

UNIVERZITA PALACKÉHO V OLMOUCI

Přírodovědecká fakulta

Katedra biochemie



**Modifikace axiálně chirálních derivátů
benzimidazolu s protirakovinnou aktivitou pomocí
Suzuki-Miyaura cross-couplingové reakce**

BAKALÁŘSKÁ PRÁCE

Autor:	Eva Matelová
Studijní program:	B0512A130008 – Biochemie
Studijní obor:	Biochemie
Forma studia:	Prezenční
Vedoucí práce:	Mgr. Jana Pospíšilová
Rok:	2024

Prohlašuji, že jsem bakalářskou práci vypracovala samostatně s vyznačením všech použitých pramenů a spoluautorství. Souhlasím se zveřejněním bakalářské práce podle zákona č. 111/1998 Sb., o vysokých školách, ve znění pozdějších předpisů. Byla jsem seznámena s tím, že se na moji práci vztahují práva a povinnosti vyplývající ze zákona č. 121/2000 Sb., autorský zákon, ve znění pozdějších předpisů.

V Olomouci dne

.....

Podpis studenta

Ráda bych poděkovala především vedoucí mé práce, Mgr. Janě Pospíšilové, za její cenné vedení, odborné rady a trpělivost během vypracování této práce. Dále bych chtěla poděkovat panu doc. RNDr. Petru Cankařovi, Ph.D. za příležitost vypracovávat bakalářskou práci v jeho výzkumné skupině. Rovněž bych ráda poděkovala RNDr. Adamu Příbylkovi, Ph.D. za měření axiální chiralidy, Mgr. Lucii Rárové, Ph.D. za měření biologické aktivity a také Mgr. Ing. Václavu Bazigerovi, Ph.D. za molekulový docking. Mé poděkování patří také Mgr. Radku Jordovi, Ph.D. a Mgr. Veronice Vojáčkové za možnost podílet se na biologickém testování na katedře Experimentální biologie. Nemohu zapomenout na poděkování svým přátelům a rodině za neustálou podporu a povzbuzení při celé době studia. V poslední řadě děkuji za grantovou podporu IGA_PrF_2024_028.

Bibliografická identifikace

Jméno a příjmení autora	Eva Matelová
Název práce	Modifikace axiálně chirálních derivátů benzimidazolu s protirakovinnou aktivitou pomocí Suzuki-Miyaura cross-couplingové reakce
Typ práce	Bakalářská
Pracoviště	Katedra Biochemie
Vedoucí práce	Mgr. Jana Pospíšilová
Rok obhajoby práce	2024

Abstrakt

Cílem bakalářské práce je rozšířit SAR studii látek se stejným strukturním motivem o nové deriváty, získané Suzuki-Miyaura couplingovou reakcí. Syntéza bude zahájena klasickou nukleofilní aromatickou substitucí. Druhým krokem je klíčový Suzuki-Miyaura cross-coupling, kde bude potřeba najít vhodné podmínky pro tento substrát, následuje redukce nitroskupiny a cyklizace na cílové benzimidazoly. Praktická část bakalářské práce se soustředí na seznámení se základními principy syntézy a separace organických látek a jejich charakterizaci pomocí analytických metod (HPLC/MS, NMR, HRMS, teploty tání). Finální látky budou testovány na jejich protirakovinné účinky na různých buněčných liniích (HeLa, Eol-1, MV4-11) vzhledem k podložené aktivitě podobných derivátů na těchto liniích. Poslední částí bakalářské práce bude molekulární docking nasyntetizovaných látek.

Klíčová slova	benzimidazol, axiální chiralita, biologická aktivita, Suzuki-Miyaura cross-couplingová reakce
Počet stran	52
Počet příloh	1
Jazyk	Český

Bibliographical identification

Autor's first name and surname	Eva Matelová
Title	Modification of axially chiral benzimidazole derivatives with anticancer activity by Suzuki-Miyaura cross-coupling reaction
Type of thesis	Bachelor
Department	Department of Biochemistry
Supervisor	Mgr. Jana Pospíšilová
The year of presentation	2024

Abstract

The aim of the bachelor thesis is to extend the SAR study of compounds with the same structural motive by new derivatives obtained by Suzuki-Miyaura coupling reaction. The synthesis will be started by nucleophilic aromatic substitution. The second step is the Suzuki-Miyaura cross-coupling, followed by reduction of the nitro group and cyclization to the target benzimidazoles. The practical part of the bachelor thesis will focus on the introduction of the basic principles of synthesis and separation of organic compounds and their characterization by analytical methods (HPLC/MS, NMR, HRMS, melting points). The final products will be tested for their anticancer activity on different cell lines (HeLa, Eol-1, MV4-11) due to the proved activity of similar derivatives on these lines. The last part of the bachelor thesis will be the molecular docking of the synthesized compounds.

Keywords	benzimidazole, axial chirality, biological activity, Suzuki-Miyaura cross-coupling
Number of pages	52
Number of appendices	1
Language	Czech

Obsah

1	ÚVOD	1
2	SOUČASNÝ STAV ŘEŠENÉ PROBLEMATIKY	4
2.1	Chiralita	4
2.1.1	Axiální chiralita	4
2.2	Benzimidazol a jeho deriváty	5
2.2.1	Struktura	6
2.2.2	Syntéza benzimidazolu	6
2.3	Biologická aktivita benzimidazolů	8
2.3.1	Protirakovinné účinky	8
2.3.1.1	Inhibitory topoisomeras	9
2.3.1.2	Inhibitory mikrotubulů	10
2.3.1.3	DNA interkalační a alkylační činidla	11
2.3.1.4	Inhibitory kinas	12
2.4	Suzuki-Miyaura cross-coupling	13
2.4.1	Historie a vývoj	13
2.4.2	Reakční mechanismus	14
2.4.3	Katalyzátory a ligandy	16
2.4.3.1	Prekatalyzátory	18
2.4.4	Využití boronových sloučenin	20
2.4.5	Báze	22
2.4.6	Rozpouštědla	22
3	VÝSLEDKY A DISKUZE	23
3.1	Reakční schéma a použité reaktanty	23
3.1.1	Aromatická nukleofilní substituce	24
3.1.2	Suzuki-Miyaura cross-coupling	24
3.1.3	Redukce nitroskupiny	27
3.1.4	Cyklizace na deriváty benzimidazolu	28
3.2	Molekulový docking	30
3.3	Antiproliferační aktivita	32
3.4	Axiální chiralita	33
4	EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST	33
4.1	Přístrojové vybavení	33
4.2	Syntéza	33
4.2.1	2-chlor- <i>N</i> -(2-jodfenyl)-6-nitroanilin III	33
4.2.2	<i>N</i> -(2-chlor-6-nitrofenyl)-4'-methyl-[1,1'-bifenyl]-2-amin (IVa)	34
4.2.3	<i>N</i> -(2-chlor-6-nitrofenyl)-[1,1'-bifenyl]-2-amin (IVb)	35
4.2.4	<i>N</i> -(2-chloro-6-nitrophenyl)-4'-methoxy-[1,1'-biphenyl]-2-amin (IVc)	35
4.2.5	2-chloro-6-nitro- <i>N</i> -(2-(thiophen-3-yl)fenyl)anilin (IVd)	36
4.2.6	<i>N</i> -(2-chlor-6-nitrofenyl)-4'-(trifluormethyl)-[1,1'-bifenyl]-2-amin (IVe)	36
4.2.7	6-chlor- <i>N</i> -(4'-methyl-[1,1'-bifenyl]-2-yl)benzen-1,2-diamin (Va)	37
4.2.8	<i>N</i> ¹ -([1,1'-bifenyl]-2-yl)-6-chlorbenzen-1,2-diamin (Vb)	38
4.2.9	6-chlor- <i>N</i> ¹ -(4'-methoxy-[1,1'-bifenyl]-2-yl)benzen-1,2-diamin (Vc)	38
4.2.10	6-chlor- <i>N</i> ¹ -(2-(thiofen-3-yl)fenyl)benzen-1,2-diamin (Vd)	39
4.2.11	6-chlor- <i>N</i> ¹ -(4'-(trifluormethyl)-[1,1'-bifenyl]-2-yl)benzen-1,2-diamin (Ve)	40
4.2.12	7-chlor-1-(4'-methyl-[1,1'-bifenyl]-2-yl)-2-fenyl-1 <i>H</i> -benzo[<i>d</i>]imidazol (VIa)	40

4.2.13	1-([1,1'-bifeny]-2-yl)-7-chlor-2-fenyl-1 <i>H</i> -benzo[<i>d</i>]imidazol (VIb)	41
4.2.14	7-chlor-1-(4'-methoxy-[1,1'-bifeny]-2-yl)-2-fenyl-1 <i>H</i> -benzo[<i>d</i>]imidazol (VIc)	42
4.2.15	7-chloro-2-fenyl-1-(2-(thiofen-3-yl)phenyl)-1 <i>H</i> -benzo[<i>d</i>]imidazol (VIId)	42
4.2.16	7-chlor-2-phenyl-1-(4'-(trifluormethyl)-[1,1'-bifeny]-2-yl)-1 <i>H</i> -benzo[<i>d</i>]imidazol (VIe)	43
5	ZÁVĚR	44
6	LITERATURA	46
7	SEZNAM POUŽITÝCH SYMBOLŮ A ZKRATEK	51
8	PŘÍLOHY	53
8.1	NMR spektra	53

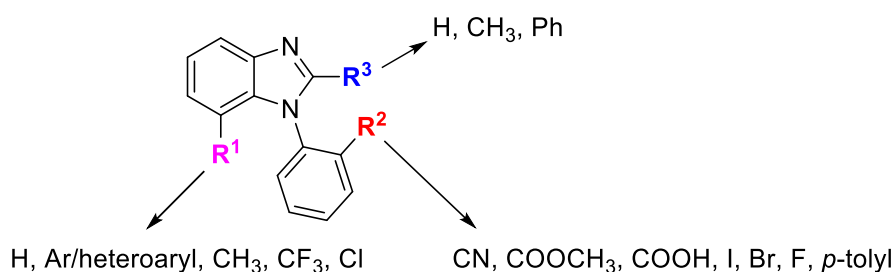
Cíle práce

- Studium struktury a vlastností benzimidazolu a jeho derivátů
- Zpracování rešerše týkající se Suzuki-Miyaura cross-couplingové reakce
- Návrh nových struktur derivátů benzimidazolu
- Rozšíření SAR studie látek se stejným strukturním motivem o nové deriváty
- Charakterizace syntetizovaných látek pomocí analytických metod
- Testování finálních látek na jejich protirakovinné účinky na různých buněčných liniích
- Molekulární docking syntetizovaných látek
- Prokázání vzniku axiálně chirálních látek pomocí analytické separace atropoisomerů

1 ÚVOD

Benzimidazol a jeho deriváty jsou častým motivem v medicíně, hlavně díky protizánětlivým a protirakovinným účinkům těchto látek. Struktura benzimidazolu poskytuje bohaté možnosti modifikace a syntéz derivátů s různými vlastnostmi. V této práci se zabývám vlivem *o*-substituce na *N*-arylu, která doposud v jiných publikacích nebyla příliš prozkoumána právě z důvodu vzniku axiálně chirálních látek.

Tato bakalářská práce navazuje na výzkum Mgr. Jany Pospíšilové, která syntetizovala malou knihovnu benzimidazolových derivátů vykazujících axiální chiralitu. Tyto deriváty jsou založeny na struktuře 1-fenylbenzimidazolu, který byl modifikován různými substituenty (Obr.1).



Obr. 1: Struktura 1-fenylbenzimidazolu modifikovaný různými substituenty

Celkem bylo syntetizováno 29 benzimidazolových derivátů, které byly následně testovány na 7 různých nádorových buněčných liniích a na 2 normálních liniích. Většina z těchto 29 látek vykazovala určitou míru cytotoxicity, přičemž některé z nich jsou zaznamenány v tabulce 1. (Pospíšilová J.)

Tab. 1: Cytotoxicita vybraných derivátů benzimidazolu u různých buněčných liniích prezentovaná jako IC₅₀ (μM) po 72 hodinách (Pospíšilová J.)

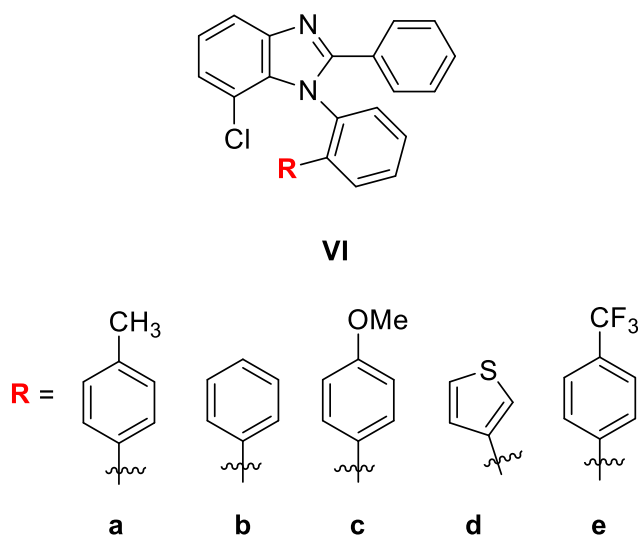
Látka	R ¹	R ²	R ³	MV4-11	HeLa	RPE-1
JP-5i	-Cl	-I	-CH ₃	19.2 ±2.5	17.1 ±0.6	>100
JP-5j	-H	-I	-CH ₃	54.9 ±4.2	>100	>100
JP-5l	-Cl	-I	-Ph	13.3 ±4.8	9.3 ±2.2	>100
JP-5n	-Cl	-CN	-Ph	7.8 ±1.0	3.2 ±0.5	23.4 ±0.6
JP-11b	-H	- <i>p</i> Tol	-Ph	36.7 ±0.2	13.6 ±1.5	25.3 ±4.5

Z porovnání biologických aktivit látek v tabulce 1 **JP-5l** a **JP-5i** vyplývá, že důležitým substituentem v poloze 2 u látky **JP-5l** byl fenyl, jako substituent R^3 . V porovnání s látkou **JP-5i**, která má v této pozici methyl, vykazovala látka **JP-5l** lepší cytotoxickou aktivitu na buněčných liniích MV4-11 i HeLa. Proto jsme se při návrhu nových struktur snažili o zachování fenylu jako substituentu R^3 .

Dalším důležitým substituentem, který jsme v nových strukturách zachovali, byl chlor v poloze 7 (R^1). Jeho přítomnost v molekule významně zvyšovala biologickou aktivitu látky. Tato skutečnost je zřetelná z porovnání látek **JP-5i** a **JP-5j**, kdy látka **JP-5i** obsahující chlor v poloze 7 vykazuje výrazně lepší výsledky u buněčných linií MV4-11 a HeLa, než látka **JP-5j**, která tento substituent neobsahuje.

Nejvýraznější cytotoxickou aktivitu vůči nádorovým buňkám MV4-11 a HeLa vykazovaly látky **JP-5l** a **JP-5n**. Látka **JP-5n** sice vykazovala lepší účinky, než látka **JP-5l**, ale oproti ní prokázala určitou cytotoxicitu i vůči zdravým buňkám. Rozdíl mezi těmito dvěma látkami byl v substituentu R^2 . Proto byla obměna jódu a nitrilu v pozici R^2 za jiné substituenty cílem výzkumu v této bakalářské práci. (Obr. 2)

Pro návrh R^2 substituentů jsme se inspirovali látkou **JP-11b**, kde přítomnost *p*-tolylu v této poloze zvýšila cytotoxickou aktivitu látky. Domnívali jsme se tak, že pokud zachováme chlor v poloze R^1 , fenyl v poloze R^3 a do polohy R^2 zavedeme substituenty podobné *p*-tolylu, je zde možnost pozorování zajímavých biologických aktivit.



Obr. 2: Navržená struktura nových derivátů benzimidazolu

Důležité bylo vymyslet vhodné reakční podmínky pro zavádění takto stericky náročných substituentů, což bylo komplikované zejména kvůli přítomnosti chloru ve struktuře. Syntéza nových látek se tak z předběžných výsledků jevila jako náročný úkol, proto byla pro tento krok byla navržena Suzuki-Miyaura cross-couplingová reakce s účinným prekatalyzátorem XPhos Pd G2.

Nově nasyntetizované deriváty budou testovány na stejných buněčných liniích, jako látky **JP-5i,j,l,n** a **JP-11b**. Protože podle předběžných výsledků tyto látky projevily také zajímavou cytotoxickou aktivitu na buněčné linii Eol-1, bude zde sledována aktivita také u mnou připravovaných derivátů.

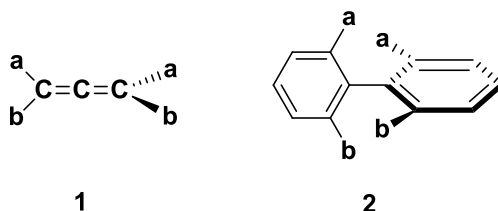
2 SOUČASNÝ STAV ŘEŠENÉ PROBLEMATIKY

2.1 Chiralita

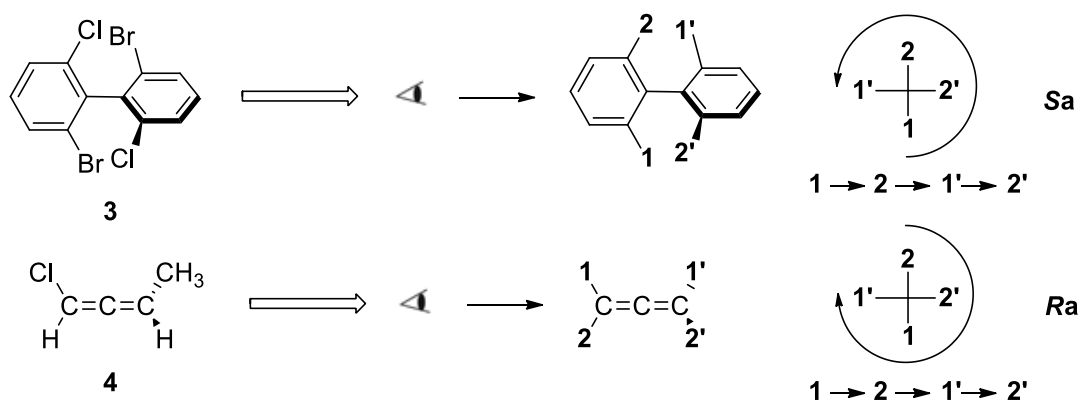
Chiralita je vlastnost molekuly, která má zásadní vliv na reaktivitu a chemické a fyzikální vlastnosti látek, zejména na interakci s polarizovaným světlem a biologickou aktivitu. Nejznámějším typem chiralitu je centrální chiralita. Centrální chiralitu organických molekul způsobuje přítomnost stereogenního centra, které je definováno jako atom, ke kterému jsou vázány čtyři různé substituenty. Tyto substituenty jsou rozmístěny tak, že molekula není ztotožnitelná se svým zrcadlovým obrazem. Molekula tedy neobsahuje osu ani střed symetrie. Molekuly, které nejsou identické se svými zrcadlovými obrazy se nazývají enantiomery. (Červinka, 1999) Chiralita molekul hraje klíčovou roli ve farmaceutickém průmyslu, kdy biologické systémy často rozpoznávají jen jednu formu enantiomeru. Výzkum a vývoj v oblasti chirálních látek je tedy důležitý pro optimalizaci účinnosti a bezpečnosti léčiv. (John McMurry, 2015)

2.1.1 Axiální chiralita

Axiální chiralita představuje specifický případ chiralitu, kdy molekula neobsahuje stereogenní centrum, ale osu chiralitu. Kolem osy chiralitu je rozmístěn soubor substituentů tak, že nejsou shodné se svým zrcadlovým obrazem. (Obr. 3) Existuje několik typů axiálně chirálních sloučenin. Například atropoisomerní sloučeniny, alleny nebo různé šroubovicové struktury (DNA). Atropoisomerie je jev, který vzniká vlivem sterické náročnosti substituentů na aromatickém jádru. Tato sterická náročnost zabraňuje rotaci kolem jednoduché vazby a v důsledku toho se molekuly atropoisomerů vyskytují ve dvou prostorově odlišných konformacích. Enantiomery axiálně chirálních sloučenin jsou značeny stereodeskriptory R_a a S_a (Obr. 4). (Moss, 1996)



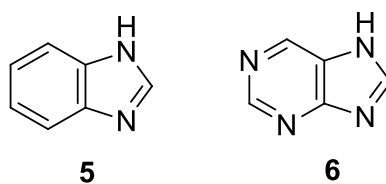
Obr. 3: Příklady axiální chiralitu (Moss, 1996)



Obr. 4: Příklady axiálně chirálních sloučenin značených stereodeskriptory R_a a S_a

2.2 Benzimidazol a jeho deriváty

Benzimidazol a jeho deriváty představují velice zajímavou třídu sloučenin v organické chemii. Díky heterocyklickému skeletu, podobnému purinům (Obr. 5), nalézá tato skupina uplatnění v široké škále biologicky aktivních látek. Jelikož jsou puriny klíčovými komponenty nukleotidů, umožňuje tato strukturní analogie derivátům benzimidazolu efektivně interagovat s různými biologickými cíli. Zároveň benzimidazolový skelet nabízí široké možnosti modifikace, což představuje zásadní výhodu pro syntézu a výzkum nových farmaceutických látek. Mezi hlavní farmaceutické účinky benzimidazolů patří jejich významná antivirová aktivita, schopnost potlačovat růst a šíření hub a jejich antioxidační vlastnosti. Dále se projevují jako potenciální protirakovinné látky, kde vykazují schopnost interferovat s různými procesy souvisejícími s nádorovým bujením. (Wright, 1951)

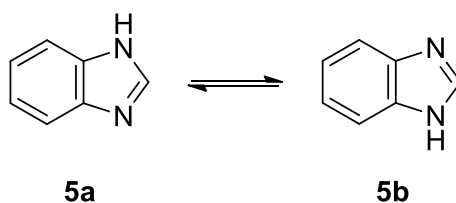


Obr. 5: Porovnání struktury benzimidazolu (5) a purinu (6)

2.2.1 Struktura

Benzimidazoly jsou heterocyklické sloučeniny obsahující dva atomy dusíku v centrálním kruhu, což jim propůjčuje jedinečné chemické vlastnosti. Benzimidazolový kruh je vysoce stabilní, není ovlivněn zahřátím s koncentrovanou kyselinou sírovou ani prudkým působením kyseliny chlorovodíkové nebo alkálií. Oxidace štěpí benzenový kruh jen za extrémních podmínek. (Fischer, 1889)

Přítomností atomů dusíku v poloze 1 a 3 mohou benzimidazoly v acidobazických reakcích vystupovat jako slabá kyselina nebo báze. Díky N-H skupině ve struktuře benzimidazolu dochází tautomerii (Obr. 6), kdy jednotlivé tautomery nelze izolovat ani separovat. K tautomerii však dochází pouze u *N*-nesubstituovaných derivátů benzimidazolu. (Day, 1950)



Obr. 6: Tautomerie benzimidazolu (Day, 1950)

2.2.2 Syntéza benzimidazolu

Jako první syntetizoval benzimidazol v roce 1872 Hobrecker, který redukcí *N*-(4-methyl-2-nitrofenyl)acetamidu **7** a následnou dehydratací získal dimethylbenzimidazol **9**. Reakce je znázorněna na Schéma 1. (Hobrecker, 1872)

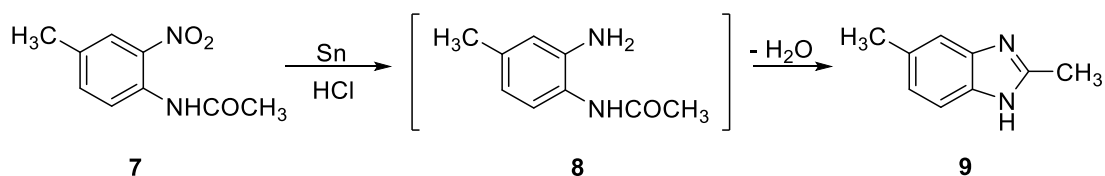


Schéma 1: Syntéza 2,5-dimethylbenzimidazolu dle Hobreckera (Hobrecker, 1872)

O pár let později získal stejnou sloučeninu Ladenburg pomocí refluxu *o*-fenylendiaminu s kyselinou octovou. (Ladenburg, 1875) Nejprve dochází ke vzniku monoacylovaného meziprojektu, který následnou dehydratací cyklizuje za vzniku derivátu benzimidazolu **9**. Tato reakce se následně stala standardní metodou pro přípravu benzimidazolů. (Wright, 1951)

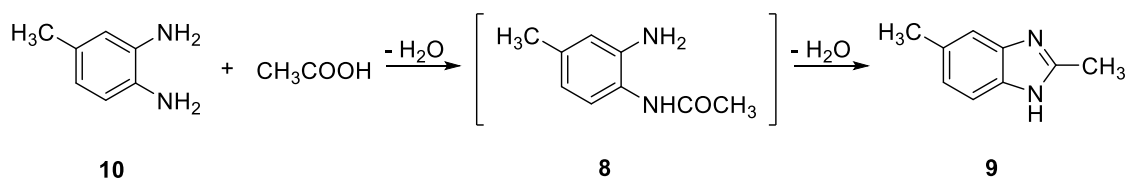


Schéma 2: Syntéza 2,5-dimethylbenzimidazolu dle Ladenburga (Wright, 1951)

Fisher v roce 1905 popsal reakci *o*-fenylendiaminu **10** s přebytkem karboxylové kyseliny. (Fischer, 1905) V roce 1928 Philips tuto metodu modifikoval. Tato modifikace spočívala v refluxu *o*-fenylendiaminu **10** a karboxylové kyseliny v minerální kyselině, konkrétně v kyselině chlorovodíkové. Benzimidazol se následně vysrážel po neutralizaci roztoku hydroxidem amonným. (Phillips, 1928)

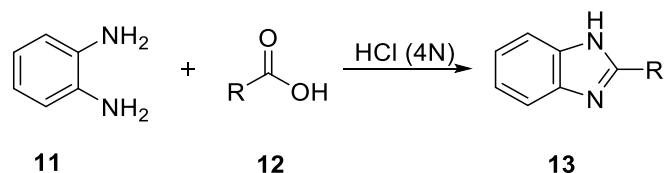


Schéma 3: Syntéza benzimidazolu substituovaného v poloze 2 (Phillips, 1928)

Za správných podmínek mohou s *o*-fenylendiaminy a jeho deriváty reagovat i aldehydy, kdy dochází ke vzniku benzimidazolů substituovaných v poloze 2. Například v roce 2005 Lin a kol. syntetizovali různé deriváty benzimidazolu z fenylendiaminů a aldehydů za přístupu vzduchu. Výhodou této reakce je jednoduchý postup, mírné podmínky, snadná purifikace produktu a také ekologická nenáročnost, jelikož jediným odpadním produktem je voda. (Lin & Yang, 2005)

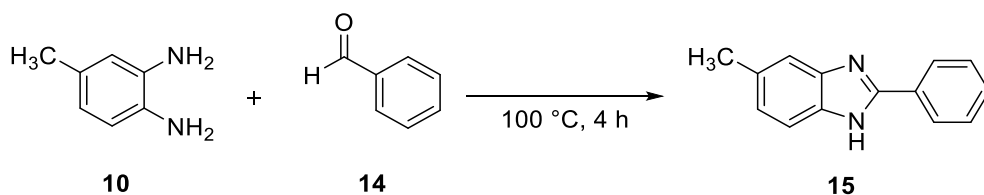


Schéma 4: Syntéza 5-methyl-2-fenylbenzimidazolu (Lin & Yang, 2005)

V literatuře je popsáno mnoho dalších způsobů přípravy benzimidazolů, které nejsou omezené jen na reakci *o*-fenylendiaminů. Ve struktuře výchozích látek je však potřeba, aby benzenový kruh obsahoval 1-2 aminoskupiny, které zajišťují správné uzavření heterocyklického kruhu benzimidazolu.

Mezi hojně popisované syntézy benzimidazolu a jeho derivátů patří tzv. one-pot reakce, vycházející z *o*-nitroanilinu **16**. Tato reakce probíhá ve dvou krocích. Nejdříve

dochází k redukci nitroskupiny *o*-nitroanilinu na *o*-fenylendiamin a následně dochází k cyklizaci s pomocí různých zdrojů uhlíku. Například Rasal a kol. využili DMF jako zdroj uhlíku v přítomnosti katalyzátoru CuFe_2O_4 , a produkt byl získán ve vysokých výtěžcích. (Rasal & Yadav, 2018)

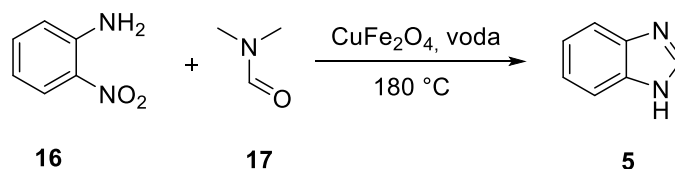


Schéma 5: Syntéza benzimidazolu pomocí one-pot reakce (Rasal & Yadav, 2018)

2.3 Biologická aktivita benzimidazolů

První zmínku o biologické aktivitě benzimidazolu publikovali Goodman a Hart v roce 1943. O rok později publikoval svoji práci také Woolley, v níž se zabýval benzimidazoly, puriny a antibakteriální aktivitou syntetizovaných benzimidazolů na *E. coli* a *S. lactis*. (Woolley, 1944) V roce 1949 získali Brink a Folkers 5,6-dimethylbenzimidazol pomocí kyselý hydrolyzy vitamínu B_{12} . Zkoumáním tohoto degradačního produktu zjistili aktivitu podobnou právě vitamínu B_{12} . (Brink & Folkers, 1949) Během mnoha dalších let byly zkoumány a syntetizovány další deriváty benzimidazolu, u kterých byla zaznamenána biologická aktivita. (Barker et al., 1960)

V dnešní době je přítomnost benzimidazolového jádra popsána u různých terapeutických látek, jako jsou například antiparazitika (Navarrete-Vázquez et al., 2001), antimikrobiotika (Bhoi et al., 2023), antivirotika (Chen et al., 2021), antioxidanty (Ayhan-Kilcigil et al., 2007), protizánětlivé látky (Thakurdesai et al., 2007), inhibitory protonových pump (Uematsu et al., 1994) nebo potenciální protirakovinná léčiva (Tan et al., 2018).

2.3.1 Protirakovinné účinky

Aktivita látek, připravených v experimentální části práce, bude v návaznosti na předchozí výzkum testována na nádorových buněčných liniích, z tohoto důvodu jsou v teoretické části práce popsány hlavně protirakovinné účinky derivátů benzimidazolu.

Rakovina je jednou z nejzávažnějších a nejčastějších nemocí na světě. Je to komplexní onemocnění, které je charakterizováno nekontrolovatelným růstem a množením buněk v těle. Její nebezpečnost spočívá v tom, že může postihnout téměř jakoukoliv tkáň nebo

orgán v lidském těle. Tato nemoc má velkou řadu forem a podtypů, kdy každá forma rakoviny má své vlastní charakteristiky, které jsou důležité pro její diagnostiku, léčbu a výzkum. (Reddy et al., 2019) I přes přínosy moderní medicíny, která pomohla vylepšit metody diagnostiky a léčby a zlepšila míru přežití pacientů, je rakovina stále velmi špatně léčitelnou nemocí. Může za to hlavně rezistence nádorů, toxicita léků a nízká úspěšnost při vývoji nových léčiv. Většina léků, které se používají pro léčbu rakoviny je necílená. Znamená to, že léky jsou toxické nejen pro rakovinné buňky, ale i pro buňky zdravé. (Aydemir & Bilaloğlu, 2003) Mezi protinádorovými léčivy se v posledních letech objevily různé deriváty benzimidazolů. (Yamori et al., 1999) (Dogra et al., 2018) Benzimidazoly se díky své jedinečné struktuře, rozmanité biologické aktivitě a minimální toxicitě staly populárním základem pro vývoj protinádorových léčiv.

2.3.1.1 Inhibitory topoisomeras

DNA topoisomerasy jsou enzymy, které hrají důležitou roli při replikaci DNA, transkripci, rekombinaci a remodelaci chromatinu. Tyto enzymy jsou schopné měnit topologii DNA bez toho, aniž by ji nějak poškodily či fyzicky rozštěpily. Buňky nesou genetickou informaci pro dva druhy: topoisomerasa typu I (Top I) a topoisomerasa typu II (Top II). Liší se od sebe tím, že, Top I jsou schopné provádět úpravy pouze na jednom z DNA vláken, zatím co Top II provádí změny v obou vláknech. (Champoux, 2001)

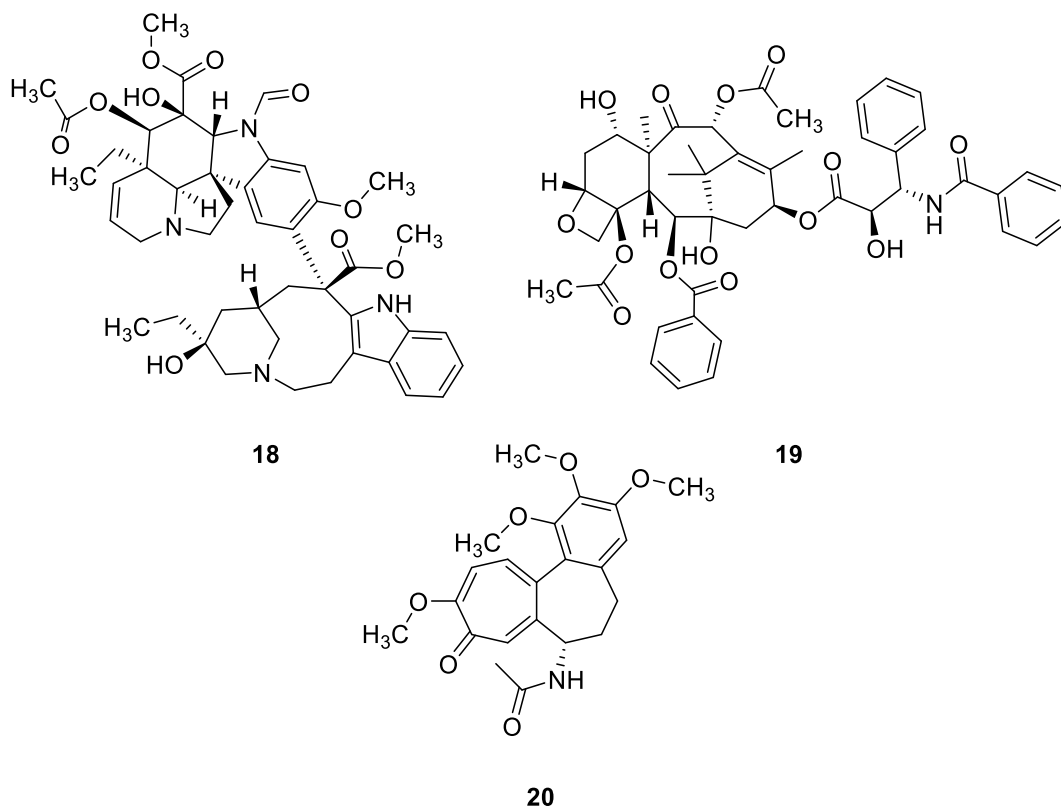
Topoisomerasy při štěpení molekuly DNA vytváří intermediát enzym-DNA, který je nezbytný pro správnou buněčnou funkci enzymu. I když je tento štěpný komplex důležitým meziproduktem, narušení jeho funkce může vést k trvalému rozštěpení řetězce DNA, který vede k buněčnému poškození či smrti. U přeživších buněk se zvýšenou hladinou štěpů v DNA může docházet k iniciaci leukemické translokace. Zdravé buňky jsou schopny rozštěpené řetězce opravit či rekombinovat, rakovinné buňky tuto funkci postrádají. (McClendon & Osheroff, 2007)

Inhibitory topoisomeras zabraňují zpětné ligaci rozštěpeného DNA řetězce a drasticky tak zvyšují hladinu štěpných komplexů Top I-DNA nebo Top II-DNA. Jejich dostatečná koncentrace iniciuje buněčnou smrt. (Fortune & Osheroff, 2000)

2.3.1.2 Inhibitory mikrotubulů

Mikrotubuly jsou hlavní strukturální složkou buňky. Udržují tvar buňky, jsou důležitými prvky při buněčném dělení, komunikaci buněk a umožňují buněčný pohyb. Jsou to dynamické sestavy heterodimerů, složených z podjednotek α a β tubulinu. Tyto podjednotky jsou rovnoběžně uspořádané kolem osy a tvoří tak dlouhé řetězce ve tvaru trubice. Na dynamice mikrotubulů, tedy schopnosti se prodlužovat či zkracovat, je závislá hlavně mitóza. Mitóza je důležitým procesem buněčného dělení, kdy je replikovaný genetický materiál ve formě chromozomů rovnoměrně rozdělován mezi dvě nové dceřiné buňky. Mikrotubulový cytoskelet buňky se při mitóze rozpadne a mikrotubuly z vřeténka se připojí k chromozomům, které následně přesunou k oběma pólům buňky. (Wilson & Jordan, 1995)

Inhibitory mikrotubulů se dají rozdělit do dvou skupin. První skupina látek inhibuje polymeraci mikrotubulů, patří mezi ně například kolchicin **20**, vinkristin **18** nebo vinblastin (Obr. 7). Druhá skupina mikrotubuly stabilizuje a patří mezi ně například paclitaxel **19** (Obr. 7) nebo docataxel. Obě skupiny narušují dynamiku mitotického vřeténka při buněčném dělení, zastavují metafázi a tím iniciují apoptózu. (Dogra et al., 2018)



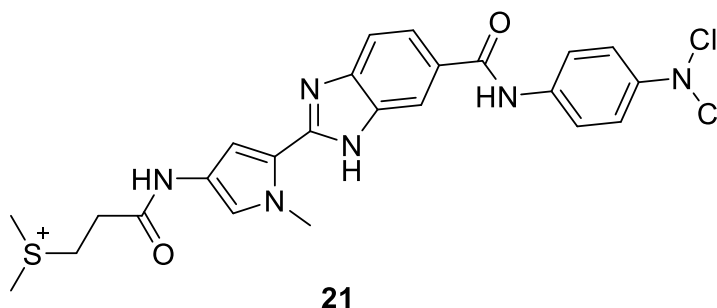
Obr. 7: Struktura vinkristinu (**18**), paclitaxelu (**19**) a kolchicinu (**20**)

2.3.1.3 DNA interkalační a alkylační činidla

DNA interkalační a alkylační činidla představují skupinu látek, které se váží na DNA, čímž ovlivňují její strukturu a znemožňují tak interakci proteinu s molekulou DNA. Tyto interakce mezi proteiny a DNA jsou důležité pro replikaci DNA, transkripci, balení chromozomů nebo opravy DNA. Přerušení těchto interakcí interkalátorem může změnit konformaci DNA a biologické funkce proteinů vázajících se na DNA, jako jsou transkripční faktory, topoizomerasy a polymerasy.

Interkalátory interagují s DNA buďto ireverzibilně pomocí kovalentní vazby, nebo reverzibilně pomocí nekovalentních elektrostatických interakcí mezi dvěma páry bází v DNA. Po navázání interkalátoru na DNA dochází k inhibici syntézy nukleových kyselin a tím i k inhibici buněčného dělení, které vede k buněčné apoptóze. Interkalační a alkylační činidla jsou využívána k selektivnímu poškozování rychle se dělících buněk a mají tak klíčový význam v léčbě nádorových onemocnění. (Karimi Goftar et al., 2014)

Yamori a kol. v roce 1999 syntetizovali derivát benzimidazolu **21** známý pod názvem MS-247 (Obr. 8). Tento derivát vykazoval protinádorovou aktivitu u 39 nádorových buněčných linií a u 17 nádorových xenografů vaječníku, prsu, žaludku a plic. Ve srovnání s klinicky používanými léčivy, jako je například cisplatina ADM a 5-FU, byl MS-247 ve většině případů účinnější a v předběžné studii byla prozatím zjištěna minimální cytotoxicita projevující se potlačením činnosti kostní dřeně. MS-247 se váže k malému žlábků DNA, konkrétně k místům bohatým na Adenin a Thymin. Tato vazba byla potvrzena pomocí fluorescenčního barviva Hoechst 33342, které bylo vytěsňováno látkou MS-247. Po navázání vytváří mezi řetězcové příčné vazby, které následně blokují buněčný cyklus ve fázi G2/M a indukují tak apoptózu. (Yamori et al., 1999)



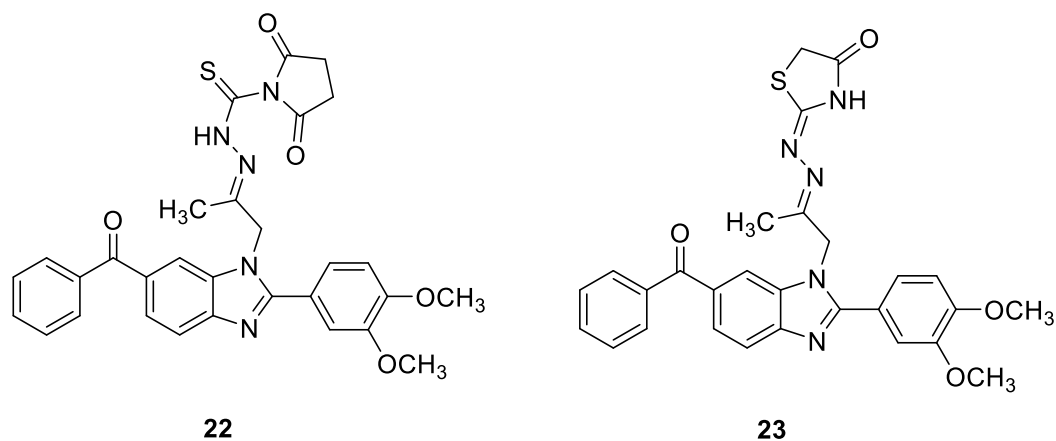
Obr. 8: Struktura látky MSF-247 (Yamori et al., 1999)

2.3.1.4 Inhibitory kinas

Kinázy jsou skupinou enzymů regulující buněčnou signalizaci pomocí katalýzy reverzibilní fosforylace proteinů. Jako první charakterizovali kinázovou aktivitu Krebs a Fisher v roce 1955. (Krebs & Fischer, 1955)

U člověka je známo více než 530 kinas, mezi které můžeme zařadit například tyrosinkinasy a serin/threoninkinasy. Při fosforylaci se přenáší fosfátová skupina z ATP na cílovou molekulu, mění tak její strukturu a funkci. Obvykle tyrosinkinase signální dráhy zabráňují buňkám v nekontrolovatelném buněčném dělení, nebo přispívají k citlivosti na apoptotické signály. V rakovinných buňkách jsou tyto signální dráhy často geneticky nebo epigeneticky změněny a poskytují tak těmto buňkám selektivní výhodu v přežití a růstu. (Hunter, 1998)

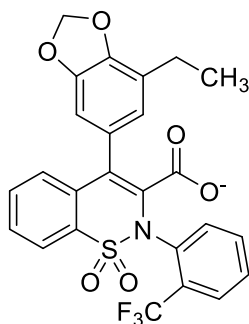
V roce 2020 El-Meguid a kol. syntetizovali nové deriváty benzimidazolu (**22** a **23**, Obr. 9), které vykazovaly slibnou inhibiční aktivitu na tyrosin kinasách, konkrétně na PDGFR- β a VEGFR-2, které jsou klíčové v regulaci růstu a vývoji buněk například při angiogenezi. Jsou ale také důležité při patologických procesech jako je růst nádoru. Účinnost sloučenin porovnávali s referenčním lékem Erlotinib, kdy například látka **23** vykazovala až 2 krát větší účinnost než Erlotinib u obou proteinkinase. (El-Meguid et al., 2020)



Obr. 9: Struktura nových derivátů benzimidazolu (El-Meguid et al., 2020)

2.4 Suzuki-Miyaura cross-coupling

Suzuki-Miyaura cross-couplingová reakce je efektivní a široce využívanou metodou v organické chemii pro vytváření C-C vazeb s využitím aromatických nebo alkenylových halogenidů a boronových sloučenin za přítomnosti katalyzátoru, nejčastěji na bázi palladia. Využívá se zejména pro výrobu biarylů, ve kterých jednoduchou vazbou vzájemně spojuje dva aromatické kruhy. Tuto vazbu obsahuje velká část běžných léčiv, proto má tato reakce uplatnění i ve farmaceutickém průmyslu. (J. McMurry, 2012) Jedním z léčiv, připravovaných pomocí Suzuki cross-couplingové reakce je například látka CI-1034 **24** (Obr. 10), která se využívá jako antagonistu endotelinu pro léčbu primární plicní hypertenze a městnavého srdečního selhání. (Jacks et al., 2004)



24

Obr. 10: Struktura látky CI-1034 (Jacks et al., 2004)

2.4.1 Historie a vývoj

V roce 1979 japonští chemici Akira Suzuki a Norio Miyaura poprvé zveřejnili článek, týkající se Suzuki-Miyaura cross-couplingové reakce. (Miyaura et al., 1979) Základní myšlenkou Suzuki-Miyaurovy reakce bylo využití organoboronových sloučenin, kterými se zabýval A. Suzuki ve své dřívější studii, pro vytváření nových vazeb mezi uhlíkovými atomy. Jako první tak tato reakce umožnila účinné provedení cross-couplingu organoboronových sloučenin za přítomnosti palladiového katalyzátoru. V následujících letech se práce A. Suzukiho stala velmi populární díky své všestrannosti, komerční dostupnosti reagentů a mírným reakčním podmínkám. Pro tvorbu C-C vazeb je k dispozici několik dalších metod, jako například Kharash coupling, Himaya coupling nebo Negishi coupling. Tyto reakce však oproti Suzuki couplingu mohou vyžadovat mnohem agresivnější podmínky, vyšší teploty, nebo reaktanty s omezenou dostupností.

A. Suzuki za svůj výzkum obdržel několik ocenění, včetně Nobelovy ceny za chemii v roce 2010, kterou získal spolu s Richardem F. Heckem a Ei-ichi Negishim za rozvoj palladiově katalyzovaných cross-couplingových reakcí. (Suzuki, 2011)

2.4.2 Reakční mechanismus

Obecný mechanismus Suzuki-Miyaura cross-couplingové reakce je založen na třech hlavních reakcích: oxidativní adice, transmetalace a redukční eliminace. Nejlépe se katalytický cyklus Suzukiho reakce popisuje na komplexu palladia viz Schéma 6.

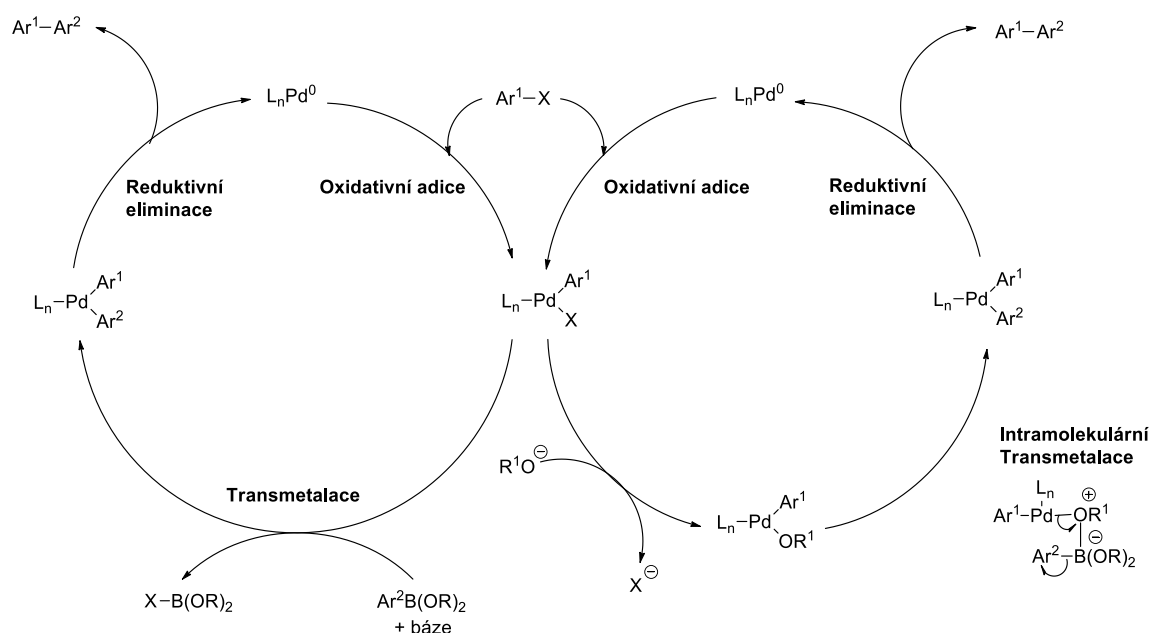


Schéma 6: Obecný mechanismus Suzuki-Miyaura cross-couplingové reakce popsany na komplexu palladia (Martin & Buchwald, 2008)

První fází cyklu je oxidativní adice, která ve většině případů bývá krokem určujícím rychlost reakce. Dochází při ní k aktivaci Pd katalyzátoru, kdy se Pd (0) oxiduje na Pd (II). Pd (0) katalyzátor reaguje s aryl-halogenidem za vzniku aryl-halogen-palladnatého intermediátu. Dochází ke štěpení vazby C-halogen a na atom Pd se váže alkyl i halogen. Relativní reaktivita substrátů klesá v pořadí $I > OTf > Br \gg Cl$. Reaktivita arylových a 1-alkenylových halogenderivátů se zvyšuje, jsou-li v sousedních polohách navázané skupiny odčerpávající elektrony. (Miyaura & Suzuki, 1995)

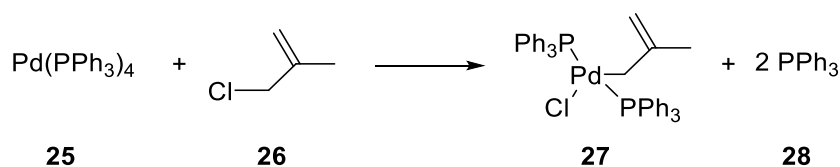


Schéma 7: Oxidativní adice

Druhou fází cyklu je transmetalace, při které je důležitá přítomnost báze. Tento krok umožňuje přenos arylové skupiny z organoboronové sloučeniny na palladnatý komplex. Transmetalace však neprobíhá snadno kvůli nízké nukleofilitě organoboronového substrátu. Báze reaguje s organoboronovým substrátem za vzniku tetravalentního komplexu boru, který zvyšuje nukleofilitu substrátu a je tak v transmetalacním kroku reaktivnější. (Miyaura et al., 1985) Alternativní proces transmetalace spočívá v reakci báze s aryl-halogen-palladnatým komplexem, kdy báze nahrazuje halogen v koordinační sféře komplexu a vzniká tak reaktivnější alkoxy-palladnatý komplex. Tento komplex velmi snadno podléhá transmetalaci a následně reaguje s organoboronovou sloučeninou za vzniku intermediátu $\text{Ar}^1\text{-Pd-Ar}^2$. (Miyaura & Suzuki, 1995)

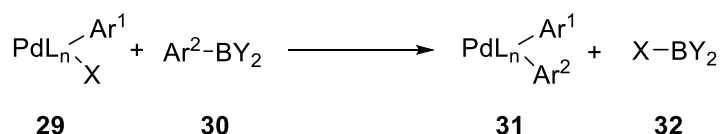


Schéma 8: Obecné schéma transmetalace (D'Alterio et al., 2021)

Poslední fází je reduktivní eliminace, při které dochází ke vzniku výsledného produktu a také k obnově částice $\text{L}_n\text{Pd}(0)$. Reakce probíhá přímo z *cis*- a *trans*- izomerů pomocí izomerace na příslušný *cis*-komplex, následně dochází k reduktivní eliminaci a vzniká výsledný produkt (Schéma 9). Reaktivita substrátů klesá v pořadí: aryl-aryl > aryl-alkyl > propyl-propyl > ethyl-ethyl > methyl-methyl, což naznačuje účast π -elektronů arylové skupiny při tvorbě vazby.

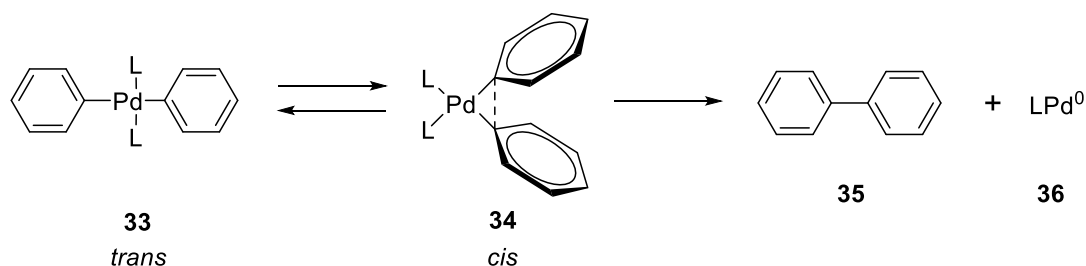


Schéma 9: Obecné schéma mechanismu reduktivní eliminace

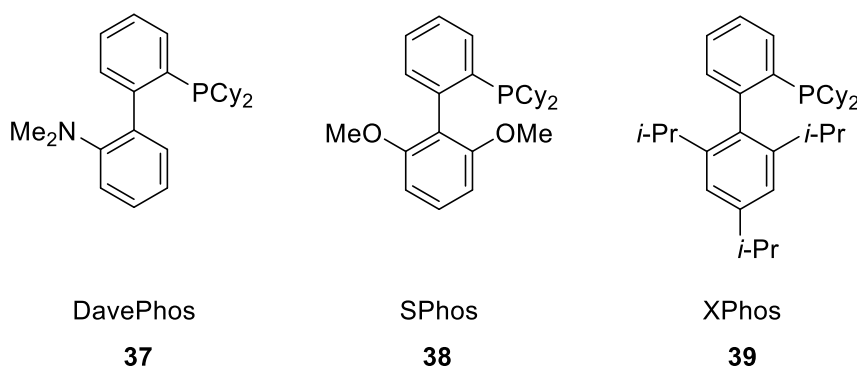
2.4.3 Katalyzátory a ligandy

Rozvoj Suzuki-Miyaura cross-couplingové reakce vedl k vývoji nových katalyzátorů. Nové katalyzátory jsou aplikovatelné na mnohem širší škálu substrátů a mají velmi dobrou toleranci k funkčním skupinám.

Aktivita katalyzátoru z velké části závisí na stereo-elektronových vlastnostech ligandu. Do roku 1998 se u většiny katalyzátorů pro cross-couplingy využívaly triarylfosfinové ligandy, které však byly později nahrazovány novými, na elektrony bohatými, fosfinovými ligandy. Tyto ligandy zlepšovaly jak účinnost, tak i selektivitu cross-couplingové reakce. Patří mezi ně hlavně dialkylbiarylfosfiny a trialkylfosfiny, které jsou dodnes nejpoužívanějšími ligandy pro cross-couplingové reakce. Dalšími často využívanými ligandy jsou například *N*-heterocyklické karbeny (NHC). (Martin & Buchwald, 2008)

Při začátcích Suzuki couplingů byl nejvíce používaným katalyzátorem $\text{Pd}(\text{PPh}_3)_4$. Tento katalyzátor je hojně využíván dodnes i přes své nedostatky, jako je citlivost na vzduch a světlo, nebo tvorba vedlejších produktů obsahujících fenylovou skupinu. Dalšími často využívanými katalyzátory jsou také $\text{PdCl}_2(\text{PPh}_3)_2$ nebo $\text{Pd}(\text{OAc})_2$ v kombinaci s fosfinovými ligandy.

V roce 1999 byla prof. Buchwaldem a kol. zveřejněna publikace popisující syntézu nového stericky náročného a na elektrony bohatého ligandu DavePhos. (Aranyos et al., 1999) Následně se Buchwald a kol. věnovali vývoji a popisu dalších dialkylbiarylfosfinových ligandů (Obr. 11), které se staly výbornými podpůrnými ligandy při tvorbě vazeb uhlík-uhlík, uhlík-dusík a uhlík-kyslík. (Martin & Buchwald, 2008)



Obr. 11: Struktury nových dialkylbiarylfosfinových ligandů (Martin & Buchwald, 2008)

Tyto ligandy mohou být syntetizovány přidáním arylového Grignardova činidla nebo aryllithia k in situ generovanému benzynu a následným zachycením intermediátu chlorfosfinem (Schéma 10).

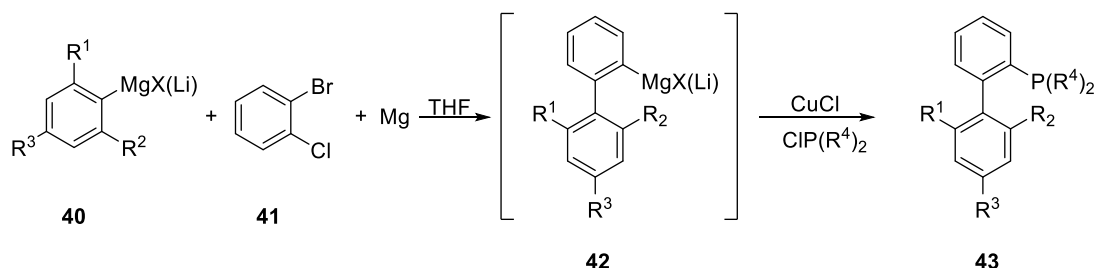
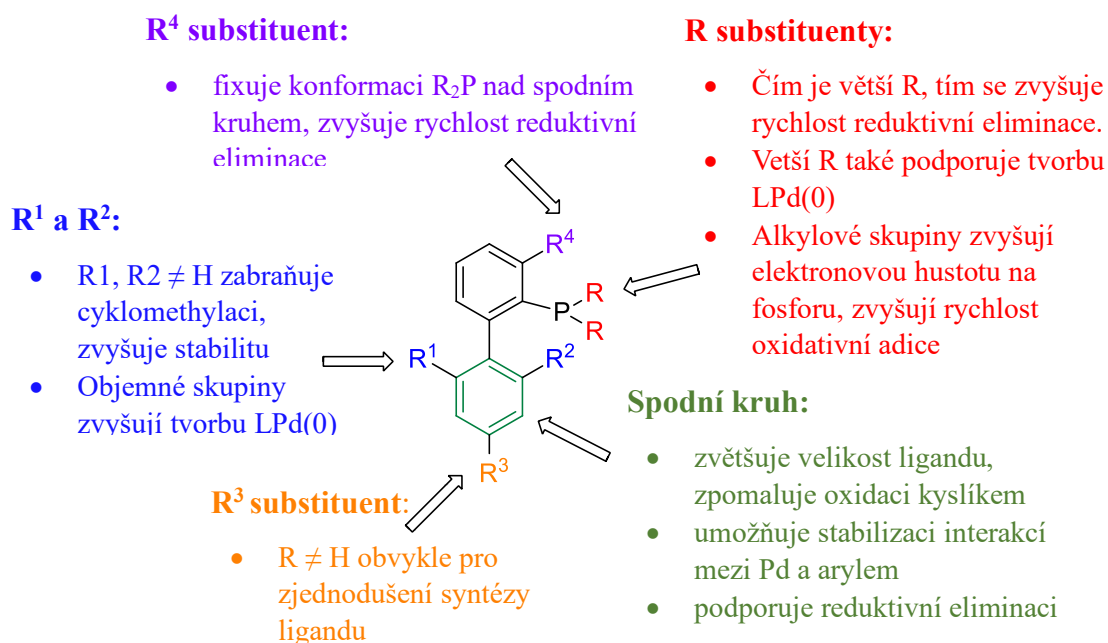


Schéma 10: Syntéza dialkylbiarylfosfinových ligandů (Martin & Buchwald, 2008)

Katalytické systémy na bázi biarylfosfinových ligandů mají kromě vysoké reaktivity i řadu dalších vlastností, díky kterým jsou velmi využívány pro organickou syntézu. Jsou to krystalické látky, stabilní na vzduchu i v roztoku, mají vysokou tepelnou stabilitu a mnoho z těchto ligandů je komerčně dostupných.

Vysoká aktivita dialkyl-biarylfosfinových ligandů je přisuzována kombinaci elektronických a sterických vlastností. Tyto vlastnosti zvyšují rychlost oxidativní adice, transmetalace a redukční eliminace v katalytickém cyklu. Obecná struktura, modifikace a jejich vliv na katalytický cyklus těchto ligandů je znázorněna na Obrázku 12. (Martin & Buchwald, 2008)



Obr. 12: Strukturální vlastnosti dialkylbiarylfosfinů a jejich vliv na účinnost katalyzátorů využívajících tyto ligandy (Martin & Buchwald, 2008)

2.4.3.1 Prekatalyzátory

Při SMC se dnes kromě katalyzátorů používají také Pd(II) prekatalyzátory, které jsou na rozdíl od Pd(0) katalyzátorů stabilní na vzduchu. Pd(II) komplex je však potřeba aktivovat redukcí na příslušnou aktivní částici $L_nPd(0)$, aby mohl vstoupit do katalytického cyklu.

Jednou z nejdůležitějších skupin prekatalyzátorů jsou tzv. palladacycles, které vykazují výbornou aktivitu v coupling a cross-coupling reakcích. Schéma aktivačního mechanismu těchto prekatalyzátorů znázorňuje Schéma 11.

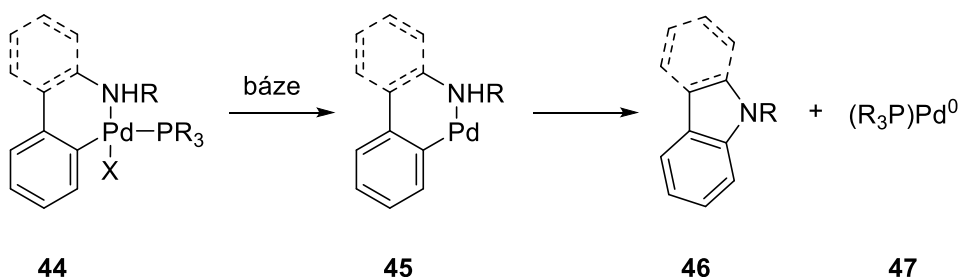


Schéma 11: Aktivační mechanismus palladacycles prekatalyzátorů

Buchwald a kol. usilovali o vývoj prekatalyzátoru, který by mohl být použit s různými typy ligandů. Podařilo se jim vyvinout vysoce účinnou skupinu prekatalyzátorů, která je rozdělena do několika generací. První generace (G1) byla založena na N,C-fenylaminovém palladacyklu. V přítomnosti báze je amin vázaný na palladium snadno deprotonován, čímž je iniciována reduktivní eliminace za vzniku $L_nPd(0)$ a indolinu.

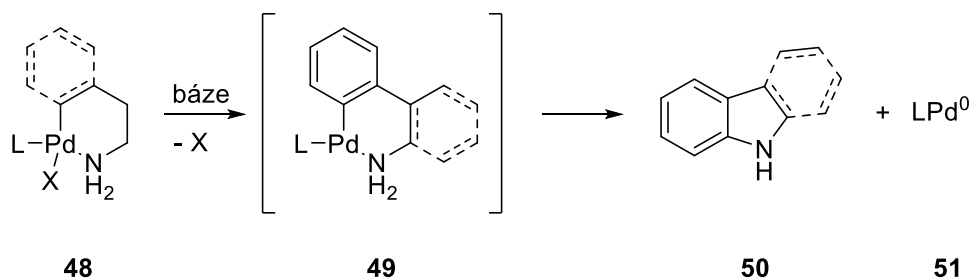


Schéma 12: Aktivační mechanismus G1 prekatalyzátorů

Druhá generace prekatalyzátorů je založena na 2-aminobifenylu. Díky vyšší kyselosti dochází k rychlejší aktivaci i se slabými bázemi za pokojové teploty. Tyto prekatalyzátory jsou využívány při SMC reakcích široké škály nechráněných heteroaryl bromidů nebo chloridů ve vynikajících výtěžcích. Mezi nejčastěji používané prekatalyzátory druhé generace patří například XPhos Pd G2. (Kinzel et al., 2010) Schéma č. 13 znázorňuje

pravděpodobný katalytický cyklus prekatalyzátoru XPhos Pd G2 pro Suzuki cross-couplingovou reakci heterocyklů s navázaným chlorem. (Savitha et al., 2019)

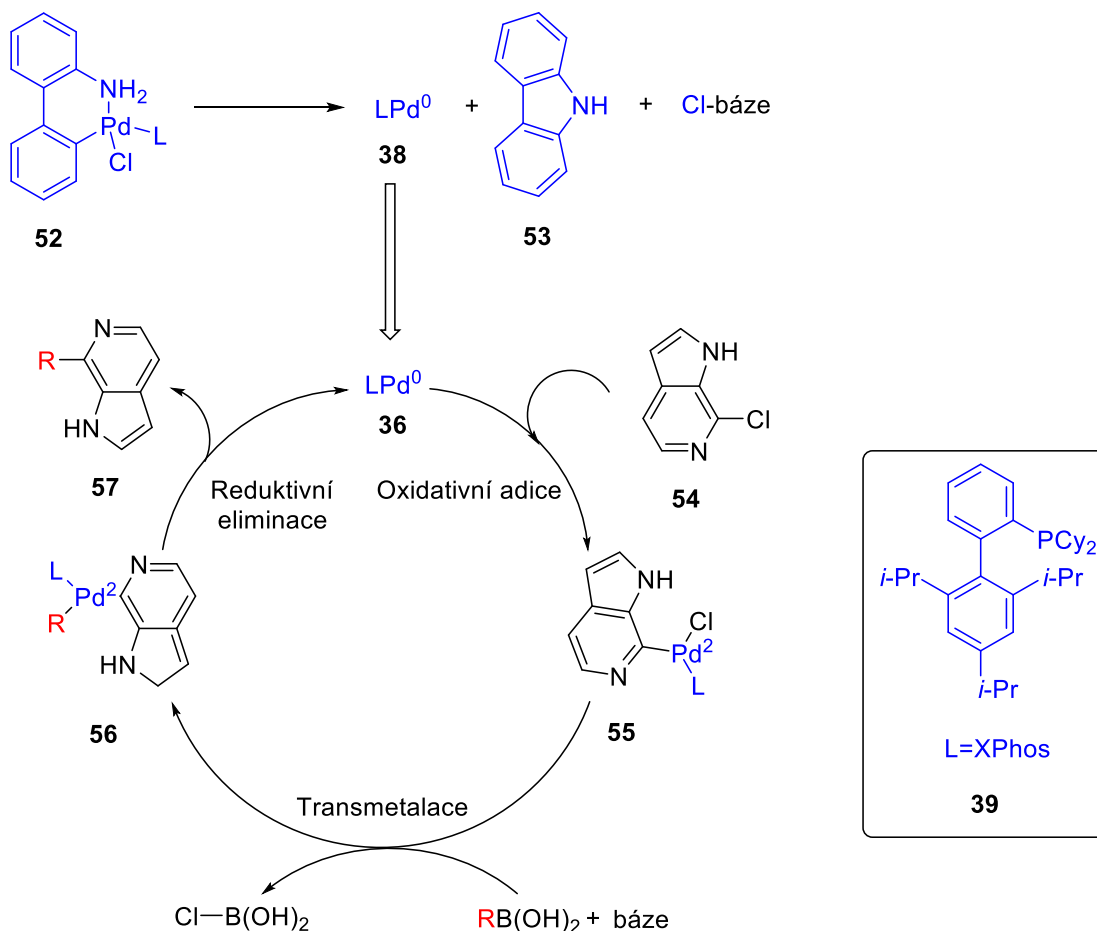


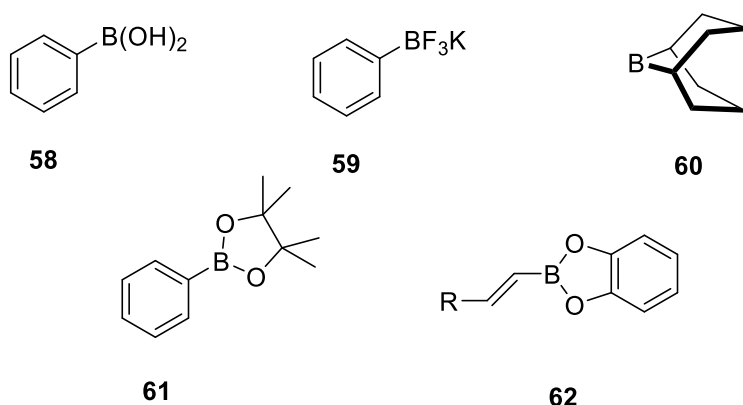
Schéma 13: Pravděpodobný katalytický cyklus Prekatalyzátoru XPhos Pd G2 (Savitha et al., 2019)

Nevýhodou G2 prekatalyzátorů je však jejich sterická náročnost. Tento problém Buchwald vyřešil nahrazením chloridového ligandu elektronově chudším mesylátovým aniontem a vytvořil tak skupinu prekatalyzátorů třetí generace. Tyto prekatalyzátory jsou aktivnější než prekatalyzátory G2 a využívají se při tvorbě C-N a C-O vazeb. (Bruno et al., 2013)

N-methylové a *N*-fenylové analogy prekatalyzátoru G3 jsou využívány k přípravě prekatalyzátorů čtvrté generace. Tyto prekatalyzátory se však využívají jen omezeně kvůli tvorbě vedlejších produktů, které komplikují zpracování produktu a jejich přítomnost ve farmaceutických vzorcích představuje zdravotní riziko. (Bruno et al., 2014)

2.4.4 Využití boronových sloučenin

Pro Suzuki-Miyaura cross-couplingové reakce se využívají organoboronové substráty. Jejich snadná příprava, relativní stabilita, rychlá transmetalace s komplexy palladia (II) a ekologická neškodnost vysvětlují oblíbenost těchto substrátů v chemickém, farmaceutickém a agrochemickém průmyslu. Tyto substráty můžeme rozdělit do sedmi skupin: organoborany, boronové kyseliny, estery boronových kyselin, organotrifluorboritanové soli, *N*-koordinované boronáty, boronáty a boronamidy (Obr. 13).



Obr. 13: Struktury boronové kyseliny (58), organotrifluorboritanové soli (59), boronátu (60) a esterů boronových kyselin (61, 62)

Původně používanými činidly v začátcích vývoje SMC byly organoborany. (Miyaura & Suzuki, 1979) (Miyaura et al., 1979b) Jejich výhodou byla především jejich snadná příprava pomocí alkenové a alkynové hydroborace. Primární nevýhodou však byl jejich sklon k oxidaci na vzduchu, která tak omezovala jejich aplikaci a podstatně snižovala výtěžky reakce.

V roce 1981 byly poprvé v SMC reakci použity boronové kyseliny, které se díky vysoké reaktivitě staly široce využívanými substráty. (Miyaura et al., 1981) Jejich další výhodou je snadná a ekonomicky nenáročná syntéza podobně jako u organoboranů, avšak boronové kyseliny se obtížněji purifikují. Primárním způsobem přípravy boronových kyselin je reakce organokovů s estery kyseliny borité. Reakce probíhá při nízké teplotě, která zabraňuje nadměrné alkylationi. Pro přípravu jsou vhodná organolitná činidla (Schéma 14) (Li et al., 2002) a Grignardova činidla (Schéma 15) (Gerbino et al., 2009). Dalším způsobem přípravy je hydrolýza esterů nebo palladiová katalýza.

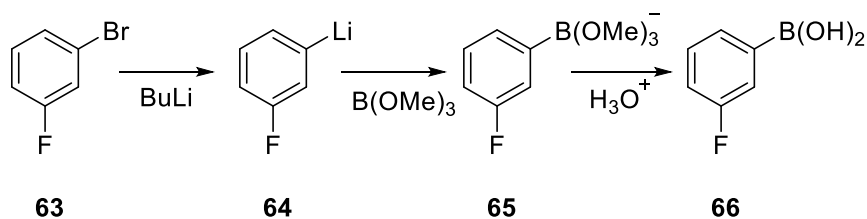


Schéma 14: Příklad syntézy boronových kyselin pomocí organolithných činidel (Li et al., 2002)

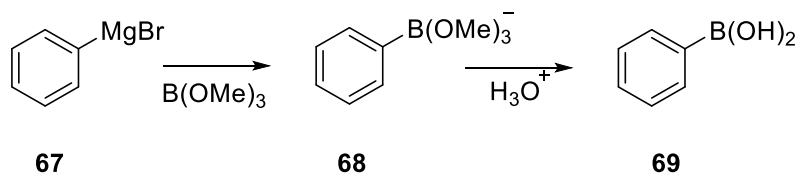


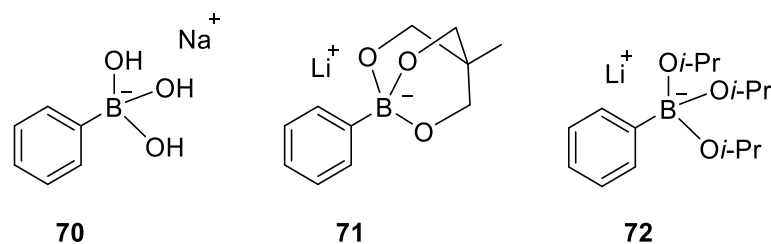
Schéma 15: Příklad syntézy boronových kyselin pomocí Grignardových činidel (Gerbino et al., 2009)

Další početnou skupinou substrátů pro SMC reakci jsou estery boronových kyselin. Mezi obecně nejčastěji používané estery patří pinacol, neopentyl a katechol boronové estery. Oproti ostatním esterům boronových kyselin vynikají svojí reaktivitou, stabilitou, a snadnou přípravou. Díky jejich zvýšené stabilitě jsou estery často využívány jako náhrady za nestabilní boronové kyseliny. (Roy & Brown, 2007)

Mezi substráty pro SMC patří také organotrifluorboritanové soli ($\text{R-BF}_3\text{K}$), které se od ostatních substrátů odlišují hlavně svojí solnou krystalickou strukturou. Tato struktura napomáhá k příznivým fyzikálním vlastnostem, jako je vysoká odolnost vůči teplu a chladu. Značnou nevýhodou je však nestabilita vůči silikagelu a nerozpustnost v mnoha nepolárních rozpouštědlech. (Chambers et al., 1960)

N-koordinované boronáty jsou charakterizovány atomem dusíku v cyklické kostře esteru boronové kyseliny. Nejčastěji používanými ligandy pro SMC jsou diethanolamin, *N*-mehyldiethanolamin, *N*-fenyldiethanolamin a kyselina *N*-methylimindioctová.

Další skupinou jsou boronáty, které jsou taktéž užitečnými vazebnými partnery v SMC reakcích. Nejběžnějšími zástupci jsou trihydroxyboronáty (Cammidge et al., 2006), cyklické triolboronáty (Yamamoto et al., 2008) a triisopropylboronáty (Billingsley & Buchwald, 2008) (Obr. 14). Boronáty podstupují SMC za podmínek, které nezahrnují přítomnost báze. Tím je naznačeno, že reakce probíhá přímou transmetalací s komplexem palladia (II). Reakce probíhají ve vodném prostředí za pokojové teploty bez potřeby ligandu pro palladium.



Obr. 14: Struktury trihydroxyboronátu (70), cyklického triolboronátu (71) a triisopropylboronátu (72) (Yamamoto et al., 2008) (Cambridge et al., 2006) (Billingsley & Buchwald, 2008)

Boronamidy jsou poslední skupinou substrátů pro SMC. Jsou to chránící skupiny boronových kyselin, které byly vyvinuty společností Suginome a byly uplatněny v tzv. iterative cross-coupling reakci (ICC). První vyvinutou chránící skupinou pro boronové kyseliny byl 1,8-diaminonaftalen (DAN), následně byly připraveny analogy antraniamid (AAM) a 2-(pyrazol-5-yl)anilin (PZA). Všechny tyto chránící skupiny jsou jednoduše odstranitelné kyselou deprotekcí. (Ihara et al., 2011)

2.4.5 Báze

V cross-couplingových reakcích s organoboronovými sloučeninami hraje báze klíčovou roli. Tato báze plní trojí funkci. Připravuje Pd (II) komplex, kdy reakcí s meziproduktem Ar-PdL_n-X tvoří Ar-PdL_n-OR, čímž urychluje transmetalaci. Dále formuje vysoce reaktivní boronátový komplex pomocí reakce organoboronových kyselin s bází a také urychluje redukční eliminaci reakcí báze s meziproduktem. Nejčastěji používanými bázemi jsou Na₂CO₃, K₃PO₄, Ba(OH)₂, Cs₂CO₃, K₂CO₃, KF a NaOH. (Braga et al., 2005)

2.4.6 Rozpouštědla

Výběr rozpouštědla pro SMC je velmi důležitý, jelikož může ovlivnit rychlost reakce, selektivitu a výtěžnost produktu. Nejběžněji používanými rozpouštědly jsou toluen, DMF, THF, dioxan, voda, methanol, acetonitril a další. Tyto reakce často probíhají ve dvoufázovém systému nebo ve vodném prostředí s přidavkem organického rozpouštědla, jelikož přítomnost vody a báze je nezbytná pro aktivaci boronových kyselin. (Littke et al., 2000)

3 VÝSLEDKY A DISKUZE

3.1 Reakční schéma a použité reaktanty

V této kapitole je popsána syntetická cesta vedoucí k axiálně chirálním derivátům benzimidazolu (Schéma 16). Cílem této práce bylo zachování chloru v poloze 7 z původního strukturního motivu a zároveň zavedení různých arylových substituentů do polohy 1.

Syntéza byla zahájena nukleofilní aromatickou substitucí 1-chlor-2-fluor-3-nitrobenzenu (**I**) s 2-jodanilinem (**II**) za vzniku látky **III**. Klíčovým krokem byla Suzuki-Miyaura cross-couplingová reakce, při které látka **III** reagovala s různými boronovými kyselinami za vzniku látky **IV**. Následujícím krokem byla redukce nitroskupiny látky **IV** na aminoskupinu za vzniku látky **V**. Finální reakcí byla cyklizace látky **V** za vzniku finálních derivátů (**VI**).

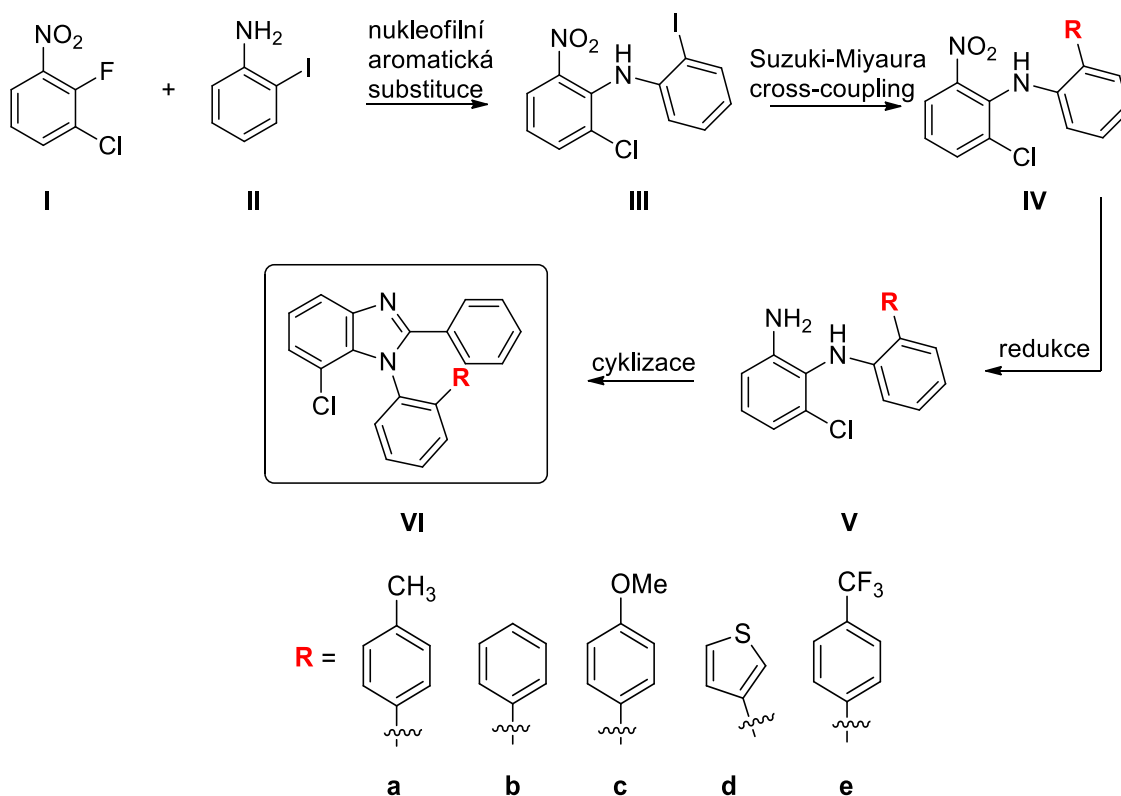


Schéma 16: Syntéza cílových derivátů benzimidazolu

3.1.1 Aromatická nukleofilní substituce

Pro syntézu látky **III** byla použita reakce 1-chlor-2-fluor-3-nitrobenzenu s 2-jodanilinem v dimethylsulfoxidu (Schéma 17). Reakční podmínky byly inspirovány diplomovou prací Mgr. Jany Pospíšilové, která při této reakci vycházela z metody podle Gorvina a kol. (Gorvin, 1988). Tato metoda původně využívala k aromatické nukleofilní substituci *t*-BuOK jako bázi. Při následné optimalizaci však bylo zjištěno, že jako báze může být využit i hydroxid draselný, který poskytuje lepší výsledky a nevyžaduje bezvodé podmínky.

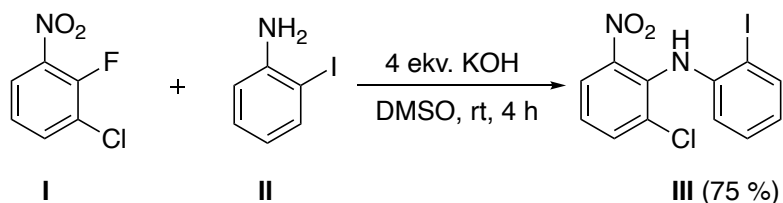


Schéma 17: Aromatická nukleofilní substituce

Produkt byl izolován nakapáním reakční směsi do ledové vody s následným okyselením zředěnou kyselinou chlorovodíkovou na pH 7, kdy se produkt po pár minutách míchání vysrážel a následně byl odfiltrován. Látka **III** byla získána v podobě hnědé amorfni látky v celkovém výtěžku 75 %.

3.1.2 Suzuki-Miyaura cross-coupling

Druhým krokem syntézy byla Suzuki-Miyaura cross-couplingová reakce. Při této reakci reagovala látka **III** s různými boronovými kyselinami **IVa-e** (Schéma 18). Pro reakci byl využit prekatalyzátor XPhos Pd G2 v bazickém prostředí fosforečnanu draselného rozpuštěného v dioxanu a vodě (1:1). Reakce probíhala cca 2 hodiny při 80 °C. Po ukončení reakce byla reakční směs okyselená zředěnou kyselinou chlorovodíkovou, extrahována do CH₂Cl₂ a promyta vodou a solankou.

Jelikož byl substrát pro tento typ reakce stericky náročný, předpokládali jsme jeho špatnou reaktivitu. Proto jsme pro reakci zvolili prekatalyzátor XPhos Pd G2, který vyniká svojí velkou účinností při Suzuki-Miyaura cross-couplingu. (Jedinák et al., 2017) (Pisár et al., 2018) Bohužel i přesto reakce nedosahovala požadovaného stupně konverze, což vedlo k problémům s izolací produktu.

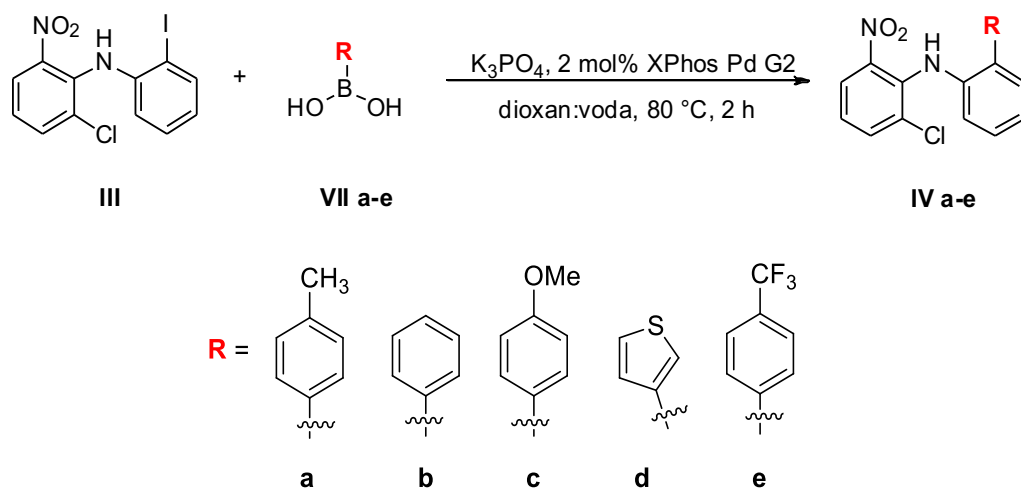
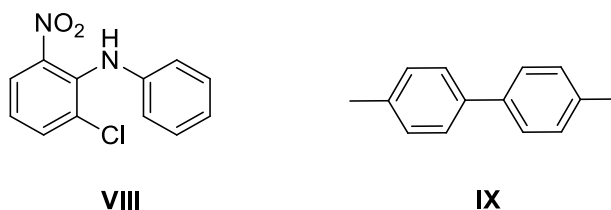


Schéma 18: Suzuki-Miyaura cross-coupling

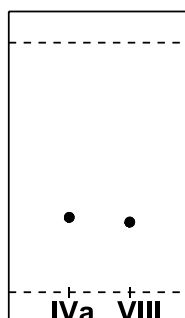
U všech reakcí s různými boronovými kyselinami vznikalo poměrně velké množství vedlejších produktů, kdy nejčastějším vedlejším produktem byla látka **VIII** (Obr. 15). Ta pravděpodobně vznikala odštěpením jodu ze struktury při oxidativní adici, ale následně již nedocházelo k pokračování cross-couplingové reakce. Tato situace nastávala nejspíše z důvodu sterické náročnosti substrátu a jeho nízké reaktivity. Reaktivitu substrátu jsme se snažili vylepšit přidavkem kyseliny boronové, jelikož jsme předpokládali, že v reakční směsi mohla probíhat vedlejší reakce tzv. homocoupling boronových kyselin. Homocoupling nastává u Suzukiho reakcí katalyzovaných palladiem za přístupu kyslíku, tudíž vzhledem k použití vody jako rozpouštědla byla tato vedlejší reakce možná. (Adamo et al., 2006) Produkt této reakce při použití kyseliny *p*-tolylboronové kyseliny je znázorněn na Obrázku 15 (látka **IX**). Ani přidavek boronové kyseliny výsledky reakcí však nezlepšil.



Obr. 15: Meziprodukty vznikající při Suzukui-Myiaura cross-couplingu

Vyizolovaný produkt bylo nutné přechistit na sloupcové chromatografii, abychom se zbavili zbytků katalyzátoru a vedlejších produktů. Z důvodu velmi podobných retenčních faktorů látky **VIII** a produktu (Obr. 16) byla separace na sloupcové chromatografii velmi obtížná. Látky se tak nepodařilo dokonale oddělit a konkrétně látku **IVb** se nepodařilo od

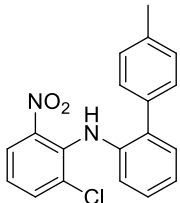
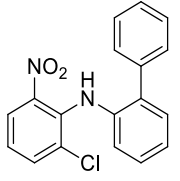
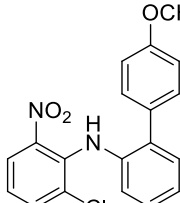
látky **VIII** oddělit vůbec. Pro následující reakce jsme využili i látky znečištěné vedlejším produktem **VIII** a produkt byl přečištěn až po následujícím kroku – redukcí nitroskupiny.



Obr. 16: Příklad TLC ze separace látek **IVa** a **VIII**. $R_{f_{IVa}} = 0,29$; $R_{f_{VIII}} = 0,31$

Výsledné produkty byly vzhledem k obtížnosti přečištění získány v nižších výtěžcích (26-83 %) ve formě amorfni látky oranžové až červené barvy s nedostatečnou čistotou pro jejich spolehlivou charakterizaci pomocí NMR. Připravené látky, jejich výtěžky a procentuální HPLC čistota v jsou shrnuty v Tabulce 2. Čistota syntetizovaných látek byla stanovena jako procentuální čistota vypočítaná z UV-VIS spektra (220–500 nm).

Tab. 2: Výtěžky látek **IVa-e** a jejich procentuální HPLC čistota vypočítaná z UV-VIS spektra (220–500 nm)

Látka	Struktura	Výtěžek	HPLC čistota
IVa		46 %	84 %
IVb		60 %	16 %
IVc		26 %	81 %

Tab. 2: Výtěžky látek **IVa-e** a jejich procentuální HPLC čistota vypočítaná z UV-VIS spektra (220–500 nm) (pokračování)

Látka	Struktura	Výtěžek	HPLC čistota
IVd		68 %	73 %
IVe		83 %	95 %

3.1.3 Redukce nitroskupiny

Následujícím krokem syntézy byla redukce nitroskupiny látek **IVa-e** (Schéma 19). Jako redukční činidlo byl v této reakci použit zinek v kyselém prostředí kyseliny octové s methanolem (3:8). Nejprve byly použity jen 4 ekv. zinku a reakce probíhala 30 min za laboratorní teploty. Později však bylo nutné přidat další 2 ekv. zinku, jelikož v reakční směsi se i po 30 minutách podle kontroly na TLC nacházela stále výchozí látka. Po přidání těchto 2 ekv. zinku reakce probíhala dalších 30 min, kdy po kontrole TLC docházelo k téměř úplné konverzi. Tato situace nastala u všech pěti reakcí. Po skončení reakce byl zinek odfiltrován, filtrát byl nakapán do vody a pomocí roztoku KOH bylo pH filtrátu upraveno na hodnotu 12. Následně byl produkt extrahován do CH_2Cl_2 a promyt vodou a solankou.

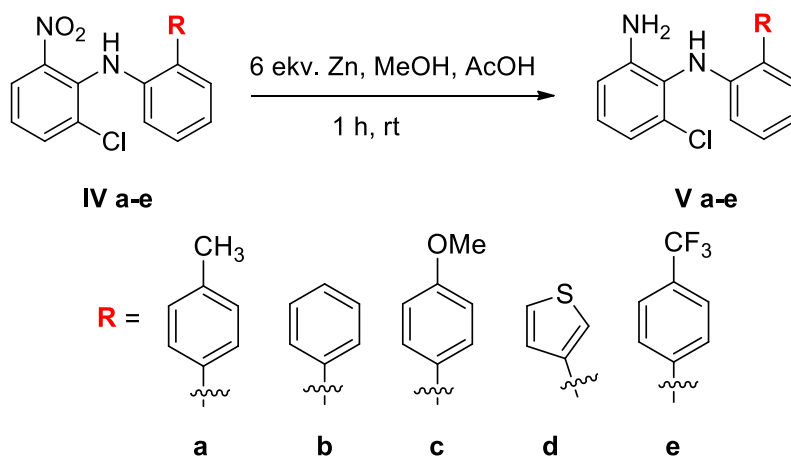
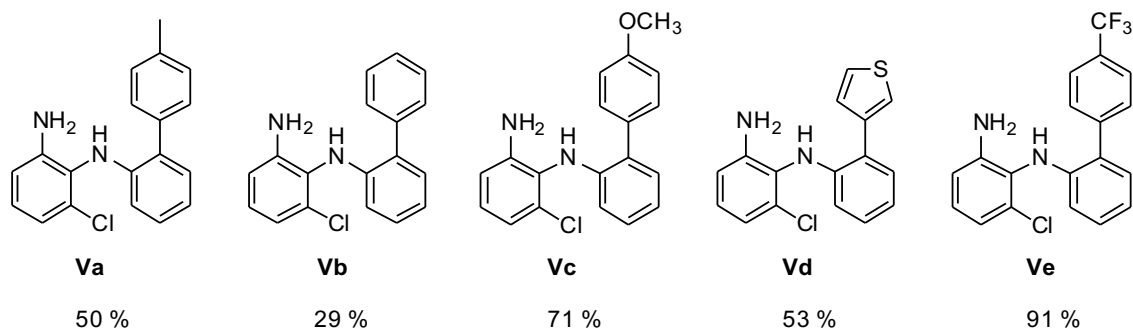


Schéma 19: Redukce nitroskupiny

Produkt bylo potřeba přecistit na sloupcové chromatografii. Mobilní fáze byla odpařena na RVO a výsledné produkty **Va-e** (Obr. 17) byly získány ve formě světle oranžové až žluté amorfnní látky. Důvodem nižšího výtěžku u některých látek je nutnost přečištění od vedlejšího produktu **VIII** z předchozího kroku.



Obr. 17: Přehled látek získaných po redukcí nitroskupiny a jejich výtěžky

3.1.4 Cyklizace na deriváty benzimidazolu

Posledním krokem byla cyklizace látek **Va-e** s benzaldehydem za katalýzy kyselinou *p*-toluensulfonovou na benzimidazoly. Jako rozpouštědlo byl použit toluen (Schéma 20) a reakce probíhala 24 h při 80 °C.

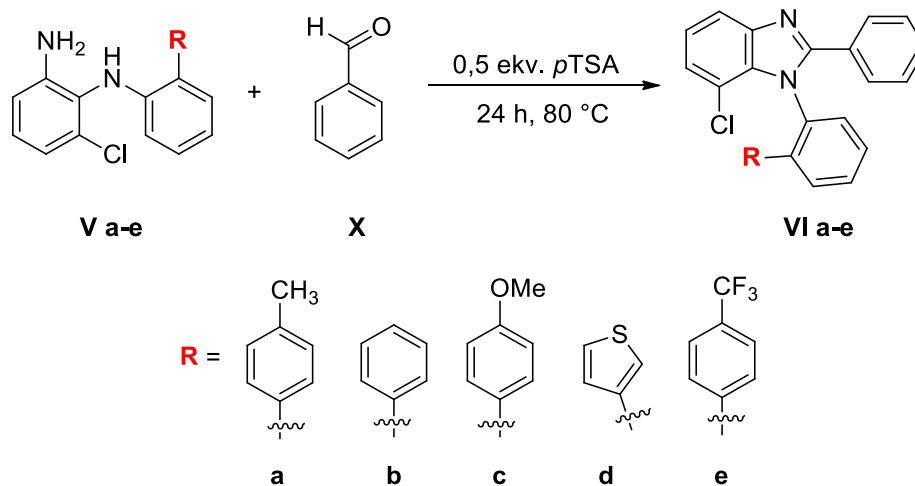
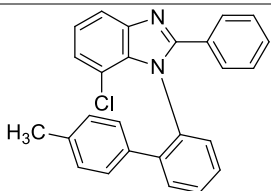
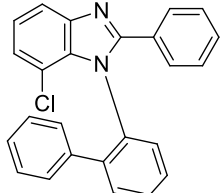
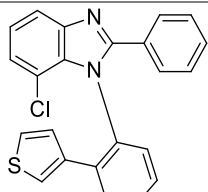
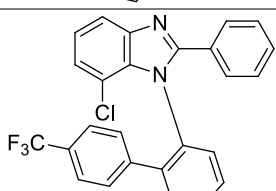


Schéma 20: Cyklizace na deriváty benzimidazolu

Po ukončení reakce byly všechny produkty přečištěny na sloupcové chromatografii. Bohužel látku **VIc** se nepodařilo izolovat v dostatečném množství a z časových důvodů již nebyla připravena znovu. Nasyntetizované finální produkty, jejich výtěžky a procentuální HPLC čistota v jsou shrnuty v Tabulce 3.

Tab. 3: Výtěžky látek **VIa-e** a jejich procentuální HPLC čistota vypočítaná z UV-VIS spektra (220–500 nm)

Látka	Struktura	Výtěžek	HPLC čistota
VIa		24 %	> 99 %
VIb		25%	96 %
VIc		21 %	97 %
VIe		64 %	> 99 %

Finální produkty byly získány ve formě bílých až světle oranžových krystalků a následnou analýzou na HPLC a ^1H a ^{13}C NMR a stanovením teploty tání těchto produktů byla prokázána jejich dostatečná čistota pro biologické testování.

3.2 Molekulový docking

Molekulový docking je velmi významným nástrojem při predikci způsobu vzájemné interakce biomakromolekul (hlavně proteinů) s jinými molekulami – ligandy, čehož se využívá zejména při výzkumu nových léčiv. Hlavním úkolem molekulového dockingu je přiblížit se optimalizované molekulové konformaci interagujících molekul, což je v mnoha případech velmi komplikované vzhledem k vlastnostem a flexibilitě některých proteinů a ligandů. Konkrétně u mnou syntetizovaných látek je potřeba dbát na přítomnost axiální chiralidy, která vede ke vzniku dvou enantiomerů, jež se do aktivního místa proteinu mohou vázat zcela jinak. Nejpravděpodobnější konformace interagujících molekul je vyhodnocována pomocí hodnoty vazebné energie. Struktury proteinů pro docking je možné získat z Proteinové databanky (PDB), která nabízí širokou škálu struktur, získanou pomocí velmi přesné rentgenové krystalografie. Pro samotný docking se v posledních letech vyvinulo mnoho komerčně dostupných programů, v našem případě byl využit program AutoDock Vina.

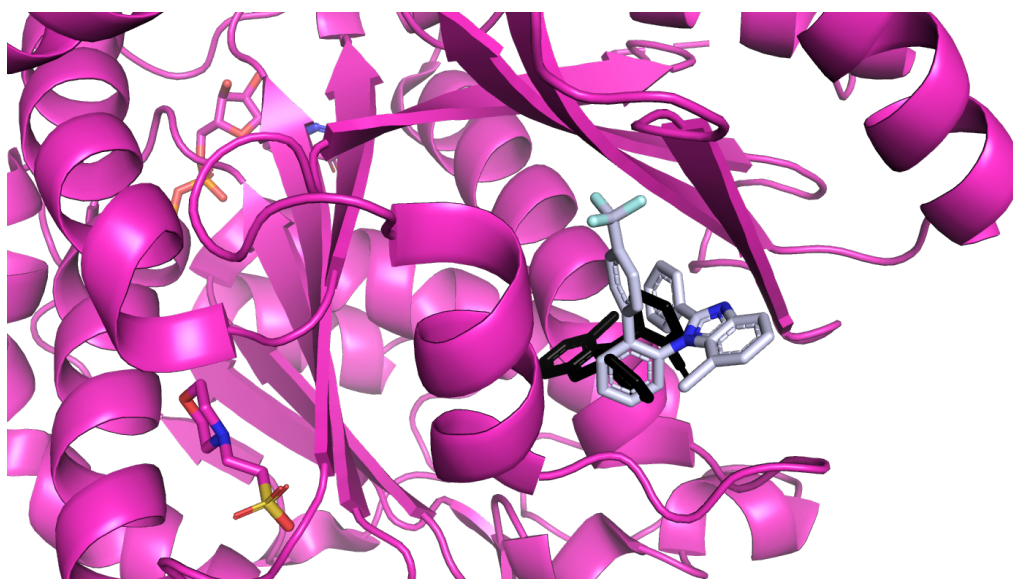
Z dřívějšího biologického testování jsme věděli, že látka **JP-5n**, kterou byly strukturně inspirovány látky v této práci, ovlivňovala polymeraci tubulinu. Podle dostupných publikací se mohla tato látka vázat do tzv. kolchicinového místa, proto jsme kolchicinové místo β -tubulinu zvolili jako cíl pro molekulový docking. Tubulin je klíčovou součástí mikrotubulů, které hrají důležitou roli v mnoha fyziologických procesech buňky, zejména při buněčném dělení a tvarování buňky. (viz Současný stav řešené problematiky)

Finální látky **VIa-e** spolu s referenční látkou **JP-5n** tak byly dokovány do kolchicinového místa β -tubulinu (identifikační kód PDB: 6LS4) pomocí programu AutoDock Vina. Struktury byly následně upraveny ve vizualizačním programu Pymol. U každé látky byly vždy dokovány oba atropoisomery a výsledkem bylo získání vazebných energií v $\text{kcal}\cdot\text{mol}^{-1}$. Podle výsledných hodnot vazebných energií se do kolchicinového místa vázaly poměrně dobře všechny syntetizované látky (Tabulka 4). Nejlepší vazebnou energii však vykazovala látka **VIe**. Atropoisomery této látky vykazovaly dokonce lepší hodnoty vazebné energie, než atropoisomery referenční látky **JP-5n**, viz Tabulka 4.

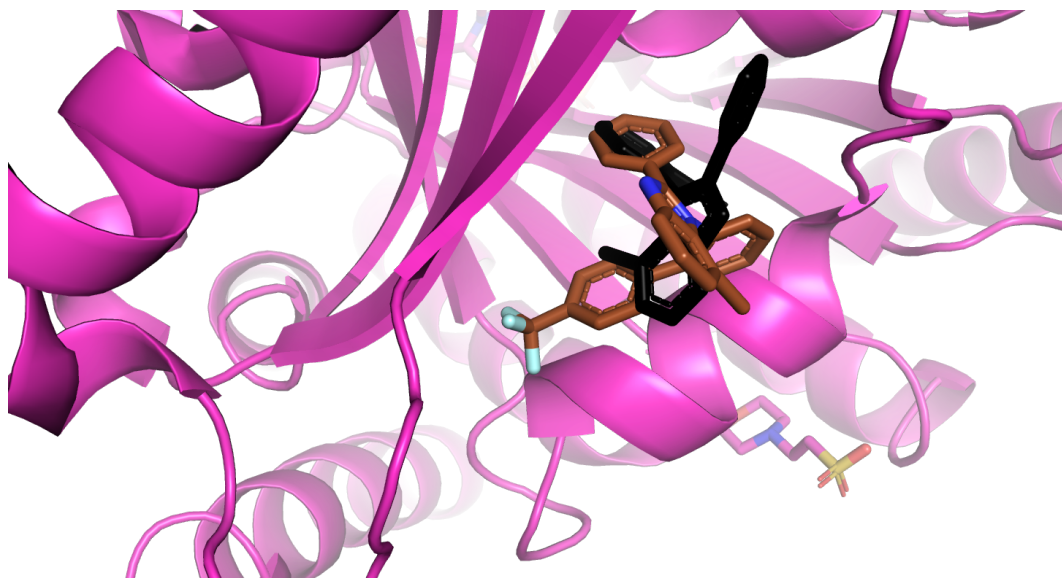
Tab. 4: Vazebné energie dockovaných látek v kcal·mol⁻¹

Látka	Vazebná energie [kcal·mol ⁻¹]
(R)-VIa	-9,0
(S)-VIa	-9,1
(R)-VIb	-8,7
(S)-VIb	-8,4
(R)-VIc	-7,9
(S)-VIc	-7,5
(R)-VIe	-9,5
(S)-VIe	-9,5
(R)-(+)-JP-5n	-8,8
(S)-(-)-JP-5n	-8,2

Na Obrázcích 18 a 19 je znázorněn pohled na kolchicinové místo proteinového komplexu β -tubulinu s vazebným módem molekul **(R)-VIe** a **(S)-VIe-2**. Současně jsou v obrázcích černou barvou znázorněny i molekuly **(R)-(+)-JP-5n** a **(S)-(-)-JP-5n**, které slouží k porovnání pozic navázaných látek. K našemu překvapení jsou u nových derivátů **(R)-VIe** a **(S)-VIe** preferovány jiné vazebné módy, než u látek **(R)-(+)-JP-5n** a **(S)-(-)-JP-5n** i přes jejich vysokou strukturální podobu.



Obr. 17: Pohled na kolchicinové místo β -tubulinu s vazebným módem molekul **(R)-VIe** (šedá) a **(+)-JP-5n** (černá)



Obr. 18: Pohled na kolchicinové místo β -tubulinu s vazebným módem molekul (**S**)-**VIe** (hnědá) a (-)-**JP-5n** (černá)

3.3 Antiproliferační aktivita

Všechny nasyntetizované finální látky byly poslány na testování antiproliferačních aktivit na různých nádorových i normálních buněčných liniích. Testování probíhá v laboratoři růstových regulátorů v Holici. První testovanou linií jsou buňky HeLa, linie lidských epiteliálních buněk izolovaných z karcinomu děložního hrdla. Jsou nestarší a nejvyužívanější buněčnou linií pro biologické testování. Dále jsou látky testovány na buněčné linii MV4-11, která je odvozena od buněk akutní monocytické leukemie. Poslední testovanou buněčnou linií je Eol-1, která je odvozena od lidské eosinofilní leukemie. V současné době byla provedena první série testů a pokračuje se v dalším testování. Výsledky buněčného testování budou prezentovány při obhajobě bakalářské práce.

Jelikož jsem nemohla být přítomna při biologickém testování mnou syntetizovaných látek, účastnila jsem se procesu biologického testování aspoň u látek jiného studenta na katedře Experimentální biologie. První den testování byly připravovány buněčné linie, které byly vhodně naředěny. Naředěné buňky byly spočítány a napipetovány do mikrotitrační destičky. Následující den byla na buňky aplikována testovaná látka v různých koncentracích a buňky byly inkubovány po dobu 72 hodin. Po inkubaci bylo do mikrotitrační destičky přidáno fluorescenční barvivo AlamarBlue, pomocí kterého byla spektrofotometricky měřena proliferace buněk v jednotlivých jamkách destičky. Na

základě získaných dat byla sestavena křivka závislosti viability buněk na koncentraci testované látky a následně vypočítána hodnota inhibiční koncentrace IC₅₀ [μmol/l].

3.4 Axiální chiralita

Pro potvrzení axiální chiralit u finálních látek byla použita chirální chromatografické separace. Analýza byla prováděna na látce **VIb**, kterou se zatím nepodařilo úspěšně analyticky separovat na dva enantiomery. Separace enantiomerů a důkaz přítomnosti axiální osy u této látky bude do budoucna ještě prozkoumána, jelikož byla potvrzena u strukturně podobných látek z předchozích výzkumů.

4 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

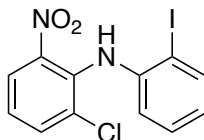
4.1 Přístrojové vybavení

Pro identifikaci sloučenin pomocí NMR analýz byl využit spektrometr JEOL ECA 400II (¹H: 399,78; ¹³C: 100,53 MHz). Chemické signály byly referencovány na reziduální signál rozpouštědla (DMSO-*d*₆: 2,50 ppm, 39,51 ppm a CDCl₃: 7,27 ppm, 77,00 ppm). Sloučeniny byly dále charakterizovány pomocí HRMS (Orbitrap Elite high-resolution hmotnostní spektrometr) firmy Thermo. Průběžné analýzy vzorků byly provedeny na UHPLC-MS systému firmy Waters (Acquity Waters SQ Detector 2) a pomocí chromatografie na tenké vrstvě (TLC). Chirální separace byla provedena na přístroji HPLC Agilent 1260 Infinity II Kolona Daicel IA-3 (4.6 × 100 mm, 3 μm).

4.2 Syntéza

Pro syntézu byly použity komerčně dostupné chemikálie a rozpouštědla.

4.2.1 2-chlor-*N*-(2-jodfenyl)-6-nitroanilin III



1750 mg 1-chlor-2-fluor-3-nitrobenzenu (10 mmol) a 2190 mg 2-jodanilinu (10 mmol) bylo rozpuštěno v 40 ml DMSO. Poté bylo přidáno 2290 mg KOH (40 mmol) a reakční směs byla míchána za laboratorní teploty 4 hodiny. Po ukončení reakce byla reakční směs

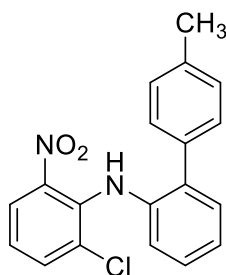
nakapána do 400 ml ledové vody a po kapkách okyselena zředěnou HCl na pH 7. Vysrážený produkt byl odfiltrován a vysušen. Bylo získáno 2810 mg hnědé amorfni látky, což odpovídá výtěžku 75 %.

^1H NMR (500 MHz; DMSO- d_6) δ = 8,03 (dd; $J=8,3$; 1,4 Hz; 1H); 7,89 (dd; $J=8,0$; 1,4 Hz; 1H); 7,80 (dd; $J=7,7$; 1,4 Hz; 1H); 7,68 (s; 1H); 7,39 (t; $J=8,1$ Hz; 1H); 7,19 (ddd; $J=7,6$; 1,4 Hz; 1H); 6,70 (ddd; $J=7,6$; 1,4 Hz; 1H); 6,46 (dd; $J=8,0$; 1,4 Hz; 1H) ppm.

^{13}C NMR (126 MHz, DMSO- d_6) δ = 145,2; 143,6; 139,1; 135,4; 134,1; 130,9; 128,8; 125,0; 124,7; 123,0; 116,9; 88,7 ppm.

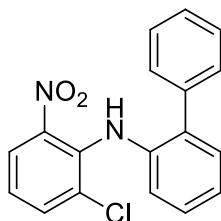
HRMS (ESI): m/z vypočítáno pro $[\text{M-H}]^-$ 372,9235, nalezeno 372,9246.

4.2.2 *N*-(2-chlor-6-nitrofenyl)-4'-methyl-[1,1'-bifenyl]-2-amin (IVa)



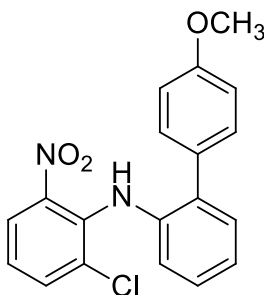
1125 mg 2-chlor-*N*-(2-jodfenyl)-6-nitroanilinu (3 mmol), 684 mg *p*-tolylboronové kyseliny (1,7 ekv. = 5,1 mmol) a 2547 mg fosforečnanu draselného (12 mmol) bylo rozpuštěno v 15 ml dioxanu a 3,75 ml vody. Po rozpuštění bylo přidáno 1 mol % XPhos Pd G2 (23,5 mg) a reakční směs byla zahřívána na 80 °C po dobu 2 h. Po ukončení reakce byla reakční směs okyselena zředěnou kyselinou chlorovodíkovou (37 % HCl s vodou 1:10 ml) a extrahována 3×100 ml CH_2Cl_2 a promyta vodou a solankou. Produkt bylo potřeba přečistit na sloupcové chromatografii s mobilní fází CH_2Cl_2 :hexan (1:2). Mobilní fáze byla odpařena na RVO a bylo získáno 473 mg produktu ve formě oranžovo-hnědé amorfni látky s 46% výtěžkem. Látku se však nepodařilo dokonale vyčistit, byla tedy použita znečištěná do další reakce.

4.2.3 *N*-(2-chlor-6-nitrofenyl)-[1,1'-bifenyl]-2-amin (IVb)



375 mg 2-chlor-*N*-(2-jodfenyl)-6-nitroanilinu (1 mmol), 207 mg fenylboronové kyseliny (1,7 mmol) a 849 mg fosforečnanu draselného (4 mmol) bylo rozpuštěno v 5 ml dioxanu a 1,25 ml vody. Po rozpuštění všech složek byly přidány 2 mol % XPhos Pd G2 (15 mg). Reakční směs byla zahřívána na 80 °C po dobu 2 h a po ukončení reakce byla okyselena 70 ml zředěné kyseliny chlorovodíkové (37 % HCl s vodou 1:10 ml). Produkt byl extrahován 3×50 ml CH₂Cl₂ a promyt vodou a solankou. Extrahovaný produkt bylo potřeba přechistit od vedlejších produktů a zbytku katalyzátoru na sloupcové chromatografii s mobilní fází CH₂Cl₂:hexan 1:2. Organická fáze byla odpařena na RVO a bylo získáno 197 mg produktu ve formě oranžové amorfni látky s výtěžkem 60 %. Látku se nepodařilo zcela vyčistit, jako znečištěná tak byla použita do další reakce.

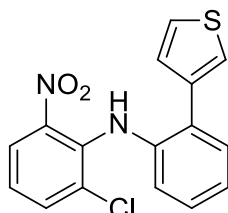
4.2.4 *N*-(2-chloro-6-nitrophenyl)-4'-methoxy-[1,1'-biphenyl]-2-amin (IVc)



V dioxanu (5ml) a vodě (1,25 ml) bylo rozpuštěno 375 mg 2-chlor-*N*-(2-jodfenyl)-6-nitroanilinu (1 mmol), 258 mg 4-methoxyfenylboronové kyseliny (1,7 mmol) a 849 mg fosforečnanu draselného (4 mmol) bylo rozpuštěno v 5ml dioxanu a 1,25 ml vody. K reakční směsi bylo přidáno 15 mg XPhos Pd G2 (2 mol %) a směs byla zahřívána na 80 °C po dobu 2 hodin. Po ukončení reakce byla reakční směs okyselena zředěnou kyselinou chlorovodíkovou (37 % HCl s vodou 1:10 ml) a extrahována 3×50 ml CH₂Cl₂. Extrahovaný produkt byl promyt vodou a solankou a následně byl přechistěn na sloupcové

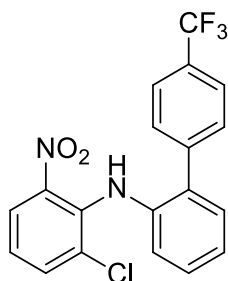
chromatografii od zbytků katalyzátoru a vedlejších produktů reakce. Jako mobilní fáze byla použita směs CH₂Cl₂:hexan 1:2 a po přečištění byla odstraněna na RVO. Produkt byl izolován ve formě oranžové amorfnní látky o hmotnosti 92 mg s výtěžkem 25 %. Látku se nepodařilo dokonale vyčistit, proto byla použita do další reakce znečištěná.

4.2.5 2-chloro-6-nitro-*N*-(2-(thiophen-3-yl)fenyl)anilin (IVd)



375 mg 2-chlor-*N*-(2-jodfenyl)-6-nitroanilinu (1 mmol), 217 mg 3-thiofenylboronové kyseliny (1,7 mmol) a 849 mg fosforečnanu draselného (4 mmol) bylo rozpuštěno ve směsi 5 ml dioxanu a 1,25 ml vody. Po úplném rozpuštění všech složek byly do směsi přidáno 2 mol % XPhos Pd G2 (15 mg). Reakční směs byla zahřívána na 80 °C po dobu 2 h a po dokončení reakce byla okyselena pomocí 70 ml zředěné kyseliny chlorovodíkové (37 % HCl, zředěné ve vodě v poměru 1:10 ml). Následně byl produkt extrahován 3×50 ml CH₂Cl₂, byl promyt vodou a solankou a přečištěn na sloupcové chromatografii. Mobilní fází při chromatografii byla směs rozpouštědel CH₂Cl₂:heptan 1:2 a organická fáze byla následně odstraněna pomocí RVO. Výsledný produkt byl izolován ve formě oranžovo-červené amorfnní látky o hmotnosti 225 mg, což činilo 68% výtěžek. Látka nebyla dokonale vyčištěná, proto byla použita jako znečištěná do další reakce.

4.2.6 *N*-(2-chlor-6-nitrofenyl)-4'-(trifluormethyl)-[1,1'-bifenyl]-2-amin (IVe)

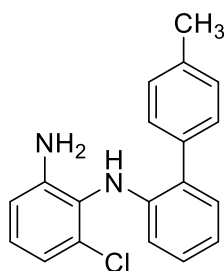


375 mg 2-chlor-*N*-(2-jodfenyl)-6-nitroanilinu (1 mmol), 323 mg 4-(trifluormethyl)fenylboronové kyseliny (1,7 mmol) a 849 mg fosforečnanu draselného (4 mmol) bylo rozpuštěno ve směsi 5 ml dioxanu a 1,25 ml vody. K reakční směsi bylo

přidáno 15 mg XPhos Pd G2 (2 mol %) a směs byla zahřívána na 80 °C po dobu 2 hodin. Po ukončení reakce byla reakční směs okyselena zředěnou kyselinou chlorovodíkovou (37 % HCl s vodou 1:10 ml) a extrahována 3×50 ml CH₂Cl₂. Extrahovaný produkt byl promyt vodou a solankou a následně byl přečištěn na sloupcové chromatografii od zbytků katalyzátoru a vedlejších produktů reakce. Jako mobilní fáze byla použita směs CH₂Cl₂:heptan 1:2 a po přečištění byla odstraněna na RVO. Výsledný produkt o hmotnosti 327 mg byl získán ve formě oranžovo-žluté amorfnní látky a výtěžek činil 83 %. Látku se nepodařilo dokonale vyčistit, proto byla použita do další reakce znečištěná.

HRMS (ESI): m/z vypočítáno [M+H]⁺ 391,0456, nalezeno 3391,0464.

4.2.7 6-chlor-*N*-(4'-methyl-[1,1'-bifeny]-2-yl)benzen-1,2-diamin (Va)

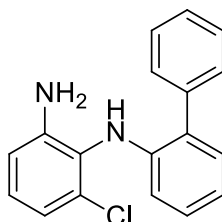


473 mg *N*-(2-chlor-6-nitrofenyl)-4'-methyl-[1,1'-bifeny]-2-aminu (1,4 mmol) bylo rozpuštěno v 11 ml methanolu. Po úplném rozpuštění bylo přidáno 365 mg Zn (4 ekv. = 5,6 mmol) a za stálého míchání byly do směsi přidány 4 ml kyseliny octové. Reakce probíhala za laboratorní teploty po dobu 30 minut. Po 30 minutách bylo do reakční směsi přidáno dalších 182 mg Zn, jelikož nedocházelo k úplné konverzi výchozí látky, a reakční směs reagovala dalších cca 30 minut. Po ukončení reakce byl nezreagovaný zinek odstraněn filtrací a filtrát byl nakapán do 100 ml vody. Směs byla alkalizována pomocí 10% vodného roztoku KOH na pH=12 a produkt byl extrahován 3×50 ml CH₂Cl₂ a promyt vodou a solankou. Následně byl produkt přečištěn na sloupcové chromatografii s mobilní fází CH₂Cl₂:hexan 1:2. Produkt byl izolován ve formě hnědo-oranžové amorfnní látky o hmotnosti 214 mg, což odpovídá 49% výtěžku.

¹H NMR (400 MHz; CHLOROFORM-*d*) δ = 7,47 – 7,51 (m; 2 H) 7,30 – 7,34 (m; 2 H) 7,20 (dd; *J*=7,32; 1,53 Hz; 1 H) 7,15 (td; *J*=7,78; 1,53 Hz; 1 H) 6,96 – 7,02 (m; 1 H) 6,89

(td; $J=7,40$; 1,07 Hz; 1 H) 6,82 (dd; $J=8,10$; 1,40 Hz; 1 H) 6,69 (dd; $J=8,09$; 1,37 Hz; 1 H) 6,39 (dd; $J=8,09$; 1,07 Hz; 1 H) 5,50 (s; 1 H) 3,99 (br. s.; 2 H) 2,44 (s; 3 H) ppm.
HRMS (ESI): m/z vypočítáno $[M+H]^+$ 309,1153, nalezeno 309,1155; m/z vypočítáno $[M-H]^-$ 307,0997, nalezeno 307,1002.

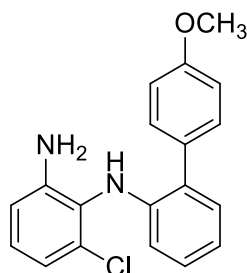
4.2.8 N^1 -([1,1'-bifeny]-2-yl)-6-chlorbenzen-1,2-diamin (Vb)



197 mg N -(2-chlor-6-nitrofenyl)-[1,1'-bifeny]-2-aminu (0,6 mmol) bylo rozpuštěno v 5 ml methanolu. Následně byly přidány 4 ekv. Zn (2,4 mmol = 157 mg) a za stálého míchání bylo do reakční směsi nakapáno 1,3 ml kyseliny octové. Reakce probíhala za laboratorní teploty po dobu 30 minut. Po 30 minutách bylo do reakční směsi přidáno dalších 78,5 mg Zn (2 ekv.), a reakční směs reagovala dalších cca 40 minut. Po ukončení reakce byl katalyzátor odstraněn filtrací, filtrát byl nakapán do 100 ml vody a pH směsi bylo pomocí 10% vodného roztoku KOH upraveno na pH=12. Produkt byl extrahován 3×50 ml CH_2Cl_2 a promyt vodou a solankou. Produkt bylo vhodné přechistit na sloupcové chromatografii, ale vzhledem k nízkému výtěžku reakce byl tento krok přeskočen. Získaný produkt byl získán ve formě hnědé amorfnní látky a vážil 52 mg, což činilo výtěžek 29 %. Podle HPLC byl produkt z 30 % znečištěn.

HRMS (ESI): m/z vypočítáno $[M+H]^+$ 295,0997, nalezeno 295,0997.

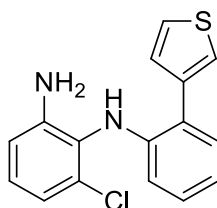
4.2.9 6-chlor- N^1 -([4'-methoxy-[1,1'-bifeny]-2-yl)benzen-1,2-diamin (Vc)



92 mg *N*-(2-chlor-6-nitrofenyl)-4'-methoxy-[1,1'-bifenyl]-2-aminu (0,26 mmol) bylo rozpuštěno v 2 ml methanolu. Po úplném rozpuštění bylo přidáno 68 mg Zn (4 ekv. = 1,04 mmol) a za stálého míchání bylo přikapáno 0,5 ml kyseliny octové. Reakce probíhala za laboratorní teploty po dobu 30 minut. Po 30 minutách bylo do reakční směsi přidáno 34 mg Zn (2 ekv. = 0,52 mmol), a reakční směs reagovala dalších cca 40 minut. Po ukončení reakce byl Zn odfiltrován a filtrát byl nakapán do 100 ml vody. K směsi byl následně přidán 10% vodný roztok KOH pro úpravu pH na pH=12 a produkt byl extrahován 3×50 ml CH₂Cl₂ a promyt vodou a solankou. Výsledný produkt byl přečištěn na sloupcové chromatografii s mobilní fází CH₂Cl₂:hexan 2:1 a po přečištění byla mobilní fáze odpařena na RVO. Bylo izolováno 60 mg hnědo-oranžové amorfnní látky s výtěžkem 71 %.

HRMS (ESI): *m/z* vypočítáno [M+H]⁺ 325,1102, nalezeno 325,1101; *m/z* vypočítáno [M-H]⁻ 323,0946, nalezeno 323,0948.

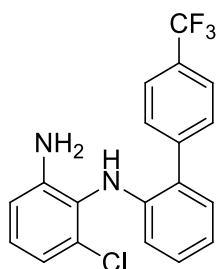
4.2.10 6-chlor-*N*¹-(2-(thiofen-3-yl)fenyl)benzen-1,2-diamin (Vd)



226 mg 2-chlor-6-nitro-*N*-(2-(thiophen-3-yl)fenyl)anilinu (0,68 mmol) bylo rozpuštěno v 5,4 ml methanolu. Po úplném rozpuštění bylo přidáno 178 mg Zn (4ekv = 2,72 mmol) a za stálého míchání byla po kapkách přidána kyselina octová (1,5 ml). Reakce probíhala za laboratorní teploty po dobu 30 minut. Po 30 minutách bylo do reakční směsi přidáno dalších 89 mg Zn (2 ekv.), a reakční směs reagovala dalších cca 30 minut. Po ukončení reakce byl Zn odfiltrován, filtrát byl nakapán do 100 ml vody a alkalizován 10% roztokem KOH na pH=12. Následně byl produkt extrahován 3×50 ml CH₂Cl₂ a promyt vodou a solankou. Produkt byl přečištěn na sloupcové chromatografii s mobilní fází CH₂Cl₂:hexan 2:1. Mobilní fáze byla odstraněna na RVO a bylo izolováno 109 mg hnědo oranžové amorfnní látky s výtěžností 53 %.

HRMS (ESI): *m/z* vypočítáno [M+H]⁺ 301,0561, nalezeno 301,0560; *m/z* vypočítáno [M-H]⁻ 299,0404, nalezeno 299,0409.

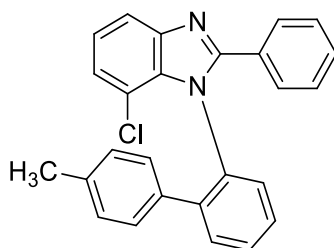
4.2.11 6-chlor-*N*¹-(4'-(trifluormethyl)-[1,1'-bifeny]-2-yl)benzen-1,2-diamin (Ve)



296 mg *N*-(2-chloro-6-nitrofenyl)-4'-(trifluoromethyl)-[1,1'-bifeny]-2-amin (0,75 mmol) bylo rozpuštěno v 6 ml methanolu. Po úplném rozpuštění bylo přidáno 197 mg Zn (4 ekv.) a za stálého míchání bylo do směsi přidáno 1,6 ml kyseliny octové. Reakce probíhala laboratorní teploty po dobu 30 minut. Po 30 minutách bylo do reakční směsi přidáno dalších 98,5 mg Zn, a reakční směs reagovala dalších cca 30 minut. Po ukončení reakce byl zinek odstraněn filtrací a k filtrát byl nakapán do 100 ml vody. Do směsi byl přidán roztok 10% vodný roztok KOH pro dosažení pH=12 a produkt byl extrahován 3×50 ml CH₂Cl₂ a promyt vodou a solankou. Následně byl produkt přečištěn na sloupcové chromatografii s mobilní fází CH₂Cl₂:hexan 2:1. Produkt byl izolován ve formě hnědo-oranžové amorfnní látky o hmotnosti 246 mg, což odpovídá 90% výtěžku.

HRMS (ESI): *m/z* vypočítáno [M+H]⁺ 363,0870, nalezeno 363,0869; *m/z* vypočítáno [M-H]⁻ 361,0714, nalezeno 361,0722.

4.2.12 7-chlor-1-(4'-methyl-[1,1'-bifeny]-2-yl)-2-fenyl-1*H*-benzo[*d*]imidazol (VIa)



160 mg 6-chlor-*N*-(4'-methyl-[1,1'-bifeny]-2-yl)benzen-1,2-diaminu (0,52 mmol) bylo rozpuštěno v 1,5 ml toluenu a poté bylo přidáno 127 μl benzaldehydu (1,25 mmol) a 50 mg *p*-toluensulfonové kyseliny (0,26 mmol). Reakce probíhala za stálého míchání 24 hodin při 80 °C. Po ukončení reakce byl produkt přečištěn na sloupcové chromatografii.

Jako mobilní fáze byl použit CH₂Cl₂. Organická fáze byla následně odstraněna na RVO a produkt byl získán ve formě světle žlutých krystalů o hmotnosti 50 mg, což odpovídá výtěžku 24 %.

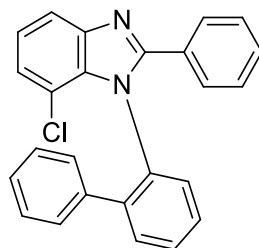
¹H NMR (400 MHz; CHLOROFORM-*d*) δ = 7,72 (dd; *J*=6,87; 2,29 Hz; 1 H) 7,63 – 7,67 (m; 1 H) 7,53 – 7,58 (m; 1 H) 7,48 – 7,53 (m; 1 H) 7,35 (dd; *J*=7,32; 1,83 Hz; 1 H) 7,27 – 7,31 (m; 1 H) 7,20 – 7,26 (m; 2 H) 7,14 – 7,18 (m; 4 H) 6,79 (d; *J*=7,63 Hz; 2 H) 6,47 – 6,51 (m; 2 H) 2,20 (s; 3 H) ppm.

¹³C NMR (101 MHz; CHLOROFORM-*d*) δ = 153,9; 144,7; 141,5; 137,7; 134,7; 134,5; 133,2; 130,9; 130,7; 129,8; 129,3; 129,2; 129,1; 128,7; 127,9; 127,8; 127,4; 124,8; 123,1; 118,7; 116,6; 21,0 ppm.

HRMS (ESI): *m/z* vypočítáno [M+H]⁺ 395,1310, nalezeno 395,1309.

Teplota tání: 145 °C

4.2.13 1-([1,1'-bifeny]-2-yl)-7-chlor-2-fenyl-1*H*-benzo[*d*]imidazol (VIb)



42 mg *N*¹-([1,1'-bifeny]-2-yl)-6-chlorbenzen-1,2-diaminu (0,14 mmol) bylo rozpuštěno v 0,5 ml toluenu. Po úplném rozpuštění bylo přikapáno 35 μl benzaldehydu (0,34 mmol) a přidáno 13,3 mg kyseliny *p*-toluensulfonové (0,07 mmol). Reakce probíhala při 80 °C za stálého míchání přibližně 24 h. Po ukončení reakce byla reakční směs přečištěna na sloupcové chromatografii s mobilní fází CH₂Cl₂. Výsledný produkt byl izolován ve formě bílé krystalické látky o hmotnosti 13,9 mg a výtěžku 25 %.

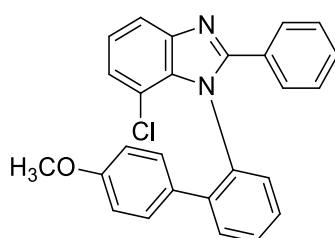
¹H NMR (400 MHz, CHLOROFORM-*d*) δ = 7,72 (dd; *J*=7,17; 1,98 Hz; 1 H) 7,67 – 7,70 (m; 1 H) 7,51 – 7,60 (m; 2 H) 7,35 – 7,38 (m; 1 H) 7,27 – 7,32 (m; 1 H) 7,20 – 7,25 (m; 2 H) 7,13 – 7,19 (m; 4 H) 7,07 – 7,12 (m; 1 H) 6,95 – 7,00 (m; 2 H) 6,57 – 6,60 (m; 2 H) ppm.

^{13}C NMR (101 MHz; CHLOROFORM-*d*) δ =153,9; 144,8; 141,4; 137,6; 134,5; 133,1; 131,0; 130,6; 129,8; 129,8; 129,3; 129,1; 128,0; 128,0; 127,9; 127,7; 127,3; 124,8; 123,1; 118,8; 116,6 ppm.

HRMS (ESI): m/z vypočítáno $[\text{M}+\text{H}]^+$ 381,1153, nalezeno 381,1152.

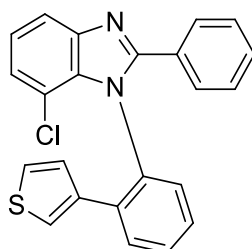
Teplota tání: 120 – 121 °C

4.2.14 7-chlor-1-(4'-methoxy-[1,1'-bifeny]-2-yl)-2-fenyl-1*H*-benzo[*d*]imidazol (VIc)



36,5 mg 6-chlor-*N*¹-(4'-methoxy-[1,1'-bifeny]-2-yl)benzen-1,2-diaminu (0,11 mmol) bylo rozpuštěno v 0,5 ml toluenu, dále bylo přidáno 27 μl benzaldehydu (0,26 mmol) a 10,5 mg kyseliny *p*-toluensulfonové (0,055 mmol). Reakční směs byla za stálého míchání zahřívána na 80 °C po dobu cca 24 hodin. Po ukončení reakce byla reakční směs přečištěna na sloupcové chromatografii s mobilní fází CH_2Cl_2 . Bohužel vzhledem k malému množství produktu se nám finální látku nepodařilo izolovat.

4.2.15 7-chloro-2-fenyl-1-(2-(thiofen-3-yl)phenyl)-1*H*-benzo[*d*]imidazol (VIId)



109 mg 6-chlor-*N*¹-(2-(thiofen-3-yl)fenyl)benzen-1,2-diaminu (0,36 mmol) bylo rozpuštěno v 1,5 ml toluenu. Následně bylo přidáno 88 μl benzaldehydu (0,86 mmol) a 34 mg kyseliny *p*-toluensulfonové (0,18 mmol). Reakce probíhala 24 hodin při 80 °C za stálého míchání. Po ukončení reakce byla směs přečištěna na sloupcové chromatografii s mobilní fází CH_2Cl_2 . Mobilní fáze byla po přečištění odstraněna pomocí RVO a finální

produkt byl izolován ve formě bílých krystalků o hmotnosti 28,8 mg, což činilo výtěžek 21 %.

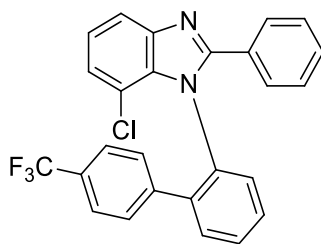
^1H NMR (400 MHz; CHLOROFORM-*d*) δ = 7,78 (dd; $J=7,00$; 2,50 Hz; 1 H) 7,46 – 7,59 (m; 4 H) 7,27 – 7,31 (m; 1 H) 7,15 – 7,26 (m; 6 H) 7,04 (dd; $J=5,04$; 2,90 Hz; 1 H) 6,52 (dd; $J=3,05$; 1,22 Hz; 1 H) 6,45 (dd; $J=4,88$; 1,22 Hz; 1 H) ppm.

^{13}C NMR (101 MHz, CHLOROFORM-*d*) δ = 153,9; 144,8; 137,9; 136,3; 134,3; 132,8; 131,0; 129,9; 129,9; 129,6; 129,4; 129,0; 128,0; 127,6; 126,9; 125,6; 124,8; 123,2; 122,9; 118,8; 116,6 ppm.

HRMS (ESI): m/z vypočítáno $[\text{M}+\text{H}]^+$ 387,0717, nalezeno 387,0714.

Teplota tání: 174–176 °C

4.2.16 7-chlor-2-phenyl-1-(4'-(trifluormethyl)-[1,1'-bifeny]-2-yl)-1H-benzo[d]imidazol (VIe)



180 mg 6-chlor-*N*¹-(4'-(trifluormethyl)-[1,1'-bifeny]-2-yl)benzen-1,2-diaminu (0,5 mmol) bylo rozpuštěno ve 2 ml toluenu. Po úplném rozpuštění bylo do reakční směsi přisypáno 47,6 mg kyseliny *p*-toluensulfonové (0,25 mmol) a přikapáno 122 μl benzaldehydu (1,2 mmol). Reakční směs byla za stálého míchání zahřívána na 80 °C po dobu cca 24 hodin. Produkt byl přečištěn na sloupcové chromatografii s mobilní fází CH_2Cl_2 . Mobilní fáze byla po přečištění odpařena na RVO a bylo izolováno 156 mg bílé krystalické látky, což odpovídá výtěžku 64 %.

^{13}C NMR (101 MHz, CHLOROFORM-*d*) δ = 153,5; 141,3; 139,8; 134,4; 133,4; 132,9; 131,3; 130,4; 130,1; 130,1; 129,5; 129,3; 129,0; 128,7 (q; $J=32,00$ Hz; 1 C) 128,4; 128,0; 125,3; 125,1; 124,9 (q; $J=3,85$ Hz; 1 C) 124,8 (q; $J=271,50$ Hz; 1 C) 118,9; 116,4 ppm.

HRMS (ESI): m/z vypočítáno $[\text{M}+\text{H}]^+$ 449,1027, nalezeno 449,1024.

Teplota tání: 123–124 °C

5 ZÁVĚR

Tato bakalářská práce se věnuje syntéze nových axiálně chirálních derivátů benzimidazolu. Teoretická část se zaměřuje především na benzimidazol, jeho deriváty a dále také na Suzuki-Miyaura cross-couplingovou reakci, která je klíčovým bodem v experimentální části.

Benzimidazol a jeho deriváty jsou častým motivem v medicíně, hlavně díky protizánětlivým a protirakovinným účinkům těchto látek. Struktura benzimidazolu poskytuje bohaté možnosti modifikace a syntéz derivátů s různými vlastnostmi. V mé bakalářské práci se zabývám vlivem *o*-substituce na *N*-arylu, která doposud nebyla příliš prozkoumána z důvodu vzniku axiálně chirálních látek. Tímto navazuji na předchozí výzkum naší výzkumné skupiny, která se vznikem axiálně chirálních látek zabývá. Právě axiální chiralitě a chiralitě samotné se věnuje první kapitola teoretické části.

Další kapitola se zabývá samotným benzimidazolem a jeho deriváty. Obzvláště důležitý byl popis struktury těchto látek, jelikož benzimidazol obsahuje dva atomy dusíku, které díky svému unikátnímu uspořádání poskytují mnoho možností pro modifikace a derivatizaci. To je důležité pro vytváření nových sloučenin a ovlivňování biologické aktivity benzimidazolu. Dále je v této kapitole zmíněn historický vývoj syntézy benzimidazolů.

Následující kapitola se zabývá biologickou aktivitou benzimidazolu. V úvodu je popsána historie a vývoj výzkumu biologické aktivity benzimidazolů a je zde uvedeno několik příkladů vlastností terapeutických látek obsahujících benzimidazolovou strukturu, které jsou využívány ve farmakologii. Tato kapitola se zaměřuje především na protirakovinné účinky a rakovinu samotnou, jelikož látky syntetizované v experimentální části bakalářské práce byly testovány na aktivitu na nádorových buněčných liniích. Více pozornosti je věnováno hlavně inhibitorům topoisomerás, inhibitorům mikrotubulů, DNA alkylačním a interkalačním činidlům a v poslední řadě také inhibitorům kinás.

Poslední kapitola teoretické části se zabývá Suzuki-Miyaura cross-couplingovou reakcí, která byla využita v rámci experimentální části. V úvodu této kapitoly je popsáno historické pozadí vývoje Suzuki-Miyaura cross-couplingové reakce, které se týká hlavně A. Suzukiho, jenž za rozvoj cross-couplingových reakcí katalyzovaných palladiem získal Nobelovu cenu za chemii. Dále je popsán samotný reakční mechanismus, kdy jsou

podrobněji popsány všechny jeho fáze. Na závěr byly podrobněji popsány jednotlivé reaktanty, katalyzátory a reakčních podmínek, které ovlivňují průběh reakce.

V části věnující se výsledkům a diskuzi je popsána samotná syntetická cesta vedoucí k cílovým produktům. Jsou zde také uvedeny výsledky z molekulového dockingu látek **VIa-e**, které se dockovaly na strukturu β -tubulinu. Z těchto výsledků jsme zjistili, že látka **VIe** má s proteinovým komplexem nejnižší vazebnou energii ze všech látek, dokonce nižší než referenční látka **JP-5n** a mohla by se tak do vazebného místa β -tubulinu vázat lépe. Jelikož byla látka **JP-5n** již dříve testována na cytotoxickou aktivitu jako inhibitor mikrotubulů, můžeme předpokládat, že látka **VIe** bude jevit podobnou aktivitu.

Nasyntetizované finální látky byly odeslány k biologickému testování na buněčných liniích HeLa, MV4-11 a Eol-1. Vzhledem k potvrzené biologické aktivitě strukturně podobných látek (**JP-5n**) se dá u látek **VIa-e** předpokládat jistá míra cytotoxické aktivity. Biologické testování mnou syntetizovaných látek probíhalo v laboratoři růstových regulátorů, u kterého jsem však nemohla být přítomna. Vzorové testování na látkách jiného studenta probíhalo na katedře experimentální biologie, kde jsem měla možnost nahlédnout do procesu biologického testování a vyzkoušet si základní principy manipulace s buněčnými kulturami a jejich očkování inhibitory. Bohužel se biologické testy nepodařilo dokončit včas, výsledky tak budou prezentovány při obhajobě této bakalářské práce.

Experimentální část bakalářské práce se zaměřuje na syntézu axiálně chirálních derivátů benzimidazolu, kdy byla tato syntéza zahájena klasickou nukleofilní aromatickou substitucí. Na ni navazovala klíčová Suzuki-Miyaura cross-couplingová reakce. Následovala redukce nitroskupiny a cyklizace na cílové deriváty benzimidazolu. Veškeré meziprodukty i produkty bylo potřeba přechistit pomocí sloupcové chromatografie. Finální produkty byly analyzovány pomocí ^1H NMR, ^{13}C NMR, HRMS, HPLC/MS, teploty tání a pro potvrzení axiální chiralita byla použita analytická separace atropoisomerů pomocí chirální HPLC. SAR studii látek se tak podařilo rozšířit o 4 nové deriváty benzimidazolu (**VIa,b,d,e**).

6 LITERATURA

- Adamo, C., Amatore, C., Ciofini, I., Jutand, A., & Lakmini, H. (2006). Mechanism of the Palladium-Catalyzed Homocoupling of Arylboronic Acids: Key Involvement of a Palladium Peroxo Complex. *Journal of the American Chemical Society*, 128(21), 6829–6836. <https://doi.org/10.1021/ja0569959>
- Aranyos, A., Old, D. W., Kiyomori, A., Wolfe, J. P., Sadighi, J. P., & Buchwald, S. L. (1999). Novel electron-rich bulky phosphine ligands facilitate the palladium-catalyzed preparation of diaryl ethers. *Journal of the American Chemical Society*, 121(18), 4369–4378. <https://doi.org/10.1021/ja990324r>
- Aydemir, N., & Bilaloğlu, R. (2003). Genotoxicity of two anticancer drugs, gemcitabine and topotecan, in mouse bone marrow in vivo. *Mutation Research - Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, 537(1), 43–51. [https://doi.org/10.1016/S1383-5718\(03\)00049-4](https://doi.org/10.1016/S1383-5718(03)00049-4)
- Ayhan-Kilcigil, G., Kus, C., Özdamar, E. D., Can-Eke, B., & Iscan, M. (2007). Synthesis and Antioxidant Capacities of Some New Benzimidazole Derivatives. *Archiv Der Pharmazie*, 340(11), 607–611. <https://doi.org/https://doi.org/10.1002/ardp.200700088>
- Barker, H. A., Smyth, R. D., Weissbach, H., Toohey, J. I., Ladd, J. N., & Volcani, B. E. (1960). Isolation and properties of crystalline cobamide coenzymes containing benzimidazole or 5, 6-dimethylbenzimidazole. *The Journal of Biological Chemistry*, 235, 480–488. [https://doi.org/10.1016/s0021-9258\(18\)69550-x](https://doi.org/10.1016/s0021-9258(18)69550-x)
- Bhoi, R. T., Bhoi, C. N., Nikume, S. R., & Bendre, R. S. (2023). Design, synthesis, and in silico studies of benzimidazoles of thymol as potent antiplasmodial and antimicrobial agents. *Results in Chemistry*, 6, 101112. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.rechem.2023.101112>
- Billingsley, K. L., & Buchwald, S. L. (2008). A General and Efficient Method for the Suzuki–Miyaura Coupling of 2-Pyridyl Nucleophiles. *Angewandte Chemie International Edition*, 47(25), 4695–4698. <https://doi.org/10.1002/anie.200801465>
- Braga, A. A. C., Morgon, N. H., Ujaque, G., & Maseras, F. (2005). Computational characterization of the role of the base in the Suzuki–Miyaura cross-coupling reaction. *Journal of the American Chemical Society*, 127(25), 9298–9307. <https://doi.org/10.1021/ja050583i>
- Brink, N. G., & Folkers, K. (1949). Vitamin B12. VI. 5, 6-Dimethylbenzimidazole, a degradation product of vitamin B12. *Journal of the American Chemical Society*, 71(8), 2951. <https://doi.org/10.1021/ja01176a532>
- Bruno, N. C., Niljianskul, N., & Buchwald, S. L. (2014). N-Substituted 2-Aminobiphenylpalladium Methanesulfonate Precatalysts and Their Use in C–C and C–N Cross-Couplings. *The Journal of Organic Chemistry*, 79(9), 4161–4166. <https://doi.org/10.1021/jo500355k>
- Bruno, N. C., Tudge, M. T., & Buchwald, S. L. (2013). Design and preparation of new palladium precatalysts for C–C and C–N cross-coupling reactions. *Chem. Sci.*, 4(3), 916–920. <https://doi.org/10.1039/C2SC20903A>
- Cambridge, A. N., Goddard, V. H. M., Gopee, H., Harrison, N. L., Hughes, D. L., Schubert, C. J., Sutton, B. M., Watts, G. L., & Whitehead, A. J. (2006). Aryl Trihydroxyborates: Easily Isolated Discrete Species Convenient for Direct

- Application in Coupling Reactions. *Organic Letters*, 8(18), 4071–4074. <https://doi.org/10.1021/ol061564w>
- Cervinka, O. (1999). Chirality and its relationship to terms. *Chemické Listy*, 93(5), 294–305. <http://ww.chemicke-listy.cz/ojs3/index.php/chemicke-listy/article/view/2608>
- Chambers, R. D., Clark, H. C., & Willis, C. J. (1960). Some Salts of Trifluoromethylfluoroboric Acid. *Journal of the American Chemical Society*, 82(20), 5298–5301. <https://doi.org/10.1021/ja01505a007>
- Champoux, J. J. (2001). DNA Topoisomerases: Structure, Function, and Mechanism. *Annual Review of Biochemistry*, 70(1), 369–413. <https://doi.org/10.1146/annurev.biochem.70.1.369>
- Chen, M., Su, S., Zhou, Q., Tang, X., Liu, T., Peng, F., He, M., Luo, H., & Xue, W. (2021). Antibacterial and antiviral activities and action mechanism of flavonoid derivatives with a benzimidazole moiety. *Journal of Saudi Chemical Society*, 25(2), 101194. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.jscs.2020.101194>
- D'Alterio, M. C., Casals-Cruañas, È., Tzouras, N. V., Talarico, G., Nolan, S. P., & Poater, A. (2021). Mechanistic Aspects of the Palladium-Catalyzed Suzuki-Miyaura Cross-Coupling Reaction. *Chemistry – A European Journal*, 27(54), 13481–13493. <https://doi.org/10.1002/chem.202101880>
- Day, A. R. (1950). *Electronic Mechanisms of Organic Reactions*. <https://books.google.cz/books?id=6fF3EWskKP8C>
- Dogra, N., Kumar, A., & Mukhopadhyay, T. (2018). Fenbendazole acts as a moderate microtubule destabilizing agent and causes cancer cell death by modulating multiple cellular pathways. *Scientific Reports*, 8(1), 11926. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-30158-6>
- El-Meguid, E. A. A., El-Deen, E. M. M., Nael, M. A., & Anwar, M. M. (2020). Novel benzimidazole derivatives as anti-cervical cancer agents of potential multi-targeting kinase inhibitory activity. *Arabian Journal of Chemistry*, 13(12), 9179–9195. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.arabjc.2020.10.041>
- Fischer, O. (1889). Ueber Harmin und Harmalin. II. *Berichte Der Deutschen Chemischen Gesellschaft*, 22(1), 637–645. <https://doi.org/https://doi.org/10.1002/cber.188902201146>
- Fischer, O. (1905). Ueber Benzimidazole und deren Aufspaltung. *Berichte Der Deutschen Chemischen Gesellschaft*, 38(1), 320–328. <https://doi.org/https://doi.org/10.1002/cber.19050380159>
- Fortune, J. M., & Osheroff, N. (2000). *Topoisomerase II as a Target for Anticancer Drugs: When Enzymes Stop Being Nice*. [https://doi.org/10.1016/s0079-6603\(00\)64006-0](https://doi.org/10.1016/s0079-6603(00)64006-0)
- Gerbino, D. C., Mandolesi, S. D., Schmalz, H., & Podestá, J. C. (2009). Introduction of Allyl and Prenyl Side-Chains into Aromatic Systems by Suzuki Cross-Coupling Reactions. *European Journal of Organic Chemistry*, 2009(23), 3964–3972. <https://doi.org/10.1002/ejoc.200900234>
- Gorvin, J. H. (1988). The synthesis of di- and tri-arylamines through halogen displacement by base-activated arylamines: comparison with the Ullmann condensation. *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 1*, 6, 1331–1335. <https://doi.org/10.1039/P19880001331>
- Hobrecker, F. (1872). Reduction-products of nitracetamide compounds. *Deut Chem Ges Ber*, 5, 920–924.
- Hunter, T. (1997). *The Croonian Lecture 1997. The phosphorylation of proteins on tyrosine: its role in cell growth and disease*. <https://royalsocietypublishing.org/>

- Ihara, H., Koyanagi, M., & Suginome, M. (2011). Anthranilamide: A Simple, Removable ortho-Directing Modifier for Arylboronic Acids Serving also as a Protecting Group in Cross-Coupling Reactions. *Organic Letters*, 13(10), 2662–2665. <https://doi.org/10.1021/ol200764g>
- Jacks, T. E., Belmont, D. T., Briggs, C. A., Horne, N. M., Kanter, G. D., Karrick, G. L., Krikke, J. J., McCabe, R. J., Mustakis, J. G., Nanninga, T. N., Risedorph, G. S., Seamans, R. E., Skeeane, R., Winkle, D. D., & Zennie, T. M. (2004). Development of a Scalable Process for CI-1034, an Endothelin Antagonist. *Organic Process Research & Development*, 8(2), 201–212. <https://doi.org/10.1021/op034104g>
- Jedinák, L., Zátoková, R., Zemánková, H., Šustková, A., & Cankař, P. (2017). The Suzuki-Miyaura Cross-Coupling Reaction of Halogenated Aminopyrazoles: Method Development, Scope, and Mechanism of Dehalogenation Side Reaction. *Journal of Organic Chemistry*, 82(1), 157–169. <https://doi.org/10.1021/acs.joc.6b02306>
- John McMurry. (2015). *Organická chemie* (C. R. D. D. Budka Jan, Ed.; 5th ed., Vol. 1). Vysoké učení technické v Brně, nakladatelství VUTIUM.
- Karimi Gofar, M., Kor, N. M., & Kor, Z. M. (2014). Dna Intercalators And Using Them As Anticancer Drugs. In *International journal of Advanced Biological and Biomedical Research* (Vol. 2, Issue 3). <http://www.ijabbr.com>
- Kinzel, T., Zhang, Y., & Buchwald, S. L. (2010). A New Palladium Precatalyst Allows for the Fast Suzuki–Miyaura Coupling Reactions of Unstable Polyfluorophenyl and 2-Heteroaryl Boronic Acids. *Journal of the American Chemical Society*, 132(40), 14073–14075. <https://doi.org/10.1021/ja1073799>
- Krebs, E. G., & Fischer, E. H. (1955). Phosphorylase Activity Of Skeletal Muscle Extracts. *Journal of Biological Chemistry*, 216(1), 113–120. [https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0021-9258\(19\)52288-8](https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0021-9258(19)52288-8)
- Ladenburg, A. (1875). Derivate von Diaminen. *Berichte Der Deutschen Chemischen Gesellschaft*, 8(1), 677–678. <https://doi.org/https://doi.org/10.1002/cber.187500801209>
- Li, W., Nelson, D. P., Jensen, M. S., Hoerrner, R. S., Cai, D., Larsen, R. D., & Reider, P. J. (2002). An Improved Protocol for the Preparation of 3-Pyridyl- and Some Arylboronic Acids. *The Journal of Organic Chemistry*, 67(15), 5394–5397. <https://doi.org/10.1021/jo025792p>
- Lin, S., & Yang, L. (2005). A Simple and Efficient Procedure for the Synthesis of Benzimidazoles Using Air as the Oxidant. *Tetrahedron Letters*, 46, 4315–4319. <https://doi.org/10.1016/j.tetlet.2005.04.101>
- Littke, A. F., Dai, C., & Fu, G. C. (2000). Versatile catalysts for the Suzuki cross-coupling of arylboronic acids with aryl and vinyl halides and triflates under mild conditions. *Journal of the American Chemical Society*, 122(17), 4020–4028. <https://doi.org/10.1021/ja0002058>
- Martin, R., & Buchwald, S. L. (2008). Palladium-catalyzed suzuki-miyaura cross-coupling reactions employing dialkylbiaryl phosphine ligands. In *Accounts of Chemical Research* (Vol. 41, Issue 11, pp. 1461–1473). <https://doi.org/10.1021/ar800036s>
- McClendon, A. K., & Osheroff, N. (2007). DNA topoisomerase II, genotoxicity, and cancer. *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*, 623(1), 83–97. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.mrfmmm.2007.06.009>

- Miyaura, N., & Suzuki, A. (1979). Stereoselective synthesis of arylated (E)-alkenes by the reaction of alk-1-enylboranes with aryl halides in the presence of palladium catalyst. *Journal of the Chemical Society, Chemical Communications*, 19, 866. <https://doi.org/10.1039/c39790000866>
- Miyaura, N., & Suzuki, A. (1995). Palladium-Catalyzed Cross-Coupling Reactions of Organoboron Compounds. In *Chem. Rev* (Vol. 95). <https://pubs.acs.org/sharingguidelines>
- Miyaura, N., Yamada, K., Suginome, H., & Suzuki, A. (1985). Aspects of Mechanism and Organometallic Chemistry. *D) Negishi, E. Pure Appl. Chem*, 107(2), 33. <https://pubs.acs.org/sharingguidelines>
- Miyaura, N., Yamada, K., & Suzuki, A. (1979a). A new stereospecific cross-coupling by the palladium-catalyzed reaction of 1-alkenylboranes with 1-alkenyl or 1-alkynyl halides. *Tetrahedron Letters*, 20(36), 3437–3440. [https://doi.org/10.1016/S0040-4039\(01\)95429-2](https://doi.org/10.1016/S0040-4039(01)95429-2)
- Miyaura, N., Yamada, K., & Suzuki, A. (1979b). A new stereospecific cross-coupling by the palladium-catalyzed reaction of 1-alkenylboranes with 1-alkenyl or 1-alkynyl halides. *Tetrahedron Letters*, 20(36), 3437–3440. [https://doi.org/10.1016/S0040-4039\(01\)95429-2](https://doi.org/10.1016/S0040-4039(01)95429-2)
- Miyaura, N., Yanagi, T., & Suzuki, A. (1981). The Palladium-Catalyzed Cross-Coupling Reaction of Phenylboronic Acid with Haloarenes in the Presence of Bases. *Synthetic Communications*, 11(7), 513–519. <https://doi.org/10.1080/00397918108063618>
- Moss, G. P. (1996). *Basic terminology of stereochemistry (IUPAC Recommendations 1996)*. 68(12), 2193–2222. <https://doi.org/doi:10.1351/pac199668122193>
- Navarrete-Vázquez, G., Cedillo, R., Hernández-Campos, A., Yépez, L., Hernández-Luis, F., Valdez, J., Morales, R., Cortés, R., Hernández, M., & Castillo, R. (2001). Synthesis and antiparasitic activity of 2-(Trifluoromethyl)benzimidazole derivatives. *Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters*, 11(2), 187–190. [https://doi.org/10.1016/S0960-894X\(00\)00619-3](https://doi.org/10.1016/S0960-894X(00)00619-3)
- Phillips, M. A. (1928). CCCXVII.—The formation of 2-substituted benzimidazoles. *J. Chem. Soc.*, 0, 2393–2399. <https://doi.org/10.1039/JR9280002393>
- Pisár, M., Schütznerová, E., Hančík, F., Popa, I., Trávníček, Z., & Cankar, P. (2018). Modification of Boc-Protected CAN508 via Acylation and Suzuki-Miyaura Coupling. *Molecules*, 23(1). <https://doi.org/10.3390/molecules23010149>
- Pospíšilová J. *Unpublished results*.
- Rasal, K. B., & Yadav, G. D. (2018). One-pot synthesis of benzimidazole using DMF as a multitasking reagent in presence CuFe2O4 as catalyst. *Catalysis Today*, 309, 51–60. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.cattod.2017.10.014>
- Reddy, G. P., Reddy, L. V., & Kim, S.-H. (2019). Cancer: Prevention, Early Detection, Treatment and Recovery. In *Cancer*. <https://doi.org/https://doi.org/10.1002/9781119645214.ch2>
- Roy, C. D., & Brown, H. C. (2007). Stability of boronic esters – Structural effects on the relative rates of transesterification of 2-(phenyl)-1,3,2-dioxaborolane. *Journal of Organometallic Chemistry*, 692(4), 784–790. <https://doi.org/10.1016/j.jorganchem.2006.10.013>
- Savitha, B., Reddy, E. K., Parthasarathi, D., Pakkath, R., Karuvalam, R. P., Ananda Kumar, C. S., Haridas, K. R., Syed Ali Padusha, M., & Sajith, A. M. (2019). A highly efficient precatalytic system (XPhos-PdG2) for the Suzuki–Miyaura cross-coupling of 7-chloro-1H-pyrrolo[2,3-c]pyridine employing low catalyst

- loading. *Molecular Diversity*, 23(3), 697–707. <https://doi.org/10.1007/s11030-018-9904-6>
- Suzuki, A. (2011). Cross-coupling reactions of organoboranes: An easy way to construct C-C bonds (Nobel Lecture). In *Angewandte Chemie – International Edition* (Vol. 50, Issue 30, pp. 6722–6737). Wiley-VCH Verlag. <https://doi.org/10.1002/anie.201101379>
- Tan, Y. J., Lee, Y. T., Yeong, K. Y., Petersen, S. H., Kono, K., Tan, S. C., & Oon, C. E. (2018). Anticancer activities of a benzimidazole compound through sirtuin inhibition in colorectal cancer. *Future Medicinal Chemistry*, 10(17), 2039–2057. <https://doi.org/10.4155/fmc-2018-0052>
- Thakurdesai, P. A., Wadodkar, S. G., & Chopade, C. T. (2007). Synthesis and anti-inflammatory activity of some benzimidazole-2-carboxylic acids. *Pharmacologyonline*, 1, 314–329. https://pharmacologyonline.silae.it/files/archives/2007/vol1/35_Prasad.pdf
- Uematsu, T., Nakano, M., Kosuge, K., Nakashima, M., Nagai, A., & Sato, A. (1994). Pharmacokinetic Properties of a Novel Gastric Proton Pump Inhibitor, (±)-2-[(4-Methoxy-6,7,8,9-Tetrahydro-5h-Cyclohepta[d]Pyridin-9-yl) Sulfinyl]-1h-Benzimidazole Sodium Salt, in Healthy Subjects. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 83(10), 1407–1411. <https://doi.org/https://doi.org/10.1002/jps.2600831009>
- Wilson, L., & Jordan, M. A. (1995). Microtubule dynamics: taking aim at a moving target. *Chemistry & Biology*, 2(9), 569–573. [https://doi.org/10.1016/1074-5521\(95\)90119-1](https://doi.org/10.1016/1074-5521(95)90119-1)
- Woolley, D. W. (1944). Some biological effects produced by benzimidazole and their reversal by purines. *Journal of Biological Chemistry*, 152(2), 225–232. [https://doi.org/10.1016/S0021-9258\(18\)72045-0](https://doi.org/10.1016/S0021-9258(18)72045-0)
- Wright, J. B. (1951). The Chemistry of the Benzimidazoles. *Chemical Reviews*, 48(3), 397–541. <https://doi.org/10.1021/cr60151a002>
- Yamamoto, Y., Takizawa, M., Yu, X., & Miyaura, N. (2008). Cyclic Triolborates: Air- and Water-Stable Ate Complexes of Organoboronic Acids. *Angewandte Chemie International Edition*, 47(5), 928–931. <https://doi.org/10.1002/anie.200704162>
- Yamori, T., Matsunaga, A., Sato, S., Yamazaki, K., Komi, A., Ishizu, K., Mita, I., Edatsugi, H., Matsuba, Y., Takezawa, K., Nakanishi, O., Kohno, H., Nakajima, Y., Komatsu, H., Andoh, T., & Tsuruo, T. (1999). Potent Antitumor Activity of MS-247, a Novel DNA Minor Groove Binder, Evaluated by an in Vitro and in Vivo Human Cancer Cell Line Panel. *Cancer Research*, 59(16), 4042–4049. <https://doi.org/10.1007/s002800000120>

7 SEZNAM POUŽITÝCH SYMBOLŮ A ZKRATEK

AAM – antraniamid

ADM – adriamycin

Ar – aryl

ATP – adenosintrifosfát

č. – číslo

DAN – 1,8-diaminonaftalen

DavePhos – 2-dicyklohexylfosfino-2'-(N,N-dimethylamino)bifenyl

DCM – dichlormethan

DMF – dimethylformamid

DMSO – dimethylsulfoxid

ekv. – ekvivalent

Eol-1 – buňky lidské eosinofilní leukemie

HeLa – buňky lidského karcinomu děložního hrdla

HPLC – High Performance Liquid Chromatography

HRMS – High-resolution Mass Spectrometry

ICC – Iterative cross-coupling reakce

IC₅₀ – hodnota inhibiční koncentrace [$\mu\text{mol/l}$]

L – ligand (všeobecně)

mol. % – molární procenta

MV-4-11 – buněčná linie odvozená od akutní myeloidní leukemie

NHC – *N*-heterocyklické karbeny

NMR – nukleární magnetická rezonance

Obr. – Obrázek

OTf – triflátový anion

PDB – Proteinová databanka

PDGF – růstový faktor produkovaný krevními destičkami

PDGFR – receptor pro růstový faktor PDGF

Ph – fenylyl

PZA – 2-(pyrazol-5-yl)anilin

R – uhlovodíkový zbytek (všeobecně)

RVO – rotační vakuová odparka

SAR – vztah mezi chemickou strukturou a biologickou aktivitou

SMC – Suzuki-Miyaura cross-coupling

SPhos – 2-dicyklohexylfosfino-2',6'-dimethoxybifenyl

Tab. – tabulka

THF – tetrahydrofuran

TLC – chromatografie na tenké vrstvě

Top – topoisomerása

VEGFR-2 – receptor pro vaskulární endoteliální růstový faktor 2

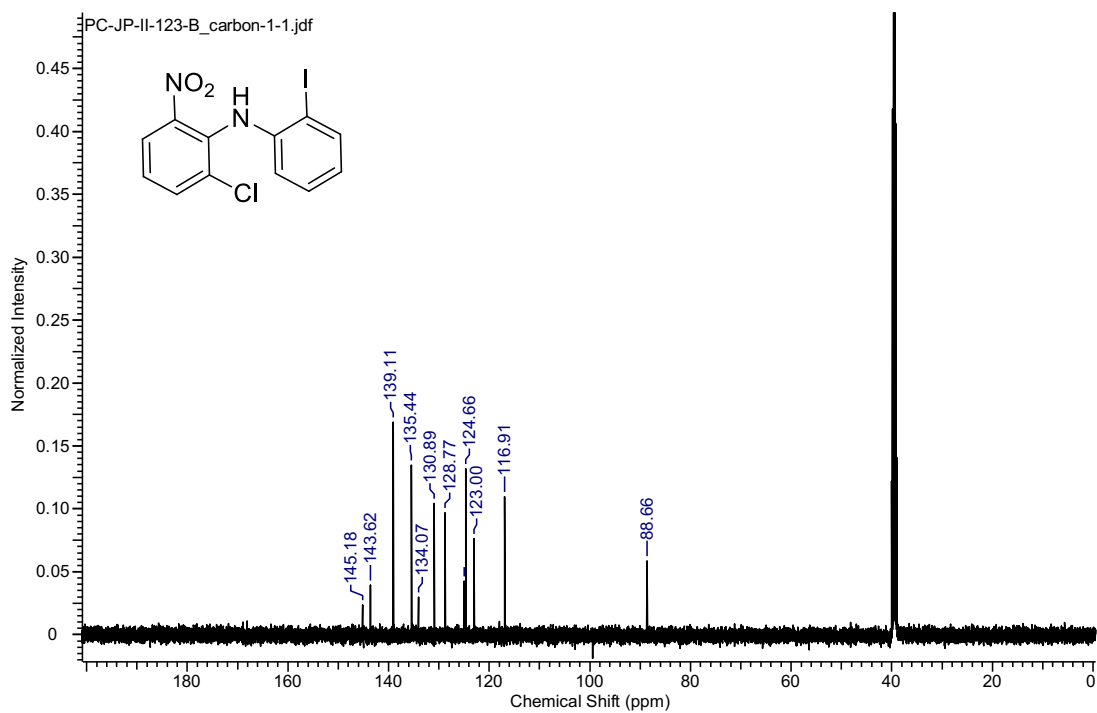
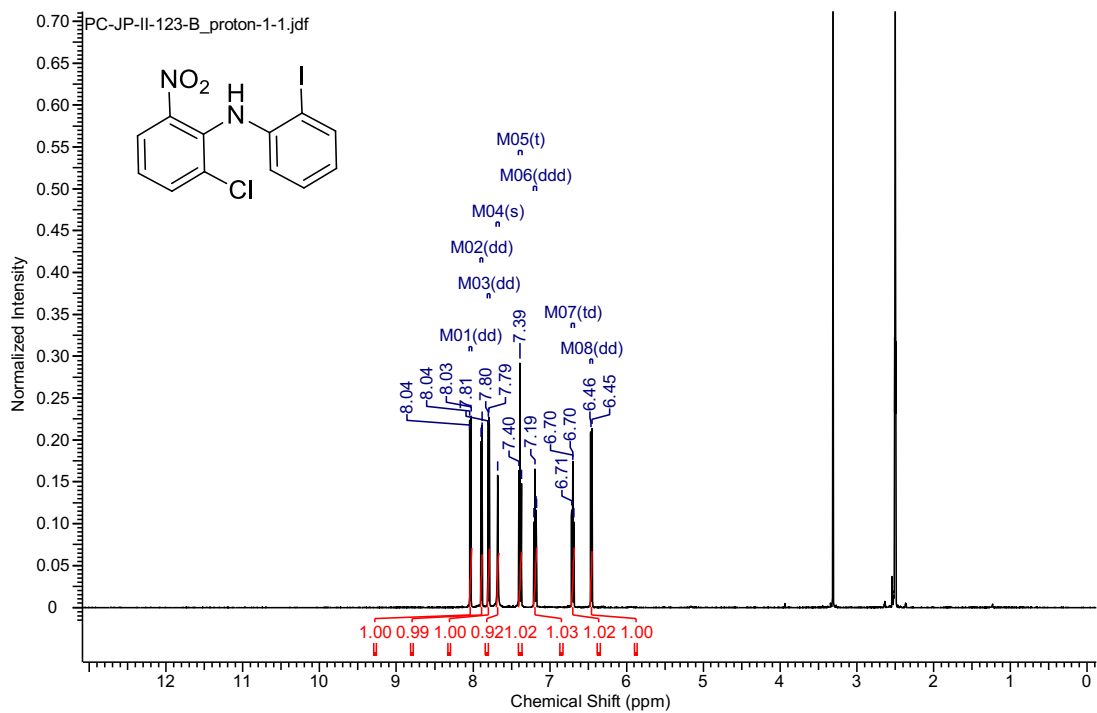
X – halogen (všeobecně)

XPhos – 2-dicyklohexylfosfino-2',4',6'-triisopropylbifenyl

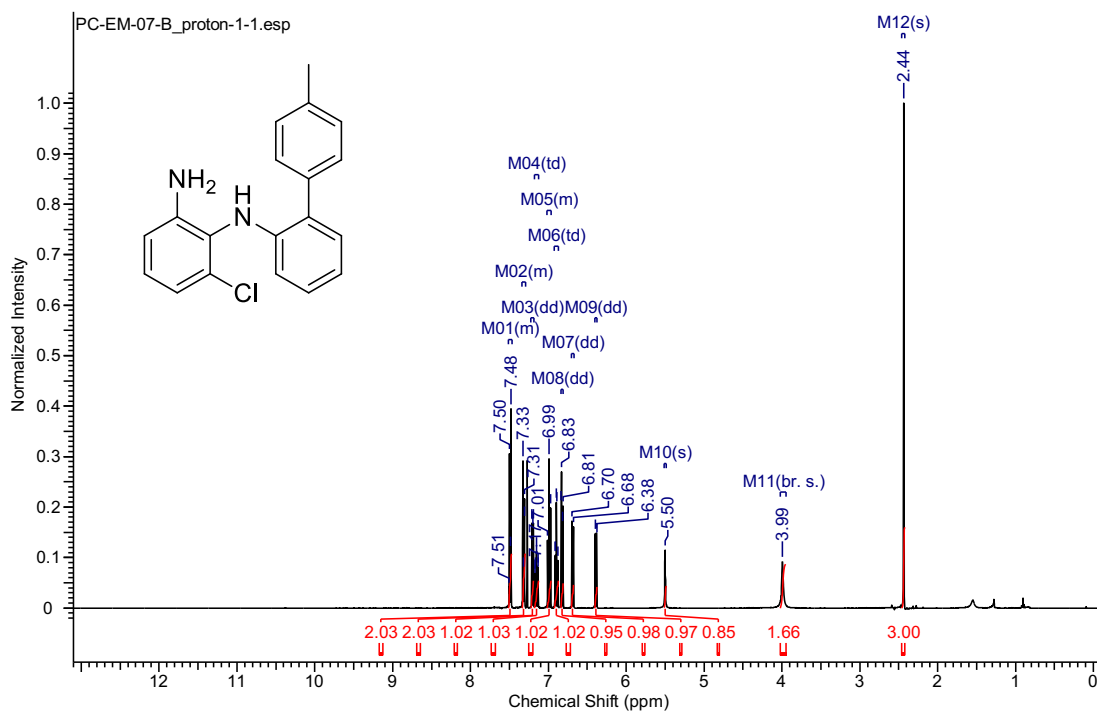
8 PŘÍLOHY

8.1 NMR spektra

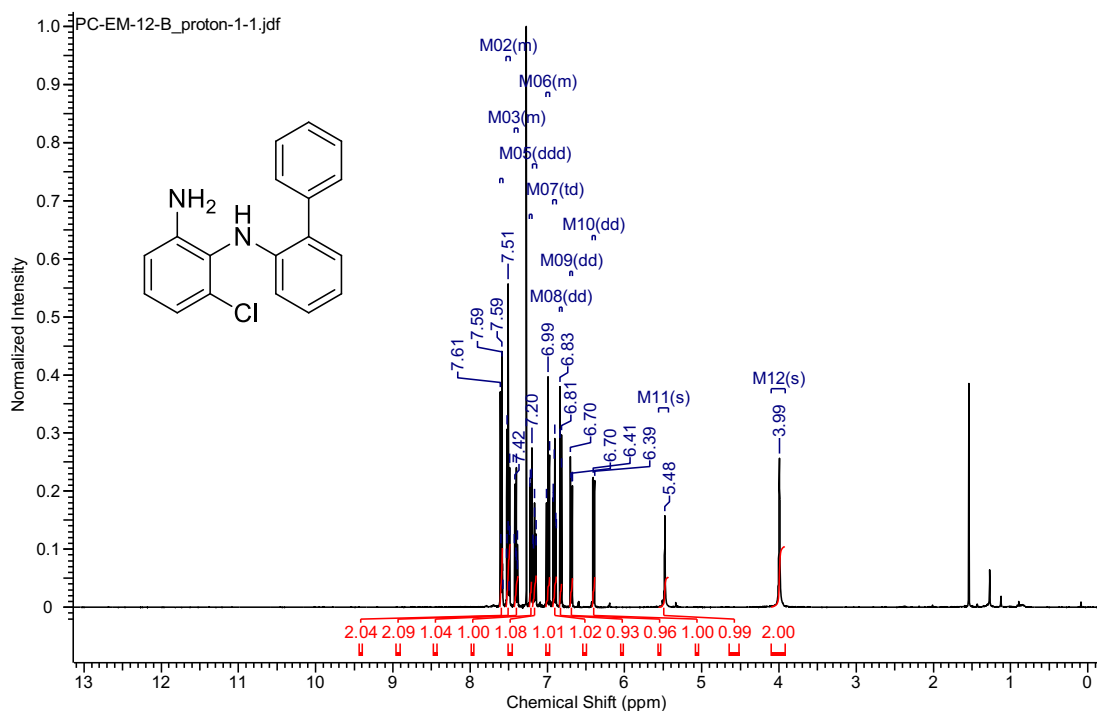
^1H a ^{13}C NMR spektra (DMSO- d_6) 2-chloro-*N*-(2-jodofenyl)-6-nitroanilinu



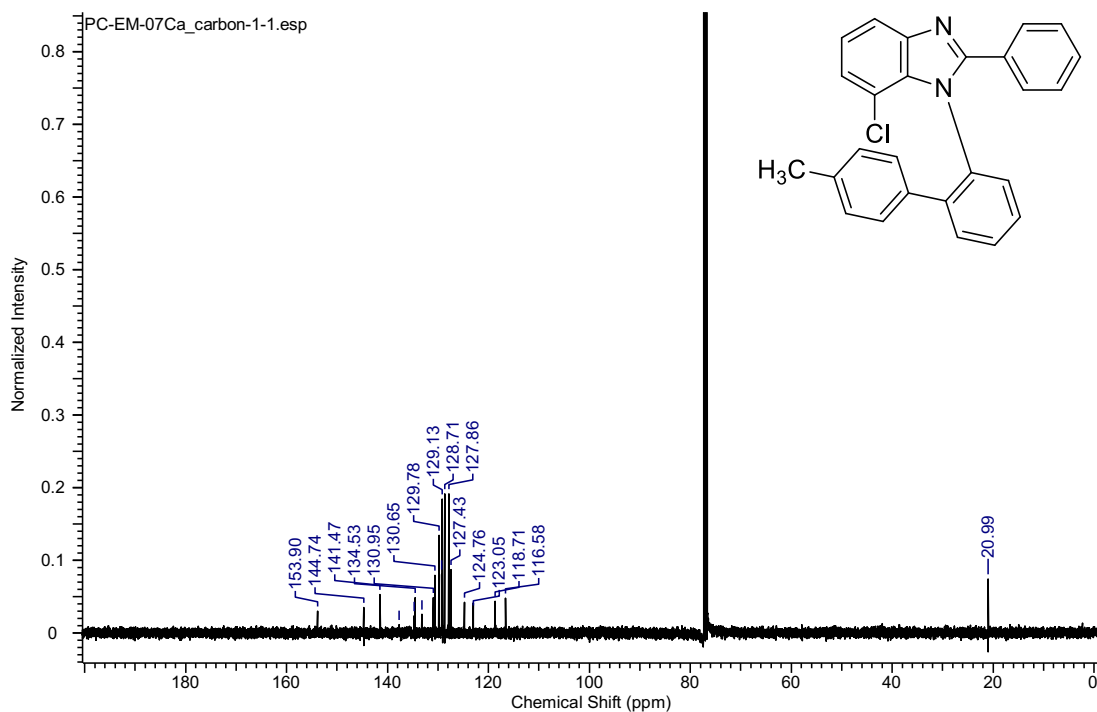
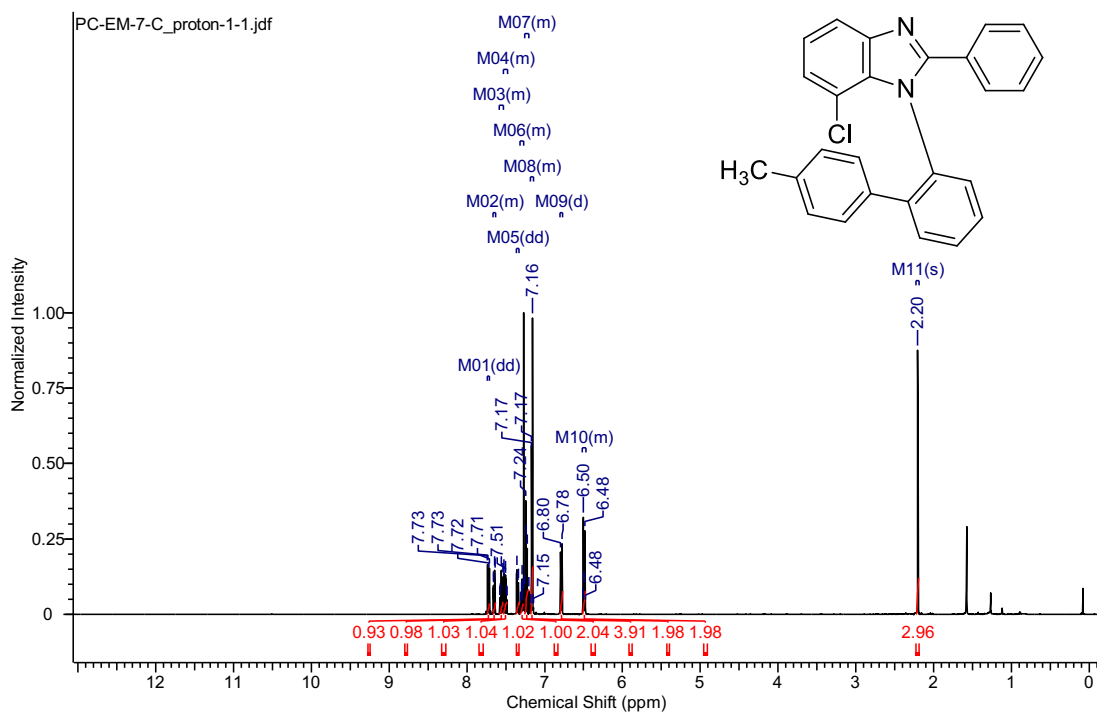
¹H NMR spektra (CHLOROFORM-*d*) 6-chloro-*N*-(4'-methyl-[1,1'-bifeny]-2-yl)benzen-1,2-diamin



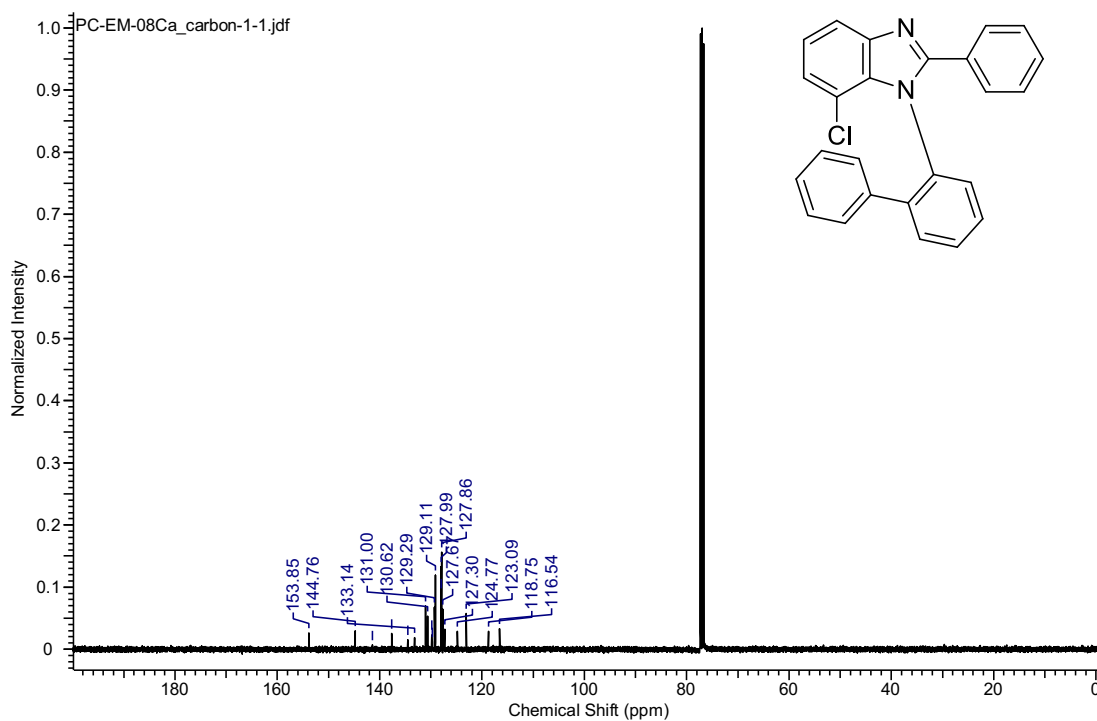
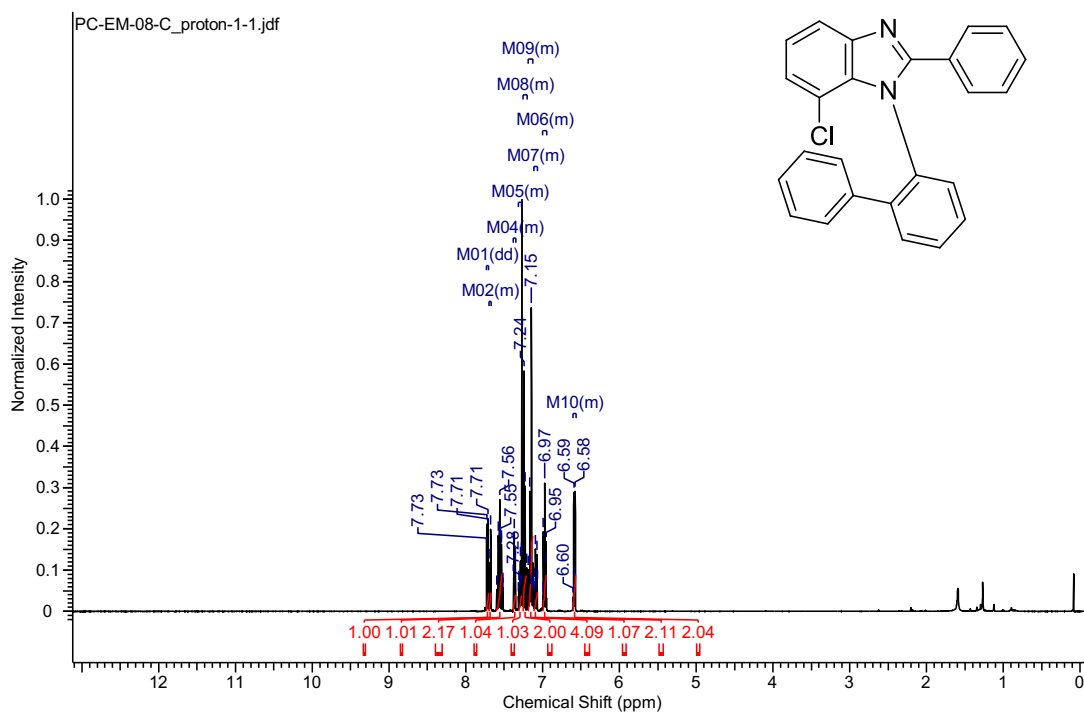
¹H NMR spektra (CHLOROFORM-*d*) *N*1-([1,1'-bifeny]-2-yl)-6-chlorobenzen-1,2-diamin



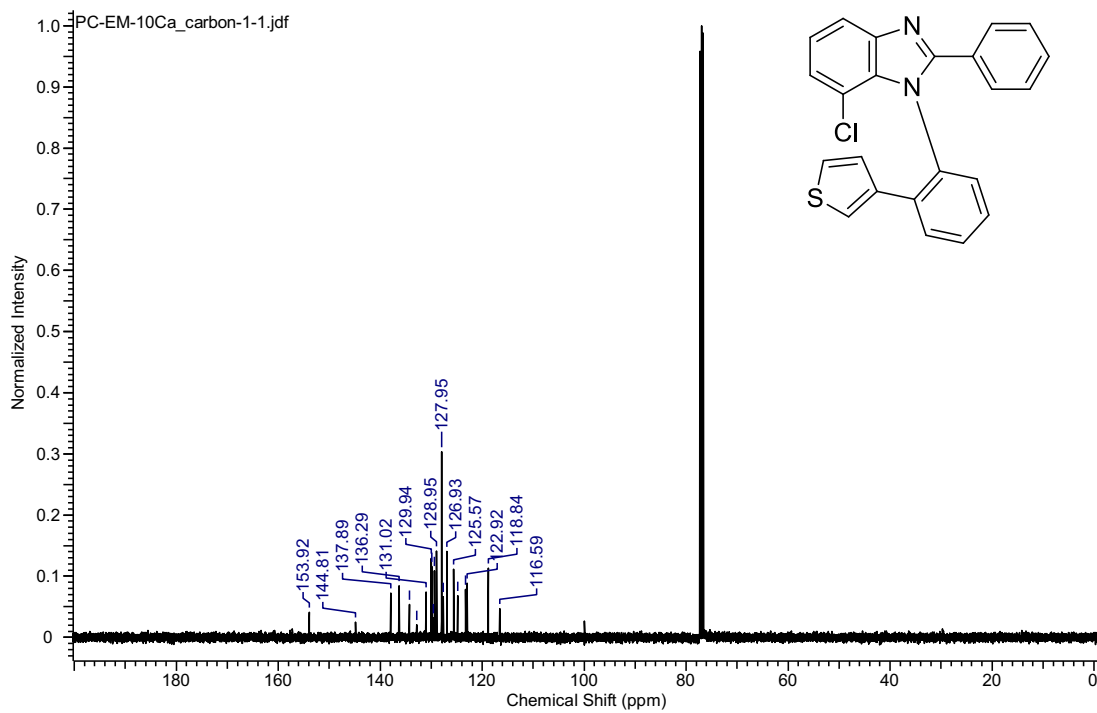
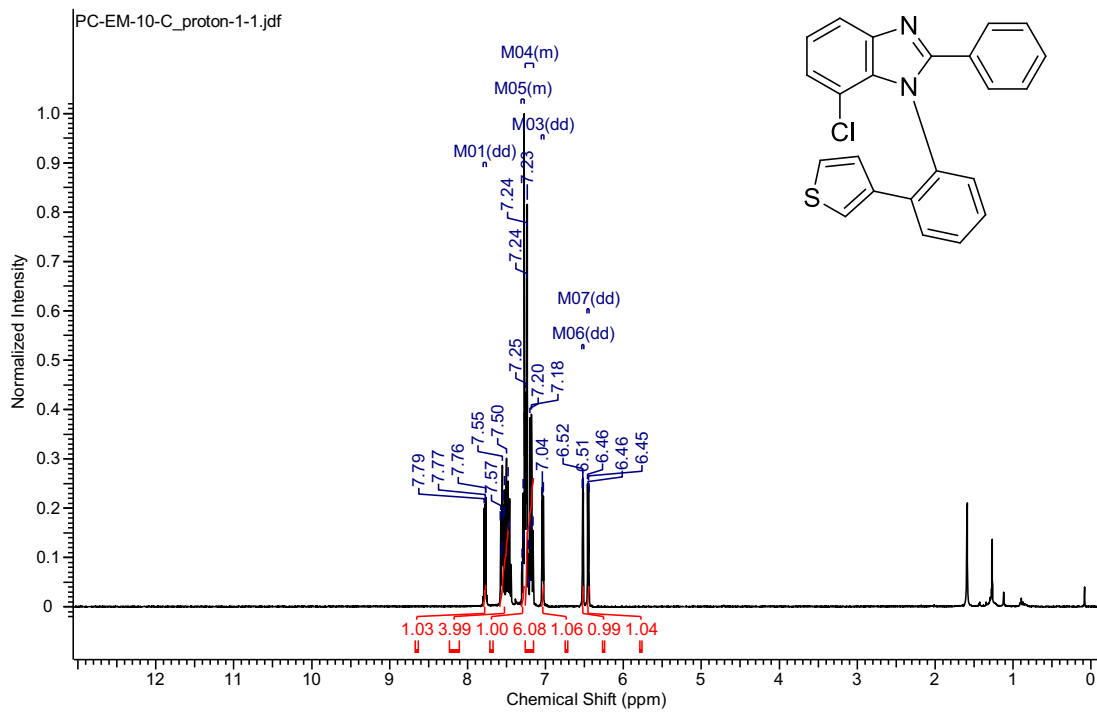
¹H a ¹³C NMR spektra (CHLOROFORM-*d*) 7-chloro-1-(4'-methyl-[1,1'-bifeny]-2-yl)-2-fenyl-1*H*-benzo[*d*]imidazolu



^1H a ^{13}C NMR spektra (CHLOROFORM-*d*) 1-([1,1'-bifeny]-2-yl)-7-chloro-2-fenyl-1*H*-benzo[*d*]imidazolu



¹H a ¹³C NMR spektra (CHLOROFORM-*d*) 7-chloro-2-fenyl-1-(2-(tiofen-3-yl)fenyl)-1*H*-benzo[*d*]imidazolu



¹³C NMR spektra (CHLOROFORM-*d*) 7-chlor-2-phenyl-1-(4'-(trifluormethyl)-[1,1'-bifeny]-2-yl)-1*H*-benzo[*d*]imidazolu

