

Univerzita Karlova

Přírodovědecká fakulta

Studijní program: Chemie

Studijní obor: Medicinální chemie



Ladislav Lóška

Syntéza substituovaných 4-nitroizoxazolov

Synthesis of substituted 4-nitroisoxazoles

Bakalárska práca

Vedúci záverečnej práce:

Doc. RNDr. Jan Veselý, Ph.D.

Praha, 2019

Prehlásenie:

Prehlasujem, že záverečnú prácu som spracoval samostatne, pod vedením môjho školiteľa doc. RNDr. Jana Veselého, Ph.D., a že som uviedol všetku použitú literatúru a všetky použité informačné zdroje. Táto práca a ani jej podstatná časť nebola predložená k získaniu iného, alebo rovnakého akademického titulu.

V Prahe, 17. 05. 2019

Ladislav Lóška

Pod'akovanie

V prvom rade by som sa chcel poďakovať môjmu školiteľovi doc. RNDr. Janovi Veselému, Ph.D., za príležitosť vstúpiť do jeho skupiny asymetrickej syntézy. Tiež by som sa mu chcel poďakovať za čas, ktorý venoval diskusiám počas celého obdobia, trpezlivosť, odborné vedenie aj tejto bakalárskej práce, cenné rady a pozitívne motivovanie. Taktiež by som sa chcel poďakovať Mgr. et Mgr. Martinovi Kamlarovi, Ph.D., za vedenie pri mojich začiatkoch a prvých reakciách. Poďakovanie patrí tiež Mgr. Michaelovi Francovi za vedenie, keď ma mal pod palcom, ale aj Mgr. Bedřichovi Formánkovi, Mgr. Michalovi Urbanovi a Bc. Róbertovi Reibergerovi za ich nespočetné množstvo rád, ktoré mi dali, za neustálu ochotu všetko vysvetliť a vytváranie výbornej atmosféry v laboratóriu. Veľké poďakovanie patrí aj Mgr. Vojtěchovi Dočekalovi za moje ďalšie vedenie pri práci, za čas strávený opravou mojej bakalárskej práce, za užitočné pripomienky, rady, ako ju vylepšiť a ochotu so všetkým pomôcť a vysvetliť. Ďalej sa chcem poďakovať Tereze Koberovej, že to so mnou prežila v spoločnom digestore. Vďaka však patrí všetkým členom laboratória za vytváranie pohodovej atmosféry.

Ďakujem tiež RNDr. Simone Hybelbauerovej, Ph.D. za zaučenie na prístrojoch NMR, Mgr. Bohunke Šperlichovej za meranie teplôt topenia a špecifických optických otáčavostí, RNDr. Martinovi Štíchovi, Ph.D. za meranie hmotnostných spektier a Ing. Adamovi Málkovi za meranie IČ spektier.

Na záver by som sa rád poďakoval svojej rodine, ktorá ma podporuje v dobrých, ale aj ťažších časoch a stojí pri mne.

Abstrakt

Táto bakalárska práca sa zaoberá prípravou enamínov odvodených od izoxazolu, za účelom prípravy série látok vhodných pre inhibíciu väzobnej interakcie FOXO3-DNA. Konkrétne bola pripravená séria derivátov izoxazolu nesúcich metylovú skupinou v polohe 3, nitro skupinou v polohe 4 a rôzne substituovaný vinyl v polohe 5. Substituentami vinylovej skupiny boli rôzne sekundárne amíny, ktoré boli zvolené na základe predchádzajúcich štúdií a za účelom zvýšenia rozpustnosti týchto látok vo vode.

Kľúčové slová

Organická syntéza, päťčlánkové aromatické heterocyklické zlúčeniny, izoxazol, sekundárne amíny, enamíny.

Abstract

This work deals with the preparation of a small library of enamines derived from isoxazole, compounds with the ability to inhibit a FOXO3-DNA interaction. The first part of the work is focused on the preparation of the key building block, (*E*)-*N,N*-dimethyl-2-(3-methyl-4-nitroisoxazole-5-yl)ethen-1-amine, and other starting materials. The second part is focused on the preparation 4-nitroisoxazole derivatives bearing methyl group at position 3 and a substituted vinyl moiety in position 5. Various secondary amines were used as substituents in order to modulate the polarity of the prepared 4-nitroisoxazole derivatives and to increase their solubility in water.

Key words

Organic synthesis, five-membered aromatic heterocyclic compounds, isoxazole, secondary amines, enamines.

Obsah

PodĎakovanie	3
Abstrakt.....	4
Kľúčové slová	4
Abstract.....	5
Key words	5
Zoznam skratiek.....	8
1. Úvod.....	9
1.1 Organická syntéza	9
1.2 Cyklické zlúčeniny.....	10
1.2.1 Heterocyklické zlúčeniny	11
1.2.2 Päťčlánkové aromatické heterocyklické zlúčeniny	12
1.2.3 Azoly	14
1.2.4 Izoxazoly	14
1.3 Syntéza izoxazolov a ich derivátov	15
1.3.1 Príprava symetrických izoxazolov	15
1.3.2 [3+2] Cykloadičné reakcie	16
1.3.3 Cykloizomerizačné reakcie	18
1.3.4 Kondenzačné reakcie.....	19
1.4 Substitučné reakcie na izoxazoloch	20
1.5 4-Nitroizoxazoly	21
1.6 FOXO proteíny.....	22
2. Ciele práce	24
3. Výsledky a diskusia	25
3.1 Pripravované enamíny.....	25
3.2 Syntéza východiskových látok	26

3.2.1	Príprava (<i>E</i>)- <i>N,N</i> -dimetyl-2-(3-metyl-4-nitroizoxazol-5-yl)etén-1-amínu.....	26
3.2.2	Príprava sekundárnych amínov	27
3.3	Syntéza cieľových enamínov	29
4.	Experimentálna časť	34
4.1	Obecné poznámky k experimentálnej časti.....	34
4.2	Použité chemikálie a rozpúšťadlá	35
4.3	Pripravované látky	35
4.3.1	Obecný postup prípravy enamínov odvodených od 4-nitroizoxazolu (A)	40
5.	Záver	45
6.	Zoznam literatúry.....	46

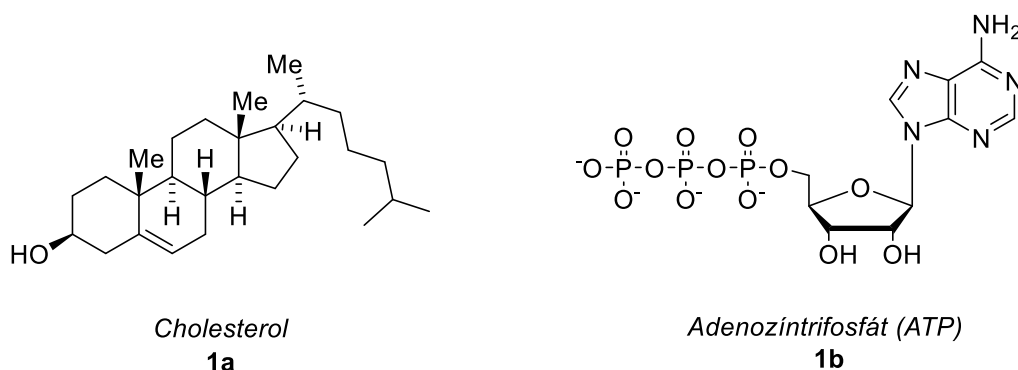
Zoznam skratiek

Ac	acetyl
aq.	vodný roztok
Ar	aryl
Bn	benzyl
Cbz	karboxybenzyl
cod	1,5-cyklooktadién
Cp	1,2,3,4,5-pentametylcyklopentadienyl
dba	dibenzylidénacetón
DMF	<i>N,N</i> -dimetylformamid
DMSO	dimetylsulfoxid
DNA	deoxyribonukleová kyselina
DRIFT	metóda difúznej reflektancie
ekv.	ekvivalent
ESI	ionizácia typu elektrosprej
Et	etyl
HetAr	heteroaryl
HRMS	hmotnostná spektrometria s vysokým rozlíšením
IČ	infračervená spektroskopia
IPr	1,3-bis(2,6-diizopropylfenyl)imidazol-2-ylidén
<i>i</i> -Pr	izopropyl
Me	metyl
mol.	molárne
Ms	mezyl (metánsulfonylová skupina)
MS	hmotnostná spektrometria
NIS	<i>N</i> -jódsukcinimid
NMR	nukleárna magnetická rezonancia
R_F	retardačný faktor
RVO	rotačná vákuová odparka
t.t.	teplota topenia
TFA	trifluóroctová kyselina
THF	tetrahydrofurán
TLC	chromatografia na tenkej vrstve
Ts	<i>p</i> -toluénsulfonyl
UV	ultrafialové žiarenie

1. Úvod

1.1 Organická syntéza

Molekuly organických látok tvoria všetko živé na planéte Zem, od hlavných zložiek živej hmoty, ako sú napríklad proteíny, lipidy, nukleové kyseliny, cholesterol (**1a**, Obrázok 1) až po tie najjednoduchšie látky, akou je napríklad metán. Taktiež sú súčasťou oleja, ropy, dreva a benzínu. V poslednej dobe sa dozvedáme, že sa vyskytujú nie len na Zemi.¹⁻³



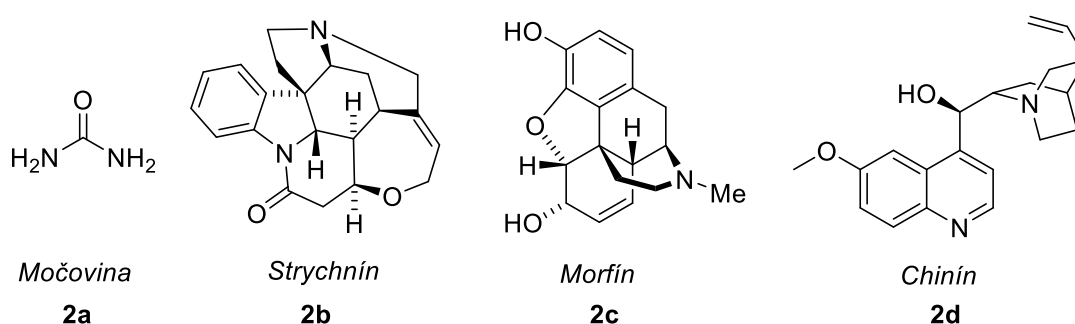
Obrázok 1: Zložky živej hmoty

Okolo osemnásteho storočia nebola chémia rozvinutá. Ľudia v tej dobe bez hlbšieho skúmania videli, že látky získavané z rastlín a živočíchov majú rozdielne vlastnosti od látok získaných z neživej prírody. Tieto povahou väčšinou anorganické látky poznali ako nerasty. Ostatné látky súviseli hlavne so živou prírodou a dejmi v nej prebiehajúcimi. V čase devätnásteho storočia však už bolo zrejmé, že látky pochádzajúce zo živých organizmov a látky neživej povahy sa zo stránky chemickej a fyzikálnej nemusia podstatne líšiť. V čom ale mierna odlišnosť medzi látkami živej prírody a látkami neživej prírody je, že molekuly látok živej prírody sú väčšinou zložené z pomerne malého množstva prvkov a v ich štruktúre dominuje uhlík a vodík.¹

Teóriu vitalizmu, že látku živej prírody sa dá pripraviť iba pomocou živých tvorov a ich orgánov nabúrала prvá príprava močoviny v „laboratórnom“ prostredí.⁴ Ľudstvo v tej dobe začalo rýchlo skúmať i ďalšie prípravy organických zlúčenín i o niečo komplikovanejšie.¹ Syntetizovať molekuly vyskytujúce sa v prírode, prípadne vytvárať deriváty odvodené od prírodných látok je dôležitá schopnosť pre rozvoj organickej syntézy, ale aj chémie.⁴ Už od konca 18. storočia sa dajú dohľadať prvé pokusy o prípravu

jednoduchých organických látok, najznámejším príkladom je práca Friedricha Wöhlera, ktorý v roku 1828 syntetizoval už zmienenú močovinu (**2a**) z kyanatanu amónneho. Počas 19. a 20. storočia sa podarilo pripraviť v laboratórnom prostredí i oveľa komplikovanejšie organické molekuly, vďaka rýchlemu rozvoju laboratórnych techník a techník používaných k identifikácii prírodných látok. Zaujímavé sú okrem iného aj totálne syntézy chinínu (**2d**), morfinu (**2c**) a strychnínu (**2b**).⁵

Takto pripravené látky sa snažia nájsť uplatnenie v rôznych odvetviach priemyslu a v medicíne, napríklad ako potenciálne nové liečivá, či vytvorenie zjednodušených a finančne menej náročných postupov na výrobu niektorých zlúčenín.

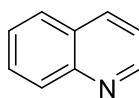


Obrázok 2: Organické molekuly

1.2 Cyklické zlúčeniny

Zlúčeniny sa dajú formálne rozdeliť do niekoľkých skupín na základe ich štruktúrneho motívu. Zlúčeniny s otvoreným reťazcom, ktoré neobsahujú cykly, nazývame acyklické, či alifatické. Naopak zlúčeniny, ktoré obsahujú cykly a majú tým pádom uzavretý reťazec, sú cyklické. Cyklické zlúčeniny sa dajú ďalej rozdeliť na základe ich štruktúry do ďalších podskupín.

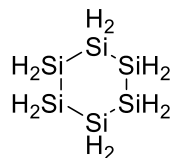
Heterocyklické zlúčeniny sú cyklické zlúčeniny, ktoré obsahujú v cykle, ktorý ich tvorí aspoň dva rôzne prvky. Najčastejšie prvky, ktoré obsahujú okrem uhlíka, sú prvky ako dusík, kyslík a síra (vzácnejšie môže ísť aj o prvky ako fosfor, kremík, selén, bór a ďalšie) - tieto prvky sa nazývajú heteroatómami (Obrázok 3).⁶



Chinolín
3

Obrázok 3: Heterocyklická zlúčenina

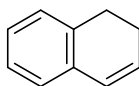
Opačným prípadom sú homocyklické zlúčeniny, ktorých kruhy sú tvorené iba tým istým prvkom, v tomto prípade sa nemusí jednať iba o prvok uhlík (Obrázok 4).⁶



Cyklohexasilán
4

Obrázok 4: Homocyklická zlúčenina

A v neposlednom rade rozoznávame aj karbocyklické zlúčeniny, ktorých kruhy sú tvorené iba atómami uhlíka (Obrázok 5).⁶

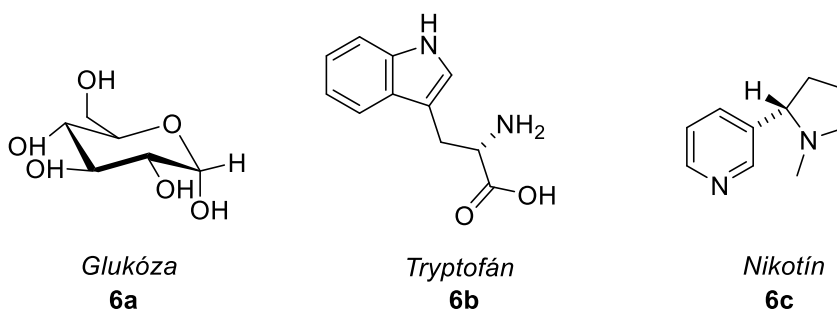


1,2-Dihydronaftalén
5

Obrázok 5: Karbocyklická zlúčenina

1.2.1 Heterocyklické zlúčeniny

Heterocyklické zlúčeniny sa vyskytujú v živočíšnych a rastlinných organizmoch a tiež sú to základné prírodné látky. Heterocyklické zlúčeniny sú napríklad - sacharidy, nukleové kyseliny, proteíny, niektoré aminokyseliny, enzýmy, hormóny, vitamíny, zložené lipidy a alkaloidy (Obrázok 6). Okrem toho sa nachádzajú v liečivách, pesticídoch a farbivách.⁷

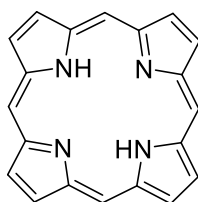


Obrázok 6: Prírodné látky

Heterocyklické zlúčeniny sa ďalej delia na jednoduché, ak majú len jeden cyklus a heterocyklické zlúčeniny s dvomi a viacerými cyklami, ktoré môžu byť kondenzované. Minimálny počet heteroatómov je jeden, ale môže ich byť aj viac. Podľa veľkosti cyklu

môže ísť o heterocykly trojčlánkové, štvorčlánkové... Najčastejšie sa vyskytujú heterocyklické zlúčeniny päťčlánkové a šesťčlánkové. Typy väzieb v cykle môžu byť jednoduché, či dvojité, menej často aj väzba trojitá, veľmi často môže ísť o konjugovaný systém. U päťčlánkových heterocyklov môže byť súčasťou konjugácie aj neväzbový elektrónový pár z prítomného heteroatómu, ako je to napríklad u tiofenu, kde je šesť elektrónov v konjugovanom systéme (**8c**, Obrázok 8).

Heterocyklické zlúčeniny s konjugovanými dvojitémi väzbami sú aj súčasťou zložitejších organických zlúčenín, príkladom je porfín (Obrázok 7). Ide o molekulu, ktorá pozostáva zo štyroch pyrolových cyklov spojených metínovými mostíkmi do makrocyklu. Ide o základnú štruktúru, z ktorej sú odvodené porfiríny, zlúčeniny schopné vytvoriť väzbu s kovovými iónmi. Príkladom je potom hém, chlorofyl, bakteriochlorofyl, vitamín B₁₂ a ďalšie.⁷⁻⁹



7

Obrázok 7: Porfín

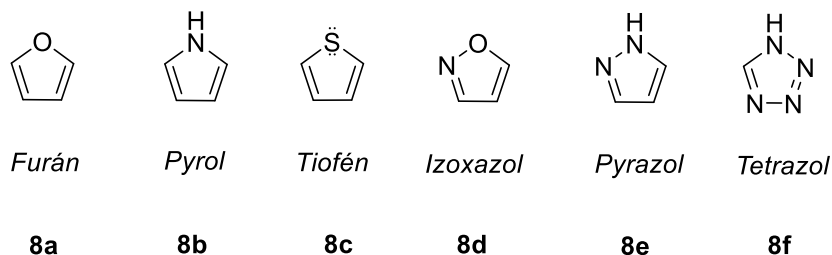
1.2.2 Päťčlánkové aromatické heterocyklické zlúčeniny

Päťčlánkové heterocyklické zlúčeniny môžu obsahovať vo svojich päťčlánkových cykloch jeden, alebo aj viac heteroátomov. V závislosti na elektronegativite heteroátomov sa dá predpokladať rozdielna miera „aromatickosti“ u týchto heterocyklov.

Z najbežnejších heteroátomov (O, S, N) má najmenšiu elektronegativitu síra, za ňou nasleduje dusík a najviac elektronegatívnym prvkom je z tejto skupiny kyslík.¹⁰ Síra ako ten najmenej elektronegatívny prvok (z tejto skupiny) poskytuje svoj voľný elektrónový pár do konjugácie najochotnejšie, tvorí sa konjugovaný aromatický systém. Kyslík vďaka svojej elektronegativite poskytuje svoj voľný elektrónový pár najmenej ochotne a aromatický charakter je preto najmenší. To ovplyvňuje chovanie týchto heterocyklických zlúčenín v ich reaktivitách.

Príkladom päťčlánkových aromatických heterocyklických zlúčenín s jedným heteroatómom môže byť furán (**8a**), pyrol (**8b**) a vyššie spomínaný tiofén (**8c**).

S viacerými heteroatómami sa napríklad stretávame u izoxazolu (**8d**), pyrazolu (**8e**) a tetrazolu (**8f**).



Obrázok 8: Vybrané päťčlánkové aromatické heterocykly

1.2.2.1 Reakcie elektrónovo bohatých päťčlánkových heterocyklických zlúčenín

Najčastejšie sú u nich reakcie prebiehajúce ako elektrofilné substitúcie. Môže ísť o metylácie, nitrácie, sulfonácie, bromácie, acylácie, alkylácie. Mechanizmus pozostáva zo zachytenia elektrofilnej častice pomocou väzby cyklu a s následným vytvorením σ -komplexu, ktorý v ďalšom kroku stráca protón, a tým vzniká substituovaný produkt. K elektrofilnej substitúcii môže dochádzať v polohách 2 a 5 alebo 3 a 4. Ale preferované sú pozície 2 a 5 z dôvodu väčšej elektrónovej hustoty a väčšieho počtu rezonančných štruktúr.¹¹ Príklad elektrónovej substitúcie je zobrazený v Schéme 1.

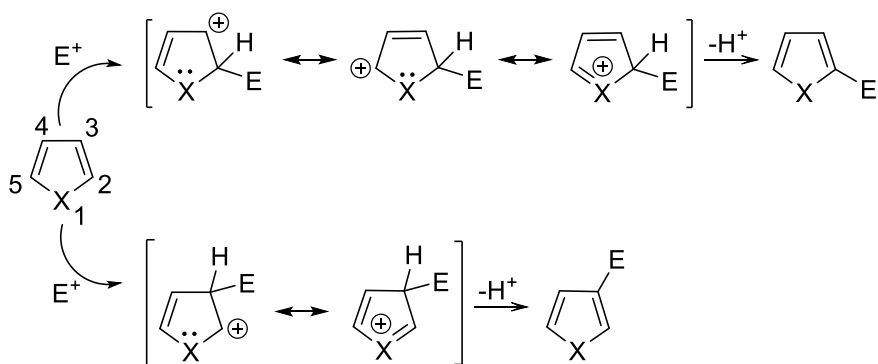


Schéma 1: Mechanizmus elektrónovej substitúcie

Ďalšiu skupinu reakcií zaraďujeme pod elektrofilné adície. Príkladom je katalytická hydrogenácia (Schéma 2) či halogenácia.¹²

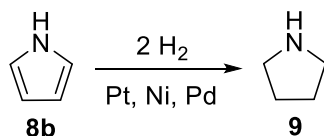
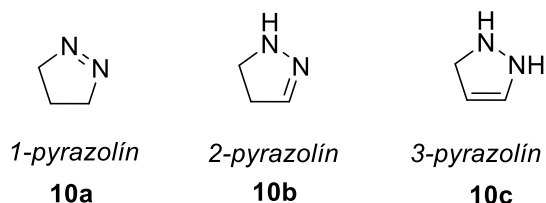


Schéma 2: Katalytická hydrogenácia

1.2.3 Azoly

Azoly sú typom päťčlenných dusíkatých heterocyklických zlúčenín, ktoré obsahujú ešte aspoň jeden ďalší heteroatóm v kruhu, najčastejšie dusík, kyslík alebo síru.¹³ Medzi azoly patria napríklad aj skupiny ako izoxazoly a pyrazolíny (Obrázok 9).

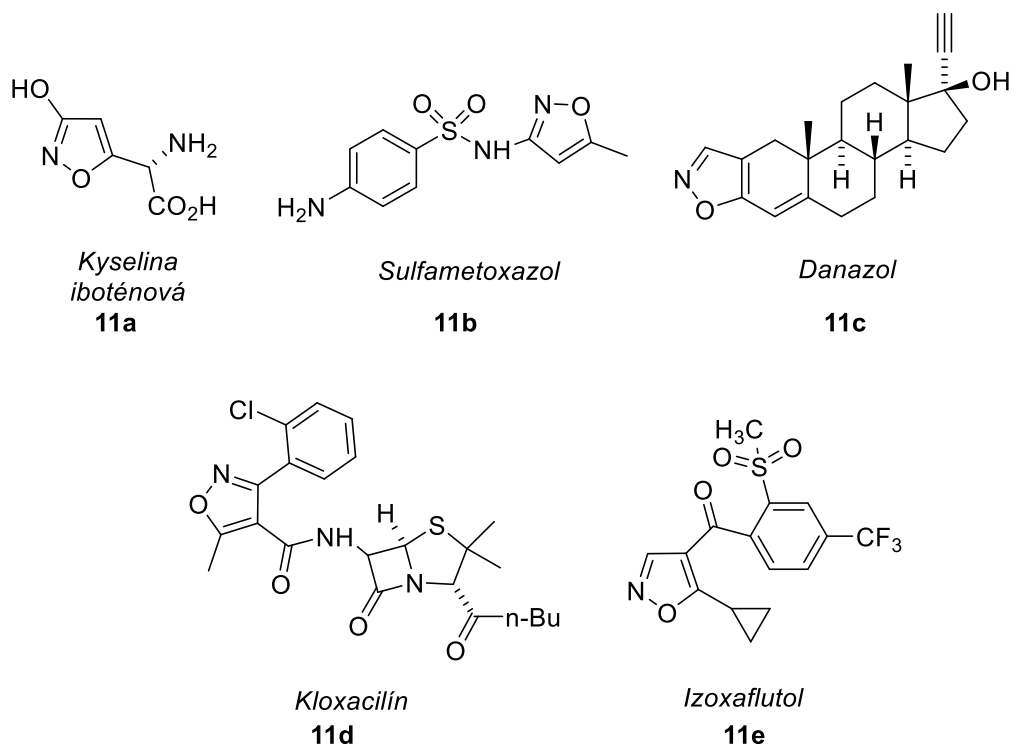


Obrázok 9: Pyrazolíny

1.2.4 Izoxazoly

Isoxazoly sú päťčlankové nenasýtené aromatické heterocyklické zlúčeniny, ktorých cyklus pozostáva okrem troch atómov uhlíka aj z jedného atómu kyslíka a jedného atómu dusíka, ktorý je v polohe 2 voči kyslíku.¹⁴

Isoxazolový skelet sa často vyskytuje v prírode ako súčasť chemických zlúčenín v niektorých prírodných produktoch, ako napríklad v kyseline iboténovej - neurotoxín (**11a**, Obrázok 10).¹⁵ Široké uplatnenie majú aj vo farmaceutickom priemysle vďaka ich širokej biologickej aktivite.¹⁶ Príkladom je antibakteriálny efekt voči širokému spektru ako gram-pozitívnych, tak aj gram-negatívnych baktérií, čoho príkladom sú beta-laktámové antibiotiká ako kloxacilín (**11d**) a antibiotikum sulfametoxazol (**11b**),^{17,18} a tiež majú protizápalový,¹⁹ protinádorový,²⁰ antifungálny,²¹ antivírusový²² a antikonvulzívny²³ efekt. Slúži tiež ako antioxidant.²⁴ Isoxazolový kruh nájdeme aj medzi analgetikami.²⁵ Je aj súčasťou herbicídov, ako je izoxaflutol (**11e**)²⁶ a syntetických androgénnych steroidov, ako je danazol (**11c**).²⁷ Je teda zrejmé, že zlúčeniny obsahujúce izoxazolový skelet majú široké využitie v rôznych oblastiach.



Obrázok 10: Zlúčeniny obsahujúce izoxazolový skelet

1.3 Syntéza izoxazolov a ich derivátov

Vďaka širokému využitiu izoxazolov bola vyvinutá rozsiahla metodika pre ich prípravu. Príprava mnohokrát vychádza z ľahko dostupných východiskových látok a vzniknuté izoxazoly sa dajú okrem iného použiť aj ako prekursori k ich ďalším modifikáciám na komplexnejšie funkčné deriváty.

1.3.1 Príprava symetrických izoxazolov

Jednou zo základných príprav izoxazolu **8d** je kondenzačná reakcia 1,1,3,3-tetraetoxypropánu **12** s hydroxylamín hydrochloridom **13**, táto reakcia poskytuje izoxazol **8d** vo výbornom výtlačku za súčasného odštiepenia štyroch molekúl etanolu **14**.²⁸

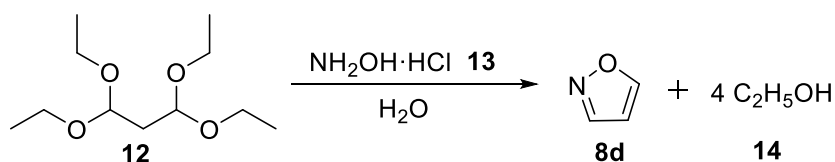


Schéma 3: Príprava izoxazolu

Jednou z možností prípravy 3,5-disubstituovaných a 3,4,5-trisubstituovaných izoxazolov s metylovými substituentami je reakcia pentán-2,4-diónu **15** respektíve

3-metyl-pentán-2,4-diónu **17** s hydroxylamín hydrochloridom **13** za vzniku odpovedajúcich produktov **16** a **18** (Schéma 4).²⁹

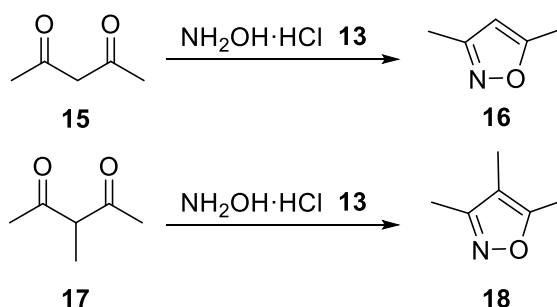


Schéma 4: Transformácia 1,3-diketónov

1.3.2 [3+2] Cykloadičné reakcie

[3+2] Cykloadičné reakcie sa používajú na syntézu päťčlánkových cyklov a patria medzi najdôležitejšie reakcie prípravy izoxazolov hlavne vďaka perfektnej atómovej ekonomike tohto typu reakcií. Využívajú sa aj vďaka ich vysokej stereospecificite a regioselektivite.³⁰

1.3.2.1 Kovom katalyzované [3+2] cykloadičné reakcie

Prvý príklad kovom katalyzovanej syntézy izoxazolov pomocou [3+2] cykloadičnej reakcie bol uvedený V. V. Fokinom, jedná sa o Cu(I)-katalyzovanú 1,3-dipolárnu cykloadíciu terminálnych alkínov s halogén-oxímami za vzniku izoxazolu (Schéma 5).^{31–34}

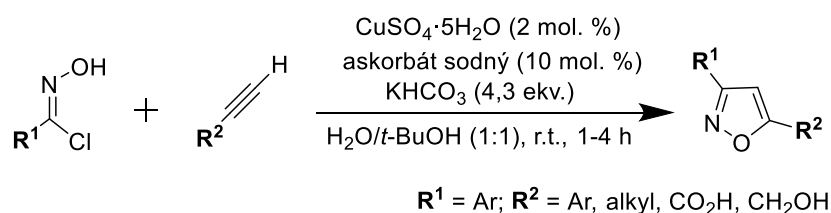


Schéma 5: Cu(I)-katalyzovaná syntéza 3,5-disubstituovaných izoxazolov

Cu(I) katalyzátor je generovaný *in situ* redukciou Cu(II) pomocou askorbátu sodného. Cu(I) sa koordinuje s terminálnym alkínom za tvorby acetylidu meďného. Jeden ligand z medi je nahradený v dôsledku tvorby väzby nitriloxidu na meď. Následne dôjde k ataku C2 uhlíku acetylidu kyslíkom a tvorbou šesťčlánkového metalocyklu. Dochádza ku kontrakcii kruhu a k uvoľneniu izoxazolového produktu, čím je katalytický cyklus ukončený (Schéma 6). V prípade reakcie bez použitia katalyzátoru je selektivita nižšia a vznikajú zmesi 3,5 a 3,4-izomérov.³¹

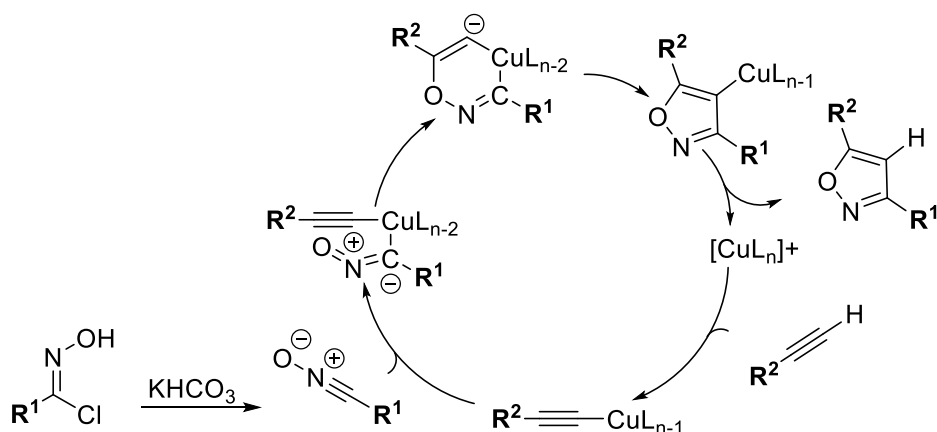


Schéma 6: Predpokladaný mechanizmus [3+2] cykloadičnej reakcie

Vznik 3,4-disubstituovaných izoxazolov je pozorovaný v Ru(II)-katalyzovanej [3+2] cykloadičnej reakcii alkínov s nitriloxidmi.³⁵

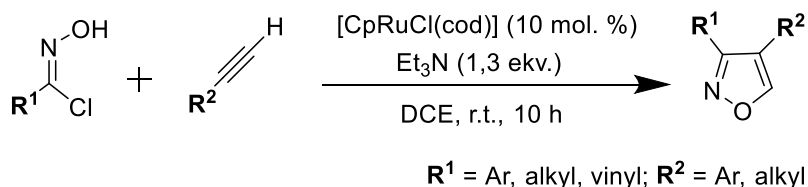


Schéma 7: Ru(II)-katalyzovaná [3+2] cykloadičná reakcia vedúca k 3,4-disubstituovaným izoxazolom

Mechanizmus tejto transformácie je zahájený vytesnením 1,5-cyklooktadiénu (cod) pomocou nitriloxidu a alkínu. Nasleduje oxidatívna adícia. V poslednom kroku pomocou redukčnej eliminácie dôjde ku uvoľneniu produktu, čím sa dokončí katalytický cyklus (Schéma 8).³⁵

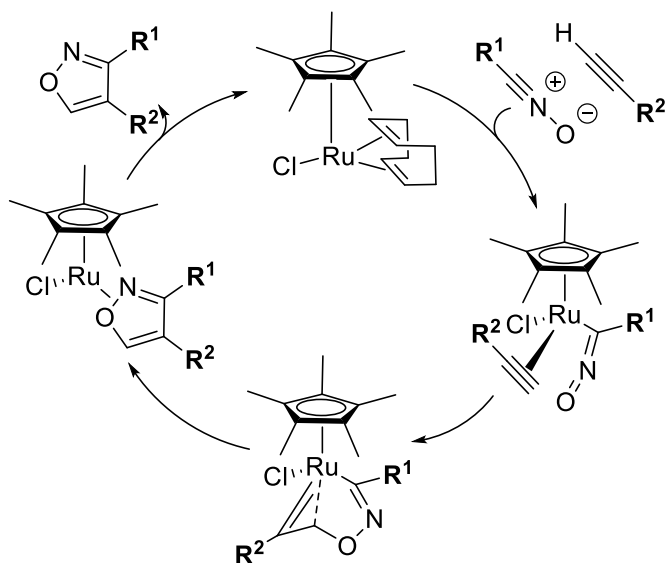


Schéma 8: Predpokladaný mechanizmus Ru(II)-katalyzovanej [3+2] cykloadičnej reakcie

1.3.3 Cykloizomerizačné reakcie

Cykloizomerizácie sú izomerizácie, pri ktorých sa vytvárajú cyklické izoméry. Výhodou tohto typu reakcií je výborná atómová ekonomika, použitie ľahko dostupných východiskových látok a vysoká selektivita.³⁶

3,5-Disubstituované izoxazoly sa dajú pripraviť cykloizomerizačnou reakciou 1,3-dialkínov s hydroxylamínom. Dialkíny môžu byť substituované alkylom, alebo aj arylom (Schéma 9).³⁷

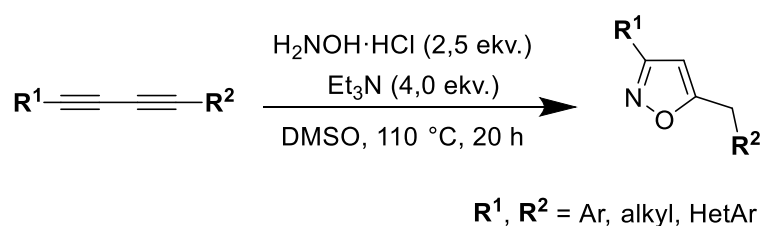


Schéma 9: Syntéza 3,5-disubstituovaných izoxazolov cykloizomerizačnou reakciou

Táto reakcia je zahájená hydroamináciou 1,3-dialkínu s hydroxylamínom, čo vedie k allenyloxímu, po prenose protónov dochádza k jeho izomerizácii, čo vedie k požadovanému produktu (Schéma 10). Hydroaminácia tohto typu je univerzálna metóda na priamu amináciu alkínov, ale aj alkénov a allénov pomocou hydroxylamínu a hydrazínových derivátov.³⁸

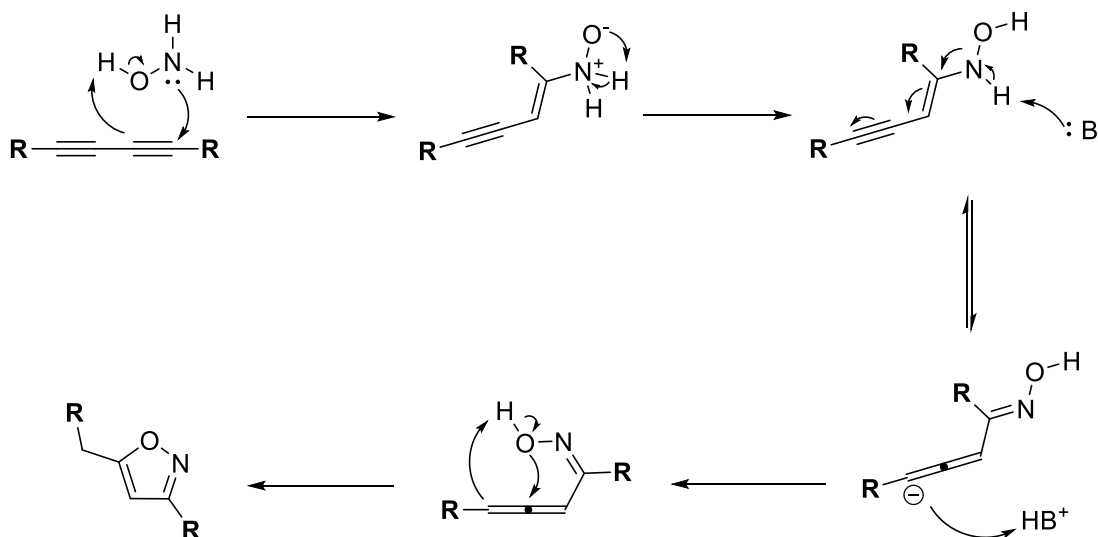


Schéma 10: Predpokladaný mechanizmus

3,4,5-Trisubstituované izoxazoly sa dajú pripraviť vo vysokých výťažkoch Pd(II)-katalyzovanou cykloizomerizačnou reakciou propargylových alkoholov s derivátmi odvodenými od hydroxylamínu (Schéma 11).³⁹

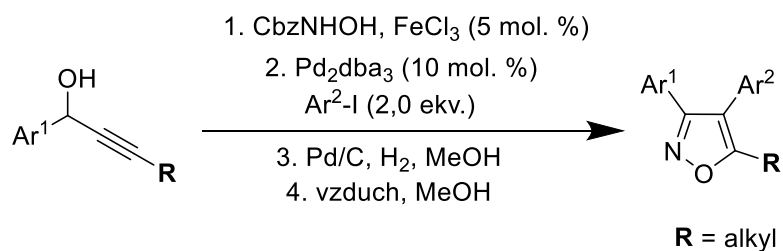


Schéma 11: Syntéza 3,4,5-trisubstituovaných izoxazolov z *N*-chránených propargyl hydroxylamínov

Predpokladaný mechanizmus pozostáva v prvom kroku z tvorby *N*-chráneného propargylhydroxylamínu katalyzovaného železitými iónmi. Následne z cykloizomerizácie sprostredkovanej komplexom Pd(II)-aryl. Z redukčnej eliminácie z vinylového organopaládiového medziproduktu a odstránenia chrániacej skupiny. A nakoniec dochádza ku aeróbnej aromatizácii (Schéma 12).³⁹

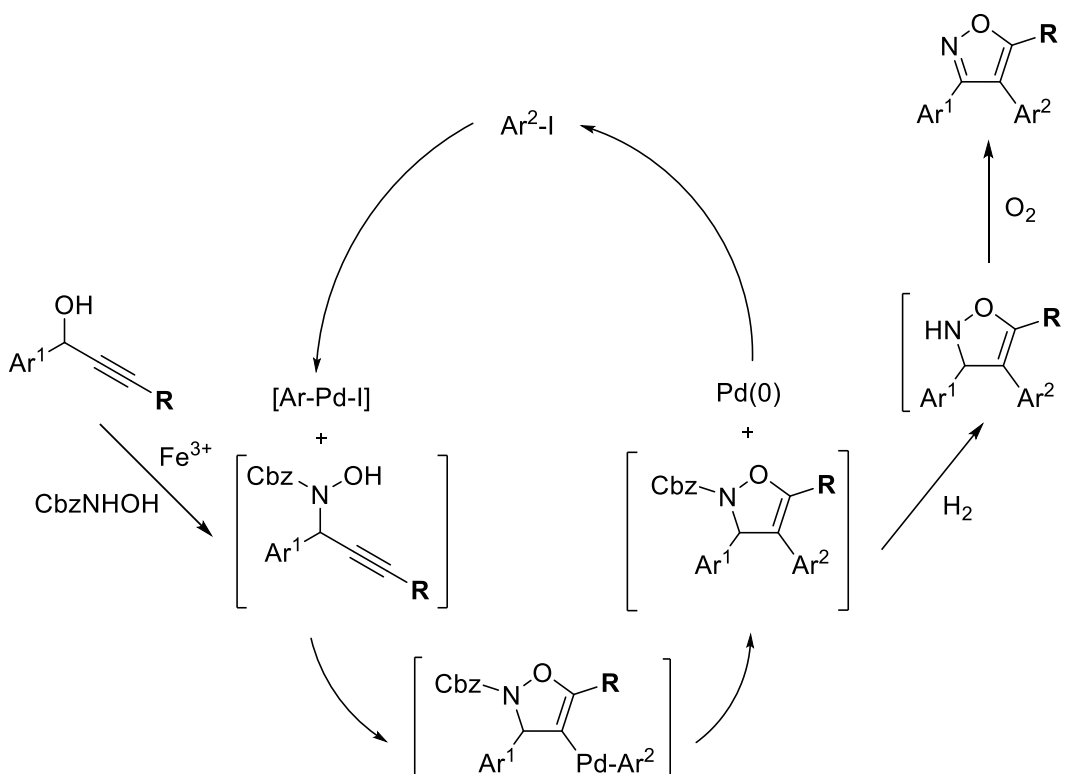


Schéma 12: Predpokladaný mechanizmus

1.3.4 Kondenzačné reakcie

Kondenzačné reakcie sú postupné reakcie, pri ktorých sa dve a viac východiskových látok spája do jednej zložitejšej za súčasného odštiepenia molekuly vody, alebo inej malej molekuly, ako je napríklad etanol, amoniak a ďalšie.⁴⁰

3,5-Disubstituované izoxazoly môžu byť pripravené aj kondenzáciou *N*-hydroxy-*p*-toluénsulfónamidu s α,β -nenасыtеныmi ketónmi a aldehydmi (Schéma 13).^{41,42}

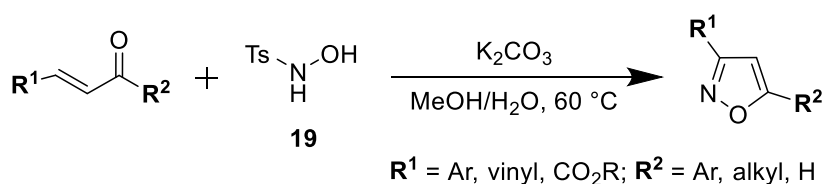


Schéma 13: Regioselektívna syntéza 3,5-disubstituovaných izoxazolov pomocou konjugovanej adície a kondenzácie

Mechanizmus pozostáva z Michaelovej konjugovanej adície tosylhydroxylamínu, následne z cyklizácie, ktorá je doprevádzaná bázou a nakoniec z dehydratácie za vzniku produktu (Schéma 14).^{41,42}

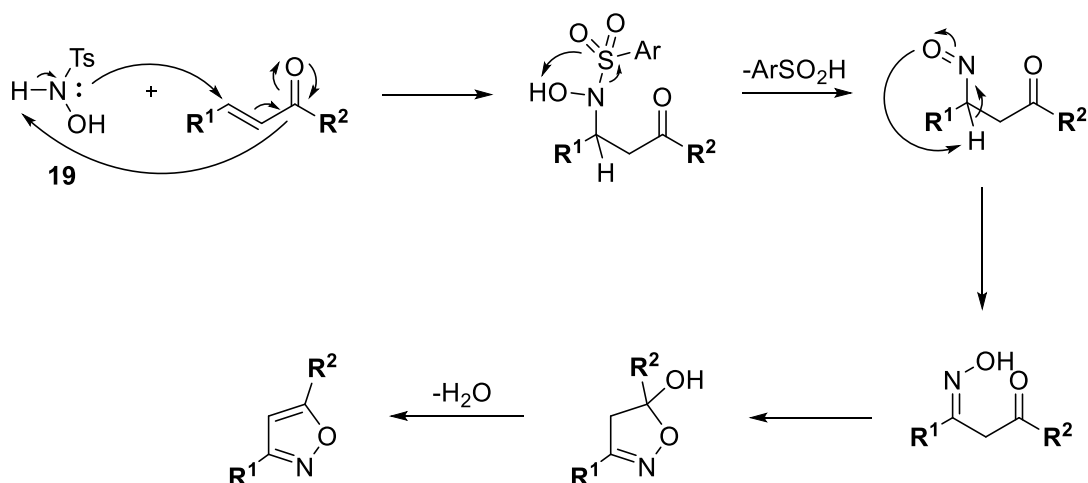


Schéma 14: Navrhnutý mechanizmus

1.4 Substitučné reakcie na izoxazoloch

Isoxazoly sa dajú tiež funkcionalizovať zavádzaním rôznych funkčných skupín na ich skelet. Častým príkladom, ktorý sa vyskytuje, je nitrácia izoxazolu samotného alebo substituovaného metylovými skupinami v polohách 3 a 5 alebo len v polohe 5 (Schéma

15).⁴³ Následnou redukciov prípravených 4-nitroizoxazolov sa dajú získať 4-aminoizoxazoly (Schéma 15).⁴⁴

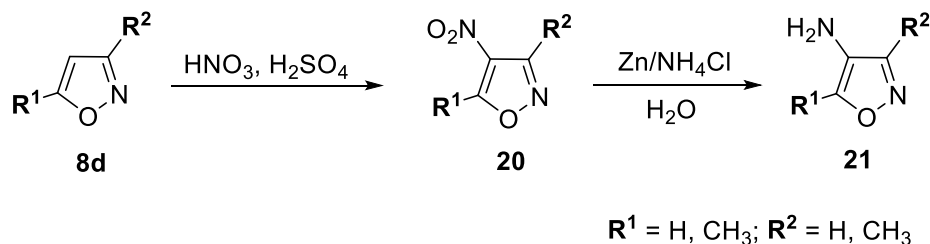


Schéma 15: Nitrácia izoxazolu nasledovaná redukciov 4-nitroizoxazolu

Ďalším z príkladov substitučných reakcií je elektrofilná aromatická jodácia nesubstituovaného izoxazolu v polohe 4 (Schéma 16)⁴⁵ a karboxylačná reakcia izoxazolového skeletu v polohe 5 (Schéma 16).⁴⁶

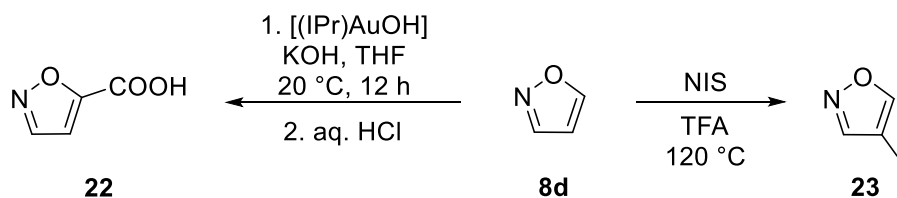
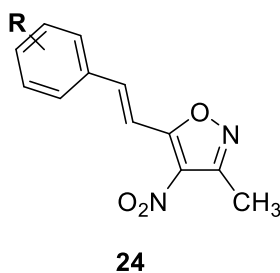


Schéma 16: Aromatická jodácia izoxazolu a karboxylácia izoxazolu za použitia katalyzátora

Okrem vyššie spomínaných substitučných reakcií sa môžeme stretnúť tiež so sulfonáciou, bromáciou, hydroxyláciou, acyláciou, deuterizáciou, kondenzáciou, či tvorbou esterovej skupiny na izoxazole.⁴⁷

1.5 4-Nitroizoxazoly

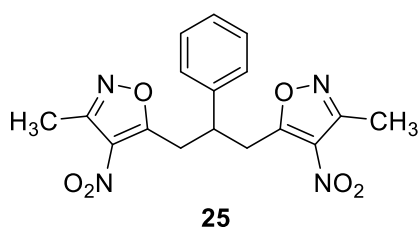
Od 4-nitroizoxazolu bolo prípravených množstvo derivátov s rôznymi skupinami v polohách 3 a 5.⁴⁸ Príkladom je skupina 3-metyl-4-nitro-5-substituovaných styrylových izoxazolov (Obrázok 11), ktoré vykazujú antioxidačné vlastnosti a nízky ulcerogénny potenciál. Ulcerogénny potenciál uľahčuje vznik vredov. Vykazujú aj známky protizápalového efektu, ktorý ešte musí byť ďalej podrobený skúmaniu.⁴⁹



Obrázok 11: 3-Metyl-4-nitro-5-substituované styrylové izoxazoly

Ďalšou skupinou látok odvođených od 4-nitroizoxazolu sú 3,3'-pyrolidinyl-dispirooxindoly, ktoré boli skúmané ako látky potencionálne schopné cytotoxického účinku voči rakovinovým bunkám. Väčšina derivátov vykazovala zaujímavé cytotoxické účinky proti ľudským bunkám rakoviny prostaty, ľudským leukemickým bunkám a ľudským bunkám rakoviny pľúc.⁵⁰

Ďalším derivátom 4-nitroizoxazolu, ktorý je tvorený dvoma prepojenými 4-nitroizoxazolovými skeletmi je 1,3-bis-(3-metyl-4-nitroizoxazol-5-yl)-2-fenylpropán (**25**, Obrázok 12). Táto látka vystupuje ako kľúčový medziprodukt pri syntéze molekúl, ktoré vykazujú protinádorovú aktivitu.^{51,52}



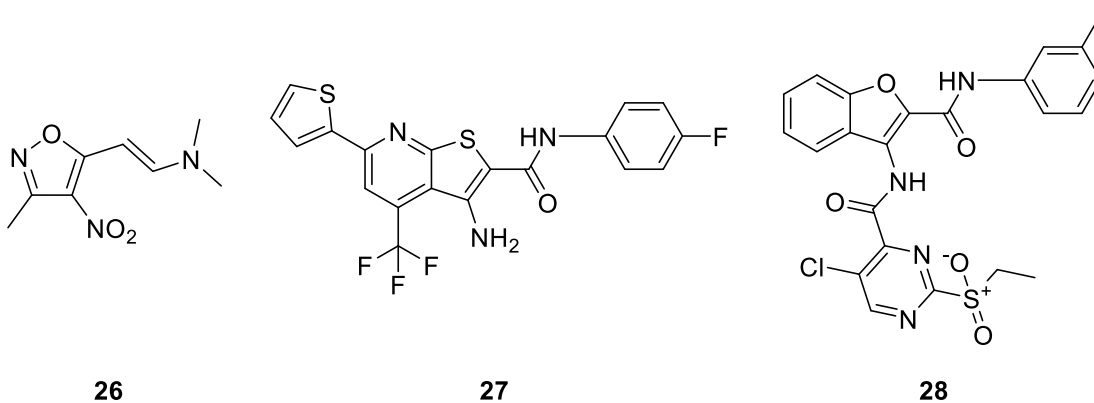
Obrázok 12: 1,3-Bis-(3-metyl-4-nitroizoxazol-5-yl)-2-fenylpropán

1.6 FOXO proteíny

V nedávnej dobe bolo preukázané, že sa pomocou nízkomolekulárnych látok dá inhibovať väzobná interakcia FOXO3 transkripčného faktoru s DNA.⁵³ V spolupráci so skupinou prof. Obšila a prof. Ausserlechnera bolo zistené, že medzi tieto nízkomolekulárne látky patria tiež deriváty 4-nitroizoxazolu. FOXO3, ako jeden z transkripčných faktorov patrí do FOXO triedy transkripčných faktorov a FOXO transkripčné faktory ďalej patria do forkhead rodiny transkripčných faktorov. Transkripčné faktory sú proteíny schopné regulovať génovú expresiu na úrovni transkripcie.⁵⁴ FOXO transkripčné faktory majú významnú úlohu pri bunkových procesoch, ako je regulácia bunkového cyklu, proliferácia, diferenciácia, apoptóza a ďalšie. Jednou z funkcií FOXO3 je zvyšovanie odolnosti určitých nádorových buniek voči chemoterapii.⁵⁵

Tieto transkripčné faktory vo svojej sekvencii obsahujú DNA-väzobný motív, ktorým sú schopné rozoznať špecifický motív na DNA a vytvoriť s ňou väzbu. Vyššie spomínané nízkomolekulárne látky, ako inhibítory, majú za úlohu obmedziť až úplne zabrániť vytvoreniu väzby medzi DNA a DNA-väzobným motívom transkripčného faktoru FOXO3 a to tak, že vytvoria väzbu s transkripčným faktorom, čím dôjde

k inhibícií ich funkcie resp. k inhibícii expresie určitých génov.^{53,56} Príklady nízkomolekulárnych inhibítorov sú zobrazené na Obrázku 13.⁵⁷



Obrázok 13: Nízkomolekulárne inhibítory

2. Ciele práce

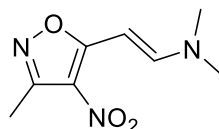
Cieľom tejto bakalárskej práce bola príprava série derivátov 4-nitroizoxazolu líšiacich sa substitúciou v enamínovej časti molekuly. Príprava týchto látok bola navrhnutá na základe poznatkov nedávno získaných v oblasti nízkomolekulárnach inhibítorov interakcie FOXO3-DNA. Tento obecný cieľ zahrňoval niekoľko čiastkových cieľov:

1. Príprava (*E*)-*N,N*-dimetyl-2-(3-metyl-4-nitroizoxazol-5-yl)etén-1-amínu (**26**) kľúčového pre syntézu navrhnutých derivátov 4-nitroizoxazolu.
2. Príprava ďalších komerčne nedostupných východiskových látok.
3. Príprava série enamínov odvodených od 4-nitroizoxazolu za účelom zvýšenia rozpustnosti týchto látok v polárnych rozpúšťadlách a zabránenia tvorby komplexu FOXO3-DNA.

3. Výsledky a diskusia

3.1 Pripravované enamíny

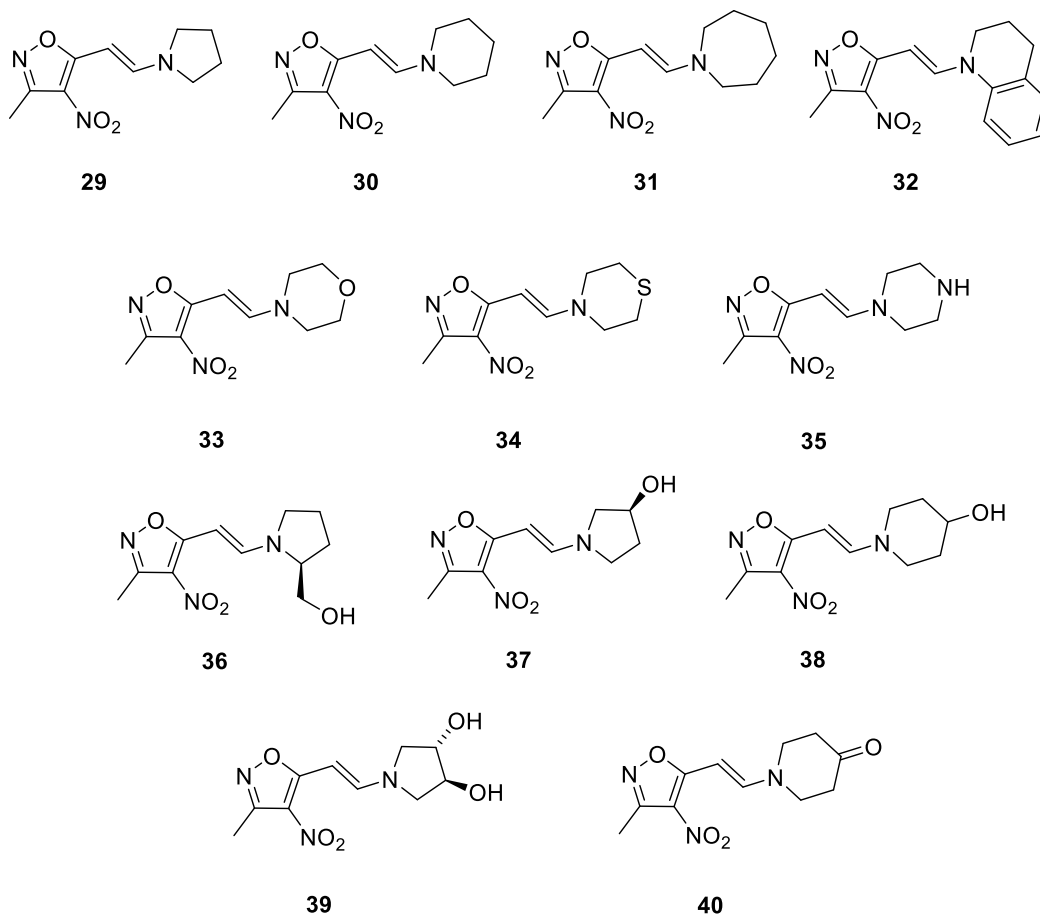
Dizajn nových potenciálnych inhibítorov je odvodený od enamínu **26** (Obrázok 14), ktorý je derivátom 4-nitroizoxazolu **20**, ktorý už v minulosti preukázal významné inhibičné vlastnosti (kap. 1.5 a 1.6). Preto bola táto bakalárska práca zameraná na ich prípravu (Obrázok 15).



26

Obrázok 14: *Východiskový enamín*

Hlavným cieľom tejto práce bolo pripraviť sériu inhibítorov, ktoré sa líšia substitúciou v enamínovej časti molekuly. Skupiny použité v rámci substitúcie boli navrhnuté tak, aby zvyšovali rozpustnosť vo vode a aby mohli prispievať k tvorbe vodíkových väzieb.



Obrázok 15: *Navrhnuté enamíny*

Z pohľadu retrosyntetickej analýzy môžu byť navrhnuté enamíny **29-40** pripravené substitučnou reakciou enamínu **26**, ktorý sa dá pripraviť kondenzačnou reakciou 3,5-dimetyl-4-nitroizoxazolu **41** s *N,N*-dimetylformamid dimetylacetáлом **42**. Nitroderivát **41** sa dá ľahko získať z 3,5-dimetylizoxazolu **16**, za použitia nitračnej zmesi v štandardných podmienkach pre tento typ transformácie. Východiskový 3,5-dimetylizoxazol **16** je dostupný kondenzačnou reakciou acetylacetónu **15** s hydroxylamín hydrochloridom **13**.

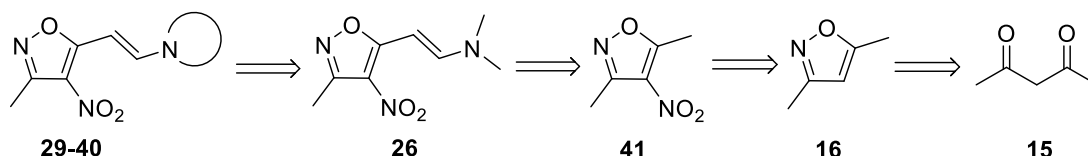


Schéma 17: Schéma retrosyntetickej analýzy vedúcej ku navrhnutým enamínom

3.2 Syntéza východiskových látok

3.2.1 Príprava (*E*)-*N,N*-dimetyl-2-(3-metyl-4-nitroizoxazol-5-yl)etén-1-amínu

Príprava enamínu **26** potrebného k ďalším reakciám pozostávala z troch krokov. Prvý krok vychádzal z reakcie acetylacetónu **15** a hydroxylamín hydrochloridu **13** (Schéma 18). Produkt 3,5-dimetylizoxazol **16** bol pripravený podľa literatúry,⁵⁸ za refluxu v prostredí etanolu a vody s výtťažkom reakcie 77 %.

V druhom kroku bol 3,5-dimetylizoxazol **16** pomocou nitrácie prevedený na 3,5-dimetyl-4-nitroizoxazol **41** podľa modifikovaného postupu uvedeného v literatúre (Schéma 18).⁵⁹ Do reakcie bola vzatá 95 % dymiaca kyselina dusičná, na ktorej prípravu bola použitá 65 % kyselina dusičná, dusičnan sodný a 98 % kyselina sírová. Po pridaní nitračnej zmesi a 3,5-dimetylizoxazolu **16** bola reakčná zmes zahrievaná na 65 °C počas noci. Nitrácia poskytla uspokojivý výtťažok látky **41** (46 %), čo predstavovalo dostatočné množstvo látky na uskutočnenie ďalšieho kroku.

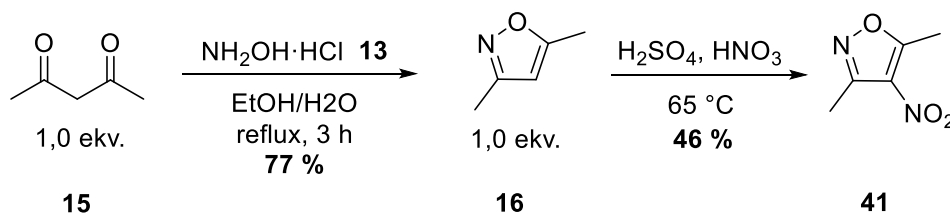


Schéma 18: Príprava 3,5-dimetylizoxazolu **16** a 3,5-dimetyl-4-nitroizoxazolu **41**

Posledným krokom prípravy východiskového enamínu **26** bola reakcia 3,5-dimetyl-4-nitroizoxazolu **41** s *N,N*-dimetylformamid dimetylacetáлом **42** v polárnom prostredí DMF za refluxu (Schéma 19).⁶⁰ Získaný produkt bol rekryštalizovaný vo vriacom etanole za vzniku zlatých kryštálov s dobrým výťažkom 78 %.

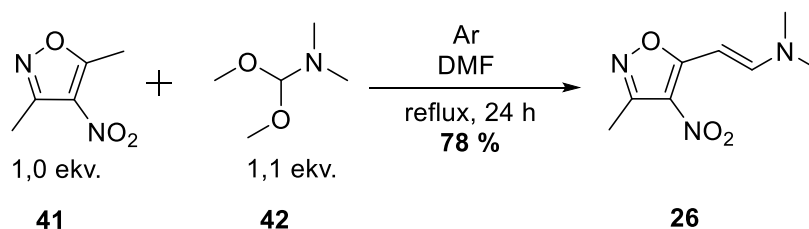
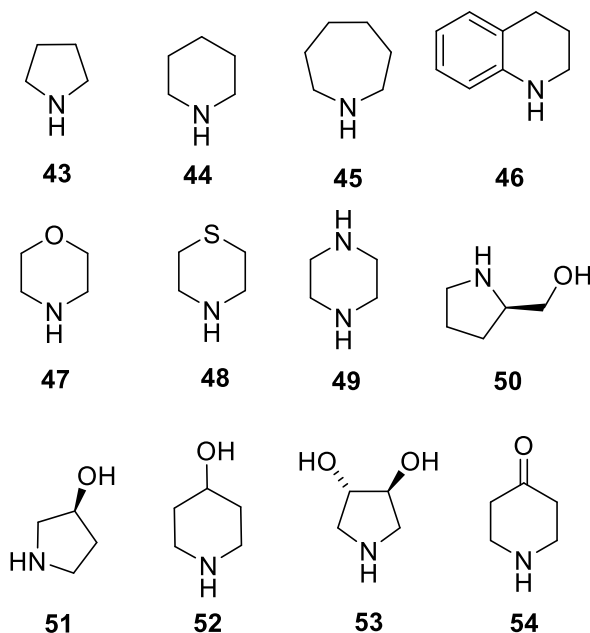


Schéma 19: *Príprava enamínu 26*

Pomocou trojkrokovej syntézy sa podarilo pripraviť kľúčovú látku **26** v multigramovom množstve (7,9 g) s celkovým výťažkom 28 %.

3.2.2 Príprava sekundárnych amínov

Okrem komerčne dostupných sekundárnych amínov **43-52** (Obrázok 16) boli pre prípravu derivátov 4-nitroizoxazolu (kap. 3.3) použité aj dva nekomerčné sekundárne amíny (3*S*,4*S*)-3,4-dihydroxypyrolidín **53** a piperidín-4-ón **54**, ktoré bolo potrebné pripraviť.



Obrázok 16: *Použité sekundárne amíny*

Príprava (3*S*,4*S*)-3,4-dihydroxypyrolidínu **53** prebiehala trojkrovovou cestou. Prvý krok vychádzal z komerčne dostupných látok, a to konkrétne D-(-)-kyseliny vínnej **55**

a benzylamínu **56** (Schéma 20). Reakčná zmes bola refluxovaná za použitia Dean-Starkovej aparatury. Ako rozpúšťadlo bol použitý nepolárny *o*-xylén.⁶¹ Produkt **57** bol rekryštalizovaný z etanolu so ziskom 62 %.

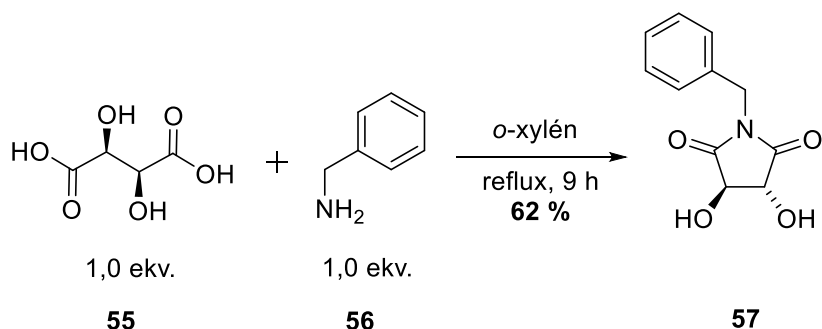


Schéma 20: *Príprava zlúčeniny 57*

Zlúčenina **59** bola v druhom kroku pripravená podľa modifikovaného postupu uvedeného v literatúre.⁶² Látka **57** bola ponechaná reagovať so Synhydridom **58**, ako redukčným činidlom v polárnom prostredí THF (Schéma 21). Reakcia bola ukončená vyliatím reakčnej zmesi na rozdrvený ľad s vodou. Získaný produkt **59** bol získaný v uspokojivom výťažku (41 %), čo predstavovalo dostatočné množstvo látky na uskutočnenie posledného kroku.

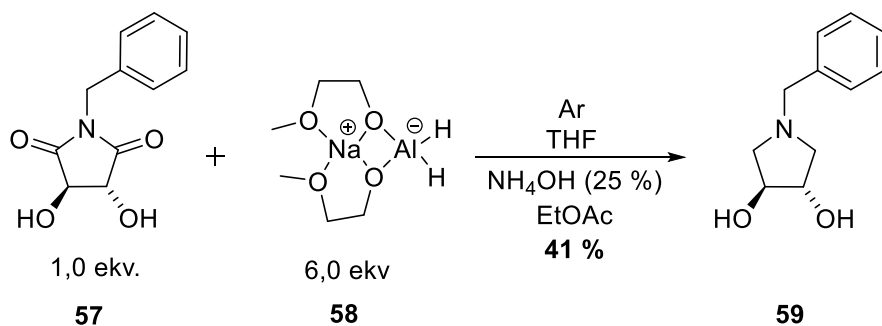


Schéma 21: *Príprava zlúčeniny 59*

Posledným krokom prípravy (3*S*,4*S*)-3,4-dihydroxypyrolidínu **53** bola katalytická hydrogenácia (Schéma 22). Príprava prebiehala podľa modifikovaného postupu uvedeného v literatúre.⁶³ Za použitia katalyzátora Pd/C (10 %) a vo vodíkovej atmosfére bol získaný (3*S*,4*S*)-3,4-dihydroxypyrolidín **53** vo výbornom výťažku 96 %.

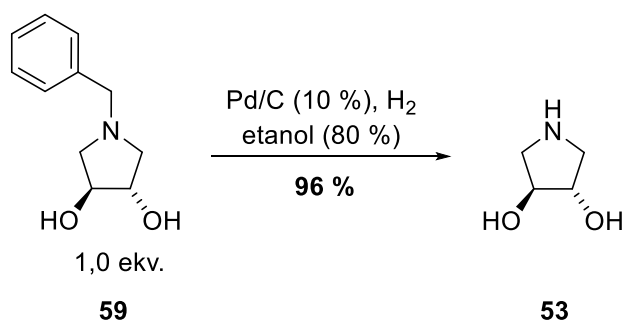
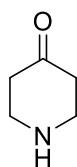


Schéma 22: *Príprava (3S,4S)-3,4-dihydroxypyrolidínu 53*

Pomocou trojkrokovej syntézy sa podarilo pripraviť sekundárny amín **53** v gramovom množstve o celkovom výťažku 24 %.

Ďalší z amínov, ktorý bol pripravovaný, bol piperidín-4-ón **54** (Obrázok 17). Išlo o sekundárny amín pripravený z komerčne dostupného piperidín-4-ón hydrochlorid monohydrátu (1:1:1) prídavkom vodného roztoku NaOH k suspenzii piperidín-4-ón hydrochlorid monohydrátu v dichlórmetáne. Výťažok tejto reakcie bol uspokojivých 30 %, čo predstavovalo postačujúce množstvo sekundárneho amínu na uskutočnenie reakcie s látkou **26**.



Piperidín-4-ón

54

Obrázok 17: *Pripravený sekundárny amín 54*

3.3 Syntéza cieľových enamínov

Navrhnuté enamíny **29-40** boli pripravované kondenzačnou reakciou enamínu **26** s príslušnými sekundárnymi amínami (Schéma 23). Navrhnutý mechanizmus tejto reakcie je zobrazený v Schéme 24. Tvorba enamínov **29-40** je založená na posune rovnováhy, preto bolo do reakcie vždy vzatých 1,0 ekvivalentu enamínu **26** a 5,0 ekvivalentu sekundárneho amínu **43-54**. Reakcia prebiehala v nepolárnom prostredí za refluxu od 1 dňa až po 8 dní v závislosti od konkrétnej reakcie. Priebeh reakcie bol kontrolovaný pomocou tenkovrstvovej chromatografie a $^1\text{H NMR}$.⁶⁰

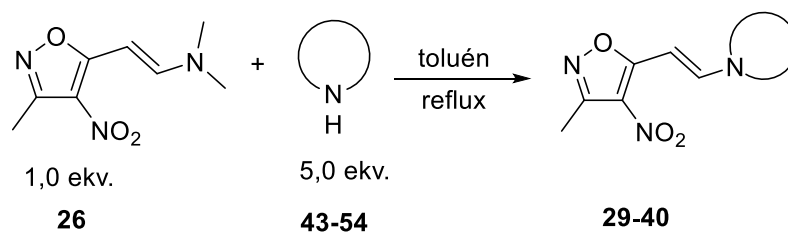


Schéma 23: *Príprava navrhnutých enamínov 29-40*

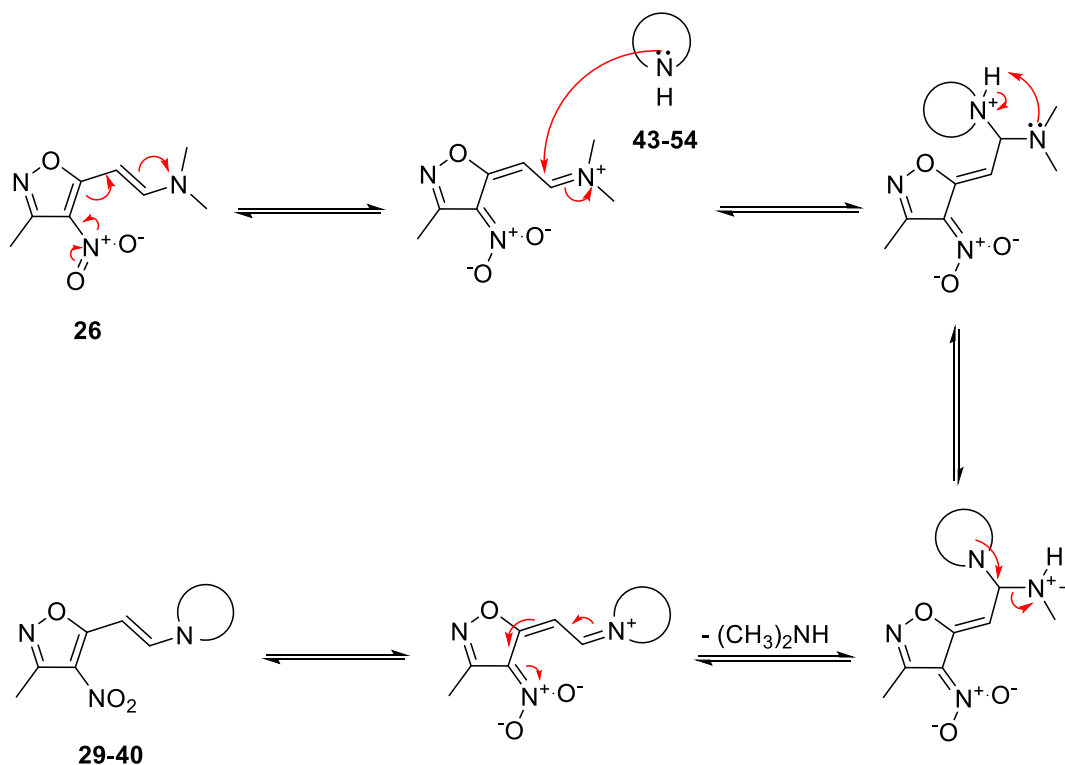



Schéma 24: *Navrhnutý mechanizmus*

Produkty boli dočistené pomocou stĺpcovej chromatografie. Pre stĺpcovú chromatografiu u produktov **29-31**, **33**, **34** a **36** bola použitá mobilná fáza zložená z hexánu a etylacetátu. U produktov **35** a **37-39** bola použitá mobilná fáza zložená z dichlórmetánu a metanolu z dôvodu lepšej rozpustnosti a z dôvodu prítomnosti polárnych skupín na amínoch.

Reakcie vedúce k enamínom **29**, **35** a **36** prebehli bezproblémovo a úplná konverzia bola dosiahnutá po 1 dni. Enamíny boli získané vo veľmi dobrých výt'azkoch, konkrétne 75 %, 83 % a 71 %. Podobne rýchlo prebehla aj reakcia prípravy enamínu **37**, ale s nižším výt'azkom 44 %. Nižší výt'azok bol zapríčinený z dôvodu zníženej rozpustnosti v mobilnej fáze a z dôvodu nedostatočnej separácie od východiskových látok, čo viedlo k opakovaniu stĺpcovej chromatografie. U prípravy enamínov **30**, **31** a **33** bolo potrebné predĺžiť reakčnú dobu na 2 dni, aby dochádzalo k plnej konverzii. Reakcie

však prebiehali bezproblémovo a výtťažky sa pohybovali v poradí 71 %, 71 % a 62 %. Ako problematické sa ukázali prípravy enamínov **34**, **38** a **39**. Bolo u nich potrebné predĺžiť reakčnú dobu na 4 až 8 dní z dôvodu pomalšieho priebehu reakcie. Výsledné výtťažky aj napriek dlhšej reakčnej dobe neboli vysoké. Konkrétne v poradí 43 %, 56 % a 22 %. U reakcie prípravy enamínu **39** bolo potrebné zvoliť DMF ako rozpúšťadlo, pretože toluén sa ukázal ako nevhodný z dôvodu nízkej rozpustnosti pyrolidín-3,4-diolu **53**. Najproblematickejšie boli reakcie vedúce k enamínom **32** a **40**.

Tabuľka 1: Reakčné časy a výtťažky jednotlivých enamínov **29-40**

Reakcia		Produkt	Čas	Výtťažok* (%)
1	pyrolidín 43	29	1 d	75
2	piperidín 44	30	2 d	71
3	azepán 45	31	2 d	71
4	1,2,3,4-tetrahydrochinolín 46	32	7 d	-
5	morfolín 47	33	2 d	62
6	tiomorfolín 48	34	8 d	43
7	piperazín 49	35	1 d	83
8	L-prolinol 50	36	1 d	71
9	pyrolidín-3-ol 51	37	1 d	44
10	piperidín-4-ol 52	38	4 d	56
11	pyrolidín-3,4-diol 53	39	4 d	22
12	piperidín-4-ón 54	40	7 d	-

*jedná sa o izolovaný výtťažok po stĺpcovej chromatografii

Bolo robených niekoľko pokusov, so snahou pripraviť enamín **32** (Schéma 25). Prvé dni počas ktorých bola reakčná zmes ponechaná reagovať žiaden potencionálny produkt nevznikal. Stopy prípadného produktu neboli detegované ani po predĺžení reakčnej doby na 1 týždeň.

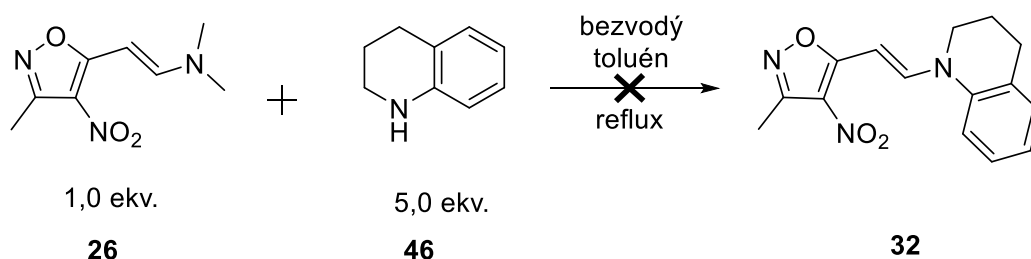


Schéma 25: *Príprava enamínu 32*

Taktiež bolo robených niekoľko pokusov s cieľom pripraviť enamín **40** (Schéma 26). Konverzia východiskových látok prebiehala veľmi pomaly, a ani po predĺžení reakčnej doby na 1 týždeň nedošlo k výraznému nárastu vznikajúcej neznámej látky. Stopové množstvo neznámej látky nebolo možné dočistiť stĺpcovou chromatografiou a taktiež sa ju nepodarilo charakterizovať.

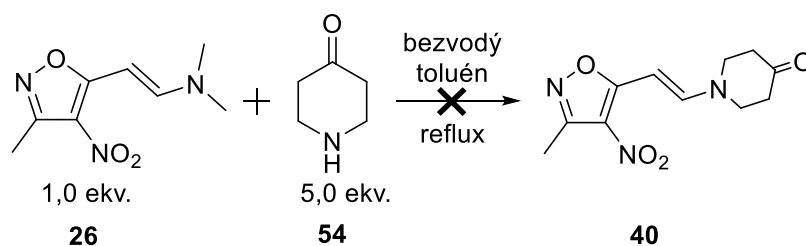


Schéma 26: *Príprava enamínu 40*

Vedľa neúspešnej prípravy kondenzačných produktov **32** a **40** sme sa pokúsili tiež o prípravu dimérnej štruktúry **60** (Schéma 27). Premena východiskových látok za refluxu v bezvodom toluéne bola prvé dni veľmi pomalá. Ani predĺženie reakčnej doby na 14 dní nevedlo k vzniku väčšieho množstva neznámej látky. Vzniknuté stopové množstvo neznámej látky nebolo možné podrobiť ďalšej analýze.

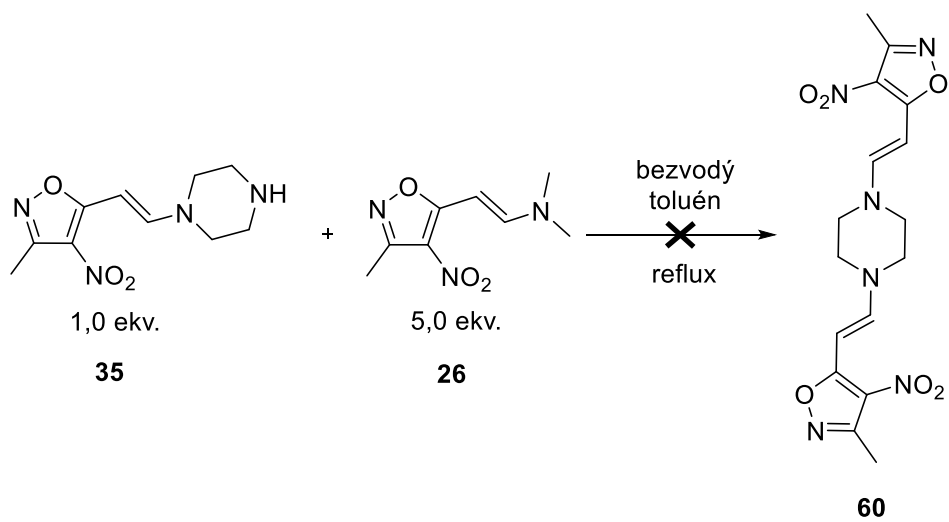


Schéma 27: *Príprava diméru 60*

4. Experimentálna časť

4.1 Obecné poznámky k experimentálnej časti

V rámci mojej bakalárskej práce boli ku stanoveniu čistoty produktov a sledovaniu konverzie reakcií použité TLC dosky Kieselgel 60 F 254 (Merck). K následnej detekcii TLC bola použitá UV lampa modelu NU – 6KL, $\lambda = 254$ nm. Činidlá, ktoré boli používané k vyvolávaniu TLC boli nasledujúce: ninhydrín (bol pripravený rozpustením 20 g ninhydrínu v 600 ml etanolu), vanilín (bol pripravený rozpustením 12 g vanilínu v 200 ml etanolu a 2,5 ml koncentrovanej kyseliny sírovej) a AMC (bolo pripravené rozpustením 10 g dihydrátu síranu ceričitého, 25 g kyseliny fosfomolybdenovej v 1 litri 1,2 mol · dm⁻³ vodného roztoku kyseliny sírovej). Následne po vyvolaní v príslušnom činidle, bola TLC doska teplovzdušnou pištoľou zahriata na 100 až 200 °C.

Pre separáciu niektorých produktov pomocou destilácie za zníženého tlaku, bol použitý Büchi Kugelrohr Glass Oven B-585.

Pre separáciu produktov pomocou stĺpcovej chromatografie, bol použitý silikagél, ako stacionárna fáza, konkrétne bol použitý silikagél Fluka 60 (40-63 µm).

Teplota topenia (t.t.) bola stanovovaná pomocou bodotávku Büchi Melting Point B-545.

Na odparovanie rozpúšťadiel bola používaná rotačná vákuová odparka (RVO) Büchi Rotavapor R-200. Produkty boli dosušené za zníženého tlaku pomocou vákuovej olejovej pumpy Vacuubrand RZ 2.

Špecifická otáčavosť ($[\alpha]_D^{25}$) bola stanovovaná pomocou prístroja AUTOMATIC POLARIMETER Autopol III (Rudolph research, Flanders, New Jersey). Jednotlivé hodnoty špecifickej otáčavosti sú uvedené v jednotkách 10⁻¹ deg · cm² · g⁻¹. Koncentrácia (meraná v jednotkách g/100 ml) a rozpúšťadlo sú uvedené u každej látky zvlášť.

Charakterizácia produktov technikou nukleárnej magnetickej rezonancie (NMR) bola robená za použitia nasledujúcich prístrojov: prístrojom Bruker AVANCE III HD 400 boli merané ¹H spektrá pri 400,13 MHz a ¹³C spektrá pri 100,61 MHz. Chemické posuny (δ) boli referencované voči reziduálnym protónom použitého deuterovaného rozpúšťadla: chloroform-*d* (¹H: $\delta_H = 7,26$ ppm; ¹³C: $\delta_C = 77,00$ ppm), DMSO-*d*₆ (¹H: $\delta_H = 2,50$ ppm; ¹³C: $\delta_C = 39,50$ ppm), metanol-*d*₄ (¹H: $\delta_H = 3,31$ ppm; ¹³C: $\delta_C = 49,15$ ppm). Hodnoty interakčných konštánt (*J*) sú určované v Hz.

Stanovenie molekulovej hmotnosti (pre nízke rozlíšenie) bolo robené pomocou hmotnostnej spektrometrie (MS) a bol k tomu využitý prístroj LCQ Fleet. K stanoveniu molekulovej hmotnosti s vysokým rozlíšením (HRMS) bol použitý prístroj Q-TOP COMPACT BRUKER. Vzorky boli zavedené pre oba typy meraní v metanole, za použitia ionizácie ESI. Metóda, ktorá bola použitá pre ionizáciu daného vzorku je uvedená u každého produktu zvlášť.

Prístroj Nicolet Avatar 370 FTIR bol použitý k meraniu spektier infračervenej spektroskopie (IČ). Meranie prebiehalo pomocou metódy difúznej reflektancie (DRIFT) v bromide draselnom. U každej látky sú vlnočty (ν) uvedené v cm^{-1} .

4.2 Použité chemikálie a rozpúšťadlá

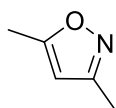
Pre prípravu mobilných fáz pre separáciu pomocou stĺpcovej chromatografie boli použité rozpúšťadlá hexán, etylacetát, metán a dichlórmetán, ktoré boli zakúpené u firiem Penta a Lach-Ner, s. r. o., určené pre analýzu a boli pred použitím ešte dočistené destiláciou.

Ďalšie rozpúšťadlá, ktoré boli použité pri reakciách, a to konkrétne acetón, bezvodý toluén, bezvodý *N,N*-dimetylformamid (DMF), *o*-xylén, bezvodý tetrahydrofurán (THF) a etanol boli zakúpené u firiem Acros Organics, Sigma-Aldrich, s. r. o. a Lab-Scan analytical sciences, s. r. o.

Látky *N,N*-dimetylformamid dimetylacetál, morfolín, piperidín, pyrrolidín, piperazín, pentán-2,4-dión, hydroxylamín hydrochlorid, kyselina sírová, kyselina dusičná, azepán, 1,2,3,4-tetrahydrochinolín, tiomorfolín, benzylamín, kyselina D-(–)-vínná, L-prolinol, Synhydrid, (*R*)-3-hydroxypyrolidín, 4-hydroxypiperidín, 10 % Pd/C a 4-piperidón hydrochlorid monohydrát boli zakúpené u firiem Fluorochem, Sigma-Aldrich, s. r. o., Fluka, Katchem spol. s r. o. a Lach-Ner s. r. o.

4.3 Pripravované látky

3,5-Dimetylizoxazol (16)



16

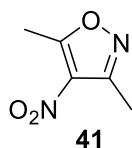
Látka **16** bola pripravovaná podľa modifikovaného postupu uvedeného v literatúre.⁵⁸

Roztok acetylacetónu **15** (25,7 ml; 250 mmol; 1,0 ekv.) a hydroxylamín hydrochloridu **13** (18,7 g; 268 mmol; 1,07 ekv.) vo vode (40 ml) a etanole (25 ml) bol refluxovaný po dobu 3 hodín. Konverzia bola kontrolovaná pomocou TLC

(hexán/EtOAc - 3:1, vizualizácia pomocou vanilínu). Po vymiznutí východiskového acetylacetónu **15** bola reakčná zmes ochladená na laboratórnu teplotu a potom vyliata na rozdrvený ľad s vodou (100 ml). Vodný roztok bol extrahovaný pomocou CH₂Cl₂ (4 x 100 ml). Organické fázy boli spojené, dosušené bezvodým Na₂SO₄, prefiltrované a odparené na rotačnej vákuovej odparke (teplota kúpeľa RVO nepresiahla 30 °C). Surový produkt bol destilovaný za atmosférického tlaku – majoritná frakcia bola odoberaná v rozmedzí teplôt 130 – 161 °C. Získaný produkt **16** bol vo forme bezfarebnej kvapaliny (18,8 g) s výťažkom 77 %. ¹H NMR spektrum odpovedá literatúre.⁶⁴

$R_F = 0,62$ (hexán/EtOAc, 3:1, vizualizácia pomocou vanilínu); ¹H NMR (400 MHz, Chloroform-*d*) $\delta_H = 5,78$ (s, 1H); 2,34 (s, 3H); 2,22 (s, 3H) ppm.

3,5-Dimetyl-4-nitroizoxazol (**41**)



Látka **41** bola pripravovaná podľa modifikovaného postupu uvedeného v literatúre.⁵⁹

Do banky umiestnenej v ľadovom kúpeľi bola pridaná H₂SO₄ (29,3 ml; 98 %) a následne po kvapkách bol pridaný **16** (10,8 g; 111 mmol; 1 ekv.). Za rovnakej teploty bola k zmesi pridaná po kvapkách dymiaca HNO₃ (10,8 ml; 242 mmol; 2,2 ekv.), ktorá bola pripravená postupom popísaným nižšie. Potom bola po kvapkách pridaná H₂SO₄ (45,6 ml; 98 %). Reakčná zmes bola zahrievaná pri 63 °C po dobu 24 hodín. Konverzia reakcie bola skontrolovaná pomocou TLC (hexán/EtOAc - 3:1, vizualizácia pomocou ninhydrínu). Po vymiznutí východiskového izoxazolu **16** bola zmes nechaná vychladnúť a pomaly vyliata na rozdrvený ľad s vodou (350 ml) za miešania. Vytvorená zrazenina bola prefiltrovaná, premývaná vodou (150 ml) do neutrálneho pH filtrátu (kontrola pomocou pH papierika). Filtračný koláč bol dosušený za zníženého tlaku (0,41 mbar). Získaný produkt **41** bol vo forme bielej pevnej látky (7,3 g) s výťažkom 46 %. ¹H NMR spektrum odpovedá literatúre.⁴³

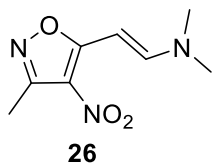
T.t. = 62,2 °C (lit.,⁶⁵ t.t. = 63,5 °C), ¹H NMR (400 MHz, Chloroform-*d*) $\delta_H = 2,82$ (s, 1H); 2,56 (s, 1H) ppm.

Príprava dymiacej kyseliny dusičnej

Do banky bola pridaná HNO₃ (140 ml; 65 %) a prisýpaný NaNO₃ (70 g). Bola zostavená destilačná aparátúra, následne bola pridaná H₂SO₄ (170 ml; 98 %). Zmes bola uvedená

k varu. Následne bol zachytávaný destilát (do teploty 120 °C), ktorý však obsahoval veľké množstvo oxidov dusíka, ktorých sa bolo potrebné zbaviť. Na banku so získaným destilátom bol nasadený Y nástavec so špirálovým chladičom podľa Dimrotha a so sklenenou trubičkou pre prívod vzduchu siahajúcou až ku dnu banky. Aparatúra bola umiestnená do vodného kúpeľa a zahrievaná na teplotu 80 °C. Kyselinou bol prehánaný vzduch, ktorý strhával oxidy dusíka, zatiaľ čo kyselina sa vracala chladičom späť do banky. Takto bola získaná bezfarebná kyselina dusičná zbavená väčšiny nežiadúcich oxidov. Kyselina bola nakoniec ochladená na teplotu 40 °C a prevedená do Erlenmeyerovej banky.

(E)-N,N-Dimetyl-2-(3-metyl-4-nitroizoxazol-5-yl)etén-1-amín (26)

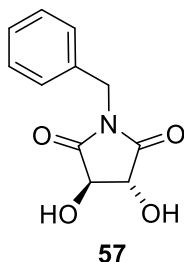


Látka **26** bola pripravovaná podľa modifikovaného postupu uvedeného v literatúre.⁶⁰

Pod argónovou atmosférou bola látka **41** (7,33 g; 51,5 mmol; 1 ekv.) rozpustená v bezvodom DMF (29,2 ml) a následne bol pridaný 1,1-dimetoxy-*N,N*-dimetylmetylamin **42** (7,5 ml; 56,7 mmol; 1,1 ekv.). Zmes bola refluxovaná počas 24 hodín. Konverzia bola skontrolovaná pomocou TLC (hexán/EtOAc - 1:1, vizualizácia pomocou ninhydrínu). Po vymiznutí východiskového izoxazolu **41** bola zmes ponechaná vychladnúť na laboratórnu teplotu a bol pridaný etanol (58 ml). Zmes bola ochladená na teplotu -18 °C, čo viedlo ku kryštalizácii produktu. Následne po vytemperovaní na laboratórnu teplotu bola zmes prefiltrovaná. Získaná pevná látka bola dvakrát rekryštalizovaná z etanolu (120 ml) za varu. Nakoniec bol produkt prefiltrovaný a dosušený za zníženého tlaku (0,41 mbar). Získaný produkt **26** bol vo forme žltej pevnej látky (7,89 g) s výtťažkom 78 %. ¹H NMR spektrum odpovedá literatúre.⁶⁰

R_F = 0,57 (hexán/EtOAc, 1:1, vizualizácia pomocou ninhydrínu), **t.t.** = 152,5 °C (lit.,⁶⁰ t.t. = 216 °C), **¹H NMR** (400 MHz, Chloroform-*d*) δ_{H} = 7,67 (d, *J* = 13,2 Hz, 1H); 5,90 (d, *J* = 13,2 Hz, 1H); 3,21 (s, 3H); 3,01 (s, 3H); 2,50 (s, 3H) ppm; **MS (ESI+)**: pre C₈H₁₂N₃O₃ [M+H]⁺ *m/z*: vypočítané: 198,1; nájdené: 198,1.

(3*R*,4*R*)-1-Benzyl-3,4-dihydroxypyrolidín-2,5-dión (57)

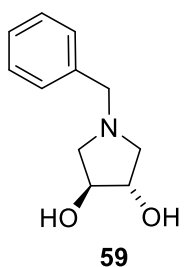


Látka **57** bola pripravovaná podľa modifikovaného postupu uvedeného v literatúre.⁶¹

Do banky bol daný *o*-xylén (25 ml), (2*R*,3*R*)-2,3-dihydroxybutándiová kyselina **55** (5,0 g; 33,3 mmol; 1 ekv.) a benzylamín **56** (3,7 ml; 33,6 mmol; 1 ekv.). Zmes bola refluxovaná s Dean-Starkovou aparátúrou po dobu 9 hodín pri teplote 120 °C. Následne bola ponechaná vychladnúť na laboratórnu teplotu, čo viedlo ku kryštalizácii produktu. Ten bol prefiltrovaný a premytý malým množstvom acetónu. Surový produkt bol rekryštalizovaný s etanolom (30 ml) za varu. Získané kryštály boli prefiltrované, vymyté etanolom (20 ml) a dosušené za zníženého tlaku (0,41 mbar). Získaný produkt **57** bol vo forme bielosivej pevnej látky (4,6 g) s výťažkom 62 %. ¹H NMR spektrum odpovedá literatúre.⁶¹

T.t. = 196,1 °C (lit.,⁶³ t.t. = 196-198 °C); $[\alpha]_D^{25} = -132,4$ (*c* = 0,56; DMSO); **¹H NMR** (400 MHz, DMSO-*d*₆) $\delta_H = 7,36 - 7,20$ (m, 5H); 6,30 (d, *J* = 6,5 Hz, 2H); 4,58 (d, *J* = 15,0 Hz, 1H); 4,52 (d, *J* = 15,0 Hz, 1H); 4,38 (dd, *J* = 5,1; 1,3 Hz, 2H) ppm; **MS (ESI+)**: pre C₁₁H₁₁NO₄Na [M+Na]⁺ *m/z*: vypočítané: 244,06; nájdené: 243,97.

(3*S*,4*S*)-1-Benzyl-pyrolidín-3,4-diol (59)



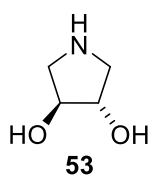
Látka **59** bola pripravovaná podľa modifikovaného postupu uvedeného v literatúre.⁶²

Látka **57** (3,5 g; 15,8 mmol; 1 ekv.) bola rozpustená v bezvodom THF (87 ml) pod argónovou atmosférou. Roztok bol chladený pomocou ľadového kúpeľa a postupne bol pridávaný za stáleho miešania roztok Synhydridu **58** (18,7 ml; 6 ekv.; 70 % v toluéne). Zmes bola následne ponechaná miešať pri laboratórnej teplote po dobu 2 hodín. Konverzia bola skontrolovaná pomocou TLC (DCM/MeOH - 2:1, vizualizácia pomocou ninhydrínu). Po vymiznutí východiskového amidu bola zmes pomaly vyliala na rozdrvený ľad s vodou (100 ml) za miešania. Po vytemperovaní bol pridaný NH₄OH (8,4 ml; 25 % vodný roztok) a hneď za tým etylacetát (105 ml). Zmes bola miešaná po dobu 17 hodín. Suspenzia bola prefiltrovaná cez kremelinu (premyté etylacetátom). Filtrát bol v deliacom lieviku vytrepaný s etylacetátom (3 x 50 ml). Organické fázy boli spojené a vysušené pomocou bezvodého

Na₂SO₄, prefiltrované a odparené. Žltá olejovitá látka bola rozpustená v CH₂Cl₂ a opäť odparená. Získaný produkt bol dočistený pomocou stĺpcovej chromatografie, kde stacionárnou fázou bol silikagél a mobilnou fázou bola zmes DCM/MeOH - 2:1. Nakoniec bol získaný produkt kodedilovaný s CH₂Cl₂ a dosušený za zníženého tlaku (0,41 mbar). Získaný produkt **59** bol vo forme hnedastej pevnej látky (1,25 g) s výťažkom 41 %. ¹H NMR spektrum odpovedá literatúre.⁶²

R_F = 0,59 (DCM/MeOH, 2:1, vizualizácia pomocou ninhydrínu); **t.t.** = 94,3 °C (lit.,⁶⁶ t.t. = 94-96 °C); **[α]_D²⁵** = -39,3 (*c* = 0,56; DMSO); **¹H NMR** (400 MHz, Chloroform-*d*) δ_H = 7,34 – 7,27 (m, 5H); 4,12 – 4,05 (m, 2H); 3,68 (d, *J* = 12,8 Hz, 1H); 3,63 (d, *J* = 12,8 Hz, 1H); 2,98 (dd, *J* = 10,1; 5,5 Hz, 2H); 2,71 (s, 2H); 2,51 – 2,44 (m, 2H) ppm; **MS (ESI+)**: pre C₁₁H₁₆NO₂ [M+H]⁺ *m/z*: vypočítané: 194,12; nájdené: 194,01.

(3*S*,4*S*)-3,4-Dihydroxypyrolidín (**53**)



Látka **53** bola pripravovaná podľa modifikovaného postupu uvedeného v literatúre.⁶³

Látka **59** (0,94 g; 4,86 mmol) bola rozpustená v etanole (29,2 ml; 80 % vodný roztok). Pomocou pumpy bol vymenený vzduch za argón. Následne bolo pridané Pd/C (85 mg; 0,718 mmol; 0,15 ekv.; 10 %) a argónová atmosféra bola pomocou pumpy vymenená za plynný vodík, ktorý bol neskôr dodávaný pomocou balónika. Roztok bol miešaný pri laboratórnej teplote po dobu 3 dní. Konverzia bola skontrolovaná pomocou TLC (DCM/MeOH - 2:1, vizualizácia pomocou ninhydrínu). Po vymiznutí východiskovej látky bola zmes prefiltrovaná cez kremelinu, vypláchnutá s etanolom a filtrát bol odparený. Produkt bol kodedilovaný s etanolom a s CHCl₃ a následne dosušený za zníženého tlaku (0,41 mbar). Získaný produkt **53** bol vo forme hnedej pevnej látky (0,48 g) s výťažkom 96 %.

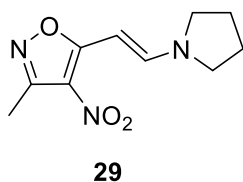
T.t. = 95,8 °C; **[α]_D²⁵** = -26,5 (*c* = 0,51; DMSO); **¹H NMR** (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ_H = 4,54 (br s, 3H); 3,83 – 3,74 (m, 2H); 2,91 (dd, *J* = 11,7; 4,6 Hz, 2H); 2,47 (d, *J* = 2,3 Hz, 2H, prekryté DMSO) ppm; **¹³C NMR** (101 MHz, DMSO-*d*₆) δ_C = 77,5 (2C); 53,2 (2C) ppm; **IČ (KBr)**: ν = 3318, 3165, 3085, 2929, 2869, 2603, 2361, 1652, 1634, 1559, 1542, 1419, 1257, 1216, 1108, 1078, 1030; **HRMS (ESI+)**: pre C₄H₁₀NO₂ [M+H]⁺ *m/z*: vypočítané: 104,0712; nájdené: 104,0706.

4.3.1 Obecný postup prípravy enamínov odvodených od 4-nitroizoxazolu (A)

Príslušné enamíny boli pripravované podľa modifikovaného postupu uvedeného v literatúre.⁶⁰

Látka **26** (100 mg; 0,507 mmol; 1 ekv.) bola rozpustená v bezvodom toluéne (2 ml). Následne bol pridaný daný sekundárny amín **43-54** (5 ekv.). Zmes bola refluxovaná do vymiznutia východiskovej látky **26**. Konverzia bola sledovaná pomocou TLC (vizualizácia pomocou ninhydrínu) a ¹H NMR. Po vymiznutí východiskovej látky bola reakčná zmes zahustená na RVO. Surový produkt bol dočistený pomocou stĺpcovej chromatografie. Nakoniec bol produkt dosušený za zníženého tlaku (0,41 mbar).

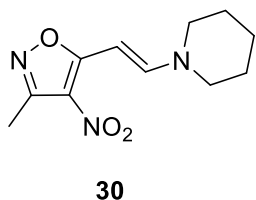
3-Metyl-4-nitro-5-(2-pyrolidín-1-yl-vinyl)-izoxazol (29)



Látka **29** bola pripravovaná podľa obecného postupu A, v reakcii s pyrolidínom **43** (0,18 g; 2,54 mmol). Doba reagovania bola 24 hodín. Mobilná fáza : hexán/EtOAc - 3:1. Získaný produkt **29** bol vo forme tmavozelenej pevnej látky (85,4 mg) s výťažkom 75 %. ¹H NMR spektrum odpovedá literatúre.⁶⁰

$R_F = 0,70$ (hexán/EtOAc, 1:1, vizualizácia pomocou ninhydrínu); **t.t.** = 141,7 °C (lit.,⁶⁰ t.t. = 215 °C); ¹H NMR (400 MHz, Chloroform-*d*) $\delta_H = 7,87$ (d, $J = 13,1$ Hz, 1H); 5,84 (d, $J = 13,1$ Hz, 1H); 3,61 (t, $J = 6,7$ Hz, 2H); 3,37 (t, $J = 7,1$ Hz, 2H); 2,49 (s, 3H); 2,09 (p, $J = 6,8$ Hz, 2H); 1,99 (p, $J = 6,7$ Hz, 2H) ppm; **MS (ESI+)**: pre C₁₀H₁₄N₃O₃ [M+H]⁺ m/z : vypočítané: 224,1; nájdené: 224,1.

1-[2-(3-Metyl-4-nitro-izoxazol-5-yl)-vinyl]-piperidín (30)

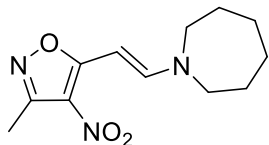


Látka **30** bola pripravovaná podľa obecného postupu A, v reakcii s piperidínom **44** (0,22 g; 2,54 mmol). Doba reagovania bola 2 dni. Mobilná fáza : hexán/EtOAc - 4:1. Získaný produkt **30** bol vo forme tmavooranžovej pevnej látky (85 mg) s výťažkom 71 %. ¹H NMR spektrum odpovedá literatúre.⁶⁰

$R_F = 0,81$ (hexán/EtOAc, 1:1, vizualizácia pomocou ninhydrínu); **t.t.** = 147,1 °C (lit.,⁶⁰ t.t. = 216 °C); ¹H NMR (400 MHz, Chloroform-*d*) $\delta_H = 7,62$ (d, $J = 13,3$ Hz, 1H);

6,00 (d, $J = 13,3$ Hz, 1H); 3,42 (d, $J = 4,4$ Hz, 4H); 2,49 (s, 3H); 1,71 (dd, $J = 3,4; 1,5$ Hz, 6H ppm); **MS (ESI+)**: pre $C_{11}H_{16}N_3O_3$ $[M+H]^+$ m/z : vypočítané: 238,1; nájdené: 238,0.

1-[2-(3-Metyl-4-nitro-izoxazol-5-yl)-vinyl]-azepán (31)

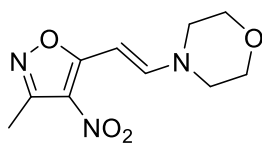


31

Látka **31** bola pripravovaná podľa obecného postupu A, v reakcii s azepánom **45** (0,29 ml; 2,54 mmol). Doba reagovania bola 2 dni. Mobilná fáza : hexán/EtOAc - 3:1. Získaný produkt **31** bol vo forme zelenej pevnej látky (90,9 mg) s výťažkom 71 %. 1H NMR spektrum odpovedá literatúre.⁶⁰

$R_F = 0,84$ (hexán/EtOAc, 1:1, vizualizácia pomocou ninhydrínu); **t.t.** = 120,1 °C (lit.,⁶⁰ t.t. = 205 °C); 1H NMR (400 MHz, Chloroform-*d*) $\delta_H = 7,72$ (d, $J = 13,3$ Hz, 1H); 5,93 (d, $J = 13,3$ Hz, 1H); 3,55 – 3,51 (m, 2H); 3,47 – 3,42 (m, 2H); 2,50 (s, 3H); 1,87 (p, $J = 5,9$ Hz, 2H); 1,82 – 1,75 (m, 2H); 1,69 – 1,57 (m, 4H) ppm; **MS (ESI+)**: pre $C_{12}H_{18}N_3O_3$ $[M+H]^+$ m/z : vypočítané: 252,1; nájdené: 252,1.

4-[2-(3-Metyl-4-nitro-izoxazol-5-yl)-vinyl]-morfolín (33)

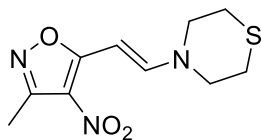


33

Látka **33** bola pripravovaná podľa obecného postupu A, v reakcii s morfolínom **47** (0,22 g; 2,24 mmol). Doba reagovania bola 2 dni. Mobilná fáza : hexán/EtOAc - 3:1. Získaný produkt **33** bol vo forme žltej pevnej látky (75,3 mg) s výťažkom 62 %. 1H NMR spektrum odpovedá literatúre.⁶⁰

$R_F = 0,52$ (hexán/EtOAc, 1:1, vizualizácia pomocou ninhydrínu); **t.t.** = 205,0 °C (lit.,⁶⁰ t.t. = 175 °C); 1H NMR (400 MHz, Chloroform-*d*) $\delta_H = 7,58$ (d, $J = 13,4$ Hz, 1H); 6,03 (d, $J = 13,4$ Hz, 1H); 3,84 – 3,75 (m, 4H); 3,46 (t, $J = 4,9$ Hz, 4H); 2,50 (s, 3H) ppm; **MS (ESI+)**: pre $C_{10}H_{14}N_3O_4$ $[M+H]^+$ m/z : vypočítané: 240,1; nájdené: 240,1.

4-[2-(3-Metyl-4-nitro-izoxazol-5-yl)-vinyl]-tiomorfolín (34)



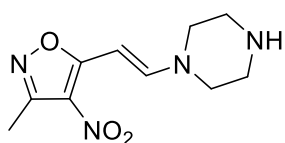
34

Látka **34** bola pripravovaná podľa obecného postupu A, v reakcii s tiomorfolínom **48** (0,27 g; 2,54 mmol). Doba reagovania bola 8 dní. Mobilná fáza : hexán/EtOAc - 3:1. Získaný produkt **34** bol vo forme oranžovej pevnej látky (56,1 mg) s výťažkom 43 %.

$R_F = 0,86$ (hexán/EtOAc, 1:1, vizualizácia pomocou ninhydrínu); **t.t.** = 166,7 °C; 1H NMR (400 MHz, Chloroform-*d*) $\delta_H = 7,57$ (d, $J = 13,4$ Hz, 1H); 6,03 (d, $J = 13,5$ Hz,

1H), 3,76 – 3,72 (m, 4H); 2,77 – 2,73 (m, 4H); 2,51 (s, 3H) ppm; ¹³C NMR (101 MHz, Chloroform-*d*) δ_C = 170,3; 156,0; 150,0; 149,9; 82,6; 48,0; 57,1; 28,0; 27,1; 12,3 ppm; **ĪČ (KBr)**: ν = 3100, 3058, 3007, 2986, 2962, 2929, 2854, 2304, 1820, 1607, 1527, 1479, 1422, 1377, 1356, 1326, 1302, 1269, 1242, 1222, 1186, 1138, 1048, 1006; **HRMS (ESI+)**: pre C₁₀H₁₃N₃O₃SNa [M+Na]⁺ *m/z*: vypočítané: 278,0575; nájdené: 278,0566.

1-[2-(3-Metyl-4-nitro-izoxazol-5-yl)-vinyl]-piperazín (35)



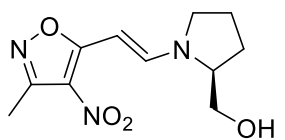
35

Látka **35** bola pripravovaná podľa obecného postupu A, v reakcii s piperazínom **49** (0,22 g; 2,54 mmol). Doba reagovania bola 1 deň. Mobilná fáza : DCM/MeOH - 2:1. Získaný produkt **35** bol vo forme žltej pevnej látky (99,6 mg) s výťažkom 83 %.

¹H NMR spektrum odpovedá literatúre.⁶⁰

R_F = 0,43 (DCM/MeOH, 2:1, vizualizácia pomocou ninhydrínu); **t.t.** = 140,1 °C (lit.,⁶⁰ t.t. = 141 °C); **¹H NMR** (400 MHz, Methanol-*d*₄) δ_H = 7,82 (d, *J* = 13,3 Hz, 1H); 6,04 (d, *J* = 13,3 Hz, 1H); 3,51 (t, *J* = 5,1 Hz, 4H); 2,98 – 2,90 (m, 4H); 2,45 (s, 3H) ppm; **MS (ESI+)**: pre C₁₀H₁₅N₄O₃ [M+H]⁺ *m/z*: vypočítané: 239,11; nájdené: 239,03.

{1-[2-(3-Metyl-4-nitro-izoxazol-5-yl)-vinyl]-pyrolidín-2-yl}-metanol (36)



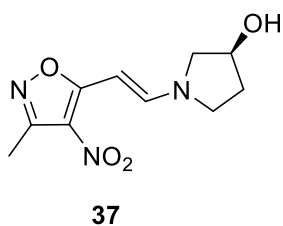
36

Látka **36** bola pripravovaná podľa obecného postupu A, v reakcii s L-prolinolom **50** (0,26 g; 2,24 mmol). Doba reagovania bola 1 deň. Mobilná fáza : hexán/EtOAc - 4:1. Získaný produkt **36** bol vo forme tmavohnedej pevnej látky (91,7 mg) s výťažkom 71 %.

¹H NMR spektrum odpovedá literatúre.⁶⁰

R_F = 0,25 (hexán/EtOAc, 1:1, vizualizácia pomocou ninhydrínu); **t.t.** = 139,0 °C (lit.,⁶⁰ t.t. = 155 °C); **[α]_D²⁵** = -11,7 (*c* = 0,52; CHCl₃); **¹H NMR** (400 MHz, Chloroform-*d*) δ_H = 8,00 (d, *J* = 13,1 Hz, 1H); 5,86 (d, *J* = 13,1 Hz, 1H); 3,91 – 3,76 (m, 2H); 3,72 – 3,62 (m, 1H); 3,46 (d, *J* = 20,6 Hz, 2H); 2,48 (s, 3H); 2,28 – 1,98 (m, 5H) ppm; **MS (ESI+)**: pre C₁₁H₁₅N₃O₄Na [M+Na]⁺ *m/z*: vypočítané: 276,10; nájdené: 276,01.

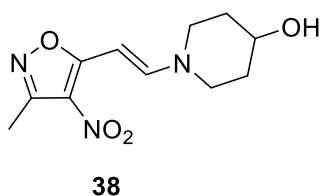
(*S,E*)-1-[2-(3-Metyl-4-nitro-izoxazol-5-yl)-vinyl]-pyrolidín-3-ol (37)



Látka **37** bola pripravovaná podľa obecného postupu A, v reakcii s (*R*)-3-hydroxypyrolidínom **51** (0,21 ml; 2,54 mmol). Doba reagovania bola 1 deň. Mobilná fáza : DCM/MeOH, gradient polarita 50:1 až 10:1. Získaný produkt **37** bol vo forme hnedej pevnej látky (52,8 mg) s výtťažkom 44 %. ¹H NMR spektrum odpovedá literatúre.⁶⁰

$R_F = 0,15$ (DCM/MeOH, 50:1, vizualizácia pomocou ninhydrínu); **t.t.** = 150,3 °C (lit.,⁶⁰ t.t. = 141 °C); $[\alpha]_D^{25} = -63,0$ ($c = 0,50$; DMSO); ¹H NMR (400 MHz, Chloroform-*d*) $\delta_H = 7,86$ (d, $J = 12,8$ Hz, 1H); 5,87 (dd, $J = 22,8$; 13,1 Hz, 1H); 4,66 (d, $J = 48,0$ Hz, 1H); 3,95 – 3,34 (m, 4H); 2,51 (s, 3H); 2,27 – 2,01 (m, 2H); 1,68 (d, $J = 18,3$ Hz, 1H) ppm; **MS (ESI+)**: pre C₁₀H₁₄N₃O₄ [M+H]⁺ m/z : vypočítané: 240,1; nájdené: 240,0.

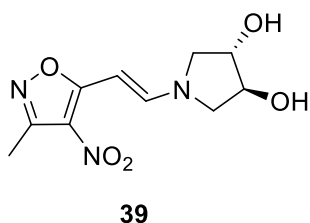
1-[2-(3-Metyl-4-nitro-izoxazol-5-yl)-vinyl]-piperidín-4-ol (38)



Látka **38** bola pripravovaná podľa obecného postupu A, v reakcii so 4-hydroxypiperidínom **52** (0,26 g; 2,54 mmol). Doba reagovania bola 4 dni. Mobilná fáza : DCM/MeOH - 50:1. Získaný produkt **38** bol vo forme tmavooranžovej pevnej látky (71,3 mg) s výtťažkom 56 %.

$R_F = 0,15$ (DCM/MeOH, 50:1, vizualizácia pomocou ninhydrínu); **t.t.** = 170,4 °C; ¹H NMR (400 MHz, Methanol-*d*₄) $\delta_H = 7,84$ (d, $J = 13,2$ Hz, 1H); 6,05 (d, $J = 13,3$ Hz, 1H); 3,94 (tt, $J = 8,0$; 3,7 Hz, 1H); 3,77 (ddd, $J = 13,4$; 6,6; 4,3 Hz, 2H); 3,37 (s, 2H, prekryté MeOD), 2,45 (s, 3H); 2,05 – 1,94 (m, 2H); 1,64 (dtd, $J = 12,9$; 8,5; 4,1 Hz, 2H) ppm; ¹³C NMR (101 MHz, Methanol-*d*₄) $\delta_C = 172,0$; 156,8; 152,3 (2C); 82,0; 66,8; 52,6; 53,3; 35,4; 33,9; 12,2 ppm; **IČ (KBr)**: $\nu = 3411, 3399, 3103, 2968, 2947, 2932, 2860, 1613, 1574, 1527, 1479, 1461, 1428, 1377, 1353, 1323, 1242, 1234, 1219, 1153, 1129, 1111, 1084, 1051, 1009$; **HRMS (ESI+)**: pre C₁₁H₁₅N₃O₄Na [M+Na]⁺ m/z : vypočítané: 276,0960; nájdené: 276,0951.

(3*S*,4*S*)-1[(*E*)-2-(3-Metyl-4-nitro-izoxazol-5-yl)-vinyl]-pyrolidín-3,4-diol (39)



Látka **39** bola pripravovaná podľa modifikovaného obecného postupu A.

Enamín **26** (100 mg; 0,507 mmol; 1 ekv.) bol rozpustený v bezvodom DMF (4 ml). Následne bol pridaný diol **53** (0,26 g; 2,54 mmol; 5 ekv.). Zmes bola refluxovaná po dobu 4 dní. Konverzia bola sledovaná pomocou TLC (DCM/MeOH - 10:1, vizualizácia pomocou ninhydrínu) a ¹H NMR. Získaný produkt **39** bol zahustený na rotačnej vákuovej odparke a následne dočistený pomocou stĺpcovej chromatografie, kde stacionárnou fázou bol silikagél a mobilnou fázou bola zmes DCM/MeOH s gradientom polarity 15:1 - 10:1. Nakoniec bol získaný produkt kodestilovaný s CHCl₃ a dosušený za zníženého tlaku (0,41 mbar). Získaný produkt **39** bol vo forme tmavooranžovej pevnej látky (28 mg) s výťažkom 22 %.

$R_F = 0,42$ (DCM/MeOH, 10:1, vizualizácia pomocou ninhydrínu); $[\alpha]_D^{25} = +56,3$ ($c = 0,40$; MeOH); $t.t. = 174,7$ °C; ¹H NMR (400 MHz, Methanol-*d*₄) $\delta_H = 8,07$ (d, $J = 13,1$ Hz, 1H); 5,87 (d, $J = 13,1$ Hz, 1H); 4,28 (d, $J = 4,4$ Hz, 1H); 4,15 (s, 1H); 3,96 (dd, $J = 12,2$; 3,8 Hz, 1H); 3,66 (dd, $J = 12,9$; 4,4 Hz, 1H); 3,59 (d, $J = 12,0$ Hz, 1H); 3,30 (s, 1H, prekryté MeOD); 3,06 (d, $J = 61,3$ Hz, 1H); 2,46 (s, 3H); 1,31 (s, 1H) ppm; ¹³C NMR (101 MHz, Methanol-*d*₄) $\delta_C = 171,4$; 156,8; 150,7 (2C); 83,4; 76,0; 75,7; 59,1; 54,6; 12,2 ppm; IČ (KBr): $\nu = 3402, 3351, 2935, 2872, 2851, 1655, 1619, 1583, 1479, 1422, 1404, 1383, 1356, 1326, 1284, 1234, 1147, 1129, 1075, 1042, 1006$; HRMS (ESI+): pre C₁₀H₁₃N₃O₅Na [M+Na]⁺ m/z : vypočítané: 278,0753; nájdené: 278,0746.

5. Záver

Cieľom tejto bakalárskej práce bola príprava série derivátov 4-nitroizoxazolu líšiacich sa substitúciou v enamínovej časti molekuly, za účelom zvýšenia rozpustnosti týchto látok v polárnych rozpúšťadlách a zabránenia tvorby komplexu FOXO3-DNA.

Na začiatku bola pozornosť venovaná príprave východiskového enamínu **26**. Viacstupňová syntéza začínala reakciou acetylacetónu a hydroxylamín hydrochloridu, čím bol pripravený 3,5-dimetylizoxazol **16** vo výťažku 77 %. Nasledujúcou nitráciou bol pripravený 3,5-dimetyl-4-nitroizoxazol **41** vo výťažku 46 %. Posledným krokom bola reakcia **41** s 1,1-dimetoxy-*N,N*-dimetylmetylamínom za vzniku spomínaného enamínu **26**, ktorý sa podarilo pripraviť vo výťažku 78 %. Súhrnný výťažok trojkrokovej syntézy bol 28 %.

Pre prípravu navrhnutých derivátov bolo potrebné pripraviť aj komerčne nedostupné sekundárne amíny. Pri príprave sekundárneho amínu (3*S*,4*S*)-3,4-dihydroxypyrolidínu **53** bola využitá viacstupňová syntéza. Prvým krokom bola reakcia (2*R*,3*R*)-2,3-dihydroxybutándiovej kyseliny s benzylamínom za vzniku (3*R*,4*R*)-1-benzyl-3,4-dihydroxypyrolidín-2,5-diónu **57** s výťažkom 62 %. Druhým krokom bola jeho redukcia pomocou Synhydridu na (3*S*,4*S*)-1-benzyl-pyrolidín-3,4-diol **59** s výťažkom 41 %. Posledným krokom bola katalytická hydrogenácia za vzniku sekundárneho amínu **53** s výťažkom 96 %. Súhrnný výťažok trojkrokovej prípravy bol 24 %.

Posledná časť bola venovaná príprave navrhnutých enamínov **29-40**. U väčšiny reakcií boli výťažky veľmi dobré. Naopak výťažok enamínu **39** bol len 22 %. Enamíny **32** a **40** sa pripraviť nepodarilo. Podobne sa tiež nepodarilo pripraviť dimérnu štruktúru **60**.

V rámci mojej bakalárskej práce sa podarilo pripraviť sériu enamínov, ktorých biologická aktivita je v tejto dobe testovaná v spolupráci s výskumnými skupinami prof. Obšila (PřF UK) a prof. Ausserlechnera (Innsbruck Medical University).

6. Zoznam literatúry

- 1 McMurry, J. E. Organic Chemistry, 9th ed.; *Cengage Learning*: Boston, **2016**.
- 2 Hart, D. J.; Hadad, Ch. M.; Craine, L. E.; Hart, H. Organic Chemistry: A Short Course, 13th ed.; *Cengage Learning*: Boston, **2012**.
- 3 Webster, C. R.; Mahaffy, P. R.; Atreya, S. K.; Moores, J. E.; Flesch, G. J.; Malespin, C.; McKay, C. P.; Martinez, G.; Smith, C. L.; Martin-Torres, J.; Gomez-Elvira, J.; Zorzano, M.-P.; Wong, M. H.; Trainer, M. G.; Steele, A.; Archer Jr., D.; Sutter, B.; Coll, P. J.; Freissinet, C.; Meslin, P.-Y.; Gough, R. V.; House, C. H.; Pavlov, A.; Eigenbrode, J. L.; Glavin, D. P.; Pearson, J. C.; Keymeulen, D.; Christensen, L. E.; Schwenzer, S. P.; Navarro-Gonzalez, R.; Pla-García, J.; Rafkin, S. C. R.; Vicente-Retortillo, Á.; Kahanpää, H.; Viudez-Moreiras, D.; Smith, M. D.; Harri, A.-M.; Genzer, M.; Hassler, D. M.; Lemmon, M.; Crisp, J.; Sander, S. P.; Zurek, R. W.; Vasavada, A. R. *Science* **2018**, *360*, 1093.
- 4 Nicolaou, K. C. *Proc. Royal Soc. A* **2014**, *470*, 2163.
- 5 Nicolaou, K. C. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2013**, *52*, 131.
- 6 Moss, G. P.; Smith, P. A. S.; Tavernier, D. *Pure Appl. Chem.* **1995**, *67*, 1307.
- 7 Kodíček, M.; Valentová, O.; Hýnek, R. Biochemie, chemický pohled na biologický svět, 2nd ed.; *VŠCHT*: Praha, **2018**.
- 8 Coliman, J. P.; Vastine, F. D.; Roper, W. R. *J. Am. Chem. Soc.* **1965**, *87*, 5037.
- 9 Kadish, K. M.; Smith, K. M.; Guillard, R. The Porphyrin Handbook; *Academic Press*: San Diego, **2000**.
- 10 Gordy, W.; Thomas, W. J. O. *J. Chem. Phys.* **1956**, *24*, 439.
- 11 Gupta, R. R.; Kumar, M.; Gupta, V. Heterocyclic Chemistry: Volume II: Five-Membered Heterocycles; *Springer-Verlag Berlin Heidelberg*: New York, **1999**.
- 12 Kuwano, R. *Heterocycles* **2008**, *76*, 909.
- 13 Eicher, T.; Hauptmann, S.; Speicher, A. The Chemistry of Heterocycles: Structures, Reactions, Synthesis and Applications, 3rd ed.; *Wiley-VCH*: Weinheim, **2012**.
- 14 Rescifina, A.; Giulia Varrica, M.; Carnovale, C.; Romeo, G.; Chiacchio, U. *Eur. J. Med. Chem.* **2012**, *51*, 163.

- 15 Li, C.; Oberlies, N. H. *Life Sci.* **2005**, *78*, 532.
- 16 Rajesh H. Vekariya, Neelam P. Prajapati, Kinjal D. Patel, Mayur K. Vekariya, D.; B. Patel and Hitesh D. Patel. *World J. Pharm. Pharm. Sci.* **2017**, *6*, 2003.
- 17 Kang, Y. K.; Shin, K. J.; Yoo, K. H.; Seo, K. J.; Hong, C. Y.; Lee, C.-S.; Park, S. Y.; Kim, D. J.; Park, S. W. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2000**, *10*, 95.
- 18 Lawrence, S. L.; Roth, V.; Slinger, R.; Toye, B.; Gaboury, I.; Lemyre, B. *BMC Pediatr.* **2005**, *5*, 49.
- 19 Khan, M. O. F.; Lee, H. J. *Chem. Rev.* **2008**, *108*, 5131.
- 20 Ratnakar Reddy, K.; Sambasiva Rao, P.; Jitender Dev, G.; Poornachandra, Y.; Ganesh Kumar, C.; Shanthan Rao, P.; Narsaiah, B. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2014**, *24*, 1661.
- 21 Vicentini, C. B.; Romagnoli, C.; Manfredini, S.; Rossi, D.; Mares, D. *Pharm. Biol.* **2011**, *49*, 545.
- 22 Loh, B.; Vozzolo, L.; Mok, B. J.; Lee, C. C.; Fitzmaurice, R. J.; Caddick, S.; Fassati, A. *Chem. Biol. Drug Des.* **2010**, *75*, 461.
- 23 Eddington, N. D.; Cox, D. S.; Roberts, R. R.; Butcher, R. J.; Edafiohgo, I. O.; Stables, J. P.; Cooke, N.; Goodwin, A. M.; Smith, C. A.; Scott, K. . *Eur. J. Med. Chem.* **2002**, *37*, 635.
- 24 Padmaja, A.; Rajasekhar, C.; Muralikrishna, A.; Padmavathi, V. *Eur. J. Med. Chem.* **2011**, *46*, 5034.
- 25 Kano, H.; Adachi, I.; Kido, R.; Hirose, K. *J. Med. Chem.* **1967**, *10*, 411.
- 26 Pallett, K. E.; Little, J. P.; Sheekey, M.; Veerasekaran, P. *Pestic. Biochem. Physiol.* **1998**, *62*, 113.
- 27 Dmowski, W. P.; Scholer, H. F. L.; Mahesh, V. B.; Greenblatt, R. B. *Fertil. Steril.* **1971**, *22*, 9.
- 28 Tarsio, P. J.; Nicholl, L. *J. Org. Chem.* **1957**, *22*, 192.
- 29 Griesbeck, A. G.; Franke, M.; Neudörfl, J.; Kotaka, H. *Beilstein J. Org. Chem.* **2011**, *7*, 127.
- 30 Tanaka, J.; Kanemasa, S. *Tetrahedron* **2001**, *57*, 899.

- 31 Himo, F.; Lovell, T.; Hilgraf, R.; Rostovtsev, V. V.; Noodleman, L.; Sharpless, K. B.; Fokin V. V. *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, *127*, 210.
- 32 Hein, J. E.; Fokin, V. V. *Chem. Soc. Rev.* **2010**, *39*, 1302.
- 33 Meldal, M.; Tornøe, C. W. *Chem. Rev.* **2008**, *108*, 2952.
- 34 Rostovtsev, V. V.; Green, L. G.; Fokin, V. V.; Sharpless, K. B. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2002**, *41*, 2596.
- 35 Grecian, S.; Fokin, V. V. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2008**, *47*, 8285.
- 36 Marinetti, A.; Jullien, H.; Voituriez, A. *Chem. Soc. Rev.* **2012**, *41*, 4884.
- 37 Wang, L.; Yu, X.; Feng, X.; Bao, M. *Org. Lett.* **2012**, *14*, 2418.
- 38 Beauchemin, A. M. *Org. Biomol. Chem.* **2013**, *11*, 7039.
- 39 Gayon, E.; Quinonero, O.; Lemouzy, S.; Vrancken, E.; Campagne, J.-M. *Org. Lett.* **2011**, *13*, 6418.
- 40 Muller, P. *Pure Appl. Chem.* **1994**, *66*, 1077.
- 41 Tang, S.; He, J.; Sun, Y.; He, L.; She, X. *Org. Lett.* **2009**, *11*, 3982.
- 42 Tang, S.; He, J.; Sun, Y.; He, L.; She, X. *J. Org. Chem.* **2010**, *75*, 1961.
- 43 Katritzky, A. R.; Scriven, E. F. V.; Majumder, S.; Akhmedova, R. G.; Akhmedov, N. G.; Vakulenko, A. V. *Arkivoc* **2005**, *2005*, 179.
- 44 Pascual, A. *Helv. Chim. Acta* **1989**, *72*, 556.
- 45 Morita, T.; Fuse, S.; Nakamura, H. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2016**, *55*, 13580.
- 46 Boogaerts, I. I. F.; Nolan, S. P. *J. Am. Chem. Soc.* **2010**, *132*, 8858.
- 47 Olah, G. A. *Acc. Chem. Res.* **1971**, *4*, 240.
- 48 Sun, H.-W.; Liao, Y.-H.; Wu, Z.-J.; Wang, H.-Y.; Zhang, X.-M.; Yuan, W.-C. *Tetrahedron* **2011**, *67*, 3991.
- 49 Madhavi, K.; Bharathi, K.; Prasad, K. V. S. R. G. *Res. J. Pharm., Biol. Chem. Sci.* **2010**, *4*, 1073.
- 50 Lin, B.; Zhang, W.-H.; Wang, D.-D.; Gong, Y.; Wei, Q.-D.; Liu, X.-L.; Feng, T.-T.; Zhou, Y.; Yuan, W.-C. *Tetrahedron* **2017**, *73*, 5176.

- 51 Rajanarendar, E.; Nagi Reddy, M.; Rama Murthy, K.; Surendar, P.; Reddy, R. N.; Reddy, Y. N. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2012**, *22*, 149.
- 52 Rajanarendar, E.; Raju, S.; Reddy, M. N.; Krishna, S. R.; Kiran, L. H.; Narasimha Reddy, A. R.; Reddy, Y. N. *Eur. J. Med. Chem.* **2012**, *50*, 274.
- 53 Kohoutová, K. Studium interakcí nízkomolekulárních látek s DNA-vazebnou doménou forkhead transkripčního faktoru FOXO3; *Univerzita Karlova, Přírodovědecká fakulta*: Praha, **2018**.
- 54 Alberts, B. Essential cell biology, 2nd ed.; *Garland Science Pub.*: New York, **2004**.
- 55 Hagenbuchner, J.; Rupp, M.; Salvador, C.; Meister, B.; Kiechl-Kohlendorfer, U.; Müller, T.; Geiger, K.; Sergi, C.; Obexer, P.; Ausserlechner, M. J. *Oncotarget* **2016**, *7*, 77591.
- 56 Tzivion, G.; Dobson, M.; Ramakrishnan, G. *Biochim. Biophys. Acta - Mol. Cell Res.* **2011**, *1813*, 1938.
- 57 Gormally, M. V.; Dexheimer, T. S.; Marsico, G.; Sanders, D. A.; Lowe, C.; Matak-Vinković, D.; Michael, S.; Jadhav, A.; Rai, G.; Maloney, D. J.; et al. *Nat. Commun.* **2014**, *5*, 5165.
- 58 Zhang, J.; Liu, X.; Ma, X.; Wang, R. *Chem. Commun.* **2013**, *49*, 9329.
- 59 Moccia, M.; Cortigiani, M.; Monasterolo, C.; Torri, F.; Del Fiandra, C.; Fuller, G.; Kelly, B.; Adamo, M. F. A. *Org. Process Res. Dev.* **2015**, *19*, 1274.
- 60 Dere, R.; Monasterolo, C.; Moccia, M.; Adamo, M. F. A. *Tetrahedron Lett.* **2015**, *56*, 7168.
- 61 WO2004/058715 **2004**, A1
- 62 WO2007/148184 **2007**, A2
- 63 Rejman, D.; Kočalka, P.; Buděšínský, M.; Pohl, R.; Rosenberg, I. *Tetrahedron* **2007**, *63*, 1243.
- 64 Sahani, R. L.; Liu, R.-S. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2017**, *56*, 1026.
- 65 Morgan, G. T.; Burgess, H. *J. Chem. Soc., Trans.* **1921**, *119*, 697.
- 66 Xie, F.; Yang, F.; Liang, Y.; Li, L.; Xia, Y.; Jiang, F.; Liu, W.; Qi, Y.; Chowdhury, S. R.; Xie, D.; Fu L. *Eur. J. Med. Chem.* **2019**, *164*, 408.