

UNIVERZITA PALACKÉHO V OLOMOUCI

PŘÍRODOVĚDECKÁ FAKULTA

Katedra organické chemie



Hana HIKLOVÁ

Příprava 2-substituovaných-3-hydroxychinolin-4(*1H*)-on-5-karboxamidů

Bakalářská práce

Studijní program: Bioorganická chemie B1407

Vedoucí práce: doc. RNDr. Miroslav Sural, Ph.D.

Olomouc 2013

Prohlášení:

Prohlašuji, že jsem bakalářskou práci zpracovala samostatně pod vedením doc. RNDr. Miroslava Sourala, Ph.D., za použití literatury, která je citována a uvedena na konci bakalářské práce. Tato práce ani její podstatná část nebyla předložena k získání jiného nebo stejného akademického titulu.

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

V Olomouci dne 3.5.2013

.....

Hana Hiklová

Poděkování:

Tímto bych chtěla upřímně poděkovat především vedoucímu mé bakalářské práce doc. RNDr. Miroslavovi Suralovi, Ph.D. za odbornou pomoc, cenné rady, ochotu a trpělivost při řešení dané problematiky. Dále bych ráda poděkovala Mgr. Adamovi Šimáčkovi za pomoc a ochotu, jakožto i celému kolektivu Katedry organické chemie PřF UP. V neposlední řadě patří velké poděkování mé rodině za jejich podporu během celého studia.

BIBLIOGRAFICKÁ IDENTIFIKACE

Jméno a příjmení autora:	Hana Hiklová
Název práce:	Příprava 2-substituovaných-3-hydroxychinolin-4(<i>1H</i>)-on-5-karboxamidů
Typ práce:	Bakalářská
Pracoviště:	Katedra organické chemie, Přírodovědecká fakulta Univerzity Palackého v Olomouci
Vedoucí práce:	doc. RNDr. Miroslav Sural, Ph.D.
Rok obhajoby:	2013
Abstrakt:	<p>Předložená bakalářská práce je zaměřena na 2-substituované-3-hydroxychinolin-4(<i>1H</i>)-on-5-karboxamidy. Text je členěn na část teoretickou a část experimentální. Teoretická část shrnuje syntetické přístupy vedoucí k 3-hydroxychinolin-4(<i>1H</i>)-onům, zabývá se jejich biologickou aktivitou a pojednává o fluorescenčních vlastnostech těchto látek.</p> <p>Experimentální část je zaměřena na vývoj schůdné syntézy 2-substituovaných-3-hydroxychinolin-4(<i>1H</i>)-on-5-karboxamidů.</p>
Klíčová slova:	Hydroxychinolony, biologická aktivita, fluorescenční vlastnosti.
Počet stran:	50
Počet příloh:	12
Jazyk:	Český

BIBLIOGRAPHIC IDENTIFICATION

Author's first name and surname:	Hana Hiklová
Title:	Synthesis of 2-substituted-3-hydroxyquinolin-4(<i>IH</i>)-one-5-carboxamides
Type of thesis:	Bachelor
Department:	Department of Organic Chemistry, Faculty of Science, Palacký University Olomouc
Supervisor:	doc. RNDr. Miroslav Soral, PhD.
The year of presentation:	2013
Abstract:	This Bachelor thesis is focused on the 2-substituted-3-hydroxyquinolin-4(<i>IH</i>)-one-5-carboxamides. The text is divided into theoretical part and experimental part. The theoretical part summarizes synthetic approaches to 3-hydroxyquinolin-4(<i>IH</i>)-ones, dealing with their biological activities and discusses the fluorescence properties of these substances. The experimental part is focused on the development of an efficient synthesis of 2-substituted-3-hydroxyquinolin-4(<i>IH</i>)-one-5-carboxamides.
Keywords:	Hydroxyquinolones, biological activity, fluorescence properties.
Number of pages:	50
Number of appendixes:	12
Language:	Czech

OBSAH

1. ÚVOD	9
2. CÍL	11
3. TEORETICKÁ ČÁST	13
3.1. Metody vedoucí k derivátům 3-hydroxychinolin-4(1H)-onů.....	13
3.2. Biologická aktivita	17
3.2.1. Protinádorová aktivita.....	18
3.2.2. Antibakteriální aktivita	25
3.2.3. Další účinky.....	26
3.3. Fluorescenční vlastnosti	27
4. VÝSLEDKY A DISKUZE	29
4.1. Příprava prekurzorů pro syntézu cílových látek.....	30
4.1.1. Příprava výchozí látky	30
4.1.2. Redukce	32
4.1.3. Chlorace	33
4.1.3.1. Chlorace sloučeniny II	33
4.1.3.2. Chlorace sloučeniny III	34
4.2. Příprava cílových látek.....	35
4.2.1. Reakce s aminy	35
4.2.1.1. Reakce sloučeniny II s propylaminem	35
4.2.1.2. Reakce sloučeniny III s propylaminem	37
4.2.1.3. Reakce sloučeniny III s cyklohexylaminem	39
4.2.1.4. Reakce sloučeniny III s benzylaminem	39
4.2.2. Hydrolýza.....	40
4.2.2.1. Hydrolýza sloučeniny VII.....	40

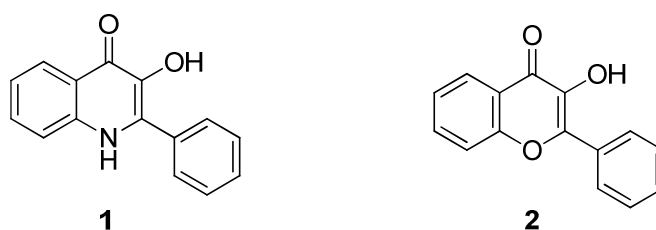
4.2.2.2. <i>Hydrolýza sloučeniny XVII</i>	41
4.2.3. Esterifikace	41
5. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST	43
5.1. Metody	43
5.2. Přípravy	43
6. ZÁVĚR	47
7. SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY	48
PŘÍLOHY	

SEZNAM ZKRATEK

Ac	acetyl
DIC	diioprylkarbodiimid
DMF	<i>N,N</i> -dimethylformamid
ekv.	ekvivalent
Et	ethyl
HOBt	hydroxybenzotriazol-
kat.	katalyzátor
LC-MS	liquid chromatography-mass spectrometry (kapalinová chromatografie-hmotnostní spektrometrie)
Me	methyl
NMR	nukleární magnetická rezonance
RVO	rotační vakuová odparka
THF	tetrahydrofuran
TLC	thin layer chromatography (tenkovrstevná chromatografie)
VL	výchozí látka

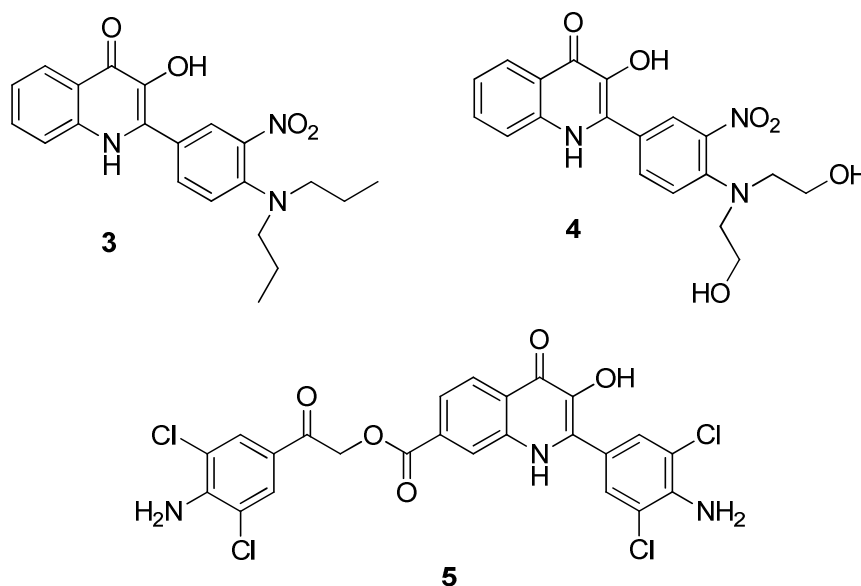
1. ÚVOD

Flavonoidy představují rozsáhlou skupinu dobře známých přírodních látek vykazujících široké spektrum biologických účinků, mezi něž patří především cytostatické a antileukemické vlastnosti.¹ Sloučeniny obsahující 3-hydroxychinolin-4(*IH*)-onový skelet jsou isosterické s přírodními flavonoidy, proto se pro svou potenciální biologickou aktivitu staly předmětem intenzivního výzkumu. Studium jsou podrobovány zejména deriváty 2-fenyl-3-hydroxychinolin-4(*IH*)-onů **1** jakožto azaanaloga flavonolů **2** (Obr. 1).



Obr. 1. Porovnání struktury 2-fenyl-3-hydroxychinolin-4(*IH*)-onů s přírodními flavonoly.

Sloučeniny odvozené od 2-substituovaného-3-hydroxychinolin-4(*IH*)-onového skeletu reprezentují třídu sloučenin se zajímavými biologickými vlastnostmi.¹⁻⁶ Tyto látky byly studovány jako inhibitory topoisomerasy II, DNA gyraasy a inosinmonofosfát dehydrogenasy (IMPDH).³ Mezi jejich známé účinky patří antiprotozoální, imunosupresivní a cytotoxická aktivita (Obr. 2).⁹



Obr. 2. Příklady některých známých 2-aryl-3-hydroxychinolin-4(*IH*)-onů s cytotoxickou aktivitou.

Syntéza 2-substituovaných-3-hydroxychinolin-4(*IH*)-onů se začala rozvíjet od počátku 70. let minulého století, kdy byla poprvé popsána jejich struktura. Z počátku byly metody přípravy těchto sloučenin vysoce specifické a reakce probíhaly s nízkým výtěžkem. Teprve v polovině 90. let minulého století byla popsána syntéza umožňující širší využití. Až na samotném konci minulého století, v roce 1999, byla popsána široce využitelná reakce s dobrým výtěžkem vedoucí k přípravě požadovaných 2-substituovaných-3-hydroxychinolin-4(*IH*)-onů.³

Jednou z možných modifikací 2-substituovaných-3-hydroxychinolin-4(*IH*)-onů je substituce vodíkového atomu chinolinového skeletu v polohách 5, 6, 7 a 8 karboxamidovou funkční skupinou, přičemž deriváty 2-substituovaných-3-hydroxychinolin-4(*IH*)-on-5-karboxamidů nebyly doposud popsány. Nahrazení vodíkového atomu karboxamidovou skupinou je snahou docílit přípravy látek obsahujících hydroxychinolinový skelet s nejúčinnější možnou kombinací substituentů.

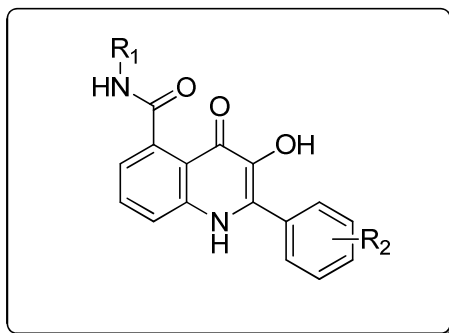
Skupina látek odvozených od 2-substituovaných-3-hydroxychinolin-4(*IH*)-onů substituovaných v poloze 6, 7 a 8 karboxamidovou funkční skupinou byla studována za účelem zjištění jejich biologické aktivity. Testy cytotoxicity byly prováděny *in vitro* na vybraných nádorových buněčných liniích. Některé z derivátů vykazovaly významné biologické vlastnosti se submikromolární cytotoxickou aktivitou.⁹

Kromě biologických účinků jsou tyto sloučeniny zajímavé také z pohledu fyzikálních vlastností, protože se vyznačují výraznými fluorescenčními vlastnostmi.¹⁰

2. CÍL

Cílem předložené bakalářské práce je pokus o vývoj syntetické metody vedoucí k derivátům 2-substituovaných-3-hydroxychinolin-4(*IH*)-on-5-karboxamidů (Obr. 3).

3-hydroxychinolin-4(*IH*)-ony substituované v poloze 5 karboxamidovou funkční skupinou se doposud nepodařilo připravit.



Obr. 3. Obecná struktura cílových derivátů.

Cíle práce lze shrnout do následujících bodů:

- Ověření navržené syntetické metody (*Schéma 1*).
- Optimalizace reakčních podmínek.

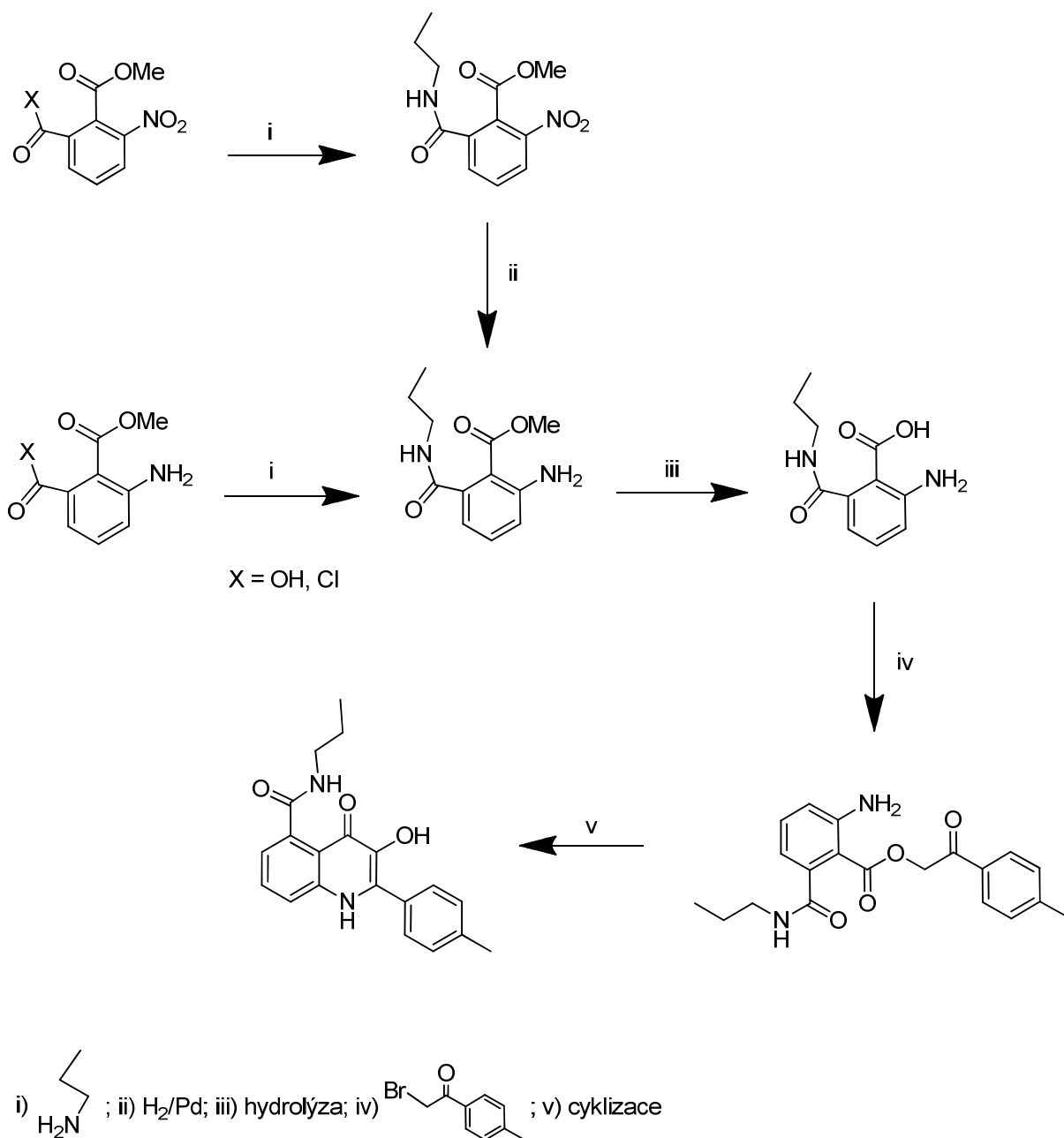


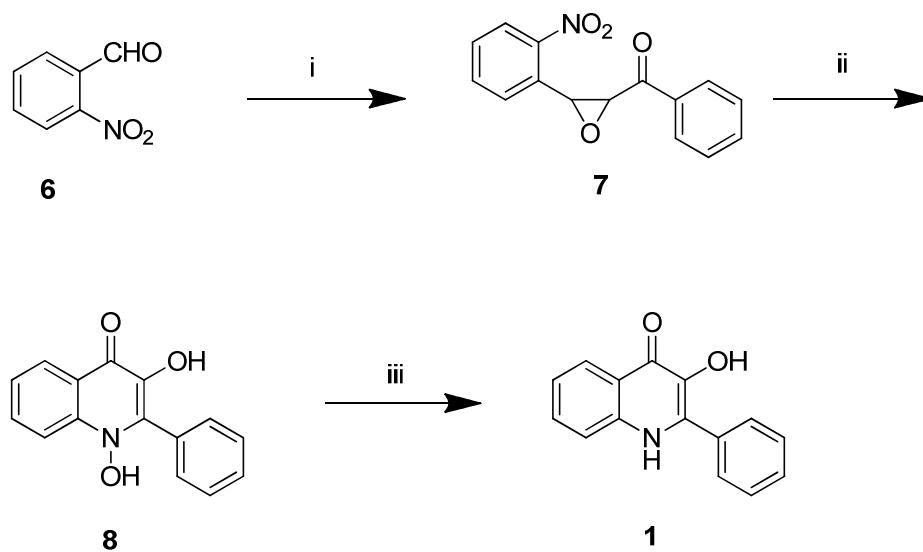
Schéma 1. Navržená příprava cílových látek.

3. TEORETICKÁ ČÁST

Teoretická část předložené bakalářské práce je členěna do tří částí. První z nich je věnována metodám příprav 3-hydroxychinolin-4(*IH*)-onů (dále jen „hydroxychinolony“), druhá se zabývá jejich biologickou aktivitou a poslední spektrálními vlastnostmi se zaměřením na fluorescenční účinky.

3.1. Metody příprav vedoucí k derivátům hydroxychinolonů

První syntéza vedoucí ke sloučeninám obsahujícím hydroxychinolonový skelet byla popsána v roce 1971. Modifikací Darzensovy reakce byl z 2-nitrobenzaldehydu **6** přes (3-(2-nitrofenyl)oxiran-2-yl)(fenyl)methanon **7** připraven 1,3-dihydroxy-2-fenylchinolin-4(*IH*)-on **8**, který byl následně převeden na výsledný 2-fenyl-3-hydroxychinolon **1** (Schéma 2).¹¹

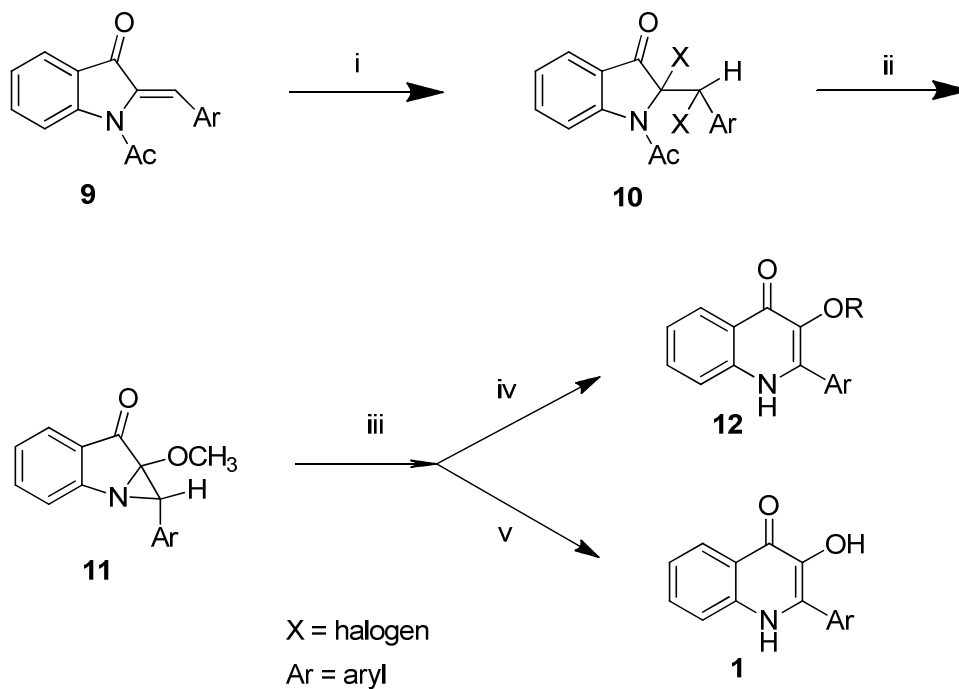


i) BrCH_2COPh , CH_3ONa ; ii) THF, HCl, hydrochinon; iii) $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$

Schéma 2. Příprava hydroxychinolonů z 2-nitrobenzaldehydu.

Tato metoda přípravy je však poněkud nevýhodná z důvodu špatné dostupnosti substituovaných 2-nitrobenzaldehydů.

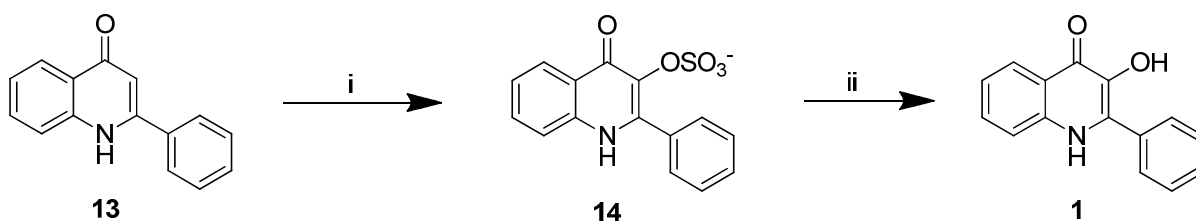
Další varianta, jak připravit hydroxychinolony, byla popsána v roce 1992. Ta je založena na rozšíření pětičlenného kruhu derivátu indolu **9** vedoucí přes aza-cyklopropan[*a*]inden **10** k požadovanému hydroxychinolonu **1** (Schéma 3).¹²



i) X₂, CHCl₃; ii) CH₃OH, CH₃ONa; iii) RONA, ROH; iv) AcOH; v) HCl

Schéma 3. Příprava hydroxychinolonů z derivátů indolu.

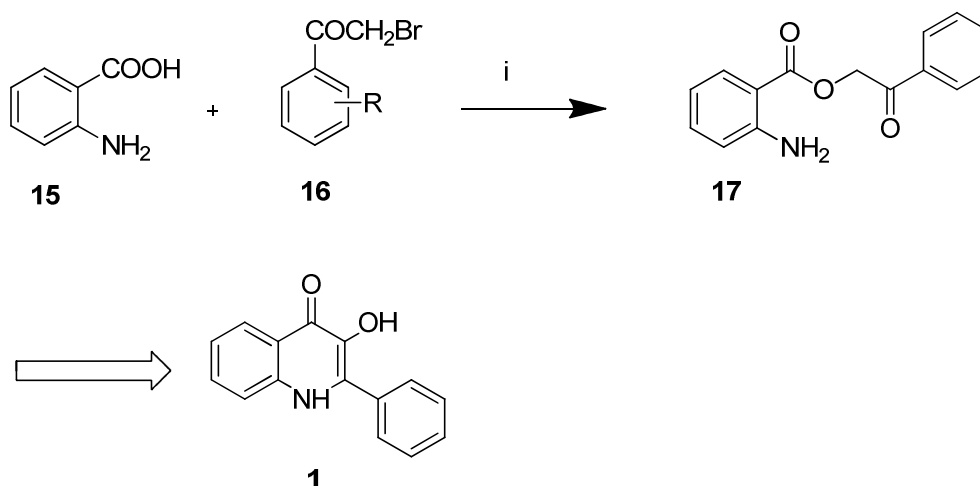
Další možností přípravy látek obsahujících hydroxychinolonový skelet je zavedení hydroxy skupiny do polohy 3 oxidací 2-aryl-4-chinolonu **13** (Schéma 4).¹³ Tento způsob přípravy není široce využitelný, použití reakce je limitováno nízkými výtěžky.



i) $S_2O_8^{2-}$, OH^- ; ii) H_2O , H^+

Schéma 4. Příprava hydroxychinolonů z 2-aryl-4-quinolonů.

V polovině devadesátých let byla vyvinuta široce využitelná metoda cyklizace fenacylesterů anthranilové kyseliny **17** připravovaných alkylací anthranilové kyseliny **15** s bromoacetofenony **16** (Schéma 5).¹⁴



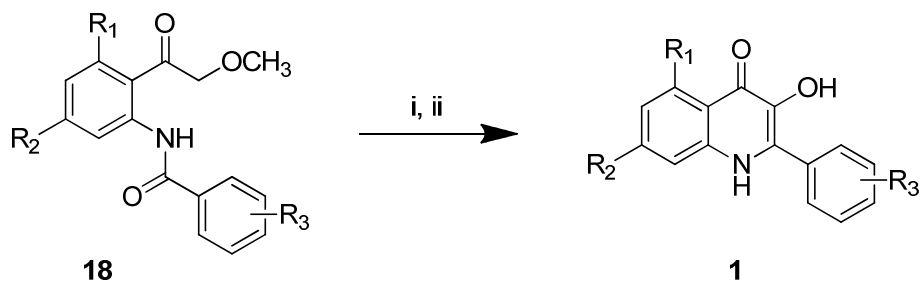
i) báze, DMF

Schéma 5. Příprava hydroxychinolonů z kyseliny anthranilové.

Původně byla tato reakce prováděna zahříváním bez rozpouštědla nebo zahříváním v kyselině polyfosforečné. Postupem času byly popsány i cyklizace v kyselině octové či trifluoroctové. Výhodou této syntetické metody je jednoduchost, dostupnost velkého počtu výchozích látek a vysoký výtěžek.

Široce využitelná syntéza hydroxychinolonů byla popsána v roce 1999, kdy se cyklizaci podrobují deriváty alkyl(2-aminofenyl)ketonů **18** (Schéma 6).⁵ Výchozí látky jsou snadno dostupné přeměnou 2-halogenketonů v poměrně dobrém výtěžku. Tato metoda

přípravy byla většinou využita pro přípravu 3-alkyl derivátů, ale příprava hydroxychinolonů **1** demethylací HBr nebo pyridinium chloridem vhodných 3-methoxy derivátů je také možná.



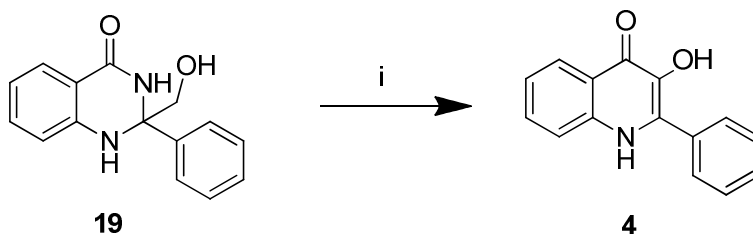
$R_1, R_2 = \text{H, OH, CH}_3, \text{F}$

$R_3 = \text{OH, halogen, CF}_3, \text{NH}_2, \text{alkyl, COOH, COEt}$

i) NaOEt; ii) HBr

Schéma 6. Příprava hydroxychinolonů z alkyl(2-aminofenyl)ketonů.

Další možností jak získat hydroxychinolonů **1** je přesmyk tetrahydrochinazolinových derivátů **19** v kyselině octové (Schéma 7).¹⁵



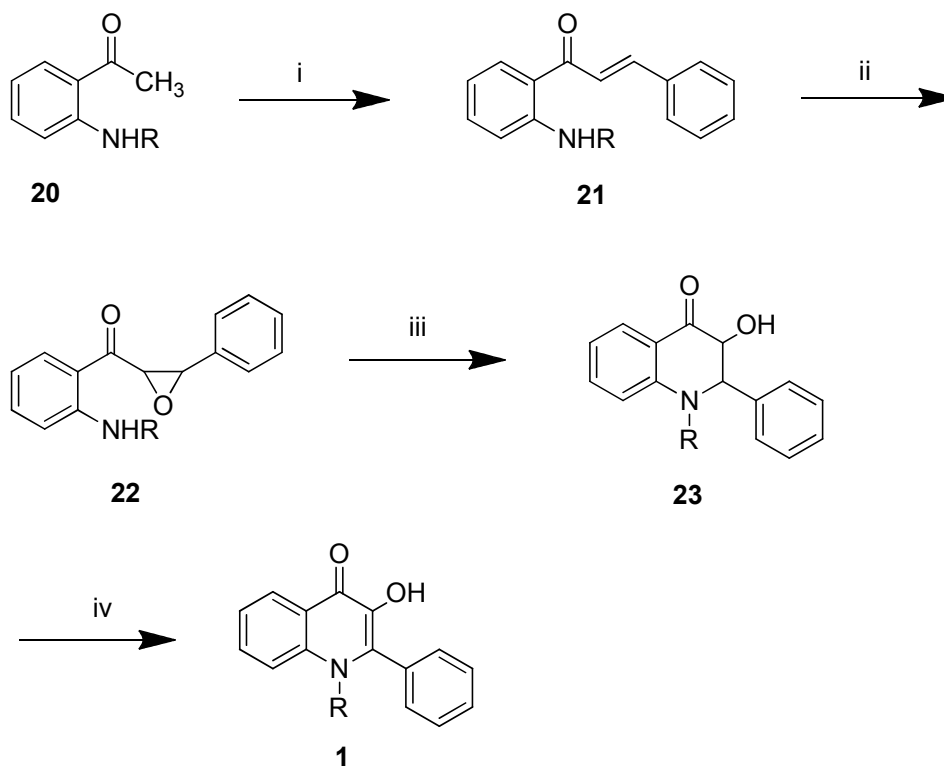
i) AcOH, reflux

Schéma 7. Příprava hydroxychinolonů z tetrahydrochinazolinových derivátů.

Výtěžek reakce činí 56%. Obecné využití této metody přípravy je značně limitováno, jelikož výtěžek je silně ovlivněn substitucí a vhodné výchozí látky nejsou jednoduše dostupné.

Další popsanou metodou přípravy je reakce, kdy z *N*-substituovaných acetofenonů **20** vzniká (2-amino-fenyl)-(3-fenyl-oxiranyl)-methanon **21**, který se ponechá refluxovat v

ethanolu. Produktem následné oxidace je požadovaný hydroxychinolon **1** (Schéma 8).¹⁶ Nicméně tato syntéza nemá praktické využití vzhledem k náročné dostupnosti výchozích látek a výtěžku reakce okolo 1%.



i) PhCH=O; ii) H₂O₂ /OH⁻; iii) EtOH, reflux; iv) H₂O₂ /OH⁻

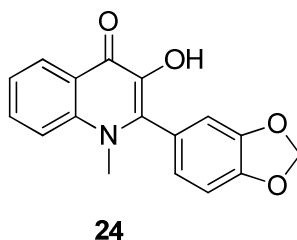
Schéma 8. Příprava hydroxychinolonů z acetofenonů.

3.2. Biologická aktivita vybraných derivátů hydroxychinolonů

Hydroxychinolony se staly v posledních letech předmětem četných studií zaměřených na biologické vlastnosti těchto látek. Intenzívnímu výzkumu jsou tyto sloučeniny podrobovány zejména z pohledu antibakteriálních a cytotoxických účinků.

První zmínka o biologické aktivitě těchto sloučenin pochází z roku 1986, kdy byl izolován 3-hydroxygraveolin **24** (Obr. 4) z nadzemní části rostliny *Ruta chalapensis*.¹⁷

Během devadesátých let minulého století byly testovány isosterické flavony, u nichž byla pozorována biologická aktivita. Bylo zjištěno, že od nich odvozené deriváty 4(*IH*)-chinolinonů působí jako inhibitory gyrazy s antibakteriálními účinky. Následnými testy se prokázalo, že zároveň působí jako inhibitory topoisomerasy, dioxygenasy a inosinmonofosfát dehydrogenasy, čímž se staly zajímavými z pohledu potenciálních nových léčiv. Byly studovány také jejich protinádorové a antibakteriální vlastnosti.¹⁷

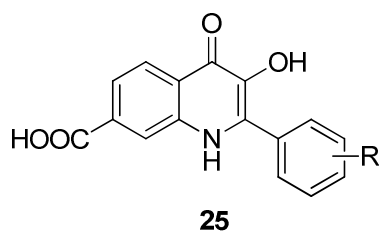


Obr. 4. 3-hydroxygraveolin.

3.2.1. Protinádorová aktivita

Testování protinádorové aktivity založené na MTT cytotoxickém testu probíhalo na buněčných liniích K562 (lidská myeloidní leukemie), K562-tax (lidská myeloidní leukemie rezistentní na paclitaxel), CEM (T-lymfoblastická leukemie), CEM-DNR-bulk (T-lymfoblastická leukemie rezistentní na doxorubicin) a A549 (adenokarcinom plic).

Protinádorová aktivita *in vitro* byla testována na derivátech 2-fenyl-3-hydroxy-4(*IH*)-chinolon-7-karboxylové kyseliny **25** (Obr. 5).

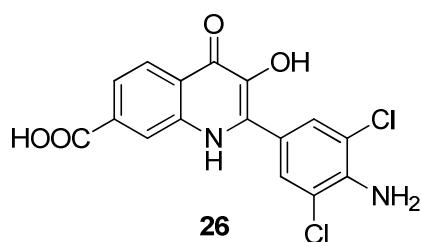


Obr. 5. Struktura derivátů 2-fenyl-3-hydroxy-4(*IH*)-chinolon-7-karboxylové kyseliny studovaných na protinádorovou aktivitu na buněčných liniích *in vitro*.

R	A 549	CEM	CEM-DNR bulk	K 562	K562-tax
R = H	236,2	223,4	171,2	198,9	196,3
R = 2-NO ₂	226,1	100,8	153,5	130,0	183,0
R = 2-I	191,8	124,4	134,1	129,0	174,9
R = 2-Cl	201,9	156,1	149,7	161,1	167,5
R = 3-Cl	239,1	224,9	163,4	190,0	197,5
R = 2-Br	192,4	117,0	145,5	146,3	160,6
R = 4-CH ₃	190,7	195,2	158,6	172,0	172,0
R = 3,5-diCl-4-NH ₂	9,83	12,3	12,0	11,0	11,7
R = 3-NO ₂	250	227,2	166,1	200,1	197,1
R = 4-NO ₂	250	235,6	167,2	208,8	192,9

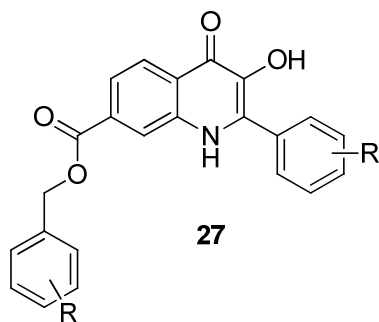
Tab. 1. Přehled substituentů **25** a hodnoty IC₅₀.

Z výsledků *in vitro* cytotoxického MTT testu výše zmíněných derivátů sloučeniny **25** vyplývá, že nevykazují příliš vysokou cytotoxickou aktivitu (IC₅₀ > 100 μM na pěti buněčných liniích). Jako nejúčinnější se ukázala být 2-(4-amino-3,5-dichlorophenyl)-3-hydroxy-4(1H)-chinolon-7-karboxylová kyselina **26** (Obr. 6) s hodnotami IC₅₀ = 9,83-11,98 μM (Tab. 1). Ostatní vysoké hodnoty mohou být vysvětleny nízkou propustností sloučenin skrze buněčnou membránu.³



Obr. 6. Nejúčinnější derivát z testovaných 2-fenyl-3-hydroxy-4(1H)-chinolon-7-karboxylových kyselin.

U všech sloučenin byla následně karboxylová kyselina substituována fenacylesterovou skupinou (Obr. 7). Aktivita některých derivátů výrazně vzrostla oproti předchozím testovaným sloučeninám (Tab. 2).



Obr. 7. Struktura derivátů studovaných na protinádorovou aktivitu na buněčných liniích *in vitro* (R viz. Tab. 1).

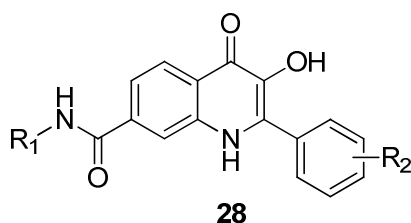
Některé z testovaných derivátů byly neaktivní vůči všem čtyřem buněčným liniím. Nejlepších výsledků v testování dosáhly deriváty 2-jodo, 2-bromo, 3-chloro, 4-methyl a 3,5-dichloro-4-amino deriváty, které vykazovaly dobrou aktivitu vůči buněčným liniím CEM a K562 ($IC_{50} = 0,76-8,0 \mu M$). Přičemž 4-methyl a 3,5-dichloro-4-amino deriváty navíc prokázaly aktivitu i proti buněčným liniím s lékovou rezistencí K562-tax a CEM-DNR-bulk (Tab. 2).²

R	A 549	CEM	CEM-DNR bulk	K 562	K562-tax
R = H	120,2	147,0	128,0	132,4	141,8
R = 2-NO ₂	46,6	25,6	105,2	28,9	40,3
R = 2-I	11,3	5,5	12,0	5,0	8,5
R = 2-Cl	38,2	17,4	36,3	15,7	79,3
R = 3-Cl	4,5	8,0	11,5	5,6	10,7
R = 2-Br	10,4	4,9	12,3	5,2	8,5
R = 4-CH ₃	2,8	3,8	4,9	2,9	2,8
R = 3,5-diCl-4-NH ₂	0,68	0,76	3,6	1,1	1,2
R = 3-NO ₂	162,5	102,0	189,8	26,1	43,2
R = 4-NO ₂	151,7	182,6	174,6	48,6	96,5

Tab. 2. Přehled substituentů a dosažených hodnot IC_{50} .

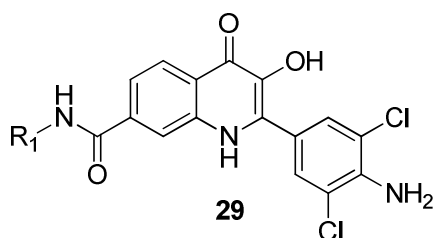
Dalšími *in vitro* cytotoxickými testy na reprezentativních buněčných liniích prošla třída látek 2-fenylsubstituovaných-3-hydroxychinolin-4(*IH*)-onů substituovaných v polohách 6, 7 a 8 karboxamidovou funkční skupinou. Uvedené sloučeniny byly testovány na buněčných liniích CEM (T-lymfoblastická leukemie), K562 (lidská myeloidní leukemie) a HCT116 (karcinom tlustého střeva).

Jako první byly testovány deriváty 2-fenylsubstituovaných-3-hydroxychinolin-4(*IH*)-on-7-karboxamidů **28** (Obr. 8). Sloučeniny s karboxamidovou skupinou substituovanou v *N*-poloze hydrofilními ligandy nevykazovaly žádnou aktivitu. Naopak karboxamidy *N*-substituované lipofilními skupinami vykazaly slibnou cytotoxicitu ($IC_{50} = 2,2-3,1 \mu M$).



Obr. 8. Struktura derivátů studovaných na protinádorovou aktivitu na buněčných liniích *in vitro*.

Dalšímu detailnějšímu testování byly podrobeny deriváty 2-(4-amino-3,5-dichlorofenyl)-3-hydroxychinolin-4(*IH*)-on-7-karboxamidů **29** (Obr. 9), které vykazaly submikromolární aktivitu na buněčných liniích CEM. Při detailnějším studiu těchto sloučenin bylo vyzorováno, že zakomponováním delšího alifatického uhlíkatého řetězce nebo většího karbocyklu dochází k mírnému nárůstu aktivity (Tab. 3).⁹



Obr. 9. Struktura derivátů studovaných na protinádorovou aktivitu na buněčných liniích *in vitro*.

R₁	CEM	K562	HCT116
cyklopropyl	3,7	16,9	15,1
cyklopentyl	1,1	15,3	12,9
cykloheptyl	1,0	9,5	10,9
cyklododecyl	0,45	2,1	4,1
methyl	3,9	25,8	32,1
pentyl	1,0	7,5	5,6
dodecyl	0,7	3,9	10,4
benzyl	0,94	6,5	6,6
indan-2-yl	0,93	3,2	6,9
2,2-difenyEt	0,74	2,5	5,3

Tab. 3. Přehled substituentů testovaných 7-karboxamidů a dosažených hodnot IC₅₀.

Další výzkum byl zaměřen na vliv polohy karboxamidové skupiny na výslednou cytotoxicitu studovaných látek. Testování byly podrobeny deriváty 2-(4-amino-3,5-dichlorofenyl)-3-hydroxychinolin-4(*1H*)-on-6-karboxamidů (Tab. 4) a 2-(4-amino-3,5-dichlorofenyl)-3-hydroxychinolin-4(*1H*)-on-8-karboxamidů (Tab. 5). Odpovídající 5-karboxamidy se nepodařilo syntézou na polystyrenové pryskyřici připravit.

R₁	CEM	K562	HCT116
cyklopropyl	1,7	2,6	2,8
cyklopentyl	2,0	2,5	2,2
cykloheptyl	0,77	0,79	0,59
cyklododecyl	0,26	0,77	0,69
methyl	2,8	2,9	2,9
pentyl	3,1	2,3	1,8
dodecyl	0,25	0,37	0,56
benzyl	3,1	2,8	2,5

indan-2-yl	2,6	2,7	2,7
2,2-difenyEt	0,84	0,8	1,4

Tab. 4. Přehled substituentů testovaných 6-karboxamidů a dosažených hodnot IC₅₀.

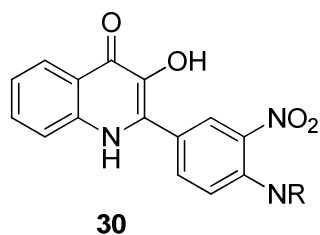
R₁	CEM	K562	HCT116
cyklopropyl	4,7	5,1	33,1
cyklopentyl	8,7	9,0	9,7
cykloheptyl	3,9	9,7	10,9
cyklododecyl	2,2	3,0	29,4
methyl	18,5	11,3	48,3
pentyl	2,5	5,3	6,8
dodecyl	2,5	3,0	42,9
benzyl	4,9	5,5	14,6
indan-2-yl	2,4	4,8	11,4
2,2-difenyEt	2,6	3,6	11,3

Tab. 5. Přehled vybraných substituentů testovaných 8-karboxamidů a dosažených hodnot IC₅₀.

Studiem těchto sloučenin bylo zjištěno, že deriváty substituované delším uhlíkatým řetězcem nebo větším karbocyklem dosahovaly výrazně lepších výsledků u 6-karboxamidů v porovnání se 7- a 8-karboxamidy. Odpovídající 7-karboxamidy vykazovaly srovnatelnou aktivitu na buněčných liniích CEM.

Výsledky ukázaly, že aktivita sloučenin je závislá především na substituentech karboxamidů, ale závisí také na její poloze.

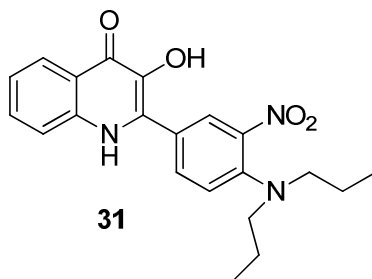
Další testovanou skupinou látek byly deriváty odvozené od skeletu sloučenin **30** (Obr. 10), jenž v kombinaci substituentů nitro v poloze 3 a amino skupiny v poloze 4 na fenylovém zbytku prokázaly zajímavé výsledky při testování protinádorové aktivity.⁴



Obr. 10. Struktura derivátů studovaných na protinádorovou aktivitu na buněčných liniích *in vitro*.

Všechny studované deriváty vykazovaly aktivitu na buněčných liniích CEM v mikromolárních či dokonce submikromolárních koncentracích. Nicméně pouze deriváty nesoucí hydrofobní substituent byly aktivní proti buněčným liniím s rezistencí na daunorubicin CEM-DNR-bulk a to v mikromolárních koncentracích.³

Nejúčinnějším ze všech testovaných derivátů byl 2-(4-(dipropylamino)-3-nitrofenyl)-3-hydroxychinolin-4(1H)-on **31** (Obr. 11), který dosáhl nejlepších výsledků téměř na všech buněčných liniích. Ze všech testovaných sloučenin dosáhl nejvyšší aktivity proti buněčným liniím s lékovou rezistencí (Tab. 6).³

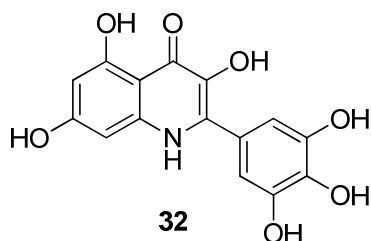


Obr. 11. Nejúčinnější z testovaných derivátů 2-(4-amino-3-nitrofenyl)-3-hydroxychinolin-4(1H)-onu.

IC ₅₀ [μM]				
CEM	CEM-DNR-bulk	K 562	K 562-tax	A 549
0,7	2,2	0,6	1,2	1,1

Tab. 6. Cytotoxické aktivity nejúčinnějšího testovaného derivátu.

Dalšími látkami podrobenými testům byly sloučeniny s hydroxylovými skupinami jako substituenty, přičemž nejvyšší aktivity dosáhl derivát **32** (Obr. 12).³



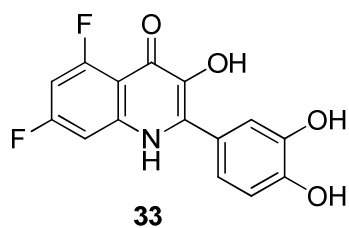
Obr. 12. Nejúčinnější testovaný derivát.

Mechanismus účinku 2-fenyl-3-hydroxychinolonů nebyl prozatím zcela objasněn. Na základě výsledků *in vitro* cytotoxického testování lze předpokládat, že testované látky mohou působit zároveň na více molekulárních cílů, nejen jakožto inhibitory topoisomerasy.

3.2.2. Antibakteriální aktivita

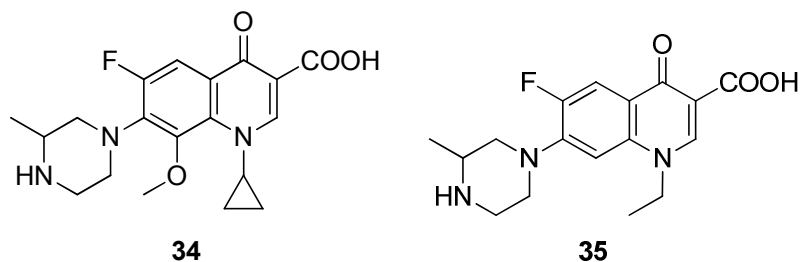
U vybraných derivátů obsahujících 3-hydroxychinolonový skelet byla testována *in vitro* aktivita proti některým grampozitivním a gramnegativním bakteriálním kmenům (*Enterococcus faecalis* CCM 4224, *Staphylococcus aureus* CCM 3953, *Escherichia coli* CCM 3954 a *Pseudomonas aeruginosa* CCM 3955). Dále byly tyto látky testovány proti grampozitivním a gramnegativním bakteriálním kmenům (methicillin rezistentní *Staphylococcus aureus* - MRSA, *Staphylococcus haemolyticus*, *Escherichia coli* a *Pseudomonas aeruginosa*) rezistentním na fluorochinolony užívané v klinické praxi. Valná většina z nich však nevykázala žádnou aktivitu.³

Studiu byly podrobeny taktéž deriváty 2-fenyl-3-hydroxychinolonů se substituovaným fenylovým zbytkem. Jako nejúčinnější z testovaných sloučenin se ukázal být 2-(3,4-dihydroxyfenyl)- 5,7-difluoro-3-hydroxychinolin-4(1H)-on **33** (Obr. 13) s aktivitou 190 μM .³



Obr. 13. Struktura neúčinnějšího derivátu testovaného jakožto inhibitoru topoisomerasy.

Přestože 3-hydroxychinolony nevykázaly žádnou výraznou antimikrobiální aktivitu, existují sloučeniny s chinolonovým skeletem substituované v poloze 3 karboxylovou skupinou, které jsou známé pro své antibakteriální účinky. Na trhu je k dostání skupina léčiv s antibakteriální aktivitou na bázi chinolonů. Například preparáty Gatifloxacin **34** a Norfloxacin **35** (*Obr. 14*) obsahující tuto účinnou látku. Mechanismus účinku je založen ve většině případů na inhibici gyrasy.

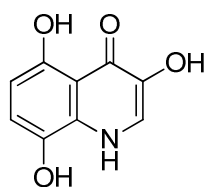


Obr. 14. Komerčně dostupné preparáty na bázi chinolin-4(*1H*)-onů.

3.2.3. Další účinky

2-fenyl-3-hydroxychinolony byly studovány jakožto inhibitory inosinmonofosfát dehydrogenasy (IMPDH) - jeden z klíčových enzymů v regulaci buněčné proliferace a diferenciaci.

3,5,8-trihydroxychinolin-4(*1H*)-on **36** (*Obr. 15*) izolovaný poprvé z houby *Verongia aerophoba*,¹⁸ prokázal významnou aktivitu proti viru HIV.¹⁹ Proto jsou sloučeniny s 3-hydroxychinolonovým skeletem zkoumány pro svou potenciální antivirální aktivitu.



36

Obr. 15. 3,5,8-trihydroxychinolin-4(1H)-on vykazující aktivitu proti viru HIV.

Některé deriváty 3-hydroxychinolonů se strukturou **30** (Obr. 10) vykazují imunosupresivní účinky.⁴

3.3. Fluorescenční vlastnosti vybraných derivátů hydroxychinolonů

Díky svým fluorescenčním vlastnostem byly hydroxychinolony studovány za účelem jejich potenciálního využití jakožto molekulárních sond. Fluorescenční metody jsou významným nástrojem užívaným při studiu biomolekulárních interakcí. Vyžadují však vhodné fluorescenční značky s optimálními vlastnostmi. Pomocí fluorescenčních sond lze detekovat jednotlivé části komplexů biomolekul, například živé buňky, nebo sledovat biologické procesy.

V případě fluorescenčních značek s jedním emisním maximem je intenzita fluorescence závislá na jejich koncentraci. Ta může kolísat v závislosti na různých biologických procesech ve vzorku. U duálních fluorescenčních značek, které vykazují dvě dobře oddělená emisní pásma, není fluorescence závislá na jejich koncentraci, protože jako signál je využit poměr intenzit těchto dvou maxim. To je výhodou u komplexních biologických systémů jako jsou buňky nebo tkáně, kde nemůže být jednoduše kontrolována koncentrace značky v daném místě.

Nejzajímavější skupinou látek s duální fluorescencí jsou deriváty 3-hydroxyflavonů. Jejich použití je však limitováno jejich relativně nízkou fotostabilitou a nízkým kvantovým výtěžkem.¹⁰ Proto začaly být zkoumány 2-aryl-3-hydroxychinolony jakožto strukturní analoga 3-hydroxyflavonů. Důvodem jejich duálního charakteru je intramolekulární přenos protonu v excitovaném stavu molekuly.²⁰

Důležitou součástí fluorescenční značky je spacer, který redukuje potenciální nežádoucí interakce mezi fluorescenční značkou a biomolekulou. Spacery mohou být připojeny ve dvou různých polohách: na karboxamidové skupině v poloze 6-8 hydroxychinolonového skeletu nebo na fenylu v poloze 2. Bylo zjištěno, že hydroxychinolony mohou být vázány k biomolekule skrze spacer připojený ke karboxamidové skupině v poloze 7 nebo 6 bez ztráty duálních vlastností. Ve druhém případě výsledky ukázaly, že zavedením substituované alkylové skupiny se zvýší fluorescenční kvantový výtěžek. Tvar emisního spektra byl ovlivněn délkou uhlíkatého řetězce.¹⁰

Hydroxychinolony byly zkoumány jakožto fluorescenční značky nukleových kyselin. Excitační maxima hydroxychinolonů se pohybují v rozmezí vlnových délek 350 až 420 nm. Zvolením vhodných substituentů je možné dosáhnout širšího rozsahu vlnových délek, ve kterých jsou hydroxychinolony excitovány.

4. VÝSLEDKY A DISKUZE

Jak již bylo zmíněno dříve, cílem bakalářské práce bylo připravit deriváty 2-aryl-3-hydroxychinolin-4(*IH*)-on-5-karboxamidů, které se doposud nepodařilo syntézou na polystyrenové pryskyřici připravit. Z tohoto důvodu byl pokus o přípravu těchto látek realizován pomocí tradiční syntézy v roztoku.

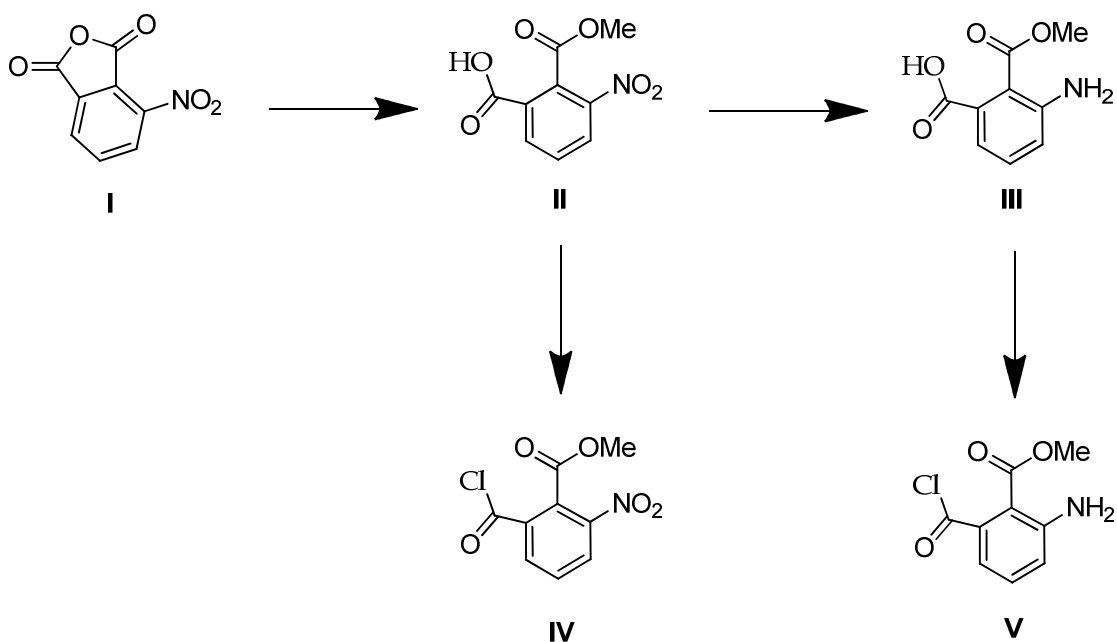


Schéma 9. Navržená příprava prekurzorů pro syntézu cílových látek.

Je známo, že příprava analogických hydroxychinolonů obsahujících karboxamidovou skupinu v polohách 6-8 z odpovídajících prekurzorů typu **II** (příslušné polohové izomery) funguje velice dobře pomocí syntézy v roztoku i na pevné fázi, přičemž všechny reakce běží jednoznačně a ve vysokých výtěžcích. Otázkou tedy bylo, zda bude tato syntetická cesta použitelná i pro přípravu cílových sloučenin **X**.

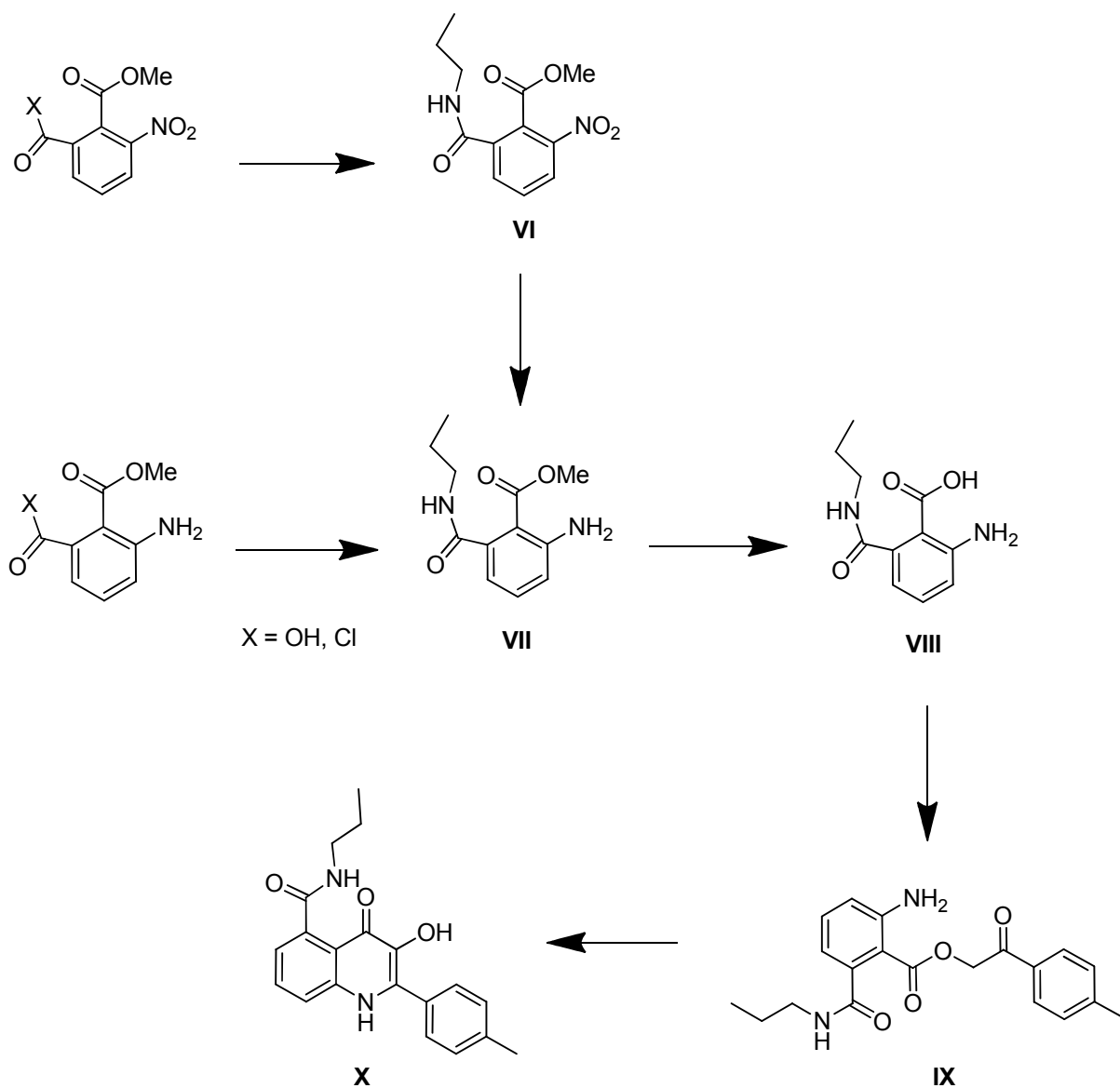
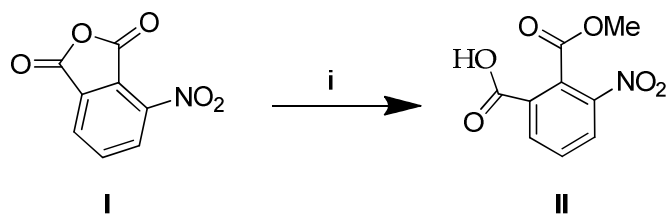


Schéma 10. Navržená příprava cílových látek.

4.1. Příprava prekurzorů pro syntézu cílových látek

4.1.1. Příprava výchozí látky

Jako výchozí látka pro syntézu cílových sloučenin byla vybrána 2-(methoxykarbonyl)-3-nitrobenzoová kyselina **II** připravovaná z 3-nitroftalanhydridu **I** (Schéma 11).



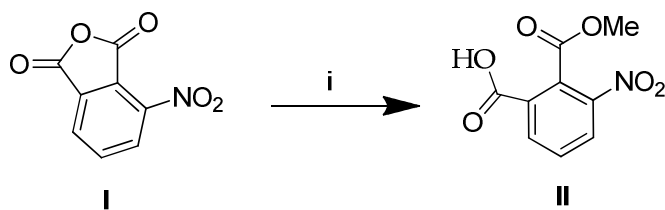
i) CH₃OH, reflux, 48h

Schéma 11. Příprava sloučeniny II.

Výše uvedená reakce je v literatuře popsána.^{22,23} 3-Nitroftalanhydrid byl rozpuštěn v methanolu a reakční směs byla refluxována na olejové lázni. Pro určení optimální reakční doby byly z reakční směsi odebírány vzorky v několikahodinových intervalech. První z nich po jedné hodině, poslední poté v čase 72 hodin. Průběh reakce byl sledován za pomoci TLC a LC-MS. Bylo vyzorováno, že nejlepší konverze lze dosáhnout, když jsou reakční komponenty míchány za refluxu po dobu 48 hodin. Přestože výchozí látka po uplynutí této doby nebyla zcela zreagována, reakce se při delší reakční době již neposunula výrazně ve prospěch produktu.

Surový produkt byl zpočátku čištěn pomocí sloupcové kapalinové chromatografií se systémem mobilní fáze EtOAc:toluen:HCOOH (25:25:1). Později se ukázalo, že pro purifikaci produktu je dostačující rekrystalizace z vody, přičemž čistota výsledného produktu činila 99%. Celkový výtěžek reakce se při reprodukcích pohyboval okolo 60 %.

Z důvodu dlouhé reakční doby výše zmíněného postupu byla vyzkoušena alternativní metoda přípravy, která měla zajistit její zkrácení. Reakcí 3-nitroftalanhydridu I s methanolátem sodným (*Schéma 12*) došlo k výraznému zkrácení reakční doby na 8 hodin. V tomto případě se podařilo téměř všechnu výchozí látku zreagovat, nicméně poměr zastoupení vedlejších produktů byl znatelně vyšší a celkově došlo k výraznému snížení výtěžku na 21 %. Z tohoto důvodu i přes dlouhou reakční dobu byla 2-(methoxykarbonyl)-3-nitrobenzoová kyselina II připravována prvním zmíněným způsobem. Struktura produktu byla potvrzena metodou NMR.

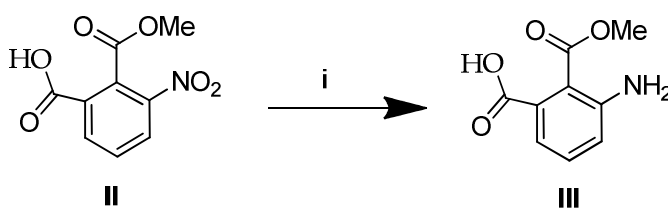


i) CH₃OH, Na, reflux, 8h

Schéma 12. Alternativní příprava sloučeniny **II**.

4.1.2. Redukce

3-amino-2-(methoxykarbonyl)benzoová kyselina **III** byla připravována redukcí 2-(methoxykarbonyl)-3-nitrobenzoové kyseliny **II** (Schéma 13). Za vhodnou metodu redukce byla zvolena katalytická hydrogenace, která je popsána v literatuře.²⁴



i) CH₃OH; 10% Pd/C; H₂; p; rt

Schéma 13. Katalytická hydrogenace.

Reakce byla prováděna v autoklávu za použití 10% Pd/C jakožto hydrogenačního katalyzátoru. Délka reakční doby a volba tlaku byla závislá na množství redukované látky. S přibývajícím množstvím látky se reakční doba prodlužovala a tlak potřebný pro redukcí se navyšoval. Závislost potřebného tlaku, času a množství katalyzátoru na hmotnosti navážky je shrnuta v Tab. 7.

Při vyvinutých podmínkách byla všechna výchozí látka zreagována, reakce probíhala bez vzniku vedlejších produktů za vysokých výtěžků okolo 93 %. Struktura produktu byla opět potvrzena metodou NMR.

Navážka VL	Čas [hod]	Tlak [atm]	Množství kat. [mg]
100 mg	1	0,25	10
200 mg	2	0,5	20
300 mg	2,5	0,5	30
2 g	24	2,5	200
9 g	96	10	1 800

Tab. 7. Přehled reakčních podmínek pro redukcí.

4.1.3. Chlorace

4.1.3.1. Chlorace sloučeniny II

Jednou z možností, jak transformovat karboxylovou kyselinu na amid, je příprava odpovídajícího acylchloridu. Chlorace 2-(methoxykarbonyl)-3-nitrobenzoové kyseliny **II** (Schéma 14) byla prováděna podle postupu popsaného v literatuře.^{22,23}

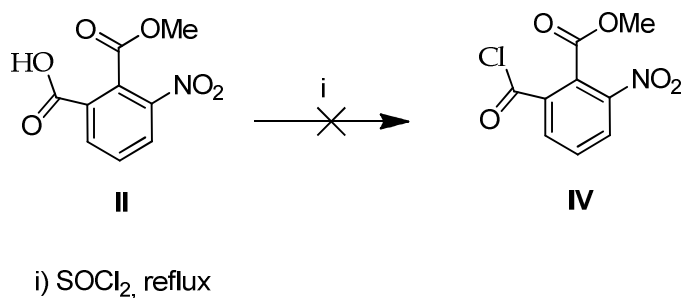


Schéma 14. Obecné schéma přípravy sloučeniny **IV**.

Výchozí látka **II** byla rozpuštěna v thionylchloridu a míchána za refluxu po dobu 24 hodin. Pro kontrolu průběhu reakce byly z reakční směsi odebírány vzorky v rozmezí několika hodin. Průběh byl sledován pomocí TLC a LC-MS. Ani jednou z použitých metod se nepodařilo prokázat přítomnost sloučeniny **IV**. Získané informace nasvědčovaly tomu, že

reakce vůbec neproběhla, což se následně po izolaci potvrdilo. Výsledek reakce nikterak neovlivnil ani přidavek několika kapek DMF jakožto katalyzátoru.

Přestože literatura^{22,23} popisuje reakci 2-(methoxykarbonyl)-3-nitrobenzoové kyseliny s thionylchloridem ve vysokém výtěžku, v našem případě se za daných podmínek výsledná sloučenina **IV** připravit nepodařila.

4.1.3.2. Chlorace sloučeniny **III**

Alternativním řešením tedy bylo použít pro přípravu acylchloridu redukovaný derivát **III**. Chlorace 3-amino-2-(methoxykarbonyl)benzoové kyseliny **III** (Schéma 15) v literatuře popsána není.

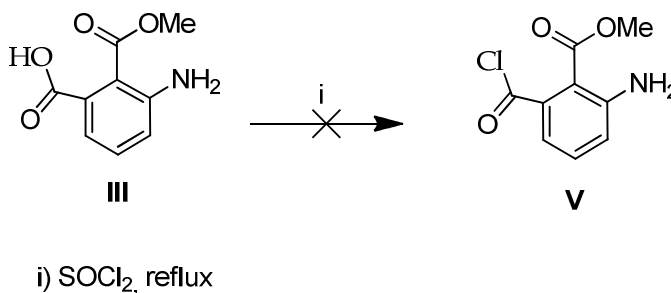


Schéma 15. Obecné schéma přípravy sloučeniny **V**.

Reakce byla prováděna za stejných podmínek jak již bylo popsáno v podkapitole 4.1.3.1. Výchozí látka **III** byla rozpuštěna v thionylchloridu, následně byl přidán katalyzátor a reakční směs byla míchána za refluxu po dobu 24 hodin. Jakožto katalyzátory byly postupně vyzkoušeny látky: DMF, triethylamin a pyridin. Kontrola reakce byla prováděna pomocí TLC. Následně bylo provedeno i měření na LC-MS. U reakcí katalyzovaných DMF a triethylaminem stejně jako v předchozím případě nedošlo vůbec ke zreagování výchozí látky. Žádná z používaných analytických metod neposkytla důkaz o vzniku látky **V**.

Při katalýze reakce pyridinem reakční směs změnila po několika minutách zbarvení. TLC potvrdilo vznik směsi látek. Podle LC-MS byla výsledkem reakce taktéž směs látek, avšak bez přítomnosti požadovaného produktu. Za daných podmínek se rovněž nepodařilo

požadovaný produkt připravit. Chlorace připravených sloučenin **II**, **III** nevedla k požadovaným intermediátům, proto se od ní upustilo.

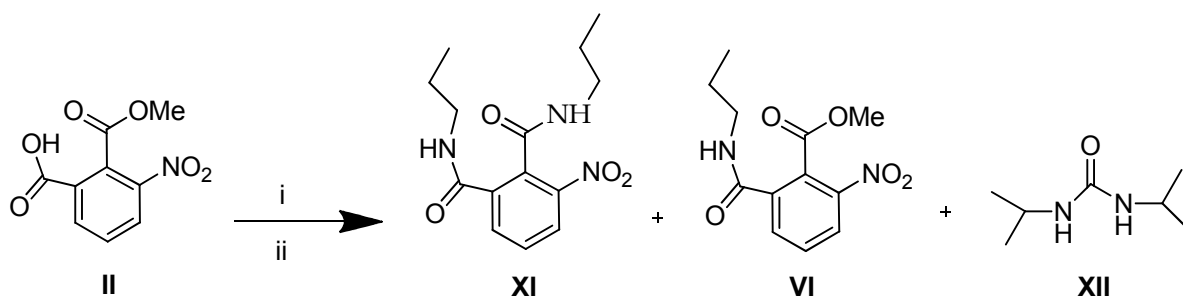
4.2. Příprava cílových látek

4.2.1. Reakce s aminy

Sloučeniny **II** a **III**, které se podařilo připravit, byly postupně podrobovány reakcím s vybranými aminy. Protože se nepodařilo připravit odpovídající acylhalogenidy, byly pro přípravu amidů testovány jiné metody založené na aktivaci karboxylové skupiny.

4.2.1.1. Reakce 2-(methoxykarbonyl)-3-nitrobenzoové kyseliny s propylaminem

Příprava methyl-2-nitro-6-(propylkarbamoyl)benzoátu **VI** byla založena na acylaci propylaminu s 2-(methoxykarbonyl)-3-nitrobenzoovou kyselinou **II**, respektive jejím *in situ* připraveným HOBt esterem. Výchozí látka byla nejprve smíchána s HOBt a DIC v DMF a po patnácti minutách byl do reakční směsi přidán propylamin.



i) DMF, DIC, HOBt; ii) propylamin; rt; 24h

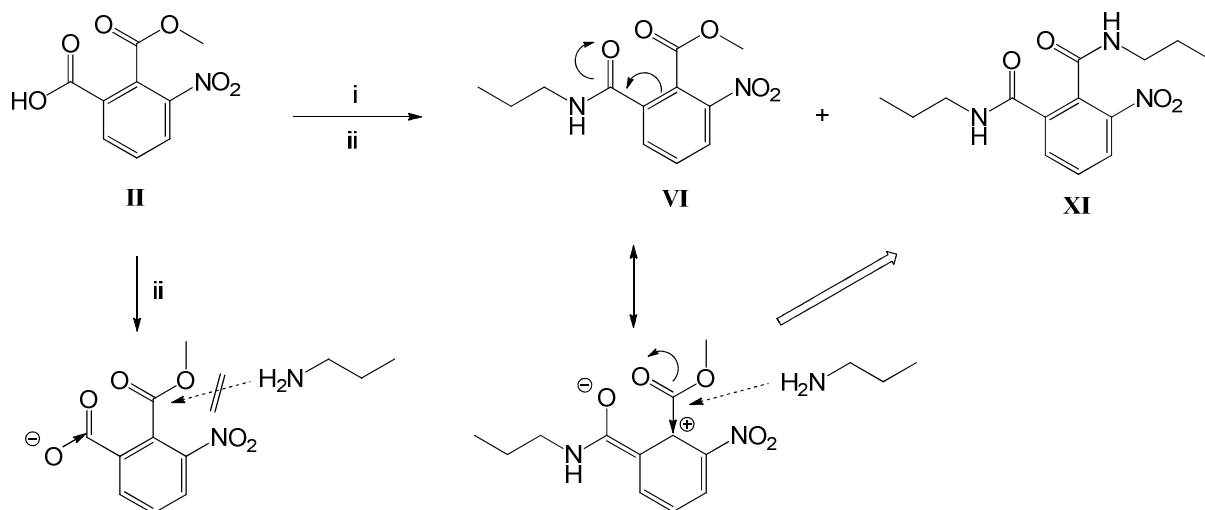
Schéma 16. Reakce sloučeniny **II** s propylaminem.

Reakce byla nejprve prováděna v nadbytku propylaminu (1,3 ekvivalent). Průběh reakce byl monitorován za pomoci TLC. Nejvyšší konverze výchozí látky se dosáhlo v případě, kdy se reakční směs ponechala reagovat po dobu 24 hodin.

Analýzou LC-MS však bylo překvapivě zjištěno, že převažujícím produktu neodpovídá příslušná molekulová hmotnost. Hmotnost majoritního produktu byla o 27 jednotek vyšší, což vedlo k domněnce, že by se mohlo jednat o diamid **XI** vznikající konkurenční aminolýzou esterové skupiny. Produkt byl izolován s využitím sloupcové kapalinové chromatografie a struktura sloučeniny **XI** byla následně potvrzena pomocí NMR. Dalším identifikovaným produktem byla *N,N'*-diisopropylmočovina **XII** (*Schéma 16*).

Snaha o optimalizaci podmínek spočívala v úpravě množství přidaného propylaminu. Místo 1,3 ekv. byl do reakce přidán pouze 1 ekv. propylaminu. Výsledkem však nebylo dosažení požadovaného produktu v dostatečné čistotě. Nepomohlo ani zkrácením reakční doby. Je ovšem zajímavé, že při reakci výchozí látky **II** s propylaminem bez použití DIC a HOBt reakce na methylesterové skupině vůbec neproběhla. Tento fakt lze vysvětlit následující teorií: při vzniku sloučeniny **XI** reakcí HOBt esteru výchozí látky s propylaminem dochází vlivem kombinovaného $-M$ efektu amidické skupiny a nitroskupiny ke zvýšené reaktivitě karbonylové skupiny methylesteru, přičemž následně snadno dochází k nukleofilnímu ataku propylaminem. Bez přítomnosti couplingových činidel (HOBt, DIC) však dochází při reakci výchozí látky s propylaminem pouze k tvorbě soli karboxylové kyseliny, kde $-M$ efekt na sousední karbonyl je částečně kompenzován $+I$, což snižuje aktivaci methylesteru a k ataku propylaminem nedochází. Tato teorie je částečně znázorněna ve schématu níže (*Schéma 17*).

Metoda přípravy nevedla k požadovanému produktu v dostatečné čistotě, proto se od ní upustilo.



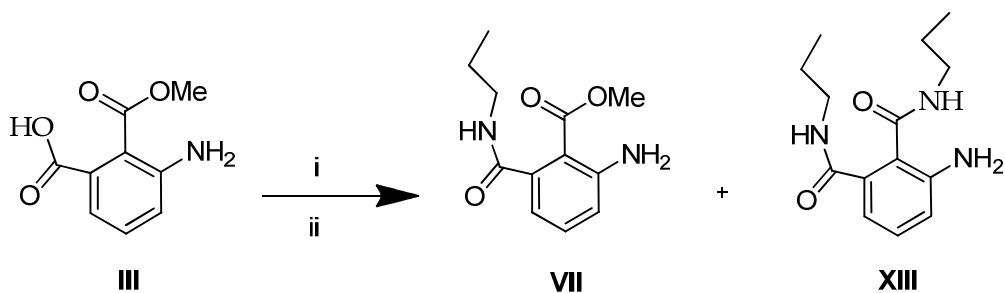
kompensace -M vlivem +I

i) DMF, HOBt, DIC; ii) propylamin; rt; 24h

Schéma 17. Vliv couplingových činidel na reakci s propylaminem.

4.2.1.2. Reakce 3-amino-2-(methoxykarbonyl)benzoové kyseliny III s propylaminem

Reakce byla prováděna za stejných podmínek, jak již bylo popsáno v podkapitole 4.2.1.1. Z předchozího výzkumu prováděného na katedře organické chemie vyplývá, že pro přípravu amidů analogických kyselin (tj. 3-amino-4-(methoxykarbonyl)benzoové kyseliny, 3-amino-2-(methoxykarbonyl)benzoové kyseliny a 4-amino-3-(methoxykarbonyl)benzoové kyseliny) tato metoda funguje ve vysokých výtěžcích i čistotě, bez vzniku vedlejších produktů. Výchozí látka tedy byla nejprve rozpuštěna v DMF a následně smíchána s couplingovými činidly HOBt a DIC. Po patnácti minutách bylo k *in situ* vzniklému HOBt esteru výchozí látky **III** přidáno 1,3 ekv. propylaminu (*Schéma 18*).



i) DMF, DIC, HOBT; ii) propylamin; rt; 24h

Schéma 18. Reakce sloučeniny **III** s propylaminem.

Kinetika reakce byla sledována za pomoci TLC a LC-MS. Již po hodině probíhající reakce byla výchozí látka z poloviny zreagována, avšak rychlost reakce se v následujících hodinách značně zpomalila. K úplné konverzi došlo po 24 hodinách.

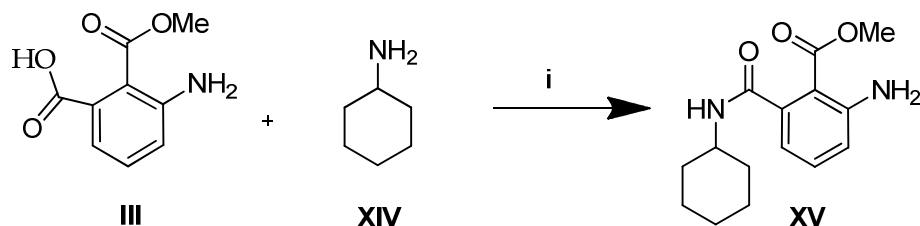
Sloučenina **III** se při acylaci propylaminem chovala odlišně od sloučeniny **II**. Výsledkem reakce byla směs, kde hlavním produktem byla požadovaná sloučenina **VII**. Mimo ní však byl v reakční směsi překvapivě opět identifikován diamid této látky **XIII**, nicméně pouze v obsahu cca 11 %, a *N,N'*-diisopropylmočovina **XII**. Další vedlejší produkty se identifikovat nepodařilo. Surová čistota produktu ve směsi se při reprodukcích pohybovala okolo 50 %.

I zde byla snaha o optimalizaci podmínek reakce. Množství přidaného propylaminu se z původních 1,3 ekv. snížilo na 1 ekv. Výsledkem bylo snížení zastoupení diamidu **XIII** a nárůst požadovaného produktu **VII**. Po úpravě reakčních podmínek dosahovala surová čistota produktu ve směsi 68 %.

Purifikace byla prováděna s využitím kapalinové chromatografie v systému mobilní fáze EtOAc:toluen (1:1), přičemž se nepodařilo izolovat zcela čistý produkt. Čistota po purifikaci dosahovala 89 %. Celkový výtěžek reakce dosahoval 56 %.

4.2.1.3. Reakce 3-amino-2-(methoxykarbonyl)benzoové kyseliny **III** s cyklohexylaminem

Jako druhý modelový amin byl testován cyklohexylamin. Reakce byla prováděna obdobným způsobem. 3-Amino-2-(methoxykarbonyl)benzoová kyselina **III** byla nejprve smíchána s 1 ekv. HOBt a DIC v DMF a po patnácti minutách byl do reakční směsi přidán 1 ekvivalent cyklohexylaminu (*Schéma 19*).



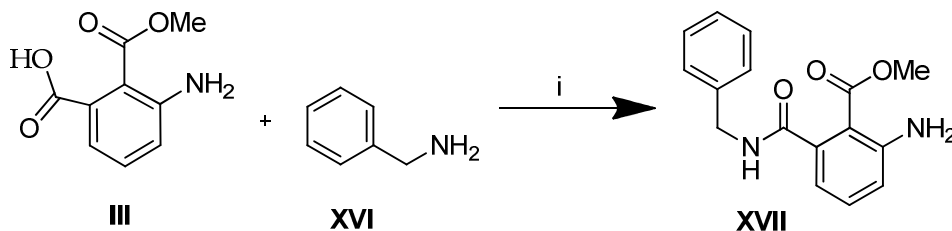
i) DMF, DIC, HOBt; rt; 24h

Schéma 19. Reakce sloučeniny **III** s cyklohexylaminem.

Surová čistota methyl-2-amino-6-(cyklohexylkarbamoyl)benzoátu **XV** v reakční směsi dosahovala pouhých 28 %. Z tohoto důvodu nebyla purifikace reakční směsi prováděna. Podle LC-MS se nepodařilo další vznikající sloučeniny identifikovat.

4.2.1.4. Reakce 3-amino-2-(methoxykarbonyl)benzoové kyseliny **III** s benzylaminem

3-Amino-2-(methoxykarbonyl)benzoová kyselina **III** byla nejprve smíchána s 1 ekv. HOBt a DIC v DMF a po patnácti minutách byl do reakční směsi přidán 1 ekvivalent benzylaminu (*Schéma 20*).



i) DMF, DIC, HOBt; rt, 24h

Schéma 20. Reakce sloučeniny **III** s benzylaminem.

Surová čistota požadovaného produktu v reakční směsi dosahovala 75%. Čištění produktu bylo realizováno pomocí preparativní kapalinové chromatografie se systémem mobilní fáze EtOAc:toluen v poměru 1:1. Čistota výsledného produktu dosahovala 90 %. Celkový výtěžek reakce byl 62 %.

4.2.2. Hydrolýza

Získané sloučeniny **VII** a **XVII** byly podrobeny přidáním hydroxidu sodného rozpuštěného v methanolu. Tato metoda byla dříve úspěšně vyvinuta pro hydrolýzu analogických isomerních sloučenin, např. pro amidy kyseliny 3-amino-4-(methoxykarbonyl)benzoové, kde byly získány odpovídající karboxylové kyseliny ve vynikající čistotě.

4.2.2.1. Hydrolýza sloučeniny **VII**

Methyl-2-amino-6-(propylkarbamoyl)benzoát **VII** byl smíchán s methanoličným roztokem NaOH (*Schéma 21*).

Průběh reakce byl monitorován za pomoci TLC. Reakční komponenty byly zreagovány po 6 hodinách. Podle LC-MS kromě požadovaného produktu **VIII** vznikala i sloučenina s molekulovou hmotností o jednotku vyšší, kterou se zatím nepodařilo blíže identifikovat. Tato látka byla ve směsi zastoupena z 50 %.

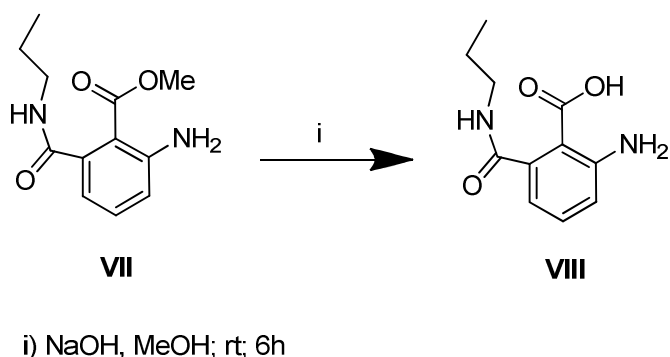


Schéma 21. Hydrolýza sloučeniny **VII**.

Purifikace byla prováděna s využitím kapalinové chromatografie v systému mobilní fáze se složením EtOAc:toluen:HCOOH v poměru 25:25:1. Celkový výtěžek reakce činil 35%.

4.2.2.2. Hydrolýza sloučeniny XVII

Methyl-2-amino-6-(benzylkarbamoyl)benzoát **XVII** byl smíchán s methanolickým roztokem NaOH rozpuštěného v MeOH (*Schéma 22*).

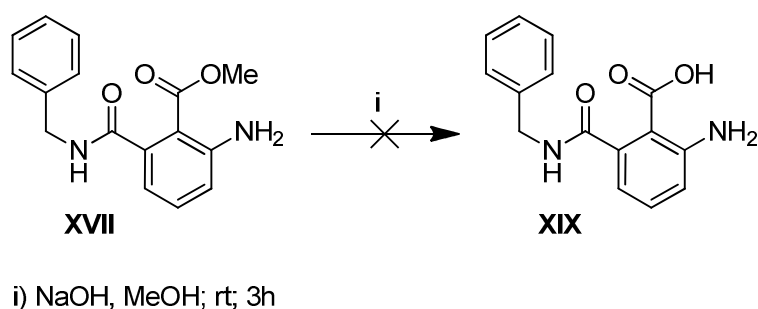
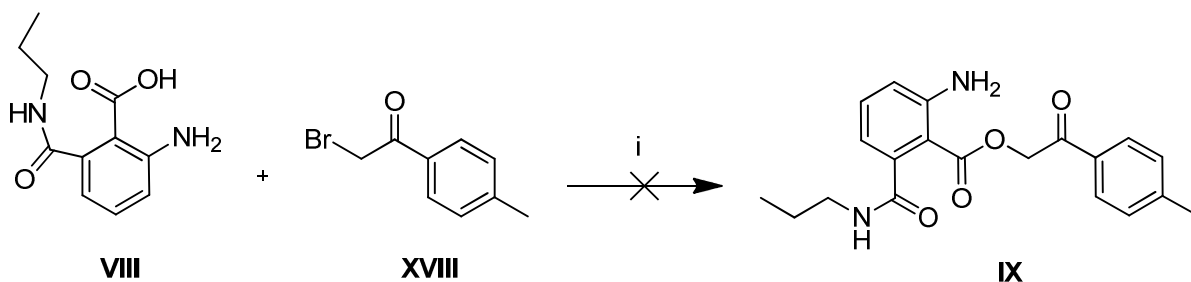


Schéma 22. Obecné schéma hydrolýzy sloučeniny **XVII**.

Intermediát **XVII** se choval při hydrolýze překvapivě jinak než v předchozím případě sloučeniny **VII**. Průběh reakce byl sledován pomocí TLC. Výchozí látka nebyla detekována již po 3 hodinách. Analýzou LC-MS se však nepodařilo prokázat vznik požadovaného produktu. Rovněž se nepodařilo identifikovat ani žádnou ze vznikajících sloučenin. Za daných podmínek se nepodařilo cílovou sloučeninu **XIX** připravit.

4.2.3. Esterifikace

Sloučenina **VIII** byla podrobena reakci s 2-bromo-4'-methylacetofenonem **XVIII** (0,8 ekv.) (*Schéma 23*) dle standardního postupu používaného pro přípravu fenacylsterů karboxylových kyselin.



i) DMF, diisopropylethylamin; rt; 1h

Schéma 23. Obecné schéma esterifikace.

Výchozí látka **VIII** byla nejprve rozpuštěna v DMF a následně smíchána s diisopropylethylaminem. Po patnácti minutách míchání za laboratorní teploty byl přidán 0,8 ekv. 2-bromo-4'-methylacetofenonu **XVIII** (*Schéma 23*). Průběh reakce byl sledován pomocí TLC v mobilní fázi EtOAc:toluen:HCOOH v poměru 25:25:1. Reakční komponenty byly míchány po dobu 1 hodiny. Po uplynutí této doby došlo k úplné konverzi látek. Výsledek tenkovrstevné chromatografie však indikoval vznik velkého množství produktů, které bylo následně potvrzeno i pomocí LC-MS analýzy. Reakce vedla ke vzniku pestré směsi produktů, z nichž se nepodařilo podle LC-MS identifikovat látku s odpovídající hmotou požadovaného produktu. Rovněž se nepodařilo identifikovat žádný z vedlejších produktů reakce. Další optimalizace reakce nebyla z časových důvodů prováděna.

5. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

5.1. Metody

TLC chromatografie byla prováděna na hliníkových deskách pokrytých silikagelem 60 F254 značky Merck. Měření NMR spekter bylo provedeno v roztoku DMSO - d_6 na Varian 400 MHz, resp. JEOL, 500 MHz spektrometru s vnitřním standardem TMS. Hodnoty chemického posunu jsou udány v ppm jednotkách, interakční konstanty v Hz. Měření hmotnostních spekter bylo realizováno na hmotnostním spektrometru TSQ Quantum ACCES, THERMO SCIENTIFIC, USA. Preparativní kapalinová flash chromatografie byla prováděna s pomocí přístroje Sepacore značky BUCHI. K odstraňování výševroucích rozpouštědel byl použit lyofilizátor Scanvac CoolSafe. Teploty tání byly měřeny na Boetiově bloku a nejsou korigovány.

5.2. Přípravy

2-(methoxykarbonyl)-3-nitrobenzoová kyselina [II]

a) 3-Nitroftalanhydrid **I** (1 g, 5.18 mmol) byl rozpuštěn v MeOH (10 ml). Směs byla míchána za refluxu po dobu 48 hodin, následně byla odpařena ve vakuové rotační odparce a rekrystalizována z vody. Vzniklá sraženina byla zfiltrována a vysušena ve vakuové sušárně. Vznik bílé krystalické látky ve výtěžku 735 mg (63 %).

UPLC-UV-MS: MS $[M-H]^- = 223.89$, čistota surového produktu 79 %, po purifikaci 98%.

1H NMR (500 MHz, DMSO- d_6) δ ppm 3.80 (s, 3 H) 7.80 (t, $J=8.25$ Hz, 1 H) 8.27 (d, $J=7.34$ Hz, 1 H) 8.32 (d, $J=8.56$ Hz, 1 H), ^{13}C NMR (100 MHz, DMSO- d_6) δ ppm 53.5, 128.1, 129.9, 131.6, 133.5, 136.1, 146.6, 165.9, 166.2.

Teplota tání: 120 - 121 °C.

b) Do MeOH (1 ml) byl přidán Na (0.03g, 1.3 mmol). Ke vzniklému roztoku byl přidán 3-nitroftalanhydrid **I** (0.2 g, 1.04 mmol). Směs byla míchána za refluxu po dobu 8 hodin, následně byla odpařena ve vakuové rotační odparce a rekrystalizována z vody. Pro vysrážení krystalků bylo přidáno pár kapek HCl o koncentraci 1 mol l^{-1} . Vzniklá sraženina byla

zfiltrována a vysušena ve vakuové sušárně. Vznik bílé krystalické látky ve výtěžku 50 mg (21%).

3-amino-2-(methoxykarbonyl)benzoová kyselina [III]

2-(methoxykarbonyl)-3-nitrobenzoová kyselina (0.1 g, 0,44 mmol) byla rozpuštěna v MeOH (2 ml). Ke vzniklému roztoku byl přidán 10% Pd/C (0.01 g). Roztok byl míchán za laboratorní teploty za tlaku 1.5 atm po dobu 1 hodiny v autoklávu. Roztok byl zfiltrován a filtrát následně odpařen na RVO. Vznik žluté sloučeniny ve výtěžku 81 mg (93%).

UPLC-UV-MS: MS [M-H]⁻ = 193.94; čistota surového produktu 98%.

¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ ppm 3.70 (s, 3 H) 5.81 (br. s., 2 H) 6.80 (dd, *J*=7.43, 1.17 Hz, 1 H) 6.87 (dd, *J*=8.22, 1.17 Hz, 1 H) 7.19 (dd, *J*=8.22, 7.43 Hz, 1 H). ¹³C NMR (100 MHz, DMSO-*d*₆) δ ppm 52.3, 113.2, 116.4, 119.1, 131.6, 134.6, 148.3, 168.5, 169.6.

Teplota tání: 131.2 - 132.8 °C.

3-Nitro-*N,N'*-dipropylftalamid [XI]

2-(methoxykarbonyl)-3-nitrobenzoová kyselina (0.1 g, 0.44 mmol) byla rozpuštěna v DMF (1 ml). Poté bylo přidáno HOBt (0.069 g, 0.513 mmol) a DIC (0.077 ml, 0.513 mmol). Roztok se nechal za laboratorní teploty míchat 15 minut. Poté byl přidán propylamin (0.042 ml, 0.513 mmol). Reakční směs se míchala za laboratorní teploty po dobu 24 hodin. Přidáním několika ml destilované vody došlo k vysrážení produktu. Reakční směs se následně zlyofilizovala. Produkt byl purifikován pomocí preparativní kapalinové chromatografie (DAVISIL LC60A 40-60 μm) se systémem mobilní fáze EtOAc:toluen v poměru 1:1. Vznik žluté látky ve výtěžku 87 mg (66 %).

UPLC-UV-MS: MS [M+H]⁺ = 293.99; čistota surového produktu 76 %.

¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ ppm 0.87 (q, *J*=7.34 Hz, 6 H) 1.46 (dq, *J*=10.56, 7.14 Hz, 4 H) 3.03 - 3.17 (m, 4 H) 7.61 - 7.68 (m, 1 H) 7.77 (dd, *J*=7.92, 1.17 Hz, 1 H) 8.07 (dd, *J*=8.22, 1.17 Hz, 1 H) 8.24 (t, *J*=5.58 Hz, 1 H) 8.39 (t, *J*=5.58 Hz, 1 H), ¹³C NMR (100 MHz, DMSO-*d*₆) δ ppm 11.9, 22.6, 41.4, 125.3, 130.1, 131.2, 133.0, 138.2, 147.4, 164.3, 166.3.

Methyl-2-amino-6-(propylkarbamoyl)benzoát [VII]

3-amino-2-(methoxykarbonyl)benzoová kyselina (0.1 g, 0.513 mmol) byla rozpuštěna v DMF (1 ml). Poté bylo přidáno HOBt (0.069 g, 0.513 mmol) a DIC (0.077 ml, 0.513 mmol).

Roztok se nechal za laboratorní teploty míchat 15 minut. Poté byl přidán propylamin (0.042 ml, 0.513 mmol). Reakční směs se míchala za laboratorní teploty po dobu 24 hodin. Přidáním několika ml destilované vody došlo k vysrážení produktu. Reakční směs se následně zlyofilizovala. Produkt byl purifikován pomocí preparativní kapalinové chromatografie (DAVISIL LC60A 40-60 μm) se systémem mobilní fáze EtOAc:toluen v poměru 1:1. Vznik žluté látky ve formě medu ve výtěžku 68 mg (56 %).

UPLC-UV-MS: MS $[\text{M}+\text{H}]^+ = 236.99$; čistota surového produktu 68 %, po chromatografickém čištění 89 %.

Methyl-2-amino-6-(cyklohexylkarbamoyl)benzoát [XV]

3-amino-2-(methoxykarbonyl)benzoová kyselina (0.1 g, 0.513 mmol) byla rozpuštěna v DMF (1 ml). Poté bylo přidáno HOBt (0.069 g, 0.513 mmol) a DIC (0.077 ml, 0.513 mmol). Roztok se nechal za laboratorní teploty míchat 15 minut. Poté byl přidán cyklohexylamin (0.059 ml, 0.513 mmol). Reakční směs se míchala za laboratorní teploty po dobu 24 hodin. Přidáním několika ml destilované vody došlo k vysrážení produktu. Reakční směs se následně zlyofilizovala. Vznik žluté látky ve formě medu ve výtěžku 101 mg (71 %).

UPLC-UV-MS: MS $[\text{M}+\text{H}]^+ = 277.11$; čistota surového produktu 28 %.

Methyl-2-amino-6-(benzylkarbamoyl)benzoát [XVII]

3-amino-2-(methoxykarbonyl)benzoová kyselina (0.1 g, 0.513 mmol) byla rozpuštěna v DMF (1 ml). Poté bylo přidáno HOBt (0.069 g, 0.513 mmol) a DIC (0.077 ml, 0.513 mmol). Roztok se nechal za laboratorní teploty míchat 15 minut. Poté byl přidán benzylamin (0.056 ml, 0.513 mmol). Reakční směs se míchala za laboratorní teploty po dobu 24 hodin. Přidáním několika ml destilované vody došlo k vysrážení produktu. Reakční směs se následně zlyofilizovala. Produkt byl purifikován pomocí preparativní kapalinové chromatografie se systémem mobilní fáze EtOAc:toluen v poměru 1:1. Vznik žluté látky ve formě medu ve výtěžku 89 mg (62 %).

UPLC-UV-MS: MS $[\text{M}+\text{H}]^+ = 284.94$; čistota surového produktu 75 %.

2-amino-6-(propylkarbamoyl)benzoová kyselina [VIII]

NaOH (0.075 g, 0.0019 mmol) byl rozpuštěn v MeOH (3 ml). K methyl-2-amino-6-(propylkarbamoyl)benzoátu (0.1 g, 0.424 mmol) byl přidán tento methanolický roztok (2.5

ml). Za laboratorní teploty se reakční směs nechala míchat po dobu 6 hodin, poté byla odpařena na RVO do sucha, pH bylo upraveno pomocí 10x naředěné 35% HCl na mírně kyselé. Vysrážené krystalky se zfiltrovaly. Purifikace byla prováděna pomocí preparativní kapalinové chromatografie v systému mobilní fáze EtOAc:toluen:HCOOH v poměru 25:25:1. Vznik krystalické světle žluté krystalické látky ve výtěžku 33.5 mg (35 %).
UPLC-UV-MS: MS $[M-H]^- = 220.89$; čistota surového produktu 42 %.

6. ZÁVĚR

Předložená bakalářská práce je zaměřena na 2-substituované-3-hydroxychinolin-4(*1H*)-on-5-karboxamidy. Úvodní část bakalářské práce je věnována teoretické části, která shrnuje syntetické přístupy vedoucí k 3-hydroxychinolin-4(*1H*)onům, zabývá se jejich biologickou aktivitou, přičemž důraz je kladen na protinádorovou aktivitu, a pojednává také o fluorescenčních vlastnostech těchto látek.

Cílem bakalářské práce bylo pokusit se o vývoj syntetické metody vedoucí k derivátům 2-substituovaných-3-hydroxychinolin-4(*1H*)-on-5-karboxamidů. Během řešení bakalářské práce se podařilo připravit některé prekuzory vhodné pro přípravu cílových sloučenin. Intermediáty **II** a **III** se podařilo po optimalizaci reakčních podmínek připravit v dobrém výtěžku i čistotě. Transformace karboxylové kyseliny na odpovídající acylchloridy pomocí thionylchloridu se nezdařila ani katalyzovanými reakcemi. Protože se nepodařilo připravit odpovídající acylhalogenidy **IV** a **V**, byly pro přípravu amidů testovány jiné metody založené na aktivaci karboxylové skupiny. Acylací propylaminu se sloučeninou **II** se nepodařilo selektivně připravit sloučeninu **VI**. I přes snahu optimalizace vždy vznikalo větší množství diamidu **XI** než požadovaného produktu **VI**, jelikož sloučenina **II** vykazovala zvýšenou reaktivitu vůči reakci s propylaminem. Za stejných podmínek byla prováděna reakce sloučeniny **III** s vybranými aminy, přičemž v tomto případě nedocházelo k dvojnásobné substituci a byly připraveny sloučeniny **VII**, **XV** a **XVII**. Vzhledem ke skutečnosti, že při reakci vznikala bohatá směs produktů, bylo čištění těchto látek problémové. Získané sloučeniny **VII** a **XV** byly poté podrobeny hydrolýze. Zatímco hydrolýzou sloučeniny **XV** nevznikl požadovaný produkt **XIX**, za stejných podmínek reakcí se sloučeninou **VII** byl produktem reakce požadovaný intermediát **VIII**, který byl po purifikaci získán v dobré čistotě. Poslední studovanou reakcí byla esterifikace sloučeniny **VIII** s **XVIII**, která poskytovala pestrou směs látek, z nichž žádná nebyla identifikována jako požadovaný produkt **IX**. Z časových důvodů se reakci již nepodařilo optimalizovat.

Do budoucna tedy bude potřeba zaměřit se na ověřování alternativních postupů pro přípravu fenacylesterů spočívajících v použití jiných rozpouštědel a bází, respektive hledání jiných syntetických přístupů pro přípravu amidů ve vyšší čistotě a výtěžku.

7. SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

1. Hradil, P.; Krejčí, P.; Hlaváč, J.; Wiedermannová, I.; Lyčka, A.; Bertolasi, V. J. *Heterocyclic Chem.* **2004**, *41*, 375-379.
2. Sural, M.; Hlaváč, J.; Hradil, P.; Frysova, I.; Hajdúch, M.; Bertolasi, V.; Maloň, M. *Eur. J. Med. Chem.* **2006**, *41*, 467-474.
3. Hradil, P.; Hlaváč, J.; Sural, M.; Hajdúch, M.; Kolář, M.; Večeřová, R. *Minirew. Med. Chem.* **2009**, *9*, 696-702.
4. Krejčí, P.; Hradil, P.; Hlaváč, J.; Hajdúch, M. Patent WO 2008028427
5. Sui, Z. H.; Nguyen, 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.
6. Sui, Z.; Jason, A.; Nguyen, V.N.; Fernandez, J.; Bernstein, J.I.; Hilliard, J.J.; Barrett, J.F.; Podlogar, B.L.; Ohemeng, K.A. *Bioorg. Med. Chem.* **1998**, *6*, 735-742.
7. Sural, M.; Krchňák, V. *J. Combinatorial Chem.* **2007**, *9*, 793-796.
8. Vaňková, B.; Hlaváč, J.; Sural, M. *J. Combinatorial Chem.* **2010**, *12*, 890-894.
9. Sural, M.; Hlaváč, J.; Funk, P.; Džubák, P.; Hajdúch, M. *J. Combinatorial Chem.* **2011**, *13*, *1*, 39-44.
10. Motyka, K.; Hlaváč, J.; Sural, M.; Funk, P. *Tetrahedron Letters* **2010**, *51* (38), 5060-5063.
11. Sword, I. P. *J. Chem. Soc. Sect. C*, **1971**, *5*, 820 - 823.

12. Velezheva V.S., Mel'man A.I., Pol'shakov V.I.; Asimova O.S., *Khim. Geter. Soed.*, **1992**, 2, 279-280.
13. Behrman J.E.; Kiser L.R.; Garas W.F.; Behrman E.C.; Pitt B.M.; *J. Chem. Res. Synop.*; **1995**, 5, 164 - 165.
14. Hradil, P.; Jirman, J.; *Collect. Czech. Chem. Commun.*, **1995**, 60, 1357 - 1366.
15. Hradil, P.; Kvapil, L.; Hlaváč, J.; Weidlich, J.; Lyčka, A.; *J. Heterocyclic Chem.*, **2000**, 37, 831 - 837.
16. Gao, F.; Johnson K.F.; Schlenoff J.B.; *J. Chem. Soc. Perkin Trans.*, **1996**, 2, 269 - 273.
17. Ulubelen A., Terem B., Tuzlaci E., Cheng K. F., Kong Y. C., *Phytochemistry*, **1986**, 25, 2692 - 2693.
18. Cimino, G.; De Rosa, S.; De Stefano, S.; Spinella, A.; Sodano, G.; *Tetrahedron Lett.*, **1984**, 25, 2925 - 2928.
19. Loya, S.; Rudi, A.; Tal, R.; Kashmin, Y.; Loya, Y.; Hizi, A.; *Arch. Biochem. Biophys.*, **1994**, 309, 315 - 322
20. Bilokin M. D.; Shvadchak V. V.; Yuschenko D. A.; Klymchenko A. S.; Duportail G.; Mely Y.; Pivovarenko V. G.; *Tetrahedron Lett.*, **2009**, 50, 4714 - 4719
21. Motyka K.; Vankova B.; Hlavac J.; Soural M.; Funk P.; *J. Fluoresc.*, **2011**, 21, 6, 2207-2212

22. Tegley, C.; Adams J.; Askew, B. C. Jr.; Croghan, M.; Elbaum, D.; Germain, J.; Habgood, G. J.; Harried, S.; Li, A.; Nishimura, N.; Nomak, R.; Tasker A.; Yang, K.; Patent WO2005021532

23. Los, M.; Patent EP0133310

24. Banzatti, C.; Carfagna, N.; Commisso, R.; Heidempergher, F.; Pegrassi, L.; Melloni, P., *J. Med. Chem.* **1988**, *31*, 1471-1475.