

Univerzita Palackého v Olomouci

Přírodovědecká fakulta

Katedra organické chemie



**SYNTÉZA NOVÝCH DERIVÁTŮ  
BENZO[1,4]-DIAZEPIN-5-ONŮ NA PEVNÉ FÁZI**

*Bakalářská práce*

Autor:	Petra Králová
Studijní program:	Chemie
Studijní obor:	Bioorganická chemie
Typ studia:	Prezenční
Vedoucí práce:	doc. RNDr. Miroslav Sural, Ph.D.

Olomouc 2014

Prohlašuji, že bakalářskou práci jsem vypracovala samostatně pod odborným dohledem doc. RNDr. Miroslava Sourala, Ph.D. a veškeré literární prameny a informace cituji v seznamu použité literatury.

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

V Olomouci dne 9. 5. 2014

.....

Na tomto místě bych ráda poděkovala vedoucímu mé bakalářské práce, panu doc. RNDr. Miroslavu Suralovi, Ph.D., za vřelou spolupráci, odborné vedení a trpělivost při zpracování bakalářské práce. Dále děkuji Mgr. Veronice Fülöpové, Mgr. Barboře Lemrové, Ph.D., a celému Ústavu molekulární a translační medicíny Lékařské fakulty Univerzity Palackého v Olomouci za pomoc při práci v laboratoři a za příjemné pracovní podmínky.

**Bibliografická identifikace:****Jméno a příjmení autora:** Petra Králová**Název práce:** Syntéza nových derivátů benzo[1,4]-diazepin-5-onů na pevné fázi**Typ práce:** Bakalářská**Pracoviště:** Ústav molekulární a translační medicíny Lékařské fakulty Univerzity Palackého v Olomouci**Vedoucí práce:** doc. RNDr. Miroslav Soural, Ph.D.**Rok obhajoby práce:** 2014**Abstrakt:**

Tato práce pojednává o přípravě nových derivátů benzo[1,4]-diazepin-5-onů se substituenty v poloze 2- a 4- pomocí syntézy na pevné fázi. Výchozími látkami pro přípravu cílových sloučenin jsou přírodní  $\alpha$ -aminokyseliny, bromacetofenony a nitrobenzoová kyselina. Teoretická část je věnována v literatuře popsaným metodám syntézy cílových derivátů a příbuzných sloučenin a studiu jejich biologické aktivity. V diskusní části je shrnuta problematika týkající se přípravy cílových sloučenin. V experimentální části práce jsou uvedeny všechny obecné postupy příprav a izolace těchto derivátů a analytická data. Poslední část je pak věnována shrnutí výsledků a jejich vyhodnocení.

**Klíčová slova:** benzo[1,4]-diazepin-5-on, syntéza na pevné fázi,  $\alpha$ -aminokyselina, haloketon, nitrobenzoová kyselina, dithioničitan sodný, dihydrát chloridu cínatého**Počet stran:** 76**Jazyk:** Čeština

**Bibliographical identification:****Author's first name and surname:** Petra Kralova**Title:** Solid-Phase Synthesis of Some Novel Benzo[1,4]-Diazepin-5-one Derivates**Type of thesis:** Bachelor**Department:** Institute of Molecular and Translational Medicine Faculty of Medicine and Dentistry Palacky University Olomouc**Supervisor:** Doc. RNDr. Miroslav Soral, Ph.D.**The year of presentation:** 2014**Abstract:**

This Bachelor thesis deals with the preparation of new derivatives of benzo[1,4]-diazepin-5-ones with various substituents in position 2- and 4- by solid phase synthesis. The starting material for the preparation of target compounds is natural  $\alpha$ -amino acids, bromoacetophenones and nitrobenzoic acid. The Theoretical section is devoted to general information about solid-phase synthesis, hereinafter described in the literature methods of synthesis of target derivatives and related compounds and the study of their biological activity. In the Discussion there are summarized issues concerning the preparation of target compounds. Experimental section contains all general procedures for preparation and isolation of target derivatives and analytical data. The last part is devoted to a summary of the results and their evaluation.

**Keywords:** benzo[1,4]-diazepin-5-one, Solid-Phase Synthesis,  $\alpha$ -amino acids, haloketones, nitrobenzoic acids, sodium dithionite, Tin chloride dihydrate**Number of pages:** 76**Language:** Czech

## OBSAH

1. ÚVOD .....	10
2. CÍL PRÁCE .....	11
3. TEORETICKÁ ČÁST .....	12
3.1. Metody příprav vedoucí k derivátům 1,4-benzodiazepin-2-onů.....	12
3.1.1. Chlordiazepoxid .....	12
3.1.2. Oxazepam.....	12
3.1.3. Diazepam.....	13
3.1.4. Bromazepam .....	15
3.1.5. Clonazepam.....	15
3.1.6. Flunitrazepam.....	16
3.2. Metody příprav vedoucí k derivátům 1,4-benzodiazepin-5-onů.....	17
3.2.1. Roztoková chemie.....	17
3.2.1.1. 1,4-dihydro-benzo[e][1,4]-diazepin-5-ony .....	17
3.2.1.1.1. 8-chloro-1,4-dihydro-benzo[e][1,4]-diazepin-5-ony.....	17
3.2.1.1.2. 1,4-dialkyl-1,4-dihydro-benzo[e][1,4]-diazepin-5-ony.....	18
3.2.1.2. Trisubstituované 3,4-dihydro-benzo[e][1,4]-diazepin-5-ony.....	19
3.2.1.2.1. Cyklizace 2-amino- <i>N</i> -(2-oxo-2-fenyl-ethyl)-benzamidů .....	19
3.2.1.2.2. Kondenzace <i>o</i> -fenylendiaminu s $\beta$ -keto estery .....	19
3.2.1.2.3. Ugiho reakce (U-4CC) .....	20
3.2.1.2.3.1. 2-aryl-3,4-dihydro-benzo[e][1,4]-diazepin-5-ony.....	21
3.2.1.2.3.2. 2,3,4-trisubstituované 3,4-dihydro-benzo[e][1,4]-diazepin-5-ony .....	21
3.2.1.3. 1-substituované 1,2,3,4-tetrahydro-5 <i>H</i> -benzo[e][1,4]-diazepin-5-ony ..	22
3.2.1.3.1. 1-benzyl- a 1-methyl-1,2,3,4-tetrahydro-5 <i>H</i> -benzo[e][1,4]-diazepin-5-ony .....	22
3.2.1.3.2. 1-fenyl-1,2,3,4-tetrahydro-5 <i>H</i> -benzo[e][1,4]-diazepin-5-ony .....	23

3.2.1.4. 2-methylen-1-tosyl-benzo[e][1,4]-diazepin-5-ony.....	23
3.2.1.5. 5-7-6-tricyklické pyrrolo[2,1-c][1,4]-benzodiazepin-5-ony .....	24
3.2.2. Syntéza na pevné fázi.....	25
3.2.2.1. Trisubstituované 3,4-dihydro-benzo[e][1,4]-diazepin-5-ony.....	27
3.2.2.2. 1,2,3,4-tetrahydro-5H-benzo[e][1,4]-diazepin-5-ony .....	28
3.2.2.2.1. Leuckart-Wallachova redukce .....	28
3.2.2.2.2. 4,7,8-trisubstituované 1,2,3,4-tetrahydro-5H-benzo[e][1,4]-diazepin-5-ony .....	29
3.3. Vlastnosti a biologická aktivita benzodiazepinů a 1,4-benzodiazepin-2-onů.....	33
3.3.1. Chlordiazepoxid .....	33
3.3.2. Oxazepam.....	34
3.3.3. Diazepam.....	34
3.3.4. Flunitrazepam.....	35
3.3.5. Inhibitory FAK kinasy .....	35
3.3.6. Inhibitory F <sub>1</sub> F <sub>0</sub> -ATPasy .....	35
3.3.7. Inhibitory Notch receptoru .....	36
3.3.8. Inhibitory DGAT 1.....	36
3.3.9. Antikonvulzivní účinek komplexů.....	37
3.3.10. Nebenzodiazepinová hypnotika .....	37
3.4. Vlastnosti a biologická aktivita derivátů 1,4-benzodiazepin-5-onů.....	39
3.4.1. Flumazenil jako antidotum.....	39
3.4.2. Fuligocandin B (FCB) jako podnět pro zvýšení apoptosy .....	39
3.4.3. Protinádorový účinek komplexů s pyrrolo[2,1-c][1,4]-benzodiazepin-5-ony .....	40
3.4.4. Aktivita derivátů 1,2,3,4-tetrahydro-5H-benzo[e][1,4]-diazepin-5-onů.....	41
3.4.4.1. Sedativní účinek 1,2,3,4-tetrahydro-5H-benzo[e][1,4]-diazepin-5-onů	41
3.4.4.2. Odlišné účinky 1-fenyl-1,2,3,4-tetrahydro-5H-benzo[e][1,4]-diazepin-5-onu.....	41

4. VÝSLEDKY A DISKUSE .....	42
4.1. $\beta$ -alanin.....	43
4.1.1. 2-brom-4-methylacetofenon, DIEA v DMF .....	44
4.1.2. 2-brom-4-methylacetofenon, protonová houba v DMF.....	44
4.1.3. 2-brom-4-methylacetofenon, DIEA v THF.....	45
4.1.4. 2-brom-4-chlor-3-nitroacetofenon, DIEA v DMF.....	45
4.1.5. 2-brom-4-chlor-3-nitroacetofenon, protonová houba v DMF.....	45
4.1.6. 2-brom-4-chlor-3-nitroacetofenon, DIEA v THF .....	46
4.1.7. 1,3-dichloraceton, DIEA v DMF .....	46
4.2. Alanin.....	47
4.2.1. Redukce dihydrátem chloridu cínatého.....	49
4.2.2. Redukce dithioničitanem sodným.....	49
4.3. Serin .....	51
4.3.1. Oxazinový intermediát XVII vznikající po alkylaci .....	53
4.3.2. Oxazinový intermediát XX vznikající po acylaci .....	54
4.4. Fenylalanin.....	56
4.5. Valin.....	57
4.6. Threonin .....	60
5. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST.....	62
5.1. Pomůcky, chemikálie a přístrojové vybavení .....	62
5.1.1. Parametry UHPLC-MS .....	62
5.1.2. Parametry NMR .....	62
5.2. Příprava derivátů benzo[1,4]-diazepin-5-onů pomocí syntézy na pevné fázi.....	63
5.2.1. Imobilizace Fmoc aminokyseliny .....	63
5.2.1.1. Standardní štěpení a kvantifikace (stanovení loadingu).....	63
5.2.2. Deprotekce koncové amino-skupiny.....	64
5.2.3. Sulfonylace primární amino-skupiny.....	64



5.2.4. Alkylace s haloketony .....	64
5.2.5. Denosylace .....	64
5.2.6. Acylace <i>o</i> -nitrobenzoovou kyselinou.....	64
5.2.7. Redukce nitro-skupiny .....	65
5.2.7.1. Redukce chloridem cínatým.....	65
5.2.7.1.1. Extrakce tuhou fází (SPE, Solid phase extraction) .....	65
5.2.7.2. Redukce dithioničitanem sodným.....	65
5.2.8. Semipreparativní HPLC a příprava NMR vzorku.....	66
5.3. Analytická data.....	66
5.3.1. 2-(5-oxo-2- <i>p</i> -tolyl-3,5-dihydro-benzo[ <i>e</i> ][1,4]-diazepin-4-yl)-propionová kyselina (XI).....	66
5.3.2. 3-hydroxy-2-(5-oxo-2- <i>p</i> -tolyl-3,5-dihydro-benzo[ <i>e</i> ][1,4]-diazepin-4-yl)-propionová kyselina (XXI) .....	67
5.3.3. 4-(4-nitrobenzensulfonyl)-6- <i>p</i> -tolyl-3,4-dihydro-2 <i>H</i> -[1,4]-oxazin-3-karboxylová kyselina (XVII) .....	67
5.3.4. 4-(2-nitrobenzoyl)-6- <i>p</i> -tolyl-3,4-dihydro-2 <i>H</i> -[1,4]-oxazin-3-karboxylová kyselina (XX) .....	67
5.3.5. 3-methyl-2-(5-oxo-2- <i>p</i> -tolyl-3,5-dihydro-benzo[ <i>e</i> ][1,4]-diazepin-4-yl)-máselná kyselina (XXX) .....	68
5.3.6. 2-methyl-4-(4-nitrobenzensulfonyl)-6- <i>p</i> -tolyl-3,4-dihydro-2 <i>H</i> -[1,4]-oxazin-3-karboxylová kyselina (XXXV).....	68
6. ZÁVĚR .....	69
7. SEZNAM ZKRATEK.....	71
8. SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY.....	74
9. PŘÍLOHY .....	77

## 1. ÚVOD

Deriváty na bázi benzodiazepinového skeletu, tzv. benzodiazepiny (BZD) tvoří významnou skupinu terapeutik v humánní medicíně. Například v oblasti účinků na centrální nervovou soustavu (CNS) je v současné době používáno přes 30 léčiv tohoto typu. BZD zesilují působení neurotransmiterů gama-aminomáselné kyseliny (GABA) <sup>2</sup>. Mají především sedativní, hypnotický, antikonvulzivní, anxiolytický, amnestický či myorelaxační účinek <sup>2,3</sup>, a proto jsou vhodné při léčbě křečí, úzkosti, nespavosti či jako premedikace před lékařskými zákroky <sup>4</sup>. Krátkodobě se předepisují pacientům trpícím nespavostí a dlouhodobě pro léčbu úzkosti <sup>2,5</sup>.

Mezi významné BZD patří deriváty benzo[1,4]-diazepin-2-onů studované pro svou biologickou aktivitu a uplatnění v medicíně. Kromě těchto derivátů byly v literatuře popsány také benzo[1,4]-diazepin-5-ony patřící mezi strukturální izomery CNS aktivních BZD (obr. 1). Biologické vlastnosti takovýchto sloučenin však nejsou téměř vůbec známé.

Základní strukturu těchto izomerních dusíkatých heterocyklů tvoří 1,4-benzodiazepinový skelet, vzniklý spojením benzenového a sedmičlenného diazepinového kruhu se dvěma atomy dusíku v polohách 1- a 4- a jednou dvojnou vazbou mezi atomy C=N v poloze 4- či poloze 1-, dle typu příslušného derivátu. Keto-skupina je lokalizovaná buď na C-2 u benzo[1,4]-diazepin-2-onů, nebo na C-5 u benzo[1,4]-diazepin-5-onů (obr. 1) <sup>2</sup>.



Obr. 1: Strukturální polohové izomery benzo[1,4]-diazepin-2-onu (a) a benzo[1,4]-diazepin-5-onu (b) s vyznačením poloh jednotlivých atomů.

Deriváty benzo[1,4]-diazepin-5-onů byly připraveny pouze několika ojedinělými syntetickými cestami, mezi které patří například aza-Wittigova reakce <sup>6</sup>, Ugiho kondenzace <sup>7</sup> či syntéza na pevné fázi <sup>1</sup>.

## 2. CÍL PRÁCE

Cílem práce je ověřit, zda dříve popsaná syntetická cesta pro přípravu derivátů benzo[1,4]-diazepin-5-onů<sup>1</sup>, využívající mimo jiné  $\beta$ -aminokyseliny jako výchozí látky, je vhodná k syntéze cílových derivátů s použitím  $\alpha$ -aminokyselin, jako substituentu v poloze 4- na atomu dusíku. Využití těchto dostupných  $\alpha$ -aminokyselin by dramaticky zvýšilo počet potenciálních cílových sloučenin, čímž by nabídlo široké portfolio látek s možnou biologickou aktivitou (schéma 1).

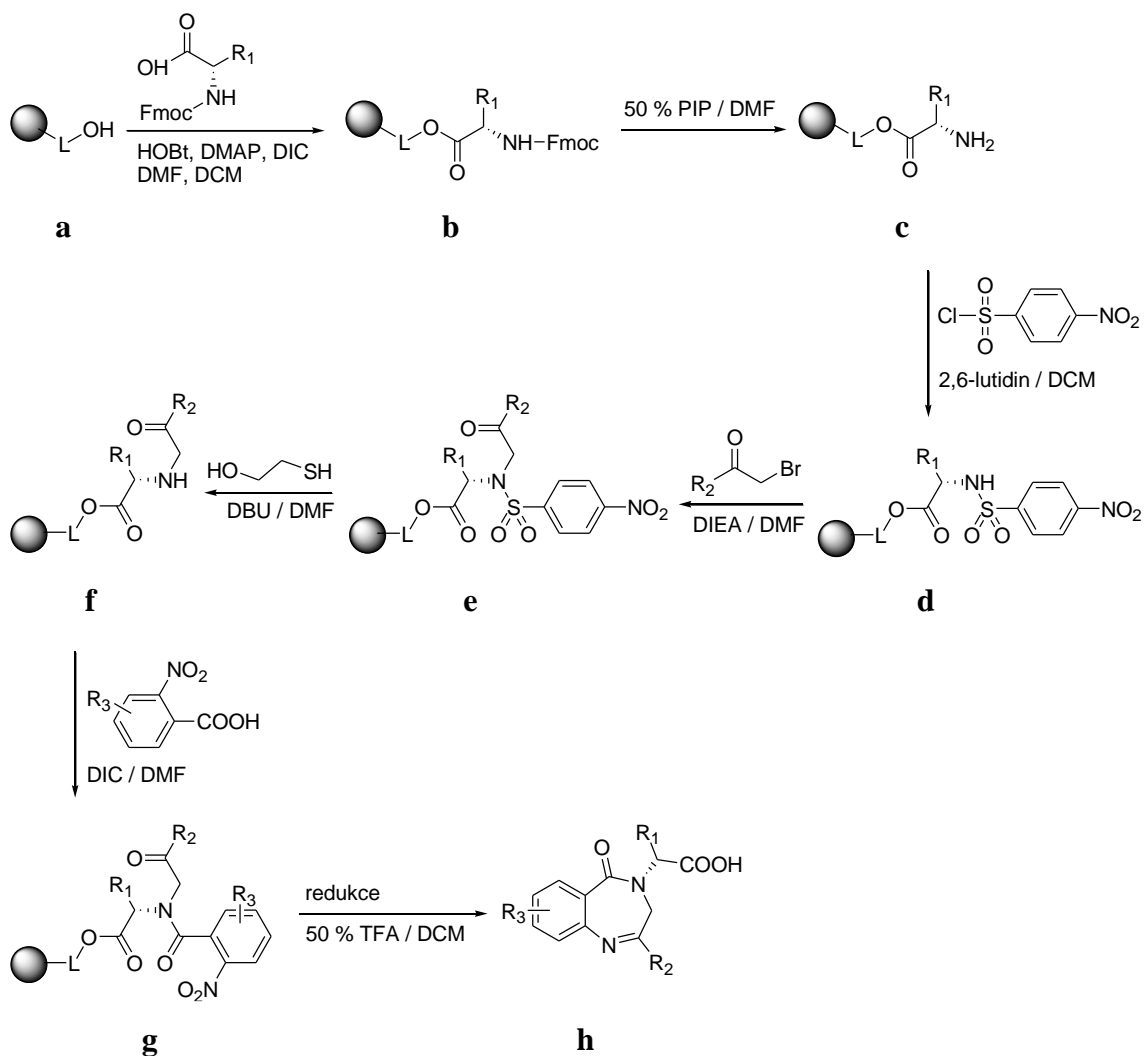


Schéma 1: Celkové schéma syntézy cílových derivátů:  $R_1$  – postranní řetězec aminokyseliny;  $R_2$  – haloketony;  $R_3$  – příslušná substituce na nitrobenzoové kyselině. Redukce je provedena dihydrátem chloridu cínatého či dithioničtanem sodným.

### 3. TEORETICKÁ ČÁST

Tato část práce stručně nastiňuje přehled syntetických cest vedoucích k vybraným derivátům, jejich vlastností a studia biologické aktivity. Kromě látek s 1,4-benzodiazepin-5-onovým skeletem jsou zde zařazeny i vybrané deriváty 1,4-benzodiazepin-2-onů, které představují významnou skupinu látek používaných v humánní medicíně. Motivací k deskripci této skupiny látek je jejich osimerie s cílovým skeletem (viz předchozí kapitola).

#### 3.1. Metody příprav vedoucí k derivátům 1,4-benzodiazepin-2-onů

##### 3.1.1. Chlordiazepoxid

Počátečním materiálem pro syntézu tohoto derivátu byl 2-amino-5-chlorobenzofenon **1** reagující s hydroxylaminem za vzniku oximu **2**, který v přítomnosti chloridu 2-chloroctové kyseliny v kyselině octové poskytoval cyklický produkt 6-chloro-2-chloromethyl-4-fenylchinazolin-3-oxid **3**. Ten reakcí s methylaminem vedl ke vzniku 7-chloro-2-methylamino-5-fenyl-3*H*-1,4-benzodiazepin-4-oxidu **4** (schéma 2) <sup>8,9</sup>.

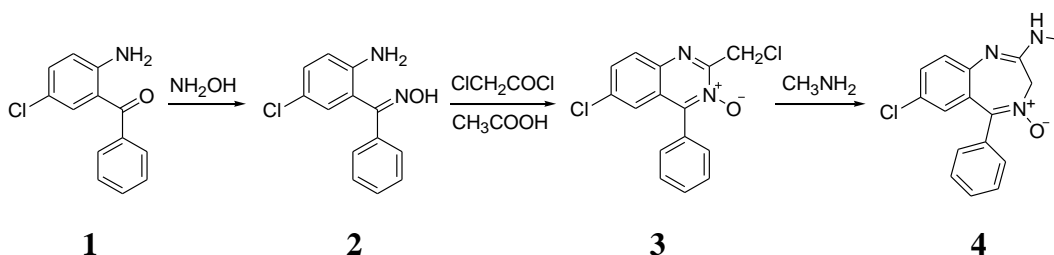


Schéma 2: Syntéza chlordiazepoxidu <sup>8,9</sup>.

##### 3.1.2. Oxazepam

Výchozí látkou pro přípravu tohoto derivátu byl cyklický produkt 6-chloro-2-chloromethyl-4-fenylchinazolin-3-oxid **3**, získaný během druhého kroku syntézy chlordiazepoxidu, který po reakci s hydroxidem sodným poskytoval intermediát 7-chloro-5-fenyl-1,2-dihydro-3*H*-1,4-benzodiazepin-2-on-4-oxid **5**. Jeho reakcí s anhydridem kyseliny octové došlo ke vzniku 7-chloro-1,3-dihydro-3-acetoxy-5-fenyl-2*H*-benzodiazepin-2-onu **6** obsahující v poloze C-3 vázanou acetylovou skupinou, jejíž bazickou hydrolyzou byl získán oxazepam **7** (schéma 3) <sup>10,11</sup>.

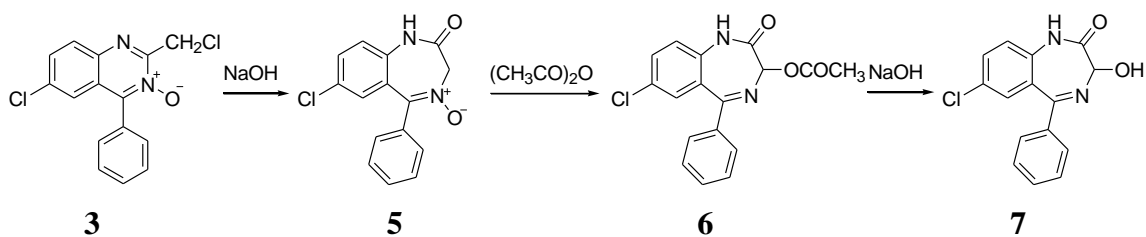


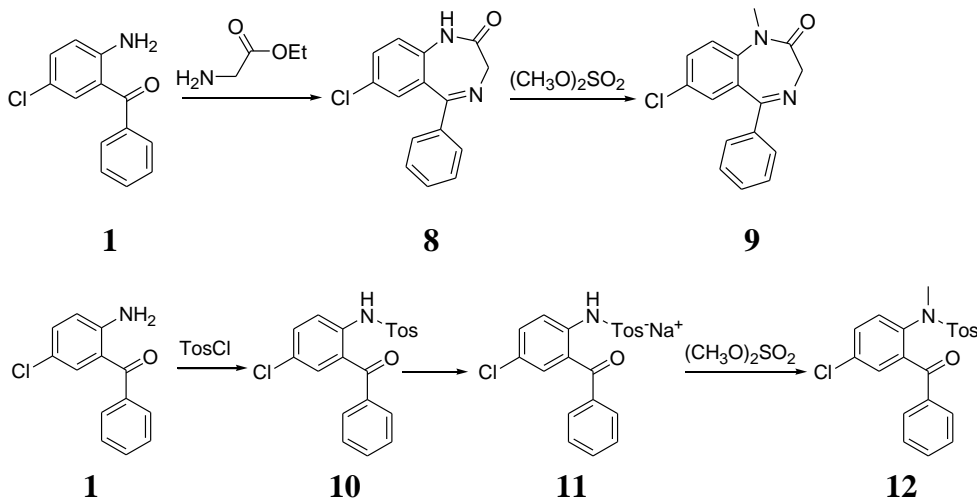
Schéma 3: Syntéza oxazepamu <sup>11</sup>.

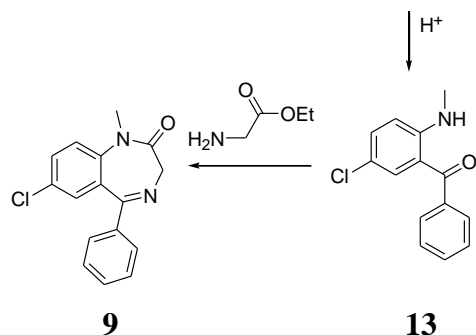
### 3.1.3. Diazepam

Pro přípravu tohoto značně zkoumaného derivátu bylo navrženo několik syntetických cest. V níže uvedených odstavcích jsou popsány pouze tři z nich. První dvě zmíněné metody vycházely ze stejného substrátu 2-amino-5-chlorobenzofenonu **1**, avšak s odlišným pořadím dvou základních reakcí, a to cyklokondenzace a methylace. Třetí metoda vedla přes intermediát 2-methylamino-5-chlorobenzofenon **17** až ke konečnému produktu **9**.

První metoda syntézy spočívala v cyklokondenzační reakci 2-amino-5-chlorobenzofenonu **1** či 2-methylamino-5-chlorobenzofenonu **8** s hydrochloridem ethylesteru glycinu za vzniku 7-chloro-1,3-dihydro-5-fenyl-2*H*-1,4-benzodiazepin-2-onu **8**. Následnou methyloací amidického dusíku s dimethylsulfátem byla získána požadovaná diazepamová struktura **9** (schéma 4 – a) <sup>10,12,13</sup>.

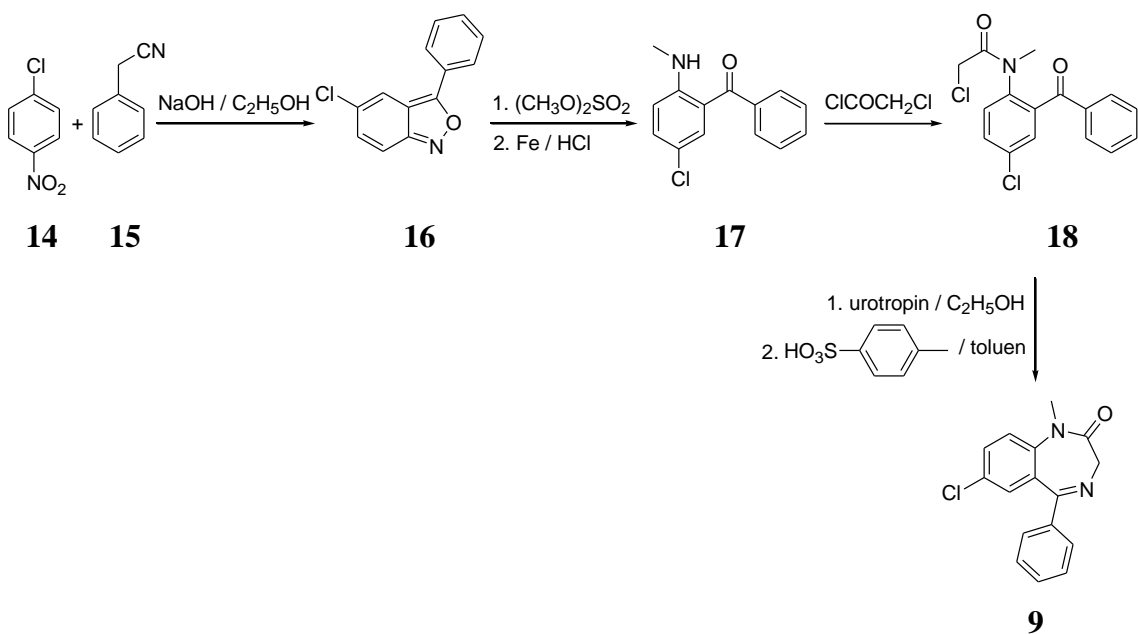
Druhý způsob přípravy spočíval v tosylaci aminoskupiny 2-amino-5-chlorobenzofenonu **1** s *p*-toluensulfonylchloridem (tosylchloridem) a následnou transformací tosylátu **10** za vzniku *N*-sodné soli (**11**), jejíž alkylace s dimethylsulfátem poskytla 2-*N*-tosyl-*N*-methyl-5-chlorobenzofenon **12**. Jeho kyselou hydrolyzou vznikl 2-methylamino-5-chlorobenzofenon **13**, jehož cyklokondenzace s hydrochloridem ethylesteru glycinu vedlo k diazepamu **9** (schéma 4 – b) <sup>10,12,13</sup>.





*Schéma 4: Syntéza diazepamu založena na cyklokondenzaci a methylaci lišící se pořadím těchto dvou reakcí: cyklokondenzační reakce 2-amino-5-chlorobenzofenonu a následná methylace dimethylsulfátem (a); reakce 2-amino-5-chlorobenzofenonu s tosylchloridem, methylace, kyselá hydrolyza a cyklokondenzace vedoucí k diazepamu (b) <sup>10,12,13</sup>.*

Třetí příprava vycházela z 1-chlor-4-nitrobenzenu **14** a benzylnitrilu **15** v bazickém prostředí za vzniku 5-chloro-3-fenylbenzo[2,1]-isoxazolu **16**. Po methylaci dimethylsulfátem a redukcí železem byl získán 2-methylamino-5-chlorobenzofenon **17**. Reakcí s chloridem kyseliny 2-chloroctové (**18**), s urotropinem a toluensulfonovou kyselinou vznikl diazepam **9** (schéma 5) <sup>14,15</sup>.



*Schéma 5: Syntéza diazepamu <sup>14,15</sup>.*

### 3.1.4. Bromazepam

Počátečním materiálem byl 2-(2-aminobenzoyl)pyridin **19** poskytující s anhydridem kyseliny octové 2-(2-acetamidobenzoyl)pyridin **20**, jehož bromace vedla k 2-(2-acetamido-5-bromobenzoyl)pyridinu **21** a kyselá hydrolyza k 2-(2-amino-5-bromobenzoyl)pyridinu **22**. Po reakci s hydrochloridem ethylesteru glycinu v pyridinu byl izolován požadovaný produkt bromazepam **23** (schéma 6) <sup>16</sup>.

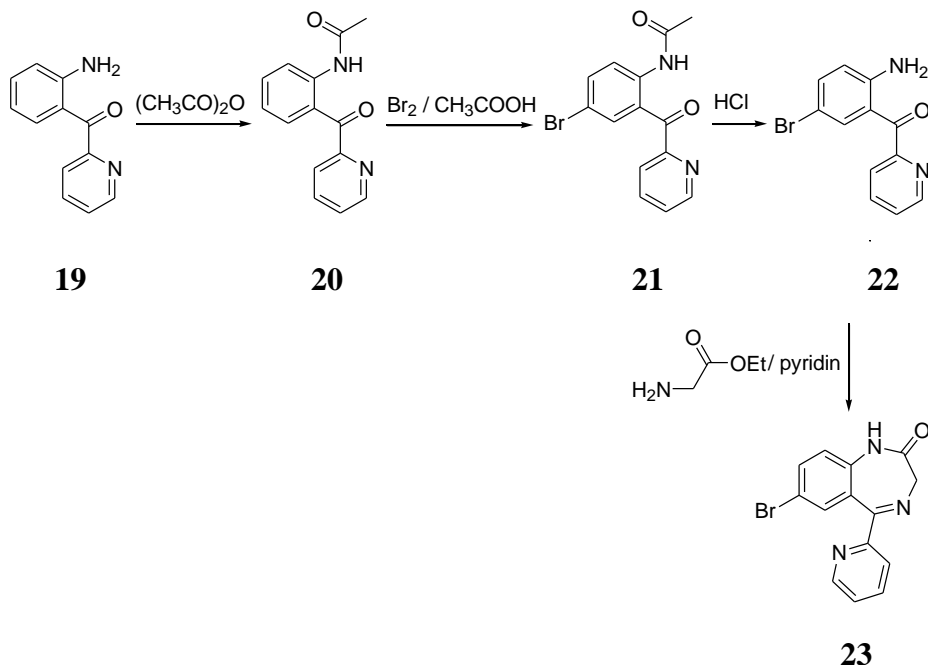


Schéma 6: Syntéza bromazepamu <sup>16</sup>.

### 3.1.5. Clonazepam

Většina 1,4-benzodiazepino-2-onů byla syntetizována dle standardní metodiky vedoucí k těmto derivátům. Výjimkou byl clonazepam lišící se finálním zavedením nitroskupiny do polohy C-7. Počátečním materiálem pro syntézu byl 2-chloro-2'-nitrobenzofenon **24**, jehož redukcí vodíkem na Raneyově niklu vznikl 2-chloro-2'-aminobenzofenon **25**. Následná reakce s bromidem kyseliny 2-bromoctové vedla k intermediátu **26** a aminolýza poskytla aminoacetamidový meziprodukt **27**, který byl po přidavku pyridinu cyklizován na 5-(2-chlorofenyl)-2,3-dihydro-1H-1,4-benzodiazepin-2-on **28**. Posledním krokem syntézy byla nitrace za mírných podmínek vedoucí k cílovému 5-(2-chlorofenyl)-1,3-dihydro-7-nitro-2H-1,4-benzodiazepin-2-onu, tedy clonazepamu **29** (schéma 7) <sup>17</sup>.

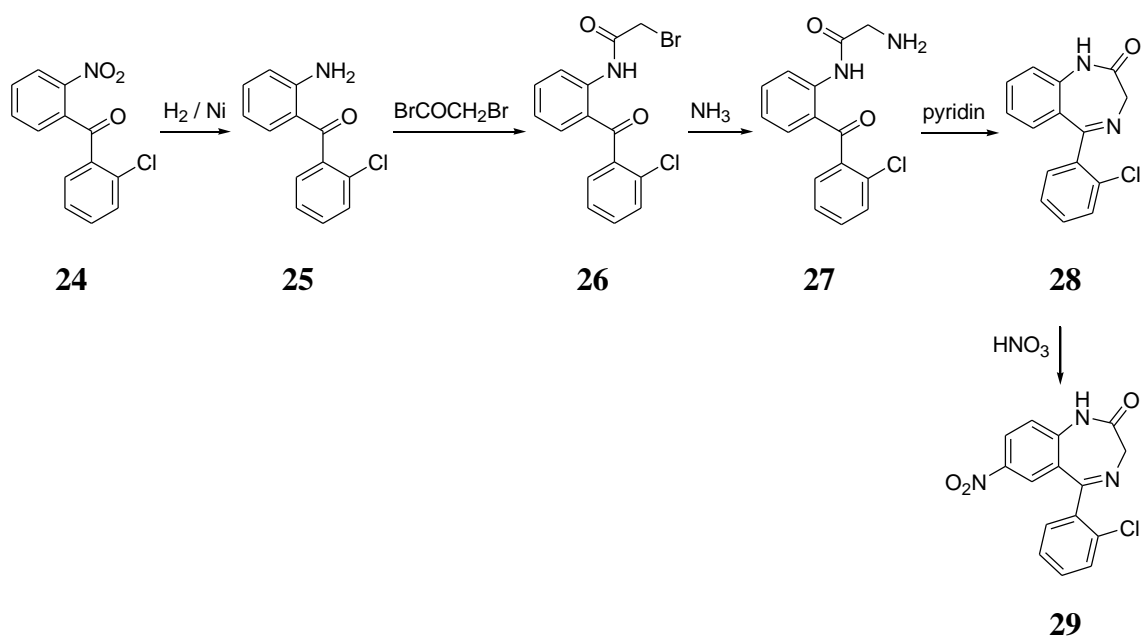


Schéma 7: Syntéza clonazepamu <sup>17</sup>.

### 3.1.6. Flunitrazepam

Jednou z možných syntéz byla redukce železem 2-fluoro-2'-nitrobenzofenonu **30** na 2-fluoro-2'-aminobenzofenon **31**. Reakcí s bromidem kyseliny 2-bromoctové (**32**), amoniakem (**33**) a působením pyridinu vedla k intermediátu 5-(2-(2-fluorofenyl)-2,3-dihydro-1H-benzo[e][1,4]-diazepin-2-onu **34**, jehož nitrací probíhající výhradně do polohy 7- (**35**) a alkylací v přítomnosti methyljodidu a báze <sup>18</sup>, například fluoridu draselného a oxidu hlinitého v acetonu <sup>19</sup>, poskytla flunitrazepam **36** (schéma 8).

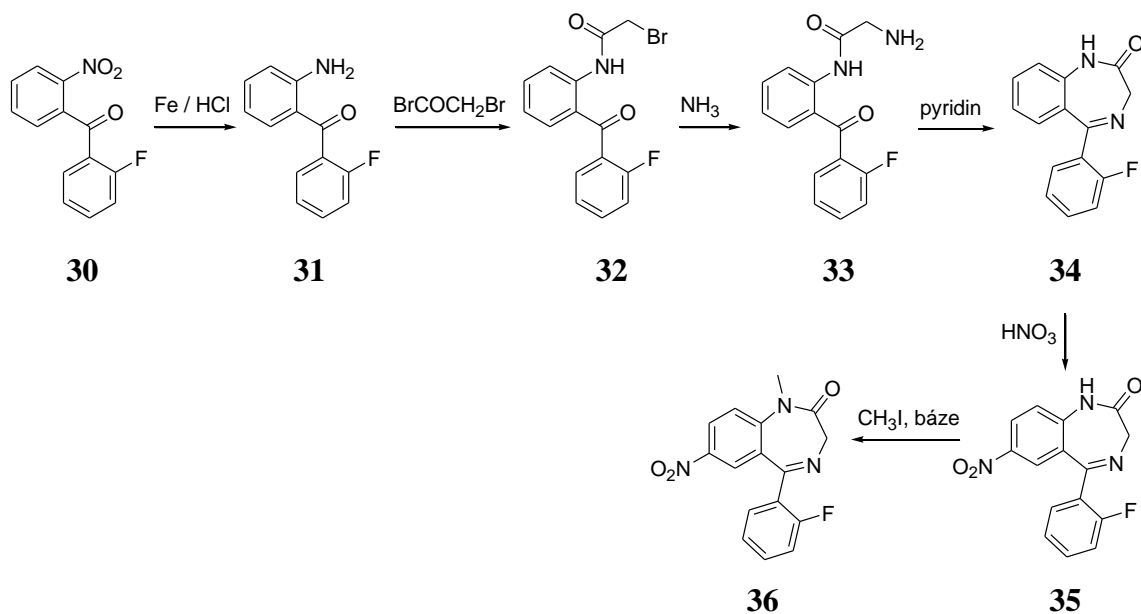


Schéma 8: Syntéza flunitrazepamu <sup>18</sup>.



## 3.2. Metody příprav vedoucí k derivátům 1,4-benzodiazepin-5-onů

V současné době je evidováno několik syntetických cest vedoucích k těmto derivátům, jejichž výběr je zpracován v následujících odstavcích a rozdělen dle typu použité metodiky na roztokovou syntézu a syntézu na pevné fázi.

### 3.2.1. Roztoková chemie

Tato kapitola byla do práce zařazena pro nastínění možných strategií syntézy klasické roztokové chemie i syntézy na pevné fázi vedoucích k derivátům 1,4-benzodiazepin-5-onů. Odlišnost těchto dvou metod spočívá zejména ve složitosti izolace jednotlivých reakčních meziproduktů. Roztoková chemie reprezentuje klasickou metodu syntetické chemie s dlouhou historií. Pro tuto práci ovšem nebyla tato metoda zvolena, z důvodu náročnější izolace a čištění během jednotlivých reakčních kroků, od nichž je syntéza na pevné fázi oproštěna, což vede k rychlé syntéze a snadné tvorbě chemických knihoven.

#### 3.2.1.1. 1,4-dihydro-benzo[e][1,4]-diazepin-5-ony

Představují první rozebíranou skupinu látek obsahující 1,4-benzodiazepinový motiv s odlišnou substitucí.

##### 3.2.1.1.1. 8-chloro-1,4-dihydro-benzo[e][1,4]-diazepin-5-ony

Tato specifická příprava byla založena na fotolýze vybraných azidů v přítomnosti methanolátu draselného v methanolu a v dioxanu. Konečné produkty však byly připraveny s poměrně nízkou výtěžností. Počátečním materiálem pro přípravu 7-chloro-4-chinolyl azidu **38** byl 4,7-dichlorochinolin **37** reagující s azidem sodným v DMSO. Následnou reakcí v methanolátu draselném v methanolu a v dioxanu a ozáření středotlakou rtuťovou výbojkou v křemenné nádobce byl získán výsledný produkt 8-chloro-1,4-dihydro-benzo[e][1,4]-diazepin-5-on **39** (schéma 9) <sup>20</sup>.

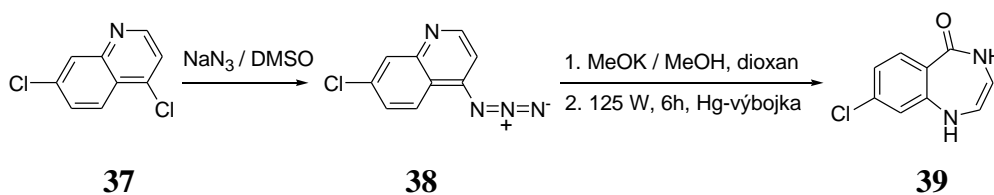


Schéma 9: Syntéza 8-chloro-1,4-dihydro-benzo[e][1,4]-diazepin-5-onu <sup>20</sup>.

### 3.2.1.1.2. 1,4-dialkyl-1,4-dihydro-benzo[e][1,4]-diazepin-5-ony

Pro přípravu 1,4-dialkyl-1,4-dihydro-1,4-benzodiazepin-5-onů byla navržena Wangem a spol. dvoukroková syntéza<sup>21</sup>. Metoda vedoucí k 2-alkylamino-*N*-methyl-*N*-(2,2-dimethoxyethyl)benzamidů **41**, **42** spočívala v reakci *N*-alkyl anhydridu kyseliny isatoové (*N*-alkyl = methyl, allyl, benzyl) **40** s *N*-alkylaminoacetaldehydem dialkylacetalu v DMF. Druhým krokem syntézy byla hydrolyza acetalové skupiny benzamidů **41**, **42** v přítomnosti vodného THF v přítomnosti katalyzátoru (Amberlyst-15). Ve směsi byly přítomny neoddělitelné složky **43**, **44** potvrzené hmotnostní spektrální analýzou. Považením směsi pod zpětným chladičem v toluenu s využitím Dean-Starkovy pasti byly získány dvě skupenství produktů **45**, a to pevné a kapalné (schéma 10)<sup>22</sup>.

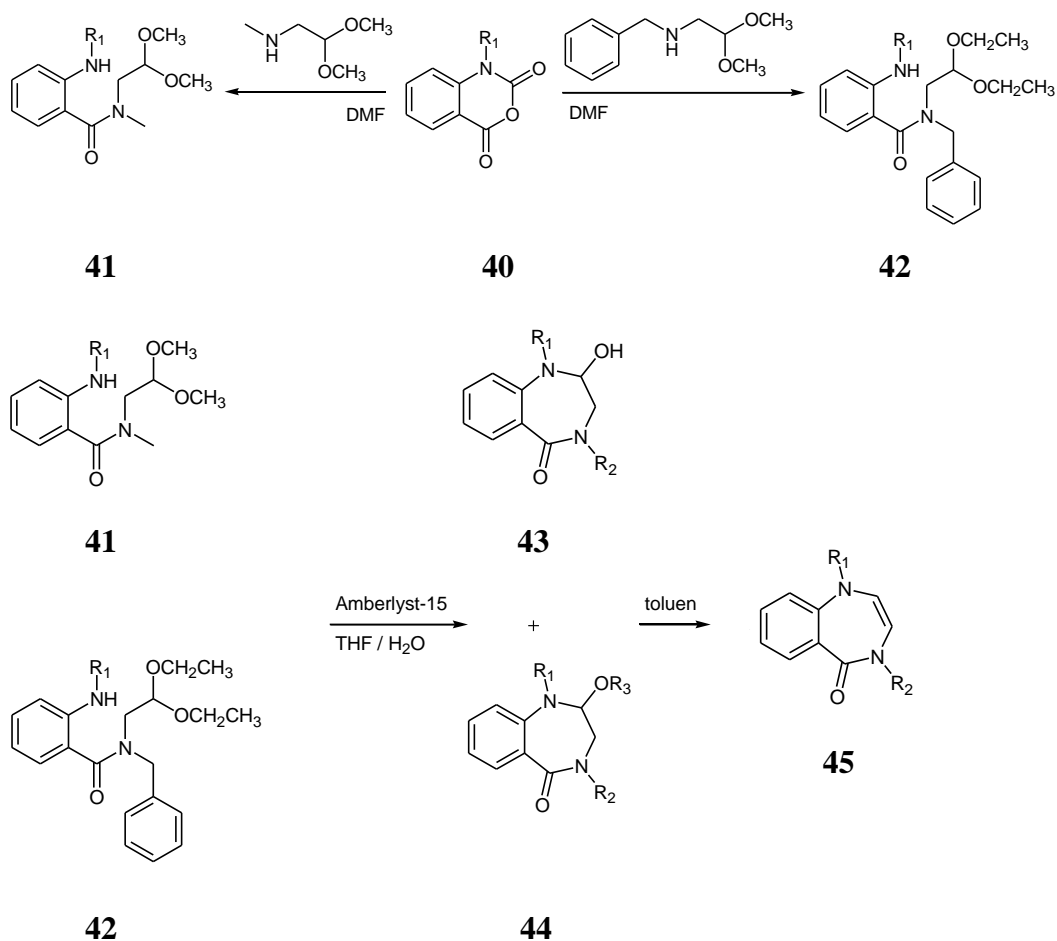


Schéma 10: Dvoukroková syntéza 1,4-dialkyl-1,4-dihydro-1,4-benzodiazepin-5-onů:  $R_1$  – methyl, allyl, benzyl;  $R_2$  – vodíkový atom, benzyl, methyl;  $R_3$  – methyl, ethyl<sup>22</sup>.

### 3.2.1.2. Trisubstituované 3,4-dihydro-benzo[e][1,4]-diazepin-5-ony

Tyto deriváty, respektive 2-fenyl-3,4-dihydro-benzo[e][1,4]-diazepin-5-on, byly připraveny třemi nezávislými cestami roztokové chemie<sup>23,24</sup> a v nedávné době i pomocí syntézy na pevné fázi<sup>25</sup>.

#### 3.2.1.2.1. Cyklizace 2-amino-*N*-(2-oxo-2-fenyl-ethyl)-benzamidů

Tento typ derivátů byl využit jako jeden z možných prekursorů pro syntézu 2-substituovaných-3-hydroxy-1*H*-chinolin-4-onů charakteristických svou biologickou aktivitou a možnou aplikací v medicíně<sup>23</sup>. Bylo využito jednoho z nejstarších popsaných postupů založených na cyklizaci 2-amino-*N*-(2-oxo-2-fenyl-ethyl)-benzamidů **47** připraveného reakcí anhydridu kyseliny isatoové s hydrochloridem  $\alpha$ -aminoacetofenonu **46** v přítomnosti uhličitanu sodného ve vodě<sup>1,23</sup> vedoucí k požadovanému produktu 2-fenyl-3,4-dihydro-benzo[e][1,4]-diazepin-5-onu **48** (schéma 11)<sup>23</sup>.

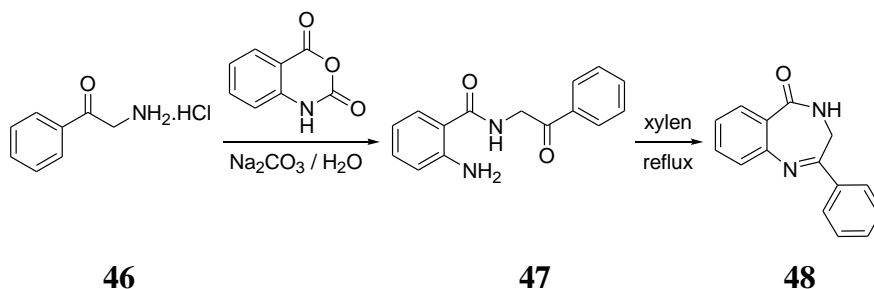


Schéma 11: Syntéza 2-fenyl-3,4-dihydro-benzo[e][1,4]-diazepin-5-onu<sup>23</sup>.

#### 3.2.1.2.2. Kondenzace *o*-fenylendiaminu s $\beta$ -keto estery

Druhým přístupem bylo uzavření kruhu  $\beta$ -keto esterů s *o*-fenylendiaminy (1,2-diaminobenzeny), čehož bylo využito k syntéze 7,8-dichloro-3,4-dihydro-2-[4-(2-methylimidazo[4,5-*c*]-pyrid-1-yl)fenyl]-5*H*-benzo[e][1,4]-diazepin-5-onu **54**. Nejprve reakcí ethyl 4'-(2-methylimidazo-[4,5-*c*]-pyrid-1-yl)benzoátu **49** s roztokem dusitanu sodného ve vodě a v ledové kyselině octové byl připraven ethyl 4'-(2-methylimidazo-[4,5-*c*]-pyrid-1-yl)benzoyloximimidoacetát **50**. Jeho hydrogenace v přítomnosti 5 % paládia na uhlíku (**51**) a reakce s 2 M kyselinou chlorovodíkovou vedla k hydrochloridu 2-amino-[4'-(2-methylimidazo-[4,5-*c*]-pyrid-1-yl)fenyl]-ethanonu **52**. K němuž byl přidán 4,5-dichloroanhydrid kyseliny isatoové ve vodě a roztok  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  v DCM poskytující 2-amino-4,5-dichloro-*N*-[2-[4'-(2-methylimidazo-[4,5-*c*]-pyrid-1-yl)fenyl]-2-oxoethyl]-benzamid **53**. Jeho zahříváním pod refluxem s *p*-toluensulfonylovou kyselinou dalo vzniku 7,8-dichloro-3,4-dihydro-2-[4-(2-methylimidazo[4,5-*c*]-pyrid-1-yl)fenyl]-5*H*-benzo[e][1,4]-diazepin-5-onu **54** (schéma 12)<sup>26</sup>.

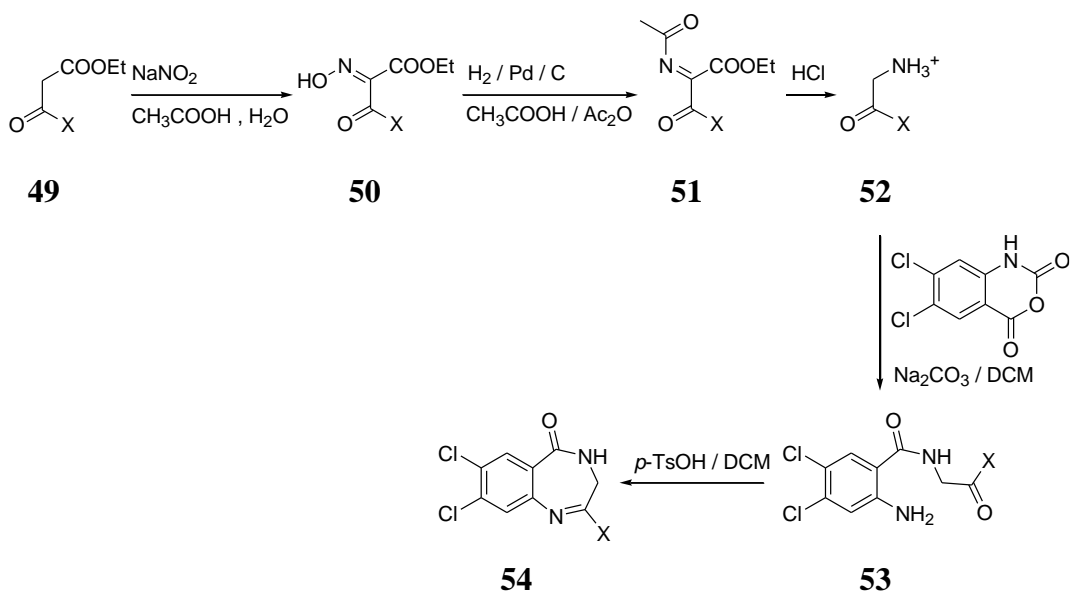


Schéma 12: Syntéza 7,8-dichloro-3,4-dihydro-2-[4-(2-methylimidazo[4,5-c]pyrid-1-yl)fenyl]-5H-benzo[e][1,4]-diazepin-5-onu: X – 4-(2-methylimidazo[4,5-c]pyrid-1-yl)fenyl<sup>26</sup>.

### 3.2.1.2.3. Ugiho reakce (U-4CC)

Poslední metodou přípravy byla U-4CC představující vícesložkovou kondenzaci, jejíž mechanismus spočíval v reakci ketonu či aldehydu **55** s aminem **56** za vzniku příslušného iminu **57**. Jeho interakcí s karboxylovou kyselinou **58** došlo k navázání vodíkového protonu z hydroxylové skupiny na tento imin **59** a následným přidavkem isokyanidu **61** k transformaci za vzniku  $\alpha$ -aminoacyl amidových derivátů **62** – **63** (schéma 13)<sup>7</sup>. Tento typ reakce byl využit pro syntézu 2-aryl-3,4-dihydro-benzo[e][1,4]-diazepin-5-onů<sup>27</sup> i 2,3,4-trisubstituovaných 3,4-dihydro-benzo[e][1,4]-diazepin-5-onů<sup>24</sup>.

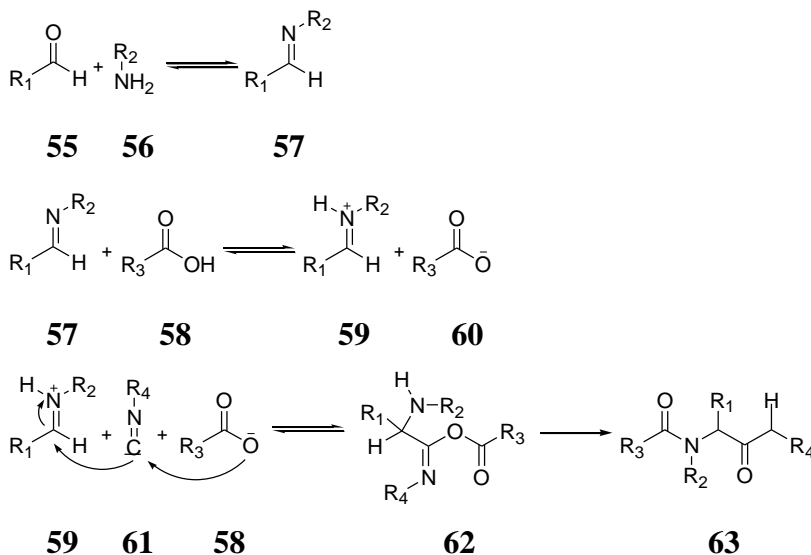


Schéma 13: Mechanismus Ugiho reakce<sup>7</sup>.

### 3.2.1.2.3.1. 2-aryl-3,4-dihydro-benzo[e][1,4]-diazepin-5-ony

Počátečním materiálem byl substituovaný benzaldehyd **64**, hydrochlorid  $\alpha$ -aminoacetofenonu **46**, 5-chloro-2-nitrobenzoová kyselina **65** a cyklohexyl isokyanid **66** reagující s hydroxidem draselným v přítomnosti methanolu (**67**). Následnou redukcí železem v horké kyselině octové docházelo k cyklizaci za vzniku požadovaného produktu se substituovaným *N*-amidem v poloze 4- **68** – **69** (schéma 14) <sup>27</sup>.

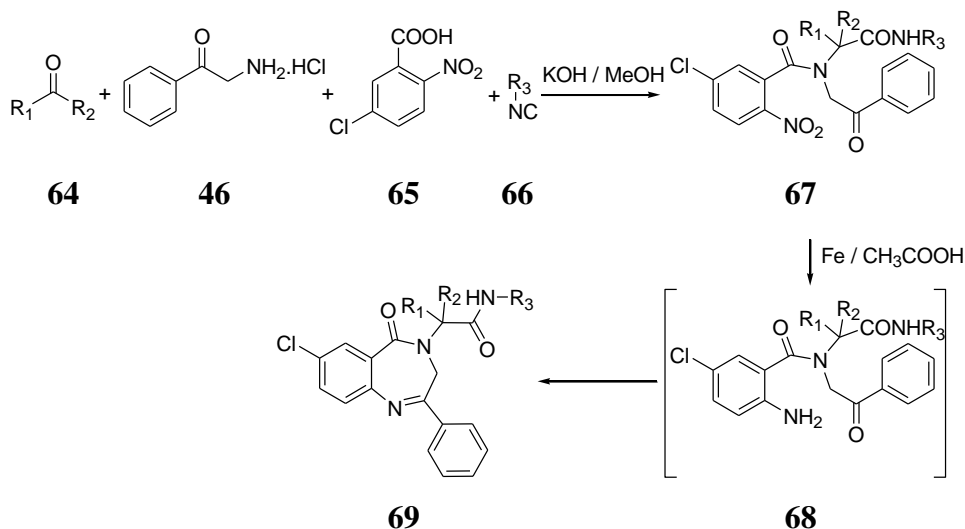


Schéma 14: Syntéza 2-aryl-3,4-dihydro-benzo[e][1,4]-diazepin-5-onů:  $R_1$  – 4-fenyl, 4-chlorofenyl, 4-methoxyfenyl, 2-methylfenyl či 4-methylfenyl, isopropyl;  $R_2$  – vodíkový atom;  $R_3$  – benzyl, cyklohexyl <sup>27</sup>.

### 3.2.1.2.3.2. 2,3,4-trisubstituované 3,4-dihydro-benzo[e][1,4]-diazepin-5-ony

Tento typ derivátů byl syntetizován na základě dvou odlišných chemických postupů. Prvním krokem syntézy byla Ugiho reakce vycházející z vhodně substituovaného benzylaminu **70** a roztoku arylglyoxalu **71** v methanolu vedoucí k intermediátu **72**. Postupným přidavkem 2-azidobenzoové kyseliny a cyklohexyl isokyanidu k roztoku tohoto iminu byl získán intermediát **73**, prokázaný pouze v enol-formě s obsahem dvou opačných konformerů. Druhý krok syntézy spočíval v aplikaci Staudinger/aza-Wittigovy cyklizace probíhající pod dusíkem v přítomnosti  $PPh_3$  v toluenu poskytující cílové deriváty **74** (schéma 15) <sup>24</sup>.

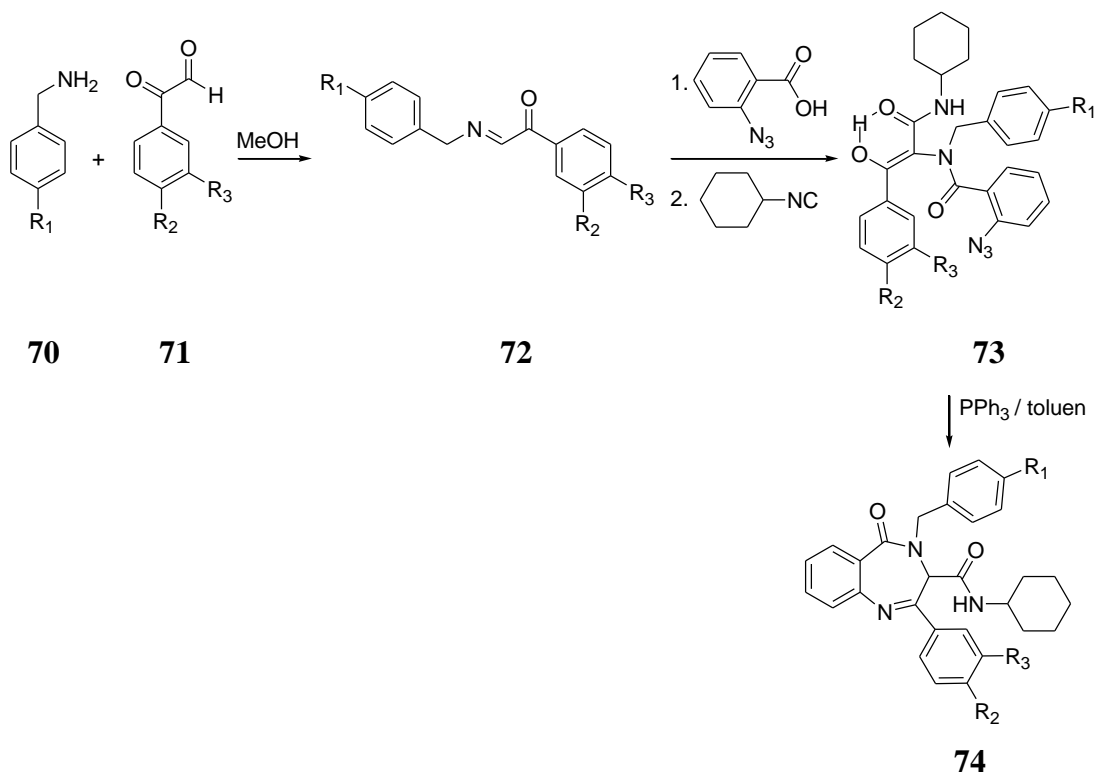


Schéma 15: Syntéza 2,3,4-trisubstituovaných 3,4-dihydro-benzo[e][1,4]-diazepin-5-onů:  $R_1$  – vodíkový atom, methyl, methoxy, halogen (F, Cl);  $R_2$  – vodíkový atom, methyl, methoxy, fluor;  $R_3$  – vodíkový atom<sup>24</sup>.

### 3.2.1.3. 1-substituované 1,2,3,4-tetrahydro-5H-benzo[e][1,4]-diazepin-5-ony

Tyto deriváty byly připraveny na základě dvou různých chemických cest.

#### 3.2.1.3.1. 1-benzyl- a 1-methyl-1,2,3,4-tetrahydro-5H-benzo[e][1,4]-diazepin-5-ony

První skupina látek byla získána reakcí s 2-substituovaným aminobenzamidem **75** s přebytkem epoxyethanu v kyselině octové za vzniku příslušného *o*-[substituovaného (2-hydroxyethyl)-amino]-benzamidu **76**. Ten s thionylchloridem vedl k *o*-[substituovanému (2-chloroethyl)-amino]-benzamidu **77**, poskytující s hydridem sodným 1-substituované 1,2,3,4-tetrahydro-5H-benzo[e][1,4]-diazepin-5-ony **78** (schéma 16)<sup>28</sup>.

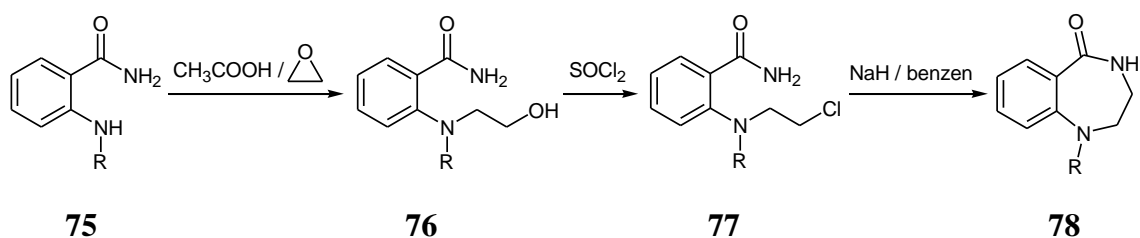


Schéma 16: Syntéza 1-substituovaných 1,2,3,4-tetrahydro-5H-benzo[e][1,4]-diazepin-5-onů: R – methyl, benzyl<sup>28</sup>.

### 3.2.1.3.2. 1-fenyl-1,2,3,4-tetrahydro-5H-benzo[e][1,4]-diazepin-5-ony

Výchozí látkou pro syntézu tohoto typu derivátů byl 1-fenyl-1,2,3,4-tetrahydrochinolin-4-on připravený Schmidtovou reakcí<sup>29,30</sup>, z něhož byl připraven 1-fenyl-1,2,3,4-tetrahydro-5H-benzo[e][1,4]-diazepin-5-on **79**, použitý jako výchozí substance pro syntézu od něj odvozených derivátů.

Následujícím postupem byly získány různé podoby těchto derivátů s třemi typy odlišných substituentů. Nejčastějším substituentem R<sub>1</sub> v poloze 4- na fenylovém zbytku a substituentem R<sub>2</sub> lokalizovaným na benzodiazepinové struktuře v pozici 7- byl vodíkový atom. Substituent R<sub>3</sub> představoval navázaný ω-bromoalkyl terciární amin. Charakteristické benzodiazepinony **80** byly získány N-alkylací **79** s ω-bromoalkyl terciárním aminem, jako například 2-dimethylamino-1-bromoethanem, v přítomnosti amidu sodného v bezvodém benzenu (schéma 17)<sup>29</sup>.

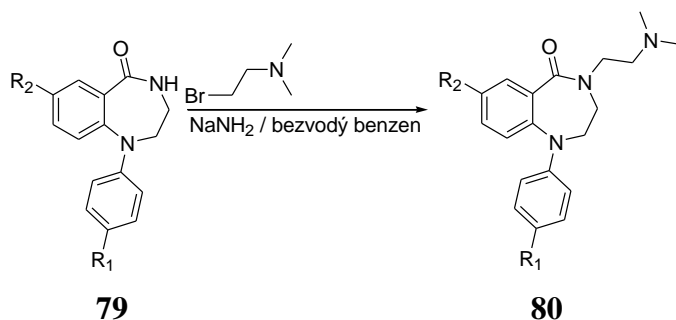


Schéma 17: Syntéza trisubstituovaných 1-fenyl-1,2,3,4-tetrahydro-5H-benzo[e][1,4]-diazepin-5-onů: R<sub>1</sub> – vodíkový atom, nitro skupina; R<sub>2</sub> – vodíkový atom; R<sub>3</sub> – alkyl terciární amin (substituovaný 2-dimethylamino-1-bromoethan)<sup>29</sup>.

### 3.2.1.4. 2-methylen-1-tosyl-benzo[e][1,4]-diazepin-5-ony

Tato syntéza vedla k přípravě dvou typů disubstituovaných 1,4-benzodiazepin-5-onů, a to 4-allyl-2-methylen-1-tosyl-1,2,3,4-tetrahydro-benzo[e][1,4]-diazepin-5-onům a 5-ethyl-2-methylen-1-tosyl-2,3,4,5-tetrahydro-benzo[e][1,4]-diazepin-5-onům.

Výchozím materiálem pro syntézu byl o-nitrobenzoyl chlorid **81** reagující s allylaminem **82** v přítomnosti Et<sub>3</sub>N v DCM za vzniku o-nitrobenzamidů **83**, jehož redukce železem v ethanolu a ve vodné kyselině octové poskytla aminoamid **84**. Tosylací v přítomnosti Et<sub>3</sub>N v DCM došlo k navázání tosylového zbytku na amino-skupinu za vzniku sekundárního aminu **85**, jehož cyklizace v xylenu a v pyridinu s acetátem paladnatým Pd(OAc)<sub>2</sub> jako katalyzátorem vedla k vytvoření směsi produktů, a to 2-vinyl-chinazolin-4-onu **86** a izolovaného 2-methylen-1-tosyl-benzo[e][1,4]-diazepin-5-onu **87** (schéma 18)<sup>31</sup>.

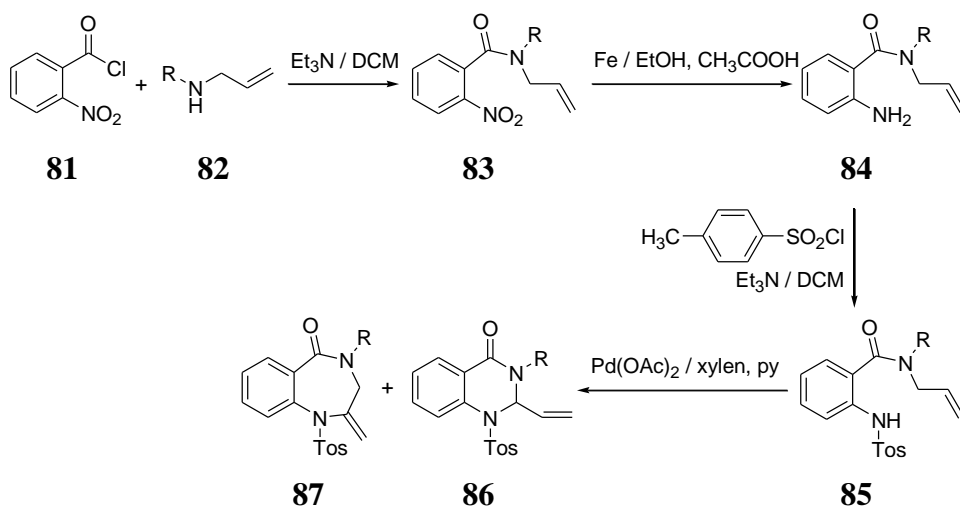


Schéma 18: Syntéza 2-methylen-1-tosyl-benzo[e][1,4]-diazepin-5-onů: *R* – allyl, methyl, fenyln, cyklohexyl, cyklopentyl<sup>31</sup>.

### 3.2.1.5. 5-7-6-tricyklické pyrrolo[2,1-c][1,4]-benzodiazepin-5-ony

Motiv této skupiny látek byl identifikován v mnoha přírodních sloučeninách, převážně s antibakteriálními či herbicidními účinky. Jejich syntéza vycházela z reakce substituovaného *o*-nitrobenzoyl chloridu **88** s pyrrolem **89** za vzniku nitro-sloučeniny **90**, redukováné železem v kyselině chlorovodíkové a v ethanolu (1 : 9) za vzniku prekurzoru Pictet-Spenglerovy reakce **91**, jehož kondenzací s 4-chlorobenzaldehydem v přítomnosti 2 % TFA došlo k 7-endo cyklizaci (**92**). Přeměnou **92** na 10,11-dihydro-pyrrolo[1,2-a][1,4]-benzodiazepin-5-on **93** a oxidací 2,3-dichloro-5,6-dikyano-1,4-benzochinonem (DDQ) byla vytvořena dvojná vazba mezi atomy N-10 a C-11 **94** (schéma 19)<sup>32</sup>.

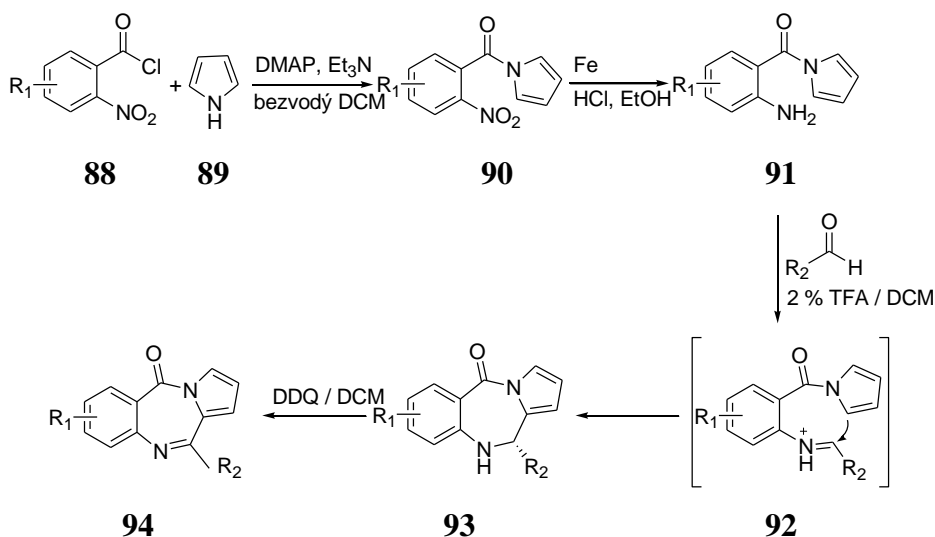


Schéma 19: Syntéza 5-7-6-tricyklických pyrrolo[1,2-a][1,4]-benzodiazepin-5-onů: *R*<sub>1</sub> – vodíkový atom, chlor, methyl, methoxy; *R*<sub>2</sub> – 4-chlorfenyl<sup>32</sup>.

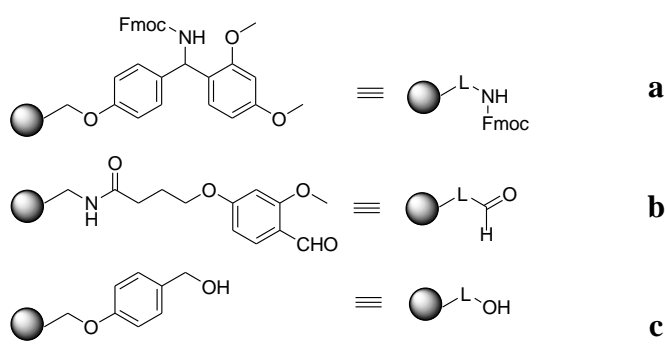


### 3.2.2. Syntéza na pevné fázi

Představuje metodu provedení kombinatoriální chemie vhodnou pro poměrně rychlou a efektivní přípravu velkého množství sloučenin a tvorbu tzv. chemických knihoven, sloužících k testování biologické aktivity a studiu vztahům mezi ní a chemickou strukturou. Metoda byla vyvinuta během 50. a 60. let minulého století Robertem Bruceem Merrifieldem, jejím benefitem u vícestupňové syntézy je jednoduchá izolace vznikajících intermediátů. Tato syntetická cesta je nejčastěji využívána k přípravě peptidů a deoxyribonukleových kyselin (DNA) <sup>33</sup>, od devadesátých let však také velice hojně k přípravě tzv. malých molekul.

Obecným principem Merrifieldovy syntézy peptidů je navázání aminokyseliny s chráněnou amino-skupinou na polymerní nosič (polystyrenovou pryskyřici) za vzniku esterové či amidické vazby v závislosti na typu linkeru. Po odchránění amino-skupiny následuje reakce s C-koncem další vhodně chráněné aminokyseliny za vzniku dipeptidu. Tyto dva kroky se opakují až do vytvoření potřebného peptidového řetězce, který je odštěpen z polymerního nosiče <sup>34</sup>.

Dle typu prováděné syntézy na pevné fázi jsou nejčastěji aplikovány tři typy pryskyřic, a to Rinkova, aminomethylová a Wangova pryskyřice (obr. 2) <sup>35</sup>. Přičemž dle velikosti částic a schopností zvětšovat svůj objem v daném typu rozpouštědla je využíván buď styren-divinylbenzenový kopolymer (PS-DVB), nebo polyethylen-glykolový kopolymer (PEG-PS-DVB) (obr. 3) <sup>36</sup>.



Obr. 2: Nejčastěji používané pryskyřice pro syntézu na pevné fázi: Rinkova amidová pryskyřice (a), aminomethylová pryskyřice s kysele labilním BAL linkerem (4-(4-formyl-3-methoxy-fenoxy)butanová kyselina) (b), Wangova pryskyřice (c) <sup>35</sup>.



Obr. 3: Typy pryskyřic dle odlišné velikosti částic a schopnosti zvětšovat svůj povrch v daných rozpouštědlech: X – charakteristická funkční skupina linkeru; PS-DVB – chlor, hydroxy, amino (a); PEG-PS-DVB – brom, hydroxy, amino, thiol, karboxy (b) <sup>36</sup>.

V této práci byla použita PS-DVB-OH (Wangova pryskyřice) bobtnající dobře v DCM, DMF, THF a toluenu, ovšem nevhodnými jsou pro ni vodná rozpouštědla.

Součástí těchto pryskyřic je kovalentně vázaný linker tvořící spojovací raménko mezi pryskyřicí a syntetizovanou molekulou. Důležitou vlastností linkerů je jejich stabilita za daných reakčních podmínek a selektivní štěpitelnost na konci syntézy. Díky známému počátečnímu loadingu, který určuje maximální obsazenost linkerů substrátem, lze určit výtěžnost reakce. K odštěpení linkeru dochází pro Merrifieldovu syntézu peptidů prostřednictvím fluorovodíkové kyseliny či různě koncentrované TFA, například linker Wang (50 % TFA) či SASRIN (1 % TFA). Linkery lze klasifikovat dle způsobu odštěpení z pryskyřice na kyselě labilní, bazicky labilní či fotochemicky štěpitelné linkery. Za různých reakčních podmínek lze získat štěpením linkerů odlišné produkty, čehož se využívá v konečných krocích syntézy pro tvorbu tzv. chemických knihoven. Při hydrolyze esterových linkerů dochází k odštěpení navázané molekuly za vzniku karboxylové kyseliny, při aminolýze ke vzniku amidu a během redukčního štěpení dochází ke tvorbě alkoholu <sup>36</sup>.

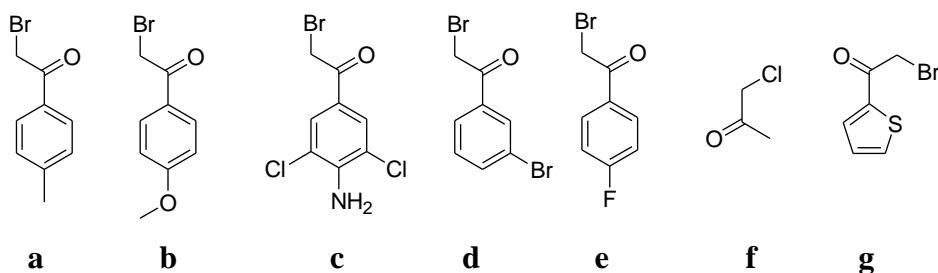
Během syntézy se může na dané sloučenině vyskytovat více než jedno reaktivní místo, aby se zabránilo nežádoucím vedlejším reakcím těchto aktivních skupin, využívá se ochranných molekul, zvaných protektivní skupiny. Nejčastějšími skupinami jsou bazicky labilní Fmoc (9-fluorenylmethoxykarbonyl) a kyselě labilní Boc (*t*-butyloxykarbonyl) (obr. 4).



Obr. 4: Struktura protektivních skupin: Fmoc (a); Boc (b).

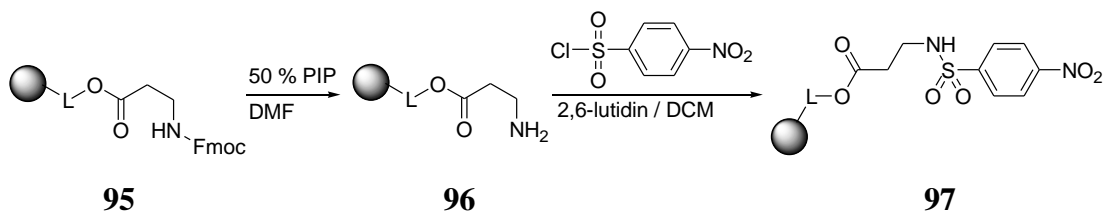
### 3.2.2.1. Trisubstituované 3,4-dihydro-benzo[e][1,4]-diazepin-5-ony

Příprava těchto typů látek doposud využívala principů roztokové chemie. Současný výzkum však přispěl k rozvoji metodiky s aplikací syntézy na pevné fázi. Počátečním materiálem byl amin vázaný na polystyrenovou pryskyřici. Byly testovány tři typy pryskyřic (Wangova, Rinkova amidová a aminomethylová) s vhodným kyselé labilním linkerem naacylovaným Fmoc- $\beta$ -Ala-OH. Pro Wangovu pryskyřici byl testován i Fmoc-aminoethanol a propylendiamin. Na aminomethylové pryskyřici byla provedena reduktivní aminace s dvěma typy aminů, a to propylaminem a benzylaminem. Pro alkylační reakce byly zvoleny heterocyklické či alifatické bromoketony (obr. 5) <sup>1</sup>.



Obr. 5: Přehled testovaných bromoketonů: 2-brom-4'-methylacetofenon (a); 2-brom-4'-methoxyacetofenon (b); 2-brom-4'-amino-3',5'-dichloroacetofenon (c); 2-brom-3'-bromoacetofenon (d); 2-brom-4'-fluoroacetofenon (e); 1-chloro-propan-2-on (f); 2-brom-1-(thiofen-1-yl)-ethanon (g).

Po acylaci  $\beta$ -alaninu na Wangovu pryskyřici (**95**) došlo k deprotekcí koncové amino-skupiny a její aktivaci. Při sulfonylaci **96** s 4-NosCl, 2,6-lutidinem v DCM vznikl intermediát **97**, jehož alkylace jedním z heterocyklických či alifatických bromoketonů, DIEA v DMF poskytla produkt **98**. Pro alkylační reakci byly zvoleny odlišné báze, rozpouštědla i teplota. Denosylace s 2-merkaptoethanolem, DBU v DMF (**99**), acylace s *o*-nitrobenzoovou kyselinou, DIC v DMF (**100**) a následnou redukcí nitro-skupiny dihydrátem chloridu cínatého, DIEA v odplyněném DMF docházelo k zacyklení struktury a vzniku konečného produktu **102** (schéma 20) <sup>1</sup>.



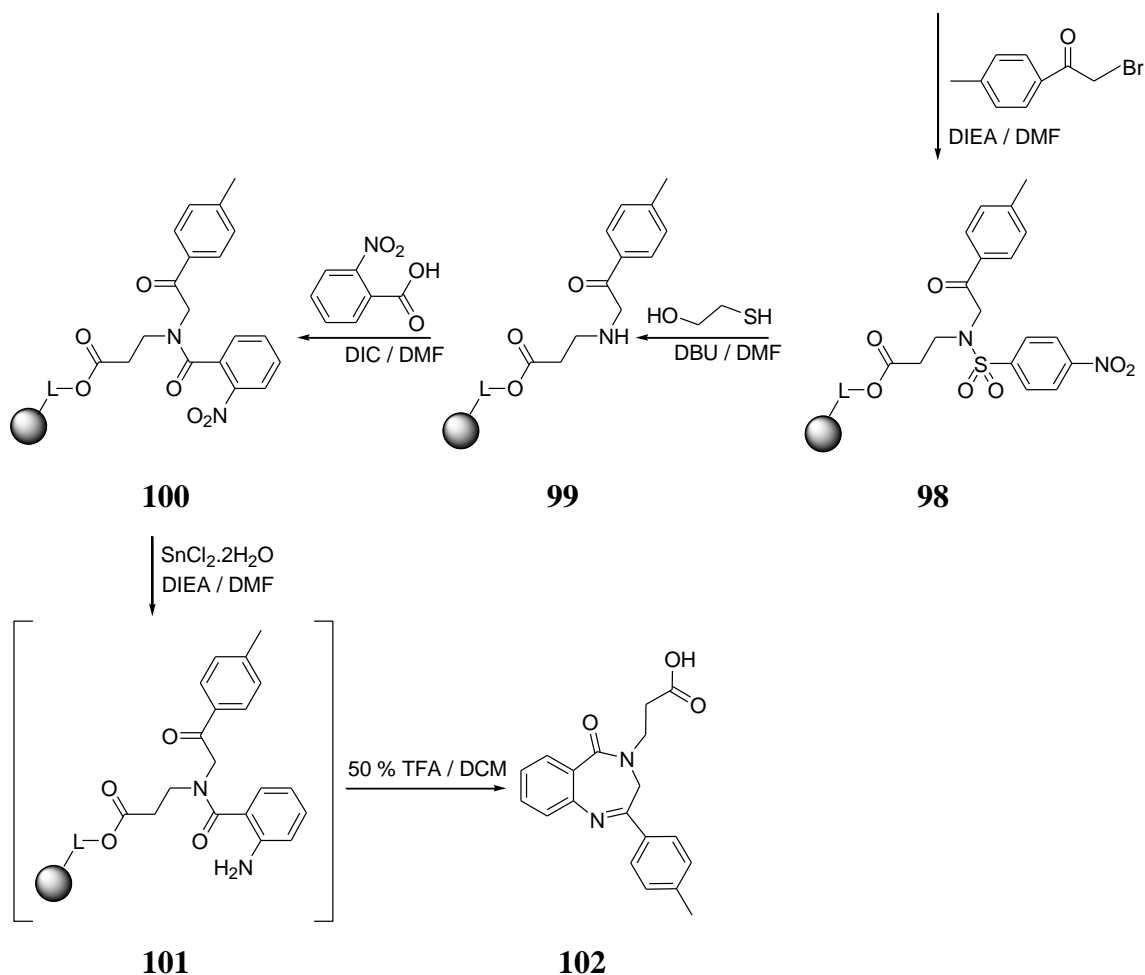


Schéma 20: Syntéza trisubstituovaných 3,4-dihydro-benzo[e][1,4]-diazepin-5-onů na Wangově pryskyřici:  $R_1$  –  $\beta$ -alanin;  $R_2$  – 4-methylfenyl;  $R_3$  – vodíkový atom, pyridinový cyklus<sup>1</sup>.

### 3.2.2.2. 1,2,3,4-tetrahydro-5H-benzo[e][1,4]-diazepin-5-ony

Byly syntetizovány na základě dvou variabilních metod. První metoda využívala Leuckart-Wallachovu reakci<sup>21</sup> a druhá metoda vycházela ze struktury zvané benzen fused heterocycles (BFH)<sup>37</sup>.

#### 3.2.2.2.1. Leuckart-Wallachova redukce

Tato metoda spočívala v nalezení vhodných substituentů  $R_1$ ,  $R_2$  a  $R_3$  pomocí syntézy na pevné fázi a aplikaci Leuckart-Wallachovy redukce, jejíž nevýhodou byla doposud tvorba nežádoucích *N*-formyl vedlejších produktů a obtíže při selektivní syntéze primárních aminů, k čemuž při této syntéze ale nedocházelo. Výhoda této metody spočívala v přímé přeměně aldehydů či ketonů za vzniku příslušného sekundárního či primárního aminu bez izolace iminových intermediátů<sup>21</sup>.

Nejprve bylo potřeba z Wangovy pryskyřice připravit bromoacetalovou pryskyřici **103**, jejíž redukční aminace s primárním aminem v přítomnosti DMSO vedla ke vzniku sekundárního aminu **104**, čímž došlo k začlenění substituentu R<sub>1</sub> do budoucí struktury cílových derivátů. Po tomto kroku bylo nutno ověřit úspěšnost aminace provedením chloranilového testu, který musel být negativní. Reakce 2-aminobenzoové kyseliny či 2-amino-4-chlorobenzoové kyseliny aktivované pomocí HATU s intermediátem **104** v přítomnosti DIEA a v DMF poskytla meziprodukt **105**, jehož redukční aminací s aldehydem či ketonem v DMF s kyanoborohydridem sodným NaBH<sub>3</sub>CN v kyseliny octové byl získán intermediát **106**. K transformaci docházelo v přítomnosti čisté kyseliny mravenčí jako redukčního činidla prostřednictvím intramolekulární Leuckart-Wallachovy redukce (**107**). Následným odštěpením z polymerního nosiče a cyklizací byl získán konečný 1,2,3,4-tetrahydro-5H-benzo[e][1,4]-diazepin-5-on **108** ve vysokém výtěžku a čistotě bez vedlejších produktů (schéma 21) <sup>21,37</sup>. Ke snížení výtěžku došlo při použití 2-amino-4-chlorobenzoové kyseliny jako substituentu R<sub>3</sub> <sup>21</sup>.

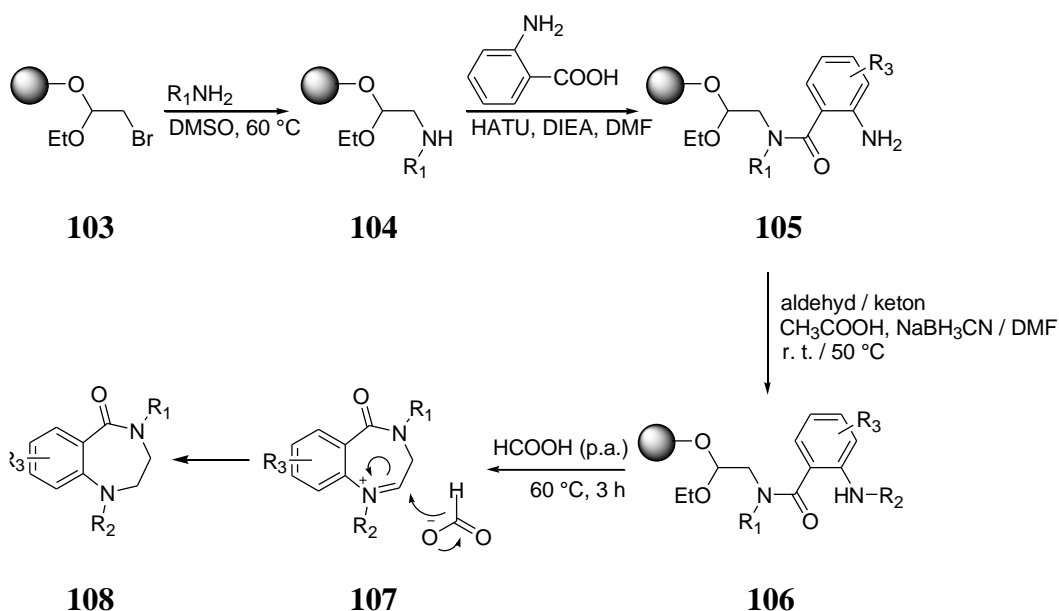


Schéma 21: Syntéza 1,2,3,4-tetrahydro-5H-benzo[1,4]-diazepin-5-onů a transformace via intramolekulární Leuckart-Wallachovy redukce: R<sub>1</sub> – benzyl, isobutyl, fenethyl, 4-methoxybenzyl; R<sub>2</sub> – benzyl, 3-brombenzyl, cyklohexyl; R<sub>3</sub> – vodíkový atom, p-chlor <sup>21</sup>.

### 3.2.2.2.2. 4,7,8-trisubstituované 1,2,3,4-tetrahydro-5H-benzo[e][1,4]-diazepin-5-ony

Principem tohoto postupu bylo vytvoření struktury zvané benzene fused heterocycles (BFH), vzniklé interakcí příslušných skupin 4-chloro-2-fluoro-5-nitrobenzoové kyseliny vázané přes polohu 2- na polymerní nosič s kyselé labilním

amidickým linkerem (BAL) **109**. Struktura BFH obsahovala benzenové jádro pocházející z výše zmíněné kyseliny a jeden ze dvou heterocyklů lokalizovaných z pravé či z levé strany jádra. Využitím této strategie byly připraveny deriváty různého typu, včetně 4,7,8-trisubstituovaných 1,2,3,4-tetrahydro-5*H*-benzo[*e*][1,4]-diazepin-5-onů <sup>37</sup>.

Syntéza vycházela z arylace 4-chloro-2-fluoro-5-nitrobenzoové kyseliny na polymerní nosič s BAL linkerem **109** a s imobilizovaným ethanolaminem (**110**) za vzniku **111**. Jeho reakce s methyljodidem poskytla reaktivní ester **112** a vedlejší produktu **113**, špatně odstranitelný i sérií specifických reakcí (schéma 22) <sup>37</sup>.

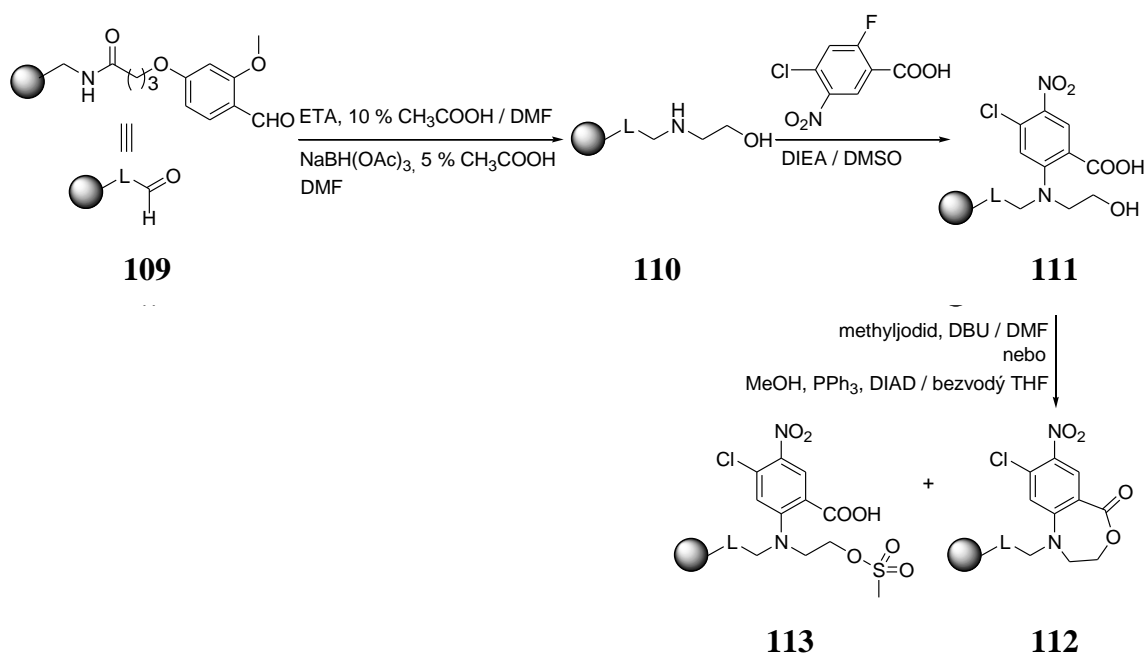


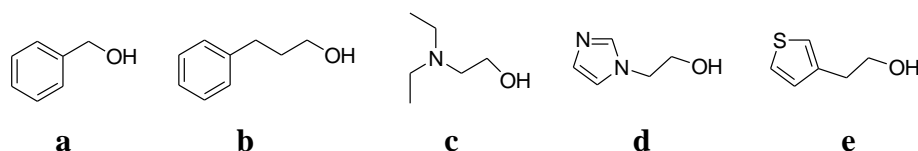
Schéma 22: Předpoklad syntézy 4,7,8-trisubstituovaných 1,2,3,4-tetrahydro-5*H*-benzo[*e*][1,4]-diazepin-5-onů <sup>37</sup>.

Proto byla navržena reakce vycházející z imobilizace *N*-(2-aminoethyl)-2-nitrobenzensulfonamidu na polymerní nosič s BAL linkerem **109** v přítomnosti 10 % kyseliny octové v DMF a NaBH(OAc)<sub>3</sub> s 5 % kyselinou octovou v DMF za vzniku sekundárního aminu chráněného 2-Nos skupinou **114**. Arylace s 4-chloro-2-fluoro-5-nitrobenzoovou kyselinou, DIEA v DMSO poskytla meziproduct **115**, podrobený alkylaci na základě dvou testovaných metod.

První metoda využila alkylhalogenidy, a to ethyljodid či benzylbromid, v přítomnosti báze Et<sub>3</sub>N či DIEA v DMF za vzniku alkylačního produktu **116a** i vedlejšího produktu vzniklého esterifikací karboxylové skupiny.

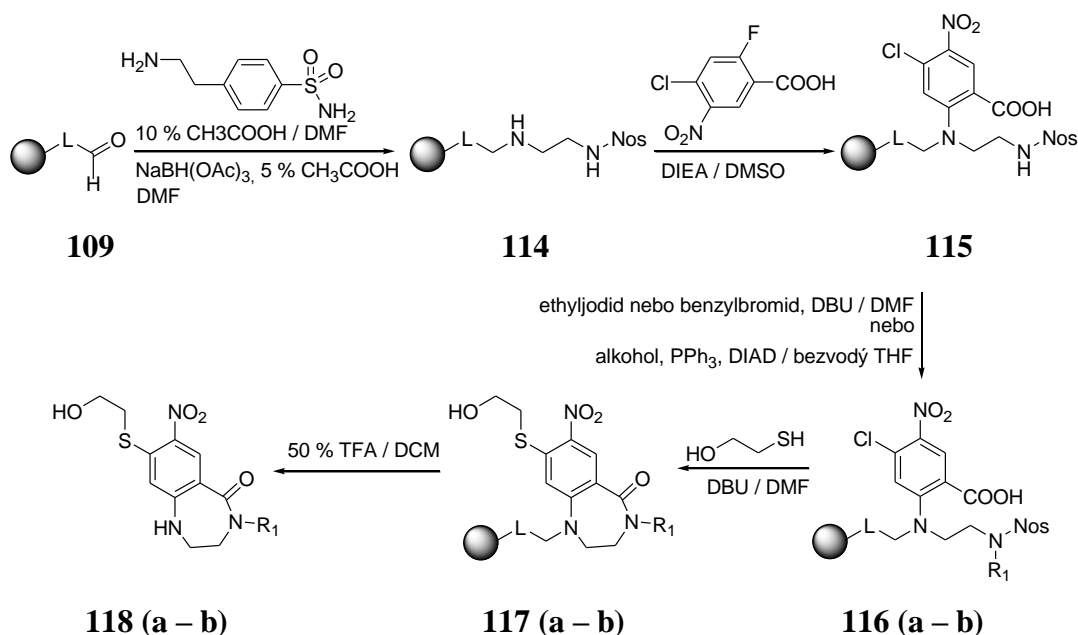
Druhá cesta aplikovala Mitsunobuovu reakci pro konverzi primárních a sekundárních alkoholů (obr. 6) a jejich naalkylování na N-H skupinu v přítomnosti DIAD, PPh<sub>3</sub> v bezvodém THF za zisku intermediátu **116b**.

Deprotekci amino-skupiny v 2-merkptoethanolu, DBU (0,6 mmol) v DMF (**117a**, **117b**) a odštěpením z pryskyřice pomocí 50 % TFA v DCM vedlo k příslušným benzodiazepinonům **118a**, **118b** (schéma 23) <sup>37</sup>.



Obr. 6: Přehled primárních a sekundárních aminů pro alkylation N-H skupiny: benzylalkohol (a); 3-fenylpropan-1-ol (b); 2-diethylaminoethanol (c); 2-imidazol-1-yl-ethanol (d); 2-thiofen-3-yl-ethanol (e).

Příslušný substituent v poloze 8- vznikl působením mikrovlnného záření v přítomnosti 10 % primárního či sekundárního aminu v DMSO na intermediát **116a**, **116b** bez vzniku vedlejších meziproduktů. Odchráněním vzniklých intermediátů **119a**, **119b** v přítomnosti 2-merkptoethanolu, DBU v DMF (**120a**, **120b**) a odštěpením z polymerního nosiče pomocí 50 % TFA v DCM byly získány 4,7,8-trisubstituované 1,2,3,4-tetrahydro-5H-benzo[e][1,4]-diazepin-5-ony **121a**, **121b** (schéma 23) <sup>37</sup>.



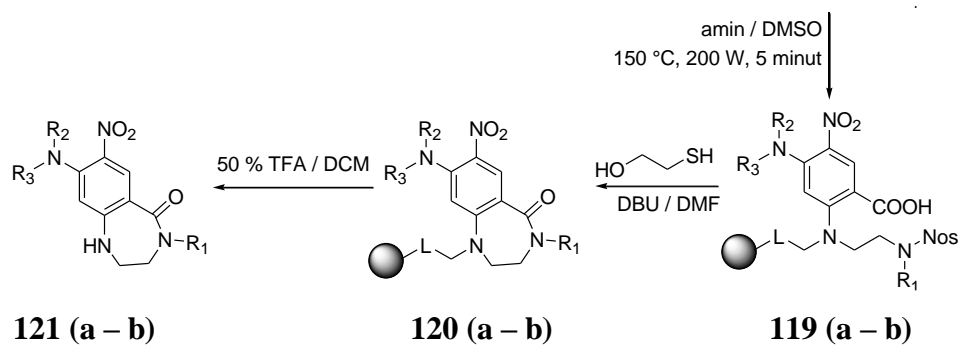


Schéma 23: Syntéza 4,7,8-trisubstituovaných 1,2,3,4-tetrahydro-5H-benzo[e][1,4]-diazepin-5-onů:  $R_1$  – benzyl, ethyl, 2-imidazol-1-yl, 2-thiofen-3-yl;  $R_2$  a  $R_3$  – primární a sekundární aminy (2-amino-ethanol, benzylamin, pentylamin, piperidin, pyrrolidin, piperazin, morfolin) <sup>37</sup>.

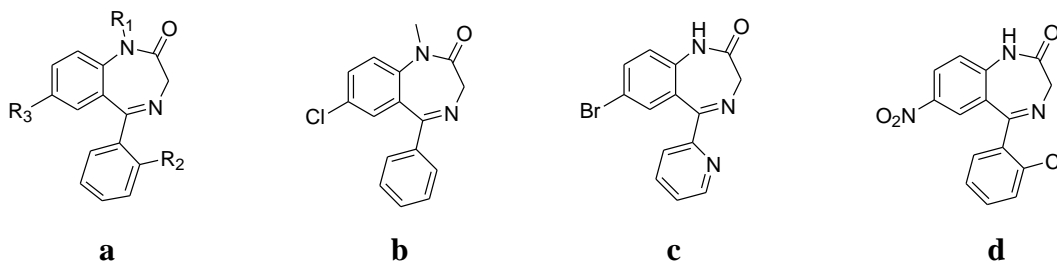


### 3.3. Vlastnosti a biologická aktivita benzodiazepinů a 1,4-benzodiazepin-2-onů

Tato kapitola podává přehled o struktuře, historii a vývoji a některých účincích výše zmíněných látek.

Ve většině případů byl prokázán účinek těchto psychoaktivních látek na CNS prostřednictvím GABA receptorů<sup>38</sup>. Tyto receptory mohou být dvojího typu s enzymaticky odlišnou funkcí, jejichž značení se liší spodním indexem charakteristickým pro daný typ receptoru. Hlavní úlohu má GABA<sub>A</sub> receptor představující iontový kanál s výrazným inhibičním účinkem<sup>39</sup>. Při inhibici tohoto typu receptoru bylo pozorováno zlepšení úzkostných stavů<sup>35</sup>. Kromě těchto účinků byly využity při léčbě nádorových onemocnění<sup>40,41,42</sup> jako inhibitory některých enzymů či léčbě jiných onemocnění, například hyperlipidemie<sup>43,44</sup>.

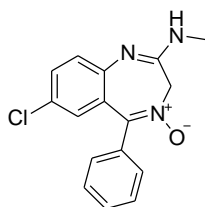
Tato vybraná skupina derivátů (obr. 7) tvoří aktivní farmaceutickou substanci v léčivech s komerčním názvem diazepam, bromazepam či clonazepam<sup>6</sup>, převážně se sedativním, hypnotickým, antikonvulzivním, anxiolytickým, amnestickým či myorelaxačním účinkem<sup>2,3</sup>.



Obr. 7: Obecná struktura 1,3-dihydro-benzo[e][1,4]-diazepin-2-onu (a) a jeho derivátů: diazepam (b), bromazepam (c) a clonazepam (d)<sup>45</sup>.

#### 3.3.1. Chlordiazepoxid

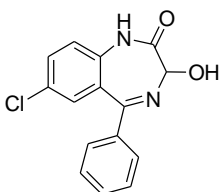
Jedním z prvních mezníků v historii benzodiazepinů představovala náhodná syntéza chlordiazepoxidu (obr. 8) připraveného roku 1955 Leem Sternbachem zabývajícím se vývojem tranquilizerů (sedativ), který této látce nevěnoval přílišnou pozornost<sup>46</sup>. Teprve až o dva roky později byly provedeny testy biologické aktivity s potvrzením výrazně silných sedativních, hypnotických, amnestických, anxiolytických i myorelaxačních účinků<sup>9</sup> a s poměrně dlouhým biologickým poločasem<sup>47</sup>. Po pěti letech od svého objevu byl uveden na trh pod několika obchodními názvy, například Librium či Elenium v České republice<sup>46</sup>.



Obr. 8: Struktura chlordiazepoxidu <sup>9</sup>.

### 3.3.2. Oxazepam

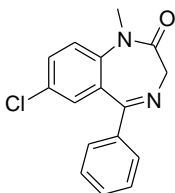
Později byla studována biologická aktivita i dalších derivátů odvozených od chlordiazepoxidu. Po neúspěšných biologických testech *N*-oxidů byly nasyntetizovány 3-acetoxy deriváty poskytující při mírné hydrolyze biologicky aktivní oxazepam (obr. 9), uvedený na trh roku 1965 pod obchodním názvem Serax <sup>9</sup>.



Obr. 9: Struktura oxazepamu <sup>9</sup>.

### 3.3.3. Diazepam

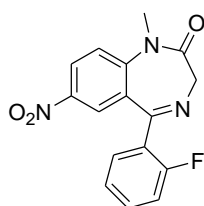
Další známou látkou byl diazepam (obr. 10) vyráběný od roku 1963 firmou Hoffmann-La Roche a distribuován pod obchodním názvem Valium <sup>46</sup>. U tohoto léčiva byly prokázány podobné účinky jako u výše zmíněných sloučenin. Své uplatnění našel i při celkové anestezii či léčbě epileptických křečí. Jeho podávání by nemělo překročit dobu pěti týdnů, poté by mohlo docházet ke vzniku závislosti. Avšak i během krátkodobého užívání byly pozorovány nežádoucí účinky jako spavost, únava či porucha koordinace pohybu. V současné době je toto generikum dostupné na lékařský předpis <sup>38</sup>.



Obr. 10: Struktura diazepamu <sup>9</sup>.

### 3.3.4. Flunitrazepam

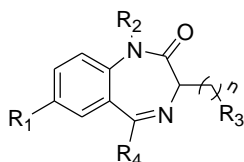
Tento derivát byl uveden na trh roku 1975 pod obchodním názvem Rohypnol (obr. 11) <sup>48,49</sup>. Základní strukturu tvořil standardně 1,4-benzodiazepin-2-onový skelet, mající vázanou nitro-skupinou v poloze 7-. Toto hypnotikum vykazovalo myorelaxační, antikonvulzivní, anxiolytické účinky i byl aplikován při krátkodobé léčbě nespavosti <sup>49,50</sup>. Jeho aktivita byla sedmkrát vyšší než dříve připraveného diazepamu se sedativními účinky <sup>51</sup> a vykazoval i vyšší toxicitu oproti jiným BZD <sup>52,53</sup>. Podáním tohoto narkotika docházelo ke zklidnění, ztrátě nervozity a emocí, čehož bylo zneužito při krádežích či uspávání lidí. V několika případech byly evidovány sebevraždy či znásilnění pod vlivem této drogy, jež při vyšších dávkách způsobovala i ztrátu paměti. Kvůli mnoha nežádoucím účinkům bylo jeho použití postupně zakázáno, v České republice až roku 2006 <sup>48,50,52</sup>.



Obr. 11: Struktura flunitrazepamu <sup>48</sup>.

### 3.3.5. Inhibitory FAK kinasy

Kromě výše zmíněných účinků byla popsána aktivita BZD jako inhibitorů FAK kinasy při léčbě nádorových onemocnění <sup>54</sup>. V posledních letech bylo pro tuto léčbu využito i dalších sloučenin s motivem 1,4-benzodiazepin-2-onů s vázaným heterocyklem v poloze C-5 jako substituent R<sub>4</sub>. Byl pozorován účinek proti solidním maligním nádorům i proti hematologické rakovině (obr. 12) <sup>40</sup>.

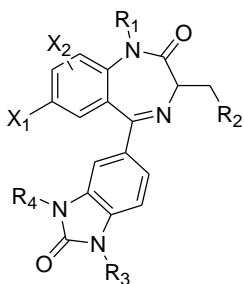


Obr. 12: Struktura 1,4-benzodiazepin-2-onů s účinkem proti nádorovým onemocněním: R<sub>1</sub> – halogen; R<sub>2</sub> – vodíkový atom, C1 až C6 alkyl; R<sub>3</sub> – fenyl či naftyl s jedním či dvěma substituenty; R<sub>4</sub> – C3 až C7 substituovaný heterocykloalkyl <sup>40</sup>.

### 3.3.6. Inhibitory F<sub>1</sub>F<sub>0</sub>-ATPasy

V neposlední řadě byly testovány i jako inhibitory mitochondriální F<sub>1</sub>F<sub>0</sub>-ATPasy využívající protonový gradient generovaný oxidativní fosforylací (obr. 13). Tato léčiva

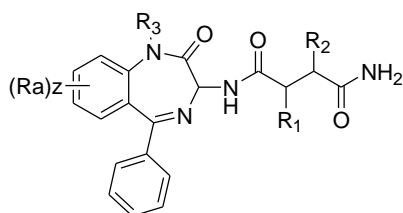
byla aplikována pro léčbu revmatické artritidy, svrabu, Crohnovy nemoci, astmatu, rakoviny či infekcí <sup>41</sup>.



Obr. 13: Struktura 1,4-benzodiazepin-2-onů působící jako inhibitor mitochondriální  $F_1F_0$ -ATPasy:  $X_1$  – chlor, fluor;  $X_2$  – vodíkový atom, halogen, hydroxyl, methoxy, ethoxy, methyl, ethyl;  $R_1$  – vodíkový atom, C1 až C3 alkyl, hydroxyethyl, hydroxypropyl;  $R_2$  – substituovaný fenyl či naftyl;  $R_3, R_4$  – vodíkový atom či C1 až C5 alkyl <sup>41</sup>.

### 3.3.7. Inhibitory Notch receptoru

Poměrně nedávno byly popsány účinky bis-fluoroalkyl-1,4-diazepinonů (obr. 14) inhibující Notch receptor <sup>42</sup>, jakožto trans-membránový protein, který je součástí signální dráhy významné pro vývoj a zrání buňky <sup>55</sup>. Tyto látky byly vhodné pro léčbu, prevenci či zpomalení onemocnění, především rakoviny <sup>42</sup>.



Obr. 14: Struktura 1,4-benzodiazepin-2-onu inhibující Notch receptor:  $R_1$  – trifluoroethyl, trifluoropropyl;  $R_2$  – jako  $R_1$ , trifluorobutyl;  $R_3$  – vodíkový atom, methyl;  $R_a$  – fluor, chlor, kyano, methoxy,  $-NHCH_2CH_2OCH_3$ ;  $z$  – 1, 2 <sup>42</sup>.

### 3.3.8. Inhibitory DGAT 1

Deriváty se složkou 1,4-benzodiazepin-2-onů byly testovány i jako inhibitory diacylglycerol *o*-acyltransferasy typu 1 (DGAT 1) <sup>43</sup> přítomné v endoplasmatickém retikulu <sup>56</sup>. Jejich hlavní funkcí je katalýza tvorby triacylglycerolu z diacylglycerolu a acyl-CoA <sup>57</sup>, které jsou nezbytné pro vznik tukové tkáně. Jedná se o integrální membránový protein vyskytující se ve dvou izomerech s podobnými katalytickými

účinky, ale rozdílnou primární strukturou <sup>57</sup>. Jejich biologické vlastnosti jsou vhodné pro prevenci a léčbu hyperlipidemie, obezity či diabetu 2. typu <sup>43,44</sup>.

### 3.3.9. Antikonvulzivní účinek komplexů

Calixareny představují skupinu látek obsahující značný počet rigidních center i funkčních skupin, čímž jsou vhodné pro studium biologické aktivity. Při studiu derivátů *p-tert*-butylcalix[4]arenů s motivem 1,4- či 1,5-benzodiazepinonů byl prokázán antikonvulzivní účinek těchto komplexů. Testování bylo provedeno na myších, kdy po transdermálním podání Corazolu, přípravku způsobujícím křeče, bylo provedeno srovnání pomocí těchto látek s pozitivním účinkem <sup>58</sup>.

Komplexy calixarenů s BZD vykazují vyšší antikonvulzivní účinek než samotný 3-hydroxyfenazepam představující aktivní metabolit fenazepamu (obr. 15-a), používaného jako sedativum <sup>58</sup>. Tvorbou komplexů BZD s přírodními komplexy  $\beta$ -cyklodextrinů a amylosy docházelo ke zvýšení jejich biologické dostupnosti, což bylo prokázáno i u vybraných sloučeniny 1,4-benzodiazepinonů, tedy 7-bromo-5-(*o*-chloro)fenyl- (obr. 15 – a) a 1-hydrazinokarbonylmethyl-7-bromo-5-fenyl-1,2-dihydro-3*H*-1,4-benzodiazepin-2-onů (obr. 15 – b) vytvářející komplexy s calix[4]areny. Tyto dva počáteční substráty poskytly srovnání s nově syntetizovaným komplexem 25,27-bis[(hydrazinokarbonyl)methoxy]-26,28-dihydroxy-*p-tert*-butylcalix[4]arenem s vyšší farmakologickou aktivitu <sup>59</sup>.

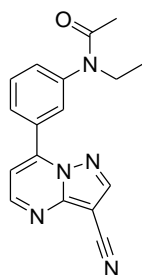


Obr. 15: Struktura 1,4-benzodiazepin-2-onů: fenazepam (7-bromo-5-(*o*-chloro)fenyl-1,2-dihydro-3*H*-1,4-benzodiazepin-2-on) (a); 1-hydrazinokarbonylmethyl-7-bromo-5-fenyl-1,2-dihydro-3*H*-1,4-benzodiazepin-2-on (b) <sup>59</sup>.

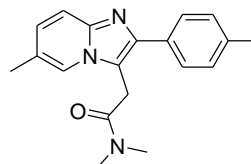
### 3.3.10. Nebenzodiazepinová hypnotika

Záhy po uvedení BZD na trh došlo k náhlému nárůstu užívání vedoucí až k jejich zneužití <sup>60</sup>. Později byl zjištěn jejich negativní účinek na CNS <sup>61</sup>, čímž byla jejich aplikace omezena či zcela zakázána <sup>61</sup>. V současné době jsou nahrazovány nebenzodiazepinovými

hypnotiky zvanými Z-drugs s podobnou aktivitou jako benzodiazepiny ovšem bez vedlejších účinků<sup>62</sup>. Mezi zástupce těchto látek byly zařazeny Zaleplon (obr. 16 – a)<sup>63</sup> či Zolpidem (obr. 16 – b) působící proti nespavosti bez vlivu na stavbu spánku<sup>60, 62</sup>.



**a**



**b**

Obr. 16: Struktura Z-drugs: Zaleplon (a)<sup>63</sup>; Zolpidem (b)<sup>60</sup>.

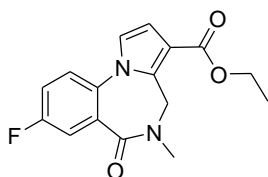
### 3.4. Vlastnosti a biologická aktivita derivátů 1,4-benzodiazepin-5-onů

V současné literatuře se nachází jen zlomek informací o vlastnostech a biologické aktivitě těchto derivátů<sup>1,64</sup>. Existuje však několik studií zabývajících se deriváty s motivem 1,4-benzodiazepin-5-onu bez dvojné vazby mezi atomy C=N<sup>65,66</sup>.

#### 3.4.1. Flumazenil jako antidotum

Antidota představují skupinu látek mající opačný účinek k jiné látce, působí tedy jako protijed. Tento imidazobenzodiazepinový derivát, zvaný flumazenil (obr. 17), je běžně předepisován právě při předávkování benzodiazepiny<sup>65</sup> s poměrně krátkým poločasem rozpadu<sup>67</sup>. V České republice byl registrován pod názvem Anexate<sup>45</sup>.

Význam tohoto antidota spočívá v kompetitivní inhibici účinné látky působící na CNS prostřednictvím GABA<sub>A</sub> receptorů. Metabolizace probíhá především v játrech, během 12 hodin po intravenózním podání odchází pouze 0,12 % v nezměněné podobě močí z těla ven. Byly prokázány tři sekundární metabolity, kterými jsou *N*-desmethylflumazenil, *N*-desmethylflumazenilová kyselina a flumazenilová kyselina. Během testování terapeutické dávky jej většina pacientů snášela dobře, více než u 1 % pacientů se objevily vedlejší účinky, jako nevolnost či zvracení. Dávkování je proto pro každého jedince individuální<sup>67</sup>.

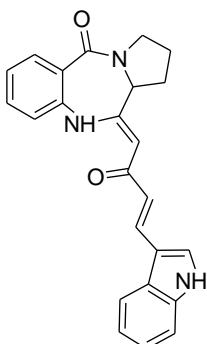


Obr. 17: Struktura flumazenilu<sup>45</sup>.

#### 3.4.2. Fuligocandin B (FCB) jako podnět pro zvýšení apoptosy

Nedávné studie potvrdily biologickou aktivitu látky zvané FCB (obr. 18) patřící mezi cykloanthranilylprolinové deriváty. Účinná látka FCB byla izolována z *myxomycete Fuligo candida*. Při testech na tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL) rezistentních buněčných liniích ATLL bylo zjištěno, že FCB zvyšuje produkci 15-deoxy- $\Delta^{12,14}$ -prostaglandinu J2 aktivací cyklooxygenasy-2. 15-deoxy- $\Delta^{12,14}$ -prostaglandin J2 zvyšuje senzitivitu leukemických buněk na TRAIL, jenž vyvolá apoptosu. FCB v kombinaci s TRAIL má výrazně vyšší účinek, než při podání látek samotných. TRAIL je členem superrodiny tumor necrosis factor selektivně

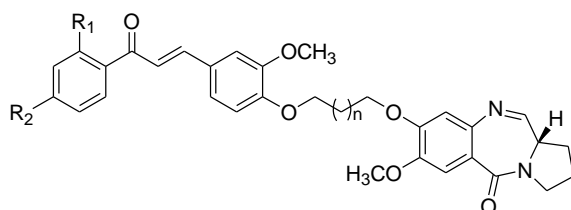
vyvolávajících apoptosu u různých nádorových buněk s nízkou toxicitou pro zdravé buňky. Rekombinantní TRAIL a protilátky vázající se na TRAIL jsou testovány v I. a II. fázi klinických studií <sup>66</sup>.



Obr. 18: Struktura Fuligocandinu B (FCB) <sup>66</sup>.

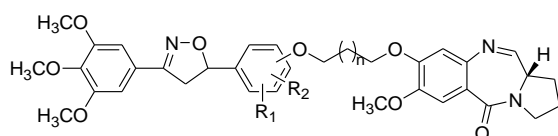
### 3.4.3. Protinádorový účinek komplexů s pyrrolo[2,1-c][1,4]-benzodiazepin-5-ony

Tyto sloučeniny byly připraveny jako potenciální protinádorové činidlo z chalkonu spojením s pyrrolo[2,1-c][1,4]-benzodiazepinovými hybridy (obr. 19) <sup>68</sup>. Chalkony patří mezi aromatické ketony významné svou biologickou aktivitou, proto se jejich základní struktura vyskytuje v mnoha syntetizovaných látkách <sup>69</sup>. Důkazem jsou pyrrolo[2,1-c][1,4]-benzodiazepinony izolované ze *Streptomyces*, u nichž byla prokázána protinádorová aktivita <sup>68</sup>.



Obr. 19: Struktura chalkonu spojeného s pyrrolo[2,1-c][1,4]-benzodiazepinonem:  $R_1$  – hydroxy, methyl, ethyl, fenyl;  $R_2$  – vodíkový atom, hydroxy, fluor;  $n$  – 1 až 4 <sup>68</sup>.

Další studovanou látkou byl komplex isoxazolinu s pyrrolo[2,1-c][1,4]-benzodiazepinony (obr. 20), které byly testovány *in vitro* s pozitivním účinkem proti lidským nádorovým buněčným liniím <sup>70</sup>.



Obr. 20: Struktura isoxazolinu s pyrrolo[2,1-c][1,4]-benzodiazepinonem:  $R_1$  – v poloze C-5 vázaný vodíkový atom, methoxy;  $R_2$  – v poloze C-3 či C-4 methoxy;  $n$  – 1 až 4 <sup>70</sup>.

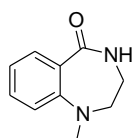


### 3.4.4. Aktivita derivátů 1,2,3,4-tetrahydro-5H-benzo[e][1,4]-diazepin-5-onů

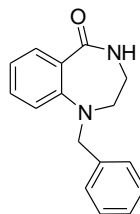
Biologická aktivita těchto derivátů byla výrazně ovlivněna příslušnou substitucí v poloze C-1<sup>28,29</sup>.

#### 3.4.4.1. Sedativní účinek 1,2,3,4-tetrahydro-5H-benzo[e][1,4]-diazepin-5-onů

První skupinu představují deriváty 1,2,3,4-tetrahydro-5H-benzo[e][1,4]-diazepin-5-onů mající v poloze C-1 vázaný methyl (obr. 21 – a) či benzyl (obr. 21 – b), u nichž byl potvrzen antikonvulzivní účinek a účinek na CNS prostřednictvím GABA<sub>A</sub> receptorů. Spolu se stejnojmennými thiony byly aplikovány jako sedativum<sup>28</sup>.



a

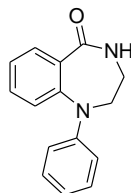


b

Obr. 21: Struktury 1,2,3,4-tetrahydro-5H-benzo[e][1,4]-diazepin-5-onů: 1,2,3,4-tetrahydro-1-methyl-5H-benzo[e][1,4]-diazepin-5-on (a); 1-benzyl-1,2,3,4-tetrahydro-5H-benzo[e][1,4]-diazepin-5-on (b)<sup>28</sup>.

#### 3.4.4.2. Odlišné účinky 1-fenyl-1,2,3,4-tetrahydro-5H-benzo[e][1,4]-diazepin-5-onu

1-fenyl-1,2,3,4-tetrahydro-5H-benzo[e][1,4]-diazepin-5-on (obr. 22) vykazoval odlišné vlastnosti než ostatní deriváty z této skupiny. Od 70. let minulého století byly studovány jeho psychotropní účinky na myších. Testováním při nízkých koncentracích byla zjištěna vyšší toxicita než u klasických benzodiazepinů a nebylo potvrzeno působení této látky na CNS<sup>29</sup>.



Obr. 22: Struktura 1-fenyl-1,2,3,4-tetrahydro-5H-benzo[e][1,4]-diazepin-5-onu.

#### 4. VÝSLEDKY A DISKUSE

Pro přípravu derivátů benzo[1,4]-diazepin-5-onů byly jako modelové aminokyseliny zvoleny  $\beta$ -alanin, alanin, serin, fenylalanin, valin a threonin (schéma 24). Uvedená metodika byla již dříve testována a popsána na  $\beta$ -alaninu <sup>1</sup>, na němž byly v této práci studovány alkylační reakce s doposud netestovanými haloketony.

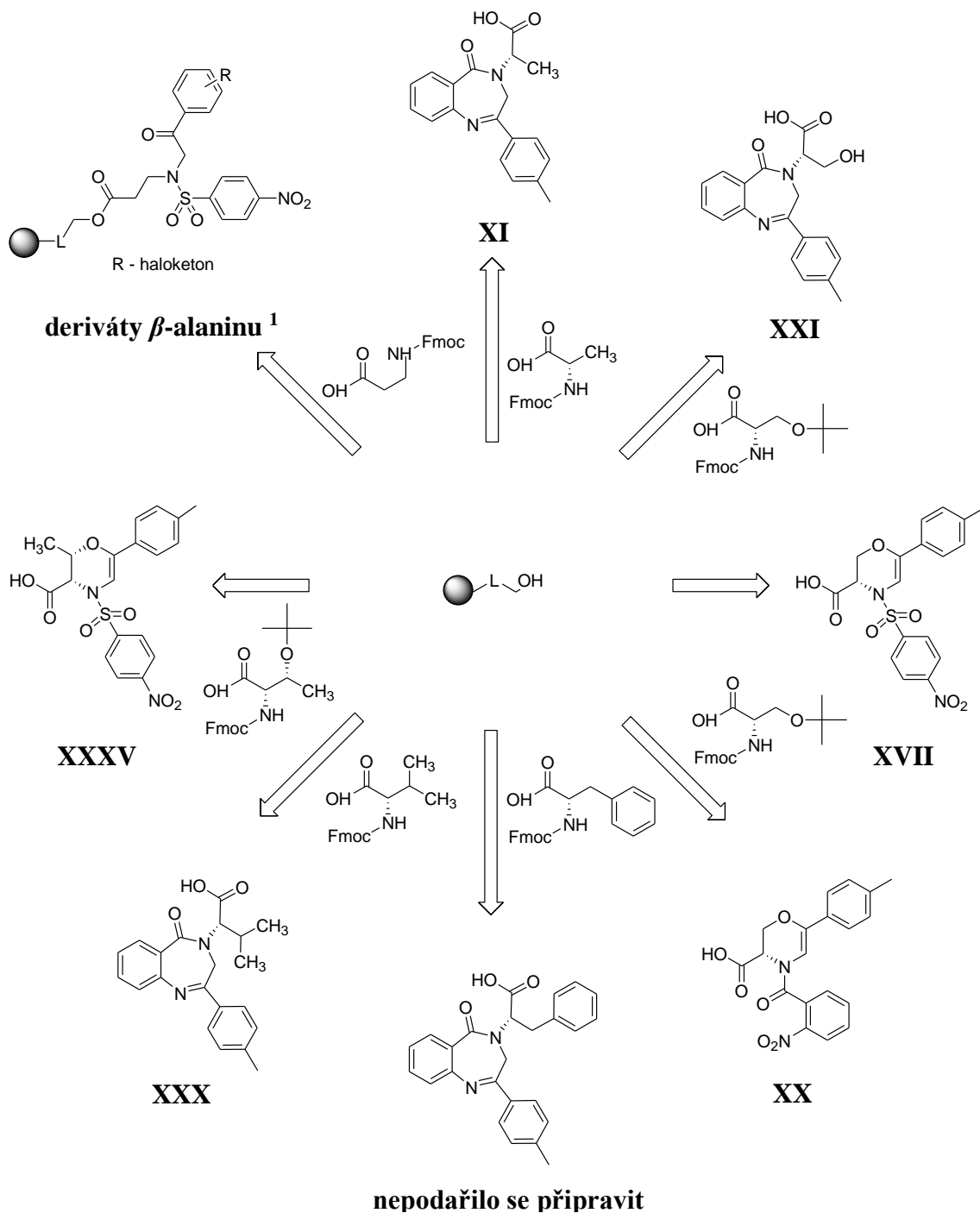


Schéma 24: Souhrnné schéma připravovaných derivátů.

#### 4.1. $\beta$ -alanin

Představuje strukturální izomer alaninu ze skupiny neesenciálních aminokyselin získávaný především z přírodních látek bohatých na dipeptidy.

Po imobilizaci Fmoc- $\beta$ -Ala-OH na Wangovu pryskyřici s ochráněnou amino-skupinou  $\beta$ -alaninu pomocí Fmoc-protektivní skupiny, probíhající dle odstavce 5.2.1. (schéma 25), byl stanoven loading pryskyřice **I** metodou vnějšího standardu na 0,30 mmol/g, což odpovídalo 45 % výtěžku reakce.

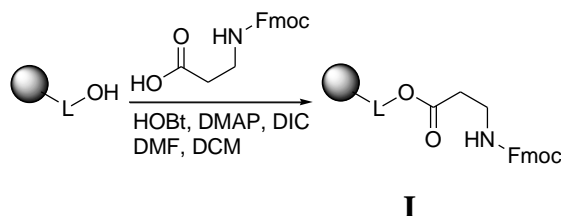


Schéma 25: Imobilizace Fmoc- $\beta$ -Ala-OH na Wangovu pryskyřici.

Následujícím krokem byla deprotektce koncové amino-skupiny dle odstavce 5.2.2. za vzniku reaktivní amino-skupiny na pryskyřici **II** využití při navazující sulfonylaci (schéma 26).

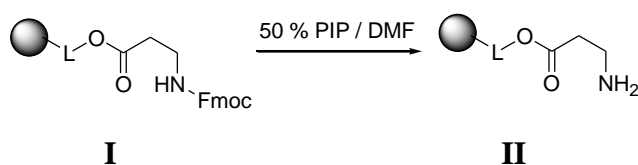


Schéma 26: Deprotektce koncové amino-skupiny.

Následovala sulfonylace dle odstavce 5.2.3. (schéma 27). Pro ověření jejího kvantitativního průběhu byla provedena kontrola s Fmoc-OSu, neboť výchozí látka ( $\beta$ -alanin) je pomocí LC-UV detekce obtížně detekovatelná. Po analýze nebyl kromě meziprojektu **III** detekován Fmoc- $\beta$ -Ala-OH, což prokázalo kvantitativní sulfonylaci a bylo přistoupeno k alkylaci s haloketony.

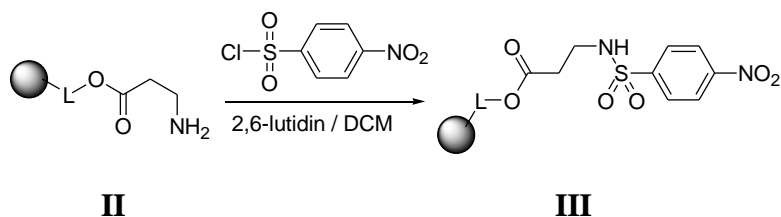


Schéma 27: Sulfonylace primární amino-skupiny.

Struktura **III** posloužila jako základ pro navázání a otestování různých bromketonů. Kromě dříve úspěšně použitého 2-brom-4-methylacetofenonu <sup>1</sup> (použitého zde jako kontrola) byly testovány i další dva haloketony, a to 2-brom-4-chlor-3-nitroacetofenon a 1,3-dichloroacetofenon), obsahující ve své struktuře aktivní halogeny vhodné pro další potenciální modifikaci pomocí nukleofilní substituce. Pro provedení reakce byly testovány odlišné typy rozpouštědel a bází.

Haloketon	Báze	Rozpouštědlo	Derivát	Čistota	ESI <sup>-</sup>
2-brom-4-methylacetofenon	DIEA	DMF	III-a	70 %	405,076
	PS	DMF	III-b	51 %	
	DIEA	THF	III-c	50 %	
2-brom-4-chlor-3-nitroacetofenon	DIEA	DMF	III-d	20 %	470,006
	PS	DMF	III-e	5 %, 10 % VL	
	DIEA	THF	III-f	0 %, 8 % VL	
1,3-dichloroacetofenon	DIEA	DMF	III-g	17 %	327,038

Tabulka 1: Přehled použitých haloketonů v kombinaci s odlišnou bází a rozpouštědlem: VL – výchozí látka (III).

#### 4.1.1. 2-brom-4-methylacetofenon, DIEA v DMF

2-brom-4-methylacetofenon byl smísen s DIEA v DMF a reagován s pryskyřicí **III** za zisku intermediátu **III-a** o čistotě 70 % (schéma 28).

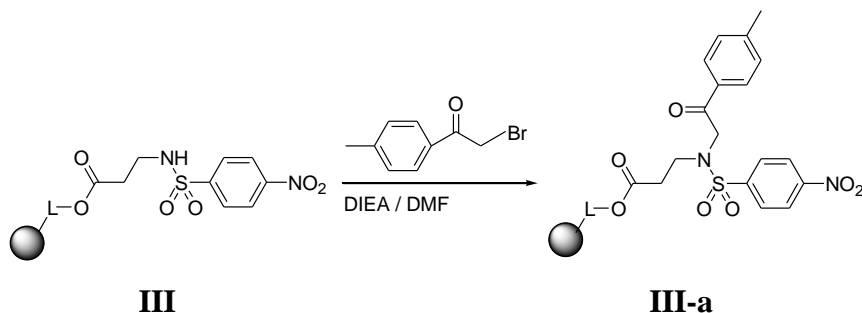


Schéma 28: Alkylace s 2-brom-4-methylacetofenonem, DIEA v DMF.

#### 4.1.2. 2-brom-4-methylacetofenon, protonová houba v DMF

Další testovanou kombinací byl 2-brom-4-methylacetofenon v přítomnosti protonové houby (PS) v DMF (schéma 29) vedoucí k intermediátu **III-b** o čistotě 51 %.

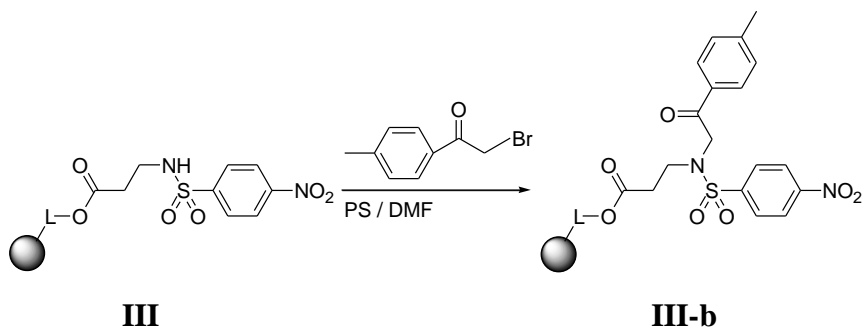


Schéma 29: Alkylace s 2-brom-4-methylacetofenonem, PS v DMF.

#### 4.1.3. 2-brom-4-methylacetofenon, DIEA v THF

Poslední testovaným typem reakce pro 2-brom-4-methylacetofenon byla záměna rozpouštědla za THF (schéma 30) za vzniku intermediátu **III-c** o čistotě 50 %.

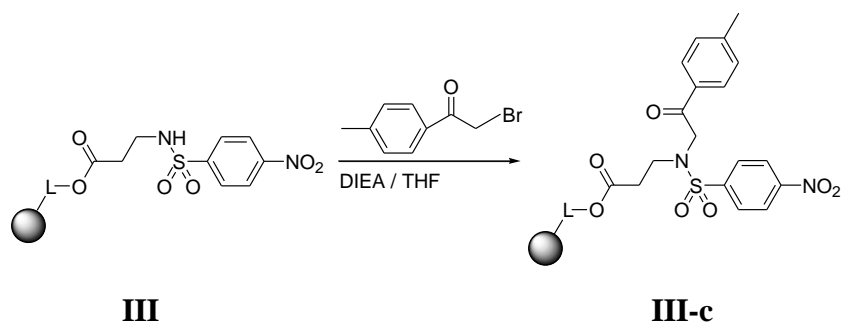


Schéma 30: Alkylace s 2-brom-4-methylacetofenonem, DIEA v THF.

#### 4.1.4. 2-brom-4-chlor-3-nitroacetofenon, DIEA v DMF

Druhým testovaným haloketonem byl 2-brom-4-chlor-3-nitroacetofenon nejprve v přítomnosti DIEA v DMF (schéma 31) za vzniku intermediátu **III-d** o čistotě 20 %.

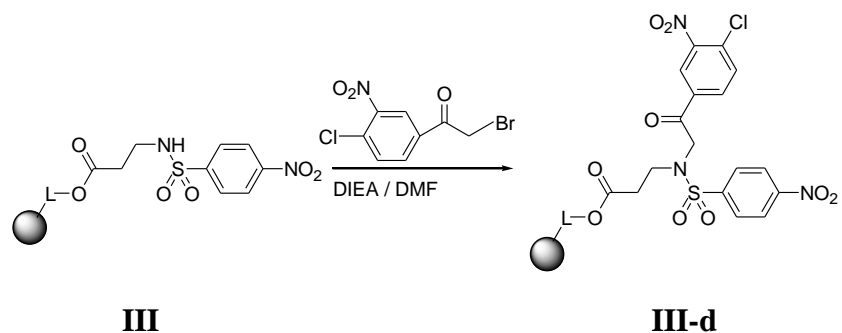


Schéma 31: Alkylace s 2-brom-4-chlor-3-nitroacetofenonem, DIEA v DMF.

#### 4.1.5. 2-brom-4-chlor-3-nitroacetofenon, protonová houba v DMF

Reakce 2-brom-4-chlor-3-nitroacetofenonu v přítomnosti PS v DMF (schéma 32) poskytla intermediát **III-e**, který byl detekován pouze s 5 % čistotou. Ve spektru byl

přítomen také sulfonamidický intermediát **III** z 10 %. Alkylace za těchto podmínek téměř neproběhla a poskytla směs neidentifikovaných sloučenin.

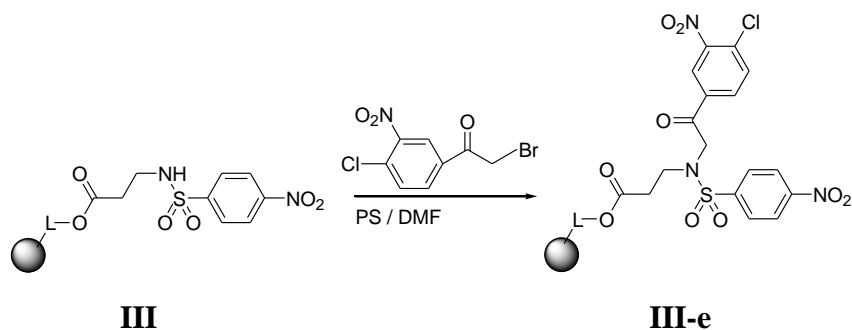


Schéma 32: Alkylace s 2-brom-4-chlor-3-nitroacetofenonem, PS v DMF.

#### 4.1.6. 2-brom-4-chlor-3-nitroacetofenon, DIEA v THF

Poslední testovanou možností byla záměna rozpouštědla za THF (schéma 33), kdy reakce neprobíhala a ve spektru byla detekována pouze výchozí látka **III**.

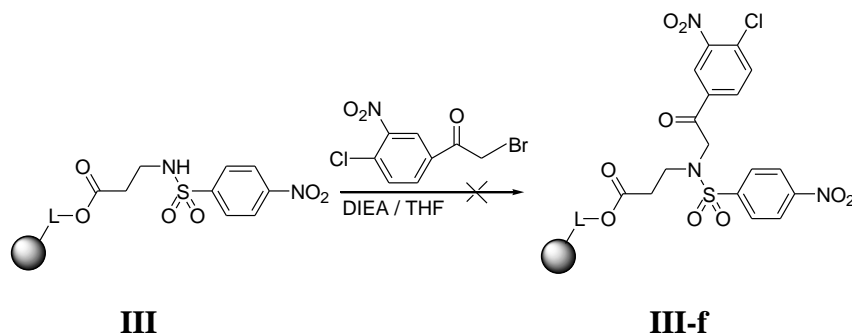


Schéma 33: Alkylace s 2-brom-4-chlor-3-nitroacetofenonem, DIEA v THF.

#### 4.1.7. 1,3-dichloraceton, DIEA v DMF

Dalším alternativním haloketonem byl 1,3-dichloraceton poskytující sloučeninu **III-g** (schéma 34). Čistota reakce však byla pouze 17 %.

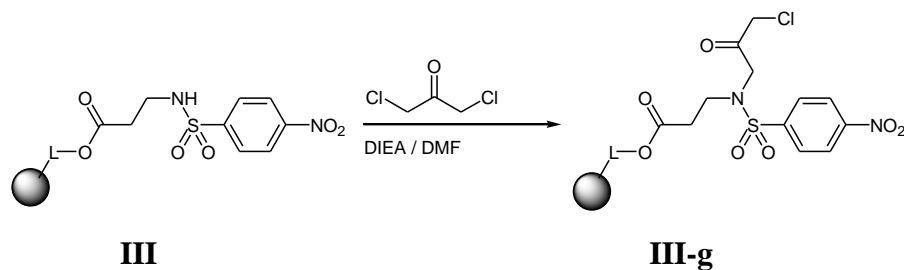


Schéma 34: Alkylace s 1,3-dichloracetonem, DIEA v DMF.

Vzhledem k neuspokojivým výsledkům bylo od dalších pokusů v této oblasti upuštěno.

## 4.2. Alanin

První nově testovanou aminokyselinou byl alanin patřící mezi neesenciální  $\alpha$ -aminokyseliny.

Úvodním krokem syntézy byla imobilizace Fmoc-Ala-OH na Wangovu pryskyřici dle odstavce 5.2.1. (schéma 35). Na základě kvantifikace byl stanoven loading pryskyřice **IV** metodou vnějšího standardu na 0,31 mmol/g, což odpovídalo 68 % výtěžku reakce.

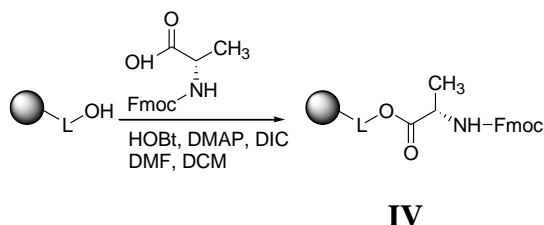


Schéma 35: Imobilizace Fmoc-Ala-OH na Wangovu pryskyřici.

Odchránění amino-skupiny alaninu proběhlo dle odstavce 5.2.2. za vzniku substrátu **V** připraveného k sulfonylaci (schéma 36).

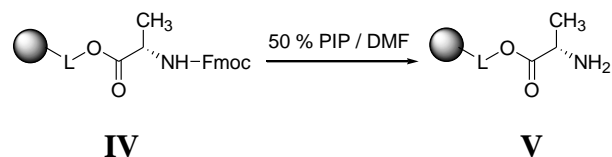


Schéma 36: Deprotekce koncové amino-skupiny.

Ta probíhala dle odstavce 5.2.3. vedoucí k intermediátu **VI** o čistotě 89 % (schéma 37). Kontrolní reakcí s Fmoc-OSu byla vyloučena přítomnost výchozí látky.

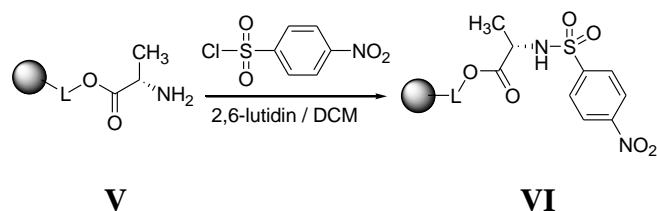
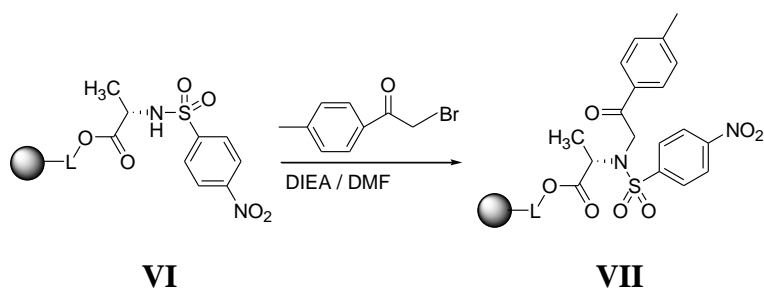


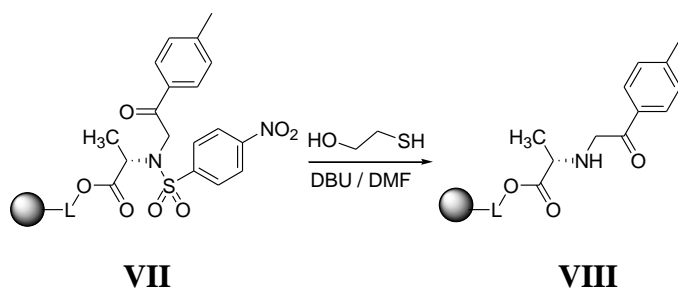
Schéma 37: Sulfonylace primární amino-skupiny.

Následovala alkylace s 2-brom-4-methylacetofenonem v bazickém prostředí DIEA v DMF za vzniku intermediátu **VII** o čistotě 77 % (schéma 38).



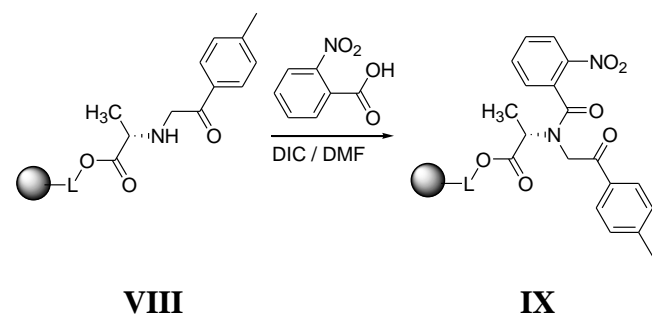
*Schéma 38: Alkylace s haloketony.*

Denosylace dle odstavce 5.2.5. vedla ke vzniku pryskyřice **VIII** a odštěpení vedlejšího produktu jako 4-nitrobenzensulfonová kyselina (schéma 39). Stanovení HPLC čistoty zde nebylo možné, protože vznikající aminoketony nejsou v TFA stabilní a podléhají rozkladu.



*Schéma 39: Denosylace.*

Immediately after this reaction, acylation was performed according to paragraph 5.2.6. (scheme 40). Purity of the product was 54 %.



*Schéma 40: Acylace s o-nitrobenzoovou kyselinou.*

This resulting structure **IX** represented the primary skeleton for the preparation of benzo[e][1,4]-diazepin-5-one, which was formed spontaneously during the reduction of the nitro group to the amino group. For this synthetic step, two reduction methods were tested and compared.



#### 4.2.1. Redukce dihydrátem chloridu cínatého

První metoda byla založena na redukci chloridem cínatým dle odstavce 5.2.7.1. Testovací reakce po jednom dni neproběhla kvantitativně a byla zopakována. Optimální reakční čas pro tuto reakci byl stanoven na dobu 3 – 5 dnů, jež zajistil dokonalou přeměnu substrátu **IX** s hmotou ESI<sup>-</sup> = 369,109 na **XI** s hmotou ESI<sup>-</sup> = 321,132. Během redukce docházelo k zacyklení, po přidavku štěpícího koktejlu k substrátu **X** pak k odštěpení z polymerního nosiče a zisku diazepinového kruhu, představující produkt **XI** o finální surové čistotě 40 % (schéma 41).

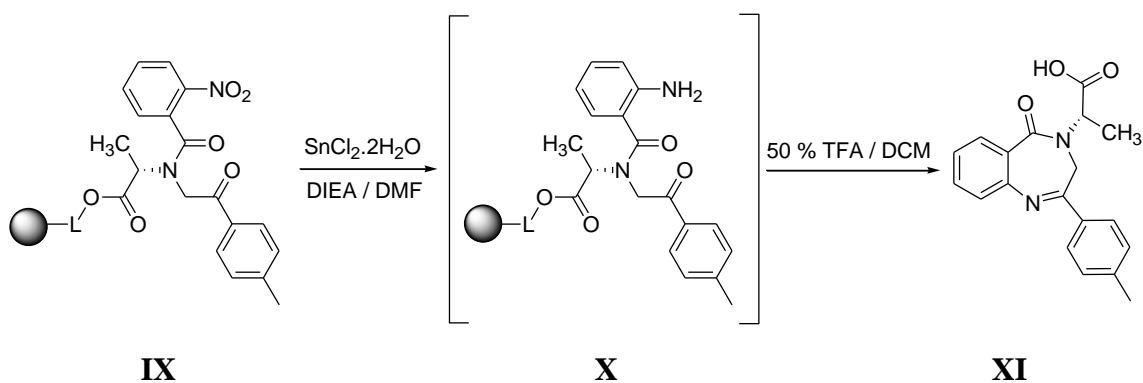


Schéma 41: Redukce nitro-skupiny dihydrátem chloridu cínatého a zacyklení struktury za vzniku konečného derivátu benzo[1,4]-diazepin-5-onu (**XI**).

Takto získaný produkt byl zbaven cínčitých solí pomocí SPE extrakce. Pro tyto účely bylo využito reversní fáze, kdy byla látka oddělena od rušivé matrice na základě jejich polariry. Polárnější látky eluovaly z kolony dříve než nepolární látky, které byly zachycovány v pevné fázi, protože mobilní fáze byla z větší části tvořena polárním rozpouštědlem, tzn., že nepolární látky měly vyšší afinitu k nepolární stacionární fázi.

Nevýhodou tohoto procesu bylo vysoké procento solí ztěžující čištění produktu, případně ztráty spojené s tímto purifikačním krokem. Po odsolení byla látka připravena na separaci pomocí semipreparativní HPLC. K její purifikaci však bylo přistoupeno po delší době od jejího nasyntetizování. Vlivem tohoto produkt degradoval a nebylo možno kvantitativně stanovit výtěžek reakce. Z časových důvodů nebyl tento krok zopakován.

#### 4.2.2. Redukce dithioničitanem sodným

Druhá redukční cesta využívala dithioničitan sodný a probíhala dle odstavce 5.2.7.2. (schéma 42). Během reakce byla testována i doba vhodná pro její kvantitativní

průběh. Optimálních výsledků bylo dosaženo při nasazení reakce přes noc. Surová čistota produktu **XI** s hmotou ESI = 321,132 činila 52 %.

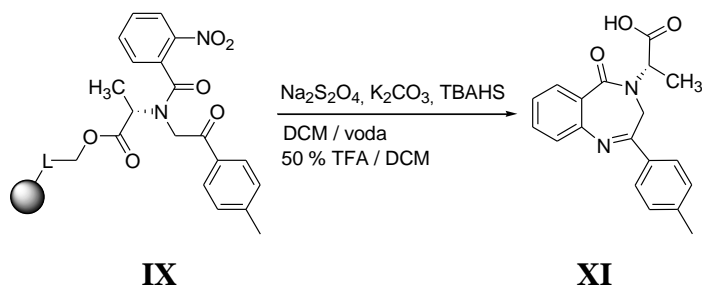


Schéma 42: Redukce nitro-skupiny dithioničitanem sodným (**XI**).

Na závěr byla provedena separace pomocí semipreparativní HPLC. Ze získaných frakcí byl odpařen na vakuové odparce přebytečný acetonitril, dále byly lyofilizovány a upraveny pro NMR spektrometrii, která potvrdila strukturu připraveného produktu **XI**. Celkový výtěžek reakce po všech krocích vztažen na množství výchozí aminokyseliny byl stanoven na 26 %.

NMR spektrum (příloha 1 – 2) potvrdilo strukturu očekávaného derivátu.



Zvoleným haloketonem byl 2-brom-4-methylacetofenon. Reakcí vznikl neočekávaný meziprodukt **XVI** o čistotě 87 % (schéma 46). Při štěpení pryskyřice z polymerního nosiče pravděpodobně docházelo (po odštěpení *tert*-butylové skupiny) k adici hydroxylové skupiny serinu na karbonyl a následné dehydrataci za vzniku cyklizovaného produktu **XVII** s hmotou ESI<sup>-</sup> = 403,060. Předpokladem pro pokračování syntézy bylo, že při závěrečné redukci by mělo dojít k zacyklení struktury za vzniku benzodiazepinového kruhu, čímž by reaktivní karbonyl nebyl k dispozici a oxazinový kruh by tak již nevznikal.

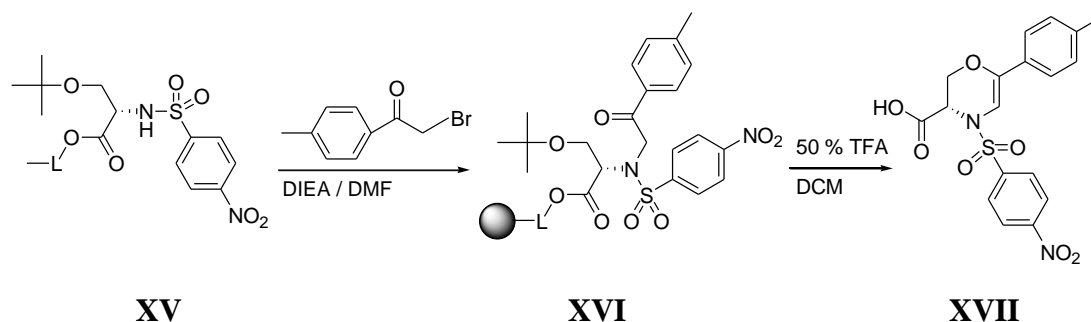


Schéma 46: Alkylace s haloketony vedoucí k cyklizovanému produktu.

Následná denosylace intermediátu **XVI** dle odstavce 5.2.5. vedla k odštěpení 4-nitrobenzensulfonové kyseliny za vzniku pryskyřice **XVIII** (schéma 47).

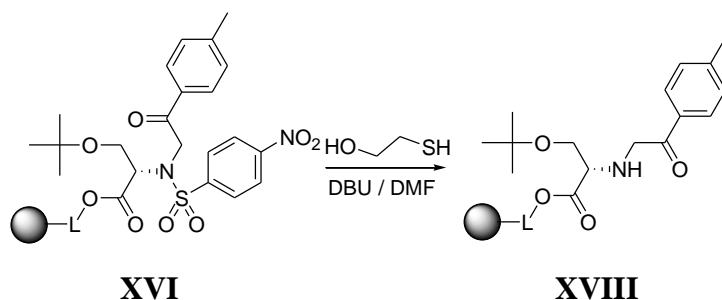


Schéma 47: Denosylace cyklického produktu.

Ihned po denosylaci bylo přistoupeno k acylaci s *o*-nitrobenzoovou kyselinou dle odstavce 5.2.6. za vzniku intermediátu **XIX** (schéma 48). Po štěpení byl zde opět detekován oxazinový produkt o čistotě 79 %.

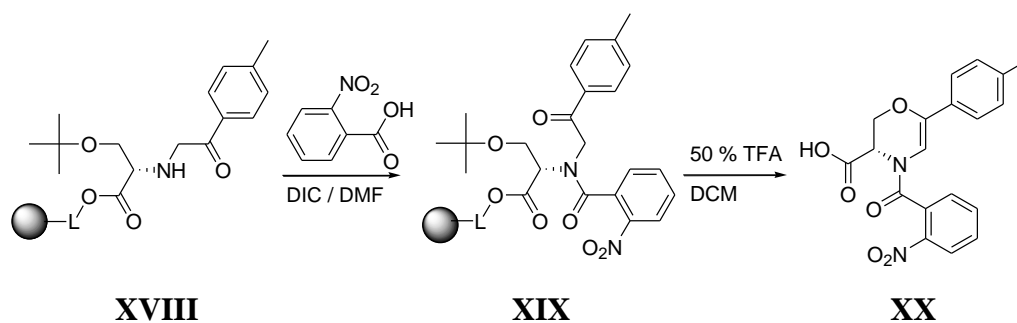


Schéma 48: Acylace cyklického produktu s *o*-nitrobenzoovou kyselinou.

Poslední krokem syntézy byla redukce nitro-skupiny pomocí dithioničitanu sodného dle odstavce 5.2.7.2. za vzniku konečného produktu **XXI** s hmotou ESI = 338,127 o čistotě 58 % (schéma 49).

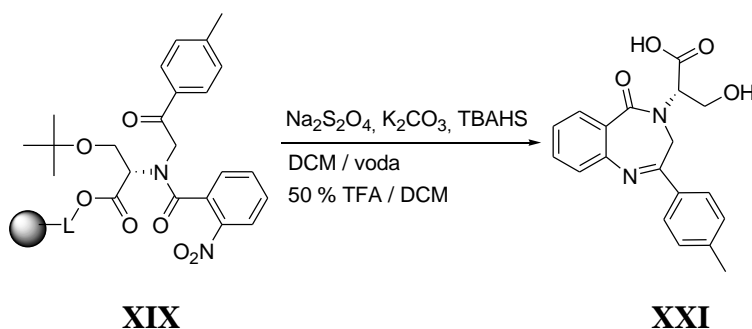


Schéma 49: Redukce nitro-skupiny a zacyklení struktury za vzniku konečného derivátu benzo[1,4]-diazepin-5-onu (XIX).

Závěrečným krokem bylo odštěpení z polymeru účinkem štěpícího koktejlu po dobu dvou hodin a purifikace pomocí semipreparativní HPLC. Celkový výtěžek produktu **XXI** byl 29 %. Analýza UHPLC-MS a následná NMR spektrometrie vyloučila přítomnost derivátu oxazinu a potvrdila strukturu produktu **XXI** (příloha 3).

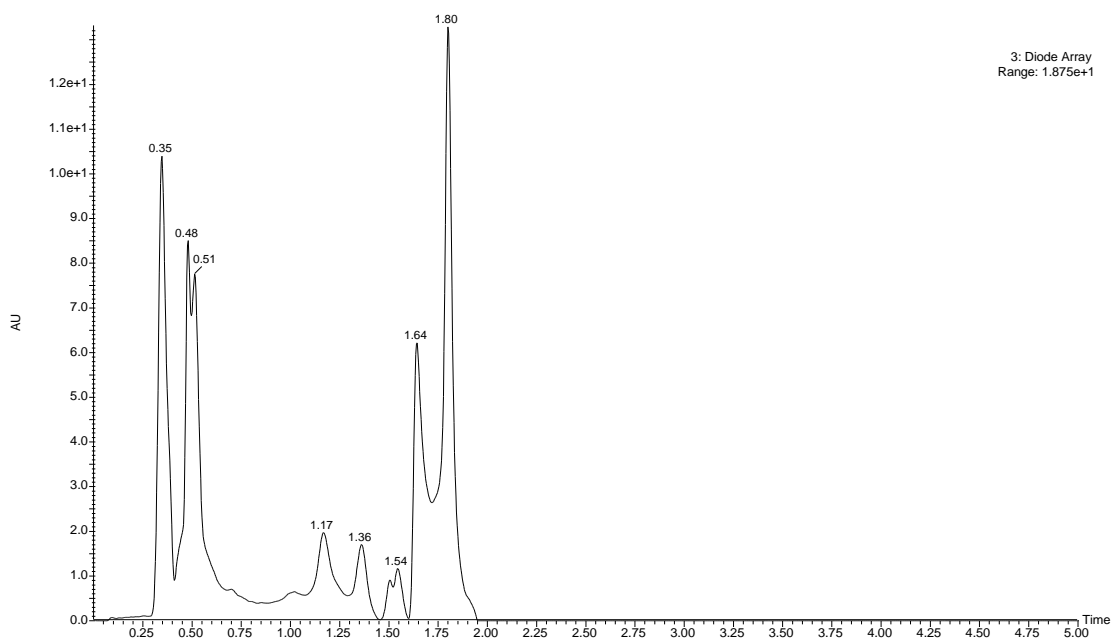
#### 4.3.1. Oxazinový intermediát **XVII** vznikající po alkylnaci

Vznik intermediátu **XVII** naznačuje možné využití reakční sekvence pro přípravu analogických oxazinových derivátů z různě substituovaných fenacylbromidů. Dalším úkolem proto bylo izolovat látku **XVII** a potvrdit její strukturu pomocí NMR spektrometrie. Intermediát **XV** byl připraven dle odstavců 5.2.1. – 5.2.3. (loading Fmoc-Ser(tBu)-OH 0,25 mmol/g) a pro alkylnaci byl zvolen 2-brom-4-methylacetofenon s DIEA v DMF (schéma 43 – 46). Surová čistota produktu s hmotou ESI = 403,060 byla 82 %. Po odštěpení z polymerního nosiče pomocí štěpícího koktejlu po dobu dvou hodin byla provedena purifikace pomocí semipreparativní HPLC vedoucí k izolaci produktu **XVII**.

Struktura produktu byla potvrzena NMR spektrometrií a výtěžek stanoven gravimetricky na 79 % (příloha 4).

#### 4.3.2. Oxazinový intermediát XX vznikající po acylaci

V preparativním měřítku byl syntetizován i intermediát produkt **XX** vznikající po acylaci s *o*-nitrobenzoovou kyselinou, který byl připraven dle odstavců 5.2.1 – 5.2.6. (loading 0,25 mmol/g, čistota po alkylation 81 %, čistota po acylaci 66 %), (schéma 43 – 48). Při UHPLC-MS analýze surového produktu byla pozorována přítomnost dvou píků s blízkým retenčním časem (1,64 a 1,80 min), přičemž oba píky vykazovaly stejné hmotností spektrum (obr. 23), obsahující molekulový iont o hodnotě odpovídající předpokládané látce (ESI<sup>+</sup> = 367,093).



Obr. 23: UHPLC-MS spektrum oxazinového produktu XX.

Tuto skutečnost lze hypoteticky vysvětlit tvorbou konformačních isomerů vzniklých rotací kolem C-N amidické vazby (schéma 49). Podobný jev byl v literatuře popsán pro peptidy obsahující ve své struktuře aminokyselinu prolin, kde energetická bariéra mezi jednotlivými rotamery umožňuje existenci obou isomerů <sup>71</sup>.

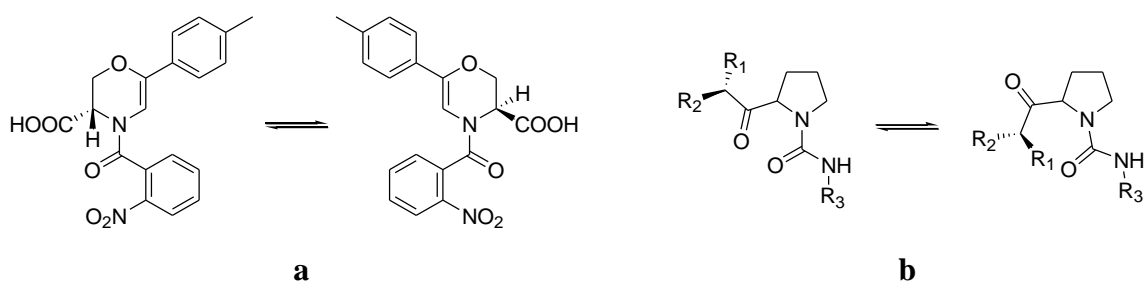
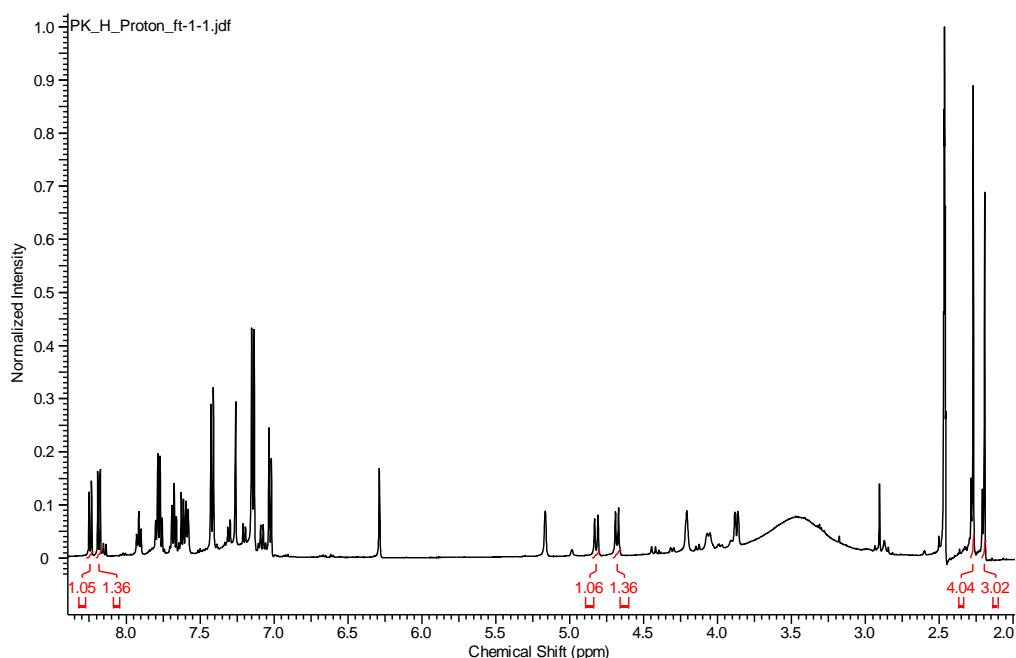


Schéma 50: Konformační isomery vzniklé rotací kolem C-N amidické vazby: a – teoretická isomerie cílové struktury; b – isomerie popsaná v literatuře <sup>71</sup>.

Po purifikaci surového produktu pomocí preparativní HPLC (píky nebylo možné oddělit, proto byly izolovány ve společné frakci) byla NMR spektrometrií stanovena celková výtěžnost produktu na 33 %. Podobně jako chromatografická analýza, i NMR potvrzuje existenci dvou látek a některé diagnostické signály naznačují možnou přítomnost dvou isomerů v poměru 1 : 1,3 (obr. 24).



Obr. 24: <sup>1</sup>H NMR spektrum produktu s integrální hodnotou vybraných dvojic signálů.

Podrobnějšímu studiu oxazinových derivátů a výše diskutovaným skutečnostem bude věnována navazující diplomová práce.

#### 4.4. Fenylalanin

Třetí testovanou aminokyselinou byl fenylalanin, patřící do skupiny glukogenní i ketogenní aminokyseliny, známý jako charakteristický přenašeč nervových vzruchů. Základním krokem syntézy byla imobilizace chráněného fenylalaninu pomocí Fmoc-protectivní skupiny vázaného na kyselé labilní linker (Fmoc-Phe-OH) na Wangovu pryskyřici dle podmínek v odstavci 5.2.1. (schéma 51). Loading pryskyřice **XXII** byl stanoven metodou vnějšího standardu na 0,50 mmol/g, tedy 90 % výtěžku reakce.

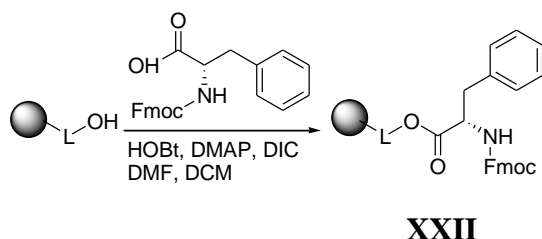


Schéma 51: Imobilizace Fmoc-Phe-OH na Wangovu pryskyřici.

Po imobilizaci byla provedena deprotektce koncové amino-skupiny dle odstavce 5.2.2. za vzniku intermediátu **XXIII** (schéma 52).

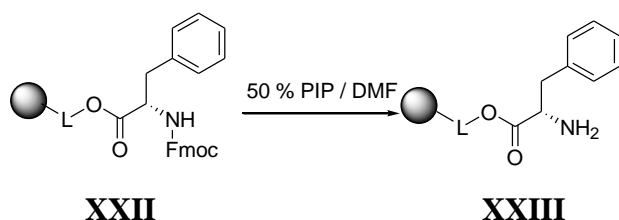


Schéma 52: Deprotekce koncové amino-skupiny.

Sulfonylaci dle odstavce 5.2.3. měl být získán meziprodukt **XXIV** (schéma 53). Analýzou však nebyla zjištěna přítomnost žádného produktu, a to ani po kontrolní reakci s Fmoc-OSu. Podobný výsledek poskytlo štěpení pryskyřice za vyšší teploty (v čisté TFA při teplotě 50 °C po dobu 30 minut). Řešení problému nebylo z časových důvodů dokončeno.

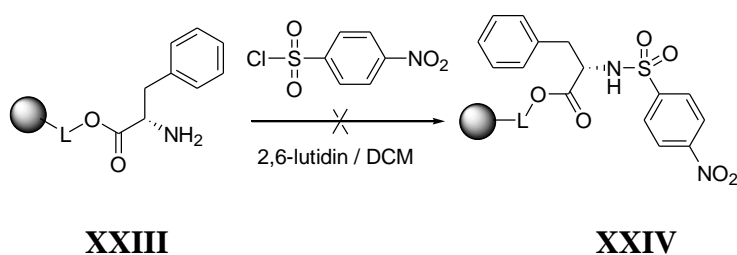


Schéma 53: Sulfonylace primární amino-skupiny.



## 4.5. Valin

Další testovanou aminokyselinou byl valin, patřící mezi esenciální a nepolární aminokyseliny, připravený dle odstavce 5.2.1. za vzniku intermediátu **XXV**. Loading výsledné pryskyřice činil 0,46 mmol/g, odpovídající 89 % výtěžku reakce (schéma 54).

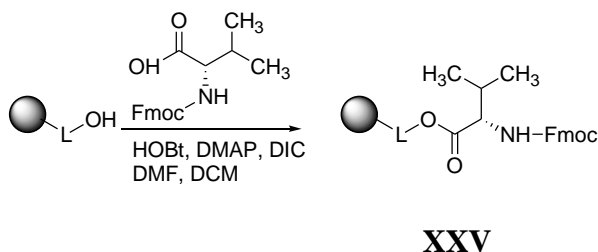


Schéma 54: Imobilizace Fmoc-Val-OH na Wangovu pryskyřici.

Po deprotekcii dle odstavce 5.2.2. byla získána volná amino-skupina (schéma 55).

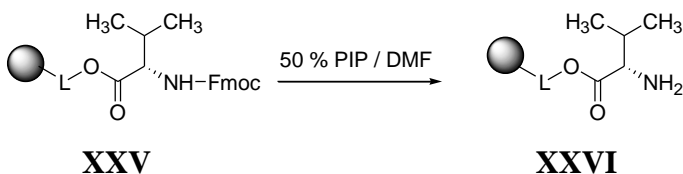


Schéma 55: Deprotekce koncové amino-skupiny.

Po sulfonylaci intermediátu **XXV** dle odstavce 5.2.3. byla provedena kontrola pomocí Fmoc-OSu pro potvrzení nepřítomnosti výchozí látky (schéma 56).

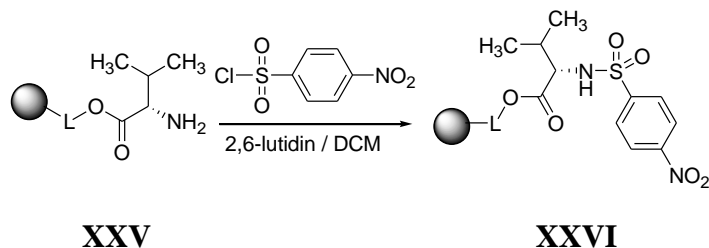
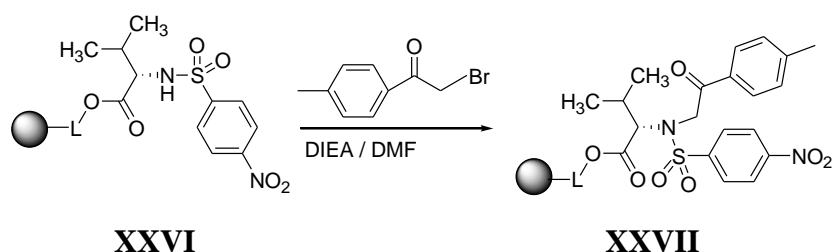


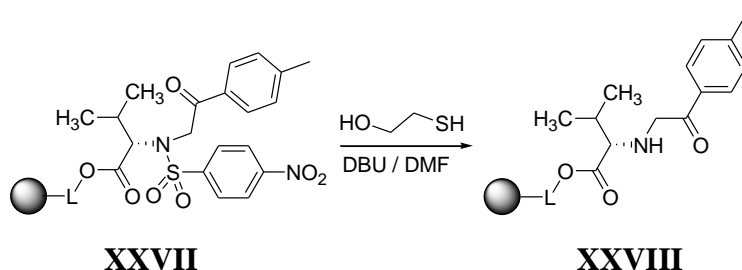
Schéma 56: Sulfonylace primární amino-skupiny.

Alkylace vzniklého intermediátu **XXVI** s 2-brom-4-methylacetofenonem, DIEA v DMF byla pravděpodobně ze sterických důvodů isopropylvé skupiny ztížena. Zopakování tohoto reakčního kroku i prodloužení reakčního času na 4 dny poskytlo očekávaný meziprodukt **XXVII** o maximální čistotě 55 % (schéma 57).



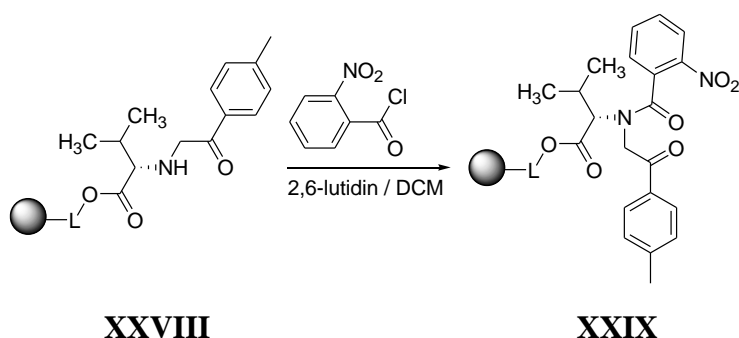
*Schéma 57: Alkylace s haloketony.*

Následovala denosylace dle odstavce 5.2.5. za vzniku pryskyřice **XXVIII** (schéma 58).



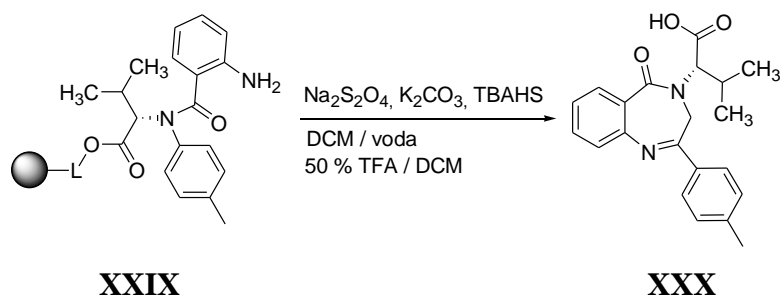
*Schéma 58: Denosylace.*

Acylace s *o*-nitrobenzoovou kyselinou dle odstavce 5.2.6. pravděpodobně ze sterických důvodů isopropylové skupiny vůbec neproběhla. Jako alternativní acylační činidlo byl proto zvolen 2-nitrobenzoyl chlorid reagující dle odstavce 5.2.3. (schéma 59). V tomto případě již acylace proběhla a byl detekován meziprodukt **XXIX** o surové čistotě 62 %.



*Schéma 59: Acylace s *o*-nitrobenzoyl chloridem.*

Pro zacyklení a získání konečného produktu **XXX** byla použita redukce nitro-skupiny na amino-skupinu pomocí dithioničitánu sodného dle odstavce 5.2.7.2. Surová čistota produktu činila 66 % (schéma 60).



*Schéma 60: Redukce nitro-skupiny a zacyklení struktury za vzniku konečného derivátu benzo[1,4]-diazepin-5-onu (XXX).*

Takto připravený produkt s hmotou  $ESI^- = 350,163$  byl odštěpen z pryskyřice ve štěpícím koktejlu po dobu jedné hodiny a purifikován pomocí semipreparativní HPLC. Na základě NMR spektra byla potvrzena struktura produktu (příloha 5), jehož souhrnný výtěžek však činil pouze 12 %.

#### 4.6. Threonin

Během přípravy cílového derivátu benzo[1,4]-diazepin-5-onu **XVII** s navázaným serinovým zbytkem v poloze 4- byl potvrzen vznik oxazinového skeletu, vznikající po alkylačních i acylačních reakcích. Na základě této skutečnosti byla otestována i alternativní aminokyselina threonin. Po immobilizaci Fmoc-Thr(tBu)-OH na Wangovu pryskyřici dle odstavce 5.2.1. (schéma 61) byl stanoven loading pryskyřice **XXXI** na 0,61 mmol/g, odpovídající 87 % výtěžku reakce.

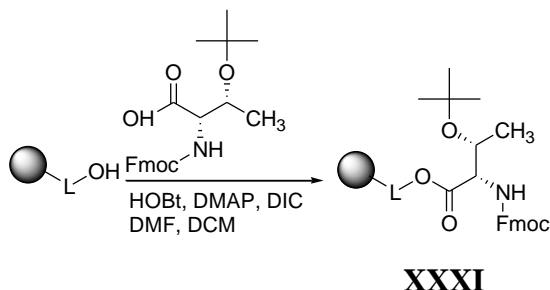


Schéma 61: Immobilizace Fmoc-Thr(tBu)-OH na Wangovu pryskyřici.

Po deprotekcí dle odstavce 5.2.2. byl získán intermediát **XXXII** (schéma 62).

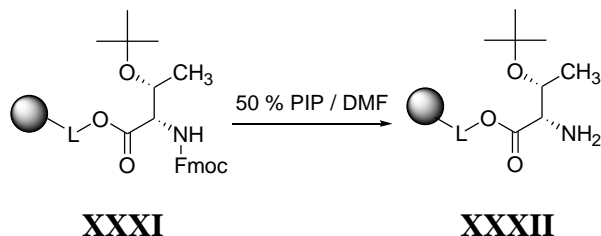


Schéma 62: Deprotekce koncové amino-skupiny.

Následná sulfonylace dle odstavce 5.2.3. poskytla meziprodukt **XXXIII** (schéma 63). Reakcí s Fmoc-OSu byla provedena kontrola na nepřítomnost výchozí látky.

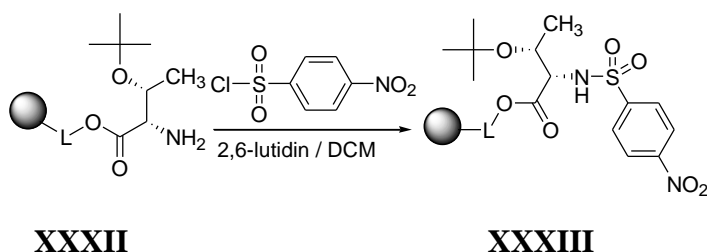
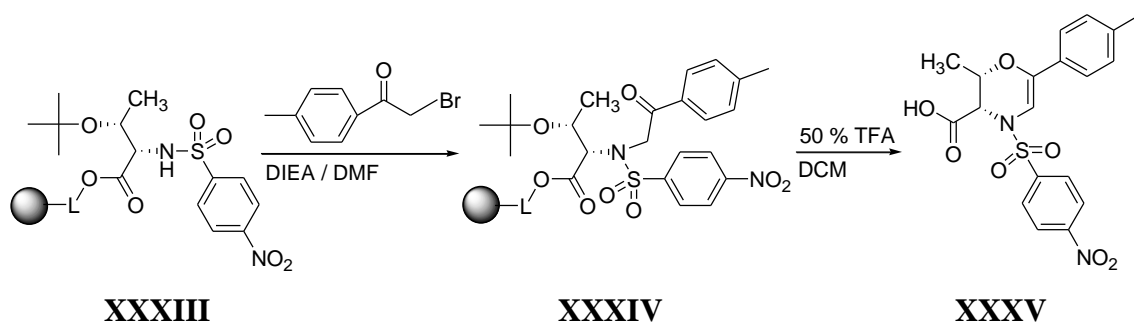


Schéma 63: Sulfonylace primární amino-skupiny.

K alkylovaní byl zvolen 2-brom-4-methylacetofenon s DIEA v DMF vedoucí k produktu **XXXV**, avšak s čistotou pouze 24 % (schéma 64). Adicí hydroxylové skupiny

threoninu na karbonyl a dehydratací došlo ke vzniku oxazinového skeletu s hmotou  $ESI = 417,076$ .



*Schéma 64: Alkylace s haloketony vedoucí k cyklizovanému produktu (XXXV).*

Odštěpením produktu z polymeru účinkem štěpícího koktejlu a odfoukáním pod dusíkem byla látka upravena pro purifikaci. NMR spektrometrie potvrdila strukturu tohoto derivátu (příloha 6). Celková výtěžnost byla stanovena pouze na 13 %.

## 5. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

### 5.1. Pomůcky, chemikálie a přístrojové vybavení

Základní pomůcky pro přípravu derivátů pomocí syntézy na pevné fázi jsou injekční stříkačky s polypropylenovou fritou, zabraňující úniku pryskyřice. Reakce probíhají při pokojové teplotě, k promíchání reakční směsi slouží stolní třepačky s horizontálním pohybem. Mezi použitá rozpouštědla patří acetonitril, vodný roztok amonium acetátu (0,1 mmol/l) o pH 5,01, DCM, DMF, TFA, THF. Všechny chemikálie byly dodány firmou Sigma-Aldrich. Analýza meziproductů byla provedena pomocí metody UHPLC-MS a vyhodnocení dat pomocí softwaru Masslynx.

#### 5.1.1. Parametry UHPLC-MS

UHPLC-MS analýza byla provedena na UHPLC-MS systému, skládajícího se z UHPLC chromatografu Acquity s detektorem fotodiodového pole a jednoduchého kvadrupólového hmotnostního spektrometru (Waters), za použití kolony X-Select C18 při teplotě 30 °C s průtokovou rychlostí 600  $\mu\text{l}\cdot\text{min}^{-1}$ . Nástřik vzorku činil 5,0  $\mu\text{l}$ , její složení bylo (A) amonium acetát ve vodě (0,01 M) : (B) acetonitril s lineárním naprogramováním od 10 % do 80 % (B) v průběhu 2,5 minut, udržovaný po dobu 1,5 minuty. Po dobu 1 minuty byla kolona ekvilibrována za použití 10 % roztoku (B). Zdroj APCI byl nastaven na vybíjecí proud 5  $\mu\text{A}$ , odpařovací teplotu 350 °C a teplotu kapiláry 200 °C.

#### 5.1.2. Parametry NMR

$^1\text{H}$  a  $^{13}\text{C}$  NMR spektra byla měřena na přístroji JEOL (500 MHz) za laboratorní teploty 21 °C v roztoku  $\text{DMSO-}d_6$ , jehož resonanční signál posloužil jako referenční standard. Chemický posun  $\delta$  byl uveden v ppm a interakční konstanta J v hertzích (Hz). Pro vyhodnocení NMR spekter byl použit ACDLABS software (1D NMR Processor).

## 5.2. Příprava derivátů benzo[1,4]-diazepin-5-onů pomocí syntézy na pevné fázi

### 5.2.1. Imobilizace Fmoc aminokyseliny

K Wangově pryskyřici (1 g; 1 mmol/g) byl přidán roztok Fmoc-Ala-OH (622 mg; 2 mmol), HOBt (306 mg; 2 mmol), DMAP (1 mg; 0,5 mmol), DIC (312  $\mu$ l; 2 mmol) ve směsi DMF a DCM (1:1; 10 ml). Reakční směs byla třepána přes noc při pokojové teplotě, poté byla pryskyřice **IV** třikrát promyta rozpouštědly DMF, DCM a MeOH a vysušena proudem dusíku. Při nízkém loadingu byla acylace zopakována.

#### 5.2.1.1. Standardní štěpení a kvantifikace (stanovení loadingu)

Kvantifikace byla provedena v dubletu. K pryskyřici (10 mg) byl přidán štěpící koktejl 50 % TFA v DCM (1 ml) a reakční směs byla třepána 30 minut při pokojové teplotě. Následně byla těkavá kapalná fáze odfoukána proudem dusíku. K odparku byl přidán HPLC MeOH (1 ml) a směs byla zfiltrována přes mikrofiltr do analytické vialky. Analýza obou vzorků spolu s vnějším standardem Fmoc-Ala-OH (0,5 mg/ml) byla provedena pomocí UHPLC-MS. Pro vyhodnocení výsledků analýzy byly příslušné píky vizualizovány při vlnové délce 300 nm charakteristické pro přítomnou Fmoc-protektivní skupinu a zjištěna jejich integrální plocha. Loading (obr. 25) a výtěžek reakce byly vypočteny dle následujícího postupu (obr. 26) a hodnoty zprůměrovány.

$$L = \frac{\delta_S \cdot \bar{x}_{FmocAla}}{M_S \cdot x_S \cdot m_{FmocAla}} \cdot 1000$$

$L$  ... loading ( $\text{mmol} \cdot \text{g}^{-1}$ )

$\delta_S$  ... hmotnostní koncentrace standardu Fmoc-Ala ( $\text{mg} \cdot \text{ml}^{-1}$ )

$\bar{x}_{FmocAla}$  ... průměr ploch píků dvou měření pro analyzovaný vzorek

$M_S$  ... molární hmotnost standardu Fmoc-Ala ( $\text{g} \cdot \text{mol}^{-1}$ )

$x_S$  ... plocha píku standardu Fmoc-Ala

$m_{FmocAla}$  ... hmotnost analyzovaného vzorku (10 mg)

Obr. 25: Výpočet loadingu pryskyřice po imobilizace Fmoc-aminokyseliny.

$$\eta(\%) = \frac{\left( n_{FmocAla} \cdot \frac{\bar{x}_{SP}}{x_{FmocAla}} \right)}{l_A} \cdot 100$$

$\eta$  ... výtěžek reakce (%)

$n_{FmocAla}$  ... látkové množství standardu Fmoc-Ala odpovídající 1 mg ( $\text{mmol} \cdot \text{mg}^{-1}$ )

$\bar{x}_{SP}$  ... průměr ploch píku dvou měření 10 mg imobilizované pryskyřice

$x_{FmocAla}$  ... plocha píku 1 mg standardu Fmoc-Ala

$l_A$  ... loading imobilizované pryskyřice za podmínky 100 % výtěžku ( $\text{mmol} \cdot \text{g}^{-1}$ )

*Obr. 26: Výpočet výtěžku reakce* <sup>72</sup>.

### 5.2.2. Deprotekce koncové amino-skupiny

K pryskyřici **IV** (300 mg) byl přidán roztok 50 % piperidinu v DMF (1:1; 3 ml). Po 30 minutách třepání byla směs promyta třikrát v DMF a DCM za zisku pryskyřice **V**.

### 5.2.3. Sulfonylace primární amino-skupiny

K pryskyřici **V** (300 mg) byla přidána reakční směs připravená rozpuštěním 4-NosCl (201 mg; 0,9 mmol) a 2,6-lutidinu (114  $\mu\text{l}$ ; 0,99 mmol) v DCM (3 ml) a třepáno dva dny při pokojové teplotě. Konečná pryskyřice **VI** byla promyta pětkrát v DCM a zhodnocen kvantitativní průběh reakce s využitím Fmoc-skupiny. K odebranému vzorku (10 mg) byl přidán Fmoc-OSu (84 mg) a DIEA (44  $\mu\text{l}$ ; 1,5 mmol) v DCM (1 ml) a třepáno 30 minut při pokojové teplotě, poté byla pryskyřice promyta v DCM a zanalyzována.

### 5.2.4. Alkylace s haloketony

K pryskyřici **VI** (300 mg) byl přidán roztok haloketonu (1,5 mmol) a DIEA (522  $\mu\text{l}$ ; 1,5 mmol) v DMF (3 ml). Reakční směs reagovala dva dny při pokojové teplotě a poté byla promyta pětkrát v DMF a zanalyzována (pryskyřice **VII**).

### 5.2.5. Denosylace

K pryskyřici **VII** (300 mg) byl přidán roztok 2-merkптоethanolu (126  $\mu\text{l}$ ; 1,8 mmol) a DBU (30  $\mu\text{l}$ ; 0,6 mmol) v DMF (3 ml) a třepáno po dobu 30 minut při pokojové teplotě. Poté byla pryskyřice promyta třikrát v DMF a pětkrát v DCM. Takto připravená pryskyřice **VIII** byla ihned acylována.

### 5.2.6. Acylace *o*-nitrobenzoovou kyselinou

K acylaci pryskyřice **VIII** (300 mg) byl použit roztok kyseliny *o*-nitrobenzoové (99 mg; 0,6 mmol) a DIC (48  $\mu\text{l}$ ; 0,3 mmol) v DMF (3 ml) a ponecháno reagovat dva dny. Pryskyřice byla promyta třikrát v DMF a DCM a zanalyzována jako pryskyřice **IX**.



### 5.2.7. Redukce nitro-skupiny

Po úspěšné acylaci byla provedena redukce nitro-skupiny vedoucí k zacyklení diazepinového kruhu za vzniku výsledného produktu **XI**. Pro tento reakční krok byly testovány a porovnávány dva odlišné typy redukcí.

#### 5.2.7.1. Redukce chloridem cínatým

První metodou byla redukce roztokem chloridu cínatého  $\text{SnCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  (675 mg; 3 mmol) a DIEA (522  $\mu\text{l}$ ; 1,5 mmol) v odplyněném DMF (3 ml). K odplyněnému roztoku chloridu cínatého byl nejprve připipetován DMF, posléze báze DIEA a vše bylo nataženo do injekční stříkačky k pryskyřici **IX**. Takto připravený systém byl třepán 24 hodin, promyt pětkrát v DMF a pětkrát v DCM. Pro kvantitativní průběh redukce byl reakční krok zopakován, případně provedeny optimalizace v podobě prodloužení reakční doby. Analýzou produktu **X** byl potvrzen vznik cílového produktu **XI**.

##### 5.2.7.1.1. Extrakce tuhou fází (SPE, Solid phase extraction)

K odsolení bylo využito reversní fáze C18. Stacionární fáze, ohraničená z obou stran fritou a umístěná v kolonce, která byla upevněna ke stojanu, byla za atmosférického tlaku aktivována postupným promytím pomocí acetonitrilu (5 ml) a octanu amonného (5 ml). Na takto připravenou kolonku byla dávkována čištěná látka, jež byla smísená s DMSO (1 ml) a octanem amonným (9 ml; 10  $\text{mmol} \cdot \text{l}^{-1}$ ) a homogenizována pod ultrazvukem. Po adsorpci vzorku byla kolonka promyta octanem amonným (5 ml), což zajistilo vymytí zbytků matrice vzorku z kolonky. Požadovaná látka zůstala sorbována na pevné fázi. Posléze byla kolonka promyta elučním rozpouštědlem (acetonitril), kdy došlo k selektivní desorbci žádané látky ze stacionární fáze, a získaný eluent byl odpařen do sucha v proudě dusíku.

##### 5.2.7.2. Redukce dithioničitanem sodným

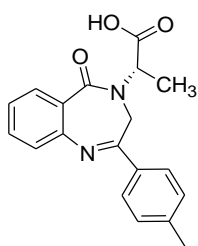
Druhá redukční metoda nitro-skupiny byla založena na aplikaci dithioničitanu sodného (840 mg; 5 mmol) v přítomnosti báze uhličitanu draselného (760 mg; 7 mmol) a TBAHS (136 mg; 0,5 mmol) ve směsi DCM – voda (1:1; 2 ml). Po nabobtnání pryskyřice **IX** (250 mg) v DCM (4 ml) k ní byla přitažena reakční směs a třepáno přes noc při pokojové teplotě a následně třikrát promyto v každém z rozpouštědel, a to ve směsi DCM – voda (1:1; v/v), DMF a DCM.

### 5.2.8. Semipreparativní HPLC a příprava NMR vzorku

Příprava vzorku spočívala v odštěpení z polymerního nosiče ve štěpícím koktejlu po dobu alespoň půl hodiny a odfoukáním pod dusíkem. Zahuštěný produkt byl rozpuštěn ve směsi HPLC MeOH – voda (4:1; 5 ml) a 20  $\mu$ l rozpuštěného vzorku bylo připipetováno k HPLC MeOH (1 ml) a zanalyzováno pomocí UHPLC-MS. Dle analýzy byla zvolena vhodná vlnová délka absorpčního maxima a metoda pro semipreparativní analýzu, tzn. složení mobilní fáze amonium acetátu (A) : acetonitrilu (B) s rostoucím gradientem. Jednotlivé frakce byly po purifikaci spojeny a zanalyzovány pomocí UHPLC-MS a přítomný acetonitril byl odpařen na vakuové odparce. Takto připravený produkt byl lyofilizován po dobu dvou dnů a následně rozpuštěn v deuterovaném DMSO (500  $\mu$ l). Po změření NMR spektra byl produkt znovu lyofilizován, pokud to výtěžek dovoľoval, zvážen. Z NMR spektra pomocí metody vnějšího standardu, který představovala 1-methylester-2-aminotereftalová kyselina (19,5 mg) rozpuštěná v přesném objemu DMSO- $d_6$  (500  $\mu$ l), byl stanoven výtěžek reakce.

### 5.3. Analytická data

#### 5.3.1. 2-(5-oxo-2-*p*-tolyl-3,5-dihydro-benzo[e][1,4]-diazepin-4-yl)-propionová kyselina (XI)



surová čistota UHPLC-MS: 52 %

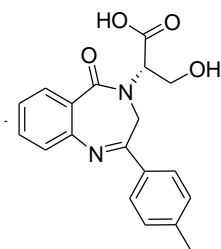
výtěžek: 29 %

ESI = 321,132

$^1\text{H}$  NMR (500 MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$  ppm 1.08 (d,  $J$  = 5.16 Hz, 3 H) 2.35 (s, 3 H) 3.70 (br.s., 2H, částečně překrytý signálem vody) 4.80 (q,  $J$  = 7.26 Hz, 1 H) 7.26 – 7.34 (m, 4 H) 7.53 – 7.58 (m, 1 H) 7.81 – 7.86 (m, 1 H) 7.96 (d,  $J$  = 8.02 Hz, 2 H).

$^{13}\text{C}$  NMR (125 MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$  ppm 21.5, 25.6, 40.9, 67.5, 126.1, 127.4, 127.6, 128.5, 129.8, 130.8, 131.9, 133.9, 141.8, 146.8, 166.9, 172.7, 173.5.

**5.3.2. 3-hydroxy-2-(5-oxo-2-*p*-tolyl-3,5-dihydro-benzo[e][1,4]-diazepin-4-yl)-propionová kyselina (XXI)**



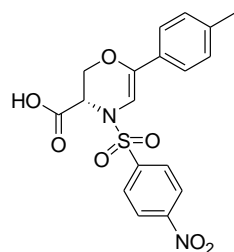
surová čistota UHPLC-MS: 58 %

výtěžek: 26 %

ESI = 338,127

$^1\text{H}$  NMR (500 MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$  ppm 2.35 (s, 3 H) 3.51 (br. s., 2 H) 4.74 (t,  $J = 6.59$  Hz, 1 H) 7.25 – 7.34 (m, 4 H) 7.53 – 7.58 (m, 1 H) 7.81 – 7.87 (m, 1 H) 7.93 (d,  $J = 8.02$  Hz, 2 H). Signál  $\text{CH}_2\text{-OH}$  překryt vodou.

**5.3.3. 4-(4-nitrobenzensulfonyl)-6-*p*-tolyl-3,4-dihydro-2*H*-[1,4]-oxazin-3-karboxylová kyselina (XVII)**



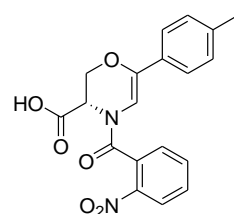
surová čistota UHPLC-MS: 82 %

výtěžek: 77 %

ESI = 403,060

$^1\text{H}$  NMR (500 MHz, DMSO- $d_6$ ),  $\delta$  ppm: 2.23 (s, 3 H), 3.09 (dd,  $J = 10.60, 2.58$  Hz, 1 H), 4.56 (dd,  $J = 10.88, 1.15$  Hz, 1 H), 4.73 (br. s., 1 H), 6.69 (d,  $J = 1.15$  Hz, 1 H), 7.08 (d,  $J = 8.02$  Hz, 2 H), 7.31 (d,  $J = 8.02$  Hz, 2 H), 8.09 – 8.12 (m, 2 H), 8.33 – 8.36 (m, 2 H).

**5.3.4. 4-(2-nitrobenzoyl)-6-*p*-tolyl-3,4-dihydro-2*H*-[1,4]-oxazin-3-karboxylová kyselina (XX)**

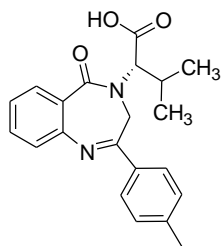


surová čistota UHPLC-MS: 66 %

výtěžek: 33 %

ESI = 367,093

**5.3.5. 3-methyl-2-(5-oxo-2-*p*-tolyl-3,5-dihydro-benzo[e][1,4]-diazepin-4-yl)-másečná kyselina (XXX)**



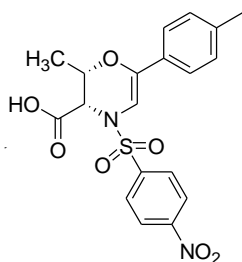
surová čistota UHPLC-MS: 66 %

výtěžek: 12 %

ESI<sup>-</sup> = 350,163

<sup>1</sup>H NMR (500 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ ppm 2.35 (s, 3 H) 4.40 – 4.44 (m, 1 H) 7.27 – 7.32 (m, 4 H) 7.50 – 7.55 (m, 1 H) 7.82 – 7.86 (m, 1 H) 7.98 – 8.02 (m, 2 H). Signál CH<sub>2</sub>-N překryt vodou, signál isopropylové skupiny překryt nečistotami v alifatické části spektra.

**5.3.6. 2-methyl-4-(4-nitrobenzensulfonyl)-6-*p*-tolyl-3,4-dihydro-2*H*-[1,4]-oxazin-3-karboxylová kyselina (XXXV)**



surová čistota UHPLC-MS: 24 %

výtěžek: 13 %

ESI<sup>-</sup> = 417,076

<sup>1</sup>H NMR (500 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ ppm 0.75 (d, *J* = 6.30 Hz, 3 H) 2.24 (s, 3 H) 4.52 (br. s., 1 H) 4.87 (m, 1 H) 6.74 (s, 1 H) 7.08 (d, *J* = 8.59 Hz, 2 H) 7.32 (d, *J* = 8.02 Hz, 2 H) 8.22 (d, *J* = 9.16 Hz, 2 H) 8.34 (d, *J* = 8.59 Hz, 2 H).

## 6. ZÁVĚR

V úvodu této bakalářské práce je nastíněna problematika derivátů 1,4-benzodiazepinonů. Dále je zde zpracována literární rešerše týkající se metodiky příprav, vlastnosti a biologické aktivity nejprve derivátů 1,4-benzodiazepin-2-onů a následně skupinou derivátů 1,4-benzodiazepin-5-onů.

K syntéze vybraných benzodiazepinových derivátů byla využita již dříve popsaná syntetická cesta, jež spočívala ve výstavbě substituovaného benzodiazepinového kruhu pomocí  $\beta$ -alaninu a příslušného bromketonu <sup>1</sup>. Prvním cílem této práce bylo ověřit syntetickou cestu se škálou vybraných přírodních  $\alpha$ -aminokyselin, jež by zvýšily biologickou dostupnost těchto látek a následně otestovat alternativní haloketony. Nejvhodnější podmínky pro alkylation za pokojové teploty představovala již dříve popsaná kombinace 2-brom-4-methylacetofenonu, DIEA v DMF <sup>1</sup>. Nově studovaná činidla nereagovala za laboratorní teploty, detekována byla přítomnost mnoha vedlejších produktů.

Pomocí popsané metodiky pro  $\beta$ -alanin <sup>1</sup> byly připraveny BZD obsahující zbytek alaninu, serinu a valinu. Látku, jejíž skelet by byl tvořen fenylalaninovým zbytkem v poloze 4- na benzodiazepinovém kruhu, se nepodařilo připravit. Během syntézy derivátu s imobilizovaným serinem byl identifikován cyklický oxazinový derivát, jež byl izolován po alkylation i acylation reakci a jeho struktura potvrzena pomocí NMR spektrometrie. Stejného derivátu po alkylation bylo docíleno i s použitím aminokyseliny threoninu, opět s potvrzením struktury pomocí NMR spektrometrie.

Dalším cílem práce bylo otestování dvou typů redukce nitro-skupiny, kdy docházelo k zacyklení a tvorbě benzodiazepinové struktury výsledných produktů. První typ redukce, aplikovaný na pryskyřici s navázaným  $\alpha$ -alaninem, spočíval v použití dihydrátu chloridu cínatého v přítomnosti báze DIEA v DCM. Tato metoda byla časově náročná, pro kvantitativní průběh redukce bylo potřeba reakční dobu prodloužit z jednoho dne na 3 – 5 dnů dle množství pryskyřice, čímž nebylo potřeba reakční krok opakovat znovu. Druhou nevýhodou bylo znečištění výsledného produktu cínicími solemi odstranitelných zčásti pomocí SPE, což bylo opět časově náročné a mnohdy neefektivní. Druhá redukční metoda spočívala v reakci dithioničitanu sodného v přítomnosti uhličitanu draselného a TBAHS ve směsi DCM – voda. Reakční doba této metody byla podstatně kratší než u výše zmíněné redukce, stačilo reagování přes noc, a nebylo

potřeba aplikace SPE k odsolení výsledného produktu, čímž byla purifikace finálních produktů snazší.

## 7. SEZNAM ZKRATEK

acyl-CoA	koenzymy pro metabolismus mastných kyselin
Ala	alanin
APCI	Atmospheric pressure chemical ionization (atmosférický tlaková chemická ionizace)
ATLL	typ rezistentní buněčné linie
BFH	Benzen Fused Heterocycles
Boc	<i>t</i> -butyloxykarbonyl
BZD	benzodiazepiny
CNS	centrální nervová soustava
DBU	1,8-diazabicyklo[5.4.0]undec-7-en
DCM	dichlormethan
DDQ	2,3-dichloro-5,6-dikyano-1,4-benzochinon
DGAT 1	diacylglycerol <i>o</i> -acyltransferasy typu 1
DIAD	diisopropylazakaboxylát
DIEA	diisopropylethylamin
DMAP	4-( <i>N,N</i> -dimethylamino)-pyridin
DMF	<i>N,N</i> -dimethylformamid
DMSO- <i>d</i> <sub>6</sub>	deuteriovaný dimethylsulfoxid
DNA	deoxyribonukleová kyselina
Et <sub>3</sub> N	<i>N,N,N</i> -triethylamin
ETA	ethanolamin
F <sub>1</sub> F <sub>0</sub> -ATPasy	ATP-syntázy
FAK-kinasy	Focal Adhesion Kinase
FCB	fuligocandin B
Fmoc	9-fluorenylmethoxykarbonyl
Fmoc-Ala-OH	<i>N</i> -(9-fluorenylmethoxykarbonyl)-L-alanin
Fmoc-OSu	<i>N</i> -(9-fluorenylmethoxykarbonyl)-sukcinimid

Fmoc-Phe-OH	<i>N</i> -(9-fluorenylmethoxykarbonyl)- <i>L</i> -fenylalanin
Fmoc-Ser( <i>t</i> Bu)-OH	<i>N</i> -(9-fluorenylmethoxykarbonyl)- <i>o</i> - <i>tert</i> -butyl- <i>L</i> -serin
GABA	gama-aminomáselná kyselina
HATU	<i>o</i> -(7-azabenzotriazol-1-yl)- <i>N,N,N',N'</i> -tetramethyluronium PF <sub>6</sub>
HOBt	1-hydroxybenzotriazol
HPLC	High Performance Liquid Chromatography
LC	kapalinová chromatografie
MeOH	methanol
MS	hmotnostní spektrometrie
2-Nos	2-nitrobenzensulfonyl
4-NosCl	4-nitrobenzensulfonyl chlorid
NaBH <sub>3</sub> CN	kyanoborohydrid sodný
NaBH(OAc) <sub>3</sub>	triacetátborohydrid sodný
NMR	nukleární magnetická rezonance
PEG-PS-DVB	polyethylen-glykolový kopolymer
Pd(OAc) <sub>2</sub>	acetát paladnatý
Phe	fenylalanin
PPh <sub>3</sub>	trifenylfosfin
PS-DVB	styren-divinylbenzenový kopolymer
py	pyridin
Ser	serin
SnCl <sub>2</sub> ·2H <sub>2</sub> O	dihydrát chloridu cínatého
SPE	Solid Phase Extraction (extrakce pevnou fází)
TBAHS	tetrabutylamonium hydrogensulfát
TFA	trifluoroctová kyselina
THF	tetrahydrofuran



Tos	p-methylbensulfonylová kyselina
TRAIL	tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand
U-4CC	Ugiho reakce
UHPLC	Ultra High Performance Liquid Chromatography (vysoce účinná kapalinová chromatografie)

## 8. SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

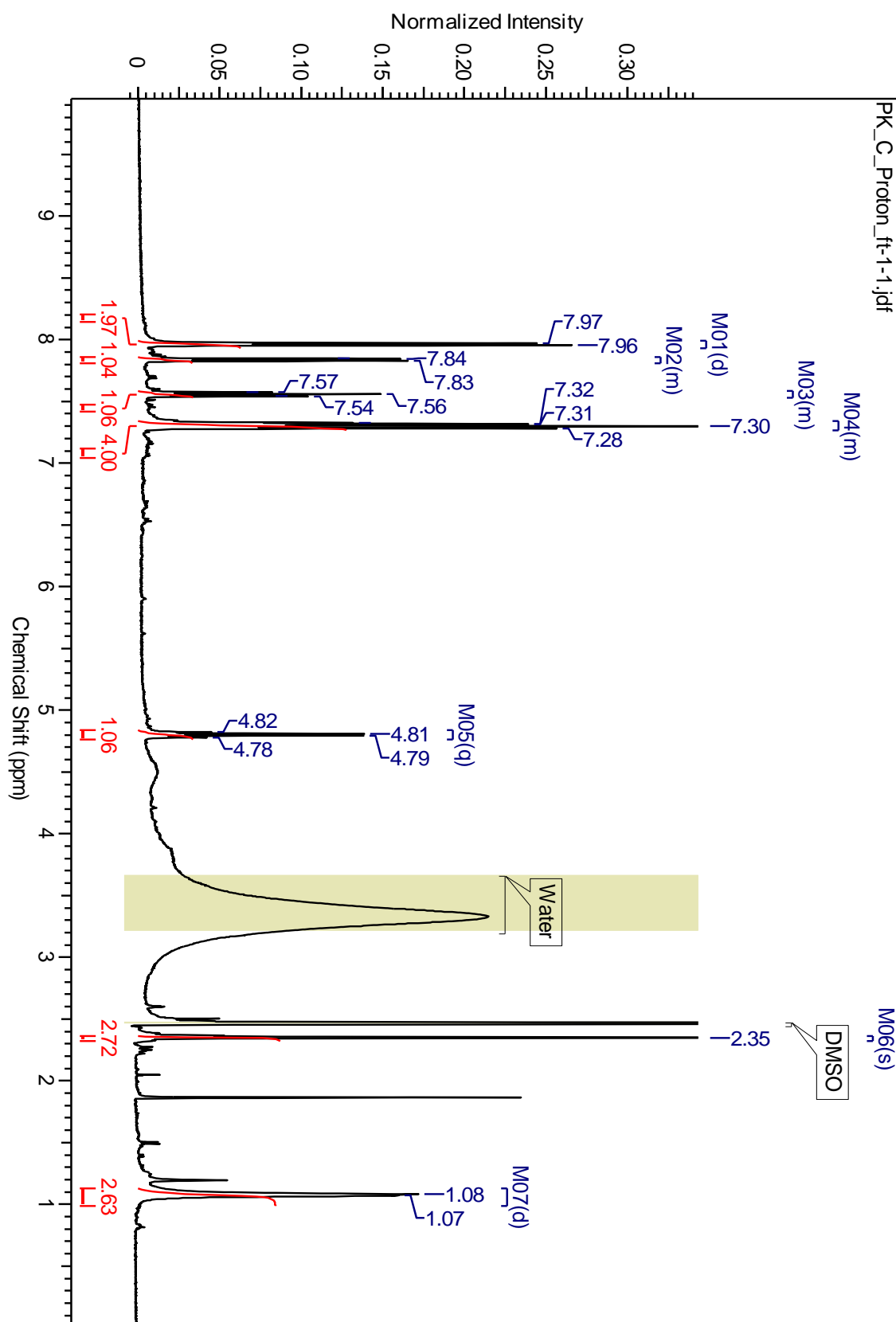
- (1) Fülöpova, V.; Gucky, T.; Grepl, M.; Sural, M. *ACS Comb. Sci.* **2012**, *14*, 651.
- (2) Karpinska, G.; Mazurek, A. P.; Dobrowolski, J. C. *Comput. Theor. Chem.* **2012**, *993*, 13.
- (3) Page, C.; Michael, C.; Sutter, M.; Walker, M.; Hoffman, B. B. *Integrated Pharmacology, C.V. Mosby, 2nd. vyd. [s.l.] 2002.*
- (4) Olkkola, K. T.; Ahonen, J. *Handb Exp Pharmacol* **2008**, *roč. 182, čís. 182.*
- (5) Dikeos, D. G.; Theleritis, C. G. *Soldatos C.R in Pandi-Perumal SR, Verster JC, Monti JM, Lader M, Langer SZ (eds.). Sleep Disorders: Diagnosis and Therapeutics. Informa Healthcare, ISBN 0-415-43818-7. 2008.*
- (6) Gil, C.; Brase, S. *Chemistry* **2005**, *11*, 2680.
- (7) El Kaïm, L.; Grimaud, L.; Oble, J. *Angewandte Chemie International Edition* **2005**, *44*, 7961.
- (8) Sternbach, L. H.; Reeder, E. *Journal of Organic Chemistry* **1961**, *26*, 1111.
- (9) Sternbach, L. H. *J. Med. Chem.* **1979**, *22*, 1.
- (10) Reeder, E. *United States - Patent application Publication* **1963**, *US3109843 A.*
- (11) C.Bell, S.; Sulkowski, T. S.; Gochman, C.; Childress, S. J. *The Journal of Organic Chemistry* **1962**, *27*, 562.
- (12) Sternbach, L. H.; Reeder, E. *The Journal of Organic Chemistry* **1961**, *26*, 4936.
- (13) Ishikura, M.; Mori, M.; Ikeda, T.; Terashima, M.; Ban, Y. *The Journal of Organic Chemistry* **1982**, *47*, 2456.
- (14) *Russ. J. Org. Chem.* **1994**, *30*, 1481.
- (15) *Coll. Czechoslovak Chem. Commun.* **1985**, *50*, 1064.
- (16) Ying, B.; Zhong, Z.; Chen, B. *Zhongshan Daxue Xuebao, Ziran Kexueban* **1985**, 115.
- (17) Sternbach, L. H.; Fryer, R. I.; Keller, O.; Metlesics, W.; Sach, G.; Steiger, N. *Journal of Medicinal Chemistry* **1963**, *6*, 261.
- (18) Sova, J. *Bakalářská práce* **2011.**
- (19) Menezes, C. M. S.; Rivera, G.; Alves, M. A.; do Amaral, D. N.; Thibaut, J. P. B.; Noël, F.; Barreiro, E. J.; Lima, L. M. *Chemical Biology & Drug Design* **2012**, *79*, 943.
- (20) Hollywood, F.; Khan, Z. U.; Scriven, E. F. V.; Smalley, R. K.; Suschitzky, H.; Thomas, D. R.; Hull, R. *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 1* **1982**, 431.
- (21) Lee, S.-C.; Park, S. B. *The Royal Society of Chemistry* **2007.**
- (22) Wang, T.; I., S. C. *Synthesis* **2000**, 265.
- (23) Hradil, P.; Grepl, M.; Hlavac, J.; Sural, M.; Malon, M.; Bertolasi, V. *J. Org. Chem.* **2006**, *71*, 819.
- (24) Sanudo, M.; Garcia-Valverde, M.; Marcaccini, S.; Delgado, J. J.; Rojo, J.; Torroba, T. *J. Org. Chem.* **2009**, *74*, 2189.
- (25) Santilli, A. A.; Osdene, T. S. *J. Org. Chem.* **1964**, *29*, 1998.
- (26) Fray, M. J.; Cooper, K.; Parry, M. J.; Richardson, K.; Steele, J. *J. Med. Chem.* **1995**, *38*, 3514.
- (27) Marcaccini, S.; Miliciani, M.; Pepino, R. *Tetrahedron Letters* **2005**, *46*, 711.
- (28) Santilli, A. A.; Osdene, T. S. *United States - Patent application Publication* **1969**, *US 1965/504130 A1.*
- (29) Bagolini, C.; Witt, P. d.; Pacifici, L.; Ramacci, M. T. *Journal of Medicinal Chemistry* **1978**, *21*, 476.
- (30) Misiti, D.; Gatta, F.; Landi-Vittory, R. *J. Heterocycl. Chem.* **1971**, *8*, 231.

- (31) Beccalli, E. M.; Broggini, G.; Paladino, G.; Penoni, A.; Zoni, C. *J Org Chem* **2004**, *69*, 5627.
- (32) Sharma, S. K.; Mandadapu, A. K.; Kumaresan, K.; Arora, A.; Gauniyal, H. M.; Kundu, B. *Synthesis* **2010**, 4087.
- (33) Robinson, N. E.; Robinson, A. B. *Peptide Science* **2008**, *90*, 297.
- (34) Murray, R. K.; Granner, D. K.; Mayes, P. A.; Rodwell, V. W. *H+H, Vyšehradská, s. r. o. ISBN 80-7319-013-3*. **2002**, 41.
- (35) Čerminová, V. *Bakalářská práce*. **2013**.
- (36) Brown, A. R.; Hermkens, P. H. H.; Ottenheijm, H. C. J.; Rees, D. C. *Synlett* **1998**, *1998*, 817.
- (37) Lemrova, B.; Soral, M. *ACS Comb Sci* **2012**, *14*, 645.
- (38) Suchopár, J. *Remedia Compendium. 3. vyd., Praha : Panax*.
- (39) Nymann-Andersen, J.; Wang, H.; Sawyer, G. W.; Olsen, R. W. *Journal of Neurochemistry* **2002**, *83*, 1164.
- (40) Click, G. D.; Taylor, C. B.; Toogood, P. L.; Huis, C. A. V. *United States - Patent application Publication* **2012**, *US 2012/0094982 A1*.
- (41) Click, G. D.; Hurd, A. R.; Huis, C. A. V. *United States - Patent application Publication* **2012**, *US 2012/0232067 A1*.
- (42) gawai, A. V.; Quesnelle, C. A.; Kim, S.-H.; Lee, F. Y. *United States - Patent application Publication* **2012**, *US 2012/0245151 A1*.
- (43) Asai, M.; Haketa, T.; Inamura, S.; Ishikawa, M.; Jona, H.; Kawamoto, H.; Kurihara, H.; Shibata, J.; Shimamura, T.; Suga, T.; Watanabe, H. *United States - Patent application Publication* **2011**.
- (44) Hubert, C. C.; Farese, R. V. *Journal of the American Hearth Assoviation, Arterioscler Thromb Vasc Biol.* **2004**, *25*, 482.
- (45) Škrobánek, M. *Bakalářská práce*. **2012**.
- (46) Shorter, E. *Oxford University Press* **2005**, 41.
- (47) Liljequist, R.; Palva, E.; Linnoila, M. *Int Pharmacopsychiatry* **1979**, *8*.
- (48) Lledo-Fernandez, C.; Pollard, P.; Romerosa, A. *Int. J. Electrochem. Sci.* **2014**, *9* 227
- (49) Anglin, D.; Spears, K. L.; Hutson, H. R. *Academic Emergency Medicine* **1997**, *4*, 323.
- (50) Mattila, M. A. K.; Larni, H. M. *Drugs* **1980**, *20*, 353.
- (51) Jonasson, B.; Jonasson, U.; Saldeen, T. *J Forensic Sci* **2000**, *45*, 7.
- (52) Ericsson, H. R.; Holmgren, P.; Jakobsson, S. W.; Lafolie, P.; De, R. B. *Lakartidningen* **1993**, *90*, 3954.
- (53) Drummer, O. H.; Syrjanen, M. L.; Cordner, S. M. *Am J Forensic Med Pathol* **1993**, *14*, 238.
- (54) Camp, J. V.; Patel, J. R.; Swann, S. *PCT Int. Appl., WO 2010-CN1577, WO 2012045194* **2012**.
- (55) Chillakuri, C. R.; Sheppard, D.; Handford, P. A. *Seminars in Cell & Developmental Biology* **2012**, *23*, 421.
- (56) Asai, M.; Haketa, T.; Inamura, S.; Kurihara, H.; Nishimura, T.; Shimamura, T. *International Application Published Under The Patent Cooperation Treaty (PTC)* **2010**, *WO 2010/095766 A1*.
- (57) Cases, S.; Smith, S. J.; Jr., R. V. F. *Proc Natl Acad Sci U S A* **1998**, *95*, 13018.
- (58) Alekseeva, E.; Andronati, K.; Mazepa, A.; Gren', A.; Pavlovskaya, T.; Kravchenko, I.; Bozhanov, V. *Russ J Gen Chem* **2006**, *76*, 1464.
- (59) Alekseeva, E. A.; Luk'yanenko, A. P.; Kravchenko, I. A.; Nevarko, N. A. *Russ J Gen Chem* **2008**, *78*, 949.

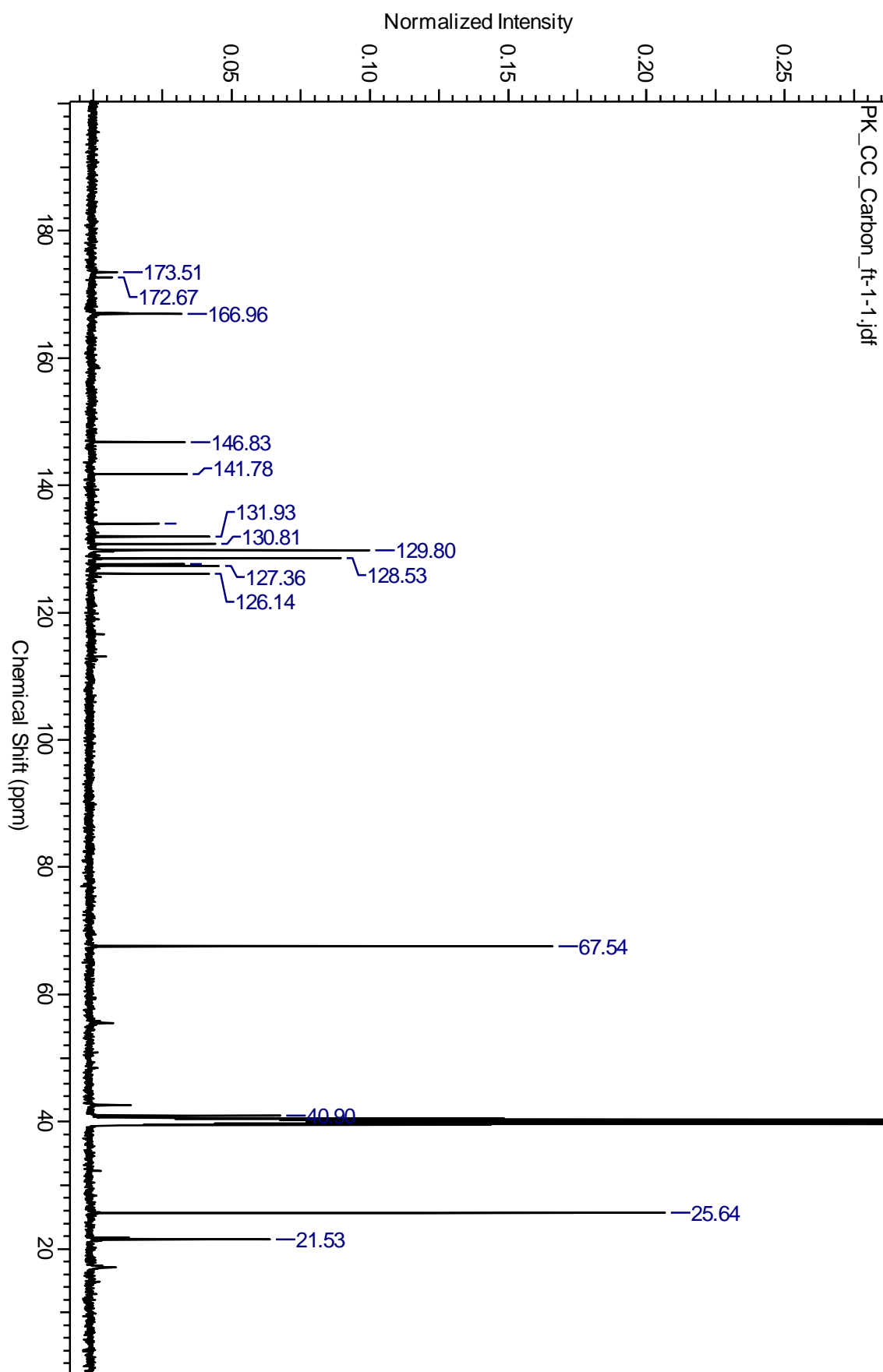
- (60) *Academic Press* **2013**, 1000.
- (61) Marshall, K. P.; Georgievskava, Z.; Georgievsky, I. *Research in Social and Administrative Pharmacy* **2009**, *5*, 94.
- (62) Barbera, J.; Shaprio, C. *Drug Saf.* **2005**, *28*, 301.
- (63) listed, n. a. *Drug and Therapeutics Bulletin* **2004**, *42*, 89.
- (64) Banfi, L.; Guanti, A. B. G.; Lecinska, P.; Riva, R. *Org Biomol Chem* **2006**, *4*, 4236.
- (65) Goldfrank, L. R. *New York: McGraw-Hill Medical Publ. Division. ISBN 0-07-136001-8.* **2002**.
- (66) Hasegawa, H.; Yamada, Y.; Komiyama, K.; Hayashi, M.; Ishibashi, M.; Sunazuka, T.; Izuhara, T.; Sugahara, K.; Tsuruda, K.; Masuda, M.; Takasu, N.; Tsukasaki, K.; Tomonaga, M.; Kamihira, S. *Blood* **2007**, *110*, 1664.
- (67) Brogden, R. N.; Goa, K. L. *Drugs* **1988**, *35*, 448.
- (68) Kamal, A.; Prasad, B. R.; Reddy, A. M. *United States - Patent application Publication* **2011**, *US 2011/0201600 A1*.
- (69) Batovska, D. I.; Todorova, I. T. *Curr. Clin. Pharmacol.* **2010**, *5*, 1.
- (70) Ahmed, K.; Reddy, J. S.; Dastagiri, D.; Earla Vij aya Bharathi *United States - Patent application Publication* **2011**, *US 2011/0118237 A1*.
- (71) Stein, R. L. *Adv Protein Chem* **1993**, *44*, 1.
- (72) Fülöpová, V. *Diplomová práce.* **2011**.

## 9. PŘÍLOHY

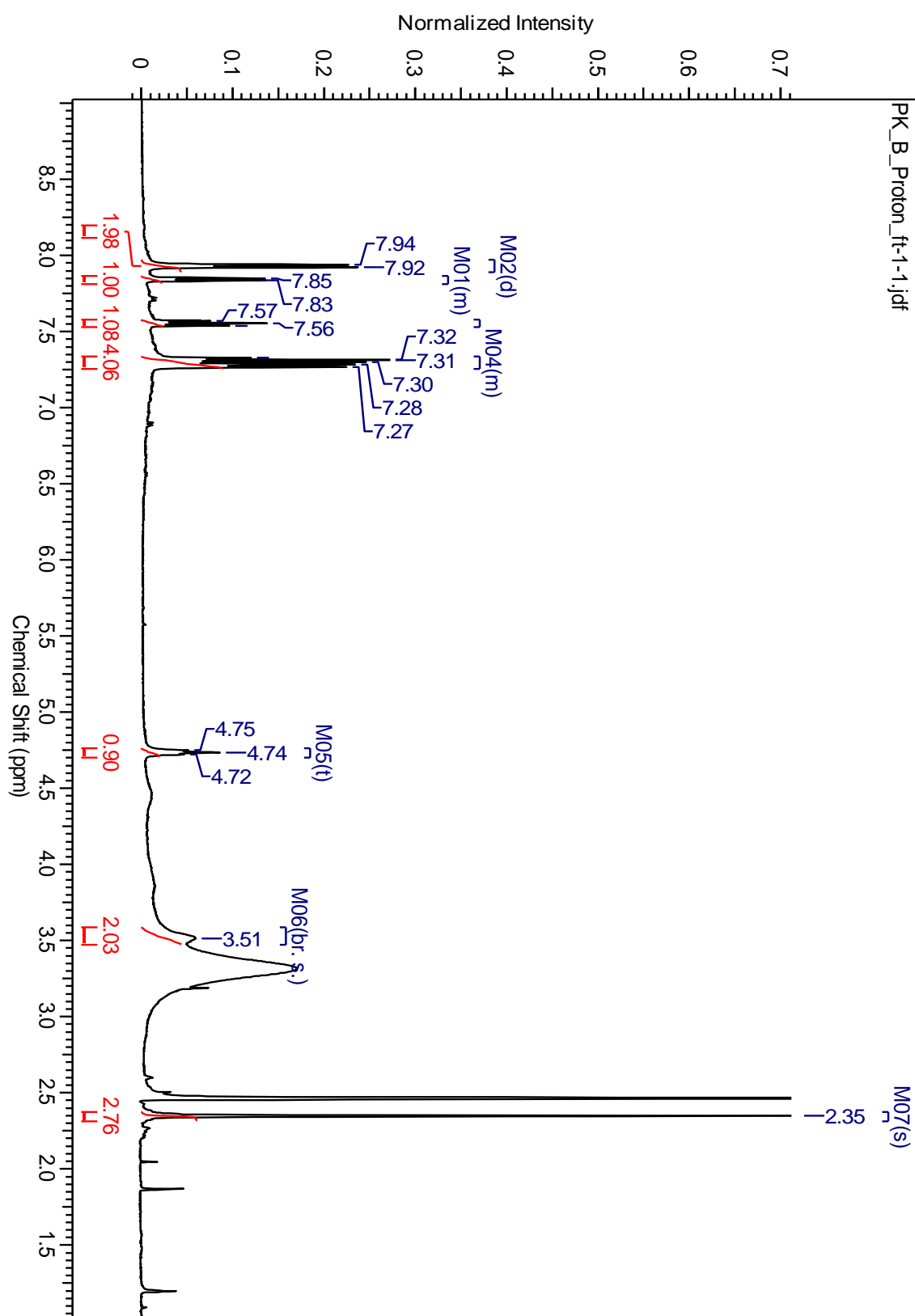
Příloha 1:  $^1\text{H}$  spektrum derivátu s alaninem v poloze 4- na benzodiazepinovém kruhu.



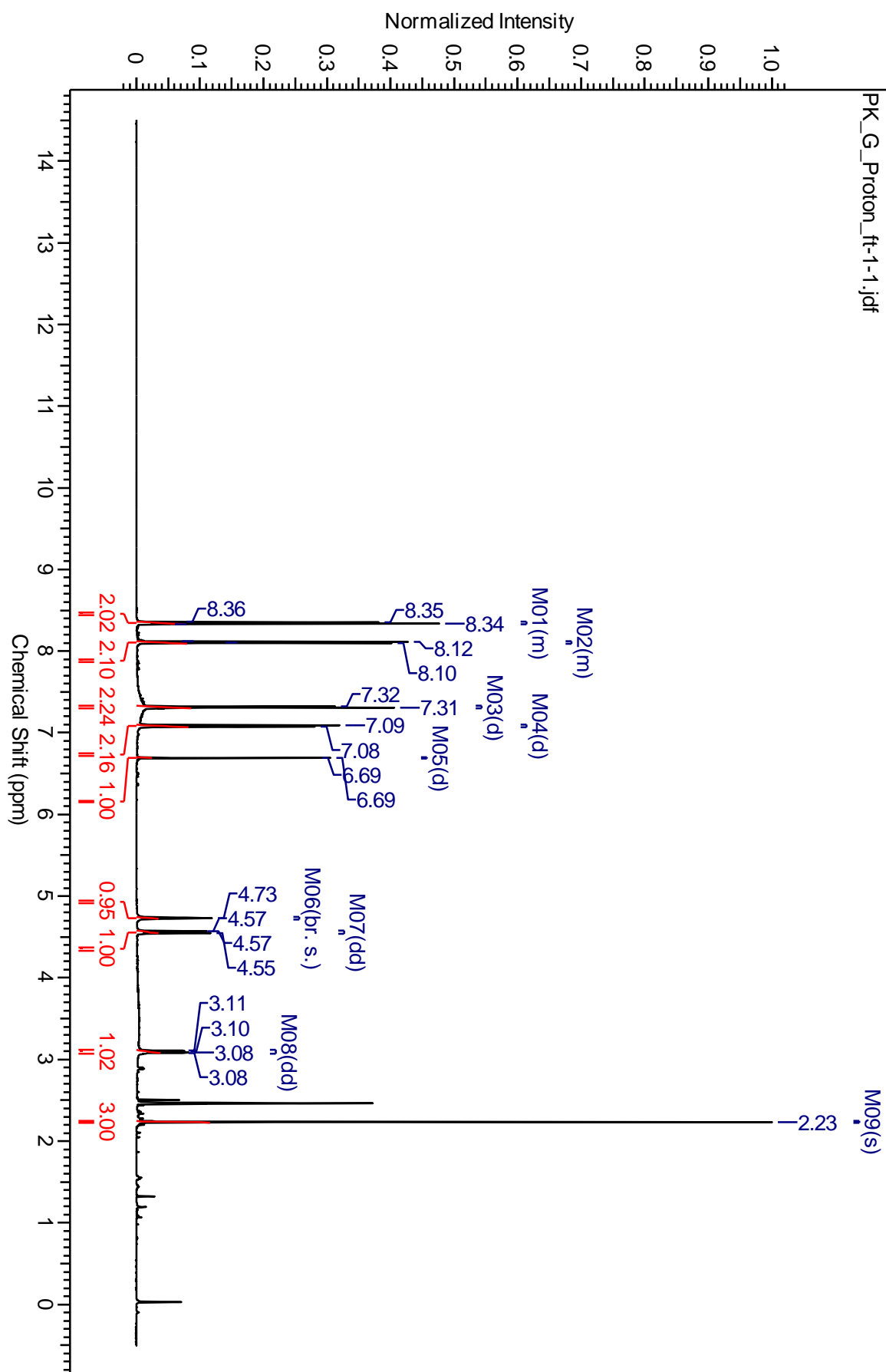
Příloha 2:  $^{13}\text{C}$  spektrum derivátu s alaninem v poloze 4- na benzodiazepinovém kruhu.



Příloha 3:  $^1\text{H}$  spektrum derivátu se serinem v poloze 4- na benzodiazepinovém kruhu.

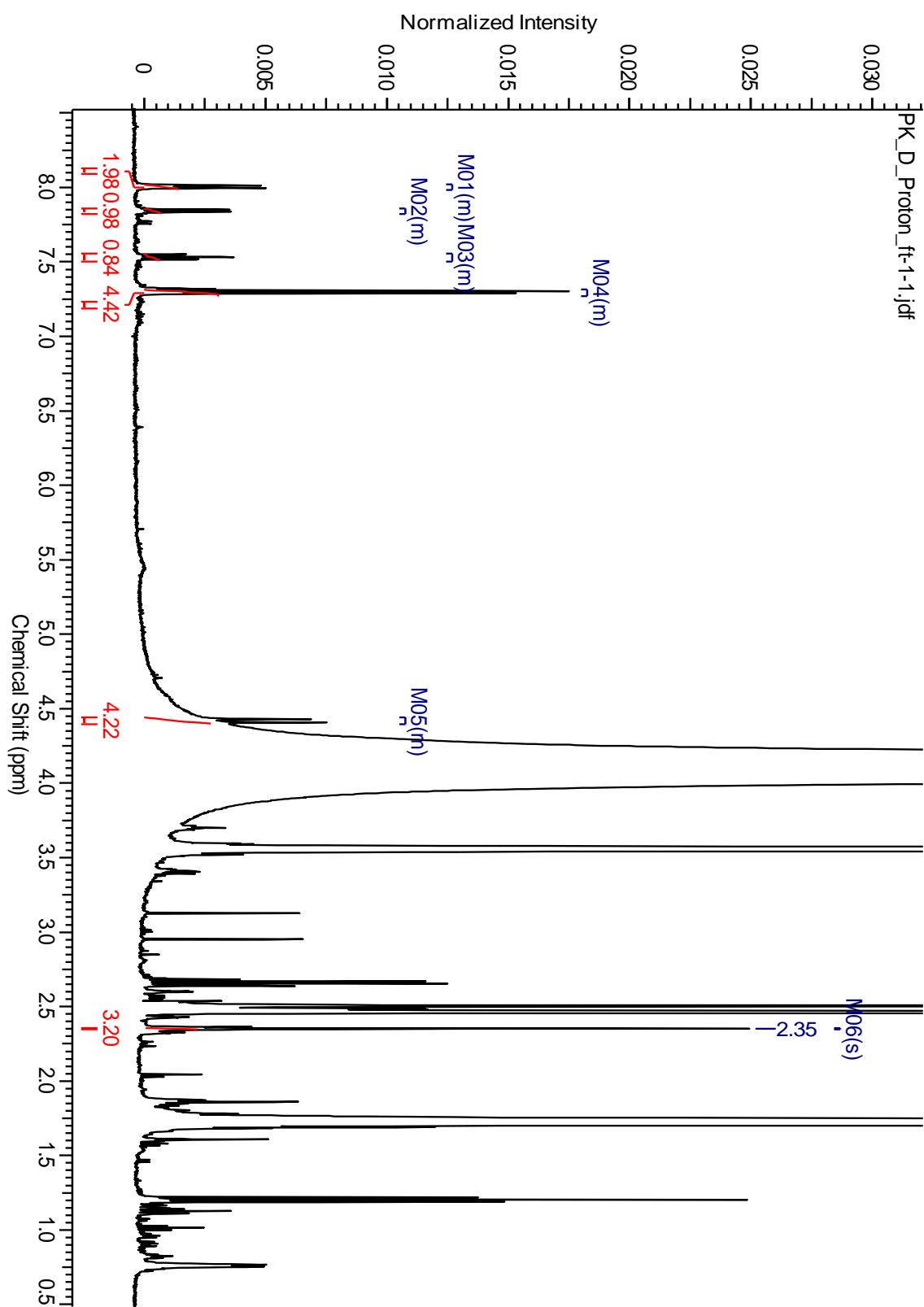


Příloha 4:  $^1\text{H}$  spektrum oxazinového derivátu se serinem po alkylaci s bromketonem.





Příloha 5:  $^1\text{H}$  spektrum derivátu s valinem v poloze 4- na benzodiazepinovém kruhu.



Příloha 6:  $^1\text{H}$  spektrum oxazinového derivátu s threoninem po alkylationi s bromoketonem.

