

UNIVERZITA PALACKÉHO V OLMOUCI

PŘÍRODOVĚDECKÁ FAKULTA

KATEDRA ORGANICKÉ CHEMIE



SYNTÉZA DERIVÁTŮ OXAZINU NA PEVNÉ FÁZI

DIPLOMOVÁ PRÁCE

Autor:	Bc. Leona Kocmanová
Studijní program:	Chemie
Studijní obor:	Bioorganická chemie a chemická biologie
Typ studia:	Prezenční
Vedoucí práce:	Doc. RNDr. Jan Hlaváč, Ph.D.

Olomouc 2015

Já, Leona Kocmanová, prohlašuji, že jsem tuto diplomovou práci vypracovala samostatně pod odborným dohledem Doc. RNDr. Jana Hlaváče, Ph.D. Veškerou použitou literaturu jsem uvedla na konci práce.

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

V Olomouci dne 18.5.2015

.....

Tímto bych chtěla upřímně poděkovat Doc. RNDr. Janu Hlaváčovi, Ph.D. za jeho odbornou pomoc, cenné rady a připomínky, ochotu a trpělivost při řešení dané problematiky. Dále bych ráda poděkovala Mgr. Tereze Volné za pomoc s chirálními separacemi a pracovníkům Katedry organické chemie za ochotu a pomoc. V neposlední řadě také rodině za podporu a trpělivost.

BIBLIOGRAFICKÁ IDENTIFIKACE:

Jméno a příjmení autora:	Bc. Leona Kocmanová
Název práce:	Syntéza derivátů oxazinu na pevné fázi
Typ práce:	Diplomová
Pracoviště:	Katedra organické chemie, Přírodovědecká fakulta Univerzity Palackého v Olomouci
Školitel:	Doc. RNDr. Jan Hlaváč, Ph.D.
Rok obhajoby práce:	2015
Abstrakt:	<p>Předložená diplomová práce se zaměřuje na syntézu 1,2-oxazinových derivátů a jejich možnou přeměnu. Práce je rozdělená na teoretickou a experimentální část.</p> <p>První část shrnuje reakce vedoucí k syntéze 1,2-oxazinů, dihydro 1,2-oxazinů a 1,2-oxazinanů. Dále se zabývá reakcemi na dvojně vazbě a reakcemi založenými na štěpení N-O a C-O vazby. Na závěr představuje deriváty 1,2-oxazinu vykazující biologickou aktivitu.</p> <p>Druhá část se věnuje optimalizaci syntetické cesty a syntéze knihovny látek derivátů oxazinu pomocí syntézy na pevné fázi a kombinatoriální chemie. Dále se zabývá chirální separací těchto derivátů metodami HPLC a SFC.</p>
Klíčová slova:	1,2-oxazin, syntéza na pevné fázi, kombinatoriální chemie, chirální separace
Počet stran:	89
Počet příloh:	4
Jazyk:	český

BIBLIOGRAPHICAL IDENTIFICATION:

Author's first name and surname: Bc. Leona Kocmanová

Title: Synthesis of Oxazine Derivatives on Solid Support

Type of thesis: Diploma

Department: Department of Organic Chemistry, Faculty of Science,
Palacky University Olomouc

Supervisor: Doc. RNDr. Jan Hlaváč, Ph.D

The year of presentation: 2015

Abstract: This Diploma thesis is focused on synthesis of 1,2-oxazine derivatives and their possible transformation. The work is divided into theoretical and experimental part.

The first part summarizes reactions leading to the synthesis of 1,2-oxazines, dihydro 1,2-oxazines and 1,2-oxazinanes. Also deals with reactions on double bond and reactions based on cleavage of N-O and C-O bonds. Finally represents 1,2-oxazine derivatives biological activity.

The second part is devoted to optimization of synthetic route and synthesis of chemical library of oxazine derivatives using solid-phase synthesis and combinatorial chemistry. It also deals with the chiral separation of these derivatives by HPLC and SFC.

Keywords: 1,2-oxazine, solid-phase synthesis, combinatorial chemistry, chiral separation

Number of pages: 89

Number of appendixes: 4

Language: Czech

SEZNAM ZKRATEK:

α	separační faktor
AChE	acetylcholinesteráza
Bn	benzyl
COSY	korelační spektroskopie (correlation spectroscopy)
COX	cyklooxygenáza
CSP	chirální stacionární fáze
Cy	cyklohexyl
DBU	1,8-diazabicyklo[5.4.0]undec-7-en
DCM	dichlormethan
DEA	diethanolamin
DIC	diisopropylkarbodiimid
DMAP	<i>N,N</i> -dimethylaminopyridin
DMF	<i>N,N</i> -dimethylformamid
DMSO	dimethylsulfoxid
Fmoc	fluorenylmethoxykarbonyl
HDA	hetero-Diels-Alderova reakce
HMBC	heteronukleární vícevazebná korelační spektroskopie (heteronuclear multiple-bond correlation spectroscopy)
HMQC	heteronukleární vícekvantová korelace (heteronuclear multiple-quantum correlation)
HOBt	<i>N</i> -hydroxybenzotriazol
HPLC	vysokoučinná kapalinová chromatografie
IC ₅₀	polovina maximální inhibiční koncentrace
LI210	buňky myši leukemie
LC-MS	kapalinová chromatografie - hmotnostní spektrometrie
LOX	lipooxygenáza
MCF-7	buněčná linie rakoviny prsu
MEK	mitogenem aktivovaná proteinkináza kináza
NMO	<i>N</i> -methylmorpholin- <i>N</i> -oxid
NMR	nukleární magnetická resonance
ON	přes noc (over night)
PC-3	buněčná linie rakoviny prostaty
Py	pyridin
Rs	rozlišení
RT	pokožová teplota (room temperature)
SFC	superkritická fluidní chromatografie
SPOS	organická syntéza na pevné fázi (solid phase organic synthesis)

TBAF	tetrabutylamonium fluorid
TBAPI	jodistan tetrabutylamonný (tetrabutylammonium (meta)periodate)
TEA	triethylamin
TEAB	tetraethylamonium bromid
TFA	trifluorooctová kyselina
THF	tetrahydrofuran
TIPS	triisopropylsilyl
TMS	trimethylsilyl
t_R	retenční čas

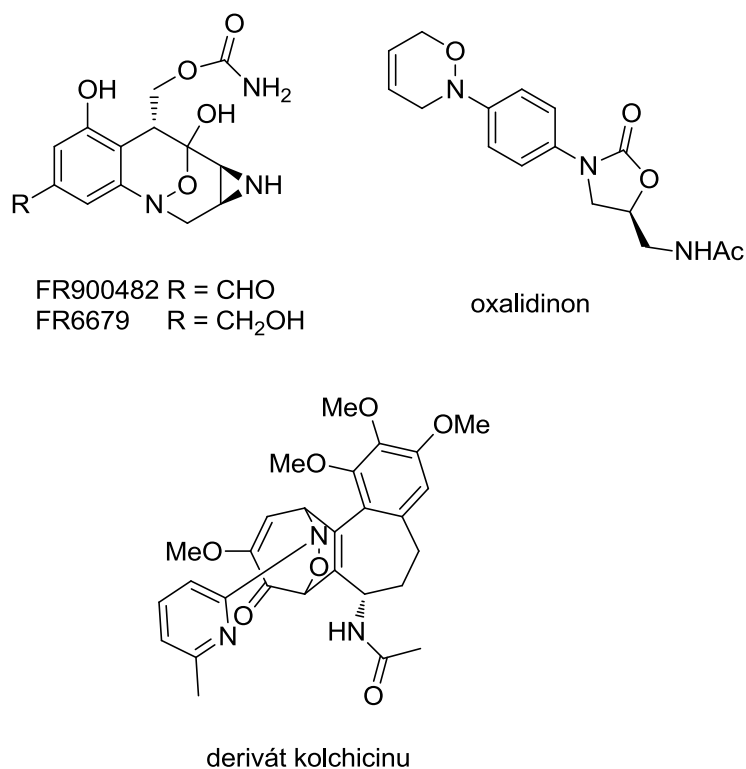
OBSAH

1.	ÚVOD	9
2.	CÍL DIPLOMOVÉ PRÁCE	11
3.	TEORETICKÁ ČÁST	12
3.1.	SYNTÉZA 1,2-OXAZINOVÝCH DERIVÁTŮ	12
3.1.1.	<i>Syntéza 1,2-oxazinového cyklu</i>	12
3.1.2.	<i>Syntéza dihydro-1,2-oxazinového cyklu</i>	15
3.1.3.	<i>Syntéza 1,2-oxazinanu</i>	18
3.2.	METODY PŘEMĚNY 1,2-OXAZINOVÝCH DERIVÁTŮ	21
3.2.1.	<i>Reakce využívající přítomnost dvojných vazeb</i>	21
3.2.2.	<i>Reakce založené na štěpení N-O vazby</i>	24
3.2.3.	<i>Reakce založené na štěpení C-O vazby</i>	26
3.3.	BIOLOGICKÁ AKTIVITA 1,2-OXAZINOVÝCH DERIVÁTŮ	28
4.	DISKUZE A VÝSLEDKY	32
4.1.	SYNTÉZA DERIVÁTŮ 1,2-OXAZINU NA PEVNÉ FÁZI	32
4.1.1.	<i>Optimalizace syntézy derivátů 1,2-oxazinu na pevné fázi</i>	34
4.1.2.	<i>Syntéza knihovny derivátů 1,2-oxazinu</i>	44
4.1.3.	<i>Identifikace derivátů 1,2-oxazinu</i>	49
4.2.	CHIRÁLNÍ SEPARACE DERIVÁTŮ 1,2-OXAZINU	59
5.	EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST	63
5.1.	METODY	63
5.1.1.	<i>Instrumentace</i>	63
5.1.2.	<i>Štěpení vzorků pro LC-MS analýzu</i>	63
5.1.3.	<i>Stanovení LC čistoty</i>	63
5.1.4.	<i>Preparativní štěpení finálních sloučenin a jejich HPLC purifikace</i>	63
5.1.5.	<i>Příprava vzorku na NMR analýzu</i>	64
5.2.	PŘÍPRAVY	64
6.	ZÁVĚR	79
7.	LITERATURA	81
8.	PŘÍLOHY	85

1. ÚVOD

Deriváty 1,2-oxazinu jsou málo se vyskytující šestičlenné cykly s N-O vazbou. Tento strukturní motiv se nachází v přírodních látkách, např. FR900482 a FR66979 (*Obr. 1*) izolovaných ze *Streptomyces sandaensis*, které vykazují protinádorové a antibakteriální účinky^{1,2}.

Dihydro-1,2-oxazin nachází své uplatnění např. při hledání nových syntetických léčiv. Byl využit v syntéze nových potenciálních oxazolidinonových antibiotik, jako je např. oxalidinon účinný proti Gram-pozitivním bakteriím (*Obr. 1*)³. Pomocí hetero-Diels-Alderovy (HDA) reakce byl také zaveden do struktury kolchicinu (*Obr. 1*). Takto modifikovaný derivát vykazuje podobné cytotoxické účinky jako samotný kolchicin a díky vratné reakci, kdy se uvolňuje zpět samotný kolchicin, funguje jako proléčivo⁴. Mezi vhodné metody přípravy 1,2-oxazinových derivátů patří nitroso HDA reakce. Spolu s následnou modifikací pomocí štěpení N-O nebo C-O vazeb či reakcí na dvojné vazbě u vzniklých 1,2-oxazinů představují tyto transformace významný klíčový krok v totální syntéze přírodních a syntetických biologicky aktivních látek⁵.



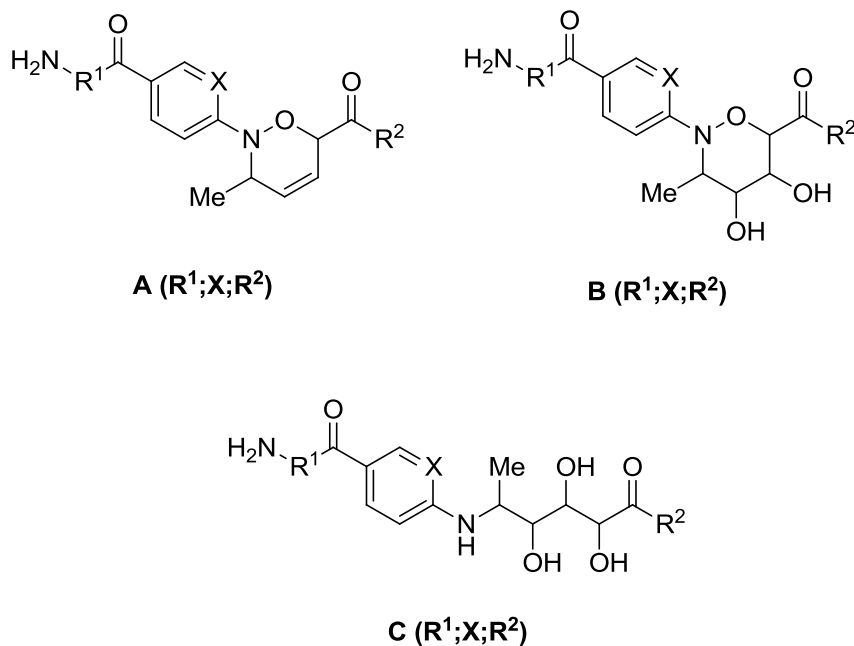
Obrázek 1: Přírodní a biologicky aktivní látky obsahující 1,2-oxazinový kruh

Nitroso HDA reakce poskytuje 1,2-oxazinové deriváty ve směsi stereo, případně regio izomerů. Pro syntézu léčiv jsou však často důležité opticky čisté deriváty daného regioisomeru. Proto je třeba mít k dispozici analytickou metodu, která by umožnila kontrolovat poměr jak regioisomerů, tak stereoisomerů při regio/steroselektivní syntéze. Nejefektivnější metodou je aktuálně využití chirální HPLC metody⁵.

Součástí této diplomové práce je vývoj syntézy nových derivátů oxazinu pomocí tzv. solid-phase organické syntézy (SPOS) s prvky kombinatoriální chemie a high-throughput syntézy a následně pak vývoj podmínek pro rychlé stanovení enantiomerní čistoty připravených látek pomocí chirální separace, které budou využity pro budoucí studium stereoselektivních syntéz oxazinových derivátů.

2. CÍL DIPLOMOVÉ PRÁCE

Předložená diplomová práce si klade za cíl připravit knihovnu látek derivátů oxazinu pomocí syntézy na pevné fázi a kombinatoriální chemie. Jedná se o optimalizaci několikastupňové syntézy vedoucí k látkám **A** ($R^1;X;R^2$), převedení těchto látek na sloučeniny **B** ($R^1;X;R^2$) a **C** ($R^1;X;R^2$) oxidací dvojné vazby a štěpením N-O vazby za podmínek SPOS (Obr. 2).



$R^1 = \emptyset$, aminokyselina, dipeptid
 $X = N, C-NO_2, C-NH_2$
 $R^2 =$ primární nebo sekundární amin

Obrázek 2: Obecné struktury finálních derivátů

Dílčím cílem je dále vývoj podmínek pro chirální separaci těchto derivátů za pomoci chirální separace metodou HPLC případně SFC provedenou u vybraných čistých derivátů a derivátů v surové reakční směsi.

Celkově by tak diplomová práce měla poskytnout základ pro budoucí studium stereoselektivní syntézy oxazinových derivátů na pevné fázi.

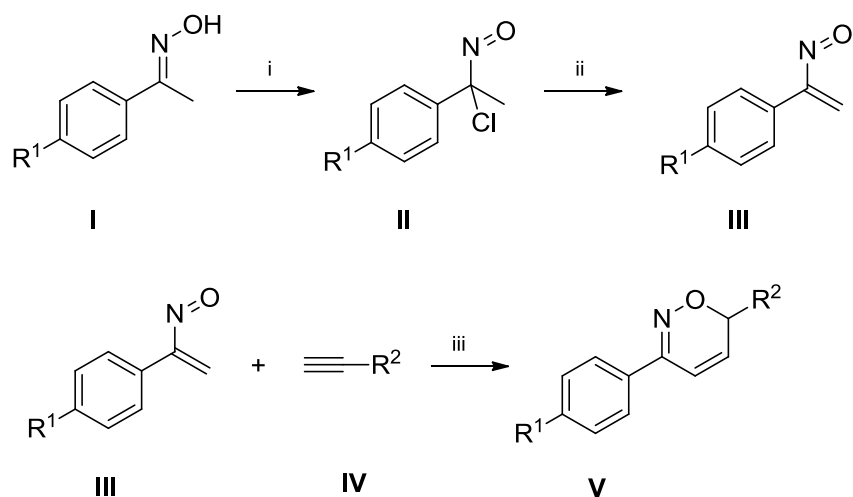
3. TEORETICKÁ ČÁST

Teoretická část diplomové práce se zabývá přehledem chemie 1,2-oxazinových derivátů. Nejprve uvádí přehled syntetických metod vedoucích k 1,2-oxazinovému cyklu, dihydro 1,2-oxazinovému cyklu a k 1,2-oxazinanu. Následně shrnuje metody přeměny 1,2-oxazinových derivátů, zejména reakce využívající přítomnost dvojných vazeb a reakce založené na štěpení N-O vazby a na štěpení C-O vazby. Nakonec se zaměřuje na biologickou aktivitu 1,2-oxazinových derivátů.

3.1. Syntéza 1,2-oxazinových derivátů

3.1.1. Syntéza 1,2-oxazinového cyklu

Jednou z metod přípravy 6*H*-1,2-oxazinů **V** je hetero-Diels-Alderova reakce α -nitrosoalkenů **III** s koncovými acetyleny **IV** (*Schéma 1*). Výchozí α -nitrosoalkeny **III** byly připraveny z ketoximů **I** reakcí s chloraminem-T s následnou dehydrohalogenací. Výsledné 6*H*-1,2-oxaziny **V** vznikaly při tomto postupu ve výtěžku 51-68 %⁶.

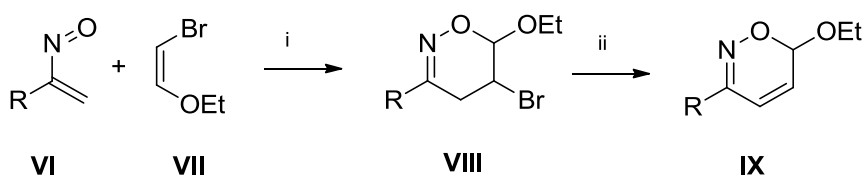


$R^1 = \text{H, CH}_3, \text{Cl, OCH}_3, \text{NO}_2$
 $R^2 = \text{CH}_2\text{OH, Ph, COOEt, CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_3$

i) chloramin-T, EtOH, 4 h, reflux
 ii) TEA, 1 h, RT
 iii) 15-20 h, reflux

Schéma 1: Příprava α -nitrosoalkenů a následná HDA s koncovými acetyleny

Této metodě předcházela dvoustupňová reakce spočívající v hetero-Diels-Alderově reakci α -nitrosoalkenů **VI** vhodným prekurzorem a následnou přeměnou dihydro-1,2-oxazinu **VIII** na 6*H*-1,2-oxazin **IX** (Schéma 2)⁷. Nevýhodou je dlouhá šestidenní reakční doba prvního kroku. Výtěžky 6*H*-1,2-oxazinů **IX** se však pohybují mezi 59 až 98 %⁷.

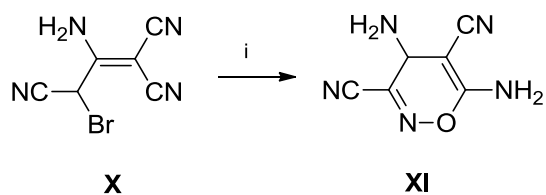


$R = \text{Ar, COOEt, CF}_3, \text{CH}_2\text{CH}=\text{CHCOOMe}$

i) MeOtBu, RT, 6 dní
 ii) DBU, MeOtBu, RT, 6 h

Schéma 2: HDA nitrosoalkenů a následná dehydrohalogenace

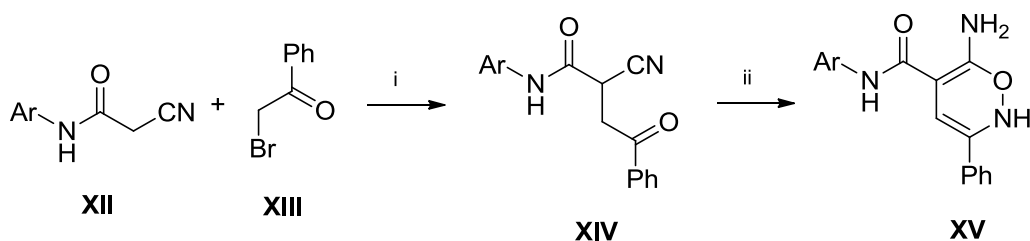
Další metodou přípravy je cyklizace 1-kyano-3-brompropenových derivátů s hydroxylaminem. K syntéze 4*H*-1,2-oxazinu **XI** byl využit 2-amino-1,1,3-trikyano-3-bromopropen **X** s hydroxylamin hydrochloridem (Schéma 3). Výsledný 1,2-oxazin **XI** byl izolován ve výtěžku 62%⁸.



i) $\text{NH}_2\text{OH}\cdot\text{HCl}$, K_2CO_3 , EtOH, 3 h, reflux

Schéma 3: Tvorba 4H-1,2-oxazinu cyklizací s hydroxylaminem

Hydroxylamin byl využit i při cyklizaci s deriváty nitrilů α -keto kyselin. Příkladem je příprava 2H-1,2-oxazinu **XV** cyklizací hydroxylaminu s derivátem **XIV**. Ten byl připraven reakcí 4-(2-kyanoacetamido)benzoové kyseliny **XII** a bromacetofenonu **XIII** (Schéma 4). Výsledný 2H-1,2-oxazin **XV** vznikl ve výtěžku 53 %⁹.

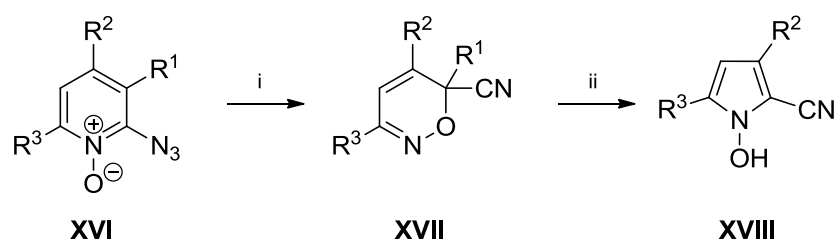


i) TEA, EtOH, 1 h, reflux

ii) $\text{NH}_2\text{OH}\cdot\text{HCl}$, Na_2CO_3 , DMF, 4 h, reflux

Schéma 4: Tvorba 2H-1,2-oxazinu cyklizací s hydroxylaminem

Jinou možností vzniku 6H-1,2-oxazinů **XVII** je fotolýza 2-azidopyridin 1-oxidu **XVI**. Fotolýza probíhá v benzenu při 350 nm a pokojové teplotě po dobu 1 h za odštěpení dusíku (Schéma 5). Výsledné deriváty **XVII** vznikly ve výtěžku 45-96%. 1,2-oxaziny **XVII** jsou však nestabilní a je třeba je rychle zpracovat či uchovávat za mrazu pod dusíkem. Za zvýšené teploty přesmykují na pyrroly **XVIII**¹⁰.



$R^1, R^2, R^3 = \text{H}, \text{CH}_3$

i) *hv*, benzen, 1 h, RT

ii) T, pro $R^1 = \text{H}$

Schéma 5: Fotolýza za vzniku oxazinu XVII a jeho izomerizace

3.1.2. Syntéza dihydro-1,2-oxazinového cyklu

Hlavní metodou přípravy 3,6-dihydro-1,2-oxazinů **XXI** je hetero-Diels-Alderova reakce N-substituovaných nitroso látek. Jedná se o [4+2] cykloadiční reakci nitroso sloučenin **XIX** s dieny **XX** (Schéma 6). Jako dienofily se využívají C-nitroso sloučeniny, např. kyanonitroso **XIXa**, arylnitroso **XIXb**, pyridylnitroso **XIXc**, vinylnitroso **XIXd**, acylnitroso **XIXe** nebo estery kyseliny nitrosomravenčí **XIXf**. Reakce jsou urychlovány přítomností elektronakceptorní skupiny¹¹.

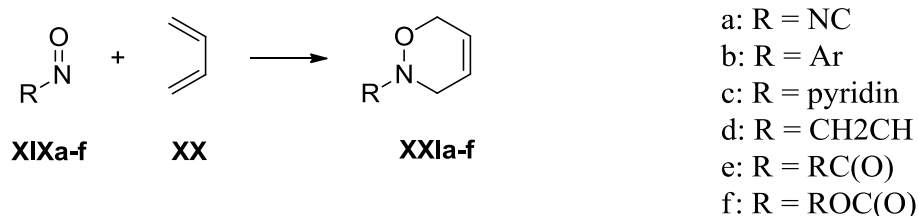
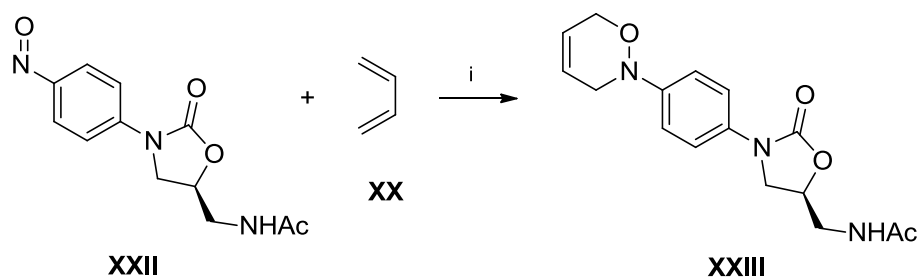


Schéma 6: Nitroso hetero-Diels-Alderova reakce

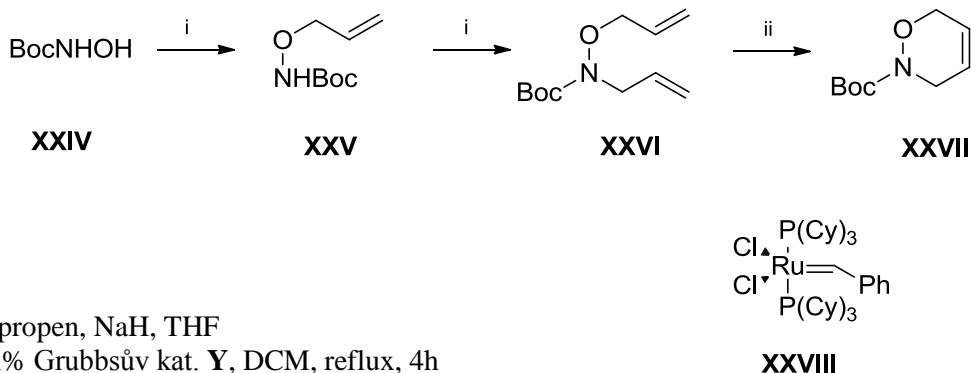
Jako praktický příklad lze pak uvést přípravu analoga oxalidinonového antibiotika linezolidu **XXIII**, u kterého chybí fluor a místo morfolinového cyklu je začleněn 3,6-dihydro-1,2-oxazin. Nitrosoderivát **XXII** poskytuje při reakci s butadienem **XX** v dichlormethanu požadovaný produkt **XXIII** ve výtěžku 89 % (Schéma 7)³.



i) DCM, 0°C až RT, 3h

Schéma 7: Nitroso HDA při syntéze analoga linezolidu

Další metodou pro přípravu 3,6-dihydro-1,2-oxazinanů je metateze s uzavíráním kruhu u 1,7-dienů. Výchozí látku **XXVI** lze připravit dvojitou alkyací *N*-Boc-hydroxylaminu **XXIV** vhodným bromalkenem. Ta pak reaguje za přítomnosti Grubbsova katalyzátoru **XXVIII** v dichlormethanu za varu (*Schéma 8*). Výsledný *N*-Boc-3,6-dihydro-1,2-oxazin **XXVII** byl připraven ve výtěžku 93 %. Touto metodou lze připravit i sedmi či vícečlenné cykly s N-O vazbou¹².

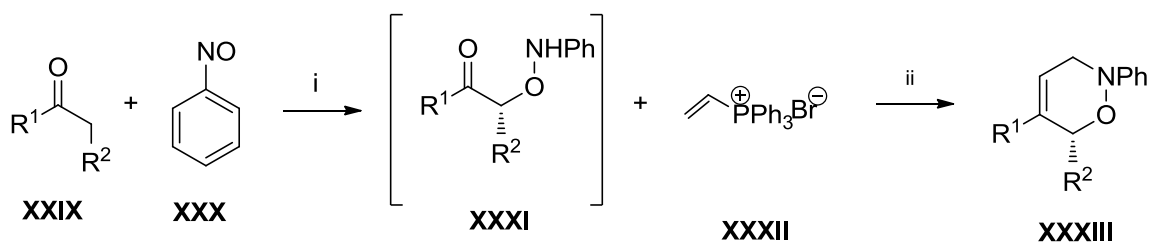


i) 3-brompropen, NaH, THF

ii) 10 mol% Grubbsův kat. **Y**, DCM, reflux, 4h

Schéma 8: Syntéza 3,6-dihydro-1,2-oxazinanů pomocí metateze s uzavíráním kruhu dienů

Metodou pro enantiomerně čisté dihydro 1,2-oxaziny je organokatalytická α -oxyaminace nitrosobenzenu a následná intermolekulární Wittigova reakce. Nejprve reaguje malý nadbytek aldehydu **XXIX** s nitrosobenzenem **XXX** za katalýzy (*S*)-pyrrolidinyltetrazolu **XXXIV** v dimethylsulfoxidu (DMSO). Následně je přidán tetrahydrofuran, vinylfosfoniová sůl **XXXII** a hydrid sodný (*Schéma 9*). Pro tuto reakci vedoucí k dihydro 1,2-oxazinům **XXXIII** jsou výhodné rozvětvené aldehydy, které vedou k výtěžkům 61 – 82 % s enantiomerní čistotou 83 – 99 %¹³.



R¹ = H, Me
R² = alkyl, alkenyl

i) (S)-pyrrolidinyl-tetrazol **XXXIV**, DMSO, RT, 15-30 min
ii) NaH, THF, 0°C, 20 min

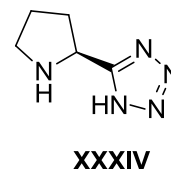
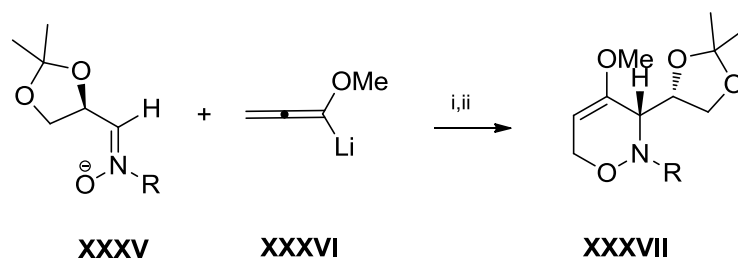


Schéma 9: Příprava 3,6-dihydro-1,2-oxazinových derivátů pomocí α -oxyaminace a intermolekulární Wittigova reakce

Poslední metodou pro syntézu dihydro-1,2-oxazinů je reakce nitronů s methoxyallenlithiem **XXXVI**. Jako konkrétní příklad lze uvést reakci nitronu odvozeného od (R)-glyceraldehydu **XXXV** (Schéma 10). Reakce probíhá v tetrahydrofuranu při -78°C po dobu 2 h. Methoxyallenlithium **XXXVI** je připravován z methoxyallenu a n-butyllithia. Výsledné dihydro-1,2-oxaziny **XXXVII** byly izolovány ve výtěžku 53 % (R = Me) a 81 % (R = Bn) a enantiomerní čistotě 98 %¹⁴.



R = Me, Bn

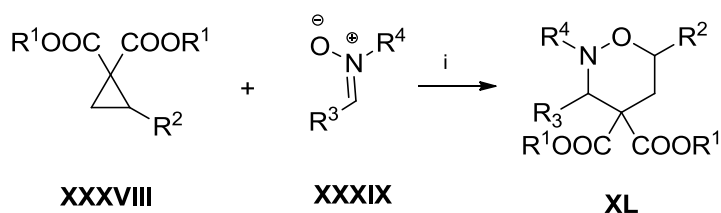
i) THF, -78°C, 2h
ii) H₂O

Schéma 10: Reakce nitronů s methoxyallenlithiem

5,6-dihydro-1,2-oxazinany mohou být syntetizovány obměnami výše zmíněných metod. Lze je připravit hetero-Diels-Alderovou reakcí^{7,15} jako příklad je výše zmíněná syntéza derivátu **VIII**⁷, cyklizačními metodami vhodných prekurzorů s hydroxylaminem¹⁶, či cyklizacemi arylalkenyl-oximů¹⁷.

3.1.3. Syntéza 1,2-oxazinanu

Pro syntézu 1,2-oxazinanů je značně rozšířená cykloadiční reakce nitronu **XXXIX** a aktivovaného cyklopropanu **XXXVIII**. Ke katalýze těchto reakcí se využívají Lewisovy kyseliny, zejména $\text{Yb}(\text{OTf})_3$ či MgI_2 (Schéma 11). Reakce katalyzované $\text{Yb}(\text{OTf})_3$ probíhají v dichlormethanu za pokojové teploty. Reakce katalyzované MgI_2 zase v bezvodém THF opět za pokojové teploty^{18,19}.



$\text{R}^{1,2} = \text{Me, Et}$

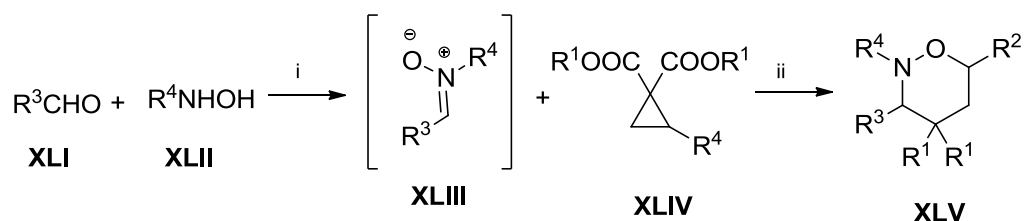
$\text{R}^{3;4;5} = \text{H, Ar, Bz, vinyl}$

i) 5 mol % $\text{Yb}(\text{OTf})_3$, DCM, RT, 3-42 h nebo

i) 10 mol % MgI_2 , THF, RT, 16-24 h

Schéma 11: Syntéza 1,2-oxazinanu reakcí cyklopropanu a nitronu

Pro méně stabilní nitrony byla vyvinuta tříkomponentová modifikace této reakce, kdy je nitron **XLIII** syntetizován *in situ* z odpovídajícího aldehydu **XLI** a hydroxylaminu **XLII** za katalýzy Lewisovou kyselinou. Reakce probíhá v toluenu za přítomnosti molekulárního síta, po 30 minutách je přidán cyklopropan **XLIV**. Reakční směs je míchána za laboratorní teploty do odreagování cyklopropanu **XLIV** (Schéma 12)²⁰.



$\text{R}^{1,2} = \text{Me, Et}$

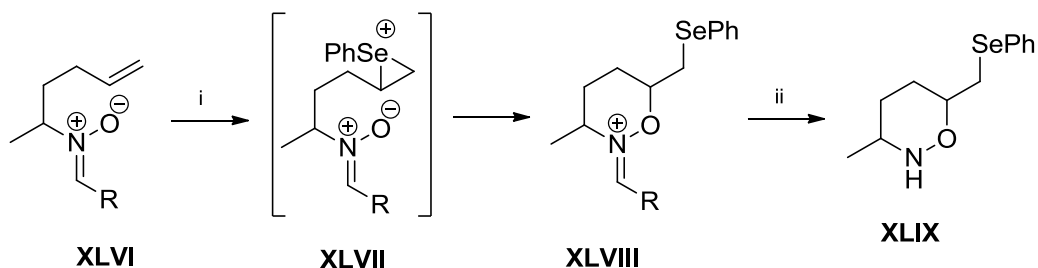
$\text{R}^{3;4;5} = \text{H, Ar, Bz, vinyl}$

i) 10 mol % $\text{Yb}(\text{OTf})_3$, molekulární síto (4\AA), toluen, RT, 30 min

ii) RT, do odreagování

Schéma 12: Tříkomponentová modifikace za vzniku 1,2-oxazinanu

Dále lze k syntéze dihydro-1,2-oxazinů využít samotné nitrony. Alkenylnitrony **XLVI** reagují s fenylselenium bromidem v dichlormethanu za pokojové teploty po dobu 1-1,5 hodiny. Následná reakce pak poskytuje mícháním v methanolu finální produkt **XLIX** ve výtěžku 70 % (*Schéma 13*)²¹.

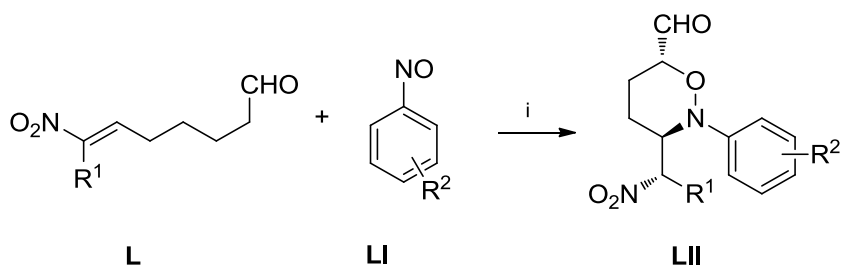


R = Ph, propyl

- i) fenylselenium bromid, DCM, RT, 1-1,5 h
 ii) MeOH, RT, 2 h

Schéma 13: Cyklizace alkenylnitronu pomocí fenylmagnesium bromidu

Dalším mechanismem tvořícím 1,2-oxazinany je α -aminoxylace a následná aza-Michaelova adice, kdy reagují nitroalkenaly **L** s nitrobenzenovými deriváty **LI** za katalýzy L-prolinu (*Schéma 14*). Za optimálních podmínek reakce probíhá v acetonitrilu při -20°C . Nízká teplota zamezuje homodimerizaci. Přídavek tetraethylamonium bromidu (TEAB) zase snižuje množství potřebného L-prolinu. Reakce byla vyzkoušena na několika derivátech a výsledné 1,2 oxazinany **LII** vznikly s výtěžky 47 – 90 % a enantiomerními čistotami 97 až $> 99\%$ ²²

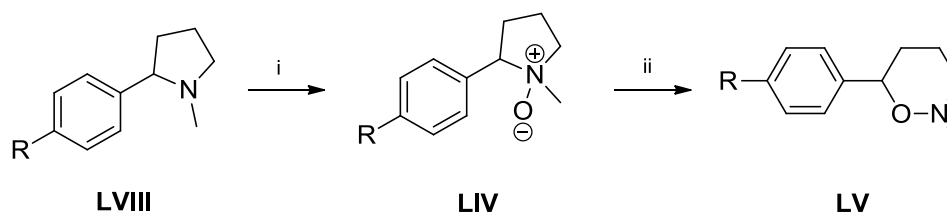


$\text{R}^1 = \text{H, Me, Et, Ph, Bn, pMeC}_6\text{H}_4\text{CH}_2, \text{pClC}_6\text{H}_4\text{CH}_2, \text{pBrC}_6\text{H}_4\text{CH}_2$
 $\text{R}^2 = \text{H, 2-Me, 4-Me, 4-Br}$

- i: L-prolin, TEAB, CH_3CN , -20°C , do odreagování

Schéma 14: Příprava 1,2-oxazinanu pomocí α -aminoxylace a následné aza-Michaelovy adice

Poslední metodou přípravy 1,2-oxazinanů, nevycházející z již šestičlenného cyklu je přesmyk pyrrolidin-*N*-oxidu. Výchozí 2-aryl substituované pyrrolidiny **LVIII** se oxidují peroxidem vodíku na pyrrolidin-*N*-oxid **LIV**. Zahřátím na 150 - 170°C vznikly 1,2-oxazinany **LV** ve výtěžku 49 až 96 % (Schéma 15)²³.



R = H, Me, Cl

i) H₂O₂, RT
 ii) 150-170°C

Schéma 15: Tvorba 1,2-oxazinanů přesmykem pyrrolidin-*N*-oxidu

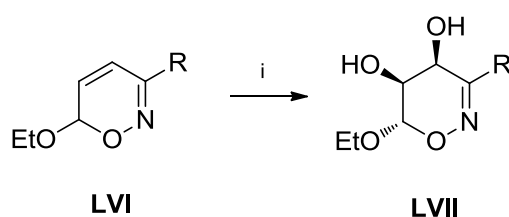
Dále lze 1,2-oxazinany připravit redukcí dvojně vazby 1,2-oxazinů a dihydro-1,2-oxazinů. Tyto reakce budou uvedeny v kapitole 3.2.1. popisující reakce využívající přítomnost dvojných vazeb.

3.2. Metody přeměny 1,2-oxazinových derivátů

3.2.1. Reakce využívající přítomnost dvojných vazeb

3.2.1.1. Přeměna dvojných vazeb 6H-1,2-oxazinového cyklu

První z reakcí využívající přítomnost dvojných vazeb 1,2-oxazinů je *cis*-dihydroxylace. K přeměně 6H-1,2-oxazinu **LVI** lze použít manganistan draselný při -45°C , kdy dihydroxyderivát vzniká ve výtěžcích 70 – 80 %, či chlorid ruthenitý s jodistanem sodným při $0 - 5^{\circ}\text{C}$ (Schéma 16). Druhá metoda je rychlejší a dihydro 1,2-oxaziny **LVII** poskytuje ve vyšších výtěžcích 79 - 99 %²⁴.

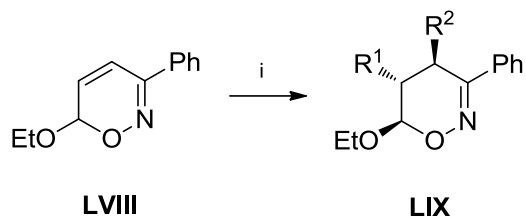


R = Ar, COOEt, CF₃

i) KMnO₄, MgSO₄, EtOH, H₂O, -45°C , 50 min
nebo RuCl₃·H₂O, NaIO₄, EtOAc, MeCN, $0 - 5^{\circ}\text{C}$, 5 - 6 min

Schéma 16: Dihydroxylace 1,2-oxazinů

Druhou metodou přeměny dvojných vazeb 1,2-oxazinů je adice na konjugovaném systému dvojných vazeb za vzniku organolithného derivátu příslušného oxazinu a jeho následná přeměna s elektrofilem. K adici na 1,2-oxaziny **LVIII** byly využity organolithné sloučeniny jako fenyllithium, *n*-butyllithium, *tert*-butyllithium či 2-propenyllithium. Následné využití různých elektrofilů vedlo k tvorbě substituovaných dihydro 1,2-oxazinů **LIX** ve výtěžcích 34 – 89 % (Schéma 17)²⁵.



$R^1 = \text{Ph, } n\text{-Bu, } tert\text{-Bu, 2-propenyl}$
 $R^2 = \text{H, Me, SMe, F, OH, CO}_2\text{Bn, CO}_2\text{Et}$

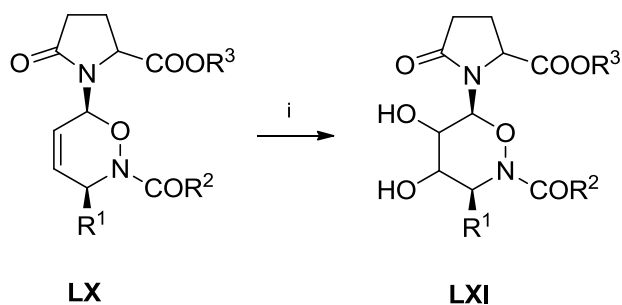
i) $R^1\text{Li}$, THF, -78°C , 15 min
 ii) $R^2\text{X}$, $-78^\circ\text{C} - \text{RT}$, 45 – 120 min

$R^2\text{X} = \text{H}_2\text{O, MeI, MeSSMe, FN(SO}_2\text{Ph)}_2, \text{O}_2, \text{ClCO}_2\text{Bn, NCCO}_2\text{Et}$

Schéma 17: Adice organolithných sloučenin na dvojnou vazbu 1,2-oxazinů

3.2.1.2. Přeměna dvojně vazby 3,6-dihydro-2*H*-1,2-oxazinového cyklu

Stejně jako v předešlém případě je i u derivátů 3,6-dihydro-1,2-oxazinu popsána dihydroxylace. Pro reakci se využívá oxid osmičelý spolu s *N*-methylmorfolin-*N*-oxidem (NMO). Takto vzniklé dihydroxy 1,2-oxazinany vznikly stereospecificky s výtěžky 40 až 99 % (*Schéma 18*)²⁶. Stejně jako v případě 1,2-oxazinů lze pro dihydroxylaci využít i jodistan sodný za katalýzy chloridem ruthenitým²⁷.



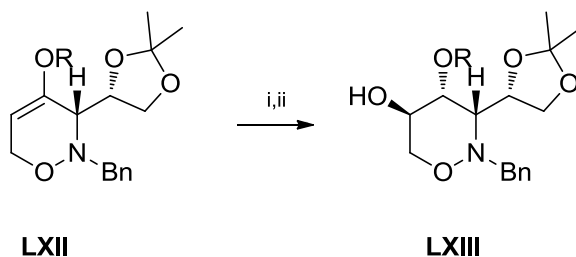
$R^1 = \text{H, Me}$
 $R^2 = \text{NMe}_2, \text{OtBu, OBn}$
 $R^3 = \text{Me, } t\text{Bu}$

i) OsO_4 , NMO, aceton, H_2O , 40°C , 16 – 24 h

Schéma 18: Dihydroxylace dihydro 1,2-oxazinu

Další metodou přeměny dvojně vazby dihydro 1,2-oxazinu je hydroborace a následná oxidace. Příkladem je reakce dihydro 1,2-oxazinu **LXII** s komplexem boranu a tetrahydrofuranu a následná oxidace peroxidem vodíku (*Schéma 19*). V případě použití

derivátu **LXII** vznikly výsledné 1,2-oxazinany **LXIII** ve výtěžku 69 % (R=Bn) a 80 % (R=Me)²⁸.



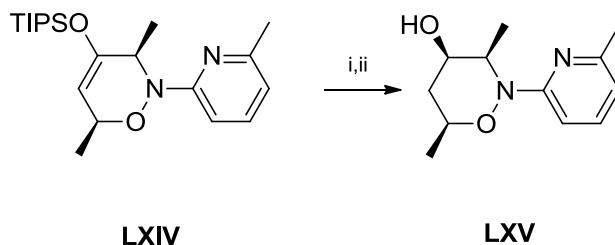
R = Me, Bn,

i) BH₃.THF, THF, -30°C - RT, 3h

ii) NaOH, H₂O₂, -10°C - RT, ON

Schéma 19: Hydroborace a následná oxidace 3,6-dihydro-1,2-oxazinu

Dále je možné dvojnou vazbu 3,6-dihydro-1,2-oxazinu podrobit redukcí. Tato přeměna byla aplikována u derivátu **LXIV** vzniklého nitroso HDA. Nejprve byla hydrolyzována chránící silylová skupina pomocí tetrabutylamonium fluoridu a následně byla provedena redukce hydridoboritanem sodným (*Schéma 20*). Redukovaný derivát **LXV** vznikl jako jediný diastereoizomer ve výtěžku 98 %²⁹.

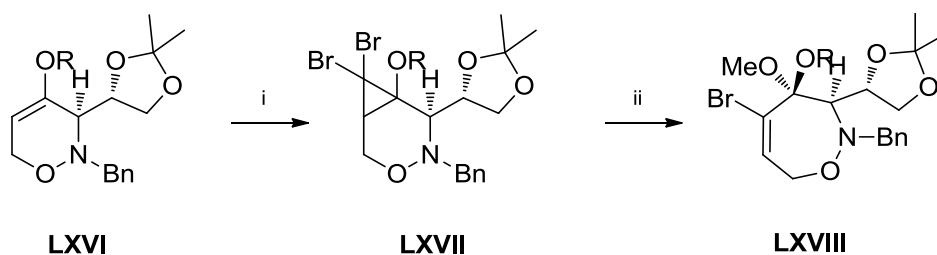


i) TBAF, THF, AcOH, -78°C – RT, 2h

ii) NaBH₄, MeOH, 0°C, 2h

Schéma 20: Redukce 3,6-dihydro-1,2-oxazinu

Dvojnou vazbu 3,6-dihydro-1,2-oxazinů lze dále využít k rozšíření cyklu za tvorby 1,2-oxazepinů. Enantiomerně čisté dihydro 1,2-oxaziny **LXVI** nejprve reagují s bromoformem, fluoridem draselným a hydroxidem sodným za přítomnosti katalyzátoru fázového přenosu. Vzniklý derivát **LXVII** pak zahříváním s uhlíčanem draselným v methanolu poskytl 1,2-oxazepin **LXVIII** ve výtěžku 53 % (R=Me) a 62 % (R=CH₂CH₂SiMe₃) (*Schéma 21*)³⁰.



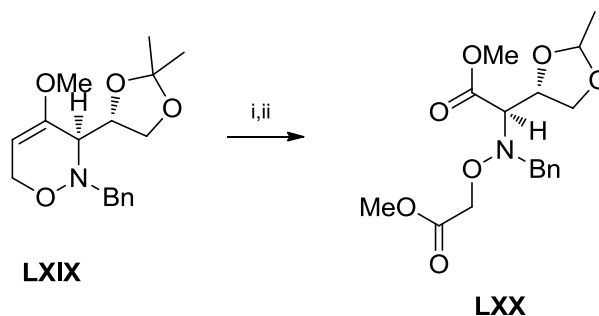
R = Me, CH₂CH₂SiMe₃

i) CHBr₃, KF, NaOH, Et₃BnNCl, RT, 2 d

ii) K₂CO₃, MeOH, reflux, 20 h

Schéma 21: Rozšíření kruhu dihydro 1,2-oxazinu

Dvojnou vazbu dihydro 1,2-oxazinů je také možné podrobit ozonolýze. Dihydro 1,2-oxazin **LXIX** poskytuje reakcí s ozonem v methanolu a následně reakcí s acetanhydridem a triethylaminem diester **LXX** ve výtěžku 68 % (*Schéma 22*)³¹.



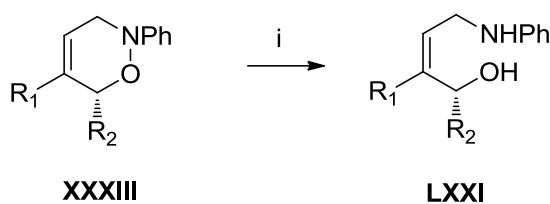
i) O₃, MeOH, -78°C, 20 min; RT, 2 h

ii) Ac₂O, NEt₃, DCM, 0°C, 30 min; RT, 21 h

Schéma 22: Ozonolýza dihydro 1,2-oxazinu a následná reakce s acetanhydridem

3.2.2. Reakce založené na štěpení N-O vazby

Reakce založené na štěpení N-O vazby byly popsány pouze pro dihydro 1,2-oxaziny a 1,2-oxazinany. Pro obě tyto skupiny se nejčastěji využívá redukce zinkem v kyselém prostředí, které zajišťuje kyselina chlorovodíková nebo octová^{13,32,33}. Příkladem je štěpení dihydro 1,2-oxazinů **XXXIII** pomocí zinku v kyselině chlorovodíkové (*Schéma 23*). Výsledné deriváty **LXXI** vznikly ve výtěžku 83 až 96 %¹³.

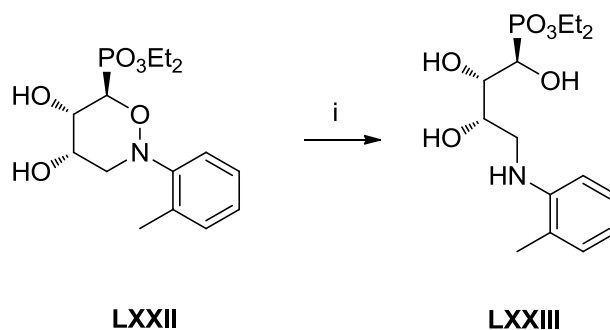


$R^1 = \text{H, Me}$
 $R^2 = \text{alkyl, alkenyl}$

i) Zn, HCl, MeOH, RT, 18 – 48 h

Schéma 23: Štěpení N-O vazby 3,6-dihydro-1,2-oxazinů pomocí Zn/HCl

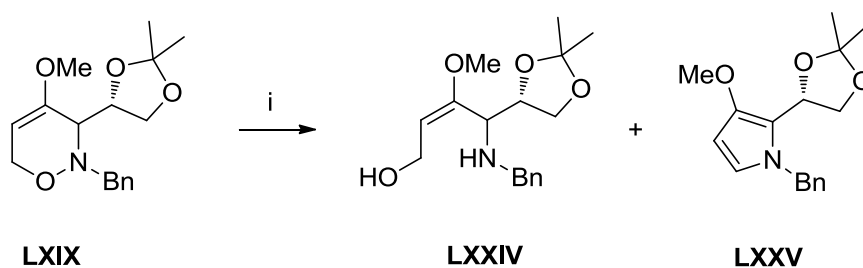
N-O vazbu derivátů 1,2-oxazinu lze dále štěpit katalytickou hydrogenací. 1,2-oxazinan **LXXII** poskytuje redukcí vodíkem za katalýzy paládiem derivát **LXXIII** ve výtěžku 99 %. (Schéma 24)³⁴.



i) H₂, Pd-C, EtOH, RT, 12 h

Schéma 24: Katalytická hydrogenace N-O vazby 1,2-oxazinanu

Pro štěpení N-O vazby 1,2-oxazinů byl také využit jodid samarnatý. U štěpení dihydro 1,2-oxazinanů **LXIX** vznikaly vedle aminoalkoholů **LXXIV** i pyrrolové deriváty **LXXV** (Schéma 25). Jejich poměr bylo možné upravit reakčními podmínkami, a to ekvivalentem jodidu samarnatého a reakční dobou. Redukce 1,2-oxazinanů probíhala kvantitativně za vzniku aminoalkoholů³⁵.



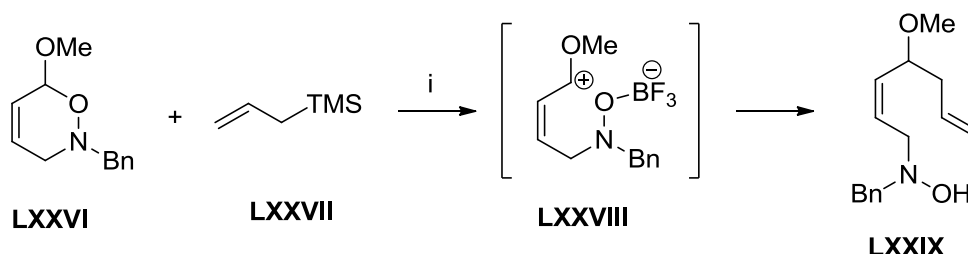
i) SmI₂, THF, RT

Schéma 25: Štěpení N-O vazby dihydro 1,2-oxazinu jodidem samarnatým

Dále lze N-O vazbu derivátů 1,2-oxazinu štěpit pomocí hexakarbonylu molybdenu, fotochemicky, enzymaticky či dalšími chemickými procesy¹¹.

3.2.3. Reakce založené na štěpení C-O vazby

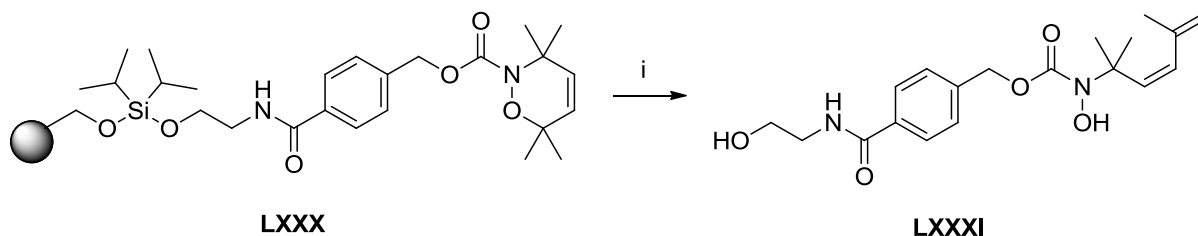
Reakce založené na štěpení C-O vazby derivátů 1,2-oxazinu byly opět popsány jen pro dihydro 1,2-oxaziny a 1,2-oxazinany. Dihydro 1,2-oxaziny mohou podléhat štěpení C-O vazby pomocí Lewisovy kyseliny a následně tvorbě C-C vazby reakcí s trimethylsilany. Příkladem je 3,6-dihydro-1,2-oxazin **LXXVI**, který reaguje s $\text{BF}_3 \cdot \text{OEt}_2$ a allyltrimethylsilanem **LXXVII** (Schéma 26). Nejprve dochází ke štěpení C-O vazby za vzniku intermediátu **LXXVIII**. Ten pak přechází na výsledný derivát **LXXIX** ve výtěžku 72 %³⁶.



i) $\text{BF}_3 \cdot \text{OEt}_2$, DCM, 0°C

Schéma 26: Štěpení C-O vazby dihydro 1,2-oxazinu a reakce s trimethylsilanem

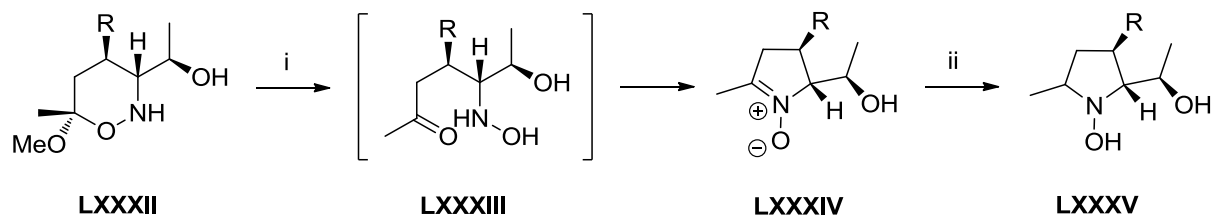
V chemii na pevné fázi může docházet ke štěpení C-O vazby při štěpení látky z pryskyřice. Látky zakotvené na pryskyřici se silylovým linkerem se z ní uvolňují pomocí tetrabutylamonium fluoridu. V případě derivátu obsahujícího dihydroxy 1,2-oxazin **LXXX** však zároveň dochází ke štěpení C-O vazby oxazinového kruhu (Schéma 27). Derivát **LXXXI** vznikl ve výtěžku 77 %³⁷.



i) TBAF, THF, RT, 30 min

Schéma 27: Štěpení 3,6-dihydro-1,2-oxazinu z pryskyřice se štěpením C-O vazby

Vhodně substituované 1,2-oxazinany podléhají po štěpení C-O dalším modifikacím. Derivát **LXXXII** poskytl se směsí vody a kyseliny octové pyrrolin *N*-oxid **LXXXIV**. Ten byl reakcí s kyanoborohydridem sodným převeden na *N*-hydroxypyrrolidin **LXXXV** ve výtěžku 55 % (Schéma 28)³⁸.



R = 4-MeOC₆H₄

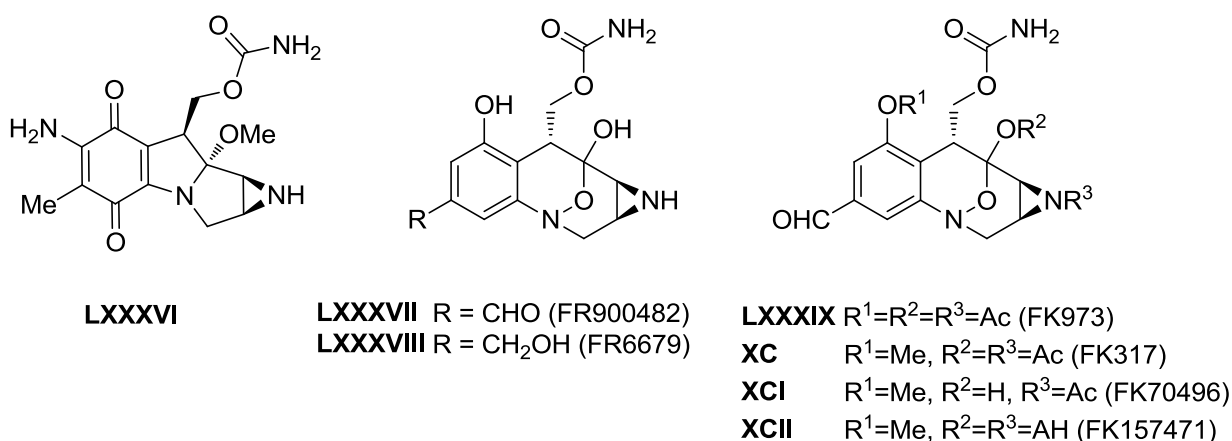
i) H₂O, AcOH, 80°C, 1,5 h

ii) NaBH₃CN, RT, 3 h

Schéma 28: Štěpení C-O vazby 1,2-oxazinanu za tvorby *N*-hydroxypyrrolidin

3.3. Biologická aktivita 1,2-oxazinových derivátů

Mezi biologicky aktivní látky obsahující 1,2-oxazinový kruh patří deriváty strukturně podobné klinicky využívaného mitomycinu C **LXXXVI**. Látky FR900482 **LXXXVII** a FR66979 **LXXXVIII** (*Obr. 3*) byly izolovány ze *Streptomyces sandaensis* a vykazují protinádorové a antibakteriální účinky^{1,2}. Tyto látky podléhají bioreduktivní aktivaci a interagují s DNA způsobem, při kterém dochází ke spojení dvou řetězců (meziřetězcový crosslink). V předběžných klinických studiích vykazovaly látky FR900482 **LXXXVII** a její derivát FK973 **LXXXIX** trojnásobně vyšší účinnost a významně nižší toxicitu než mitomycin C. Jsou účinné proti multirezistentním buňkám P388. FK973 **LXXXIX** tvoří DNA - DNA meziřetězcové crosslinky a DNA - protein crosslinky v buňkách L1210³⁹. Dále byly studovány meziřetězcové crosslinky u látky FK317 **XC** a jejích metabolitů FK70496 **XCI** a FK157471 **XCII** (*Obr. 3*)⁴⁰.



Obrázek 3: Mitomycin C, FR900482 a jeho analoga

Na příkladu látky FR900482 **LXXXVII** byl navržen a následně experimentálně ověřen mechanismus bioreduktivní aktivace a následného meziřetězcového crosslinku (*Schéma 29*). Nejprve dochází k redukci N-O vazby za tvorby intermediátů **XCIII** a **XCIV**, které po odštěpení vody přecházejí na mitosen **XCV**. Ten pak reaguje s DNA a vytváří meziřetězcový crosslink **XCVI**³⁹.

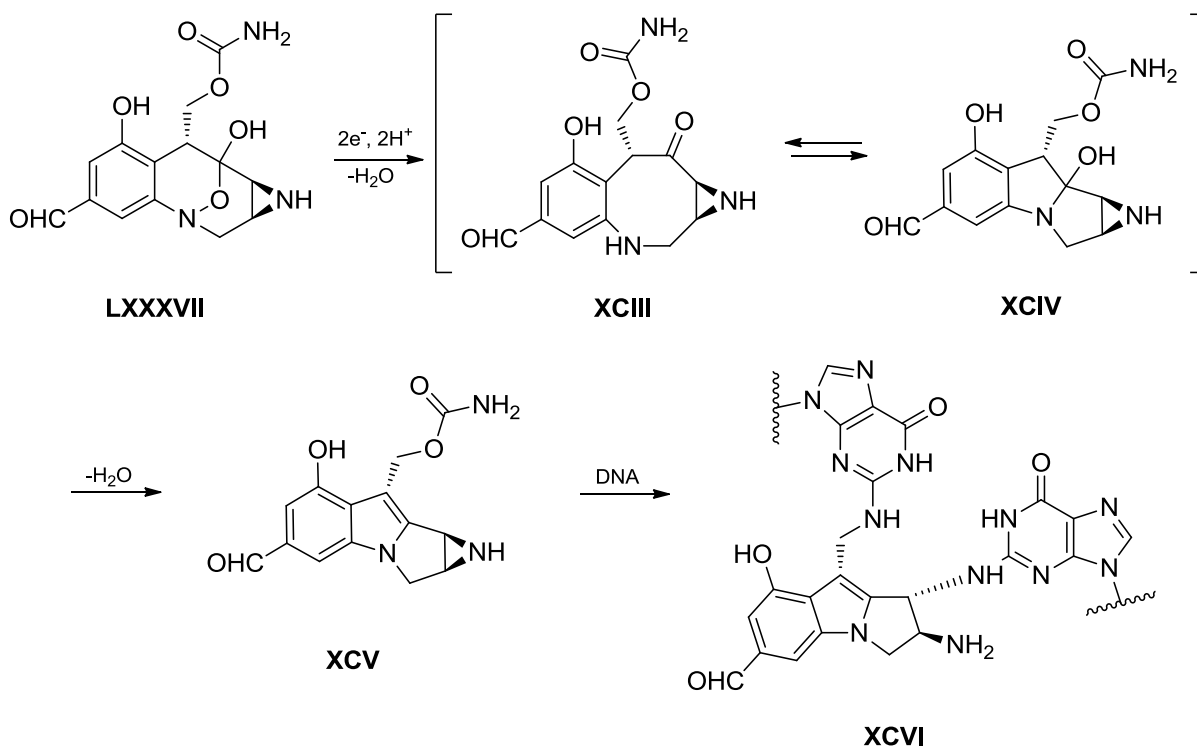
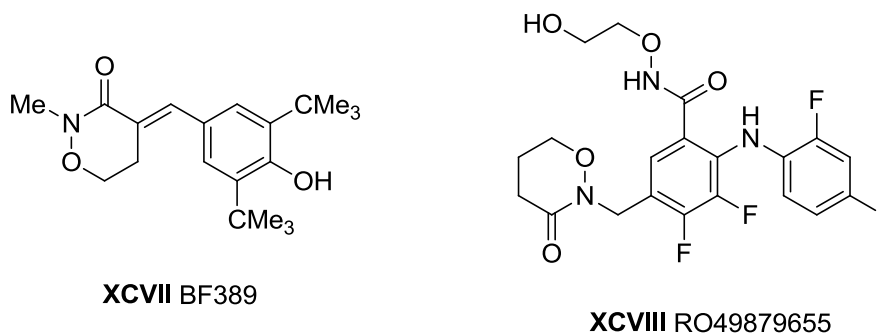


Schéma 29: Bioreduktivní aktivace a meziřetězcový crosslink FR900482

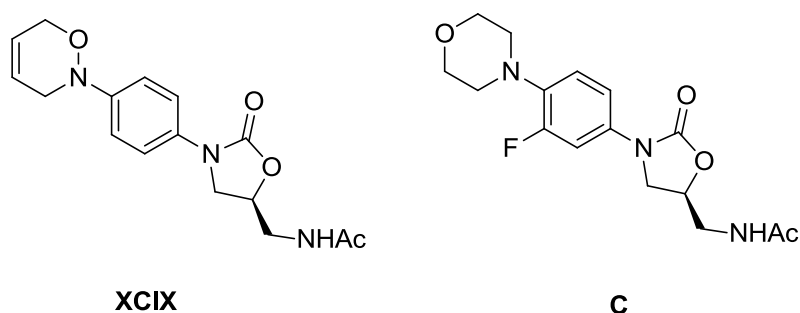
Další biologicky aktivní látkou obsahující 1,2-oxazinanový kruh je BF389 **XCVII** (*Obr. 4*). Jedná o jeden z prvních selektivních inhibitorů cyklooxygenázy 2 (COX-2) s inhibiční koncentrací IC_{50} pro COX-2 0,03 μM . a poměrem IC_{50} COX-2/COX-1 0,2. Řadí se do druhé třídy nesteroidních antiflogistik, jedná se tedy o kompetitivní, časově závislou, reversibilní inhibici. BF389 **XCVII** je pouze experimentální látkou⁴¹.

Stejný 3-oxo-1,2-oxazinanový kruh má i látka RO49879655 **XCVIII** (*Obr. 4*) vyvíjená jako kancerostatikum. Tato látka nekompetitivně inhibuje enzym mitogenem aktivovanou proteinkináza kinázu (MEK). V preklinických testech vykazovala slibné aktivity. Byla testována v 1. fázi klinických studií na pokročilých metastazujících solidních nádorech a melanomech. Mezi nežádoucí účinky patří zvýšení kreatin fosfokinázy, rozmazané vidění, vyrážka a gastrointestinální poruchy⁴².



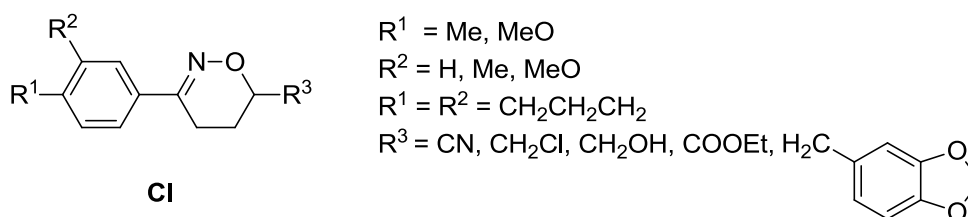
Obrázek 4: Inhibitory COX2 a MEK obsahující 3-oxo-1,2-oxazinanový kruh

Deriváty 1,2-oxazinu nacházejí uplatnění i při hledání nových antimikrobiálních látek. Při testování nových oxalidinonových antibiotik proti gram-pozitivním bakteriím měl slibné minimální inhibiční koncentrace derivát **XCIX** (Obr. 5). Ty byly srovnatelné s komerčně dostupným linezolidem **C**. Dalo by se předpokládat, že jeho fluorovaný derivát by byl ještě aktivnější. Při testování na myších *in vivo* modelech však derivát **XCIX** prokazoval velmi nízkou aktivitu a proto nebyl dále charakterizován³.



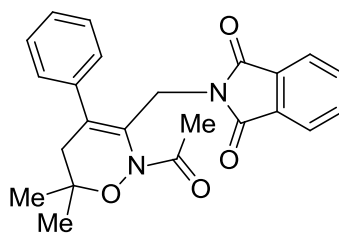
Obrázek 5: Oxalidinonový derivát obsahující dihydro 1,2-oxazin a linezolid

Na antimikrobiální aktivitu byly testovány i nové 5,6-dihydro-1,2-oxazinové deriváty. Kombinatoriálním způsobem nasyntetizované nové deriváty **CI** (Obr. 6) byly testovány na antibakteriální a antifungální aktivitu proti čtyřem druhům bakterií a plísní. Všechny sloučeniny vykazovaly výbornou *in vitro* aktivitu⁴³.



Obrázek 6: 5,6-dihydro-1,2-oxaziny s *in vitro* antimikrobiální aktivitou

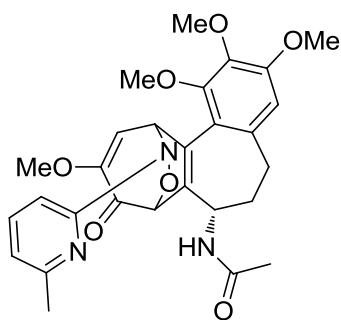
Dále byly deriváty 1,2-oxazinu cíleny na 5-lipooxygenázu (5-LOX) a acetylcholinesterázu (AChE). Z třinácti nově nasyntetizovaných derivátů byl nejvíce účinný derivát **CII** (Obr. 7) s inhibiční koncentrací IC_{50} 1,88 μ M vůči 5-LOX a 2,5 μ M vůči AChE. Afinitu k enzymům potvrdil i *in silico* docking. Vzhledem k lipofilitě látky ($\log P=2,66$) se předpokládá dobrá prostupnost hematoencefalickou bariérou. Z těchto důvod by látka mohla mít roli při hledání nových léčiv proti Alzheimerově chorobě¹⁵.



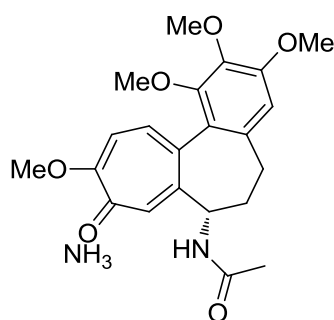
CII

Obrázek 7: Derivát 5,6-dihydro-1,2-oxazin inhibující 5-LOX a AChE

Deriváty 1,2-oxazinu mohou sloužit jako proléčiva díky své tvorbě pomocí HDA. Derivát **CIII** (Obr. 8) vykazuje podobnou cytotoxickou aktivitou proti PC-3 a MCF-7 buněčným liniím jako kolchicin **CIV**. Slouží jako jeho proléčivo, kdy kolchicin se uvolňuje retro Diels-Alderovou reakcí⁴.



CIII



CIV

Obrázek 8: Derivát kolchicinu obsahující 1,2-oxazinový kruh a kolchicin

4. DISKUZE A VÝSLEDKY

4.1. Syntéza derivátů 1,2-oxazinu na pevné fázi

Hlavní cíl diplomové práce byl soustředěn na optimalizaci syntézy derivátů dihydro 1,2-oxazinu **5** ($R^1;X$) a dále pak vývoj následných syntetických kroků zahrnujících tvorbu amidů **6** ($R^1;X;R^2$), přeměnu dvojných vazeb za vzniku 1,2-oxazinů **7** ($R^1;X;R^2$) a následnou přeměnu oxazinového kruhu z vzniku derivátů **8** ($R^1;X;R^2$) dle navrženého schématu (Schéma 30). Jednotlivé substituenty využité v syntéze shrnuje tabulka substituentů (Tab. 1).

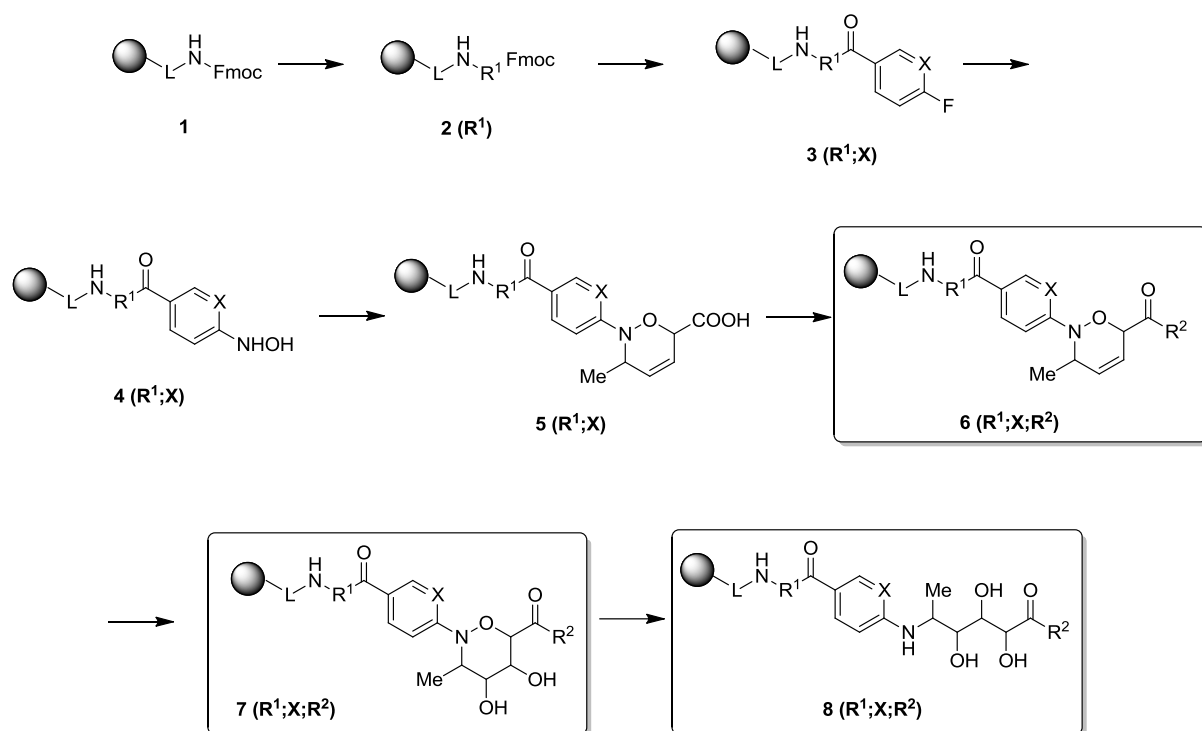


Schéma 30: Celkové schéma syntézy

Tabulka 1: Seznam substituentů

R^1		X		R^2 (amidy odvozené od)	
1	β -Ala	1	C-NO ₂	1	Piperidin
2	Gly	2	N	2	Benzylamin
3*	\emptyset	3	C-NH ₂	3	Propylamin
4	β -Ala-Gly			4	Morfolin
5	Gly- β -Ala			5	Anilin
				6	1-ethoxykarbonyl piperazin

* Platí pro deriváty **3** ($R^1;X$) až **8** ($R^1;X;R^2$)

Navržená syntéza amino derivátů ($X = C-NH_2$) vychází z předem připravených nitro derivátů ($X = C-NO_2$) (Schéma 31).

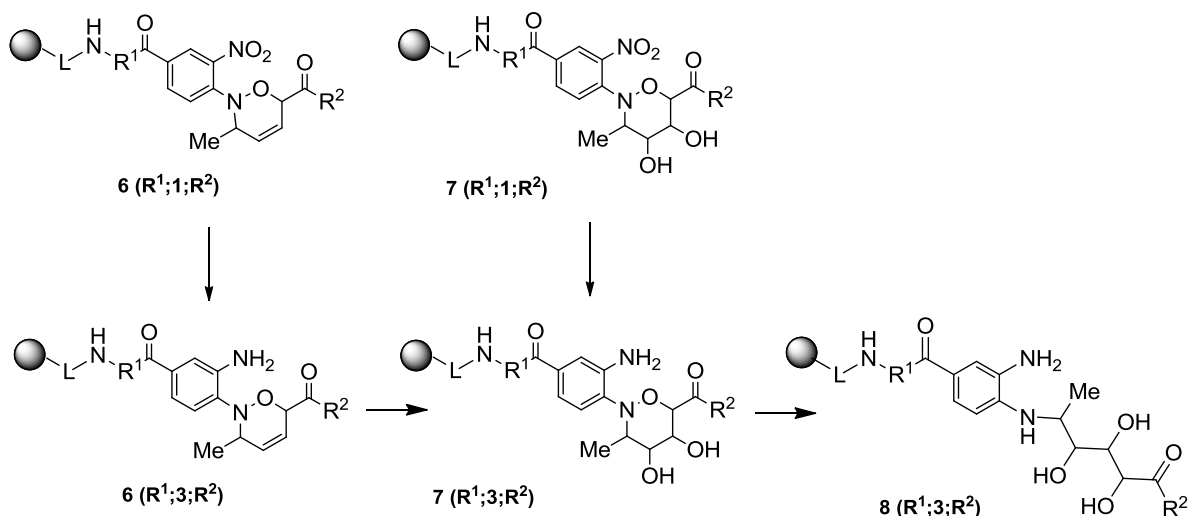


Schéma 31: Návrh syntézy amino derivátů $X = C-NH_2$

Pro syntézu těchto derivátů byla zvolena syntéza na pevné fázi, která je vhodná k efektivní syntéze chemických knihoven. Spočívá v navázání látky na nerozpustný polymerní nosič. Separace látky od rozpustných složek reakční směsi se provádí pouhou filtrací a promytím rozpouštědly jako DCM, DMF, THF a další⁴⁴.

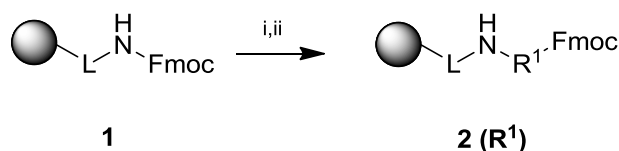
Syntéza (Schéma 30) vychází z Rinkovy pryskyřice **1**, na kterou se může navázat aminokyselina, která může být následně přeměněna na dipeptid za vzniku derivátů **2** (R^1). Dalším stupněm je navázání kyseliny 4-fluoro-3-nitrobenzoové za vzniku derivátu **3** ($R^1;1$) nebo 6-fluoronikotinové za tvorby sloučeniny **3** ($R^1;2$). Fluor je následně možné substituovat hydroxylaminem za vzniku derivátu **4** ($R^1;X$). Následně dochází k *in situ* oxidaci na nitroso derivát, který ihned podléhá hetero-Diels-Alderově reakci se sorbovou kyselinou za tvorby kyseliny **5** ($R^1;X$). Tvorba 1,2-oxazinů touto metodou na pevné fázi byla již dříve v literatuře popsána⁴⁵. Tuto kyselinu je možné využít k tvorbě amidů **6** ($R^1;X;R^2$) a oxidaci dvojně vazby za tvorby diolů **7** ($R^1;X;R^2$). Na závěr se provádí štěpení N-O vazby za vzniku trihydroxyderivátu **8** ($R^1;X;R^2$). Redukce nitro skupiny **6-7** ($R^1;1;R^2$) pak může vést k nové sérii amino derivátů **6-7** ($R^1;3;R^2$) (Schéma 31).

Nejprve bylo provedeno ověření reakční cesty podle popsaných podmínek po deriváty **5** (**3;1**) a **5** (**3;2**)⁴⁵. Tato reakce je popsána s vysokou regioselektivitou, což bylo posléze potvrzeno i našimi experimenty. Jelikož standardní reakční časy jsou popsány přes noc, byla provedena optimalizace reakční doby těchto reakcí pro zefektivnění celé syntézy se snahou

zachovat její univerzálnost s ohledem na použité reaktanty (tzv. building blocks). Konkrétní reakční podmínky budou shrnuty v následující podkapitole.

4.1.1. Optimalizace syntézy derivátů 1,2-oxazinu na pevné fázi

Syntéza aminokyselinového linkeru vycházela z Rinkovy pryskyřice **1**, která po deprotekcí Fmoc skupiny reagovala s glycinem (*Schéma 32*). Karboxylová skupina byla aktivována za běžných podmínek pomocí karbodiimidu za přítomnosti HOBt⁴⁴. Pro ověření reakčních podmínek byla reakce třepána za pokojové teploty přes noc. Při optimalizaci reakční doby byl využit test s bromthymolovou modří pro indikaci volné amino skupiny. Již po jedné hodině byla reakce u konce (*Tab. 2*). Optimalizovaná reakční doba byla ověřena i u β -alaninu. LC-MS čistoty navázaných aminokyselin byly ve všech případech 100 %.



i) 50% piperidin/DMF, 20 min, RT

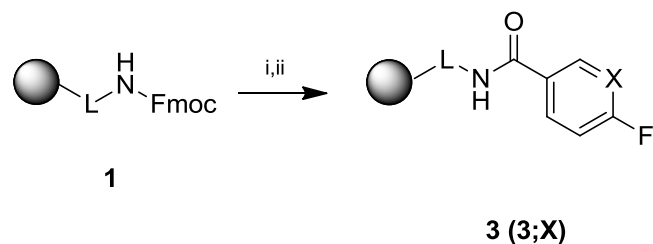
ii) Fmoc-Gly-OH/ Fmoc- β -Ala-OH (1 ekv.), HOBt (1 ekv.), DIC (1 ekv.), DCM/DMF (1:1), RT, c=0,28 mol.l⁻¹

Schéma 32: Navázání aminokyselin

Tabulka 2: Optimalizace reakčních časů navazování aminokyselin

Pokus	Derivát	R ¹	Reakční čas (h)	Čistota (%)
1	2 (2)	Gly	22	100
2	2 (2)	Gly	1	100
3	2 (1)	β -Ala	1	100

Optimalizace navazování kyselin 4-fluoro-3-nitrobenzoové a 6-fluoronikotinové probíhalo přímo na Rinkově pryskyřici **1**. Opět docházelo k aktivaci karboxylové kyseliny pomocí diisopropylkarbodiimidu a HOBt (*Schéma 33*)⁴⁵. Při optimalizaci byl konec reakce indikován po jedné hodině testem s bromthymolovou modří. Vedle zkrácení reakční doby došlo i ke zvýšení LC-MS čistoty na 100 % (*Tab. 3*).



i) 50% piperidin/DMF, 20 min, RT

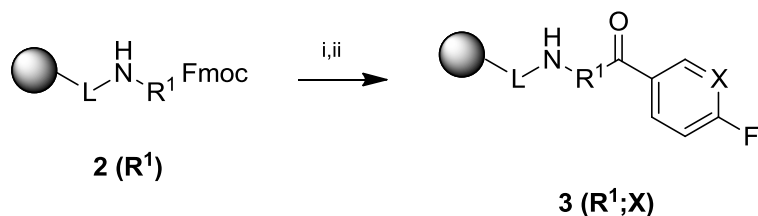
ii) 4-fluoro-3-nitrobenzoová/6-fluoronikotinová kyselina (1 ekv.), HOBT (1 ekv.), DIC (1 ekv.), DCM/DMF (1:1), RT, $c=0,35 \text{ mol.l}^{-1}$

Schéma 33: Navázání 4-fluoro-3-nitrobenzoové a 6-fluoronikotinové kyseliny na Rinkovu pryskyřici

Tabulka 3: Optimalizace navázání 4-fluoro-3-nitrobenzoové a 6-fluoronikotinové kyseliny

Pokus	Derivát	R ¹	X	Reakční čas (h)	Čistota (%)
1	3 (3;1)	∅	C-NO ₂	23	89
2	3 (3;2)	∅	N	23	76
3	3 (3;1)	∅	C-NO ₂	1	100
4	3 (3;2)	∅	N	1	100

Ověření proběhlo u derivátů s β-alaninovým **2 (1)** a glycinovým **2 (2)** linkerem (Schéma 34). LC-MS čistoty těchto derivátů byly opět 100 % (Tab. 4).



i) 50% piperidin/DMF, 20 min, RT

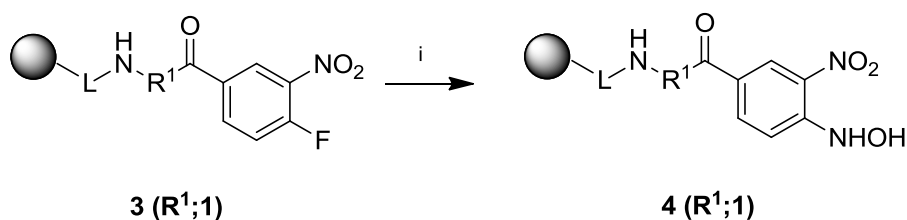
ii) 4-fluoro-3-nitrobenzoová/6-fluoronikotinová kyselina (1 ekv.), HOBT (1 ekv.), DIC (1 ekv.), DCM/DMF (1:1), RT, $c=0,35 \text{ mol.l}^{-1}$

Schéma 34: Navázání 4-fluoro-3-nitrobenzoové a 6-fluoronikotinové kyseliny na sloučeniny

Tabulka 4: Ověření navázání 4-fluoro-3-nitrobenzoové a 6-fluoronikotinové kyseliny

Pokus	Derivát	R ¹	X	Reakční čas (h)	Čistota (%)
1	3 (1;1)	β-Ala	C-NO ₂	1	100
2	3 (1;2)	β-Ala	N	1	100
3	3 (2;1)	Gly	C-NO ₂	1	100
4	3 (2;2)	Gly	N	1	100

Substituce fluoru nitro derivátů **3** ($R^1;1$) se provádí hydroxylamin hydrochloridem za přítomnosti báze za laboratorní teploty (Schéma 35)⁴⁵. Sledováním reakce v čase za této teploty bylo zjištěno, že je potřeba dodržet reakční čas 17 hodin, kdy dochází k úplné konverzi výchozí látky. Možné zkrácení reakčního času bylo studováno pomocí zvýšené teploty. Pro substituci derivátu **3** (**3;1**) bylo nejprve zvolena teplota 75°C, tedy teplota nutná pro substituci analogického derivátu **3** (**3;2**)⁴⁵. Při reakční době 1h byl identifikován produkt v zastoupení 39%. Zvýšení teploty na 80°C pak poskytlo za stejný čas 92% produktu (Tab. 5). Nakonec byly jako výsledné podmínky zvoleny pokojová teplota a reakční čas 17h. Při takto zvolených podmínkách je výhodou zjednodušená manipulace při přechodu z plastových stříkaček používaných při laboratorní teplotě do skleněných nádob nutných pro zahřívání a zase zpět. Ověření proběhlo s deriváty **3** (**1;1**) a **3** (**2;1**).



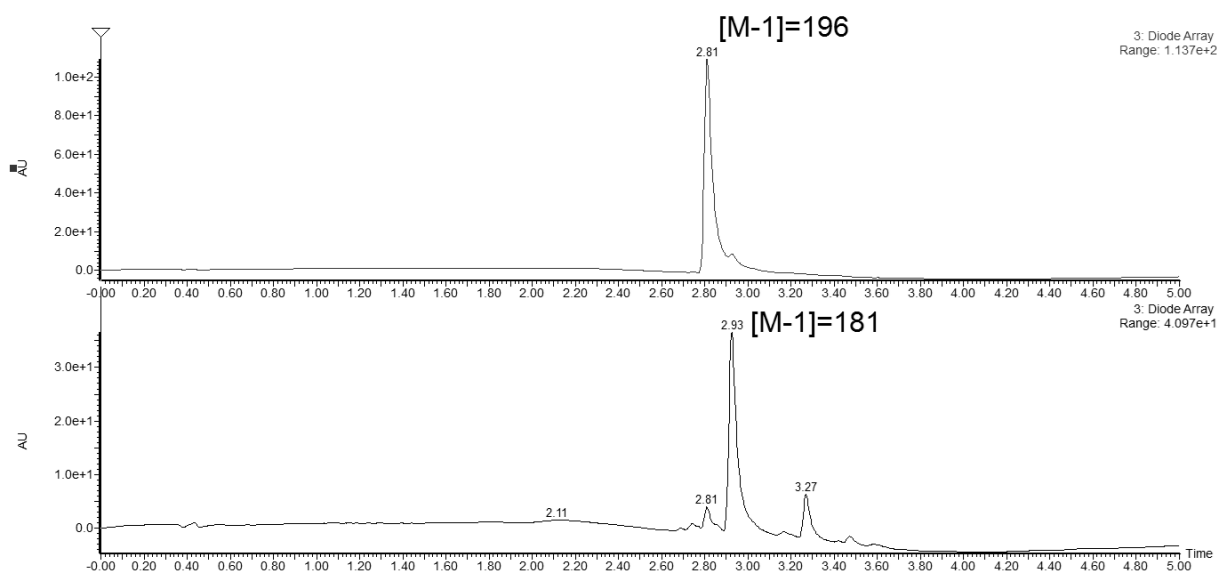
i) $\text{NH}_2\text{OH}\cdot\text{HCl}$, Py, $c=1,2 \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$

Schéma 35: Substituce nitro derivátů **3** ($R^1;1$)

Tabulka 5: Optimalizace a ověření substituce nitro derivátů **3** ($R^1;1$)

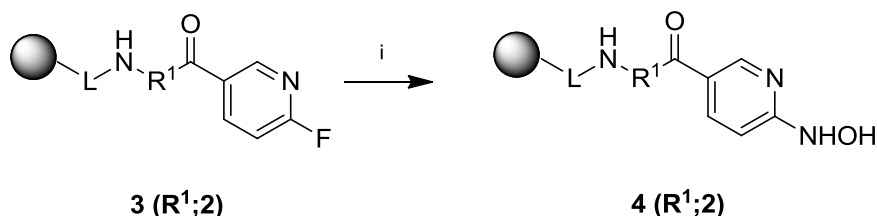
Pokus	Derivát	R^1	Reakční čas (h)	Teplota (°C)	Čistota (%)
1	4 (3;1)	\emptyset	27,5	75	92
2	4 (3;1)	\emptyset	1	75	39
3	4 (3;1)	\emptyset	1	80	92
4	4 (3;1)	\emptyset	17	RT	93
5	4 (1;1)	β -Ala	17	RT	91
6	4 (2;1)	Gly	17	RT	94

Během uchovávání sloučeniny **4** (**3;1**) byl zjištěn problém s její stabilitou, kdy po čase došlo u některých šarží k rozkladu a změně barvy z oranžové na červenou. K rozkladu docházelo náhodně jak za pokojové teploty, tak i při uchování v lednici. Na obrázku (Obr. 9) lze vidět záznam z LC-MS spekter zobrazující příklad, kdy látka byla na pryskyřici stabilní (horní část obrázku), a příklad, kdy došlo k jejímu rozložení (spodní část obrázku). Rozklad může být způsoben zbytkovými rozpouštědly. Aby se zabránilo nežádoucímu rozkladu, nebyly deriváty **4** ($R^1;1$) skladovány a byly hned použity do další reakce.



Obrázek 9: Rozklad derivátu **4 (3;1)**

Substituce pyridinových derivátů **3 (R¹;2)** vycházela ze substituce tohoto substrátu s hydroxylamin hydrochloridem za přítomnosti báze (*Schéma 36*), jak je popsáno v literatuře⁴⁵. Reakce probíhala v pyridinu za teploty 75°C po dobu 27,5 hodin s čistotou 95 % (*Tab. 6*). Při této teplotě časová optimalizace nebyla možná. Při přechodu z analytického množství pryskyřice na 1 g nastal problém a reakce po 20 h zreagovala pouze z 20 %. Proto byla vyzkoušena vyšší teplota (88°C) pro vyšší konverzi. Čas nutný pro dokončení reakce byl i za této teploty přes 20 hodin. Pro deriváty **4 (1;2)** a **4 (2;2)** však reakce nebyla reprodukovatelná. Zbytek reakční směsi tvořily nečistoty, mezi nimiž byly pravděpodobně přítomny pyridiniové soli. Derivát **3 (3;2)** byl proto podroben reakci s hydroxylamin hydrochloridem za přítomnosti DBU v dimethylsulfoxidu. Reakce byla vyzkoušena při dvou teplotách, a to 75 a 85°C. Vyšší čistoty se dosahovalo při teplotě 75°C. Reakci se již povedlo ověřit u dalších derivátů (*Tab. 6*).



Metoda A: i) NH₂OH.HCl, Py, c=1,2 mol.l⁻¹

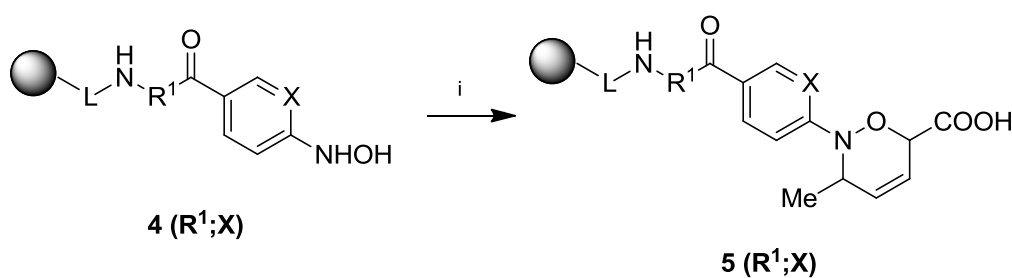
Metoda B: i) NH₂OH.HCl (1 ekv.), DBU (0,4 ekv.), DMSO c=1,4 mol.l⁻¹

Schéma 36: Substituce pyridinových derivátů **3 (R¹;2)**

Tabulka 6: Optimalizace a ověření substituce pyridinových derivátů **3** ($R^1;2$)

Pokus	Derivát	R^1	Metoda	Reakční čas (h)	Teplota (°C)	Čistota (%)
1	4 (3;2)	\emptyset	A	27,5	75	95
2	4 (3;2)	\emptyset	A	2	75	0
3	4 (3;2)	\emptyset	A	22	75	89
4	4 (3;2)	\emptyset	A	2	88	24
5	4 (3;2)	\emptyset	A	4	88	43
6	4 (3;2)	\emptyset	A	21	88	92
7	4 (1;2)	β -Ala	A	21	88	42
8	4 (2;2)	Gly	A	21	88	40
9	4 (3;2)	\emptyset	B	24	75	92
10	4 (3;2)	\emptyset	B	24	85	16
11	4 (2;2)	Gly	B	24	75	89
12	4 (5;2)	Gly- β -Ala	B	24	75	82

Následoval krok oxidace derivátů **4** ($R^1;X$) a následná hetero-Diels-Alderova reakce. Oxidace probíhala *in situ* pomocí jodistanu tetrabutylamonného (TBAPI), následovná HDA s kyselinou sorbovou (Schéma 37)⁴⁵. Reakce byla ověřena pro deriváty **5** (3;1) a **5** (3;2), kdy po čase 21 h byly identifikovány požadované produkty v LC-MS čistotě 83 a 80% (Tab. 7). Optimalizace proběhla u derivátu **5** (3;1), kdy bylo stejné čistoty dosaženo při snížení reakční doby na 3 hodiny. Ověření proběhlo u dalších derivátů **5** ($R^1;X$), kde se dosáhlo celkově i vyšších čistot.



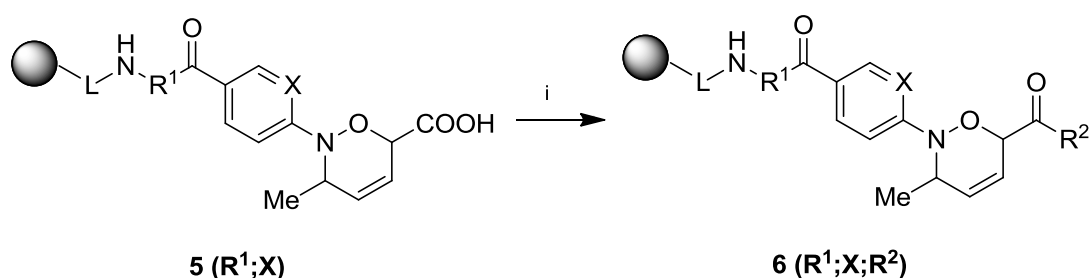
i) sorbová kyselina (1 ekv.) TBAPI (0,5 ekv.), DCM, RT, $c=0,35 \text{ mol.l}^{-1}$

Schéma 37: *In situ* oxidace a HDA vedoucí k dihydro 1,2-oxazinu

Tabulka 7: Optimalizace a ověření *in situ* oxidace a HDA

Pokus	Derivát	R ¹	X	Reakční čas (h)	Čistota (%)
1	5 (3;1)	∅	C-NO ₂	21	83
2	5 (3;2)	∅	N	21	80
3	5 (3;1)	∅	C-NO ₂	1	41
4	5 (3;1)	∅	C-NO ₂	2	56
5	5 (3;1)	∅	C-NO ₂	3	83
6	5 (3;2)	∅	N	3	80
7	5 (1;1)	β-Ala	C-NO ₂	3	92
8	5 (1;2)	Gly	N	3	90
9	5 (2;1)	Gly	C-NO ₂	3	91

Tvorba amidů dihydro 1,2-oxazinů **6** (R¹;X;R²) spočívala v aktivaci karboxylové skupinky pomocí karbodiimidu v přítomnosti HOBt a katalyzátoru (*Schéma 38*). Reakce byla nejprve vyzkoušena s piperidinem, benzylaminem a 1-ethoxykarbonyl piperazinem (*Tab. 8*). Poslední zmiňovaný poskytoval nízké výtěžky, proto nebyl využit pro optimalizaci ani pro syntézu knihovny látek.



i) amin (1 ekv.), HOBt (1 ekv.), DIC (1 ekv.) DMAP (kat.mn.), DCM/DMF (1:1), RT, c=0,3 mol.l⁻¹

Schéma 38: Tvorba amidů **6** (R¹;X;R²)

Tabulka 8: Ověření tvorby amidů **6** (R¹;X;R²)

Pokus	Derivát	R ¹	X	R ²	Reakční čas (h)	Čistota (%)
1	6 (3;1;1)	∅	C-NO ₂	piperidin	21	81
2	6 (3;1;2)	∅	C-NO ₂	benzylamin	21	83
3	6 (3;1;6)	∅	C-NO ₂	1-ethoxykarbonyl piperazin	21	42
4	6 (3;2;1)	∅	N	piperidin	21	81
5	6 (3;2;2)	∅	N	benzylamin	21	81
6	6 (3;2;6)	∅	N	1-ethoxykarbonyl piperazin	21	56

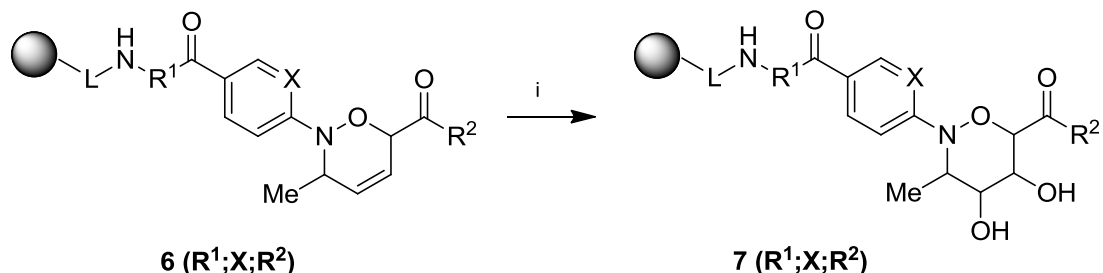
Pro optimalizaci byly využity aminy piperazin a benzylamin (*Tab. 9*). Derivát **5 (3;1)** zreagoval s benzylaminem již po 5,5 hodinách. Reakce s piperidinem trvala výrazně déle, kdy po 4 h byla LC-MS čistota produktu 23 %. Po 24 h výchozí látka z reakční směsi zcela vymizela a čistota dosáhla maximálních 81 %. U derivátu **5 (3;2)** byly hodnoty obdobné. Zkrácení reakčního času při zvýšené koncentraci reakční směsi se nepodařilo, jelikož docházelo k vysrážení reaktantů. Pro univerzálnost tohoto kroku byl pro další syntézy zvolen čas 24 h. Postup byl ověřen u dalších derivátů reakcí s anilinem, propylaminem a morfolinem. Reakce s anilinem však neposkytovala požadovaný produkt. Při reakci s morfolinem vzniklo pouze 30 % požadovaného produktu. K syntéze knihovny byly proto zvoleny piperidin, benzylamin a propylamin.

Tabulka 9: Optimalizace a následné ověření tvorby amidů **6 (R¹;X;R²)**

Pokus	Derivát	R ¹	X	R ²	Reakční čas (h)	Čistota (%)
1	6 (3;1;1)	∅	C-NO ₂	piperidin	1	2
2	6 (3;1;1)	∅	C-NO ₂	piperidin	4	23
3	6 (3;1;1)	∅	C-NO ₂	piperidin	24	81
4	6 (3;1;2)	∅	C-NO ₂	benzylamin	2	39
5	6 (3;1;2)	∅	C-NO ₂	benzylamin	5,5	69
6	6 (3;1;2)	∅	C-NO ₂	benzylamin	24	69
7	6 (3;2;1)	∅	N	piperidin	1	5
8	6 (3;2;1)	∅	N	piperidin	4	35
9	6 (3;2;1)	∅	N	piperidin	24	80
10	6 (3;2;2)	∅	N	benzylamin	1	5
11	6 (3;2;2)	∅	N	benzylamin	18	91
12	6 (2;1;5)	Gly	C-NO ₂	anilin	24	0
13	6 (1;1;3)	β-Ala	C-NO ₂	propylamin	24	75
14	6 (1;2;4)	β-Ala	N	morfolin	24	30

Následující reakcí byla hydroxylace dvojně vazby dihydro 1,2-oxazinu. Reakční podmínky byly převzaty a modifikovány z roztokové chemie²⁸. Reakce probíhala pomocí oxidu osmičelého za přítomnosti *N*-methylmorfolin-*N*-oxidu (*Schéma 39*). Nejprve byla vyzkoušena koncentrace oxidu osmičelého 0,1 mol.l⁻¹. Ani po 24 hodinách nedocházelo k odreagování a ve směsi stále zůstával podíl výchozí látky. Proto byla třikrát zvýšena koncentrace oxidu osmičelého. Jak je však vidět u pokusů 4 a 5 (*Tab. 10*) ani delší čas ani v tomto případě výrazně nepřispěl k vyšší konverzi. Nejlepší podmínky, které byly nalezeny, však nebyly reprodukovatelné při přechodu do preparativního měřítka. Pro celkovou konverzi

bylo v tomto případě zapotřebí po 24 h vyměnit reakční roztok, pro tyto účely stačila koncentrace 0,1 mol.l⁻¹. Podle pokročilých NMR experimentů bylo zjištěno, že hydroxylace probíhá s vysokou stereoselektivitou (více než 95 %).



Metoda A: OsO₄ (1 ekv.), NMO (7,2 ekv.), DCM, RT, c=0,1 mol.l⁻¹

Metoda A: OsO₄ (1 ekv.), NMO (2,4 ekv.), DCM, RT, c=0,3 mol.l⁻¹

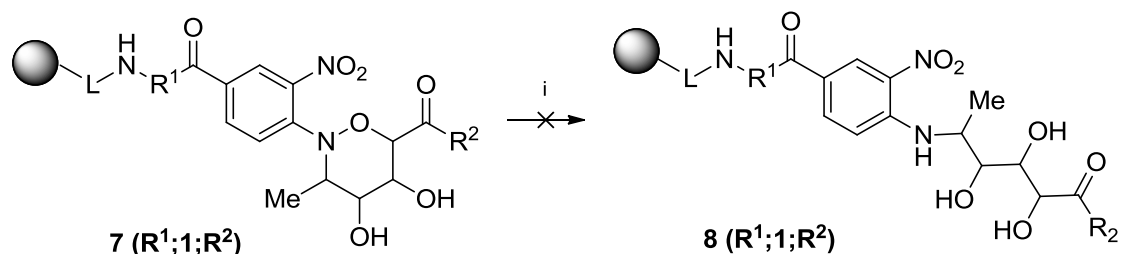
Schéma 39: Hydroxylace dihydro 1,2-oxazinu

Tabulka 10: Optimalizace hydroxylace dihydro 1,2-oxazinu

Pokus	Derivát	R ¹	X	R ²	Metoda	Reakční čas (h)	Čistota (%)
1	7 (3;1;1)	∅	C-NO ₂	piperidin	A	2	23
2	7 (3;1;1)	∅	C-NO ₂	piperidin	A	24	70
3	7 (3;1;1)	∅	C-NO ₂	piperidin	B	1	34
4	7 (3;1;1)	∅	C-NO ₂	piperidin	B	6	73
5	7 (3;1;1)	∅	C-NO ₂	piperidin	B	24	77
6	7 (3;1;2)	∅	C-NO ₂	benzylamin	A	18	32
7	7 (3;1;2)	∅	C-NO ₂	benzylamin	B	1	14
9	7 (3;1;2)	∅	C-NO ₂	benzylamin	B	3	31
10	7 (3;1;2)	∅	C-NO ₂	benzylamin	B	24	67
11	7 (3;2;1)	∅	N	piperidin	A	2	20
12	7 (3;2;1)	∅	N	piperidin	A	24	72
13	7 (3;2;1)	∅	N	piperidin	B	1	31
14	7 (3;2;1)	∅	N	piperidin	B	6	70
15	7 (3;2;1)	∅	N	piperidin	B	24	90
16	7 (3;2;2)	∅	N	benzylamin	A	2	10
17	7 (3;2;2)	∅	N	benzylamin	A	24	40
18	7 (3;2;2)	∅	N	benzylamin	B	1	16
19	7 (3;2;2)	∅	N	benzylamin	B	3	33
20	7 (3;2;2)	∅	N	benzylamin	B	24	78

Posledním krokem syntézy bylo štěpení N-O vazby 1,2-oxazinanu. Reakce byla provedena u derivátů **7 (3;1;1)** a **7 (1;1;3)** pomocí hexakarbonyl molybdenu při 100°C

(Schéma 40). Podmínky byly převzaty z roztokové chemie¹¹. Reakce však neprobíhala dle očekávání a vzniklo velké množství vedlejších produktů. Nepomohlo ani snížení teploty na 90°C či 50°C (Tab. 11) a proto bylo od této metody prozatím upuštěno. Pro syntézu derivátu **8** ($R^1;X;R^2$) je pro další práci možné vyzkoušet jiná redukční činidla či využít alternativní syntetickou cestu.



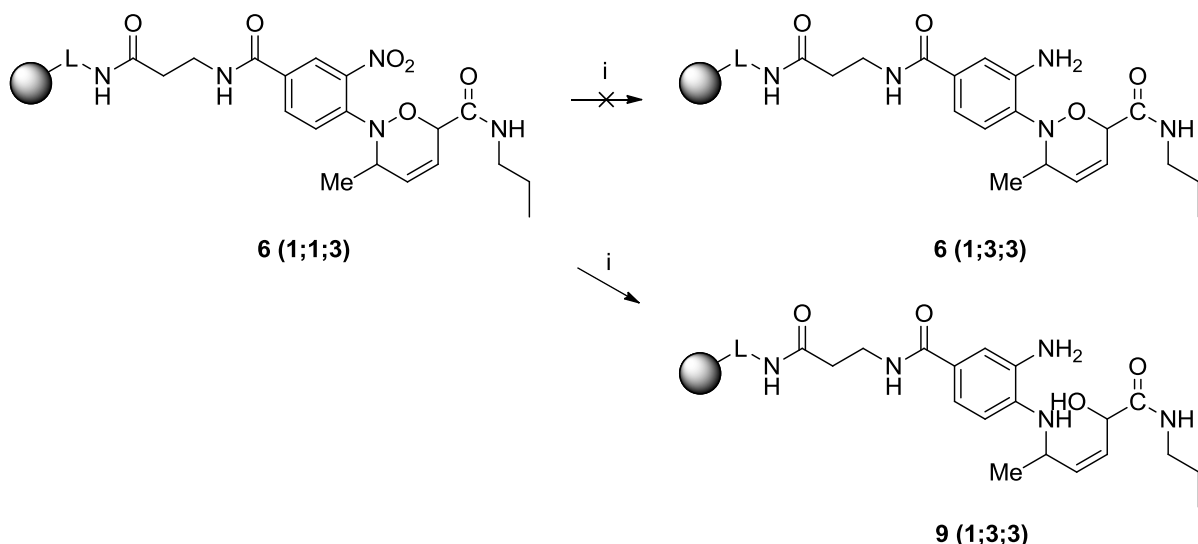
i) Mo(CO)₆(0,19 mmol), H₂O (100 μl), DMF (1 ml), 1h

Schéma 40: Štěpení N-O vazby 1,2-oxazinanu

Tabulka 11: Štěpení N-O vazby 1,2-oxazinanů za různých teplot

Pokus	Derivát	R ¹	R ²	Teplota (°C)	Čistota (%)
1	8 (3;1;1)	∅	piperidin	100	∅
2	8 (3;1;1)	∅	piperidin	90	∅
3	8 (3;1;1)	∅	piperidin	50	∅
4	8 (1;1;3)	β-Ala	propylamin	100	∅
5	8 (1;1;3)	β-Ala	propylamin	90	∅
6	8 (1;1;3)	β-Ala	propylamin	50	∅

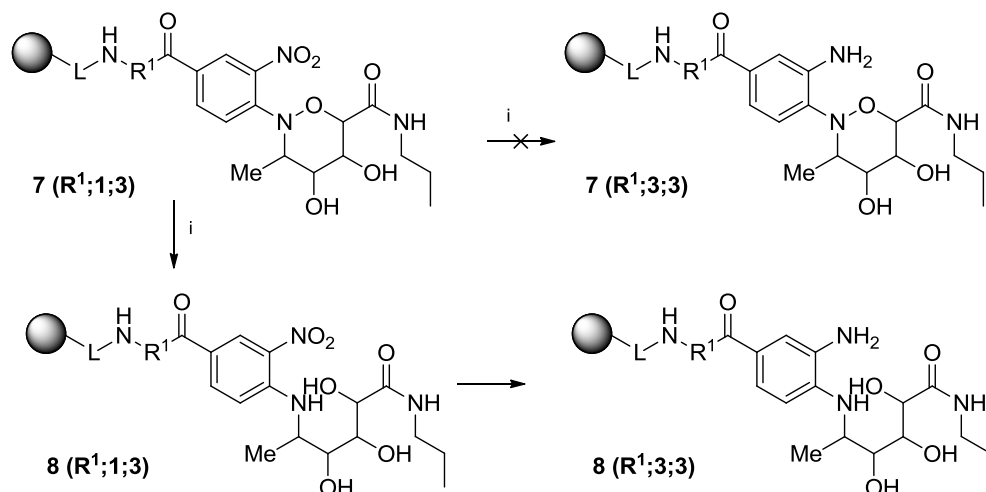
Ve snaze připravit další typ derivátů byla vyzkoušena redukce nitro skupiny za vzniku nových amino derivátů **6** ($R^1;3;R^2$) a **7** ($R^1;3;R^2$). Podmínky reakce byly převzaty z již popsané redukce nitrosloúčenin na pevné fázi⁴⁶. Redukce byla provedena dithioničitanem a byla vyzkoušena na derivátu **6** (**1;1;3**) (Schéma 41) a derivátu **7** (**1;1;3**) (Schéma 42). Reakce však nevedly k požadovaným derivátům **6** (**1;2;3**) ani **7** (**1;3;3**). Dle LC-MS analýz docházelo vedle redukce nitro skupiny také ke štěpení N-O vazby. Z dihydrooxazinového derivátu **6** (**1;1;3**) tak vzniká sloučenina **9** (**1;3;3**) v čistotě 65 % (Schéma 41). Z dihydroxyderivátu **7** (**1;1;3**) pak vzniká sloučenina **8** (**1;3;3**) v čistotě 54 %, se kterou bylo ve směsi i 21 % látky **8** (**1;1;3**) (Schéma 42). Látka **8** (**1;3;3**) byla připravena v preparativním měřítku, přečištěna pomocí semipreparativního HPLC a izolována v celkovém výtěžku reakční sekvence 9 %.



i) $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$ (1 ekv.), K_2CO_3 (1,4 ekv.), ethylviologen diiodid (5 mol%), DCM/ H_2O (1:1), RT, 20 h, $c=0,3 \text{ mol.l}^{-1}$

Schéma 41: Redukce nitro skupiny za současného štěpení N-O vazby látky **6 (1;1;3)**

Při redukci látky **7 (1;1;3)** byla vyzkoušena vyšší koncentrace dithioničitanu, což vedlo k vyššímu podílu látky **8 (1;3;3)** (Tab. 12). Dá se tedy předpokládat, jak je vidět v naznačené schématu (Schéma 42), že nejprve dochází ke štěpení N-O vazby 1,2-oxazinového kruhu a následně k redukci nitro skupiny. Což dále naznačují analýzy v čase, provedené u derivátu **7 (4;1;3)** (Tab. 12). Je tedy možné, že v případě dostatečně krátké doby a úpravě koncentrace reagentů by bylo možné izolovat deriváty **8 (R¹;1;R²)** a obecně se vyhnout problémům při štěpení N-O vazby pomocí $\text{Mo}(\text{CO})_6$. Z časových důvodů nebyla již optimalizace této reakce studována.



Metoda A: i) $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$ (1 ekv.), K_2CO_3 (1,4 ekv.), ethylviologen diiodid (5 mol%), DCM/ H_2O (1:1), RT, $c=0,3 \text{ mol.l}^{-1}$

Metoda B: i) $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$ (1ekv.), K_2CO_3 (0,7 ekv.), ethylviologen diiodid (10 mol%), DCM/ H_2O (1:1), RT, $c=0,6 \text{ mol.l}^{-1}$

Schéma 42: Redukce nitro skupiny za současného štěpení N-O vazby látky **7 (1;1;3)**

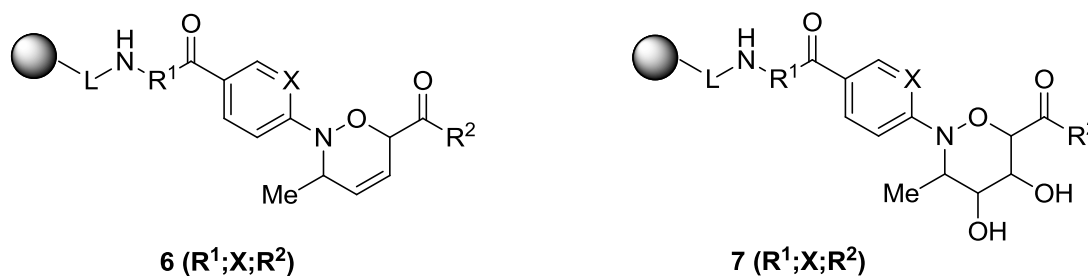
Tabulka 12 Poměry látek **8 (1;1;3)** a **8 (1;3;3)** při redukci nitro skupiny

Pokus	Metoda	Čas	R ¹	8 (R ¹ ;1;3) (%)	8 (R ¹ ;3;3) (%)
1	A	20 h	β-Ala	21	54
2	B	20 h	β-Ala	6	74
3	A	10 min	β-Ala-Gly	71	14
4	A	30 min	β-Ala-Gly	64	21
5	A	1 h	β-Ala-Gly	59	25

4.1.2. Syntéza knihovny derivátů 1,2-oxazinu

Výše uvedené optimalizované podmínky reakční sekvence byly použity pro ověření syntézy modelové knihovny vybraných derivátů **6 (R¹;X;R²)** a **7 (R¹;X;R²)** (Obr. 10). Jako finální sloučeniny navrženy deriváty uvedené v tabulce (Tab. 13).

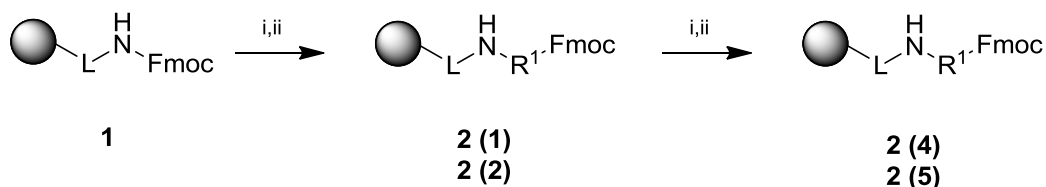
Obrázek 10: Obecné struktury látek navržených pro syntézu modelové knihovny



Tabulka 13: Seznam substituentů látek navržených pro syntézu modelové knihovny

6 (R ¹ ;X;R ²)	7 (R ¹ ;X;R ²)	R ¹	X	R ²
6 (1;1;3)	7 (1;1;3)	β-Ala	C-NO ₂	propylamin
6 (3;1;1)	7 (3;1;1)	∅	C-NO ₂	piperidin
6 (2;1;2)	7 (2;1;2)	Gly	C-NO ₂	benzylamin
6 (4;1;3)	7 (4;1;3)	β-Ala-Gly	C-NO ₂	propylamin
6 (2;2;3)	7 (2;2;3)	Gly	N	propylamin
6 (3;2;2)	7 (3;2;2)	∅	N	benzylamin
6 (5;2;1)	7 (5;2;1)	Gly- β-Ala	N	piperidin

Jako výchozí materiál bylo použito 1,2g Rinkovy pryskyřice, na které byly imobilizovány aminokyseliny β-alanin resp. glycin. Část těchto pryskyřic byla pak dále využita pro tvorbu dipeptidů β-Ala-Gly a Gly-β-Ala (Schéma 43). Pro navázání druhé aminokyseliny byly použity stejné reakční podmínky jako pro navazování první aminokyseliny. LC-MS čistoty jednotlivých derivátů byly 100 % (Tab. 14).



i) 50% piperidin/DMF (10 ml), 20 min, RT

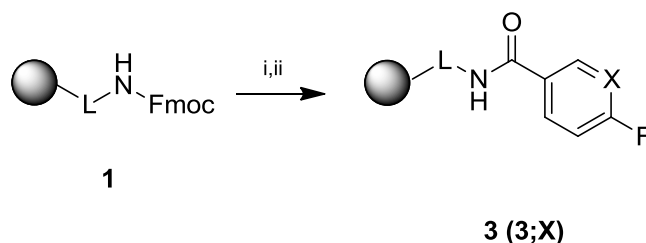
ii) Fmoc-Gly-OH/ Fmoc-β-Ala-OH (3,4 mmol), HOBT (3,4 mmol), DIC (3,4 mmol), DCM (6 ml), DMF (6 ml), 1h, RT

Schéma 43: Přípravy aminokyselinových linkerů **2** (R^1)

Tabulka 14: Přehled derivátů **2** (R^1), jejich substituentů a LC-MS čistot

Derivát	R^1	Čistota (%)
2 (1)	β-Ala	100
2 (2)	Gly	100
2 (4)	β-Ala-Gly	100
2 (5)	Gly-β-Ala	100

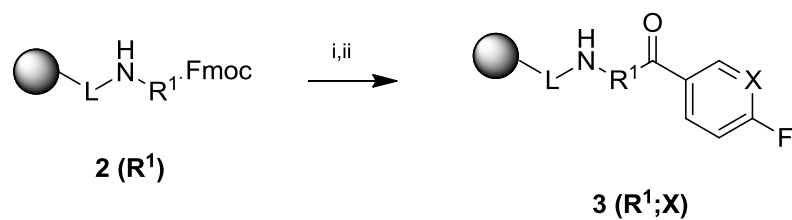
Dalším krokem bylo navázání kyseliny 4-fluoro-3-nitrobenzoové nebo kyseliny 6-fluoronikotinové. Jako výchozí materiál byla využita samotná Rinkova pryskyřice **1** (*Schéma 44*) a pryskyřice s aminokyselinovými linkery **2 (1)**, **2 (2)**, **2 (4)** a **2 (5)** (*Schéma 45*). Čistoty produktů dle LC-MS byly 100 % (*Tab. 15*).



i) 50% piperidin/DMF, 20 min, RT

ii) 4-fluoro-3-nitrobenzoová/6-fluoronikotinová kyselina (1 ekv.), HOBT (1 ekv.), DIC (1 ekv.), DCM/DMF (1:1), RT, $c=0,35 \text{ mol.l}^{-1}$

Schéma 44: Deprotekce a navázání 4-fluoro-3-nitrobenzoové a 6-fluoronikotinové kyseliny na Rinkovu pryskyřici



i) 50% piperidin/DMF (10 ml), 20 min, RT

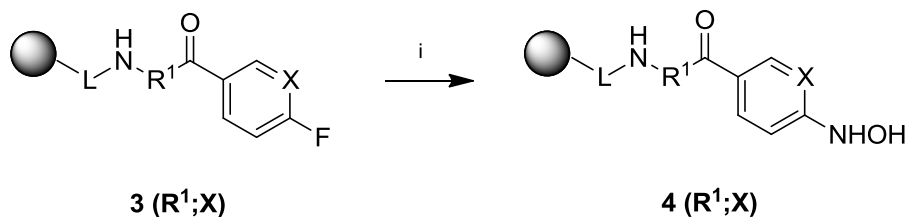
ii) 4-fluoro-3-nitrobenzoová/ 6-fluoronikotinová kyselina (3,5 mmol), HOBt (3,5 mmol), DIC (3,5 mmol), DCM (5 ml), DMF (5 ml), 1h, RT

Schéma 45: Deprotekce a navázání 4-fluoro-3-nitrobenzoové a 6-fluoronikotinové kyseliny

Tabulka 15: Přehled derivátů **3 (R¹;X)**, jejich substituentů a LC-MS čistot

Derivát	R ¹	X	Čistota (%)
3 (3;1)	∅	C-NO ₂	100
3 (2;1)	Gly	C-NO ₂	100
3 (1;1)	β-Ala	C-NO ₂	100
3 (4;1)	β-Ala-Gly	C-NO ₂	100
3 (3;2)	∅	N	100
3 (2;2)	Gly	N	100
3 (5;2)	Gly-β-Ala	N	100

Následovala substituce atomu fluoru hydroxylaminem (*Schéma 46*). Deriváty byly připraveny v očekávané LC-MS čistotě 82 - 91 % (*Tab. 16*) Deriváty **4 (2;1)** a **4 (4;1)** byly použity do další reakce bez analýzy, jelikož se předpokládal stejný průběh jako u derivátů **4 (3;1)** a **4 (1;1)**. Pyridinové deriváty **4 (R¹;2)** byly zanalyzovány ve všech případech z důvodu problémů, které nastaly při optimalizaci jejich syntézy.



Metoda A: i) NH₂OH.HCl (12 mmol), Py (10ml), RT, 17h.

Metoda B: i) NH₂OH.HCl (14,4 mmol), DMSO (10ml), DBU (0,4 mmol), 80°C, 24 h.

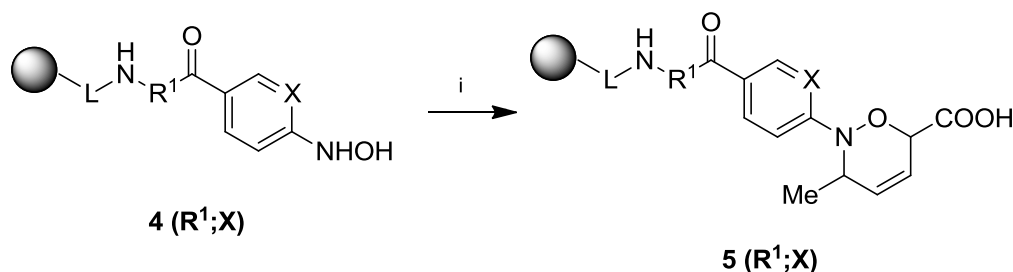
Schéma 46: Substituce nitro derivátů **3 (R¹;1)** hydroxylaminem

Tabulka 16: Přehled derivátů **4** (**R¹**; **X**), jejich substituentů a LC-MS čistot

Derivát	R ¹	X	Metoda	Čistota (%)
4 (3;1)	∅	C-NO ₂	A	91
4 (2;1)	Gly	C-NO ₂	A	-*
4 (1;1)	β-Ala	C-NO ₂	A	91
4 (4;1)	β-Ala-Gly	C-NO ₂	A	-*
4 (3;2)	∅	N	B	92
4 (2;2)	Gly	N	B	89
4 (5;2)	Gly-β-Ala	N	B	82

*čistota stanovena byla stanovena až v následujícím kroku

Další reakcí byla hetero-Diels-Alderova reakce vedoucí k tvorbě dihydro 1,2-oxazinů (Schéma 47). Deriváty byly připraveny v čistotě 67 – 92 % (Tab. 17).



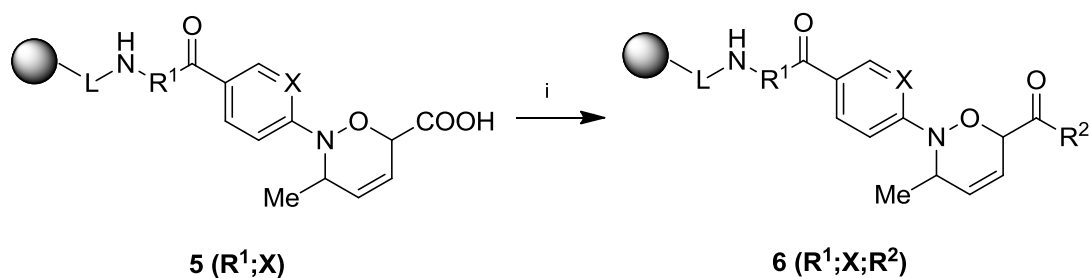
i) sorbová kyselina (3,5 mmol) TBAPI (1,75 mmol), DCM (10 ml), RT, 3h

Schéma 47: *In situ* oxidace a HDA vedoucí k dihydro 1,2-oxazinu

Tabulka 17: Přehled derivátů **5** (**R¹**; **X**), jejich substituentů a LC-MS čistot

Derivát	R ¹	X	Čistota (%)
5 (3;1)	∅	C-NO ₂	89
5 (2;1)	Gly	C-NO ₂	91
5 (1;1)	β-Ala	C-NO ₂	92
5 (4;1)	β-Ala-Gly	C-NO ₂	90
5 (3;2)	∅	N	81
5 (2;2)	Gly	N	90
5 (5;2)	Gly-β-Ala	N	67

Dle výše optimalizovaného postupu přeměny karboxylové skupiny na amid bylo připraveno 7 finálních derivátů dihydro 1,2-oxazinu **6** (**R¹**; **X**; **R²**) (Schéma 48). LC-MS čistoty byly 63 – 84 %. Látky byly přečištěny na semipreparativním HPLC a izolovány v celkovém výtěžku 20 - 35 % (Tab. 18).



i) amin (piperidin/benzylamin/propylamin) (3 mmol), HOBT (3 mmol), DIC (3 mmol), DMAP (kat.mn.), DCM (5 ml), DMF (5 ml), 24h, RT

Schéma 48: Tvorba amidu **6 (R¹;X;R²)**

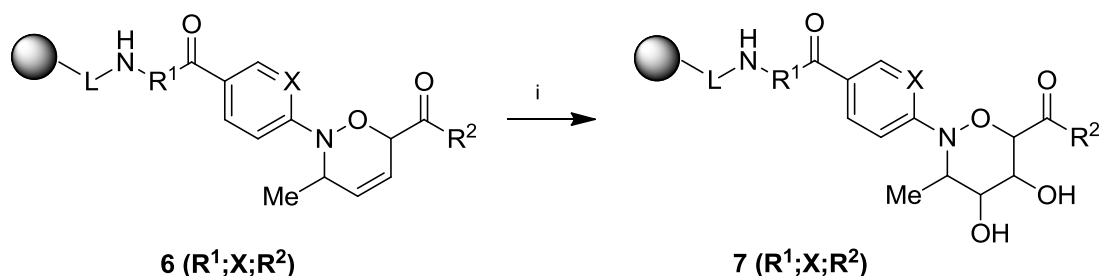
Tabulka 18: Přehled derivátů **6 (R¹;X;R²)**, jejich substituentů, LC-MS čistot a výtěžků

Derivát	R ¹	X	R ²	Čistota (%) *	Výtěžek (%) **
6 (3;1;1)	∅	C-NO ₂	piperidin	78	31
6 (2;1;2)	Gly	C-NO ₂	benzylamin	66	33
6 (1;1;3)	β-Ala	C-NO ₂	propylamin	75	35
6 (4;1;3)	β-Ala-Gly	C-NO ₂	propylamin	78	29
6 (3;2;2)	∅	N	benzylamin	84	30
6 (2;2;3)	Gly	N	propylamin	63	25
6 (5;2;1)	Gly-β-Ala	N	piperidin	63	20

* Čistota surové směsi před HPLC purifikací

** Výtěžek reakční sekvence po HPLC purifikací

Pro tvorbu finálních derivátů **7 (R¹;X;R²)** byla na části pryskyřice aplikována hydroxylace dvojné vazby a tvorba dalších sedmi finálních sloučenin (*Schéma 49*). Čistoty látek **7 (R¹;X;R²)** se pohybovaly mezi 60 až 82 %. Sloučeniny byly přečištěny na semipreparativním HPLC. Nitro deriváty **7 (R¹;1;R²)** byly vyizolovány ve výtěžku 34 - 46 %, pyridinové deriváty **7 (R¹;2;R²)** v nižším výtěžku 16 - 26 % (*Tab. 19*).



i) OsO₄ (250 μl), NMO (750 μl), DCM (1 ml), 24h, RT, 2x

Schéma 49: Hydroxylace dvojné vazby dihydro 1,2-oxazinu

Tabulka 19: Přehled derivátů **7** (**R¹**;**X**;**R²**), jejich substituentů, LC-MS čistot a výtěžků

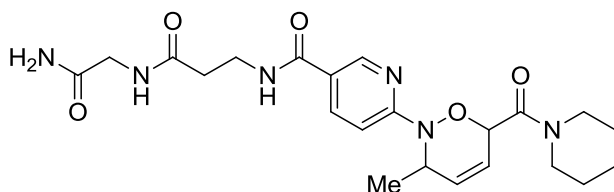
Derivát	R1	X	R2	Čistota (%) [*]	Výtěžek (%) ^{**}
7 (3;1;1)	∅	C-NO ₂	Piperidin	66	41
7 (2;1;2)	Gly	C-NO ₂	Benzylamin	72	34
7 (1;1;3)	β-Ala	C-NO ₂	Propylamin	82	39
7 (4;1,3)	β-Ala-Gly	C-NO ₂	Propylamin	75	46
7 (3;2;2)	∅	N	Benzylamin	74	26
7 (2;2;3)	Gly	N	Propylamin	78	19
7 (5;2;1)	Gly-β-Ala	N	Piperidin	60	16

* Čistota surové směsi před HPLC purifikací

** Výtěžek reakční sekvence po HPLC purifikaci

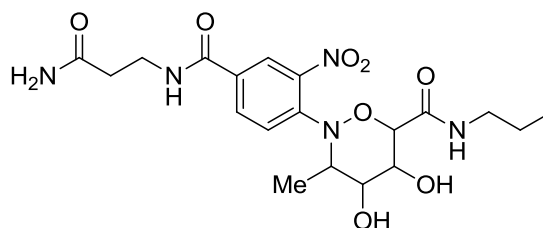
4.1.3. Identifikace derivátů 1,2-oxazinu

Identifikace derivátů přiřazením jednotlivých signálů ¹H a ¹³C NMR spekter k vodíkovým a uhlíkovým atomům byla vzorově provedena u látek **6 (5;2;1)** a **7 (1;1;3)** (Obr. 11). Vedle 1D NMR experimentů byly využity i 2D NMR experimenty COSY, HMBC a HMQC.



6 (5;2;1)

Sumární vzorec: C₂₂H₃₀N₆O₅
M_r: 458,23

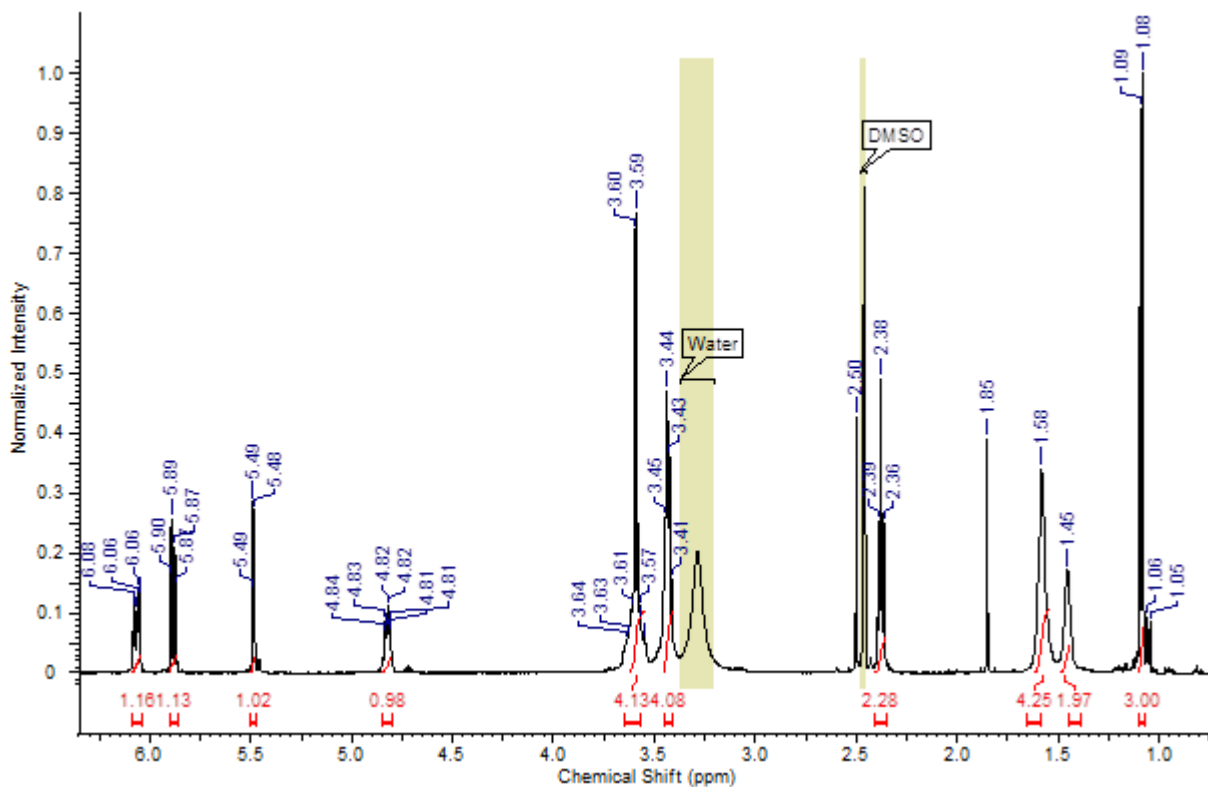


7 (1;1;3)

Sumární vzorec: C₁₉H₂₇N₅O₈
M_r: 453,19

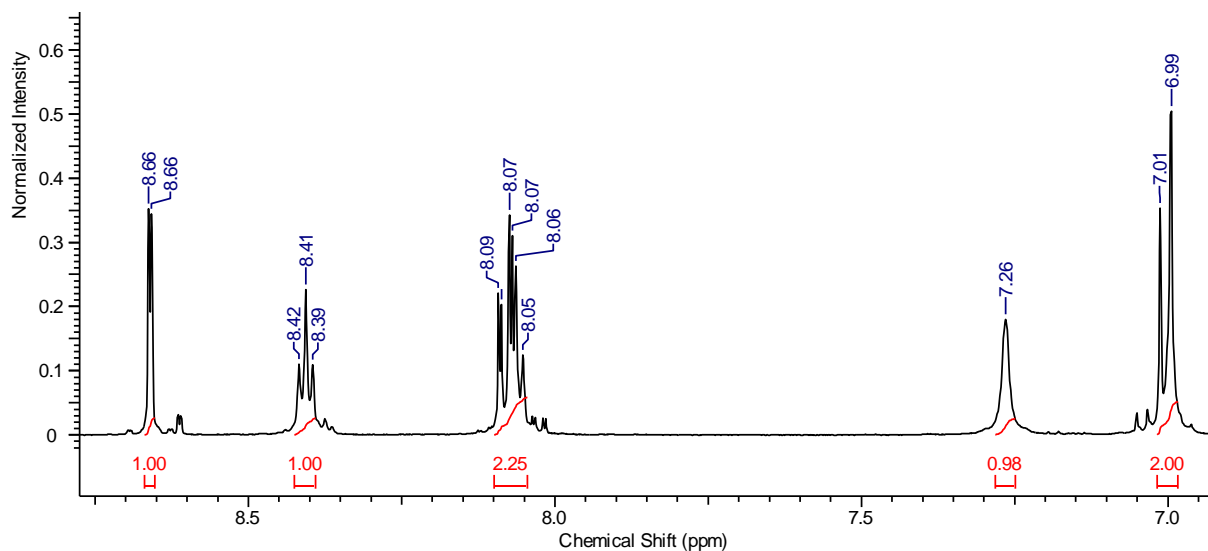
Obrázek 11: Struktury látek **6 (5,2,1)** a **7 (1,1,3)**

V alifatické části ¹H NMR spektra látky **6 (5;2;1)** je v rozsahu 1 – 4 ppm vidět dublet s posunem 1.09 ppm odpovídající třem vodíkům (Obr. 12). Tento signál odpovídá methylové skupině štěpené vodíkem dihydro 1,2-oxazinového kruhu. Dále se zde nachází deset vodíků odpovídajících piperidinovému cyklu a šest vodíků aminokyselinového linkeru. Singlety s posuny 1.85 a 2.50 ppm odpovídají zbytkové kyselině octové a dimethylsulfoxidu z rozpouštědla. V rozsahu 4 - 6,5 ppm jsou vidět čtyři atomy vodíku odpovídající dihydro 1,2-oxazinovému kruhu.



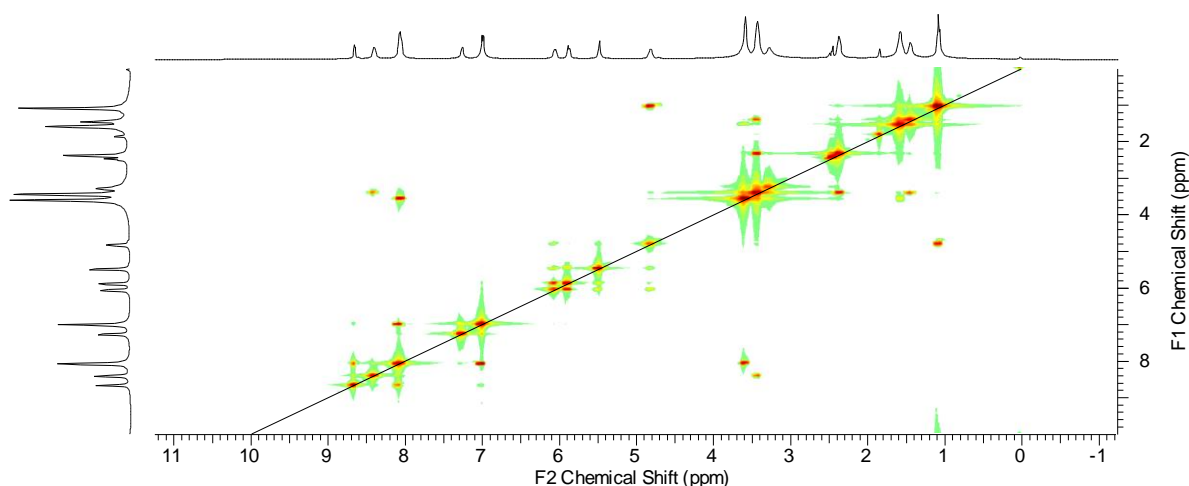
Obrázek 12: Alifatická část ^1H NMR spektra látky **6 (5;2;1)** v rozsahu

V aromatické části ^1H NMR spektra látky **6 (5;2;1)** se nacházejí tři aromatické vodíky pyridinového cyklu a čtyři amidické vodíky (*Obr. 13*). Singlet s posunem 7.26 ppm náleží jednomu amidickému NH_2 vodíku, druhý je pravděpodobně obsažen v signálu 7.00 ppm. Triplet s posunem 8.41 ppm odpovídá jednomu z amidických NH vodíků, druhý triplet je skrytý v multipletu s posunem 8.04 - 8.11 ppm.



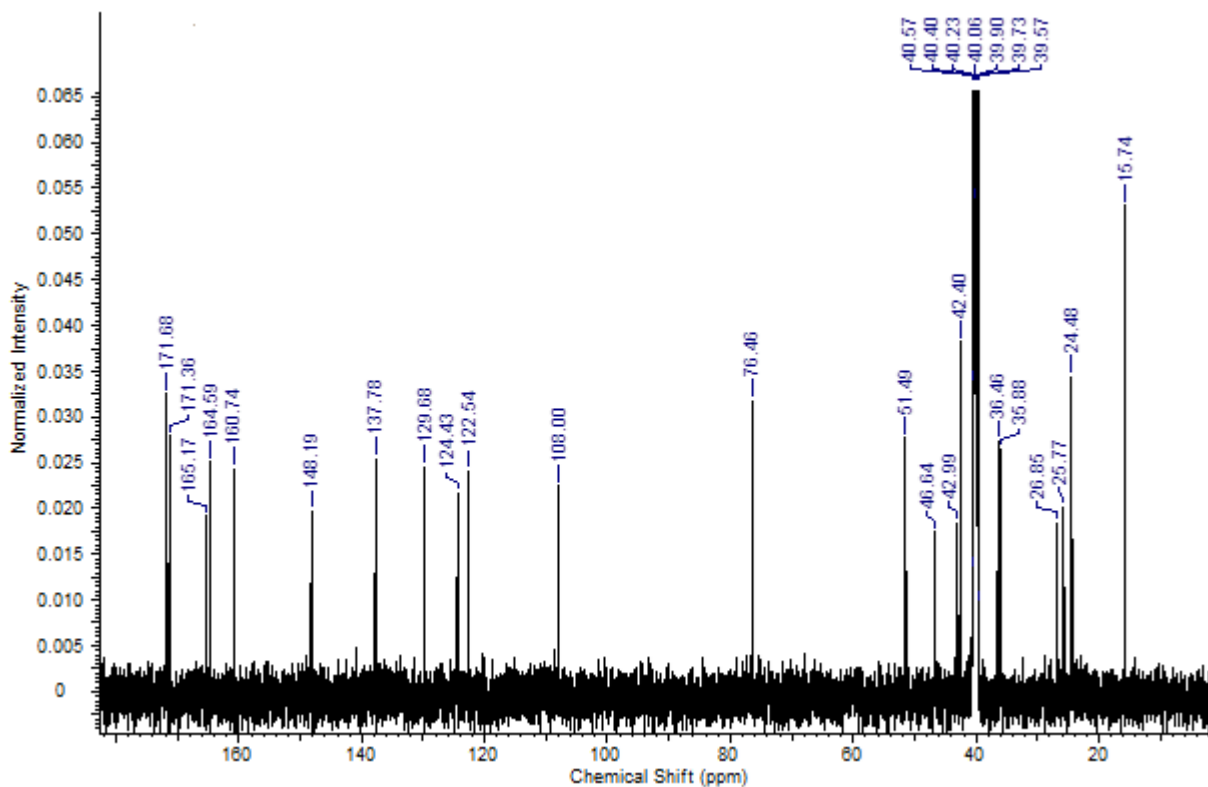
Obrázek 13: Aromatická část ^1H NMR spektra látky **6 (5;2;1)**

COSY experiment v ^1H NMR (*Obr. 14*) zobrazuje interakci methylové skupiny se signálem sousedící CH skupiny s posunem 4.79 - 4.85 ppm. Další tři vodíky 1,2-oxazínového kruhu náležejí multipletům s posuny 5.47 - 5.50, 5.86 - 5.90 a 6.05 - 6.08 ppm. Vodíky dipeptidu lze určit pomocí interakcí s amidickými vodíky. Ve spektru vidíme interakci signálu s posunem 8.04 - 8.11 ppm s glycinovou CH_2 skupinou s posunem 3.52 - 3.67 ppm. Triplet s posunem 8.41 ppm interaguje se sousedící CH_2 skupinou β -alaninu s posunem 3.40 - 3.48 ppm. Druhé CH_2 skupině β -alaninu náleží triplet s posunem 2.38 ppm. Piperidinu náležejí signály s posuny 1.45, 1.58, 3.40 - 3.48 a 3.52 - 3.67 ppm. Aromatické uhlíky nelze stále rozlišit, jelikož je vidět interakce i mezi izolovaným CH vodíkem.



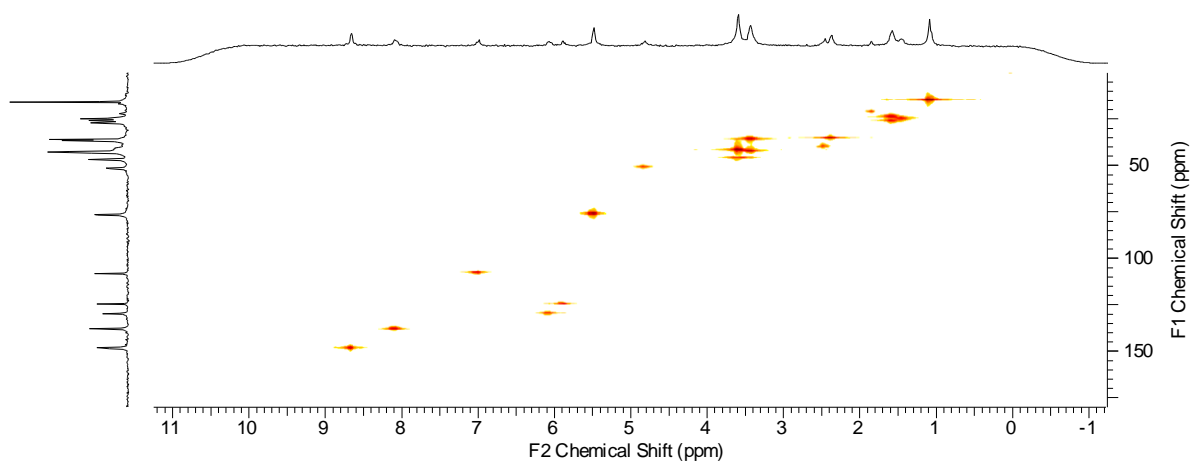
Obrázek 14: Záznam z 2D COSY experimentu látky **6 (5;2;1)**

V ^{13}C NMR spektru lze vidět jedenáct alifatických uhlíků s posuny 15.74 - 76.46 ppm, dva uhlíky dvojně vazby a pět aromatických s posuny 108.00 - 148.19 ppm a čtyři karbonylové uhlíky s posuny 160.74 - 171.68 ppm (*Obr. 15*).



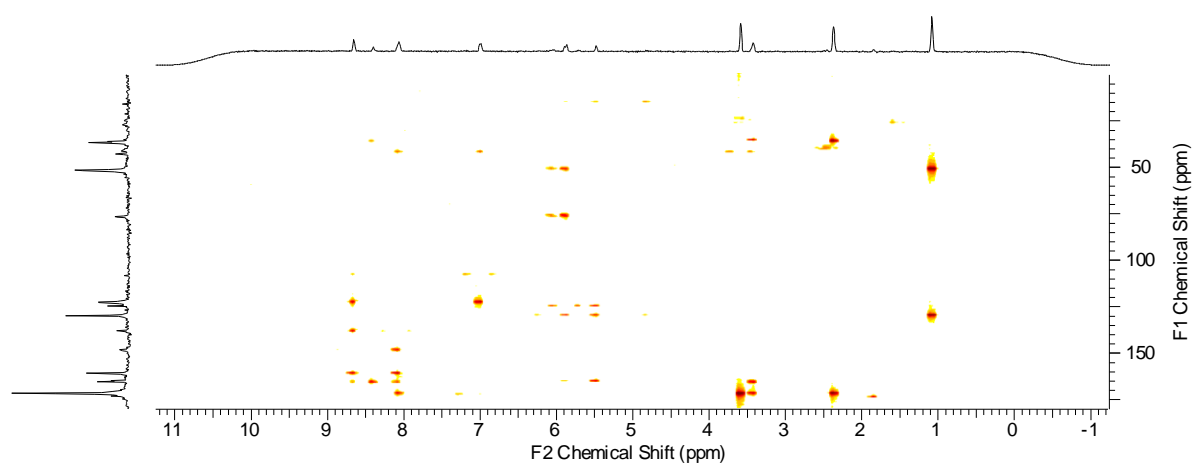
Obrázek 15: ^{13}C NMR spektrum látky **6 (5;2;1)**

V HMQC experimentu (*Obr. 16*) lze vidět interakce vodíků s uhlíkem přes jednu vazbu. Identifikovat tak lze signály CH_3 uhlíku s posunem 15.74 ppm, 1,2-oxazinové uhlíky s posuny 51.49, 76.46, 124.43 a 129.68 ppm, a jeden CH_2 uhlík β -alaninu s posunem 35.88 ppm. Zbylé dva peptidové CH_2 uhlíky nelze rozlišit, jelikož jejich vodíkové signál jsou součástí multipletů zahrnujících signály piperidinového kruhu. Aromatickým CH uhlíků náleží posuny 108.00, 137.78 a 148.19 ppm.



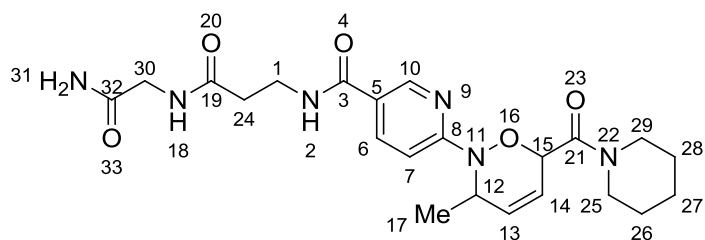
Obrázek 16: Záznam z 2D HMQC experimentu látky **6 (5;2;1)**

HMBC experimentu zobrazuje interakce přes dvě až tři vazby. Ze spektra (Obr. 17) lze přiřadit signály jednotlivých karbonylových uhlíků s posuny 164.59, 165.17, 171.36 a 171.68 ppm. Uhlíku CH₂ skupiny glycinu odpovídá posun 42.40 ppm a druhému CH₂ uhlíku β-alaninu posun 36.46 ppm. Dále je možné identifikovat aromatické uhlíky. Z předchozího spektra bylo zjištěno, že terciální uhlíkům pyridinového jádra odpovídají posuny 108.00, 137.78 a 148.19 ppm. Z HMQC spektra lze vyčíst, že uhlík s posunem 108.00 neinteraguje s karbonylovou skupinou. Dle vzájemných interakcí lze identifikovat i aromatické uhlíky s posuny 122.54, 137.78, 148.19 a 160.74. Piperidinové uhlíky s posuny 24.48, 25.77, 26.85, 42.99 a 46.64 ppm identifikovány nebyly.



Obrázek 17: Záznam z 2D HMBC experimentu látky **6 (5;2;1)**

Zjištěné informace z výše uvedených spekter jsou shrnuty na následujícím obrázku (Obr. 18). Jednotlivé atomy jsou přiřazeny k chemickým posunům ¹H a ¹³C NMR záznamů.

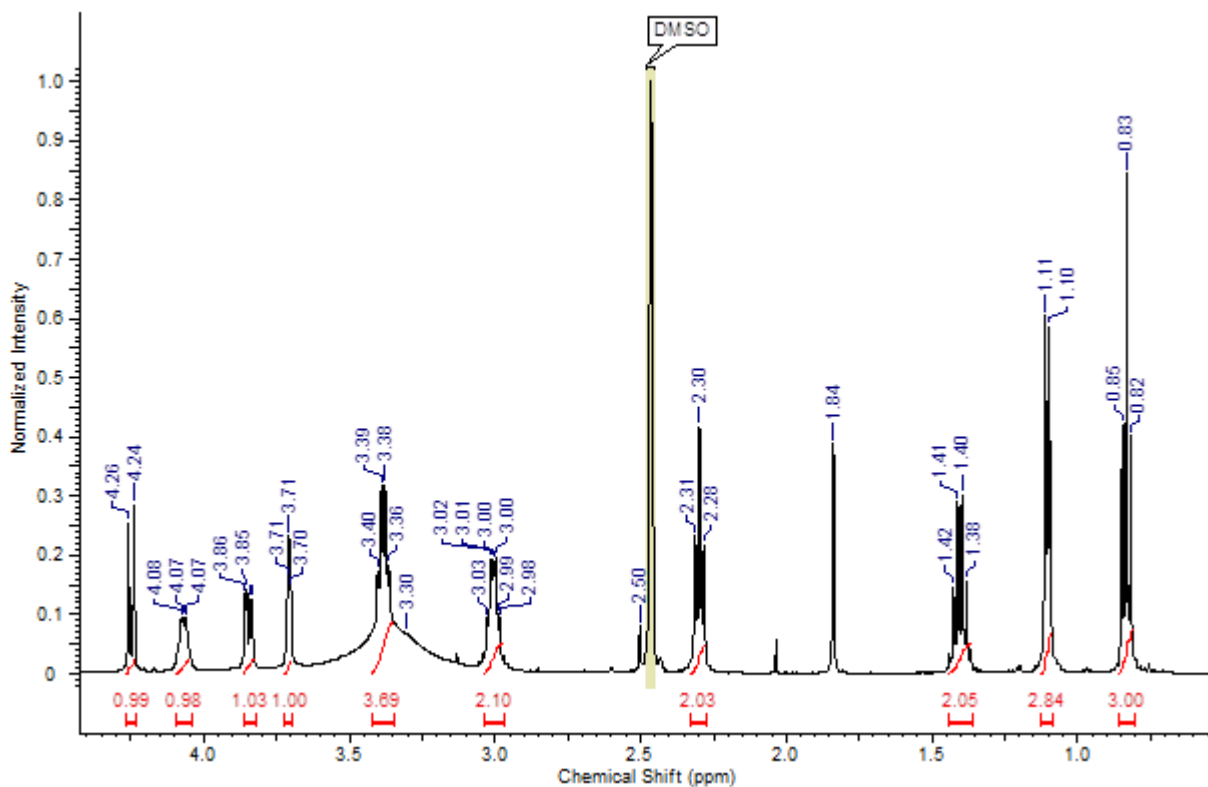


Obrázek 18: Struktura **6 (5;2;1)** s označenými atomy

^1H NMR (500 MHz, DMSO- d_6) δ ppm 1.09 (d, $J=6.30$ Hz, 3 H) **17** 1.45 (br. s., 2 H) 1.58 (br. s., 4 H) 2.38 (t, $J=7.16$ Hz, 2 H) **24** 3.40 - 3.48 (m, 4 H) **1** 3.52 - 3.67 (m, 4 H) **30** 4.79 - 4.85 (m, 1 H) **12** 5.47 - 5.50 (m, 1 H) **15** 5.86 - 5.90 (m, 1 H) **14** 6.05 - 6.08 (m, 1 H) **13** 6.99 - 7.01 (m, 2 H) **31, 7** 7.26 (br. s., 1 H) **31** 8.04 - 8.11 (m, 2 H) **18, 6** 8.41 (t, $J=5.73$ Hz, 1 H) **2** 8.66 (d, $J=2.29$ Hz, 1 H) **10**

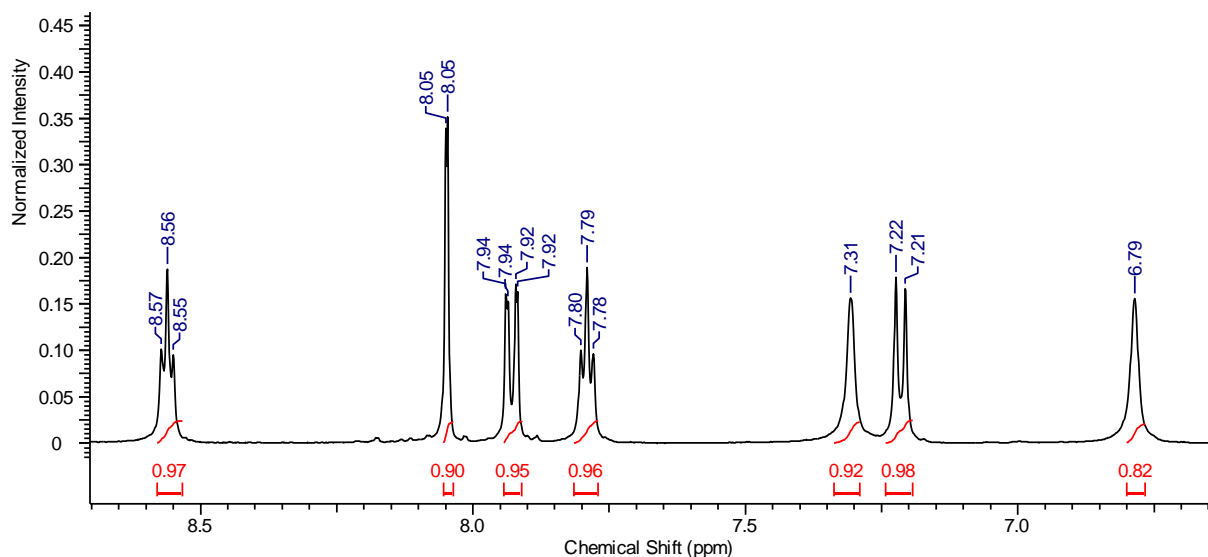
^{13}C NMR: 15.74 **17**, 24.48, 25.77, 26.85, 35.88 **24**, 36.46 **1**, 42.40 **30**, 42.99, 46.64, 51.49 **12**, 76.46 **15**, 108.00 **7**, 122.54 **8**, 124.43 **14**, 129.68 **13**, 137.78 **6**, 148.19 **10**, 160.74 **5**, 164.59 **21**, 165.17 **3**, 171.36 **19**, 171.68 **32**

Identifikace struktury finálních látek **7 (R¹;X;R²)** byla provedena na sloučenině **7 (1;1;3)**. V alifatické části ^1H NMR spektra látky **7 (1;1;3)** (*Obr. 19*) lze identifikovat triplet s posunem 0.83 ppm odpovídající methylové skupině propylaminu. Dublet s posunem 1.10 ppm patří methylové skupině na 1,2-oxazinovém cyklu. Triplet s posunem 2.30 ppm náleží jedné CH₂ skupině β-alaninu. Dublet s posunem 4.25 ppm odpovídá CH skupině 1,2-oxazinového kruhu sousedící pouze s jednou CH skupinou. Dále lze ve spektru vidět vodíky odpovídající CH₂ skupinám propylaminu a β-alaninu, CH skupiny 1,2-oxazinového kruhu a vodíky OH skupiny.



Obrázek 19: Alifatická část ^1H NMR spektra látky **7 (1;1;3)**

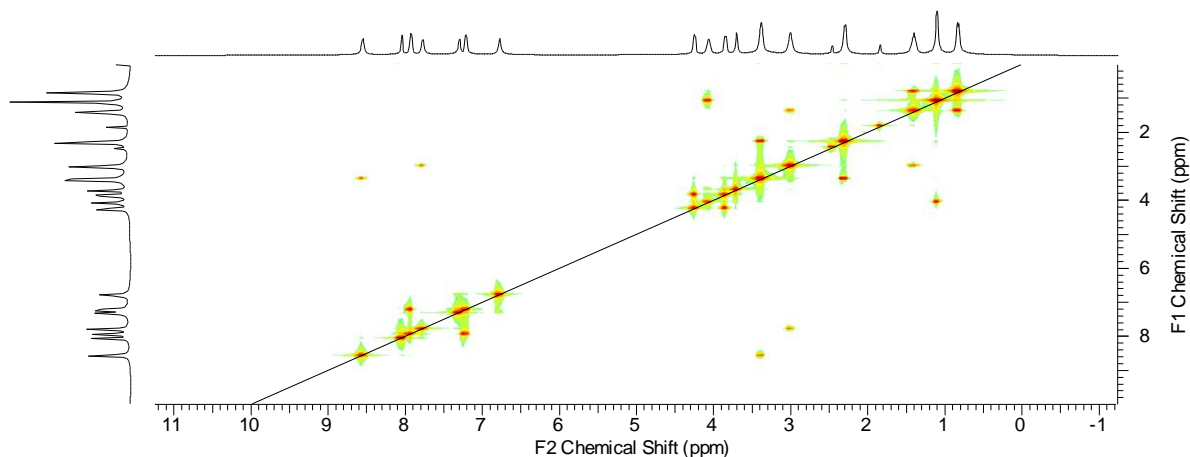
Aromatická část ^1H NMR spektra (*Obr. 20*) pak zobrazuje amidické vodíky (NH_2) se signály 6.79 a 7.31 ppm. Dále vidíme dva triplety patřící amidickým (NH) vodíkům a tři signály patřící aromatickým vodíkům.



Obrázek 20: Aromatická část ^1H NMR spektra látky **7 (1;1;3)**

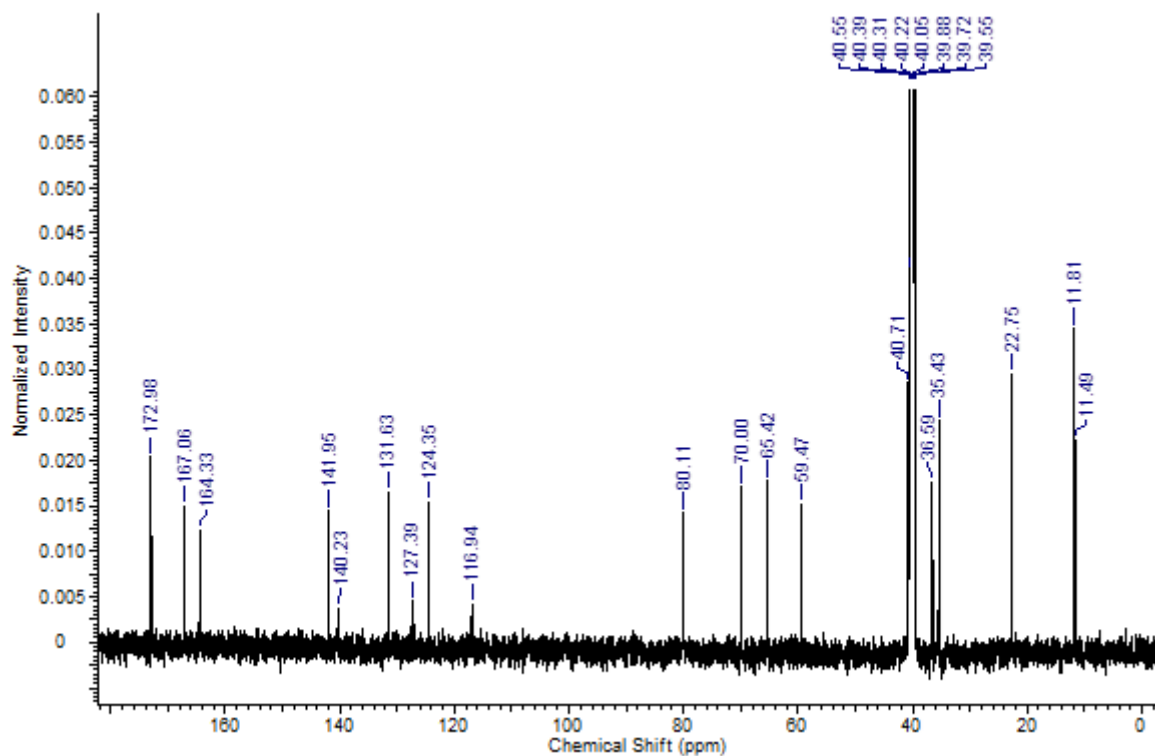
Dle COSY experimentu ^1H NMR (*Obr. 21*) lze přiřadit signály 1.40 ppm a 2.94 - 3.06 ppm CH_2 skupinám propylaminu a s nimi sousedící amidický vodík s posunem 7.79 ppm. Zbývajícím vodíkům 1,2-oxazinového kruhu lze přiřadit signály s posuny 4.04 – 4.09, 3.71

a 3.85 ppm. Vodíky OH skupin jsou součástí signálu s posunem 3.34 - 3.42 ppm spolu s druhou CH₂ skupinou β-alaninu. Ta sousedí s amidickým vodíkem s posunem 8.56 ppm. Aromatickému vodíku bez sousední interakce patří signál s posunem 8.05 ppm. Zbylé dva jsou zatím nerozlišené.



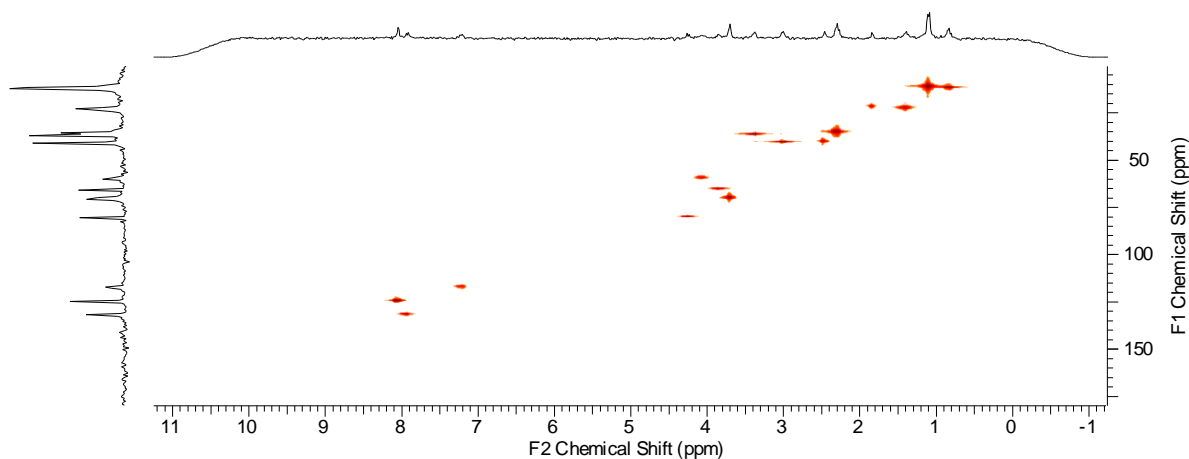
Obrázek 21: Záznam z 2D COSY experimentu látky **7 (1;1;3)**

V uhlíkovém ¹³C NMR spektru (*Obr. 22*) lze vidět deset alifatických uhlíků s posuny 11.49 – 80.11 ppm, šest aromatických uhlíků s posuny 116.94 – 141.95 ppm a tři karbonylové uhlíky s posuny 164.33 – 172.98. Ke konkrétnímu přiřazení je třeba využít 2D NMR experimenty HMQC a HMBC.



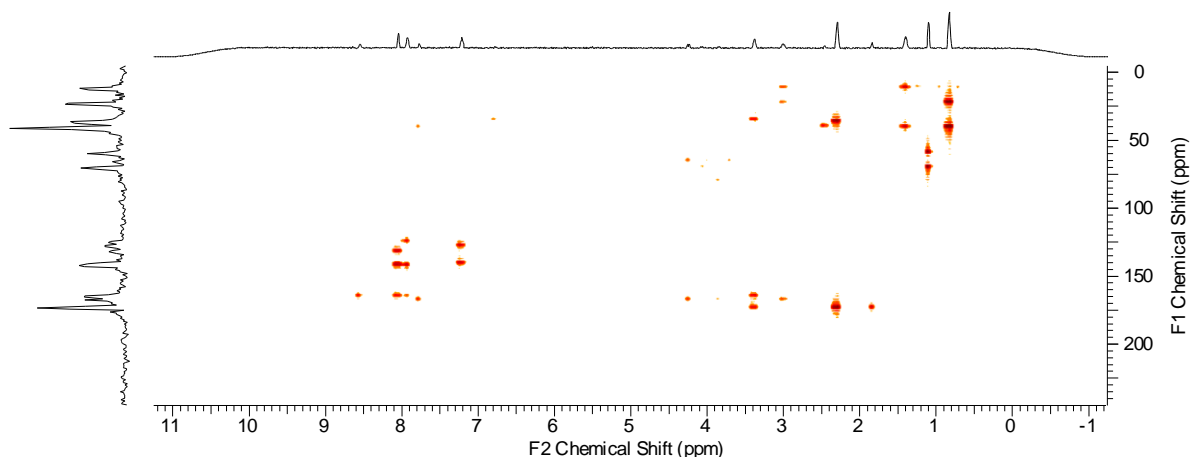
Obrázek 22: ¹³C NMR spektrum látky **7 (1;1;3)**

K přiřazení uhlíkových atomů nesoucích vodíky lze využít HMQC experiment (Obr. 23). Uhlíky propylaminu odpovídají signálům s posuny 11.49, 22.75 a 40.71 ppm. Uhlíky 1,2-oxazinového kruhu náleží posunům 11.81, 59.47, 65.42, 70.00 a 80.11 ppm. Signály β -alaninu odpovídají posunům 35.43 a 36.59 ppm. Aromatický uhlík s vodíkovým posunem 8.05 ppm odpovídá signál s posunem 124.35 ppm. Zbylé dva aromatické CH uhlíky s posuny s posuny 116,94 ppm, kterému odpovídá vodíkový posun 7.22 ppm, a 131.63 ppm, kterému odpovídá vodíkový posun 7.93 ppm, jsou zatím nerozlišené.



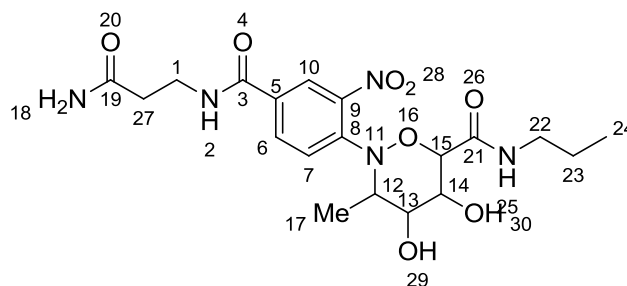
Obrázek 23: Záznam z 2D HMQC experimentu látky **7 (1;1;3)**

Kvarterní uhlíky lze určit z interakcí v HMBC spektru (Obr. 24), ve kterém vidíme interakce přes dvě až tři vazby. Karbonylovému uhlíku v sousedství CH_2 skupiny propylaminu náleží posun 167.06 ppm, karbonylu na aromatickém cyklu signál s posunem 164.33 ppm a karbonylovému uhlíku β -alaninu posun 172.98. Z interakcí izolovaného aromatického CH vodíku (124.35 ppm) lze identifikovat aromatický uhlík nesoucí karbonyl (164.33 ppm), který odpovídá posunu 141.95 ppm. Tyto interakce jsou společné s CH uhlíkem s posunem 131.63 ppm. Vylučovací metodou lze určit poslední CH aromatický uhlík s posunem 116.94 ppm, který sousedí s posledními dvěma kvarterními uhlíky s posuny 127.29 a 140.23, které lze rozlišit pomocí navázaných substituentů.



Obrázek 24: Záznam z 2D HMBC experimentu látky **7 (1;1;3)**

Všechny přiřazené posuny k jednotlivým atomům jsou shrnuty v ^1H a ^{13}C NMR záznamech. Čísla atomů jsou znázorněny na obrázku (*Obr. 25*).



Obrázek 25: Struktura **7 (1;1;3)** s označenými atomy

^1H NMR (500 MHz, DMSO- d_6) δ ppm 0.83 (t, $J=7.45$ Hz, 3 H) **24** 1.10 (d, $J=6.87$ Hz, 3 H) **17** 1.40 (m, 2 H) **23** 2.30 (t, $J=7.16$ Hz, 2 H) **27** 2.94 - 3.06 (m, 2 H) **22** 3.34 - 3.42 (m, 4 H) **1+29+30** 3.71 (t, $J=2.86$ Hz, 1 H) **13** 3.85 (dd, $J=9.16, 2.86$ Hz, 1 H) **14** 4.04 - 4.09 (m, 1 H) **12** 4.25 (d, $J=9.17$ Hz, 1 H) **15** 6.79 (br. s., 1 H) **18** 7.22 (d, $J=8.59$ Hz, 1 H) **7** 7.31 (br. s., 1 H) **18** 7.79 (t, $J=5.73$ Hz, 1 H) **25** 7.93 (dd, $J=9.16, 1.72$ Hz, 1 H) **6** 8.05 (d, $J=1.72$ Hz, 1 H) **10** 8.56 (t, $J=5.44$ Hz, 1 H) **2**

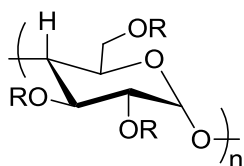
^{13}C NMR: 11.49 **24**, 11.81 **17**, 22.75 **23**, 35.43 **27**, 36.59 **1**, 40.71 **22**, 59.47 **12**, 65.42 **14**, 70.00 **13**, 80.11 **15**, 116.94 **7**, 124.35 **10**, 127.29 **8**, 131.63 **6**, 140.23 **9**, 141.95 **5**, 164.33 **3**, 167.06, **21** 172.98 **19**

4.2. Chirální separace derivátů 1,2-oxazinu

Během navržené syntézy vznikají 1,2-oxazinové deriváty ve směsi stereo, případně regio izomerů. Pro syntézu léčiv jsou však často důležité opticky čisté deriváty daného regioisomeru. Proto je třeba mít k dispozici analytickou metodu, která by umožnila kontrolovat poměr jak regioisomerů, tak stereoisomerů při regio/steroselektivní syntéze⁵.

Důležitým krokem syntézy, ve kterém vzniká směr stereo a regioizomerů je HDA reakce. Pro takto vzniklé deriváty byly podmínky pro chirální separaci již vyvíjeny⁵. Součástí diplomové práce tak bylo stanovení optimálních podmínek pro chirální separaci finálních látek **6** ($R^1;X;R^2$) a **7** ($R^1;X;R^2$) chirálními metodami HPLC a nově SFC. Tyto podmínky by měly sloužit jak ke kontrole stereoizomerie při hydroxylaci dvojně vazby, tak k určení optické čistoty u finálních derivátů.

Analýzy proběhly s kolonami s chirální stacionární fází (CSP) na bázi chirálních amylozových derivátů imobilizovaných na silikagelu. CSP kolony na bázi celulózových derivátů nebyly pro separace těchto derivátů vhodné, jak již bylo zjištěno dříve⁵. Využity byly kolony CHIRALPAK IA a IA3, která je založená na bázi tris(3,5-dimethylfenylkarbamát) amylozy a CHIRALPAK ID a ID3, založená na bázi tris(3-chlorofenylkarbamát) amylozy, a CHIRALPAK IF, založená na bázi tris(3-chloro-4-methylfenylkarbamát) amylozy (*Obr. 26*).



CSP	Druh	-R
CHIRALPAK IA	Imobilizovaná na 5 μm silikagelu	
CHIRALPAK IA3	Imobilizovaná na 3 μm silikagelu	
CHIRALPAK ID	Imobilizovaná na 5 μm silikagelu	
CHIRALPAK ID3	Imobilizovaná na 3 μm silikagelu	
CHIRALPAK IF	Imobilizovaná na 5 μm silikagelu	

Obrázek 26: Struktury chirálních selektorů přítomných v použitých CSP kolonách

Chirální separace byly provedeny u látek **6 (1;1;3)**, **6 (3;1;1)**, **6 (4;1;3)**, **7 (1;1;3)**, **7 (3;1;1)** a **7 (4;1;3)**. Pro HPLC metodu byly použity CSP kolony CHIRALPAK IA a CHIRALPAK ID. Jako výchozí mobilní fáze byl zvolen hexan a 2-propanol v poměru 70:30. Poměr byl dále upravován, tak aby došlo k rozdělení jednotlivých enantiomerů. Ve většině případů pak byl 2-propanol nahrazen ethanolem. K zaostření píků byl v některých případech použit přídatek kyseliny trifluoroctové. V případech derivátů **6 (3.1.1)** a **7 (1.1.3)** bylo rozlišení za použití izokratické eluce příliš vysoké, a proto byl ke zkrácení času analýzy stanoven gradient za použití 20 – 50 % alkoholu. Látku **6 (4.1.3)** se nepodařilo rozdělit na kolonách CHIRALPAK IA ani CHIRALPAK ID, a proto byla pro separaci této látky vyzkoušena třetí kolona CHIRALPAK IF. Ani na této koloně však nedošlo k rozdělení látky. Jednotlivé podmínky chirální separace pomocí HPLC metody jsou shrnuty v tabulce (Tab. 20).

Tabulka 20: Kolony a podmínky separace jednotlivých derivátů pomocí HPLC metody

Derivát	Kolona	Mobilní fáze	Poměr	Rs	α
6 (1;1;3)	CHIRALPAK IA	hexan/ethanol/ TFA	85/15/0.1	0,64	1,08
6 (3;1;1)	CHIRALPAK ID	A: hexan B: 2-propanol	gradient*	2,47	1,44
6 (4;1;3)	CHIRALPAK IF	hexan/ethanol/ TFA	90/10/0,1	-----	-----
7 (1;1;3)	CHIRALPAK IA	A: hexan B: ethanol	gradient*	2,50	1,47
7 (3;1;1)	CHIRALPAK IA	hexan/ethanol/ TFA	75/25/0.1	0,90	1,18
7 (4;1;3)	CHIRALPAK IA	hexan/ethanol/ TFA	50/50/0.1	1,37	1,49

*Gradient 20 – 50% alkoholu B v A v čase 0-25 min.

Vedle klasické HPLC metody byla chirální separace provedena také pomocí superkritické fluidní chromatografie (SFC). Pro SFC metodu byly použity CSP kolony CHIRALPAK IA3 a CHIRALPAK ID3. Jako mobilní fáze se zde využívá oxid uhličitý ve formě superkritické tekutiny spolu s methanolem s přídatkem diethanolaminu a kyseliny trifluoroctové. Podmínky chirální separace pro jednotlivé deriváty jsou uvedeny v tabulce (Tab. 21). Rozlišení je ve všech případech velmi dobré. Selektivitu se v případě SFC ještě nepodařilo z časových důvodů určit.

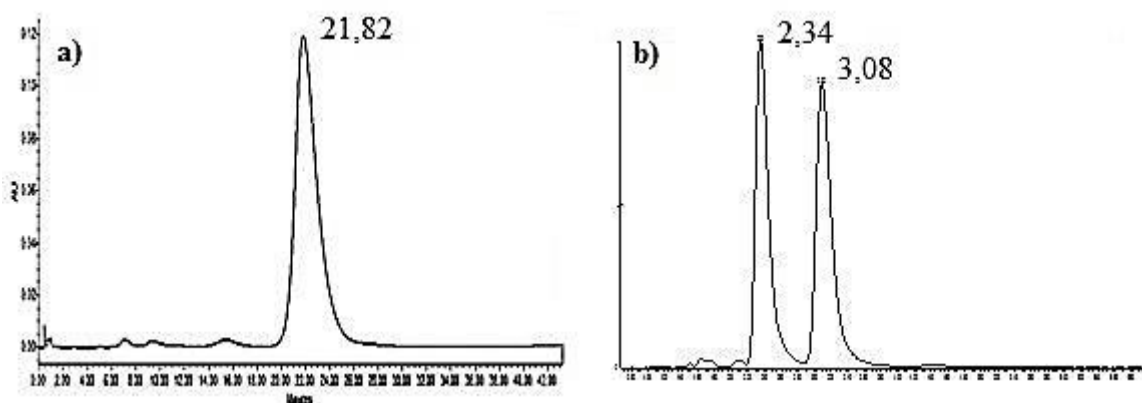
Tabulka 21: Kolony a podmínky separace jednotlivých derivátů pomocí SFC metody

Derivát	Kolona	Mobilní fáze*	Poměr	Rs
6 (1;1;3)	CHIRALPAK IA3	A: CO ₂ B: MeOH/DEA/TFA	70:30	2,22
6 (3;1;1)	CHIRALPAK ID3	A: CO ₂ B: MeOH/DEA/TFA	gradient**	1,25
6 (4;1;3)	CHIRALPAK ID3	A: CO ₂ B: MeOH/DEA/TFA	64:40	1,97
7 (1;1;3)	CHIRALPAK ID3	A: CO ₂ B: MeOH/DEA/TFA	gradient**	2,14
7 (3;1;1)	CHIRALPAK IA3	A: CO ₂ B: MeOH/DEA/TFA	gradient**	1,75
7 (4;1;3)	CHIRALPAK ID3	A: CO ₂ B: MeOH/DEA/TFA	60:40	3,50

*MeOH/DEA/TFA v poměru 100:0,3:0,22

**Gradient 15 – 35 % směsi B v A v čase 0-4 min.

Na rozdíl od HPLC metody se pomocí SFC metody podařilo rozdělit všechny deriváty. Srovnání chromatogramu sloučeniny **6 (4;1;3)** z HPLC a SFC je možné vidět na obrázku (*Obr. 27*).

**Obrázek 27:** Chromatogramy látky **6 (4;1;3)** stanovené pomocí metody a) HPLC, b) SFC

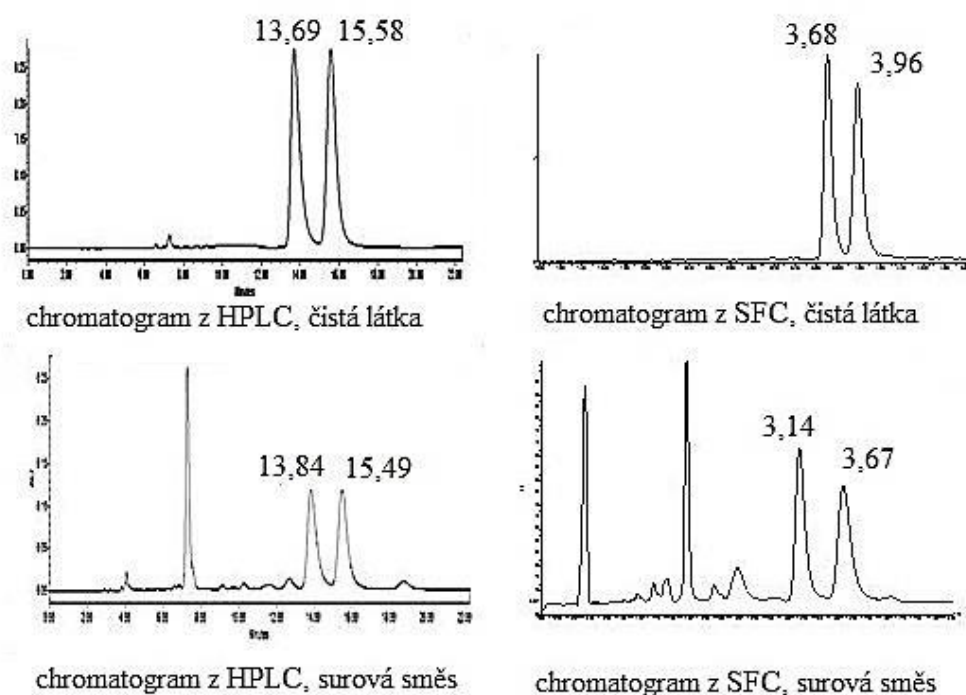
SFC metoda umožňuje výrazně kratší dobu analýzy. Nejvyšší retenční čas 5,55 min měl derivát **7 (1;1;3)** oproti retenčnímu času 48,88 min derivátu **6 (1;1;3)** pomocí HPLC metody (*Tab. 22*).

Tabulka 22: Retenční časy jednotlivých derivátů

Derivát	HPLC		SFC	
	t _R (min); čistá látka	t _R (min); surová směs	t _R (min); čistá látka	t _R (min); surová směs
6 (1;1;3)	45,64; 48,88	42,66; 44,10	1,81; 2,31	1,78; 2,35
6 (3;1;1)	18,17; 24,68	18,07; 24,58	3,82; 3,96	-*
6 (4;1;3)	21,82	21,28	2,34; 3,08	-*
7 (1;1;3)	17,66; 24,33	17,71; 24,97	4,96; 5,55	-*
7 (3;1;1)	13,69; 15,58	13,84; 15,49	3,68; 3,96	3,14; 3,67
7 (4;1;3)	21,25; 30,25	21,41; 30,37	1,90; 3,74	-*

* Data dosud nejsou k dispozici.

Pro budoucí studium stereoselektivních syntéz je důležité rychlé stanovení poměru regio/stereo izomerů. Proto je potřeba zjištění podmínky pro chirální separace aplikovat na látky v surové směsi. Podmínky pro chirální separaci surové směsi byly ověřeny pomocí HPLC metody. Pomocí SFC metody byly kvůli dostupnosti instrumentálního vybavení ověřeny pouze podmínky pro kolonu CHIRALPAK IA3 a tedy pro látky **6 (1;1;3)** a **7 (3;1;1)**. Pro zbylé látky budou podmínky pro SFC metodu ověřeny v nejbližší době. Retenční časy jak čistých tak surových látek z obou metod jsou shrnuty v tabulce (Tab. 22). Přestože se v některých případech retenční časy mírně posunuly, je možné jednotlivé izomery ve spektrech rozlišit. Pro ilustraci jsou ukázány chromatogramy látky **7 (3;1;1)** (Obr. 28). Ostatní chromatogramy jsou zobrazeny v příloze.

**Obrázek 28:** Záznamy chromatogramů látky **7 (3;1;1)**

5. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

5.1. Metody

5.1.1. Instrumentace

Pro reakce na pevné fázi byly použity plastové injekční stříkačky opatřené polypropylenovou fritou. Měření hmotnostních spekter bylo realizováno na hmotnostním spektrometru UPLC-MS Acquity Waters SQ Detector 2 (Waters) USA nebo UPLC Waters Acquity H s PDA a QDa detektory (Waters) USA. Měření NMR spekter bylo provedeno v roztoku DMSO – d₆ na JNM-ECA 500 (500 MHz, JEOL) s vnitřním standardem TMS. Hodnoty chemického posunu jsou udány v ppm jednotkách, interakční konstanty v Hz. Purifikace sloučenin byly provedeny na sestavě semipreparativního HPLC (Waters) USA. Chirální separace byly realizovány na sestavě HPLC s PDA detektorem (Waters) USA s kolonami CHIRALPAK IA, CHIRALPAK ID a CHIRALPAK IF. SFC analýzy byly prováděny na sestavě Acquity UPC² na kolonách CHIRALPAK IA3 a CHIRALPAK ID3. K sušení vzorků byl použit lyofilizátor Scanvac CoolSafe.

5.1.2. Štěpení vzorků pro LC-MS analýzu

Analytické množství (5-10 mg) promyté pryskyřice bylo mícháno ve směsi 50% TFA/DCM (1 ml) po dobu 30 min. Po odpaření rozpouštědel pod proudem dusíku byl vzorek rozpuštěn v MeOH (0,5 ml) a H₂O (0,5 ml) a následně přefiltrován přes mikrofiltr.

5.1.3. Stanovení LC čistoty

Čistota látek byla stanovena z poměru ploch píků z HPLC/PDA záznamu při průmětu vlnových délek.

5.1.4. Preparativní štěpení finálních sloučenin a jejich HPLC purifikace

Pro purifikaci finálních látek bylo použito 400 mg suché pryskyřice. Pryskyřice byla smíchána s 50% TFA/DCM (10 ml) a třepána 30 min. Roztok byl zfiltrován a pryskyřice byla ještě dvakrát smíchána s 50% TFA/DCM (10 ml) a třepána 15 min. Spojené filtráty byly odpařeny pod proudem dusíku. Odparek byl rozpuštěn v 5 ml methanolu. Roztok byl přečištěn na HPLC za použití gradientu acetonitril/10mM vodný octan amonný. Jednotlivé

frakce byly sesbírány, acetonitril byl odpařen na RVO. Následně byl roztok zmražen a lyofilizován. Výtěžek byl stanoven jako celkový výtěžek po všech reakčních krocích.

5.1.5. Příprava vzorku na NMR analýzu

Po lyofilizaci bylo 5 – 11 mg látky rozpuštěno v deuterovaném DMSO (600 μ l).

5.2. Přípravy

Obecný postup přípravy imobilizovaných aminokyselin/dipeptidů **2 (R¹)**

Výchozí pryskyřice (1 – 1,2 g) byla promyta 3 \times DCM a 3 \times DMF. Poté byl přidán roztok 50 % piperidinu v DMF (10 ml) a směs byla třepána po dobu 20 min. Pryskyřice byla promyta 6 \times DMF a 3 \times DCM. K pryskyřici byl přidán roztok aminokyseliny (3,4 mmol), HOBt (3,4 mmol) a DIC (3,4 mmol) ve směsi DCM (6 ml) a DMF (6 ml). Reakční směs byla třepána 1 h za laboratorní teploty. Pryskyřice byla promyta 3 \times DCM, 3 \times DMF a 3 \times DCM.

Imobilizovaná 2-(((9H-fluoren-9-yl)methoxy)karbonyl)amino)propanová kyselina [2 (1)]

Jako výchozí látka byla použita Rinkova pryskyřice **1**, jako aminokyselina byl použit Fmoc- β -Ala-OH.

MS m/z pro C₁₈H₁₈N₂O₃: vypočteno 310,13; nalezeno 311 [M+1]⁺. LC čistota 100%.

Imobilizovaná 2-(((9H-fluoren-9-yl)methoxy)karbonyl)amino)octová kyselina [2 (2)]

Jako výchozí látka byla použita Rinkova pryskyřice **1**, jako aminokyselina byl použit Fmoc-Gly-OH.

MS m/z pro C₁₇H₁₆N₂O₃: vypočteno 296,12; nalezeno 297 [M+1]⁺. LC čistota 100%.

Imobilizovaná 3-(2-(((9H-fluoren-9-yl)methoxy)karbonyl)amino)acetamido)propanová kyselina [2 (4)]

Jako výchozí látka byla použita imobilizovaná aminokyselina **2 (1)**, jako aminokyselina byl použit Fmoc-Gly-OH.

MS m/z pro C₂₀H₂₁N₃O₄: vypočteno 367,15; nalezeno 368 [M+1]⁺. LC čistota 100%.

Imobilizovaná 3-(2-(((9H-fluoren-9-yl)methoxy)karbonyl)amino)propanamido)octová kyselina [2 (5)]

Jako výchozí látka byla použita imobilizovaná aminokyselina **2 (2)**, jako aminokyselina byl použit Fmoc-β-Ala-OH.

MS m/z pro C₂₀H₂₁N₃O₄: vypočteno 367,15; nalezeno 368 [M+1]⁺. LC čistota 100%.

Obecný postup přípravy imobilizovaných látek 3 (R¹;X)

Výchozí pryskyřice (1 – 1,2 g) byla promyta 3×DCM a 3×DMF. Poté byl přidán roztok 50 % piperidinu v DMF (10 ml) a směs byla třepána po dobu 20 min. Pryskyřice byla promyta 6×DMF a 3×DCM. K pryskyřici byl přidán roztok 4-fluoro-3-nitrobenzoové nebo 6-fluoronikotinové kyseliny (3,5 mmol), HOBt (3,5 mmol) a DIC (3,5 mmol) ve směsi DCM (5 ml) a DMF (5 ml). Reakční směs byla třepána 1 h za laboratorní teploty. Pryskyřice byla promyta 3×DCM, 3×DMF a 3×DCM.

Imobilizovaná 3-(4-fluoro-3-nitrobenzamido)propanová kyselina [3 (1;1)]

Jako výchozí látka byla použita imobilizovaná aminokyselina **2 (1)**. Jako reaktant byla použita kyselina 4-fluoro-3-nitrobenzoová.

MS m/z pro C₁₀H₁₀FN₃O₄: vypočteno 255,07; nalezeno 254 [M-1]⁺. LC čistota 100%.

Imobilizovaná 2-(4-fluoro-3-nitrobenzamido)octová kyselina [3 (2;1)]

Jako výchozí látka byla použita imobilizovaná aminokyselina **2 (2)**. Jako reaktant byla použita kyselina 4-fluoro-3-nitrobenzoová.

MS m/z pro C₉H₈FN₃O₄: vypočteno 241,01; nalezeno 240 [M-1]⁺. LC čistota 100%.

Imobilizovaná 4-fluoro-3-nitrobenzoová kyselina [3 (3;1)]

Jako výchozí látka byla použita Rinkova pryskyřice **1**. Jako reaktant byla použita kyselina 4-fluoro-3-nitrobenzoová.

MS m/z pro C₇H₅FN₂O₃: vypočteno 184,03; nalezeno 183 [M-1]⁺. LC čistota 100%.

Imobilizovaná 3-(2-(4-fluoro-3-nitrobenzamido)acetamido)propanová kyselina [3(4;1)]

Jako výchozí látka byl použit imobilizovaný dipeptid **2 (4)**. Jako reaktant byla použita kyselina 4-fluoro-3-nitrobenzoová.

MS m/z pro $C_{12}H_{13}FN_4O_5$: vypočteno 312,09; nalezeno 311 $[M-1]^+$. LC čistota 100%.

Imobilizovaná 2-(6-fluoronikotinamido)octová kyselina [3 (2;2)]

Jako výchozí látka byl použit Glycin **2 (2)**. Jako reaktant byla použita kyselina 6-fluorobenzoová.

MS m/z pro $C_8H_8FN_3O_2$: vypočteno 197,06; nalezeno 196 $[M-1]^+$. LC čistota 100 %.

Imobilizovaná 6-fluoronikotinová kyselina [3 (3;2)]

Jako výchozí látka byla použita Rinkova pryskyřice **1**. Jako reaktant byla použita kyselina 6-fluorobenzoová.

MS m/z pro $C_6H_5FN_2O$: vypočteno 140,04; nalezeno 139 $[M-1]^+$. LC čistota 100 %.

Imobilizovaná 2-(3-(6-fluoronicotinamido)propanamido)octová kyselina [3 (5;2)]

Jako výchozí látka byl použit imobilizovaný dipeptid **2 (5)**. Jako reaktant byla použita kyselina 6-fluorobenzoová.

MS m/z pro $C_{11}H_{13}FN_4O_3$: vypočteno 268,10; nalezeno 267 $[M-1]^+$. LC čistota 100 %.

Obecný postup přípravy imobilizovaných látek 4 (R^1 ;1)

Nabobtnaná pryskyřice **3 (R^1 ;1)** (1,2 g) byla promyta 3×Py a smíchána s roztokem $NH_2OH.HCl$ (12 mmol) v pyridinu (10 ml) a byla třepána 17 h za pokojové teploty. Pryskyřice byla promyta 3×Py, 3×DMF a 3×DCM.

Imobilizovaná 3-(4-(hydroxyamino)-3-nitrobenzamido)propanová kyselina [4 (1;1)]

Jako výchozí látka byl použit imobilizovaný derivát **3 (1;1)**.

MS m/z pro $C_{10}H_{12}N_4O_5$: vypočteno 268,08; nalezeno 267 $[M-1]^+$. LC čistota 91 %.

Imobilizovaná 2-(4-(hydroxyamino)-3-nitrobenzamido)octová kyselina [4 (2;1)]

Jako výchozí látka byl použit imobilizovaný derivát **3 (2;1)**. Derivát **4 (2;1)** byl ihned použit do následující reakce.

Imobilizovaná 4-(hydroxylamino)-3-nitrobenzoová kyselina [4 (3;1)]

Jako výchozí látka byl použit imobilizovaný derivát **3 (3;1)**.

MS m/z pro $C_7H_7N_3O_4$: vypočteno 197,04; nalezeno 196 $[M-1]^+$. LC čistota 93%.

Imobilizovaná 3-(2-(4-(hydroxyamino)-3-nitrobenzamido)acetamido)propanová kyselina [4 (4;1)]

Jako výchozí látka byl použit imobilizovaný derivát **3 (4;1)**. Derivát **4 (4;1)** byl ihned použit do následující reakce.

Obecný postup přípravy imobilizovaných látek 4 (R^1 ;2)

Pryskyřice **3 (R^1 ;2)** (1,2 g) byla promyta 3×DMSO a smíchána s roztokem $NH_2OH.HCl$ (14,4 mmol) a DMSO (10 ml) a DBU (0,4 mmol). Reakční směs byla míchána 24 h při 80°C. Pryskyřice byla promyta 3×DMSO, 3×DMF a 3×DCM.

Imobilizovaná 3-(6-(hydroxyamino)nicotinamido)octová kyselina [4 (2;2)]

Jako výchozí látka byl použit imobilizovaný derivát **3 (2;2)**.

MS m/z pro $C_8H_{10}N_4O_3$: vypočteno 210,08; nalezeno 211 $[M+1]^+$. LC čistota 89 %.

Imobilizovaná 6-(hydroxylamino)nikotinová kyselina [4 (3;2)]

Jako výchozí látka byl použit imobilizovaný derivát **3 (3;2)**.

MS m/z pro $C_6H_7N_3O_2$: vypočteno 153,05; nalezeno 154 $[M+1]^+$. LC čistota 92 %.

Imobilizovaná 2-(3-(6-(hydroxyamino)nicotinamido)propanamido)octová kyselina [4 (5;2)]

Jako výchozí látka byl použit imobilizovaný derivát **3 (5;2)**.

MS m/z pro $C_{11}H_{15}N_5O_4$: vypočteno 281,11; nalezeno 282 $[M+1]^+$. LC čistota 82 %.

Obecný postup přípravy látek 5 (R^1 ;X)

Nabobtnaná výchozí látka **4 (R^1 ;X)** (1,2g) byla smíchána s roztokem sorbové kyseliny (3,5 mmol), TBAPI (1,75 mmol) v DCM (10 ml). Reakční směs byla třepána 3 h za pokojové teploty. Pryskyřice byla promyta 3×DCM, 3×THF a 3×DCM.

Imobilizovaná 2-(4-((2-karboxyethyl)karbamoyl)-2-nitrofenyl)-3-methyl-3,6-dihydro-2H-1,2-oxazin-6-karboxylová kyselina [5 (1;1)]

Jako výchozí látka byl použit imobilizovaný derivát **4 (1;1)**.

MS m/z pro C₁₆H₁₈N₄O₇: vypočteno 378,08; nalezeno 379 [M+1]⁺. LC čistota 92 %.

Imobilizovaná 2-(4-((karboxymethyl)karbamoyl)-2-nitrofenyl)-3-methyl-3,6-dihydro-2H-1,2-oxazin-6-karboxylová kyselina [5 (2;1)]

Jako výchozí látka byl použit imobilizovaný derivát **4 (2;1)**.

MS m/z pro C₁₅H₁₆N₄O₇: vypočteno 364,10; nalezeno 365 [M+1]⁺. LC čistota 91 %.

Imobilizovaná 2-(4-karboxy-2-nitrofenyl)-3-methyl-3,6-dihydro-2H-1,2-oxazin-6-karboxylová kyselina [5 (3;1)]

Jako výchozí látka byl použit imobilizovaný derivát **4 (3;1)**.

MS m/z pro C₁₃H₁₃N₃O₆: vypočteno 307,08; nalezeno 308 [M+1]⁺. LC čistota 89 %.

Imobilizovaná 2-(4-((2-((2-karboxyethyl)amino)-2-oxoethyl)karbamoyl)-2-nitrofenyl)-3-methyl-3,6-dihydro-2H-1,2-oxazin-6-karboxylová kyselina [5 (4;1)]

Jako výchozí látka byl použit imobilizovaný derivát **4 (4;1)**.

MS m/z pro C₁₈H₂₁N₅O₈: vypočteno 435,14; nalezeno 436 [M+1]⁺. LC čistota 90 %.

Imobilizovaná 2-(5-((karboxymethyl)karbamoyl)pyridin-2-yl)-3-methyl-3,6-dihydro-2H-1,2-oxazin-6-karboxylová kyselina [5 (2;2)]

Jako výchozí látka byl použit imobilizovaný derivát **4 (2;2)**.

MS m/z pro C₁₄H₁₆N₄O₅: vypočteno 320,11; nalezeno 321 [M+1]⁺. LC čistota 81 %.

Imobilizovaná 2-(5-(3-methyl-3,6-dihydro-2H-1,2-oxazin-6-karboxylová kyselina [5 (3;2)]

Jako výchozí látka byl použit imobilizovaný derivát **4 (3;2)**.

MS m/z pro C₁₂H₁₃N₃O₄: vypočteno 263,09; nalezeno 264 [M+1]⁺. LC čistota 90 %.

Imobilizovaná 2-(5-((3-((karboxymethyl)amino)-3-oxopropyl)karbamoyl)pyridin-2-yl)-3-methyl-3,6-dihydro-2H-1,2-oxazin-6-karboxylová kyselina [5 (5;2)]

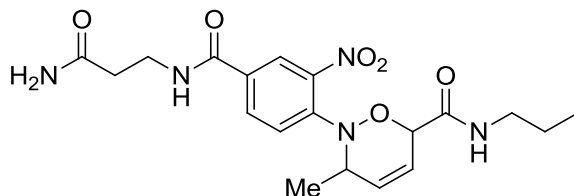
Jako výchozí látka byl použit imobilizovaný derivát **4 (5;2)**.

MS m/z pro C₁₇H₂₁N₅O₆: vypočteno 391,15; nalezeno 392 [M+1]⁺. LC čistota 67 %.

Obecný postup přípravy amidů 6 (R¹;X;R²)

K promyté pryskyřici **5 (R¹,X)** (1,2 g) byl přidán roztok aminu (3 mmol), HOBt (3 mmol), DIC (3 mmol) a DMAP (katalytické mn.) ve směsi DCM (5 ml) a DMF (5 ml). Reakční směs byla třepána 24 h za laboratorní teploty. Pryskyřice byla promyta 3×DCM, 3×DMF a 3×DCM a byla podrobena štěpení za použití TFA.

2-(4-((3-amino-3-oxopropyl)karbamoyl)-2-nitrofenyl)-3-methyl-N-propyl-3,6-dihydro-2H-1,2-oxazin-6-karboxamid [6 (1;1;3)]



Jako výchozí látka byl použit imobilizovaný derivát **5 (1;1)**. Jako amin byl použit propylamin.

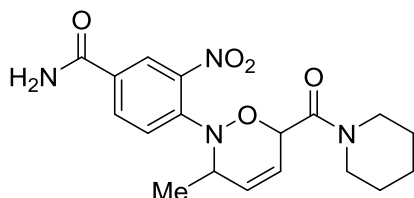
MS m/z pro C₁₉H₂₅N₅O₆: vypočteno 419,18; nalezeno 420 [M+1]⁺. Výtěžek 35 %.

¹H NMR (500 MHz, DMSO-*d*₆) δ ppm 0.79 (t, *J*=7.45 Hz, 3 H) 1.17 (d, *J*=6.30 Hz, 3 H) 1.34 - 1.43 (m, 2 H) 2.31 (t, *J*=7.16 Hz, 2 H) 2.94 (dd, *J*=12.89, 6.01 Hz, 1 H) 3.07 (dd, *J*=13.17, 6.30 Hz, 1 H) 3.37 - 3.43 (m, 2 H) 4.34 - 4.40 (m, 1 H) 4.77 - 4.82 (m, 1 H) 5.80 - 5.86 (m, 1 H) 6.06 (m, 1 H) 6.79 (br. s., 1 H) 7.30 (br. s., 1 H) 7.38 (d, *J*=8.59 Hz, 1 H) 7.53 (t, *J*=6.01 Hz, 1 H) 7.97 - 8.02 (m, 1 H) 8.13 (d, *J*=2.29 Hz, 1 H) 8.60 (t, *J*=5.44 Hz, 1 H)

^{13}C NMR*: 11.61, 14.79, 22.71, 35.40, 36.63, 40.13, 53.25, 78.76, 118.20, 124.25, 128.37, 130.24, 131.58, 140.47, 141.51, 164.25, 166.80, 172.97

*Z důvodu nízké intenzity není viditelný jeden uhlíkový signál.

**4-(3-methyl-6-(piperidin-1-karbonyl)-3,6-dihydro-2H-1,2-oxazin-2-yl)-3-nitrobenzamid
[6 (3;1;1)]**



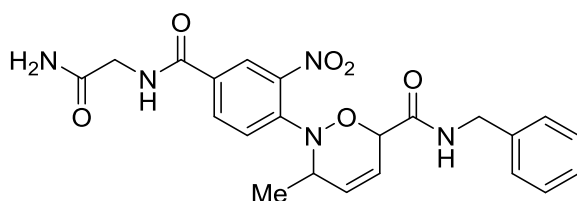
Jako výchozí látka byl použit imobilizovaný derivát **5 (3;1)**. Jako min byl použit piperidin.

MS m/z pro $\text{C}_{18}\text{H}_{22}\text{N}_4\text{O}_5$: vypočteno 374,16; nalezeno 375 $[\text{M}+1]^+$. Výtěžek 31 %.

^1H NMR (500 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) δ ppm 1.08 (d, $J=6.30$ Hz, 3 H) 1.36 - 1.47 (m, 4 H) 1.47 - 1.60 (m, 2 H) 3.35 - 3.46 (m, 4 H) 4.23 - 4.38 (m, 1 H) 5.31 (d, $J=1.72$ Hz, 1 H) 5.84 (d, $J=9.74$ Hz, 1 H) 6.05 (m, 1 H) 7.38 (d, $J=9.16$ Hz, 1 H) 7.48 (br. s., 1 H) 8.01 - 8.11 (m, 2 H) 8.17 (d, $J=1.72$ Hz, 1 H)

^{13}C NMR: 15.03, 24.47, 25.77, 26.58, 43.09, 46.37, 54.22, 76.99, 118.99, 124.24, 124.64, 128.88, 129.92, 132.14, 140.79, 142.24, 164.58, 165.94

2-(4-((2-amino-2-oxoethyl)karbamoyl)-2-nitrofenyl)-N-benzyl-3-methyl-3,6-dihydro-2H-1,2-oxazin-6-karboxamid [6 (2;1,2)]



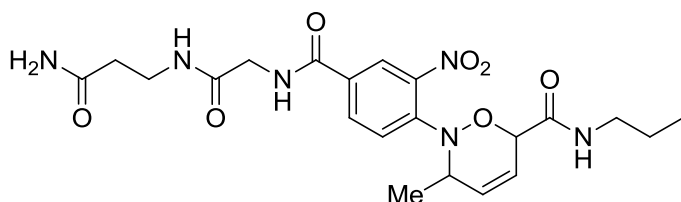
Jako výchozí látka byl použit imobilizovaný derivát **5 (2;1)**. Jako amin byl použit benzylamin.

MS m/z pro $\text{C}_{22}\text{H}_{23}\text{N}_5\text{O}_6$: vypočteno 453,16; nalezeno 454 $[\text{M}+1]^+$. Výtěžek 33 %.

^1H NMR (400 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) δ ppm 1.20 (d, $J=6.18$ Hz, 3 H) 3.77 (d, $J=6.18$ Hz, 2 H) 4.18 (dd, $J=15.34, 5.72$ Hz, 1 H) 4.34 (dd, $J=15.46, 6.53$ Hz, 1 H) 4.38 - 4.45 (m, 1 H) 4.90 (d, $J=1.83$ Hz, 1 H) 5.86 (d, $J=10.08$ Hz, 1 H) 6.07 - 6.14 (m, 1 H) 7.03 (s, 1 H) 7.17 - 7.22 (m, 3 H) 7.25 - 7.31 (m, 2 H) 7.39 (s, 1 H) 7.42 (d, $J=8.70$ Hz, 1 H) 8.04 (dd, $J=8.82, 1.95$ Hz, 1 H) 8.20 (d, $J=1.83$ Hz, 1 H) 8.26 (t, $J=6.07$ Hz, 1 H) 8.82 (t, $J=5.95$ Hz, 1 H)

^{13}C NMR: 14.73, 42.20, 42.97, 53.23, 78.92, 118.11, 124.07, 124.62, 127.24, 127.32, 128.01, 128.73, 130.51, 131.83, 139.65, 140.35, 141.61, 164.59, 167.12, 171.39

2-(4-((2-((3-amino-3-oxopropyl)amino)-2-oxoethyl)karbamoyl)-2-nitrofenyl)-3-methyl-N-propyl-3,6-dihydro-2H-1,2-oxazin-6-karboxamid [6 (4;1,3)]



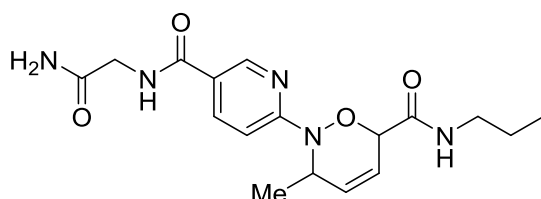
Jako výchozí látka byl použit imobilizovaný derivát **5 (2;1)**. Jako amin byl použit propylamin.

MS m/z pro $\text{C}_{21}\text{H}_{28}\text{N}_6\text{O}_7$: vypočteno 476,20; nalezeno 477 $[\text{M}+1]^+$. Výtěžek 29 %.

^1H NMR (500 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) δ ppm 0.79 (t, $J=7.45$ Hz, 3 H) 1.18 (d, $J=6.30$ Hz, 3 H) 1.32 - 1.44 (m, 2 H) 2.19 (t, $J=7.16$ Hz, 2 H) 2.94 (dd, $J=13.17, 5.73$ Hz, 1 H) 3.07 (dd, $J=13.17, 6.87$ Hz, 1 H) 3.21 (m, 2 H) 3.75 - 3.80 (m, 2 H) 4.35 - 4.44 (m, 1 H) 4.76 - 4.83 (m, 1 H) 5.79 - 5.87 (m, 1 H) 6.02 - 6.12 (m, 1 H) 6.78 (br. s., 1 H) 7.28 (br. s., 1 H) 7.40 (d, $J=8.59$ Hz, 1 H) 7.54 (t, $J=6.01$ Hz, 1 H) 7.93 (t, $J=5.73$ Hz, 1 H) 8.03 (dd, $J=8.88, 2.00$ Hz, 1 H) 8.17 (d, $J=1.72$ Hz, 1 H) 8.84 (t, $J=6.01$ Hz, 1 H)

^{13}C NMR: 11.62, 14.79, 22.79, 35.45, 35.73, 40.97, 43.18, 53.23, 78.78, 118.10, 124.26, 124.54, 127.91, 130.23, 131.77, 140.38, 141.63, 164.62, 166.77, 169.17, 173.01

2-(5-((2-amino-2-oxoethyl)karbamoyl)pyridin-2-yl)-3-methyl-N-propyl-3,6-dihydro-2H-1,2-oxazin-6-karboxamid [6 (2;2;3)]



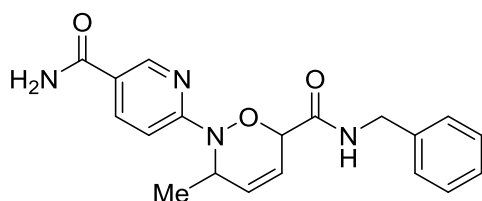
Jako výchozí látka byl použit imobilizovaný derivát **5 (2;2)**. Jako amin byl použit propylamin.

MS m/z pro C₁₇H₂₃N₅O₄: vypočteno 361,18; nalezeno 362 [M+1]⁺. Výtěžek 25 %.

¹H NMR (500 MHz, DMSO-*d*₆) δ ppm 0.81 (t, *J*=7.45 Hz, 3 H) 1.17 (d, *J*=6.30 Hz, 3 H) 1.44 (sxt, *J*=7.22 Hz, 2 H) 3.00 - 3.13 (m, 2 H) 3.77 (d, *J*=6.30 Hz, 2 H) 4.86 - 4.91 (m, 1 H) 4.97 - 4.99 (m, 1 H) 5.85 - 5.90 (m, 1 H) 6.05 - 6.10 (m, 1 H) 6.99 (br. s., 1 H) 7.21 (d, *J*=8.59 Hz, 1 H) 7.34 (br. s., 1 H) 8.00 (t, *J*=6.01 Hz, 1 H) 8.11 (dd, *J*=8.59, 2.29 Hz, 1 H) 8.61 (t, *J*=6.01 Hz, 1 H) 8.70 (d, *J*=1.72 Hz, 1 H)

¹³C NMR: 11.81, 16.43, 22.83, 40.75, 42.79, 50.99, 77.60, 108.54, 122.20, 124.23, 130.54, 137.72, 148.33, 160.70, 165.72, 167.14, 171.60

***N*-benzyl-2-(5-karbamoylpyridin-2-yl)-3-methyl-3,6-dihydro-2*H*-1,2-oxazin-6-karboxamid [6 (3;2;2)]**



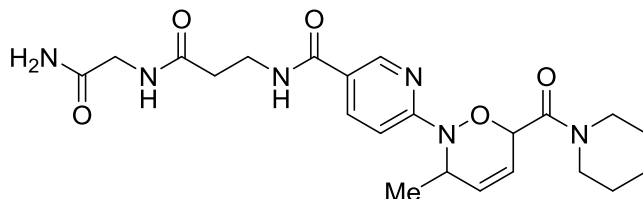
Jako výchozí látka byl použit imobilizovaný derivát **5 (3;2)**. Jako amin byl použit benzylamin.

MS m/z pro C₁₉H₂₀N₄O₃: vypočteno 352,15; nalezeno 353 [M+1]⁺. Výtěžek 30 %.

¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ ppm 1.18 (d, *J*=6.41 Hz, 3 H) 4.30 - 4.35 (2xd, 2 H) 4.86 - 4.91 (m, 1 H) 5.07 - 5.09 (m, 1 H) 5.92 (dt, *J*=10.19, 1.55 Hz, 1 H) 6.07 - 6.13 (m, 1 H) 7.18 - 7.33 (m, 7 H) 7.89 (br. s., 1 H) 8.10 (dd, *J*=8.70, 2.29 Hz, 1 H) 8.60 (t, *J*=5.95 Hz, 1 H) 8.69 (d, *J*=2.29 Hz, 1 H)

¹³C NMR: 16.41, 21.60, 42.45, 51.06, 77.65, 108.67, 122.32, 124.07, 127.64, 128.82, 130.75, 137.87, 139.81, 148.47, 160.73, 166.86, 167.43

***N*-(3-((2-amino-2-oxoethyl)amino)-3-oxopropyl)-6-(3-methyl-6-(piperidin-1-karbonyl)-3,6-dihydro-2*H*-1,2-oxazin-2-yl)nikotinamid **6** (5;2;1)**



Jako výchozí látka byl použit imobilizovaný derivát **5** (5;2). Jako amin byl použit piperidin.

MS m/z pro C₂₂H₃₀N₆O₅: vypočteno 458,23; nalezeno 459 [M+1]⁺. Výtěžek 20 %.

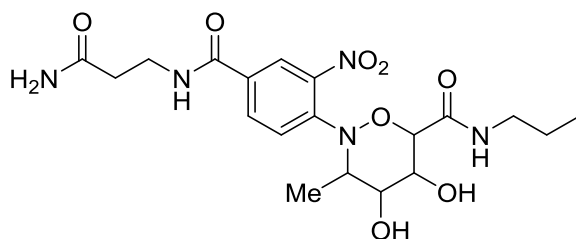
¹H NMR (500 MHz, DMSO-*d*₆) δ ppm 1.09 (d, *J*=6.30 Hz, 3 H) 1.45 (br. s., 2 H) 1.58 (br. s., 4 H) 2.38 (t, *J*=7.16 Hz, 2 H) 3.40 - 3.48 (m, 4 H) 3.52 - 3.67 (m, 4 H) 4.79 - 4.85 (m, 1 H) 5.47 - 5.50 (m, 1 H) 5.86 - 5.90 (m, 1 H) 6.05 - 6.08 (m, 1 H) 7.00 (m, 2 H) 7.26 (br. s., 1 H) 8.04 - 8.11 (m, 2 H) 8.41 (t, *J*=5.73 Hz, 1 H) 8.66 (d, *J*=2.29 Hz, 1 H)

¹³C NMR: 15.74, 24.48, 25.77, 26.85, 35.88, 36.46, 42.40, 42.99, 46.64, 51.49, 76.46, 108.00, 122.54, 124.43, 129.68, 137.78, 148.19, 160.74, 164.59, 165.17, 171.36, 171.68

Obecný postup hydroxylace – deriváty **7 (R¹;X;R²)**

K promyté pryskyřici **6** (R¹;X;R²) (0,8 g) byl přidán roztok 2,5 % OsO₄ v *t*BuOH (250 μl), NMO (750 μl) v DCM (10 ml). Reakční směs byla třepána 24 h za laboratorní teploty. Pryskyřice byla promyta 3×DCM, 3×DMF a 3×DCM a byla podrobena štěpení za použití TFA.

2-(4-((3-amino-3-oxopropyl)karbamoyl)-2-nitrofenyl)-4,5-dihydroxy-3-methyl-*N*-propyl-1,2-oxazinan-6-karboxamid [7 (1;1;3)]



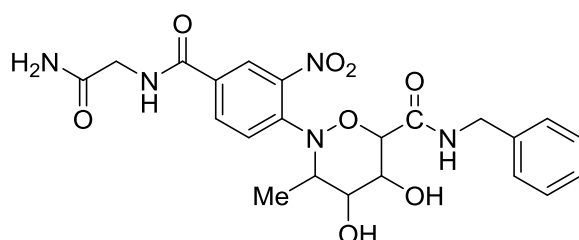
Jako výchozí látka byl použit imobilizovaný derivát **6** (1;1;3).

MS m/z pro C₁₉H₂₇N₅O₈: vypočteno 453,19; nalezeno 454 [M+1]⁺. Výtěžek 39 %.

^1H NMR (500 MHz, DMSO- d_6) δ ppm 0.83 (t, $J=7.45$ Hz, 3 H) 1.10 (d, $J=6.87$ Hz, 3 H) 1.36 – 1.44 (m, 2 H) 2.30 (t, $J=7.16$ Hz, 2 H) 2.94 - 3.06 (m, 2 H) 3.34 - 3.42 (m, 4 H) 3.71 (t, $J=2.86$ Hz, 1 H) 3.85 (dd, $J=9.16, 2.86$ Hz, 1 H) 4.04 – 4.09 (m, 1 H) 4.25 (d, $J=9.17$ Hz, 1 H) 6.79 (br. s., 1 H) 7.22 (d, $J=8.59$ Hz, 1 H) 7.31 (br. s., 1 H) 7.79 (t, $J=5.73$ Hz, 1 H) 7.93 (dd, $J=9.16, 1.72$ Hz, 1 H) 8.05 (d, $J=1.72$ Hz, 1 H) 8.56 (t, $J=5.44$ Hz, 1 H)

^{13}C NMR: 11.49, 11.81, 22.75, 35.43, 36.59, 40.71, 59.47, 65.42, 70.00, 80.11, 116.94, 124.35, 127.29, 131.63, 140.23, 141.95, 164.33, 167.06, 172.98

2-(4-((2-amino-2-oxoethyl)karbamoyl)-2-nitrofenyl)-N-benzyl-4,5-dihydroxy-3-methyl-1,2-oxazinan-6-karboxamid [7 (2;1;2)]



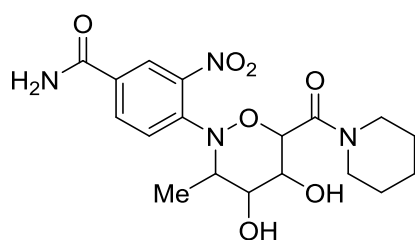
Jako výchozí látka byl použit imobilizovaný derivát **6 (2;1;2)**.

MS m/z pro $\text{C}_{22}\text{H}_{25}\text{N}_5\text{O}_8$: vypočteno 487,17; nalezeno 488 $[\text{M}+1]^+$. Výtěžek 34 %.

^1H NMR (500 MHz, DMSO- d_6) δ ppm 1.14 (d, $J=6.87$ Hz, 3 H) 3.74 – 3.77 (m, 3 H) 3.90 (d, $J=8.59$ Hz, 1 H) 4.09 – 4.15 (m, $J=6.59, 3.15$ Hz, 1 H) 4.29 (d, $J=6.30$ Hz, 2 H) 4.38 (d, $J=9.16$ Hz, 1 H) 4.86 (br. s., 1 H) 5.08 (br. s., 1 H) 7.00 (br. s., 1 H) 7.17 - 7.29 (m, 8 H) 7.35 (br. s., 1 H) 7.97 (dd, $J=8.59, 1.72$ Hz, 1 H) 8.13 (d, $J=1.72$ Hz, 1 H) 8.43 (t, $J=6.01$ Hz, 1 H) 8.75 (t, $J=5.73$ Hz, 1 H)

^{13}C NMR: 11.42, 42.38, 42.98, 59.45, 65.60, 70.02, 80.22, 116.72, 124.79, 126.94, 127.11, 127.44, 128.63, 131.93, 139.55, 140.06, 142.02, 164.69, 167.44, 171.44

4-(4,5-dihydroxy-3-methyl-6-(piperidin-1-karboxyl)-1,2-oxazinan-2-yl)-3-nitrobenzamid [7 (3;1;1)]



Jako výchozí látka byl použit imobilizovaný derivát **6 (3;1;1)**.

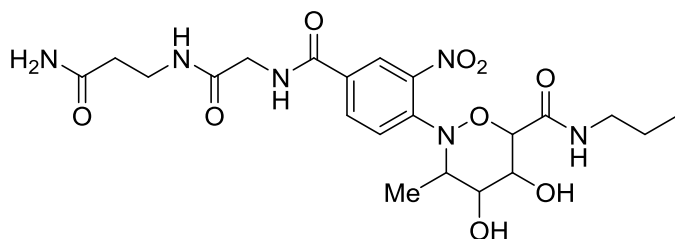
MS m/z pro C₁₈H₂₄N₄O₇: vypočteno 408,16; nalezeno 409 [M+1]⁺. Výtěžek 41 %.

¹H NMR (500 MHz, DMSO-*d*₆) δ ppm 1.08 (d, *J*=6.87 Hz, 3 H) 1.38 – 1.61 (m, 6 H) 3.33 - 3.42 (m, 2 H) 3.45 - 3.51 (m, 2 H) 3.76 (m, 1 H) 3.87 - 3.92 (m, 1 H) 4.07 (br. s., 1 H) 4.82 (d, *J*=9.16 Hz, 1 H) 5.01 (d, *J*=6.87 Hz, 1 H) 5.04 (d, *J*=4.01 Hz, 1 H) 7.22 (d, *J*=8.59 Hz, 1 H) 7.41 (br. s., 1 H) 7.96 (dd, *J*=8.88, 2.00 Hz, 1 H) 8.00 (br. s., 1 H) 8.05 (d, *J*=2.29 Hz, 1 H)

¹³C NMR*: 11.55, 24.61, 25.91, 26.38, 42.91, 46.84, 59.49, 66.07, 70.30, 124.59, 131.94, 141.95, 165.66, 166.02

*Z důvodu nízké intenzity nejsou patrné všechny uhlíkové signály

2-(4-((2-((3-amino-3-oxopropyl)amino)-2-oxoethyl)karbamoyl)-2-nitrofenyl)-4,5-dihydroxy-3-methyl-N-propyl-1,2-oxazinan-6-karboxamid [7 (4;1;3)]



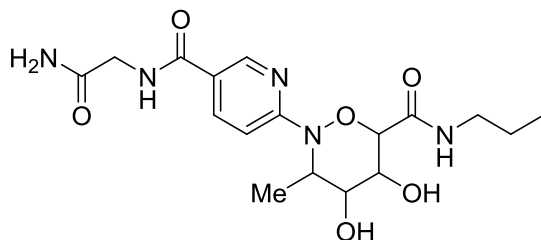
Jako výchozí látka byl použit imobilizovaný derivát **6 (4;1;3)**.

MS m/z pro C₂₁H₃₀N₆O₉: vypočteno 510,21; nalezeno 511 [M+1]⁺. Výtěžek 46 %.

¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ ppm 0.83 (t, *J*=7.33 Hz, 3 H) 1.11 (d, *J*=6.41 Hz, 3 H) 1.33 - 1.45 (m, 2 H) 2.19 (t, *J*=7.10 Hz, 2 H) 2.94 - 3.04 (m, 2 H) 3.21 (q, *J*=6.87 Hz, 2 H) 3.69 - 3.73 (m, 1 H) 3.77 (d, *J*=5.95 Hz, 2 H) 3.85 (dd, *J*=9.62, 3.21 Hz, 1 H) 4.09 (dd, *J*=6.41, 2.75 Hz, 1 H) 4.26 (d, *J*=9.16 Hz, 1 H) 6.79 (br. s., 1 H) 7.23 (d, *J*=9.16 Hz, 1 H) 7.29 (br. s., 1 H) 7.82 (t, *J*=5.72 Hz, 1 H) 7.89 - 7.98 (m, 2 H) 8.09 (d, *J*=1.83 Hz, 1 H) 8.82 (t, *J*=5.95 Hz, 1 H)

¹³C NMR: 11.45, 11.84, 22.78, 35.45, 35.72, 40.72, 43.17, 59.44, 65.41, 70.00, 80.09, 116.73, 124.70, 126.80, 131.85, 140.10, 142.07, 164.72, 167.03, 169.24, 173.06

2-(5-((2-amino-2-oxoethyl)karbamoyl)pyridin-2-yl)-4,5-dihydroxy-3-methyl-N-propyl-1,2-oxazinan-6-karboxamid [7 (2;2;3)]



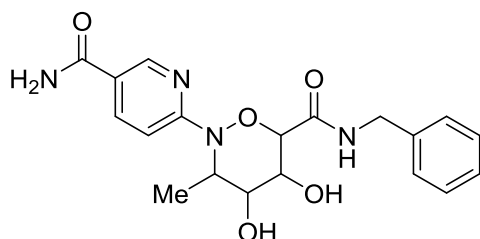
Jako výchozí látka byl použit imobilizovaný derivát **6 (2;2;3)**.

MS m/z pro C₁₇H₂₅N₅O₆: vypočteno 395,18; nalezeno 396 [M+1]⁺. Výtěžek 19%.

¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ ppm 0.84 (t, *J*=7.56 Hz, 3 H) 1.09 - 1.13 (m, 3 H) 1.40 - 1.47 (m, 2 H) 3.03 - 3.10 (m, 2 H) 3.73 - 3.76 (m, 3 H) 3.98 (dd, *J*=9.62, 3.21 Hz, 1 H) 4.30 (d, *J*=10.08 Hz, 1 H) 4.80 (dd, *J*=7.10, 2.52 Hz, 1 H) 6.86 (d, *J*=8.70 Hz, 1 H) 7.00 (s, 1 H) 7.35 (br. s., 1 H) 8.02 - 8.06 (m, 1 H) 8.28 (t, *J*=5.50 Hz, 1 H) 8.58 (t, *J*=5.95 Hz, 1 H) 8.63 (d, *J*=1.83 Hz, 1 H)

¹³C NMR: 11.88, 13.22, 22.70, 40.84, 42.77, 57.12, 65.37, 69.86, 79.03, 107.17, 121.05, 137.54, 148.29, 161.23, 165.50, 167.43, 171.68

N-benzyl-2-(5-karbamoylpyridin-2-yl)-4,5-dihydroxy-3-methyl-1,2-oxazinan-6-karboxamid [7 (3;2;2)]



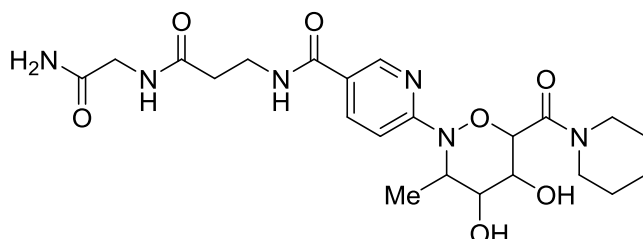
Jako výchozí látka byl použit imobilizovaný derivát **6 (3;2;2)**.

MS m/z pro C₁₉H₂₂N₄O₅: vypočteno 386,16; nalezeno 387 [M+1]⁺. Výtěžek 26 %.

¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ ppm 1.11 - 1.15 (m, 3 H) 3.76 (t, *J*=2.86 Hz, 1 H) 4.04 (dd, *J*=9.85, 3.21 Hz, 1 H) 4.28 - 4.43 (m, 3 H) 4.82 (m, 1 H) 6.88 (dd, *J*=8.70, 0.69 Hz, 1 H) 7.18 - 7.34 (m, 7 H) 7.83 (br. s., 1 H) 8.01 - 8.05 (m, 1 H) 8.62 (dd, *J*=2.29, 0.69 Hz, 1 H) 8.83 (t, *J*=6.07 Hz, 1 H)

^{13}C NMR: 13.29, 42.49, 57.09, 65.36, 69.86, 79.03, 107.14, 121.15, 127.31, 127.56, 128.82, 137.72, 139.56, 148.47, 161.23, 166.95, 167.67

***N*-(3-((2-amino-2-oxoethyl)amino)-3-oxopropyl)-6-(4,5-dihydroxy-3-methyl-6-(piperidin-1-karbonyl)-1,2-oxazinan-2-yl)nikotinamid 7 (5;2;1)**



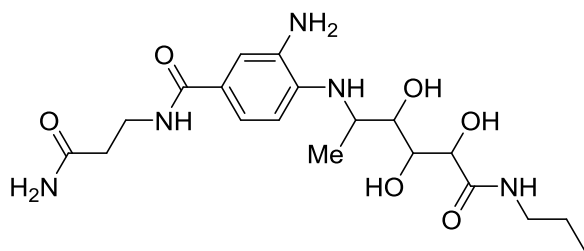
Jako výchozí látka byl použit imobilizovaný derivát **6 (5;2;1)**.

MS m/z pro $\text{C}_{22}\text{H}_{32}\text{N}_6\text{O}_7$: vypočteno 492,23; nalezeno 493 $[\text{M}+1]^+$. Výtěžek 16 %.

^1H NMR (400 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) δ ppm 1.05 (d, $J=6.87$ Hz, 3 H) 1.43 – 1.49 (m, 2 H) 1.51 - 1.60 (m, 4 H) 2.37 (t, $J=7.10$ Hz, 2 H) 3.38 - 3.61 (m, 10 H) 3.77 (t, $J=2.75$ Hz, 1 H) 4.08 (dd, $J=9.62, 3.21$ Hz, 1 H) 4.74 - 4.80 (m, 2 H) 6.85 (d, $J=8.70$ Hz, 1 H) 7.02 (br. s., 1 H) 7.29 (br. s., 1 H) 8.01 (dd, $J=8.93, 2.06$ Hz, 1 H) 8.10 (t, $J=5.72$ Hz, 1 H) 8.38 (t, $J=5.50$ Hz, 1 H) 8.60 (d, $J=1.83$ Hz, 1 H)

^{13}C NMR: 12.70, 24.55, 25.83, 27.02, 35.91, 36.42, 42.39, 42.91, 46.60, 57.72, 65.08, 70.01, 74.88, 107.74, 121.84, 137.51, 148.10, 161.26, 165.05, 165.21, 171.38, 171.70

3-amino-*N*-(3-amino-3-oxopropyl)-4-((3,4,5-trihydroxy-6-oxo-6-(propylamino)hexan-2-yl)amino)benzamid [8 (1;3;3)]



Promytá pryskyřice **7 (1;1;3)** byla smíchána s roztokem $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$ (6 mmol), K_2CO_4 (4,2 mmol) a ethylviologen diiodidem (10 mol %) ve směsi DCM (5 ml) a H_2O (5 ml). Reakční směs byla třepána 24h za pokojové teploty. Reakce byla promyta 3×DCM, 3× H_2O , 3×DMF a 3×DCM. Z důvodu nedoreagování byl postup zopakován ještě jednou.

MS m/z pro $\text{C}_{19}\text{H}_{31}\text{N}_5\text{O}_6$: vypočteno 425,23; nalezeno 426 $[\text{M}+1]^+$. Výtěžek 9 %.

^1H NMR (400 MHz, DMSO- d_6) δ ppm 0.78 (t, $J=7.44$ Hz, 3 H) 1.02 (d, $J=6.41$ Hz, 3 H) 1.33 - 1.40 (m, 2 H) 2.26 (t, $J=7.21$ Hz, 3 H) 2.94 - 3.04 (m, 2 H) 3.28 - 3.36 (m, 4 H) 3.57 (dd, $J=9.16, 2.29$ Hz, 1 H) 3.71 - 3.83 (m, 3 H) 4.06 (d, $J=2.52$ Hz, 1 H) 4.49 (d, $J=7.79$ Hz, 1 H) 6.36 (d, $J=8.47$ Hz, 1 H) 6.78 (br. s., 1 H) 6.97 - 7.06 (m, 3 H) 7.31 (br. s., 1 H) 7.45 (t, $J=5.95$ Hz, 1 H) 7.86 (t, $J=5.38$ Hz, 1 H)

6. ZÁVĚR

Tato diplomová práce se zabývala deriváty 1,2-oxazinu, jejich syntézou, metodami přeměny, identifikací a chirální analýzou.

Teoretická část práce shrnula syntetické metody vedoucí k 1,2-oxazinům, dihydro 1,2-oxazinům a 1,2-oxazinanům. Dále popsala metody přeměny 1,2-oxazinových derivátů, a to reakce využívající přítomnost dvojných vazeb a reakce založené na štěpení N-O a C-O vazeb. Na závěr se zaměřila na biologickou aktivitu 1,2-oxazinových derivátů.

Experimentální část se zabývala optimalizací syntetické cesty a syntézou modelové knihovny derivátů oxazinu pomocí syntézy na pevné fázi a kombinatoriální chemie. Optimalizace reakční cesty vycházela z již popsané syntézy derivátů **5 (3;1)** a **5 (3;2)**⁴⁵. Prvním možným krokem byla tvorba aminokyselinového linkeru. Zde bylo zjištěno, že čas dostačující pro navázání aminokyseliny na Rinkovu pryskyřici **1** je 1 hodina. Pro syntézu modelové knihovny byly zvoleny aminokyseliny β -alanin a glycin za tvorby derivátů **2 (1)** a **2 (2)** a dipeptidy β -Ala-Gly a Gly- β -Ala za tvorby derivátů **2 (4)** a **2 (5)**. Druhá aminokyselina byla navázána podle stejného postupu jako první. Následovalo navázání kyseliny 4-fluoro-3-nitrobenzoové za vzniku derivátů **3 (R¹;1)** a kyseliny 6-fluoronikotinové za vzniku derivátů **3 (R¹;2)**. Reakční doba potřebná pro tento krok byla opět zkrácena na 1 hodinu. Dalším krokem byla substituce atomu fluoru hydroxylaminem. Podmínky pro tvorbu nitro derivátů **4 (R¹;1)** a pyridinových derivátů **4 (R¹;2)** se v tomto kroku liší. Deriváty **4 (R¹;1)** vznikly reakcí s hydroxylamin hydrochloridem v pyridinu při pokojové teplotě za dobu 17 h. Deriváty **4 (R¹;2)** byly připraveny reakcí s hydroxylamin hydrochloridem v dimethylsulfoxidu za přítomnosti báze DBU při 75°C za dobu 24 h. V tomto kroku nastalo několik problémů s reprodukovatelností a univerzálností reakce, které se však podařilo odstranit, zejména díky použití DBU jako báze. Následovala tvorba 1,2-oxazinů **5 (R¹;X)** pomocí HDA reakce. Oxidace hydroxylaminové skupiny probíhala *in situ* a byla následovaná okamžitou HDA reakcí s kyselinou sorbovou. Reakce byla u konce již po třech hodinách. Další reakcí byla již tvorba prvních finálních sloučenin, kdy docházelo k tvorbě amidů **6 (R¹;X;R²)**. Aby se zachovala univerzálnost tohoto kroku, byl reakční čas stanoven na 24 h. V tomto kroku však byla zjištěna určitá limitace building blocku. Část těchto látek byla přeměněna na další sérii finálních látek dihydroxy 1,2-oxazinany **7 (R¹;X;R²)**. Bylo zjištěno, že pro kompletní konverzi těchto derivátů, je potřebné v průběhu reakce vyměnit reakční roztok. Deriváty **8 (R¹;X;R²)** se podle původně navržených reakčních

podmínek připravit nepodařilo, ale byla navržena alternativní možnost přípravy. Byla vyzkoušena redukce nitro skupiny za požadovaného vzniku derivátů **6** ($R^1;3;R^2$) a **7** ($R^1;3;R^2$). Tyto deriváty se však připravit nepodařilo, jelikož vedle redukce nitro skupiny docházelo ke štěpení N-O vazby oxazinového cyklu. Podařilo se tak izolovat derivát **8** ($1;3;3$).

Podle takto upraveného postupu byla připravena modelová knihovna obsahující sedm derivátů **6** ($R^1;X;R^2$) a sedm derivátů **7** ($R^1;X;R^2$). Na příkladu látek **6** ($5;2;1$) a **7** ($1;1;3$) byla provedena identifikace struktur pomocí 1D a 2D NMR experimentů.

Dále se tato část věnovala chirální separaci těchto derivátů pomocí HPLC a SFC metody. Pro nalezení podmínek pro chirální separaci bylo zvoleno šest látek. Pomocí HPLC metody se podařilo rozdělit pouze pět látek a čas potřebný k jedné analýze byl až 50 minut. Oproti tomu pomocí SFC se podařilo rozdělit všechny látky a čas potřebný k analýze byl maximálně 6 minut. SFC tak představuje rychlou a efektivní metodu pro chirální separace, což je důležité pro budoucí studium stereoselektivních syntéz těchto derivátů, kdy bude třeba provádět celou řadu analýz z důvodu optimalizace podmínek.

7. LITERATURA

1. Uchida, I.; Takase, S.; Kayakiri, H.; Kiyoto, S.; Hashimoto, M.; Tada, T.; Koda, S.; Morimoto, Y. Structure of FR 900482, a Novel Antitumor Antibiotic from a Streptomyces. *J. Am. Chem. Soc.* **1987**, 109, 4108-4109.
2. Terano, H.; Takase, S.; Hosoda, J.; Kohsaka, M. A New Antitumor Antibiotic FR-66979. *J. Antibiot.* **1989**, 42, 145-148.
3. D'Andrea, S.; Zheng, Z. B.; DenBleyker, K.; Fung-Tomc, J. C.; Yang, H.; Clark, J.; Taylor, D.; Bronson, J. Synthesis and antibacterial activity of dihydro-1,2-oxazine and 2-pyrazoline oxazolidinones: novel analogs of linezolid. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2005**, 15, 2834–2839.
4. Yang, B.; Zhu, Z. C.; Goodson, H. V.; Miller, M. J. Syntheses and biological evaluation of ring-C modified colchicine analogs. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2010**, 20, 3831-3833.
5. Harrison, A.; Melchionna, M.; Franco, P.; Hlavac J. Solid-phase synthesis and analysis of 3,6-dihydro-2H-1,2-oxazines in their stereo- and regioisomer mixtures. *New J. Chem.* **2014**, 38, 5491-5499.
6. Yahya, R. K.; Kudva, N. U. N.; Rai, K. M. L. Synthesis of Derivatives of 6H-1,2-Oxazine by Cyclization of Ketoximes With Derivatives of Terminal Acetylene Compounds. *Int. J. Chem.* **2014**, 6, 26-34.
7. Homann, K.; Angermann, J.; Collas, M.; Zimmer, R.; Reissig, H. U. Synthesis of 6-Ethoxy-6H-1,2-oxazines by Hetero Diels–Alder Reaction of 1-Bromo-2-ethoxyethene with α -Nitroso Alkenes. *J. prakt. Chem.* **1998**, 340, 649-655.
8. Salah El-Din, A. M. Pyridazine, Oxazine, Pyrrole, and Pyrrolo[1,2-a]quinazoline Derivatives from Malononitrile Dimer. *Heteroatom Chem.* **2003**, 14, 612–616.
9. Fadda, A. A.; Mukhtar, M. M.; Refat, H. M. Utility of Activated Nitriles in the Synthesis of Some New Heterocyclic Compounds. *Am. J. Org. Chem.* **2012**, 2 (2), 32-40.
10. Abramovitch, R. A.; Dupuy, C. Photolysis of 2 -Azidopyridine 1 -Oxides. A Convenient Synthesis of 1,2 - Oxazines. *J. Chem. Soc., Chem. Commun.* **1981**, 36-37.
11. Bodnar, B. S.; Miller, M. J. The Nitrosocarbonyl Hetero-Diels–Alder Reaction as a Useful Tool for Organic Syntheses. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2011**, 50, 5630-5647.
12. Yang, K. Y.; Tae, J. Synthesis of Heterocycles Containing an N-O Bond by Ring-Closing Metathesis of Dienes Tethered by Hydroxylamine. *Synlett.* **2003**, 7, 1043-1045.

13. Kumarn, S.; Oelke, A. J.; Shaw, D. M.; Longbottom, D. A.; Ley, S. V. A sequential enantioselective, organocatalytic route to chiral 1,2-oxazines and chiral pyridazines. *Org. Biomol. Chem.* **2007**, *5*, 2678–2689.
14. Shade, W.; Reissig, H. U. A New Diastereoselective Synthesis of Enantiomerically Pure 1,2-Oxazine Derivatives by Addition of Lithiated Methoxyallene to Chiral Nitrones. *Synlett.* **1999**, *5*, 632-634.
15. Sukhorukov, A. Y.; Nirvanappa, A. C.; Swamy, J.; Ioffe, S. L.; Swamy, S. N.; Basappa; Rangappa, K. Synthesis and characterization of novel 1,2-oxazine-based small molecules that targets acetylcholinesterase. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2014**, *24*, 3618-3621.
16. El-Sayed, R.; Wasfy, A. A. F.; Aly, A. A. A. Synthesis of Novel Heterocycles with Antimicrobial and Surface Activity. *J. Heterocyclic Chem.* **2005**, *42*, 125-130.
17. Karapetyan, V.; Mkrtchyan, S.; Dang, T. T.; Villiger, A.; Reinke, H.; Langer, P. Regioselective synthesis of 6-halomethyl-5,6-dihydro-4H-1,2-oxazines based on cyclizations of arylalkenyl-oximes. *Tetrahedron.* **2008**, *64*, 8010–8015.
18. Young, I. S. a Kerr, M. A. A Homo [3+2] Dipolar Cycloaddition: The Reaction of Nitrones with Cyclopropanes. *Angew. Chem.,Int. Ed.* **2003**, *26*, 3023-3026.
19. Ganton, M. D. a Kerr, M. A. Magnesium Iodide Promoted Reactions of Nitrones with Cyclopropanes: A Synthesis of Tetrahydro-1,2-oxazines. *J. Org. Chem.* **2004**, *69*, 8554-8557.
20. Young, I. S. a Kerr, M. A. Three-Component Homo 3+2 Dipolar Cycloaddition. A Diversity-Oriented Synthesis of Tetrahydro-1,2-oxazines and FR900482 Skeletal Congeners. *Org. Lett.* **2004**, *6*, 139-141.
21. Tiecco, M.; Testaferri, L.; Bagnoli, L. Alkenyl Nitrones Cyclizations Induced by Phenylselenenyl Bromide. A Convenient Synthetic Route to 1,2-Oxazines. *Tetrahedron.* **1996**, *52* (19), 6811-6822.
22. Lu, M.; Zhu, D.; Lu, Y.; Hou, Y.; Tan, B., Zhong G. Organocatalytic Asymmetric-Aminoxylation/Aza-Michael Reactions for the Synthesis of Functionalized Tetrahydro-1,2-oxazines. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2008**, *47*, 10187 –10191.
23. Quin; L. D. a Roof, G. L. Rearrangement of 1-Methyl-2-arylpyrrolidine N-Oxides to Tetrahydro-2-methyl-6-aryl-2H-1,2-oxazines. *J. Org. Chem.* **1962**, *27*, 4451-4454.
24. Zimmer, R.; Homann, K.; Angermann, J.; Reissig, R. U. Stereoselective Preparation of 4,5-Dihydroxy-5,6-dihydro-4H-1,2-oxazines and Their Derivatives. *Synthesis.* **1999**, *7*, 1223-1235.

25. Buchholz, M. a Reissig, R. U. Highly Stereoselective and Flexible Synthesis of 6-Alkoxy-5,6-dihydro-4H-1,2-oxazines by Conjugate Addition of Organolithium Compounds to 6H-1,2-Oxazines Followed by Trapping with Electrophiles. *Synthesis*. **2002**, 10, 1412-1422.
26. Behr, J. B.; Chevrier, C.; Defoin, A.; Tarnus, C.; Streith, J. Asymmetric synthesis of potent glycosidase and very potent α -mannosidase inhibitors: 4-amino-4-deoxy-L-erythrose and 4-amino-4,5-dideoxy-L-ribose. *Tetrahedron*. **2003**, 59, 543-553.
27. Patel, S. K.; Murat, K.; Py, S.; Vallée, Y. Asymmetric Total Synthesis and Stereochemical Elucidation of the Antitumor Agent PM-94128. *Org. Letters*. **2003**, 5 (22), 4081-4084.
28. Pulz, R.; Al-Harrasi, A.; Reissig, H. U. New Polyhydroxylated Pyrrolidines Derived from Enantiopure 3,6-Dihydro-2H-1,2-oxazines. *Org. Letters*. **2002**, 4 (14), 2353-2355.
29. Yamamoto, Y. a Yamamoro, H. Catalytic Asymmetric Nitroso-Diels–Alder Reaction with Acyclic Dienes. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2005**, 44, 7082-7085.
30. Al-Harrasi, A. a Reissig, R. U. Ring Enlargement of Enantiopure 1,2-Oxazines to 1,2-Oxazepine Derivatives and Their Palladium-Catalyzed Couplings. *Synlett*. **2005**, 15, 2376-2378.
31. Helms, M. a Reissig, H. U. Ozonolyses of Enantiopure 4-Alkoxy-3,6-dihydro-2H-1,2-oxazines: An Expedient Route to Functionalized α -Amino- β -hydroxy Esters. *Eur. J. Org. Chem.* **2005**, 998-1001.
32. Miyabe, H.; Moriyama, K.; Takemoto, Y. Regio- and Enantioselective Allylic Substitution with Less Active N- or O-Nucleophiles Catalyzed by Iridium-Complex of Bis(oxazoliny)pyridine. *Chem. Pharm. Bull.* **2011**, 59 (6), 714-720.
33. Lin, H.; Sun, X. W.; Lin, G. Q. Dual-Organocatalyst-Promoted Asymmetric Cascade Reaction: Highly Efficient Construction of Enantiopure Fully Substituted Tetrahydro-1,2-oxazines. *Org. Letters*. **2014**, 16, 752-755.
34. Monbaliu, J. Ch. a Brynaet, J. M. [4+2] Cycloaddition of 1-phosphono-1,3-butadiene with azo- and nitroso-heterodienophiles. *Tetrahedron Letters*. **2008**, 49, 1839-1842.
35. Jasiński, M.; Watanabe, T.; Reissig, H. U. Samarium Diiodide Promoted Reduction of 3,6-Dihydro-2H-1,2-oxazines: Competition of 1,4-Amino Alcohol Formation and Ring Contraction to Pyrrole. *Eur. J. Org. Chem.* **2013**, 605-610.
36. Le Flohic, A.; Meyer, Ch.; Cossy, J.; Desmurs, J. R. Synthesis of unsaturated [1,2]oxazines by using sigmatropic rearrangements and the ring-closing metathesis reaction. *Tetrahedron Lett.* **2003**, 44, 8577-8580.

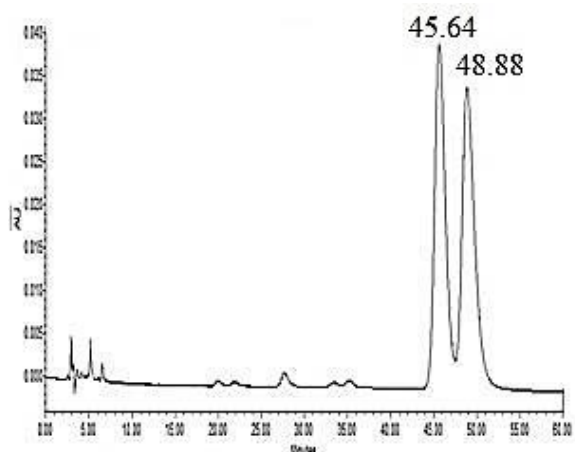
37. Krchňák, V.; Moellman, U.; Dahse, H. M.; Miller M. J. Solid-Supported Nitroso Hetero-Diels–Alder Reactions. 3. Acid-Mediated Transformation of Cycloadducts by Scission of the Oxazine C-O Bonds. *J. Comb. Chem.* **2008**, 10, 112-117.
38. Tabolin, A. A.; Lesiv, A. V.; Khomutova, Y. A.; Ioffe, S. L. Synthesis of α -Prolinols and 2-Amino-1,5-diols from Primary Nitroalkanes and Other Simple Precursors via Intermediacy of 5,6-Dihydro-4H-1,2-oxazines. *Synthesis*. **2012**, 44, 1898-1906.
39. Rajski, S. R. a Williams R. M. DNA Cross-Linking Agents as Antitumor Drugs. *Chem. Rev.* **1998**, 98 (8), 2723-2795.
40. Brulíková, L.; Hlaváč, J.; Hradil, P. DNA Interstrand Cross-Linking Agents and their Chemotherapeutic Potential. *Current Med. Chem.* **2012**, 19, 364-385.
41. Taketo, M. M. Cyclooxygenase-2 Inhibitors in Tumorigenesis (Part I). *J. Natl. Cancer Inst.* **1998**, 90, 1529-1536.
42. Miller, C. R.; Oliver, K. E.; Farley, J. H. MEK1/2 inhibitors in the treatment of gynecologic malignancies. *Gynecologic Oncology*. **2014**, 13, 128-137.
43. Manjula, M. K.; Rai, K. M. L.; Gaonkar, S. L.; Raveesha, K. A.; Satish, S. Synthesis of new series of 5,6-dihydro-4H-1,2-oxazines via hetero DielsAlder reaction and evaluation of antimicrobial activity. *Eur. J. Med. Chem.* **2009**, 44, 280-288.
44. Toy, P. H. a Lam, Y. Solid-Phase Organic Synthesis: Concepts, Strategies, and Applications. John Wiley & Sons, Inc., **2012**. ISBN: 978-0-470-59914-3.
45. Krchňák, V.; Moellmann, U.; Dahse, H. M.; Miller, M. J. Solid-Supported Nitroso Hetero Diels–Alder Reactions. 2. Arylnitroso Dienophiles: Scope and Limitations. *J. Comb. Chem.* **2008**, 10, 104-111.
46. Kaplánek, R. a Krchňák, V. Fast and effective reduction of nitroarenes by sodium dithionite under PTC conditions: application in solid-phase synthesis. *Tetrahedron Lett.* **2013**, 54, 2600-2603.

8. PŘÍLOHY

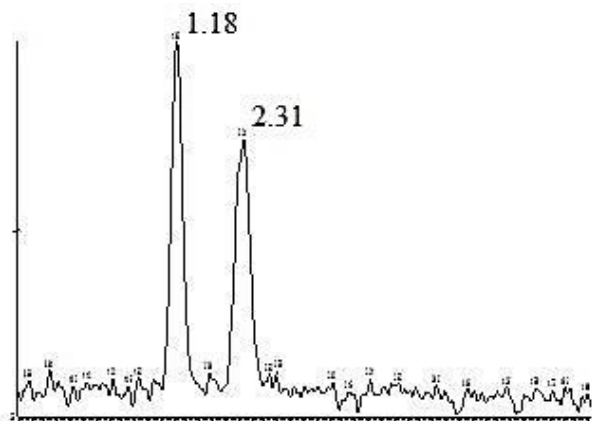
Seznam příloh

Příloha 1: Záznamy chromatogramů látky 6 (1;1;3)	86
Příloha 2: Záznamy chromatogramů látky 6 (3;1;1)	87
Příloha 3: Záznamy chromatogramů látky 7 (1;1;3)	88
Příloha 4: Záznamy chromatogramů látky 7 (4;1;3)	89

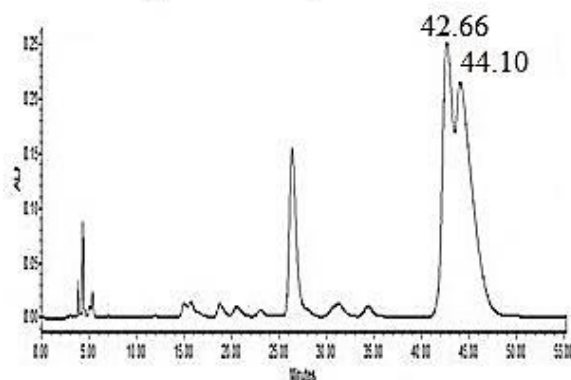
Příloha 1: Záznamy chromatogramů látky 6 (1;1;3)



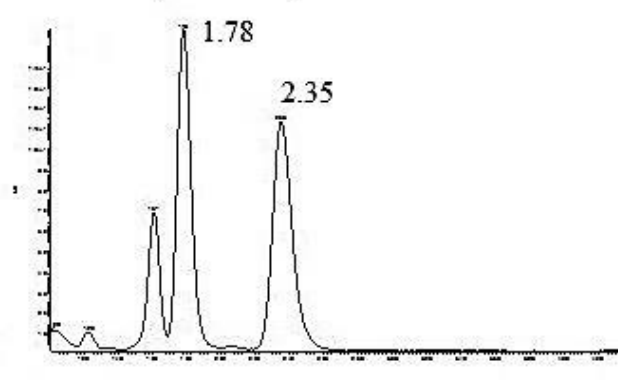
chromatogram z HPLC, čistá látka



chromatogram z SFC, čistá látka



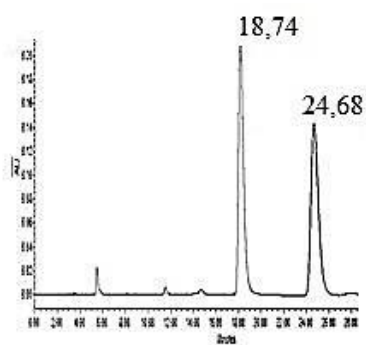
chromatogram z HPLC, surová směs



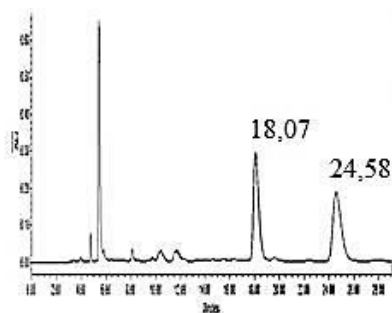
chromatogram z SFC, surová směs

Rozlišení a separační faktory pro HPLC jsou uvedeny v tabulce (Tab. 19). Rozlišení pro SFC jsou uvedeny v tabulce (Tab. 20).

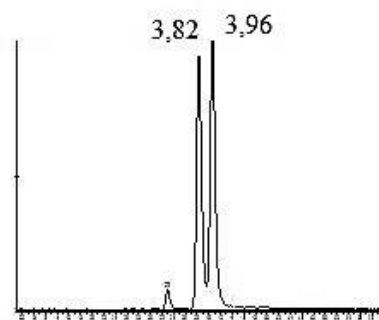
Příloha 2: Záznamy chromatogramů látky 6 (3;1;1)



chromatogram z HPLC,
čistá látka



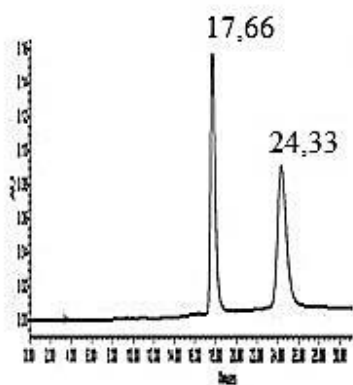
chromatogram z HPLC,
surová směs



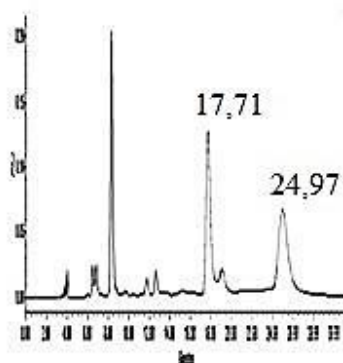
chromatogram z SFC,
čistá látka

Rozlišení a separační faktory pro HPLC jsou uvedeny v tabulce (Tab. 19). Rozlišení pro SFC jsou uvedeny v tabulce (Tab. 20).

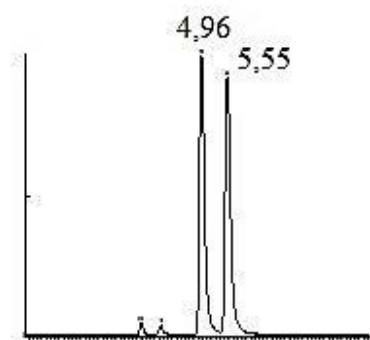
Příloha 3: Záznamy chromatogramů látky 7 (1;1;3)



chromatogram z HPLC,
čistá látka



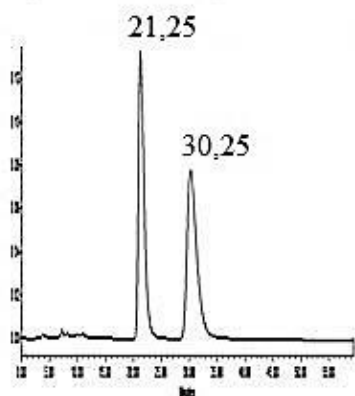
chromatogram z HPLC,
surová směs



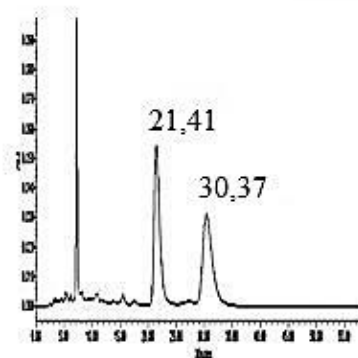
chromatogram z SFC,
čistá látka

Rozlišení a separační faktory pro HPLC jsou uvedeny v tabulce (Tab. 19). Rozlišení pro SFC jsou uvedeny v tabulce (Tab. 20).

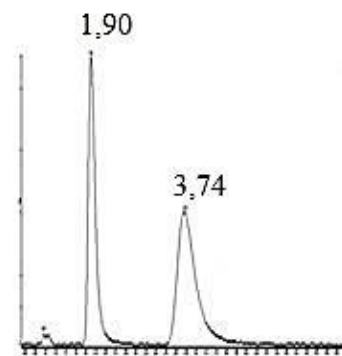
Příloha 4: Záznamy chromatogramů látky 7 (4;1;3)



chromatogram z HPLC,
čistá látka



chromatogram z HPLC,
surová směs



chromatogram z SFC,
čistá látka

Rozlišení a separační faktory pro HPLC jsou uvedeny v tabulce (*Tab. 19*). Rozlišení pro SFC jsou uvedeny v tabulce (*Tab. 20*).