

UNIVERZITA PALACKÉHO V OLOMOUCI

Přírodovědecká fakulta

Katedra organické chemie



**Vývoj metody přípravy derivátů
imidazo[4',5':4,5]benzo[1,2-e][1,4]diazepin-9(3H)-onu
pomocí syntézy na pevné fázi**

Vypracoval:

Miroslav Škrobánek

Vedoucí diplomové práce:

doc. RNDr. Miroslav Sural, Ph.D.

Studijní obor:

Bioorganická chemie

Olomouc 2014

Prohlašuji, že jsem předloženou diplomovou práci vypracoval samostatně a čerpal jen z pramenů, které cituji a uvádím v seznamu použité literatury.

V Olomouci 1. května 2014

Miroslav Škrobánek

Upřímné poděkování všem pracovníkům Katedry organické chemie PřF UP v Olomouci, především doc. RNDr. Miroslavovi Suralovi, Ph. D. za odborné vedení, cenné rady a připomínky, které mi při plnění zadaného úkolu poskytl.

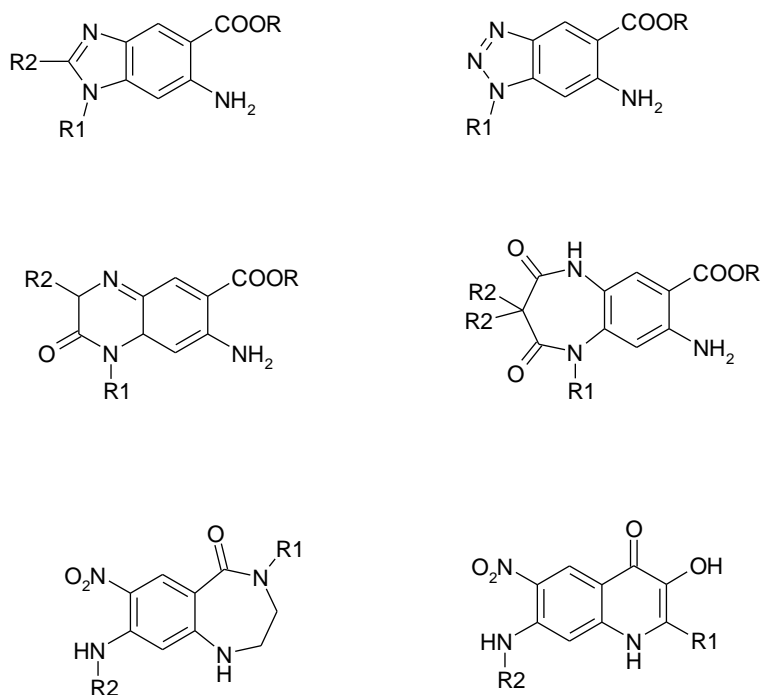
1	ÚVOD	1
2	CÍL PRÁCE	2
3	TEORETICKÁ ČÁST	3
3.1	Využití kyseliny 2-fluor-4-chlor-5-nitrobenzoové k přípravě heterocyklických sloučenin	3
3.2	Způsoby přípravy derivátů benzimidazolů	7
3.3	Biologická aktivita derivátů benzimidazolů	14
3.4	Příprava vybraných derivátů 1,2,3,4-tetrahydro-5H-1,4-benzodiazepin-5-onů	18
3.5	Biologická aktivita derivátů 1,2,3,4-tetrahydro-5H-1,4-benzodiazepin-5-onů	23
3.6	Vybraná analoga cílových bisheterocyklických sloučenin	25
4	VÝSLEDKY A DISKUSE	29
5	EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST	41
6	ZÁVĚR	45
7	SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK	47
8	LITERATURA	48

1. ÚVOD

Kyselina 2-fluor-4-chlor-5-nitrobenzoová představuje velmi výhodnou výchozí sloučeninu pro chemické transformace nejrůznějšího typu. Kromě nukleofilní substituce v polohách 2 a 4 je možno modifikovat také karboxylovou skupinu či redukovat a dále modifikovat nitroskupinu v poloze č. 5. Navzdory tomuto potenciálu byla 2-fluor-4-chlor-5-nitrobenzoová kyselina využita v chemickém výzkumu jen velice zřídka, přestože se jedná o komerčně velmi dobře dostupnou chemikálii.

Volbou vhodných reaktantů lze výše uvedené typy reakcí použít pro výstavbu heterocyklických skeletů různého typu. Tyto heterocykly mohou být generovány buďto transformací nitro-chloro seskupení nebo karboxy-fluoro seskupení. V několika ojedinělých pracích byla popsána výstavba 5-7 členných cyklů (Obr.1). Příprava bisheterocyklických sloučenin, tj. skeletů obsahujících dva heterocykly zároveň, byla v literatuře popsána pouze jednou (viz. rešeršní část). Předložená práce je zaměřena na rozpracování této metodiky, přičemž volně navazuje na předchozí bakalářskou práci.

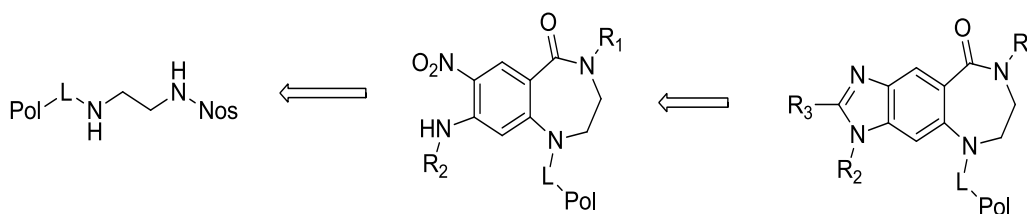
Obrázek 1: Některé typy heterocyklů připravené z 2-fluor-4-chlor-5-nitrobenzoové kyseliny jako výchozí látky



2. CÍL PRÁCE

Cílem této práce je vývoj syntézy nových bisheterocyklických derivátů z kyseliny 2-fluor-4-chlor-5-nitrobenzoové pomocí syntézy na pevné fázi. Jako výchozí látka byl použit vhodně chráněný ethylendiamin imobilizovaný na aminomethylovou pryskyřici s navázaným kyselé labilním linkerem benzaldehydového typu (4-(4-formyl-3-methoxyfenoxy)másečná kyselina). Schema 1 ukazuje retrosyntetický postup přípravy benzodiazepinového intermediátu, jehož příprava byla v literatuře nedávno popsána a jehož syntéza je součástí této práce. Následnou transformací pak měl být připraven imidazolový cyklus na opačné straně molekuly vedoucí k cílovým tricyklickým sloučeninám.

Schema 1: retrosyntetický postup přípravy cílových derivátů



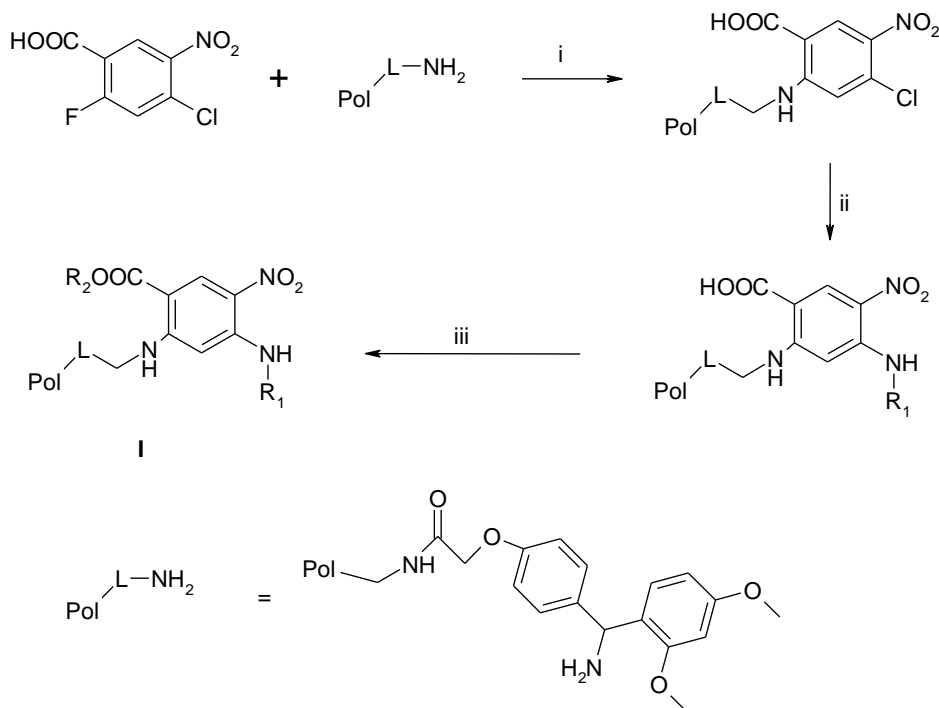
Cílem práce bylo ověření reakčních podmínek pro modelové výchozí látky, optimalizace jednotlivých reakčních kroků, příprava a izolace několika cílových sloučenin a jejich plná charakterizace.

3. TEORETICKÁ ČÁST

3.1. Využití kyseliny 2-fluor-4-chlor-5-nitrobenzoové k přípravě heterocyklických sloučenin

Jedním z faktorů umožňujícím použití této kyseliny k tvorbě heterocyklů je její komerční dostupnost. V literatuře je popsána metoda využívající kyselinu 2-fluor-4-chlor-5-nitrobenzoovou k přípravě dusíkatých heterocyklů s proměnlivou velikostí cyklu. Strategie je založena na syntéze intermediátu **I** pomocí syntézy na pevné fázi, přičemž je použit kyselý labilní linker¹.

Schema 1: příprava intermediátu **I** pomocí kyseliny 2-fluor-4-chlor-5-nitrobenzoové



R₁ = propyl, benzyl, cyklohexyl

R₂ = H, C₆H₅CH₂, C₆H₅COCH₂

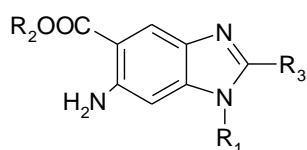
(i) 2-fluor-4-chlor-5-nitrobenzoová kyselina, DMSO, DIEA

(ii) amin, DMSO

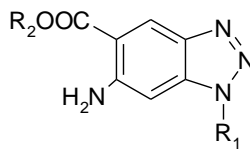
(iii) 2-bromacetofenon, TEA, DMF nebo benzylbromid, DIEA, DMF

Z intermediátu **I** byla dále uvedena příprava benzimidazolů, benzotriazolů, chinoxalinonů a benzodiazepindionů, viz schema 2.

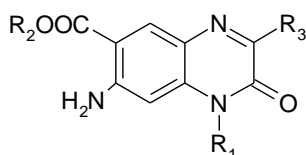
Schema 2: souhrn typů derivátů připravených z intermediátu **1**



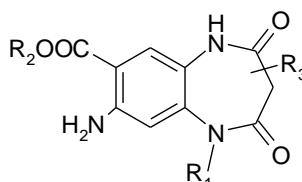
Benzimidazoly



Benztriazoly



Chinoxaliny

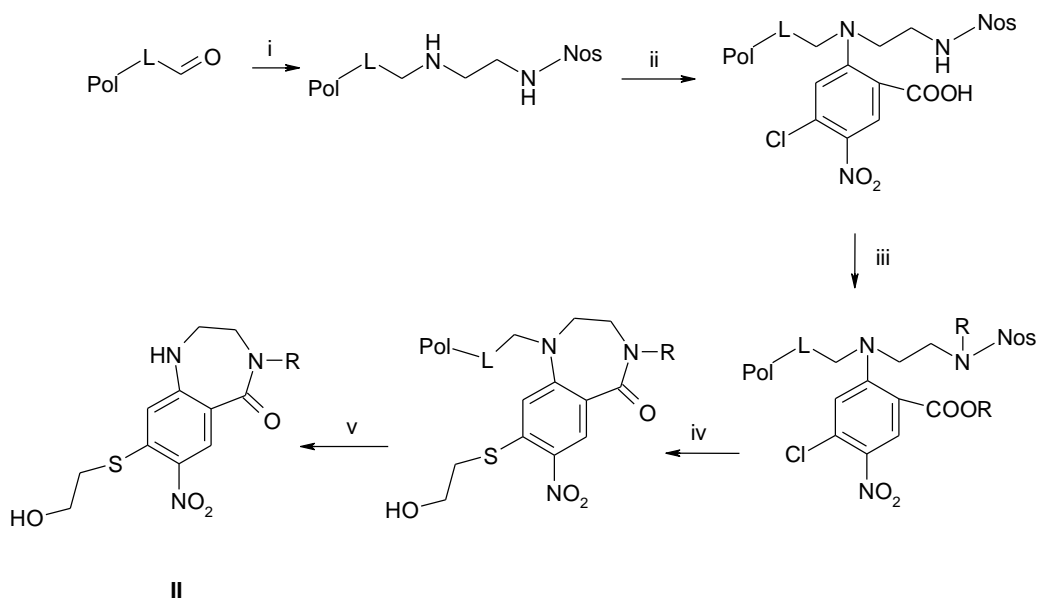


Benzodiazepindiony

Další práce popisuje přípravu derivátů 4,7,8-trisubstituovaných-1,2,3,4-tetrahydrobenzo[e][1,4]diazepin-5-onů vznikajících opět z kyseliny 2-fluor-4-chlor-5-nitrobenzoové². Tyto sloučeniny vznikají modifikací „nitro-chlor strany“ a „karboxy-fluor strany“ výše uvedené kyseliny.

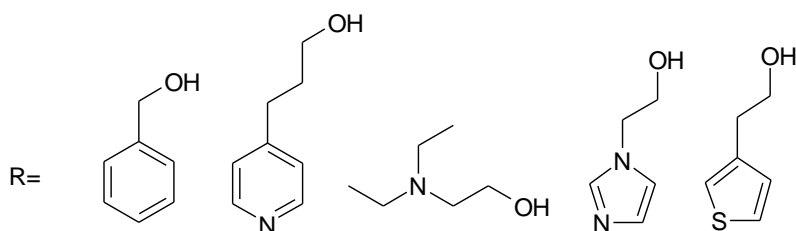
Příprava těchto derivátů s využitím syntézy na pevné fázi spočívala v navázání *N*-(2-aminoethyl)-2-nitrobenzenesulfonamidu (takzvaný „nosylovaný ethylendiamin“) na polystyrenovou pryskyřici (i), následovalo navázání kyseliny 2-fluor-4-chlor-5-nitrobenzoové (ii), po té bylo využito Mitsunobu reakce (iii). Použité alkoholy pro Mitsunobu reakci jsou uvedeny ve schématu 4. Po Mitsunobu reakci byla provedena deprotektace aminoskupiny, při které docházelo zároveň k nukleofilní substituci výměnou atomu chloru za thioalkohol (iv). Sedmičlenný kruh byl poté spontánně uzavřen a kyselinou trifluoroctovou následně došlo k odštěpení intermediátu **II** z polymerního nosiče. Vše naznačuje schéma 3.

Schema 3: příprava heterocyklů **II**



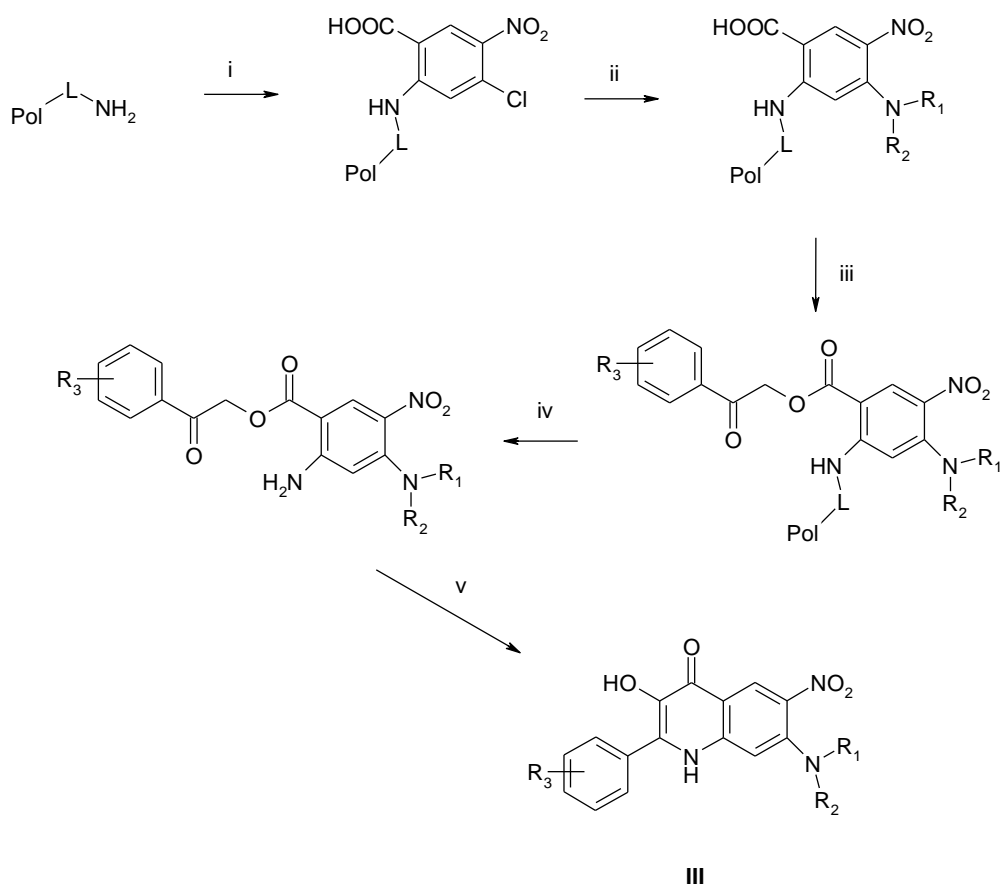
- (i) N-(2-aminoethyl)-2-nitrobenzenesulfonamid, AcOH v DMF, potom NaBH(OAc)₃
(ii) 2-fluor-4-chlor-5-nitrobenzoová kyselina, DIEA, DMSO
(iii) alkohol, DIAD, PPh₃, bezvodý THF
(iv) merkaptoethanol, DBU, DMF
(v) TFA v DMF

Schema 4: použité alkoholy pro Mitsunobu reakci



Z kyseliny 2-fluor-4-chlor-5-nitrobenzoové byla také popsána příprava 3-hydroxy-6-nitrochinolin-4(1*H*)-onů opět pomocí syntézy na pevné fázi. Prvním krokem je reakce kyseliny 2-fluor-4-chlor-5-nitrobenzoové na polystyrenovou pryskyřici s navázaným aminem (i). Následně se provede substituce nukleofilní na atomu chloru vhodným aminem (ii) a potom dojde k esterifikaci karboxylové skupiny pomocí bromoketonu (iii). Vzniklý meziprodukt je odštěpen z pryskyřice s využitím kyseliny trifluoroctové (iv) a dále pak dochází k cyklizaci v prostředí kyseliny sírové (v) za vzniku cílových hydroxychinolinonů **III**. Sled reakcí je uveden na schématu 5.

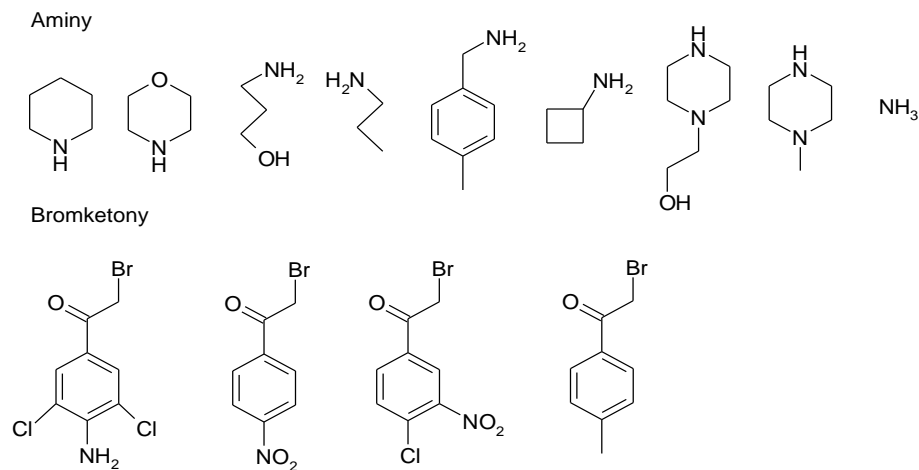
Schema 5: příprava 3-hydroxy-6-nitrochinolin-4(1*H*)-onů



- (i) 2-fluor-4-chlor-5-nitrobenzoová kyselina, DMSO, DIEA
(ii) amin, DMSO
(iii) bromketon, TEA, DMF
(iv) TFA, DCM
(v) H₂SO₄

Aminy použité pro substituci nukleofilní (výměna atomu chloru) jsou uvedeny spolu s bromoketony využitými pro esterifikaci imobilizované kyseliny ve schématu 6.

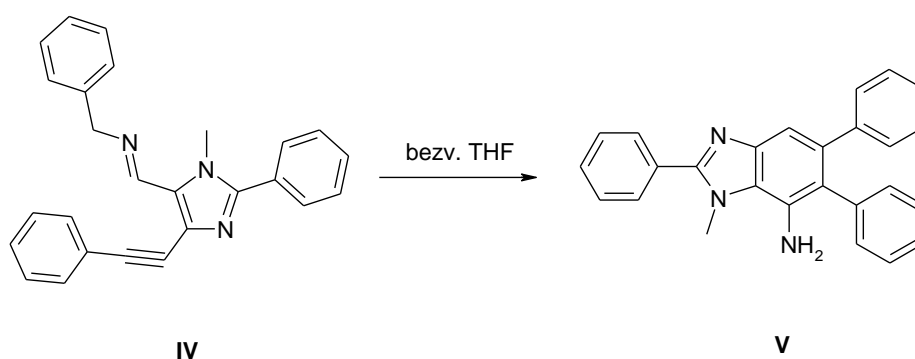
Schema 6: Aminy a bromoketony využité v přípravě derivátů hydroxychinolinů



3.2. Způsoby přípravy derivátů benzimidazolů

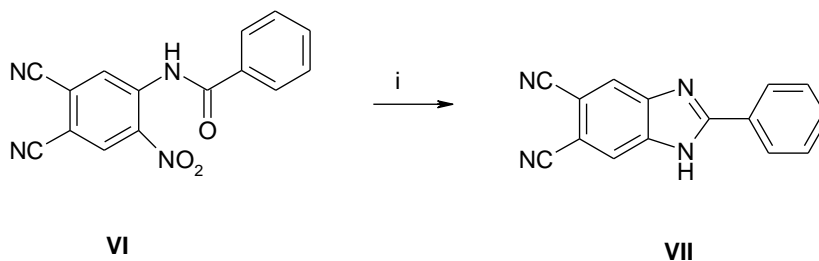
Benzimidazoly jsou heterocyklické sloučeniny skládající se z benzenového jádra, na které je přikondenzován imidazol. Jednou z mnoha syntetických cest vedoucích k derivátům benzimidazolů je příprava ze sloučeniny **IV**, reakce je uvedena na schématu 7. Touto reakcí vzniká benzimidazol **V**⁴⁾.

Schema 7: příprava sloučeniny **V**



Další deriváty benzimidazolů byly připraveny během studia kovových komplexů ftalokyaninových strukturálních analogů. Schema 8 ukazuje jednoduchou redukci nitroskupiny za pomoci chloridu cínatého v koncentrované kyselině chlorovodíkové, přičemž vznikne z 4-benzoylamino-5-nitroftalodinitrilu **VI** 2-fenylbenzimidazol-5,6-dikarbonitril **VII**⁵⁾.

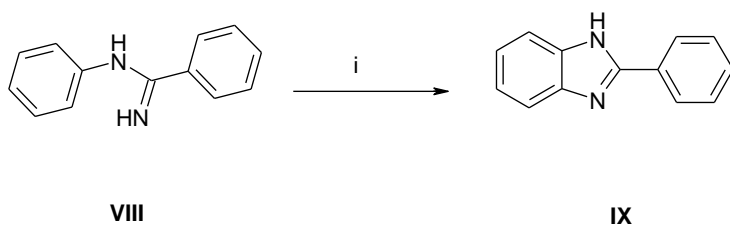
Schema 8: redukce chloridem cínatým a cyklizace



(i) SnCl_2 v HCl, potom T

Způsob jak připravit další deriváty benzimidazolů byl vyvinut za použití palladnatých solí katalyzující intramolekulární aktivaci. Začíná se ze snadno dostupného *N*-fenylobenzimidamidu **VIII** jako prekursoru, který vzniká z anilinu a nitrilu kyseliny benzoové. V reakci je použit komplex palladia. Při reakci tedy vzniká sloučenina **IX** z *N*-fenylobenzimidamidu⁶⁾. Uvedeno na schématu 9.

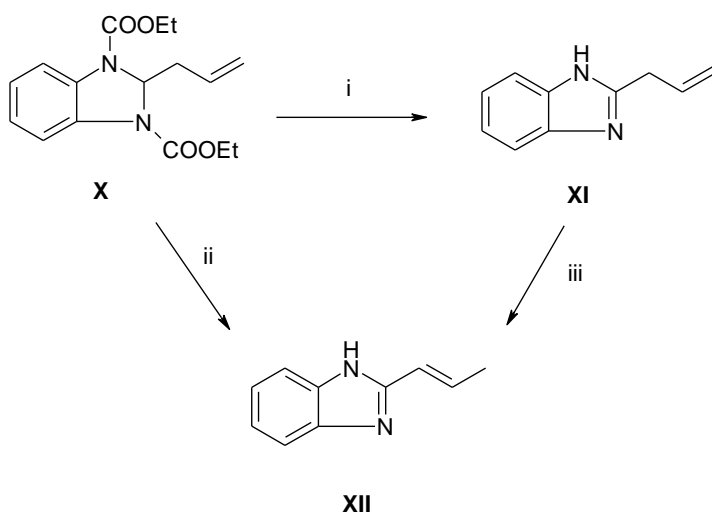
Schema 9: reakce *N*-fenylobenzimidamidu



(i) $[\text{PdCl}_2(\text{PhCN})_2]$, bezvodý $\text{Cu}(\text{OAc})_2$, TMTU, NMP

Další příprava vybraných derivátů benzimidazolů spočívá v reakci intermediátu **X**. Reakční směs poskytuje sloučeninu **XI**. Jiné reakční podmínky dávají vzniku sloučenině **XII** z intermediátu **XI**. Nutno podotknout, že sloučenina **XII** může také vznikat ze sloučeniny **XI**, a to působením zvýšené teploty⁷. Reakce jsou uvedeny na schématu 10.

Schema 10: schema přípravy sloučenin **XI** a **XII**



(i) KOH , $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$, H_2O -dioxan, 20°C
(ii) KOH , $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$, H_2O -dioxan, reflux
(iii) teplota

Další metodou k získání benzimidazolů je příprava benzimidazolů **XIII**, **XIV**, **XIX** a **XXI**⁸⁾. K přípravě těchto sloučenin se vychází ze 4 metod přípravy označených A-D.

Metoda A je založena na cyklokondenzaci *o*-fenyldiaminu s bromyanem, která dává vzniku benzimidazolu **XIII**.

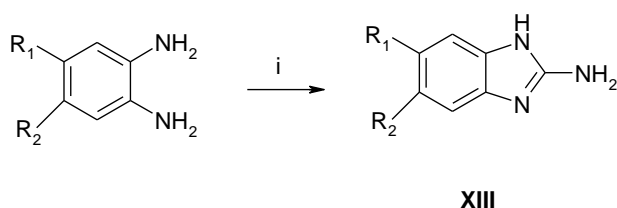
Pro přípravu benzimidazolů metodou B se vychází z 2-nitroanilinu a tříkrokovou syntézou se dojde k benzimidazolu **XIV**. Metodu A i B znázorňuje schema 11.

V metodě C se využívá cyklokondenzace *o*-fenyldiaminu s intermediátem **XV** za vzniku intermediátu **XVI**.

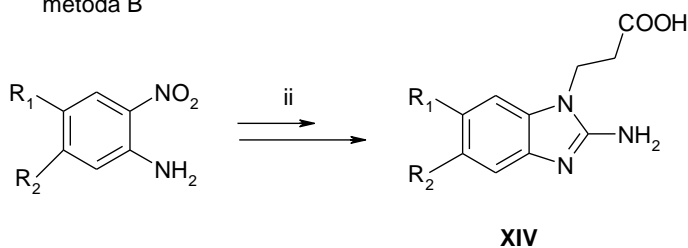
Metoda D je založena na podobném principu. Začíná se z intermediátu **XVII**, který musí být nejprve zredukován pomocí vodíku a pak se následně provede kondenzační reakce s intermediátem **XV** za vzniku intermediátu **XVIII**. Ve schématu 12 je uvedena metoda C spolu s metodou D.

Schema 11: metoda A i B vedoucí k benzimidazolům **XIII** a **XIV**

metoda A



metoda B



$R_1 = \text{H}, \text{CH}_3\text{O}-, \text{CH}_3\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{O}-, i\text{-C}_3\text{H}_7\text{O}-$

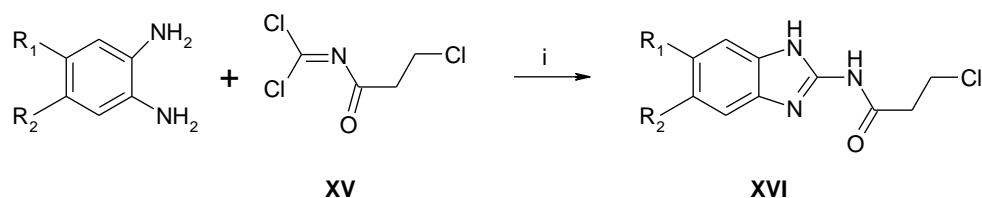
$R_2 = \text{H}, \text{CH}_3\text{O}-, \text{CH}_3\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{O}-, i\text{-C}_3\text{H}_7\text{O}-, \text{CF}_3-, \text{CH}_3\text{OOC}-$

(i) CNBr

(ii) H_2/Ni , CNBr, alkyl akrylát

Schema 12: metoda C a D vedoucí k benzimidazolům XVI a XVIII

Metoda C

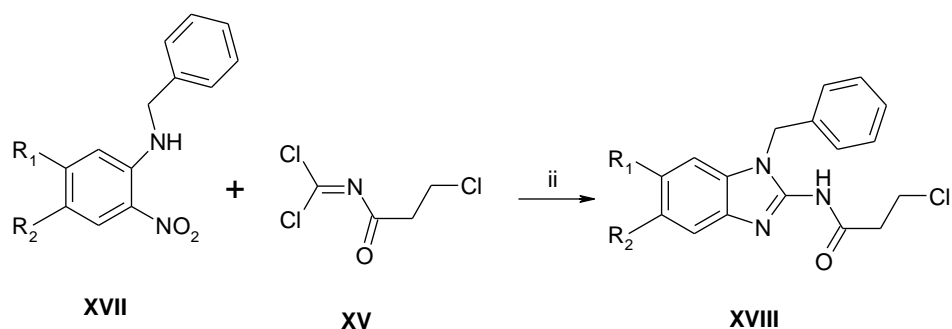


$R_1 = \text{H}, \text{CH}_3\text{O}-, \text{CH}_3\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{O}-, i\text{-C}_3\text{H}_7\text{O}-$

$R_2 = \text{H}, \text{CH}_3\text{O}-, \text{CH}_3\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{O}-, i\text{-C}_3\text{H}_7\text{O}-, \text{CF}_3-, \text{CH}_3\text{OOC}-$

(i) TEA, THF

Metoda D



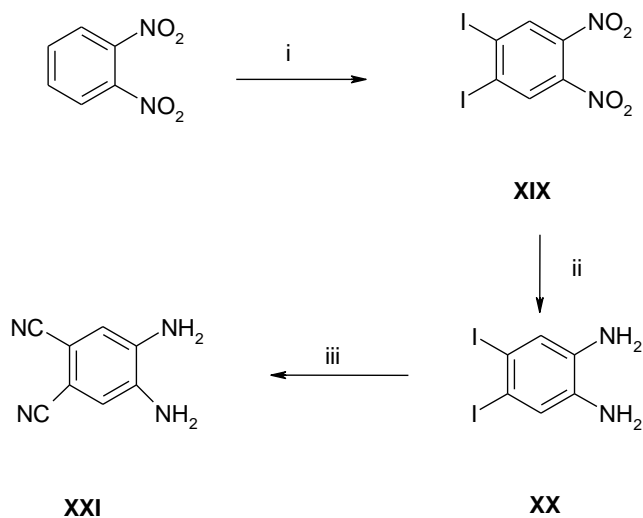
$R_1 = \text{H}, \text{CH}_3\text{O}-, \text{CH}_3\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{O}-, i\text{-C}_3\text{H}_7\text{O}-$

$R_2 = \text{H}, \text{CH}_3\text{O}-, \text{CH}_3\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{O}-, i\text{-C}_3\text{H}_7\text{O}-, \text{CF}_3-, \text{CH}_3\text{OOC}-$

(ii) H_2/Ni , THF, TEA

Další metoda přípravy benzimidazolů využívá jako výchozí látku 1,2-dinitrobenzen, ze které se nasyntetizuje cílový 2-alkyl-5,6-dikyanobenzimidazol **XXII**⁹⁾. 1,2-dinitrobenzen reaguje jodací za vzniku jodovaného intermediátu **XIX**. Jodovaný meziprodukt **XIX** se zredukuje. Po redukci nitroskupin u intermediátu **XIX** vzniká intermediát **XX**, který kyanizací dále reaguje za vzniku intermediátu **XXI**. Sled reakcí je znázorněn na schématu 13.

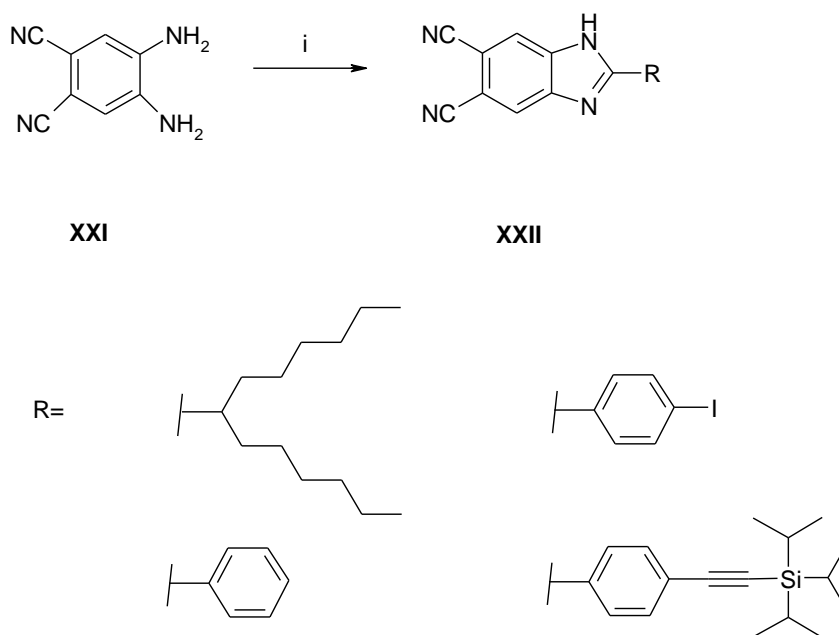
Schema 13: příprava meziprojektu **XXI**



- (i) I₂, H₂SO₄
- (ii) Fe, HCl, Ethanol
- (iii) CuCN, NMP

Meziprojekt **XXI** reaguje cyklizační reakcí s vybranými aldehydy za vzniku substituovaných benzimidazolů **XXII**. Přípravu konečných 2-alkyl-1-propyl-5,6-dikyanobenzimidazolů ukazuje schema 14.

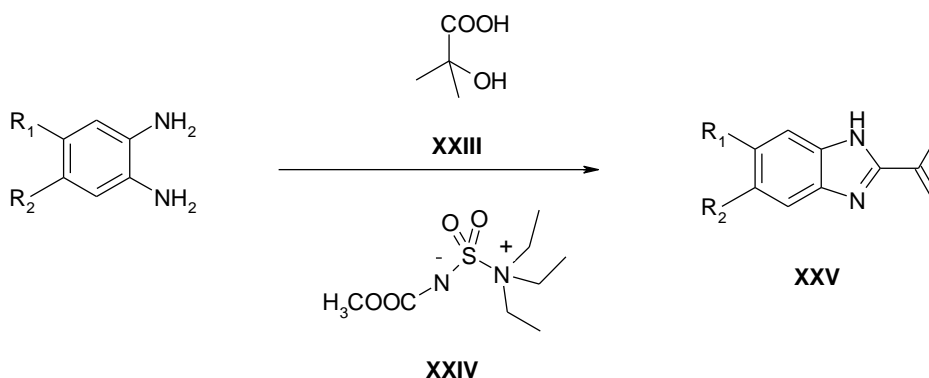
Schema 14: příprava 2-alkyl-1-propyl-5,6-dikyanobenzimidazolů



- (i) R-CHO, FeCl₃, O₂, NMP nebo pentanol

Jednou z dalších možných příprav derivátů benzimidazolů může být cyklizační reakce, kdy se místo aldehydu použije 2-hydroxyisomáselná kyselina **XXIII** a jako dehydratační činidlo se zde využilo tzv. Burgessovo činidlo, neboli methyl *N*-(triethylammoniumsulfonyl)karbamát **XXIV**. Z této reakce vzniká benzimidazol **XXV**¹⁰, jak je uvedeno na schematu 15.

Schema 15: příprava benzimidazolu **XXV**

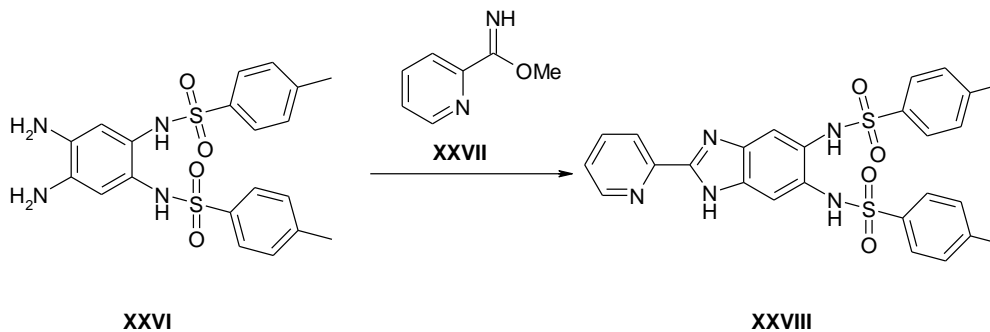


XXVa - $\text{R}_1 = \text{CN}$, $\text{R}_2 = \text{CF}_3$

XXVb - $\text{R}_1 = \text{R}_2 = \text{Cl}$

Další práce popisuje přípravu vznik ligandů pro ruthenaté komplexy¹¹). Tyto ligandy obsahují ve své struktuře benzimidazolový základ. Jako výchozí látky pro výše uvedené ligandy je využito tosylovaného intermediátu **XXVI**, který poskytuje s intermediátem **XXVII** cyklizační reakcí benzimidazol **XXVIII**, který je uveden na schematu 16.

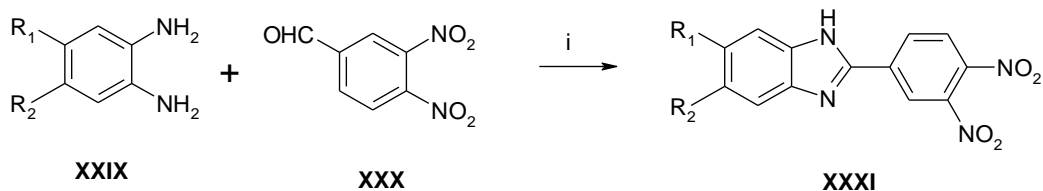
Schema 16: příprava tosylovaného benzimidazolu **XXVIII**



Byly připraveny také deriváty benzimidazolů, které se podílejí jako inhibitory topoisomerázy I¹²). Tyto deriváty se připravují klasickou kondenzací

aldehydů se substituovanými *o*-fenylendiaminy. Jako výchozí látky byl využit *o*-fenylendiamin **XXIX** reagující s aldehydem **XXX** za vzniku benzimidazolu **XXXI**.

Schema 17: vznik benzimidazolu XXXI



$\text{R}_1 = \text{Br}, \text{p-Cl-fenyl}$

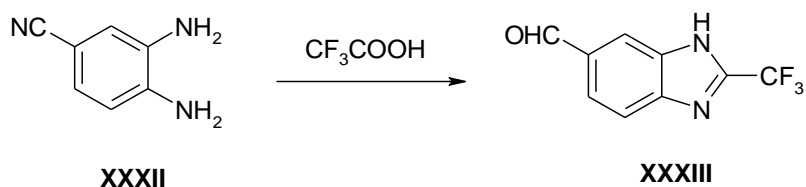
$\text{R}_2 = \text{H}, \text{Br}$

$\text{R}_3 = \text{OH}, \text{n-propyl}, \text{CF}_3, \text{Cl}$

(i) nitrobenzen

Další reakcí kdy vznikají deriváty benzimidazolů je reakce intermediátu **XXXII** s kyselinou trifluoroctovou za vzniku benzimidazolu **XXXIII**. Reakce je uvedena na schématu 18.

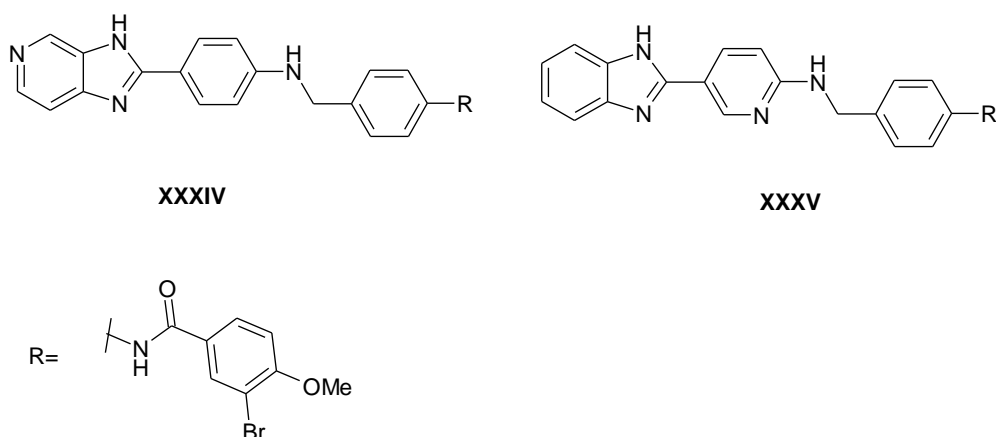
Schema 18: vznik benzimidazolu XXXIII



3.3. Biologická aktivita derivátů benzimidazolů

Rozmanitost biologické aktivity derivátů benzimidazolů je v literatuře popsána z důvodu intenzivních studií této skupiny látek. Vybrané benzimidazoly byly klasifikovány např. jako inhibitory heparanasy. Heparanasa je enzym, který degraduje heparansulfát v extracelulární matrix a bazální membráně. Podílí se na invazi nádorových buněk, angiogenezi a jiných fyziologických a patologických procesech. Mezi těmito deriváty jsou sloučeniny **XXXIV** a **XXXV**. IC₅₀ u sloučeniny **XXXIV** je 0,93 μM a u sloučeniny **XXXV** 0,29 μM¹³⁾. Sloučeniny **XXXIV** a **XXXV** jsou uvedeny na schématu 19.

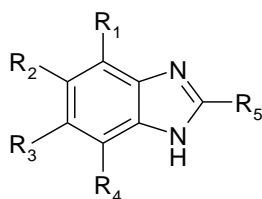
Schema 19: sloučeniny **XXXIV** a **XXXV**



Další deriváty benzimidazolů vykazovaly antiprotozoální a protinádorovou aktivitu. Antiprotozoální aktivita byla zaměřena na *Giardia intestinalis*, *Entamoeba histolytica* a *Trichomonas vaginalis*. Antiprotozoální aktivita se týkala všech testovaných sloučenin **XXVI**. Protinádorová aktivita byla zjištěna u 5,6-dichlor-2-pentafluorethylbenzimidazolu **XXXVII**, a to zejména proti nádorovým buněčným liniím prsu a prostaty¹⁴⁾. Sloučeniny **XXXVI** s antiprotozoálním účinkem a 5,6-dichlor-2-pentafluorethylbenzimidazol **XXXVII** s protinádorovou aktivitou jsou znázorněny ve schématu 20.

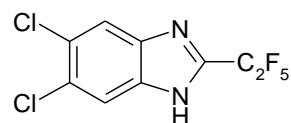
Schema 20: sloučeniny s antiprotozoální a protinádorovou aktivitou

Antiprotozoální aktivita



XXXVI

Protinádorová aktivita

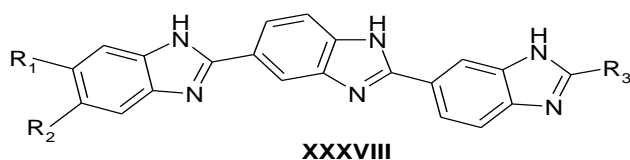


XXXVII

- XXXVIa $R_1, R_3, R_4 = H, R_2 = Br, R_5 = CF_3$
XXXVIb $R_1, R_4 = H, R_2, R_3 = Br, R_5 = CF_3$
XXXVIc $R_1, R_3 = Br, R_2, R_4 = H, R_5 = CF_3$
XXXVI d $R_1, R_2, R_3 = Br, R_4 = H, R_5 = CF_3$
XXXVI e $R_1, R_2, R_3, R_4 = Br, R_5 = CF_3$
XXXVI f $R_1, R_4 = H, R_2, R_3 = Cl, R_5 = C_2F_5 = \text{XXXVII}$
XXXVI g $R_1, R_4 = H, R_2, R_3 = NO_2, R_5 = CF_3$
XXXVI h $R_1, R_2, R_3, R_4 = Br, R_5 = C_2F_5$
XXXVI i $R_1, R_3 = Br, R_2, R_4 = H, R_5 = SCH_2CH_2N(CH_3)_2$

Mezi zajímavou biologickou aktivitu patří také deriváty benzimidazolů, které se řadí mezi inhibitory topoisomerasy I. Zkoumáním bi- a ter-benzimidazolů bylo zjištěno, že se chovají jako inhibitory savčí topoisomerasy I. Struktura bi- a ter-benzimidazolů je uvedena na schématu 21 (sloučeniny **XXXVIII** a **XXXIX**). Topoisomerasa I patří mezi enzymy, které rozštěpují jedno vlákno dvoušroubovice DNA a tím zabraňují překroucení dvoušroubovice DNA. Inhibitorů topoisomerasy I může být využito jako protinádorových léčiv¹⁵⁾.

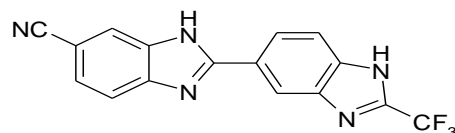
Schema 21: struktura bi- a ter-benzimidazolů



R₁= fenyl, Br

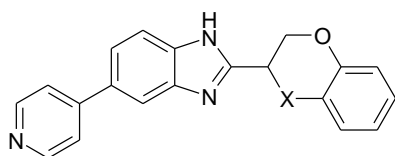
R₂= fenyl, OCH₃

R₃= H, CF₃

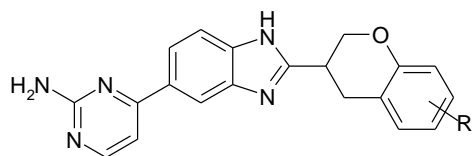


Další deriváty benzimidazolů se uplatňují jako selektivní inhibitory Rho kinasy. Rho kinasa patří do skupiny enzymů, které jsou všudypřítomné a hrají důležitou roli v základních signálních drahách. Při aktivaci tohoto enzymu dochází k buněčným procesům, jako jsou kontrakce, migrace, adheze a regulace cytoskeletu¹⁶⁾. Inhibitory Rho kinasy **XL**, **XLI** a **XLII** jsou uvedeny na schématu 22.

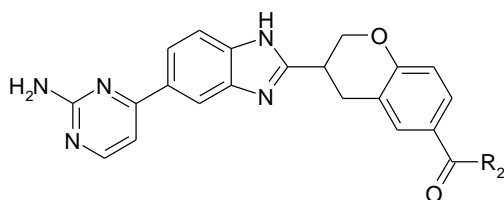
Schema 22: inhibitory Rho kinasy



X= O, CH₂



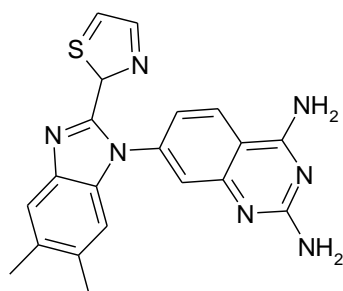
R₁= H, OMe, OPr, F, Br, CN



R₂= Me, NH₂, N(CH₃)₂

V nedávné době byl popsán 7-(benzimidazol-1-yl)-2,4-diaminoquinazolin **XLIII**, který se chová jako inhibitor dihydrofolát reduktasy. Antibakteriální účinky této látky byly zkoušeny na bakterii *Staphylococcus aureus*. Vznik bakteriální rezistence některých bakterií způsobuje významné zdravotní problémy, jednou z nejznámějších je MRSA (methicillin rezistentní *Staphylococcus aureus*). Dihydrofolát reduktasa katalyzuje NADPH dependentní redukci dihydrofolátu na tetrahydrofolát, to je důležité pro syntézu purinů a některých aminokyselin. 7-(Benzimidazol-1-yl)-2,4-diaminoquinazolin je vysoce selektivní inhibitor bakteriální dihydrofolát reduktasy a je 46 700krát selektivnější k bakteriální dihydrofolát reduktasy ($K_i=0,002$ nM) než k savčí dihydrofolát reduktase ($K_i=93,5$ nM)¹⁷⁾. Na schématu 23 je uveden 7-(benzimidazol-1-yl)-2,4-diaminoquinazolin.

Schema 23: 7-(benzimidazol-1-yl)-2,4-diaminoquinazolin



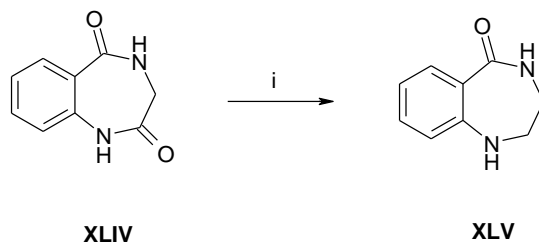
XLIII

3.4. Příprava vybraných derivátů 1,2,3,4-tetrahydro-5H-1,4-benzodiazepin-5-onů

Už na začátku teoretické části této diplomové práce bylo popsáno několik příprav 4,7,8-trisubstituovaných 1,2,3,4-tetrahydrobenzo[e][1,4]diazepin-5-onů²⁾. Při přípravě těchto derivátů byla využita kyselina 2-fluor-4-chlor-5-nitrobenzoová jako prekursor.

Jednoduchá příprava, která vede přímo k 1,2,3,4-tetrahydro-5H-1,4-benzodiazepin-5-onu **XLV** vychází z 3,4-dihydro-1H-1,4-benzodiazepin-2,5-dionu **XLIV**. Reakce probíhá v přítomnosti suchého tetrahydrofuranu a LiAlH_4 ,¹⁸⁾. Reakci naznačuje schema 24.

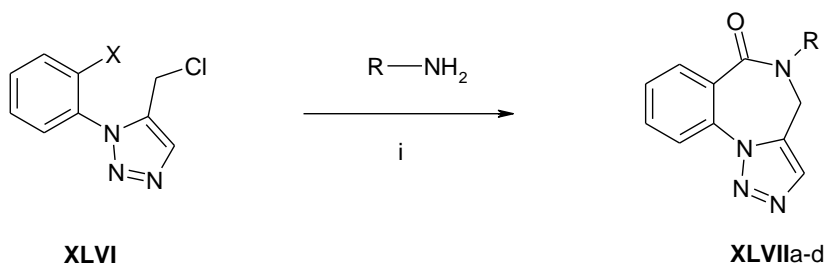
Schema 24: vznik 1,2,3,4-tetrahydro-5H-1,4-benzodiazepin-5-onu



(i) LiAlH_4 , THF

Deriváty benzodiazepinonu se mohou připravit z triazolových derivátů **XLVI**. Tyto deriváty reagují s různými aminy za přítomnosti triethylaminu nebo amoniaku za vzniku sloučenin **XLVIIa-d**¹⁹⁾. Výchozí látka **XLVI** a produkt **XLVIIa-d** jsou uvedeny na schématu 25.

Schema 25: připravené látky **XLVIIa-d**



XLVIIa X=COOMe, R= H

XLVIIb X=COOMe, R=

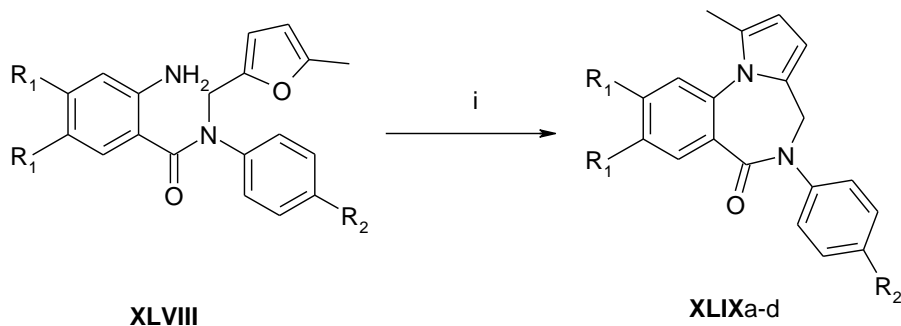
XLVIIc X=COOMe, R=

XLVIId X=CHO, R=

(i) **XLVIIa** - AcCN; **XLVIIb** - TEA, toluen; **XLVIIc** - TEA, toluen; **XLVIId** - TEA, DCM

V další přípravě benzodiazepinonů je využito amidu **XLVIII** a jeho recyklizaci za pomoci ethanolickeho roztoku kyseliny chlorovodikove za vzniku pyrrolo[1,2-a]diazepinoveho systemu **XLIXa-d**²⁰. Schema 26 naznacuje vznik tohoto pyrrolo[1,2-a]diazepinoveho systemu.

Schema 26: vznik pyrrolo[1,2-a]diazepinoveho systemu



XLIXa R₁= H, R₂= Br

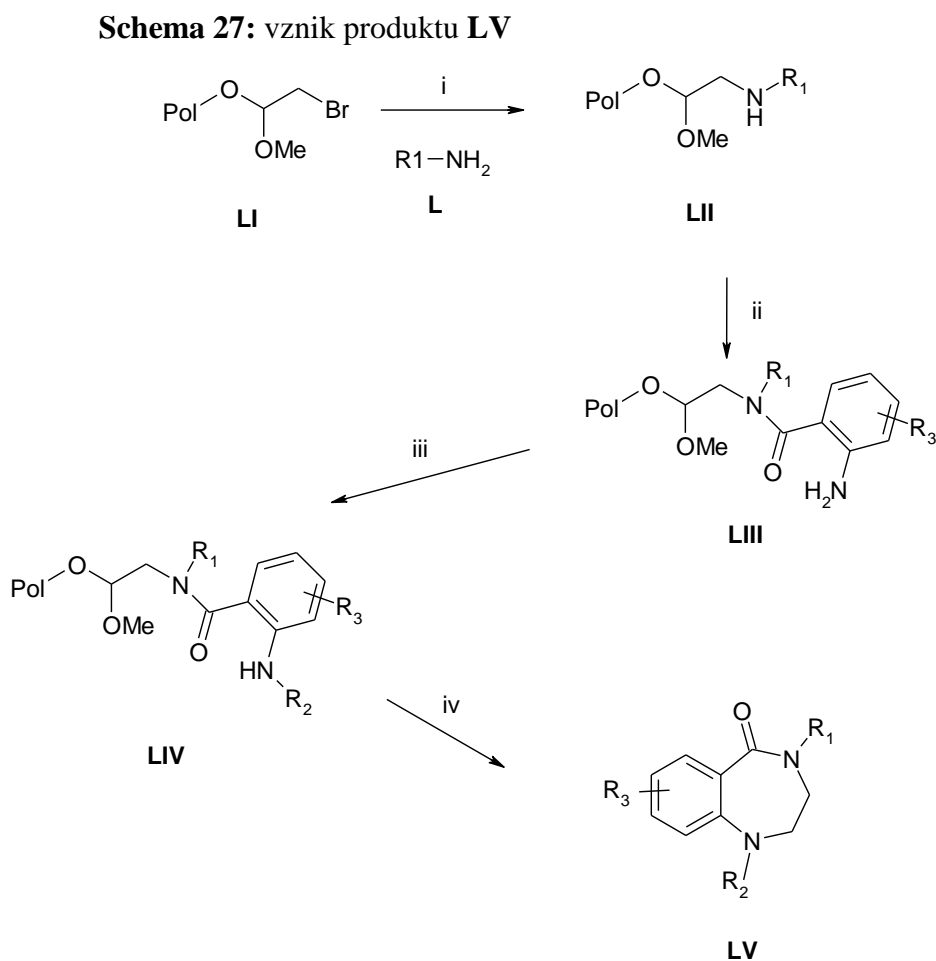
XLIXb R₁= OMe, R₂= Br

XLIXc R₁= OMe, R₂= Me

XLIXd R₁= OMe, R₂= H

(i) HCl, ethanol

Jednou ze zajímavých příprav derivátů benzodiazepinonů je aplikace syntézy na pevné fázi. Syntéza byla zahájena reakcí aminu **L** s intermediátem **LI**. Vzniklý sekundární amin **LII** byl podroben reakci se substituovanou kyselinou anthranilovou. Amidace sekundárního aminu **LII** bylo dosaženo aktivací karboxylové skupiny s *O*-(7-azabenzotriazol-1-yl)-*N,N,N9,N9*-tetramethyluronium PF₆ (HATU) v dimethylformamidu za vzniku intermediátu **LIII**. Další krok syntézy je reduktivní aminace na volné NH₂ skupině intermediátu **LIII** za vzniku intermediátu **LIV**. Konečný krok byl uskutečněn pomocí kyseliny mravenčí, aby došlo ke štěpení látky z pryskyřice. Tímto krokem vznikal finální produkt **LV**²¹⁾. Reakční sled je naznačen na schématu 27.

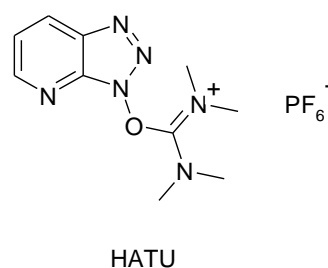


- (i) R_1NH_2 , DMSO
- (ii) anthranilová kyselina, HATU, DIEA, DMF
- (iii) aldehyd nebo keton, AcOH, $NaBH_3CN$, DMF
- (iv) HCOOH

Na schématu 28 jsou uvedeny substituenty pro produkt **LV** a strukturní vzorec *O*-(7-azabenzotriazol-1-yl)-*N,N,N',N'*-tetramethyluronium PF₆ (HATU) využívaný při aktivaci karboxylové skupiny.

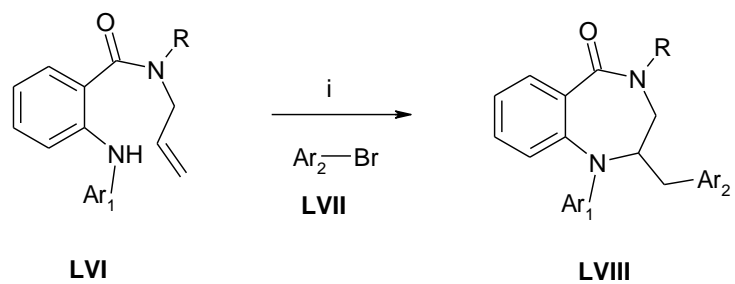
Schema 28: substituenty látky **LV** a vzorec HATU

- LVa R₁=fenethyl, R₂=benzyl, R₃=H
- LVb R₁=4-MeO-benzyl, R₂=benzyl, R₃=H
- LVc R₁=benzyl, R₂=benzyl, R₃=H
- LVd R₁=isobutyl, R₂=benzyl, R₃=H
- LVe R₁=fenethyl, R₂=3-Br-benzyl, R₃=H
- LVf R₁=4-MeO-benzyl, R₂=3-Br-benzyl, R₃=H
- LVg R₁=benzyl, R₂=3-Br-benzyl, R₃=H
- LVh R₁=isobutyl, R₂=3-Br-benzyl, R₃=H
- LVi R₁=fenethyl, R₂=cyklohexyl, R₃=H
- LVj R₁=4-MeO-benzyl, R₂=cyklohexyl, R₃=H
- LVk R₁=benzyl, R₂=cyklohexyl, R₃=H
- LVl R₁=isobutyl, R₂=cyklohexyl, R₃=H
- LVm R₁=fenethyl, R₂=benzyl, R₃=p-Cl
- LVn R₁=4-MeO-benzyl, R₂=benzyl, R₃=p-Cl
- LVo R₁=benzyl, R₂=benzyl, R₃=p-Cl
- LVp R₁=isobutyl, R₂=benzyl, R₃=p-Cl

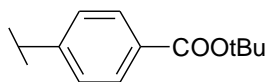


Další reakcí vedoucí k derivátům benzodiazepinonů je Pd-katalyzovaná kondenzace *N*-allyl-2-aminobenzylaminových derivátů **LVl** s arylbromidy **LVll** za vzniku benzodiazepinonu **LVlll**. Tato metoda je účinná pro celou řadu různých arylbromidových couplingových reaktantů²²⁾. Reakce je uvedena na schématu 29.

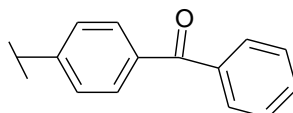
Schema 29: couplingová reakce arylbromidů za vzniku derivátů benzodiazepinonů.



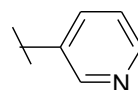
L VIIIa R=benzyl, Ar₁=fenyl, Ar₂=



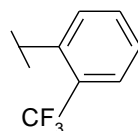
L VIIIb R=benzyl, Ar₁=fenyl, Ar₂=



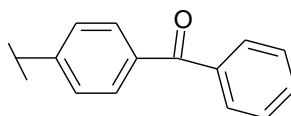
L VIIIc R=benzyl, Ar₁=3,5-Cl₂-C₆H₃, Ar₂=



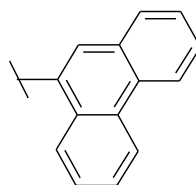
L VIIId R=benzyl, Ar₁=3,5-Cl₂-C₆H₃, Ar₂=



L VIIIe R=oktyl, Ar₁=fenyl, Ar₂=



L VIIIf R=oktyl, Ar₁=fenyl, Ar₂=

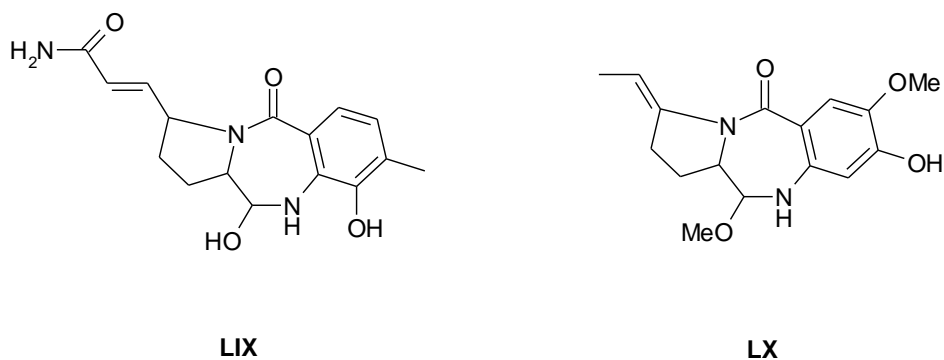


(i) Pd-ligand, NaOtBu, xylen

3.5. Biologická aktivita derivátů 1,2,3,4-tetrahydro-5H-1,4-benzodiazepin-5-onů

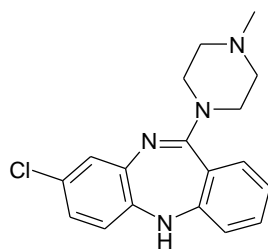
Pyrrolo [2,1-c] [1,4] benzodiazepiny jsou přirozeně se vyskytující protinádorová antibiotika produkovaná různými *Streptomyces species*. Tyto deriváty jsou známy tím, že jsou schopné se kovalentně vázat s exocyklickými NH₂-skupinami guaninu uvnitř malého žlábků dvoušroubovice DNA se sekvenční specifikou pro 5'-purin-guanin-purinové sekvence. Jako příklad se může uvést protinádorové antibiotikum antramycin **LIX** a tomaymycin **LX**²³⁾. Obě struktury jsou uvedeny na schématu 30.

Schema 30: struktura antramycinu **LIX** a tomaymycinu **LX**

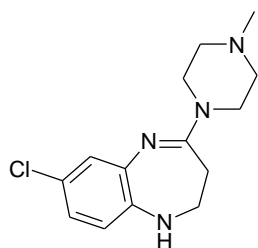
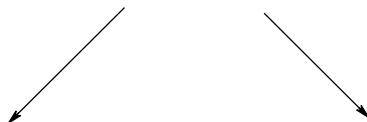


Další biologická aktivita je spojena s dopaminovými (D₂, D₄) a serotoninovými (5HT_{1A}, 5HT₂) receptory. 4-Arylpiperazin-1-yl-substituované 2,3-dihydro-1H-1,4- a 1H-1,5-benzodiazepiny **LXII** a **LXIII** a jejich aza-analogy byly hodnoceny jako potenciální ligandy receptory D₄. Strukturně se vycházelo ze známého atypického antipsychotika clozapinu **LXI**. Ukázalo se však, že některé sloučeniny mají překvapivě vyšší selektivitu než clozapin, a to zejména k receptoru D₂. Byla také stanovena aktivita některých látek k serotoninovým receptorům¹⁸⁾. Schema 31 ukazuje clozapin a z něho odvozené sloučeniny.

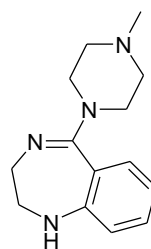
Schema 31: clozapin a odvozené sloučeniny



LXI



LXII



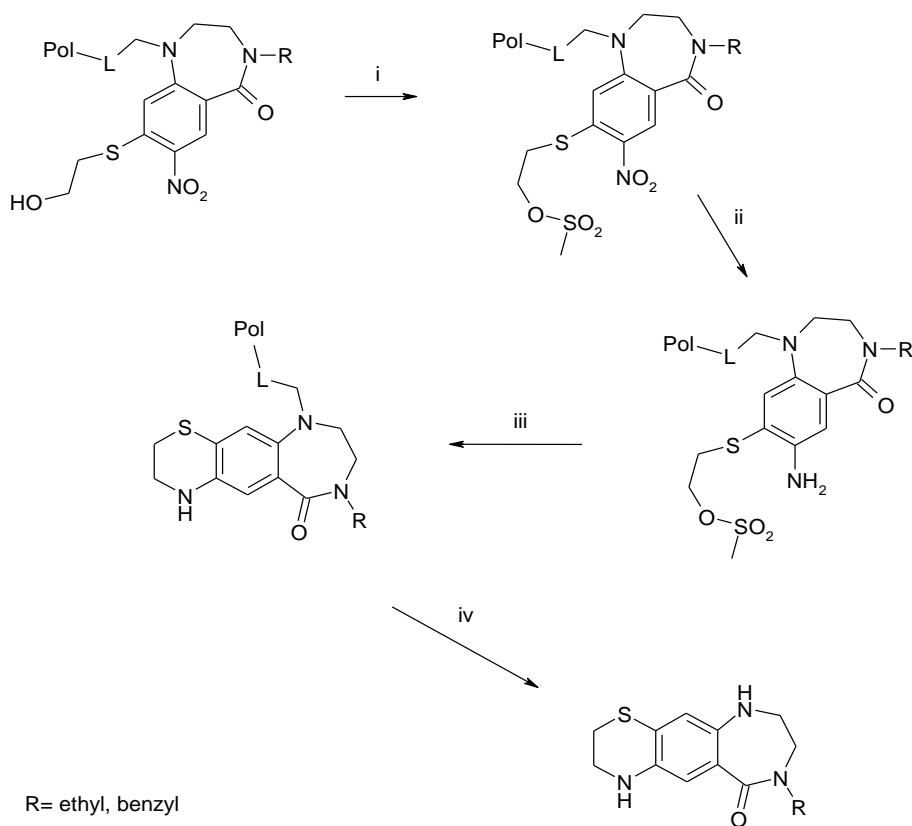
LXIII

3.6. Vybraná analoga cílových bisheterocyklických sloučenin

V této kapitole se pojednává o přípravě a biologických vlastnostech bis a polyheterocyklických sloučeninách, které představují analoga cílových derivátů. Bis a polyheterocyklické sloučeniny zde prezentované se zde tedy skládají z centrálního benzenového jádra, na jehož protilehlých stranách jsou přikondenzované heterocyklické skelety.

Literatura popisuje např. syntetickou cestu, která vede k těmto derivátům ze sloučeniny **II**. Sled reakcí vedoucích ke sloučenině **II** byl uveden ve schématu 3. Bylo využito syntézy na pevné fázi a sloučenina **II** byla navázána polymerní nosič. Imobilizovaná sloučenina **II** se nejprve nechala namesylovat, následně proběhla redukce nitroskupiny a cyklizace. Po odštěpení z pryskyřice pomocí triflouroctové kyseliny se získává sloučenina **LXIV**²⁾. Sled reakcí je uveden na schématu 32.

Schema 32: příprava sloučeniny **LXIV**

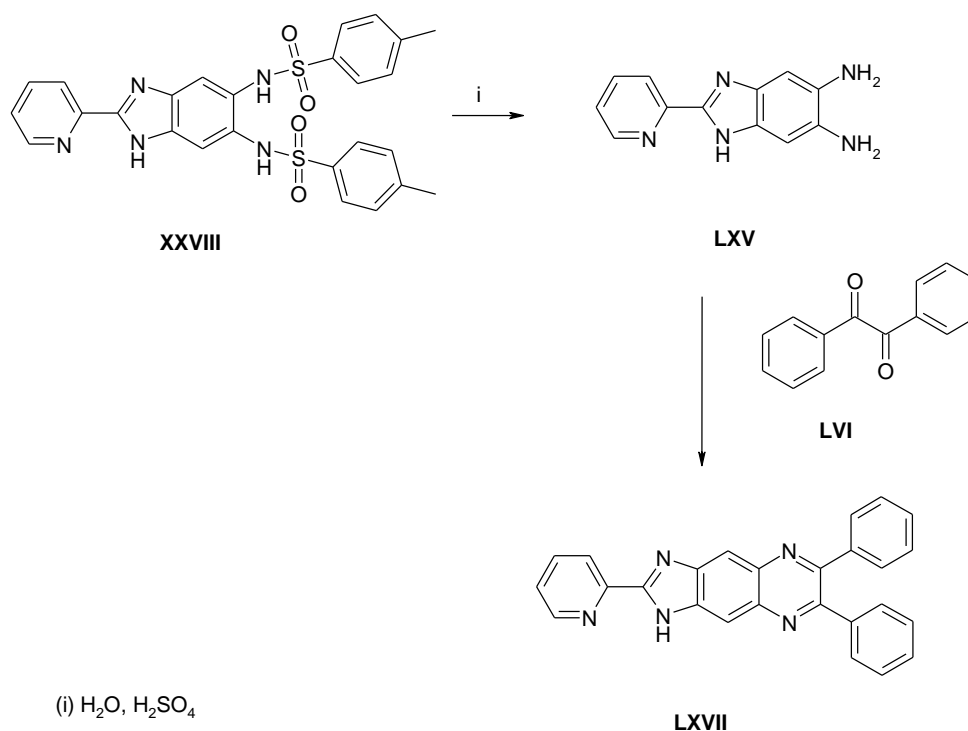


- (i) MsCl, pyridin
- (ii) SnCl₂·2H₂O, DIEA, DMF
- (iii) DIEA, DMSO
- (iv) TFA, DCM

LXIV

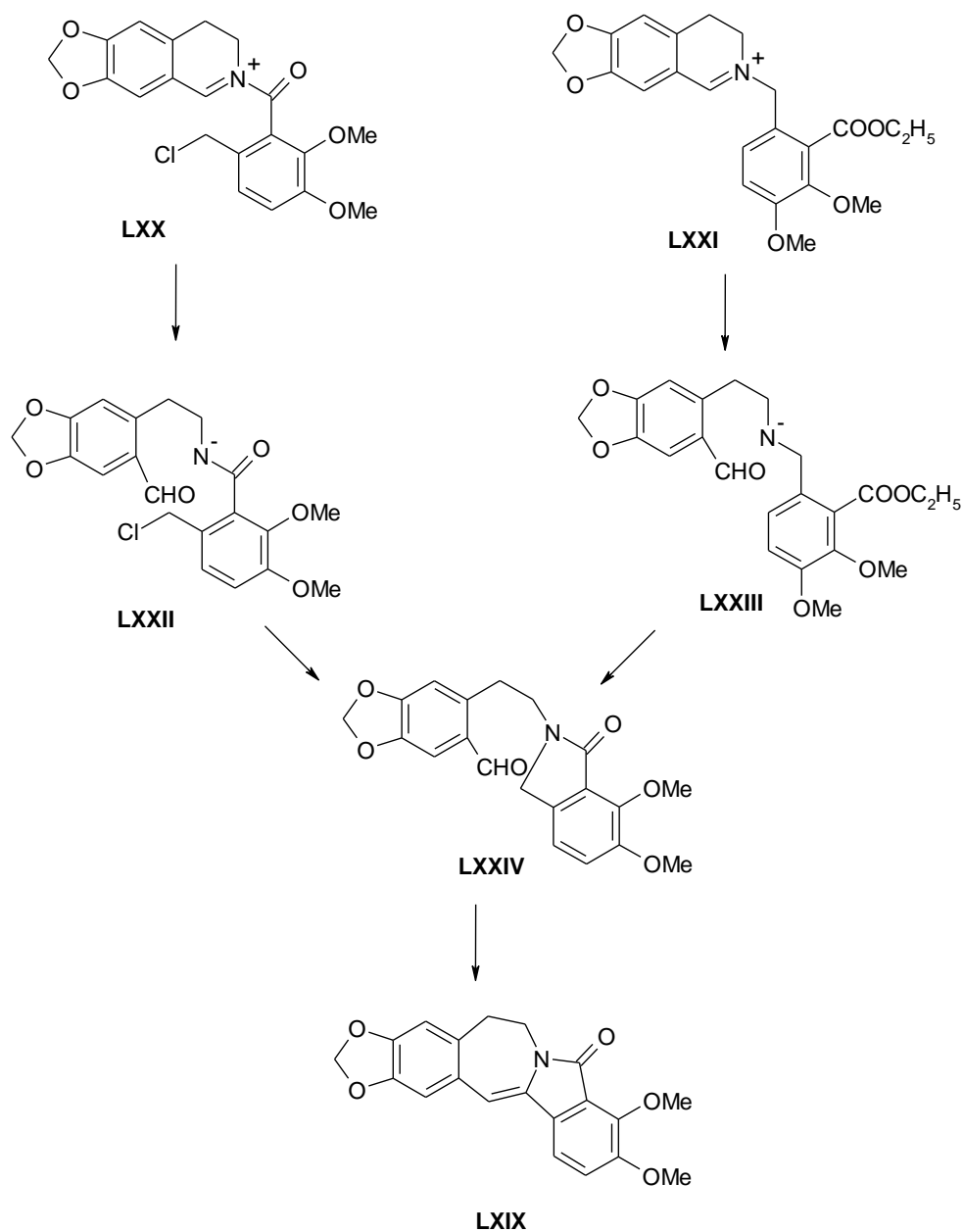
Další možnou přípravou alternativních bisheterocyklů je detosylace benzimidazolu **XXVIII** v prostředí kyseliny sírové, kdy vzniká benzimidazol **LXV**. Následnou reakcí s benzilem **LXVI** dojde ke kondenzaci za vzniku sloučeniny **LXVII**¹¹⁾. Reakce je uvedena na schématu 33.

Schema 33: příprava ligandu LXVII



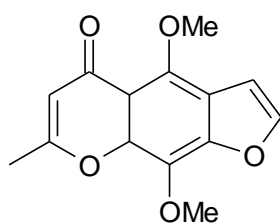
Jiná práce popisuje přípravu isoindolobenzazepinu **LXIX**, ke kterému vedou dvě syntetické cesty. První z nich používá intermediátu **LXX** jako prekursoru a druhá využívá intermediátu **LXXI**. Otevřením šestičlenného kruhu vzniká z intermediátu **LXX** sloučenina **LXXII** a intermediátu **LXXI** sloučenina **LXXIII**. Ze sloučenin **LXXII** a **LXXIII** pak dále vzniká meziprodukt **LXXIV**, jenž podléhá cyklizaci a dává vzniku isoindolobenzazepinu **LXIX**²⁴⁾. Obě metody jsou uvedeny na schématu 34.

Schema 34: příprava isoindolobenzazepinu LXIX

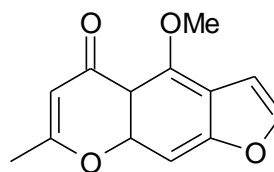


Jednou ze zajímavých přírodních bisheterocyklů je khellin. Khellin je obsažen v pakmínu visnaga (*Ammi visnaga*), tato jednoletá bylina se vyskytuje ve středozemí a pěstuje se v severní Africe jako léčivá rostlina. Khellinové produkty jsou komerčně dostupné na evropském trhu pro orální a parenterální podávání při léčbě bronchiálního astmatu a anginy pectoris jako vasodilatační látka. *A. visnaga* obsahuje spoustu pyranokumarinů, jako například výše uvedený khellin a visnadin. Tyto sloučeniny blokují aktivitu vápenatých kanálů a používají se mimo jiné také při profylaxi a léčbě infarktu myokardu²⁵⁾. Struktura khellinu a visnadinu je uvedena na schématu 35.

Schema 35: khellin a visnagin



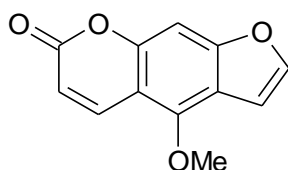
khellin



visnagin

Další přírodní látka bergapten, která se nachází v bergamotové silici, se vyskytuje v *Tongoloa silaifolia*, tato rostlina se vyskytuje především na jihozápadě číny. V čínské medicíně jsou kořeny této rostliny používány k léčbě traumatického poranění, traumatického krvácení, metroragie a revmatické bolesti²⁶⁾. Struktura bergaptenu je na schématu 36.

Schema 36: bergapten



bergapten

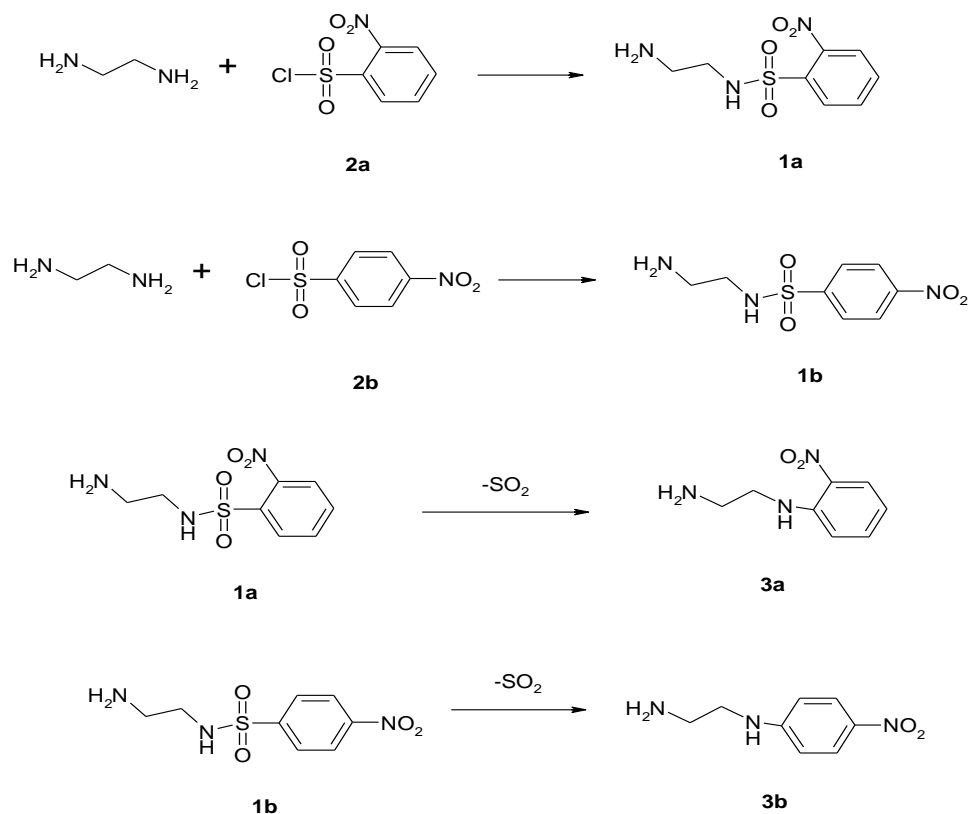
Bergapten se také vyskytuje v *Esenbeckia febrifuga*. *Esenbeckia febrifuga* je rostlina užívaná v brazilské Amazonii při léčbě malárie²⁷⁾.

4. VÝSLEDKY A DISKUSE

Záměrem této diplomové práce byla příprava derivátů bisheterocyklických sloučenin pomocí syntézy na pevné fázi. Jako výchozí látka pro syntézu těchto sloučenin byla využita kyselina 2-fluor-4-chlor-5-nitrobenzoová, jako výborný stavební blok pro heterocykly.

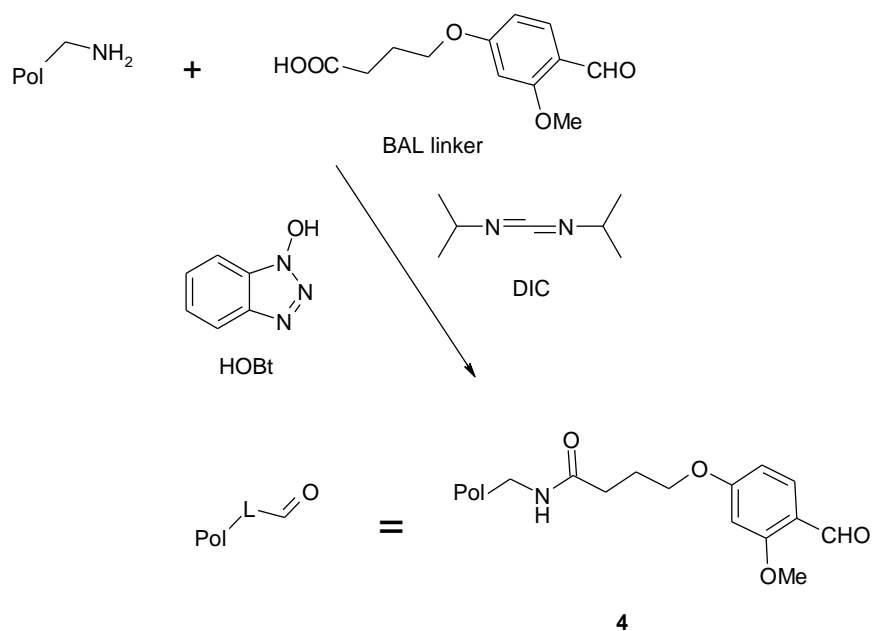
Počátečním krokem syntézy byla příprava nosylovaného ethylendiaminu **1a**. Příprava se odvíjela od použití ethylendiaminu, který byl zreagován s 2-nitrobenzensulfonylchloridem **2a** za teploty -5°C v DCM. Tato reakce byla také provedena s isomerním 4-nitrobenzensulfonylchloridem **2b**, za vzniku nosylovaného ethylendiaminu **1b**. Po přípravě nosylovaného ethylendiaminu bylo nutné provést přečištění pomocí sloupcové chromatografie, kde se používala mobilní směs $i\text{PrOH}:\text{NH}_3:\text{H}_2\text{O}$ v poměru 5:1:1. Tato směs byla dále odpařena na vakuové odparce a zlyofilizována. Nutno dodat, že při lyofilizaci obou isomerů **2a** a **2b** se z asi cca 25% odštěpoval oxid siřičitý a tím vznikala sloučenina **3a** a její isomer **3b**, a tím pádem byla z hlediska našeho cíle nepoužitelná. Bohužel se nepodařilo zjistit přesné podmínky rozkladu těchto látek, ale některé šarže pro sloučeninu **2a** se podařilo připravit čistě, se kterými se mohlo dále pracovat. Výtěžek látky **1a** byl 75%. Schema 1 naznačuje přípravu nosylovaného ethylendiaminu **2a**, **2b** a vznik nežádoucí látky **3a** a **3b**.

Schema 1: průběh nosylace a nežádoucí reakce vedoucí k látce **3a** a **3b**



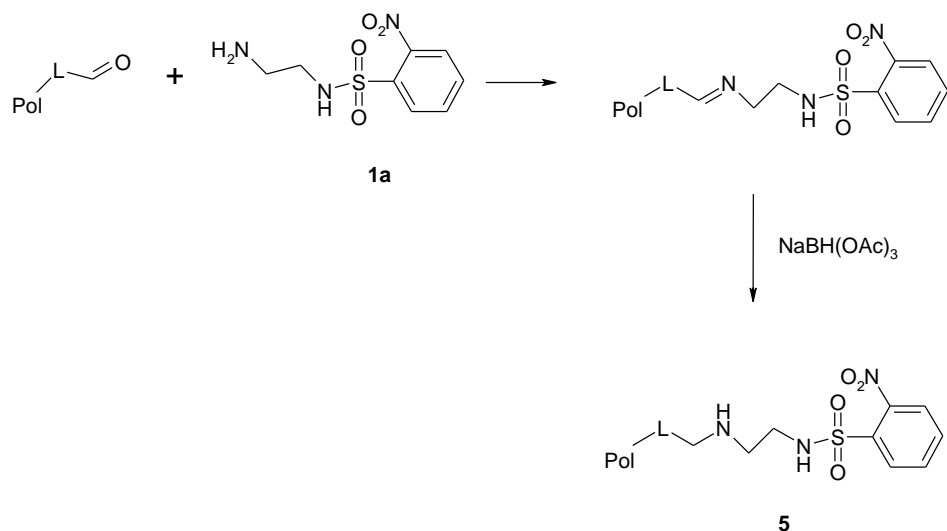
Před dalším krokem bylo nutné připravit pryskyřici s navázaným linkerem **4**. K tomuto účelu bylo využito aminomethylenové pryskyřice, která se nejprve zalkalizovala pomocí DIEA a následně se nechala zreagovat s BAL linkerem za přítomnosti HOBt a DIC v DCM a DMF v poměru 1:1. Pomocí bromfenolové modři se provedl test na volné aminoskupiny, který byl negativní, a tím pádem se takto připravená pryskyřice mohla použít k reduktivní aminaci. Schema 2 ukazuje přípravu pryskyřice s navázaným BAL linkerem.

Schema 2: reakce BAL linkeru s aminomethylenovou pryskyřicí



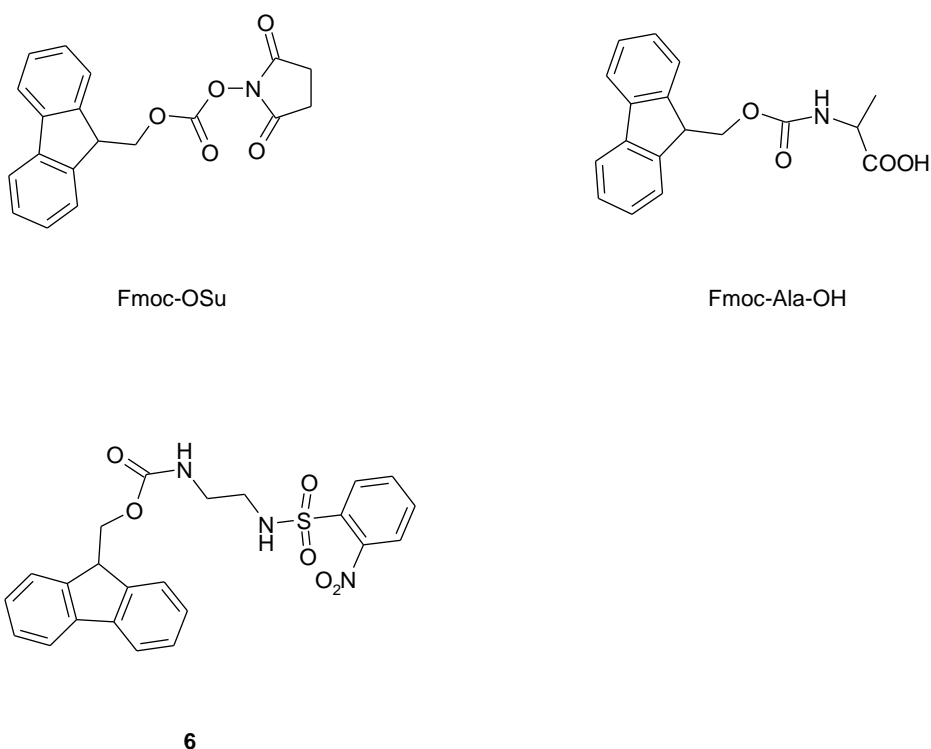
Po přípravě nosylovaného ethylendiaminu byla provedena reductivní aminace na pryskyřici. Pryskyřice s navázaným aldehydickým linkerem reagovala s nosylovaným ethylendiaminem **1a** v suchém dimethylformamidu za katalýzy kyselinou octovou za vzniku příslušného iminu, který byl následně bez izolace redukován pomocí $\text{NaBH}(\text{OAc})_3$. Reduktivní aminací vznikl imobilizovaný ethylendiamin s nosylovou skupinou **5**. Reakce je uvedena na schématu 3.

Schema 3: reductivní aminace



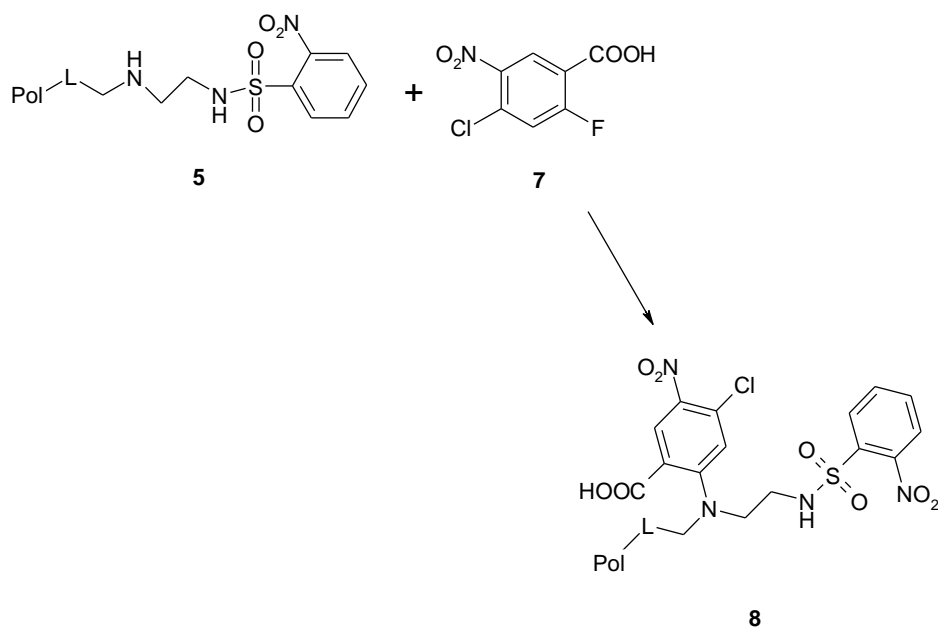
Následovala kvantifikace imobilizovaného ethylendiaminu **5**. Protože nebylo možné produkt **5** jednoduchým způsobem odštěpit z pryskyřice, byla kvantifikace provedena pomocí reakce s Fmoc-OSu, při níž vznikl příslušně chráněný produkt **6**. Po jeho odštěpení z polymerního nosiče byla provedena kvantifikace s použitím metody vnějšího standardu, který byl Fmoc-Ala-OH. Loading pryskyřice **5** byl stanoven na 0,5 mmol/g, což odpovídá výtěžku reakce 42%. Schema 4 ukazuje strukturu Fmoc-OSu, standardu Fmoc-Ala-OH a stanovovaného produktu **6**.

Schema 4: Fmoc-OSu a Fmoc-Ala-OH



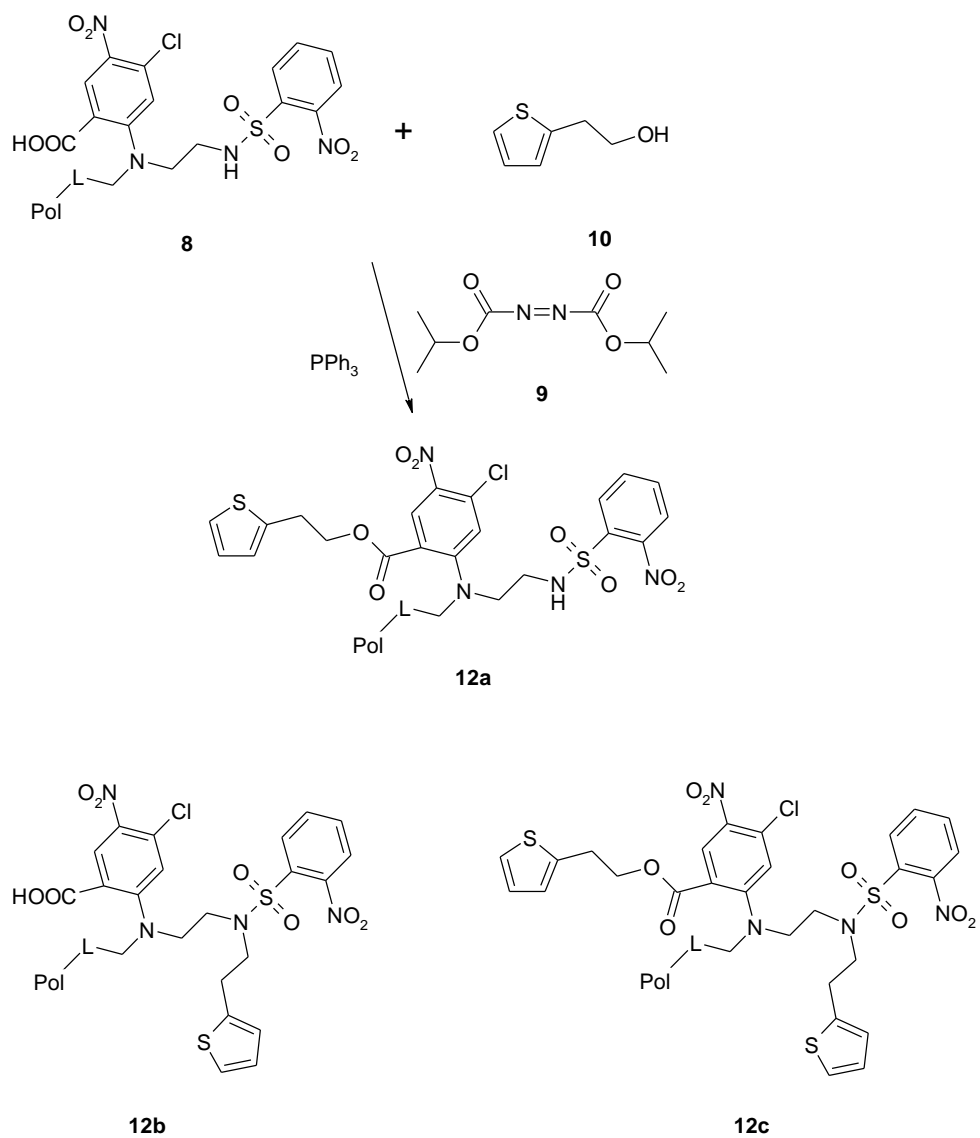
Po určení loadingu pryskyřice byl imobilizovaný derivát ethylendiaminu **5** zreagován s kyselinou 2-fluor-4-chlor-5-nitrobenzoovou **7** za vzniku intermediátu **8**. Reakce proběhla v přítomnosti *N,N*-diisopropylethylaminu, čistota surového produktu stanovená pomocí HPLC po odštěpení z polymerního nosiče byla 96%. Schema 5 ukazuje reakci s kyselinou 2-fluor-4-chlor-5-nitrobenzoovou.

Schema 5: navázání kyseliny 2-fluor-4-chlor-5-nitrobenzoové **7** na imobilizovaný derivát ethylendiaminu **5**

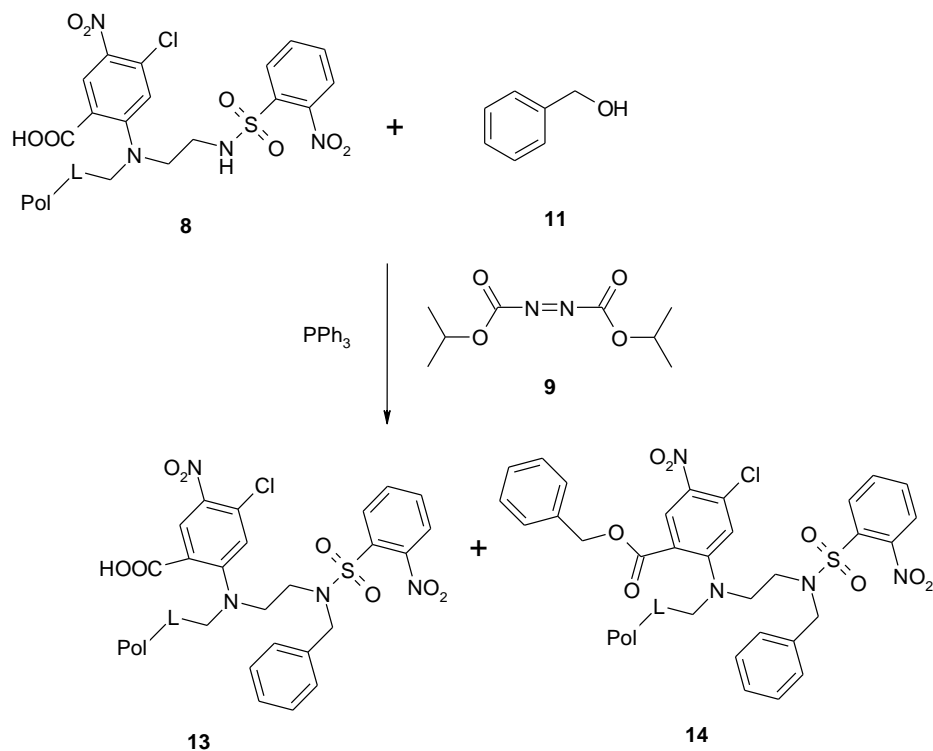


Po získání intermediátu **8** byla provedena Mitsunobu reakce. Tato reakce se provádí v suchém tetrahydrofuranu za přítomnosti trifenylofosfinu (PPh_3), diisopropyl azodikarboxylátu (DIAD) **9** a příslušného alkoholu. V této práci byla reakce provedena se dvěma různými alkoholy, které dávaly různé výsledky. V prvním případě byl použit 2-(2-thienyl)ethanol **10**. V tomto případě poskytovala reakce dva majoritní produkty, přičemž molekulová hmotnost jednoho z nich odpovídala monoalkylovanému produktu (HPLC čistota 16%). Z LC-MS analýzy nebylo možné prokázat, zda se jedná o derivát s alkylovanou karboxylovou skupinou **12a** nebo derivát s alkylovanou sulfonamidickou skupinou **12b**, protože se v daném případě jedná o isomerní sloučeniny. Dále reakce poskytovala dialkylovaný intermediát **12c**, jehož obsah byl 35%. Ve spektru však byla přítomna řada dalších neidentifikovatelných vedlejších produktů (souhrnná čistota mono a dialkylderivátu byla pouze 51%). Jako alternativní reagent byl proto použit benzylalkohol **11**, který poskytoval intermediát **13** s čistotou 6%. Zde je možné s jistotou usuzovat na přítomnost *N*-alkylovaného meziprojektu, protože při pozdější denosylaci (Schema 10) nebyla detekována přítomnost *N*-nesubstituovaného benzodiazepinového produktu. Kromě meziprojektu **13** byl po Mitsunobu reakci detekován i vznik intermediátu **14** s čistotou 76%. Schema 6 a 7 naznačuje Mitsunobu reakci.

Schema 6: předpokládaná Mitsunobu reakce s 2-(2-thienyl)etanolem, a vzniklé deriváty **12b** a **12c**

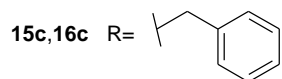
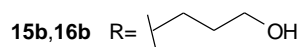
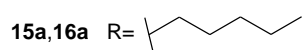
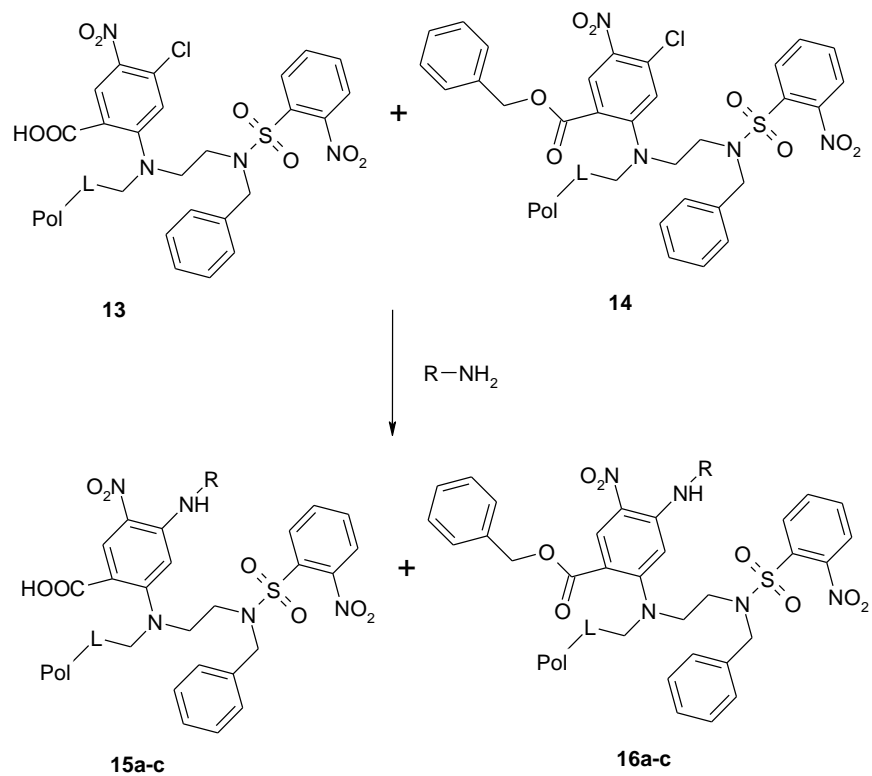


Schema 7: Mitsunobu reakce s benzylalkoholem



Dalším krokem byla reakce intermediátů **13** a **14** po Mitsunobu reakci s pentylaminem, benzylaminem a aminopropanolem za vzniku intermediátů **15a-c** a **16a-c**. Reakce byla prováděna pomocí 10%-ního roztoku aminu v dimethylsulfoxidu při 80°C. Reakce s benzylaminem proběhla částečně úspěšně, ale bohužel se ve spektru objevily další, neidentifikovatelné látky. Reakce s aminopropanolem proběhla taktéž částečně a opět byla detekována směs neidentifikovatelných látek. Reakce s pentylaminem běžela hladce, ale dále byl ve spektru přítomen intermediát **17**, a to z cca 30% viz dále. Na schématu 8 je předpokládán sled reakce a tabulka 1 shrnuje jednotlivé stupně konverze pro použité aminy.

Schema 8: reakce intermediátů **13** a **14** s aminy

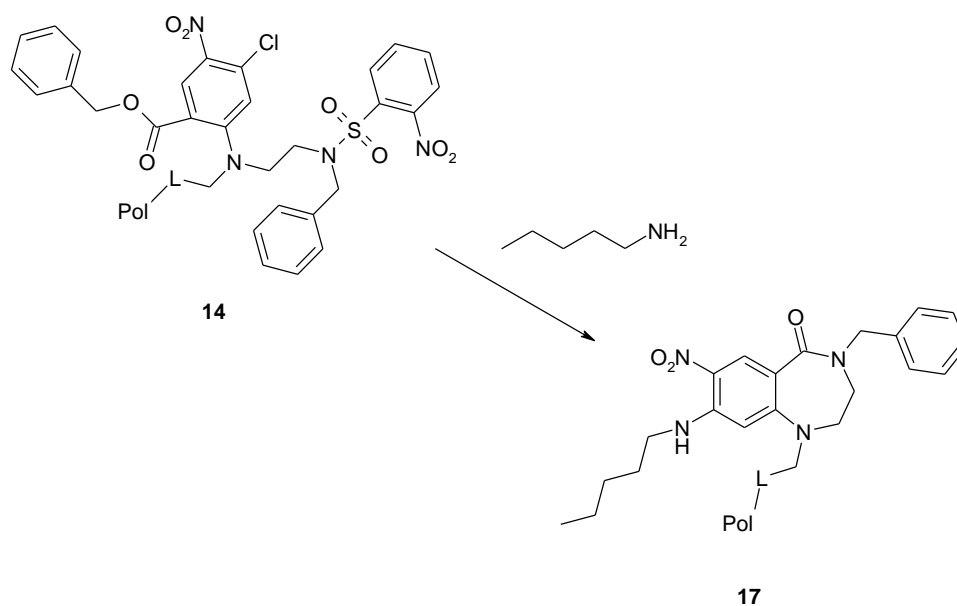


Tabulka 1: stupně konverze reakcí pro použité aminy

amin	produkt	Obsah dle HPLC (%)
pentylamin	15a	5
	16a	55
	17	30
3-aminopropanol	15b	0
	16b	14
benzylamin	15c	2
	16c	46

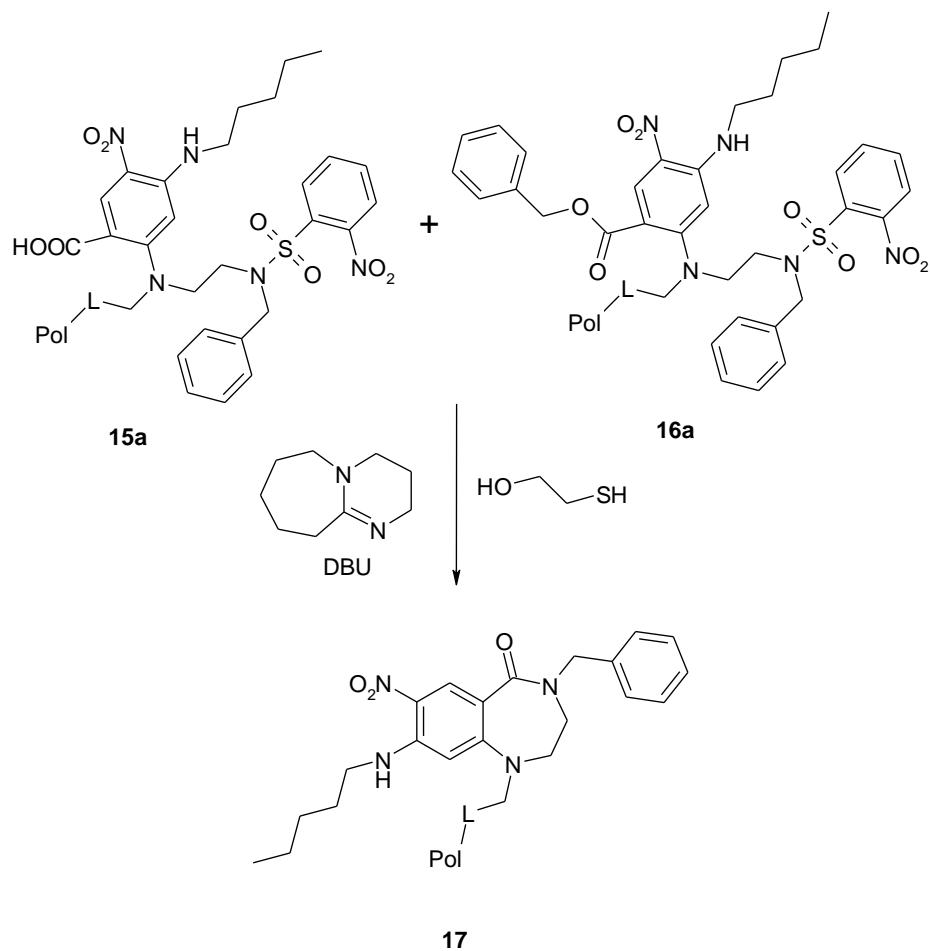
Zajímavostí reakce pentylaminu s intermediátem **14** byla skutečnost, že částečně docházelo k denosylaci a uzavření sedmičlenného kruhu. Schema 9 naznačuje denosylaci, která proběhla asi z 30%, jak bylo uvedeno výše.

Schema 9: denosylace a cyklizace



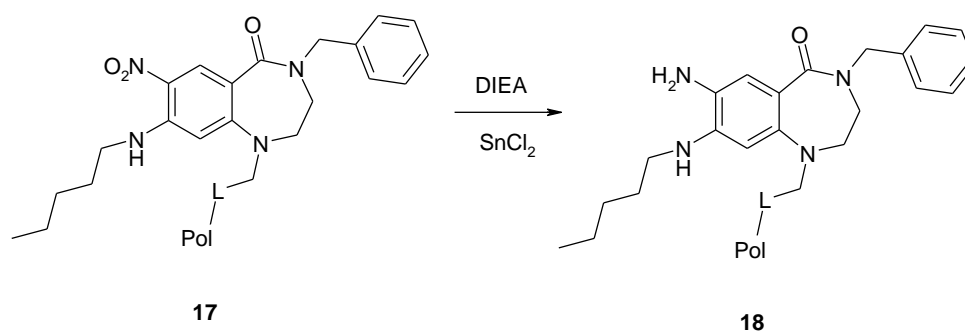
Po reakci pentylaminu se provedla denosylace na intermediátech **15a** a **16a**. Deprotekce se provedla pomocí merkptoethanolu a 1,8-diazabicykloundec-7-enu DBU v dimethylformamidu. Oba intermediáty při reakci poskytly intermediát **17** s čistotou 86%, jak je uvedeno ve schématu 10.

Schema 10: denosylace a vznik intermediátu 17



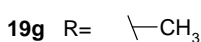
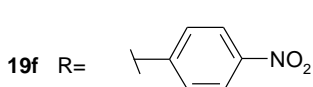
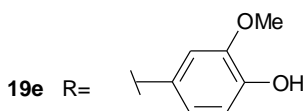
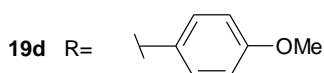
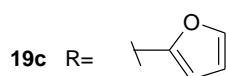
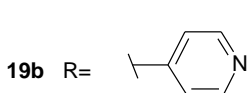
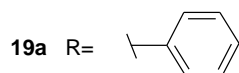
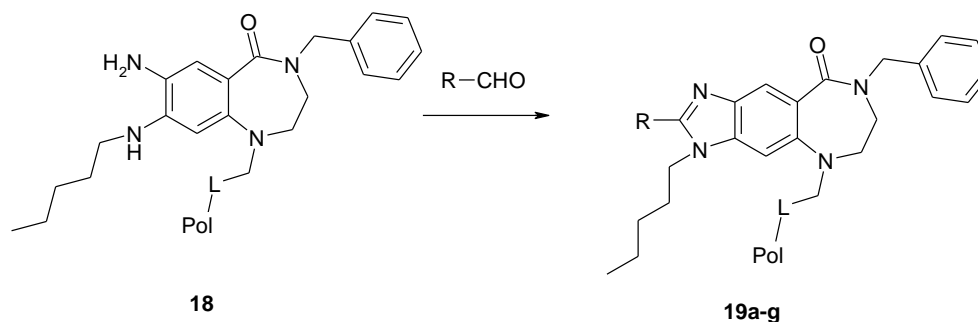
Následující reakce byla redukce nitroskupiny intermediátu **17**. Byly vyzkoušeny dvě metody této redukce. První z nich byla metoda, která využívala dithioničitanu sodného, uhličitanu draselného a tetrabutylammonium hydrogensulfátu. Bohužel tato redukce proběhla z 26%, což bylo nedostačující pro další krok. Druhou testovanou redukcí bylo použití chloridu cínatého a diisopropylethylaminu DIEA v dimethylformamidu, která poskytovala intermediát **18**. Čistota surového produktu byla 50%. Zbýlých 50% tvořilo neznámý intermediát o $M_r=461$, jednalo se pravděpodobně o neznámý adukt sloučeniny **18** s TFA. Schema 11 naznačuje redukci nitroskupiny.

Schema 11: redukce nitroskupiny pomocí SnCl₂



Konečnou reakcí byla cyklokondenzace intermediátu **18** s vybranými aldehydy, která byla prováděna při zvýšené teplotě. Cyklokondenzace vedla k finálním sloučeninám **19a-g**. Reakce proběhla úspěšně s benzaldehydem, pyridin-4-karbaldehydem a furfurelem za vzniku sloučenin **19a-c**. U 4-anisaldehydu reakce probíhala z cca 23%, u vanilinu reakce proběhla z 2%, u 4-nitrobenzaldehydu z 3% a u acetaldehydu z 15% (sloučeniny **19d-g**), ve všech těchto případech však vznikaly různé meziprodukty a tedy bohaté směsi látek. Schema 12 naznačuje reakci intermediátu **18** s vybranými aldehydy a tabulka 2 shrnuje stupně konverze jednotlivých reakcí.

Schema 12: cyklokondenzace s vybranými aldehydy



Tabulka 2: stupně konverze reakcí s různými aldehydy

aldehyd	produkt	čistota dle HPLC (%)
benzaldehyd	19a	88
pyridin-4-karbaldehyd	19b	91
furfural	19c	90
4-anisaldehyd	19d	23
vanilin	19e	4
4-nitrobenzaldehyd	19f	3
acetaldehyd	19g	15

5. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

Použité přístroje a metody

HPLC-MS analýza byla provedena na UHPLC-MS systému, skládajícího se z UHPLC chromatografu Acquity s detektorem fotodiodového pole a jednoduchého kvadrupólového hmotnostního spektrometru (Waters), za použití kolony X-Select C18 při teplotě 30 °C s průtokovou rychlostí 600 $\mu\text{l}\cdot\text{min}^{-1}$. Nástřik vzorku činil 5,0 μl , její složení bylo (A) amonium acetát ve vodě (0,01 M) : (B) acetonitril s lineárním naprogramováním od 10 % do 80 % (B) v průběhu 2,5 minut, udržovaný po dobu 1,5 minuty. Po dobu 1 minuty byla kolona ekvilibrována za použití 10 % roztoku (B). Zdroj APCI byl nastaven na vybíjecí proud 5 μA , odpařovací teplotu 350 °C a teplotu kapiláry 200 °C.

Syntéza intermediátu 1a

Ethylen-1,2-diamin (41mmol, 2,74ml) byl rozpuštěn v DCM (22,5ml), tento roztok se nechal zchladit pomocí ledu a NaCl na -5°C. Po té byl přidán roztok 2-nitrobenzensulfonylchloridu **2a** (13,5mmol, 3g) v 90ml DCM k předchozímu roztoku po kapkách během 45 minut. Reakční směs se nechá zreagovat 60 minut. Následně se vysrážený dinosylovaný ethylendiamin odfiltruje a zbylý intermediát **1a** v roztoku se zakoncentruje v rotační vakuové odparce. Tento odparek je rozpuštěn v 15 ml roztoku iPrOH:NH₃:H₂O v poměru 5:1:1 a přečištěn pomocí preparativní chromatografie (mobilní fáze iPrOH:NH₃:H₂O v poměru 5:1:1). Po té bylo rozpouštědlo odpařeno. Výtěžek reakce je přibližně 75%.

Syntéza intermediátu 4

Aminomethylenová pryskyřice (1g, 1,2 mmol) byla promyta 3x DCM a neutralizována s DIEA v DCM (2ml, 5%) po dobu 5 minut a znovu promyta 3x DCM. Roztok 4-(4-formyl-3,5-dimethoxyfenoxy)máslé kyseliny (BAL linker) (4 mmol, 953mg), HOBt (4 mmol, 613mg) a DIC (4 mmol, 620mg) v DCM a DMF v poměru 1:1 (10ml) byl přidán k pryskyřici. Reakce běžela přes noc za laboratorní teploty a po té se promyla 3x DMF a 3x DCM. Asi

10mg pryskyřice bylo použito pro testování volných aminoskupin pomocí bromfenolové modři (0,03 M) v DMF.

Syntéza intermediátu 5

Aminomethylenová pryskyřice s navázaným kyselé labilním linkerem (1g) byla promyta 3x DCM a 3x suchým DMF. Roztok intermediátu **1a** (4,4mmol, 1,078g) a kyseliny octové v bezvodém DMF (10ml, 10%) byl přidán k pryskyřici a směs byla třepána přes noc při laboratorní teplotě. Další den se přidal triacetoxyhydroborid sodný (1,5mmol, 310mg) v roztoku kyseliny octové a DMF (5ml, 5%). Po jedné hodině se přidala další dávka pevného triacetoxyhydroboridu sodného (1,5mmol, 310mg) a nechala se 60 minut třepat. Po druhém přidání triacetoxyhydroboridu sodného (1,5mmol, 310mg) se tento krok opakoval. Reakční směs se po posledním přidání redukčního činidla nechala třepat přibližně 2 hodiny. Po redukci byla pryskyřice promyta 3x DMF a nechala se na 10 minut protřepat s roztokem piperidinu v DMF (10ml) v poměru 1:1, následně byla promyta 3x DMF, 3x DCM, 3x MeOH a vysušena proudem dusíku.

Stanovení loadingu pryskyřice po reduktivní aminaci

Pryskyřice s navázaným nosylovaným ethylendiaminem **5** (30mg) byla smíchána s *N*-(9-fluorenylmethoxykarbonyloxy) sukcinimidem (0,5mmol, 165 mg) a DIEA (0,5mmol, 87 μ l) v DCM (1ml). Směs byla třepána 30 minut za laboratorní teploty a potom byla pryskyřice promyta 5x v DCM, 3x v MeOH a následně vysušena proudem dusíku. Po reakci bylo odebráno 2x po 10 mg pryskyřice a tyto vzorky byly štěpeny pomocí kyseliny trifluoroctové v DCM (0,5ml, 50%). Provedlo se standardní štěpení na analýzu LC-MS. Jako vnější standard byl použit *N*-(9-fluorenylmethoxycarbonyl)-L-alanin (0,25mg) v MeOH (1ml). Z LC-MS analýzy bylo zjištěno, že loading této pryskyřice byl 0,5 mmol/g.

Syntéza intermediátu 8

Nosylovaný ethylendiamin imobilizovaný na pryskyřici **5** (1g) byl podroben reakci s kyselinou 2-fluoro-4-chloro-5-nitrobenzoovou **7** (2mmol,

0,4394g) v přítomnosti DIEA (4mmol, 700 μ l) v DMSO (10ml). Reakce běžela přes noc při teplotě 50°C. Po reakci byla pryskyřice promyta 3x DMF a 3x DCM a bylo provedeno standardní štěpení pomocí TFA v DCM (0,5ml, 50%) pro LC-MS. Čistota intermediátu **8** byla 96%.

Syntéza intermediátů 13 a 14

Imobilizovaný intermediát **8** (1g) byl promyt 3x DCM, 3x THF a 3x bezvodým THF. Roztok benzylalkoholu **11** (3mmol, 312 μ l) a trifenyfosfinu (3mmol, 792mg) v bezvodém THF (8ml) byl přidán k pryskyřici s navázaným intermediátem **8**, Tato směs byla ponechána při teplotě -18°C. DIAD **9** (3mmol, 576 μ l) byl rozpuštěn v bezvodém THF (4ml) a tento roztok byl také ponechán při teplotě -18°C. Po 30 minutách byl roztok DIAD pomalu přidáván ke směsi s pryskyřicí. Reakce běžela při laboratorní teplotě přes noc, následně byla promyta 3x THF, 3x DCM a bylo provedeno standardní štěpení. Čistota intermediátu **13** je 6% a intermediátu **14** činila 76%.

Syntéza intermediátů 15a a 16a

Pryskyřice s navázanými meziproducty **13** a **14** (750mg) byla promyta 3x DCM a 3x DMF. Roztok pentylaminu v DMSO (7,5 ml, 10%) se přidá k této pryskyřici a reakce se nechá přes noc při teplotě 80°C. Po té se pryskyřice promyje 3x DMF, 3x DCM a standardně štěpí. Čistota byla přibližně pro intermediát **15a** 5% a pro intermediát **16a** 55%.

Syntéza intermediátu 17

Pryskyřice s imobilizovanými meziproducty **15a** a **16a** (750 mg) se promyje 3x DCM a 3x DMF. Roztok merkaptoethanolu (5,4mmol, 378 μ l) a DBU (5,4mmol, 810 μ l) v DMF (9ml) byl přidán k pryskyřici. Reakce běží 30 minut při laboratorní teplotě. Po reakci se pryskyřice promyje 3x DMF, 3xDCM a standardně se štěpí. Čistota látky **17** činila 86%.

Syntéza intermediátu 18

Pryskyřice s navázaným intermediátem **17** (750 mg) byla promyta 3x DCM, 3x DMF, 3x DMF nasyceným dusíkem. Roztok dihydrátu chloridu cínatého (9mmol, 2g) a DIEA (18 mmol, 3,132ml) v DMF (9ml), který byl prosycen dusíkem, byl přidán k pryskyřici. Reakce běžela přes noc za laboratorní teploty. Po reakci byla pryskyřice promyta 3x DMF, 3x DCM a standardně štěpena. Čistota meziprojektu **18** byla 50%.

Syntéza intermediátu 19a

Pryskyřice s navázaným intermediátem **18** (250mg) se promyje 3x DCM a 3x DMF. Roztok benzaldehydu (4mmol, 405 μ l) v DMSO (5ml) byl přidán k pryskyřici. Reakce probíhala přes noc při teplotě 80°C, potom se pryskyřice promyje 3xDMF, 3x DCM a standardně štěpí. Čistota produktu **19a** činila 88%

Syntéza intermediátu 19b

Pryskyřice s navázaným intermediátem **18** (250mg) se promyje 3x DCM a 3x DMF. Roztok pyridin-4-karbaldehydu (4mmol, 376 μ l) v DMSO (5ml) byl přidán k pryskyřici. Reakce probíhala přes noc při teplotě 80°C, potom se pryskyřice promyje 3xDMF, 3x DCM a standardně štěpí. Čistota produktu **19b** byla přibližně 91%

Syntéza intermediátu 19c

Pryskyřice s navázaným intermediátem **18** (250mg) se promyje 3x DCM a 3x DMF. Roztok furfuralu (4mmol, 331 μ l) v DMSO (5ml) byl přidán k pryskyřici. Reakce probíhala přes noc při teplotě 80°C, potom se pryskyřice promyje 3xDMF, 3x DCM a standardně štěpí. Čistota produktu **19c** byla 90%.

6. ZÁVĚR

Během této práce jsme se snažili nastínit využití kyseliny 2-fluoro-4-chloro-5-nitrobenzoové jako výchozí sloučeniny pro syntézu heterocyklických sloučenin, dále potom několik metod zaměřených na přípravu benzimidazolů a tricyklických bisheterocyklů. Byla zde uvedena také biologická aktivita benzimidazolů a bisheterocyklických sloučenin.

Experimentální část této práce byla zaměřena na přípravu bisheterocyklických sloučenin, kde se vycházelo z kyseliny 2-fluoro-4-chloro-5-nitrobenzoové. Začínalo se přípravou nosylovaného ethylendiaminu **1a** který byl imobilizován na aminomethylenovou pryskyřici s BAL linkerem **4**. Dále bylo provedeno navázání kyseliny 2-fluoro-4-chloro-5-nitrobenzoové **7** na pryskyřici s imobilizovaným ethylendiaminem **5**. Po navázání kyseliny **7** jsme provedli Mitsunobu reakci na pryskyřici **8**, nejprve jsme se rozhodli použít 2-(2-thienyl)ethanol **10**, který však poskytoval intermediáty **12b** a **12c** a mimo to se ve spektru vyskytovaly neidentifikovatelné směsi látek. Namísto alkoholu **10** jsme se rozhodli použít benzylalkohol **11**, ten poskytoval deriváty **13** a **14**. Oba deriváty nijak nebránili dalšímu postupu, proto bylo provedeno navázání pentylaminu na deriváty **13** a **14**. Při této reakci vznikal spontánní deprotekcí nosylované skupiny intermediát **17**. Byly vyzkoušeny další reakce derivátů **13** a **14** s benzylaminem a 3-aminopropanolem. Tyto reakce probíhaly částečně a v obou případech vznikaly neznámé směsi látek. Deriváty, vzniklé reakcí pentylaminu, **15** a **16** byly podrobeny denosylaci za vzniku derivátu **17**. Následovala redukce nitroskupiny derivátu **17**, zde jsme použili dvě metody, první z nich byla pomocí chloridu cínatého a druhá využívala dithioničitanu sodného. Redukce s využitím dithioničitanu sodného vedla ke směsi látek. V našem případě jsme teda použili redukci pomocí chloridu cínatého, která proběhla za vzniku intermediátu **18**, ale pravděpodobně při standardním štěpení s TFA došlo ke vzniku neznámého derivátu o $M_r=461$. I přes tuto skutečnost jsme provedli cyklizaci benzaldehydu na intermediát **18**, která proběhla úspěšně a ve vysoké čistotě za vzniku látky **19a**, potom byly

připraveny i látky **19b**, s využitím pyridin-4-karbaldehydu a **19c**, s využitím furfuralu. Zkoušeli jsme připravit i jiné deriváty z 4-anisaldehydu, vanilinu, 4-nitrobenzaldehydu a acetaldehydu, ale tyto aldehydy poskytovali jen částečně požadovanou látku a v každé reakci vznikaly směsi různých látek. Bylo tedy ověřeno, že navržená syntetická metoda vede k cílovým derivátům, které bylo možné získat ve vysoké surové čistotě. Navzdory tomu však byla pozorována i určitá omezení týkající se výchozích látek, z nichž některé nebylo možné k přípravě cílových derivátů použít.

7. SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK

AcCN	acetonitril
DBU	1,8-diazabicykloundec-7-en
DCM	dichlormethan
DIC	diisopropylkarbodiimid
DIEA	diisopropylethylamin
DMF	dimethylformamid
DMSO	dimethylsulfoxid
HATU	<i>O</i> -(7-azabenzotriazol-1-yl)- <i>N,N,N</i> 9, <i>N</i> 9-tetramethyluronium PF ₆
HOBt	hydrobenzotriazol
iPrOH	isopropylalkohol
LC-MS	kapalinová chromatografie s hmotnostním spektrometrem
MeOH	methanol
NMP	<i>N</i> -methyl-2-pyrrolidon
TEA	triethylamin
TFA	trifluoroctová kyselina
THF	tetrahydrofuran
TMTU	tetramethylthiomočovina

8. LITERATURA

1. S.Křupková, P.Funk, M.Soural and J. Hlaváč.: *ACS Comb. Sci.*, 15, 20-28 (2013)
2. B.Lemrová, M.Soural.: *ACS Comb. Sci.*, 14, 645-650 (2012)
3. S.Křupková, M.Soural, J.Hlaváč and P.Hradil.: *J. Comb. Chem.*, 11, 951-955 (2009)
4. V. Lyaskovskyy, R. Fröhlich, E.U. Würthwein.: *Synthesis*, 14, 2135-2144 (2007)
5. V.E. Maizlish, G.P. Shaposhnikov, O.V. Balakireva, M.A. Zharnikova, I.G. Abramov, S.A. Ivanovskii, and A.V. Smirnov.: *Russian Journal of General Chemistry*, 74(5), 787-790 (2004)
6. Q. Xiao, W.-H. Wang, G. Liu, F.-K. Meng, J.-H. Chen, Z. Yang, and Z.-J. Shi.: *Chem. Eur. J.*, 15, 7292 – 7296 (2009)
7. T. Itoh, H. Hasegawa, K. Nagata, and A. Ohsawa.: *J. Org. Chem.*, 59, 1319-1325 (1994)
8. D. Descours, D.Festal.: *Synthesis*, 1033-1036 (1983)
9. W. J. Youngblood.: *J. Org. Chem.*, 71, 3345-3356 (2006)
10. X. Zhang, R. Ng, J. Lanter, and Z. Sui.: *Synthetic Communications*[®], 37, 1437-1444 (2007)
11. X.-W. Liu, L. Li, J.-L. Lu, Y.-D. Chen and D.-S. Zhang.: *Journal of Coordination Chemistry*, 64(24), 4344–4356 (2011)
12. M. Rangarajan, J.S. Kim, S.-P. Sim, A. Liu, L.F. Liu and E.J. LaVoie.: *Bioorg. Med. Chem.*, 8, 2591-2600 (2000)
13. Y.-J. Xu, H.-Q. Miao, W. Pan, E.C. Navarro, J.R. Tonra, S. Mitelman, M.M. Camara, D.S. Deevi, A.S. Kiselyov, P. Kussie, W.C. Wonga and H. Liu.: *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, 16, 404-408 (2006)
14. M. Andrzejewska, L. Ye'pez-Mulia, R. Cedillo-Rivera, A. Tapia, L. Vilpo, J. Vilpo and Z. Kazimierczuk.: *European Journal of Medicinal Chemistry*, 37, 973-976 (2002)
15. S. Alper, Ö.T. Arpacı, E.Ş. Aki, I. Yalcin.: *Il Farmaco*, 58, 497-507 (2003)

16. E.H. Sessions, M. Smolinski, B. Wang, B. Frackowiak, S. Chowdhury, Y. Yin, Y.T. Chen, C. Ruiz, L. Lin, J. Pocas, T. Schröter, M.D. Cameron, P. LoGrasso, Y. Feng, T.D. Bannister.: *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, 20, 1939–1943 (2010)
17. T. Lam, M.T. Hilgers, M.L. Cunningham, B.P. Kwan, K.J. Nelson, V. Brown-Driver, V. Ong, M. Trzoss, G. Hough, K.J. Shaw and J. Finn.: *J. Med. Chem.*, 57, 651-668 (2014)
18. T. Hussenether, H. Hübner, P. Gmeiner and R. Troschütz.: *Bioorg. Med. Chem.*, 12, 2625-2637 (2004)
19. M. Alajarín, J. Cabrera, A. Pastora and J.M. Villalgordo.: *Tetrahedron Letters*, 48, 3495-3499 (2007)
20. T.A. Stroganova and I.V. Malikov.: *Chemistry of Heterocyclic Compounds*, 45(9), 1149-1150 (2009)
21. S.-C. Lee and S.B. Park.: *Chem. Commun.*, 36, 3714-3716 (2007)
22. J.D. Neukom, A.S. Aquino and J.P. Wolfe.: *Org. Lett.*, 13(9), 2196–2199 (2011)
23. S.R. Hopton and A.S. Thompson.: *Biochemistry*, 50, 4720–4732 (2011)
24. S. Ruchirawat and P. Sahakitpichan.: *Tetrahedron Letters*, 41, 8007-8010 (2000)
25. H.K. Sellami, A. Napolitano, M. Masullo, S. Smiti, S. Piacente and C. Pizza.: *Phytochemistry*, 95, 197-206 (2013)
26. N. Qin, Y.-F. Su, Y.-D. Wang, J.-G. Shi, F.-X. Yue, Z.-H. Wu and X.-M. Gao.: *Biochemical Systematics and Ecology*, 44, 380-382 (2012)
27. M.F. Dolabela, S.G. Oliveira, J.M. Nascimento, J.M. Peres, H. Wagner, M.M. Póvoa and A.B. de Oliveira.: *Phytomedicine*, 15, 367-372 (2008)