

UNIVERZITA PALACKÉHO V OLOMOUCI
PŘÍRODOVĚDECKÁ FAKULTA
KATEDRA ORGANICKÉ CHEMIE



PŘÍPRAVA ANOLOGŮ ANAGRELIDU POMOCÍ
SYNTÉZY NA PEVNÉ FÁZI

Bakalářská práce

Autor:	Radka Pechancová
Studijní program:	Chemie
Studijní obor:	Bioorganická chemie
Typ studia:	Prezenční
Vedoucí práce:	doc. RNDr. Miroslav Sural, Ph.D.
Termín odevzdání práce:	15. 5. 2014

Ráda bych poděkovala všem pracovníkům Katedry organické chemie PřF UP a ÚMTM, a to především doc. RNDr. Miroslavu Suralovi, Ph. D. a Mgr. Ivanu Messinovi, Ph. D. za odborné vedení a pomoc při řešení dané problematiky.

Já, Radka Pechancová, prohlašuji, že jsem tuto bakalářskou práci vypracovala samostatně pod odborným dohledem doc. RNDr. Miroslava Sourala, Ph. D. Veškerou použitou literaturu jsem uvedla 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: 15. 5. 2014

Bibliografická identifikace

Jméno a příjmení autora:	Radka Pechancová
Název práce:	Příprava analogů Anagrelidu pomocí syntézy na pevné fázi
Typ práce:	Bakalářská
Pracoviště:	Katedra organické chemie, Přírodovědecká Fakulta Univerzity Palackého v Olomouci
Vedoucí práce:	doc. RNDr. Miroslav Sural, Ph. D.
Rok obhajoby práce:	2014

Abstrakt:

Tato bakalářská práce je zaměřena na syntézu analog Anagrelidu pomocí syntézy na pevné fázi. Cílové deriváty se liší typem aminokyseliny, ze které látka vychází nebo substitucí na dusíku v poloze 1. Teoretická část je zaměřena na možnosti příprav těchto látek buď pomocí syntézy na pevné fázi, nebo syntézy v roztoku. Dále je tu zmíněno několik zajímavých biologických, chemických a fyzikálních vlastností těchto sloučenin a jejich využití v praxi. V části Výsledky a diskuze je probírána problematika všech reakčních kroků, jejich následná optimalizace a konečné výsledky. V poslední části (Experimentální část) je přehled příprav jednotlivých derivátů a použitých zařízení.

Klíčová slova:	syntéza na pevné fázi, Anagrelid, Wangova pryskyřice
Počet stran:	65
Jazyk:	čeština

Bibliographical identification

Author's first name and surname: Radka Pechancová

Title: Solid – phase synthesis of analogues
of Anagrelide

Type of thesis: Bachelor

Department: Department of Organic chemistry, Faculty
of Science, Palacký University Olomouc

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

The year of presentation: 2014

Abstract:

This Bachelor thesis is focused on the preparation of analogues of Anagrelide using solid-phase synthesis. Target derivatives differ in amino acid used as a starting material or in substitution of the nitrogen in position 1. Theoretical part is focused on the review of preparation of similar compounds using either solid-phase synthesis or solution-phase synthesis. Furthermore, there is mentioned a number of interesting biological, chemical and physical properties of these compounds and their use in practice. Results and discussion chapter describes discussed issues of individual reaction steps and their subsequent optimization and final results. In the last section (experimental) is an overview of protocols and used equipment.

Keywords: solid-phase synthesis, Anagrelide,
Wang resin

Number of pages: 65

Language: Czech

OBSAH

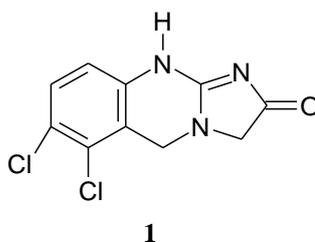
Obsah	6
1. ÚVOD	7
2. CÍL PRÁCE	9
3. TEORETICKÁ ČÁST	11
3.1. Syntéza na pevné fázi	11
3.2. Vybrané přípravy cyklických guanidinů.....	17
3.3. Vlastnosti bicyklických sloučenin na bázi guanidinu.....	28
3.3.1. Přírodní látky na bázi guanidinu.....	28
3.3.2. Syntetické guanidiny.....	30
3.3.2.1. Inhibitory HIV-1 proteasy založené na bicyklických guanidinech ..	30
3.3.2.2. Cyklické guanidiny jako antagonisté lidských receptorů glukagonu	31
3.3.2.3. Antimikrobiální účinky.....	32
3.3.2.4. Antiproliferační aktivita.....	33
3.3.2.5. Antithrombotická aktivita	34
3.3.2.6. Další významné vlastnosti využitelné ve farmakologii	37
4. VÝSLEDKY A DISKUZE	38
4.1. Syntéza noranalogů derivátů Anagrelidu na Wangově pryskyřici vycházejících z různých typů aminokyselin	38
4.2. Syntéza vycházející z lysinu	47
4.3. Syntéza vycházející z asparagové kyseliny	49
4.4. Syntéza za použití benzyliothiokyanátu	50
5. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST	53
6. ZÁVĚR	62
7. ZDROJE.....	64
8. SEZNAM ZKRATEK	65

1. ÚVOD

Příprava analog již známých, biologicky aktivních sloučenin je jedním z možných způsobů hledání kandidátů nových léčiv. Obecným principem je změna v základním strukturním motivu, resp. jeho substituci a následné studium vlivu této změny na chování sloučeniny v biologickém systému. Příprava vybraných analog může být realizována pomocí tradiční syntézy v roztoku, alternativním způsobem je využití syntézy na polymerní matici, tzv. syntézy na pevné fázi. Výhodou druhé zmíněné metody je snadná izolace jednotlivých reakčních meziproductů, což umožňuje rychlé provedení reakční sekvence. Důsledkem je vyšší kapacita umožňující přípravu většího počtu derivátů v krátkém časovém úseku. Větší množství získaných dat pak umožňuje snázeji dedukovat vztahy mezi strukturou a biologickou aktivitou zkoumaných látek.

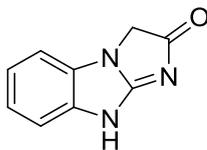
Anagrelid je sloučenina na bázi cycklické guanidinové struktury (Schéma 1). V současnosti je tato látka léčivem schváleným Úřadem pro kontrolu potravin a léčiv pod obchodními názvy Agrylin/Xagrid a používá se zejména k redukci zvýšeného počtu krevních destiček způsobeného vystupňováním destičkové křvetvorby (tzv. esenciální trombocytémie). Ve zvýšeném množství může mít i antiagregační účinky.

Schéma 1: Struktura Anagrelidu



Kromě samotného Anagrelidu jsou v literatuře popsána i některá jeho strukturní analoga. Mimo jiné byly pomocí syntézy v roztoku připraveny deriváty s absencí methylenové skupiny v poloze C⁵ (Schéma 2), která tedy lze označit jako 5-noranaloga původní struktury.

Schéma 2: Struktura 5-noranalogu základního skeletu Anagrelidu



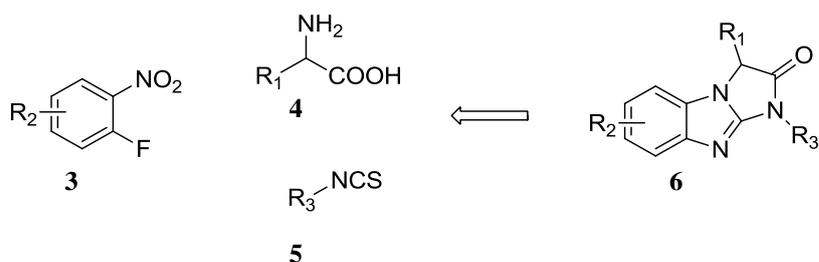
2

Navzdory této strukturní podobnosti bylo dosud pouze několika ojedinělými syntetickými přístupy připraveno omezené množství těchto derivátů a jejich biologická aktivita nebyla studována.

2. CÍL PRÁCE

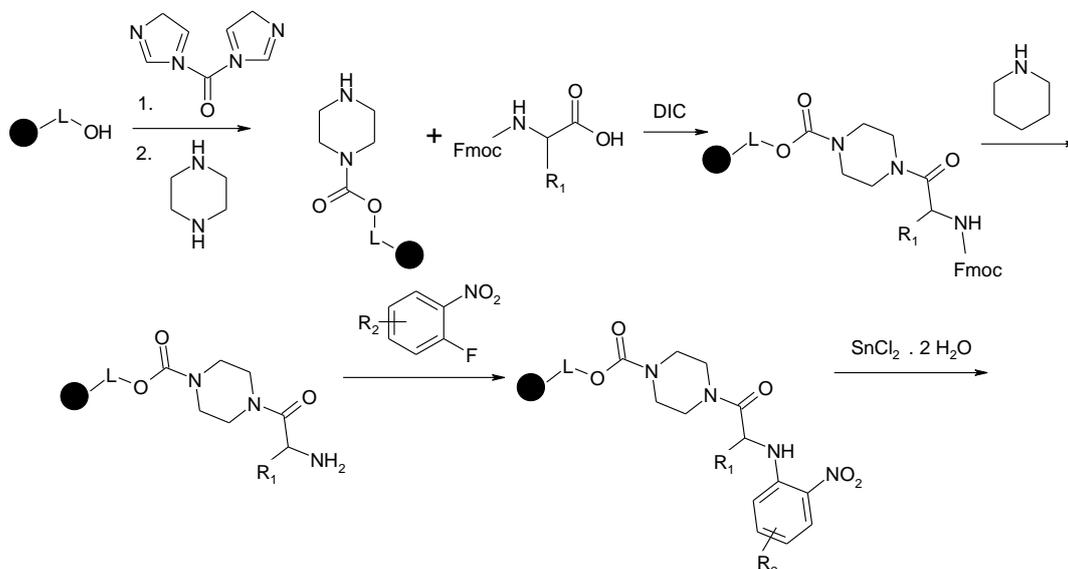
Cílem předložené práce je vývoj syntézy derivátů 5 - noranagrelidu. Jako výchozí látky byly navrženy pouze komerčně dobře dostupné sloučeniny: α -aminokyseliny (4), *o*-nitrofluorbenzeny (3) a isothiokyanáty (5) (Schéma 3).

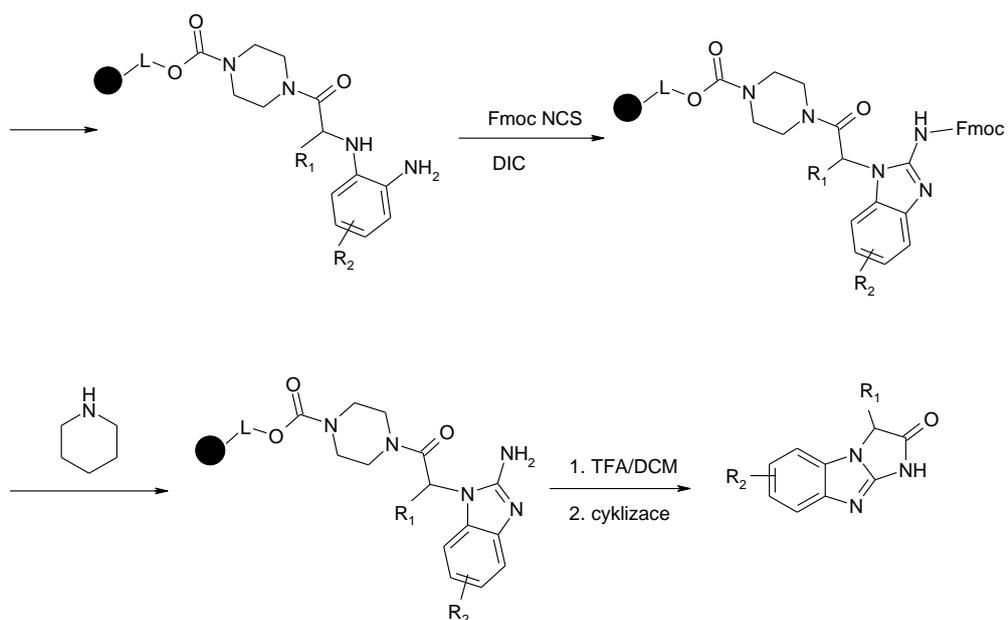
Schéma 3: Cílový skelet a zvolené výchozí látky pro jeho přípravu



Vzhledem k tomu, že účelem metodiky je příprava chemických knihoven pro případné studium závislosti biologické aktivity na struktuře cílových derivátů, je cílem práce aplikovat pro přípravu produktů syntézu na vhodně funkcionalizované polystyrenové matrici. Konkrétně se jedná o využití Wangovy pryskyřice. Celkové navržené reakční schéma je znázorněno níže (Schéma 4)

Schéma 4: Celkové reakční schéma





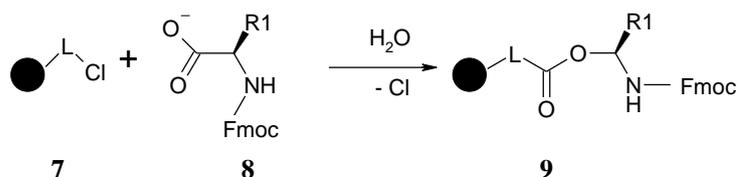
Reakční sekvence bude testována na vybraných, modelových výchozích látkách (4-fluoro-3-nitrobenzotrifluorid, Fmoc-aminokyseliny s různě substituovaným postranním řetězcem, Fmoc-NCS a benzyl-NCS). Cílem je optimalizace reakčních podmínek, příprava několika modelových derivátů a jejich strukturní charakterizace. Všechny připravené sloučeniny budou podrobeny biologickému testování na Ústavu molekulární a translační medicíny v Olomouci.

3. TEORETICKÁ ČÁST

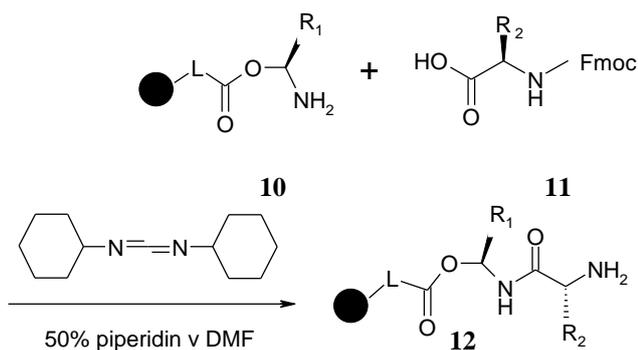
3.1. Syntéza na pevné fázi

Jde o chemický způsob syntézy organických sloučenin spočívající ve vazbě výchozí látky (např. aminokyseliny) na pevný substrát (nosič) s následným postupným vytvářením řetězce¹. Hlavní výhodou je rychlá a univerzální izolace meziproductů z reakční směsi. Poprvé byla tato metoda použita v minulém století Robertem Bruce Merrifieldem k syntéze peptidových řetězců. (Schéma 5)

Schéma 5: Imobilizace aminokyseliny přes C – konec



Syntéza dipeptidu z Fmoc-aminokyselin

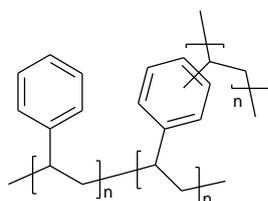


Jako pevný nosič se používá polystyren s vhodným linkerem. Nejčastěji používaným polystyrenem je buď PS (13), nebo PEG – PS (14).

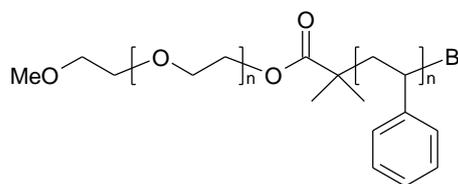
Pryskyřice typu PS je polystyren zesíťovaný divinylbenzenem. Obvykle bobtná v rozpouštědlech jako je DMF, DCM, DMSO, THF, málo v alkoholech. Loading této pryskyřice se obvykle pohybuje mezi 0.5 – 1.3 mmol/g.

Druhý typ pryskyřice je směs Tentagelu (15), Argogelu (16) a Novasynu TG (17). Bobtná dokonce i ve vodě a jeho loading je obvykle 0.2 – 0.3 mmol/g. Nevýhodou je ovšem jeho vyšší cena.

Schéma 6: Struktury jednotlivých typů pryskyřic



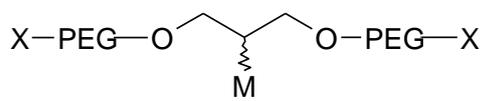
13



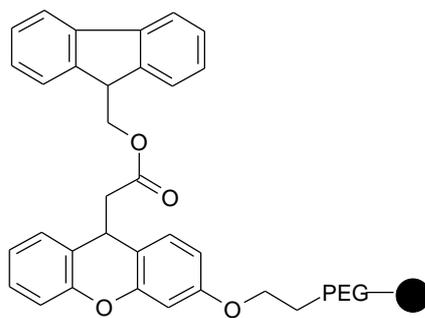
14



15



16



17

M = Merrifieldova pryskyřice

PEG = polyethylenglykol

X = Br, OH, COOH, ...

Důležitou součástí systému pro syntézu na polymerní matrici je tzv. linker². Hlavní rolí linkeru je vratné připojení počátečního materiálu k pevnému nosiči. Existuje několik kritérií, podle nichž se pak linker vybírá. Nejdůležitější je charakteristika výchozího materiálu, zejména zda je připojitelný k linkeru. Dále rozhodují podmínky syntézy, a zda je možné štěpit finální produkt selektivně bez rizika jeho dekompozice.

Kategorizace linkerů podle podmínek štěpení (Schéma 7)

- Linkery labilní v kyselém prostředí

Tyto linkery jsou většinou založeny na alkoxybenzylových chránících skupinách nebo tritylových systémech. Byly navrženy tak, aby docházelo ke štěpení už za mírně kyselých podmínek. Síla kyseliny potřebná k vyvolání štěpení je ovlivněna substituenty na aromatickém skeletu linkeru, které fungují jako donor elektronů. Linker je tím stabilnější, čím je méně alkoxy skupin nebo arylových kruhů a tím silnější kyseliny jsou nutné pro štěpení.

1. Wangova pryskyřice

Tento typ pryskyřice je bezpochyby nejčastěji používaná pryskyřice v oblasti syntézy na pevné fázi. Štěpení esterů probíhá za přítomnosti koncentrované TFA nebo směsi TFA a DCM (nejčastěji 50% roztokem). Tím se získají požadované karboxylové kyseliny. Naopak alkoholy jsou z Wangovy pryskyřice štěpeny 10% TFA v DCM.

2. Sheppardova pryskyřice

Tento typ se liší od Wangovy pryskyřice přítomností methoxy skupiny v ortho pozici. Díky tomu je v kyselém prostředí ještě více labilní a produkty lze štěpit už v 5% TFA v DCM.

3. Rinkova pryskyřice

Byla především vyvinuta pro syntézu peptidů a peptidových amidů. Avšak stejně jako u Wangovy pryskyřice bylo její využití rozšířeno od karboxylových kyselin a amidů až po aminy, thioly a alkoholy.

Existuje mnoho pryskyřic vycházejících z tohoto typu. Například Rinkova aminová pryskyřice pro imobilizaci aminů, Rinkova kyselá pryskyřice pro imobilizaci alkoholů a thiolů.

4. Další linkery

Tritylvé linkery se často využívají na imobilizaci karboxylových kyselin, primárních aminů a alkoholů. Pro lepší stabilitu v kyselině byl vytvořen fenyfluorenylový linker. Ten na rozdíl od tritylových obsahuje dva

fenylové kruhy, které jsou přemostěny, a tak tvoří fluorenylový systém. Štěpení z této pryskyřice se provádí ve směsi TFA : DCM : MeOH (2 : 7 : 1) po dobu 2h.

- Linkery labilní v bazickém prostředí

Tyto linkery jsou značně výhodné, protože odolávají mnoha reakčním podmínkám.

1. Methakrylová pryskyřice

Nový linker určený pro karboxylové kyseliny, thioly, alkoholy a aminy je odvozen od metakrylové kyseliny. Je stabilní v kyselých podmínkách a odolává i terciárním aminům, náchylný je na sekundární aminy a fluoridové ionty. Stabilita vůči nukleofilnímu štěpení roste v řadě $R = H < Me < i\text{-Pr} < Ph$.

2. DDE linker

Linker odvozený od 1 - (4,4-dimethyl-2,6-dioxocyklohexyliden) ethylu byl vytvořen zejména pro imobilizaci primárních aminů. Je stabilní v kyselých i bazických podmínkách, ale štěpení probíhá ve 2 % hydrazinu v DMF.

3. Sulfonylové a sulfonové linkery

Velmi zajímavý přístup zahrnuje použití nových sulfonylchloridových pryskyřic. Tato pryskyřice může obsahovat různé alkoxykupiny. Po syntetických reakcích se štěpení provádí reakcí s různými nukleofily, jako jsou aminy, thioláty a imidazol. Výhodné podmínky štěpení jsou 18 h při 60°C v acetonitrilu.

- Fotolabilní linkery

Fotolýza je typem štěpení za mírnějších podmínek na rozdíl od štěpení v kyselém nebo bazickém prostředí. Provádí se typicky ozářením pryskyřice v THF po dobu 16h vlnovou délkou 365nm. Tyto linkery jsou vhodné pro imobilizaci karboxylových kyselin a amidů.

- Traceless (bezestopé) linkery

Příkladem je polymerní arylsulfonátový linker pro syntézu trisubstituovaných olefinů.

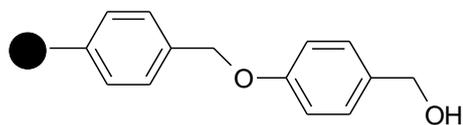
Dalším typem jsou arylsilanové pryskyřice, které jsou navrženy tak, aby uvolnily nesubstituovanou arylovou skupinu. Jsou labilní vůči kyselinám a fluoridovým iontům. Na takový silanový linker může být místo arylové skupiny navázán i alken.

Schéma 7: Přehled jednotlivých linkerů



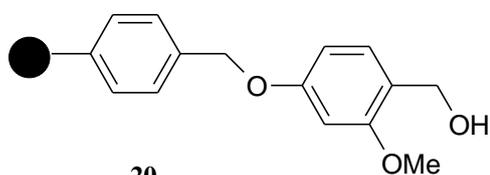
Merrifieldova pryskyřice

18



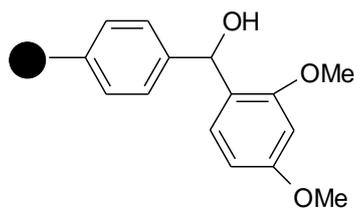
Wangova pryskyřice

19



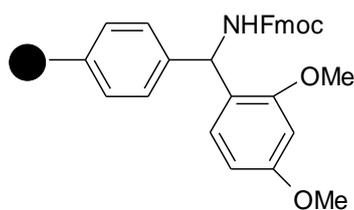
Sheppardova pryskyřice

20



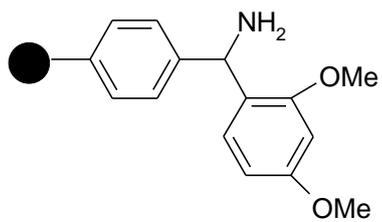
Rinkův kyselý linker

21



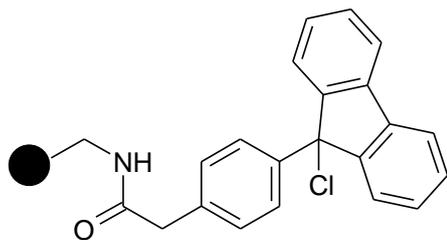
Fmoc – chráněný Rinkův amidový linker

22



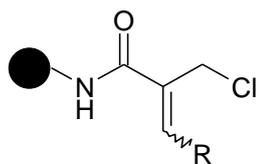
23

Rinkův amidový linker



24

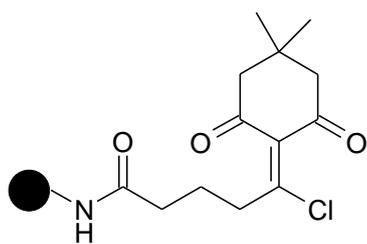
Fenylfluorenylový linker



25

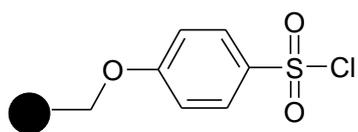
Methakrylový linker

R = H, Me, i-Pr, Ph



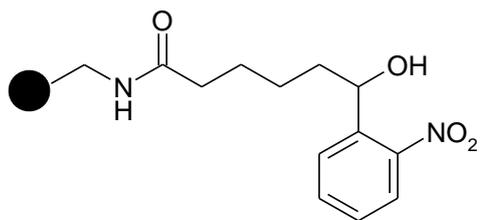
26

DDE linker



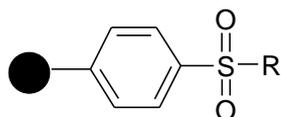
27

Sulfonylchloridový linker



28

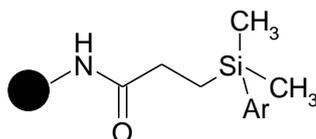
Fotolabilní linker



R = allyl

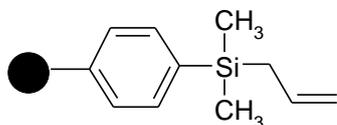
29

Arylsulfonátový linker



30

Arylsilanový linker



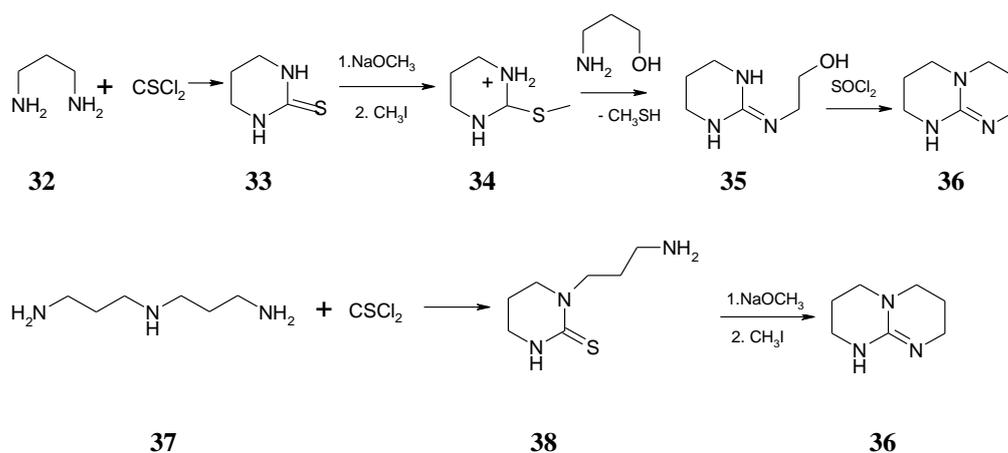
31

Allylsilanový linker

3.2. Vybrané přípravy cyklických guanidinů

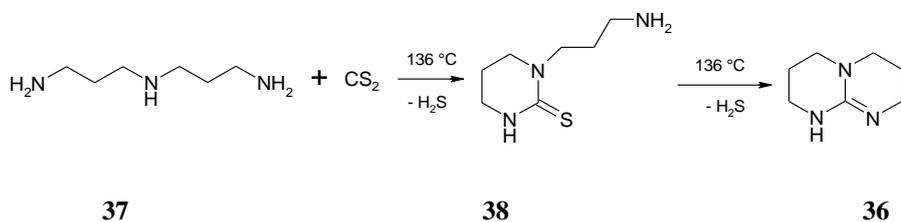
V literatuře lze najít mnoho metod pro přípravu cyklických derivátů pomocí syntézy v roztoku. Jednou z nich je i příprava 1,5,7 – triazabicyklo-[4.4.0]des-5-enu (TBD)³. Tato látka je známá zejména svou vysokou bazicitou, díky které je vhodným katalyzátorem v řadě reakcí. Příprava TBD vychází z chlorace propylenaminu (32) pomocí thiofosgeny. Výtěžky se pohybují mezi 30 až 70%. Tato reakce může být zjednodušena náhradou propylenaminu za *N*¹-(3-aminopropyl)propan-1,3-diamin (37) (Schéma 8)

Schéma 8



Navzdory dobrým výtěžkům jsou zde toxické reaktanty (thiofosgen a merkaptan). Další syntéza naznačuje nahrazení thiofosgenu za sirouhlík, nicméně sirovodík, který se během reakce tvoří, je také poměrně toxický. (Schéma 9)

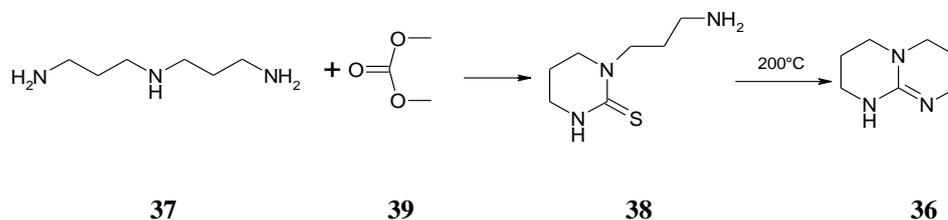
Schéma 9



Tato reakce poskytuje výtěžky až 80%. Díky značnému znečištění se ale v praxi často využívá vyšších teplot a různých rozpouštědel.

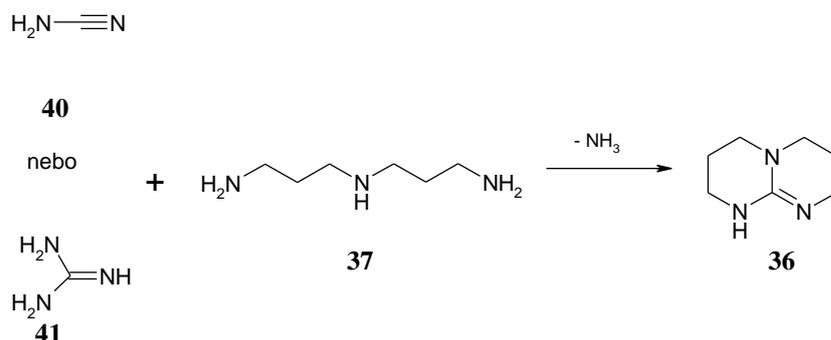
V poslední době se také doporučuje používat cyklické deriváty močoviny při zvýšených teplotách a dehydratační činidla (39). (Schéma 10)

Schéma 10



TBD lze připravit i z guanidinu a kyanamidu pomocí několika jednoduchých kroků. Příprava spočívá v zahřívání guanidinu nebo jejich derivátů s aminoderivátem (37) a silnou kyselinou na 140 až 180 °C za vzniku TBD ve výtěžku 95 až 97%. (Schéma 11)

Schéma 11



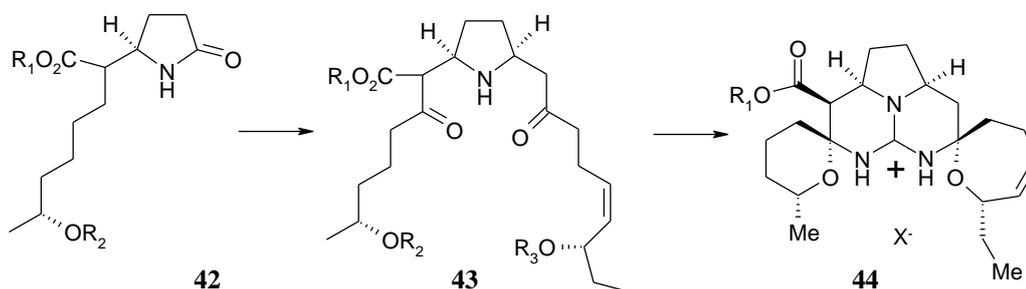
Nejdříve je nutný přídavek kyseliny (HCl, HBr), jejíž množství je ekvivalentní k triaminu. Bez kyseliny je výtěžek pouze 50%, přičemž nejlepší teplota pro reakci je 130 °C. Při nižší teplotě je reakce pomalá. Hlavní hnací silou reakce je odstranění těkavých aminů z reakční směsi (amoniak, dimethylamin)

Další metodou přípravy je syntéza bicyckých guanidinů z pyrrolidin-2-onu⁴. Nedávný vzestup zájmu o guanidinové alkaloidy činí molekuly obsahující strukturní motiv

guanidinu častým cílem organické syntetické chemie. V souvislosti s výzkumem totální syntézy ptilomycalinu byla zkoumána i syntéza bicyklických guanidinů z pyrrolidin – 2 – onu.

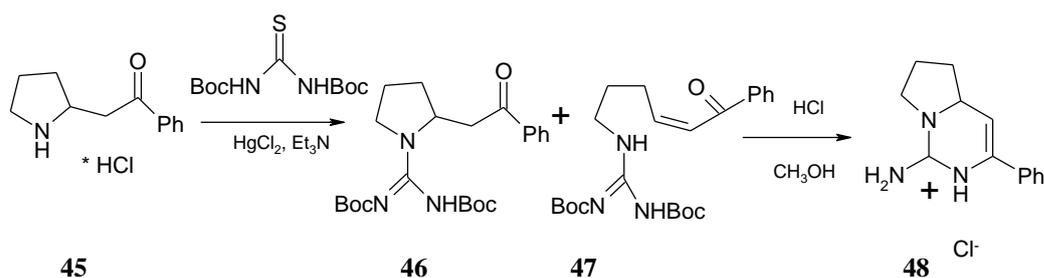
Schéma 12 ukazuje přítomnost pentacyklického jádra ptilomycalinu v 2 - substituovaných pyrrolidínech, ze kterých jsou pak syntetizovány cyklické guanidiny. 2,5 disubstituovaný pyrrolidin (43) je považován za přijatelný prekurzor pentacyklického guanidinu (44), tento prekurzor lze získat z monosubstituovaného laktamu (42).

Schéma 12



V poslední době se objevuje řada nových metod pro přeměnu aminu přímo na (chráněné) guanidiny. Předběžné studie na 2,5-dimethylpyrrolidinu jako modelové sloučenině pro sekundární aminy odhalila nejlepší výsledky u *N,N* - bis - (terc - butoxykarbonyl) - thiočoviny v přítomnosti HgCl₂. Tato metoda byla tedy vybrána pro syntézu bicyklických guanidinů z pyrrolidinu (45). Reakcí 45 s bis - Boc - thiočovinou v přítomnosti HgCl₂ se získá žádaný produkt 46 v 93 % výtěžku obsahující stopu acyklického produktu 47. Působení směsi 46 a 47 v methanolu vytváří guanidinovou sůl (48) ve vysokém výtěžku jako jediný produkt. Proto po deprotekcí 46 přímo následuje cyklizace volného guanidinu a dehydratace konjugovaného produktu 48. Deprotekce 47 vede k regeneraci pyrrolidinu prostřednictvím Michaelovy adice.

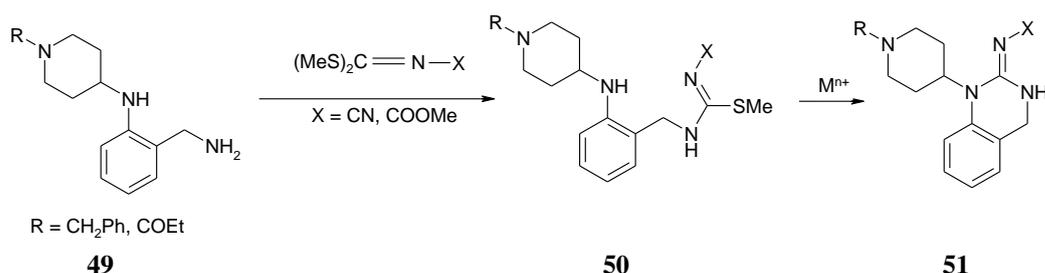
Schéma 13



Dále literatura popisuje syntézu cyklických guanidinů založenou na cyklizaci působením kovových iontů⁵. Tato metoda spočívá ve tvorbě pěti nebo šesti-členných cyklů u cyklických guanidinů. 2-(Amino)alanin nebo 2-(aminomethyl)alanin reagují s dimethylkarbonimidodisulfidem za tvorby isothiomočoviny, která účinkem iontů (Ag^+ , Hg^{2+}) cyklizuje za vzniku cyklických guanidinů (Schéma 14). Reakce probíhá za celkem mírných podmínek, ale tvorba klíčového produktu 2-(kyanoimino)tetrahydrochinazolinu vyžaduje drastičtější podmínky.

Dochází k zahřívání 2-(benzyl-aminomethyl)anilinu s dimethylkyanokarbonimidodisulfidem na 180 – 200 °C.

Schéma 14

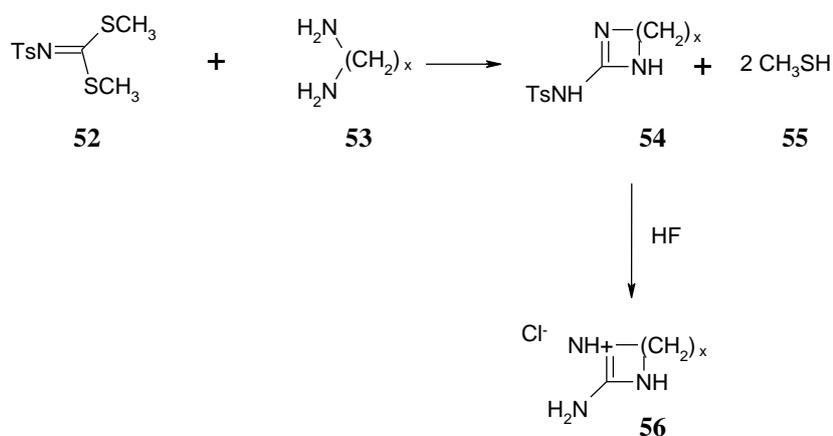


Metoda, která vychází z použití stříbrných nebo rtuťnatých iontů není tak drastická. Dochází k reakci *o*-fenyldiaminu s bází a s dimethylkarbonimidodisulfidem za vzniku 2-(kyanoimino)-1*H*-benzimidazolu. K cyklizaci pak dochází působením HgCl_2 , $\text{Hg}(\text{OAc})_2$, CH_3COOAg nebo CF_3COOAg .

Další metoda přípravy cyklických guanidinů využívá reakce mezi tosyl-chráněnými cyklickými guanidiny (54)⁶. Tyto sloučeniny jsou snadno dostupné z reakcí jak alifatických, tak aromatických diaminů (53) s *S,S*-dimethyl-*N*-tosyliminodithiokarbonimidátem (52). Detosylace v bezvodém fluorovodíku má pak za následek vznik cyklických guanidinů. Schéma 15 ukazuje přípravu tosyl-chráněných cyklických guanidinů z alifatických diaminů. Čím delší je alifatický řetězec diaminu, tím menší výtěžky reakce poskytuje.

Sloučenina 52 reaguje s různými alifatickými i aromatickými diaminy velmi ochotně, což poskytuje snadno izolovatelné tosyl-chráněné cyklické guanidiny a obvykle velmi obtížná detosylace může být provedena v bezvodém fluorovodíku docela snadno.

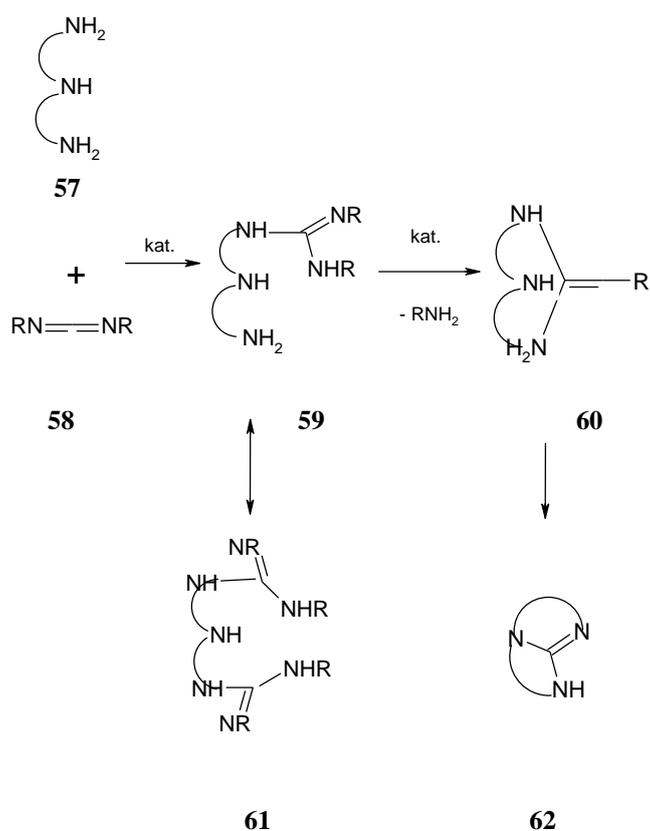
Schéma 15: Příprava tosyl-chráněných cyklických guanidinů



$x = 2, 3, 4, 6$

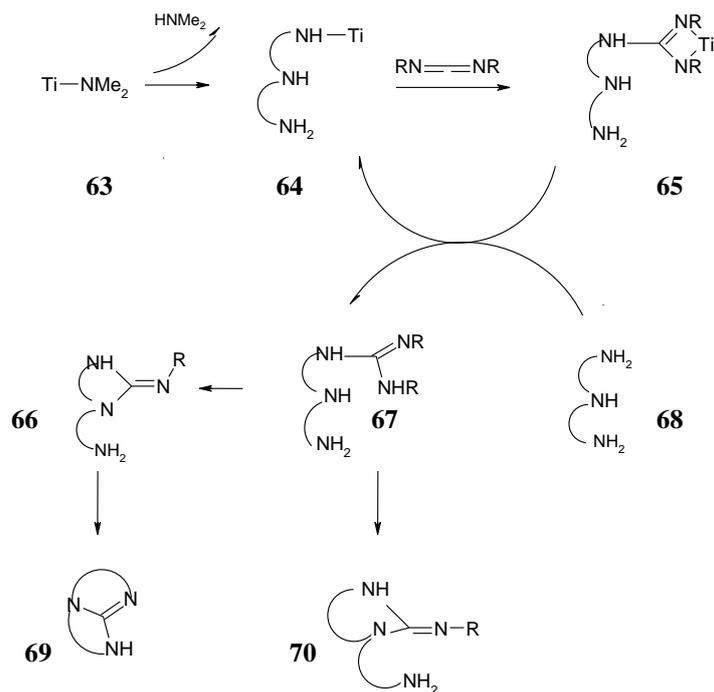
Další způsob přípravy cyklických guanidinů je založen na použití komerčně dostupných di/triaminů (57) a karbodiimidů (58)⁷. Tato metoda je jednodušší a výrazně rychlejší, neboť poskytuje cílové deriváty v jediném kroku.

Schéma 16



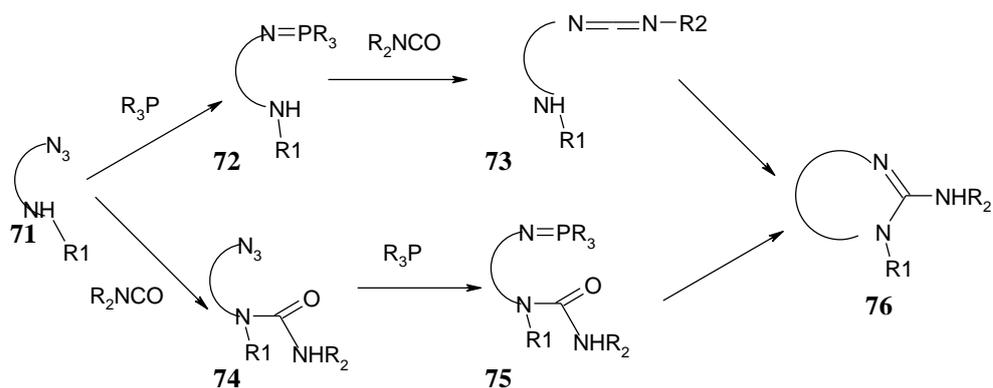
Reakce vyžaduje použití vhodného katalyzátoru. V tomto případě byl použit monoamid titanu, který je analogem kovového kationtu amidu. Tento komplex katalyzuje kaskádu hydroaminací kyanoalkynů za tvorby isochinolinů a isoindolů. Chová se i jako elegantní katalyzátor pro hydroaminaci karbodiimidů. (Schéma 17)

Schéma 17



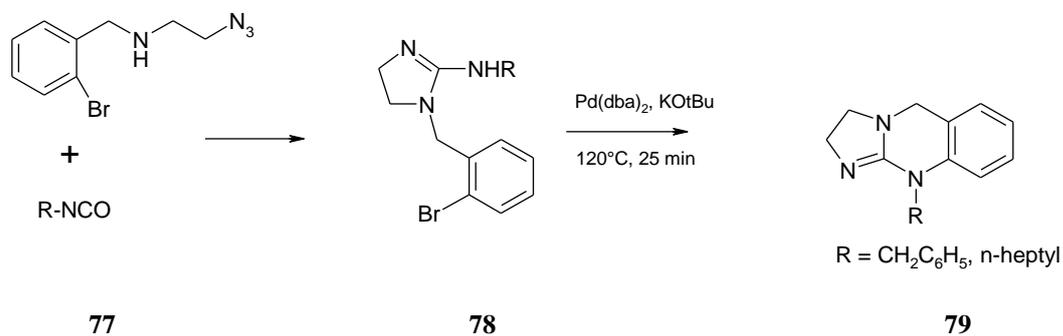
V literatuře jsou dále popsány novější zajímavé způsoby, jak syntetizovat cyklické guanidiny. V poslední době upoutala velkou pozornost Staudinger / aza-Wittigova reakce vedoucí k syntéze substituovaných *N*-heterocyklů⁸. V této souvislosti platí, že reakce β -amino-1-azidů s isokyanáty je výhodnější pro tvorbu různě substituovaných 2-aminoimidazolidinů (možné reakční cesty jsou znázorněny ve schématu 18). První cesta pokračuje vznikem iminophosphoranu, následuje tvorba karbodiimidu a nakonec intramolekulární cyklizace na požadované sloučeniny.

Schéma 18



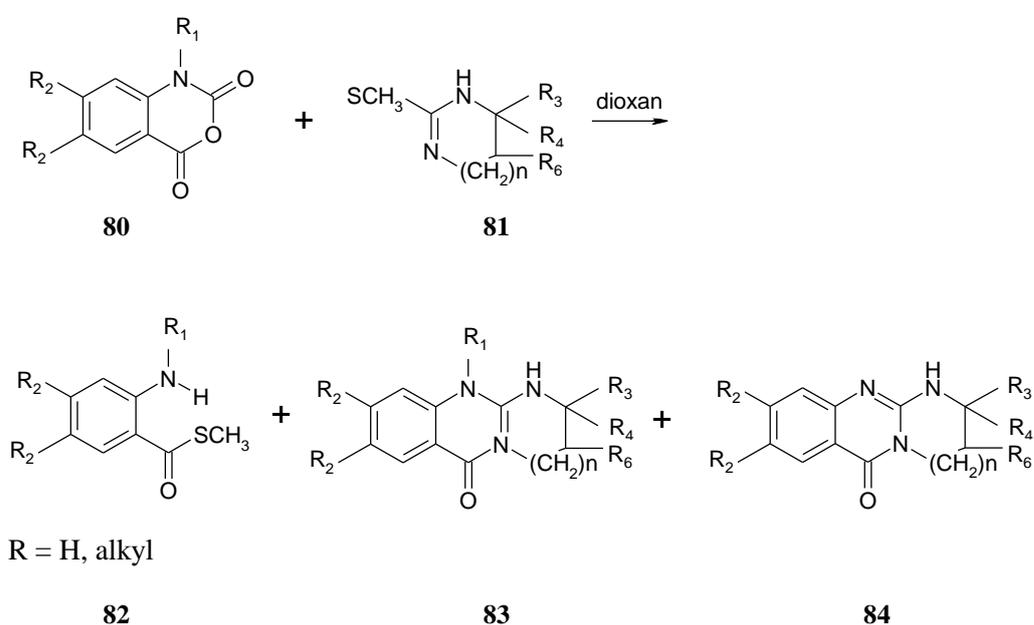
Staudinger / aza-Wittig / Buchwald-Hartwigova varianta byla v literatuře popsána pro přípravu látek skeletálně příbuzných derivátům řešeným v této práci (Schéma 19). Syntéza je založena na přípravě monocyklických guanidinů dle výše uvedené strategie a následné cyklizaci pomocí katalyzátoru na bázi palladia. Reakce probíhá za teploty 120 °C, při nižší teplotě než je 100 °C nedošlo k požadované cyklizaci.

Schéma 19



Jiný syntetický přístup byl popsán pro přípravu analogických sloučenin lišících se záměnou methylenové skupiny za karbonyl (Schéma 20)⁹. Princip přípravy těchto látek spočívá v působení *N*-substituovaných anhydridů isatoové kyseliny (80) s deriváty *S*-alkyl thiomocoviny (81). Tato reakce dobře funguje při 100°C v dioxanu nebo v jiných inertních rozpouštědlech. Při reakci vzniká velké množství cílové sloučeniny typu 83, ale i menší podíl *S*-methylesteru kyseliny thioanthranilové (82).

Schéma 20

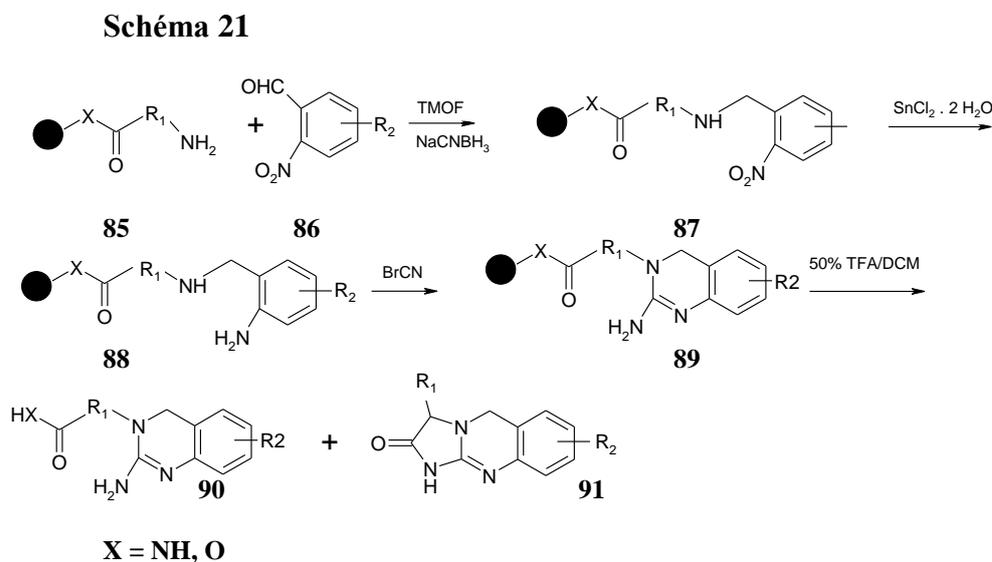


Možnost přípravy kombinatoriálních knihoven vyvolala velký zájem o proces syntézy na pevné fázi. Hlavním cílem je v současnosti vyvinout reakce vedoucí k syntéze malých organických molekul, důležitých zejména z medicánálního hlediska. Z tohoto důvodu se také zvýšil zájem o syntézu knihoven derivátů cyklických guanidinů pro biologické testování.

Jako vybraný příklad zde uvádíme přípravu derivátů blíže strukturně příbuzných cílovým derivátům této bakalářské práce¹⁰. Reakční sekvence spočívá v reakci imobilizovaných aminokyselin (85) s 2-nitrobenzaldehydem (86), redukcí nitro skupiny na amino skupinu (88) a cyklizaci výsledných meziproduktů s bromcyanem (89). Po kyselém

nebo bazickém štěpení vzniká požadovaná guanidinová sloučenina ve vysokém výtěžku a čistotě.

Za použití neprotogenních aminokyselin (*p*-aminobenzoová kyselina, 3-aminobenzoová kyselina) dochází k tvorbě 2 - aminochinazolinu jako konečného produktu. Za použití α -aminokyseliny (alanin) po reakci s bromcyanem následuje kyselé štěpení a získá se produkt tricyklické struktury: imidazochinazolin (3-methyl-1, 5 -dihydroimidazo [2,1-b]-chinazolin-2 (3*H*)-on (109). V tomto případě tedy dochází k sekvenčním cyklizacím.(Schéma 21)



Popsáno bylo i použití dalších aminokyselin jako glycin, leucin, izoleucin, fenylalanin. Po štěpení došlo ke tvorbě směsi tricyklických sloučenin a 2-aminochinazolinu u fenylalaninu, leucinu a izoleucinu. U glycinu vzniká pouze imidazochinazolin ve velké čistotě. Dále byl použit i methionin, valin, lysin, glutamin, kdy opět dochází k tvorbě směsi imidazochinazolinu a 2 - aminochinazolinu.

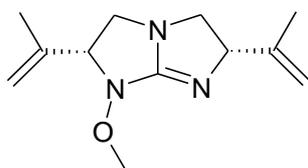
3.3. Vlastnosti bicyklických sloučenin na bázi guanidinu

Cyklické guanidiny mají fyzikální i chemické vlastnosti, které je odlišují od jejich acyklických protějšků¹¹. Tyto charakteristické rysy vedly ke hledání jejich využití v různých oblastech chemie, včetně organokatalýzy, nebo jako ligandy v koordinační chemii. Kromě neutrálních molekul byly široce zkoumány i kationty (guanidinium) nebo anionty (guanidinát).

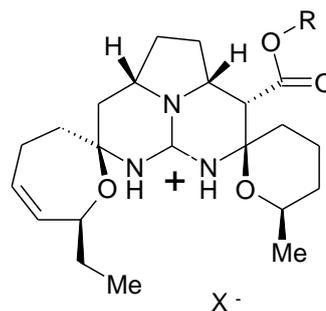
Důležitá vlastnost guanidinů je schopnost přenášet náboj, buď záporný pro guanidátové anionty, nebo kladný pro guanidiové kationty.

3.3.1. Přírodní látky na bázi guanidinu

Většina sloučenin obsahujících motiv cyklického guanidinu je syntetického původu. Nicméně je třeba poznamenat, že se látky s bicyklickým (a tricyklickým) guanidinovým skeletem vyskytují i v přírodě. Příklady zahrnují relativně jednoduché systémy, jako je isoalchornein (92), zdrojem je alkaloid izolovaný z jihu Afriky, a několik dalších biomolekul, včetně crambescidinu (cytotoxické/antivirové účinky), batzelladinu (anti-HIV). Bylo prokázáno, že to jsou metabolity z mateřského alkaloidu ptilomycalinu (93).

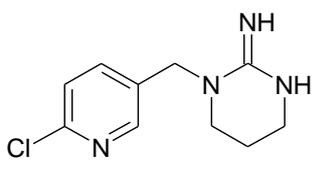


92

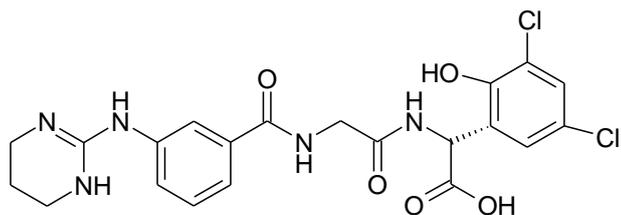


93

Jak už bylo mnohokrát řečeno, guanidiny jsou fyziologicky aktivní látky¹². Bývají například i součástí nikotinových $\alpha_4 \beta_2$ agonistů 94 nebo integrinových $\alpha\beta_3$ antagonistů 95.



94



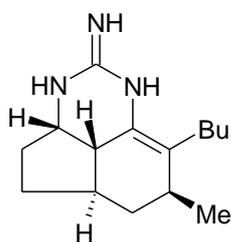
95

Nejznámějšími zástupci cyklických guanidinů přírodního původu s vysokou biologickou aktivitou jsou sloučeniny získané ze tří druhů hub, avšak všechny mají podstatné antimikrobiální účinky¹³. První byl získán z oranžové houby *Ptilocaulis*, je neaktivnější proti gram-pozitivním a gram-negativním bakteriím. Z této houby byly vyizolovány dvě látky, které nesou název ptilocaulin a isoptilocaulin.

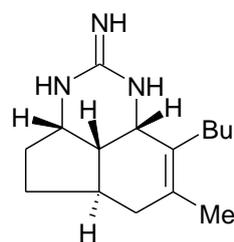
Ptilocaulin nitrát byl získán jako bezbarvá krystalická látka, isoptilocaulin jako žlutý olej obsahující z 10% ptilocaulin.

Ptilocaulin samotný má vyšší biologickou aktivitu, jeho ID_{50} je 0.39 $\mu\text{g/ml}$ (koncentrace pro 50% inhibici růstu buněk). Tyto dvě sloučeniny jsou isomery, rozdíly jsou dány právě přítomností ptilocaoulinu (96) nebo isoptilocaulinu (97). Tři dusíky v obou strukturách reprezentují guanidinový skelet. (Schéma 22)

Schéma 22



96

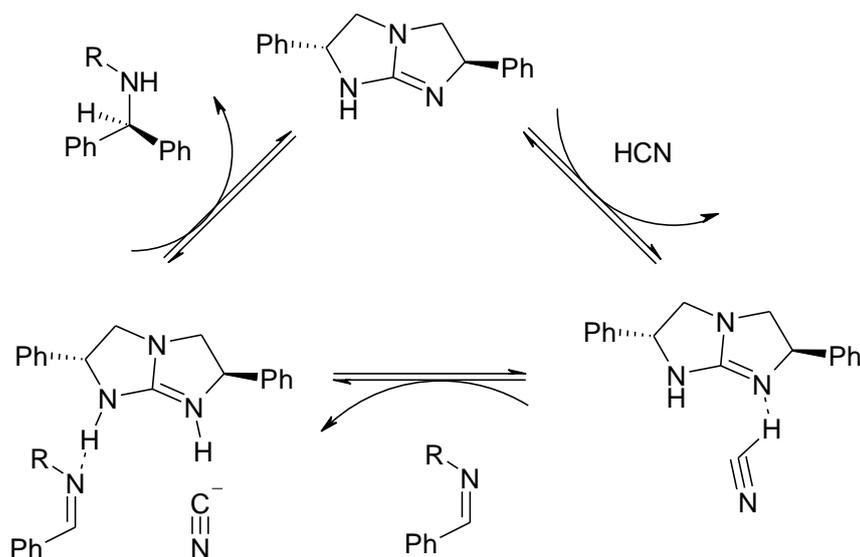


97

3.3.2 Syntetické guanidiny

Jedním z hlavních důvodů výzkumu chemie bicyklických guanidinů je jejich využití jako organokatalyzátorů a to především díky jejich vysoké bazicitě¹¹. Jejich výhody spočívají zejména v nenáročných reakčních podmínkách a snadné manipulaci. Rozpustnost mnoha guanidiniových solí ve vodě umožnila, aby byly zkoumány jako katalyzátory pro organické transformace. Příkladem takového využití je příprava chirálního α – amino nitrilu za katalýzy bicyklickým guanidinem. (Schéma 23)

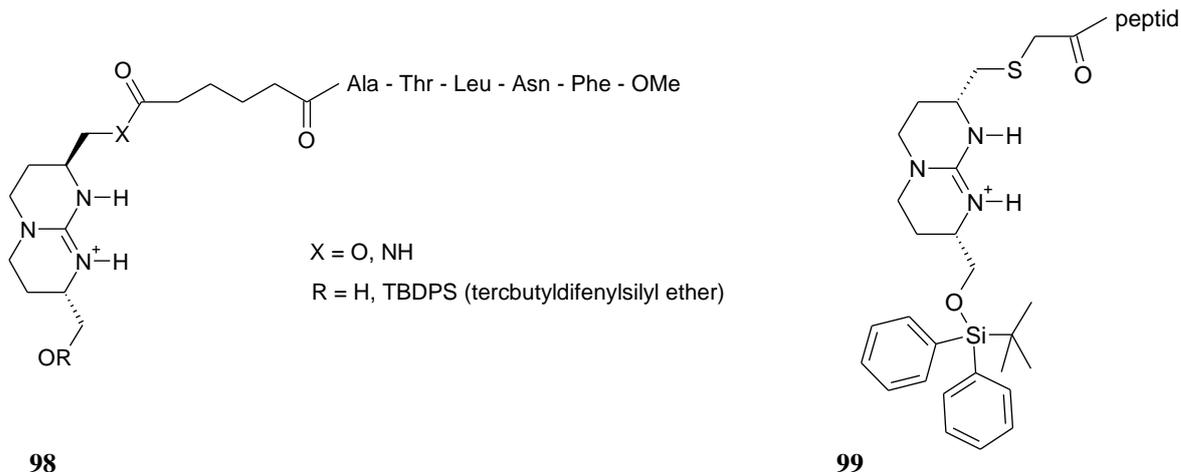
Schéma 23



3.3.2.1 Inhibitory HIV-1 proteasy založené na bicyklických guanidinech

Původní inhibitory HIV - 1 proteázy, založené na chirálních bicyklických guanidinech s krátkými peptidovými částmi a lipofilními skupinami jsou v současné době hodně studovány¹⁴. Tyto inhibitory zabraňují dimerizaci proteázy prostřednictvím mezifázové struktury na β - řetězec zahrnující N a C konec. (Schéma 24)

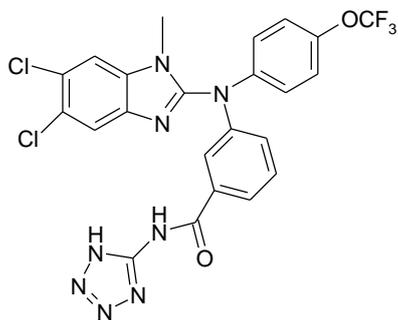
Schéma 24



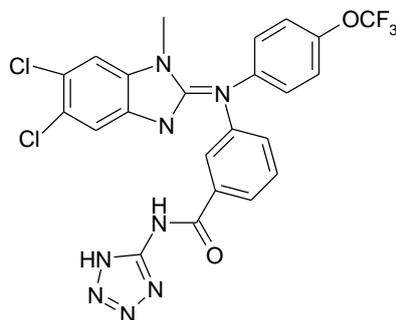
3.3.2.2 Cyklické guanidiny jako antagonisté lidských receptorů glukagonu

Glukagon a insulin jsou hlavní hormony odpovědné za regulaci glukózy v játrech¹⁵. V reakci na klesající hladinu glukózy v plazmě je glukagon vylučován ze slinivky břišní. Tento hormon G - protein vázané receptory. U pacientů s diabetem 2. typu nepřiměřeně zvýšené hladiny glukagonu vedou k nadměrné produkci glukózy, což je klíčový faktor, který přispívá k hyperglykemii. Na základě tohoto biologického zdůvodnění jsou malé molekuly antagonistů receptorů glukagonu využívány k léčbě diabetu 2. typu. Díky tomu se zvýšil zájem o cyklické guanidiny jako o antagonisty těchto receptorů. Nedávná zpráva popsala objev aminobenzimidazolu ze třídy hGCGR antagonistů. (Schéma 25)

Schéma 25



100

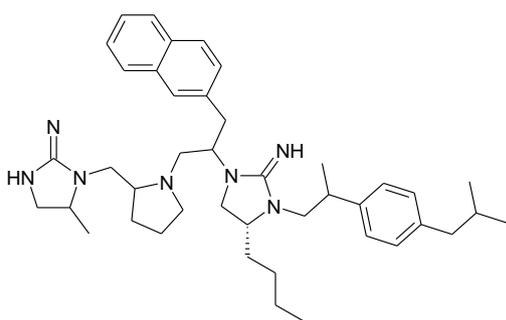


101

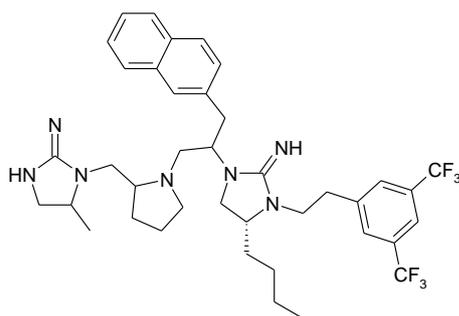
3.3.2.3 Antimikrobiální účinky

Rychlý nárůst rezistentních grampozitivních bakteriálních infekcí vedl k vývoji nových strategií pro syntézu velkých chemických knihoven s látkami s antimikrobiální aktivitou¹⁶. Příkladem jsou chemické knihovny založené na strukturních motivech uvedených ve schématu 26, které vykazují baktericidní aktivitu proti důležitému lidskému patogenu methicilin-rezistentní *Staphylococcus aureus* (MRSA)

Schéma 26: Struktury s vysokou baktericidní aktivitou

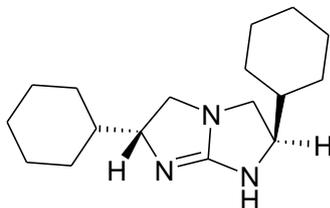


102



103

Sloučeniny obsahující cyklický guanidin vykazují také antihypotenzní a antiadrenergní účinky (104)¹⁷.

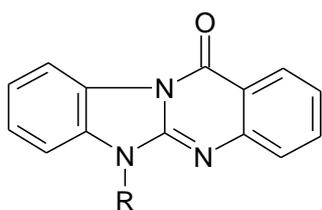


104

3.3.2.4 Antiproliferační aktivita

Benzimidazochinazolinové deriváty nesoucí různé alkylaminové postranní řetězce vykazují antiproliferační účinky na lidské nádorové buňky¹⁸. Cytotoxický účinek závisí na typu postranního řetězce vycházejícího z jádra a v některých případech je srovnatelný s účinkem dobře známého léku ellipticinu. Většina protinádorových léčiv se váže přímo na DNA. Mezi na DNA vázající se látky patří zajímavá skupina interkalátorů. Tyto látky ovlivňují prodlužování a vyztužování šroubovice, čímž vytváří strukturální změny. Působí tak na kondenzaci chromatinu a interakce s DNA enzymy. Mezi tyto látky se řadí i benzimidazoly a sloučeniny nesoucí benzimidazolovou skupinu. (Schéma 27)

Schéma 27

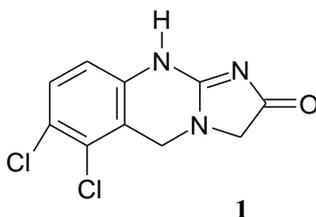


R = (CH₂)₂N(CH₃)₂
 (CH₂)₃N(CH₃)₂
 (CH₂)₂N(C₂H₅)₂
 (CH₂)₃N(C₂H₅)₂
 (CH₂)₂NH(CH₂)₂OH

105

3.3.2.5 Antithrombotická aktivita

Anagrelid



Tato sloučenina představuje bezpochyby nejznámější derivát cyklického guanidinu používaný v oblasti medicíny¹⁹. Léčivo Anagrelid (Agrylin[®], Xagrid[®]) se obvykle předepisuje na snížení počtu krevních destiček v krvi pacientů, kteří mají poruchu kostní dřeně, kdy tělo produkuje mnoho z jednoho nebo více typů krevních buněk. Tímto onemocněním je například esenciální trombocytémie, kdy organismus produkuje příliš mnoho červených krvinek nebo i krevních destiček. Anagrelid tedy funguje tak, že toto nadměrné množství redukuje.

Esenciální trombocytémie

Toto onemocnění je charakterizováno trvalou trombocytózou, hyperplazií kostní dřeně a zvýšeným rizikem trombózy a krvácení. Pacienti s mírnou formou tohoto onemocnění mohou být léčeni kyselinou acetylsalicylovou, pro pacienty s rozsáhlejším typem je první volbou hydroxykarbamid, Anagrelid je podáván až u rezistence nebo intolerance na hydroxykarbamid. Avšak rozsáhlé studie ukázaly, že primární cílový parametr (arteriální nebo venózní trombóza, vážné krvácení nebo úmrtí z vaskulárních příčin) se objevil mnohem častěji u příjemců Anagrelidu a aspirinu než u pacientů léčených hydroxykarbamidem (hydroxyurea) včetně kyseliny acetylsalicylové. U všech pacientů musí být prováděna kontrola na kardiovaskulární onemocnění.

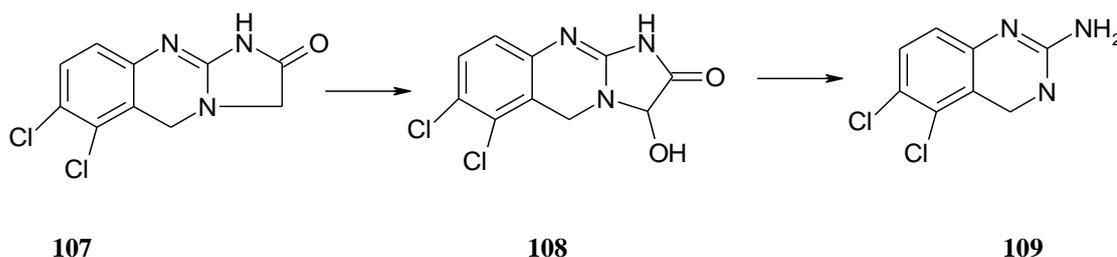
Farmakodynamické vlastnosti

Anagrelid inhibuje agregaci krevních destiček a změny tvaru trombocytů *in vitro* v důsledku silné inhibice adenosinmonofosfátu (cAMP). Avšak vyšší dávky tohoto léčiva u lidí vede k vytvoření trombocytopenie. U králíků, krysu nebo psů ale inhibuje vzniklou trombózu. U zdravých jedinců dokonce dávka 5 mg snižuje krevní tlak.

Farmakokinetické vlastnosti

U zdravých dobrovolníků je podáván Anagrelid po 1 mg orálně, maximální plazmatická koncentrace 4,5 mg/l bylo dosaženo po 0,9 hodiny. Distribuční objem Anagrelidu je 12 l/kg a lék je distribuován do hlubokých tkání a pomalu eliminován s terminálním eliminačním poločasem 76 hodin. 75% podané dávky Anagrelidu se vylučuje močí během 6 dnů, dalších 10 % je vylučováno stolicí. Anagrelid je rozsáhle metabolizován na minimálně 4 metabolity (aktivní 3-hydroxy anagrelid (108) a neaktivní 5,6-dichlor-3,4-dihydroquinazol-2-ylamin (109)). (Schéma 28)

Schéma 28

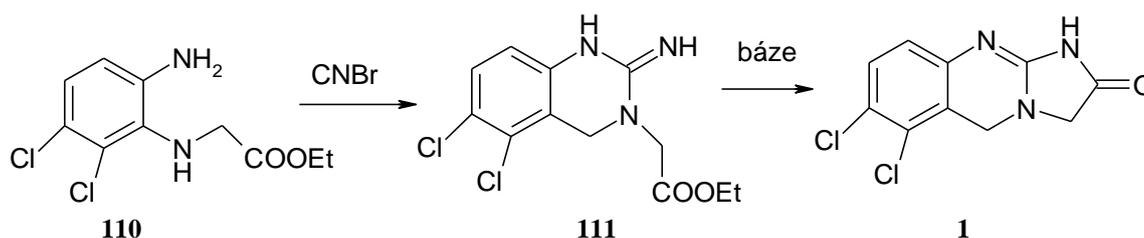


Nejsou k dispozici údaje týkající se vlivu věku nebo nemoci na farmakokinetické vlastnosti léku.

Příprava a vlastnosti

Komerčně je Anagrelid připravován z látky nazývané ethyl-*N*-(6-amino-2,3-dichlorobenzyl)glycin (110) reakcí s bromcyanem v aprotickém rozpouštědle jako je toluen²⁰. Tato reakce vede k iminochinazolinu (111), který je vyzolován a poté reaguje s bází v horkém roztoku alkoholu za vytvoření báze Anagrelidu. (Schéma 29)

Schéma 29



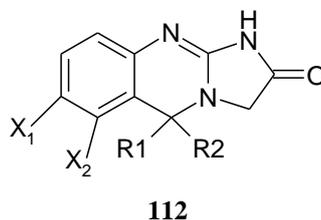
Deriváty odvozené od tohoto léčiva, zejména 3- a 5-substituované deriváty Anagrelidu, mají další zajímavé účinky²¹. Tyto látky mají velmi nízké PDE III inhibitory (inhibitory fosfodiesterázy III) oproti samotnému Anagrelidu. Mají široké využití v léčbě případů, kde je tato inhibice nutná. Deriváty Anagrelidu (imidazo[2,1-*b*] chinazolin - 2 - ony), jejichž vzorce jsou uvedeny níže (Schéma 30), mohou být tedy inhibitory zvýšené produkce krevních destiček stejně jako Anagrelid, ale narozdíl od něj mají nedostatečné trombocytopenické účinky. Nejčastěji jsou ale využívány jako antithrombotické přípravky.

Schéma 30

R1 = C₁₋₆ alkyl, C₁₋₆ haloalkyl

R2 = H, C₁₋₆ alkyl, C₁₋₆ haloalkyl

X₁, X₂ = halogeny

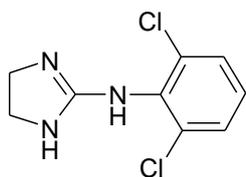


Tyto látky se připravují jako diastereoizomery, geometrické izomery nebo jejich směsi, avšak všechny vykazují potřebné vlastnosti k farmakologickým účinkům. Nemají žádný nežádoucí účinek na protisrážlivá léčiva jako aspirin, clopidogrel, prasugrel. Tyto látky totiž nezasahují adenosin difosfát receptor P2Y₁₂, cíl clopidogrelu a prasugrelu.

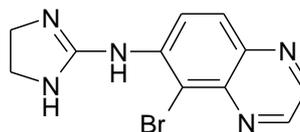
3.3.2.6 Další významné vlastnosti využitelné ve farmakologii

Struktura cyklických guanidinů (2-aminoimidazolidin) představuje dále součást mnoha léčiv (Klonidin-anestetikum, Brimonidin- antiglaukoma, antibiotikum ze skupiny Streptothricinů) a bioaktivních přírodních produktů. (Schéma 31)⁸.

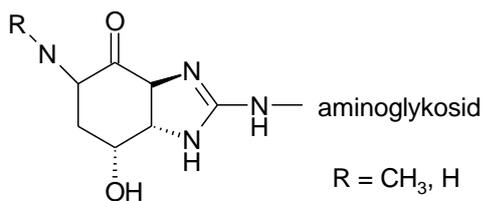
Schéma 31



Klonidin



Brimonidin



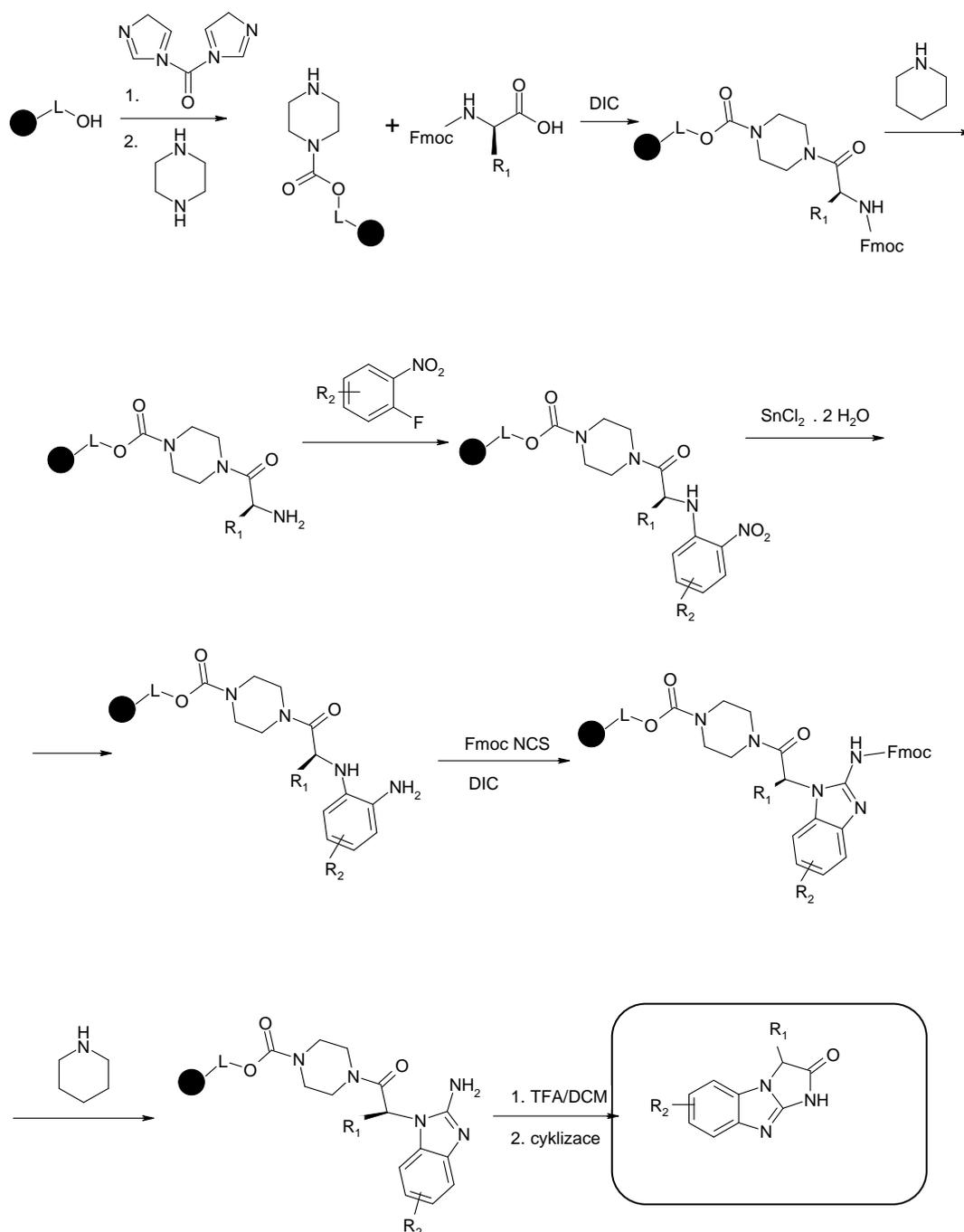
Antibiotikum

4. VÝSLEDKY A DISKUZE

Na základě kapitoly 1 je hlavním cílem této práce zejména ověření metody pro přípravu vybraných derivátů 5-noranagrelidu, poté samotná příprava modelových sloučenin a optimalizace jednotlivých kroků.

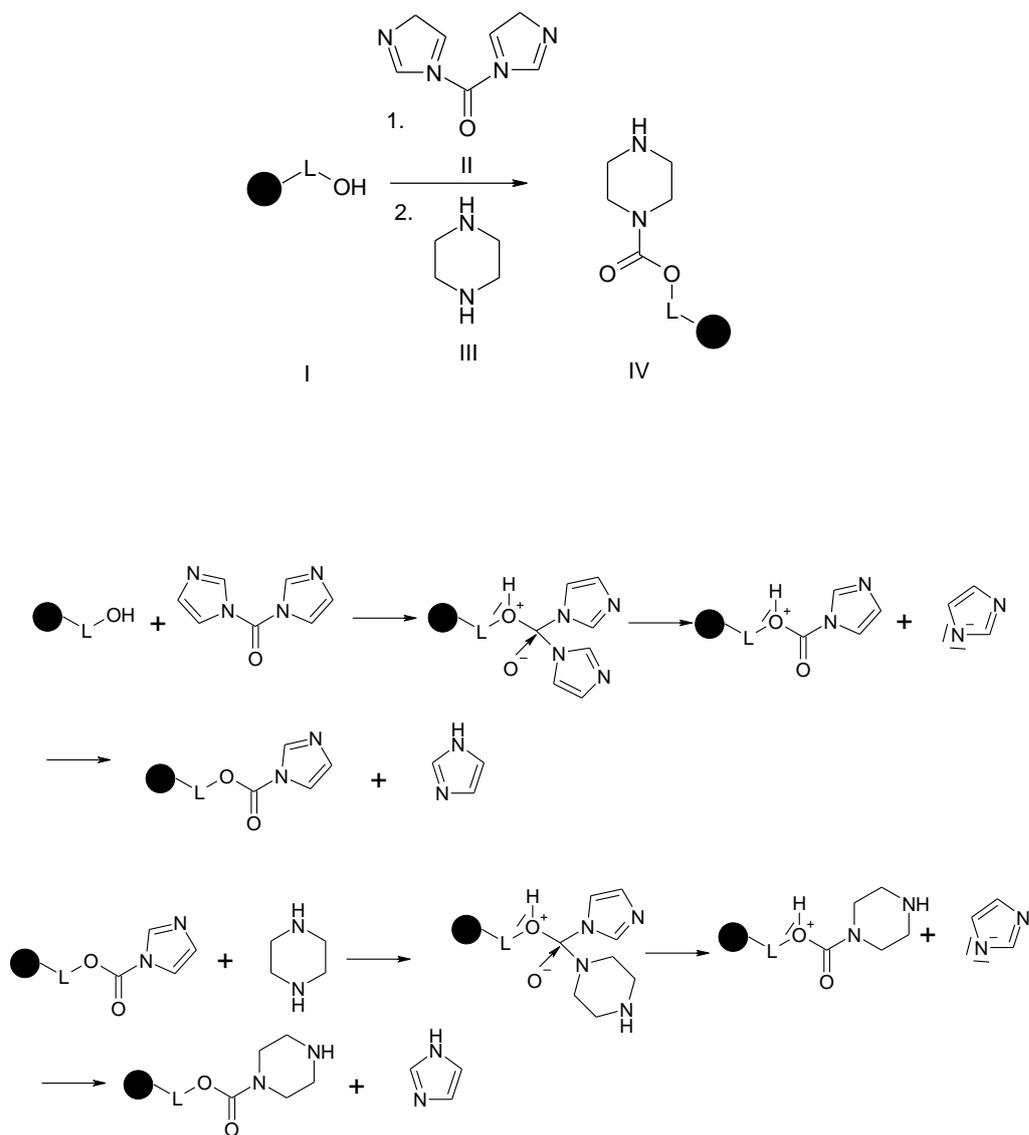
4.1. Syntéza noranalogů derivátů Anagrelidu na Wangově pryskyřici vycházejících z různých typů aminokyselin

Obecné schéma syntézy



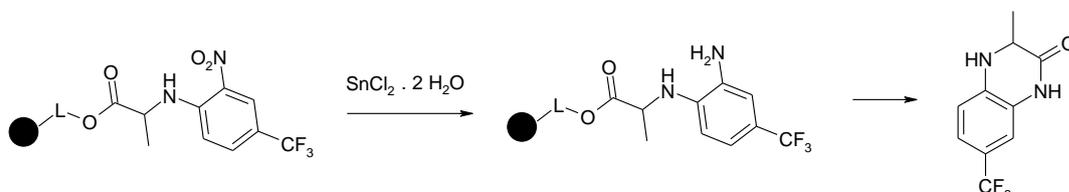
V této práci byl použit pouze jeden druh polystyrenové pryskyřice, což je kopolymer styrenu a divinylbenzenu, a to Wangova pryskyřice (I). Prvním krokem reakční sekvence bylo ukotvení piperazinu. K této reakci byl použit roztok CDI (II) a pyridinu jako báze v DCM (reakční doba 2 h), následně byl přidán roztok piperazinu (III) v DCM (reakce přes noc). (Schéma 32)

Schéma 32 – imobilizace piperazinu včetně mechanismu reakce



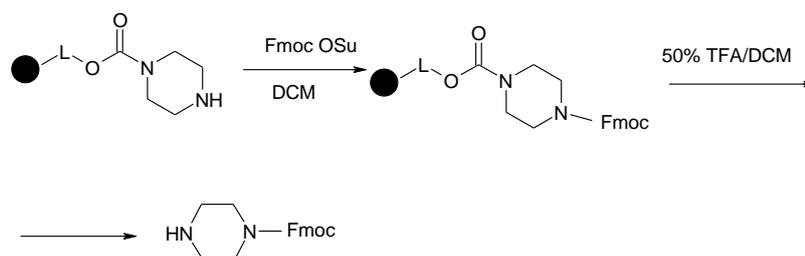
Inkorporace piperazinu měla pro zdárný průběh reakční sekvence zásadní význam, protože při ukotvení aminokyseliny přímo na Wangově pryskyřici by ve fázi redukce nitroskupiny docházelo k nežádoucímu odštěpení intermediátu z polymerního nosiče vlivem cyklického štěpení. (Schéma 33)

Schéma 33



Po imobilizaci piperazinu byla provedena jeho kvantifikace. To slouží ke zjištění, zda došlo k dostatečnému navázání piperazinu a zda je pryskyřice vhodná pro další reakce pro syntézu požadovaného intermediátu v preparativním měřítku. Protože piperazin není UV aktivní molekula, byl pro potřeby stanovení derivatizován pomocí Fmoc-OSu. Vzniklý Fmoc-piperazin byl po odštěpení z pryskyřice stanoven pomocí HPLC s použitím Fmoc-Ala metodou vnějšího standardu. Loading pryskyřice IV byl takto stanoven na 0,6 mmol piperazinu na gram pryskyřice, což odpovídá 75 % výtěžku reakce.

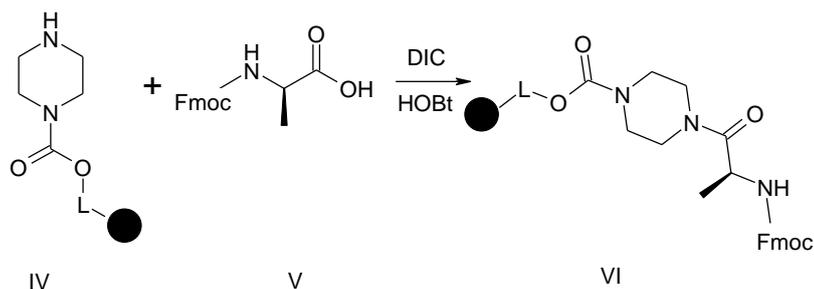
Reakce s Fmoc-OSu



V dalším kroku byl imobilizovaný piperazin acylován vhodně chráněnou aminokyselinou. Jako modelová sloučenina byl nejprve vybrán Fmoc-Ala, tudíž následující schémata budou popisovat přípravu cílové sloučeniny z této výchozí látky. Pro acylaci byla použita technika aktivovaného HOBt esteru, tedy roztok Fmoc – aminokyseliny, HOBt a DIC

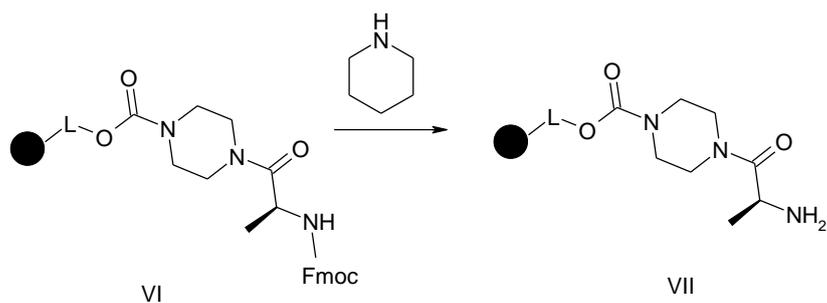
v DCM/DMF (1:1). Po této reakci malé množství pryskyřice zreagovalo s roztokem Fmoc-OSu ke kontrole, zda proběhla reakce kvantitativně a zda tedy pryskyřice neobsahuje ještě výchozí materiál. Tato kontrola byla vždy negativní, tudíž se acylace nemusela opakovat či optimalizovat, HPLC čistota se vždy pohybovala kolem 99%. (Schéma 34)

Schéma 34



Meziprodukt (VI) byl následně podroben štěpení Fmoc-protektivní skupiny, kterou bylo nutno odstranit pro provedení dalších kroků. K ochránění byl použit standardně 50 % roztok piperidinu v DMF. Tato reakce je rychlá a spolehlivá, tudíž opět nebylo třeba žádné optimalizace. (Schéma 35)

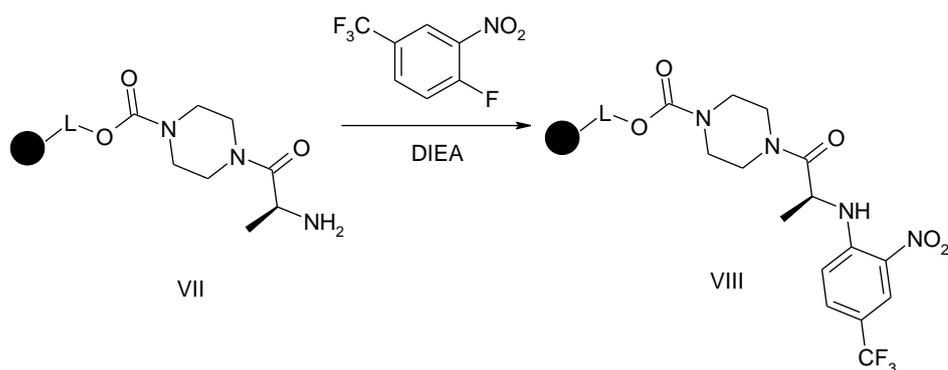
Schéma 35 – štěpení Fmoc protektivní skupiny



Další krok spočíval v arylaci *o*-nitrofluoroderivátem, v tomto případě byl jako modelový reagent zvolen 4-fluoro-3-nitrobenzotrifluorid. K pryskyřici byl přidán 0,2 M roztok této látky s ekvivalentem DIEA v DMSO. Pro kontrolu kvantitativního průběhu reakce byl opět proveden test pomocí reakce s roztokem Fmoc-OSu v DCM, který odhalil asi 50% množství

výchozí látky (VII) a 50 % množství požadovaného produktu (VIII). Proto byla následně zvýšena koncentrace nitroderivátu a DIEA na 0,4 M. Poté už reakce probíhala kvantitativně, HPLC čistota byla 99%.

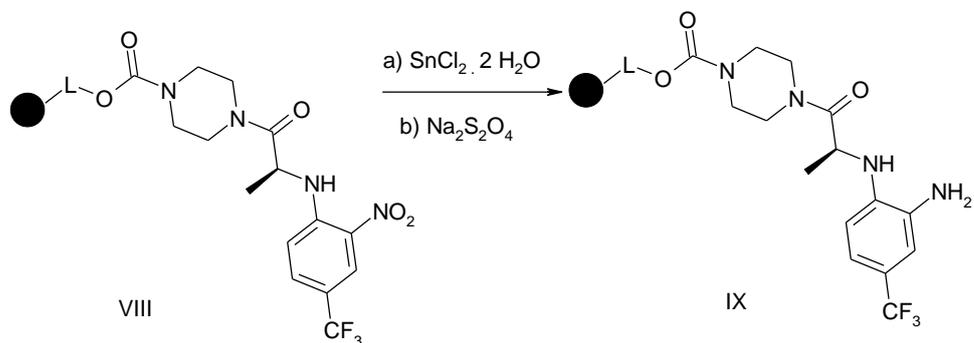
Schéma 36 – arylace



Nitro skupina vzniklého meziproductu (VIII) se musí pro další reakce zredukovat na aminoskupinu, tudíž dalším krokem byla redukce. Nejprve byla testována redukce pomocí $\text{SnCl}_2 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$. Tato část syntézy byla nejproblémovější, neboť se dlouhou dobu nedařilo dosáhnout požadovaného produktu kvantitativně. Zde je nutné uvést, že při štěpení intermediátu IX vznikal působením TFA také derivát chinoxalinu X (schéma 38), v analytickém vzorku byly přítomny obě tyto sloučeniny. Po řadě optimalizací byla konverze zvýšena pomocí vyšší koncentrace redukčního činidla, produkt byl ovšem stále kontaminován vedlejšími produkty. Proto byl hledán jiný způsob, jak nitro skupinu zredukovat.

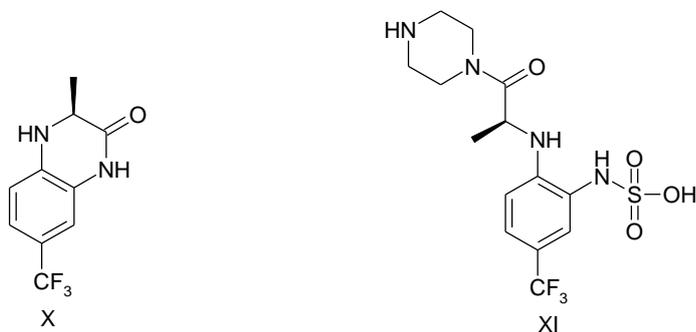
Takovou alternativou bylo použití roztoku $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$, K_2CO_3 a TBAHS ve vodě a DCM (1:1). Tato metoda poskytla cílový produkt kvantitativně ve výrazně kratším reakčním čase. Dále byla výhodnější pro konečnou purifikaci produktu, neboť nebylo potřeba látku zdlouhavě čistit od cínatých a cíničitých solí.

Schéma 37 - redukce pomocí chloridu cínatého nebo dithioničitanu sodného



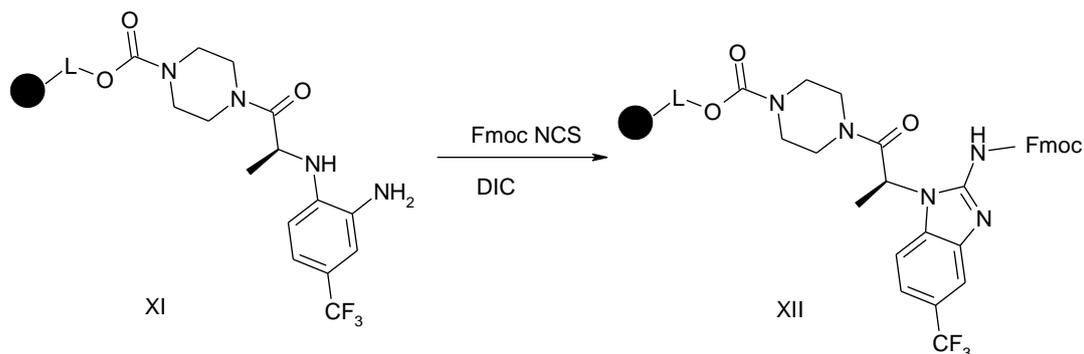
Tato metoda má ale i určitou nevýhodu a to vznik vedlejšího produktu. Jedná se o derivát (XI) vznikající reakcí zredukovaného derivátu s nadbytkem dithioničitanu. Při dalším kroku sekvence však tento derivát v daném případě rovněž poskytoval žádaný produkt, jeho tvorba tedy nijak nekomplikovala celkový průběh syntézy. Sloučeniny X a Y byly v analytickém vzorku detekovány o čistotě 45% (X) a 55% (XI). (Schéma 38)

Schéma 38



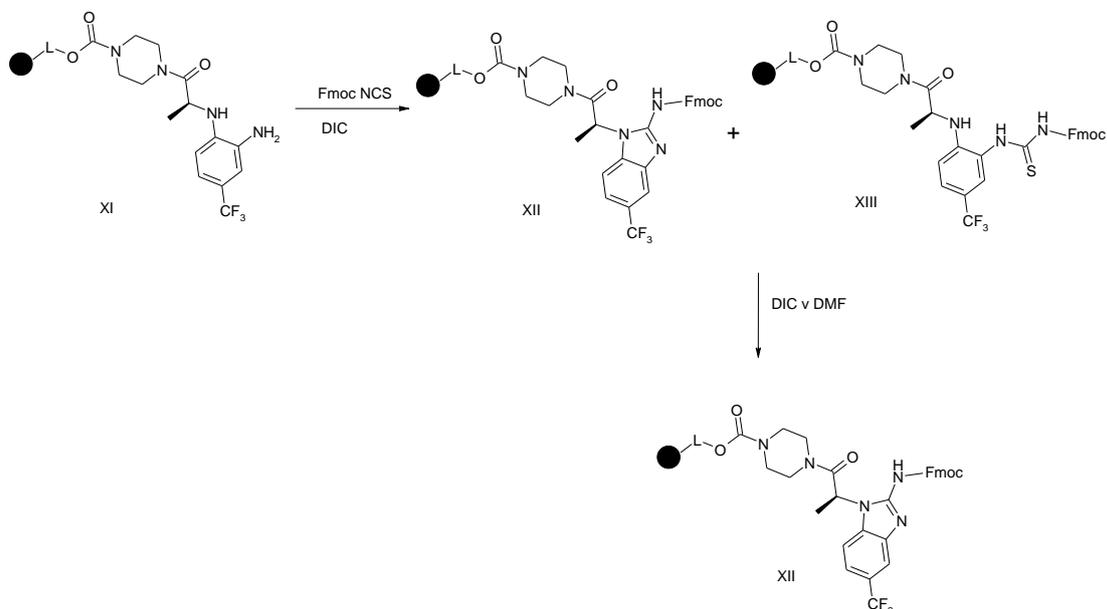
Následujícím krokem byla reakce s Fmoc-NCS za získání požadovaného Fmoc-derivátu (XII). Při této reakci byl použit roztok Fmoc-NCS s ekvivalentem DIC v suchém THF. Reakce proběhla velmi rychle (reakční čas byl pouze 30 minut). (Schéma 39)

Schéma 39



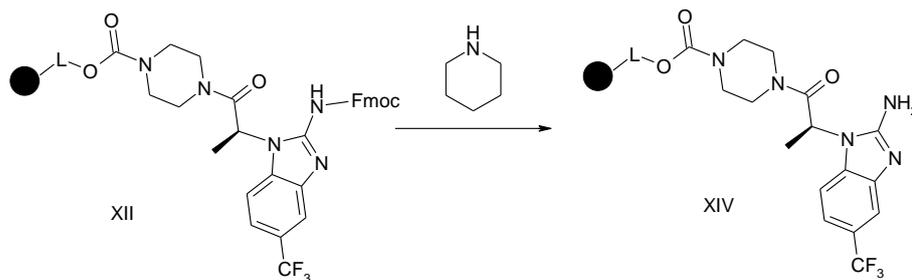
Při dalších experimentech však bylo zjištěno, že kromě očekávaného produktu často vzniká i necyklický meziprodukt (XIII). Tento produkt se zde obvykle vyskytoval i po prodloužení reakčního času. Byla-li však směs derivátů XII (65%) a XIII (35%) vystavena dalšímu působení DIC v DMF, došlo ke kvantitativní cyklizaci za vzniku jednotného produktu XII (HPLC čistota 85%). (Schéma 40)

Schéma 40 – reakce s Fmoc-NCS, následná cyklizace



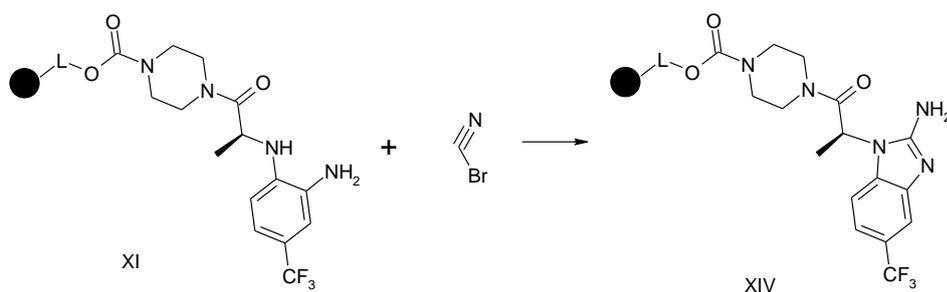
Dalším krokem bylo štěpení Fmoc-protectivní skupiny, které bylo klasicky provedeno 50 %-ním roztokem piperidinu v DMF.(Schéma 41)

Schéma 41



Jako alternativní metoda přípravy derivátu XIV přímo z intermediátu XI byla testována reakce s bromcyanem. Při zvýšené teplotě (45°C) bylo dosaženo kvantitativní konverze za vzniku požadovaného derivátu, HPLC čistota byla dokonce 95%. Tato metoda je velmi výhodná, neboť zkracuje syntézu o dva stupně.

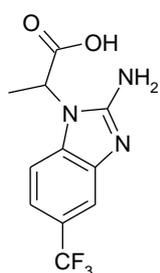
Schéma 42



Posledním krokem této syntetické metody byla finální cyklizace. Navržený postup spočíval nejprve v odštěpení intermediátu XIV z polymerního nosiče pomocí 50 % TFA v DCM. Štěpící koktejl byl následně odfoukán dusíkem a zbylý materiál byl zahříván na 50 °C v methanolu. Výsledky po této reakci však nebyly uspokojivé, zejména z důvodu nízké čistoty a přítomnosti výchozí látky i při reakčním čase 24 hodin.

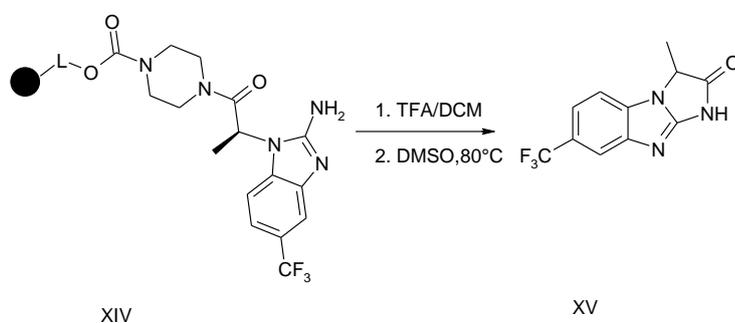
Další pokus bylo použití DMSO místo MeOH, roztok byl zahříván na 80 °C po dobu 3 dnů. Produkt byl už získán ve větší čistotě, avšak pořád se zde vyskytovaly další látky, jako například karboxylová kyselina vznikající hydrolyzou intermediátu XIV (Schéma 43).

Schéma 43



Další optimalizací bylo použití suchého DMSO. Tato metoda fungovala výborně u modelové sloučeniny připravované z Fmoc-Ala, ostatních finálních produktů (viz. další syntetizované deriváty) ale opět neposkytovala optimální výsledky. Nejlepší surové čistoty (78%) bylo dosaženo, byl-li vzorek po odštěpení a odpaření TFA lyofilizován a až poté cyklizován v DMSO.

Schéma 44

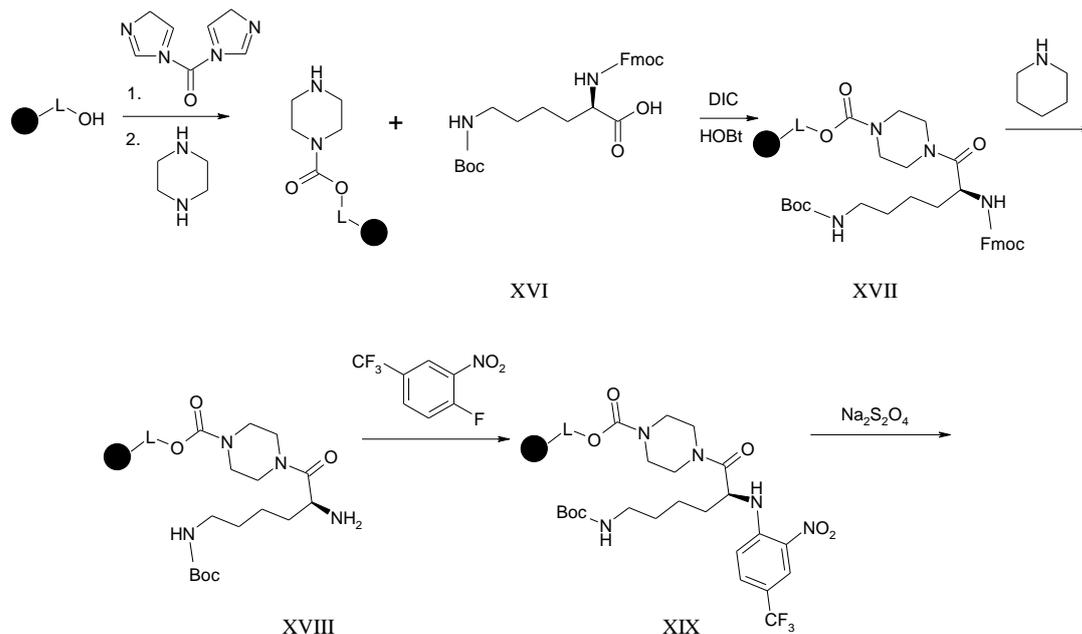


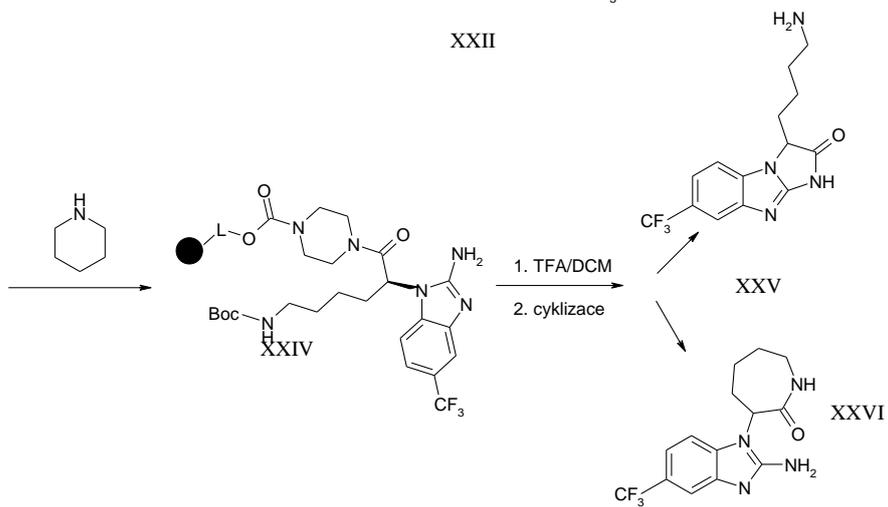
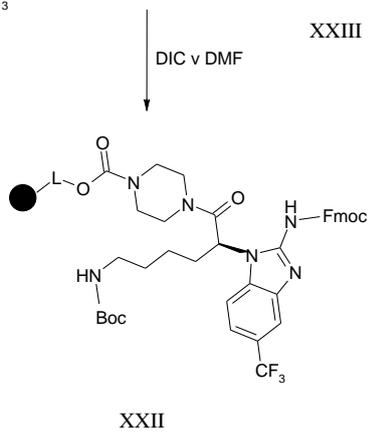
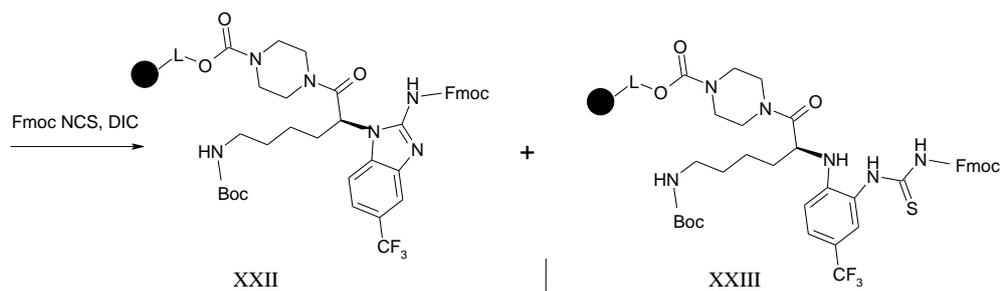
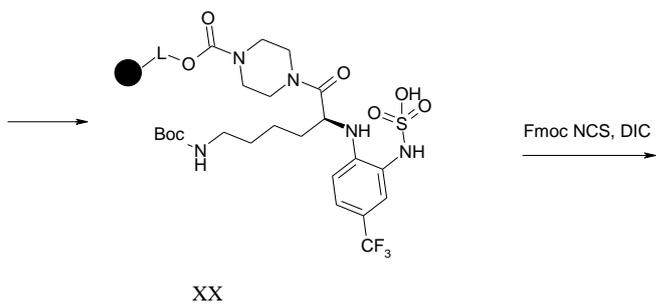
Pomocí optimalizovaných reakčních podmínek byla připravena sloučenina (XV) v preparativním množství. Po purifikaci na semipreparativním HPLC byla struktura látky potvrzena pomocí ^1H NMR. Produkt byl obdržen v celkovém výtěžku 75%.

4.2 Syntéza vycházející z lysinu

Syntéza tohoto derivátu opět vychází z Wangovy pryskyřice s imobilizovaným piperazinem. Následuje sled reakcí stejně jako u derivátu z α alaninu; alkylace, štěpení Fmoc skupiny, arylace, redukce pomocí $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$. Problém ale nastal při reakci s BrCN. Po jejím uskutečnění bylo dosaženo požadovaného produktu o nízké čistotě 55%. Proto musela být provedena alternativní reakce s Fmoc-NCS, která v tomto případě vyžadovala 24 h místo 30 minut, poté cyklizace s DIC v DMF a nakonec štěpení Fmoc-skupiny. V tomto případě už byla čistota intermediátu XXIV dobrá (85%) a mohla následovat cyklizace v DMSO. Jako produkt zde teoreticky může vznikat buď sloučenina XXV, nebo XXVI. Bohužel, finální cyklizace pro tento derivát probíhala velmi obtížně. I po mnoha optimalizacích nebylo možné produkt vyizolovat, neboť byla ve všech případech obdržena pouze jako součást velmi pestré směsi látek.

Schéma 45

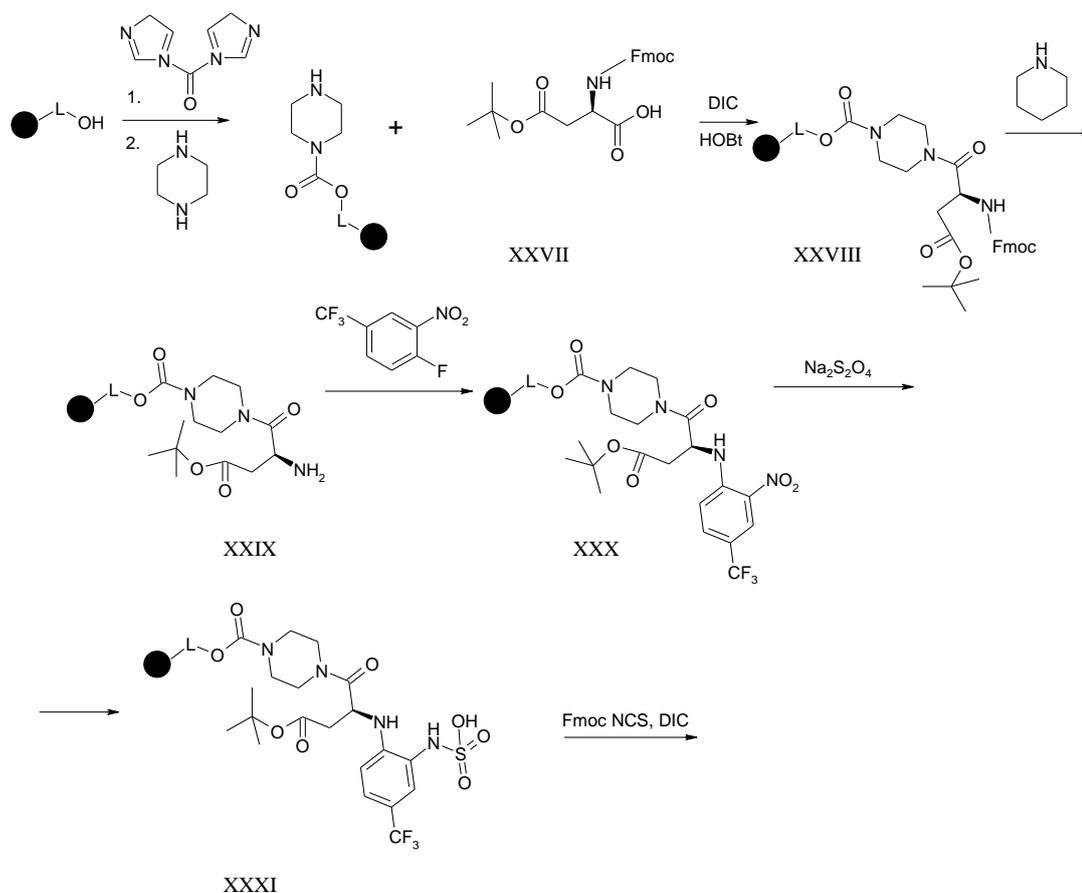


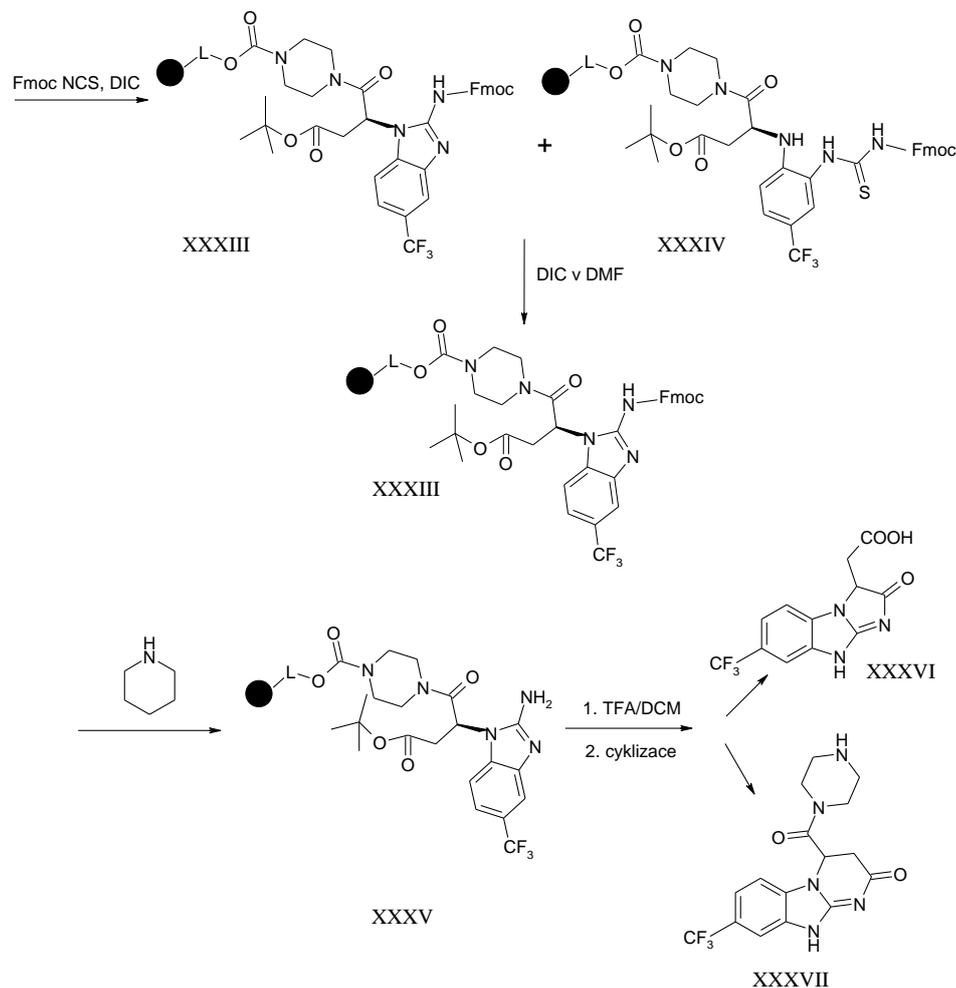


4.3. Syntéza vycházející z asparagové kyseliny

Syntéza derivátů vycházejícího z asparagové kyseliny byla provedena identicky jako syntéza vycházející z alaninu. I v tomto případě je tu možnost vzniku dvou finálních produktů Z této aminokyseliny se podařilo provést finální cyklizaci, přičemž byly pomocí HPLC-MS detekovány oba předpokládané produkty XXXVI a XXXVII v poměru 1:9. Vzhledem k nízkému obsahu produktu XXXVI tento nebyl izolován. Produkt XXXVII byl po chromatografickém přečištění obdržen ve výtěžku 37% a jeho struktura byla potvrzena pomocí ^1H NMR. (Schéma 46)

Schéma 46





4.4 Syntéza za použití benzyloisothiokyanátu

Dalším úkolem bylo prověřit možnost využití vyvinuté metodiky pro přípravu N^1 -substituovaných derivátů, které by mohly být přístupné nahrazením Fmoc-NCS alkyloisothiokyanátem. Jako modelový derivát byl vybrán benzyloisothiokyanát. (Schéma 47)

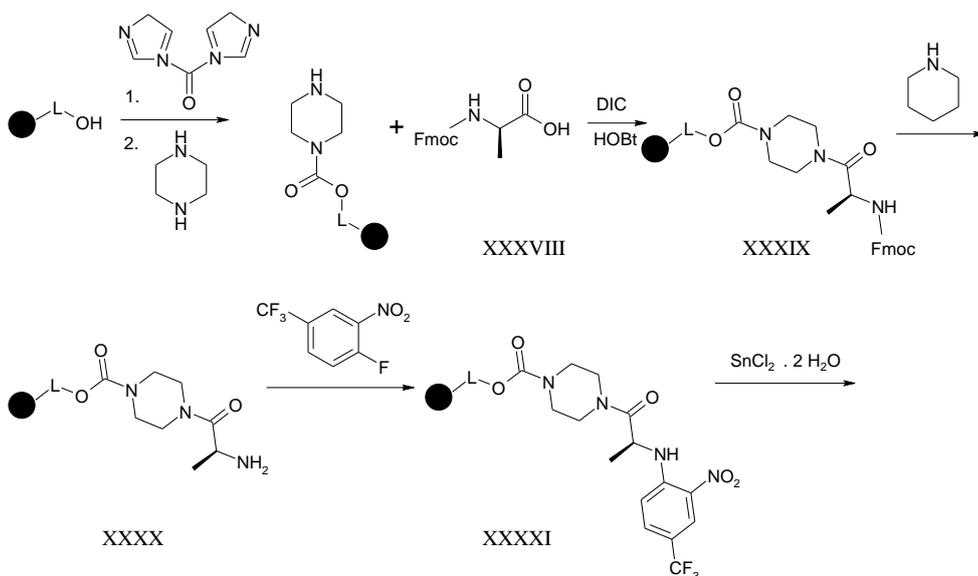
Pro syntézu byl vybrán imobilizovaný alanin jako výchozí látka. Syntetické kroky spočívající v arylaci a redukcii byly totožné jako u předešlých derivátů. Problém však nastal při reakci s benzyloisothiokyanátem. Při reakčních podmínkách identických reakci s Fmoc-NCS bylo pozorováno pouze malé množství žádaného produktu (asi pouze 5%), přičemž derivát sulfonové kyseliny (XI), který vzniká po redukcii, nezreagoval vůbec. Bylo tedy přikročeno k optimalizaci a to nejprve testováním alternativních rozpouštědel (místo suchého THF byly

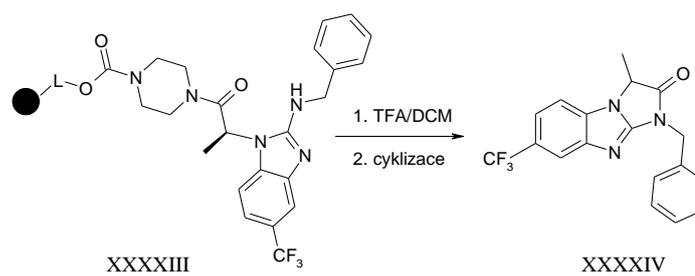
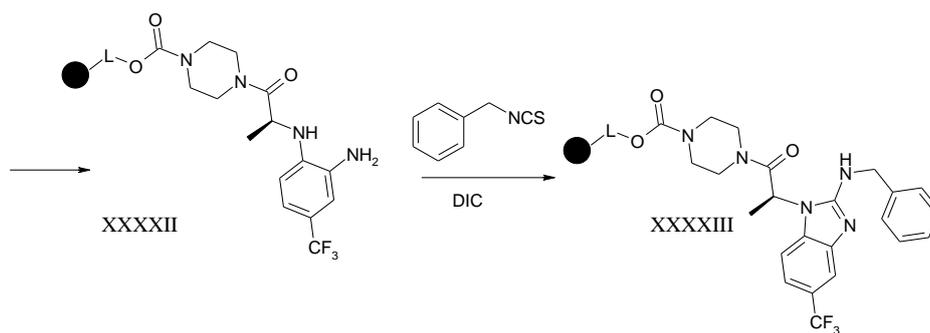
použity 1,4 – dioxan, DMF, toluen). U všech možností se nepodařilo připravit kvantitativně požadovaný meziprodukt. Dále byla místo laboratorní teploty použita teplota 50, 80 a 100°C, což ale vedlo k mnoha vedlejším produktům. Nakonec byl prodloužen reakční čas z 30 minut na 3 dny, ale ani tím se nepodařilo zcela odreagovat výchozí derivát sulfonové kyseliny.

Po těchto neúspěšných optimalizacích bylo nutné změnit postup při redukcí, protože při redukcí s $\text{SnCl}_2 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$ se nežádoucí derivát sulfonové kyseliny netvoří. Následná reakce s benzyl-NCS byla provedena při 50°C, kdy po 3 dnech byl obdržen požadovaný produkt ve vynikající čistotě 95%. Po této reakci následovala už pouze finální cyklizace, na kterou byla použita metoda zahřívání v DMSO, kterou byl požadovaný produkt obdržen v surové čistotě 70%.

Problémem ale byla purifikace na semipreparativním HPLC, neboť produkt obsahoval díky redukcí cínaté soli, které snadno ucpávají kolonu. Před vyčištěním pomocí preparativního HPLC bylo tedy nutné předčistit produkt pomocí SPE extrakce (postup viz. Exp. část). Po chromatografii byl produkt obdržen ve výtěžku 58% a jeho struktura byla potvrzena pomocí NMR.

Schéma 47





5. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

Použité přístroje:

- Acquity UPLC-MS (Waters)
 - Hmotnostní spektrometr s jednoduchým kvadrupólem a PDA detektorem
 - Mobilní fáze je složena z 0,1% roztoku octanu amonného ve vodě a acetonitrilu, lineární gradient z 20% na 80% acetonitrilu během 2,5 min, poté dochází k ekvilibraci kolony 20% roztokem acetonitrilu po dobu 1 min. Průtok 0,6 ml/min.
 - Kolona: X Select kolona (HSS T3, 2,5 mikronů)
 - Další parametry: odpařovací teplota 400°C, kapilární teplota 200°C

- Mikrovlnný reaktor CEM
 - Standardní sensor infračerveného záření
 - Optický sensor teploty
 - Maximální teplota 200 °C a maximální tlak 200 psi
 - Použití zkumavek s míchadly

- Lyofilizátor SCANVAC
 - Odstranění rozpouštědla (voda, DMSO, DMF) ze vzorku

- Semipreparativní HPLC Breeze Waters
 - Mobilní fáze: 0,1% roztok octanu amonného ve vodě + acetonitrilu
 - Kolona: YMC Pack ODS-A, 5µm, 100x20 mm.
 - Průtok 20 ml/min

- JEOL – 500 MHz
 - Spektra měřena v DMSO – d₆ za laboratorní teploty (23°C)

- Chemický posun v ppm, interakční konstanty v Hz

Stanovení loadingu pryskyřice po imobilizaci piperazinu

Z vysušené pryskyřice se odebere 30 mg a toto množství se nechá reagovat s roztokem Fmoc-OSu (*N*-(fluorenylmethoxykarbonyloxy)sukcinimid) v DCM (169 mg v 1 ml) po dobu 30 minut. Po této reakční době je pryskyřice promyta 3 x DCM, 3 x MeOH a poté vysušena proudem dusíku. Pak se odebere dvakrát přesně 10 mg pryskyřice, toto množství se odváží do dvou eppendorfek, pryskyřice je podrobena štěpení pomocí 50 % kyseliny trifluoroctové v DCM (asi 1 ml), (Schéma 27). Po odštěpení se tento roztok odfouká dusíkem a odštěpená látka se vyextrahuje do 1 ml MeOH. Poté jsou vzorky připravené k analýze v LC – MS.

Postup pro výpočet loadingu:

Po analýze vzorků je provedena integrace píků při 300 nm. Poté se podle následujícího vztahu z těchto ploch píků a standardu vypočítá molární koncentrace produktu odštěpeného z pryskyřice.

$$c_{\text{vzorek}} = \frac{\text{plocha piku vzorku}}{\text{plocha piku standardu}} \cdot c_{\text{standard}}$$

$$c_{\text{standard}} = \frac{0,2}{311} = 8,038 \cdot 10^{-4} \text{ mol/l}$$

V dalším kroku se molární koncentrace každého vzorku vztáhne na jeho přesnou hmotnost, a tím dostáváme požadované loadingy, které je nutno ještě zprůměrovat.

$$L = \frac{c_{\text{vzorku}}}{m_{\text{vzorku}}} = \text{mmol/g}$$

Odstranění cínatých solí před HPLC purifikací

Pryskyřice se nechá půl hodiny reagovat s 50% TFA v DCM, štěpící kotel se pak pomocí dusíku zbaví přebytečné TFA a rozpustí se v 1ml DMSO. Do polypropylenové stříkačky s fritou se naváží 2g reversní fáze C18 (50 mikronů) a směs se opět uzavře fritou. Takto vytvořená „kolona“ se promyje 10ml octanového pufru (0,01 M roztok octanu amonného ve vodě) a 5ml AcCN. K látce v DMSO se přidá 9 ml octanového pufru, pak se tato směs oddělí od cínatých solí přes kolonu, kolona se nakonec promyje 10ml octanového pufru a 5ml AcCN. Poté se tato směs může přechistit semipreparativní HPLC.

Syntéza 3-methyl-7-(trifluoromethyl)-1H-benzo[d]imidazo[1,2-a]imidazol – 2(3H)-onu (XV)

1. 250 mg Wangovy pryskyřice s imobilizovaným piperazinem bylo smícháno s roztokem Fmoc- α – alaninem (0,5 mmol, 0,156 mg), HOBt (0,5 mmol, 0,083 mg) a DIC (0,5 mmol, 78 μ l) v DCM a DMF (1:1, 1,25 ml : 1,25 ml). Pryskyřice byla třepána 24 h za laboratorní teploty, promyta 3xDMF a 3xDCM. Poté byl proveden test na přítomnost výchozí látky: K asi 30 mg pryskyřice byl přidán roztok Fmoc-OSu v DCM (169 mg v 1 ml), směs reagovala asi 30 minut, poté promyta 5xDCM. Nakonec byl z pryskyřice odštěpen meziproduct obvyklým způsobem (pomocí 50% TFA v DCM, 30 minut). Po odfoukání dusíkem byl ke směsi přidán 1 ml metanolu a byla provedena analýza v LC-MS. Pokud se ve spektru neobjevil pík náležící Fmoc-piperazinu, bylo možné pokračovat dalším reakčním krokem.

LC-MS: meziproduct (VI) $[M - H^+] = 380$

Čistota: 99%

2. Štěpení Fmoc protektivní skupiny: K pryskyřici byl přidán 50% roztok piperidinu v DMF, reakce probíhala 1 h za laboratorní teploty, poté byla pryskyřice promyta 3x DMF, 3x DCM.

Analýza LC-MS: neprovádí se

3. Arylace pryskyřice roztokem 4-fluoro-3-nitrobenzotrifluoridu (1 mmol, 140 μ l), DIEA (1 mmol, 175 μ l) v DMSO (2,5 ml). Reakce probíhala přes noc za laboratorní teploty. Následovalo promytí 3x DMF, 3x DCM. Opět byla nutná kontrola reakce s Fmoc-OSu.

LC-MS: meziproduct (VIII) $[M - H^+] = 347$

Čistota: 99%

4. Redukce roztokem $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$ (2,5 mmol, 525 mg), K_2CO_3 (3,5 mmol, 485 mg) a TBAHS (0,25 mmol, 85 mg) v 2,5 ml destilované vody a 2,5 ml DCM. Reakce probíhala 2 h za laboratorní teploty, poté byla pryskyřice promyta 3x DCM:DMF (1:1), 3x DMF, 3x MeOH, 3x DCM.

LC-MS: meziprodukt

$$\text{(X)} [\text{M} - \text{H}^+] = 231$$

$$\text{(XI)} [\text{M} - \text{H}^+] = 396$$

Čistota: (X) = 25%

(XI) = 75%

5. Reakce s BrCN: K pryskyřici byl přidán roztok BrCN (2,4 mmol, 250 mg) v 10 ml DCM, směs byla zahřívána na 45 °C přes noc. Poté byla promyta 3xDMF a 3xDCM.

LC-MS: meziprodukt (XIV) $[\text{M} - \text{H}^+] = 341$

Čistota: 95%

6. Finální cyklizace: Meziprodukt (XIV) byl odštěpen z pryskyřice pomocí 50% TFA v DCM. Následovalo odpaření přebytečné TFA dusíkem, byly přidány 3 ml DMSO a směs se zahřívala na 80 °C po dobu 3 dnů. DMSO se odstranil lyofilizátorem a produkt se rozpustil v 3 ml MeOH. Nakonec byl vyčištěn pomocí semipreparativní HPLC.

LC-MS: produkt (XV) $[\text{M} - \text{H}^+] = 256$

Čistota: 70%

Po purifikaci získán produkt ve výtěžku 75%.

^1H NMR: (500 MHz, DMSO-d_6) δ ppm 1.6 (d, $J = 7,4$ Hz, 3H) 4.93 (quar, $J = 7,3$ Hz, 1H) 5.71 (s, 1H) 7.42 (d, $J = 8$, 1H) 7.61 (d, $J = 8$, 1H), 7.75 (s, 1H)

Syntéza 4-(piperazin-1-karbonyl)-8-(trifluoromethyl)-3,4-dihydrobenzo[4,5]imidazo[1,2-a]pyrimidin-2(1H)-onu (XXXIII)

1. Acylace 250 mg Wangovy pryskyřice s imobilizovaným piperazinem roztokem Fmoc-asparagovou kyselinou (Boc) (XXVII) (0,5 mmol, 0,205 mg), HOBt (0,5 mmol, 0,083 mg) a DIC (0,5 mmol, 78 μl) v DCM a DMF (1:1, 0,75 ml : 0,75 ml). Směs byla třepána 24 h za laboratorní teploty, poté promyta 3xDMF a 3xDCM, nutná reakce části pryskyřice s Fmoc-OSu.

LC-MS: meziprodukt (XXVIII) $[M - H^+] = 425$

Čistota: 99%

2. Štěpení Fmoc protektivní skupiny: K pryskyřici byl přidán 50% roztok piperidinu v DMF, reakce probíhala 1 h za laboratorní teploty, poté byla směs promyta 3x DMF, 3x DCM.

Analýza LC-MS: neprovádí se

3. Arylace pryskyřice roztokem 4-fluoro-3-nitrobenzotrifluoridem (1 mmol, 140 μ l), DIEA (1 mmol, 175 μ l) v DMSO (2,5 ml). Reakce probíhala přes noc za laboratorní teploty. Následovalo promytí pryskyřice 3x DMF, 3x DCM. Opět je nutná kontrola reakce s Fmoc-OSu.

LC-MS: meziprodukt (XXX) $[M - H^+] = 391$

Čistota: 95%

4. Redukce roztokem $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$ (2,5 mmol, 525 mg), K_2CO_3 (3,5 mmol, 485 mg) a TBAHS (0,25 mmol, 85 mg) v 2,5 ml destilované vody a 2,5 ml DCM. Reakce probíhala 2 h za laboratorní teploty, poté byla pryskyřice promyta 3x DCM:DMF (1:1), 3x DMF, 3x MeOH, 3x DCM.

LC-MS: meziprodukt (XXXII) $[M - H^+] = 274$

(XXXI) $[M - H^+] = 440$

Čistota: (XXXI) = 45%

(XXXII) = 55%

5. Reakce s Fmoc-NCS: K pryskyřici byl přidán roztok 0,5 M Fmoc-NCS (0,14 mg), 0,5 M DIC (76 μ l) v 2,5 ml suchého THF. Reakce probíhala přes noc za laboratorní teploty, poté byla pryskyřice promyta 3x THF, 3x DCM.

LC-MS: meziprodukty (XXXIII) $[M - H^+] = 609$

(XXXIV) $[M - H^+] = 643$

Čistota: (XXXIII) = 65%

(XXXIV) = 35%

6. Cyklizace meziproduktu ($[M - H^+] = 664$) pomocí 0,5 M roztoku DIC v DMF. Reakce byla nasazena přes noc za laboratorní teploty, nakonec byla pryskyřice promyta 3x DMF, 3x DCM.

LC-MS: meziprodukt (XXXIII) $[M - H^+] = 609$

Čistota: 85%

7. Štěpení Fmoc protektivní skupiny: K pryskyřici byl přidán 50% roztok piperidinu v DMF, reakce probíhala 1 h za laboratorní teploty, poté promytí 3x DMF, 3x DCM.

Analýza LC-MS: neprovádí se

8. Finální cyklizace: Meziprodukt (XXXV) byl odštěpen z pryskyřice pomocí 50% TFA v DCM. Následovalo odpaření přebytečné TFA dusíkem, byly přidány 3 ml DMSO a směs se zahřívala na 80 °C po dobu 3 dnů. DMSO bylo odstraněno lyofilizátorem a produkt byl rozpuštěn v 3 ml MeOH. Nakonec byl vyčištěn pomocí semipreparativní HPLC.

LC-MS: produkt (XXXVII) $[M - H^+] = 368$

Čistota: 75%

Po purifikaci získán produkt ve výtěžku 37%.

^1H NMR (500 MHz, DMSO- d_6) δ ppm 1.72 (dt, $J=6.44, 3.37$ Hz, 4 H) 3.56 (t, $J=6.59$ Hz, 4 H) 6.01 (d, $J=7.45$ Hz, 1 H) 7.38 - 7.49 (m, 2 H) 7.70 (s, 1 H). Methylenový signál překryt vodou.

Syntéza 3 - (4 - aminobutyl) -7- (trifluoromethyl)-1H-benzo[d]imidazo[1,2 - a]imidazol – 2(3H)-onu (XVII) nebo 3 - (2 - amino-5-(trifloromethyl)-H-benzo[d]imidazol-1-yl)azepan-2-onu (XXIII nebo XXIV)

1. Acylace 250 mg Wangovy pryskyřice s imobilizovaným piperazinem roztokem Fmoc lysinem (Boc) (XVI) (0,5 mmol, 0,234 mg), HOBt (0,5 mmol, 0,083 mg) a DIC (0,5 mmol, 78 μl) v DCM a DMF (1:1, 0,75ml : 0,75ml). Směs byla třepána 24 h za laboratorní teploty, promyta 3xDMF a 3xDCM, nutná reakce části pryskyřice s Fmoc-OSu.

LC-MS: meziprodukt (XVII) $[M - H^+] = 438$

Čistota: 99%

2. Štěpení Fmoc protektivní skupiny: K pryskyřici byl přidán 50% roztok piperidinu v DMF, reakce probíhala 1 h za laboratorní teploty, poté promyta 3x DMF, 3x DCM.
Analýza LC-MS: neprovádí se
3. Arylace pryskyřice roztokem 4 – fluoro – 3 - nitrobenzotrifluoridem (1 mmol, 140 μl), DIEA (1 mmol, 175 μl) v DMSO (2,5 ml). Reakce probíhala přes noc za laboratorní

teploty. Následovalo promytí 3x DMF, 3x DCM. Opět je nutná kontrola reakce s Fmoc-OSu.

LC-MS: meziprodukt (XIX) $[M - H^+] = 404$

Čistota: 99%

4. Redukce roztokem $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$ (2,5 mmol, 525 mg), K_2CO_3 (3,5 mmol, 485 mg) a TBAHS (0,25 mmol, 85 mg) v 2,5 ml destilované vody a 2,5 ml DCM. Reakce probíhala 2 h za laboratorní teploty, poté byla pryskyřice promyta 3x DCM:DMF (1:1), 3x DMF, 3x MeOH, 3x DCM.

LC-MS: meziprodukt (XXI) $[M - H^+] = 373$

(XX) $[M - H^+] = 454$

Čistota: (XX) = 45%

(XXI) = 55%

5. Reakce s Fmoc-NCS: K pryskyřici byl přidán roztok 0,5 M Fmoc-NCS (0,14 mg), 0,5 M DIC (76 μl) v 2,5 ml suchého THF. Reakce probíhala přes noc za laboratorní teploty, pryskyřice byla promyta 3x THF, 3x DCM.

LC-MS: meziprodukty (XXII) $[M - H^+] = 621$

(XXIII) $[M - H^+] = 654$

Čistota: (XXII) = 55%

(XXIII) = 45%

6. Cyklizace meziproduktu ($[M - H^+] = 654$) pomocí 0,5 M roztoku DIC v DMF. Reakce probíhala přes noc, za laboratorní teploty, nakonec byla pryskyřice promyta 3x DMF, 3x DCM.

LC-MS: meziprodukt (XXII) $[M - H^+] = 621$

Čistota: 85%

7. Štěpení Fmoc protektivní skupiny: K pryskyřici byl přidán 50% roztok piperidinu v DMF, reakce probíhala 1 h za laboratorní teploty, poté promytí 3x DMF, 3x DCM.

Analýza LC-MS: neprovádí se

8. Finální cyklizace: Meziprodukt byl odštěpen z pryskyřice pomocí 50% TFA v DCM. Následovalo odpaření přebytečné TFA dusíkem, byly přidány 3 ml DMSO a směs

byla zahřívána na 80 °C po dobu 3 dnů. DMSO bylo odstraněno lyofilizátorem a produkt rozpuštěn v 3 ml MeOH.

LC-MS: produkt (XXV nebo XXVI) $[M - H^+] = 313$

Surová čistota: 18%

Produkt nebyl vyizolován, neboť jeho obsah ve směsi byl velmi malý (viz. příloha, HPLC spektrum).

Syntéza 3 – methyl – 7 - (trifluoromethyl) -1 – benzyl - benzo[d]imidazo[1,2 - a]imidazol – 2(3H)-onu (XXXX)

1. Acylace 250 mg Wangovy pryskyřice s imobilizovaným piperazinem roztokem Fmoc-Ala (XXXVIII) (0,5 mmol, 0,156 mg), HOBt (0,5 mmol, 0,083 mg) a DIC (0,5 mmol, 78 μ l) v DCM a DMF (1:1, 0,75ml : 0,75ml). Směs byla třepána 24 h za laboratorní teploty, promyta 3xDMF a 3xDCM, nutný test s Fmoc-Osu na přítomnost výchozí látky.

LC-MS: meziprodukt (XXXIX) $[M - H^+] = 380$

Čistota: 99%

2. Štěpení Fmoc protektivní skupiny: K pryskyřici byl přidán 50% roztok piperidinu v DMF, reakce probíhala 1 h za laboratorní teploty, poté promytí 3x DMF, 3x DCM.

Analýza LC-MS: neprovádí se

3. Arylace pryskyřice roztokem 4 - fluoro-3 - nitrobenzotrifluoridem (1 mmol, 140 μ l), DIEA (1 mmol, 175 μ l) v DMSO (2,5 ml). Reakce probíhala přes noc za laboratorní teploty. Následovalo promytí 3x DMF, 3x DCM. Opět byla nutná kontrola reakce s Fmoc-OSu.

LC-MS: meziprodukt (XXXXI) $[M - H^+] = 346$

Čistota: 99%

4. Redukce s $\text{SnCl}_2 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$: Pryskyřice byla 3x promyta bezvodým DMF, byl přidán roztok 2,5 M $\text{SnCl}_2 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$ (0,562 mg) a 2,5 M DIEA (435 μ l) ve 2,5 ml suchého DMF. Reakce probíhala přes noc, za laboratorní teploty. Další den byla promyta 3x DMF, 3x DCM.

LC-MS: meziprodukt (XXXXII) $[M - H^+] = 231$

Čistota: 95%

5. Reakce s benzyl-NCS: K pryskyřici byl přidán 0,5 M roztok benzylu NCS (69 μ l) a 0,5 M DIC (77,5 μ l) v 2,5 ml suchého THF. Reakce probíhala 3 dny za teploty 50 °C, poté promyta 3x THF, 3x DCM.

LC-MS: meziprodukt (XXXXIII) $[M - H^+] = 432$

Čistota: 95%

6. Finální cyklizace: Meziprodukt (XXXXIII) byl odštěpen z pryskyřice pomocí 50% TFA v DCM. Následovalo odpaření přebytečné TFA dusíkem, byly přidány 3 ml DMSO a směs byla zahřívána na 80 °C po dobu 3 dnů. DMSO bylo odstraněno lyofilizátorem a produkt rozpuštěn v 3 ml MeOH. Nakonec byl vyčištěn pomocí semipreparativní HPLC.

LC-MS: produkt (XXXXIV) $[M - H^+] = 346$

Čistota: 70%

Po purifikaci získán produkt ve výtěžku 55%.

^1H NMR (500 MHz, DMSO- d_6) δ ppm 1.67 (d, $J=7.45$ Hz, 3 H) 4.91 (d, $J=2.29$ Hz, 2 H) 5.13 (q, $J=7.45$ Hz, 1 H) 7.24 - 7.29 (m, 1 H) 7.32 (t, $J=7.73$ Hz, 2 H) 7.36 - 7.40 (m, 2 H) 7.46 (d, $J=8.02$ Hz, 1 H) 7.67 (d, $J=8.02$ Hz, 1 H) 7.82 (s, 1 H)

6. ZÁVĚR

Cílem této bakalářské práce byla optimalizace podmínek pro přípravu 5-norderivátů Anagrelidu vycházejících z různých aminokyselin vedoucích k proměnlivé substituci v poloze č. 3, resp. nebo lišících se substitucí na dusíku v poloze 1 v závislosti na použitých isothiokyanátech. Po zmíněné optimalizaci byla dalším cílem samotná syntéza několika modelových derivátů a jejich charakterizace.

Úvodní část bakalářské práce je zaměřena na rešerši přípravy cyklických guanidinů, a to jak metodou syntézy na pevné fázi, tak i pomocí roztokové chemie. Dále jsou zde zmíněny nejvýznamnější biologické, chemické a fyzikální vlastnosti těchto sloučenin a v neposlední řadě jejich využití v praxi.

První úsek experimentální části byl zaměřen na syntézu modelové sloučeniny vycházející z Fmoc-Ala. Během vývoje metody bylo potřeba optimalizovat jednotlivé reakční kroky, protože buď neposkytovaly vyhovující konverze, nebo nedocházelo k reakci vůbec. První optimalizací bylo zvýšení koncentrace arylačního činidla a báze během arylace, neboť při použití standardních podmínek byla stále přítomna výchozí látka, což snižovalo výtěžnost dalších kroků. Dalším krokem byla redukce, která v případě SnCl_2 neposkytovala přijatelné výsledky, navíc byl produkt znečištěn cínatými solemi, což komplikovalo finální čištění produktů. Proto bylo vhodné přejít na jiný typ redukce, a to s použitím $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$ jako redukčního činidla. Po tomto kroku následovala reakce s Fmoc-NCS, která musela být také optimalizována kvůli vzniku dvou produktů, přičemž musel být do reakčního schématu zařazen aditivní cyklizační krok s roztokem DIC v DMF. Jako alternativní metoda byla úspěšně testována reakce s roztokem BrCN v DCM, která poskytla vynikající výsledky, navíc zkrátila původní sekvenci o dva kroky. Poslední optimalizace se týkala finální cyklizace v roztoku, kdy byla vyvinuta cyklizační metoda v DMSO poskytující finální produkty o dobré surové čistotě.

Další částí experimentu byla příprava dalších dvou alternativních derivátů, která vycházela z lysinu a asparagové kyseliny. Syntézy těchto látek probíhaly na stejném principu a nebyla nutná žádná další optimalizace. V případě lysinu selhala finální cyklizace, která poskytla produkt pouze jako součást komplikované směsi látek. V případě asparagové kyseliny byl připraven analog, který se liší od cílové struktury expanzí imidazolového cyklu na pyrimidinový. Příprava posledního modelového derivátu byla založena opět na použití

Fmoc-Ala, nicméně pro výstavbu guanidinového skeletu byl použit místo Fmoc-NCS benzyl-NCS. Tato reakce byla asi nejtěžším krokem této syntézy, protože dlouhou dobu se nedařilo dosáhnout požadovaného meziprojektu v požadované čistotě. Řešením bylo použití redukce SnCl_2 místo redukce dithioničitanem použitým v předchozích případech.

Po pečlivé optimalizaci tak byla vyvinuta jednoduchá metoda pro přípravu cílových látek pomocí syntézy na pevné fázi. Byly připraveny 3 modelové sloučeniny a provedena jejich charakterizace pomocí NMR. V současné době probíhá testování jejich biologické aktivity na UMTM Olomouc. Vyvinutá metoda je použitelná pro přípravu chemických knihoven z velkého množství komerčně dostupných výchozích látek.

7. ZDROJE

1. Ian W. James; *Tetrahedron* 1999, 55, 4855-4946
2. Hans-Michael Eggenweiler; *DDT* 1998, 3(12)
3. Sergei Usachev and Alexei Gridnev; *Synthetic Communications* 2011, 41,3683–3688
4. S. Louwrier, A. Tuynman, H. Hiemstra; *Tetrahedron* 1996, 52 (7), 2629-2646
5. H. Obase, N. Nakamizo, H. Takai, and M. Teranishi; *Bull. Chem. Soc. Jpn.* 1983, 56, 3189-3190
6. Joseph V. Rodricks and Henry Rapoport; *J. Org. Chem.* 1971,36 (1)
7. Hao Shen, Yang Wang, and Zuwei Xie; *Organic Letters* 2011, 13(17), 4562-4565
8. Rakesh Kumar, Denis S. Ermolat'ev, and Erik V. Van der Eycken; *J. Org. Chem.* 2013, 78, 5737–5743
9. Goetz E. Hardtmann, Gabor Koletar, Oskar R. Pfister; *Journal of Medicinal Chemistry* 1975, 18(5), 447-453
10. Gaurav K. Srivastava; Amit P. Kesarwani; Rajesh K. Grover; Raja Roy; T. Srinivasan, and Bijoy Kundu; *J. Comb. Chem.* 2003, 5, 769-774
11. Martyn P. Coles; *Chem. Commun.* 2009, 3659-3676
12. V. Y. Vvedensky, B. V. Rogovoy, A. S. Kiselyov and A. V. Ivachtchenko; *Tetrahedron Letters* 2005, 46, 8699–8703
13. Gary C. Harbour, et al; *J. Am. Chem. Soc.* 1981, 103, 5606-5607
14. Perla Breccia, Nicole Boggetto, Ruth Pe'rez-Ferna'ndez, Michiel Van Gool, Masayuki Takahashi, Loi'c Rene', Pilar Prados, Bernard Badet, Miche`le Reboud-Ravaux, and Javier de Mendoza; *J. Med. Chem.* 2003, 46, 5196-5207
15. Christopher Sinz, Jiang Chang, et al; *Bioorg. Med. Chem.* 2011, 21, 7131–7136
16. Mary E. Hensler, Gregory Bernstein, Victor Nizeta and Adel Nefzib; *Bioorg. Med. Chem.* 2006, 16, 5073–5079
17. V. Alagarsamy, V. Raja Solomonb and K. Dhanabal; *Bioorg. Med. Chem.* 2007, 15, 235–241
18. Lisa Dalla Via, Ornella Gia; et al; *Il Farmaco* 2001, 56, 159–167
19. Antona J. Wagstaff and Gillian M. Keating; *Drugs* 2006, 66 (1), 111-131
20. P. McGee; 2012, WO 2012/052781 A1
21. B. Golding; 2010; WO 2010/070318 A1

8. SEZNAM ZKRATEK

DCM – dichlormethan

DIC - *N,N'*- diisopropylkarbodiimid

DIEA - *N,N'*- diisopropylethylamin

DMF - dimethylformamid

DMSO - dimethylsulfoxid

EDIPA – *N,N'*- diisopropylethylamin

Fmoc-OSu – *N* – (9 – fluorenylmethoxykarbonyloxy)sukcinimid

Fmoc-NCS – Fmoc-isothiokyanát

HOBt – 1 - hydroxybenztriazol

MeOH – metanol

TBAHS – hydrogensíran tetrabutylamonný

TFA – trifluoroctová kyselina

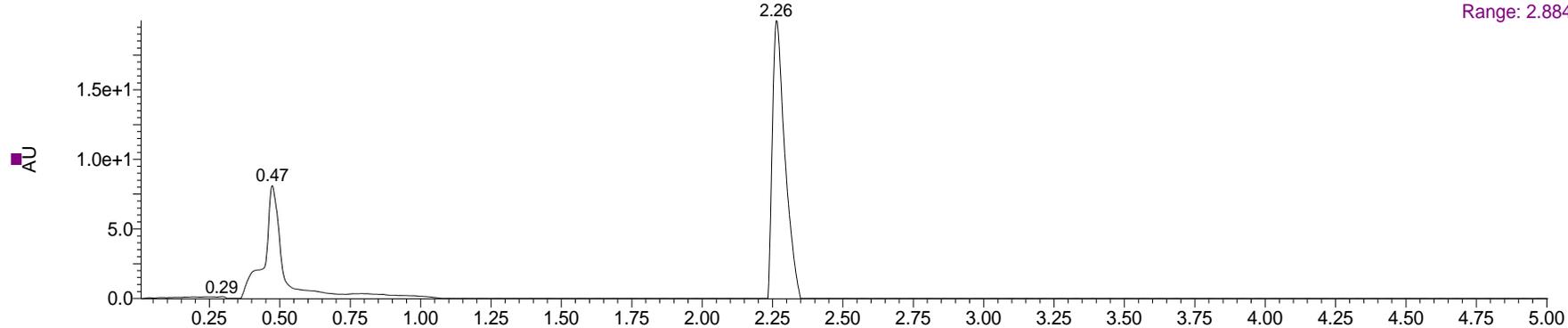
THF – tetrahydrofuran

AcCN - acetonitril

PŘÍLOHY

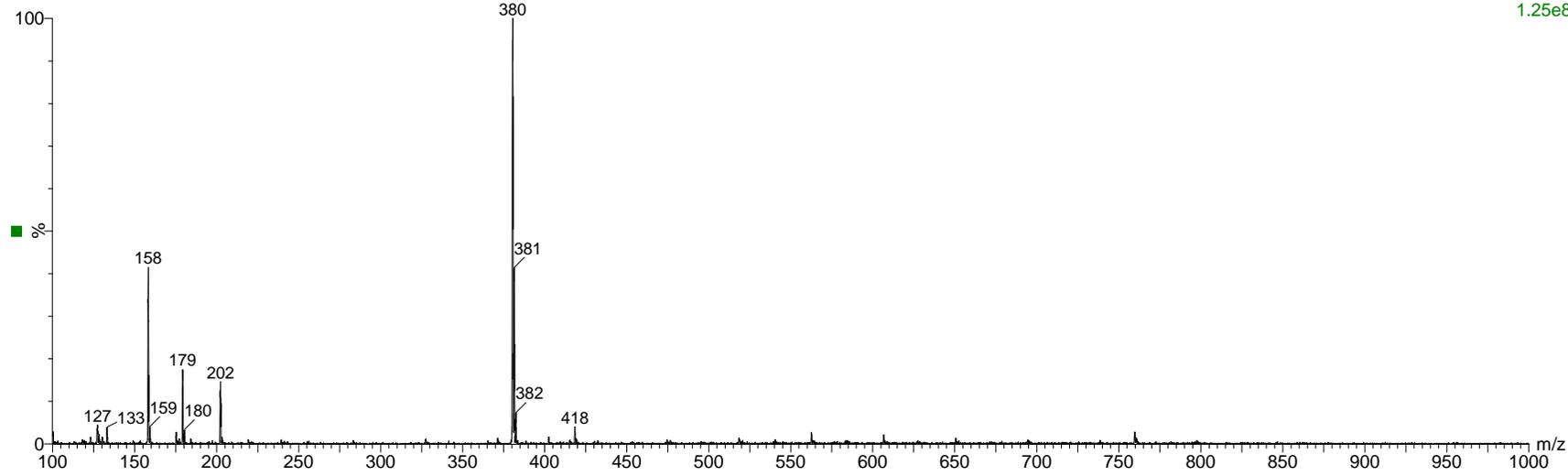
Příloha č.1: Analýza acylace (VI) $[M - H^+] = 380$

RP alanin C1



3: Diode Array
Range: 2.884e+1

RP alanin C1 132 (2.281) Cm (131:136)

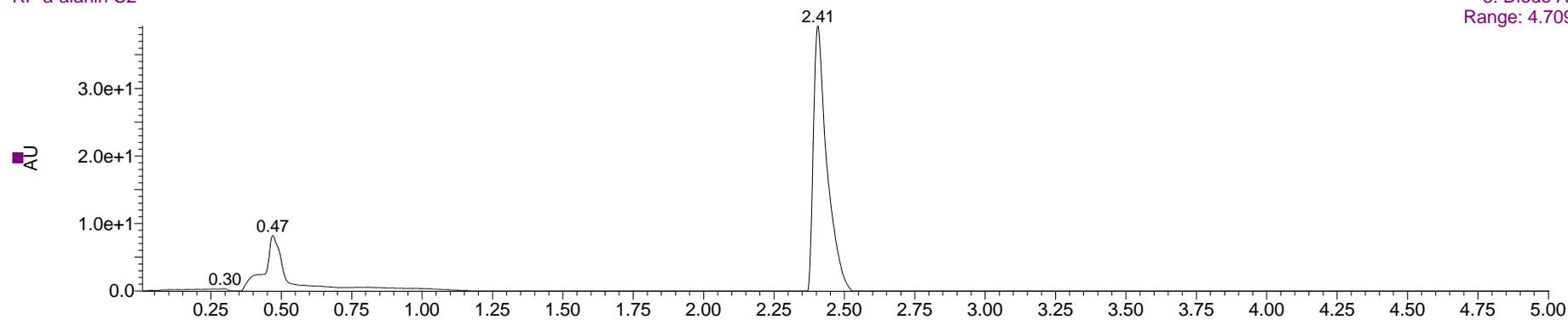


1: Scan ES+
1.25e8

Příloha č.2: Analýza arylace (VIII) $[M - H^+] = 347$

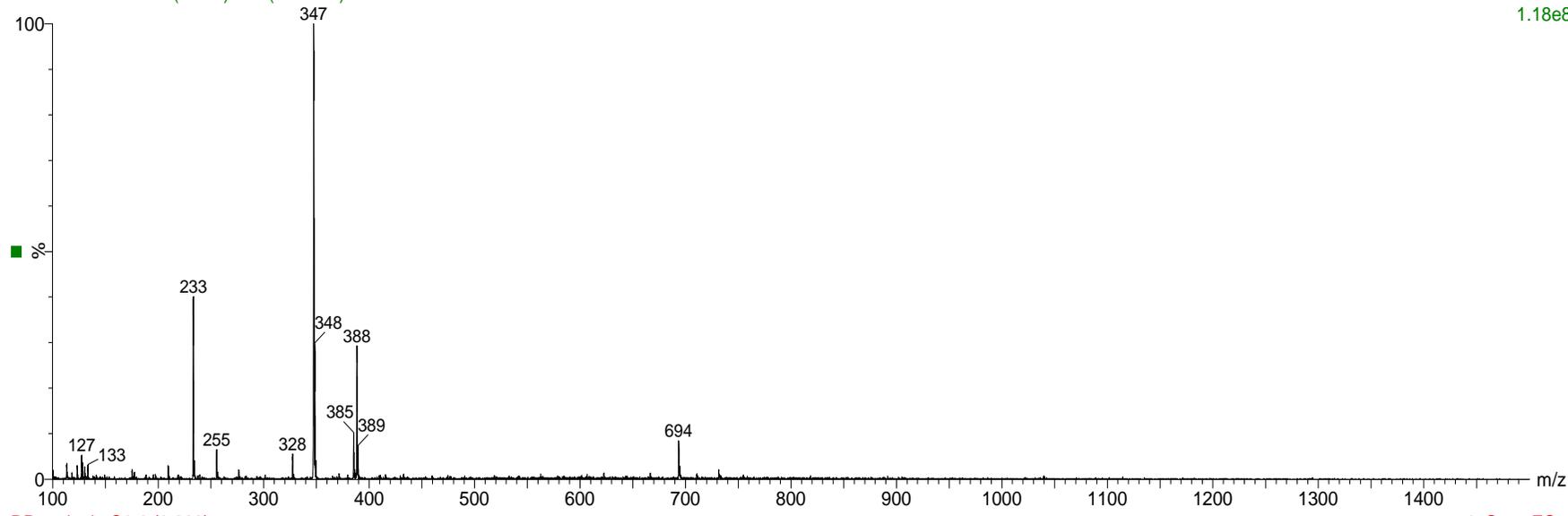
RP a-alanin C2

3: Diode Array
Range: 4.709e+1



RP a-alanin C2 140 (2.419) Cm (139:146)

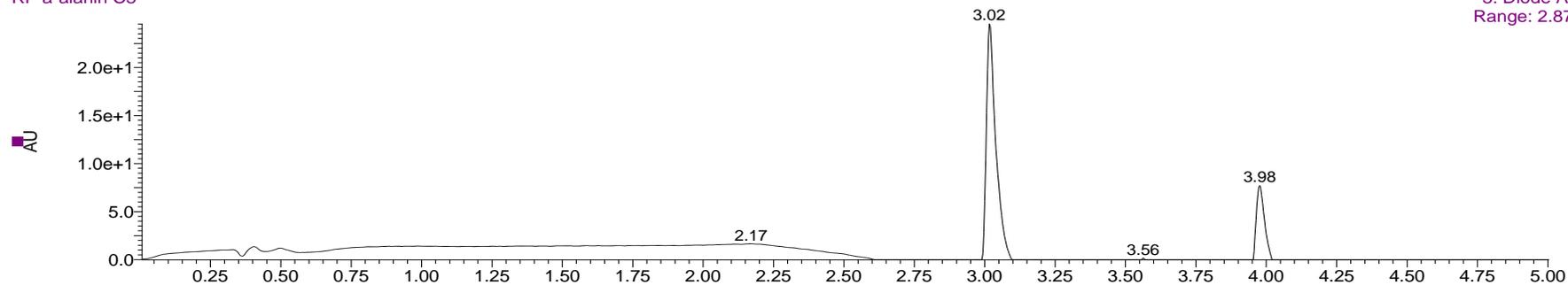
1: Scan ES+
1.18e8



Příloha č.3: Analýza redukce (X) [M - H]⁻ = 229, (XI) [M - H]⁻ = 396

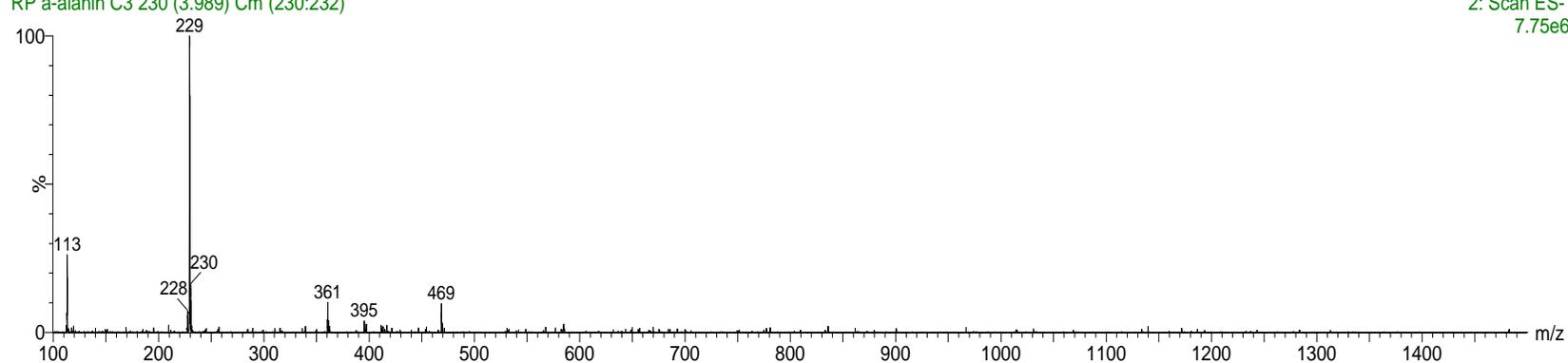
RP a-alanin C3

3: Diode Array
Range: 2.87e+1



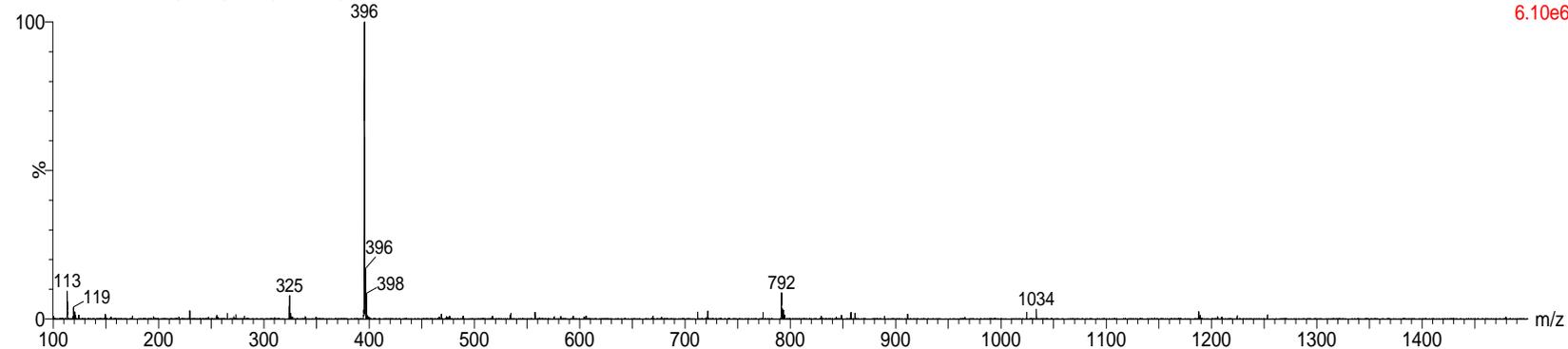
RP a-alanin C3 230 (3.989) Cm (230:232)

2: Scan ES-
7.75e6



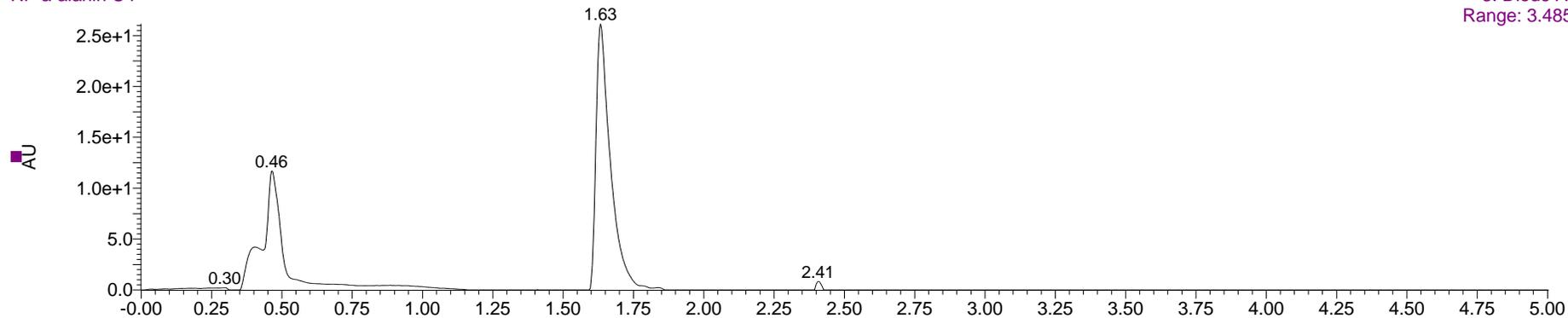
RP a-alanin C3 175 (3.035) Cm (174:177)

2: Scan ES-
6.10e6



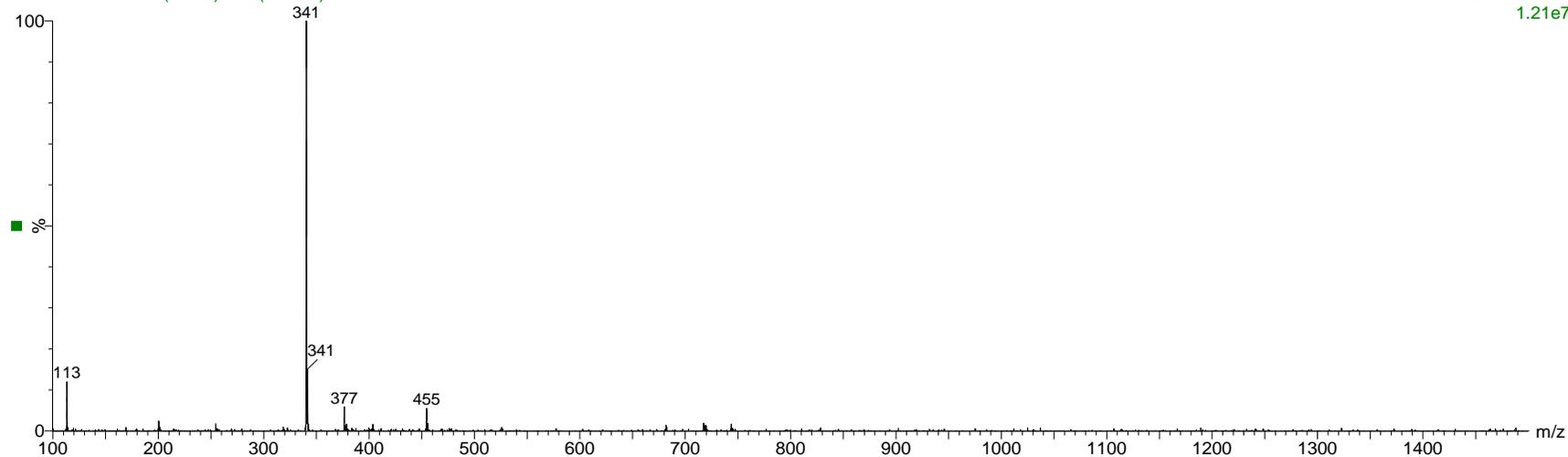
Příloha č.4: Analýza reakce s BrCN (XIV) $[M - H^+] = 341$

RP a-alanin C4



3: Diode Array
Range: 3.485e+1

RP a-alanin C4 95 (1.648) Cm (94:101)

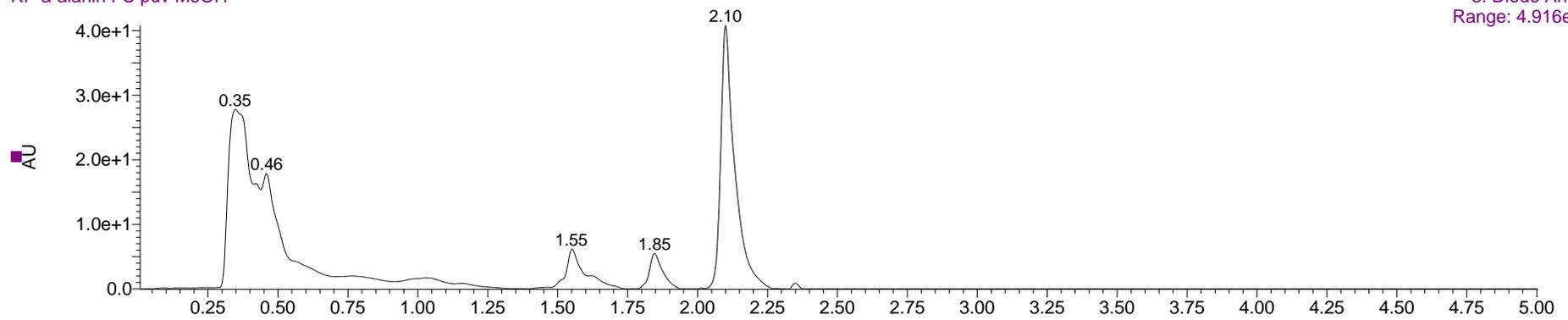


2: Scan ES-
1.21e7

Příloha č.5: Analýza finální cyklizace (XV) $[M - H]^- = 254$

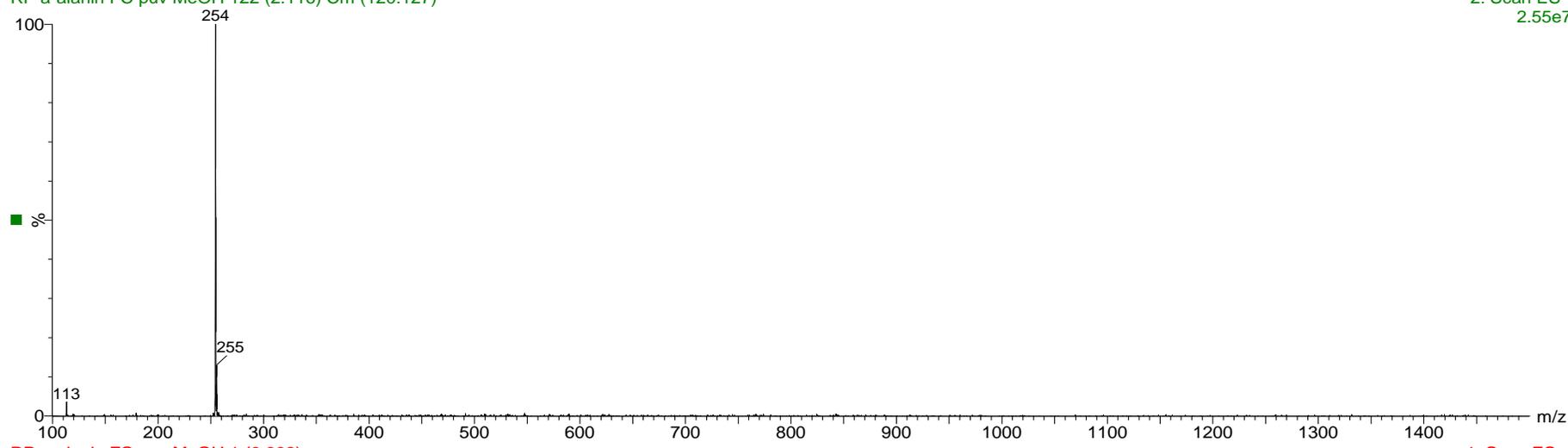
RP a-alanin FC puv MeOH

3: Diode Array
Range: 4.916e+1



RP a-alanin FC puv MeOH 122 (2.116) Cm (120:127)

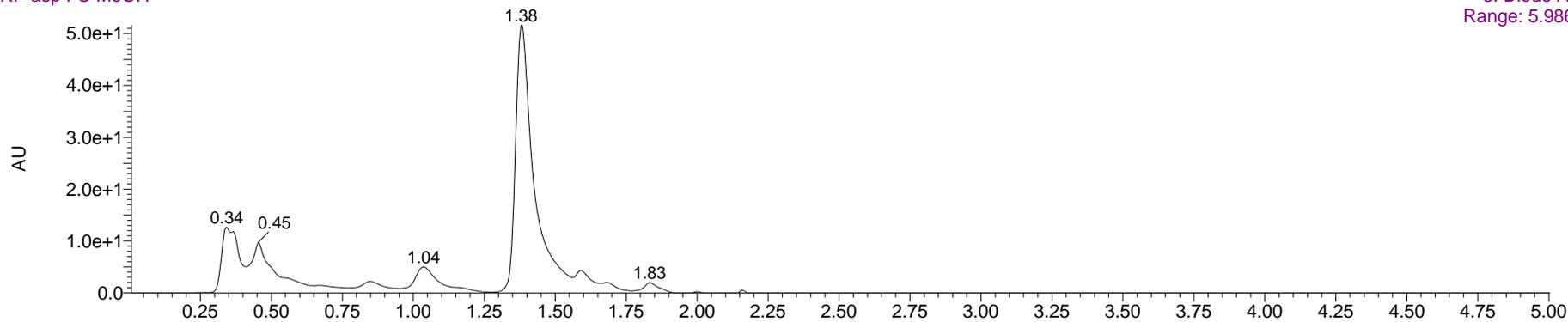
2: Scan ES-
2.55e7



Příloha č.6: Analýza po finální cyklizaci (XXXVII) $[M - H^+] = 368$

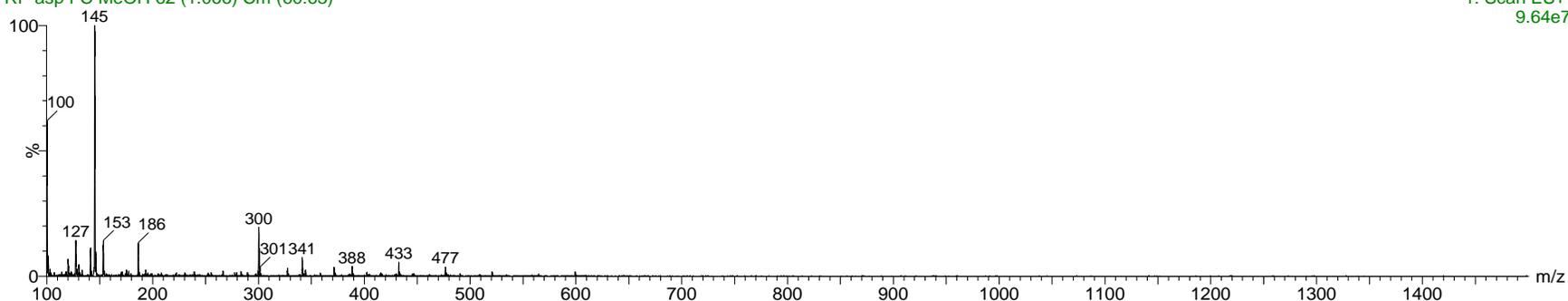
RP asp FC MeOH

3: Diode Array
Range: 5.986e+1



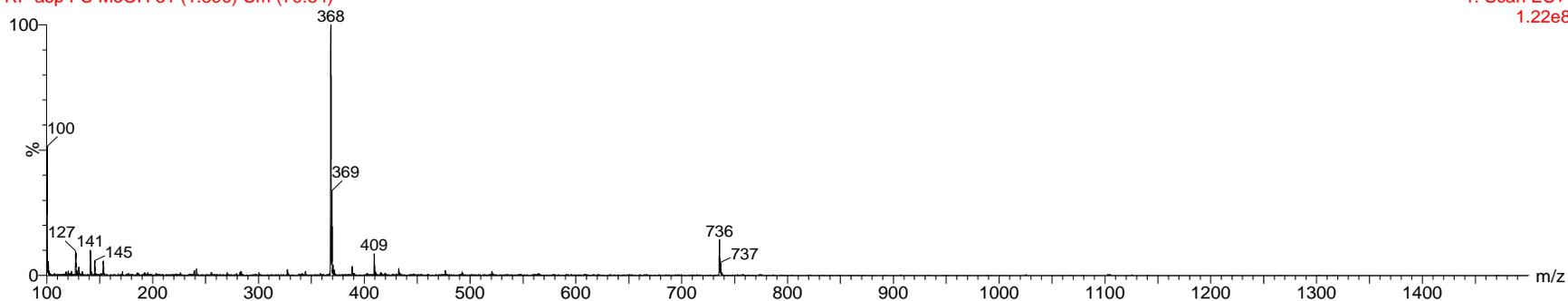
RP asp FC MeOH 62 (1.066) Cm (60:63)

1: Scan ES+
9.64e7



RP asp FC MeOH 81 (1.396) Cm (79:84)

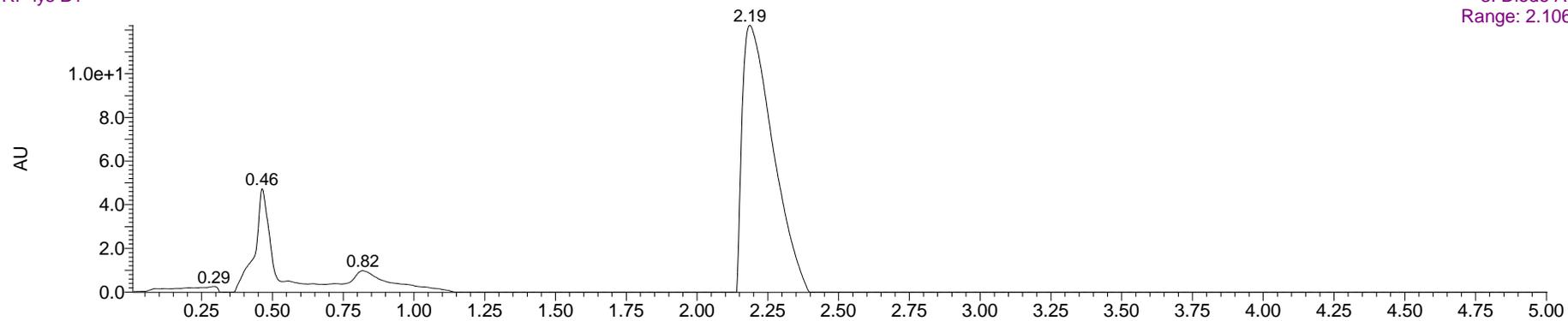
1: Scan ES+
1.22e8



Příloha č. 7: Analýza po acylaci (XVII) $[M - H^+] = 438$

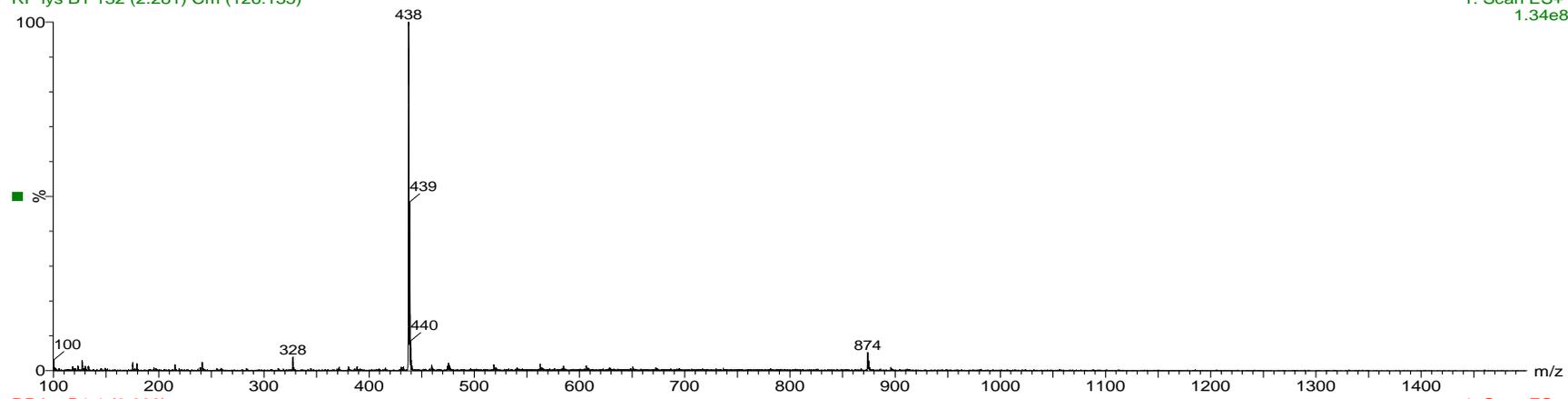
RP lys B1

3: Diode Array
Range: 2.10e+1



RP lys B1 132 (2.281) Cm (126:135)

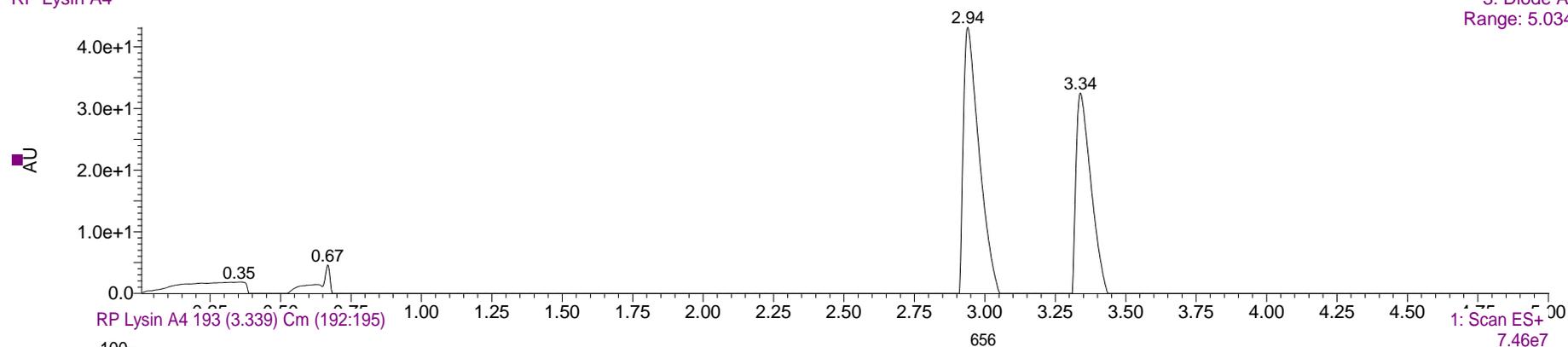
1: Scan ES+
1.34e8



Příloha č.8: Analýza po reakci s Fmoc NCS (XXII) $[M - H^+] = 621$, (XXIII) $[M - H^+] = 655$

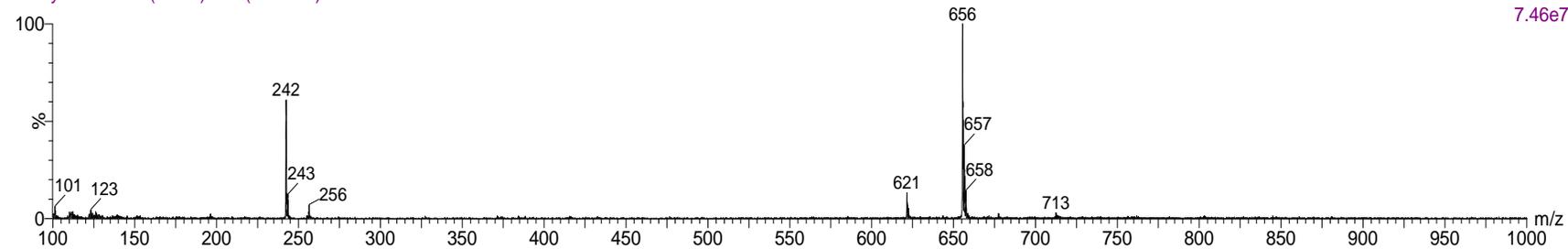
RP Lysin A4

3: Diode Array
Range: 5.034e+1



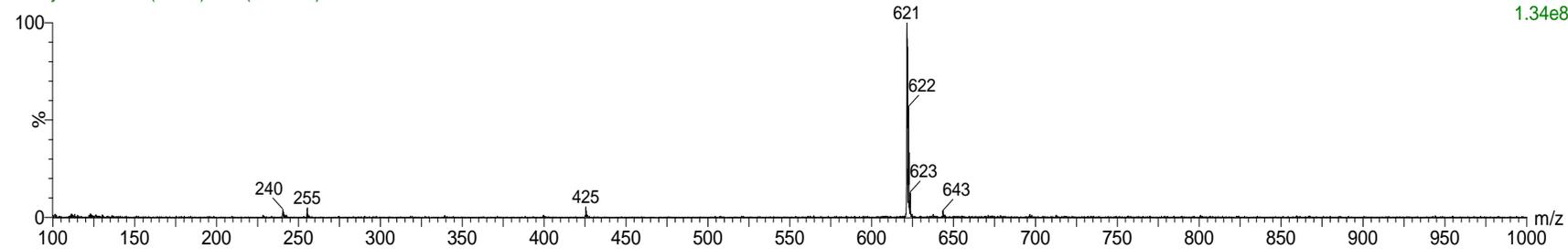
RP Lysin A4 193 (3.339) Cm (192:195)

1: Scan ES+
7.46e7



RP Lysin A4 171 (2.957) Cm (170:172)

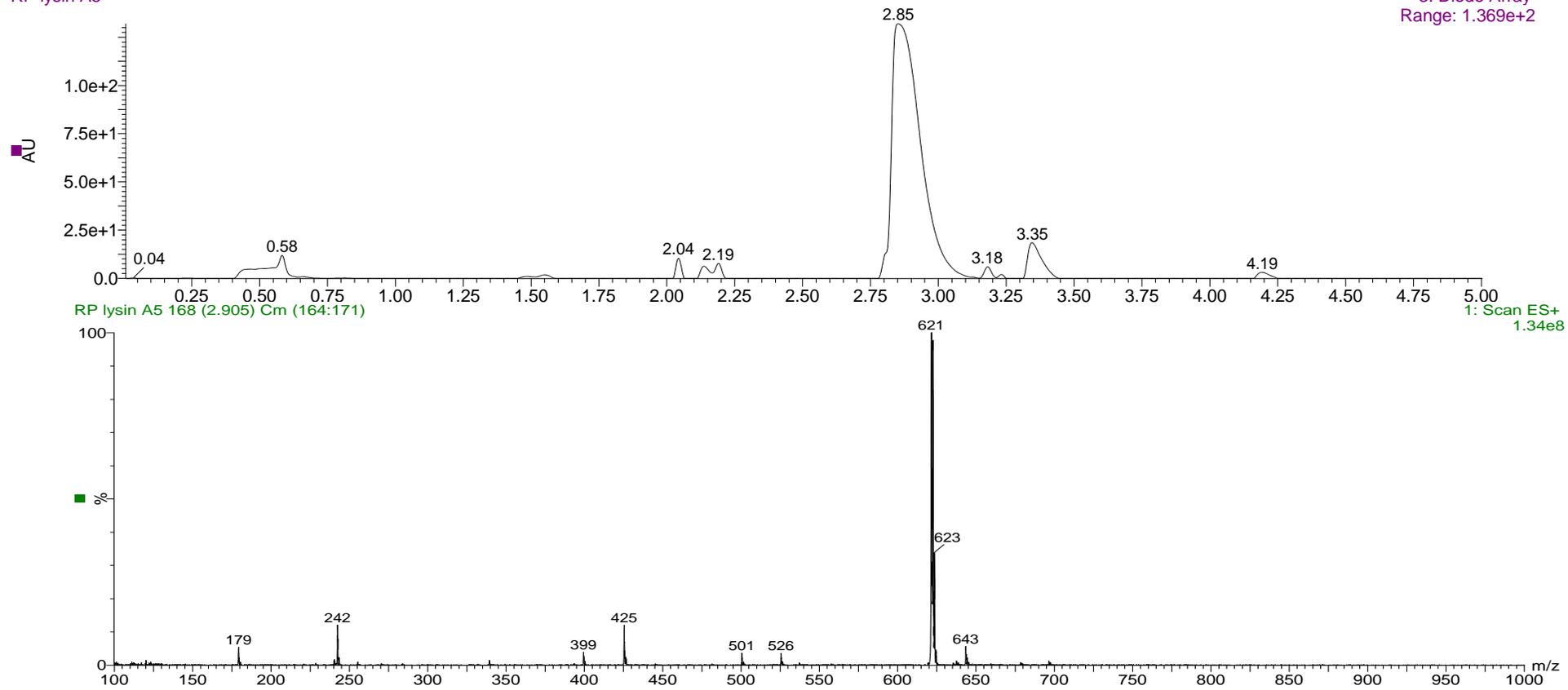
1: Scan ES+
1.34e8



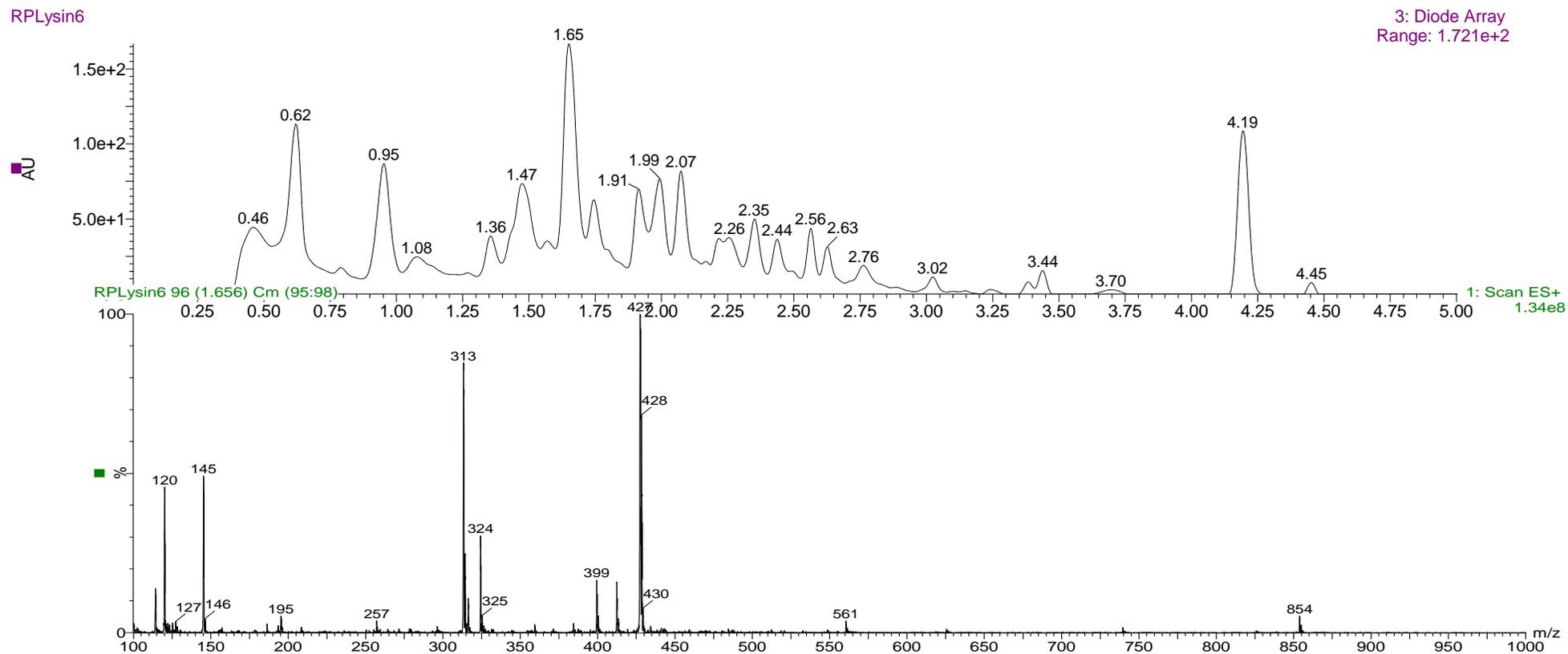
Příloha č.9: Analýza po reakci s DIC v DMF (XXII) $[M - H^+] = 621$

RP lysin A5

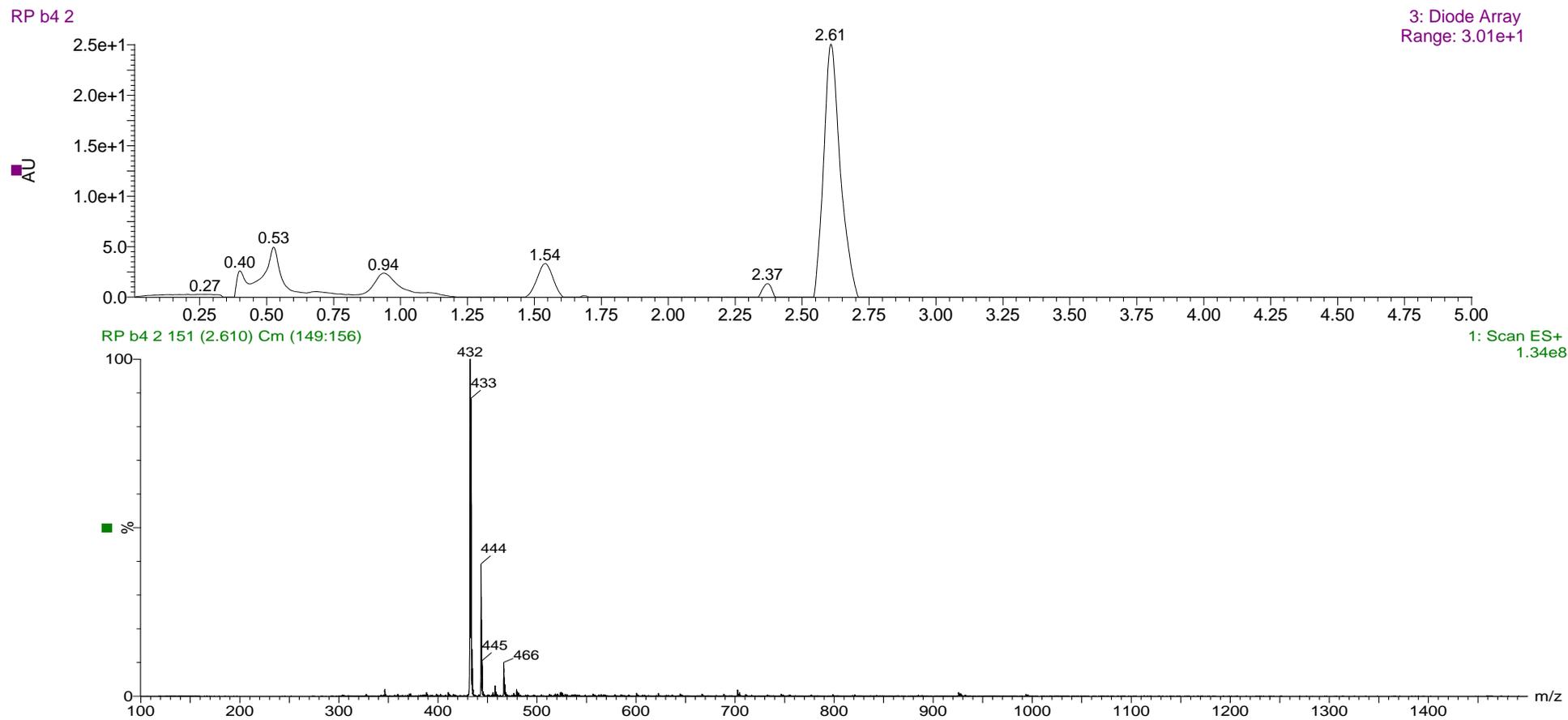
3: Diode Array
Range: 1.369e+2



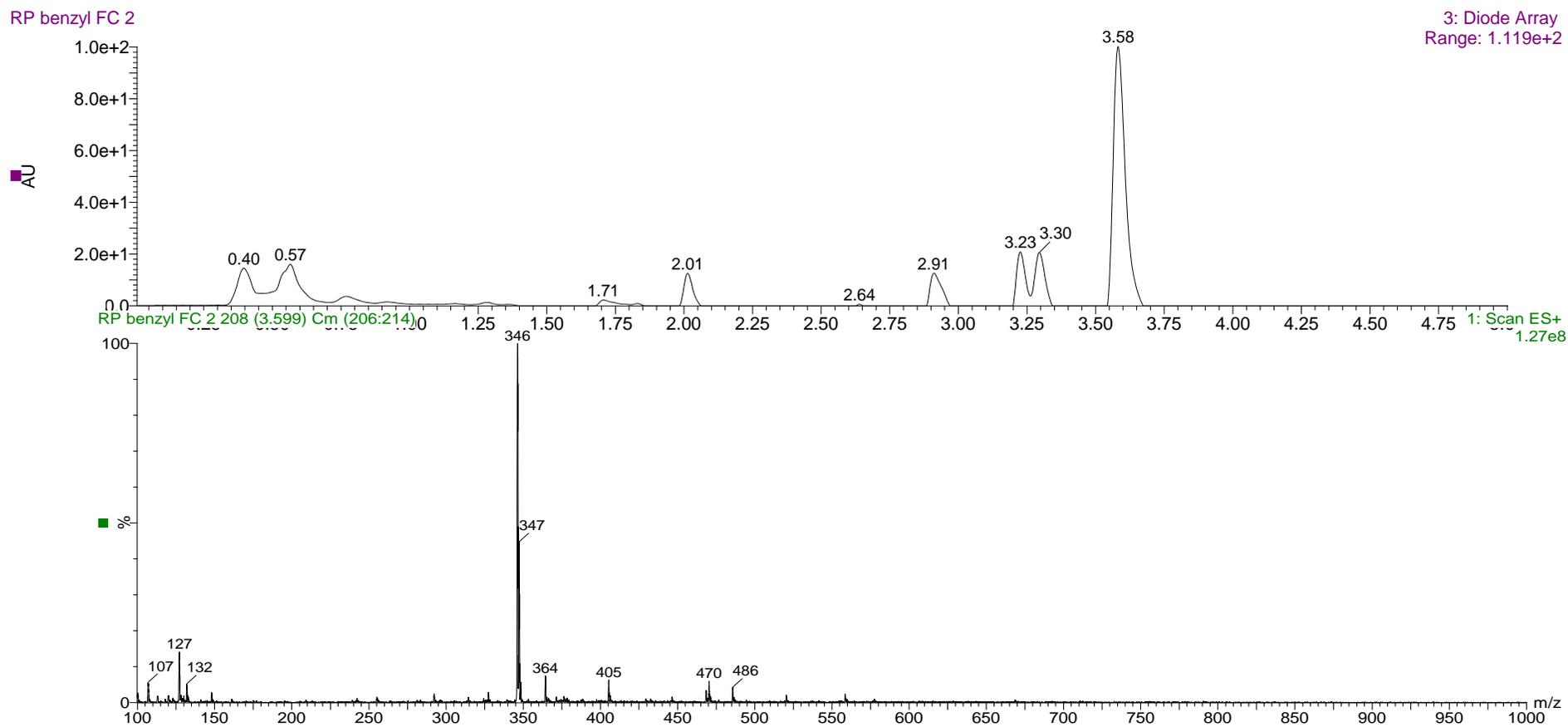
Příloha č.10: Analýza po finální cyklizaci (XXV nebo XXVI) $[M - H^+] = 313$



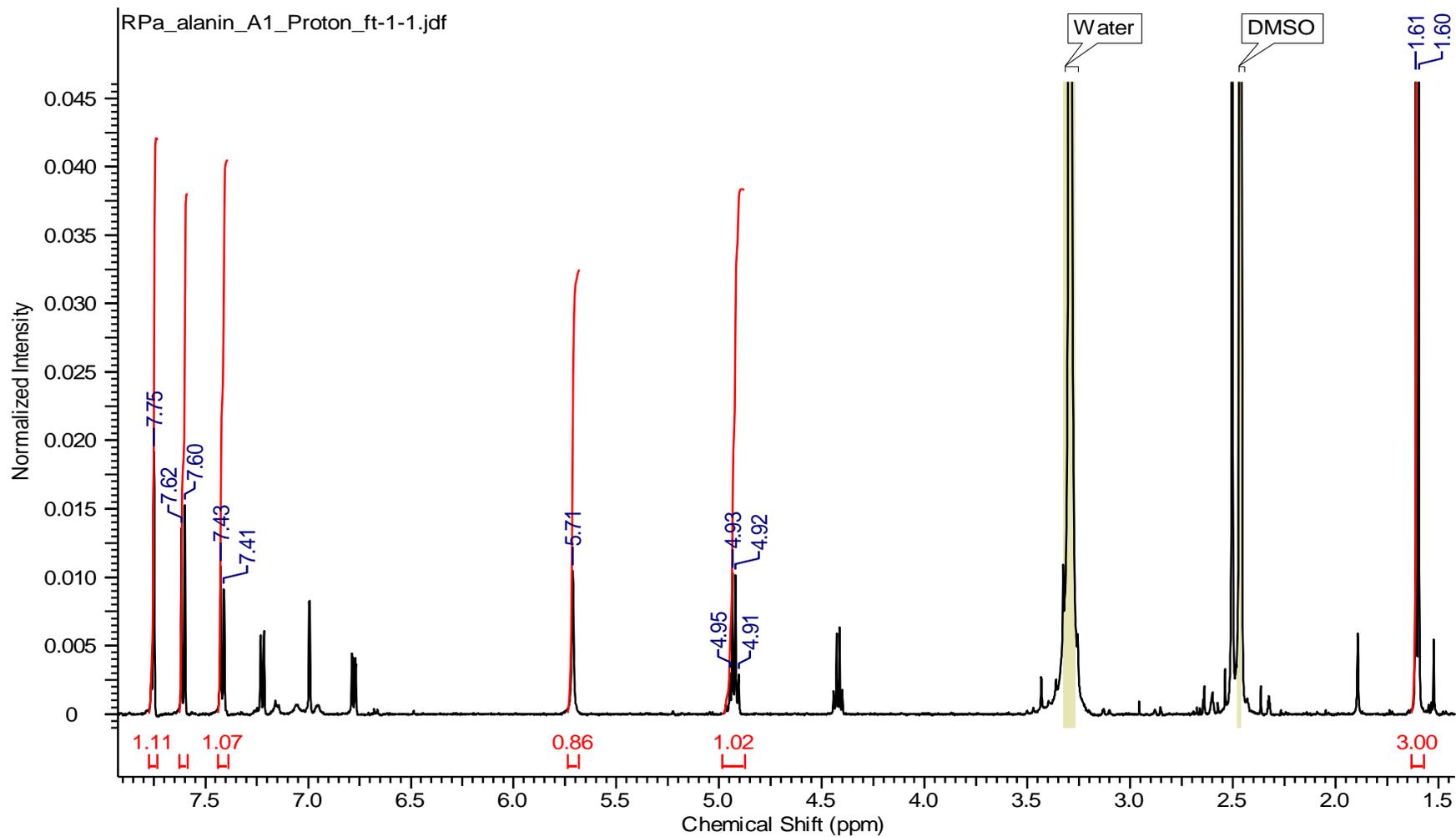
Příloha č.11: Analýza po reakci s benzyl-NCS (XXXXXIII)[M – H⁺] = 432



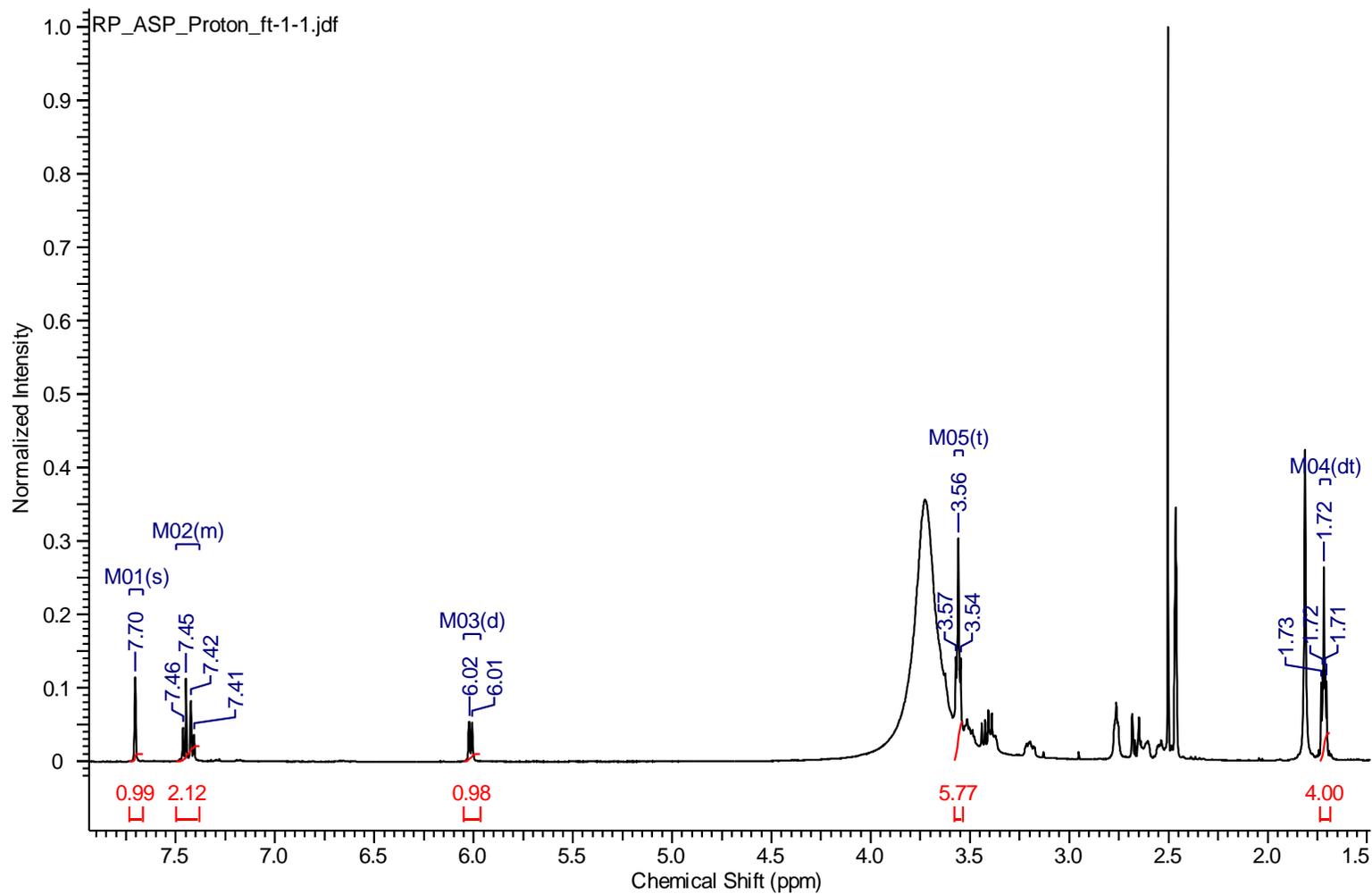
Příloha č.12: Analýza po finální cyklizaci (XXXXIV) $[M - H^+] = 346$



Příloha č.13: 3-methyl-7-(trifluoromethyl)-1H-benzo[d]imidazo[1,2-a]imidazol – 2(3H)-on (XV)- Pozn.: produkt kontaminován sloučeninou uvedenou ve schématu č. 43



Příloha č. 14: 4-(piperazin-1-karboxyl)-8-(trifluoromethyl)-3,4-dihydrobenzo[4,5]imidazo[1,2-a]pirimidin-2(1H)-on (XXXIII)



Příloha č.15: 3 – methyl – 7 - (trifluoromethyl) -1 – benzyl - benzo[d]imidazo[1,2 - a]imidazol – 2(3H)-on (XXXX)

