

UNIVERZITA PALACKÉHO V OLOMOUCI
PŘÍRODOVĚDECKÁ FAKULTA
KATEDRA ORGANICKÉ CHEMIE



SOLID-PHASE SYNTÉZA DERIVÁTŮ 2H-INDAZOLŮ JAKO
BIOLOGICKY VÝZNAMNÝCH SLOUČENIN

Bakalářská práce

Autor:	Monika Tomanová
Studijní program:	Chemie
Studijní obor:	Bioorganická chemie
Typ studia:	Prezenční
Vedoucí práce:	Mgr. Naděžda Cankařová, Ph.D.
Termín odevzdání práce:	7. 5. 2013

Poděkování:

Na tomto místě bych ráda poděkovala vedoucí mé bakalářské práce Mgr. Naděždě Cankařové, Ph.D. za odborné vedení, obětavou pomoc, cenné rady, připomínky a informace. Také bych jí ráda poděkovala za zprostředkování odborné zahraniční stáže v Indiana University-Purdue University Indianapolis, USA.

Já, Monika Tomanová, prohlašuji, že jsem tuto bakalářskou práci vypracovala samostatně pod odborným dohledem Mgr. Naděždy Cankařové, Ph.D. Veškerou použitou literaturu jsem uvedla na konci práce.

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

V Olomouci dne 7. 5. 2013

.....
Monika Tomanová

Bibliografická identifikace:

Jméno a příjmení autora: Monika Tomanová

Název práce: Solid-phase syntéza derivátů 2*H*-indazolů jako biologicky významných sloučenin

Typ práce: Bakalářská

Pracoviště: Katedra organické chemie, Přírodovědecká fakulta Univerzity Palackého v Olomouci

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

Rok obhajoby práce: 2013

Abstrakt

Bakalářská práce je zaměřena na syntézu derivátů 2*H*-indazolů se třemi diverzními místy na polymerním nosiči. Práce je rozdělena do několika kapitol. První část je teoreticky věnovaná různým syntézám vedoucím k derivátům 2*H*-indazolů a rovněž se zde pojednává o jejich význačné biologické aktivitě. Diskuze je zaměřena na samotnou syntézu derivátů 2*H*-indazolů na pevné fázi a jsou zde vyhodnoceny jednotlivé experimenty. V experimentální části práce jsou detailně popsány postupy příprav jednotlivých 2*H*-indazolů a produkty charakterizovány. Přílohou této práce je referát ze stáže z Indiana University-Purdue University Indianapolis (IUPUI).

Klíčová slova: 2*H*-indazol, peptidomimetikum, solid-phase syntéza

Počet stran: 70

Jazyk: Čeština

Bibliographical identification:

Autor's first name and Surname: Monika Tomanová

Title: Solid-Phase Synthesis of *2H*-Indazoles Derivatives as Biological Significant Coumpounds

Type of thesis: Bachelor

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

Supervisor: Mgr. Naděžda Cankařová, Ph.D.

The year of presentation: 2013

Abstract

The Bachelor thesis is focused on the synthesis of *2H*-indazole derivatives with three diversity positions on solid support. The work is devided into several chapters. The first part describes various reported syntheses leading to *2H*-indazole derivatives. In this part significant biological activity of these heterocycles is also mentioned. Discussion is focused on the synthesis of *2H*-indazole derivatives on solid phase and individual experiments are evaluated here. In the Experimental section methods for preparation of *2H*-indazole derivatives are described in detail and the products characterized. In this thesis Report from internship at Indiana University-Purdue University Indianapolis (IUPUI) is attached.

Keywords: *2H*-indazole, peptidomimetic, solid-phase synthesis

Number of pages: 70

Language: Czech

Obsah

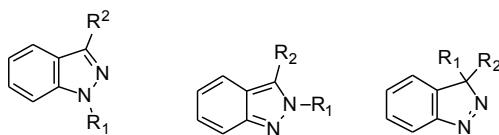
1. Úvod.....	8
2. Cíl bakalářské práce	9
3. Metody přípravy derivátů 2H-indazolů.....	10
3.1. Metody příprav N-substituovaných 2H- indazolů	10
3.1.1. Syntéza vycházející z 2-nitrobenzaldehydu	10
3.1.2. Syntéza derivátů 2H-indazolů z 2-nitrobenzylaminu	13
3.1.3. Příprava 2H-indazolů z 2-nitrobenzamidů	16
3.1.4. Příprava 2H-indazolů z 2-bromobenzaldehydu.....	17
3.1.5. Příprava 2H-indazolů z Baylis-Hillmanových aduktů	19
3.1.6. Syntéza 2H-indazolů z derivátů kyseliny anthranilové	19
3.1.7. Syntéza 2H-indazolů [3+2] dipolární cykloadicí sydnonů a arynů	20
3.1.8. Syntéza 2-aryl-2H-indazolů z 1-chloromethyl-2-jodobenzenu	21
3.2. Alkylace 1H-indazolů	22
4. Syntéza na pevné fázi.....	24
5. Biologická aktivita.....	26
5.1. Antiangiogenní aktivita 2H-indazolů	26
5.2. 2H-indazoly jako PARP inhibitory	27
5.3. 2H-indazoly 1-oxidy jako látky s antiparazitickou aktivitou.....	28
5.4. 2H-indazoly jako vysoce selektivní ligandy pro Estrogenní receptor β.....	29
6. Peptidomimetika	31
7. Výsledky a diskuze	33
7.1. Celkový postup přípravy 2H-indazolů 1-oxidů.....	34
7.2. Příprava derivátů 2H-indazolů 1-oxidů.....	35
7.2.1. Odštěpení Fmoc protektivní skupin z Rinkovy pryskyřice	35
7.2.2. Acylační reakce	35
7.2.3. Kvalitativní a kvantitativní zjišťování průběhu reakce	36
7.2.4. Reakce vedoucí k sulfonamidům, alkylace a cyklizace na finální indazoly	36
7.2.5. Mechanismus cyklizace.....	37
7.2.6. Příprava dalších derivátů 2H-indazolů 1-oxidů.....	39
7.3. Příprava 2H-indazolu s peptidomimetikem	42

7.3.1.	Reakce Rinkovy pryskyřice s bromoctovou kyselinou a následně s aminoacetaldehydem dimethylacetalem	43
7.3.2.	Acylační reakce	43
7.3.3.	Reakce vedoucí ke vzniku 2 <i>H</i> -indazolu	46
7.4.	Snaha o přípravu dalších derivátů 2<i>H</i>-indazolů s peptidomimetikem	50
7.4.1.	Mitsunobu reakce	51
8.	Experimentální část	54
8.1.	Použité přístroje a metody	54
9.	Závěr	63
10.	Seznam literatury	64
12.	Seznam zkratk	68
13.	Přílohy	70

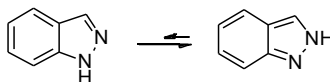
1. Úvod

Indazoly se v posledních letech staly středem zájmu mnoha biologických studií. Ukázaly se jako látky s protizánětlivými,¹ antimikrobiálními,² protinádorovými,³ antimykotickými,⁴ antiangiogenními⁵ a cytotoxickými účinky.⁶ Jsou také například potenciálními inhibitory syntézy oxidu dusnatého,⁷⁻⁹ proteinkinázy,^{10,11} tubulinu¹² a TRPV1.^{13,14}

Indazol je heterocyklická sloučenina, skládající se z benzenového a pyrazolového jádra. Systematický název podle IUPAC je benzo[*c*]pyrazol, ale běžně se používá název triviální. Indazol tvoří tři tautomery *1H*, *2H* a *3H*-indazol (Obrázek 1).^{15,16}



Obrázek 1



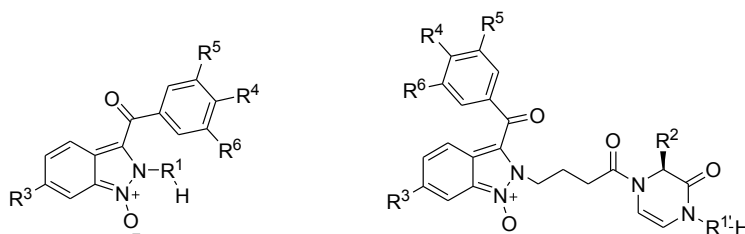
Obrázek 2

1H-indazol je energeticky nejstabilnější, proto je rovnováha obou tautomerů více posunutá vlevo (Obrázek 2), ale energetický rozdíl není až tak vysoký. Nejvyšší stabilita *1H*-indazolu je zřejmě i důvodem, proč jsou právě tyto tautomery nejvíce prozkoumané. Chemie *2H*-indazolů není prozkoumaná do takové míry jako *1H*-indazoly a deriváty *3H*-indazolů nejsou běžné.

V této bakalářské práci se budu věnovat derivátům *2H*-indazolů. Práce je členěna do třinácti kapitol. Rešerše pojednává o metodách příprav derivátů *2H*-indazolů a o jejich biologické aktivitě. Následují krátké kapitoly o peptidomimetikách a o úvodu k syntéze na pevné fázi. Diskuze se zaměřuje na syntézu *2H*-indazolů, jednotlivé experimenty jsou zde popsány a vyhodnoceny. V experimentální části jsou detailní postupy a charakterizace těchto látek. V závěru je shrnutí celé bakalářské práce. Součástí je také seznam literatury a zkratk. Přílohou této práce je referát ze stáže z Indiana University-Purdue University Indianapolis (IUPUI).

2. Cíl bakalářské práce

Cílem bakalářské práce byla syntéza derivátů *2H*-indazolů 1-oxidů na polymerním nosiči. Práce byla zaměřena především na kombinaci stavebních bloků vedoucí k syntéze nových derivátů *2H*-indazolů 1-oxidů. Druhá část bakalářské práce byla soustředěna na syntézu derivátů *2H*-indazolů s peptidomimetikem. Peptidomimetikum bylo navázáno na dusík postranního řetězce R¹ *2H*-indazol 1-oxidu (Obrázek 3). Pro přípravu těchto derivátů byly použity dvě strategie – reakce s bromoctovou kyselinou a Mitsunobu reakce, která otevřela možnost začlenění substituentů různého typu do stavebního bloku R¹ na peptidomimetiku, a tím zvýšení počtu diverzních míst.



Obrázek 3

převědena na β -aminonitrilový derivát **III**. Ke vzniku indazolu dojde buď spontánně, nebo působením HCO_3^- či Et_3N . Vznikne $2H$ -indazol 1-oxid **IV** (Schéma 2). Kyslík na dusíku může být odstraněn působením PPh_3 v ethanolu. Výtěžky této reakce byly od 15 do 75%.¹⁶

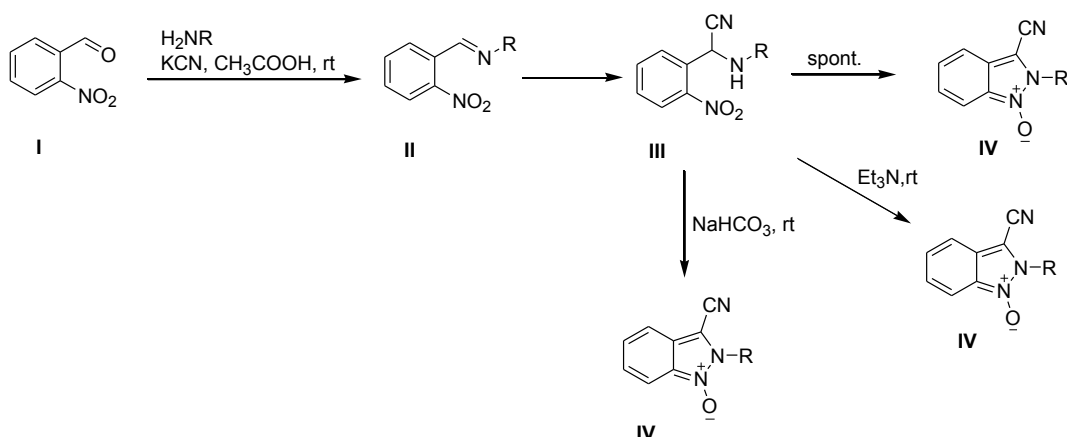
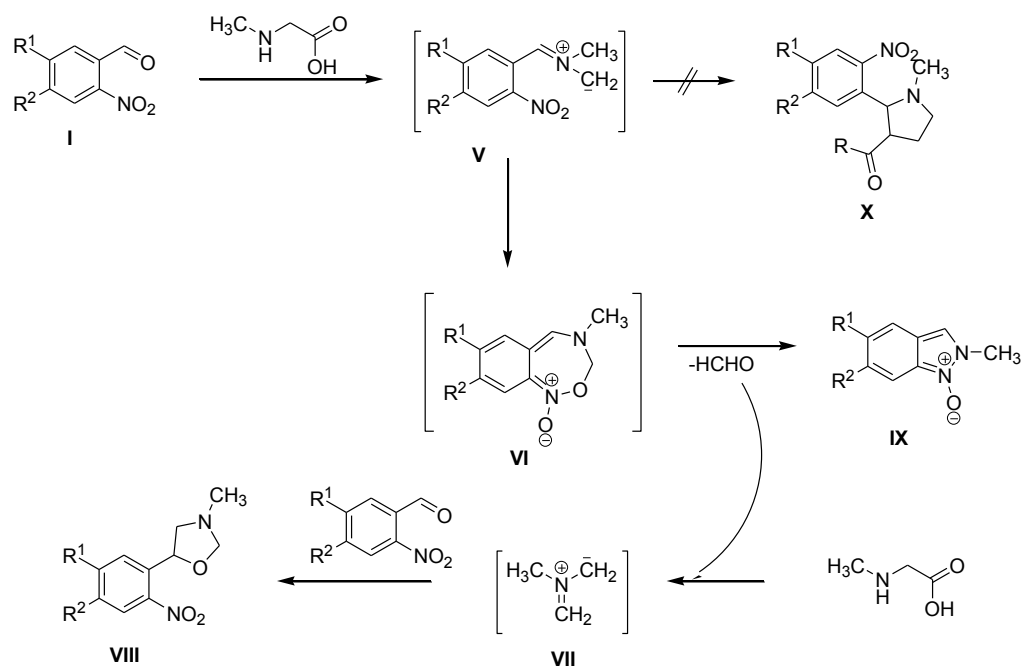


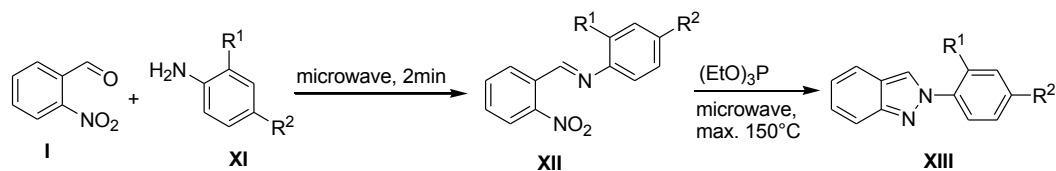
Schéma 2

Další syntéza vedoucí k $2H$ -indazolům 1-oxidům vychází také z 2-nitrobenzaldehydu **I** a probíhá přes 1,7-elektrocyklizaci azomethin ylidů. Nyerges²¹ a kolektiv při zkoumání reaktivity nestabilního azomethin ylidu izolovali po chromatografické separaci $2H$ -indazol 1-oxid **IX** a oxazolidin **VIII**. Nestabilní azomethin ylid **V** vzniká reakcí 2-nitrobenzaldehydu **I** s *N*-methylglycinem v benzenu nebo toulenu pod refluxem 2-8 hodin. Azomethin ylid **V** byl podroben 1,7-elektrocyklizaci za vzniku benz-1,2,6-oxadiazepinového intermediátu **VI**, ze kterého po eliminaci formaldehydu vzniká 2-methyl- $2H$ -indazol 1-oxid **IX**. Formaldehyd je dále schopen reagovat s *N*-methylglycinem za vzniku azomethin ylidu **V**, který může reagovat s dalším 2-nitrobenzaldehydem za vzniku 3-methyl-5-aryl-oxazolidinu **VIII** jako druhého produktu (Schéma 3). Jestliže R^1 , R^2 substituenty byly vodíky, výtěžek byl 40%, nahrazením těchto vodíků methoxyskupinou výtěžek klesl na 34%, pokud R^1 byl brom a R^2 vodík, výtěžek činil 37%.



Následující syntéza 2*H*-indazolů z 2-nitrobenzaldehydu **I** vychází z práce Cadogana a spolupracovníků z roku 1962.²² Syntéza byla navržena za účelem energetického zefektivnění syntézy v duchu tzv. zelené chemie.

V prvním kroku reakce dochází ke vzniku Schiffovy báze **XII**, pro tento krok bylo vyvinuto několik strategií. Prvním efektivním postupem byla syntéza za působení mikrovlnného záření a druhá výhodná metoda byla dvoufázová metoda na vodní fázi. Strategie založená na vodní fázi probíhá tak, že se do velkého množství vody pomalu přidávají reaktanty, nastává exotermická reakce a po chvíli se začne krystalizovat Schiffova báze ve velmi čisté formě. Výsledný indazol **XIII** byl připraven působením triethyl fosfátu za působení mikrovlnného záření (Schéma 4).



Celá reakce byla dále modifikovaná na „one-pot“ reakci. Směs všech reaktantů v ekvivalentním množství byla podrobena působení mikrovlnného záření. Bylo

vypozorováno, že v první fázi reakce vzniká Schiffova báze **XII** a ve druhé fázi dojde ke vzniku 2*H*-indazolu **XIII**.²³

3.1.2. Syntéza derivátů 2*H*-indazolů z 2-nitrobenzylaminu

3.1.2.1. Kysele a bazicky katalyzovaná Davis-Beirutova reakce

Příprava 3-alkoxy-2*H*-indazolů z 2-nitrobenzylaminu či 2-nitrosobenzylaminu byla publikovaná v roce 2005.²⁴ Autoři odkazovali na práci jiných skupin autorů,^{25, 26} které se snažily o přípravu 2,1-benzisoxazolových derivátů z diethyl((benzylamino)(2-nitrofenyl)methyl)fosfonátu v prostředí alkoholického roztoku hydroxidu; domnívali se, že 2,1-benzisoxazolové deriváty takto připraví.

Tým autorů z Kalifornské univerzity a Americké Beirutské univerzity však na základě toho, že sekundární aminy jsou více nukleofilní než sekundární alkoholy, to znamená, že –NH skupina atakuje –N=O skupinu lépe než –OH skupina, připravili 2-benzyl-1*H*-indazol-3(2*H*)-on.

Davis-Beirutova reakce vyžaduje pouze bazické prostředí a relativně nízkou teplotu v alkoholickém roztoku. 2-Nitrobenzylamin **XVI** se připraví reakcí primárního aminu a 2-nitrobenzaldehydu **I** (Schéma 5) nebo 1-(bromomethyl)-2-nitrobenzenem **XV** (Schéma 6). Reakce benzylaminů s 1-(bromomethyl)-2-nitrobenzenem probíhala ve velmi dobrých výtěžcích, ale reakce arylaminů s 1-(bromomethyl)-2-nitrobenzenem poskytovala velmi nízké výtěžky, na rozdíl od reakce 2-nitrobenzaldehydu s arylaminy.²⁷

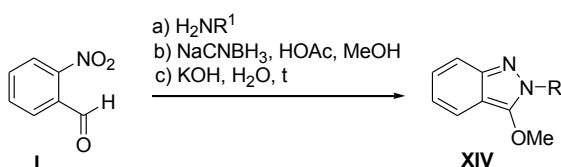


Schéma 5

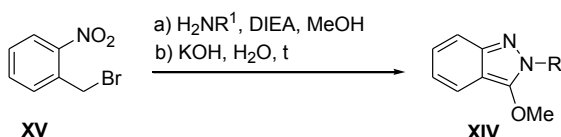


Schéma 6

Ve snaze o optimalizaci reakčních podmínek se ukázalo, že výtěžky vzrostly, pokud bylo použito určité procento vody. Pro reakci, ve které se použije methanol (MeOH), je nejlepší 10% vody, pro ethanol (EtOH) a propanol (PrOH) pak 20% vody. Jedná se tedy o

reakci 2-nitrobenzaldehydu, respektive 1-(bromomethyl)-2-nitrobenzenu zprostředkovanou alkoholem (používá se MeOH, EtOH, PrOH) a vodným roztokem hydroxidu.

Byl navržen mechanismus této reakce. 2-Nitrobenzylamin **XVI** za bazických podmínek poskytuje hemiaminální nitroso meziproduct **XIX** a následnou ztrátou vody vzniká důležitý meziproduct 2-nitrosobenzilidin **XX**. Dále následuje *N,N*-cyklizace, atak alkoxy skupiny a 1,4-eliminace vody. Toto probíhá buď v jednom kroku, nebo ve dvou krocích (Schéma 7).

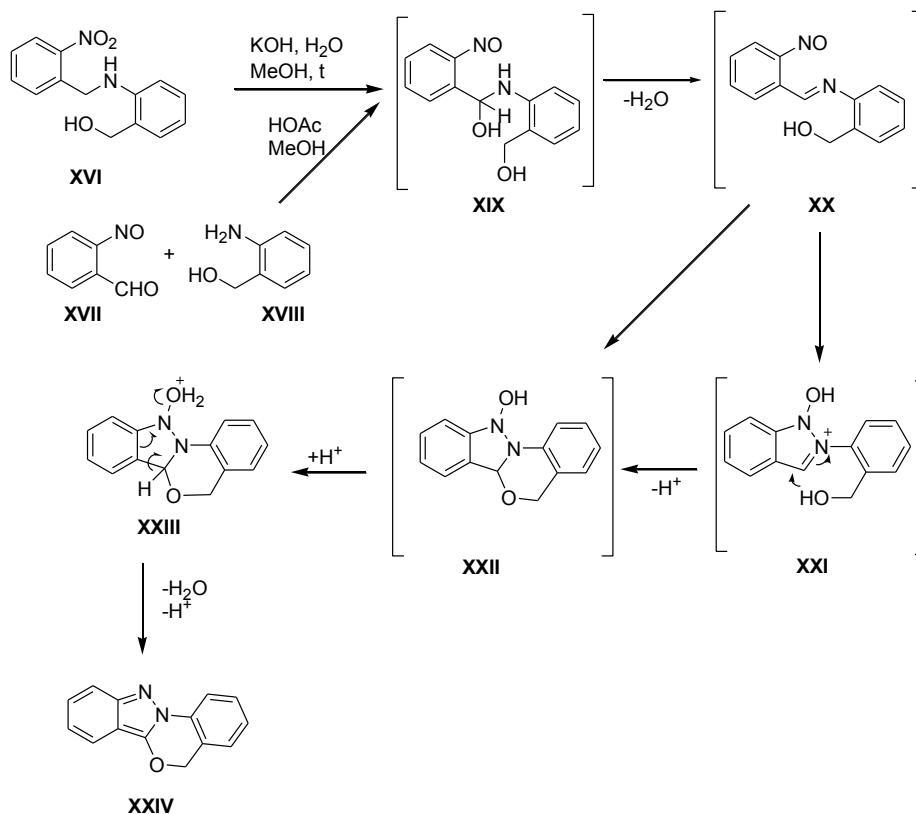


Schéma 7

Pro potvrzení tohoto mechanismu, byl 2-nitrobenzylalkohol **XVIII** podroben třem pokusům. V prvním pokuse bylo na 2-nitrobenzylalkohol **XVIII** působeno zářením a vznikl 2-nitrosobenzaldehyd, který za působení typických Davis-Beirut podmínek (KOH, MeOH, voda) za pokojové teploty selhal. Pokud se k roztoku methanolu přidala kyselina octová při pokojové teplotě, získali produkt v 85% výtěžku. Jedná se tedy o kyselé katalyzovanou Davis-Beirutovu reakci. Jestliže však 2-nitrosobenzaldehyd ve druhém pokusu nechali zreagovat pouze s kyselinou octovou (HOAc), byl výtěžek 50%. Třetí pokus znamenal působení zářením na systém 2-nitrobenzylalkohol/MeOH/HOAc, pro tento pokus byl výtěžek 10%, ale byl to velmi čistý proces, poskytující pouze produkt a nezreagované výchozí látky.²⁸

3.1.2.2. Další příprava 2*H*-indazolů z 2-nitrobenzylaminu

V roce 2012 byla publikována příprava 2*H*-indazolů **XXVI** reakcí 2-nitrobenzylaminu **XXV** s titanem v nízkém mocenství v přítomnosti báze Et₃N, která udržuje potřebné pH (Schéma 8). Tato metoda má výhodu v tom, že výchozí látky jsou dobře dostupné, probíhá v poměrně krátkém čase a ve vysokých výtěžcích s možností použití širokého rozsahu substituentů.

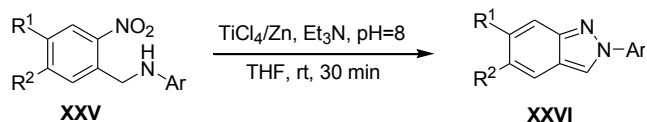


Schéma 8

Pro optimalizaci reakčních podmínek byla vyzkoušena řada kombinací, reakce TiCl₄/Zn bez přidané báze nedala žádný výsledek. Byla vyzkoušena řada kovů k redukci titanu, například Fe, Zn, Mg, Al – nejlepší kov se ukázal být Zn a pH, při kterém reakce probíhala s největším výtěžkem (83%), bylo 8.

2-Nitrobenzylamin byl substituován arylovými skupinami se substituenty, odebírajícími i dodávajícími elektrony do arylového systému, ve všech případech byly výtěžky vyšší než 70%.

Reakce chloridu titaničitého se zinkem poskytuje titan v nízkém oxidačním stavu, pravděpodobně je zredukován do oxidačního čísla III, existuje i titan s oxidačním číslem II, je velmi reaktivní a má silné redukční schopnosti. Článek pouze uvádí, že vznikají částice titanu v nízkém oxidačním stupni. TiCl₄ byl přidáván po kapkách do zinkového prášku v bezvodém tetrahydrofuranu (THF) za pokojové teploty pod dusíkovou atmosférou a pod refluxem. Titan totiž v nízkém oxidačním stupni II reaguje s vodou za vzniku vodíku.

Mechanismus reakce je založen na redukci nitrobenzylaminu **XXV** na nitrosobenzylamin **XXVII** pomocí titanu v nízkém oxidačním stupni. Nitroso skupina je atakována volným elektronovým párem amino skupiny, dojde ke vzniku N-N vazby, odštěpení protonu pomocí báze a po následné eliminaci vody dostaneme finální 2*H*-indazol **XXVI**²⁹ (Schéma 9).

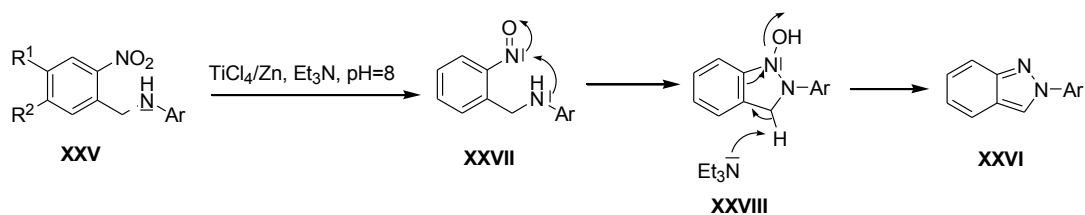


Schéma 9

3.1.3. Příprava 2H-indazolů z 2-nitrobenzamidů

V roce 2006 Sawant a kolektiv publikovali přípravu 5,6-dihydroindazolo[3,2-a]isochinolinů **XXXII**.³⁰ Jednalo se o cyklizaci nitroarenů zprostředkovanou chloridem cíničitým za vzniku N-N vazby. Snažili se zredukovat nitro skupinu 1-(2-nitrofenyl)-3,4-dihydroisochinolinu **XXX** za pomoci $\text{SnCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ a získali neobvyklý produkt ve 3% výtěžku. Jestliže byl k redukci použit katalyzátor Pd-C, dostali amin, ale ne vedlejší produkt. Výtěžek aminu pro katalyzátor Pd/C v MeOH byl 95% a při podmínkách $\text{SnCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, MeOH 85%, přičemž vznikl 2H-indazol ve výtěžku 3%.

Vznik toho vedlejšího produktu byl první příklad syntézy 2H-indazolů zprostředkované chloridem cíničitým za mírných podmínek (Schéma 10).

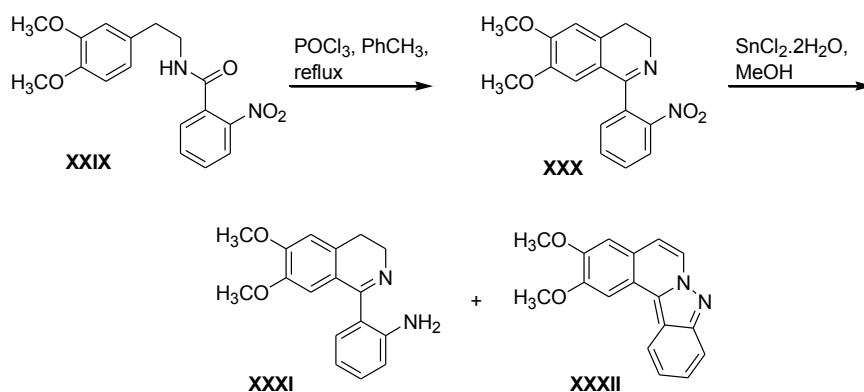


Schéma 10

Redukce nitro skupiny na amino skupinu probíhá přes nitroso a hydroxylaminové intermediáty. Redukcí za použití $\text{SnCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, PhSH a Et_3N byl získán 2H-indazol **XXXII** ve 29% výtěžku (metoda I), intermediát byl hydroxylamin a to v 71% výtěžku. K cyklizaci pravděpodobně dochází přes hydroxylaminový intermediát **XXXIII** a to ztrátou vody, ale protože hydroxy skupina je špatně odtupující skupinou, výtěžek byl pouze 29%.

Byla snaha o zefektivnění tohoto kroku. Aby hydroxylová skupina lépe odstupovala, byl do reakce přidán tosyl chlorid, po patnácti minutách došlo k dokonalé přeměně hydroxylaminového derivátu **XXXIII** na *2H*-indazol **XXXII** (metoda II). (Schéma 11).

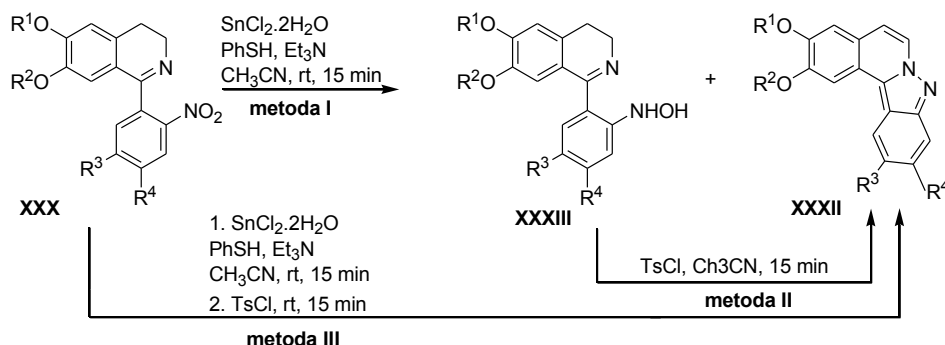


Schéma 11

Dále byla připravena strategie „one-pot“ reakce, přeměny nitro derivátu na indazol bylo dosaženo nejprve působením $\text{SnCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, PhSH a Et_3N po dobu 15 minut, následně byl do směsi přidán tosyl chlorid a za dalších 15 minut byl získán finální indazol v 99% čistotě (metoda III). Byly připraveny čtyři *2H*-indazolové deriváty s výtěžky od 88 do 91%.¹⁶ Mechanismus vzniku *2H*-indazolu je znázorněný ve schématu 12.

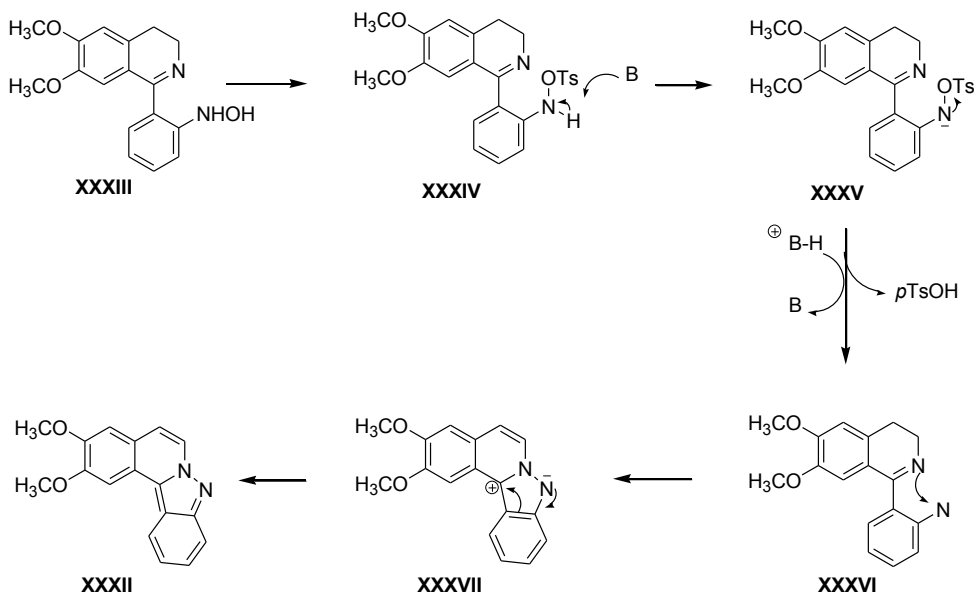


Schéma 12

3.1.4. Příprava *2H*-indazolů z *2*-bromobenzaldehydu

Tato syntéza je třísloužková „one-pot“ syntéza, to znamená, že všechny komponenty jsou přidány do jedné reakční nádoby najednou. Jde o postupné vytváření C-N a N-N vazby.

Jednotlivými komponenty jsou 2-bromobenzaldehyd **XXXVIII**, primární amin, azid sodný a měď jako katalyzátor (Schéma 13).

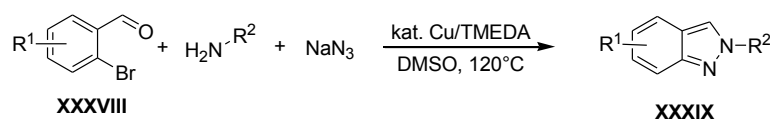


Schéma 13

Měď se ukázala být nejlepším katalyzátorem a to v podobě CuI. Dále jako rozpouštědlo se zdá být vhodný dimethylsulfoxid (DMSO), pro toto polární rozpouštědlo byly nejlepší výsledky. Reakce probíhá dobře pro aromatické, heteroaromatické i alifatické aminy, poněkud nižší výtěžek poskytl 2,4,6-trimethylanilin, zřejmě kvůli sterické zábraně. Pokud byl 2-bromobenzaldehyl substituován, výtěžky byly také dost vysoké, ovšem poněkud nižší než u nesubstituovaného 2-bromobenzaldehydu.

V současnosti se pracuje na bližším upřesnění mechanismu této reakce, pravděpodobně dochází nejprve k vazbě mezi aldehydickou skupinou a aminem, dále je brom substituován azidem za katalýzy mědi, pokud měď není přítomna, žádný produkt nevzniká. Následuje nukleofilní atak a vytvoření vazby mezi dusíky za současného odštěpení molekuly dusíku (Schéma 14).

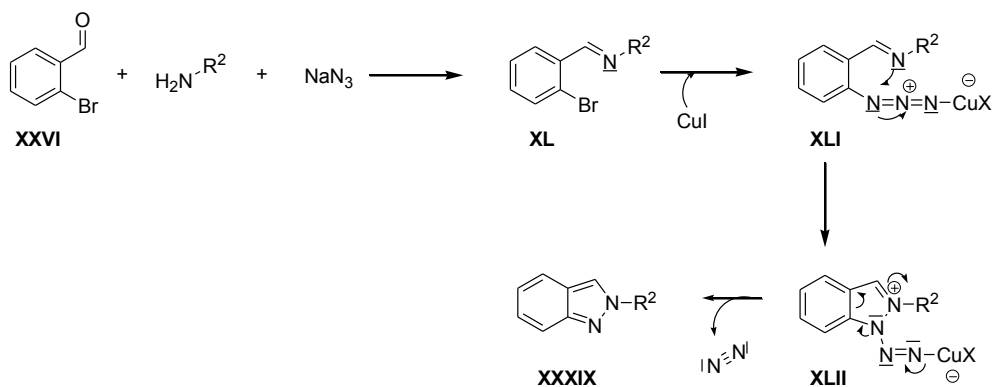


Schéma 14

Zajímavostí je, že pokud místo aminu použili mravenčan amonný, připravili 1*H*-indazol, který pravděpodobně vznikl tautomerizací z 2*H*-indazolu, který je termodynamicky méně stabilní.³¹

3.1.5. Příprava 2H-indazolů z Baylis-Hillmanových aduktů

Následující syntéza pojednává o přípravě 2,3-disubstituovaných 2H-indazolů. Vychází se z cyklohex-2-en-1-onu a aldehydu. Z těchto dvou reaktantů vznikly tzv. Baylis-Hillmanovy adukty **XLV** (Schéma 15).

Reakcí se substituovaným hydrazinem se připraví 2,3-disubstituované 4,5,6,7-tetrahydro-2H-indazoly **XLVI**. Oxidací cyklohexanové části molekuly se získá finální indazol **XLVII**. Oxidace nejlépe probíhá pomocí 2,3-dichloro-5,6-dikyanobenzochinonu (DDQ) v benzenu pod refluxem (24 hodin). Omezení této reakce spočívá v tom, že pokud R = furanyl, nedostaneme očekávaný 2H-indazol, ale karbazolový derivát. Další omezení je v reakci s 4,4-dimethylcyklohex-2-en-1-onem s aldehydem a následně s fenylhydrazinovým derivátem. Po působení DDQ totiž u tohoto konkrétního derivátu nedojde k dehydrogenaci cyklohexanové části heterocyklu, ale vznikne alkoholový derivát.^{32,16}

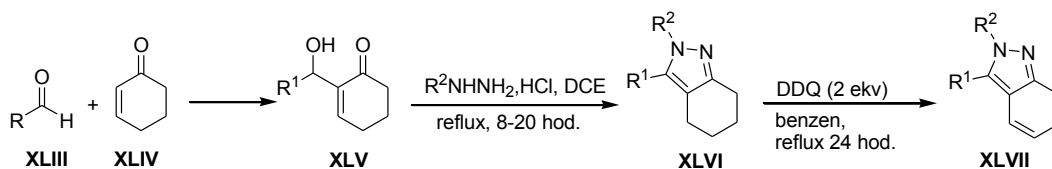


Schéma 15

3.1.6. Syntéza 2H-indazolů z derivátů kyseliny anthranilové

Tato syntéza navazuje na starou metodu přípravy substituovaných 3-chloro-2H-indazolů.^{33,34} Byla snaha přeměnit indazoly v přechodný receptor potenciálního kationového kanálu podrodiny V členu 1 (TRPV1 – transient receptor potential cation channel subfamily V member 1), jehož funkcí je detekce a regulace tělesné teploty a bolesti. TRPV1 antagonisté mohou být potenciálními analgetiky a vysoce selektivními ligandy pro estrogenní receptor β (ER β). Pokud R² byl fenyl, pak tyto látky vykazovaly vysokou afinitu a dobrou ER β selektivitu, hlavně pokud jen fenyl substituovaný v para poloze halogenem, -CF₃ nebo nitrilem. Výtěžky této reakce byly od 35 do 85%. Pod schématem 16 jsou vypsány reakční podmínky v závislosti na substituentu R¹.¹⁶

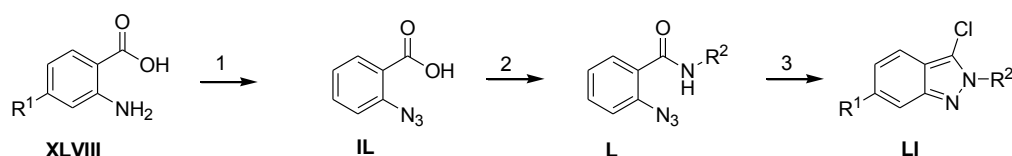


Schéma 16

Činidla:

R¹(-OCH₃): (1) TfN₃, CuSO₄, DCM, MeOH; (2) SOCl₂, *p*-anisidin; (3) benzen, SOCl₂.

R¹(-Br): NaNO₂, 2N HCl, 5°C; potom NaN₃, NaOAc, H₂O; (2) SOCl₂, reflux; potom 4-aminobenzotriflorid, DMAP, DCM; (3) SOCl₂, reflux, 96 h.

3.1.7. Syntéza 2H-indazolů [3+2] dipolární cykloadicí sydnonů a arynů

Jedná se o reakci sydnonů a arynů v jednom kroku. Tato metoda dovoluje použít širokou škálu sydnonů a arynů. Reakce poskytuje vysoké výtěžky a probíhá za mírných podmínek.

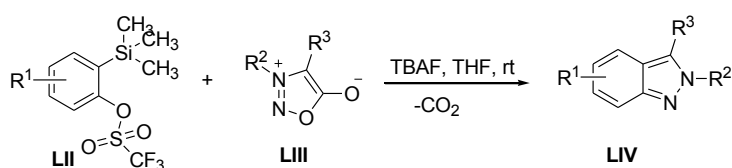
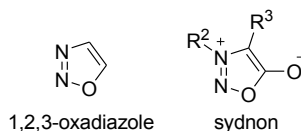


Schéma 17

Sydnon je heterocyklus vycházející z 1,2,3-oxadiazolu (Obrázek 4). Tyto sloučeniny se připravují z příslušné aminokyseliny LV, která je podrobena nitrosaci a poté cyklodehydrataci (Schéma 18). Nitrosace probíhá buď pomocí dusitanu sodného v kyselém prostředí při 0°C, nebo pomocí dusitanu amylnatého (systematický název je 3-methyl-1-nitrosooxybutan). Cyklodehydratace nastane za působení anhydridu kyseliny octové nebo anhydridu kyseliny trifluoroctové.



Obrázek 4

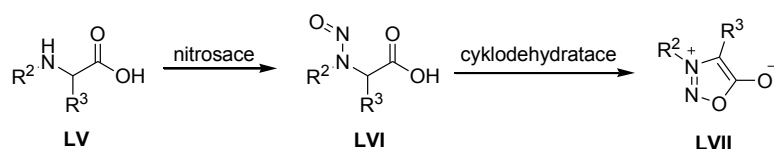


Schéma 18

Výchozí látky pro tuto reakci jsou *o*-(trimethylsilyl)fenyl triflát **LVIII** a příslušný sydnon **LIX** za katalýzy tetra-*N*-butylamomium fluoridu (TBAF) v THF. Nejlepší substituenty na sydnonu v poloze 3 byly aryly se substituenty dodávajícími do systému elektrony, pokud byl na aromatickém jádře navázán substituent odebírající elektrony, 2*H*-indazol **LIV** téměř nevznikl.

Mechanismus této reakce popisuje schéma 19. Reakcí s fluoridy vzniká trojná vazba na aromatickém jádře, vznikají tzv. aryny, následuje nukleofilní atak uhlíku na trojnou vazbu a následné odštěpení oxidu uhličitého za vzniku 2*H*-indazolu.³⁵

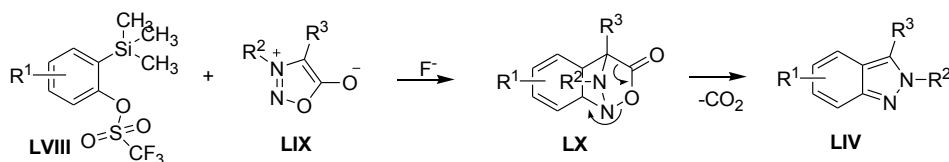


Schéma 19

3.1.8. Syntéza 2-aryl-2*H*-indazolů z 1-chloromethyl-2-jodobenzenu

2-Chloromethyl-2-jodobenzen **LXI** reaguje se zinečnatou solí za vzniku zinečnatého činidla 2-chloromethylarylu **LXII** (Schéma 20).³⁶ Toto činidlo dále reaguje aryldiazoniovými tetrafluorboráty za vzniku 2*H*-indazolů **LXIII**. Tato reakce dovoluje použít různé funkční skupiny navázané na aromatický kruh diazoniové soli.

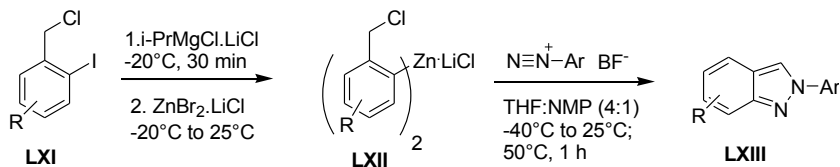


Schéma 20

V prvním kroku reakce se působí *i*-PrMgCl.LiCl na 2-jodobenzyl chlorid za vzniku diarylu zinečnatého. Toto zinečnaté činidlo je přidáno do aryldiazoinové soli za nízké teploty

(-40°C). Směs se dále míchá za pokojové teploty a po zahřátí na 50°C po dobu jedné hodiny vznikne příslušný indazol **LXIII**.

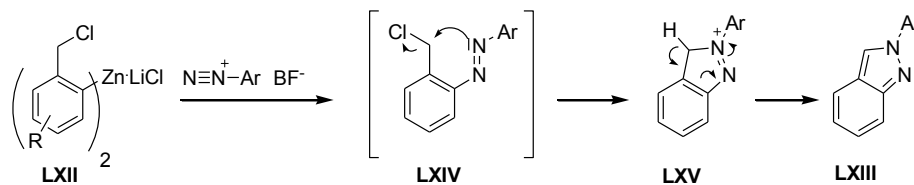


Schéma 21

3.2. Alkylace 1*H*-indazolů

Alkylace N-H-indazolů poskytuje obvykle směs derivátů alkylovaných buď na jednom, nebo druhém dusíku. Slade a jeho spolupracovníci publikovali v roce 2009 reakci, kdy docházelo ke chránění prvního nebo druhého dusíku pomocí *p*-methoxybenzyl chloridu v závislosti na podmínkách. Při použití slabší kyseliny vzniká 2*H*-indazol, pokud se použije silnější kyselina, dojde ke vzniku 1*H*-indazolu a pokud se použije silné bazické prostředí, vzniká směs obou (Schéma 22).

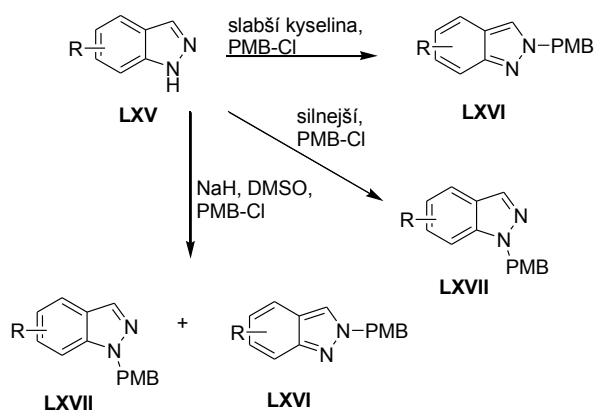


Schéma 22

Otázkou, proč v bazickém prostředí vznikají oba deriváty, se detailně zabývali Luo³⁷ a jeho spolupracovníci. Jestliže se použije silná báze, jako je NaH, dojde k deprotonaci 1*H*-indazolu přednostně v pozici N(1). Vzniklý záporný náboj se může přemístit na druhý dusík bez větších energetických problémů, proto může 2-(trimethylsilyl)ethoxymethyl chlorid (SEM-Cl) reagovat jak na prvním, tak na druhém dusíku. Pokud se použije slabší báze, pak elektronový pár na dusíku č. 2, který je nukleofilnější než na prvním dusíku, jelikož je součástí aromatického systému, reaguje s elektrofilem SEM-Cl, vytvoří se kationové

uspořádání, kdy je vodík na prvním dusíku následně odštěpen pomocí slabší báze (Schéma 23).¹⁶

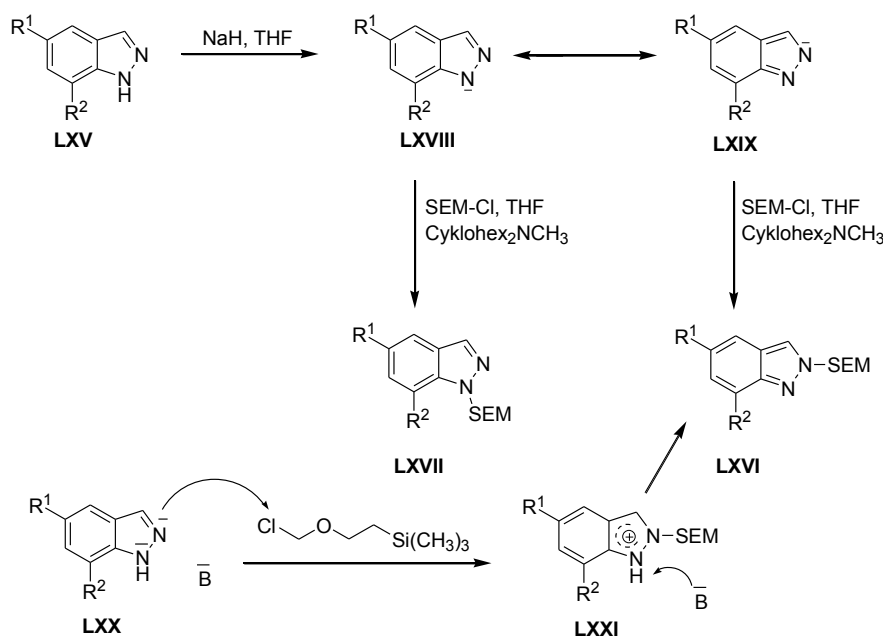


Schéma 23

4. Syntéza na pevné fázi

Syntéza na pevné fázi byla navržena roku 1959 Robertem Bruceem Merrifieldem. V roce 1984 mu byla udělena Nobelova cena za chemii pro objev syntézy peptidů na pevné fázi (Schéma 24).³⁸

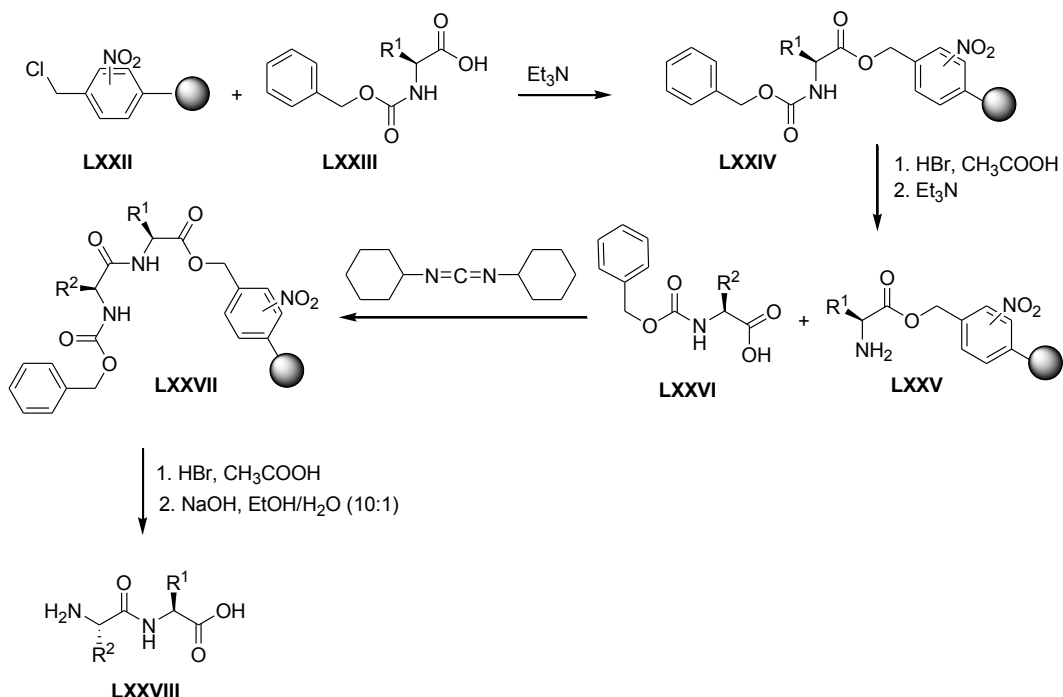
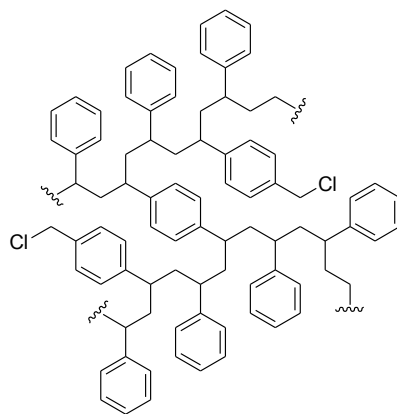


Schéma 24

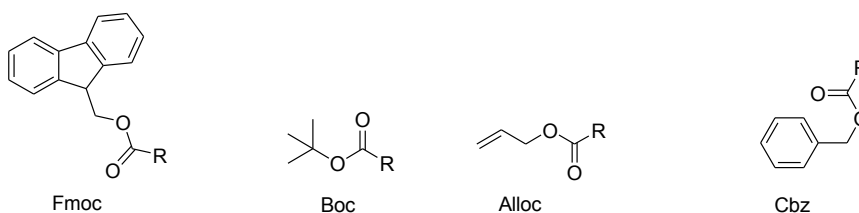
Syntéza na pevné fázi byla původně vyvinuta pro syntézu peptidů. Syntézy krátkých peptidových řetězců byly dříve úspěšně prováděny, ovšem se vzrůstajícím počtem aminokyselin rostly problémy s rozpustností a čištěním peptidů. Za účelem odstranění těchto problémů byla pro syntézu peptidů nalezena nová technika. Výhody spočívají především v jednoduché manipulaci, snadné filtraci a čištění výsledného peptidu od rozpouštědla a vedlejších produktů. Všechny tyto výhody urychlují syntézu a dnes se běžně vyskytují přístroje, které peptidy automaticky syntetizují pomocí této techniky. V dnešní době se syntéza na pevné fázi neomezuje pouze na syntézu peptidů, ale použití se rozšiřuje na přípravu mnohem komplexnějších organických molekul.

Pevná fáze je polymerní pryskyřice navržena tak, aby byla chemicky stálá a měla dostatečnou velikost pro filtraci a pohodlnou manipulaci. Jedná se o prostorově zesíťovaný polystyren obsahující 1-2% divinylbenzenu (Obrázek 4 – Merrifieldova pryskyřice).



Obrázek 4³⁹

Na polymerním nosiči je navázán linker, který umožní štěpení reakčních produktů z pryskyřice. Existuje řada linkerů, ty jsou obecně buď kyselé, nebo bazicky labilní. R. B. Merrifield navrhl chlormethylenovou pryskyřici. Skupiny, které nemají vstoupit do peptidové vazby, jsou pokryté chránícími skupinami. Existuje mnoho chránících skupin, například fluorenylmetoxykarbonyl (Fmoc), allyloxykarbonyl (Alloc), *tert*-butoxykarbonyl (Boc) (Obrázek 5).⁴⁰ R. B. Merrifield při svém experimentu použil jako chránící skupinu benzyloxykarbonyl (Cbz).



Obrázek 5

5. Biologická aktivita

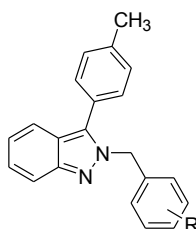
Jak jsem v úvodu uvedla, indazoly se ukázaly být látkami s mnoha význačnými biologickými účinky. Například deriváty 4,5,6-tetrahydro-2*H*-indazolu vykazují protizánětlivou aktivitu.¹ Jiné deriváty mohou vykazovat antimikrobiální,^{2,41} antiparazitickou aktivitu,^{41,19} antiangiogenní.⁵ Také mohou být inhibitory poly(ADP-ribóza)polymerázy (PARP)⁴² a ligandy pro estrogení receptory.⁴³

5.1. Antiangiogenní aktivita 2*H*-indazolů

Angiogeneze je proces, kdy dochází k nové tvorbě krevních kapilár. Je to nezbytný fyziologický a patologický děj probíhající například při hojení ran, při zánětlivých procesech a je nezbytný také pro vznik a růst nádorů. Nově vzniklé kapiláry vyživují vznikající nádor, a tím mu umožňují další růst. A právě léčba, která umožní zastavení růstu nových kapilár a může tak zničit vznikající tumor, se nazývá anti-angiogenní.

Bylo zjištěno, že při tvorbě nových cév mají největší roli růstové faktory, nejlépe je prozkoumán VEGF – vaskulární endotelový růstový faktor.⁴⁴

Huang a kolektiv testovali N(2) – substituované benzyl-3-(4-methylfenyl)indazoly pro potenciální anti-angiogenní účinek. Bylo vybráno 5 derivátů, které byly testovány in vivo na VEGF-indukované buněčné proliferaci a tvorbě nových kapilár. Tyto látky byly testovány při 30 μM , 10 μM a 1 μM koncentraci. Při koncentraci 10 a 30 μM všechny vykazovaly významnou aktivitu, avšak při koncentraci 1 μM významnou aktivitu vykazovali pouze **LXXX**, **LXXXII** a **LXXXIII**. Dále byly všechny látky porovnány vzhledem k látce, vykazující velmi významnou antiangiogenní aktivitu ethyl-4-(1-benzyl-1*H*-indazol-3-yl)benzoát (YD-3). V koncentraci 1 μM měly látky **LXXX**, **LXXXII** a **LXXXIII** lepší anti-angiogenní aktivitu než YD-3.⁵



Obrázek 6

Tabulka 1:

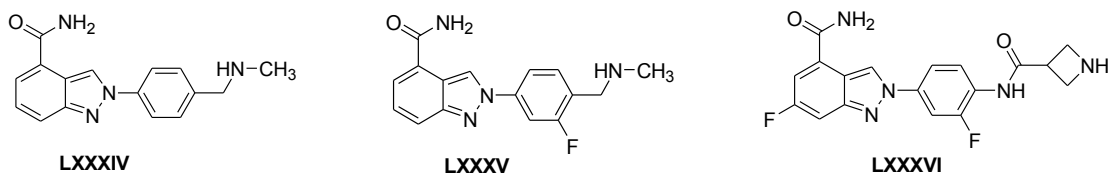
Číslo sloučeniny	Typ substituentu (R)
LXXIX	H
LXXX	4-Cl
LXXXI	3-Cl
LXXXII	4-CH ₃
LXXXIII	3-OCH ₃

5.2. 2*H*-indazoly jako PARP inhibitory

PARP – poly(ADP-ribóza)polymerázy jsou enzymy důležité v buněčných procesech opravy DNA a programované buněčné smrti (apoptózy). Hlavní rolí PARP je najít zlomy na jednovláknové DNA. PARP enzymy katalyzují přenos ADP-ribózových jednotek na akceptory jako jsou histony, DNA polymeráza apod. Pro tvorbu ADP-ribózových monomerů je nezbytný substrát nikotinamidadeninukleotid NAD⁺. PARP inhibitory mohou selektivně zničit ty nádorové buňky, které mají špatně opravenou DNA dvoušroubovici. Jedná se například o nádory s mutacemi v genech spojených s rakovinou plic BRCA-1 a BRCA-2 („Breast cancer-associated genes“).

Jako látka s dobrou aktivitou – PARP inhibitor byla látka **LXXXVI**, u které byla zjištěna hodnota pro PARP-1 IC₅₀ = 5 nM, BRCA-1 CC₅₀ = 500 nM.

Na začátku SAR studie („structure activity relationship“) byla příprava analogů různě substituovaných v meta a para polohách. Do para polohy byla navázána buď skupina karboxamidů, nebo skupina anilidů. Obě tyto skupiny však měly slabší vlastnosti než **LXXXIV** (Obrázek 7). Proto se studie dále zaměřila na kombinaci substituentů na benzenovém kruhu indazolu a benzenovém kruhu připojeném na N(2). Analog **LXXXV**, který byl substituován na benzenovém kruhu na N(2) vyšel nejlépe a měl podobnou aktivitu jako látka **LXXXIV**. Pokud byly navázány do polohy 3 nebo 4 na benzenovém kruhu indazolu atomy chloru, znamenalo to pokles aktivity, podobně jako u substituentů –OH a –OCH₃ v poloze 4. Zjistilo se, že největší aktivitu vykazují látky, které mají v poloze 5 na benzenovém kruhu indazolu fluor taktéž fluor v poloze 3 na benzenovém jádře. Jako neaktivnější derivát vyšel **LXXXVI**.⁴²

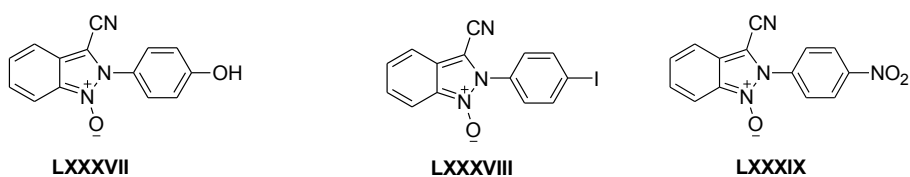


Obrázek 7

5.3. 2H-indazoly 1-oxidy jako látky s antiparazitickou aktivitou

Parazitické onemocnění je jedno z nejrozšířenějších na světě, především v rozvojových zemích. Rozšířená je především Chagasova choroba, malárie, schistosomiáza (bilharióza), leishmanióza, trichomoniáza. Chagasovu chorobu způsobuje prvek *Trypanosoma cruzi*, malárii přenáší prvoci rodu *Plasmodium*, schistosomiázu motolice rodu *Schistosoma* (krevnička), leishmaniózu způsobují prvoci rodu *Leishmania* a trichomoniáza je způsobena prvokem *Trichomonas vaginalis*.

Gerpe a kolektiv zjistili, že látky obsahující *N*-oxid a indazolový cyklus vykazují výbornou aktivitu proti prvokům rodu *Trypanosoma*. Nejprve zkoušeli testovat in vivo 5-nitroindazoly, zjistili, že nitro skupina není zásadní pro tuto aktivitu. Poté objevili, že *N*-oxid s indazolovým kruhem právě tuto aktivitu má. Uvedu zde tři struktury, které vykazovaly největší aktivitu proti trypanosomě; jsou to struktury **LXXXVII**, **LXXXVIII** a **LXXXIX**. Testy pro porovnání indazolů obsahující *N*-oxid s těmi, které neobsahovaly *N*-oxid ukázaly, že *N*-oxid je opravdu důležitý v účinku proti Chagasově chorobě.²⁰ Proti leishmanióze byla nejvíce aktivní struktura **LXXXIX** (viz. tabulka 2).



Obrázek 8

Tabulka 2:

Struktura	<i>L. amazonensis</i>	<i>L. infantum</i>	<i>L. braziliensis</i>
LXXXVII	+	+	+
LXXXVIII	+	+	+
LXXXIX	++	++	++
Pentamidin	+++	+++	+++
DMSO	0	0	0

+++ , udává úplné zničení parazita; ++ , označuje znehybnění nebo zpomalení růstu parazitů; + , paraziti rostli jako v kontrolním vzorku DMSO, ale byly méně pohyblivé. Pentamidin je chemoterapeutikum proti prvokům.

5.4. 2H-indazoly jako vysoce selektivní ligandy pro Estrogenní receptor β

Estrogeny jsou steroidní pohlavní hormony. Jsou především ženské, ale vyskytují se také u mužů. Mají zásadní roli pro vývoj sekundárních pohlavních znaků u žen, jsou součástí antikoncepčních přípravků, také snižují řídnutí kostí, ovlivňují produkci koagulačních faktorů, zvyšují množství cholesterolu HDL a snižují množství cholesterolu LDL.^{45,46} Nedávna data taky ukázala estrogeny jako neuroprotektivní látky.⁴⁷ Do této skupiny hormonů patří estradiol, estron a estriol. Prostředníkem pro působení estrogenních hormonů jsou jejich receptory-ER (estrogenní receptory).

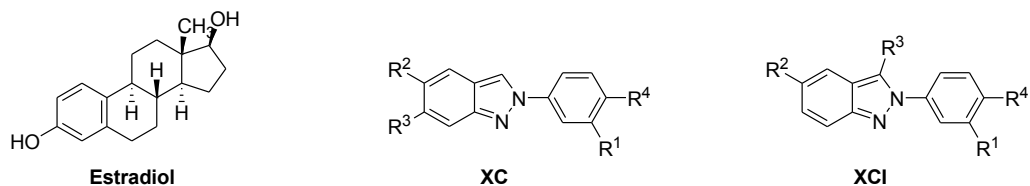
Jsou dva druhy ER a to ER α a ER β , oba jsou kódované jinými geny. Tkáňová distribuce každého z nich je trochu jiná, ER α převládá hlavně v děloze, játrech, prsní žláze, kostech a kardiovaskulárním systému. ER β je produkován prostatou, vaječníky a v močovém traktu. Nejprve byl objeven ER α , po objevení i druhého receptoru se oba staly středem zájmu mnoha vědců.

Meri De Angelis a kolektiv⁴³ vytvořili model nesteroidních ligandů pro estrogenní receptory, které mají fenylyl-2H-indazolové jádro, zaměřili se především na ER β . Všechny struktury, které byly pro tento účel připraveny, můžeme rozdělit do dvou skupin. Jedna skupina má hydroxylovou skupinu na C-5 a druhá na C-6.

Nejprve bylo testováno, která hydroxylová skupina v derivátech **XCa**, **b** a **XCIa**, **b** vázaná na benzenový kruh mimikuje A-kruh estradiolu. Bylo zjištěno, že hydroxylové skupiny na R² a R⁴ pozici hrají důležitou roli ve vazbě na ER β a byl potvrzený předpoklad

snížení vazby mezi nesteroidními ligandy a ER β v případě, že by hydroxylová skupina v pozici R² a R⁴ na těchto ligandech nebyla.

Pro deriváty **XC**, které mají hydroxylovou skupinu na C-5 bylo také testováno, který halogen má v poloze R³ na derivátu **XCI** největší afinitu k ER β . Nejlépe vyšel atom bromu a chloru. Také bylo testováno pár C-6 hydroxylových analog; ty vykazovaly nižší afinitu ve srovnání s C-5 deriváty. Z celého testování vyšly nejlépe látky **XCIc** a **XCI d**. Tyto látky by mohly být do budoucna sondy pro definování fyziologické role ER β receptoru.



Obrázek 9

6. Peptidomimetika

V dnešní době se výzkum mimo jiné soustředí na syntézu a screening přírodních biopolymerů nebo biopolymerů, které jsou přírodním látkám podobné, jelikož mají mnohé význačné vlastnosti. Jednou skupinou těchto látek jsou i peptidomimetika, látky, které „mimikují“ – napodobují peptidy. Jedná se většinou o modifikace určitého peptidu nebo o přípravu systému, který se peptidům přibližuje, například jsou do peptidového řetězce zařazeny β -aminokyseliny.

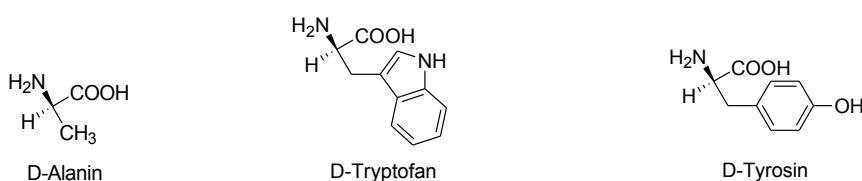
Peptidy jsou látky, které se skládají z aminokyselin spojených peptidovou vazbou. Dělíme je podle počtu aminokyselin na oligopeptidy, polypeptidy, bílkoviny. Jsou to látky, které mají nezastupitelnou roli v živých organismech. Jsou důležitými signálními molekulami pro různé receptory, jsou to hormony, neurotransmitery a různé fyziologické modulatory.⁴⁸⁻⁵²

Důvodem, proč jsou připravovány peptidomimetika, je především jejich případná biologická aktivita a větší stabilita než u přírodního peptidu, přičemž obě tyto vlastnosti jsou dobrým předpokladem pro syntézu nového léčiva.

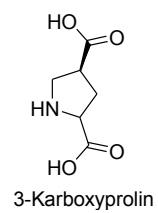
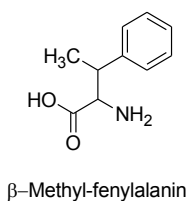
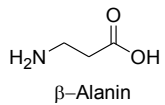
Větší stabilita spočívá především v tom, že peptidy jsou často degradovány proteolytickými enzymy, tudíž pokud je peptid nějakou cestou modifikovaný, může to degradaci snížit.

Peptidomimetika tak mohou být připraveny různými způsoby, například použitím nepřirodních D-aminokyselin (Obrázek 10), odstraněním aminokyseliny z řetězce, použitím L-aminokyselin, avšak nepřirozených (Obrázek 11),⁵³ dále různou cyklizací řetězce (Obrázek 11). Pro přípravu peptidů byla navržena syntéza na pevné fázi, která se později začala uplatňovat pro přípravu nejrůznějších látek, včetně peptidomimetik (viz. oddíl „Syntéza na pevné fázi“). Například níže uvedené struktury Valinomycin a Colistin (Obrázek 12) jsou potenciálními antibiotiky.

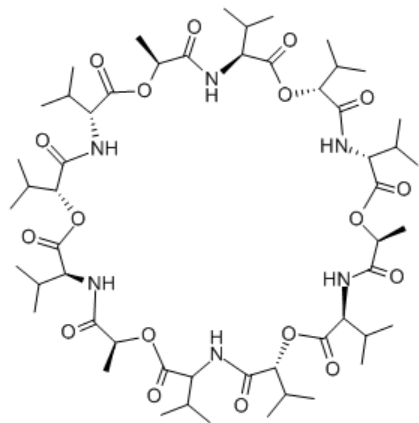
Peptidomimetika jsou potenciálními novými léčivy, jelikož mnohé z nich vykazují značnou antimikrobiální, protirakovinnou, analgetickou, antivirální nebo antimalarickou aktivitu.⁵⁴



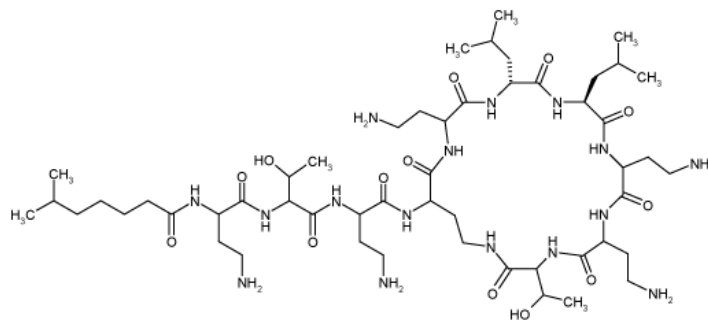
Obrázek 10



Obrázek 11



Valinomycin⁵⁵



Colistin⁵⁶

Obrázek 12

7. Výsledky a diskuze

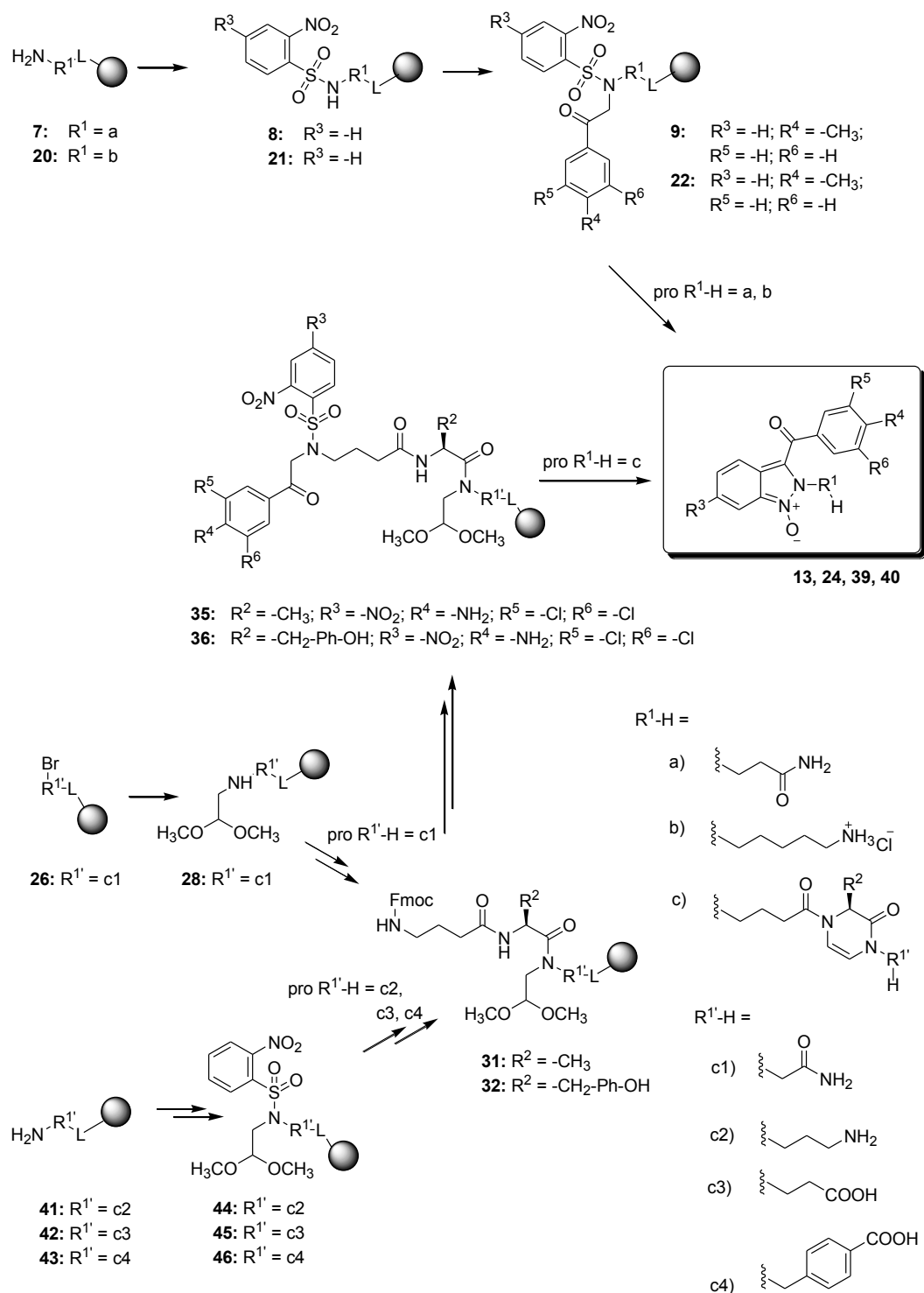


Schéma 25

7.1. Celkový postup přípravy 2*H*-indazolů 1-oxidů

Syntéza 2*H*-indazolů 1-oxidů vychází z primárních aminů navázaných na pryskyřici. Tím, že je amin navázaný, je zároveň imobilizovaný a chráněný před nežádoucími reakcemi. Dále následuje reakce s 2-nitrobenzensulfonyl chloridem či jeho deriváty za vzniku sulfonamidů, v dalším kroku pak alkylace bromketonem. Finální 2*H*-indazol vznikne působením báze 1,8-diazabicyklo[5.4.0]undec-7-enu (DBU). Celkové schéma této reakce jsem znázornila ve schématu 26. „L“ – představuje libovolný linker a šedá kulička představuje pryskyřici. Reakce vedoucí ke vzniku 2*H*-indazolu je unikátní. Dochází ke vzniku vazby mezi C-C a následně mezi N-N. Výsledný produkt se z pryskyřice odštěpí působením silné kyseliny, používá se 50% trifluoroctová kyselina (TFA) v dichlormethanu (DCM).

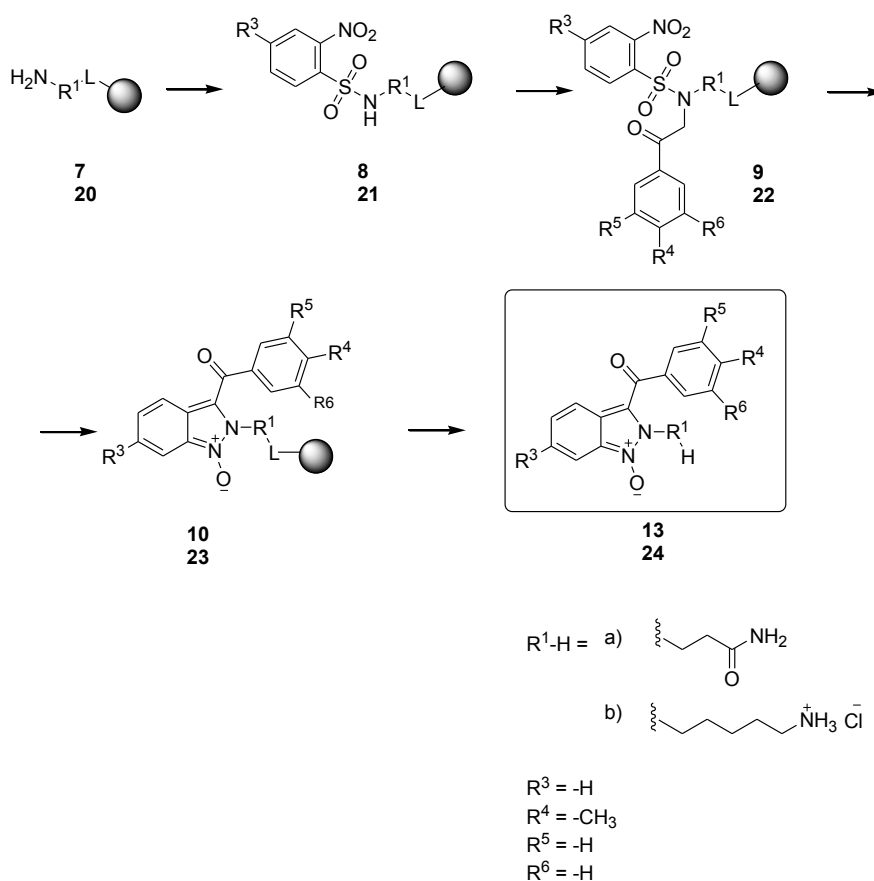


Schéma 26

7.2. Příprava derivátů 2H-indazolů 1-oxidů

7.2.1. Odštěpení Fmoc protektivní skupin z Rinkovy pryskyřice

Pro přípravu prvního produktu se vycházelo z Rinkovy pryskyřice **1**, tato pryskyřice obsahuje aminoskupinu chráněnou Fmoc protektivní skupinou, která se dá z aminu odstranit působením 50% piperidinu v roztoku dimethylformamidu (DMF).

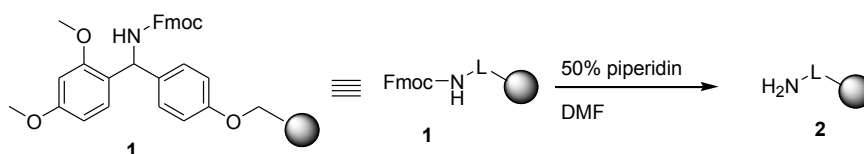


Schéma 27

Piperidin je báze, která způsobí odštěpení protonu a vznikne anion na uhlíku č. 9 fluorenového kruhu. Odtah elektronů způsobí uvolnění oxidu uhličitého a vznikne konjugovaný stabilní systém 9-methylen-9H-fluorenu **5** (Schéma 28). Výsledkem je volná aminoskupina připravená k reakci.

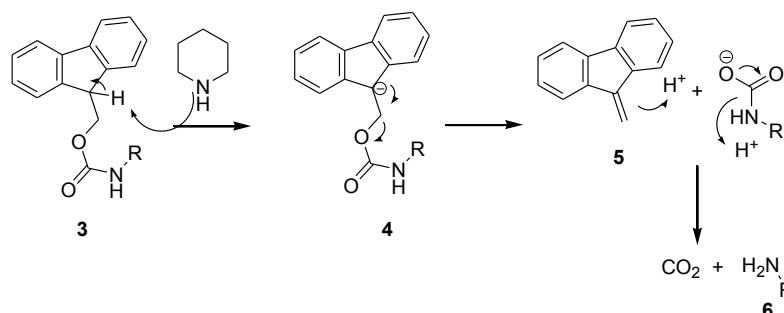


Schéma 28

7.2.2. Acylační reakce

V dalším kroku dochází k acylační reakci. Podle toho, jaké se použije acylační činidlo, tím se bude lišit R¹ stavební blok (Schéma 29).

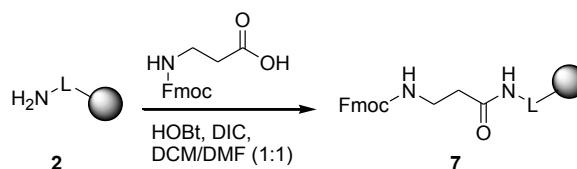


Schéma 29

Pro první produkt bylo použito jako acylační činidlo Fmoc- β -alanin. Aminoskupina tohoto alaninu byla ochráněná také Fmoc skupinou. Jelikož pouhá reakce primárního aminu a aminokyseliny neprobíhá samovolně, byla použita aktivační činidla; hydroxybenztriazol (HOBt) a *N,N'*-diisopropylkarbodiimid (DIC). Mechanismus této reakce spočívá ve vytvoření aktivovaného esteru aminokyseliny s HOBt. DIC je báze, která způsobí odtržení protonu z kyseliny a vytvoří se přechodný kation na uhlíku mezi dusíky, dojde k posunu elektronů a navázání kyslíku z karboxylátu na tento elektronově deficitní uhlík. Následně hydroxylová skupina HOBt atakuje uhlík s karbonylem a dojde ke vzniku aktivovaného esteru a 1,3-diisopropylmočoviny (DIU). Vzniklý aktivovaný ester pak zreaguje s volnou aminoskupinou za vzniku amidu. Tato reakce probíhala při laboratorní teplotě přes noc.

7.2.3. Kvalitativní a kvantitativní zjišťování průběhu reakce

Pro kvalitativní zhodnocení reakce, kdy se zjišťuje, zda jsou všechny volné aminokyseliny naacylovány, byla provedena zkouška s bromfenolovou modří (roztok v *N*-methylpyrrolidonu). Ve směsi nebylo pozorováno modré zbarvení, což znamená nepřítomnost volné aminoskupiny. Reakce byla tedy negativní na bromfenolovou modř (BB). Pro kvantitativní zhodnocení průběhu reakce se počítá tzv. loading. Loading udává, kolik látky (v milimolech) se navázalo na 1 gram pryskyřice. Tato kvantifikace se provádí relativně vůči vnějšímu standardu. Porovnávají se plochy píků vzorků se standardem při vlnové délce 300 nm, u kterého známe přesnou koncentraci. U vzorků známe přesnou hmotnost, tudíž můžeme výsledek přepočítat na 1 gram pryskyřice. Jako standard byl použit 0,01M roztok *N*-(9-fluorenylmethoxykarbonyloxy)sukcinimid (Fmoc-Osu). Loading se pak využívá pro výpočet procentuálního výtěžku reakce. Loading pro tuto reakci vyšel 0,44 mmol/g.

7.2.4. Reakce vedoucí k sulfonamidům, alkylace a cyklizace na finální indazoly

V dalším kroku byla naacylovaná pryskyřice smíchána s roztokem 2-nitrobenzensulfonyl chloridu. Právě dusík nitroskupiny tohoto reaktantu tvoří jeden z dusíků ve výsledném indazolu a benzenové jádro je součástí indazolového kruhu. Nejprve byla odštěpena Fmoc skupina, poté mohlo dojít k reakci s 2-nitrobenzensulfonyl chloridem. Do reakce se přidává báze 2,6-lutidin, která pomáhá k odtržení protonu z aminoskupiny. Výsledkem této reakce byl benzensulfonamid **8** (Schéma 30).

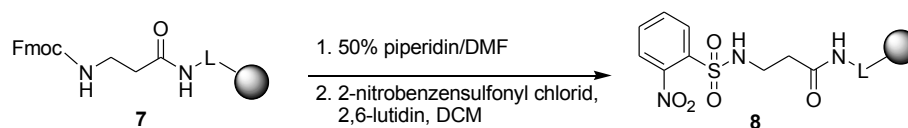


Schéma 30

Po tomto kroku byla provedena LC-MS analýza a v analýze se objevily dva píky. Plochy jednotlivých píků představovaly 79% a 21%. Byla udělána zkouška, zda byla reakce nedoreagovaná, nebo nebyla kvantitativně odštěpena Fmoc protektivní skupina. Byly odebrány dva vzorky pryskyřice, jeden vzorek byl smíchán s reakční směsí na odchránění Fmoc protektivní skupiny a poté byla nasazena znova reakce s 2-nitrobenzensulfonyl chloridem (A). Druhý vzorek byl smíchán s reakční směsí 2-nitrobenzensulfonyl chloridu (B).

Byla provedena opět LC-MS analýza a zintegrovány plochy píků. V analýze vzorku A byly plochy jednotlivých píků 93% a 7%, v analýze vzorku B byla plocha 100%. Na základě těchto výsledků byla provedena znova reakce s 2-nitrobenzensulfonyl chloridem pro celé množství pryskyřice.

Pro vznik finálního indazolu je důležitý další krok a to reakce s bromketonem. Tím se do systému dostane tzv. C-kyselina – z uhlíku vedle karbonylu může být za vhodných podmínek odtržen proton. Reakce s 2-bromo-1-*p*-tolyl-ethanonem probíhala v reakční směsi s bází *N,N'*-diisopropylethylendiaminem (DIEA) přes noc. Výsledkem reakce byl 3-[(2-nitrobenzensulfonyl)-(2-oxo-2-*p*-tolyl-ethyl)-amino]-propionamid **9** (Schéma 31).

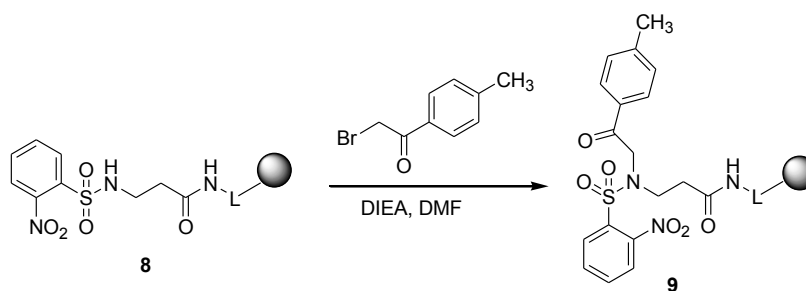


Schéma 31

7.2.5. Mechanismus cyklizace

Už jsem zmínila, že důležité je, aby byla v systému C-kyselina. Pro vznik 2*H*-indazolu **10** se k pryskyřici přidává báze DBU v DMF (Schéma 32).

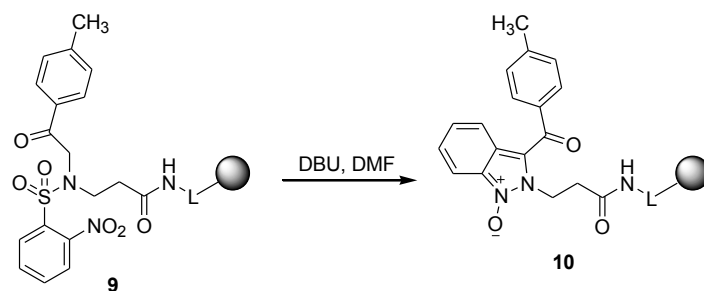


Schéma 32

Tato báze zapříčiní odtržení protonu vedle karbonylu. Karbanion atakuje uhlík benzenového jádra sousedícího s SO₂ skupinou. Síra si následně přitáhne elektrony z vazby mezi aromatickým uhlíkem a sírou za odštěpení SO₂ a současného vzniku nové vazby C-C. Ihned poté následuje uzavření indazolového cyklu za vzniku nové N-N vazby (tandemová reakce). (Schéma 33).

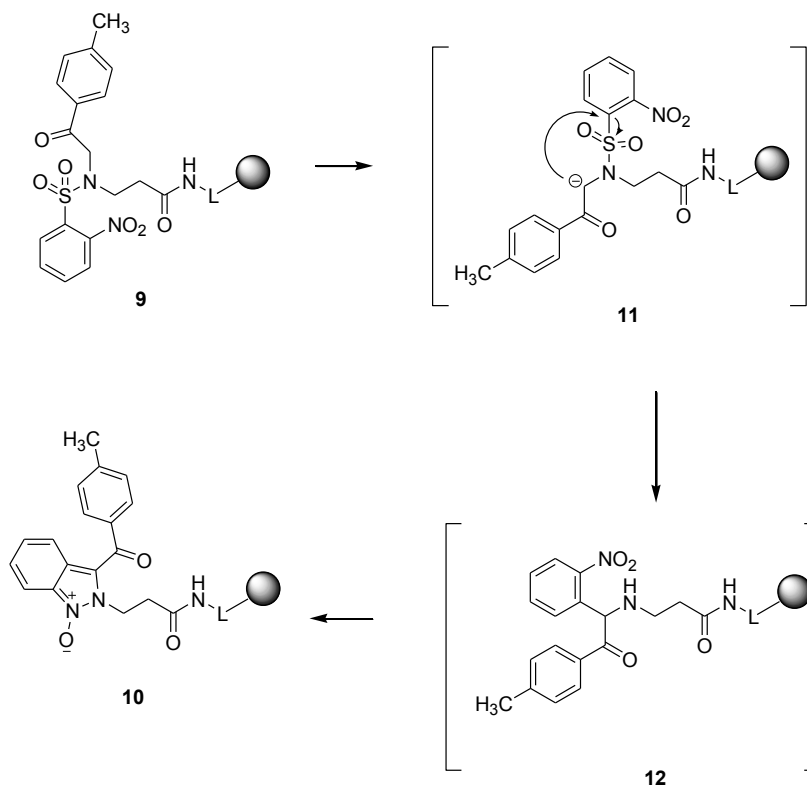


Schéma 33

Jelikož produkt byl navázán na kyselé labilní linker, výsledný indazol **13** byl tedy odštěpen z pryskyřice pomocí 50% TFA v DCM (Schéma 34), po odpaření TFA byl produkt suspendován v diethyletheru.

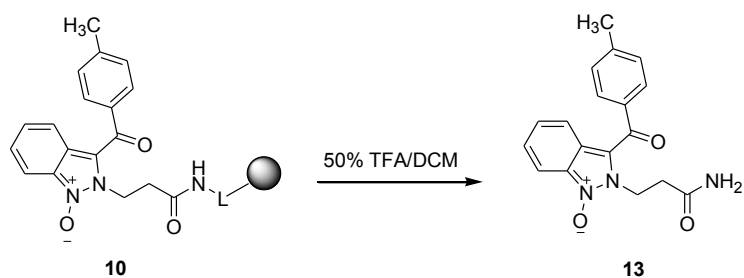


Schéma 34

7.2.6. Příprava dalších derivátů 2H-indazolů 1-oxidů

Po izolaci předchozího produktu byla snaha o přípravu dalších dvou derivátů 2H-indazolů a to na Wangově pryskyřici **19**. Tato pryskyřice má hydroxymethylovou skupinu. K aktivaci hydroxylové skupiny se používá karbonyldiimidazol **15** (CDI). Mechanismus, jakým tato reakce probíhá, je znázorněn ve schématu 35.

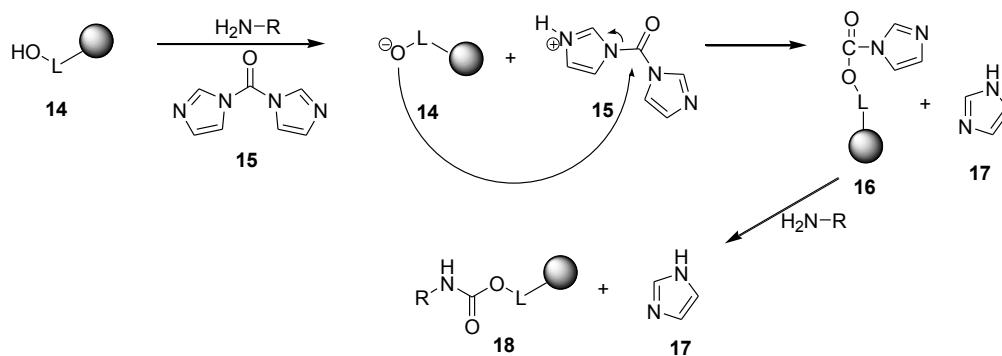


Schéma 35

Byly vybrány dva primární aminy – alifatický a alicyklický. Pro první produkt byl použit 1,5-diaminopentán a pro druhý pak 1,4-diaminocyklohexan, u nichž byla jedna aminoskupina ochráněna Fmoc skupinou (Schéma 36).

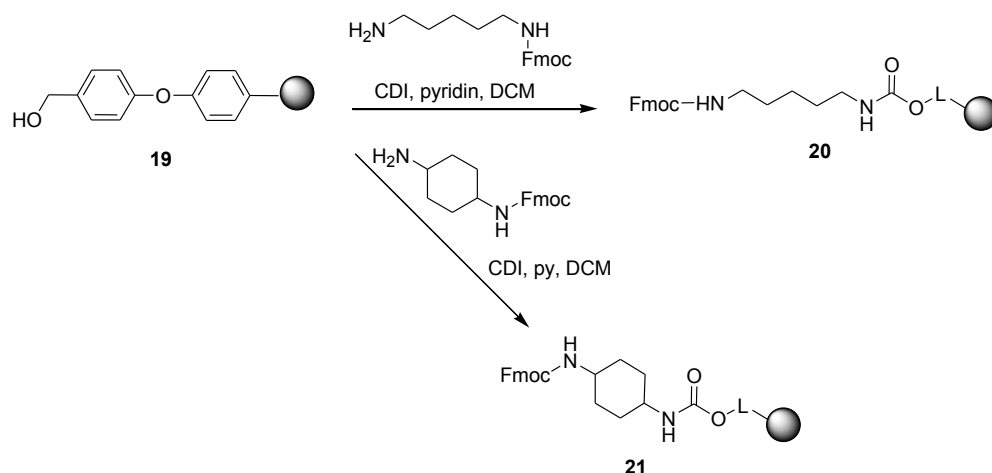


Schéma 36

Při odštěpování produktu z pryskyřice byla použita silná kyselina – 50% TFA, tím došlo k uvolnění oxidu uhličitého a vzniku volný produkt.

Po provedení tohoto kroku byly zjištěny loadings. Pro 1,5-diaminopentan **20** byl loading 0,59 mmol/g, pro druhou reakci byl loading ovšem pouze 0,15 mmol/g. Reakce byla provedena znovu, s tím rozdílem, že byla zvýšená teplota (50°C). Následně byl zjištěn loading, který byl však téměř shodný s prvním pokusem 0,16 mmol/g. Z tohoto důvodu jsem s pryskyřicí nepokračovala v syntéze.

Dále jsem pracovala pouze s navázaným 1,5-diaminopentanem **20**, ze kterého byla odštěpena Fmoc protektivní skupina v 50% piperidinu, tím byla volná aminoskupina připravená pro reakci s 2-nitrobenzensulfonyl chloridem (Schéma 37).

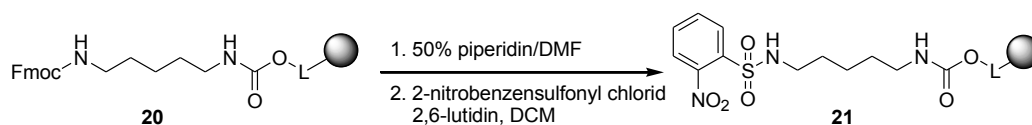
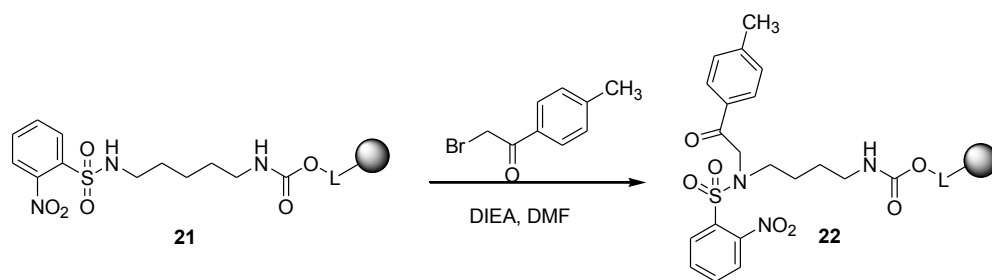
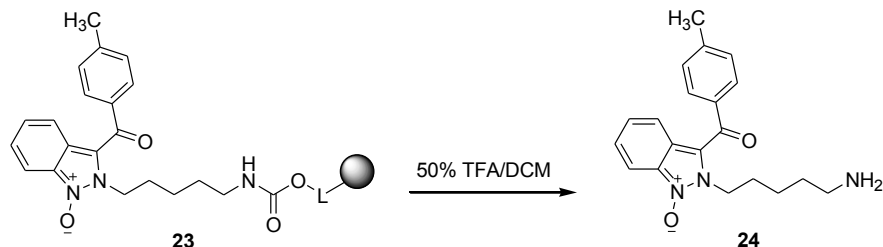
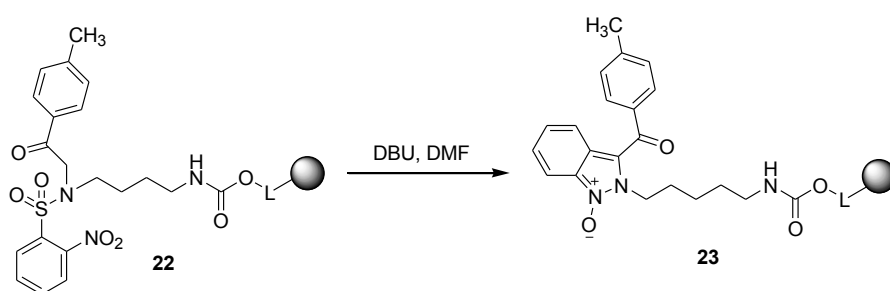


Schéma 37

Reakce proběhla dobře; test pomocí BB vyšel negativně. Byla tedy nasazena reakce s 2-bromo-1-*p*-tolyl-ethanonem (Schéma 38), kdy reakce opět proběhla kvantitativně.



Na základě těchto výsledků mohlo dojít k poslednímu kroku, cyklizaci pomocí DBU (Schéma 39). LC-MS analýza po tomto kroku byla velmi čistá, produkt **24** byl odštěpen z pryskyřice pomocí 50% TFA (Schéma 40).



Pro izolaci tohoto produktu **24**, vzhledem k vysoké čistotě produktu, mohlo být použito vysrážení z diethyletheru, neobjevila se však žádná sraženina, po přikápnutí HCl se objevil pouze zákal. Produkt se musel izolovat na semipreparativní kolonce C18-silikagel. Před izolací byl z produktu pomocí dusíku odfoukán ether, produkt byl rozpuštěn ve vodě s kapkou acetonitrilu (AcCN). Kolonka byla nejprve promyta acetonitrem, poté vodou a následně byl pipetou nanesen vzorek. Jako mobilní fáze byla použita nejprve voda, pak acetonitril a nakonec methanol.

7.3. Příprava 2H-indazolu s peptidomimetikem

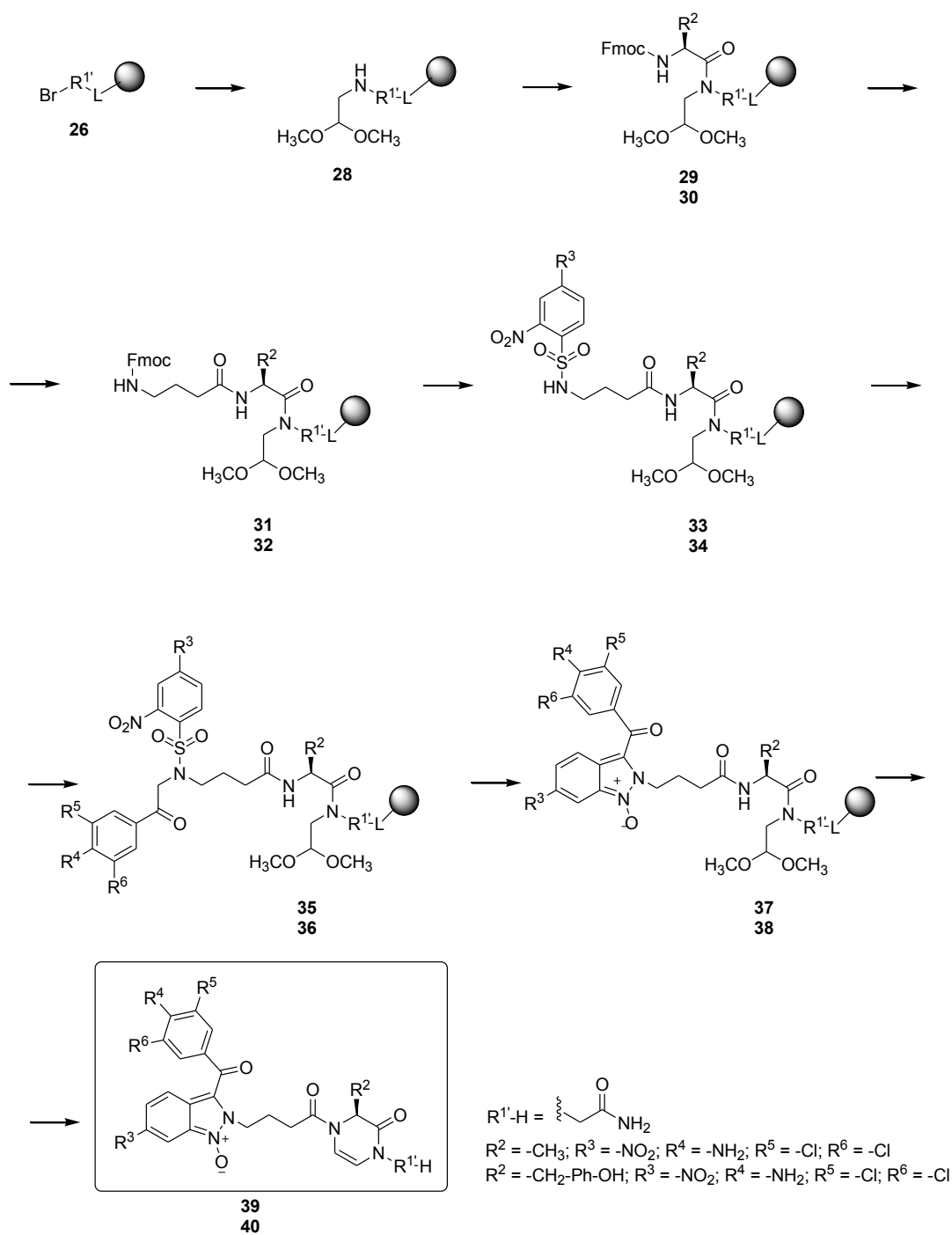


Schéma 41

Jak jsem již uvedla, peptidomimetika jsou látky, které napodobují peptidy a mohou mít význačné biologické vlastnosti. Druhá část mé práce byla proto zaměřena na syntézu 2*H*-indazolu s peptidomimetikem navázaným na N(2) dusíku indazolu. Syntéza vycházela z bromderivátu navázaného na Rinkovou pryskyřici. V dalším kroku následovala reakce s aminoacetaldehydem dimethylacetalem, který bude tvořit na závěr část cyklu peptidomimetika a následně reakce se dvěma aminokyselinami. Pro vznik indazolu byl v další fázi na řetězec navázán derivát 2-nitrobenzensulfonyl chloridu, poté bromketon, a díky působení báze DBU došlo k cyklizaci na 2*H*-indazol. Indazol s peptidomimetikem byl odštěpen z pryskyřice působením 50% TFA (Schéma 41).

7.3.1. Reakce Rinkovy pryskyřice s bromoctovou kyselinou a následně s aminoacetaldehydem dimethylacetalem

Pro přípravu dvou derivátů 2*H*-indazolů byla použita Rinkova pryskyřice **2**. Nejprve byla odštěpena z Rinkovy pryskyřice Fmoc protektivní skupina v 50% piperidinu, pak volná aminoskupina zreagovala s roztokem bromoctové kyseliny **25** s DIC a DIEA. Reakce probíhala dvě hodiny při laboratorní teplotě (Schéma 42).

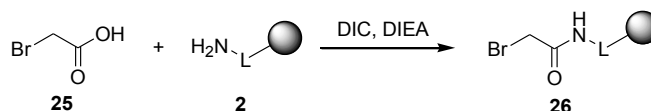


Schéma 42

Další krok byla reakce s aminoacetaldehydem dimethylacetalem **27** za přítomnosti DIEA. Trvala dvě hodiny při laboratorní teplotě. Po tomto kroku byl zjištěn loading reakce, který vyšel 0,26 mmol/g.

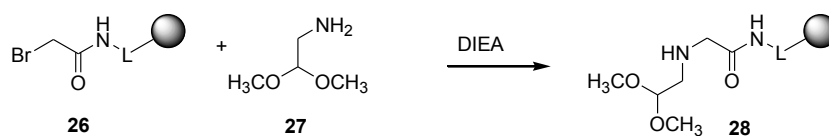
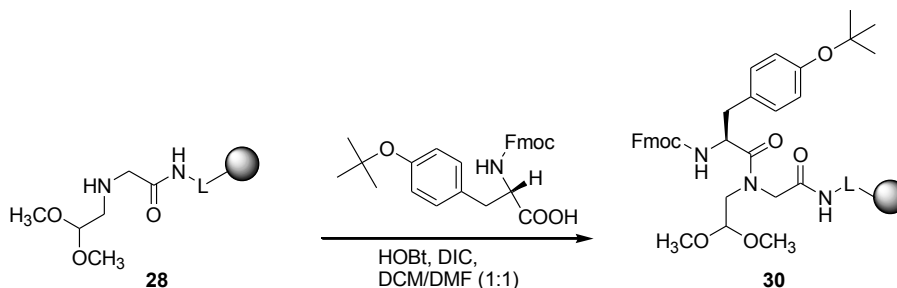
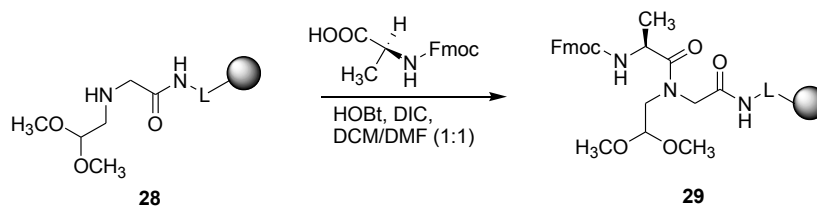


Schéma 43

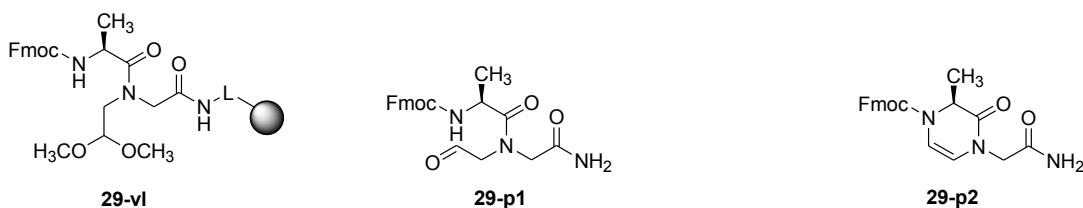
7.3.2. Acylační reakce

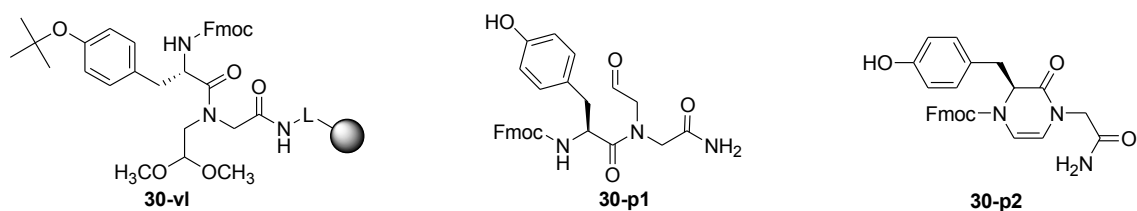
Následovala reakce s aminokyselinami. Pryskyřice **28** byla v tomto kroku rozdělena na dvě části. Na jednu část pryskyřice byl navázán Fmoc-Ala-OH (Schéma 44) a na druhou část Fmoc-Tyr(*t*Bu)-OH (Schéma 45).



Pro aktivaci karboxylových skupiny těchto aminokyselin na pryskyřici bylo přidáno HOBt a DIC v DCM/DMF (1:1) a reakce probíhala při laboratorní teplotě přes noc.

Po skončení reakce byly provedeny LC-MS analýzy. Podle předpokladu došlo k hydrolyze acetalu. V analýze se objevily píky odpovídající molekulové hmotnosti volného aldehydu a produktu, který obsahuje šestičlenný kruh vzniklý po eliminaci vody. V Obrázku 13 jsem znázornila produkty s navázaným alaninem, Obrázek 14 ukazuje struktury s navázaným tyrosinem. Zde je potřeba zdůraznit, že tyrosin obsahoval chránící *tert*-butylovou skupinu, která je rovněž štěpitelná kyselinou trifluoroctovou - tato chránící skupina přítomna proto po odštěpení produktu z pryskyřice přítomna nebyla.





Obrázek 14

V dalším kroku byly pryskyřice s navázanými aminokyselinami **29**, **30** třepány roztokem na odchránění Fmoc protektivní skupiny a následně reagovány s roztokem Fmoc- γ -aminobutanové kyseliny, HOBt a DIC v DCM/DMF (1:1). Tyto reakce také probíhaly přes noc při laboratorní teplotě (Schémata 46 a 47).

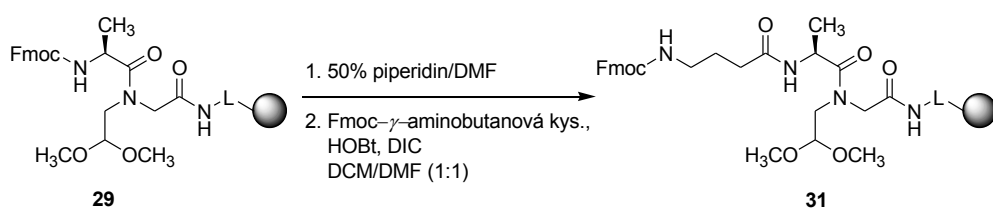


Schéma 46

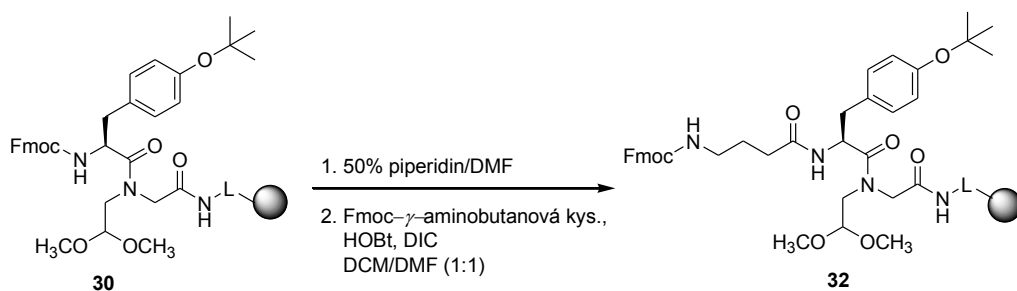
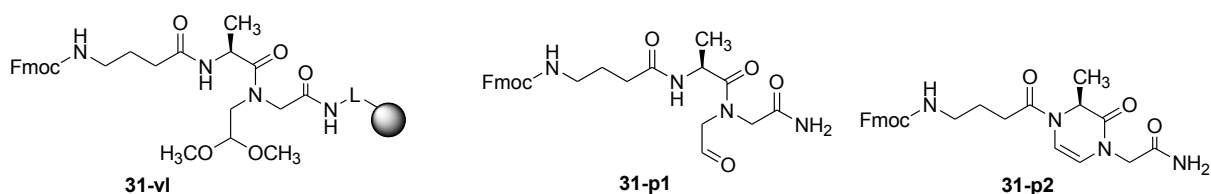
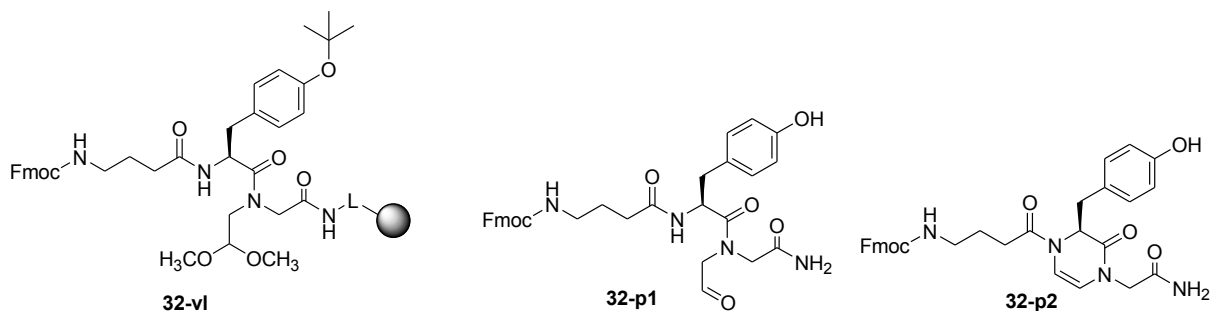


Schéma 47

Byla provedena opět LC-MS analýza. Z předchozí zkušenosti už vyhodnotit tato spektra nedalo velikou práci. V každé analýze se objevily dva píky, větší z nich odpovídal molekulové hmotnosti zcyklizovaného produktu **31-p2**, **32-p2**. Chránící *tert*-butylová skupina byla opět při štěpení odstraněna. Jednotlivé formy produktů jsou v obrázku 15 a 16.



Obrázek 15



Obrázek 16

7.3.3. Reakce vedoucí ke vzniku 2H-indazolu

Pro obě pryskyřice **31**, **32** následovaly reakce, které byly již výše zmíněny (v části práce pojednávající o přípravě 2H-indazolů bez peptidomimetika). Jedná se o reakce, které umožní vzniku indazolového kruhu. Nejprve byly z obou pryskyřic **31**, **32** odštěpeny Fmoc protektivní skupiny a následně byly obě pryskyřice **31**, **32** třepány s reakční směsí 2,4-dinitrobenzensulfonyl chloridu a 2,6-lutidinu v DCM. Reakce probíhaly přes noc při laboratorní teplotě. Byla provedena zkouška na BB, která vyšla negativně. V LC-MS analýzách byly identifikovány produkty zobrazeny níže (Obrázek 17 a18).

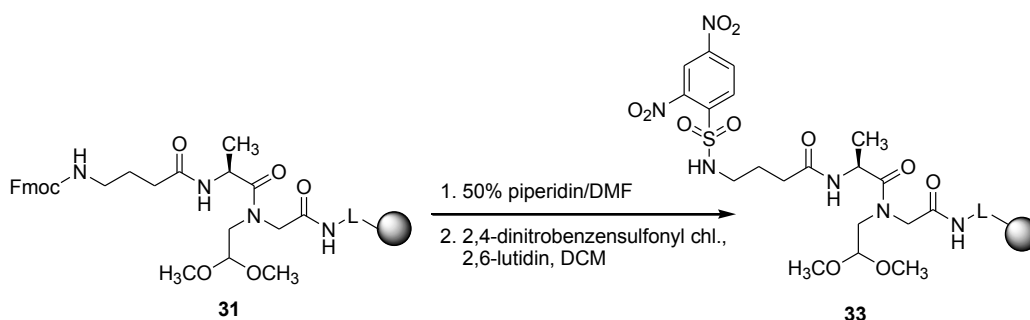


Schéma 48

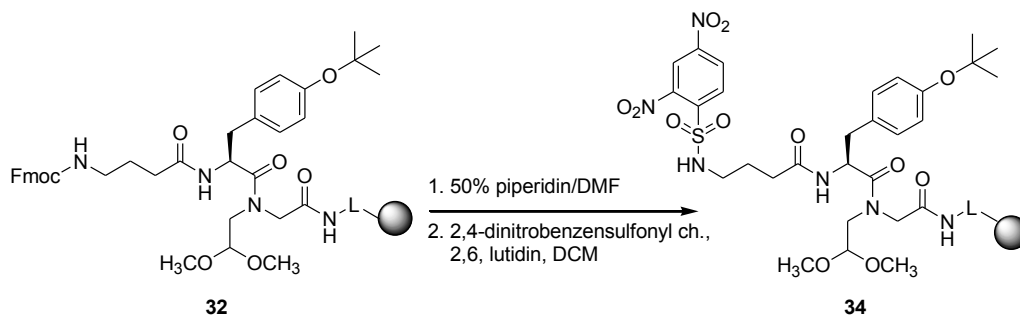
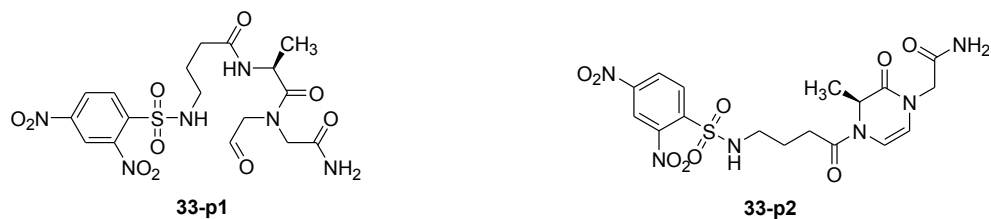
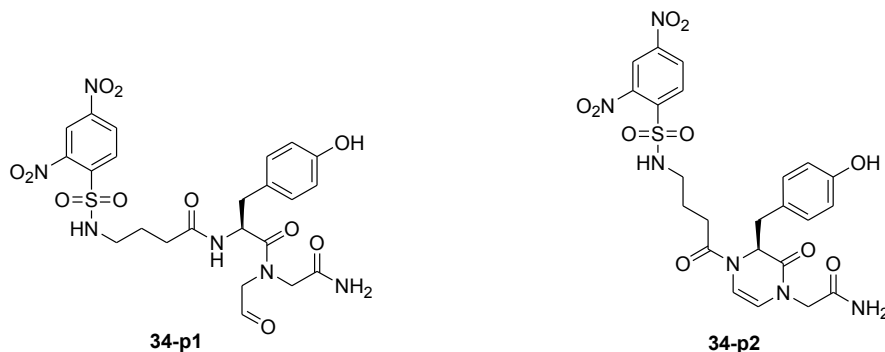


Schéma 49



Obrázek 17



Obrázek 18

Poté byla provedena reakce obou pryskyřic **33** a **34** s 1-(4-amino-3,5-dichloro-fenyl)-2-bromo-ethanonem a DIEA v DMF. Reakce probíhaly opět přes noc při laboratorní teplotě. Oba vzniklé meziprodukty **35** a **36** jsou znázorněny ve schématech 46 a 47. Vyhodnocení LC-MS analýzy bylo v tomto případě hodně komplikované, bylo pozorováno mnoho píků s různou hmotností. Struktury, které bylo možno v analýze identifikovat, jsou níže znázorněny (Obrázek 19 a 20).

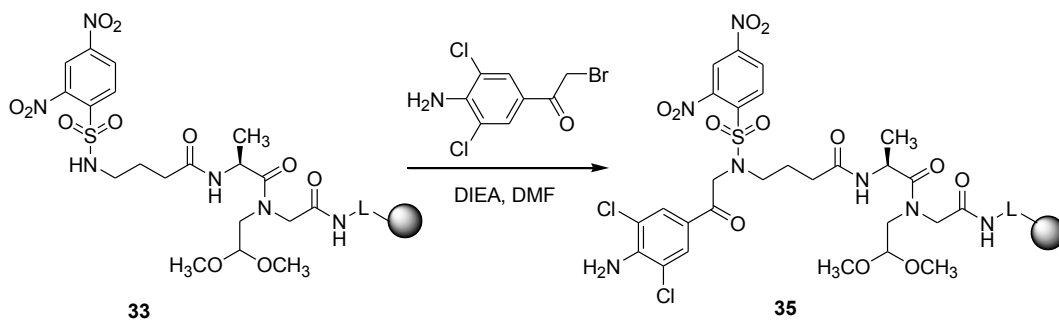


Schéma 50

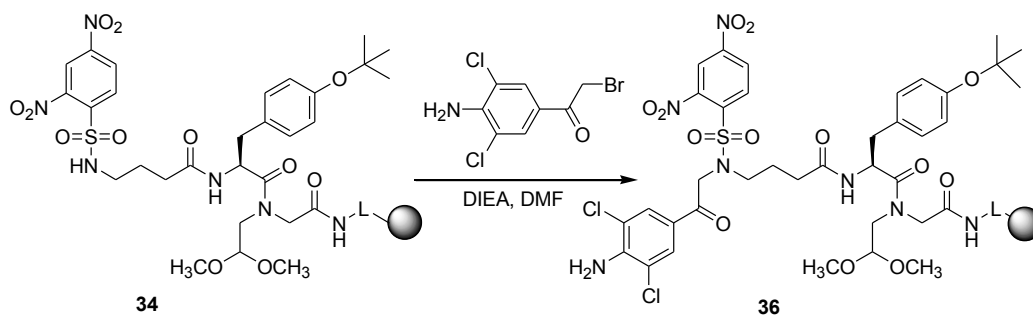
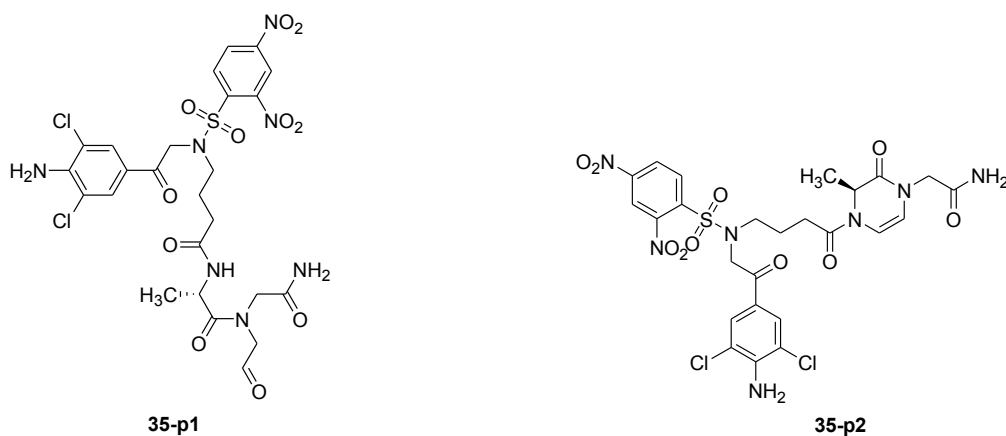
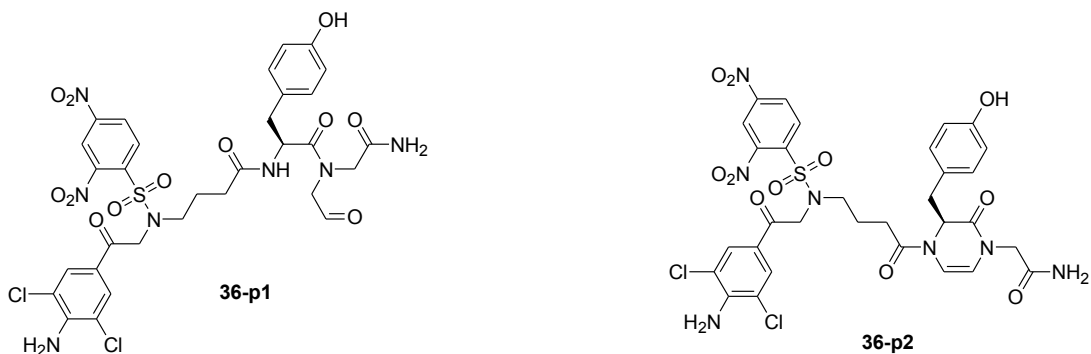


Schéma 51



Obrázek 19



Obrázek 20

I přes nejasnou analýzu byla provedena reakce s roztokem DBU v DMF po dobu 30 minut při laboratorní teplotě (Schéma 52 a 53).

Konec reakce byl ověřen LC-MS analýzou. Ta byla již čistá, objevil se v každé analýze jediný pík, který odpovídal očekávanému produktu.

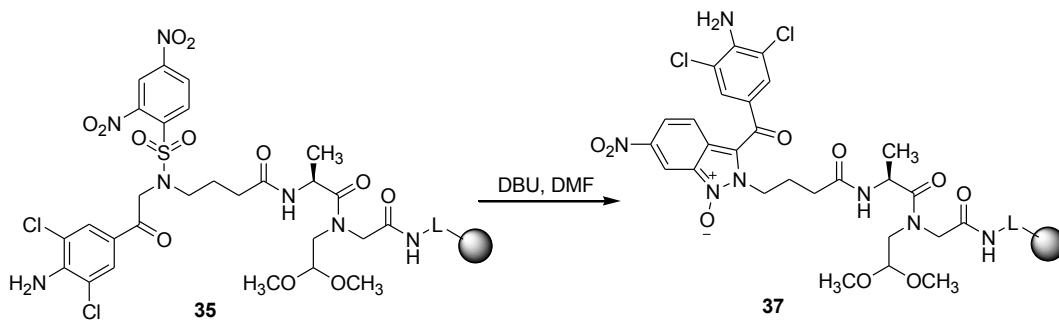


Schéma 52

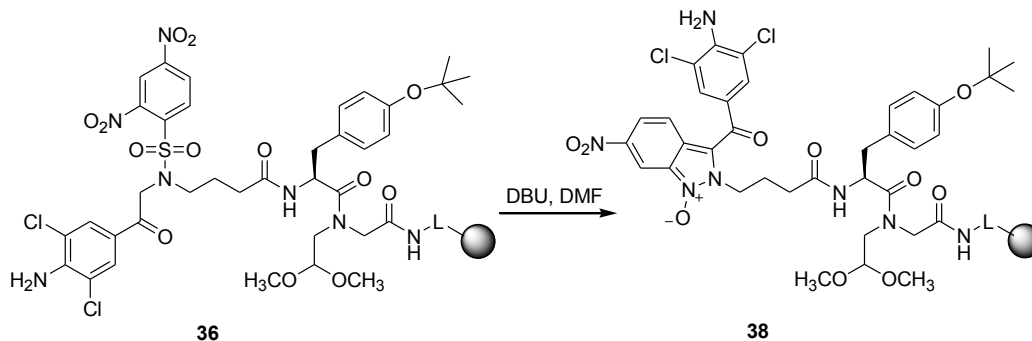


Schéma 53

Obě látky **37**, **38** byly po hodině při působení 50% TFA v DCM odštěpeny z pryskyřice za vzniku finálních 2*H*-indazolů 1-oxidů navázaných na peptidomimetikum **39** a **40** (Schéma 54 a 55).

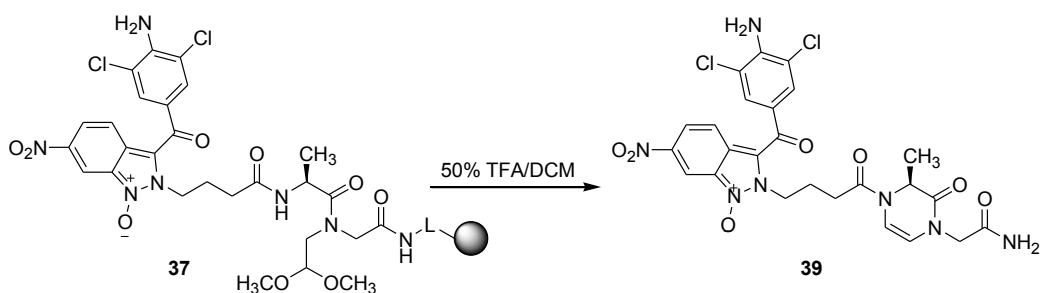


Schéma 54

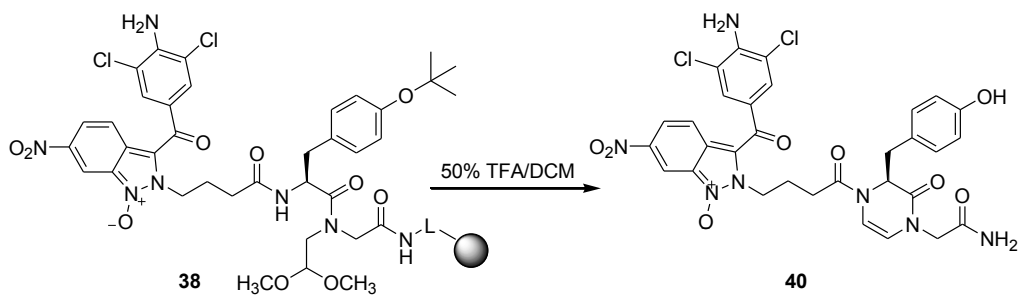


Schéma 55

7.4. Snaha o přípravu dalších derivátů 2*H*-indazolů s peptidomimetikem

Schéma 25 ukazuje dvě možné cesty přípravy 2*H*-indazolu s peptidomimetikem. Ve výše popsané syntéze se vycházelo z bromoctové kyseliny (Schéma 41), která tvoří R^{1'}-řetězec. Abychom nebyli omezeni pouze na postranní řetězec –CH₂-CO-NH₂ (R^{1'} = c1), a tím nesnižovali počet diverzních míst výsledných produktů, byla k navázání prvního stavebního kamene použita Mitsunobu reakce. Tato reakce otevřela možnost prodloužení řetězce teoreticky o libovolný počet atomů uhlíku. Taktéž povaha substituentu se mohla lišit, to znamená, že vedlejší řetězec mohl například zahrnovat aromát. Pro lepší pochopení a názornost byly tyto možnosti nakresleny (Schéma 56). Toto schéma obsahuje zakroužkovaný R^{1'} substituent, aby bylo zjevné, kde mohou vznikat další diverzní místa a jak se od sebe mohou jednotlivé substituenty lišit.

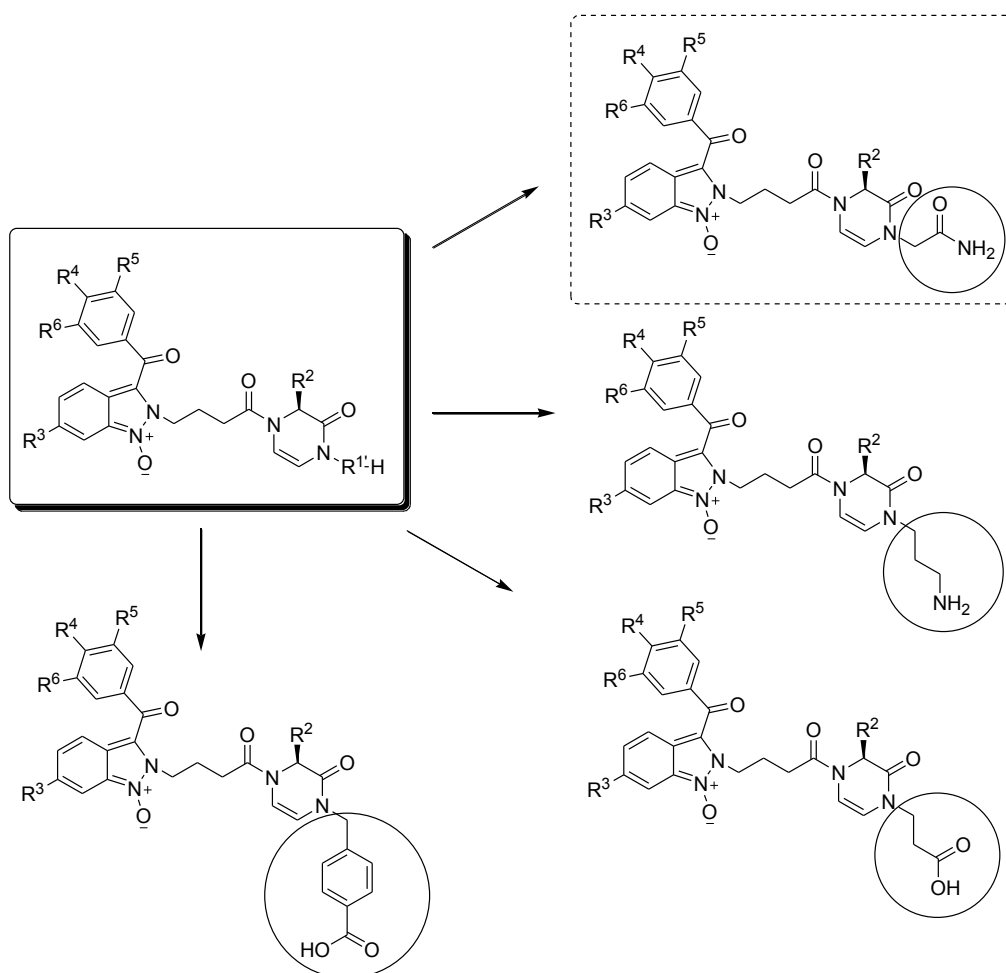


Schéma 56

7.4.1. Mitsunobu reakce

Jako Mitsunobu reakce se označuje reakční přeměna primárních nebo sekundárních alkoholů na různé funkční deriváty, jako jsou estery, imidy apod. pomocí PPh_3 , diisopropylazodikarboxylátu (DIAD) či diethylazodikarboxylátu (DEAD). Pro reakci s alkoholy mohou být použita různá nukleofilní činidla jako karboxylové kyseliny, fenoly, aromatické thioly, dioly, imidy, azidy, isothiokyanát amonný jako zdroj HSCN apod. Velmi důležité je bezvodé prostředí, používá se většinou bezvodý tetrahydrofuran, dioxan, DCM nebo benzen.

Vycházelo se z 3x 1g Wangovy pryskyřice **19**, která byla reagována se třemi různými Fmoc-chráněnými aminy, resp. aminokyselinami: diaminopropanem, β -alaninem a *p*-aminobenzoovou kyselinou. Jeden gram byl smíchán s reakční směsí Fmoc-1,3-diaminopropanem, CDI a pyridinem v DCM (loading = 0,67 mmol/g). Druhý gram **19** s Fmoc- β -Ala-OH, HOBt, DMAP a DCM/DMF a DIC (loading = 0,5 mmol/g). Třetí gram Wangovy pryskyřice **19** byl smíchán s Fmoc-*p*-aminobenzoovou kyselinou (Fmoc-PAMBA) s HOBt, DMAP, DCM/DMF a DIC (loading = 0,38). (Schéma 57).

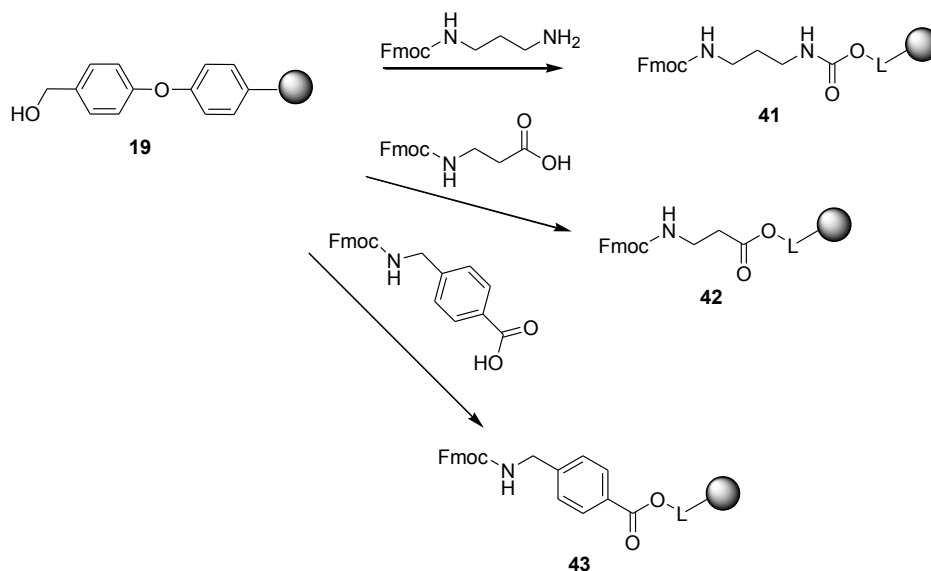


Schéma 57

Všechny tři meziprodukty **41**, **42**, **43** byly po odštěpení protektivní skupiny aktivovány pomocí 2-nitrobenzensulfonyl chloridu pro následnou Mitsunobu reakci. Produkty byly promyty v bezvodém THF a do jedné stříkačky s pryskyřicí byl přidán glykolaldehyd

dimethylacetal, PPh_3 a THF. Do druhé stříkačky byl připraven roztok DIAD v THF. Byl použit dvojnásobný objem rozpouštědla, než se klasicky pro reakce na pevné fázi používá, aby reakce proběhla kvantitativně.⁵⁷

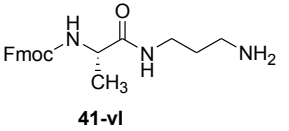
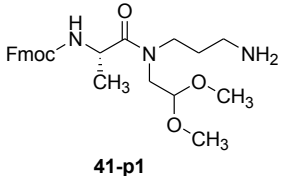
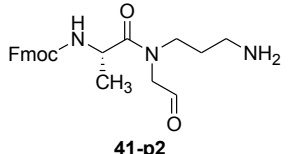
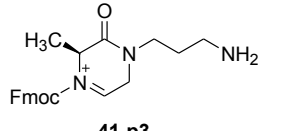
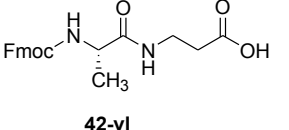
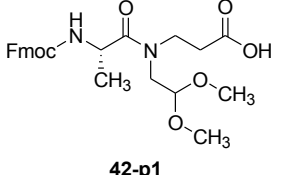
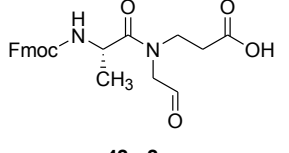
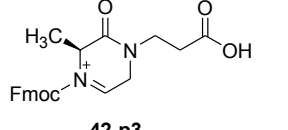
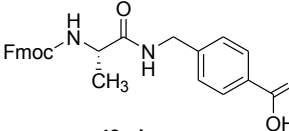
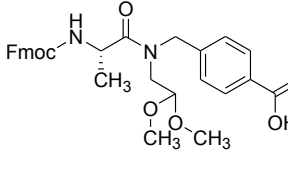
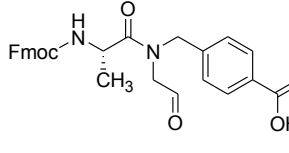
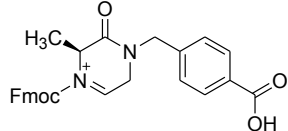
Obě stříkačky byly spojeny plastovou spojkou a vloženy na 30 minut do mrazáku. Po půl hodině byly obsahy stříkaček spojeny a stříkačka byla vložena pro vytemperování na laboratorní teplotu na třepačku. Poté byla reakční směs přenesena do vialky, uzavřené pryžovou zátkou a byla dána do reaktoru vyhřívaného na 50°C přes noc.

Po provedení Mitsunobu reakce byly udělány LC-MS analýzy dvojnásobným způsobem – odštěpením z pryskyřice pomocí 50% TFA (1. vzorek) a po odstranění aktivující skupiny a pro reakci pryskyřice s Fmoc-alaninem (2. vzorek). Analýza ukázala širokou škálu produktů.

V první analýze produktu **41** měla výchozí látka stejný retenční čas jako **41-p2** a **41-p3**. Objevily se také hmoty, které měly stejný retenční čas jako produkty, ovšem nebylo možné zjistit, o jaké látky se jedná. Obecně však tato analýza byla ze všech tří analýz nejčistější. V analýze produktu **42** se objevila jak výchozí látka, která měla retenční čas stejný s produktem **42-p2**, tak jednotlivé formy produktů a také látky, které jsem nemohla identifikovat. V poslední analýze – produkt **43**, byla situace nejhorší, obecně vzniklo málo produktů a objevily se píky s hmotou, které jsem nebyla schopna určit. Všechny formy těchto produktů a výchozích látek jsou uvedeny v tabulce 3.

I přes všechny tyto komplikace byly plochy jednotlivých píků zintegrovány a bylo zjištěno, že v reakci je stále určitý podíl výchozích látek (až 45%). Mitsunobu reakce byla tedy zopakována se všemi deriváty a opět byly provedeny LC-MS analýzy. Po zintegrování všech ploch píků ve spektru bylo zjištěno, že v reakci stále zůstává určité množství výchozích látek (až 27%). Reakce tudíž neproběhly kvantitativně. Objasnění tohoto faktu by mohlo být předmětem dalšího výzkumu. Podíl výchozích látek i produktů ukazuje tabulka 4.

Tabulka 3:

Výchozí látky 41-vl, 42-vl, 43-vl	Produkty 41-p, 42-p, 43-p		
 <p>41-vl</p>	 <p>41-p1</p>	 <p>41-p2</p>	 <p>41-p3</p>
 <p>42-vl</p>	 <p>42-p1</p>	 <p>42-p2</p>	 <p>42-p3</p>
 <p>43-vl</p>	 <p>43-p1</p>	 <p>43-p2</p>	 <p>43-p3</p>

Tabulka 4:

Číslo produktu	Integrace plochy píků po 1. MR		Integrace plochy píků po 2. MR	
	Výchozí látka	Produkt	Výchozí látka	Produkt
41	28 %	72 %	24 %	76 %
42	19 %	81 %	15 %	85 %
43	45 %	55 %	27 %	73 %

8. Experimentální část

8.1. Použité přístroje a metody

- LC-MS spektra byla měřena na systému skládajícího se z:
 - UHPLC chromatograf (Accela Thermo Scientific).
 - Hmotnostní spektrometr s trojitým kvadrupólovým analyzátozem.
 - Detektor TSQ Quantum Access (Thermo Scientific, CA, USA).
- Vyhodnocení LC-MS spekter bylo prováděno v rozsahu vlnových délek 200-700 nm.
- ¹H a ¹³C NMR spektra byla měřena v DMSO-d₆ při 25°C na spektrometru Varian 400 FT NMR.
- Všechny používané výchozí suroviny jsou komerčně dostupné a byly použity bez čištění.

Pro techniku solid-phase syntézy se používají speciální reakční nádoby – stříkačky s polypropylenovou fritou pro reakce probíhající při laboratorní teplotě nebo vialky s pryžovou zátkou pro reakce při zvýšené teplotě v reaktoru. Pro lepší průběh reakce jsou stříkačky umístěny na speciální zařízení, tzv. třepačku, kde dochází k promíchávání reakční směsi s pryskyřicí.

Příprava vzorků na LC-MS analýzu

Pro analýzu vzorků na LC-MS je potřeba, aby byly produkty odštěpeny z pryskyřice. Pro přípravu vzorků bylo odebráno malé množství pryskyřice (přibližně 5 mg) a byla přidána štěpící směs, což je 50% TFA v DCM. Štěpící reakce probíhala 30 minut. Poté byla TFA spolu s DCM odpařena dusíkem a produkt extrahován z MeOH (1 ml). Celá směs pryskyřice s odštěpeným produktem byla přefiltrována přes mikrofiltr a přenesena do vialky na LC-MS analýzu.

Zjišťování loadingu

Loading udává, kolik milimolů látky se naváže na jeden gram pryskyřice. Zjišťuje se porovnáním ploch píků vzorku a vnějšího standardu z LC-MS spektra. Zjišťování loadingu bylo prováděno následovně. Před samotnou kvantifikací byla pryskyřice smíchána s roztokem *N*-(9-fluorenylmethoxykarbonyloxy)sukcinimidu – Fmoc-Osu (0,5M) v DCM. Reakce probíhala 30 minut při pokojové teplotě. Reakční směs byla poté promyta 5x v DCM. Následně bylo odebráno přibližně 10 mg pryskyřice do jedné stříkačky. Vždy byly připravovány dva vzorky. Pryskyřice byla poté vysušena dusíkem. Následně bylo odváženo přesné množství z každé stříkačky. Vzorky byly štěpeny 30 minut štěpící směsí (50%

TFA/DCM) – dále jako „standardní štěpení“ a příprava vzorku na LC-MS analýzu. Vzorky byly extrahovány přesně MeOH (1 ml). Současně byla provedena i analýza standardu Fmoc-Osu (1ml; 0,01M) v MeOH

Příprava 2-(3-amino-3-oxopropyl)-3-(4-methylbenzoyl)-2H-indazol 1-oxidu 13

a) Štěpení Fmoc protektivní skupiny

250 mg Rinkovy pryskyřice **1** bylo nabobtnáno v DCM a 3x promyto v DMF. Pryskyřice **1** byla smíchána se 3 ml 50% piperidinu v DMF a reakční směs byla protřepávána 15 minut. Poté byla reakční směs vypuštěna a pryskyřice **2** promyta 3x v DMF a 5x v DCM.

b) Acylace Rinkovy pryskyřice β -alaninem a zjišťování loadingu

250 mg ochráněné Rinkovy pryskyřice **2** bylo reagováno s roztokem acylační směsi obsahující Fmoc- β -Ala-OH (3-(9H-Fluoren-9-ylmethoxykarbonylamino)-propionová kyselina) - (280 mg; 0,9 mmol) a HOBt (138 mg; 0,9 mmol) v celkových 3ml DCM/DMF (1:1). Následně bylo přidáno DIC (139 μ l; 0,9 mmol). Acylační směs byla nasáta do stříkačky obsahující pryskyřici **2** a reakce probíhala přes noc při pokojové teplotě. Pro kvalitativní zhodnocení byla provedena zkouška s indikátorem – bromfenolová modř tak, že byl malý vzorek pryskyřice **7** smíchán s roztokem tohoto indikátoru. Před kvantifikací byla pryskyřice **7** třepána s roztokem Fmoc-Osu (168,7 mg) v DCM (1 ml). Reakce probíhala 30 minut, poté byla reakční směs vypuštěna, pryskyřice 5x promyta DCM a bylo z ní odebráno do dvou vzorků. Následně byla pryskyřice vysušena a bylo odváženo 2x 10 mg. Loading 0,44 mmol/g. Čistota dle LC-MS: 98%

9H-fluoren-9-ylmethyl ester (2-karbamoyl-ethyl)-karbamové kyseliny: $[M+H]^+$
= 310,98

c) Reakce s 2-nitrobenzensulfonyl chloridem – příprava 3-(2-nitrobenzensulfonylamino)-propionamidu

Fmoc protektivní skupina na β -alaninu navázaném na pryskyřici byla ochráněná pomocí 50% piperidinu v DMF (15 minut). Poté byla pryskyřice **8** promyta 3x v DMF a 3x v DCM. Pryskyřice **7** byla smíchána s reakční směsí 2-nitrobenzensulfonyl chloridu (166 mg; 3 mmol), 2,6-lutidinu (96 μ l; 3,3 mmol) ve 2,5ml DCM. Reakce probíhala přes noc při pokojové teplotě.

Následně byla provedena LC-MS analýza odebráním malého množství pryskyřice a bylo provedeno standardní štěpení.

Čistota dle LC-MS: 100%

3-(2-Nitro-benzensulfonylamino)-propionamid: $[M+H^+] = 273,81$

- d) Reakce s 2-bromo-1-*p*-tolylethanonem – příprava 3-[(2-nitro-benzensulfonyl)-(2-oxo-2-*p*-tolyl-ethyl)-amino]-propionamidu

Pryskyřice **8** s navázaným 2-nitrobenzensulfonyl chloridem byla 3x promytá v DCM a 5x v DMF a poté smíchána s reakční směsí 2-bromo-1-*p*-tolylethanonem (266,3 mg; 0,5M; 1,5 mmol) a DIEA (435μl; 1M; 3 mmol) ve 2,5 ml DMF. Reakce probíhala přes noc. Pryskyřice **9** byla promyta 3x v DMF a 3x v DCM. Poté bylo provedeno standardní štěpení a připravený vzorek na LC-MS analýzu.

Čistota dle LC-MS: 100%

3-[(2-Nitro-benzenesulfonyl)-(2-oxo-2-*p*-tolyl-ethyl)-amino]-propionamid: $[M+H^+] = 405, 90$

- e) Cyklizace na finální 3-[3-(4-methyl-benzoyl)-1-oxy-indazol-2-yl]-propionamid

Pryskyřice **9** byla smíchána s roztokem DBU (75μl; 0,2M; 1mmol) ve 2,5ml DMF. Reakční směs byla protřepávána 30 minut při pokojové teplotě a poté promyta 3x v DMF a 3x v DCM. Bylo provedeno opět standardní štěpení a LC-MS analýza.

Čistota dle LC-MS: 100%

3-[3-(4-Methyl-benzoyl)-1-oxy-indazol-2-yl]-propionamid: $[M+H^+] = 323,92$

- f) Izolace produktu

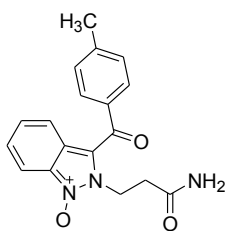
Pryskyřice s navázaným produktem **10** byla 1 hodinu štěpena v 50% TFA. TFA bylo odfoukáno proudem dusíku. Produkt byl suspendován v 5 ml diethyletheru. Byla vysrážena žlutá sraženina, která byla odfiltrována a vložena do lyofilizátoru. Filtrát byl zanalyzován pomocí LC-MS.

Výtěžek: 12,4 mg (26%).

- g) Příprava vzorku na NMR analýzu

10 mg produktu bylo rozpuštěno v 800 μl deuterovaného dimethylsulfoxidu (DMSO) tak, že byl vzorek nejprve rozpuštěn v 650 μl rozpouštědla, dále na vypláchnutí vialky bylo použito 100 μl a následně dalších 50 μl. Roztok převeden do NMR vialky přes mikrofiltr.

2-(3-amino-3-oxopropyl)-3-(4-methylbenzoyl)-2H-indazol 1-oxid 13



Výtěžek 12.4 mg (26%). APCI-MS $m/z = 323.92$, $[M+H]^+$. 1H NMR (300 MHz, DMSO- d_6), ppm 7.76 (d, $J=8.8$ Hz, 1 H), 7.68 (d, $J=7.9$ Hz, 2 H), 7.45 (br. s., 1 H), 7.40 (d, $J=8.2$ Hz, 2 H), 7.31 – 7.38 (m, 1 H), 7.20 - 7.28 (m, 1 H), 6.94 (br. s., 1 H), 6.85 (d, $J=8.5$ Hz, 1 H), 4.94 (t, $J=7.2$ Hz, 2 H), 2.73 (t, $J=7.2$ Hz, 2 H), 2.45 (s, 3 H).

^{13}C NMR (75 MHz, DMSO- d_6): 181.6, 170.9, 143.1, 136.4, 129.3, 129.2, 128.5, 127.6, 126.3, 120.1, 119.6, 117.4, 113.4, 42.1, 32.6, 21.3.

2-(5-aminopentyl)-3-(4-methylbenzoyl)-2H-indazol 1-oxid 24

a) Aktivace Wangovy pryskyřice a reakce s 1,5-diaminopentanem

250 mg Wangovy pryskyřice **19** bylo nabobtnáno v DCM, pryskyřice byla smíchána s reakční směsí CDI (202,5 mg; 1,25 mmol) a pyridinu (100 μ l; 1,25 mmol) v DCM a směs byla třepána 3 hodiny. Následně byla pryskyřice 3x promyta v DCM a byl přidán roztok 1,5-diaminopentanu (146 μ l; 1,25 mmol) v DCM (2,5 ml) a reakce probíhala další 3 hodiny.

b) Zjišťování loadingu

Loading byl zjišťován stejným způsobem jako v předchozím případě a vyšel 0,59 mmol/g.

Čistota dle LC-MS: 100%

9H-fluoren-9-ylmethyl ester (5-amino-pentyl)-karbamové kyseliny: $[M+H]^+ = 324,96$

c) Reakce s 2-nitrobenzensulfonyl chloridem – příprava *N*-(5-Amino-pentyl)-2-nitrobenzenesulfonamidu

250 mg pryskyřice **20** bylo promyto 3x v DCM a byla přidána reakční směs 2-nitrobenzensulfonyl chloridu (166 mg; 3 mmol) a 2,6-lutidinu (96 μ l; 3,3 mmol) v DCM (2,5 ml). Reakce probíhala přes noc při pokojové teplotě.

Čistota dle LC-MS: 100%

N-(5-Amino-pentyl)-2-nitro-benzensulfonamid: $[M+H]^+ = 287,87$

d) Reakce s 2-bromo-1-*p*-tolyl-ethanonem – příprava *N*-(5-Amino-pentyl)-2-nitro-*N*-(2-oxo-2-*p*-tolyl-ethyl)-benzensulfonamidu

250 mg pryskyřice **2** bylo promyto 3x v DCM a 5x v DMF. K pryskyřici byl přidán roztok obsahující 2-bromo-1-*p*-tolyl-ethanon (266 mg; 0,5M; 1,5 mmol) a DIEA (435 μ l; 1 M; 3 mmol) v DMF (2,5 ml). Reakce probíhala přes noc při pokojové teplotě.

Čistota dle LC-MS: 100%

N-(5-Amino-pentyl)-2-nitro-*N*-(2-oxo-2-*p*-tolyl-ethyl)-benzensulfonamid: $[M+H^+] = 419,89$

e) Cyklizace na finální 2-(5-aminopentyl)-3-(4-methylbenzoyl)-2*H*-indazol 1-oxid

Pryskyřice **22** byla smíchána s roztokem DBU (75 μ l; 0,2M; 1mmol) v DMF (2,5 ml). Reakční směs byla protřepávána 30 minut při pokojové teplotě a poté promyta 3x v DMF a 3x v DCM. Bylo provedeno opět standardní štěpení a LC-MS analýza.

Čistota dle LC-MS: 100%.

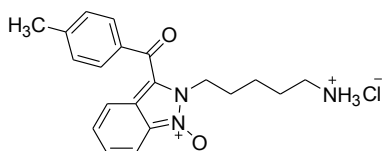
2-(5-aminopentyl)-3-(4-methylbenzoyl)-2*H*-indazol 1-oxid: $[M+H^+] = 337,96$

f) Izolace produktu

Pryskyřice s navázaným produktem **23** byla 1 hodinu štěpena v 50% TFA a TFA bylo odpařeno proudem dusíku. Produkt byl nejdříve suspendován v diethyletheru, neobjevila se žádná sraženina, poté byla přidána kapka HCl, objevil se pouze zákal. Produkt byl proto izolován na semipreparativní kolonce C18-silikagel. Kolonka byla nejdříve promyta AcCN, potom vodou a následně byl nanesen vzorek. Po provedení chromatografie bylo získáno celkem sedm frakcí; jedna vodná, pět AcCN a nakonec jedna methanolová. Všechny frakce byly zanalyzované pomocí LC-MS a na základě výsledků z LC-MS spektra byla první a druhá AcCN frakce spojena dohromady. Rozpouštědlo bylo odpařeno a produkt vložen do lyofilizátoru.

Výtěžek: 49,0 mg (90%).

2-(5-aminopentyl)-3-(4-methylbenzoyl)-2*H*-indazol 1-oxid **24**



Výtěžek 49,0 mg (90 %). APCI-MS $m/z = 337.96$, $[M+H]^+$. 1H NMR (300 MHz, DMSO- d_6), ppm 7.85 – 7.76 (m, 4 H), 7.69 (d, $J=7.9$ Hz, 2 H), 7.31 - 7.45 (m, 3 H), 7.26 (t, $J=7.5$ Hz, 1 H), 6.86 (d, $J=8.6$ Hz, 1 H), 4.78 (t, $J=7.1$ Hz, 2 H), 2.85 – 2.74 (m, 2 H), 2.45 (s, 3 H), 1.88 (dt, $J=14.0, 7.2$ Hz, 2 H), 1.59 (dt, $J=14.5, 7.6$ Hz, 2 H), 1.33 - 1.49 (m, 2 H).

^{13}C NMR: 181.6, 143.1, 136.6, 129.3, 129.1, 128.6, 127.7, 126.3, 120.2, 119.9, 116.6, 113.4, 45.1, 38.6, 27.4, 26.5, 22.8, 21.2.

Syntéza 2*H*-indazolů s peptidomimetikem

V prvních třech bodech popíšu společné kroky pro oba produkty. V dalším kroku došlo k rozdělení pryskyřice na polovinu a pro každou reakci byla použita jiná aminokyselina. Další kroky jsou pro obě látky opět stejné.

Příprava (*S*)-2-(4-(4-(2-amino-2-oxoethyl)-2-methyl-3-oxo-3,4-dihydropyrazin-1(2*H*)-yl)-4-oxobutyl)-3-(4-amino-3,5-dichlorobenzoyl)-6-nitro-2*H*-indazol 1-oxidu **39**

a (*S*)-2-(4-(4-(2-amino-2-oxoethyl)-2-(4-hydroxybenzyl)-3-oxo-3,4-dihydropyrazin-1(2*H*)-yl)-4-oxobutyl)-3-(4-amino-3,5-dichlorobenzoyl)-6-nitro-2*H*-indazol 1-oxidu **40**

a) Štěpení Fmoc protektivní skupiny a acylace kyselinou bromoctovou

500 mg Rinkovy pryskyřice **1** bylo nabobtnáno v DCM, 3x promyto v DMF a následovalo odchránění Fmoc protektivní skupiny 50% piperidinem v DMF (15minut). Následovalo 3x promytí pryskyřice v DMF a 3x v DCM. Byl vytvořen roztok z bromoctové kyseliny (350 mg; 5mmol), DIC (193 μ l; 2,5 mmol) v DCM (5 ml). Vyloučila se sraženina diisopropylmočoviny (DIU), která se odfiltrovala. K filtrátu bylo přidáno DIEA (218 μ l; 2,5 mmol). Tato reakční směs byla smíchána s pryskyřicí. Reakce probíhala 2 hodiny při pokojové teplotě.

b) Reakce s aminoacetaldehydem dimethylacetalem a zjišťování loadingu

Pryskyřice **26** byla promyta 3x v DCM, 3x v DMF a smíchána s roztokem aminoacetaldehyd dimethylacetalu (545 μ l; 10 mmol) a DIEA (870 μ l) v DMF (5 ml). Reakce probíhala 2 hodiny při pokojové teplotě. Pryskyřice **28** byla 5x promyta v DCM a smíchána s roztokem Fmoc-Osu (338 mg) ve 2 ml DCM (30 minut) a 5x promyta DCM. Pryskyřice byla odebrána do dvou vzorků a po vysušení bylo odváženo 10,6 mg a 11 mg. Vzorky štěpeny 30 minut 50% TFA/DCM - standardní štěpení a příprava vzorku na LC-MS analýzu. Vzorky byly

extrahovány přesně 1 ml MeOH. Současně byla provedena i analýza standardu 1 ml Fmoc-Osu (0,01M) v MeOH. Loading vyšel 0,26 mmol/g.

c) Reakce s Fmoc-Ala-OH, respektive s Fmoc-Tyr(*t*Bu)-OH

500 mg pryskyřice **28** bylo rozděleno na polovinu. Rozdělení bylo provedeno tak, že pryskyřice v suspenzi byla rovnoměrně přenesena pomocí Pasteurovy pipety do dvou stříkaček.

1. 250 mg pryskyřice **28** bylo 3x promyto v DCM a třepáno s reakční směsí obsahující Fmoc-Ala-OH (280,2 mg; 0,3M), HOBt (138 mg) a DIC (139 μ l) v DCM/DMF (3 ml).
2. Další 250 mg pryskyřice **28** bylo také promyto 3x v DCM a pryskyřice byla smíchána s Fmoc-Tyr(*t*Bu)-OH (431,6 mg; 0,3M), HOBt (138 mg) a DIC (139 μ l) v DCM (3 ml).

Obě reakce probíhaly přes noc za pokojové teploty. Byla provedena LC-MS analýza pro oba produkty.

Čistota dle LC-MS: 89%

9*H*-fluoren-9-ylmethyl ester {1-[karbamoylmethyl-(2-oxo-ethyl)-karbamoyl]-ethyl}-karbamové kyseliny: $[M+H^+] = 484,03$

Čistota dle LC-MS: 92%

9*H*-fluoren-9-ylmethyl ester 4-karbamoylmethyl-2-(4-hydroxy-benzyl)-3-oxo-3,4-dihydro-2*H*-pyrazin-1-karboxylové kyseliny $[M+H^+] = 410,05$

d) Reakce s 4-(9*H*-Fluoren-9-ylmethoxykarbonylamino)-butanovou kyselinou

2x 250 mg pryskyřice **29**, **30** bylo promyto 3x v DCM a 3x v DMF, poté byla odštěpena Fmoc protektivní skupina 50% roztokem piperidinu. Po 15 minutách byl roztok odsátý a pryskyřice byla promyta 3x v DMF a 3x v DCM. Obě pryskyřice byly smíchány s roztokem Fmoc- γ -aminobutanové kyseliny (239 mg), HOBt (138 mg) a DIC (139 μ l) v DCM/DMF (3 ml). Reakce probíhala přes noc a bylo provedeno standardní štěpení a LC-MS analýza.

Čistota dle LC-MS: 100%

9*H*-fluoren-9-ylmethyl ester [4-(4-karbamoylmethyl-2-methyl-3-oxo-3,4-dihydro-2*H*-pyrazin-1-yl)-4-oxo-butyl]-karbamové kyseliny: $[M+H^+] = 477,07$

Čistota dle LC-MS: 100%

9*H*-fluoren-9-ylmethyl ester {4-[4-karbamoylmethyl-2-(4-hydroxy-benzyl)-3-oxo-3,4-dihydro-2*H*-pyrazin-1-yl]-4-oxo-butyl}-karbanové kyseliny: $[M+H^+] = 569,09$

e) Reakce s 2,4-dinitrobenzensulfonyl chloridem

Pryskyřice **31**, **32** byly promyty 3x v DCM a 3x v DMF, Fmoc protektivní skupina byla ochráněna pomocí 50% piperidinu v DMF (15 minut). Obě pryskyřice byly smíchány s reakčním roztokem 2,4-dinitrobenzensulfonyl chloridu (240 mg), 2,6-lutidinu (115 μ l) v DCM (3 ml). Reakce probíhala přes noc při pokojové teplotě. Poté byla provedena LC-MC analýza pro oba produkty.

Čistota dle LC-MS: 82%

2-{4-[4-(2,4-Dinitro-benzensulfonylamino)-butyryl]-3-methyl-2-oxo-3,4-dihydro-2*H*-pyrazin-1-yl}-acetamid: $[M+H^+] = 484,89$

Čistota dle LC-MS: 78%

9*H*-fluoren-9-ylmethyl ester {4-[4-karbamoylmethyl-2-(4-hydroxy-benzyl)-3-oxo-3,4-dihydro-2*H*-pyrazin-1-yl]-4-oxo-butyl}-karbamová kyselina: $[M+H^+] = 576,92$

f) Reakce s 1-(4-amino-3,5-dichloro-fenyl)-2-bromoethanonem

Pryskyřice **33**, **34** byly promyty 3x DCM a 3x DMF a smíchána s reakční směsí 1-(4-amino-3,5-dichloro-fenyl)-2-bromoethanonu (423,2 mg; 0,5 M), DIEA (522 μ l) v DMF (3 ml). Reakce probíhala přes noc při laboratorní teplotě.

LC-MS: analýza byla velmi komplikovaná, objevilo se množství píků, proto čistotu ani hmoty produktů zde neuvádím.

g) Cyklizace na finální indazoly:

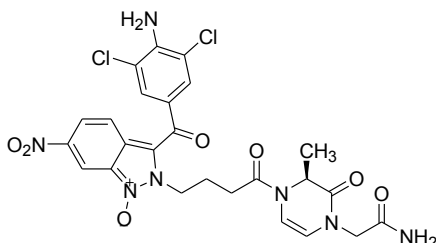
(S)-2-(4-(4-(2-amino-2-oxoethyl)-2-methyl-3-oxo-3,4-dihydropyrazin-1(2*H*)-yl)-4-oxobutyl)-3-(4-amino-3,5-dichlorobenzoyl)-6-nitro-2*H*-indazol 1-oxid 39

(S)-2-(4-(4-(2-amino-2-oxoethyl)-2-(4-hydroxybenzyl)-3-oxo-3,4-dihydropyrazin-1(2*H*)-yl)-4-oxobutyl)-3-(4-amino-3,5-dichlorobenzoyl)-6-nitro-2*H*-indazol 1-oxid 40

Pryskyřice **35**, **36** byly 3x promyty v DMF, 3x v DCM a smíchána s reakční směsí DBU (90 μ l) v DMF (3ml). Reakce probíhala 30 minut při pokojové teplotě. Poté byla provedena standardní analýza LC-MS. Produkty byly odštěpeny z pryskyřice pomocí 50% TFA v DCM (1 hodina) a TFA byla odpařena dusíkem. Oba produkty byly chromatograficky čištěny. Produkt s navázaným tyrosinem **40** byl přečištěn kompletně, avšak produkt **39** nebyl

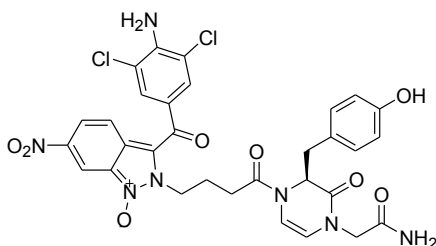
z časových důvodů přečištěn celý. Stalo se ovšem to, že tento produkt **39** byl 4 měsíce v lednici v roztoku a za tu dobu se z části rozložil, nemám proto pro něj reprezentativní data z NMR analýz.

(S)-2-(4-(4-(2-amino-2-oxoethyl)-2-methyl-3-oxo-3,4-dihydropyrazin-1(2H)-yl)-4-oxobutyl)-3-(4-amino-3,5-dichlorobenzoyl)-6-nitro-2H-indazol 1-oxid 39



APCI-MS $m/z = 605,76$, $[M+H]^+$.

(S)-2-(4-(4-(2-amino-2-oxoethyl)-2-(4-hydroxybenzyl)-3-oxo-3,4-dihydropyrazin-1(2H)-yl)-4-oxobutyl)-3-(4-amino-3,5-dichlorobenzoyl)-6-nitro-2H-indazol 1-oxid 40



Výtěžek 17,5 mg (39 %). APCI-MS $m/z = 697,89$, $[M+H]^+$. ^1H NMR (300 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) δ ppm 9.14 (s, 1 H), 8.57 (d, $J=2.0$ Hz, 1 H), 7.92 - 8.03 (m, 1 H), 7.31 - 7.48 (m, 1 H), 7.12 (br. s., 1 H), 6.84 (d, $J=8.2$ Hz, 2 H), 6.67 (br. s. 1 H), 6.48 - 6.60 (m, 3 H), 6.23 (d, $J=5.9$ Hz, 1 H), 5.80 (d, $J=5.9$ Hz, 1 H), 4.82 (t, $J=6.6$ Hz, 1 H), 4.73 (t, $J=6.2$ Hz, 2 H), 4.00 (s, 2 H), 2.69 (dd, $J=13.3, 6.3$ Hz, 2 H), 2.57 (d, $J=7.0$ Hz, 2 H), 2.03 - 2.15 (m, 2 H).

^{13}C NMR: 178.7, 169.7, 169.4, 165.1, 156.4, 146.6, 145.5, 130.8, 130.7, 127.4., 126.9, 126.6, 122.8, 121.0, 120.6, 118.2, 118.0, 116.0, 115.3, 112.0, 107.6, 56.2, 48.0, 46.1, 35.4, 29.9, 23.4

9. Závěr

Úvodní část bakalářské práce se věnuje rešerši několika typů syntéz vedoucích k derivátům *2H*-indazolů, celkově jich je zde uvedeno devět typů. Všechny zde uvedené metody jsou prováděny v roztoku a jediná syntéza derivátů *2H*-indazolů na pevné fázi je ta, kterou jsem v této práci aplikovala, proto byla k této práci přiložena krátká kapitola zabývající se úvodem k syntéze na pevné fázi. Důvodem, proč jsou *2H*-indazoly syntetizovány, je jejich potenciální biologická aktivita, na kterou se tato práce také snažila poukázat.

Hlavním záměrem bakalářské práce byla příprava derivátů *2H*-indazolů 1-oxidů pomocí syntézy na pevné fázi. Syntéza těchto derivátů je unikátní. Jednotlivé reakční komponenty jsou deriváty 2-nitrobenzensulfonyl chloridů, bromketony a primární aminy navázané na pryskyřici. Syntéza spočívá v přeměně *N*-alkyl-2-nitro-*N*-(2-oxo-1-aryl-ethyl)-benzensulfonamidů na *2H*-indazoly 1-oxidy pomocí báze DBU, ke vzniku indazolu dojde prostřednictvím vzniku vazby mezi C-C a N-N (tandemová reakce).

V první části práce byla snaha o přípravu celkem tří derivátů *2H*-indazolů 1-oxidů, avšak kvůli nízkému loadingu jednoho z derivátů se mi podařilo připravit tyto indazoly pouze dva. Obecně na derivátech *2H*-indazolů 1-oxidů existují tři diverzní místa. Oba připravené indazoly se od sebe liší substituentem na jednom z těchto míst. Reakční kroky probíhaly kvantitativně a výsledné produkty byly připraveny ve vynikající čistotě.

Druhá část práce byla zaměřena na syntézu *2H*-indazolu 1-oxidu s peptidomimetikem. Vyzkoušela jsem dvě strategie syntézy. První vycházela z bromderivátu, který vznikl reakcí primárního aminu navázaného na pryskyřici s bromoctovou kyselinou, ve druhém kroku došlo k navázání aminoacetaldehydu dimethylacetalu a následně dvou aminokyselin; tyto komponenty tvoří ve výsledné struktuře peptidomimetikum. Druhá strategie otevřela možnost přípravy derivátů, které nejsou omezeny pouze na jednouflíkatý řetězec vzniklý z bromoctové kyseliny. Pro tuto strategii byla použita Mitsunobu reakce, která umožnila vzniku rozdílných derivátů a vzniku více diverzních míst v molekule. Díky Mitsunobu reakci došlo k navázání glykolaldehydu dimethylacetalu na aminoskupinu navázanou na pryskyřici. Výsledky z této reakce nebyly dostačující, v analýze se objevovaly výchozí produkty a to i po zopakování reakce. Důvody, proč reakce neproběhly kvantitativně, by se mohly stát předmětem dalšího výzkumu. Celkem tedy byly připraveny dva indazoly s peptidomimetikem a to pouze první strategií. Připravené deriváty budou podrobeny biologickému screeningu.

10. Seznam literatury

1. Rosati, O.; Curini, M.; Marcotullio, M. C.; Macchiarulo, A.; Parfumi, M.; Mattioli, L.; Rismondo, F.; Cravotto, G. *Bioorg. Med. Chem.* **2007**, 15, 3463-3473.
2. Yakaiah, T.; Lingaiah, B. P.V.; Narsaiah, B.; Kumar, K. P.; Murthy, U. S. N. *Eur. J. Med. Chem.* **2008**, 43, 341-347.
3. Yakaiah, T.; Lingaiah, B. P.V.; Shiereesha, B.; Kumar, B. A.; Gururaj, S.; Parthasarathy, T.; Shidhar, B. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2007**, 17, 3445-3453.
4. Park, J. S.; Yu, K. A.; Kuang, T. H.; Suh, Y. G. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2007**, 17, 3486-3490.
5. Huang, L. J.; Shih, M. L.; Chen, H. S.; Pan, S. L.; Teng C. M.; Lee, F. Y.; Kuo S. C. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2006**, 14, 528-536.
6. Rakib, E.; Oulemda, B.; Abouricha, S.; Bouissane, L.; Mouse, h. A.; Ziyad, A. *Lett. Drug Des. Discovery.* **2007**, 4, 467-470.
7. Kalish, B. E.; Connop, B. P.; Jhamandas K.; Beninger, R. J.; Boegman R. *J. Neuroscience Lett.* **1996**, 219, 75-78.
8. Boulourad, M.; Schumann-Bard, P.; butt-gueulle, S.; Lohou, E.; Stiebing, S.; Collot, V.; Rault, S. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2007**, 17, 3177-3180.
9. Claramunt, R. M.; López, C.; López A.; Pérez-Medina C.; Pérez-Torrallba, M. Alkorta, I. A.; Elguero, J.; Escames G.; Acuña-Castroviejo, D. *Eur. J. Med. Chem.* **2011**, 46, 1439-1447.
10. Zhu, g. D.; Gandhi, V. B.; Gong, J. C.; Thomas, S.; Woods, K. W.; Song, X. H.; Li, T. M.; Diebold, R. B.; Luo, Y.; Liu, X. S.; Guan, R.; Klinghofer, V.; Johnson, E. F.; Bouska, J.; Olson, A.; Marsh, k. C.; Stoll, V. S.; Mamo, M.; Polakowski, J.; Champbell, T. T.; Martin, R. I.; Gintant, G. A.; Penning, t. D.; Li, Q.; Rosenberg, S. H.; Giranda, V. L. *J. Med. Chem.* **2007**, 50, 2990-3003.
11. Lee, J.; Choi, H.; Kim, K. H.; Jeong, S.; Park, J. W.; Baek, C. S.; Lee, S. H.; *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2008**, 18, 2292-2295.
12. Meng, F. Y.; Cai, X. H.; Duan, J. X.; Matteucci, M. G.; Hart, C. P.; *Cancer Chemother. Pharmacol.* **2008**, 61, 953-963.

13. Gomtsyan, A.; Bayburt, E. K.; Schmidt, R. G.; Surowy, C. S.; Honore, P.; Marsh, K. C.; Hannick, S. M.; McDonald, H. A.; Wetter, J. M.; Sullivan, J. P.; Jarvis, M. F.; Faltynek, C. R.; Lee, C. H. *J. Med. Chem.* **2008**, 51, 392-395.
14. Perner, R. J.; DiDomenico, S.; Koenig, J. R.; Gomtsyan, A.; Bayburt, E. K.; Schmidt, R. G.; Drizin, I.; Zheng, G. Z.; Turner, S. C.; Jirkenson, T.; Brown, B. S.; Keddy, R. G.; Lukin, K.; McDonald, H. A.; Honore, P.; Mikusa, J.; Marsh, K. C.; Wetter, J. M.; Jarvis, M. F.; Faltynek, C. R.; Lee, C. H. *J. Med. Chem.* **2007**, 50, 3651-3660.
15. Eicher, Theophil, Siegfried Hauptmann a Andreas Speicher. *The chemistry of heterocycles: structure, reactions, syntheses, and applications*. 2nd, completely rev., and enl. ed. Weinheim: Wiley-VCH, c2003, xvi, 556 p. ISBN 35-273-0720-6.
16. Cankařová, N.; Hlaváč, J.; Krchňák, V. *Organic Preparations and Procedures International*, **2010**, 42, 433-465.
17. Bouillon, I.; Zajíček, J.; Pudelová, N.; Krchňák, V. *J. Org. Chem.* **2008**, 73, 9027-9032
18. Behr, L. C. *J. Am. Chem. Soc.*, **1954**, 14, 3672-3675.
19. Behr, L. C.; Alley, E. G.; Levand O. *J. Org. Chem.* **1962**, 27, 65.
20. Gerpe, A.; Aguirre G.; Boiani, L.; Cerecetto, H.; Gonzáles, M. Olea-Azar, C.; Rigol, C.; Maya, J. D.; Morello, A.; Piro, O. E.; Arán, V. J.; Azqueta, A.; A. L. de Ceráin; Monge, A.; Rojas, M. A.; Yaluff G. *Bioorg. Med. Chem.* **2006**, 14, 3467-3480.
21. Nyerges, M.; Virányi, A.; Zhang, W.; Groundwater, P. W.; Blasko, G.; Tóke, L. *Tetrahedron*, **2004**, 60, 9937-9944.
22. Cadogan, j. I. G. *Quart. Rev.* **1962**, 6, 208.
23. Varughese, D. J.; Manhas, M. S.; Bose, A. K. *Tetrahedron Lett.* **2006**, 47, 6795-6797.
24. Kurth, M. J., Olmstead, M. M.; Haddadin, M. J. *J. Org. Chem*, **2005**, 70, 1060-1062.
25. Boduszek, B.; Halama, A., Zón, J. *Tetrahedron*. **1997**, 53, 11399-11410.
26. Chen, L. J.; Burka, L. T. *Tetrahedron Lett.* **1998**, 39, 5351-5354.
27. Mills, A. D.; Nazer, M. Z.; Haddadin, M. J.; Kurth, M. J. *J. Org. Chem.* **2006**, 71, 2687-2689.
28. Avila, B.; El-Dakdouki, M. H.; Nazer, M. Z.; Harrison, J. G.; Tantillo, D. J.; Haddadin, M. J.; Kurth, M. J. *Tetrahedron Lett.* **2012**, 53, 6475-6478.
29. Sun, F.; Feng, X.; Zhao, X.; Huang, Z. B.; Shi, D. Q. *Tetrahedron*. **2012**, 68, 3851-3855.
30. Sawant, D.; Kumar, R.; Maulik, P. R.; Kundu, B. *Org. Lett.* **2006**, 8, 1525-1528.
31. Kumar, M. R.; Park, A.; Park, N.; Lee, S. *Org. Lett.* **2011**, 13, 3542-3545.

32. Lee, A. Y.; Gowrisankar, S.; Kim, J. N. *Tetrahedron Lett.* **2005**, 46, 5387-5391.
33. Angelis, M. De.; Stossi, F.; Carlson, K. A.; Katzenellenbogen, B. S.; Katzenellenbogen, J. A. *J. Med. Chem.* **2005**, 48, 1132-1144.
34. Fletcher, S. R.; McIver, E. Lewis, S.; Burkamp, F.; Leech, C.; Mason, G.; Boyce, S.; Morrison, D.; Richards, G.; Sutton, K.; Jones, A. B.; *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2006**, 16, 2872-2876.
35. Fang, Y.; Wu, C.; Larock, R. C.; Shi, F. *J. Org. Chem.* **2011**, 76, 8840-8851.
36. Haag, B.; Peng, Z.; Knochel, P. *Organic Lett.* **2009**, 11, 4270-4273.
37. Luo, g. L.; Chen, L. Dubowchik, G. *J. Org. Chem.*, **2006**, 71, 5392-5395
38. Merrifield, R. B. *Journal of the American Chemical Society.* **1963**, 14, 2149-54.
39. Albercio, F.; Martin, F. G. *Chemistry Today*, **2006**, 26
40. Orain, D.; Ellard, J.; Bradley, M. *Journal of Combinatorial Chemistry.* **2002**, 4.
41. Thangadurai, A.; Minu, m.; Wakode, S.; Agraval, S.; Narasimhad, B. *Med. Chem. Res.* **2012**, 21, 1509-1523.
42. Scarpelli, R.; Boueres, J. K.; Cerretani, M.; Ferrigno, F.; Ontoria, J. M.; Rowley, M.; Schultz-Fademrecht, C.; Toniatti, C.; Philip Jones. *Bioorg. Med. Chem.* **2010**, 20, 488-492.
43. Meri de Angelis; Stossi, F.; Carlson, K. A.; Katzenellenbogen, B. S.; *J. Med. Chem.* **2005**, 48, 1132-1144.
44. Povýšil, Ctibor a Ivo Šteiner. *Obecná patologie.* 1. vyd. Praha: Galén, 2011, xiii, 290 s. ISBN 978-807-2627-738.
45. Tice, L. F. *American Pharmaceutical Association*, **1978**, 18(1), 26-31.
46. Bhavnani, B. R. *J. Steroid. Biochem. Mol. Biol.* **2003**, 85(2-5), 473-82.
47. Behl, C.; *Nature Rev. Neurosci.* **2002**, 3, 488-443.
48. Sharma, S.; Singh, R.; Rana, S. J. *Bioautomation*, **2011**, 15, 223-250.
49. Rholam, M.; Fany, C. *Cell. Mol. Life. Sci.*, **2009**, 66, 2075-2091.
50. Branch, D. R. *Pharmaceuticals*, **2011**, 4, 485-493.
51. Gurakova, M. A. *The International Journal of Biochemistry and Cell Biology*, **2007**, 39, 890-909.
52. Yehuda, S.; Rabinovitz, S.; Carasso, R. L.; Moftofsky, D. I. *Peptides*, **1998**, 19, 407-419.
53. Ruzza, P. *Peptides and Peptidomimetics in Medicinal Chemistry*, **2012**, 14.

54. Kharb, R.; Rana, M.; Sharma, P. C.; Yar, M. S. *J. Chem. and Pharm. Res.* **2011**, 3, 173-186.
55. Obrázek z: Valinomycin. *ChemicalBook* [online]. 2010. vyd. [cit. 2013-04-27]. Dostupné z: http://www.chemicalbook.com/ChemicalProductProperty_EN_CB7199194.htm.
56. Obrázek z: Colistin.sulfate: Antibiotic. *Enzo Life Sciences, Inc.* [online]. 2013 [cit. 2013-04-27]. Dostupné z: <http://www.enzolifesciences.com/ALX-380-272/colistin-.sulfate/>.
57. Cankařová, N.; Krchňák, V; *J. Org. Chem.*, **2012**, 77 (13), 5687-5695.

12. Seznam zkratek

AcCN	acetonitril
Alloc	allyoxykarbonyl
BB	bromfenolová modř
Boc	<i>tert</i> -butoxykarbonyl
CDI	karbonyldiimidazol
Cbz	karbobenzoxy
DBU	1,8-diazabicyklo[5.4.0]undek-7-en
DCM	dichlormethan
DDQ	2,3-dichloro-5,6-dikyanobenzochinon
DEAD	diethylazodikarboxylát
DIAD	diisopropylazodikarboxylát
DIC	<i>N,N'</i> -diisopropylkarbodiimid
DIEA	<i>N,N</i> -diisopropylethyldiamin
DIU	1,3-diisopropylmočovina
DMF	dimethylformamid
DMAP	4-dimethylaminopyridin
DMSO	dimethylsulfoxid
ER β	estrogenní receptor β
Fmoc	fluorenylmethoxykarboxyl
Fmoc-Osu	<i>N</i> -(9-Fluorenylmethoxykarbonyloxy)sukcinimid
HOAc	kyselina octová
HOBt	hydroxybenztriazol
MeOH	metanol
NAD ⁺	nikotin amid adenin dinukleotid

NaOAc	octan sodný
PARP	poly(ADP-ribóza)polymeráza
PrOH	propanol
SAR studie	„structure activity relationship“ – vztah mezi strukturou a aktivitou
SEM-Cl	2-(trimethylsilyl)ethoxymethyl chlorid
TBAF	tetra- <i>N</i> -butylamonium chlorid
TEA	triethylamin
TFA	trifluoroctová kyselina
TfN ₃	trifluoromethansulfonyl azid
THF	tetrahydrofuran
TMEDA	tetramethylethylenediamin
TRPV1	přechodný receptor potenciálního kationového kanálu podrodiny V členu 1 (transient receptor potential cation channel subfamily V member 1)
VEGF	vaskulární endotelový růstový faktor
YD-3	ethyl-4-(1-benzyl-1 <i>H</i> -indazol-3-yl)benzoát

13. Přílohy

INVESTICE DO ROZVOJE VZDĚLÁVÁNÍ

Inovace vzdělávání v chemii a biologii s ohledem na aktuální trendy
v biomedicínálním výzkumu
reg. č.: CZ.1.07/2.2.00/28.0184

Zahraniční studentská stáž v IUPUI

Zahraniční stáž byla realizována z projektu INOVACE VZDĚLÁVÁNÍ V CHEMII A BIOLOGII S OHLEDEM NA AKTUÁLNÍ TRENDY V BIOMEDICINÁLNÍM VÝZKUMU (CZ.1.07/2.2.00/28.0184).

<u>Účel cesty:</u>	Zvyšování odborných a jazykových schopností
<u>Účastníci:</u>	Veronika Černínová Monika Tomanová
<u>Doba trvání cesty:</u>	7. 1. 2013 do 7. 2. 2013
<u>Místo:</u>	Indiana University – Purdue University Indianapolis (IUPUI) Indianapolis, Indiana, USA
<u>Práce pod vedením:</u>	William L. Scott, Martin J.O'Donnell



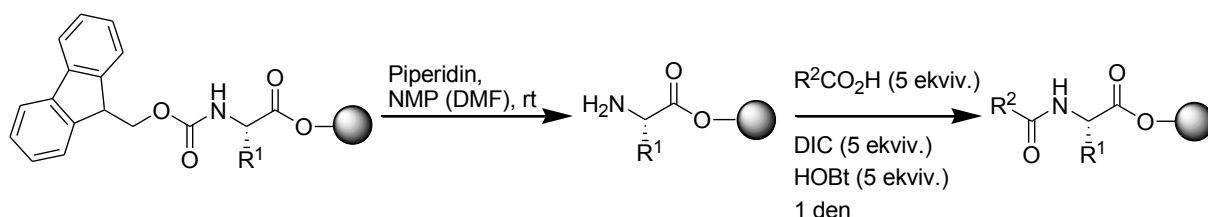
Zahraniční stáž se konala na Indiana University -Purdue University Indianapolis a trvala jeden měsíc. Byly jsme ubytované v Guest Apartment, Apartments on the Riverwalk. Byly jsme součástí D3 projektu (Distributed Drug Discovery). Pracovaly jsme každý den v laboratoři na syntéze látek s potenciálním biologickým účinkem, hlavně na tzv. neglected diseases (např. malárie). Všechny nasyntetizované látky jsme analyzovaly pomocí HPLC/MS, NMR a purifikovaly jsme je. Součástí stáže byly rovněž meetingy, konané 1x týdně, s ostatními členy podílejícími se na D3 projektu. Na konci stáže jsme měly nesyntetizováno každá 16 látek, z nichž 4 látky budou v blízké době testovány proti malárii. Stáž byla přínosná jak po chemické stránce, tak po stránce zdokonalování se v anglickém jazyce.

Referát o chemické práci na IUPUI

BILL BOARD 1

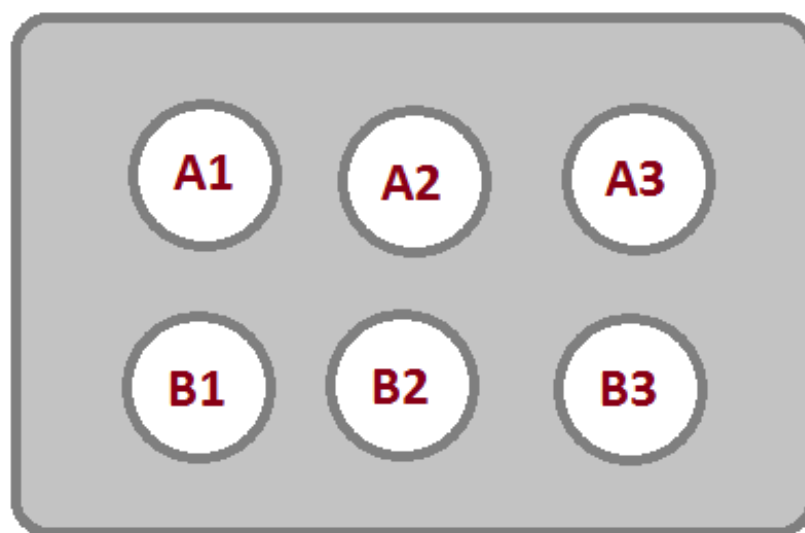
1. Deprotekce, acylace

Schéma č. 1: Odchránění Fmoc projektivní skupiny a acylace



Každá jsme dostala jeden tzv. bill board, do kterého jsme daly 6 oboustranně průchozích vialek s filtrem.

Obrázek č. 1: Schéma Bill Boardu

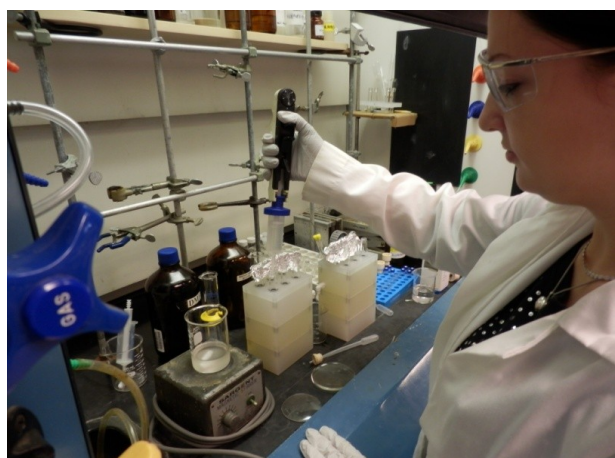


Do vialek jsme rozdělily „isopycnic mixture“, kterou jsme si připravily za asistence vedoucího. Isopycnic mixture se připravuje tak, že si do kádinky navážíme předem vypočítané množství pryskyřice (50 μ mol/vialka), pak přidáme DMF a CH_2Cl_2 v takovém množství abychom dostali homogenní směs.

Obrázek č. 2. Isopycnic mixture



Obrázek č. 3. Rozdělování Isopycnic mixture



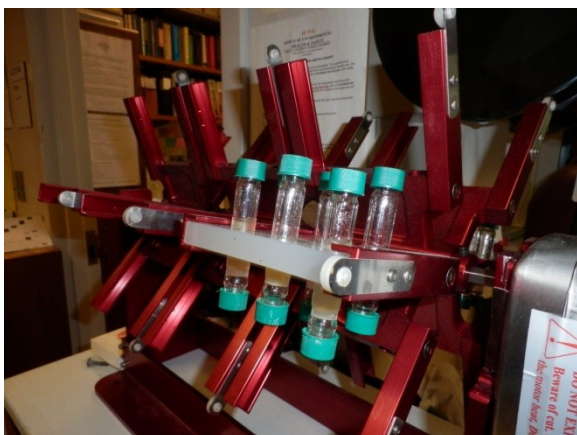
Tuto směs jsme pak rozdělovaly do vialek, tímto způsobem se mělo zajistit stejnoměrné rozdělení pryskyřice do vialek, protože v každém přidavku bylo stejné množství pryskyřice, jelikož směs byla homogenní.

Připravily jsme 2 druhy isopycnic mixture – Fmoc-fenylalanin jsme rozdělily do řad A, Fmoc-tyrosin do řad B. Pryskyřice jsme promyli DMF, odštěpily Fmoc protektivní skupiny 20% piperidinem v DMF – přidaly jsme 2 ml roztoku a nechaly v něm pryskyřici 5 min stát, pak jsme roztok vypustily a 2x opakovaly předchozí krok. Po odštěpení jsme pryskyřice promyli DMF. Následovala acylace, pro kterou jsme si připravily roztoky 3 acylačních činidel o koncentraci 0,25mol/l. Do každého sloupce bill boardu jsme přidaly 1 acylační činidlo, roztok HOBt v DMF a DIC jsme přidaly do všech vialek. Tuto reakční směs jsme nechaly míchat do dalšího dne.

Tabulka č. 1: Navážky činidel na acylaci

Sloupec BB		Počet vialek	μmol/vialka	20% nadbytek	Množství (mg)	Obj. na 0,25M	Obj. na 0,5M
1	<chem>O=C(O)c1ccncc1</chem>	2	250	600	73,87	2,4 ml	-
2	<chem>O=C(O)c1ccc([N+](=O)[O-])cc1</chem>	2	250	600	100,27	2,4 ml	-
3	<chem>O=C(O)c1ccc(cc1)-c2ccccc2</chem>	2	250	600	118,9	2,4 ml	-
1, 2, 3	<chem>O=C(O)N1C=NC2=CC=CC=C12</chem>	6	250	1800	275,65	7,2 ml	-
1, 2, 3	<chem>CC(C)N=C(N)C(C)C</chem>	6	250	1800	227,16	-	3,6 ml

Obrázek č. 4: Míchání reakčních roztoků



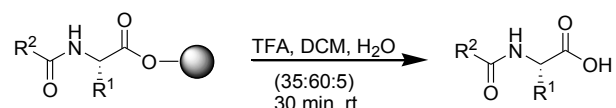
Obrázek č. 5: Bill board s reakčními roztoky



Acylační roztoky jsme vypustily z vialek a vypudily je z pryskyřice vzduchem pod mírným tlakem, pak jsme pryskyřice promývaly 2x 3ml DMF, 2x 3ml THF a nakonec 3x 3ml CH₂Cl₂.

2. Odštěpení produktů

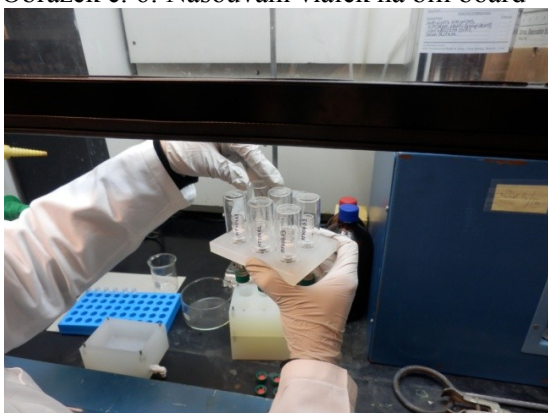
Schéma č. 2: Odštěpení produktů



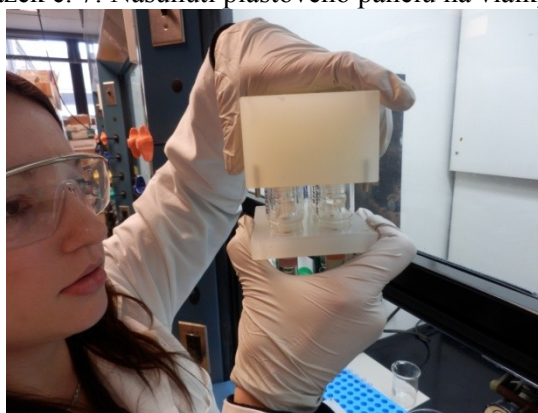
Nejdříve jsme zazátkovaly spodní strany všech vialek a pak jsme do každé vialky přidaly 2ml štěpícího koktejlu složeného z TFA/CH₂Cl₂/H₂O v poměru 35:60:5. Následně jsme vialky zazátkovaly zcela a nechaly štěpící koktejl 30 min působit. Mezitím jsme vzaly větší čisté vialky, zvážíly je a také jsme si připravily dalších 6 vialek pro HPLC.

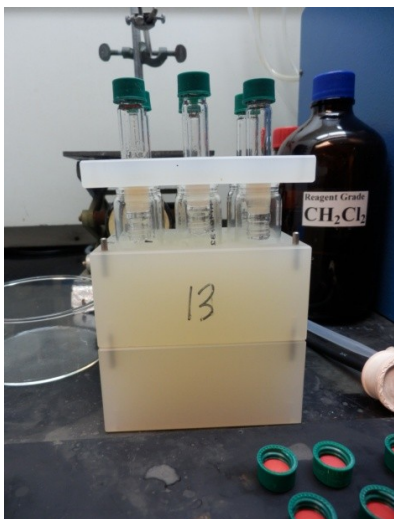
Po 30 minutách jsme přetočily bill board tak, že jsme měly spodní víčka nahoře a sundaly je. Zvážené a označené vialky jsme postavily dnem nahoru na vialky v bill boardu, na takto převrácené vialky jsme nasunuly plastový panel a tento celý systém jsme otočily, aby odštěpený produkt odtékal skrz filtr do označených a zvážených vialek. Odtok jsme urychlily vzduchem pod mírným tlakem.

Obrázek č. 6: Nasouvání vialek na bill board



Obrázek č. 7: Nasunutí plastového panelu na vialky





Obrázek č. 8: Odtékání produktu do vialek

Pryskyřice jsme ještě promyli 2ml štěpícího koktejlu a 2ml CH_2Cl_2 a vzduchem pod mírným tlakem jsme pryskyřice vysušily. Pak jsme sundaly bill board ze sběrných vialek. Z každé vialky jsme odebraly 100 μl roztoku produktu do 6 HPLC vialek.

Následovalo odfoukání štěpícího koktejlu. Tento proces probíhal v uzavřených plastových komorách s přívodem dusíku, do kterých jsme umístily vialky. Páry byly odváděny do odpadní lahve s hydroxidem, čímž se zamezovalo vypařování TFA do ovzduší. Vialky s produkty jsme zvážily a zjistily, kolik produktu jsme získaly.

Obrázek č. 9: Odraňovací komora

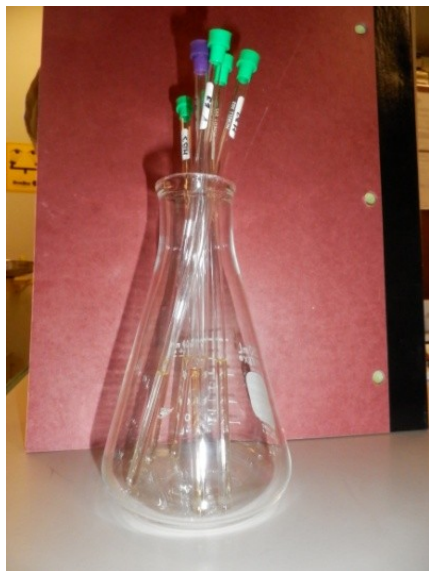


3. HPLC a NMR analýzy

K vysušeným vzorkům produktů v HPLC vialkách jsme přidaly acetonitril s metanolem v poměru 1:1, tak aby byla vialka alespoň z poloviny naplněná. Zkontrolovaly jsme, zda se vše rozpustilo a pak jsme udělaly analýzu na HPLC.

Příprava vzorků pro NMR analýzu: Do vialek se vzorky jsme přidaly 500μl HmDS, 5% CD₃OD v CDCl₃. Některé vzorky se nerozpustily zcela, proto jsme k těmto vzorkům přidaly ještě 4 kapky CD₃OD, pokud se ani tak nerozpustili, přidaly jsme ještě 200 μl HmDS. Pak jsme vzorky skleněnými pipetami transferovaly do NMR trubiček. Analýzy se prováděly na přístroji s frekvencí 500MHz.

Obrázek č. 9: Vzorky pro NMR



Obrázek č. 10: NMR



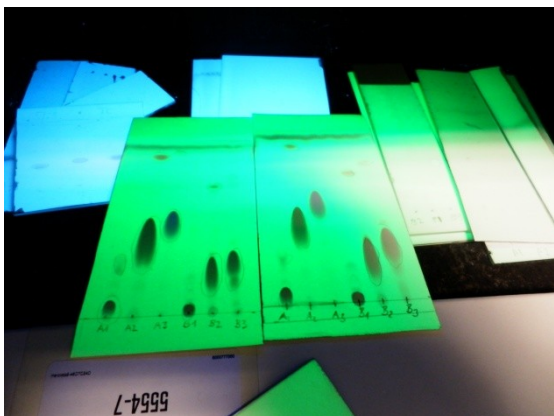
Tabulka č. 2: Produkty

	Sloupec 1	Sloupec 2	Sloupec 3
	<chem>O=C(O)c1ccncc1</chem>	<chem>O=C(O)c1ccc([N+](=O)[O-])cc1</chem>	<chem>O=C(O)c1ccc(cc1)-c2ccccc2</chem>
<chem>Fmoc-NH-CH(Ph)-CO-O-Sphere</chem> Řada A	<chem>O=C(O)C(NC(=O)c1ccncc1)C(c2ccccc2)C(=O)O</chem>	<chem>O=C(O)C(NC(=O)c1ccc([N+](=O)[O-])cc1)C(c2ccccc2)C(=O)O</chem>	<chem>O=C(O)C(NC(=O)c1ccc(cc1)-c2ccccc2)C(c3ccccc3)C(=O)O</chem>
<chem>Fmoc-NH-CH(4-OH-Ph)-CO-O-Sphere</chem> Řada B	<chem>O=C(O)C(NC(=O)c1ccncc1)C(c2ccc(O)cc2)C(=O)O</chem>	<chem>O=C(O)C(NC(=O)c1ccc([N+](=O)[O-])cc1)C(c2ccc(O)cc2)C(=O)O</chem>	<chem>O=C(O)C(NC(=O)c1ccc(cc1)-c2ccccc2)C(c3ccc(O)cc3)C(=O)O</chem>

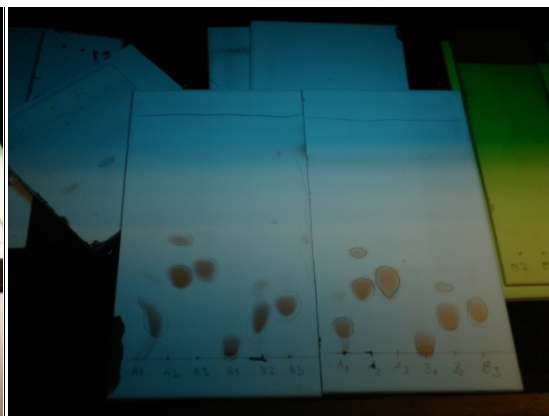
4. TLC analýzy

Používaly jsme 5x10cm silika gel TLC desky a CN-silika gel desky, na každou jsme nanesly značky pro 6 vzorků označených A1-A3 a B1-B3. Do každé vialky ke vzorkům jsme odpipetovaly 300 μ l acetonu a rozpustily je. Vzorky jsme nanesly na značky, nechaly je zaschnout a pak jsme je vyvíjeli s mobilní fází $\text{CHCl}_3/\text{THF}/\text{AcOH}$ (85/15/2) pro silika-gel, hexan/acetone (7/3) pro CN-silika gel. Pod UV lampou jsme pak pozorovaly, zda vzorky obsahují nečistoty, případně kolik. Podle R_f jsme pak přibližně dokázaly odhadnout, při jakém poměru rozpouštědel vymyjeme produkt z kolony při purifikaci.

Obrázek č. 11: Vyvinuté TLC – silika gel



Obrázek č. 12: Vyvinuté TLC – CN- silika gel



5. Purifikace

Produkty jsme čistily na 500mg CN-silikagelové koloně. Nejdříve jsme vzorky rozpustily ve 250-300 μ l acetonu, pak jsme tento roztok nanesly na kolonu a do výpusti kolony jsme zapojily přívod dusíku a aceton odfoukaly, aby produkt zůstal v horní vrstvě kolony.

Obrázek č. 13: Odfoukávání acetonu dusíkem



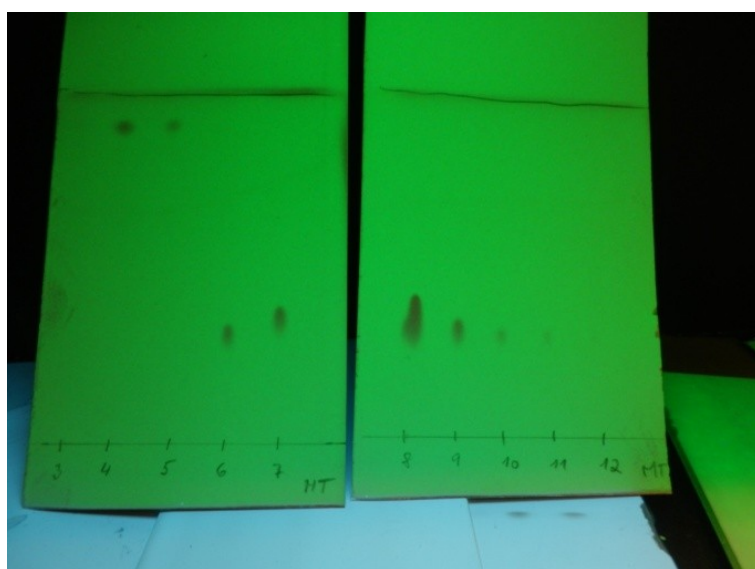
Když byl všechen aceton odfoukaný, odpojily jsme přívod dusíku a začaly purifikovat. Používaly jsme systém mobilních fází hexan/aceton. Začaly jsme vymývat čistým hexanem, pak 9:1 hexan/aceton, 8:2 hexan aceton až 5:5 hexan/aceton. Mobilní fázi jsme přidávaly po 2ml, frakce jsme sbíraly rovněž po 2ml. Z každé frakce jsme nanesly na TLC silika-gelovou desku (pokud bylo nutno tak na TLC CN-silikagelovou desku) kapilárou vzorek, pak jsme pod UV lampou zjišťovaly, zda se už eluluje produkt, případně nečistota. Podle vzorků frakcí na TLC jsme pak upravovaly sílu mobilní fáze.

Poté, co jsme ukončily purifikaci, jsme udělaly TLC analýzu všech frakcí na silikagelu, které obsahovaly produkt nebo nečistoty. Mobilní fázi jsme použily stejnou jako v předchozím případě $\text{CHCl}_3/\text{THF}/\text{AcOH}$ (85/15/2). Pak jsme frakce se stejným R_f kvantitativně převedly do čisté a zvážené vialky a odfoukaly přes noc rozpouštědla.

Obrázek č. 14.: Sbíráání frakcí



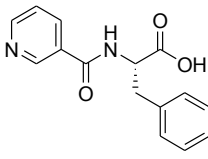
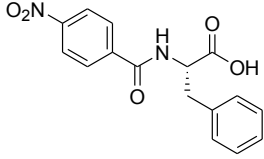
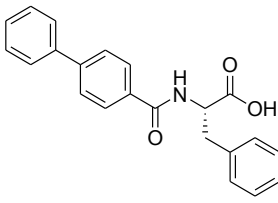
Obrázek č. 15: TLC-silica gel analýza frakcí



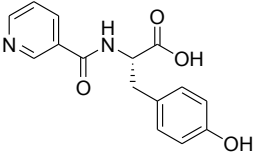
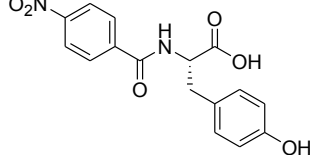
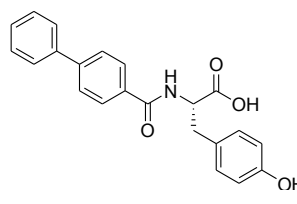
Úplně nakonec jsme udělaly NMR analýzu čistých produktů.

Výsledky:

Tabulka č. 3: Data z BB1, řada A

Finální data z BB#1 řada A						
						
Značka produktu	MT1-04-A1	VC1-06-A1	MT1-04-A2	VC1-06-A2	MT1-04-A3	VC1-06-A3
MW	270,3		314,3		345,4	
Teoretický výtěžek (mg)	13,6	13,6	15,8	15,8	17,4	17,4
Výtěžek (mg)	18,2	20,6	15,6	17,1	14,5	15,4
QNMR Výtěžek (mg)	10,2	8,8	14,8	13,5	14,7	15,3
QNMR výtěžek (%)	74,6	64	85,7	85	84,5	88
Čistota - LC/MS při 210 nm	76%	66%	93,90%	82%	94%	96%
Přecistěný výtěžek (mg)	7,2	7,5	8,8	9,9	7,3	9,3
Přecistěný výtěžek (%)	53	55	56	63	42	53

Tabulka č. 4: Data z BB1, řada B

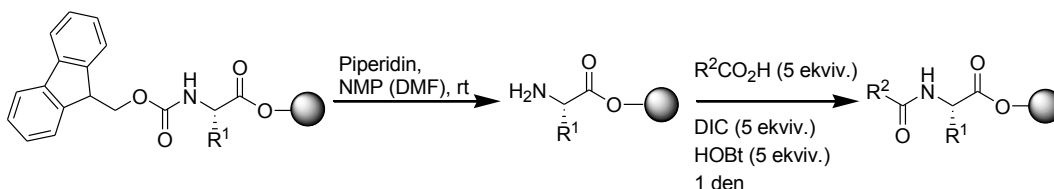
Finální data z BB#1 řada B						
						
Značka produktu	MT1-04-B1	VC1-06-B1	MT1-04-B2	VC1-06-B2	MT1-04-B3	VC1-06-B3
MW	286,3		330,3		361,4	
Teoretický výtěžek (mg)	14,5	14,5	16,5	16,7	18	18,3
Výtěžek (mg)	23,2	21,9	18,4	19,3	15,5	15,8
QNMR Výtěžek (mg)	13,8	12,3	13	13,1	15,5	15
QNMR výtěžek (%)	95,3	85	77,8	78	84,6	82
Čistota - LC/MS při 210 nm	86%	82%	87%	83%	88%	85%
Přecistěný výtěžek (mg)	6,0; 2,9	5,6; 2,3	8,5	10	9,1	5,4
Přecistěný výtěžek (%)	61	54	50,9	69	49,7	30

Bill Board 2

Pro přípravu sloučenin v Bill Boardu 2 jsme postupovali stejně jako v předchozím případě. Pouze jsme používaly jiné acylační roztoky (viz tabulka č. 5) a reakci jsme při acylaci nemíchali, ale nechaly volně stát.

1. Deprotekce, acylace

Schéma č. 1: Deprotekce, acylace



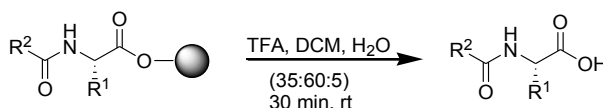
Tabulka č. 5: Acylační činidla pro BB2

Sloupec BB		Počet vialek	$\mu\text{mol/vialka}$	20% nadbytek	Množství (mg)	Obj. na 0,25M	Obj. na 0,5M
1		2	250	600	73,87	2,4 ml	-
2		2	250	600	73,2	2,4 ml	-
3		2	250	600	103,2	2,4 ml	-
1,2,3		6	250	1800	275,65	7,2 ml	-
1,2,3		6	250	1800	227,16	-	3,6 ml

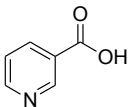
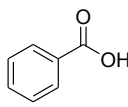
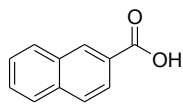
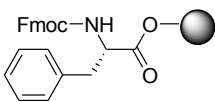
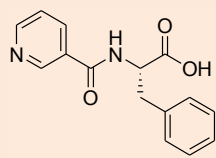
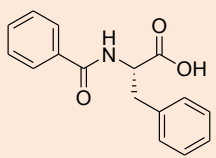
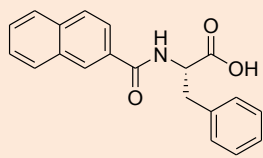
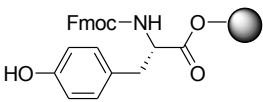
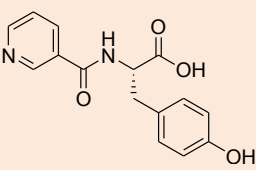
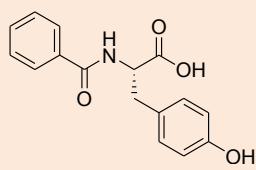
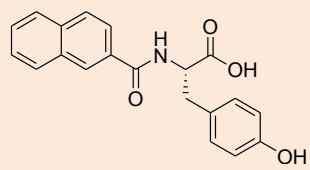
2. Odštěpení produktů

Taktéž k odštěpení produktů z pryskyřice jsme použily stejný štěpící koktejl i pracovní postup.

Schéma č. 2: Štěpení produktů



Tabulka č. 6: Produkty

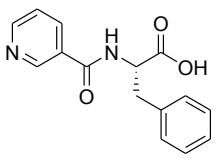
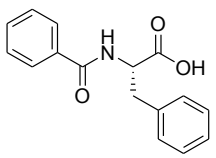
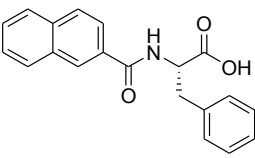
	Sloupec 1	Sloupec 2	Sloupec 3
			
 řada A			
 řada B			

Kroky 3, 4 a 5

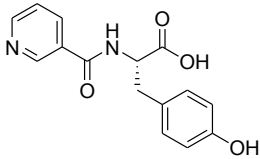
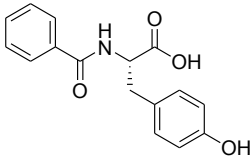
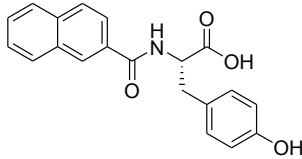
Rovněž jsme udělaly analýzy na HPLC i NMR a analýzy na tenkých vrstvách. Purifikaci jsme provedly jen u těch vzorků, jejichž značka začínala iniciály VC, a to z toho důvodu, že produkty s označením MT budou podstupovat testování na biologickou aktivitu v hrubém stavu. Po purifikaci jsme udělaly znovu NMR analýzu již čistých produktů.

Výsledky:

Tabulka č. 7: Data z BB2, řada A

Finální data z BB#1 řada A						
						
Značka produktu	MT2-13-A1	VC2-18-A1	MT2-13-A2	VC2-18-A2	MT-13-A3	VC2-18-A3
MW	270,28		269,3		319,35	
Teoretický výtěžek (mg)	13,9	13,9	13,8	13,8	16,4	16,4
Výtěžek (mg)	19,5	19	15	13,5	17,4	16,9
QNMR Výtěžek (mg)	12,5	12,6	12,9	12,7	15,1	15,9
QNMR výtěžek (%)	89,6	91	93,3	92	92,1	97
Čistota - LC/MS při 210 nm	92%	95%	96%	91%	97%	98%
Přecistěný výtěžek (mg)	-	8	-	8,2	-	10,9
Přecistěný výtěžek (%)	-	58	-	59	-	66

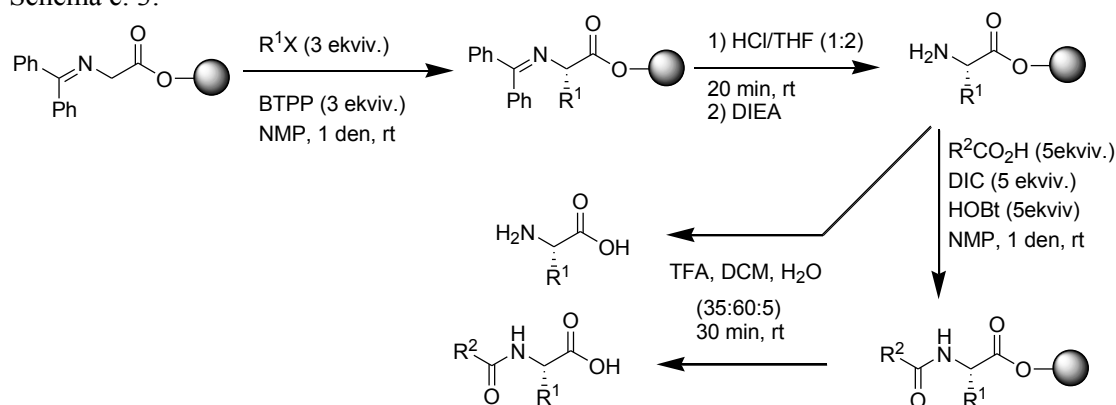
Tabulka č. 8: Data z BB2, řada B

Finální data z BB#2 řada B						
						
Značka produktu	MT2-13-B1	VC2-18-B1	MT2-13-B2	VC2-18-B2	MT2-13-B3	VC2-18-B3
MW	286,28		285,3		335,35	
Teoretický výtěžek (mg)	14,7	14,7	14,6	14,6	17,2	17,2
Výtěžek (mg)	21,9	20,9	16,1	15,9	18,9	18,7
QNMR Výtěžek (mg)	11,6	13,5	13	14,4	15	15,9
QNMR výtěžek (%)	86,4	92	89	99	87,2	92
Čistota - LC/MS při 210 nm	91%	93%	92%	93%	96%	96%
Přecistěný výtěžek (mg)	-	6,9	-	10,4	-	10,8
Přecistěný výtěžek (%)	-	47	-	71	-	63

BILL BOARD 3

Příprava produktů v BB3 se od předchozích dvou trochu lišila. Na rozdíl od prvních dvou produktů došlo ještě k alkylnaci obou řad a následně řada B bill boardu byla acylována. Tento proces je znázorněn ve schématu č. 3.

Schéma č. 3:

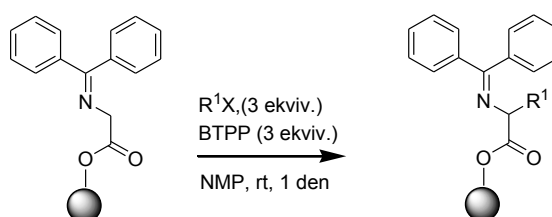


1. Příprava isopycnic mixture a alkylace

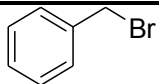
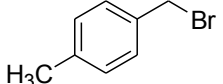
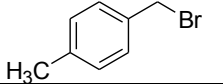
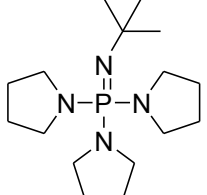
Isopycnic mixture jsme připravily stejně jako v předchozích případech, použily jsme Wangovu pryskyřici s navázaným benzofenon iminem glycinu. Připravily jsme si ji pro 12 vialek, dva bill boardy, a rovnoměrně jsme ji rozdělily do každé vialky, poté jsme pryskyřici 3 krát promyly 3 ml NMP.

Zazátkovaly jsme spodní část vialek a přidaly jsme do každé vialky 0,3ml roztoku BTTPP (303 μ l ve 2ml NMP) a vyčkaly 5 minut, došlo ke katalyzaci reakce. Připravily jsme si tři alkylační roztoky. Alkylační směs bromomethyl-benzenu v NMP jsme přidaly do A1 a B1, směs 1-bromomethyl-4-methyl-benzenu v NMP do A2 a B2 a směs 1-bromomethyl-4-methyl-benzenu v NMP do A3 a B3. Vialky jsme zazátkovaly a nechali reakci probíhat přes noc při volném stání.

Schéma č. 4: Alkylace



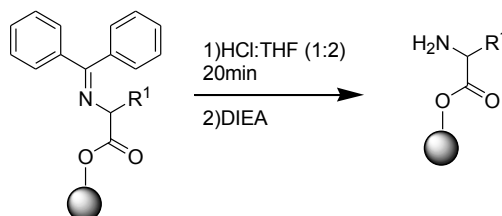
Tabulka č. 9: Alkylační činidla pro BB3

Sloupec BB		Počet vialek	$\mu\text{mol/vialka}$	10% nadb.	Množství (mg)	Obj. na 0,5M	Obj. NMP
1		2	150	330	56,4	0,66 ml	0,6
2		2	150	330	61,07	0,66 ml	0,06
3		2	150	330	81,55	0,66 ml	0,6
1, 2, 3		6	150	990	309,3 (303.24 μl)	1,98 ml	1,67

2. Neutralizace a hydrolýza

Po alkylnaci jsme pryskyřici promyli 3 ml THF, zazátkovaly jsme spodní část vialek a přidaly jsme 2,5 ml HCl-THF (1:2) do každé vialky, zazátkovaly jsme i vrchní část vialek a počkali 20 minut. Pak jsme promyli pryskyřici 3 ml THF a dvakrát jsme přidaly 2,5 ml 0,2M roztoku DIEA v NMP a pak jsme směs 2 krát promyli 2,5 ml NMP.

Schéma č. 5: Neutralizace a hydrolýza

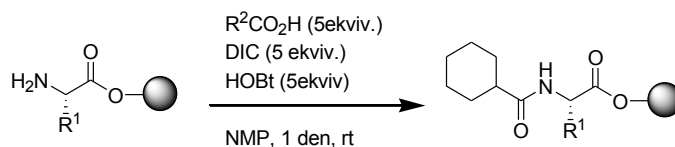


3. Acylace

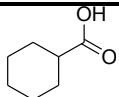
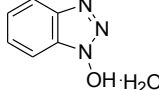
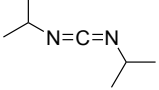
Acylační činidlo byla cyklohexan karboxylová kyselina. Vypočítané množství HOBt jsme rozpustily ve 3,3 ml NMP a tento roztok jsme přidaly do vypočítaného množství kyseliny. Tento roztok jsme rozdělily po 1ml do každé z vialek v řadě B.

Dále jsme přidaly 0,5 ml roztoku DIC do každé vialky z řady B. Acylační reakce probíhala přes noc.

Schéma č. 6: Acylace



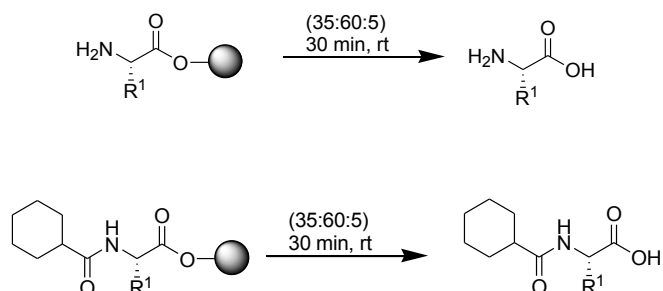
Tabulka č. 10: Acylační činidla BB3 – řada B

Sloupec BB		Počet vialek	μmol/vialka	10% nadbytek	Množství (mg)	Obj. na 0,25M
1		3	250	825	106	1
1, 2, 3		6	250	825	126	3,3
1, 2, 3		6	250	1800	104 (127,8 μl)	1,65

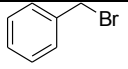
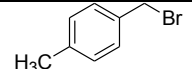
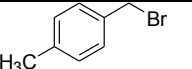
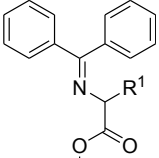
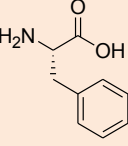
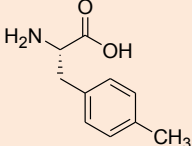
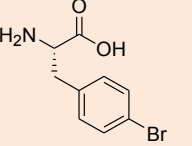
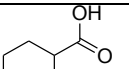
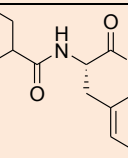
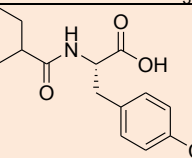
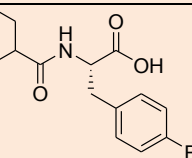
4. Odštěpení produktů

Štěpení jsme provedly stejně jako v předchozích dvou bill boardech a získaly jsme dalších 6 produktů.

Schéma č. 7: Štěpení řady A a B z BB3



Tabulka č. 11: Produkty

		Sloupec 1	Sloupec 2	Sloupec 3
				
				
Řada A i B				
	Řada B			

Z odštěpených produktů se opět odebralo 100μl roztoku do HPLC vialek a ze všech vialek bylo odfouknáno rozpouštědlo.

5. HPLC a NMR analýzy

Pro HPLC se do vialek s produkty opět přidal acetonitril s metanolem v poměru 1:1 asi do půlky vialky a provedla se analýza.

Pro NMR analýzu byly všechny vzorky rozpuštěny ve 300 μ l H₂O a 600 μ l CD₃OD, aby se vzorky lépe rozpustily. Roztoky jsme přenesly do NMR vialek a provedly NMR analýzu.

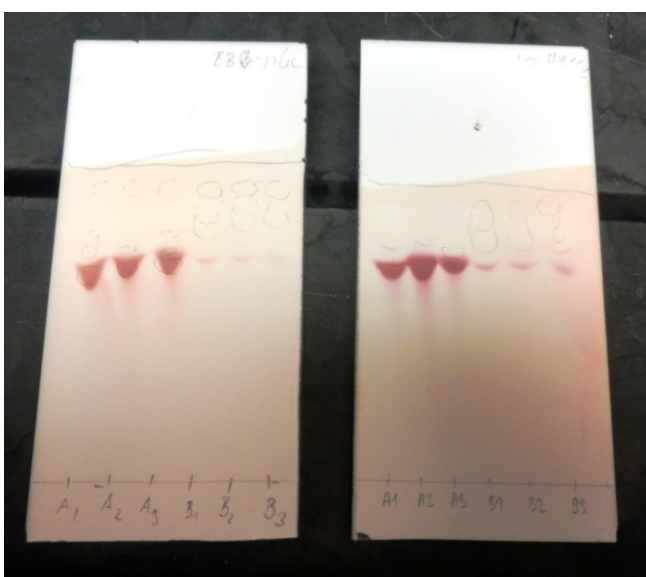
6. TLC analýzy

TLC analýza produktů z BB3 se prováděla na skleněné desce silikagelu. Po provedení NMR jsme vzorky přenesly zpět do vialek a z těchto roztoků jsme odebraly vzorky pro TLC. TLC jsme nechaly vyvíjet v mobilní fázi iPrOH/MeOH/NH₃ (3:2:1). Po analýze jsme se na TLC podívaly pod UV lampou, ovšem látky neobsahovaly dostatečný chromofor, proto jsme skvrny musely vizualizovat. Vizualizace skvrn se provedla ponořením plátu do roztoku ninhydrinu a po vyjmutí z roztoku jsme plát zahřívaly, až se objevily barevné skvrny.

Obrázek č. 16: Zahřívání TLC plátu



Obrázek č. 17: TLC plátky z BB3 po vizualizaci skvrn



7. Čištění produktů

Jelikož jsme neměly dostatek času, rozhodly jsme se provést čištění jen jednoho bill boardu – s iniciály VC.

Čištění produktů z řady A:

Produkty jsme rozpustily v mobilní fázi iPrOH/MeOH/NH₄OH (5:2:1), objevila se bílá krystalická látka, látku jsme odfiltrovaly a provedly NMR analýzu, zjistily jsme, že se jedná o náš produkt.

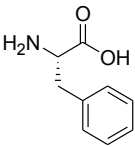
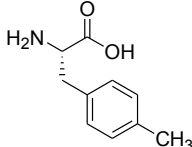
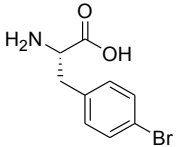
Filtráty jsme přečistily na 500mg silikagelové kolonce. Kolonky jsme promyly mobilní fází iPrOH/MeOH/NH₄OH (5:2:1) a nadávkovaly vzorek. Čištění jsme prováděly stále stejnou mobilní fází iPrOH/MeOH/NH₄OH (5:2:1) po přidavcích 0,5 ml. Filtrát také obsahoval náš produkt.

Čištěné produktů z řady B.

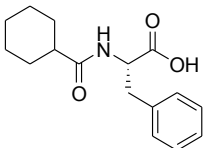
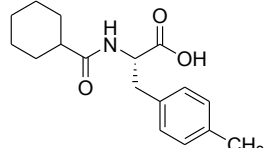
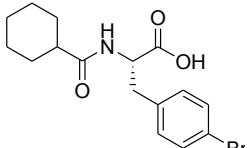
Produkty byly rozpuštěny v mobilní fázi CHCl₃/THF/AcOH (85:15:2) ve 250μl. Silikagelové kolonky jsme promyly touto mobilní fází a nadávkovaly vzorek. Čištění bylo provedeno pěti přidavky 0,5ml mobilní fázi.

Výsledky:

Tabulka č. 12: Data z BB3 řada A

Finální data z BB#3 řada A						
						
Značka produktu	MT3-19-A1	VC3-34-A1	MT3-13-A2	VC3-34-A2	MT3-13-A3	VC3-34-A3
MW	165,2		179,2		244,1	
Teoretický výtěžek (mg)	8,6	8,6	9,3	9,3	12,7	12,7
Výtěžek (mg)	167,4 s NMP	11,7	19,2	20,1	12,4 s NMP	19,6
QNMR Výtěžek (mg)	3,4	6,1	7,4	8,2	3,7	10,6
QNMR výtěžek (%)	39,4	71	79,6	88	29,2	83
Čistota - LC/MS při 210 nm	66.3% bez NMP; 8,3% s NMP	77%	79,5% bez NMP; 54% s NMP	57%	69% bez NMP; 8.6% s NMP	68%
Přečistěný výtěžek (mg)	-	1,1; 2,6	-	1,4; 3,0	-	1,4; 3,6
Přečistěný výtěžek (%)	-	43	-	47	-	39

Tabulka č. 13: Data z BB3 řada B

Finální data z BB#3 řada B						
						
Značka produktu	MT3-13-B1	VC3-34-B1	MT3-13-B2	VC3-34-B2	MT3-13-B3	VC3-34-B3
MW	275,3		289,4		354,2	
Teoretický výtěžek (mg)	14,3	14,3	15,0	15,0	18,4	18,4
Výtěžek (mg)	16,0	11,9	12,6	13,8	15,4	15,3
QNMR Výtěžek (mg)	36,1	19,8	17,9	24,6	27,5	28,4
QNMR výtěžek (%)	252	138%	119,4	164%	149,6	154%
Čistota - LC/MS při 210 nm	82,3%	79%	76,7%	80%	74,4%	80%
Přečištěný výtěžek (mg)	-	5,5	-	5,7	-	7,3
Přečištěný výtěžek (%)	-	38	-	38	-	40

Shrnutí a závěr:

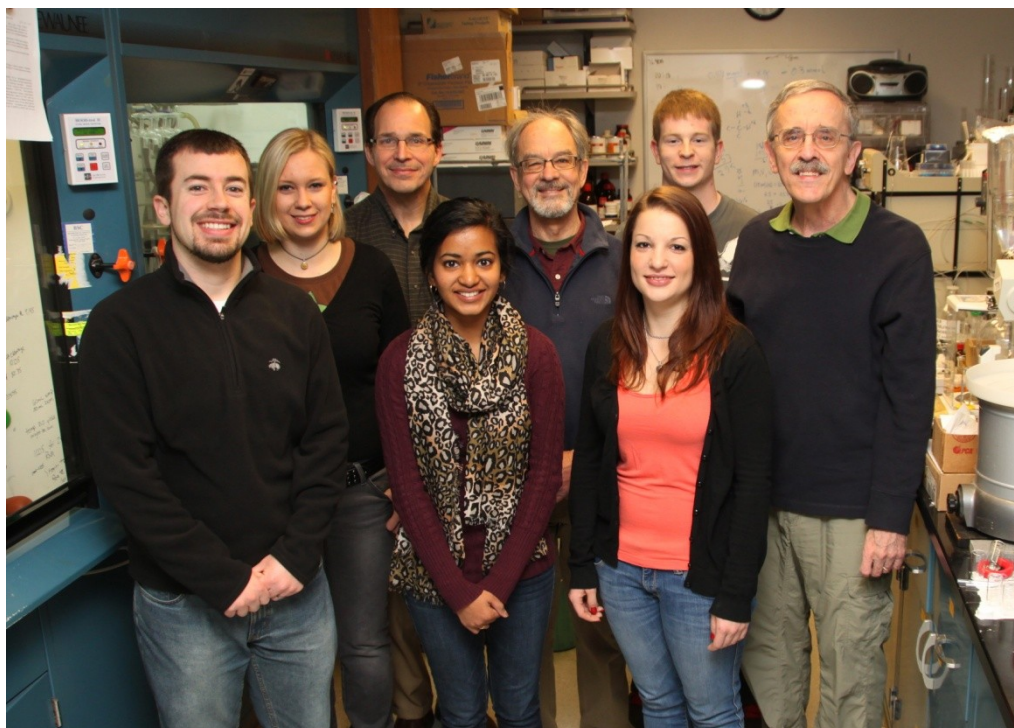
Naše stáž trvala měsíc a během této doby jsme připravily každá tři bill boardy látek. Vzhledem k tomu, že v prvním a druhém bill boardu byly v pozicích A1 a B1 kontrolní látky, které byly pro oba bill boardy stejné, připravily jsme celkem 16 látek. Všechny látky jsme zanalyzovaly pomocí TLC techniky, dále pomocí HPLC/MS a NMR. Všechny tyto techniky jsme si samy vyzkoušely, jak přípravu vzorků, tak samotnou analýzu, vyzkoušely jsme si práci se softwarem HPLC/MS a NMR (1H-NMR) techniky a také jsme analýzy vyhodnocovaly.

Naši práci jsme každý týden konzultovali na meetingu. Všechny látky měly být přečištěny, vzhledem k tomu, že naše stáž trvala pouze měsíc, neměly jsme tedy dostatek času. Na meetingu jsme se rozhodly, že každá přečistí svůj první bill board a druhý a třetí bill board bude přečištěn jen od jedné z nás, zbylé látky přečistí buď jiní studenti, nebo se případně budou testovat jako hrubé vzorky, takové testy jsou rovněž zajímavé.

Všechny přečištěné vzorky byly také analyzovány pomocí NMR (1H-NMR). Vybraly jsme dvě sloučeniny jako reprezentativní látky a byla u nich provedena také analýza 13C-NMR, tato analýza však byla provedena již po našem návratu domů. Jedná se o látky B3 z prvního BB a B3 ze třetího BB, tyto látky byly také analyzovány pomocí HRMS, rovněž po našem návratu.

Některé informace dáváme dohromady pomocí emailů s dr. Samaritonim, se kterým jsme spolupracovali, a od pana prof. Scotta jsme obdržely email o tom, že čtyři látky budou testovány proti malárii v Kalifornské univerzitě v San Franciscu (UCSF).

Obrázek č. 18: Kolektiv lidí, se kterými jsme spolupracovali – vpravo Martin J. O'Donnell, uprostřed William L. Scott, vlevo od profesora Scotta - Jack Geno Samaritoni



Seznam zkratek:
BB – bill board

