

Katedra organické chemie Přírodovědecké fakulty Univerzity Palackého
v Olomouci



BAKALÁŘSKÁ PRÁCE

**Syntéza na pevné fázi vedoucí ke kondenzovaným
bisheterocyklickým derivátům 3-hydroxychinolin-4(1*H*)-onu**

Vypracoval:

Boháček Tomáš

Vedoucí bakalářské práce:

doc. RNDr. Miroslav Sural, Ph.D.

Studijní obor:

Chemie

Olomouc 2012

Prohlašuji, že jsem bakalářskou práci vypracoval samostatně pod vedením doc. RNDr. Miroslava Sourala, Ph.D., za použití literatury, kterou cituji a uvádím na konci bakalářské práce.

V Olomouci dne

.....
Boháček Tomáš

Chtěl bych tímto upřímně poděkovat doc. RNDr. Miroslavu Suralovi, Ph.D. za obětavou pomoc, trpělivost a cenné připomínky při řešení a zpracování dané problematiky. Dále bych rád poděkoval ostatním zaměstnancům a studentům Katedry organické chemie PřF UP, kteří byli rovněž ochotni mi poradit či pomoci. Tato práce by nevznikla bez trpělivosti a podpory mé rodiny a přítelkyně, kterým taktéž děkuji.

Bibliografická identifikace:

Jméno a příjmení autora: Tomáš Boháček

Název práce: Syntéza na pevné fázi vedoucí ke kondenzovaným bisheterocyklickým derivátům 3-hydroxychinolin-4(1*H*)-onu

Typ práce: Bakalářská

Pracoviště: Katedra organické chemie

Školitel: doc. RNDr. Miroslav Sural, Ph.D.

Rok obhajoby práce: 2012

Abstrakt: Předložená bakalářská práce se zabývá syntézou 3-hydroxychinolin-4(1*H*)-onů, především pak kondenzovaných bisheterocyklických derivátů, které doposud detailněji nebyly zkoumány. V teoretické části práce jsou popsány nejdůležitější způsoby a principy přípravy různých derivátů 3-hydroxychinolin-4(1*H*)-onů, jejich četné biologické účinky, zejména cytotoxicita vůči nádorovým buňkám, a v neposlední řadě také významné fluorescenční vlastnosti. Na základě získaných poznatků je v části diskusní pozornost zaměřena na jednotlivé kroky a jejich optimalizaci při pokusu o přípravu modelové látky. Konkrétní postup práce a dosažené výsledky jsou uvedeny v experimentální části. Veškeré provedené syntetické kroky byly realizovány prostřednictvím metody syntézy na pevné fázi, která se oproti tradiční syntéze v roztoku vyznačuje systematičtější procesem a umožňuje detailnější studium závislosti biologické aktivity na struktuře pomocí přípravy tzv. chemických knihoven.

Klíčová slova: Biologická aktivita, bisheterocyklické deriváty, cyklizace, cytotoxicita, hydroxychinolony, syntéza na pevné fázi

Počet stran: 57

Počet příloh: 5

Jazyk: Český

Bibliographical identification:

Author's first name and surname: Tomáš Boháček

Title: Solid-phase synthesis of condensed bisheterocyclic derivatives of 3-hydroxyquinolinon-4(1*H*)-one

Type of thesis: Bachelor thesis

Department: Department of Organic Chemistry

Advisor: doc. RNDr. Miroslav Sural, Ph.D.

The year of presentation: 2012

Abstract: The present bachelor's thesis deals with the synthesis of 3-hydroxyquinoline-4(1*H*)-ones, especially condensed bisheterocyclic derivatives, that have not yet been studied in detail. The theoretical part describes the main principles and methods of preparation of various derivatives of 3-hydroxyquinoline-4(1*H*)-ones, their numerous biological effects, in particular cytotoxicity against tumor cells, and last but not least, a significant fluorescence properties. Based on previous findings in the discussion, the attention was focused on the individual steps and optimization of the preparation of model compounds. Specific workflow and results are given in the experimental section. All performed synthetic steps were carried out using the solid-phase synthesis, which is in comparison to traditional synthesis in solution characterized by more systematic process and enables detailed studies of biological activity depending on the structure.

Keywords: Biological activity, bisheterocyclic derivatives, cyclization, cytotoxic activity, hydroxyquinolinones, solid-phase synthesis

Number of pages: 57

Number of appendixes: 5

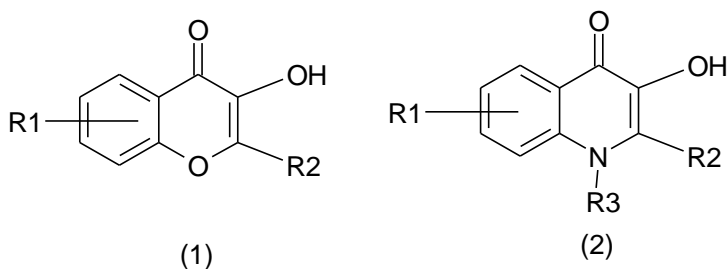
Language: Czech

OBSAH

1. ÚVOD	7
2. CÍL BAKALÁŘSKÉ PRÁCE	7
3. TEORETICKÁ ČÁST	8
3.1. METODY PŘÍPRAVY VEDOUcí KE ZNÁMÝM DERIVÁTŮM 3-HYDROXY-4(1 <i>H</i>) CHINOLONU	8
3.1.1. Cyklizační metody.....	8
3.1.2. Metoda rozšíření kruhu	16
3.1.3. Metody oxidačně-redukční.....	16
3.1.4. Metody substituční	17
3.2. BIOLOGICKÁ AKTIVITA 3-HYDROXY-4(1 <i>H</i>)-CHINOLONŮ.....	18
3.2.1. Cytotoxická aktivita	18
3.2.2. Antibakteriální aktivita.....	21
3.2.3. Antivirální aktivita	24
3.2.4. Imunosupresivní aktivita	24
3.3. FLUORESCENČNÍ VLASTNOSTI 2-ARYL-3-HYDROXY-4(1 <i>H</i>)CHINOLONŮ	25
4. VÝSLEDKY A DISKUZE	26
4.1. SYNTÉZA NA PEVNÉ FÁZI.....	27
4.1.1. Obecná strategie přípravy cílových látek	27
4.1.2. Odstranění chránící skupiny pryskyřice	29
4.1.3. Navázání vhodného building blocku.....	29
4.1.4. Nukleofilní substituce primárním aminem.....	30
4.1.5. Redukce nitro skupiny.....	31
4.1.6. Esterifikace nezredukovávané formy pomocí substituovaného acetofenonu	32
4.1.7. Redukce nitro skupiny na již esterifikovaném meziprojektu	33
4.1.8. Vznik benzimidazolového skeletu	33
4.1.9. Esterifikace benzimidazolového skeletu	36
4.1.10. Závěrečná cyklizace za vzniku modelového tricyklického bisheterocyklu	36
4.2. SYNTÉZA NA AMINOMETHYLOVÉ PRYSKYŘICI S BAL LINKEREM	38
4.2.1. Navázání linkeru	38
4.2.2. Reduktivní aminace.....	39
5. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST	41
6. ZÁVĚR	49
7. LITERATURA	51
8. SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK	53
9. PŘÍLOHY	54

1. Úvod

Vzhledem k podobnosti derivátů 3-hydroxy-4(1*H*)-chinolonu (v textu dále jako „hydroxychinolony“) se základním skeletem flavonoidů, je můžeme považovat za jejich aza-analoga (schéma 1). Flavonoidy obecně zahrnují asi 60 látek, které jsou někdy označovány jako vitamin P. Jsou známy zejména pro své antioxidační účinky.



(schéma 1)

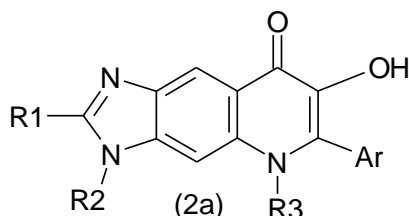
Srovnání základních struktur flavonoidů (1) a hydroxychinolonů (2)

Pravděpodobně právě na základě této strukturální podobnosti jsou hydroxychinolony v posledních letech hojně studovány. Mezi pracoviště, která se deriváty hydroxychinolonů zabývají, patří zejména katedra organické chemie PřF UP, která již několik let zkoumá jak jejich optimální syntézu, tak ve spolupráci s laboratoří Experimentální Medicíny v Olomouci i cytotoxickou aktivitu proti nádorovým buňkám (včetně linií resistantních proti chemoterapii). Výzkum podhalil i neméně významnou antibakteriální, antivirální, antiprotozoální a imunosupresivní aktivitu. V posledních letech navíc tým z katedry organické chemie pracuje na využití fluorescence derivátů hydroxychinolonů. Předložená bakalářská práce se věnuje převážně syntéze na pevné fázi derivátů 3-hydroxy-4(1*H*)-chinolonu.

2. Cíl bakalářské práce

Mezi hlavní cíle předložené bakalářské práce patří syntéza prekursorů kondenzovaných bisheterocyklických derivátů 3-hydroxy-4(1*H*)-chinolonů (2a) metodou na pevné fázi. Samotná syntéza bude po krocích vedena především přes imidazolový skelet, zkondenzovaný spolu s hydroxychinolonovým heterocyklem. Syntéza na pevné fázi umožňuje efektivní a rychlou přípravu mnoha diverzních

sloučenin, které budou následně systematicky podrobeny testování své biologické aktivity. Její studium je jedním z dalších cílů. Důraz je kladen i na optimalizaci důležitých kroků v přípravě cílového prekursoru.



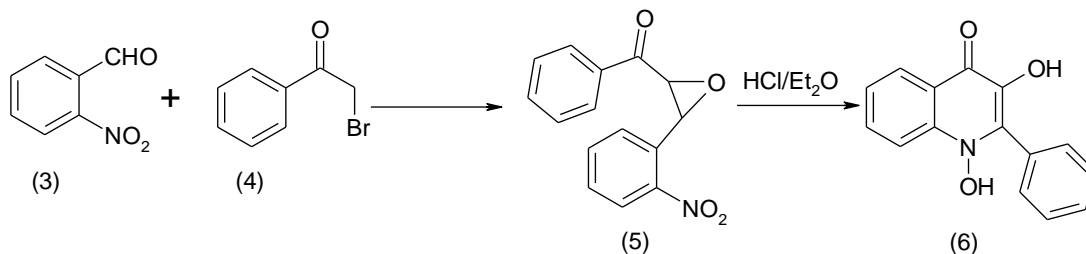
3. Teoretická část

3.1. Metody přípravy vedoucí ke známým derivátům 3-hydroxy-4(1H) chinolonu

Metod, jak lze připravit hydroxychinolony, existuje celá řada. Snadno se však dají rozdělit podle typu a průběhu samotné syntézy.

3.1.1. Cyklizační metody

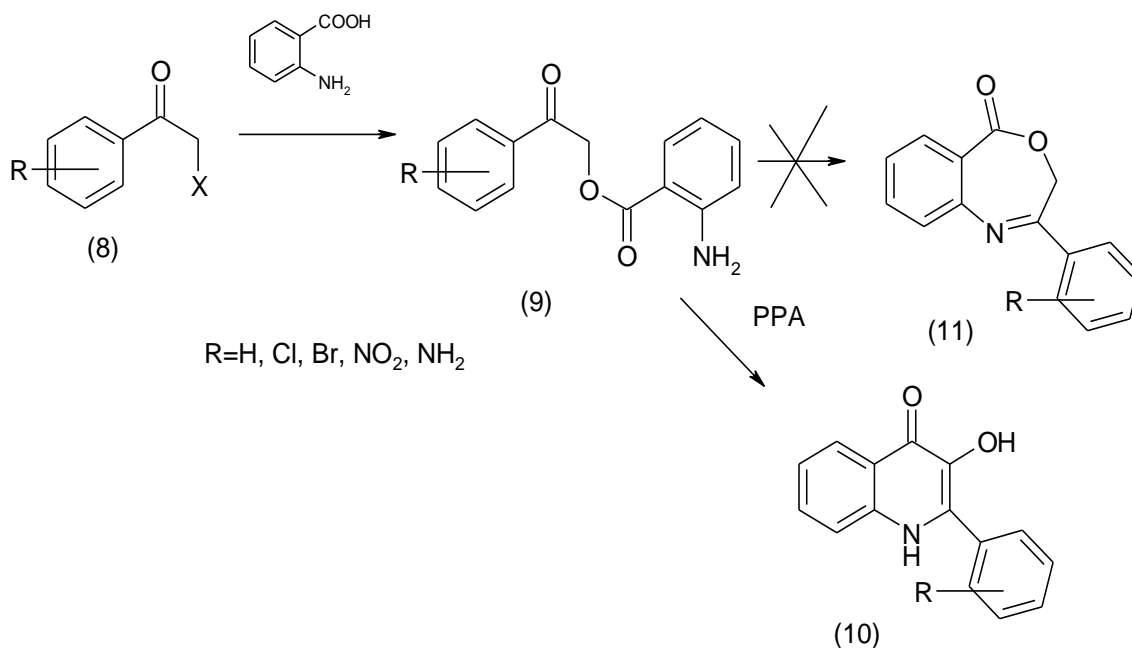
Za jednu z nejstarších metod je považována modifikace Darzensovy reakce^{1,2}, díky které získáváme intermediát 2-nitrofenylethylenoxid (5). Jeho reakce se suchým chlorovodíkem v suchém diethyletheru poskytuje deriváty 3-hydroxy-4(1H)-chinolonu (6) (schéma 2). Tato metoda je však vzhledem ke své náročnosti - obtížná dostupnost derivátů nitrobenzaldehydu (3) - a nízkým výtěžkům velmi nevýhodná.



(schéma 2)

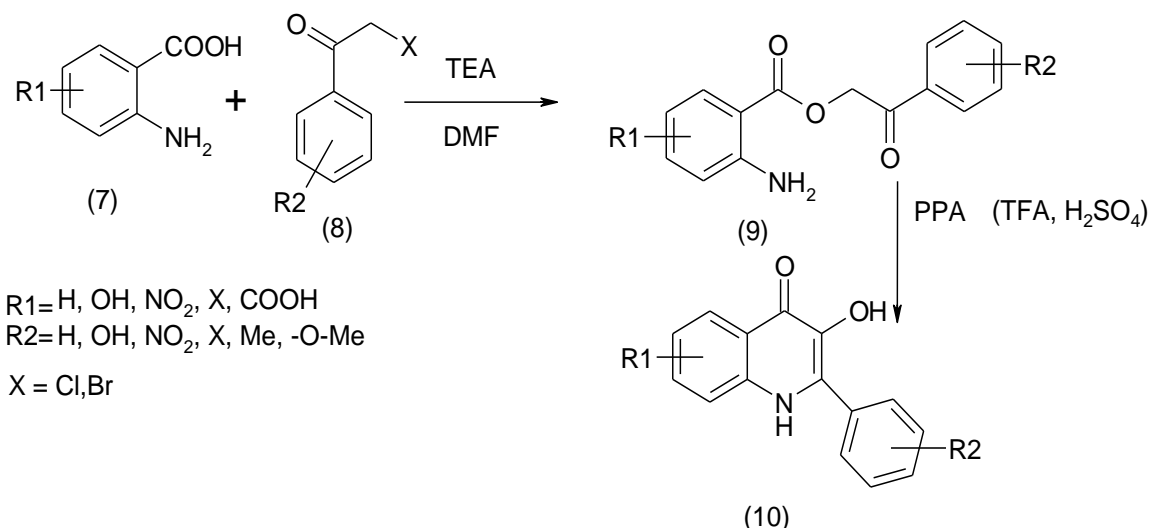
K velice významnému objevu v historii syntézy hydroxychinolonů došlo v roce 1995. Tehdy byly popsány reakce fenacylhalogenidů (8) (Br především) s kyselinou

anthranilovou (7), která vede ke vzniku sady různě substituovaných fenacylanthranilátů (9). Tyto estery kyseliny anthranilové byly poté podrobeny termické cyklizaci v polyfosforečné kyselině (120 °C; 1h). Produktem však nebyl 2-aryl-1*H*-benz[e][1,4]oxazepin-5-on (11), jak se původně uvádělo^{3,4}, ale 2-aryl-3-hydroxy-4(1*H*)-chinolon (10)⁵, což bylo ověřeno ¹H a ¹³C NMR analýzou (schéma 3).



(schéma 3)

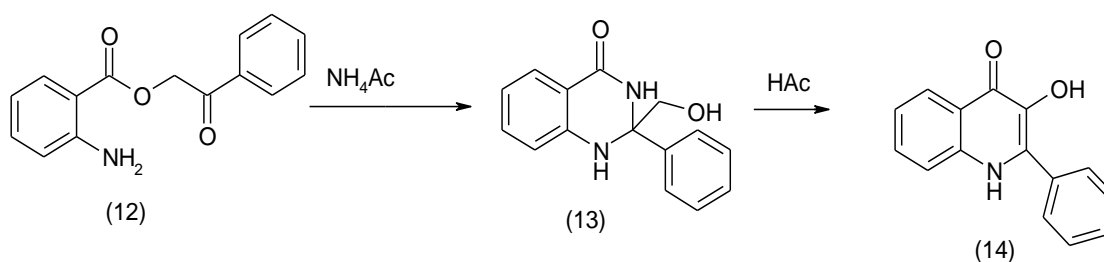
Tato syntéza představuje dodnes nejefektivnější a nejsnazší způsob, jak hydroxychinolony syntetizovat, a to s velkými výtěžky. Detailnější průběh reakce je naznačen níže (schéma 4). Nejprve je třeba převést výchozí derivát kyseliny anthranilové (7) na anorganickou sůl použitím K₂CO₃ či organickou sůl např. triethylaminem. Následuje esterifikace haloketonem za vzniku příslušných derivátů (9). Pro získání požadovaných hydroxychinolonů (10) je nutné je termicky zacyklizovat vhodnou kyselinou (v závislosti na derivátu) – velice obstojně se jeví PPA, avšak lze použít i kyselinu fosforečnou, kyselinu sírovou, kyselinu trifluoroctovou nebo kyselinu octovou. Jedním z hlavních faktorů, které reakci ovlivňují, je volba rozpouštědla.



(schéma 4)

Že lze cyklizaci provést i za refluxu v *N*-methylpyrrolidonu popisuje literatura⁶. Od širšího uplatnění se ale vzhledem k nedostatečné univerzálnosti a problémům s izolací produktů upustilo.

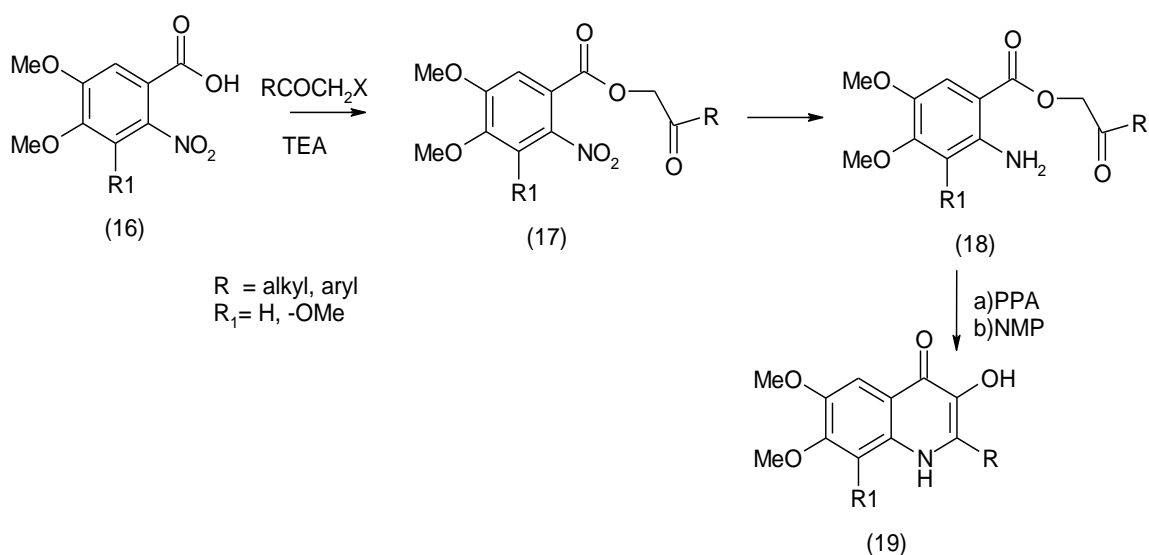
Další výzkum⁷ na katedře nabídl zajímavou syntézu derivátu hydroxychinolonu s využitím přesmyku. Vychází se z meziprojektu výše uvedených reakcí, čili esteru kyseliny anthranilové (12), reagujícím s octanem amonným za vzniku 2-fenyl-2-hydroxymethyl-1,2,3,4-tetrahydrochinazolin-4-onu (13). V posledním kroku je pak proveden zmiňovaný přesmyk na hydroxychinolon (14) zahříváním v kyselině octové. Reakce (schéma 5) však příliš velké využití nepřináší.



(schéma 5)

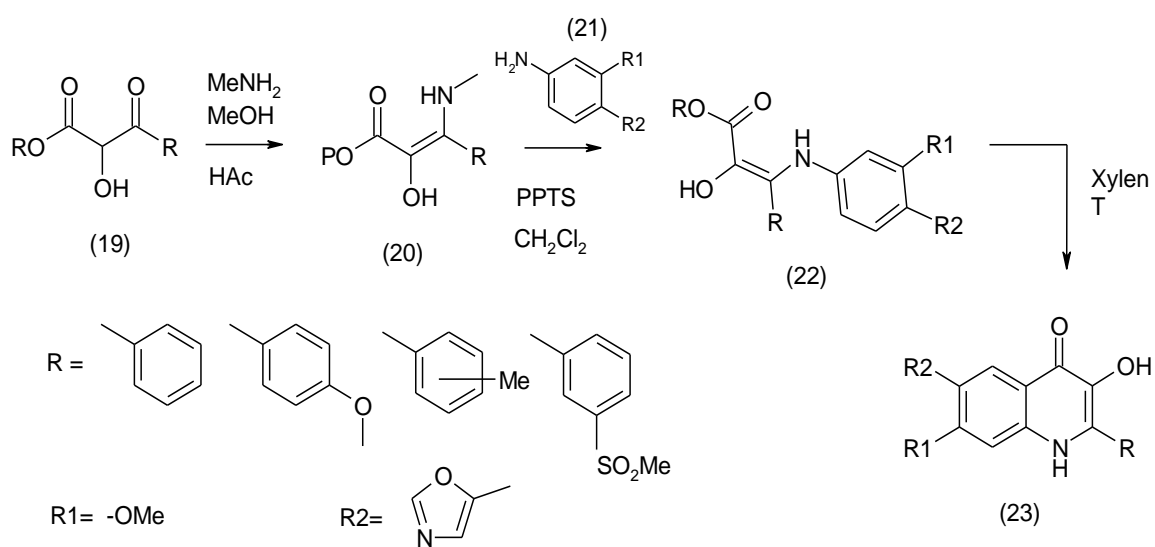
Varianta⁸ reakce s haloketonem (15), kdy je místo kyseliny anthranilové v prvním kroku použit derivát kyseliny nitrobenzoové (16), vyžaduje v druhém kroku redukci (např. chloridem zinečnatým) produktu esterifikace (17). Finální cyklizace

vzniklého esteru kyseliny anthranilové (18) probíhá dobře zejména v polyfosforečné kyselině nebo *N*-methylpyrrolidonu (schéma 6).



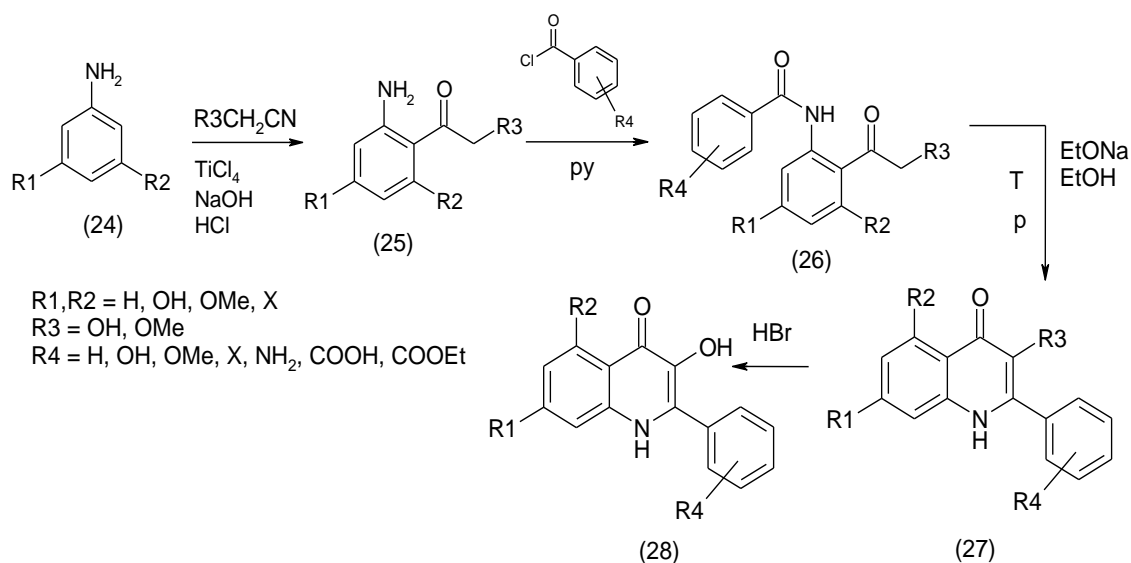
(schéma 6)

Pro závěrečnou cyklizaci lze za určitých podmínek zvolit xylén. Tento způsob syntézy⁹ využívá Friedel-Craftsovu acylaci. Reakcí intermediátu (20) s derivátem anilinu (21) a následným podrobením cyklizace v xylenu za teploty v rozmezí 150 - 300 °C vzniká substituovaný derivát hydroxychinolonu (23) (schéma 7). Důraz je kladen na substituent výchozího synthonu (19).



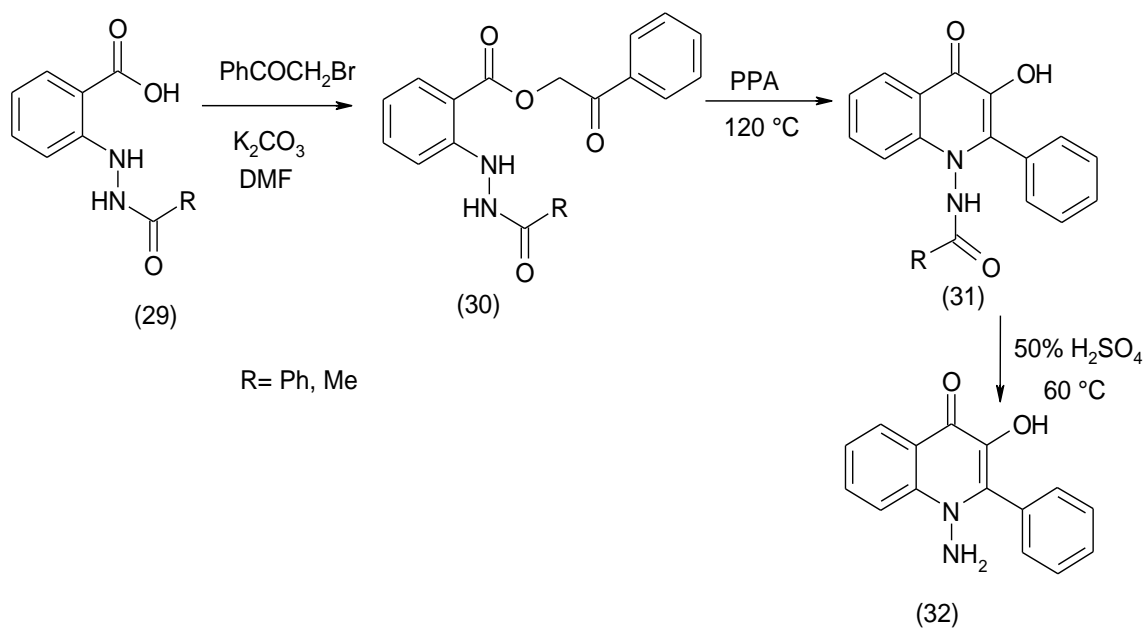
(schéma 7)

Existuje reakce (schéma 8), využívající *m*-derivát anilinu (24). Nejprve provedeme katalyzovanou (TiCl_4) acylaci acetonitrilem do ortho polohy. Nadcházející acylace benzoylhalogenidem je směřována na amino skupinu vzniklého ketonu (25), díky čemuž získáváme meziproduct (26). Působením ethanolátu sodného za zvýšené teploty a tlaku pak dojde ke vzniku derivátu chinolin-4-(1*H*)-onu¹⁰ (27). Pro získání 3-hydroxy derivátu je třeba přidat na závěr HBr.



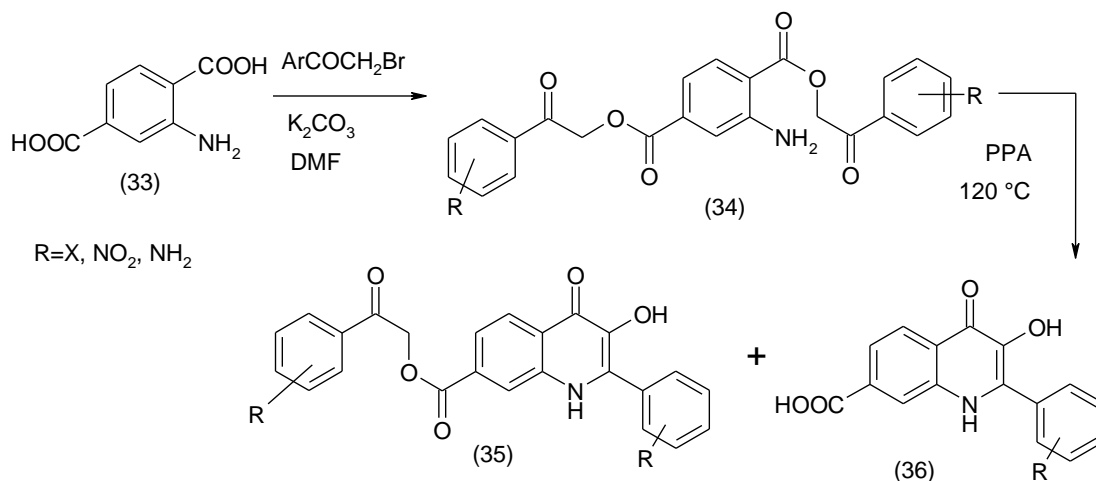
(schéma 8)

Přípravu *N*-amino derivátu hydroxychinolonů popisuje následující schéma (schéma 9). V prvním kroku se esterifikuje *N*-acetyl či *N*-benzoylhydrazinobenzoová kyselina (29) za vzniku fenacyl esterů *N*-acetyl/*N*-benzoylhydrazinobenzenové kyseliny (30). V kroku druhém se působením PPA a zvýšené teploty dosáhne cyklizace na hydroxychinolon (31). Na závěr se v 50% kyselině sírové při 60 °C odstraní chránící skupina a výsledkem je derivát *N*-amino-3-hydroxy-2-fenyl-4(1*H*)-chinolonu (32)¹¹.



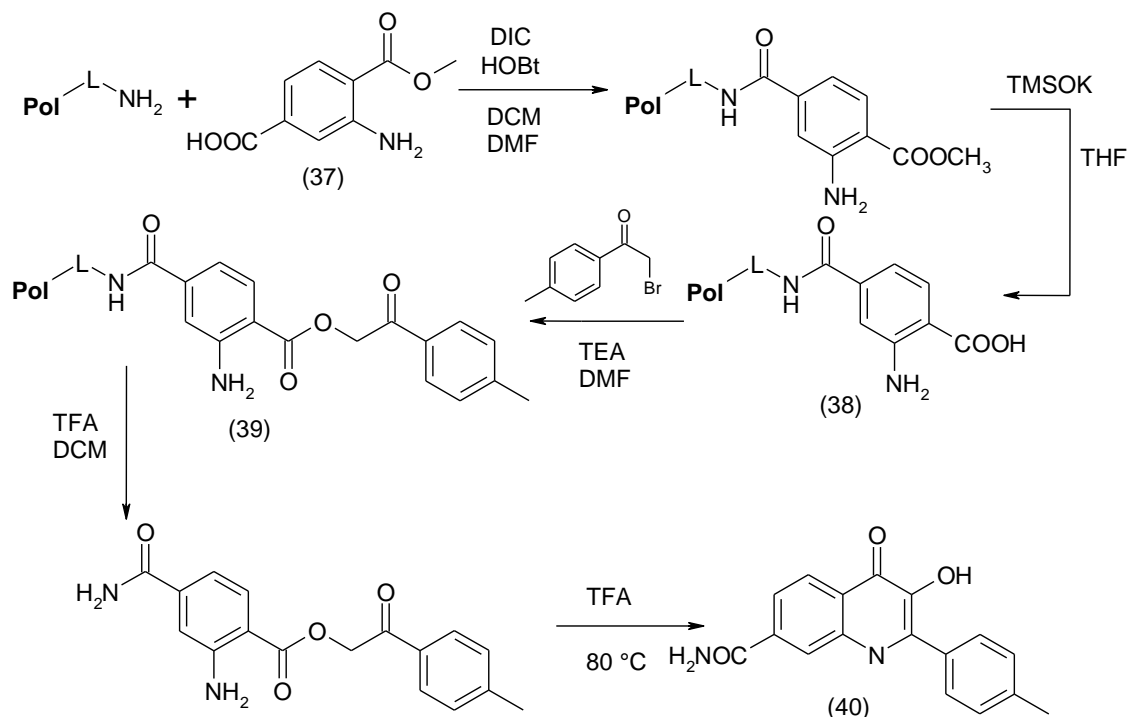
(schéma 9)

Zajímavou syntézu a zároveň lépe rozpustné deriváty hydroxychinolonu uvádí literatura¹². Jako výchozí sloučenina je použita 2-aminotereftalová kyselina (33) a k její dvojité esterifikaci již několikrát zmíněný bromoacetofenon. Vzniklé bisfenacylestery (34) poskytují při termické cyklizaci PPA příslušné fenacylestery 7-karboxychinolinonů (35), ale také částečnou hydrolyzou 7-karboxychinolinon (36). Rozpustnost většiny derivátů, které mají v poloze 7 karboxylový substituent, vzrostla (schéma 10).



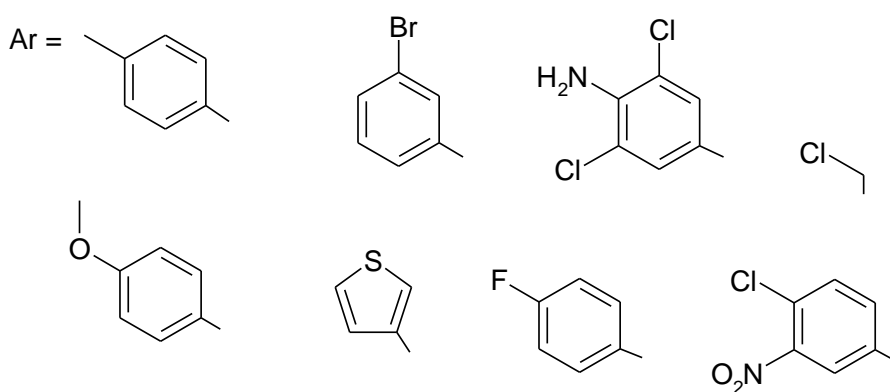
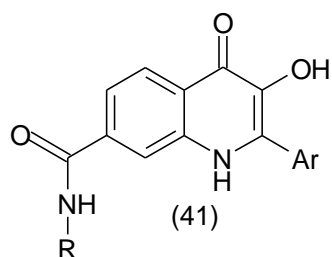
(schéma 10)

Velice výhodný způsob syntézy na pevné fázi byl popsán v roce 2007¹³. Ke komerčně dostupnému polymernímu nosiči s již předem navázaným linkerem byl acylací navázán 1-methyl-2-aminotereftalát (37). Následnou saponifikací trimethylsilanolátem draselným dochází k odstranění chránícího methylesteru (38) a je tak umožněna již známá esterifikace substituovaným bromoacetofenonem. Takto navázaný meziprodukt (39) lze pak snadno odštěpit od polymerního nosiče 0,5 h protřepáváním v 50% roztoku TFA v DCM a zacyklizovat tentokrát působením TFA při teplotě 80 °C. Ziskem reakčního schématu je derivát 2-aryl-3-hydroxy-4(1*H*)-chinolon-7-karboxamidu (40) v poměrně vysokém výtěžku. Syntéza navíc byla optimalizována tak, že celá příprava netrvá déle než dva dny (schéma 11).

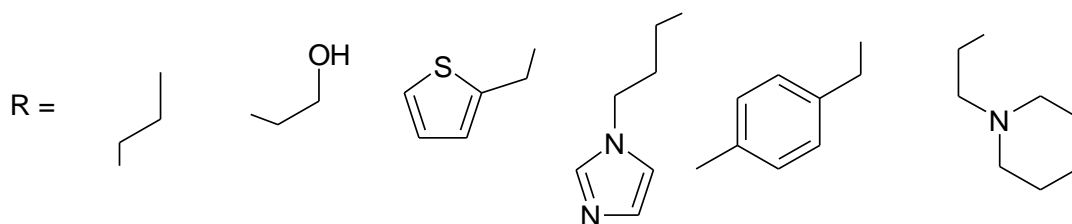


(schéma 11)

Byla také připravena sada *N*-derivatizovaných karboxamidů (41) se dvěma diverzními pozicemi. Ty byly ovlivněny výběrem několika různě substituovaných reagentů, a to za použití bromoacetofenonů (schéma 12) a některých derivátů aminů (schéma 13).



(schéma 12)



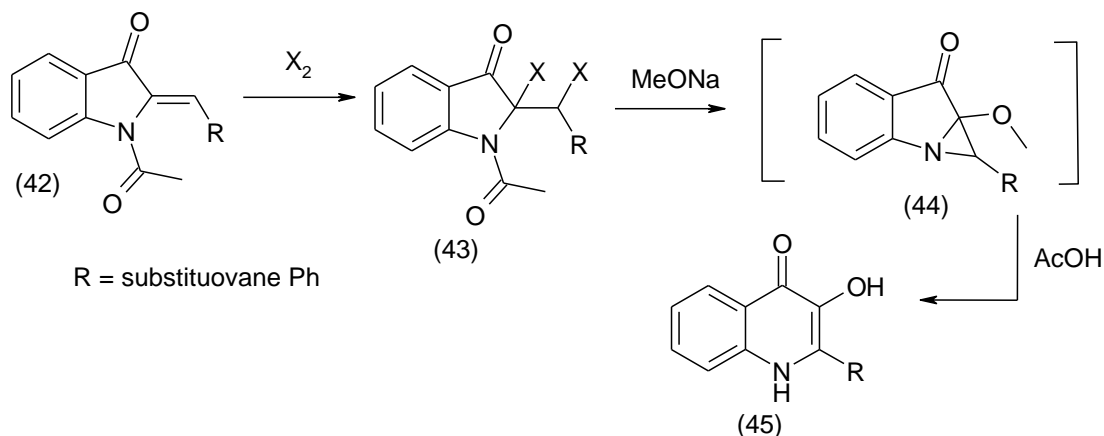
(schéma 13)

Další používané metody syntézy

Jak je jistě zřejmé, pro syntézu 3-hydroxy-4(1*H*)-chinolonu jsou nevhodnější a nejhojněji využívané metody cyklizační. Existují však i jiné metody, které svůj praktický význam mají značně omezený, ať už kvůli špatné dostupnosti výchozích látek, náročnosti syntézy, či často mizivým výtěžkům. Většinou se jedná o modifikace v poloze č. 3 chinolového skeletu.

3.1.2. Metoda rozšíření kruhu

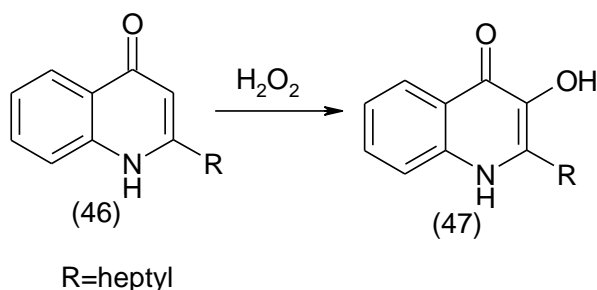
Výjimkou ve trendu modifikace polohy č. 3 je metoda rozšíření pětičlenného kruhu na hydroxychinolonový skelet¹⁴ (schéma 14). V prvním kroku dojde k halogenaci na dvojitou vazbu a následně přidavkem methanolátu sodného vzniká přesmykem derivát aza-cyclopropana[*a*]indenu (44). Ten je na závěr převeden kyselinou octovou na výsledný 2-aryl-3-hydroxychinol-4(1*H*)-onu (45).



(schéma 14)

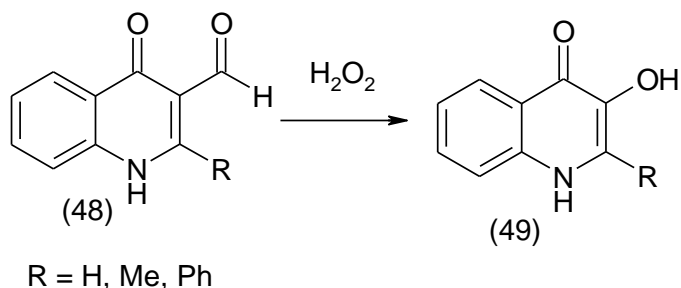
3.1.3. Metody oxidačně-redukční

Pro derivát obsahující v poloze č. 2 heptylový zbytek lze jako oxidačního činidla využít peroxid vodíku¹⁵. Dochází ke vzniku derivátu 2-heptyl-3-hydroxychinol-4(1*H*)-onu (47) (schéma 15).



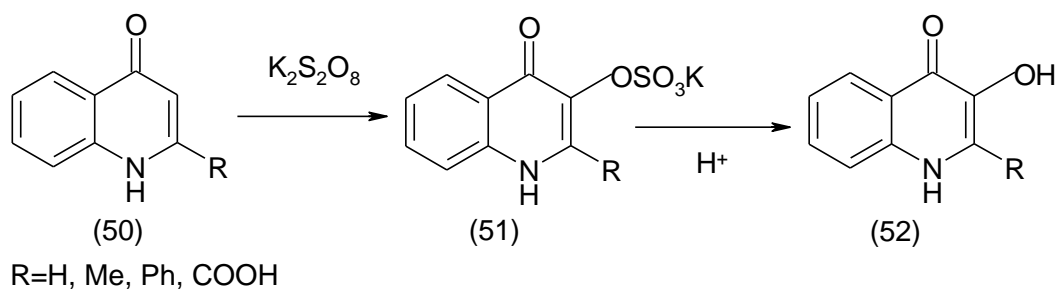
(schéma 15)

Naopak redukční účinky na karbonylovou skupinu chinolového skeletu (48) popisuje literatura¹⁶ (schéma 16).



(schéma 16)

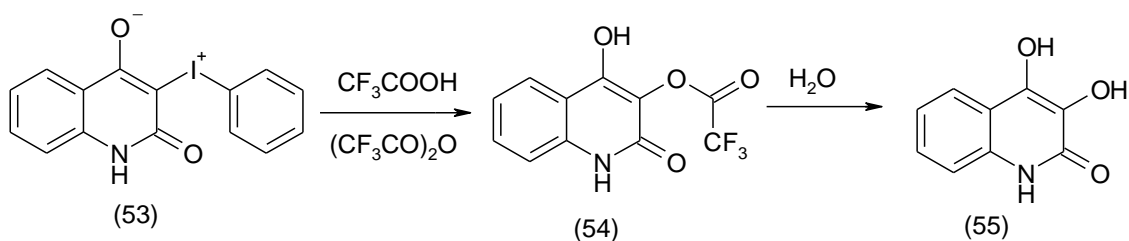
Analogická oxidace působením jiného oxidačního činidla - peroxodisíranu draselného byla také popsána¹⁷ (schéma 17).



(schéma 17)

3.1.4. Metody substituční

Existuje pouze jediná zmínka o substitučních reakcích vedoucích ke vzniku hydroxychinolového skeletu¹⁸ (schéma 18). Výchozí derivát iodinium ylidu (53) reaguje s organickou či anorganickou kyselinou. Produkt (54) je pak třeba v posledním kroku hydrolizovat za vzniku derivátu (v poloze č. 2 není aryl) cílové sloučeniny (55).



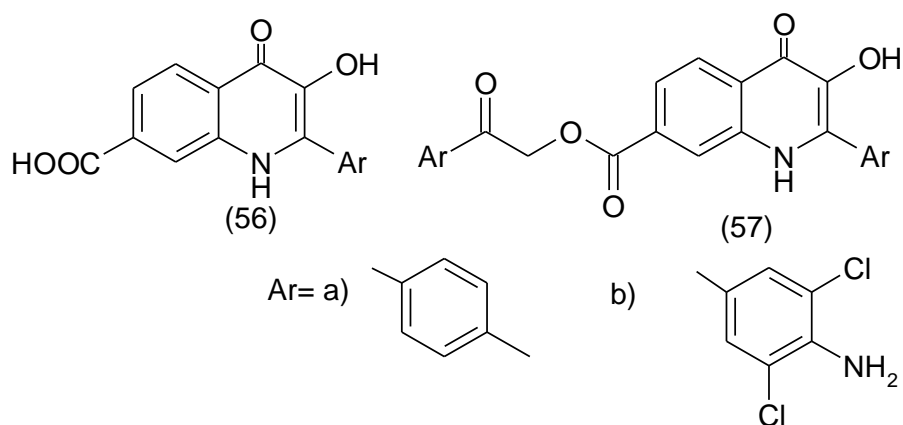
(schéma 18)

3.2. Biologická aktivita 3-hydroxy-4(1H)-chinolonů

Jak bylo naznačeno v úvodu, hydroxychinolony jsou v posledních letech čím dál tím více zkoumány, kvůli jejich podobnosti se základním skeletem flavonolů, jejichž široké spektrum biologických účinků bylo předmětem mnoha studií¹⁹. Biologické účinky hydroxychinolonů však doposud nebyly důkladně prozkoumány patrně kvůli obtížnější syntéze takových derivátů (avšak již v roce 1986 byl takovýto derivát izolován z rostliny *ruta chalepensis*). Tato podkapitola obsahuje stručný přehled těch nejvýznamnějších objevů rozdělených z hlediska různých antimikrobiálních a jiných účinků doposud syntetizovaných derivátů hydroxychinolonu a náznaku jejich působení v organismech.

3.2.1. Cytotoxická aktivita

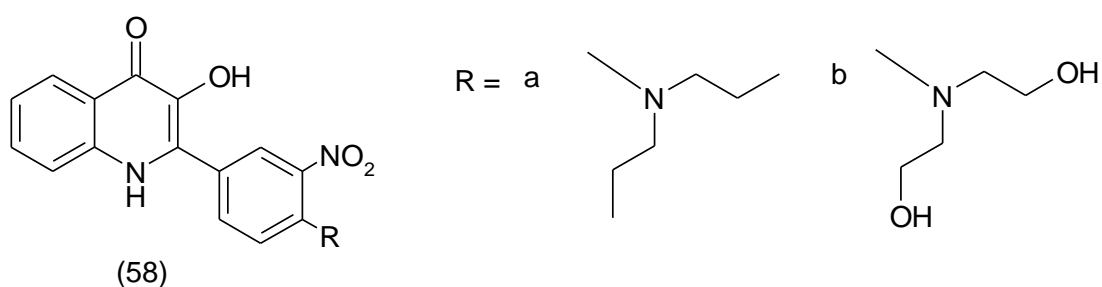
Poměrně vysoké hodnoty (tabulka 1) cytotoxické aktivity uvádí mimo jiné literatura¹³. Testování *in-vitro* metodou MTT²⁰ na tkáních a maligních nádorech: K562 (lidská myeloidní leukémie), včetně linií resistantních na paclitaxel – K562-tax, CEM (T-lymfoblastická leukémie), CEM-DNR-bulk (T-lymfoblastická leukémie resistantní na doxorubicin a postrádající topoisomerasa II α gen) a A549 (plicní nádor). Nejúčinnějšími deriváty proti těmto liniím se ukázaly aminodichloroderiváty (56b) a methylderiváty (56a) hydroxychinolon-7-karboxylové kyseliny. Aktivita ještě zesílila po substituci na volné karboxylové skupině a vytvoření příslušných fenacylesterů (57a,b).



IC ₅₀ některých testovaných derivátů na následujících liniích [μM]					
	K 562	K 562-tax	CEM	CEM-DNR-bulk	A 549
56a	172,0	172,0	195,2	158,6	190,7
56b	11,0	11,7	12,3	12,0	9,8
57a	2,9	2,8	3,8	4,9	2,8
57b	1,10	1,20	0,76	3,60	0,68

Tabulka 1 : Vypsané hodnoty IC₅₀ v μM pro dané sloučeniny

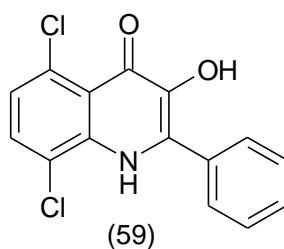
Ze studií²⁰ vyplynulo, že mononitrofenylderiváty jsou inaktivní. Avšak při zaměření se na vhodnou substituci pozice č. 3' a 4' 2-fenylderivátu hydroxychinolonu došlo ke zjištění zajímavých hodnot aktivity. Mezi ty nejvýznamnější patří kombinace 3'-nitro a N-substituované 4'-aminofenyl deriváty (58a,b).



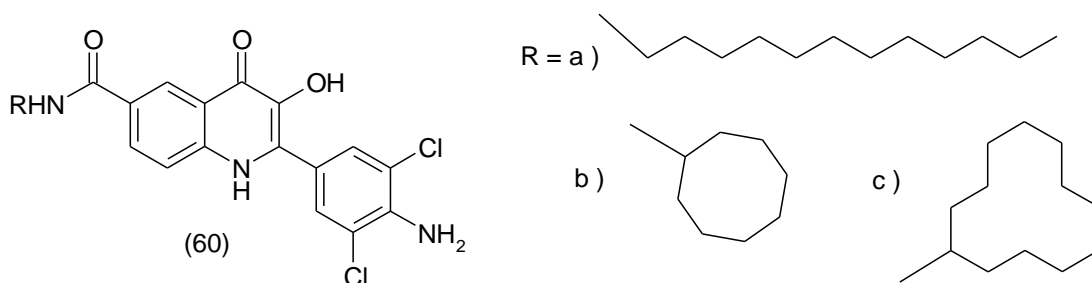
IC ₅₀ některých testovaných derivátů na následujících liniích [μM]					
	K 562	K 562-tax	CEM	CEM-DNR-bulk	A 549
58a	0,6	1,2	0,7	2,2	1,1
58b	187,0	198,0	0,3	143,0	225,0

Tabulka 2

Nevýznamná protinádorová aktivita byla v minulosti popsána ještě u dichloro derivátů hydroxychinolonu²¹. Nejvyšší vykazoval derivát 5,8-dichloro-2-fenyl-3-hydroxychinolin-4(1*H*-)onu (59). Studované monochloro deriváty v porovnání s nimi již nestojí za zmínku. Celé testování probíhalo na třech vybraných nádorových liniích: MCF7 (karcinom prsu), NCI-H460 (karcinom plic) a SF-268 (nádor mozku).



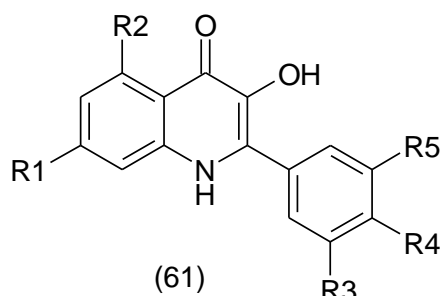
Nedávno však byl publikován výzkum²² cytotoxické aktivity karboxamidů substituovaných v polohách č. 7, 8 a 6 hydroxychinolonového skeletu (60) (v poslední zmiňované poloze vykazovaly deriváty aktivitu vyšší než v ostatních polohách), který systematickým a postupným vývojem nejúčinnějších derivátů přinesl doposud nejvýznamnější hodnoty IC₅₀ (tabulka 3). Díky tzv. chemickým knihovnám, syntetizovaných v několika generacích se našla vhodná kombinace substituentů v závislosti na rozlišných chemických vlastnostech použitých synthonů – ve finále se v substituci amidů nejvíc osvědčily lipofilní uhlovodíkové zbytky. U některých úspěšných derivátů byl pak navíc zjišťován terapeutický index (rozdíl mezi toxicitou na nádorových liniích a zdravých). Testování probíhalo na liniích CEM, K562, HCT116 – karcinom konečníku a pro CEM IC₅₀ < 1 μM normálních lidských fibroblastech – BJ a PBMC – krevní lymfocyty.



IC ₅₀ některých testovaných derivátů na následujících liniích [μM]					
	K 562	CEM	HCT116	BJ	PBMC
60a	0,37	0,25	0,56	90,1	98,3
60b	0,62	0,75	0,75	12,4	27,0
60c	0,77	0,26	0,69	36,2	56,5

Tabulka 3

Některé hydroxylové deriváty 4-(1*H*)-chinolonů poskytly velmi významné hodnoty cytotoxické aktivity¹⁰ způsobené inhibicí topoisomerasy II. Nejvyšší aktivity vykazovala látka kde R₁ = R₂ = R₃ = R₄ = R₅ = OH (61a).

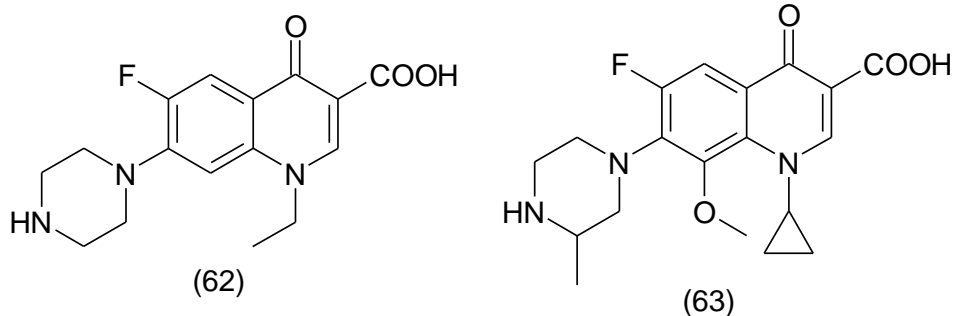


IC ₅₀ některých testovaných derivátů na následujících liniích [μg/mL]							
	R ₁	R ₂	R ₃	R ₄	R ₅	DNA - gyrasa	Topoisomerasa II
61a	OH	OH	OH	OH	OH	472	0,01
61b	OH	OH	F	H	F	131	0,12
61c	CH ₃	CH ₃	H	OH	OH	113	0,07

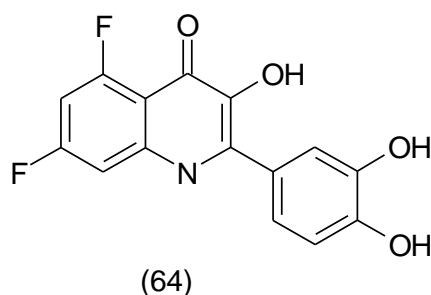
Tabulka 4

3.2.2. Antibakteriální aktivita

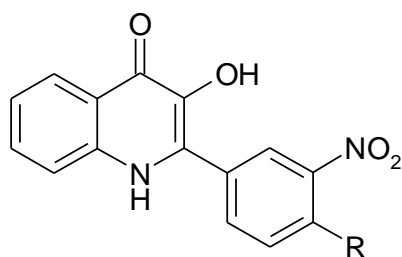
Již nějakou dobu jsou známy deriváty 4-(1*H*)-chinolonů vykazující antibakteriální aktivitu. Mezi komerčně známé léky patří například Norfloxacin (62) či Gatifloxacin (63). Ve většině těchto derivátů flourochinolonu se v poloze č. 3 vyskytuje karboxylová skupina a mechanismus účinku funguje nejčastěji na základě inhibice bakteriální DNA-gyrasy (bakteriální typ topoisomerasy II). K inhibici eukaryotní topoisomerasy II však v tomto případě nedochází vlivem absence hydroxylové skupiny.



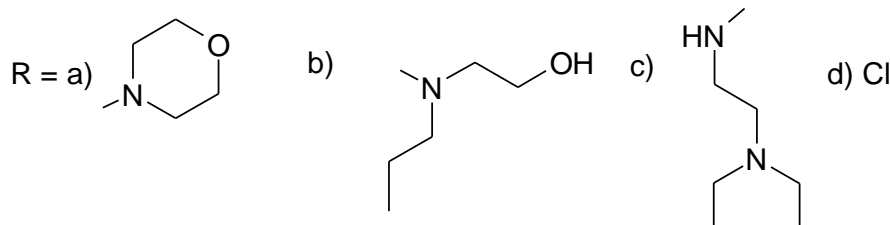
Na sklonku milénia bylo uvedeno studium hydroxychinolonů v již zmiňované publikaci¹⁰. Náhradou karboxylové skupiny v poloze č. 3 za skupinu hydroxylovou byl mechanismus účinku antibakteriální aktivity pozorován pouze inhibicí gyrasy. Nejúčinnější derivát 2-(3,4-dihydroxyfenyl)-3-hydroxy-5,7-difluoro-4(1*H*)-chinolonu (64) dosahoval hodnot $IC_{50} = 190 \mu\text{M}$. Pro aktivitu vůči gyrase jsou nezbytné hydroxylové skupiny fenylového substituentu.



I zde na katedře byly některé deriváty, zkoumané na jejich protinádorovou aktivitu, podrobeny *in-vitro* testování proti následujícím gram-pozitivním i gram-negativním kmenům bakterií²²: CCM 4224 - *Enterococcus faecalis*, CCM 3953 - *Staphylococcus aureus*, CCM 3954 - *Escherichia coli*, CCM 3955 - *Pseudomonas aeruginosa*, MRSA - methicillin resistantní *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus haemolyticus*, *Escherichia coli* a *Pseudomonas aeruginosa*. Testovanou látkou byly deriváty 3-hydroxy-2-(3-nitrofenyl)-4(1*H*)-chinolonu (65). V tabulce 5 jsou uvedeny nejvyšší naměřené hodnoty vybraných derivátů. I přesto se jedná o nepříliš významné výsledky.



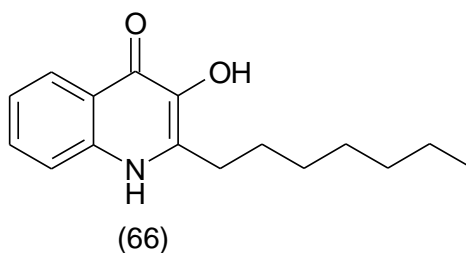
(65)



	Minimální inhibiční koncentrace [mg/l]							
	CCM 4224	CCM 3953	CCM 3954	CCM 3995	MRSA	Staphylococcus haemolyticus	Escherichia coli	Pseudomonas aeruginosa
65a	32	64	128	128	64	64	128	128
65b	128	64	X	128	64	64	128	128
65c	128	64	64	128	64	64	128	128
65d	X	128	64	128	64	X	X	64

Tabulka 5

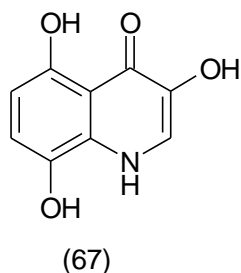
Poslední jmenovaný kmen *Pseudomonas aeruginosa* je schopen produkovat na 50 derivátů 4-chinolonu. Jedním z důležitějších je 2-heptyl-3-hydroxy-4(1H)-chinolon (66), jehož syntéza¹⁵ je vypsána v kapitole oxidačně-redukčních metod. Zajímavým faktem je, že tato produkce má pro kmen své výhody i nevýhody. Tzv. PQS – pseudomonas quinolone signal - je zodpovědný za produkci chinolonů, které bakterii buď poskytnou anti-oxidativní ochranu, či naopak učiní citlivou vůči oxidaci a dalším stresům. Malou dávkou jedu vlastně bakterie vyeliminují nejslabší články²³.



(66)

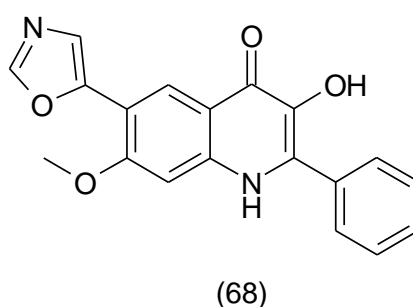
3.2.3. Antivirální aktivita

Doposud nebylo na antivirální aktivitu testováno mnoho derivátů hydroxychinolonů. Avšak na principu inhibice reverzní transkriptasy existuje derivát 3,5,8-trihydroxy-4(1*H*)-chinolonu (67) izolovaný z mořské houby *Verongia Aerophoba* jako její žlutý zochrom. Tato látka²⁴ se ukázala jako obstojná substance v boji proti viru HIV typu 1 a 2.



3.2.4. Imunosupresivní aktivita

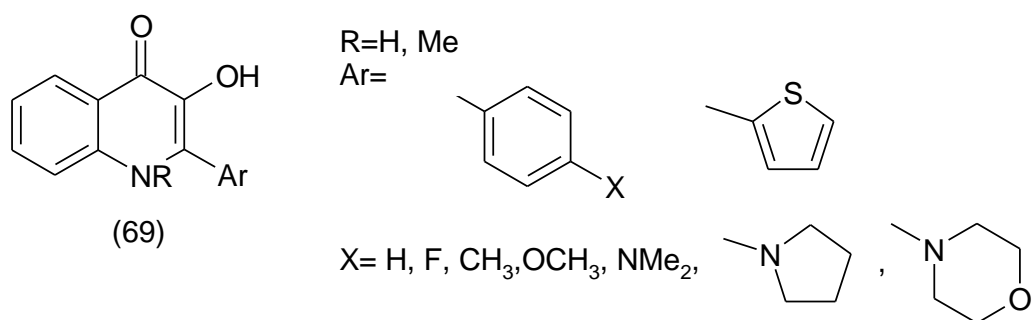
Schéma č. 7 popisuje syntézu derivátu 6-(oxazol-5-yl)-3-hydroxy-4(1*H*)-chinolonu (68), který se vyznačuje inhibicí inosinmonofosfát dehydrogenasy (IMPDH) - jeden z hlavních enzymů buněčné proliferace a diferenciaci. Z toho vyplývá, že nachází své využití jako imunosupresivum při komplikacích po transplantaci dárcovského orgánu⁹.



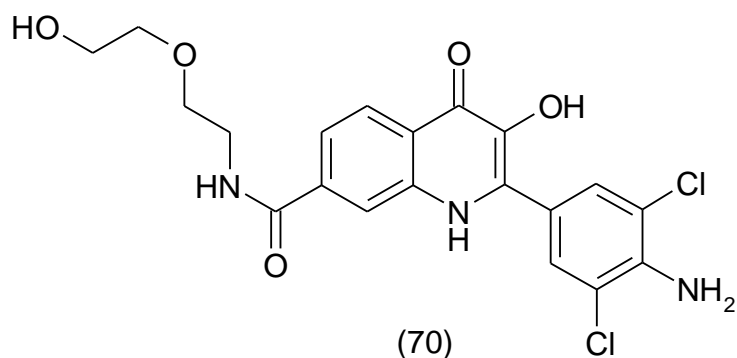
Dalšími možnými deriváty k léčbě imunitního systému a proliferačních chorob jsou deriváty 3-hydroxy-2-(3-nitrofenyl)-4(1*H*)-chinolonu (65). Látka se zaměřuje zejména na ty aktivní a proliferující lymfocyty na rozdíl od těch v klidovém stavu.

3.3. Fluorescenční vlastnosti 2-aryl-3-hydroxy-4(1*H*)chinolonů

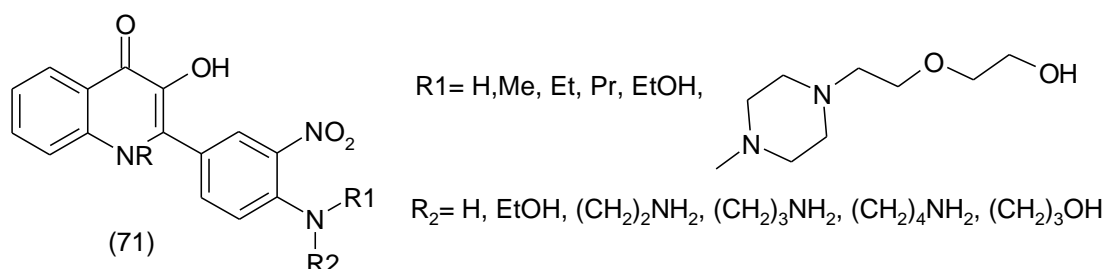
K výše uvedeným příkladům biologických aktivit hydroxychinolonů se v posledních letech přidává i aktivita fluorescenční. Ta je způsobena tzv. intramolekulárním přenosem excitovaného protonu (ESIPT), což vede ke tvorbě dvou tautomerních forem. První studie²⁵ přinesla zajímavé spektrální hodnoty různých derivátů 2-aryl-3-hydroxy-4(1*H*)-chinolonu (3HQ) (69). V závislosti na substituci se téměř u všech vyskytovali intenzivní fluorescenční vlastnosti. Podstatným faktorem pro velikost kvantového výtěžku se ukázala volba rozpouštědel, ze kterých byl nakonec na základě porovnání spektroskopických vlastností 3HQs vybrán nejvhodnější kandidát DMSO.



Následující navazující výzkum 3HQs na katedře se začal zaměřovat na optimalizaci kvantových výtěžků a především využití derivátů jako potenciální fluorescenční sondy, včetně popisu vhodného raménka k jejímu připojení na biomolekuly. Nejprve byly popsány vlastnosti karboxamidů hydroxychinolonu²⁶ v různých pozicích (3HQ6Cs, 3HQ7Cs, 3HQ8Cs). Následovala selekce v závislosti na velikosti kvantového výtěžku, při které byl vybrán nejslibnější derivát (70) k prozkoumání dalších vlastností, jako je vliv rozpouštědla či určování hodnoty pH (později byla opravdu látka přihlášena jako užitný vzor pro sondu na měření pH). Derivát byl vybrán i mimo jiné díky obecně známým vlastnostem ethylenoxy skupiny: dobrá rozpustnost ve vodě, biokompatibilita a dostupnost různých délek řetězce.



Pro modifikaci druhé části molekuly a zlepšení fluorescenčních vlastností byly později připraveny 4'-aminosubstituované nitroderiváty 3HQs (71). Přílišným prodlužováním řetězce substituentu však docházelo k zásadním poklesům kvantových výtěžků fluorescence, které už tak nebyly příliš vysoké v porovnání s hodnotami ze studie 3HQCs. Opět bylo určeno i rozpouštědlo s nejvyššími dosaženými kvantovými výtěžky – toluen²⁷.



4. Výsledky a diskuze

Jak vyplývá z rešeršní části, je možné připravovat deriváty hydroxychinolonů jak pomocí tradiční syntézy v roztoku, tak s použitím syntézy na polystyrenové pryskyřici. V této práci byl použit druhý zmíněný způsob, neboť v případě úspěšné optimalizace se otevírají možnosti efektivní přípravy většího množství derivátů pomocí HTOS a jejich následná studie biologické aktivity v závislosti na struktuře (SAR).

Jak je v teoretické části naznačeno, několik typů derivátů hydroxychinolonu již bylo podrobena detailnějšímu výzkumu a optimalizaci syntetické cesty, avšak kondenzované bisheterocyklické deriváty, kterým se věnuje tato předložená bakalářská práce, byly studovány ojediněle.

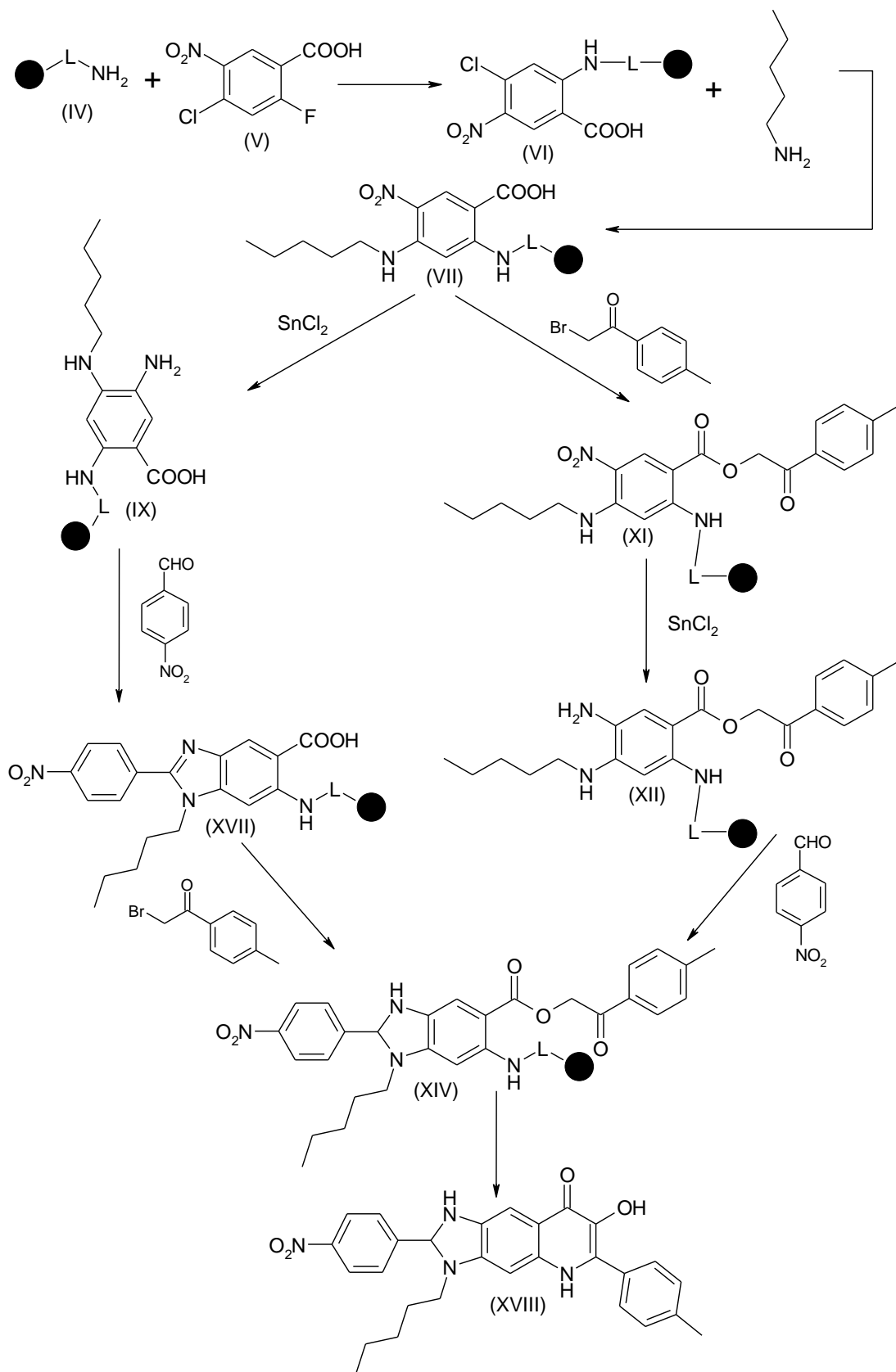
4.1. Syntéza na pevné fázi

Pevnou fází je obecně myšlen velmi jemně „granulovaný“ kopolymer styrenu a 1-2 % divinylbenzenu. Existuje mnoho druhů těchto tzv. pryskyřic (Pol), u kterých je často třeba před samotnou syntézou navázat spojení mezi polymerem a atomem, který je na základě volby strategie přípravy třeba ukotvit k pevné fázi. Takovéto spojení nazýváme Linker (L) a jeho význam spočívá převážně ve specifčnosti následných štěpení syntetických intermediátů. Řada komerčních pryskyřic linker již obsahuje. Jedna z nich - Rinkova pryskyřice (Rink amide resin)²⁸ zvolená pro tuto práci obsahuje trialkoxy-benzhydrylaminový linker (I).

Na základě rozsáhlého výzkumu syntézy bisheterocyklických derivátů na pevné fázi²⁹ se odráží možný postup v přípravě modelových kondenzovaných bisheterocyklů. Co se týče samotné strategie a logistického přístupu, je třeba si zvolit ze dvou variant, jak je ve studii také naznačeno.

4.1.1. Obecná strategie přípravy cílových látek

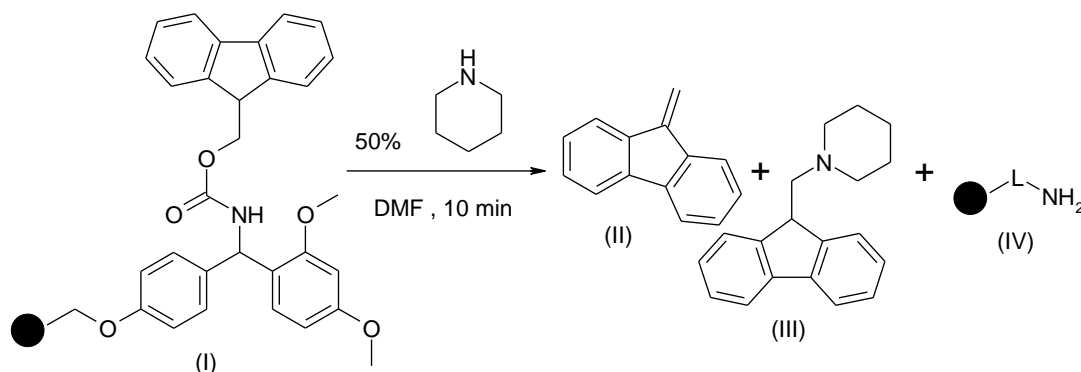
Pro syntézu modelových látek (XVIII) bylo nejprve nutné odstranění protektivní Fmoc skupiny z Rinkovy pryskyřice. Teprve poté mohlo dojít k arylaci velice výhodného building blocku 2-fluor-4-chlor-5-nitrobenzoové kyseliny (V), který svou strukturou otevírá možnosti dalším substitučním nebo adičním modifikacím jak uvádí literatura³⁰. Takto připravený intermediát byl podroben další substituci za vzniku 4-amino-5-nitroanthranilové kyseliny (VII) a tudíž prvního diverzního místa (možnost použití různých aminů). V této části byly ozkoušeny různé logistické přístupy, přičemž se postupovalo nejprve přes esterifikaci karboxylové skupiny 2-brom-1-fenyl-ethanony za zisku prekurzoru hydroxychinolonu (XI) a druhého diverzního místa, následně redukce nitro- skupiny z druhé strany molekuly, čímž vzniká výhodná výchozí struktura pro tvorbu třetího diverzního místa – přikondenzovaného heterocyklu²⁹ (XII). Byla ověřena i možnost začít modifikovat molekulu nejprve na nitro substituentu a teprve poté esterifikovat za vzniku prekurzorů určených k závěrečné cyklizaci na modelový bisheterocyklus (XIV) (schéma 19).



(schéma 19)

4.1.2. Odstranění chránicí skupiny pryskyřice

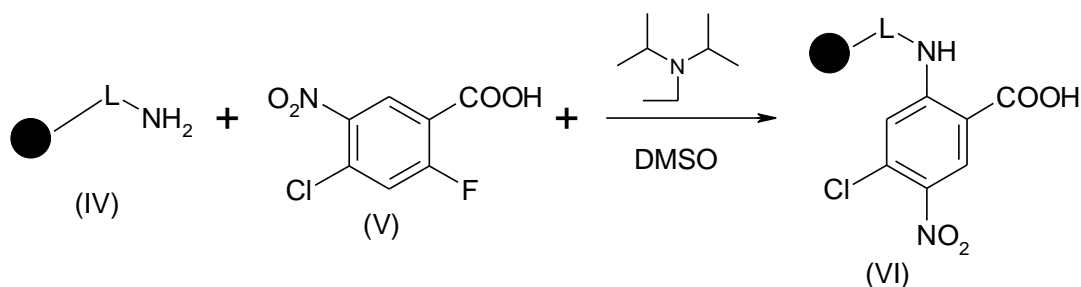
Rinkovu pryskyřici (I) je třeba nechat protřepat v 50% roztoku piperidinu v dimethylformamidu (DMF) po dobu 10 min (schéma 20). Následkem toho odstraníme chránicí skupinu Fmoc, jež se za katalýzy rozkládá na deriváty fluorenu (II, III), a polymer (IV) je poté připravený k nasazení dalších reakčních kroků. Vzhledem k předchozím zkušenostem vyhodnocení reakce nebylo zapotřebí³¹.



(schéma 20)

4.1.3. Navázání vhodného building blocku

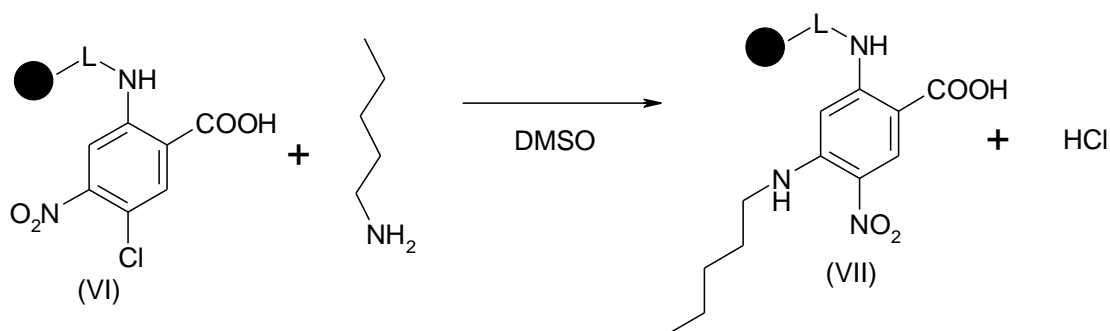
Regioselektivní nukleofilní substitucí pryskyřice s primárním aminem (IV) do polohy 2 výchozí 2-fluor-4-chlor-5-nitrobenzoové (V) kyseliny dojde k imobilizaci building blocku (bb) na polymerní nosič (VI). Arylace probíhá za současného působení báze diisopropylethylaminu (EDIPA), které je třeba přidat dvojnásobek ekvivalentu přidaného bb (1 ekvivalent pro karboxylovou skupinu a druhý k odebrání vzniklé fluorovodíkové kyseliny). Směs je protřepávána přes noc v dimethylsulfoxidu při teplotě 50 °C (schéma 21). Loading pryskyřice před reakcí odpovídal hodnotě 1,1 mmol/g. Čistota produktu byla určena pomocí HPLC na 99 %.



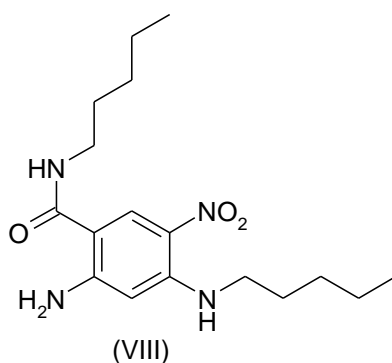
(schéma 21)

4.1.4. Nukleofilní substituce primárním aminem

Pro další nukleofilní substituci byl jako modelový nukleofil zvolen pentylamin (10% roztok v dimethylsulfoxidu). Výchozí intermediát ukotvené 4-chloro-5-nitroanthranilové kyseliny (VI) tak modifikujeme na 4-pentylamino-5-nitroanthranilovou kyselinu (VII) (schéma 22).



Reakční teplota a čas byl nejprve stanoven na 100 °C přes noc. Avšak dle vyhodnocení LC-MS spektra byla v jedné z analýz prokázána přítomnost 15 % vedlejšího produktu. Dle analýzy hmotnostního spektra se jednalo o pentylamid kyseliny 4-pentylamino-5-nitroanthranilové (VIII). Vzhledem k této nežádoucí reakci byla navržena teplota mezi 80 – 90 C° se stejným reakčním časem.

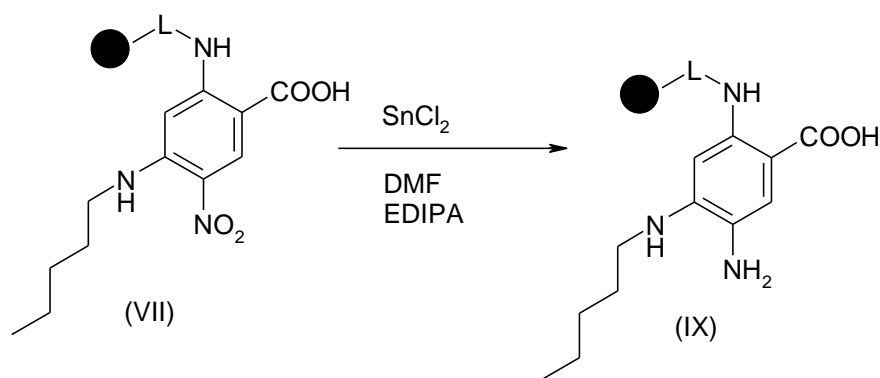


Výše uvedená změna teploty a ponechání reakční doby 24 h přinesli uspokojivější výsledek vzniku produktu o čistotě 83 %, ale detekován byl i zbytek nezreagované výchozí pryskyřice (VI). Reakce proto byla za stejných podmínek

opakována pro doreagování a tudíž zisk co nejčistšího produktu. Dle analýzy však došlo opět k vytvoření nečistoty v podobě intermediátu (VIII) a to v téměř ekvivaletním množství k produktu o čistotě 50 %. Následkem toho byl navržen pokus o provedení substituce pomocí mikrovlnného zahřívání. Zvolená teplota byla ponechána na 90 °C a směs pryskyřice (VI) s 10% roztokem pentylaminu v DMSO byla promíchávána po dobu 20 min. Výsledkem bylo velké množství nezreagované výchozí pryskyřice (79 %) i produkt o čistotě 15 %. Jelikož byl opět zaznamenán vznik nečistoty (VIII), byl sledován pokus v mikrovlnce jako neúspěšný. Tato skutečnost vedla k opětovnému nasazení reakce konvenčním zahříváním, tentokrát při snížené teplotě 70 °C a prodloužení reakční doby na 68 hodin. Analýzou byl potvrzen výsledný produkt o čistotě 95 % a evidentní byla i absence výchozí pryskyřice.

4.1.5. Redukce nitro skupiny

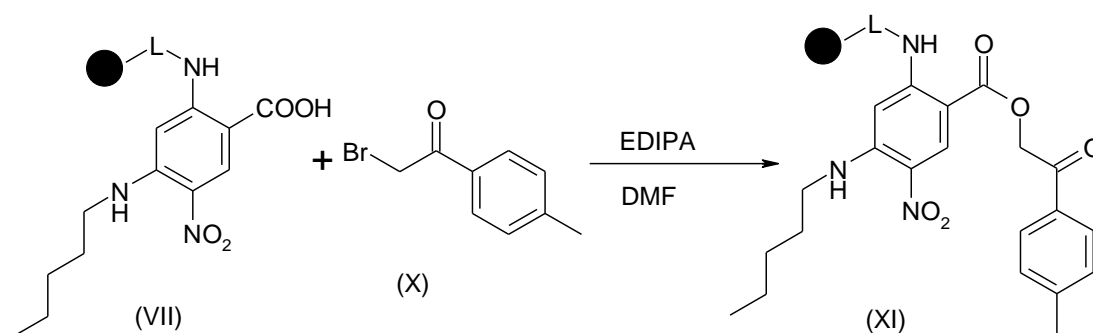
V této části syntézy jsme se rozhodli otestovat oba logistické přístupy na základě postupné modifikace substituentů. Jedním z nich je redukce nitro skupiny výchozího intermediátu za vzniku 5-amino-4-pentylaminoanthranilové kyseliny (IX). Ta je zprostředkována působením redukčního činidla - chloridu cínatého - rozpuštěného v dimethylformamidu za přítomnosti diisopropylethylaminu (schéma 23). Rozpouštědlo je třeba řádně odplynit dusíkem, aby nedocházelo ke vzniku nečistot. Takto upraveným dimethylformamidem se zároveň promývá pryskyřice (VII) před nasazením samotné reakce. Pro reakci postačuje laboratorní teplota a reakční doba 24 h. Při těchto podmínkách bylo kromě detekce malého množství předchozího nežádoucího produktu (VIII) ověřeno kvantitativní zredukování (90% čistota produktu) výchozí látky (VII). Ve snaze zkrátit celkový čas potřebný na veškeré syntetické kroky, byla reakce prováděna i po dobu 1 h. Analýza ale odhalila blíže neidentifikovatelný meziprodukt s retenčním časem 1,41 o čistotě 34 %. Navíc vzorek obsahoval pouze 55 % požadovaného produktu.



(schéma 23)

4.1.6. Esterifikace nezreduované formy pomocí substituovaného acetofenonu

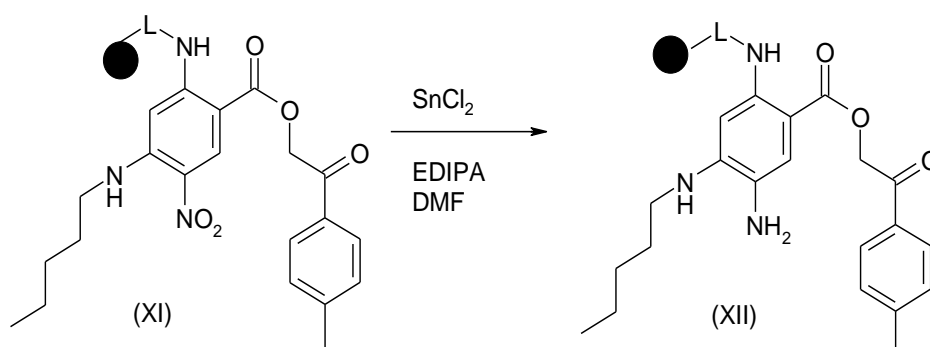
Naopak pokud se nejprve vydáme modifikací druhé strany molekuly, bude se jednat o zásadní esterifikaci pro budoucí vytvoření chinolonového skeletu. Reakce již byla několikrát prováděna a popsána i pro tento building block³⁰. Nezreduvaný intermediát (VII), získaný substitucí pentylaminu, je za pomoci ethyldiisopropylaminu mechanismem nukleofilní substituce vystaven reakci s modelovým synthonem 2-bromo-4'-methylacetofenonem (X) (schéma 24). Produktem je odpovídající ester (XI) o 90% čistotě (zbytek tvoří nečistota ve formě látky VIII z minulého reakčního kroku). Jako rozpouštědlo pro tuto reakci byl použit dimethylformamid.



(schéma 24)

4.1.7. Redukce nitro skupiny na již esterifikovaném meziprojektu

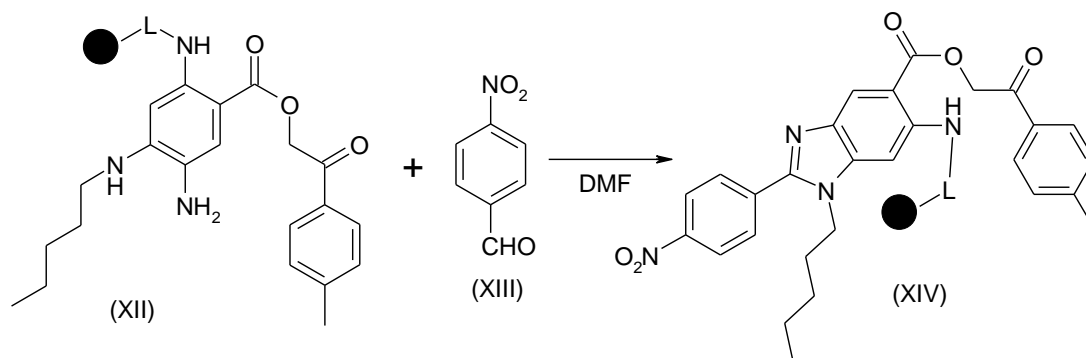
Jakmile byla provedena esterifikace potřebná k budoucímu uzavření na chinolonový skelet, bylo nutné se zaměřit na modifikaci druhé strany molekuly. Redukcí nitro skupiny na ukotveném esteru (XI) dochází k tvorbě jeho redukované formy (XII). Tato nová struktura (XII) je připravena na kondenzaci za vzniku heterocyklu a tudíž tvorbu třetího diverzního místa (schéma 25). Kromě přidané báze (EDIPA) i zde byl dimethylformamid nejprve dusíkem odplyněn a následně tímto DMF byla promývána pryskyřice před nasazením reakce. Pomineme-li 15% obsah nečistot (např. meziprojekt VIII) byla látka zredukována kvantitativně



(schéma 25)

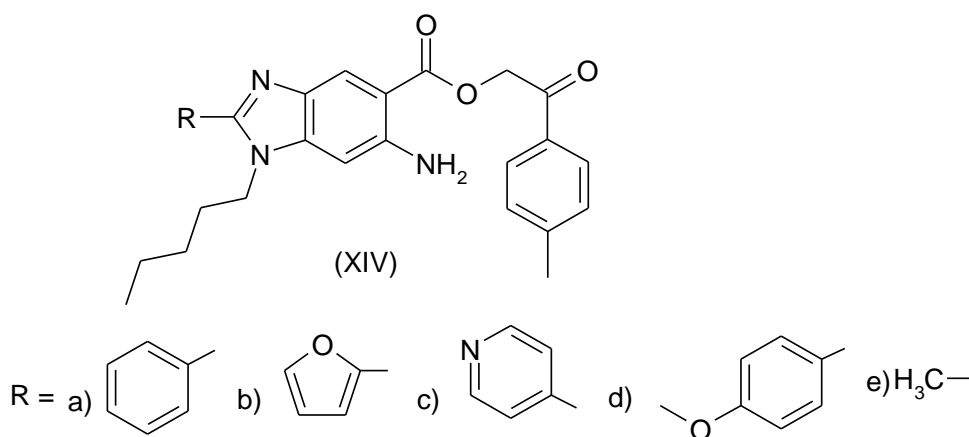
4.1.8. Vznik benzimidazolového skeletu

Pro kondenzaci příslušných amino skupin (XII) na benzimidazolový skelet byl jako modelový synthon použit 4-nitrobenzaldehyd (XIII). Pryskyřice byla přes noc protřepávána při laboratorní teplotě v 0,2M roztoku aldehydu v DMF (schéma 26). V analýze byl opravdu detekován pík odpovídající produktu (XIV) o čistotě 85 % spolu s malým množstvím nezreagované výchozí látky.



(schéma 26)

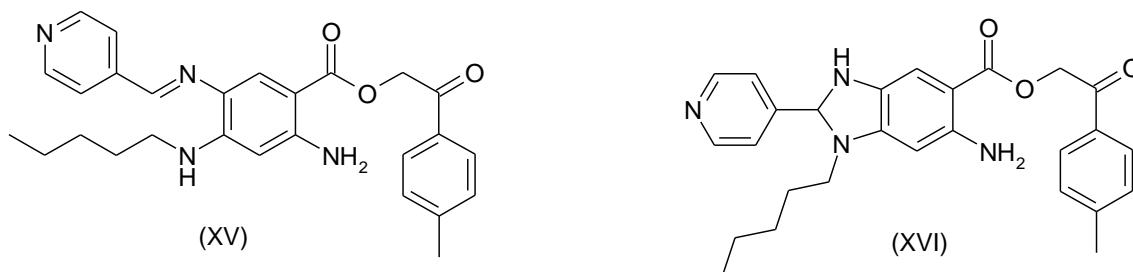
V rámci ověření schůdnosti reakce i pro jiné typy aldehydů byly provedeny totožné kondenzace za laboratorní teploty s benzaldehydem (XIVa), furfurelem (XIVb), pyridin-4-karbaldehydem (XIVc), anisaldehydem (XIVd) a acetaldehydem (XIVe) (schéma 27). U všech byl detekován vznik požadovaného derivátu benzimidazolu, avšak produkty byly znečištěny značným množstvím nezreagované výchozí látky.



(schéma 27)

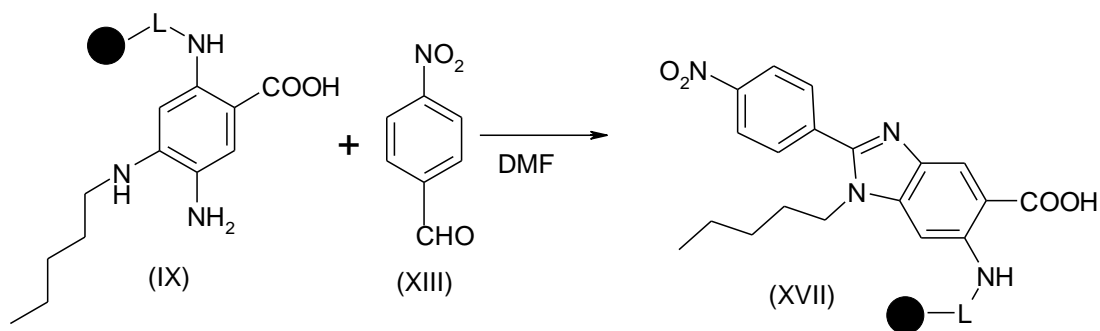
V této fázi optimalizace byl nejprve vybrán pyridin-4-karbaldehyd, reprezentující sadu aldehydů, a poté bylo navrženo zvýšení reakční teploty. Původní laboratorní teplota byla zaměněna za teplotu 50 °C. Avšak i tento krok přinesl téměř totožné výsledky jako při teplotě původní. K doreagování byla ta samá pryskyřice (XIVc) podrobena opětovnému působení roztoku pyridin-4-karbaldehydu za teploty 50 °C a reakční doby 24 h. Souběžně nasazená reakce výchozí látky (XII) za stejných podmínek sloužila pro srovnání. Reakce však kvantitativně neproběhly. Teprve až

záměnou rozpouštědla a prodloužení reakčního času se dosáhlo větších výtěžků. Původní dimethylformamid byl postupně nahrazen tetrahydrofuranem, dimethylsulfoxidem a dichlormethanem. Z analýzy těchto reakcí pro vybraný karbaldehyd (XIVc) byl rozpoznat lepší průběh v dichlormethanu, nicméně ve všech rozpouštědlech byly v téměř ekvivalentním množství jako potřebný produkt reakce zaznamenány dva další píky intermediátů (XV, XVI), jejichž struktura byla predikována na základě hmotnostního spektra (schéma 28). Opakovaným nasazením reakce nedoreagované pryskyřice s pyridin-4-karbaldehydem a nově s celým souborem aldehydů (k diskusi ohledně různých mezomerních efektů a jejich vlivů na reakci) v dichlormethanu byl zcela odstraněn pík nezreagované výchozí látky (XII) a navíc ani nebyly detekovány intermediáty (XV, XVI). Reakce byla zkoušena nejprve s aldehydy poskytující deriváty (XIV, XIVa, XIVd) a produkt (XIVc), testovaný opět na reakční čas jeden den a na jeho opětovném nasazení (48 h). Díky této optimalizaci byla reakce kvantitativní. Čistota produktu (XIVc) byla z LC-MS spektra stanovena na 95 % (optimalizace probíhala na rozdílných šaržích pryskyřice – proto rozdíly v čistotách). Později byla pro úplnost potvrzena schůdnost reakce i pro zbývající používané aldehydy (XIVb, XIVe)



(schéma 28)

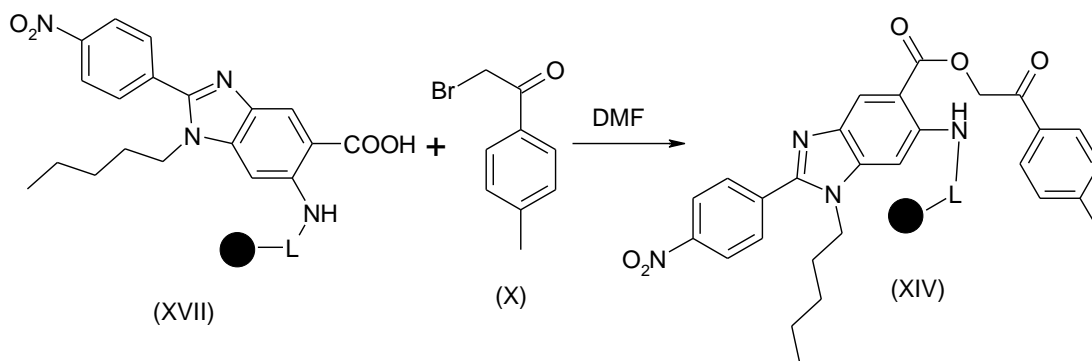
Ačkoliv se jedná o velmi podobnou reakci, je nutné uvést schůdnost kondenzace na benzimidazolový skelet i pro případ, kdy je reakční sekvence po substituci aminu vedena nejprve přes redukci nitro skupiny (IX). Reakce za vzniku látky (XVII) (schéma 29) proběhla, pomocí LC-MS byla stanovena čistota produktu na 70 %. Spektrum navíc obsahovalo blíže neidentifikovatelné nečistoty.



(schéma 29)

4.1.9. Esterifikace benzimidazolového skeletu

Posledním krokem před pokusem o cyklizaci na hydroxychinolon byla pro látku (XVII) výše zmíněná obdobná esterifikace použitím bromoacetofenonu (X) (schéma 30). Až na drobné nečistoty v podobě výchozí látky byl detekován pík produktu (XIV) o čistotě 55 % a zbytek tvořily blíže neidentifikovatelné píky nežádoucích meziproductů.

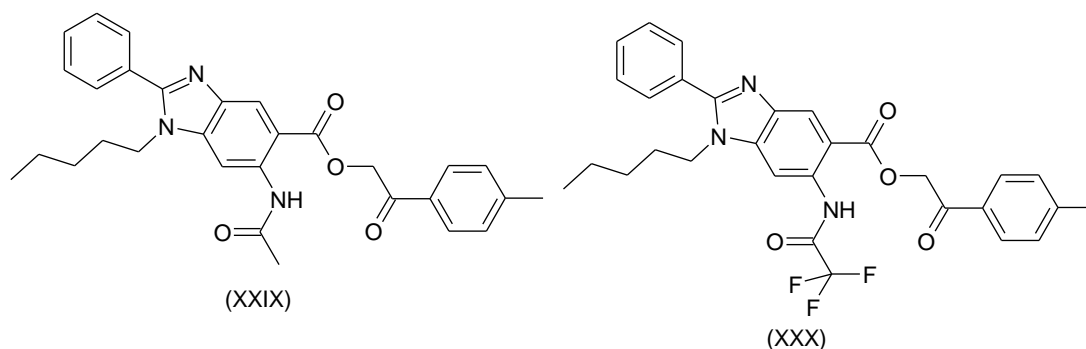


(schéma 30)

4.1.10. Závěrečná cyklizace za vzniku modelového tricyklického bisheterocyklu

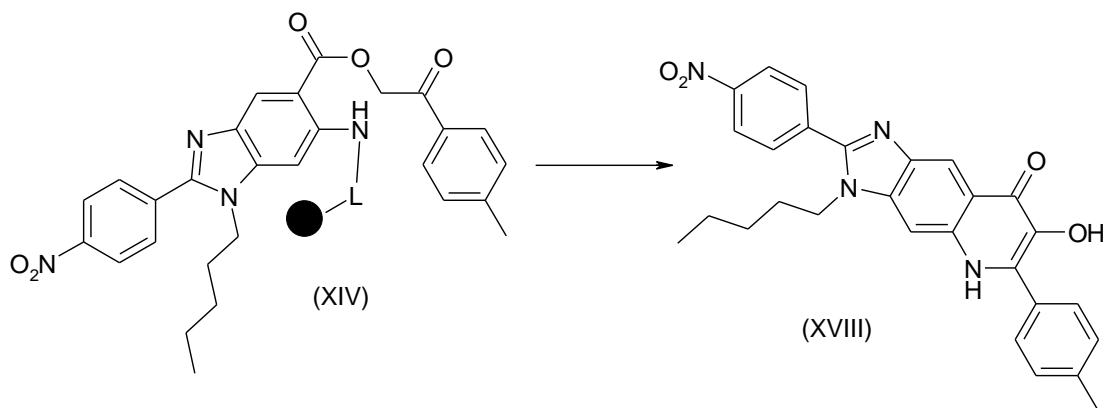
Je již dobře známo, že finální cyklizace na derivát hydroxychinolonu nemusí patřit mezi snadné reakce vlivem sterických faktorů a struktury intermediátů. Nejprve byla na výchozí pryskyřici (XIV) vyzkoušena metoda cyklizace působením kyseliny octové a kyseliny trifluoroctové (TFA) za refluxu při teplotě 130 °C, respektive 90 °C,

po dobu jedné hodiny. Byl otestován reflux postupně po dobu 1,5 h, 3 h, 5,5 h a 9 h. Z průběžně odebraných vzorků u HAc se vesměs ve všech spektrech vyskytoval pík výchozí látky o čistotě 50 %), kromě toho byla dále detekována sloučenina s molekulovou hmotností odpovídající acetylované výchozí látce (zřejmě *N*-acetyl derivát XXIX) o obsahu 25 %. Žádaný produkt byl sice detekován pomocí sledování příslušného iontu v hmotnostním spektru, nicméně docházelo k jeho výraznému rozmývání na koloně a proto nebylo možné vyhodnotit jeho procentuální obsah ve směsi..



U TFA byly čistoty produktu cyklizace v hmotnostních spektrech nejvyšší při reakční době 5,5 h, avšak přesné vyhodnocení čistoty bylo nemožné vlivem opětovného rozmývání. Vzorek navíc obsahoval pík trifluoracetyl derivátu výchozí látky (XXX). Zmíněné rozmývání jsme se snažili eliminovat záměnou mobilní fáze nejprve za kyselinu mravenčí, poté za 0,01% roztok kyseliny trifluoroctové. Výsledkem byly opravdu čitelnější spektra s výraznějšími píky produktů. Následně se přešlo k jiné metodě - pokusu o cyklizaci působením kyseliny sírové na výchozí pryskyřici (XIVa). Ta byla společně s pokusem o cyklizaci pomocí PPA testována při 100 °C na olejové lázni po dobu 1 a 3 h. Jelikož zejména konzistence směsi v PPA komplikovala následné vysrážení vodou, byla po promíchání na chvíli odstavena v lednici. Vzniklé sraženiny z PPA i kys. sírové byly 3x centrifugovány a 2x promyty destilovanou vodou. Poté byly vzorky rozpuštěny v adekvátním množství EtOH pro LC-MS analýzu. Výsledné hmotnostní spektra obsahovaly řadu neidentifikovatelných nečistot či výchozí látky, a ačkoliv k cyklizaci produktu došlo, markantnější pík látky (XVIIIa) byl zaznamenán pouze v případě působení PPA po dobu 3 hodin. Následoval pokus o cyklizaci výchozí látky pomocí oxidu fosforečného. Odparek výchozí pryskyřice (XIV) po štěpení TFA byl rozpuštěn v butanolu s přídavkem cyklizačního média a ponechán na olejové lázni při 130 °C. V opakovaných analýzách však bylo objeveno množství fragmentů a nečistot. V hmotnostním spektru sice byl nalezen iont odpovídající cílové látce (XVIII),

která však byla rozmyta na koloně natolik, že nebylo možné vyhodnotit její čistotu (schéma 31).



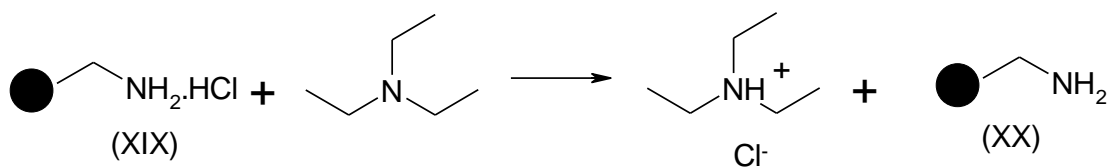
(schéma 31)

4.2. Syntéza na aminomethylové pryskyřici s BAL linkerem

Kromě Rinkovy pryskyřice byla v rámci výzkumu využita také aminomethylová pryskyřice s BAL linkerem. Cílem byl pokus o zavedení dalšího diverzního místa - substituce na dusíku anthranilové kyseliny (resp. cílového hydroxychinolonu). Z časových důvodů však nebyla tato výzkumná větev detailněji rozpracována.

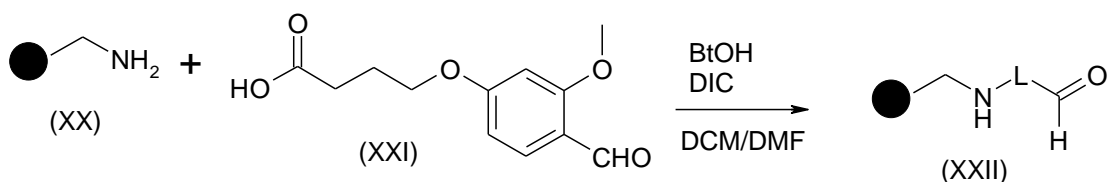
4.2.1. Navázání linkeru

Jelikož se výše zmíněná pryskyřice dodává ve stabilizované formě hydrochloridu (XIX), bylo nezbytné nechat jí protřepat v 10% roztoku triethylaminu v dimethylformamidu na dobu 10 min (schéma 32). Po řádném promytí došlo k odstranění soli a uvolnění potřebné amino (XX) skupiny k následné acylaci.



(schéma 32)

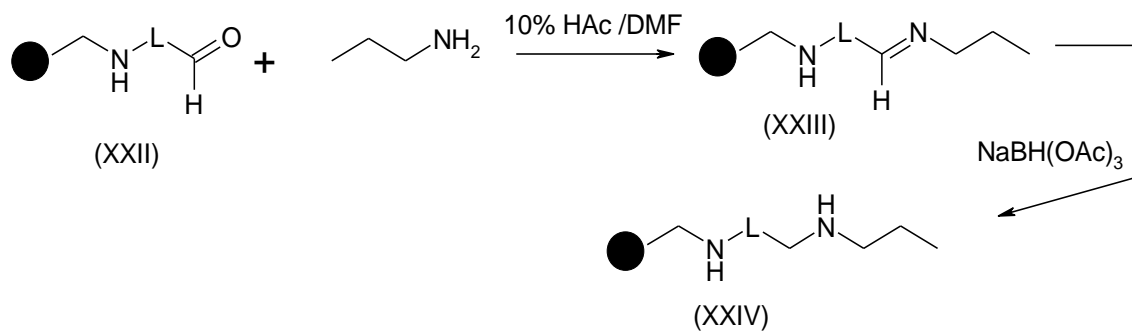
Samotná acylace BAL linkerem 4-(4-formyl-3-methoxy-fenoxy)butanové kyseliny (XXI) byla uskutečněna díky vytvoření aktivovaného HOBt esteru za současného odebírání vody dehydratačním činidlem (DIC). Jako rozpouštědlo byla zvolena směs dimethylformamidu, který dobře rozpouští reagentie a dichlormethanu, známým díky dobrému bobtnání přítomné pryskyřice (schéma 33). Kvalitativním zhodnocením průběhu acylace byl test výskytu primární aminoskupiny. Odebrán byl vzorek pryskyřice (XXII) (1 mg), který byl smíchán s roztokem bromfenolové modře ve směsi *N*-methylpyrrolidonu a DCM (1 ml). Jelikož se pryskyřice nezabarvila do modra, byla prokázána absence primárního aminu ve vzorku. Loading výchozí pryskyřice byl před jejím použitím uváděn 1,12 mmol/g, čímž byl při uvažování kvantitativního průběhu acylace loading systému polymer – linker (XXII) přepočten na 0,9 mmol/g.



(schéma 33)

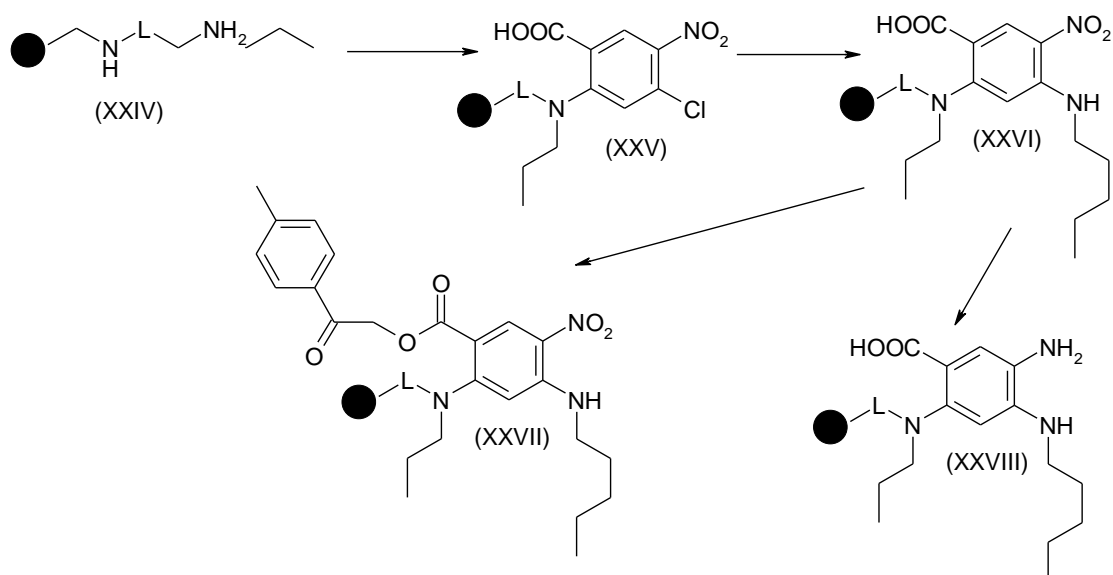
4.2.2. Reduktivní aminace

Pro vytvoření základního kamene budoucího cílového hydroxychinolonu byla zapotřebí imobilizace námi vybraného primárního aminu. Pryskyřice s navázaným BAL linkerem (XXII) byla smíchána s roztokem propylaminu v systému 10% kyseliny octové v bezvodém dimethylformamidu a protřepávána přes noc. Po uplynutí reakčního času se vzniklý aldimin (XXIII) redukuje za pomoci redukčního činidla triacetoxyborohydridu sodného. Ten je ke směsi suchého DMF a kyseliny octové přidáván na tři etapy. Kvůli vzniku molekuly vodíku bylo zvoleno vertikální protřepávání s propíchnutou jehlou (schéma 34). Loading systému polymer – linker byl po reductivní aminaci zapomocí derivatizace Fmoc-OSu stanoven na 0,41 mmol/g.



(schéma 34)

S takto imobilizovaným propylaminem (XXIV) byly následně testovány reakce (později optimalizované na Rinkové pryskyřici) vedoucí až ke vzniku substituovaných látek (XXVII, XXVIII) (schéma 35). Arylace i nukleofilní substituce propylaminu probíhaly bez větších problémů. Hmotnostní spektrum vykazovalo látky (XXV, XXVI) v čistotě větší než 95 %. Komplikace nastaly až u následné redukce za vzniku produktu (XXVIII) o čistotě 45 % a blíže neidentifikovatelné látky (55 %). Analýza dále potvrdila přítomnost produktu esterifikace (XXVII) o čistotě 20 %, avšak vzorek obsahoval 42 % výchozí pryskyřice (XXVI). Definitivně se tak přešlo k syntéze na Rinkové pryskyřici.



(schéma 35)

5. Experimentální část

Syntéza na pevné fázi má dnes již řadu metod, při nichž využívá různé typy nádob a přístrojů. To však nebylo předmětem této práce. Aby se celá reakční směs důkladně promývala, byla protřepávána na laboratorním shakeru v plastových injekčních stříkačkách adekvátních objemů vůči množství pryskyřice, které jsou vybavené polypropylenovou fritou k zamezení úniku pevné fáze nejen během reakce. V případě nutnosti zvýšení reakční teploty byly aplikovány běžnější skleněné zkumavky do reaktoru Büchi Syncore, a to uzavřené gumovou zátkou, nebo pro menší množství pryskyřice vialky se septem a uzávěrem.

Použité přístroje a metody:

Pro analýzu látek byla použita metoda LC–MS, záznamy byly vyhodnoceny pomocí softwaru ExcaliburTM.

- UPLC chromatograf (Accela Thermo Scientific) s termostatem (30 °C)
- Parametry UPLC:
 - nástřik – 5 μ l
 - mobilní fáze – acetonitril (A) : amonium acetát 0,1% (B)
 - gradientová eluce – 10 A : 90 B (0 min); 80 A : 20 B (2,5 min); 80 A : 20 B (4 min); 10 A : 90 B (4,5 min); 10 A : 90 B (5 min).
- Hmotnostní spektrometr s trojitým kvadrupólovým analyzátozem
- Detektor TSQ Quantum Access (Thermo Scientific, USA, SN: TQU01482)

Proces standardního štěpení

Před analýzou každé reakce bylo zapotřebí uvolnit produkty ukotvené k pevné fázi, a to pomocí roztoku trifluoroctové kyseliny v dichlormethanu v objemovém poměru 1 : 1. K cca 5 mg pryskyřice postačil přídavek 1 ml štěpícího koktejlu a směs se nechala protřepávat po dobu 30 minut. Poté se nechá vzorek odpařit pod proudem dusíku, aby byl zase zpět rozpuštěn přídávkem cca 1 ml methanolu. Do malých vialek pak putuje až přefiltrovaný roztok v methanolu připravený k analýze na LC-MS.

Syntéza na Rinkové pryskyřici

Odstranění protektivní skupiny pryskyřice (I): 922 mg navážené Rinkovy pryskyřice bylo smícháno s 9 ml 50% roztoku piperidinu v dimethylformamidu a třepáno po dobu 10 minut. Následně byla pryskyřice (IV) promyta 3x v DMF, DCM, MeOH a sušena pod proudem dusíku.

Arylace vedoucí ke vzniku 4-chloro-5-nitroanthranilové kyseliny (VI)

K výchozí pryskyřici (IV) byl přidán roztok 2-fluor-4-chlor-5-nitrobenzoové kyseliny (V) (1,098 g, 5 mmol) a báze diisopropylethylaminu (1,74 ml, 10 mmol) v DMSO (10 ml). Směs byla protřepávána při 50 °C po dobu 24 hodin, následně promyta 3x v DMF, DCM, MeOH a vysušena pod proudem dusíku. Vzorek byl dále zpracován k analýze LC-MS procesem standardního štěpení.

LC-MS:

4-chloro-5-nitroanthranilová kyselina: $[M - H]^- = 215,00$; čistota 99 %

4-pentylamino-5-nitroanthranilová kyselina (VII)

Do skleněné zkumavky byla vpravena pryskyřice z předchozího kroku (VI) a smíchána s připraveným 10% roztokem 1-pentylaminu (1 ml) v DMSO (9 ml). Celá směs byla za teploty 90 °C protřepávána po dobu 24 hodin. Po vychlazení a následném promytí 3x v DMF, DCM se vzorek procesem standardního štěpení upravil k analýze.

LC-MS:

4-pentylamino-5-nitroanthranilová kyselina: $[M - H]^- = 265,91$; čistota 85 %

2-amino-5-nitro-*N*-pentyl-4-(pentylamino)benzamid: $[M + H]^+ = 337,04$; $[M - H]^- = 335,37$; čistota 15 %

10 - 20 mg pryskyřice (VI) bylo smícháno s roztokem 1-pentylaminu (100 μ l) v DMSO (900 μ l) a převedeno do speciální zkumavky s plastovým uzávěrem, určené pro provádění reakcí v mikrovlnce. Směs byla míchána po dobu 20 minut za teploty 90 °C a výkonu 300 W. Po uplynutí reakční doby byla pryskyřice promyta 3x DMF, DCM a procesem standardního štěpení podrobena analýze.

LC-MS:

4-pentylamino-5-nitroanthranilová kyselina: $[M] = 265,80$; čistota 15 %

Výchozí pryskyřice opatřená bb (VI) (100 mg) byla přes víkend (68 h) protřepávána v 10% roztoku 1-pentylaminu (100 μ l) v DMSO (900 μ l) a zahřívána při 70 °C. Po vychladnutí a promytí 3x DMF, DCM se vzorek procesem standardního štěpení připravil k analýze.

LC-MS:

4-pentylamino-5-nitroanthranilová kyselina: $[M - H]^- = 265,83$; čistota 95 %

5-amino-4-pentylaminoanthranilová kyselina (IX)

Smícháním 100 mg pryskyřice (VII) s roztokem dihydrátu chloridu cínatého (2 mmol, 451 mg) a diisopropylethylaminem (2 mmol, 348 μ l) v odplyněném DMF (1 ml) a ponecháním na shakeru po dobu 24 hodin dojde za laboratorní teploty k redukci nitro skupiny a k zisku prekurzoru (IX).

LC-MS:

5-amino-4-pentylaminoanthranilová kyselina: $[M + H]^+ = 238,08$; čistota 90 %

2-oxo-2-(*p*-tolyl)ethyl 2-amino-5-nitro-4-(pentylamino)benzoát (XI)

K 50 mg výchozí pryskyřice po nukleofilní substituci (VII) byl přidán 0,2 molární roztok 2-bromo-4'-methylacetofenonu (X) (42,6 mg) v DMF (1 ml – při dodržování pravidla na množství 100 mg pryskyřice a méně vždy použít 1 ml rozpouštědla) za současného přidavku diisopropylethylaminu (0,2 mmol, 35 μ l). Reakční směs byla ponechána na shakeru za pokojové teploty na 24 hodin. Následovalo obdobné promytí 3x v DMF, DCM a standardním štěpením byl vzorek podroben analýze.

LC-MS:

2-oxo-2-(*p*-tolyl)ethyl 2-amino-5-nitro-4-(pentylamino)benzoát: $[M + H]^+ = 400,03$; čistota 90 %

2-oxo-2-(*p*-tolyl)ethyl 2,5-diamino-4-(pentylamino)benzoát (XII)

Řádně odplyněným DMF byla před nasazením promyta výchozí pryskyřice (XI). Poté byl připraven roztok dihydrátu chloridu cínatého (2 mmol, 451 mg), diisopropylethylaminu (2 mmol, 348 μ l) v odplyněném DMF (1 ml). Po smíchání s připravenou pryskyřicí byla směs protřepávána při RT po dobu 24 hodin a na závěr promyta 3x v DMF, DCM a standardně štěpena.

LC-MS:

2-oxo-2-(*p*-tolyl)ethyl 2,5-diamino-4-(pentylamino)benzoát: $[M + H]^+ = 370,10$; čistota 85 %

2-oxo-2-(*p*-tolyl)ethyl 6-amino-2-(4-nitrofenyl)-1-pentyl-1*H*-benzo[d]imidazole-5-karboxylát (XIV)

Do injekční stříkačky byla vpravena připravená pryskyřice (XII) (50 mg) spolu s roztokem 4-nitrobenzaldehydu (0,2 mmol, 30,22 mg) v DMF (1 ml) a za laboratorní teploty protřepávána přes noc (24 h). Jakmile byla pevná fáze promyta 3x v DMF, DCM, bylo zapotřebí podrobit vzorek (5-10 mg) procesu standardního štěpení a vyhodnotit pomocí LC-MS spekter.

LC-MS:

2-oxo-2-(*p*-tolyl)ethyl 6-amino-2-(4-nitrofenyl)-1-pentyl-1*H*-benzo[d]imidazole-5-karboxylát : $[M + H]^+ = 501,06$; čistota 85 %

2-oxo-2-(*p*-tolyl)ethyl 2,5-diamino-4-(pentylamino)benzoát: $[M + H]^+ = 370,03$; čistota 15 %

K cyklizaci předchozího produktu (XII) byla polystyrenová pryskyřice podrobena reakci s roztokem aldehydu (XIII) (0,2 mmol) v DCM (1 ml) za zvýšené reakční teploty 50 °C. Po 48 hodinách následovalo promývání 3x v DCM, DMF, MeOH a vysušení pod proudem dusíku. Typickým procesem standardního štěpení byl vzorek připraven k analýze.

LC-MS:

2-oxo-2-(*p*-tolyl)ethyl 6-amino-2-(4-nitrofenyl)-1-pentyl-1*H*-benzo[d]imidazole-5-karboxylát: $[M + H]^+ = 500,98$; čistota 95 %

Esterifikace benzimidazolového skeletu byla provedena rozpuštěním modelového bromoacetofenonu (X) (0,2 mmol, 42,6 mg) v DMF, přidáním báze EDIPA (0,2 mmol, 35 μ l) a 24 hodinovým protřepáváním reakční směsi s výchozí pryskyřicí (XVII). Reakce probíhala za laboratorní teploty. Závěrečné promytí 3x v DMF, DCM, MeOH a vysušení pryskyřice následoval proces standardního štěpení.

LC-MS:

2-oxo-2-(*p*-tolyl)ethyl 6-amino-2-(4-nitrofenyl)-1-pentyl-1*H*-benzo[d]imidazole-5-karboxylát : $[M + H]^+ = 501,06$; čistota 70 %

6-amino-2-(4-nitrofenyl)-1-pentyl-1*H*-benzo[d]imidazol-5-karboxylová kyselina : $[M + H]^+ = 369,04$; čistota 20 %

2-oxo-2-(*p*-tolyl)ethyl 6-amino-1-pentyl-2-(pyridin-4-yl)-1*H*-benzo[d]imidazole-5-karboxylát (XIVc)

Vybraný pyridin-4-aldehyd (0,2 mmol, 18 μ l) byl smíchán s výchozí pryskyřicí (XII) v roztoku DCM (1 ml) a ponechán v reaktoru Büchi po dobu 24 hodin a zvýšené teploty 50 °C. Promytím 3x v DCM, DMF byl následně vzorek procesem standardního štěpení upraven k analýze. Ta však obsahovala pik intermediátů (XV) spolu s (XVI). Jejich rozlišení ze spekter však nebylo reálné.

LC-MS:

2-oxo-2-(*p*-tolyl)ethyl 6-amino-1-pentyl-2-(pyridin-4-yl)-1*H*-benzo[d]imidazole-5-karboxylát: $[M + H]^+ = 457,04$; čistota 55 %

2-oxo-2-(*p*-tolyl)ethyl 6-amino-1-pentyl-2-(pyridin-4-yl)-2,3-dihydro-1*H*-benzo[d]imidazol-5-karboxylát: $[M + H]^+ = 459,00$; čistota 45 %

(*E*)-2-oxo-2-(*p*-tolyl)ethyl 2-amino-4-(pentylamino)-5-((pyridin-4-ylmetylen)amino)benzoát: $[M + H]^+ = 459,00$; čistota 45 %

Obdobným postupem byly připraveny také deriváty XIVa o čistotě 80 %, XIVb o čistotě 75 %, XIVd o čistotě 75 % a XIVe o čistotě 55 % .

6-amino-2-(4-nitrofenyl)-1-pentyl-1H-benzo[d]imidazol-5-karboxylová kyselina (XVII)

Výchozí pryskyřice (IX) byla za laboratorní teploty protřepávána s 4-nitrobenzaldehydem (0,2 mmol, 30,22 mg) rozpuštěným v DMF (1ml). Po skončení reakce došlo k promytí 3x v DMF, DCM a procesem standardního štěpení byl vzorek podroben analýze.

LC-MS:

6-amino-2-(4-nitrofenyl)-1-pentyl-1H-benzo[d]imidazol-5-karboxylová kyselina [M + H]⁺ = 369,06; čistota 55 %

7-hydroxy-3-pentyl-2-phenyl-6-(p-tolyl)-3H-imidazo[4,5-g]quinolin-8(5H)-one (XVIIIa)

Vysušená výchozí pryskyřice (XIVa) (100 mg) byla podrobena procesu standardního štěpení a před odpařením štěpícího koktejlu rozdělena do dvou Erlenmayerových baněk na ekvivalentní směsi. K těmto odparkům byly přidány kyseliny (TFA, HAc) a ponechány na rexlufu (90 °C, 130 °C) po dobu 9 h. Vzorky odebírané po 90 min, 180 min, 330 min a 540 min byly odpařeny a připraveny k LC-MS analýze.

LC-MS: produkt rozmýván na koloně (TFA i HAc)

2-oxo-2-(p-tolyl)ethyl 6-amino-1-pentyl-2-phenyl-1H-benzo[d]imidazole-5-carboxylate: [M + H]⁺ = 456,09; čistota 50 %

7-hydroxy-3-pentyl-2-phenyl-6-(p-tolyl)-3H-imidazo[4,5-g]quinolin-8(5H)-one: [M + H]⁺ = 438,08

Cca 150 mg vysušené výchozí pryskyřice (XIVa) bylo v injekční stříkačce podrobena procesu standardního štěpení. Po uplynuté době byl roztok rovnoměrně rozdělen do 3 vialek a pod dusíkem odpařen.

Vzorek byl rozpuštěn kyselinou sírovou (1 ml), načež byla směs ve vialce za stálého míchání ponořena v olejové lázni a zahřívána na teplotu 100 °C. První vzorek byl odebrán po uplynutí 1 h a druhý po uplynutí 3 h. K vzorkům bylo přidáno adekvátní množství destilované vody pro vytvoření sraženiny, která byla následně 3x

centrifugována a 2x promyta vodou. Vzorek byl analyzován po rozpuštění sedimentu v MeOH.

LC-MS: produkt rozmýván na koloně

K odparku ve vialce byla vpravena gelovitá PPA (4,7 g, cca 1,5 ml) a celá směs byla ponechána za stálého míchání v olejové lázni při teplotě 100 °C. Po uplynutí reakční doby 1 h a 3 h byly odebrány vzorky a převedeny do kádinky s adekvátním množstvím destilované vody. Vzniklé sraženiny pak byly trojnásobnou centrifugací a následným promýváním vodou rozpuštěny v MeOH a podrobeny analýze.

LC-MS: produkt rozmýván na koloně

V kádince byla připravena směs butanolu (1 ml) a oxidu fosforečného (20 mg). Tento roztok byl poté přidán k odparku ve vialce a podroben míchání v olejové lázni při teplotě 130 °C. Po třech hodinách byl odebraný vzorek zředěn směsí MeOH a vody (1:1) a touto směsí vždy po centrifugaci (3x) promýván. Přídavkem methanolu na závěr byla směs připravena k analýze.

LC-MS: produkt rozmýván na koloně

Acylace Linkeru

Aminomethylová pryskyřice (XIX) (1 g; 0,78 mmol) byla smíchána s 10% roztokem triethylaminu v DMF (10 ml) a směs byla protřepávána 10 minut za RT. Následně byla pryskyřice promyta 3x v DMF, DCM. K pryskyřici (XX) byla přidána acylační směs připravená rozpuštěním 4-(4-formyl-3-methoxy-fenoxy)butanové kyseliny (XXI) (553,6 mg; 2,24 mmol) a 1-hydroxybenzotriazol hydrátu (302,7 mg; 2,24 mmol) v DMF (5 ml) a za přídavku diisopropylkarbodiimidu (0,35 ml; 2,24 mmol) a DCM (5 ml). Po 24 hodinách byl naacylovaný polymer (XXII) promyt 3x v DMF, DCM, MeOH a vysušen pod dusíkem.

Reduktivní aminace

Výchozí pryskyřice (XXII) (0,5 g; 0,45 mmol) byla nejdříve promyta suchým DMF a následně byla protřepána s roztokem propylaminu (180 µl; 2,25 mmol) ve směsi

kyseliny octové (0,5 ml) a suchého DMF (4,5 ml). Po 24 hodinách třepání za laboratorní teploty byl k pryskyřici přidán roztok triacetoxyhydroboridu sodného (156 mg; 0,75 mmol) ve směsi kyseliny octové (125 μ l) a suchého DMF (2,5 ml). Reakční nádoba byla přesunuta do vertikální polohy a propíchnuta, aby docházelo k odvodu vznikajícího vodíku. Po 1 hodině třepání za RT byl přisypán pevný triacetoxyhydroborid sodný (156 mg; 0,75 mmol) a po opětovném protřepávání po dobu 1 h byl přidavek stejného množství redukčního činidla opakován. Po uběhnutí reakční doby 2 h byla pryskyřice promyta 3x v DMF a následně protřepána ve směsi piperidinu (1 ml) v DMF (4 ml). Na závěr byl polymer s imobilizovaným propylaminem (XXIV) promyt 3x v DMF, DCM, MeOH a poté vysušen pod dusíkem.

Stanovení loadingu po reduktivní aminaci

Pryskyřice s imobilizovaným propylaminem (XXIV) (30 mg) byla smíchána s *N*-(9-fluorenylmethoxykarbonyl)sukcinimidem (0,5 mmol) a diisopropylethylaminem (0,5 mmol) v DCM (0,5 ml). Po 30 minutách třepání za pokojové teploty byl vzorek promyt 5x v DCM, 3x v MeOH a vysušen pod dusíkem. Následně byly odebrány dva vzorky po 10 mg a smíchány se štěpícím koktejlem kyseliny trifluoroctové (0,5 ml) v DCM (0,5 ml), přičemž bylo provedeno standardní štěpení a příprava vzorků na LC-MS analýzu spolu s vnějším standardem, kterým byl fluorenylmethoxykarbonylalanin (1 mg) v MeOH (1 ml). Na základě LC-MS analýzy bylo zjištěno, že loading pryskyřice po imobilizaci aminopropanolu činí 0,41 mmol/g.

6. Závěr

V úvodní části rešerše předložené bakalářské práce byly popsány některé dosud známé syntetické postupy vedoucí k derivátům 3-hydroxy-4(1*H*)-chinolonu, zejména pak metody cyklizační. Dále byla pozornost zaměřena na různorodou biologickou aktivitu vybraných derivátů 3-hydroxy-4(1*H*)-chinolonu, doplněná o jejich významné fluorescenční vlastnosti.

Hlavní předmět této práce – syntéza nových typů kondenzovaných bisheterocyklických derivátů metodou na pevné fázi – je rozebrán v části výsledky a diskuse. Prvním úkolem tak bylo ověření a případná optimalizace reakčních kroků vedoucích k modelovému prekursoru (XIV).

Po deprotekcí Rinkové pryskyřice (I) byla nejprve provedena arylace 2-fluor-4-chlor-5-nitrobenzoové kyseliny (V). S takto imobilizovaným prekurzorem (VI) byla testována nukleofilní substituce vybraného 1-pentylaminu. Vlivem opakovaných případů nedoreagování a vzniku nežádoucího produktu (VIII) byla reakce několikrát modifikována postupným snížením reakční teploty a prodloužením času na 48 hodin. Reakce byla otestována i za podmínek mikrovlnného zahřívání.

V této fázi výzkumu jsme se z větší části zaměřili nejprve na modifikaci karboxylové skupiny, ačkoliv prověřena byla i schůdnost reakcí, při kterých je nejprve modifikována nitro skupina (IX). Nukleofilní substituce modelového 2-bromo-4'-methylacetofenonu (X) vedla opravdu k zisku esteru (XI) ve velmi dobré čistotě. Následující redukce, realizovaná prostřednictvím chloridu cínatého za vzniku redukované formy esteru (XII) proběhla u většiny vzorků kvantitativně (v průběhu práce se vyskytl problém se špatnou účinností jedné z šarží redukčního činidla).

Poměrně značná pozornost byla věnována pokusům o vytvoření benzimidazolového skeletu. Zprvu byla schůdnost ověřena modelovým synthonem 4-nitrobenzaldehydu (XIII). Rozsáhlejší informace o průběhu a výtěžku kondenzace byly získány provedením reakce se sadou dalších aldehydů, ze kterých byl kvůli přítomnosti velkého množství výchozí pryskyřice (XII) pro další fázi optimalizace vybrán aldehyd poskytující deriváty (XIVc). Navržená zvýšená teplota a záměna rozpouštědla za DCM s prokázáním nejlepším průběhem odhalila přítomnost vedlejších meziproduktů (XV, XVI). Teprve až paralelním zvýšením teploty, reakční doby a použitím DCM analýza prokázala absenci jak nezreagované pryskyřice, tak nežádoucích intermediátů. Tyto

podmínky se osvědčili i pro zbývající aldehydy. Abychom se v průběhu cyklizačních pokusů vyhnuli vlivu substituentů, byl pro tyto reakce připraven prekursor (XIVa).

Pro cyklizaci na cílový chinolon (XVIIIa) byla otestována řada metod. V kyselině octové byl průběh velmi pomalý a byla detekována výchozí látka (XIVa). Podobně tomu bylo také v případě kys. sírové, kde byl sice detekován produkt cyklizace, avšak také velké množství nezcyklizované formy. Nadějnější výsledky poskytovalo zahřívání v PPA, kterým jsme získali ostřejší pik výsledné látky (XVIIIa), ale také nečistotu ve formě nežádoucího trifluoracetyl derivátu. Použití oxidu fosforečného sice produkt cyklizace rozmývaný na koloně přineslo, ale došlo ke vzniku blíže neidentifikovatelné nečistoty. I přes značné rozmývání na koloně a výskyt trifluoracetyl derivátu byla jako nejobstojnější cyklizační metoda určena metoda působením TFA na výchozí pryskyřici (XIVa). V další fázi výzkumu však bude třeba výslednou látku podrobit procesu čištění.

Detailnější optimalizace cyklizačních pokusů, izolace a studium biologické aktivity připravených kondenzovaných bisheterocyklických derivátů je z časových důvodů předmětem budoucího výzkumu.

7. Literatura

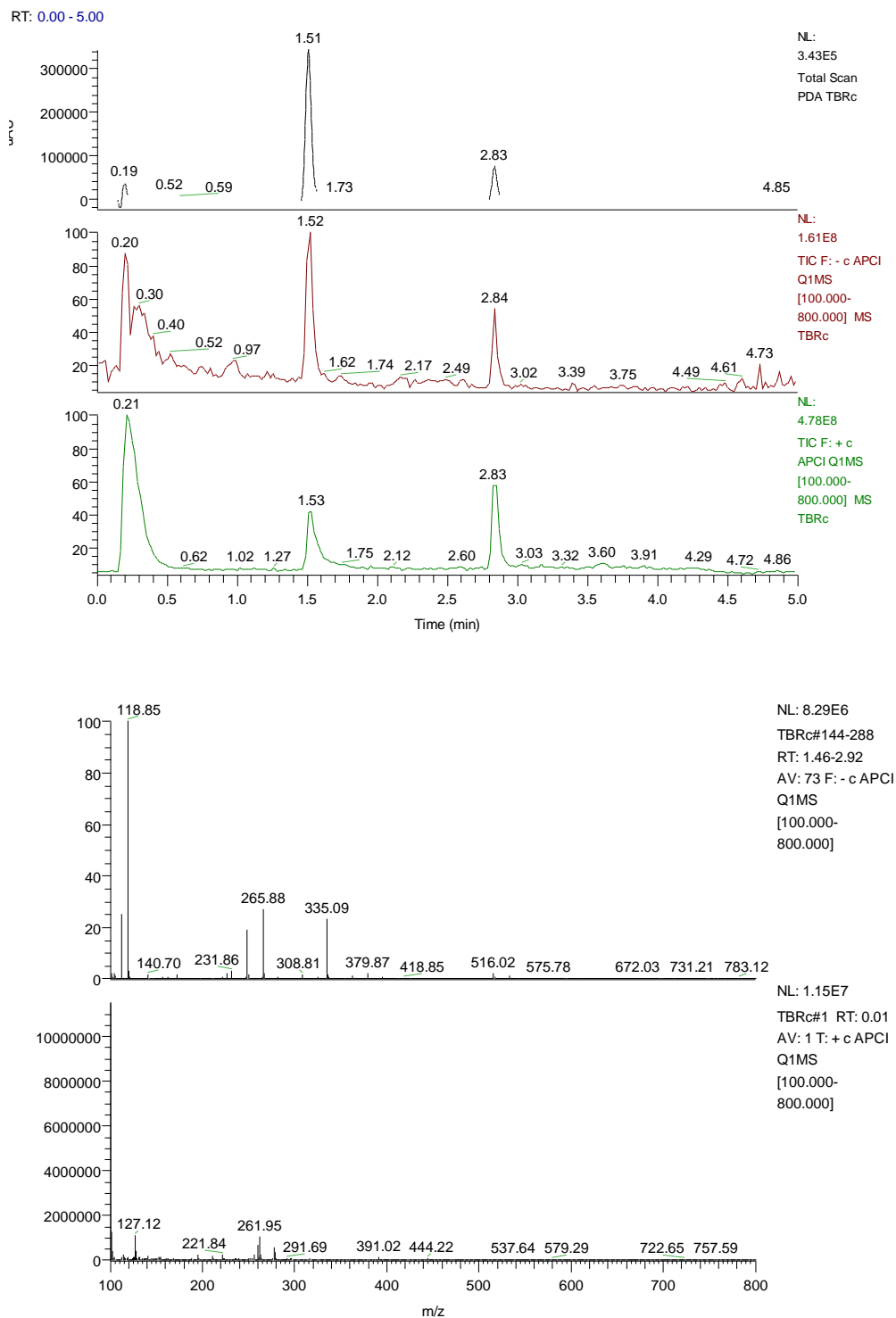
1. Spence T. W. M., Tennant G.: *J. Chem. Soc. [Section] C: Organic* (1971), (22), 3712-3719
2. Sword I. P.: *J. Chem. Soc. [Section] C: Organic* (1971), (5), 820 – 823
3. Sicker D.: *J. Prakt. Chem.* 332, 336 (1990)
4. Sicker D., Hoffmann K., Goetz L., Mann G.: *Ger (G. D. K) DD 288 602, Chem. Abstr.* 115, 159191 (1991)
5. Hradil P., Jirman J.: *Collect. Czech. Chem. Commun.* (1995), 60, 1357 – 1366
6. Hradil P., Hlaváč J., Krejčí P., Lemr K.: *Acta Univers. Palack. Olom.* 38, 17 (1999)
7. Hradil, P., Kvapil, L., Hlaváč, J., Weidlich, T. and Lyčka, A. (2000) *J. Heterocyclic Chem.*, 37, 831.
8. Hradil P., Vaněček J., Hlaváč J., Ševčík J.: *Collect. Czech. Chem. Commun.* 64, 257 (1999)
9. Iwanowicz E. J., Watterson S. H., Dhar T. G. M., Pitts W. J., Gu H. H.: *PCT Int. Appl.* (2001), WO 2001081340
10. Sui Z., Nguyen V. N., Altom J., Fernandez J., Hillard J. J., Bernstein J. I., Barrett J. F., Ohemeng K. A.: *Eur. J. Med. Chem.* 34, (1999), 381 – 387
11. Spáčilová L., Hlaváč J., Hradil P., Frýšová I., Maloň M., Soural M., Krejčí P.: *J. Heterocyclic Chem.*, 43, 1065 (2006)
12. Soural M., Hlaváč J., Hradil P., Frýšová I., Hajdúch M., Bertolasi V., Maloň M. *European Journal of Medicinal Chemistry* 41(4), 467-474, (2006)
13. Soural M., Krchnak V.: *Journal of Combinatorial Chemistry* 9(5), 793-796, (2007)
14. Velezheva V. S., Mel'man A. L., Pol'shakov V. I., Anisimova O. S.: *Khimiya Geterotsiklicheskikh Soedinenii* (1992), (2), 279 – 280
15. Pesci E., Milbank J. B. J., Pearson J. P., Kende A. S., Freenberg E. P., Izlewski B. H.: *PCT Int. Appl.* (2002), WO 20020183442
16. Morgan J. R., Schunior R. J., Boyer J. H.: *J. Org. Chem.* 28, 260 (1963)
17. Behrman E. J., Keiser R. L., Garas W. F., Behrman E. C., Pitt B. M.: *J. Chem. Research, Synopses* (1995), (5), 164 – 168
18. Pongratz E., Kappe T.: *Monatshefte fuer chemie* 115, 231, (1984)

19. Noskova V., Dzubak, P., Kuzmina, G., Ludkova, A., Stehlík, D., Trojanec, R., Janostakova, A., Kořínková, G, Mihál, V. and Hajdúch, M. (2002) *Neoplasma*, 49, 418
20. Krejčí, P., Hradil, P., Hlaváč, J. and Hajdúch, M. (2008) WO2008028427
21. Hradil P., Krejčí P., Hlaváč J., Wiedermannová I., Lyčka A., Bertolasi V.: *J. Heterocyclic Chem.*, 41, 375 (2004)
22. Sural M., Hlavac J., Funk P., Dzubak P., Hajduch M.: *ACS Combinatorial Science* 13 (1), 39-44, (2011)
23. Häussler S., Becker T.: *PloS Pathog* , 4(9): e1000166, (2008)
24. Loya S., Rudi A., Tal R., Kashman Y., Loya Y., Hizi A.: *Archives of Biochemistry and Biophysics* (1994), 309 (2), 315 – 322
25. Yushchenko D. A., Bilokin M. D., Pyvovarenko O. V., Duportail G., Melly Y., Pyvovarenko V. G.: *Tetrahedron Letters* 47, (2006), 905 – 908
26. Motyka K., Hlavac J., Sural M., Funk P., *Tetrahedron Letters*, (2010), 51 (38), 5060-5063
27. Motyka K., Hlavac J., Sural M., Hradil P., Krejčí P., Kvapil L., Weiss M., *Tetrahedron Letters*, (2011) 52, 715–717
28. Rink H., *Tetrahedron Lett.* (1987), 28, 3787-3790
29. Sural M., Bouillon I., Krchnak V., *Journal of Combinatorial Chemistry*, (2008), 10 (6), 923-933
30. Křupková S., Sural M., Hlaváč J., Hradil P., *J.Comb. Chem.*, (2009), 11, 951 – 955
31. Sural M., nepublikované výsledky

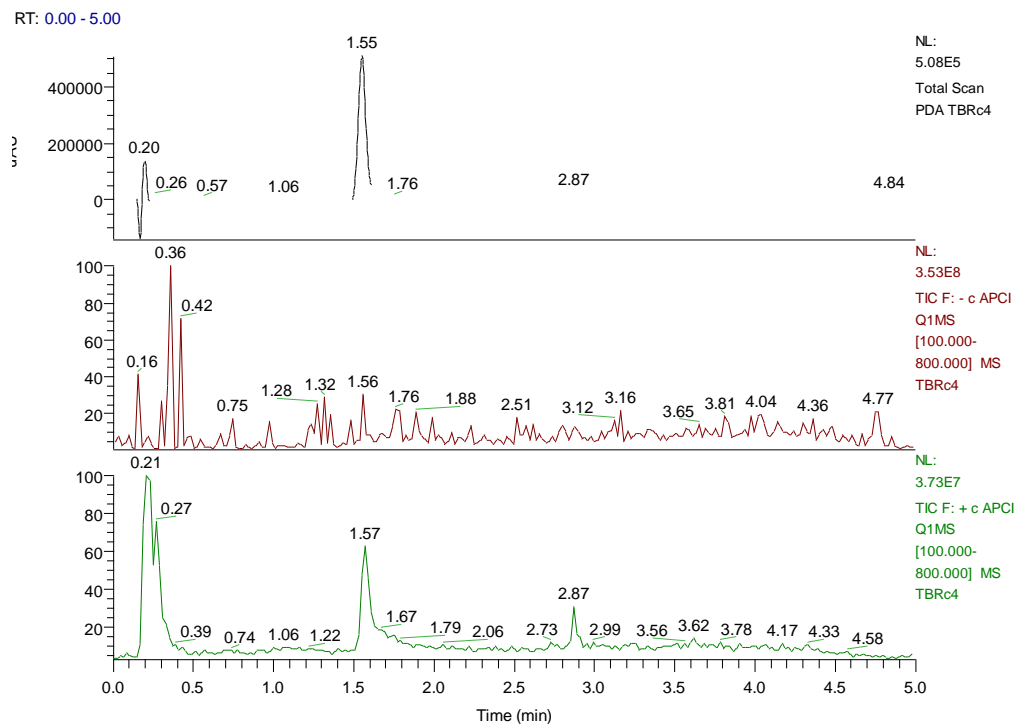
8. Seznam použitých zkratek

- bb – building block
- BtOH – *N*-hydroxybenzotriazol
- DCM – dichlormethan
- DIC – *N,N'*-diisopropylcarbodiimid
- DMF – *N,N'*-dimethylformamid
- DMSO – dimethylsulfoxid
- EDIPA - *N,N*-diisopropylethylamin
- EtOH – ethanol
- HTOS – high throughput organic synthesis
- MeNH₂ – methylamin
- MeOH – methanol
- NMP – *N*-methyl-2-pyrrolidon
- NMR – nukleární magnetická resonance
- PPA – polyfosforečná kyselina
- PPTS – pyridinium *p*-toluensulfonát
- Py – pyridin
- SAR – structure activity relationship
- TEA – triethylamin
- TFA – trifluoroctová kyselina
- THF - tetrahydrofuran
- TMSOK – trimethylsilanolát draselný

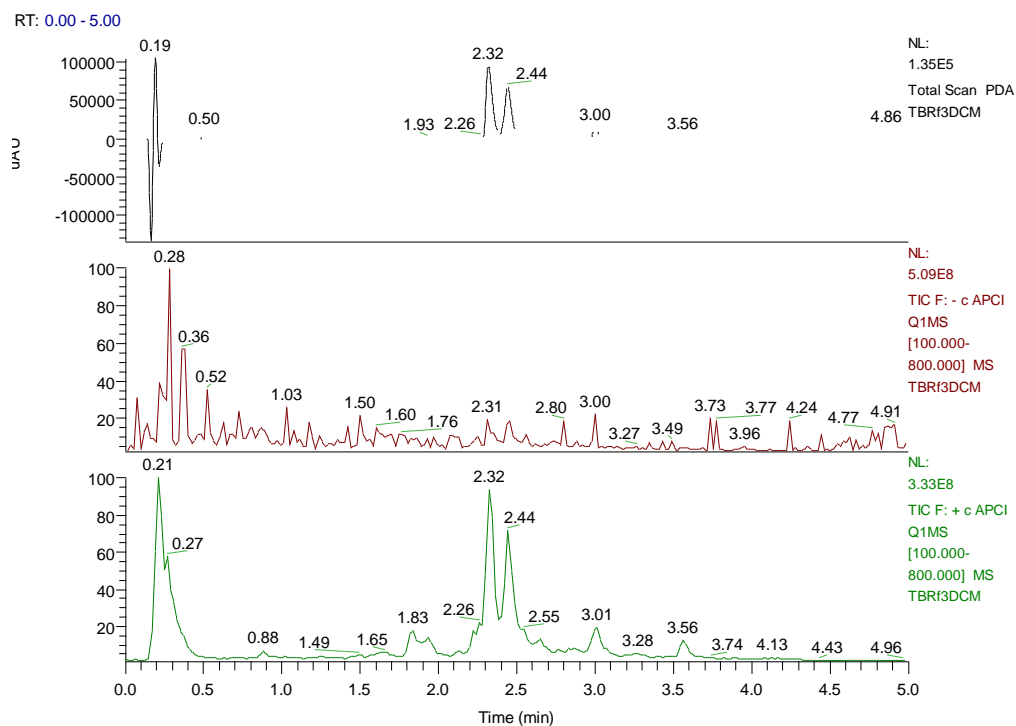
9. Přílohy

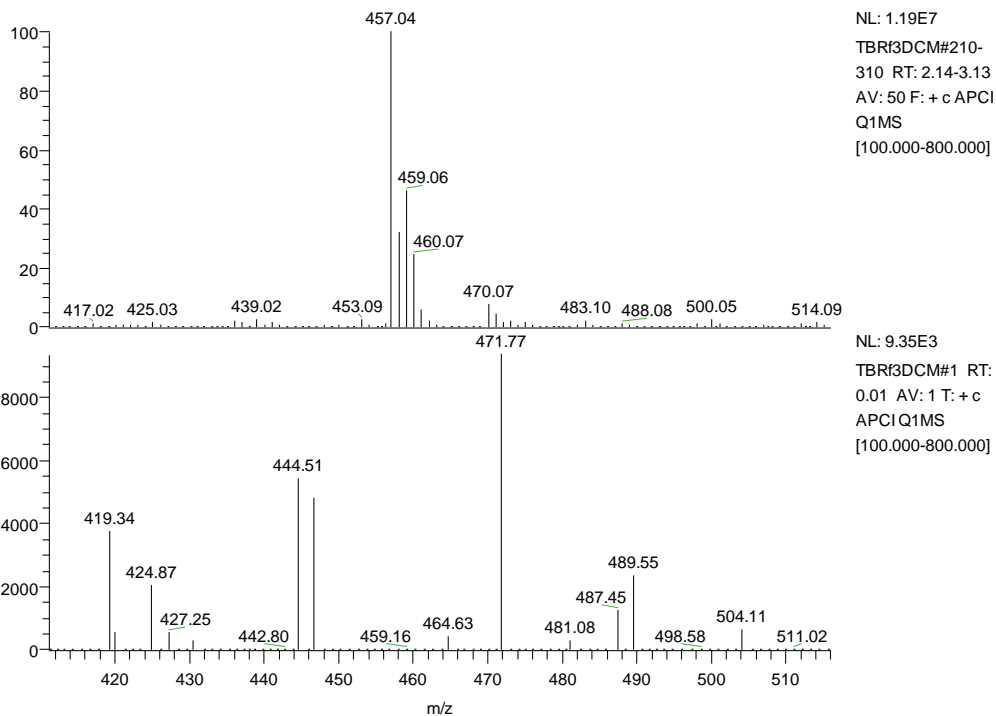


Příloha 1: Záznam spektra vzniku látky (VII) a nečistoty (VIII) před optimalizací reakce

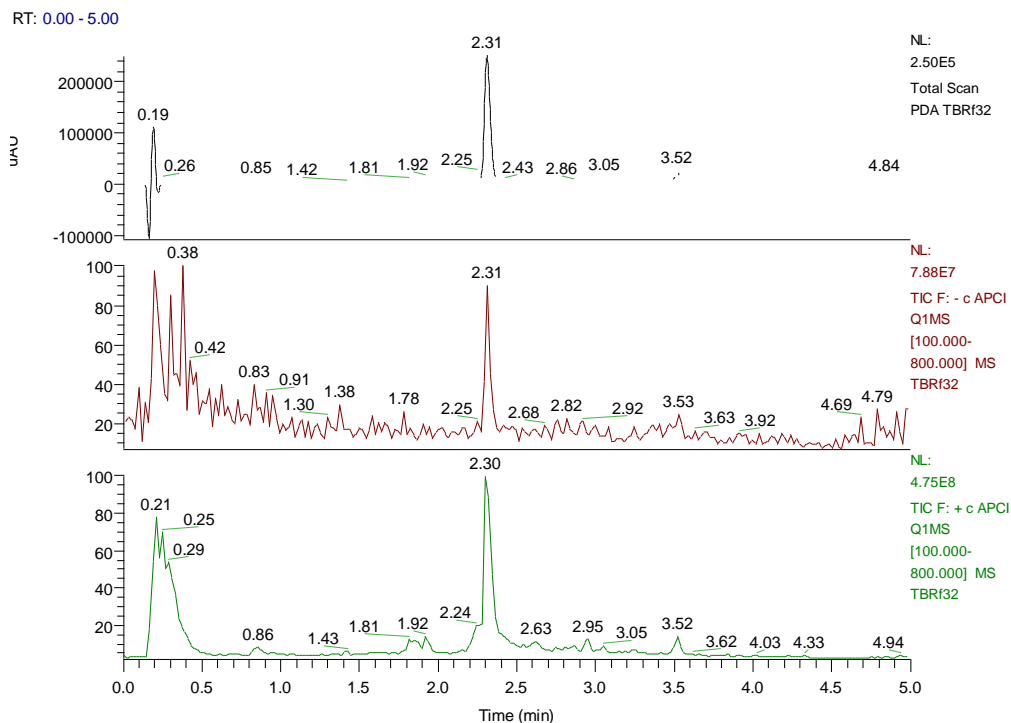


Příloha 2: Záznam spektra vzniku látky (VII) po optimalizaci reakce (zanedbatelné množství nečistoty VIII)



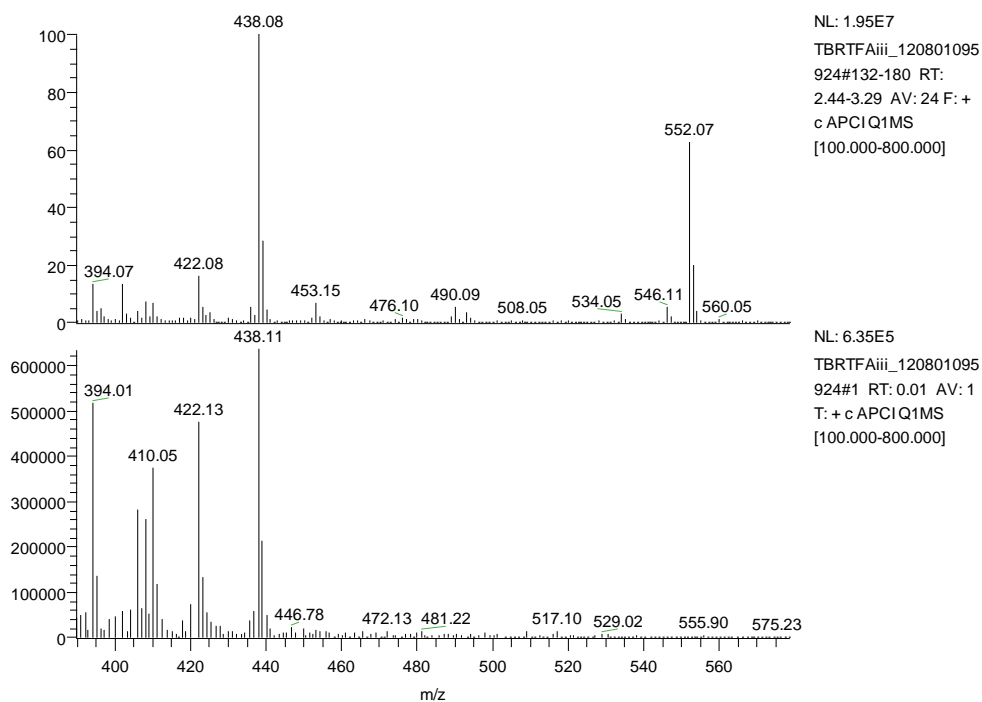
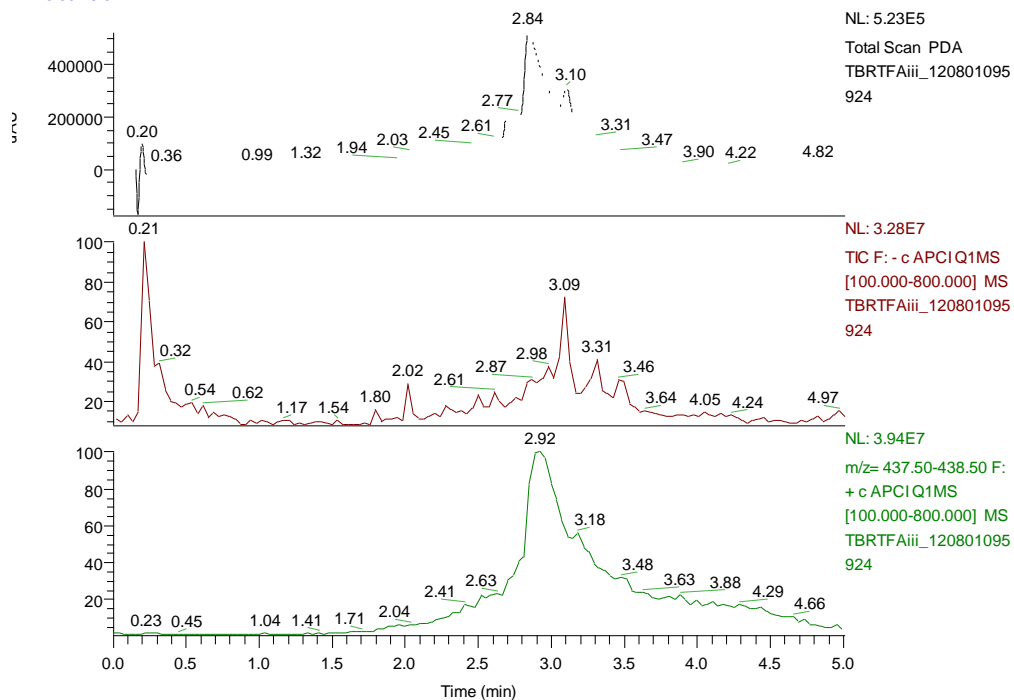


Příloha 3: Záznam spektra vzniku benzimidazolového skeletu (XIVc) a jeho nežádoucích intermediátů (XV, XVI)



Příloha 4: Záznam spektra vzniku benzimidazolového skeletu (XIVc) po optimalizaci podmínek reakce

RT: 0.00 - 5.01



Příloha 5: Záznam spektra nejslibnější metody cyklizace v TFA (XVIIIa) a detekce trifluoracetyl derivátu (XXX)