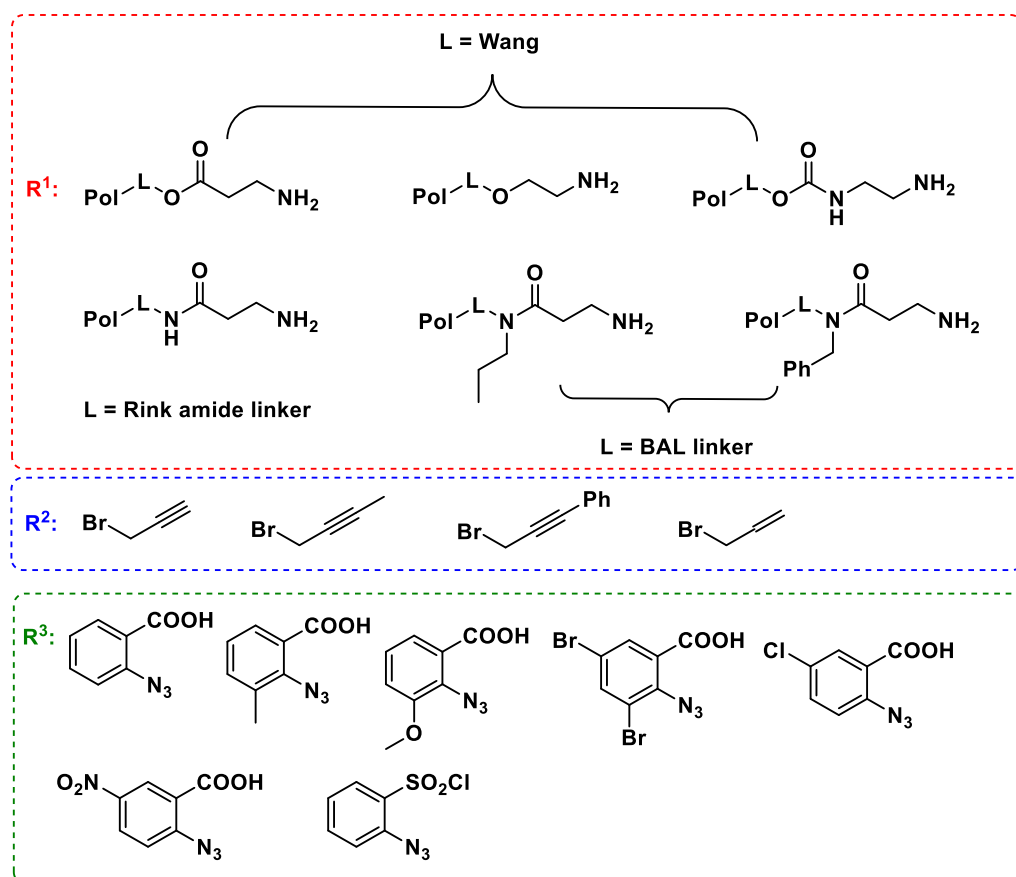
Takto imobilizované aminoderiváty **1** byly následně sulfonylovány pomocí 4-*NsCl* za vzniku sulfonamidu **2**. Následovala alkylace propargylbromidy za vzniku derivátu **3**. Po odštěpení nosylové skupiny (denosylace) byla sloučenina **4** podrobena acylaci různě substituovanými deriváty 2-azidobenzoové kyseliny. Finální derivát byl odštěpen z polymerního nosiče za vzniku intermediátu **6**. Přeměna intermediátu **5** na triazol **6** proběhla spontánně ještě před odštěpením z polymerního nosiče, což bylo prokázáno pomocí IČ spektroskopie – vzorek pryskyřice po acylaci s 2-azidobenzoovou kyselinou byl podroben měření na IČ spektroskopu, přičemž nebyla detekována charakteristická vibrace alkylové vazby.¹

Kromě benzotriazolodiazepinonů byly připraveny i další sloučeniny, aby byl otestován rozsah použitelnosti vyvinuté metodiky. Pro alkylation byl rovněž použit i allylbromid, tato cesta vedla k příslušnému dihydro derivátu. Metodika rovněž umožnila i přípravu analogických sulfonamidů v případě, že byl použit 2-azidobenzensulfonyl chlorid namísto 2-azidobenzoové kyseliny.¹



Podmínky: i) 4-NsCl, 2,6-lutidin, DCM, rt, on ii) propargylbromid, DBU, DMSO, rt, on iii) merkaptoethanol, DBU, DMF, rt, 30 min iv) 2-azidobenzoová kyselina, HOBT, DIC, DMF/DCM 1:1, rt, on v) TFA/DCM 1:1, rt, 1 h

Schéma 1: Příprava benzotriazolodiazepinonů **6**¹



Obrázek 7: Přehled použitých výchozích látek

2.2.2 Další syntetické přístupy vedoucí k derivátům benzotriazolodiazepinů

Kromě výše zmíněného syntetického postupu byla popsána i řada dalších založených na různých principech. Byla popsána cyklizace triazol-1-yl benzamidů za použití katalýzy [Pd] vedoucí k benzotriazolodiazepin-7-onům, principem byla intramolekulární inserce palladia do trojné vazby.²⁰

Další možností bylo využití 8-brom-3,4-dihydro- β -karbolinu, který byl po reakci s TMSOTf a ethynylmagnesiumbromidem acylován 2-azidobenzoylchloridem za vzniku intermediátu, který následně po ohřátí na laboratorní teplotu podléhal intramolekulární 1,3-dipolární cykloadici.²¹

Základní benzotriazolodiazepin pro další modifikace bylo rovněž možné připravit z 2-azidobenzaldehydu a propargylaminu (reduktivní aminace), následovala termální cykloadice.²²

Byl rovněž popsán i přístup vycházející z cykloadice 2-oxoalkylidenfosforanů (přípravených z 2-azidobenzylalkoholu) na *o*-funkcionalizované arylazidy, které byly reakcí s aminy převedeny na příslušné benzotriazolodiazepiny.²³

Pro přípravu benzotriazolodiazepinů byla rovněž použita i Ugiho čtyřkomponentní reakce. Komponentami byly 2-brombenzoová kyselina, propargylaminy, aldehydy a isokyanidy. Klíčovým krokem byla *in situ* click reakce s azidem sodným.²⁴

Benzotriazolodiazepin-6-ony bylo možné připravit také pomocí Sonogashira couplingu aryljodidů s 2-amino-*N*-methyl-*N*-(prop-2-ynyl)benzamidů, následovala diazotace, azidace a cykloadice.²⁵

2.2.3 Syntéza triazolodiazepinů pomocí Ugiho reakce

Z předchozí kapitoly vyplývá, že příprava benzotriazolodiazepinů byla v literatuře poměrně často popsána s využitím různých přístupů. V kontrastu s touto skutečností je příprava triazolodiazepinů velmi málo prozkoumaná. 4-aminotriazolodiazepinony byly připraveny pomocí klasické syntézy v roztoku s využitím Ugiho čtyřkomponentní reakce, která byla následovaná Huisgenovou termální [3+2] cykloadicí. Struktura finálních produktů připomíná dipeptidy (struktura **8**, viz **Schéma 2**) či tripeptidy (struktury **10** a **12**, viz **Schéma 3**) a mohou proto najít uplatnění v oblasti medicínální chemie jako peptidomimetika – viz kapitola 2.2.4.^{4,17} Klíčovou komponentou byl v tomto případě Boc-azidoalanin, který byl

připraven katalytickým diazotransferem z Boc-diaminopropanové kyseliny.^{26,27} Tento postup je principiálně stejný jako procedura, která byla použita k syntéze Fmoc-azidoalaninu, klíčové komponenty pro tuto práci.²⁸

Jako výchozí látky pro Ugiho reakci byly použity propargylamin, substituované aldehydy, *tert*-butyl, cyklohexyl či benzylisokyanid a Boc-azidoalanin. Kvantitativní konverze intermediátu **7** na produkt **8** bylo dosaženo při zahřívání, nicméně náznaky produktu **8** byly detekovány i při laboratorní teplotě. Výtěžky byly značně vyšší při použití aromatických aldehydů oproti alifatickým. Ve všech případech byla v NMR spektrech detekována směs diastereomerů i přesto, že v některých případech byl v HPLC spektru přítomen pouze jeden pík produktu.¹⁷

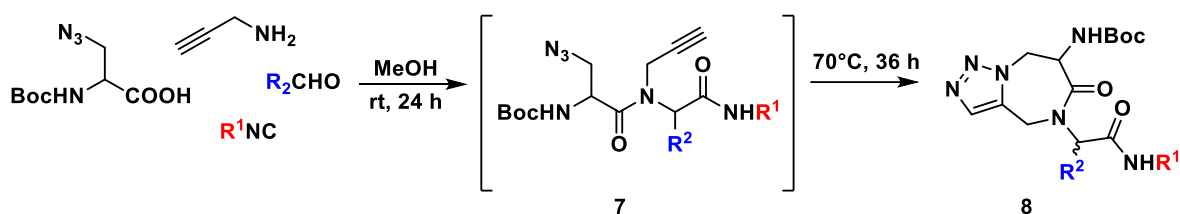
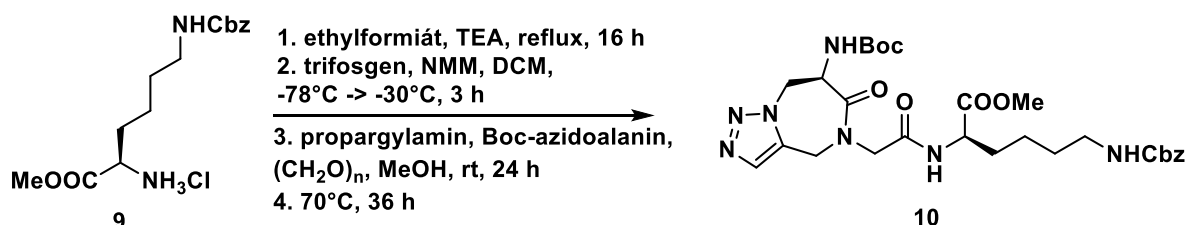


Schéma 2: Syntéza triazolodiazepinonů pomocí Ugiho reakce¹⁷

Dále byly připraveny i dva produkty připomínající svou strukturou tripeptidy. V tomto případě byla nejprve provedena formylace chráněných aminokyselin (Cbz-lysin methylester **9** a methylester glycinu **11**), následovala dehydratace pomocí trifosgenu či T3P (**Schéma 3**) na žádané isokyanidy. Důvod použití trifosgenu místo T3P v případě Cbz-lysinu **9** bylo zachování konfigurace chirálního centra. V případě methylesteru glycinu **11** tento požadavek není relevantní, vzhledem k absenci chirálního centra. Dalšími kroky byla Ugiho čtyřkomponentní reakce a Huisgenova termální cykloadice, analogicky jako v případě dipeptidů. Finálními produkty jsou tripeptidy **10** a **12**. V případě produktu **12** došlo opět k racemizaci za vzniku směsi diastereomerů. Celkové reakční výtěžky byly 51 % a 43 %.¹⁷



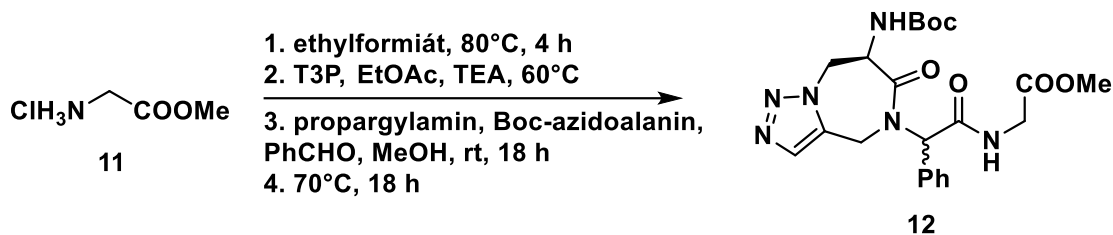


Schéma 3: Příprava triazolodiazepinonů připomínající tripeptidy¹⁷

2.2.4 Syntéza triazolodiazepinonů jako potenciálních peptidomimetik

V roce 2011 byly popsány dvě alternativní syntetické cesty vedoucí k triazolodiazepinonům **16** – viz **Schéma 4 a 5**. První přístup (**Schéma 4**) využíval jako první krok intermolekulární RuAAC mezi chráněným propargylaminem a derivátem Boc-azidoalaninu **13**, výsledkem byl triazol **14**. Následovala saponifikace, při které došlo zároveň i k odštěpení Fmoc protektivní skupiny (derivát **15**), posledním krokem byla tvorba amidu pomocí couplingového činidla EDC.HCl za vzniku produktu **16**.⁴

Cesta A:

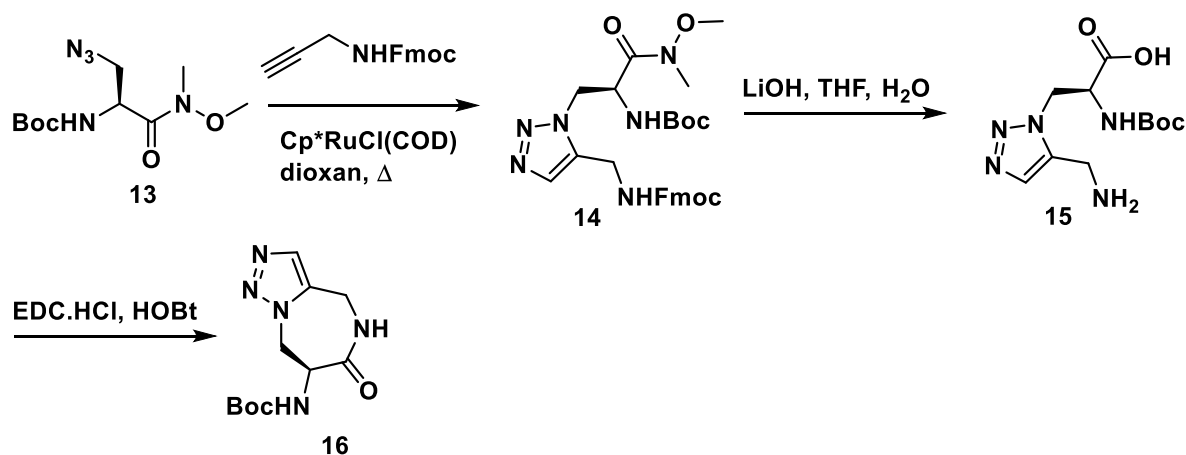


Schéma 4: Příprava triazolodiazepinonů – cesta A⁴

Autoři zároveň prozkoumali i druhou syntetickou možnost využívající intramolekulární Huisgenovu cykloadici, viz **Schéma 5**. Reakce probíhala při použití vyšší teploty - vzhledem k tomu, že může vzniknout pouze jeden regioisomer, nebylo nutné používat katalýzu rutheniem. Syntézu se tak podařilo zkrátit o 2 kroky (zavedení chránící skupiny pro Boc-azidoalanin a poté její odstranění). V tomto případě se navíc ukázalo, že pro tvorbu amidu a Huisgenovu cykloadici je možné využít one-pot protokol.⁴

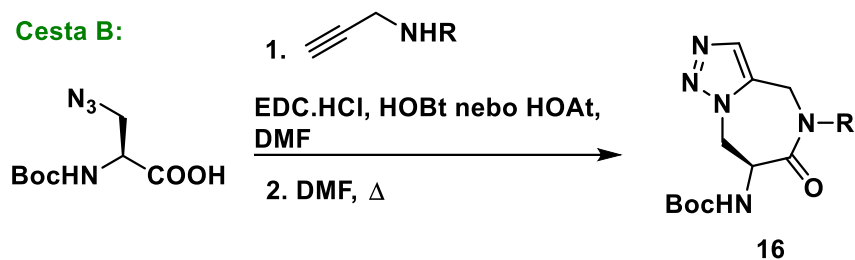


Schéma 5: Příprava triazolodiazepinonů – cesta B⁴

Potenciál připravených triazolodiazepinonů v oblasti peptidomimetik byl následně úspěšně demonstrován, když autoři zaměnili dipeptidový segment His-Pro v angiotensinu IV (H-Val-Tyr-Ile-**His-Pro**-Phe-OH, AT IV) za peptidomimetikum obsahující segment Ata-Gly (Ata = triazolodiazepinon, viz **Schéma 6**). Výsledná sekvence tedy byla H-Val-Tyr-Ile-**Ata-Gly**-Phe-OH. V enzymatické studii zabývající se mírou inhibice insulinem regulované aminopeptidázy (IRAP) a aminopeptidázy-N (AP-N) se ukázalo, že peptidomimetikum obsahující segment Ata-Gly je ekvipotentní k původnímu AT-IV obsahující segment His-Pro, naměřené hodnoty pK_i (IRAP)=7.093 pro testovanou molekulu versus 7.142 naměřenou pro AT-IV.⁴

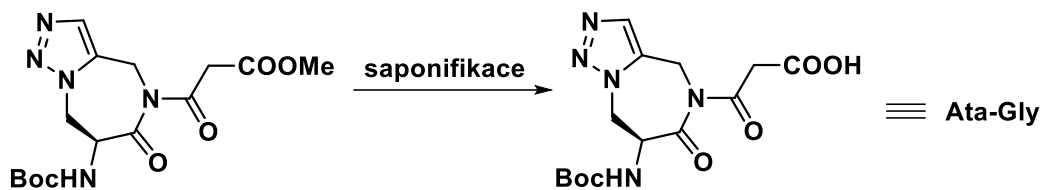


Schéma 6: Dipeptid Ata-Gly použitý pro demonstraci aplikace v oblasti peptidomimetik

Uvedený syntetický přístup je z pohledu použití analogických výchozích látek podobný metodice vyvinuté v této rigorózní práci, nicméně jeho nevýhodou jsou velmi omezené výtěžky a dále provedení pomocí tradiční syntézy v roztoky, která je značně neefektivní v případě syntézy delších peptidů.

2.3 Komentář k předložené publikaci

Pro větší přehlednost bude v následujících kapitolách použito rovněž arabské číslování, struktury budou číslovány opět od čísla 1. Pro číslování derivátů je použito kombinatoriální číslování $X(R^1, R^2)$, kde R^1 identifikuje použitou aminokyselinu, R^2 použitý alkynol.

2.3.1 Příprava Fmoc-azidoalaninu

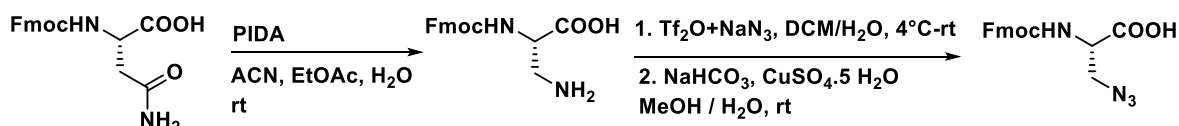


Schéma 7: Příprava Fmoc-azidoalaninu

Příprava Fmoc-azidoalaninu byla již dříve popsána.²⁸ Bohužel se nepodařilo publikovanou syntézu zreprodukovat se stejnými výsledky a bylo nutné reakční podmínky mírně upravit. Navíc bylo nutné, aby syntéza byla dostatečně robustní, aby ji bylo možné použít i pro reakce z většího množství výchozího materiálu. Po pečlivé optimalizaci se syntetickou cestu úspěšně podařilo převést až do měřítka několika desítek gramů Fmoc-asparaginu. Kritickým krokem je Hofmannovo odbourání, u kterého se nepodařilo získat lepší výtěžek než 50 %. Tento výsledek je pravděpodobně způsobený nerozpustností produktu, který nejspíše vytváří zwitterion. Vzhledem k uvolňování CO₂ zejména během prvních 5 hodin reakce je vhodné použít balónek naplněný dusíkem pro vyrovnání tlaku. Reakce je prováděna přes noc. Mírně optimalizován byl i postup izolace produktu. Těkává rozpouštědla byla odpařena na RVO, poté byla reakční směs ochlazena v kapalném dusíku a byl přidán EtOAc, rovněž vychlazený v kapalném dusíku. Bílá až žlutá sraženina byla odfiltrována a několikrát promyta vychlazeným EtOAc. Produkt byl bez dalšího čištění použit v následném kroku, katalytickém diazotransferu.

V prvním reakčním kroku bylo obtížné monitorovat průběh reakce. Vzhledem k přítomnosti PIDA obsahující hypervalentní jód nebylo možné monitorovat reakci pomocí UPLC-MS kvůli riziku poškození chromatografické kolony. Sledování reakce pomocí NMR rovněž mělo svá úskalí, a to kvůli přítomnosti AcOH jako vedlejšího produktu reakce – signál AcOH potlačil signály produktu/výchozí látky a analýza byla vždy zkreslená. Reakci se však podařilo monitorovat pomocí TLC chromatografie. Jako MF byl použit 20% DCM v MeOH, MF byla okyselena AcOH. Jako standard byl použit výchozí Fmoc-Asn-OH. Po vyvolání byla nejprve provedena kontrola pomocí UV lampy, zda nejsou přítomny i jiné

skvrny kromě PIDA a výchozí látky/produktu. Retenční faktory výchozí látky a produktu byly ale velmi podobné, pro odlišení skvrn na TLC destičce byla následně použita vizualizace skvrny produktu pomocí ninhydrinu.

Následný katalytický diazotransfer již probíhal kvantitativně bez větších problémů. Na počátku reakce může dojít k uvolňování toxických plynů (reakce TfN_3 s halogenovanými rozpouštědly může vést k tvorbě diazidomethanu²⁹), reakce byla proto kvůli vyrovnaní tlaku prováděna pod inertní atmosférou (balónek s dusíkem). Pro chromatografickou separaci byla použita MF Tol:EtOAc:AcOH 1,5 : 1 : 0,1. Přesný postup je popsán v experimentální části v kapitole 3.

2.3.2 Optimalizace syntetické cesty

Pro přípravu cílových derivátů byly otestovány různé výchozí látky – Fmoc-L- α -aminokyseliny, Fmoc- β -alanin a substituované 3-fenylprop-2-yn-1-oly či propargylalkohol. Obecné schéma syntézy je zobrazeno na **Schématu 8**. Prvním krokem je imobilizace Fmoc-aminokyseliny na Wangovu pryskyřici (derivát **1**(R^1)), následuje odštěpení Fmoc a sulfonylace 4-nitrobenzensulfonyl chloridem za vzniku sulfonamidu **2**(R^1). Dalším krokem je alkylace za vzniku derivátu **3**(R^1, R^2). Po denosylaci je sloučenina **4**(R^1, R^2) acylována Fmoc-azidoalaninem na klíčový lineární intermediát **5**(R^1, R^2), který je podroben cykloadici a na závěr odštěpen z polymerního nosiče (v případě, že $R^2 \neq \text{H}$, štěpení ještě předchází odstranění Fmoc skupiny). Optimalizace jednotlivých kroků jsou popsány v následujících podkapitolách.

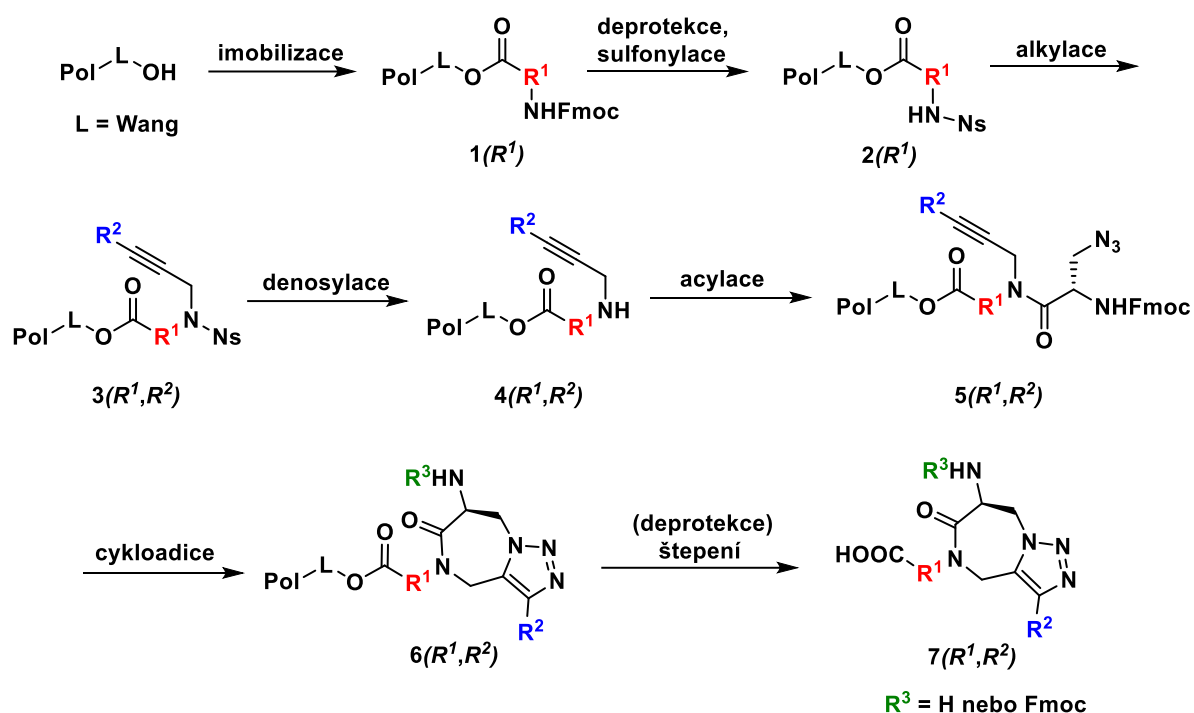
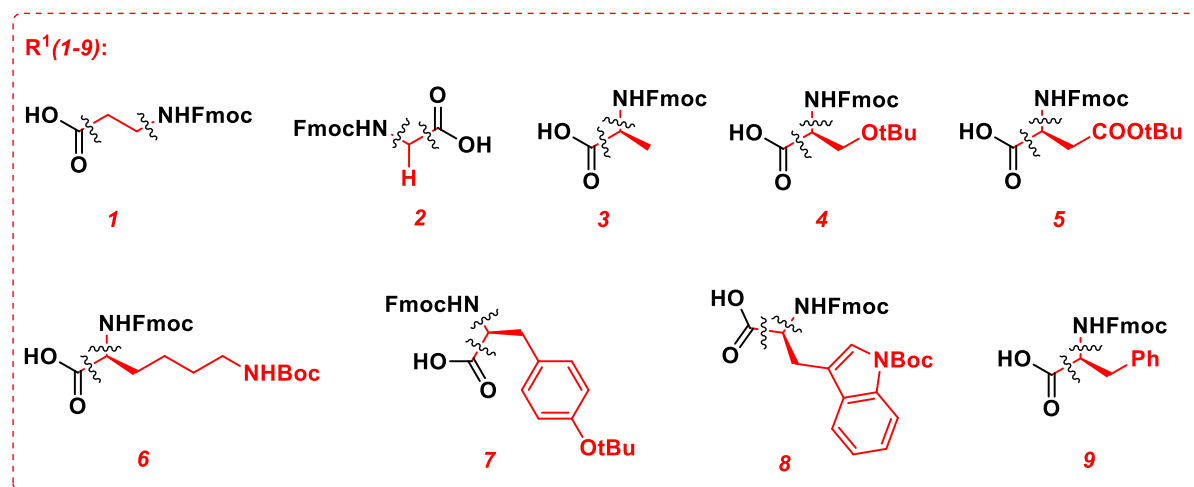


Schéma 8: Obecná syntéza cílových derivátů

2.3.2.1 Fmoc-*L*-aminokyseliny



Obrázek 8: Přehled testovaných Fmoc-*L*-aminokyselin

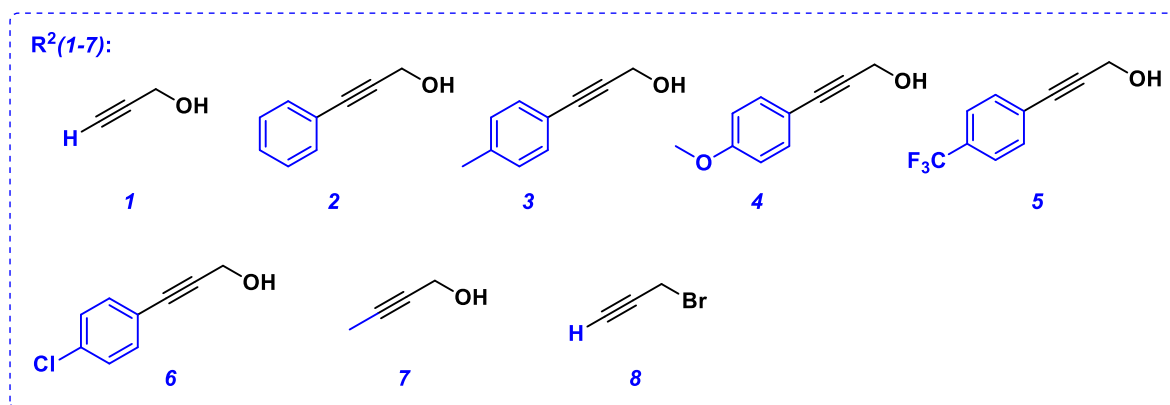
Všechny otestované Fmoc-*L*-aminokyseliny jsou zobrazeny na **Obrázku 8**, červeně zvýrazněná část odpovídá struktuře R^1 v molekule cílové sloučeniny. Syntéza byla nejprve testována na strukturně jednoduchých *L*-aminokyselinách – Fmoc- β -Ala-OH, Fmoc-Ala-OH, Fmoc-Gly-OH, jako modelový alkohol byl vybrán propargylalkohol. Všechny kroky probíhaly bez problémů. Původním cílem bylo připravit všechny finální deriváty s volnou aminoskupinou (ponechání Fmoc skupiny v koncové molekule nemá žádnou přidanou hodnotu). Nicméně se ukázalo, že triazolodiazepinony nejsou detekovatelné pomocí UV-

VIS detektoru, pokud R^1 či R^2 neobsahuje chromoforní skupinu. Tento fakt významně komplikoval finální separaci pomocí semipreparativní HPLC, zejména u látek nesyntetizovaných z fenylalkynolů. Kromě UV-VIS detekce bylo dále některé finální látky snazší čistit ve formě Fmoc-derivátů z pohledu účinnějšího odstranění nečistot (vhodnější polarita, příznivější chromatografické vlastnosti). Proto byla u některých vybraných sloučenin Fmoc-protectivní skupina ponechána.

Co se UV-VIS detekovatelnosti produktů týče, další možností, jak začlenit do struktury finálních derivátů chromofor kromě použití fenylalkynolů, bylo použití aromatických Fmoc-aminokyselin: Fmoc-Tyr(*OtBu*)-OH, Fmoc-Phe-OH a Fmoc-Trp(NHBoc)-OH. Bohužel, u všech těchto aminokyselin syntéza selhala ve fázi acylace Fmoc-azidoalaninem. Acylaci bylo nutné několikrát opakovat pro dosažení kvantitativní tvorby derivátů **5(7-9,1)** kde $I = H$. Navíc při aplikaci identických podmínek (při použití identických chemikálií) na jiné šarži pryskyřice se opět acylace ukázala být nekompletní a výsledky tak byly velmi málo reprodukovatelné, což je při syntéze na polymerní matici klíčový parametr (intermediáty nelze čistit). Z tohoto důvodu bylo od použití těchto tří aminokyselin upuštěno a jako modelový alkohol byl i nadále používán 3-fenyl-prop-2-yn-1-ol.

Pro získání strukturální rozmanitosti cílových derivátů však byly otestovány další aminokyseliny obsahující funkční skupinu v postranním řetězci, Fmoc-Asp(COO*tBu*)-OH, Fmoc-Ser(*OtBu*)-OH a Fmoc-Lys(NHBoc)-OH. Syntéza intermediátů **4(R¹,2)** kde $2 = Ph$ probíhala bez větších problémů, bylo pouze nutné prodloužit dobu denosylace. Kritickým krokem se ukázala být opět acylace Fmoc-azidoalaninem, která neprobíhala kvantitativně, bylo ji nutné dvakrát opakovat. Nicméně výsledky bylo možné reprodukovat. U všech těchto derivátů bylo nutné ve struktuře finálních produktů ponechat Fmoc skupinu, aby je bylo možné dokonale vyizolovat ze surové směsi pomocí semipreparativní HPLC. V případě, že byla Fmoc skupina z molekuly odštěpena, byly tyto deriváty z důvodu přítomnosti aditivní $NH_2/OH/COOH$ skupiny příliš polární, chromatografická separace byla velmi komplikovaná a finální čistota nebyla ideální. Dále je nutno zmínit, že v případě derivátu serinu bylo nutné prodloužit čas štěpení z polymerního nosiče, aby došlo ke kvantitativnímu odštěpení *tBu*.

2.3.2.2 Alkylace alkynylderiváty



Obrázek 9: Přehled testovaných alkylačních činidel se zvýrazněním R^2

Všechny testované alkynoly jsou zobrazeny na **Obrázku 9**. Jak již bylo zmíněno v předchozí podkapitole, jako modelový alkohol byl nejprve zvolen propargylalkohol. Pomocí něj byly připraveny tři deriváty **7(1-3,1)**, v jejich struktuře však bylo nutné ponechat Fmoc skupinu, aby byly deriváty UV-detekovatelné a bylo je tak možné snadno vyčistit pomocí semipreparativní HPLC. Poté, co selhalo zavedení chromoforu použitím aromatických Fmoc-*L*-aminokyselin, byl jako modelový alkohol pro syntézu série produktů zvolen místo propargylalkoholu 3-fenyl-prop-2-yn-1-ol ($R^2 = \text{Ph}$).

Pro otestování použitelnosti syntetické metody z pohledu alkynolů byly dále použity substituované 3-fenyl-prop-2-yn-1-oly nesoucí substituent s +I efektem ($R^2 = 4\text{-Me-Ph}$), +M efektem ($R^2 = 4\text{-OMe-Ph}$) a -I efektem ($R^2 = 4\text{-CF}_3\text{-Ph}$). Bohužel použití alkoholu kde $R^2 = 4\text{-CF}_3\text{-Ph}$ bylo komplikované kvůli jeho vysoké reaktivitě, ve fázi denosylace totiž docházelo k adici merkptoethanolu na trojnou vazbu a po dalších krocích vznikaly nežádoucí meziprodukty, přičemž výsledná čistota byla nižší než v ostatních případech (méně než 50 %). Proto byl připraven pouze jeden derivát **7(2,5)**. Následně byl použit o něco méně reaktivní alkynol ($R^2 = 4\text{-Cl-Ph}$), kde nedocházelo k tvorbě nežádoucích meziproduktů a byly připraveny dva modelové finální deriváty **7(2-3,6)**.

Zajímavostí je, že při použití alkoholu, kde $R^2 = 4\text{-OMe-Ph}$ a $R^2 = 4\text{-Me-Ph}$, byly vždy v UPLC-MS spektru detekovány pouze příslušné ketony, k jejichž vzniku docházelo hydrolyzou alkynů působením TFA a následným kontaktem s vodou (obsažená v mobilní fázi UPLC-MS chromatografu). V případě derivátů s $R^2 = 4\text{-OMe-Ph}$ byly detekovány výhradně příslušné ketony. Pro získání derivátů **7(1-2,7)**, kde $R^2 =$ alifatický substituent byl použit but-2-yn-1-ol.

Kromě 3-fenyl-prop-2-yn-1-olu jsou ostatní substituované deriváty komerčně nedostupné, byly proto syntetizovány pomocí Sonogashira couplingu z příslušných jódderivátů a propargylalkoholu, syntézy jsou v literatuře popsány a probíhaly bezproblémově s vysokými výtěžky (> 90 %).^{30,31}

V počátku vývoje syntetické metodiky byla kromě Fukuyama-Mitsunobu alkylace s propargylalkoholem testována i klasická alkylace propargylbromidem. Nejprve byly testovány podmínky propargylbromid, DIPEA, DMSO, rt na pryskyřici **2(2)**. Bohužel tyto podmínky nebyly použitelné pro efektivní přípravu pryskyřice **2(3)** – alkylace byla vždy nekompletní, nepomohlo ani zahřívání na 70°C, alkylaci bylo nutné opakovat. Při použití silnější nenukleofilní báze DBU byl průběh reakce kvantitativní, ale docházelo k tvorbě vedlejších produktů, čistota byla pouze 75 %. Mezitím se podařilo najít podmínky pro Fukuyama-Mitsunobu alkylaci, která fungovala bezproblémově. Druhou výhodou této metody je i větší komerční dostupnost alkoholů oproti příslušným bromidům.

2.3.2.3 Denosylace a acylace Fmoc-azidoalaninem

Ve všech případech kromě derivátu **3(2,5)** byly pro denosylaci použity merkptoethanol, DBU, DMF, rt. Reakční čas bylo nutné u některých derivátů prodloužit. V případě derivátu **3(2,5)** bylo nutné místo merkptoethanolu použít méně reaktivní thiofenol. Jak bylo popsáno v předchozí kapitole, docházelo k adici thiolu na trojnou vazbu a vznikaly nežádoucí alkeny (neizolováno, určeno pouze na základě UPLC-MS analýzy). V případě použití thiofenolu nečistoty vznikaly také, ale v menší míře (čistota 70 %). Optimalizované podmínky denosylace shrnuje **Tabulka 1**.

Výchozí látka	Činidla	Čas [h]
3(1-3,1-2)	Merkptoethanol, DBU, DMF	2
3(2-3,3)	Merkptoethanol, DBU, DMF	4
3(2,5)	Thiofenol, DBU, DMF	0,5
3(2-3,4)	Merkptoethanol, DBU, DMF	6
3(4-6,2)	Merkptoethanol, DBU, DMF	6
3(2-3,6)	Merkptoethanol, DBU, DMF	0,5
3(1-2,7)	Merkptoethanol, DBU, DMF	0,5

Tabulka 1: Optimalizace denosylace pro jednotlivé deriváty

Následná acylace Fmoc-azidoalaninem byla testována s použitím HOBt či bez něj (pouze DIC). Při použití podmínek DIC, DMF, rt byla čistota derivátů **5(R¹,R²)** > 75 %.

V případě použití HOBt se čistota výrazně snížila (> 40 %). Je důležité zmínit, že chirální deriváty **5**(R^1, R^2) byly připraveny opticky čisté, nedocházelo k racemizaci. Při analýze UPLC-MS byl ve spektru přítomen pouze jeden signál odpovídající produktu. I kdyby docházelo k překryvu signálů v UV spektru, v NMR spektrech by byly přítomné i další sady signálů pro diastereomery. Ve všech případech byl ale v NMR spektru přítomen pouze jediný produkt – k racemizaci tedy nedošlo.

2.3.2.4 Cykloadice

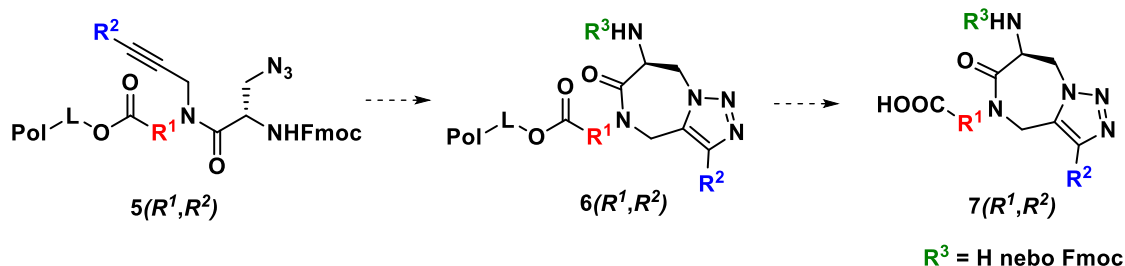


Schéma 9: Poslední kroky syntézy

Posledním syntetickým krokem byla cykloadice derivátů **5**(R^1, R^2) na imobilizované triazolodiazepinony **6**(R^1, R^2), viz **Schéma 9**. Nejprve byla na modelovém derivátu **5**(I, I) testována CuAAC s použitím různých podmínek¹⁶, viz **Tabulka 2**. CuAAC probíhala kvantitativně u derivátů **5**(I, I), ale u ostatních téměř neprobíhala.

Derivát	Činidla	Rozpouštědlo	Čas [h]	Teplota	Výsledek*
5 (I, I)	CuSO ₄ .5 H ₂ O, askorbát sodný	DMF	16	rt	probíhá
5 (I, I)	CuSO ₄ .5 H ₂ O, askorbát sodný	DMF	16	70°C	neprobíhá
5 (I, I)	CuI, DIPEA, lutidin	DMF	16	rt	neprobíhá
5 ($I, 2$)	CuSO ₄ .5 H ₂ O, askorbát sodný	DMF	36	rt	neprobíhá

*probíhá = kvantitativně vznikl produkt, neprobíhá = přítomna pouze výchozí látka či došlo k rozkladu na neidentifikovatelnou směs produktů

Tabulka 2: Testované podmínky CuAAC

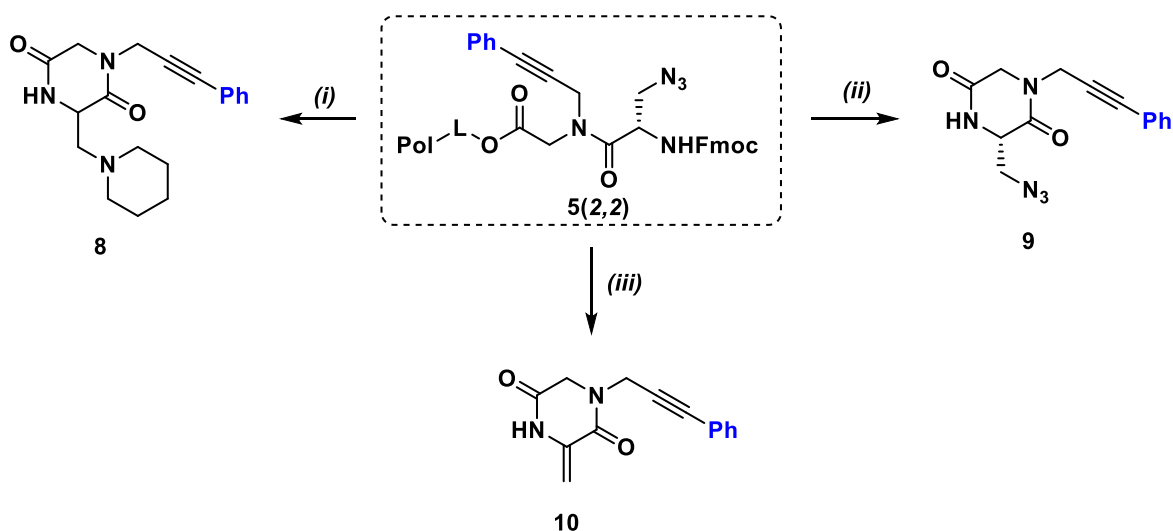
Paralelně byla testována i klasická termální cykloadice, která probíhala i u derivátů **5**($R^1, 2-7$), proto CuAAC nebyla dále optimalizována. Jako nejvhodnější rozpouštědlo se osvědčil acetonitril při teplotě 75°C. V případě některých derivátů bylo nutné prodloužit reakční čas nebo reakci zopakovat. Při použití DMF a vyšší teploty (100°C) byla čistota produktů nižší (kolem 35 %). Proto byl pro přípravu všech finálních látek použit acetonitril a teplota 75°C, i přes nutnost použití delšího reakčního času (až 36 hodin). Na závěr byly finální deriváty odštěpeny z polymerního nosiče za použití 50% TFA/DCM. Standardní

doba štěpení byla 1 h, pouze v případě derivátu **7(4,2)** bylo nutné štěpení prodloužit na 16 h, aby došlo ke kvantitativnímu odštěpení *tBu* chránící skupiny.

Celkem bylo připraveno 19 finálních derivátů. Jejich přehled je součástí podkapitoly 2.4 a kapitoly 3.

2.3.3 Příprava diketopiperazinů

V případě, že Fmoc deproteckce byla provedena ještě před cykloadicí na lineárním intermediátu **5(2,2)**, došlo k samovolnému odštěpení z pryskyřice za vzniku diketopiperazinu. V závislosti na různých podmínkách štěpení byly detekovány různé produkty **8-10**, viz **Schéma 10**.



Podmínky: *i*) 50% piperidin/DMF, rt, 16 h *ii*) 10% piperidin/DMF, rt, 10 min *iii*) 10% DBU/DCM, rt, 10 min

Schéma 10: Různé produkty **8-10** získané z derivátu **5(2,2)** v závislosti na podmínkách Fmoc deproteckce

Vznik různých produktů je zde řízen bazicitou reakčního roztoku. Při použití 10% piperidinu se podařilo izolovat očekávaný produkt **9**, zatímco vyšší koncentrace (50%) vedla k derivátu **8**. Mechanismus jeho vzniku bezpochyby zahrnuje nejprve tvorbu derivátu **9**, následnou eliminaci azidoskupiny za vzniku methylenderivátu **10** a adici nukleofilu (piperidinu) za tvorby aduktu **8**. Při použití nenukleofilní báze (DBU) se podařilo intermediát **10** izolovat a charakterizovat. Pro zajímavost, na derivátu **9** byla následně otestována cykloadice – nepodařilo se najít žádné podmínky, které by vedly k tvorbě triazolového cyklu (CuAAC / termální cykloadice), pravděpodobně ze sterických důvodů.

2.3.4 Příprava heptapeptidu

Potenciál syntetické metodiky byl následně demonstrován na přípravě heptapeptidu, který je strukturně podobný popsaným peptidomimetikům.⁴ Aby byla potlačena nežádoucí tvorba diketopiperazinu ve fázi dipeptidu, byla použita Rinkova pryskyřice, na kterou byla první Fmoc-aminokyselina imobilizována ve formě amidu. Nejprve byl připraven tripeptid Gly-Phe-Ala-NHFmoc, následovala série kroků Fmoc deprotektce – sulfonylace – Fukuyama-Mitsunobu alkylace – denosylace – acylace s Fmoc-azidoalaninem – cykloadice. Po Fmoc deprotektci následovala opět tradiční peptidová syntéza a byly navázány další tři aminokyseliny Gly-Ala-Phe-NHFmoc. Celá sekvence je vyobrazena na **Schématu 11**. Cílový produkt byl obdržen v surové čistotě 93 % a celkovém výtěžku 70 % (po chromatografickém čištění).

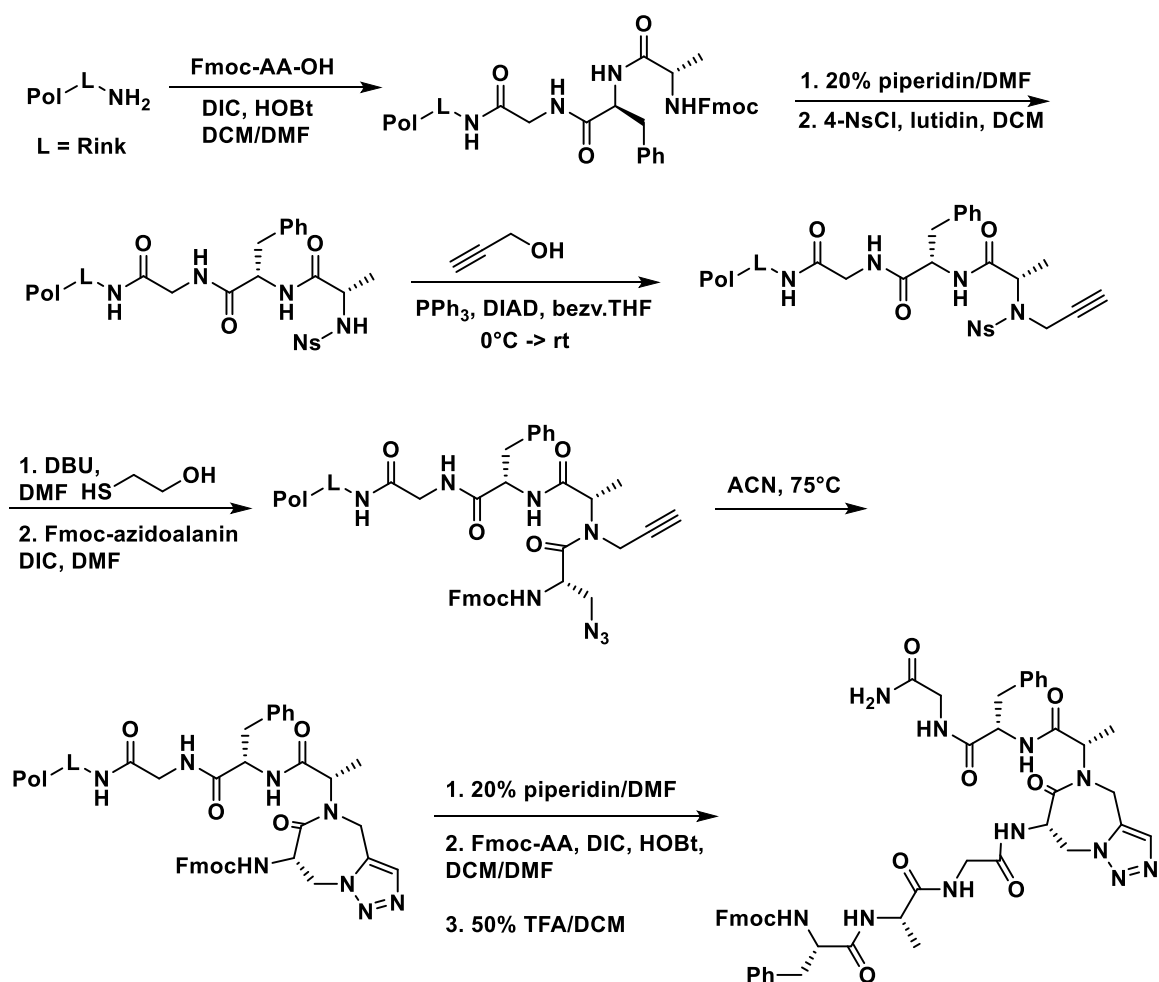


Schéma 11: Příprava heptapeptidu

2.4 Shrnutí

Cílem práce bylo vyvinout syntetickou cestu vedoucí k triazolo[1,5-a][1,4] diazepin-6-onům a připravit sérii derivátů za použití kombinace různých výchozích látek. Pro derivatizaci byly použity různé Fmoc-aminokyseliny a substituované prop-2-yn-3-oly. Klíčovou komponentou společnou pro všechny deriváty byl Fmoc-azidoalanin. Podařilo se připravit celkem 19 finálních látek, až na výjimky ve vysoké surové čistotě a s dobrými celkovými výtěžky (viz **Tabulka 3** níže). V průběhu syntézy nedošlo k racemizaci, v HPLC spektru byl vždy přítomen pouze jeden signál a rovněž v NMR spektrech byla detekována vždy jen jedna sada signálů příslušného diastereomeru.

Derivát	R ¹	R ²	Čistota (%) ^a	Výtěžek (%) ^b
7(1,1) ^c	-CH ₂ -CH ₂ -	H	85	28
7(2,1) ^c	-CH ₂ -	H	84	20
7(3,1) ^c	-CH(CH ₃)-	H	90	60
7(1,7) ^c	-CH ₂ -CH ₂ -	Me	82	48
7(2,7) ^c	-CH ₂ -	Me	78	60
7(1,2)	-CH ₂ -CH ₂ -	Ph	78	20
7(2,2)	-CH ₂ -	Ph	80	78
7(3,2)	-CH(CH ₃)-	Ph	70	40
7(1,3)	-CH ₂ -CH ₂ -	4-Me-Ph	80	22
7(2,3)	-CH ₂ -	4-Me-Ph	80	22
7(2,4)	-CH ₂ -	4-OMe-Ph	90	80
7(2,5)	-CH ₂ -	4-CF ₃ -Ph	54	32
7(2,6)	-CH ₂ -	4-Cl-Ph	75	43
7(3,3)	-CH(CH ₃)-	4-Me-Ph	79	52
7(3,4)	-CH(CH ₃)-	4-OMe-Ph	85	58
7(3,6)	-CH(CH ₃)-	4-Cl-Ph	65	42
7(4,2) ^d	-CH(CH ₂ OH)-	Ph	60	43
7(5,2) ^d	-CH(CH ₂ COOH)-	Ph	70	57
7(6,2) ^d	-CH((CH ₂) ₄ NH ₂)-	Ph	65	27
8 ^e	-CH ₂ -	Ph	61	32
9 ^e	-CH ₂ -	Ph	99	30
10 ^e	-CH ₂ -	Ph	94	20

^asurová čistota určená z poměru ploch píků v UV spektru při vlnové délce 205-400 nm

^bcelkový výtěžek určený z ¹H NMR spektra produktu po čištění

^cizolováno jako Fmoc derivát

^dsurová čistota určena pro Fmoc derivát, výtěžek pro derivát bez Fmoc

^esurová čistota nezahrnuje Fmoc fragmenty

Tabulka 3: Přehled připravených derivátů

Rovněž se podařilo identifikovat i zajímavé chování derivátu **5(2,2)** v bazickém prostředí. V závislosti na koncentraci a typu použité báze se podařilo připravit 3 strukturně odlišné sloučeniny. Různé koncentrace piperidinu v DMF vedou k dvěma produktům – při použití 50% roztoku vzniká výlučně produkt **8**, zatímco při použití 10% roztoku a zkrácení reakčního času na 10 minut nedochází tak rychle k eliminaci azidoskupiny a k tvorbě methylderivátu **10** a je tedy možné vyizolovat piperazin **9**. V případě použití silné nenukleofilní báze (DBU) dochází ke kvantitativní tvorbě methylderivátu.

Vyvinutá metodika by navíc mohla nalézt široké uplatnění v oblasti peptidomimetik, pro demonstraci byl připraven jeden modifikovaný heptapeptid.

Přínosem této práce je rovněž i optimalizace přípravy Fmoc-azidoalaninu z Fmoc-asparaginu, který je komerčně špatně dostupný. Jeho syntézu se podařilo převést do většího měřítka (desítky gramů).

2.5 Přehled použité literatury

- (1) Fülöpová, V.; Funk, P.; Popa, I.; McMaster, C.; Soral, M. Diazepin-6(5H)-Ones and Their Sulfonyl Analogues under Mild Reaction Conditions. *Eur. J. Org. Chem.* **2015**, *6*, 3551–3557.
- (2) X. Han, X. Lin, H. Shen, T. Hu, Z. Z. WO 2018/011163 A1, 2018.
- (3) N. Jared, K. D. Cumming, A. Dykstra, D. Hruza, L.; LiHong, T. Haiqun, M. Brandon, A. Taoka, S. Verras, P.; Walsh, W. W.-L. WO 2018/034918 A1, 2018.
- (4) Buysse, K.; Farard, J.; Nikolaou, A.; Vanderheyden, P.; Vauquelin, G.; Pedersen, D. S.; Tourw, D. Amino Triazolo Diazepines (Ata) as Constrained Histidine Mimics. *Org. Lett.* **2011**, *13* (11), 6468–6471.
- (5) Trapani, P. Příprava 2,3-Dihydrobenzo[f][1,2,5]Thiadiazepin-4(5H)-on 1,1-Dioxidů Pomocí Syntézy Na Pevné Fázi, *bakalářská práce*, **2016**.
- (6) Krajčovičová, S. High-Throughput Conjugation of Drug-like Molecules for Chemical

Biology, *dizertační práce*, **2019**.

- (7) Drábiková, M. Příprava Nových Heterocyklických Derivátov Na Bázi Benzothia(Dia)Zínu, *diplomová práce*, **2017**.
- (8) Kriegelsteinová, P.; Lemrová, B.; Ručilová, V.; Sural, M. Copper-Free Solid-Phase Synthesis of Triazolo [1,5- a][1,4] Diazepin-6-Ones. *Adv. Synth. Catal.* **2021**, *363*, 1112–1119.
- (9) Kolb, H. C.; Finn, M. G.; Sharpless, K. B. Click Chemistry: Diverse Chemical Function from a Few Good Reactions. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2001**, *40*, 2004–2021.
- (10) Breugst, M.; Hans-Ulrich, R. The Huisgen Reaction: Milestones of the 1,3-Dipolar Cycloaddition. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2020**, *59*, 12293–12307.
- (11) Singh, M. S.; Chowdhury, S.; Koley, S. Advances of Azide-Alkyne Cycloaddition-Click Chemistry over the Recent Decade. *Tetrahedron* **2016**, *72* (35), 5257–5283.
- (12) Meldal, M.; Tornøe, C. W. Cu-Catalyzed Azide - Alkyne Cycloaddition. *Chem. Rev.* **2008**, *108*, 2952–3015.
- (13) Huisgen, R. Centenary Lecture - 1,3-Dipolar Cycloadditions. *Proc. Chem. Soc.* **1961**, 357–369.
- (14) Huisgen, R. The Concerted Nature of 1,3-Dipolar Cycloadditions and the Question of Diradical Intermediates. *J. Org. Chem.* **1976**, *41* (3), 403–419.
- (15) Worrell, B. T.; Malik, J. A.; Fokin, V. V. Direct Evidence of a Dinuclear Copper Intermediate in Cu(I)-Catalyzed Azide-Alkyne Cycloadditions. *Science* **2013**, *340*, 457–460.
- (16) Castro, V.; Rodríguez, H.; Albericio, F. CuAAC: An Efficient Click Chemistry Reaction on Solid Phase. *ACS Comb. Sci.* **2016**, *18* (1), 1–14.
- (17) Barlow, T. M. A.; Jida, M.; Tourwé, D.; Ballet, S. Efficient Synthesis of Conformationally Constrained, Amino-Triazoloazepinone-Containing Di- and Tripeptides via a One-Pot Ugi–Huisgen Tandem Reaction. *Org. Biomol. Chem.* **2014**, *12*, 6986–6989.
- (18) Cankarova, N.; La-Venia, A.; Krchnak, V. Polymer-Supported Stereoselective Synthesis of Tetrahydrobenzopyrazino-Thiadiazinone Dioxides via N - Sulfonyl

- Iminiums. *ACS Comb. Sci.* **2014**, *16*, 293–302.
- (19) Cankarova, N.; Krchnak, V. Polymer-Supported Stereoselective Synthesis of Benzimidazolinopiperazinones. *J. Org. Chem.* **2012**, *77*, 5687–5695.
- (20) Chen, K.; Barve, I. J.; Sun, C. Catalyst-Controlled Regioselective Synthesis of Benzotriazolodiazepin-7-Ones and Benzotriazolodiazocin-8-Ones. *Org. Lett.* **2019**, *22* (2), 428–432.
- (21) Granger, B. A.; Wang, Z.; Kaneda, K.; Fang, Z.; Martin, S. F. Multicomponent Assembly Processes for the Synthesis of Diverse Yohimbine and Corynanthe Alkaloid Analogues. *ACS Comb. Sci.* **2013**, *15*, 379–386.
- (22) Donald, J. R.; Martin, S. F. Synthesis and Diversification of 1,2,3-Triazole-Fused 1,4-Benzodiazepine Scaffolds James. *Org. Lett.* **2011**, *13* (5), 852–855.
- (23) Alajarin, M.; Cabrera, J.; Pastor, A.; Villalgorido, J. M. A New Modular and Flexible Approach to [1,2,3]Triazolo[1,5-a][1,4]Benzodiazepines Mateo. *Tetrahedron Lett.* **2007**, *48*, 3495–3499.
- (24) Asgari, S. M.; Soheilzad, M.; Ranjbar, R. P.; Larijani, B.; Rahimi, R.; Mahdavi, M. Novel and Efficient Synthesis of Triazolobenzodiazepine Analogues through the Sequential Ugi 4CR-Click- N -Arylation Reactions. *Tetrahedron Lett.* **2019**, *60* (8), 583–585.
- (25) Chowdhury, C.; Sasmal, A. K.; Achari, B. An Expedient and Facile Route for the General Synthesis of 3-Aryl. *Org. Biomol. Chem.* **2010**, *8*, 4971–4977.
- (26) Brans, L.; García-garayoa, E.; Schweinsberg, C.; Maes, V.; Struthers, H.; Schibli, R.; Tourwø, D. Synthesis and Evaluation of Bombesin Analogues Conjugated to Two Different Triazolyl-Derived Chelators for ^{99m}Tc Labeling. *Chem. Med. Chem.* **2010**, *5*, 1717–1725.
- (27) Stanley, N. J.; Pedersen, D. S.; Nielsen, B.; Kvist, T.; Mathiesen, J. M.; Bräuner-osborne, H.; Taylor, D. K.; Abell, A. D. Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters 1, 2, 3-Triazolyl Amino Acids as AMPA Receptor Ligands. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2010**, *20* (24), 7512–7515.
- (28) Pícha, J.; Collinsová, M. Optimized Syntheses of Fmoc Azido Amino Acids for the Preparation of Azidopeptides. *J. Pept. Sci.* **2017**, *23* (3), 202–214.

- (29) <https://ehs.stanford.edu/reference/information-azide-compounds>.
- (30) Mojr, V.; Svobodova, E.; Chudoba, J.; Dvor, H.; Cibulka, R. Tailoring Flavins for Visible Light Photocatalysis: Organocatalytic [2+2] Cycloadditions Mediated by a Flavin Derivative and Visible Light†. *Chem. Commun.* **2015**, *51*, 12036–12039.
- (31) Kralova, P.; Malon, M.; Pospisil, J.; Sural, M. Rearrangement of Threonine- and Serine-Based N - (3-Phenylprop-2- Yn-1-Yl) Sulfonamides Yields Chiral Pyrrolidin-3-Ones. *J. Org. Chem.* **2020**, *85*, 985–993.

Copper-Free Solid-Phase Synthesis of Triazolo[1,5-*a*][1,4]diazepin-6-ones


Patricia Kriegelsteinová,^{+a} Barbora Lemrová,^{+a} Veronika Ručilová,^a and Miroslav Soural^{a, b, *}

^a Department of Organic Chemistry
Faculty of Science
Palacký University
771 46 Olomouc, Czech Republic

^b Institute of Molecular and Translational Medicine
Faculty of Medicine and Dentistry
Palacký University
Hněvotínská 5, 779 00 Olomouc, Czech Republic
+420 58563 2196
E-mail: miroslav.soural@upol.cz

⁺ Equal contribution

Manuscript received: November 11, 2020; Revised manuscript received: December 21, 2020;
Version of record online: December 30, 2020

 Supporting information for this article is available on the WWW under <https://doi.org/10.1002/adsc.202001403>

Abstract: Synthesis of triazolo[1,5-*a*][1,4]diazepin-6-ones on solid support is reported in this article. Amino acids immobilized on Wang resin were nosylated and alkylated with propargyl alcohol, but-2-yn-1-ol or different 3-phenylprop-2-yn-1-ols using Mitsunobu alkylation conditions. After denosylation, acylation with Fmoc-azidoalanine yielded linear precursors that were thermally cyclized on resin to give immobilized triazolodiazepinones. After cleavage from the polymer support, the target compounds were obtained in high crude purities and good overall yields. Furthermore, the synthetic approach was applied to convenient solid-phase synthesis of oligopeptide containing the triazolodiazepinone moiety as the peptidomimetic heterocyclic constraint.

Keywords: Huisgen reaction; triazolodiazepinone; solid-phase synthesis; peptidomimetic.

Introduction

In the past decade, the Huisgen 1,3-dipolar cycloaddition of azides to alkynes (AAC) has received considerable attention in the field of both traditional and solid-phase synthesis. In the latter, AAC was applied to a wide range of immobilized molecular frameworks, such as peptides,^[1] peptoids,^[2] peptide nucleic acids,^[3] nucleosides^[4] and small molecules.^[5] Most frequently, the Huisgen solid-phase cycloaddition has been promoted by catalysis with various Cu(I) salts, which enabled the performance of this reaction in the “click” format (CuAAC).^[6–8] Polymer-supported substrates are beneficial in this regard, as the catalyst can be simply removed from the reaction mixture by the filtration of the resin-bound product and washing

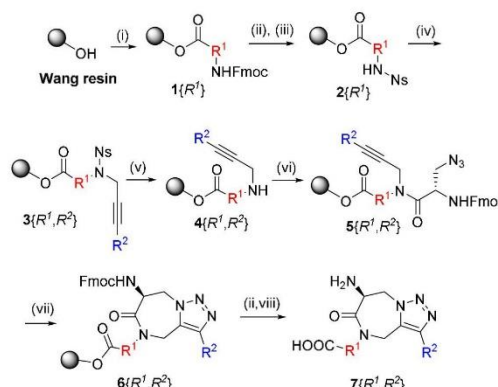
with fresh solvent without the need for chromatography. Compared to the CuAAC, non-catalysed Huisgen cycloaddition on resin was reported much less frequently. Recently, we developed a solid-phase synthesis method for triazolobenzodiazepinones based on the spontaneous AAC of immobilized propargyl-azidobenzamides.^[9] The preparation of triazolobenzodiazepinones was also reported by others using different approaches.^[10–15] In contrast, the synthesis of parent triazolodiazepinones has rarely been studied. Buysse et al. prepared these derivatives using traditional solution-phase synthesis starting from propargylamine and α -azidoacids.^[16] Several derivatives were synthesized by using alternative approaches: (i) The starting materials were subjected to the RuAAC followed by a seven-membered ring condensation, and (ii) the start-

ing materials were coupled to dipeptides and subsequently subjected to a thermal Huisgen reaction. The latter alternative was performed in dimethylformamide and furnished the desired product in very low yields. Inspired by this fact, we decided to develop an alternative and more robust approach consisting of the preparation of immobilized linear intermediates using convenient solid-phase synthesis with on-resin Huisgen cyclization being the final step. Apart from the applicability of the proposed methodology to easily obtaining collections of small molecules resembling the structure of biologically active triazolopiperazines with antiviral^[17] and antidiabetic properties,^[18] we also tested the application of our method to prepare constrained peptidomimetics,^[19] which have recently found wide application in medicinal chemistry.^[20] In this regard, it was already proven that the triazolodiazepinone scaffold serves as a constrained histidine mimic.^[21] The recent study reported that the replacement of histidine by an aminoindolozepinone or aminobenzazepinone moiety led to selective agonist and antagonist ligands of the melanocortin receptor subtypes.^[21] It is worth mentioning that triazolodiazepinone-based short oligopeptides were recently synthesized by Barlow et al.^[22] using a one-pot Ugi-Huisgen tandem reaction; however, with the application of traditional solution-phase chemistry which is unfavourable in the preparation of long peptides.

Results and Discussion

The key building block in the suggested reaction sequence was Fmoc-azidoalanine, which was prepared in two steps from Fmoc-Asn-OH according to a previously reported, slightly modified procedure.^[23] The synthetic approach leading to target compounds is depicted in Scheme 1.

Fmoc- β -alanine and propargyl alcohol were selected as the representative building blocks to test the sequence. Using DIC/HOBt technique to suppress the racemization^[24,25] Fmoc- β -alanine was immobilized on Wang resin to obtain derivative **1**{*I*}. After Fmoc cleavage and sulfonylation with 4-nitrobenzenesulfonyl chloride, sulfonamide **2**{*I*} was subjected to the reaction with propargyl alcohol using Fukuyama-Mitsunobu conditions. The resulting resin **3**{*I*} was exposed to denosylation using mercaptoethanol and 1,8-diazabicyclo[5.4.0]undec-7-ene (DBU). After acylation with Fmoc-azidoalanine, the derivative **5**{*I*,*I*} was obtained. In this case, DIC/HOBt technique was replaced with only DIC activation which provided the intermediate in higher crude purity. We detected only one compound of the corresponding mass using LC-MS analysis. Furthermore, only one diastereomer was observed in the final product using NMR analysis. These facts indicate that probably no racemization occurred. The last synthetic step was Huisgen cycliza-



Reagents and Conditions: *i*) Fmoc-aminoacid, *N,N'*-diisopropylcarbodiimide (DIC), 1-hydroxybenzotriazole (HOBt), 4-dimethylaminopyridine (DMAP), dimethylformamide (DMF)/dichloromethane (DCM) (1:1), rt, 24 h; *ii*) 20% piperidine in DMF, rt, 15 min; *iii*) 4-NsCl, 2,6-lutidine, DCM, rt, 16 h; *iv*) alcohol, PPh₃, diisopropyl azodicarboxylate (DIAD), dry tetrahydrofuran (THF), 0°C – rt, 16 h; *v*) thiophenol or mercaptoethanol, 1,8-diazabicyclo[5.4.0]undec-7-ene (DBU), DMF, rt, 0.5–6 h; *vi*) Fmoc-azidoalanine, DIC, DMF, rt, 24 h; for **1** = **4**, **5**, **6** (see Figure 1) repeated twice; *vii*) acetonitrile, 75°C, 24–48 h; *viii*) TFA/DCM, rt, 1 h (16 h for **7**{*I*,*I*}).

Scheme 1. Synthesis of target compounds (Chemset Compound Numbering System is used).

tion, which was performed in acetonitrile at 75°C and required 24 hours. It is worth mentioning that if linear intermediate **5**{*I*,*I*} was liberated from the resin and stored for a month, cyclization to **6**{*I*,*I*} was accomplished at room temperature. We also tested heating in DMF, which was previously reported for similar derivatives;^[16] however, the crude purity of the desired product was significantly lower (less than 35% as calculated from LC-UV traces). After cleavage of **6**{*I*,*I*} from the polymer support using TFA/DCM, the target compound **7**{*I*,*I*} was obtained in crude purity 85% (calculated from LC-UV traces) and 25% overall yield (after semipreparative RP-HPLC purification). In this case, the Fmoc-protective group was not cleaved from intermediate **6**{*I*,*I*} to retain UV-VIS visibility, enabling comfortable purification.

To reveal the limitations and scope of the method, we subsequently tested different building blocks (Figure 1). In the case of amino acids, Fmoc- β -Ala-OH was replaced with Fmoc-Gly-OH, Fmoc-Ala-OH, Fmoc-Ser(O*t*Bu)-OH, Fmoc-Asp(COO*t*Bu)-OH, and Fmoc-Lys(NHBoc)-OH. In the case of alkylnols, we included an aromatic analogue (3-phenyl-prop-2-yn-1-ol) and its alternatives bearing both electron-donating (3-(*p*-tolyl)prop-2-yn-1-ol and 3-(4-methoxy)phenyl-prop-2-yn-1-ol) and electron-withdrawing (3-(4-

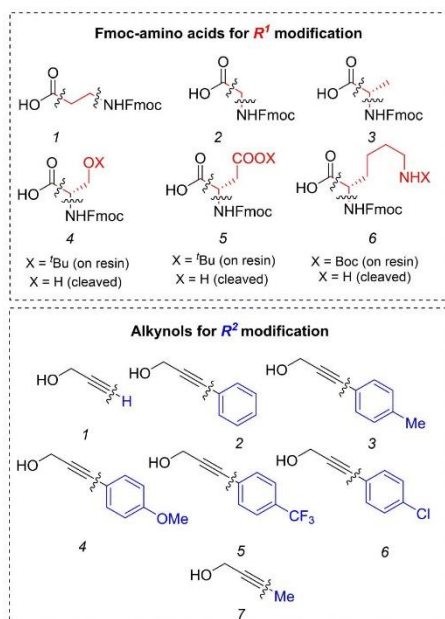
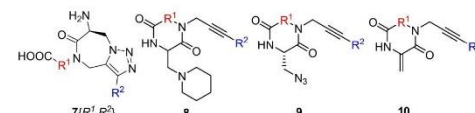


Figure 1. The list of successfully tested building blocks.

trifluoromethyl)phenyl-prop-2-yn-1-ol) and (3-(4-chloro)phenyl-prop-2-yn-1-ol) functional groups. The substituted 3-phenyl-prop-2-yn-1-ols were synthesized using slightly modified previously reported approaches.^[27,28] Finally, but-2-yn-1-ol was selected to receive the aliphatic R² moiety.

When using Fmoc-Gly-OH and Fmoc-Ala-OH, the reaction sequence smoothly furnished the desired products in good crude purities and overall yields (Table 1). In the case of Fmoc-Ser(O^tBu)-OH, Fmoc-Asp(COO^tBu)-OH and Fmoc-Lys(NHBoc)-OH, the corresponding intermediates **4**{4-6,R²} were easily prepared; however, the subsequent acylation with Fmoc-azidoalanine was incomplete and for the quantitative preparation of the intermediates **5**{4,R²}, **5**{5,R²} and **5**{6,R²}, the acylation had to be repeated twice. In the case of alkynols, Fukuyama-Mitsunobu alkylation was applicable to all tested building blocks; however it is worth mentioning that in the case of intermediates **3–5** with R² = 4-Me-Ph and 4-OMe-Ph, the corresponding ketones were detected by LC-MS analysis as a consequence of alkyne hydrolysis by the treatment with TFA and subsequent contact with water from the mobile phase. The reaction conditions for denosylation step of intermediates **3** varied depending on R². The standard denosylation procedure (i.e., mercaptoethanol, DBU, DMF, rt) was used but in some

Table 1. List of synthesized and characterized compounds.



Compounds	R ¹	R ²	Crude Purity (%) ^[a]	Overall Yield (%) ^[b]
7 {1,1} ^[c]	-CH ₂ -CH ₂ -	H	85	28
7 {2,1} ^[c]	-CH ₂ -	H	84	20
7 {3,1} ^[c]	-CH(CH ₃)-	H	90	60
7 {1,7} ^[c]	-CH ₂ -CH ₂ -	Me	82	48
7 {2,7} ^[c]	-CH ₂ -	Me	78	60
7 {1,2}	-CH ₂ -CH ₂ -	Ph	78	20
7 {2,2}	-CH ₂ -	Ph	80	78
7 {3,2}	-CH(CH ₃)-	Ph	70	40
7 {1,3}	-CH ₂ -CH ₂ -	4-Me-Ph	80	22
7 {2,3}	-CH ₂ -	4-Me-Ph	80	22
7 {2,4}	-CH ₂ -	4-OMe-Ph	90	80
7 {2,5}	-CH ₂ -	4-CF ₃ -Ph	54	32
7 {2,6}	-CH ₂ -	4-Cl-Ph	75	43
7 {3,3}	-CH(CH ₃)-	4-Me-Ph	79	52
7 {3,4}	-CH(CH ₃)-	4-OMe-Ph	85	58
7 {3,6}	-CH(CH ₃)-	4-Cl-Ph	65	42
7 {4,2} ^[d]	-CH(CH ₂ OH)-	Ph	60	43
7 {5,2} ^[d]	-CH(CH ₂ COOH)-	Ph	70	57
7 {6,2} ^[d]	-CH((CH ₂) ₄ NH ₂)-	Ph	65	27
8 ^[e]	-CH ₂ -	Ph	61	32
9 ^[e]	-CH ₂ -	Ph	99	30
10 ^[e]	-CH ₂ -	Ph	94	20

^[a] Crude purity after the entire reaction sequence calculated from HPLC-UV traces at 205–400 nm.

^[b] Calculated from the ¹H NMR spectrum of the purified product.

^[c] Compound isolated as Fmoc-protected derivative.

^[d] Crude purity calculated for the Fmoc product, yield for the product without Fmoc.

^[e] Crude purity does not include the Fmoc fragments (fluorenylmethyl-piperidine and methylene-fluorene).

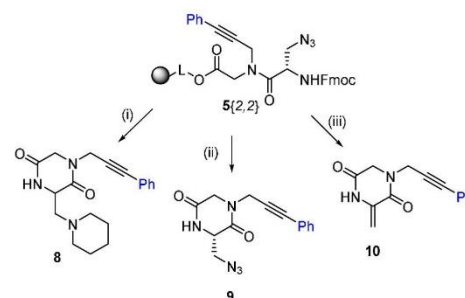
cases (Table 2), the reaction time had to be prolonged from standard 30 min to 2–6 hours to completion; however it still furnished the desired intermediates **4** in

Table 2. Conditions for denosylation.

Resin	Reagents	Time [h]
3 {1-3,1-2}	mercaptoethanol, DBU	2
3 {2-3,3}	mercaptoethanol, DBU	4
3 {2,5}	thiophenol, DBU	0,5
3 {2-3,4}	mercaptoethanol, DBU	6
3 {4-6,2}	mercaptoethanol, DBU	6
3 {2-3,6}	mercaptoethanol, DBU	0,5
3 {1-2,7}	mercaptoethanol, DBU	0,5

excellent crude purities. On the other hand, the limitation has been observed for intermediates **3** {*R'*, *S*} containing the electron-withdrawing moiety (4- CF_3 -Ph as *R*²): their exposure to a mixture of mercaptoethanol and DBU caused an immediate addition of thiolate to the triple bond, resulting in the formation of the mixture of alkenes (detected by LC-MS, not isolated). For this reason, mercaptoethanol was replaced by thiophenol, which slightly suppressed the unwanted reaction, and the desired intermediates **4** {*R'*, *S*} were received in acceptable crude purities above 70% (calculated from LC-UV traces after cleavage from the resin). Despite exhaustive optimization, we were not able to fully suppress the formation of mentioned alkenes. Consequently, the following steps (i. e. acylation and cyclization) led to significant decrease of purities (typically below 50%) probably due to the cross-reactivity of alkene by-products. For this reason, taking the crude purity as the key parameter in solid-phase synthesis,^[29] only one representative product **7** {*2,5*} was isolated and purified. Nevertheless, compound **7** {*2,5*} was still obtained in good overall yield 32%. It should be noted that the mentioned side reaction was not detected for intermediate **4** {*2,6*} synthesized from 3-(4-chloro)phenyl-2-yn-1-ol. This proves that addition of thiolates takes place only in the case of strongly electron withdrawing groups. Finally, use of but-2-yn-1-ol as the starting alkynol tested in combination with Fmoc-Gly-OH and Fmoc- β -Ala-OH yielded the final compounds **7** {*2,7*} and **7** {*1,7*} in excellent purity.

The dipolar cycloaddition of intermediates **5** worked for all tested derivatives; however, compounds bearing *R*² substitution required a longer reaction time to complete (48 h) than unsubstituted derivatives (24 h). Based on LC-MS analyses, we could state that the thermal Huisgen reaction was quantitative in terms of a full conversion of the starting material and it did not furnish considerable side products. In the case of serine-based intermediate **5** {*4,2*}, the standard TFA/DCM cleavage from the resin (1 h) did not lead to quantitative removal of the *t*-butyl protecting group, and the cleavage step had to be prolonged to 16 h. However, the corresponding derivative **7** {*4,2*} was obtained in the acceptable crude purity of 60% and overall yield of 43% after RP-HPLC purification. In the case of compounds **7** {*4,2*}, **7** {*5,2*} and **7** {*6,2*} synthesized from Fmoc-amino acids with functionalized side chains, the protective group was preserved for the semipreparative RP-HPLC to complete the purification. When the Fmoc-protective group was removed prior to chromatography, the separation of minor impurities from the previous steps was difficult. If the Fmoc group was cleaved prior to the Huisgen cycloaddition, the spontaneous cyclative cleavage took place which liberated the corresponding piperazine-diones from the resin (Scheme 2). Interestingly, we



Reagents and conditions: *i*) 50% piperidine/DMF, rt, 16 h; *ii*) 10% piperidine/DMF, rt, 10 min; *iii*) 10% DBU/DCM, rt, 10 min.

Scheme 2. Different products received from **5** {*2,2*} under different conditions.

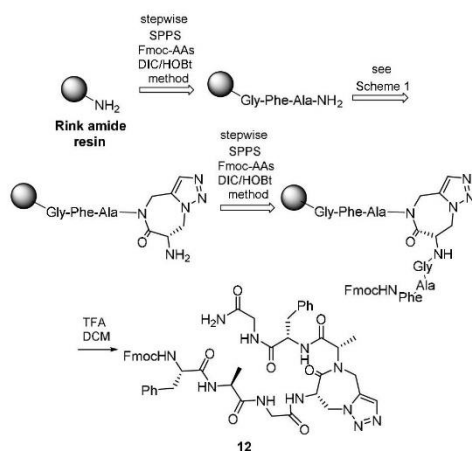
observed different outcomes based on the reaction conditions used. When 50% piperidine/DMF was applied to cleave the product from resin **5** {*2,2*}, we detected the unexpected formation of compound **8**. This compound was formed by the base-induced azide elimination from intermediate **9** and subsequent Michael-type addition of piperidine to the resulting methylene intermediate **10**. When the concentration of piperidine was decreased to 10% and the reaction time shortened to 10 min, pure azidomethyl-diketopiperazine **9** was isolated. In contrast, use of a stronger and non-nucleophilic base (DBU) exclusively yielded the methylene compound **10**.

Finally, the developed conditions were applied to the synthesis of model peptidomimetic **12** (Scheme 3). To avoid undesirable diketopiperazine formation in the stage of dipeptide formation, Rink amide resin was used instead of Wang resin. Briefly, immobilized tripeptide Gly-Phe-Ala was synthesized using the convenient solid-phase peptide synthesis. After triazolodiazepinone formation analogically to the Scheme 1, the synthesis was continued by stepwise making Gly-Ala-Phe fragment. Final peptidomimetic **12** was obtained in crude purity 93% (calculated from LC-UV traces) and 70% overall yield (after RP-HPLC purification).

Conclusion

In conclusion, we developed simple solid-phase synthesis of disubstituted triazolo[1,5-*a*][1,4]diazepin-6-ones using Fmoc-azidoalanine as the key building block. 19 representative compounds were synthesized and fully characterized.

The method can be used for rapid preparation of the target compounds from readily available building



Scheme 3. Simplified synthesis of peptidomimetic **12**

blocks (polymer-supported amines, amino acids and alkenols). Cyclization of the target scaffold was accomplished under catalyst-free conditions using the thermal Huisgen cyclization. Further, linear intermediates can be simply applied to the synthesis of novel piperidine-diones using various condition. Additionally, the developed protocols were successfully applied to solid-phase synthesis of triazolodiazepinone-based peptidomimetic which allows for the simple synthesis of long peptides with constrained histidine mimicking effects using convenient solid-phase peptide synthesis. With respect to the high potential of constrained peptidomimetics leading to the peptide analogues with an increased potency, efficacy and selectivity,^[26] the reported protocols offer a simple tool for the production of novel drug-like molecules.

Experimental section

General Information

Solvents and chemicals were purchased from Sigma-Aldrich (Milwaukee, USA, www.sigmaaldrich.com), Acros Organic (Geel, Belgium, www.acros.com) and Fluorochem (Derbyshire, UK, www.fluorochem.co.uk). Wang resin (100–200 mesh, 1% DVB, 1.4 mmol/g) was obtained from AAPPTec (Louisville, USA, www.aapptec.com). Solid-phase synthesis was carried out in plastic reaction vessels (syringes, each equipped with a porous disk) using a manually operated synthesizer (Torviq, Niles, USA, www.torviq.com). Dry solvents were dried over 4 Å molecular sieves or stored as received from commercial suppliers. All reactions were carried out at ambient temperature (23 °C) unless stated otherwise. For the LC/MS analyses, a sample of resin (~5 mg) was treated with 50% TFA in DCM, the cleavage cocktail was evaporated under a stream of

nitrogen, the cleaved compounds dissolved in MeCN/H₂O (20% or 50%; 1 mL) and the resin was removed by filtration. LC/MS analyses were carried out using UPLC-MS system consisting of UPLC chromatograph Acquity with photodiode array detector and single quadrupole mass spectrometer (Waters), using C18 X-Select HSS T3 column (2.5 μm, 3.0 mm × 50 mm) at 30 °C and flow rate of 0.6 mL/min. Mobile phase was (A) 0.01 M ammonium acetate (AmAc) in H₂O, and (B) MeCN, linearly programmed gradient elution). The ESI source operated at capillary voltage of 3 kV, desolvation temperature of 350 °C and source temperature of 120 °C. Purification was carried out using semipreparative HPLC chromatograph with MS detector (YMC-Actus Pro C18 column, 20 × 100 mm, 5 μm, MP 0.01 M aqueous AmAc/ MeCN, flow rate 15 mL/min, gradient elution) or by normal phase (silica gel chromatography). Residual solvents (H₂O and AmAc buffer) were lyophilized by the ScanVac Coolsafe 110-4 operating at –110 °C. HRMS analysis was performed using LC-MS (Dionex Ultimate 3000, Thermo Fischer Scientific, USA) with Exactive Plus Orbitrap high-resolution mass spectrometer (Thermo Exactive plus, Thermo Fischer Scientific, USA) operating at positive or negative full scan mode (120 000 FWHM) in the range of 100–1000 *m/z* with electrospray ionization operating at 150 °C and the source voltage of 3.6 kV. Chromatographic separation was performed on Phenomenex Gemini column (C18, 50 × 2 mm, 3 μm particle size) with isocratic elution and mobile phase (MP) containing MeOH/H₂O/formic acid 95:5:0.1. The samples were dissolved in MeCN or MeOH/H₂O (95:5 v/v). NMR experiments were performed with the use of ECX500 spectrometer (JEOL RESONANCE, Tokyo, Japan) at magnetic field strength of 11.75 T corresponding to ¹H and ¹³C resonance frequencies of 500.16 MHz and 125.77 MHz at 27 °C. Chemical shifts (δ) are reported in parts per million (ppm) and coupling constants (*J*) are reported in Hertz (Hz). The signals of DMSO-*d*₆ was set at 2.50 ppm in ¹H NMR spectra and at 39.50 ppm in ¹³C NMR spectra. Abbreviations in NMR spectra: br. s – broad singlet, s – singlet, d – doublet, dd – doublet of doublets, ddd – doublet of doublets of doublets, dt – doublet of triplets, m – multiplet, t – triplet.

Preparation of Starting Materials

Fmoc-Azidoalanine Hofmann Rearrangement of *Fmoc*-Asn-OH

Starting *Fmoc*-L-asparagine (17.9 mmol; 6.3 g) was added to a mixture of MeCN (28 mL), EtOAc (28 mL) and water (14 mL). Subsequently, PIDA (diacetoxy iodobenzene) was added portionwise (5 × 1.4 g every hour, 21.7 mmol in total). Reaction mixture was stirred overnight at rt. Next day, last portion of PIDA (4.3 mmol; 1.4 g) was added and the reaction mixture was stirred for additional 2 hours. The reaction was monitored using TLC (20% DCM in MeOH + 1% AcOH) and ninhydrin visualization. Then, all volatile solvents were evaporated using rotavapor. Residual water was lyophilized overnight to obtain sticky yellow/pale brown solid. Next day, EtOAc (100 mL) was cooled in liquid nitrogen and small amount (20 mL) was added to the residue. Flask was then put to ultrasound for few minutes and then again briefly cooled in liquid nitrogen. Pale yellow-light brown precipitate was then filtrated, washed with nitrogen-cooled EtOAc (3 ×) and dried using vacuum. Yield approx. 52%

– product was used for catalytic diazotransfer without further purification.

Catalytic Diazotransfer

First, NaN_3 (176 mmol; 11.5 g) was dissolved in water (53 mL)/DCM (80 mL) and the flask was placed into ice bath, Tf_3O (6 mL; 35 mmol) was then added in small portions using addition funnel (over 20 minutes). Reaction mixture was stirred for 15 minutes in the ice bath and then for 2 hours at rt. Aqueous layer turned pink/light brown. Then, layers were separated in a funnel and aqueous layer was extracted 2x with DCM (2×50 mL). Organic layers were combined and added as a last reagent to the solution B. Solution B contained starting material (6 g) after Hofmann rearrangement in a mixture of MeOH (100 mL)/water (33 mL), NaHCO_3 (15 g; 176 mmol) and $\text{CuSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ (43 mg; 176 μmol). Reaction mixture slowly turned green – brown after addition of TfN_3 solution (solution A). Reaction mixture was stirred overnight at rt under N_2 atmosphere. Next day, all volatile solvents were removed using RVO. Pale green suspension was then acidified using conc. HCl to pH = 2. Pale yellow precipitate was formed. EtOAc was then added to the flask and the mixture was then quantitatively transferred to the funnel. Extraction with EtOAc was repeated 3x. Organic layers were combined and dried over Na_2SO_4 , filtrated and evaporated to dryness. Yellow-light brown oily residue was obtained. Product was isolated using column chromatography (Tol:EtOAc:AcOH 1.5:1:0.1) with a purity of 90% as white-pale yellow solid. Yield 5.8 g (94%). Measured data (1D-NMR, HRMS) are consistent with published data.^[23]

Alcohols for Fukuyama-Mitsunobu Alkylation

Aryliodide (6.5 mmol) was dissolved in degassed TEA (13 mL). Then, CuI (0.53 mmol; 100 mg) and $\text{Pd}(\text{PPh}_3)_2\text{Cl}_2$ (5 mol.%, 230 mg) were added and pale brown suspension was formed. When propargylalcohol (7.8 mmol; 450 μL) was added, the suspension changed color to yellow and then to pale brown and dark precipitate was formed. The reaction mixture was vigorously stirred under N_2 atmosphere. After 6.5 hours, small sample was extracted with DCM/sat. NH_4Cl in eppendorf tube. DCM layer was analyzed using TLC (H/E 7:3 – Rf of product is 0.4, ArI 0.9). After completion, the reaction mixture was quenched with sat. NH_4Cl (10 mL), diluted with sat. NH_4Cl and extracted with DCM (3x). Organic layers were combined, dried over MgSO_4 , filtered and concentrated. Product was then sorbed to SiO_2 and purified using column chromatography with DCM as the mobile phase. Product was isolated as yellow solid after lyophilization of residual solvents. Analytical data were consistent with published data.^[27,28]

Preparation of Triazolodiazepinones

Immobilization of Fmoc-Amino Acids 1{R¹}

A solution of Fmoc-amino acid (3 mmol), $\text{HOBt} \times 0.5 \text{ H}_2\text{O}$ (3 mmol; 430 mg), DMAP (0.75 mmol; 92 mg) and DIC (3 mmol; 470 μL) in DCM/DMF (1:1, 10 mL) was added to Wang resin (1.4 mmol; 1 g). Reaction mixture was shaken for 24 hours at rt. Resin was washed with DMF (3x) and DCM (3x). Small sample of the resin (approx. 30 mg) was washed

with MeOH (3x) and used for quantification. 2×15 mg of the resin was cleaved using 50% TFA in DCM for 1 hour and then dried using a stream of nitrogen. Samples were dissolved in HPLC MeCN (1 mL) and the loading was determined by UPLC-MS using Fmoc- β -Ala (0.25 mg/mL) as an external standard. Calculated loading of the resin was in the range 0.6–0.7 mmol/g.

Nosylation with 4-Nitrobenzenesulfonyl Chloride 2 {R¹}

Resin 1{R¹} (1 g) was treated with 20% piperidine in DMF (10 mL) for 15 minutes and subsequently washed with DMF (3x) and DCM (5x). A solution of 4- NsCl (3 mmol; 640 mg) and 2,6-lutidine (3 mmol; 380 μL) in DCM (10 mL) was added to the resin and reaction mixture was shaken overnight. Resin was washed with DCM (5x).

Fukuyama-Mitsunobu Alkylation 3{R¹,R²}

Resin 2{R¹} (500 mg) was washed with DCM (3x), dry DMF (3x) and dry THF (3x). Then, a solution of PPh_3 (2.2 mmol; 590 mg) and alcohol (2.2 mmol) in dry THF (2.5 mL) was added to the resin. A solution of DIAD (2.2 mmol, 444 μL) in dry THF (2.5 mL) was added to the second syringe and both syringes were connected with a joint and put in a freezer for 15 minutes. Both solutions were then combined. Reaction mixture was shaken overnight at rt, washed with THF (3x) and DCM (5x).

Deprotection of 4-Nosyl Group 4{R¹,R²}

Resin 3{R¹,R²} (for all resins except 3{2,5}) (500 mg) was washed with DMF (3x). Then, a solution of mercaptoethanol (7 mmol; 500 μL) and DBU (0.8 mmol; 120 μL) in DMF (5 mL) was added to the resin and reaction mixture was shaken at rt for various time (see Table 2). In the case of 3{2,5}, a solution of thiophenol (4 mmol; 420 μL) and DBU (4 mmol; 600 μL) in DMF (5 mL) was added to the resin (500 mg) and reaction mixture was shaken for 30 minutes at rt. After reaction, the resin was washed with DMF (5x) and DCM (5x).

Acylation with Fmoc-Azidoalanine 5{R¹,R²}

After washing of the resin 4 (500 mg) with DMF (3x), a solution of Fmoc-azidoalanine (2.2 mmol; 796 mg) and DIC (2.2 mmol; 356 μL) in DMF (5 mL) was added to the resin and the reaction mixture was shaken overnight at rt. (for resins 4{4-6,2} the reaction was repeated twice). Next day, resins were washed with DMF (3x) and DCM (3x).

Cyclization to Triazolodiazepinones 6{R¹,R²} and their Cleavage from the Resin

Resin 5 was heated in MeCN (10 mL) at 75 °C for 24 ($\text{R}^2 = \text{H}$) or 48 hours ($\text{R}^2 = \text{aryl, Me}$) in a glass vial. After cooling down to rt, the resin was filtered and washed with DCM (3x). For all triazoles apart from 7{1-3,1}, 7{2,5}, 7{4,2} and 7{6,2} resin was then washed with DMF (3x) and a 20% solution of piperidine in DMF was added to the resin. After 15 minutes,

resin was washed with DMF and DCM (3x each). Resin 7 were shaken in 50% TFA/DCM (3 mL) for 1 hour (or 16 h for 7 {4,2}). The resin was filtered and washed with 50% TFA/DCM (1 mL) and DCM (2x), washes were combined and cleavage cocktail was evaporated under the stream of nitrogen. Crude product (brown oil) was purified by semipreparative RP-HPLC.

Preparation of Diketopiperazines

1-(3-phenylprop-2-yn-1-yl)-3-(piperidin-1-ylmethyl)piperazine-2,5-dione 8

Resin 5{2,2} (250 mg) was washed with DMF (3x). Then, a 50% solution in DMF (3 mL) was added and the resin was shaken on at rt. Solution containing product was then transferred from the syringe to a separatory funnel and the resin was washed with DCM (3×2 mL). DCM solution was then extracted 3x with 10% HCl to remove piperidine and DMF. Organic layer was then evaporated to dryness. Crude product (yellow oil) was purified using semipreparative HPLC.

(S)-3-(azidomethyl)-1-(3-phenylprop-2-yn-1-yl)piperazine-2,5-dione 9

Resin 5{2,2} (250 mg) was washed with DMF (3x). Then, a 10% solution of piperidine in DMF (3 mL) was added and the resin was shaken for 10 minutes. Solution containing product was then transferred from the syringe to a separatory funnel and the resin was washed with DCM (3×2 mL). DCM solution was then extracted 3x with 10% HCl to remove piperidine and DMF. Organic layer was evaporated to dryness. Crude product (yellow oil) was purified using semipreparative HPLC.

3-methylene-1-(3-phenylprop-2-yn-1-yl)piperazine-2,5-dione 10

Resin 5{2,2} (250 mg) was washed with DCM (3x). Then, a 10% solution of DBU in DCM (3 mL) was added and the resin was shaken for 10 minutes at rt. Solution containing product was then transferred from the syringe to a separatory funnel and the resin was washed with DCM (3×2 mL). DCM solution was then extracted 3x with 10% HCl to remove DBU. Organic layer was then evaporated to dryness. Crude product (yellow oil) was purified using semipreparative HPLC to obtain white solid after lyophilization.

Preparation of Peptidomimetic 12

Gly-Phe-Ala peptide was synthesized on Rink resin according to standard SPPS.^[30] Triazolodiazepinone synthesis was carried out in the same manner as described above. Denosylation using mercaptoethanol/DBU was performed for 2 h. Cyclization in ACN was carried out for 24 hours at 75 °C. Following Gly-Phe-Ala peptide chain synthesis was performed by standard SPPS. The cleavage from the resin was performed using 50% TFA/DCM and the crude peptidomimetic was purified using semipreparative RP-HPLC.

Acknowledgements

This study was supported by the Grant Agency of the Czech Republic (grant number 19-23972S).

References

- [1] R. A. Turner, A. G. Oliver, R. S. Lokey, *Org. Lett.* **2007**, *9*, 5011–5014.
- [2] A. Norgren, C. Budke, Z. Majer, C. Heggemann, T. Koop, N. Sewald, *Synthesis* **2009**, *3*, 488–494.
- [3] Y. Liu, X.-F. Wang, Y. Chen, L.-H. Zhang, Z.-J. Yang, *MedChemComm.* **2012**, *3*, 506–511.
- [4] F. Amblard, J. H. Cho, R. F. Schinazi, *Chem. Rev.* **2009**, *109*, 4207–4220.
- [5] M. Zhu, B. J. Lim, M. Koh, S. B. Park, *ACS Comb. Sci.* **2012**, *14*, 124–134.
- [6] V. Castro, H. Rodriguez, F. Albericio, *ACS Comb. Sci.* **2016**, *18*, 11–14.
- [7] H. C. Kolb, M. G. Finn, K. B. Sharpless, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2001**, *40*, 2004–2021; *Angew. Chem.* **2001**, *113*, 2056–2075.
- [8] H. C. Kolb, K. B. Sharpless, *Drug Discovery Today* **2003**, *8*, 1128–1137.
- [9] V. Fülöpová, P. Funk, I. Popa, C. McMaster, M. Soural, *Eur. J. Org. Chem.* **2015**, *2015* (16), 3551–3557.
- [10] K.-Ch. Chen, I. J. Barve, Ch. M. Sun, *Org. Lett.* **2020**, *22* (2), 428–432.
- [11] M. S. Asgari, M. I. Soheilzad, P. R. Ranjbar, B. Larijani, R. Rahimi, M. Mahdavi, *Tetrahedron Lett.* **2019**, *60* (8), 583–585.
- [12] B. A. Granger, Z. Wang, K. Kaneda, Z. Fang, S. F. Martin, *ACS Comb. Sci.* **2013**, *15* (7), 379–386.
- [13] J. R. Donald, S. F. Martin, *Org. Lett.* **2011**, *13* (5), 852–855.
- [14] Ch. Chowdhury, S. A. Kumar, B. Achari, *Org. Biomol. Chem.* **2010**, *8* (21), 4971–4977.
- [15] M. Alajarin, J. Cabrera, A. Pastor, J. M. Villalgorido, *Tetrahedron Lett.* **2007**, *48* (20), 3495–3499.
- [16] K. Buysse, J. Farard, A. Nikolaou, P. Vanderheyden, G. Vauquelin, D. S. Pedersen, D. Tourwe, S. Ballet, *Org. Lett.* **2011**, *13* (24), 6468–6471.
- [17] X. Han, X. Lin, H. Shen, T. Hu, Z. Zhang, WO/2018/011163.
- [18] N. Jared, K. D. Cumming, A. Dykstra, D. Hruza, L. LiHong, T. Haiqun, M. Brandon, A. Taoka, S. Verras, P. Walsh, W. Wen-Lian WO 2018034918.
- [19] A. La-Venia, P. Ventosa-Andrés, V. Krchňák, *Top. Heterocycl. Chem.* **2017**, *49*, 105–126.
- [20] A. Junaid, K. Pran, I. H. Ooi, D. El-Rabie, F. O. Shuaib, R. Rajasingam, *Asian J. Chem.* **2015**, *27* (9), 3137–3142.
- [21] O. Van der Poorten, K. Fehér, K. Buysse, D. Feytens, I. Zoi, S. D. Schwartz, J. C. Martins, D. Tourwé, M. Cai, V. J. Hruby, S. Ballet, *ACS Med. Chem. Lett.* **2015**, *6*, 192–197.
- [22] T. M. A. Barlow, M. Jida, D. Tourwé, S. Ballet, *Org. Biomol. Chem.*, **2014**, *12*, 6986–6989.

- [23] J. Pícha, M. Buděšínský, K. Macháčková, M. Collinsová, J. Jiráček, *J. Pept. Sci.* **2017**, *23* (3), 202–214.
- [24] W. König, R. Geiger, *Chem. Ber.* **1970**, *103*, 788–798.
- [25] W. König, R. Geiger, *Chem. Ber.* **1970**, *103*, 2024–2033.
- [26] O. Van der Poorten, A. Knuhtsen, D. S. Pedersen, S. Ballet, D. Tourwe, *J. Med. Chem.* **2016**, *59* (24), 10865–10890.
- [27] P. Kralova, M. Malon, J. Pospisil, M. Soural, *J. Org. Chem.* **2020**, *85* (2), 985–993.
- [28] V. Mojr, E. Svobodova, K. Strakova, T. Nevesely, J. Chudoba, H. Dvorakova, R. Cibulka, *Chem. Commun.* **2015**, *51* (60), 12036–12039.
- [29] In comparison to the traditional solution-phase synthesis, overall yields in solid-phase synthesis can be affected by several specific features such as potentially incomplete cleavage of products from the polymer support, an unexpected partial cleavage of intermediates within the reaction sequence, or a partial loss of compounds within the final RP-HPLC purification, especially in the case of low-scale synthesis. As the SPS has been typically used for the synthesis of chemical libraries of compounds in small quantities for the biological screening, the yield was even not considered as the critical parameter. We believe that to judge a feasibility of the solid-phase methodology, a crude purity is the more important criterion. This is also supported by the fact that the polymer-supported intermediates cannot be purified, thus lowering of their crude purity leads to inevitable accumulation of side-products after a multistep reaction sequence.
- [30] J. Tulla-Puche, A. El-Faham, A. S. Galanis, E. De Oliveira, A. A. Zompra, F. Albericio, *Methods for the Peptide Synthesis and Analysis*; John Wiley & Sons, Inc, **2015**; pp 11–73.

4 Doplnující informace k publikaci

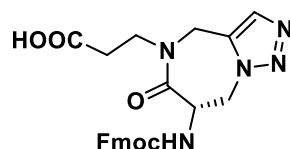
Následující kapitola je převzata přímo z originální publikace uvedené v kapitole 3: Kriegelsteinová, P.; Lemrová, B.; Ručilová, V.; Sural, M. Copper-free Solid-phase Synthesis of Triazolo[1,5-*a*][1,4]diazepin-6-ones *Adv. Synth. Catal.* **2021**, *363*, 1112 - 1119.⁸ Text byl ponechán v angličtině.

General method for calculation of yields using ¹H NMR

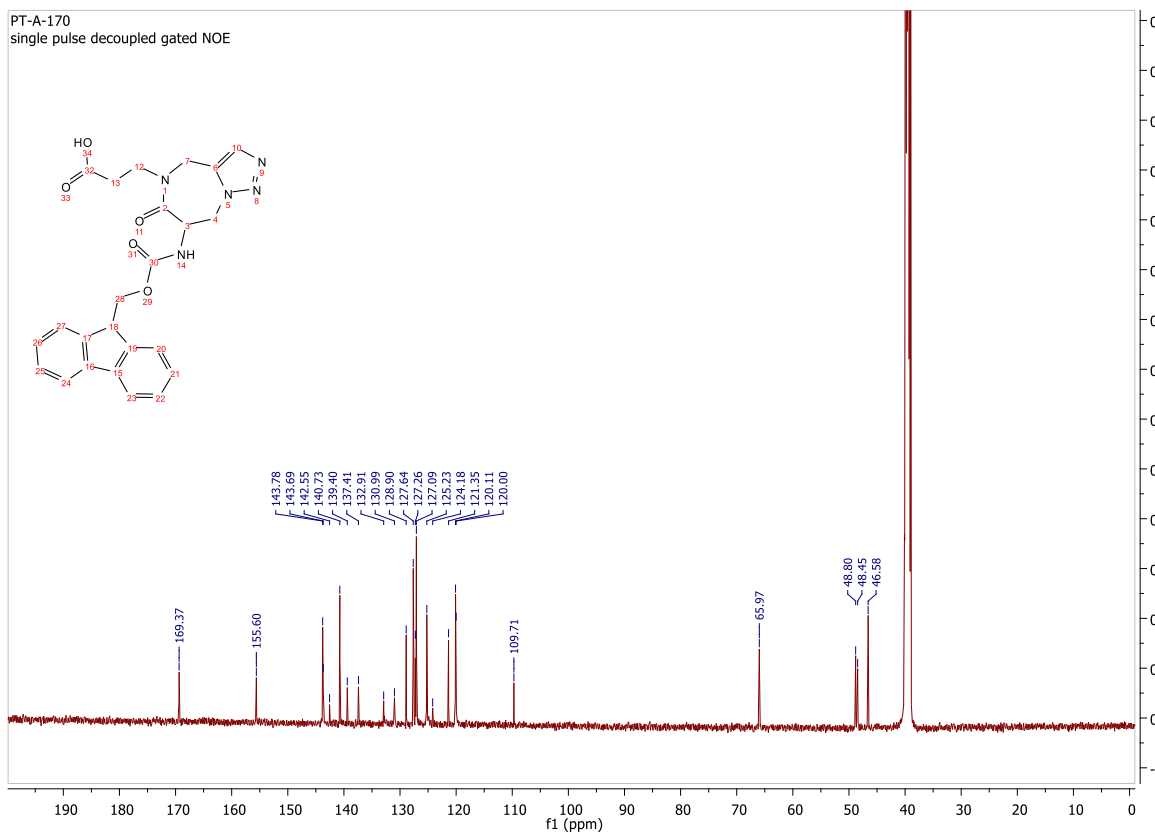
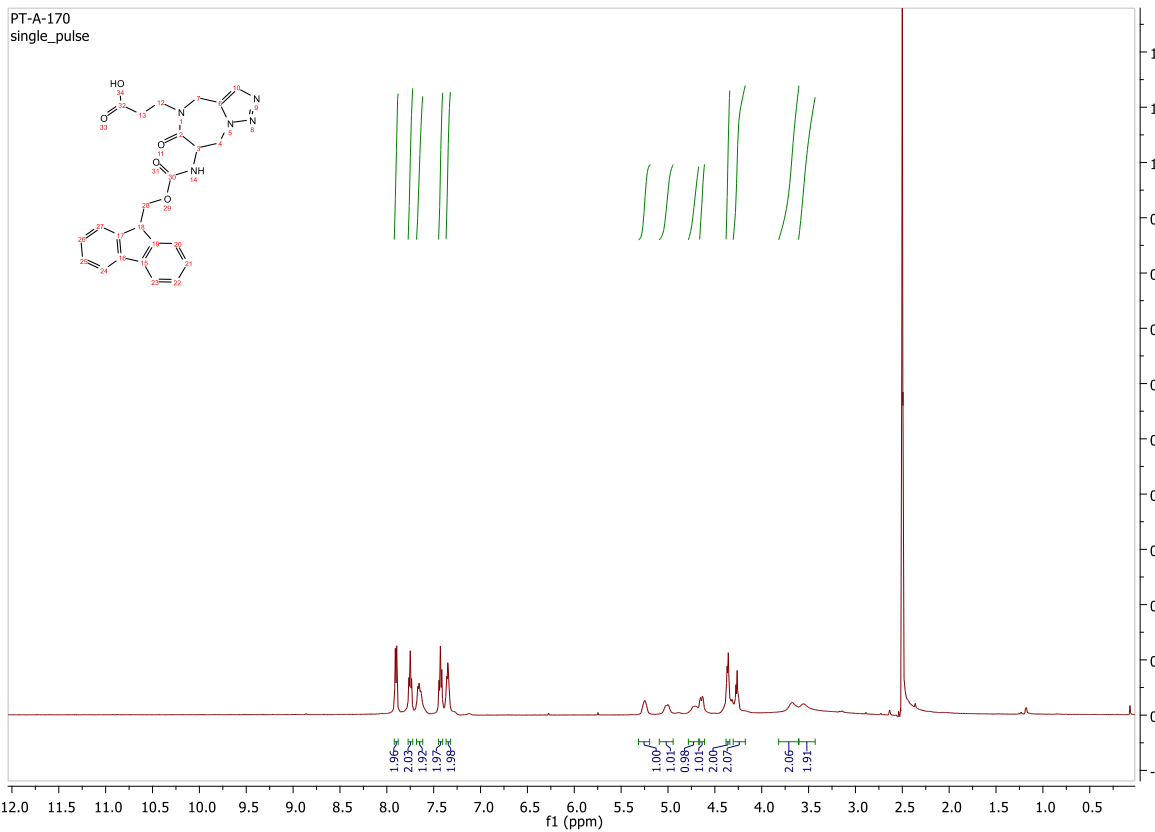
¹H NMR spectra of external standard at three different concentration were measured. In each spectrum, the solvent signal was integrated followed by the integration of selected H^{Ar} signal of external standard. Ratios of solvent/standard signal areas along with known quantity of standard were used to construct a calibration curve. Then, ¹H NMR spectra of studied sample were measured and the ratio of solvent/sample (selected H^{Ar} signal) areas was determined. Using the calibration curve, the quantity of compound in the sample was calculated.

¹H, ¹³C NMR and HRMS characterization of triazolodiazepinones 7

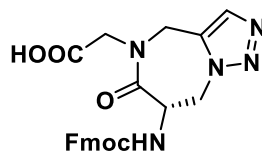
(*S*)-3-(7-(((9*H*-fluoren-9-yl)methoxy)carbonyl)amino)-6-oxo-7,8-dihydro-4*H*-[1,2,3]triazolo[1,5-*a*][1,4]diazepin-5(6*H*)-yl)propanoic acid **7**{*1,1*}



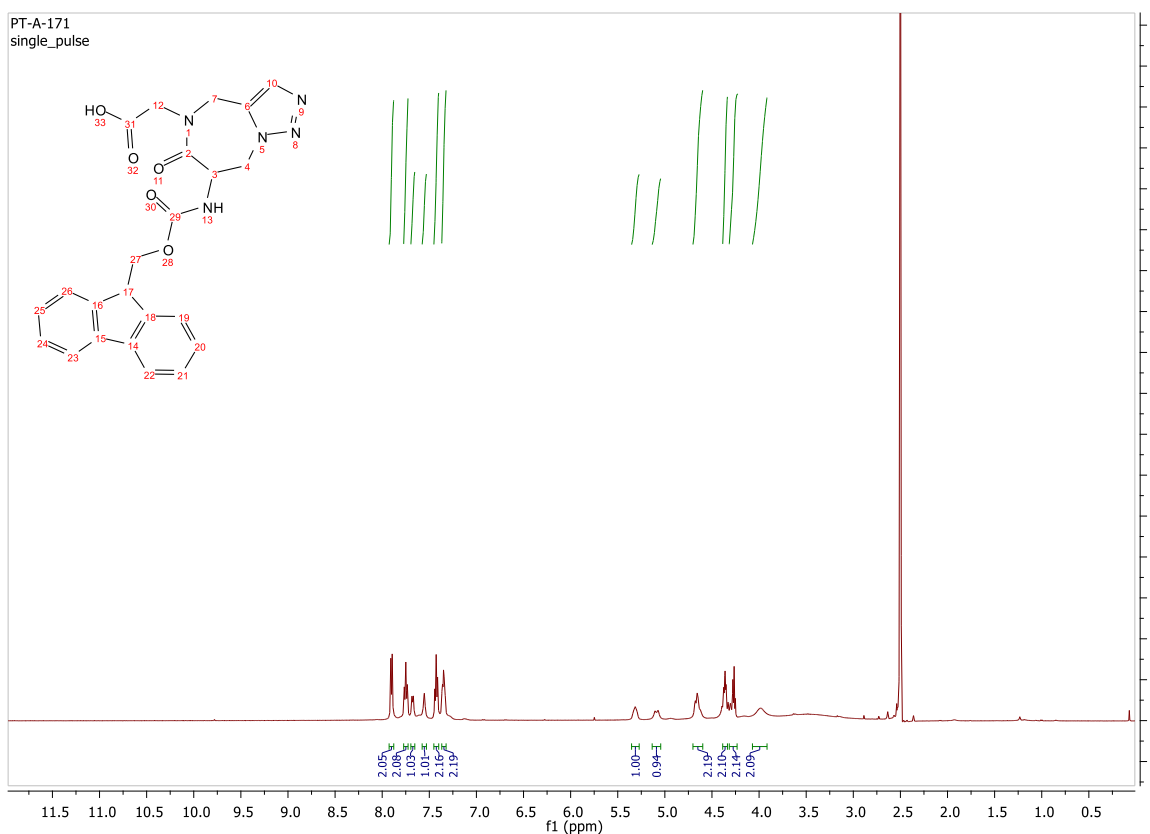
White solid, overall yield 25 mg (28 %). ¹H NMR (500 MHz, DMSO-*d*₆) δ 7.90 (d, *J* = 7.5 Hz, 2H), 7.75 (t, *J* = 7.3 Hz, 2H), 7.69 – 7.61 (m, 2H), 7.43 (t, *J* = 7.3 Hz, 2H), 7.38 – 7.31 (m, *J* = 5.1 Hz, 2H), 5.30 – 5.19 (m, 1H), 5.07 – 4.95 (m, 1H), 4.70 (s, 1H), 4.64 (d, *J* = 9.3 Hz, 1H), 4.35 (t, *J* = 8.4 Hz, 2H), 4.26 (t, *J* = 6.6 Hz, 2H), 3.82 – 3.60 (m, 2H), 3.60 – 3.42 (m, 2H). ¹³C NMR (126 MHz, DMSO-*d*₆) δ 169.37, 155.60, 143.78, 143.69, 142.55, 140.73, 139.40, 137.41, 132.91, 130.99, 128.90, 127.64, 127.26, 127.09, 125.23, 124.18, 121.35, 120.11, 120.00, 109.71, 65.97, 48.80, 48.45, 46.58. HRMS (ESI+) *m/z* calcd for C₂₄H₂₄N₅O₅ [M+H]⁺ = 462.1772, found [M+H]⁺ = 462.1776.

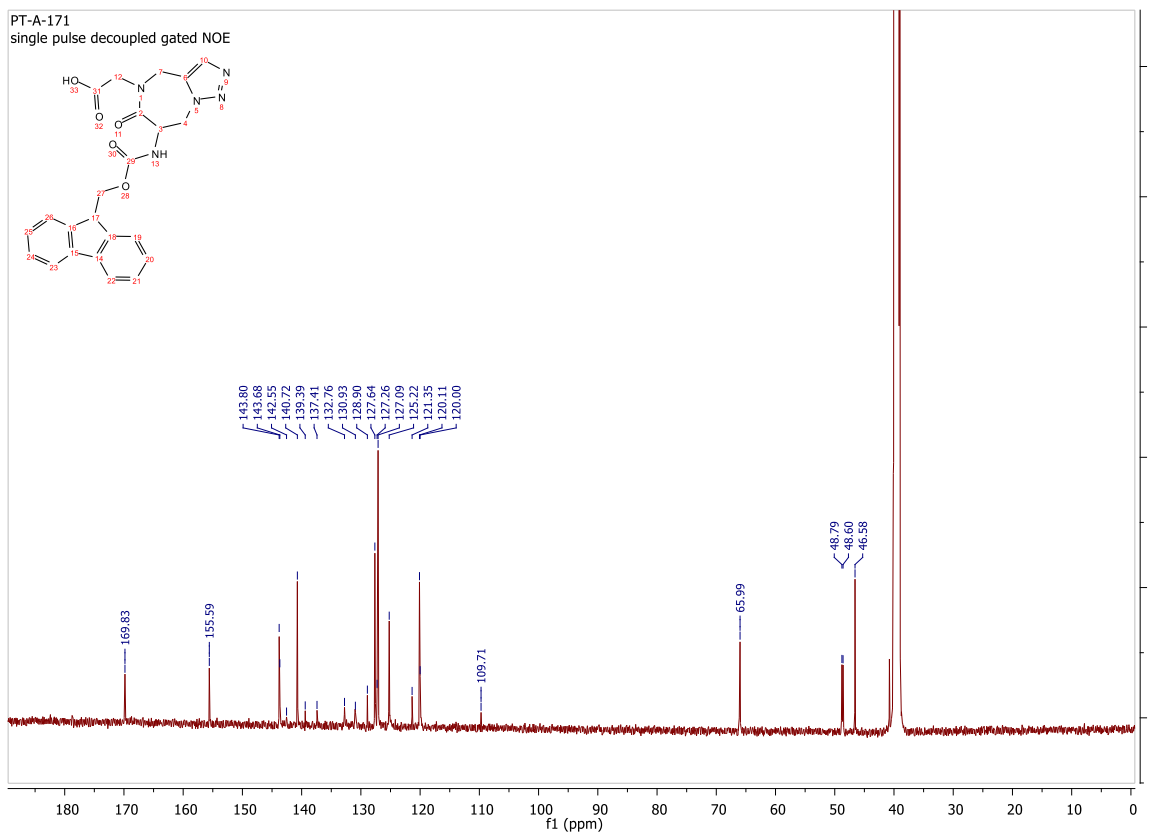


(S)-2-(7-((((9H-fluoren-9-yl)methoxy)carbonyl)amino)-6-oxo-7,8-dihydro-4H-[1,2,3]triazolo[1,5-a][1,4]diazepin-5(6H)-yl)acetic acid 7{2,I}

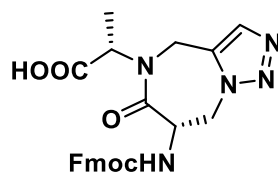


White solid, overall yield 30 mg (20 %). ^1H NMR (500 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) δ 7.90 (d, $J = 7.4$ Hz, 2H), 7.75 (t, $J = 8.0$ Hz, 2H), 7.68 (d, $J = 7.3$ Hz, 1H), 7.55 (s, 1H), 7.43 (t, $J = 7.3$ Hz, 2H), 7.35 (t, $J = 5.9$ Hz, 2H), 5.36 – 5.26 (m, 1H), 5.09 (d, $J = 15.3$ Hz, 1H), 4.72 – 4.58 (m, $J = 9.7$ Hz, 2H), 4.43 – 4.32 (m, 2H), 4.27 (dd, $J = 16.5, 9.8$ Hz, 2H), 3.98 (s, 2H). ^{13}C NMR (126 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) δ 169.8, 155.6, 143.8, 143.7, 142.6, 140.7, 139.4, 137.4, 132.8, 130.9, 128.9, 127.6, 127.3, 127.1, 125.2, 121.4, 120.1, 120.0, 109.7, 66.0, 48.8, 48.6, 46.6. HRMS (ESI-) m/z calcd for $\text{C}_{23}\text{H}_{20}\text{N}_5\text{O}_5$ $[\text{M-H}]^- = 446.1459$, found $[\text{M-H}]^+ = 446.1453$.

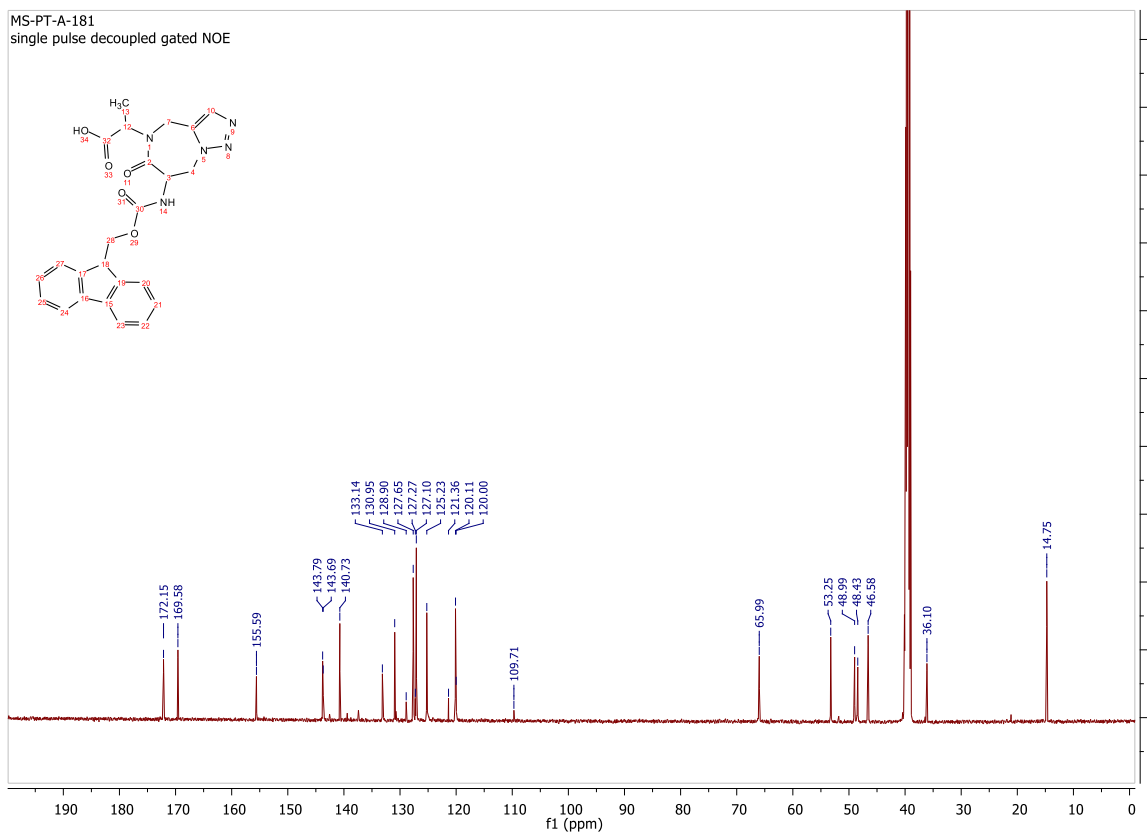
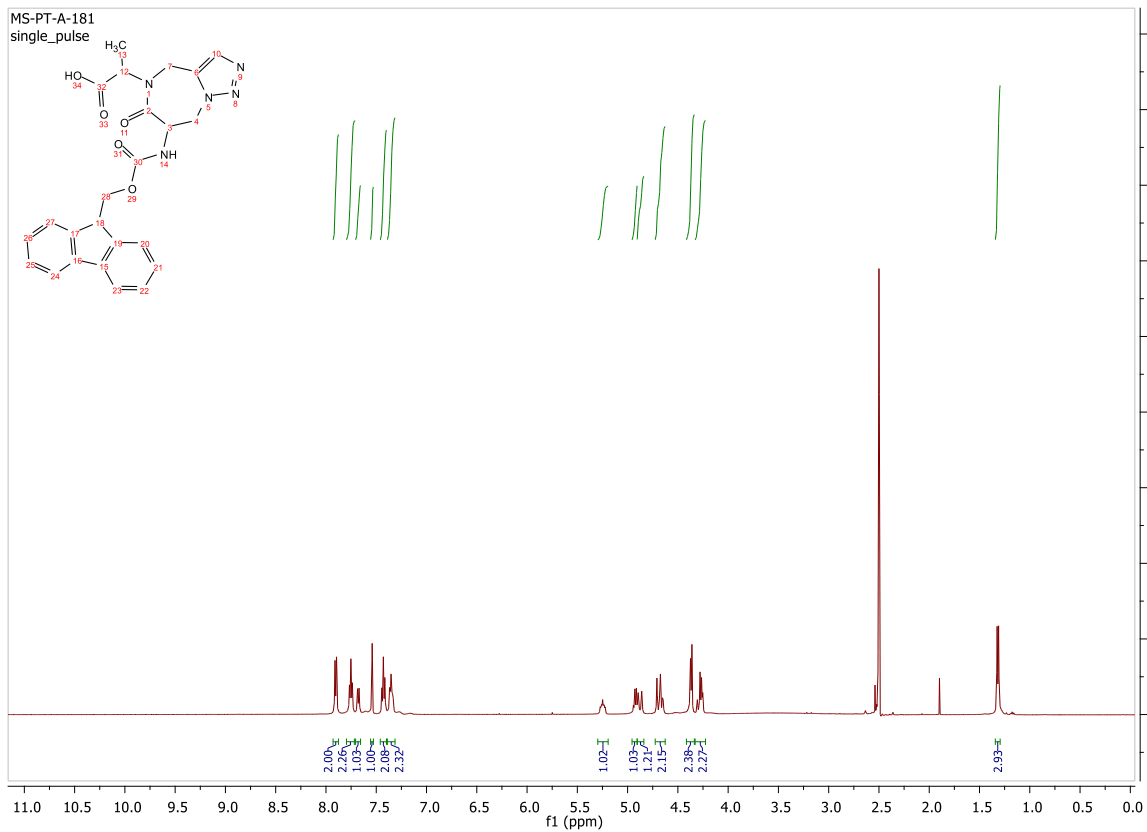




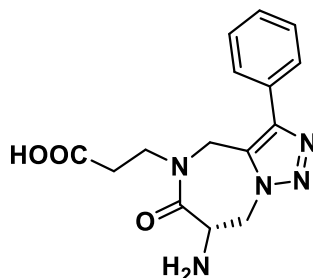
(S)-2-(((S)-7-(((9H-fluoren-9-yl)methoxy)carbonyl)amino)-6-oxo-7,8-dihydro-4H-[1,2,3]triazolo[1,5-a][1,4]diazepin-5(6H)-yl)propanoic acid 7{3,I}



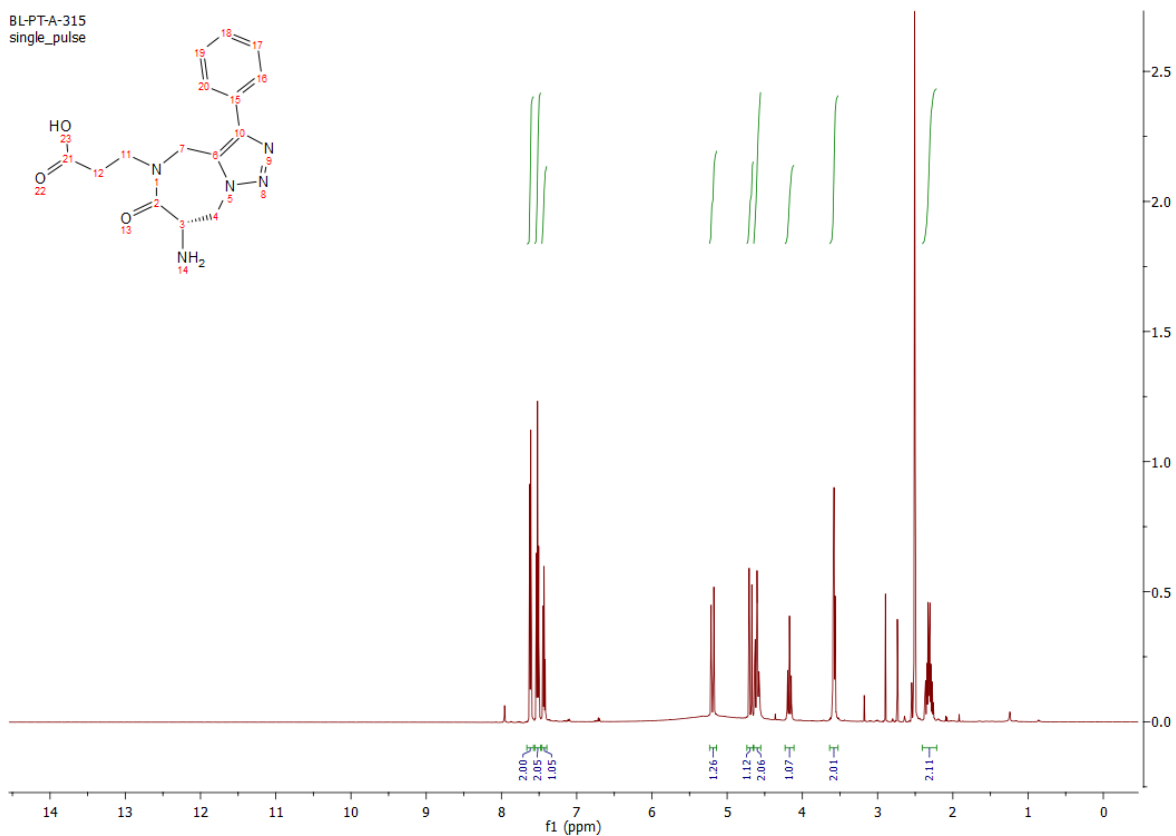
White solid, overall yield 100 mg (60 %). ^1H NMR (500 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) δ 7.90 (d, $J = 7.5$ Hz, 2H), 7.75 (t, $J = 7.2$ Hz, 2H), 7.68 (d, $J = 7.5$ Hz, 1H), 7.54 (s, 1H), 7.43 (t, $J = 7.4$ Hz, 2H), 7.35 (dd, $J = 7.0, 5.0$ Hz, 2H), 5.25 (ddd, $J = 12.0, 7.4, 4.5$ Hz, 1H), 4.92 (dd, $J = 15.4, 8.1$ Hz, 1H), 4.86 (s, 1H), 4.67 (dd, $J = 20.0, 10.8$ Hz, 2H), 4.36 (t, $J = 8.7$ Hz, 2H), 4.33 – 4.22 (m, 2H), 1.32 (d, $J = 7.2$ Hz, 3H). ^{13}C NMR (126 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) δ 172.2, 169.6, 155.6, 143.8, 143.7, 140.7, 133.2, 131.0, 128.9, 127.6, 127.3, 127.1, 125.2, 121.4, 120.1, 120.0, 109.7, 66.0, 53.3, 49.0, 48.4, 46.6, 36.1, 14.8. HRMS (ESI+) m/z calcd for $\text{C}_{24}\text{H}_{24}\text{N}_5\text{O}_5$ $[\text{M}+\text{H}]^+ = 462.1772$, found $[\text{M}+\text{H}]^+ = 462.1775$.

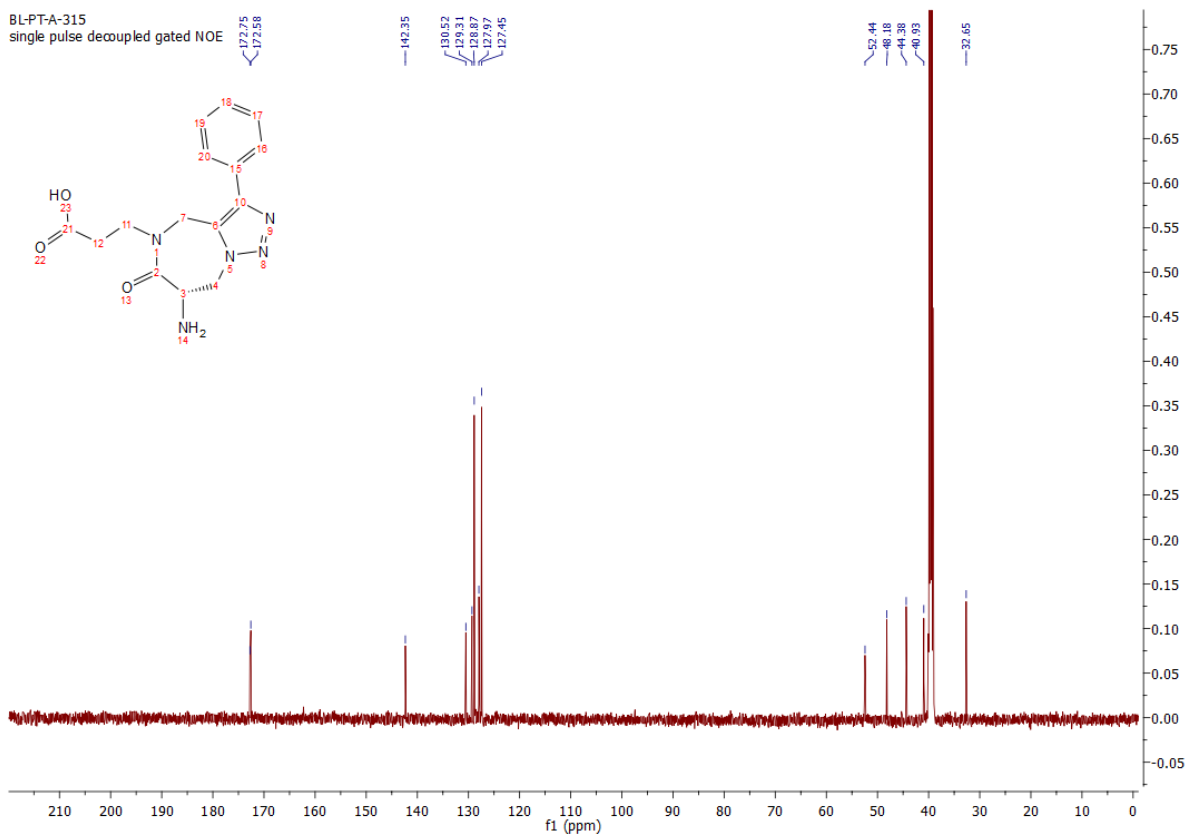


(S)-3-(7-amino-6-oxo-3-phenyl-7,8-dihydro-4H-[1,2,3]triazolo[1,5-a][1,4]diazepin-5(6H)-yl)propanoic acid 7{1,2}

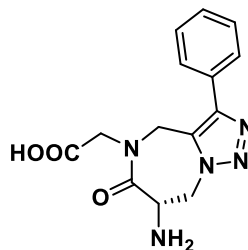


White solid, yield 10 mg (20 %). ^1H NMR (500 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) δ 7.65 – 7.57 (m, 2H), 7.66 – 7.58 (m, 2H), 7.55 – 7.49 (m, 2H), 7.46 – 7.39 (m, 1H), 5.28 – 5.14 (m, 1H), 4.69 (d, $J = 17.6$ Hz, 1H), 4.64 – 4.55 (m, 2H), 4.17 (t, $J = 11.7$ Hz, 1H), 3.63 – 3.52 (m, 2H), 2.42 – 2.20 (m, 2H). ^{13}C NMR (126 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) δ 172.8, 172.6, 142.4, 130.5, 129.3, 128.9, 128.0, 127.5, 52.4, 48.2, 44.4, 40.9, 32.7. HRMS (ESI+) m/z calcd for $\text{C}_{15}\text{H}_{18}\text{N}_5\text{O}_3$ $[\text{M}+\text{H}]^+$ 316.1404, found 316.1405.



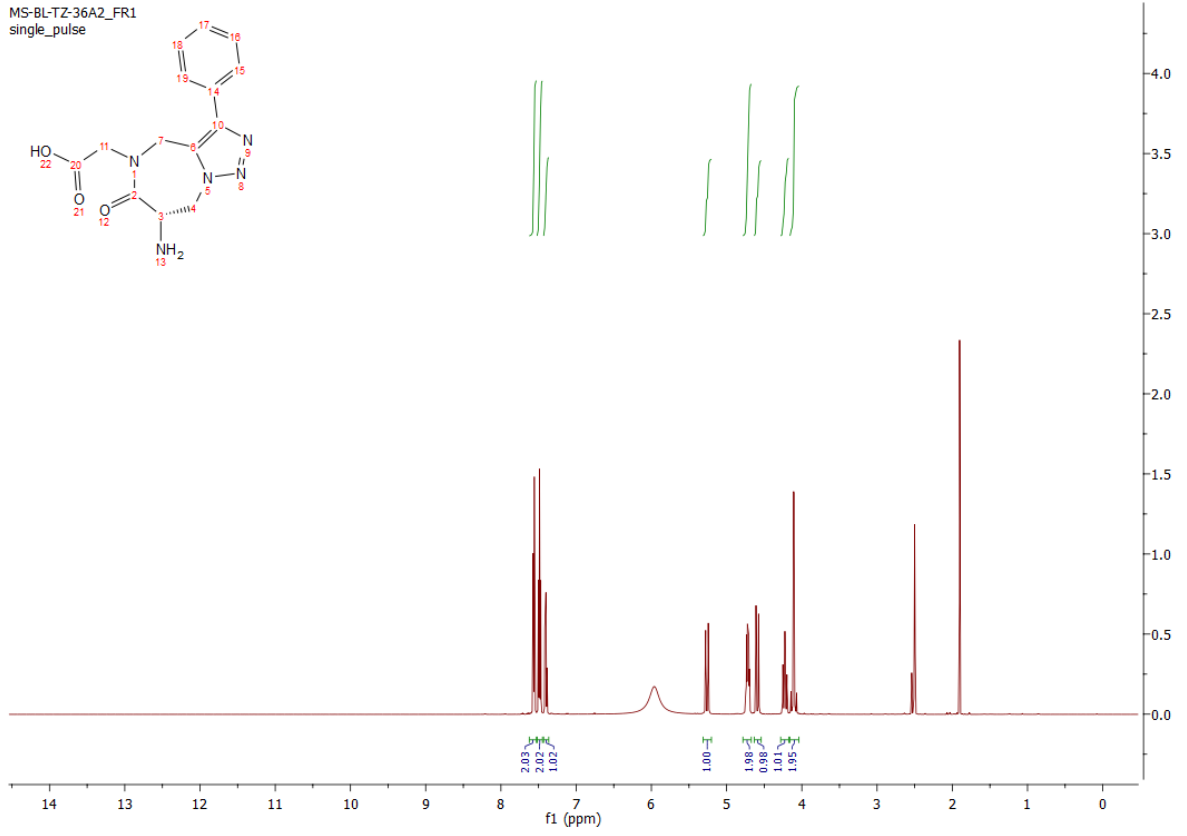


2-(7-amino-6-oxo-3-phenyl-7,8-dihydro-4H-[1,2,3]triazolo[1,5-a][1,4]diazepin-5(6H)-yl)acetic acid 7{2,2}

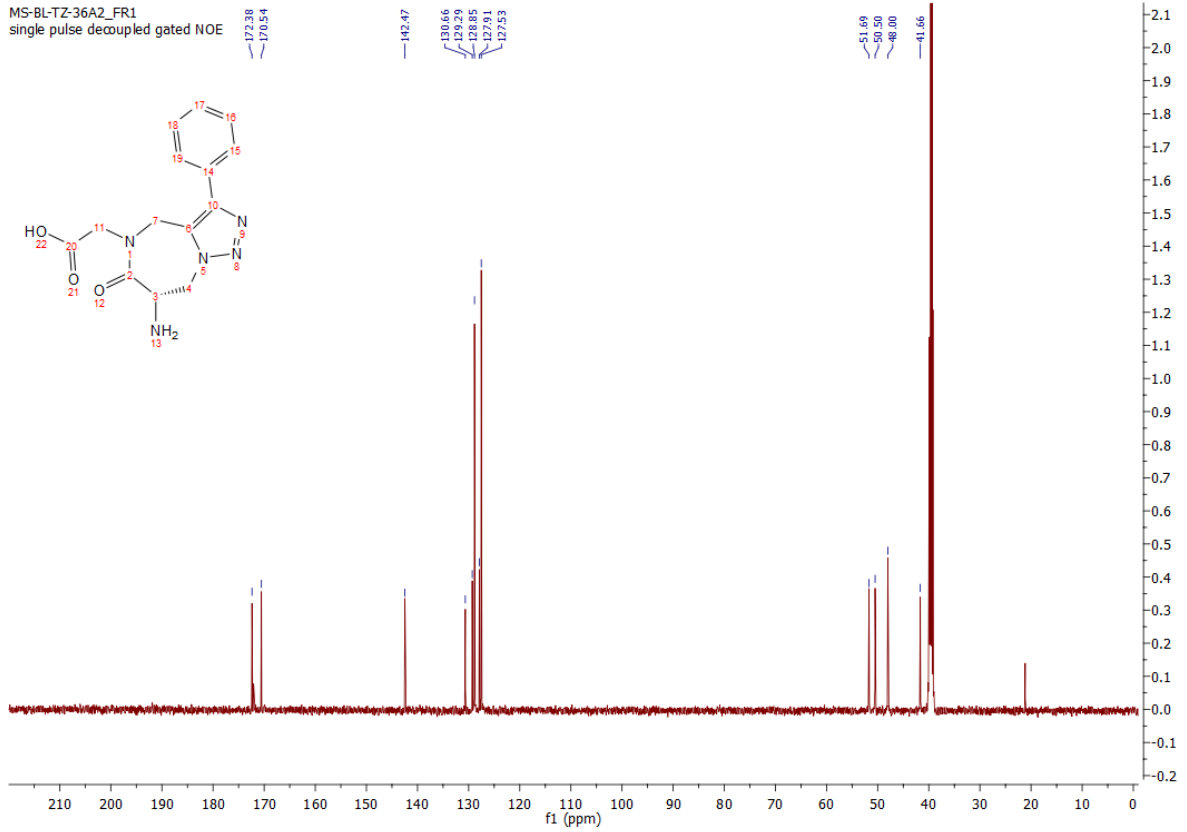


Light yellow residue, overall yield 75 mg (78%). ^1H NMR (500 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) δ 7.57 (dd, $J = 5.1, 3.3$ Hz, 2H), 7.49 (dd, $J = 10.4, 4.8$ Hz, 2H), 7.43 – 7.37 (m, 1H), 5.26 (d, $J = 17.5$ Hz, 1H), 4.72 (dt, $J = 10.3, 4.1$ Hz, 2H), 4.59 (d, $J = 17.7$ Hz, 1H), 4.23 (dd, $J = 16.2, 10.6$ Hz, 1H), 4.17 – 4.03 (m, 2). ^{13}C NMR (126 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) δ 172.4, 170.5, 142.5, 130.7, 129.3, 128.9, 127.9, 127.5, 51.7, 50.5, 48.0, 41.7. HRMS (ESI+) m/z calcd for $\text{C}_{14}\text{H}_{15}\text{N}_5\text{O}_3$ $[\text{M}+\text{H}]^+ = 302.1248$, found $[\text{M}+\text{H}]^+ = 302.1245$.

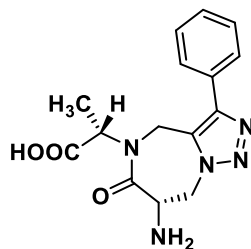
MS-BL-TZ-36A2_FR1
single_pulse



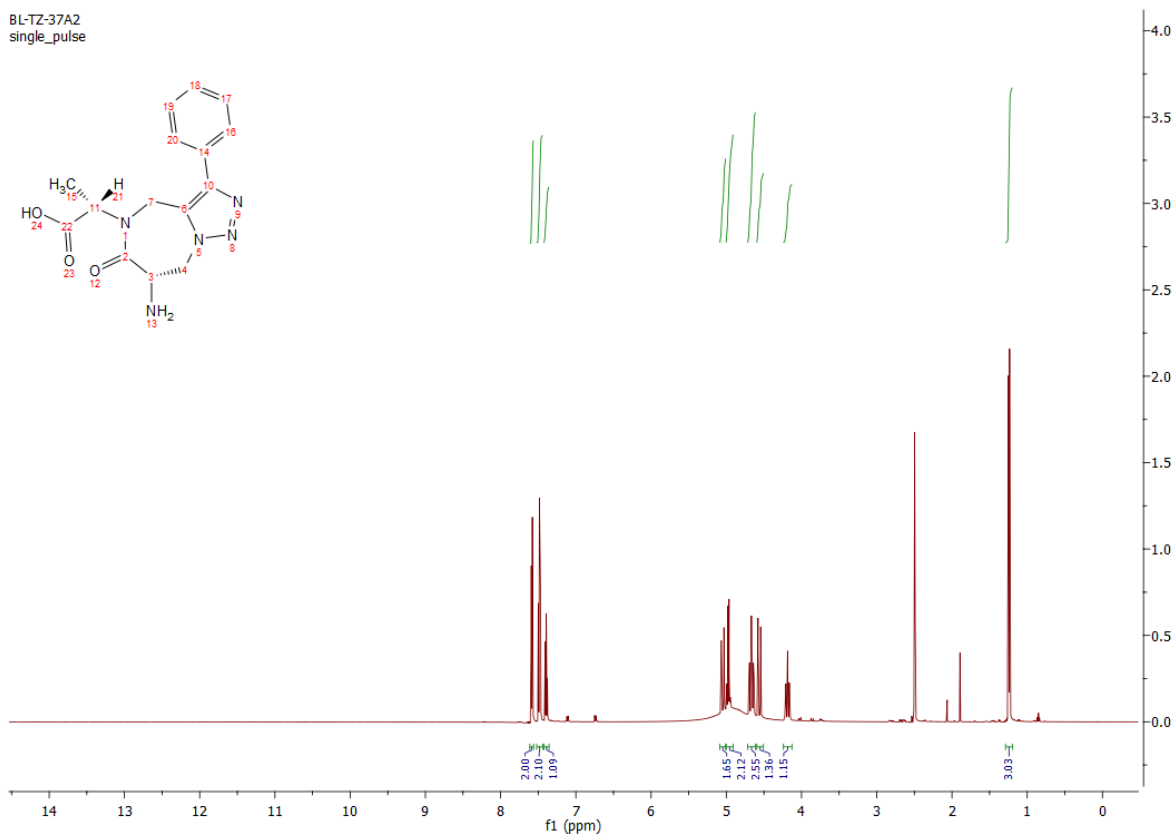
MS-BL-TZ-36A2_FR1
single pulse decoupled gated NOE

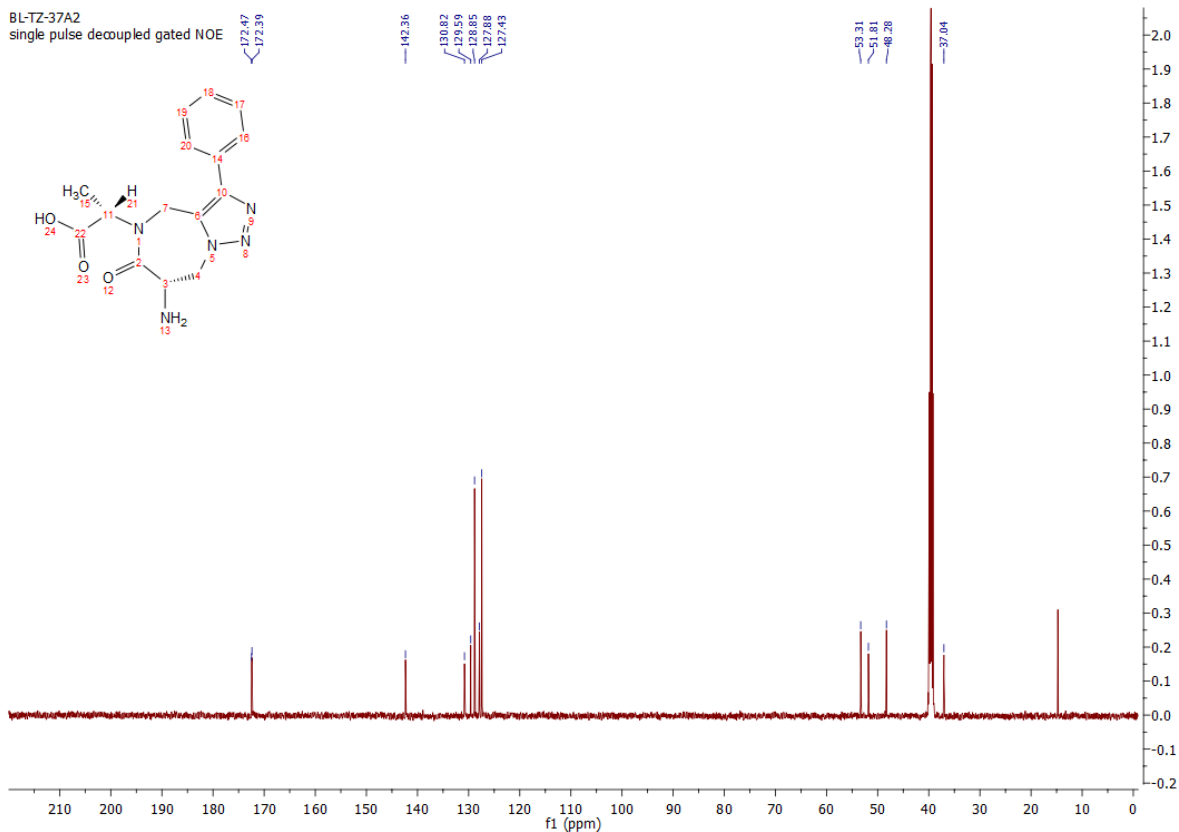


(S)-2-((S)-7-amino-6-oxo-3-phenyl-7,8-dihydro-4H-[1,2,3]triazolo[1,5-a][1,4]diazepin-5(6H)-yl)propanoic acid 7{3,2}

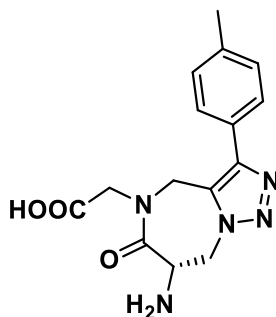


Yellow residue, overall yield 32 mg (40%). ^1H NMR (500 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) δ 7.61 – 7.56 (m, 2H), 7.51 – 7.45 (m, 2H), 7.42 – 7.36 (m, 1H), 5.05 (d, $J = 17.4$ Hz, 1H), 4.97 (q, $J = 7.2$ Hz, 1H), 4.67 (ddd, $J = 16.8, 11.8, 4.1$ Hz, 2H), 4.56 (d, $J = 17.6$ Hz, 1H), 4.23 – 4.14 (m, 1H), 1.24 (d, $J = 7.3$ Hz, 3H). ^{13}C NMR (126 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) δ 172.5, 172.4, 142.4, 130.8, 129.6, 128.9, 127.9, 127.4, 53.3, 51.8, 48.3, 37.1. HRMS (ESI+) m/z calcd for $\text{C}_{14}\text{H}_{15}\text{N}_5\text{O}_3$ $[\text{M}+\text{H}]^+$ 316.1404, found $[\text{M}+\text{H}]^+ = 316.1402$.

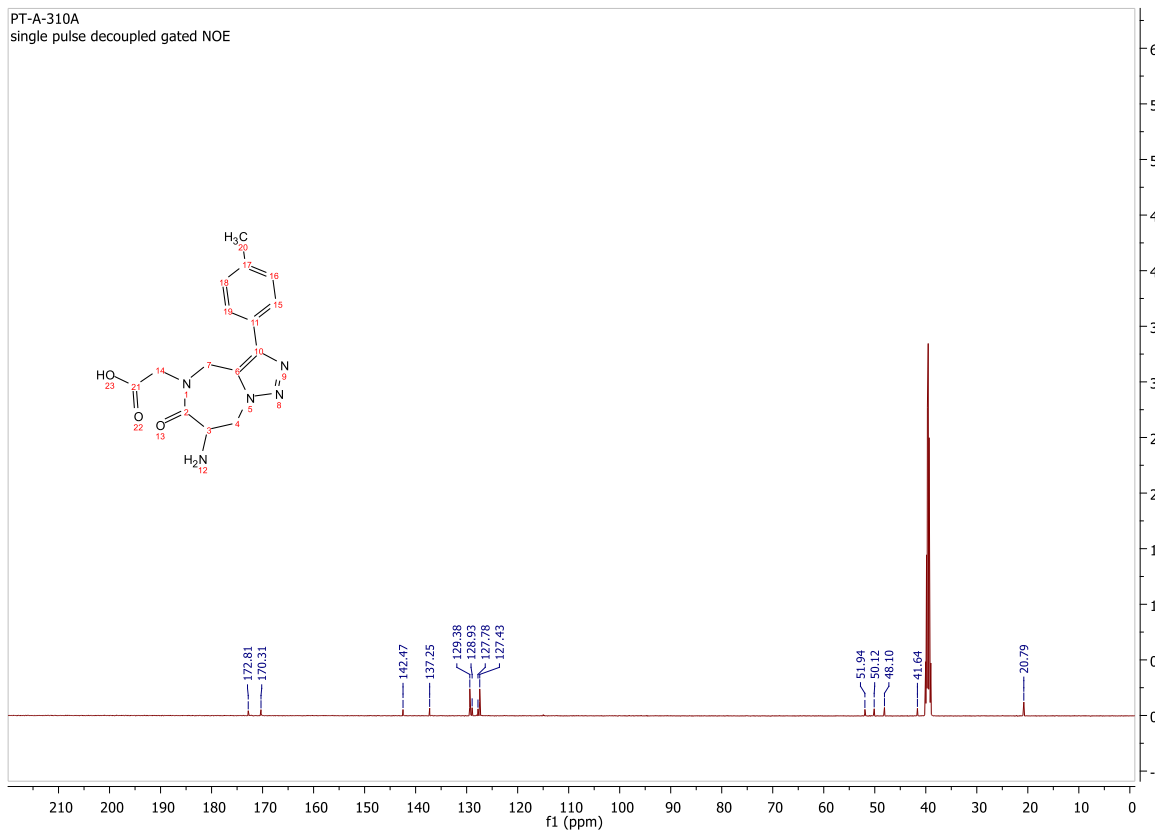
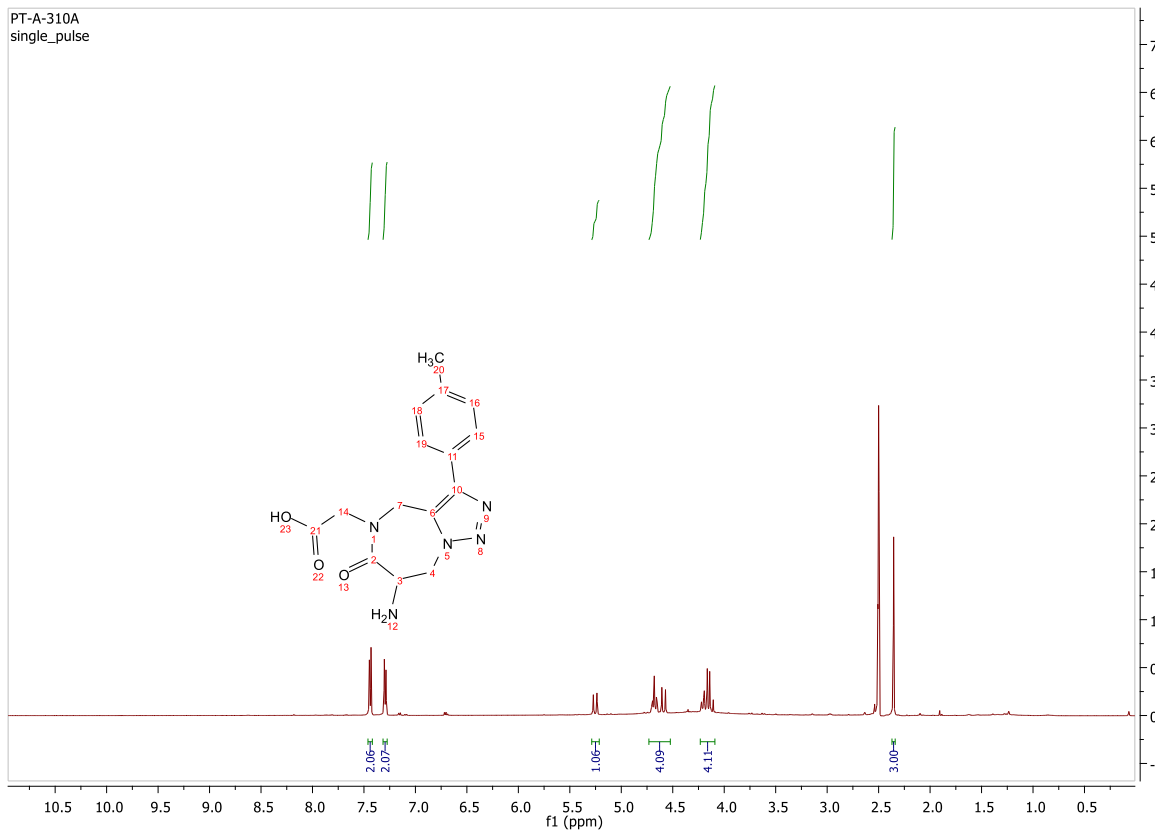




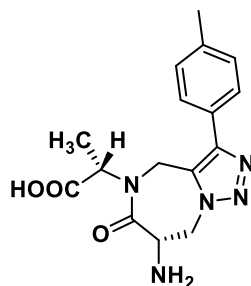
(S)-2-(7-amino-6-oxo-3-(*p*-tolyl)-7,8-dihydro-4H-[1,2,3]triazolo[1,5-*a*][1,4]diazepin-5(6H)-yl)acetic acid 7{2,3}



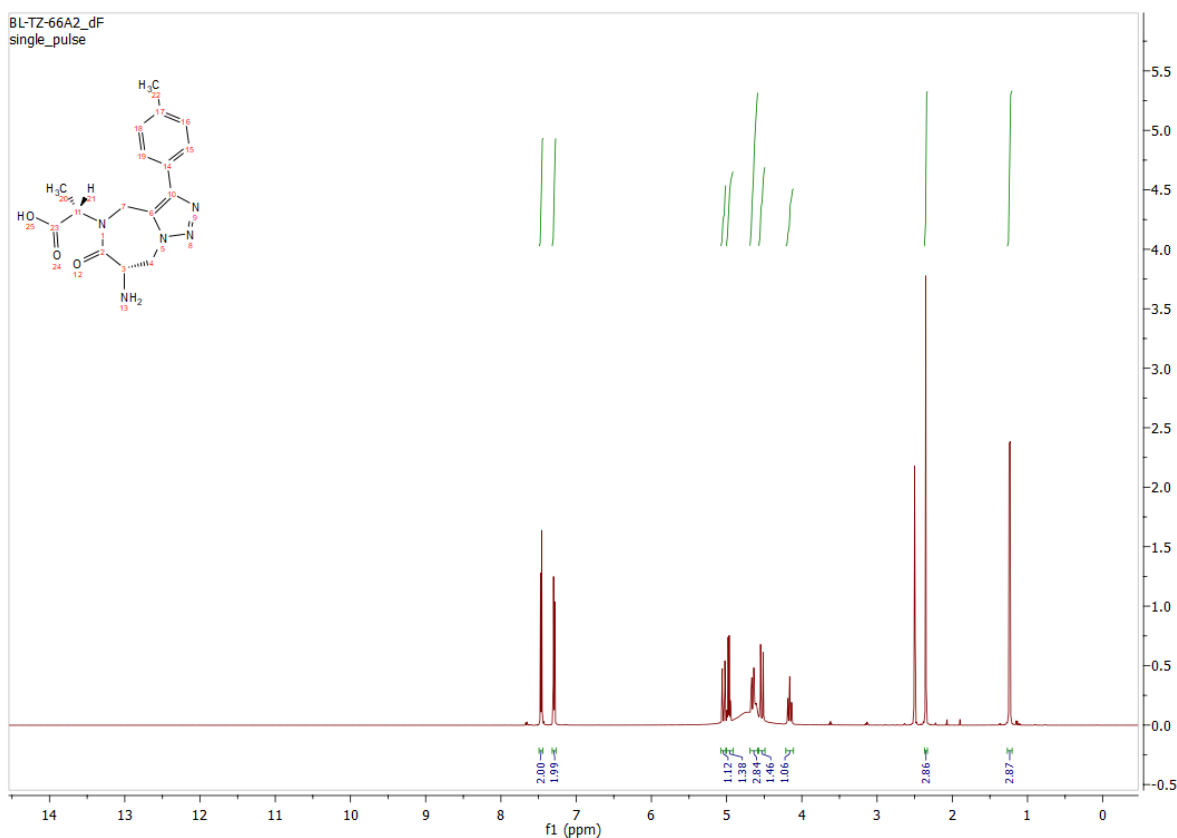
White solid, yield 8 mg (22 %). ^1H NMR (500 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) δ 7.44 (d, $J = 8.1$ Hz, 2H), 7.29 (d, $J = 7.9$ Hz, 2H), 5.25 (d, $J = 17.5$ Hz, 1H), 4.72 – 4.54 (m, 4H), 4.23 – 4.09 (m, 4H), 2.35 (s, 3H). ^{13}C NMR (126 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) δ 172.8, 170.3, 142.5, 137.3, 129.4, 128.9, 127.8, 127.4, 51.9, 50.1, 48.1, 41.6, 20.8. HRMS (ESI+) m/z calcd for $\text{C}_{15}\text{H}_{18}\text{N}_5\text{O}_3$ $[\text{M}+\text{H}]^+$ = 316.1404, found $[\text{M}+\text{H}]^+$ = 316.1403.

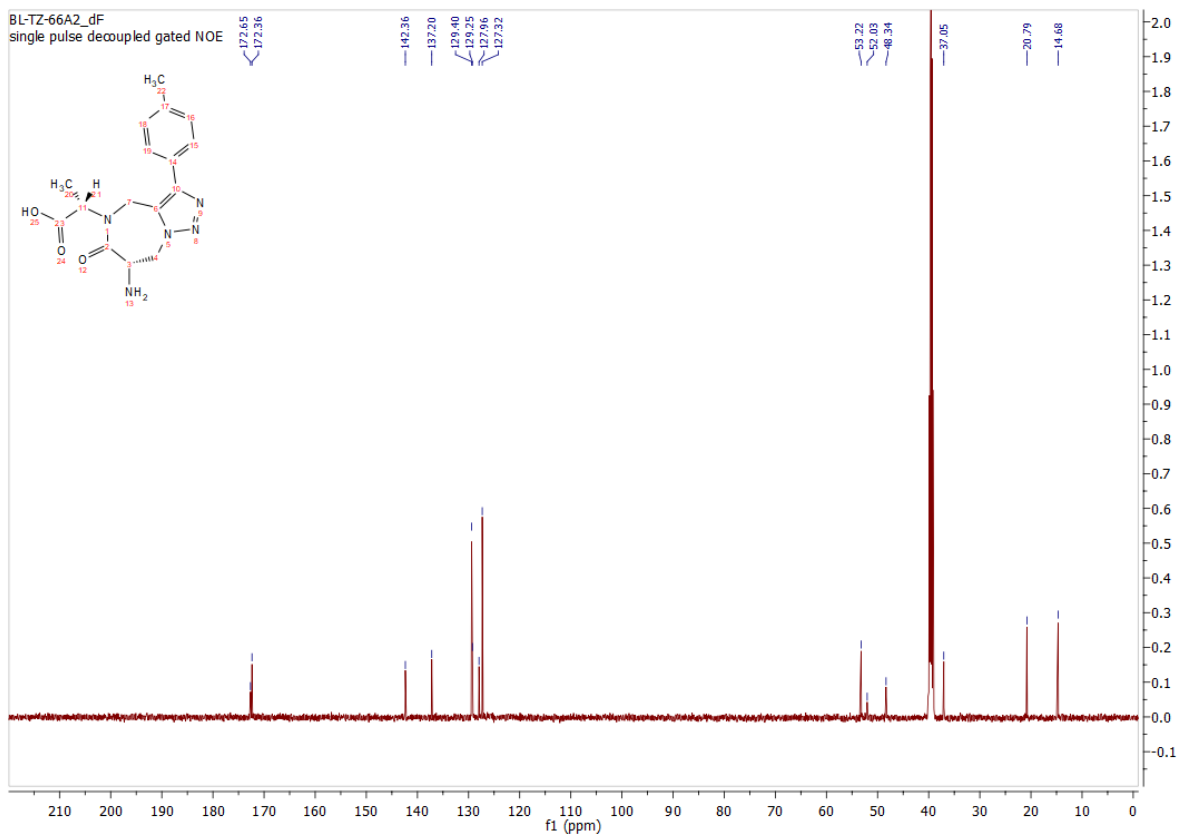


(S)-2-((S)-7-amino-6-oxo-3-(p-tolyl)-7,8-dihydro-4H-[1,2,3]triazolo[1,5-a][1,4]diazepin-5(6H)-yl)propanoic acid 7{3,3}

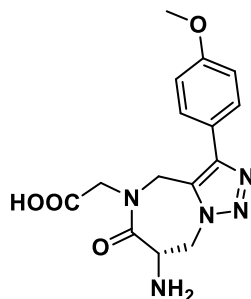


White solid, overall yield 36 mg (52%). ¹H NMR (500 MHz, DMSO-*d*₆) δ 7.49 – 7.44 (m, 2H), 7.29 (d, *J* = 7.8 Hz, 2H), 5.04 (d, *J* = 17.4 Hz, 1H), 5.01 – 4.93 (m, 1H), 4.69 – 4.59 (m, 2H), 4.53 (d, *J* = 17.6 Hz, 1H), 4.16 (t, *J* = 12.2 Hz, 1H), 2.35 (s, 3H), 1.24 (d, *J* = 7.2 Hz, 3H). ¹³C NMR (126 MHz, DMSO-*d*₆) δ 172.7, 172.4, 142.4, 137.2, 129.4, 129.3, 128.0, 127.3, 53.2, 52.0, 48.3, 37.1, 20.8, 14.7. HRMS (ESI+) *m/z* calcd for C₁₆H₁₉N₅O₃ [M+H]⁺ = 330.1561, found [M+H]⁺ = 330.1557.

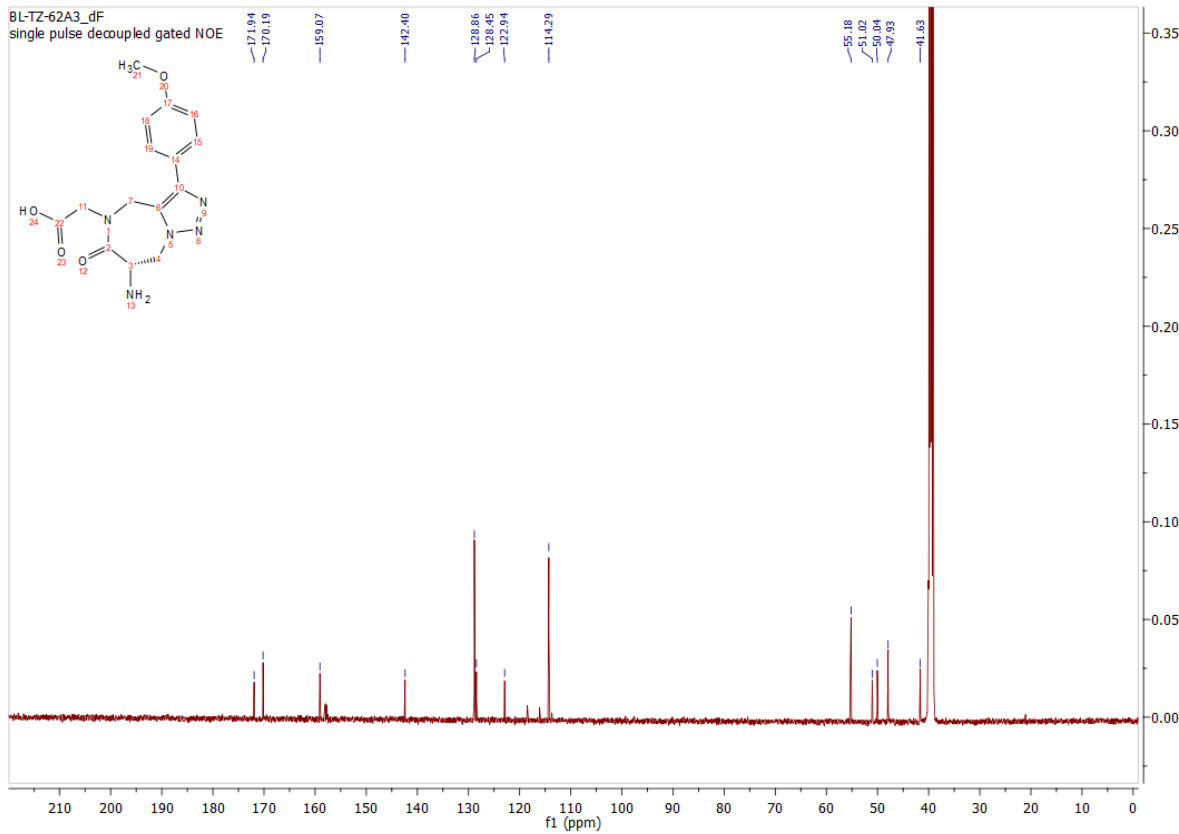
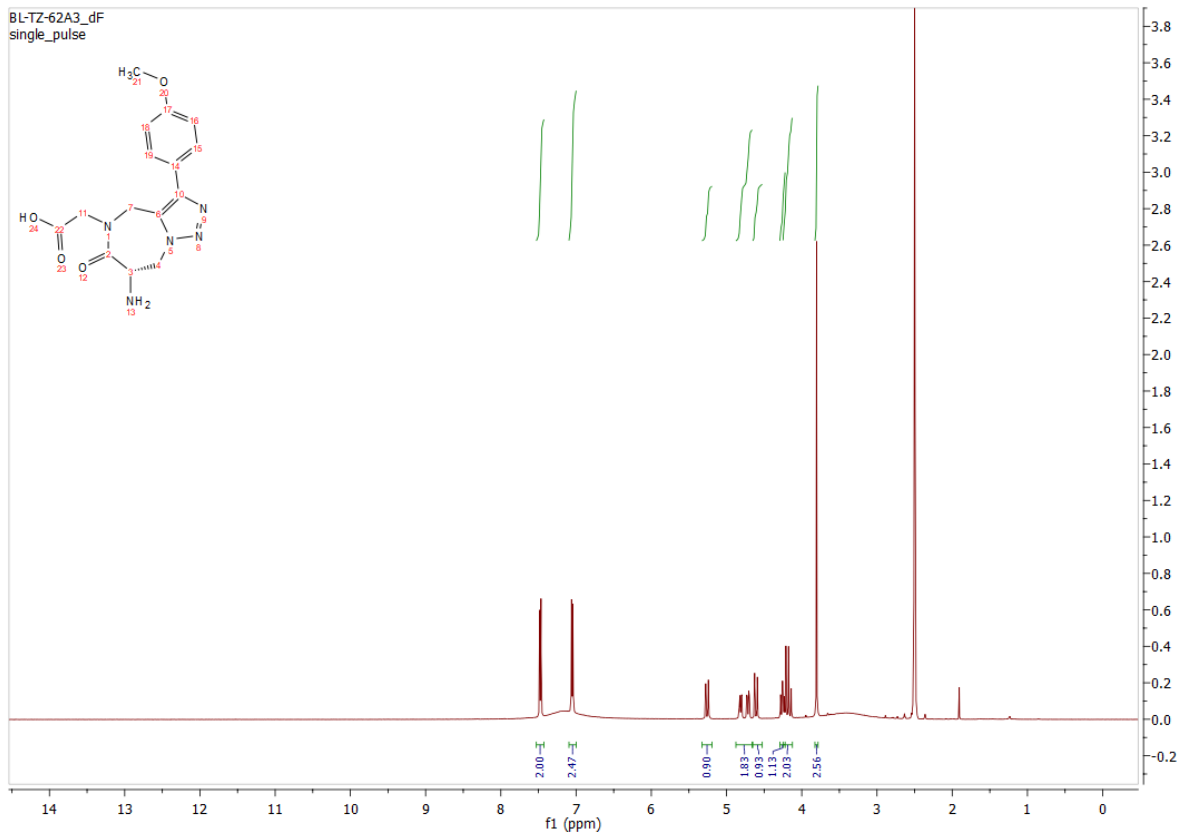




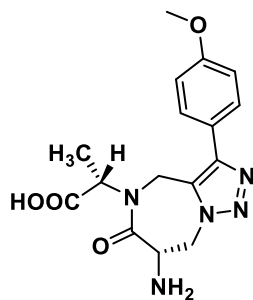
(S)-2-(7-amino-3-(4-methoxyphenyl)-6-oxo-7,8-dihydro-4H-[1,2,3]triazolo[1,5-a][1,4]diazepin-5(6H)-yl)acetic acid 7{2,4}



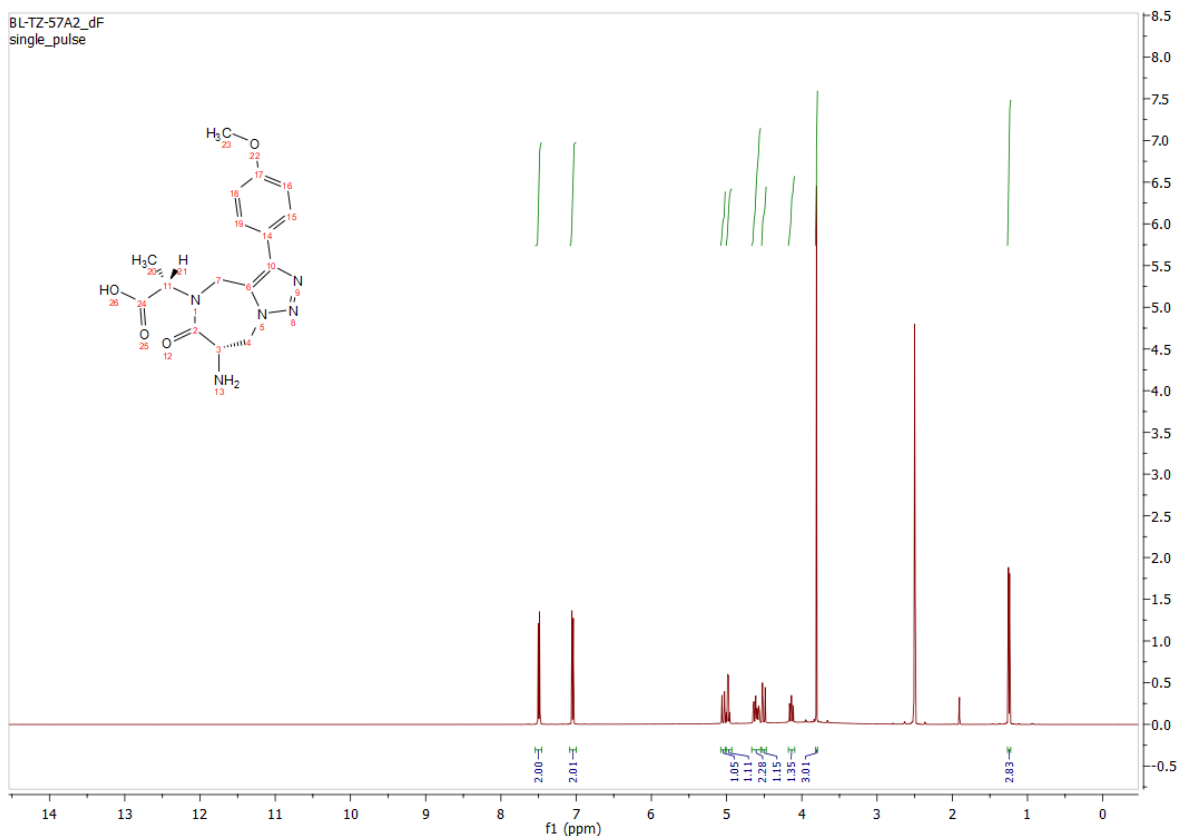
White solid, overall yield 99 mg (83%). ^1H NMR (500 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) δ 7.51 – 7.44 (m, 2H), 7.08 – 7.02 (m, 2H), 5.26 (d, $J = 17.5$ Hz, 1H), 4.76 (ddd, $J = 17.1, 12.6, 3.9$ Hz, 2H), 4.61 (d, $J = 17.7$ Hz, 1H), 4.26 (t, $J = 12.5$ Hz, 1H), 4.19 (q, $J = 17.5$ Hz, 2H), 3.80 (s, 3H). ^{13}C NMR (126 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) δ 171.9, 170.2, 159.1, 142.4, 128.9, 128.4, 122.9, 114.3, 55.2, 51.0, 50.0, 47.9, 41.6. HRMS (ESI+) m/z calcd for $\text{C}_{15}\text{H}_{17}\text{N}_5\text{O}_4$ $[\text{M}+\text{H}]^+ = 332.1253$, found $[\text{M}+\text{H}]^+ = 332.1355$.

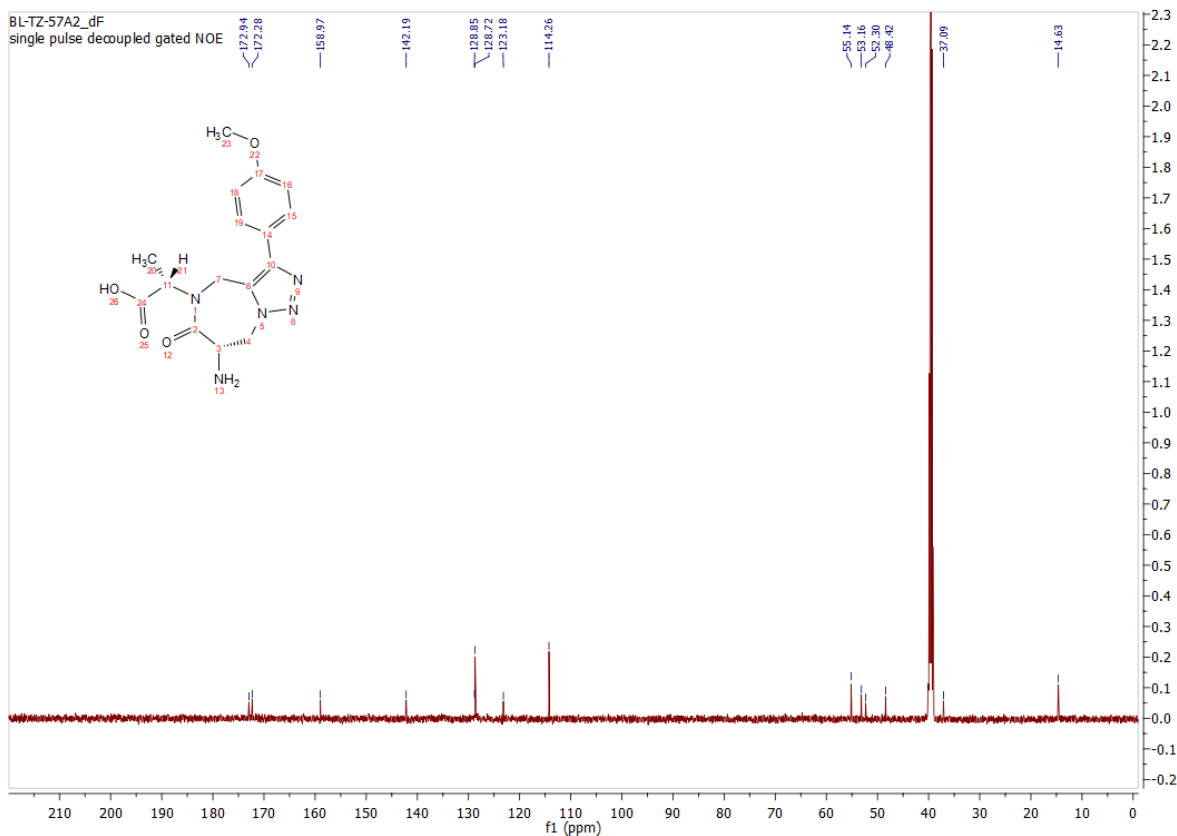


(S)-2-((S)-7-amino-3-(4-methoxyphenyl)-6-oxo-7,8-dihydro-4H-[1,2,3]triazolo[1,5-*a*][1,4]diazepin-5(6*H*)-yl)propanoic acid 7{3,4}

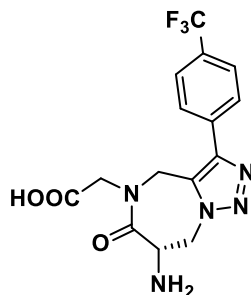


White solid, overall yield 49 mg (58%). ^1H NMR (500 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) δ 7.55 – 7.42 (m, 2H), 7.11 – 6.97 (m, 2H), 5.05 (d, $J = 17.4$ Hz, 1H), 4.98 (q, $J = 7.2$ Hz, 1H), 4.61 (ddd, $J = 15.8, 12.2, 4.1$ Hz, 2H), 4.51 (d, $J = 17.6$ Hz, 1H), 4.20 – 4.09 (m, 1H), 3.81 (s, 3H), 1.25 (d, $J = 7.3$ Hz, 3H). ^{13}C NMR (126 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) δ 172.9, 172.3, 159.0, 142.2, 128.9, 128.7, 123.2, 114.3, 55.1, 53.2, 52.3, 48.4, 37.1, 14.6. HRMS (ESI+) m/z calcd for $\text{C}_{16}\text{H}_{19}\text{N}_5\text{O}_4$ $[\text{M}+\text{H}]^+ = 346.1510$, found $[\text{M}+\text{H}]^+ = 346.1511$.

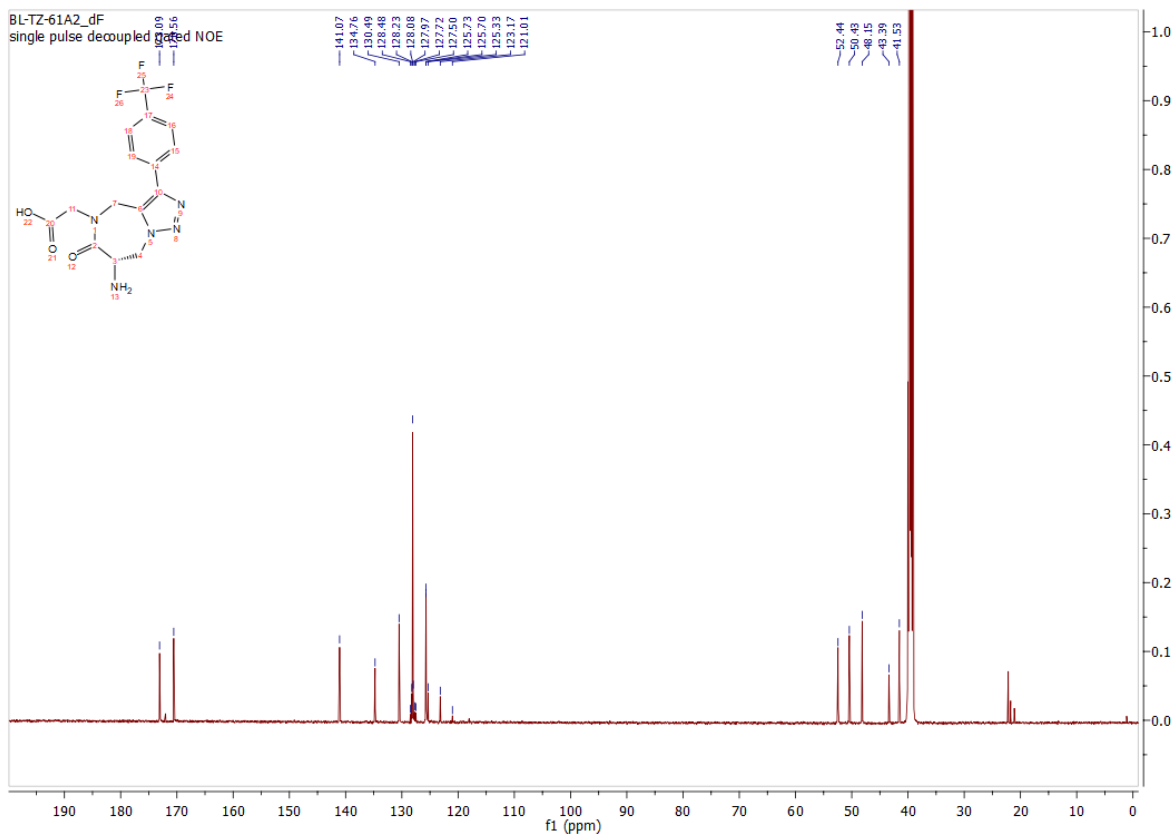
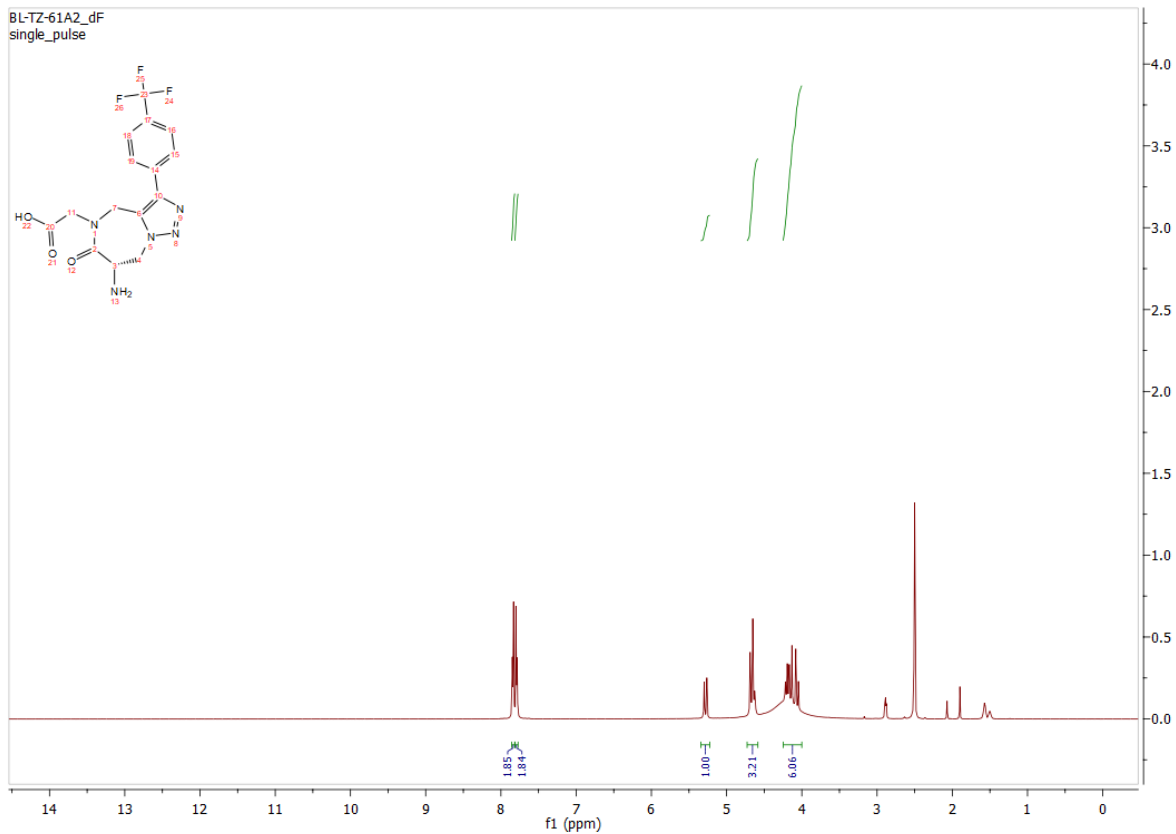




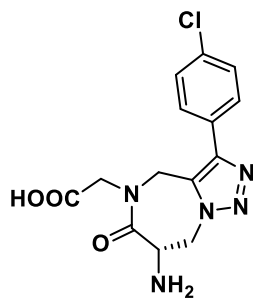
(S)-2-(7-amino-6-oxo-3-(4-(trifluoromethyl)phenyl)-7,8-dihydro-4H-[1,2,3]triazolo[1,5-a][1,4]diazepin-5(6H)-yl)acetic acid 7{2,5}



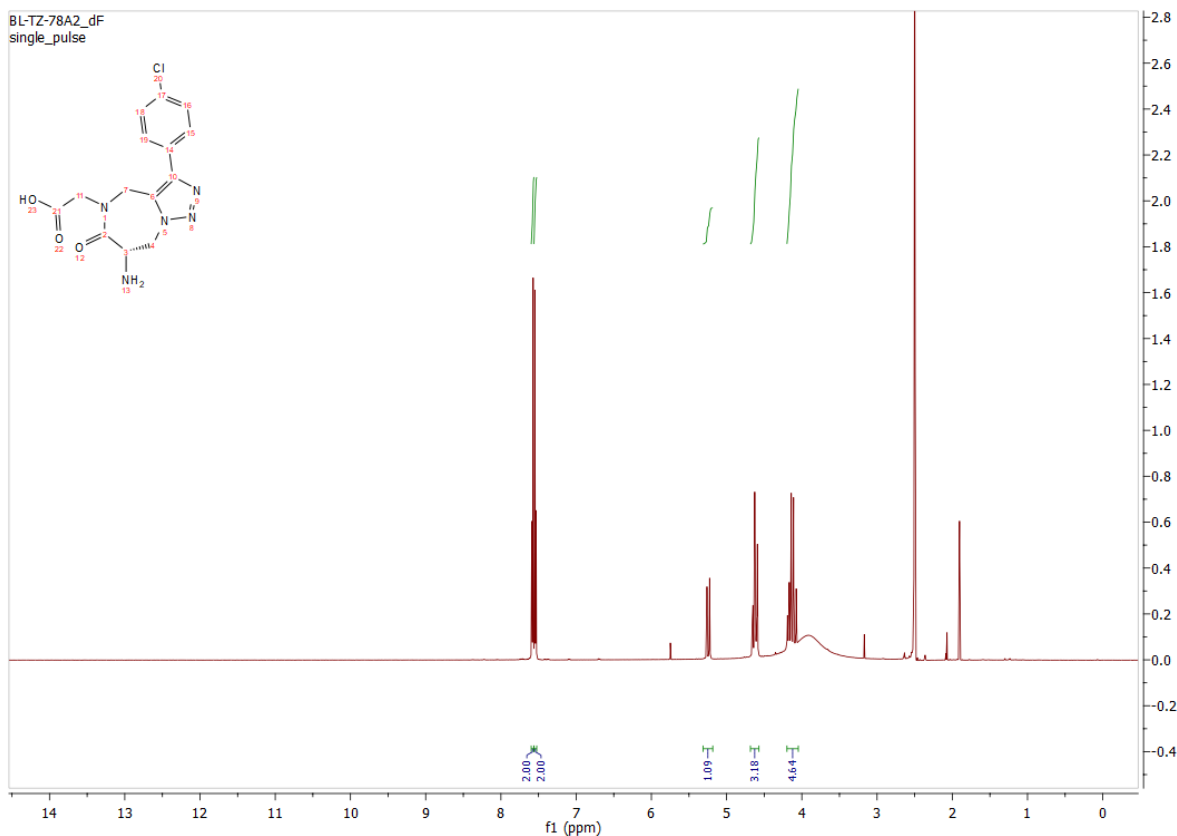
White solid, overall yield 25 mg (32%). ^1H NMR (500 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) δ 7.84 (d, $J = 8.2$ Hz, 2H), 7.79 (d, $J = 8.1$ Hz, 2H), 5.28 (d, $J = 17.6$ Hz, 1H), 4.66 (m, 2H), 4.14 (m, 4H). ^{13}C NMR (126 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) δ 173.1, 170.6, 141.1, 134.8, 130.5, 128.1 (q, $J = 31.5$ Hz, 1C), 128.1, 125.7 (q, $J = 3.8$ Hz, 1C), 124.3 (q, $J = 272.2$, 1C), 52.4, 50.4, 48.2, 43.39, 41.53. HRMS (ESI+) m/z calcd for $\text{C}_{15}\text{H}_{14}\text{F}_3\text{N}_5\text{O}_3$ $[\text{M}+\text{H}]^+ = 370.1121$, found $[\text{M}+\text{H}]^+ = 370.1122$.

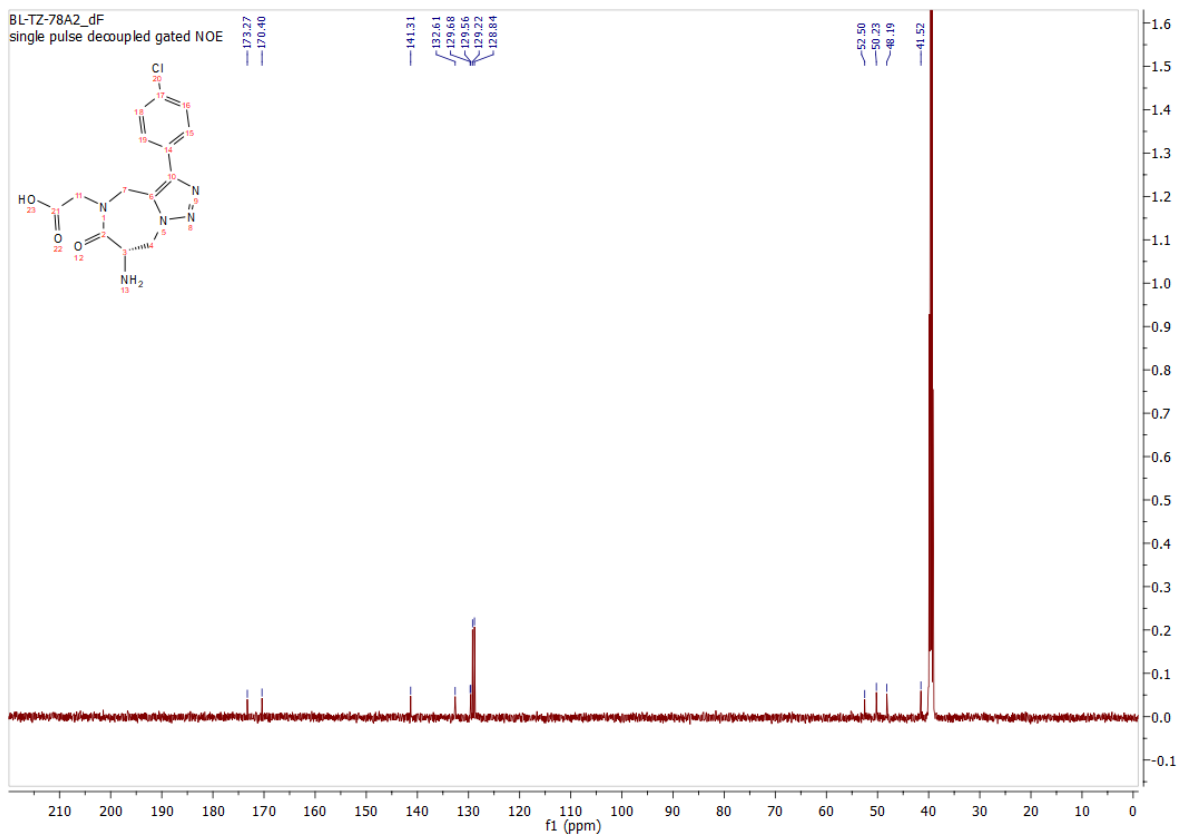


(S)-2-(7-amino-3-(4-chlorophenyl)-6-oxo-7,8-dihydro-4H-[1,2,3]triazolo[1,5-*a*][1,4]diazepin-5(6*H*)-yl)acetic acid 7{2,6}

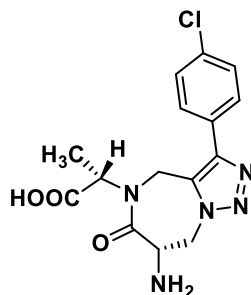


White solid, overall yield 21mg (43%). ¹H NMR (500 MHz, DMSO-*d*₆) δ 7.60 – 7.56 (m, 2H), 7.56 – 7.53 (m, 2H), 5.24 (d, *J* = 17.6 Hz, 1H), 4.63 (m, 3H), 4.19 – 4.05 (m, 3H). ¹³C NMR (126 MHz, DMSO-*d*₆) δ 173.3, 170.4, 141.3, 132.6, 129.7, 129.6, 129.2, 128.8, 52.5, 50.2, 48.2, 41.5. HRMS (ESI+) *m/z* calcd for C₁₄H₁₄ClN₅O₃ [M+H]⁺ = 336.0858, found [M+H]⁺ = 336.0861.

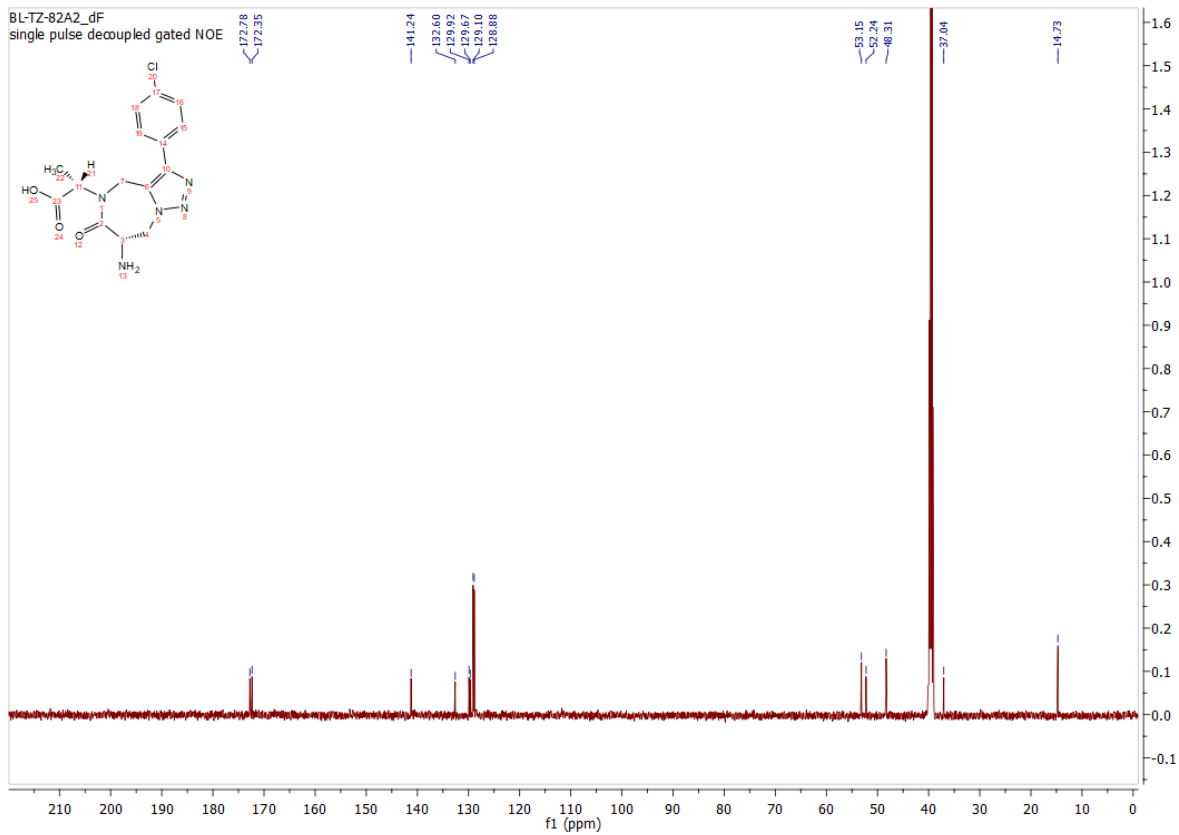
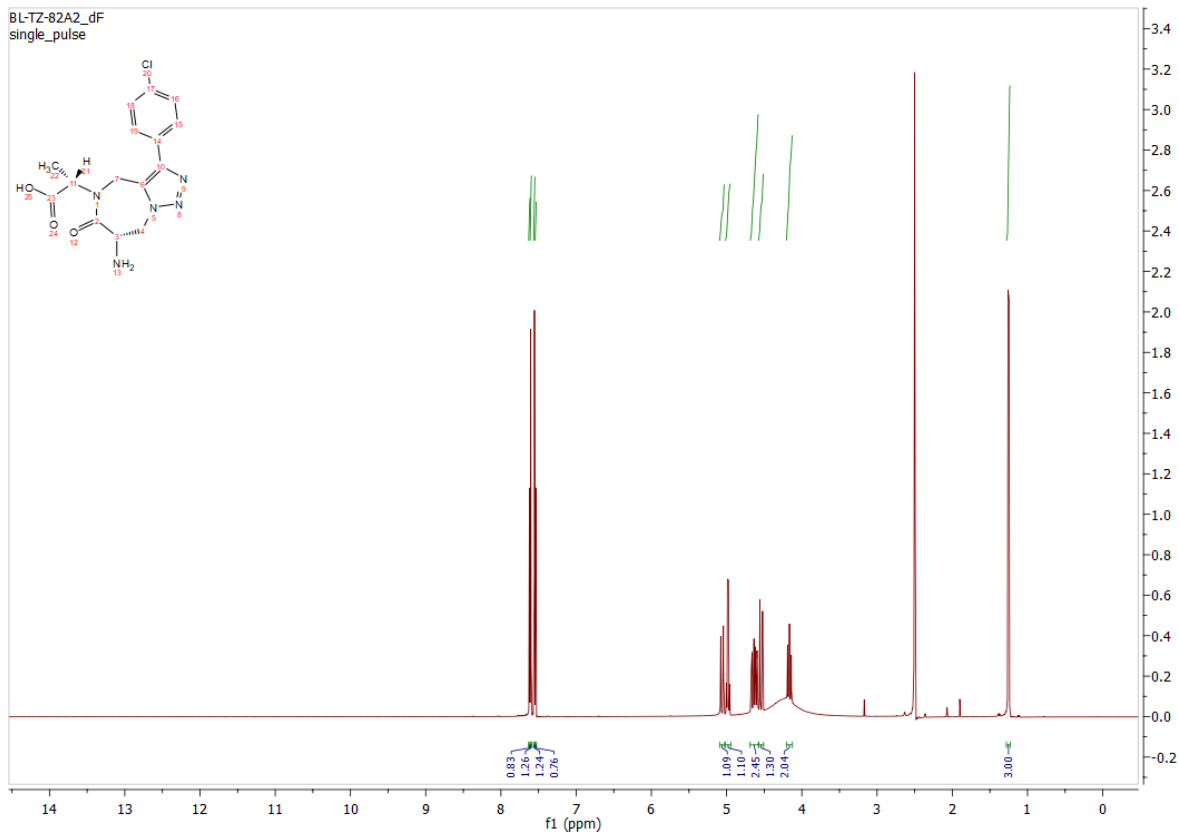




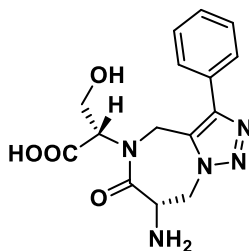
(S)-2-((S)-7-amino-3-(4-chlorophenyl)-6-oxo-7,8-dihydro-4H-[1,2,3]triazolo[1,5- α][1,4]diazepin-5(6H)-yl)propanoic acid 7{3,6}



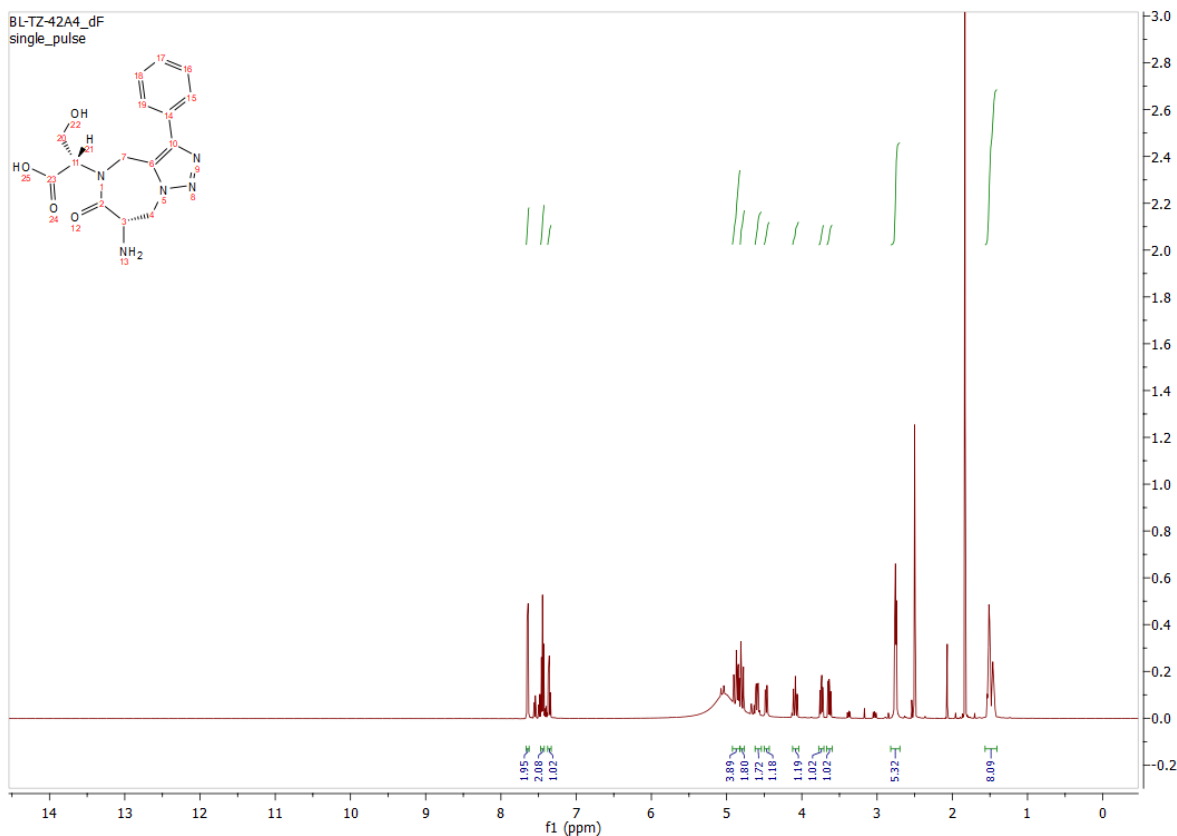
White solid, overall yield 31mg (42%). ^1H NMR (500 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) δ 7.63 – 7.61 (m, 1H), 7.61 – 7.60 (m, 1H), 7.56 – 7.55 (m, 1H), 7.55 – 7.53 (m, 1H), 5.06 (d, $J = 17.4$ Hz, 1H), 4.98 (q, $J = 7.2$ Hz, 1H), 4.63 (ddd, $J = 15.9, 12.3, 4.2$ Hz, 1H), 4.54 (d, $J = 17.6$ Hz, 1H), 4.18 (dd, $J = 24.3, 11.9$ Hz, 2H), 1.26 (t, $J = 7.7$ Hz, 3H). ^{13}C NMR (126 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) δ 172.8, 172.4, 141.3, 132.6, 129.9, 129.7, 129.1, 128.9, 53.2, 52.2, 48.3, 37.0, 14.7. HRMS (ESI+) m/z calcd for $\text{C}_{15}\text{H}_{16}\text{ClN}_5\text{O}_3$ $[\text{M}+\text{H}]^+ = 350.1014$, found $[\text{M}+\text{H}]^+ = 350.1017$.

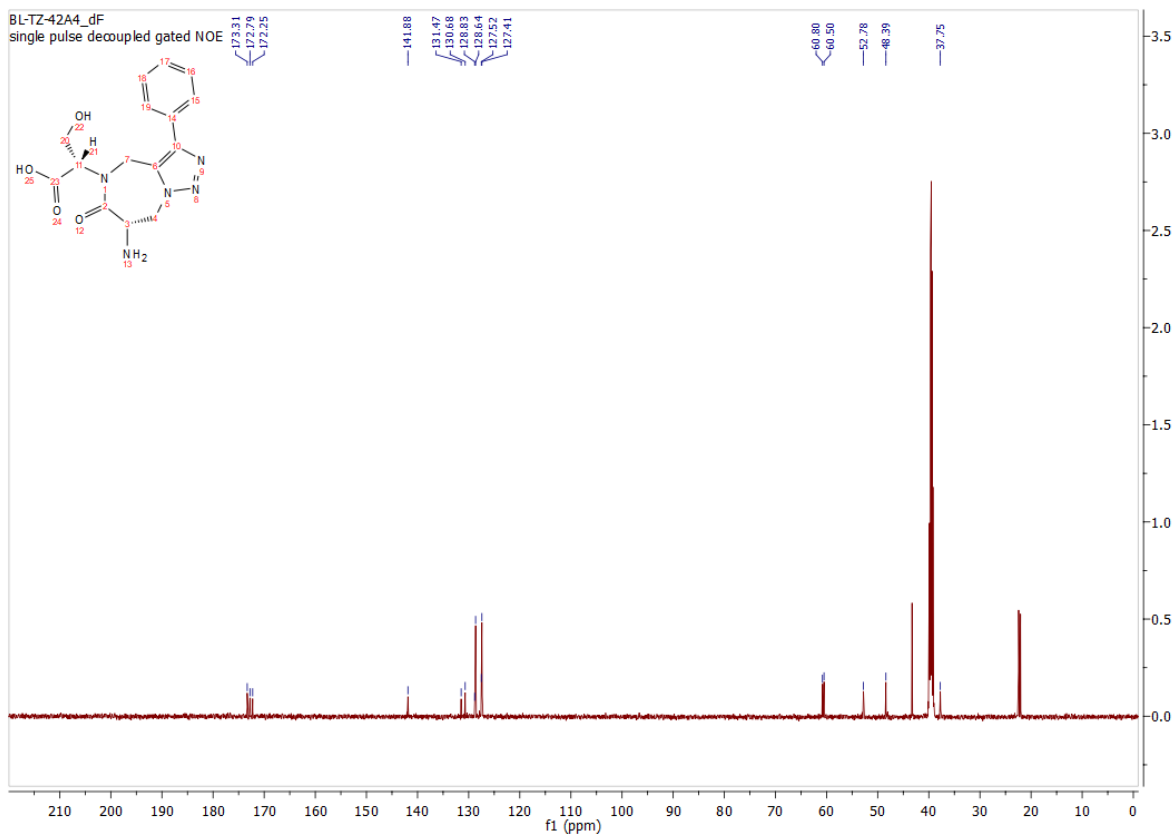


(S)-2-((S)-7-amino-6-oxo-3-phenyl-7,8-dihydro-4H-[1,2,3]triazolo[1,5-a][1,4]diazepin-5(6H)-yl)-3-hydroxypropanoic acid 7{4,2}

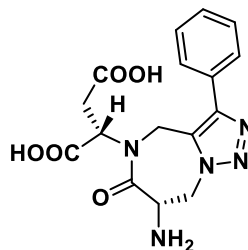


White solid, overall yield 30mg (76%). ^1H NMR (500 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) δ 7.67 – 7.62 (m, 2H), 7.47 – 7.42 (m, 2H), 7.38 – 7.33 (m, 1H), 4.91 – 4.82 (m, 2H), 4.79 (dd, $J = 15.7, 7.6$ Hz, 1H), 4.59 (dt, $J = 13.6, 5.2$ Hz, 1H), 4.47 (dd, $J = 11.9, 3.8$ Hz, 1H), 4.09 (dd, $J = 17.4, 7.6$ Hz, 1H), 3.74 (dd, $J = 11.3, 5.5$ Hz, 1H), 3.63 (dd, $J = 11.3, 7.7$ Hz, 1H). ^{13}C NMR (126 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) δ 173.3, 172.8, 172.3, 141.9, 131.5, 130.7, 128.8, 128.6, 127.5, 127.4, 60.8, 60.5, 52.8, 48.4, 37.8. HRMS (ESI+) m/z calcd for $\text{C}_{15}\text{H}_{17}\text{N}_5\text{O}_4$ $[\text{M}+\text{H}]^+ = 332.1353$, found $[\text{M}+\text{H}]^+ = 332.1353$.

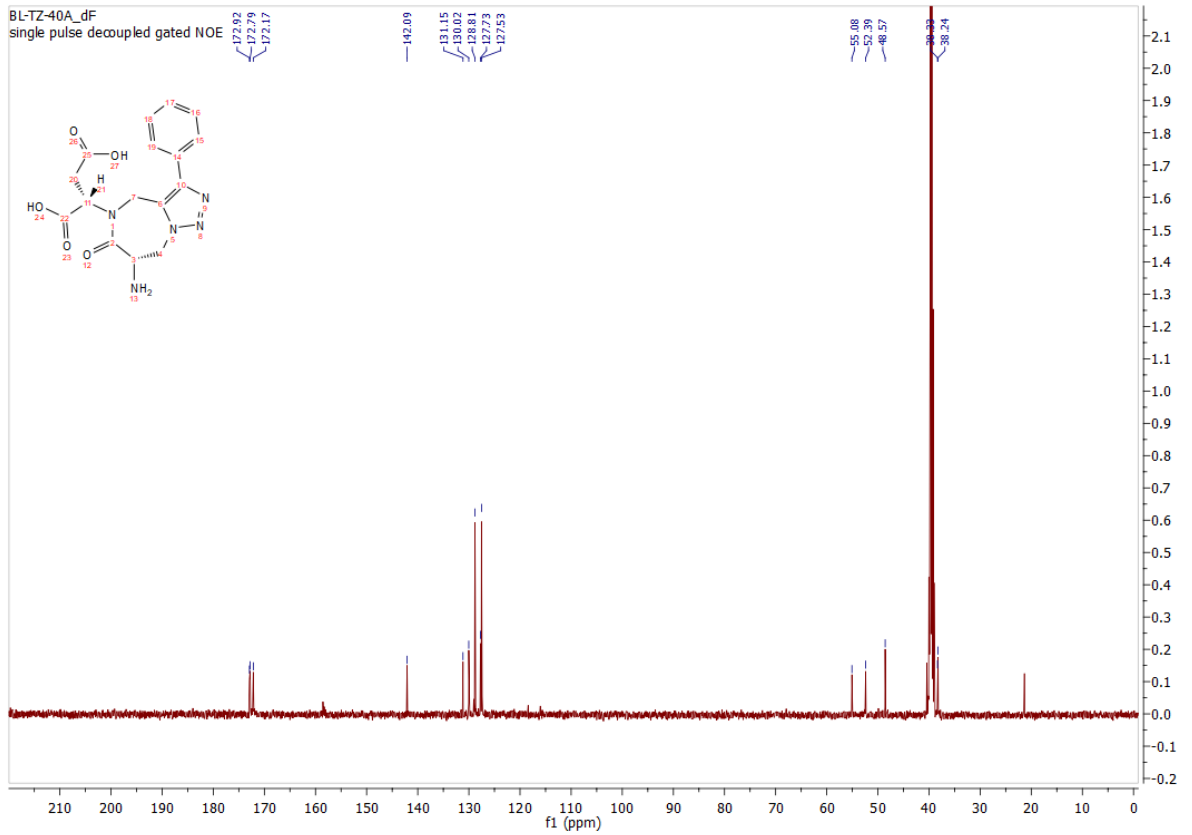
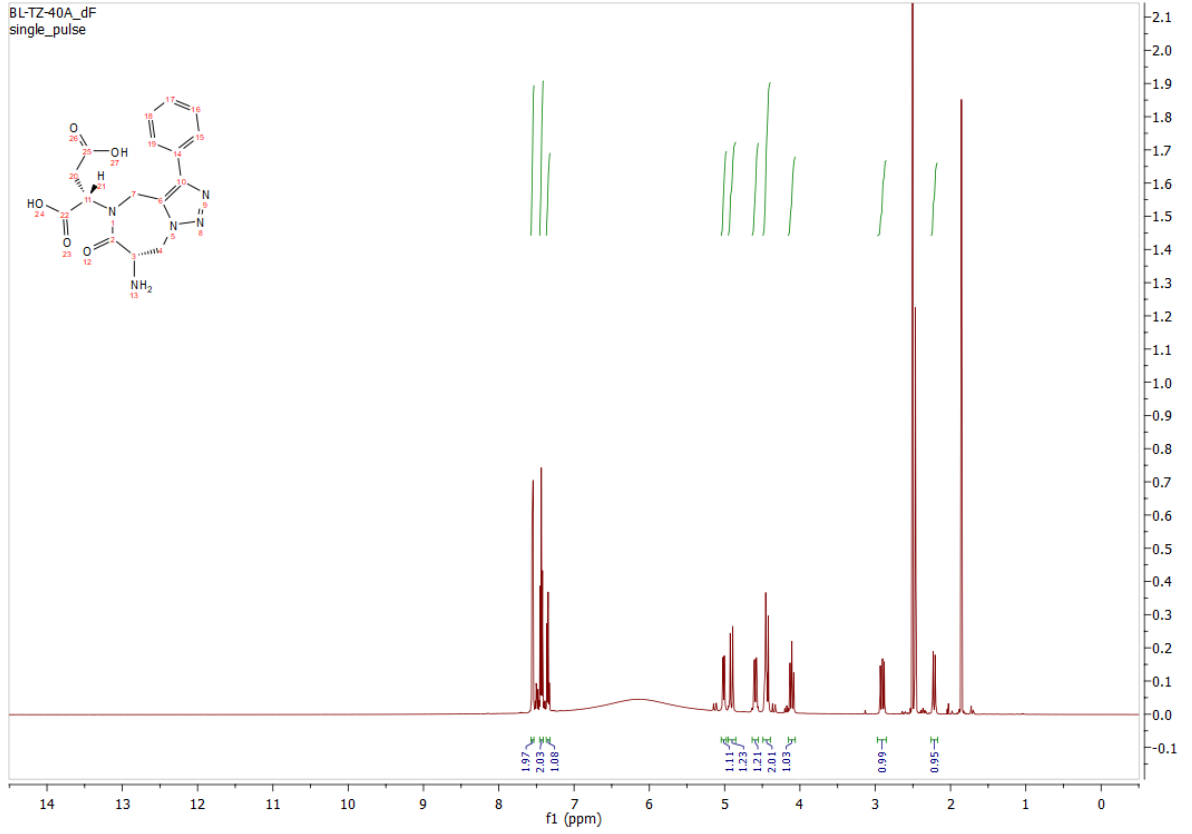




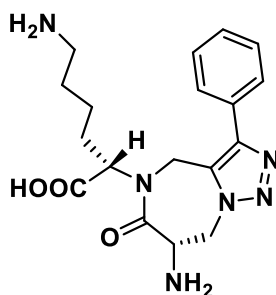
(S)-2-((S)-7-amino-6-oxo-3-phenyl-7,8-dihydro-4H-[1,2,3]triazolo[1,5-a][1,4]diazepin-5(6H)-yl)succinic acid 7{5,2}



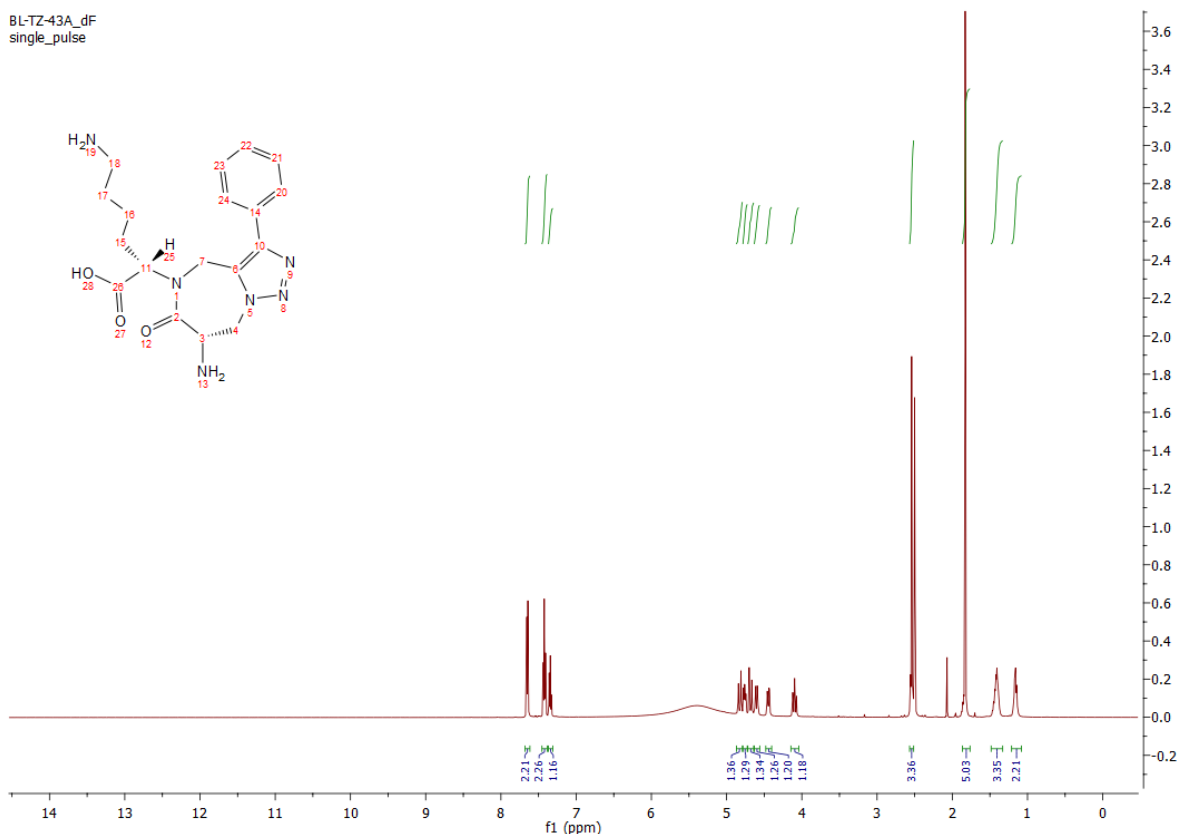
White solid, overall yield 43mg (57%). ^1H NMR (500 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) δ 7.57 – 7.53 (m, 2H), 7.44 (dd, $J = 10.5, 4.8$ Hz, 2H), 7.37 – 7.32 (m, 1H), 5.01 (dd, $J = 10.9, 2.8$ Hz, 1H), 4.91 (d, $J = 17.2$ Hz, 1H), 4.59 (dt, $J = 17.4, 6.1$ Hz, 1H), 4.49 – 4.39 (m, 2H), 4.11 (t, $J = 12.5$ Hz, 1H), 2.91 (dd, $J = 15.2, 11.0$ Hz, 1H), 2.22 (dd, $J = 15.2, 2.9$ Hz, 1H). ^{13}C NMR (126 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) δ 172.9, 172.8, 172.2, 142.1, 131.2, 130.0, 128.8, 127.7, 127.5, 55.1, 52.4, 48.6, 38.3, 38.2. HRMS (ESI+) m/z calcd for $\text{C}_{16}\text{H}_{17}\text{N}_5\text{O}_5$ $[\text{M}+\text{H}]^+ = 360.1302$, found $[\text{M}+\text{H}]^+ = 360.1302$.

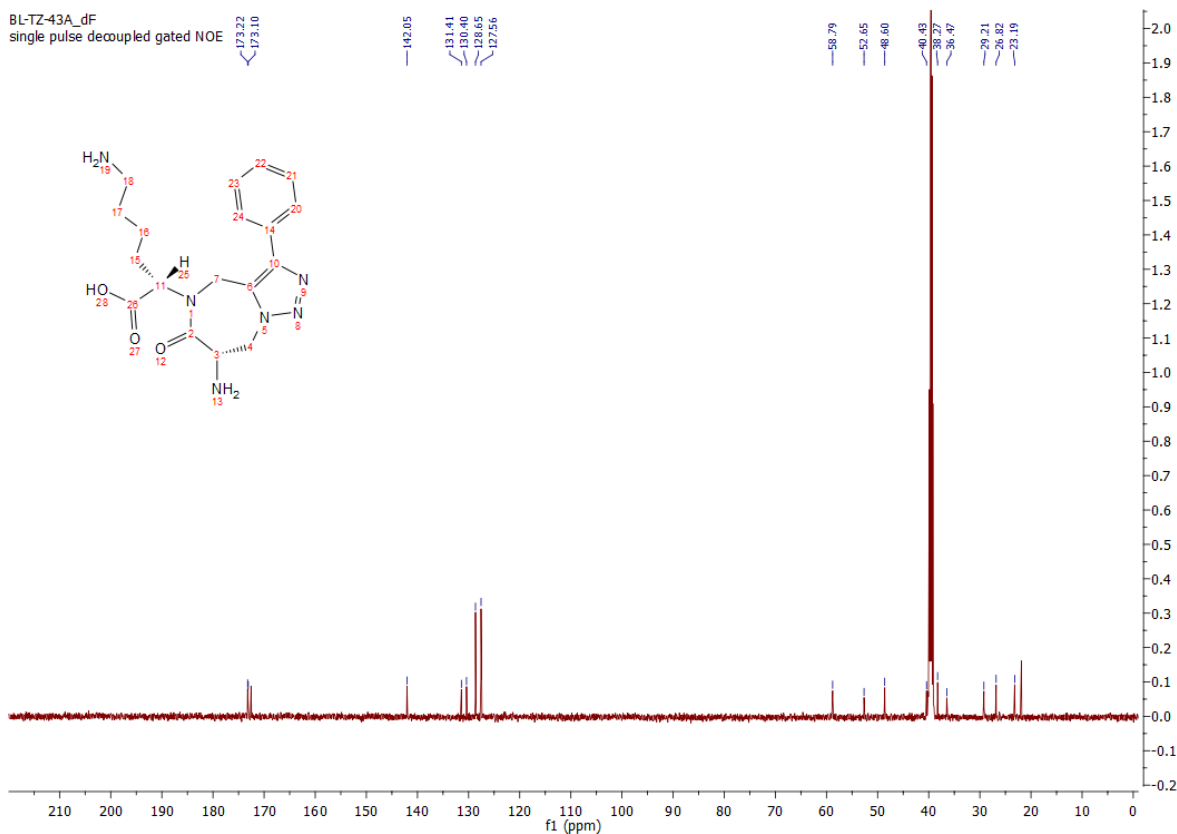


(S)-6-amino-2-((S)-7-amino-6-oxo-3-phenyl-7,8-dihydro-4H-[1,2,3]triazolo[1,5-*a*][1,4]diazepin-5(6H)-yl)hexanoic acid 7{6,2}

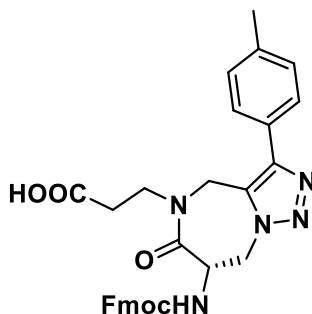


Light yellow residue, overall yield 23.6 mg (27%). ^1H NMR (500 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) δ 7.66 (t, $J = 7.1$ Hz, 2H), 7.43 (dd, $J = 14.5, 7.1$ Hz, 2H), 7.34 (t, $J = 7.4$ Hz, 1H), 4.83 (d, $J = 16.9$ Hz, 1H), 4.76 (dd, $J = 9.9, 5.3$ Hz, 1H), 4.68 (d, $J = 17.1$ Hz, 1H), 4.60 (dd, $J = 13.1, 3.4$ Hz, 1H), 4.44 (dd, $J = 11.6, 3.5$ Hz, 1H), 4.10 (t, $J = 12.4$ Hz, 1H), 2.57 – 2.51 (m, 2H), 1.50 – 1.31 (m, 3H), 1.17 (dd, $J = 14.7, 7.3$ Hz, 2H). ^{13}C NMR (126 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) δ 173.2, 173.1, 142.1, 131.4, 130.4, 128.7, 127.6, 58.8, 52.7, 48.6, 40.4, 38.3, 36.5, 29.2, 26.8, 23.2. HRMS (ESI+) m/z calcd for $\text{C}_{18}\text{H}_{24}\text{N}_6\text{O}_3$ $[\text{M}+\text{H}]^+ = 373.1983$, found $[\text{M}+\text{H}]^+ = 373.1981$.

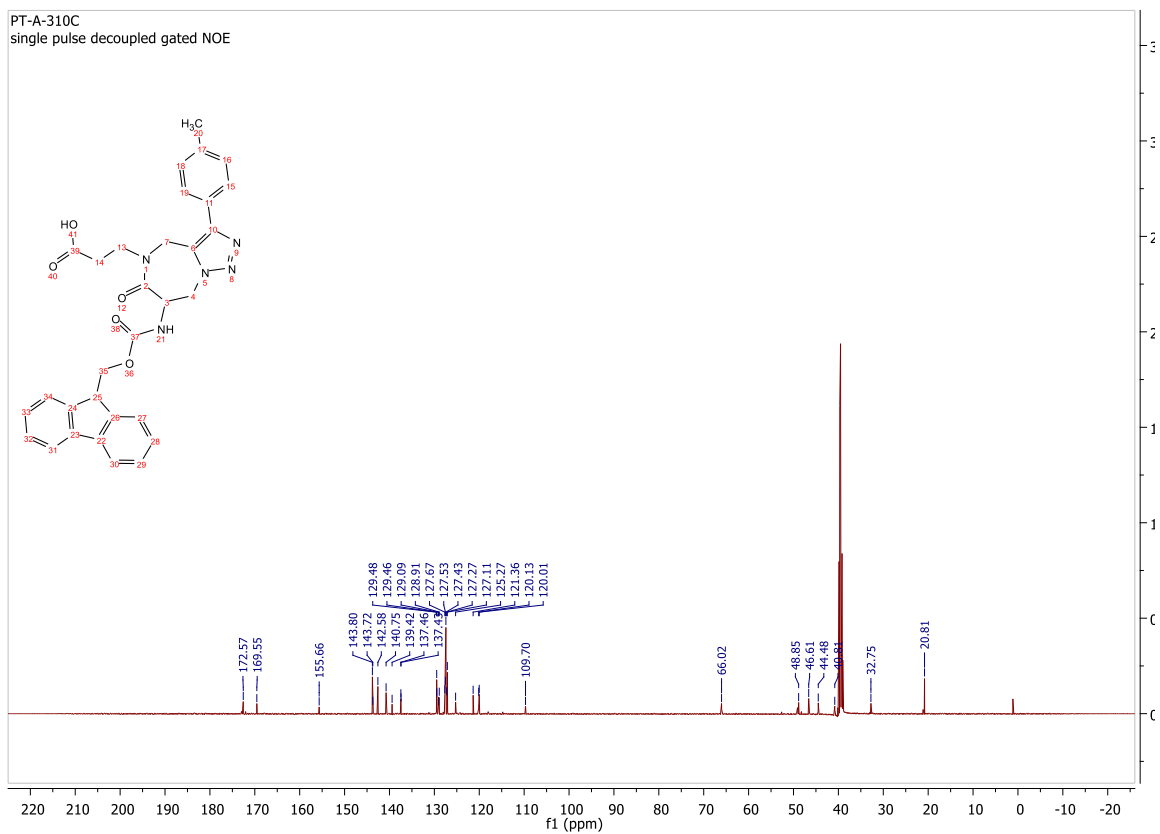
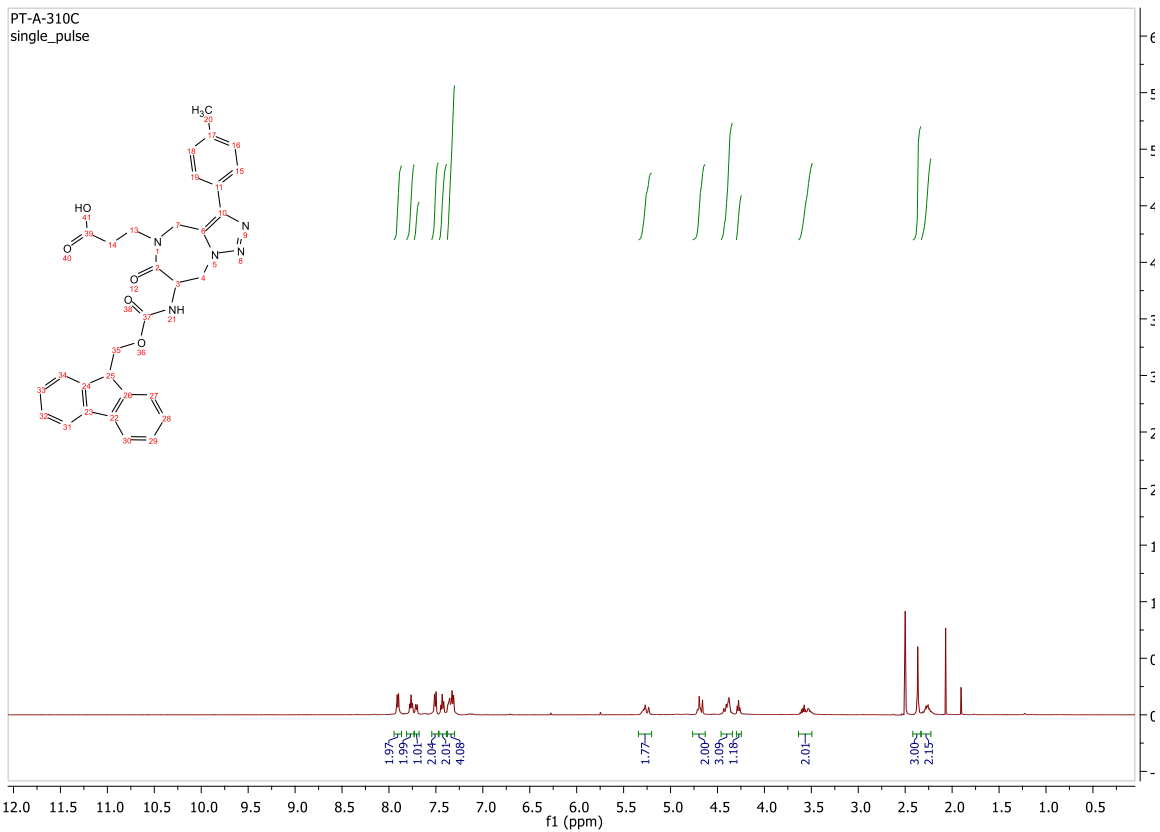




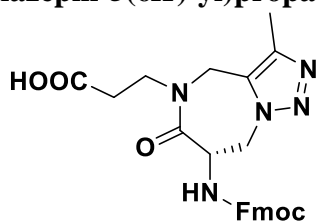
(S)-3-(7-(((9H-fluoren-9-yl)methoxy)carbonyl)amino)-6-oxo-3-(p-tolyl)-7,8-dihydro-4H-[1,2,3]triazolo[1,5-a][1,4]diazepin-5(6H)-yl)propanoic acid 7{1,3}



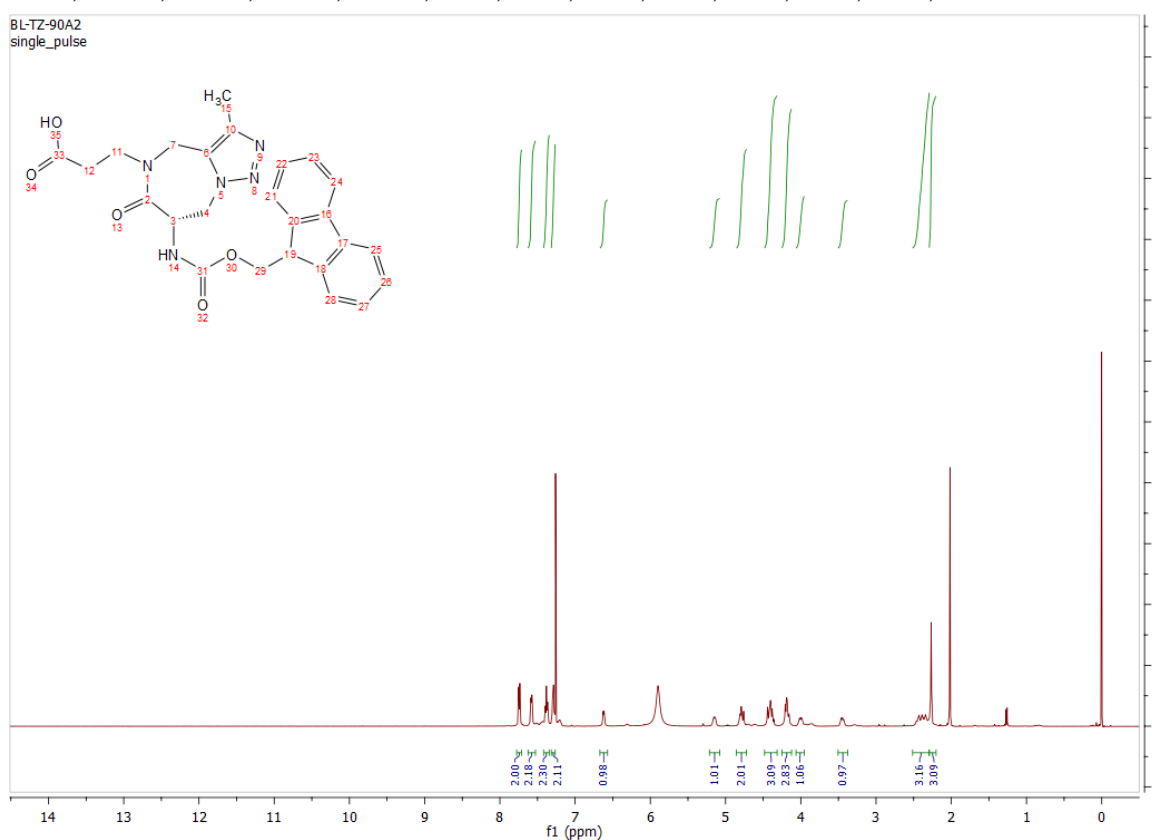
White solid, yield 20 mg (25 %). ^1H NMR (500 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) δ 7.91 (d, $J = 7.5$ Hz, 2H), 7.76 (t, $J = 7.1$ Hz, 2H), 7.71 (d, $J = 7.4$ Hz, 1H), 7.51 (d, $J = 7.9$ Hz, 2H), 7.46 – 7.40 (m, 2H), 7.39 – 7.29 (m, 4H), 5.33 – 5.20 (m, 2H), 4.74 – 4.63 (m, 2H), 4.47 – 4.33 (m, 3H), 4.27 (dd, $J = 13.1, 6.4$ Hz, 1H), 3.64 – 3.46 (m, 2H), 2.35 (s, 3H), 2.32 – 2.18 (m, 2H). ^{13}C NMR (126 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) δ 172.6, 169.6, 155.7, 143.8, 143.7, 142.6, 140.8, 139.4, 137.5, 137.4, 129.5, 129.5, 129.1, 128.9, 127.7, 127.5, 127.4, 127.3, 127.1, 125.3, 121.4, 120.1, 120.0, 109.7, 66.0, 48.9, 46.6, 44.5, 40.8, 32.8, 20.8. HRMS (ESI+) m/z calcd for $\text{C}_{31}\text{H}_{30}\text{N}_5\text{O}_5$ $[\text{M}+\text{H}]^+$ 552.2241, found 552.2243.

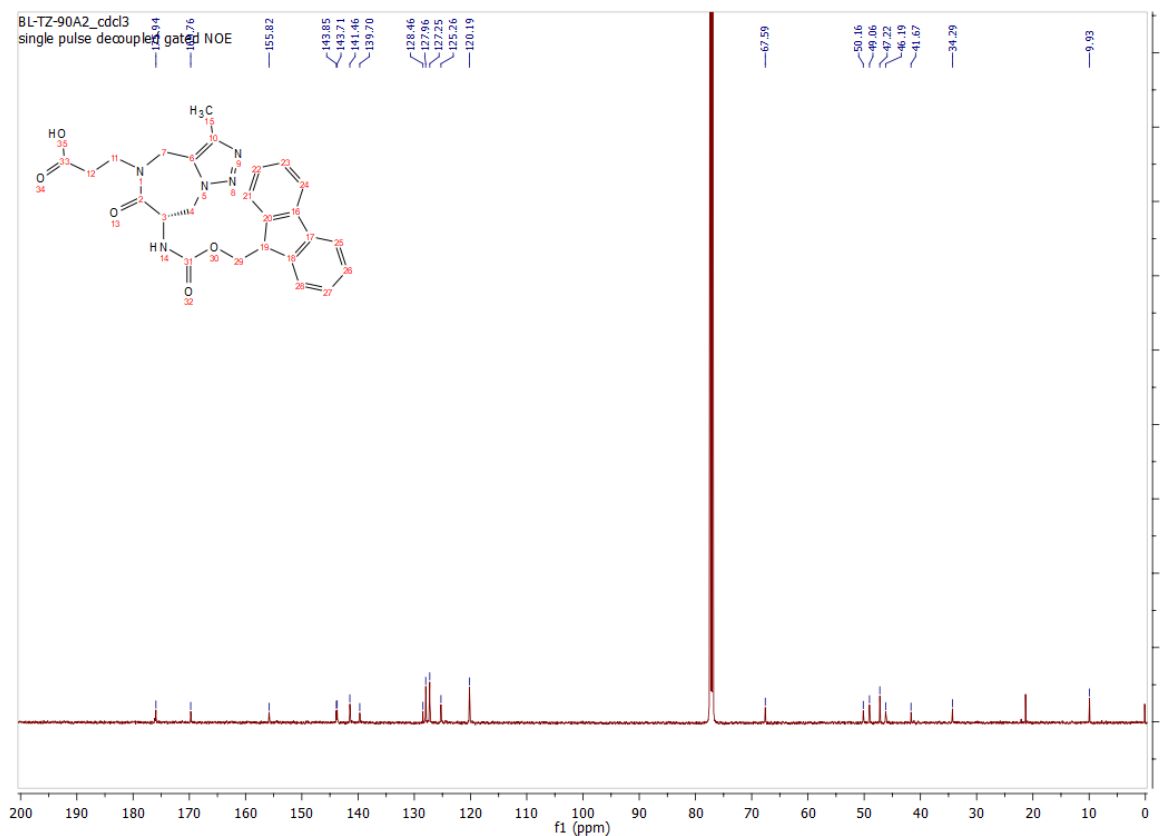


(S)-3-(7-(((9H-fluoren-9-yl)methoxy)carbonyl)amino)-3-methyl-6-oxo-7,8-dihydro-4H-[1,2,3]triazolo[1,5-a][1,4]diazepin-5(6H)-yl)propanoic acid 7{1,7}

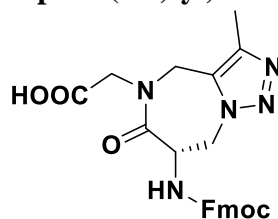


White solid, overall yield 40 mg (48 %). MS (ESI+) m/z calcd for $C_{25}H_{25}N_5O_5$ $[M+H]^+ = 476,19$, found $[M+H]^+ = 476.45$. 1H NMR (500 MHz, $CDCl_3$) δ 7.74 (d, $J = 7.5$ Hz, 2H), 7.58 (d, $J = 5.5$ Hz, 2H), 7.38 (t, $J = 7.4$ Hz, 2H), 7.29 (t, $J = 7.4$ Hz, 2H), 6.62 (d, $J = 6.1$ Hz, 1H), 5.23 – 5.07 (m, 1H), 4.79 (dd, $J = 17.6, 10.0$ Hz, 2H), 4.48 – 4.33 (m, 3H), 4.18 (dd, $J = 14.9, 9.8$ Hz, 2H), 4.06 – 3.96 (m, 1H), 3.51 – 3.37 (m, 1H), 2.50 – 2.32 (m, 2H), 2.27 (s, 3H). ^{13}C NMR (126 MHz, $CDCl_3$) δ 175.9, 169.8, 155.8, 143.8, 141.5, 139.7, 128.5, 128.0, 127.3, 125.2, 120.2, 67.6, 50.2, 49.1, 47.2, 46.2, 41.7, 34.3, 9.9.

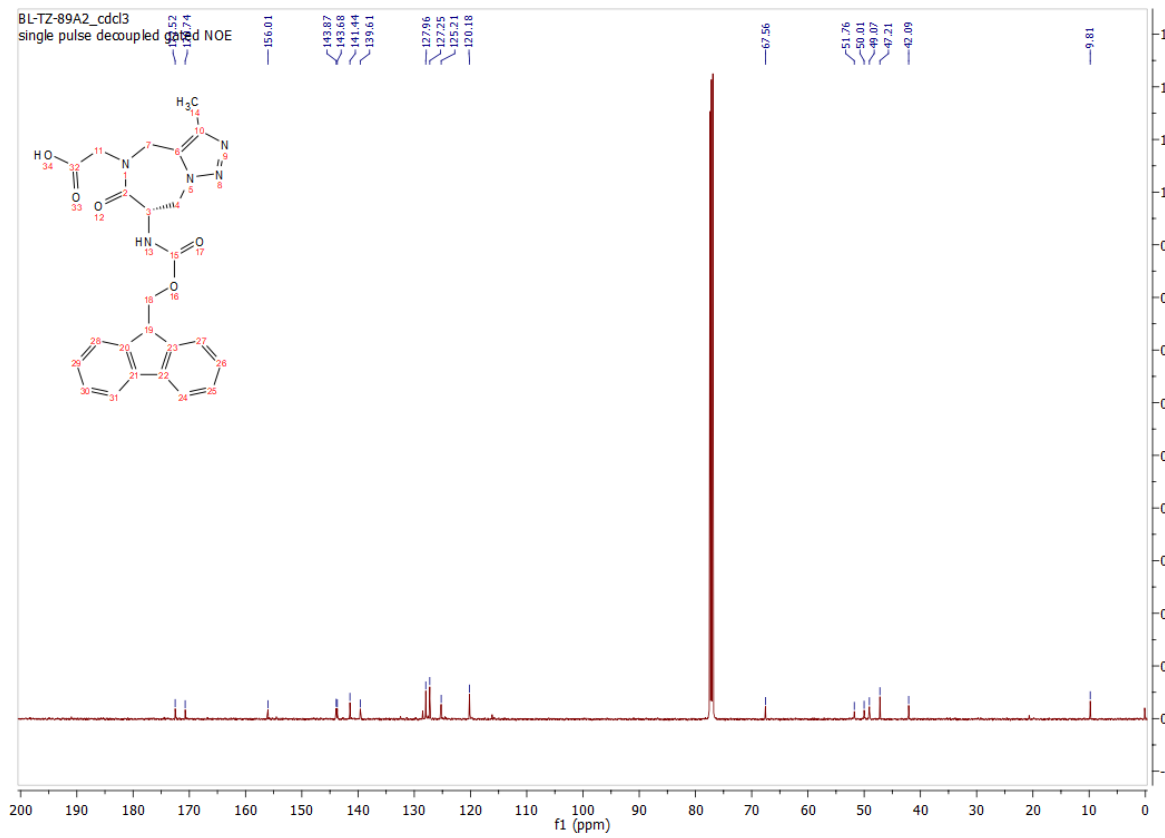
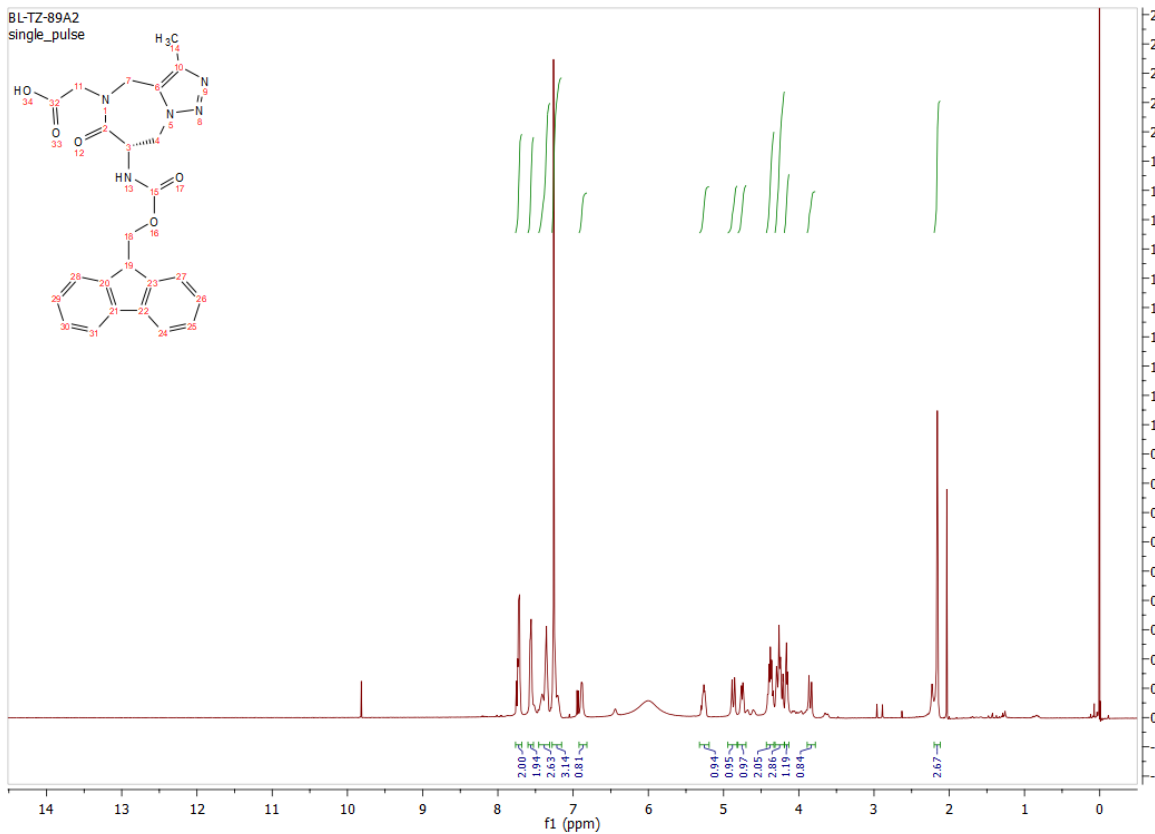




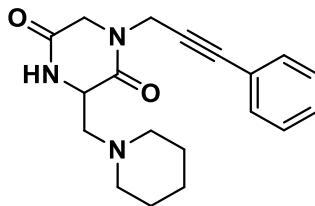
(S)-2-(7-(((9H-fluoren-9-yl)methoxy)carbonyl)amino)-3-methyl-6-oxo-7,8-dihydro-4H-[1,2,3]triazolo[1,5-a][1,4]diazepin-5(6H)-yl)acetic acid 7{2,7}



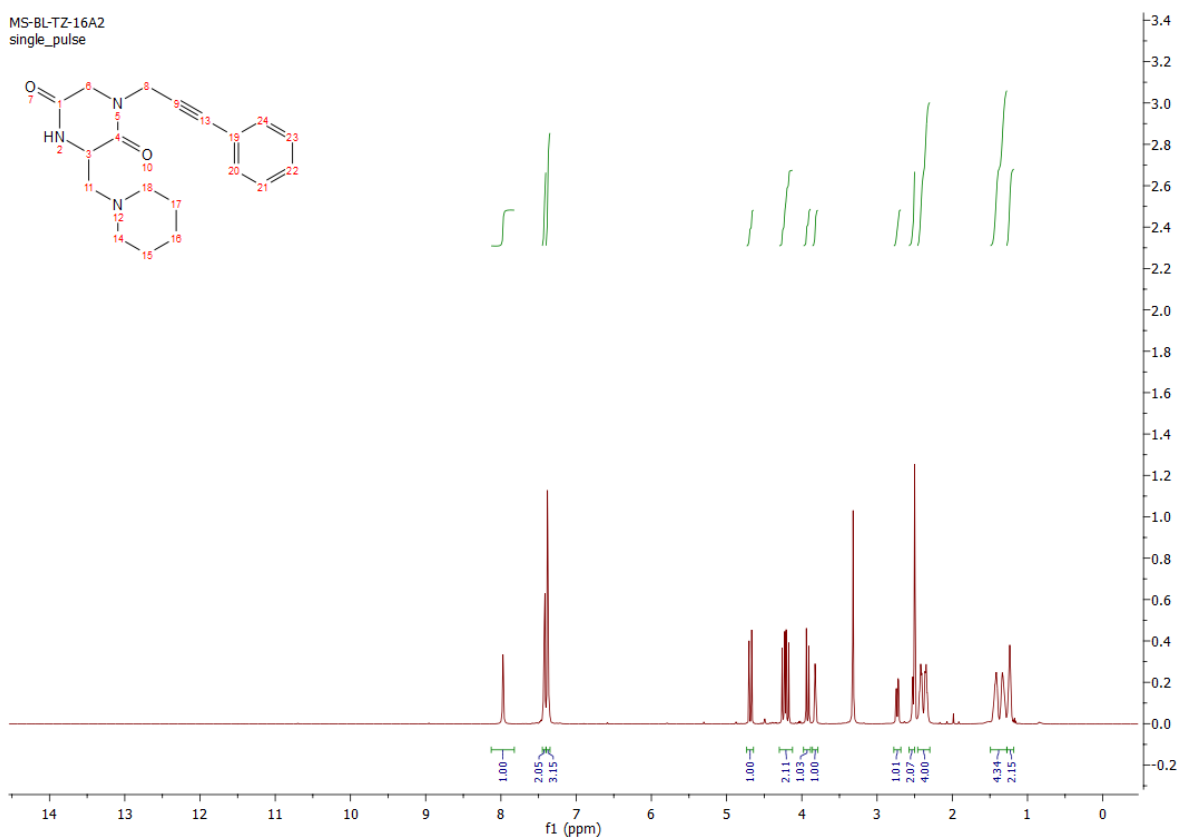
White solid, overall yield 77 mg (60 %). MS (ESI+) m/z calcd for $C_{24}H_{23}N_5O_5$ $[M+H]^+ = 462,17$, found $[M+H]^+ = 462.46$. 1H NMR (500 MHz, $CDCl_3$) δ 7.74 – 7.68 (m, 2H), 7.56 (dd, $J = 6.8, 3.7$ Hz, 2H), 7.45 – 7.32 (m, 2H), 7.30 – 7.16 (m, 2H), 6.88 (d, $J = 5.1$ Hz, 1H), 5.27 (dd, $J = 13.8, 8.7$ Hz, 1H), 4.87 (d, $J = 17.3$ Hz, 1H), 4.73 (t, $J = 17.1$ Hz, 1H), 4.43 – 4.32 (m, 2H), 4.25 (dd, $J = 25.9, 17.1$ Hz, 3H), 4.16 (t, $J = 7.0$ Hz, 1H), 3.85 (d, $J = 17.3$ Hz, 1H), 2.16 (s, 3H). ^{13}C NMR (126 MHz, $CDCl_3$) δ 172.5, 170.7, 156.0, 143.8, 141.4, 139.6, 128.5, 128.0, 127.3, 125.2, 120.2, 67.6, 51.8, 50.0, 49.1, 47.2, 42.1, 9.8.

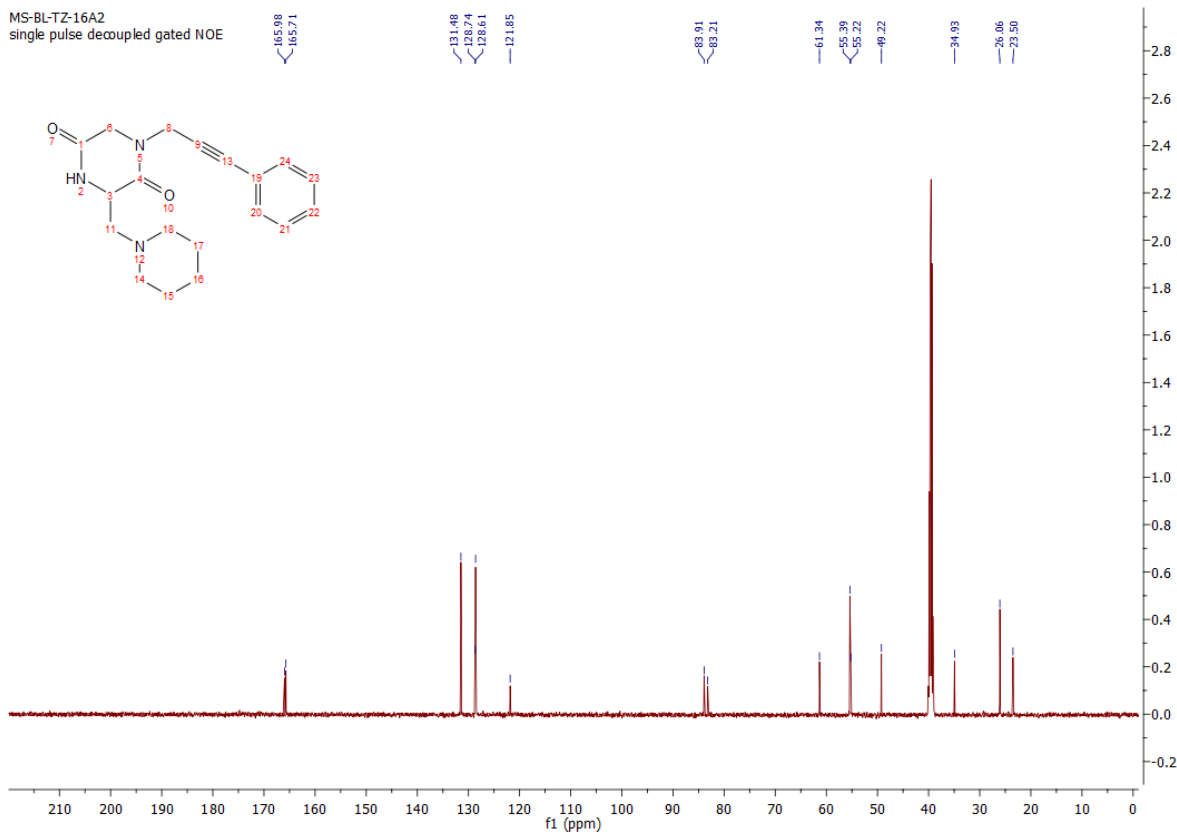


1-(3-phenylprop-2-yn-1-yl)-3-(piperidin-1-ylmethyl)piperazine-2,5-dione {8}

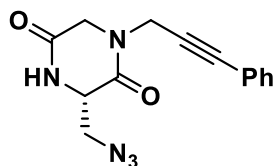


White solid, yield 30 mg (32 %). ^1H NMR (500 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) δ 7.97 (s, 1H), 7.46 – 7.40 (m, 2H), 7.37 (m, 3H), 4.68 (d, $J = 17.3$ Hz, 1H), 4.22 (dd, $J = 26.4, 17.0$ Hz, 2H), 3.92 (d, $J = 16.7$ Hz, 1H), 3.82 (d, $J = 2.4$ Hz, 1H), 2.73 (dd, $J = 13.7, 3.7$ Hz, 1H), 2.52 (dd, overlapped with DMSO, 1H), 2.38 (m, 4H), 1.50 – 1.29 (m, 4H), 1.27 – 1.14 (m, 2H). ^{13}C NMR (126 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) δ 166.0, 165.7, 131.5, 128.7, 128.6, 121.9, 83.9, 83.2, 61.3, 55.4, 55.2, 49.2, 34.9, 26.1, 23.5. HRMS (ESI+) m/z calcd for $\text{C}_{19}\text{H}_{23}\text{N}_3\text{O}_2$ $[\text{M}+\text{H}]^+$ 326.1863, found 326.1864.

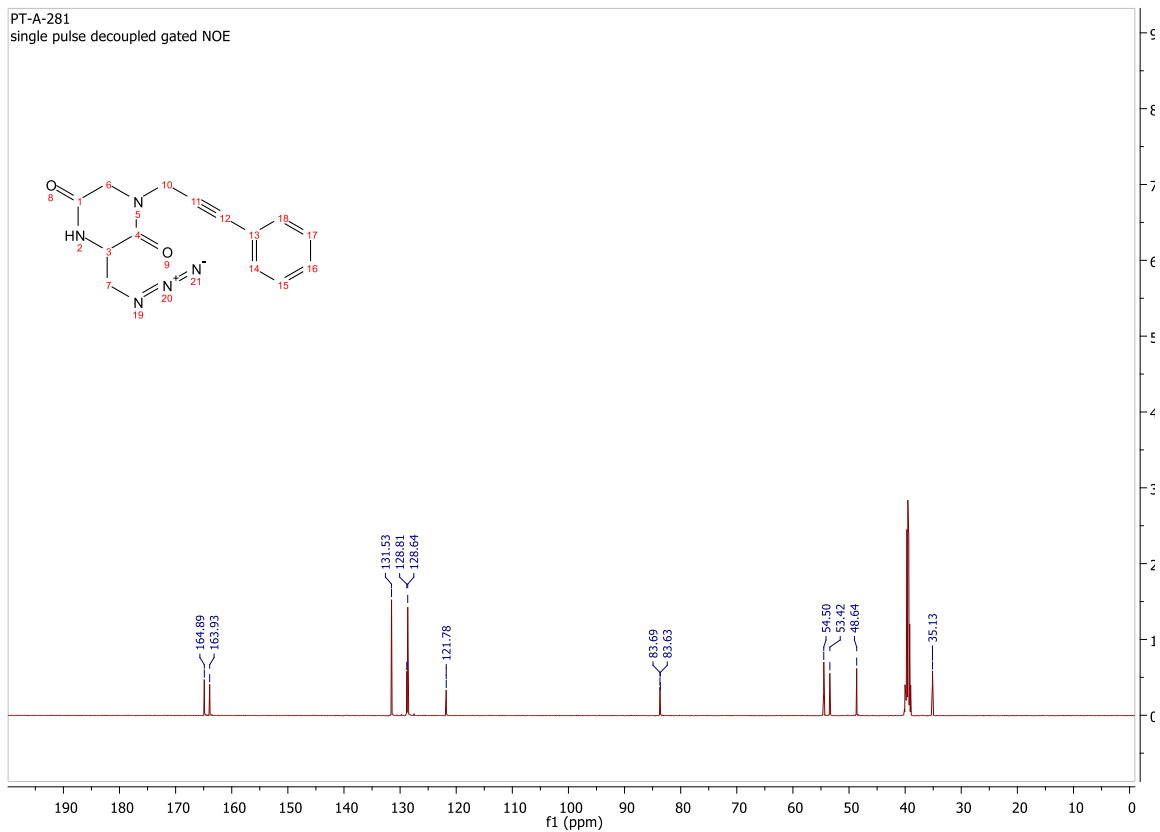
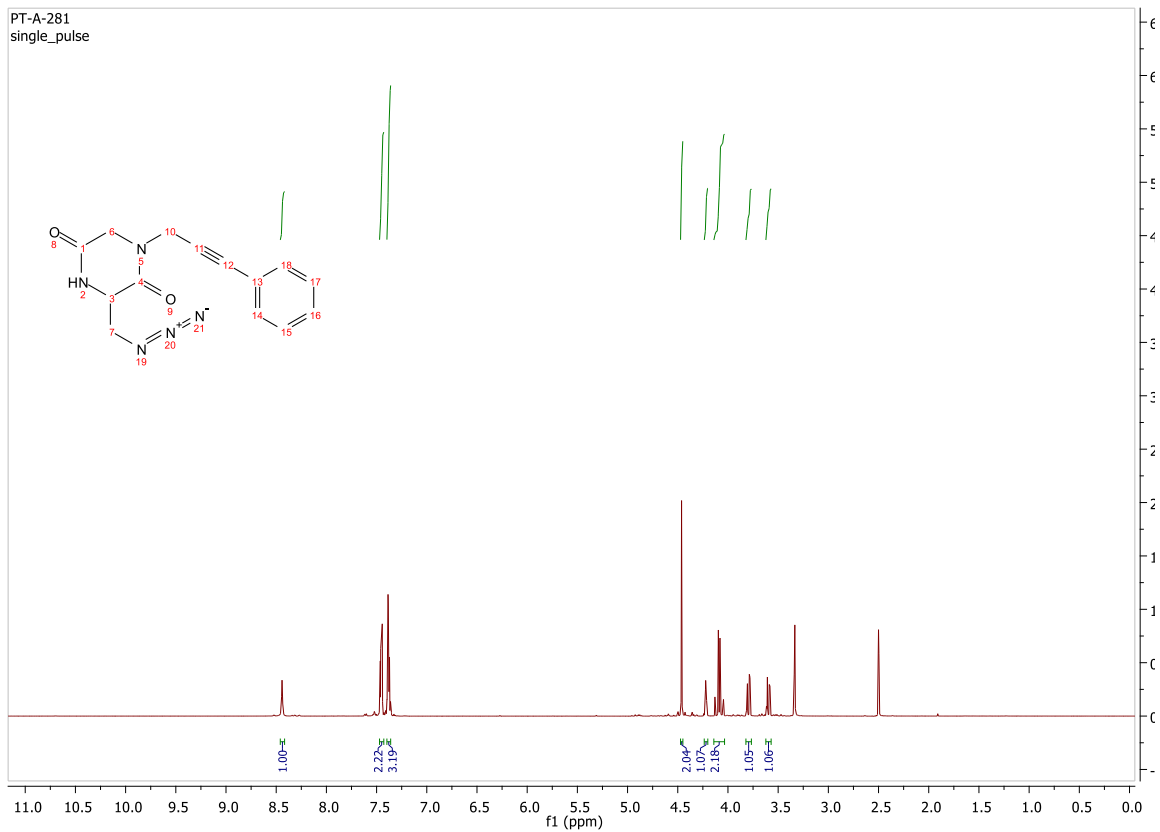




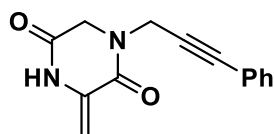
(S)-3-(azidomethyl)-1-(3-phenylprop-2-yn-1-yl)piperazine-2,5-dione {9}



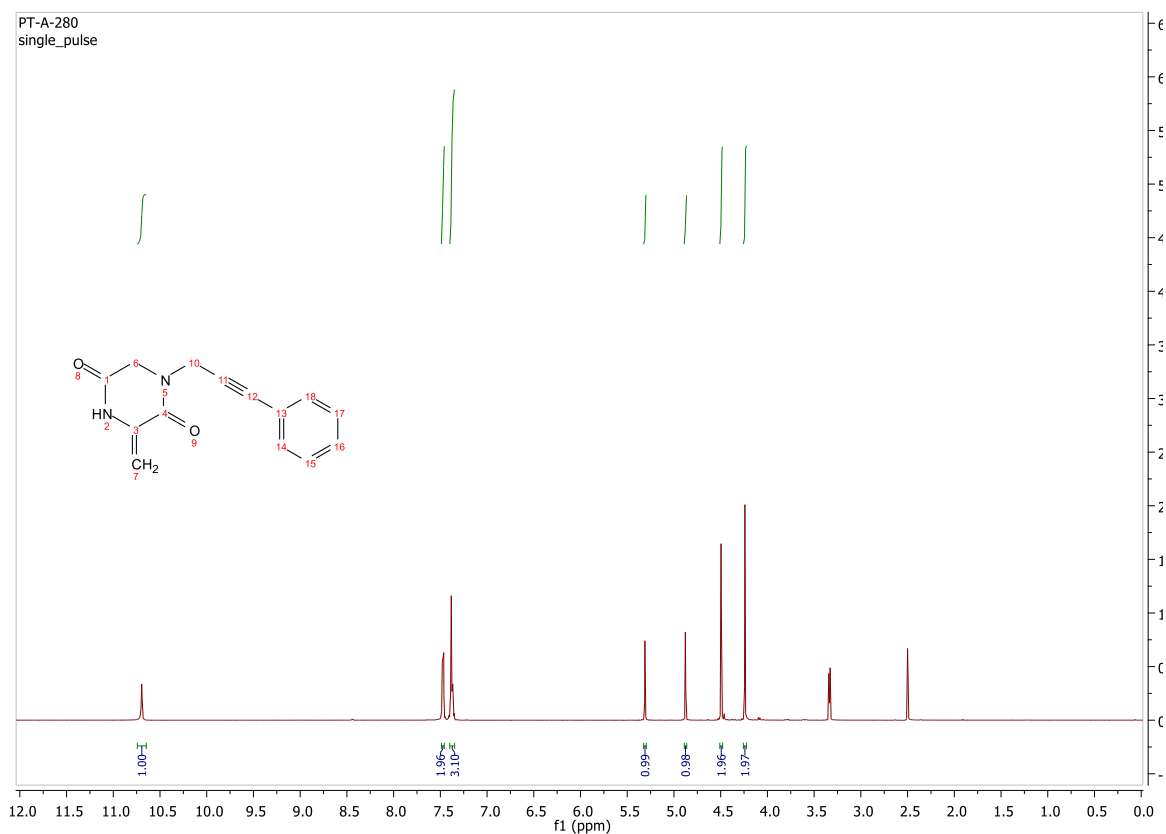
Colorless oil, overall yield 30 mg (30 %). ^1H NMR (500 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) δ 8.44 (s, 1H), 7.48 – 7.43 (m, 2H), 7.40 – 7.36 (m, 3H), 4.46 (s, 2H), 4.24 – 4.20 (m, 1H), 4.14 – 4.03 (m, 2H), 3.80 (dd, $J = 12.7, 3.2$ Hz, 1H), 3.60 (dd, $J = 12.7, 3.4$ Hz, 1H). ^{13}C NMR (126 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) δ 164.9, 163.9, 131.5, 128.8, 128.6, 121.8, 83.7, 83.6, 54.5, 53.4, 48.6, 35.1. HRMS (ESI+) m/z calcd for $\text{C}_{14}\text{H}_{14}\text{N}_5\text{O}_2$ $[\text{M}+\text{H}]^+$ 284.1142, found 284.1140.

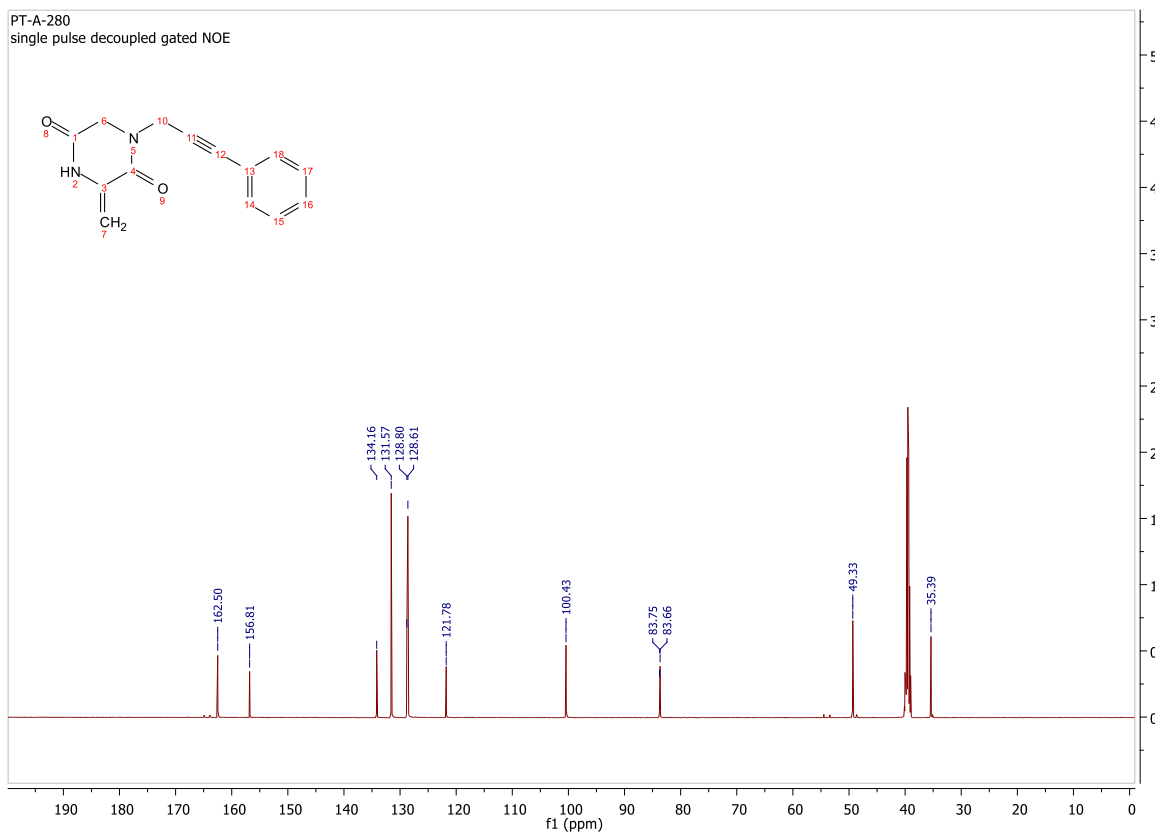


3-methylene-1-(3-phenylprop-2-yn-1-yl)piperazine-2,5-dione {10}

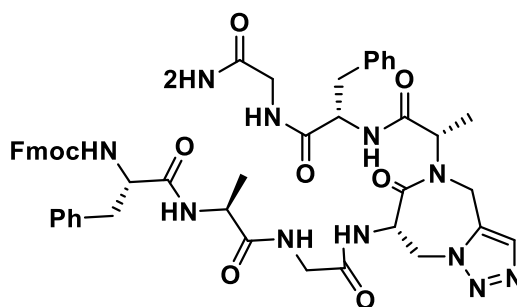


White solid, yield 20 mg (20 %). ^1H NMR (500 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) δ 10.70 (s, 1H), 7.49 – 7.45 (m, 2H), 7.40 – 7.34 (m, 3H), 5.31 (d, $J = 2.3$ Hz, 1H), 4.88 (d, $J = 1.3$ Hz, 1H), 4.50 (s, 2H), 4.24 (s, 2H). ^{13}C NMR (126 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) δ 162.5, 156.8, 134.2, 131.6, 128.8, 128.6, 121.8, 100.4, 83.8, 83.7, 49.3, 35.4. HRMS (ESI+) m/z calcd for $\text{C}_{14}\text{H}_{13}\text{N}_2\text{O}_2$ $[\text{M}+\text{H}]^+$ 241.0972, found 241.0972.





(9*H*-fluoren-9-yl)methyl ((*S*)-1-(((*S*)-1-((2-(((*S*)-5-(((*S*)-1-(((*S*)-1-((2-amino-2-oxoethyl)amino)-1-oxo-3-phenylpropan-2-yl)amino)-1-oxopropan-2-yl)-6-oxo-5,6,7,8-tetrahydro-4*H*-[1,2,3]triazolo[1,5-*a*][1,4]diazepin-7-yl)amino)-2-oxoethyl)amino)-1-oxopropan-2-yl)amino)-1-oxo-3-phenylpropan-2-yl)carbamate {12}



White solid, overall yield 100 mg (70 %). ^1H NMR (500 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) δ 8.22 (dd, $J = 10.2, 6.5$ Hz, 2H), 8.16 (dd, $J = 9.0, 7.1$ Hz, 2H), 8.07 (t, $J = 5.8$ Hz, 1H), 7.87 (d, $J = 7.6$ Hz, 2H), 7.62 (t, $J = 8.0$ Hz, 2H), 7.61 – 7.54 (m, 2H), 7.40 (ddd, $J = 7.4, 5.1, 3.1$ Hz, 2H), 7.34 – 7.11 (m, 10H), 7.06 (t, $J = 2.6$ Hz, 2H), 7.06 – 6.95 (m, 2H), 5.41 – 5.35 (m, 1H), 5.02 (q, $J = 7.1$ Hz, 1H), 4.88 (d, $J = 17.0$ Hz, 1H), 4.71 (d, $J = 17.5$ Hz, 1H), 4.65 (dd, $J = 12.9, 4.0$ Hz, 1H), 4.36 (dd, $J = 14.2, 7.1$ Hz, 1H), 4.33 – 4.28 (m, 1H), 4.25 (dd, $J = 14.4, 7.5$ Hz, 1H), 4.22 – 4.09 (m, 4H), 3.91 (dd, $J = 16.8, 5.9$ Hz, 1H), 3.82 (dd, $J = 16.8, 5.8$ Hz, 1H), 3.63 (dd, $J = 16.8, 6.0$ Hz, 1H), 3.54 – 3.47 (m, 1H), 3.05 (dt, $J = 9.8, 5.0$ Hz, 1H), 2.79 (ddd, $J = 25.1, 18.2, 9.0$ Hz, 2H), 2.54 (ddd, $J = 9.4, 8.8, 4.9$ Hz, 2H), 1.29 (dd, $J = 7.0, 4.1$ Hz, 5H).

^{13}C NMR (126 MHz, DMSO- d_6) δ 172.6, 171.3, 170.9, 170.7, 170.2, 169.4, 168.7, 155.8, 143.7, 143.7, 140.6, 138.2, 137.4, 132.7, 131.1, 129.2, 128.9, 128.0, 127.6, 127.0, 126.2, 125.3, 125.2, 120.1, 65.6, 55.9, 54.3, 52.3, 48.2, 48.1, 47.5, 46.5, 42.0, 41.9, 37.4, 36.7, 35.9, 18.3, 14.8. HRMS (ESI+) m/z calcd for $\text{C}_{49}\text{H}_{54}\text{N}_{11}\text{O}_9$ $[\text{M}+\text{H}]^+$ 940.4100, found 940.4101.

