

UNIVERZITA PALACKÉHO V OLOMOUCI

Přírodovědecká fakulta

Katedra organické chemie



**Divergentní syntéza fúzovaných morfolin-2-onů
s využitím imobilizovaných intermediátů**

DIPLOMOVÁ PRÁCE

Autor:	Bc. Daniel Chrenko
Studijní program:	N1407 Chemie
Studijní obor:	Organická chemie
Typ studia:	Prezenční
Vedoucí práce:	Mgr. Patricia Kriegelsteinová

Prohlašuji, že jsem tuto závěrečnou práci sepsal samostatně pod dohledem vedoucí Mgr. Patricie Kriegelsteinové, a že jsem na konci práce uvedl všechnu použitou literaturu. Dále prohlašuji, že jsem při tvorbě této práce neporušil autorská práva.

V Olomouci dne

.....

Bc. Daniel Chrenko

Poděkování

Chtěl bych poděkovat Mgr. Patricii Krieglsteinové za vedení, cenné rady, trpělivost a ochotu při vypracovávání této práce. Doc. RNDr. Miroslavu Suralovi, Ph.D. za možnost pracovat v jeho výzkumné skupině a za odborné připomínky. Dále bych chtěl poděkovat Mgr. Soně Krajčovičové, Ph.D. za změření NMR spekter a rady při syntetických problémech a RNDr. Sandře Benické za změření HRMS spekter a přátelský přístup. Děkuji i všem ostatním členům naší výzkumné skupiny, zaměstnancům Katedry organické chemie, rodině a přátelům.

Tato závěrečná práce vznikla za finanční podpory grantu IGA_PrF_2020_012.

Bibliografická identifikace:

Jméno a příjmení autora:	Bc. Daniel Chrenko
Název práce:	Divergentní syntéza fúzovaných morfolin-2-onů s využitím imobilizovaných intermediátů
Typ práce:	diplomová
Pracoviště:	Katedra organické chemie, Přírodovědecká fakulta, Univerzita Palackého v Olomouci Ústav molekulární a translační medicíny
Vedoucí práce:	Mgr. Patricia Kriegelsteinová
Rok odevzdání práce:	2020

Abstrakt:

Předložená diplomová práce se věnuje přípravě fúzovaných morfolin-2-onů s pomocí syntézy na pevné fázi. Práce tématicky navazuje na předchozí výzkum na Katedře organické chemie. Stěžejní část práce je založena na přípravě klíčových alkylovaných intermediátů vycházejících z Fmoc-serinu, 2- či 4-nitrobenzensulfonyl chloridů a *tert*-butylbromoacetátu. U těchto intermediátů je následně otestována jejich reaktivita na dvou syntetických cestách. První cesta obsahuje tři až pět syntetických kroků vedoucích k tvorbě fúzovaných morfolin-2-onů díky reakcím s různými činidly po předchozí denosylaci výchozího intermediátu. Druhá dvoukroková cesta je založena na redukci 2-nitrobenzensulfonamidu obsaženého ve struktuře připraveného intermediátu a následné cyklizaci za vzniku fúzovaného derivátu morfolin-2-onu.

Klíčová slova:	aminokyseliny, syntéza na pevné fázi, sulfonamidy, bromoacetáty, morfolin-2-on
Počet stran:	93
Počet příloh:	28
Jazyk:	čeština

Bibliographical identification:

Author's first name and surname: Bc. Daniel Chrenko

Title: Diversity oriented solid-phase synthesis of heterocycles bearing morpholine-2-one scaffolds

Type of thesis: diploma

Department: Department of Organic Chemistry, Faculty of Science, Palacky University in Olomouc, Czech Republic
Institute of molecular and translational medicine

Supervisor: Mgr. Patricia Kriegelsteinová

The year of submission: 2020

Abstract:

This diploma thesis is devoted to the preparation of fused morpholin-2-ones with the use of solid phase synthesis. The thesis follows previous research at the Department of Organic Chemistry. Crucial part of the work is based on the preparation of key alkylated intermediates based on Fmoc-serine, 2- or 4-nitrobenzenesulfonyl chlorides and *tert*-butylbromoacetate. The reactivity of these key intermediates is subsequently tested on two synthetic pathways. First path consists of three to five synthetic steps leading to fused morpholin-2-ones due to reactions with various reagents after prior denosylation of the starting intermediate. Second two-step synthetic path is based on a reduction of 2-nitrobenzenesulfonamide contained in the structure of the prepared intermediate and subsequent cyclization which results in fused morpholin-2-one derivative.

Keywords: amino acids, solid-phase synthesis, sulfonamides, bromoacetates, morpholin-2-one

Number of pages: 93

Number of appendixes: 28

Language: Czech

OBSAH

1	Seznam použitých zkratek	9
2	Úvod.....	11
3	Teoretická část.....	14
3.1	Kombinatoriální chemie a syntéza na pevné fázi	14
3.1.1	Merrifieldova syntéza na pevné fázi	14
3.1.2	Princip syntézy na pevné fázi a kinetika	15
3.1.3	Linkery	16
3.1.4	Polymerní nosiče	17
3.1.5	Loading	18
3.2	Biologická aktivita morfolin-2-onů	18
3.2.1	Morfolin-2-ony jako nové selektivní blokátory vápenatých kanálu T – typu	18
3.2.2	Morfolin-2-ony jako cenné intermediáty a potenciální nová léčiva	19
3.3	Příprava morfolin-2-onů	21
3.3.1	Oxidace	21
3.3.2	Tvorba dvou vazeb mezi O1–C2 a C3–N4	21
3.3.3	Tvorba dvou vazeb mezi O1–C2 a N4–C5	23
3.3.4	Tvorba dvou vazeb mezi O1–C6 a N4–C5	24
3.3.5	Tvorba jedné vazby mezi O1–C2.....	25
3.4	Příprava strukturně podobných fúzovaných morfolinů	25
3.4.1	Syntéza thiohydantoinů, imidazol-2-thionů a imidazo[2,1- <i>b</i>] thiazol-4-iumů pomocí syntézy na pevné fázi	25
3.4.2	Syntéza disubstituovaných pyrazino-oxazinových derivátů	27

3.4.3	Stereoselektivní syntéza benzoxazino[4,3- <i>b</i>][1,2,5]thiadiazepinon 6,6-dioxidů.....	29
3.4.4	Stereoselektivní syntéza tricyklických benzo-oxazino-diazepinů	31
3.4.5	Příprava diketomorfolinů	34
4	Cíle práce.....	37
5	Výsledky a diskuze	38
5.1	Příprava a využití alkylovaných intermediátů	38
5.1.1	Syntéza alkylovaných intermediátů	38
5.1.2	Využití alkylovaných intermediátů pro další transformace	42
5.2	Syntéza dihydrobenzo-oxazino-thiadiazepindiondioxidu 11a	44
5.3	Syntéza dihydrobenzo-oxazino-diazepintronu 15	48
5.4	Syntéza 3-thioxotetrahydro-imidazo-oxazindionu 12	51
5.5	Syntéza 2-benzyl-thioxotetrahydro-imidazo-oxazindionu 13	53
5.6	Syntéza benzo-oxazino-diazepindionu 14	54
5.7	Syntéza 7-methyl a 7-benzyl-pyrazino-oxazin-trionů 7a a 7b	56
5.8	Syntéza oxazino-oxazin-trionů 8 a 9	58
5.9	C-arylace vedoucí k oxazino-indazol-oxidu 10	60
6	Experimentální část.....	62
6.1	Přístrojové vybavení a použité chemikálie	62
6.2	Studium cyklizačních reakcí.....	63
6.2.1	Obecný postup přípravy vzorku pro analýzu reakcí	63
6.2.2	Syntéza klíčových intermediátů 145 , 146 , 147 a 148	64
6.2.2.1	Ukotvení na Wangův linker.....	65
6.2.2.2	Deprotekce Fmoc protektivní skupiny	65
6.2.2.3	Příprava nosylovaných derivátů	65

6.2.2.4	Alkylace.....	66
6.2.2.5	Štěpení	66
6.2.2.6	Denosylace	68
6.2.3	Využití alkylovaného intermediátu pro další transformace	69
6.2.3.1	Reakce vedoucí k 7b	69
6.2.3.2	<i>N</i> -Acylace 2-nitrobenoovou kyselinou nebo 2-nitrobenzoyl chloridem vedoucí k derivátu 15	72
6.2.3.3	Alkylace 2-nitrobenzyl bromidem vedoucí k derivátu 14	74
6.2.3.4	Acylace α -bromofenylocotovou kyselinou vedoucí k derivátu 9	75
6.2.3.5	Reakce s Fmoc-NCS vedoucí k 12	77
6.2.3.6	Reakce s benzyl-NCS vedoucí k 13	79
6.2.3.7	Syntéza derivátů 11a , 11b a 11c	80
7	Závěr	84
8	Seznam použité literatury	87
9	Přílohy	94

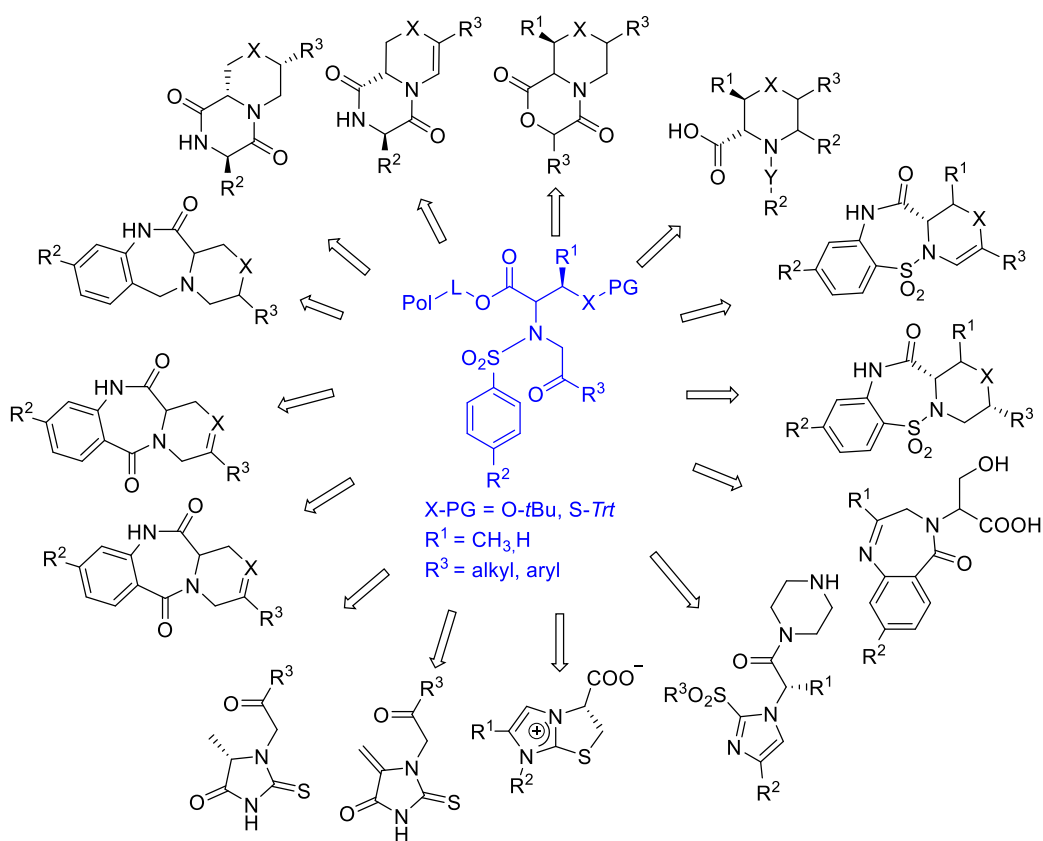
1 Seznam použitých zkratek

AcOH	kyselina octová
Ala	alanin
APT	attached proton test
Boc	<i>tert</i> -butoxykarbonyl
COSY	homonuclear correlation spectroscopy $^1\text{H} - ^1\text{H}$
Cys	cystein
DBU	1,8-diazabicyklo[5.4.0]undec-7-en
DCM	dichlormethan
DIAD	diisopropylazodikarboxylát
DIC	<i>N,N'</i> -diisopropylkarbodiimid
DIPEA	<i>N,N</i> -diisopropylethylamin
deg.	degassed, odplyněný
DMAP	4-(dimethylamino)pyridin
DMF	<i>N,N</i> -dimethylformamid
DMSO	dimethylsulfoxid
DVB	divinylbenzen
ESI-MS	hmotnostní spektrometrie s ionizací elektrosprejem
Et	ethyl
EtOAc	ethylacetát
EtOH	ethanol
Fmoc-	<i>N</i> -(9-fluorenylmethoxykarbonyloxy) -
Fmoc-Cl	<i>N</i> -(9-fluorenylmethoxykarbonyloxy) chlorid
Fmoc-Osu	<i>N</i> -(9-fluorenylmethoxykarbonyloxy) sukcinimid
HF	kyselina fluorovodíková
HMBC	heteronuclear multi-bond correlation spectroscopy $^1\text{H} - ^{13}\text{C}$
HMQC	heteronuclear multiple quantum coherence $^1\text{H} - ^{13}\text{C}$
HOBt	<i>N</i> -hydroxybenzotriazol

HPLC-MS	vysokoúčinná kapalinová chromatografie spojená s hmotnostní spektrometrií
HRMS	hmotnostní spektroskopie s vysokým rozlišením
MeCN	acetonitril
MeOH	methanol
NMR	nukleární magnetická rezonance
<i>p</i> TSA	kyselina <i>p</i> -toluensulfonová
rt	laboratorní teplota
Ser	serin
SPS	syntéza na pevné fázi
TBAHS	tetrabutylammonium hydrogensulfát
TBAI	tetrabutylammonium jodid
<i>t</i> Bu	<i>tert</i> -butyl
TEA	triethylamin
TES	triethylsilan
TFA	kyselina trifluoroctová
TFE	2,2,2-trifluorethanol
THF	tetrahydrofuran
Thr	threonin
Trt	trityl
UPLC-MS	ultra vysokoúčinná kapalinová chromatografie spojená s hmotnostní spektrometrií

2 Úvod

Výzkumná skupina doc. RNDr. Miroslava Sourala, Ph.D. na Katedře organické chemie UP se již delší dobu věnuje syntéze na pevné fázi. Jedním z témat je použití vhodně chráněných aminokyselin pro divergentně orientovanou syntézu nových heterocyklických sloučenin nesoucích oxazinový anebo thiazinový skelet. Na **Obrázku 1** jsou znázorněny již popsané sloučeniny, které byly připraveny ze stejného klíčového intermediátu. Syntéza tohoto intermediátu využívá jako výchozí látky chráněné aminokyseliny (Fmoc-serin, Fmoc-threonin či Fmoc-cystein) imobilizované na Wangově pryskyřici, 2- či 4-nitrobenzensulfonyl chloridy a různé bromoketony. Intermediát může být následně podroben různým transformacím vedoucím k vyobrazeným sloučeninám.



Obrázek 1: Přehled již připravených heterocyklických sloučenin vycházejících ze společného imobilizovaného intermediátu.¹⁻⁸

Tato diplomová práce navazuje na předchozí výzkum skupiny a je zaměřená na přípravu derivátů morfolin-2-onů kombinací vhodných výchozích látek: Fmoc-serinu, 2- či 4-nitrobenzensulfonyl chloridů a *tert*-butylbromoacetátu. Základní syntetický postup přípravy klíčového intermediátu popisuje **Schéma 1**.

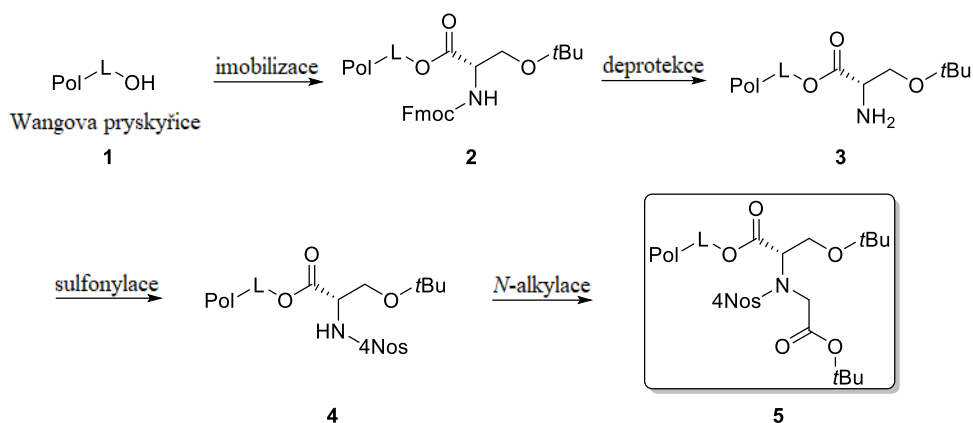
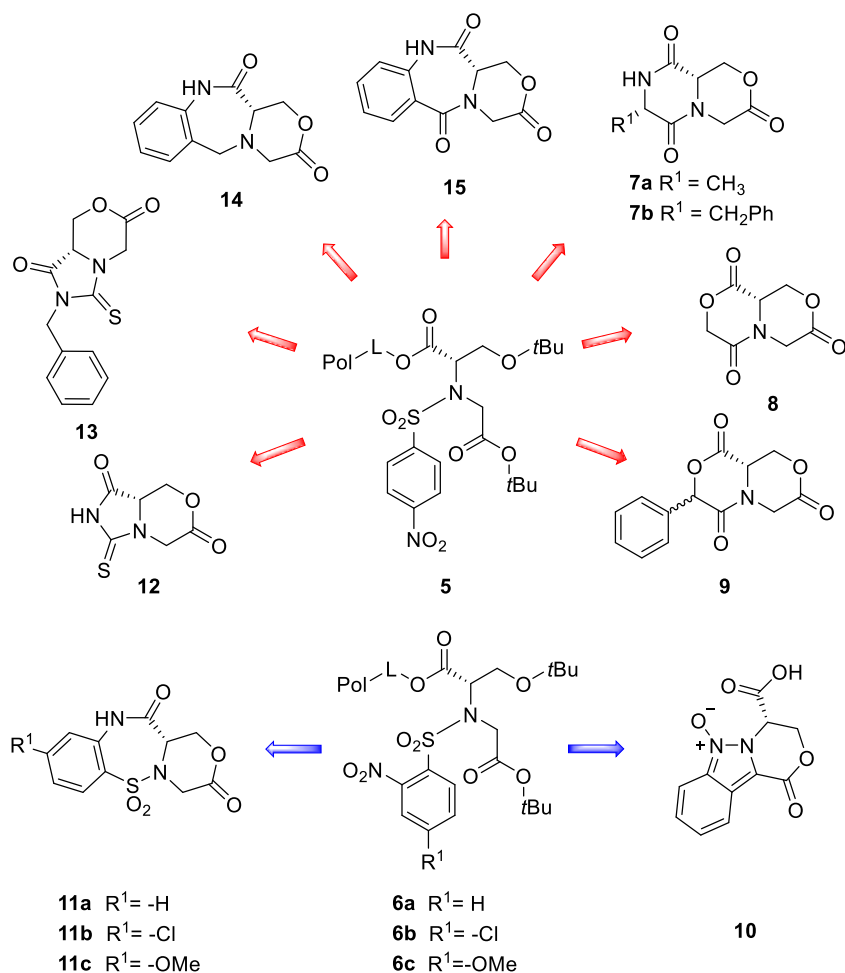


Schéma 1: Reakční schéma syntézy klíčového intermediátu 5.

Strukturní rozmanitost heterocyklických skeletů teoreticky dostupných z klíčového intermediátu popisuje **Obrázek 2**.



Obrázek 2: Struktury cílových látek této diplomové práce nesoucí morfolin-2-onový skelet.

Celá práce je rozdělená do devíti kapitol. **Teoretická část** práce se věnuje nejprve obecně syntéze na pevné fázi, následně biologické aktivitě morfolin-2-onů a jejich

syntéze. Následuje kapitola **Cíle práce**, kapitoly **Výsledky a diskuse** a **Experimentální část**. Kapitola **Závěr** shrnuje, jakých výsledků se podařilo dosáhnout a které cíle nebyly z objektivních důvodů dosaženy. V poslední kapitole **Přílohy** jsou přiložena NMR spektra klíčových intermediátů, některých prekurzorů a připravených finálních látek.

3 Teoretická část

V teoretické části bude shrnuta syntéza na pevné fázi, syntéza morfolin-2-onů a jejich derivátů a syntéza látek strukturně podobných cílovým derivátům této diplomové práce.

3.1 Kombinatoriální chemie a syntéza na pevné fázi

Kombinatoriální chemie je technika umožňující přípravu velkých souborů látek (knihoven) kombinací určitého počtu reaktantů různým způsobem. Výchozí látky používané na přípravu neboli „stavbu“ požadovaných produktů se nazývají „stavební bloky.“ Tyto stavební bloky jsou opakovaně kovalentně spojovány za vzniku souborů chemických knihoven. V dnešní době se kombinatoriální chemie využívá zejména v oblasti hledání nových léčiv.^{9,10}

3.1.1 Merrifieldova syntéza na pevné fázi

Syntéza na pevné fázi byla poprvé popsána v roce 1963, kdy Robert Bruce Merrifield publikoval studii zabývající se syntézou peptidů, která měla velký dopad na kombinatoriální chemii (Schéma 2).⁹

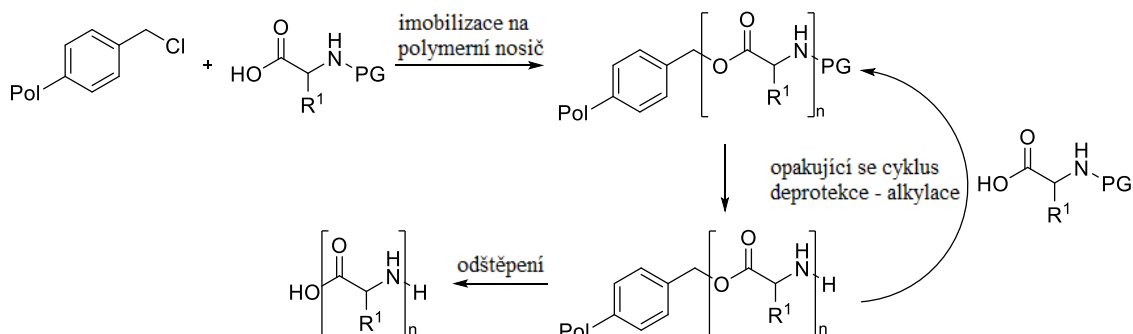


Schéma 2: Merrifieldova syntéza peptidů na pevné fázi (převzato a upraveno).⁹

Merrifieldova syntéza peptidů na pevné fázi využívá chlormethylový polymer. Reakcí N-ochráněné aminokyseliny s tímto polymerem je aminokyselina imobilizována přes C-konec, za vzniku esterové vazby. K ochránění aminoskupiny je použita *tert*-butoxykarbonyl (Boc) protektivní skupina, která je následně odštěpena pomocí roztoku kyseliny trifluoroctové (TFA) v dichlormethanu (DCM) nebo kyseliny chlorovodíkové (HCl). Odchráněná aminokyselina může být posléze acylována další N-ochráněnou aminokyselinou. Na závěr syntézy jsou odštěpeny chránící skupiny

postranního řetězce a peptid je odštěpen z pryskyřice za použití kyseliny fluorovodíkové (HF).^{9,10}

Při acylaci je nutno karboxylové kyseliny aktivovat. Jako nejčastější způsob aktivace karboxylové skupiny se v případě syntézy na pevné fázi používá karbodiimid (např. *N,N'*-diisopropylkarbodiimid, DIC) za přítomnosti *N*-hydroxybenzotriazolu (HOBt) a 4-(dimethylamino)pyridinu (DMAP). **Schéma 3** popisuje princip aktivace aminokyselin technikou DIC/DMAP. *N,N'*-diisopropylkarbodiimid (DIC) je používán pro aktivaci karboxylových skupin za vzniku *O*-acylmočoviny. DMAP se používá jako katalyzátor reakce, která by jinak probíhala z důvodu nedostatečné nukleofility alkoholu (v tomto případě Wangova linkeru) velmi pomalu a mohlo by dojít k nežádoucím reakcím (přesmyku na nereaktivní *N*-acylmočovinu). DMAP reaguje s *O*-acylmočovinou rychleji než alkohol (linker) a vznikne tak aktivovaný reaktivní amid, který je následně atakován alkoholem (linkerem) za vzniku esteru. HOBt je používáno pro potlačení racemizace alfa-aminokyselin.

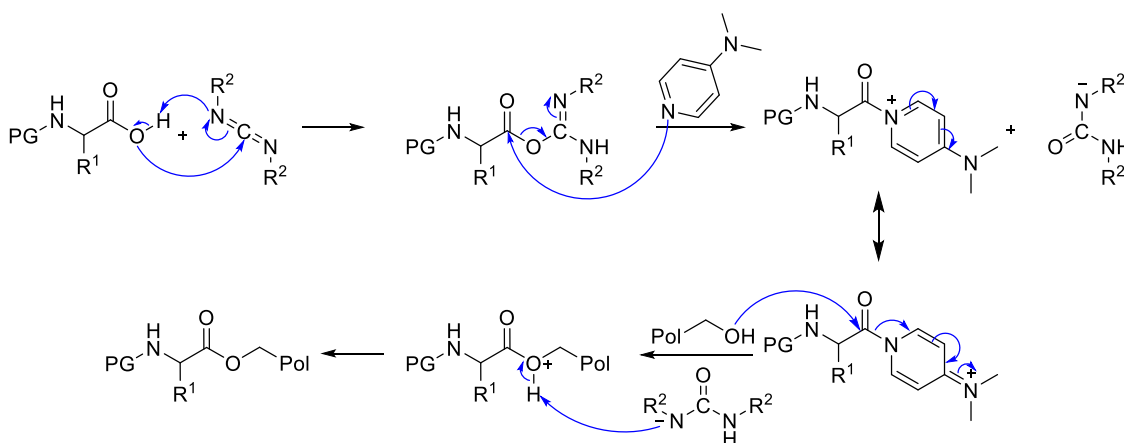
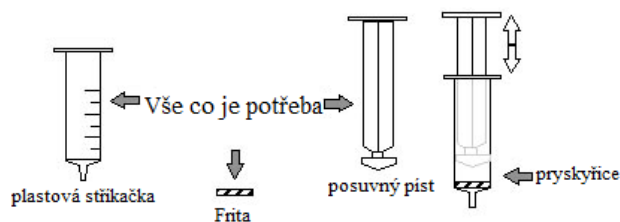


Schéma 3: Aktivace karboxylové skupiny pomocí DIC a DMAP.

3.1.2 Princip syntézy na pevné fázi a kinetika

Syntéza na pevné fázi (SPS) začíná navázáním látky (imobilizací) na nerozpustný polymerní nosič (pryskyřici) a končí odštěpením finální látky z nosiče. To usnadňuje separaci jednotlivých intermediátů navázaných na pryskyřici od látek rozpuštěných v roztoku, které jsou odstraněny z pryskyřice pouhým vymytím.

SPS nevyžaduje žádné speciální vybavení (**Obrázek 3**). Celou syntézu lze provést např. v běžné injekční stříkačce, vybavené polypropylenovou fritou a uzávěrem. Proces SPS je navíc možné automatizovat, což je velkou výhodou oproti syntéze v roztoku (je možné provádět více reakcí najednou, což značně šetří čas).

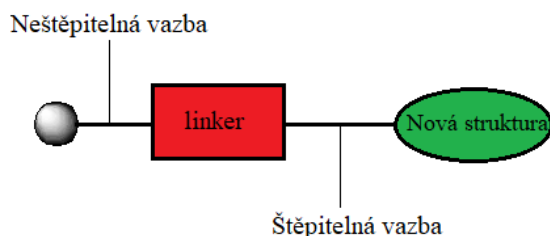


Obrázek 3: Vybavení potřebné pro syntézu na pevné fázi (převzato a upraveno z www.torviq.com).

Kinetika SPS je pomalejší než kinetika reakcí v roztoku z důvodu nutnosti migrace reagentů ke všem reaktivním místům porézní pryskyřice, a proto je vhodné optimalizovat reakční podmínky tak, aby bylo dosaženo co nejvyšší čistoty, jelikož imobilizované intermediáty lze od sebe separovat pouze až po odštěpení z polymerního nosiče.⁹

3.1.3 Linkery

Linkery zprostředkovávají dočasné spojení mezi pevným polymerním nosičem a první výchozí látkou, nejčastěji chráněnou aminokyselinou (**Obrázek 4**). Linker má vždy dvě funkční části. První neštěpitelnou, která je použita k vytvoření pevné vazby s aktivní skupinou polymeru a druhou sloužící k imobilizaci výchozí látky. Tuto vazbu lze za specifických podmínek přerušit a uvolnit daný meziprodukt či finální látku z polymerní matrice.^{11,12}

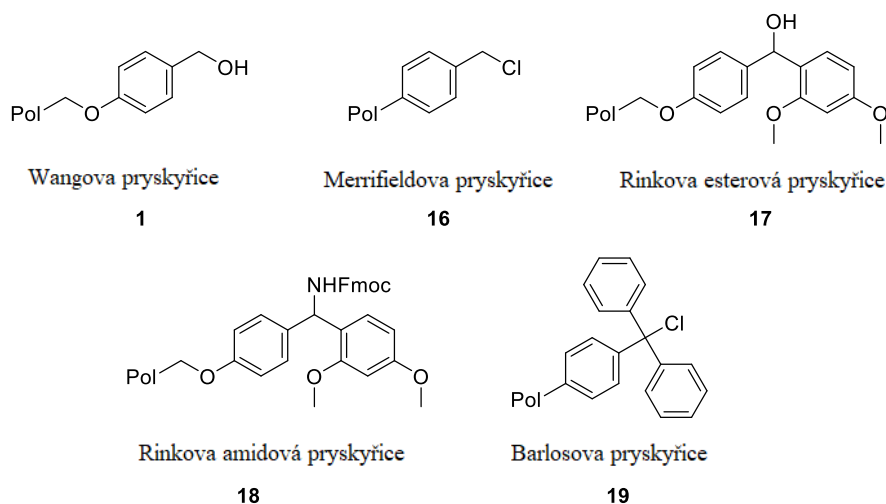


Obrázek 4: Obecná struktura navázání výchozí látky na pevný polymerní nosič přes linker.

Linkery lze rozdělit podle typu štěpení finální látky například na kyselinou, bázi nebo fotolyticky štěpitelné linkery a také podle typu funkční skupiny použité při navázání první výchozí látky na linker (v případě aminokyselin pomocí karboxylové nebo amino skupiny, nebo přes funkční skupinu v postranním řetězci).¹¹

Nejčastěji používané linkery v syntéze na pevné fázi jsou kyselě štěpitelné. Obvykle používaný způsob štěpení látky z linkeru je pomocí kyselin TFA nebo HF v různých koncentracích v závislosti na typu použitého linkeru. Výhodou těchto kyselin je jejich těkavost, která umožňuje snadné odstranění. Mezi nejčastěji používané linkery

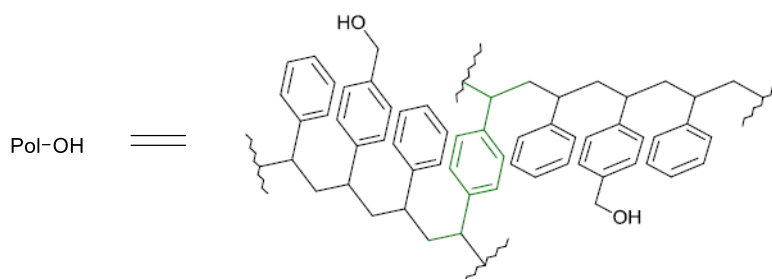
patří např. Wangova pryskyřice obsahující hydroxymethylovou skupinu, Rinkova esterová pryskyřice obsahující benzhydrlaminovou skupinu, (chráněnou *N*-(9-fluorenylmetoxykarbonyloxy) (Fmoc) protektivní skupinou), Merrifieldova pryskyřice obsahující chlormethylovou skupinu a Barlosova pryskyřice obsahující chlortritylovou skupinu (**Obrázek 5**).¹¹



Obrázek 5: Typy nejpoužívanějších linkerů.

3.1.4 Polymerní nosiče

Polymerní nosič je materiál vznikající polymerací vhodné látky. V syntéze na pevné fázi se nejčastěji používají nosiče na bázi polystyrenu a divinylbenzenu (1-2% DVB). Přítomnost 1-2 % DVB je dostatečná, aby byl polymer přiměřeně robustní a odolný vůči různým mechanickým vlivům. Zároveň je zachována velmi dobrá kapacita bobtnání. Rozpouštědla používaná pro bobtnání jsou nejčastěji DCM, dimethylformamid (DMF) a tetrahydrofuran (THF). Naopak pro srážení se nejčastěji používá methanol (MeOH). (**Obrázek 6**).¹²



Obrázek 6: Struktura polymerního nosiče na bázi polystyrenu zesíťovaného divinylbenzenem.¹²

3.1.5 Loading

Výchozí loading neboli počet aktivních míst na použitém polymeru se udává v mmol/g a definuje počet aktivních míst pryskyřice. Loading po první reakci (zpravidla imobilizaci první výchozí látky) udává, kolik mmol aktivních míst jednoho gramu pryskyřice bylo pokryto imobilizovanou látkou. Jednotkou loadingu je tedy mmol/g. Stanovení loadingu probíhá odštěpením přesně definovaného množství látky z pryskyřice a pomocí vhodné instrumentální metody (LC-MS pro látky s chromoforem, ^1H NMR pro látky bez chromoforu) se změří série vzorků o různé koncentraci, vytvoří se kalibrační křivka a dopočítá se loading.

3.2 Biologická aktivita morfolin-2-onů

3.2.1 Morfolin-2-ony jako nové selektivní blokátory vápenatých kanálu T – typu

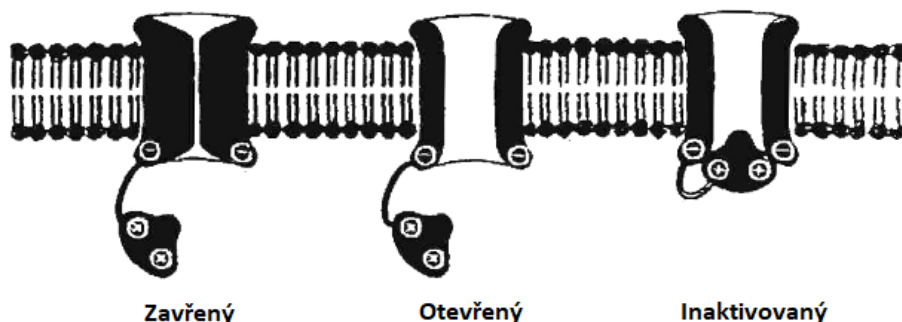
Vápník je jedním z nejdůležitějších prvků v našem těle. Vápenaté ionty jsou součástí komunikačních drah a pomáhají rychlému šíření signálů. Podílejí se na regulaci enzymů, endokrinní a exokrinní sekreci, kontrole genové exprese, fungování imunitního systému, srážení krve a metabolismu kostí. Dále se podílejí na regulaci svalové kontrakce a na různých pochodech v nervovém systému jako je například uvolňování neurotransmiterů.^{13–15}

Pokud není koncentrace vápenatých kationů kontrolována, může působit patologicky a vyvolávat poškození i smrt buňky. Vápenaté ionty jsou regulovány vápenatými kanály. Doposud bylo popsáno 6 tříd napětově řízených kanálů v membránách buněk L-, T-, N-, P-, Q- a R-typ lišící se především ve svých elektrofyziologických, strukturních a farmakologických vlastnostech.^{16–19}

T-typ je nízkoprahový kanál aktivovaný při nízké depolarizaci buňky otevírající se na velmi krátkou dobu.^{13,15} Bylo popsáno, že kanál T-typu je zapojen v některých formách rakoviny, v patogenezi epilepsie, neuropatické bolesti a Parkinsonově nemoci.^{16–19}

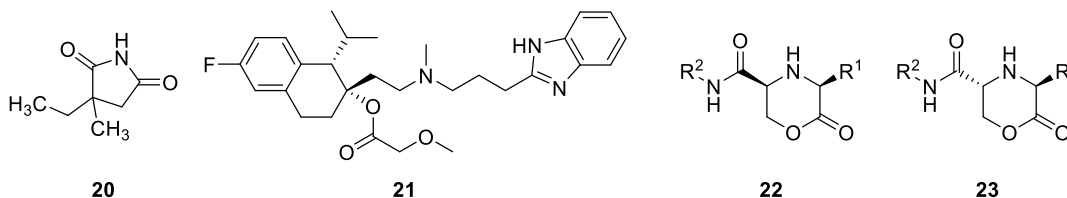
Napětově řízené vápenaté kanály jsou jednou z hlavních cest vstupu vápníku do buněk. Selektivně propouštějí vápenaté ionty v přítomnosti sodných a draselných iontů. Rovněž vykazují selektivitu pro ionty barnaté, ale pro nikelnaté a kademnaté ionty jsou nepropustné. Tento typ kanálů reaguje na změnu membránového potenciálu a je otevřen depolarizací buněčné membrány. Snížením negativního náboje na povrchu

buňky dojde ke změně konformace kanálového proteinu a k jeho otevření. To umožňuje vápenatým iontům proniknout přes membránu do buňky ve směru koncentračního gradientu. Následně dojde k inaktivaci kanálů a k jejich zavření (**Obrázek 7**).^{13–15}



Obrázek 7: Tři základní stavy napěťově řízených vápenatých kanálů.¹³

Mibefradil byl zaveden jako selektivní blokátor T-typu kanálů, ale později se ukázalo, že je neselektivní a byl zakázán z důvodu farmakokinetické interakce jeho metabolitů. Ethosuximid je antiepileptikum schopné inhibovat T-typ kanálů. Morfolin-2-on-5-karboxamidové deriváty **22** a **23** byly testovány proti vápenatým kanálům T-typu a bylo zjištěno, že jsou aktivní a selektivní v blokování těchto kanálů (**Obrázek 8**).²⁰



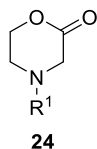
Obrázek 8: Ethosuximid **21**, Mibefradil **22** a morfolin-2-on-5-karboxamidové deriváty *cis* a *trans*.²⁰

Z důvodu nedostatku látek účinných jako blokátory T-typu kanálů, je důležité pátrat po nových látkách, stejně jako porozumět fyziologickým funkcím těchto kanálů a rozvinout klinicky aplikovatelné cíle pro léčbu epilepsie a neuropatické bolesti.²⁰

3.2.2 Morfolin-2-ony jako cenné intermediáty a potenciální nová léčiva

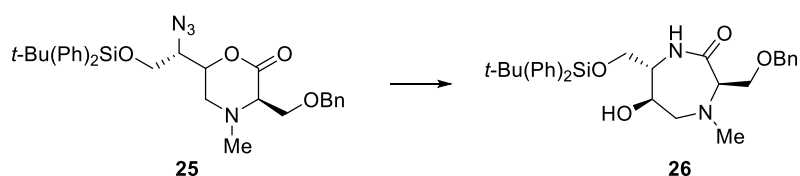
Morfolin-2-ony (**Obrázek 9**) mohou být považovány za cyklické α -amino kyseliny. Z tohoto důvodu mohou sloužit jako prekurzory derivátů aminokyselin. *N*-alkylmorfolin-2-ony jsou používány jako prekurzory pro syntézu mnoha necyklických sloučenin, také pro přípravu potenciálních agonistů jednoho ze základních typů dopaminových receptorů D3 a pro přípravu nových bimodálních ligandů používaných v radioimunoterapii a jiných zobrazovacích technikách. *N*-alkylmorfolin-2-ony mohou

být využity jako rozpouštědla a prekurzory pro přípravu tenzidů - látek snižujících povrchové napětí rozpouštědel.^{21–23}



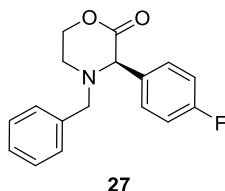
Obrázek 9: Substituované *N*-alkylmorpholin-2-ony.²³

Zajímavým derivátem je substituovaný derivát morfolin-2-onu, který může být snadno izomerizován na diazepanon (**Obrázek 10**), který má potencionální inhibiční vlastnosti bakteriálního transportního proteinu MraY.²⁴



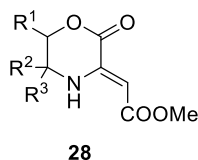
Obrázek 10: Derivát morfolin-2-onu **25** a jeho izomerace na diazepanon **26**.²³

Roku 2002 Devine a spol publikovali asymetrickou syntézu morfolin-2-onového derivátu **27** (**Obrázek 11**). Tento derivát je klíčovým intermediátem v syntéze aprepitantu, vysoce účinného antiemetika používaného na prevenci pooperační nevolnosti a zvracení při chemoterapii.^{23,25}



Obrázek 11: (*R*)-4-benzyl-3-(4-fluorofenyl)morpholin-2-on.²³

Různě substituovaný methyl (*Z*)-2-(2-oxomorpholin-3-yliden)acetát **28** (**Obrázek 12**) vykazuje střední až výraznou aktivitu proti bakteriím *Neisseria gonorrhoeae*, které jsou původcem akutního zánětlivého onemocnění urogenitálního traktu zvaného kapavka.^{26,27}



Obrázek 12: Struktura methyl (Z)-2-(2-oxomorfolin-3-yliden)acetátu **28**.²³

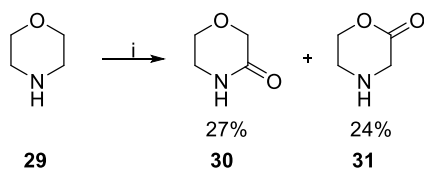
Morfolin-2-ony nepochybně patří mezi důležité intermediáty pro přípravu zajímavých přírodních a biologicky aktivních látek používaných v medicíně. Byly také rozsáhle studovány organickými chemiky pro jejich možnou syntetickou aplikaci a stále zůstávají zajímavým cílem pro další výzkum.²³

3.3 Příprava morfolin-2-onů

V této kapitole bude shrnuta příprava morfolin-2-onů pomocí tradiční syntézy v roztoku.

3.3.1 Oxidace

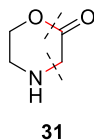
Oxidace morfolinu **29** na morfolin-2-on **31** (**Schéma 4**) probíhá za současné tvorby morfolin-3-onu **30**. Nezbytná je přítomnost kyslíku a katalyzátorů, jako například *N*-hydroxyftalimidu a promotoru kobalt diacetylacetonátu.²³



Podmínky: (i) O₂, *N*-hydroxyftalimid, kobalt diacetylacetonát v MeCN.

Schéma 4: Oxidace morfolinu na morfolin-3-on a morfolin-2-on.²³

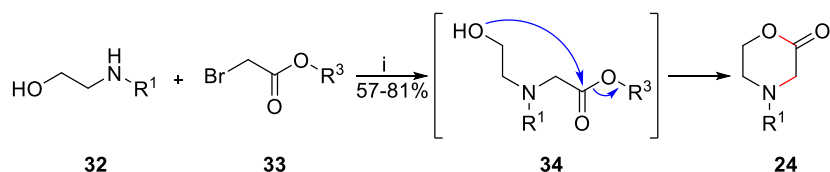
3.3.2 Tvorba dvou vazeb mezi O1–C2 a C3–N4



Obrázek 13: Zobrazení formace dvou vazeb mezi O1–C2 a C3–N4.

Tato metoda syntézy substituovaných i nesubstituovaných morfolin-2-onů (**Obrázek 13**) je velmi běžná. Zahrnuje například intramolekulární cyklizaci 2-aminoethanolových derivátů **32**, která probíhá přes substituci bromu sekundární

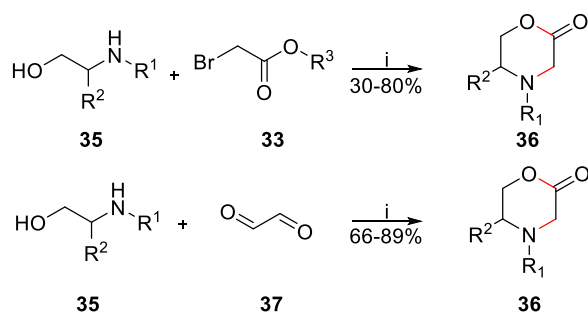
aminoskupinou 2-aminoethanolu. Následuje intramolekulární transesterifikace vedoucí k *N*-substituovaným morfolin-2-onům **24** (Schéma 5).²³



Podmínky: (i) DIPEA v MeCN.

Schéma 5: Syntéza *N*-substituovaných morfolin-2-onů.²³

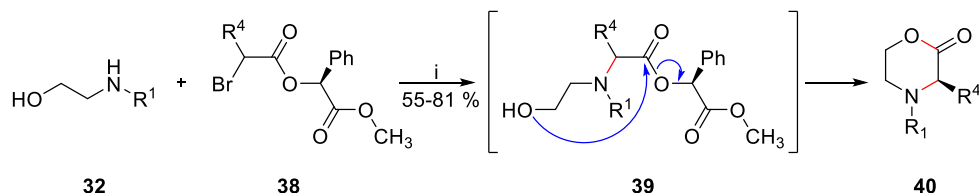
5-substituované a 4,5- disubstituované deriváty morfolin-2-onu **36** se syntetizují nejčastěji z 2-substituovaných 2-aminoethanolů a alkylbromoacetátů **33** nebo glyoxalu **37** (Schéma 6).²³



Podmínky: (i) DIPEA v MeCN.

Schéma 6: Syntéza 5-substiovaných derivátů morfolin-2-onu.²³

Příprava 3,4- substituovaných derivátů morfolin-2-onů **40** je založena na použití α - bromoesterů **38** reagujících s *N*-substituovanými 2-aminoethanoly **32** za následné intramolekulární cyklizace (Schéma 7).²³

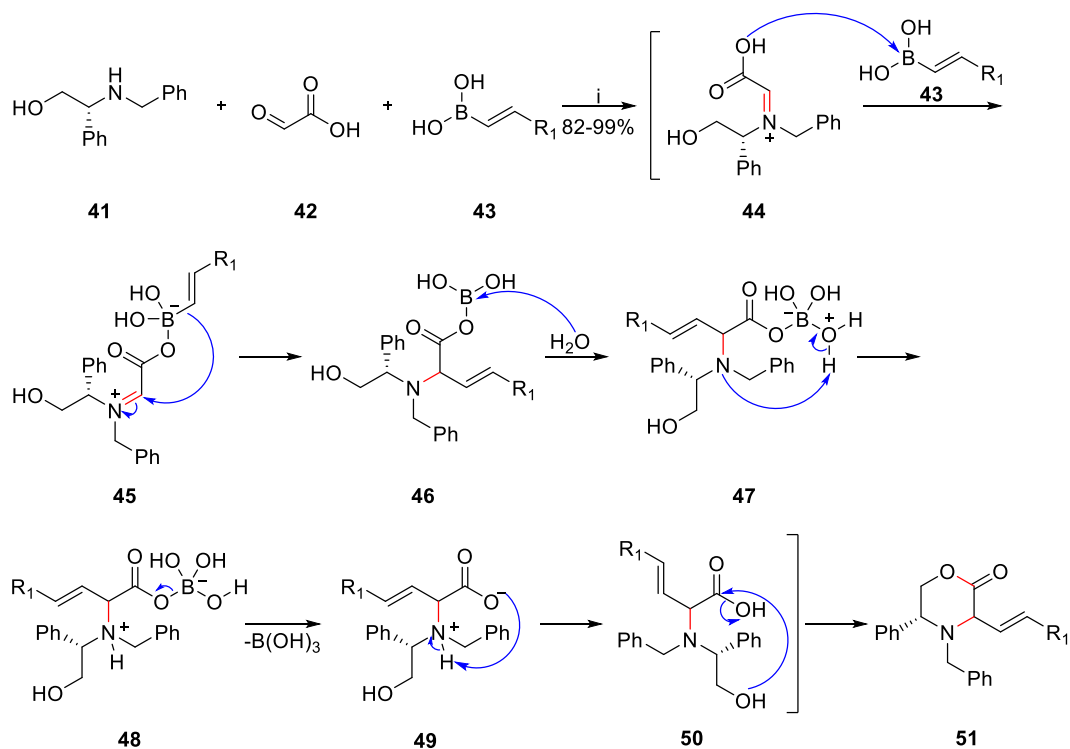


Podmínky: (i) DIPEA, TBAI v MeCN.

Schéma 7: Syntéza 3,4 substituovaných derivátů morfolin-2-onů.²³

Syntéza 3,4,5-trisubstituovaných morfolin-2-onů probíhá pomocí Petasisovy tří komponentní reakce, jejímž mechanismu bylo porozuměno až v roce 2015.²⁸ Zahnuje (*R*)-*N*-benzylfenylglycinol **41**, glyoxalovou kyselinu **42** a variabilní styrylboronové

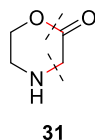
kyseliny **43** (Schéma 8). Prvním krokem reakce je tvorba iminu následovaná reakcí s boronovou kyselinou na meziprodukt **45**. Reakce pokračuje intramolekulárním přesmykem na derivát **46**, odštěpením kyseliny borité a proton transferem. V posledním kroku dochází k intramolekulární cyklizaci na derivát **51**.^{23,29,30}



Podmínky: (i) TEA v DCM.

Schéma 8: Navržený mechanismus syntézy 3,4,5-trisubstituovaných morfolin-2-onů pomocí Petasisovy tří komponentní reakce.

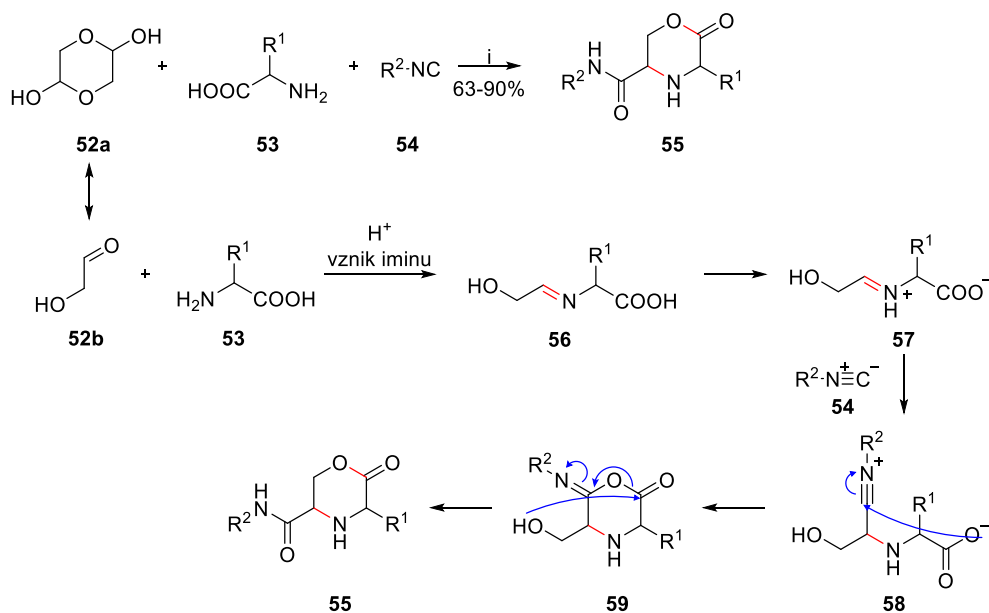
3.3.3 Tvorba dvou vazeb mezi O1–C2 a N4–C5



Obrázek 14: Zobrazení formace dvou vazeb mezi O1–C2 a N4–C5.

V roce 2003 byla publikována nová syntéza 3-substituovaných morfolin-2-on-5-karboxamidových derivátů formací vazby mezi O1-C2 a N4-C5 (**Obrázek 14**). Vycházelo se z komerčně dostupné látky **52a**, α -aminokyseliny **53** a isokyanidů **54** za pomoci Ugiho multikomponentní reakce (**Schéma 9**). V prvním kroku reaguje aminokyselina s aldehydem **52b** za tvorby iminu **56**. Ten následně reaguje s isokyanidem

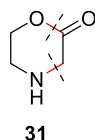
54 za tvorby derivátu **58**. Následuje intramolekulární cyklizace a přesmyk na finální derivát **55**.³¹



Podmínky: (i) TFA, TFE, H₂O, -40 °C – rt.

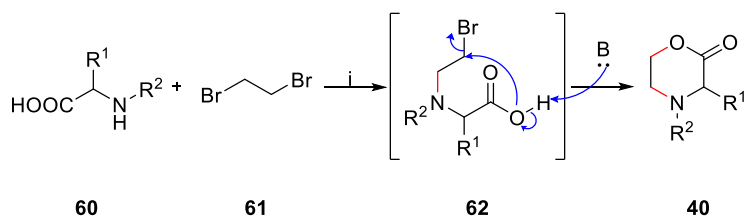
Schéma 9: Ugiho multikomponentní reakce vedoucí k 3-substituovaným morfolin-2-on-5-karboxamidovým derivátům.³¹

3.3.4 Tvorba dvou vazeb mezi O1–C6 a N4–C5



Obrázek 15: Zobrazení formace dvou vazeb mezi O1–C6 a N4–C5.

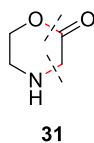
Tato intramolekulární cyklizace vznikající tvorbou vazby mezi O1-C6 a N4-C5 (**Obrázek 15**) probíhá ve dvou krocích. Reaguje substituovaný derivát aminokyseliny **60** s 1,2-dibromoethanem **61** za tvorby 3,4-disubstituovaných morfolin-2-onů **40** (**Schéma 10**).²³



Podmínky: (i) K₂CO₃, DMF nebo DIPEA.

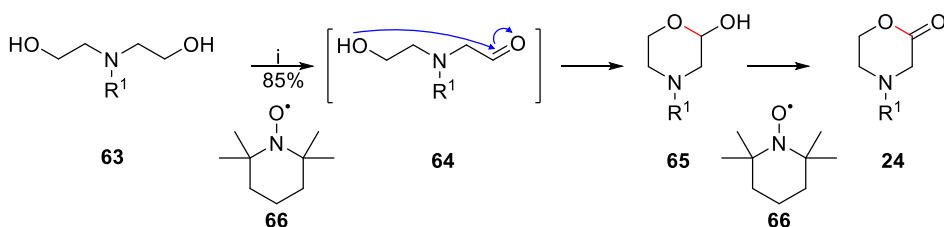
Schéma 10: Příprava 3,4-disubstituovaných morfolin-2-onů.²³

3.3.5 Tvorba jedné vazby mezi O1–C2



Obrázek 16: Zobrazení formací jedné vazby mezi O1–C2.

N-substituované morfolin-2-ony **24** mohou být připraveny z *N*-alkyldiethanolaminu **63** pod různými oxidativními podmínkami. Je možno například použít selektivní oxidaci pomocí NaClO v DCM za přítomnosti radikálového katalyzátoru (2,2,6,6-tetramethylpiperidin-1-yl)oxy (TEMPO, **66**) a KBr (**Schéma 11**).²³



Podmínky: (i) NaOCl, KBr, TEMPO v H₂O/DCM.

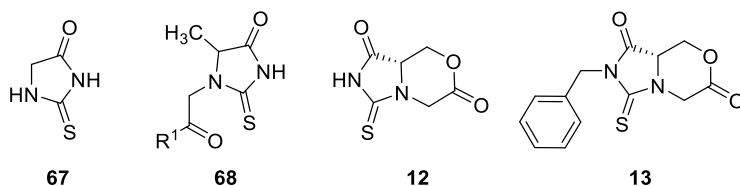
Schéma 11: Mechanismus selektivní oxidace při přípravě *N*-substituovaných morfolin-2-onů.^{23,32}

3.4 Příprava strukturně podobných fúzovaných morfolinů

Tato část diplomové práce bude věnovaná syntéze v roztoku a na pevné fázi strukturně podobným látkám cílovým derivátům této práce (**Obrázek 2**).

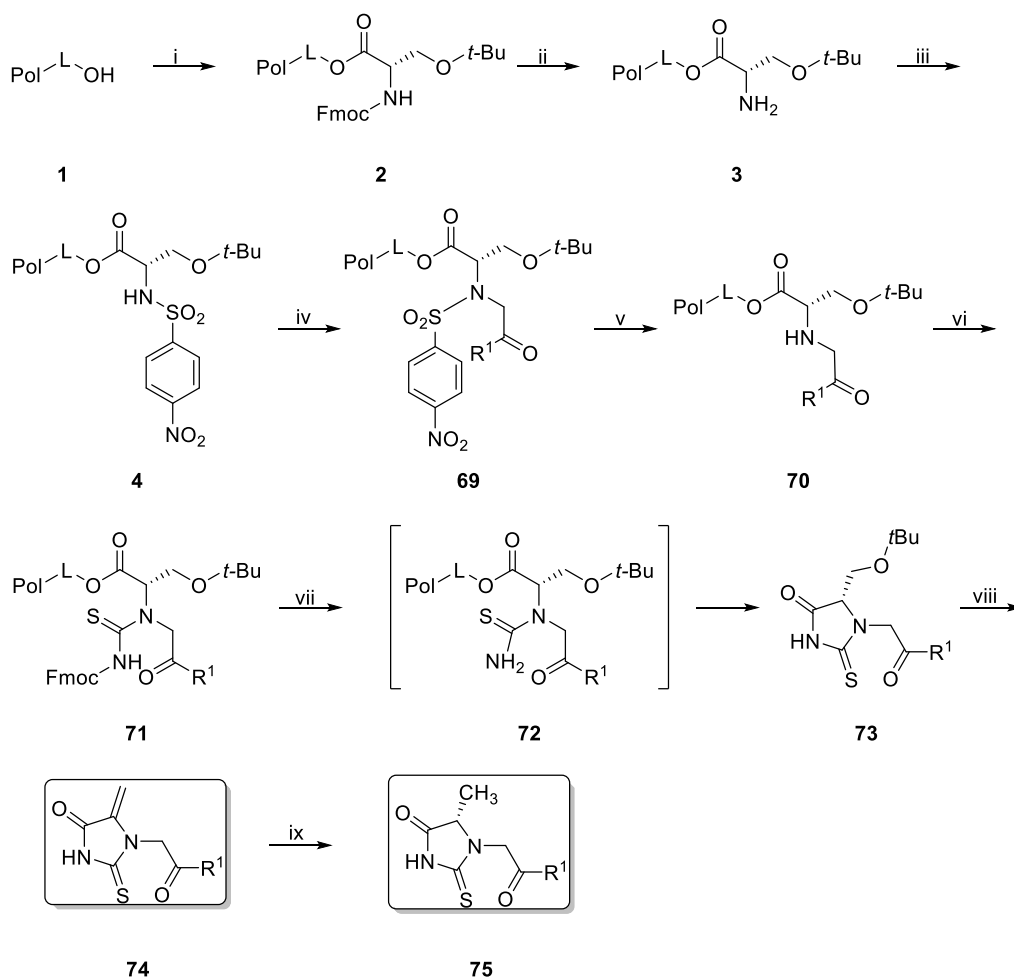
3.4.1 Syntéza thiohydantoinů, imidazol-2-thionů a imidazo[2,1-*b*]thiazol-4-iumů pomocí syntézy na pevné fázi

Motiv 2-thiohydantoinů (**Obrázek 17**) je přítomen ve struktuře mnoha přírodních a syntetických látek, které mohou sloužit jako antiandrogeny a imunomodulátory. Tyto deriváty mají antimykobakteriální, protizánětlivé, antikonvulzivní, antiarytmické a protinádorové účinky.^{2,33–36}



Obrázek 17: Struktura 2-thiohydantoinu **67**, derivátu 2-thiohydantoinu **68** a cílových derivátů 2-thiohydantoinu fúzovaných s morfolin-2-onem **12** a **13**.

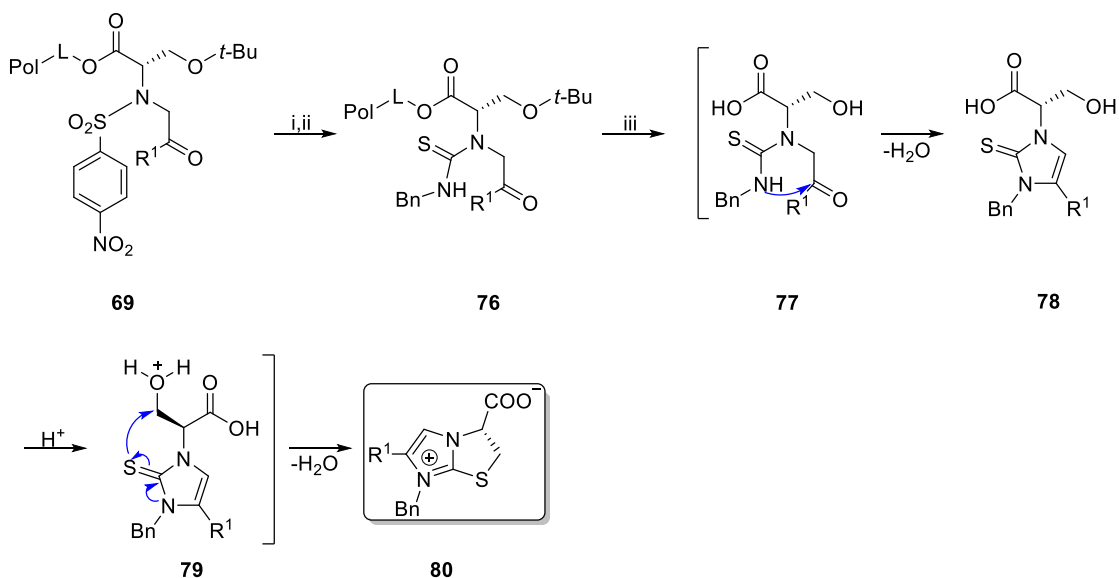
Níže je popsána syntetická cesta k novým derivátům 5-methylen-thiohydantoinům pomocí syntézy na pevné fázi, vedoucí k 36 různě substituovaným derivátům. První reakcí byla imobilizace Fmoc-Ser(*t*Bu)OH na Wangovu pryskyřici **1**, následovala deprotektce derivátu **2**, sulfonylace derivátu **3** a alkylace derivátu **4** variabilními bromoketony za získání intermediátu **69**. Tento intermediát byl dále podroben denosylaci a reakci s Fmoc-NCS. Deprotektací Fmoc protektivní skupiny došlo k cyklickému štěpením z pryskyřice za tvorby derivátu **73**. Kyselá katalyzovaná cyklizace poskytla látku **74**, jako produkt odštěpení *tert*-butyl protektivní skupiny a následné dehydratace. Poslední reakcí byla redukce methylidinového derivátu **74** pomocí triethylsilanu (TES) v TFA na derivát 5-methyl- thiohydantoin **75** (Schéma 12).²



Podmínky: (i) Fmoc-Ser(*t*Bu)-OH, HOBt, DIC, DMAP, DMF/DCM(1:1), 24 h, rt; (ii) piperidin/DMF (1:1), 30 min, rt; (iii) 4-NosCl, 2,6-lutidin, DCM, 24 h, rt; (iv) 2-bromoketon, DIPEA, DMF, 24 h, rt; (v) 2-merkptoethanol, DBU, DMF, 1 h, rt; (vi) Fmoc-NCS, bezvodý THF, 2 h, rt; (vii) 35% piperidin/DMF, 24 h, rt; (viii) čistá TFA, 20 h, 35 °C; (ix) TFA/TES/DCM (5:3:5), 24 h, rt.

Schéma 12: Syntéza 5-methyliden- a 5-methyl-thiohydantoinu.²

Byla také otestována příprava *N*-substituovaných derivátů. V případě derivátu obsahující benzyl **76** (místo Fmoc) nedocházelo působením TFA k cyklickému odštěpení z pryskyřice. Působením TFA došlo pouze k odštěpení z pryskyřice za současného odštěpení protektivních skupin na derivát **77**. Delšímu vystavení TFA za zvýšené teploty došlo k cyklické reakci na imidazol-2-thion **78** a následnému uzavření druhého cyklu za vzniku imidazo[2,1-*b*]thiazol-4-ia **80** (Schéma 13).²

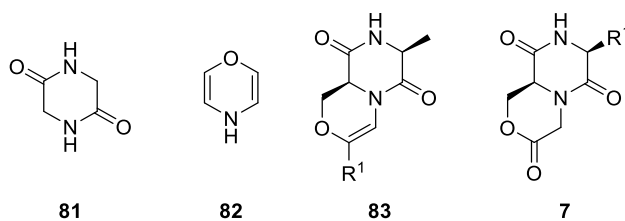


Podminky: (i) 2-merkptoethanol, DBU, DMF, 1 h, rt; (ii) Bn-NCS, bezvodý THF, 44 h, rt; (iii) (a) TFA, 80 °C, 20 h.

Schéma 13: Syntéza *N*-substituovaných imobilizovaných derivátů thiomocoviny.²

3.4.2 Syntéza disubstituovaných pyrazino-oxazinových derivátů

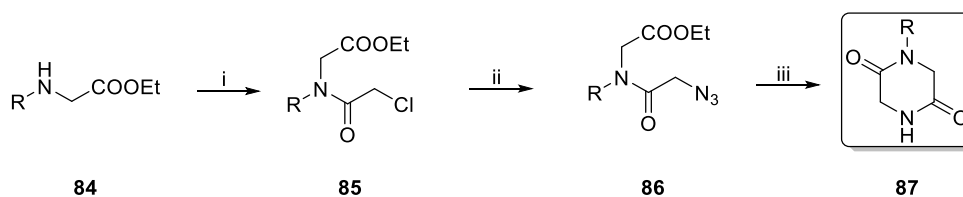
Specifická třída heterocyklů piperazin-2,5-dionů (diketopiperaziny) zastupuje bohatý zdroj biologicky zajímavých sloučenin vykazujících široké spektrum farmakologických aktivit, jako antivirové, antibakteriální, antimykotické, antitrombické či protinádorové (**Obrázek 18**).^{37,38}



Obrázek 18: Struktura piperazin-2,5-dionu **81**, 4*H*-1,4-oxazinu **82**, pyrazino-oxazinový derivát **83** a cílová struktura pyrazino-morfolin-2-on **7**.

Diketopiperaziny se obvykle syntetizují z dipeptidů v roztoku nebo na pevné fázi za následné derivatizace a cyklizace při různých podmínkách.^{39–44} Dále také mohou být syntetizovány pomocí Aza Wittigovy³⁷ (Schéma 14) nebo Ugiho⁴⁵(Schéma 15) reakce.

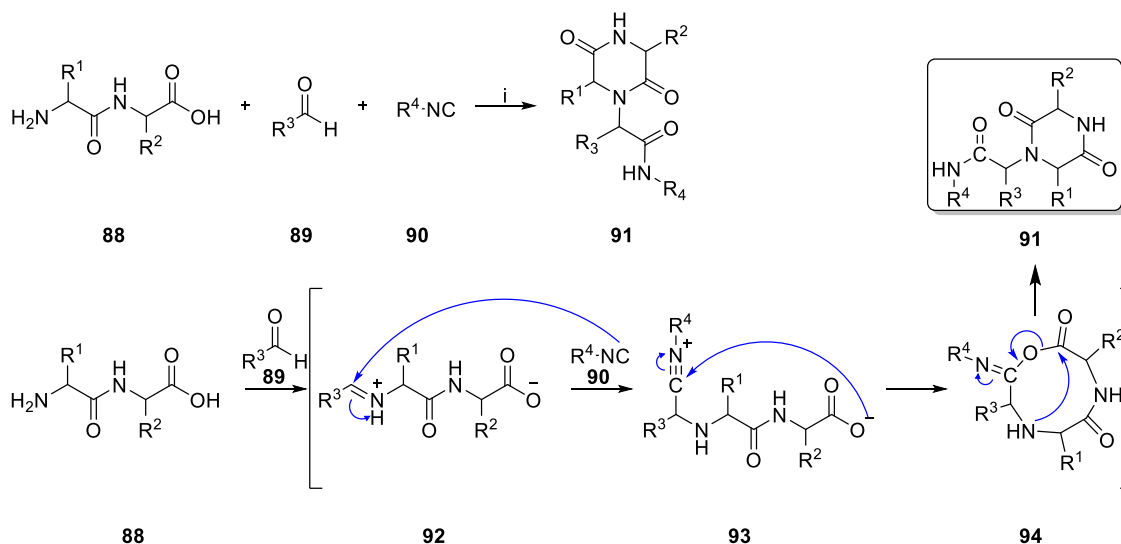
U Aza Wittigovy reakce se vycházelo z aminoesterů **84**. Prvním krokem byla acylace chloroacetyl chlorem za tvorby derivátu **85**, následně tvorba azidu **86** pomocí azidu sodného, který podléhá Aza Wittigově reakci s PPh₃ za tvorby finálního substituovaného piperazin-2,5-dionu **87**.³⁷



Podmínky: (i) chloroacetyl chlorid, K₂CO₃, DCM/H₂O, rt; (ii) NaN₃, DMF, 90 °C; (iii) PPh₃, THF, rt.

Schéma 14: Syntéza diketopiperazinů pomocí Aza Wittigovy reakce.³⁷

U Ugiho multikomponentní reakce v prvním kroku reaguje primární aminoskupina derivátu **88** s aldehydem **89** za tvorby iminu **92**. Isokyanid **90** reaguje s tímto iminem za tvorby derivátu **93**, který podléhá intramolekulární cyklizaci a přesmyku na finální látku **91**.⁴⁵

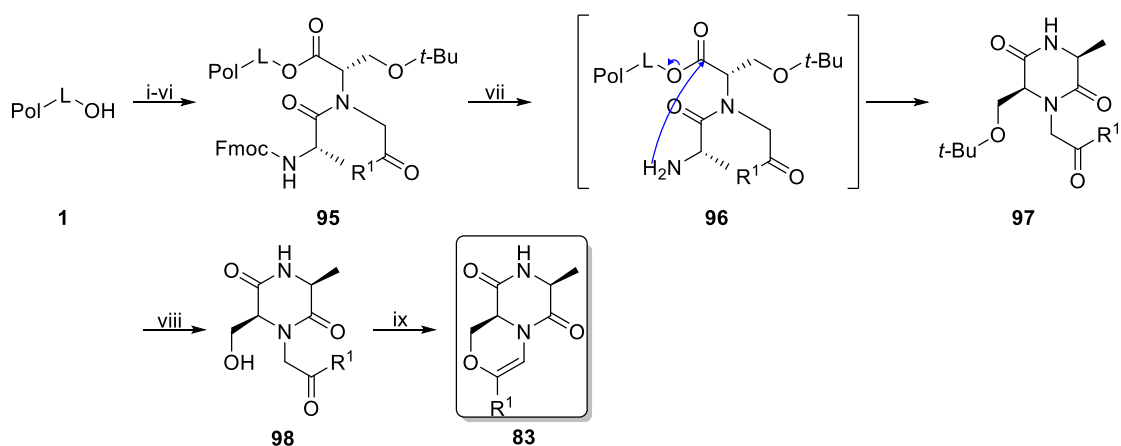


Podmínky: (i) CF₃CH₂OH, 40 h, -40°C – rt.

Schéma 15: Syntéza diketopiperazinů pomocí Ugiho tříkomponentní reakce.⁴⁵

I přesto, že je v literatuře velké množství záznamů o syntéze piperazin-2,5-dionů fúzovaných s dalšími heterocyklickými sloučeninami, pouze malý prostor byl věnován přípravě pyrazino[2,1-*c*][1,4]oxazinů.⁴

Pro syntézu pyrazino[2,1-*c*][1,4]oxazinů bylo možno využít novou relativně jednoduchou metodu syntézy, která byla založena na imobilizované Fmoc-Ser(*t*Bu)-OH na Wangově pryskyřici **1**. Za následné deprotektce Fmoc – protektivní skupiny, sulfonace 4-nitrobenzensulfonyl chloridem, alkylace variabilními 2-bromoketony, denosylace 4-Nos skupiny a acylace pomocí Fmoc-Ala-OH vznikl derivát **95**, který byl podroben deprotektci Fmoc protektivní skupiny pomocí piperidinu v DMF. To vedlo ke spontánnímu cyklickému štěpení z pryskyřice a formaci diketopiperazinu **97**. Štěpení *t*Bu protektivní skupiny bylo provedeno pomocí TFA/DCM (1:1) za získání derivátu **98**. Trifluoroctová kyselina poskytla finální pyrazino[2,1-*c*][1,4]oxazin-6,9-dion **83** až po zahřátí v acetonitrilu (**Schéma 16**).⁴



Podmínky: (i) Fmor-Ser(*t*Bu)-OH, HOBT, DIC, DMAP, DMF/DCM (1:1), 24 h, rt; (ii) piperidin/DMF (1:1), 30 min, rt; (iii) 4-NosCl, 2,6-lutidin, DCM, 24 h, rt; (iv) 2-bromoketon, DIPEA, DMF, 24 h, rt; (v) 2-merkptoethanol, DBU, DMF, 1 h, rt; (vi) Fmoc-Ala-OH, HOBT, DIC, DMAP, DMF/DCM(1:1), 24 h, rt; (vii) piperidin/DMF(1:1), 30 min, rt, poté lyofilizace; (viii) TFA/DCM (1:1), 30 min, rt, poté vysušit dusíkem; (ix) MeCN, 5, 80 °C, poté vysušit dusíkem.

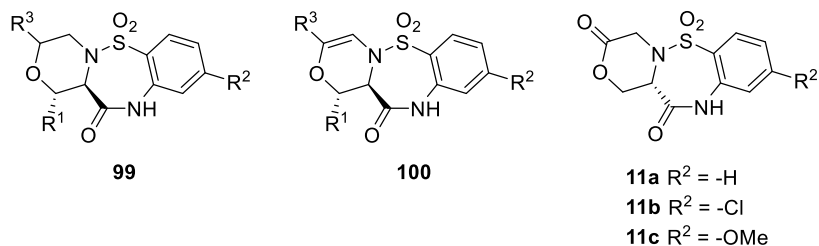
Schéma 16: Syntéza fúzovaných pyrazino-oxazinů.⁴

3.4.3 Stereoselektivní syntéza benzoxazino[4,3-*b*][1,2,5]thiadiazepinon 6,6-dioxidů

Sloučeniny obsahující benzensulfonamidový skelet patří do skupiny nejintenzivněji studovaných organických sloučenin síry.⁴⁶ Mnoho sloučenin nesoucích tento skelet má aplikaci v medicíně, zejména jako silná antidepresiva,⁴⁷ protinádorová,^{48–50} antivirová,⁵¹ antimikrobiální činidla, sloučeniny s antileishmaniální a antimalarickou aktivitou.^{52,53}

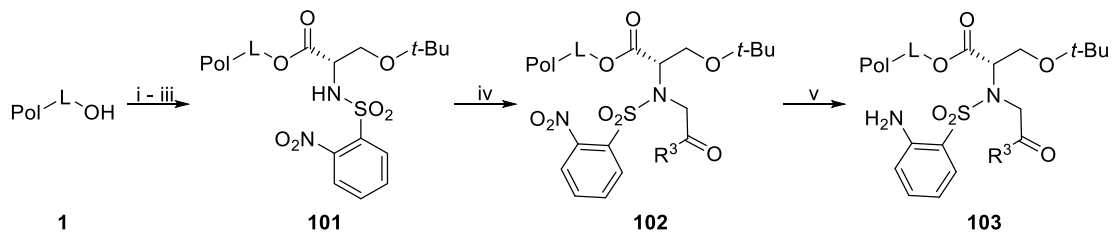
2/4-nitrobenzensulfonyl chloridy jsou efektivní výchozí materiály pro přípravu těchto farmakologicky slibných heterocyklů. Za poslední desetiletí tyto látky získaly značnou pozornost.^{54,55}

Například byly využity při syntéze [7 + 6] fúzovaných heterocyklů obsahujících benzodiazepinový skelet, které mají zajímavé fyzikálně-chemické a biologické vlastnosti (**Obrázek 19**).^{7,54}



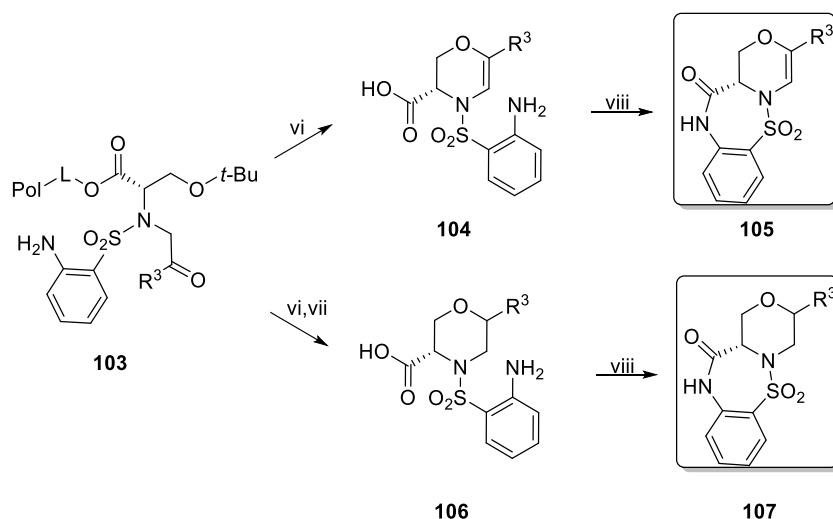
Obrázek 19: Struktura benzo-oxazino-thiadiazepinonů **99**, **100** a cílových derivátů **11a**, **11b** a **11c**.

Níže je popsána syntetická cesta k fúzovaným heterocyklům morfolino-benzo-thiadiazepinů pomocí syntézy na pevné fázi. První reakcí byla imobilizace Fmoc-Ser(*t*Bu)-OH na Wangův linker **1**, následovala deprotektce Fmoc-protektivní skupiny a sulfonace 2-nitrobenzensulfonyl chloridem za vzniku benzensulfonamidu **101**. Dalším krokem byla alkylace variabilními bromoketony, což poskytlo *N*-alkyl 2-nitrobenzen sulfonamid **102**, který byl podroben redukcí na linkeru za tvorby derivátu **103**. Odštěpením z Wangova linkeru byl získán derivát derivátu **104**. Finální cyklizace vedoucí k derivátu **105** proběhla v 1,2-dichlorethanu (DCE) za přítomnosti *p*-toluensulfonové kyseliny. Přidání TES do štěpícího koktejlu vedlo k nasycenému derivátu **106**, který po cyklizaci poskytl nenasycený finální produkt heterocyklu morfolino- benzothia-diazepinu **107** (**Schéma 17** a **18**).⁷



Podmínky: (i) Fmoc-Ser(*t*Bu)-OH, HOBt, DIC, DMAP, DMF/DCM(1:1), 24 h, rt; (ii) piperidin/DMF (1:1), 30 min, rt; (iii) 2-NosCl, 2,6-lutidin, DCM, 24 h, rt.; (iv) R^3COCH_2Br , DIPEA, DMF, 24 h, rt; (v) $Na_2S_2O_4$, K_2CO_3 , TBAHS, DCM/ H_2O (1:1), 2,5 h, rt.

Schéma 17: Syntéza intermediátu pro syntézu benzoxazino[4,3-*b*][1,2,5]thiadiazepinon 6,6-dioxidů.⁷

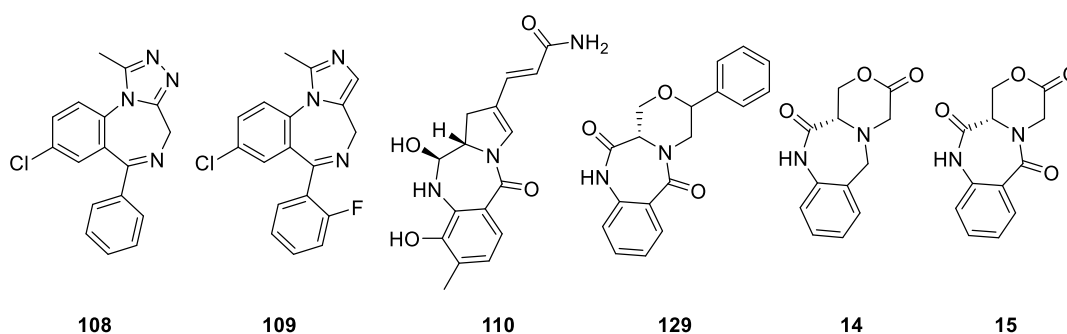


Podmínky: (vi) TFA/DCM, 3 h, rt; (vii) TFA/DCM, TES, 1 h, rt; (viii) *p*TSA, DCE, 5,5h, 90 °C.

Schéma 18: Syntéza trisubstituovaných benzoxazino[4,3-*b*][1,2,5]thiadiazepinon 6,6-dioxidů.⁷

3.4.4 Stereoselektivní syntéza tricyklických benzo-oxazino-diazepinů

Syntetické benzo[1,4]diazepiny jsou velmi zajímavé molekuly s účinkem především na centrální nervový systém.⁵⁶ Benzodiazepiny (**Obrázek 20**) momentálně patří mezi nejvíce předepisovaná léčiva na světě, a to hlavně díky jejich dalším vlastnostem antiarytmickým,⁵⁷ protinádorovým, protizánětlivým,^{58,59} antiepileptickým, hypnotickým, opioidním⁶⁰ a sedativním.⁶¹ Dále také inhibují HIV-1 reverzní transkriptázu.⁶²



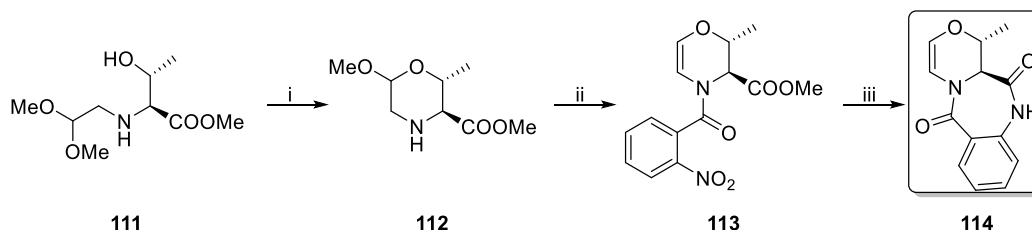
Obrázek 20: Přehled vybraných benzodiazepinů – Alprazolam (triazolobenzodiazepinon) **108**; Midazolam (imidazolobenzodiazepinon) **109**; Anthramycin (pyrrolobenzodiazepin) **110**; derivátu **129** a cílových struktur **14** a **15**.

Na trh byly zavedeny před více než 50 lety a stále jsou benzodiazepiny považovány za nejbezpečnější a nejúčinnější anxiolytická hypnotika. Přestože jednotlivé deriváty mají velmi podobnou strukturu, mají tato léčiva odlišné farmakologické a metabolické vlastnosti. Biotransformovány jsou především různými izomery cytochromu P450.⁶¹

Benzodiazepiny s fúzovanými heterocykly (tricyklické benzodiazepiny) byly popsány jako vysoce účinné ligandy pro různé molekulární cíle. Uvedme anxiolytické triazolobenzodiazepiny⁶¹ a imidazolobenzodiazepiny⁶³ či protinádorové pyrrolobenzodiazepiny.⁶⁴ Dále jako antagonisté receptoru pro vazopresin byly popsány oxazinobenzodiazepiny, thiazinobenzodiazepiny⁶⁵ a pyrazinobenzodiazepiny⁶⁶ nebo jako antagonisté dopaminového D2 receptoru thiazolobenzodiazepiny.⁶⁷ Z těchto důvodů jsou tricyklické benzodiazepiny řazeny mezi velmi zajímavé heterocyklické sloučeniny z hlediska medicínální chemie.⁵

Jejich syntéza velmi často začíná z běžně dostupných α -amino kyselin, které po acylaci *o*-nitrobenzoovými kyselinami, redukcí nitroskupiny a finální cyklizaci poskytnou benzodiazepinový skelet.⁵

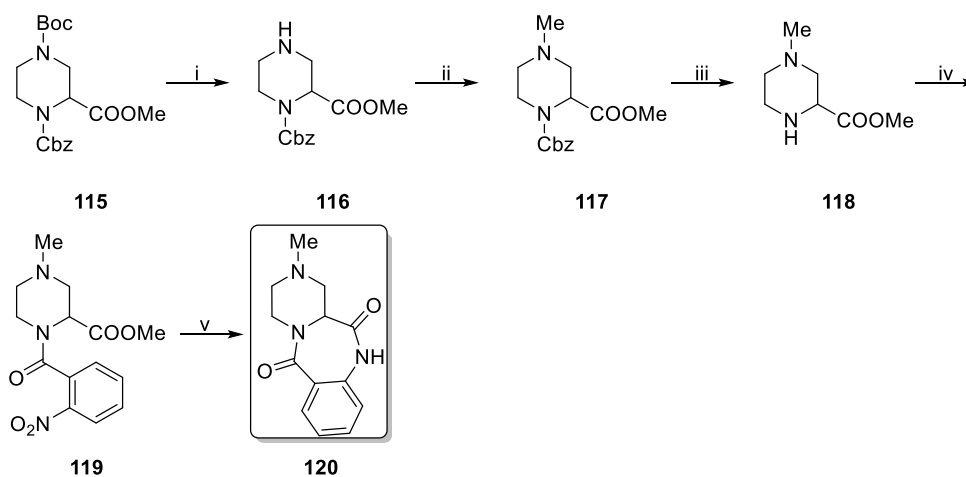
První syntetická cesta (**Schéma 19**) vycházela z derivátu threoninu **111**, který byl cyklizován v kyselých podmínkách za tvorby morfolinového skeletu **112**. Morfolinový derivát byl poté podroben *N*-acylaci 2-nitrobenzoyl chloridem za tvorby derivátu **113**. Během katalytické redukce nitroskupiny na aminoskupinu došlo zároveň i k cyklizaci za vzniku finálního tricyklického benzo-oxazino-diazepin-2,5-dionu **114**.⁶⁸



Podmínky: (i) *p*TSA, toluen, reflux; (ii) 2-nitrobenzoyl chlorid, TEA, CH₂Cl₂, 18 h, rt; (iii) 10% Pd/C, MeOH, NH₄COOH, 18 h, rt.

Schéma 19: Syntéza tricyklických benzo-oxazino-diazepindionů.⁶⁸

Druhá syntetická cesta (**Schéma 20**) vycházela z chráněného piperazinu **115**. V prvním kroku docházelo ke kyselé deprotekcí Boc- skupiny pomocí TFA za získání derivátu **116**, který byl podroben reduktivní aminaci pomocí formaldehydu na *N*-methylovaný derivát **117**. Dále proběhla deprotekcí benzylní skupiny pomocí H₂ a Pd/C za tvorby **118**. Následná acylace 2-nitrobenzoyl chloridem za přítomnosti báze poskytla derivát **119**, který byl podroben one-pot transformací - redukcí nitroskupiny pomocí Fe v kyselině octové a následné kyselé katalyzované cyklizaci na laktam **120**.⁶⁹

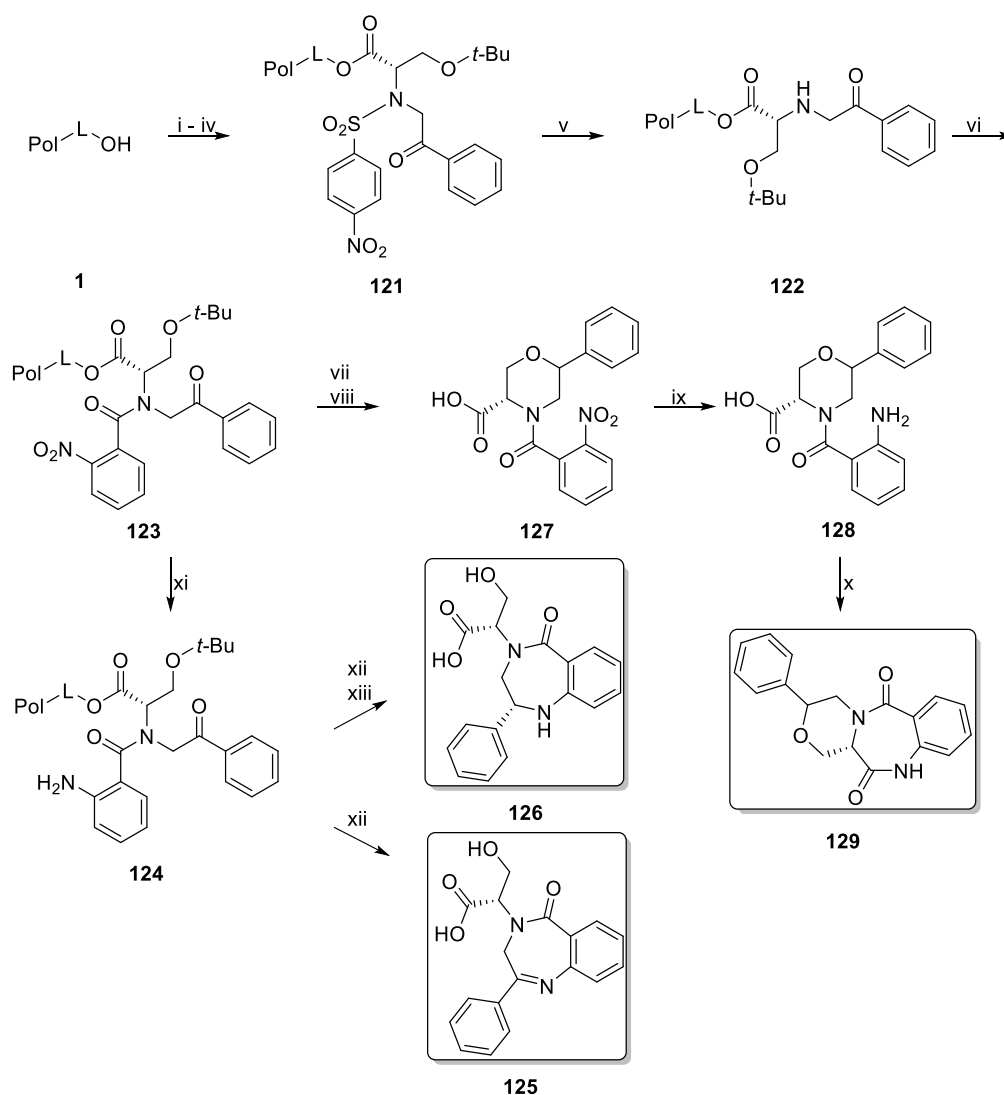


Podmínky: (i) TFA/DCM (1:1), 3 h, rt; (ii) DCE, 37% HCHO, NaB(OAc)₃H; 48 h, rt; (iii) ethanol, HCl, 10% Pd/C, H₂, 24 h, rt; (iv) TEA, 2-nitrobenzoyl chlorid, DCM, 18 h, rt; (v) ledová CH₃COOH, Fe, 4-6 h, 110 °C.

Schéma 20: Syntéza tricyklických benzo-pyrazino-diazepindionů.⁶⁹

Další metoda přípravy těchto benzo-oxazino-diazepindionů využívá syntézu na pevné fázi. Jako první byl imobilizován Fmoc-Ser(*t*Bu)-OH na Wangovu pryskyřici **1**, následovalo odštěpení Fmoc protektivní skupiny, sulfonace 4-nitrobenzensulfonyl chloridem a alkylace 2-bromoacetofenonem, což vedlo k *N*-alkyl 4-nitrobenzen sulfonamidu **121**. Po denosylaci byl derivát **122** acylován pomocí 2-nitrobenzoové kyseliny za tvorby derivátu **123**. Tento derivát byl podroben odštěpení pomocí štěpícího koktejlu za následného přidání TES a následné katalytické redukci za tvorby derivátu **128**. Finální cyklizace na derivát **129** byla provedena pomocí 10% TFA v DCM při 50 °C (**Schéma 21**).⁵

Derivát **123** byl také podroben redukci na pryskyřici pomocí dithioničitanu sodného za tvorby derivátu **124**. Zajímavostí je, že následná cyklizace vedla k odštěpení z polymerního nosiče za vzniku benzo[*e*][1,4]diazepin-5-onu **125**. Přidání TES do štěpícího koktejlu vedlo k tvorbě nasyceného derivátu **126**.⁵

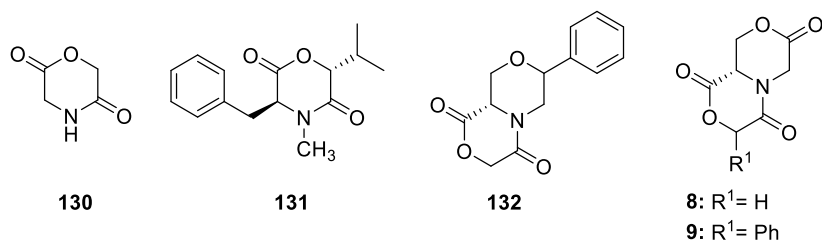


Podmínky: (i) Fmoc-Ser(*t*Bu)-OH, HOBt, DMAP, DIC, DMF, DCM, 24 h, rt; (ii) 50% piperidin/DMF, 30 min, rt; (iii) 4-NosCl, 2,6-lutidin, DCM, 24 h, rt; (iv) bromoacetofenon, DIPEA, DMF, 24 h, rt; (v) 2-merkptoethanol, DBU, deg. DMF, 1.5 h, rt; (vi) 2-nitrobenzoová kyselina, DIC, deg. DMF, 66 h, rt; (vii) 50% TFA/DCM, 22 h, rt; (viii) TFA/DCM/TES, 2 h, rt; (ix) H₂, 10% Pd/C, propan-2-ol, 4 h; (x) 10% TFA/DCM, 41 h, 50 °C; (xi) Na₂S₂O₄, K₂CO₃, TBAHS, 2 h, rt; (xii) 50% TFA/DCM, 3 h, rt; (xiii) TFA/DCM/TES, 3 h, rt.

Schéma 21: Syntéza benzo-oxazino-diazepindionů pomocí syntézy na pevné fázi.⁵

3.4.5 Příprava diketomorfolinů

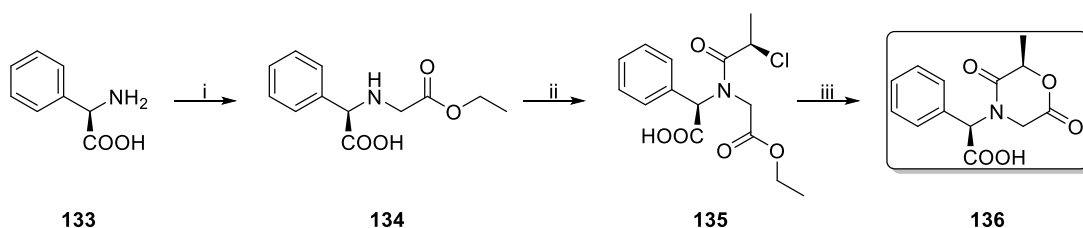
Diketomorfoliny (**Obrázek 21**) reprezentují zajímavou skupinu biologicky aktivních heterocyklů. Jsou součástí přírodních i syntetických derivátů, ale v menším zastoupení než izosterní diketopiperaziny zmíněné v kapitole **3.4.3**. Diketomorfoliny mohou být izolovány z různých přírodních zdrojů.



Obrázek 21: Struktura diketomorfolinu **130**, Lateritinu **131**, derivátu **132** a cílových derivátů **8** a **9**.

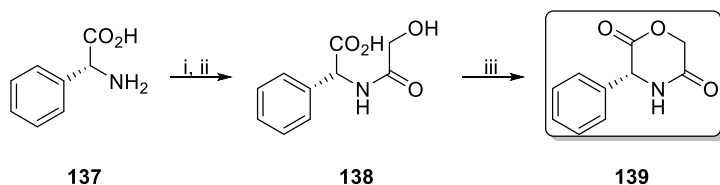
V minulosti byly diketomorfoliny popsány jako účinné ligandy různých biomolekulárních cílů. Jako příklad je možné uvést inhibitory trombinu; proléčivo Levodopa - prekurzor dopaminu, který proniká do mozku a je dekarboxylován na dopamin působící jako antiparkinsonikum;⁷⁰ inhibitor acetylkoenzymu A; Lateritin - inhibitor cholesterové absorpce;⁷¹ inhibitor α -glukosidázy pro léčbu Diabetes mellitus typu 2;⁷² inhibitor xantinoxidázy (enzym účastnící se katabolismu purinů);⁷³ inhibitor agregace červených krvinek Bassiatin⁷⁴ a také látky způsobující apoptózu lidských buněk leukémie (HL-60).⁷⁵

Syntéza diketomorfolinů byla popsána pomocí tradiční roztokové syntézy, přičemž nejvhodnější strategií byly acylace α -halogenkarboxylovými⁷⁶ (**Schéma 22**) nebo α -hydroxykarboxylovými⁷⁷ (**Schéma 23**) kyselinami za kyselých či bazických podmínek.



Podmínky: (i) $\text{BrCH}_2\text{COOC}_2\text{H}_5$, TEA, CH_2Cl_2 , 0°C – rt, 24 h, poté HCl; (ii) aceton, $\text{CH}_3\text{CHClCOCl}$, 3 h, poté HCl; (iii) $\text{NaOH}/\text{H}_2\text{O}$, rt, 1h, poté HCl.

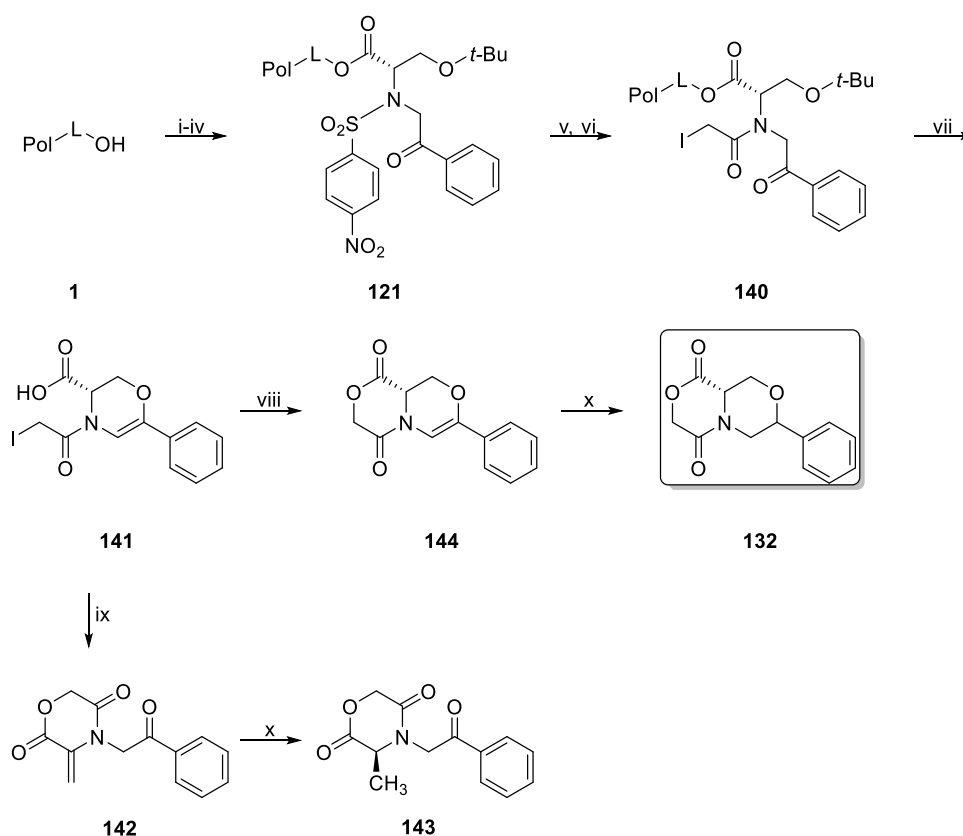
Schéma 22: Syntéza diketomorfolinů pomocí α -halogenkarboxylových kyselin.⁷⁶



Podmínky: (i) $\text{CH}_3\text{CO}_2\text{CH}_2\text{COCl}$, NaOH (1 eq), dioxan, 2 h, rt; (ii) HCl; (iii) $\text{CH}_3\text{SO}_3\text{H}$, MeCN/PhH (6/1), $\text{CH}_3\text{CH}_2\text{COCl}$, 48 h, reflux.

Schéma 23: Syntéza diketomorfolinů pomocí α -hydroxykarboxylových kyselin.⁷⁷

Níže je popsána syntéza diketomorfolinů na pevné fázi. Na Wangovu pryskyřici **1** byl imobilizován Fmoc-Ser(*t*Bu)-OH, následovalo odštěpení Fmoc protektivní skupiny, sulfonylace pomocí 4-nitrobenzensulfonyl chloridu a alkylace 2-bromoacetofenonem za tvorby intermediátu **121**. Dále následovala denosylace 4-Nos skupiny a acylace pomocí jód octové kyseliny na derivát **140**. Tento derivát byl následně odštěpen z polymerního nosiče na derivát **141**, který byl cyklizován pomocí DIPEA v DMSO. Po pouhých 20 minutách byla kvantitativně pozorována tvorba oxazino[3,4-*c*][1,4]oxazindionu **144**, přičemž delší působení báze (20 h) vedlo kvantitativně k 3-methylidenmorfolin-2,5-dionu **142**. Deriváty **142** a **144** byly následně redukovány pomocí TES v TFA na příslušné nasycené deriváty **143** a **132** (Schéma 24).⁸

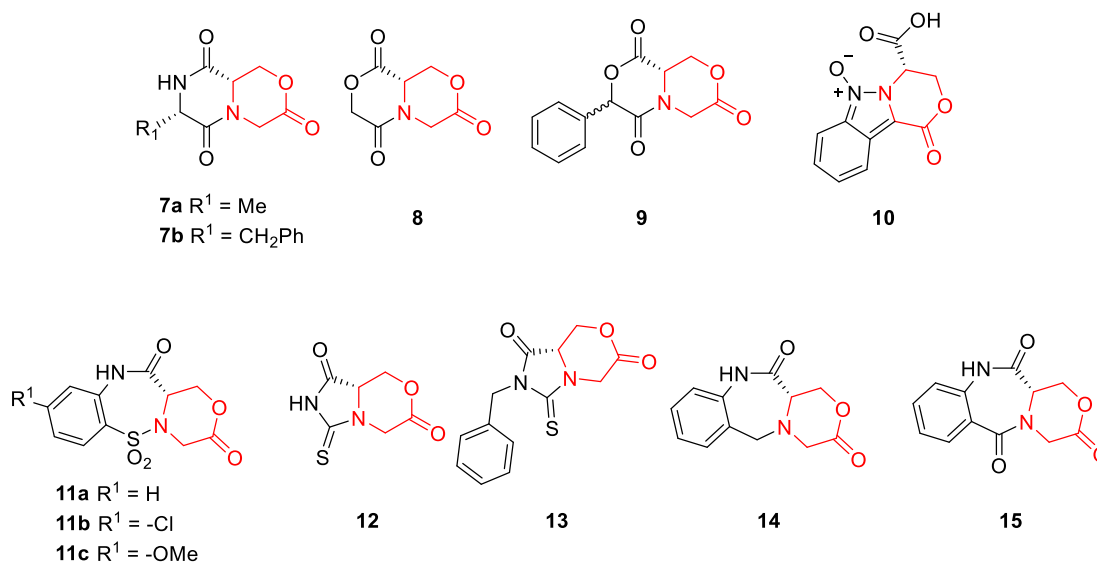


Podmínky: (i) Fmoc-Ser(*t*Bu)-OH, HOBT, DMAP, DIC, DMF, DCM, 24 h, rt; (ii) 50% piperidin/DMF, 30 min, rt; (iii) 4-NosCl, 2,6-lutidin, DCM, 24 h, rt; (iv) bromoacetofenon, DIPEA, DMF, 24 h, rt; (v) 2-merkptoethanol, DBU, deg. DMF, 30min, rt; (vi) 2-jód octová kyselina, DIC, DCM, 30 min, a poté přidat k pryskyřici, 24 h, rt; (vii) 50% TFA/DCM, 3 h, rt; (viii) DIPEA, DMSO, 20 min, rt; (ix) DIPEA, DMSO, 20 h, rt; (x) TFA/TES/DCM (10:3:10), 24, rt.

Schéma 24: Syntéza diketomorfolinů na pevné fázi.⁸

4 Cíle práce

Cílem této diplomové práce byla optimalizace nově navržené syntetické cesty vedoucí k fúzovaným derivátům morfolin-2-onu (**Obrázek 22**) s využitím syntézy na pevné fázi za Wangovy pryskyřice jako polymerního nosiče. Navržená cesta vychází z komerčně dostupných výchozích látek Fmoc-Ser(*t*Bu)-OH, substituovaných 2-nitrobenzensulfonyl chloridů či 4-nitrobenzensulfonyl chloridu a *tert*-butylbromoacetátu.



Obrázek 22: Struktury cílových derivátů.

Prvním cílem byla příprava klíčového intermediátu, který slouží jako prekurzor všech cílových derivátů uvedených na **Obrázku 22**. Po optimalizaci syntézy tohoto intermediátu může být následně otestována jeho reaktivita při dalších transformacích.

Syntéza látek **7** až **15** (kromě derivátu **10**) tématicky navazuje na předchozí výzkum.¹⁻⁸ Cílem bylo prozkoumat, zda již popsané syntetické metody (vedoucí k fúzovaným morfolinovým derivátům s použitím bromoketonů jako alkylačních činidel) lze aplikovat i pro přípravu fúzovaných morfolin-2-onů, s použitím vhodného bromoacetátu pro alkylaci.

Syntéza derivátu **10** byla zahrnuta kvůli otestování reaktivity intermediátu při C-arylaci.⁷⁸

Připravené deriváty mohou být následně podrobeny testování biologické aktivity (např. antimikrobiální či cytotoxické).

5 Výsledky a diskuze

V této kapitole bude shrnuta syntéza alkylovaných intermediátů, optimalizace reakcí a využití intermediátů pro následující transformace na cílové deriváty.

5.1 Příprava a využití alkylovaných intermediátů

5.1.1 Syntéza alkylovaných intermediátů

Jako první bylo nutné připravit klíčový intermediát, ze kterého vycházejí následné chemické transformace pomocí variabilních reaktantů vedoucí k cílovým fúzovaným heterocyklům nesoucí morfolin-2-on ve svém skeletu. Pro syntézu tohoto intermediátu byla vybrána chráněná aminokyselina Fmoc-Ser(*t*Bu)-OH, Wangův linker a různě substituované *o/p*-nitrobenzensulfonyl chloridy.

Navržená syntetická cesta ke klíčovému intermediátu využívá metodu syntézy na pevné fázi a skládá ze čtyř reakčních kroků. Prvním krokem je imobilizace Fmoc-Ser(*t*Bu)-OH na Wangovu pryskyřici. Druhým krokem je bazicky katalyzovaná deprotektce Fmoc protektivní skupiny derivátu. Třetím krokem je nosylace substituovanými i nesubstituovanými *o/p*-nitrobenzensulfonyl chloridy. Posledním krokem je alkylace sulfonamidu **4** *t*Bu-bromoacetátem (**Schéma 25**).

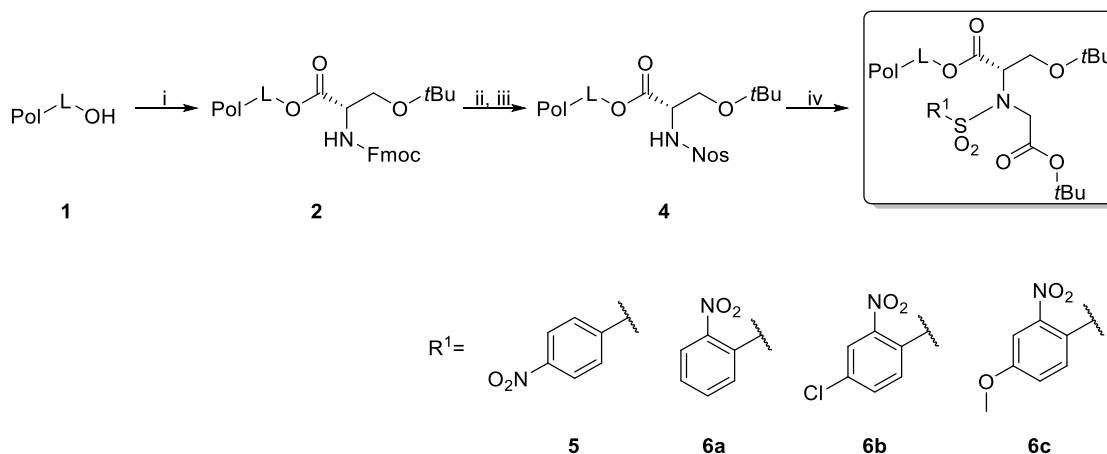


Schéma 25: Příprava klíčových intermediátů **5**, **6a**, **6b** a **6c**.

Imobilizace Fmoc-Ser(*t*Bu)-OH, deprotektce i následná nosylace probíhaly bez jakýchkoli problémů. Loading se pohyboval v rozmezí 0,4 – 0,7 mmol/g pryskyřice. Kvantitativní průběh nosylace byl ověřen pomocí acylace s Fmoc-OSu.

Alkylace bromoacetáty musela být optimalizována a u preparativního měřítka v některých případech opakována v závislosti na množství pryskyřice.

Jelikož alkylace *tert*-butylbromoacetátem nejprve neprobíhala kvantitativně a bylo ji nutné opakovat, byla otestována i alkylace méně objemným ethylbromoacetátem. Nicméně i při dvouhodinovém štěpení v TFA/DCM (1:1) tohoto derivátu z pryskyřice docházelo pouze k částečné deprotekcí a konverze na žádaný morfolin-2-on tak probíhala pouze z 50%. Proto nebyla alkylace ethylbromoacetátem dále používána a bylo přistoupeno k opakované alkylaci *tert*-butylbromoacetátem, kdy morfolin-2-on vznikal po působení štěpicího koktejlu kvantitativně. Optimalizace alkylační reakce shrnuje **tabulka 1**. Čistota po optimalizaci dosahovala více než 95 % dle UPLC-MS analýz. Reakční čas alkylace byl 18 h.

Tabulka 1: Optimalizace alkylačních podmínek.

amino kyselina	alkylační činidlo	Cacetát [M]	báze	Cbáze [M]	rozpouštědlo	T [°C]	surová čistota [%]*
Serin	<i>t</i> -butylbromoacetát	0,2	DIPEA	0,2	DMF	rt	58
Serin	ethylbromoacetát	0,2	DIPEA	0,2	DMF	rt	80 ^a
Serin	<i>t</i> -butylbromoacetát	0,2	DIPEA	0,2	DMF	70	85
Serin	ethylbromoacetát	0,2	DIPEA	0,2	DMF	70	89 ^a
Serin	<i>t</i> -butylbromoacetát	0,5	TEA	1	DMF	rt	75
Serin	ethylbromoacetát	0,5	TEA	1	DMF	rt	64 ^a
Serin	<i>t</i> -butylbromoacetát	0,5	DBU	1	DMF	rt	5
Serin	ethylbromoacetát	0,5	DBU	1	DMF	rt	4 ^a
Serin	<i>t</i> -butylbromoacetát	0,5	DIPEA	1	NMP	rt	82
Serin	ethylbromoacetát	0,5	DIPEA	1	NMP	rt	87 ^a
Serin	<i>t</i>-butylbromoacetát	0,5	DIPEA	1	DMSO	rt	99
Serin	ethylbromoacetát	0,5	DIPEA	1	DMSO	rt	99^a
Serin	<i>t</i>-butylbromoacetát	0,5	DIPEA	1	DMF	rt	99
Serin	ethylbromoacetát	0,5	DIPEA	1	DMF	rt	99^a

*Dle UPLC-MS; ^asurová čistota alkylace pryskyřice (součet ploch píků odpovídajících lineárnímu derivátu s ethyl esterovou skupinou a zacyklenému derivátu morfolin-2-onu)

Aminokyseliny Fmoc-Thr(*t*Bu)-OH a Fmoc-Cys(Trt)-OH byly původně zařazeny z důvodu možné další diverzifikace finálních derivátů. Imobilizace i následná nosylace u těchto zvolených aminokyselin probíhala bez problémů. Byly vyzkoušeny optimalizované podmínky využívané pro alkylace imobilizovaného serinu, avšak alkylace u threoninu a cysteinu neprobíhala kvantitativně.

Alkylace imobilizovaného derivátu threoninu probíhaly, avšak konverze na alkylovaný derivát byla velmi nízká. Byl vyzkoušen jak ethyl, tak *tert*-butylbromoacetát, nejspíše však kvůli sterickému bránění methylovou skupinou nedocházelo ke kvantitativní alkylaci. Výchozí látka byla přítomná ze 70 – 90 %. Alkylační reakce u derivátů threoninu shrnuje **tabulka 2**.

Tabulka 2: Optimalizace alkylace threoninové pryskyřice.

amino kyselina	alkylační činidlo	acetát [M]	báze	cbáze [M]	rozpouštědlo	čas [h]	T [°C]	surová čistota [%]*
Threonin	<i>t</i> -butyl bromoacetát	0,5	DIPEA	1	DMSO	18	rt	15
Threonin	ethylbromoacetát	0,5	DIPEA	1	DMSO	18	rt	27 ^a
Threonin	<i>t</i> -butyl bromoacetát	0,5	DIPEA	1	DMF	18	rt	7
Threonin	ethylbromoacetát	0,5	DIPEA	1	DMF	18	rt	18 ^a

^aDle UPLC-MS; ^asurová čistota alkylace pryskyřice (součet ploch píků odpovídajících lineárnímu derivátu s ethyl esterovou skupinou a zacyklenému derivátu morfolin-2-onu)

Alkylace imobilizovaného derivátu cysteinu probíhala s nízkou čistotou a s tvorbou vedlejších produktů. Výchozí látka nebyla přítomná. Alkylační reakce u derivátů cysteinu shrnuje **tabulka 3**.

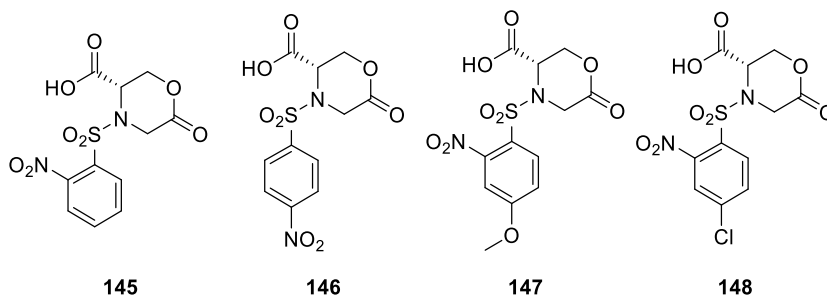
Tabulka 3: Optimalizace alkylace cysteinové pryskyřice.

amino kyselina	alkylační činidlo	acetát [M]	báze	C _{báze} [M]	rozpouštědlo	čas [h]	T [°C]	surová čistota [%]*
Cystein	<i>t</i> -butyl bromoacetát	0,5	DIPEA	1	DMSO	18	rt	12
Cystein	<i>t</i> -butyl bromoacetát	0,5	DIPEA	1	DMF	18	rt	15

*Dle UPLC-MS.

Vzhledem k tomu, že se nepodařilo u těchto dvou aminokyselin připravit žádaný alkylovaný intermediát v dostatečné čistotě, byly vyřazeny a pokračovalo se pouze se serinovou pryskyřicí, kde bylo možné připravit žádaný intermediát s vysokou čistotou i v preparativním množství při použití 500 mg pryskyřice.

Byly připraveny celkem čtyři klíčové intermediáty **145**, **146**, **147** a **148** (Obrázek 23) Tyto intermediáty byly připraveny v <95% čistotě opakovanou alkylací při optimalizovaných podmínkách alkylace uvedených v **tabulce 1**, a následným odštěpením z pryskyřice pomocí TFA/DCM (50 %) po dobu 2 h.

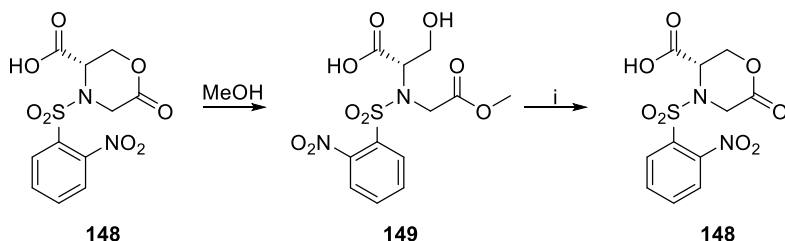
**Obrázek 23** Struktury připravených klíčových intermediátů.

Byly provedeny pokusy o čištění těchto látek, avšak samotné čištění bylo velice problematické kvůli nestabilitě morfolin-2-onového kruhu v prostředí vody či alkoholů – došlo k jeho otevření.

I po lyofylizaci zůstalo v látce značné množství DMF (dle ¹H NMR), které bylo potřeba odstranit. Kvůli problematické stabilitě morfolin-2-onového kruhu bylo tyto látky možné čistit pouze pomocí sloupcové chromatografie, jelikož při použití semipreparativní HPLC docházelo k otevření tohoto kruhu vlivem nutnosti použití vody v mobilní fázi.

Dalším problematickým parametrem byla vysoká polarita těchto látek – čištění vyžadovalo polární mobilní fázi. Jediná mobilní fáze, ve které měl produkt vhodný

retenční faktor a nedocházelo k rozmytí, byla 15% MeOH/DCM s přidavkem 1% AcOH. Bohužel, během separace derivátu **145** na silikagelovém sloupci došlo opět k otevření morfolin-2-onu a k tvorbě methylesteru **149**. Byla vyzkoušena zpětná cyklizace u derivátu **149** v DCE za přidání katalytického množství *p*TSA, kdy ke zpětné cyklizaci docházelo po 6 h při 85°C (**Schéma 26**).



Podmínky: (i) *p*TSA v DCE, 6 h, 85°C.

Schéma 26: Otevření laktonového kruhu v prostředí alkoholu a zpětná cyklizace.

U derivátu **146** byla vyzkoušena kyselá extrakce pro zbavení se DMF za použití 10% HCl v DCM. Extrakce byla provedena 3x. Následně byla provedena UPLC-MS analýza, přičemž bylo zjištěno, že nedošlo k otevření laktonového kruhu vlivem vody v 10% HCl, avšak DMF nebylo zcela odstraněno.

Struktura klíčových intermediátů **145**, **146**, **147** a **148** byla potvrzena pomocí 1D NMR a HRMS experimentů. Reziduální DMF se podařilo čištěním sloupcovou chromatografií odstranit, avšak došlo k otevření laktonového kruhu. Kyselá extrakce reziduální DMF zcela neodstranila. Naměřená 1D NMR spektra tudíž obsahují reziduální množství DMF, které ale nepřekrývá signály látek a nekomplikuje interpretaci dat. Protože se jednalo pouze o syntetické intermediáty a nikoliv finální látky, nebyla dokonalé purifikaci věnována další pozornost.

5.1.2 Využití alkylovaných intermediátů pro další transformace

V případě derivátů **6a** (*N*-(2-(*tert*-butoxy)-2-oxoethyl)-*O*-(*tert*-butyl)-*N*-((2-nitrofenyl)sulfonyl)serin) odvozeného od 2-nosylchloridu lze využít dva přístupy syntézy cílového derivátu, přičemž oba využívají stejné typy reakcí, ale liší se jejich pořadím. V prvním přístupu je prvním krokem redukce nitroskupiny na pevné fázi na derivát **150**, následovaná kyselým štěpením vedoucím k deprotekcí *t*Bu na derivát **151** a následném uzavření obou kruhů. Ve druhém přístupu je nejprve derivát odštěpen z polymerního nosiče, *t*Bu se odštěpí a dojde k uzavření morfolin-2-onu **145**, který je následně podroben redukci v roztoku a finální cyklizaci vedoucí k uzavření druhého kruhu (**Schéma 27**).

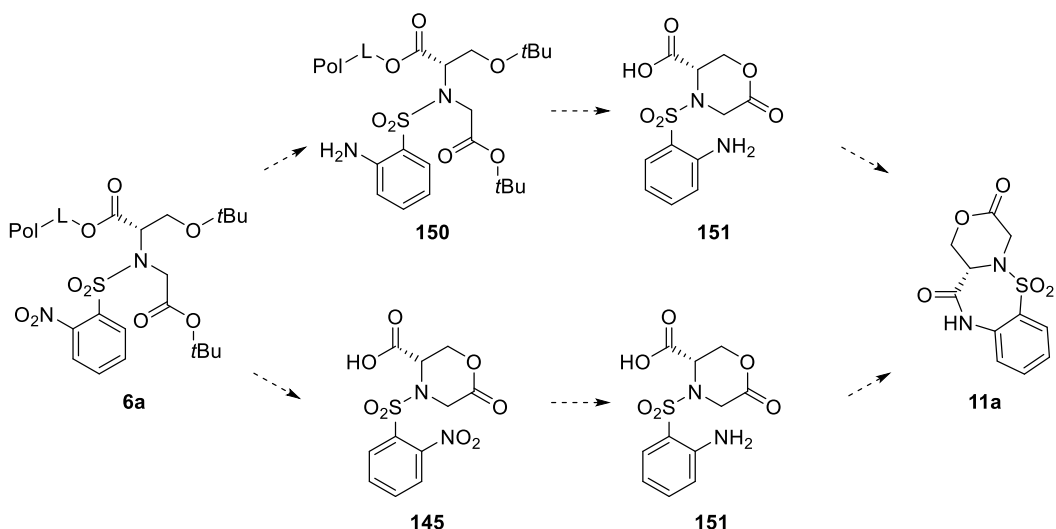


Schéma 27: Využití alkylovaného imobilizovaného derivátu 6a.

V případě derivátu 5 (*N*-(2-(*tert*-butoxy)-2-oxoethyl)-*O*-(*tert*-butyl)-*N*-((4-nitrofenyl)sulfonyl)serin) odvozeného od 4-nosylchloridu bylo využito pouze denosylace a následně divergentně orientované syntézy s různými reagenty pro dosažení cílových fúzovaných heterocyklů (Schéma 28).

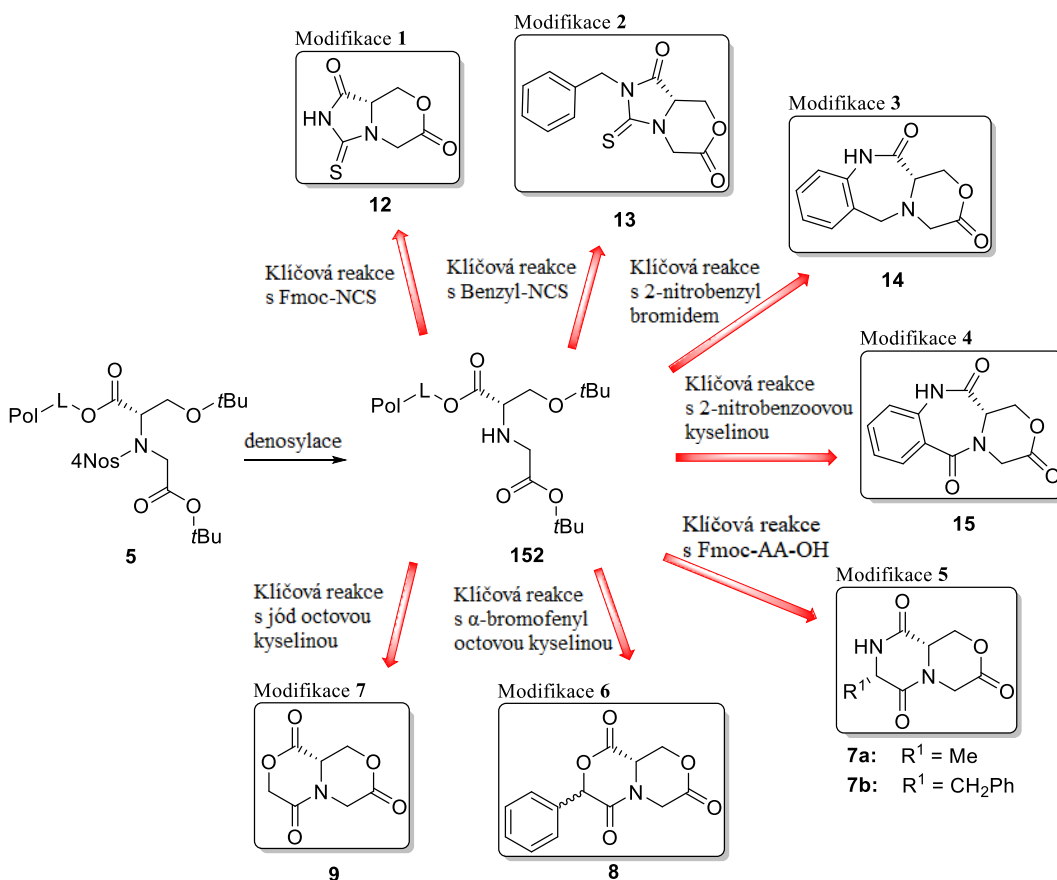
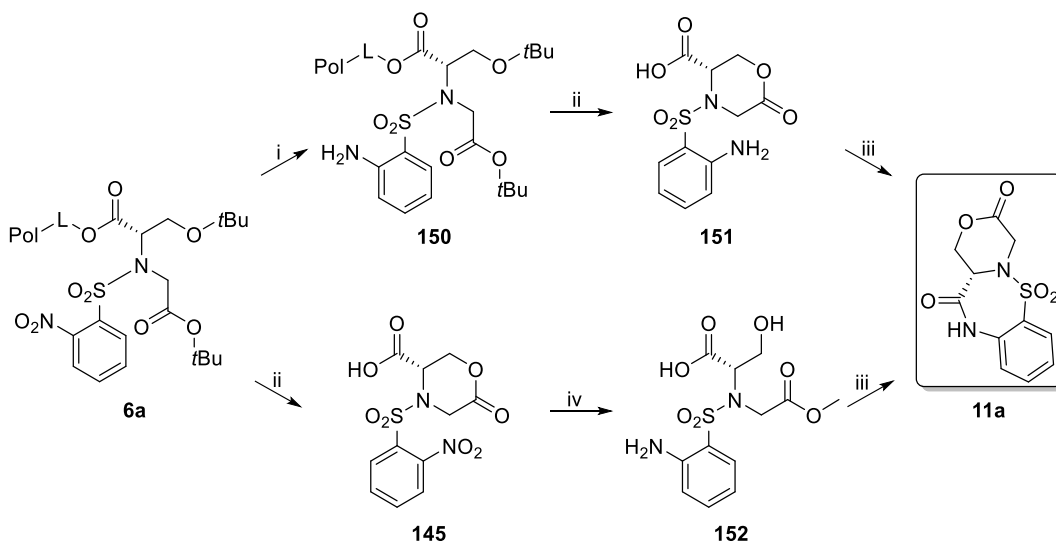


Schéma 28: Navržené transformace alkylovaného derivátu 5.

V následujících kapitolách jsou detailně popsány jednotlivé varianty a jejich modifikace vedoucí k cílovým derivátům 7 až 15.

5.2 Syntéza dihydrobenzo-oxazino-thiadiazepindioxidu **11a**

Syntéza dihydrobenzo-oxazino-thiadiazepindioxidů zahrnovala postup založený na redukci a následné cyklizaci nitro skupiny na připraveném klíčovém intermediátu **6a**. Byly studovány dvě cesty redukce nitro skupiny na amino skupinu (**Schéma 29**).



Podmínky: (i) $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, K_2CO_3 , TBAHS, DCM/ H_2O (1:1), 18 h, rt; (ii) TFA/DCM (1:1) 2 h, rt; (iii) *p*TSA, DCE, 18 h, 85°C; (iv) MeOH, 10% Pd/C, H_2 , 2 h, rt.

Schéma 29: Reakce vedoucí k 1,12a-dihydro-6*H*-benzo[*e*][1,4]oxazino[4,3-*a*][1,4]diazepin-3,6,12 (4*H*,11*H*)-trionu **11a**.

Nejprve byla vyzkoušena redukce intermediátu **6a** na pryskyřici pomocí $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$. Reakce probíhala, avšak derivát **150** byl získán pouze s 61% konverzí. Z pryskyřice byl následně redukován derivát **150** štěpen za přidání štěpícího koktejlu TFA/DCM (1:1) za získání derivátu **151**. Redukci na pryskyřici shrnuje **tabulka 4**.

Tabulka 4: Optimalizace redukce nitro skupiny na pryskyřici.

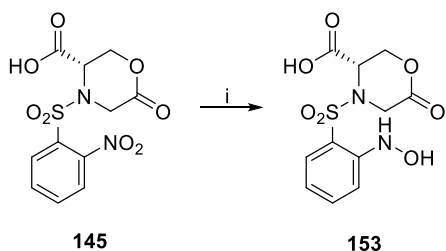
pryskyřice [mg]	redukční podmínky	rozpuštědlo	čas [h]	surová čistota [%]*
50	$\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$, K_2CO_3 , TBAHS	DCM/ H_2O (1:1)	18	70
250	$\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$, K_2CO_3 , TBAHS	DCM/ H_2O (1:1)	18	61

*Dle UPLC-MS

Při přidání čisté TFA k derivátu **151** i po 4 hodinách nedošlo k cyklizaci na derivát **11a**.

Následně byla vyzkoušena redukce v roztoku po odštěpení derivátu **6a** z pryskyřice. Redukce za atmosférického tlaku byla provedena pomocí H_2 a katalyzátoru

Pd/C v různých rozpouštědlech (**tabulka 5**). Při atmosférickém tlaku docházelo k částečné redukci nitro skupiny na hydroxylamin **153** (**Schéma 30**), ale kvantitativní redukce nebylo dosaženo.



Podmínky: (i) H₂, Pd/C, ethylacetát, 60 h, rt

Schéma 30: Částečná redukce nitroskupiny na hydroxylamin.

Redukce byla proto otestována v autoklávu za různých podmínek. Úplné redukce bylo dosaženo pomocí H₂ a Pd/C (35 mol.%) v MeOH nebo THF při tlaku 3,5 bar. Při použití rozpouštědla MeOH redukce probíhala již po 2 hodinách, ale docházelo k otevření laktonového kruhu vlivem reesterifikace karboxylové kyseliny methanolem za vzniku methylesteru **152**. Při dalším kroku (kyselá cyklizace) však docházelo k opětovnému uzavření laktonového kruhu a tvorbě žádaného finálního produktu **11a**. Optimalizaci katalytické redukce v roztoku shrnuje **tabulka 5**.

Tabulka 5: Optimalizace redukce nitro skupiny intermediátu **6a** v roztoku.

	katalyzátor	mol%	rozpuštědlo	tlak [bar]	čas [h]	surová čistota [%]*	hydroxylamin [%]*
H ₂	Pd/C 10%	35	THF	1	120	0	9
H ₂	Pd/C 10%	35	Ethylacetát	1	60	52	18
H ₂	Pd/C 10%	35	MeOH	1	24	45	31
H ₂	Pd/C 10%	35	Ethylacetát	3,5	18	25	31
H₂	Pd/C 10%	35	THF	3,5	18	99	0
H₂	Pd/C 10%	35	MeOH	3,5	2	99	0

*Dle UPLC-MS

Finální cyklizace na derivát **11a** probíhala v DCE za přídavku katalytického množství *p*TSA po dobu 6 hodin při teplotě 85°C. Surová HPLC čistota produktu byla 48%, přítomny byly další neidentifikovatelné produkty.

Čištění finálního derivátu **11a** se však ukázalo být velice problematické. Jako první bylo vyzkoušeno čištění pomocí semipreparativní HPLC, avšak vlivem mobilní fáze obsahující octanový pufr nejpravděpodobněji docházelo k částečné hydrolyze laktonového kruhu u produktu a tvorbě derivátu **154**, který byl detekován pomocí HPLC-MS (**Schéma 31**). Čistě teoreticky mohlo dojít i k otevření kruhu za vzniku isomerní látky **151** s identickou molekulovou hmotností, ale tento scénář není příliš pravděpodobný.

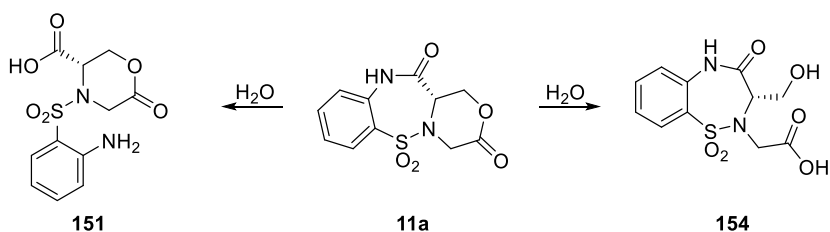
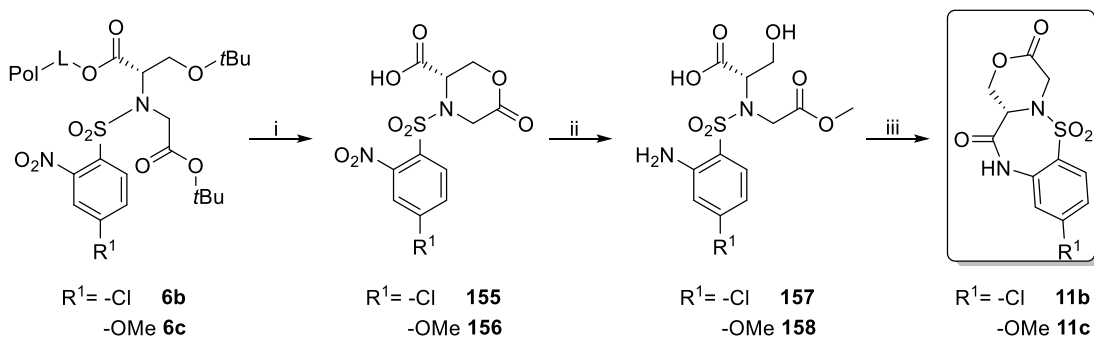


Schéma 31: Možnosti hydratace a otevření cyklu vlivem vodné mobilní fáze na semipreparativním HPLC.

Čištění bylo tedy provedeno pomocí sloupcové chromatografie se zvolením mobilní fáze EtOAc/*n*-hexan 2:1. Struktura vyizolovaného produktu **11a** byla potvrzena pomocí 1D, 2D NMR experimentů a HRMS.

Dále byla vyzkoušena redukce nitroskupiny v poloze 2 s další substitucí na benzenovém jádře v poloze 4. Jako substituenty byly vybrány komerčně dostupné deriváty nesoucí -Cl a -OMe (**Schéma 32**)



Podmínky: (i) TFA/DCM (1:1), 2 h, rt; (ii) MeOH, Pd/C nebo PtO₂, H₂, 18 h, rt; (iii) pTSA, DCE, 18 h, 85°C.

Schéma 32: Redukce a následná cyklizace substituovaných derivátů **6b** a **6c**.

Katalytická hydrogenace substituovaných derivátů probíhala obdobným způsobem jako u nesubstituovaného analogu. Nejprve došlo k odštěpení z pryskyřice pomocí TFA/DCM (1:1) a následně vysušení proudem dusíku. Dále byl odštěpený intermediát rozpuštěn v degasovaném methanolu, do kterého bylo přidáno Pd/C, v případě derivátu obsahujícího chlór bylo přidáno PtO₂ (odlišný katalyzátor byl zvolen

z toho důvodu, že při použití Pd/C by mohlo dojít k hydrogenaci C-Cl vazby). Nejprve byla vyzkoušena hydrogenace za atmosférického tlaku. V tomto případě k redukcí docházelo po 6 h u chlór derivátu pouze ze 40 % a u methoxy derivátu z 37 %. Z tohoto důvodu bylo přistoupeno k redukcí v autoklávu při tlaku 5 barů. Ke kvantitativní redukcí došlo již po 3 hodinách. Optimalizaci katalytické redukce shrnuje **tabulka 6**.

Tabulka 6: Optimalizace redukce nitro skupiny intermediátu **152** a **153** v roztoku.

R ¹	čínidlo	katalyzátor	poměr	rozpuštědlo	tlak [bar]	čas [h]	surová čistota [%]*
-Cl	H ₂	PtO ₂	1 ekvivalent	MeOH	1	6	40
-OMe	H ₂	Pd/C 10%	35 mmol %	MeOH	1	6	37
-OMe	H ₂	Pd/C 10%	45 mmol %	MeOH	1	6	62
-Cl	H ₂	PtO ₂	1 ekvivalent	MeOH	5	4	40
-Cl	H₂	PtO₂	2 ekvivalenty	MeOH	5	3	99
-OMe	H₂	Pd/C 10%	45 mmol %	MeOH	5	3	99

*Dle UPLC-MS.

Finální cyklizace redukovaných intermediátů byla nejprve vyzkoušena v TFA/DCM (1:1) za laboratorní teploty po dobu 18 h. Následně byla cyklizace provedena i v čisté TFA při teplotě 50°C po dobu 18 h. V obou případech nedocházelo k cyklizaci a tvorbě finálních derivátů **11b** a **11c**. Při cyklizaci v DCE při 85°C za přidání katalytického množství *p*TSA došlo k finální cyklizaci a tvorbě derivátu **11c** obsahující methoxy skupinu po 18 h. V případě derivátu **11b** obsahující chlor musel být reakční čas prodloužen na 30 h. V obou případech docházelo k tvorbě derivátů **11b** a **11c** v čistotě přibližně 50 %, zbytek směsi tvořily neidentifikovatelné produkty. Optimalizace cyklizace substituovaných derivátů shrnuje **tabulka 7**.

Tabulka 7: Optimalizace cyklizace intermediátů **6b** a **6c** na **11b** a **11c** v roztoku.

substituent	katalýza	rozpuštědlo	teplota [°C]	čas [h]	surová čistota [%]*
-Cl	-	TFA/DCM (1:1)	rt	18	0
-Cl	-	čistá TFA	50	18	0
-Cl	<i>p</i>TSA	DCE	85	30	47
-OMe	-	TFA/DCM (1:1)	rt	18	0
-OMe	-	čistá TFA	50	18	0
-OMe	<i>p</i>TSA	DCE	85	18	52

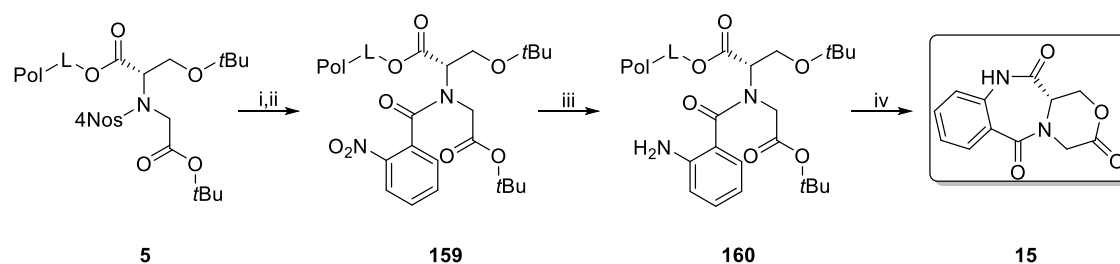
*Dle UPLC-MS.

Derivát **11b** byl čištěn pomocí sloupcové chromatografie za zvolení mobilní fáze EtOAc / *n*-hexan 1:1. Derivát **11c** byl čištěn pomocí sloupcové chromatografie za zvolení mobilní fáze EtOAc / *n*-hexan 2:1. Struktury vyizolovaných derivátů **11b** a **11c** byly plně charakterizovány 1D NMR experimenty a HRMS.

5.3 Syntéza dihydrobenzo-oxazino-diazepintrionu **15**

Byla navržena syntetická cesta vycházející z klíčového intermediátu **5**, vedoucí k tricyklickým benzodiazepinům. Příbuzné benzodiazepiny s fúzovanými heterocykly byly popsány jako vysoce účinné ligandy pro různé molekulární cíle (kapitola **3.4.4**).

Navržená syntetická cesta vedoucí k derivátu **15** vycházela z klíčového intermediátu **5** (Schéma 33).



Podmínky: (i) 2-merkaptoethanol, DBU, DMF, 1 h, rt; (ii) 2-nitrobenzoová kyselina, DIC, suché DCM, 18 h, rt; nebo 2-nitrobenzoyl chlorid, DIPEA, DMF, 18 h, rt; (iii) Na₂S₂O₄·2H₂O, K₂CO₃, TBAHS, DCM/H₂O (1:1), 18 h, rt; (iv) TFA/DCM, 2 h, rt.

Schéma 33: Reakce vedoucí k 1,12a-dihydro-6*H*-benzo[*e*][1,4]oxazino[4,3-*a*][1,4]diazepin-3,6,12 (4*H*,11*H*)-trionu **15**.

Tento intermediát byl podroben denosylaci 4-nitrobenzensulfonylu pomocí standardního denosylačního postupu využívajícího 2-merkptoethanol a DBU v DMF. Následná acylace s 2-nitrobenzoovou kyselinou a DIC poskytovala požadovaný produkt **159** v konverzi pouze 20 %. Po vyměnění rozpouštědla za suché DCM reakce s 2-nitrobenzoovou kyselinou probíhala lépe a produkt **159** vznikal v 87 % čistotě (dle UPLC-MS). Ověření, zda došlo k odreagování veškeré výchozí látky bylo provedeno pomocí reakce s Fmoc-Osu a následné UPLC-MS analýzy. Provedené experimenty shrnují **tabulky 8 a 9**.

Tabulka 8: Optimalizace reakce s 2-nitrobenzoovou kyselinou.

pryskyřice [mg]	reagent	další podmínky	rozpouštědlo	čas [h]	teplota [°C]	surová čistota [%]*
50	2-nitrobenzoová kyselina	DIC, DCM	deg. DMF	18	rt	20
50	2-nitrobenzoová kyselina	DIC, DCM	suché DCM	24	rt	90
500	2-nitrobenzoová kyselina	DIC, DCM	suché DCM	24	rt	87

*Dle UPLC-MS.

Paralelně z důvodů původně malé konverze (20 %) byla otestována i tvorba 2-nitrobenzoyl chloridu. Konverze reakce 2-nitrobenzoové kyseliny na acyl chlorid byla analyzována nepřímo pomocí benzylaminu. Vzorek z reakční směsi byl každých 30 minut odebrán. K tomuto vzorku byl přidán benzylamin. Následovala analýza pomocí UPLC-MS. Při nedokonalé konverzi byla ve spektru pozorována výchozí kyselina a příslušný amid. Při 100% konverzi byl přítomen pouze příslušný amid. Testované postupy přípravy 2-nitrobenzensulfonyl chloridu shrnuje **tabulka 9**.

Tabulka 9: Optimalizace chlorace 2-nitrobenzoové kyseliny.

pokus	chlorační čínidlo	teplota [°C]	čas [h]	rozpouštědlo	katalýza	surová čistota[%]*
1	SOCl ₂	76	4	-	-	22
2	SOCl ₂	76	4	-	DMF	89
3	(COCl) ₂	rt	1	DCM	DMF	69

*Dle UPLC-MS

Následně byla vyzkoušena reakce s denosylovaným substrátem, přičemž byl otestován čerstvě připravený i komerčně dostupný 2-nitrobenzoyl chlorid za kombinace různých rozpouštědel a bází. Reakce s 2-nitrobenzoyl chloridem a DIPEA v suchém DMF probíhala s čistotou 58 %. Provedené experimenty s 2-nitrobenzoyl chloridem shrnuje **tabulka 10**.

Tabulka 10: Optimalizace acylace s 2-nitrobenzoyl chloridem.

pryskyřice [mg]	reagent	báze	poměr	rozpuštědlo	čas [h]	teplota [°C]	surová čistota [%]*
50	2-nitrobenzoyl chlorid	DIPEA	1:1	deg. DMF	18	rt	23
300	2-nitrobenzoyl chlorid	DIPEA	1:2	deg. DMF	18	rt	44
50	2-nitrobenzoyl chlorid	pyridin	1:2	suché DCM	24	rt	55
50	2-nitrobenzoyl chlorid	pyridin	1:2	suché DMF	24	rt	54
300	2-nitrobenzoyl chlorid	DIPEA	1:2	suché DMF	24	rt	58

*Dle UPLC-MS.

Další reakcí acylovaného derivátu **159** byla redukce na pryskyřici pomocí $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$. Redukce byla vyzkoušena na derivátu připraveném pomocí 2-nitrobenzoové kyseliny (90% čistota) i pomocí 2-nitrobenzoyl chloridu (58% čistota). V obou případech redukce probíhala za získání derivátu **160**. V případě použití výchozí látky získané acylací 2-nitrobenzoovou kyselinou (90 % čistota) byl redukován derivát získán v 65 % čistotě. V případě redukce derivátu připraveného acylací 2-nitrobenzoyl chloridem (58 % čistota) byl získán derivát v 22 % čistotě viz. **tabulka 11**.

Tabulka 11: Redukce imobilizovaného derivátu **156** na **157**.

pryskyřice [mg]	redukční podmínky	rozpuštědla	čas [h]	surová čistota [%]*
50	$\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$, K_2CO_3, TBAHS	DCM/H_2O (1:1)	18	70^a
500	$\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$, K_2CO_3, TBAHS	DCM/H_2O (1:1)	18	65^a
300	$\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$, K_2CO_3 , TBAHS	DCM/ H_2O (1:1)	18	22 ^b

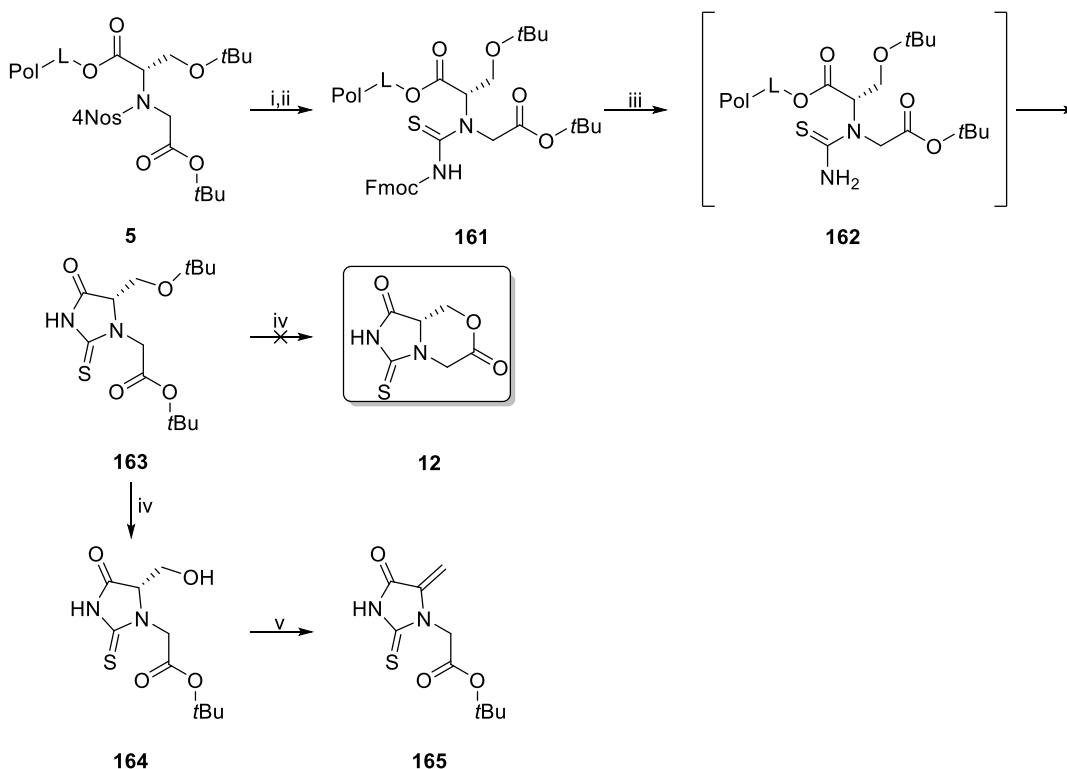
*Dle UPLC-MS; ^ačistota redukováného derivátu připraveného z 2-nitrobenzoové kyseliny; ^bčistota redukováného derivátu připraveného z 2-nitrobenzoyl chloridu.

Následné odštěpení z pryskyřice ve štěpícím koktejlu TFA/DCM (1:1) po dobu 3 h vedlo ke spontánní intramolekulární cyklizaci a tvorbě derivátu **15** v 65 % čistotě.

Čištění vzniklého derivátu **15** bylo problematické z důvodu omezeného výběru složení mobilní fáze kvůli možnosti otevření kruhu v prostředí alkoholu či vody. Byla tedy zvolena mobilní fáze EtOAc / *n*-hexan 17:1. Struktura vyizolovaného derivátu **15** byla potvrzena 1D NMR experimenty a HRMS.

5.4 Syntéza 3-thioxotetrahydro-imidazo-oxazindionu **12**

Byla navržena syntetická cesta vedoucí k derivátu **12** (Schéma 34), nesoucí 2-thiohydantoin fúzovaný s morfolin-2-onem. Látky obsahující motiv 2-thiohydantoinu jsou přítomny jak v syntetických tak v přírodních látkách a mají rozsáhlou biologickou aktivitu (kapitola 3.4.1).^{32–35}



Podmínky: (i) 2-merkptoethanol, DBU, DMF, 1.5 h, rt; (ii) Fmoc-NCS, THF, 2 h, rt; (iii) 35% piperidin/DMF; (iv) 10 % TFA/DCM (1:1), 30 min, rt; (v) 10 % TFA/DCM (1:1), 80 min, rt.

Schéma 34: Reakce vedoucí k 3-thioxotetrahydro-1H-imidazo[5,1-c][1,4]oxazin-1,6(5H)-dionu **12**.

Navržená syntetická cesta vycházela z klíčového intermediátu **5**, který byl denosylován. Následně byl tento derivát ponechán reagovat s připraveným Fmoc-NCS. Fmoc-NCS byl připraven z Fmoc-Cl a KSCN v čistotě 80% (dle UPLC-MS).

Připravený Fmoc-NCS reagoval s denosylovanou pryskyřicí po dobu 2 h v suchém THF za tvorby derivátu **161**. Kvantitativní ověření konverze bylo provedeno pomocí reakce s Fmoc-Osu a následnou UPLC-MS analýzou. Dále proběhla deprotektce Fmoc protektivní skupiny pomocí piperidinu/DMF, která vedla k intramolekulární cyklizaci a odštěpení substrátu z pryskyřice za tvorby derivátu **163**. Byla vyzkoušena cyklizace surové směsi v TFA/DCM (50%), avšak cyklizace na cílový derivát **12** neproběhla. Pravděpodobně došlo k rozložení výchozí látky.

Bylo tedy přistoupeno nejprve k vyčištění derivátu **163**, abychom potvrdili jeho strukturu. Po deprotektci pomocí piperidinu byly v surovém produktu přítomny i Fmoc fragmenty 1-(9H-Fluoren-9-ylmethyl)piperidin a 9-methylen-9H-fluoren, které nebyly rozpustné v počáteční mobilní fázi pro čištění na semipreparativní HPLC a musely být odfiltrovány. Roztok obsahující derivát **163** zbavený většiny Fmoc fragmentů byl následně vyčištěn pomocí semipreparativní HPLC a plně charakterizován pomocí NMR a HRMS.

Cyklizace derivátu **163** na cílový derivát **12** byla vyzkoušena v 10% TFA/DCM a byla sledována pomocí UPLC-MS každých 10 minut. Již po 30 minutách bylo pozorováno odchránění hydroxy skupiny za vzniku derivátu **164**. Po 80 minutách byla pozorována látka odpovídající svou hmotou produktu dehydratace **165**. Vznik žádaného derivátu **12** nebyl vůbec pozorován. Byla tedy provedena snaha o izolaci obou meziproduktů reakce **164** a **165** – při navýšení množství výchozí látky se ale bohužel nepodařilo průběh reakce zreprodukovat a byla detekována pouze směs neidentifikovatelných produktů (obsahujících mj. i látky **164** a **165**, surová čistota směsi ale byla tak nízká, že se bohužel nepodařilo tyto produkty vyizolovat a potvrdit jejich strukturu pomocí NMR, jedná se tedy o navržené struktury na základě analýzy hmotnostní spektrometrií). Optimalizaci finální cyklizace shrnuje **tabulka 12**.

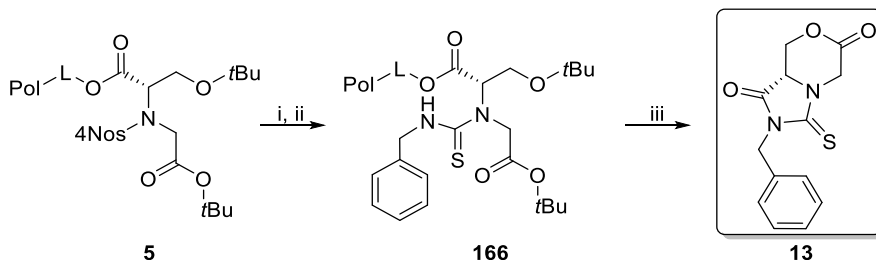
Tabulka 12: Optimalizace kyselé cyklizace derivátu 163 na derivát 12

Pokus	kyselina	čas [h]	surová čistota [%]*
1	TFA/DCM (50%)	2	0 ^a
2	TFA/DCM (10%)	3	27 ^b
3	TFA/DCM (10%)	18	15 ^b

*Dle UPLC-MS; ^arozložení výchozí látky; ^bprodukt dehydratace **165**

5.5 Syntéza 2-benzyl-thioxotetrahydro-imidazo-oxazindionu **13**

Byla také otestována příprava *N*-substituovaného derivátu 2-thiohydantoinu fúzovaného s morfolin-2-onem **13**. Jako modelový isokyanát byl zvolen benzyl-NCS (Schéma 35).



Podmínky:(i) 2-merkptoethanol, DBU, DMF, 1.5 h, rt; (ii) benzyl-NCS, suché THF, 44 h, rt;(iii) TFA, 2 h, rt.

Schéma 35: Reakce vedoucí k 2-benzyl-3-thioxotetrahydro-1*H*-imidazo[5,1-*c*][1,4]oxazin-1,6(5*H*)-dionu **13**.

Klíčový intermediát **5** byl denosylován a následně ponechán reagovat s benzyl-NCS po dobu 2 h. Bohužel nebyl detekován žádaný produkt. Reakční čas byl proto prodloužen na 18 h a následně na 44 h, kdy byl v LC-MS spektru detekován produkt s 31 % čistotou v analytickém měřítku. Analýza neposkytovala reprodukovatelné výsledky, chtěli jsme tedy vznikající produkt vyizolovat a přesvědčit se, že opravdu vzniká derivát **166**. Při přechodu do preparativního měřítka došlo ke snížení čistoty na 17 % a tvorbě vedlejších produktů. Z důvodu velmi nízké konverze i při navýšení času bylo od této syntetické cesty upuštěno, cílového derivátu **13** nebylo tedy dosaženo. Pokusy o optimalizaci reakce s benzyl-NCS shrnuje **tabulka 13**.

Tabulka 13: Optimalizace reakce s benzyl-NCS.

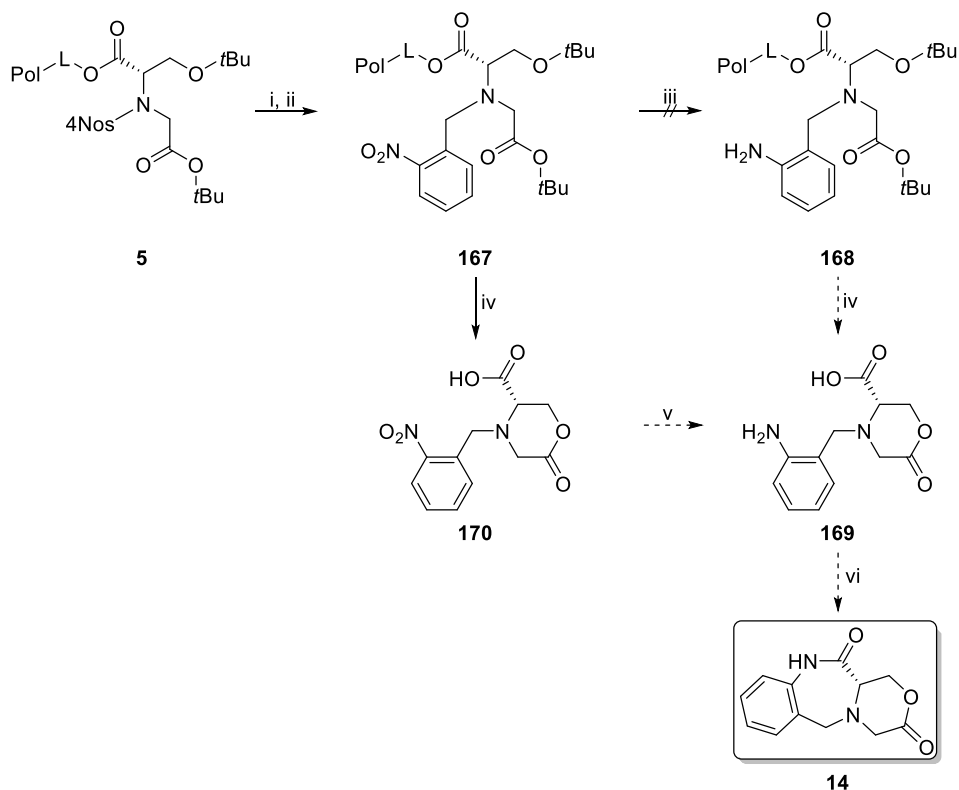
pryskyřice [mg]	reagent	čas [h]	Teplota [°C]	Čas štěpení [h]	Surová čistota [%]*
50	benzyl-NCS	2	rt	2	0
50	benzyl-NCS	18	rt	2	2
50	benzyl-NCS	44	rt	2	31
500	benzyl-NCS	44	rt	2	17

*Dle UPLC-MS

5.6 Syntéza benzo-oxazino-diazepindionu **14**

Další navrženou syntetickou byla cesta vedoucí k tricyklickému benzodiazepinu **14** nesoucím morfolin-2-on. Jak bylo shrnuto v kapitole **3.4.4**, tyto deriváty mají rozsáhlou biologickou aktivitu.

Vycházelo se z klíčového intermediátu **5**, který byl podroben denosylaci pomocí 2-merkptoethanolu a DBU. Následovala alkylace s 2-nitrobenzyl bromidem za tvorby derivátu **167**, který vznikal v 99 % čistotě. Kvantitativní průběh alkylace byl ověřen pomocí reakce s Fmoc-Osu a UPLC-MS analýzou.



Podmínky: (i) 2-merkptoethanol, DBU, DMF, 1.5h, rt; (ii) 2-nitrobenzyl bromid, DIPEA, DMF, 18 h, rt; (iii) $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, K_2CO_3 , TBAHS, DCM/ H_2O (1:1), 18 h, rt; (iv) TFA/DCM (1:1) 2 h, rt; (v) THF, H_2 , Pd/C, 6 h, rt (vi) TFA/DCM (1:1), 2h, rt.

Schéma 36: Reakce vedoucí k 1,6,11,12a-tetrahydro-12H-benzo[e][1,4]oxazino[4,3-a][1,4]diazepin - 3,12(4H)-dionu **14**.

Byla vyzkoušena redukce na pryskyřici derivátu **167** na derivát **168** pomocí $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, K_2CO_3 a TBAHS v DCM/ H_2O po dobu 18 h za následného štěpení pomocí TFA/DCM (1:1), avšak v tomto případě redukce vůbec neprobíhala a došlo pouze k rozložení výchozí látky.

Z důvodu rozkladu výchozí látky při redukci na pryskyřici se přistoupilo nejprve ke kyselému štěpení derivátu **167** z pryskyřice. Při štěpení pomocí TFA/DCM ani pomocí čisté TFA po dobu 2 h velmi překvapivě nedocházelo k odštěpení kyselých labilních protektivních skupin. Přidáním silnější kyseliny trifluormethansulfonové (TFMS) k TFA po dobu 2 h docházelo k tvorbě požadovaného produktu pouze v analytickém měřítku. V preparativním měřítku štěpení za přidání TFMS poskytovalo pouze částečné štěpení *tert*-butyl protektivních skupin a derivát **170** vznikal pouze v 30 % čistotě.

Bylo vyzkoušeno i prodloužení času štěpení v TFA/DCM (1:1), v čisté TFA a v TFA/TFMS z 2 h na 24 h, kdy ve všech případech docházelo ke kvantitativní tvorbě derivátu **170**. Při navýšení navážky pryskyřice na 1 g muselo být štěpení prodlouženo na 48 h. Nejlepší čistoty při štěpení bylo dosaženo v čisté TFA po 24 h. Optimalizace kyselého štěpení shrnuje **tabulka 14**.

Tabulka 14: Optimalizace štěpení derivátu **167** na derivát **170**.

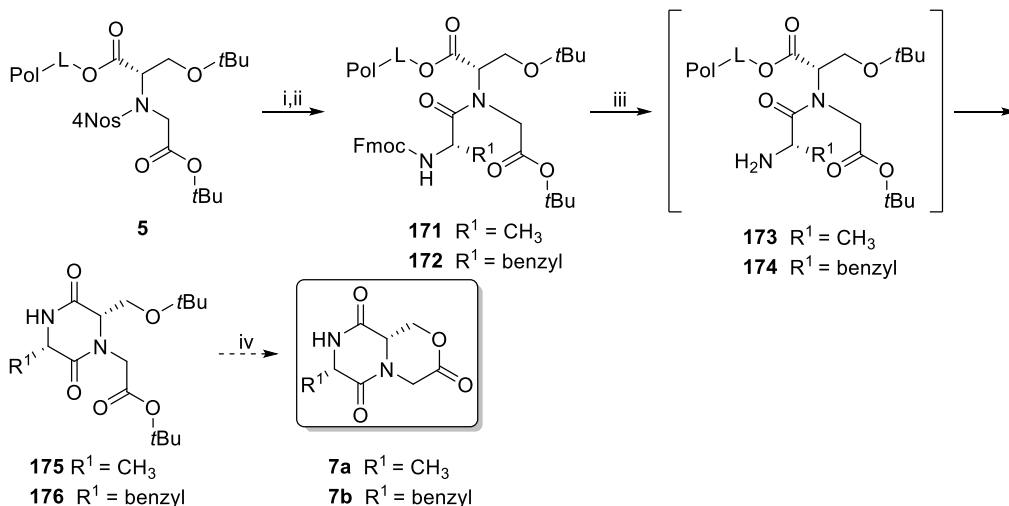
pryskyřice [mg]	kyselina	čas štěpení [h]	surová čistota [%]*
50	TFA/ DCM (1:1)	2	12
50	TFA	2	18
50	TFA/TFMS	2	30
50	TFA	18	99
100	TFA/TFMS	18	99
100	TFA/ DCM (1:1)	24	99
100	TFA/TFMS	24	99
500	TFA/ DCM (1:1)	24	92
500	TFA	24	99
500	TFA/TFMS	24	93
1000	TFA	48	99

*Dle UPLC-MS

Podarilo se úspěšně vyizolovat derivát **170**, abychom potvrdili jeho strukturu. Čištění derivátu **170** probíhalo za zvolení mobilní fáze EtOAc / *n*-hexan 17:1 za přídavku 1% AcOH. Struktura byla potvrzena pomocí 1D NMR experimentů a HRMS. Následně bude otestována jeho reaktivita při redukci nitroskupiny a finální cyklizaci na derivát **14**.

5.7 Syntéza 7-methyl a 7-benzyl-pyrazino-oxazin-trionů **7a** a **7b**

Byla navržena syntetická cesta vedoucí k derivátu **7a** a **7b** (Schéma 36), fúzovaného morfolin-2-onu s piperazin-2,5-dionem. Heterocykly nesoucí motiv piperazin-2,5-dionů ve svém skeletu zastupují bohatý zdroj biologicky zajímavých sloučeniny (kapitola 3.4.2)



Podmínky: (i) 2-merkptoethanol, DBU, DMF, 1.5h, rt; (ii) Fmoc-AA-OH, HOBt, DIC, DMF/DCM (1:1) 18 h, rt nebo Fmoc-Ala-Cl, DIPEA, DMF, 18h, rt; (iii) piperidin/DMF (1:1), 30 min, rt; (iv) TFA/DCM (1:1) 1h, rt.

Schéma 37: Reakce vedoucí k 7-methyl a 7-benzyl-tetrahydropyrazino[2,1-*c*][1,4]oxazin-3,6,9(4*H*)-trionu **7a** a **7b**.

První reakce byla denosylace klíčového intermediátu **5** následována reakcí s Fmoc-Ala-OH, HOBt a DIC po dobu 18 h. Kvantitativní průběh acylace byl ověřen pomocí reakce s Fmoc-Osu po dobu 1 h a UPLC-MS analýzy. Bylo zjištěno, že Fmoc-Ala-OH reaguje pouze částečně a derivát **171** vzniká přibližně ze 22 %.

Při pokusu zvýšit konverzi byl připraven Fmoc-Ala-Cl pomocí SOCl₂ nebo C₂O₂Cl₂ (tabulka 15). Konverze chlorace Fmoc-Ala-OH na Fmoc-Ala-Cl byla analyzována nepřímou pomocí MeOH. Vzorek z reakční směsi byl každých 30 minut odebrán a vysušen do sucha proudem dusíku. K tomuto vzorku byl přidán MeOH. Následovala UPLC-MS analýza. Při dokonalé konverzi byl v reakční směsi pozorován příslušný ester. U chlorace pomocí thionylchloridu byl methylester Fmoc alaninu detekován v 78% čistotě. U chlorace pomocí oxalylchloridu byla detekována převážně výchozí látka a příslušný methylester vznikal pouze z 10 %.

Denosylovaný derivát byl následně nechán reagovat s Fmoc-Ala-Cl, připraveným pomocí thionylchloridu, avšak ani tato reakce nebyla úspěšná a acylovaný derivát vůbec nevznikal.

Tabulka 15: Optimalizace chlorace Fmoc-Ala-OH.

chlorační činidlo	rozpouštědlo	katalýza	Teplota [°C]	čas [h]	Surová čistota[%]*
SOCl ₂	-	-	rt	4	11
SOCl ₂	-	DMF	70	4	78
(COCl) ₂	DCE	DMF	60	1	10

*Dle UPLC-MS

Dalším plánovaným krokem v případě kompletní acylace Fmoc-aminokyselinou byla odštěpení Fmoc protektivní skupiny a intramolekulární cyklizace. V případě derivátu vycházející z Fmoc-Ala by tak ovšem došlo ke ztrátě chromoforu a reakci by bylo náročné monitorovat pomocí HPLC.

Byla proto vyzkoušena i reakce s Fmoc-Phe-OH, HOBt a DIC po dobu 18 h. Reakce probíhala, ale s tvorbou vedlejších produktů a v konverzi přibližně 46 % v preparativním měřítku za vzniku derivátu **172**. Optimalizace reakce s Fmoc-AA-OH a Fmoc-Ala-Cl shrnuje **tabulka 16**.

Tabulka 16: Optimalizace reakce s Fmoc-AA-OH.

pryskyřice [mg]	činidlo	další podmínky	rozpouštědlo	čas [h]	surová čistota [%]*
50	Fmoc-Ala-OH	HOBt, DIC	DMF/DCM (1:1)	18	34
500	Fmoc-Ala-OH	HOBt, DIC	DMF/DCM (1:1)	18	22
50	Fmoc-Ala-Cl	DIPEA	DMF	18	0
50	Fmoc-Ala-Cl	Pyridin	DMF	18	0
50	Fmoc-Phe-OH	HOBt, DIC	DMF/DCM (1:1)	18	53
500	Fmoc-Phe-OH	HOBt, DIC	DMF/DCM (1:1)	18	46

*Dle UPLC-MS

Následující krok u derivátu obsahujícího Fmoc-Phe **172** byla deprotektce Fmoc skupiny pomocí piperidin/DMF (1:1) po dobu 1 h. Derivát **176** vznikal kvantitativně.

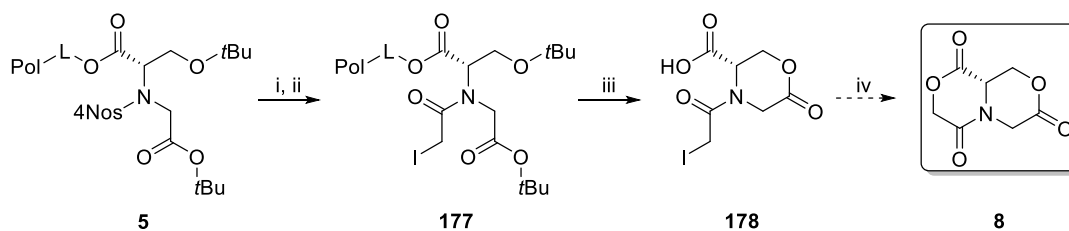
Poté bylo provedeno přečištění derivátu **176**, abychom potvrdili jeho strukturu. Při deprotektci pomocí piperidinu byly v surové směsi přítomny rovněž Fmoc fragmenty, které byly z velké části nerozpustné v počáteční mobilní fázi pro čištění na semipreparativní HPLC a musely být odfiltrovány. Surový derivát **176** zbavený většiny Fmoc fragmentů byl následně vyčištěn pomocí semipreparativní HPLC a plně charakterizován pomocí 1D NMR experimentů a HRMS.

Byla otestována cyklizace derivátu **176** na cílový derivát **7b** v TFA/DCM (50%). Při cyklizaci již po 30 minutách došlo k tvorbě derivátu **7b** v čistotě 45 % (dle LCMS), zbytek směsi tvořily neidentifikovatelné produkty. Reakce bude zopakována z většího množství výchozí látky a cílový derivát **7b** bude následně vyizolován a charakterizován.

5.8 Syntéza oxazino-oxazin-trionů **8 a 9**

Diketomorfoliny reprezentují zajímavou skupinu biologicky aktivních heterocyklů (kapitola **3.4.3**). Navržená syntetická cesta vycházela z intermediátu **5**. Klíčová transformace byla založena na acylaci dvěma deriváty octové kyseliny. Prvním byla 2-jódoctová kyselina a druhým byla α -bromofenyloctová kyselina.

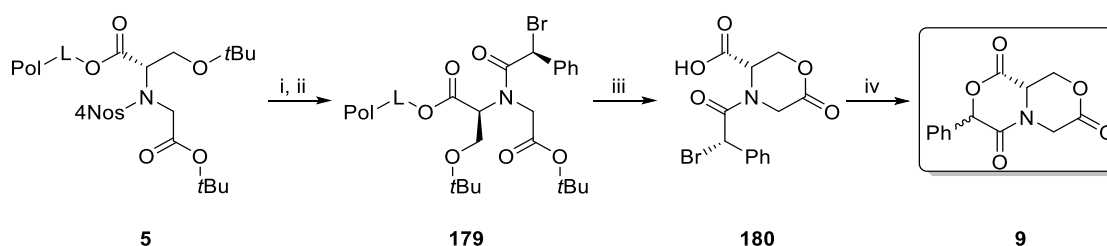
První reakcí byla denosylace 4-nitrobenzensulfonylu. Následovala aktivace 2-jód octové kyseliny pomocí DIC v DCM po dobu 30 minut. Vysrážená diisopropylmočovina byla odfiltrována přes diskový mikrofiltr a roztok byl přidán k denosylované pryskyřici. Monitorování této reakce bylo obtížné kvůli absenci chromoforu. Nicméně po acylaci a následném štěpení došlo k tvorbě derivátu **178**, neboť v hmotnostním spektru byl nalezen hmotnostní fragment odpovídající žádanému produktu. Pro potvrzení kvantitativního odreagování výchozí látky byl proveden Fmoc-Osu test, který vyšel negativně. Nebylo však možné jednoduše zjistit jaká je čistota produktu a zda derivát **178** vzniká kvantitativně. (Schéma **38**).



Podmínky: (i) 2-merkптоethanol, DBU, DMF, 1.5 h, rt; (ii) 2-jód octová, DIC, DCM, rt, 30 min, poté přidáno k pryskyřici, 18 h, rt; (iii) TFA/DCM (1:1), 2 h, rt; (iv) DIPEA, DMSO, 18 h, rt.

Schéma 38: Reakce vedoucí k dihydro-1*H*-[1,4]oxazino[3,4-*c*][1,4]oxazine-1,4,7(3*H*,6*H*)-trionu **8**.

Z výše uvedených důvodů byla následně pozornost věnována reakci s α -bromofenyloctovou kyselinou (**Schéma 39**), která ve své struktuře nese UV detektorem analyzovatelný element (fenyl). Tento derivát byl nejprve aktivován pomocí DIC v DCM a následně byla vysrážená močovina odstraněna pomocí diskového mikrofiltru. Filtrát byl přidán k denosylované pryskyřici. Reakce probíhala bez větších problémů a vznikl derivát **179**. Po odštěpení z pryskyřice a odštěpení kyselých labilních protektivních skupin pomocí TFA/DCM (1:1) po dobu 2 h došlo k tvorbě derivátu **180**. Následovala cyklizace v DMSO/DIPEA po dobu 18 h. Derivátu **9** bylo dosaženo v čistotě 86 %.



Podmínky: (i) 2-merkптоethanol, DBU, DMF, 1.5 h, rt; (ii) α -bromofenyloctová kyselina, DIC, DCM, rt, 30 min, poté přidáno k pryskyřici, 18 h, rt; (iii) TFA/DCM (1:1), 2 h, rt; (iv) DIPEA, DMSO, 18 h, rt.

Schéma 39: Reakce vedoucí k 3-fenyldihydro-1*H*-[1,4]oxazino[3,4-*c*][1,4]oxazin-1,4,7(3*H*,6*H*)-trionu **9**.

Čištění produktu **9** bylo velice problematické. Nejprve byla použita semipreparativní HPLC. Při čištění však docházelo vlivem mobilní fáze obsahující octanový pufr k otevírání kruhu. Nejpravděpodobněji docházelo k otevření laktonového kruhu a tvorbě derivátu **182** (**Schéma 40**).

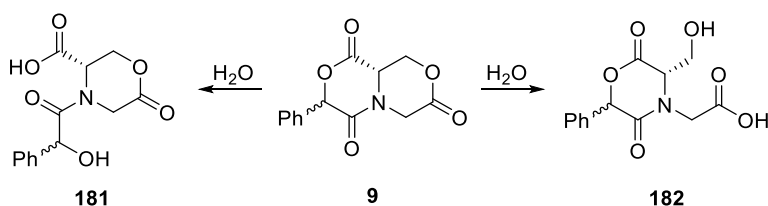
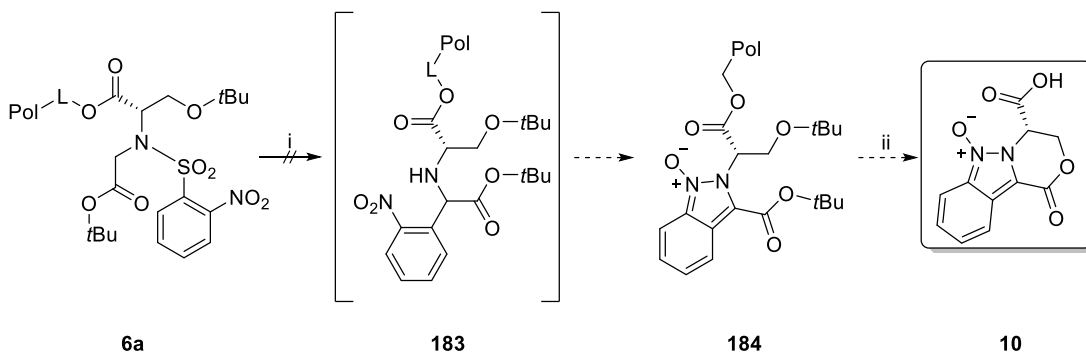


Schéma 40: Hydratace a otevření cyklu vlivem vodné mobilní fáze na semipreparativní HPLC.

Z tohoto důvodu bylo čištění provedeno pomocí sloupcové chromatografie za zvolení mobilní fáze 7% MeOH/DCM a 1% AcOH. Struktura derivátu **9** byla potvrzena pomocí 1D NMR experimentů a HRMS.

5.9 C-arylace vedoucí k oxazino-indazol-oxidu **10**

C-arylace byla navržena pro vyzkoušení reaktivity derivátu **6a** obsahující 2-nitrobenzensulfonamid. Obdobná syntéza byla dříve popsána pro substráty obsahující ve své molekule keton.⁷⁸ Chtěli jsme vyzkoušet, zda stejný průběh reakce můžeme očekávat u našich derivátů nesoucích méně reaktivní esterovou skupinu. Při reakci mělo docházet k intramolekulárnímu přesmyku z derivátu **6a** na derivát **184** působením DBU.



Podmínky: (i) DBU, DMF, 1h, rt; (ii) TFA/DCM (1:1), 2 h, rt.

Schéma 41: C-Arylace vedoucí k 4-karboxy-1-oxo-3,4-dihydro-1H-[1,4]oxazino[4,3-b]indazol 6-oxidu **10**.

V našem případě však tato reakce neprobíhala při podmínkách uvedených v literatuře (0,5M DBU v DMF) a došlo k rozložení výchozí látky. Proto bylo vyzkoušeno postupné navýšení koncentrace až na 2M, avšak ani navýšením koncentrace DBU nebylo dosaženo cílového derivátu **10**. Při reakci došlo pravděpodobně k rozložení výchozí látky. Důvodem je pravděpodobně nižší reaktivita esterů oproti ketonům. Optimalizace C-arylace pro esterovou skupinu je shrnuta v **tabulce 16**.

Tabulka 17: Optimalizace C-Arylace.

báze	c[M]	čas [h]	surová čistota [%]*
DBU	0,5	0,5	0
DBU	0,5	2	0
DBU	1	1	0
DBU	1,5	1	0
DBU	2	1	0
DBU	2	2	0

*Dle UPLC-MS

6 Experimentální část

6.1 Přístrojové vybavení a použité chemikálie

Všechny chemikálie a rozpouštědla byly zakoupeny od firmy Sigma Aldrich (Milwaukee, IL, www.sigmaaldrich.com) a Acros Organics (Geel, Belgium, www.acros.cz). Suchá rozpouštědla byla vysušena a skladována pomocí molekulárních sít o velikosti 4 Å anebo jak byla dodána od komerčních dodavatelů. Wangova pryskyřice (s 1 % divinylbenzenu, výchozí loading 1,4 mmol/g) byla zakoupena od firmy AAPPTec (Louisville, KY, www.aapptec.com). Syntézy popsané na pevné fázi byly prováděné v plastových stříkačkách opatřených polypropylenovou fritou) za použití manuálně ovládaného syntetizéru (Torviq, Niles, MI, www.torviq.com) pokud není řečeno jinak. Při promývání byla pryskyřice míchána s čerstvým rozpouštědlem po dobu 1 minuty před změnou rozpouštědla. Objem promývacího rozpouštědla byl 10 ml na 1g pryskyřice. Intermediáty navázané na pryskyřici byly pro kvantitativní analýzu či dlouhodobé skladování vysušeny proudem dusíku. Všechny reakce probíhaly za laboratorní teploty, pokud není uvedena jiná teplota reakce.

UPLC-MS analýza byla provedena pomocí systému složeného z UPLC chromatografu Acquity s PDA a MS detektorem (Waters). Byla použita C18 kolona X-Select HSS T3 (2.5 μm , 3.0 mm X 50 mm) při 30°C a průtok 600 $\mu\text{l}/\text{min}$. Jako MF byl použit: (A) 0,01M octan amonný v H₂O, (B) ACN, eluce: gradientová, gradient lineárně naprogramovaný od 20 do 80% B po 3 minuty, udržováno po 1 minutu, následuje návrat na počáteční poměr MF. ESI zdroj operoval při kapilárním napětí 3 kV, s teplotou desolvatace 350°C a teplotou zdroje 120°C.

Čištění látek pomocí semipreparativní HPLC s PDA a MS detektorem bylo provedeno pomocí YMC-Actus Pro C18 kolony (20.0 x 100 mm, 5 μm částice), s gradientovou elucí. MF byla tvořená z 0,01M octanu amonného v H₂O a ACN, průtokem 15 ml/min.

HRMS analýza byla prováděna na systému tvořeném kapalinovým chromatografem (Dionex UltiMate 3000, Thermo Fischer Scientific, MA, USA) a hmotnostním spektrometrem Exactive Plus Orbitrap high-resolution (Thermo Fischer Scientific, MA, USA). Jako ionizační zdroj byl použit elektrosprej a snímána byla spektra v kladném i záporném módu v rozsahu 150-450 m/z . Chromatografická separace byla prováděna na koloně Phenomenex Gemini (C18, 50 x 2 mm, 3 μm částice), eluce byla

izokratická, MF obsahovala 80 % ACN a 20 % pufru (0,01M octan amonný). Vzorky byly připraveny rozpuštěním látek ve směsi MeOH: voda (1:1).

NMR spektra byla zaznamenána na spektrometru JEOL ECX500 s magnetickým polem 11,75 T (při operační frekvenci 500,16 MHz pro ^1H a 125,77 MHz pro ^{13}C) při laboratorní teplotě (25°C). Chemické posuny (δ) jsou uváděny v parts per million (ppm) a interakční konstanty (J) v Hertzech (Hz). ^1H a ^{13}C signály byly referovány na signály rozpouštědel: CDCl_3 [7.26 ppm (^1H) a 77.23 ppm (^{13}C)] a $\text{DMSO-}d_6$ [2.50 ppm (^1H) a 39.51 ppm (^{13}C)]. Určení přesné struktury a rezonance jednotlivých signálů bylo provedeno pomocí pokročilejších 2D experimentů, které zahrnují COSY, ^1H - ^{13}C HMBC, ^1H - ^{13}C HMQC.

Zbytková rozpouštědla (H_2O , DMSO, DMF) byla odstraněna pomocí lyofilizace při -110 °C (ScanVac Coolsafe 110-4).

6.2 Studium cyklizačních reakcí

6.2.1 Obecný postup přípravy vzorku pro analýzu reakcí

Pro analýzu vzorků na UPLC-MS bylo odebráno přibližně 10 mg pryskyřice promyté DCM do ependorfy. Následně byl přidán 1 ml 50% TFA v DCM a reakční směs byla třepána 30 min za laboratorní teploty. Poté byla reakční směs odpařena do sucha pomocí proudu dusíku a vzorek byl rozpuštěn v 1ml příslušné počáteční mobilní fáze. Vzorek byl přefiltrován přes mikrofiltr do HPLC vialky.

Následuje obecný popis pro stanovení loadingu pryskyřice po prvním reakčním kroku pomocí UPLC-MS: bylo odebráno přibližně 30 mg pryskyřice promyté DCM a pryskyřice byla promyta 5x MeOH. Promytá pryskyřice byla vložena do stříkačky opatřené z obou stran fritou a vysušena pomocí proudu dusíku. Poté bylo odváženo co nejpresnější množství 2x 10-15 mg pryskyřice do dvou ependorfech. Do obou ependorfech byl následně přidán 1 ml 50% TFA v DCM a reakční směs byla třepána 1 hodinu při laboratorní teplotě. Štěpící koktejl byl odpařen pomocí proudu dusíku a vzorek byl rozpuštěn v 1 ml ACN. Do druhé ependorfy bylo odebráno 0,5 ml vzorku a přidáno 0,5 ml vody a vzorek byl přefiltrován přes mikrofiltr do HPLC vialky. V UV spektru byla poté provedena integrace píku při 300 nm (vlnová délka odpovídající absorpčnímu maximu Fmoc skupiny sloužící zároveň jako chromofor v molekule standardu) a hodnota plochy byla zaznamenána. Jako referenční hodnota byla použita

plocha píku standardu (Fmoc-Ala-OH o koncentraci 0,5 mg/ml) získaná opět integrací při 300 nm. Loading byl následně vypočítán dle následujícího vzorce:

$$L = c_{st} * \frac{A_{vz}}{A_{st}} * \frac{r}{m}$$

C_{st}látková koncentrace standardu

A_{vz}plocha píku vzorku

A_{st}plocha píku standardu

rředění

mnavážka

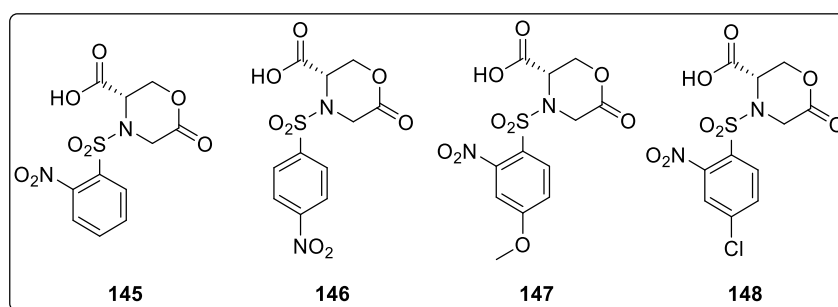
Kvantifikace: Pryskyřice (~30 mg) byla promyta 5x MeOH, vysušena a rozdělena na dva vzorky (2x 15 mg). Oba vzorky byly odštěpeny pomocí 1ml TFA/DCM (1:1) po dobu 1h za laboratorní teploty. Štěpící koktejl byl odpařen proudem dusíku a odštěpené podíly byly extrahovány 1 ml MeCN a analyzovány pomocí UPLC-MS

Loading imobilizace serinové aminokyseliny byl vypočítán pomocí výše uvedeného vzorce s použitím standardu Fmoc- β -Ala-OH o koncentraci 0.5 mg/ ml.

Tabulka 18: Vypočtený loading imobilizace serinové aminokyseliny dle LC-MS

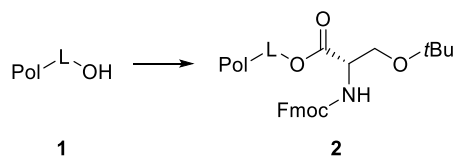
pryskyřice [g]	loading imobilizace [mmol/g]	počet opakování imobilizace
1	0.41	1
1	0.60	2
2.5	0.61	2
2.5	0.72	3
5	0.69	3

6.2.2 Syntéza klíčových intermediátů **145**, **146**, **147** a **148**



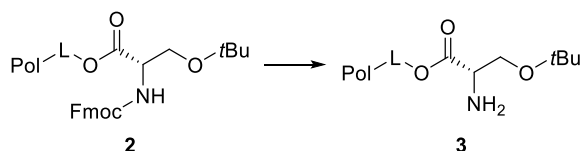
Obrázek 24: Struktura klíčových intermediátů **145**, **146**, **147** a **148**.

6.2.2.1 Ukotvení na Wangův linker



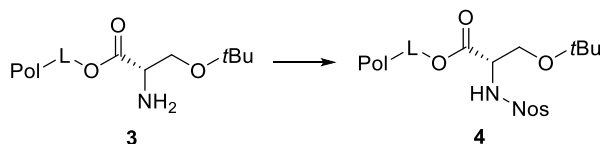
Wangova pryskyřice (1 g; 1,4 mmol/g) byla promyta 3x DCM a roztok Fmoc-Ser(*t*Bu)-OH (767 mg; 2 mmol), HOBt (306 mg; 2.0 mmol), DMAP (61 mg; 0.5 mmol) and DIC (312 μ l; 2.0 mmol) bylo přidáno v DMF/DCM (10 ml; 50%) k pryskyřici. Reakční směs byla třepána 18 h za laboratorní teploty a poté byla pryskyřice promyta 3 \times v DMF a 3x DCM.

6.2.2.2 Deprotekce Fmoc protektivní skupiny



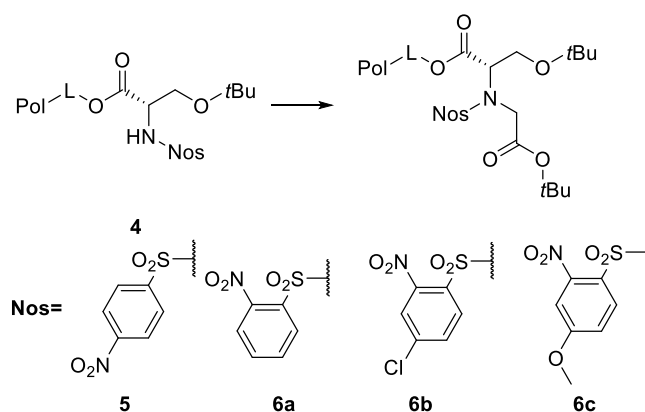
Odštěpení Fmoc-protektivní skupiny bylo provedeno pomocí piperidinu/DMF (5 ml; 50%) po dobu 30 min. za laboratorní teploty. Pryskyřice byla následně promyta 3x DMF a 3x DCM.

6.2.2.3 Příprava nosylovaných derivátů



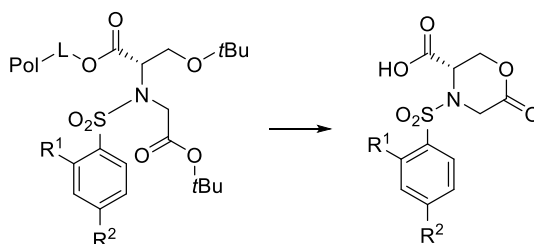
Deprotekovaná pryskyřice (500 mg) byla nosylována roztokem příslušného nitrosulfonyl chloridu (1.5 mmol) a 2,6-lutidinu (228 μ l; 2 mmol) v DCM (5 ml). Reakční směs byla třepána po dobu 18 h za laboratorní teploty. Následně byla pryskyřice promyta 3 \times v DCM. Ověření kvantitativního průběhu nosylace bylo provedeno reakcí s Fmoc-Osu (0.5M roztok v DCM, 1ml) a UPLC-MS analýzou.

6.2.2.4 Alkylace



Nosylovaná pryskyřice (500 mg) byla promyta 3x DMF a následně alkylována roztokem *tert*-butylbromoacetátu (148 μ l; 1 mmol) a DIPEA (348 μ l; 2 mmol) v DMF (5 ml) po dobu 18 h při laboratorní teplotě. Poté byla pryskyřice promyta 3 \times DMF a 3x DCM. Vzorek byl následně odštěpen pomocí 50% TFA/DCM po 30 minut a analyzován na UPLC-MS.

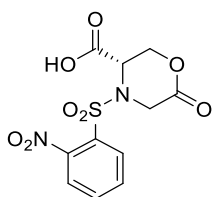
6.2.2.5 Štěpení



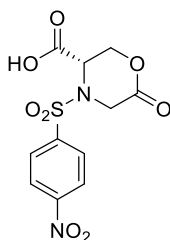
- 145 R¹ = NO₂ R² = H
146 R¹ = H R² = NO₂
147 R¹ = NO₂ R² = OMe
148 R¹ = NO₂ R² = Cl

Finální deriváty **145**, **146**, **147** a **148** byly štěpeny 50% TFA/DCM z pryskyřice po dobu 2 h. TFA byla vysušena proudem dusíku do sucha a následně reziduální TFA byla lyofilizována.

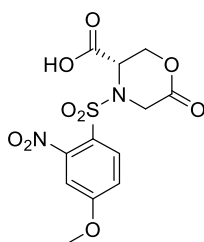
NMR byly změřeny se zbytkovým DMF a TFA, z důvodu obtížné purifikace těchto intermediátů (kapitola **5.1.1**). DMF v ¹H NMR poskytuje tři signály – 2.73 a 2.89 singlety pro CH₃ skupiny a singlet 7.95 pro CH skupinu. V ¹³C NMR poskytuje také tři signály – dvě CH₃ skupiny 30.73, 35.73 a CH skupina 162.29. TFA poskytuje dva signály V ¹³C NMR, které tvoří dva kvartety. První u 158 ppm a druhý u 115 ppm.



Látka **145**: Hnědá olejovitá látka. Výtěžek 32 mg (38 %). ESI-MS m/z 329 $[M-H]^-$. 1H NMR (500 MHz, DMSO- d_6): δ 8.17 (dd, $J = 7.9, 1.4$ Hz, 1H), 8.01 (dd, $J = 8.0, 1.4$ Hz, 1H), 7.93 (td, $J = 7.7, 1.5$ Hz, 1H), 7.88 (td, $J = 7.6, 1.4$ Hz, 1H), 4.79 (t, $J = 2.9$ Hz, 1H), 4.73 – 4.63 (m, 2H), 4.34 (d, $J = 16.8$ Hz, 1H), 4.24 (d, $J = 16.7$ Hz, 1H) ppm. ^{13}C NMR (126 MHz, DMSO- d_6): δ 169.75, 164.98, 147.45, 135.11, 132.68, 130.63, 130.26, 124.40, 68.41, 53.97, 44.87 ppm. HRMS (ESI-TOF) m/z vypočteno pro $C_{11}H_{10}N_2O_8S$ $[M-H]^-$ 329,0085, nalezeno: 329,0074.

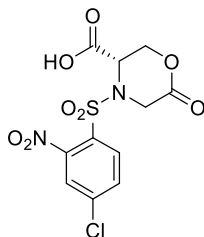


Látka **146**: Hnědá olejovitá látka. Výtěžek 39 mg (47 %). ESI-MS m/z 329 $[M-H]^-$. 1H NMR (500 MHz, DMSO- d_6): δ 8.43 – 8.39 (m, 2H), 8.18 – 8.15 (m, 2H), 4.83 (t, $J = 3.3$ Hz, 1H), 4.56 (d, $J = 3.3$ Hz, 2H), 4.26 (d, $J = 16.8$ Hz, 1H), 4.15 (d, $J = 16.7$ Hz, 1H) ppm. ^{13}C NMR (126 MHz, DMSO- d_6) δ 169.8, 165.2, 150.1, 143.0, 129.0, 124.6, 67.9, 53.6, 44.7 ppm. HRMS (ESI-TOF) m/z vypočteno pro $C_{11}H_{10}N_2O_8S$ $[M-H]^-$ 329,0085, nalezeno: 329,0074.



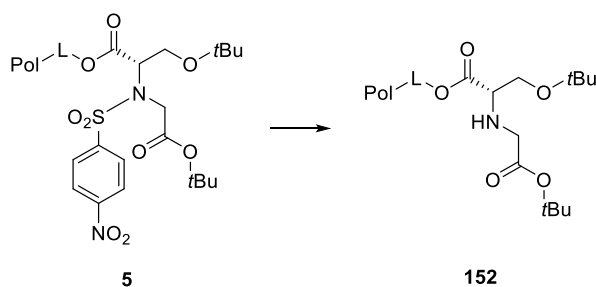
Látka **147**: Hnědá olejovitá látka. Výtěžek 29 mg (24 %). ESI-MS m/z 359 $[M-H]^-$. 1H NMR (500 MHz, DMSO- d_6): δ 8.06 (d, $J = 9.0$ Hz, 1H), 7.64 (d, $J = 2.6$ Hz, 1H), 7.35 (dd, $J = 8.9, 2.6$ Hz, 1H), 4.73 (t, $J = 2.9$ Hz, 1H), 4.69 – 4.61 (m, 2H), 4.29 (d, $J = 16.8$ Hz, 1H), 4.19 (d, $J = 16.8$ Hz, 1H), 3.92 (s, 3H) ppm. ^{13}C NMR (126 MHz, DMSO- d_6) δ

169.8, 165.1, 163.4, 149.1, 132.5, 131.6, 121.4, 117.3, 68.4, 56.8, 53.8, 44.7 ppm. HRMS (ESI-TOF) m/z vypočteno pro $C_{12}H_{12}N_2O_9S$ $[M-H]^-$ 359,0191, nalezeno: 359,0180.



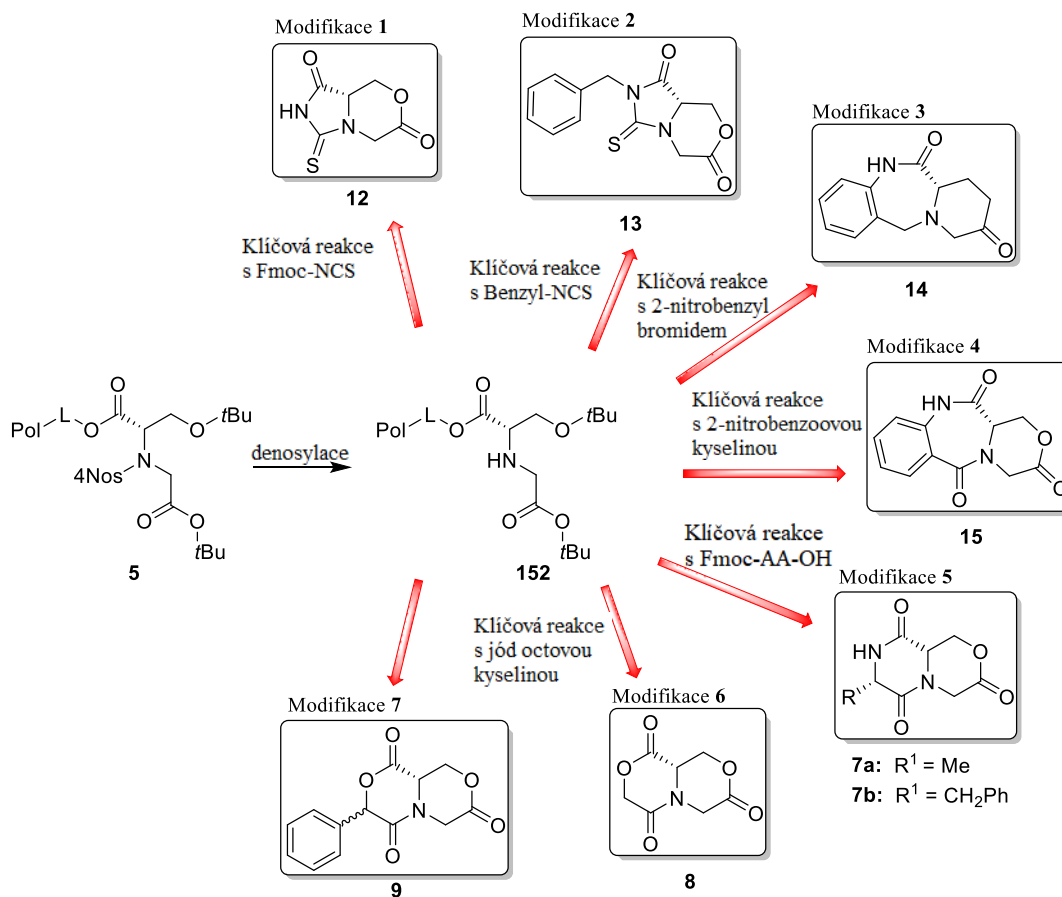
Látka **148**: Hnědá olejovitá látka. Výtěžek 30 mg (27 %). ESI-MS m/z 363 $[M-H]^-$. 1H NMR (500 MHz, DMSO- d_6): δ 8.34 (d, $J = 2.2$ Hz, 1H), 8.19 (d, $J = 8.6$ Hz, 1H), 7.98 – 7.95 (m, 1H), 4.79 (t, $J = 2.8$ Hz, 1H), 4.71 – 4.63 (m, 2H), 4.35 (d, $J = 17.0$ Hz, 1H), 4.21 (d, $J = 16.8$ Hz, 1H) ppm. ^{13}C NMR (126 MHz, DMSO- d_6): δ 169.6, 164.8, 147.9, 139.3, 132.5, 132.3, 128.9, 124.3, 68.4, 53.9, 44.8 ppm. HRMS (ESI-TOF) m/z vypočteno pro $C_{11}H_9ClN_2O_8S$ $[M+H]^+$ 364,9841 nalezeno: 364,9841.

6.2.2.6 Denosylace



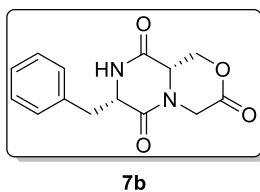
Pryskyřice (500 mg) byla promyta 3x DMF a následně byl přidán roztok 2-merkaptoethanolu (210 μ l; 3.0 mmol) a DBU (150 μ l; 1.0 mmol) v deg. DMF (5 ml). Po třepání po dobu 1h za laboratorní teploty byla pryskyřice promyta 3x DMF a 3x DCM. Látka byla následně odštěpena a analyzována pomocí UPLC-MS.

6.2.3 Využití alkylovaného intermediátu pro další transformace



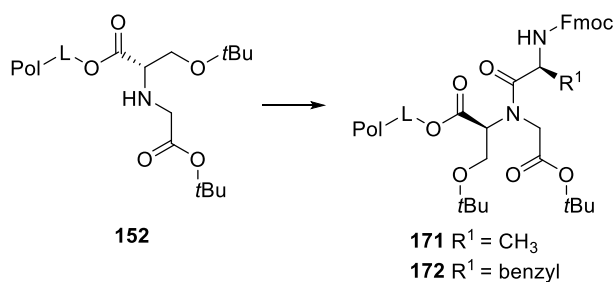
Obrázek 25: Možnosti transformací alkylovaných intermediátů.

6.2.3.1 Reakce vedoucí k 7b



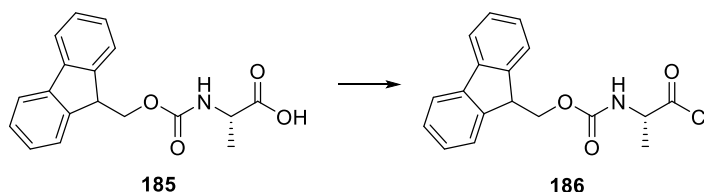
Obrázek 26: Struktura 7-benzyltetrahydropyrazino[2,1-c][1,4]oxazine-3,6,9(4H)-trionu 7b.

1) Acylace pomocí Fmoc-AA-OH



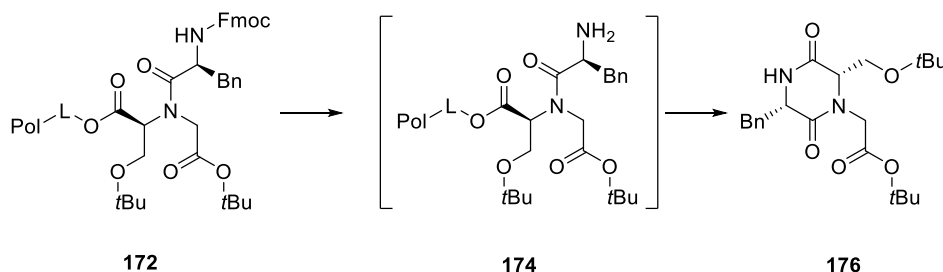
K denosylované pryskyřici (500mg) byl přidán roztok Fmoc-Ala-OH (529,3 mg; 1,7 mmol) nebo Fmoc-Phe-OH (660 mg; 1,7 mmol) HOBt × H₂O (229 mg; 1,7 mmol) a DIC (214 μl; 1,7 mmol) v DMF/DCM (5 ml, 1:1). Reakční směs byla třepána po dobu 18 h za laboratorní teploty. Pryskyřice byla promyta 3x DCM. Kvantitativní průběh reakce byl ověřen odštěpením derivátu z pryskyřice a následně pomocí UPLC-MS, dále byla provedena kontrola pomocí Fmoc-Osu (0.5M roztok v DCM, 1ml) a UPLC-MS analýza.

2) Příprava Fmoc-Ala-Cl

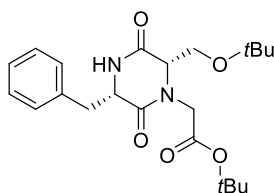


Fmoc-Ala-Cl byl připraven rozpuštěním Fmoc-Ala-OH (100 mg; 0,32 mmol) v SOCl₂ (3 ml). Reakční směs byla míchána při teplotě 76°C po dobu 4 h. Následně byl Fmoc-Ala-Cl kodestilován 3x pomocí toluenu a odpařen na RVO.

3) Štěpení Fmoc

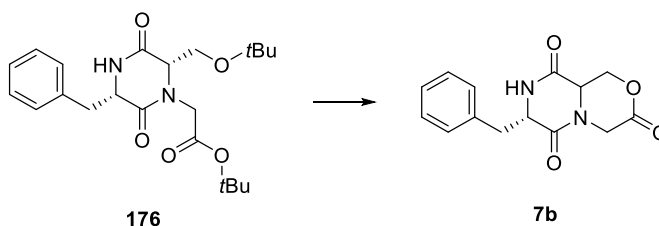


Štěpení Fmoc protektivní skupiny za současného cyklického štěpení z pryskyřice **172** (500 mg) probíhalo za přidání piperidinu v DMF (5 ml; 50%) po dobu 30 minut za laboratorní teploty. Reakční roztok byl následně oddělen od pryskyřice a pryskyřice byla promyta 5x DMF. Všechny frakce byly spojeny a přidány k reakčnímu roztoku. Zbytkový piperidin/DMF byl odstraněn pomocí lyofilizace po dobu 18 h. Čištění proběhlo pomocí semipreparativní čištění za zvolení metody 50:90.. Frakce byly spojeny a odpařeny na RVO. Pufr byl následně odstraněn lyofilizací. NMR bylo změřeno v DMSO-*d*₆.

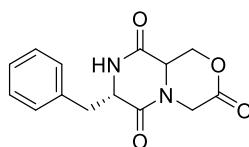


Látka **176**: Bílá amorfní látka. Výtěžek 22 mg (13 %). ESI-MS m/z 403 $[M-H]^-$ 1H NMR (500 MHz, DMSO- d_6): δ 8.19 (d, $J = 3.3$ Hz, 1H), 7.31 (t, $J = 7.4$ Hz, 2H), 7.25 – 7.22 (m, 1H), 7.18 – 7.15 (m, 2H), 4.19 (d, $J = 17.0$ Hz, 1H), 4.05 (ddd, $J = 7.8, 5.1, 3.3$ Hz, 1H), 3.90 (dd, $J = 4.3, 2.4$ Hz, 1H), 3.82 (d, $J = 17.0$ Hz, 1H), 3.53 (dd, $J = 10.0, 2.5$ Hz, 1H), 3.15 – 3.04 (m, 3H), 1.40 (s, 9H), 1.10 (s, 9H) ppm. ^{13}C NMR (126 MHz, DMSO- d_6): δ 167.35, 166.00, 165.05, 136.72, 129.68, 128.27, 126.53, 81.01, 73.27, 61.97, 61.55, 55.86, 46.48, 41.45, 27.69, 27.12 ppm. HRMS (ESI-TOF) m/z vypočteno pro $C_{22}H_{32}N_2O_5$ $[M+H]^+$ 405,2384, nalezeno: 405,2384.

4) Cyklizace

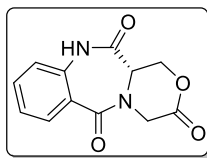


Finální cyklizace na derivát **7b** probíhala ve 3 ml TFA/DCM (50%) po dobu 30 min. TFA byla následně vysušena proudem dusíku.



Látka **7b**: Žlutá olejovitá látka. Výtěžek 7 mg (6 %). ESI-MS m/z 273 $[M-H]^-$. HRMS (ESI-TOF) m/z vypočteno pro $C_{14}H_{14}N_2O_4$ $[M+H]^+$ 275.1026, nalezeno: 275.1026.

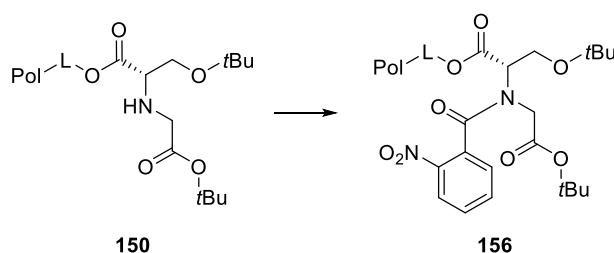
6.2.3.2 *N*-Acylace 2-nitrobenoovou kyselinou nebo 2-nitrobenzoyl chloridem vedoucí k derivátu 15



15

Obrázek 27: Struktura 1,12a-dihydro-6*H*-benzo[*e*][1,4]oxazino[4,3-*a*][1,4]diazepine-3,6,12(4*H*,11*H*)-trionu 15.

1) Acylace 2-nitrobenzoovou kyselinou

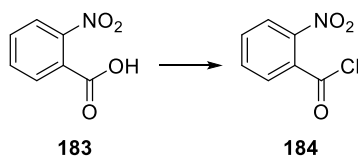


150

156

K denosylované pryskyřici (500 mg) byla přidána 2-nitrobenzoová kyselina (334 mg; 2 mmol) a DIC (157 μ l; 1 mmol) v suchém DMF (5 ml). Reakční směs byla třepána po dobu 18 h za laboratorní teploty. Pryskyřice byla promyta 3x DMF a 3x DCM. Kvantitativní průběh reakce byl ověřen pomocí reakce s Fmoc-Osu (0.5M roztok v DCM, 1 ml) a UPLC-MS analýzy.

2) Příprava 2-nitrobenzoyl chloridu

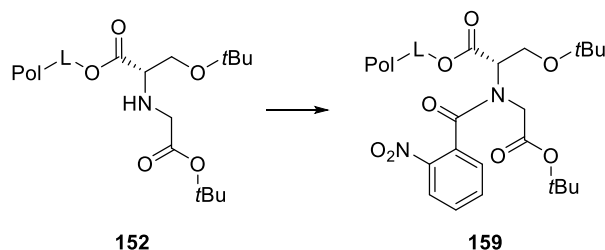


183

184

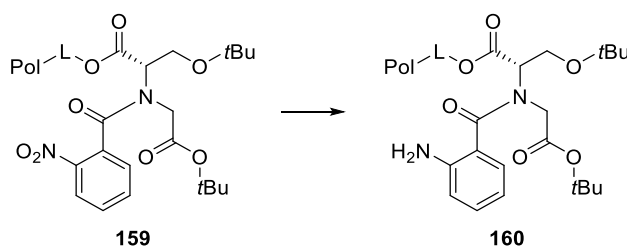
2-Nitrobenzoyl chlorid byl připraven rozpuštěním 2-nitrobenzoové kyseliny (334 mg; 2 mmol) v 3 ml SOCl_2 . Reakční směs byla míchána po dobu 4 h při teplotě 76°C. Následně byl roztok 3 x kodesťilován s toluenem a odpařen na RVO.

3) Acylace 2-nitrobenzoyl chloridem



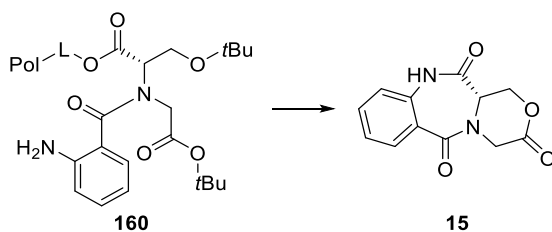
K denosylované pryskyřici (500 mg) byla přidán čerstvě připravený nebo komerční 2-nitrobenzoyl chlorid (263 μ l; 2 mmol) a DIPEA (695 μ l; 4 mmol) v suchém DMF. Reakční směs byla třepána po dobu 18 h za laboratorní teploty. Pryskyřice byla promyta 3x DMF a 3x DCM. Kvantitativní průběh reakce byl ověřen reakcí s Fmoc-Osu (0.5M roztok v DCM, 1 ml) a UPLC-MS analýzou.

4) Redukce



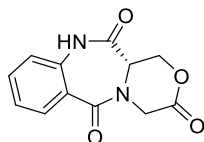
K alkylovanému derivátu navázanému na pryskyřici (500 mg) byl přidán roztok připravený rozpuštěním $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (1 235 mg; 5.8 mmol), K_2CO_3 (965 mg; 7.0 mmol) v $\text{H}_2\text{O}/\text{DCM}$ (5 ml; 50%) za následného přidavku TBAHS (170 mg; 0.5 mmol). Reakční směs byla třepána 18 h při laboratorní teplotě. Následně byla pryskyřice promyta 6x a $\text{DCM}/\text{H}_2\text{O}$ a 6x DCM. Následně byla provedena kontrola pomocí Fmoc-Osu (0.5M roztok v DCM, 1 ml) a její analýza pomocí UPLC-MS.

5) Finální cyklizace



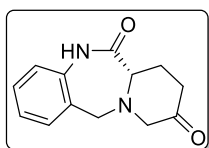
Finální cyklizace na derivát **15** probíhala ve 3 ml TFA/DCM (1:1) po dobu 2 h. TFA byla oddělena od pryskyřice a pryskyřice byla promyta 3x TFA/DCM (3ml).

Všechny podíly byly sloučeny a odpařeny do sucha pomocí proudu dusíku. Zbytková TFA byla zlyofilizována. Čištění proběhlo pomocí sloupcové chromatografie za zvolení mobilní fáze EtOAc / *n*-hexan (17:1). NMR bylo změřeno v DMSO-*d*₆.



Látka **15**: Žlutá olejovitá látka. Výtěžek 21 mg (19 %). ESI-MS m/z 245 [M-H]⁻. ¹H NMR (500 MHz, DMSO-*d*₆): δ 10.73 (s, 1H), 7.82 (dd, $J = 7.8, 1.6$ Hz, 1H), 7.57 (ddd, $J = 8.2, 7.4, 1.6$ Hz, 1H), 7.27 (td, $J = 7.6, 1.1$ Hz, 1H), 7.16 (dd, $J = 8.2, 1.1$ Hz, 1H), 4.82 (dd, $J = 12.3, 5.8$ Hz, 1H), 4.66 – 4.56 (m, 2H), 4.42 (t, $J = 5.3$ Hz, 2H), 4.36 (d, $J = 16.9$ Hz, 1H) ppm. ¹³C NMR (126 MHz, DMSO-*d*₆): δ 168.97, 167.83, 165.97, 136.32, 132.78, 131.26, 124.65, 124.19, 121.08, 63.47, 50.30, 42.94 ppm. HRMS (ESI-TOF) m/z vypočteno pro C₁₂H₁₀N₂O₄ [M+H]⁺ 247,0713, nalezeno: 247,0710.

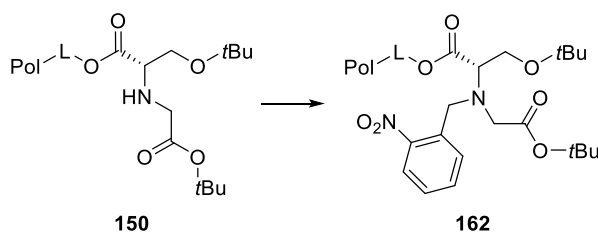
6.2.3.3 Alkylace 2-nitrobenzyl bromidem vedoucí k derivátu **14**



14

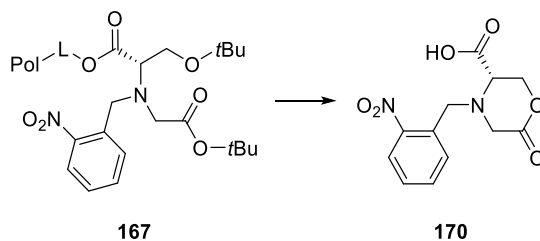
Obrázek 28: Struktura 5,7,8,12-tetrahydrobenzo[*e*]pyrido[1,2-*a*][1,4]diazepin-6,9(6*a*H,10*H*)-dionu **14**.

1) Alkylace

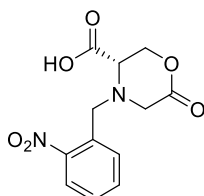


Denosylovaná pryskyřice (500 mg) byla promyta 3x DMF a byl přidán roztok 2-nitrobenzyl bromidu (540 mg; 2,5 mmol), DIPEA (870 μl; 5 mmol) v DMF. Reakční směs byla třepána po dobu 18 h za laboratorní teploty. Byla provedena kontrola pomocí Fmoc-Osu (0.5M roztok v DCM, 1 ml). Vzorek byl následně odštěpen pomocí TFA/DCM 50% a analyzován na UPLC-MS.

2) Štěpení a cyklizace derivátu **167** na morfolin-2-on **170**

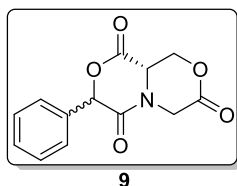


Cyklizace pryskyřice **167** (500 mg) na morfolin-2-on probíhala v čisté TFA (3 ml) po dobu 18 h. Všechny podíly byly sloučeny, rozpouštědla byla odpařena pomocí proudu dusíku a následně lyofilizována, aby byla odstraněna reziduální TFA. Čištění proběhlo pomocí EtOAc /*n*-hexan (17:1) a 1% AcOH. NMR bylo změřeno v DMSO-*d*₆.



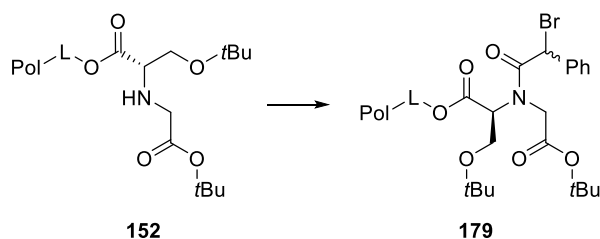
Látka **170**: Hnědá olejovitá látka. Výtěžek 40 mg (35 %). ¹H NMR (500 MHz, DMSO-*d*₆): δ 12.09 (b.s., 1H), 7.91 (d, *J* = 7.9 Hz, 1H), 7.72 – 7.66 (m, 2H), 7.53 (t, *J* = 7.6 Hz, 1H), 4.54 (dd, *J* = 11.3, 2.0 Hz, 1H), 4.46 (dd, *J* = 11.2, 3.8 Hz, 1H), 4.27 (d, *J* = 15.2 Hz, 1H), 4.05 (d, *J* = 15.1 Hz, 1H), 3.68 – 3.66 (m, 1H), 3.64 (d, *J* = 18.1 Hz, 1H), 3.43 (d, *J* = 18.0 Hz, 1H) ppm. ¹³C NMR (126 MHz, DMSO-*d*₆): δ 171.59, 167.09, 149.23, 133.18, 132.34, 130.91, 128.82, 124.49, 69.51, 57.12, 54.83, 50.83 ppm. HRMS (ESI-TOF) *m/z* vypočteno pro C₁₃H₁₁NO₅ [M+H]⁺ 281,0768 nalezeno: 281,0768.

6.2.3.4 Acylace α-bromofenylocetovou kyselinou vedoucí k derivátu **9**



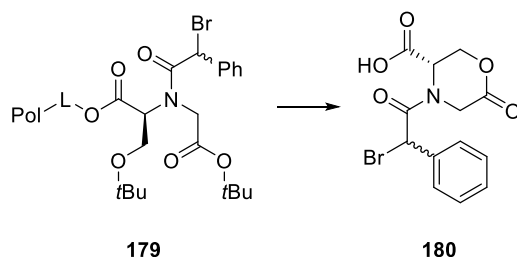
Obrázek 29: Struktura 3-fenyldihydro-1*H*-[1,4]oxazino[3,4-*c*][1,4]oxazine-1,4,7(3*H*,6*H*)-trionu **9**.

1) Acylace



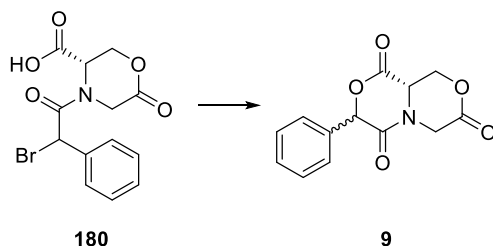
α -Bromofenylacetová kyselina (645 mg; 3.0 mmol) rozpuštěná v DCM (10 ml) aktivována pomocí DIC (232 μ l; 1.5 mmol) po dobu 30 min za laboratorní teploty, následně byla sraženina diisopropylmočoviny odfiltrována pomocí diskového mikrofiltru a roztok byl přidán k denosylované pryskyřici (1 g) promyté 3x DCM. Pryskyřice byla třepána 18 h za laboratorní teploty a následně promyta 3x DCM, 3x DMF a znovu 3x DCM. Dále byla provedena kontrola pomocí Fmoc-Osu (0.5M roztok v DCM, 1ml) a UPLC-MS analýza.

2) Cyklizace na morfolin-2-on



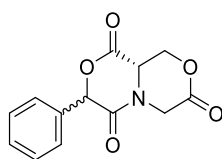
Cyklizace na morfolin-2-on byla provedena pomocí ve 3 ml TFA/DCM (1:1) po dobu 2 h. Štěpící koktejl byl následně oddělen od pryskyřice a pryskyřice byla znovu promyta 3x štěpícím koktejlem. Všechny podíly byly sloučeny a odpařeny pomocí proudu dusíku. Reziduální TFA byla zlyofilizována.

3) Cyklizace na oxazino-oxazintrion 9



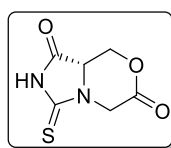
Cyklizace na diketomorfolin-2-on byla provedena rozpuštěním odštěpených intermediátů v DMSO za přidání DIPEA (435 ul; 2,5 mmol). Reakční směs byla míchána po dobu 18 h za laboratorní teploty. DMSO bylo následně odstraněno lyofilizací. Čištění proběhlo pomocí sloupcové chromatografie za použití mobilní fáze 7% MeOH/DCM a 1% AcOH.

Látka **9** byla čištěna pomocí sloupcové chromatografie za zvolení mobilní fáze 7 % MeOH/DCM a 1% AcOH. NMR bylo měřeno v DMSO-*d*₆. ¹H NMR obsahuje zbytkovou kyselinu octovou, která poskytuje singlet CH₃ skupiny při 1.91 ppm. V ¹³C kyselina octová poskytuje dva signály. První odpovídá CO při 171.93 a druhý signál CH₃ při 20.95.



Látka **9**: Hnědá olejovitá látka. Výtěžek 32 mg (41 %). ESI-MS *m/z* 260 [M-H]⁻. ¹H NMR (500 MHz, DMSO-*d*₆): δ 7.49 – 7.38 (m, 6H), 6.27 (s, 1H), 5.82 (d, *J* = 2.3 Hz, 1H), 5.40 (d, *J* = 2.3 Hz, 1H), 4.62 (d, *J* = 17.6 Hz, 1H), 4.41 (d, *J* = 17.5 Hz, 1H) ppm. ¹³C NMR (126 MHz, DMSO-*d*₆): δ 168.5, 162.9, 159.0, 135.2, 132.9, 129.4, 128.9, 127.4, 108.0, 78.9, 44.9 ppm. HRMS (ESI-TOF) *m/z* vypočteno pro C₁₃H₁₁NO₅ [M+H]⁺ 262,0710 nalezeno: 262,0710.

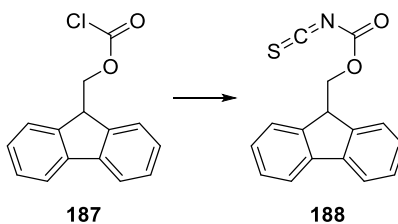
6.2.3.5 Reakce s Fmoc-NCS vedoucí k **12**



12

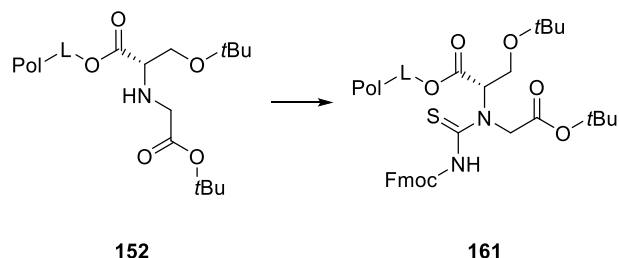
Obrázek 30: Struktura 3-thioxotetrahydro-1*H*-imidazo[5,1-*c*][1,4]oxazin-1,6(5*H*)-dionu **12**.

1) Příprava Fmoc-NCS



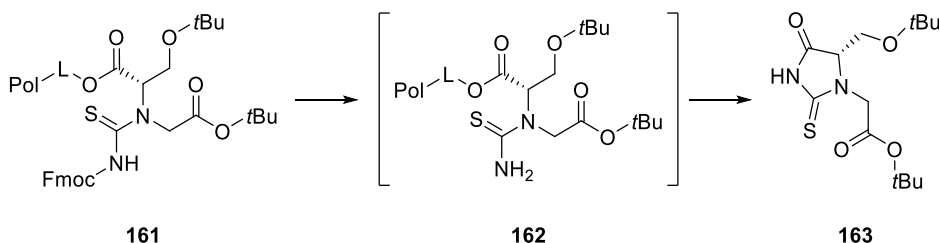
Fmoc-NCS byl připraven z Fmoc-Cl (388 mg; 1.5 mmol) a KSCN (146 mg; 1.5 mmol) v suchém THF po dobu 24 h za laboratorní teploty. Následně byl roztok Fmoc-NCS přefiltrován přes diskový mikrofiltr.

2) Reakce s Fmoc-NCS

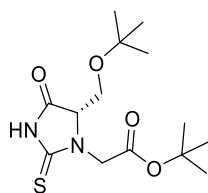


Roztok s připraveným Fmoc-NCS byl přidán k denosylované pryskyřici (500 mg) promyté suchým THF. Reakce probíhala 2 h za laboratorní teploty. Pryskyřice byla následně promyta 3x THF a 5x DCM. Vzorek pryskyřice byl následně odštěpen a analyzován na UPLC-MS po provedení kontroly pomocí Fmoc-Osu (0.5M roztok v DCM, 1ml).

3) Cyklické štěpení

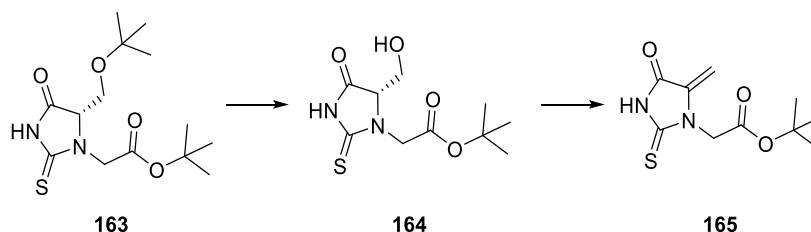


Štěpení Fmoc skupiny proběhlo v 35% roztoku piperidinu v DMF po dobu 18 h. Následně byl piperidin/DMF oddělen od pryskyřice a pryskyřice byla promyta 10 % piperidinem/DMF. Veškeré frakce byly spojeny a lyofilizovány po dobu 18 h. Čištění proběhlo na semipreparativní HPLC. Vzorek byl rozpuštěn v počáteční mobilní fázi. Nerozpustné Fmoc fragmenty byly odflitrovány a proběhlo čištění za zvolení metody 50:90. Následně byla látka analyzována HRMS a 1D NMR experimenty. Ve spektru ^1H NMR je vidět singlet u 3.31, který odpovídá D_2O v $\text{DMSO-}d_6$.



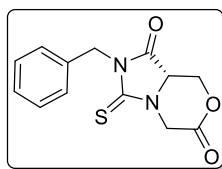
Látka **163**: Bílá amorfní látka. Výtěžek 40 mg (38 %). ESI-MS m/z 315 $[M-H]^{-1}$. 1H NMR (500 MHz, DMSO- d_6): δ 11.98 (b.s., 1H), 4.56 (d, $J = 17.4$ Hz, 1H), 4.35 (dd, $J = 4.8, 2.6$ Hz, 1H), 4.18 (d, $J = 17.5$ Hz, 1H), 3.78 (dd, $J = 10.5, 2.7$ Hz, 1H), 3.62 (dd, $J = 10.5, 4.8$ Hz, 1H), 1.42 (s, 9H), 1.10 (s, 9H) ppm. ^{13}C NMR (126 MHz, DMSO- d_6): δ 183.1, 172.6, 166.6, 81.6, 73.2, 64.2, 58.9, 46.0, 27.6, 27.0 ppm. HRMS (ESI-TOF) m/z vypočteno pro $C_{11}H_{10}N_2O_5S$ $[M-H]^{-}$ 315,1384 nalezeno: 315,1373.

4) Finální cyklizace



Finální cyklizace probíhala v 10% TFA/DCM. Cyklizace byla pozorována pomocí LCMS každý 10 minut po dobu 3 hodin. Při cyklizaci bylo pozorováno po 20 minutách štěpení nejpravděpodobněji etherové skupiny. Po 80 minutách byla pozorována dehydratace, za vzniku dvojné vazby. Cílový derivát **12** nevznikal. Produkt dehydratace **165** vznikal v 27 % čistotě. Z důvodu malého množství výchozí látky a vzniku velkého množství produktů při cyklizaci se jej nepodařilo izolovat.

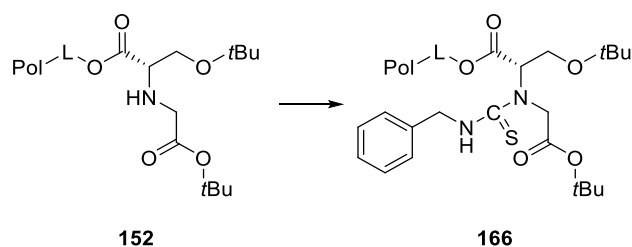
6.2.3.6 Reakce s benzyl-NCS vedoucí k **13**



13

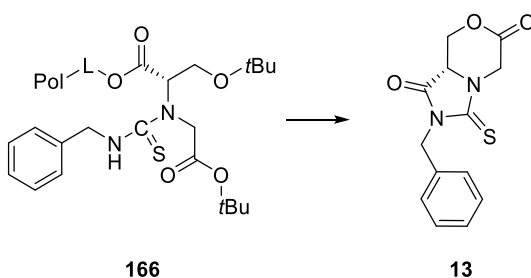
Obrázek 31: Struktura 2-benzyl-3-thioxotetrahydro-1*H*-imidazo[5,1-*c*][1,4]oxazin-1,6(5*H*)-dionu **13**.

1) Reakce s benzyl-NCS



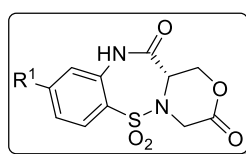
Benzyl-NCS (270 μL , 2 mmol) byl rozpuštěn v suchém THF (3 ml) a přidán k denosylované pryskyřici promyté suchým THF. Reakční směs byla třepána 44 h za laboratorní teploty. Pryskyřice byla promyta 3x THF a 5x DCM. Vzorek pryskyřice byl následně odštěpen a analyzován na UPLC-MS po provedení kontroly pomocí Fmoc-Osu (0.5M roztok v DCM, 1ml).

2) Cyklické štěpení



Finální štěpení proběhlo v čisté TFA (2 ml) po dobu 2 h. TFA byla následně odpařena proudem dusíku a lyofilizována po dobu 18 h.

6.2.3.7 Syntéza derivátů **11a**, **11b** a **11c**

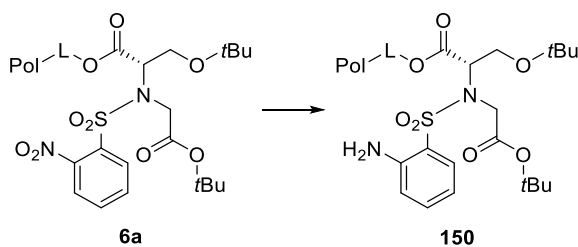


- 11a** $R^1 = \text{H}$
11b $R^1 = -\text{Cl}$
11c $R^1 = -\text{OMe}$

Obrázek 32: 1,12a-dihydrobenzo[f][1,4]oxazino[4,3-b][1,2,5]thiadiazepin-3,12(4*H*,11*H*)-dion 6,6-dioxid **11a** a substituované deriváty v poloze 9 - **11b** a **11c**.

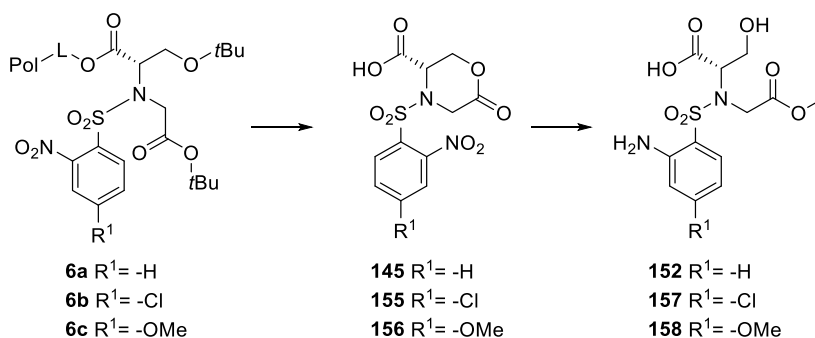
1) Redukce

a) Redukce na pryskyřici



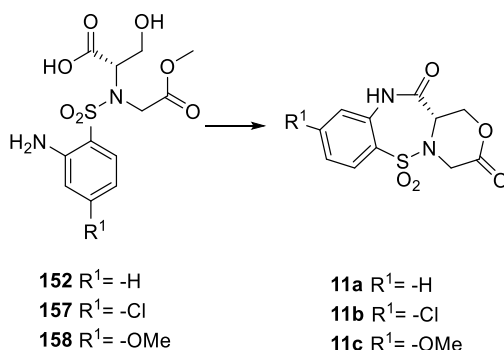
K alkylovanému derivátu navázanému na pryskyřici (500 mg) byl přidán roztok připravený rozpuštěním Na₂S₂O₄·2H₂O (1 235 mg; 5.8 mmol), K₂CO₃ (965 mg; 7.0 mmol) v H₂O/DCM (1:1; 5 ml) za následného přidavku TBAHS (170 mg; 0.5 mmol). Reakční směs byla třepána 18 h při laboratorní teplotě. Následně byla pryskyřice promyta 6x a DCM/H₂O a 6x DCM. Posledním krokem bylo standardní štěpení látky a její analýza pomocí UPLC-MS po provedení kontroly pomocí Fmoc-Osu (0.5M roztok v DCM, 1ml).

b) Redukce v roztoku za použití autoklávu



Nejdříve byla látka odštěpena z pryskyřice pomocí štěpícího koktejlu TFA/DCM (1:1). Roztok TFA/DCM obsahující odštěpený produkt z 500 mg pryskyřice (112mg) byl zbaven zbytků TFA a DCM odpařením pomocí proudu dusíku a lyofilizací. Odparek byl rozpuštěn v degasovaném MeOH (5 ml) a poté byl přidán katalyzátor - 10% Pd/C (114 mg; 35 mol%) pro derivát **148** a **153** nebo PtO₂ (68 mg; 1 eq.) pro derivát **152**. Baňka byla umístěna do autoklávu. Autokláv byl napřed 3x promyt dusíkem, poté 2x promyt vodíkem a následně napuštěn vodíkem na tlak 0.35 MPa pro **148** anebo na tlak 0,5 MPa pro **152** a **153**. Analýza byla prováděna průběžně po dobu 6 hodin pomocí UPLC-MS.

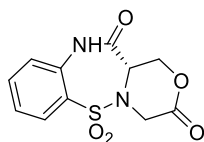
2) Cyklizace



Cyklizace probíhala v DCE 3 ml za přidání katalytického množství *p*TSA při teplotě 85°C po dobu 18 h v případě chloro derivátu **11b** po dobu 30 h. Průběh reakce byl kontrolován pomocí UPLC-MS analýz. Po skončení cyklizace byl DCE odpařen na RVO do sucha.

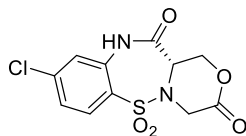
Čištění látky **11a** proběhlo pomocí sloupcové chromatografie za zvolení mobilní fáze EtOAc/*n*-Hexan (2:1).

NMR bylo měřeno v DMSO-*d*₆. V ¹H NMR je singlet u 2.54 ppm, který odpovídá DMSO a singlet u 3.31 ppm odpovídající D₂O.



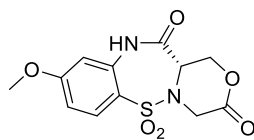
Látka **11a**: Hnědá olejovitá látka. Výtěžek 25 mg (29 %). ESI-MS *m/z* 281 [M-H]⁻. ¹H NMR (500 MHz, DMSO-*d*₆): δ 11.03 (s, 1H), 7.82 (dd, *J* = 7.9, 1.5 Hz, 1H), 7.75 (td, *J* = 7.8, 1.5 Hz, 1H), 7.37 (td, *J* = 7.7, 1.1 Hz, 1H), 7.28 (dd, *J* = 8.1, 1.1 Hz, 1H), 4.68 (d, *J* = 18.5 Hz, 1H), 4.18 (d, *J* = 18.6 Hz, 1H), 1.73 (s, 3H) ppm. ¹³C NMR (126 MHz, DMSO-*d*₆): δ 168.6, 165.4, 136.0, 135.8, 128.8, 126.6, 124.7, 122.9, 96.1, 46.1, 25.2 ppm. HRMS (ESI-TOF) *m/z* vypočteno pro C₁₁H₁₀N₂O₅S [M+H]⁺ 283,0383 nalezeno: 283,0383.

Čištění látky **11b** proběhlo pomocí sloupcové chromatografie za zvolení mobilní fáze EtOAc/*n*-Hexan (1:1).



Látka **11b**: Žlutá amorfnní pevná látka. Výtěžek 16 mg (11 %). ESI-MS m/z 315 [M-H]⁻. ¹H NMR (500 MHz, DMSO-*d*₆): δ 11.16 (s, 1H), 7.82 (d, J = 8.5 Hz, 1H), 7.45 (dd, J = 8.4, 2.0 Hz, 1H), 7.35 (d, J = 2.0 Hz, 1H), 4.68 (d, J = 18.5 Hz, 1H), 4.27 (d, J = 18.4 Hz, 1H), 1.75 (s, 3H) ppm. ¹³C NMR (126 MHz, DMSO-*d*₆): δ 168.56, 165.55, 140.08, 137.45, 130.75, 125.38, 124.56, 122.25, 95.96, 45.97, 25.28 ppm. HRMS (ESI-TOF) m/z vypočteno pro C₁₁H₉ClN₂O₅S [M+H]⁺ 316,9993 nalezeno: 316,9994.

Čištění látky **11c** proběhlo pomocí sloupcové chromatografie za zvolení mobilní fáze EtOAc/*n*-Hexan (2:1).



Látka **11c**: Žlutá olejovitá látka: Výtěžek 19 mg (14%). ESI-MS m/z 311 [M-H]⁻. ¹H NMR (500 MHz, DMSO-*d*₆): δ 10.95 (s, 1H), 7.74 (d, J = 8.8 Hz, 1H), 6.92 (dd, J = 8.8, 2.4 Hz, 1H), 6.77 (d, J = 2.5 Hz, 1H), 4.65 (d, J = 18.6 Hz, 1H), 4.14 (d, J = 18.6 Hz, 1H), 3.85 (s, 3H), 1.72 (s, 3H) ppm. ¹³C NMR (126 MHz, DMSO-*d*₆): δ 168.93, 165.61, 164.43, 138.01, 130.89, 118.48, 110.10, 107.94, 96.21, 56.04, 46.25, 25.22 ppm. HRMS (ESI-TOF) m/z vypočteno pro C₁₂H₁₂N₂O₆S [M+H]⁺ 313,0489 nalezeno: 313,0489.

7 Závěr

Tato diplomová práce se zabývala syntézou fúzovaných morfolin-2-onů pomocí syntézy na pevné fázi. V teoretické části byla shrnuta metodika příprav morfolin-2-onů, jejich vlastnosti a biologická aktivita. Dále zde byla shrnuta problematika syntézy látek strukturně podobných cílovým derivátům této práce.

Prvním cílem byla příprava klíčových intermediátů pro následné chemické transformace. Po optimalizaci podmínek alkylace byly připraveny čtyři klíčové intermediáty: 4-((2-nitrofenyl)sulfonyl)-6-oxomorfolin-3-karboxylová kyselina; 4-((4-chloro-2-nitrofenyl)sulfonyl)-6-oxomorfolin-3-karboxylová kyselina; 4-((4-methoxy-2-nitrofenyl)sulfonyl)-6-oxomorfolin-3-karboxylová kyselina a 4-((4-nitrofenyl)sulfonyl)-6-oxomorfolin-3-karboxylová kyselina. Následně byly tyto deriváty plně charakterizovány pomocí HRMS a 1D NMR experimentů.

Druhým cílem bylo otestovat a optimalizovat devět navržených syntetických transformací připravených klíčových intermediátů, které měly poskytnout dvanáct různých heterocyklických derivátů. V této části práce bylo zjištěno, že reaktivita klíčových intermediátů s různými elektrofilny je podstatně problematičtější než u analogických ketonických sloučenin, které byly předmětem předchozího výzkumu. Záměna ketonu za esterovou funkční skupinu způsobila výrazné snížení nukleofility NH skupiny, což se (pravděpodobně i ve spojení se sterickým efektem COO*t*Bu skupiny) negativně projevilo na acylačních nebo karbamoylačních reakcích. Ve většině případů musely být reakční podmínky velmi složitě hledány a optimalizovány, aby byly získány příslušné meziprodukty v akceptovatelné surové čistotě. Další nečekanou komplikací byla i velmi nízká stabilita morfolin-2-onového skeletu, který snadno podléhal hydrolyze a alkoholýze vedoucí k otevření cyklu. Z tohoto důvodu byla v řadě případů problematická izolace a čištění intermediátů i finálních produktů.

Navzdory výše uvedeným problémům bylo několikastupňovou syntézou připraveno celkově pět cílových derivátů a tři prekurzory cílových heterocyklů.

První derivát byl připraven pomocí klíčové reakce s α -bromofenylacetovou kyselinou, která vedla k 3-fenyldihydro-1*H*-[1,4]oxazino[3,4-*c*][1,4]oxazin-1,4,7(3*H*,6*H*)-trionu. Druhý derivát 1,12a-dihydro-6*H*-benzo[*e*][1,4]oxazino[4,3-*a*][1,4]diazepin-3,6,12(4*H*,11*H*)-trion byl připraven pomocí reakce s 2-nitrobenzoovou kyselinou. Redukcí nitro skupiny na benzenovém jádře byly připraveny tři deriváty. První

nesubstituovaný derivát 1,12a-dihydrobenzo[*f*][1,4]oxazino[4,3-*b*][1,2,5]thiadiazepin-3,12(4*H*,11*H*)-dion 6,6-dioxid a dva substituované deriváty 9-chloro-1,12a-dihydrobenzo[*f*][1,4]oxazino[4,3-*b*][1,2,5]thiadiazepin-3,12(4*H*,11*H*)-dion 6,6-dioxid a 9-methoxy-1,12a-dihydrobenzo[*f*][1,4]oxazino[4,3-*b*][1,2,5]thiadiazepin-3,12(4*H*,11*H*)-dion 6,6-dioxid. Tyto deriváty byly plně charakterizovány.

Po acylaci s Fmoc-Phe-OH bylo další modifikací dosaženo *tert*-butyl 2-(3-benzyl-6-(*tert*-butoxymethyl)-2,5-dioxopiperazin-1-yl)acetátu, který byl vyizolován pomocí semipreparativní HPLC a plně charakterizován. Finální cyklické štěpení *tert*-butyl protektivních skupin na cílový derivát 7-benzyltetrahydropyrazino[2,1-*c*][1,4]oxazin-3,6,9(4*H*)-trion bylo provedeno pomocí TFA/DCM (50%) a bylo zjištěno, že cyklizace na finální heterocyklus probíhá.

Po reakci s Fmoc-NCS bylo dosaženo *tert*-butyl 2-(5-(*tert*-butoxymethyl)-4-oxo-2-thioxoimidazolidin-1-yl)acetátu, který byl vyčištěn pomocí semipreparativní HPLC a plně charakterizován. Byla vyzkoušena i finální cyklizace pomocí TFA/DCM (50%), kdy došlo k rozložení výchozí látky. Dále byla vyzkoušena cyklizace v TFA/DCM (10%), kdy bylo zjištěno, že pravděpodobně dochází nejprve ke štěpení *tert*-butyl skupiny na primární alkoholové skupině a následně k dehydrataci za tvorby dvojné vazby. Tyto meziprodukty se bohužel nepodařilo vyizolovat v dostatečné čistotě.

Další klíčovou reakcí byla reakce s 2-nitrobenzyl bromidem. Při této reakci docházelo, po optimalizaci kyselého štěpení v prvním kroku, k tvorbě produktu v 99% konverzi. Následná redukce na pevné fázi však neposkytla požadovaný produkt a došlo k rozložení výchozí látky. Podařilo se tedy připravit pouze 4-(2-nitrobenzyl)-6-oxomorfolin-3-karboxylovou kyselinu, která byla vyizolována a charakterizována pomocí 1D NMR experimentů a HRMS.

Reakce s benzyl-NCS sice vedla k požadovanému intermediátu, nicméně tento byl detekován ve velmi nízké surové čistotě (17 %), proto nebyl v preparativním měřítku připraven.

Byla také vyzkoušena chemická transformace – C-arylace, která byla navržena pro vyzkoušení reaktivity derivátu obsahujícího 2-nitrobenzensulfonamid. Navzdory optimalizaci této reakce 4-((2-nitrofenyl)sulfonyl)-6-oxomorfolin-3-karboxylová kyselina neposkytovala předpokládaný produkt, kterého bylo dosaženo v případě látek nesoucích ve své molekule keton.

Připravené cílové deriváty a klíčové intermediáty budou podrobeny testování antimikrobiální a cytotoxické aktivity.

Jak je patrné z výše uvedených výsledků, nepodařilo se vzhledem k problematické reaktivitě a stabilitě provést všechny vytyčené transformace v preparativním měřítku, nicméně i v případě problematických modifikací byly ve většině případů nalezeny podmínky pro přípravu cílových derivátů nebo jejich prekurzorů v analytickém množství. V těchto případech budou následně příslušné látky připraveny v preparativním množství a plně charakterizovány.

8 Seznam použité literatury

- (1) Králová, P.; Soral, M. Synthesis of 2-Alkylsulfonyl-imidazoles with three diversity positions from immobilized α -acylamino ketones. *ACS Comb. Sci.* **2018**, *20* (8), 467–471.
- (2) Králová, P.; Maloň, M.; Koshino, H.; Soral, M. Convenient Synthesis of Thiohydantoins, Imidazole-2-Thiones and imidazo[2,1-*b*]thiazol-4-iums from Polymer-Supported α -Acylamino Ketones. *Molecules* **2018**, *23* (4), 976.
- (3) Ručilová, V.; Maloň, M.; Soral, M. Use of Triethylsilane for Directed Enantioselective Reduction of Olefines: Synthesis of Pyrazino[2,1-*c*][1,4]oxazine-6,9-Diones with Full Control of the Absolute Configuration. *European J. Org. Chem.* **2018**, *2018* (4), 564–570.
- (4) Ručilová, V.; Králová, P.; Soral, M. Synthesis of Disubstituted Pyrazino-Oxazine Derivatives with Controlled Stereochemistry. *European J. Org. Chem.* **2017**, *2017* (47), 7034–7039.
- (5) Králová, P.; Maloň, M.; Soral, M. Stereoselective Synthesis of Benzo[*e*][1,4]oxazino[4,3-*a*][1,4]diazepine-6,12-diones with Two Diversity Positions. *ACS Comb. Sci.* **2017**, *19* (12), 770–774.
- (6) Králová, P.; Fülöpová, V.; Maloň, M.; Volná, T.; Popa, I.; Soral, M. Stereoselective Polymer-Supported Synthesis of Morpholine- and Thiomorpholine-3-carboxylic Acid Derivatives. *ACS Comb. Sci.* **2017**, *19* (3), 173–180.
- (7) Králová, P.; Maloň, M.; Volná, T.; Ručilová, V.; Soral, M. Polymer-Supported Stereoselective Synthesis of Benzoxazino[4,3-*b*][1,2,5]thiadiazepinone 6,6-dioxides. *ACS Comb. Sci.* **2017**, *19* (10), 670–674.
- (8) Králová, P.; Benická, S.; Soral, M. Polymer-Assisted Synthesis of Single and Fused Diketomorpholines. *ACS Comb. Sci.* **2019**, *21* (3), 154–157.
- (9) Hlaváč, J.; Soral, M.; Krchňák, V. Practical Aspects of Combinatorial Solid-Phase Synthesis. V *Solid-Phase Organic Synthesis*; John Wiley & Sons, Inc., **2011**; pp 95–130.
- (10) Hampl, F.; Paleček, J. *Farmakochemie*, 1st ed.; Praha, **2002**.
- (11) Soral, M.; Hlaváč, J.; Krchňák, V. Linkers for solid-phase peptide synthesis. In *Amino Acids, Peptides and Proteins in Organic Chemistry*; Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA: Weinheim, **2011**; pp 273–312.
- (12) Lemrová, B.; Fülöpová, V. *Praktické Aspekty Syntézy Na Pevné Fázi*; Univerzita Palackého v Olomouci, **2015**.
- (13) Veizerová, L.; Světlík, J.; Kettmann, V. Napětovo Riadené Vápnikové Kanály: Štruktúra,

Charakteristika a Terminológia. *Čes. slov. Farm.*, **2007**, 4 (56), 178–182.

- (14) Catterall, W. A. Voltage-Gated Calcium Channels. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* **2011**, 3 (8), 3947–3947.
- (15) Trojan, S. *Lékařská Fyziologie*, 4th ed.; Grada: Praha, **2003**.
- (16) Nelson, M.; Todorovic, S.; Perez-Reyes, E. The Role of T-Type Calcium Channels in Epilepsy and Pain. *Curr. Pharm. Des.* **2006**, 12 (18), 2189–2197.
- (17) Dziegielewska, B.; Gray, L. S.; Dziegielewski, J. T-Type Calcium Channels Blockers as New Tools in Cancer Therapies. *Pflügers Arch. - Eur. J. Physiol.* **2014**, 466 (4), 801–810.
- (18) Bermejo, P. E.; Anciones, B. Review: A Review of the Use of Zonisamide in Parkinson's Disease. *Ther. Adv. Neurol. Disord.* **2009**, 2 (5), 313–317.
- (19) Todorovic, S. M.; Jevtovic-Todorovic, V. Targeting of Cav_{3.2} T-Type calcium channels in peripheral sensory neurons for the treatment of painful diabetic neuropathy. *Pflügers Arch. - Eur. J. Physiol.* **2014**, 466 (4), 701–706.
- (20) Ku, I. W.; Cho, S.; Doddareddy, M. R.; Jang, M. S.; Keum, G.; Lee, J.-H.; Chung, B. Y.; Kim, Y.; Rhim, H.; Kang, S. B. Morpholin-2-One derivatives as novel selective T-Type Ca²⁺ channel blockers. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2006**, 16 (19), 5244–5248.
- (21) Kashima, C.; Harada, K. Nucleophilic Ring-Opening Reactions of Morpholin-2-Ones. A Resolution of dl-(Secondary-alkyl)amines. *J. Org. Chem.* **1989**, 54 (4), 789–792.
- (22) Chong, H.-S.: Bimodal Ligands with Macrocyclic and Acyclic Binding Moieties, Complexes and Compositions Thereof, and Methods of Using. WO2010011367A3, 28 leden, **2010**.
- (23) Trstenjak, U.; Ilaš, J.; Kikelj, D. Advances in the Synthesis of Morpholin-3-Ones and Morpholin-2-Ones. *Synthesis (Stuttg.)* **2012**, 44 (23), 3551–3578.
- (24) Monasson, O.; Ginisty, M.; Mravljak, J.; Bertho, G.; Gravier-Pelletier, C.; Le Merrer, Y. Synthetic studies towards diazepamone scaffolds. *Tetrahedron: Asymmetry* **2009**, 20 (20), 2320–2330.
- (25) N. Devine, P.; S. Foster, B.; J. J. Grabowski, E.; J. Reider, P. An Asymmetric Synthesis of 3-Aryl-1,4-oxazin-2-Ones: Synthesis of a Key Intermediate of an NK₁ Receptor Antagonist. *Heterocycles* **2002**, 58 (1), 119–123.
- (26) St. Georgiev, V.; B. Mullen, G.; G. Acker, C. Synthesis of Novel Methyl (2-Oxo-3-morpholinylodene)acetates. *Heterocycles* **1986**, 24 (5), 1285–1286.

- (27) Horáček, J. *Základy Lékařské Mikrobiologie*; Karolinum, 2000.
- (28) Souza, R. Y.; Bataglioni, G. A.; Ferreira, D. A. C.; Gatto, C. C.; Eberlin, M. N.; Neto, B. A. D. Insights on the Petasis Borono-Mannich multicomponent reaction mechanism. *RSC Adv.* **2015**, *5* (93), 76337–76341.
- (29) Churches, Q. I.; Johnson, J. K.; Fifer, N. L.; Hutton, C. A. Anomalies in the Stereoselectivity of the Petasis Reaction Using Styrenyl Boronic Acids. *Aust. J. Chem.* **2011**, *64* (1), 62–67.
- (30) Le Quement, S. T.; Flagstad, T.; Mikkelsen, R. J. T.; Hansen, M. R.; Givskov, M. C.; Nielsen, T. E. Petasis Three-Component Coupling Reactions of Hydrazides for the Synthesis of Oxadiazolones and Oxazolidinones. *Org. Lett.* **2012**, *14* (2), 640–643.
- (31) Kim, Y. B.; Choi, E. H.; Keum, G.; Kang, S. B.; Lee, D. H.; Koh, H. Y.; Kim, Y. An Efficient Synthesis of Morpholin-2-one Derivatives Using Glycolaldehyde Dimer by the Ugi Multicomponent Reaction. *Org. Lett.* **2001**, *3* (26), 4149–4152.
- (32) Bailey, W. F.; Bobbitt, J. M.; Wiberg, K. B. Mechanism of the Oxidation of Alcohols by Oxoammonium Cations. *J. Org. Chem.* **2007**, *72* (12), 4504–4509.
- (33) Blanc, M.; Cussac, M.; Boucherle, A.; Leclerc, G. Synthesis and immunomodulating activity of 1-amino-2-thiohydantoin derivatives. *Eur. J. Med. Chem.* **1992**, *27* (8), 839–843.
- (34) Łażewska, D.; Maludziński, P.; Szymańska, E.; Kieć-Kononowicz, K. The lipophilicity estimation of 5-arylidene derivatives of (2-thio)hydantoin with antimycobacterial activity. *Biomed. Chromatogr.* **2007**, *21* (3), 291–298.
- (35) Santos, L. C.; Uchoa, F. T.; Canas, A. R. P. A.; Sousa, I. A.; Moura, R. O. Synthesis and anti-inflammatory activity of new thiazolidine-2,4-diones, 4-thioxothiazolidinones and 2-thioxoimidazolidinones. *Heterocycl. Commun.* **2005**, *11* (2), 121–128.
- (36) Rodgers, T. R.; LaMontagne, M. P.; Markovac, A.; Ash, A. B. Hydantoins as antitumor agents. *J. Med. Chem.* **1977**, *20* (4), 591–594.
- (37) Majumdar, K.; Ray, K.; Ganai, S. Intramolecular Aza-Wittig Reaction: A New Efficient Tool for the Construction of Piperazine 2,5-Dione Derivatives. *Synlett* **2010**, *14*, 2122–2124.
- (38) Tullberg, M.; Grøtli, M.; Luthman, K. Synthesis of Functionalized, Unsymmetrical 1,3,4,6-Tetrasubstituted 2,5-Diketopiperazines. *J. Org. Chem.* **2007**, *72* (1), 195–199.
- (39) Chai, C. L. L.; King, A. R. Methylene piperazine-2,5-diones as templates for the synthesis

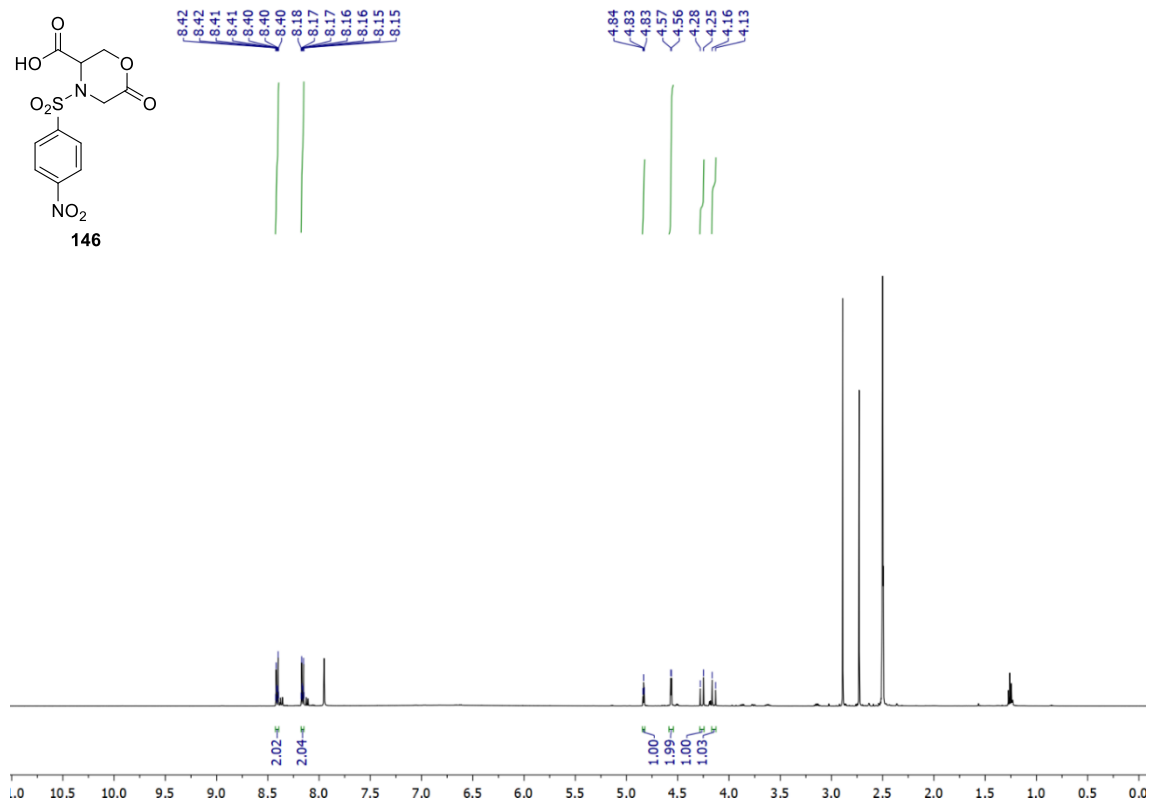
- of amino acid derivatives. *Tetrahedron Lett.* **1995**, *36* (24), 4295–4298.
- (40) Gordon, D. W.; Steele, J. Reductive alkylation on a solid phase: Synthesis of a piperazinedione combinatorial Library. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **1995**, *5* (1), 47–50.
- (41) Kowalski, J.; Lipton, M. A. Solid Phase Synthesis of a Diketopiperazine Catalyst Containing the Unnatural Amino Acid (*S*)-Norarginine. *Tetrahedron Lett.* **1996**, *37* (33), 5839–5840.
- (42) Wang, D.-X.; Liang, M.-T.; Tian, G.-J.; Lin, H.; Liu, H.-Q. A facile pathway to synthesize diketopiperazine derivatives. *Tetrahedron Lett.* **2002**, *43* (5), 865–867.
- (43) Veerman, J. J. N.; Bon, R. S.; Hue, B. T. B.; Girones, D.; Rutjes, F. P. J. T.; van Maarseveen, J. H.; Hiemstra, H. Synthesis of 2,6-Bridged Piperazine-3-Ones by *N*-Acyliminium Ion Chemistry. *J. Org. Chem.* **2003**, *68* (11), 4486–4494.
- (44) Smith, R. A.; Bobko, M. A.; Lee, W. Solid-phase synthesis of a library of piperazinediones and diazepinediones via kaiser oxime resin. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **1998**, *8* (17), 2369–2374.
- (45) Cho, S.; Keum, G.; Kang, S. B.; Han, S. Y.; Kim, Y. An efficient synthesis of 2,5-diketopiperazine derivatives by the Ugi four-center three-component reaction. *Mol. Divers.* **2003**, *6*, 283–286.
- (46) Igwe, C. N.; Okoro, U. C. Synthesis, Characterization, and Evaluation for Antibacterial and Antifungal Activities of *N*-Heteroaryl Substituted Benzene Sulphonamides. *Org. Chem. Int.* **2014**, *2014*, 1–5.
- (47) Giannotti, D.; Viti, G.; Sbraci, P.; Pestellini, V.; Volterra, G.; Borsini, F.; Lecci, A.; Meli, A.; Dapporto, P.; Paoli, P. New dibenzothiadiazepine derivatives with antidepressant activities. *J. Med. Chem.* **1991**, *34* (4), 1356–1362.
- (48) Owa, T.; Yoshino, H.; Okauchi, T.; Yoshimatsu, K.; Ozawa, Y.; Sugi, N. H.; Nagasu, T.; Koyanagi, N.; Kitoh, K. Discovery of novel antitumor sulfonamides targeting G1 phase of the cell cycle. *J. Med. Chem.* **1999**, *42* (19), 3789–3799.
- (49) Ren, J.; Wang, Y.; Wang, J.; Lin, J.; Wei, K.; Huang, R. Synthesis and antitumor activity of *N*-sulfonyl-3,7-dioxo-5 β -cholan-24-amides, ursodeoxycholic acid derivatives. *Steroids* **2013**, *78* (1), 53–58.
- (50) Kim, D. H.; Yun, B. H.; Choi, E. W.; Oh, S. M.; Alam, M. M.; Lee, K.-T.; Lee, Y. S. Synthesis and Cytotoxic Effects of Sulfonamide-Substituted 5,6,7-Trimethoxyflavones on Human Cancer Cell Lines. *Bull. Korean Chem. Soc.* **2013**, *34* (8), 2507–2510.

- (51) Flosi, W. J.; DeGoey, D. A.; Grampovnik, D. J.; Chen, H.; Klein, L. L.; Dekhtyar, T.; Masse, S.; Marsh, K. C.; Mo, H. M.; Kempf, D. Discovery of imidazolidine-2,4-dione-linked HIV protease inhibitors with activity against lopinavir-resistant mutant HIV. *Bioorg. Med. Chem.* **2006**, *14* (19), 6695–6712.
- (52) Barea, C.; Pabón, A.; Castillo, D.; Zimic, M.; Quiliano, M.; Galiano, S.; Pérez-Silanes, S.; Monge, A.; Deharo, E.; Aldana, I. New salicylamide and sulfonamide derivatives of quinoxaline 1,4-Di-N-oxide with antileishmanial and antimalarial activities. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2011**, *21* (15), 4498–4502.
- (53) Samala, G.; Devi, P. B.; Nallangi, R.; Yogeewari, P.; Sriram, D. Development of 3-phenyl-4,5,6,7-tetrahydro-1*H*-pyrazolo[4,3-*c*]pyridine derivatives as novel Mycobacterium tuberculosis pantothenate synthetase inhibitors. *Eur. J. Med. Chem.* **2013**, *69*, 356–364.
- (54) Fülöpová, V.; Soral, M. Mining the Chemical Space: Application of 2/4-Nitrobenzenesulfonamides in Solid-Phase Synthesis. *ACS Comb. Sci.* **2015**, *17* (10), 570–591.
- (55) Fukuyama, T.; Jow, C.-K.; Cheung, M. 2- and 4-Nitrobenzenesulfonamides: Exceptionally versatile means for preparation of secondary amines and protection of amines. *Tetrahedron Lett.* **1995**, *36* (36), 6373–6374.
- (56) Hadjipavlou-Litina, D.; Hansch, C. Quantitative Structure-Activity Relationships of the Benzodiazepines. A Review and Reevaluation. *Chem. Rev.* **1994**, *94* (6), 1483–1505.
- (57) Butcher, J. W.; Liverton, N. J.; Claremon, D. A.; Freidinger, R. M.; Jurkiewicz, N. K.; Lynch, J. J.; Salata, J. J.; Wang, J.; Dieckhaus, C. M.; Slaughter, D. E.; et al. Novel 5-cyclopropyl-1,4-benzodiazepin-2-ones as potent and selective I_{Ks}-blocking class III antiarrhythmic agents. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2003**, *13* (6), 1165–1168.
- (58) Chen, C.-Y.; Lee, P.-H.; Lin, Y.-Y.; Yu, W.-T.; Hu, W.-P.; Hsu, C.-C.; Lin, Y.-T.; Chang, L.-S.; Hsiao, C.-T.; Wang, J.-J.; et al. Synthesis, DNA-binding abilities and anticancer activities of triazole-pyrrolo[2,1-*c*][1,4]benzodiazepines hybrid scaffolds. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2013**, *23* (24), 6854–6859.
- (59) Cortez-Maya S.; Cortés C.E.; Hernández-Ortega S.; Ramírez Apan T.; Nieto C.A.; Lijanová, I.; Martínez-García M.; Anticancer activity and anti-inflammatory studies of 5-aryl-1,4-benzodiazepine derivatives. *Anticancer. Agents Med. Chem.* **2012**, *12* (6), 611–618.
- (60) Anzini, M.; Canullo, L.; Braile, C.; Cappelli, A.; Gallelli, A.; Vomero, S.; Menziani, M.

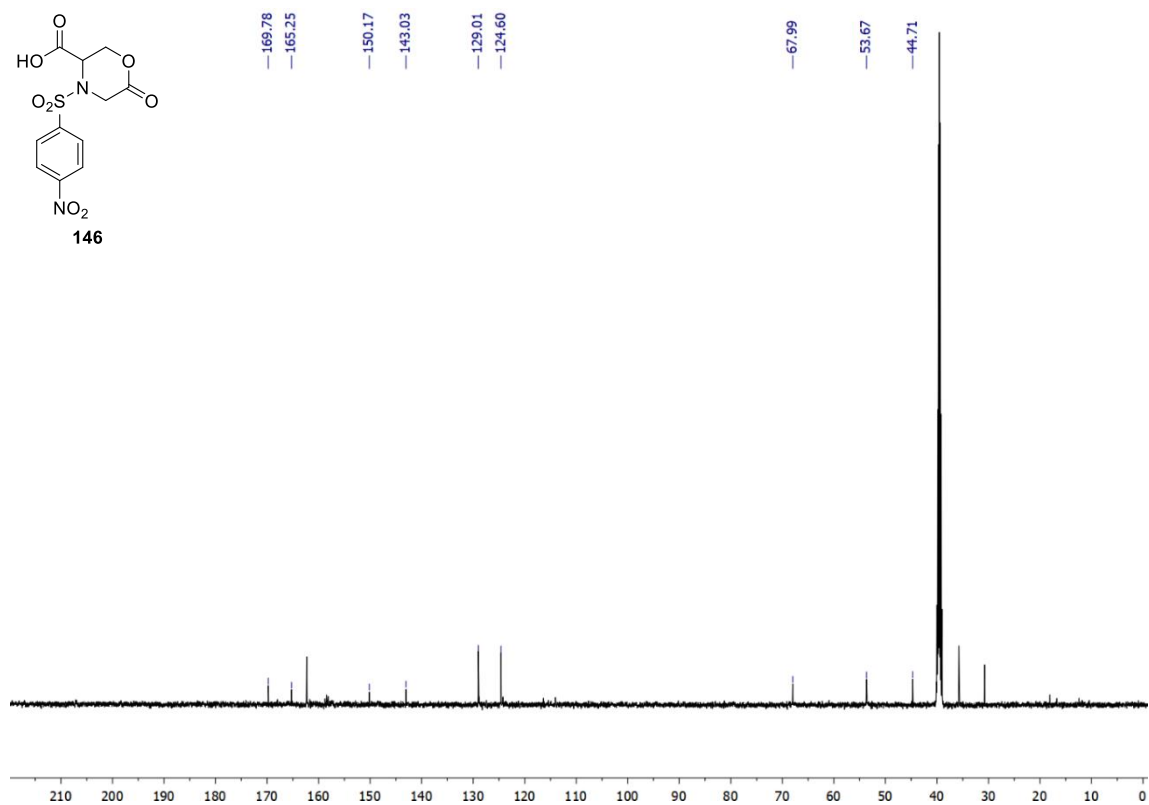
- C.; De Benedetti, P. G.; Rizzo, M.; Collina, S.; et al. Synthesis, Biological Evaluation, and Receptor Docking Simulations of 2-[(Acylamino)ethyl]-1,4-benzodiazepines as κ -Opioid Receptor Agonists Endowed with Antinociceptive and Antiamnesic Activity. *J. Med. Chem.* **2003**, *46* (18), 3853–3864.
- (61) Mandrioli, R.; Mercolini, L.; Raggi, M. A. Benzodiazepine metabolism: an analytical perspective. *Curr. Drug Metab.* **2008**, *9* (8), 827–844.
- (62) Breslin, H. J.; Kukla, M. J.; Kromis, T.; Cullis, H.; De Knaep, F.; Pauwels, R.; Andries, K.; De Clercq, E.; Janssen, M. A. C.; Janssen, P. A. J. Synthesis and anti-HIV activity of 1,3,4,5-tetrahydro-2*H*-1,4-benzodiazepin-2-one (TBO) derivatives. truncated 4,5,6,7-tetrahydro-5-methylimidazo[4,5,1-*jk*][1,4]benzodiazepin-2(1*H*)-ones (TIBO) analogues. *Bioorg. Med. Chem.* **1999**, *7* (11), 2427–2436.
- (63) Olkkola, K. T.; Ahonen, J. Midazolam and other benzodiazepines. In *Modern Anesthetics; V Handbook of Experimental Pharmacology*, **2008**; Vol. 182, pp 335–360.
- (64) Thurston, D. E. Advances in the Study of Pyrrolo[2,1-*c*][1,4]benzodiazepine (PBD) Antitumour Antibiotics. V *Molecular Aspects of Anticancer Drug-DNA Interactions. Topics in Molecular and Structural Biology*. **1993**; pp 54–88.
- (65) Matthews, J. M.; Hoekstra, W. J.; Dyatkin, A. B.; Hecker, L. R.; Hlasta, D. J.; Poulter, B. L.; Andrade-Gordon, P.; de Garavilla, L.; Demarest, K. T.; Ericson, E.; et al. Potent nonpeptide vasopressin receptor antagonists based on oxazino- and thiazinobenzodiazepine templates. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2004**, *14* (11), 2747–2752.
- (66) Matthews, J.; Hlasta, D.; Andrade-Gordon, P.; Demarest, K.; Ericson, E.; Gunnet, J.; Hageman, W.; Look, R.; Moore, J.; Maryanoff, B. Pyrazinobenzodiazepines as Potent Nonpeptide Vasopressin Receptor Antagonists. *Lett. Drug Des. Discov.* **2005**, *2* (3), 219–223.
- (67) Aicher, T. D.; Chen, Z.; Chen, Y.; Faul, M. M.; Joseph Herman Krushinski; Huerou, Y. Le; Pineiro-Nunez, M. M.; Rocco, V. P.; Ruley, K. M.; Schaus, J. M.; et al.: Preparation of Piperazine-Substituted Aryl-Fused Benzodiazepines as Dopamine D2 Receptor Antagonists for Treating Psychosis and Bipolar Disorders. WO2003082877A1, říjen 9, **2003**.
- (68) Lalli, C.; Trabocchi, A.; Sladojevich, F.; Menchi, G.; Guarna, A. Diversity-Oriented Synthesis of Morpholine-Containing Molecular Scaffolds. *Chem. - A Eur. J.* **2009**, *15* (32), 7871–7875.
- (69) Matthews, J. M.; Dyatkin, A. B.; Evangelisto, M.; Gauthier, D. A.; Hecker, L. R.;

- Hoekstra, W. J.; Liu, F.; Poulter, B. L.; Sorgi, K. L.; Maryanoff, B. E. Synthesis, resolution, and absolute configuration of novel tricyclic benzodiazepines. *Tetrahedron: Asymmetry* **2004**, *15* (8), 1259–1267.
- (70) Cingolani, G. M.; Di Stefano, A.; Mosciatti, B.; Napolitani, F.; Giorgioni, G.; Ricciutelli, M.; Claudi, F. Synthesis of L-(+)-3-(3-hydroxy-4-pivaloyloxybenzyl)-2,5-diketomorpholine as potential prodrug of L-dopa. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2000**, *10* (12), 1385–1388.
- (71) Hasumi, K.; Shinohara, C.; Iwanaga, T.; Endo, A. Lateritin, a new inhibitor of acyl-CoA:cholesterol acyltransferase produced by *Gibberella lateritium* IFO 7188. *J. Antibiot. (Tokyo)*. **1993**, *46* (12), 1782–1787.
- (72) Arcelli, A.; Balducci, D.; Grandi, A.; Porzi, G.; Sandri, M.; Sandri, S. Chiral 1,4-morpholin-2,5-dione derivatives as α -glucosidase inhibitors: Part 2. *Tetrahedron: Asymmetry* **2005**, *16* (8), 1495–1501.
- (73) Smelcerovic, A.; Rangelov, M.; Smelcerovic, Z.; Veljkovic, A.; Cherneva, E.; Yancheva, D.; Nikolic, G. M.; Petronijevic, Z.; Kocic, G. Two 6-(propan-2-yl)-4-methyl-morpholine-2,5-diones as new non-purine xanthine oxidase inhibitors and anti-inflammatory agents. *Food Chem. Toxicol.* **2013**, *55*, 493–497.
- (74) Kagamizono, T.; Nishino, E.; Matsumoto, K.; Kawashima, A.; Kishimoto, M. Bassiatin, a New Platelet Aggregation Inhibitor Produced by *Beauveria bassiana* K-717. *J. Antibiot. (Tokyo)*. **1995**, *48* (12), 1407–1413.
- (75) Oh, H.; Kim, T.; Oh, G. S.; Pae, H. O.; Hong, K. H.; Chai, K. Y.; Kwon, T. O.; Chung, H. T.; Lee, H. S. (3*R*,6*R*)-4-Methyl-6-(1-methylethyl)-3-phenylmethyl-perhydro-1,4-oxazine-2,5-dione: An Apoptosis-Inducer from the Fruiting Bodies of *Isaria japonica*. *Planta Med.* **2002**, *68* (4), 345–348.
- (76) Porzi, G.; Sandri, S. Enantioselective synthesis of (*R*)- and (*S*)- α -aminoacids using (6*S*)- and (6*R*)-6-methyl-morpholine-2,5-dione derivatives. *Tetrahedron: Asymmetry* **1996**, *7* (1), 189–196.
- (77) Segat-Dioury, F.; Lingibé, O.; Graffe, B.; Sacquet, M.-C.; Lhommet, G. A General Synthesis of Enantiopure 1,2-Aminoalcohols via Chiral Morpholinones. *Tetrahedron* **2000**, *56* (2), 233–248.
- (78) Bouillon, I.; Zajíček, J.; Pudelová, N.; Krchňák, V. Remarkably Efficient Synthesis of 2*H*-Indazole 1-Oxides and 2*H*-Indazoles via Tandem Carbon–Carbon Followed by Nitrogen–Nitrogen Bond Formation. *J. Org. Chem.* **2008**, *73* (22), 9027–9032.

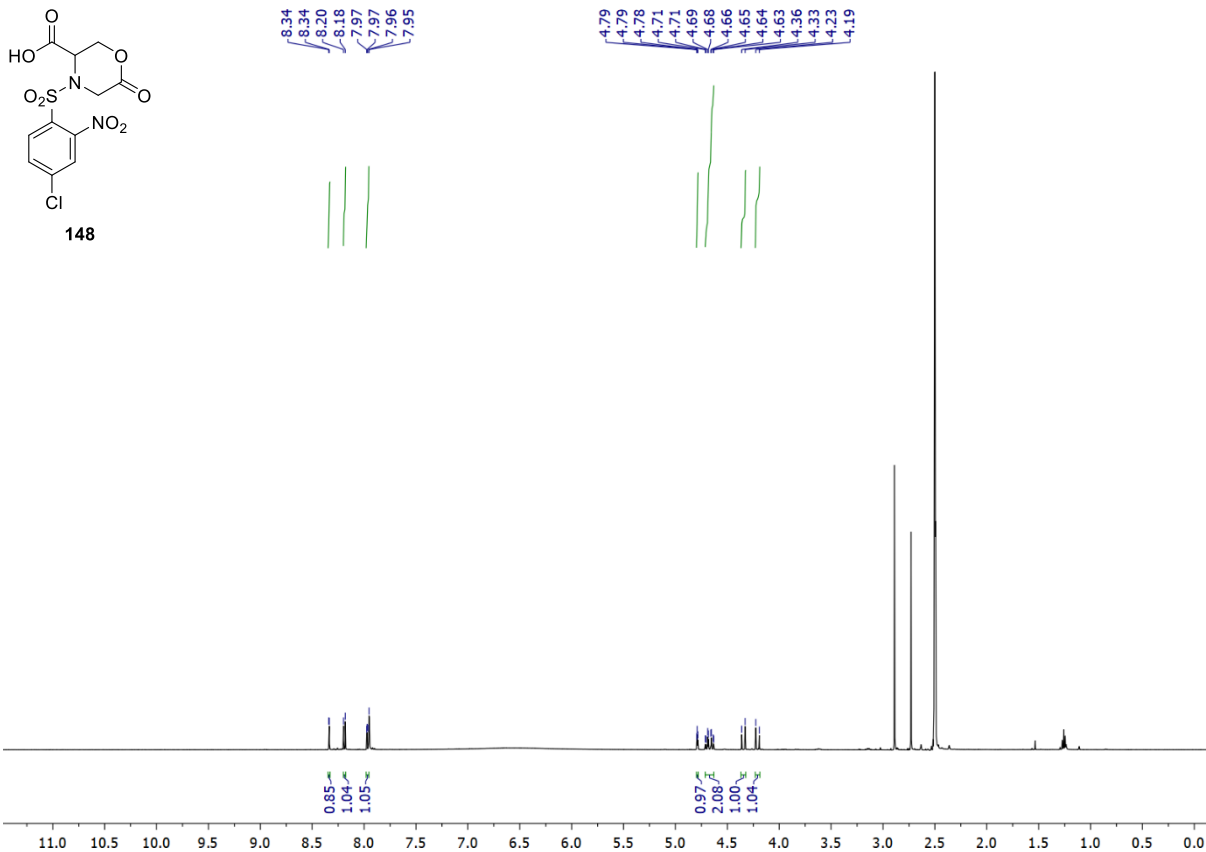
9 Přílohy



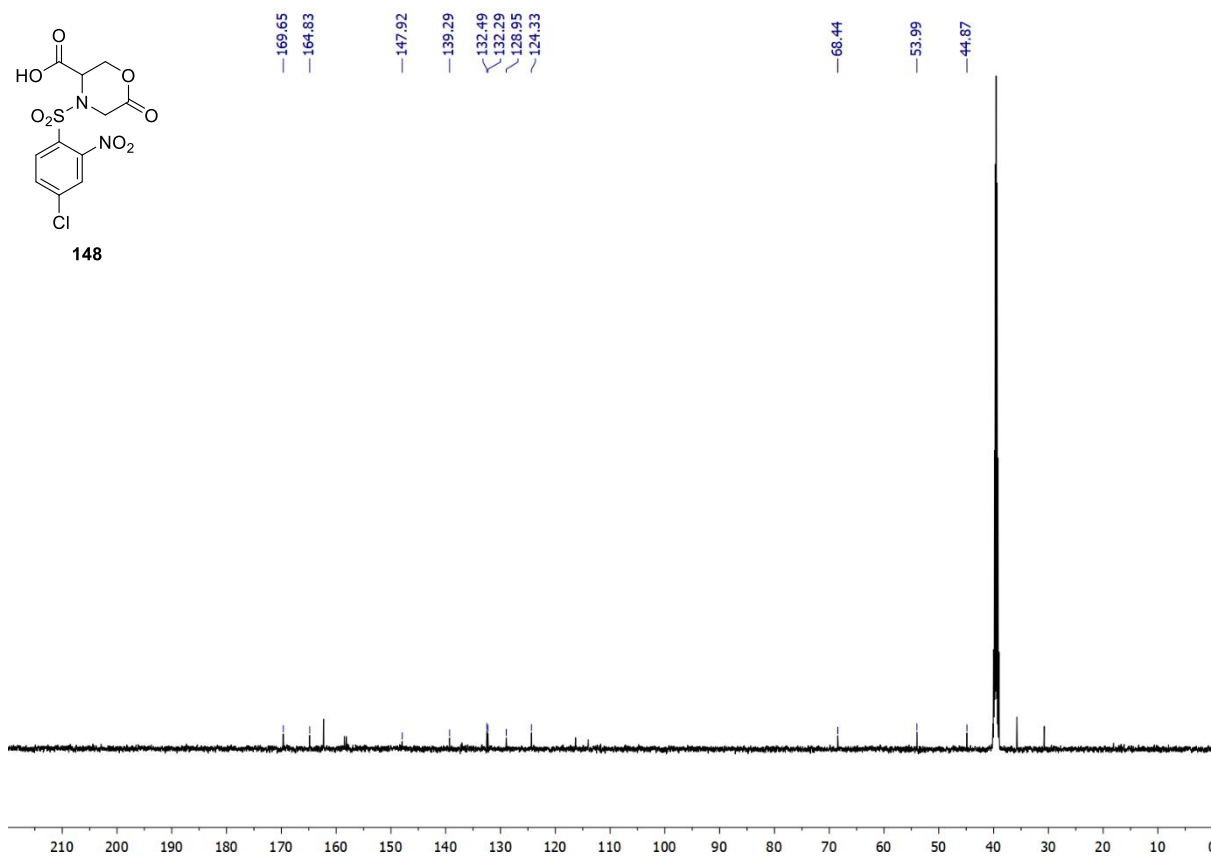
¹H Spektrum 1: Látka **146** v DMSO-*d*₆.



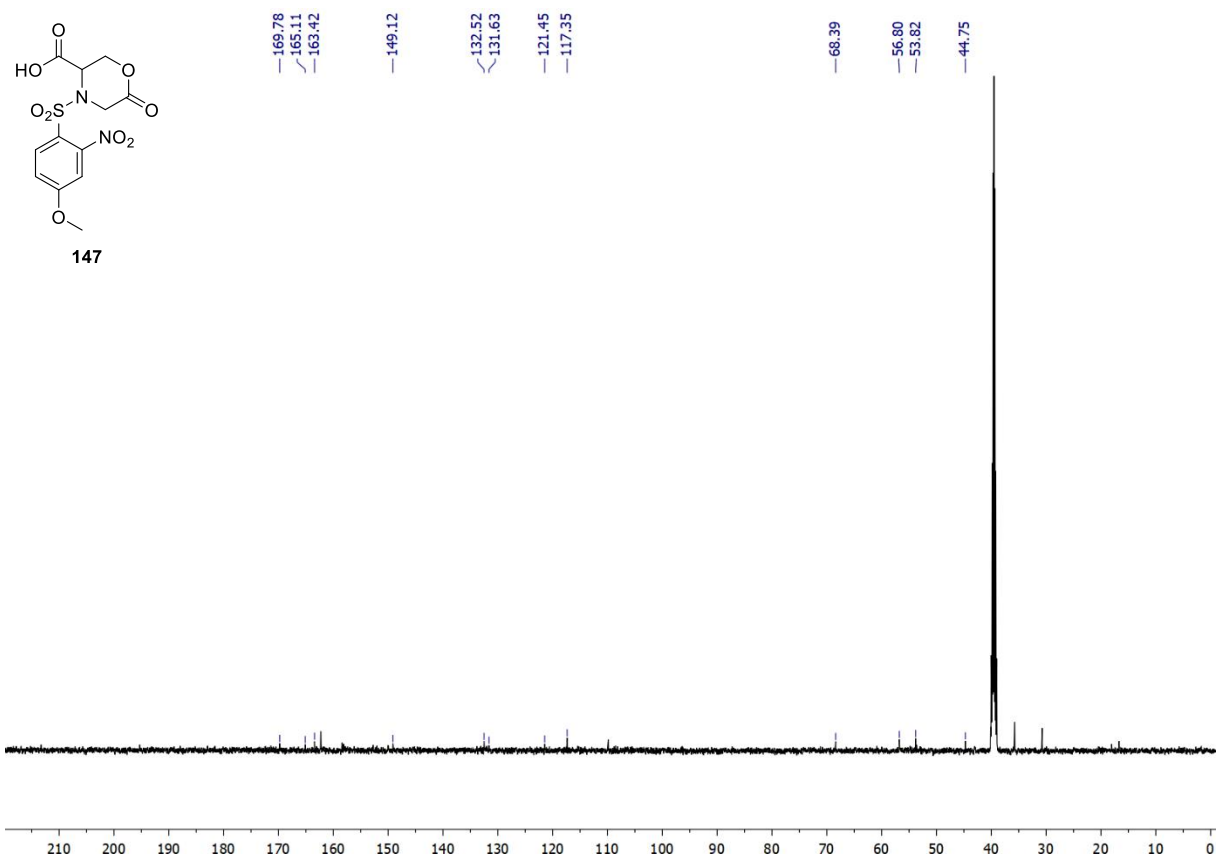
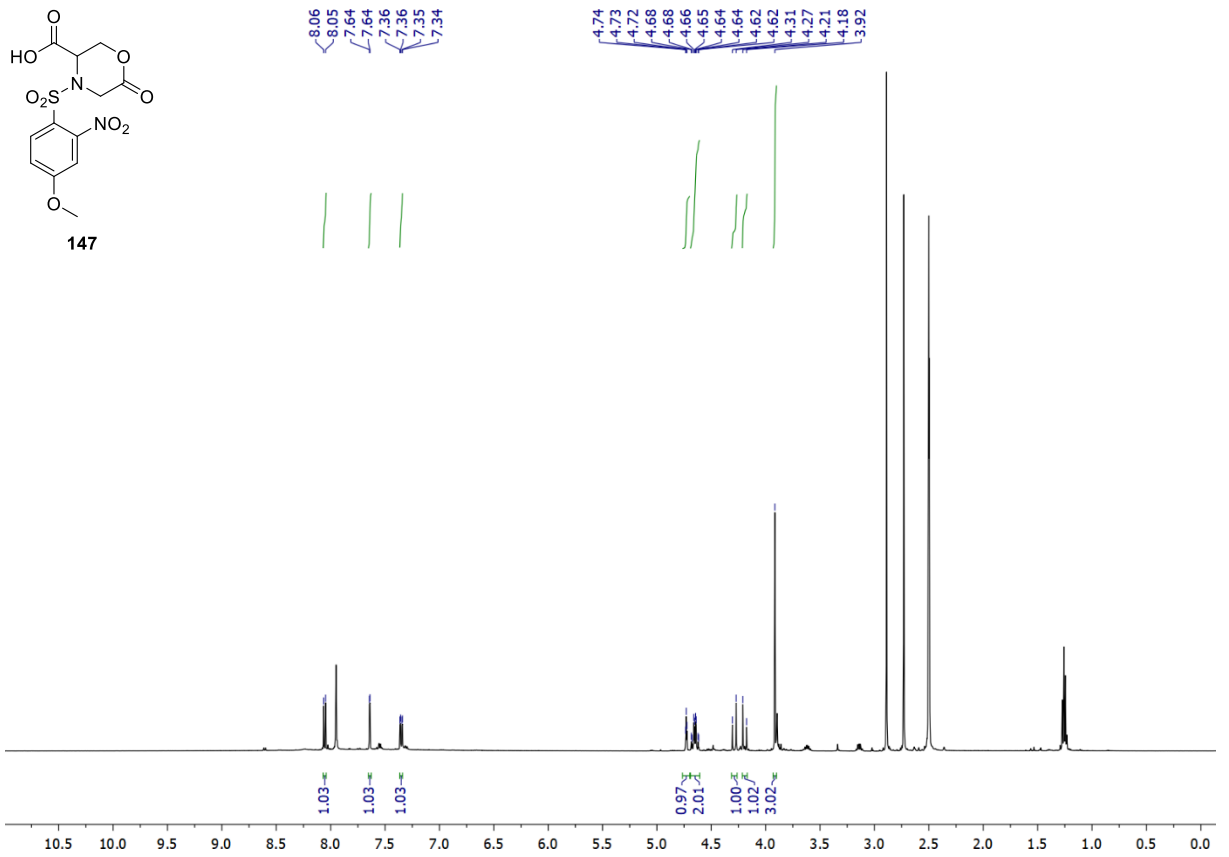
¹³C Spektrum 2: Látka **146** v DMSO-*d*₆.

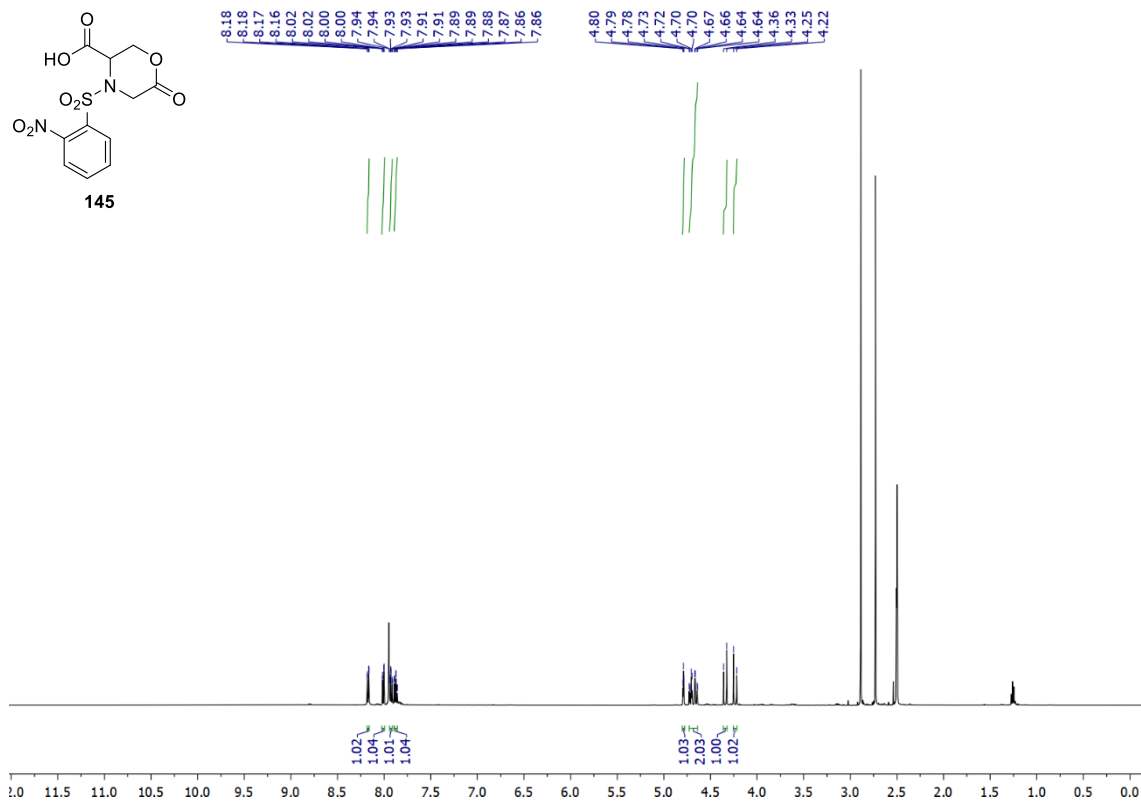


¹H Spektrum 3: Látka **148** v DMSO-*d*₆.

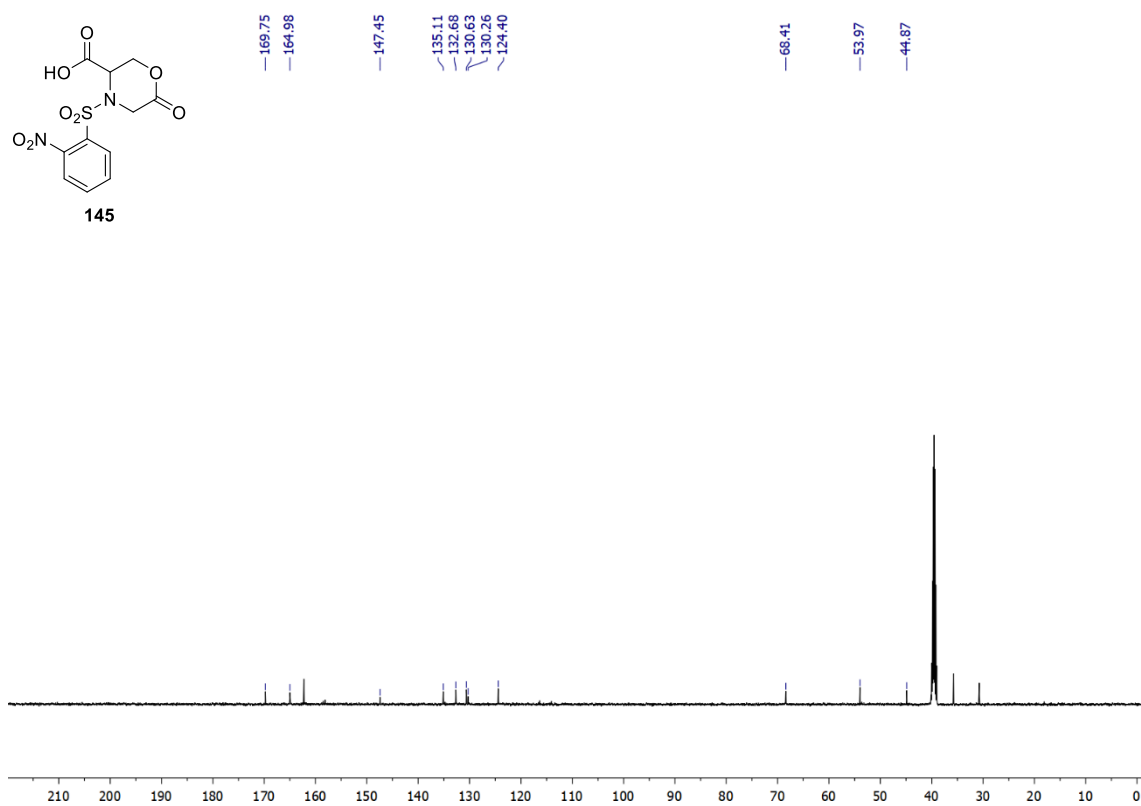


¹³C Spektrum 4: Látka **148** v DMSO-*d*₆.



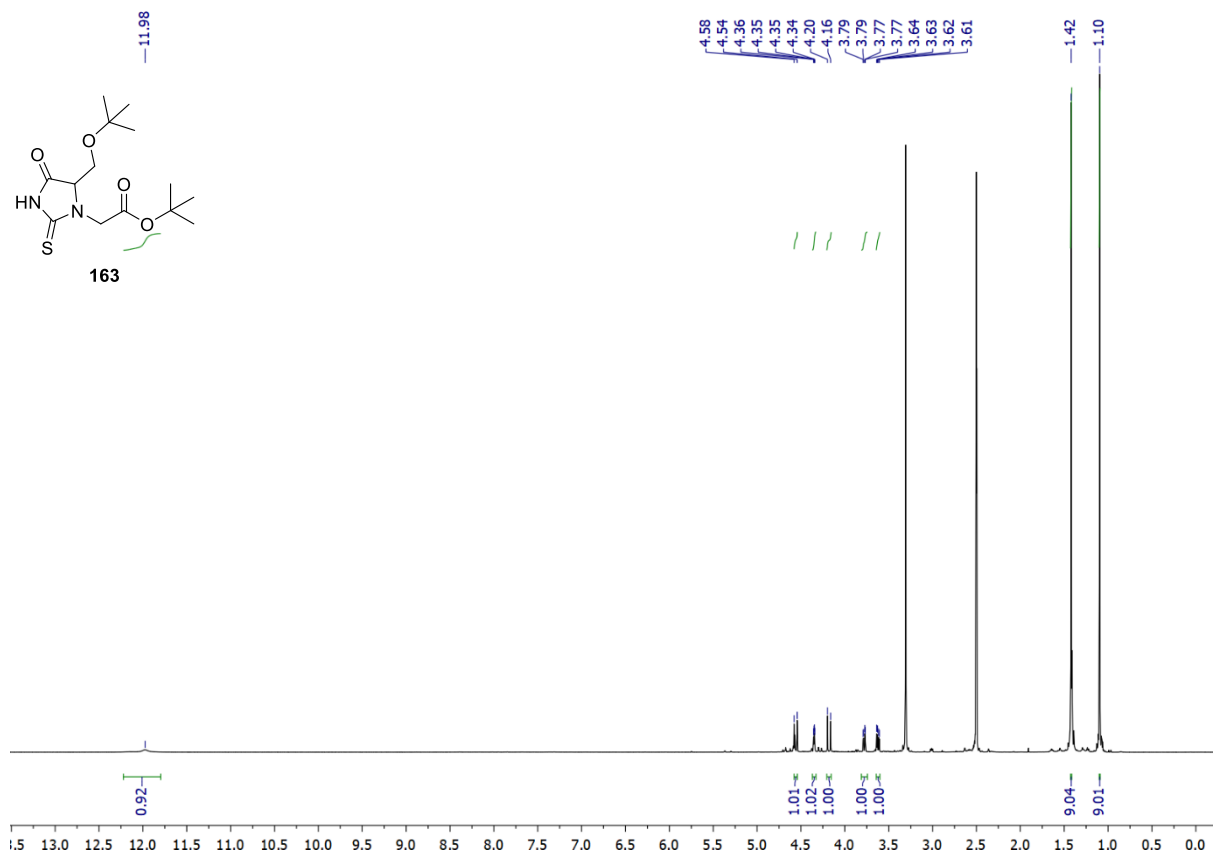


¹H Spektrum 7: Látka **145** v DMSO-*d*₆.

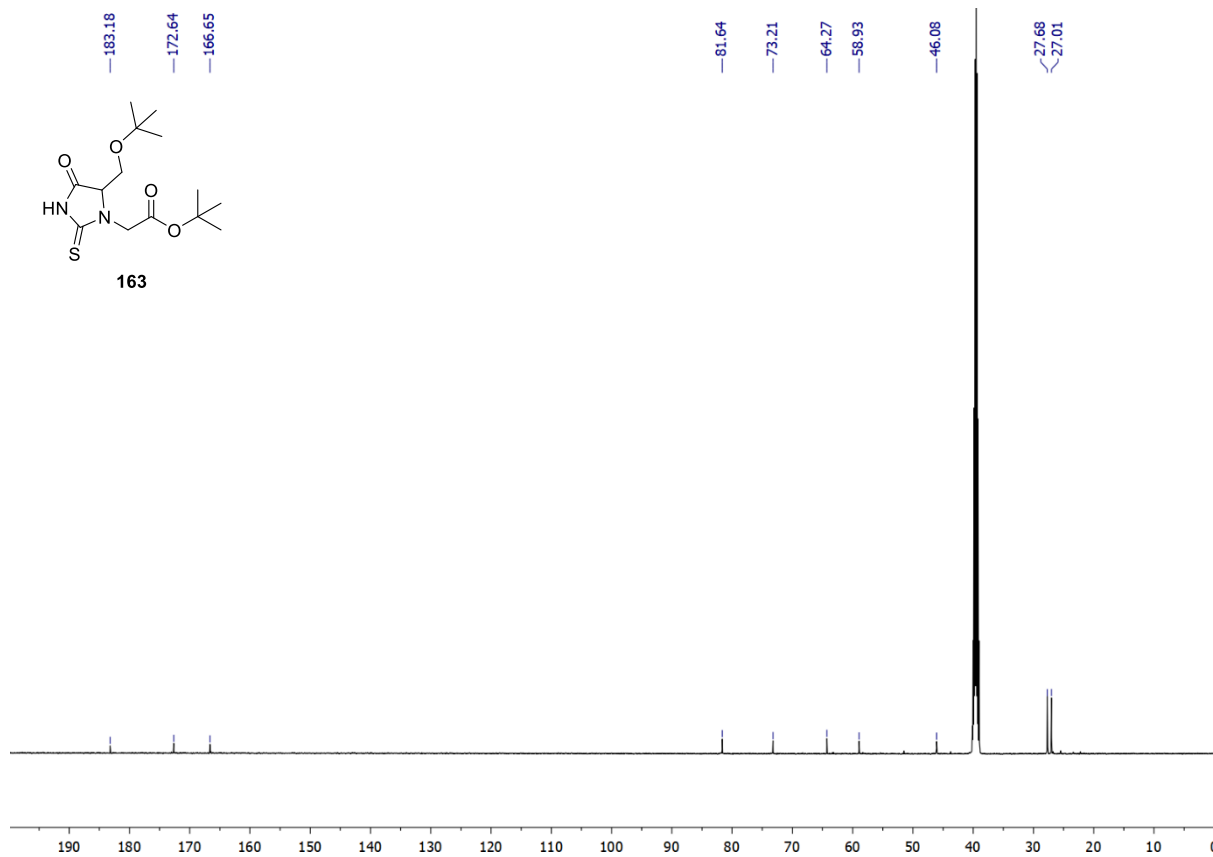


¹³C Spektrum 8: Látka **145** v DMSO-*d*₆.

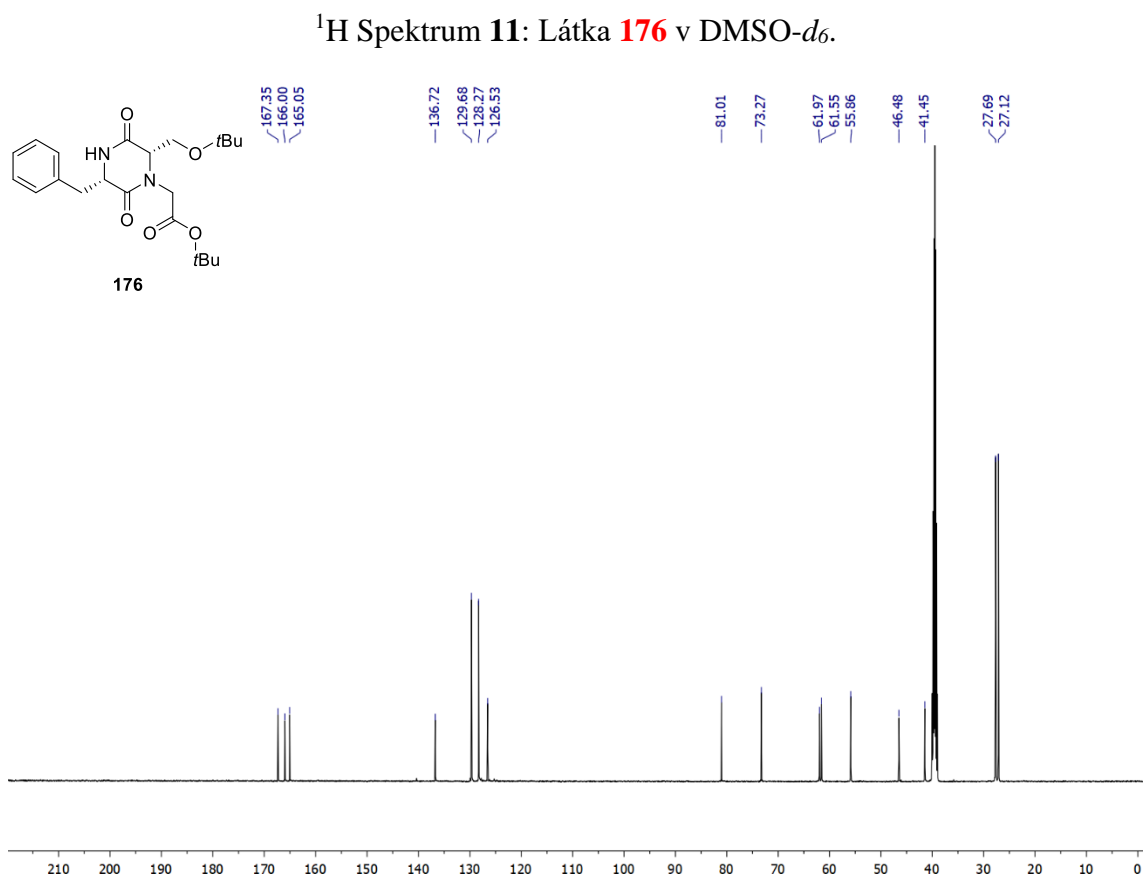
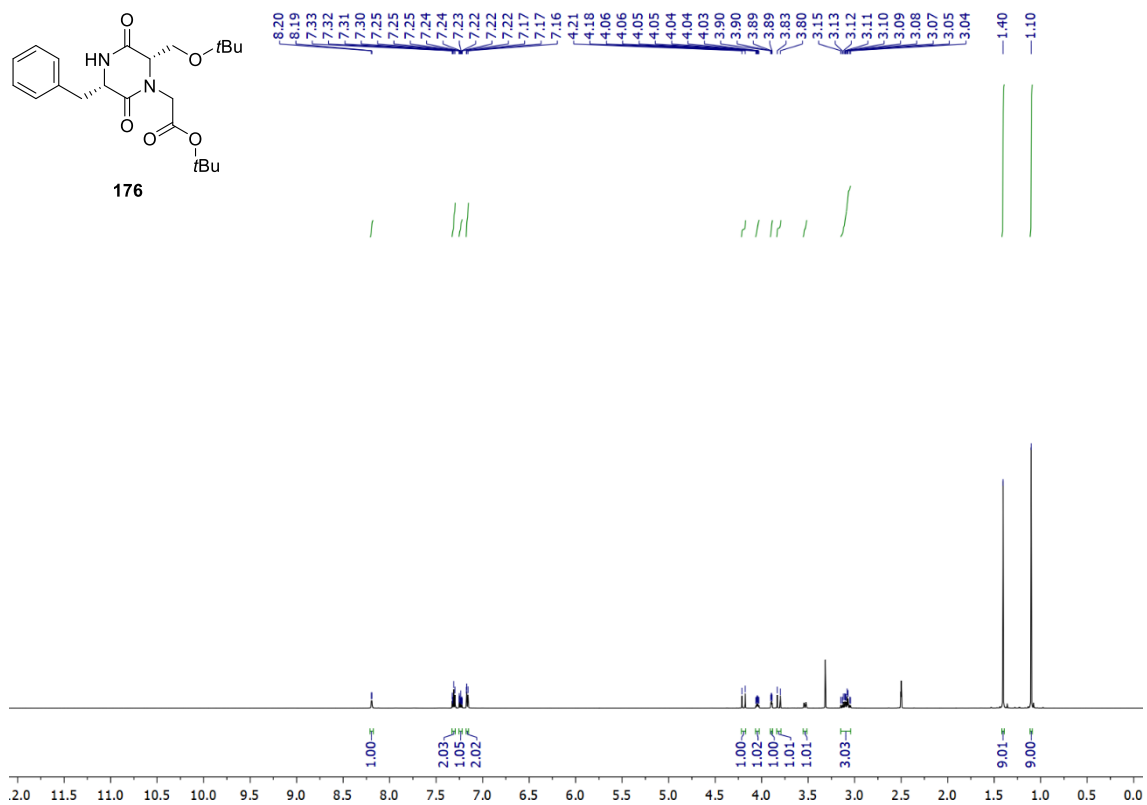
NMR byly změřeny se zbytkovým DMF a TFA, z důvodu obtížné purifikace těchto intermediátů (kapitola **5.1.1**). DMF v ^1H NMR poskytuje tři signály – 2.73 a 2.89 singlety pro CH_3 skupiny a singlet 7.95 pro CH skupinu. V ^{13}C NMR poskytuje také tři signály – dvě CH_3 skupiny 30.73, 35.73 a CH skupina 162.29. TFA poskytuje dva signály V ^{13}C NMR, které tvoří dva kvartety. První u 158 ppm a druhý u 115 ppm.

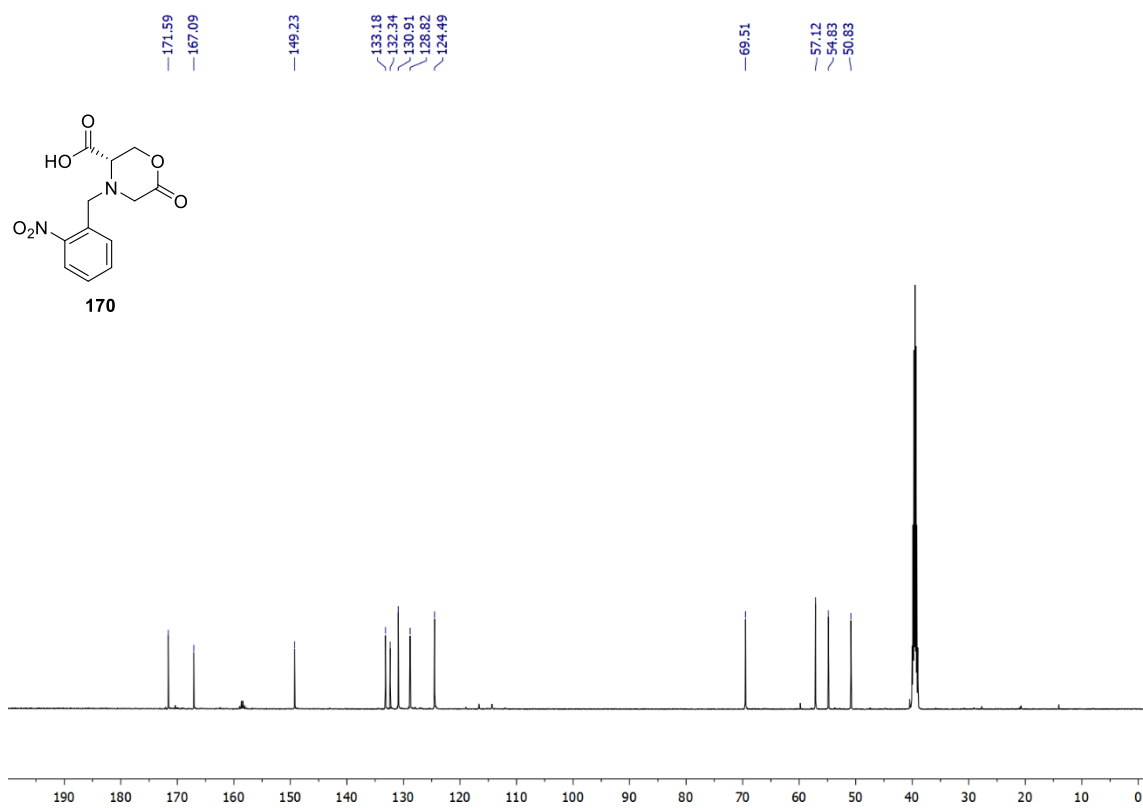
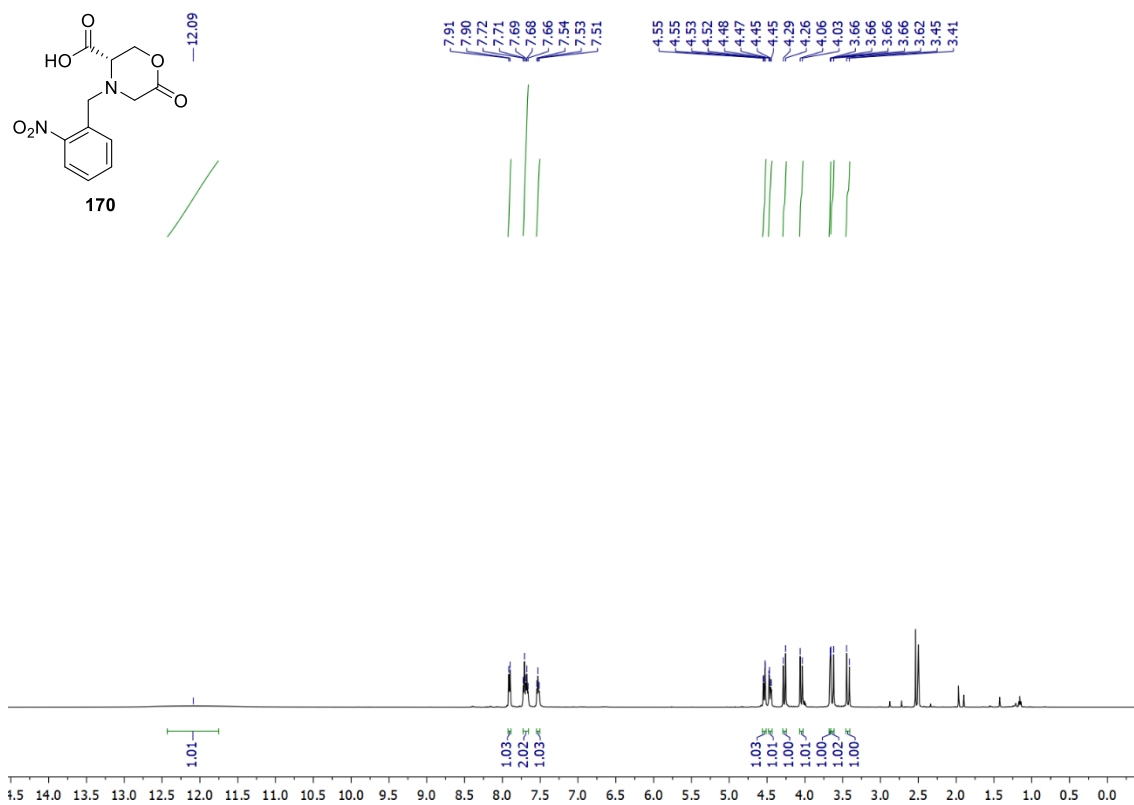


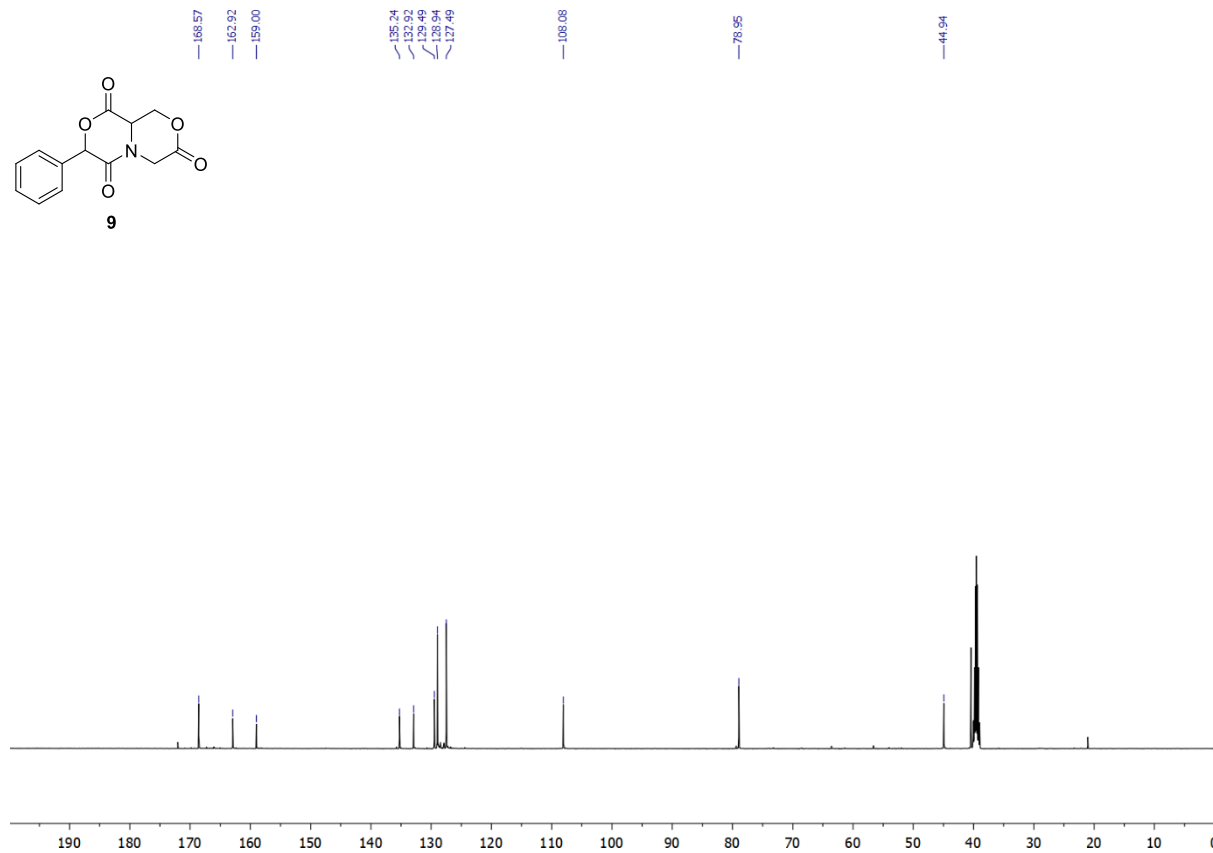
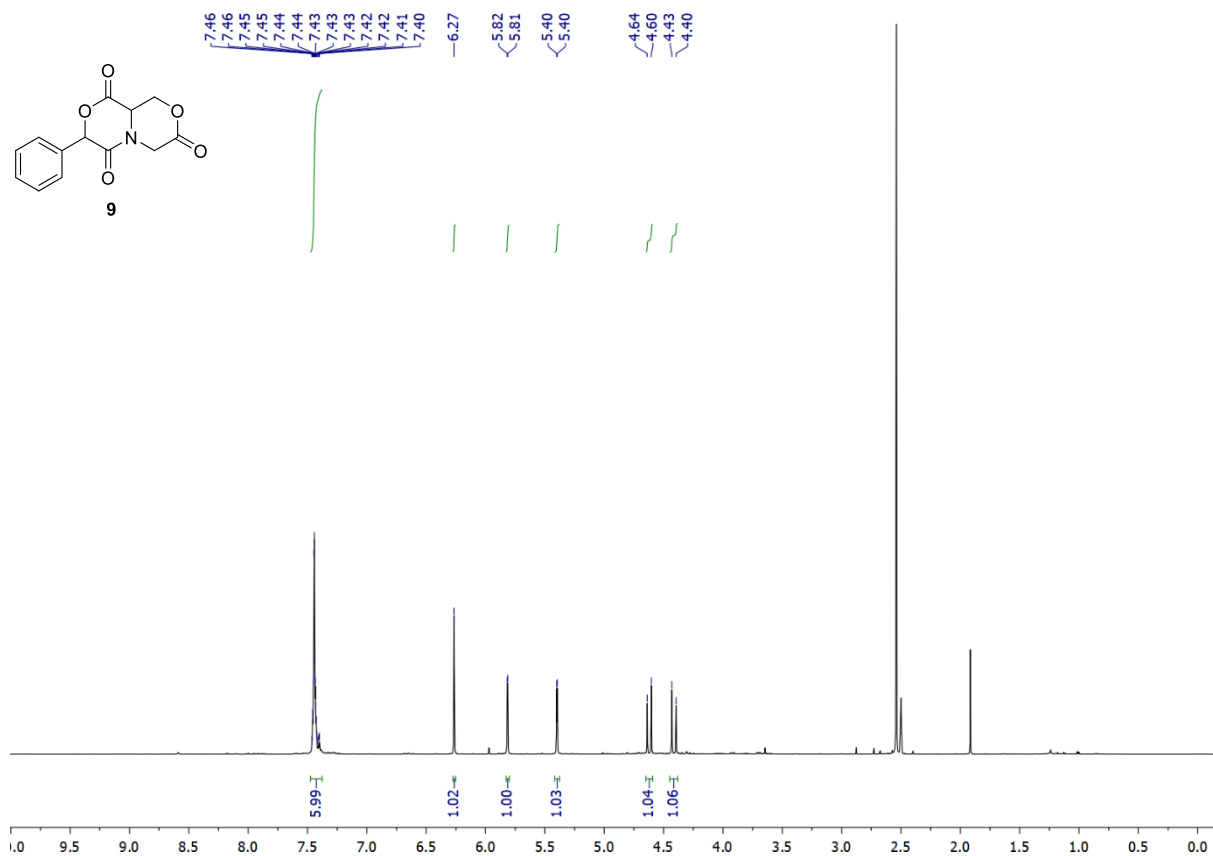
¹H Spektrum 9: Látka **163** v DMSO-*d*₆.



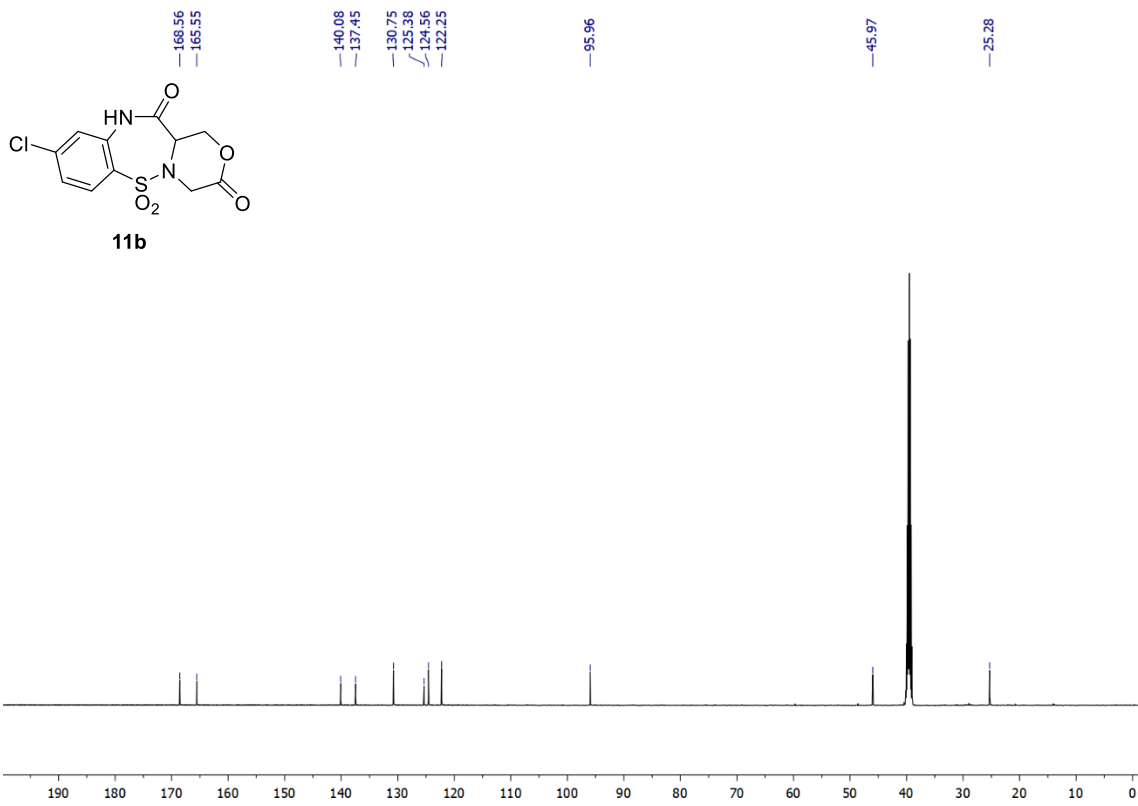
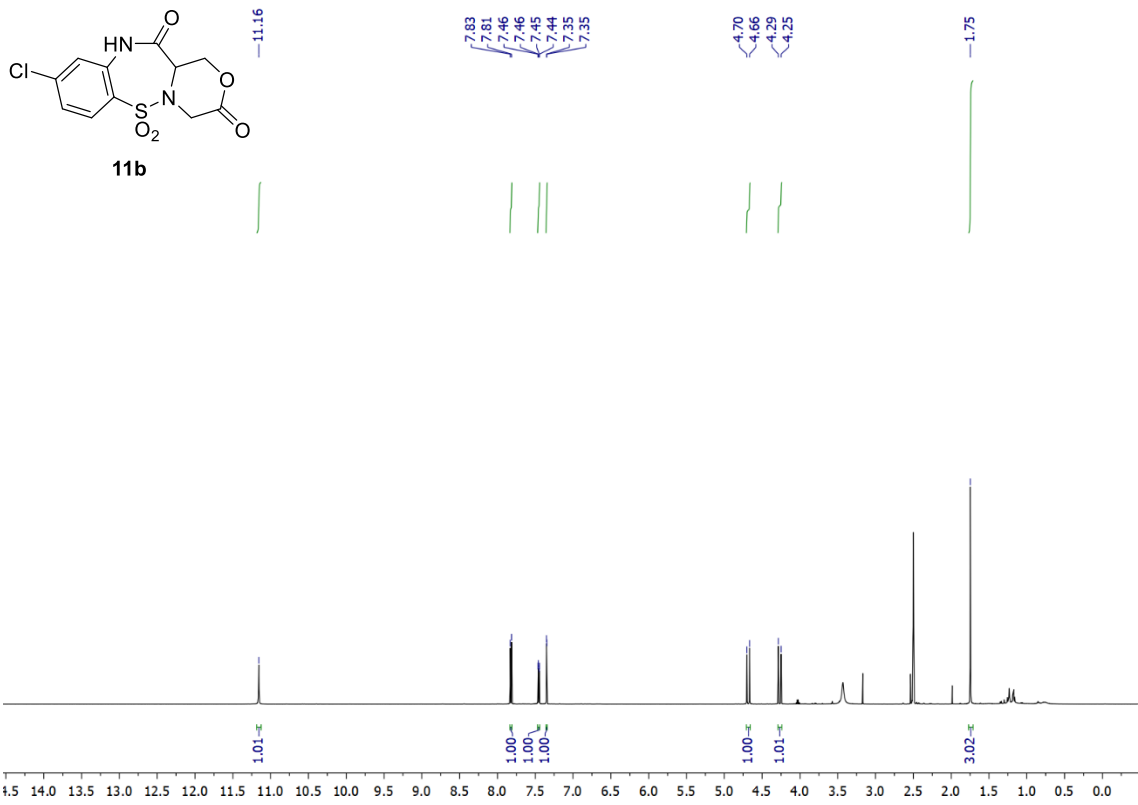
¹³C Spektrum 10: Látka **163** v DMSO-*d*₆.

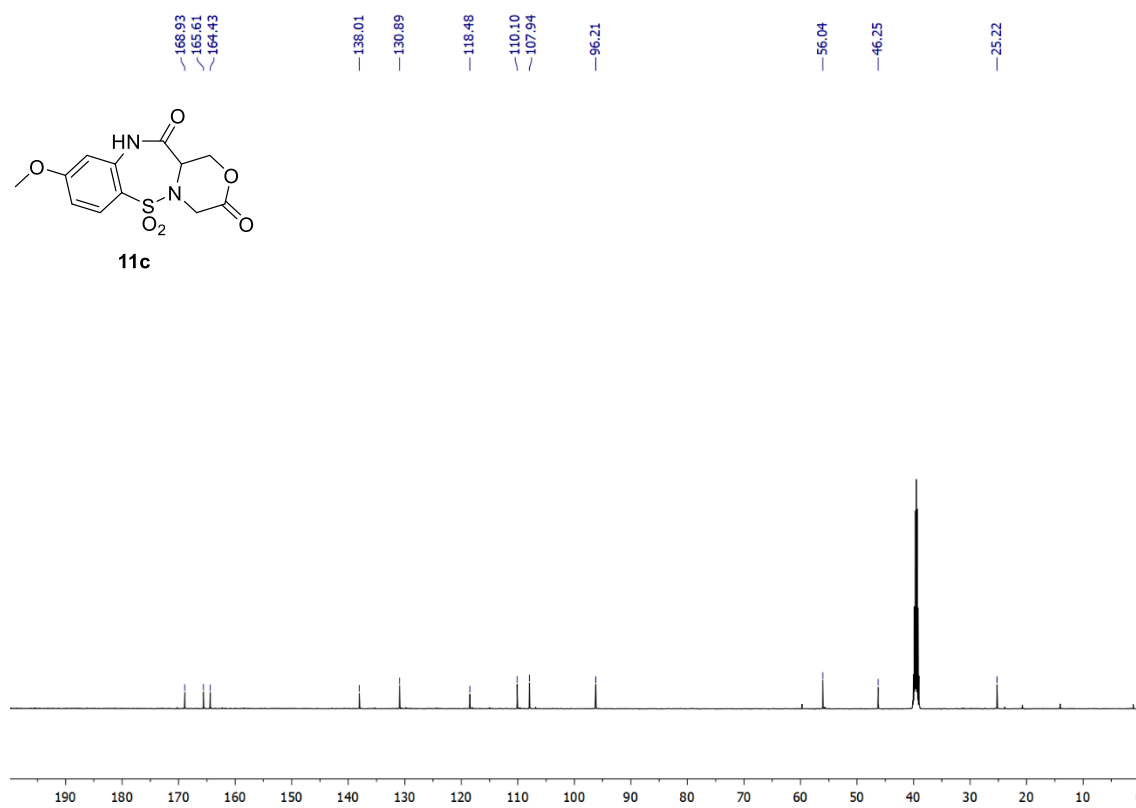
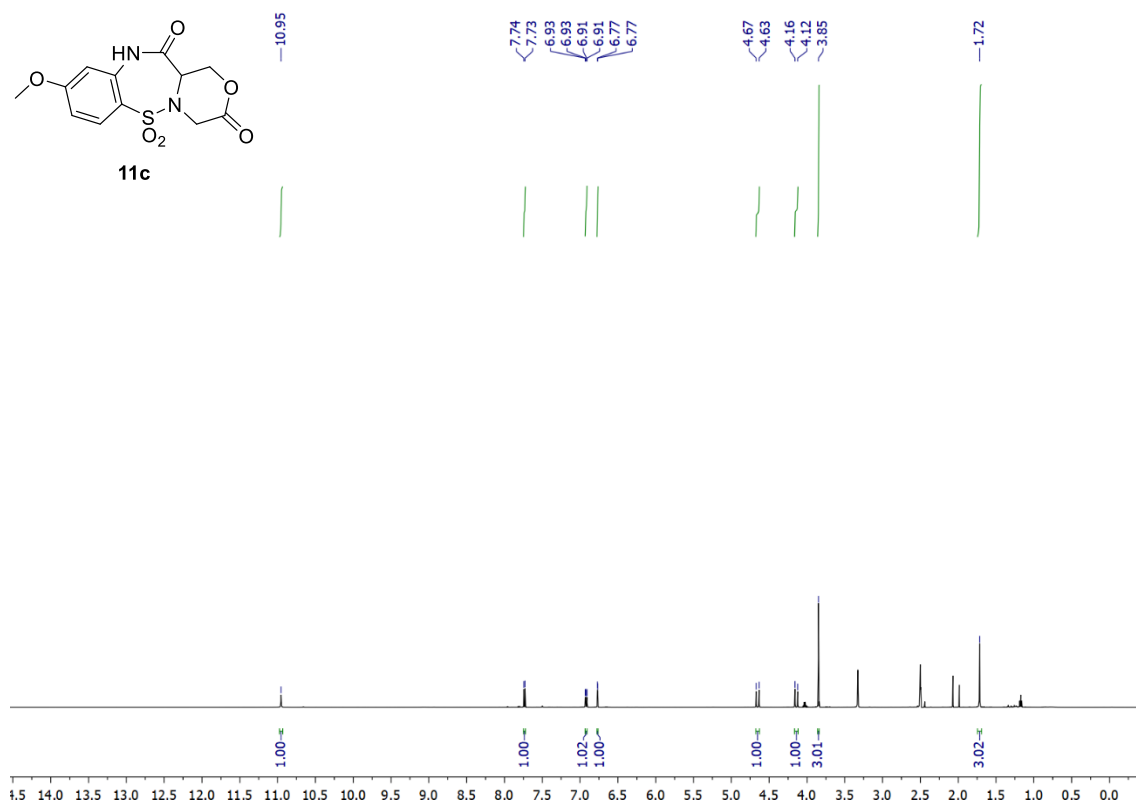


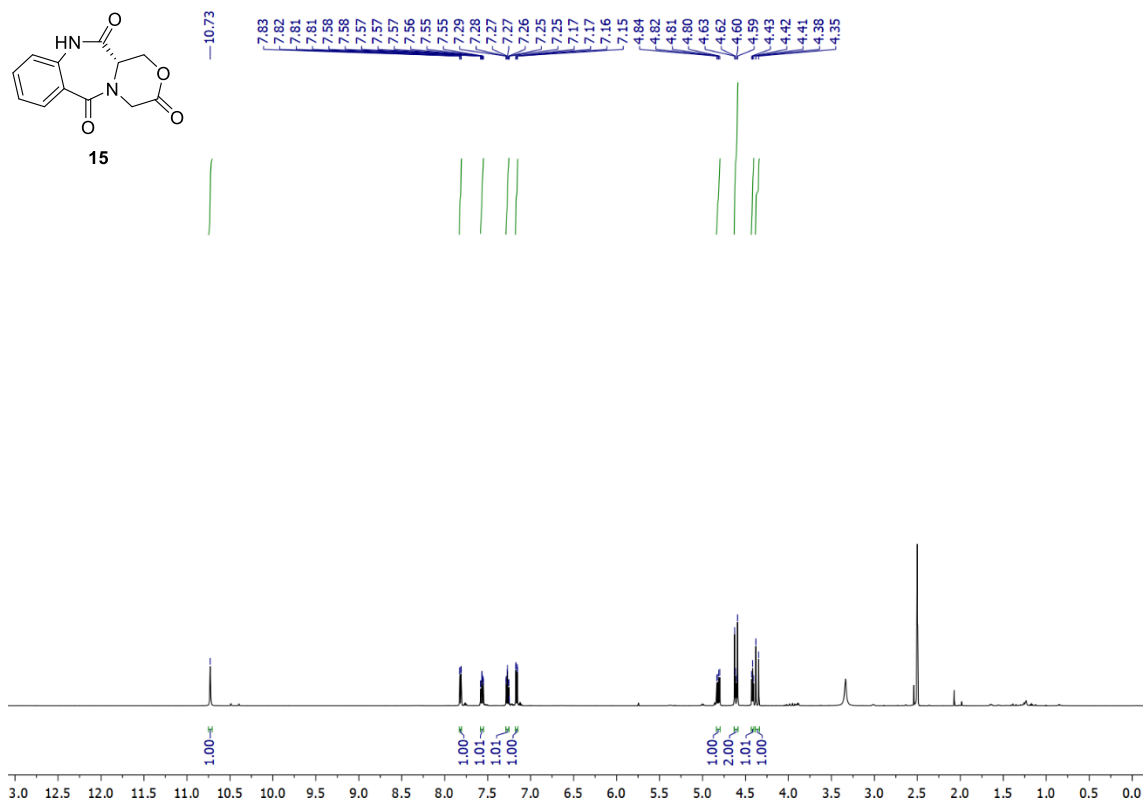




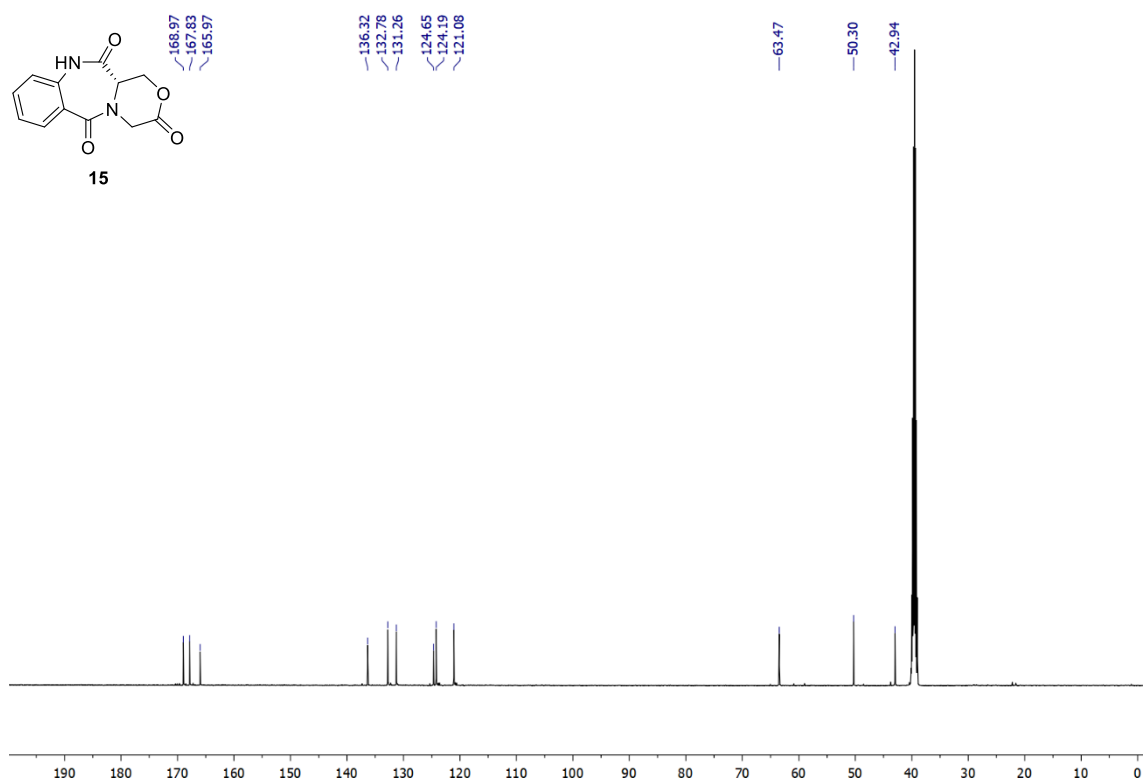
Látka **9** byla čištěna pomocí sloupcové chromatografie za zvolení mobilní fáze 7 % MeOH/DCM a 1% AcOH. NMR bylo měřeno v DMSO-*d*₆. ¹H NMR obsahuje zbytkovou kyselinu octovou, která poskytuje singlet CH₃ skupiny při 1.91 ppm. V ¹³C kyselina octová poskytuje dva signály. První odpovídá CO při 171.93 a druhý signál CH₃ při 20.95.



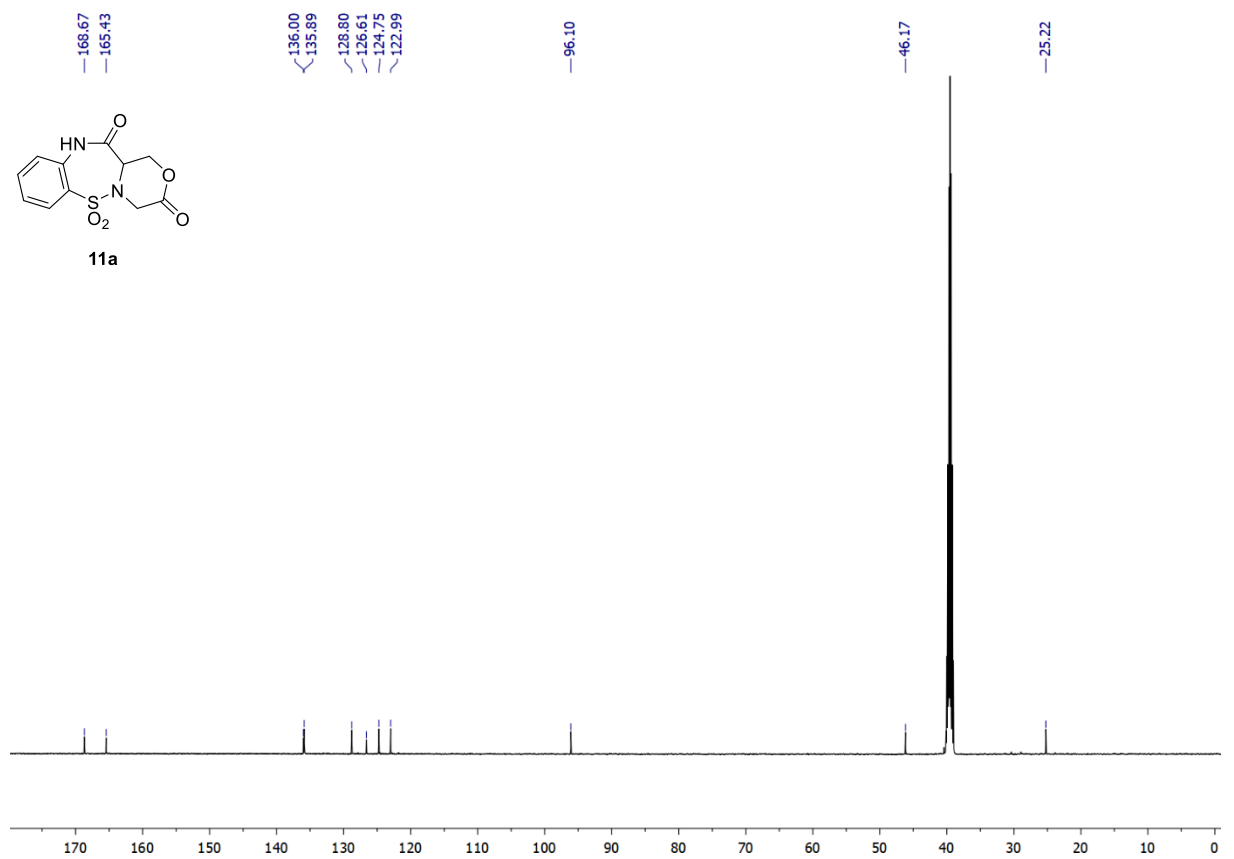
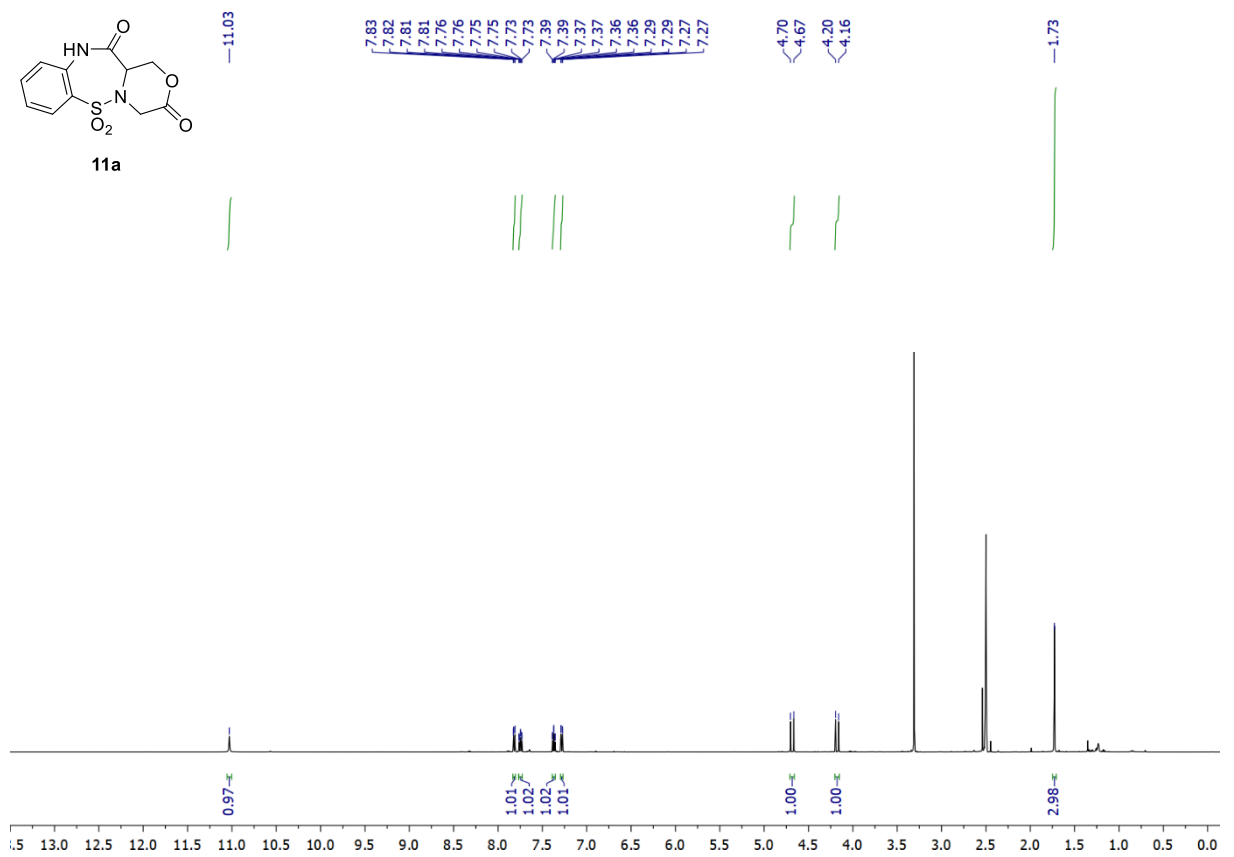


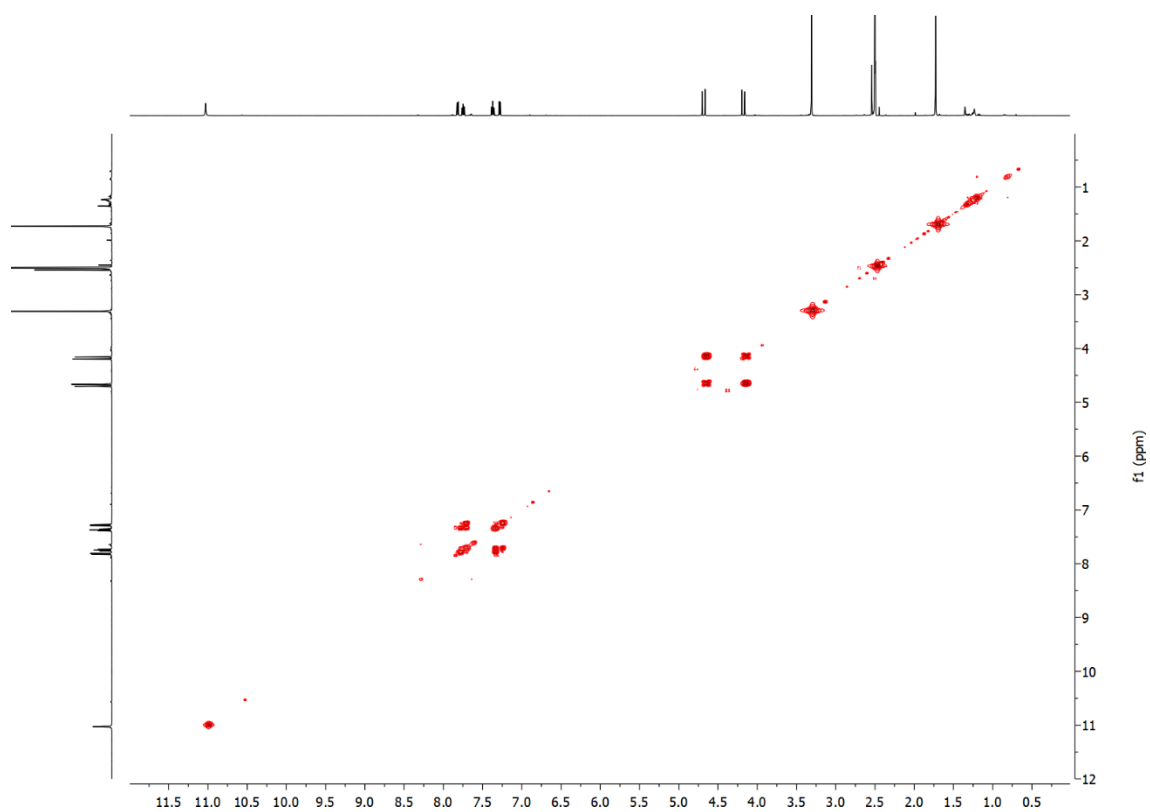


¹H Spektrum 21: Látka **15** v DMSO-*d*₆.

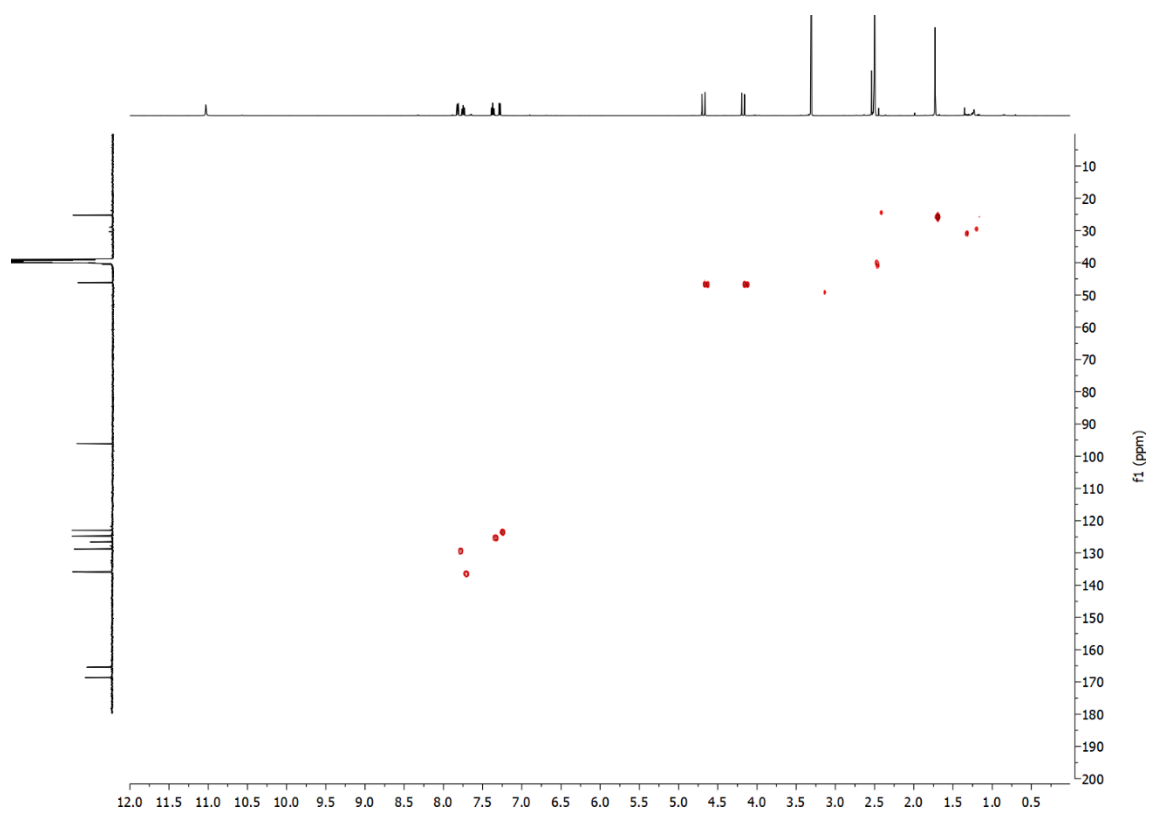


¹³C Spektrum 22: Látka **15** v DMSO-*d*₆.

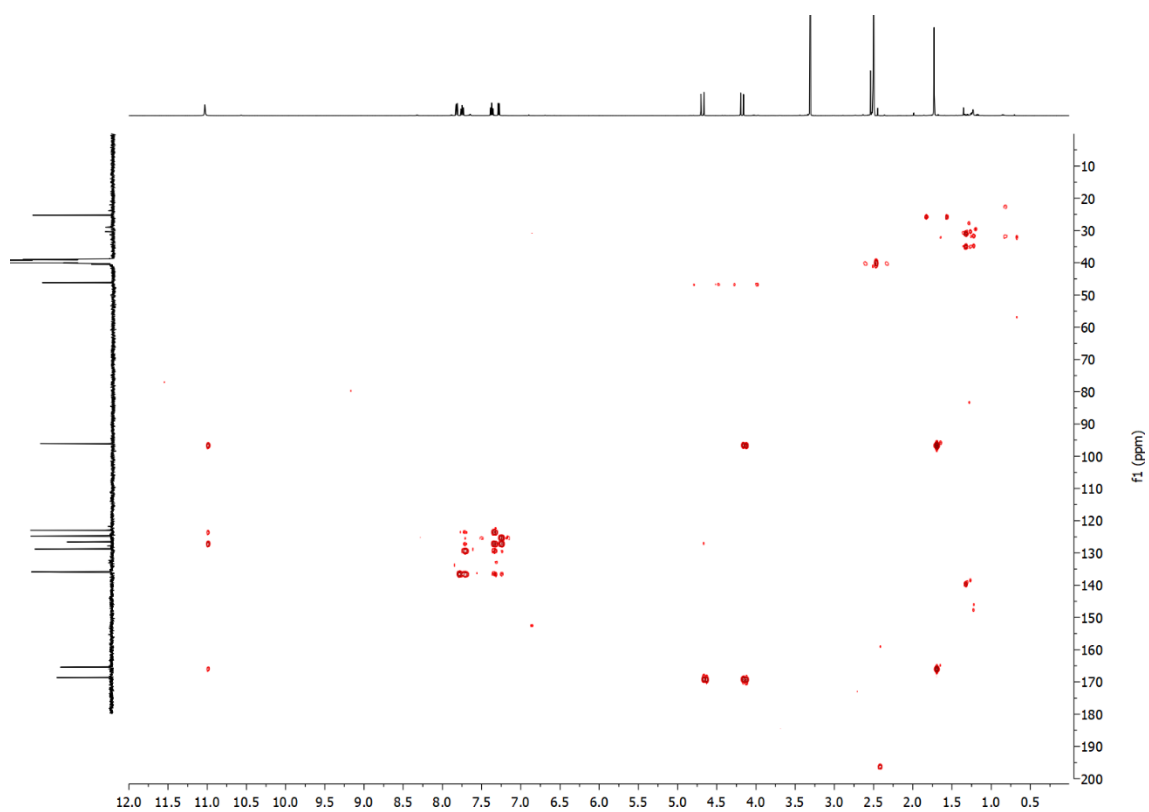




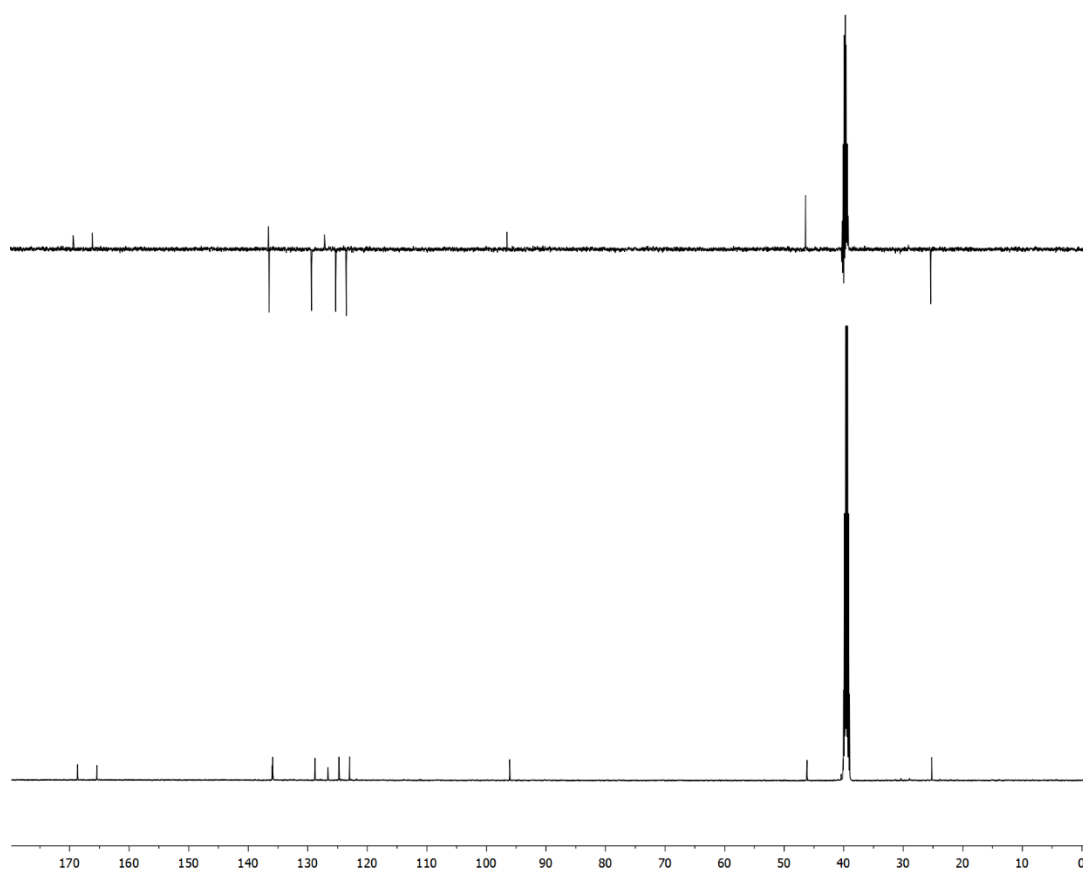
Spektrum 25: ^1H - ^1H COSY spektrum látky **11a**.



Spektrum 26: ^1H - ^{13}C HMQC spektrum látky **11a**.



Spektrum 27: ^1H - ^{13}C HMBC spektrum látky **11a**.



Spektrum 28 APT (nahore) a ^{13}C (dole) spektrum látky **11a** v $\text{DMSO-}d_6$.