

UNIVERZITA PALACKÉHO V OLOMOUCI

Fakulta přírodovědecká

Katedra analytické chemie

**Syntéza derivátů dihydropteridinonu na
pevné fázi**

Bakalářská práce

Autor práce: Pavel Vepřík

Studijní obor: Chemie

Vedoucí bakalářské práce: Mgr. Soňa Křupková, Ph.D.

Olomouc 2015

Prohlašuji, že jsem tuto bakalářskou práci vypracoval samostatně pod odborným dohledem Mgr. Soni Křupkové Ph.D. Veškerou použité zdroje jsem uvedl v seznamu literatury na konci práce.

V Olomouci dne.....

.....

Pavel Vepřík

Tímto bych chtěl poděkovat své vedoucí Mgr. Soně Křupkové Ph.D., za odborné vedení po celou dobu zpracovávání této bakalářské práce, pomoc při vyhodnocování MS a NMR spekter a za velkou trpělivost. Rovněž děkuji pracovníkům Ústavu molekulární a translační medicíny za změření NMR spekter a pomoc poskytnutou během řešení této práce. Děkuji také své rodině a přátelům za podporu během doby studia.

Souhrn

Tato bakalářská práce se zabývá syntézou derivátů 5,8-dihydropteridinonu substituovaných v poloze C4 s využitím syntézy na pevné fázi. Syntéza vychází z 4,6-dichloro-5-nitropyrimidinu, který byl v prvním kroku navázán na pryskyřici přes aminokyselinový linker. Po substituci druhého atomu chloru různými nukleofily a redukcí nitroskupiny byly získané meziproducty štěpeny z pryskyřice a současně cyklizovány za vzniku pteridinového cyklu. Připravené sloučeniny byly charakterizovány pomocí LC-MS a NMR analýz a budou testovány na jejich biologickou aktivitu.

Součástí této práce bylo i ověření aplikovatelnosti této metody v syntéze sloučenin pyrimidodiazepinového typu. Doposud byl připraven jeden derivát obsahující tento skelet. V budoucnu bude této oblasti věnována další pozornost.

Summary

This bachelor thesis describes the solid-phase synthesis of 5,8-dihydropteridinone derivatives substituted in position C4. The synthetic pathway starts from 4,6-dichloro-5-nitropyrimidine which was bound to the resin by amino acid linker. After substitution of the second chlorine atom with various nucleophiles and reduction of the nitro group the resulting intermediates were cleaved from the resin and simultaneously cyclised to pteridine cycle. The prepared compounds were characterised with LC-MS and NMR analyses. They will be tested for their biological activity.

The applicability of this method to the synthesis of pyrimidodiazepine derivatives was studied as well. One compound of this type has been prepared so far and more attention will be paid this chemistry in the future.

Obsah

1. Úvod	8
2. Teoretická část	9
2.1. Historie pteridinů	9
2.2. Biologicky významné pteridiny.....	9
2.2.1. Přírodní látky	9
2.2.1.1. Kyselina listová	10
2.2.1.2. Riboflavin	11
2.2.1.3. Tetrahydrobiopterin	11
2.2.2. Syntetické pteridiny	12
2.3. Syntéza pteridinů	12
2.3.1. Syntéza v roztoku	12
2.3.1.1. Syntézy vycházející z pyrimidinu.....	12
2.3.1.2. Syntézy vycházející z pyrazinu	16
2.3.2. Syntéza na pevné fázi	17
3. Experimentální část.....	19
3.1. Použité přístroje	19
3.2. Zpracování vzorku na analýzu	19
3.3. Stanovení loadingu pryskyřice	19
3.4. Výpočet výtěžku reakce	20
3.5. Syntéza	20
3.5.1. Ukotvení amino kyseliny (pryskyřice 1).....	20
3.5.2. Reakce s 4,6-dichloro-5-nitropyrimidinem (pryskyřice 2).....	20
3.5.3. Substituce 4,6-dichloro-5-nitropyrimidinu (pryskyřice 3).....	20
3.5.4. Redukce nitro skupiny (pryskyřice 4)	21
3.5.5. Odštěpení z pryskyřice a cyklizace (sloučeniny 5 a 13)	21
3.5.6. Příprava diazepinového cyklu.....	21
3.6. Úprava vzorku na NMR analýzu	21
4. Výsledky a diskuze.....	22
4.1. Syntéza	22
4.1.1. Ukotvení aminokyseliny	22
4.1.2. Reakce se 4,6-dichloro-5-nitropyridinem.....	23

4.1.3. Substituce 4,6-dichloro-5-nitropyridinu.....	24
4.1.4. Redukce nitro skupiny	24
4.1.5. Odštěpení z pryskyřice, cyklizace a purifikace	25
4.2. Připravené látky	27
4.3. Analytická data	28
5. Závěr	33
6. Seznam použitých zkratk	34
7. Literatura.....	35

1. Úvod

Dihydropteridinony patří do skupiny pteridinů. Historie těchto heterocyklů sahá do 19. století, kdy byly z křídel motýlů izolovány první sloučeniny obsahující pteridinový skelet. Později začaly být tyto látky podrobně zkoumány pro jejich hojné zastoupení v přírodě. Pteridiny zastávají řadu významných fyziologických a biochemických funkcí. Působí jako koenzymy transferáz nebo oxidoreduktáz, jako růstové faktory, v očích hmyzu fungují jako ochranné filtry nebo světelné receptory. Jako pigmenty se nachází v kůžích ryb, obojživelníků a plazů a v tělech hmyzu. Asi nejvýznamnější a nejnámější zástupce pteridinů je kyselina listová, známá také jako vitamín B9. Skupina pteridinů má své zastoupení i mezi léčivy, v této oblasti je pravděpodobně nejvýznamnější metotrexát jako lék proti některým druhům rakoviny.

Pro syntézu derivátů dihydropteridinonu byla použita metoda syntézy na pevné fázi. Syntéza na pevné fázi představuje metodu, ve které jsou organické molekuly vázané na polymerní nosič. Největší výhodou ve srovnání s klasickou roztokovou syntézou je provedení celé reakční sekvence bez nutnosti izolace produktů jednotlivých kroků. Tímto způsobem lze pak dosáhnout velkého počtu látek za relativně krátkou dobu. Velký význam má tato technika hlavně ve spojení s kombinatoriální chemií, kdy jsou syntetizovány početné chemické knihovny pro rychlejší postup při hledání nových farmaceutik.

2. Teoretická část

2.1. Historie pteridinů

Jako pteridiny **I** jsou označovány bicyklické *N*-heterocykly mající pyrimidinový kruh připojený v pozici 5,6 k pyrazinovému cyklu (Schéma I).

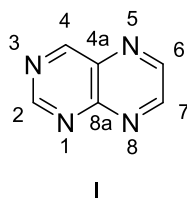


Schéma I: Struktura pteridinu

Chemie pteridinů začíná v roce 1889, kdy Hopkins izoloval žluté pigmenty z křídel motýla „*Gonepteryx rhamni*“. V roce 1925-26 Clemens Schöpf izoloval tyto pigmenty v čisté formě a pojmenovává je podle jejich barvy a vzhledu v přírodě xanthopterin **II** a leucopterin **III** (Schéma II). Poté byly isoxanthopterin **IV** a erythropterin **V** izolovány z křídel tropických motýlů. V roce 1940 Pullmann objasnil strukturu těchto látek dosud neznámou. Skupina těchto látek byla pojmenována pteridiny podle řeckého slova pteron znamenajícího křídlo.¹

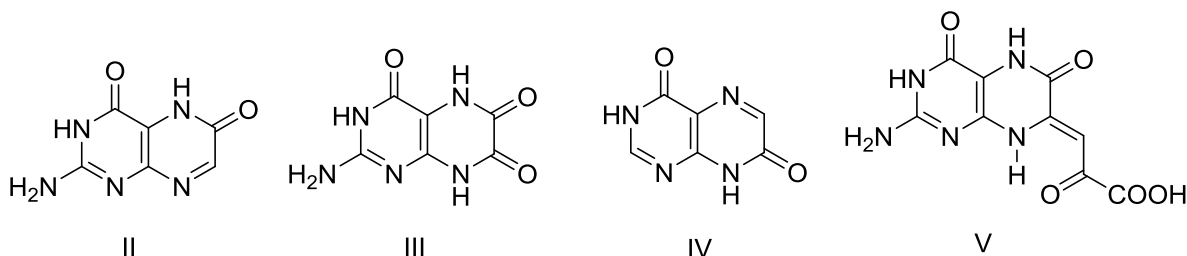


Schéma II: První izolované přírodní pteridiny

2.2. Biologicky významné pteridiny

2.2.1. Přírodní látky

Pteridiny jsou v přírodě hojně rozšířené, vyskytují se v očích a kůžích některých ryb, v těle vos a včel, kvasnicích, játrech. V této kapitole uvedeme několik nejvýznamnějších zástupců přírodně se vyskytujících pteridinů.

2.2.1.1. Kyselina listová

Kyselina listová **VI** je asi nejznámější sloučeninou obsahující skelet pterinu (pteridin substituovaný aminoskupinou v pozici 2 a ketoskupinou v pozici 4) známá také jako vitamín B9 nebo folát (Schéma III).²

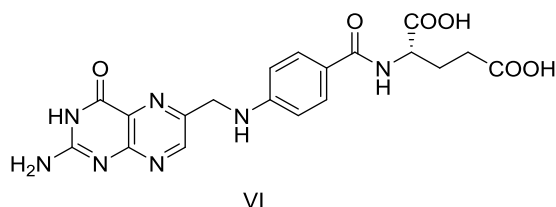


Schéma III: Kyselina listová

Nachází se ve špenátu, listech tuřinu, hlávkovém zelí, hrášku a dalších. Kyselina listová byla poprvé izolována v roce 1941 ze špenátových listů a poprvé syntetizována v roce 1946 reakcí tří výchozích komponent: 2,5,6-triamino-4(3*H*)-pyrimidinonu **VII**, 2,3-dibromopropionaldehydu **VIII** a p-aminobenzoylglutamové kyseliny **IX** (Schéma IV).³

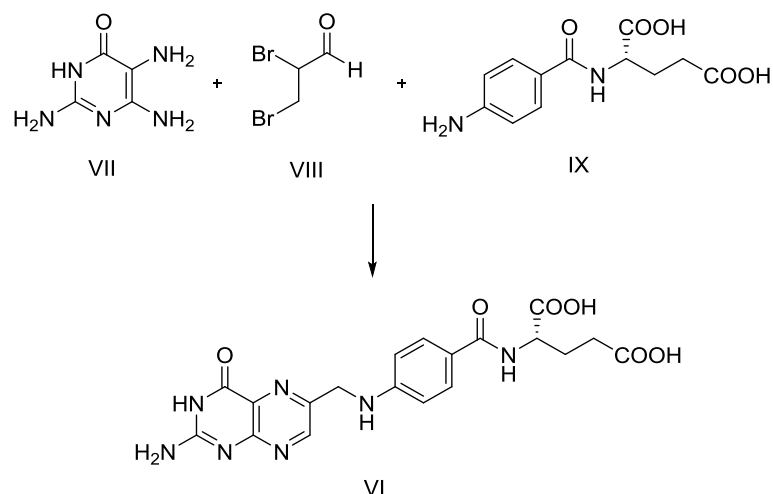


Schéma IV: Syntéza kyseliny listové

Folát je nezbytný pro vznik a chod buňky, je potřebný k syntéze DNA bází, některých aminokyselin, podílí se i na tvorbě červených krvinek.¹ Nedostatek folátu má mnoho neblahých účinků. Vede ke zpomalení dělení buněk a produkce červených krvinek. U těhotných žen může způsobit poruchu neurální trubice plodu. Může mít i fyziologické projevy například anémii.²

2.1.1.2. Riboflavin

Dalším významným zástupcem z rodiny pteridinových derivátů je riboflavin, známý také jako vitamín B2 (Schéma V). Riboflavin **X** je ve vodě rozpustný vitamín nacházející se v celé řadě potravin jako mléku, vejcích, masu, rybách atd. Poprvé byl izolován v roce 1879 z mléčné syrovátky.⁴ Podobně jako ostatní vitamíny B má i riboflavin významnou roli v metabolismu tuků, cukrů a bílkovin. V jeho nejvýznamnější biologicky aktivní formě (flavin adenin dinukleotid FAD a flavin mononukleotid FMN) se účastní redox reakcí v dýchacím řetězci. Jeho nedostatek se projevuje zánětem ústních koutků, rtů, jazyka, spojivek. Riboflavin byl studován v souvislosti s léčbou migrény⁵ nebo redukce patogenů krevních destiček a plazmy, čímž by se zvýšila bezpečnost krevních transfúzí.⁶

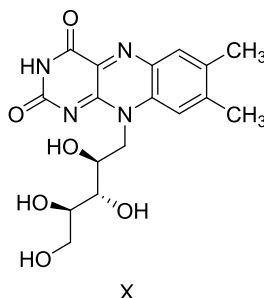


Schéma V: Riboflavin

2.2.1.3. Tetrahydrobiopterin

Fenylketonurie, dědičné metabolické onemocnění projevující se zvýšenou hladinou fenylalaninu v krvi, je způsobená nedostatečnou aktivitou fenylalanin hydroxylázy. V roce 1963 byla objasněna struktura kofaktoru tohoto enzymu, tetrahydrobiopterinu (BH₄) **XI**.⁷ Kromě fenylalanin hydroxylázy působí BH₄ také jako kofaktor pro syntézu oxidu dusného a může tak mít klíčovou roli při léčbě některých vaskulárních onemocnění.⁸ Je důležitý i při biosyntéze neurotransmiterů jako dopaminu, norepinefrinu a serotoninu. V roce 2010 byla publikována studie popisující BH₄ účinným v léčbě dětského autismu.⁹

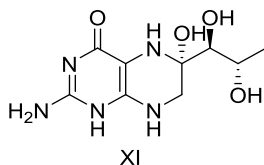


Schéma VI: Tetrahydrobiopterin

2.2.2. Syntetické pteridiny

Metotrexát XII je aminoderivát pteridinu (Schéma VII) jehož historie začala v 50. letech minulého století, kdy se začal podávat dětem s akutní lymfoblastickou leukémií. Později našel uplatnění v léčbě jiných nádorových onemocnění, např. rakoviny prsu nebo choriokarcinomu. Dále je využíván v léčbě autoimunitních chorob, jako je lupénka, revmatoidní artritida, Crohnova nemoc a další.¹

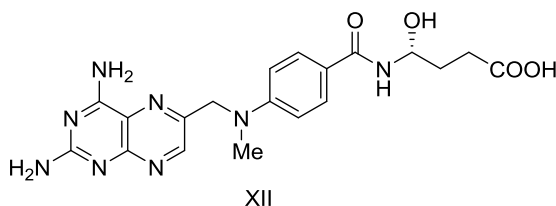


Schéma VII: Metotrexát

Kromě výše zmíněných účinků bylo publikováno mnoho prací zaměřených na syntézu a studium biologické aktivity sloučenin odvozených od pteridinového heterocyklu. Z popsaných biologických účinků uveďme například inhibici viru hepatitidy C,¹⁰ antimalarické,¹¹ antibakteriální²² nebo protizánětlivé účinky.¹²

2.3. Syntéza pteridinů

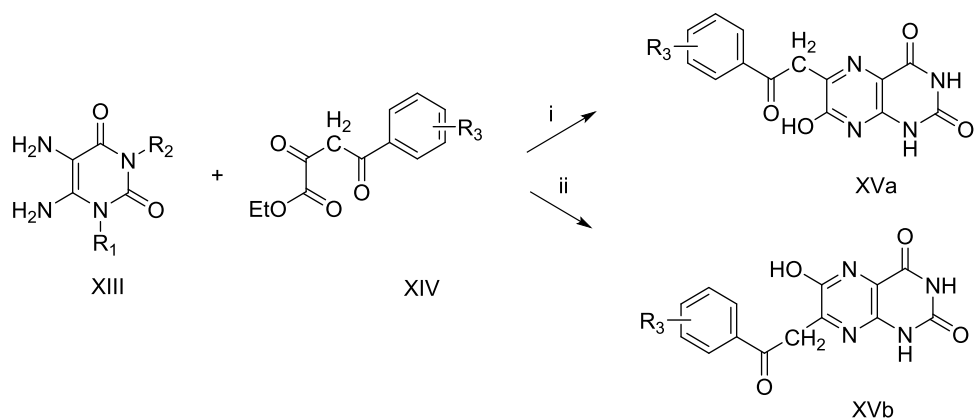
2.3.1. Syntéza v roztoku

Syntézy sloučenin s pteridinovým skeletem lze rozdělit do dvou skupin: syntézy vycházející z pyrimidinu a syntézy vycházející z pyrazinu.

2.3.1.1. Syntézy vycházející z pyrimidinu

Většina syntéz pteridinového cyklu vychází z pyrimidinu jako výchozí látky. Jedna z nejstarších metod spočívá v kondenzaci diaminopyrimidinu s dikarbonylovou sloučeninou známá jako Gabriel-Isayova kondenzace.¹³

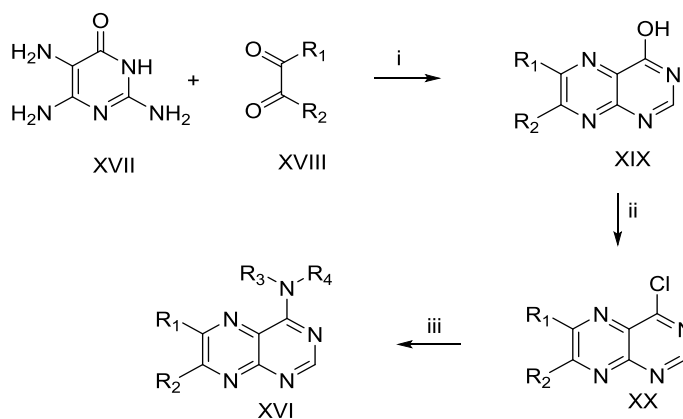
Konkrétním příkladem syntézy tohoto typu může být syntéza z roku 1985, kdy byly kondenzací 5,6-diaminouracilu **XIII** s různě substituovanými benzoylpyruváty **XIV** připraveny deriváty acylmethylpteridinu **XV**. Regioselektivita reakce byla kontrolována použitými podmínkami (Schéma VIII).¹⁴



Podmínky: i) pyridin, reflux, 1 h; ii) HCl, reflux, 45 min.

Schéma VIII

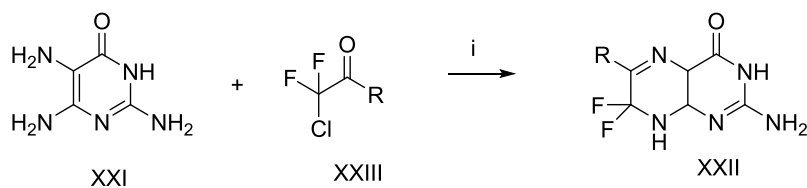
Wu a kolektiv získali knihovnu 4,6,7-trisubstituovaných pteridinových derivátů **XVI** kondenzací 4,5-diaminopyrimidinonu **XVII** s diketony **XVIII**. Takto získané hydroxyderiváty **XIX** byly převedeny na chlorderiváty **XX**, které byly dále modifikovány reakcí s různými aminy (Schéma IX).¹⁵



Podmínky: i) AcOH, AcONa, 150°C, 2 h; ii) POCl₃, 75°C, 1 h; iii) amin, EtOH, 70°C, 2 h.

Schéma IX

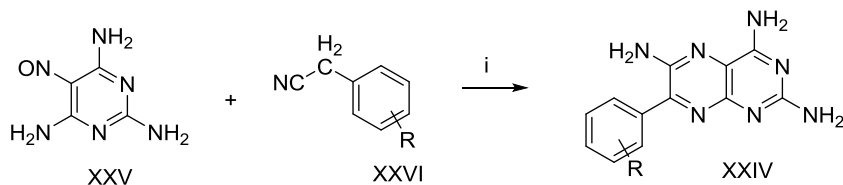
Aminopyrimidiny **XXI** byly využity i při syntéze difluorovaných derivátů pteridinu **XXII** získaných reakcí s trihalogen karbonylovými sloučeninami **XXIII** (Schéma X).¹⁶



Podmínky: i) Et₃N, EtOH, reflux, 48 h.

Schéma X

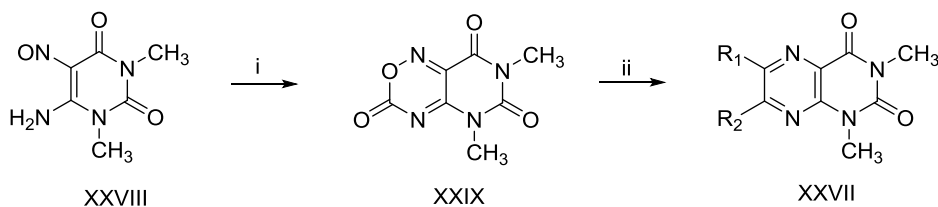
Další klíčovou výchozí látkou pro syntézu sloučenin obsahujících pteridinový cyklus je 4-amino-5-nitrosopyrimidin. Ten byl využit například při syntéze 6-substituovaných triaminopteridinů **XXIV** pomocí metodiky vyvinuté Timmisem.¹⁷ Syntéza spočívala v kondenzaci 2,4,6-triamino-5-nitrosopyrimidinu **XXV** s deriváty arylacetonitrilu **XXVI** (Schéma XI).¹⁸



Podmínky: i) Na, 2-ethoxyethanol, reflux, 2 h.

Schéma XI

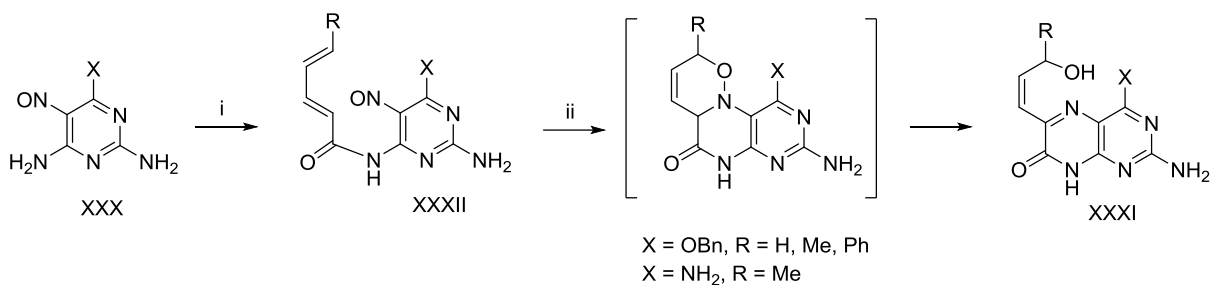
Reaktivita pyrimidooxadiazinonů byla studována při přípravě 6,7-disubstituovaných pteridin-2,4-dionů **XXVII**.¹⁹ Reakce 1,3-dimetyl-4-amino-5-nitrosouracilu **XXVIII** s trichlormethylchloroformátem poskytla klíčový meziprodukt **XXIX**, který dále reagoval s karbanionty generovanými *in situ* působením silné báze na sloučeniny obsahující aktivovanou methylenovou skupinu jako β -diketony, β -diestery, β -ketoamidy a další (Schéma XII).



Podmínky: i) trichlormethylchloroformát, THF, rt, 3 h; ii) sloučenina s aktivovanou methylenovou skupinou, NaH, THF, rt, 30 – 60 min.

Schéma XII

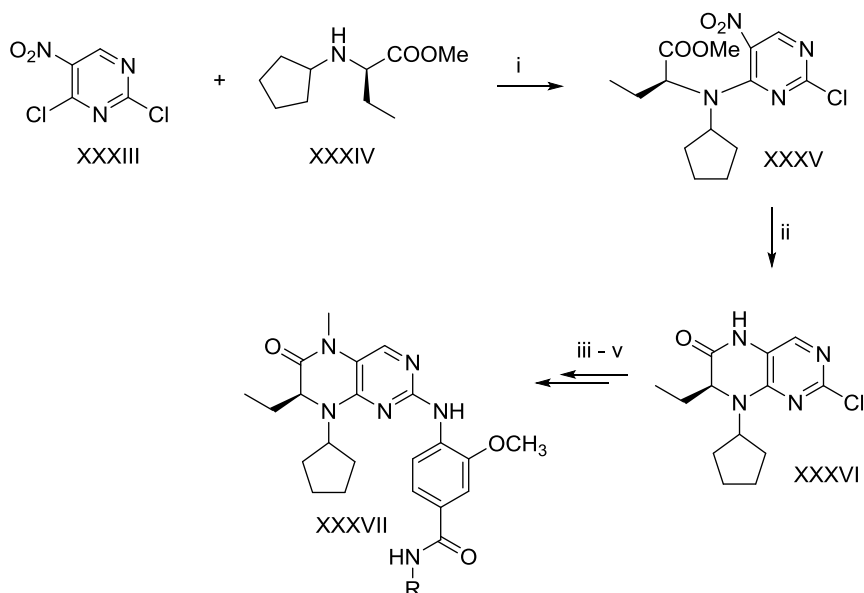
Relativně novou metodou vycházející ze 4-amino-5-nitrosopyrimidinu **XXX** je intramolekulární [4+2] cykloadice, která poskytla deriváty pteridinonů s C(6)-(Z)-allyl hydroxylem **XXXI** substitucí²⁰ přes acylaci 4-amino-5-nitrosopyrimidinů chloridy dienových kyselin následovanou již zmiňovanou intramolekulární Diels-Alderovou cykloadicí (Schéma XIII).



Podmínky: i) $\text{RCH}=\text{CH}-\text{CH}=\text{CH}-\text{COCl}$, pyridine -10°C , 12 h; ii) toluen, 100°C , 3-5 h nebo xylen, 120°C , 12 h.

Schéma XIII

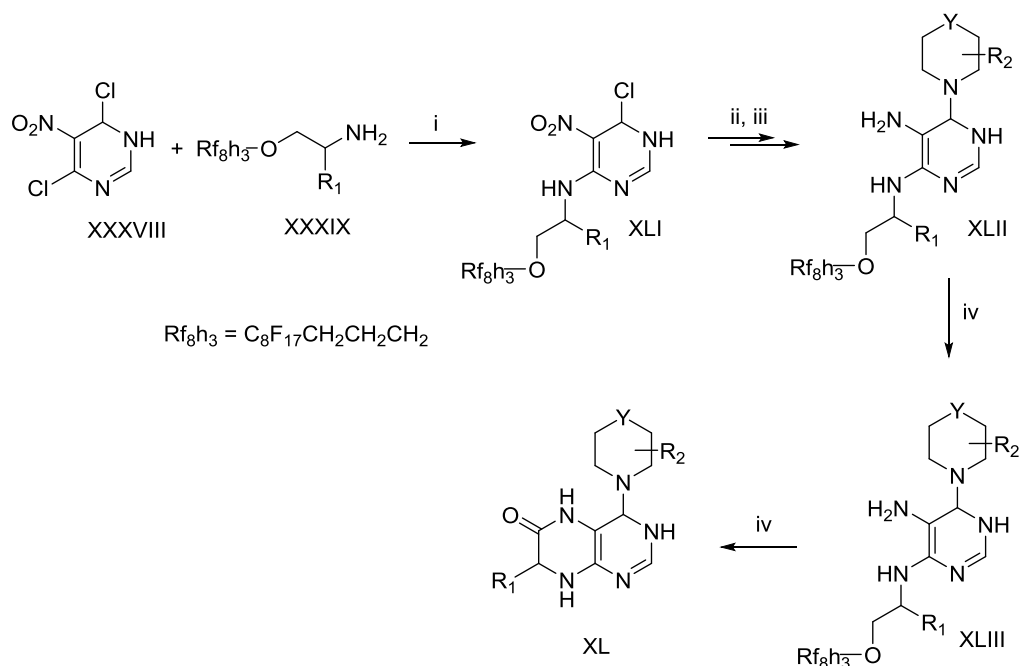
Velký počet prací popisuje přípravu pteridinových derivátů s využitím dichloro-5-nitropyrimidinu a to jak 2,4-dichlorovaného izomeru, tak 4,6-dichlorovaného izomeru. Schéma XIV zobrazuje reakční sekvenci vedoucí k derivátům tetrahydropteridinonu, kde jedním z reakčních kroků je substituce 2,4-dichloro-5-nitropyrimidinu **XXXIII**.²¹



Podmínky: i) K_2CO_3 , aceton, rt, 14 h; ii) Zn , NH_4Cl , MeOH , H_2O , reflux, 17 h; iii) MeI , NaH , DMA , -15°C – rt, 1,5 h; iv) 4-amino-3-methoxybenzoová kyselina, HCl , EtOH , H_2O , reflux, 72 h; v) amin, DCM , TBTU , DIEA , rt, 1,5 – 12 h.

Schéma XIV

Pětistupňovou syntézou začínající substitucí 4,6-dichloro-5-nitropyrimidinu **XXXVIII** fluorovanými aminokyselinami **XXXIX** a aminy byly připraveny deriváty dihydropteridinonů **XL**.²² Po dvojité substituci následovala redukce nitroskupiny a v závěrečném kroku cyklizace katalyzovaná mikrovlnami (Schéma XV).

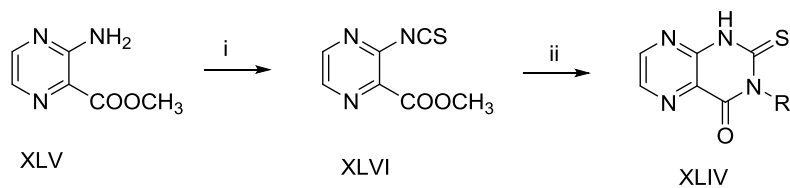


Podmínky: i) DIEA, DMF, rt, 8 min; ii) morfolin, rt, 24 h; iii) Pd/C, H₂, THF-MeOH, rt, 24 h; iv) MW, 150°C, 15 min.

Schéma XV

2.3.1.2. Syntézy vycházející z pyrazinu

Ze syntetických metod využívajících pyrazin jako výchozí látku může být uvedena například syntéza 3-substituovaných 2-thioxo-1,2-dihydro-4(3*H*)pteridinonů **XLIV**. Příslušné isothiokyanátové meziprodukty byly získány reakcí 3-amino-2-pyrazinkarboxylátů **XLV** s thiofosgenem. Reakce sloučenin s dusíkatými nukleofily pak poskytla cílové deriváty pteridinonů (Schéma XVI).²³



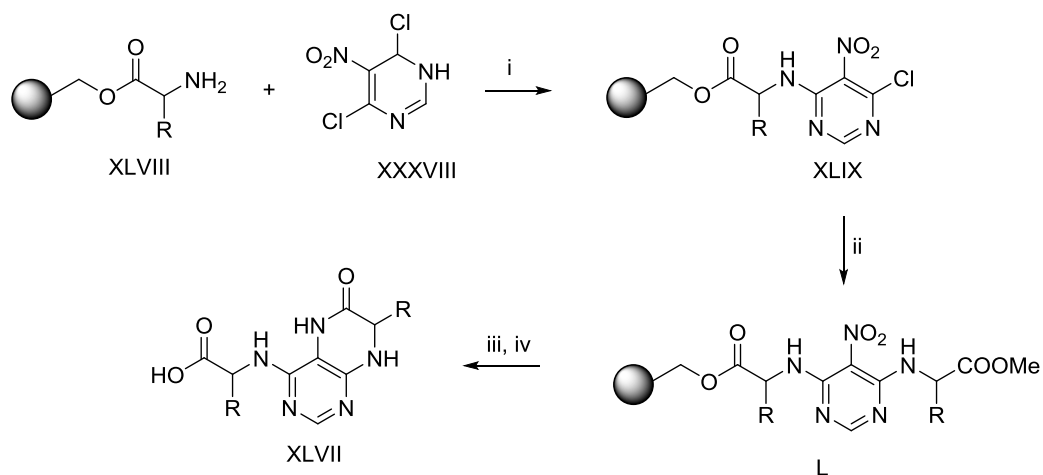
Podmínky: i) thiofosgen, Ca₂CO₃, DCM, rt, 48 h; ii) amin, EtOH, rt, 5 h.

Schéma XVI

2.3.2. Syntéza na pevné fázi

Syntéza na pevné fázi využívá polymerní nosič, na který je v prvním kroku navázaná výchozí stavební jednotka. K té jsou pak postupně přidávány ostatní fragmenty až do dosažení cílových látek. Posledním krokem je pak odštěpení sloučenin z pryskyřice. Výhodou této metody oproti klasické roztokové syntéze je to, že jednotlivé meziproducty nemusí být izolovány a jsou jednoduchým promytím pryskyřice zbaveny nadbytku reagentů. Tato výhoda má velký význam zejména u kombinatoriálního způsobu přípravy chemických knihoven.

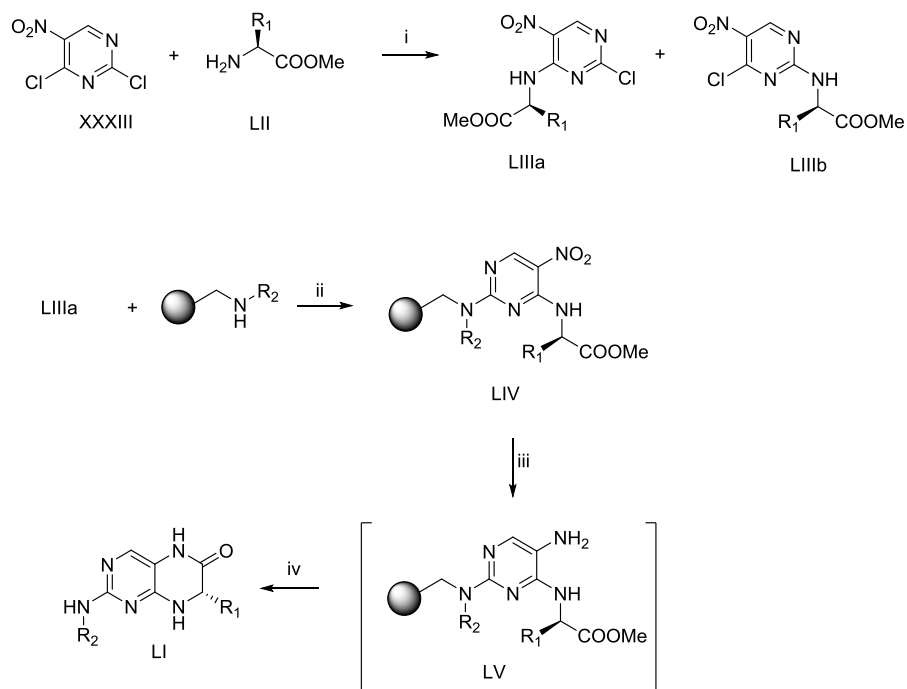
4,6-dichloro-5-nitropyrimidin byl studován jako výhodný výchozí stavební blok pro syntézu heterocyklů odvozených od pyrimidinového cyklu s využitím syntézy na pevné fázi.²⁴ Zmiňovaný dichlorovaný pyrimidin byl v prvním kroku navázán na Wangovu pryskyřici přes aminokyselinový linker. Poté byl substituován řadou aminokyselin, redukován a odštěpen z pryskyřice za vzniku příslušných dihydropteridinonů **XLVII** (Schéma XVII).



Podmínky: i) DIEA, DMF, rt, 4 h; ii) methylester aminokyseliny, DIEA, DMF, rt, 4 h; iii) $\text{SnCl}_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$, EtOH, DMF, 70°C, 16 h; iv) 50% TFA, DCM.

Schéma XVII

Obdobným způsobem byl 2,4-dichloro-5-nitropyrimidin využit pro přípravu 2-amino-7,8-dihydropteridinonů **LI**.²⁵ 2,4-dichloro-5-nitropyrimidin byl nejprve modifikován reakcí s methylesterem aminokyselin **LII** a v následujícím kroku reagován s aminy vázanými k pevné fázi. Po redukcí nitroskupiny došlo ke spontánní cyklizaci za vzniku pteridinového cyklu (Schéma XVIII).



Podmínky: i) DIEA, THF, 0°C; ii) DIEA, DMF, rt; iii) Na₂S₂O₄, NH₄OH, H₂O/1,4-dioxane, rt; iv) 60% TFA, MeCN, rt.

Schéma XVIII

3. Experimentální část

Pro syntézu na pevné fázi byly použity plastové stříkačky s vloženou fritou pro snadné přidávání a odstraňování reakčních roztoků a promývacích rozpouštědel k syntetizované látce imobilizované na pryskyřici. Při reakcích za laboratorní teploty byla použita třepačka pro zajištění promíchávání reakční směsi. Pro promývání pryskyřice byl použit domino blok. Po jednotlivých reakčních krocích byla pryskyřice promývána asi 1 minutu příslušnými rozpouštědly. Při vyšších teplotách byly použity skleněné vialky s vloženým magnetickým míchadlem.

3.1. Použité přístroje

Měření hmotnostních spekter bylo provedeno na hmotnostním spektrometru s jednoduchým kvadrupólem (Waters) s kolonou X-Select C18 za použití mobilní fáze složené z (A) 0,01 M octanu amonného ve vodě a (B) acetonitrilu. Měření NMR spekter bylo provedeno v roztoku DMSO – d_6 na Jeol ECX-500 (500 MHz). Hodnoty chemického posunu (δ) jsou udány v ppm jednotkách, interakční konstanty (J) v Hz. Preparativní HPLC byla prováděna s využitím přístroje Waters 1500 series a preparativní kolony YMC-Pack Pro C1820x100mm. s-5 μ m, 12 nm. Mobilní fáze byla složena z 0,01 M octanu amonného ve vodě a acetonitrilu.

3.2. Zpracování vzorku na analýzu

Po každém kroku syntézy bylo odebráno cca. 5 mg pryskyřice k analýze, pro stanovení loadingu bylo odebráno okolo 10 mg pryskyřice, přesná hmotnost byla zaznamenána pro pozdější výpočty. Tato pryskyřice byla štěpena 1 ml 50% roztoku TFA/DCM. Odštěpení z pryskyřice probíhalo 30 minut za laboratorní teploty. Poté byla kyselina trifluoroctová s DCM odfoukána proudem N_2 , vysušený odparek byl rozpuštěn v cca. 1 ml směsi methanolu s vodou (1:1), pro stanovení loadingu byl rozpuštěn přesně v 1 ml methanolu. Následovala filtrace přes mikrofiltr.

3.3. Stanovení loadingu pryskyřice

Pro stanovení loadingu byla provedena metoda vnějšího standardu, jako standard byl použit roztok o přesné koncentraci Fmoc- β -Ala-OH v methanolu. Protektivní skupina Fmoc absorbuje UV záření o vlnové délce 300 nm. Na základě toho byly srovnány plochy píků absorbance standardu a vzorku. Pro každé stanovení loadingu byly provedeny dva paralelní odběry vzorku.

$$L = \frac{S_{vz.}}{S_{std.}} * \frac{c_{std.}}{m_{vz.}}$$

(L = loading pryskyřice [mmol/g]; $S_{vz.}$ = plocha píku vzorku; $S_{std.}$ = plocha píku standardu; $c_{std.}$ = koncentrace standardu [mmol/ml]; $m_{vz.}$ = hmotnost odebrané pryskyřice [g])

3.4. Výpočet výtěžku reakce

Výtěžky reakce byly vypočítány pomocí NMR spekter, na analýzu byla poslána veškerá získaná látka. Jako vnější standard byl použit 1-methyl-2-nitroterefalát o známé koncentraci. Takto byla získána relativní odezva aromatického vodíku vůči signálu DMSO.

$$m = \frac{S_{vz.}}{S_{std.}} * c_{std.} * V_{vz.} * M_{vz.} * 1000$$

(m = hmotnost produktu [mg]; $S_{std.}$ = plocha píku standardu; $S_{vz.}$ = plocha píku vzorku; $c_{std.}$ = koncentrace standardu [mol/l]; $V_{vz.}$ = objem roztoku vzorku [l]; M = molární hmotnost vzorku [g/mol])

3.5. Syntéza

3.5.1. Ukotvení amino kyseliny (pryskyřice 1)

Do plastové stříkačky s fritou bylo naváženo 0,5 g Wangovi pryskyřice, která byla následně 3x promyta DMC. Do stříkačky byl natáhnut roztok Fmoc-Ala-OH (1 mmol; 0,3113 g), HOBt (1 mmol; 0,1531 g), DMAP (0,25 mmol; 0,0305 g) a DIC (1 mmol; 0,1262 g) v 5 ml DMF. Po 2 hodinách na třepače byl roztok vypuštěn a pryskyřice byla promyta 3x DMF, 3x DCM. Poté byla odebrána část pryskyřice na stanovení loadingu. Zbýlá pryskyřice byla vložena do 50% roztoku piperidinu v DMF (5 ml) na 15 minut a následně byla pryskyřice promyta 5x DMF, 3x DCM.

3.5.2. Reakce s 4,6-dichloro-5-nitropyrimidinem (pryskyřice 2)

0,5 g pryskyřice 1 bylo 3x promyto v bezvodém DMF. Poté byl přidán roztok 4,6-dichloro-5-nitropyridinu (2,5 mmol; 0,485 g) a DIEA (2,5 mmol; 0,413 ml) v 5 ml bezvodého DMF. Po 1,5 hodině za laboratorní teploty byla pryskyřice promyta 3x DMF, 3x DCM, následně 3x MeOH pro sražení pryskyřice a uskladnění v lednici.

3.5.3. Substituce 4,6-dichloro-5-nitropyrimidinu (pryskyřice 3)

Pryskyřice byla nabobtnána promytím 3x DCM. K 314 mg pryskyřice 2 byl přidán roztok piperidinu (1,57 mmol; 0,155 ml) a DIEA (1,57 mmol; 0,259 ml) v 3,5 ml DMF. Reakce probíhala 4 hodiny za laboratorní teploty, poté následovalo promytí pryskyřice 3x DMF, 3x DCM.

3.5.4. Redukce nitro skupiny (pryskyřice 4)

Redukční roztok byl připraven rozpuštěním $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$ (3,14 mmol; 0,5467 g), K_2CO_3 (3,768 mmol; 0,5208 g) a TBAHS (0,314 mmol; 0,1066 g) v 3,5 ml vody a následně přidáním 3,5 ml DCM. Připravený roztok byl přidán k pryskyřici 3. Po 2 hodinách na třepače byla pryskyřice promyta 3x DCM/voda, 3x DMF, 3x MeOH, 3x DCM.

3.5.5. Odštěpení z pryskyřice a cyklizace (sloučeniny 5 a 13)

314 mg pryskyřice 3 bylo přeneseno do skleněné vialky s magnetickým míchadlem, bylo přidáno 3,5 ml 50% roztoku TFA/DCM. Během hodiny byla vialka zahřívána na 60°C , došlo k odštěpení látky z pryskyřice a k následné cyklizaci. Poté se kyselina trifluoroctová s dichlormethanem odfoukala proudem N_2 , zbylý odparek byl rozpuštěn v MeOH na HPLC separaci a přefiltrován přes mikrofiltr.

3.5.6. Příprava diazepinového cyklu

Pryskyřice 11 byla připravena stejným postupem jako pryskyřice 4. 300 mg pryskyřice 11 bylo štěpeno v 3,5 ml 50% roztoku TFA/DCM. Po 30 minutách byl štěpící koktejl odfoukán, odparek byl rozpuštěn ve 3 ml 96% H_2SO_4 . Roztok byl zahříván 1 hodinu při 80°C . Následně byla reakční směs zředěna 15 ml vody a zneutralizována přidáním NaOH. Produkt byl extrahován do EtAc a to třikrát po 2 ml. Z organické fáze byl získán produkt odpařením EtAc na vakuové odparce. Odparek v baňce byl sonifikován v diethyletheru, zfiltrován a vysušen na vzduchu.

3.6. Úprava vzorku na NMR analýzu

Produkt rozpuštěný v MeOH byl přečištěn pomocí semipreparativního HPLC, přečištěný produkt rozpuštěný v mobilní fázi byl na vakuové odparce zbaven acetonitrilu. Zbytku rozpouštědla byl zbaven lyofilizací. Přečištěný produkt po lyofilizaci byl rozpuštěn v 600 μl $\text{DMSO-}d_6$, poté byl roztok kvantitativně převeden do kyvety pro měření NMR pro potvrzení struktury a určení výtěžku.

4. Výsledky a diskuze

Hlavním cílem bakalářské práce byla syntéza dihydropteridinonu substituovaného různými nukleofily v poloze C4, byla provedena i syntéza jednoho derivátu pyrimidodiazepinového typu. Látky byly připraveny pomocí syntézy na pevné fázi.

Klíčovým building blokem pro syntézu derivátů dihydropteridinonu byl 4,6-dichloro-5-nitropyrimidin **2** ukotvený na polymerní nosič přes aminokyselinový linker. Po následné redukci nitro skupiny byly získané meziproducty **4** odštěpeny z pryskyřice a současně cyklizovány na cílové molekuly **5**. Syntetická cesta je znázorněna ve Schématu XIX.

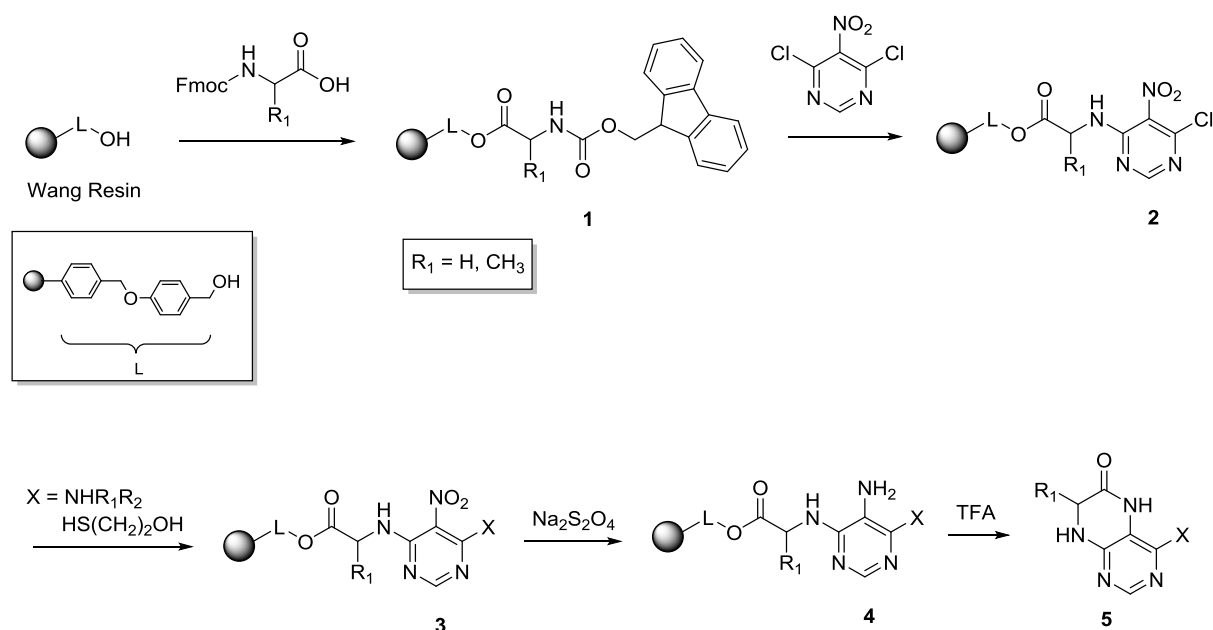


Schéma XIX: Syntéza 4-substituovaných 7,8-dihydropteridin-6(5H)-onů.

4.1. Syntéza

4.1.1. Ukotvení aminokyseliny

Na Wangovu pryskyřici byla navázána aminokyselina přes esterovou vazbu. Pro vznik výlučně esterové vazby byla použita aminokyselina s ochráněnou aminoskupinou. Fmoc-Gly-OH a Fmoc-Ala-OH byly nejprve převedeny na aktivované estery pomocí HOBt techniky a poté navázány na pryskyřici. Reakce byla provedena za laboratorní teploty a ukončena po dvou hodinách. Po reakci bylo odebráno analytické množství (asi 20 mg) pryskyřice pro stanovení loadingu (viz. experimentální část). Ze zbytku pryskyřice byla odstraněna chránící Fmoc skupina 15-ti minutovou reakcí v 50% piperidinu v DMF (Schéma XX).

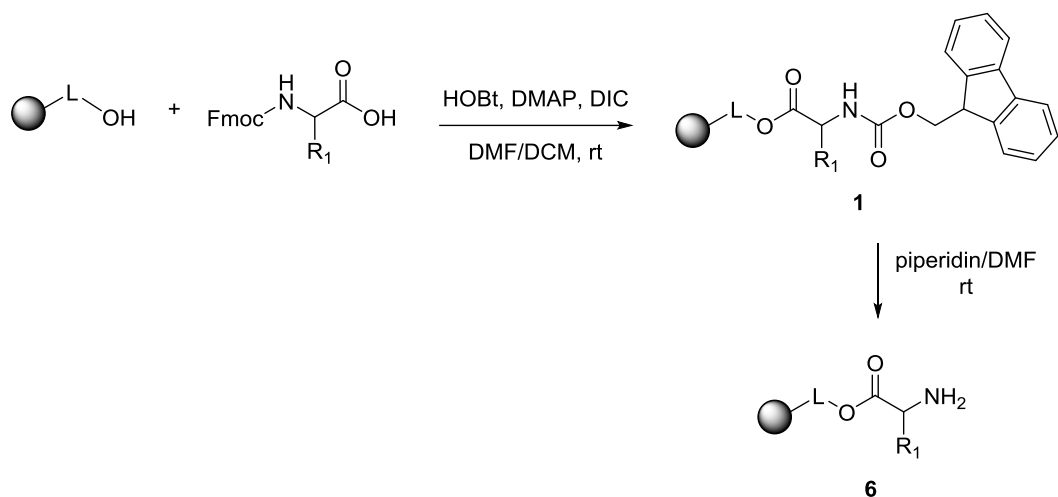


Schéma XX: Syntéza aminokyselinového linkeru.

4.1.2. Reakce se 4,6-dichloro-5-nitropyridinem

V následujícím kroku byla pryskyřice podrobena reakci s 4,6-dichloro-5-nitropyridinem v bezvodém DMF za přítomnosti DIEA. Reakce probíhala 1,5 hodiny za laboratorní teploty. Bezvodé rozpouštědlo bylo použito z důvodu zamezení substituce reaktivního atomu chlóru na pyrimidinu hydroxylovou skupinou. Vysoká reaktivita chlóru je i příčinou zdánlivě nízké čistoty produktu **2** této reakce (podle LC-MS), která je snížena přítomností nečistot vznikajících během analýzy. Pro jednoznačné určení čistoty produktu lze část pryskyřice substituovat piperidinem za vzniku stabilnějšího derivátu **7** (Schéma XXI).

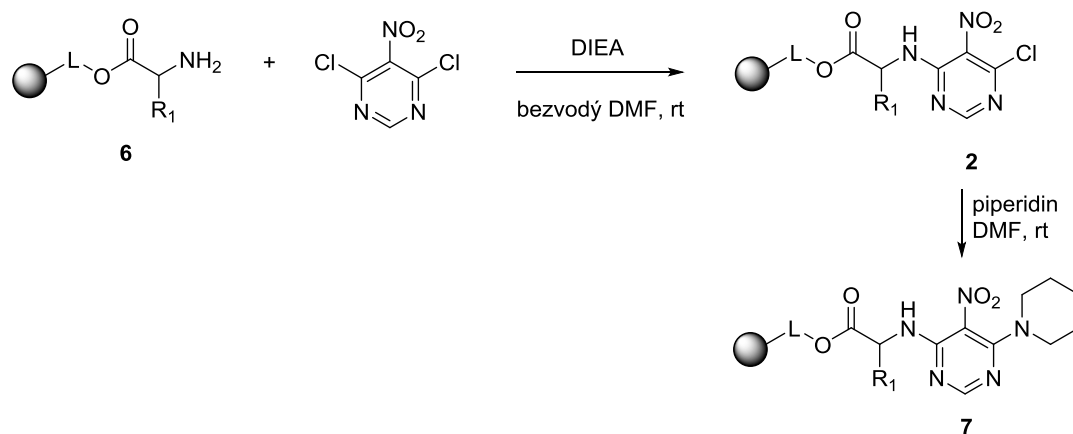


Schéma XXI: Navázání centrálního pyrimidinového cyklu.

4.1.3. Substituce 4,6-dichloro-5-nitropyridinu

Po získání derivátů **2** byl atom chlóru substituován dusíkatými a sirnými nukleofily (Schéma XXII). Reakce probíhala v DMF za přítomnosti DIEA. Pro kvantitativní průběh reakce byla zapotřebí 4-hodinová reakční doba.

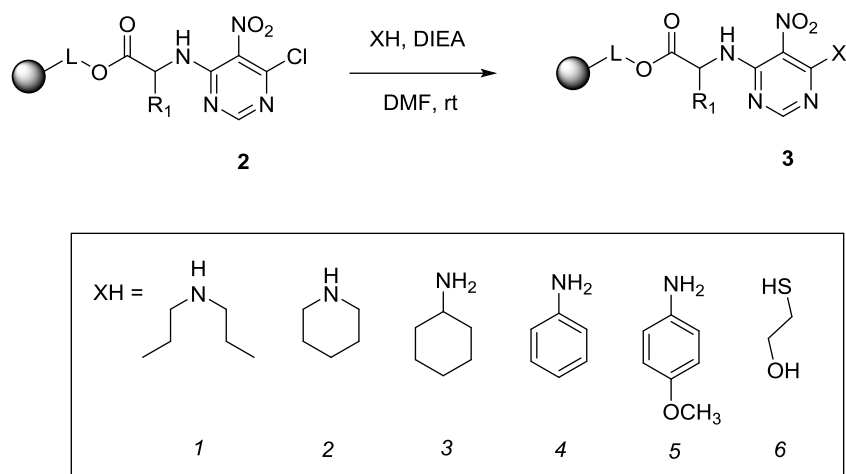


Schéma XXII: Substituce atomu chlóru.

4.1.4. Redukce nitro skupiny

Pro redukci nitroskupiny byly testovány dvě metody: redukce chloridem cínatým a redukce dithioničitanem sodným. První zmiňovaná metoda, tj. reakce s chloridem cínatým v DMF poskytla po 23 hodinách produktu (64 %) a výchozí látky (25 % podle LC-MS). Redukce dithioničitanem sodným byla provedena ve směsi DCM a vody za přítomnosti fázového katalyzátoru. Byly vyzkoušeny dva fázové katalyzátory: hydrogensíran tetrabutylamonný (TBHAS) a ethylviologen dibromid. V případě katalýzy ethylviologen dibromidem po 23-hodinové reakci směs obsahovala z převážné části výchozí látku (podle LC-MS). Nejlépe se osvědčila reakce s Na₂S₂O₄ a TBHAS, kdy po 23 hodinách za laboratorní teploty došlo ke stoprocentní konverzi. Získané aminoderiváty **4** byly ale doprovázeny vedlejším produktem. Zvláště u derivátu **4(1,3)** a **4(2,4)** byly čistoty a výtěžky finálních látek v důsledku vzniku tohoto vedlejšího produktu značně sníženy. Ze srovnání LC-MS analýz všech derivátů vyplynulo, že hmotnost vedlejšího produktu je závislá na substituci R₁, ale nezávislá na substituci X. Jinými slovy, že hmotnost vedlejšího produktu je stejná pro všechny deriváty s glycinovým linkerem a stejně tak pro všechny deriváty s alaninovým linkerem. Na základě tohoto pozorování byla navržena struktura nečistoty jako produkt tzv. cross-linkingu **14** (Schéma XXIII). Ověření struktury na základě NMR analýzy je prozatím v řešení.

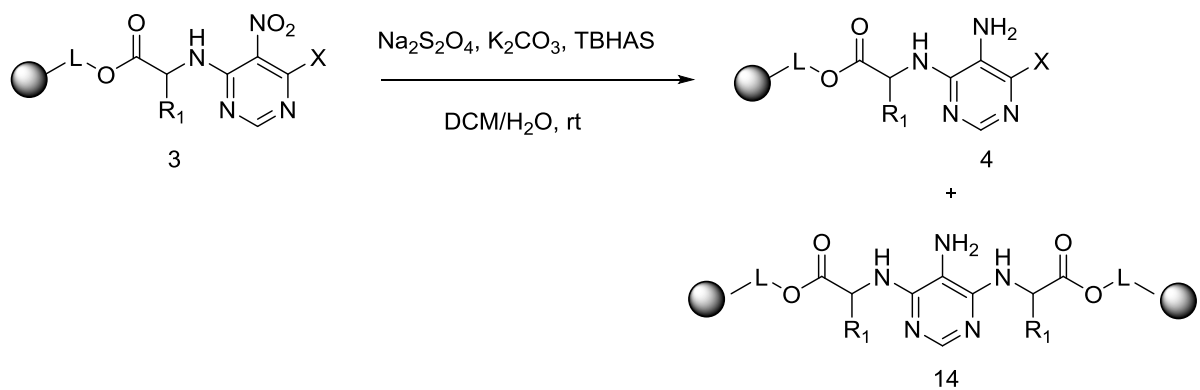


Schéma XXIII: Redukce nitro skupiny

4.1.5. Odštěpení z pryskyřice, cyklizace a purifikace

Posledním krokem bylo odštěpení získaných meziproduktů **4** z pryskyřice a současně uzavírání pteridinového cyklu. K rozštěpení esterové vazby a následné cyklizaci za eliminace vody byl použit 50 % roztok TFA v DCM. Uzavření cyklu bylo nejprve testováno za laboratorní teploty, kdy byly po 22 hodinách na LC-MS záznamu detekovány produkt (55 %) a výchozí látka (20 %). Pro doreagování výchozí látky bylo zapotřebí prodloužit reakční dobu na 4 dny. Za účelem urychlení cyklizace byla zvýšena reakční teplota na 60 °C. Za těchto podmínek byla cyklizace kompletní již během jedné hodiny. Po cyklizaci byl roztok TFA/DCM odfoukán proudem N_2 , vysušený odparek byl rozpuštěn v MeOH, přefiltrován a přečištěn na semipreparativním HPLC (Schéma XXIV).

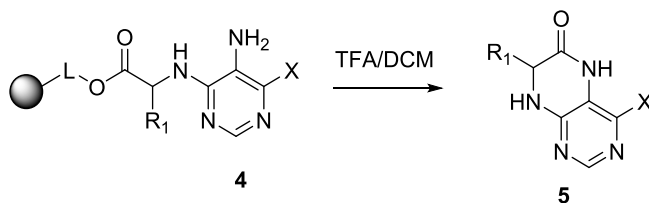


Schéma XXIV: Uzavírání pteridinového cyklu.

Uzavírání diazepinového kruhu

Vedle 6-ti členného kruhu bylo studováno i uzavírání 7-členného kruhu. Syntéza meziproduktu **12** probíhala za stejných reakčních podmínek jako u meziproduktů **4** (Schéma XXV). V posledním cyklizačním kroku se však výše zmíněné reakční podmínky neosvědčily a výchozí látka zůstala zcela nezreagována. Byly proto zvoleny drsnější reakční podmínky a to reflux v TFA. Sloučenina **12** byla odštěpena z pryskyřice, poté byl štěpící koktejl odpařen proudem N_2 , odparek rozpuštěn a refluxován v TFA. Bohužel ani po 2 hodinách nedošlo k žádané cyklizaci. Další volbou byla kyselina sírová. Reakce byla provedena při 80°C. Po hodinovém záhřevu následovalo zředění kyseliny vodou a

neutralizace pomocí NaOH. Následovala extrakce cyklické formy produktu do EtAc a po odpaření EtAc na vakuové odparce byl odparek sonifikován v diethyletheru a nakonec zfiltrován.

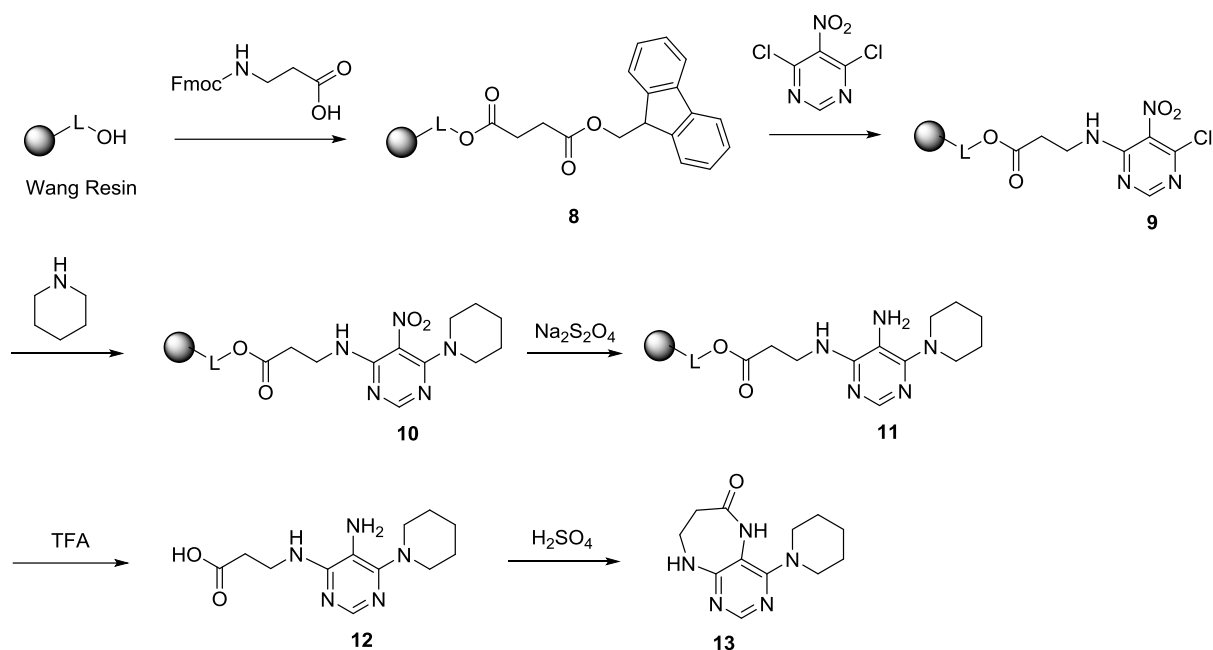
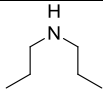
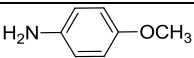
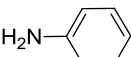
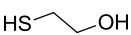
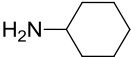


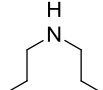
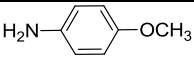
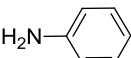
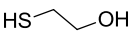
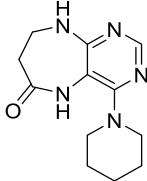


Schéma XXV: Syntéza 4-(piperidin-1-yl)-5,7,8,9-tetrahydro-6H-pyrimido[4,5-b][1,4]diazepin-6-onu.

4.2. Připravené látky

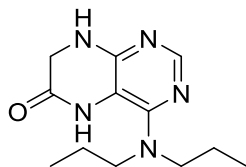
Podářilo se připravit 12 lerek (Tab. I), které byly charakterizovány pomocí LC-MS a ^1H a ^{13}C NMR analýz.

kód larky	R ₁	X	surov čistota	čistota po peisten	vtezek
5(1,1)	H		63 %	99 %	24 %
5(1,5)	H		54 %	99 %	16 %
5(1,4)	H		61 %	95 %	26 %
5(1,6)	H		64 %	96 %	53 %
5(1,3)	H		33 %	98 %	4 %
5(1,2)	H		68 %	98 %	17 %
5(2,2)	CH ₃		85 %	95 %	12 %
5(2,1)	CH ₃		71 %	99 %	56 %
5(2,5)	CH ₃		67 %	99 %	3 %
5(2,4)	CH ₃		32 %	99 %	3 %
5(2,6)	CH ₃		80 %	98 %	34 %
13			89 %	98 %	25 %

Tabulka I

4.3. Analytická data

4-(Dipropylamino)-7,8-dihydropteridin-6(5H)-on



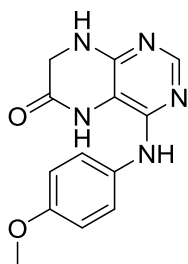
Výtěžek 8,4 mg (24 %). Čistota surového produktu 63 %.

HPLC-MS $m/z = 250$, $[M+H]^+$

$^1\text{H NMR}$ (DMSO- d_6) δ : 9.46 (br. s., 1H), 7.82 (s, 1H), 7.18 (br. s., 1H), 3.80 (s, 2H), 3.24 (t, $J = 7.1$ Hz, 4H), 1.44 (sxt, $J = 7.1$ Hz, 4H), 0.79 (t, $J = 7.3$ Hz, 6H)

$^{13}\text{C NMR}$ (DMSO- d_6) δ : 164.0, 153.0, 151.8, 151.2, 104.1, 50.5, 45.2, 20.5, 11.4

4-[(4-Methoxyfenyl)amino]-7,8-dihydropteridin-6(5H)-on



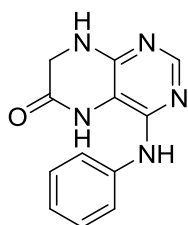
Výtěžek 5,5 mg (16 %). Čistota surového produktu 54 %.

HPLC-MS $m/z = 272$, $[M+H]^+$

$^1\text{H NMR}$ (DMSO- d_6) δ : 9.92 (s, 1H), 8.16 (s, 1H), 7.80 (s, 1H), 7.44 - 7.49 (m, $J = 9.2$ Hz, 2H), 7.10 (s, 1H), 6.85 - 6.90 (m, $J = 9.2$ Hz, 2H), 3.95 (s, 2H), 3.72 (s, 3H)

$^{13}\text{C NMR}$ (DMSO- d_6) δ : 164.5, 154.9, 151.5, 150.5, 146.0, 133.6, 122.2, 114.1, 100.1, 55.5, 45.5

4-(Fenylamino)-7,8-dihydropteridin-6(5H)-on



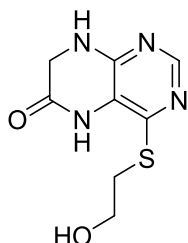
Výtěžek 8,1 mg (26 %). Čistota surového produktu 61 %.

HPLC-MS $m/z = 242$, $[M+H]^+$

^1H NMR (DMSO-*d*₆) δ : 10.03 (br. s., 1H), 8.32 (s, 1H), 7.86 (s, 1H), 7.60 (d, $J = 7.8$ Hz, 1H), 7.27 (t, $J = 7.9$ Hz, 2H), 7.20 (s, 1H), 6.95 (t, $J = 7.3$ Hz, 1H), 3.93 - 3.98 (m, 2H)

^{13}C NMR (DMSO-*d*₆) δ : 164.0, 150.9, 150.2, 144.9, 140.2, 128.3, 121.5, 119.5, 100.2, 44.9

4-[(2-Hydroxyethyl)sulfanyl]-7,8-dihydropteridin-6(5*H*)-on



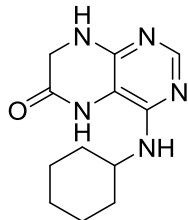
Výtěžek 15,5 mg (53 %). Čistota surového produktu 64 %.

HPLC-MS $m/z = 227$, $[\text{M}+\text{H}]^+$

^1H NMR (DMSO-*d*₆) δ : 8.00 (s, 1H), 7.64 (br. s., 1H), 3.97 (s, 2H), 3.55 (t, $J = 6.6$ Hz, 2H), 3.24 (t, $J = 6.6$ Hz, 2H)

^{13}C NMR (DMSO-*d*₆) δ : 164.1, 151.4, 149.9, 147.0, 114.7, 60.4, 45.1, 31.7

4-(Cyclohexylamino)-7,8-dihydropteridin-6(5*H*)-on



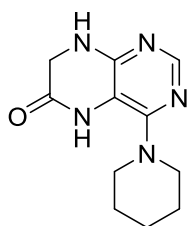
Výtěžek 1,4 (4 %). Čistota surového produktu 33 %.

HPLC-MS $m/z = 248$, $[\text{M}+\text{H}]^+$

^1H NMR (DMSO-*d*₆) δ : 9.70 (br.s., 1H), 7.68 (s, 1H), 6.74 (br. s., 1H), 6.10 (d, $J = 7.4$ Hz, 1H), 3.82 (s, 2H), 3.80 (m, $J = 3.4$ Hz, 1H), 1.85 (dq, $J_1 = 11.2$ Hz, $J_2 = 2.8$ Hz, 2H), 1.67 (dq, $J_1 = 12.7$ Hz, $J_2 = 3.4$ Hz, 2H), 1.54 (dt, $J_1 = 12.7$ Hz, $J_2 = 3.4$ Hz, 1H), 1.26 (qd, $J_1 = 12.7$ Hz, $J_2 = 3.4$ Hz, 2H), 1.12 (qd, $J_1 = 11.2$ Hz, $J_2 = 2.8$ Hz, 2H), 1.12 (m, 1H)

^{13}C NMR (DMSO-*d*₆) δ : 169.03, 164.70, 152.14, 150.46, 149.85, 148.26, 143.26, 99.21, 49.31, 45.77, 33.41, 25.90, 25.20

4-(Piperidin-1-yl)-7,8-dihydropteridin-6(5H)-on



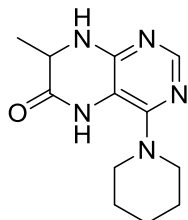
Výtěžek 5,8 mg (17 %). Čistota surového produktu 68 %.

HPLC-MS $m/z = 234$, $[M+H]^+$

$^1\text{H NMR}$ (DMSO- d_6) δ : 9.47 (br. s., 1H), 7.81 - 7.88 (m, 1H), 7.25 (br. s., 1H), 3.82 (br. s., 2H), 3.18 (br. s., 3H), 1.48 - 1.68 (m, 5H)

$^{13}\text{C NMR}$ (DMSO- d_6) δ : 163.8, 152.7, 152.6, 151.3, 104.5, 48.3, 45.3, 25.0, 24.1

7-Methyl-4-(piperidin-1-yl)-7,8-dihydropteridin-6(5H)-on



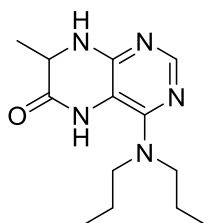
Výtěžek 3,8 mg (12 %). Čistota surového produktu 85 %.

HPLC-MS $m/z = 248$, $[M+H]^+$

$^1\text{H NMR}$ (DMSO- d_6) δ : 9.50 (br. s., 1H), 7.87 (s, 1H), 7.37 (br. s., 1H), 3.86 - 3.94 (m, 1H), 3.14 - 3.27 (m, 4H), 1.50 - 1.68 (m, 6H), 1.25 (d, $J = 6.9$ Hz, 3H)

$^{13}\text{C NMR}$ (DMSO- d_6) δ : 166.8, 153.0, 151.9, 104.9, 50.8, 48.6, 25.5, 24.7, 17.5

4-(Dipropylamino)-7-methyl-7,8-dihydropteridin-6(5H)-on

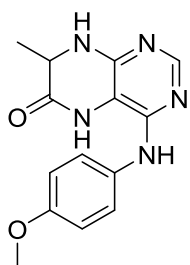


Výtěžek 4,3 mg (56 %). Čistota surového produktu 72 %.

HPLC-MS $m/z = 264$, $[M+H]^+$

$^1\text{H NMR}$ (DMSO- d_6) δ : 9.49 (br. s., 1H), 7.84 (s, 1H), 7.28 (s, 1H), 3.86 (q, $J = 6.7$ Hz, 1H), 3.28 (td, $J = 7.0, 3.7$ Hz, 4H), 1.44 (sxt, $J = 7.2$ Hz, 4H), 1.24 (d, $J = 6.3$ Hz, 3H), 0.78 (t, $J = 7.4$ Hz, 6H)

4-[(4-Methoxyfenyl)amino]-7-methyl-7,8-dihydropteridin-6(5H)-on



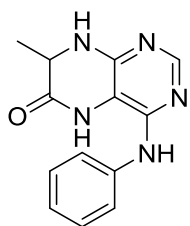
Výtěžek 0,9 mg (3 %). Čistota surového produktu 67 %.

HPLC-MS $m/z = 286$, $[M+H]^+$

$^1\text{H NMR}$ (DMSO- d_6) δ : 9.90 (br. s., 1H), 8.18 (s, 1H), 7.83 (s, 1H), 7.44 - 7.51 (m, $J = 8.9$ Hz, 2H), 7.23 (s, 1H), 6.84 - 6.91 (m, $J = 8.9$ Hz, 2H), 4.06 (q, $J = 6.8$ Hz, 1H), 3.72 (s, 3H), 1.32 (d, $J = 6.6$ Hz, 3H)

$^{13}\text{C NMR}$ (DMSO- d_6) δ : 167.4, 155.1, 151.8, 150.5, 146.1, 133.8, 122.4, 114.3, 100.5, 55.7, 50.9, 19.0

7-Methyl-4-(fenylamino)-7,8-dihydropteridin-6(5H)-on

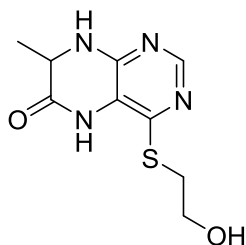


Výtěžek 0,9 mg (3 %). Čistota surového produktu 32 %.

HPLC-MS $m/z = 257$, $[M+H]^+$

$^1\text{H NMR}$ (DMSO- d_6) δ : 8.54 (br. s., 1H), 7.86 - 7.90 (m, 1H), 7.63 (d, $J = 8.2$ Hz, 1H), 7.23 - 7.32 (m, 2H), 6.90 - 6.99 (m, 1H), 4.07 (q, $J = 6.9$ Hz, 1H), 1.32 (d, $J = 6.4$ Hz, 2H)

4-[(2-Hydroxyethyl)sulfanyl]-7-methyl-7,8-dihydropteridin-6(5H)-on



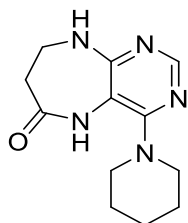
Výtěžek 10,2 mg (34 %). Čistota surového produktu 80 %.

HPLC-MS $m/z = 257$, $[M+H]^+$

^1H NMR (DMSO-*d*6) δ : 8.04 (s, 1H), 7.77 (s, 1H), 5.00 (t, $J = 4.6$ Hz, 1H), 4.04 - 4.14 (m, 1H), 3.52 - 3.59 (m, 2H), 3.18 - 3.29 (m, 2H), 1.31 (d, $J = 6.9$ Hz, 2H)

^{13}C NMR (DMSO-*d*6) δ : 166.9, 151.5, 149.7, 147.1, 114.8, 60.3, 50.5, 31.6, 18.6

4-(Piperidin-1-yl)-5,7,8,9-tetrahydro-6H-pyrimido[4,5-*b*][1,4]diazepin-6-on



Výtěžek 9,3 mg (25 %). Čistota surového produktu 89 %.

HPLC-MS $m/z = 248$, $[\text{M}+\text{H}]^+$

^1H NMR (DMSO-*d*6) δ : 8.14 (s, 1H), 7.87 (s, 1H), 7.06 (br. s., 1H), 4.10 (br. s., 3H), 3.54 (d, $J = 4.0$ Hz, 2H), 2.54 - 2.58 (m, 2H), 1.53 - 1.62 (m, 6H)

^{13}C NMR (DMSO-*d*6) δ : 172.3, 159.6, 156.2, 153.4, 102.9, 49.2, 49.1, 43.2, 36.2, 25.8, 24.7

5. Závěr

Bakalářská práce byla zaměřena na syntézu 5,8-dihydropteridinonů a 6-methyl-5,8-dihydropteridinonů substituovaných v poloze C4. Série derivátů byla připravena metodou syntézy na pevné fázi. Klíčovou sloučeninou této syntetické cesty byl 4,6-dichloro-5-nitropyrimidin, který díky svému uspořádání může být vhodně modifikován za vzniku prekursoru připraveného na uzavírání pteridinového cyklu. Použitá reakční sekvence již byla popsána Boonem v roztokové syntéze,²⁶ v této práci byla aplikována na syntézu na pevné fázi.

Během této práce bylo připraveno 12 derivátů, které byly charakterizovány pomocí LC-MS a NMR analýz a budou zaslány na biologické testování.

Vedle zmíněných pteridinových heterocyklů byla ověřena i aplikovatelnost této metody pro přípravu sloučenin obsahující 8,9-dihydro-5*H*-pyrimido[4,5-*b*][1,4]diazepin-6(7*H*)-onový skelet. Sloučeniny tohoto typu s volnou NH skupinou v poloze 9 dosud nebyly popsány. Do této chvíle byl připraven jeden derivát obsahující tento cyklus, série těchto látek bude v budoucnu rozšířena.

6. Seznam použitých zkratek

Ala	alanin
BH ₄	tetrahydrobiopterin
DCM	dichlormethan
DIC	N,N'-diisopropylcarbodiimid
DIEA	N,N-diisopropylethylamin
DMAP	4-(dimethylamino)pyridin
DMF	dimethylformamid
DMSO	dimethylsulfoxid
DNA	deoxyribonukleová kyselina
EtAc	ethylacetát
FAD	flavin adenin dinukleotid
FMN	flavin mononukleotid
Fmoc	fluorenylmethyloxycarbonyl chlorid
Gly	glycin
HOBt	hydroxybenzotriazol
HPLC	vysokoučinná kapalinová chromatografie
LC-MS	kapalinová chromatografie-hmotnostní spektrometrie
MeOH	methanol
MS	hmotnostní spektrometrie
NMR	nukleární magnetická rezonance
TBAHS	hydrogensulfát tetrabutylamonný
TFA	kyselina trifluoroctová
UV	ultrafialové záření

7. Literatura

1. Zhang, F.-L. *The Ene Reactions of Aminonitrosopyrimidines. A Novel Synthesis of Pterins, Homopterins and Related Heterocycles*. dissertation, **2008**.
2. Basu, P.; Burgmayer, S. J. N. *Coord. Chem. Rev.* **2011**, *255* (9-10), 1016-1038.
3. Waller, C. W.; Hutchings, B. L.; Mowat, J. H.; Stokstad, E. L. R.; Boothe, J. H.; Angier, R. B.; Semb, J.; SubbaRow, Y.; Cosulich, D. B.; Fahrenbach, M. J.; Hultquist, M. E.; Kuh, E.; Northey, E. H.; Seeger, D. R.; Sickels, J. P.; Smith, J. M., Jr. *J. Am. Chem. Soc.* **1948**, *70*, 19-22.
4. Powers, H. J. *Am. J. Clin. Nutr.* **2003**, *77* (6), 1352-1360.
5. Sandor, P. S.; Afra, J.; Ambrosini, A.; Schoenen, J. *Headache* **2000**, *40* (1), 30-35.
6. Solheim, B. G.; Seghatchian, J. *Transfus. Apher. Sci.* **2006**, *35* (1), 83-90.
7. Longo, N. J. *Inherit. Metab. Dis.* **2009**, *32* (3), 333-342.
8. Alp, N. J.; Channon, K. M. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Bio.* **2004**, *24* (3), 413-420.
9. Frye, R. E.; Huffman, L. C.; Elliott, G. R. *Neurotherapeutics* **2010**, *7* (3), 241-249.
10. Slusarczyk, M.; De Borggraeve, W. M.; Toppet, S.; Hoornaert, G. J. *European J. Org. Chem.* **2007**, (18), 2987-2994.
11. Nzila, A. *Drug Discovery Today* **2006**, *11* (19 & 20), 939-944.
12. Guirado, A.; Lopez Sanchez, J. I.; Ruiz-Alcaraz, A. J.; Garcia-Penarrubia, P.; Bautista, D.; Galvez, J. *Eur. J. Med. Chem.* **2013**, *66*, 269-275.
13. Isay, O. *Ber. Dt. Chem. Ges.* **1906**, *39*, 250.
14. Abdel-Hady, S. A. L.; Badawy, M. A.; Mosselhi, M. A. N.; Ibrahim, Y. A. J. *Heterocycl. Chem.* **1985**, *22* (3), 801-803.
15. Ding, Y.; Girardet, J. L.; Smith, K. L.; Larson, G.; Prigaro, B.; Lai, V. C. H.; Zhong, W.; Wu, J. Z. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2005**, *15* (3), 675-678.
16. Dunn, C.; Gibson, C. L.; Suckling, C. J. *Tetrahedron* **1996**, *52* (40), 13017-13026.
17. Spickett, R. G. W.; Timmis, G. M. *J. Chem. Soc.* **1954**, 2887-2895.
18. Osdene, T. S.; Russell, P. B.; Rane, L. *J. Med. Chem.* **1967**, *10* (3), 431-434.

19. Giori, P.; Poli, T.; Veronese, A. C.; Vicentini, C. B.; Manfrini, M.; Guarneri, M. *J. Heterocycl. Chem.* **1986**, *23* (6), 1661-1665.
20. Xu, M.; Vasella, A. *Helv. Chim. Acta* **2006**, *89* (6), 1140-1146.
21. Babulreddy, A.; Narayanaswamy, G. *J. Pharm. Res.* **2012**, *5* (4), 1841-1845, 5.
22. Nagashima, T.; Zhang, W. *J. Comb. Chem.* **2004**, *6* (6), 942-949.
23. Urleb, U.; Neidlein, R.; Kramer, W. *J. Heterocycl. Chem.* **1990**, *27* (2), 433-437.
24. Baxter, A. D.; Boyd, E. A.; Cox, P. B.; Loh, V., Jr.; Monteils, C.; Proud, A. *Tetrahedron Lett.* **2000**, *41* (42), 8177-8181.
25. Metzger, A.; Qin, L. Y.; Cole, A. G.; Saionz, K. W.; Brescia, M. R.; Gstach, H.; Wareing, J. R.; Zimmermann, J.; Brill, W. K. D.; Baldwin, J. J.; Dolle, R. E.; Henderson, I. *Tetrahedron Lett.* **2009**, *50* (50), 7082-7085.
26. Boon, W. R.; Jones, W. G. M.; Ramage, G. R. *J. Chem. Soc.* **1951**, 96-102.