

Univerzita Palackého v Olomouci

Přírodovědecká fakulta

Katedra organické chemie



**PŘÍPRAVA NOVÝCH DERIVÁTŮ MORFOLIN/THIOMORFOLIN-3-KARBOXYLOVÝCH
KYSELIN POMOCÍ SYNTÉZY NA PEVNÉ FÁZI**

Diplomová práce

Autor:	Bc. Petra Králová
Studijní program:	Chemie
Studijní obor:	Organická chemie
Typ studia:	Prezenční
Vedoucí práce:	Mgr. Veronika Fülöpová, Ph.D.
Konzultant:	doc. RNDr. Miroslav Sural, Ph.D.

Olomouc 2016

Prohlašuji, že diplomovou práci jsem vypracovala samostatně pod odborným dohledem Mgr. Veroniky Fülöpové, Ph.D. a 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

.....

Na tomto místě bych ráda poděkovala své školitelce Mgr. Veronice Fülöpové, Ph.D. a konzultantu doc. RNDr. Miroslavu Suralovi, Ph.D. za vřelou spolupráci, cenné rady a připomínky, konzultaci při samotném vypracovávání diplomové práce a odborné vedení. Dále bych ráda poděkovala celému Ústavu molekulární a translační medicíny Lékařské fakulty Univerzity Palackého v Olomouci za pomoc při práci v laboratoři a za příjemné pracovní podmínky.

Tato závěrečná práce vznikla za podpory projektu studentské grantové soutěže na UP s registračním číslem IGA-PrF-2016-020.

BIBLIOGRAFICKÁ IDENTIFIKACE

Jméno a příjmení autora: Bc. Petra Králová

Název práce: Příprava nových derivátů morfolin/thiomorfolin-3-karboxylových kyselin pomocí syntézy na pevné fázi

Typ práce: Diplomová

Pracoviště: Ústav molekulární a translační medicíny Lékařské fakulty Univerzity Palackého v Olomouci

Vedoucí práce: Mgr. Veronika Fülöpová, Ph.D.

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

Rok obhajoby práce: 2016

Abstrakt:

Tato diplomová práce pojednává o přípravě nových substituovaných derivátů morfolin/thiomorfolin-3-karboxylových kyselin pomocí syntézy na pevné fázi. Výchozí látky pro přípravu cílových molekul představují 4 typy pryskyřic s kyselé labilními linkery, α -aminokyseliny, sulfonyl chloridy, α -bromacetofenony, karboxylové kyseliny nebo jejich chloridy, trifluoroctová kyselina a redukční činidlo triethylsilan. Teoretická část je věnována literární rešerši shrnující metody vedoucích k cílovým derivátům. V diskusní části je popsána problematika týkající se přípravy žádaných sloučenin. V experimentální části jsou nastíněny všechny obecné postupy příprav a izolace těchto derivátů, následované analytickými daty k jednotlivým látkám. V závěru práce jsou shrnuty výsledky a jejich vyhodnocení. V poslední části práce jsou předloženy přílohy k nasyntetizovaným sloučeninám.

Klíčová slova: morfolin/thiomorfolin, oxazin/thiazin, syntéza na pevné fázi, α -aminokyselina, sulfonyl chlorid, sulfonylace, α -bromacetofenon, alkylace, *N*-acylace, triethylsilan

Počet stran: 97

Jazyk: Čeština

BIBLIOGRAPHICAL IDENTIFICATION

Author's first name and surname: Bc. Petra Kralova

Title: Solid-Phase Synthesis of Novel Morpholine/Thiomorpholine-3-Carboxylic Acid Derivatives

Type of thesis: Diploma

Department: Institute of Molecular and Translational Medicine Faculty of Medicine and Dentistry
Palacky University Olomouc

Supervisor: Mgr. Veronika Fülöpová, Ph.D.

Consultant: Doc. RNDr. Miroslav Soural, Ph.D.

The year of presentation: 2016

Abstract:

This diploma thesis deals with the preparation of novel morpholine/thiomorpholine-3-carboxylic acids derivatives with use of solid phase synthesis. The starting materials for the preparation of target compounds are four types of resin with acid-labile linkers, natural α -amino acids, sulfonyl chlorides, α -bromoacetophenones, carboxylic acids or their chlorides, trifluoroacetic acid and reducing agent (triethylsilane). The Theoretical section is devoted to the literature summarizing methods for the preparation of the target derivatives. In the Discussion part there are described issues concerning the preparation of the desired compounds. The Experimental section presents general procedures for the preparation and isolation of these derivatives followed by analytical data of the individual substances. The Conclusion part summarizes our results and their evaluation. In the last part, there are attached annexes of the prepared compounds.

Keywords: morpholine/thiomorpholine, oxazine/thioxazine, Solid-Phase Synthesis, α -amino acid, sulfonyl chloride, α -bromoacetophenone, alkylation, *N*-acylation, triethylsilane

Number of pages: 97

Language: Czech

OBSAH

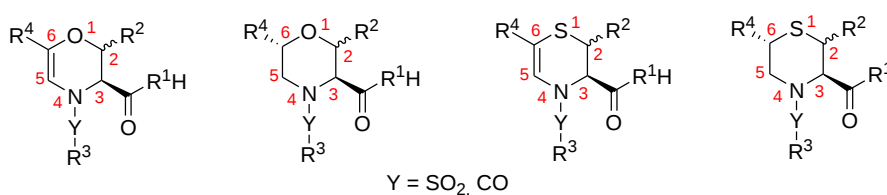
1. ÚVOD	8
2. CÍLE PRÁCE	9
3. TEORETICKÁ ČÁST	11
3.1. Obecné metody příprav derivátů morfolin/thiomorfolin-3-karboxylových kyselin	11
3.1.1. Přístup A: Přímá tvorba heterocyklu	11
3.1.1.1. Deriváty morfolinu/thiomorfolinu	12
3.1.1.2. Deriváty oxazinu/thiazinu	17
3.1.1.3. Deriváty morfolinu s přikondenzovaným cyklem	19
3.1.2. Přístup B: Tvorba heterocyklu a následná substituce atomu dusíku	23
3.1.2.1. Deriváty morfolinu/thiomorfolinu	24
3.1.2.2. Deriváty oxazinu/thiazinu	31
3.1.2.3. Deriváty morfolinu/oxazinu s přikondenzovaným cyklem	31
3.1.3. Přístup C: Tvorba heterocyklu a následná redukce či eliminace vedoucí k derivátům morfolinu/oxazinu	33
3.1.3.1. Redukce dvojně vazby	33
3.1.3.2. Eliminace vhodných odstupujících skupin	34
3.1.4. Přístup D: Syntéza peptidomimetik obsahujících morfolin/thiomorfolin-3-karboxylové fragmenty	35
4. VÝSLEDKY A DISKUSE	37
4.1. Vývoj a optimalizace navržené metodiky	37
4.1.1. Přístup A: Příprava N-sulfonylovaných derivátů morfolinu a thiomorfolinu	39
4.1.1.1. Problematika sulfonylací a alkylací	39
4.1.1.2. Problematika alkylací po „přímých“ sulfonylacích	43
4.1.1.3. Problematika cyklizací na nenasycené deriváty morfolinu	44
4.1.1.4. Problematika cyklizací na nasycené deriváty morfolinu	48
4.1.1.5. Problematika separace	49
4.1.2. Přístup B: Příprava N-acylovaných derivátů morfolinu	52
4.1.2.1. Problematika acylací po denosylaci	52
4.1.2.2. Problematika cyklizací na nenasycené deriváty morfolinu	53
4.1.2.3. Problematika cyklizací na nasycené deriváty morfolinu	54
4.1.2.4. Problematika separace	55
4.1.2.5. Problematika „přímé“ acylace, následné alkylace a cyklizace na finální produkty 14(1,1,R ³ ,1)	56

4.2. Syntéza peptidomimetik a jejich amino-prekurzorů	58
4.2.1. Problematika redukce nitroskupiny v poloze 4 a testování cyklizace na nenasycené deriváty morfolinu.....	60
4.2.2. Testování cyklizace prekurzorů s aminoskupinou v poloze 4 na nasycené deriváty morfolinu	61
4.2.3. Problematika acylací aminoskupiny v poloze 4.....	61
4.2.4. Testování cyklizace acylovaných derivátů na nenasycené a nasycené produkty	62
4.2.5. Problematika redukce nitroskupiny v poloze 2 a testování cyklizace na nenasycené deriváty morfolinu.....	63
4.2.6. Problematika separace	65
4.3. Rotamerie	67
4.4. Studium konfigurace na chirálních centrech	68
5. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST	71
5.1. Pomůcky, chemikálie a přístrojové vybavení	71
5.2. Experimentální syntéza derivátů morfolinu/thiomorfolinu	72
5.2.1. Příprava kyselého labilního linkeru	72
5.2.2. Derivatizace s Fmoc-Osu či Fmoc-Cl.....	73
5.2.3. Imobilizace Fmoc- α -aminokyseliny	73
5.2.4. Štěpení vzorků z pevné fáze	74
5.2.5. Stanovení loadingu pryskyřice.....	74
5.2.6. Deprotekce terminální aminoskupiny	74
5.2.7. Příprava N-sulfonylovaných derivátů.....	74
5.2.8. Příprava N-acylovaných a re-sulfonylovaných derivátů.....	75
5.2.9. Redukce nitroskupiny na arylu v poloze 2 nebo 4.....	75
5.2.10. Štěpení vedoucí ke spontánní cyklizaci na nenasycené/nasycené deriváty.....	76
5.2.11. Extrakce tuhou fází (SPE, Solid Phase Extraction)	76
5.2.12. Separace finálních látek	76
5.3. Analytická data.....	76
6. ZÁVĚR	91
7. SEZNAM ZKRATEK.....	93
8. REFERENCE	96
9. PŘÍLOHY.....	

1. ÚVOD

Látky obsahující morfolinový a thiomorfolinový skelet tvoří širokou plejádu biologicky aktivních sloučenin, jejichž účinky se liší v závislosti na volbě substituentů. Mezi strukturně zajímavé morfoliny patří deriváty odvozené od *N*-sulfonylovaných/acylovaných 3,4-dihydro-2*H*-1,4-oxazinů s karbonylovou skupinou na uhlíku C3 (Obr. 1), z nichž některé byly jen velmi málo studovány.¹⁻⁵ Dosavadní průzkum ukázal, že tyto sloučeniny mohou působit jako inhibitory metaloproteasy⁶, konkrétně tumor necrosis factor alfa konvertujícího enzymu (TACE) zodpovědného za zánětlivé procesy v organismu (např. Crohnovy choroby a jiných imunitních onemocnění)⁷, dále jako inhibitory trombinu⁸, nebo se využívají k léčbě neurodegenerativních onemocnění (např. Parkinsonovy a Alzheimerovy nemoci) či nádorů⁹.

Obr. 1: Obecné struktury diskutovaných derivátů morfolinu.

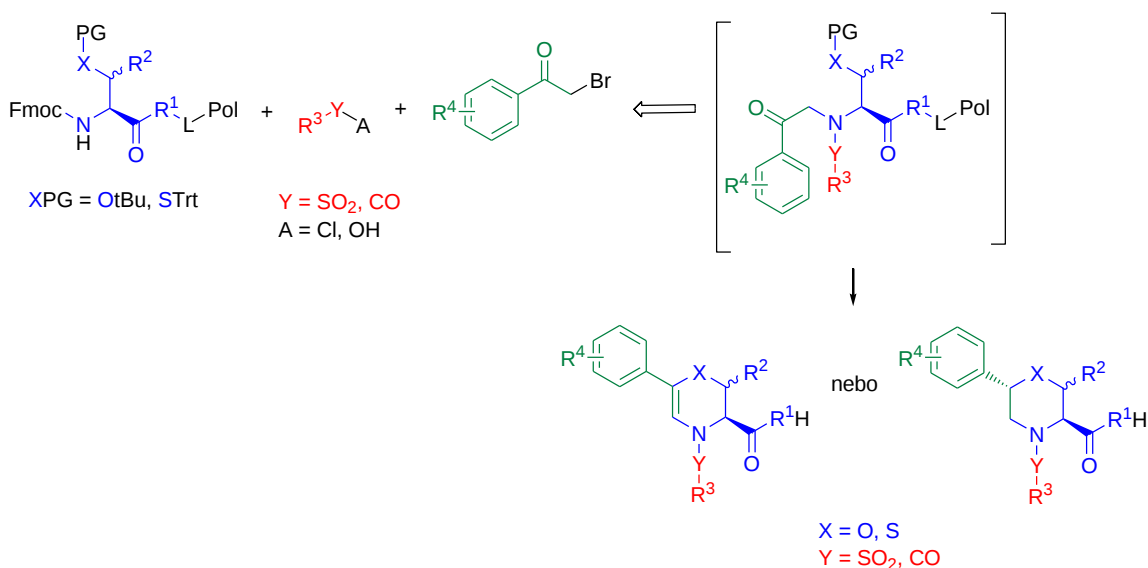


Široká biologická aktivita vybraných derivátů morfolinu⁶⁻⁹ a fakt, že dosud byly publikovány jen dva články zmiňující syntézu 3,4-dihydro-2*H*-1,4-oxazin-3-karboxylových kyselin na pevné fázi^{2,10}, nás inspirovaly k navázání na předchozí výsledky bakalářské práce vykonané na Katedře organické chemie.¹¹ V této souvislosti je předložena diplomová práce zaměřena na vývoj obecné metodiky aplikovatelné pro syntézu dosud nepopsaných derivátů morfolin/thiomorfolin-3-karboxylových kyselin z odpovídajících α -aminokyselin imobilizovaných na pevném nosiči. Tato práce je rozdělena do devíti kapitol. V teoretické části jsou popsány doposud známé metody vedoucí k derivátům morfolinu/thiomorfolinu pomocí syntézy v roztoku či na pevné fázi. Provedený výzkum, experimenty a výsledky jsou nastíněny v sekci Výsledky a diskuse následované Experimentální částí. V závěru práce je stručně shrnuta problematika týkající se přípravy derivátů morfolinu/thiomorfolinu na pevné fázi a v přílohách jsou uvedena NMR spektra finálních látek a některých vedlejších produktů.

2. CÍLE PRÁCE

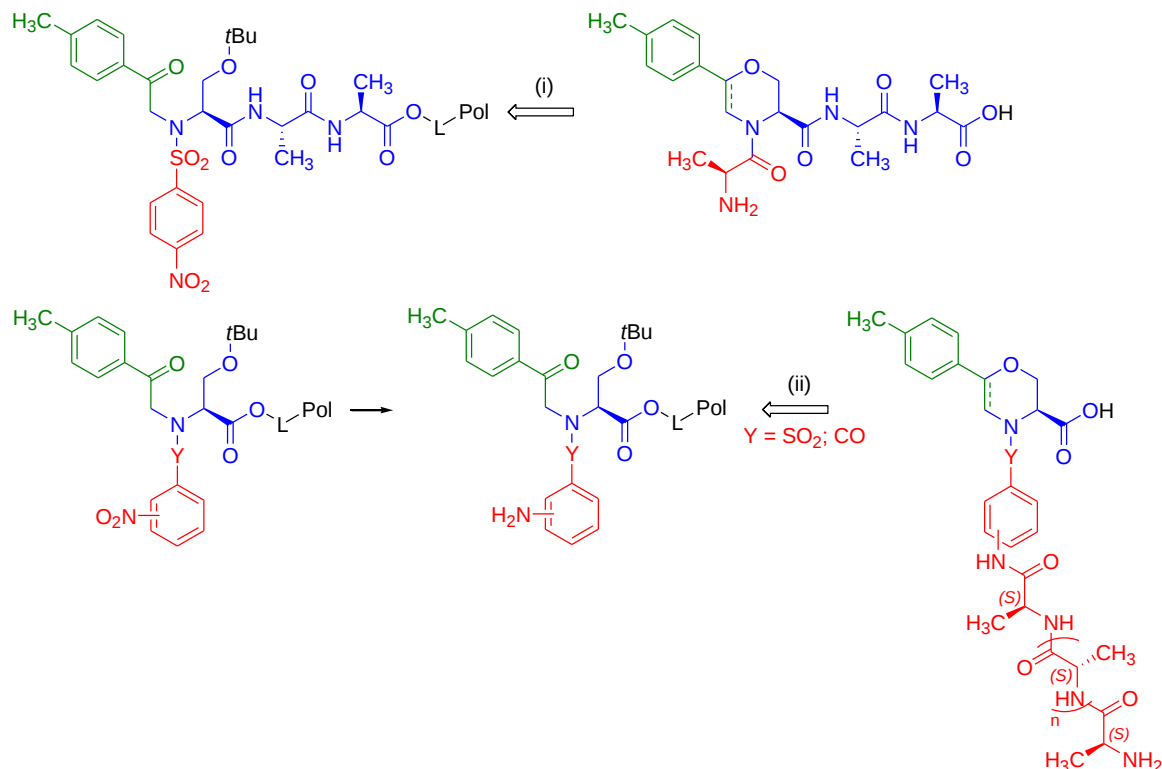
Záměrem diplomové práce bylo vyvinout a optimalizovat přípravu derivátů morfolin/thiomorfolin-3-karboxylových kyselin s využitím syntézy na pevné fázi a komerčně dostupných výchozích látek: Fmoc- α -aminokyselin (Ser, Cys a Thr) opatřených kyselé labilní protektivní skupinou (PG) na kyslíku nebo síře, variabilních sulfonyl chloridů, karboxylových kyselin nebo jejich chloridů a α -bromacetofenonů. Za tímto účelem byla připravena série lineárních prekurzorů (Obr. 2), které byly následně kyselé štěpeny z polymerního nosiče. Paralelní deprotektce chránicí skupiny (PG) vedla k cyklizaci na finální dihydrooxazin/dihydrothiazin-3-karboxylové kyseliny. Přídavek triethylsilanu (TES)¹² do štěpícího koktejlu měl za následek formaci příslušných morfolin/thiomorfolin-3-karboxylových kyselin.

Obr. 2: Retrospektivní syntéza derivátů morfolin a thiomorfolin-3-karboxylových kyselin.



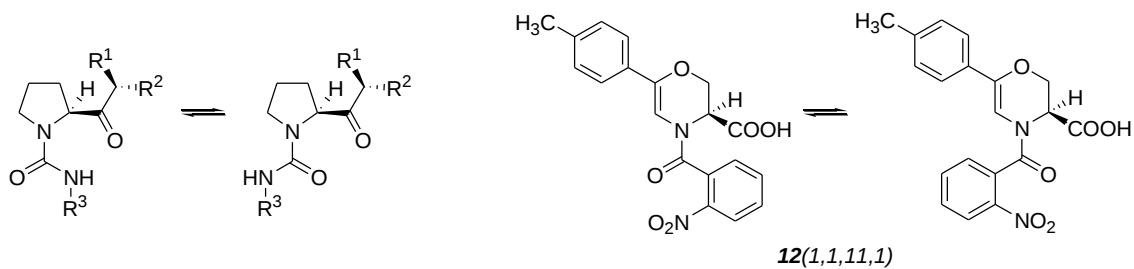
Druhým cílem bylo otestovat navrženou syntézu pro přípravu peptidomimetik, látek podobných peptidům, obsahujících morfolin-3-karboxylové fragmenty^{13,14}. K tomuto účelu byly zvoleny dva přístupy: (i) přímá metoda založená na spojování určitého počtu α -aminokyselin přes peptidovou vazbu, kdy poslední aminokyselinou měl být serin, ze kterého je možno následně vytvořit oxazin/morfolin, dále (ii) nepřímá metoda využívající redukci nitroskupiny na již nasyntetizovaném lineárním prekurzoru oxazinu/morfolinu. Takto připravená aminoskupina měla být dále modifikována acylací Fmoc- α -alaninem a následnou tvorbou peptidového řetězce. Finální cyklizace měla poskytnout cílová peptidomimetika (Obr. 3).

Obr. 3: Ukázka dvou přístupů přípravy peptidomimetik.



Třetím cílem bylo potvrdit tvorbu stabilních konformačních izomerů vznikajících předpokládanou rotací kolem C-N amidické vazby u derivátu **10**(1,1,11,1) připraveného během bakalářské práce (Obr. 4)¹¹ a u nově nasyntetizovaných N-acyl analogů. Vznik izomerů byl doposud uvažován na základě podobnosti s jevem popsáným u peptidů s navázaným prolinem (Obr. 4).¹⁵

Obr. 4: Konformační izomery u peptidů s navázaným prolinem a u derivátu **10**(1,1,11,1).



Posledním cílem práce bylo určení konfigurace na chirálních centrech připravených látek a ověření enantiosektivního průběhu navržené syntézy.

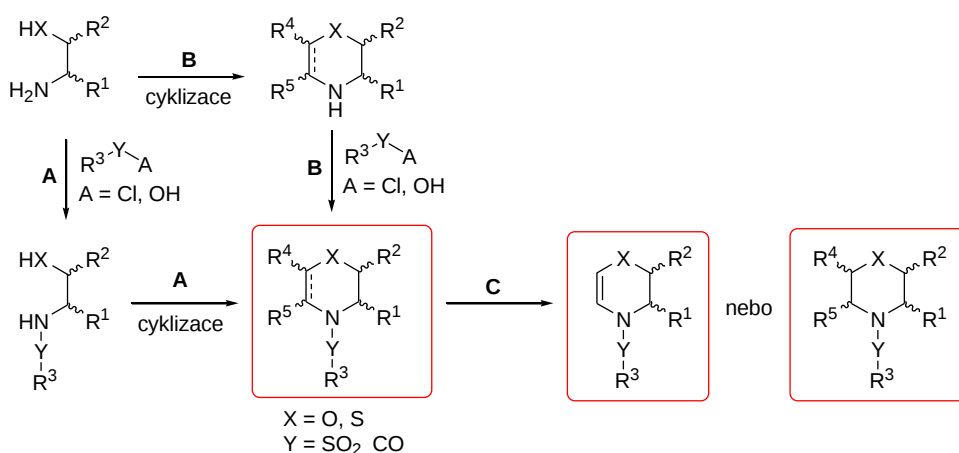
3. TEORETICKÁ ČÁST

3.1. Obecné metody příprav derivátů morfolinu/thiomorfolinu-3-karboxylových kyselin

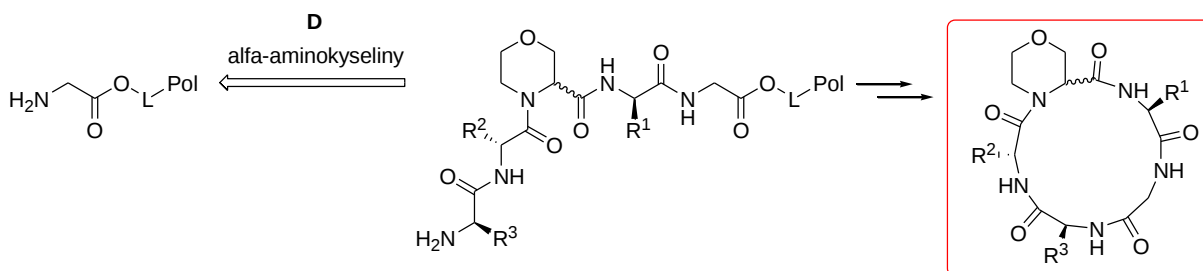
Nejpoužívanější metodou vedoucí k derivátům oxazinu, morfolinu a jejich sirných analogů (Obr. 1) je tradiční syntéza v roztoku využívající tři obecných přístupů: **(A)** přímá tvorba heterocyklu, **(B)** tvorba heterocyklu a následná substituce atomu dusíku, nebo **(C)** tvorba heterocyklu a následná redukce či eliminace vedoucí k žádaným produktům. Kromě syntézy v roztoku je v této části práce popsána také příprava derivátů oxazinu pomocí syntézy na pevné fázi^{2,10}, na kterou navazuje stručný úvod do syntézy peptidomimetik s morfolinovým skeletem **(D)**. Výchozími látkami byly deriváty serinu, cysteinu či threoninu s vhodnou *O*/*N*-protekcí nebo β -aminoalkoholy/thioly (Obr. 5).

Obr. 5: Obecné přístupy k syntéze derivátů morfolinu a thiomorfolinu.

Přístup (A) – (C):



Přístup (D):



3.1.1. Přístup A: Přímá tvorba heterocyklu

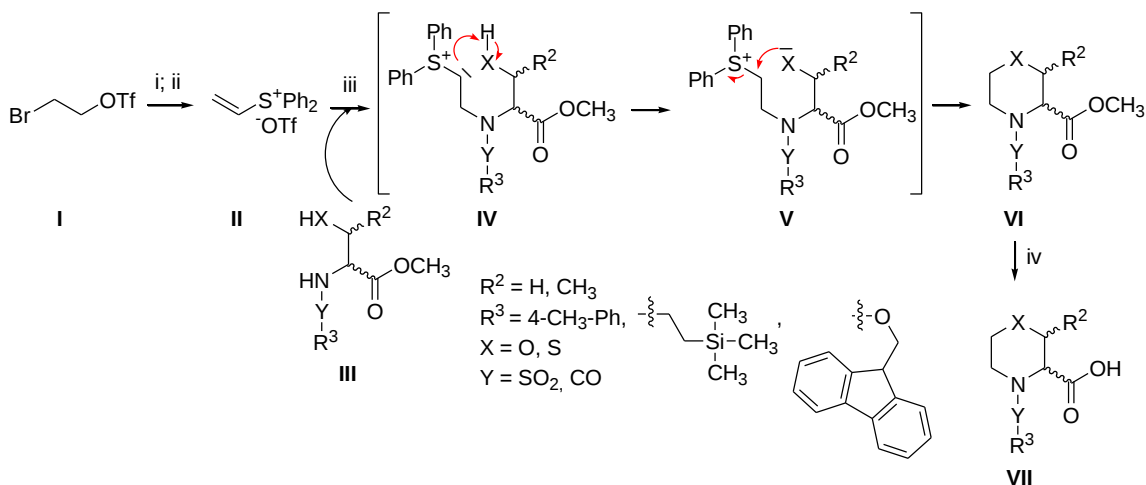
První přístup je založen na přímé tvorbě heterocyklu a vychází ze syntézy *N*-substituovaného lineárního prekursoru, jenž je následně intramolekulárně cyklizován za vzniku cílových derivátů. Pro přehlednost je tato kapitola rozdělena na tři podkapitoly týkající se přípravy: (1) derivátů morfolinu/thiomorfolinu, (2) derivátů oxazinu/thiazinu a (3) derivátů morfolinu s přikondenzovaným cyklem.

3.1.1.1. Deriváty morfolinu/thiomorfolinu

Výchozími substráty pro přípravu finálních sloučenin byly deriváty serinu, cysteinu a threoninu s vhodnou *O/N*-protektivní skupinou (PG) či substitucí na atomu dusíku. Nejprve jsou uvedeny syntézy vedoucí k *N*-sulfonylovaným derivátům morfolinu/thiomorfolinu, poté známé metody poskytující morfoliny a následně thiomorfoliny. Stejného členění je použito pro *N*-acylované deriváty.

Na úvod je popsána syntéza využívající reakce hydroxyskupiny s vinyl deriváty, například vinylsulfoniovými solemi **II** a vinylselenony **X** jakožto Michaelovými akceptory, čehož bylo využito dále pro přípravu *N*-acylovaných analogů ($\text{YR}^3 = \text{COPh}$).¹⁶⁻¹⁹ První metoda (Schéma 1)^{16,17} vycházela z difenylsulfoniové soli **II** připravené reakcí 2-bromethyl triflátu **I** s difenylsulfidem za následné eliminace bromovodíku v bazickém prostředí. Adice methyl 2-amino-3-hydroxy-/3-merkaptopropanoátu **III** na dvojnou vazbu vinylsulfoniové soli **II** v přítomnosti báze (Et_3N^{16} či NaH^{17}) vedla k ylidu **IV**. Protonovým transferem z hydroxyskupiny a následným odstoupením difenylsulfidu došlo k uzavření za vzniku heterocyklu **VI**, jehož hydrolýzou byla získána žádaná morfolin/thiomorfolin-3-karboxylová kyselina **VII**.^{16,17}

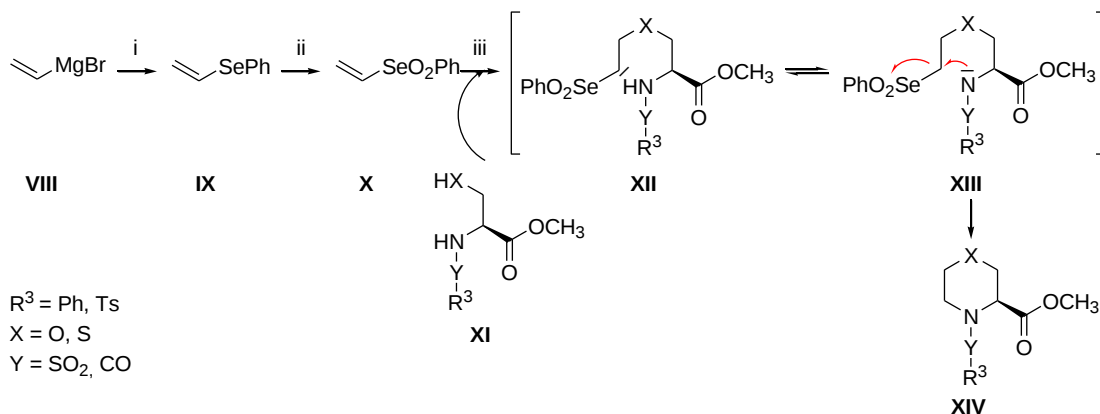
Schéma 1: Syntéza derivátů morfolin/thiomorfolin-3-karboxylových kyselin VII.^{16,17}



Reagencie: (i) PhS_2 , PhCH_3 , 5 h, reflux; (ii) KHCO_3 , 50% THF/ H_2O , 20 min, 25 °C; (iii) Et_3N , DCM, 15 h, 25 °C nebo NaH, DCM, 15 h, 0 - 25 °C; (iv) PhOH , 45% $\text{HBr}/\text{CH}_3\text{COOH}$, 16 h, 25 °C.

Analogií výše popsané metodiky je syntéza založena na reakci vinyl selenonů **X** s chirálními β -aminoalkoholy/thioly **XI** mající aktivovanou aminoskupinou. Výchozí fenyl(vinyl)selenony **X** byly získány oxidací fenyl(vinyl)selenidu **IX** pomocí MCPBA připraveného reakcí vinylmagnesium bromidu **VIII** s difenyldiselenidem.²⁰ V přítomnosti báze došlo k ataku atomu kyslíku/síry látky **XI** na β -uhlíku vinyl selenonu **X** a k následnému protonovému transferu vedoucímu k uzavření intermediátu **XIII** do cyklu **XIV** (Schéma 2).¹⁹

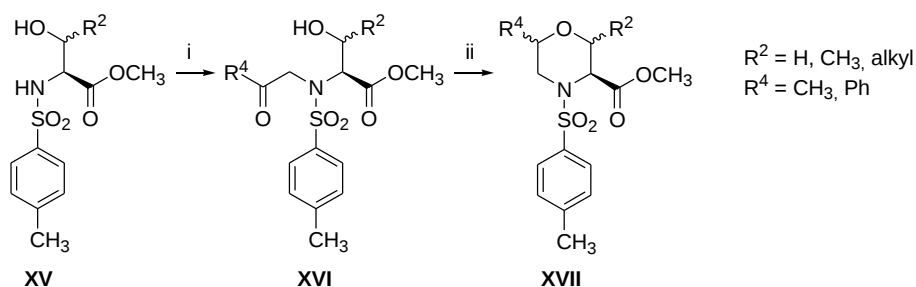
Schéma 2: Syntéza derivátů morfolin/thiomorfolin-3-karboxylových kyselin **XIV**.^{19,20}



Reagencie: (i) $(\text{PhSe})_2$, THF, 30 min, 0 °C; (ii) MCPBA, DCM, 15 min, 25 °C; (iii) X = O: NaH, THF, 24 h, 0 °C; X = S: Et_3N , DCM, 15 h, 0 - 25 °C.

Dalším zajímavým přístupem byla stereoselektivní syntéza 2,6-disubstituovaných derivátů morfolin-3-karboxylových kyselin **XVII** založená na reduktivní etherifikaci (Schéma 3). Stereoselektivitu reakce snižovala přítomnost methylové skupiny či alkylu v pozici R^2 a vzniklý izomer byl konformován převážně do výhodnějšího *trans* uspořádání. Syntéza žádaných produktů **XVII** spočívala v reduktivní etherifikaci keto alkoholu **XVI**, připraveného z *N*-tosylovaného derivátu serinu **XV** alkylovaného α -bromketonem v bazickém prostředí K_2CO_3 , a cyklizaci na látku **XVII** v přítomnosti TMS-OTf a Et_3SiH .²¹

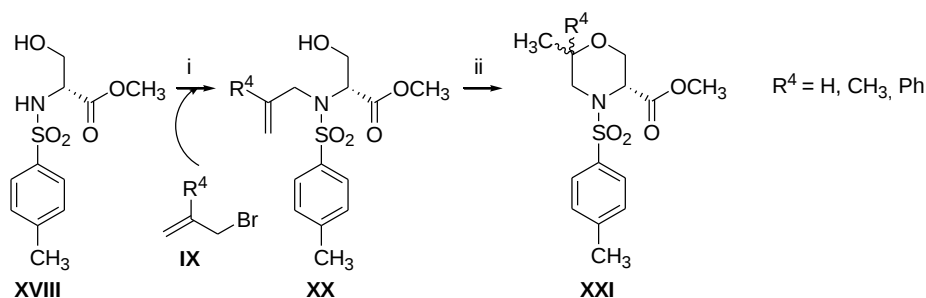
Schéma 3: Syntéza derivátů morfolin-3-karboxylových kyselin **XVII**.²¹



Reagencie: (i) $\text{R}^4\text{COCH}_2\text{Br}$, K_2CO_3 , DCM, 5 h, 25 °C; (ii) TMS-OTf, Et_3SiH , DCM, 1 - 2 h, 0 °C.

Výhodnou metodu vedoucí k *N*-sulfonylovaným derivátům morfolinu **XXI** byla dvou kroková syntéza vycházející z intramolekulární hydroalkoxylace alkenolu **XX** s etherátem fluoridu boritého (Schéma 4). Výchozí alkenol **XX** byl připraven reakcí 2-amino-3-hydroxypropanoátu methylnatého **XVIII** s allylbromidem **IX** v bazickém prostředí NaH.²²

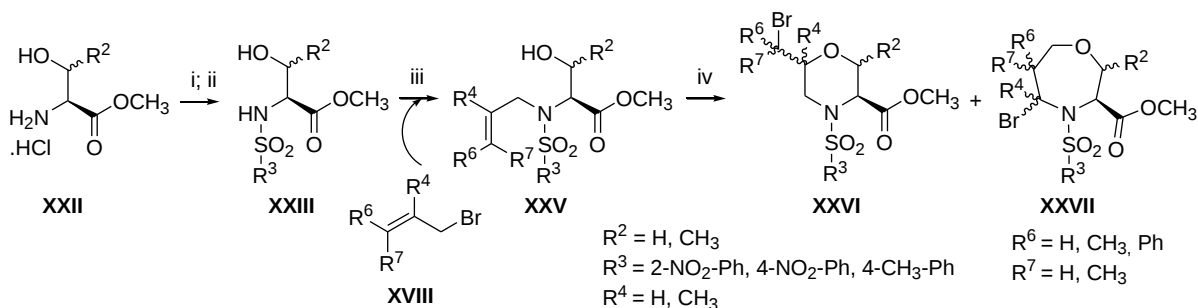
Schéma 4: Syntéza derivátů morfolin-3-karboxylových kyselin **XXI**.²²



Reagencie: (i) NaH, suchý DMF, 16 h, 0 - 25 °C; (ii) $\text{BF}_3 \cdot \text{Et}_2\text{O}$, DCM, 5 h, 25 °C.

Během syntézy 1,4-oxazepanů **XXVII** založené na Markovnikově 7-endo cyklizaci byly minoritně detekovány deriváty morfolinu **XXVI** vznikající jako vedlejší produkty při cyklizaci alkylovaného intermediátu **XXV** v přítomnosti NBS v THF za katalýzy ($\pm$)-CSA a za chlazení (Schéma 5).²³ N-alkylovaný prekursor **XXV** byl získán po aktivaci derivátů serinu **XXII** jejich nosylací/tosylací a následnou alkylací derivátu **XXIII** allylbromidem **XVIII** v přítomnosti K_2CO_3 .²³

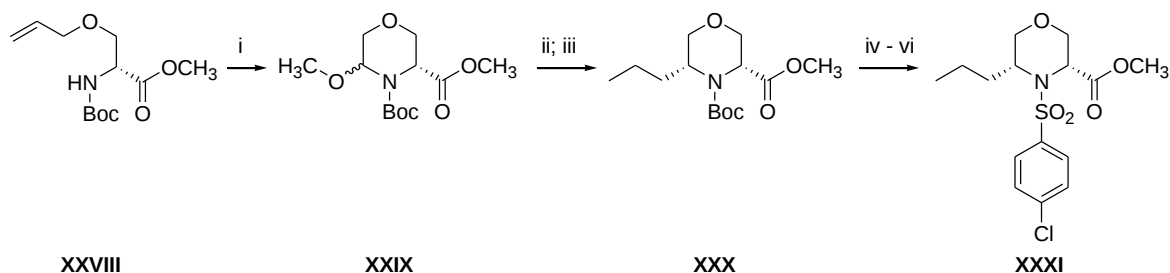
Schéma 5: Syntéza derivátů morfolin-3-karboxylových kyselin **XXVI**.²³



Reagencie: (i) Et_3N , DCM, 30 min, 25 °C; (ii) Nos-Cl nebo Tos-Cl, Et_3N , DCM, 16 h, 25 °C; (iii) K_2CO_3 , $(CH_3)_2CO$, 16 h, 25 °C; (iv) NBS, THF, ($\pm$)-CSA, 12 h, 0 °C.

Vybrané N-sulfonylované morfoliny **XXXI** představují prekursorů pro přípravu γ -inhibitorů sekretáz jako potenciálních léčiv Alzheimerovy choroby. Jejich syntéza spočívala v ozonolyze derivátů O-allyl-D-serinu s amino-protektivní Boc skupinou **XXVIII** za následné modifikace morfolinového skeletu **XXIX** v poloze 5 allyltrimethylsilanem (**XXX**)^{24,25}. Kyselá N-deproteckce a okamžitá sulfonylace s 4-chlorbenzensulfonyl chloridem vedla k žádanému esteru **XXXI** (Schéma 6).²⁴

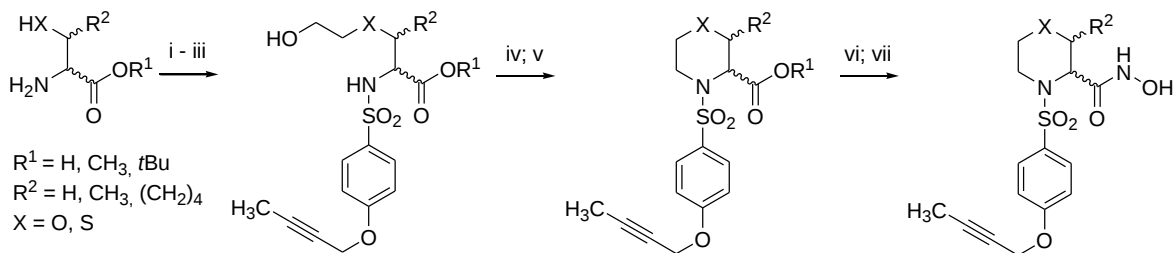
Schéma 6: Syntéza derivátů morfolin-3-karboxylových kyselin **XXXI**.²⁴



Reagencie: (i) 1. O_3 , MeOH, DCM, -78 °C (do perzistentní zelené barvy); 2. DMSO, 16 h, 25 °C; 3. TsOH, MeOH, 4 h, 25 °C; (ii) allyltrimethylsilan, $BF_3 \cdot Et_2O$, 1 h, -78 °C; (iii) H_2 , 10% Pd/C, EtOAc, MeOH, 6 h, 25 °C, 101 kPa; (iv) 50% TFA/DCM, 2 h, 25 °C; (v) 4-Cl-Ph-SO₂Cl, Et_3N , DCM, 16 h, 25 °C; (vi) MCPBA, DCM, 16 h, 25 °C.

Následující rozebraná syntéza vedoucí k morfolin/thiomorfolin-3-hydroxamovým kyselinám **XXXV** byla založena na ataku hydroxy či merkapto skupiny látky **XXXII** 2-bromethanolem (Schéma 7).²⁶ Následná sulfonylace 4-butynyloxybenzensulfonyl chloridem poskytla intermediát **XXXIII**, který byl v případě $R^1 = H$ esterifikován *tert*-butyl bromidem. Látka **XXXIII** byla dále podrobena Mitsunobu alkylaci ($X = O$) nebo nukleofilní substituci s CBr_4 za vzniku odpovídajícího bromidu cyklizujícího v bazickém prostředí roztoku K_2CO_3 (**XXXIV**). V závislosti na substituci R^1/X byl ester **XXXIV** buďto hydrolyzován bazicky LiOH ($R^1 = CH_3$; $X = O$), nebo kyselé ($R^1 = tBu$; $X = S$) za následné aktivace a substituce s hydroxylaminem poskytující racemickou směsí hydroxamových kyselin **XXXV**.²⁶

Schéma 7: Syntéza morfolin/thiomorfolin-3-hydroxamových kyselin **XXXV**.²⁶



XXXII

XXXIII

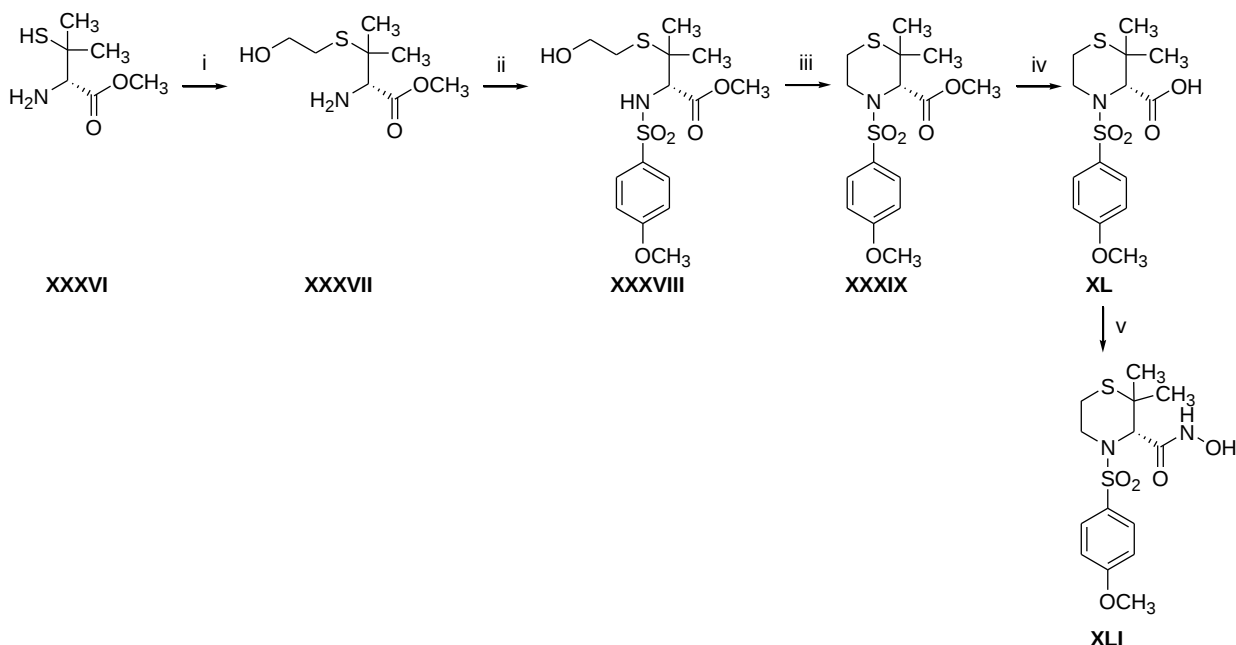
XXXIV

XXXV

Reagencie: (i) $\text{Br}(\text{CH}_2)_2\text{OH}$, $X = \text{O}$: $\text{BF}_3\text{-Et}_2\text{O}$, 30 min, 0 °C, poté 6 h, 25 °C; $X = \text{S}$: NaOH , 25 min, 0 °C, do odbarvení; (iii) 4-butynyloxybenzensulfonyl chlorid, Na_2CO_3 , $\text{DMF}/\text{H}_2\text{O}$, 17 h, 25 °C; (iii) $R^1 = \text{H}$: $t\text{BuBr}$, K_2CO_3 , BTEAC , DMA , 18,5 h, 55 °C; (iv) $X = \text{O}$: PPh_3 , DEAD , THF , 18 h, 25 °C; $X = \text{S}$: PPh_3 , CBr_4 , suchý THF , 20 min, 25 °C (v) K_2CO_3 , bezvodý DMF , 1 h, 25 °C; (vi) $X = \text{O}$: LiOH , 30 min, 0 °C; $X = \text{S}$: 50% TFA/DCM , 1 h, 25 °C; (vii) 1. $(\text{COCl})_2$, DMF nebo EDC , HOBt , 30 min, 0 - 25 °C; 2. NH_2OH , 30 min, 0 - 25 °C.

Významných prekurzorů **XLI** vedoucích k inhibitorům metaloproteinasy bylo dosaženo S-alkylací merkapto skupiny D-penicilaminu **XXXVI**, následnou sulfonylací aminoskupiny (**XXXVIII**) a uzavřením do cyklu pomocí Mitsunobu reakce (**XXXIX**). Konverze připraveného thiomorfolin-3-esteru **XXXIX** v přítomnosti jodidu lithného (**XL**) a následná modifikace karboxylové skupiny hydroxylaminem poskytla žádané thiomorfolin-3-hydroxamové kyseliny **XLI** (Schéma 8).²⁷

Schéma 8: Syntéza thiomorfolin-3-hydroxamových kyselin **XLI**.²⁷



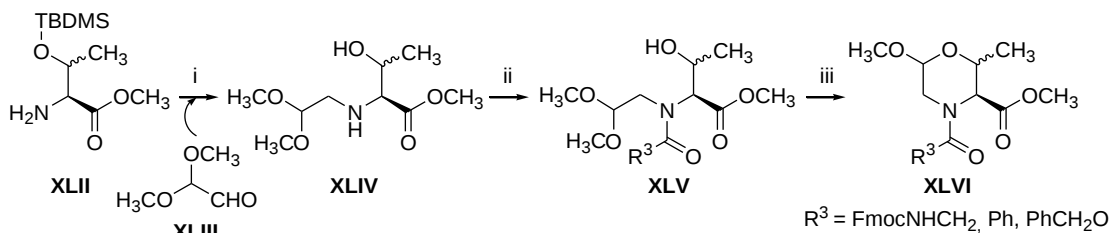
Reagencie: (i) $\text{Br}(\text{CH}_2)_2\text{OH}$, DBU , DMF , 30 min, 25 °C; (ii) 4- $\text{OCH}_3\text{-PhSO}_2\text{Cl}$, Et_3N , 1,4-dioxan/ H_2O , 18 h, 25 °C; (iii) PPh_3 , DEAD , THF , 2 h, 25 °C; (iv) LiI , Py , 3 h, reflux; (v) 1. $(\text{COCl})_2$, DMF , DCM , 30 min, 25 °C; 2. NH_2OH , $\text{H}_2\text{O}/\text{THF}$ (2:7), 15 min, 25 °C.

Kromě metod vedoucích k N-sulfonylovaným derivátům jsou známy další postupy poskytující deriváty morfolinu a thiomorfolinu s N-acyl substitucí. První dvě metody byly nastíněny dříve ve Schématech 1 a 2, přičemž následující odstavce popisují konkrétní metodiky detailněji.

První metoda zaměřená na syntézu N-acyl-morfolinů **XLVI** byla založena na tvorbě aminoacetalu **XLIV** vzniklého kondenzací threoninového derivátu **XLII** s 2,2-dimethoxyacetaldehydem **XLIII** za následné N-acylace benzyl chlorformiátem poskytující lineární intermediát

XLV. Finální cyklizaci tohoto prekurzoru **XLV** v přítomnosti thionyl chloridu byl získán požadovaný produkt **XLVI** (Schéma 9).¹

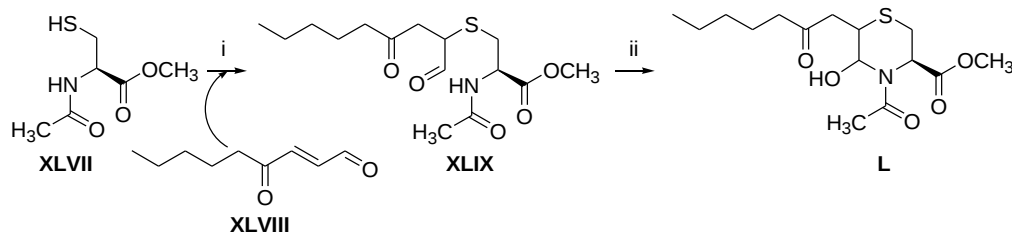
*Schéma 9: Syntéza derivátů morfolin-3-karboxylových kyselin **XLVI**.¹*



Reagencie: (i) H_2 , 10% Pd/C, Et_3N , MeOH, 16 h, 25 °C; (ii) Fmoc-Gly-OH, NMM, ClCOOEt, suchý THF, 1 h, 0 °C, poté 18 h, 25 °C nebo BzCl, DIEA, suchý THF, 18 h, 0 °C nebo Cbz-Cl, NaHCO_3 , EtOAc/ H_2O , 10 min, 0 °C, poté 18 h, 25 °C; (iii) SOCl_2 , MeOH, 4 h, reflux.

Článek⁵ popisuje poměrně jednoduchou syntézu 5,6-disubstituovaných thiazin-3-karboxylových kyselin **L** založenou na reakci *N*-acetylaminu-L-cysteinu **XLVII** a 4-oxo-non-2-enalu **XLVIII** v přítomnosti citrátového pufru při 37 °C (**XLIX**). Finální cyklizace Michalova akceptoru **XLIX** bylo dosaženo během separace pomocí semipreparativní HPLC s gradientem 10 – 60% MeCN/0,1% TFA (**L**) (Schéma 10).

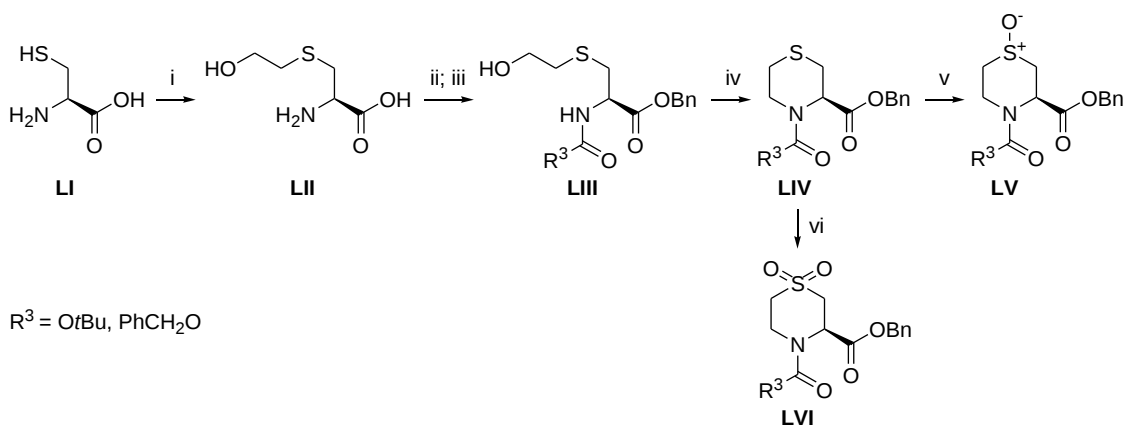
*Schéma 10: Syntéza derivátů thiomorfolin-3-karboxylových kyselin **L**.⁵*



Reagencie: (i) 0,1M citrátový pufr (pH = 4), 24 h, 37 °C; (ii) semipreparativní HPLC (gradient 10 - 60% MeCN/0,1% TFA).

Další modifikace *S*-alkylace L-cysteinu **LI** ethylenoxidem (**LII**) za následné *N*-acylace Boc_2O či Cbz-Cl a esterifikace BnBr v přítomnosti CsHCO_3 vedla k esteru *N*-acylamino-L-cysteinu **LIII**. Intramolekulární Mitsunobu alkylací byl posléze připraven žádaný thiomorfolin **LIV**, jehož oxidace bromem v 10% roztoku KHCO_3 či oxonem poskytla dané *S*-oxidy **LV** a **LVI** (Schéma 11).²⁸

*Schéma 11: Syntéza derivátů thiomorfolin-3-karboxylových kyselin **LIV** a jejich *S*-oxidů **LV** a **LVI**.²⁸*



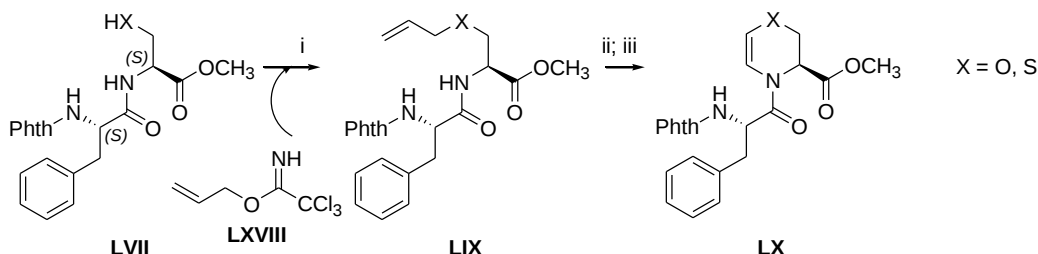
Reagencie: (i) ethylenoxid, NaOH (aq, pH = 7), 1,5 h, 0 - 25 °C; (ii) Boc_2O , NaOH (aq), $t\text{BuOH}$, 16 h, 25 °C nebo Cbz-Cl, KHCO_3 , dioxan/ H_2O , 16 h, 25 °C; (iii) BnBr, CsHCO_3 , DMF, 16 h, 25 °C; (iv) PPh_3 , DEAD, TPP, suchý THF, 5 h, 25 °C; (v) 1. Br_2 , 10% KHCO_3 , DCM, 20 min, 25 °C; 2. $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$; (vi) KHSO_5 , MeOH, 16 h, 0 - 25 °C.

3.1.1.2. Deriváty oxazinu/thiazinu

V porovnání s předchozími postupy existuje velmi malý počet prací zabývajících se syntézou derivátů oxazinu/thiazinu v roztoku nebo na pevné fázi. Všechny dosud publikované metody jsou založeny na použití derivátů serinu, cysteinu či 4*H*-1,4-oxazinu jakožto výchozích látek.

Jednou ze syntéz v roztoku byla kyselě katalyzovaná *O*-allylace *N*-substituovaných sloučenin serinu či cysteinu **LVII** allyl trichloracetimidátem **LXVIII** za následné ozonolýzy připraveného allylu **LIX** a jeho katalytické cyklizace v TFA poskytující produkt **LX** (Schéma 12).²⁹

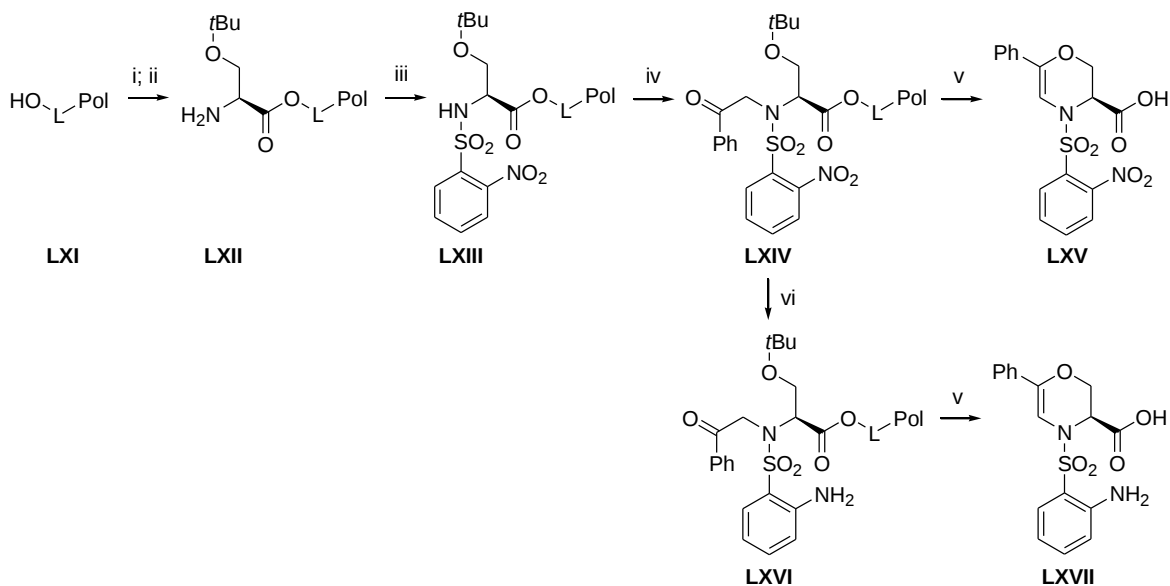
Schéma 12: Syntéza derivátů oxazin/thiazin-3-karboxylových kyselin **LX**.²⁹



Reagencie: (i) TfOH, DCM, PhH, 4 h, 20 °C; (ii) 1. O₃, DCM, MeOH, -78 °C; 2. DMS, -78 - 20 °C; (iii) TFA/DCM, 2,5 h, 20 °C.

Na pevné fázi byly zmíněné produkty pozorovány poprvé jako nežádoucí látky při přípravě trisubstituovaných 2,5-dihydrobenzo[*f*][1,2,5]thiadiazepin 1,1-dioxidů.² Deprotekce a následná sulfonylace Fmoc-serinu ukotveného přes esterovou vazbu na Wangově pryskyřici **LXI** poskytla intermediát **LXIII**, jehož alkylation α -bromacetofenonem (**LXIV**), následné štěpení a cyklizace vedly k derivátům **LXV** ($R^3 = 2\text{-NO}_2\text{-Ph}$). Redukce alkylovaného meziproductu **LXIV** dithioničtanem sodným v přítomnosti katalyzátoru fázového přenosu (**LXVI**) za následného štěpení a spontánní cyklizace poskytla derivát **LXVII** ($R^3 = 2\text{-NH}_2\text{-Ph}$) (Schéma 13).²

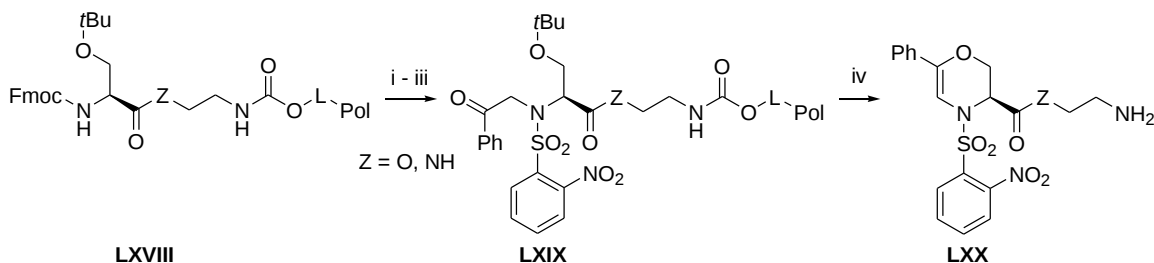
Schéma 13: Syntéza na pevné fázi derivátů oxazin-3-karboxylových kyselin **LXV** a **LXVII**.²



Reagencie: (i) Fmoc-Ser(tBu)-OH, HOBt, DMAP, DIC, DMF, DCM, 16 h, 25 °C; (ii) 50% PIP/DMF, 30 min, 25 °C; (iii) 2-Nos-Cl, 2,6-lutidin, DCM, 16 h, 25 °C; (iv) PhCOCH₂Br, DIEA, DMF, 16 h, 25 °C; (v) 50% TFA/DCM, 1 h, 25 °C; (vi) Na₂S₂O₄, K₂CO₃, TBAHS, DCM/H₂O (1:1), 16 h, 25 °C.

Nezávisle na výše popsané metodě byly detekovány deriváty oxazinu **LXX** jako vedlejší produkty při přípravě 2-aryl-3-alkylamino-1*H*-indolů vycházejících z Fmoc- α -serinu imobilizovaného přes linker karbamátovou vazbou opět na Wangově pryskyřici **LXVIII**.¹⁰ Následný sled reakcí je shodný s předchozím schématem 15 a vede k alkylovanému intermediátu **LXIX**, jehož kyselá cyklizace poskytla oxazin **LXX** (Schéma 14).¹⁰

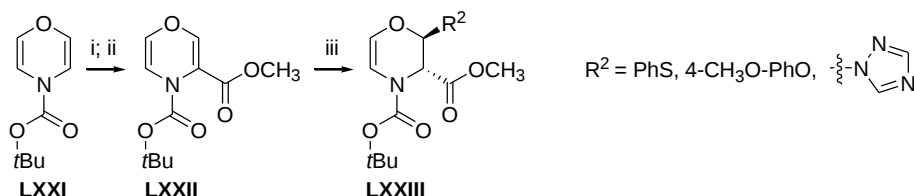
Schéma 14: Syntéza na pevné fázi esterů/amidů oxazin-3-karboxylových kyselin **LXX**.¹⁰



Reagencie: (i) 50% PIP/DMF, 30 min, 25 °C; (ii) 2-Nos-Cl, 2,6-lutidin, DCM, 16 h, 25 °C; (iii) PhCOCH₂Br, DIEA, DMF, 16 h, 25 °C; (iv) 50% TFA/DCM, 1 h, 25 °C.

Další syntéza v roztoku využívala Michaelovy adice vhodného aromatického nukleofilu na dvojnou vazbu derivátu 4*H*-1,4-oxazin-3-karboxylové kyseliny **LXXII** poskytující daný oxazin **LXXIII**. Výchozí derivát **LXXII** byl připraven reakcí 4*H*-1,4-oxazinu **LXXI** s *n*-BuLi a methyl kyanofórmátem při -78 °C (Schéma 15).³⁰

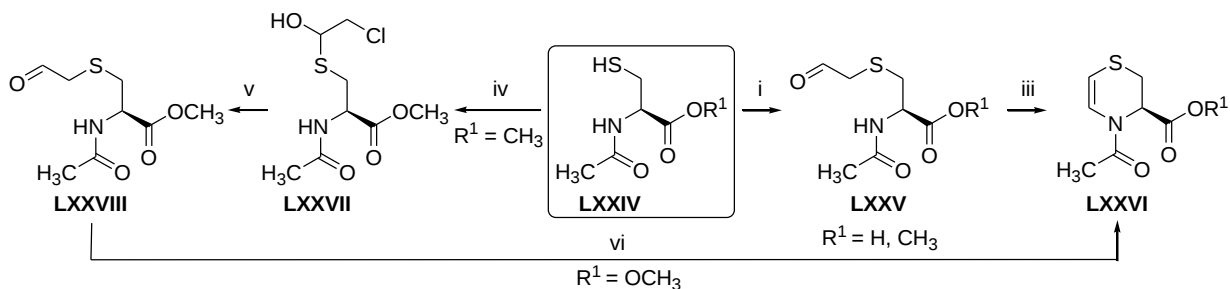
Schéma 15: Syntéza 2-substituovaných derivátů oxazin-3-karboxylových kyselin **LXXIII**.³⁰



Reagencie: (i) *n*-BuLi, hexan, THF, 5 min, -78 °C; (ii) NC-COOCH₃, THF, 1 h, -78 °C; (iii) PhSH nebo 4-OCH₃-PhOH nebo 1,2,4-triazol, K₂CO₃, MeCN, 17 - 44 h, 25 °C.

Mimo výše uvedené přípravy je známá poměrně ekonomická syntéza thiazinů **LXXVI** založena na reakci derivátu *N*-acetylcysteinu **LXXIV** v přítomnosti chlorethylenoxidu či chloracetaldehydu. Reakce s chlorethylenoxidem (i) v přítomnosti bazického prostředí za chlazení nebo chloroformu poskytla odpovídající thiohemiacetal **LXXV**, jehož cyklizace v kyselém prostředí či chloroformu za následné dehydratace vedla k žádanému produktu **LXXVI**. Druhou možností byla *S*-alkylace *N*-acylcysteinu **LXXIV** chloracetaldehydem (iv) vedoucí k 1,2-halogenalkoholu **LXXVII** konvertovaného na thiohemiacetal **LXXVIII** cyklizující účinkem chloroformu či ve směsi chloroformu s Et₃N při -20 °C za následné dehydratace na produkt **LXXVI** (Schéma 16).⁴

Schéma 16: Syntéza derivátů thiazin-3-karboxylových kyselin **LXXVI**.⁴



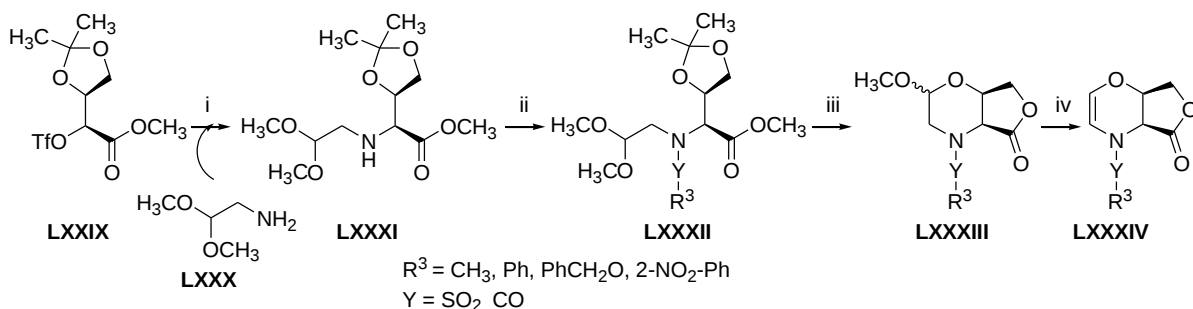
Reagencie: (i) chlorethylenoxid, NaOH (pH = 7), Et₂O/H₂O, 15 min, 0 °C nebo chlorethylenoxid, CHCl₃, 25 °C, 3 h; (ii) pH = 1, 10 h, 25 °C nebo CHCl₃, 15 h, 25 °C; (iv) ClCH₂CHO, CHCl₃, 15 h, 0 °C; (v) CHCl₃, 3 h, 25 °C nebo Et₃N, CHCl₃, 1 h, -20 °C; (vi) CHCl₃, 15 h, 25 °C.

3.1.1.3. Deriváty morfolinu s přikondenzovaným cyklem

V literatuře byla popsána syntéza široké plejády biologicky aktivních sloučenin pomocí přístupu **(A)** mající vedle morfolin/thiomorfolin/oxazin/thiazin-3-karboxylových fragmentů přikondenzované aromatické jádro, cykloalkyl či heterocyklus v různých polohách. Výchozími substráty byly deriváty serinu, cysteinu, threoninu či β -aminoalkoholy/thioly. Následující odstavce nastiňují přehled příprav vedoucích k cílovým derivátům s vázanými cykly v polohách [b] až [e].

První uvedená metoda popisuje syntézu oxazinových/morfolinových analogů s navázaným [b]-laktonem **LXXXIII/LXXXIV** (Schéma 17).^{1,31} Výchozí aminoacetal **LXXXI** byl připraven reakcí 2,2-dimethoxy-ethylaminu **LXXX** s methyl esterem kyseliny **LXXIX** za následné *N*-acylace příslušnými činidly.¹ Cyklického morfolin-3-laktonu **LXXXIII** bylo dosaženo *trans*-acetalizací intermediátu **LXXXII** v přítomnosti thionyl chloridu. Případný reflux **LXXXIII** v přítomnosti *p*-TsOH vedl k oxazin-3-laktonu **LXXXIV**.^{1,31}

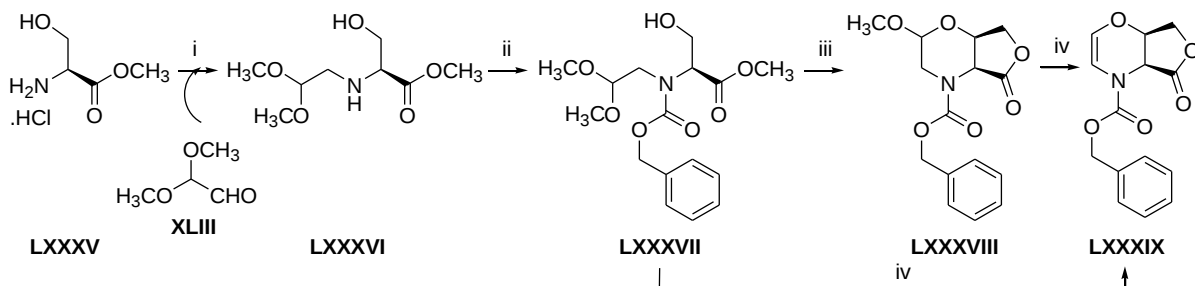
Schéma 17: Syntéza morfolin/oxazin-3-laktonů **LXXXIII/LXXXIV**.^{1,31}



Reagencie: (i) (CF₃CO)₂O, suchý Py, suchý DCM, 30 min, -10 - 25 °C; (ii) BzCl, DIEA, suchý THF, 16 h, 0 - 25 °C nebo Cbz-Cl, NaHCO₃, H₂O/EtOAc, 16 h, 0 - 25 °C nebo 2-NO₂-PhCHO, NaBH(OAc)₃, THF, 16 h, 25 °C nebo Ac₂O, DIEA, DMAP, suchý DCM, 16 h, 25 °C; (iii) SOCl₂, MeOH, 16 h, 25 °C; (iv) *p*-TsOH, PhCH₃, 2 h, reflux.

Podobná metoda byla využita v případě syntézy oxazin-3-laktonů **LXXXIX** založené na kondenzaci aminoskupiny derivátů serinu **LXXXV** s 2,2-dimethoxyacetaldehydem **XLIII**. Redukce Schiffovy báze následována acylací benzyl chlorformiátem vedla k látce **LXXXVII** s aldehydickou skupinou maskovanou jako acetal. Finálního uzavření látky **LXXXVII** bylo dosaženo refluxem v přítomnosti *p*-TsOH nebo přes morfolin-3-lakton **LXXXVIII** cyklizující účinkem thionyl chloridu za následné eliminace methanolu a vzniku sloučeniny **LXXXIX** (Schéma 18).¹

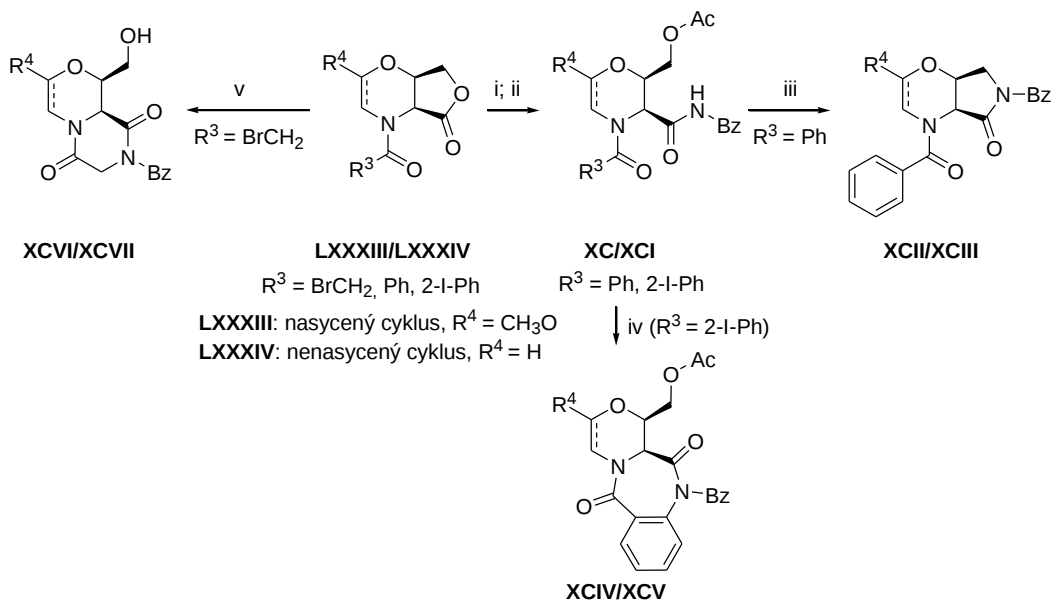
Schéma 18: Syntéza morfolin/oxazin-3-laktonů **LXXXVIII/LXXXIX** s příkondenzovaným heterocyklem v poloze [b].¹



Reagencie: (i) H_2 , 10% Pd/C, Et_3N , MeOH, 16 h, 25 °C; (ii) Cbz-Cl, $NaHCO_3$, EtOAc/ H_2O , 10 min, 0 °C, poté 18 h, 25 °C; (iii) $SOCl_2$, MeOH, 4 h, reflux; (iv) p -TsOH, $PhCH_3$, 2 h, reflux.

Výše připravený morfolin/oxazin-3-lakton **LXXXIII/LXXXIV** (Schéma 17) posloužil jako výchozí prekursor pro syntézu morfolinů s příkondenzovaným cyklem v poloze [b] a [c] (Schéma 19).¹ Morfolin/oxazin-3-laktam **XCII/XCIII** byl připraven reakcí výchozího laktonu **LXXXIII/LXXXIV** s benzylaminem za následné Mitsunobu reakce vedoucí k cyklizaci na laktam **XCII/XCIII**. Derivátů morfolinu s příkondenzovaným sedmičlenným heterocyklem v pozici [c] **XCIV/XCV** bylo dosaženo intramolekulární arylací amidu **XC/XCI**. Naopak syntéza morfolinu s šestičlenným příkondenzovaným cyklem v pozici [c] **XCVI/XCVII** byla založena na reakci bromderivátu ($R^3 = BrCH_2$) s morfolin/oxazin-3-laktonem **XCIII/XCIV** v přítomnosti benzylaminu.¹

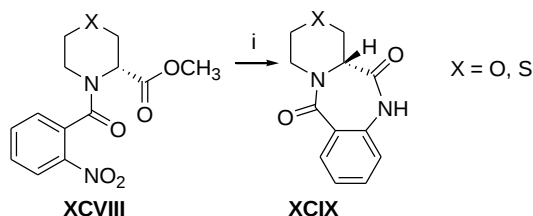
Schéma 19: Syntéza derivátů **XCII/XCIII**, **XCIV/XCV** a **XCVI/XCVII** s příkondenzovaným heterocyklem v poloze [b] a [c].¹



Reagencie: (i) $BzNH_2$, 2-OH-Py, suchý THF, 16 h, 25 °C; (ii) Ac_2O , DMAP, suchý DCM, 16 h, 25 °C; (iii) PPh_3 , DIAD, suchý $PhCH_3$, 16 h, 25 °C; (iv) suchý DMSO, $CsOAc$, CuI, $PhCH_3$, 16 h, 90 °C; (v) $BzNH_2$, MeOH, 16 h, 25 °C.

Kromě výše popsané metody byly [c] kondenzované morfoliny/thiomorfoliny se sedmičlenným heterocyklem **XCIX** připraveny intramolekulární acylací aminoskupiny připravené redukcí nitroskupiny v poloze 2 na arylu ($R^3 = 2-NO_2-Ph$) **XCVIII** (Schéma 20).³² Bicyklický derivát **XCIX** bylo možno dále modifikovat na složitější molekulu.³²

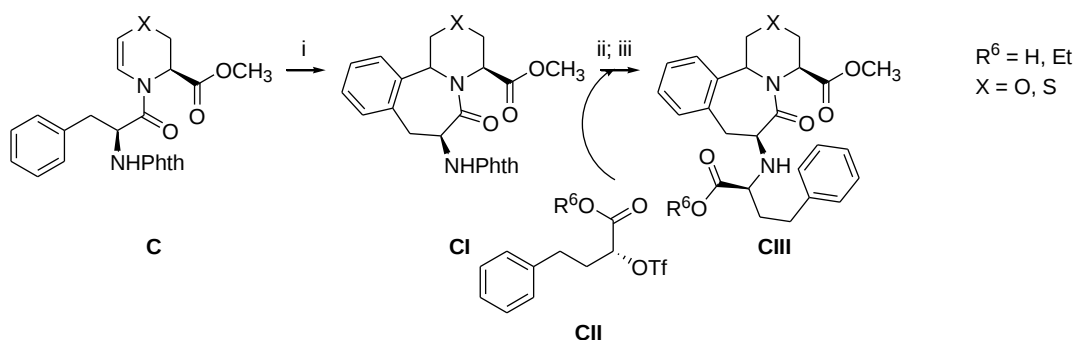
Schéma 20: Syntéza derivátů **XCIX** s přikondenzovaným sedmičlenným cyklem v poloze [c].³²



Reagencie: (i) Fe, CH₃COOH, 4 - 20 h, reflux.

Pátá modifikace spočívala v intramolekulární cyklizaci látky **C** s TfOH poskytující morfolin s přikondenzovaným sedmičlenným cyklem v poloze [d] **CI**. Následná hydrazinolýza připraveného ftalátu **CI** a substituce primární aminoskupiny *R*-triflátem **CII** vedla k žádanému inhibitoru angiotensin-1-konvertujícího enzymu (ACE) **CIII** (Schéma 21).²⁹

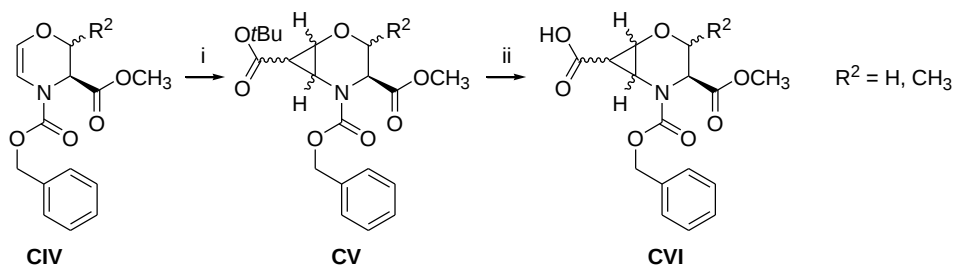
Schéma 21: Syntéza derivátů **CIII** s přikondenzovaným cyklem v poloze [d].²⁹



Reagencie: (i) TfOH, (CF₃CO)₂O, DCM, 123 h, 20 °C; (ii) N₂H₄, MeOH, 16 h, 100 °C; (iii) PS, DCM, 30 min, 20 °C.

Další přístup znázorňuje syntézu derivátů morfolinu s přikondenzovaným cyklopropanovým cyklem v poloze [e] **CVI** založenou na katalyzované adici diazoacetátu *tert*-butylnatého na dvojnou vazbu oxazinu **CIV** za následné hydrolyzy připraveného esteru **CV** v TFA/TIS/DCM poskytující žádaný bicyklus **CVI** (Schéma 22).^{1,31}

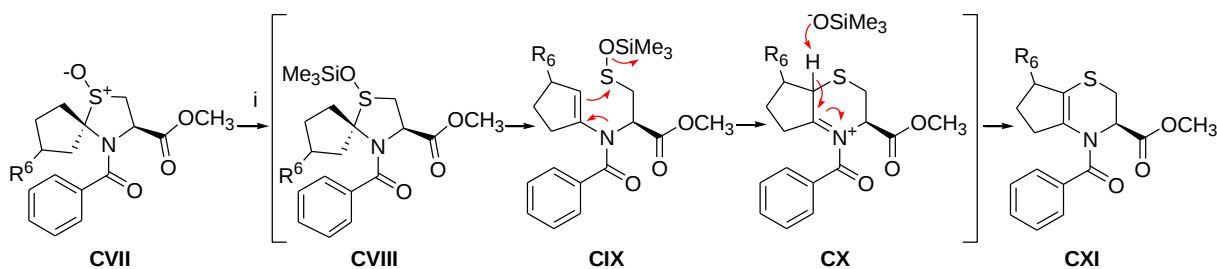
Schéma 22: Syntéza derivátů **CVI** s přikondenzovaným cyklopropanovým skeletem v poloze [e].^{1,31}



Reagencie: (i) 1. Cu(OTf)₂, (S,S)-*t*Bu-BOX, PhNNH₂, suchý DCM, 30 min, 0 - 25 °C; 2. N₂=CH-CO₂tBu, 16 h, 25 °C; (ii) TFA/TIS/DCM (48:5:112), 50 min, 25 °C.

Deriváty [e] kondenzovaných thiazinů **CXI** byly pozorovány jako vedlejší produkty při přípravě thiazolidin *S*-oxidů pomocí Pummererovy reakce.³ Výchozí thiazolidin 1-oxid **CVII** byl podroben silylaci v přítomnosti trimethylsilyl jodidu poskytující odpovídající silylether **CVIII**. Vlivem Et₃N došlo k elektronovému transferu (**CIX**), následné cyklizaci (**CX**) a po odstoupení trimethylsilanolu tvorbě nenasyceného bicyklu **CXI** jako minoritního produktu (Schéma 23).³

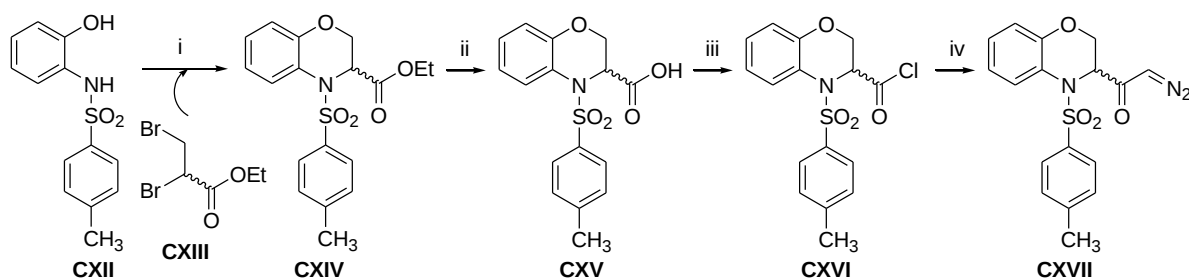
Schéma 23: Syntéza derivátů **CXI** s přikondenzovaným cyklopentanovým skeletem v poloze [e].³



Reagencie: (i) Me_3SiI , Et_3N , DCM, do odreagování výchozí látky (TLC), 0 - 25°C.

Komplexní metodu vedoucí k oxazinům s [e] přikondenzovaným jádrem **CXVII** představovala syntéza potenciálních β -adrenergických blokátorů.³³ Tato metoda byla založena na nukleofilní substituci *p*-toluensulfonyl-2-aminofenolu **CXII** 1,2-dibromopropionátem **CXIII**, bazické hydrolyze esteru **CXIV** a následné thionylaci látky **CXV**. Vzniklý chlorid **CXVI** byl podroben reakci s diazometanem za vzniku příslušného diazoketonu **CXVII** (Schéma 24).³³

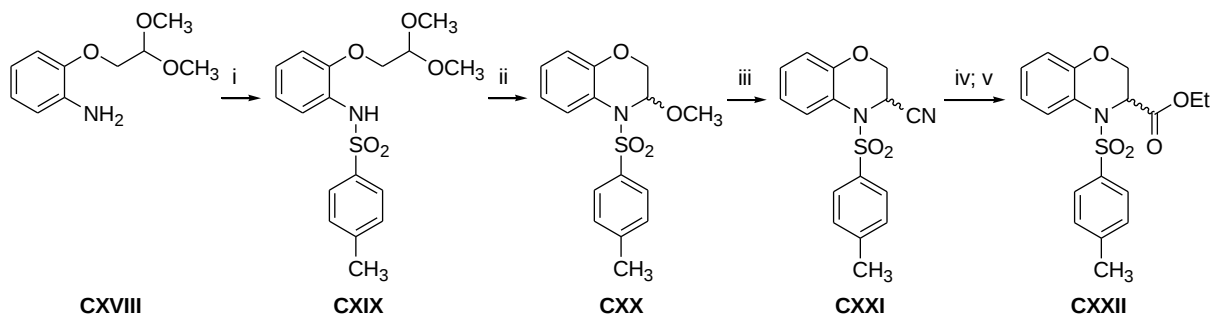
Schéma 24: Syntéza derivátů **CXVII** s přikondenzovaným aromátem v poloze [e].³³



Reagencie: (i) K_2CO_3 , $(\text{CH}_3)_2\text{CO}$, 30 min, reflux; (ii) NaOH , H_2O , 16 h, 100 °C; (iii) SOCl_2 , CHCl_3 , 16 h, reflux; (iv) CH_2N_2 , Et_2O , 16 h, 25 °C.

Kromě výše uvedených metod byla popsána syntéza benzoxazinů **CXXII** přes karbonitril **CXXI** prostřednictvím Pinnerovy reakce za následné hydrolyzy vzniklého iminoetheru (Schéma 25). Výchozí nitril **CXXI** byl připraven cyklizací tosylovaného 2-(2,2-dimethoxy-ethoxy)fenylaminu **CXIX** v přítomnosti 10% TFA za chlazení a následnou reakcí s trimethylsilyl kyanidem v etherátu fluoridu boritého.³⁴

Schéma 25: Syntéza derivátů **CXXII** s přikondenzovaným aromátem v poloze [e].³⁴

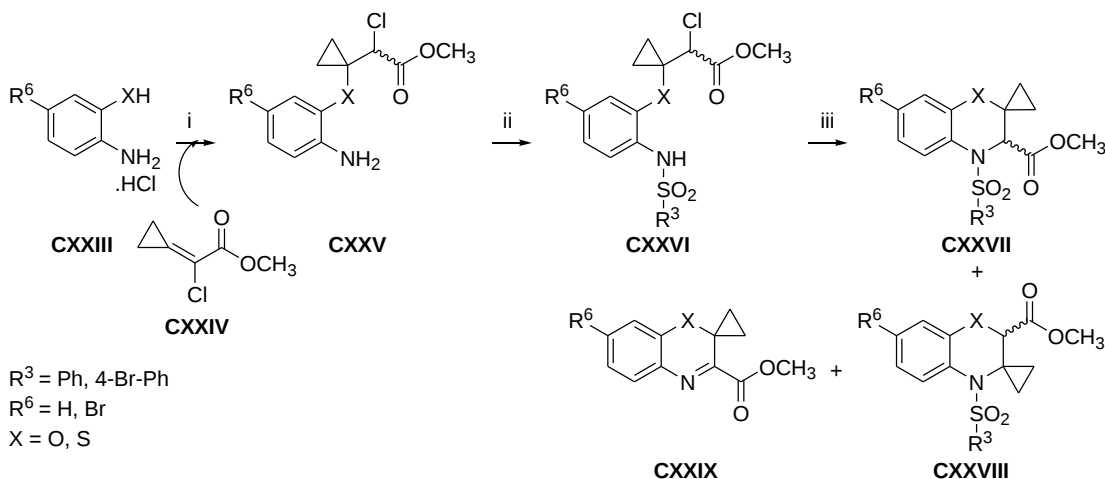


Reagencie: (i) Tos-Cl , DIEA , PhCH_3 , 20 h, 70 °C; (ii) 10% TFA/DCM , 2,5 h, 0 °C; (iii) Me_3SiCN , $\text{BF}_3 \cdot \text{Et}_2\text{O}$, 20 h, 20 °C; (iv) EtOH , HCl , 24 h, 60 °C; (v) H_2O .

Dále je uvedena syntéza benzoxazinů/thiazinů **CXXVII** založena na nukleofilním ataku hydroxy/merkaptu skupiny **CXXIII** na methyl 2-chlor-2-cyklopropyliden acetát (1-Me) **CXXIV**. Finální produkt **CXXVII** byl získán *N*-sulfonylací látky **CXXV** a následnou intramolekulární alkylací

připraveného sulfonamidu **CXXVI** zahřátím v bazickém prostředí K_2CO_3 (Schéma 26).³⁵ Substituce v poloze X, R^6 a použitá teplota ovlivňovaly průběh reakce poskytující dva nežádoucí produkty v různých poměrech.³⁵

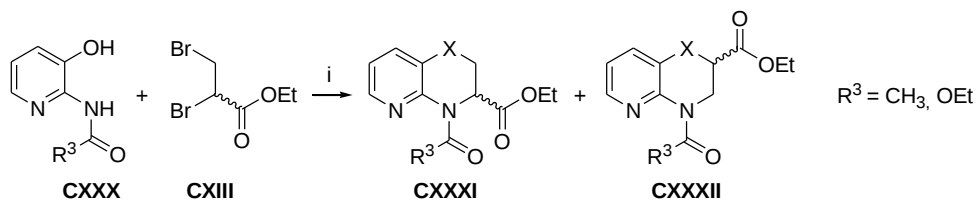
Schéma 26: Syntéza derivátů **CXXVII** s přikondenzovaným aromátem v poloze [e].³⁵



Reagencie: (i) 1-Me, Et_3N , DCM, 24 h, 20 °C; (ii) R^3SO_2Cl , Py, DCM, 2 - 24 h, 20 °C; (iii) K_2CO_3 , KI, suchý DMF, 28 h, 20 - 80 °C.

Poslední uvedenou metodou je syntéza pyridoxazinů **CXXXI** vycházející z reakce 2-acylamid-3-hydroxypyridinu **CXXX** s 2,3-dibompropanoátem **CXIII** v bazickém prostředí K_2CO_3 . Žadáný morfolin-3-ester **CXXXI** byl získán jako minoritní produkt vedle 2-substituovaného pyridoxazinu **CXXXII** (Schéma 27).³⁶

Schéma 27: Syntéza derivátů **CXXXI** s přikondenzovaným pyridinovým jádrem v poloze [e].³⁶



Reagencie: (i) K_2CO_3 , MeCN, 2 - 24 h, reflux.

3.1.2. Přístup B: Tvorba heterocyklu a následná substituce atomu dusíku

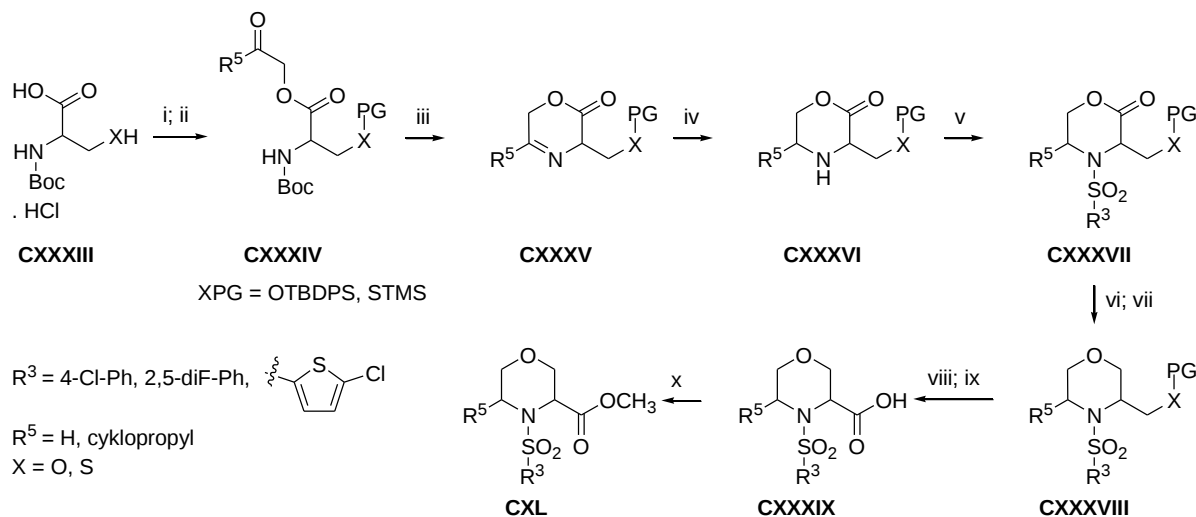
Cílových sloučenin připravených podle přístupu (B) bylo dosaženo pomocí dvou principů. První z nich byl založen na tvorbě heterocyklu cyklizací lineárního prekursoru, jehož atom dusíku byl chráněn vhodnou PG. Po deprotekcí Fmoc, Boc, Bn či Cbz byl tak atom dusíku následně zpřístupněn reakci s požadovanými sulfonylačními či acylačními činidly. Druhá metodika naopak vycházela ze syntézy derivátů morfolinu/thiomorfolinu nesubstituovaných na atomu dusíku, jenž byl následně modifikován sulfonylačními, acylačními a méně frekventovanými alkylačními reakcemi. Pro přehlednost je kapitola rozdělena na tři podkapitoly týkající se syntézy: (1) derivátů morfolinu/thiomorfolinu, (2) derivátů oxazinu/thiazinu a (3) derivátů morfolinu/oxazinu s přikondenzovaným cyklem.

3.1.2.1. Deriváty morfolinu/thiomorfolinu

Vybrané *N*-sulfonylované deriváty morfolinu/thiomorfolinu představují významné prekurzory biologicky aktivních sloučenin, jejichž syntéza pomocí deprotektce PG za následné *N*-sulfonylace je nastíněna níže.

První metoda popisuje syntézu γ -inhibitoru sekretázy započaté na karboxylové skupině derivátů serinu s *O*-/*N*-protekcí.²⁴ Esterifikace karboxylové skupiny 2-amino-3-hydroxypropanové kyseliny **CXXXIII** substituovanými α -bromketony či 1-hydroxypropan-2-ony poskytla intermediát **CXXXIV**. Přítomnost TFA pak vedla k cyklizaci na stabilnější intermediát **CXXXV**, který byl následně podroben redukci dvojné vazby (**CXXXVI**) a poté sulfonylaci aromatickými či heteroaromatickými sulfonyl chloridy (**CXXXVII**). Po odstranění karbonylu v poloze 2 (**CXXXVIII**) a následné *O*-deprotektci a oxidaci vzniklého alkoholu byla připravena morfolin-3-karboxylová kyselina **CXXXIX**, která byla následně konvertována na chlorid a poté na příslušný ester **CXL** (Schéma 28).²⁴ Analogicky byly připraveny deriváty thiomorfolin-3-karboxylových kyselin vycházející z derivátu cysteinu s protektivní STMS skupinou **CXXXIV**.²⁴

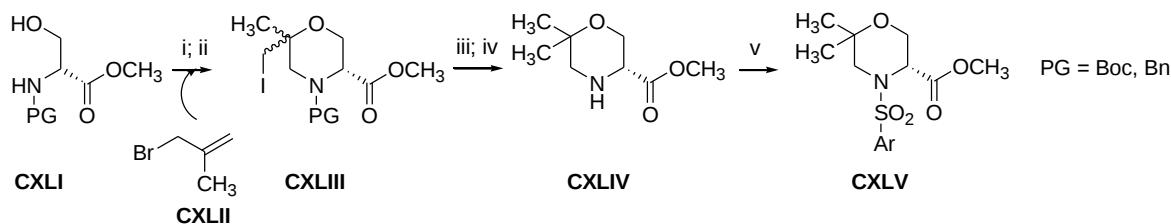
Schéma 28: Syntéza derivátů morfolin/thiomorfolin-3-karboxylových kyselin **CXL**.²⁴



Reagencie: (i) TBDPS-Cl nebo TMS-Cl, Et_3N , DCM, 48 h, 25 °C; (ii) $\text{R}^5\text{COCH}_2\text{Br}$ nebo $\text{R}^5\text{COCH}_2\text{OH}$, KI, DMF, 48 h, 25 °C; (iii) 30% TFA/DCM, 2 h, 25 °C; (iv) 1. $\text{NaBH}(\text{OAc})_3$, MeCN, 0 °C; 2. TMS-Cl, 3 h, 25 °C; (v) 1. $\text{R}^3\text{SO}_2\text{Cl}$, Py, 6 h, 25 °C; 2. MCPBA, DCM, 6 h, 25 °C; (vi) NaBH_4 , CaCl_2 , THF/EtOH (9:13), 20 min, 0 °C, poté 1 h, 60 °C; (vii) PPh_3 , DEAD, PhCH_3 , 16 h, 25 °C; (viii) TBAF, THF, 16 h, 25 °C; (ix) NaIO_4 , $\text{RuCl}_3 \cdot \text{H}_2\text{O}$, EtOAc/MeCN/ H_2O (1:1:2), 16 h, 25 °C; (x) SOCl_2 , MeOH, 2 h, 60 °C.

Druhý přístup pojednává o syntéze prekurzorů **CXLV** pro přípravu potenciálních analgetik a antiflogistik vycházející z *N*-protektovaného derivátu serinu **CXLI** alkylovaného allylbromidem **CXLII**. Následná anti-Markovnikova dehydrohalogenace připraveného 6-methylenjodidmorfolinu **CXLIII** v přítomnosti AIBN poskytla 6-allylmorfolin, jehož hydrogenací a hydrogenolýzou protektivní skupiny byl získán derivát **CXLIV**. Posledním krokem byla sulfonylace látky **CXLIV** vedoucí k žádané sloučenině **CXLV** (Schéma 29).³⁷

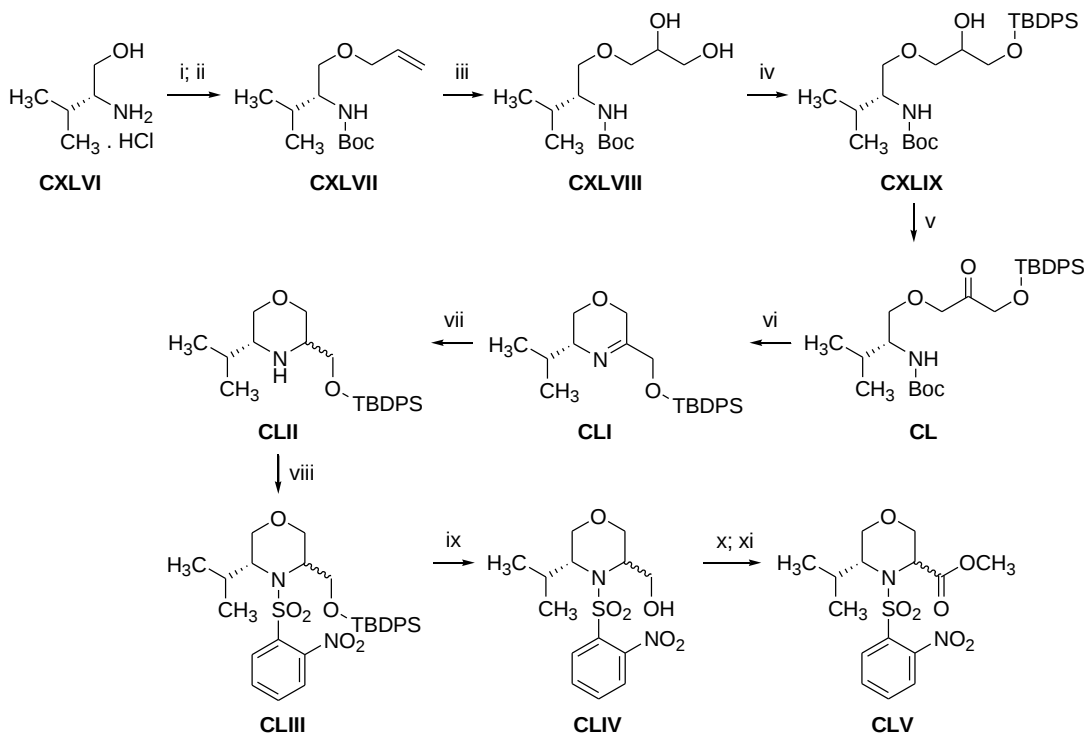
Schéma 29: Syntéza derivátů morfolin-3-karboxylových kyselin **CXLV**.³⁷



Reagencie: (i) K_2CO_3 , KI, MeCN, 72 h, 25 °C; (ii) I_2 , 2 h, 25 °C; (iii) Bu_3SnH , AIBN, $PhCH_3$, 12 h, reflux; (iv) 1. H_2 , $Pd(OH)_2$, MeOH/ CH_3COOH , 10 h, 25 °C, 345 kPa; 2. $Pd(OH)_2$, 25 h, 25 °C, 345 kPa; (v) $ArSO_2Cl$, DMAP, Py, 5 h, 50 °C.

Další syntéza *N*-arylsulfonyl morfolinů **CLV** působících jako γ -selektivní inhibitory byla založena na hydroxylaci allylu **CXLVII**, selektivní protekci jedné z terminálních hydroxylových skupin diolu **CXLVIII** pomocí TBDPS-Cl a následné oxidaci druhé hydroxylové skupiny látky **CXLIX** Dess-Martin perjodnanem za vzniku derivátu **CL**. Cyklizace látky **CL** v přítomnosti TFA za chlazení vedla k iminu **CLI** stabilizovaného redukcí dvojné vazby pomocí $NaBH(OAc)_3$ podrobeného substituci aromatickým sulfonyl chloridem (**CLIII**). Následná kyselá deprotektce TBDPS skupiny **CLIII** poskytla 3-hydroxymethylmorfolin **CLIV**. Finálních produktů **CLV** bylo dosaženo oxidací látky **CLIV** jodistanem sodným za katalýzy chloridem ruthenitým a esterifikací trimethyl-silyldiazomethanem (Schéma 30).³⁸

Schéma 30: Syntéza derivátů morfolin-3-karboxylových kyselin **CLV**.³⁸

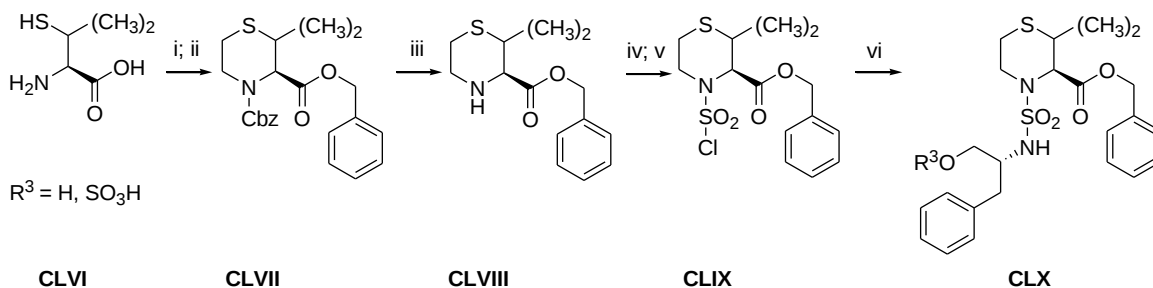


Reagencie: (i) NaH, allylbromid, THF, 16 h, 25 °C; (ii) Boc_2O , Et_3N , DCM, 16 h, 25 °C; (iii) NMO, OsO_4 , $tBuOH/THF/H_2O$ (10:3:1), 12 h, 25 °C; (iv) TBDPS-Cl, imidazol, DMF, 1 h, 25 - 120 °C; (v) DMP, Py, DCM, 1 h, 25 °C; (vi) TFA/DCM, 10 h, 0 °C; (vii) $NaBH(OAc)_3$, DCM, 24 h, 25 °C; (viii) 4-Cl- $PhSO_2Cl$, DMAP, Py, 10 h, 80 °C; (ix) TBAF, THF, 30 min, 25 °C; (x) $NaIO_4$, $RuCl_3 \cdot nH_2O$, $EtOAc/MeCN/H_2O$ (1:1:2), 2 h, 0 °C; (xi) $N_2=CH-TMS$, $PhCH_3/MeOH$ (4:1), 30 min, 25 °C.

Zajímavou syntetickou cestou poskytující thiomorfolin-3-karboxylové kyseliny **CLIX** používané pro léčbu hypertenze, infekcí či neurodegenerativních onemocnění představovala *S,N*-alkylace L-penicilaminu **CLVI** 1,2-dichlorethanem v přítomnosti DBU a TMS-Cl za následné

O,N-acylace vzniklého thiomorfolinu benzyl chlorformiátem (**CLVII**). N-deprotektovaný intermediát **CLVIII** byl podroben reakci s chloridem sulfonové kyseliny za následné chlorace pomocí PCl_5 vedoucí k žádanému sulfamoyl chloridu **CLIX**. Nukleofilní substituce látky **CLIX** se substituovanými amino-sloučeninami poskytla cílový inhibitor **CLX** (Schéma 31).³⁹

Schéma 31: Syntéza derivátů thiomorfolin-3-karboxylových kyselin **CLX**.

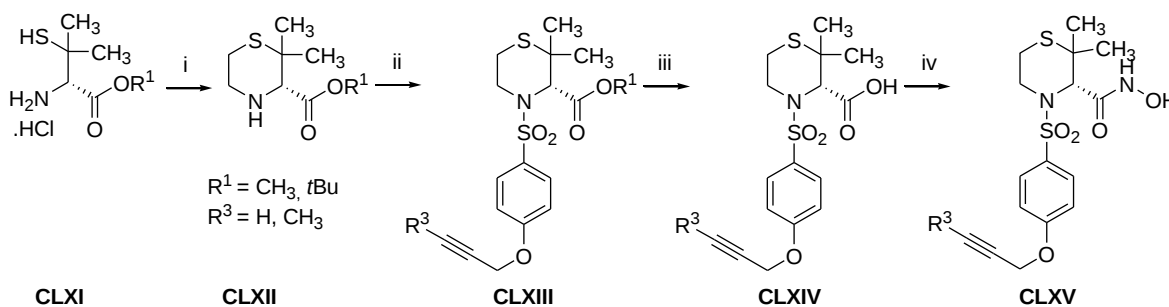


Reagencie: (i) 1. $\text{Cl}(\text{CH}_2)_2\text{Cl}$, DBU, TMS-Cl, DMF, 3 h, 0 °C; 2. DBU, 17 h, 25 °C; (ii) Cbz-Cl, NaOH, 15 h, 0 - 25 °C; (iii) DMS, $\text{BF}_3 \cdot \text{Et}_2\text{O}$, 16 h, 0 °C; (iv) ClSO_3H , Et_3N , DCM, 2 h, 25 °C; (v) PCl_5 , PhH, 30 min, reflux; (vi) $\text{PhCH}_2\text{C}(\text{NH}_2)\text{CH}_2\text{OR}^3$ ($\text{R}^3 = \text{H}$), Py, 12 h, 25 °C nebo $\text{PhCH}_2\text{C}(\text{NH}_2)\text{CH}_2\text{OR}^3$ ($\text{R}^3 = \text{SO}_3\text{H}$), Et_3N , ClSO_3H , 3 h, -70 - 25 °C.

Druhým principem založeným na přístupu (**B**) byla tzv. „přímá“ N-sulfonylace připraveného thiomorfolinového cyklu nejčastěji aromatickými činidly v přítomnosti báze.

Následující dvě syntézy využívaly konverzi esterů **CLXIII** a **CLXX** na žádané thiomorfolin-3-hydroxamové kyseliny **CLXV** a **CLXXIII** působící jako inhibitory metaloproteinasy a TACE.^{40,41} První metoda byla založena na tvorbě esteru thiomorfolin-3-karboxylové kyseliny **CLXIII** pomocí S,N-alkylace D-penicilaminu **CLXI** 1,2-dibromethanem v bazickém prostředí DBU a následné sulfonylaci aromatickým činidlem.⁴⁰ Finálního inhibitoru **CLXV** pak bylo dosaženo bazickou hydrolyzou připraveného esteru **CLXIII** ($\text{R}^1 = \text{CH}_3$) či jeho kyselou deprotekcí ($\text{R}^1 = t\text{Bu}$) za následné tvorby hydroxamové kyseliny reakcí s hydroxylaminem (Schéma 32).⁴⁰

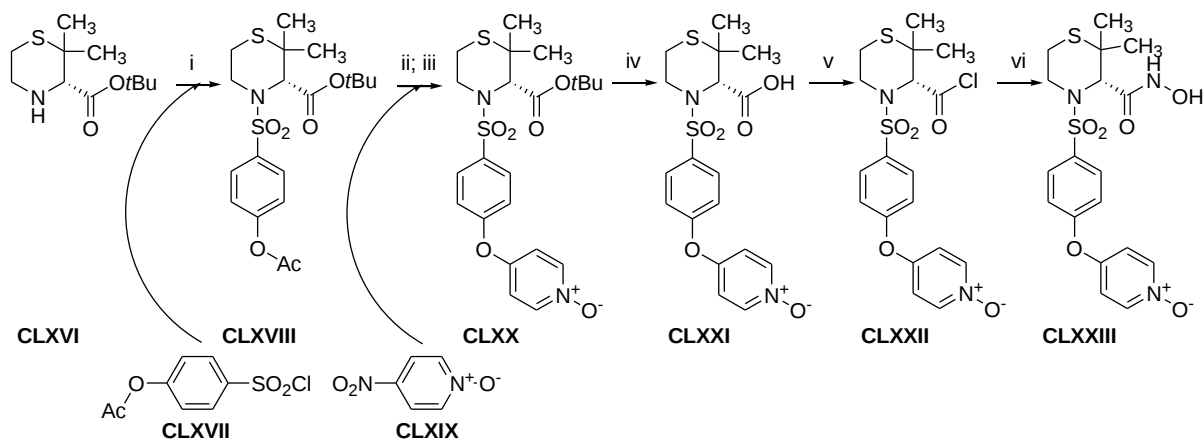
Schéma 32: Syntéza thiomorfolin-3-hydroxamových kyselin **CLXV**.⁴⁰



Reagencie: (i) $\text{Br}(\text{CH}_2)_2\text{Br}$, DBU, DMF, 30 min, 25 °C; (ii) $\text{H}_2\text{C}\equiv\text{CCH}_2\text{OPhSO}_2\text{Cl}$, NMM, DCM, 15 h, 25 °C nebo $\text{CH}_3\text{C}\equiv\text{C}-\text{CH}_2-\text{OPhSO}_2\text{Cl}$, PPh_3 , DEAD, THF, 4 h, 0 - 25 °C; (iii) $\text{R}^1 = \text{CH}_3$: LiOH , THF/MeOH/ H_2O (2:2:1); $\text{R}^1 = t\text{Bu}$: 20 % TFA/DCM, 2 h, 25 °C; (iv) NH_2OH , HOBT, EDC, NMM, DMF, 2 h, 25 °C.

Druhý přístup využíval sulfonylace připraveného thiomorfolinu **CLXVI** aromatickým činidlem s p-acylovanou hydroxyskupinou **CLXVII**, jejíž bazická deprotektace a následná modifikace 4-nitropyridin-N-oxidem **CLXIX** v přítomnosti K_2CO_3 vedla k esteru **CLXX**. Kyselá hydrolyza esteru **CLXX** ve směsi TFA/anisol/DCM, konverze karboxylové skupiny (**CLXXI**) na chlorid **CLXXII** a následná acylace hydroxylaminu poskytla žádaný derivát thiomorfolinu **CLXXIII** (Schéma 33).⁴¹

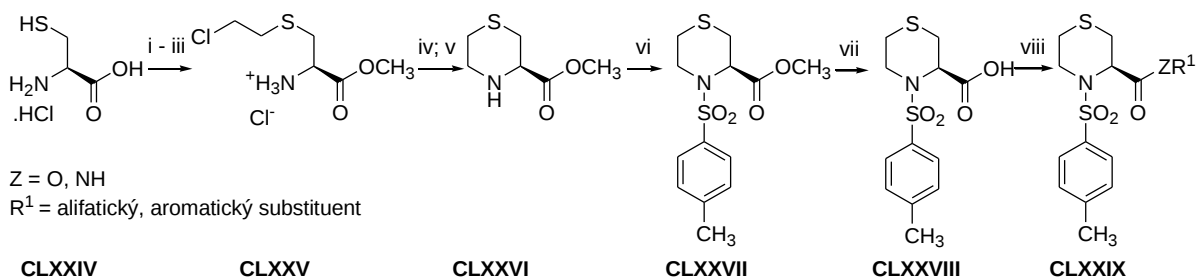
Schéma 33: Syntéza thiomorfolin-3-hydroxámových kyselin **CLXXIII**.⁴¹



Reagencie: (i) Et_3N , DCM, 24 h, 28 °C; (ii) K_2CO_3 , $\text{MeOH}/\text{H}_2\text{O}$ (10:1), 3,5 h, 28 °C; (iii) K_2CO_3 , DMF, 3 h, 110 °C; (iv) TFA/anisol/DCM, 15 h, 20 °C; (v) SOCl_2 , DMF, 5 - 6 h, 25 - 37 °C; (vi) NH_2OH (aq), DCM/EtOH, 2 h, 25 °C.

Syntéza významných imunosupresiv **CLXXIX** vycházela z *S*-alkylace merkaptu skupiny L-cysteinu **CLXXIV** ethylenoxidem za následné konverze hydroxyskupiny na chlorid cyklizující vlivem aktivované karboxylové skupiny L-cysteinu (**CLXXV**) v přítomnosti Et_3N na žádaný thiomorfolin **CLXXVI**. Tosylace esteru **CLXXVI** a jeho následná bazická hydrolyza poskytla prekurzor **CLXXVIII** vedoucí k derivátům thiomorfolin-3-karboxylových kyselin **CLXXIX** s variabilní substitucí ZR^1 ($\text{Z} = \text{O}, \text{NH}$) (Schéma 34).⁴²

Schéma 34: Syntéza thiomorfolin-3-esterů/amidů **CLXXVIII**.⁴²

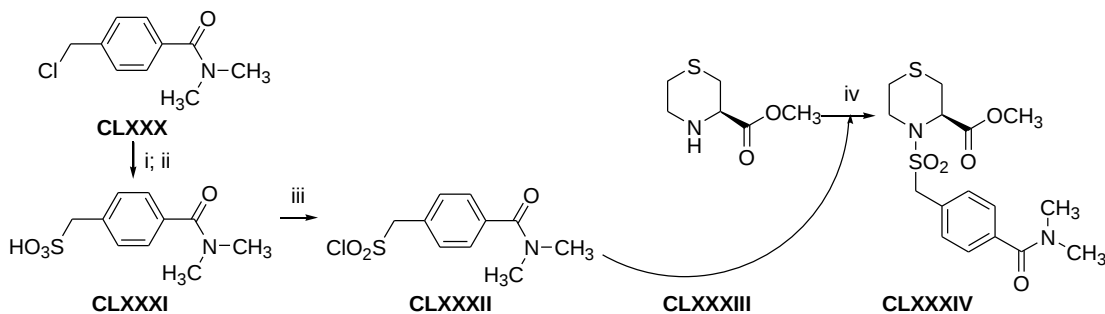


$\text{Z} = \text{O}, \text{NH}$
 $\text{R}^1 = \text{alifatický, aromatický substituent}$

Reagencie: (i) ethylenoxid, $\text{NaOH}/\text{H}_2\text{O}$, 1,5 h, 0 - 25 °C; (ii) $\text{HCl}/\text{H}_2\text{O}$, 7 h, 90 - 95 °C; (iii) MeOH p.a., suchý HCl , 12 h, 0 - 25 °C; (iv) Et_3N , suchý DMF, 8 h, 90 - 95 °C; (v) HCl , Et_2O , EtOH, 0 °C; (vi) 4- CH_3 - PhSO_2Cl , Et_3N , DCM, 24 h, 0 - 25 °C; (vii) LiOH , MeOH , HCl (pH = 2), 24 - 48 h, 0 - 25 °C; (viii) R^1ZH ($\text{Z} = \text{O}, \text{NH}$), DCC, DMAP, D-(+)-CSA, DCM, 24 h, 25 °C.

Tzv. „přímá“ sulfonylace představuje efektivní metodu vedoucí k žádaným *N*-sulfonylovaným produktům. Vzhledem k omezené dostupnosti či vysoké ceně některých sulfonylačních činidel je výhodné výchozí chloridy nasyntetizovat. Níže popsaná metoda zobrazuje přípravu sulfonyl chloridu **CLXXXII** například z dostupného chloridu **CLXXX** reakcí s NaHCO_3 za následné chlorace výsledné sulfonové kyseliny **CLXXXI** thionyl chloridem (Schéma 35).⁴³

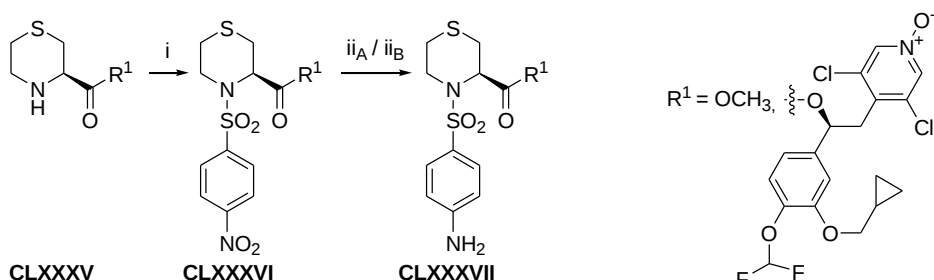
Schéma 35: Syntéza chloridu **CLXXXII** a derivátů thiomorfolin-3-karboxylových kyselin **CLXXXIV**.⁴³



Reagencie: (i) NaHCO_3 , H_2O , 1 h, 100 °C; (ii) HCl /dioxan; (iii) SOCl_2 , DCM, 20 h, 25 °C; (iv) Py, 4 h, 25 °C.

Syntéza důležitých amino-prekursorů **CLXXXVII** vedoucích k fosfodiesterázovým inhibitorům spočívala v *N*-sulfonylaci substrátu **CLXXXV** 4-nitrobenzensulfonyl chloridem a následné redukci nitroskupiny (**CLXXXVI**) dihydrátem chloridu cínatého v THF (ii_A), nebo vodíkem s 5% palladiem na aktivním uhlí v methanolu (ii_B) (Schéma 36).⁴³

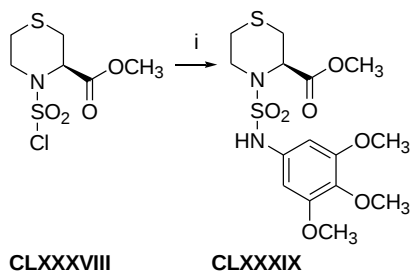
Schéma 36: Syntéza amino-derivátů thiomorfolin-3-karboxylových kyselin **CLXXXVII**.⁴³



Reagencie: (i) 4- NO_2 - PhSO_2Cl , Py, 3 h, 0 °C; (ii_A) $\text{SnCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, THF, 48 h, 25 °C nebo (ii_B) H_2 , 5% Pd/C, MeOH/ H_2O (3:2), 10 h, 25 °C, 345 kPa.

Mimo výše uvedené přístupy využívající tzv. „přímé“ sulfonylace atomu dusíku byla popsána i tzv. „nepřímá“ syntéza sulfonamidu **CLXXXIX** založena na reakci *N*-sulfonyl chloridu thiomorfolin-3-esteru **CLXXXVIII** s 3,4,5-trimethoxyanilinem v přítomnosti 3,5-lutidinu (Schéma 37).⁴⁴

Schéma 37: „Nepřímá“ syntéza derivátů morfolin-3-karboxylových kyselin **CLXXXIX**.⁴⁴



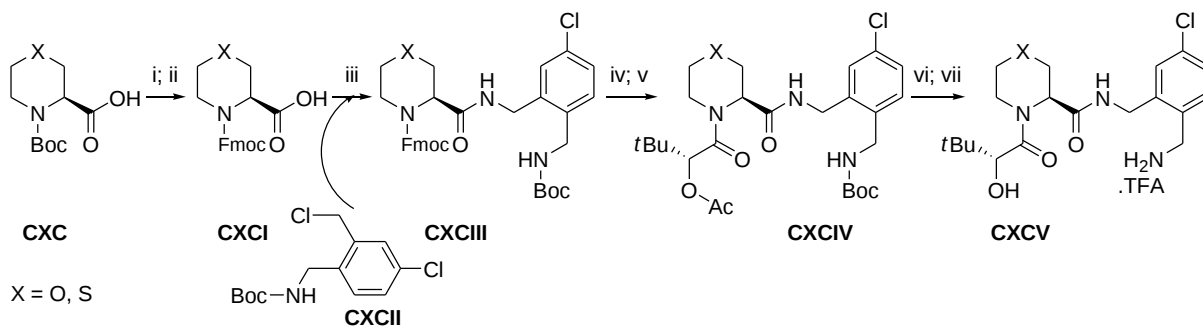
Reagencie: (i) 3,4,5-(OCH_3)₃- PhNH_2 , 3,5-lutidin, DCM, 20 h, 25 °C.

Následující část práce nastiňuje vybrané metody vedoucí k *N*-acylovaným morfolinům/thiomorfolinům, z nichž mnohé vykazují značnou aktivitu.

Jako první je rozebrána syntéza amidů morfolin/thiomorfolin-3-karboxylových kyselin **CXCV** působících jako inhibitory thrombinu.⁴⁵ Výchozí *N*-Boc protekovaná morfolin/thiomorfolin-3-karboxylová kyselina **CXC** podrobená kyselé deprotekcí a následné fmocylaci (**CXCI**) byla použita k acylaci primárního aminu **CXCII** za vzniku amidu **CXCIII**. *N*-acylace defmokovaného amidu

O-chráněným (2R)-hydroxy-3,3-dimethylbutyryl chloridem (**CXCIV**) a následná deprotektace vedly k žádané sloučenině **CXCV** (Schéma 38).

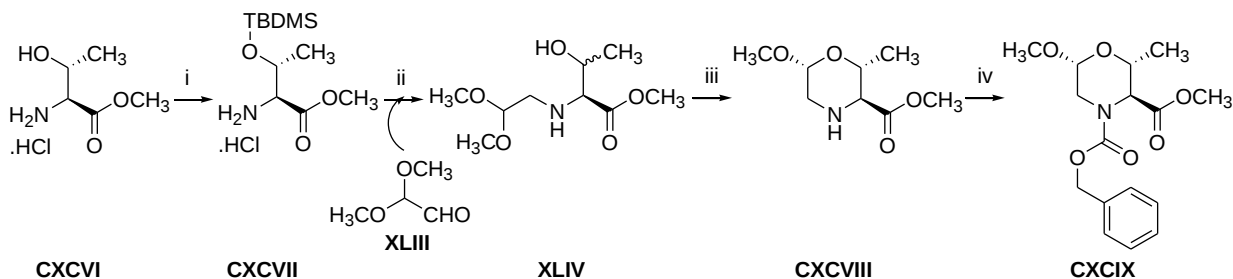
Schéma 38: Syntéza derivátů morfolin/thiomorfolin-3-karboxamidu **CXCV**.⁴⁵



Reagencie: (i) TFA/DCM, 5 h, 25 °C; (ii) Fmoc-Cl, 1,4-dioxan/H₂O, X = O: K₂CO₃, 3 h, 25 °C; X = S: NaHCO₃, 16 h, 25 °C; (iii) X = C: EDC, HOBT, DMF, 5 h, 0 - 25 °C; X = S: Hunigova báze, DMF, 16 h, 25 °C; (iv) PIP/DMF, 1 h, 25 °C; (v) O-acetyl (2R)-hydroxy-3,3-dimethyl-butyl chloridem, Et₃N, DCM, 1 - 16 h, -10 - 25 °C; (vi) K₂CO₃, MeOH, 30 min, 25 °C; (vii) TFA/DCM, 30 min - 2 h, 0 °C; (viii) MCPBA (0,88 ekv.), DCM, 30 min, 25 °C; (ix) MCPBA (2,5 ekv.), DCM, 4 h, 25 °C.

Další elegantní metoda byla založena na reduktivní aminaci O-chráněného threoninu **CXCVII** s dimethoxyacetaldehydem **XLIII**. Příslušný intermediát **XLIV** byl následně podroben konverzi ochráněné hydroxyskupiny na chlorid cyklizující na prekurzor **CXCVIII**. Následná N-acylace poskytla cílový produkt **CXCIX** (Schéma 39).^{1,46,47}

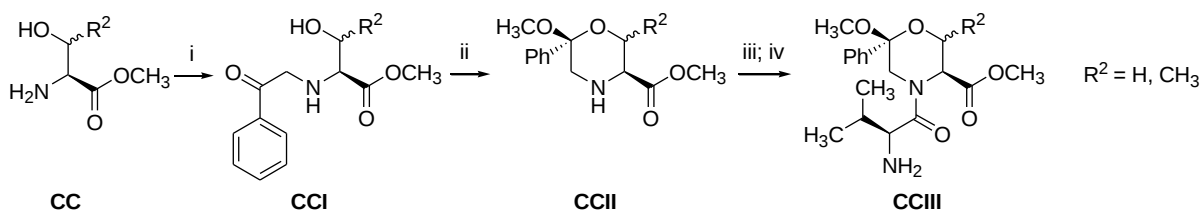
Schéma 39: Syntéza derivátů morfolin-3-karboxylových kyselin **CXCIX**.^{1,46,47}



Reagencie: (i) TBDMS-Cl, imidazol, suchý DMF, 30 min, 0 °C; (ii) 10% Pd/C, Et₃N, MeOH, 24 h, 25 °C; (iii) SOCl₂, MeOH, 4 h, reflux; (iv) Cbz-Cl, NaHCO₃, dioxan/H₂O, 10 min, 0 °C, poté 24 h, 25 °C.

Podobného přístupu bylo využito pro syntézu látek **CCIII** významných pro buněčné dýchání a β -oxidaci.⁴⁷ Alkylation aminoskupiny derivátů serinu či threoninu **CC** α -bromacetofenonem v přítomnosti NMP (**CCI**) a následná kysele katalyzovaná cyklizace vedla k žádané látce **CCII** podrobené acylaci Fmoc-Val-Cl v přítomnosti 2,6-lutidinu a bazické defmokaci účinkem Et₂NH za vzniku sloučeniny **CCIII** (Schéma 40).⁴⁷

Schéma 40: Syntéza derivátů morfolin-3-karboxylových kyselin **CCIII**.⁴⁷



Reagencie: (i) PhCOCH₂Br, NMP; (ii) HCl/MeOH; (iii) Fmoc-Val-Cl, 2,6-lutidin, PhCH₃, 2 h, 60 °C; (iv) 30% Et₂NH, MeCN, 2 h, 25 °C.

Dále byla popsána příprava prekurzorů **CCVIII** pro syntézu tricyklických benzodiazepinů působících jako antagonisté vazopresinových receptorů.³² Tato metoda je založena na otevírání

Schéma 41: Syntéza derivátů morfolin-3-karboxylových kyselin CCVIII.³²

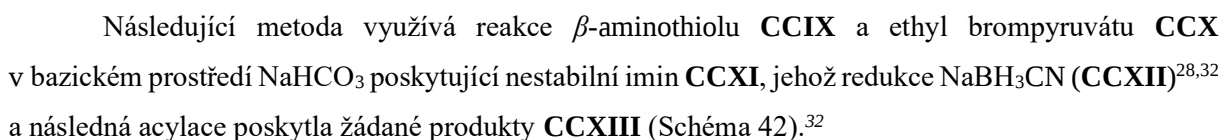
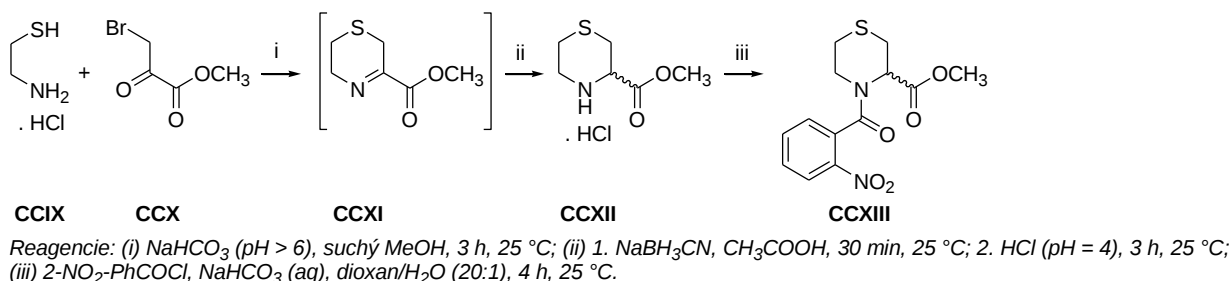
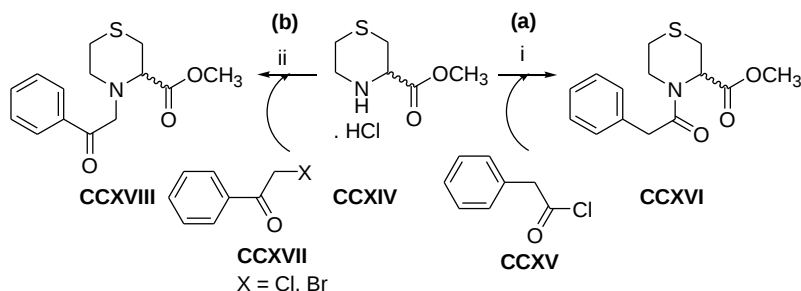


Schéma 42: Syntéza derivátů thiomorfolin-3-karboxylových kyselin CCXIII.^{28,32}



Na závěr této podkapitoly jsou rozebrány dvě podobné metody založené na nukleofilní substituci poskytující odlišné produkty **CCXVI** a **CCXVIII**. První cesta (**a**) využívá *N*-acylace thiomorfolinu **CCXIV** fenyl-acetyl chloridem **CCXV** v přítomnosti pyridinu za vzniku produktu **CCXVI**. Druhá syntéza (**b**) vychází z *N*-alkylace látky **CCXIV** α -halogenacetofenonem **CCXVII** v přítomnosti K_2CO_3 vedoucí k odlišnému *N*-acylovanému produktu **CCXVIII** (Schéma 43).⁴³

*Schéma 43: Syntéza derivátů thiomorfolin-3-karboxylových kyselin CCXVIII.*⁴³



Reagencie: (i) Py, suchý DCM, 2 h, 0 - 25 °C; (ii) K₂CO₃, DMF, 3 h, 45 °C.

3.1.2.2. Deriváty oxazinu/thiazinu

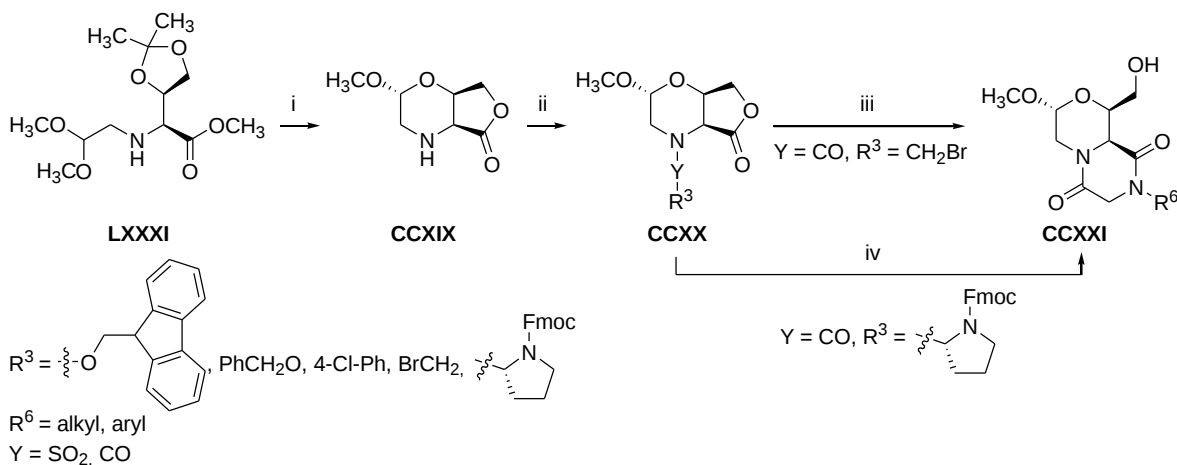
„Přímá“ syntéza derivátů oxazinů/thiazinů pomocí přístupu **(B)** nebyla doposud publikována. V literatuře existuje několik málo prací zabývajících se „nepřímou“ přípravou daných sloučenin vycházející z 6-substituovaných morfolinů/thiomorfolinů podrobených následné eliminaci vhodně odstupujících skupin. Tato metodika je blíže rozebrána v kapitole **(C)**.

3.1.2.3. Deriváty morfolinu/oxazinu s přikondenzovaným cyklem

Oproti bioaktivním kondenzovaným derivátům morfolinu/oxazinu připravených pomocí přístupu **(A)** nevykazují jejich analoga získána metodikou **(B)** výraznější aktivitu, a proto bylo publikováno pouze minimum prací zabývajících se jejich syntézou.

První uvedená metoda vedoucí k bicyklu morfolin-3-laktonu **CCXX** využívá cyklizace aminoketalu **LXXXI** v přítomnosti thionyl chloridu (**CCXIX**) za následné *N*-substituce acylačními či sulfonylačními činidly poskytující žádaný lakton **CCXX**, jehož konverzí s aminem lze připravit *N*-acylované morfoliny s [c] kondenzovaným šestičlenným heterocyklem **CCXXI** (Schéma 44).^{31,47}

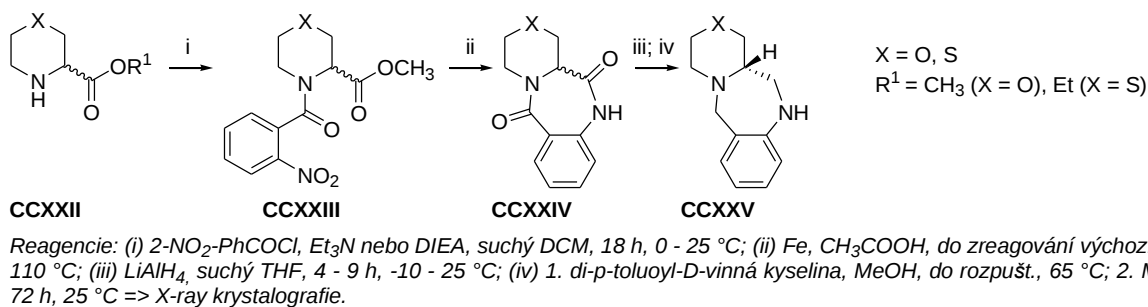
Schéma 44: Syntéza morfolin-3-laktonu **CCXX** a derivátu **CCXXI**.^{31,47}



Reagencie: (i) SOCl_2 , MeOH, 16 h, 25 °C; (ii) Fmoc-Cl, 2,6-lutidine, DCM, 16 h, 25 °C nebo Cbz-Cl, NaHCO_3 , dioxan/ H_2O , 16 h, 25 °C nebo 4-Cl- PhSO_2Cl , Et_3N , DCM, 24 h, 25 °C nebo BrCH_2COBr nebo Fmoc-Pro-Cl, 2,6-lutidin, suchý DCM, 2 h, 60 °C; (iii) R^6NH_2 , Et_3N , MeOH, 20 min, 100 °C; (iv) 30% PIP/DMF, 2 h, 25 °C.

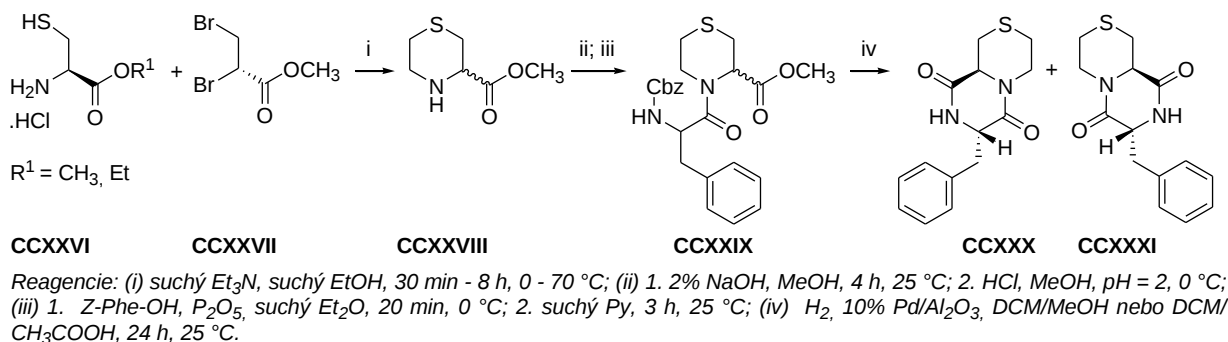
Druhou efektivní metodou byla syntéza *N*-acylovaných morfolinů/thiomorfolinů s [c] přikondenzovaným sedmičlenným cyklem **CCXXV**. Acylace výchozího racemického esteru **CCXXII** poskytla odpovídající amid **CCXXIII** podrobený redukci a intramolekulární cyklizaci na laktam **CCXXIV**. Redukce laktamového cyklu **CCXXIV** LiAlH_4 za následného ověření stereoselektivity syntézy pomocí X-ray krystalografie vedla z $\pm 97\%$ k cílovým tricyklickým (*S*)-(+)-benzodiazepinům **CCXXV** (Schéma 45) používaných jako antiflogistika či chemoterapeutika, působící také jako antagonisté vazopresinových receptorů nebo antagonisté opiátů.⁴⁸

Schéma 45: Syntéza tricyklického benzodiazepinu **CCXXV** přes benzodiazepin-2,5-dion **CCXXIV**.⁴⁸



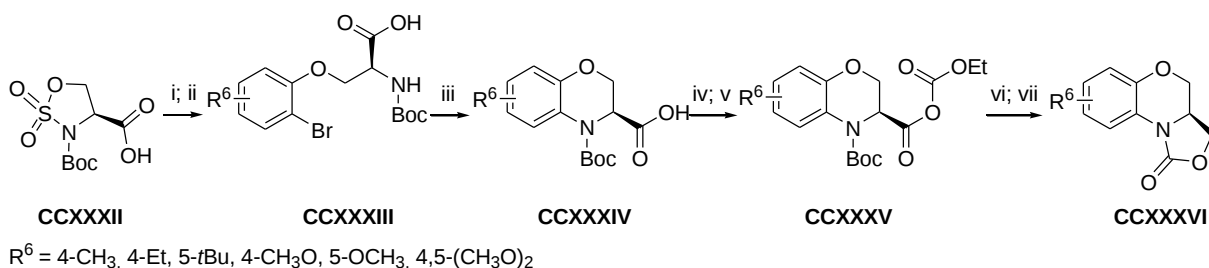
Další syntéza byla založena na kondenzaci esteru L-cysteinu **CCXXVI** s 2,3-dibrompropanoátem **CCXXVII** v přítomnosti Et₃N za následné N-acylace látky **CCXXVIII** Z-Phe-OH (**CCXXIX**). Hydrogenolýza Cbz skupiny vázané v postranním řetězci připraveného amidu **CCXXIX** umožnila intramolekulární cyklizaci a tvorbu žádaných diastereoisomerů **CCXXX** a **CCXXXI**, jejichž poměr závisel na substituci v pozici R¹ a použitím rozpouštědla při cyklizaci. Vyšší konverze reakce bylo dosaženo cyklizací ethylesteru (R¹ = Et) buď v methanolu, kdy byla detekována směs obou izomerů **CCXXX** a **CCXXXI** s převahou [c] kondenzovaného derivátu v *trans* uspořádání **CCXXXI** (60% konverze), nebo v přítomnosti DCM/CH₃COOH podporující vznik [d] kondenzovaného thiomorfolinu **CCXXX** (74% konverze) a zcela znemožňující tvorbu produktu **CCXXXI** (Schéma 46).⁴⁹

Schéma 46: Syntéza derivátů **CCXXX** a **CCXXXI**.⁴⁹



Zajímavým přístupem byla syntéza [c,e] kondenzovaných oxazinů založena na regioselektivním otevírání oxathiazolidin dioxidu **CCXXXII** v důsledku substituce 2-bromfenolem za chlazení. Následná intramolekulární Buchwald-Hartwigova arylaminace intermediátu **CCXXXIII** v přítomnosti Pd(dba)₃ poskytla výchozí N-protektovaný benzoxazin **CCXXXIV**. Ten byl následně podroben reakci s ethyl chloroformiátem v přítomnosti DIPA. Redukce karbonylové skupiny a následná kyselá deprotektace Boc skupiny vedla v přítomnosti NaOH k cyklizaci na finální karbamát **CCXXXVI** (Schéma 47).⁵⁰

Schéma 47: Syntéza derivátů benzoxazinyl oxazolidonu **CCXXXVI**.⁵⁰



Reagencie: (i) R^6 substituovaný 2-Br-PhOH, NaH, THF, 4 h, 0 °C; (ii) NaHSO₄ (aq), pH = 3 - 4; (iii) Pd(dba)₃, Cs₂CO₃, dioxan, 15 h, 100 °C; (iv) Cl-COOEt, DIPA suchý THF, 20 min, 0 °C; (v) NaBH₄, MeOH, 1 h, 0 °C; (vi) TFA, DCM, 1 h, 0 °C; (vii) NaOH, DMF, 1 h, 0 °C.

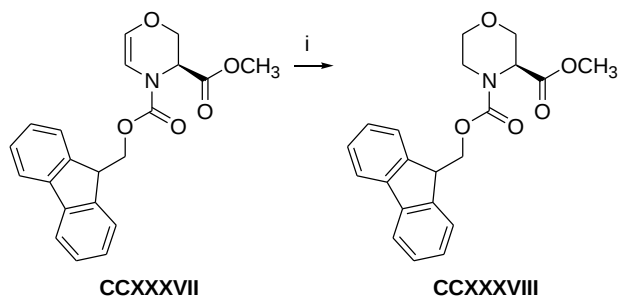
3.1.3. Přístup C: Tvorba heterocyklu a následná redukce či eliminace vedoucí k derivátům morfolinu/oxazinu

Deriváty morfolinu/oxazinu připravené pomocí přístupu (A) a (B) byly dále modifikovány pomocí: (1) redukce dvojné vazby oxazinů v poloze 5 vedoucí k žádaným morfolinům, nebo (2) eliminace vhodných odstupujících skupin vázaných na morfolinovém skeletu za tvorby dvojné vazby v pozici 5 cílových oxazinů.

3.1.3.1. Redukce dvojné vazby

Tato metodika je založena na redukci dvojné vazby v poloze 5 derivátů oxazinu **CCXXXVII** připravených kyselé katalyzovanou cyklizací aminoacetalu v *p*-TsOH a toluenu za refluxu.^{1,51} Žádaný morfolin **CCXXXVIII** byl připraven vysoce selektivní hydrogenací (95% konverze) připraveného oxazinu **CCXXXVII** katalyzované 10% Pt/C ve směsi methanol/DCM v poměru 2:1 (Schéma 48).⁵¹

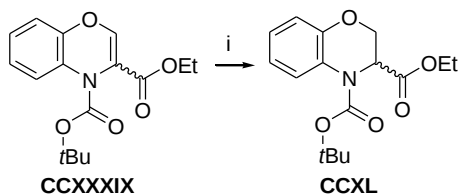
Schéma 48: Syntéza derivátů morfolin-3-karboxylových kyselin **CCXXXVIII**.⁵¹



Reagencie: (i) H₂, 10% Pt/C, MeOH/DCM (2:1), 16 h, 25 °C, 101 kPa.

Analogicky byly připraveny benzoxaziny **CCXL**, jejichž syntéza vycházela z hydrogenace látky **CCXXXIX** v ethanolu za zvýšeného tlaku po dobu tří dnů (Schéma 49).⁵²

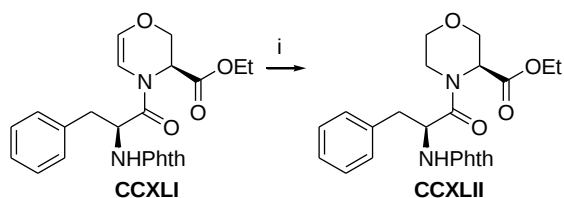
Schéma 49: Syntéza derivátů benzoxazinu **CCXL**.⁵²



Reagencie: (i) H₂, 10% Pt/C, EtOH, 72 h, 25 °C, 5 066 kPa.

Poslední uvedená metoda byla založena na konverzi enamínu **CCXLI** v přítomnosti TfOH a jejího anhydridu vedoucí k cílovým morfolinům **CCXLII** (Schéma 50).⁵³

Schéma 50: Syntéza derivátů morfolin-3-karboxylových kyselin **CCXLII**.⁵³



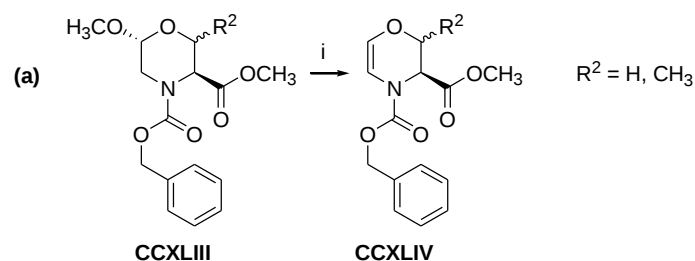
Reagencie: (i) TfOH , $(\text{CF}_3\text{CO})_2\text{O}$, DCM , 123 h, 25 °C.

3.1.3.2. Eliminace vhodných odstupujících skupin

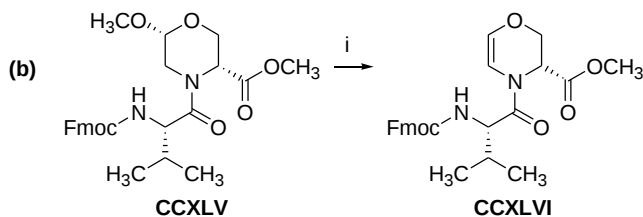
Cílových oxazinů bylo dosaženo prostřednictvím dvou typů reakcí: (i) eliminací methoxy skupiny z 5-acetalmorfolinu, nebo (ii) kysele katalyzovanou dehydratací z 5-hydroxythiomorfolinu.

Pomocí prvního přístupu (i) byly připraveny žádané oxaziny **CCXLIV**, **CCXLVI** a oxazin-3-laktony **LXXXIV**. Schéma 51 popisuje kysele katalyzovanou eliminaci methanolu z 5-acetalmorfolinu **CCXLIII** nebo **CCXLV** v přítomnosti (a) $p\text{-TsOH}$ ^{1,54} či (b) MsOH ⁵⁵ vedoucí k dihydrooxazinům **CCXLIV** a **CCXLVI**.^{1,54,55}

Schéma 51: Syntéza derivátů oxazin-3-karboxylových kyselin **CCXLIV** a **CCXLVI**.^{1,54,55}



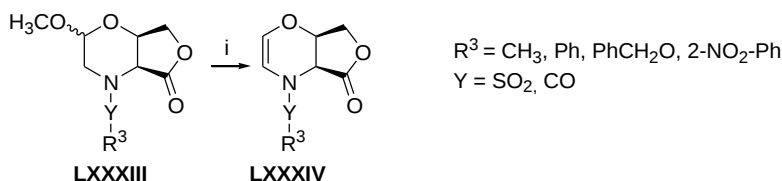
Reagencie: (i) $p\text{-TsOH}$, PhCH_3 , 2 h, reflux.



Reagencie: (i) MsOH , PhCH_3/DCM (4:1) 2 h, reflux.

Stejného principu bylo využito pro přípravu oxazin-3-laktonů **LXXXIV** (Schéma 52).^{1,54}

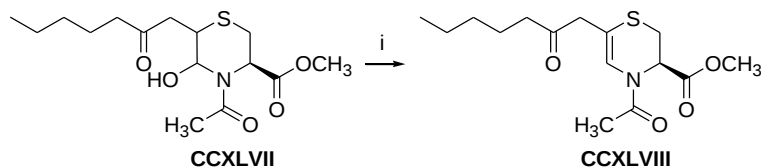
Schéma 52: Syntéza oxazin-3-laktonu **LXXXIV**.^{1,54}



Reagencie: (i) $p\text{Ts-OH}$, PhCH_3 , 2 - 24 h, reflux.

Druhý přístup byl použit v případě kysele katalyzované dehydratace 5-hydroxythiomorfolinů **CCXLVII** poskytující odpovídající thiaziny **CCXLVIII** během separace na semipreparativním HPLC s gradientem 40% $\text{MeCN}/0,1\%$ TFA (Schéma 53).⁵

Schéma 53: Syntéza derivátů thiazin-3-karboxylových kyselin **CCXLVIII**.⁵



Reagencie: (i) semipreparativní HPLC (gradient 40% MeCN/0,1% TFA).

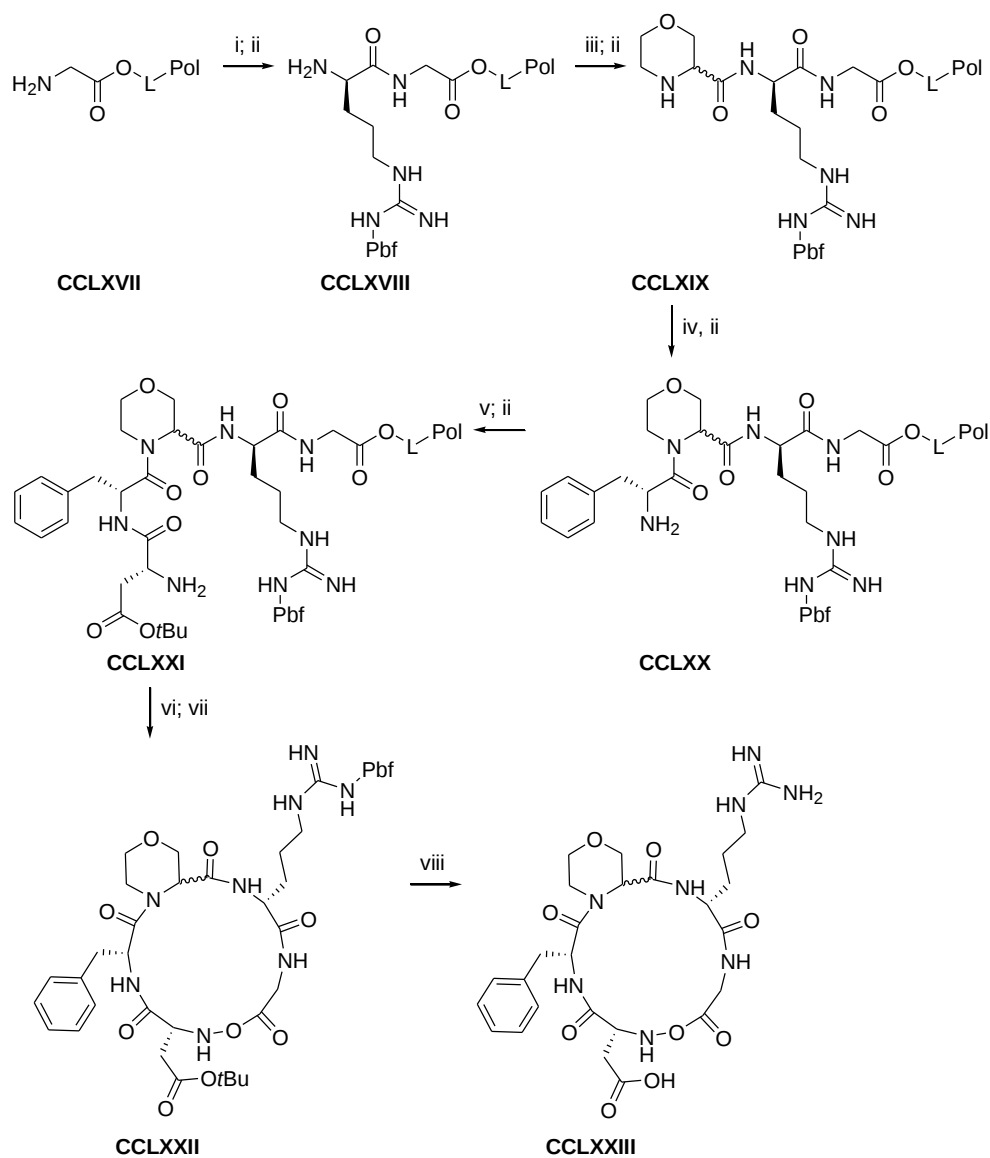
3.1.4. Přístup D: Syntéza peptidomimetik obsahujících morfolin/thiomorfolin-3-karboxylové fragmenty

Peptidomimetika představují skupinu syntetických látek, které napodobují vlastnosti přírodních peptidů či proteinů. Struktura těchto molekul je obvykle navrhována za účelem upravit molekulární vlastnosti peptidů (jejich stabilitu a biologickou aktivitu) s cílem objevit nové léčivo. Motivy především cyklických peptidomimetik se nacházejí v mnoha bioaktivních látkách, které se uplatňují například jako chemoterapeutika, analgetika, katalyzátory pro asymetrickou syntézu, chemické sondy či jako inhibitory trombinu a trypsinu. Jejich hlavní výhoda spočívá ve vazbě na nižší počet biologických receptorů umožňující vyšší počet interakcí s požadovaným biologickým cílem, což vede ke zvýšení terapeutického významu a snížení potenciálních vedlejších účinků.⁵⁶

V minulosti již byla syntetizována řada peptidomimetik s morfolinovým skeletem substituovaným v poloze 2,4 nebo 6⁵⁷⁻⁶¹, nicméně z dostupných zdrojů jsou známy jen dvě publikace týkající se přípravy derivátů morfolin/thiomorfolin-3-karboxylových kyselin^{13,14}, pro ilustraci je první z nich rozebrána níže.

Základní metodikou vedoucí ke zmíněným peptidomimetikům **CCLV** vykazující aktivitu k $\alpha_v\beta_3/\alpha_v\beta_5$ integrinu je syntéza na pevné fázi.¹⁴ Východí L-/D-morfolin-3-karboxylová kyselina s *N*-protekcí byla připravena pěti krokovou syntézou vycházející z dimethoxyacetaldehydu a L-/D-2-amino-3-hydroxypropanoátu methylnatého.⁵¹ Acylace připraveného derivátu morfolinu na deprotektovanou aminoskupinu argininu **CCL** vázaného na 2-chlorotrityllové pryskyřici za následné defmokace (**CCLI**) a sledu acylačních a defmokačních reakcí vedly k lineárnímu peptidu **CCLIII** sestávajícího ze sekvencí fenylalanin-asparagová kyselina a arginin-glycin. Kyselé štěpení korespondujícího peptidu **CCLIII** z polymeru poskytlo volnou karboxylovou skupinu kondenzující s terminální aminoskupinou asparagové kyseliny v přítomnosti TBTU a DIEA na cyklický tetrapeptid **CCLIV**, jehož deprotektace vedla k žádané sloučenině **CCLV** (Schéma 54).¹⁴

Schéma 54: Synthèse peptidomimetik CCLV.



Reagencie: (i) *Fmoc-Arg(Pbf)-OH*, DIC/HOBt, BB, DMF, 16 h, 25 °C; (ii) 30% PIP/DMF, 30 min, 25 °C; (iii) *Fmoc-L-/D-Mor-OH*, TBTU, DIEA, DMF, 48 h, 25 °C; (iv) *Fmoc-D-Phe-OH*, DIC/HOBt, BB, DMF, 16 h, 25 °C; (v) *Fmoc-Asp(t-Bu)-OH*, TBTU, DIEA, DMF, 16 h, 25 °C; (vi) 1% TFA/DCM, 10×2 min, 25 °C; (vii) TBTU, DIEA DMF, 24 h, 25 °C; (viii) 95% TFA, 2,5% H_2O , 2,5% TIS, 2 h, 25 °C.

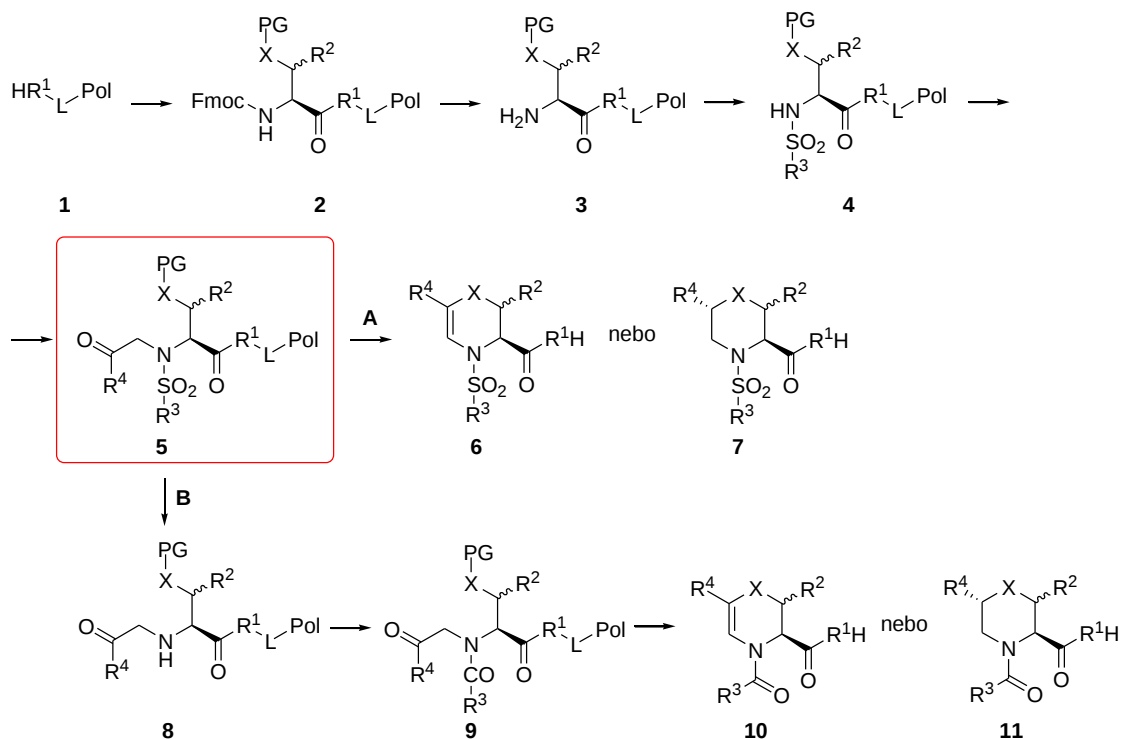
4. VÝSLEDKY A DISKUSE

4.1. Vývoj a optimalizace navržené metodiky

První část diplomové práce je zacílená na vývoj a optimalizaci syntézy derivátů morfolinu, které byly poprvé pozorovány jako vedlejší produkty přípravy benzo[*f*][1,4]diazepin-5-onů.¹¹

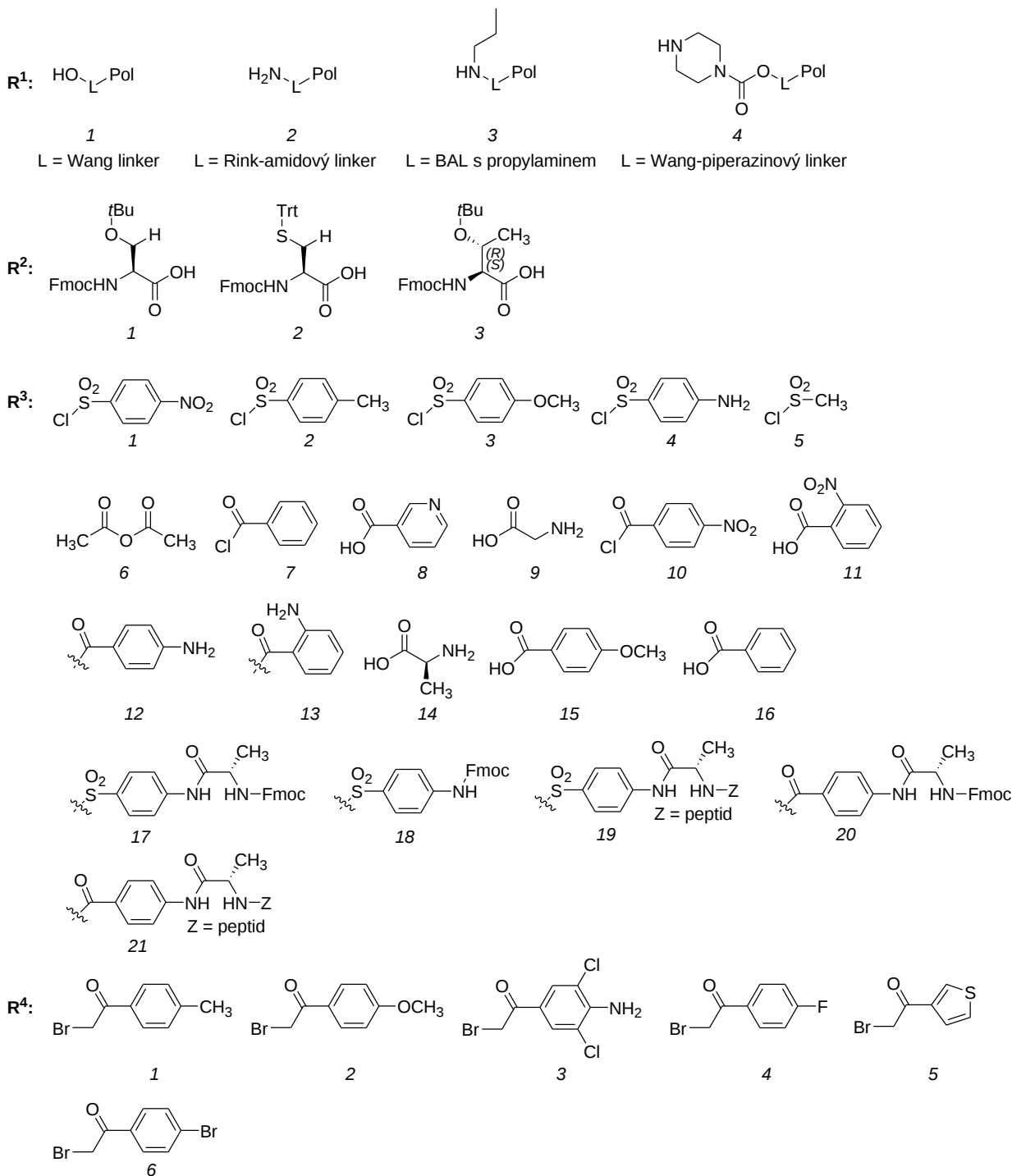
Původní metodika (Schéma 55) byla založena na imobilizaci Fmoc- α -aminokyselin na polymer přes vhodný linker. Následná deprotektace Fmoc skupiny měla zpřístupnit aminoskupinu, která by mohla být dále aktivována/chráněna 4-nitrobenzensulfonyl chloridem (4-Nos-Cl) pro alkylaci α -bromacetofenonem. V přístupu **A** měla být 4-nitrobenzensulfonylová (4-Nos) skupina ponechána v molekule jako *N*-substituent, přičemž aplikace štěpícího koktejlu TFA/DCM měla vést k uvolnění intermediátu z pryskyřice a jeho cyklizaci na nenasycený produkt **6**. V rámci metody **B** měla být 4-Nos skupina po alkylaci odstraněna za účelem acylace výsledného sekundárního aminu **8** vhodnými benzoovými kyselinami či jejich chloridy. Následné kyselé štěpení mělo vést k *N*-acylovaným derivátům **10**. Vzniku nasyčených derivátů morfolinu/thiomorfolinu **7** a **11** pak mělo být dosaženo přidávkem redukčního činidla (TES) do štěpícího koktejlu.

Schéma 55: Metodika navržená pro syntézu derivátů morfolin/thiomorfolin-3-karboxylových kyselin.



V následujících kapitolách jsou jednotlivé přístupy a jejich modifikace popsány detailněji, přičemž je využíváno číslování **1 – 25** (R^1, R^2, R^3, R^4) odvozené od výchozích látek (Obr. 6).

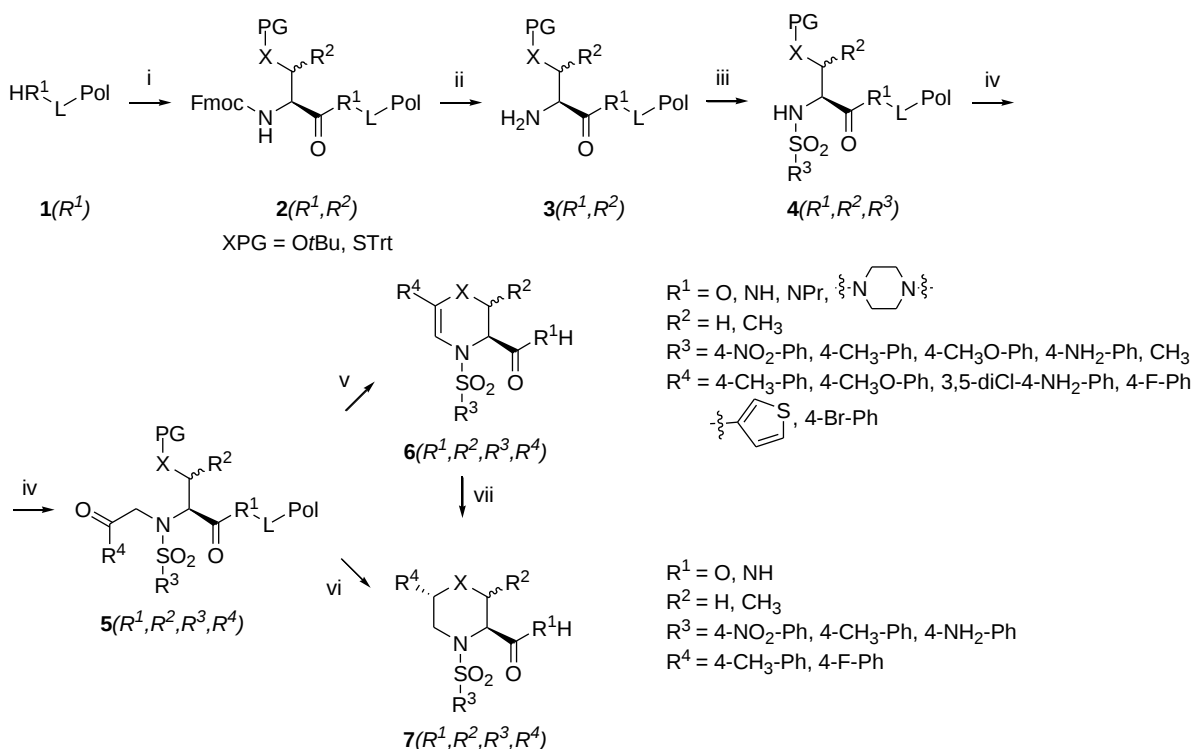
Obr. 6: Výchozí látky použité pro substituci R^1 , R^2 , R^3 a R^4 .



4.1.1. Přístup A: Příprava *N*-sulfonylovaných derivátů morfolinu a thiomorfolinu

Na základě metodiky použité v bakalářské práci¹¹ byla navržena syntéza menší chemické knihovny dihydrooxazinů/morfolinů a jejich sirných analogů. Jako výchozí látky byly použity Fmoc- α -aminokyseliny (L-serin, L-cystein a L-threonin) ukotvené na pryskyřici s různým linkerem, dále aromatické sulfonyl chloridy či Mes-Cl a α -bromacetofenony s elektrondonorními/akceptorními skupinami (Schéma 56). Deprotekovaná Fmoc- α -aminokyselina **3**(R^1, R^2) byla sulfonylována příslušnými činidly za ověření kvantitativního průběhu reakce pomocí Fmoc-OSu a následně alkylována α -bromacetofenony. Štěpení a spontánní cyklizace alkylovaných sulfonamidů **5**(R^1, R^2, R^3, R^4) v TFA, 50% TFA/DCM či v TFA/TES/DCM vedly k cílovým produktům **6**(R^1, R^2, R^3, R^4) nebo **7**(R^1, R^2, R^3, R^4) s 38 – 92% konverzí (Tabulka 13).

Schéma 56: Obecná syntéza derivátů **6**(R^1, R^2, R^3, R^4) a **7**(R^1, R^2, R^3, R^4) pomocí přístupu A.

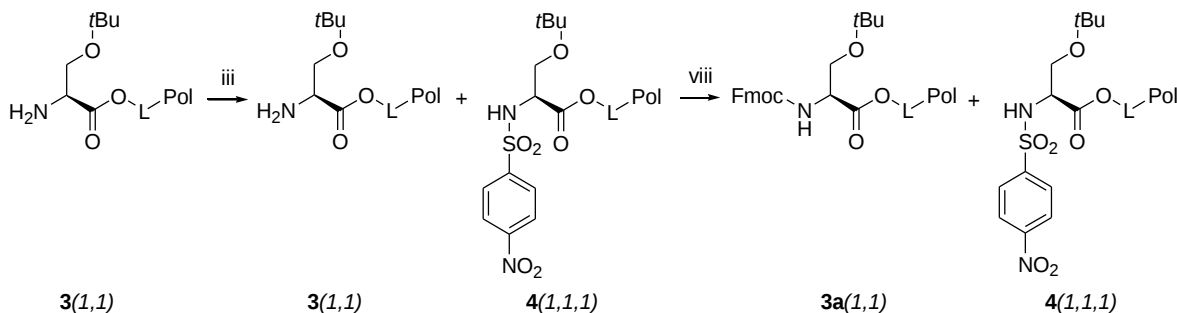


Reagencie: (i) Fmoc- α -aminokyselina, HOBt, DMAP, DIC, DMF, DCM, 24 h, 25 °C; (ii) 50% PIP/DMF, 30 min, 25 °C; (iii) sulfonyl chlorid, 2,6-lutidin, DCM, 24 h, 25 °C; (iv) 2-brom-4'-substituovaný acetofenon, DIEA / PS / BTPP, DMF, 24 h, 25 °C; (v) 50% TFA/DCM nebo TFA p.a., 24 h, 25 °C; (vi) TFA/TES/DCM (10:1:9), 5 - 8 h, 25 °C; (vii) TES, 1 h, 25 °C.

4.1.1.1. Problematika sulfonylací a alkylací

Po ukotvení příslušné Fmoc- α -aminokyseliny na pryskyřici a její deprotekcí pomocí 50% roztoku PIP v DMF byl substrát **3**(1,1) sulfonylován 4-Nos-Cl (Schéma 57). Konverze reakce byla následně ověřena pomocí acylace Fmoc-OSu, přičemž kvantitativního průběhu bylo dosaženo po 24 h za laboratorní teploty (Tabulka 1).

Schéma 57: Sulfonylace intermediátu 3(1,1) pomocí 4-Nos-Cl za následné kontroly reakce derivatizací Fmoc-OSu.



Reagencie: (iii) 4-Nos-Cl, 2,6-lutidin, DCM, reak. doba (Tabulka 1), 25 °C; (viii) Fmoc-OSu, DCM, 30 min, 25 °C.

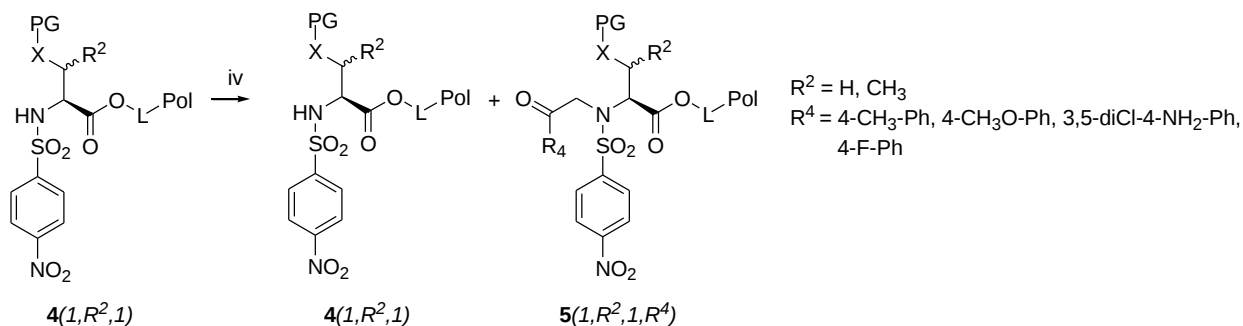
Tabulka 1: Optimalizace reakčních podmínek sulfonylace intermediátu 3(1,1) 4-Nos-Cl při 25 °C.

vých. látka	čas [h]	poměr 3a/4 [%] ^a	surová čistota 4 [%] ^a
3(1,1)	16	21:79	74
	16	0:100	85 ^{op}
	24	0:100	90

^aHPLC-MS (205 – 400 nm); ^{op}opakování reakčního kroku pro dosažení kvantitativního průběhu reakce.

Alkylace intermediátu 4(1,R²,1) aromatickými α-bromacetofenony poskytla cílové meziprodukty 5(1,R²,1,R⁴) s 38 – 92% konverzí (Schéma 58). Z testovaných alkylačních činidel byl nejméně vhodný 2-brom-1-thienofen-3-yl-ethanon, jehož použitím došlo ke snížení surové čistoty reakce na 38 %. Alkylace derivátů threoninu 4(1,3,1) neprobíhaly zcela kvantitativně nejspíše kvůli sterickému bránění methylové skupiny v pozici R². Nicméně po nalezení optimálních reakčních podmínek byl produkt 5(1,3,1,1) získán v 74% surové čistotě (Tabulka 2). Nalezené podmínky byly následně použity pro syntézu všech intermediátů 5(1,R²,1).

Schéma 58: Alkylace intermediátu 4(1,R²,1) různě substituovanými α-bromacetofenony.



Reagencie: (iv) 2-brom-4'-substituovaný acetofenon, báze (Tabulka 2), DMF, reak. doba (Tabulka 2), 25 °C.

Tabulka 2: Optimalizace reakčních podmínek alkylace threoninu 4(1,3,1) při 25 °C.

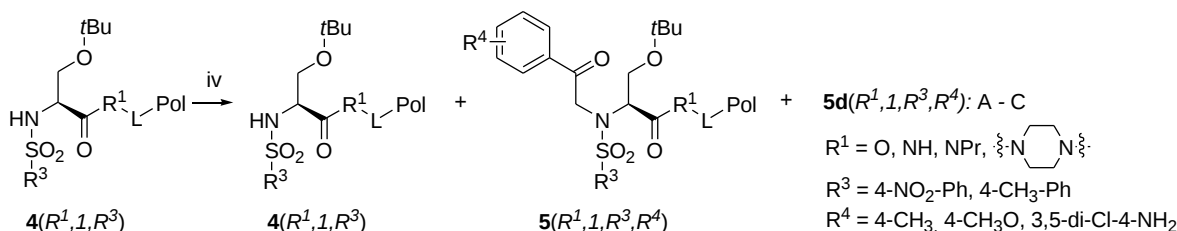
vých. látka	báze	ekv. ^a	čas [h]	poměr 4/5 [%] ^b	surová čistota 5 [%] ^b
4(1,3,1)	DIEA	1	24	32:68	40
	DIEA	1	48	9:91	56

	DIEA	2	48	2:98	61
	DIEA	2	24	15:85	74
	BTPP	1	24	100:0	42
	PS	1	24	19:81	54
	PS	1	48	29:71	34

^aekvivalent báze vůči alkylačnímu činidlu; ^bHPLC-UV (205 – 400 nm).

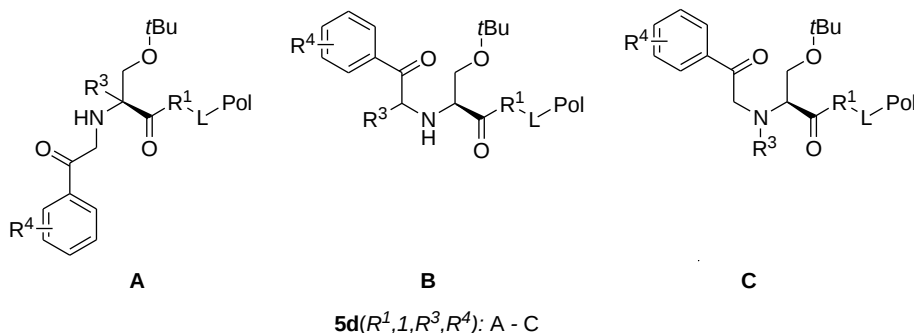
Při alkylationi intermediátu **4**(1,1,2) 4'-amino-2-brom-3',5'-dichloracetofenonem byla detekována směs produktu **5**(1,1,2,3) a vedlejší látky **5d**(1,1,2,3) (Schéma 59). Na základě znalosti možných přesmyků nosylovaných derivátů⁶² a hmoty zjištěné z HPLC-UV-MS záznamu byly navrženy tři struktury sloučeniny **5d**(*R*¹,1,*R*³,*R*⁴) (varianta A, B nebo C; Obr. 7), které vznikají obecně z produktu **5**(*R*¹,1,*R*³,*R*⁴) jeho *C*/*N*-arylací za následné eliminace SO₂ skupiny.⁶³ Strukturu látky **5d**(1,1,2,3) se přes veškerou snahu nepodařilo potvrdit, neboť během HPLC čištění došlo k rozkladu látky. Snížením koncentrace báze na 0,7 mmol roztok však byla tvorba nežádoucí sloučeniny **5d**(1,1,2,3) zcela potlačena (Schéma 59, Tabulka 3).

Schéma 59: Alkylationi intermediátu **4**(*R*¹,1,*R*³) α-bromacetofenony.



Reagencie: (iv) 2-brom-4'-substituovaný acetofenon, báze (Tabulka 3 - 4), DMF, reak. doba (Tabulka 3 - 4), teplota (Tabulka 3 - 4).

Obr. 7: Předpokládané struktury sloučeniny **5d**(*R*¹,1,*R*³,*R*⁴): A – C.



Tabulka 3: Optimalizace reakčních podmínek alkylationi intermediátu **4**(1,1,2) 4'-amino-2-brom-3',5'-dichloraceto-fenonem.

vých. látka	<i>R</i> ¹ H	<i>R</i> ³	<i>R</i> ⁴	báze	koncentrace báze [mmol]	čas [h]	teplota [°C]	poměr 5/5d [%] ^a	surová čistota 5 [%] ^a
4 (1,1,2)	OH	4-CH ₃ -Ph	3,5-diCl-4-NH ₂	DIEA	1,5	24	25	66:34	63
				DIEA	0,7	24	25	82:18	68
				DIEA	0,7	48	25	100:0	84
				PS	1,5	24	25	100:0	40
				Et ₃ N	1,5	24	25	100:0	58

^aHPLC-UV (205 – 400 nm).

Dále byl studován vliv konstituce linkeru (R^1) na průběh alkylačních reakcí (Schéma 59). Použití Rinkova amidového linkeru nebo propylaminu imobilizovaného na BAL linkeru vedlo pouze ke vzniku vedlejších produktů **5d**($R^1,1,1,R^4$) se surovou čistotou 42 – 51% (Schéma 59). Lepší konverze se nepodařilo dosáhnout změnou báze, teploty ani použitím mikrovlnného reaktoru (Tabulka 4). Lze tedy konstatovat, že při ukotvení přes ester nebo cyklický amid probíhá alkylace dle očekávání, zatímco ukotvení přes *N,N*-disubstituovaný amid vede k bazicky katalyzovanému přesmyku na nežádoucí produkty **5d**($R^1,1,1,R^4$).

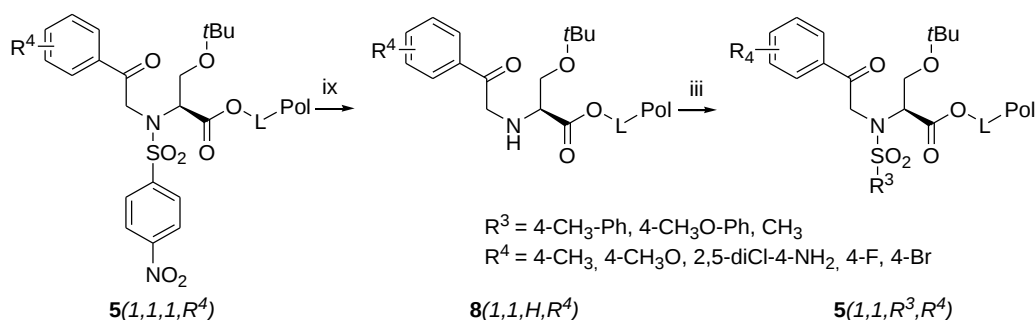
Tabulka 4: Optimalizace reakčních podmínek alkylace derivátu **4**(3,1,1) ukotveného na BAL s propylaminem.

vých. látka	R^1H	R^3	R^4	báze	čas [h]	teplota [°C]	MW [W]	poměr 4/5d [%] ^a	surová čistota 5d [%] ^a
4 (3,1,1)	NHPr	4-NO ₂ -Ph	4-CH ₃	DIEA	24	25	-	34:66	49
				BTTP	24	25	-	41:59	23
				PS	24	25	-	23:77	51
				PS	48	25	-	28:72	34
				PS	1	70	200	39:61	27
				PS	24	70	200	31:69	44
4 (3,1,1)			4-CH ₃ O	DIEA	24	25	-	42:58	40
				BTTP	24	25	-	51:49	18
				PS	24	25	-	25:75	49
				PS	48	25	-	32:68	44

^aHPLC-UV (205 – 400 nm).

V další části práce byly studovány sulfonylace jinými sulfonyl chloridy, jakožto modifikace přístupu popsaného v první části této kapitoly. Pro tento účel byl zvolen postup využívající deprotekcí aminoskupiny sloučeniny **5**(1,1,1, R^4). Výsledný intermediát **8**(1,1,*H*, R^4) byl dále podroben opětovné reakci s novým sulfonyl chloridem, tzv. re-sulfonylaci (Schéma 60). Dosažené výsledky bohužel poukázaly na nereaktivitu Mes-Cl a Tos-Cl. Re-sulfonylace 4-methoxybenzensulfonyl chloridem poskytla příslušné produkty **5**(1,1,3,1) a **5**(1,1,3,4) v 56 – 72% surové čistotě, nicméně vzhledem k omezené použitelnosti metody bylo přistoupeno k tzv. „přímým“ sulfonylacím s deriváty nesoucími elektrondonorní skupiny, které probíhaly s 56 – 92% konverzí (Schéma 61).

Schéma 60: Denosylace a následná re-sulfonylace.

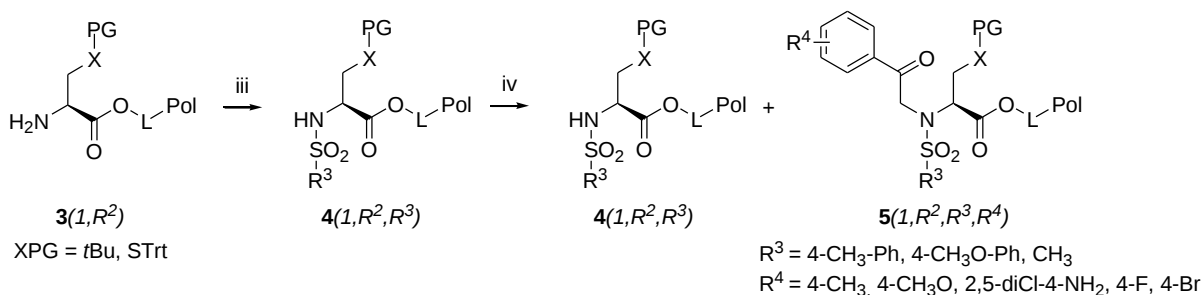


Reagencie: (ix) 2-merkptoethanol, DBU, DMF, 30 min, 25 °C; (iii) sulfonyl chlorid, 2,6-lutidin, DCM, 24 h, 25 °C.

4.1.1.2. Problematika alkylací po „přímých“ sulfonylacích

Deriváty **4**(1,*R*²,*R*³) připravené „přímou“ sulfonylací s různě substituovanými sulfonyl chloridy byly dále alkylovány za standardních podmínek. Přítomnost methylové skupiny v poloze 4 (*R*³ = CH₃) zcela znesnadnila průběh reakce, přičemž žádaný produkt **5**(1,1,5,1) nebyl připraven ani po opakování alkylačního kroku. Alkylace meziproduktů **4**(1,1,*R*³) probíhaly obtížně zejména v přítomnosti α -bromacetofenonů s elektrondonorními skupinami (*R*⁴ = CH₃, OCH₃) (Schéma 61, Tabulka 5). Z toho důvodu se žádanou látku **5**(1,1,2,2) podařilo připravit pouze v omezené surové čistotě, a to i přes optimalizaci alkylačních podmínek (Tabulka 5). Porovnání surové čistoty produktů **5**(1,1,*R*³,*R*⁴) připravených pomocí re-sulfonylace a „přímé“ sulfonylace je uvedeno v Tabulce 6.

Schéma 61: „Přímá“ sulfonylace činidly s elektrondonorními skupinami a následná alkylace.



Reagencie: (iii) sulfonyl chlorid, 2,6-lutidin, DCM, 24 h, 25 °C; (iv) 2-brom-4'-substituovaný acetofenon, báze (Tabulka 5), DMF, reak. doba (Tabulka 5), teplota (Tabulka 5).

Tabulka 5: Optimalizace reakčních podmínek alkylace látek **4**(1,*R*²,*R*³).

vých. látka	X	<i>R</i> ³	<i>R</i> ⁴	báze	ekv. ^a	čas [h]	teplota [°C]	MW [W]	poměr 4/5 [%] ^b	surová čistota 5 [%] ^b
4 (1,1,2)	O	4-CH ₃ -Ph	4-CH ₃	DIEA	1	24	25	-	43:57	51
				DIEA	2	24	25	-	22:78	74
				DIEA	1	24	70	-	44:56	41
				DIEA	1	1	70	200	15:85	60
				DIEA	1	12	70	200	28:72	59
				DIEA	1	24	70	200	0:100	63
				BTTP	1	24	25	-	22:78	25
				BTTP	2	24	25	-	100:0	0
				BTTP	1	24	70	-	100:0	0
4 (1,1,2)	O	4-CH ₃ -Ph	4-CH ₃ O	DIEA	1	24	25	-	52:48	26
				DIEA	1	24	70	200	57:43	30
				DIEA	1	48	70	200	0:0	0
				DIEA	1	24	100	200	73:27	14
				DIEA	1	24	120	200	0:0	0
				PS	1	24	25	-	100:0	0
4 (1,1,2)	O	4-CH ₃ -Ph	4-F	DIEA	1	24	25	-	15:85	73
				DIEA	1	48	25	-	12:88	81
				DIEA	1	72	25	-	0:100	94
				PS	1	24	25	-	84:16	11
4 (1,1,2)	O	4-CH ₃ -Ph	4-Br	DIEA	1	48	25	-	10:90	82
				DIEA	1	72	25	-	0:100	97

4(1,1,3)	O	4-CH ₃ O-Ph	4-CH ₃	DIEA	1	24	25	-	69:31	23
				DIEA	1	24	25	-	0:100	56 ^{op}
4(1,1,3)	O	4-CH ₃ O-Ph	4-F	DIEA	1	24	25	-	39:71	65
				DIEA	1	24	25	-	0:100	65 ^{op}
4(1,2,3)	S	4-CH ₃ O-Ph	4-CH ₃ O	DIEA	1	24	25	-	4:96	77
				DIEA	1	24	25	-	0:100	83 ^{op}
				DIEA	1	48	25	-	10:90	71
4(1,2,3)	S	4-CH ₃ O-Ph	4-F	DIEA	1	72	25	-	0:100	58
				DIEA	1	24	25	-	0:100	81
4(1,1,5)	O	CH ₃	4-CH ₃	DIEA	1	24	25	-	100:0	0
				DIEA	1	24	25	-	100:0	0

^aekvivalent báze vůči alkylačnímu činidlu; ^bHPLC-UV (205 – 400 nm); ^{op}opakování reakčního kroku pro dosažení kvantitativního průběhu reakce.

Tabulka 6: Porovnání surové čistoty modelových látek 5(1,1,R²,R³) připravených re-sulfonylací a „přímou“ sulfonylací.

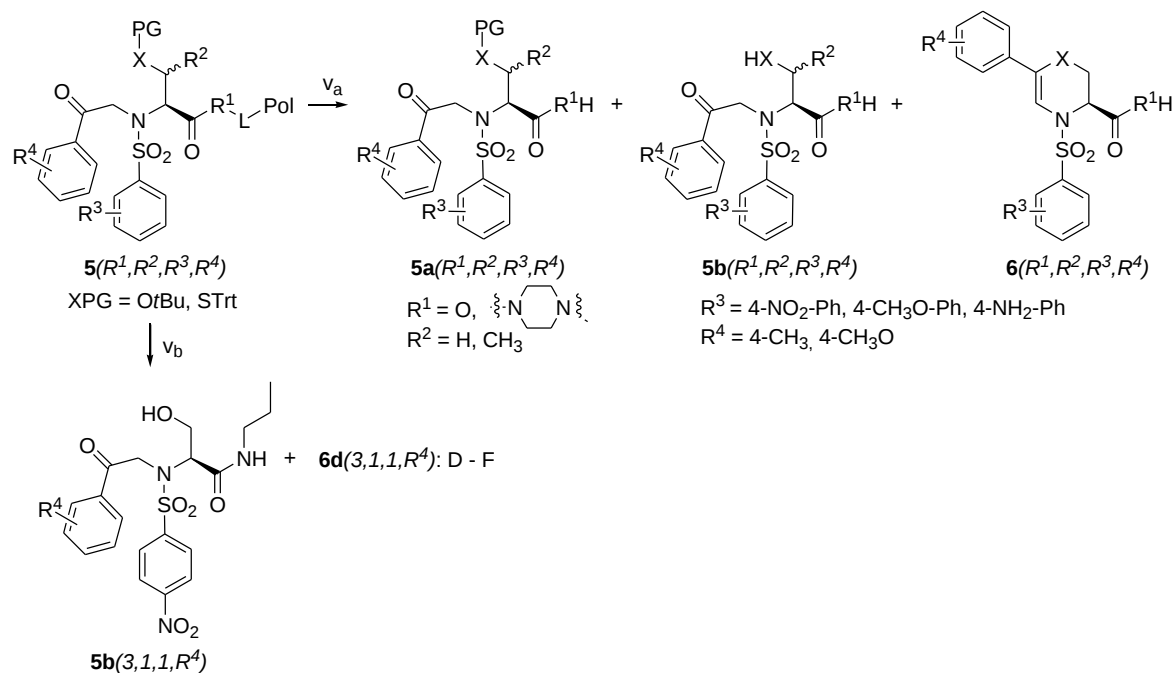
slouč.	R ³	R ⁴	surová čistota 5 [%] ^a	
			resulfonylace	„přímá“ sulfonylace
5(1,1,2,1)	4-CH ₃ -Ph	4-CH ₃	0	63
5(1,1,2,2)	4-CH ₃ -Ph	4-CH ₃ O	0	42
5(1,1,3,1)	4-CH ₃ O-Ph	4-CH ₃	72	75
5(1,1,3,4)	4-CH ₃ O-Ph	4-F	56	79
5(1,1,5,1)	CH ₃	4-CH ₃	0	0

^aHPLC-UV (205 – 400 nm).

4.1.1.3. Problematika cyklizací na nenasycené deriváty morfolinu

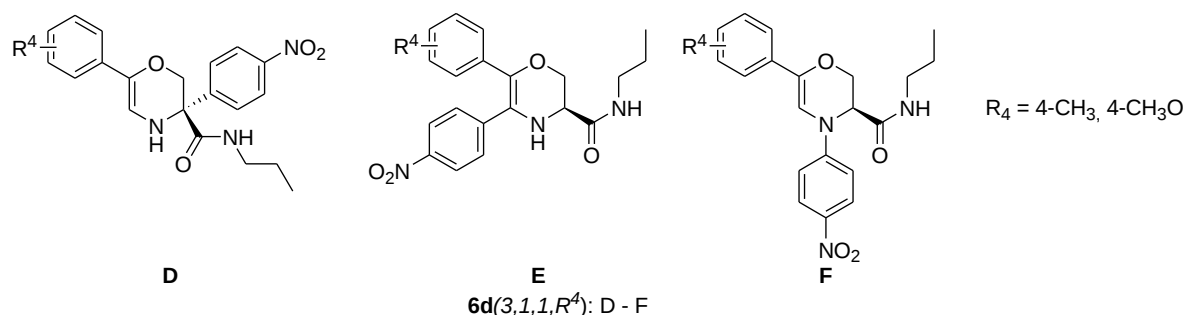
Průběh cyklizací intermediátů 5(R¹,R²,R³,R⁴) byl ovlivněn složením štěpícího koktejlu a délkou štěpení. První pokusy byly prováděny na různých substrátech s 50% TFA v DCM po dobu 30 minut (Schéma 62, Tabulka 7), kdy docházelo ke vzniku deprotektovaného vedlejšího produktu **5b**. S měněním se poměrem TFA/DCM nebo reakční dobou byla v LC-MS spektrech detekována další nežádoucí struktura **5a** s chránicí *t*-butylovou nebo tritylovou skupinou. Teprve použití 50% TFA v DCM po dobu 24 – 26 h vedlo k optimální cyklizaci na sloučeninu **6**, a to zejména u derivátů serinu **6(1,1,R³,R⁴)** a threoninu **6(1,3,1,1)**. Uzavření cysteinových intermediátů **6(1,2,R³,R⁴)** bylo dosaženo až po celodenním štěpení v čisté TFA, jako modelový příklad je zde uvedena cyklizace sloučeniny 5(1,2,1,1) (Tabulka 7). Výjimku tvořily látky 5(3,1,1,R⁴) s navázaným propylaminem v poloze R¹, u kterých ani po 24 h nedocházelo k cyklizaci, ve směsi však vznikl vedlejší produkt **6d(3,1,1,R⁴)** s přepokládanou strukturou D, E nebo F (Schéma 62, Obr. 8, Tabulka 8) odvozenou od skeletu A, B nebo C (Obr. 7). Sledování trendu substituce odhalilo, že uzavření do cyklu znesnadňuje přítomnost sekundárního a terciárního aminu v poloze R¹, methylové skupiny v pozici R² či elektrondonorních skupin v polohách R³ = 4-CH₃O-Ph, 4-NH₂-Ph a R⁴ = 4-CH₃O (Tabulka 7 – 8).

Schéma 62: Cyklizace intermediátu 5(R¹,R²,R³,R⁴).



Reagencie: (v_a) XPG = OtBu: TFA/DCM; XPG = STrt: TFA p.a. nebo 50% TFA/DCM, reak. doba (Tabulka 7), teplota (Tabulka 7); (v_b) 50% TFA/DCM, reak. doba (Tabulka 8), 25 °C.

Obr. 8: Předpokládané struktury sloučeniny 6d(3,1,1,R⁴): D - F



Tabulka 7: Poměr látek 5a:5b:6 v závislosti na složení štěpící směsi, reakčním čase a teplotě.

vých. látka	X	R ¹	R ²	R ³	R ⁴	poměr TFA/DCM	čas [h]	teplota [°C]	poměr 5a/5b/6 [%] ^a	surová čistota 6 [%] ^a
5(1,1,3,1)	O	O	H	4-CH ₃ O-Ph	4-CH ₃	1:1	2	25	0:89:21	15
						1:1	24	25	0:26:74	50
5(1,1,4,1)	O	O	H	4-NH ₂ -Ph	4-CH ₃	1:1	0,5	25	0:37:63	39
						1:2	0,5	25	0:14:86	56
						2:1	0,5	25	0:33:67	50
						1:1	2	25	0:29:71	49
						1:2	2	25	0:13:87	58
						2:1	2	25	0:22:78	53
						1:1	4	25	0:19:81	52
						1:2	4	25	0:9:91	67
						2:1	4	25	0:16:84	51
						1:1	15	25	0:7:93	56
						1:2	15	25	0:4:96	55
						1:1	24	25	0:0:100	68

						1:2	24	25	0:0:100	44
5(1,3,1,1)	O	O	CH ₃	4-NO ₂ -Ph	4-CH ₃	1:1	0,5	25	67:0:33	28
						1:0	0,5	25	0:16:84	71
						1:1	2	25	44:19:37	31
						1:0	2	25	0:5:95	85
						1:0	2	50	0:0:100	22
						1:1	24	25	0:30:70	54
						1:0	24	25	0:0:100	90
						1:1	72	25	100:0:0	0
5(1,2,3,2)	S	O	H	4-CH ₃ O-Ph	4-CH ₃ O	1:0	0,5	25	0:25:75	58
						1:0	1	25	0:4:96	80
						1:0	2	25	0:1:99	77
						1:0	24	25	0:54:46	22
						1:1	24	25	0:14:86	68
5(4,1,1,1)	O	^b	H	4-NO ₂ -Ph	4-CH ₃	1:1	0,5	25	0:11:89	73
						1:1	2	25	0:15:85	73
						1:1	2	50	0:8:92	67
						3:97	2	25	100:0:0	0
						19:1	2	25	0:26:74	64
						19:1	2	50	0:9:91	50
						1:1	5	50	0:18:82	33
						3:97	24	25	10:24:66	54
						1:1	24	25	0:7:93	75
						1:1	24	50	0:100:0	0
						19:1	24	25	0:30:70	55
						1:1	26	25	0:17:83	75
						1:1	38	25	0:11:89	78

^aHPLC-UV (205 – 400 nm); ^b

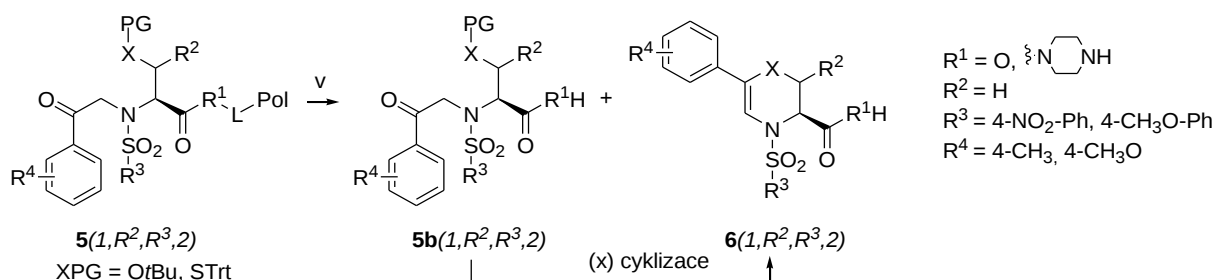
Tabulka 8: Poměr látek **5b**:**6d** v závislosti na délce štěpení v 50% TFA/DCM při 25 °C.

vých. látka	R ⁴	čas [h]	poměr 5b/6d [%] ^a	surová čistota 5d [%] ^a	surová čistota 6d [%] ^a
5(3,1,1,1)	4-CH ₃	0,5	28:72	17	44
		1	22:78	14	49
		2	14:86	8	51
		24	17:83	49	24
5(3,1,1,2)	4-CH ₃ O	0,5	49:51	27	28
		1	24:76	14	44
		2	21:89	13	55
		24	0:100	0	47

^aHPLC-UV (205 – 400 nm).

Protože cyklizace některých intermediátů **5**(*R*¹,*R*²,*R*³,*R*⁴) neprobíhaly kvantitativně (Tabulka 7), byly lineární produkty **5b**(*R*¹,*R*²,*R*³,*R*⁴) podrobeny zpětné cyklizaci za různých podmínek (Schéma 63, Tabulka 9). Uzavření cyklu bylo dosaženo ponecháním směsi **5b**/**5** v čisté TFA při -18 °C, dle předpokladu však jejich stáním v čisté TFA při 25 °C docházelo opět k částečnému otevírání cyklu (Tabulka 9). V případě látky **5b**(1,2,3,2) byla také vyzkoušena cyklizace v DMSO, nicméně žádný z experimentů nevedl k pozitivním výsledkům.

Schéma 63: Štěpení intermediátu **5**(R^1, R^2, R^3, R^4) a následná cyklizace sloučenin **5b**(R^1, R^2, R^3, R^4).



Reagencie: (v) XPG = OtBu: 50% TDA/DCM, 24 h, 25 °C; XPG = STrt: TFA p.a., 24 h, 25 °C; (x) cyklizace (Tabulka 9).

Tabulka 9: Optimalizace reakčních podmínek cyklizace sloučeniny **5b**($1, R^2, R^3, 2$).

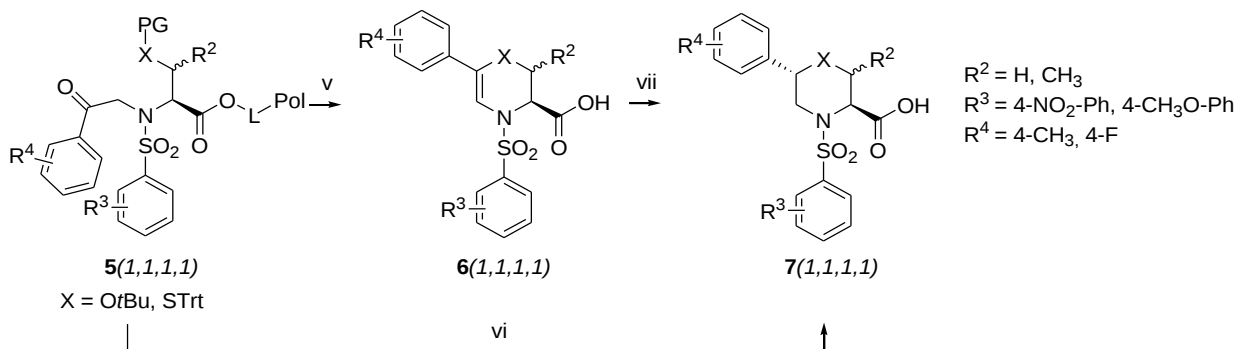
vých. látka	cyklizační činidlo	poměr složek cyklizačního činidla	čas [h]	teplota [°C]	MW [W]	poměr 5b/6 [%] ^a	surová čistota 6 [%] ^a
5b ($1, 1, 1, 2$)	TFA/DCM	1:0	24	25	-	44:56	47
			24	4	-	17:83	73
			210	4	-	35:65	53
			24	-18	-	53:47	43
			48	-18	-	25:75	68
			114	-18	-	39:51	50
			163	-18	-	22:78	76
			276	-18	-	18:82	78
			303	-18	-	16:84	76
5b ($1, 2, 3, 2$)	TFA/DCM	1:1	5 min	25	-	100:0	0
			5 min	25	200	100:0	0
			5 min	120	200	0:0	0
			1	25	-	100:0	0
			1	40	-	100:0	0
			2	40	-	100:0	0
		1:0	2	25	-	100:0	0
			2	50	-	100:0	0
			2	80	-	100:0	0
			24	-18	-	0:100	99
			90	-18	-	0:100	97
			138	-18	-	0:100	98
			251	-18	-	0:100	97
		1:0	1	40	-	100:0	0
			2	80	-	100:0	0
			3	60	-	100:0	0
			19	80	-	0:0	0
	DMSO	1:0	1	40	-	100:0	0
5b ($4, 1, 1, 1$)	TFA/DCM	1:0	24	4	-	24:76	58
			48	4	-	65:35	26
			210	4	-	80:20	11
			24	-18	-	37:63	62
			90	-18	-	24:76	75
			138	-18	-	61:39	38
			251	-18	-	51:49	37

^aHPLC-UV (205 – 400 nm).

4.1.1.4. Problematika cyklizací na nasycené deriváty morfolinu

Syntéza derivátů **7**(1,*R*²,*R*³,*R*⁴) s redukovanou dvojnou vazbou v poloze 5 (Schéma 64, Tabulka 10) byla provedena s použitím štěpící směsi obsahující redukční činidlo TES v poměru TFA/TES/DCM (10:1:9). Později se ukázalo, že cyklizace probíhá s vyšší surovou čistotou (> 86%), pokud je nejdříve provedeno standardní štěpení v 50% TFA v DCM a teprve následně přidán TES. Tato strategie však byla objevena až v závěru práce, proto byla většina cílových látek připravena méně výhodným štěpením s TFA/TES/DCM se surovou čistotou v rozmezí 58 – 75% (Tabulka 13).

Schéma 64: Štěpení intermediátu **5**(1,*R*²,*R*³,*R*⁴) v přítomnosti redukčního činidla TES.



Reagencie: (v) XPG = OtBu: 50% TFA/DCM, 24h, 25 °C; XPG = STrt: TFA p.a., reak. doba (Tabulka 10), 25 °C; (vi) TFA/TES/DCM (10:1:9), reak. doba (Tabulka 10), 25 °C; (vii) TES, reak. doba (Tabulka 10), 25 °C.

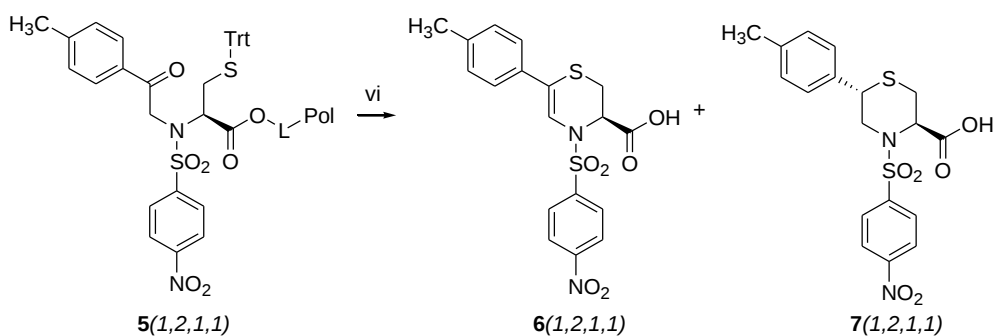
Tabulka 10: Surová čistota finálního produktu **7**(1,1,*R*³,*R*⁴) v závislosti na podmínkách štěpení při 25 °C.

vých. látka	štěpící koktejl	čas [h]	poměr 6/7 [%] ^a	surová čistota 7 [%] ^a
5 (1,1,1,1)	TFA/TES/DCM (10:1:9)	24	0:100	74
	50% TFA/DCM + TES	24 + 0,3	0:100	86
5 (1,1,2,4)	TFA/TES/DCM (10:1:9)	5	0:100	11
	50% TFA/DCM + TES	24 + 0,3	75:25	20
	50% TFA/DCM + TES	24 + 0,5	67:33	31
	50% TFA/DCM + TES	24 + 1	0:100	93

^aHPLC-UV (205 – 400 nm).

Redukce meziproductu **6**(1,2,1,1) neproběhla kvantitativně (Schéma 65), což bylo prokázáno až s pomocí 2D-NMR experimentů, které odhalily přítomnost 35% výchozí látky **6**(1,2,1,1), kterou nebylo možno pomocí semipreparativní HPLC oddělit kvůli totožnému retenčnímu času (1,99 min) s produktem **7**(1,2,1,1).

Schéma 65: Redukce intermediátu **6(1,2,1,1)**.

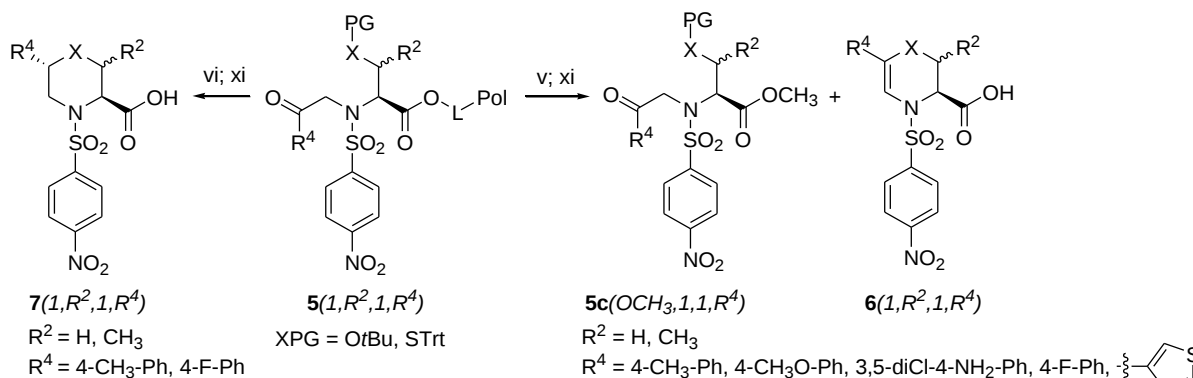


Reagencie: (vi) TFA/TES/DCM (10:1:9), 5 h, 25 °C.

4.1.1.5. Problematika separace

Finální látky **6(1,R²,R³,R⁴)** a **7(1,R²,R³,R⁴)** byly po cyklizaci ve štěpícím koktejlů zbaveny podílů TFA a DCM jejich odfoukáním pod proudem dusíku. Vzniklý odparek byl následně naředěn na vhodný objem methanolem a podroben kontrolní LC-MS analýze, která ukázala značnou nestabilitu produktů **6(1,R²,1,R⁴)**, kromě R⁴ = 4-CH₃ (Schéma 66). Zatímco serinové deriváty **6(1,1,1,R⁴)** byly otevřeny a částečně konvertovány na esterifikované lineární prekurzory **5c(OCH₃,1,1,R⁴)** (Příloha 1 – 2), látky odvozené od cysteinu byly účinkem zbytku TFA v MeOH rozloženy. Tyto nežádoucí jevy byly eliminovány záměnou MeOH za MeCN (Tabulka 11). V případě látek **7(1,R²,1,R⁴)** nemělo použité rozpouštědlo na jejich stabilitu žádný vliv (Schéma 66, Tabulka 12).

Schéma 66: Stabilita finálních látek **6(1,1,1,R⁴)** a **7(1,R²,1,R⁴)** v závislosti na použitém rozpouštědle.



Reagencie: (v) XPG = OtBu: 50% TFA/DCM, 24 h, 25 °C; XPG = STrt: TFA p.a., 24 h, 25 °C.; (vi) TFA/TES/DCM (10:1:9), 5 - 8 h, 25 °C; (xi) MeOH nebo MeCN.

Tabulka 11: Vliv rozpouštědla na stabilitu látek **6(1,R²,1,R⁴)**.

vých. látka	X	R ²	R ⁴	rozpouštědlo	poměr 5c/6 [%] ^a	surová čistota 6 [%] ^a
5(1,1,1,1)	O	H	4-CH ₃ -Ph	MeOH	0:100	82
				MeCN	0:100	80
5(1,1,1,2)	O	H	4-CH ₃ O-Ph	MeOH	63:37	31
				MeCN	0:100	51
5(1,1,1,3)	O	H	3,5-diCl-4-NH ₂ -Ph	MeOH	44:56	45
				MeCN	0:100	72

5(1,1,1,4)	O	H	4-F-Ph	MeOH	10:90	89
				MeCN	0:100	81
5(1,1,1,5)	O	H		MeOH	40:60	33
				MeCN	0:100	38
5(1,2,1,1)	S	H	4-CH ₃ -Ph	MeOH	0:100	90
				MeCN	0:100	91
5(1,2,1,2)	S	H	4-CH ₃ O-Ph	MeOH	0:0	0
				MeCN	0:100	69
5(1,2,1,4)	S	H	4-F-Ph	MeOH	0:0	0
				MeCN	0:100	67
5(1,3,1,1)	O	CH ₃	4-CH ₃ -Ph	MeOH	0:100	60
				MeCN	0:100	59

^aHPLC-UV (205 – 400 nm).

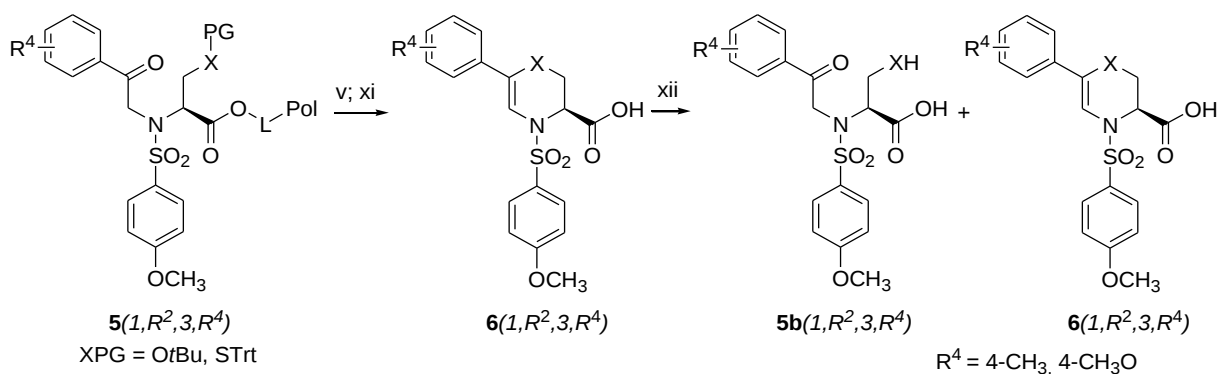
Tabulka 12: Vliv rozpouštědla na stabilitu látek 7(1,R²,1,R⁴).

vých. látka	X	R ²	R ⁴	rozpuštědlo	surová čistota 7 [%] ^a
5(1,1,1,1)	O	H	4-CH ₃ -Ph	MeOH	65
				MeCN	64
5(1,2,1,1)	S	H	4-CH ₃ -Ph	MeOH	64
				MeCN	66
5(1,3,1,1)	O	CH ₃	4-CH ₃ -Ph	MeOH	58
				MeCN	57
5(1,1,1,4)	O	H	4-F-Ph	MeOH	68
				MeCN	75

^aHPLC-UV (205 – 400 nm).

Deriváty **6(1,1,3,1)** a **6(1,2,3,2)** s elektrondonorními skupinami v pozici R³ a R⁴ byly sice v MeCN stabilní, nicméně po nástřiku látek na kolonu došlo nejspíše vlivem kombinace zbytku TFA a systému mobilních fází (MeCN:AmAc) k jejich částečnému otevření na **5b(1,R²,3,R⁴)**. Z tohoto důvodu byly výtěžky žádaných sloučenin výrazně nižší (Schéma 67, Tabulka 13).

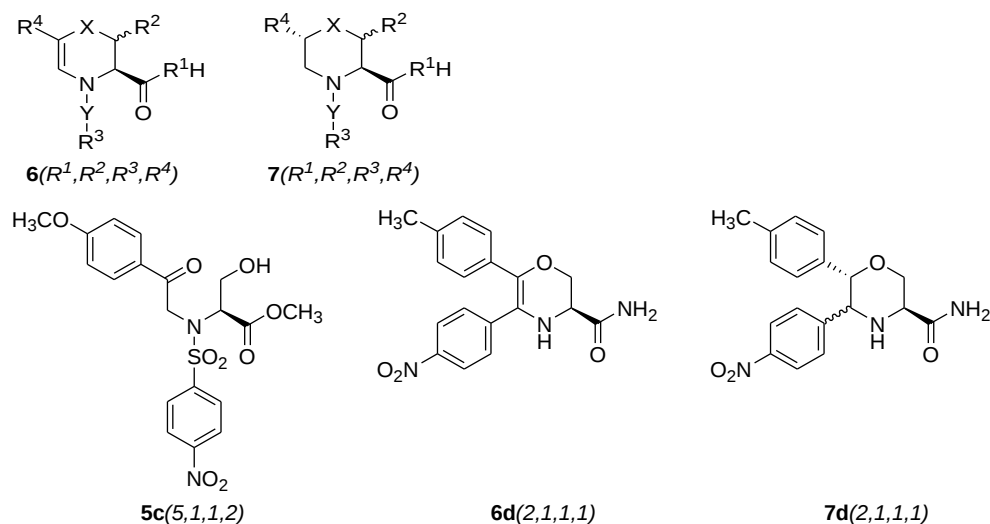
Schéma 67: Vliv mobilní fáze na stabilitu produktů **6(1,1,3,1)** a **6(1,2,3,2)**.



Reagencie: (v) XPG = OtBu: 50% TFA/DCM, 24 h, 25 °C; XPG = STrt: TFA p.a., 24 h, 25 °C; (xi) MeCN; (xii) HPLC purifikace v MeCN/AmAc.

Závěrem je uvedena Tabulka 13 s výčtem všech N-sulfonylovaných derivátů morfolinu/thio-morfolinu a vedlejších produktů, které se podařilo či nepodařilo během práce připravit. Struktura všech izolovaných derivátů byla potvrzena pomocí 1D, 2D-NMR analýzy a HRMS.

Tabulka 13: Přehled finálních N-sulfonylovaných derivátů morfolinu/thiomorfolinu a vedlejších produktů.



slouč.	X	Y	R ¹ H	R ²	R ³	R ⁴	surová čistota [%] ^a	finální čistota [%] ^b	výtěžek [%] ^c
5c(OCH ₃ ,1,1,2)	O	SO ₂	OCH ₃ ^d	H	4-NO ₂ -Ph	4-CH ₃ O-Ph	43	98	68
6(1,1,1,1)	O	SO ₂	OH	H	4-NO ₂ -Ph	4-CH ₃ -Ph	82	99	79
6(1,1,1,2)	O	SO ₂	OH	H	4-NO ₂ -Ph	4-CH ₃ O-Ph	51	97	44
6(1,1,1,3)	O	SO ₂	OH	H	4-NO ₂ -Ph	3,5-diCl-4-NH ₂ -Ph	72	97	92
6(1,1,1,4)	O	SO ₂	OH	H	4-NO ₂ -Ph	4-F-Ph	81	99	51
6(1,1,1,5)	O	SO ₂	OH	H	4-NO ₂ -Ph		38	99	30
6(1,2,1,1)	S	SO ₂	OH	H	4-NO ₂ -Ph	4-CH ₃ -Ph	90	98	83
6(1,2,1,2)	S	SO ₂	OH	H	4-NO ₂ -Ph	4-CH ₃ O-Ph	69	99	70
6(1,3,1,1)	O	SO ₂	OH	CH ₃	4-NO ₂ -Ph	4-CH ₃ -Ph	60	98	41
6(1,1,2,1)	O	SO ₂	OH	H	4-CH ₃ -Ph	4-CH ₃ -Ph	64	99	4 ^e
6(1,1,2,2)	O	SO ₂	OH	H	4-CH ₃ -Ph	4-CH ₃ O-Ph	NP	NP	NP
6(1,1,2,3)	O	SO ₂	OH	H	4-CH ₃ -Ph	3,5-diCl-4-NH ₂ -Ph	72	97	19
6(1,1,2,4)	O	SO ₂	OH	H	4-CH ₃ -Ph	4-F-Ph	73	99	52 ^e
6(1,1,2,6)	O	SO ₂	OH	H	4-CH ₃ -Ph	4-Br-Ph	92	99	44 ^e
6(1,1,3,1)	O	SO ₂	OH	H	4-CH ₃ O-Ph	4-CH ₃ -Ph	56	99	8
6(1,1,3,4)	O	SO ₂	OH	H	4-CH ₃ O-Ph	4-F-Ph	65	98	32
6(1,2,3,2)	S	SO ₂	OH	H	4-CH ₃ O-Ph	4-CH ₃ O-Ph	56	98	9 ^e
6(1,2,3,4)	S	SO ₂	OH	H	4-CH ₃ O-Ph	4-F-Ph	81	99	90
6(1,1,5,1)	O	SO ₂	OH	H	CH ₃	4-CH ₃ -Ph	NP	NP	NP
6(4,1,1,1)	O	SO ₂		H	4-NO ₂ -Ph	4-CH ₃ -Ph	75	99	63
6d(2,1,1,1)	O	-	NH ₂	H	4-NO ₂ -Ph	4-CH ₃ -Ph	51	NI	NI
6d(3,1,1,1)	O	-	NHPr	H	4-NO ₂ -Ph	4-CH ₃ -Ph	51	NI	NI
6d(3,1,1,2)	O	-	NHPr	H	4-NO ₂ -Ph	4-CH ₃ O-Ph	49	NI	NI
7(1,1,1,1)	O	SO ₂	OH	H	4-NO ₂ -Ph	4-CH ₃ -Ph	65	99	97
7(1,2,1,1)	S	SO ₂	OH	H	4-NO ₂ -Ph	4-CH ₃ -Ph	64	99	84
7(1,2,1,4)	S	SO ₂	OH	H	4-NO ₂ -Ph	4-F-Ph	67	98	80
7(1,3,1,1)	O	SO ₂	OH	CH ₃	4-NO ₂ -Ph	4-CH ₃ -Ph	58	99	57
7(1,1,2,4)	O	SO ₂	OH	H	4-CH ₃ -Ph	4-F-Ph	72	97	44 ^e

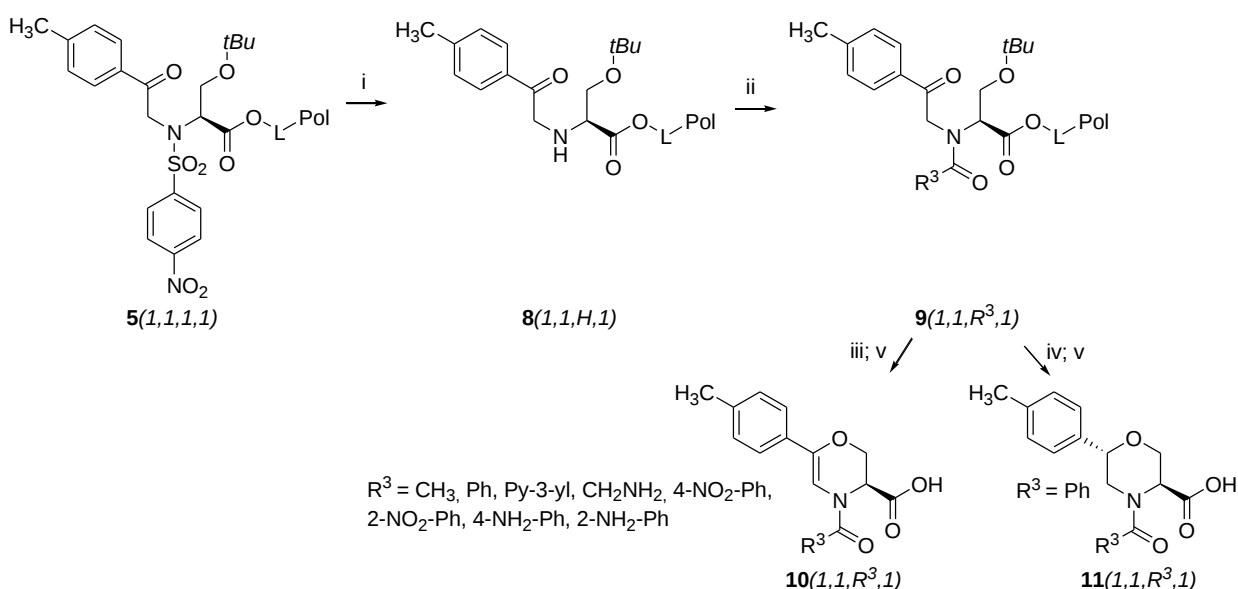
7(1,1,1,4)	O	SO ₂	OH	H	4-NO ₂ -Ph	4-F-Ph	75	98	80
7d(2,1,1,1)	O	-	NH ₂	H	4-NO ₂ -Ph	4-CH ₃ -Ph	42	NI	NI

^aHPLC-UV (205 – 400 nm); ^bHPLC-UV čistota po purifikaci (205 – 400 nm); ^cpočítáno z 1H-NMR; ^dMísto R¹H je OCH₃; ^e1H-NMR znečištěno alifatickým kontaminantem pocházejícím buď z DMSO, či semipreparativní HPLC; NI = Nepodařilo se Izolovat; NP = Nepodařilo se Připravit.

4.1.2. Přístup B: Příprava N-acylovaných derivátů morfolinu

V návaznosti na předchozí popsanou problematiku byla analogicky navržena syntéza acylovaných dihydrooxazinů a morfolinů vycházející z alkylovaného prekursoru **5(1,1,1,1)** připraveného standardním způsobem uvedeným ve Schématu 56 (kapitola 4.1.1.). Výchozí intermediát **5(1,1,1,1)** byl dále podroben denosylaci a následné acylaci alifatickými/aromatickými kyselinami či jejich chloridy (Schéma 68). Štěpení a spontánní cyklizace acylamidů **9(1,1,R³,1)** v 50% TFA/DCM nebo TFA/TES/DCM vedly k cílovým produktům **10(1,1,R³,1)** a **11(1,1,7,1)** s 48 – 73% konverzí (Tabulka 22).

Schéma 68: Obecná syntéza derivátů **10(1,1,R³,1)** a **11(1,1,R³,1)** pomocí přístupu B.

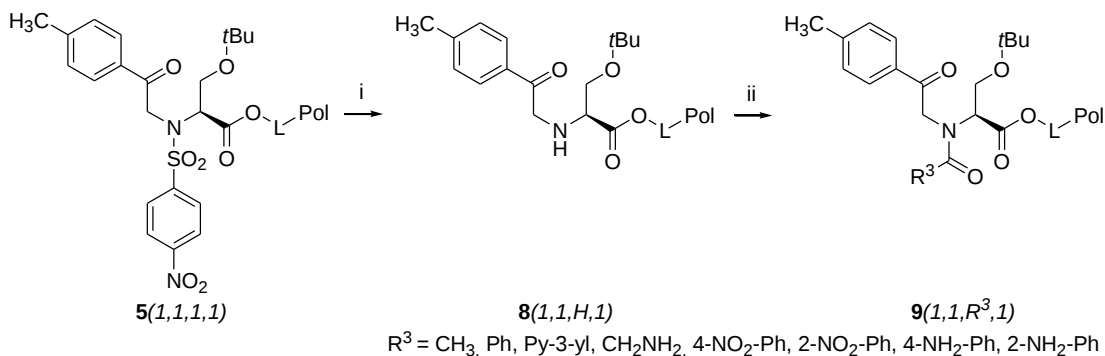


Reagencie: (i) 2-merkaptoethanol, DBU, DMF, 30 min, 25 °C; (ii) kyselina nebo chlorid kyseliny, DIC nebo 2,6-lutidin, DMF nebo DCM, 24 h, 25 °C; (iii) 50% TFA/DCM, 24 h, 25 °C; (iv) TFA/TES/DCM (10:1:9), 7 h, 25 °C; (v) MeOH nebo MeCN.

4.1.2.1. Problematika acylací po denosylaci

Po denosylaci alkylovaného prekursoru **5(1,1,1,1)** byl intermediát **8(1,1,H,1)** ihned acylován příslušnými činidly na žádané produkty **9(1,1,R³,1)** se 73 – 85% konverzí (Schéma 69). Jediným derivátem, který se nepodařilo připravit v dostatečné surové čistotě (pouze 34%), byla látka **9(1,1,9,1)**, neboť acylace Fmoc-glycinem neprobíhala kvantitativně, i přes snahu najít optimální reakční podmínky (Tabulka 14).

Schéma 69: Denosylace a následná acylace látky **8(1,1,H,1)**.



Reagencie: (i) 2-merkptoethanol, DBU, DMF, 30 min, 25 °C; (ii) kyselina nebo chlorid kyseliny, báze (Tabulka 14), rozpouštědlo (Tabulka 14), 24 h, 25 °C.

Tabulka 14: Optimalizace reakčních podmínek acylace látky **8(1,1,H,1)**.

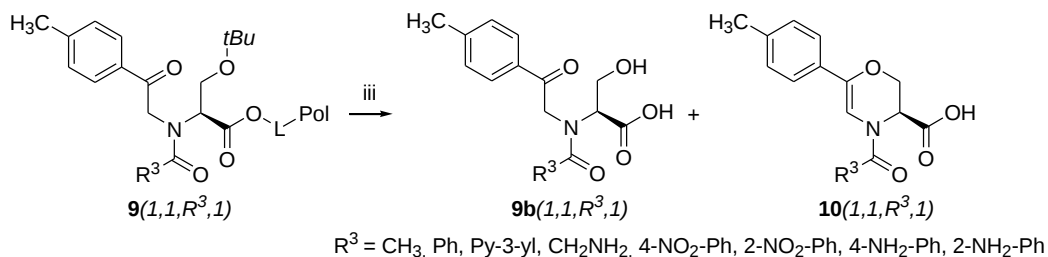
vých. látka	acylační činidlo (R ³)	koncentrace acylačního činidla [mmol]	báze	koncentrace báze [mmol]	rozpouštědlo	surová čistota 9 [%] ^a
8(1,1,H,1)	CH ₃	1,0	DIC	0,6	DMF	78
	Ph	1,0	DIC	0,6	DMF	2
		0,9	2,6-lutidin	0,9	DCM	85
	Py-3-yl	0,9	2,6-lutidin	1,8	DCM	45
		1,0	DIC	0,3	DMF	59
		1,0	DIC, HOBt	0,3	DMF	37
		1,0	DIC	0,6	DMF	76
	CH ₂ NH ₂	1,0	DIC, HOBt	0,6	DMF	57
		1,0	DIC	0,3	DMF	23
		1,0	DIC, HOBt	0,3	DMF	27
		1,0	DIC, HOBt	1,0	DMF	30
	4-NO ₂ -Ph	0,9	2,6-lutidin	0,9	DMF	76
		1,5	2,6-lutidin	0,9	DMF	73
		0,9	2,6-lutidin	1,5	DMF	70
		0,9	2,6-lutidin	3,0	DMF	76
		0,6	DIC	0,3	DMF	61
		0,6	DIC	0,6	DMF	83
		0,3	DIC	0,6	DMF	17
		1,0	DIC	0,6	DMF	81
	2-NO ₂ -Ph	0,6	DIC	1,0	DMF	85
		0,6	DIC	0,3	DMF	54
		0,6	DIC	1,0	DMF	73
		0,6	DIC, HOBt	1,0	DMF	0

^aHPLC-UV (205 – 400 nm).

4.1.2.2. Problematika cyklizací na nenasycené deriváty morfolinu

Podobně jako u sulfonamidů byl průběh cyklizací intermediátů **9(1,1,R³,1)** ovlivněn složením štěpícího koktejlu a délkou štěpení (Schéma 70). Optimalizace byly prováděny na obtížném cyklizujícím substrátu **9(1,1,11,1)**, přičemž jehož téměř kvantitativní cyklizace bylo dosaženo v 50% TFA/DCM po dobu 24 h při 25 °C (Tabulka 15).

Schéma 70: Cyklizace intermediátu **9**(1,1,*R*³,1).



Reagencie: (iii) TFA/DCM, reak. doba (Tabulka 15), 25 °C.

Tabulka 15: Poměr látek **9b**:**10** v závislosti na složení štěpící směsi a reakčním čase.

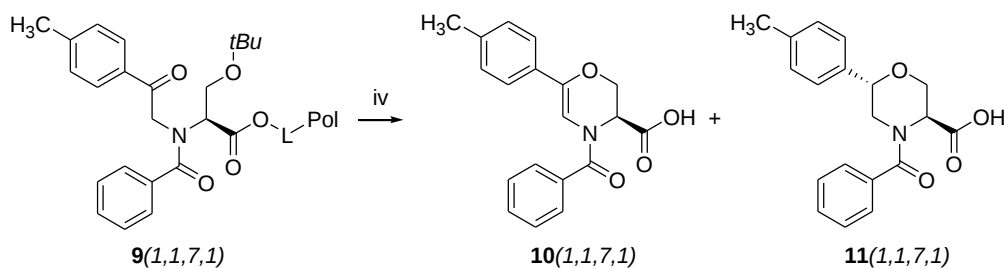
vých. látka	poměr TFA/DCM	čas [h]	poměr 9b/10 [%] ^a	surová čistota 10 [%] ^a
9 (1,1,11,1)	1:1	4	19:81	70
	1:1	24	1:99	73
	1:2	4	18:82	59
	1:2	24	4:96	65
	2:1	4	13:87	52
	2:1	24	6:94	68

^aHPLC-UV (205 – 400 nm).

4.1.2.3. Problematika cyklizací na nasycené deriváty morfolinu

Pro přípravu derivátu **11**(1,1,7,1) s redukovanou dvojnou vazbou v poloze 5 (Schéma 71) bylo využito štěpení látky **9**(1,1,7,1) s redukčním činidlem TES v poměru TFA/TES/DCM (10:1:9) poskytujícího po 7 h žádaný produkt v surové čistotě 70% (Tabulka 16).

Schéma 71: Štěpení intermediátu **9**(1,1,7,1) v přítomnosti redukčního činidla TES.



Reagencie: (iv) TFA/TES/DCM (10:1:9), reak. doba (Tabulka 16), 25 °C.

Tabulka 16: Surová čistota finálního produktu **11**(1,1,7,1) v závislosti na délce štěpení při 25 °C.

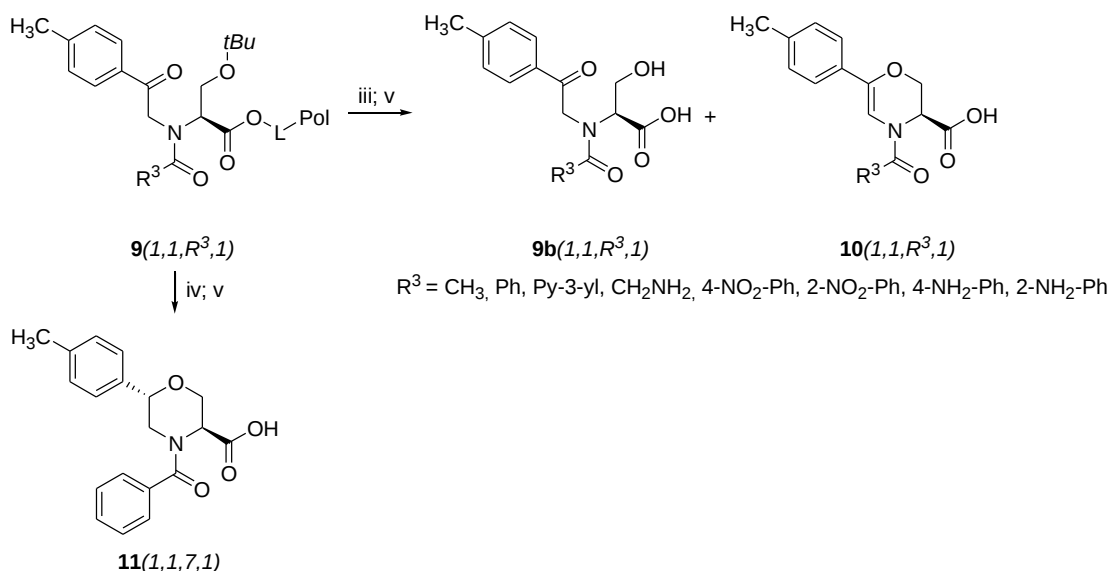
vých. látka	čas [h]	poměr 10/11 [%] ^a	surová čistota 11 [%] ^a
9 (1,1,1,1)	0,5	65:35	28
	2	30:70	52
	4	10:90	68
	7	0:100	70

^aHPLC-UV (205 – 400 nm).

4.1.2.4. Problematika separace

Vzhledem k nestabilitě vybraných sulfonamidů **6**(1, R^2 , R^3 , R^4) a **7**(1, R^2 , R^3 , R^4) v MeOH byla studována také stabilita acylamidů **10**(1,1, R^3 ,1) a **11**(1,1,7,1) v závislosti na použitém rozpouštědle (Schéma 72). Finální látky **10**(1,1, R^3 ,1) a **11**(1,1,7,1) byly zbaveny zbytků TFA a DCM pod proudem dusíku a vzniklý odparek byl naředěn na vhodný objem methanolem či acetonitrilem a podroben kontrolní LC-MS analýze. V případě látek **10**(1,1, R^3 ,1) nemělo použité rozpouštědlo výrazný vliv na jejich stabilitu (Tabulka 17) a pro separaci byl vybrán MeOH. Naopak vhodným rozpouštědlem pro izolaci derivátu **11**(1,1,7,1) byla směs MeOH/MeCN, protože v čistém MeOH či MeCN docházelo po nástřiku látky na kolonu k jejímu rozmývání (Tabulka 18).

Schéma 72: Stabilita finálních látek **10**(1,1, R^3 ,1) a **11**(1,1,7,1) v závislosti na použitém rozpouštědle.



Reagencie: (iii) 50% TFA/DCM, 4 h, 25 °C; (iv) TFA/TES/DCM (10:1:9), 7 h, 25 °C; (v) MeOH nebo MeCN (Tabulka 17 - 18).

Tabulka 17: Vliv rozpouštědla na stabilitu látek **10**(1,1, R^3 ,1) při 25 °C.

vých. látka	rozpouštědlo	poměr 9b/10 [%] ^a	surová čistota 10 [%] ^a
9 (1,1,6,1)	MeOH	0:100	82
	MeCN	12:88	80
9 (1,1,7,1)	MeOH	5:95	82
	MeCN	6:94	80
9 (1,1,8,1)	MeOH	4:96	75
	MeCN	0:100	75
9 (1,1,10,1)	MeOH	5:95	82
	MeCN	5:95	85
9 (1,1,11,1)	MeOH	1:99	73
	MeCN	6:94	69
9 (1,1,12,1)	MeOH	1:99	70
	MeCN	3:97	70

^aHPLC-UV (205 – 400 nm).

Tabulka 18: Vliv rozpouštědla na stabilitu látky **11**(1,1,7,1) při 25 °C.

vých. látka	rozpouštědlo	surová čistota 11 [%] ^a
11 (1,1,7,1)	MeOH	22
	MeCN	29
	MeOH/MeCN	70

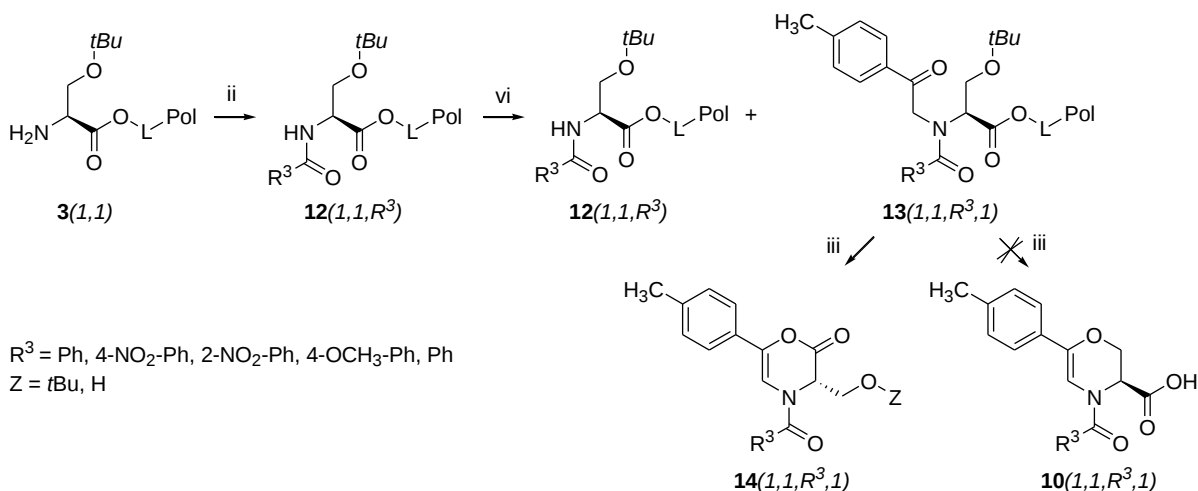
^aHPLC-UV (205 – 400 nm).

Deriváty **10**(1,1,*R*³,1) byly sice v MeOH i MeCN stabilní, nicméně po nástřiku látek na kolonu došlo zřejmě vlivem kombinace zbytku TFA a složení mobilního systému (MeCN:AmAc) k jejich částečnému otevření. Z tohoto důvodu byly výtěžky žádaných sloučenin výrazně nižší (Schéma 72, Tabulka 22).

4.1.2.5. Problematika „přímé“ acylace, následné alkylation a cyklizace na finální produkty **14**(1,1,*R*³,1)

Kromě výše zmíněných *N*-acylací byly na základě podobnosti s „přímými“ sulfonylacemi studovány také tzv. „přímé“ acylace a následná reaktivita acylovaných meziproduktů (Schéma 73). Imobilizovaná a deprotektovaná Fmoc- α -aminokyselina **3**(1,1) byla acylována aromatickými kyselinami či jejich chloridy (Tabulka 19) za následného ověření kvantitativního průběhu reakce pomocí Fmoc-Osu (Tabulka 19). Acylovaný intermediát **12**(1,1,*R*³,1) byl dále alkylován 2-brom-4'-methylacetofenonem v přítomnosti DIEA nebo BTPP (Tabulka 20), přičemž u derivátů s chybějící 2-nitro skupinou (*R*³ = 2-NO₂-Ph) alkylation vůbec neproběhla. V další fázi této problematiky bylo sledováno štěpení, potažmo cyklizace látky **13**(1,1,11,1). Použití standardního štěpícího koktejlu nevedlo k žádanému produktu **10**(1,1,11,1), ale nejspíše k látce **14**(1,1,11,1) s atomem vodíku či *t*Bu-skupinou v poloze *R*⁵ (Tabulka 21). Protože se sloučeninu **14**(1,1,11,1) nepodařilo připravit v dostatečném množství, byla její struktura navržena pouze na základě hmoty z HPLC-MS záznamu.

Schéma 73: Příprava derivátů oxazinu „přímou“ acylací.



Reagencie: (ii) kyselina nebo chlorid kyseliny, báze (Tabulka 19), DMF nebo DCM, 24 h, 25 °C; (vi) 2-brom-4'-methylacetofenon, báze (Tabulka 20), DMF, 24 h, teplota (Tabulka 20); (iii) 50% TFA/DCM, reak. doba (Tabulka 21), 25 °C.

Tabulka 19: Testování podmínek acylace látky 3(1,1) s různými acylačními činidly.

vých. látka	acylační činidlo	báze	surová čistota 12 [%] ^a
3(1,1)	BzOH	DIC	0
	BzCl	2,6-lutidin	95
	4-NO ₂ -Ph-COOH	DIC	94
	2-NO ₂ -Ph-COOH	DIC	88
		DIC, HOBT	23
	4-CH ₃ O-Ph-COOH	DIC	95

^aHPLC-UV (205 – 400 nm).

Tabulka 20: Reakční podmínky alkylatione derivátů 12(1,1,R³).

vých. látka	R ³	báze	teplota [°C]	MW [W]	poměr 12/13 [%] ^a	surová čistota 13 [%] ^a
12(1,1,3)	4-CH ₃ O-Ph	DIEA	25	-	100:0	0
12(1,1,7)	Ph	DIEA	25	-	100:0	0
12(1,1,10)	4-NO ₂ -Ph	DIEA	25	-	100:0	0
12(1,1,11)	2-NO ₂ -Ph	DIEA	25	-	0:100	84
	2-NO ₂ -Ph	DIEA	70	200	0:100	29
	2-NO ₂ -Ph	BTPP	25	-	0:100	41

^aHPLC-UV (205 – 400 nm).

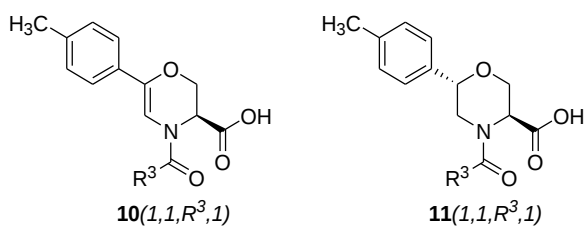
Tabulka 21: Optimalizace podmínek štěpení látky 13(1,1,R³,1) v 50% TFA/DCM.

vých. látka	čas štěpení [h]	poměr 14 Z = tBu/H [%] ^a	surová čistota 14 Z = tBu [%] ^a	surová čistota 14 Z = H [%] ^a
13(1,1,11,1)	10 min	100:0	86	0
	1	71:29	60	24
	2	62:38	45	27
	3	56:44	36	28
	24	0:100	0	9

^aHPLC-UV (205 – 400 nm).

Na závěr kapitoly je uvedena Tabulka 22 s výčtem všech finálních *N*-acylovaných derivátů morfolinu. Struktura izolovaných derivátů byla potvrzena pomocí 1D, 2D-NMR analýzy a HRMS.

Tabulka 22: Přehled finálních *N*-acylovaných derivátů morfolinu.



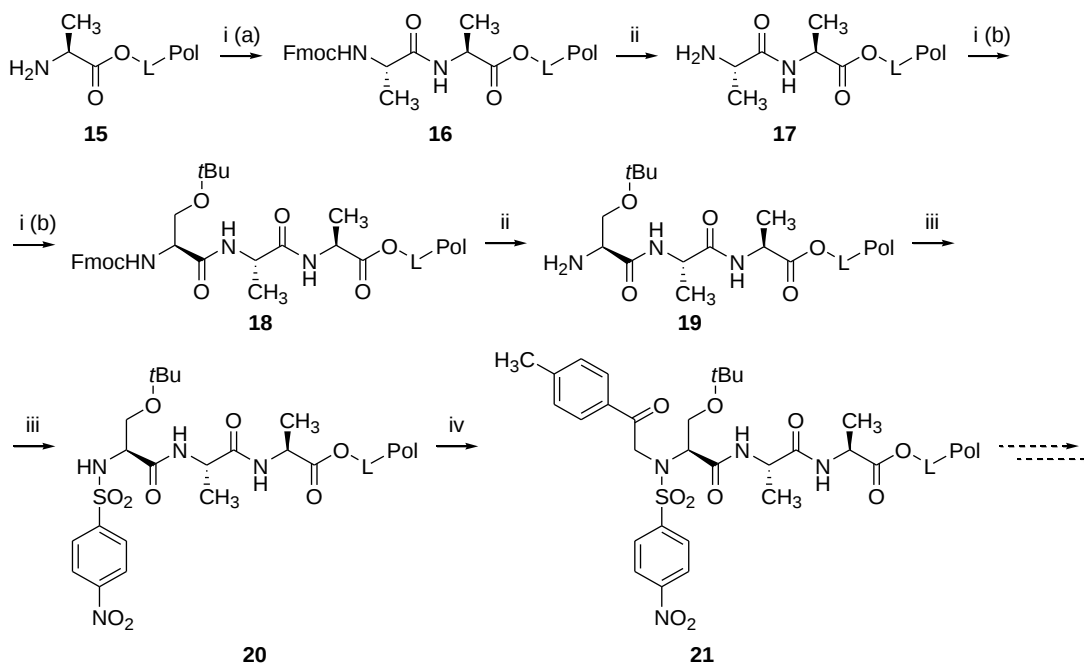
slouč.	X	Y	R ³	surová čistota [%] ^a	finální čistota [%] ^b	výtěžek [%] ^c
10(1,1,6,1)	O	CO	CH ₃	57	98	20
10(1,1,7,1)	O	CO	Ph	54	65	57
10(1,1,8,1)	O	CO	Py-3-yl	48	97	32
10(1,1,9,1)	O	CO	CH ₂ NH ₂	34	NP	NP
10(1,1,10,1)	O	CO	4-NO ₂ -Ph	52	99	51
10(1,1,11,1)	O	CO	2-NO ₂ -Ph	73	98	33
11(1,1,7,1)	O	CO	Ph	70	98	33

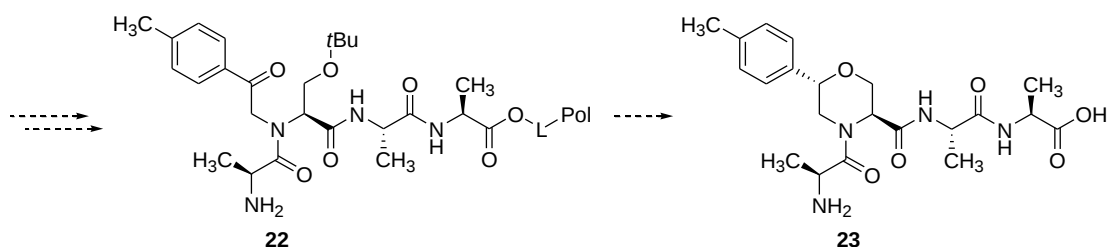
^aHPLC-UV (205 – 400 nm); ^bHPLC-UV čistota po purifikaci (205 – 400 nm); ^cpočítáno z 1H-NMR; NP = Nepodařilo se Připravit v dostatečné surové čistotě.

4.2. Syntéza peptidomimetik a jejich amino-prekurzorů

Vzhledem k popsané biologické aktivitě peptidů obsahujících morfolin-3-karboxylové fragmenty^{13,14} byla výše optimalizovaná syntéza morfolin-*N*-acylamidů testována pro přípravu peptidomimetik. Výchozí sekvence byla započata *N*-acylací imobilizovaného a ochráněného alaninu **15** dalším Fmoc-alaninem. Po deprotektci dipeptidu **16** byla příslušná aminoskupina opět acylována L-serinem, jehož bazická defmokace a následná sulfonylace 4-Nos-Cl vedla k meziproductu **20** s 66% konverzí. Následná alkylace 2-brom-4'-methylacetofenonem v přítomnosti DIEA neproběhla kvantitativně (22% konverze) (Schéma 74), proto bylo od dalších plánovaných reakcí upuštěno a přistoupeno k tzv. „obrácené“ (nepřímé) syntéze peptidomimetik.

Schéma 74: Přímá metoda syntézy peptidomimetik.

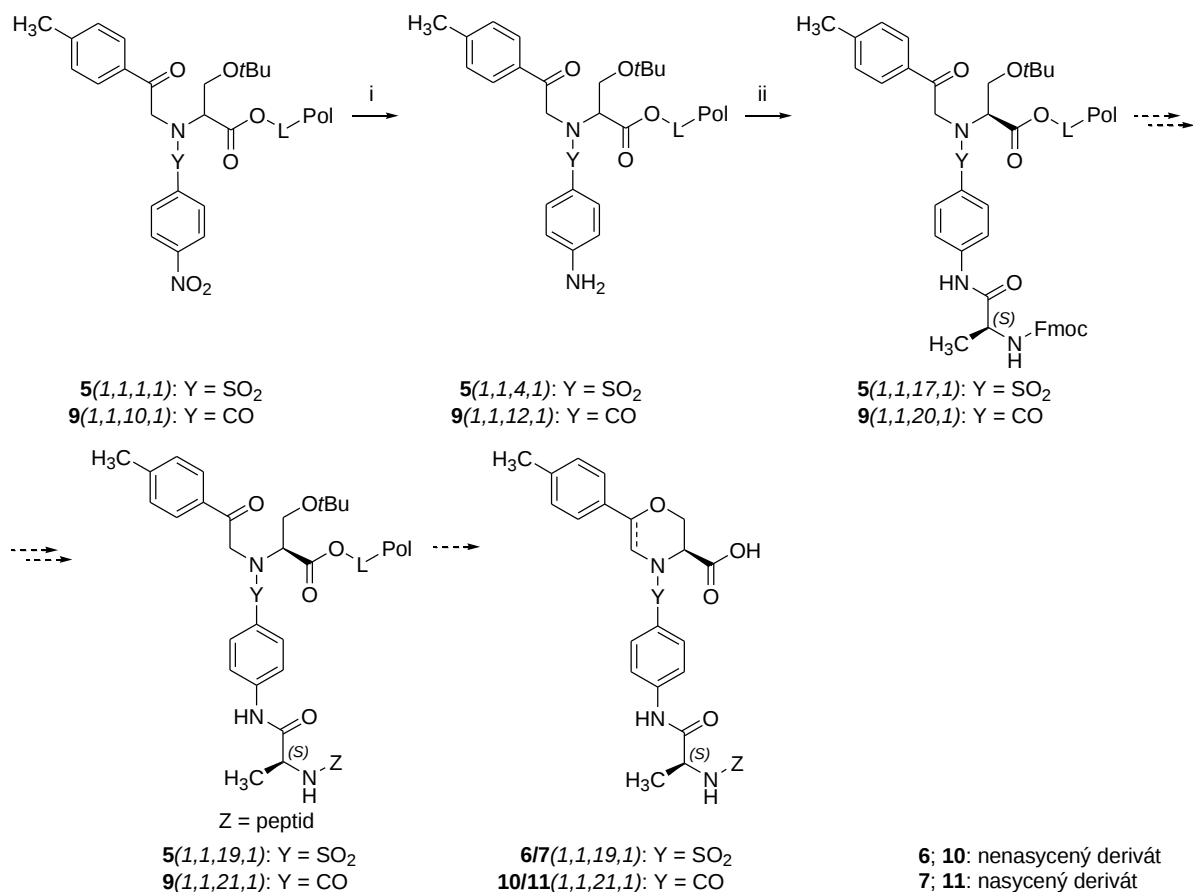




Reagence: (i) (a) *Fmoc-Ala-OH* (a) nebo (b) *Fmoc-Ser-OH*, *HOBT*, *DMAP*, *DIC*, *DMF*, *DCM*, 24 h, 25 °C; (ii) 50% *PIP*/*DMF*, 30 min, 25 °C; (iii) 4-*Nos-Cl*, 2,6-*lutidin*, *DCM*, 24 h, 25 °C; (iv) 2-brom-4'-methylacetofenon, *DIEA*, *DMF*, 24 h, 25 °C.

Nepřímá syntéza peptidomimetik (Schéma 75) byla založena na využití lineárních prekurzorů *N*-sulfonylovaných/*N*-acylovaných derivátů morfolinu a oxazinu **5**(1,1,1,1) a **9**(1,1,10,1) (příprava viz kapitoly 4.1.1.2. a 4.1.2.1.), které měly být následně podrobeny redukcí nitroskupiny na arylu v poloze 4. Takto připravené deriváty **5**(1,1,4,1) a **9**(1,1,12,1) měly být dále acylovány *Fmoc-α*-alaninem za následné výstavby peptidového řetězce a cyklizovány na finální produkty **6**(1,1,19,1) a **10**(1,1,19,1), potažmo **7**(1,1,19,1) a **11**(1,1,19,1) přidávkem redukčního činidla *TES* do štěpícího koktejlu.

Schéma 75: Nepřímá metoda syntézy peptidomimetik.

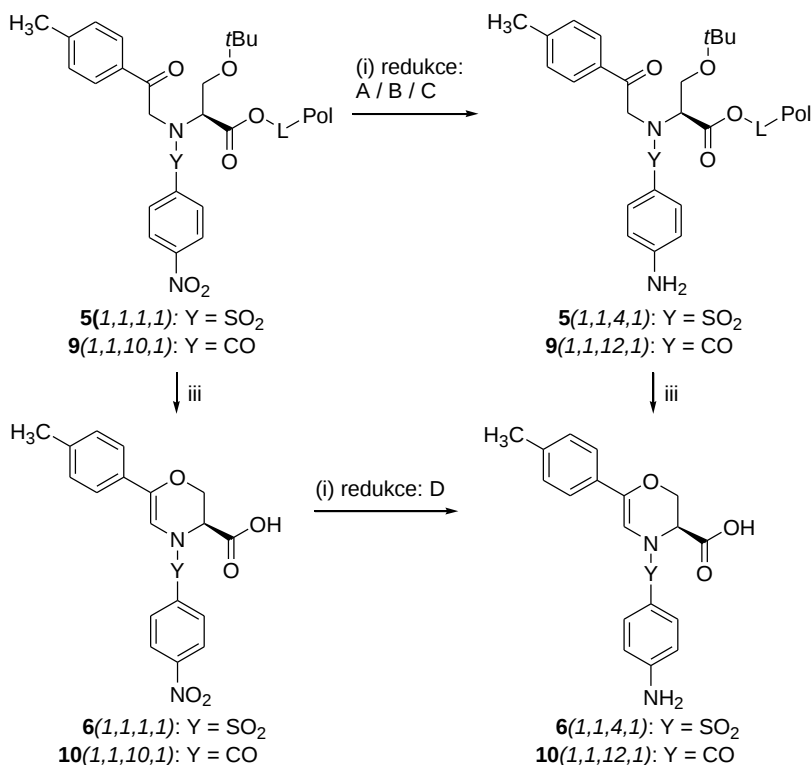


Reagencie: (i) *SnCl₂·2H₂O*, *DIEA*, *DMF*, 24 h, 25 °C; (ii) *Fmoc-Ala-OH*, *HOBT*, *DIC*, *DMF/DCM* (1:1), 24 h, 25 °C.

4.2.1. Problematika redukce nitroskupiny v poloze 4 a testování cyklizace na nenasyčené deriváty morfolinu

Připravený alkylovaný **5(1,1,1,1)** a acylovaný intermediát **9(1,1,10,1)** byly nejdříve podrobeny redukci nitroskupiny v poloze 4 vázané na arylu (Schéma 76). Vzhledem k nekvantitativnímu průběhu redukce s dithioničtanem sodným (metoda A¹¹ a B) bylo přistoupeno k redukci v roztoku (metoda D) probíhající pouze se 45 – 57% konverzí. Za účelem zvýšení surové čistoty redukováných intermediátů byla vyzkoušena metoda C, probíhající opět na substrátech ukotvených na pryskyřici, která vedla po standardním štěpení k žádaným cyklickým produktům **6(1,1,4,1)** a **10(1,1,12,1)** s 71 – 80% konverzí (Tabulka 23).

Schéma 76: Redukce nitroskupiny v poloze 4 a testování cyklizace.



Reagencie: (i) redukce: (A) Na₂S₂O₄·2H₂O, K₂CO₃, TBAHS, DCM/H₂O (1:1), 24 h, 25 °C; (B) Na₂S₂O₄·2H₂O, K₂CO₃, ethyl viologen diiodid, DCM/H₂O (1:1), 24 h, 25 °C; (C) SnCl₂·2H₂O, DIEA, DMF, 24 h, 25 °C; (D) Na₂S₂O₄·2H₂O, K₂CO₃, DMF/H₂O (neutralizace DIEA), reak. doba (Tabulka 23), 25 °C; (iii) 50% TFA/DCM, 24 h, 25 °C.

Tabulka 23: Optimalizace reakčních podmínek redukce nitroskupiny v poloze 4 na arylu látek **5(1,1,1,1)** a **9(1,1,10,1)**.

vých. látka	redukce	čas [h]	surová čistota 6(1,1,4,1) [%] ^a	surová čistota 10(1,1,12,1) [%] ^a
5(1,1,1,1)	A	24	44	-
	B	24	58	-
	C	24	80	-
	D	24	57	-
9(1,1,10,1)	A	24	-	13
	B	24	-	6
	C	24	-	71

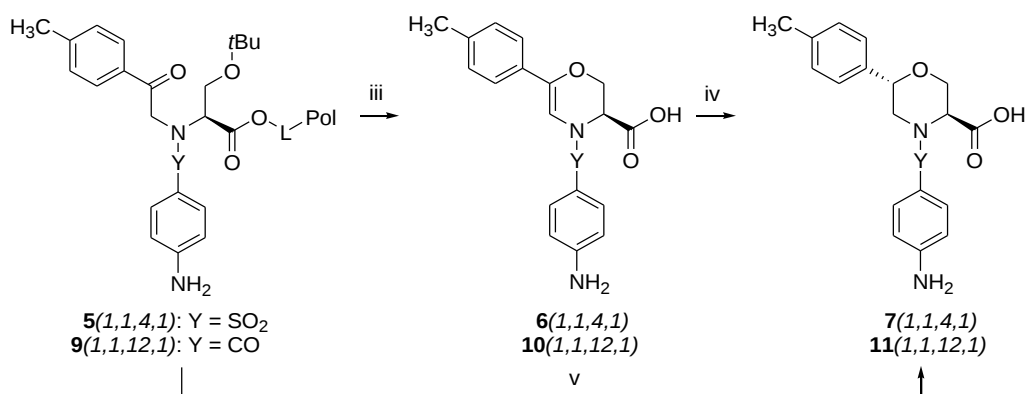
	D	6	-	45
--	---	---	---	----

^aHPLC-UV (205 – 400 nm).

4.2.2. Testování cyklizace prekurzorů s aminoskupinou v poloze 4 na nasycené deriváty morfolinu

Pro přípravu nasycených derivátů **7(1,1,4,1)** a **11(1,1,12,1)** byla primárně zvolena metoda štěpení látek **5(1,1,4,1)** a **9(1,1,12,1)** v přítomnosti redukčního činidla TES (Schéma 77). Protože štěpení v TFA/TES/DCM (10:1:9) neprobíhalo kvantitativně, bylo provedeno standardní štěpení v 50% TFA v DCM s následným přidavkem TES poskytující žádaný produkt **7(1,1,4,1)** a **11(1,1,12,1)** s 68% a 81% konverzí (Tabulka 24).

Schéma 77: Štěpení intermediátů **5(1,1,4,1)** a **9(1,1,12,1)** v přítomnosti redukčního činidla TES.



Reagencie: (iii) 50% TFA/DCM, 24 h, 25 °C; (iv) TFA/TES/DCM (10:1:9), 24 h, 25 °C; (v) TES, 1 h, 25 °C.

Tabulka 24: Optimalizace reakčních podmínek štěpení látek **5(1,1,4,1)**, **6(1,1,4,1)** při 25 °C.

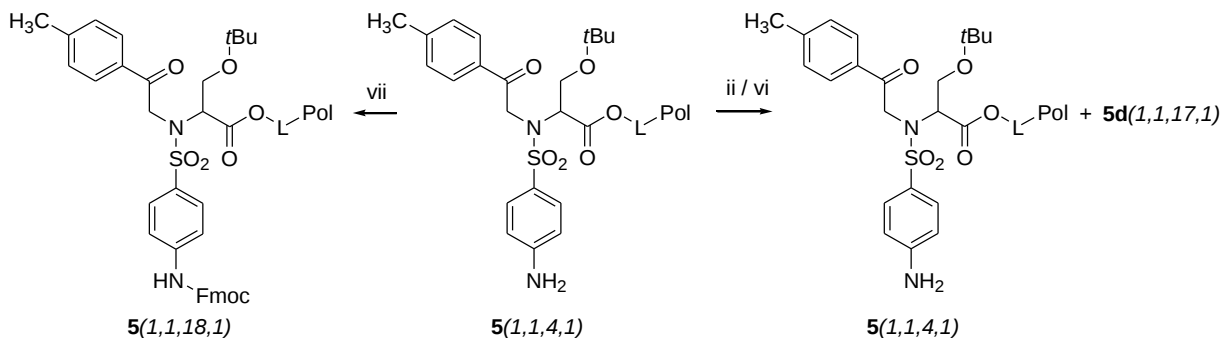
vých. látka	štěpící koktejl / redukční koktejl	čas [h]	poměr 6/7 [%] ^a	surová čistota 7 [%] ^a	poměr 10/11 [%] ^a	surová čistota 11 [%] ^a
5(1,1,4,1)	TFA/TES/DCM (10:1:9)	24	14:86	36	-	-
	50% TFA/DCM + TES	24 + 1	0:100	68	-	-
9(1,1,12,1)	TFA/TES/DCM (10:1:9)	24	-	-	0:100	62
	50% TFA/DCM + TES	24 + 1	-	-	0:100	81

^aHPLC-UV (205 – 400 nm).

4.2.3. Problematika acylací aminoskupiny v poloze 4

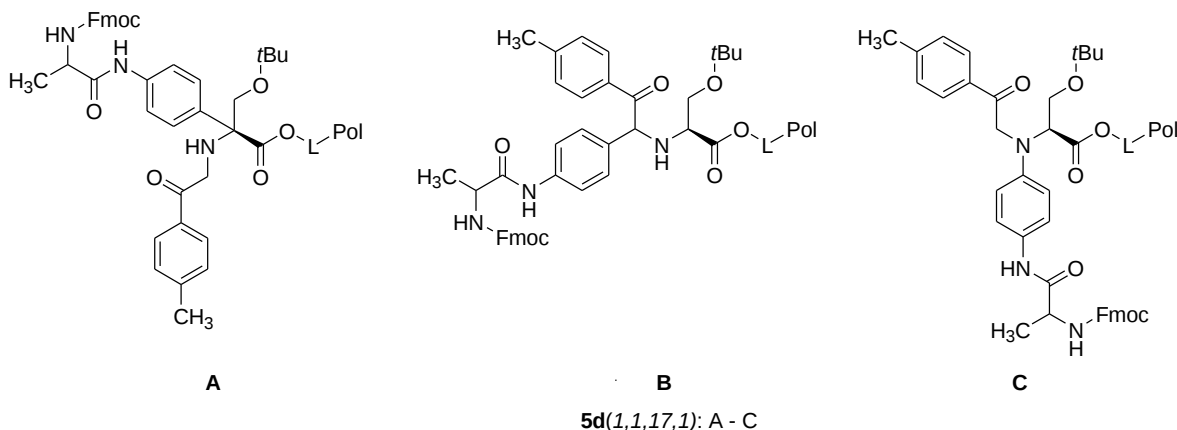
Po acylaci aminoskupiny látky **5(1,1,4,1)** Fmoc-alaninem byla pomocí LC-MS detekována směs výchozí látky **5(1,1,4,1)** a vedlejšího produktu **5d(1,1,17,1)** s předpokládanou strukturou A, B nebo C⁶² (Schéma 78, Obr. 9). Za účelem ověřit vliv podmínek acylace na vznik vedlejšího produktu byla provedena kontrolní acylace s Fmoc-Cl, která proběhla kvantitativně a poskytla pouze žádaný produkt **5(1,1,18,1)** (Tabulka 25).

Schéma 78: Acylace intermediátu **5**(1,1,4,1) Fmoc-alaninem a Fmoc-Cl.



Reagencie: (ii) Fmoc-Ala-OH, HOBt, DIC, DMF/DCM (1:1), 24 h, 25 °C; (vi) Fmoc-Ala-OH, DIC, DMF, 24 h, 25 °C; (vii) Fmoc-Cl, DIEA, DCM, 30 min, 25 °C.

Obr. 9: Předpokládané struktury sloučeniny **5d**(1,1,17,1): A – C.



5d(1,1,17,1): A - C

Tabulka 25: Reakční podmínky acylace aminoskupiny v poloze 4 na arylu látky **5**(1,1,4,1) při 25 °C.

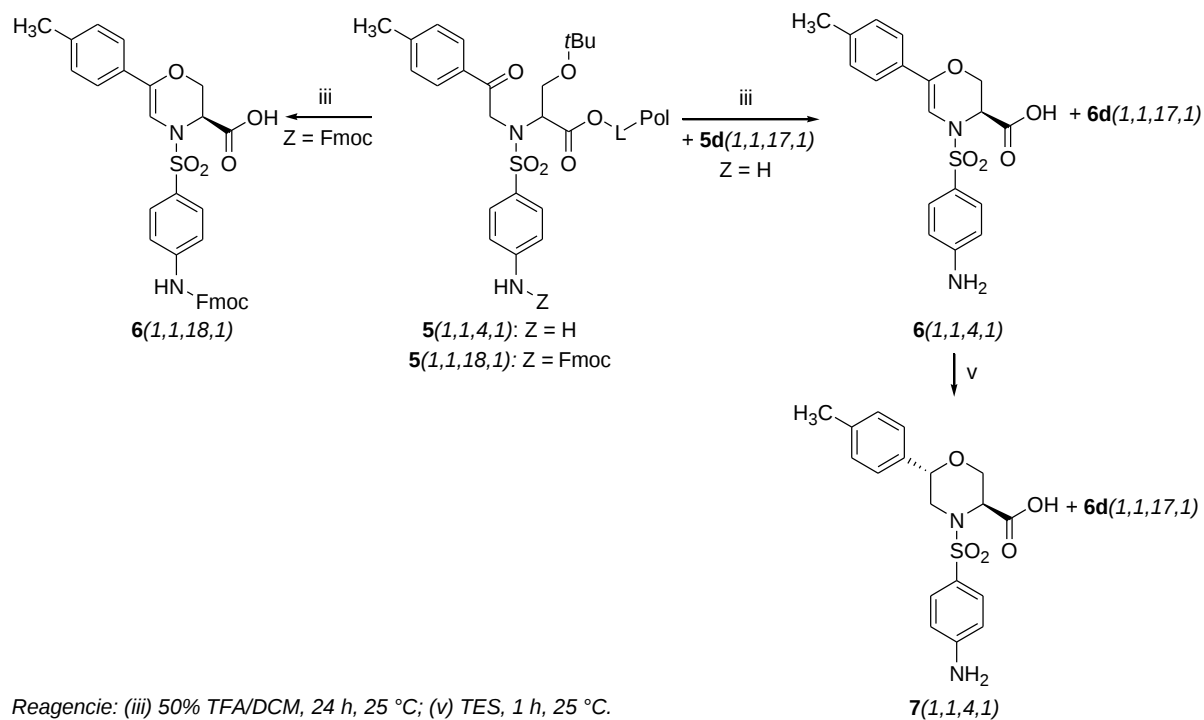
vých. látka	metoda acylace	podmínky acylace	čas [h]	poměr 5/5d [%]	surová čistota 5 [%] ^a	surová čistota 5d [%] ^a
5 (1,1,4,1)	(ii)	Fmoc-Ala-OH, HOBt, DIC, DMF/DCM (1:1)	24	15:85	11	64
	(vi)	Fmoc-Ala-OH, DIC, DMF	24	23:77	10	34
	(vii)	Fmoc-Cl, DIEA, DCM	0,5	100:0	87	-

^aHPLC-UV (205 – 400 nm).

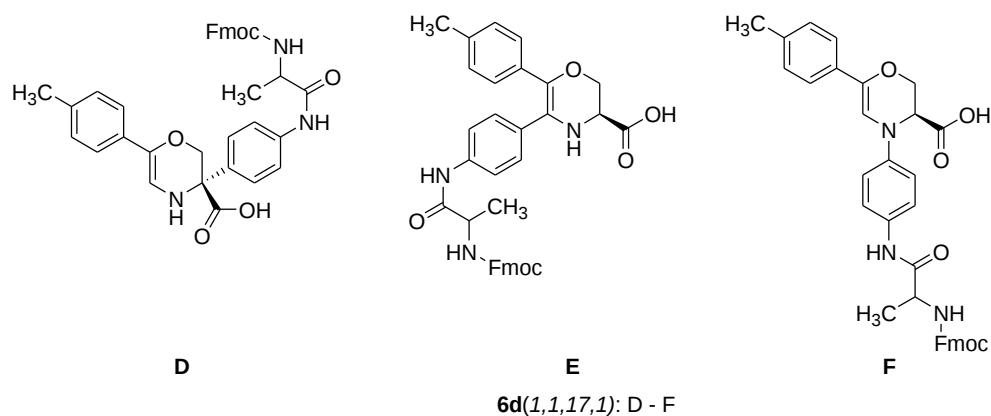
4.2.4. Testování cyklizace acylovaných derivátů na nenasycené a nasycené produkty

Standardní štěpení a spontánní cyklizace acylovaného intermediátu **5**(1,1,18,1) vedly k žádanému produktu **6**(1,1,18,1). Při štěpení směsi acylovaných intermediátů **5**(1,1,4,1) a **5d**(1,1,17,1) v 50% TFA/DCM či 50% TFA/DCM s následným přidavkem TES byly majoritně detekovány vedlejší produkty **6d**(1,1,17,1) (Schéma 79, Obr. 10, Tabulka 26). Vzhledem k nekvantitativnímu průběhu acylací a následných cyklizací bylo od další přípravy derivátů amino-oxazinu/amino-mofolinu s navázaným peptidickým řetězcem upuštěno.

Schéma 79: Štěpení a cyklizace směsi látek **5**(1,1,4,1) a **5d**(1,1,17,1) a látky **5**(1,1,18,1).



Obr. 10: Předpokládané struktury sloučeniny **6d**(1,1,17,1): D – F.



Tabulka 26: Štěpení a cyklizace látky **5**(1,1,R³,1) při 25 °C.

vých. látka	štěpící koktejl / redukční koktejl	čas [h]	surová čistota 6 [%] ^a	surová čistota 6d [%] ^a	surová čistota 7 (1,1,4,1) [%] ^a
5 (1,1,17,1)	50% TFA/DCM	24	11	64	-
	50% TFA/DCM + TES	24 + 1	0	67	11
5 (1,1,18,1)	50% TFA/DCM	24	87	0	-

^aHPLC-UV (205 – 400 nm).

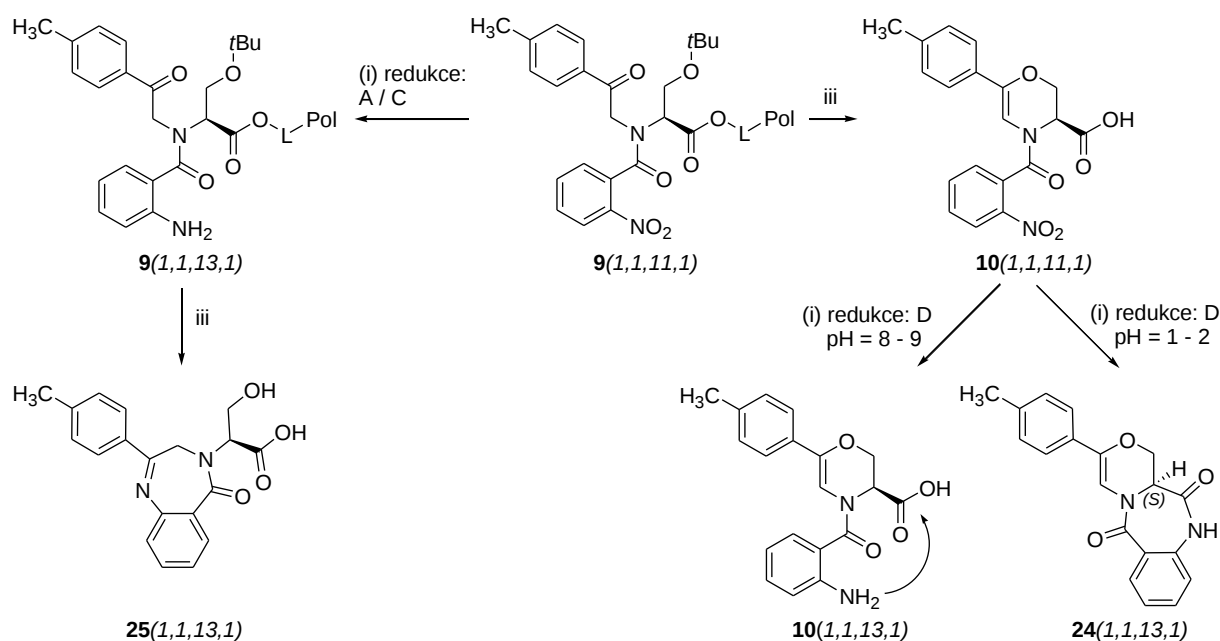
4.2.5. Problematika redukcí nitroskupiny v poloze 2 a testování cyklizace na nenasycené deriváty morfolinu

V další části práce byla studována možnost redukcí nitroskupiny v poloze 2 jakožto modifikací výše popsané metodiky. V rámci tohoto úkolu byly vyzkoušeny dvě metody, kdy redukce intermediátu

9(1,1,11,1) metodou A či C a jeho následné štěpení a cyklizace vedly k benzo[f][1,4]diazepin-5-onu **25(1,1,13,1)**¹¹ připraveného během bakalářské práce. Naopak použití alternativní cesty v roztoku (Schéma 80) spočívající v odštěpení a spontánní cyklizaci látky **9(1,1,11,1)** vedlo k meziprojektu **10(1,1,11,1)**. Tato látka byla dále zbavena štěpící směsi pod proudem dusíku a její odparek, rozpuštěný v DMF, byl následně zneutralizován přídatkem DIEA. V závislosti na pH neutralizace byly detekovány dva odlišné produkty. Redukce při pH 8 – 9 vedla již po 6 h k očekávanému produktu **10(1,1,13,1)**. Při neutralizaci na pH 6 – 7 pravděpodobně docházelo k protonizaci DIEA za vzniku slabé Lewisovy kyseliny a k posunu pH do kyselé oblasti v rozmezí 1 – 2 podporující vznik cyklického benzo[f][1,4]-diazepin-2,5-dionu s přikondenzovaným oxazepinovým kruhem v poloze [c] **24(1,1,11,1)** (Tabulka 27).

Z časových důvodů se již nepodařilo vyzkoušet acylaci 2-aminoskupiny derivátu **9(1,1,13,1)** Fmoc-alaninem.

Schéma 80: Redukce nitroskupiny v poloze 2.



Reagencie: (i) redukce: (A) $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, K_2CO_3 , TBAHS, $\text{DCM}/\text{H}_2\text{O}$ (1:1), 24 h, 25 °C; (C) $\text{SnCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, DIEA, DMF, 24 h, 25 °C; (D) $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, K_2CO_3 , $\text{DMF}/\text{H}_2\text{O}$ (neutralizace DIEA), reak. doba (Tabulka 23), 25 °C; (iii) 50% TFA/DCM, 24 h, 25 °C.

Tabulka 27: Optimalizace reakčních podmínek redukce nitroskupiny v poloze 2 látky **9(1,1,11,1)**.

vých. látka	redukce	čas [h]	pH ¹	pH ²	surová čistota 10 [%] ^a	surová čistota 24 [%] ^a	surová čistota 25 [%] ^a
9(1,1,11,1)	D	6	8 – 9	8 – 9	56	-	-
	D	24	6 – 7	1 – 2	-	38	-
	A	24	-	-	-	-	52
	C	24	-	-	-	-	40 ^b

pH¹ = pH před redukcí; pH² = pH po redukcí; ^aHPLC-UV (205 – 400 nm); ^bpřipraveno během bakalářské práce¹¹.

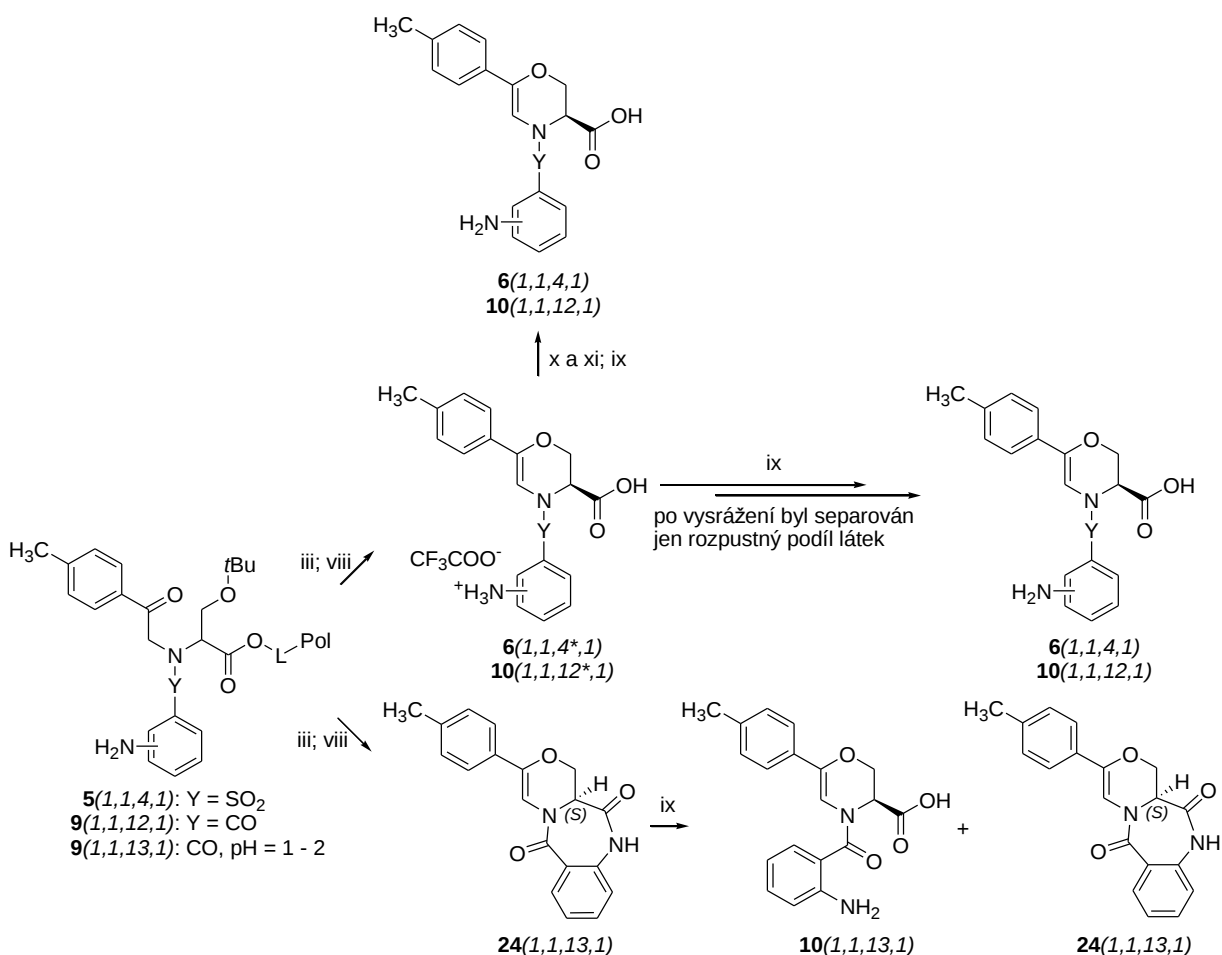
4.2.6. Problematika separace

Cyklické produkty **6(1,1,4,1)** a **10(1,1,12,1)** (Schéma 81) zbavené podílů TFA a DCM odfoukáním pod proudem dusíku byly nejdříve odděleny od cínčitých solí pomocí reverzní fáze C18. Po odpaření elučního rozpouštědla byly naředěny na vhodný objem acetonitrilem nebo methanolem a následně vodou (1:1), což vedlo k vysrážení produktů **6(1,1,4*,1)** a **10(1,1,12*,1)** pravděpodobně ve formě solí. Rozpuštěný podíl látek byl dále podroben kontrolní LC-MS analýze, která již potvrdila stabilitu produktů. Protože bylo potřeba vyhnout se srážení cílových produktů po přidavku rozpouštědla před separací, byla látka **6(1,1,4*,1)** po štěpení, odpaření TFA/DCM a rozpuštění v acetonitrilu zneutralizována přidavkem Et₃N na pH = 8 – 10 a následně přečištěna pomocí reverzní fáze C18 a semipreparativní HPLC, což poskytlo žádaný produkt pouze s 27% výtěžkem.

Látka **24(1,1,13,1)** se při rozpouštění nesrážela, avšak vlivem použité mobilní fáze došlo k jejímu částečnému otevření na derivát **10(1,1,13,1)** (Schéma 81).

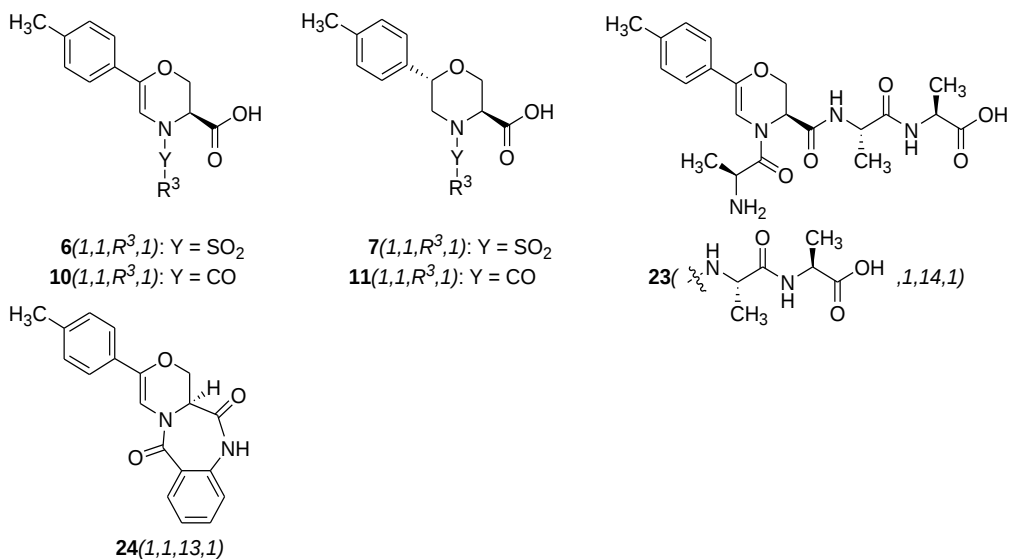
Z výše uvedených důvodů byly finální výtěžky připravených látek výrazně nižší (Tabulka 28).

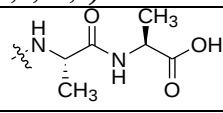
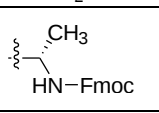
*Schéma 81: Vliv mobilní fáze na stabilitu produktů **6(1,1,4,1)**, **10(1,1,12,1)** a **24(1,1,13,1)**.*



Závěrem kapitoly je uvedena Tabulka 28 s výčtem všech připravených či nepřípravených derivátů morfolinu. Struktura izolovaných látek byla potvrzena pomocí 1D, 2D-NMR analýzy a HRMS.

Tabulka 28: Přehled finálních peptidomimetik a amino-derivátů morfolinu.



slouč.	Y	R ³	surová čistota [%] ^a	finální čistota [%] ^b	výtěžek [%] ^c
6(1,1,4,1)	SO ₂	4-NH ₂ -Ph	44	98	38 ^d
6(1,1,4,1)	SO ₂	4-NH ₂ -Ph	80	98	27 ^e
6(1,1,17,1)	SO ₂		11	NI	NI
6(1,1,18,1)	SO ₂		87	NI	NI
6d(1,1,17,1)	SO ₂		64	NI	NI
7(1,1,4,1)	SO ₂	4-NH ₂ -Ph	68	98	NV
7(1,1,17,1)	SO ₂		NP	NP	NP
10(1,1,12,1)	CO	4-NH ₂ -Ph	71	99	8 ^{d,f}
10(1,1,13,1)	CO	2-NH ₂ -Ph	56	98	NV
11(1,1,12,1)	CO	4-NH ₂ -Ph	81	NI	NI
23( ,1,14,1)	CO		NP	NP	NP
24(1,1,13,1)	CO	2-NH ₂ -Ph	38	95	NV

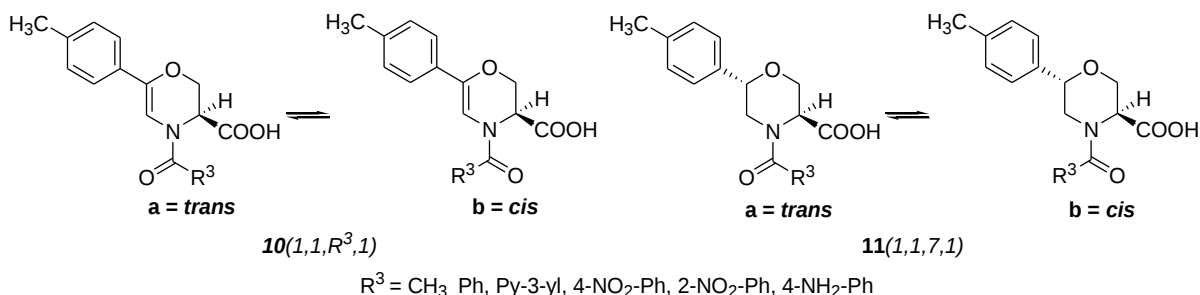
^aHPLC-UV (205 – 400 nm); ^bHPLC-UV čistota po purifikaci (205 – 400 nm); ^cpočítáno z 1H-NMR; ^dseparovány jen rozpustné podíly po vysrážení; ^eseparace v analytickém množství; ^f1H-NMR znečištěno alifatickým kontaminantem pocházejícím buď z DMSO, či semipreparativní HPLC; NI = Nebylo Izolováno; NV = Nízký výtěžek (< 0,5 mg) – struktura nebyla prokázána pomocí NMR experimentů; NP = Nepodařilo se Připravit.

4.3. Rotamerie

Během bakalářské práce byl připraven *N*-acylovaný derivát **10(1,1,11,1)**¹¹, jehož HPLC-MS analýza poukázala na přítomnost dvou píků s různými retenčními časy a stejnou molekulovou hmotou. Následná NMR analýza potvrdila zdvojené signály v protonovém spektru. Tato skutečnost byla vysvětlena tvorbou konformačních izomerů vznikajících rotací kolem C-N amidické vazby¹¹, které byly popsány při přípravě peptidů obsahujících ve své struktuře aminokyselinu prolin (Obr. 4).¹⁵ Přítomnost obou izomerů látky **10(1,1,11,1)** byla prokázána pomocí 1H-NMR experimentů v poměru 55:45 (Tabulka 29). Cílem této práce bylo ověřit, zda k rotamerii dochází také u nově navržených *N*-acylovaných analogů syntetizovaných z alifatických a aromatických kyselin či jejich chloridů (Schéma 68).

Pro snazší orientaci bylo použito označení izomerů jako *cis* (**a**) a *trans* (**b**), které je vztaženo k cyklu O-C6-C5-N4-CH3-2HC2 (Obr. 11). U nasyntetizovaných *N*-acylovaných derivátů (Tabulka 29) byla pomocí 1H-NMR a ROESY prokázána přítomnost rotamerů v různých poměrech v závislosti na teplotě. Při 25 °C byl majoritně detekován výhodnější *trans* izomer. Výjimku tvořil derivát **10(1,1,8,1)** s převládajícím *cis* uspořádáním při této teplotě. Z Tabulky 29 je patrné, že zahřívání látky **10(1,1,8,1)** nevedlo ke změně poměru izomerů pozorované například u derivátu **10(1,1,11,1)**, kdy došlo k protočení kolem C-N amidické vazby a tedy ke změně konformace.

Obr. 11: Diskutované konformační izomery.



Tabulka 29: Poměr zastoupení konformačních izomerů **a:b** při dané teplotě určen z 1H-NMR a ROESY.

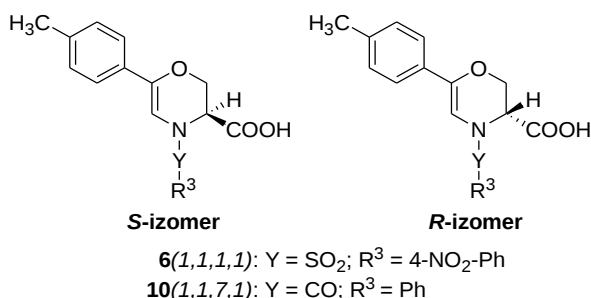
slouč.	R ³	teplota [°C] ^a	poměr a/b [%] ^a	výtěžek [%] ^a
10(1,1,6,1)	CH ₃	25	67:33	20
10(1,1,7,1)	Ph	25	66:34	57
10(1,1,8,1)	Py-3-yl	25	42:58	32
		50	42:58	
		75	42:58	
		100	42:58	
10(1,1,10,1)	4-NO ₂ -Ph	25	60:40	51
10(1,1,11,1)	2-NO ₂ -Ph	25	55:45	33
		50	44:56	
11(1,1,7,1)	Ph	25	54:46	33

^a1H-NMR, ROESY.

4.4. Studium konfigurace na chirálních centrech

Závěr práce byl zaměřen na studium konfigurace chirálního centra C3 modelových látek **6(1,1,1,1)** a **10(1,1,7,1)** s využitím superkritické fluidní chromatografie (SFC). Pro tento účel byly nejdříve připraveny odpovídající standardy z ekvimolární směsi L-/D-serinu a standard použitého Fmoc-serinu pro ověření racemické čistoty dané aminokyseliny a vyloučení možnosti částečné racemizace výchozí látky. Připravené standardy byly následně porovnávány s nasyntetizovanými sloučeninami (Schéma 56, Schéma 68). Výsledky jednoznačně prokázaly, že navržená metodika na pevné fázi vedoucí k derivátům morfolin/thiomorfolin-3-karboxylových kyselin není zcela enantioselektivní. Při esterifikaci Wangovy pryskyřice pravděpodobně dochází z menší části ke změně konfigurace na stereocentru, proto byl pomocí SFC detekován minoritní R-izomer s 4 – 5% konverzí (Tabulka 30; Obr. 12 – 15). Dle údajů v Tabulce 30 předpokládáme konfigurační analogii u všech připravených látek.

Obr. 12: R-/S-izomer látek **6(1,1,1,1)** a **10(1,1,7,1)**.

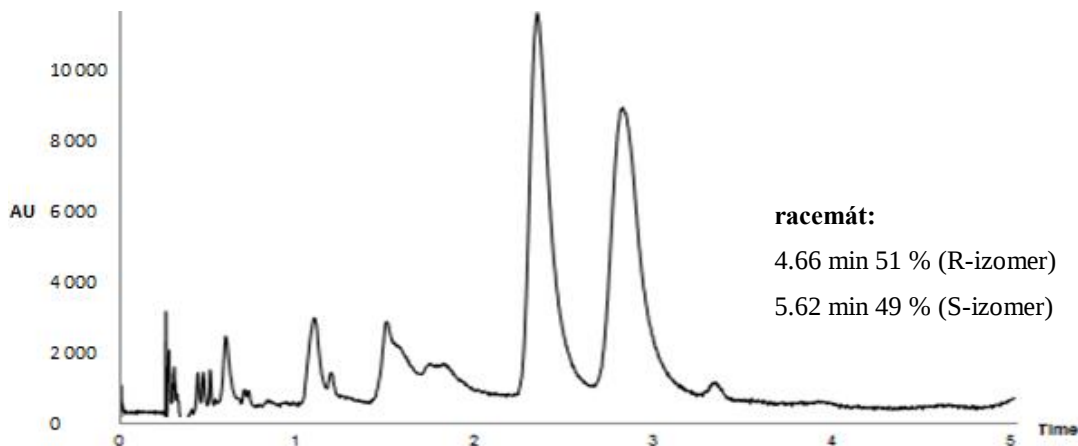


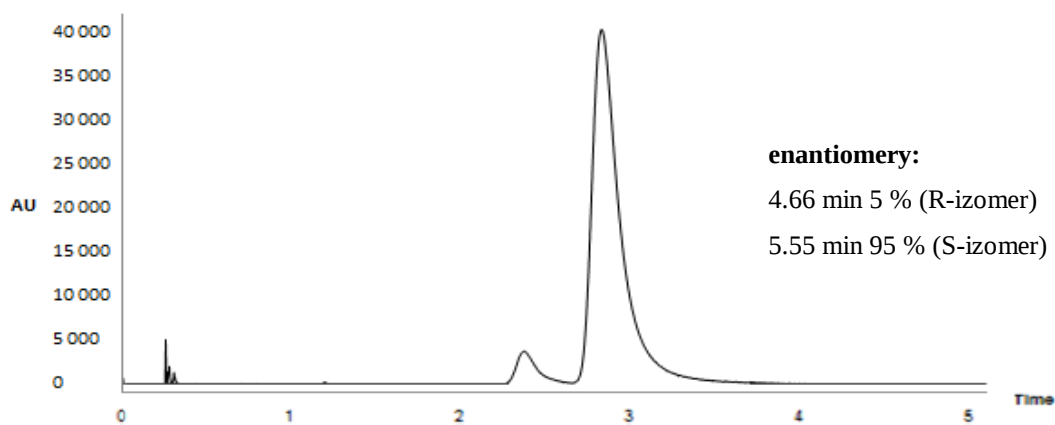
Tabulka 30: Enantiomerní čistota R-/S-izomerů sloučenin **6(1,1,1,1)**, **10(1,1,7,1)** a L-Fmoc-serinu.

slouč.	Y	R ³	enantiomerní čistota [%] ^b	
			S-izomer	R-izomer
6(1,1,1,1)	SO ₂	4-NO ₂ -Ph	95	5
10(1,1,7,1)	CO	Ph	96	4
Fmoc-Ser(tBu)-OH			100	0

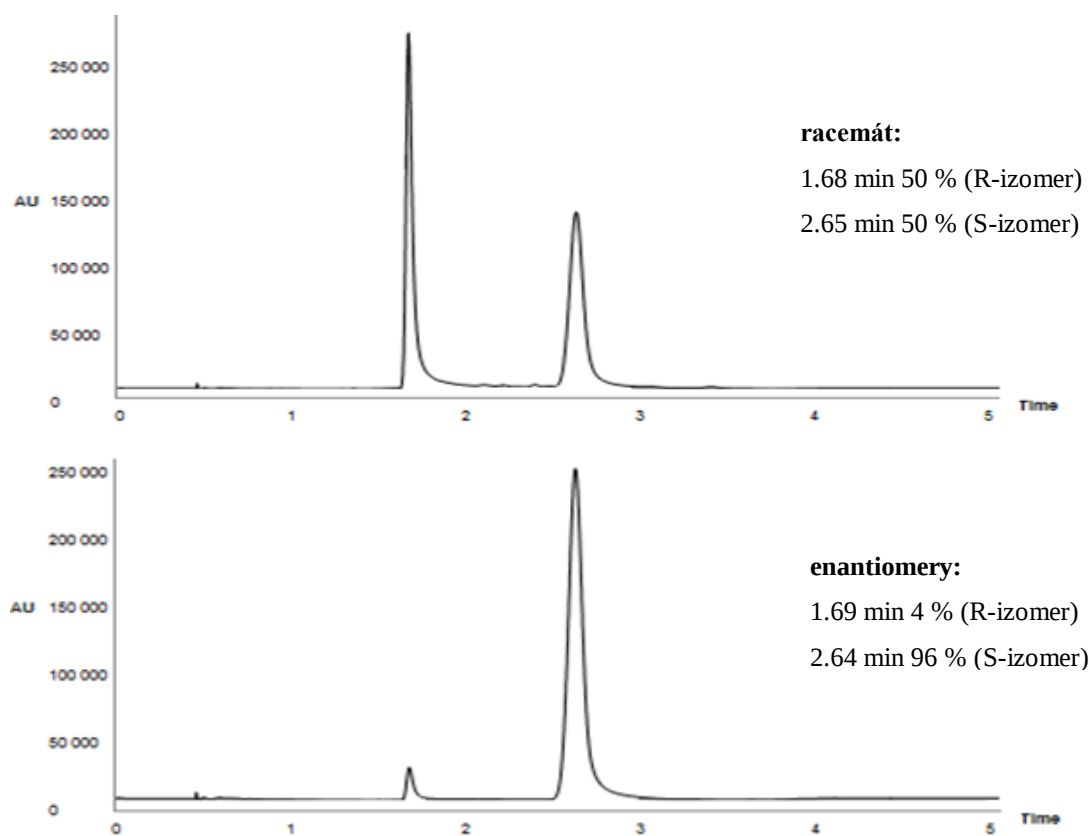
^aHPLC-UV (205 – 400 nm); ^bUV detekce (260 nm).

Obr. 13: Chirální separace racemátu a finální látky **6(1,1,1,1)**.

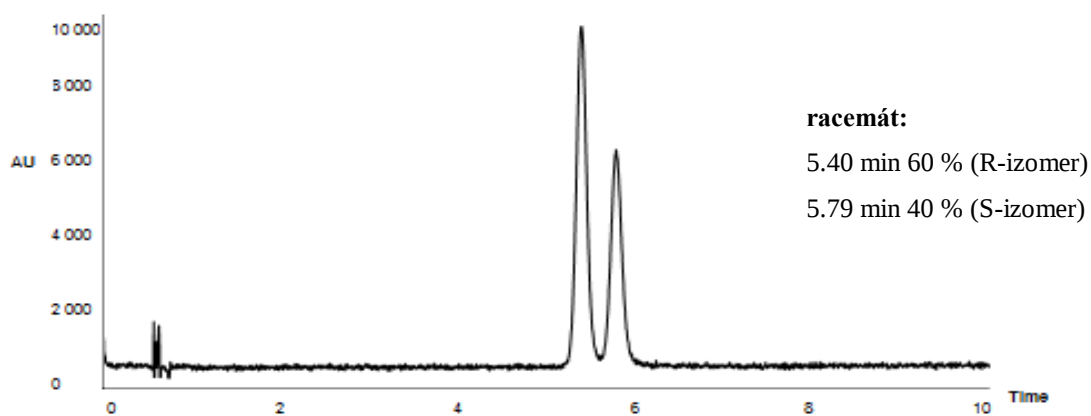


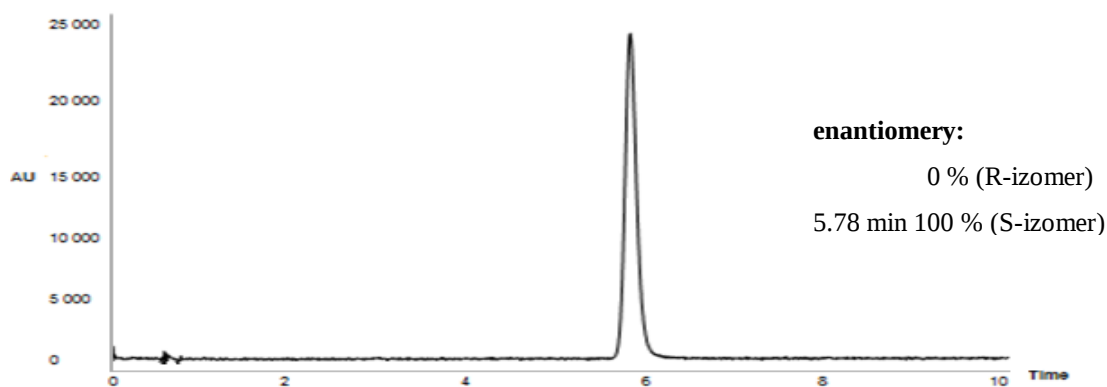


Obr. 14: Chirální separace racemátu a finální látky **10**(1,1,7,1).



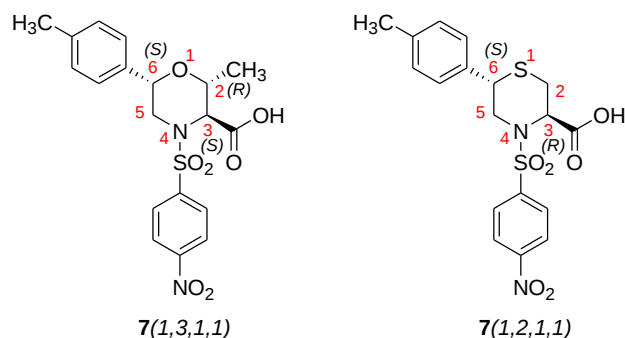
Obr. 15: Chirální separace racemátu a α -Fmoc-serinu.





Na základě výše uvedených informací je zřejmé, že konfigurace chirálního centra C3 zůstává zachována. S jejím použitím jako referenčního bodu byla následně pomocí 2D-NMR experimentů (ROESY a NOESY) určena absolutní konfigurace center C2 a C6 sloučeniny **7(1,3,1,1)** jako 2*R*, 3*S*, 6*S*. Pro deriváty cysteinu byla konfigurace dvou chirálních center stanovena jako 3*R*, 6*S* (Obr. 16). Znalostí konfigurace všech chirálních center modelových látek bylo využito pro znázornění struktur ostatních nasyntetizovaných derivátů morfolinu/thiomorfolinu-3-karboxylových kyselin, u nichž opět předpokládáme analogii.

Obr. 16: Konfigurace na chirálních centrech C2, C3 a C6 pro modelovou sloučeninu **7(1,3,1,1)** a cysteinový derivát **7(1,2,1,1)**.



5. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

5.1. Pomůcky, chemikálie a přístrojové vybavení

Syntéza derivátů morfolin/thiomorfolin-3-karboxylových kyselin byla provedena v injekčních stříkačkách s polypropylenovou fritou bránící vymývání pryskyřice. Pro reakce probíhající při 25 °C byly využity laboratorní třepačky či kónické reakční nádoby s magnetickým míchadlem. Pro práci za vyšších teplot byly použity baňky s kulatým dnem a magnetickým míchadlem, či tlustostěnné zkumavky s teflonovým míchadlem vhodné do mikrovlnného reaktoru. Jako rozpouštědla byly využity DCM, DMF, THF, DMSO, TFA, MeCN, MeOH, EtOH, hexan a vodný roztok AmAc (0,1 mmol/l) o pH 5,01. Uvedené chemikálie byly dodány firmou Sigma-Aldrich. Meziprodukty a produkty byly analyzovány pomocí HPLC-MS a data byla vyhodnocena pomocí softwaru MassLynx.

5.1.1. Acquility HPLC-MS (Waters)

Vzorky byly analyzovány na HPLC-MS složeného z hmotnostního spektrometru s jednoduchým kvadrupólem a PDA detektorem na koloně X-Select (HSS T3; 2,5 mikronů) při teplotě 30 °C s průtokovou rychlostí 600 µl/min. Nástřik vzorku 5,0 µl. Mobilní fáze 0,1 % AmAc ve H₂O/MeCN s lineárním gradientem z 20 % na 80 % MeCN po dobu 2,5 min, udržovaný po dobu 1,5 min a na ekvilibraci kolony 20% MeCN po dobu 1 min. Zdroj APCI byl nastaven na vybíjecí proud 5 µA, odpařovací teplotu 350 °C a teplotu kapiláry 200 °C.

5.1.2. Semipreparativní HPLC Breeze Waters

Finální látky **5c**, **6**, **6d**, **7**, **10**, **11** a **24** byly přečištěny na základě specifických absorbancí v UV-VIS oblasti na koloně YMC (YMC Pack ODS-A, 5µm, 100x20 mm) s průtokovou rychlost 20 ml/min. Mobilní fáze 0,1 % AmAc v H₂O/MeCN.

5.1.3. Lyofylizátor ScanVac Coolsafe 110-4

Zbytková rozpouštědla (H₂O, DMSO, DMF) byla odstraněna pomocí lyofylizace při -110 °C.

5.1.4. Mikrovlnný reaktor Discover (CEM)

Vybrané reakce byly prováděny v mikrovlnném reaktoru po dobu 5 min – 24 h při 25 – 120 °C s výkonem 200 W.

5.1.5. Parametry NMR

¹H a ¹³C spektra byla změřena na přístroji JEOL (400 – 500 MHz) při 25 °C – 100 °C v roztoku DMSO-*d*₆ (600 µl) jako referenčního standardu. Chemický posun δ byl uveden v ppm a integrační konstanty v Hz. Změřená spektra byla vyhodnocena pomocí softwaru ACDLABS (1D NMR Processor) a Jeol. Acetátové soli vykazují singlet v rozmezí 1.70 – 1.90 ppm v ¹H-NMR a dvě rezonance při 23.0 a 173.0 ppm v ¹³C-NMR. Alifatický kontaminant vykazuje triplet v intervalu 1.23 – 1.24 ppm, singlet

2.54 ppm a kvartet v rozmezí 2.68 – 2.70 ppm v ^1H -NMR a tři rezonance v intervalu 14.3 – 14.8, 31.7 – 32.5 a 40.4 – 40.9 ppm v ^{13}C -NMR.

5.1.6. Chirální separace

Pomocí superkritické fluidní chromatografie (SFC) byla určena enantiomerní čistota látek **6**(1,1,1,1), **10**(1,1,7,1) a α -Fmoc-serinu. SFC byla provedena na koloně Chiralpak IA-3 (3 μm , 4,6 mm x 100 mm) s průtokem 2,2 ml/min, teplotou kolony 38 °C a ABPR 2000 psi (13 790 kPa). Vzorek **6**(1,1,1,1) byl rozpuštěn v 1 ml EtOH a 300 μl MeCN a vzorky **10**(1,1,7,1) a α -Fmoc-serinu byly rozpuštěny ve 400 μl EtOH, 200 μl hexanu a 400 μl MeCN. Mobilní fáze pro separaci látek **6**(1,1,1,1) a **12**(1,1,7,1) byl 80% kapalný CO_2 s 20% MeOH a pro separaci α -Fmoc-serinu 93% kapalný CO_2 a 7% MeOH s 0,1% TFA, 0,1% DEA a 1% H_2O . UV detekce při 300 nm. Pro všechna měření bylo provedeno ověření retenčních časů a chirální separace nástřikem racemátu.

5.1.7. HRMS

Analýza HRMS byla provedena pomocí LC-MS s vysokým rozlišením Orbitrap hmotnostního spektrometru (Dionex Ultimate 3000, Thermo Exactive plus, MA, USA) s kladným módem v rozmezí m/z 100 – 1000. Ionizace elektrosprejem s teplotou 150 °C a zdroj napětí 3,6 kV. Interní kalibrace získaných dat pomocí ftalátu v methanolu (m/z 297,15909). Vzorky po HPLC separaci byly zředěny na konečnou koncentraci 0,1 mg/ml v methanolu a nastříknuty do hmotnostního spektrometru přes autosampler skládajícího se z předkolony (Phenomenex 2.6 μm C18). Mobilní fáze MeCN/IPA/0,01M AmAc (80:10:10) s průtokem 0,3 ml/min.

5.2. Experimentální syntéza derivátů morfolinu/thiomorfolinu

5.2.1. Příprava kyselého labilního linkeru

5.2.1.1. Aminomethylová pryskyřice s BAL (backbone amide linker)

Hydrochlorid aminomethylové pryskyřice (AM; 0,98 mmol/g; 1 g) byl aktivován roztokem DIEA v DMF (10 ml; 10%) po dobu 30 min (25 °C). Po promytí polymeru 3 $\times$ v DMF a v DCM byl k pryskyřici přidán roztok připravený rozpuštěním 4-(4-formyl-3-methoxyphenoxy)butanové kyseliny (2 mmol; 476 mg) a HOBt (2 mmol; 306 mg) v DMF (5 ml) za přídavku DIC (3,6 mmol; 557 μl) a DCM (5 ml). Reakční směs byla třepána 24 h (25 °C) a poté byla naacylovaná pryskyřice promyta 3 $\times$ v DMF a DCM a vysušena pod proudem dusíku za následného kvalitativního zhodnocení průběhu reakce odběrem malého množství polymeru (1 mg) smíchaného s roztokem bromfenolové modře (BB) v DCM (0,5 ml). Přítomnost zelenožlutého zbarvení potvrdila absenci volné aminoskupiny.

AM pryskyřice (1 g) s navázaným linkerem byla 3 $\times$ promyta bezvodým THF a bezvodým DMF za následného přídavku roztoku propylaminu (4 mmol; 329 μl) ve směsi kyseliny octové a bezvodého DMF (10 ml; 10%). Po 20 h (25 °C) byl k reakční směsi přidán roztok triacetoxyborohydridu sodného

(1,25 mmol; 317 mg) v roztoku s kyselinou octovou v bezvodém DMF (10 ml; 10%). Reakční stříkačka byla umístěna do svislé polohy a propíchnuta těsně pod pístem, což mělo za následek odvod vznikajícího vodíku. Po 1 h třepání (25 °C) byl přidán pevný triacetoxyborohydrid (1,25 mmol; 317 mg). Tento krok byl po následující hodině zopakován, přičemž reakční směs byla třepána další 2 h (25 °C). Po ukončení reakce byla pryskyřice promyta 3× v DMF, neutralizována roztokem PIP v DMF (10 ml; 20%) po dobu 30 min (25 °C) a opět promyta 3× v DMF a DCM. Odebraný vzorek (30 mg) byl derivatizován pomocí Fmoc-OSu (kapitola 5.2.2.), poté promyt 3× v MeOH, vysušen pod proudem dusíku a kvantifikován (kapitola 5.2.5.). Loading pryskyřice po reduktivní aminaci činil 0,52 mmol/g.

5.2.1.2. Rink amidový linker

Rinkova pryskyřice (0,6 mmol/g; 1 g) promytá 3× v DCM a DMF byla aktivována roztokem PIP v DMF (10 ml, 50%) po dobu 30 min (25 °C). Reakční roztok byl následně odstraněn promytím polymeru 3× v DMF. Loading pryskyřice byl zjištěn standardním způsobem (kapitola 5.2.5) po imobilizaci Fmoc-aminokyseliny (kapitola 5.2.3). Vypočtený loading po imobilizaci činil 0,18 mmol/g.

5.2.1.3. Wang-piperazinový linker

K Wangově pryskyřici (0,9 mmol/g; 1 g) promyté 3× v DCM byl přidán roztok CDI (5,0 mmol; 810 mg) a pyridinu (5,0 mmol; 400 µl) v DCM (10 ml). Po 2 h (25 °C) byla pryskyřice promyta 5× v DCM za následného přidavku roztoku piperazinu (5,0 mmol; 431 mg) v DCM (10 ml). Reakční směs byla třepána 3 h (25 °C) a poté byla pryskyřice opět promyta 5× v DCM. Kvantifikace byla provedena po imobilizaci Fmoc-aminokyseliny (kapitola 5.2.3) standardním způsobem (kapitola 5.2.5.). Vypočtený loading po imobilizaci činil 0,40 mmol/g.

5.2.2. Derivatizace s Fmoc-OSu či Fmoc-Cl

Aminosloučeniny s nedostatečnou absorbancí v UV oblasti byly derivatizovány pomocí roztoku Fmoc-OSu (0,19 mmol; 65 mg) v DCM (0,5 ml) či roztoku Fmoc-Cl (0,25 mmol; 65 mg) a DIEA (0,26 mmol; 45 µl) v DCM (1 ml) po dobu 30 min (25 °C). Po ukončení reakce byla pryskyřice promyta 3× v DCM a dále standardně štěpena (kapitola 5.2.4. pro deriváty **4** a **5(1,1,4,1)**) nebo podrobena kvantifikaci (kapitola 5.2.5.).

5.2.3. Imobilizace Fmoc- α -aminokyseliny

K pryskyřici (1 g) promyté 3× v DCM, DMF byl přidán roztok připravený rozpuštěním příslušné Fmoc- α -aminokyseliny (2 mmol; L-serin, L-cystein, L-threonin), HOBt (2 mmol; 306 mg) a DMAP (0,5 mmol; 61 mg) v DMF (5 ml) za přidavku DIC (2 mmol; 312 µl) v DCM (5 ml). Po 24 h (25 °C) byla reakční směs promyta 3× v DMF, DCM a odebrán vzorek (20 – 30 mg), který byl promyt 3× v MeOH, vysušen pod proudem dusíku, odštěpen z polymeru (kapitola 5.2.4) a následně kvantifikován pomocí HPLC-MS (kapitola 5.2.5.).

5.2.4. Štěpení vzorků z pevné fáze

Ke kvantitativnímu zhodnocení průběhu reakce bylo odebráno malé množství polymeru (5 – 10 mg), které bylo štěpeno ve směsi TFA/DCM (1 ml; 50%) či v čisté TFA (1 ml). Po 2 h (25 °C) byla těkavá složka odpařena pod proudem dusíku a odparek rozpuštěn buď v MeOH (1 ml), či MeCN (1 ml), zfiltrován a analyzován pomocí HPLC-MS.

5.2.5. Stanovení loadingu pryskyřice

Loading pryskyřice byl stanoven metodou vnějšího standardu s použitím Fmoc- β -alaninu (0,5 mg/ml). Přesné množství posuzovaného vzorku (2×10 mg) nesoucího Fmoc skupinu bylo standardně odštěpeno z polymeru a následně podrobeno HPLC-MS analýze. Z integrace plochy píku standardu a vzorku při 300 nm byl vypočten loading přepočtem látkového množství vzorku na 1 g použité pryskyřice (Obr. 17).⁶⁴

Obr. 17: Výpočet loadingu pryskyřice.

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

L ... loading (mmol/g)

δ_S ... hmotnostní koncentrace standardu Fmoc-Ala (mg/ml)

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

M_S ... molární hmotnost standardu Fmoc-Ala (g/mol)

x_S ... plocha píku standardu Fmoc-Ala

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

5.2.6. Deprotekce terminální aminoskupiny

Deprotekce Fmoc skupiny byla provedena protřepáním pryskyřice (300 mg) s roztokem PIP v DMF (3 ml; 50%) po dobu 30 min (25 °C). Poté byla pryskyřice promyta $3 \times$ v DMF a DCM.

5.2.7. Příprava N-sulfonylovaných derivátů

5.2.7.1. Sulfonylace variabilními sulfonyl chloridy a re-sulfonylace

Deprotekovaná pryskyřice **3** (300 mg) byla sulfonylována/re-sulfonylována roztokem příslušného sulfonyl chloridu (0,9 mmol) a 2,6-lutidinu (0,99 mmol; 114 μ l) v DCM (3 ml). Po 24 h (25 °C) byl polymer promyt $5 \times$ v DCM za následného ověření kvantitativního průběhu sulfonylace derivatizací s Fmoc-OSu.

5.2.7.2. Alkylace variabilními bromacetofenony

Sulfonylovaná pryskyřice **4** (300 mg) byla podrobena alkylaci roztokem α -bromacetofenonu (1,5 mmol), DIEA (522 μ l; 1,5 mmol) v DMF (3 ml). Po 24 h (25 °C) byla pryskyřice promyta $3 \times$ v DMF a DCM. Vzorek byl následně standardně odštěpen z polymeru a analyzován na HPLC-MS.

5.2.8. Příprava *N*-acylovaných a re-sulfonylovaných derivátů

5.2.8.1. Denosylace

K alkylované pryskyřici **5** (300 mg) byl přidán roztok 2-merkapt ethanolu (1,8 mmol; 126 μ l), DBU (0,6 mmol; 90 μ l) v DMF (3 ml). Po 30 min (25 °C) byla reakční směs promyta 3 $\times$ v DMF a DCM.

5.2.8.2. *N*-acylace

Denosylovaná pryskyřice **8** (300 mg) byla acylována roztokem kyseliny či jejího chloridu (0,6 mmol) a DIC (0,3 mmol; 48 μ l) v DMF (3 ml). Po 24 h (25 °C) byl polymer promyt 3 $\times$ v DMF a DCM. Pro substráty **10**(1,1,7,1) a **11**(1,1,7,1) byla použita acylace roztokem benzoyl chloridu (0,9 mmol; 105 μ l) a 2,6-lutidinu (0,9 mmol; 114 μ l) v DCM (3 ml) po dobu 24 h (25 °C) za následného promytí reakční směsi 3 $\times$ v DCM. Po odštěpení látek z polymeru byl ověřen kvantitativní průběh reakce pomocí HPLC-MS analýzy.

5.2.9. Redukce nitroskupiny na arylu v poloze 2 nebo 4

5.2.9.1. Redukce na pryskyřici s TBAHS či ethyl viologenem diiodidem

K alkylované či acylované pryskyřici **5** či **9** (300 mg) byl přidán roztok připravený rozpuštěním $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (3,0 mmol; 523 mg) a K_2CO_3 (3,5 mmol; 484 mg) ve směsi DCM/ H_2O (1:1; 3 ml) za následného přidavku TBAHS (0,25 mmol; 85 mg) či ethyl viologen diiodidu (0,25 mmol; 69 mg). Reakční směs byla protřepávána 24 h (25 °C) a poté promyta 3 $\times$ DCM/ H_2O (1:1) a DCM. Následně bylo provedeno standardní štěpení látky a její analýza pomocí HPLC-MS.

5.2.9.2. Redukce na pryskyřici s $\text{SnCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$

Alkylovaná či acylovaná pryskyřice **5** nebo **9** (300 mg) byla redukována přidavkem roztoku $\text{SnCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (3,0 mmol; 675 mg) a DIEA (1,5 mmol; 522 μ l) v odplyněném DMF (3 ml). Po 24 h (25 °C) byl polymer promyt 10 $\times$ MeOH/ H_2O , 10 $\times$ v MeOH, DMF a 3 $\times$ v DCM. Připravené produkty byly po standardním odštěpení z polymeru analyzovány na HPLC-MS.

5.2.9.3. Redukce v roztoku

Odštěpené produkty **6**(1,1,1,1) a **10**(1,1,10,1) (300 mg) byly zbaveny zbytků TFA a DCM odfoukáním pod proudem dusíku a jejich odparek rozpuštěný v DMF (0,5 ml) byl zneutralizován DIEA na pH 6 – 9. K reakční směsi byl přidán roztok $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (0,4 mmol; 84 mg) a K_2CO_3 (0,4 mmol; 55 mg) ve H_2O (1 ml). Reakční nádoba byla následně opatřena magnetickým míchadlem a umístěna na magnetickou míchačku. Po 6 – 24 h (25 °C) byla reakce ukončena přidavkem roztoku $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$ (0,4 mmol; 70 mg) ve vodě (1,5 ml) a ponechána k doreagování 1 h (25 °C). Poté byla reakční směs extrahována 2 $\times$ EtAc a 3 $\times$ vodou. Organická fáze byla odpařena na RVO a žádaný produkt analyzován na HPLC-MS.

5.2.10. Štěpení vedoucí ke spontánní cyklizaci na nenasycené/nasycené deriváty

Produkty **6** a **10** (300 mg) byly připraveny štěpením polymeru ve směsi TFA/DCM (3 ml; 50%) nebo v čisté TFA (3 ml) po dobu 24 h (25 °C). K nasyceným derivátům **7** a **11** vedlo štěpení ve směsi TFA/TES/DCM (10:1:9) po dobu 5 – 8 h (25 °C) nebo standardní štěpení v TFA/DCM (3 ml; 50%) po dobu 24 h (25 °C) za následného přidavku redukčního činidla TES (150 µl). Reakční směs byla dále protřepávána 1 h (25 °C), poté byly zbytky TFA a DCM odfoukány pod proudem dusíku a provedena kontrolní HPLC-MS analýza.

5.2.11. Extrakce tuhou fází (SPE, Solid Phase Extraction)

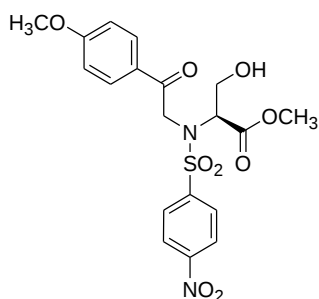
Produkty **6**(1,1,4,1) a **10**(1,1,12,1) byly zbaveny nežádoucích solí pomocí kartridže s reverzní fází C18. Po homogenizaci stacionární fáze acetonitrilem (5 ml) a octanem amonným (5 ml, 10 mmol/l) za atmosférického tlaku byla na připravenou kolonku převedena odštěpená látka rozpuštěná v DMSO (1 ml) a octanu amonném (9 ml; 10 mol/l). Nežádoucí podíly byly z kolony odstraněny nanesením roztoku octanu amonného (10 ml) a finální látka byla následně eluována postupným přidavkem MeCN (10 ml) na kolonu. Jednotlivé frakce odsoleného produktu byly spojeny dohromady a odpařeny na RVO. Finální odparek byl analyzován na HPLC-MS.

5.2.12. Separace finálních látek

Připravené cílové látky **5c**, **6**, **6d**, **7**, **10**, **11** a **24** byly rozpuštěny ve vhodném organickém rozpouštědle, a to v MeOH, MeCN (3 ml), ve směsi MeOH/H₂O, MeCN/H₂O (3 ml; 1:1) či MeCN/MeOH/H₂O (3 ml; 1:1:1). Přefiltrovaný vzorek byl separován pomocí semipreparativní HPLC.

5.3. Analytická data

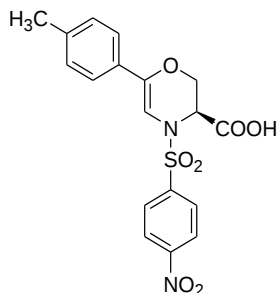
(*S*)-3-hydroxy-2-(*N*-(2-(4-methoxyfenyl)-2-oxoethyl)-4-nitrofenylsulfonamido)propanoát *methylnatý*
5c(OCH₃,1,1,2)



Výtěžek: 5,0 mg (68%); krémová amorfnní látka. ¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆): δ = 8.31 – 8.35 (m, 2 H), 8.04 – 8.09 (m, 2 H), 7.25 – 7.29 (m, 2 H), 6.90 – 6.94 (m, 2 H), 4.42 (br. s., 1 H), 4.15 (d, *J* = 10.7 Hz, 1 H), 3.82 (dd, *J* = 3.9, 11.5 Hz, 1 H), 3.74 (s, 3 H), 3.71 (br. s, 1 H), 3.26 – 3.29 (m, 1H, překryv s vodou), 2.71 (s, 3 H). ¹³C NMR (101 MHz, DMSO-*d*₆): δ = 169.9, 159.4, 149.5, 145.5, 130.3, 128.8,

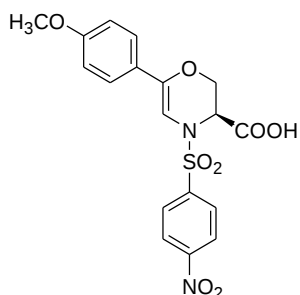
127.3, 124.1, 113.8, 96.7, 61.2, 55.1, 54.4, 50.3, 48.6. HRMS (ESI-TOF): m/z vypočteno pro $C_{19}H_{20}N_2O_9S$ $[M-H]^-$ 451.0794, nalezeno 451.0806.

(S)-4-((4-nitrofenyl)sulfonyl)-6-(p-tolyl)-3,4-dihydro-2H-1,4-oxazin-3-karboxylová kyselina **6**(1,1,1,1)



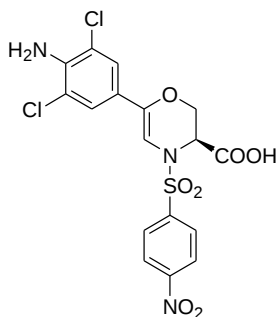
Výtěžek: 11,5 mg (79%); oranžová amorfnní látka. 1H NMR (500 MHz, DMSO- d_6): δ = 8.35 – 8.40 (m, 2 H), 8.12 – 8.17 (m, 2 H), 7.32 – 7.37 (m, 2 H), 7.12 (d, J = 8.0 Hz, 2 H), 6.73 (d, J = 1.1 Hz, 1 H), 4.77 (br. s., 1 H), 4.59 (dd, J = 1.1, 10.9, 1 H), 3.13 (dd, J = 2.6, 10.6 Hz, 1 H), 2.27 (s, 3 H). ^{13}C NMR (126 MHz, DMSO- d_6): δ = 168.5, 150.0, 142.6, 139.9, 137.2, 130.3, 128.9, 128.7, 124.7, 123.2, 99.9, 65.5, 55.7, 20.7. HRMS (ESI-TOF): m/z vypočteno pro $C_{18}H_{16}N_2O_7S$ $[M-H]^-$ 403.0585, nalezeno 403.0594.

(S)-4-((4-nitrofenyl)sulfonyl)-6-(4-methoxyfenyl)-3,4-dihydro-2H-1,4-oxazin-3-karboxylová kyselina **6**(1,1,1,2)



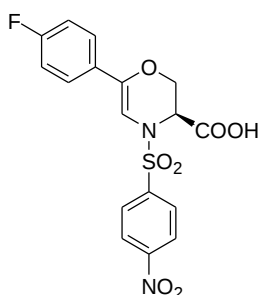
Výtěžek: 14,8 mg (44%); oranžová amorfnní látka. 1H NMR (500 MHz, DMSO- d_6): δ = 8.36 – 8.41 (m, 2H), 8.12 (d, J = 8.6 Hz, 2H), 7.36 – 7.42 (m, 2H), 6.85 – 6.89 (m, 2H), 6.62 (s, 1H), 4.59 (d, J = 10.3 Hz, 2H), 3.74 (s, 3H), 3.08 (d, J = 9.7 Hz, 1H). ^{13}C NMR (126 MHz, DMSO- d_6): δ = 159.0, 149.9, 142.7, 139.9, 128.6, 124.7, 124.6, 124.6, 113.7, 99.0, 65.6, 55.1, 54.8. HRMS (ESI-TOF): m/z vypočteno pro $C_{18}H_{16}N_2O_8S$ $[M-H]^-$ 419.0535, nalezeno 419.0544.

(S)-4-((4-nitrofenyl)sulfonyl)-6-(4-amino-3,5-dichlorofenyl)-3,4-dihydro-2H-1,4-oxazin-3-karboxylová kyselina **6(1,1,1,3)**



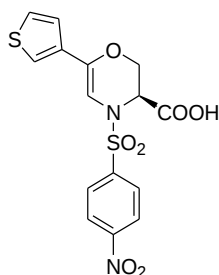
Výtěžek: 38,5 mg (92%); oranžová amorfnní látka. ^1H NMR (500 MHz, $\text{DMSO-}d_6$): δ = 8.36 – 8.40 (m, 2H), 8.14 v 8.17 (m, 2H), 7.33 – 7.36 (m, 2H), 6.75 (d, J = 1.15 Hz, 1H), 5.61 (s, 2H), 4.70 (br. s., 1H), 4.54 – 4.59 (m, 1H), 3.10 (dd, J = 2.3, 10.9 Hz, 1H, překryv s vodou). ^{13}C NMR (126 MHz, $\text{DMSO-}d_6$): δ = 168.5, 149.9, 142.7, 140.6, 138.0, 128.7, 124.6, 122.9, 122.3, 118.1, 99.6, 65.7, 55.9. HRMS (ESI-TOF): m/z vypočteno pro $\text{C}_{17}\text{H}_{13}\text{Cl}_2\text{N}_3\text{O}_5$ $[\text{M-H}]^-$ 471.9755, nalezeno 471.9768.

(S)-4-((4-nitrofenyl)sulfonyl)-6-(4-fluorofenyl)-3,4-dihydro-2H-1,4-oxazin-3-karboxylová kyselina **6(1,1,1,4)**



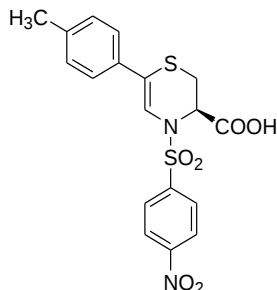
Výtěžek: 18,1 mg (51%); oranžová amorfnní látka. ^1H NMR (500 MHz, $\text{DMSO-}d_6$): δ = 8.38 (d, J = 8.6 Hz, 2H), 8.15 (d, J = 9.2 Hz, 2H), 7.50 – 7.56 (m, 2H), 7.11 – 7.17 (m, 2H), 6.79 (s, 1H), 4.73 (br. s., 1H), 4.61 (d, J = 10.3 Hz, 1H), 3.14 – 3.18 (m, 1H, překryv s vodou). ^{13}C NMR (101 MHz, $\text{DMSO-}d_6$): δ = 168.9, 161.7 (d, J = 242.3 Hz), 149.9, 142.8, 138.9, 129.9 (d, J = 2.9 Hz), 128.7, 125.3 (d, J = 8.1 Hz), 124.7, 115.2 (d, J = 21.6 Hz), 100.8, 66.0, 55.6. HRMS (ESI-TOF): m/z vypočteno pro $\text{C}_{17}\text{H}_{13}\text{FN}_2\text{O}_7\text{S}$ $[\text{M-H}]^-$ 407.0334, nalezeno 407,0344.

(S)-4-((4-nitrofenyl)sulfonyl)-6-(thiofen-3-yl)-3,4-dihydro-2H-1,4-oxazin-3-karboxylová kyselina **6(1,1,1,5)**



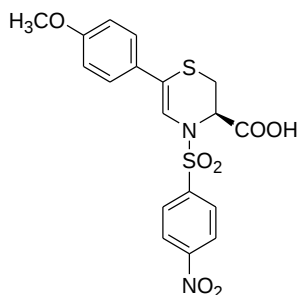
Výtěžek: 39,5 mg (30%); žlutá amorfnní látka. ^1H NMR (400 MHz, DMSO- d_6): δ = 8.38 – 8.42 (m, 2H), 8.12 – 8.16 (m, 2H), 7.51 (dd, J = 3.1, 5.2 Hz, 1H), 7.39 – 7.42 (m, 1H), 7.34 (dd, J = 1.6, 5.2 Hz, 1H), 6.75 (d, J = 1.0 Hz, 1H), 4.78 (br. s., 1H), 4.56 (dd, J = 1.6, 10.9 Hz, 1H), 3.14 (dd, J = 2.6, 10.9 Hz, 1H, překryv s vodou). ^{13}C NMR (101 MHz, DMSO- d_6): δ = 168.6, 150.0, 142.5, 137.8, 135.1, 128.7, 126.8, 124.8, 123.8, 120.0, 100.6, 65.3, 55.5. HRMS (ESI-TOF): m/z vypočteno $\text{C}_{15}\text{H}_{12}\text{N}_2\text{O}_7\text{S}_2$ $[\text{M-H}]^-$ 394.9990, nalezeno 395.0002.

(*R*)-4-((4-nitrofenyl)sulfonyl)-6-(*p*-tolyl)-3,4-dihydro-2*H*-1,4-oxazin-3-karboxylová kyselina **6**(1,2,1,1)



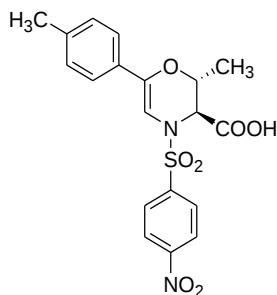
Výtěžek: 14,6 mg (83%); žlutá amorfnní látka. ^1H NMR (400 MHz, DMSO- d_6): δ = 8.34 – 8.41 (m, 2 H), 8.12 – 8.17 (m, 2 H), 7.25 – 7.31 (m, 2 H), 7.17 (d, J = 0.5 Hz, 2 H), 7.14 (s, 1H), 5.07 (br. s., 1 H), 3.42 – 3.44 (m, 1 H, překryv s vodou), 2.41 (dd, J = 3.5, 13.40 Hz, 1 H), 2.29 (s, 3 H). ^{13}C NMR (126 MHz, DMSO- d_6): δ = 168.5, 150.0, 143.4, 137.1, 134.4, 129.3, 128.5, 125.2, 124.8, 115.6, 115.3, 55.1, 27.2, 20.7. HRMS (ESI-TOF): m/z vypočteno pro $\text{C}_{18}\text{H}_{16}\text{N}_2\text{O}_7\text{S}$ $[\text{M-H}]^-$ 419.0357, nalezeno 419.0366.

(*R*)-4-((4-nitrofenyl)sulfonyl)-6-(4-methoxyfenyl)-3,4-dihydro-2*H*-1,4-thiazin-3-karboxylová kyselina **6**(1,2,1,2)



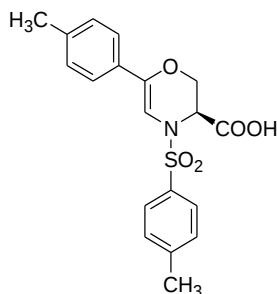
Výtěžek: 12,9 mg (70%); oranžová amorfnní látka. ^1H NMR (400 MHz, DMSO- d_6): δ = 8.35 – 8.40 (m, 2H), 8.11 – 8.15 (m, 2H), 7.29 – 7.33 (m, 2H), 7.07 (s, 1H), 6.90 – 6.94 (m, 2H), 5.04 (br. s., 1H), 3.75 (s, 3H), 3.40 – 3.44 (m, 1H, překryv s vodou), 2.39 (dd, J = 3.1, 13.0 Hz, 1H). ^{13}C NMR (101 MHz, DMSO- d_6): δ = 168.6, 159.0, 150.0, 143.4, 129.6, 128.5, 126.7, 124.8, 115.4, 115.0, 114.1, 55.2, 40.4, 27.3. HRMS (ESI-TOF): m/z vypočteno pro $\text{C}_{18}\text{H}_{16}\text{N}_2\text{O}_7\text{S}_2$ $[\text{M-H}]^-$ 435.0305, nalezeno 435.0315.

(2*R*,3*S*)-2-methyl-4-((4-nitrofenyl)sulfonyl)-6-(*p*-tolyl)-3,4-dihydro-2*H*-1,4-oxazin-3-karboxylová kyselina **6**(1,3,1,1)



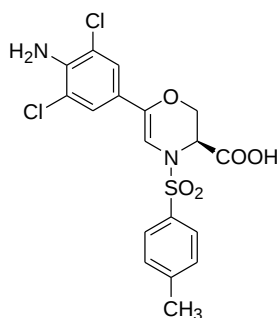
Výtěžek: 9,0 mg (41%); bílá amorfnní látka. ^1H NMR (400 MHz, DMSO- d_6): δ = 8.33 (d, J = 8.8 Hz, 2 H), 8.21 (d, J = 8.8 Hz, 2 H), 7.31 (d, J = 7.4 Hz, 2 H), 7.07 (d, J = 8.5 Hz, 2 H), 6.71 (d, J = 1.1 Hz, 1 H), 4.92 – 4.83 (m, 1 H), 4.41 (br. s., 1 H), 2.50 (s, 3H), 2.23 (s, 3 H). ^{13}C NMR (126 MHz, DMSO- d_6): δ = 169.0, 149.8, 144.4, 136.8, 135.1, 131.0, 128.8, 128.7, 124.4, 123.2, 99.4, 70.1, 59.5, 20.7, 16.5. HRMS (ESI-TOF): m/z vypočteno pro $\text{C}_{19}\text{H}_{18}\text{N}_2\text{O}_7\text{S}$ $[\text{M}-\text{H}]^-$ 417.0742, nalezeno 417.0751.

(*S*)-4-((*p*-tolyl)sulfonyl)-6-(*p*-tolyl)-3,4-dihydro-2*H*-1,4-oxazin-3-karboxylová kyselina **6**(1,1,2,1)



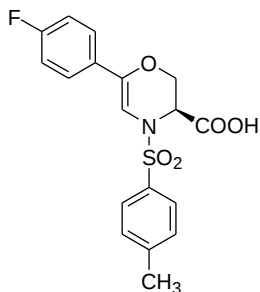
Výtěžek: 5,4 mg (4%); bílá amorfnní látka; ^1H NMR (500 MHz, DMSO- d_6): δ = 7.76 (d, J = 8.3 Hz, 2 H), 7.42 (d, J = 8.0 Hz, 2 H), 7.34 (d, J = 8.3 Hz, 2 H), 7.13 (d, J = 8.0 Hz, 2 H), 6.69 (d, J = 1.4 Hz, 1 H), 4.89 (br. s., 1 H), 4.55 (dd, J = 1.4, 11.2 Hz, 1 H), 2.99 (dd, J = 2.9, 11.2 Hz, 1 H), 2.37 (s, 3 H), 2.27 (s, 3 H). ^{13}C NMR (126 MHz, DMSO- d_6): δ = 169.4, 144.7, 140.1, 137.8, 134.5, 130.8, 130.6, 129.5, 127.7, 123.7, 100.9, 65.2, 55.2, 21.6, 21.3. HRMS (ESI-TOF): m/z vypočteno pro $\text{C}_{19}\text{H}_{19}\text{NO}_5\text{S}$ $[\text{M}+\text{H}]^+$ 374.1055, nalezeno 374.1057. Znečištěno alifatickým kontaminantem.

(*S*)-4-((*p*-tolyl)sulfonyl)-6-(4-amino-3,5-dichlorofenyl)-3,4-dihydro-2*H*-1,4-oxazin-3-karboxylová kyselina **6**(1,1,2,3)



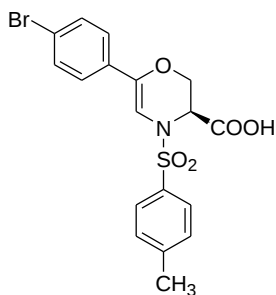
Výtěžek: 18,1 mg (19%); žlutá amorfnní látka; ^1H NMR (500 MHz, $\text{DMSO-}d_6$): δ = 7.75 (dd, J = 1.6, 6.5 Hz, 2H), 7.40 (d, J = 8.3 Hz, 2H), 7.32 (s, 2H), 6.67 (d, J = 1.3 Hz, 1H), 5.60 (s, 2H), 4.70 (br. s., 1H), 4.51 (dd, J = 1.4, 10.7 Hz, 1H), 2.88 (dd, J = 2.9, 10.8 Hz, 1H), 2.36 (s, 3H). ^{13}C NMR (126 MHz, $\text{DMSO-}d_6$): δ = 168.9, 144.2, 140.6, 137.7, 134.2, 129.9, 127.2, 122.9, 122.4, 118.1, 100.1, 65.0, 55.3, 21.0. HRMS (ESI-TOF): m/z vypočteno pro $\text{C}_{18}\text{H}_{16}\text{Cl}_2\text{N}_2\text{O}_5\text{S}$ $[\text{M}+\text{H}]^+$ 443.0228, nalezeno 440.0230.

(*S*)-4-((*p*-tolyl)sulfonyl)-6-(4-fluorofenyl)-3,4-dihydro-2*H*-1,4-oxazin-3-karboxylová kyselina
6(1,1,2,4)



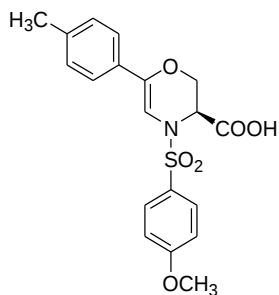
Výtěžek: 55,3 mg (52%); žlutá amorfnní látka; ^1H NMR (500 MHz, $\text{DMSO-}d_6$): δ = 7.78 (d, J = 8.3 Hz, 2 H), 7.51 (dd, J = 5.4, 9.0 Hz, 2 H), 7.39 – 7.44 (m, 2 H), 7.14 (d, J = 8.9 Hz, 2 H), 6.77 (d, J = 1.3 Hz, 1 H), 4.93 (s, 1 H), 4.58 (dd, J = 1.4, 11.1 Hz, 1 H), 3.03 (dd, J = 2.9, 11.1 Hz, 1 H), 2.36 (s, 3 H). ^{13}C NMR (126 MHz, $\text{DMSO-}d_6$): δ = 169.4, 162.3 (d, J = 245.0), 144.7, 139.2, 134.6, 130.6, 130.0 (d, J = 3.0 Hz), 127.7, 126.0 (d, J = 5.7 Hz), 115.8 (d, J = 21.6 H), 101.7 (d, J = 1.5 Hz), 65.3, 55.2, 21.6. HRMS (ESI-TOF): m/z vypočteno pro $\text{C}_{18}\text{H}_{16}\text{FNO}_5\text{S}$ $[\text{M}+\text{H}]^+$ 378.0804, nalezeno 378.0806. Znečištěno alifatickým kontaminantem.

(*S*)-4-((*p*-tolyl)sulfonyl)-6-(4-bromofenyl)-3,4-dihydro-2*H*-1,4-oxazin-3-karboxylová kyselina
6(1,1,2,6)



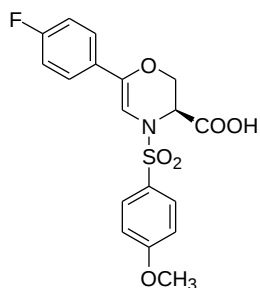
Výtěžek: 55,5 mg (44%); bílá amorfnní látka; ^1H NMR (500 MHz, $\text{DMSO-}d_6$): δ = 7.75 (d, J = 8.3 Hz, 2 H), 7.46 (s, 1 H), 7.36 – 7.41 (m, 4 H), 6.83 (d, J = 1.3 Hz, 1 H), 4.86 (s, 1 H), 4.55 (dd, J = 1.5, 11.0 Hz, 1 H), 3.00 (dd, J = 3.0, 11.1 Hz, 1 H), 2.33 (s, 3 H). ^{13}C NMR (126 MHz, $\text{DMSO-}d_6$): δ = 169.4, 144.7, 138.8, 134.6, 132.8, 131.8, 130.6, 127.7, 125.7, 121.2, 102.6, 65.5, 55.4, 21.6. Znečištěno alifatickým kontaminantem. HRMS (ESI-TOF): m/z vypočteno pro $\text{C}_{18}\text{H}_{16}\text{BrNO}_5\text{S}$ $[\text{M}+\text{H}]^+$ 438.0002, nalezeno 438.0005. Znečištěno alifatickým kontaminantem.

(S)-4-((4-methoxyfenyl)sulfonyl)-6-(p-tolyl)-3,4-dihydro-2H-1,4-oxazin-3-karboxylová kyselina
6(1,1,3,1)



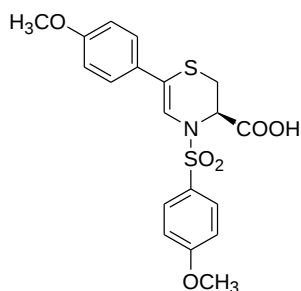
Výtěžek: 8,1 mg (8%); žlutá amorfnní látka; ^1H NMR (500 MHz, DMSO- d_6): δ = 7.71 – 7.74 (m, 2 H), 7.26 – 7.30 (m, 2 H), 7.05 – 7.10 (m, 4 H), 6.58 (d, J = 1.4 Hz, 1 H), 4.51 (dd, J = 1.4, 10.4 Hz, 1 H), 4.44 (br. s., 1 H), 3.79 (s, 3 H), 2.83 (dd, J = 2.9, 10.5 Hz, 1 H), 2.23 (s, 3 H). ^{13}C NMR (126 MHz, DMSO- d_6): δ = 168.9, 162.7, 139.4, 136.9, 130.7, 129.3, 128.9, 128.8, 123.0, 114.6, 100.7, 65.2, 55.9, 55.7, 20.7. HRMS (ESI-TOF): m/z vypočteno pro $\text{C}_{19}\text{H}_{19}\text{NO}_6\text{S}$ $[\text{M}+\text{H}]^+$ 390.1005, nalezeno 390.1006.

(S)-4-((4-methoxyfenyl)sulfonyl)-6-(4-fluorofenyl)-3,4-dihydro-2H-1,4-oxazin-3-karboxylová kyselina
6(1,1,3,4)



Výtěžek: 20,8 mg (32%); hnědá amorfnní látka. ^1H NMR (400 MHz, DMSO- d_6): δ = 7.73 – 7.78 (m, 2H), 7.44 – 7.50 (m, 2H), 7.07 – 7.16 (m, 4H), 6.66 (d, J = 1.6 Hz, 1H), 4.55 (dd, J = 1.3, 10.1 Hz, 1H), 4.33 (br. s., 1H), 3.82 (s, 3H), 2.84 (dd, J = 2.9, 10.1 Hz, 1H). ^{13}C NMR (126 MHz, DMSO- d_6): δ = 169.0, 162.7, 161.9 (d, J = 244.4 Hz), 138.5, 130.2 (d, J = 2.9 Hz), 129.3, 128.9, 125.1 (d, J = 7.7 Hz), 115.2 (d, J = 22.1), 114.6, 101.4, 65.5, 56.3, 55.67. HRMS (ESI-TOF): m/z vypočteno pro $\text{C}_{18}\text{H}_{16}\text{FNO}_6\text{S}$ $[\text{M}-\text{H}]^-$ 392.0591, nalezeno 392.0599.

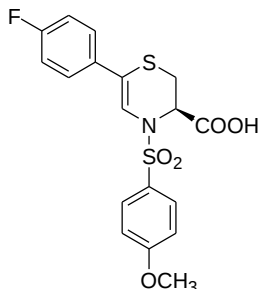
(R)-4-((4-methoxyfenyl)sulfonyl)-6-(4-methoxyfenyl)-3,4-dihydro-2H-1,4-thiazin-3-karboxylová kyselina **6(1,2,3,2)**



Výtěžek: 13,3 mg (9%); žlutá amorfnní látka; ^1H NMR (500 MHz, DMSO- d_6): δ = 7.78 (d, J = 9.1 Hz, 2 H), 7.28 (d, J = 8.9 Hz, 2 H), 7.09 (d, J = 9.1 Hz, 2 H), 7.05 (s, 1 H), 6.89 (d, J = 8.9 Hz, 2 H), 5.23

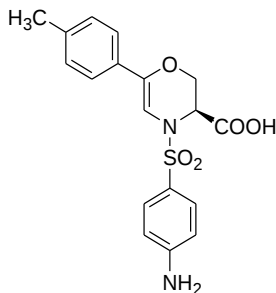
(t, $J = 3.2$ Hz, 1 H), 3.80 (s, 3 H), 3.72 (s, 3 H), 3.36 (dd, $J = 3.4, 13.3$ Hz, 1 H), 2.27 (dd, $J = 3.4, 13.3$ Hz, 1 H). ^{13}C NMR (126 MHz, DMSO- d_6): $\delta = 168.8, 163.0, 159.0, 129.5, 129.3, 129.2, 126.6, 115.4, 114.8, 114.2, 114.0, 55.7, 55.2, 53.7, 26.6$. HRMS (ESI-TOF): m/z vypočteno pro $\text{C}_{19}\text{H}_{19}\text{NO}_6\text{S}_2$ $[\text{M}-\text{H}]^-$ 420.0562, nalezeno 420.0570. Znečištěno alifatickým kontaminantem.

(R)-4-((4-methoxyfenyl)sulfonyl)-6-(4-fluorofenyl)-3,4-dihydro-2H-1,4-thiazin-3-karboxylová kyselina
6(1,2,3,4)



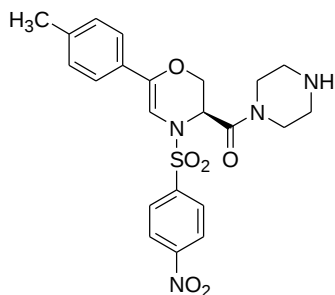
Výtěžek 21,0 mg (90%); zelená amorfnní látka. ^1H NMR (400 MHz, DMSO- d_6): $\delta = 7.77 - 7.81$ (m, 2 H), 7.38 – 7.43 (m, 2 H), 7.15 – 7.20 (m, 2 H), 7.15 (s, 1 H), 7.08 – 7.12 (m, 2 H), 5.00 (t, $J = 3.1, 1$ H), 3.82 (s, 3 H), 3.40 (dd, $J = 3.2, 12.9$ Hz, 1 H), 2.18 (dd, $J = 3.3, 12.9$ Hz, 1 H). ^{13}C NMR (101 MHz, DMSO- d_6): $\delta = 169.0, 162.9, 161.5$ (d, $J = 243.2$ Hz), 134.0 (d, $J = 2.9$ Hz), 129.5, 129.2, 127.2 (d, $J = 8.2$ Hz), 117.2, 115.6 (d, $J = 21.6$ Hz), 114.8, 112.9, 55.7, 54.7, 26.8. HRMS (ESI-TOF): m/z vypočteno pro $\text{C}_{18}\text{H}_{16}\text{FNO}_5\text{S}_2$ $[\text{M}-\text{H}]^-$ 408.0361, nalezeno 408.0370.

(S)-4-((4-aminofenyl)sulfonyl)-6-(*p*-tolyl)-3,4-dihydro-2H-1,4-oxazin-3-karboxylová kyselina
6(1,1,4,1)



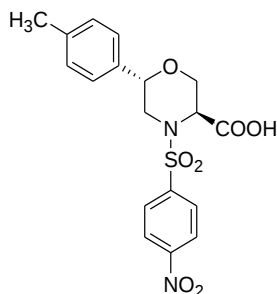
Výtěžek: 2,9 mg (27%); bílo-žlutá amorfnní látka. ^1H NMR (500 MHz, DMSO- d_6): $\delta = 7.42$ (dd, $J = 1.7, 7.2$ Hz, 2H), 7.31 (dd, $J = 1.7, 6.6$ Hz, 2H), 7.12 (d, $J = 8.0$ Hz, 2H), 6.59 (dd, $J = 2.0, 7.5$ Hz, 2H), 6.58 (d, $J = 1.2$ Hz, 1H), 6.10 (s, 1H), 4.51 – 4.54 (m, 1H), 2.88 – 2.92 (m, 1H), 2.54 (s, 2H), 2.27 (s, 3H). ^{13}C NMR (126 MHz, DMSO- d_6): $\delta = 162.7, 153.4, 139.1, 136.8, 130.7, 129.1, 128.9, 123.0, 121.4, 112.8, 101.1, 64.7, 55.3, 20.7$. HRMS (ESI-TOF): m/z vypočteno pro $\text{C}_{18}\text{H}_{18}\text{FNO}_5\text{S}_2$ $[\text{M}+\text{H}]^+$ 375.1007, nalezeno 375.1009.

(S)-4-((4-nitrofenyl)sulfonyl)-6-(*p*-tolyl)-3,4-dihydro-2*H*-1,4-(oxazin-3-yl)-piperazin-1-yl-methanon
6(4,1,1,1)



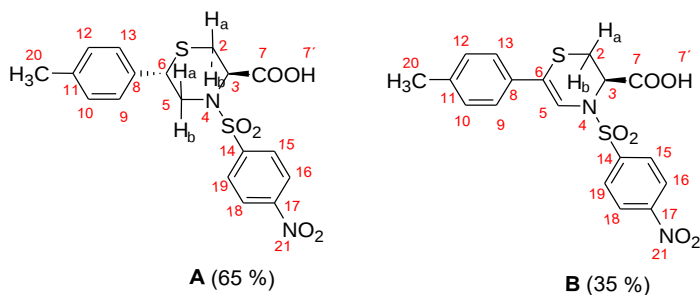
Výtěžek: 37,1 mg (63%); oranžovo-hnědá amorfnní látka. ^1H NMR (500 MHz, $\text{DMSO-}d_6$): δ = 8.42 – 8.37 (m, 2 H), 8.21 – 8.17 (m, 2 H), 7.39 – 7.34 (m, 2 H), 7.15 – 7.11 (m, 2 H), 6.86 (d, J = 0.9 Hz, 1 H), 5.32 (t, J = 1.0 Hz, 1 H), 4.41 (dd, J = 1.0, 11.7 Hz, 1 H), 3.63 (s, 1 H), 3.55 (s, 1 H), 3.46 (dd, J = 2.9, 11.7 Hz, 1 H), 3.41 (s, 2 H), 3.22 (s, 1 H), 2.73 (br. s., 2 H), 2.65 (br. s., 2 H), 2.27 (s, 3 H). ^{13}C NMR (126 MHz, $\text{DMSO-}d_6$): δ = 164.0, 150.1, 142.8, 139.4, 137.2, 130.2, 128.9, 128.8, 124.6, 123.2, 101.0, 65.4, 52.2, 46.1, 45.8, 45.2, 42.8, 20.7. HRMS (ESI-TOF): m/z vypočteno pro $\text{C}_{22}\text{H}_{24}\text{N}_4\text{O}_6\text{S}$ $[\text{M}+\text{H}]^+$ 473.1489, nalezeno 473.1489.

(3S,6S)-4-((4-nitrofenyl)sulfonyl)-6-(*p*-tolyl)morfolin-3-karboxylová kyselina **7(1,1,1,1)**



Výtěžek: 36,0 mg (97%); bílá amorfnní látka. ^1H NMR (500 MHz, $\text{DMSO-}d_6$): δ = 8.33 (d, J = 8.6 Hz, 2H), 8.05 (d, J = 8.6 Hz, 2H), 7.16 (q, J = 8.0 Hz, 4H), 4.38 – 4.44 (m, 2H), 4.35 (d, J = 11.5 Hz, 1H), 3.76 (d, J = 11.5 Hz, 1H, překryv s vodou), 3.67 (d, J = 11.5 Hz, 1H, překryv s vodou), 3.25 (t, J = 11.7 Hz, 1H), 2.27 (s, 3H). ^{13}C NMR (126 MHz, $\text{DMSO-}d_6$): δ = 170.1, 149.6, 145.0, 137.4, 135.8, 128.9, 128.7, 126.1, 124.2, 76.6, 68.8, 55.2, 47.6, 20.7. HRMS (ESI-TOF): m/z vypočteno pro $\text{C}_{18}\text{H}_{18}\text{N}_2\text{O}_7\text{S}$ $[\text{M}-\text{H}]^-$ 405.0744, nalezeno 405.0751.

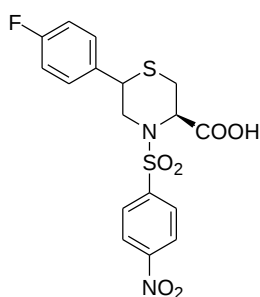
(3R,6S)-4-((4-nitrofenyl)sulfonyl)-6-(*p*-tolyl)thiomorfolin-3-karboxylová kyselina (*A*) **7(1,2,1,1)**



Výtěžek: 8,9 mg (84%); žlutá amorfnní látka. **(A)** ^1H NMR (500 MHz, $\text{DMSO-}d_6$, 25 °C, TMS): δ = 8.30 (d, J = 8.8 Hz, 2H, $\text{HC}^{16,18}$), 8.04 (d, J = 8.8 Hz, 2H, $\text{HC}^{15,19}$), 7.13 (d, J = 8.2 Hz, 2H, $\text{HC}^{9,13}$), 7.11 (d, J = 8.2 Hz, 2H, $\text{HC}^{10,12}$), 4.76 (t, J = 3.5 Hz, 1H, HC^3), 3.88 (dd, J = 2.7, 13.0 Hz, 1H, H_bC^2), 3.85 (dd, J = 3.7, 11.7 Hz, 1H, HC^6), 3.61 (m, J = 11.9 Hz, 1H, H_aC^2), 3.13 (dd, J = 2.8, 13.5 Hz, 1H, H_bC^5), 2.98 (dd, J = 4.0, 13.5 Hz, 1H, H_aC^5), 2.23 (s, 3H, HC^{15}), HO^7 – nebyl detekován. ^{13}C NMR (126 MHz, $\text{DMSO-}d_6$, 25 °C, TMS): δ = 169.88 (C7), 150.08 (C14), 146.06 (C17), 137.92 (C11), 136.28 (C8), 129.81 (C10,12), 129.18 (C15,19), 127.93 (C9,15), 124.80 (C16,18), 55.64 (C3), 49.44 (C2), 44.30 (C6), 31.74 (C5), 21.19 (C20). ^{15}N -NMR (500 MHz, d_6 -DMSO, 25 °C, nitromethan): δ = N4 – 4.76:97.51 (s, HC^3 , l. int.); 3.13:97.51 (d, J = 18.3 Hz, H_bC^5 , h. int.); N21 – 8.04:364.26 (s, $\text{HC}^{16,18}$, h. int.).

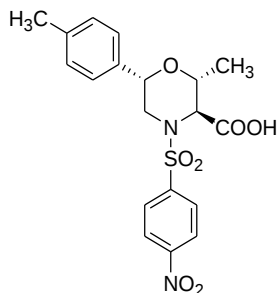
(B) ^1H -NMR (500 MHz, d_6 -DMSO, 25 °C, TMS): δ = 8.33 (d, J = 8.8 Hz, 2H, $\text{HC}^{16,18}$), 8.10 (d, J = 8.8 Hz, 2H, $\text{HC}^{15,19}$), 7.25 (d, J = 8.2, 2H, $\text{HC}^{9,13}$), 7.12 (s, 1H, HC^5), 7.10 (d, J = 8.2, 2H, $\text{HC}^{10,12}$), 5.10 (t, J = 3.5, 1H, HC^3), 3.39 (dd, J = 3.5, 13.0, 1H, H_bC^2), 2.50 (m, 1H, HC^6), 2.38 (dd, J = 13.2, 1H, 3.4, H_aC^2), 2.25 (s, 3H, HC^{20}), HO^7 – nebyl detekován. ^{13}C -NMR (126 MHz, d_6 -DMSO, poměrně TMS): δ = 169.00 (C7), 150.53 (C14), 143.84 (C17), 137.68 (C8), 134.86 (C11), 129.77 (C10,12), 129.07 (C15,19), 125.72 (C9,13), 125.29 (C16,18), 116.12 (C5), 115.87 (C6), 55.52 (C3), 27.66 (C2), 21.17 (C20). ^{15}N -NMR (500 MHz, d_6 -DMSO, poměrně nitromethan): δ = N4 – 7.12:119.30 (s, HC^5 , v. int.), 3.39:119.30 (d, J = 22.7 Hz, H_bC^2 , n. int.); N21 – 8.33:362.67 (s, $\text{HC}^{16,18}$, n. int.); v. int. a n. int. – vysoká a nízká intenzita. Směs látek **A** a **B**. Identifikace a přiřazení ^1H , ^{13}C a ^{15}N signálů pomocí 1D: ^{13}C APT; 2D: 1H-1H gCOSY, 1H-1H gROESY, ^1H - ^{13}C HSQC, ^1H - ^{13}C gHMBC a ^1H - ^{15}N gHMBC. HRMS (ESI-TOF) m/z vypočteno pro $\text{C}_{18}\text{H}_{18}\text{N}_2\text{O}_6\text{S}_2$ $[\text{M-H}]^-$ 421.0510, nalezeno 421.0523.

(R)-4-((4-nitrofenyl)sulfonyl)-6-(4-fluorofenyl)-3,4-dihydro-2H-1,4-thiazin-3-karboxylová kyselina 7(1,2,1,4)



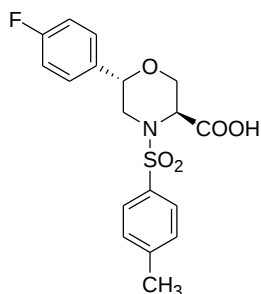
Výtěžek: 10,0 mg (80%); oranžová amorfnní látka. ^1H NMR (400 MHz, $\text{DMSO-}d_6$): δ = 8.35 – 8.39 (m, 2H), 8.11 – 8.16 (m, 2H), 7.39 – 7.45 (m, 2H), 7.14 – 7.21 (m, 2H), 4.85 (br. s., 1H), 3.58 (dd, J = 4.8, 5.9 Hz, 1H, překryv s vodou), 3.43 (dd, J = 3.1, 12.7 Hz, 2H, překryv s vodou), 2.87 – 2.91 (m, 1H), 2.38 (dd, J = 3.1, 12.7 Hz, 1H). ^{13}C NMR (101 MHz, $\text{DMSO-}d_6$): δ = 168.9, 161.6 (d, J = 245.4 Hz), 149.9, 143.6, 133.9 (d, J = 2.9 Hz), 128.5, 127.2 (d, J = 8.6 Hz), 124.7, 115.5 (d, J = 22.1 Hz), 56.8, 55.8, 49.3, 27.5. HRMS (ESI-TOF): m/z vypočteno pro $\text{C}_{17}\text{H}_{15}\text{FN}_2\text{O}_6\text{S}_2$ $[\text{M+H}]^+$ 425.0262, nalezeno 425.0272.

(2R,3S,6S)-2-methyl-4-((4-nitrofenyl)sulfonyl)-6-(p-tolyl)morfolin-3-karboxylová kyselina 7(1,3,1,1)



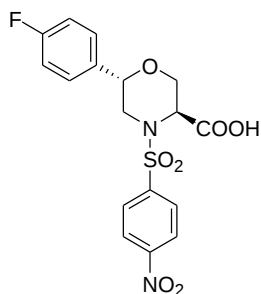
Výtěžek: 17,0 mg (57%); bílá amorfnní látka. ^1H NMR (500 MHz, DMSO- d_6): δ = 8.36 – 8.40 (m, 2H), 8.16 – 8.20 (m, 2H), 7.15 – 7.19 (m, 2H), 7.10 – 7.14 (m, 2H), 4.63 (dd, J = 3.2, 10.0 Hz, 1H), 3.90 – 3.97 (m, 1H, překryv s vodou), 3.61 (dd, J = 3.2, 11.2 Hz, 1H, překryv s vodou), 2.83 (d, J = 7.5 Hz, 1H), 2.34 (t, J = 10.6 Hz, 1H), 2.27 (s, 3H), 1.14 (d, J = 5.7 Hz, 3H). ^{13}C NMR (126 MHz, DMSO- d_6): δ = 170.1, 149.4, 145.3, 137.1, 136.4, 128.7, 128.6, 126.3, 124.0, 70.3, 68.3, 59.5, 47.4, 20.7, 16.6. HRMS (ESI-TOF): m/z vypočteno pro $\text{C}_{19}\text{H}_{20}\text{N}_2\text{O}_7\text{S}$ $[\text{M}-\text{H}]^-$ 419.0899, nalezeno 419.0907.

(3S,6S)-4-((p-tolyl)sulfonyl)-6-(4-fluorofenyl)morfolin-3-karboxylová kyselina 7(1,1,2,4)



Výtěžek: 49,8 mg (44%); bílo-žlutá amorfnní látka. ^1H NMR (500 MHz, DMSO- d_6): δ = 7.71 (d, J = 8.3 Hz, 2H), 7.35 – 7.38 (m, 2H), 7.32 (dd, J = 5.6, 8.76 Hz, 2H), 7.16 (t, J = 8.8 Hz, 2H), 4.45 – 4.47 (m, 1H), 4.36 – 4.41 (m, 1H), 4.29 – 4.33 (m, 1H), 3.72 – 3.76 (m, 1H), 3.63 – 3.68 (m, 1H), 3.23 – 3.29 (m, 1H), 2.37 (s, 3H). ^{13}C NMR (126 MHz, DMSO- d_6): δ = 170.4, 161.8 (d, J = 244.7 Hz), 143.1, 136.8, 135.0 (d, J = 3.6 Hz), 129.6, 128.3 (d, J = 8.4 Hz), 127.0, 115.2 (d, J = 20.4 Hz), 75.9, 68.5, 54.3, 47.2, 21.0. HRMS (ESI-TOF): m/z vypočteno pro $\text{C}_{18}\text{H}_{18}\text{FNO}_5\text{S}$ $[\text{M}+\text{H}]^+$ 380.0962, nalezeno 380.0962. Znečištěno alifatickým kontaminantem.

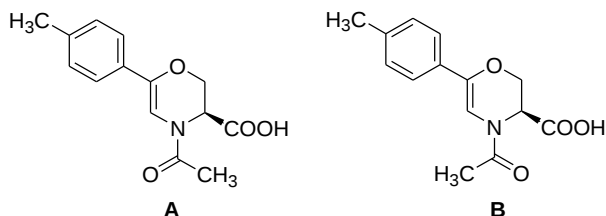
(3S,6S)-4-((4-methoxyfenyl)sulfonyl)-6-(4-fluorofenyl)morfolin-3-karboxylová kyselina 7(1,1,1,4)



Výtěžek: 73,0 mg (80%); bílá amorfnní látka. ^1H NMR (400 MHz, DMSO- d_6): δ = 8.31 – 8.36 (m, 2H), 8.03 – 8.07 (m, 2H), 7.31 – 7.38 (m, 2H), 7.13 – 7.19 (m, 2H), 4.48 (dd, J = 2.9, 11.2 Hz, 1H, překryv

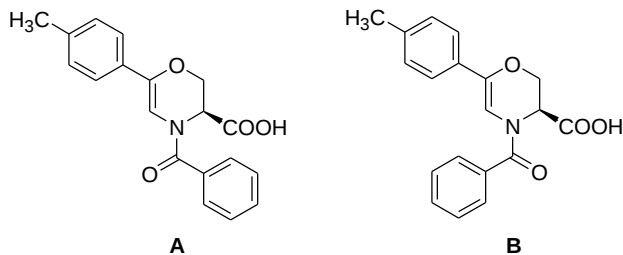
s vodou), 4.41 (d, $J = 2.6$ Hz, 1H, překryv s vodou), 4.35 (d, $J = 10.9$ Hz, 1H, překryv s vodou), 3.77 (d, $J = 3.6$ Hz, 1H, překryv s vodou), 3.72 (dd, $J = 2.6, 12.5$ Hz, 1H, překryv s vodou), 3.21 – 3.28 (m, 1H, překryv s vodou). ^{13}C NMR (101 MHz, DMSO- d_6): $\delta = 170.5, 162.4$ (d, $J = 238.7$ Hz), 150.1, 145.5, 135.5 (d, $J = 2.9$ Hz), 129.1, 128.9 (d, $J = 7.7$ Hz), 124.8, 115.7 (d, $J = 20.1$ Hz), 76.5, 69.4, 55.7, 48.0. HRMS (ESI-TOF): m/z vypočteno pro $\text{C}_{17}\text{H}_{15}\text{FN}_2\text{O}_7\text{S}$ $[\text{M}-\text{H}]^-$ 409.0490, nalezeno 409.0500.

(S)-4-acetyl-6-(*p*-tolyl)-3,4-dihydro-2*H*-1,4-oxazin-3-karboxylová kyselina **10**(1,1,6,1)



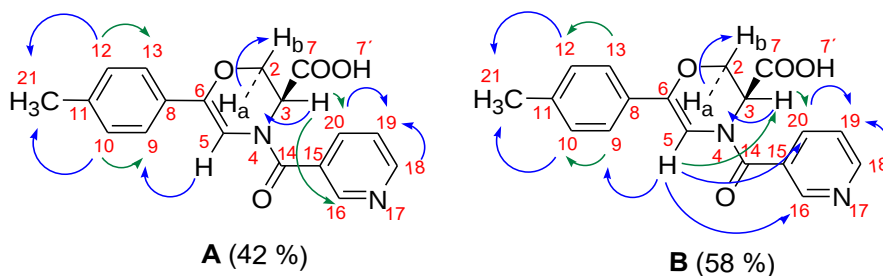
Výtěžek: 14,4 mg (20%); žlutá amorfnní látka. ^1H NMR (400 MHz, DMSO- d_6): $\delta = 7.43 - 7.46$ (m, 2H), 7.32 – 7.34 (m, 2H), 7.21 (d, $J = 1.2$ Hz, 1H), 7.12 (dd, $J = 0.6, 8.6$ Hz, 4H), 6.87 (d, $J = 1.1$ Hz, 1H), 4.80 (dd, $J = 1.0, 10.3$ Hz, 1H), 4.73 – 4.76 (m, 1H), 4.35 – 4.42 (m, 2H), 3.89 (dd, $J = 1.0, 10.3$ Hz, 1H), 3.85 (dd, $J = 2.8, 10.3$ Hz, 1H), 2.28 (s, 3H), 2.27 (s, 3H), 2.22 (s, 3H), 2.02 (s, 3H). ^{13}C NMR (101 MHz, DMSO- d_6): $\delta = 170.7, 170.5, 167.4, 166.5, 138.3, 136.7, 136.6, 136.3, 132.1, 131.9, 129.5, 129.3, 123.4, 123.2, 104.1, 101.5, 67.6, 67.3, 58.1, 53.9, 21.5, 21.5, 21.2, 21.2$. Směs rotamerů **A** a **B** v poměru 67:33. HRMS (ESI-TOF): m/z vypočteno pro $\text{C}_{14}\text{H}_{15}\text{NO}_4$ $[\text{M}+\text{H}]^+$ 262.1075, nalezeno 262.1074.

(S)-4-benzoyl-6-(*p*-tolyl)-3,4-dihydro-2*H*-1,4-oxazin-3-karboxylová kyselina **10**(1,1,7,1)



Výtěžek: 30,2 mg (57%); bílá amorfnní látka. ^1H NMR (400 MHz, DMSO- d_6): $\delta = 7.55$ (br. s., 1H), 7.53 (d, $J = 1.4$ Hz, 2H), 7.51 (d, $J = 1.8$ Hz, 2H), 7.44 – 7.47 (m, 1H), 7.37 – 7.44 (m, 6H), 7.31 – 7.32 (m, 1H), 7.11 – 7.17 (m, 4H), 7.02 – 7.10 (m, 2H), 6.46 (s, 1H), 4.89 (br. s., 1H), 4.84 (d, $J = 10.3$ Hz, 1H), 4.69 – 4.72 (m, 1H), 4.08 (br. s., 1H), 4.05 (d, $J = 2.7$ Hz, 1H), 3.93 (dd, $J = 2.6, 10.3$ Hz, 1H), 2.29 (s, 3H), 2.23 (s, 3H). ^{13}C NMR (101 MHz, DMSO- d_6): $\delta = 170.4, 170.2, 167.2, 166.7, 139.8, 137.1, 137.0, 136.4, 136.1, 135.4, 131.9, 131.6, 130.8, 130.1, 129.5, 129.0, 128.7, 128.5, 127.8, 126.5, 123.5, 123.2, 104.5, 101.6, 67.8, 67.5, 59.5, 54.6, 21.3, 21.2$. Směs rotamerů **A** a **B** v poměru 66:34. HRMS (ESI-TOF): m/z vypočteno pro $\text{C}_{19}\text{H}_{17}\text{NO}_4$ $[\text{M}+\text{H}]^+$ 324.1229, nalezeno 324.1230.

(*S*)-4-(pyridin-3-karbonyl)-6-(*p*-tolyl)-3,4-dihydro-2*H*-1,4-oxazin-3-karboxylová kyselina **10**(1,1,8,1)



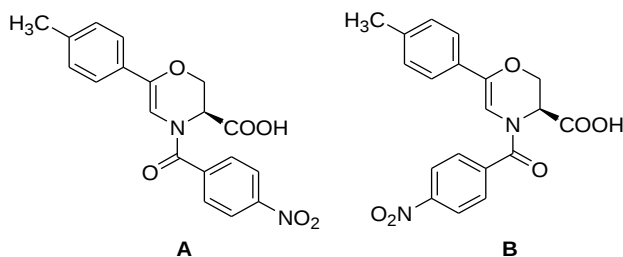
Výtěžek: 30,6 mg (32%); hnědo-žlutá amorfnní látka. (**A**) ^1H NMR (500 MHz, $\text{DMSO}-d_6$): δ = 8.67 (d, J = 4.0 Hz, 1H, $\text{HC}^{18}(\text{A})$), 8.65 (br. s, 1H, $\text{HC}^{16}(\text{A})$), 7.88 (dt, J = 7.7 Hz, 1H, $\text{HC}^{20}(\text{A})$), 7.49 (dd, J = 5.2, 7.5 Hz, 1H, $\text{HC}^{19}(\text{A})$), 7.44 (d, J = 8.0 Hz, 2H, $\text{HC}^{9,13}(\text{A})$), 7.35 (s, 1H, $\text{HC}^5(\text{A})$), 7.17 (d, J = 8.0 Hz, 2H, $\text{HC}^{10,12}(\text{A})$), 4.71 (d, J = 10.6 Hz, 1H, $\text{H}_b\text{C}^2(\text{A})$), 4.54 (s, 1H, $\text{HC}^3(\text{A})$), 4.11 (dd, J = 2.0, 10.6 Hz, 1H, $\text{H}_a\text{C}^2(\text{A})$), 2.30 (s, 3H, $\text{HC}^{21}(\text{A})$), $\text{CH}^6(\text{A}, \text{B})$ – nebyl detekován, $\text{HO}^{7'}(\text{A}, \text{B})$ – nebyl detekován.

^{13}C NMR (126 MHz, $\text{DMSO}-d_6$): δ = 169.9 (C7A), 164.7 (C14A), 150.7 (C18A), 147.6 (C16A), 140.2 (C6A), 137.3 (C11A), 134.7 (C20A), 130.8 (C15A), 130.6 (C8A), 129.1 (C10,12A), 123.5 (C19A), 123.3 (C9,13A), 100.5 (C5A), 66.5 (C2A), 57.5 (C3A), 20.7 (C21A). ^{15}N -NMR (500 MHz, d_6 -DMSO, 25 °C, nitromethan): δ = N4(A) – 7.32:127.55 (s, $\text{HC}^5(\text{A})$, v. int.), 4.68:127.55 (d, J = 12.4 Hz, $\text{H}_b\text{C}^2(\text{A})$, v. int.), 4.51:127.55 (s, $\text{HC}^3(\text{A})$, n. int.); N17(A) – 8.64:312.20 (s, $\text{HC}^{18\text{A}}$, v. int.), 8.62:312.20 (s, $\text{HC}^{16\text{A}}$, v. int.), 7.46:312.20 (s, $\text{HC}^{19\text{A}}$, n. int.); v. int. a n. int. – vysoká a nízká intenzita; A, B – rotamery.

(**B**) ^1H NMR (500 MHz, $\text{DMSO}-d_6$): δ = 8.78 (s, 1H, $\text{HC}^{16}(\text{B})$), 8.75 (d, J = 3.7 Hz, 1H, $\text{HC}^{18}(\text{B})$), 8.02 (d, J = 7.7 Hz, 1H, $\text{HC}^{20}(\text{B})$), 7.58 (dd, J = 4.9, 7.5 Hz, 1H, $\text{HC}^{19}(\text{B})$), 7.25 (d, J = 8.0 Hz, 2H, $\text{HC}^{9,13}(\text{B})$), 7.09 (d, J = 8.0 Hz, 2H, $\text{HC}^{10,12}(\text{B})$), 6.59 (s, 1H, $\text{HC}^5(\text{B})$), 5.21 (br. s, 1H, $\text{HC}^3(\text{B})$), 4.84 (d, J = 10.9 Hz, 1H, $\text{H}_b\text{C}^2(\text{B})$), 4.26 (dd, J = 2.9, 11.2 Hz, 1H, $\text{H}_a\text{C}^2(\text{B})$), 2.25 (s, 3H, $\text{HC}^{21}(\text{B})$), CH^6 – nebyl detekován, $\text{HO}^{7'}$ – nebyl detekován. ^{13}C NMR (126 MHz, $\text{DMSO}-d_6$): δ = 169.2 (C7B), 164.4 (C14B), 151.5 (C18B), 148.7 (C16B), 137.1 (C11B), 136.9 (C6B), 136.0 (C20B), 130.3 (C8B), 129.9 (C15B), 129.0 (C10,12B), 123.7 (C19B), 123.2 (C9,13B), 103.2 (C5B), 66.1 (C2B), 52.6 (C3B), 20.6 (C21B).

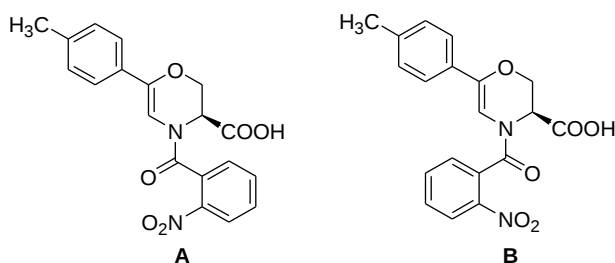
^{15}N -NMR (500 MHz, d_6 -DMSO, 25 °C, nitromethan): δ = N4(B) – 6.56:127.22 (s, $\text{HC}^5(\text{B})$, h. int.), 4.81:127.22 (d, J = 13.7 Hz, $\text{H}_b\text{C}^2(\text{B})$, h. int.), 4.22:127.22 (s, $\text{H}_a\text{C}^2(\text{B})$, l. int.); N17(B) – 8.75:312.29 (s, $\text{HC}^{16\text{B}}$, v. int.), 8.64:312.29 (s, $\text{HC}^{18\text{B}}$, v. int.), 7.54:312.29 (s, $\text{HC}^{19\text{B}}$, n. int.); v. int. a n. int. – vysoká a nízká intenzita. Směs rotamerů **A** a **B** v poměru 42:58. Identifikace a přiřazení ^1H , ^{13}C a ^{15}N signálů pomocí 1D: ^{13}C APT; 2D: 1H-1H gCOSY, 1H-1H gROESY (důležité křížové vrcholy – modré šipky, slabé interakce – zelené šipky), ^1H - ^{13}C HSQC, ^1H - ^{13}C gHMBC a ^1H - ^{15}N gHMBC. HRMS (ESI-TOF): m/z vypočteno pro $\text{C}_{18}\text{H}_{16}\text{N}_2\text{O}_4$ $[\text{M}+\text{H}]^+$ 325.1181, nalezeno 325.1183. Znečištěno alifatickým kontaminantem.

(*S*)-4-(4-nitrobenzoyl)-6-(*p*-tolyl)-3,4-dihydro-2*H*-1,4-oxazin-3-karboxylová kyselina **10**(1,1,10,1)



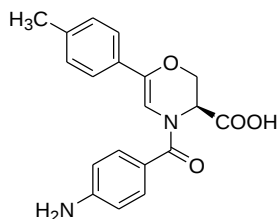
Výtěžek: 35,9 mg (51%); oranžová amorfnní látka. ^1H NMR (400 MHz, DMSO- d_6): δ = ^1H NMR (400 MHz, DMSO- d_6): δ = 8.37 (d, J = 8.7 Hz, 2H), 8.25 (d, J = 8.8 Hz, 2H), 7.83 (d, J = 8.7 Hz, 2H), 7.78 (d, J = 7.3 Hz, 2H), 7.43 (d, J = 8.2 Hz, 2H), 7.34 (d, J = 5.1 Hz, 1H), 7.32 (d, J = 1.0 Hz, 1H), 7.21 (d, J = 8.2 Hz, 1H), 7.16 (d, J = 8.2 Hz, 2H), 7.06 (d, J = 8.1 Hz, 1H), 6.44 (s, 1H), 5.01 (br. s., 1H), 4.86 (d, J = 10.2 Hz, 1H), 4.72 (dd, J = 1.3, 10.4 Hz, 1H), 4.13 (dd, J = 2.9, 10.8 Hz, 1H), 4.09 (br. s., 1H), 3.99 – 4.03 (m, 1H), 2.89 – 2.94 (m, 1H), 2.30 (s, 3H), 2.23 (s, 3H). ^{13}C NMR (101 MHz, DMSO- d_6): δ = 170.2, 169.9, 165.6, 165.1, 148.8, 148.3, 142.3, 140.6, 137.5, 137.4, 131.5, 131.4, 131.3, 131.2, 129.9, 129.5, 129.4, 129.2, 124.5, 124.0, 123.7, 123.6, 103.7, 101.1, 67.4, 67.2, 59.1, 54.3, 21.7, 21.3. Směs rotamerů **A** a **B** v poměru 60:40. HRMS (ESI-TOF): m/z vypočteno pro $\text{C}_{19}\text{H}_{16}\text{N}_2\text{O}_6$ $[\text{M}+\text{H}]^+$ 369.1079, nalezeno 369.1081.

(*S*)-4-(2-nitrobenzoyl)-6-(*p*-tolyl)-3,4-dihydro-2*H*-1,4-oxazin-3-karboxylová kyselina **10**(1,1,11,1)



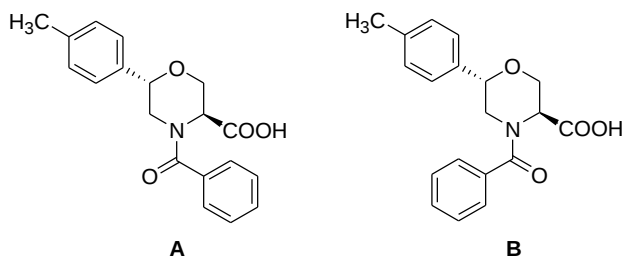
Výtěžek: 1,7 mg (33%); oranžová amorfnní látka. ^1H NMR (500 MHz, DMSO- d_6): δ = 8.28 (dd, J = 1.0, 8.3 Hz, 1H), 8.22 (dd, J = 1.0, 8.3 Hz, 1H), 7.95 (t, J = 7.5 Hz, 1H), 7.81 (d, J = 7.2 Hz, 1H), 7.71 (t, J = 7.2 Hz, 1H), 7.66 (dd, J = 1.1, 7.5 Hz, 1H), 7.63 (d, J = 7.5 Hz, 1H), 7.45 (d, J = 8.2 Hz, 2H), 7.30 (s, 1H), 7.18 (dd, J = 1.0, 8.5 Hz, 4H), 7.05 – 7.08 (m, 2H), 6.32 (s, 1H), 5.20 (br. s., 1H), 4.86 (d, J = 11.1 Hz, 1H), 4.72 (d, J = 10.5 Hz, 1H), 4.24 (br. s., 1H), 4.06 – 4.13 (m, 1H), 3.91 (dd, J = 2.2, 10.5 Hz, 1H, signál překrytý vodou), 2.94 (s, 1H), 2.31 (s, 3H), 2.23 (s, 3H). ^{13}C NMR (126 MHz, DMSO- d_6): δ = 169.9, 169.7, 164.2, 164.0, 146.2, 145.5, 140.8, 138.2, 138.0, 137.8, 135.7, 135.4, 131.8, 131.5, 131.1, 130.9, 130.6, 129.7, 129.5, 128.7, 126.3, 126.2, 125.6, 125.5, 123.9, 123.8, 102.9, 100.5, 67.1, 66.4, 56.8, 52.6, 21.3, 21.3. Směs rotamerů **A** a **B** v poměru 55:45. HRMS (ESI-TOF): m/z vypočteno pro $\text{C}_{19}\text{H}_{16}\text{N}_2\text{O}_6$ $[\text{M}-\text{H}]^-$ 367.0915, nalezeno 367.0925.

(*S*)-4-(4-aminobenzoyl)-6-(*p*-tolyl)-3,4-dihydro-2*H*-1,4-oxazin-3-karboxylová kyselina **10**(1,1,12,1)



Výtěžek: 6,6 mg (8%); oranžová amorfnní látka. ^1H NMR (500 MHz, $\text{DMSO}-d_6$): δ = 7.30 – 7.36 (m, 2H), 7.21 – 7.28 (m, 2H), 7.09 – 7.13 (m, 2H), 6.57 – 6.63 (m, 2H), 6.53 (d, J = 8.5 Hz, 1H), 5.75 (br. s, 2H), 4.77 (d, J = 13.3 Hz, 1H), 2.26 (s, 3H), H_2C^2 nebyl detekován. ^{13}C NMR (126 MHz, $\text{DMSO}-d_6$): δ = 169.1, 167.4, 145.5, 136.5, 134.0, 131.0, 130.9, 130.5, 129.0, 122.8, 112.7, 103.7, 66.4, 52.3, 20.7. HRMS (ESI-TOF): m/z vypočteno pro $\text{C}_{19}\text{H}_{18}\text{N}_2\text{O}_4$ $[\text{M}+\text{H}]^+$ 339.1338, nalezeno 339.1339. Znečištěno alifatickým kontaminantem.

(3*S*,6*S*)-4-benzoyl-6-(*p*-tolyl)-morfolin-3-karboxylová kyselina **11**(1,1,7,1)



Výtěžek: 4,3 mg (33%); žlutá amorfnní látka. ^1H NMR (400 MHz, $\text{DMSO}-d_6$): δ = 7.41 – 7.42 (m, 8H), 7.25 (d, J = 8.3 Hz, 4H), 7.16 (d, J = 8.4 Hz, 4H), 7.08 (s, 2H), 4.72 (d, J = 3.3 Hz, 1H), 4.58 (d, J = 11.0 Hz, 1H), 4.41 – 4.44 (m, 1H), 4.34 – 4.40 (m, 1H), 4.30 (d, J = 12.1 Hz, 1H), 3.77 (br. s., 1H), 3.75 (d, J = 3.7 Hz, 1H), 3.65 – 3.69 (m, 1H), 3.59 – 3.64 (m, 1H), 3.48 (t, J = 11.8 Hz, 1H), 3.07 (m, 1H), 2.79 (dt, J = 0.7, 6.6 Hz, 1H), 2.29 (s, 3H), 2.22 (s, 3H). ^{13}C NMR (101 MHz, $\text{DMSO}-d_6$): δ = 171.7, 171.4, 170.3, 169.5, 137.1, 137.0, 136.9, 136.7, 136.6, 136.3, 129.3, 129.2, 128.9, 128.8, 128.4, 128.3, 126.9, 126.8, 126.0, 77.0, 76.9, 68.5, 68.4, 59.6, 59.4, 53.5, 51.5, 45.5, 20.8, 20.7. Směs rotamerů **A** a **B** v poměru 54:46. HRMS (ESI-TOF): m/z vypočteno pro $\text{C}_{19}\text{H}_{19}\text{NO}_4$ $[\text{M}+\text{H}]^+$ 326.1384, nalezeno 326.1387.

6. ZÁVĚR

Předložená diplomová práce navazuje na bakalářskou práci zaměřenou na přípravu benzo[f][1,4]diazepin-5-onů. Během jejich syntézy vycházející ze serinu a threoninu byla pozorována tvorba *N*-sulfonamidů a *N*-acylamidů morfolinu, jejichž struktura byla potvrzena pomocí ¹H-NMR¹¹. Cílem práce bylo vypracovat literární řešerši týkající se problematiky derivátů morfolin/thiomorfolin-3-karboxylových kyselin. Dále rozvinout a optimalizovat nalezené reakce do obecné metody a ověřit její použitelnost pro přípravu analogických derivátů. Třetím cílem byla syntéza peptidomimetik obsahujících morfolinový/oxazinový kruh. Na závěr bylo potřeba u navržených *N*-acylamidů potvrdit tvorbu konformačních izomerů vznikajících předpokládanou rotací kolem C-N amidické vazby, určit konfiguraci na chirálních centrech a ověřit enantioselektivní průběh syntézy.

Nejprve byla navržená syntéza (Přístup A) rozšířena o sérii látek vycházející ze tří Fmoc- α -aminokyselin (serinu, cysteinu a threoninu) a variabilních α -bromacetofenonů. Dále byl sledován vliv linkeru (R^1) na průběh alkylačních reakcí, kdy se jako nejvhodnější ukotvení jeví imobilizace na Wangově a Wang-piperazinovém linkeru. Kromě modifikace syntézy s odlišnou substitucí R^4 bylo přistoupeno k tzv. resulfonylacím vycházejících z deprotektovaného alkylovaného intermediátu podrobeného reakci s novým sulfonyl chloridem. Vzhledem k omezené aplikovatelnosti této metody byly testovány tzv. „přímé“ sulfonylace, jejichž průběh byl znesnadněn přítomností methylové skupiny či elektrondonorních skupin v poloze 4 ($R^3 = \text{CH}_3$, 4- CH_3 -Ph, 4- CH_3O -Ph). Dále byly optimalizovány podmínky štěpení a spontánní cyklizace vedoucí k žádaným derivátům morfolinu/thiomorfolinu, jejichž uzavření do cyklu znesnadňovala přítomnost sekundárního či terciárního aminu v poloze R^1 , methylové skupiny v pozici R^2 nebo elektrondonorních skupin v polohách $R^3 = 4\text{-CH}_3\text{O-Ph}$, 4- $\text{NH}_2\text{-Ph}$ a $R^4 = 4\text{-CH}_3\text{O}$. Vzhledem k nekvantitativnímu průběhu cyklizací u některých látek, byla testována zpětná cyklizace lineárních intermediátů, které bylo dosaženo stáním v čisté TFA při -18 °C. Naopak při vyšších teplotách docházelo k opětovnému otevírání cyklu. Nasycené deriváty morfolinu/thiomorfolinu byly připraveny štěpením v TFA/TES/DCM (10:1:9). Později se ukázalo, že cyklizace probíhá s vyšší surovou čistotou standardním štěpením v 50% TFA/DCM a teprve následným přidavkem TES. Další komplikace nastala při separaci cílových derivátů s variabilními substituenty R^4 rozpuštěných v MeOH, kdy docházelo k částečnému otevírání cyklu a vzniku esterifikované nežádoucí látky, jejíž struktura byla potvrzena pomocí NMR (Příloha 1 – 2).

Přístup B byl věnován syntéze *N*-acylamidů dihydrooxazinů/morfolinů vycházejících z alkylovaného prekursoru připraveného podle protokolu popsáno v přístupu A. Po optimalizaci acylací a následných cyklizací byly připraveny odpovídající produkty, kromě derivátu s navázaným α -Fmoc-glycinem v pozici R^3 . Bohužel, během separace docházelo zřejmě vlivem kombinace zbytkové TFA a složení mobilního systému (MeCN:AmAc) k částečnému otevírání cyklu připravovaných látek a snížení konečného výtěžku. Proto bylo po vzoru „přímých“ sulfonylací přistoupeno k tzv. „přímým“ acylacím, které ovšem neposkytovaly žádané *N*-acylamidy a bylo od testování jejich přípravy upuštěno.

Další problematika se týkala syntézy peptidomimetik obsahujících morfolin/oxazin-3-karboxylové fragmenty připravovaných pomocí dvou přístupů: (i) přímou metodou založenou na spojování určitého počtu Fmoc- α -aminokyselin (alaninu, serinu) přes peptidickou vazbu a následné tvorby oxazinu/morfolinu z poslední navázané aminokyseliny (serinu), nebo (ii) nepřímou metodou založenou na redukci nitroskupiny v poloze 4 na již nasyntetizovaném lineárním prekursoru oxazinu/morfolinu, která měla být dále modifikována acylací Fmoc- α -aminokyselinou za následné výstavby peptidového řetězce. Finální cyklizace pak měla vést k žádaným peptidomimetikům. Aplikace obou přístupů bohužel nevedla k cílovým *N*-acylamidům, nicméně na základě optimalizací redukcí nitroskupiny byly nasyntetizovány amino-prekurzory peptidomimetik a optimalizovány podmínky jejich cyklizace a separace.

Důležitou součástí práce bylo potvrdit tvorbu konformačních izomerů vznikajících rotací kolem C-N amidické vazby u navržených *N*-acylovaných analogů, kde u většiny derivátů převládal při 25 °C izomer v *trans* uspořádání, kromě derivátu s $R^3 = \text{Py-3-yl}$. Zahřívání *N*-acylamidů do 100 °C vedlo ke změně konfigurace například u látky s $R^3 = 2\text{-NO}_2\text{-Ph}$, naopak u derivátu s $R^3 = \text{Py-3-yl}$ tato změna nebyla pozorována.

Na závěr byla určena konfigurace chirálních center C3 s využitím SFC. Pomocí 2D-experimentů (ROESY a NOESY) byla následně určena absolutní konfigurace center C2 a C6 vztažená k referenčnímu chirálnímu centru C3 serinových (*2R,3S,6S*) a cysteinových derivátů (*3R,6S*). Zároveň jsme zjistili, že navržená syntéza derivátů morfolinu/thiomorfolinu je téměř enantioselektivní.

7. SEZNAM ZKRATEK

ACE	inhibitor angiotensin-1-konvertujícího enzymu
Ala	alanin
AM	aminomethylová pryskyřice
AmAc	amonium acetát
aq	vodný roztok
BAL	„Backbone“ amidový linker
Boc	<i>tert</i> -butyloxykarbonyl
(Boc) ₂ O	di- <i>tert</i> -butyldikarbonát
BB test	test s bromfenolovou modří
BTEAC	benzyltriethylamonium chlorid
BTPP	<i>tert</i> -butylimino-tri(pyrrolidino)fosforan
Bu ₃ SnH	tributylstannan
Bn	benzyl
Bz	benzoyl
C18	oktadecylová revezní fáze
CSA	kafrsulfonová kyselina
Cbz-Cl	benzyl chlorformiát
CDI	karbonyldiimidazol
DBU	1,8-diazabicyklo[5.4.0]undec-7-en
DCC	<i>N,N'</i> -dicyklohexylkarbodiimid
DCM	dichlormethan
DEA	diethanolamin
DEAD	diethyl azodikarboxylát
DIAD	diisopropyl azodikarboxylát
DIPA	diisopropylamin
DIEA	<i>N,N</i> -diisopropylethylamin
DIC	<i>N,N'</i> -diisopropylkarbodiimid
di-Tol-D-vinná kyselina	di-toluoyl-D-vinná kyselina
DMAP	4-(<i>N,N</i> -dimethylamino)-pyridin
DMF	<i>N,N</i> -dimethylformamid
DMP	Dess-Martin perjodnan
DMS	dimethylsulfid
DMSO	dimethylsulfoxid
DMSO- <i>d</i> ₆	deuterovaný dimethylsulfoxid
EDC	1-ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)karbodiimid

EtOAc	ethyl acetát
Et ₂ NH	<i>N</i> -diethylamin
Et ₃ N	triethylamin
Et ₃ SiH	triethylsilan
Fmoc-OSu	<i>N</i> -(9-fluorenymethoxykarbonyl)-sukcinimid
HOBt	1-hydroxybenzotriazol
HPLC	vysoce účinná kapalinová chromatografie (High Performance Liquid Chromatography)
HMBC	heteronukleární ¹ H- ¹³ C korelace přes dvě a více chemických vazeb (Heteronuclear Multiple Bond Correlation, 2D-NMR)
HRMS	hmotnostní spektrometrie s vysokým rozlišením (High-Resolution Mass Spectrometry)
HSQC	heteronukleární ¹ H- ¹³ C korelace přes jednu chemickou vazbu (Heteronuclear Single Quantum Coherence, 2D-NMR)
IPA	isopropanol
kPa	kilopascal
LC	kapalinová chromatografie (Liquid Chromatography)
MCPBA	<i>m</i> -chlorperoxybenzoová kyselina
Me ₃ SiI	trimethylsilyl jodid
MS	hmotnostní spektrometrie (Mass Chromatography)
MsOH	methansulfonová kyselina
MTBE	methyl- <i>tert</i> -butyl ether
NaEH	2-ethylhexanoát sodný
NBS	<i>N</i> -bromsukcinimid
NMM	<i>N</i> -methylmorfolin
NMO	<i>N</i> -methylmorfolin- <i>N</i> -oxid
NMR	nukleární magnetická rezonance
NOESY	homonukleární ¹ H- ¹ H korelace přes prostor (Nuclear Overhauser Effect Spectroscopy, 2D-NMR)
p.a.	chemicky čistá látka
Pd(dba) ₃	tris(dibenzylidenaceton) paladia
PG	protektivní skupina (protective group)
PhH	benzen
Phth	ftalát
PIP	piperidin
PS	protonová houba (Proton Sponge)
<i>p</i> -TsOH	<i>p</i> -toluensulfonová kyselina

Py	pyridin
ROESY	¹ H- ¹ H korelace přes prostor pomocí cross-relaxace (Rotating-frame Overhauser Effect Spectroscopy, 2D-NMR)
RVO	rotační vakuová odparka
Ser	serin
SPE	extrakce pevnou fází (Solid Phase Extraction)
(<i>S,S</i>)- <i>t</i> Bu-BOX	2,2'-isopropylidenbis[(4 <i>S</i>)- <i>terc</i> -butyl-2-oxazolin]
TBAHS	tetrabutylamonium hydrogensulfid
TBDMS	<i>terc</i> -butyldimethylsilan
TBDPS	<i>terc</i> -butyldifenylsilan
<i>t</i> Bu	<i>terc</i> -butyl
TBTU	2-(1 <i>H</i> -benzotriazol-1-yl)-1,1,3,3,-tetramethyluronium tetrafluorborát
TFA	trifluoroctová kyselina
THF	tetrahydrofuran
TES	triethylsilan
TfOH	trifluoromethansulfonová kyselina
TIS	triisopropylsilan
TMS	trimethylsilylether
TMSCH ₂ N ₂	trimethylsilyldiazomethan
TMSOTf	trimethylsilyl trifluoromethansulfonát
Tos-Cl	<i>p</i> -methylbenzensulfonyl chlorid (tosyl chlorid)
TPP	thyamin pyrofosfát
TsOH	<i>p</i> -toluensulfonová kyselina
UHPLC	vysoce účinná kapalinová chromatografie (Ultra High Performance Liquid Chromatography)
UV	ultrafialové záření (Ultraviolet Light)
Z-Phe-OH	<i>N</i> -(karbobenzyloxy)-L-fenylalanin
¹ H-NMR	protonové spektrum NMR
1-Me	methyl 2-chloro-2-cyklopropyliden acetát
4-NosCl	4-nitrobenzensulfonyl chlorid
¹³ C-NMR	uhlíkové spektrum NMR

8. REFERENCE

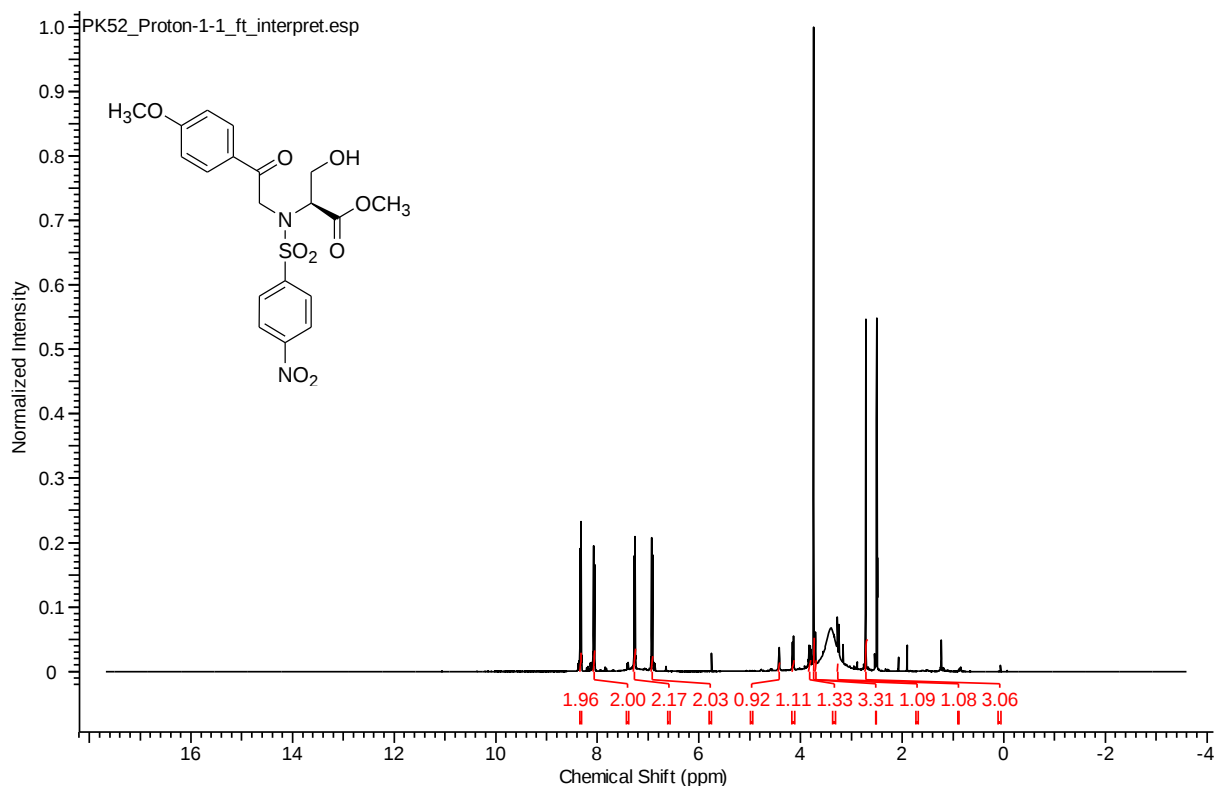
- (1) Guarna, A.; Trabocchi, A.; Menchi, G.; Lalli, C.; Sladojevich, F.; Cini, N. *WO 2008129004 A3*, **2008**.
- (2) Fulopova, V.; Krchnak, V. *ACS Comb. Sci.* **2014**, *16*, 412.
- (3) Tokitoh, N.; Igarashi, Y.; Ando, W. *Tetrahedron Lett.* **1987**, *28*, 5903.
- (4) Joseph, J. T.; Elmore, J. D.; Wong, J. L. *J. Am. Chem. Soc.* **1990**, *55*, 471.
- (5) Shimozu, Y.; Shibata, T.; Ojika, M.; Uchida, K. *Chem. Res. Toxicol.* **2009**, *22*, 957.
- (6) Wijtmans, R.; Vink, M. K. S.; Schoemaker, H. E.; Van Delft, F. L.; Blaauw, R. H.; Rutjes, F. P. J. T. *Synthesis* **2004**, 641.
- (7) Smith, L. E. *Ind. Eng. Chem.* **1938**, *10*, 60.
- (8) Blizzard, T. A.; Biftu, T. *WO 2013148478 A1*, **2013**.
- (9) Carr, G.; Williams, D. E.; Diaz-Marrero, A. R.; Patrick, B. O.; Bottriell, H.; Balgi, A. D.; Donohue, E.; Roberge, M.; Andersen, R. J. *J. Nat. Prod.* **2010**, *73*, 422.
- (10) Schutznerova, E.; Krchnak, V. *ACS Comb. Sci.* **2015**, *17*, 137.
- (11) Kralova, P. Bachelor Thesis, Palacky University Olomouc. Faculty of Science, **2014**.
- (12) Pearson, D. A.; Blanchette, M.; Baker, M. L.; Guindon, C. A. *Tetrahedron Lett.* **1989**, *30*, 2739.
- (13) Yanagisawa, H.; Ishihara, S.; Ando, A.; Kanezaki, T.; Koike, H.; Tsujita, Y. *JP 60237076 A*, **1985**, 28.
- (14) Cinia, N.; Trabocchia, A.; Menchia, G.; Bottoncettib, A.; Raspantib, S.; Pupib, A.; Guarnaa, A. *Bioorg. Med. Chem.* **2009**, *17*, 1542.
- (15) Stein, R. L. *Adv. Protein Chem.* **1993**, *44*, 1.
- (16) Yar, M.; McGarrigle, E. M.; Aggarwal, V. K. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2008**, *120*, 3844.
- (17) Yar, M.; McGarrigle, E. M.; Aggarwal, V. K. *Org. Lett.* **2009**, *11*, 257.
- (18) Matlock, J. V.; Scarponi, C.; Rossi, M. G.; Testaferri, L.; Tiecco, M. *Org. Lett.* **2015**, *17*, 5044.
- (19) Bagnoli, L.; Scarponi, C.; Rossi, M. G.; Testaferri, L.; Tiecco, M. *Chem. Eur. J.* **2011**, *17*, 993.
- (20) Bagnoli, L.; Scarponi, C.; Testaferri, L.; Tiecco, M. *Tetrahedron: Asymmetry* **2009**, *20*, 1506.
- (21) Gharpure, S. J.; Prasad, J. V. K. *J. Org. Chem.* **2011**, *76*, 10325.
- (22) Deka, M. J.; Indukuri, K.; Sultana, S.; Borah, M.; Saikia, A. K. *J. Org. Chem.* **2015**, *80*, 4349.
- (23) Bezanson, M.; Pottel, J.; Bilbeisi, R.; Toumieux, S.; Cueto, M.; Moitessier, N. *J. Org. Chem.* **2013**, *78*, 872.
- (24) Josien, H. B.; Clader, J. W.; Bara, T. A.; Xu, R.; Li, H.; Pissarnitski, D.; Zhao, Z. *WO 2006004880 A2*, **2006**.
- (25) O'Neil, S. V.; Wang, Y.; Laufersweiler, M. C.; Oppong, K. A.; Soper, D. L.; Wos, J. A.; Ellis, C. D.; Baize, M. W.; Bosch, G. K.; Fancher, A. N.; Lu, W.; Suchanek, M. K.; Wang, R. L.; De, B.; Demuth Jr, T. P. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2005**, *15*, 5434.
- (26) Levin, J. I.; Chen, J. M.; Laakso, L. M.; Du, M.; Du, X.; Venkatesan, A. M.; Sandanayaka, V.; Zask, A.; Xu, J.; Xu, W.; Zhang, Y.; Skotnicki, J. S. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2005**, *15*, 4345.
- (27) Almstead, N. G.; Bradley, R. S.; Pikul, S.; De, B.; Natchus, M. G.; Taiwo, Y. O.; Gu, F.; Williams, L. E.; Hynd, B. A.; Janusz, M. J.; Dunaway, C. M.; Mieling, G. E. *J. Med. Chem.* **1999**, *42*, 4547.
- (28) Larsson, U.; Carlson, R.; Leroy, J. *Acta Chem. Scand.* **1993**, *47*, 380.
- (29) Burkholder, T. P.; Le, T.-B.; Giroux, E. L.; Flynn, G. A. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **1992**, *2*, 579.
- (30) Claveau, E.; Gillaizeau, I.; Kalinowska-Tluscik, J.; Bouyssou, P.; Coudert, G. *J. Org. Chem.* **2009**, *74*, 2911.
- (31) Lalli, C.; Trabocchi, A.; Sladojevich, F.; Menchi, G.; Guarna, A. *Chem. Eur. J.* **2009**, *15*, 7871.
- (32) Dyatkin, A. B.; Hoekstra, W. J.; Maryanoff, B. E.; Matthews, J. M. *WO 2000043398 A3*, **2001**.
- (33) Chodnekar, M. S.; Crowther, A. F.; Hepworth, W.; Howe, R.; McLoughlin, B. J.; Mitchell, A.; Rao, B. S.; Slatcher, R. P.; Smith, L. H.; Stevens, M. A. *J. Med. Chem.* **1972**, *15*, 49.
- (34) Bartsch, H.; Erker, T.; Neubauer, G. *J. Heterocycl. Chem.* **1989**, *26*, 205.
- (35) de Meijere, A.; Kuchuk, I.; Sokolov, V.; Labahn, T.; Rauch, K.; Es-Sayed, M.; Krämer, T. *Eur. J. Med. Chem.* **2003**, *2003*, 985.
- (36) Henry, N.; Sánchez, I.; Sabatié, A.; Bénétiau, V.; Guillaumet, G.; Pujol, M. D. *Tetrahedron Lett.* **2006**, *62*, 2405.

- (37) Ge, P.; Guo, Q.; Hodgetts, K. J.; Hutchison, A. J.; Ihle, D. C.; Li, G.; Peterson, J. M. *WO 2007101007 A2*, **2007**.
- (38) Lia, H.; Xua, R.; Colea, D.; Cladera, J. W.; Greenleea, W. J.; Nomeirb, A. A.; Lixin Songc, L. *Z. Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2010**, *20*, 6606
- (39) Dagostino, E. F.; Dong, L.; Guo, C.; Hou, X.; Margosiak, S. A. *WO 2004087720 A1*, **2004**.
- (40) Delos, S. E. G.; Sandanayaka, V. P. *WO 2003037852 A1*, **2003**.
- (41) Ouellette, M. A.; Potts, B. C. M.; Srirangam, J. K.; Tibbetts, A. R.; Zhang, K. E. *WO 2003104224 A1*, **2003**.
- (42) Nie, A.; Xiao, J.; Wang, L.; Liao, G.; Liu, H.; Ren, S.; Li, S. *Sci. CHINA Chem.* **2007**, *50*, 405.
- (43) Armani, E.; Amari, G.; Carzaniga, L.; Capaldi, C.; Esposito, O.; Villetti, G.; De, F. R. *WO 2012168226 A1*, **2012**.
- (44) Guo, C.; Dong, L.; Kephart, S.; Hou, X. *Tetrahedron Lett.* **2010**, *51*, 2909.
- (45) Blizzard, T. A.; Singh, S.; Patil, B.; Chidurala, N.; Komanduri, V.; Debnath, S.; Belyakov, S.; Crespo, A.; Struck, A.; Kurtz, M.; Wiltsie, J.; Shen, X.; Sonatore, L.; Arocho, M.; Lewis, D.; Ogletree, M.; Biftu, T. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2014**, *24*, 1111.
- (46) Sladojevich, F.; Trabocchi, A.; Guarna, A. *Org. Biomol. Chem.* **2008**, *6*, 3328.
- (47) Trabocchi, A.; Stefanini, I.; Morvillo, M.; Ciofi, L.; Cavalieri, D.; Guarna, A. *Org. Biomol. Chem.* **2010**, *8*, 5552.
- (48) Matthews, J. M.; Dyatkin, A. B.; Evangelisto, M.; Gauthier, D. A.; Hecker, L. R.; Hoekstra, W. J.; Liu, F.; Poulter, B. L.; Sorgi, K. L.; Maryanoff, B. E. *Tetrahedron: Asymmetry* **2004**, *15*, 1259.
- (49) Paradisi, M. P.; Zecchini, G. P.; Torrini, I.; Lucente, G. *J. Heterocycl. Chem.* **1990**, *27*, 1661.
- (50) Malhotra, R.; Dey, T. K.; Basu, S.; Hajra, S. *Org. Biomol. Chem.* **2015**, *13*, 3211.
- (51) Sladojevich, F.; Trabocchi, A.; Guarna, A. *J. Org. Chem.* **2007**, *72*, 4254.
- (52) Mayer, S.; Arrault, A.; Guillaumet, G.; Mérou, J.-Y. *J. Heterocycl. Chem.* **2001**, *38*, 221.
- (53) Flynn, G. A.; Beight, D. W. *US 5208230 A*, **1993**.
- (54) Sladojevich, F.; Trabocchi, A.; Guarna, A. *Org. Biomol. Chem.* **2008**, *6*, 3328.
- (55) Lenci, E.; Innocenti, R.; Menchi, G.; Faggi, C.; Trabocchi, A. *Org. Biomol. Chem.* **2015**, *13*, 7013.
- (56) Ella-Menye, J. R. Book. *Synthesis of novel chiral heterocyclic compounds for antibacterial agents and peptidomimetics*; ProQuest: University of New Orleans, 2007.
- (57) Abramova, T. V.; Belov, S. S.; Tarasenko, Y. V.; Silnikov, V. N. *Beilstein J. Org. Chem.* **2014**, *10*, 1151.
- (58) Fox, C. M. J.; Weller, D. D. *US 8299206 B2*, **2012**.
- (59) Pérez-Rentero, S.; Alguacil, J.; Robles, J. *Tetrahedron* **2009**, *65*, 1171.
- (60) Bhadra, J.; Kundu, J.; Ghosh, K. C.; Sinha, S. *Tetrahedron Lett.* **2015**, *56*, 4565.
- (61) Lukashuk, E. I.; Abdurakhmanova, E. R.; Kondratyuk, K. M.; Golovchenko, A. V.; Brovarets, V. S. *Russ. J. Gen. Chem.* **2015**, *85*, 71.
- (62) Smyslova, P.; Kisseljova, K.; Krchnak, V. *ACS Comb. Sci.* **2014**, *16*, 500.
- (63) Pudelova, N.; Krchnak, V. *J. Comb. Chem.* **2009**, *11*, 370.
- (64) Fulopova, V. Diploma Thesis, Palacky University Olomouc. Faculty of Science, **2011**.

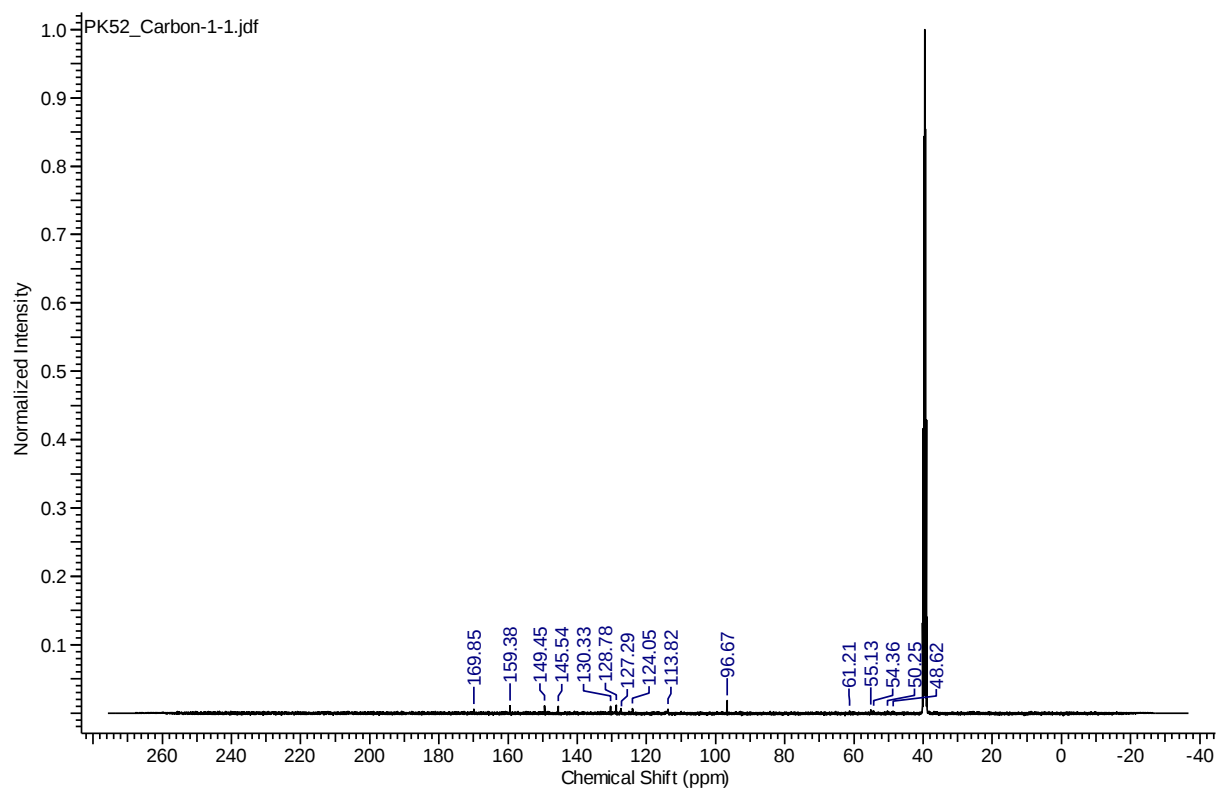
9. PŘÍLOHY

V závěru práce byla některá spektra značně znečištěna alifatickým kontaminantem pocházejícím buďto z DMSO, či semipreparativní HPLC, což výrazně ovlivnilo konečný výtěžek cílových sloučenin až o polovinu a z časových důvodů nebylo možno dané látky přecistit.

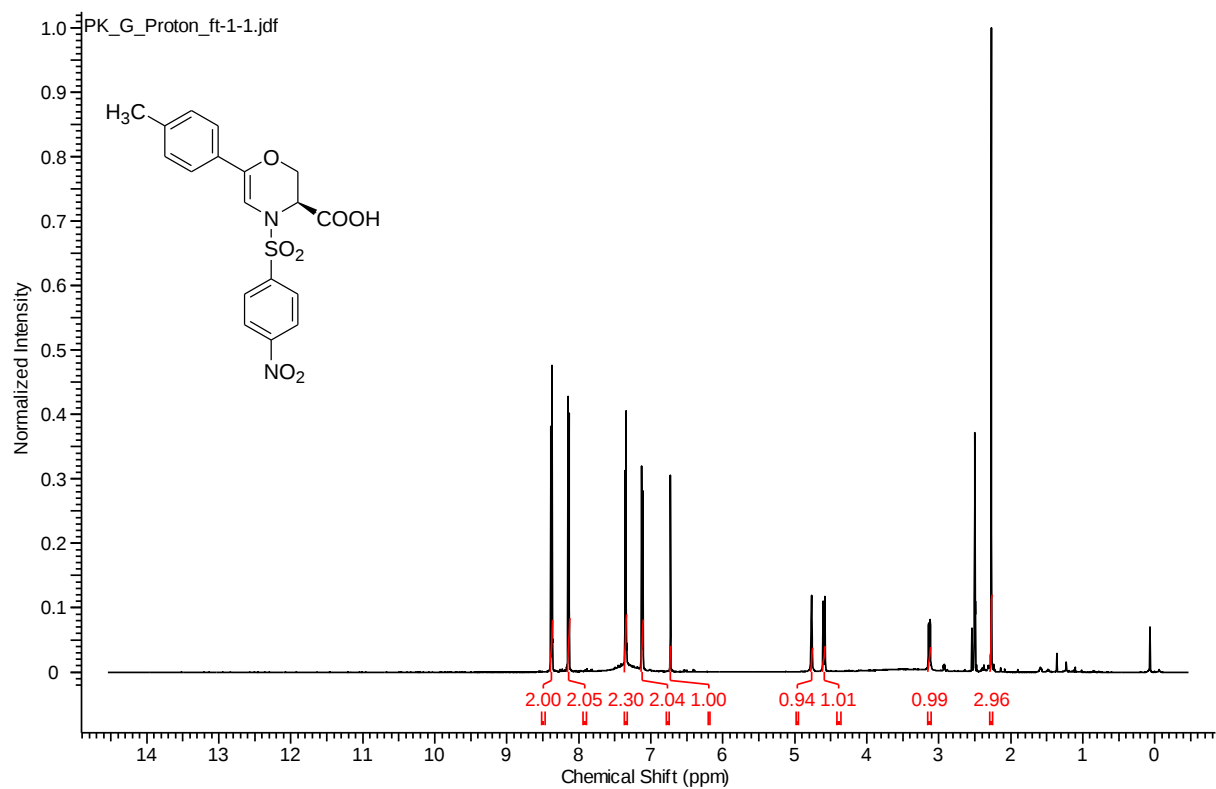
Příloha 1: ^1H -NMR spektrum sloučeniny 5c(OCH₃,1,1,2).



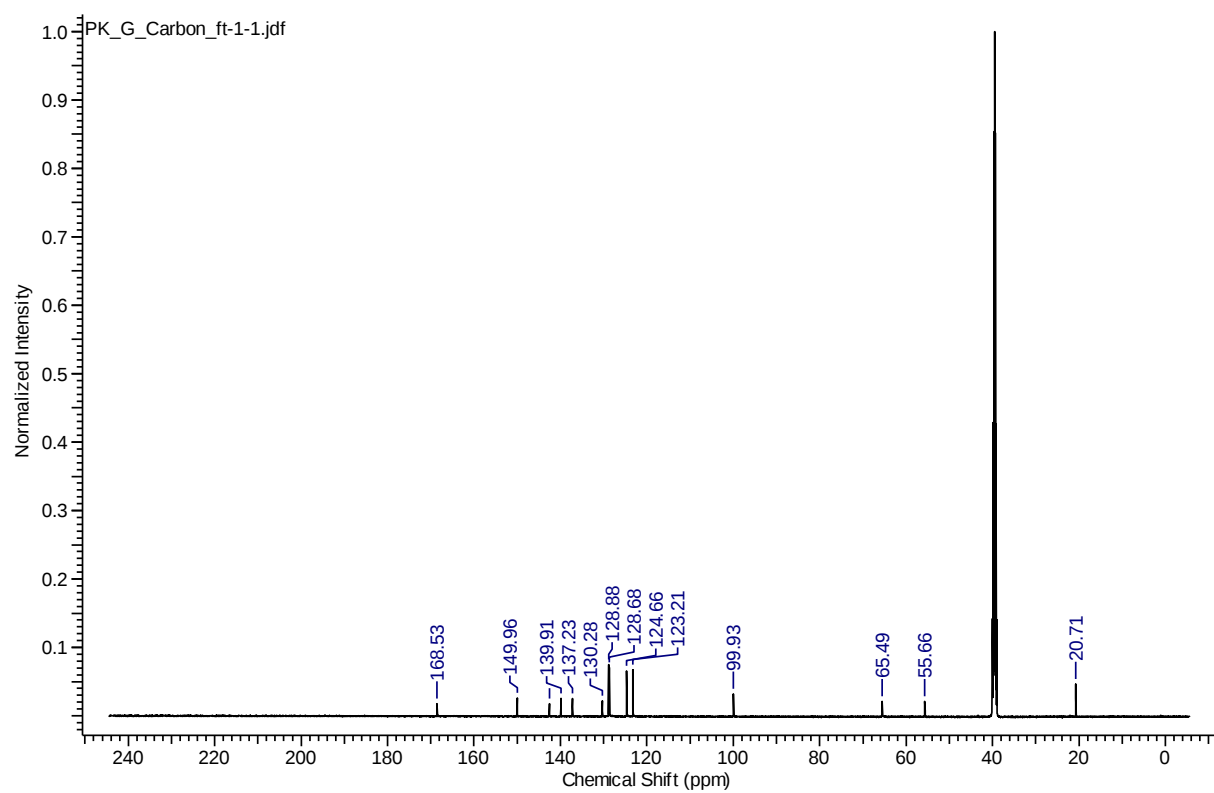
Príloha 2: ^{13}C -NMR spektrum sloučeniny **5c**(OCH_3 ,1,1,2).



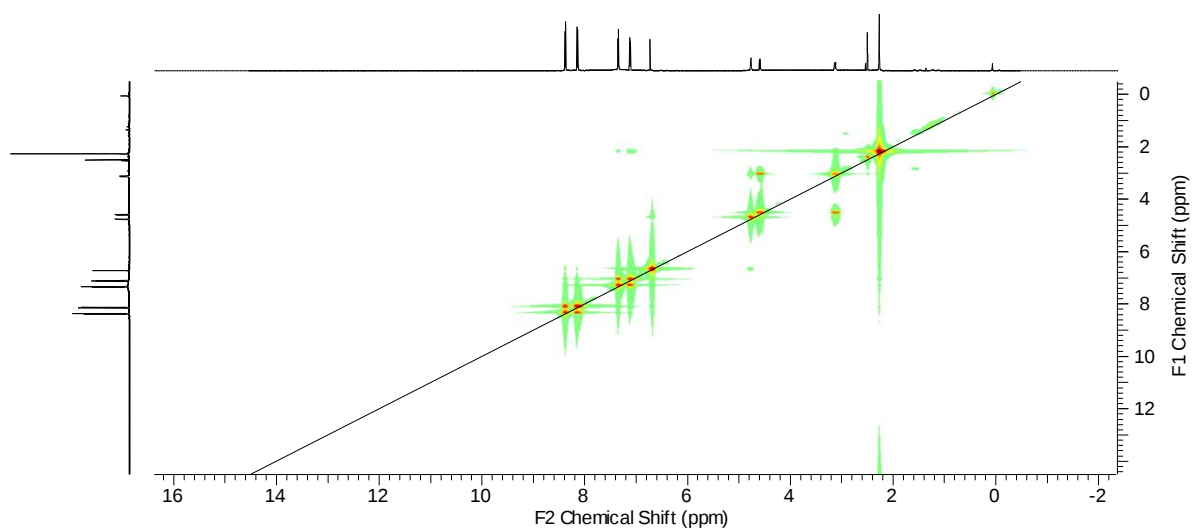
Príloha 3: ^1H -NMR spektrum sloučeniny **6**(1,1,1,1).



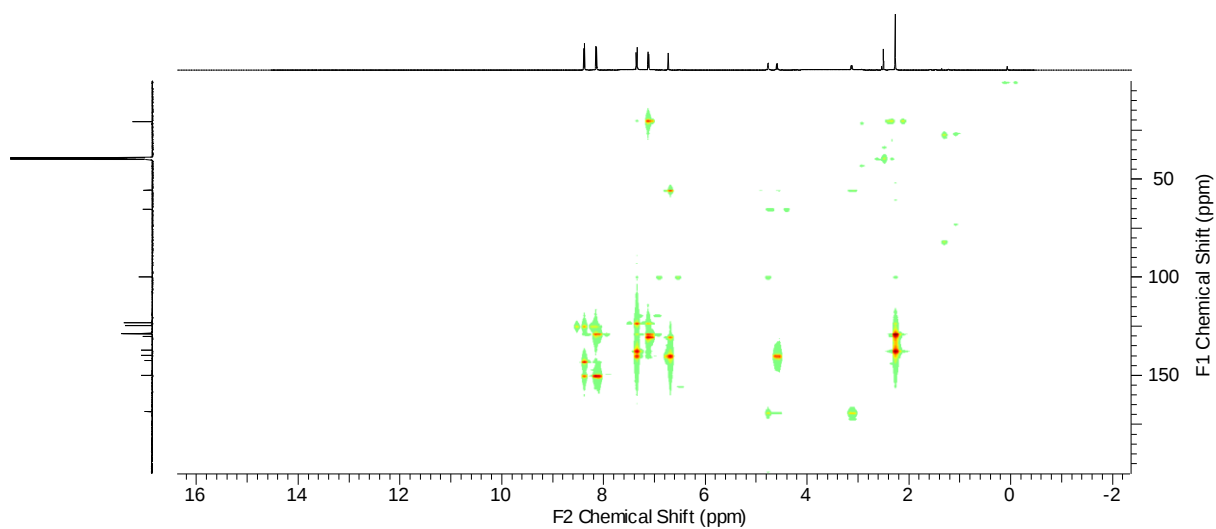
Příloha 4: ^{13}C -NMR spektrum sloučeniny **6**(1,1,1,1).



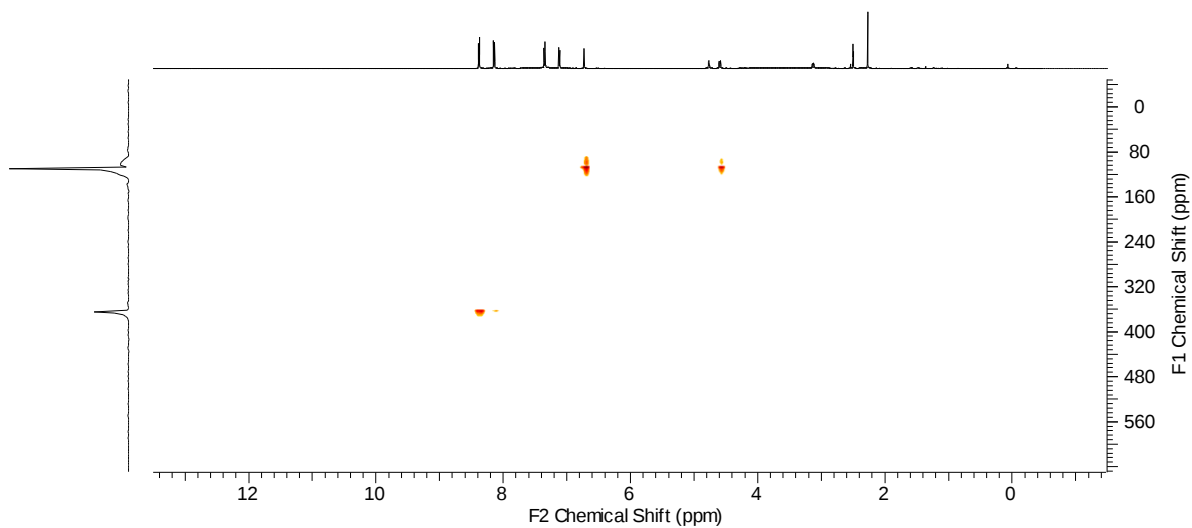
Příloha 5: COSY spektrum sloučeniny 6(1,1,1,1).



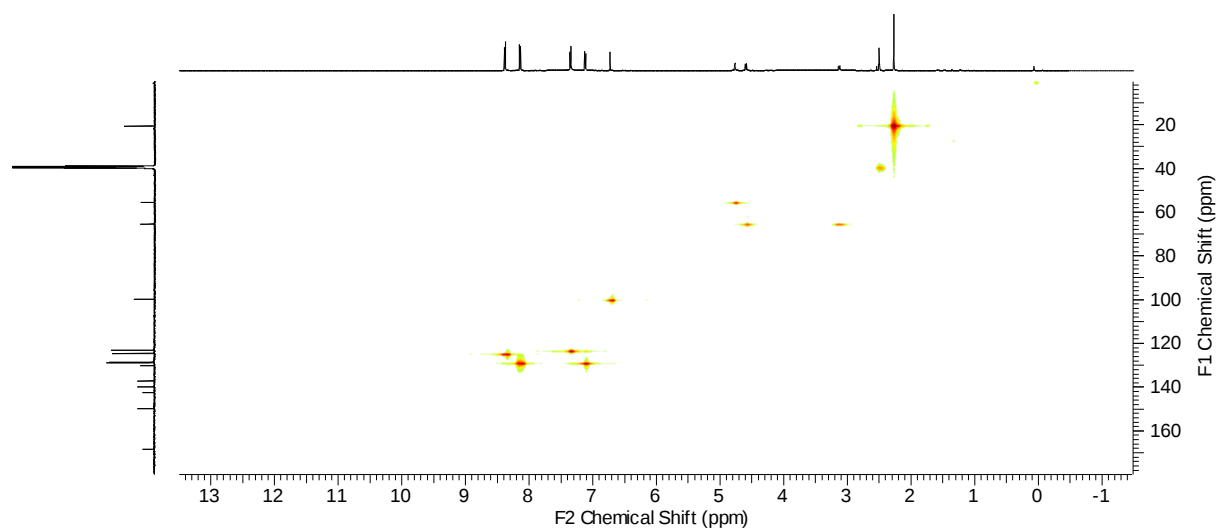
Příloha 6: HMBC spektrum sloučeniny 6(1,1,1,1).



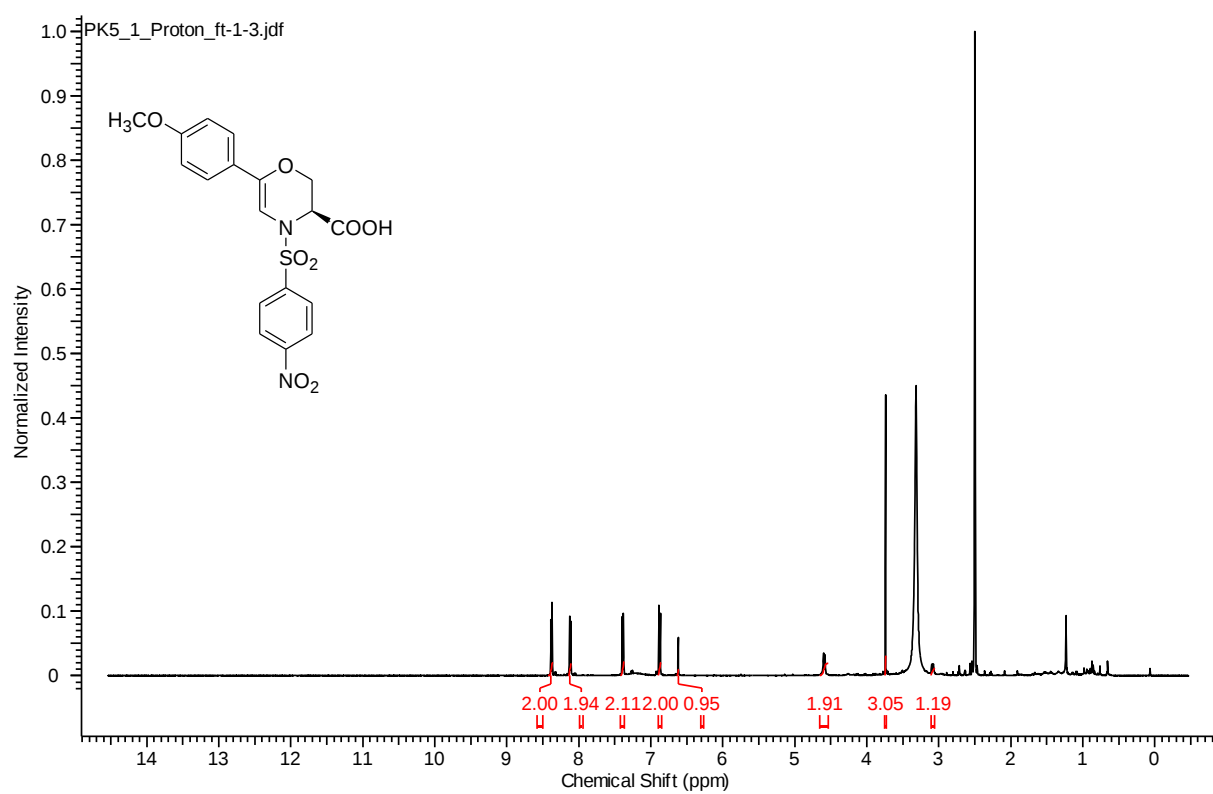
Příloha 7: ¹H-¹⁵N spektrum sloučeniny 6(1,1,1,1).



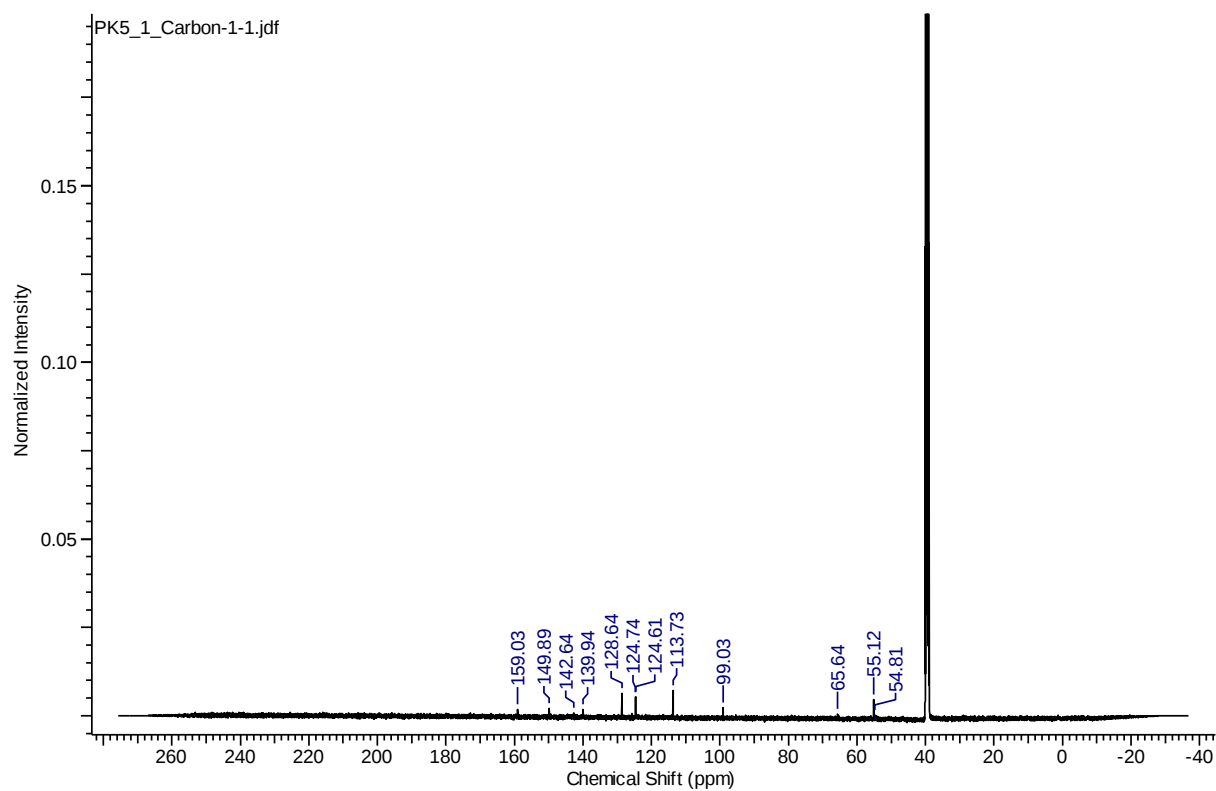
Příloha 8: HMQC spektrum sloučeniny **6**(1,1,1,1).



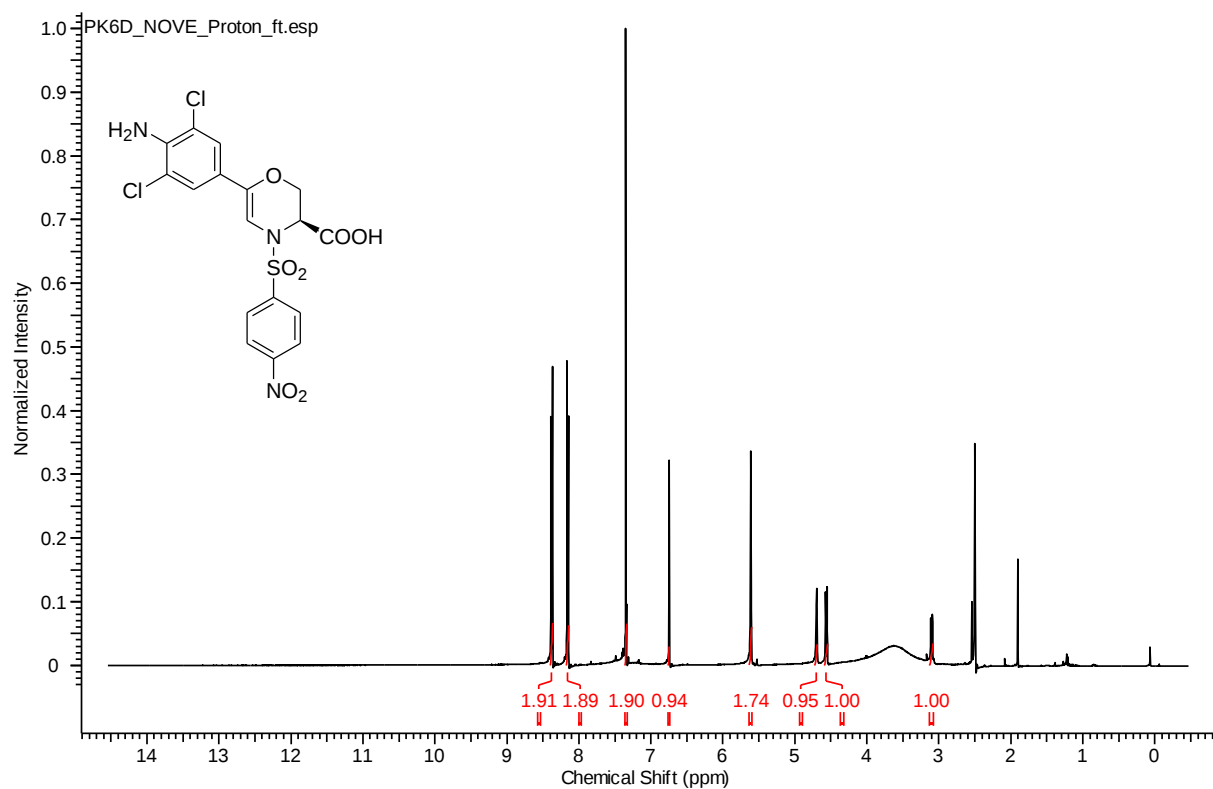
Příloha 9: ^1H -NMR spektrum sloučeniny **6**(1,1,1,2).



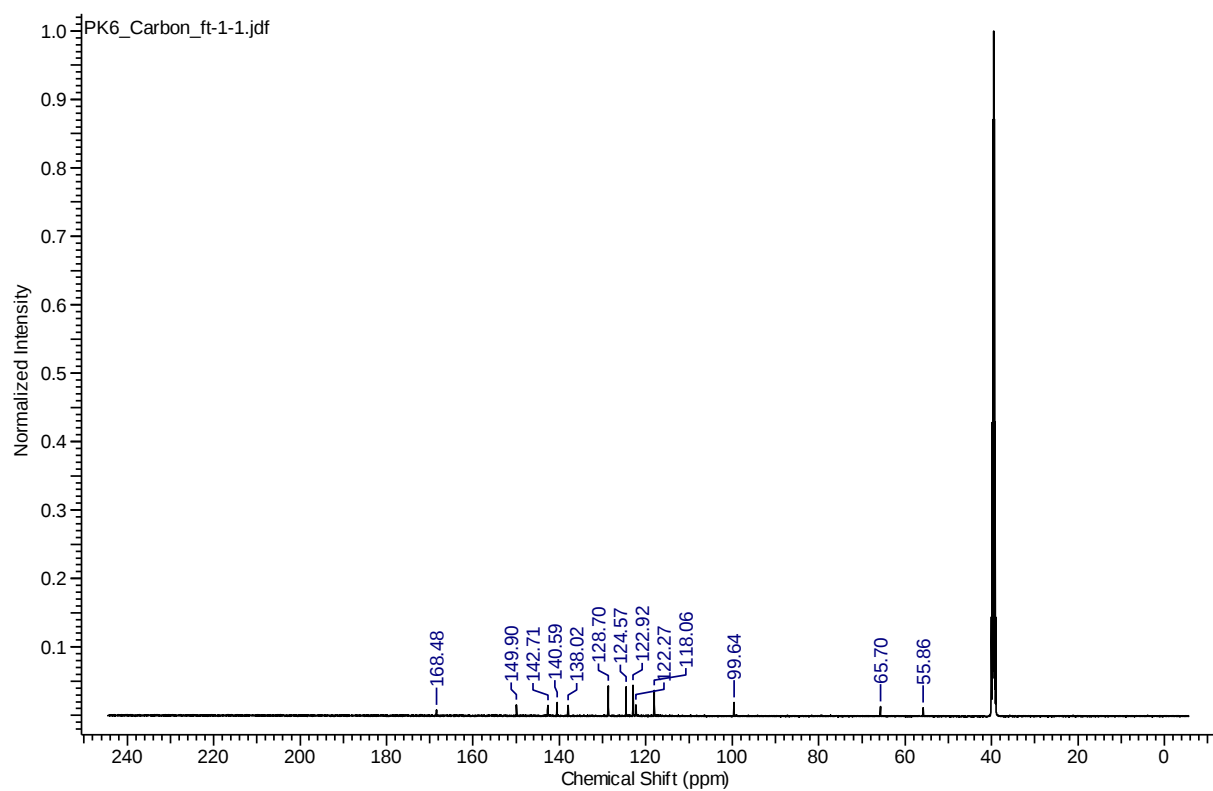
Příloha 10: ^{13}C -NMR spektrum sloučeniny **6**(1,1,1,2).



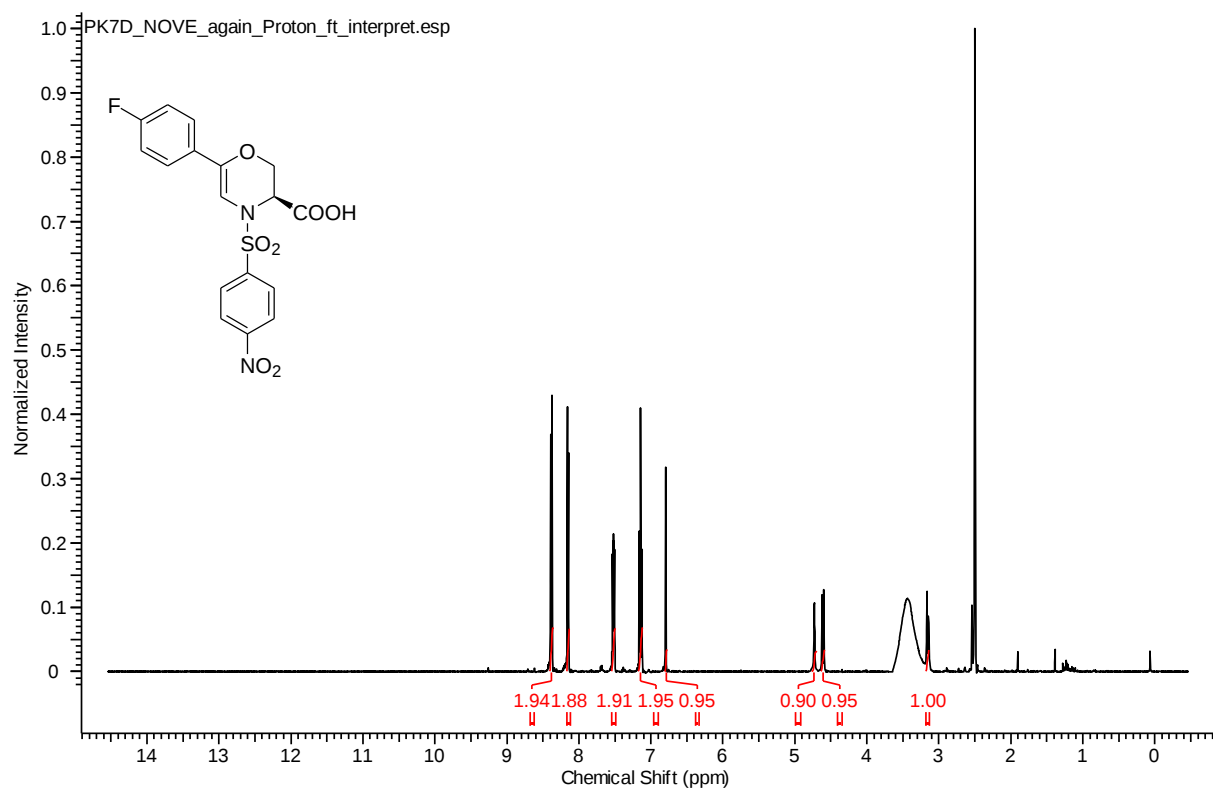
Příloha 11: ^1H -NMR spektrum sloučeniny **6**(1,1,1,3).



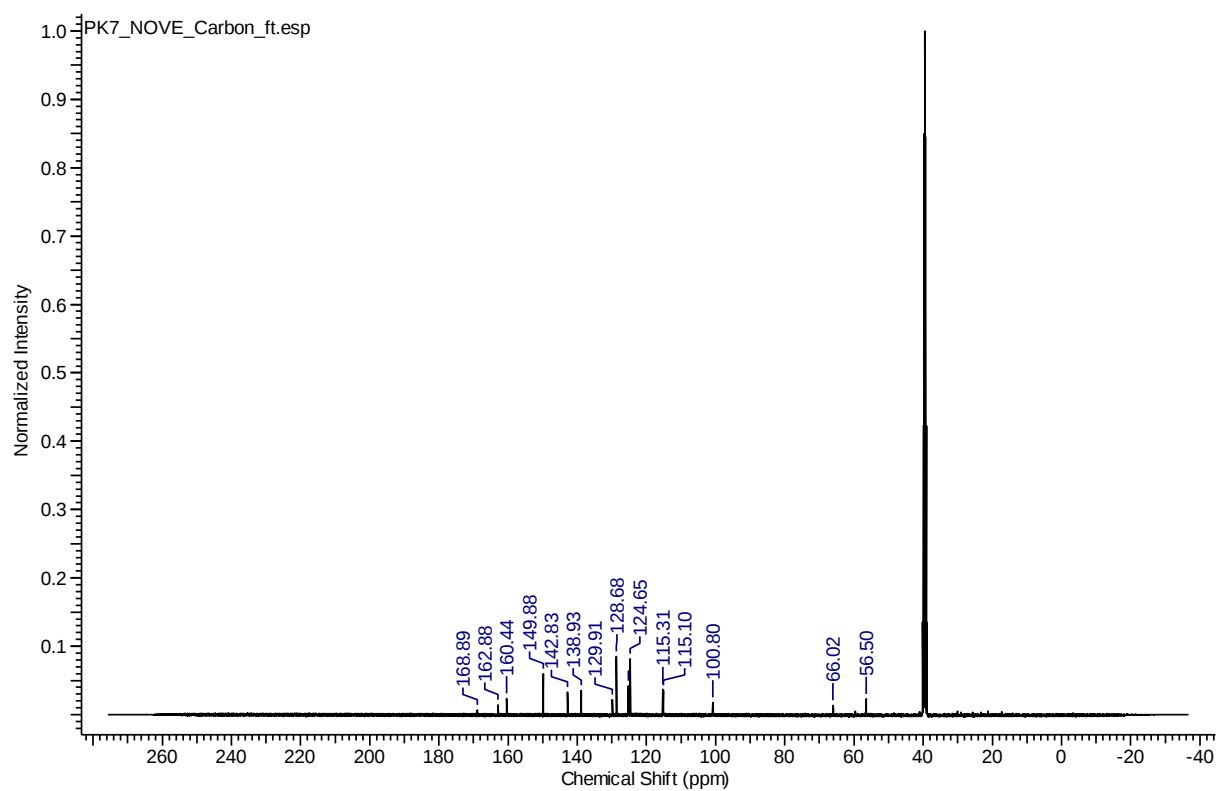
Příloha 12: ^{13}C -NMR spektrum sloučeniny **6**(1,1,1,3).



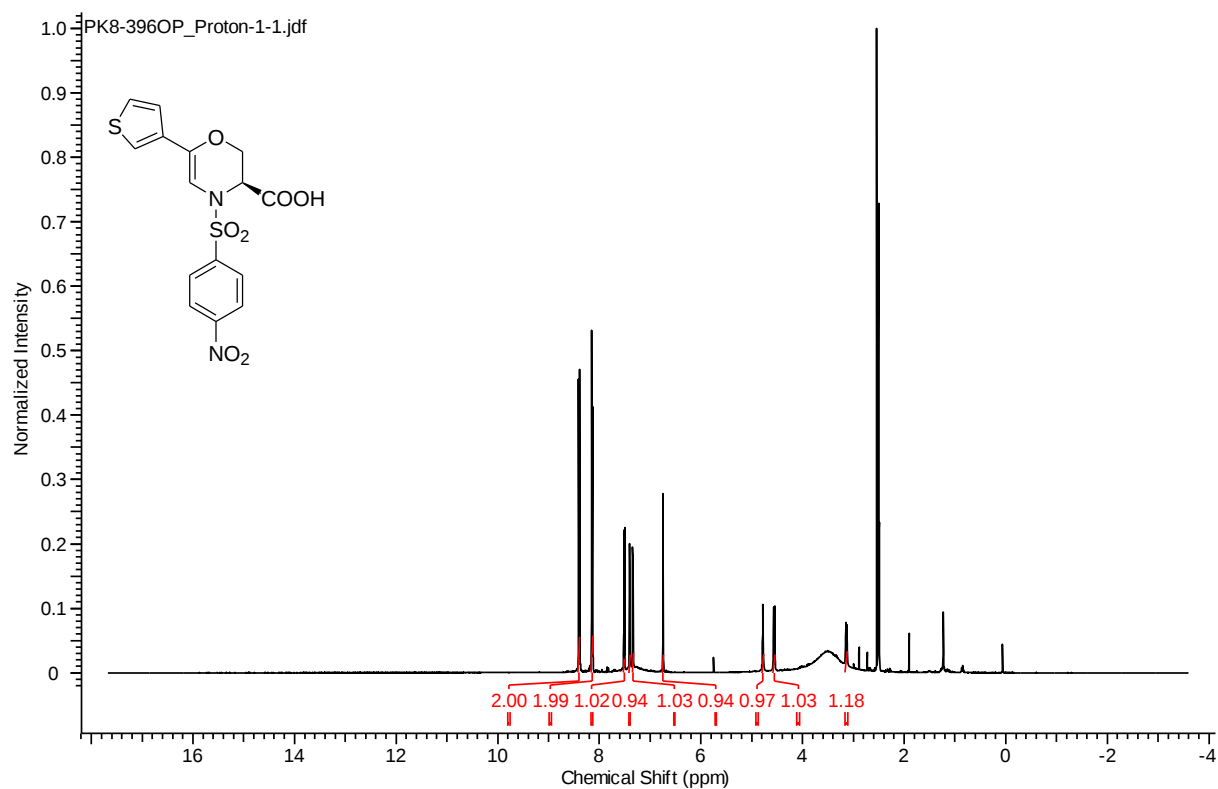
Příloha 13: ^1H -NMR spektrum sloučeniny **6**(1,1,1,4).



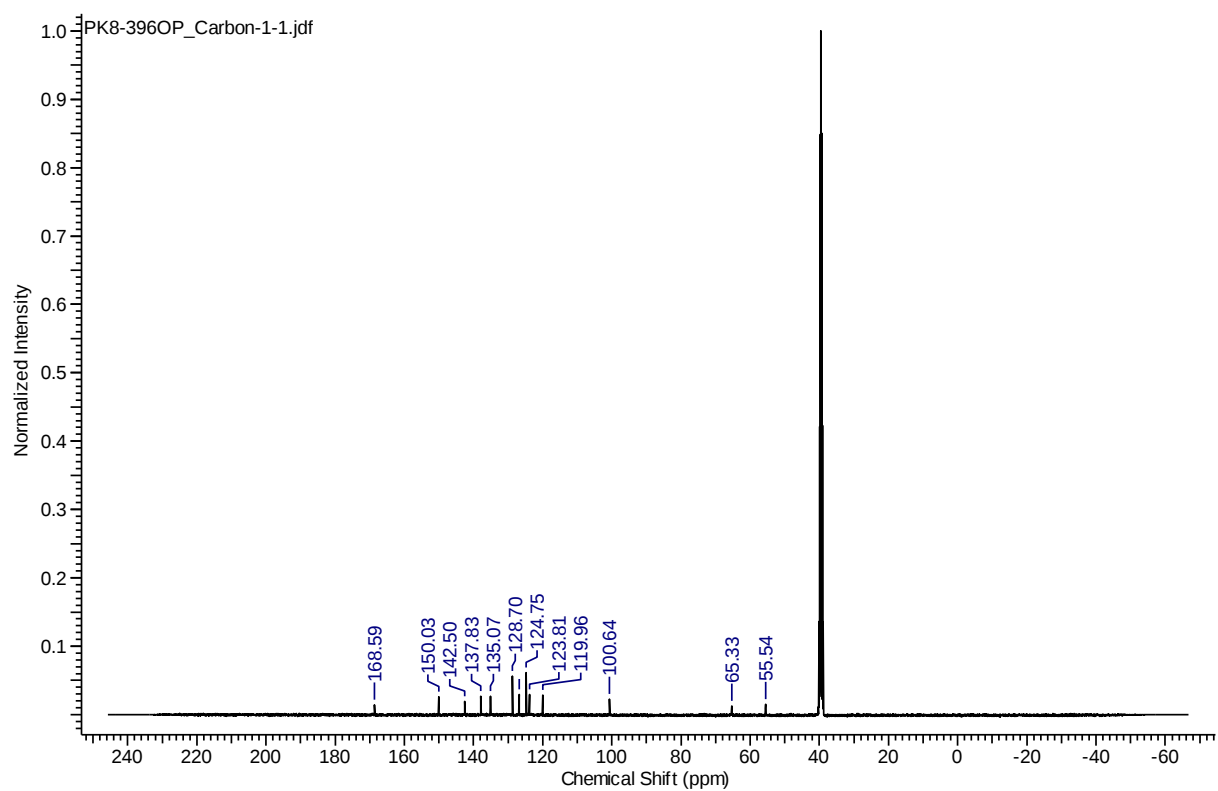
Příloha 14: ^{13}C -NMR spektrum sloučeniny **6**(1,1,1,4).



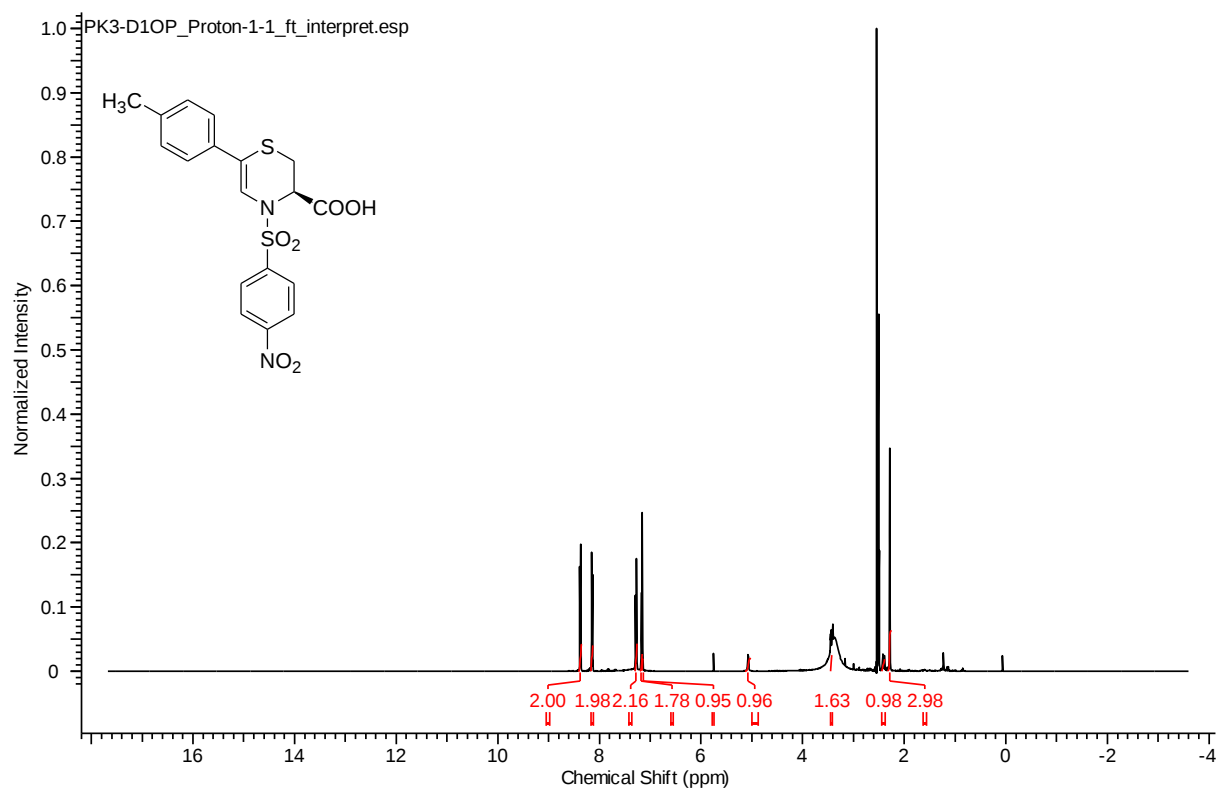
Příloha 15: ^1H -NMR spektrum sloučeniny **6**(1,1,1,5).



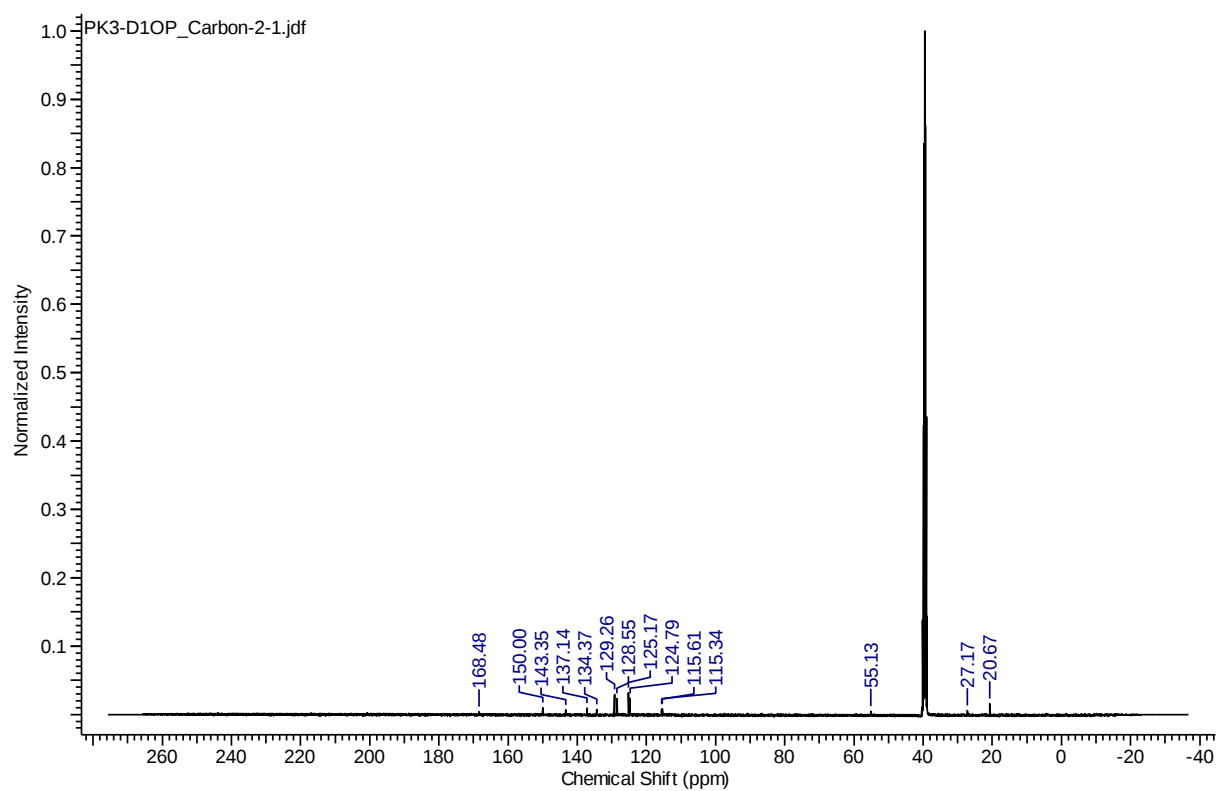
Příloha 16: ^{13}C -NMR spektrum sloučeniny **6**(1,1,1,5).



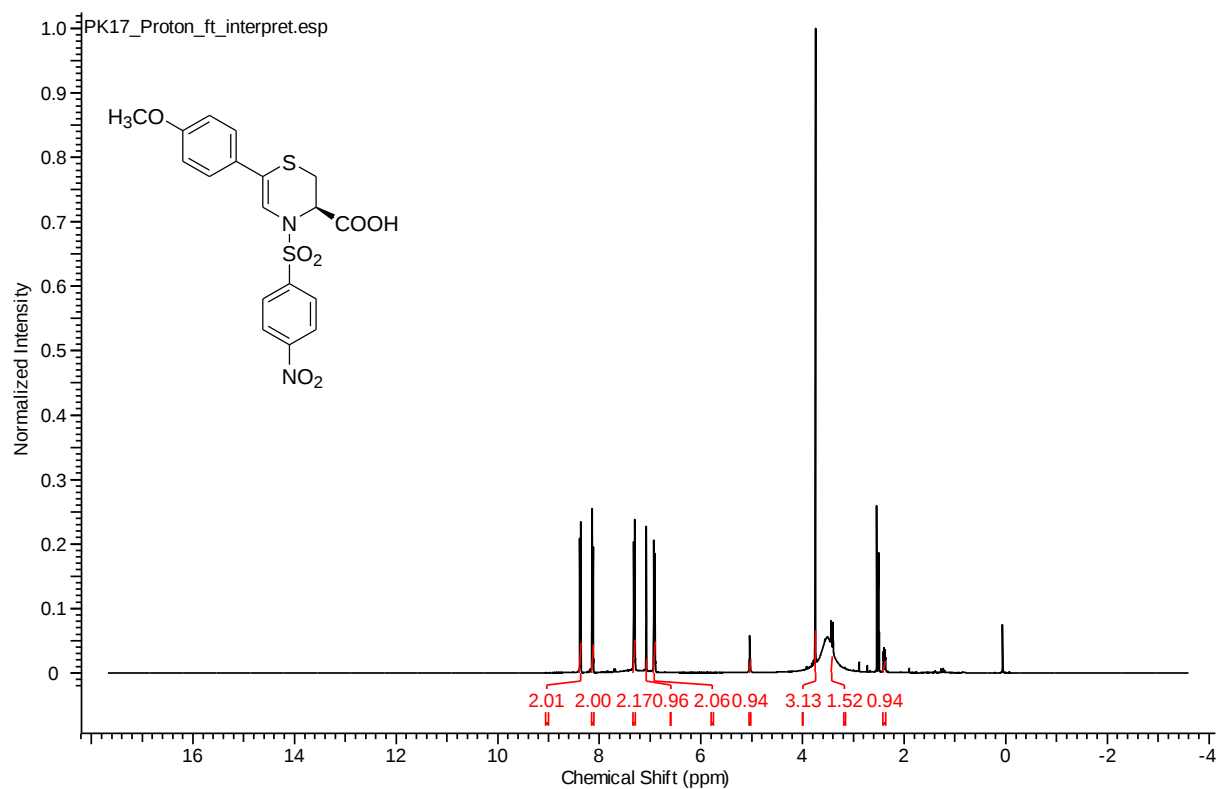
Príloha 17: ^1H -NMR spektrum sloučeniny **6**(1,2,1,1).



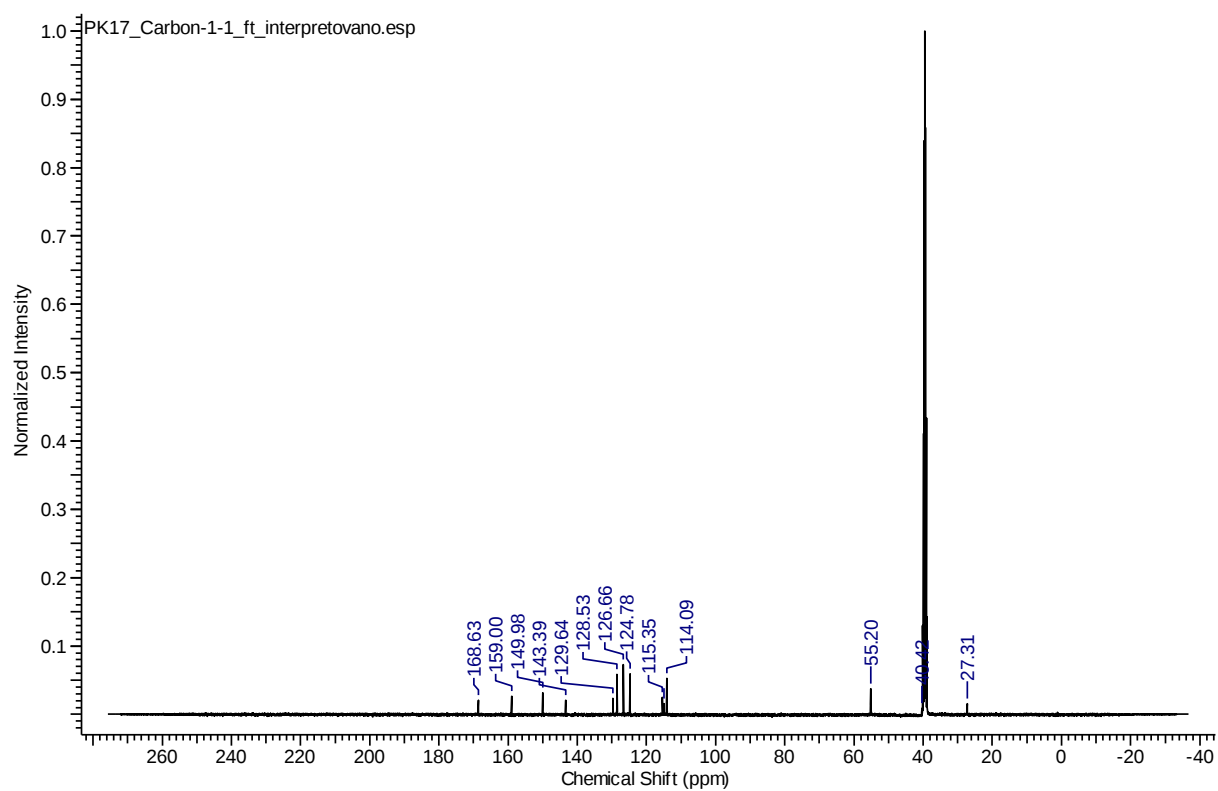
Príloha 18: ^{13}C -NMR spektrum sloučeniny **6**(1,2,1,1).



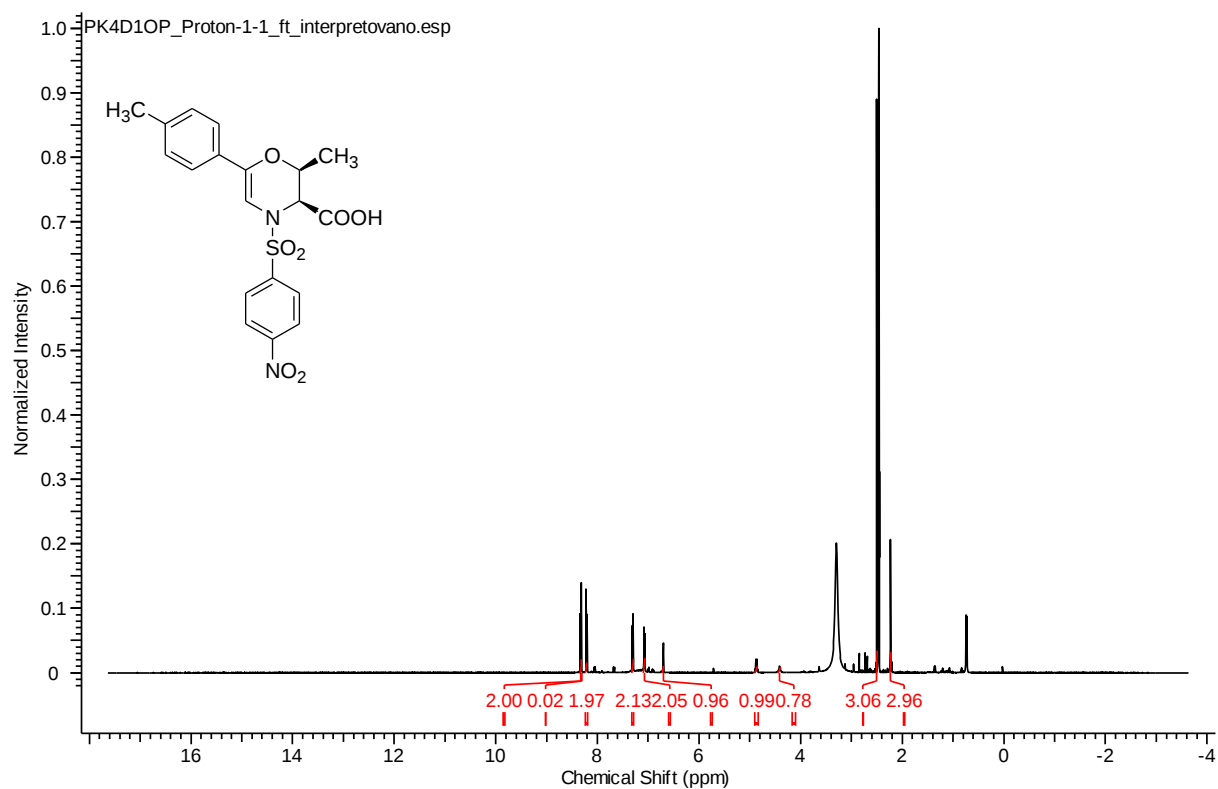
Príloha 19: ^1H -NMR spektrum sloučeniny **6**(1,2,1,2).



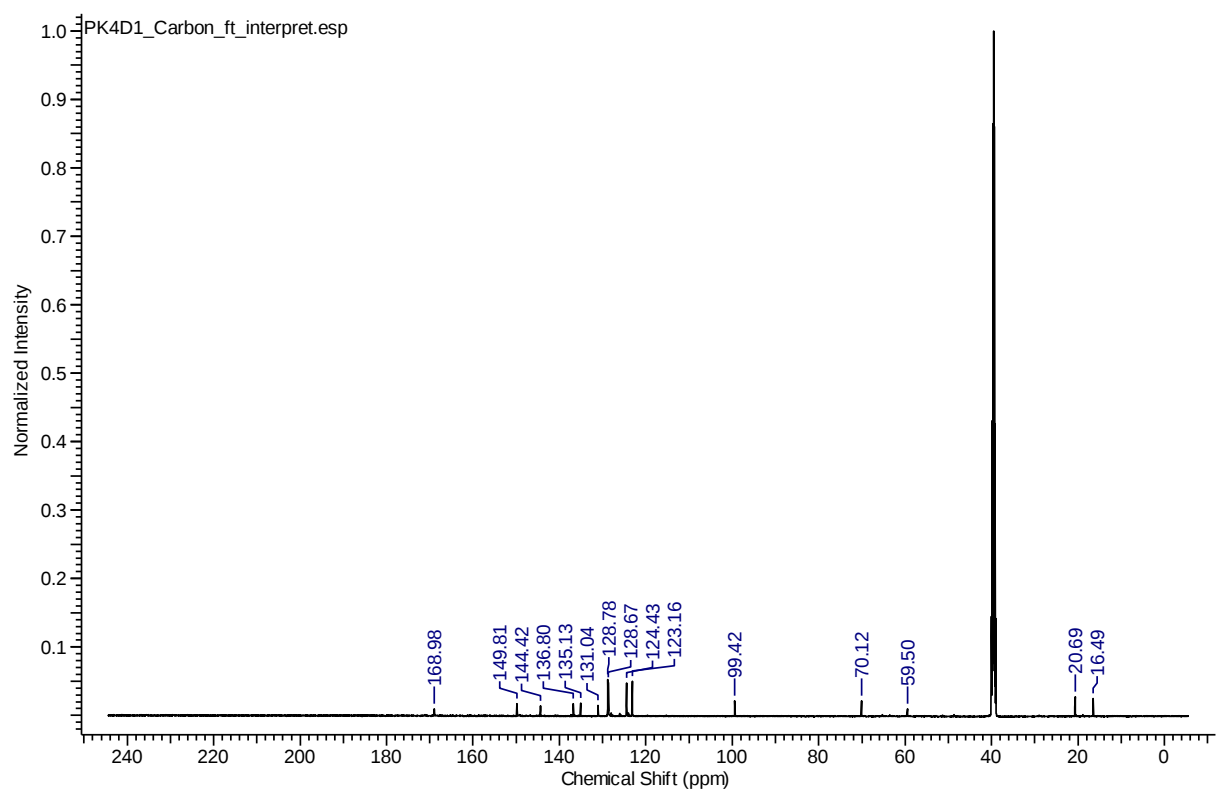
Príloha 20: ^{13}C -NMR spektrum sloučeniny **6**(1,2,1,2).



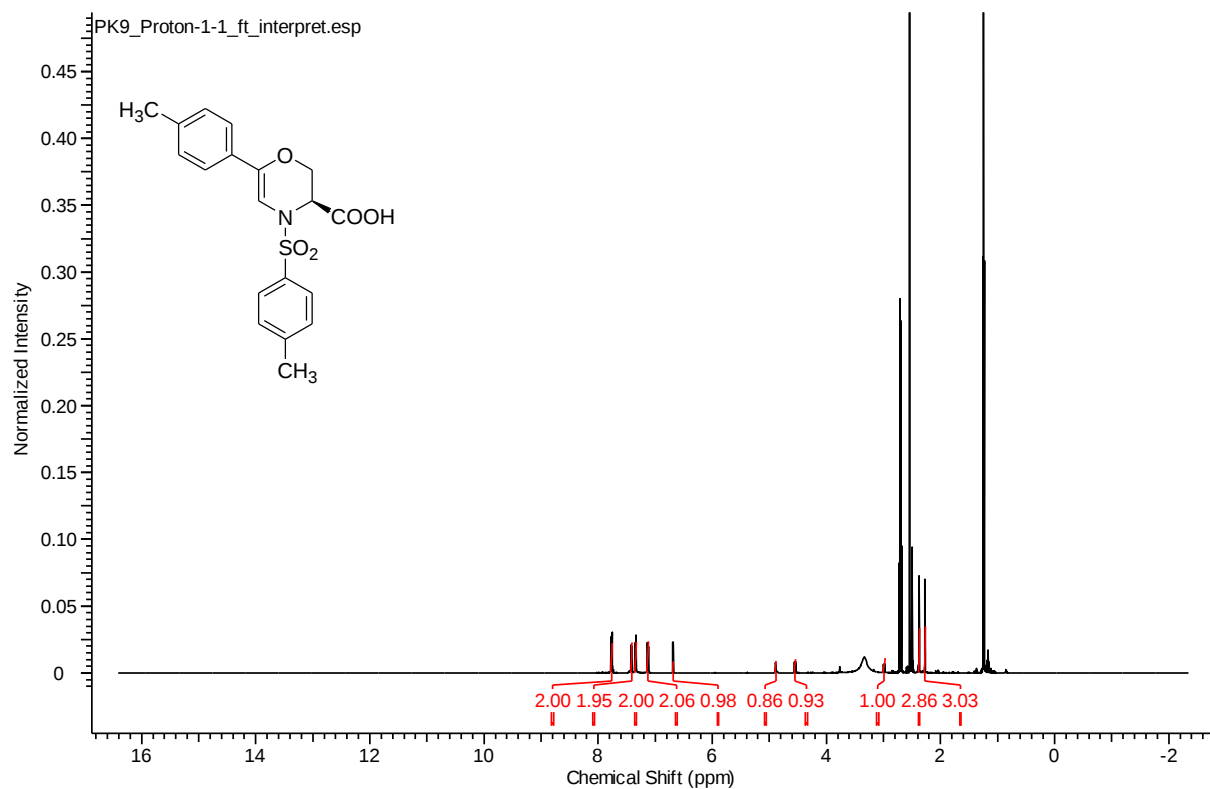
Příloha 21: ^1H -NMR spektrum sloučeniny **6**(1,3,1,1).



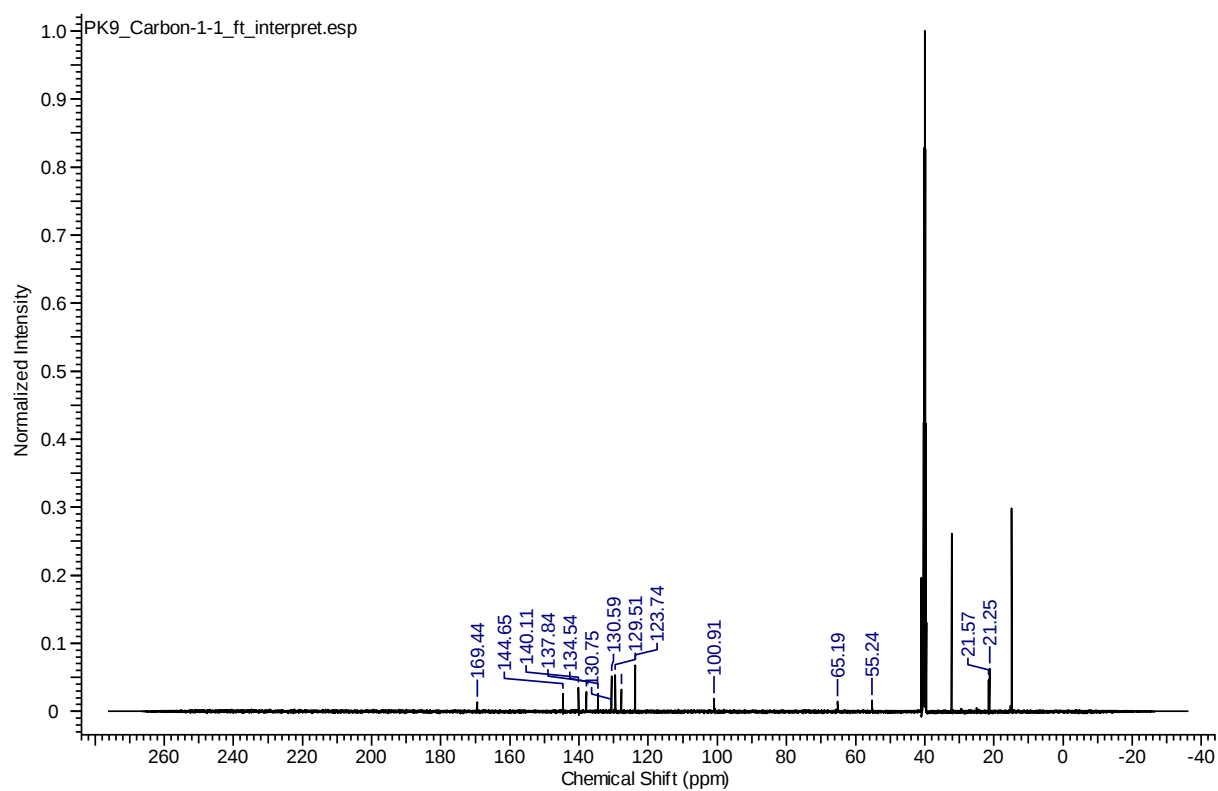
Příloha 22: ^{13}C -NMR spektrum sloučeniny **6**(1,3,1,1).



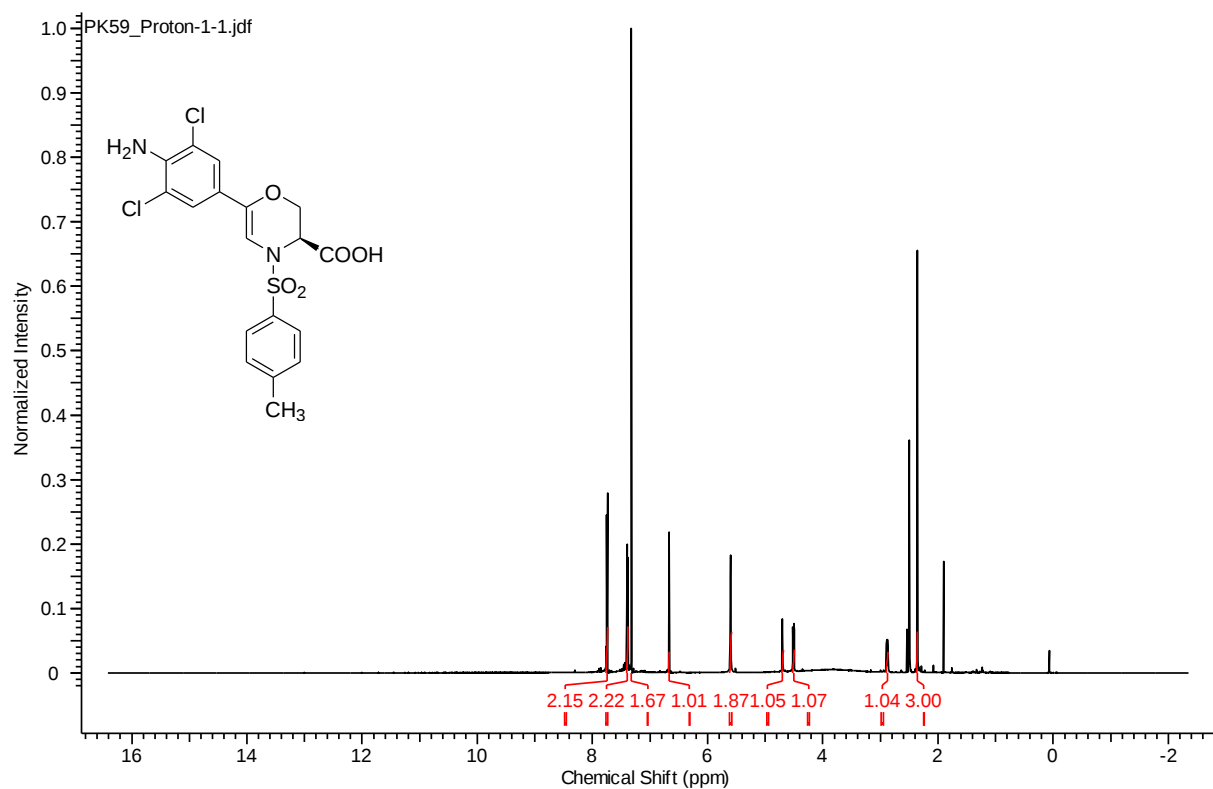
Príloha 23: ^1H -NMR spektrum sloučeniny **6**(1,1,2,1) – znečištěno alifatickým kontaminantem.



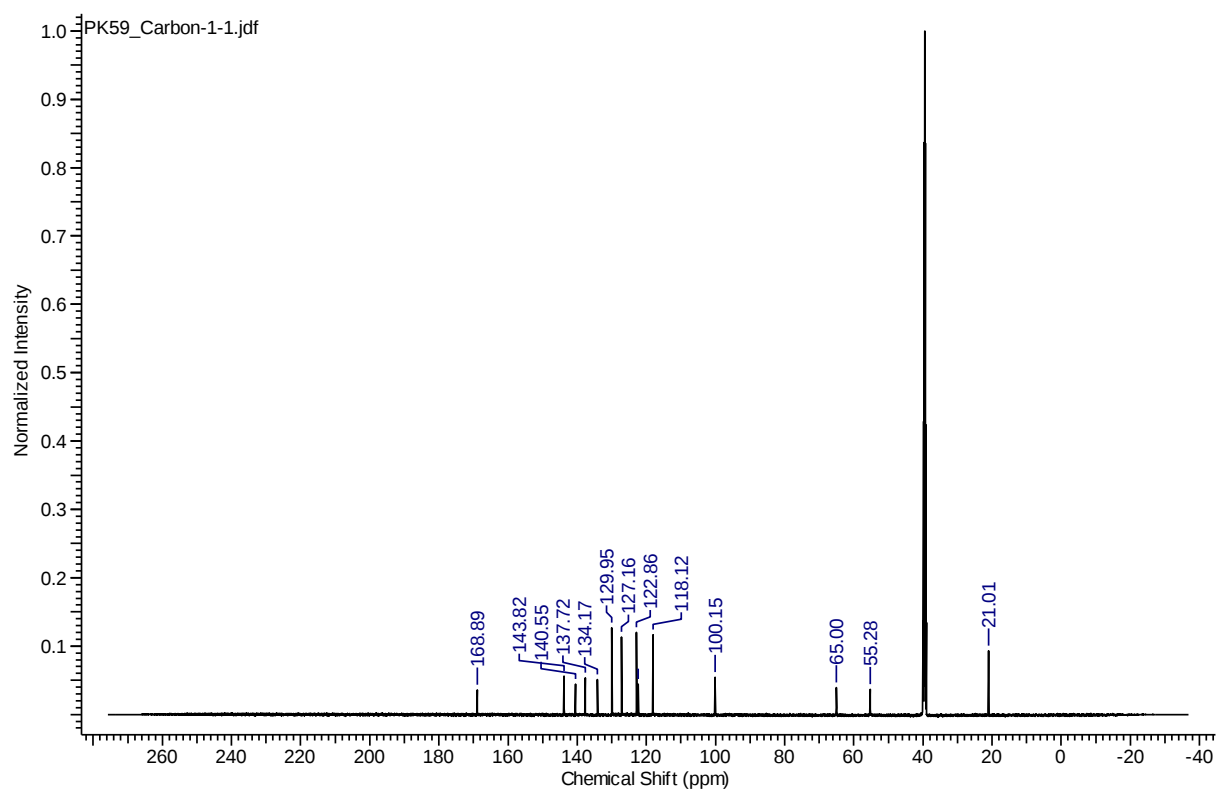
Príloha 24: ^{13}C -NMR spektrum sloučeniny **6**(1,1,2,1) – znečištěno alifatickým kontaminantem.



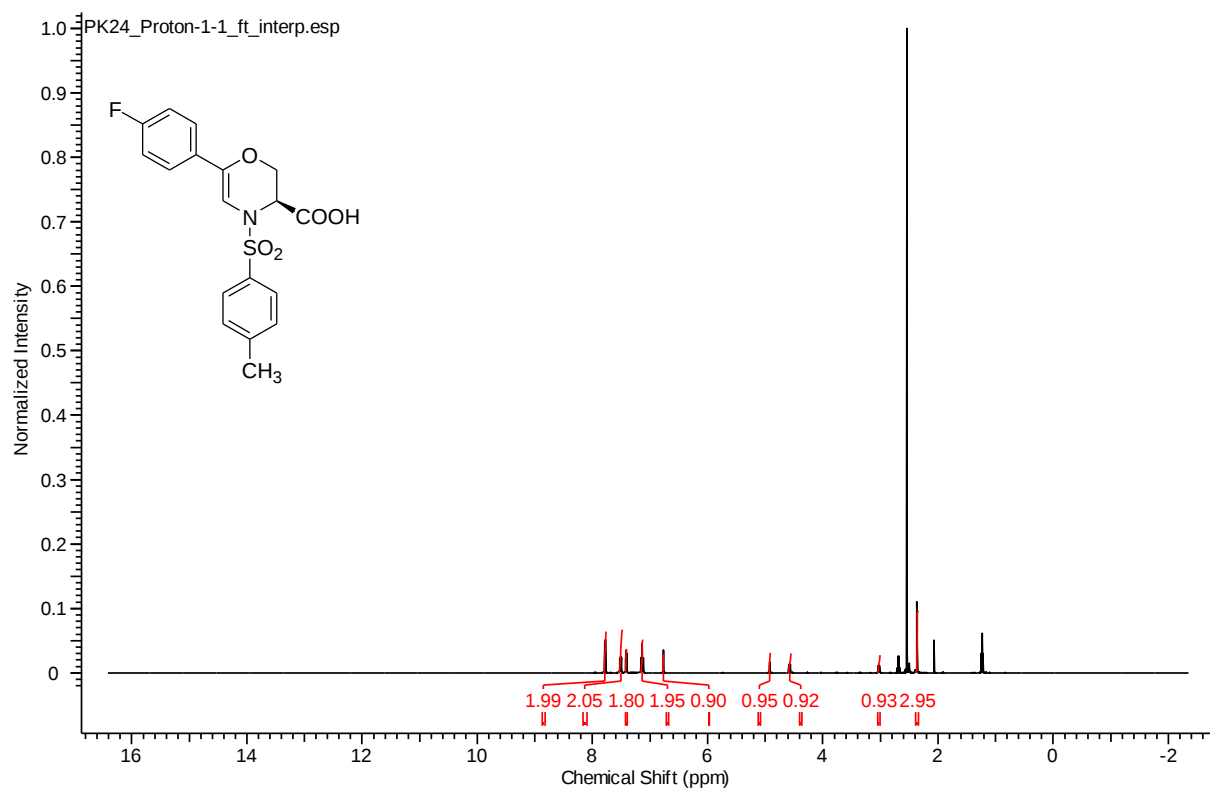
Príloha 25: ^1H -NMR spektrum sloučeniny **6**(1,1,2,3).



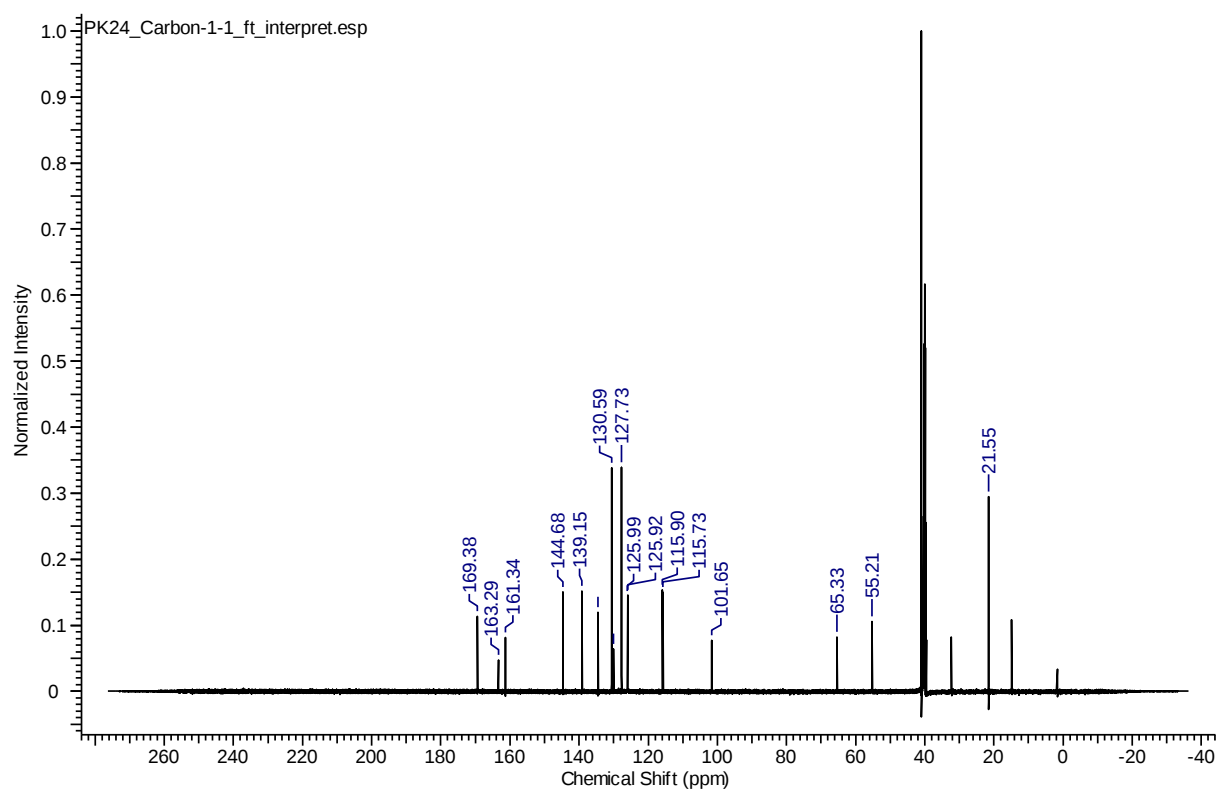
Príloha 26: ^{13}C -NMR spektrum sloučeniny **6**(1,1,2,3).



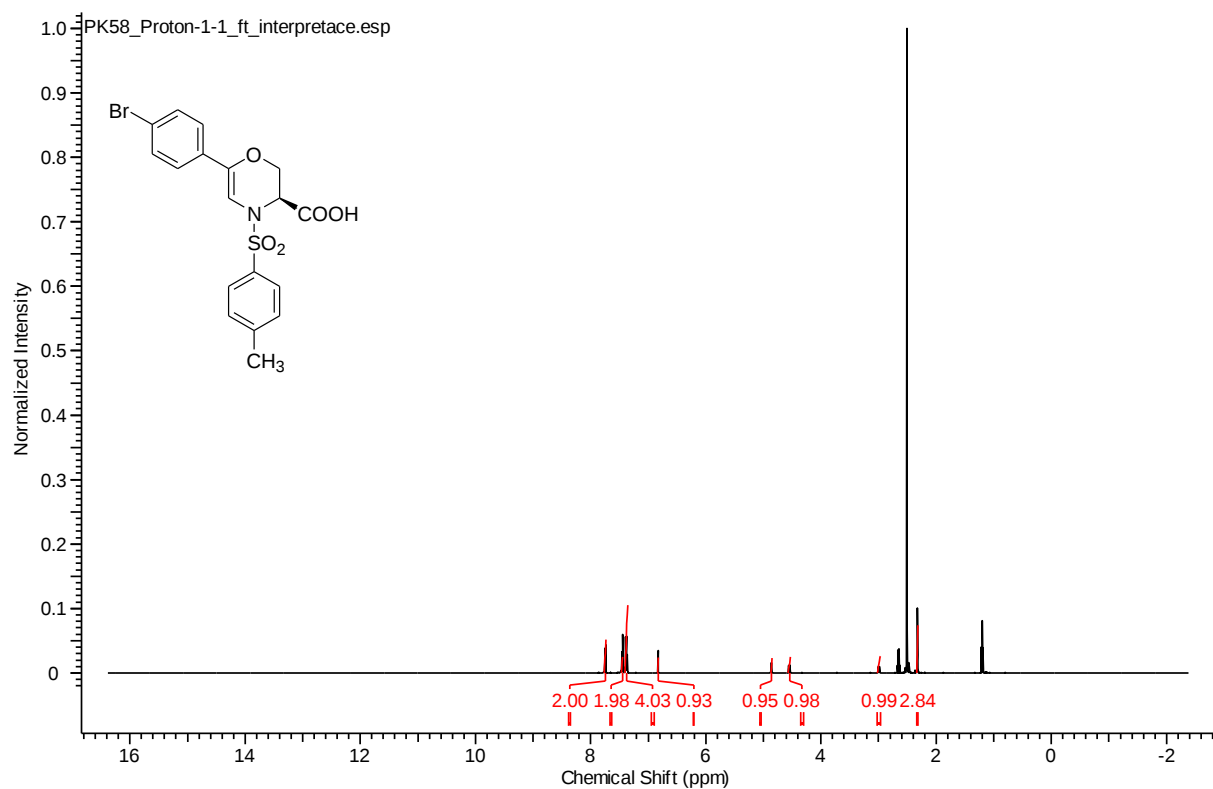
Príloha 27: ^1H -NMR spektrum sloučeniny **6**(1,1,2,4) – znečištěno alifatickým kontaminantem.



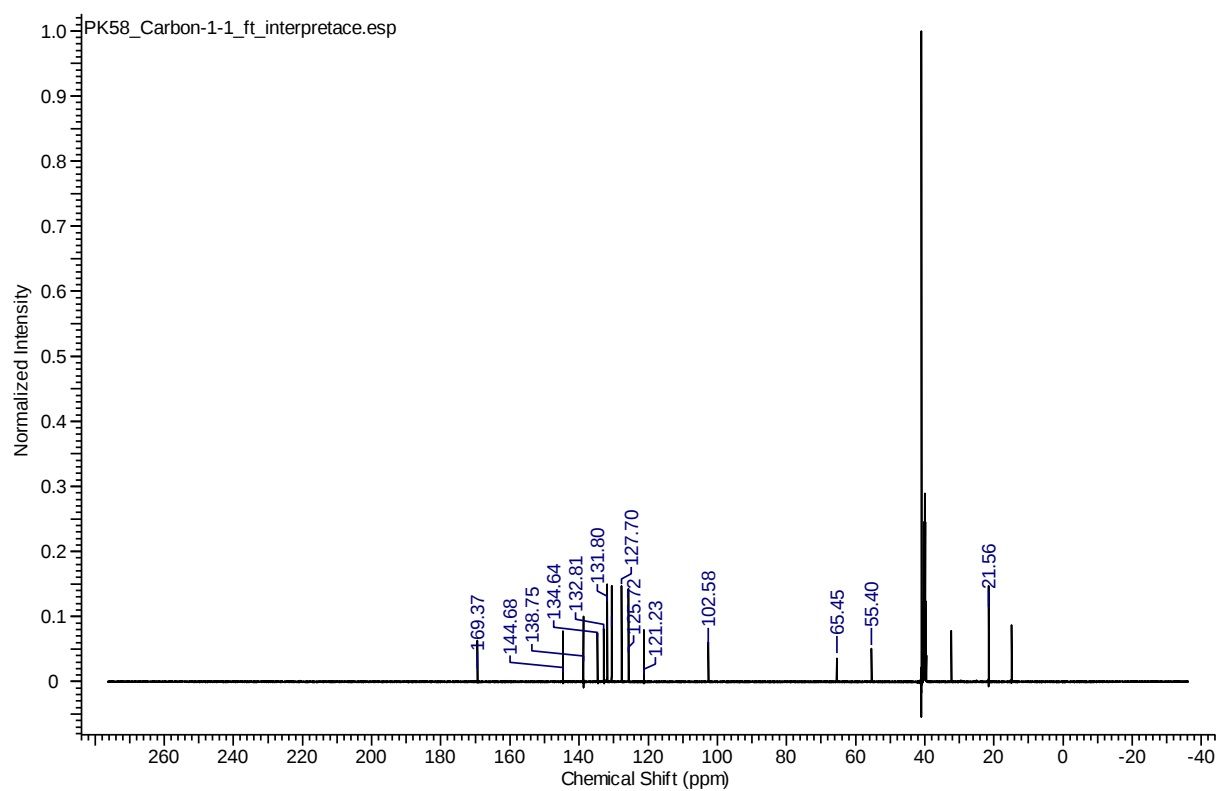
Príloha 28: ^{13}C -NMR spektrum sloučeniny **6**(1,1,2,4) – znečištěno alifatickým kontaminantem.



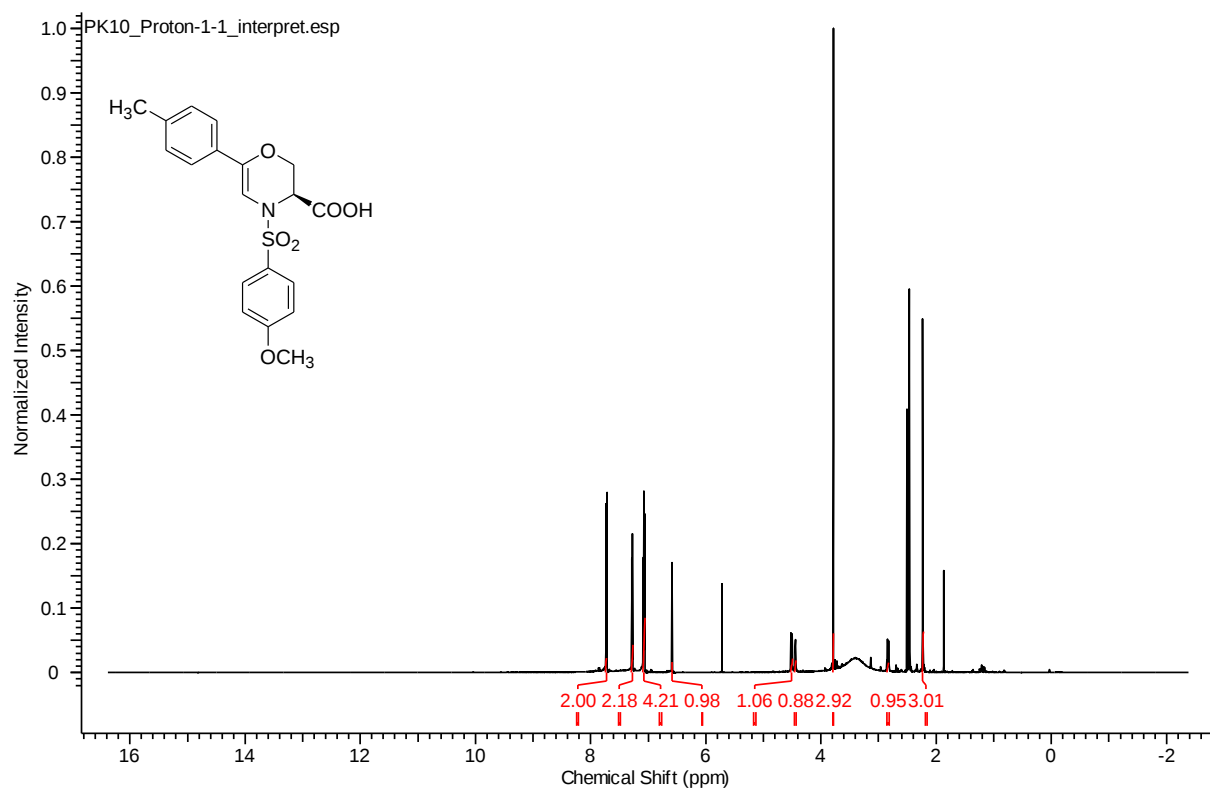
Příloha 29: ^1H -NMR spektrum sloučeniny **6**(1,1,2,6) – znečištěno alifatickým kontaminantem.



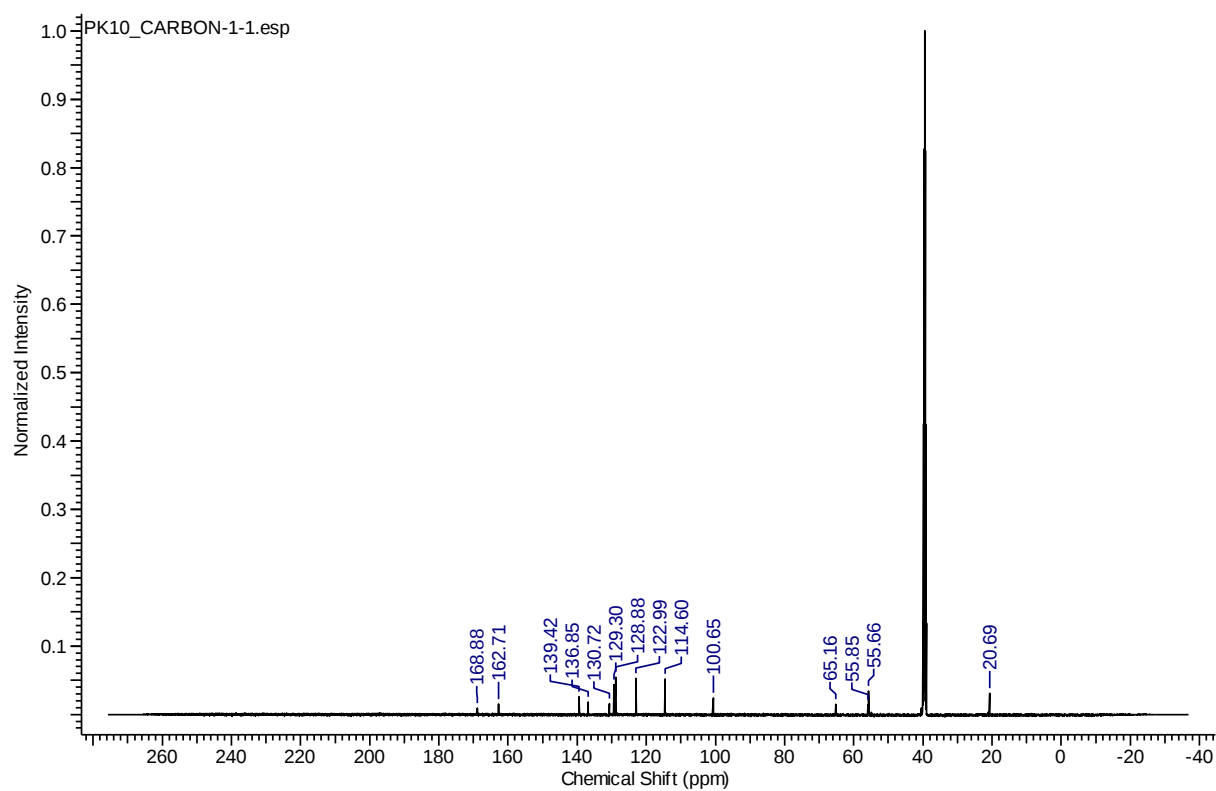
Příloha 30: ^{13}C -NMR spektrum sloučeniny **6**(1,1,2,6) – znečištěno alifatickým kontaminantem.



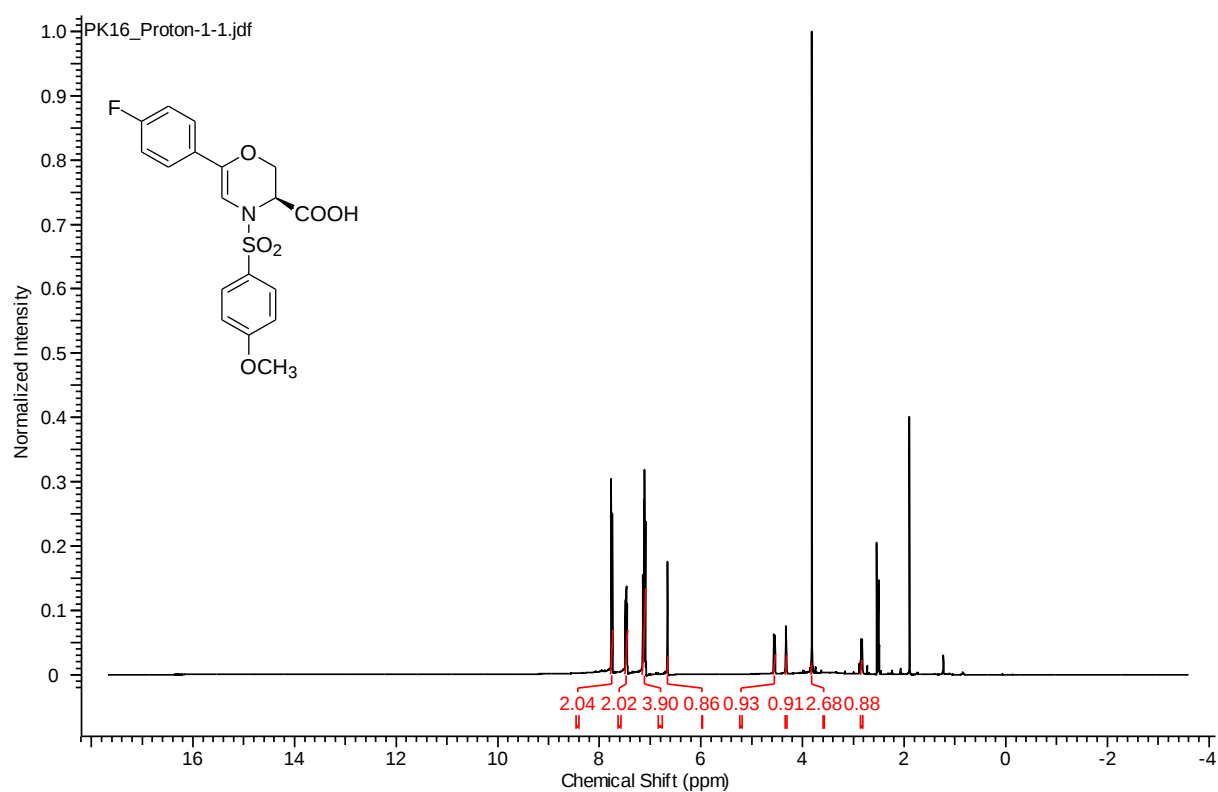
Príloha 31: ^1H -NMR spektrum sloučeniny **6**(1,1,3,1).



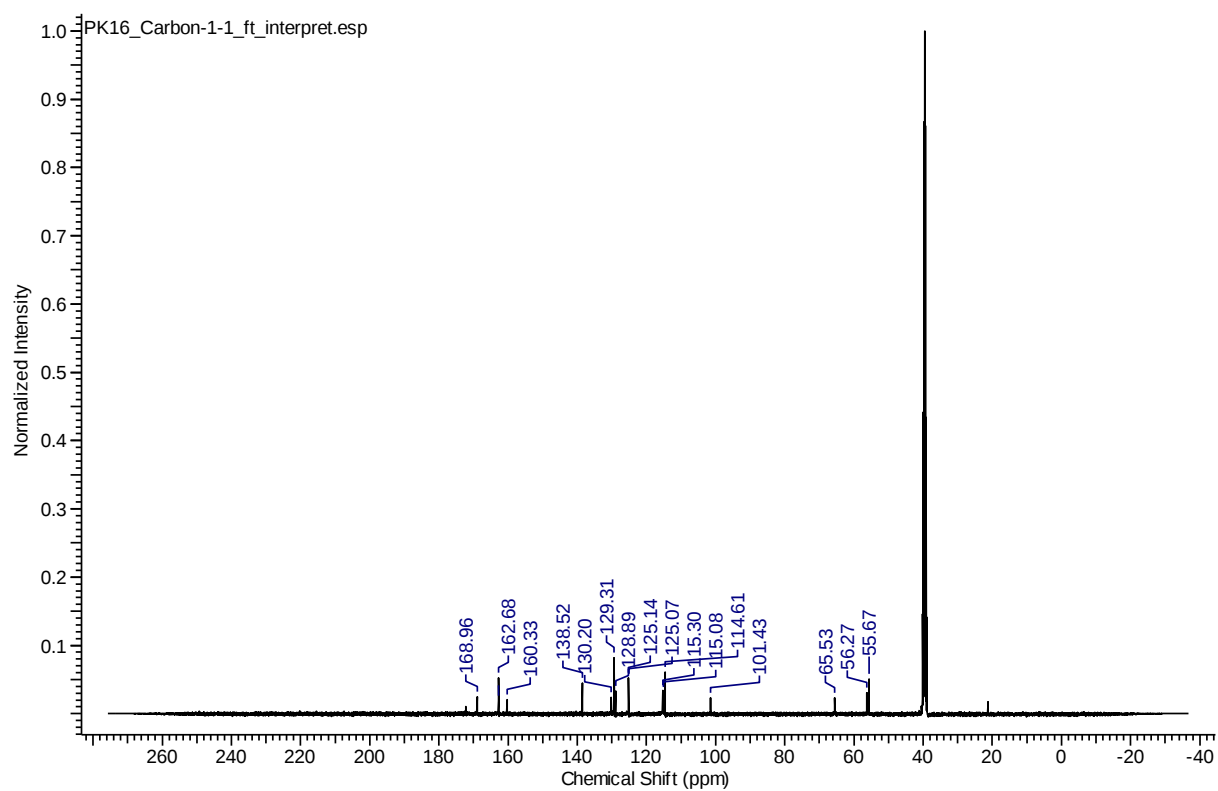
Príloha 32: ^{13}C -NMR spektrum sloučeniny **6**(1,1,3,1).



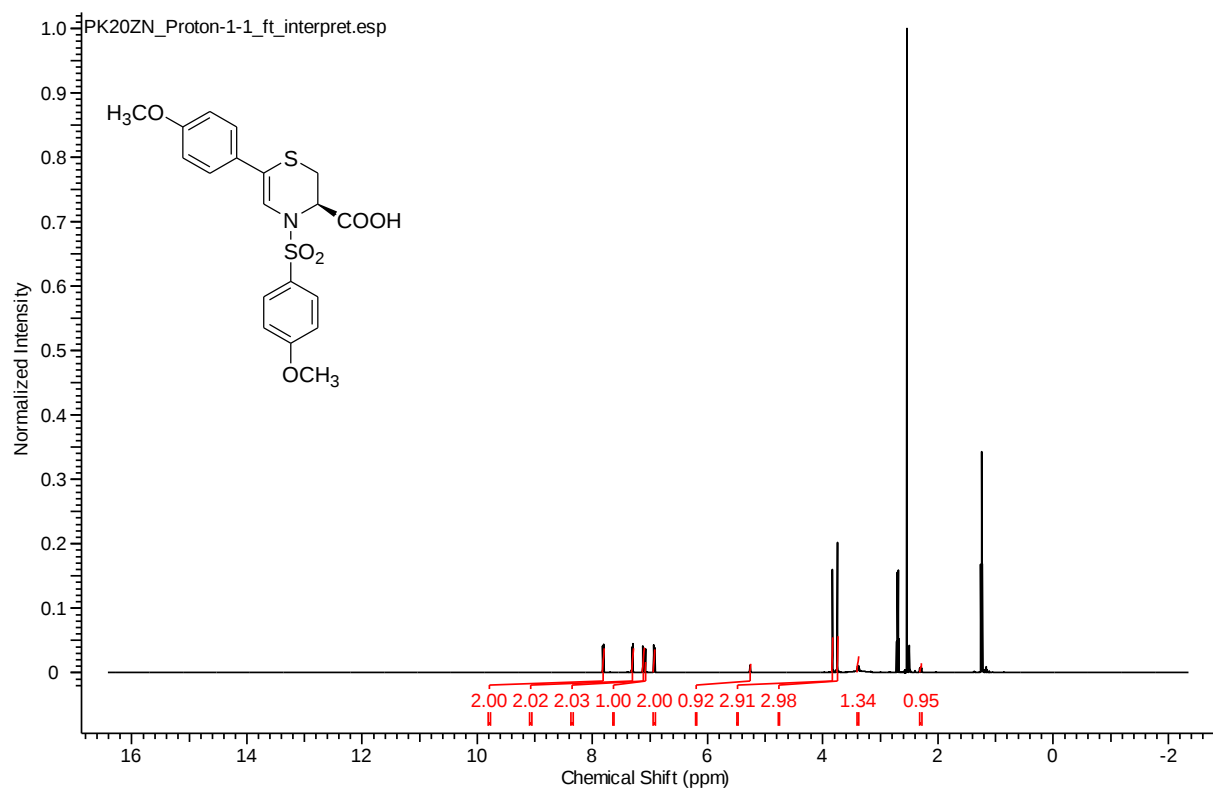
Příloha 33: ^1H -NMR spektrum sloučeniny **6**(1,1,3,4).



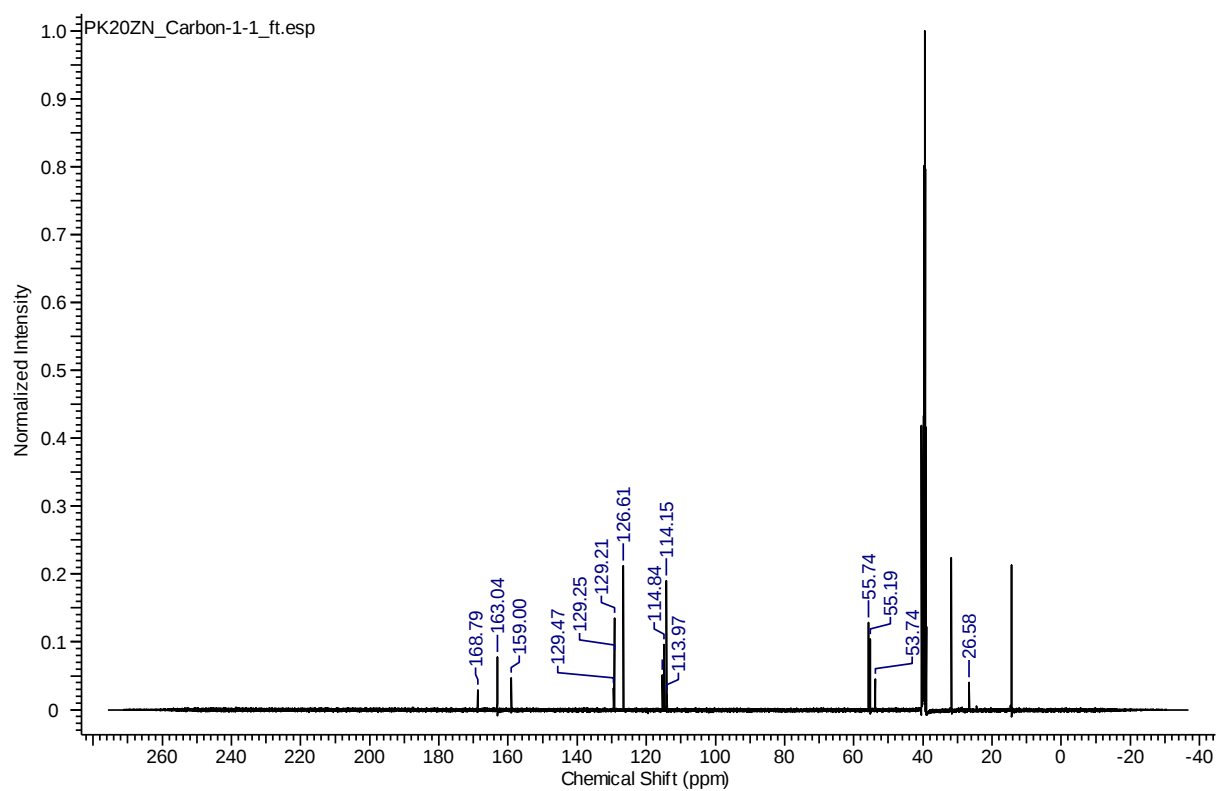
Příloha 34: ^{13}C -NMR spektrum sloučeniny **6**(1,1,3,4).



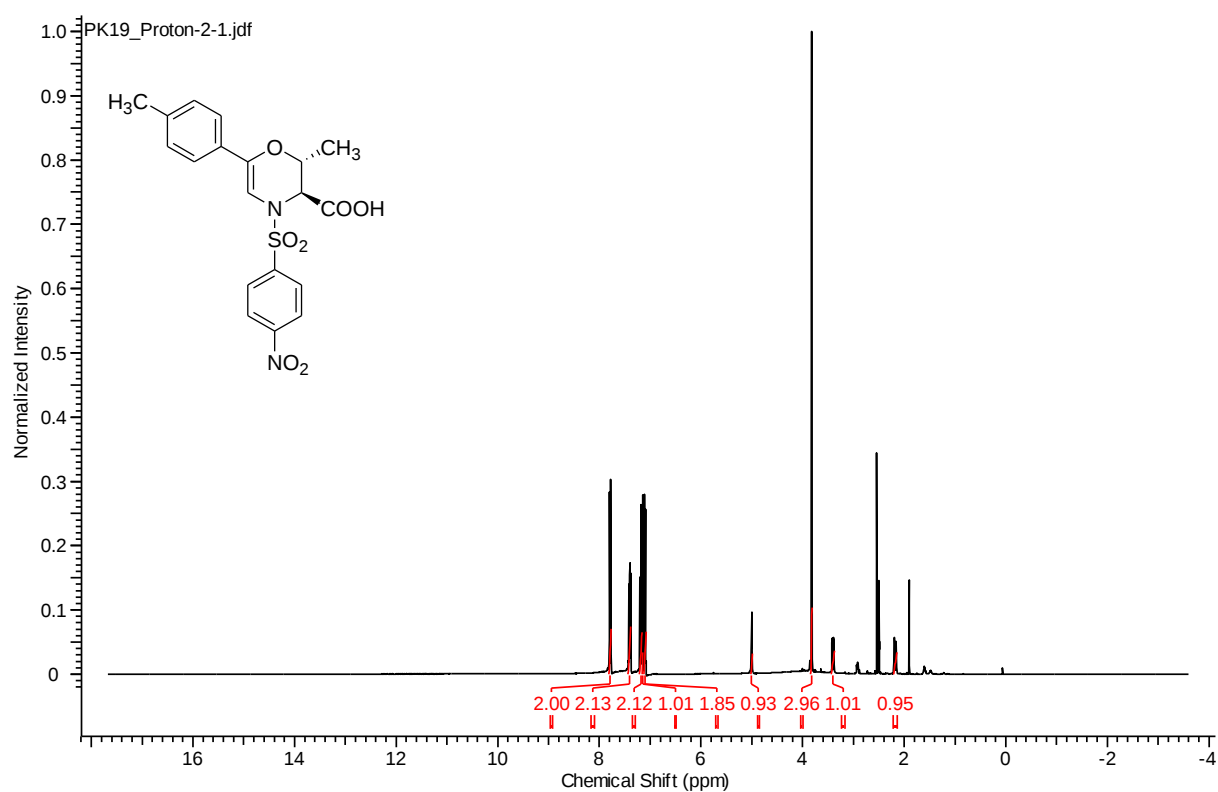
Příloha 35: ^1H -NMR spektrum sloučeniny **6**(1,2,3,2) – znečištěno alifatickým kontaminantem.



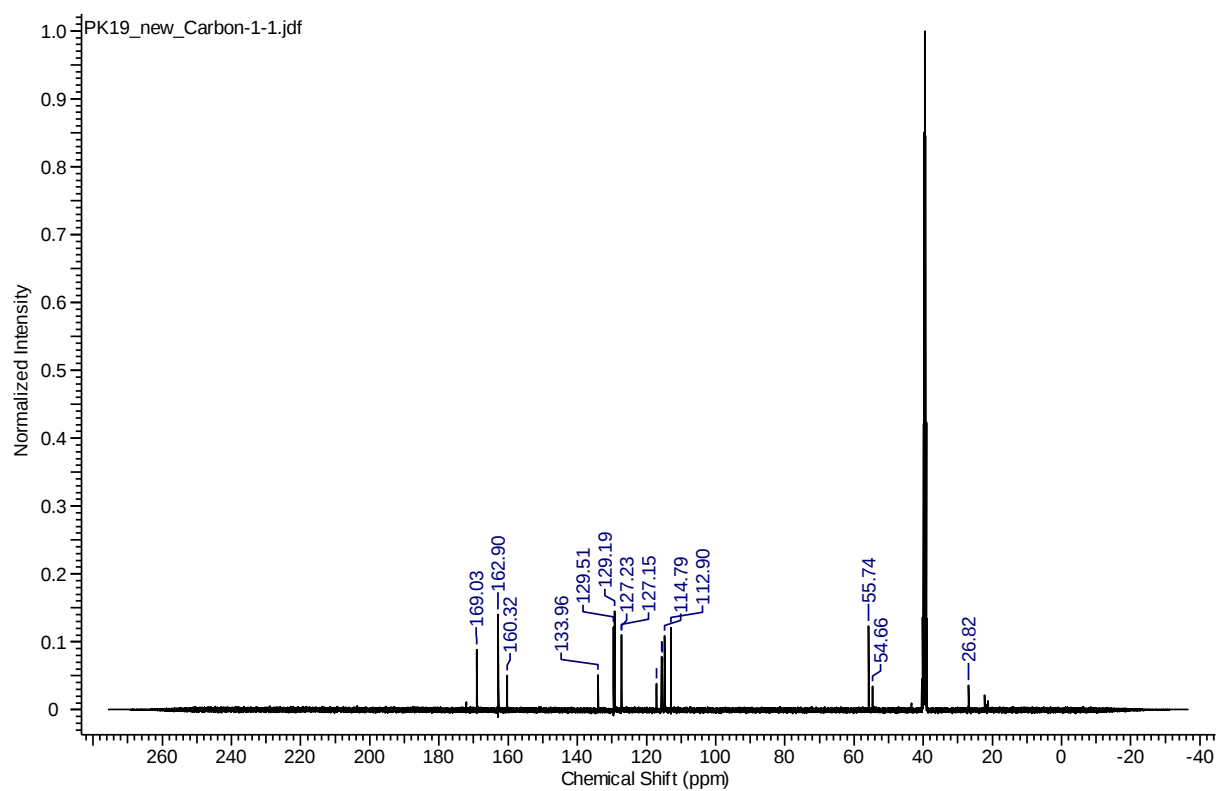
Příloha 36: ^{13}C -NMR spektrum sloučeniny **6**(1,2,3,2).



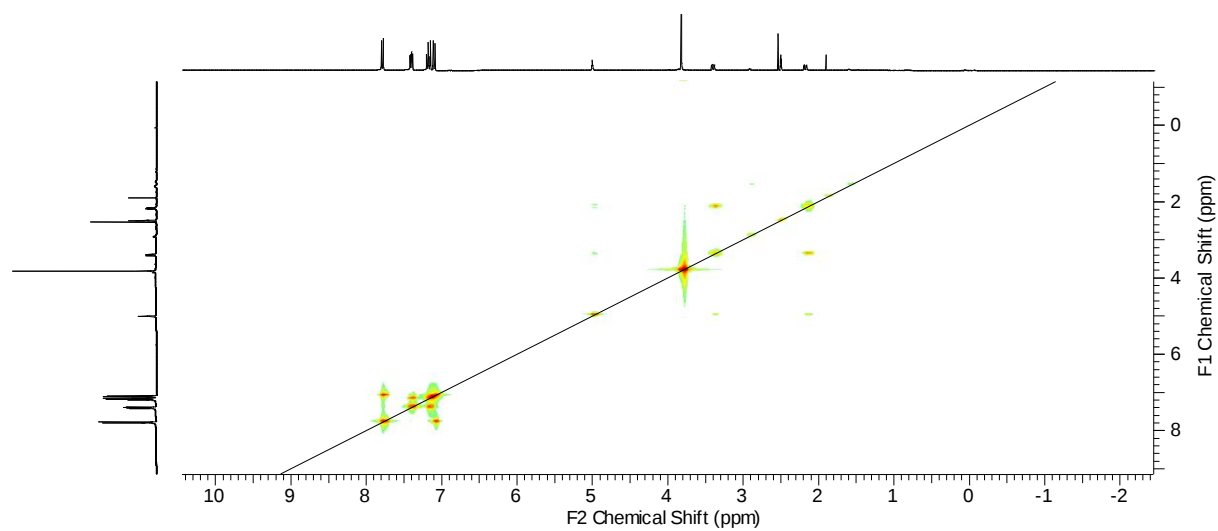
Příloha 37: ^1H -NMR spektrum sloučeniny **6**(1,2,3,4).



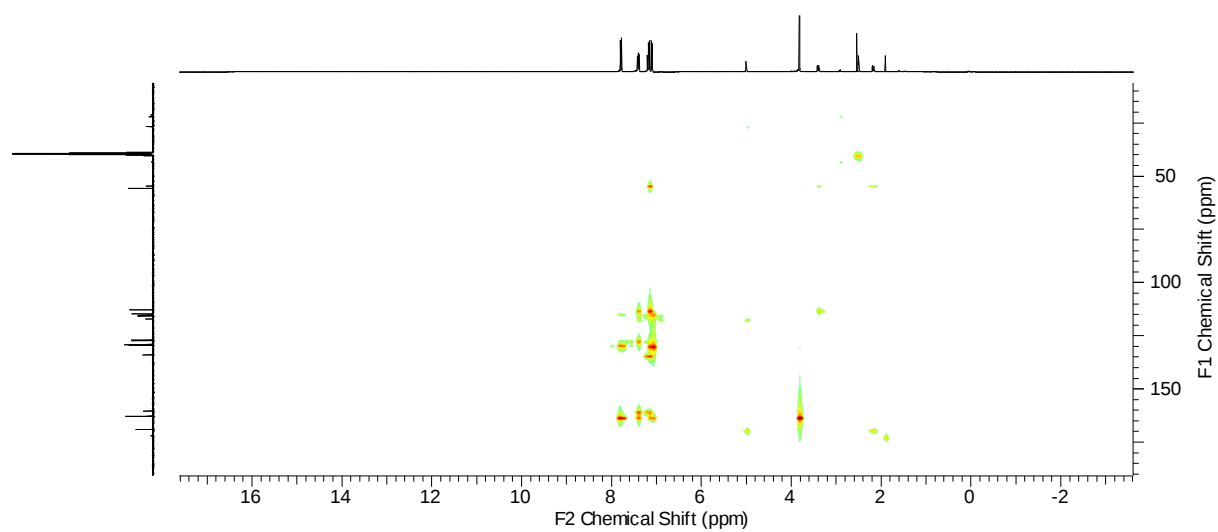
Příloha 38: ^{13}C -NMR spektrum sloučeniny **6**(1,2,3,4).



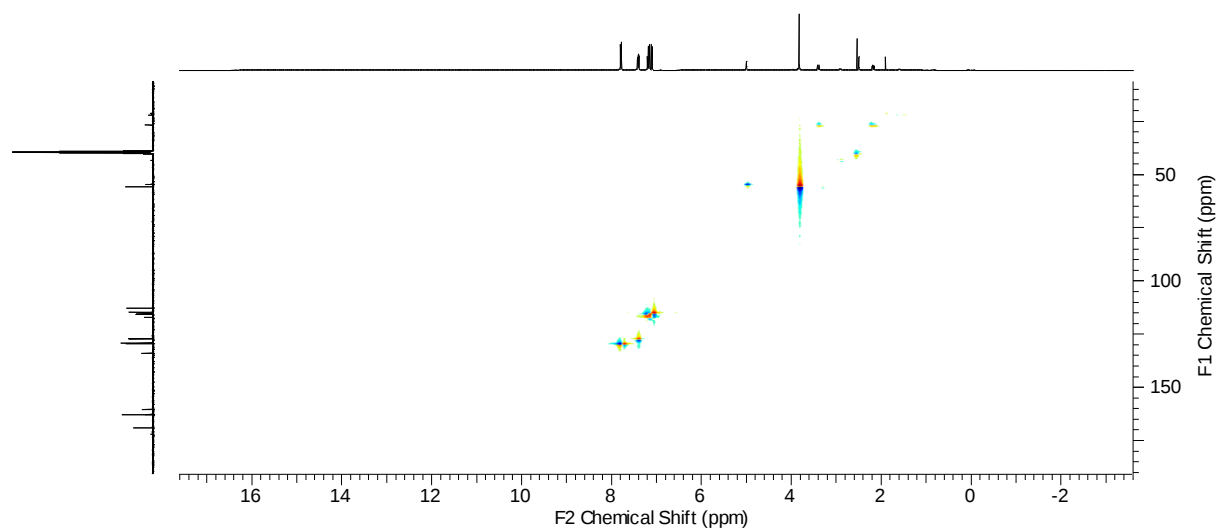
Příloha 39: COSY spektrum sloučeniny 6(1,2,3,4).



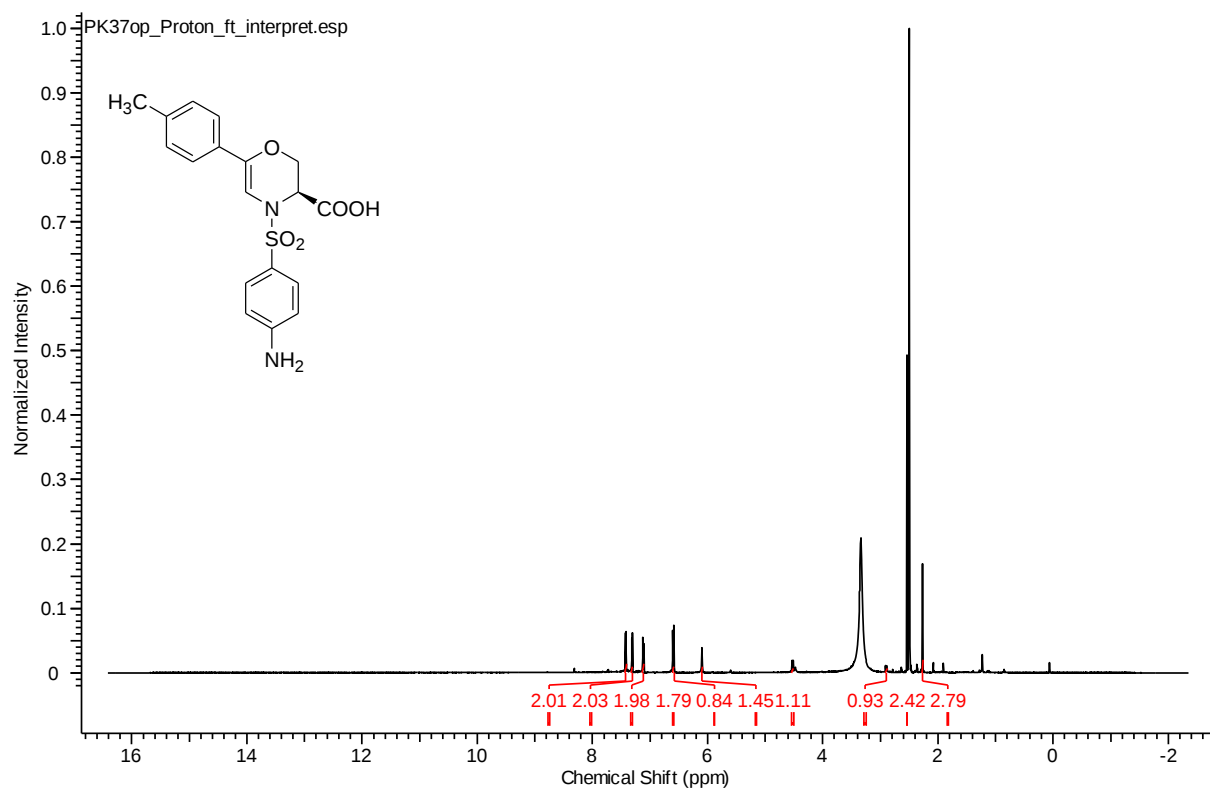
Příloha 40: HMBC spektrum sloučeniny 6(1,2,3,4).



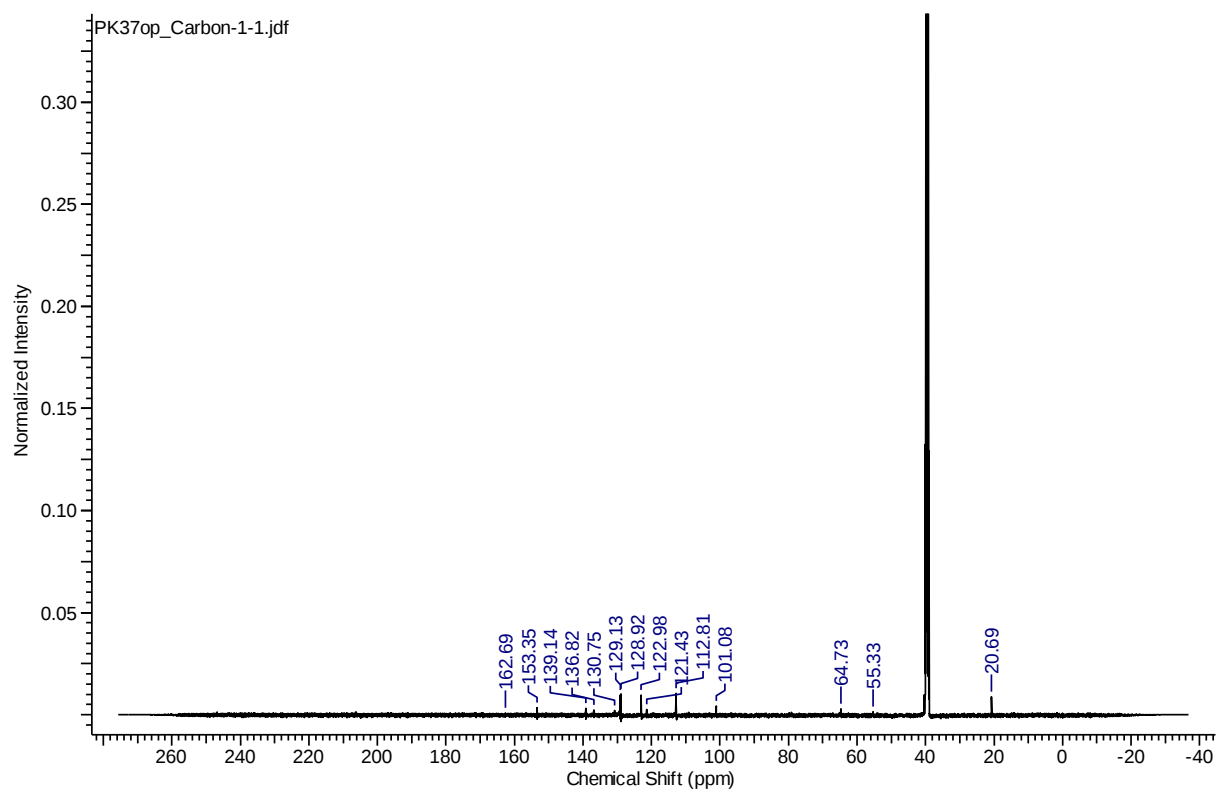
Příloha 41: HMQC spektrum sloučeniny 6(1,2,3,4).



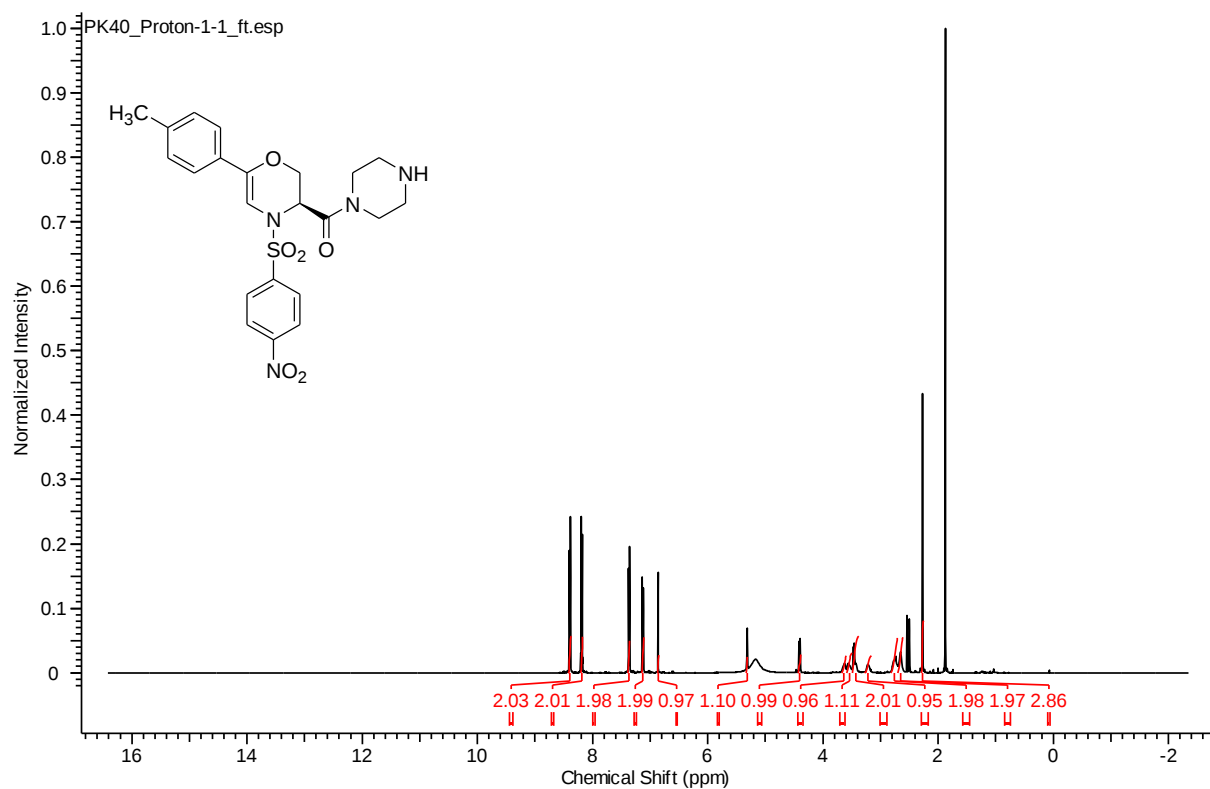
Příloha 42: ^1H -NMR spektrum sloučeniny **6**(1,1,4,1).



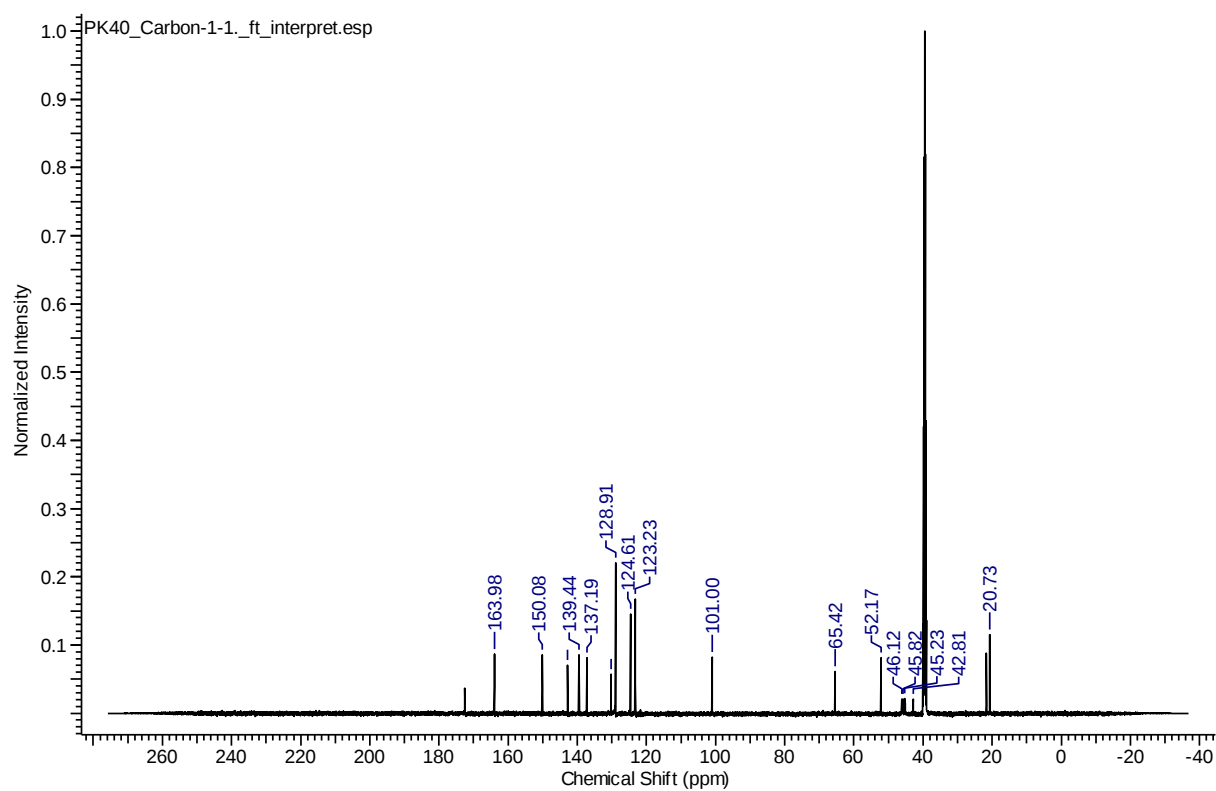
Příloha 43: ^{13}C -NMR spektrum sloučeniny **6**(1,1,4,1). PK37 (připravit znovu)



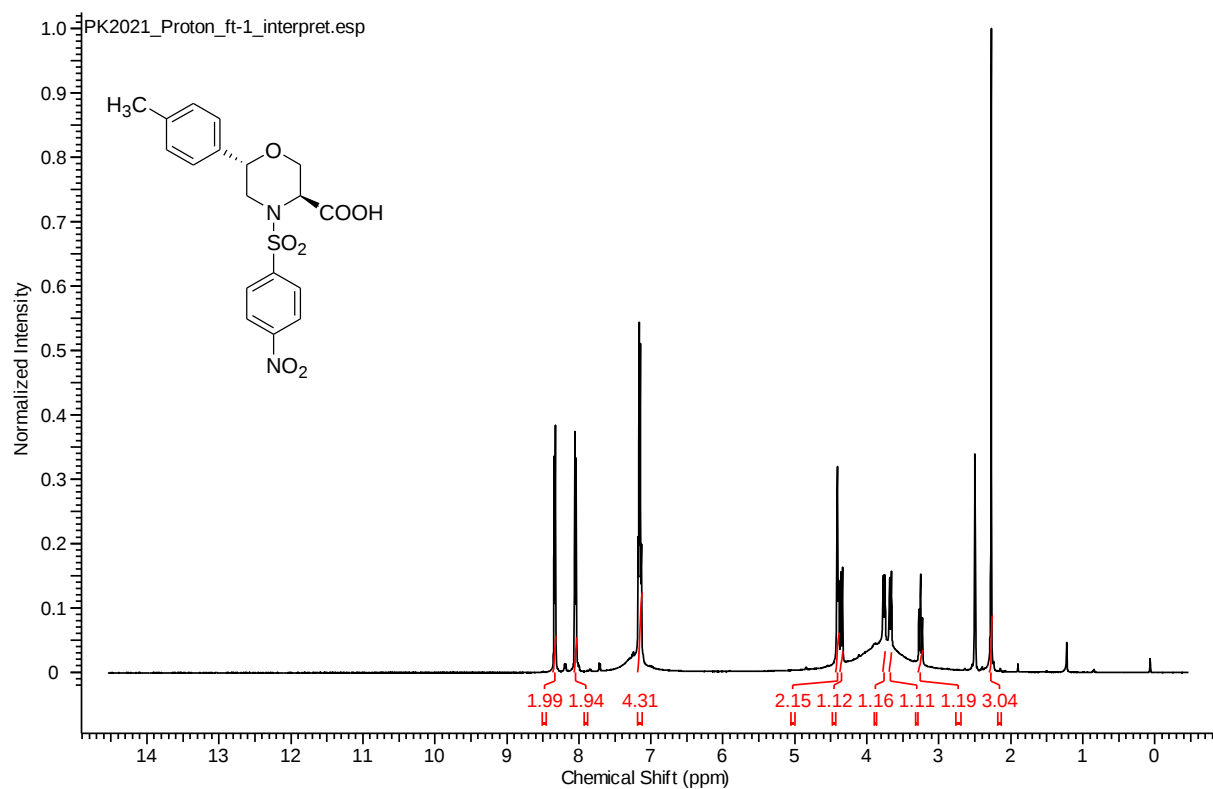
Příloha 44: ^1H -NMR spektrum sloučeniny **6**(4,1,1,1).



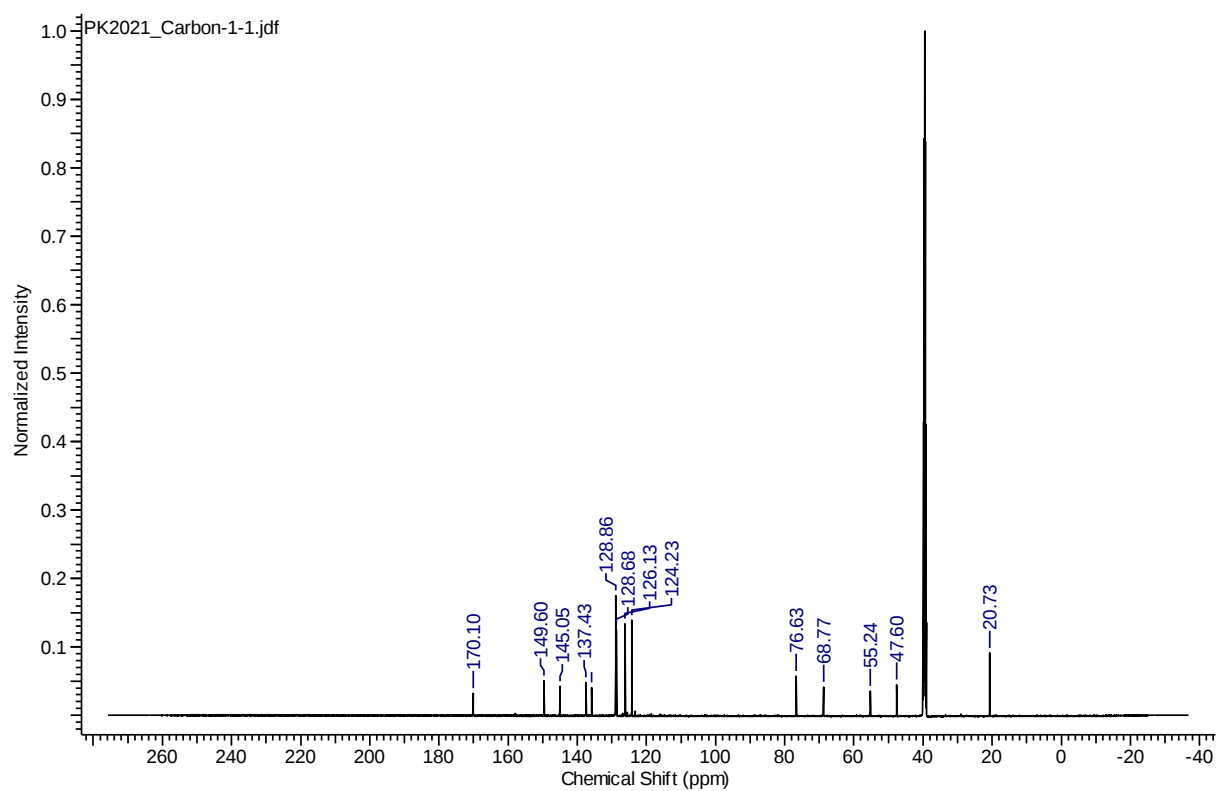
Příloha 45: ^{13}C -NMR spektrum sloučeniny **6**(4,1,1,1).



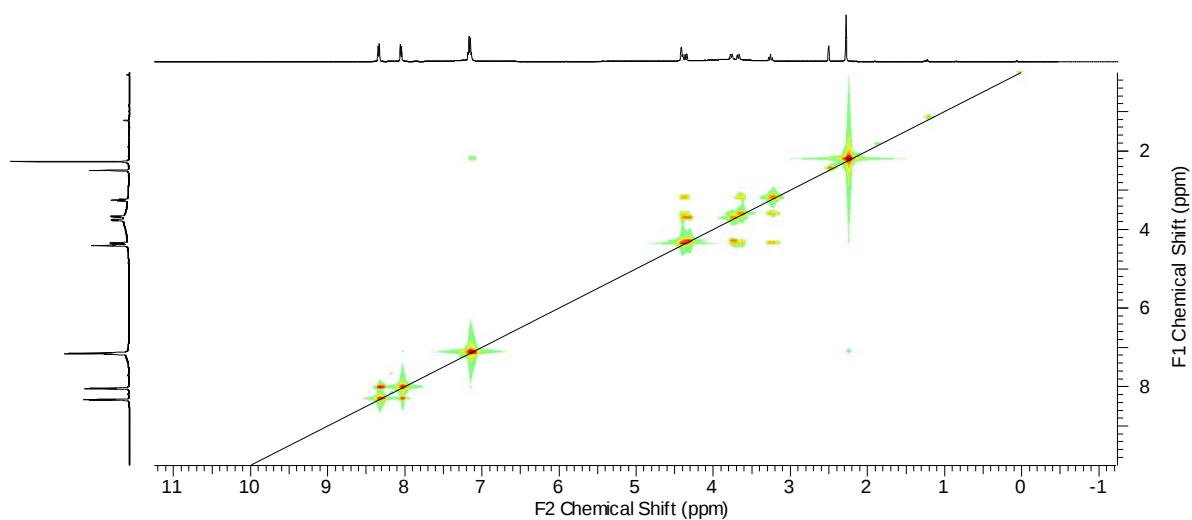
Příloha 46: ^1H -NMR spektrum sloučeniny 7(1,1,1,1).



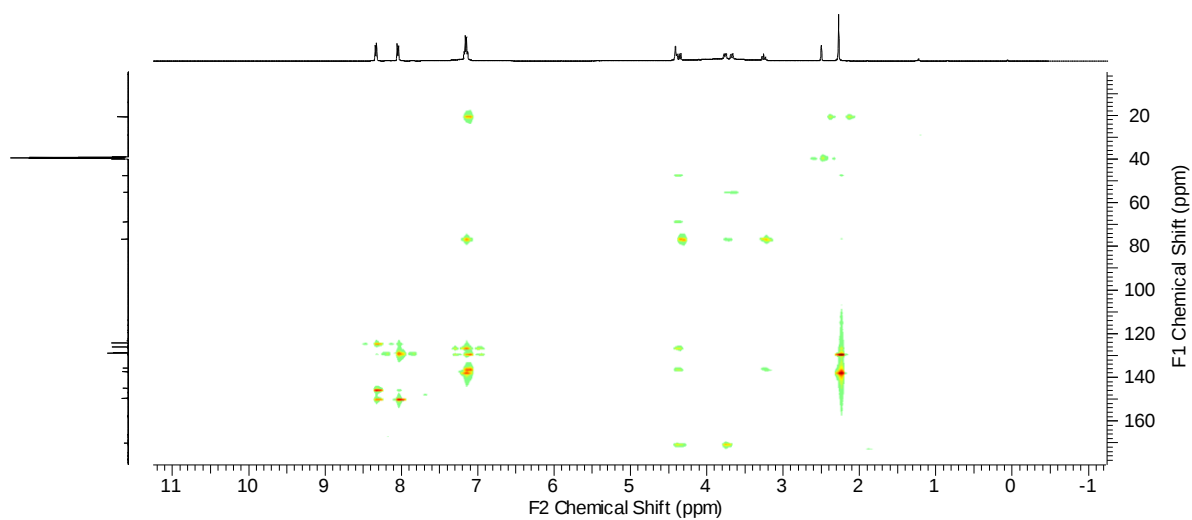
Příloha 47: ^{13}C -NMR spektrum sloučeniny 7(1,1,1,1).



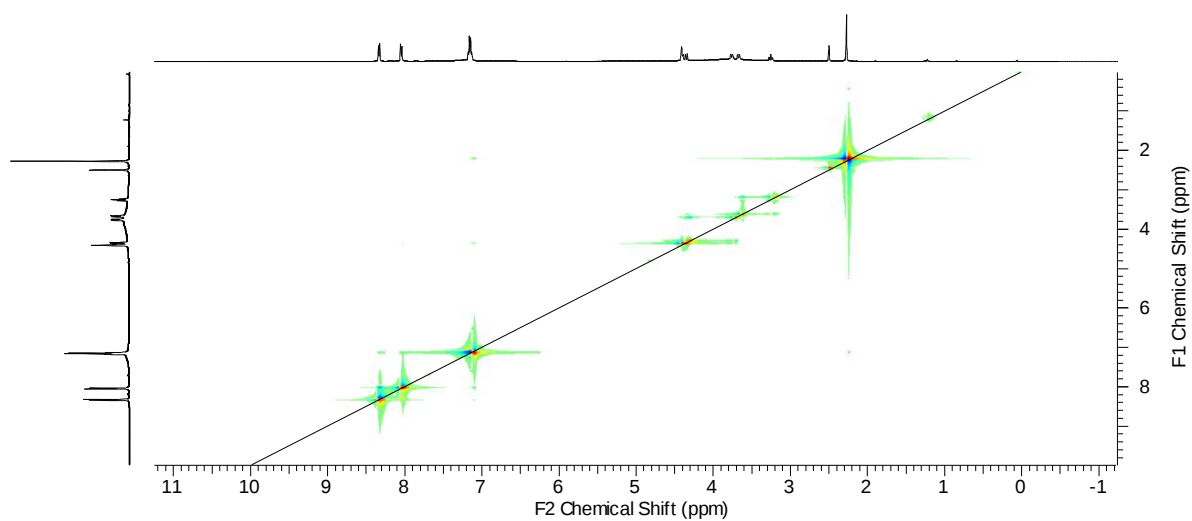
Příloha 48: COSY spektrum sloučeniny 7(1,1,1,1).



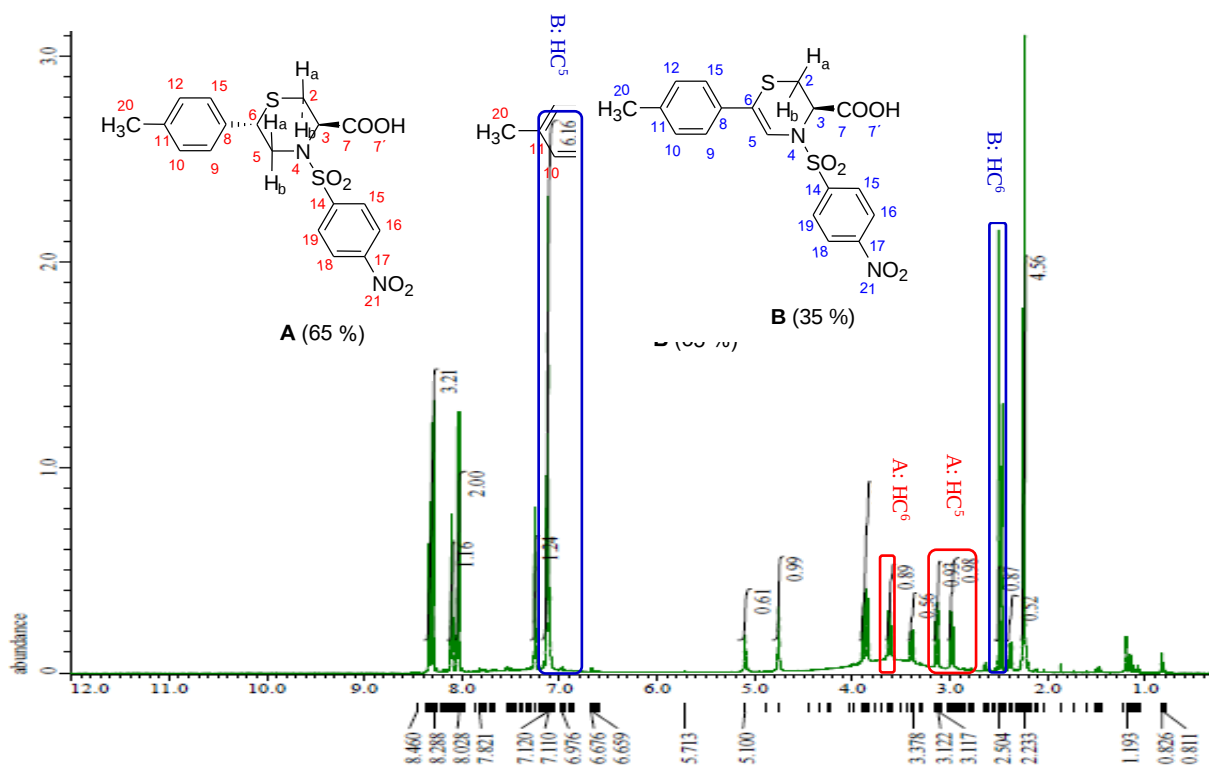
Příloha 49: HMBC spektrum sloučeniny 7(1,1,1,1).



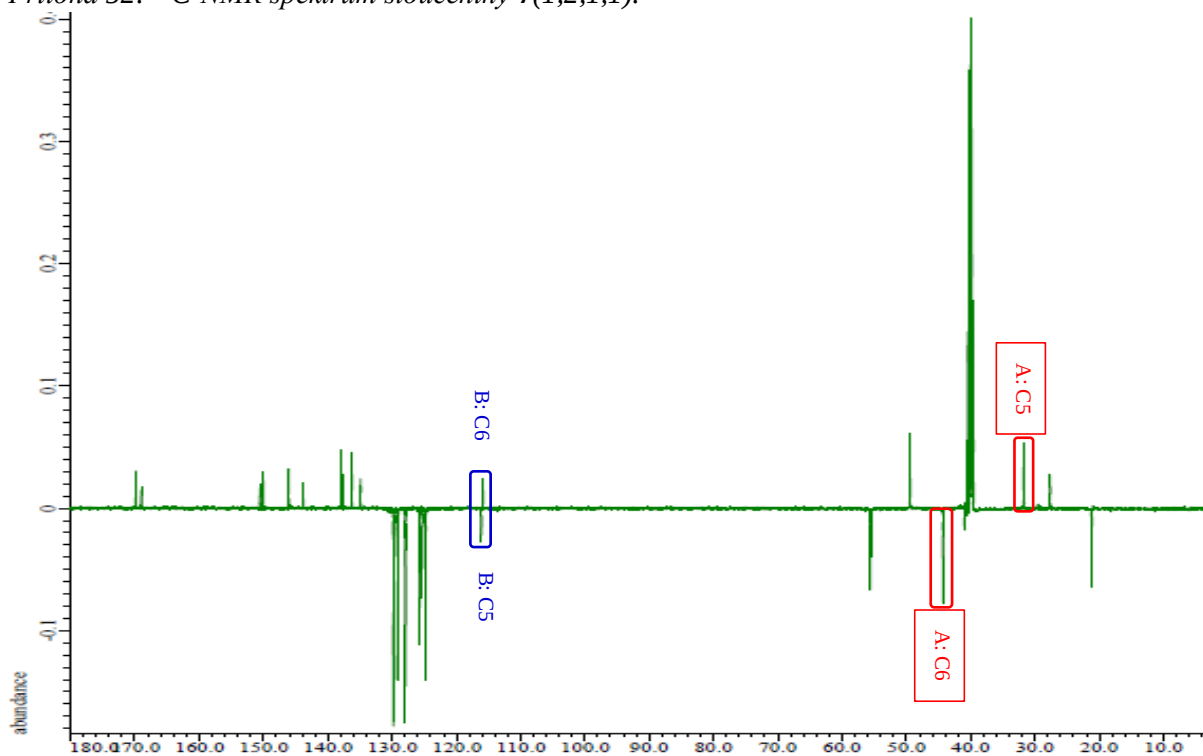
Příloha 50: HMBC spektrum sloučeniny 7(1,1,1,1).



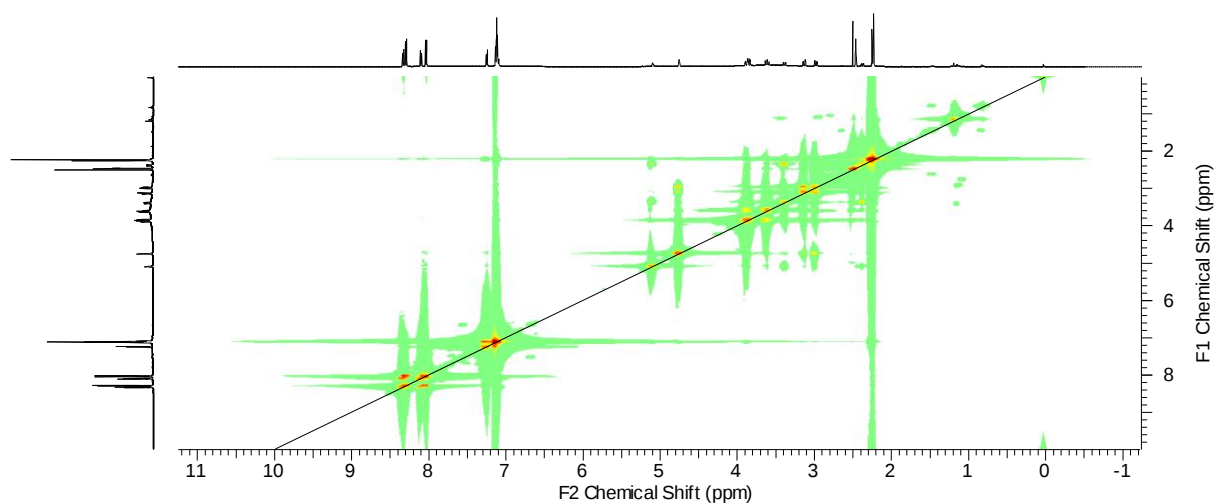
Příloha 51: ^1H -NMR spektrum sloučeniny 7(1,2,1,1).



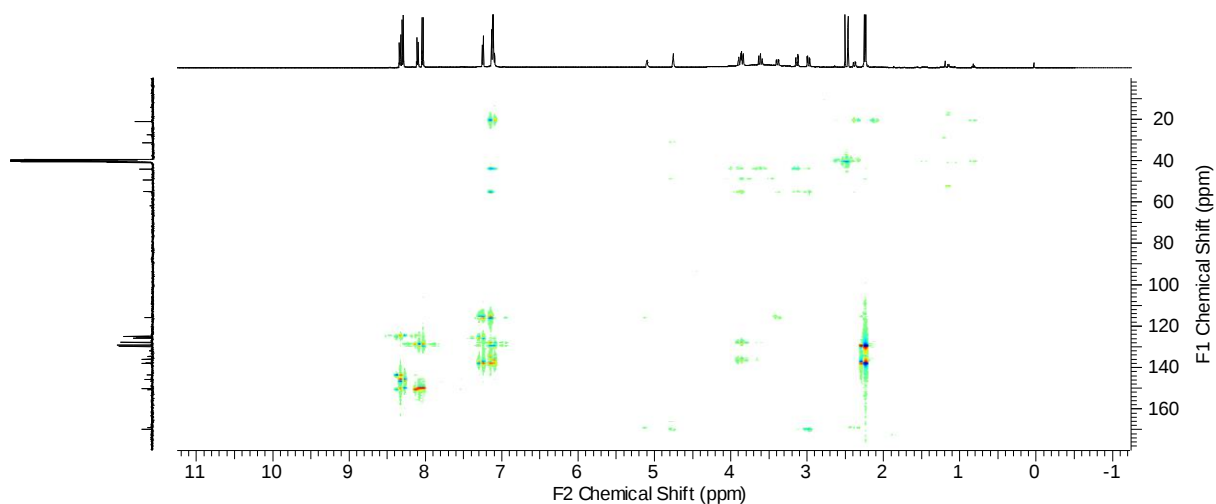
Příloha 52: ^{13}C -NMR spektrum sloučeniny 7(1,2,1,1).



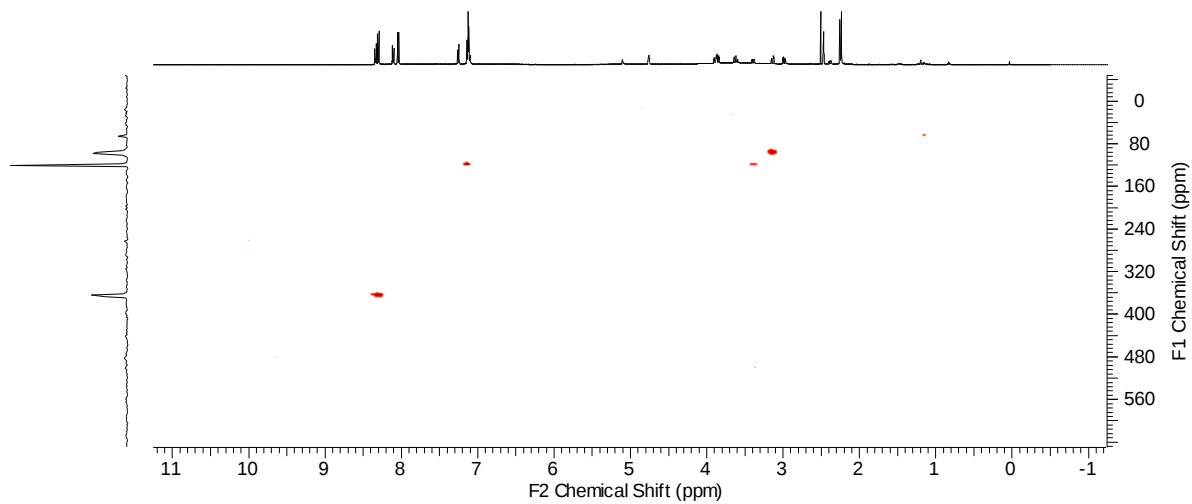
Příloha 53: COSY spektrum sloučeniny 7(1,2,1,1).



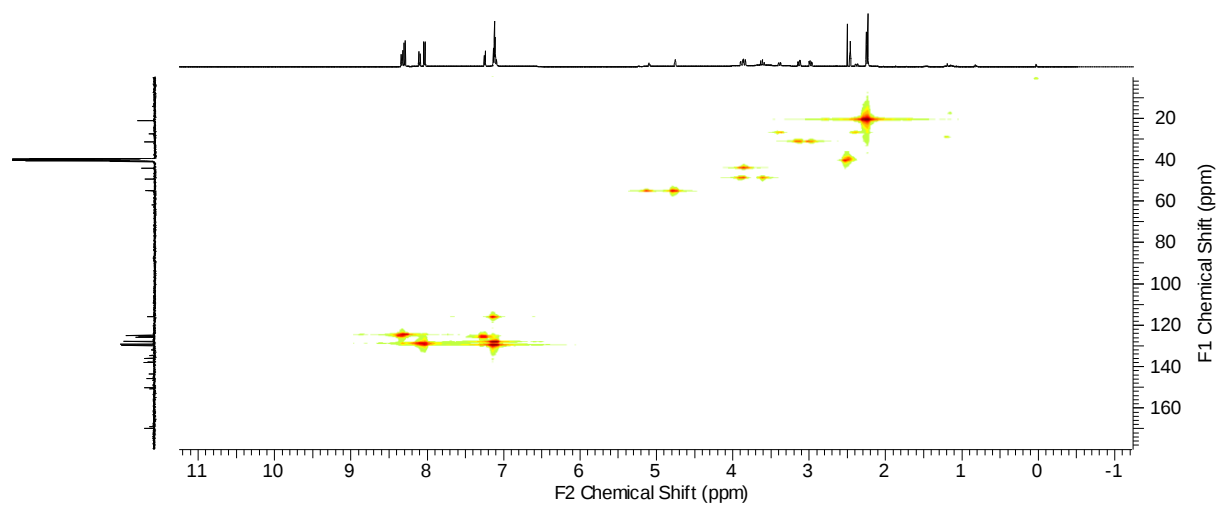
Příloha 54: HMBC spektrum sloučeniny 7(1,2,1,1).



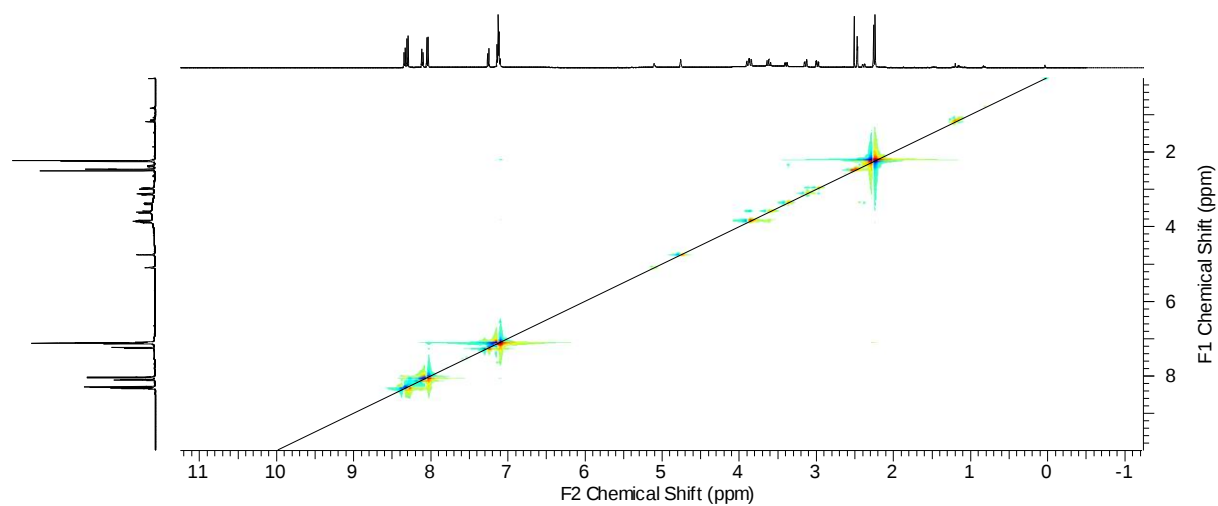
Příloha 55: ¹H-¹⁵N spektrum sloučeniny 7(1,2,1,1).



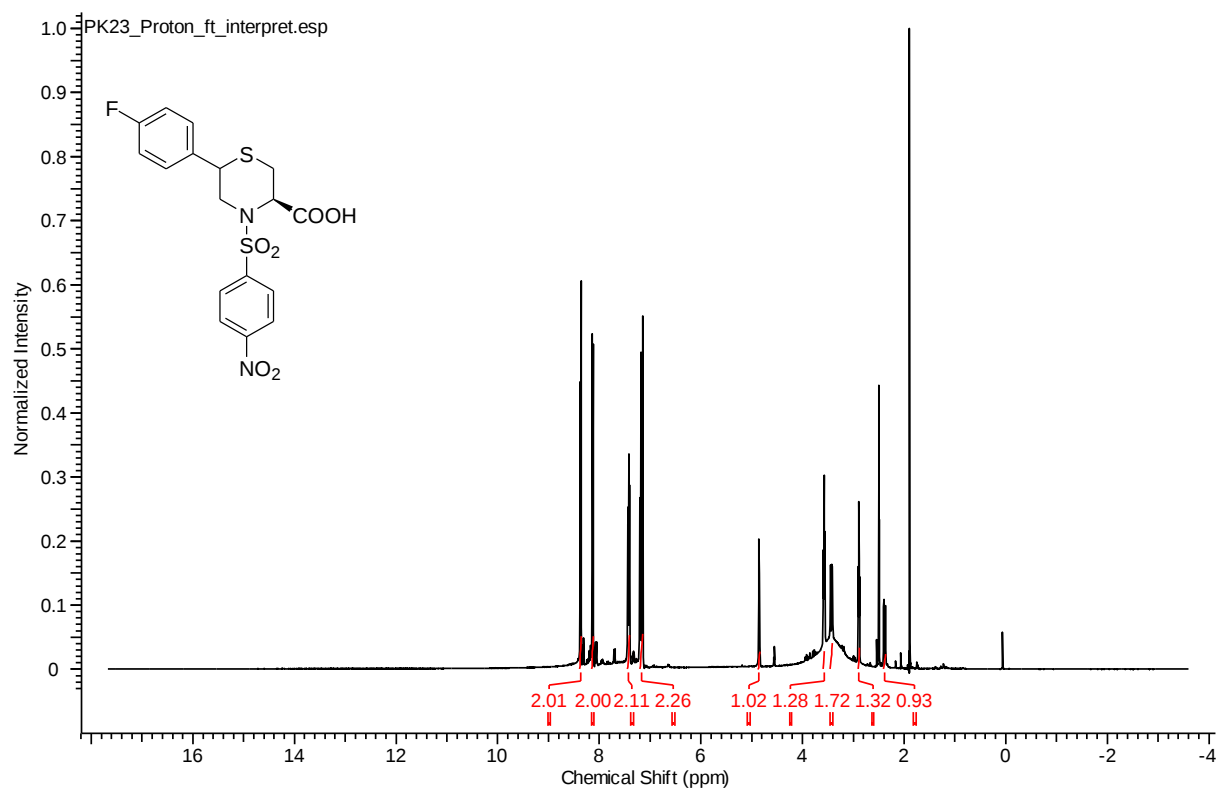
Příloha 56: HMQC spektrum sloučeniny 7(1,2,1,1).



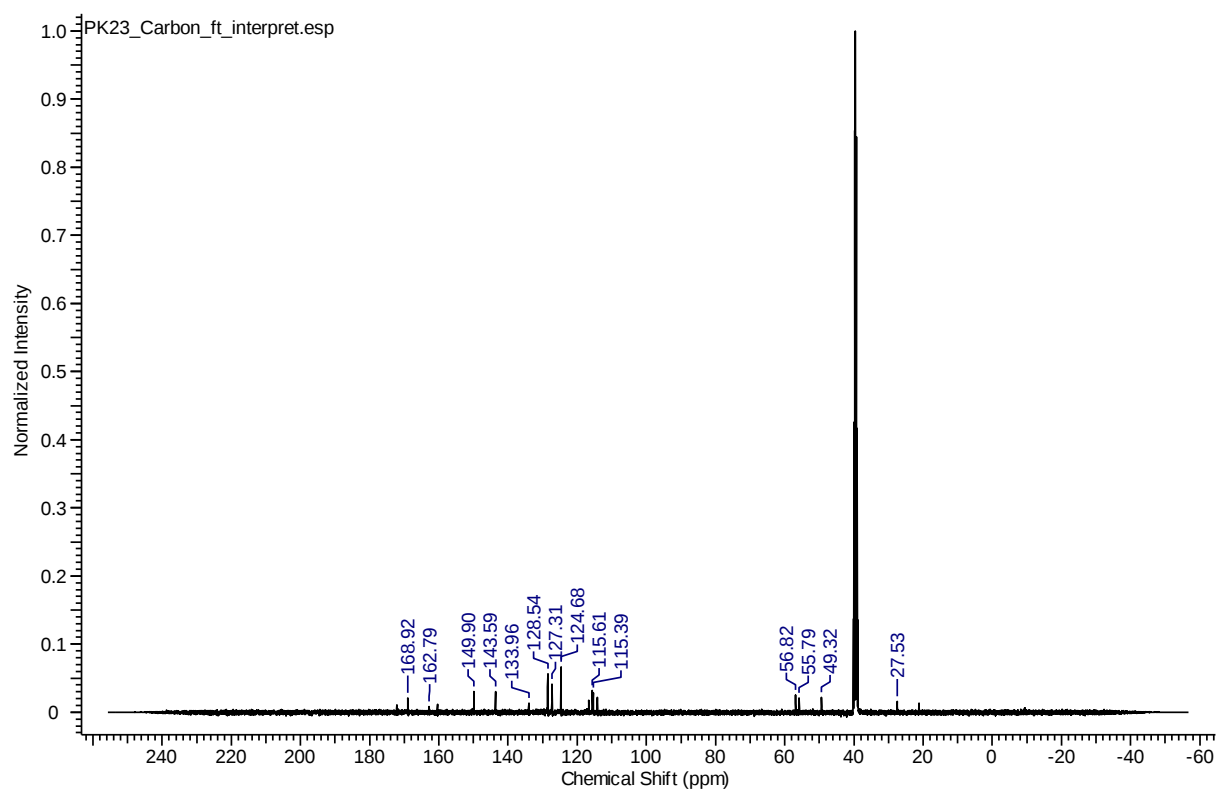
Příloha 57: ROESY spektrum sloučeniny 7(1,2,1,1).



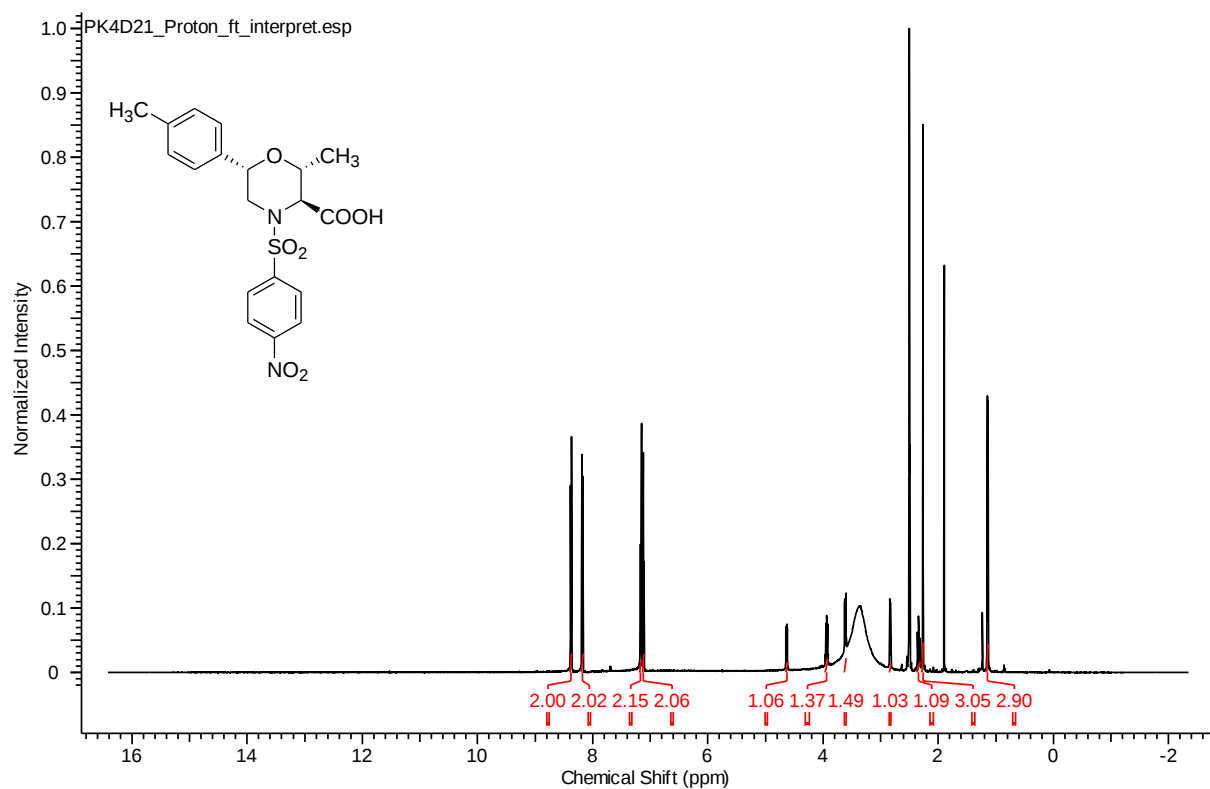
Příloha 58: ^1H -NMR spektrum sloučeniny 7(1,2,1,4).



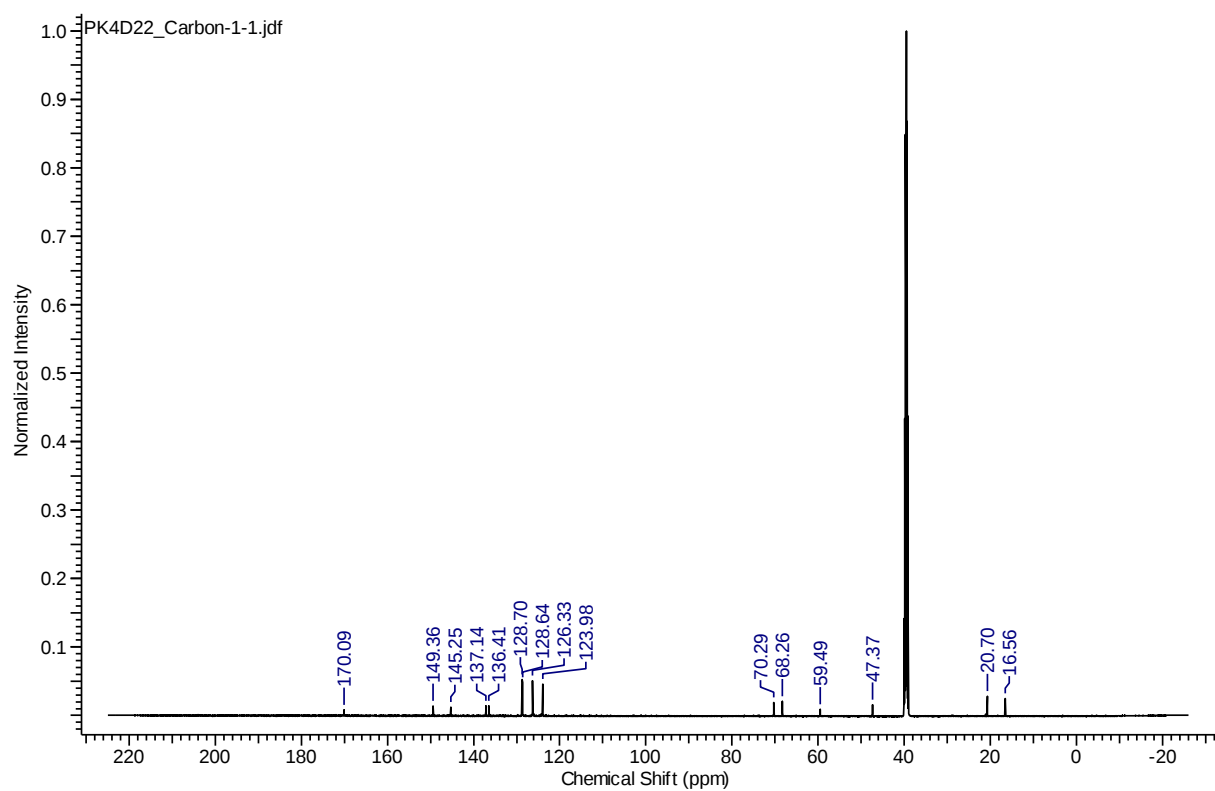
Příloha 59: ^{13}C -NMR spektrum sloučeniny 7(1,2,1,4).



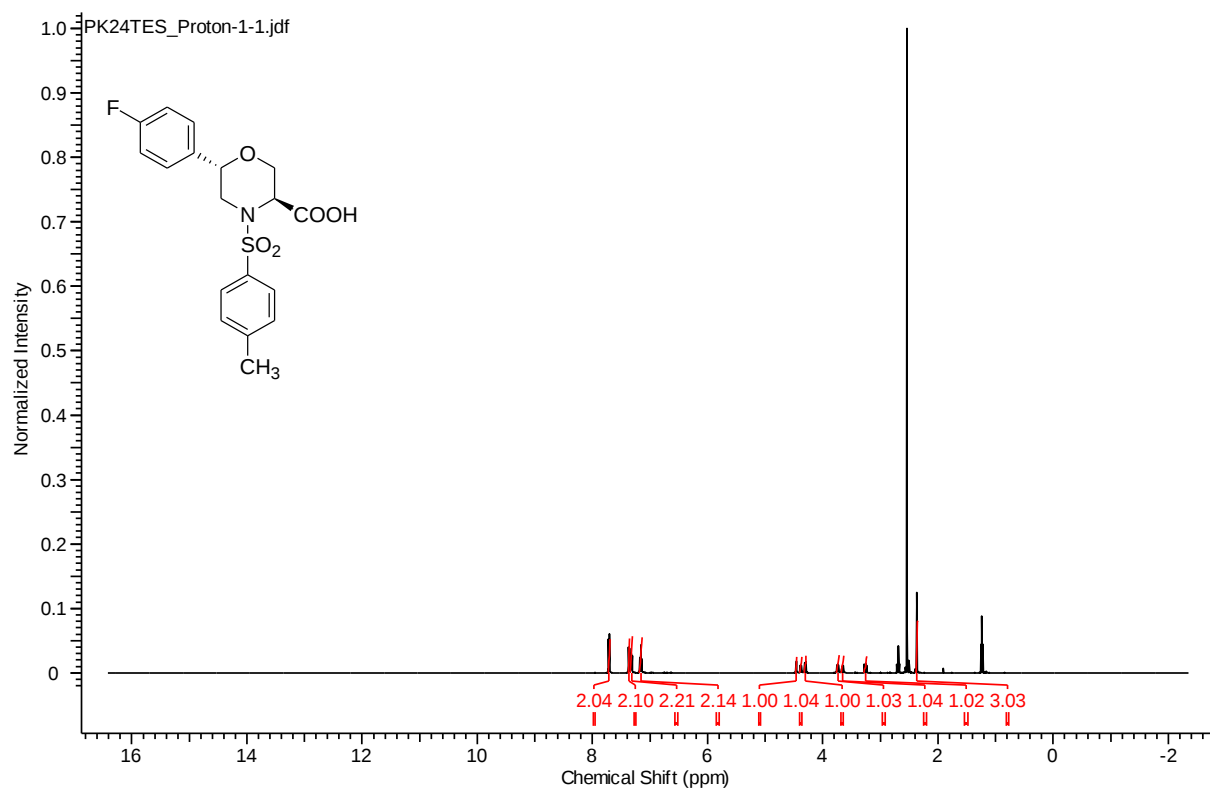
Příloha 60: ^1H -NMR spektrum sloučeniny 7(1,3,1,1).



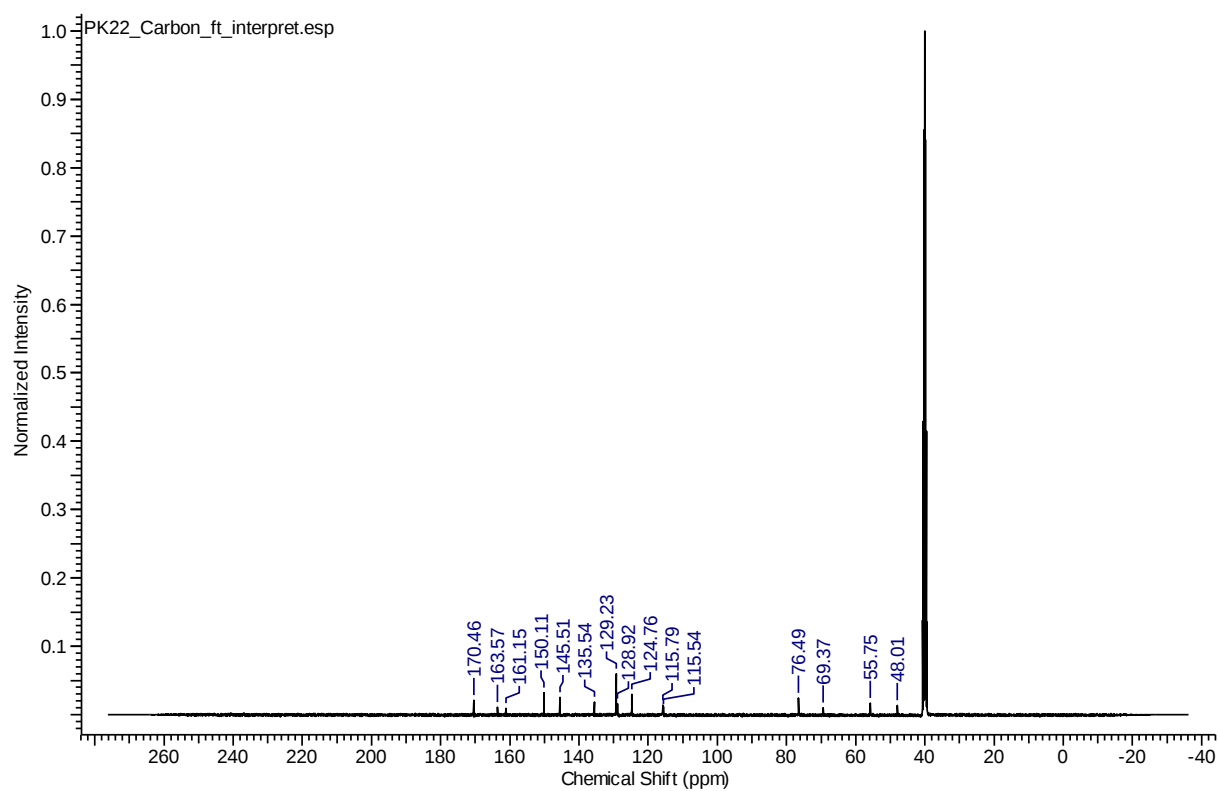
Příloha 61: ^{13}C -NMR spektrum sloučeniny 7(1,3,1,1).



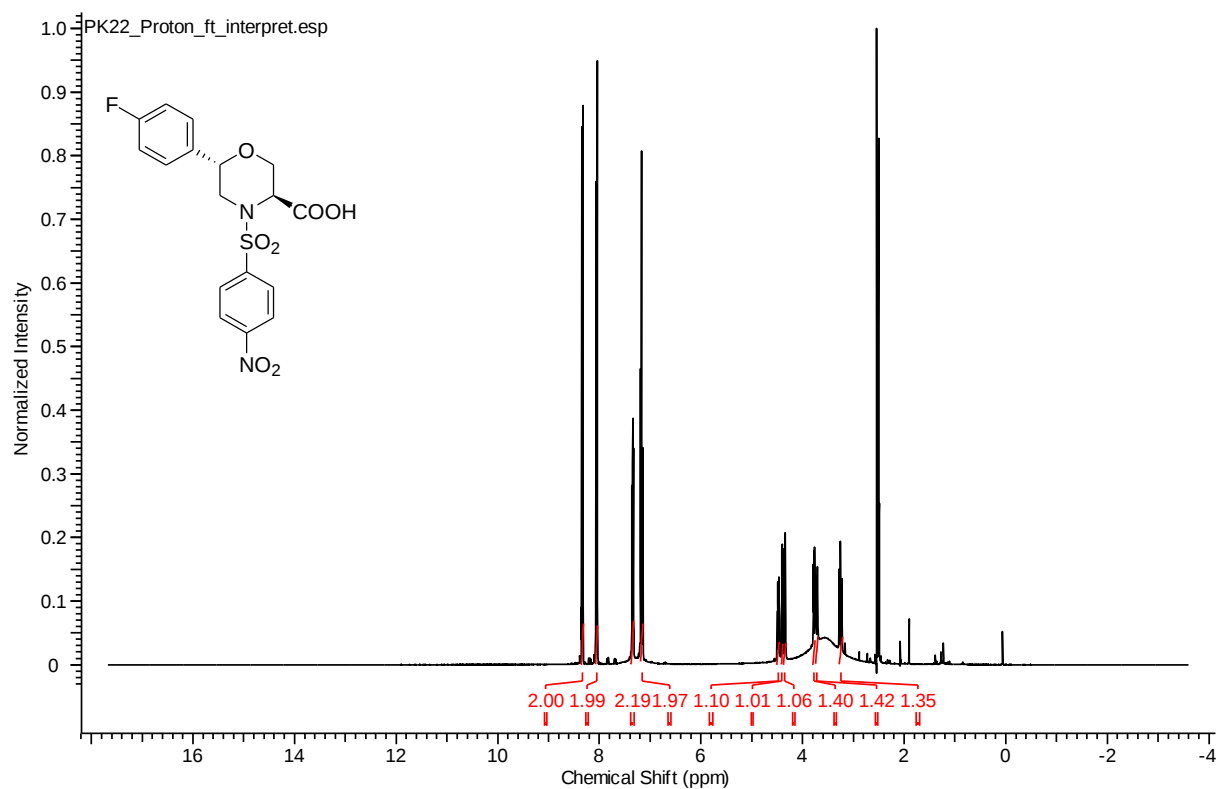
Príloha 62: ^1H -NMR spektrum sloučeniny 7(1,1,2,4) – znečištěno alifatickým kontaminentem.



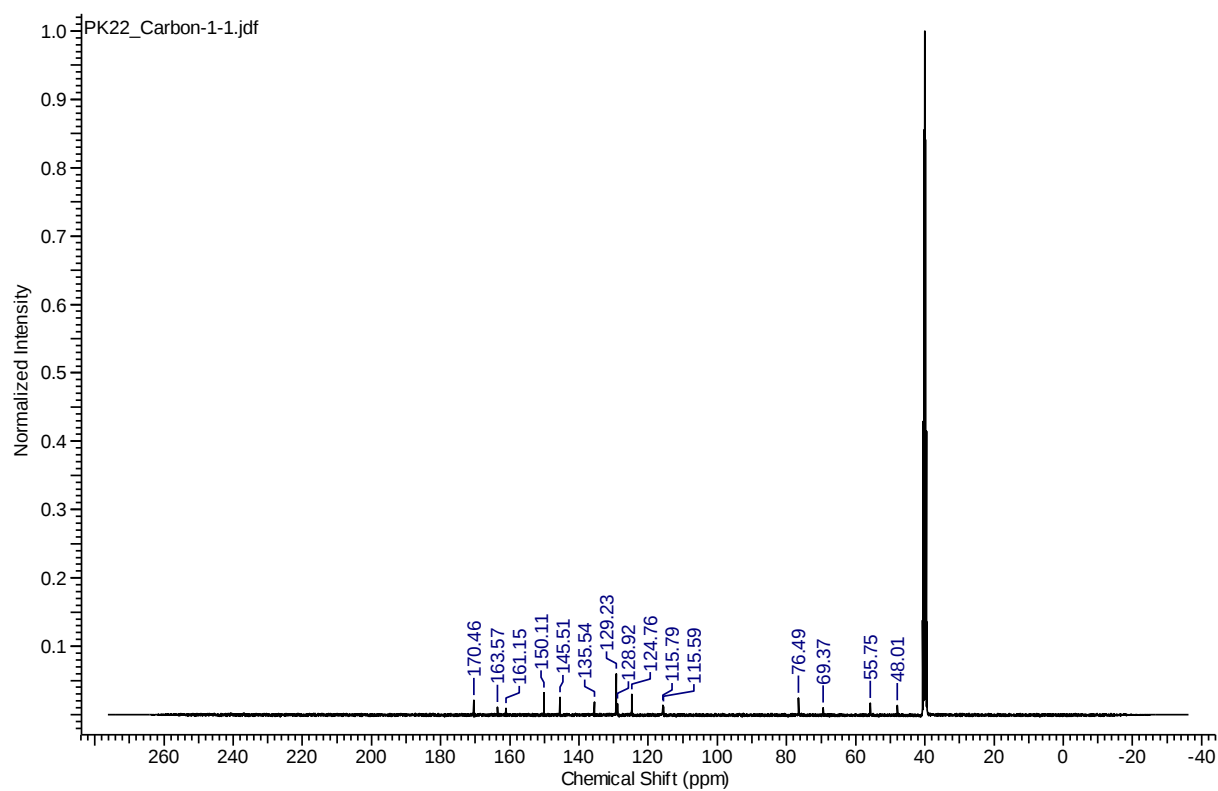
Príloha 63: ^{13}C -NMR spektrum sloučeniny 7(1,1,2,4) – znečištěno alifatickým kontaminentem.



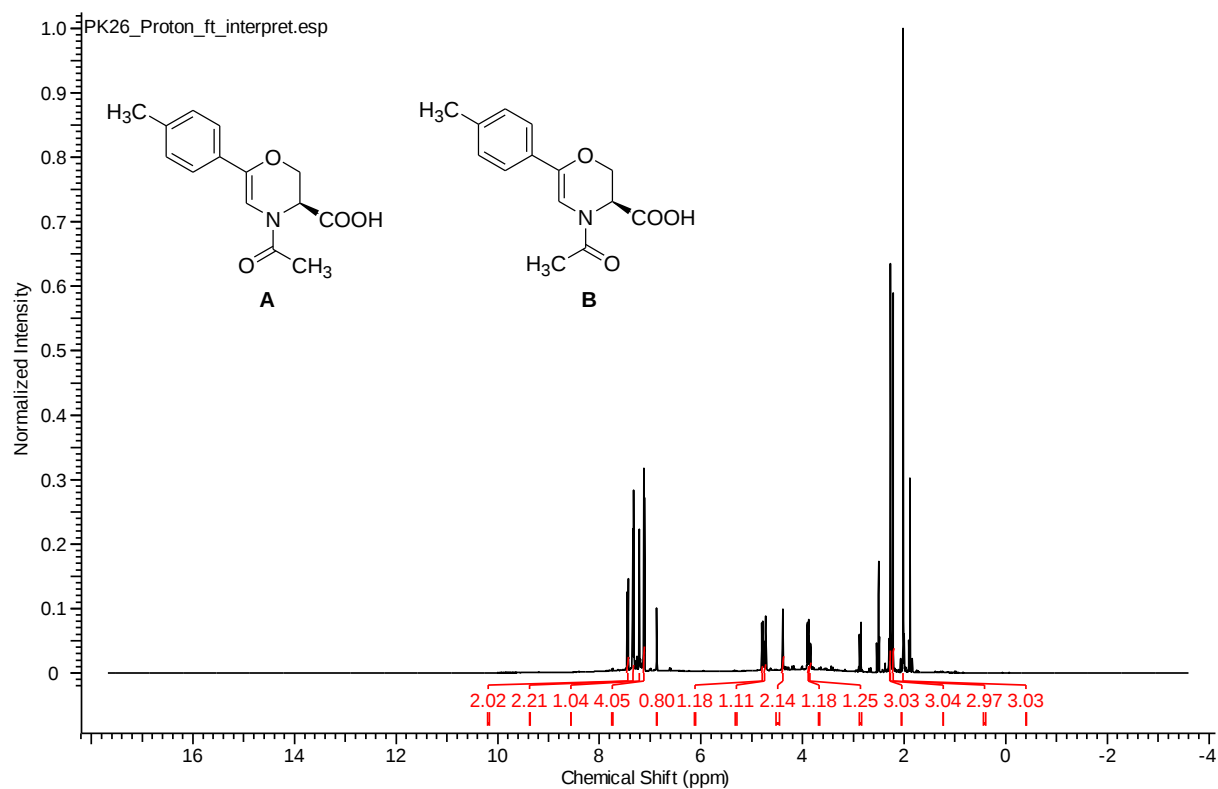
Príloha 64: ^1H -NMR spektrum sloučeniny 7(1,1,1,4).



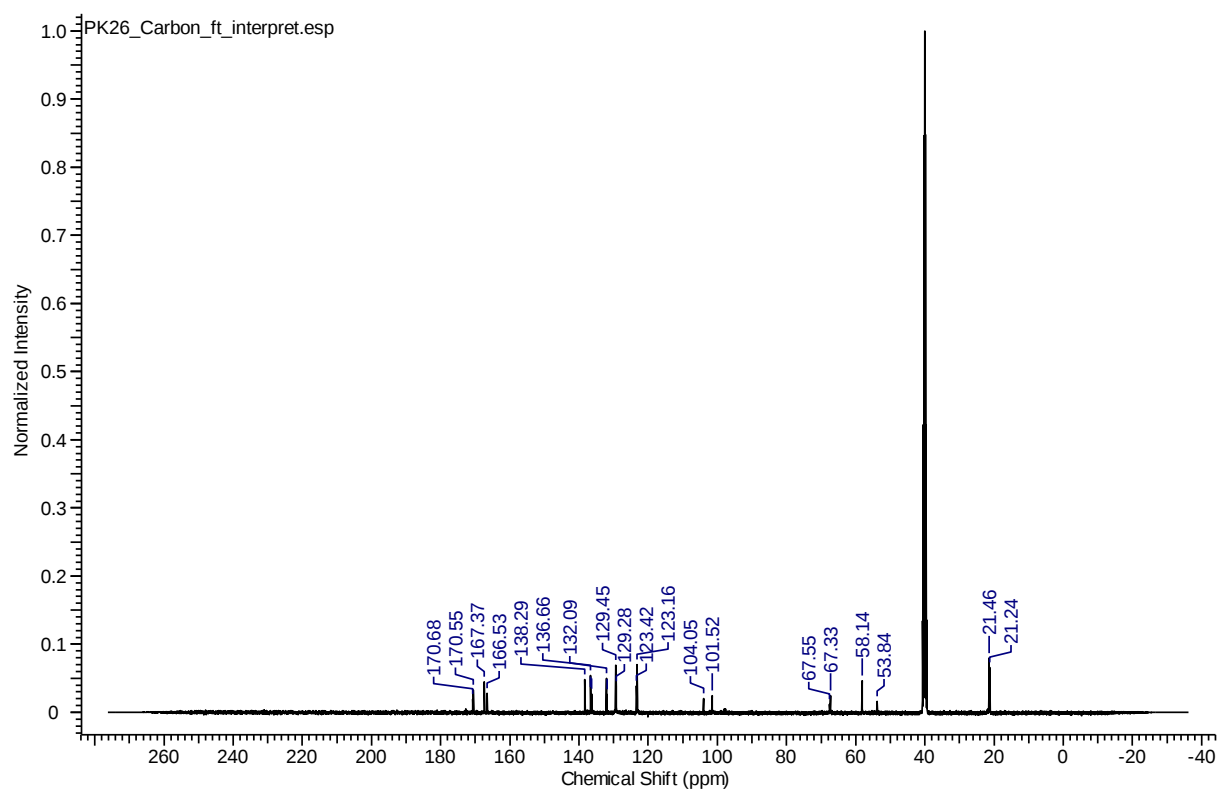
Príloha 65: ^{13}C -NMR spektrum sloučeniny 7(1,1,1,4).



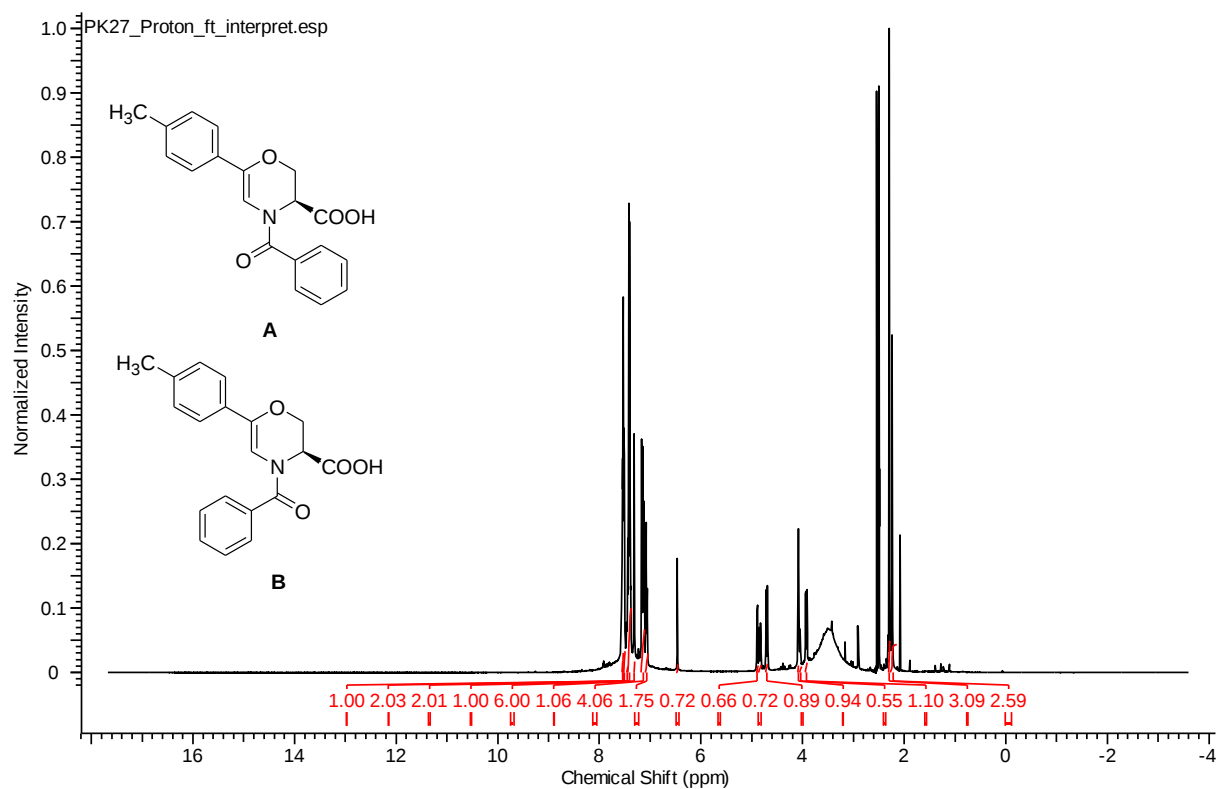
Príloha 66: ^1H -NMR spektrum sloučeniny **10**(1,1,6,1).



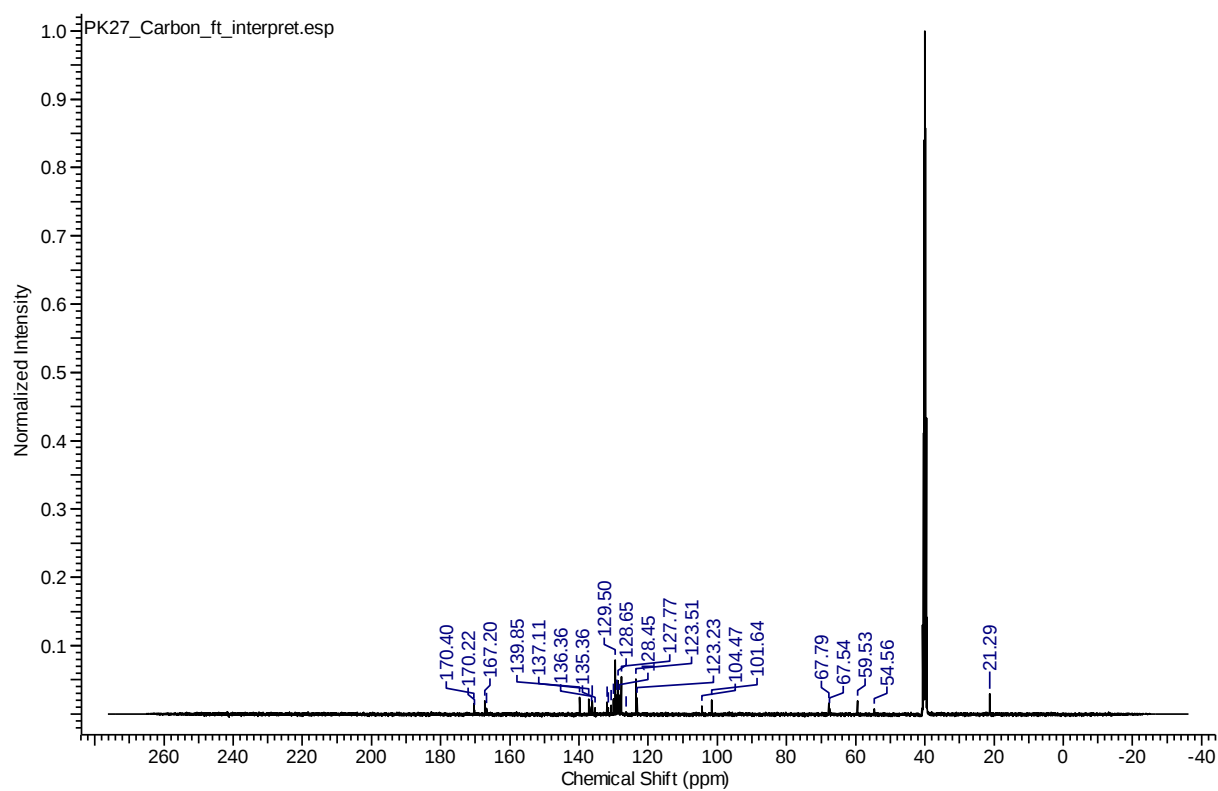
Príloha 67: ^{13}C -NMR spektrum sloučeniny **10**(1,1,6,1).



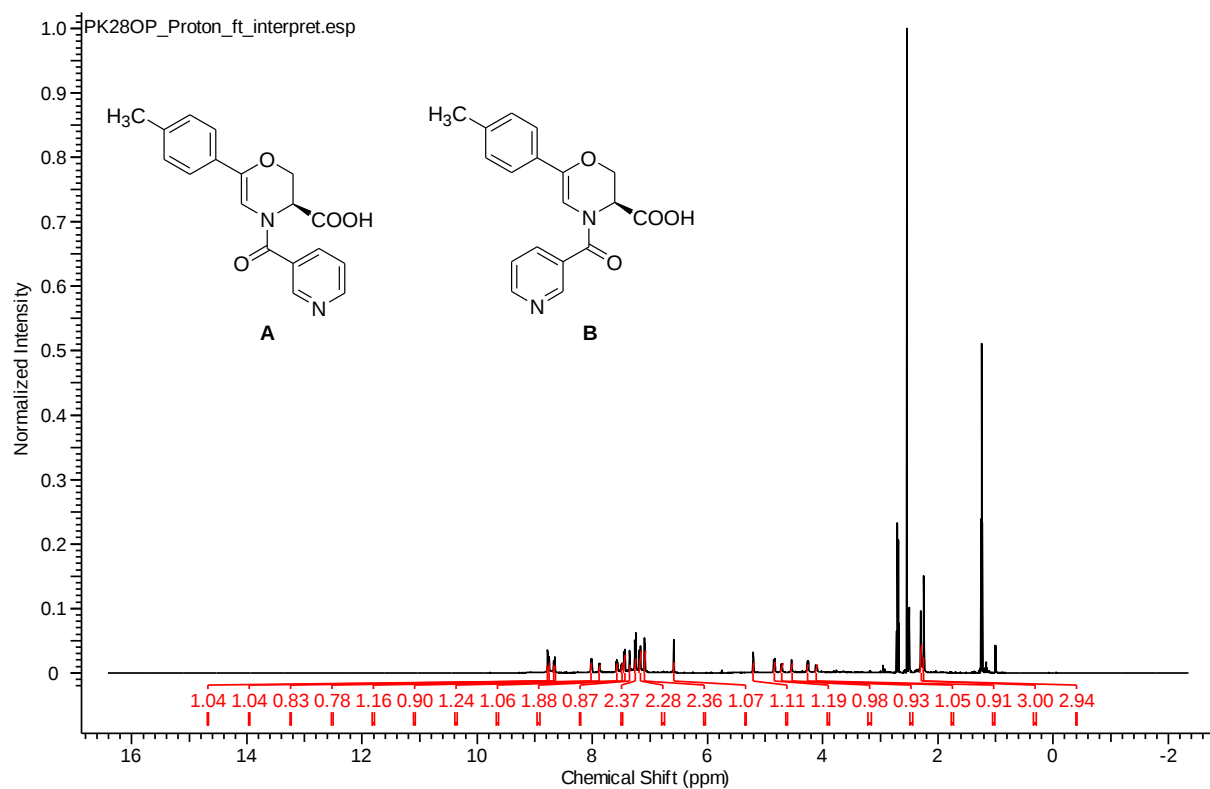
Príloha 68: ^1H -NMR spektrum sloučeniny **10**(1,1,7,1).



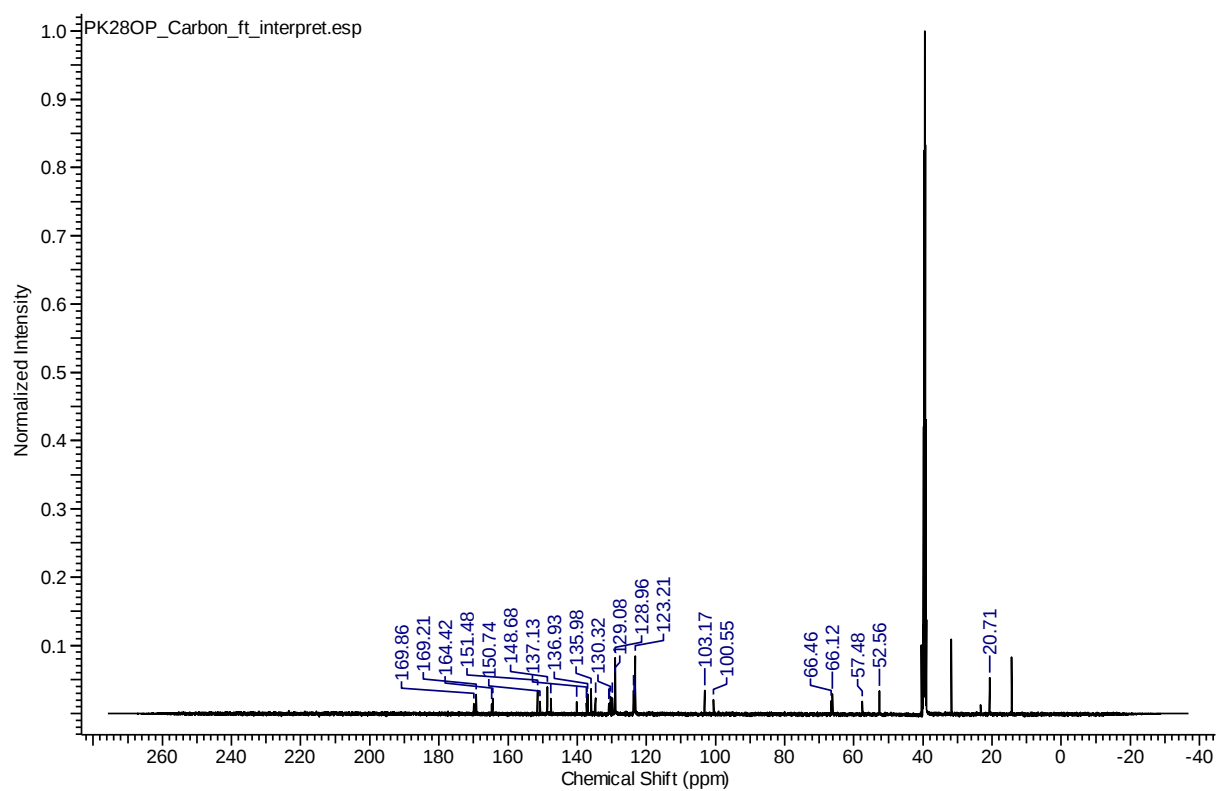
Príloha 69: ^{13}C -NMR spektrum sloučeniny **10**(1,1,7,1).



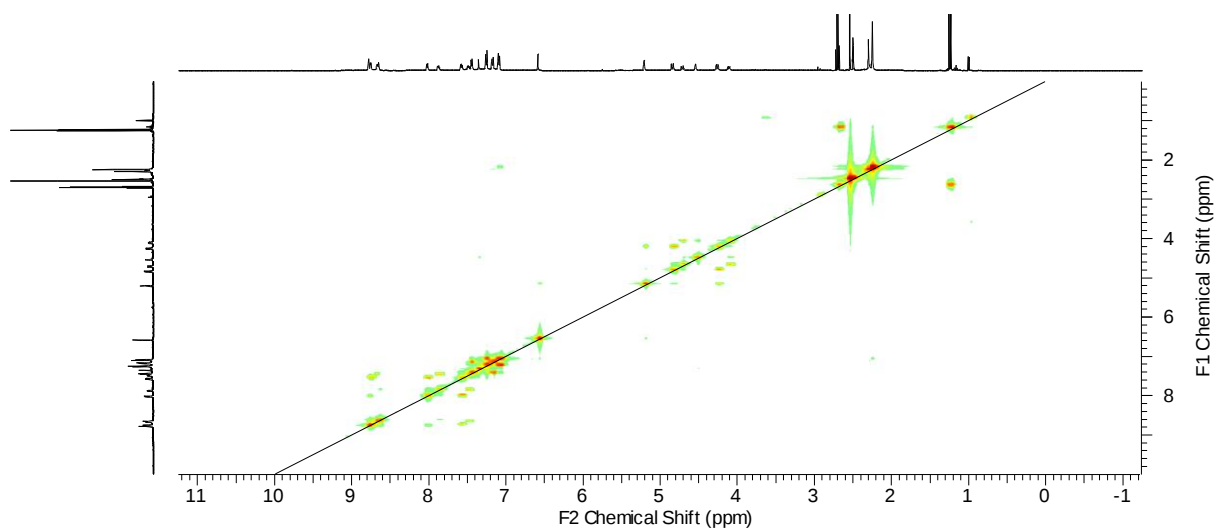
Príloha 70: ^1H -NMR spektrum sloučeniny **10**(1,1,8,1) – znečistěno alifatickým kontaminantem.



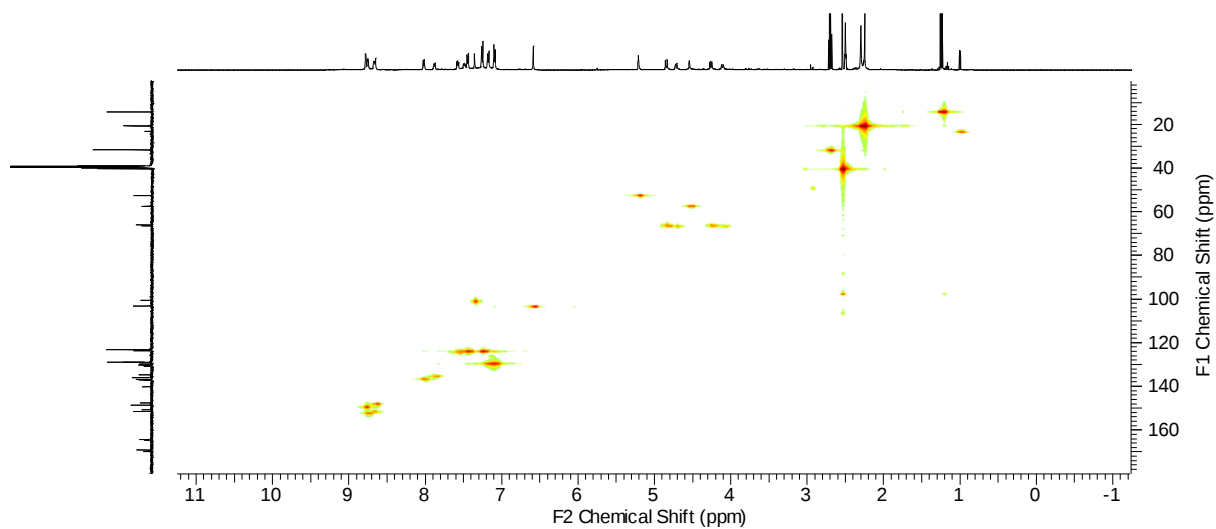
Príloha 71: ^{13}C -NMR spektrum sloučeniny **10**(1,1,8,1) – znečistěno alifatickým kontaminantem.



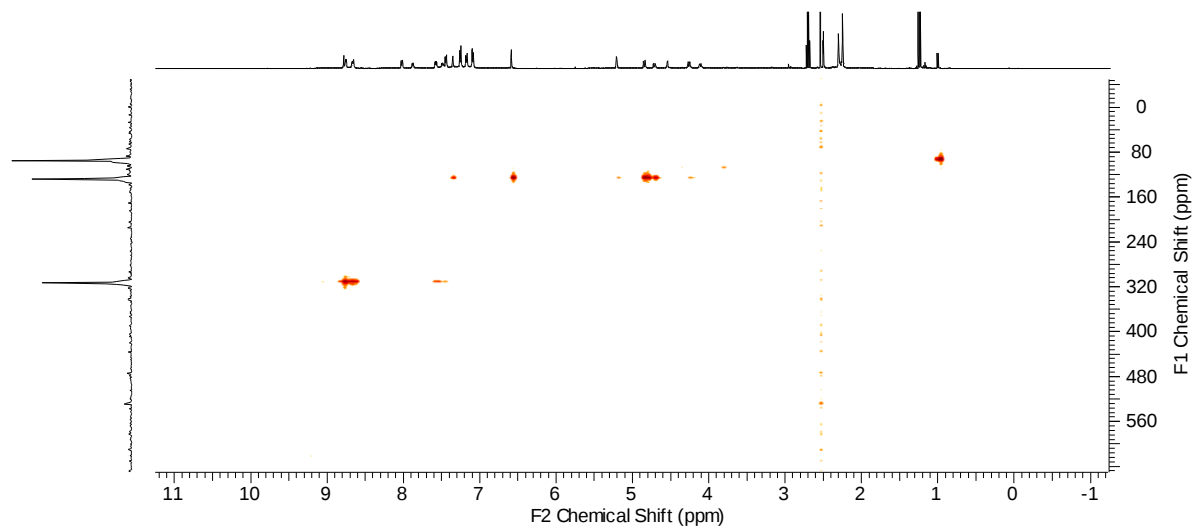
Příloha 72: COSY spektrum sloučeniny **10**(1,1,8,1).



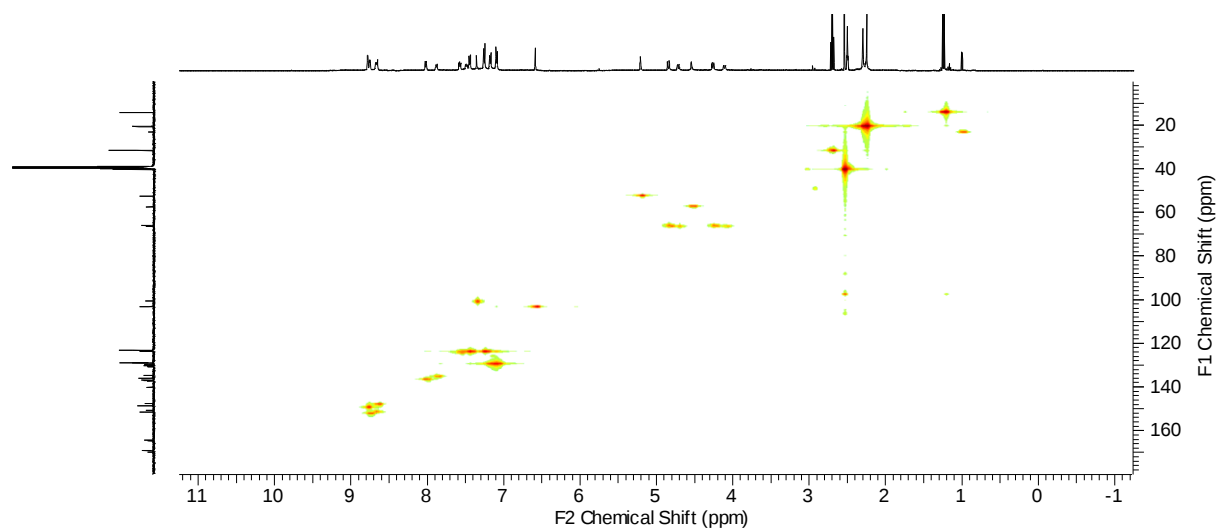
Příloha 73: HMBC spektrum sloučeniny **10**(1,1,8,1).



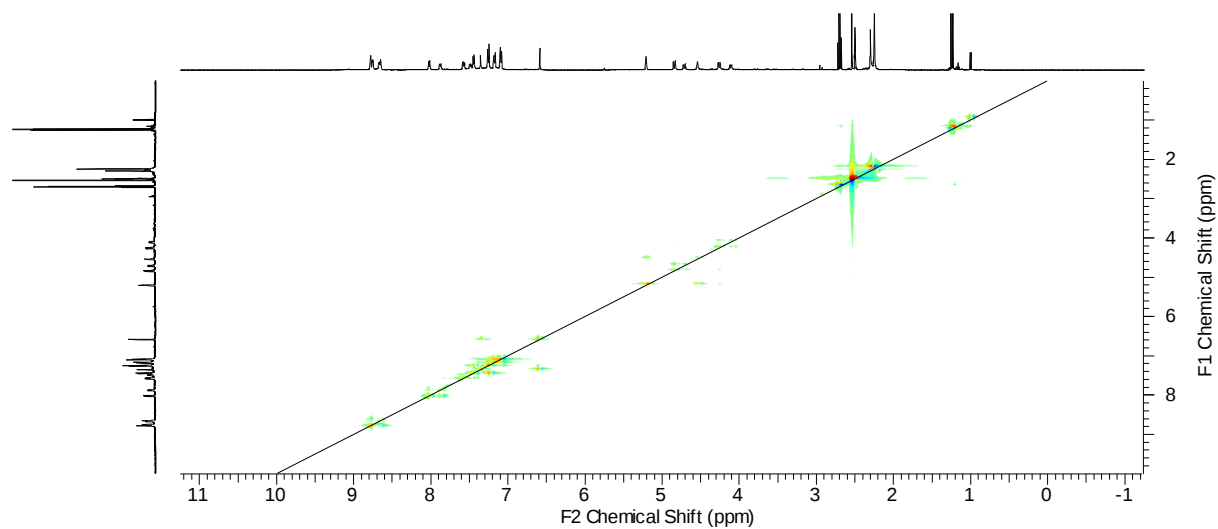
Příloha 74: ^1H - ^{15}N HMBC spektrum sloučeniny **10**(1,1,8,1).



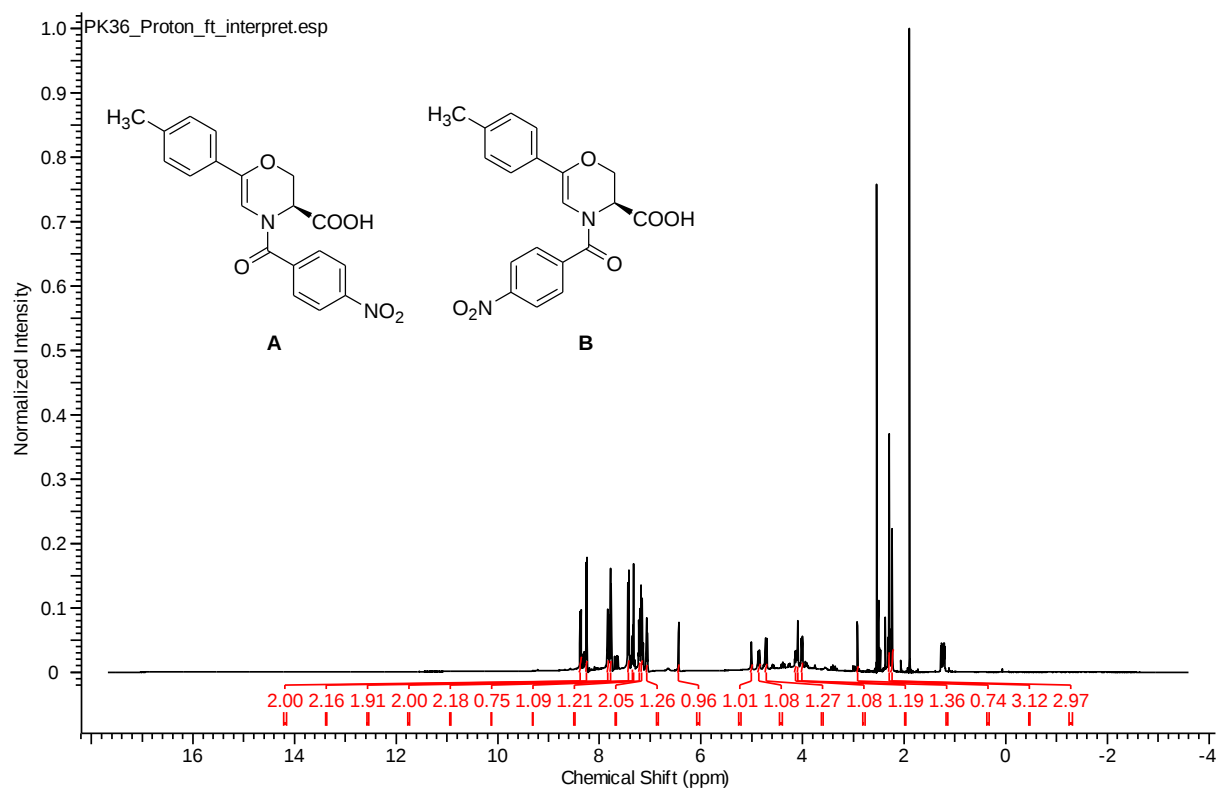
Příloha 75: HMQC spektrum sloučeniny **10**(1,1,8,1).



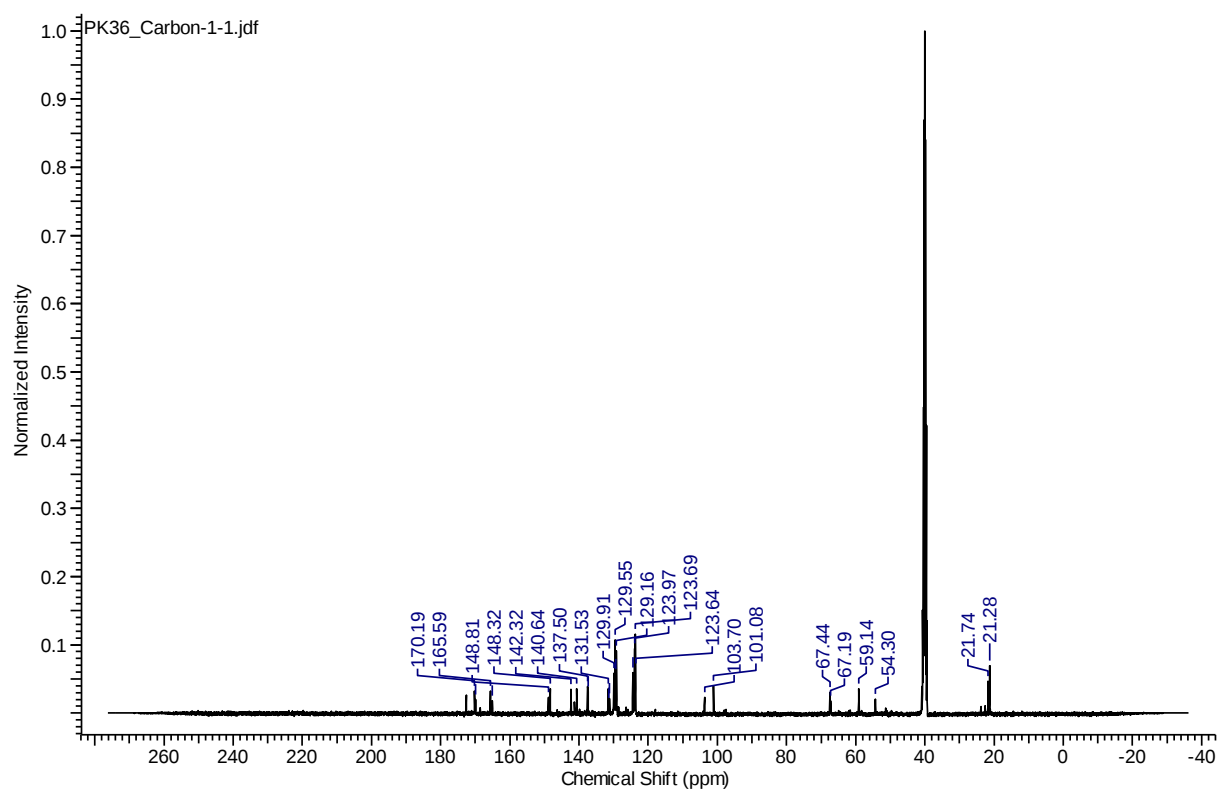
Příloha 76: ROESY spektrum sloučeniny **10**(1,1,8,1).



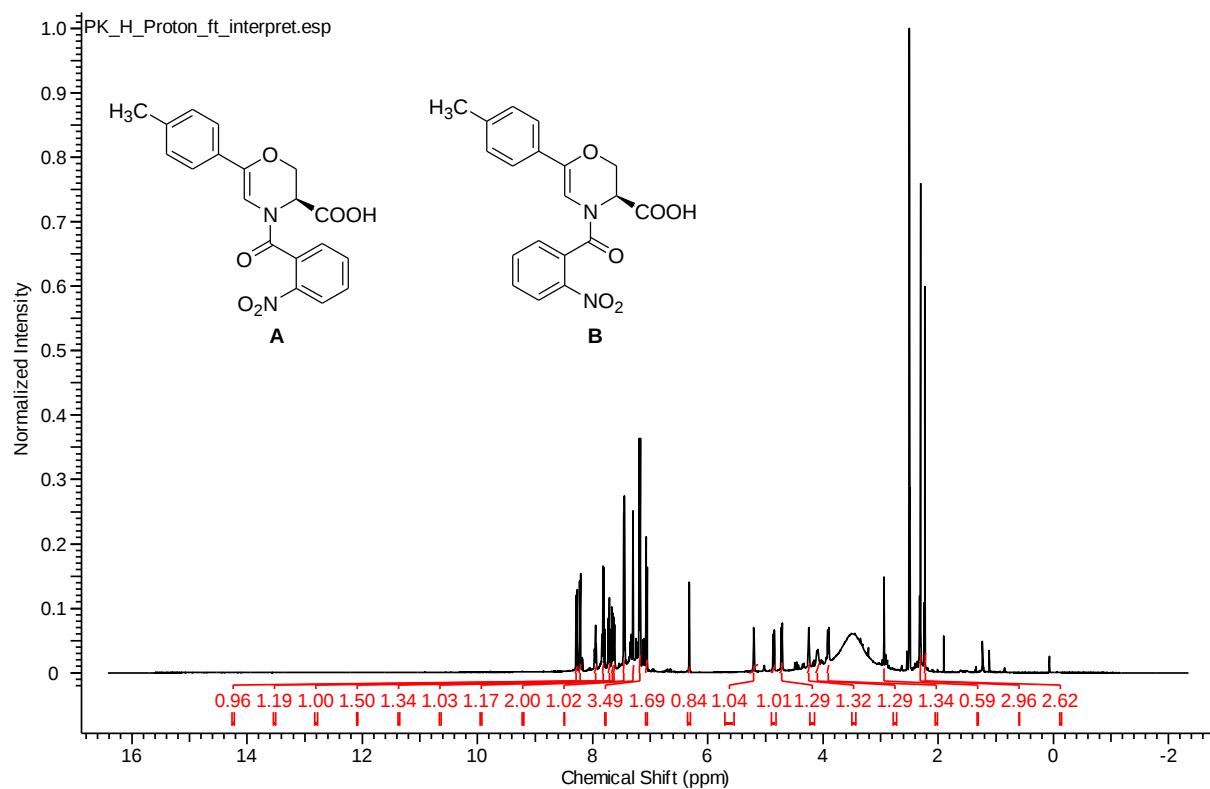
Príloha 77: ^1H -NMR spektrum sloučeniny **10**(1,1,10,1).



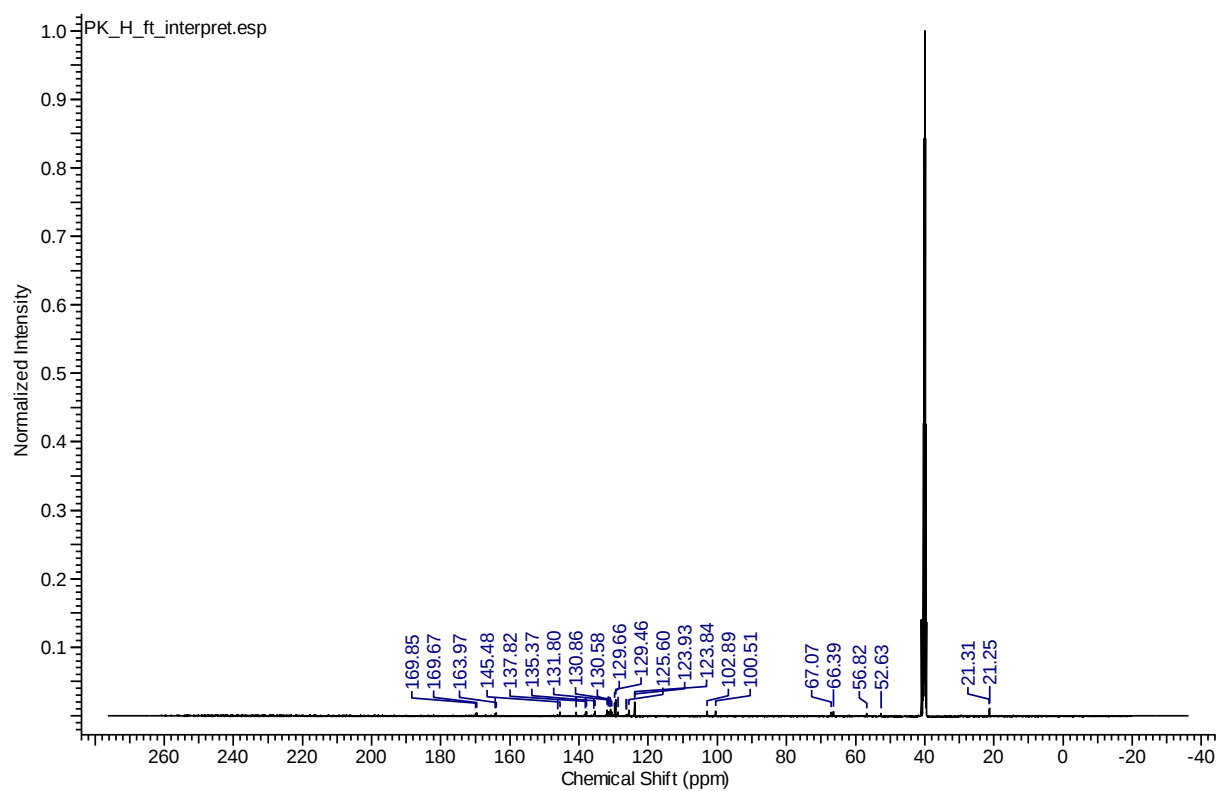
Príloha 78: ^{13}C -NMR spektrum sloučeniny **10**(1,1,10,1).



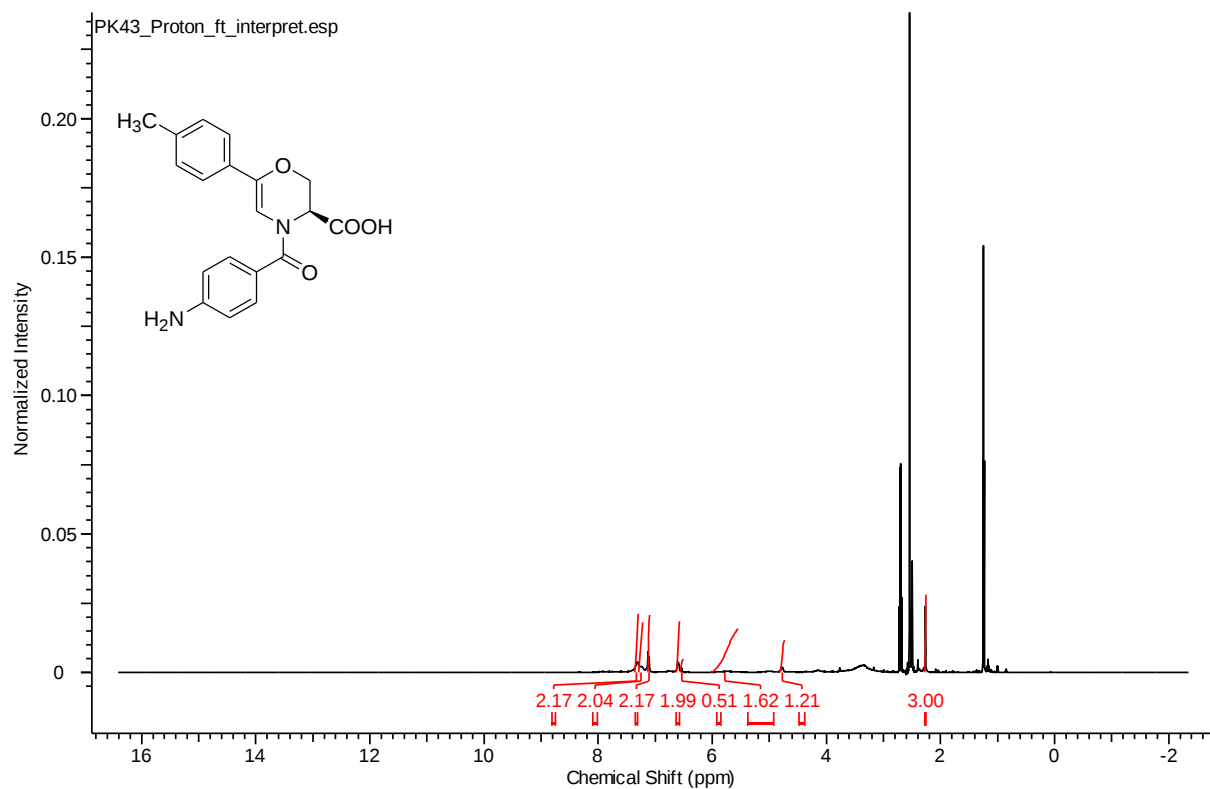
Príloha 79: ^1H -NMR spektrum sloučeniny **10**(1,1,11,1).



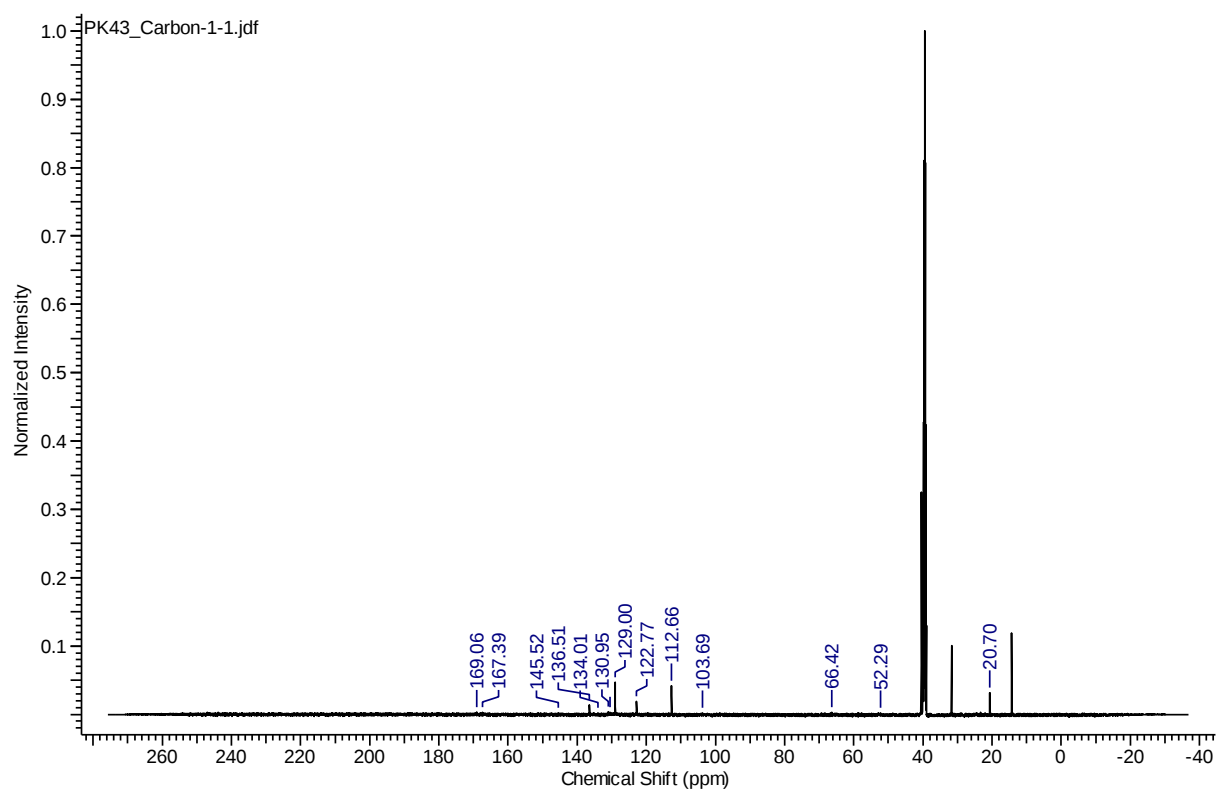
Príloha 80: ^{13}C -NMR spektrum sloučeniny **10**(1,1,11,1).



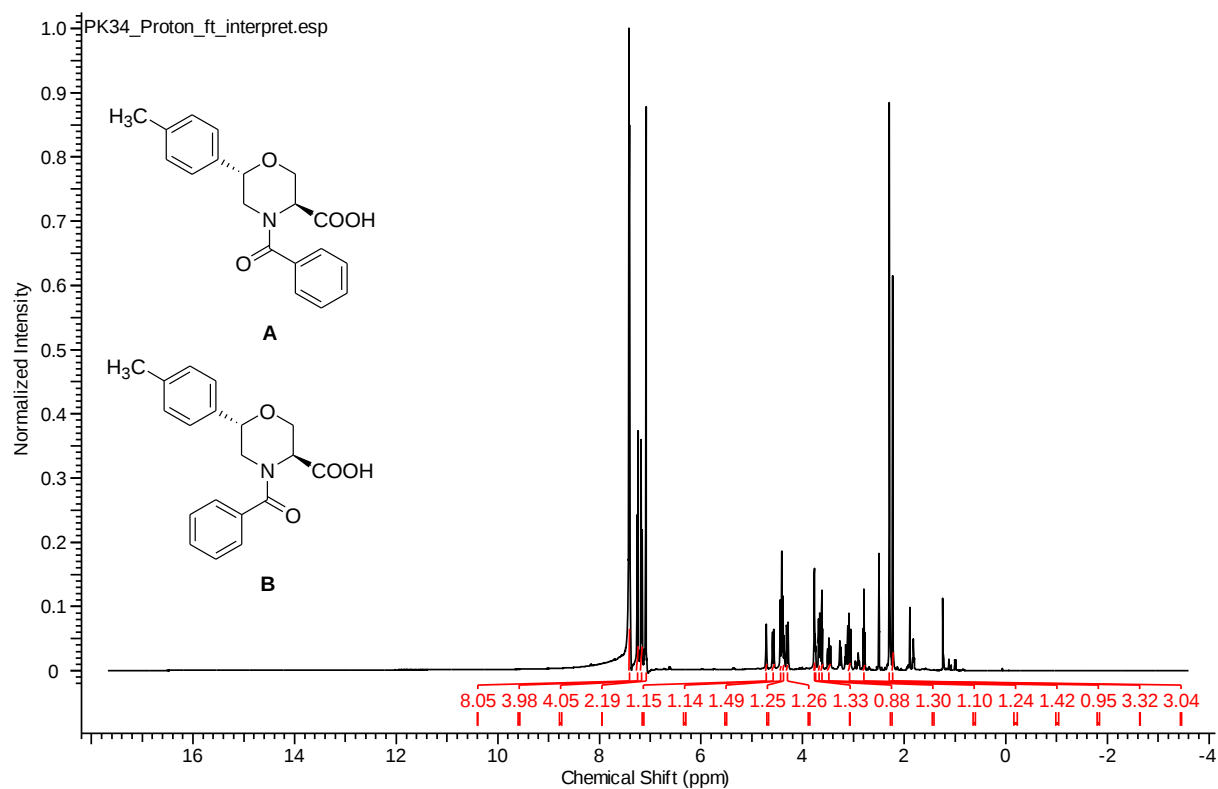
Príloha 81: ^1H -NMR spektrum sloučeniny **10**(1,1,12,1) – znečištěno alifatickým kontaminantem.



Príloha 82: ^{13}C -NMR spektrum sloučeniny **10**(1,1,12,1) – znečištěno alifatickým kontaminantem.



Příloha 83: ^1H -NMR spektrum sloučeniny **11**(1,1,7,1)



Příloha 84: ^{13}C -NMR spektrum sloučeniny **11**(1,1,7,1).

