

UNIVERZITA PALACKÉHO V OLMOUCI

PŘÍRODOVĚDECKÁ FAKULTA

KATEDRA ORGANICKÉ CHEMIE



**SYNTÉZA NOVÝCH DERIVÁTŮ
3,4-DIHYDROPYRAZINO[1,2-*b*]INDAZOL-6-OXIDŮ
NA POLYMERNÍM NOSIČI**

Bakalářská práce

Autor: Richard Hekele

Studijní obor: Chemie

Typ studia: Prezenční

Vedoucí práce: Mgr. Naděžda Cankařová, Ph.D.

Termín odevzdání práce: 7. 5. 2013

Rád bych poděkoval vedoucí své bakalářské práce, Mgr. Naděždě Cankařové, Ph.D., za skvělé vedení v celém průběhu vypracování bakalářské práce, plné objasnění dané problematiky, pomoc při vyhodnocování NMR spekter a trpělivost, kterou se mnou měla. Dále bych chtěl poděkovat RNDr. Petru Cankařovi, Ph.D. za všestrannou pomoc v nepřítomnosti Mgr. Naděždy Cankařové, Ph.D. a paní Kamile Wisnerové za přípravu vzorků pro měření NMR a udržení bezchybného chodu laboratoře.

Já, Richard Hekele, prohlašuji, že jsem tuto bakalářskou práci vypracoval samostatně pod odborným dohledem Mgr. Naděždy Cankařové, Ph.D. Veškerou použitou literaturu jsem uvedl na konci práce.

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

V Olomouci dne

.....

Richard Hekele

Bibliografická identifikace:

| | |
|--------------------------|--|
| Jméno a příjmení autora: | Richard Hekele |
| Název práce: | Syntéza nových derivátů 3,4-dihydropyrazino[1,2- <i>b</i>]indazol-6-oxidů na polymerním nosiči |
| Typ práce: | Bakalářská |
| Pracoviště: | Katedra organické chemie, Přírodovědecká fakulta, Univerzita Palackého v Olomouci |
| Vedoucí práce: | Mgr. Naděžda Cankařová, Ph.D. |
| Rok obhajoby práce: | 2013 |

Abstrakt:

Předložená bakalářská práce se zabývá syntézou nových derivátů 3,4-dihydropyrazino[1,2-*b*]indazol-6-oxidů na pevné fázi. Jedná se o rozšíření databáze již existujících látek tohoto typu. Cílem je připravit skupinu látek lišících se svými modifikacemi na heterocyklickém jádře i postranním řetězci, které budou posléze podrobeny biologickému testování na cytotoxicitu, která již byla u předešlých látek prokázána. Snahou je najít látku s protinádorovým účinkem. Pro přípravu těchto látek bylo využito polymerního nosiče (pevné fáze) s postupy uvedenými v žurnálu kombinatoriální chemie. Syntéza na pevné fázi byla zvolena z důvodu, protože umožňuje pracovat ve velmi malých množstvích a odpadá složité čištění výsledného produktu oproti roztokové chemii.

Klíčová slova: syntéza na pevné fázi, heterocykly, deriváty indazolu

Počet stran: 47

Jazyk: Čeština

Bibliographical identification:

Author's first name and surname: Richard Hekele

Title: Polymer-Supported Synthesis of Novel Derivatives of 3,4-Dihydropyrazino[1,2-*b*]indazol-6-Oxides

Type of thesis: Bachelor

Department: Department of Organic Chemistry, Faculty of Science at Palacky University, Czech Republic

Supervisor: Mgr. Naděžda Cankařová, Ph.D.

The year of defense: 2013

Abstract:

This bachelor degree work is focused on polymer-supported synthesis of novel derivatives of 3,4-dihydropyrazino[1,2-*b*]indazol 6-oxides. It is aimed on enlarging database of existing substances of this kind. Main goal of this work is to prepare group of substances varying in heterocyclic core and side-chain modifications, which will be subdue biological testing of cytotoxic effect that has been approved for previously prepared substances. Effort is to find substance with anti-cancer effect. For preparation of these compounds synthesis on solid phase with procedure published in Journal of combinatorial chemistry has been used. Solid-phase synthesis has been chosen in case of it enables work in small amounts and there is eliminated difficult purification of final product in comparison to solution chemistry.

Keywords: Solid-phase synthesis, heterocycles, derivatives of indazole
Number of pages: 47
Language: Czech

Obsah

| | |
|--|----|
| 1. Úvod | 7 |
| 2. Cíl bakalářské práce | 9 |
| 3. Teoretická část | 10 |
| 3.1 Příprava derivátů indolu a indazolu | 10 |
| 3.1.1 Karbazoly | 10 |
| 3.1.2 4,5,6,7-Tetrahydroindazoly | 11 |
| 3.1.3 Deriváty <i>N</i> -methyl indazol-3-karboxylové kyseliny | 11 |
| 3.1.4 3-Halogenindazoly | 11 |
| 3.1.5 Pyrazolo[1,5- <i>a</i>]indoly | 12 |
| 3.1.6 Pyrido[4,3- <i>b</i>]indoly | 13 |
| 3.1.7 Diazepino[1,7- <i>a</i>]indoly | 13 |
| 3.1.8 Benztriazoly | 14 |
| 3.1.9 Pyridazino[4,5- <i>b</i>]indoly | 15 |
| 3.2 Biologická aktivita derivátů indolu a indazolu | 15 |
| 3.2.1 Karbazoly a jejich deriváty | 16 |
| 3.2.2 4,5,6,7-Tetrahydroindazoly a jejich deriváty | 16 |
| 3.2.3 Deriváty <i>N</i> -methyl indazol-3-karboxylové kyseliny | 16 |
| 3.2.4 Benztriazoly, 3-halogenindazoly a jejich deriváty | 16 |
| 3.2.5 Pyrazolo[1,5- <i>a</i>]indoly a jejich deriváty | 17 |
| 3.2.6 Pyrido[4,3- <i>b</i>]indoly a jejich deriváty | 17 |
| 3.2.7 Diazepino[1,7- <i>a</i>]indoly a jejich deriváty | 17 |
| 3.2.8 Pyridazino[4,5- <i>b</i>]indoly, pyridazino[4,5- <i>a</i>]indoly a jejich deriváty | 17 |
| 3.3 Merrifieldova syntéza | 17 |
| 3.4 Pevná fáze | 19 |
| 3.4.1 Pryskyřice | 20 |
| 3.4.1.1 Styrenové pryskyřice | 20 |
| 3.4.1.2 Tentagelové pryskyřice | 21 |
| 3.4.1.3 Polyakrylamidové pryskyřice | 21 |
| 3.4.1.4 Polyethylenglykolamidové pryskyřice | 22 |
| 3.4.2 Linkery | 22 |
| 3.4.2.1 Kysele štěpitelné linkery | 23 |
| 3.4.2.2 Bazicky štěpitelné linkery | 24 |
| 4. Výsledky a diskuze | 25 |
| 4.1 Strategie přípravy 3,4-dihydropyrazino[1,2- <i>b</i>] indazol-6-oxidů | 25 |
| 4.1.1 Navázání 1,2-diaminoethanu na Wangovu pryskyřici | 27 |
| 4.1.2 Reakce s 2-nitrobenzensulfonyl chloridy | 28 |
| 4.1.3 Reakce s bromketony | 29 |
| 4.1.4 Cyklizace pomocí DBU a štěpení trifluoroctovou kyselinou | 30 |
| 4.2 Připravené látky | 31 |
| 5. Experimentální část | 32 |

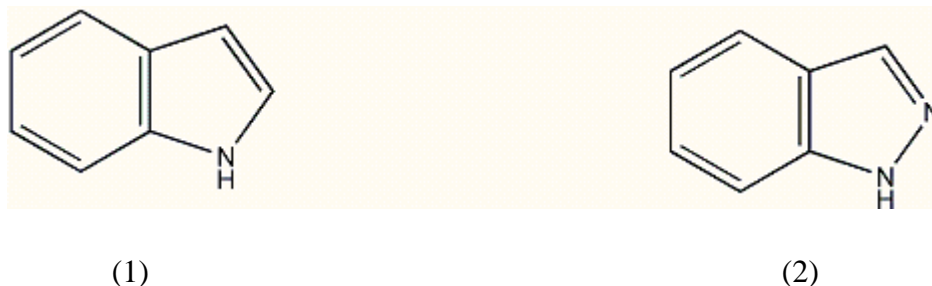
| | | |
|-------|---|-----------|
| 5.1 | <u>Použité přístroje a metody</u> | <u>32</u> |
| 5.2 | <u>Proces standardního štěpení</u> | <u>32</u> |
| 5.3 | <u>Syntéza na Wangové pryskyřici</u> | <u>33</u> |
| 5.3.1 | <u>Navázání 1,2-diaminoethanu na Wangovu pryskyřici</u> | <u>33</u> |
| 5.3.2 | <u>Reakce s 2-nitrobenzensulfonyl chloridy</u> | <u>34</u> |
| 5.3.3 | <u>Reakce s bromketony</u> | <u>34</u> |
| 5.3.4 | <u>Cyklizace za vzniku indazolového kruhu</u> | <u>38</u> |
| 5.3.5 | <u>Odštěpení produktu a cyklizace dihydropyrazinového kruhu</u> | <u>39</u> |
| 5.3.6 | <u>Charakterizace připravených látek</u> | <u>39</u> |
| 6. | <u>Závěr</u> | <u>44</u> |
| 7. | <u>Literatura</u> | <u>45</u> |
| 8. | <u>Použité zkratky</u> | <u>47</u> |

1. Úvod

Na začátku svojí bakalářské práce na téma syntéza nových derivátů 3,4-dihydropyrazino[1,2-*b*]indazol-6-oxidů na polymerním nosiči jsem se nejprve zaměřil na to, o jaké látky se vlastně jedná a jak budu postupovat. Při procházení databází jsem zjistil, že jsem teprve třetím člověkem, který se těmito látkami zabývá, a že tyto látky jsou velmi nové, s širokou perspektivou dalšího výzkumu.

První zmínka o těchto látkách je z roku 2009, kdy byla poprvé popsána syntéza 3,4-dihydropyrazino[1,2-*b*]indazol-6-oxidů a to na polymerním nosiči.¹ Na tuto práci pak bylo v roce 2010 navázáno, kdy byla pozornost věnována především modifikovaným dihydropyrazinoindazolům jakožto kationtům trifluoroacetátových solí². Tento článek dále obsahuje bližší informace o biologické aktivitě těchto látek testovaných na buněčných nádorových liniích *in vitro*. Žádná další studie, která by se věnovala dihydropyrazinoindazolům, jak po stránce syntézy nebo biologického testování publikována nebyla.

Indazoly, tedy látky, které jsou hlavním motivem připravovaných připravovaných 3,4-dihydropyrazino[1,2-*b*]indazol-6-oxidů, jsou strukturními analogy indolů, nesoucí o jeden dusíkatý heteroatom na pěti-uhlíkatém kruhu indolů více (Schéma 1). Indoly i indazoly, a jejich deriváty, byly intenzivně studovány pro svou biologickou aktivitu. V závislosti na strukturní modifikaci byly pozorovány velmi rozmanité účinky. Pro představu byly prokázány protizánětlivé, cytostatické, antivirotické, antimikrobiální a antiprotozoální účinky, některé látky vykazovaly i hypoglykemický efekt.



(Schéma 1) Srovnání struktury indolu (1) a indazolu (2).

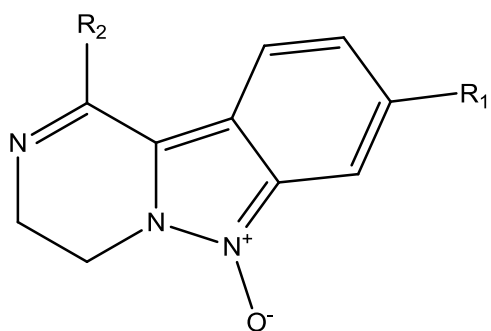
Tato bakalářská práce je věnována syntéze nových derivátů 3,4-dihydropyrazino[1,2-*b*]indazol-6-oxidů na pevné fázi, kdy se vycházelo z ověřeného postupu¹.

Práce je členěna do 8 kapitol. Úvod nastiňuje obecnou problematiku, po něm následuje cíl bakalářské práce. Teoretická část věnuje pozornost přípravám derivátů indolu a indazolu a jejich biologické aktivitě a obecně syntéze na pevné fázi. Kapitola Diskuze a výsledky je věnována syntetickým postupům použitým pro přípravu cílových 3,4-dihydropyrazino[1,2-*b*]indazol-6-oxidů. V experimentální části jsou pak detailně popsány postupy a výsledky analýz. V závěru je krátké shrnutí celkového obsahu této bakalářské práce. Obsah následných kapitol odpovídá jejich názvům.

2. Cíl bakalářské práce

Hlavním cílem předložené bakalářské práce je syntéza nových derivátů 3,4-dihydropyrazino[1,2-*b*]indazol-6-oxidů (3) metodikou syntézy na pevné fázi, které budou v budoucnu podrobeny testování *in vitro* na buněčných nádorových liniích. Snahou je rozšířit databázi již známých látek tohoto typu pro účely nalezení strukturního motivu vedoucího ke zvýšení cytotoxické aktivity.

Syntéza vychází z 1,2-diaminoethanu, který byl prostřednictvím jedné aminoskupiny navázaný na polymerní nosič. Syntéza cílových látek je založena především na cyklizačních reakcích.



(3)

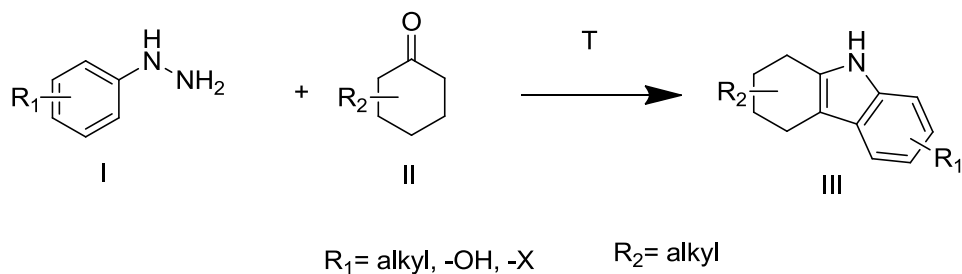
3. Teoretická část

3.1 Příprava derivátů indolu a indazolu

Tento oddíl bych rád věnoval syntéze derivátů indolu a indazolu. Jelikož těchto látek je velmi velké množství, zmíněny budou pouze ty s významnou biologickou aktivitou.

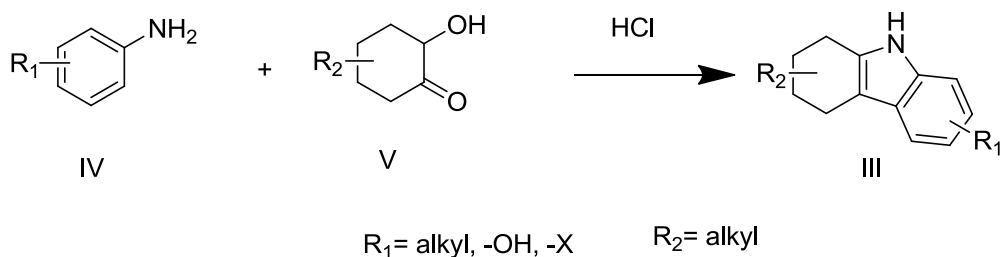
3.1.1 Karbazoly

Tyto látky lze připravit principem Fischerovy indolové syntézy, kdy reaguje substituovaný hydrazin (I) s cyklohexanonem (II) za vzniku karbazolů (III)³ (Schéma 2).



(Schéma 2)

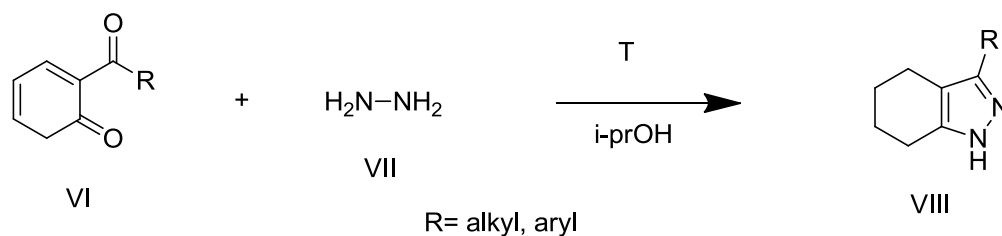
Druhým způsobem přípravy karbazolů je reakce anilinu (IV) s 2-hydroxycyklohexanonem (V) za kyselé katalýzy, kdy dochází k adici aminoskupiny anilinu na karbonylovou skupinu a následné cyklizaci za vzniku stabilnějšího karbazolového cyklu⁴ (Schéma 3).



(Schéma 3)

3.1.2 4,5,6,7-Tetrahydroindazoly

Tyto látky jsou připravovány cyklokondenzační reakcí cyklohexanonů (VI) s hydrazinem (VII) ve vroucím isopropanolu. Reakce probíhá za zvýšené teploty. Jedná se o poměrně snadnou syntézu v roztoku⁵ (Schéma 4).

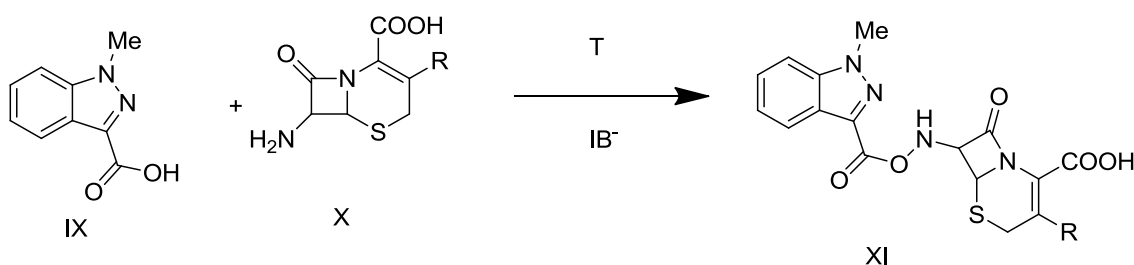


R= alkyl, aryl

(Schéma 4)

3.1.3 Deriváty *N*-methyl indazol-3-karboxylové kyseliny

V této sekci byly jako nejvíce účinné prokázány amidy (XI) vytvořené reakcí s aminocefalosporanovou kyselinou (X). Reakce probíhá za zvýšené teploty v přítomnosti bazického katalyzátoru⁶ (Schéma 5).

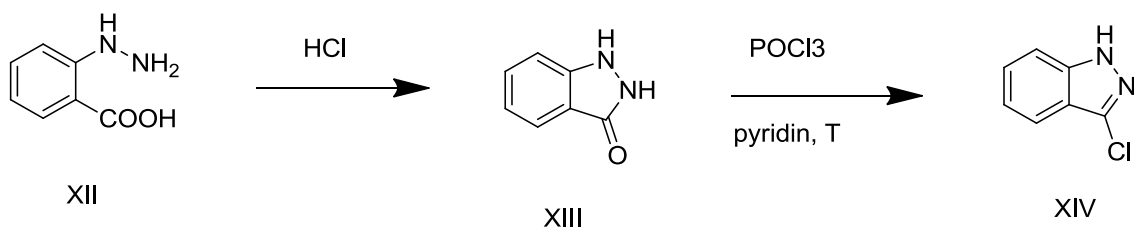


R= alkyl, aryl, -OH

(Schéma 5)

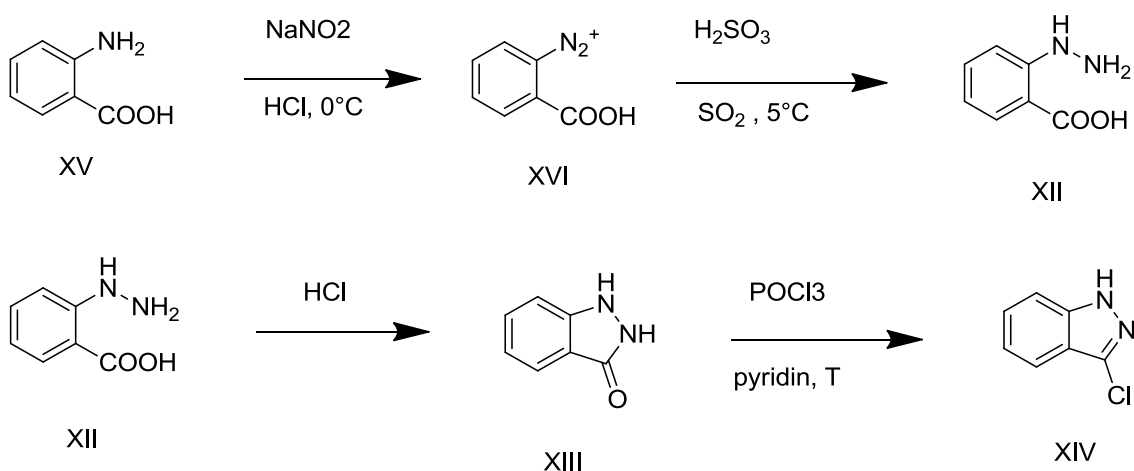
3.1.4 3-Halogenindazoly

Pro přípravu těchto látek je využíváno především dvou výchozích látek *o*-hydrazinobenzoová kyseliny (XII) nebo *o*-aminobenzoové kyseliny (XV). *O*-Hydrazinobenzoová kyselina v kyselém prostředí intramolekulárně cyklizuje na 3-ketonindazol (XIII) a ten je následně pomocí halogenačních činidel převeden za zvýšené teploty v pyridinu na 3-halogenindazol (XIV)⁷ (Schéma 6).



(Schéma 6)

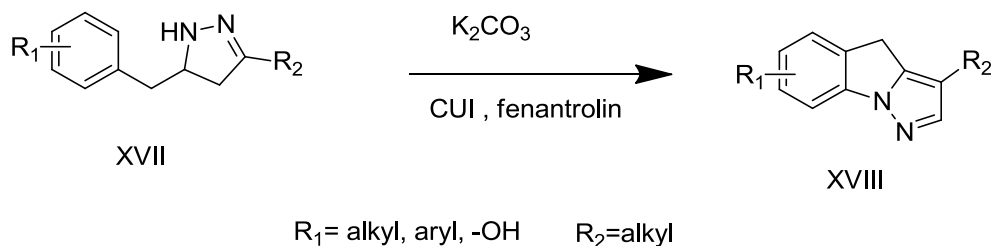
Pokud je jako výchozí látka použita *o*-aminobenzoová kyselina (XV), podléhá nitrosaci (XVI) a následně selektivní redukci (XII). Další postup je totožný se syntézou v roztoku uvedenou výše (Schéma 7).



(Schéma 7)

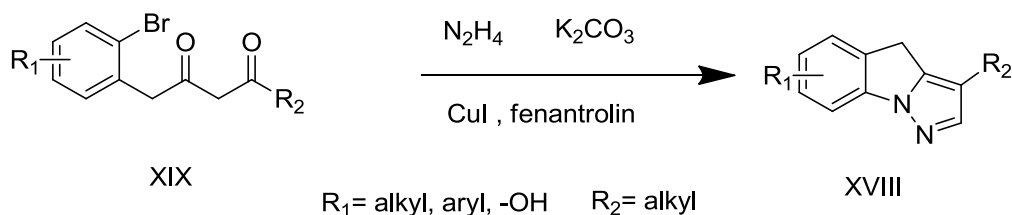
3.1.5 Pyrazolo[1,5-*a*]indoly

K přípravě těchto látek lze použít dvě analogické reakce. První využívá jako výchozí surovinu 1-(2-bromo-benzyl)pyrazol (XVII), který reaguje s uhličitánem draselným za katalýzy jodidem měďným a fenantrolinem, kdy dochází k uzavření indolového kruhu (XVIII)⁸ (Schéma 8).



(Schéma 8)

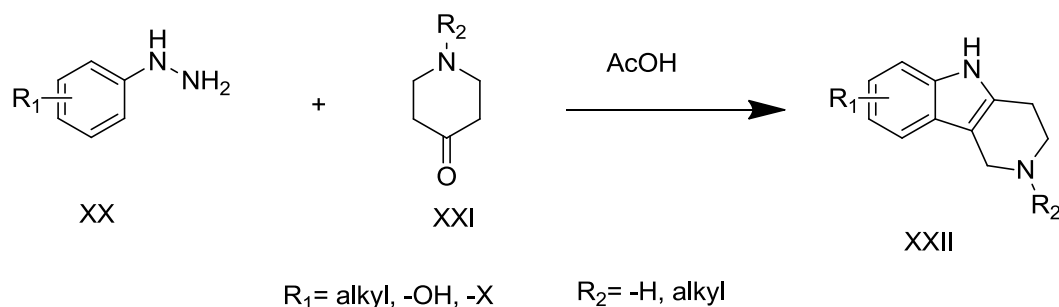
Druhý postup vychází z 1-(2-bromo-fenyl)alkyl-2,4-diketonu (XIX), ten reaguje s hydrazinem, kdy dochází k tvorbě pyrazolového kruhu a následně stejným postupem, jako je uvedeno výše k uzavření indolového kruhu⁹ (Schéma 9).



(Schéma 9)

3.1.6 Pyrido[4,3-*b*]indoly

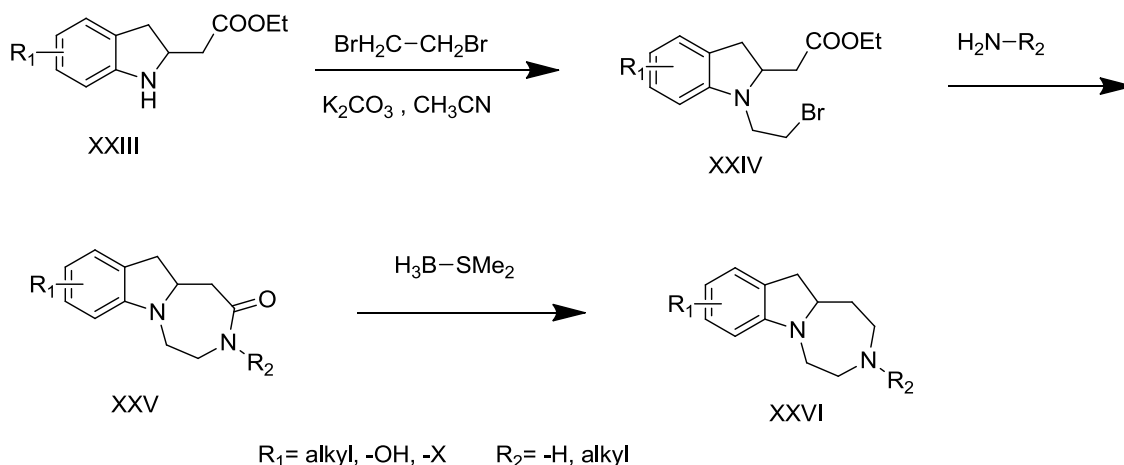
Pyrazolo[4,3-*b*]indoly (XXII) jsou připravovány principem Fischerovy indolizace. Jedná se o reakci hydrazinu substituovaného benzenovým jádrem (XX) s piperidin-4-onem (XXI) za katalýzy alkoholátem¹⁰ (Schéma 10).



(Schéma 10)

3.1.7 Diazepino[1,7-*a*]indoly

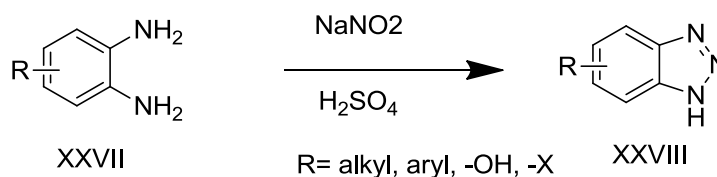
Syntéza diazepino[1,7-*a*]indolů (XXVI) vychází z ethylesteru indol-2-yl-octové kyseliny (XXIII), ten reaguje s 1,2-dibrommethanem za současné redukce (XXIV). Vzniklý intermediát reaguje s amoniakem nebo primárním aminem, kdy dochází k uzavření diazepinového kruhu (XXV). Konečným krokem je redukce karbonylové skupiny boranem (XXVI)¹¹ (Schéma 11).



(Schéma 11)

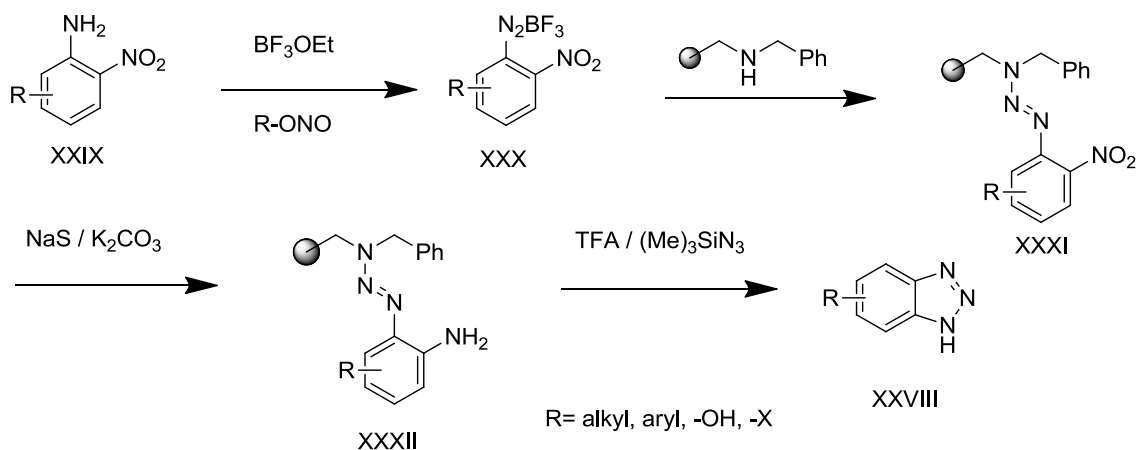
3.1.8 Benzotriazoly

Benzotriazoly (XXVIII) jsou připravovány jak v roztoku, tak i na pevné fázi. Pro syntézu v roztoku je využito diaminobenzenu (XXVII), které reagují s dusitanem sodným v přítomnosti kyseliny sírové. Dochází k nitrosaci aminu a následné stabilizaci tvorbou triazolového cyklu¹² (Schéma 12).



(Schéma 12)

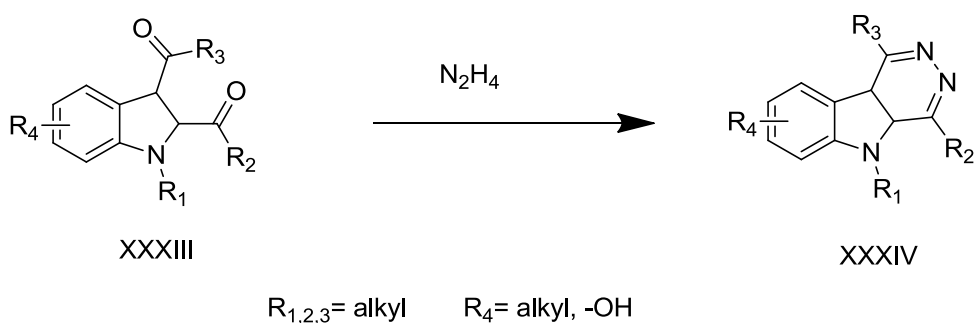
Pro syntézu na pevné fázi je užito složitější reakční cesty. Výchozími látkami jsou nitroaniliny (XXIX), které jsou nitrosovány (XXX) a následně vázány na benzylaminomethylénovou pryskyřici (XXXI). Posléze je redukována nitro skupina (XXXII) a po odštěpení z pryskyřice dochází k cyklizaci na benzotriazoly (XXXVI)¹³ (Schéma 13).



(Schéma 13)

3.1.9 Pyridazino[4,5-*b*]indoly

Tyto sloučeniny jsou připravovány výhradně v roztoku. Pro nejjednodušší způsob přípravy je jako výchozí látka zvolen indol-2,3-dicarboxyketon (XXXIII), který reaguje s hydrazinem (XXXIV). Kondenzační reakce je následována uzavřením pyridazinového kruhu, jenž je více stabilní¹⁴ (Schéma 14).



(Schéma 14)

3.2 Biologická aktivita derivátů indolu a indazolu

Indoly a indazoly se vyznačují především svou biologickou aktivitou, rozsáhlé množství těchto látek již našlo své uplatnění ve farmacii, jiné jsou ve fázích klinického testování a pravděpodobně budou v blízké době uvedeny na trh.

Počátek vývoje těchto látek a strukturně podobných látek leží v rozsáhlé studii, kde byly testovány indoly a indazoly na vše možné. Výsledky byly velmi překvapující,

jelikož se nepředpokládalo, že působení bude mít tak široké využití. U indolů a indazolů byla totiž zjištěna aktivita v následujících skupinách působení: Antivirotika – především testování na HIV, protinádorové působení – testy na buněčných liniích, antihypertenziva, protizánětlivé působení, antimikrobiální působení, antiprotozoální působení a hypoglykemický efekt¹⁵.

Tyto výsledky byly inspirací pro četné skupiny vědců, kteří začali s přípravou a testováním látek, kde je indolový či indazolový kruh základním motivem.

3.2.1 Karbazoly a jejich deriváty

Tyto látky působí jako anxiolytika, předchází je jimi stresu, psychickému napětí, neurózám. Tyto látky postrádají sedativní a relaxační vedlejší účinky, což podstatně zvyšuje možnost jejich využití oproti jiným anxiolytikům, která tyto vedlejší účinky mají a jsou pro danou situaci nežádoucí¹⁶.

3.2.2 4,5,6,7-Tetrahydroindazoly a jejich deriváty

U této skupiny látek je prokázána antibakteriální a fungicidní aktivita. V praxi jsou tyto látky používány proti bakteriím kmene *Escherichia coli* a jako jedno z mála účinných léčiv proti zlatému stafylokoku. Fungicidního působení je užíváno proti *Candida albicans*, jež je častou příčinou ústních a genitálních infekcí a u lidí se sníženou imunitou může vést až k úmrtí⁵.

3.2.3 Indazol-3-karboxylové kyseliny a jejich deriváty

Tyto látky byly prokázány jako antibakteriální, protizánětlivé a analgetické agens. Protizánětlivé účinky byly prokázány na in vivo testech na myších, analgetický účinek těchto látek však není příliš silný. Antibakteriální účinek byl prokázán na následující rody bakterií: *Bacillus subtilis*, *Bacillus thurengensis*, *Proteus vulgaris*, *Stafilococcus aureus* a některé z *Escherichia coli*.⁶

3.2.4 Benztriazoly, 3-halogenindazoly a jejich deriváty

Tyto látky našly své uplatnění jako antiparazitika. Jejich hlavní využití je k léčbě parazitických infekcí *Entamoeba histolytica* způsobujících úplavici a četná onemocnění

jater. Tato onemocnění jsou hojná především v rozvojových zemích, kde způsobují nesčetná úmrtí¹⁷.

3.2.5 Pyrazolo[1,5-*a*]indoly a jejich deriváty

Těmto látkám je připisována protinádorová aktivita, působí jako inhibitory topoisomerázy. Zablokováním tohoto enzymu se zabrání v růstu nádoru a umožní jeho další léčbu či chirurgické odstranění. Inhibicí topoisomerázy dochází k znemožnění replikace DNA¹⁸.

3.2.6 Pyrido[4,3-*b*]indoly a jejich deriváty

U těchto látek byl prokázán takzvaný geroprotektivní účinek. Jedná se o zpomalení stárnutí založeném na schopnosti těchto látek prodloužit životnost buněk¹⁹.

3.2.7 Diazepino[1,7-*a*]indoly a jejich deriváty

Tak jako jiné diazepinové látky, tak i diazepino[1,7-*a*]indoly jsou používány v léčbě poruch centrální nervové soustavy. Jedná se o selektivní agonisty serotoninových receptorů 5-HT. Plný rozsah působení nebyl doposud popsán, ale zatím byly látky úspěšně používány k léčbě bulimie, chronického únavového syndromu, inkontinence a některých sexuálních dysfunkcí²⁰.

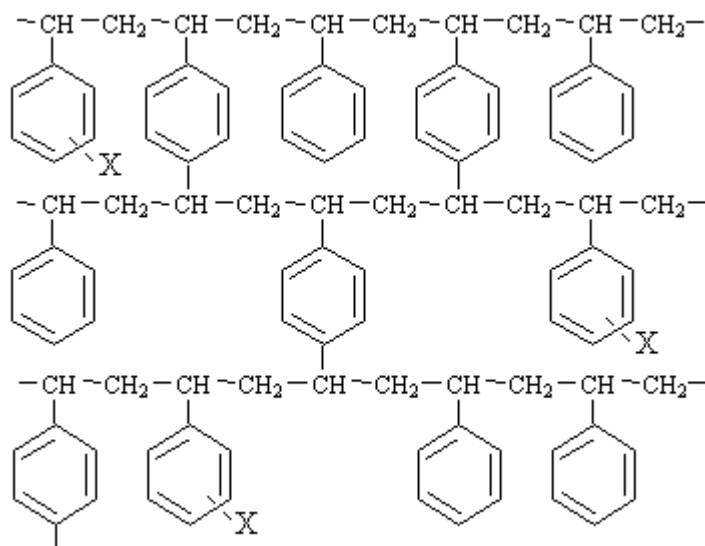
3.2.8 Pyridazino[4,5-*b*]indoly, pyridazino[4,5-*a*]indoly a jejich deriváty

Tyto látky působí jako selektivní inhibitory thromboxan syntázy, což tyto látky předurčuje k použití jako antihypertenziva. Svým působením zabraňují agregaci krevních destiček a lze je tedy považovat za prevenci mrtvice či infarktu²¹.

3.3 Merrifieldova syntéza

Celá chemie na pevné fázi odstartovala zásadním objevem Roberta Bruce Merrifielda (1921-2006), který byl v roce 1984 oceněn Nobelovou cenou za chemii za

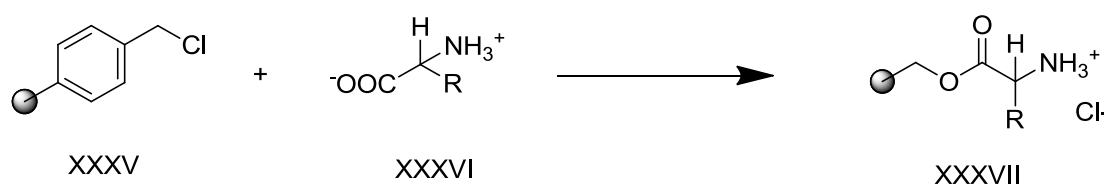
rozvoj metodologie chemických reakcí na pevných maticích). R. B. Merrifield svou prací zásadně změnil přístup k experimentální syntéze²². Ve své práci se zabýval novým přístupem k syntéze peptidů, které se do té doby prováděly v roztoku, což bylo velice náročné. Bylo zapotřebí komplikovaně chránit reaktivní skupiny jednotlivých aminokyselin tak, aby se docílilo jejich požadované sekvence. Pro delší řetězce pak bylo téměř nemožné najít dostatečné množství chránících skupin, které by bylo možné selektivně odchránit a následně podrobit dalším reakcím. Nemluvě o tom, že reflux nejednou znehodnotil celou syntézu. R. B. Merrifield přišel s myšlenkou, kde je úvodní aminokyselina sekvence kovalentně navázána na polymerním nosiči a k ní jsou postupně navazovány další, v pořadí v jakém je sekvence zamýšlena. Při tomto uspořádání odpadá především časově náročné čištění produktu od reaktantů, rekrystalizace intermediátů a následná příprava reakčního roztoku pro další krok. Další věcí, které se snažil docílit, bylo vyvinout metodu, která by umožňovala automatizaci syntézy polypeptidů, což se také podařilo. První a zásadní otázkou bylo, co použít jako nosič, aby splňoval požadavky: nerozpustný, chemicky i fyzikálně stabilní, umožňující filtraci, byl porézní a nesl funkční skupinu, na kterou by bylo možné navázat první aminokyselinu i ji následně odštěpit. Pro tento účel byly testovány celulóza, polyvinyl alkoholy, polymetakryláty, sulfonovaný polystyren a další. Jako nejvhodnější byl nakonec zvolen chlormethylenovaný kopolymer styrenu a divinylbenzenu. (obr. 1)



(obr. 1)

Tento kopolymer měl ve výsledku porézní gelovou strukturu umožňující průnik reaktantů k chlormethylové skupině především za použití smáčečích rozpouštědel. K zásadnímu kroku, tedy navázání první aminokyseliny, bylo využito reakce

chlormethylové skupiny (XXXV) s ethylenamoniovou solí dané aminokyseliny (XXXVI). Při této reakci vzniká substituovaný benzyl-esterový linker (XXXVII), který po celou dobu drží prodlužující se řetězec polypeptidu přichycen na pevném nosiči (Schéma 15). Zároveň tento benzyl-esterový linker umožňuje odštěpení kompletního produktu z nosiče.



(Schéma 15)

Po navázání 1. aminokyseliny se postupovalo *p*-nitrofenylesterovou metodou, která byla používána i pro klasickou roztokovou syntézu. Po přečištění finálního produktu bylo zjištěno, že výtěžek této nové metody je 80%, což v této době bylo opravdu vysoké číslo.

Krátce po publikování tohoto článku se začaly objevovat doslova tisíce dalších popisujících syntézu různých oligopeptidů a polypeptidů na pevné fázi odkazujících na Merrifieldovu syntézu²³⁻²⁵. Posléze se však začali objevovat i publikace popisující syntézu jiných látek než peptidů s užitím principu Merrifieldovy syntézy, což odstartovalo raketový rozvoj syntetických technik na pevné fázi²⁶⁻²⁷. Se zvyšující se popularitou syntézy na pevné fázi začaly pochopitelně růst i nároky na dostupnost komponent, s tím souvisí i značný rozvoj průmyslové výroby a vývoje nových polymerních pryskyřic a modifikací linkerů pro rozšíření možností využití syntézy na pevné fázi na co největší část organické chemie.

3.4 Pevná fáze

Pevnou fází je obecně myšlen pevný či gelovitý materiál mající pórovitou strukturu, na které je přítomna reaktivní skupina, na kterou lze navázat linker a následně „building block“. Ostatní části tohoto materiálu musejí být chemicky inertní. Dalším požadavkem na tyto materiály je schopnost bobtnání za použití specifických

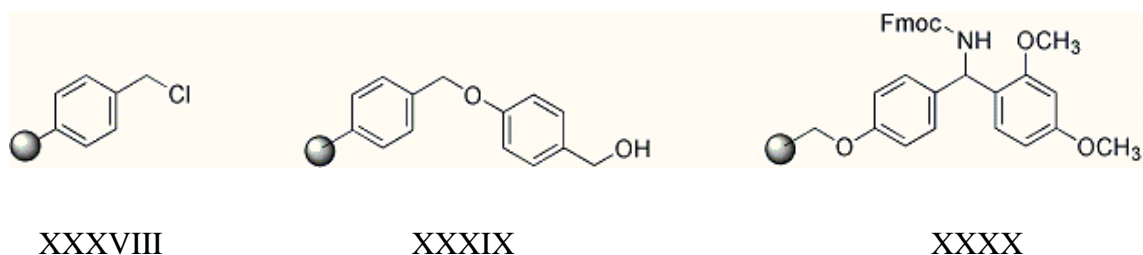
rozpouštědel či jejich směsí tak, aby reakční komponenty dokázaly proniknout k reaktivním skupinám uvnitř materiálu. Velmi podstatnou věcí je pak opatření pevné fáze linkerem nebo spacerem, které umožňují odštěpení kovalentně vázaného produktu z polymerního nosiče.

3.4.1 Pryskyřice

Komerčně dostupné pryskyřice pro syntézu na pevné fázi lze rozdělit do čtyř skupin, podle dominantní struktury polymeru, kterým jsou tvořeny. Následně jsou děleny dle funkční skupiny, pomocí které jsou reaktanty kovalentně vázány na tento pevný nosič. Zmíněny zde budou pouze některé, především ty, jejichž využití má signifikantní význam pro syntézu na pevné fázi.

3.4.1.1 Styrenové pryskyřice

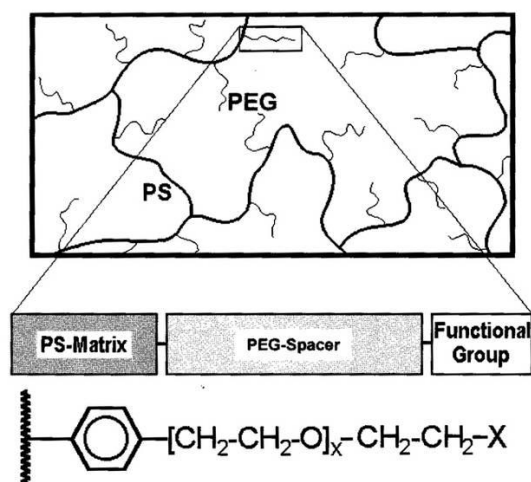
Jedná se o pryskyřice založené na kopolymeru styrenu a divinylbenzenu, funkční skupina se nachází v blízkosti styrenového kruhu. Mezi nejpoužívanější se řadí chloromethylpolystyrenová pryskyřice, též nazývaná jako Merrifieldova pryskyřice (XXXVIII), hydroxymethylpolystyrenová pryskyřice, známá také pod názvem Wangova pryskyřice (XXXIX) a aminomethylpolystyrenová pryskyřice, která je označována i jako Rinkova pryskyřice (XXXX) (Schéma 16). Tyto pryskyřice bobtnají především v rozpouštědlech typu dichlormethan a dimethylformamid, tedy převážně v nepolárních rozpouštědlech.



(Schéma 16)

3.4.1.2 TentaGelové pryskyřice

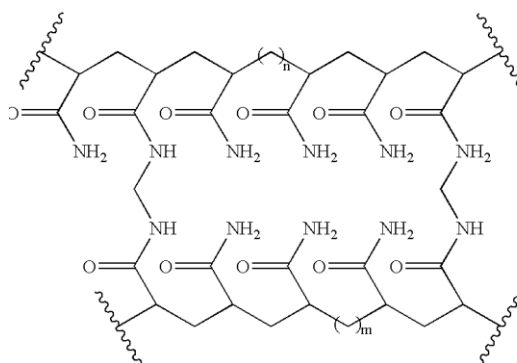
Jedná se o pryskyřice s uhlíkovou páteří založenou na kopolymeru styrenu a divinylbenzenu, který je modifikovaný polyethylenglykolem (obr. 2). Tyto pryskyřice jsou hydrofilnější a bobtnají v širokých variacích rozpouštědel, nejen v nepolárních ale i polárních, jako jsou alkoholy. Slabě dokážou bobtnat i ve vodě. Umožňují rychlejší průběh reakce, díky zvýšené mobilitě intermediátů. Nevýhodou je vysoká cena a tepelná labilita.



(obr. 2)

3.4.1.3 Polyakrylamidové pryskyřice

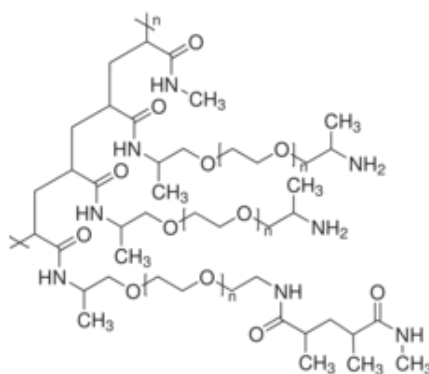
Polyakrylamidové pryskyřice (obr. 3) byly vyvinuty především k syntéze delších řetězců polypeptidů. Důvodem byla nevhodnost standardní Merrifieldovy pryskyřice, která je ve své podstatě velmi hydrofobní, avšak s prodlužujícím se řetězcem peptidů roste hydrofilita. Polyakrylamidové pryskyřice tento trend však nevykazují a jsou využívány k syntézám polypeptidů s řetězcem delším než dvacet aminokyselin.



(obr. 3)

3.4.1.4 Polyethylenglykolamidové pryskyřice

Tyto pryskyřice se svými vlastnostmi velice podobají polyakrylamidovým. Mají schopnost bobtnání jak v protických tak i aprotických rozpouštědlech, lze je použít pro enzymaticky katalizované reakce (obr. 4). Omezení je však v mechanické stabilitě těchto pevných fází, které nastávají především při filtraci.



(obr. 4)

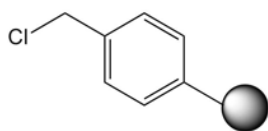
3.4.2 Linkery

Linkery²⁸, nebo také někdy nazývanými jako spacers, jsou myšleny řetězce vázané na polymerní nosič nesoucí funkční skupinu. Pomocí této reaktivní skupiny jsou tvořeny kovalentní vazby mezi polymerním nosičem a building blockem, který chceme na pevnou fázi navázat. Hlavní podmínkou je vytvořit vazbu nebo řetězec, který je po dobu probíhajících reakcí stabilní a zároveň po ukončení reakcí jej lze rozštěpit tak, abychom získaly produkt předešlých reakcí. Pro potřeby organické syntézy na pevné

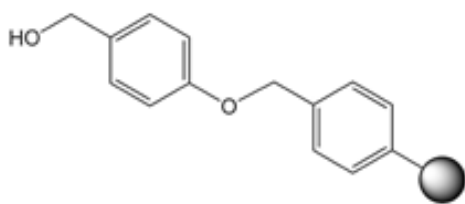
fázi byly vyvinuty velmi rozmanité skupiny linkerů, zmíněny zde budou pouze základní a nejpoužívanější typy.

3.4.2.1 Kysele štěpitelné linkery

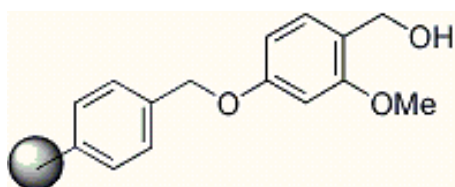
Jedná se o nejpoužívanější linkery pro organickou syntézu (obr. 5). Původně byly vyvinuty pro syntézu oligopeptidů na polystyrenové pryskyřici. Pro syntézu nepeptidických sloučenin byly připraveny modifikace, které jsou stabilnější pro reakční podmínky daných syntéz. Ke štěpení vazeb dochází, jak již název naznačuje, působením kyselin. Jedná se především o velmi silné kyseliny jako je kyselina fluorovodíková nebo trifluoroctová kyselina.



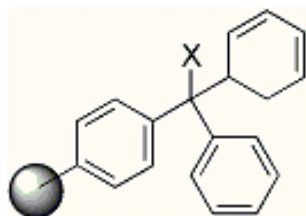
Merrifieldův linker, štěpení: 0°C, HF, 30-60 minut



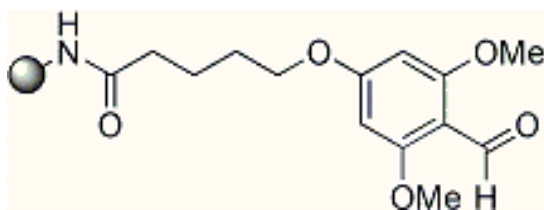
Wangův linker, štěpení: >20% TFA



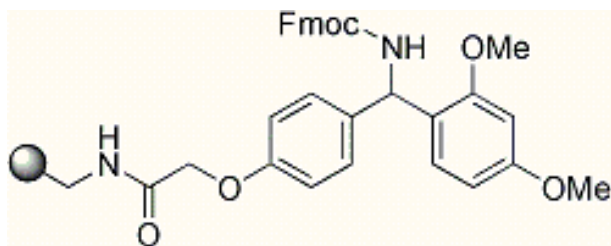
SASRIN linker, štěpení: 0,1-1% TFA



Trityl linker, štěpení: 2% TFA, HCOOH



BAL linker, štěpení: 50% TFA

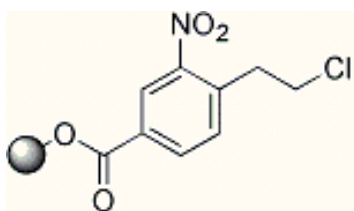


Rink linker, štěpení: 50% TFA

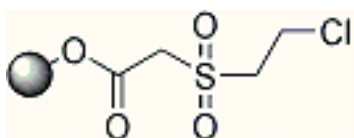
(obr. 5)

3.4.2.2 Bazicky štěpitelné linkery

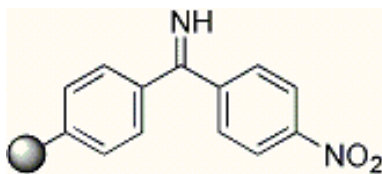
Bazicky štěpitelné linkery sice nejsou tak často využívány, jako kyselě štěpitelné linkery, avšak i jejich použití je dost časté (obr. 6). Tyto linkery byly vyvinuty k potřebám syntézy na pevné fázi, kde je k reakčním krokům využíváno kyselé katalýzy. Kyselě katalyzované reakce jsou totiž ke kyselě štěpitelným linkerům velmi nehostinné, díky možným rizikům odštěpení v průběhu syntézy byly tedy připraveny linkery štěpitelné bazicky.



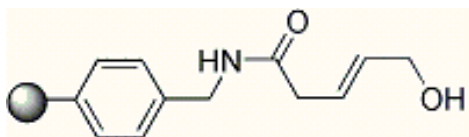
štěpení: DBU



štěpení: NaOH



štěpení: hydrazin hydrát



štěpení: Pd⁰/(PPh₃)₄/morfolin

(obr. 6)

4. Výsledky a diskuze

Pro přípravu 3,4-dihydropyrazino[1,2-*b*]indazol-6-oxidů byl úspěšně popsán pouze model využívající syntézy na pevné fázi. Tímto postupem byly tedy připraveny i látky v této bakalářské práci uvedené. Zmiňovaná syntéza je vhodná především pro svou nenáročnost na vybavení, možnosti pracovat v malých množstvích bez obav nedostatečného množství produktu a schopnosti připravit velké množství různých derivátů v krátkém čase principem kombinatoriální chemie.

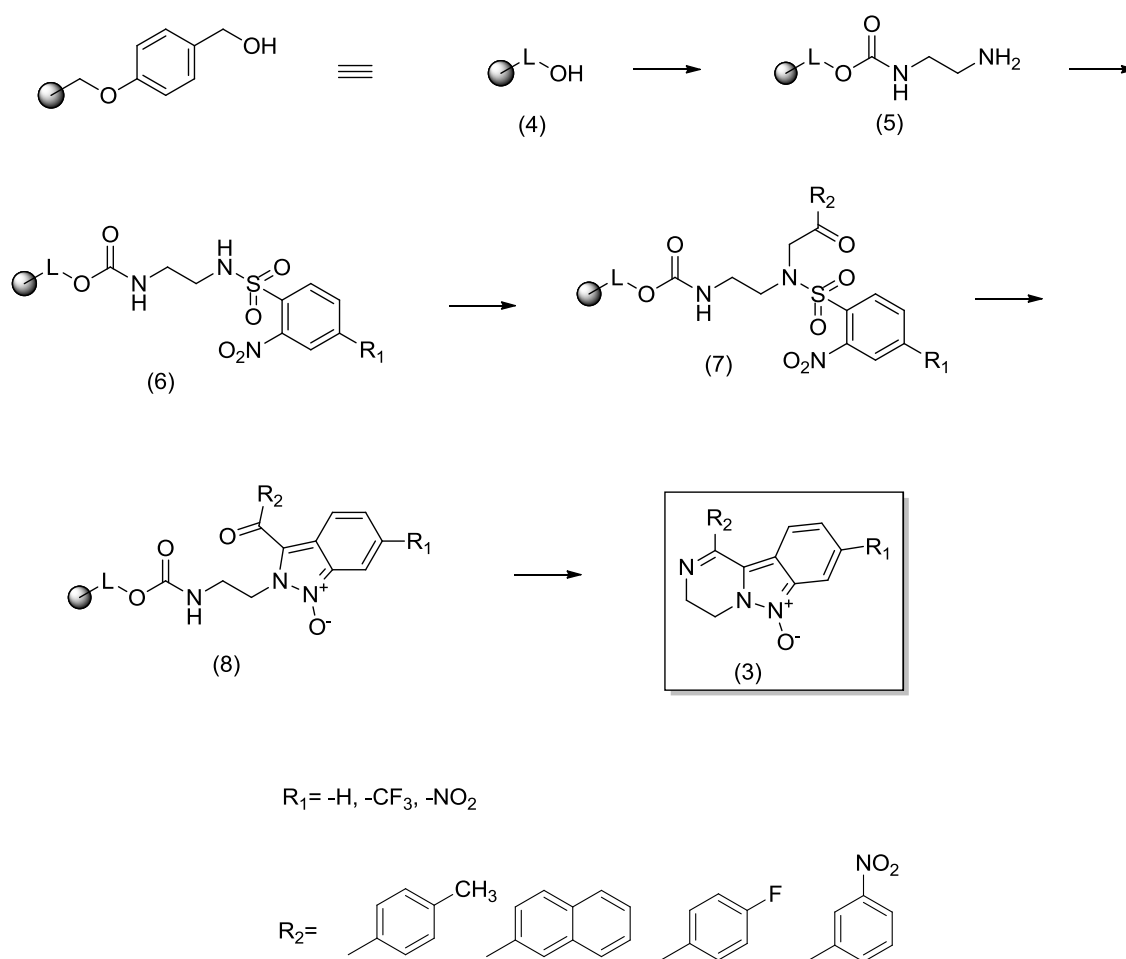
Jak je již v teoretické části naznačeno, velké množství derivátů indolu a indazolu s přikondenzovaným cyklem obsahujícím další heteroatom dusíku bylo podrobena biologickému testování a následnému detailnějšímu výzkumu. Látky uvedené v této bakalářské práci doposud nebyly testovány. Dříve připravené deriváty 3,4-dihydropyrazino[1,2-*b*]indazolů byly testovány na cytotoxické účinky *in vitro* na buněčných nádorových liniích a ukázalo se, že některé deriváty vykazovaly významnou protinádorovou aktivitu. Výsledky těchto testů však nebyly zatím publikovány.

Veškeré reakce jsou prováděny v injekčních stříkačkách utěsněných fritou. Toto uspořádání nám umožňuje vysokou operabilitu, reakční činidla a rozpouštědla nemusí být složitě napouštěny a vypouštěny za současné filtrace, jelikož reakce běží na polymerním nosiči, který je umístěn uvnitř injekční stříkačky. Stačí reakční činidla a rozpouštědla nasát přes fritu a po ukončení reakce opět odfiltrovat, aniž bychom se museli obávat ztráty produktu. Toto nám umožňuje polymerní nosič, na kterém je produkt navázán, je totiž natolik objemný, že přes fritu neprojde.

4.1 Strategie přípravy 3,4-dihydropyrazino[1,2-*b*]indazol-6-oxidů

Pro syntézu 3,4-dihydropyrazino[1,2-*b*]indazol-6-oxidů je zapotřebí navázání 1,2-diamonoethanu na Wangovu pryskyřici. Délka tohoto řetězce je klíčová pro konečnou cyklizaci, protože umožňuje uzavření výhodného 6-ti členného cyklu za vzniku finálního 3,4-dihydropyrazino[1,2-*b*]indazol-6-oxidu. Následuje reakce s 2-

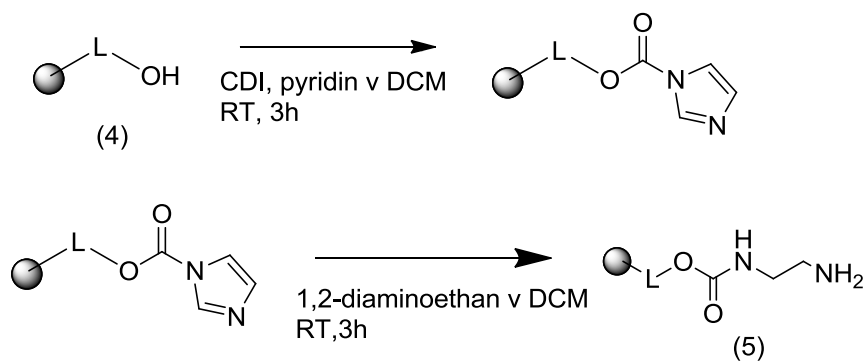
nitrobenzensulfonyl chloridem za vzniku příslušného benzensulfonamidu. Použitím různě substituovaného benzenového jádra se otevírají možnosti přípravy takových derivátů, které by svou aktivitou vynikaly nad ty dosud připravené. Takto připravený intermediát podléhá alkylní reakci s 2-bromketonem za vzniku N-alkylsulfonamidu; tímto způsobem je docíleno modifikací R_2 cílových struktur. Tyto intermediáty jsou následně cyklizovány pomocí 1,8-diazabicyclo[5.4.0]undec-7-enu (DBU). Touto cyklizací dochází k uzavření indazolového kruhu a vzniku 2-(3-acyl-indazol-2-yl)-ethylaminu. Tyto struktury jsou poté odštěpeny z polymerního nosiče působením 50% trifluoroctové kyseliny v dichlormethanu. Po odštěpení z pryskyřice dochází samovolně k uzavírání dihydropyrazinového kruhu (Schéma 17).



(Schéma 17)

4.1.1 Navázání 1,2-diaminoethanu na Wangovu pryskyřici

Wangova pryskyřice (4) (Advanced ChemTech, 1mmol/g) byla bobtnána a třikrát promyta v dichlormethanu. Takto upravená pryskyřice reaguje s roztokem karbonyldiimidazolu (CDI) v dichlormethanu (DCM). Reakce probíhá za bazické katalýzy, kde je jako báze použit pyridin. Reakční směs je třepána na shakeru za laboratorní teploty tři hodiny. (Schéma 18) Po ukončení reakce je reakční směs vymyta a pryskyřice třikrát promyta dichlormethanem. Následně je k pryskyřici přidán reakční roztok 1,2-diaminoethanu v dichlormethanu. Reakční směs je třepána tři hodiny, posléze je směs vymyta a pryskyřice promyta třikrát dichlormethanem.

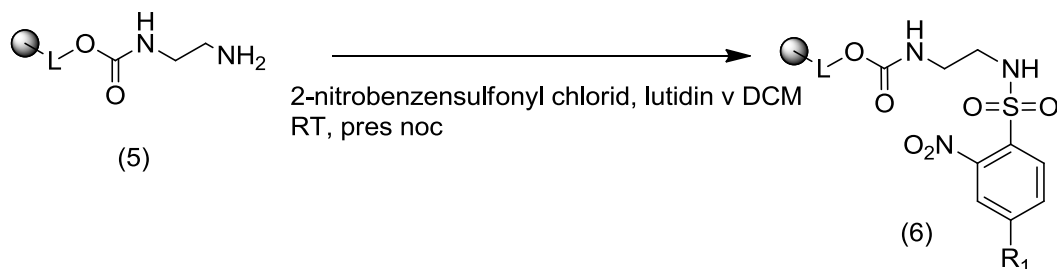


(Schéma 18)

Z takto připravené pryskyřice je odebráno několik miligramů, které jsou podrobeny reakci s Fmoc-OSu. Pro analýzu není používán pouze 1,2-diaminoethan bez navázané Fmoc protektivní skupiny, jedná se totiž o malou molekulu s nízkou hmotou, která je blízká hmotě mobilní fáze. Fmoc navíc poskytuje specifický signál v UV spektru při 300 nm. Pryskyřice s navázanou Fmoc skupinou je štěpena 50% trifluoroctovou kyselinou a analyzována na LC-MS. Z analýzy je stanoven loading pryskyřice pro výpočet konečného výtěžku. Využívá se srovnání intenzity signálu vzorku oproti signálu standardu známé koncentrace. Hodnoty loadingu jednotlivých pryskyřic se pohybovaly v rozmezí 0,22 – 0,59 mmol/g.

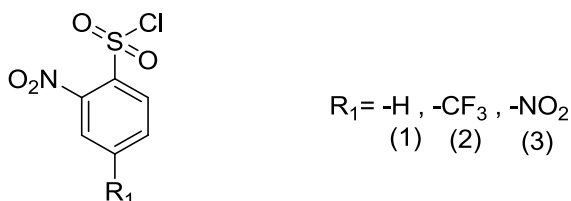
4.1.2 Reakce s 2-nitrobenzensulfonyl chloridy

Wangova pryskyřice s navázaným 1,2-diaminoethanem (5) přes karbamátový linker je bobtnána v dichlormethanu. K nabobtnané pryskyřici je přidán reakční roztok 2-nitrobenzensulfonyl chloridu (Schéma 19).



(Schéma 19)

Byly použity tyto tři různé 2-nitrobenzensulfonyl chloridy: 2-nitrobenzensulfonyl chlorid (1), 2-nitro-4-(trifluormethyl)benzensulfonyl chlorid (2) a 2,4-dinitrobenzensulfonyl chlorid (3) (obr. 7).



(obr. 7)

Reakce probíhá za bazické katalýzy, jako báze je přidán lutidin. Reakční směs je třepána na shakeru při laboratorní teplotě přes noc. Úplné zreagování výchozí látky bylo ověřeno odebráním malého množství pryskyřice a reakcí s bromfenolovou modří. Je-li přítomna primární aminoskupina, dojde k fialovému zabarvení pryskyřice. Ve všech případech byl kontrolní test negativní. Po ukončení reakce je reakční směs vymyta a pryskyřice je promyta třikrát N,N-dimethylformamidem a třikrát dichlormethanem.

Před LC-MS analýzou bylo potřeba pryskyřici zreagovat s Fmoc-Osu, aby bylo možné detekovat případnou výchozí látku. LC-MS analýza ukázala ve všech případech produkty v čistotě od 96 do 99%. Výchozí látka, respektive Fmoc-1,2-diaminoethan ani

v jednom spektru přítomen nebyl. Všechny struktury odpovídající píkům v LC-MS analýzám jsou uvedeny v experimentální části.

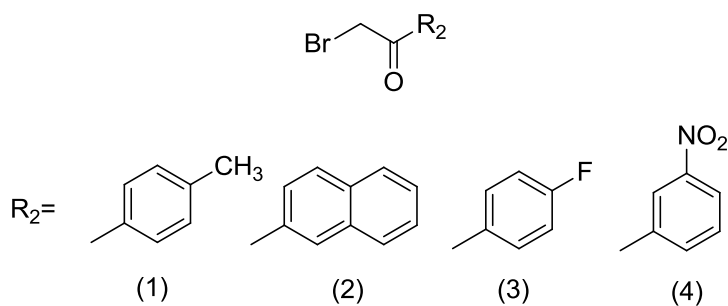
4.1.3 Reakce s bromketony

Pryskyřice s navázaným sulfonamidem (6) byla bobtnána v dichlormethanu a následně pětkrát promyta N,N-dimethylformamidem. K pryskyřici je přidán reakční roztok bromketonu v N,N-dimethylformamidu (Schéma 20).



(Schéma 20)

Byly použity následující bromketony: 2-brom-4'-methylacetofenon (1), 2-brom-4'-fluoracetofenon (3), 2-brom-3'-nitroacetofenon (4) a 2-brom-2'acetonafon (2) (obr. 8).



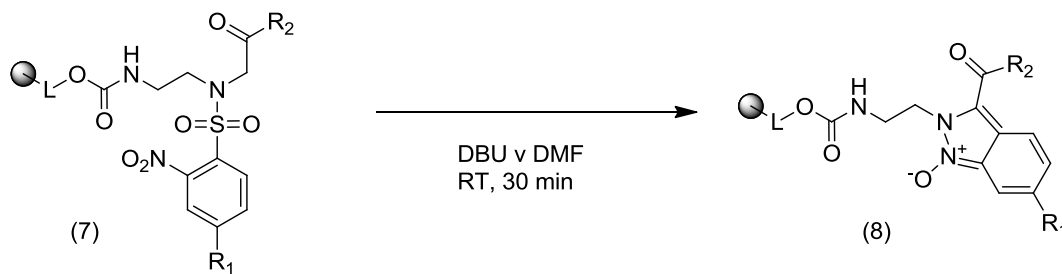
(obr. 8)

Reakce je katalyzována diisopropylethylaminem. Reakční směs je třepána na shakeru za laboratorní teploty přes noc. Po ukončení reakce je pryskyřice promyta třikrát N,N-dimethylformamidem a pětkrát dichlormethanem.

Již v tomto kroku docházelo k přesmyku benzenového jádra použitého 2-nitrobenzensulfonyl chloridu na karbanion, který vzniká působením báze na hyperkonjugovaný vodík, a v některých případech i ke vzniku finálního 3,4-dihydropyrazino[1,2-*b*]indazol-6-oxidu. Výsledné struktury jsou uvedené v experimentální části.

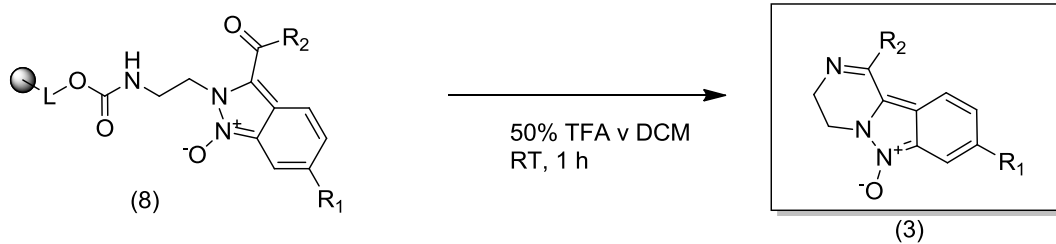
4.1.4 Cyklizace pomocí DBU a štěpení finálního produktu kyselinou trifluoroctovou

Pryskyřice se všemi reakčními komponentami (7) navázanými na ní je bobtnána v N,N-dimethylformamidu. Následně je pryskyřice podrobena cyklizační reakci pomocí roztoku 1,8-diazabicyclo[5.4.0]undec-7-enu, kdy dochází k tvorbě indazolového kruhu (8). (Schéma 21) Reakční směs je třepána na shakeru třicet minut. Po ukončení reakce je pryskyřice promývána několikanásobně dichlormethanem, N,N-dimethylformamidem a methanolem, aby byla zbavena veškerých reakčních činidel před štěpením.



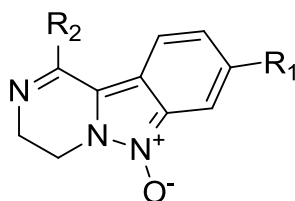
(Schéma 21)

K pryskyřici s cyklizovaným produktem (8) je přidán 50% roztok kyseliny trifluoroctové v dichlormethanu. Štěpící směs je třepána hodinu na shakeru. (Schéma 22) Štěpení produktu v kyselině trifluoroctové ve všech případech způsobilo cyklizaci na finální 3,4-dihydropyrazino[1,2-*b*]indazol-6-oxidy (3). Po odštěpení produktu z pryskyřice je roztok jímán do vialky, z té je pak proudem dusíku odpařen přebytek rozpouštědla, koncentrovaný roztok produktu je lyofilizován k získání čisté látky.



(Schéma 22)

4.2 Připravené látky



| označení | název | R ₁ | R ₂ |
|----------|---|------------------|----------------|
| 3(1,1)* | 1-(<i>p</i> -tolyl)-3,4-dihydropyrazino[1,2- <i>b</i>]indazol-6-oxid | -H | |
| 3(1,2) | 1-(naphthalen-2-yl)-3,4-dihydropyrazino[1,2- <i>b</i>]indazol-6-oxid | -H | |
| 3(2,2) | 1-(naphthalen-2-yl)-8-(trifluoromethyl)-3,4-dihydropyrazino[1,2- <i>b</i>]indazol-6-oxid | -CF ₃ | |
| 3(3,3) | 1-(4-fluorophenyl)-8-nitro-3,4-dihydropyrazino[1,2- <i>b</i>]indazol-6-oxid | -NO ₂ | |
| 3(3,4) | 1-(3-nitrophenyl)-8-nitro-3,4-dihydropyrazino[1,2- <i>b</i>]indazol-6-oxid | -NO ₂ | |

* Nejedná se o novou látku, 3(1,1) byla již popsána¹. Její syntéza byla použita jako modelový příklad.

5. Experimentální část

Pro syntézu na pevné fázi je nutností, aby byla celá reakční směs důkladně pryskyřice dostatečně nabobtnaná a reaktanty měly snadný přístup k funkčním skupinám, na kterých probíhají reakce. Pro tento účel byly pryskyřice protřepávány na laboratorním shakeru v plastových injekčních stříkačkách opatřených polypropylenovou fritou k zamezení úniku pevné fáze jak v průběhu reakcí tak při promývání. Pro každou reakci byl použit desetinásobek objemu roztoku vůči navážce pryskyřice (pro 1 g pryskyřice bylo použito 10 ml reakčního roztoku).

5.1 Použité přístroje a metody:

Pro analýzu připravených intermediátů a finálních látek bylo použito LC-MS, záznamy měřených spekter byly vyhodnoceny pomocí softwaru ExcaliburTM.

- UPLC chromatograf (Accela Thermo Scientific) s termostatem (30 °C)
- Parametry UPLC:
 - o nástřik – 5 μ l
 - o mobilní fáze – acetonitril (A) : amonium acetát 0,1% (B)
 - o 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)

5.2 Proces standardního štěpení:

K analýze každé reakce bylo zapotřebí odštěpení produktů z polymerního nosiče, na kterém byly navázány. K tomuto účelu byl použit roztok kyseliny trifluoroctové v dichlometanu v hmotnostním poměru 1:1. K analýzám bylo odebráno 5-10 mg pryskyřice, ke které byl přidán 1 ml štěpící směsi, ta byla na shakeru třepána po dobu 30 minut. Poté se vzorek nechal odpařit proudem dusíku a takto upravený vzorek byl rozpuštěn v 1 ml methanolu. Methanolký roztok je posléze přefiltrován do vialek určených pro autosampler LC-MS.

5.3 Syntéza na Wangové pryskyřici

5.3.1 Navázání 1,2-diaminoethanu na Wangovu pryskyřici

Do injekční stříkačky bylo odváženo 250mg Wangovy pryskyřice (4), ta byla bobtnána v DCM. Je přidán reakční roztok CDI (1,25mmol, 202mg) a pyridinu (1,25mmol, 100 μ l) v 2,5 ml DCM. Pryskyřice byla třepána 3 hodiny. Reakční směs byla poté vymyta a promyta DCM. Následně byl přidán reakční roztok 1,2-diaminoethanu (1,25mmol, 83 μ l) v 2,5 ml DCM areakční směs třepána 3 hodiny, následně vymyta a promyta 3x DCM (Schéma 18).

Ze zreagované pryskyřice bylo odebráno 5-10 mg a ty reagují s Fmoc-Osu (0,5mol, 337 mg) ve 2 ml DCM.

LC-MS analýza:

Fmoc-1,2-diaminoethan $[M-H]^- = 281,34$; čistota: 99%

Tato látka je výchozí pro veškeré syntetizované 3,4-dihydropyrazino[1,2-*b*]indazol-6-oxidy. Výsledky se liší pouze intenzitou signálu, ze kterého je spočítán loading pryskyřice (Tabulka 1).

Tabulka 1

| Látka | Loading |
|--------|------------|
| 5(1,1) | 0,44mmol/g |
| 5(1,2) | 0,22mmol/g |
| 5(2,2) | 0,59mmol/g |
| 5(3,4) | 0,59mmol/g |
| 5(3,3) | 0,22mmol/g |

5.3.2 Reakce s 2-nitrobenzensulfonyl chloridy

Pryskyřice s navázaným 1,2-diaminoethanem (5) byla bobtnána v DCM a následně přidán reakční roztok 2-nitrobenzensulfonylchloridu (1-3) (Obrázek 5) (0,8mmol) a lutidinu (0,825mmol, 96 μ l) ve 2,5ml DCM. Reakční směs byla třepána přes noc, poté vymyta a promyta 3x DCM a 3x DMF (Schéma 19).

LC-MS analýza (viz Tabulka 2).

Tabulka 2

| Látka | [M-H] ⁻ | Čistota |
|--------|--------------------|---------|
| 6(1,1) | 244,26 | 99% |
| 6(1,2) | 244,26 | 99% |
| 6(2,2) | 312,25 | 98% |
| 6(3,4) | 289,25 | 96% |
| 6(3,3) | 289,25 | 97% |

5.3.3 Reakce s bromketony

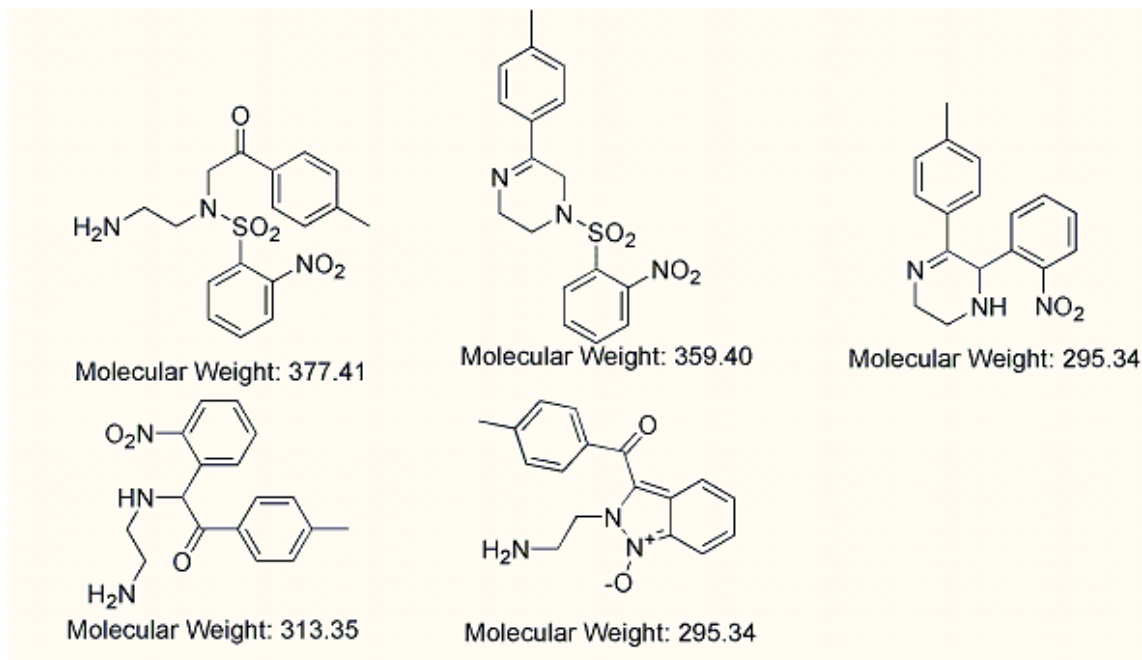
Pryskyřice (6) byla bobtnána v DCM posléze promyta 5x DMF. Byl přidán reakční roztok bromketonu (1-4) (Obrázek 6) (1,5mmol) a DIEA (3mmol, 433 μ l) ve 2,5ml DMF. Reakční směs byla třepána přes noc, reakční roztok posléze vymyt a pryskyřice promyta 3x DCM a 5x DMF (Schéma 20).

LC-MS analýza:

Při analýze alkylovaných meziproductů byla získána spektra obsahující více píků. Tyto píky však náležely různým formám intermediátů směřujícím k výslednému produktu (obr. 9-13).

Meziprodukt 7(1,1)

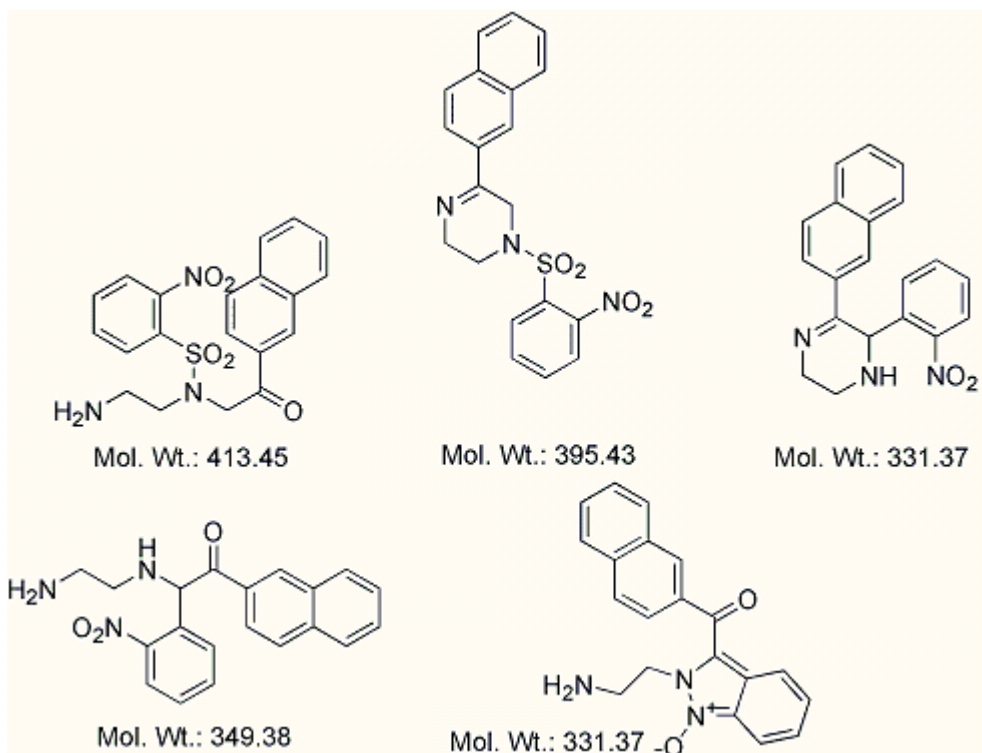
$[M-H]^- = 376,41; 358,4; 294,34; 312,35; 295,34$; čistota: 92% zastoupení uvedených hmot.



(obr. 9)

Meziprodukt 7(1,2)

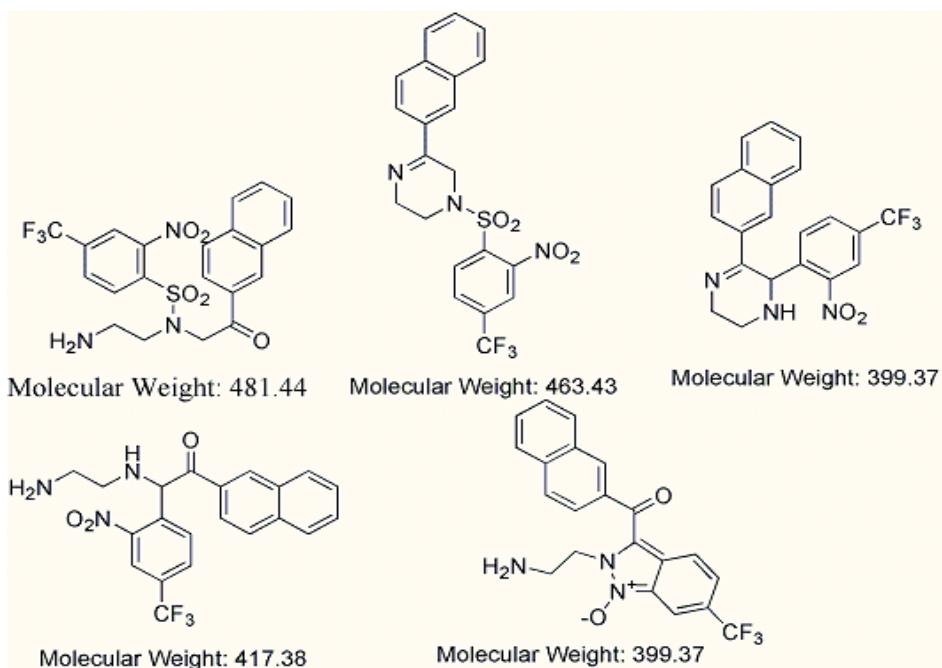
$[M-H]^- = 412,45; 394,43; 330,37; 348,38$; čistota: 98% zastoupení uvedených hmot.



(obr. 10)

Meziprodukt 7(2,2)

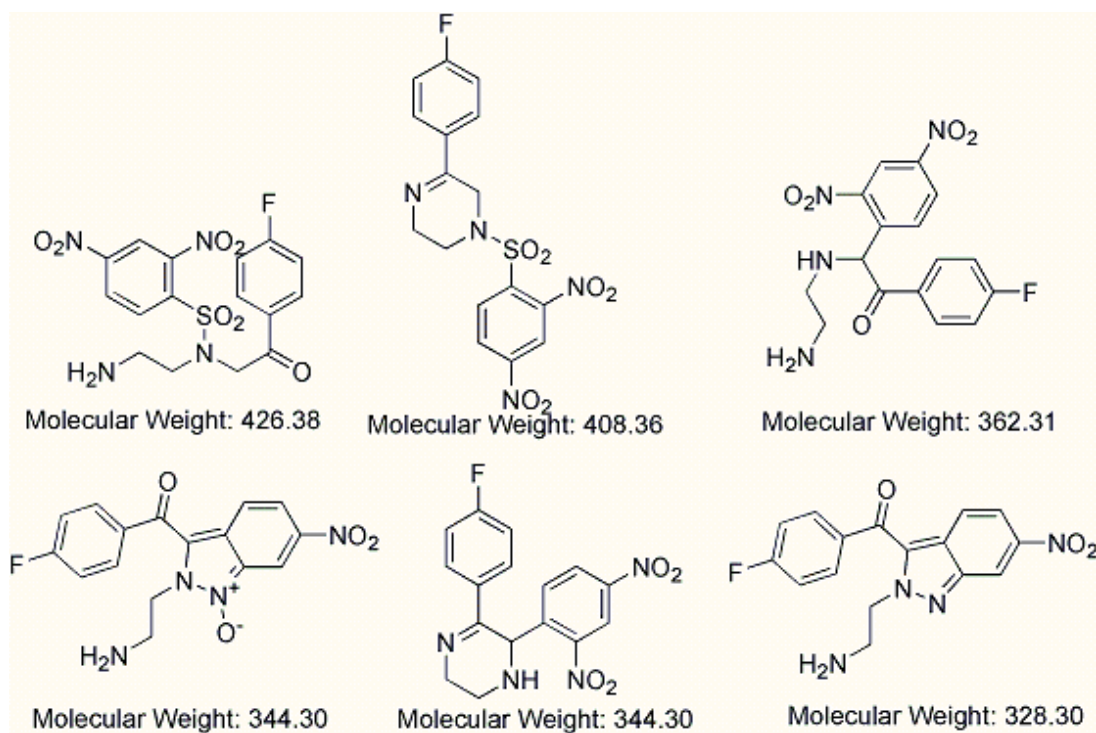
$[M-H]^- = 480,44; 462,43; 398,37; 416,38$; čistota: 87% zastoupení uvedených hmot.



(obr. 11)

Meziprodukt 7(3,4)

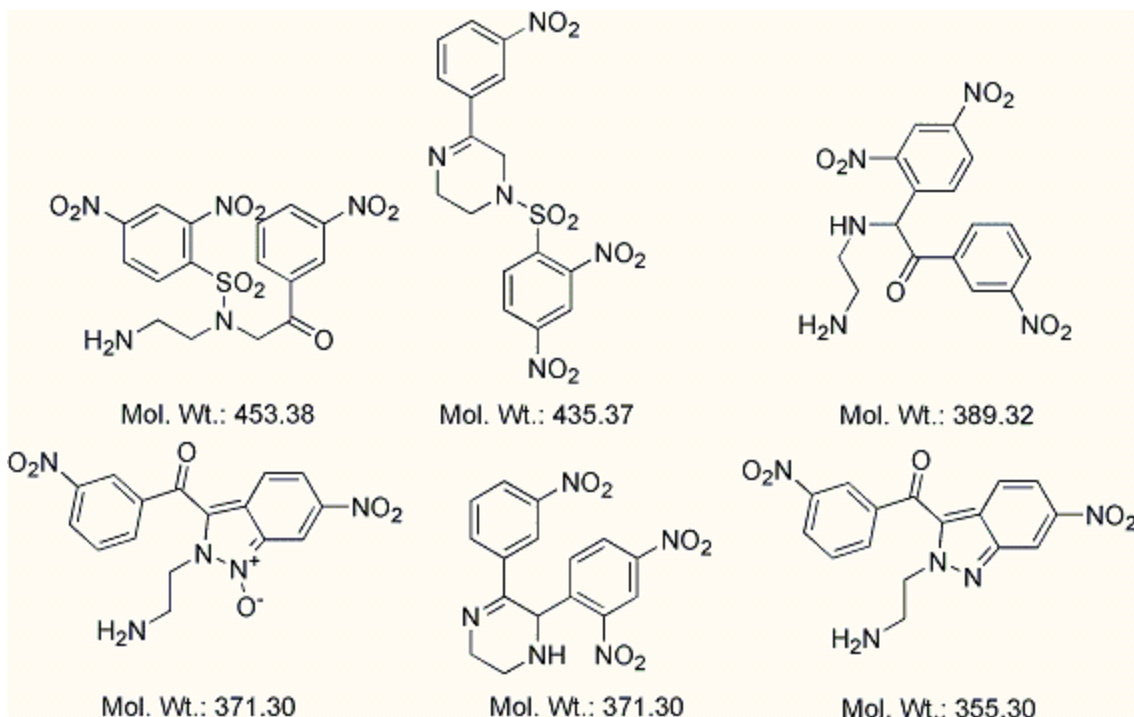
$[M-H]^- = 425,38; 407,36; 362,31; 344,3, 328,3$; čistota: 96% zastoupení uvedených hmot.



(obr. 12)

Meziprodukt 7(3,3)

$[M-H]^- = 452,38; 434,37; 389,32; 370,3; 354,3$; čistota: 97% zastoupení uvedených hmot.



(obr. 13)

5.3.4 Cyklizace za vzniku indazolového kruhu

Alkylovaná pryskyřice (7) byla bobtnána v DCM a promyta DMF. Byl přidán reakční roztok DBU (0,5mmol, 75 μ l) v 2,5ml DMF. Reakční směs byla třepána 30 minut, Reakční roztok byl vymyt a pryskyřice propláchnuta 5x DMF, 3x DCM, 3x MeOH a znovu 3x DCM (Schéma 21).

LC-MS analýza (viz Tabulka 3).

Tabulka 3

| Látka | [M-H] ⁻ | Čistota |
|--------|--------------------|---------|
| 8(1,1) | 276,32 | 91% |
| 8(1,2) | 312,35 | 84% |
| 8(2,2) | 380,35 | 91% |

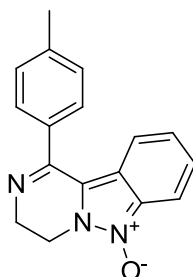
| | | |
|--------|--------|-----|
| 8(3,4) | 325,28 | 93% |
| 8(3,3) | 352,29 | 77% |

5.3.5 Odštěpení meziproductu a cyklizace dihydropyrazinového kruhu

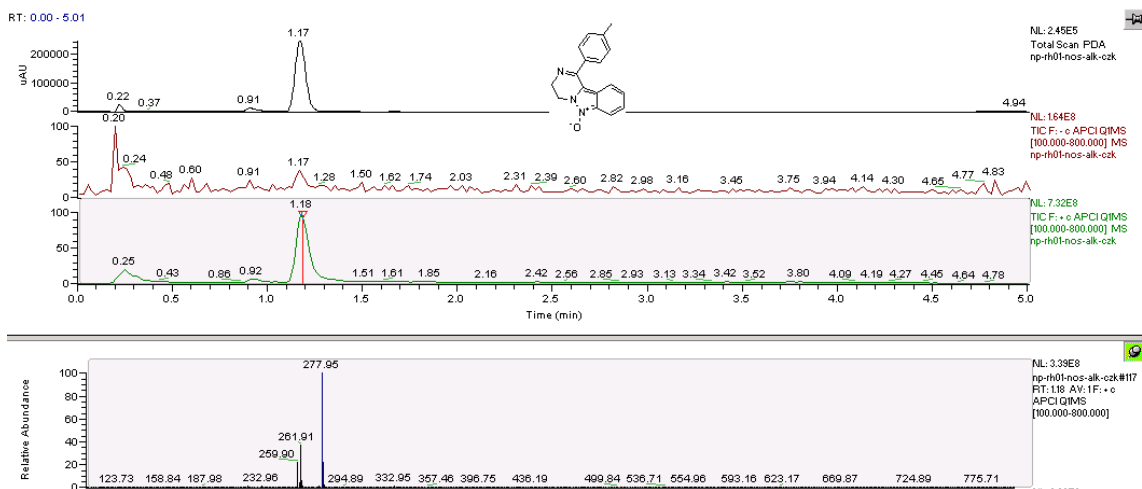
K pryskyřici (8) byla přidána štěpící směs 50% TFA v DCM (1ml). Směs byla třepána 1 hodinu na shakeru (Schéma 22). Po kvantitativním odštěpení produktu z pryskyřice byl roztok jímán do předem odvážených vialek. Připravené látky velice rychle cyklizují za vzniku finálních 3,4-dihydropyrazino[1,2-*b*]indazol-6-oxidů. Přebytek roztoku TFA je odpařen proudem dusíku. Zbývající rozpouštědlo je odstraněno na lyofilizátoru. Vialky byly znovu zváženy a z rozdílu hmotností byl spočítán výtěžek.

5.3.6 Charakterizace připravených látek

1-(*p*-tolyl)-3,4-dihydropyrazino[1,2-*b*]indazol-6-oxid 3(1,1)

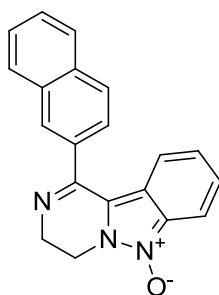


Výtěžek: 26,7 mg (88%). APCI-MS $m/z = 277,95$ $[M+H]^+$ (obr. 14). ^1H NMR (300 MHz, DMSO- d_6) $\delta = 7.73$ (d, $J = 8.6$ Hz, 1 H), 7.59 (d, $J = 8.1$ Hz, 2 H), 7.46 - 7.28 (m, 3 H), 7.25 - 7.16 (m, 1 H), 7.00 (d, $J = 8.6$ Hz, 1 H), 4.42 (t, $J = 6.6$ Hz, 2 H), 4.15 - 4.08 (m, 2 H), 2.42 (s, 3 H). ^{13}C NMR (75 MHz, DMSO- d_6) $\delta = 155.6, 140.1, 134.3, 129.0, 128.8, 128.4, 126.1, 125.9, 120.0, 114.8, 113.0, 110.0, 46.8, 37.3, 21.0$.

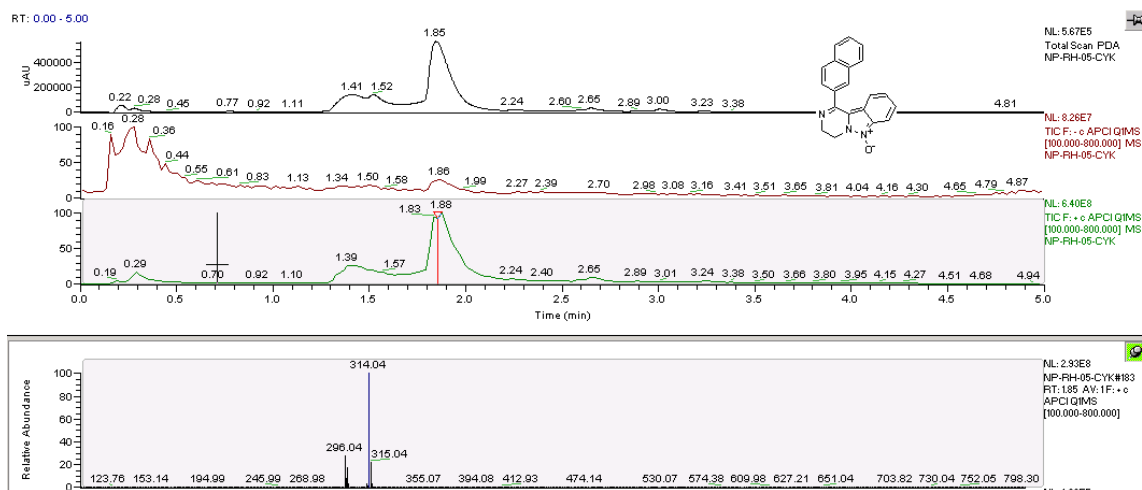


(obr. 14) LC-MS 3(1,1)

1-(naphthalen-2-yl)-3,4-dihydropyrazino[1,2-b]indazol-6-oxid 3(1,2)

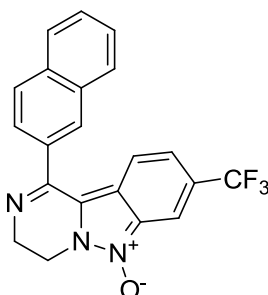


Výtěžek: produkt 3(1,2) nebyl štěpen z pryskyřice. APCI-MS $m/z = 314,04 [M+H]^+$
(obr. 15).

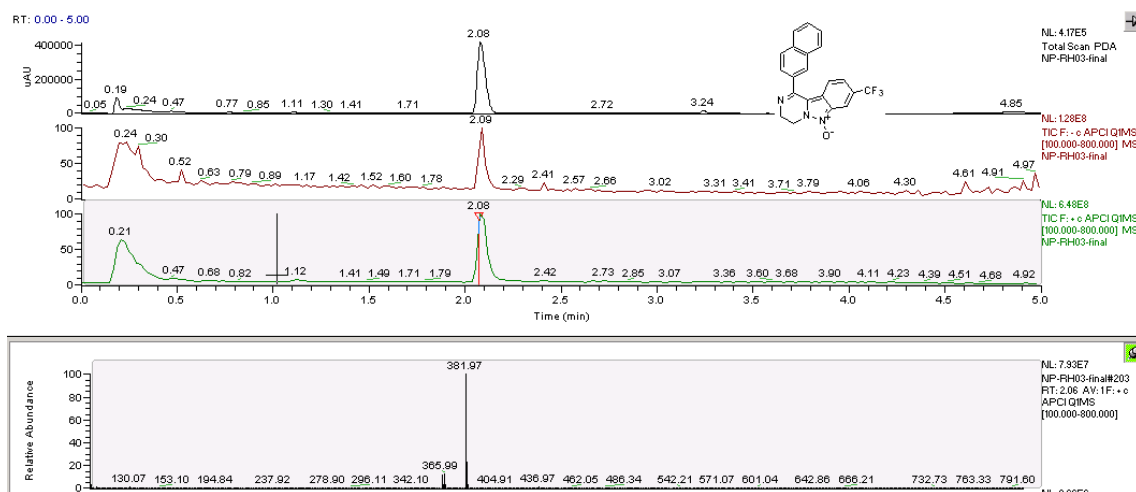


(obr. 15) LC-MS 3(1,2)

1-(naphthalen-2-yl)-8-(trifluoromethyl)-3,4-dihydropyrazino[1,2-*b*]indazol 6-oxid
3(2,2)

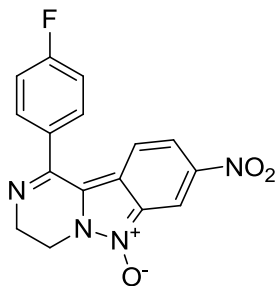


Výtěžek: 37,7 mg (67%). APCI-MS $m/z = 381,97 [M+H]^+$ (obr. 16). ^1H NMR (300 MHz, DMSO- d_6) $\delta = 8.54$ (s, 1 H), 8.46 (s, 1 H), 8.27 (d, $J = 8.6$ Hz, 1 H), 8.15 (d, $J = 8.2$ Hz, 2 H), 7.87 (d, $J = 7.5$ Hz, 1 H), 7.81 (d, $J = 1.0$ Hz, 1 H), 7.76 (t, $J = 1.0$ Hz, 1 H), 7.72 (t, $J = 1.0$ Hz, 1 H), 7.25 (d, $J = 9.0$ Hz, 1 H), 4.83 (br. t, $J = 1.0$ Hz, 2 H), 4.34 (br. t, $J = 1.0$ Hz, 2 H).

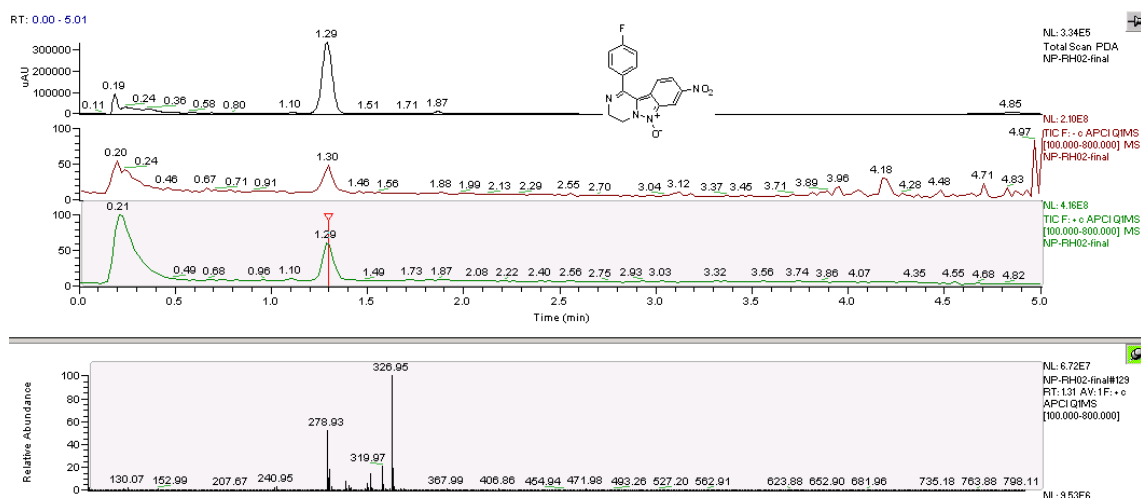


(obr. 16) LC-MS 3(2,2)

1-(4-fluorophenyl)-8-nitro-3,4-dihydropyrazino[1,2-*b*]indazol-6-oxid 3(3,4)

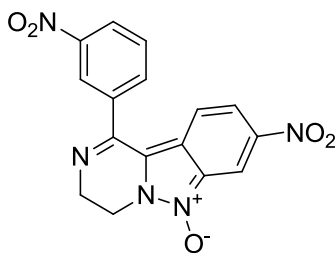


Výtěžek: 45,5 mg (93%). APCI-MS $m/z = 326,95$ $[M+H]^+$ (obr. 17).

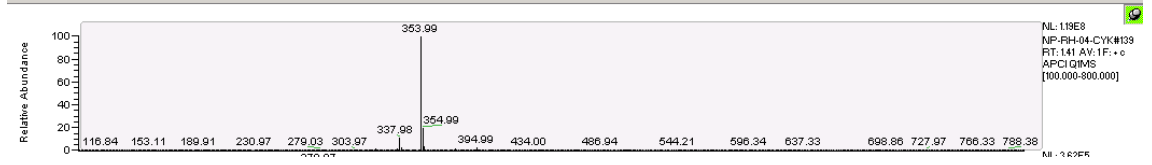
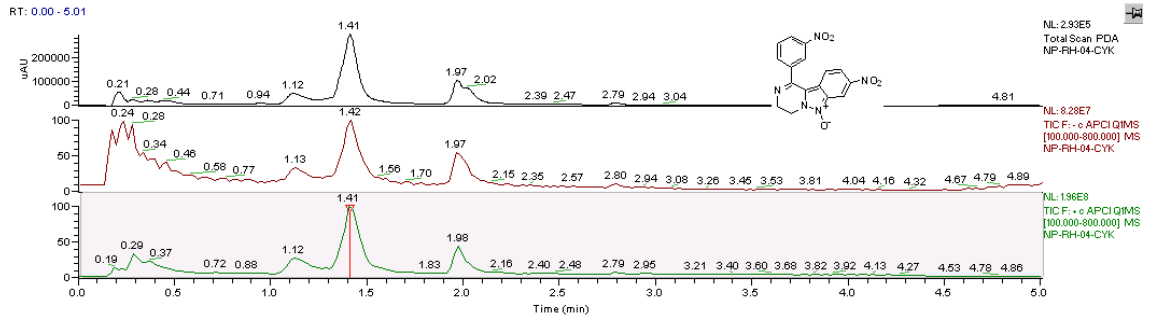


(obr. 17) LC-MS 3(3,4)

8-nitro-1-(3-nitrophenyl)-3,4-dihydropyrazino[1,2-*b*]indazol 6-oxid 3(3,3)



Výtěžek: 14,6 mg (75%). APCI-MS $m/z = 353,99$ $[M+H]^+$ (obr. 18).



(obr. 18) LC-MS 3(3,3)

6. Závěr

V rešeršní části předložené bakalářské práce byly popsány přípravy významných derivátů indolu a indazolu, jak v roztoku, tak i na pevné fázi. Dále je zmíněna biologická aktivita těchto derivátů indolu a indazolu. Následuje popis a princip Merrifieldovy syntézy, která byla zásadní pro rozvoj syntetických postupů s využitím polymerního nosiče. V návaznosti jsou zařazeny typy pryskyřic a linkerů užívané v syntéze na pevné fázi.

Hlavní náplň této práce, tedy syntéza nových derivátů 3,4-dihydropyrazino[1,2-*b*]indazol-6-oxidů, je podrobně rozebrána v části výsledky a diskuze.

Po navázání 1,2-diaminoethanu na pryskyřici byla provedena reakce s různě substituovanými 2-nitrobenzensulfonyl chloridy. Pryskyřice s takto imobilizovaným intermediátem byla následně alkylována bromketony. Takto připravené látky byly posléze cyklizovány za pomoci DBU, kdy dojde k uzavření indazolového kruhu. Cyklizované produkty byly odštěpeny z pryskyřice působením 50% TFA v DCM, kdy následně dochází ke kondenzaci finálních dihydropyrazinoindazolů.

Experimentální část je věnována výsledkům laboratorní práce, zahrnuje navážky a objemy použitých reaktantů a rozpouštědel pro jednotlivé reakce, výsledky analýz intermediátů i finálních produktů na LC-MS a výtěžky syntéz spočtené po izolaci finálních produktů.

Syntézou na pevné fázi bylo připraveno 5 látek, z toho 4 jako nové deriváty. Všechny připravené 3,4-dihydropyrazino[1,2-*b*]indazol-6-oxidy byly analyzovány pomocí LC-MS. Některé z nich pak byly charakterizovány i nukleární magnetickou rezonancí.

7. Literatura

1. Pudelová, N.; Krchňák, V. *Journal of Combinatorial Chemistry* **2009**, 11(3), 370-374
2. Kočí, J.; Krchňák, V. *Journal of Combinatorial Chemistry* **2010**, 12 (1), pp 168–175
3. Rogers, Crosby U.; Corson, B. B.; *Journal of the American Chemical Society* **1947**, 69, pp 2910-11
4. Jones, Morton E.; Hedberg, Kenneth; Schomaker, Verner; *Journal of the American Chemical Society* **1953**, 75, p 4116
5. Pantyukhin, A. A.; Pershina, N. N.; Mikhailovskii, A. G.; Vikhareva, E. V.; Aleksandrova, G. A.; Krylova, I. O.; Makhmudov, R. R, Russia **2012**, RU 2469027 C2 20121210
6. Farooqui, Mazahar; Ali, Nasir Ali Shafakat; Zaheer, Zahed; Rahman, Zia Ur; Khan, Ashpaq, *International Journal of Drug Design and Discovery* **2010**, 1(4), pp 314-324
7. Stephenson, Emily F. M., *Organic Syntheses* **1949**, 29
8. Zhu, Yong-Ming; Qin, Lie-Na; Liu, Rui; Ji, Shun-Jun; Katayama, Hajime; *Tetrahedron Letters* **2007**, 48(36), pp 6262-66
9. Hang, Chenchen; Li, Qiulian; Zhu, Yongming; Katayama, Hajime; *Synthetic Communications* **2011**, 41(22), pp 3318-24
10. Bonjoch, Josep; Diaba, Faiza; Pages, Lluís; Perez, Daniel; Soca, Lidia; Miralpeix, Montserrat; Vilella, Dolors; Anton, Paquita; Puig, Carles; *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* **2009**, 19(15), pp 4299-4302
11. Ennis, Michael D.; Hoffman, Robert L.; Ghazal, Nabil B.; Olson, Rebecca M.; Knauer, Christopher S.; Chio, Chris L.; Hyslop, Deborah K.; Campbell, Jeffery E.; Fitzgerald, Lawrence W.; Nichols, Nanette F.; Svensson, Kjell A.; McCall, Robert B.; Haber, Christopher L.; Kagey, Michelle L.; Dinh, Dac M., *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* **2003**, 13(14), pp 2369-2372
12. Pereira, Claudio M. P.; Stefani, Helio A.; Guzen, Karla P.; Orfao, Aline T. G., *Letters in Organic Chemistry* **2007**, 4(1), pp 43-46
13. Zimmermann, Viktor; Avemaria, Frank; Brase, Stefan; *Journal of Combinatorial Chemistry* **2007**, 9(2), pp 200-203

14. Dupas, Georges; Duflos, Jack; Queguiner, Guy; *Journal of Heterocyclic Chemistry* **1980**, 17(1), pp 93-96
15. Thangadurai, Ananda; Minu, Maninder; Wakode, Sharad; Agrawal, Shyam; Narasimhan, Balasubramanian; *Medicinal Chemistry Research* **2012**; 21 (7); pp 1509-1523
16. Bachurin, S. O.; Voronina, T. A.; Garibova, T. L.; Grigor'ev, V. V.; Russia, RU 2338533, 2007
17. Lopez-Vallejo, Fabian; Castillo, Rafael; Yopez-Mulia, Lilian; Medina-Franco, Jose L.; *Journal of Biomolecular Screening* **2011**, 16(8), pp 862-868
18. Kong, Qingzhong; Sun, Juan; Kong, Qingxin; Su, Hongqing; Sun, Jing; Shandong Lanjin Biotech Co., Ltd., Peop. Rep. China, CN 1679945, 2005
19. Bachurin, Sergey Olegovitch; Grigoriev, Vladimir Viktorovich; Medivation, Inc., USA, WO 2005055951, 2005
20. Ennis, Michael Dalton; Hoffman, Robert Louis; Ghazal, Nabil B.; Olson, Rebecca M.; Pharmacia & Upjohn Co., USA; WO 2001072752, 2001
21. Monge, A.; Parrado, P.; Fernandez-Alvarez, E.; Font, M.; *Anales de la Real Academia de Farmacia* **1986**, 52(3), pp 465-480
22. Merrifield, R. B. , *Journal of the American Chemical Society* **1963**, 85 (14) , pp 2149-54
23. Bodanszky, M.; Sheehan, J. T. ; *Chemistry & Industry* 1964, 32, pp 1423-24
24. Rothe, M.; Schneider, Hj., *Angewandte Chemie*, International Edition in English **1966**, 5(4), p 417
25. Klostermeyer, H.; Halstrom, J.; Kusch, P.; Foehles, J.; Lunkenheimer, W. Peptides, Proceedings of the European Peptide Symposium **1967**, pp 113-116
26. Kusama, Tsuneo; Hayatsu, Hikoya, *Chemical & Pharmaceutical Bulletin* **1970**, 18(2), pp 319-27
27. Leznoff, Clifford C.; Wong, Jack Y., *Canadian Journal of Chemistry* 1972, 50(17), pp 2892-94
28. Scott, Peter; *Linker Strategies in Solid-Phase Organic Synthesis*; 1. vydání; 2009; ISBN 978-0-470-51116-9 - John Wiley & Sons

8. Použité zkratky

| | |
|----------|-----------------------------------|
| 2-Nos-Cl | 2-nitrobenzensulfonyl chlorid |
| CDI | karbonyldiimidazol |
| DBU | 1,8-diazabicyclo[5.4.0]undec-7-en |
| DCM | dichlormethan |
| DIEA | diisopropylethylamin |
| DMF | N,N-dimethylformamid |
| TFA | kyselina trifluoroctová |