

UNIVERZITA PALACKÉHO V OLOMOUCI

PŘÍRODOVĚDECKÁ FAKULTA

Katedra organické chemie



Petra DRÁBKOVÁ

**Syntéza nových bisheterocyklických sloučenin
purinu a 3-hydroxy-4(1*H*)-chinolonu**

Bakalářská práce

Studijní obor: Chemie

Vedoucí práce: Mgr. Barbora Vaňková

Olomouc 2012

Bibliografická identifikace:

Jméno a příjmení autora: Petra Drábková

Název práce: Syntéza nových bisheterocyklických sloučenin purinu a 3-hydroxy-4(1*H*)-chinolonu

Typ práce: bakalářská práce

Pracoviště: Katedra organické chemie

Školitel: Mgr. Barbora Vaňková

Rok obhajoby práce: 2012

Abstrakt:

Bakalářská práce popisuje přípravu bisheterocyklických sloučenin purinu a hydroxychinolonu. Teoretická část shrnuje metody syntézy 2-substituovaných-3-hydroxychinolonů v roztoku i na pevné fázi. Zároveň popisuje významnou biologickou aktivitu a fluorescenční vlastnosti těchto derivátů. První část experimentální práce je zaměřena na přípravu výchozích intermediátů a jejich aplikaci na pevnou fázi. Druhá část se věnuje samotné solid phase syntéze cílových bisheterocyklických sloučenin.

Klíčová slova: bisheterocyklická struktura, purin, chinolon, syntéza, reaktivita, pevná fáze.

Počet stran: 57

Počet příloh: 0

Jazyk: český

Bibliographical identification:

Author's first name and surname: Petra Drábková

Title: Synthesis of Novel Bisheterocyclic Structures of Purine and 3-Hydroxy-4(1*H*)-quinolinones

Type of thesis: bachelor

Department: Department of Organic Chemistry

Advisor: Mgr. Barbora Vaňková

The year of presentation: 2012

Abstract:

Bachelor theses describes solid phase preparation of bisheterocyclic structures of purine and hydroxyquinolinones. Theoretical part summarizes methods of synthesis of 2-substituted-3-hydroxy-4(1*H*)-quinolinones in solution and solid phase. Important biological activities and fluorescence properties of these derivatives are also reported. First part of experimental work is focused on preparation of starting intermediates in solution and their application to solid phase. Second part is dedicated to synthesis of target bisheterocyclic structures on solid phase.

Keywords: bisheterocyclic structure, purine, quinolinone, synthesis, reactivity, solid phase.

Number of pages: 57

Number of appendixes: 0

Language: Czech

Prohlášení:

Prohlašuji, že jsem závěrečnou práci zpracovala samostatně a že jsem uvedla všechny použité informační zdroje a literaturu. Tato práce ani její podstatná část nebyla předložena k získání jiného nebo stejného akademického titulu.

V Olomouci.....

Podpis

Ráda bych poděkovala své školitelce Mgr. Barboře Vaňkové za pomoc při syntéze a neocenitelné rady při zpracování bakalářské práce. Dále děkuji také své rodině za trpělivost a podporu.

Seznam použitých zkratek

AcOH – kyselina octová
BAL - (4-(4-formyl-3-methoxyfenoxy)butanová kyselina
DBU - 1,8-Diazabicyclo[5.4.0]undec-7-en
DCM – dichlormethan
DIAD - Diisopropyl azodikarboxylát
DIC - *N,N*-diisopropylcarbodiimid
DMSO - dimethylsulfoxid
DMF – dimethylformamid
EDIPA – diisopropylethylamin
MW – mikrovlnné záření
NMP – *N*-methylpyrrolidon
on – přes noc (16h)
RT - laboratorní teplota
TEA - triethylamin
THF – tetrahydrofuran
TMSOK - kalium trimethylasilanolát

Obsah

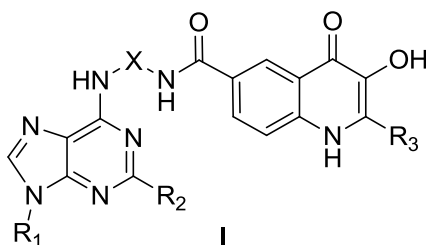
1	Úvod.....	8
2	Cíl práce	8
3	Současný stav řešené problematiky.....	9
3.1	Příprava 2-substituovaných-3-hydroxy-4(1 <i>H</i>)-chinolonů v roztoku.....	9
3.2	Příprava 2-substituovaných-3-hydroxy-4(1 <i>H</i>)-chinolonů na pevném nosiči	12
3.3	Vlastnosti 2-substituovaných-3-hydroxy-4(1 <i>H</i>)-chinolonů	18
3.3.1	Biologická aktivita	18
3.3.2	Fluorescenční vlastnosti	21
3.4	Vlastnosti bisheterocyklických sloučenin purinu a hydroxychinolonu.....	24
4	Výsledky a diskuze	25
4.1	Strategie č. 1: Příprava a imobilizace <i>N</i> -(2-chlor-9 <i>H</i> -purin-6yl)propan-1,3-diaminu	25
4.1.1	Syntéza výchozích látek pomocí chemie v roztoku	26
4.1.2	Solid-phase syntéza.....	27
4.2	Strategie č. 2: Příprava methyl-4-((1,3-diaminopropyl) karbamoyl)-2-nitrooxybenzoátu.....	29
4.2.1	Syntéza výchozích látek pomocí chemie v roztoku	30
4.3	Strategie č. 3: Využití <i>N</i> -(3-Amino-propyl)-2-nitro-benzen sulfonamidu.	31
4.3.1	Syntéza výchozích látek pomocí chemie v roztoku	32
4.3.2	Solid-phase syntéza.....	33
4.4	Syntéza <i>N</i> 9 nesubstituovaných derivátů purinu	42
4.4.1	Příprava terc-butyl 2,6-dichlorpurin-9-karboxylátu (Boc- purinu)	43
4.4.2	Příprava Fmoc purinu.....	44
4.4.3	Příprava Nos purinu	45
5	Experimentální část.....	46
5.1	Přístroje a metody	46
5.2	Štěpení produktů z pevné fáze a příprava vzorků na analýzu	47
5.3	Derivatizace meziproduktů na LC-MS analýzu	47
5.4	Příprava výchozích látek v roztoku.....	47
5.5	Reakce na pevné fázi.....	48
6	Závěr	53
7	Literatura.....	56

1 Úvod

Deriváty 3-hydroxy-4(1*H*)-chinolonů známé také jako aza-analoga přírodních a biologicky účinných flavonoidů se v průběhu minulého století staly častým tématem studia pro jejich „potenciální“ biologickou aktivitu. Katedra organické chemie PřF UP se řadu let intenzivně věnuje syntéze a studiu vlastností 2-substituovaných-3-hydroxy-4(1*H*)-chinolonů (dále jen „hydroxychinolonů“). Výrazným mezníkem v této oblasti byl objev efektivní přípravy těchto sloučenin pomocí klasické syntézy v roztoku a následné aplikace na pole syntézy na pevné fázi, která umožňuje potenciálně rychlou přípravu knihoven látek. V současné době dochází k vývoji metod k přípravě nových derivátů hydroxychinolonů převážně založených na kombinaci chinolonového skeletu s dalším heterocyklickým systémem. Výzkum hydroxychinolonů potvrdil výrazné biologické účinky v oblasti cytotoxické, antiprotozoální, antivirální a imunosupresivní aktivity. Navíc je pozornost studia stále více zaměřena a rozvíjena i na výrazné fluorescenční vlastnosti hydroxychinolonů pro jejich potenciální použití jako fluorescenční značky.

2 Cíl práce

Cílem bakalářské práce bylo navázání na dosavadní výsledky v oblasti syntézy nových bisheterocyklických sloučenin založených na kombinaci hydroxychinolonu a purinu spojených tzv. spacerem o různé délce či struktuře. Navržená struktura využívá spojení hydroxychinolonu s purinem přes alkylaminoskupinu v poloze č. 6 purinového skeletu. Konečné deriváty **I** by měly obsahovat až 4 diverzní místa: 2 diverzní místa ve struktuře purinu, 1 diverzní místo na hydroxychinolonovém skeletu a poslední diverzní místo by měl představovat samotný spacer o různé délce/struktuře spojující oba heterocyklické systémy.



Hlavní pozornost byla věnována syntéze různých výchozích intermediátů pomocí klasické roztokové chemie a studiu jejich reaktivity při ukotvení na pevnou fázi.

Navržená syntéza efektivně kombinuje solid phase syntézu s klasickou syntézou v roztoku.

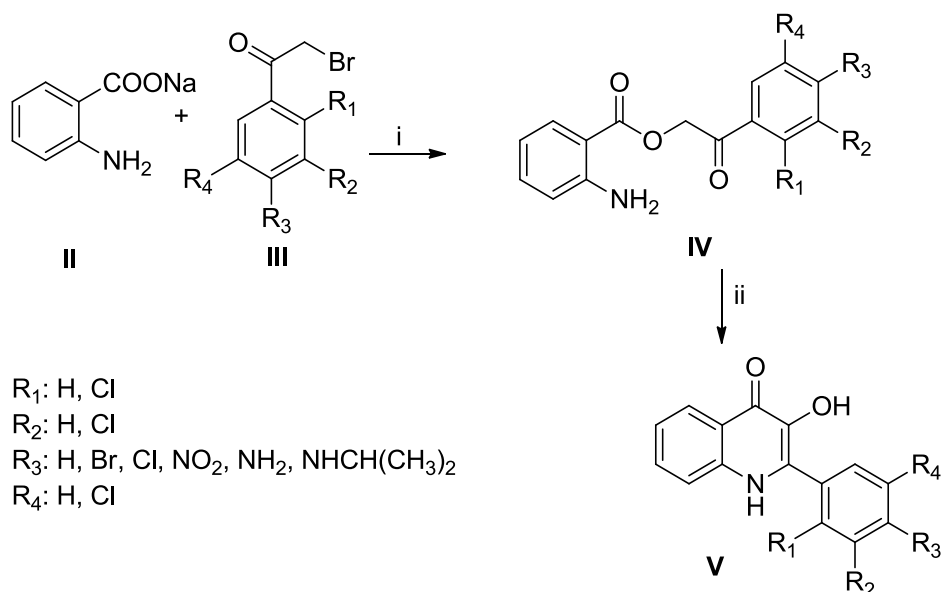
3 Současný stav řešené problematiky

Předložená rešerše shrnuje problematiku 2-substituovaných-3-hydroxy-4(1*H*)-chinolonů. Metody příprav hydroxychinolonů jsou rozděleny do podkapitol podle způsobu syntézy. Další podkapitoly pojednávají o biologických a fluorescenčních vlastnostech.

3.1 Příprava 2-substituovaných-3-hydroxy-4(1*H*)-chinolonů v roztoku

Přípravy hydroxychinolonů v roztoku zahrnují Darzenovu cyklizační metodu,¹ jejíž modifikací byly připraveny další deriváty.² Jiné metody jsou založeny na expanzi pětičlenného kruhu derivátů isatinu pomocí methanolátu sodného³ nebo indolového derivátu v kyselině octové⁴ či methanolátu sodném.⁵ Mezi méně používané syntézy patří oxidační metody, kde dochází ke vnášení hydroxy skupiny do chinolonového skeletu pomocí peroxosíranu draselného⁶ nebo peroxidu vodíku.⁷

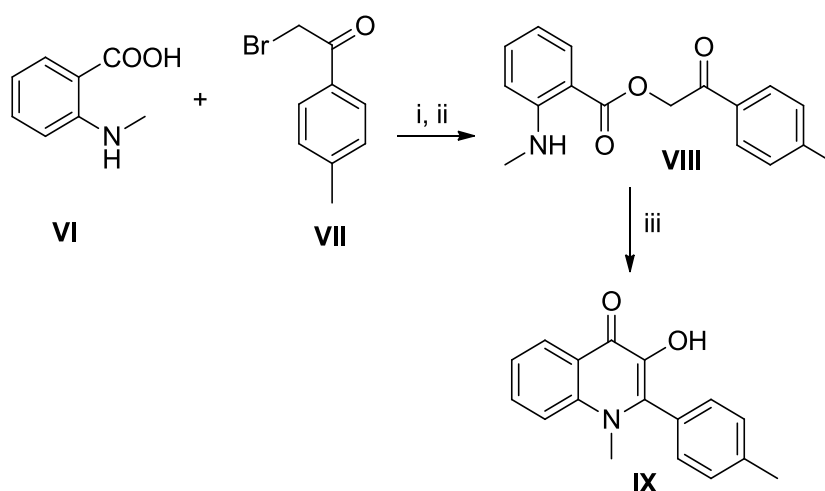
V rámci bakalářské práce byly podrobněji studovány cyklizační reakce fenacyl esterů, kterým je v textu věnováno větší pozornosti. První syntéza je založena na reakci antranilátu sodného s fenacylhalogenidy, která vede k různě substituovaným fenacylantranilátům (**IV**). Následná termická cyklizace v *N*-methylpyrrolidonu (NMP) nebo kyselině polyfosforečné (PPA) velmi rychle a efektivně vede ke vzniku hydroxychinolonu (Schéma 1). Postupnou modifikací syntézy a použitím různě substituovaných výchozích látek byla připravena pestrá série různě modifikovaných 2-substituovaných hydroxychinolonů.⁸



Reakční podmínky: (i) DMF, (ii) PPA, 120°C nebo NMP.

Schéma 1

Cyklizační metoda je vhodná i pro přípravu *N*-derivatizovaných derivátů hydroxychinolonu. Jednoduchá záměna kyseliny anthranilové za kyselinu *N*-methylanthranilovou, její následná reakce s bromoketonem za vzniku příslušného fenacylesteru a konečná cyklizace v kyselině polyfosforečné vede k *N*-methylhydroxychinolonům (Schéma 2).⁹

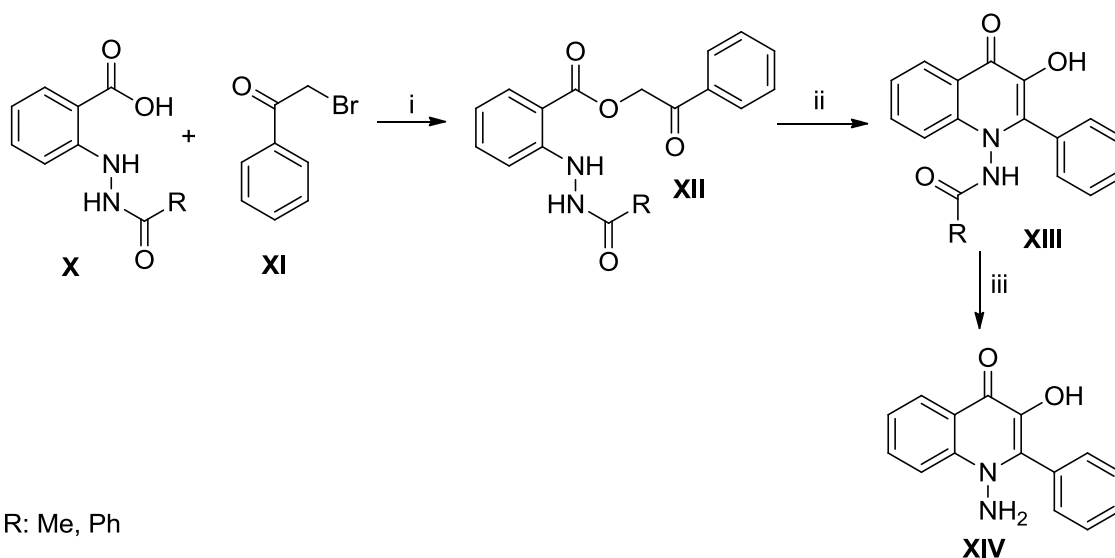


Reakční podmínky: (i) KOH, 50% DMF v H₂O, 45 min, 25-35°C; (ii) 10 h, RT; (iii) PPA, 6h, 140°C.

Schéma 2

Jiná modifikace výchozích látek poskytuje *N*-aminohydroxychinolony. Bromoketon reaguje s 2-(*N'*-acyl-hydrazino)-benzoovou kyselinou za vzniku esteru.

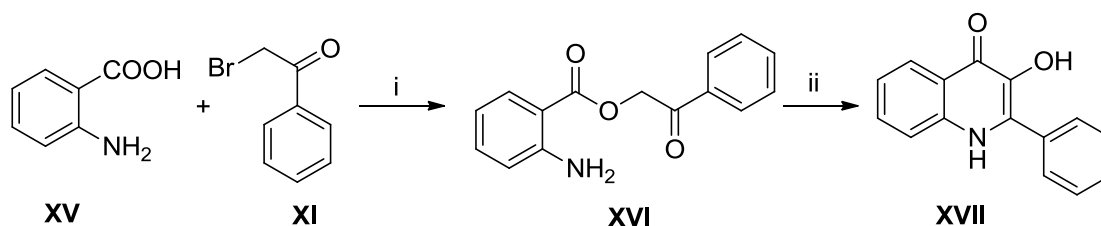
Cyklizace probíhá za klasických podmínek v kyselině polyfosforečné. V konečném kroku dochází k deprotekcí amino skupiny působením kyseliny sírové (Schéma 3).¹⁰



Reakční podmínky: (i) K_2CO_3 , DMF, RT; (ii) PPA, 120°C, 30 min.; (iii) 50% H_2SO_4 , 60°C, 1 h.

Schéma 3

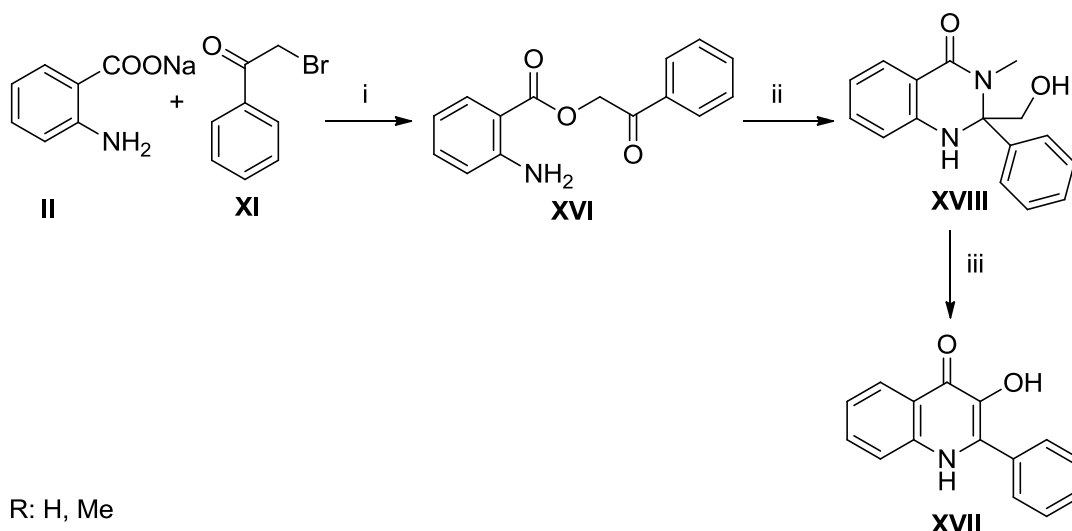
Cyklizace fenacylesterů byla testována i za použití mikrovlnného záření. Nejprve byla směs soli antranilové kyseliny a bromacetofenonu vystavena mikrovlnnému záření bez použití rozpouštědel. Na rozdíl od předešlých postupů byla reakční doba 2 minuty. Výsledný fenacylanthranilát byl rozpuštěn v kyselině polyfosforečné a smíchán se silikagelem. Reakční směs byla opět vystavena mikrovlnnému záření po dobu 2 minut a poskytovala cílové deriváty hydroxychinolonů (Schéma 4).¹¹



Reakční podmínky: (i) K_2CO_3 , 2 min, MW; (ii) PPA, silikagel, 2 min, MW.

Schéma 4

Předchozí postupy cyklizace byly nadále modifikovány. V následující syntéze dochází k reakci fenacylesteru s octanem amonným za vzniku derivátů 2-fenyl-2-hydroxymethyl-2,3-dihydrochinazolin-4-onu, který za varu v kyselině octové (AcOH) přesmykuje na požadovaný hydroxychinolon (Schéma 5).¹²



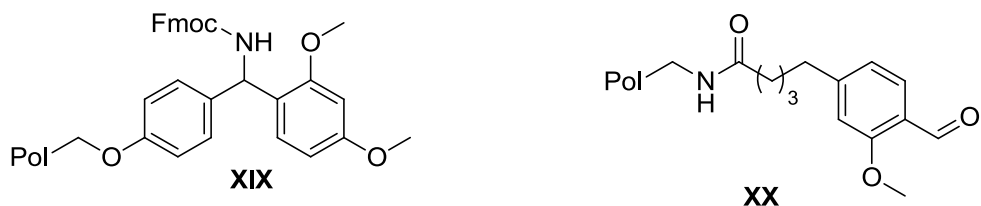
Reakční podmínky: (i) DMF; (ii) $\text{CH}_3\text{COONH}_4$, 20 min. nebo $\text{CH}_3\text{COONH}_2\text{CH}_3$, 90 min, 120°C ; (iii) AcOH, $230\text{-}250^\circ\text{C}$, 45 min.

Schéma 5

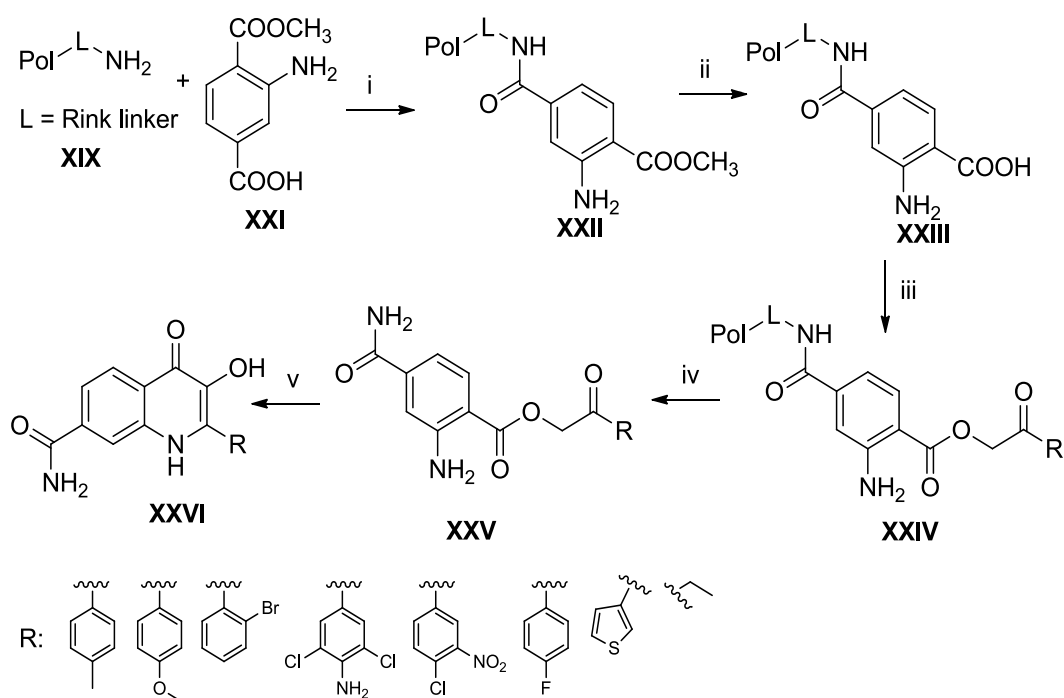
Jiná cyklizační metoda vychází z acylace amino skupiny derivátů methyl 2-aminobenzoátu. Finální cyklizace je provedena za zvýšené teploty a tlaku v ethanolátu sodném.¹³

3.2 Příprava 2-substituovaných-3-hydroxy-4(1H)-chinolonů na pevném nosiči

Dalším mezníkem ve vývoji hydroxychinolonů byla aplikace a modifikace cyklizační metody fenacylsterů na pevnou fázi. Syntéza na pevné fázi je velmi jednoduchá technika přípravy různých typů organických sloučenin. Princip je založen na myšlence Bruce Merrifielda, kdy sloučenina zakotvená na pevném nerozpustném nosiči je podrobena reakci s roztokem činidel a po ukončení reakce jsou reagenty spolu s rozpouštědlem vymyty. Konečná struktura je po promytí pevné fáze za specifických avšak jednoduchých podmínek odštěpena. Výchozí látka není ukotvena přímo na polymerním nosiči, ale je na něj navázána přes linker.¹⁴ Pro syntézu 2-substituovaných hydroxychinolonů byla použita Rinkova (**XIX**) a aminomethylenová pryskyřice s BAL linkerem (**XX**). Způsoby syntézy na pevném nosiči často vychází z předchozích příprav v roztoku.



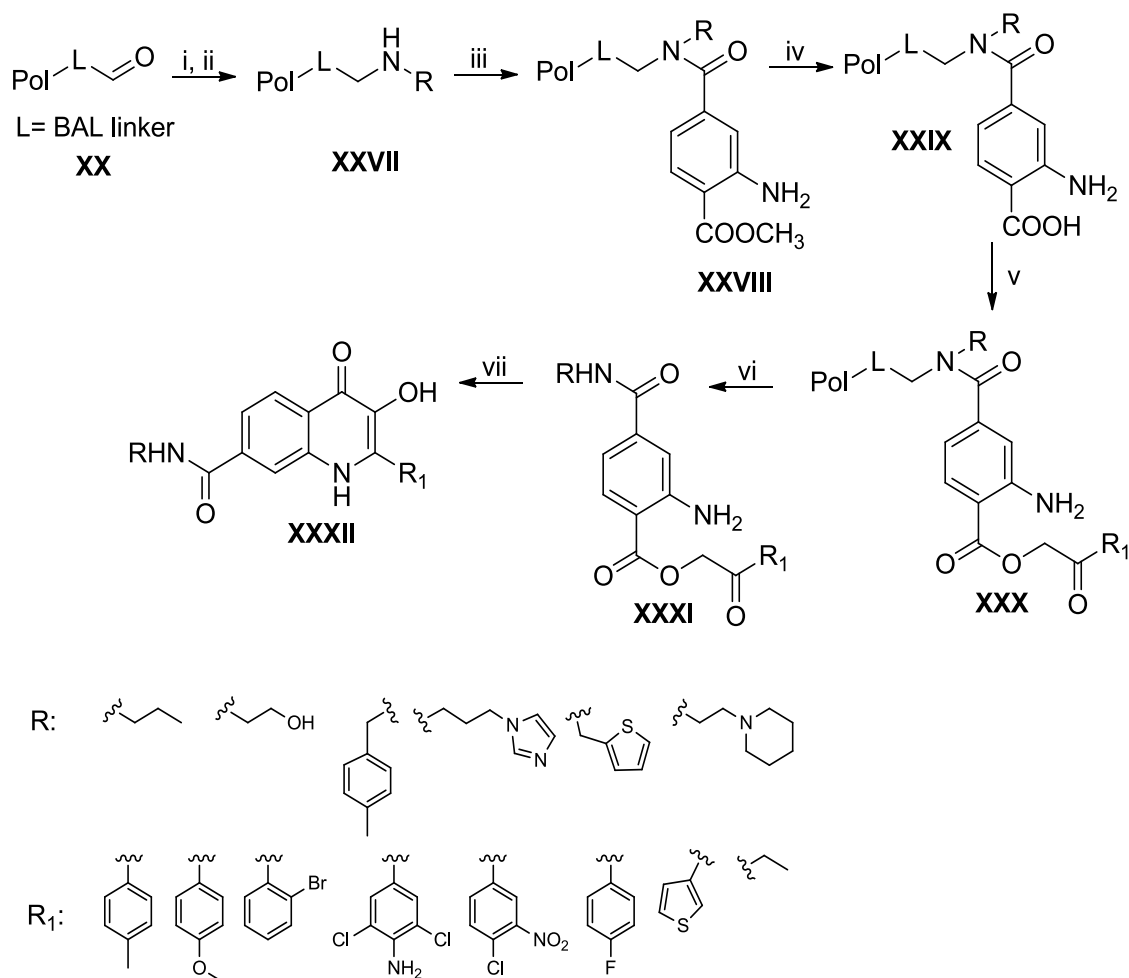
První v literatuře popsaná syntéza na pevné fázi je zaměřena na přípravu 2-substituovaných-3-hydroxy-4(1*H*)-chinolon-7-karboxamidů. Tyto cílové struktury byly připravovány na dvou různých pevných nosičích podle požadovaného typu výsledného karboxamidu. Pevným nosičem (fází) je myšlen kopolymer styrenu a divinylbenzenu nazývaný také polystyrenová pryskyřice. Pro syntézu *N*-nesubstituovaných karboxamidů byla využita Rinkova pryskyřice. V prvním kroku dochází k acylaci amino skupiny pevného nosiče 1-methyl-2-aminotereftalátem pomocí *in situ* vytvořeným benzotriazolovým esterem (HOBt esterem), následuje převedení methyl esteru na volnou karboxylovou skupinu působením kalium trimethylasilanolátu (TMSOK) a esterifikace vhodným bromoketonem za vzniku intermediátu **XXIV**. Samotná cyklizace probíhá až po odštěpení z pryskyřice za varu v kyselině trifluoroctové (TFA) (Schéma 6).¹⁵



Reakční podmínky: (i) DIC, HOBt, DMF, DCM, on; (ii) TMSOK, THF, 7h; (iii) bromoketon, TEA, DMF, 2 h; (iv) 50% TFA v DCM, 30 min; (v) TFA, 80°C, 2 h.

Schéma 6

N-substituované karboxamidy byly připraveny na aminomethylenové pryskyřici, na kterou byl navázán kyselé labilní linker BAL (4-(4-formyl-3-methoxyfenoxy)butanová kyselina. Na vzniklou aldehydickou skupinu byly reaktivní aminací imobilizovány různé aminy, které tímto tvořily substituent na konečné karboxamidové skupině. Další reakční sekvence kopíruje syntézu na Rinkově pryskyřici (Schéma 7).¹⁵

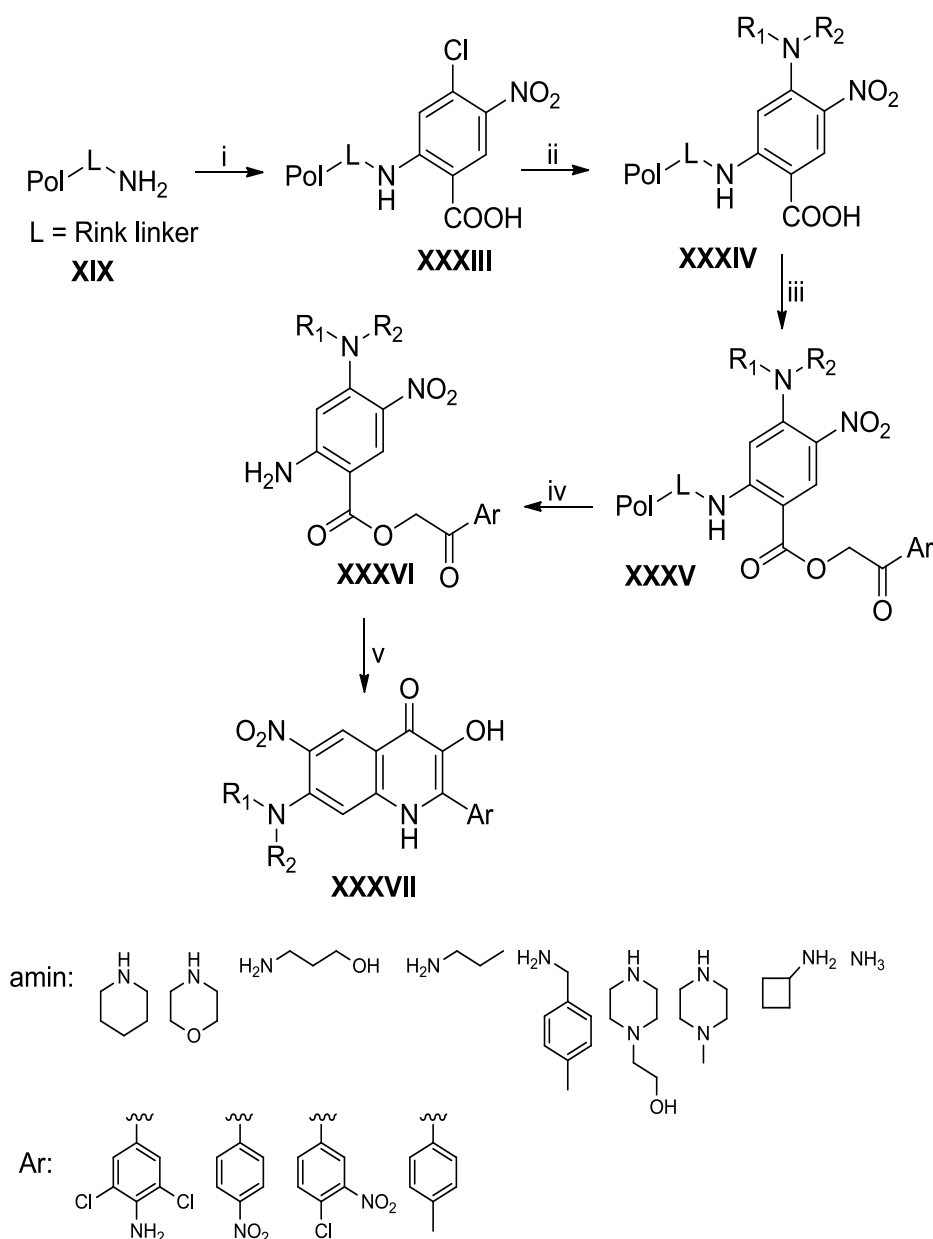


Reakční podmínky: (i) primární amin, 10% AcOH v DMF, on; (ii) NaBH(OAc)₃, 5 h; (iii) 1-methyl-2-aminotereftalová kyselina, DIC, HOBT, DMF, DCM, on; (iv) TMSOK, THF, 7 h; bromoketon, TEA, DMF, 2 h; (v) 50% TFA v DCM, 30 min; (vi) TFA, 80°C, 2 h.

Schéma 7

Vývoj solid phase metody pro přípravu hydroxychinolonů vedl k rozvoji těchto sloučenin a podrobnému studiu širokého spektra derivátů obsahující hydroxychinolonový skelet. Další výzkum hydroxychinolonů je zaměřen na syntézu 2-substituovaných-3-hydroxy-4(1*H*)-chinolonů obsahující 2 diverzní místa. Strategie

syntézy je založena na navázání vysoce diverzního „building blocku“ 4-chlor-2-fluor-5-nitrobenzoové kyseliny na Rinkovu pryskyřici. Následně dochází k substituci atomu chloru vhodným aminem a esterifikaci bromoketonem. Působením kyseliny trifluoroctové je cílový intermediát **XXXVI** odštěpen z pryskyřice. Samotná cyklizace závisí na substituentu v poloze 2 a probíhá za varu v kyselině trifluoroctové, octové nebo sírové (Schéma 8).¹⁶

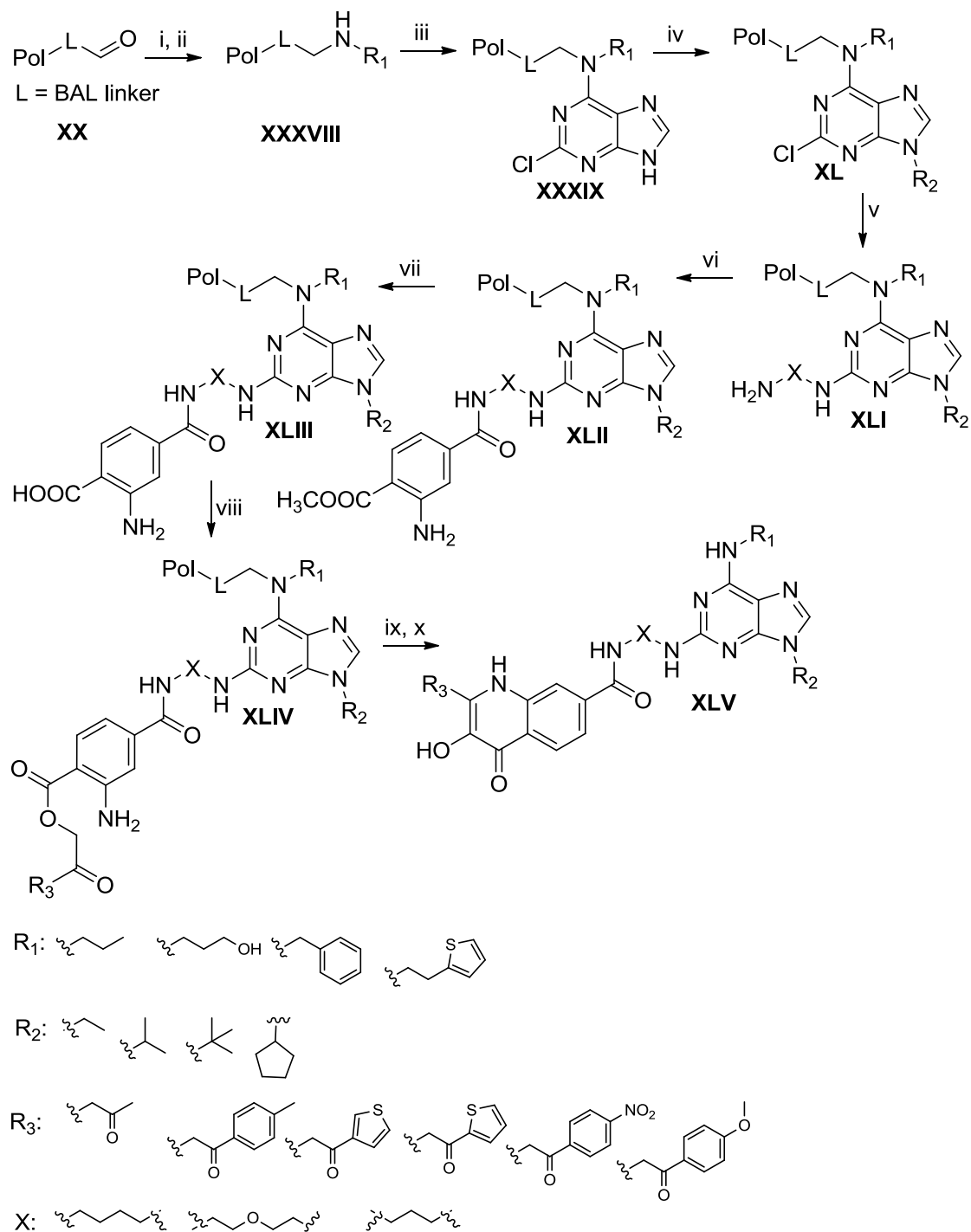


Reakční podmínky: (i) 4-chlor-2-fluor-5-nitrobenzoová kyselina, DMSO, EDIPA, 50°C, on; (ii) amin, DMSO, (EDIPA), 120°C, on; (iii) bromoketon, TEA, DMF, RT, 3-48 h; (iv) TFA, DCM, RT, 30 min; (v) H₂SO₄, 100°C, 2 h nebo TFA, RT, 2-8 h nebo AcOH, RT, 14 h.

Schéma 8

Mezi další studované deriváty hydroxychinolonu patří bisheterocyklické struktury založené na kombinaci purinu a hydroxychinolonu. Bisheterocyklické sloučeniny mohou být imobilizovány na pevnou fázi dvěma základními způsoby. První způsob spočívá v připojení celého systému přes jeden z heterocyklů, který je poté pevně spojen přes tzv. spacer o různé délce či struktuře s heterocyklem. Druhá možnost využívá připojení přes spacer pevně spojující oba heterocykly.¹⁷

Syntéza výše zmíněných derivátů byla opět provedena na aminomethylenové pryskyřici s navázaným BAL linkerem. V prvním kroku byl imobilizován vhodný primární amin, který byl následně regioselektivně arylován 2,6-dichlorpurinem. V dalším kroku byl purinový skelet modifikován alkylací v pozici *N*9 a substitucí chloru v poloze 2 diaminovým spacerem, který je zároveň spojující část mezi oběma heterocykly. Další reakční sekvence aplikuje metodu přípravy hydroxychinolonů na pevné fázi. Syntéza poskytuje dobré výtěžky a připravené látky mají čistotu od 65-99%. Díky spojení 3-hydroxychinolonového a purinového kruhu se u těchto látek očekává značná biologická aktivita (Schéma 9).¹⁸



Reakční podmínky: (i) primární amin, 10% AcOH v DMF, on; (ii) NaBH(OAc)₃, 4 h; (iii) 2,6-dichlorpurin, EDIPA, THF, 50°C, on; (iv) alkyljodid, DBU, DMSO, 50°C, on; (v) diamin, diethylether diethylenglykolu, 150°C, 24 h; (vi) 1-methyl-2-aminotereftalát, DIC, HOBt, DMF, DCM, on; (vii) TMSOK, THF, 24 h; (viii) haloketon, EDIPA, DMF, 2 h; (ix) TFA, DCM, 30 min; (x) AcOH, RT, 3 h nebo TFA, RT, 2 h.

Schéma 9

3.3 Vlastnosti 2-substituovaných-3-hydroxy-4(1H)-chinolonů

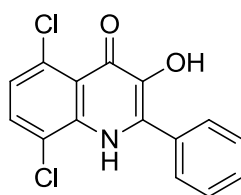
Jak již bylo zmíněno v úvodu hydroxychinolony vykazují významnou biologickou aktivitu a fluorescenční vlastnosti.

3.3.1 Biologická aktivita

U 2-substituovaných 3-hydroxy-4(1H)-chinolonů se projevuje biologická aktivita především inhibicí enzymů. Zatím prokázaný inhibiční účinek mají u topoizomerázy II, gyrázy nebo inosin monofosfát dehydrogenázy dále vykazují aktivitu cytotoxickou a antibakteriální či protozoální.

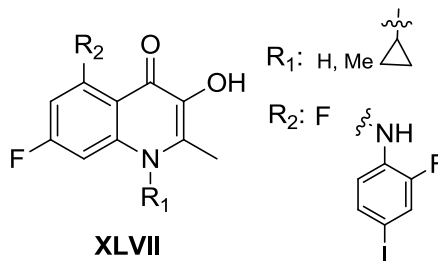
Cytotoxická aktivita

Při testování biologické aktivity vybraných dichlorderivátů hydroxychinolonů poskytl nejlepší výsledky 5,8-dichlor-2-fenyl-3-hydroxychinolon (**XLVI**), který vykazuje účinnost proti rakovině prsu, vaječníku, ledvin, melanomu i testované linii leukémie.¹⁹



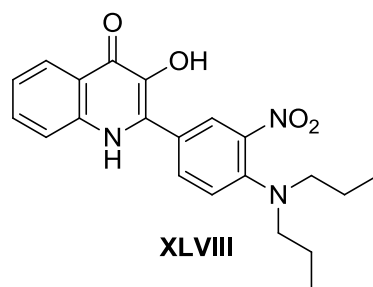
XLVI

Sloučeniny struktury **XLVII** již při nízkých koncentracích inhibují MEK-1 proteinkynázu. Tento enzym patří do signální dráhy ovlivňující růst, odlišení a reakci na stres v buňce. Proto jsou potenciálně použitelné při léčbě rakoviny, pankreatitidy, onemocnění ledvin a astmatu.²⁰

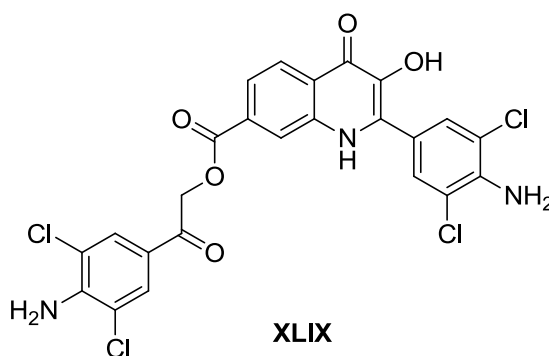


XLVII

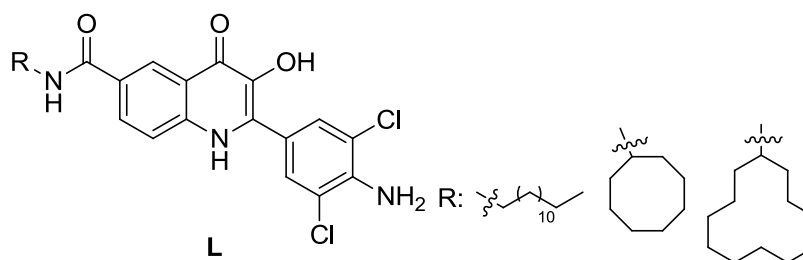
Studium látek se strukturou **XLVIII** vykazuje cytotoxickou aktivitu již při nízkých až submikromolárních koncentracích. Není bez povšimnutí, že tuto aktivitu vykazují jen látky s kombinací nitro a amino skupiny na 2-fenyl substituentu a současně s hydrofobními substituenty na amino skupině. Nejlepší výsledky ukázal 2-(4-(dipropylamino)-3-nitrofenyl)-3-hydroxychinolin-4(1H)-on (**XLVIII**).²¹ Látky s obdobnou strukturou mají i antibakteriální aktivitu.²²



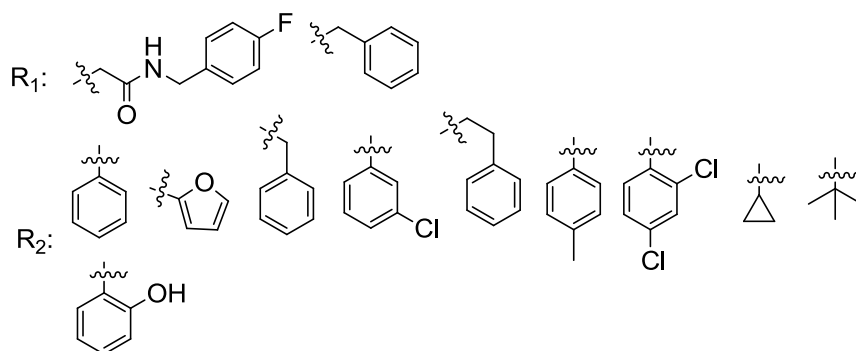
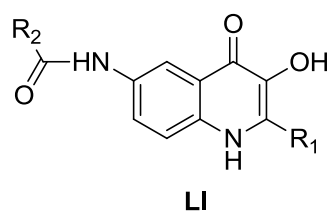
Karboxychinolony a estery karboxychinolonů působí proti multirezistentním nádorům a tím mohou poskytnout výjimečný léčebný přínos při chemoterapii pacientů s rezistentním typem rakoviny. Nejlepší výsledky při testování biologické aktivity poskytují 2-(4-amino-3,5-dichlorofenyl)-2-oxoethyl 2-(4-amino-3,5-dichlorofenyl)-3-hydroxy-4-oxo-1,4-dihydrochinolin-7-karboxylát (**XLIX**).²³



Zajímavé biologické vlastnosti mají i substituované amidy, především lipofilní *N*-substituované amidy. Látky se strukturou **L** mají nejmenší hodnotu IC₅₀ při testování proti lymfoblastické a myeloidní leukémii.²⁴

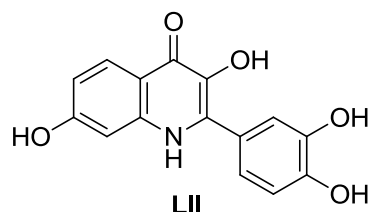


Látky struktury **LI** se ukázaly jako dobré inhibitory HL-60 (*Human promyelocytic leukemia cells*) buněčné linie a jsou potenciálně použitelné při léčbě leukémie.⁵

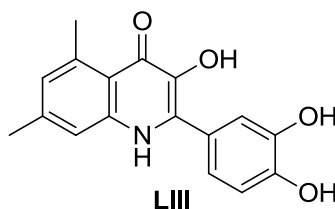


Antivirotická aktivita

Velmi dobré výsledky při testování biologické aktivity poskytl 7-hydroxy-2-(3,4-dihydroxyfenyl)-3-hydroxy- 4(1*H*)-chinolon (**LII**), který se ukázal jako účinný inhibitor topoizomerázy II katalyzující topologickou přeměnu molekul DNA, nutnou pro základní procesy v metabolismu DNA, včetně replikace, rekombinace a transkripce.²⁵



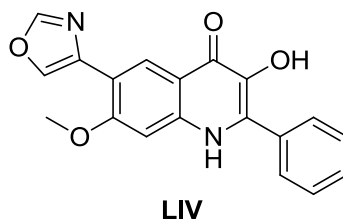
Při replikaci DNA se kromě topoizomeráz uplatňují i gyrázy napomáhající rozvolňování a zřetězení DNA. Proto bylo nutné najít sloučeninu inhibující oba enzymy. Struktura s dobrou schopností inhibovat oba enzymy je 2-(3,4-dihydroxyfenyl)-3-hydroxy-5,7-dimethyl-4(1*H*).chinolon (**LIII**).²⁶



Inhibice IMPDH

Deriváty hydroxychinolonů s oxazolinovým kruhem v poloze 6 inhibují inosin monofosfát dehydrogenázu (IMPDH). Tento enzym je klíčový pro *de novo* syntézu purinových bázi. Praktické využití má 2-fenyl-7-methoxy-6-(oxazol-4-yl)-3-hydroxy-

4(1*H*)-chinolon (**LIV**) používaný jako imunosupresivum v případě odmítnutí dárcovského orgánu.²⁶

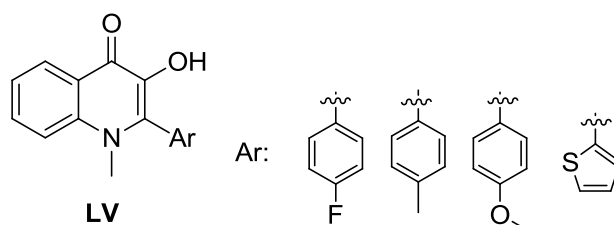


3.3.2 Fluorescenční vlastnosti

Kromě značné biologické aktivity mají hydroxychinolony i fluorescenční vlastnosti, které se využívají při buněčných a tkáňových studiích. U 2-substituovaných-3-hydroxy-4(1*H*)-chinolonů můžeme pozorovat dva oddělené fluorescenční emisní pásy, jejichž intenzita se však liší. Pásy jsou způsobeny intermolekulárním přenosem protonu v excitovaném stavu (ESIPT).

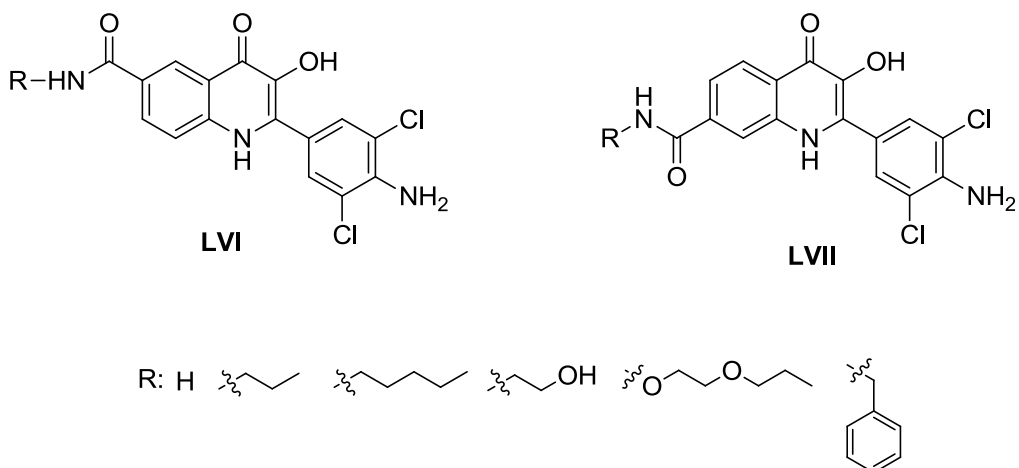
Závislost fluorescenčních vlastností na polaritě biosystému

N-methyl-2-substituované-3-hydroxy-4(1*H*)-chinolony (**LV**) mají výrazné solvatochromické vlastnosti v poměrně širokém rozsahu polarit. V důsledku toho se jeví jako perspektivní fluorescenční sondy citlivé na polaritu nukleových kyselin a proteinů.²⁷

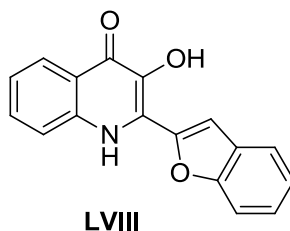


Závislost fluorescenčních vlastností na pH biosystému

Zanedbatelné nejsou ani fluorescenční vlastnosti *N*-substituovaných karboxamidů-3-hydroxy-4(1*H*)-chinolonu. Kvantový výtěžek je závislý na pozici karboxamidu na hydroxychinolonu a klesá v pořadí dle pozic 7, 6 a 8. U látek se strukturou **LVI** a **LVII** se projevila změna pH změnou fluorescenčních spekter. S rostoucím pH poklesá poměr obou fluorescenčních maxim.²⁸

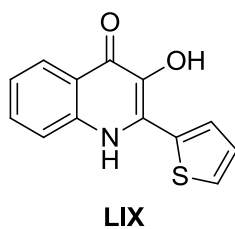


2-benzofuryl-3-hydroxyquinolony (**LVIII**) mají díky zcela rovinné konformaci vysoké kvantové výtěžky. Spektrální vlastnosti 2-benzofuryl-3-hydroxyquinolonů jsou citlivé na bazicitu, přičemž nehraje roli polarita rozpouštědla. Silná citlivost na bazické prostředí vyplývá z narušení vodíkové vazby, čímž je zabráněno v ESIPT reakci. Míra bazicity hraje důležitou roli v bílkovinách a lipidových membránách. Látka se strukturou **LVIII** se jeví jako potenciální značky pro stadium mezimolekulárních interakcí v lipidových membránách a proteinech.²⁹



Závislost fluorescenčních vlastností na viskozitě v biosystémech

Viskozita je základní parametr v biologických systémech. Proto jsou hledány látky, které mohou měřit viskozitu přímo v buňkách. Jako velmi zajímavá se ukázala závislost inhibice ESIPT reakce na viskozitě. Tato vlastnost se projevuje v protických rozpouštědlech. Struktura (**LIX**) může mít potenciální využití jako sonda pro měření viskozity.³⁰



Studium interakcí v biosystémech založené na fluorescenčních vlastnostech

Jako řada jiných 3-hydroxy-4(1*H*)-chinolonů má i 1,2-dimethyl-3-hydroxychinolon (**LX**) dva fluorescenční pásy. Při [3+2]fotocykloadici s elektronově bohatými nukleofily (Schéma 10) dochází k zhášení fluorescence. Nukleofily se silnou schopností zhášet fluorescenci jsou látky **LXI** až **LXV**. Tato reakce může být potencionálně použita pro studium interakcí v biosystémech.³¹

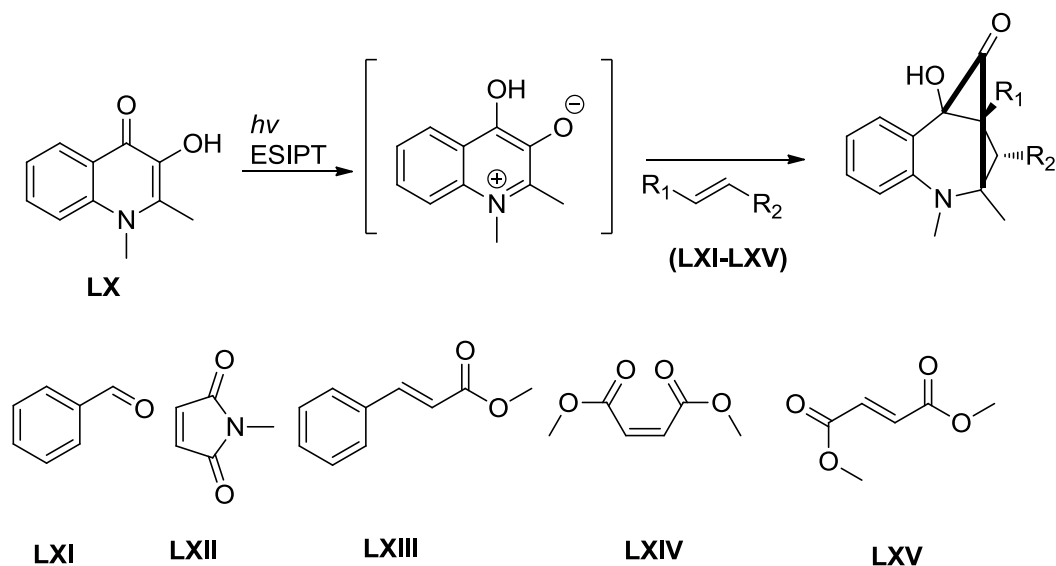
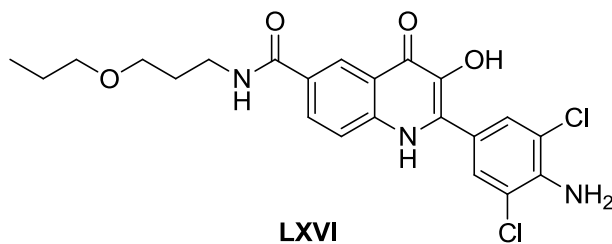
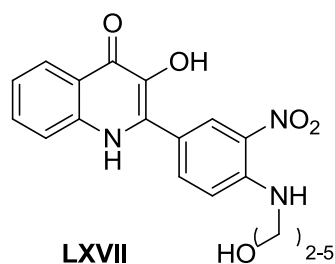


Schéma 10

Dále byl bližšímu zkoumání podroben 2-(4-amino-3,5-dichlorofenyl)-3-hydroxy-4-oxo-*N*-(2-propoxyethoxy)-1,4-dihydrochinolon-6-karboxamid (**LXVI**), který v širokém rozsahu polarity prostředí nemění fluorescenční vlastnosti. Látka **LXVI** a její izomer s karboxamidovou skupinou v poloze 7 se mohou teoreticky připojit k biomolekule přes spacer při zachování obou emisních pásů.²⁸

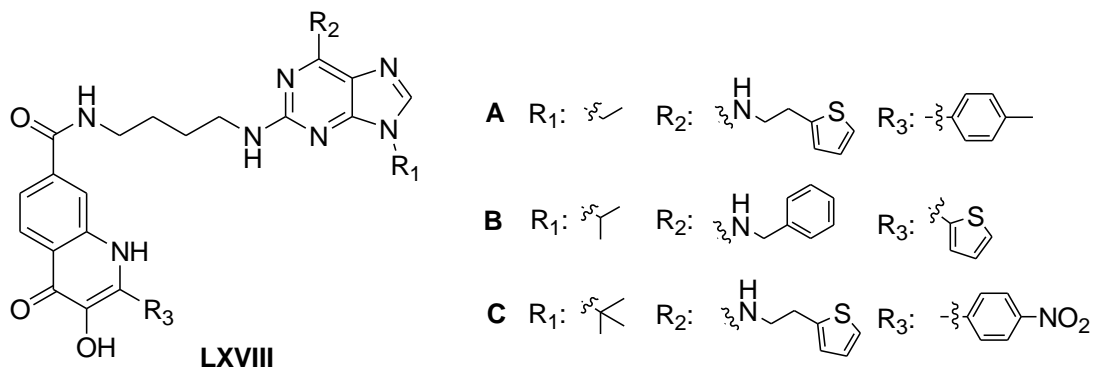


Následné studie se zabývají navazováním 2-substituovaného-3-hydroxy-4(1*H*)-chinolonu do biomolekuly přes reaktivní místo. Sloučeniny s nejvyššími kvantovými výtěžky mají strukturu **LXVII**. S prodlužováním alkylaminového řetězce se výrazně snižují hodnoty kvantového výtěžku.³²



3.4 Vlastnosti bisheterocyklických sloučenin purinu a hydroxychinolonu

Předložená bakalářská práce navazuje na výzkum v oblasti bisheterocyklických sloučenin hydroxychinolonů vázaných na nukleovou bázi, konkrétně purin. Biologické testování těchto látek poskytlo tři významné strukturální „hity“, které vykazují submikromolární aktivitu na buňkách s akutní lymfoblastickou leukémií. Derivát **LXVIII B** zároveň vyazuje submikromolární aktivitu i na buňkách chronické myeloidní leukémie.³³ Testované sloučeniny však vykazují velkou diverzitu a je nutné připravit širší knihovnu látek pro další biologický screening.



Bisheterocyklické sloučeniny hydroxychinolonů byly také podrobeny testování fluorescenčních vlastností. Oproti 2-substituovaným hydroxychinolonům vykazovaly excitaci v širším rozmezí vlnových délek a některé deriváty mohou být excitovány i v relativně vysoké vlnové délce okolo 400 nm, tedy ve viditelné oblasti světla. Současně byla měřena fluorescenční aktivita v závislosti na použitém rozpouštědle. Nejvyšší kvantový výtěžek poskytují látky při měření v DMSO, naopak přidavek vody snižuje kvantový výtěžek fluorescence.³⁴ Stejně jako v oblasti biologické aktivity bude probíhat další výzkum fluorescenčních vlastností na širším spektru látek.

4 Výsledky a diskuze

Bakalářská práce byla založena na syntéze bisheterocyklických sloučenin obsahující derivát purinu a 3-hydroxy-4(1*H*)chinolonu spojené pomocí vhodného spaceru. Cílem práce bylo syntetizovat strukturu, kde 3-hydroxy-4(1*H*)chinolon bude spojen s 2,6,9-modifikovaným purinem přes alkylaminoskupinu v poloze 6 purinového jádra. Cílové deriváty **11** by měly obsahovat 4 diverzní místa: 2 diverzní místa na purinovém skeletu, 1 diverzní místo ve struktuře chinolonu a posledním diverzní prvek by představoval spacer o různé délce/struktuře mezi oběma heterocykly.

4.1 Strategie č. 1: Příprava a imobilizace *N*-(2-chlor-9*H*-purin-6yl)propan-1,3-diaminu

Navržená syntéza byla založena na kombinaci klasické chemické syntézy v roztoku, kde byly připraveny výchozí intermediáty, které následně sloužily jako základ syntézy na pevné fázi.

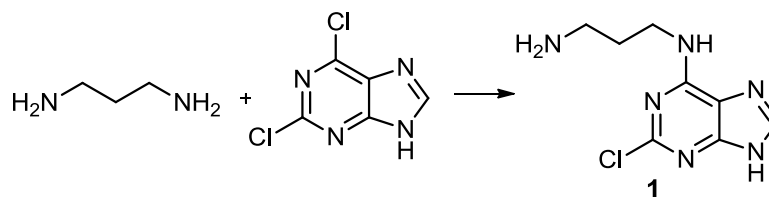


Schéma 11

Prvním krokem sekvence měla být příprava výchozí látky **1** v roztoku (Schéma 11), která by následně byla navázána pomocí reduktivní aminace primárního aminu na aminomethylenovou pryskyřici s kyselé labilním linkerem (BAL). Vzniklý sekundární amin by byl poté acylován 1-methyl-2-nitrotetralátem. V dalším kroku by docházelo k alkylationi pozice *N*9 a nukleofilní substituci atomu chloru vhodným aminem v pozici 2 purinového kruhu. Syntéza chinolonového skeletu by byla založena na redukcí nitroskupiny, saponifikaci methylesteru a následné esterifikaci vhodným bromoketonem. Finální cyklizace by byla provedena již po odštěpení z pryskyřice v kyselině trifluoroctové či octové (Schéma 12).

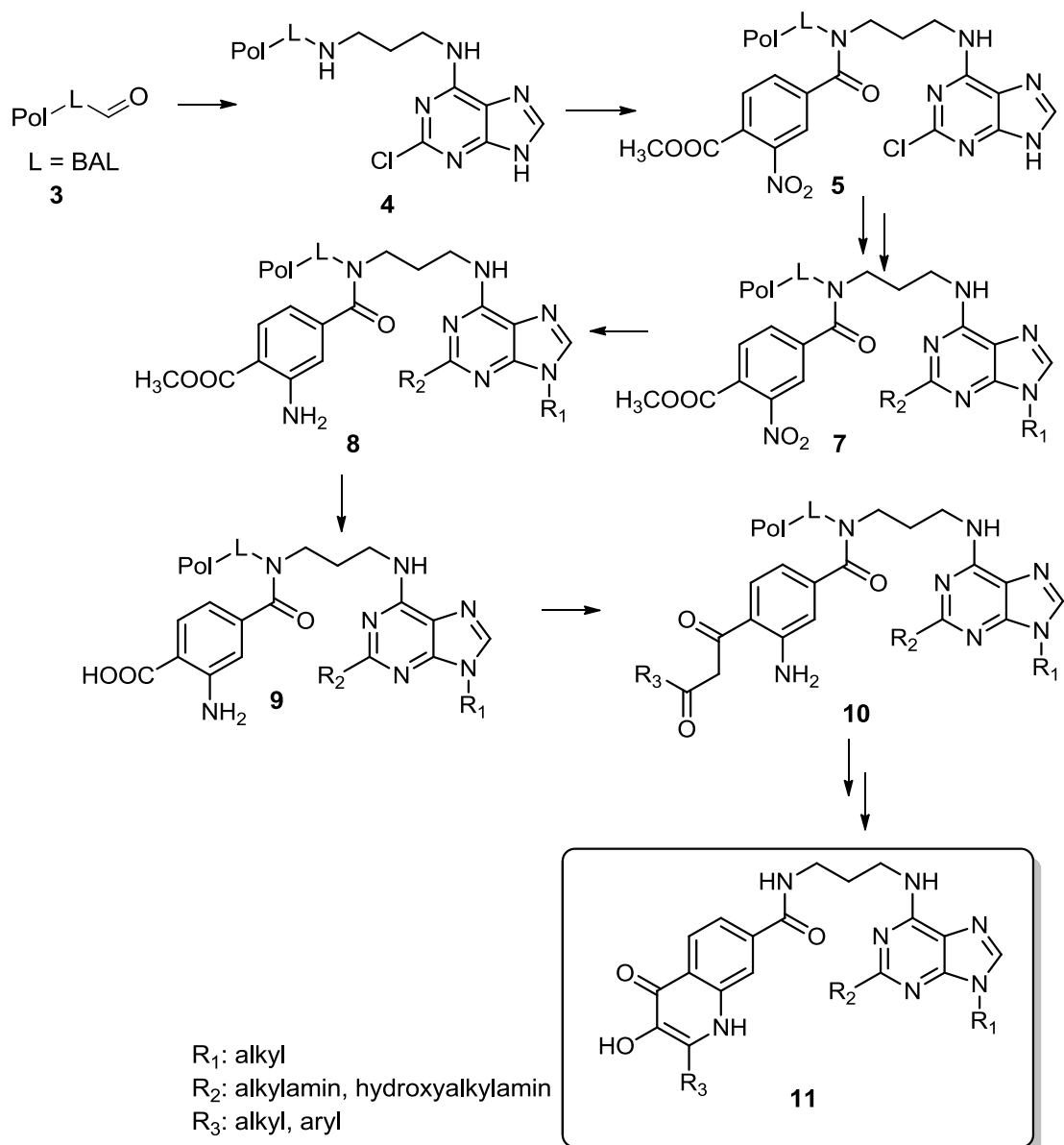


Schéma 12

4.1.1 Syntéza výchozích látek pomocí chemie v roztoku

Prvním stupněm syntézy byla příprava výchozího intermediátu obsahující spacer, konkrétně propan-1,3-diamin vázaný na purinový skelet v poloze 6. Reakce 2,6-dichlorpurinu s 1.5 ekv. propan-1,3-diaminu v *n*-butanolu při 120°C vedla k *N*-(2-chlor-9*H*-purin-6yl)propan-1,3-diaminu (**1**) (Schéma 13). Již po 30 minutách docházelo k zreagování převážné většiny výchozí látky, avšak úplné konverze bylo dosaženo až po 3 hodinách. Vznikající produkt **1** byl v reakční směsi *n*-butanolu nerozpustný a srážel se již v průběhu reakce. Izolace byla provedena jednoduchou filtrací. Získaná pevná látka obsahovala 80% požadovaného produktu a 20% vedlejší látky **2**, který s ohledem na nereaktivitu s aldehydickou skupinou v dalším kroku sekvence nebylo nutné

odstranit. Směs látek **1** a **2** byla značně nerozpustná ve vodě, jen částečně rozpustná v dimethylformamidu (DMF), *N*-methylpyrrolidonu (NMP) a methanolu (MeOH). Nerozpustnost látky **1** znesnadňovala následné navázání na aminomethylenovou pryskyřici s BAL linkerem. Příprava výchozí látky byla následně testována s 2 a 4 ekv. propan-1,3-diaminu, který reagoval s uvolňujícím se chlorovodíkem za vzniku propan-1,3-diamin dihydrochloridu. Rozpustnost látky **1** se ani v jednom z případů nezvýšila. Pro další postup byly proto opět zvoleny výchozí podmínky a současně byly k reakční směsi přidány 2 ekv. diisopropylethylaminu (EDIPA), u něhož se očekávala vyšší afinita k chlorovodíku. Překvapivě zde docházelo přednostně ke vzniku vedlejší látky **2**. Reakce byla provedena i za nižší teploty (80°C) v ethanolu. V tomto případě byla reakce provedena za stejných podmínek jako v *n*-butanolu s 1.5 ekv. propan-1,3-diaminu. Opět byly v LC-MS detekovány 2 látky, izolovaný produkt obsahoval 60% látky **1** a 40% bisderivátu **2**. Ani v tomto případě se rozpustnost směsi látek **1** a **2** nezvýšila, přesto byla testována další reakce v sekvenci.

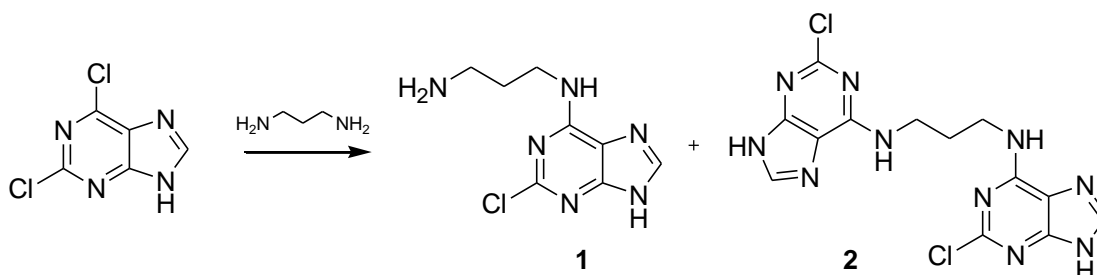


Schéma 13

4.1.2 Solid-phase syntéza

Prvním krokem syntézy na pevné fázi byla acylace aminomethylenové pryskyřice s 4-(4-formyl-3-methoxyfenoxy)butanovou kyselinou (BAL linker) pomocí *in situ* připraveného benzotriazolového esteru (HOBt ester). Tento ester byl připraven z (4-(4-formyl-3-methoxyfenoxy)butanové kyseliny, 1-hydroxybenzotriazolu (HOBt) a *N,N*-diisopropylcarbodiimidu (DIC) ve směsi dichlormethanu (DCM) a dimethylformamidu (DMF) v poměru 1:1. Reakce probíhala za laboratorní teploty přes noc (Schéma 14). Kvantitativní průběh reakce byl ověřen testem s bromfenolovou modří.

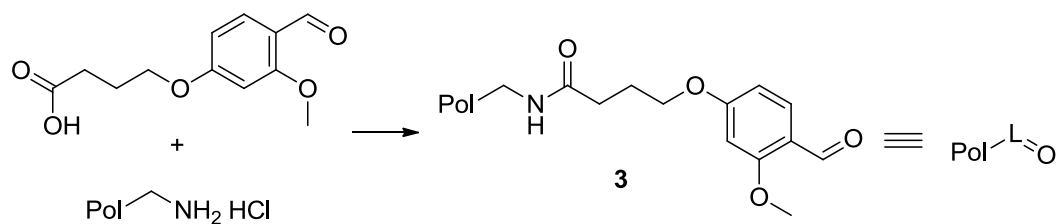


Schéma 14

Následujícím krokem syntézy bylo ukotvení *N*-(2-chlor-9*H*-purin-6-yl)propan-1,3-diaminu (**1**) na pevnou fázi pomocí reduktivní aminace (Schéma 15). Reakce probíhala ve dvou krocích, v prvním kroku docházelo ke vzniku iminu, který byl následně redukován pomocí tri(acetoxy)borohydridu sodného.

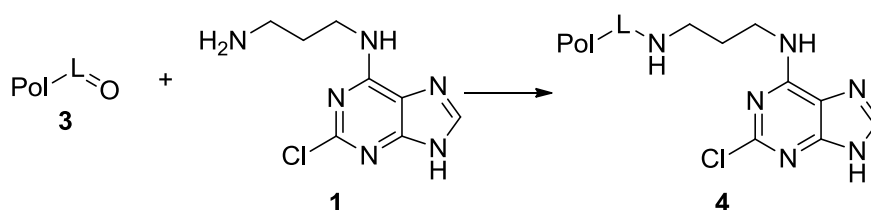


Schéma 15

5 ekv. látky **1** bylo za horka rozpuštěno v suchém NMP, po přidání kyseliny octové (AcOH) (za vzniku 10% roztoku) byl výsledný reakční roztok přidán k aminomethylenové pryskyřici s BAL linkerem. Druhý den následoval další krok, kde byl k reakční směsi přidán 5% roztok AcOH v suchém NMP a ve třech dávkách tri(acetoxy)borohydrid sodný (2 ekv.; 0.88 mol). Reakce byla ukončena po 4 hodinách a výsledný produkt byl kvantifikován reakcí s FmocOSu. Pomocí LC-MS analýzy byly detekovány velmi nízké hodnoty koncentrace imobilizovaného produktu **4** a výpočet loadingu potvrdil nedostatečné navázání výchozí látky na pevný nosič. Pro zvýšení rozpustnosti výchozí látky byla reakce otestována v DMF v přítomnosti AcOH nebo směsi AcOH/TFA. Nepodařilo se však kvantitativně navázat látku **1** na pevnou fázi. Použití pryskyřice **4** bylo pro další preparativní experimenty neakceptovatelné, avšak spolehlivě postačila k prvotnímu studiu další reaktivity aktivních center.

Dále byly testovány alkylace polohy *N*9 purinu, acylace s 1-methyl-2-nitroterefalátem, následná redukce nitroskupiny a saponifikace methyl esteru (Schéma 16). Konkrétní podmínky jsou pro jednoduchost textu uvedeny dále.

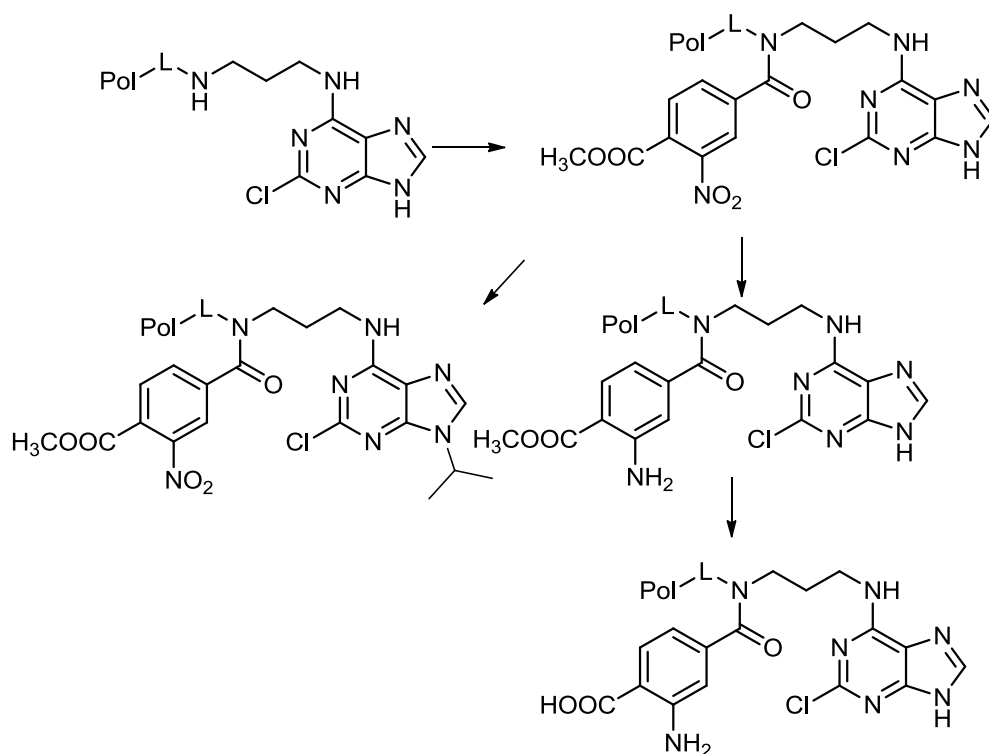


Schéma 16

4.2 Strategie č. 2: Příprava methyl-4-((1,3-diaminopropyl)karbamoyl)-2-nitrooxybenzoátu

Z důvodů nízké rozpustnosti výchozí látky **1** a nemožnosti kvantitativního navázání na pevnou fázi byla změněna strategie syntézy. V prvním kroku by probíhala reakce v roztoku mezi 1-methyl-2-nitroteraftalátem a propan-1,3-diaminem. Výsledný produkt by byl posléze reduktivní aminací navázán na aminomethylenovou pryskyřici s BAL linkerem. Po substituci 2,6-dichlorpurinem by byl postup syntézy totožný s první navrženou strategií syntézy (Schéma 17).

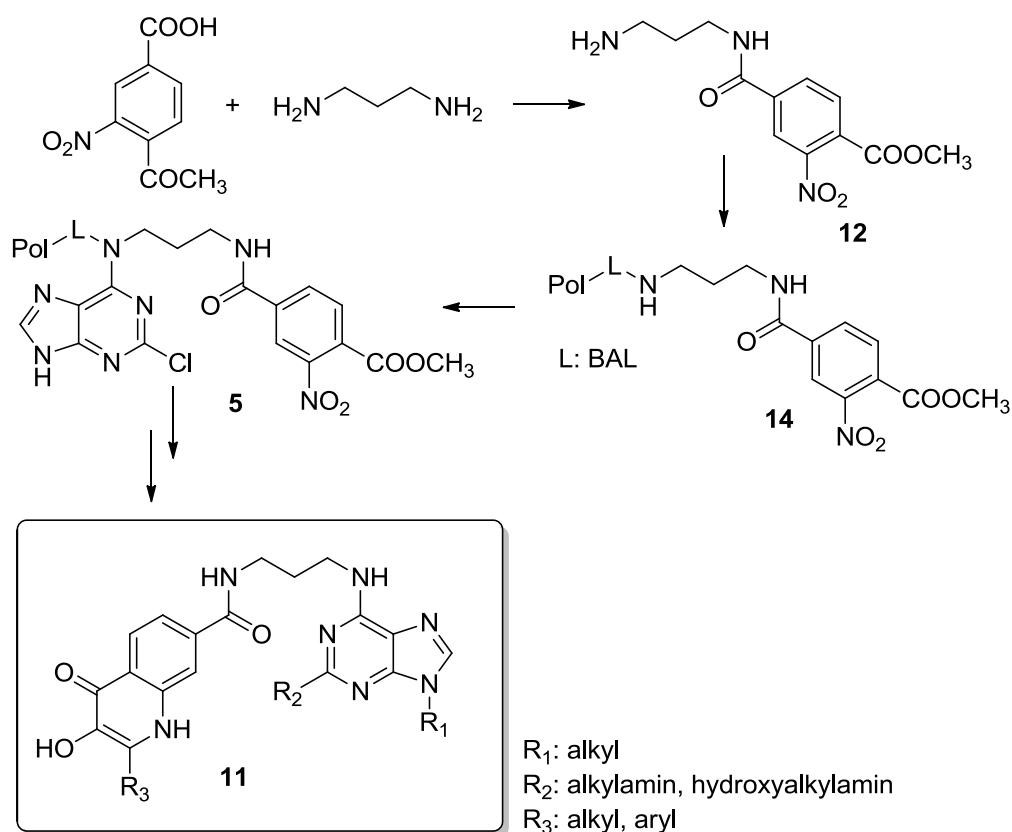


Schéma 17

4.2.1 Syntéza výchozích látek pomocí chemie v roztoku

Příprava methyl-4-((1,3-diaminopropyl)karbamoyl)-2-nitrooxybenzoátu (**12**) byla založena na acylaci nadbytku propan-1,3-diaminu (5 ekv.) s *in situ* připraveným HOBt esterem 1-methyl-2-nitroterefalátu za laboratorní teploty. Průběh reakce byl kontrolován pomocí TLC. Po hodině již nebyla detekována žádná výchozí látka. Avšak LC-MS analýzou bylo zjištěno, že reakční směs obsahuje pouze 19% 1-methyl-4-((1,3-diaminopropyl)karbamoyl)-2-nitrooxybenzoátu (**12**) a 80% dimerního produktu **13** (Schéma 18). Reakce byla provedena i při 50°C a 0°C. Při zahřívání reakčního roztoku vznikal jen produkt **13**. Avšak ani zpomalení acylace chlazením reakční směsi neposkytovalo čistý produkt. Opět bylo detekováno jen 16% látky **12** a zbývajících 84% tvořila vedlejší látka **13**. Tato metoda nevedla k požadovanému intermediátu, a proto jsme od ní upustily.

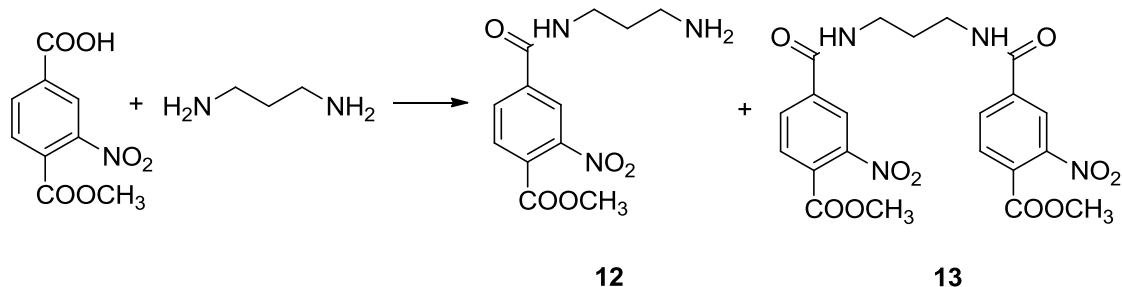


Schéma 18

4.3 Strategie č. 3: Využití *N*-(3-Amino-propyl)-2-nitro-benzen sulfonamidu.

S ohledem na nízkou rozpustnost látky **1** a neselektivní reaktivitu 1-methyl-2-nitrotereftalátu pro přípravu produktu **12** byla opět změněna strategie syntézy. Další alternativa byla založena na přípravě *N*-(3-aminopropyl)-2-nitrobenzensulfonamidu (**15**) v roztoku, který by byl následně imobilizován na aminomethylenové pryskyřici s BAL linkerem (Schéma 19).

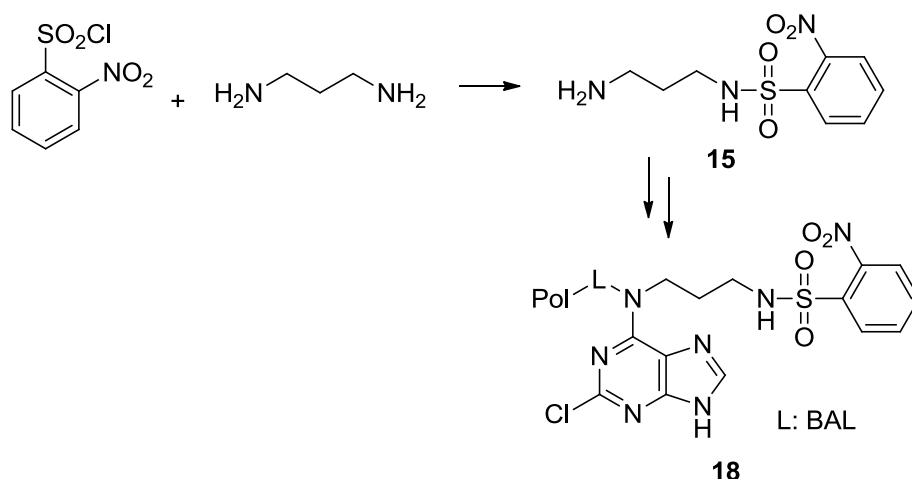
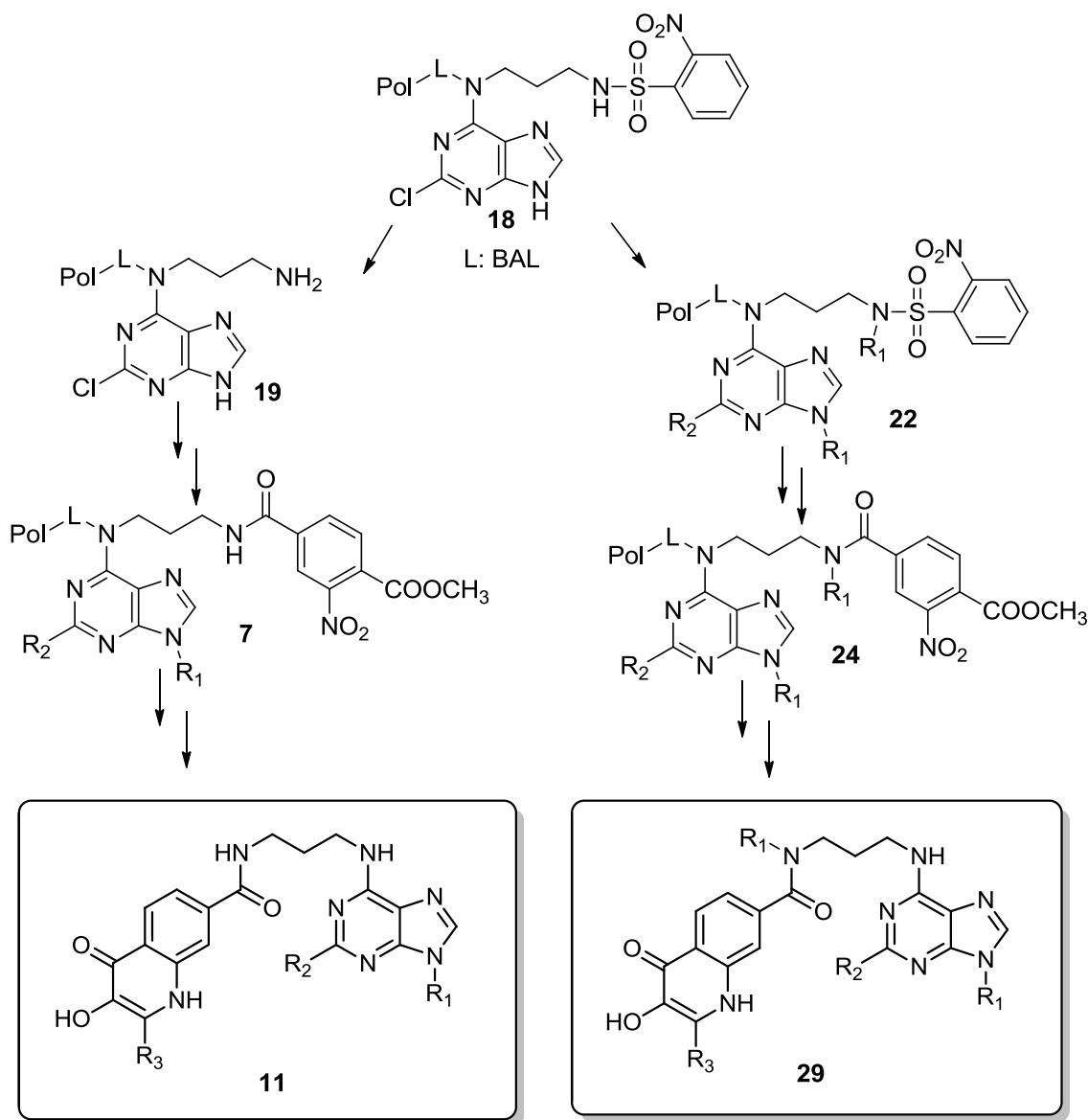


Schéma 19

Poté by následovala substituce 2,6-dichlorpurinem a rozdělení sekvence na dva směry. V prvním směru by syntéza pokračovala deprotekcí 2-nitrosulfonylové skupiny, acylací 1-methyl-2-nitrotereftalátem a dále alkyací pozice *N*9 purinu, substitucí chloru v poloze C2, redukcí, saponifikací, reakcí s bromacetofenonem a konečnou cyklizací na finální produkt **11** (Schéma 20). Při druhém směru by byl alkylován již derivát **18**, čímž by docházelo ke zvýšení diverzity molekuly. Alkylace by pak neprobíhala jen v poloze *N*9 purinu, ale i na 2-nosyl aktivované amino skupině spaceru. Alkylovaný produkt **22** by byl následně denosylován a sekvence by pokračovala podle výše zmíněného postupu (Schéma 20).



R₁: alkyl
R₂: alkylamin, hydroxyalkylamin
R₃: alkyl, aryl

Schéma 20

4.3.1 Syntéza výchozích látek pomocí chemie v roztoku

Prvním krokem syntézy byla příprava *N*-(3-aminopropyl)-2-nitrobenzensulfonamidu (**15**).³⁵ Již popsáný postup přípravy látky **15** je založen na substituci chloridového atomu 2-nitrobenzensulfonylchloridu (2-NosCl) za dusíkový atom propan-1,3-diamin, který je v nadbytku. Reakce probíhá v prostředí DCM při – 5°C, přičemž roztok 2-nitrobenzensulfonylchloridu byl přidáván k roztoku propan-1,3-diaminu po dobu 45 minut. Reakce byla sledována pomocí TLC. Po dvou hodinách došlo k úplnému zreagování 2-nitrobenzensulfonylchloridu a reakce byla ukončena.

Výsledný reakční roztok obsahoval směs tří látek – požadovaný produkt **15**, bis-derivát **16** a nadbytečný propan-1,3-diamin (Schéma 21). Bis-substituovaný derivát byl částečně nerozpustný v DCM a byl odstraněn jednoduchou filtrací. Konečná izolace produktu **15** byla provedena pomocí kapalinové chromatografie. Takto byl z reakční směsi odstraněn zbytek látky **16** a především nezreagovaný propan-1,3-diamin. Použitá mobilní fáze vznikla smícháním *iso*-propylalkoholu, amoniaku a destilované vody v poměru 5:1:1. Přečištěný produkt byl identifikován pomocí LC-MS a NMR.

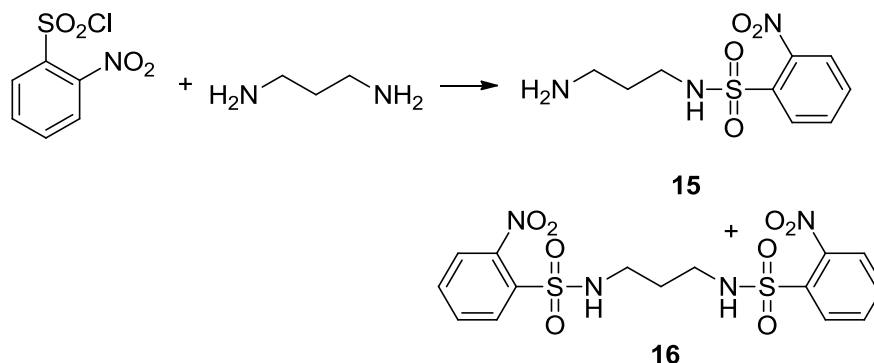


Schéma 21

4.3.2 Solid-phase syntéza

Při následné solid-phase syntéze byla nejprve provedena reduktivní aminace s *N*-(3-aminopropyl)-2-nitrobenzensulfonamidem (**15**) (Schéma 22). Postup byl totožný jako u předchozí reduktivní aminace. Látka **15** byla rozpuštěna v DMF s přídavkem AcOH (10% roztok AcOH v DMF). Vzniklý roztok byl přidán k aminomethylenové pryskyřici s BAL linkerem. Druhý den byl přidán roztok 5% AcOH v DMF a tri(acetoxy)borohydrid sodný ve třech dávkách. Po 4 hodinách byla reakce ukončena, výsledný produkt byl podroben reakci s FmocOSu a výtěžek reakce byl určen pomocí metody vnějšího standardu (Fmoc-Ala-OH). Látka **17** byla získána v kvantitativním výtěžku s loadingem 0.4 mmol/g.

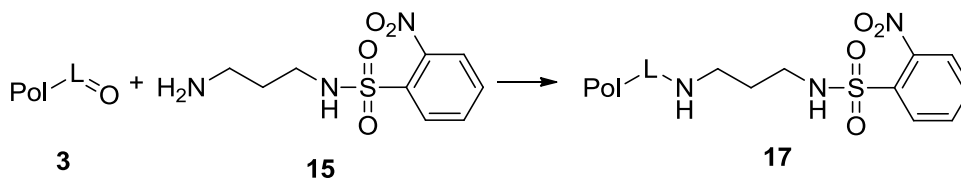


Schéma 22

Následujícím krokem syntézy byla nukleofilní substituce s 2,6-dichlorpurinem (Schéma 23). Reakční směs byla zahřívána na 50°C přes noc. Pokud byl jako rozpouštědlo použit DMSO, byla úspěšnost substituce značně závislá na reakčním čase

a neposkytovala čistý produkt. Proto byla reakce provedena v THF při stejných reakčních podmínkách. V tomto případě vedla reakce vždy k žádanému produktu a to i při větších navázkách. Kvantitativní průběh reakce byl vždy ověřen reakcí s FmocOSu.

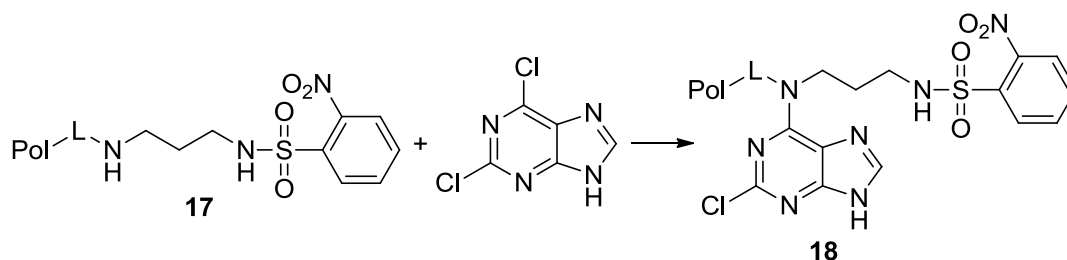


Schéma 23

První směr syntézy: Příprava monoalkylovaných derivátů

Denosylace *N*-(3-((2-chlor-9*H*-purin-6-yl)amino)propyl)benzensulfonamidu byla provedena podle již popsaného postupu.³⁶ Při reakci látky **18** s 0.6 M roztokem 2-merkptoethanolu za přítomnosti 0.2 M roztoku báze 1,8-Diazabicyclo[5.4.0]undec-7-en (DBU) docházelo k odstoupení chránící Nos skupiny. Reakční doba byla 1 hodina. Denosylace byla provedena i s 1 ekv. báze. Takto byla reakční doba zkrácena na 30 minut (Schéma 24).

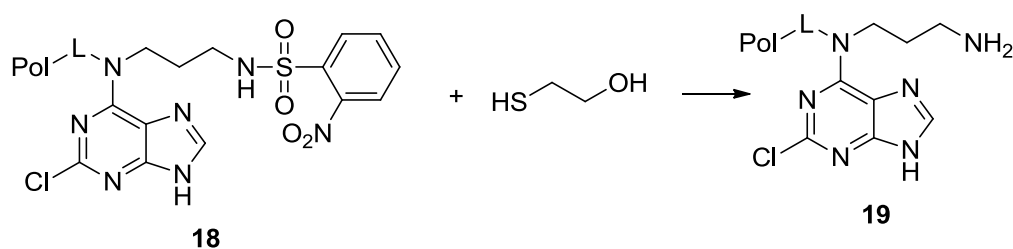


Schéma 24

Příprava 1-methyl-4-((3-((2-chloro-9*H*-purin-6-yl)amino)propyl)karbamoyl)-2-nitrooxybenzoátu (**5**) probíhala přes *in situ* připravený HOBt ester, který vznikl z 1-methyl-2-nitrotereftalové kyseliny, HOBt a DIC ve směsi DMF a DCM přes noc při laboratorní teplotě (Schéma 25).

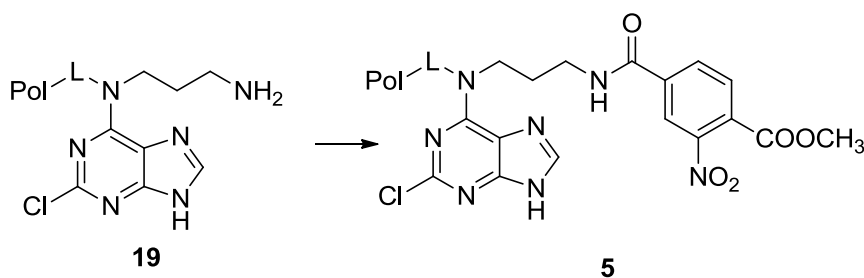


Schéma 25

Pro alkylation látky **5** byl použit alkylid, konkrétně: ethylid, *iso*-propylid a *tert*-butylid. Optimalizace reakčního kroku byla nejprve provedena pro ethylid. K látce **5** byl přidán 0.2 M roztok ethylidu s 2 ekv. DBU v DMSO. Reakce byla zahřívána přes noc při 50°C a poskytovala 80% produktu. Následně bylo nutné alkylation opakovat za stejných podmínek v THF. V případě větších navážek nedocházelo dle LC-MS k úplné konverzi, reakční směs obsahovala 78% výchozí látky. Proto byla reakční teplota zvýšena na 60°C, ale přesto nebyla alkylation kvantitativně dokončena. Čistý produkt **6a** byl obdržen až po zvýšení koncentrace ethylidu na 0.5 M roztok s 2 ekv. DBU při 60°C, nejprve v DMSO a poté v THF za stejných podmínek (Schéma 26).

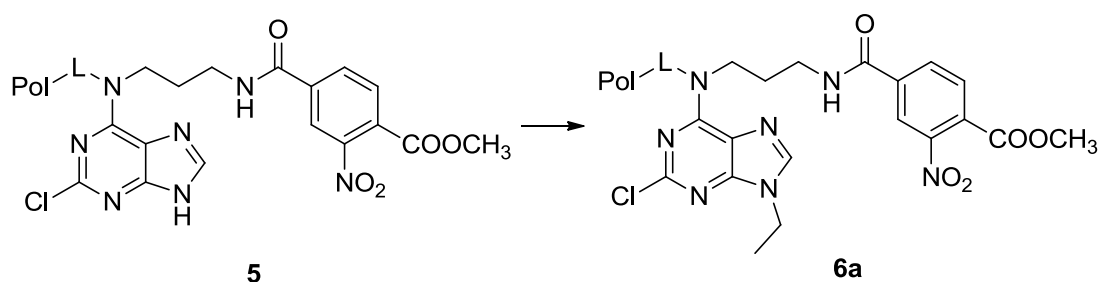


Schéma 26

Stejné reakční podmínky byly použity i pro syntézu *iso*-propyl a *tert*-butyl derivátů. Ani v jednom případě se neukázaly jako vhodné. Vedle tvorby produktu docházelo i k reesterifikaci methylesteru výchozí látky **5**. Takto pozměněná výchozí látka téměř nepodléhala alkylation v poloze N9 (Schéma 27). Reakční podmínky byly dále modifikovány a postup byl proveden s 0.2 M, 0.5 M a 1 M roztokem alkylidu při 60°C a současně s 0.5 M roztokem alkylidu při 90°C. Jako nejlepší se ukázalo použití 0.5 M roztoku *iso*-propylidu s 2 ekvivalenty báze při 60°C, avšak *tert*-butyl derivát se touto metodou podařilo připravit v konverzi 70%. Pro přípravu *iso*-propylderivátu byla studována i Mitsunobova reakce,³⁷ která přinesla očekávaný produkt v čistotě 87 %, avšak ve spektru byly detekovány i neidentifikovatelné vedlejší látky.

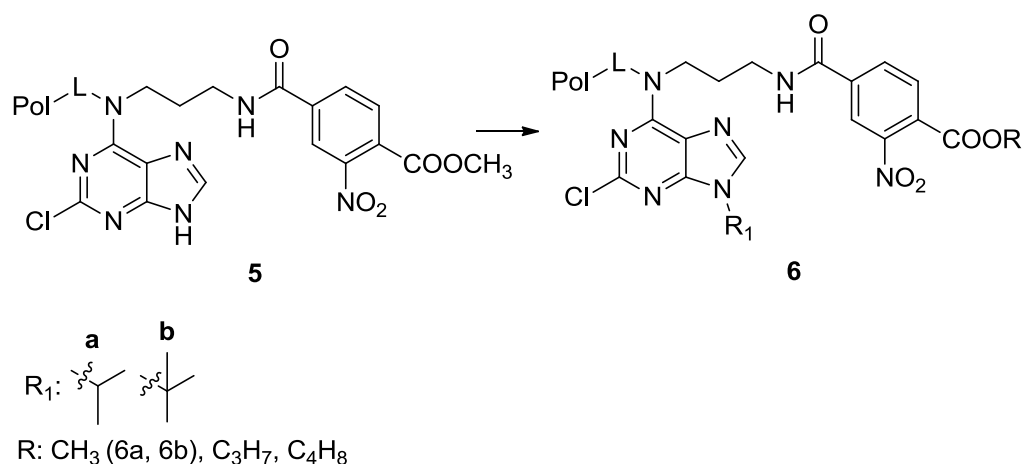


Schéma 27

Následná derivatizace purinového skeletu v poloze 2 byla testována s 1 M roztokem pentyl aminu v diethylether diethylenglykolu (celosolvu) při 150°C, reakční doba byla 24 hodin. V tomto případě nebyl připraven očekávaný produkt, pravděpodobně přednostně docházelo k vedlejším reakcím na 1-methyl-2-nitroterefalovém zbytku (Schéma 28). Vedlejší produkty v LC-MS spektru se však nepodařilo identifikovat.

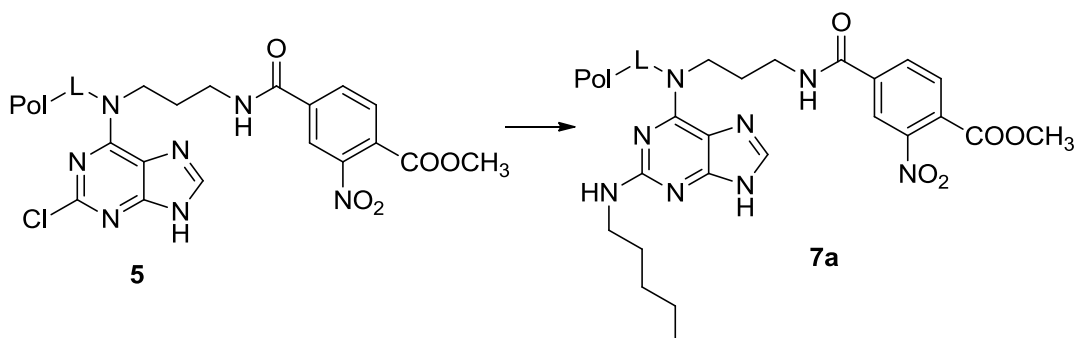


Schéma 28

S ohledem na nízkou reaktivitu pentyl aminu byla reakce testována se silnějším nukleofilním činidlem piperidinem. Jako výchozí materiál byla použita pryskyřice **18**, aby nedocházelo k reakci na acylovém zbytku (Schéma 29).

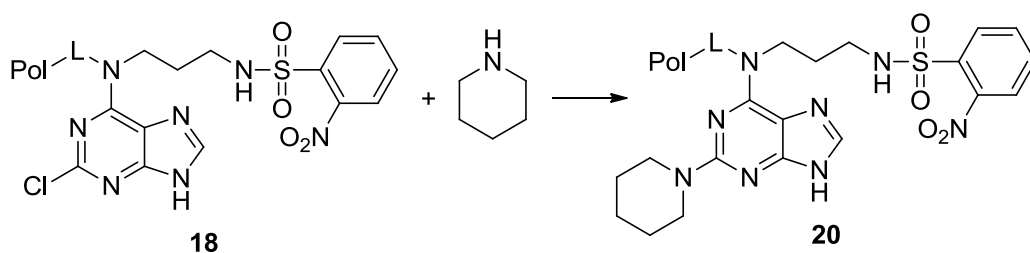


Schéma 29

Po 24 hodinách byl ve spektru detekován jen produkt s molární hmotností o 30 jednotek menší než očekávaný produkt. Tato molární hmotnost odpovídá látce s redukovanou nitro skupinou. V současné době připravujeme vedlejší produkt pro izolaci a následnou charakterizaci na NMR.

Z toho důvodu byl testován postup s pryskyřicí **19** bez nosyl skupiny s 1 M roztokem piperidinu. Při 150°C již po 1 hodině kvantitativně vznikal požadovaný produkt, čímž se potvrdila reaktivita na acylovém zbytku nebo nosyl skupině. (Schéma 30).

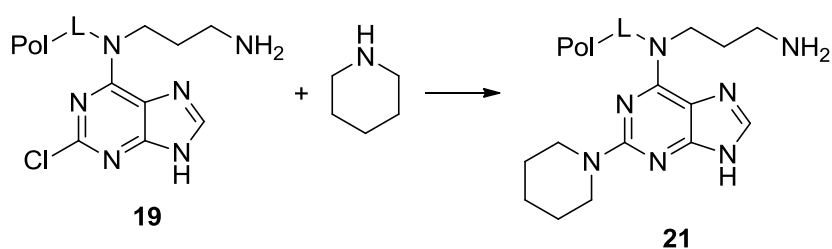


Schéma 30

Principem přípravy 1-methyl-4-((3-((2-chlor-9H-purin-6-yl)amino)propyl) karbamoyl)-2-aminobenzoátu (**8**) byla selektivní redukce nitro skupiny. Redukce byla provedena s 1 M roztokem $\text{SnCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 2 ekv. EDIPA v DMF při 50°C přes noc (Schéma 34). Vedle očekávaného amino derivátu **8** byla v LC-MS spektru nalezena vedlejší látka s molární hmotností o 15 jednotek nižší než očekávaný produkt. Docházelo nejen k redukci, ale i k částečné saponifikaci methylesteru. Vedlejší reakce však nebyla překážkou v další sekvenci, naopak zkracovala reakční dobu následující saponifikace (Schéma 31).

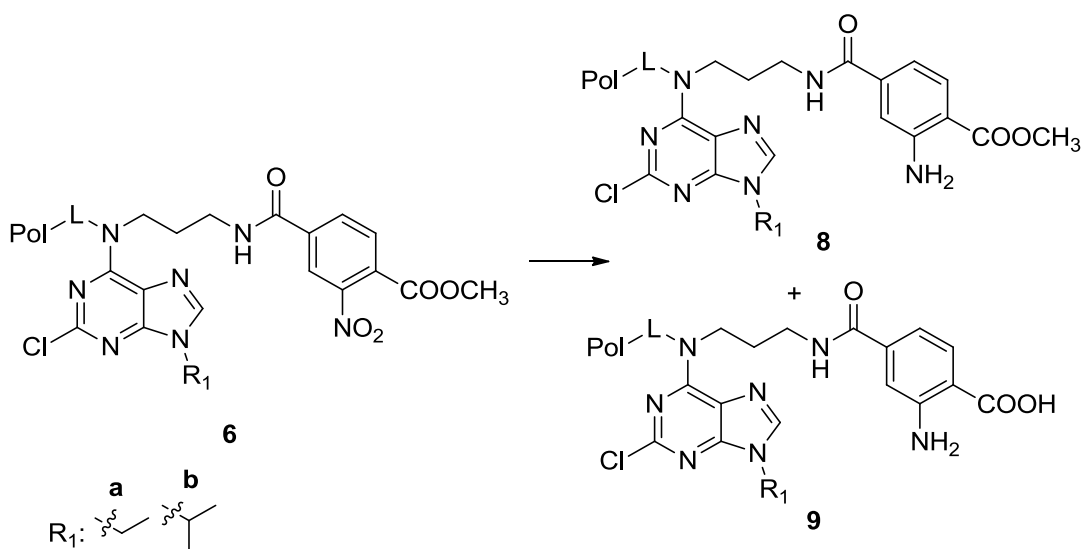


Schéma 31

Produkt **8** byl saponifikován 0.2 M roztokem kalium trimethylsilanolátu (TMSOK) v THF za laboratorní teploty za vzniku 4-((3-((2-chlor-9*H*-purin-6-yl)amino)propyl)karbamoyl)-2-aminobenzoové kyseliny (**9**) (Schéma 32). Reakční doba byla pouze 2 hodiny díky částečné hydrolyze popsané v předchozím kroku.

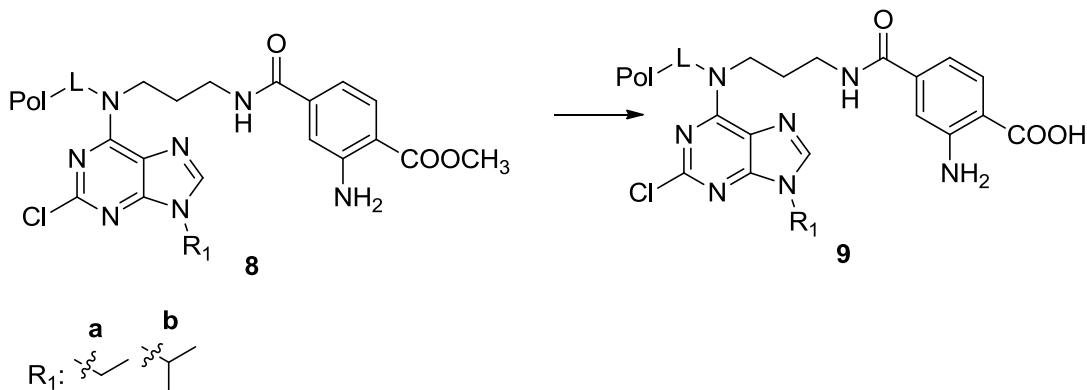


Schéma 32

Poslední krok na pevné fázi byla esterifikace látky s 2-brom-4'-methylacetofenonem. Reakce byla provedena s 0.2 M roztokem bromoketonu s 1 ekv. EDIPA v DMF za laboratorní teploty přes noc (Schéma 33).

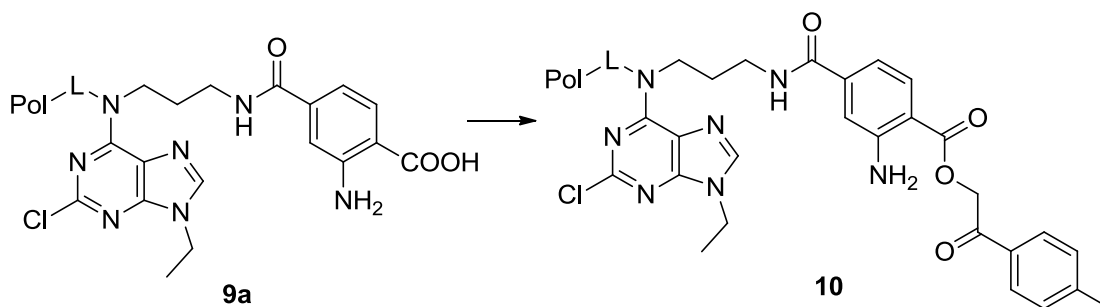


Schéma 33

Cyklizace 2-oxo-2-(*p*-tolyl)ethyl-2-amino-4-((3-((2-chlor-9*H*-purin-6-yl)amino)propyl)karbamoyl)benzoátu byla provedena po odštěpení produktu **10** z pryskyřice (Schéma 34). Látka **9a** byla zahřívána na 90°C v TFA po dobu 1 hodiny. LC-MS analýza však obsahovala pouze výchozí látku, proto byla reakční doba zvýšena na 3 hodiny, ale docházelo k rozkladu výchozí látky na neidentifikovatelnou směs. Dále byla reakce provedena při vyšší teplotě ve vroucí kyselině octové při stejné reakční době, ani tento postup nepřinesl očekávaný produkt, pouze byla detekována bohatá směs látek. Pryskyřice s derivátem **10** byla spotřebována při studiu cyklizační reakce na hydroxychinolon. V současné době opětovně připravujeme tento intermediát a budeme dále cyklizační metodu studovat.

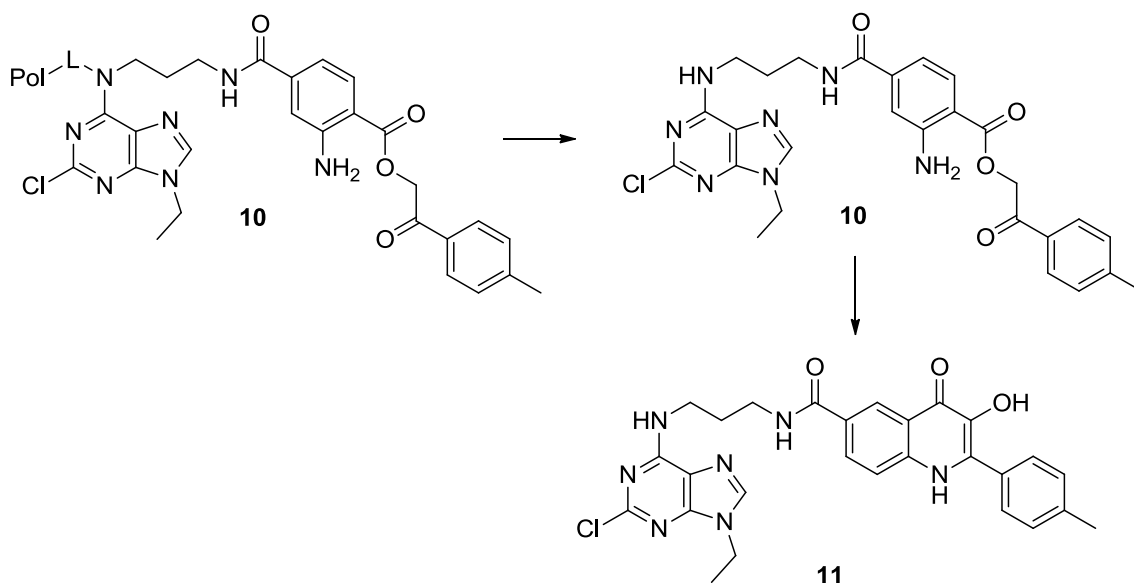


Schéma 34

Druhý směr syntézy: Příprava dialkylovaných derivátů

Jednoduchá záměna reakčních kroků zvyšovala diverzitu cílové molekuly. Opět jsme vycházely z *N*-(3-((2-chlor-9*H*-purin-6-yl)amino)propyl)benzensulfonamidu (**18**), který byl alkylován, aniž by byla odstraněna nosylová skupina. Alkylace purinového skeletu v poloze 9 byla provedena ethyliodidem, *iso*-propyliodidem a *tert*-butyliodidem (Schéma 35). Při ethylaci byly nejprve použity stejné podmínky jako při přípravě látky **6**, 0.2 M roztok ethyliodidu a 2 ekv. DBU při 50°C. V tomto případě docházelo vždy jen částečně k tvorbě diethylovaného produktu. Při zvýšení reakční teploty na 60°C byl připraven derivát **22a** se skvělou čistotou.

K přípravě *iso*-propyl derivátu byly zvoleny stejné reakční podmínky, ale vždy docházelo ke vzniku směsi monoalkyl a dialkyl derivátu. Ani zvýšení teploty, koncentrace nebo obou reakčních podmínek nevedlo k čistému produktu **22b**. Očekávaný *iso*-propylderivát **22b** byl připraven až Mitsunobovou reakcí s *iso*-propanolem. Mitsunobova reakce byla testována i pro přípravu dibenzylderivátu. I v tomto případě byl získán produkt **22c** s vynikající čistotou. Tento typ derivátů je na rozdíl od monoalkylovaných derivátů vhodnější připravovat Mitsunobovou reakcí.

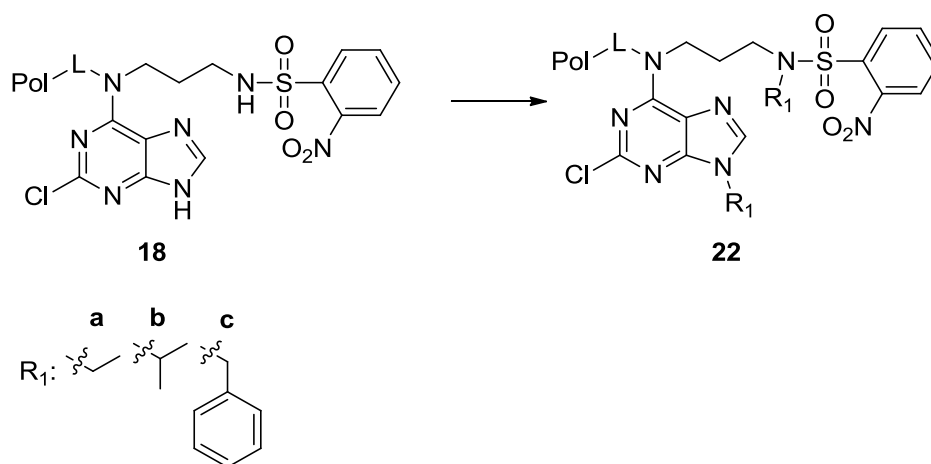


Schéma 35

Následujícím reakčním krokem byla denosylace (Schéma 36) za podmínek popsaných výše v textu (0.6 M merkaptoethanolu a 0.6 M DBU v DMF, 30 minut).

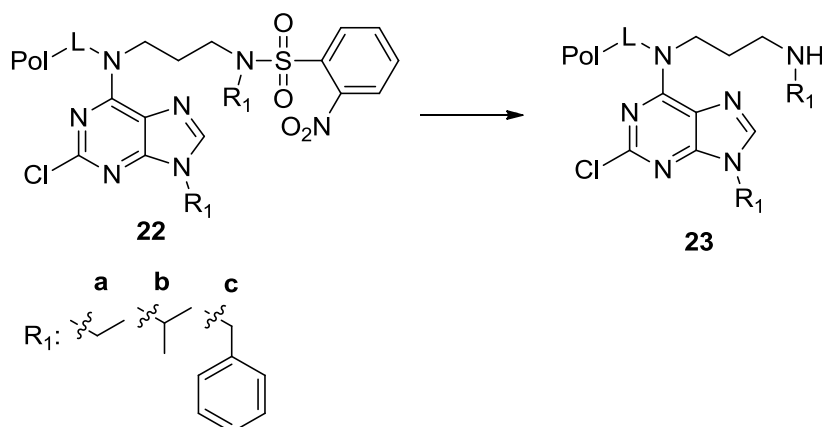


Schéma 36

Pro derivatizaci purinového skeletu v poloze 2 byly použity stejné podmínky jako v předchozím případě (1 M roztok aminu v celosolvu, při 150°C, 24 hodin). Substituce byla provedena na pryskyřici **23a** s pentyl aminem (Schéma 37). Po 24 hodinách bylo detekováno jen 28% produktu.

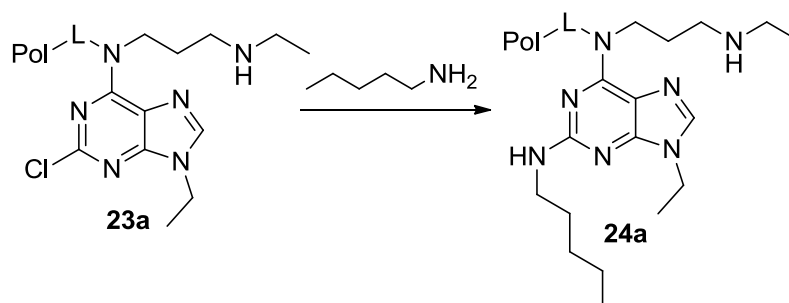


Schéma 37

S ohledem na nízkou reaktivitu chlorového atomu v poloze 2 a již dříve získaných informacích o reaktivitě na derivátu **21**, byly testovány i silnější nukleofilní

činidla. Reakce byla testována na dibenzylderivátu s 1 M roztokem *N*-methylpiperazinu při 150°C, již po 4 hodinách docházelo k úplné konverzi výchozí látky (Schéma 38).

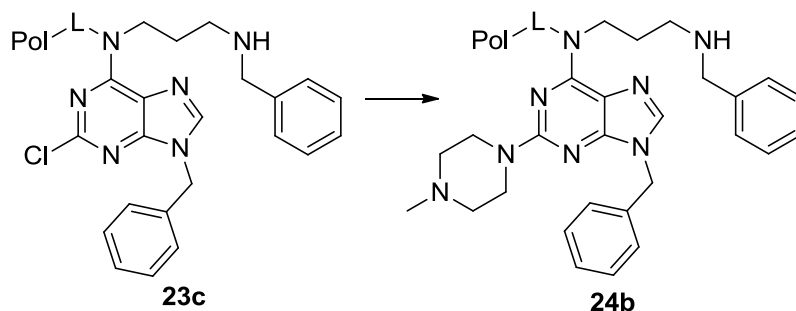


Schéma 38

Acylace látky **23** za vzniku methyl 4-((3-((2-chloro-9-alkylovaný-9*H*-purin-6-yl)amino)propyl)(*N*-alkylovaný)karbamoyl)-2-nitrobenzoátu (**25**) byla provedena za stejných reakčních podmínek jako příprava látky **5** (Schéma 39).

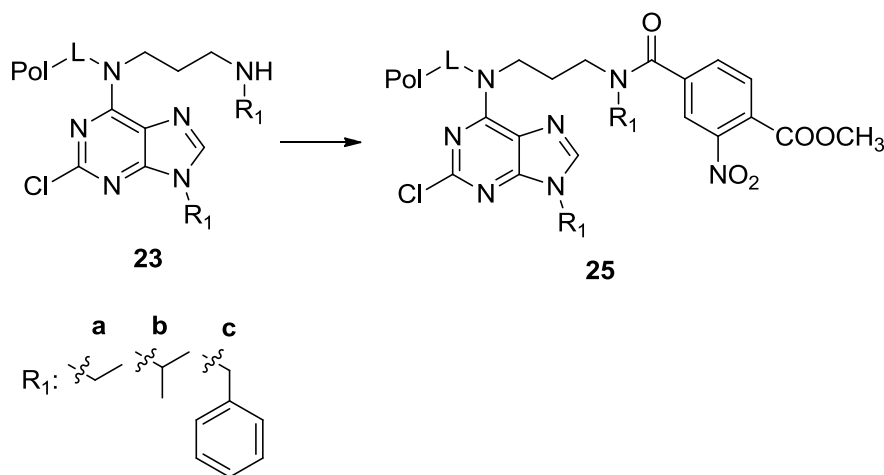


Schéma 39

Při redukci (1 M roztok $\text{SnCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 2 ekv. EDIPA v DMF při 50°C) také docházelo k částečné hydrolyze methyl esteru produktu **26**.

Saponifikace (0.2 M roztok TMSOK v THF) byla na rozdíl od výše popsaného postupu provedena přes noc.

Posledním reakčním krokem prováděným solid phase syntézou byla esterifikace látky **27** 2-brom-4'-methylacetofenonem (0.2 M roztok bromacetofenonu, 1 ekv. báze v DMF). Za laboratorní teploty byla reakční doba 4 hodiny. Látku **28** se bohužel podařilo připravit pouze s čistotou 65%.

Poté následovala cyklizace za vzniku látky **29**, která byla provedena až po odštěpení z pryskyřice. Nejprve v prostředí TFA při 90°C v tomto případě nedošlo ani po 4 hodinách k úplnému odreagování výchozí látky. Proto byla cyklizace provedena

při vyšší teplotě ve vroucí kyselině octové, kde naopak již po hodině docházelo k vzniku směsi neidentifikovatelných látek (Schéma 40).

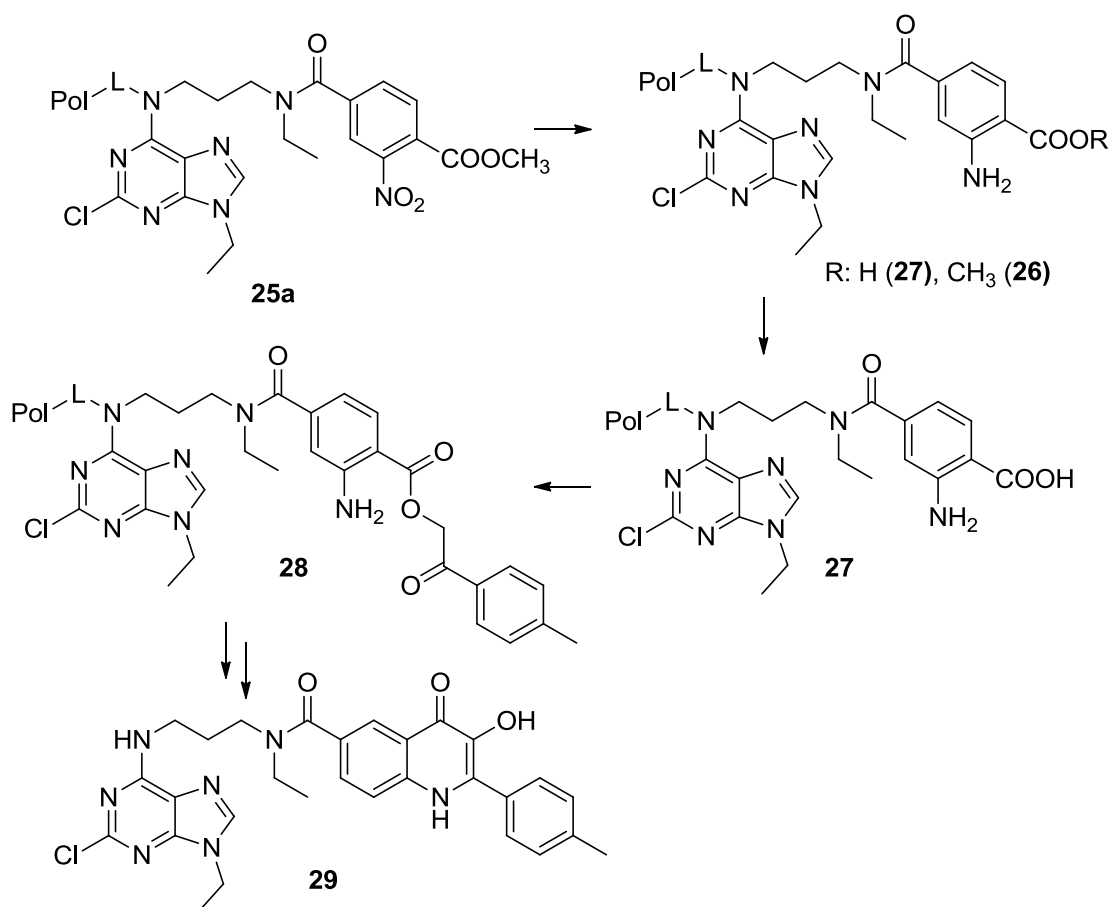


Schéma 40

Měření LC-MS analýz v kyselé mobilní fázi (roztok kyseliny mravenčí ve vodě/AcCN) prokázalo přítomnost produktu ve spektru. Cílový hydroxychinolon se při klasických podmínkách (pufr $\text{CH}_3\text{COONH}_4/\text{AcCN}$) na koloně rozmývá a není možné jej detekovat. Pro další cyklizační experimenty je nutné připravit výchozí intermediát **28** o vyšší čistotě a otestovat měření LC-MS analýz v mobilní fázi s přidavkem kyseliny trifluoroctové.

4.4 Syntéza *N9* nesubstituovaných derivátů purinu

Dalším cílem syntézy bylo připravit deriváty **30** s volnou *N9* skupinou purinového skeletu. Pro syntézu těchto derivátů bylo nutné použít *N9* chráněný 2,6-dichlorpurin. Následně by celá sekvence probíhala za stejných podmínek a k odchránění by došlo před odštěpením derivátu z pryskyřice (Schéma 41). Podrobně byly testovány Boc, Fmoc a Nosyl protekční skupiny.

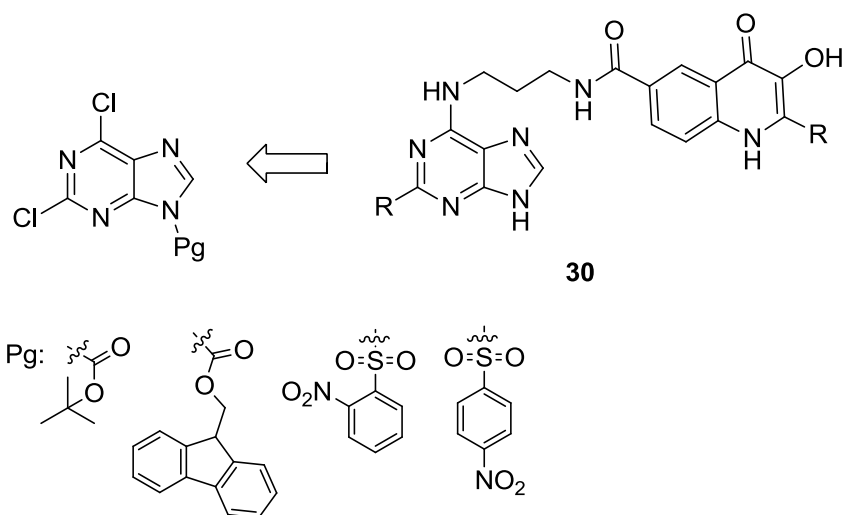


Schéma 41

4.4.1 Příprava *tert*-butyl 2,6-dichlorpurin-9-karboxylátu (Boc-purinu)

Syntéza *boc*-purinu (**31**) vycházela z reakce 2,6-dichlorpurinu a *di-tert*-butylkarbonátu (*Boc*-anhydrid). Nejprve byla zvolena příprava dle popsaného postupu³⁸ v přítomnosti triethylaminu a 4-dimethylaminopyridinu (DMAP) v suchém THF. Při kontrole pomocí TLC nebyla po 1.5 hodině detekována žádná výchozí látka. Avšak LC-MS analýza vykazovala pouze látku o molární hmotnosti výchozí látky. Reakce byla následně provedena bez přítomnosti báze a současně s dvojnásobným množstvím báze. I přesto analýza reakční směsi poskytovala pouze výchozí látku.

Proto bylo změněno rozpouštědlo na pyridin a poté na DMF bez přítomnosti báze a následně bez přítomnosti báze i katalyzátoru. V obou případech byla v reakční směsi detekována opět jen výchozí látka.

Na závěr byla provedena reakce na základě popsaného postupu,³⁹ k 2,6-dichlorpurinu byl přidán uhličitan draselný a *boc*-anhydrid, reakce byla provedena v DMF za laboratorní teploty přes noc. Žádný z výše uvedených postupů nevedl kvantitativně k požadovanému produktu (Schéma 42).

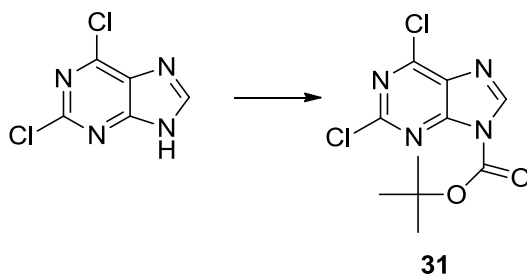


Schéma 42

Bokace byla testována i na pevné fázi, kdy byla vložena do reakční sekvence po substituci s 2,6-dichlorpurinem (Schéma 43).

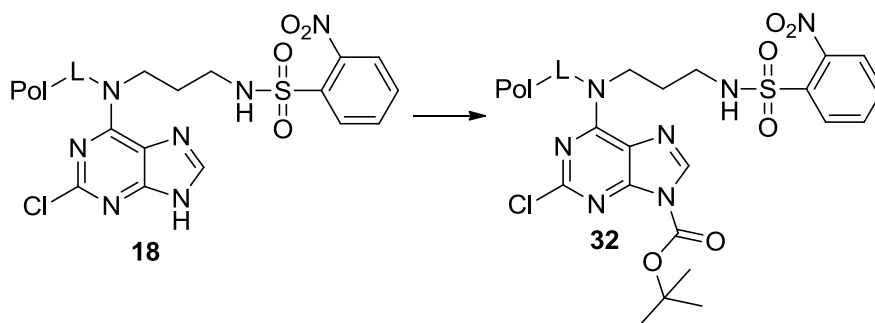


Schéma 43

Nejprve byla provedena s 0.5 M roztokem boc-anhydridu v DCM při laboratorní teplotě přes noc. Kvantitativní průběh reakce byl ověřen pomocí Fmoc-Cl. Jen malé množství, okolo 12% výchozí látky podléhalo bokaci a dále byly detekovány nečistoty. Reakce byla provedena se sušeným DCM. V tomto případě nedocházelo k výrazné změně. Při použití suchého DMF bylo detekováno opět jen 12% produktu, ale nedocházelo k vzniku nežádoucích vedlejších látek, proto byla bokace provedena při stejných reakčních podmínkách s 1 M roztokem boc-anhydridu a současně s 0.5 M a 1 M roztokem boc-anhydridu s reakční dobou 3 dny. Opět bylo detekováno okolo 15% produktu. Ani solid phase syntézou nebyly kvantitativně připraveny boc deriváty purinu.

4.4.2 Příprava Fmoc purinu

Navázání fmoc protekční skupiny bylo navrženo na pryskyřici **18** před plánovanou alkylací N9 polohy purinu a sulfonamidu. Pro fmokaci bylo použito silnější činidlo, Fmoc-Cl v přítomnosti EDIPA v DCM. Fmoc derivát se podařilo připravit, při následné alkylaci docházelo k odstoupení protekční skupiny vlivem báze (DBU) (Schéma 44).

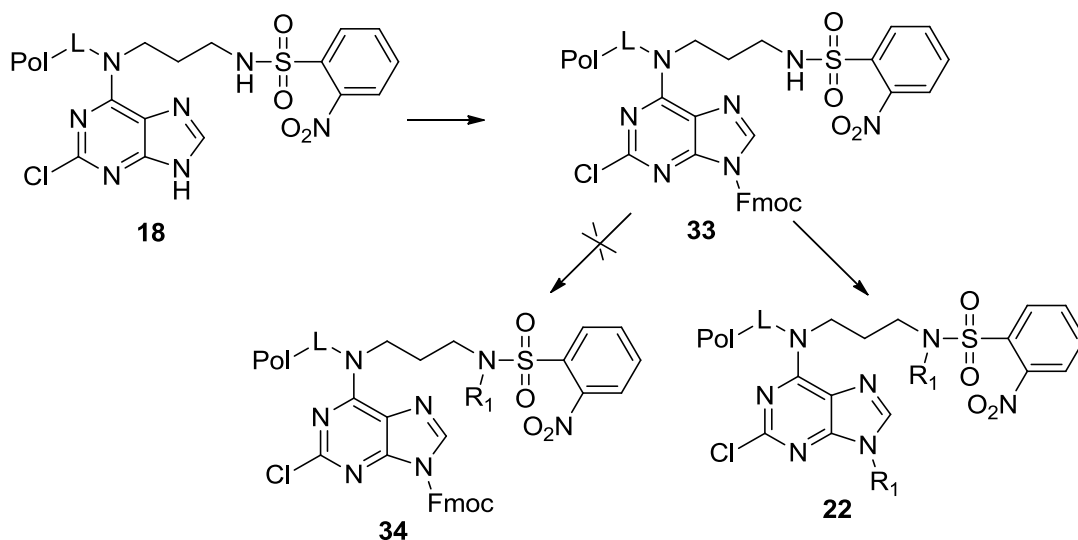


Schéma 44

Navázání fmoc skupiny není možné zařadit až po substituci chloru v poloze 2 purinu. Výrazně se tím snižuje nukleofilita dusíkové atomu v poloze 9 a k reakci již nedochází.³³ S ohledem na vzniklé obtíže jsme od fmoc skupiny odstoupili.

4.4.3 Příprava Nos purinu

Nosylace by byla provedena po acylaci 1-methyl-2-nitroreftalovou kyselinou. Jako nosylační činidlo byl použit 2-nitrobenzensulfonylchlorid i 4-nitrobenzensulfonylchlorid v DCM i DMF za přítomnosti báze. V DMF k reakci nedocházelo, analýza poskytovala pouze výchozí látku. Použití DCM při laboratorní teplotě poskytovalo 20% produktu, ani zvýšení teploty na 50°C neposkytovalo větší konverzi (Schéma 45).

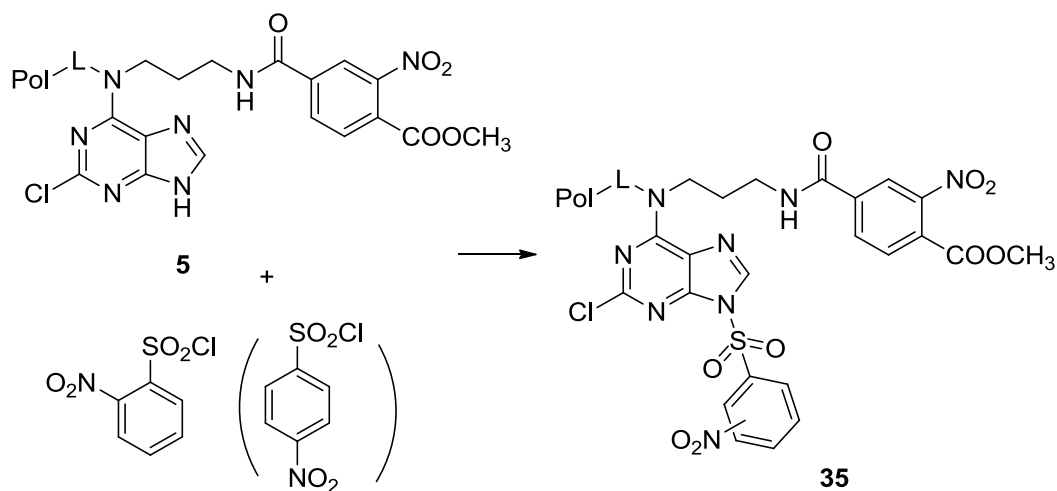


Schéma 45

5 Experimentální část

Syntéza na pevné fázi byla prováděna ve speciálních reakčních nádobách. Reakce za laboratorní teploty byly realizovány v plastových stříkačkách opatřených porézní polypropylenovou fritou (www.torviq.com). Konstantní promíchávání reakčního roztoku a pryskyřice zajišťoval laboratorní shaker. Pro zahřívání syntéz do 135°C byl použit paralelní reaktor Büchi a jako reakční nádoby byly použity skleněné lahvičky uzavíratelné víčkem se septem. Zahřívání nad 135°C bylo dosaženo v olejové lázni. V tomto případě byly použity skleněné vialky s trojúhelníkovým míchadlem.

5.1 Přístroje a metody

Všechny meziprodukty byly analyzovány metodou LC-MS Accela Thermo Scientific. Přístroj je složený z gradientové kvartérní pumpy (USA, SN: 82738), thermostatovaného autosampleru (SN: 82794), odplyňovače, termostatu a PDA detektoru (SN: 81447). Dále byl aplikován hmotnostní spektrometr s trojitým kvadrupólem, detektor TSQ Quantum Access (Thermo Scientific, USA, SN: TQU01482).

Kolona: Macherey-Nagel, Nucleodur C18 Gravity, 1.8 μm , Cat. No.:760079.20, Batch: 37206033.

Předkolona: Macherey-Nagel, Nucleodur C18 Gravity, 3 μm .

Termostat: 30 °C.

UPLC podmínky: A: acetonitrile, B: 0.1 % ammonium acetate (pH 5.01);

gradientová eluce: 0 min 10 A : 90 B; 2.5 min 80 A : 20 B; 4 min 80 A : 20 B; 4.5 min 10 A : 90 B; 5min 10 A : 90 B; 800 $\mu\text{l}/\text{min}$;

Nástřík vzorku: 5 μl .

Pro vyhodnocení a kontrolu dat byl použit software Excalibur™. NMR $^1\text{H}/^{13}\text{C}$ spektra byla měřena na přístroji Bruker Avance (300 MHz) za laboratorní teploty 21°C. Deuteriovaný dimethylsulfoxid (DMSO- d_6) byl použit jako rozpouštědlo a jeho rezonanční signál sloužil k referenční standard. Chemický posun δ je uváděn v in ppm a coupling konstanta J v Hz. Pro vyhodnocení NMR spekter byl použit ACDLABS software

5.2 Štěpení produktů z pevné fáze a příprava vzorků na analýzu

Po ukončení reakce a promytí pryskyřice byl vždy vzorek pryskyřice s navázaným produktem podroben štěpení z pevné fáze a k přípravě analytického vzorku pro měření LC-MS spekter. K malému množství pryskyřice (5-10 mg) bylo přikapáno 0.5 ml štěpícího roztoku (směs TFA v DCM v poměru 1:1) a tato směs byla třepána po dobu 30 minut (V textu dále uvedeno jen „štěpení v TFA“). Následně byl těkavý roztok odpařen v proudu dusíku a vzniklý odparek rozpuštěn v 1 ml MeOH. Před samotnou analýzou byl roztok zfiltrován do analytické vialky. V průběhu štěpení mohlo docházet k reakci produktu s TFA či použitým rozpouštědlem. Při vyhodnocování analytických dat bylo nutné zohlednit trifluoroacetyl deriváty.

5.3 Derivatizace meziproduktů na LC-MS analýzu

Řada meziproduktů vyžaduje pro LC-MS analýzu derivatizaci skupinou s vysoce absorpční schopností v UV oblasti. Pro tyto účely se využívá navázání Fmoc skupiny. Fmocylace se provádí pro kvantifikaci pryskyřice po navázání prvního building bloku a k ověření kvantitativní reakce na neštěpitelných aminech či derivátech, které nemají žádný chromofor v UV oblasti.

Fmocylace byla vždy prováděna na malém vzorku pryskyřice s 0.5 M roztokem FmocOSu (160 mg; 0.5 mmol) v 1 ml DCM. Reakční směs byla třepána po dobu 30 minut za laboratorní teploty a následně byla pryskyřice promyta 5x DCM a 5-10 mg pryskyřice bylo štěpeno v roztoku TFA na LC-MS analýzu (dále v textu jen “fmocylce s FmocOSu”).

5.4 Příprava výchozích látek v roztoku

Příprava *N*-(2-chlor-9*H*-purin-6-yl)propan-1,3-diaminu (1)

2,6-dichlorpurin (500 mg; 2.6 mmol) byl rozpuštěn v *n*-butanolu (15 mL), přidán 1,3-diaminopropan (329 μ L; 3.9 mmol) a reakční roztok byl refluxován při 130°C po dobu 3 hodin. Reakce byla sledována TLC v mobilní fázi (Tol/AcCN 5:1)/MeOH v poměru 5:1. Vzniklý krystalický produkt byl filtrován a promyt ethanolem. Nadbytečný 1,3-diaminopropan byl kvantitativně odstraněn macerací krystalu v horkém ethanolu a opětovnou filtrací. Produkt byl vysušen na vzduchu.

N-(2-chlor-9*H*-purin-6-yl)propan-1,3-diamin

LC-MS: rt = 0.24 min.; [M+H]⁺ = 226.94

Výtěžek byl 399 mg, 66%.

Produkt obsahoval 20% bisderivátu, který však nemá vliv na další sekvenci. Směs těchto dvou produktů nebyla purifikována, z tohoto důvodu nebylo měřeno NMR spektrum.

Příprava *N*-(3-aminopropyl)-2-nitrobenzensulfonamidu (15)

Roztok propan-1,3-diaminu (3.5 mL; 41 mmol) v DCM (22.5 mL) byl zchlazen na teplotu -5°C . Následně byl přikapáván roztok 2-nitrosulfonylchloridu (3g; 13.5 mmol) v DCM (90 mL) po dobu 45 minut. Reakce byla kontrolována TLC v mobilní fázi iPrOH, amoniaku a vody v poměru 5:1:1. Po 1 hodině byla reakce ukončena a pevný podíl (vedlejší bis-nosylovaný produkt) odfiltrován. Filtrát byl zahuštěn na vakuové odparce do sucha, rozpuštěn v 15 mL mobilní fáze a přečištěn pomocí kapalinové chromatografie ve výše uvedené mobilní fázi.

N-(3-aminopropyl)-2-nitrobenzensulfonamid

LC-MS: $rt = 0.35 \text{ min.}$; $[M+H]^+ = 259.93$; čistota 98%

Výtěžek byl 1.9g; 54%.

^1H NMR (300 MHz, DMSO- d_6) δ ppm 1.58 (quin, $J=6.68 \text{ Hz}$, 2 H) 2.64 (t, $J=6.77 \text{ Hz}$, 2 H) 2.95 (t, $J=6.77 \text{ Hz}$, 2 H) 5.23 (br. s., 2 H) 7.80 - 7.90 (m, 2 H) 7.92 - 7.98 (m, 1 H) 7.99 - 8.06 (m, 1 H). ^{13}C NMR (75 MHz, DMSO- d_6) δ ppm 30.96 (s, 1 C) 38.36 (s, 1 C) 41.12 (s, 1 C) 124.91 (s, 1 C) 129.99 (s, 1 C) 133.17 (s, 1 C) 133.38 (s, 1 C) 134.43 (s, 1 C) 148.33 (s, 1 C).

5.5 Reakce na pevné fázi

Příprava aminomethylenové pryskyřice s BAL linkerem (3)

K hydrochloridu aminomethylenové pryskyřice (2 g; 2.24 mmol) byl přidán 10% roztok EDIPA v DMF (20 ml), reakční směs byla třepána při RT po dobu 10 minut, poté byla pryskyřice promyta 5x DMF. Následně byl k pryskyřici přidán roztok, který vznikl rozpuštěním (4-(4-formyl-3-methoxyfenyloxy)butanové kyseliny (1.108 g; 4.48 mmol) v DMF (10 mL), HOBt (605.6 mg; 4.48 mmol), DIC (700 μL ; 4.48 mmol) a DCM (10 mL) a reakční směs byla třepána přes noc (16 hod.) při laboratorní teplotě. Po reakci byla pryskyřice promyta 3x DMF, 3x DCM a proveden test s bromfenolovou modří.

Důkaz nepřítomnosti s Bromfenolovou modří

K malému množství produktu **3** (5-10 mg) bylo přidáno 0.5 ml DCM a jedna kapka 0.03 M roztoku bromfenolové modří v NMP roztok se zbarvil zeleně a

nedocházelo k modrání pryskyřice. Tento negativní důkaz na přítomnost amino skupin prokázal kvantitativní navázání BAL linkeru na aminomethylenovou pryskyřici.

Reduktivní aminace (17)

Pryskyřice **3** (1 g; 0.88 mmol) byla nabobtnána v DCM, vysušena promytím 3x suchým THF, 3x suchým DMF a třepána v roztoku intermediátu **15** (1.14 mg; 4.4 mmol) suchém DMF (9 mL) a AcOH (1 mL) přes noc při laboratorní teplotě. Následující den byl přidán roztok NaBH(OAc)₃ (310 mg; 1.47 mmol) v 5% AcOH v suchém DMF (5 mL), injekční stříkačka byla propíchnuta těsně pod pístem jehlou, umístěna do vertikální polohy a třepána po dobu 1 hodiny při laboratorní teplotě. Poté byl přidán krystalický NaBH(OAc)₃ (310 mg; 1.47 mmol), směs byla opět třepána další hodinu a následně byl přidán poslední podíl NaBH(OAc)₃ (310 mg; 1.47 mmol) a reakční směs byla třepána po dobu 2 hodin při laboratorní teplotě. Po ukončení reakce byla pryskyřice promyta 3x DMF, přidán 20% roztok piperidinu v DMF (10 mL) a třepána při RT 10 minut. Finální pryskyřice byla promyta 3x DMF a 3x DCM a kvantifikována.

Kvantifikace

30 mg pryskyřice **17** bylo podrobena reakci s FmocOSu, pryskyřice byla po reakci promyta 5x DCM a 3x MeOH a vysušena v proudu dusíku. 2 vzorky pryskyřice přesně o 10 mg byly štěpeny v roztoku TFA v DCM a výsledné odparky byly rozpuštěny přesně v 1 mL MeOH a analyzovány LC-MS spolu s externím standardem Fmoc-Ala-OH (10 mM roztok).

9H-Fluoren-9-ylmethyl-(3-benzensulfonylamino-propyl)-karbamát

LC-MS: rt = 2.39 min.; [M+H]⁺ = 498.89; čistota 99%.

Loading: 0.4 mmol/g

Substituce s 2,6-dichlorpurinem (18)

Pryskyřice **17** (1 g) byla nabobtnána v DCM a promyta 3x THF. 2,6-dichlorpurin (600 mg; 3 mmol) byl rozpuštěn v THF (10 mL), poté byl přidán EDIPA (570 μL; 3 mmol). Roztok byl smíchán s pryskyřicí a reakční směs byla zahřívána při 50°C přes noc. Po reakci byla pryskyřice promyta 3x THF a 3x DCM. Kvantitativnost reakce byla ověřena reakcí s FmocOSu.

N-(3-((2-chloro-9H-purin-6-yl)amino)propyl)-2-nitrobenzenesulfonamid (18)

LC-MS: rt = 1.08 min.; [M+H]⁺ = 411.83; čistota 95%

(9H-fluoren-9-yl)methyl 2-chloro-6-((3-(2-nitrofenylsulfonamid)propyl)amino)-9-purin-9-karboxylát (18a)

LC-MS: rt = 2.58; [M+H]⁺ = 633.94; čistota 85%

Denosylace (19, 23a, 23b, 23c)

Pryskyřice **18**, **22** (500 mg) byla nabobtnána v DCM a promyta 3x DMF. Merkaptoethanol (210 μL; 3 mmol) a DBU (450 μL; 3 mmol) byly rozpuštěny v DMF (5 mL), reakční roztok byl smíchán s pryskyřicí a třepán 30 minut při RT. Po reakci byla pryskyřice promyta 3x DMF, 3x DCM.

N-(2-chlor-9*H*-purin-6-yl)propan-1,3-diamin (19)

LC-MS: rt = 0.47 min.; [M+H]⁺ = 226.80; čistota 98%

*N*¹-(2-chlor-9-ethyl-9*H*-purin-6-yl)-*N*³-ethylpropan-1,3-diamin (23a)

LC-MS: rt = 2.07 min.; [M+H]⁺ = 282.95 čistota 98%

*N*¹-(2-chlor-9-iso-propyl-9*H*-purin-6-yl)-*N*³-iso-propylpropan-1,3-diamin (23b)

LC-MS: rt = 2.52 min.; [M+H]⁺ = 310.95; čistota 99%

*N*¹-(2-chlor-9-benzyl-9*H*-purin-6-yl)-*N*³-benzylpropan-1,3-diamin (23c)

LC-MS: rt = 3.26 min.; [M+H]⁺ = 406.90; čistota 98%

Acylace s 1-methyl-2-nitrotereftalátem (5, 25)

Pryskyřice **19**, **23** (500 mg) byla nabobtnána v DCM. 1-methyl-2-nitrotereftalát (225 mg; 1 mol) byl rozpuštěn v DMF (2.5 mL), byl přidán HOBt (135 mg; 1 mol), DIC (155 μL; 1 mol) a DCM (2.5 mL). Roztok byl smíchán s pryskyřicí a třepán přes noc. Po reakci byla pryskyřice promyta 3x DMF, 3x DCM.

1-methyl-4-((3-((2-chloro-9*H*-purin-6-yl)amino)propyl)karbamoyl)-2-nitrooxybenzoát (5)

LC-MS: rt = 1.09 min.; [M+H]⁺ = 434.07; čistota 98 %.

1-methyl-4-((3-((2-chloro-9-ethyl-purin-6-yl)amino)propyl)(ethyl)karbamoyl)-2-nitrooxybenzoát (25)

LC-MS: rt = 1.54 min.; [M+H]⁺ = 489.89; čistota 89 %.

Alkylace s ethyljodidem, iso-propyljodidem (6a, 6b, 22a)

Pryskyřice **5**, **18** byla nabobtnána v DCM a promyta 3x DMSO. 0.5 M roztok alkyljodidu v DMSO s 2 ekv. DBU byl přidán k pryskyřici a reakční směs byla zahřívána přes noc na 60°C. Pryskyřice byla promyta 3x DMF, 3x DCM, 3x THF. Reakce byla zopakována v THF při stejných reakčních podmínkách. Po reakci byla pryskyřice promyta 3x THF, 3x DCM.

1-methyl-4-((3-((2-chloro-9-ethyl-purin-6-yl)amino)propyl)karbamoyl)-2-nitrooxybenzoát (6a)

LC-MS: rt = 1.52 min.; [M+H]⁺ = 461.89; čistota 92 %

1-methyl-4-((3-((2-chloro-9-iso-propyl-purin-6-yl)amino)propyl)karbamoyl)-2-nitrooxy benzoát (6b)

LC-MS: rt = 1.51 min.; [M+H]⁺ = 475.92; čistota 98%

N-(3-((2-chloro-9-ethyl-purin-6-yl)amino)propyl)-N-ethyl-2-nitrobenzenesulfonamid (22a)

LC-MS: rt = 2.04 min.; [M+H]⁺ = 467.89; čistota 99%

Mitsunobova reakce (6b, 23b, 23c)

Pryskyřice **5**, **18** (500 mg) byla nabobtnána v DCM, promyta 1x THF a 3x bezvodým THF. Byly připraveny 2 roztoky. K promyté pryskyřici byl přidán roztok trifenylfosfinu (330 mg; 1.25 mmol), alkoholu (isopropylalkohol: 100 µL; 1.25 mmol; benzylalkohol: 130 µL; 1.25 mmol) v bezvodém THF (3 mL). Druhý roztok vznikl smícháním DIAD (240 µL; 1.25 mmol) a suchého THF (2 mL). Obě reakční komponenty byly 30 minut chlazeny při 0°C. Poté byl roztok DIAD přidán k roztoku s pryskyřicí. Reakce probíhala přes noc při laboratorní teplotě, poté byla pryskyřice promyta 3x THF, 3x DCM.

1-methyl-4-((3-((2-chloro-9-iso-propyl-purin-6-yl)amino)propyl)karbamoyl)-2-nitrooxybenzoát (6b)

LC-MS: rt = 1.65 min.; [M+H]⁺ = 475.90; čistota 87%

N-(3-((2-chloro-9-iso-propyl-purin-6-yl)amino)propyl)-N-iso-propyl-2-nitrobenzene sulfonamid (23b)

LC-MS: rt = 2.23 min.; [M+H]⁺ = 495.94; čistota 98%

N-(3-((2-chloro-9-benzyl-purin-6-yl)amino)propyl)-N-benzyl-2-nitrobenzenesulfonamid (23c)

LC-MS: rt = 2.72 min.; [M+H]⁺ = 594.85; čistota 98%

Substituce N2 polohy purinu (21, 24b)

Pryskyřice **19**, **23c** (250 mg) byla nabobtnána v DCM. 1 M roztok aminu (piperidin: 245 µL; 2.5 mmol (**21**); N-methylpyperazin 277 µL; 2.5 mmol (**24b**)) v celosolvu (2.5 mL) byl přidán k pryskyřici a zahříván na 150°C po dobu 1 hodiny v případě pryskyřice **19**, 4 hodiny byla zahřívána pryskyřice **23c**. Po reakci byla pryskyřice promyta 3x DMF, 3x DCM.

N¹-(2-(piperidin-1-yl)-9H-purin-6-yl)propan-1,3-diamin (21)

LC-MS: rt = 0.84 min.; [M+H]⁺ = 279.90; čistota 64%

*N*¹-benzyl-*N*³-(9-benzyl-2-(4-methylpiperazin-1-yl)-9*H*-purin-6-yl)propan-1,3-diamin (24b)

LC-MS: rt = 0.57 min.; [M+H]⁺ = 471.08; čistota 98%

Redukce nitro skupiny (8, 8a, 26)

Pryskyřice **6**, **25a** (250 mg) byla nabobtnána v DCM, promyta 1x DMF a 3x DMF nasyceným dusíkem. Roztok dihydrátu chloridu cínatého (564 mg; 2.5 mmol) v DMF nasyceným dusíkem (2.5 mL), byl přidán EDIPA (350 µL; 2.5 mmol). Roztok byl smíchán s pryskyřicí a zahříván na 50°C přes noc. Po reakci byla pryskyřice promyta 3x DMF, 3x DCM.

1-methyl 4-((3-((2-chlor-9*H*-purin-6-yl)amino)propyl)karbamoyl)-2-aminobenzoát(8)

LC-MS: rt = 1.12 min.; [M+H]⁺ = 404.07; čistota 72%

4-((3-((2-chlor-9*H*-purin-6-yl)amino)propyl)karbamoyl)-2-aminobenzoová kyselina(9)

LC-MS: rt = 0.57 min.; [M+H]⁺ = 390.02; čistota 12%

Celková čistota 84%.

1-methyl-4-((3-((2-chloro-9-ethyl-purin-6-yl)amino)propyl)karbamoyl)-2-aminobenzoát(8a)

LC-MS: rt = 1.42 min.; [M+H]⁺ = 431.96; čistota 4%

4-((3-((2-chloro-9-ethyl-purin-6-yl)amino)propyl)karbamoyl)-2-aminobenzoová kyselina (9a)

LC-MS: rt = 0.70; [M+H]⁺ = 417.95; čistota 91%

Celková čistota 95%.

Methyl 4-((3-((2-chloro-9-ethyl-purin-6-yl)amino)propyl)karbamoyl)-*N*-ethyl-2-aminobenzoát (26)

LC-MS: rt = 0.97 min.; [M+H]⁺ = 471.91; čistota 18%

4-((3-((2-chloro-9-ethyl-purin-6-yl)amino)propyl)karbamoyl)-*N*-ethyl-2-aminobenzoová kyselina (27)

LC-MS: rt = 0.78 min.; [M+H]⁺ = 445.96; čistota 70%

Celková čistota 83%.

Saponifikace methyl esteru kyseliny (9, 9a, 27)

Pryskyřice **8**, **26** (250 mg) byla nabobtnána v DCM a promyta 3x THF. TMSOK (65 mg; 0.5 mmol) byl rozpuštěn v THF (2.5 mL) a přidán k látce **8** nebo (**26**) a směs byla třepána přes noc. V případě pryskyřice **8** byla reakční doba 2 hodiny. Na závěr byla pryskyřice promyta 3x THF, 3x DMF, 3x DCM.

4-((3-((2-chlor-9*H*-purin-6-yl)amino)propyl)karbamoyl)-2-aminobenzoová kyselina (9)

LC-MS: rt = 0.57 min.; [M+H]⁺ = 390.02; čistota 94%

4-((3-((2-chloro-9-ethyl-purin-6-yl)amino)propyl)karbamoyl)-2-aminobenzoová kyselina (9a)

LC-MS: rt = 0.71; [M+H]⁺ = 417.95; čistota 97%

4-((3-((2-chloro-9-ethyl-purin-6-yl)amino)propyl)karbamoyl)-N-ethyl-2-aminobenzoová kyselina(27)

LC-MS: rt = 0.78 min.; [M+H]⁺ = 445.96; čistota 93%

Esterifikace bromoketonem (10, 28)

Prskyřice **9a**, **27** (250 mg) byla nabobtnána v DCM, promyta 3x DMF a přidán roztok 2-brom-4'-methylacetofenonu (106 mg; 0.5 mmol) a EDIPA (88 µL; 0.5 mmol) v DMF (2.5 mL). reakční směs byla třepána 4 hodiny (**28**), přes noc (**9a**) při RT. Po reakci byla prskyřice promyta 3x DMF, 3x DCM.

2-oxo-2-(p-tolyl)ethyl 2-amino-4-((3-((2-chloro-9-ethyl-purin-6-yl)amino)propyl)karbamoyl)benzoát(10)

LC-MS: rt = 2.06 min.; [M+H]⁺ = 549.95; čistota 67%

2-oxo-2-(p-tolyl)ethyl 2-amino-4-((3-((2-chloro-9-ethyl-purin-6-yl)amino)propyl)(ethyl)karbamoyl)benzoát (28)

LC-MS: rt = 2.16 min.; [M+H]⁺ = 577.96; čistota 65%

6 Závěr

Předložená bakalářská práce navazuje na výzkum v oblasti bisheterocyklických sloučenin hydroxychinolonu s nukleovou bází, purinem. Získané informace biologické aktivity i fluorescenčních vlastností těchto struktur podpořily další studium hydroxychinolonů. Teoretická část shrnuje metody příprav hydroxychinolonů a jejich vlastností. Velký důraz je kladen na řešení v oblasti cyklizačních reakcí a syntéz na pevné fázi.

Experimentální část byla zaměřena na syntézu cílových bisheterocyklických derivátů hydroxychinolonů s spojením s purinem přes vhodný spacer v poloze č.6 purinu. První strategie spočívala v přípravě 6-purinylyl-propan-1,3-diaminu (**1**) v roztoku a jeho navázání na aminomethylenovou prskyřici s BAL linkerem. Intermediát **1** byl připraven v dobrém výtěžku i čistotě, avšak díky nízké rozpustnosti v rozpouštědlech vhodných pro redukční aminaci se jej nepodařilo kvantitativně navázat na prskyřici. Další alternativa předpokládala reakci spaceru (1,3-diaminopropanu) s 1-methyl-2-nitroterefalátem za vzniku intermediátu **12** a opět jeho navázání redukční aminací na

pryskyřici. Derivát **12** se nepodařilo selektivně v roztoku připravit, vždy vznikalo více dimerního produktu **13** než požadovaného produktu **12**.

Další modifikace spočívala v přípravě 1-(2-Nos)-propan-1,3-diaminu (**15**) v roztoku a jeho imobilizaci na pryskyřici s BAL linkerem za vzniku intermediátu **17**, který se stal základem pro tvorbu cílových biheterocyklických látek s 4 nebo 5 diverzními místy. Syntéza cílových derivátů (**11**) s 4 diverzními místy byla založena na denosylaci intermediátu **18**, acylaci 1-methyl-2-nitrotrefalátem, alkylaci pozice *N*9 purinu a substitucí atomu chloru v poloze 2. Mezi finální kroky patřila výstavba hydroxychinolonového skeletu. Zvýšení diverzity konečných struktur bylo docíleno pouhou záměnou reakčních kroků. Alkylován byl již intermediát **18**, kde docházelo i k reakci na amino skupině aktivované 2 Nosyl protekční skupinou. Další reakční sekvence již byla totožná s předchozím postupem.

Alkylační reakce byly testovány pomocí alkyliodidů v přítomnosti báze DBU. Kvantitativně se podařilo připravit pouze ethyl a *iso*-propyl deriváty **6a**, **6b**, **22a**, přestože byly testovány podmínky při vyšší teplotě i koncentraci alkylačního činidla. Naopak pro deriváty **22b** a **22c** byla vhodnější Mitsunobova reakce, kde se úspěšně podařilo připravit i stericky náročný *iso*-propyl (**22a**) i benzyl (**22c**) derivát. Denosylační reakce byla testována za standardních popsanych podmínek, ale přidavek ekvivalentu báze (DBU) zkracovalo reakční dobu na 30 minut.

Další studovaná reakce byla substituce chloru v poloze 2 purinu. Nejprve byly studovány podmínky popsané z předešlého výzkumu na pentylaminu, použití pentyl aminu na acylovaném derivátu **5** vedlo k směsi nečistot, proto byla testována reakce s piperidinem na nosylovaném derivátu **18**, která poskytovala vedlejší produkt o 30 jednotek nižší. Nejvhodnější se jevila substituce po denosylační reakci, v tomto případě se derivát **21** podařilo připravit o dobré čistotě. Pro tento typ reakce byl studován i *N*-methyl-piperazin, který také poskytoval čistý produkt **24b**. Pro další syntézu bude nutné využít silnější nukleofily typu piperidin, *N*-methylpiperidin, pyrrolidin apod., méně reaktivnější alkylaminy typu pentylamin neposkytovat dostatečnou konverzi produktu. Další sekvence byla testována bez substituce v poloze 2. Tento reakční krok se podařilo vyřešit až v průběhu řešení bakalářské práce.

Acylační reakce byla provedena za standardních podmínek s 1-methyl-2-nitrotrefalátem, taktéž redukční aminace probíhala s dihydrátem chloridu cínatého za vzniku derivátů **8**, **26**. Při redukcí docházelo již k částečné saponifikaci methyl esteru, vedlejší reakce byla využita pro zkrácení následující saponifikace pomocí kalium

silanolátu. Poslední reakci na pevné fázi byla esterifikace s bromoketonem. Pro esterifikaci byly použity běžné podmínky: 0.2 M roztok s ekvivalentem báze v DMF. Derivát **28** však byl získán pouze s čistotou 65%. Přesto byla na obou výchozích intermediátech testována i cyklizační reakce v kyselině trifluoroctové a octové. V kyselině trifluoroctové nedocházelo po 1 hodině k cyklizaci. Po prodloužení reakční doby byla získána pouze směs neidentifikovatelných látek. Kyselina octová poskytovala podobné výsledky, vždy byla detekována jen směs látek, ve spektru nebyla přítomná výchozí látka, ale podle LC-MS analýzy je hmota odpovídající produktu přítomná v celém spektru. Finální deriváty bude pravděpodobně nutné analyzovat v kyselém prostředí v kyselině mravenčí či kyselině trifluoroctové. Závěrečné cyklizaci bude věnována další pozornost po přípravě pre-cyklizačních intermediátů **10**, **28** ve větším množství.

Zároveň byly testovány i deriváty volné v poloze *N9* purinu. Studovaly jsme skupiny boc, fmoc a nosyl v roztoku i na pevné fázi. První studovaná reakce byla bokace 2,6-dichlorpurinu v roztoku. Reakci jsme testovaly v THF, DMF i pyridinu v přítomnosti báze i katalyzátoru DMAP, cílový boc-purin **32** se však nepodařilo připravit. Zároveň byla věnována pozornost na bokaci na pevné fázi, kde byla kvantitativnost reakce ověřena fmocylací s FmocCl, vždy však byl detekován 9-fmoc-purin. Purinový skelet bylo velmi snadno fmocylovat v *N9* pozici, při následné alkylaci nosyl aktivované aminoskupiny byla fmoc protekční skupina vlivem báze odštěpena. Použití nosyl protekční skupiny se také neosvědčilo, reakce byla provedena na pevné fázi a neposkytovala kvantitativně požadovaný produkt **35**, přestože byl použit 2-NosCl i 4-NosCl za různých teplot i koncentrací činidla.

Bakalářská práce představuje stabilní základ pro metodu vhodnou pro přípravu bisheterocyklických sloučenin purinu a hydroxychinolonu. V nejbližší době budeme dále studovat finální cyklizační reakci.

7 Literatura

- ¹ Spence, T. W. M.; Tennant, G. *J. Chem. Soc.* **1971**, 22, 3712-3719.
- ² Gao F.; Johnson K. F.; Schlenoff J. B.: *J. Chem. Soc. Perkin Trans.*, 1996, 269-273.
(tady jsem nikde nomohla najít volume takže to číslo co tam je je issue)
- ³ Putokhin, N. I. *Zhurnal Obshchei Khimii* **1935**, 5, 1176-84.
- ⁴ Velezheva, V. S.; Mel'man, A. I.; Pol'shakov, V. I.; Anisimova, O. S. *Khim. Geter. Soed.* **1992**, 2, 279-280.
- ⁵ Guisen, Z.; Jingkun, G.; Yanmei, T.; Tan, Guyue, L.; Junjie L.; Wen ,L.; Ting L., *Faming Zhuanli Shenqing* **2010**, CN 101863823A.
- ⁶ Berman, J. E.; Kiser, L.R.; Garas, W. F.; Behrman, E. C.; Pitt, B. M. *J. Chem. Res. Synop.* **1995**, 5, 164-165.
- ⁷ Pesci E. C.; Milbank J. B. J.; Pearson, J. P.; Kende, A. S.; Greenberg, E. P.; Iglewski, B. H. *PCT Int. Appl.*, **2002**, WO 2002018342.
- ⁸ Hradil, P.; Jirman, J. *Collect. Czech. Chem. Commum.* **1995**, 60, 1357-1366.
- ⁹ Yeleswarapu, K. R.; Manojit, P.; Vedula, M. S.; Akella, V.; Pillarisetti, S.; Padakanti, S.; Kalleda, S. R. *PCT Int. Appl.* **2005**, WO 2005040163.
- ¹⁰ Spáčilová, L.; Hlaváč, J.; Hradil, P.; Fryšová, I.; Maloň, M.; Soural, M.; Krejčí, P. *J. Heterocyclic Chem.* **2006**, 43, 1065-1070.
- ¹¹ Heravi M. M.; Oskooie H. A.; Bahrami L.; Ghassemzadeh M. *Indian. J. Chem. B.* **2006**, 45B, 779-781.
- ¹² Hradil, P.; Kvapil, L.; Hlaváč, J.; Weidlich, T.; Lyčka, A. *J. Heterocyclic Chem.* **2000**, 37, 831-837.
- ¹³ Sui, Z.; Ngyen, V. N.; Altom, J.; Fernandez, J.; Hilliard, J. J.; Bernstein, J. I.; Barrett, J. F.; Ohemeng, K. A. *Eur. J. Med. Chem.* **1999**, 34, 381-387.
- ¹⁴ Dorwald, F. Z. *Organic Synthesis on Solid Phase*, 2 ed.; Wiley-VCH: Weinheim, Germany, 2002; pp 1-15.
- ¹⁵ Soural, M.; Krchňák, V. *J. Comb. Chem.* **2007**, 9, 793-796.
- ¹⁶ Křupková, S.; Soural, M.; Hlaváč, J.; Hradil, P. *J. Comb. Chem.* **2009**, 11, 951-955.
- ¹⁷ Soural, M.; Bouillon, I.; Krchňák, V. *J. Comb. Chem.* **2008**, 10, 923-933.
- ¹⁸ Vaňkova, B.; Hlaváč, J.; Soural, M. *J. Comb. Chem.* **2010**, 12, 890-894.
- ¹⁹ Hradil, P.; Krejčí, P.; Hlaváč, J.; Weidemannová I.; Lyčka A.; Bertolasi V. *J. Heterocyclic Chem.* **2004**, 41, 375-379.
- ²⁰ Dong, Q.; Kanouni, T.; Wallace, M. B. *PCT Int. Appl.* **2008**, WO 2008115890.
- ²¹ Krejčí, P.; Hradil, P.; Hlaváč, J.; Hajdúch, M. *PCT Int. Appl.* **2008**, WO2008028427.
- ²² Hradil, P.; Hlaváč, J.; Soural, M.; Hajdúch, M.; Kolář, M.; Večeřová; R. *Mini-Rev. Med. Chem.* **2009**, 9, 696-702.
- ²³ Soural, M.; Hlaváč, J.; Hradil, P.; Fryšová, I.; Hajdúch, M.; Bertolasi, V.; Maloň, M. *Eur. J. Med. Chem.* **2006**, 41, 467-474.
- ²⁴ Soural, M.; Hlaváč, J.; Funk, P.; Džubák, P.; Hajdúch, M. *ACS Comb. Sci.* **2011**, 13, 39-44.
- ²⁵ Verma, P. R. *Bioorgan. Med. Chem.* 2005, 13, 1059-1067.
- ²⁶ Iwanowicz, J.E.; Watterson, H. S.; Murali, D. G. T.; Pitts, J.W.; Henry, H. *PCT Int. Appl.* 2001, WO 2001081340.
- ²⁷ Yushchenko, D. A.; Bilokin, M.D.; Pyvovarenko, O. V.; Duportail, G.; Mély, Y.; Pivovarenko, V. G. *Tetrahedron Lett.* **2006**, 47, 905-908.
- ²⁸ Motyka, K.; Hlaváč, J.; Soural, M.; Funk, P. *Tetrahedron Lett.* **2010**, 51, 5060-5063.

-
- ²⁹ Bilokin, M. D.; Volodymyr, V.; Shvadchak, V. V.; Yushchenko, D. A.; Duportail, G.; Mély, Y.; Pivovarenko, V. G. *J Fluoresc.* **2009**, *19*, 545–553.
- ³⁰ Yushchenko, D. A.; Shvadchak, V. V.; Klymchenko, S. A.; Duportail, G.; Pivovarenko, V. G.; Mély, Y. *J. Phys. Chem. A* **2007**, *111*, 10435–10438.
- ³¹ Xia, B.; Gerard, B.; Solano, D. M.; Wan, J.; Jones, G.; Porco, J. A. *Org. Lett.*, **2011**, *13*, 61346–1349.
- ³² Motyka, K.; Hlaváč, J.; Sural, M.; Hradil, P.; Krejčí, P.; Kvapil, L.; Weiss, M. *Tetrahedron Lett.*, **2011**, *52*, 715–717.
- ³³ Vaňková, B. Nепublikované výsledky.
- ³⁴ Motyka, K.; Vaňková, B.; Hlaváč, J.; Sural, M.; Funk, P. *J. Fluoresc.* **2011**, *21*, 2207–2212.
- ³⁵ Cankařová, N.; Funk, P.; Hlaváč, J.; Sural, M. *Tetrahedron Lett.*, **2011**, *52*, 5782–5788.
- ³⁶ Fukuyama, T.; Jow, C. K.; Cheung, M. *Tetrahedron Lett.* **1995**, *36*, 6377–6374.
- ³⁷ Mitsunobu, O. *Synthesis* **1981**, *1*, 1–28.
- ³⁸ Dey, S.; Garner, P. *J. Org. Chem.* **2000**, *65*, 7697–7699.
- ³⁹ Austin, R. E.; Okonya, J. F.; Bond, D. R. S.; Al-Obeidi, F. *Tetrahedron Lett.*, **2002**, *43*, 6169–6171.