Studium možností přípravy 1*H*-benzo[e]pyrrolo [1,2-*a*][1,4]diazepintrionů vycházející z chinolin- 2,4(1*H*,3*H*)-dionů

Bc. Mariia Khilchenko

Diplomová práce
2020

Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně
Fakulta technologická

Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně
Fakulta technologická
Ústav chemie

Akademický rok: 2019/2020

ZADÁNÍ DIPLOMOVÉ PRÁCE

(projektu, uměleckého díla, uměleckého výkonu)

Jméno a příjmení:	**Bc. Mariia Khilchenko**
Osobní číslo:	**T18702**
Studijní program:	**N2901 Chemie a technologie potravin**
Studijní obor:	**Chemie potravin a bioaktivních látek**
Forma studia:	**Prezenční**
Téma práce:	**Studium možností přípravy 1H-benzo[e]pyrrolo[1,2-a][1,4]diazepintrionů vycházející z chinolin-2,4(1H,3H)-dionů**

Zásady pro vypracování

I. Teoretická část

1. Zpracovat literární rešerši zaměřenou na přípravu a biologické účinky analogů k připraveným derivátům v rámci DP.

II. Praktická část

1. Vybraný 4-hydroxychinolin-2(1*H*)-on převést účinkem sulfurylchloridu na odpovídající 3-chlorchinolin-2,4(1*H*,3*H*)-dion.
2. Pokusit se nalézt vhodné podmínky pro převedení 3-chlorchinolin-2,4(1*H*,3*H*)-dionu na 1*H*-benzo[*e*][1,4]diazepin-2,5-dion nesoucí vhodný zbytek z kyseliny propanové.
3. Po přípravě dostatečného množství sloučeniny uvedené v bodě 2, pokusit se o cyklizaci jejího postranního řetězce směřovanou k tvorbě 1*H*-benzo[*e*]pyrrolo[1,2-*a*][1,4]diazepintrionu.
4. Izolované produkty charakterizovat dostupnými metodami instrumentální analýzy.
5. Vyhodnotit výsledky experimentů a sepsat diplomovou práci.

Forma zpracování diplomové práce: **Tištěná/elektronická**

Seznam doporučené literatury:

[1] McMURRY, J.: Organická chemie. 2005, 1. vyd., VŠCHT Praha.

[2] ANNOR-GYAMFI, J. K., JARRETT, J. M., et al.: Synthesis and biological activity of fused tetracyclic pyrrolo [2,1-c][1,4]benzodiazepines. Heliyon 2018, 4, 539.

[3] MANTAJ, J., JACKSON, P. J. M., et al.: From Anthramycin to Pyrrolobenzodiazepine (PBD)-Containing Antibody-Drug Conjugates (ADCs). Angew. Chem. Int. Ed. 2017, 56, 462-488.

Vedoucí diplomové práce: **Ing. Roman Kimmel, Ph.D.**
Ústav chemie

Datum zadání diplomové práce: **3. února 2020**
Termín odevzdání diplomové práce: **15. května 2020**

L.S.

prof. Ing. Roman Čermák, Ph.D.
děkan

Ing. Michal Rouchal, Ph.D.
ředitel ústavu

Ve Zlíně dne 18. února 2020

PROHLÁŠENÍ AUTORA
DIPLOMOVÉ PRÁCE

Beru na vědomí, že:

- diplomová práce bude uložena v elektronické podobě v univerzitním informačním systému a dostupná k nahlédnutí;
- na moji diplomovou práci se plně vztahuje zákon č. 121/2000 Sb. o právu autorském, o právech souvisejících s právem autorským a o změně některých zákonů (autorský zákon) ve znění pozdějších právních předpisů, zejm. § 35 odst. 3;
- podle § 60 odst. 1 autorského zákona má Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně právo na uzavření licenční smlouvy o užití školního díla v rozsahu § 12 odst. 4 autorského zákona;
- podle § 60 odst. 2 a 3 autorského zákona mohu užít své dílo – diplomovou práci nebo poskytnout licenci k jejímu využití jen s předchozím písemným souhlasem Univerzity Tomáše Bati ve Zlíně, která je oprávněna v takovém případě ode mne požadovat přiměřený příspěvek na úhradu nákladů, které byly Univerzitou Tomáše Bati ve Zlíně na vytvoření díla vynaloženy (až do jejich skutečné výše);
- pokud bylo k vypracování diplomové práce využito softwaru poskytnutého Univerzitou Tomáše Bati ve Zlíně nebo jinými subjekty pouze ke studijním a výzkumným účelům (tj. k nekomerčnímu využití), nelze výsledky diplomové práce využít ke komerčním účelům;
- pokud je výstupem diplomové práce jakýkoliv softwarový produkt, považují se za součást práce rovněž i zdrojové kódy, popř. soubory, ze kterých se projekt skládá. Neodevzdání této součásti může být důvodem k neobhájení práce.

Prohlašuji,

- že jsem diplomové práci pracoval samostatně a použitou literaturu jsem citoval. V případě publikace výsledků budu uveden jako spoluautor.
- že odevzdaná verze diplomové práce a verze elektronická nahraná do IS/STAG jsou obsahově totožné.

Ve Zlíně dne:

Jméno a příjmení studenta:

……..
podpis studenta

ABSTRAKT

Představená diplomová práce je zaměřená na problematiku syntézy sloučenin benzodiazepinového a pyrrolobenzodiazepinového typu. V teoretické části je popsána jejich biologická aktivita, farmakokinetika a možnosti syntézy. Experimentální část je věnována možnostem postupné přeměny chinolin-2,4(1*H*,3*H*)-dionů na benzo[*e*]pyrrolo[1,2- *a*] [1,4]diazepin-1,5,11(10*H*,11a*H*)-triony nebo na benzo[*e*]pyrrolo[1,2-*a*][1,4]diazepin-3,5,11(2*H*,10*H*,11a*H*)-triony, které byly navrženy na základě poznatků mých předešlých kolegů.

Klíčová slova: chinolindion, benzodiazepin, pyrrolobenzodiazepin, intramolekulární přeměna, biologická aktivita

ABSTRACT

The presented master thesis is focused on the synthesis of benzodiazepine and pyrrolobenzodiazepine compounds. The theoretical part describes their biological activity, pharmacokinetics and different synthetic paths. The experimental part is devoted to the possibilities of gradual conversion of quinoline-2,4 (1*H*, 3*H*) -diones to benzo[*e*]pyrrolo [1,2-*a*][1,4]diazepine-1,5,11(10*H*, 11a*H*)- triones or benzo[*e*]pyrrolo [1,2-*a*] [1,4] diazepine-3,5,11(2*H*, 10*H*, 11a*H*)-triones, their design was based on the results of my colleagues.

Keywords: quinolindione, benzodiazepine, pyrrolobenzodiazepine, intramolecular change, biological aktivity.

Na tomto místě bych ráda poděkovala vedoucímu mé diplomové práce Ing. Romanu Kimmleovi, Ph.D především za trpělivost, obětavost, podporu a za to, že bez něj by realizace této práce nebyla možná. Za ty dva roky jsem od něj dostala nesmírné množství jak cenných rad, tak i vtipných poznámek. To vše mělo pozitivní dopad na výsledky mé práce v laboratoři a na mou následně dobrou náladu.

Dále mé poděkování patří té nejlepší kolegyňce Zuzce, která byla vždy hodná a ochotná pomoci.

V neposlední řadě bych chtěla poděkovat své rodině, která věřila, že to zvládnu, i v ty momenty, kdy jsem si nevěřila sama.

Prohlašuji, že odevzdaná verze bakalářské/diplomové práce a verze elektronická nahraná do IS/STAG jsou totožné.

OBSAH

ÚVOD **8**

I TEORETICKÁ ČÁST **9**

1. BENZODIAZEPINY **10**

1.1 HISTORIE VZNIKU BENZODIAZEPINOVÝCH LÉČIV 11

1.2 MECHANISMUS PŮSOBENÍ BENZODIAZEPINOVÝCH LÉČIV 11

1.3 FARMAKOKINETICKÉ VLASTNOSTI A METABOLISMUS BENZODIAZEPINŮ 12

1.4 SYNTÉZA BENZODIAZEPINOVÝCH DERIVÁTŮ 14

2 PYRROLOBENZODIAZEPINY **17**

2.1 INTERAKCE PYRROLOBENZODIAZEPINŮ S DNA 17

2.2 PYRROLOBENZODIAZEPINY IZOLOVANÉ Z PŘÍRODY 18

2.3 PYRROLOBENZODIAZEPINY PŘIPRAVENÉ SYNTETICKY 20

2.3.1 Monomerní pyrrolobenzodiazepiny 20

II PRAKTICKÁ ČÁST **26**

3 VÝSLEDKY A DISKUZE **27**

3.1 REKAPITULACE DOSAŽENÝCH VÝSLEDKŮ KOLEGŮ 27

3.2 STANOVENÍ CÍLŮ A ZADÁNÍ PROBLEMATIKY 29

3.3 DISKUZE VÝSLEDKU DANÉ PRÁCE 30

3.4 EXPERIMENTY PLÁNOVANÉ DO BUDOUCNA 37

4 CHARAKTERISTIKA PŘÍSTROJOVÉHO VYBAVENÍ A POUŽITÝCH INSTRUMENTÁLNÍCH METOD **40**

5 DETAILNÍ POPIS SYNTETICKÝCH POSTUPŮ A STRUKTURNÍ CHARAKTERISTIKY PŘIPRAVENÝCH SLOUČENIN **41**

5.1 PŘÍPRAVA PREKURZORŮ A CÍLOVÝCH LÁTEK 41

5.2 POSTUP NEZDAŘENÝCH EXPERIMENTŮ 46

ZÁVĚR **48**

SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY **50**

SEZNAM POUŽITÝCH SYMBOLŮ A ZKRATEK **53**

SEZNAM SCHÉMAT **54**

SEZNAM OBRÁZKŮ **55**

ÚVOD

Již 80 let benzodiazepiny a jejich deriváty pomáhají lidem trpícím úzkostnými poruchy, problémy spánku, epilepsií a svalovým napětím. Díky tomu, že s nimi nejsou téměř spjata žádná rizika, pomohli nahradit, a tím i vyřešit nežádoucí účinky barbiturátových léčiv, jako jsou sexuální disfunkce, dýchací potíže a mnoho dalších. Krátkodobé užívání těchto léků je bezpečné a léčiva se ukazují jako dost efektivní proti řadě již zmíněných na začátku onemocnění. Dlouhodobé užívání je však kontroverzní z důvodu možnosti vzniku tolerance, a závislosti, taky je důležité pamatovat, že konzumace alkoholu spolu s BZD by mohla být pro pacienta fatální.

Pyrrolobenzodiazepiny (PBD), což jsou v podstatě benzodiazepiny s přikondenzovaným pyrrolovým kruhem, tvoří další zajímavou skupinu látek, kterým jsou připisovány například kancerostatické, protiinfekční, fungicidní a analgetické účinky. Biologická aktivita PBD s konfigurací *S* a jejich derivátů je způsobena interakcí s dvoušroubovicí DNA. Tvorba takového aduktu inhibuje sérii důležitých buněčných procesů včetně vazby transkripčních faktorů na DNA a funkci některých enzymů, např. endonukleázy, která slouží u bakterií jako ochrana před nežádoucími plazmidy nebo bakteriálními víry. Ale i když teď jsou PBD léčiva účinná proti řádě druhů mikroorganismů, s časem z různých důvodů se u bakterií a plísní vyvíjí rezistence, a proto stále panuje potřeba vyvíjet nové a nové deriváty PBD. Díky tomu se o jejich syntézu hojně zajímají nejen organičtí chemici v různých koutech světa, ale i úzká skupinka lidí na našem Ústavu chemie Univerzity Tomáše Bati, kteří hledají kratší a snazší cesty k syntéze derivátů PBD, které by mohly, v případě štěstí, vykazovat zajímavé účinky na živé organismy.

I. TEORETICKÁ ČÁST

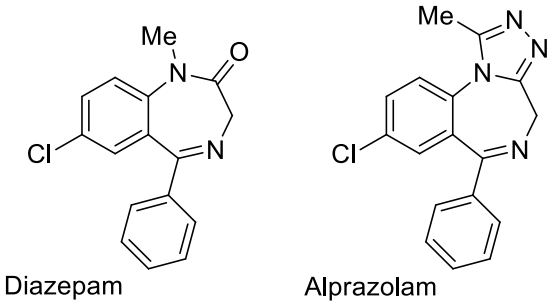
1. BENZODIAZEPINY

Benzodiazepiny (BZD) jsou vysoce účinné léčivé látky. Chemická struktura všech látek této skupiny má společný strukturní znak, skládají se z benzenového a diazepinového kruhu. Dle polohy atomů dusíků v diazepinovém kruhu lze benzodiazepiny rozdělit na:

- 1*H*-benzo[*b*][1,4]diazepiny
- 1*H*-benzo[*f*][1,4]diazepiny
- 3*H*-benzo[*d*][1,2]diazepiny
- 3*H*-benzo[*e*][1,3]diazepiny

Druhým společným strukturním znakem BZD je substituce v poloze 5 fenylovou skupinou. Účinnost BZD lze zvýšit buď substitucí uvedeného fenylu v poloze *ortho* atomem halogenu, nejčastěji chlorem anebo fluorem, anebo přítomností elektronegativní skupiny (Cl, NO_2) v poloze 7. Nitroskupina současně zesiluje hypnotický účinek na pacienta.[1]

Díky svým biologickým účinkům jsou ve farmacii nejvýznamnější 1,4- benzodiazepiny (**Obrázek 1**), které se využívají v léčbě úzkostných stavů, nespavostí, amnesie a také jako myorelaxancia, antiepileptika či hypnotika.[2]



Obrázek 1. Příklad nejčastěji používaných 1,4-benzodiazepinů. [1]

Postranní substituenty ovlivňují vázání molekuly benzodiazepinu na receptor $GABA_A$ a tak je možné modulovat farmakologické vlastnosti, farmakokinetiku a celkovou účinnost BZD.[3] Alkylace BZD v poloze 1 zvyšuje aktivitu léčiva (diazepam). Substituce v poloze 2 elektronegativním atomem kyslíku, nebo atomem dusíku, je běžná pro první generace BZD (medazepam). Substituce v poloze 3 hydroxylovou skupinou způsobuje zvýšení polarity a současně umožňuje glukoronidaci, jejímž výsledkem je rychlejší eliminace léčiva z organismu (lorazepam). Pro aktivitu BZD je optimální benzenový kruh v pozici 5. Substituce tohoto benzenového kruhu atomem chloru nebo fluoru v *ortho* poloze podnítí zvýšení aktivity léčiva (flurazepam-F, klonazepam-Cl). Substituce v poloze 7 nitroskupinou zvyšuje hypnotický účinek léčiva (klonazepam), oproti tomu substituce halogenem na

stejném místě zvýrazňuje účinek anxiolytický (lorazepam).[2] Účinnost benzodiazepinového léčiva lze taktéž měnit zvýšením nebo snížením jeho podávané dávky. Například snížení dávky BZD má za následek hypnotický účinek a potlačuje úzkost, ale naopak vyšší dávky vyvolávají u pacientů spánek.[3]

1.1 Historie vzniku benzodiazepinových léčiv

Historicky první benzodiazepin, chlordiazepoxid, byl syntetizovaný v roce 1955 chemikem Leem Sternbachem během své práce ve farmaceutické společnosti Hoffman-La Roche. Při testování biologických vlastností chlordiazepoxidu se ukázalo, že sloučenina má velmi silné sedativní, antikonvulsivní a myorelaxační účinky. V roce 1960 byla tato látka zavedena firmou Hoffman-La Roche na farmaceutický trh pod názvem Librium® a v roce 1963 stejná společnost představila více účinný diazepin známý pod názvem Valium®.[4] Nové léčivo mělo oproti původnímu ty výhody, že působilo po kratší dobu a vykazovalo anxiolytické účinky.[5]

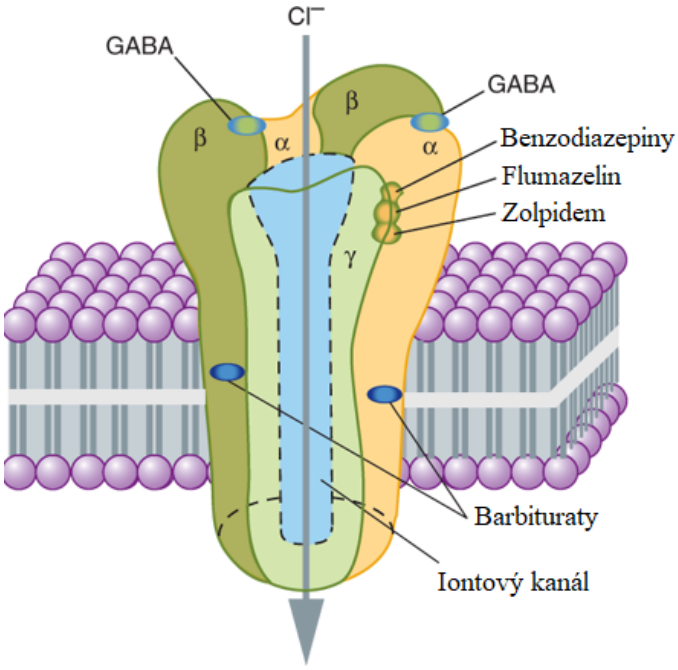
Od té doby byly dříve hojně předepisované barbituráty do značné míry nahrazeny benzodiazepiny.[6] Oproti barbiturátům použití BZD je méně rizikové. Protože mozková aktivita při požití BZD není obecně tak inhibovaná jako barbituráty, je sebevražda předávkováním nebo možná paralýza dechu téměř vyloučená.[7] I když benzodiazepiny byly nejvíce předepisovanými léky na celém světě, až za 15 let od momentu syntézy prvního benzodiazepinu (bio)chemici pochopili mechanismus působení těchto léčiv.[8]

1.2 Mechanismus působení benzodiazepinových léčiv

Působení BZD je závislé na třech faktorech. První a nejdůležitější je rychlost redistribuce z centrálního do periferního kompartmentu. Druhým faktorem je jaterní metabolismus a renální exkrece. Třetím je akutní tolerance a akutní adaptace, které jsou podmíněny sníženou citlivostí benzodiazepinových receptorů při kontinuálním podávání.[9] Hlavním principem mechanismů účinků BZD je augmentace inhibičního působení γ-aminomáselné kyseliny pozitivní alosterickou modulací postsynaptického $GABA_A$-receptoru.[10]

Pro to, aby byl vysvětlen mechanismus působení BZD léčiv je nutné porozumět, jak funguje receptor γ-aminomáselné kyseliny (GABA). GABA je neurotransmiterem v centrálním nervovém systému (CNS), který zvyšuje nebo snižuje excitabilitu neuronů, a tak reguluje mozkovou aktivitu. Po navázání GABA na příslušný receptor se otevře iontový

kanál pro chloridové ionty, které následně hyperpolarizují buněčnou membránu, což způsobí snížení excitability cílové buňky.[7] V CNS existují tři druhy GABA receptorů: $GABA_A$, $GABA_B$, $GABA_C$. BZD léčiva jsou agonistou $GABA_A$ receprorů.[2] Ionotropní receptor $GABA_A$ je proteinový komplex, který je umístěný na synapsích neuronů a je tvořený pěti glykoproteinovými subjednotky: dvěma α, dvěma β a jednou γ. BZD se obvykle váže na α subjednotku $GABA_A$ ergního komplexu (**Obrázek 2**).[2]



Obrázek 2. Vázání benzodiazepinů na receptor $GABA_A$.

BZD působí na $GABA_A$ jako pozitivní alosterický modulátor, to znamená, že BZD neovlivňuje receptor přímo, ale zvyšuje afinitu GABA pro daný receptor, tím se zvyšuje celkové vedení chloridových iontů přes membrány neuronálních buněk a důsledkem je hyperpolarizace neuronů, čímž se snižuje aktivita CNS.

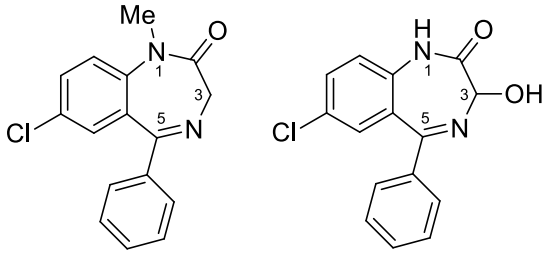
1.3 Farmakokinetické vlastnosti a metabolismus benzodiazepinů

Obvykle BZD jsou podávány orálně kvůli dobré absorpci. Absorpce se charakterizuje vysokou rychlostí, je úplná a probíhá v proximální části tenkého střeva.[9] Intravenózní podávání je charakterizované rychlou distribucí léčiva do mozku a CNS, ale jsou určeny výhradně pro mimořádné situace, jako jsou například akutní záchvaty.

BZD a jejich metabolity při podávání jsou v organismu distribuovány do vysoce prokrvených orgánů, zejména do CNS. Tyto léčiva jsou lipofilní a pasivní difuzí prochází

hematoencefalickou bariérou. Průnik do CNS je rychlý, a proto za rozdíl v nástupu účinků u různých BZD léčiv může jen rozdílná rychlost vstřebávání. Je nutné podotknout, že vysoce lipofilní BZD léčiva jsou rychleji vstřebávány a tak účinky nastupují rychleji.[11]

Metabolismus BZD lze popsat na příkladu diazepamu (**Obrázek 3**). Nejdříve proběhne demethylace na atomu dusíku v poloze 1, potom (nebo současně) na atomu uhlíku v poloze 3 nastává hydroxylace, čímž vzniká biologicky aktivní farmakofor oxazepam (**Obrázek 3**).[7] BZD ztrácí účinnost až po konjugaci hydroxylové skupiny v poloze 3 s kyselinou glukuronovou. V této formě se může z organismu snadno vyloučit ledvinami.



Obrázek 3. Struktura diazepamu (vlevo) a oxazepamu (vpravo).[7]

BZD, které místo atomu chloru mají nitroskupinu a na fenylovém substituentu atom fluoru (např. flunitrazepam) vykazují podobný metabolismus. Všechny uvedené látky s výjimkou oxazepamu, který se inaktivuje jedinou metabolickou změnou, patří ke dlouhodobě působícím.[7]

Většina BZD je metabolizována ve dvou fázích. Prvně probíhá oxidace, hydroxylace nebo dealkylace enzymy cytochromu P450 (fáze I) a dále nastává konjugace s glukuronidem nebo sulfátem (fáze II). Nakonec jsou močí vyloučeny z těla téměř úplně.[11] Některé druhy BZD mohou být metabolicky přetvářeny na aktivní metabolity (chlordiazepoxid, diazepam, flurazepam) nebo na neaktivní, které jsou vylučovány ledvinami.[10]

Jedna z klasifikací BZD je založena právě na jejich biologickém poločase a dělí se na krátce působící (biologický čas < 5 h), středně dlouho působící (biologický čas 5–24 h) a dlouhodobě působící (biologický čas > 24 h). Existují ovšem také i velmi dlouho působící, které mají dobu eliminace z organismu až do 300 h. Příkladem krátce působících BZD jsou flurazepam, midazolam a triazolam, které po podání způsobují u pacientů rychlý nástup spánku. Díky těmto účinkům se předepisují jako hypnotika. Ke středně dlouho působícím BZD léčivům patří alprazolam, chlordiazepoxid, lorazepam, oxazepam, lormetazepam, které se předepisují při léčbě úzkostných stavů. Za dlouhodobě působící BZD léčiva jsou považovány diazepam a klonazepam[11] za velmi dlouho působící prazepam a klorazepát[10]

Tyto poslední dvě skupiny BZD představují riziko akumulace v těle starších lidí a pacientů s poruchou metabolismu.

Látky s krátkým poločasem eliminace lze získat zavedením dalšího cyklu obsahujícího atom dusíku s methylovou skupinou, která se rychle hydroxyluje (midazolam, brotizolam a triazolam). Brotizolam a triazolam jsou hypnotika, midazolam se podává jako anestetikum. Látky středně dlouho působící lze získat náhradou nitroskupiny za atom chloru nebo za atom bromu. Nitroskupina se totiž poměrně rychle redukuje na aminoskupinu, která se pak ihned acetyluje. V těchto případech bioinaktivace probíhá v důsledku jen jedné jediné inaktivační reakce.[7]

1.4 Syntéza benzodiazepinových derivátů

BZD lze získat různými postupy, jak chemicky, tak i biologicky. Historicky první a klasický syntetický postup přípravy BZD, jak již bylo řečeno, byl navřen Leem Sternbachem (**Schéma 1**).[1] Principem této syntézy je kondenzace substituovaných 2-aminobenzofenonů s hydrochloridem ethyl-glycinátu. Případně požadovaná methylace polohy 1 se provádí v posledním stupni syntézy účinkem dimethylsulfátu v přítomnosti silné báze.[12]

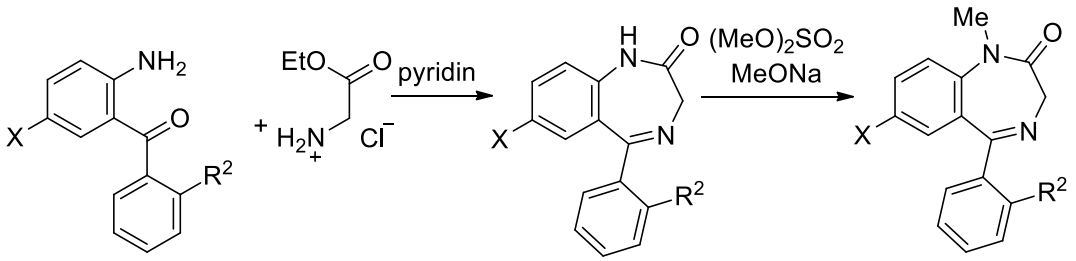
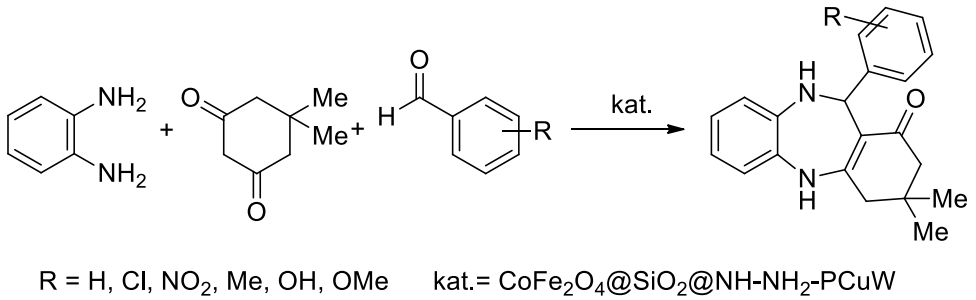


Schéma 1. Obecná syntéza benzodiazepinových sloučenin.[1]

V roce 2019 byla popsána reakce syntézy derivátů 1,4-benzodiazepinu s heterogenním nanokatalyzátorem $CoFe_2O_4$@SiO_2@NH-NH_2-PCuW (**Schéma 2**). Karbonylová skupina dimedonu se aktivuje kyselou částí katalyzátoru a reaguje ihned s aminoskupinou *o*-fenylendiaminu, čímž dochází k eliminaci vody a k tvorbě iminového meziproduktu, který je nestabilní a podléhá tautomerizaci za vzniku isomerního enaminu. Současně reaguje i druhá primární aminoskupina s karbonylovou skupinou benzaldehydového derivátu opět za vzniku iminu. Nakonec se intramolekulární cyklizací ze vzniklého meziproduktu uzavře diazepinový kruh. Výhodou tohoto syntetického postupu jsou vysoké výtěžky (98 %) za

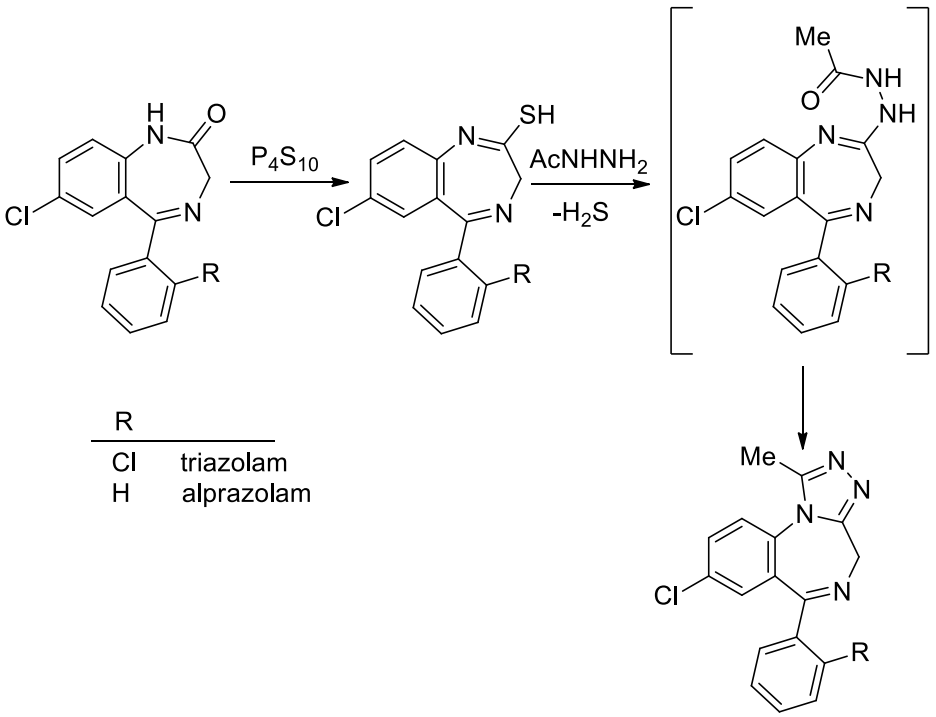
poměrně krátkou reakční dobu (10 min), „zelené" reakční podmínky, snadnost regenerace katalyzátoru a jeho opětovné použití.[13]



R = H, Cl, NO_2, Me, OH, OMe kat.= $CoFe_2O_4$@SiO_2@NH-NH_2-PCuW

Schéma 2. Katalytická syntéza derivátů 1,4-benzodiazepinu.[13]

Triazolobenzodiazepiny jsou skupinou benzodiazepinů, které se strukturně odlišují od ostatních BZD tím, že mají přikondenzovaný triazolový kruh. Například triazolam a alprazolam se připravují převedením příslušných benzodiazepinonů účinkem sulfidu fosforečného na odpovídající sulfanylové deriváty, které jsou v dalším kroku kondenzovány s acethydrazidem (**Schéma 3**).[1]



R	
Cl	triazolam
H	alprazolam

Schéma 3. Syntéza triazolobenzodiazepinů.[1]

Jak již bylo řečeno, BZD lze získat i biologickou cestou. Zatím jediný známý mikroorganizmus, který produkuje BZD, je plíseň *Penicillium cyclopium*. Tento mikroorganismus, jak je možné vidět na **Schématu 4**, k biosyntéze BZD využívá kyselinu anthranilovou, fenylalanin a methionin, které svým metabolismem přemění na cyklopeptin,

dehydrocyklopeptin, cyklopenon a cyklopenin. Alkaloidy cyklopenin a cyklopenol mohou být dále převedeny na chinolinony viridicatin a viridicatol enzymem cyklopentáza, který je přítomný v konidiích plísni.[14] Tyhle čtyři látky jsou významné díky svým fytotoxickým a antibakteriálním účinkům.[15]

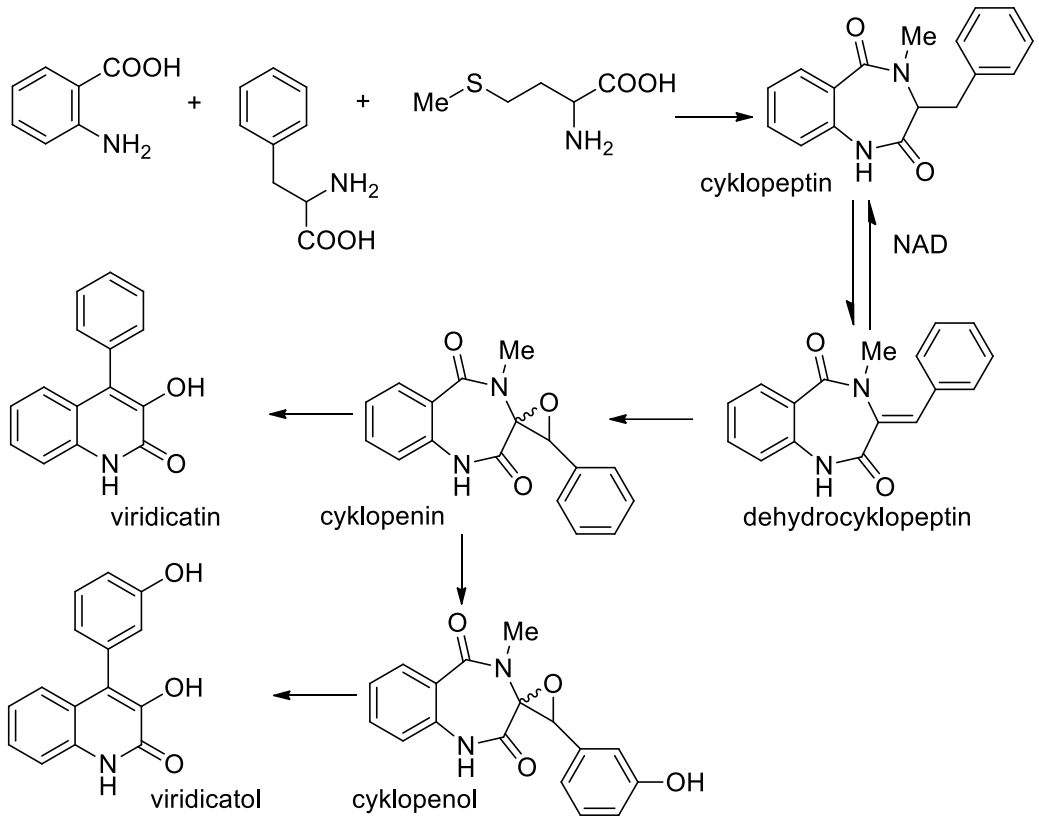


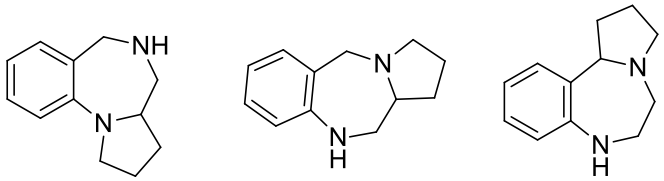
Schéma 4. Biologická syntéza BZD alkaloidů plísní *Penicillium cyclopium* .[16]

2 PYRROLOBENZODIAZEPINY

Pyrrolo[1,4]benzodiazepiny (PBD) jsou tricyklické sloučeniny, které mají širokou škálu biologických účinků. Existují tři možné známé strukturní izomery PBD, a to jsou:

- pyrrolo[1,2-*a*][1,4]benzodiazepiny;
- pyrrolo[2,1-*c*][1,4]benzodiazepiny;
- pyrrolo[1,2-*d*][1,4]benzodiazepiny;

Jejichž základní strukturní motivy je možné vidět na **Obrázku 4**.[17]



pyrrolo[2,1-*c*][1,4]benzodiazepin

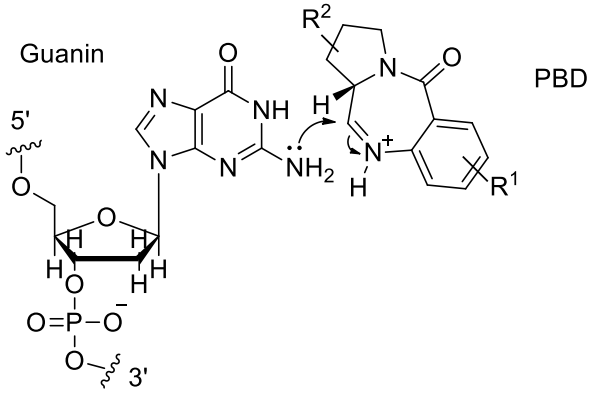
pyrrolo[1,2-*a*][1,4]benzodiazepin pyrrolo[1,2-*d*][1,4]benzodiazepin

Obrázek 4. Strukturní izomery pyrrolobenzodiazepinů.[17]

Pyrrolo[2,1-*a*][1,4]benzodiazepiny jsou známé díky svým protizánětlivým, analgetickým, fungicidním, silným sedativním, antikonvulzivním a myorelaxačním účinkům.[18] Další dva izomery PBD pyrrolo[2,1-*c*][1,4]benzodiazepiny a pyrrolo[1,2- *d*][1,4]benzodiazepiny představují taky zajímavou skupinu látek, protože jeden z izomerů se používá jako inhibitor enzymu nenukleosidové HIV–1 reverzní transkriptázy[19] a druhý vykazuje protinádorové účinky.[20]

2.1 Interakce pyrrolobenzodiazepinů s DNA

Od počátku objevení prvního PBD, anthramycinu, bylo vynaloženo mnoho úsilí pro studium mechanismu působení těchto látek. Ukázalo se, že biologická aktivita PBD je způsobená tím, že nejen prostorová struktura molekuly PBD umožňuje perfektně zapadnout do malého žlábku DNA, ale i tím, že je v tomto místě schopná tvořit pevnou kovalentní vazbu mezi uhlíkem C-11 PBD a atomem dusíku guaninu (**Obrázek 5**).[21]



Obrázek 5. Mechanismus tvorby kovalentní vazby mezi PBD a DNA.[22]

Během biochemických testů typu „*in vitro* transcription stop“ bylo zjištěno, že PBD mohou blokovat transkripci kódující oblasti genů.[23] Další testy (EMSA, ChiP apod.) ukázaly, že PBD jsou schopny se podílet na inhibici vazby transkripčního faktoru genů.[24] Obě tyto vlastnosti potenciálně způsobují zmírnění exprese genů v nádorových buňkách, kde na rozdíl od zdravých buněk je exprese nadměrná.

2.2 Pyrrolobenzodiazepiny izolované z přírody

Přírodní PBD jsou monomerní sloučeniny, které tvoří velkou, strukturálně dosti různorodou skupinu sekundárních metabolitů bakterií.[25]. Prvním PBD získaným z přírodních zdrojů je anthramycin, který je svými známými antibiotickými a protinádorovými účinky významnou sloučeninou. Tento derivát PBD byl izolovaný z aktinomycetu *Streptomyces refuineus* sbsp. *thermotolerans*, který jej produkuje, jak je naznačeno na **Schématu 5**, z 4-methyl-3-hydroxyanthranilové kyseliny, jež je získávána primární metabolickou kynureninovou dráhou z tryptofanu, a z derivátu dehydroprolinu vznikajícího oxidačním štěpením benzenového kruhu tryrosinu.[26]

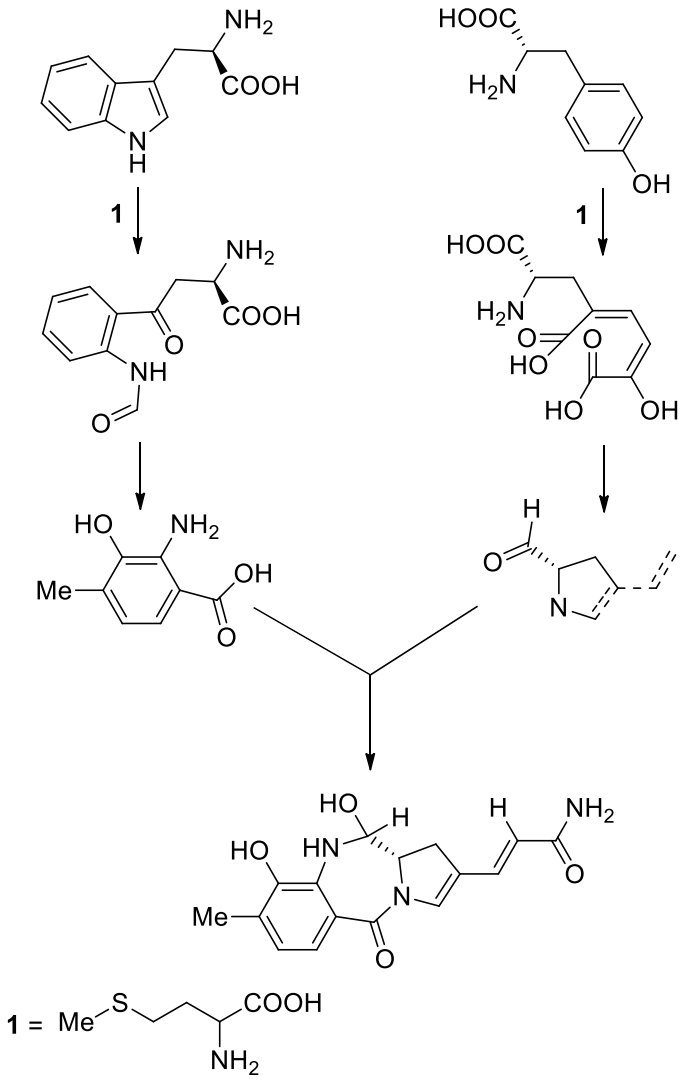
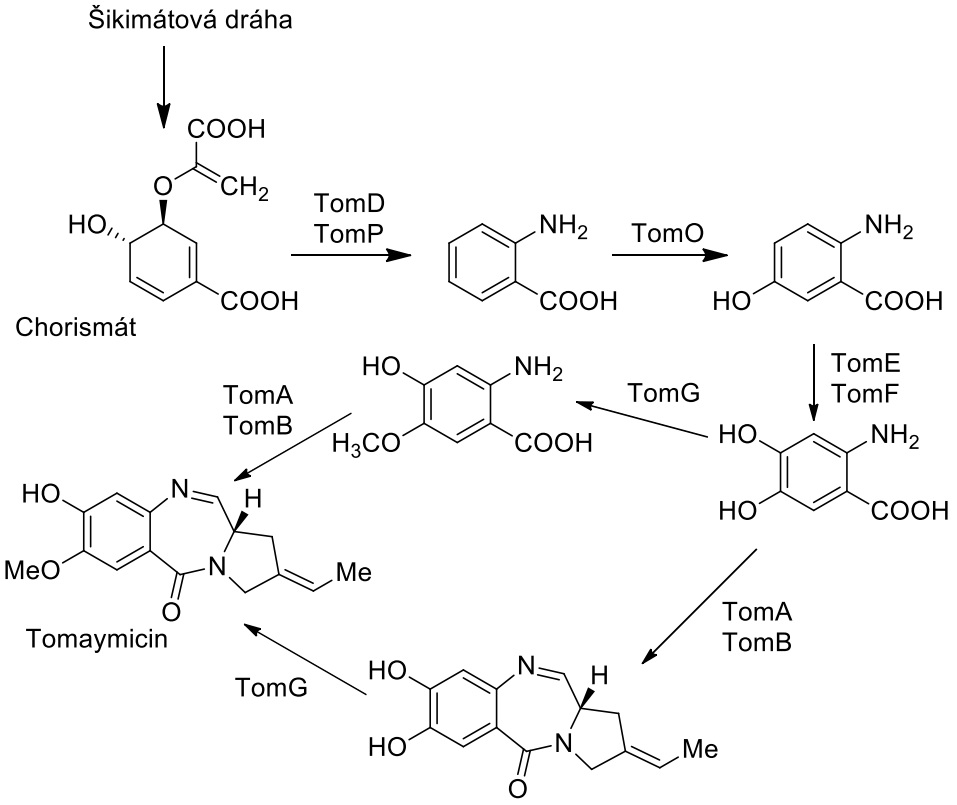


Schéma 5. Biosyntéza anthramycinu bakteriemi *Streptomyces refuines*.[26]

Anthramicin není ovšem jediný PBD izolovaný z mikroorganizmů. Existuje celá řada přírodních PBD, například tomaymycin[27], tilivallin[28] nebo alkaloidy circumdatiny, které se využívají jako chemotaxonomické markry, jsou metabolity plísní *Exophialia* sp. a *Aspergillus* sp. FM242.[29] Tilivallin je enterotoxický metabolit mikroorganismu *Klebsiella oxytoca,* který způsobuje u lidí střevní onemocnění. Tomaymycin je biosyntetizován aktinomycety *Streptomyces achromogenes* a nachází uplatnění ve farmacii jako protinádorové antibiotikum.

Biosyntéza tomaymicinu (**Schéma 6**) gram-pozitivními bakteriemi *Streptomyces achromogenes* začíná Šikimátovou dráhou, při které vzniká kyselina chorismová, která je účinkem enzymů fenazin syntetázy a anthranilát syntetázy je transformována na anthranilovou kyselinu. NADH-závislá flavin oxidoreduktáza katalyzuje hydroxylaci anthranilové kyseliny v poloze 5, následovanou hydroxylací v poloze 4. Dále pak před,

anebo po vytvoření pyrrolobenzodiazepinového kruhu O-methyltransferáza způsobí methylaci jedné ze dvou hydroxylových skupin.[27]



TomD = fenazin syntetáza
TomP = anthranilát syntetáza
TomO = NADH-závislá flavin oxidoreduktáza
TomE = fenol-2-monooxygenáza, reduktáza
TomF = fenol-2-monooxygenáza, oxygenáza
TomG = O-methyltransferáza
TomA = neribosomální peptid syntetáza ORF21
TomB = neribosomální peptid syntetáza ORF22

Schéma 6. Biosyntetická dráha produkce tomaymicinu.[27]

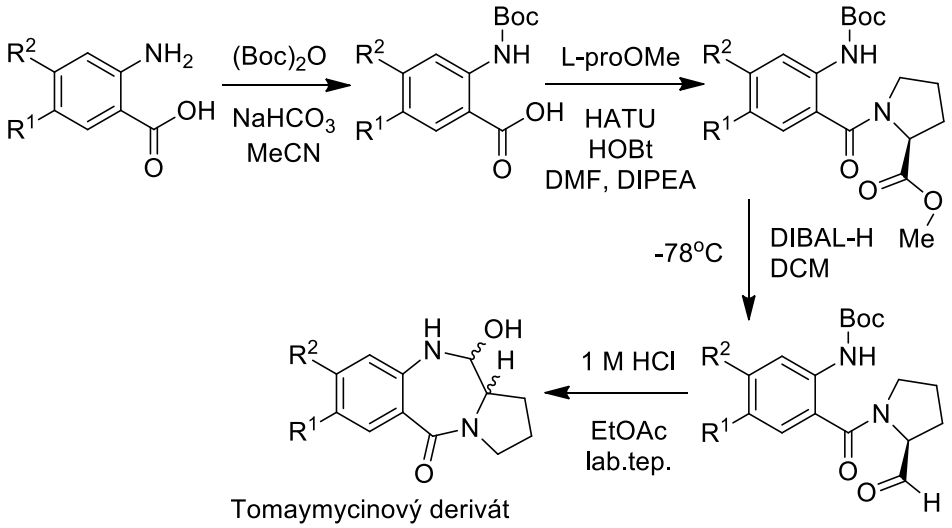
2.3 Pyrrolobenzodiazepiny připravené synteticky

Syntetické PBD představuje celá řada rozmanitých sloučenin, které je možné, podle jejich základní struktury, rozdělit na monomerní PBD, dimerní PBD, nebo na konjugované PBD.

2.3.1 Monomerní pyrrolobenzodiazepiny

Příklad syntézy monomerních PBD může být prezentován na postupu přípravy derivátů tomaymycinu, kterého je často využíváno i pro získávání derivátů jiných PBD. Jak je možné

vidět ze **Schématu 7**, v prvním kroku syntetického postupu reaguje, po ochránění primární aminové skupiny *t*-butyloxykarbonylovou skupinou (BOC), anthranilová kyselina s methylesterem L-prolinu. Následně po redukci esterové skupiny účinkem diisobutylaluminiumhydridu (DIBAL-H) je kyselou hydrolýzou odstraněna chránící skupina, čímž je umožněna intramolekulární cyklizace za vzniku 1,4-diazepin-2-olového kruhu.[30]

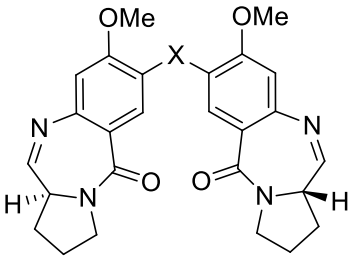


HATU = 1-[bis(dimethylamino)methylen]-1*H*-1,2,3-triazolo[4,5-*b*]pyridin-3-oxidhexaflorfosfát
HOBt = hydroxybenzotriazol
DIPEA = diisopropylethylamin
DIBAL-H = diisobutylaluminiumhydrid

Schéma 7. Syntéza derivátů tomaymycinu.[30]

2.3.2 Dimerní a konjugované pyrrolobenzodiazepiny

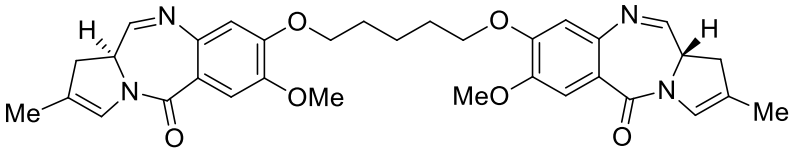
PBD dimery jsou převážně používány při monoterapii.[31] Tímto pojmem se označuje léčení nádorových onemocnění jedním lékem nebo jedním způsobem. První dimerní PBD (**Obrázek 6**) byly syntetizovány v roce 1988 Suggesem a jeho spolupracovníky. Obecně se jednalo o dvě jednotky PBD spojených prostřednictvím různého alifatického linkeru v poloze C-7/C-7′. Nevýhodou těchto látek byla však poměrně slabá interakce s DNA a nízká cytotoxicita.[32]



X= $S(CH_2)_4S$, $O(CH_2)_2N(CH_3)(CH_2)_2O$, $HN(CH_2)_3N(CH_3)(CH_2)_3NH$

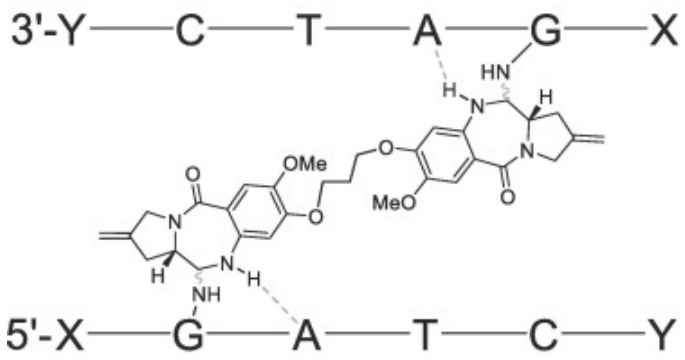
Obrázek 6. Struktura prvních dimerních pyrrolobenzodiazepinů.[32]

Oproti tomu, bylo v testech provedených *in vitro* zjištěno,[33] že dimerní PBD spojené v poloze C-8/C-8´ pentyldioxylovým linkerem (**Obrázek 7**) se pevně kovalentně spojují s protilehlými řetězci šroubovice DNA. Tím znemožňují její rozplétání při replikaci, což ve výsledku způsobuje jejich vysokou cytotoxicitu.



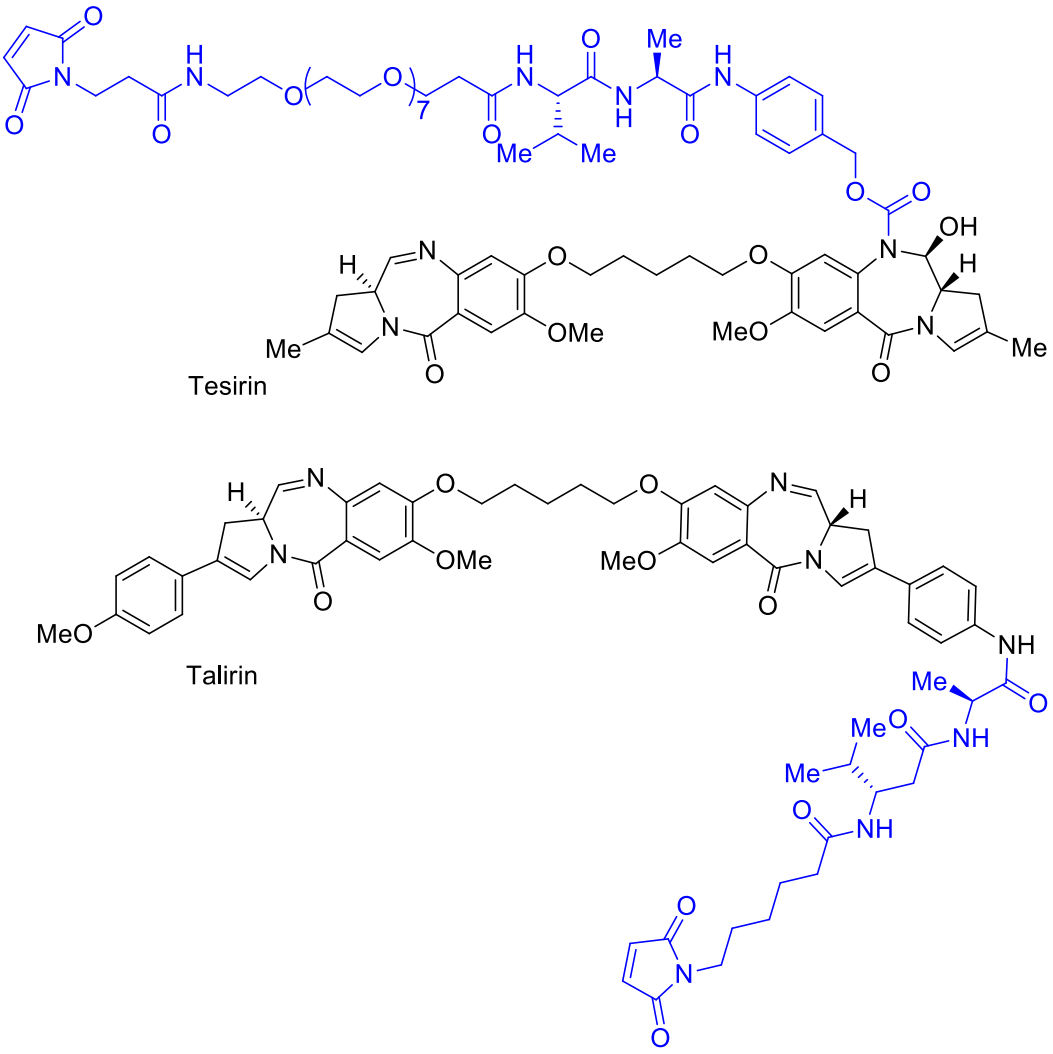
Obrázek 7. Příklad PBD dimeru spojeného v poloze C-8/C-8´.[32]

Spojení PBD dimeru s DNA a následné vytvoření aduktu je výsledkem nukleofilního ataku obou exocyklických primárních aminových skupin guaninových bází na elektrofilní atomy uhlíku C-11/C-11´ PBD dimeru. Dále jsou tvořeny vodíkové vazby mezi atomy dusíku N-3/N-3´ adeninů, které jsou v DNA řetězci sousedící s guaninem, a oběma atomy vodíku v poloze N-10/N-10´ PBD jednotek (**Obrázek 8**). Dokonalé umístění dimeru PBD v malém žlábku DNA má za následek pokřivení šroubovice DNA, čímž se potenciálně zabrání mechanismům opravy DNA a běžnému jevu rezistence vůči podávaným terapeutikům.[31]



Obrázek 8. Adukt PBD dimeru s dvoušroubovicí DNA.[31]

V posledních letech bylo provedeno mnoho experimentů, ve kterých byla u řady PBD dimerů sledována schopnost tvořit jejich konjugáty s protilátkou. Prvními PBD konjugáty, které se dostaly až do klinické praxe, byly rovalpituzumab-tesirin (Rova-T) a vadastuximab-talirin (**Obrázek 9**). Tesirin byl vyvinut firmou StemCentrx Inc. pro léčení rakoviny plic a nedávno prošel první fází klinických zkoušek. Talirin byl připraven společností Seatle Genetics Inc. za účelem terapie akutní myeloidní leukemie.[34,35] Od té doby bylo syntetizováno hodně dalších konjugovaných PBD, které jsou nyní v různých stadiích klinických zkoušek.[36]



Obrázek 9. Struktura PBD proléčiva tesirin a talirin.[36]

Mnoho vědců různých výzkumných skupin, za účelem léčby rakoviny, stále pracují na vývoji nových a nových PBD konjugátů. V tomto roce byl připraven první PBD konjugát s adenosinovým nukleosidem. Toto spojení bylo navrženo proto, že adenosin plní u savců

řadu fyziologických funkcí a současně bylo prokázáno, že jako odpověď na buněčný stres zprostředkovává cytoprotekci,[37] zatímco PBD má na buňku vliv opačný. Způsobuje narušení klasického tvaru DNA, což ve výsledku vede k apoptóze. Začlenění cytoprotektivního nukleosidu do struktury PBD umožnilo modulaci biologické aktivity PBD konjugátů.[38]

Příprava PBD konjugátu s adenosinem byla započata modifikovanou syntézou 2- jodadenosinu z guanosinu (**Schéma 8**). Jak je tomu při reakcích glykosidů běžné, bylo prvně nezbytné ochránit reaktivní hydroxylové skupiny cukerné části, které byly účinkem acetanhydridu v pyridinu acetylovány. 2-Jodadenosin, dále používaný jako vhodný reaktant pro tvorbu konjugátu s PBD, byl z výchozího acetylovaného guanosinu připraven třístupňovým procesem zahrnujícím chloraci oxoskupiny guanosinu a Sandmeyerovu reakci, která představovala převedení primární aminoskupiny za atom jodu přes diazoniovou sůl. Na závěr byly účinkem methanolického amoniaku současně provedeny nukleofilní substituce atomu chloru v poloze 6 a odstraněny protekční skupiny ribosylu.[38]

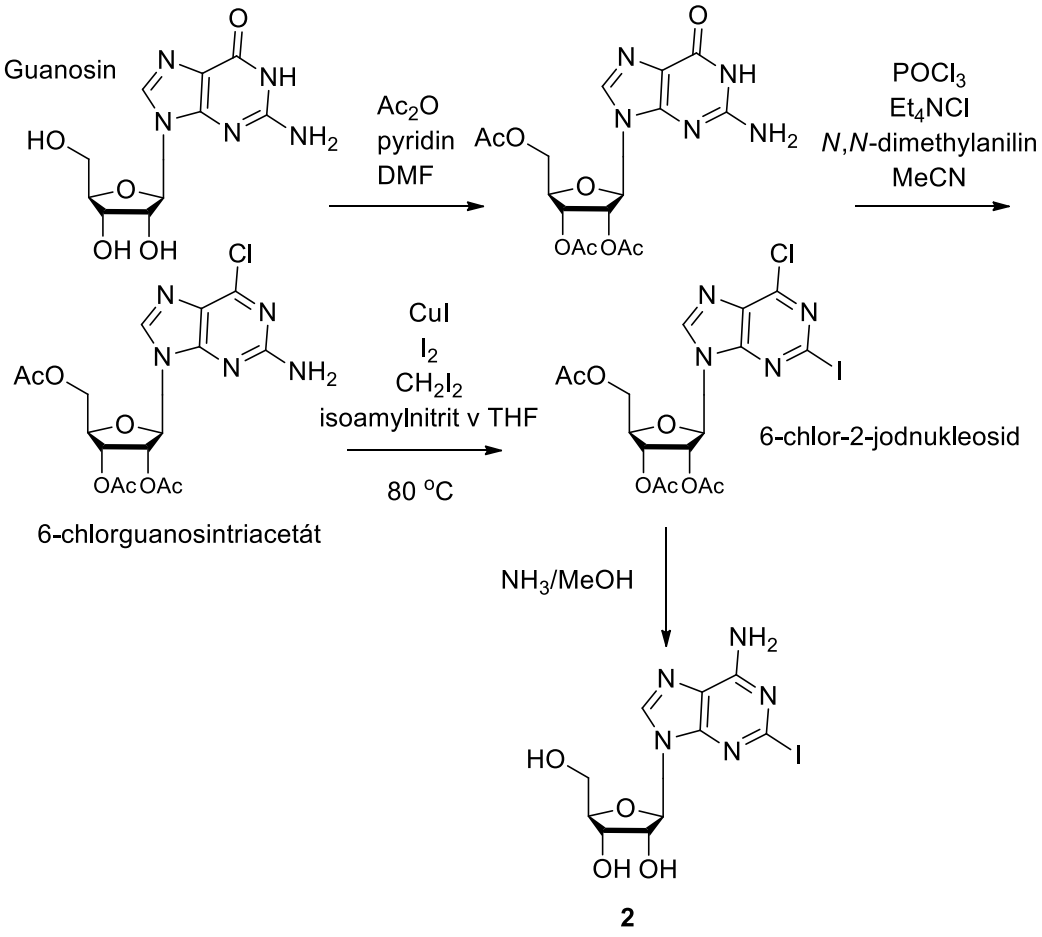


Schéma 8. Syntéza výchozího 2-jodadenosinu.[38]

Další kroky syntetické přípravy konjugátu PBD-adenosinu zahrnovaly kondenzaci 2- jodadenosinu (**2**) s pentynylmetansulfonátem Sonogashirovou cross-couplingovou reakcí, čímž byl získán meziprodukt **3**, který po protekci hydroxylových skupin cukerné části byl ponechán reagovat s derivátem tomaymycinu.[38]

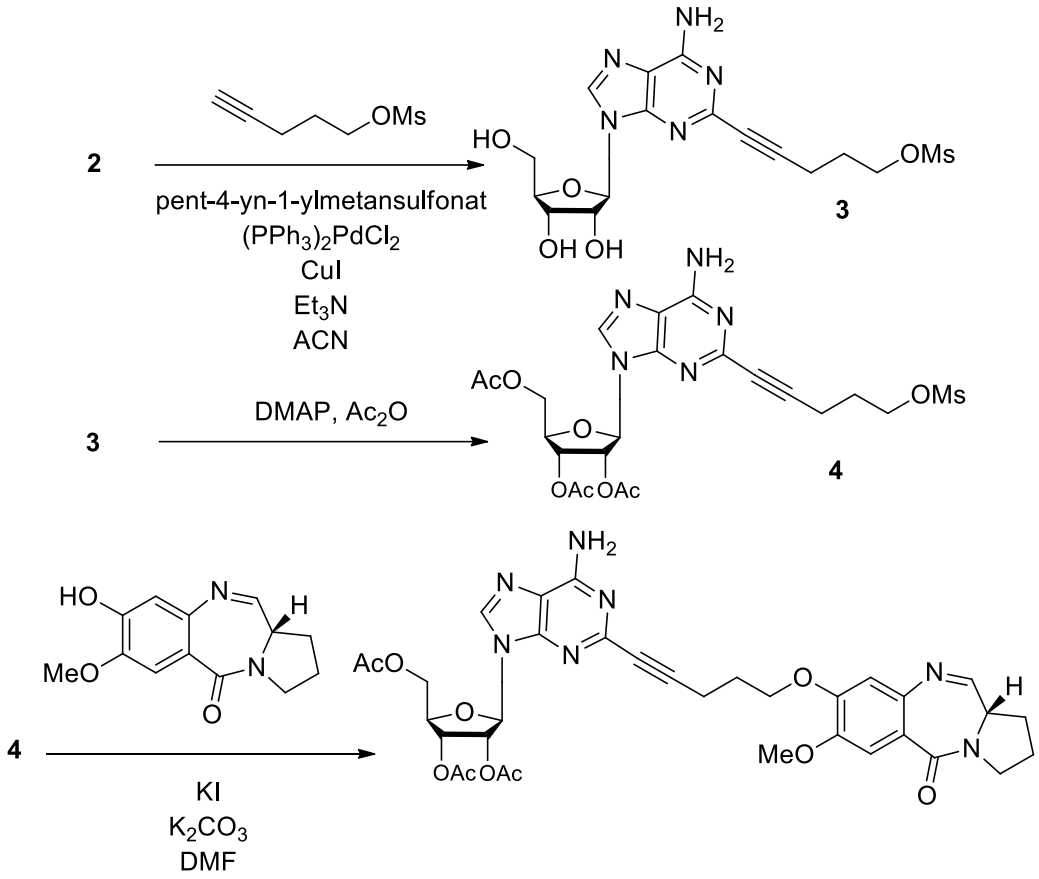


Schéma 9. Syntetická příprava konjugátu PBD s adenosinem.[38]

Po podrobení připraveného konjugátu řadě biologických testů vztažených na cytotoxicitu a antimikrobiální účinky vůči mikroorganismům *Mycobacterium aurum* a *Mycobacterium bovis*, což jsou nepatogenní mikroorganismy fylogeneticky blízké k patogenním *Mycobacterium tuberculosis*, se ukázalo, že nově syntetizovaná látka není pro vybrané mikroorganismy cytotoxická ani inhibiční. Další zklamání bylo, když se prokázalo, že se konjugát ani při vysokých koncentracích neváže na žádnou DNA sekvenci lidského genu HexA (hexaaminidáza A). Ale i když tato látka nevykazovala očekávané účinky, vědci experiment považují za průlomový a předpokládají, že bude mít dopad na budoucí design PBD konjugátů.[38]

II. PRAKTICKÁ ČÁST

3 VÝSLEDKY A DISKUZE

3.1 Rekapitulace dosažených výsledků kolegů

Část výzkumné skupiny pana docenta Kafky na Ústavu chemie na Univerzitě Tomáše Bati ve Zlíně se zabývá syntézou pyrrolobenzodiazepinů a jejich derivátů už delší dobu. Počátečním impulzem byla náhoda, kdy Ing. Marianna Molnárová se pokoušela provádět nukleofilní substituce sekundární aminoskupiny jednou stranou poutanou k chinolindionovému uskupení a druhou stranou k propynylové skupině. Jelikož amin byl vůči propargylbromidu za přítomnosti obvyklé báze, uhličitanu draselného, rezistentní, byly sledovány účinky bází silnějších, tetramethylguanidinu (TMG) a hydridu sodného. Po izolaci hlavních produktů z diskutovaných reakcí bylo zjištěno, že při žádné reakci k nukleofilní substituci nedošlo, nicméně byly izolovány zcela jiné neočekávané sloučeniny, benzo[*e*][1,4]diazepin-2,5-dion (účinek TMG) a benzo[*e*]pyrrolo[1,2-*a*][1,4]diazepin-5,11-dion (účinek hydridu) (**Schéma 10**). Benzodiazepinové sloučeniny z původních 3-aminochinolindionů vznikly začleněním atomu dusíku aminoskupiny do heterocyklu, čímž došlo k expanzi šestičlenného kruhu na kruh sedmičlenný. U pyrrolobenzodiazepinových sloučenin nedochází pouze ke zmiňované expanzi kruhu, ale nastává také vlivem mocného hydridového iontu k cyklizaci postranního propargylového řetězce za vzniku pětičlenného kruhu.

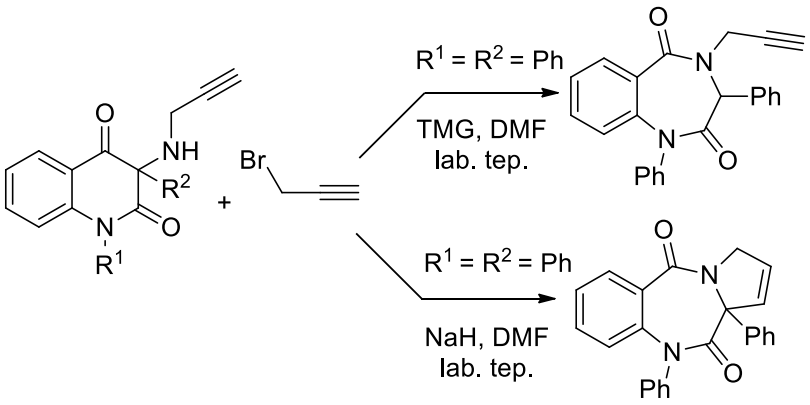


Schéma 10. Prvotně izolované látky izomerizací propargylaminochinolindionů.[39]

Během následných průzkumů literatury bylo zjištěno, že PBD jsou pro své biologické účinky (antibakteriální, kancerostatické, fungicidní, …)[26] zajímavé látky. Protože nikde nebylo nalezeno, že by tuto „snadnou“ přeměnu z chinolindionů na PBD někdo prezentoval, začala naše výzkumná skupina na Ústavu chemie tyto isomerizační přesmyky studovat (**Schéma 11**). Postupem času po optimalizaci reakčních poměrů výchozích derivátů a

použitých bázích Ing. Adéla Lajdová syntetizovala šest benzodiazepindionů nesoucích v poloze 4 propargylovou skupinu, dva pyrrolobenzodiazepindiony s nenasyceným pětičlenným kruhem, které obsahovaly fenylovou skupinu vázanou v poloze 11a. V pokusech o přípravu analogických PBD nesoucích v poloze 11a methylový substituent úspěšná nebyla, protože tyto sloučeniny byly za studovaných silně bazických podmínek značně nestabilní a poskytovaly značné množství dekompozičních produktů, které nebylo možné vzájemně separovat.[39]

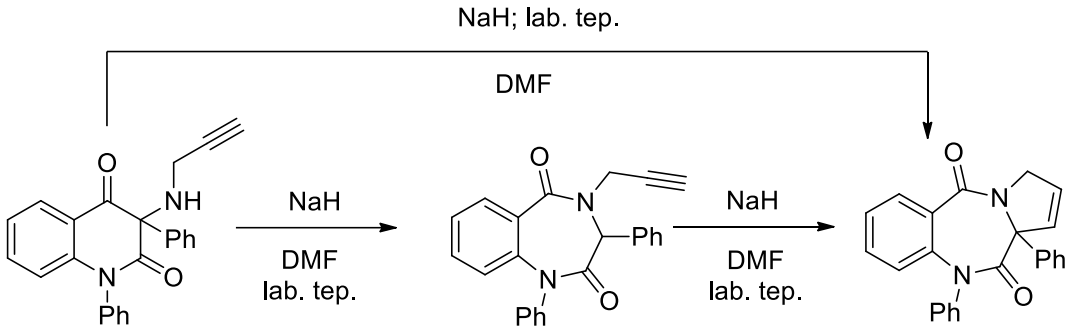


Schéma 11. Přeměny propargylaminochinolindionů na BZD a PBD studované.

Další výzvy, kterou byla příprava takřka identických PBD sloučenin lišících se pouze nasyceností pětičlenného kruhu, se zhostila Ing. Zuzana Máčalová. Ta ve své diplomové práci připravila tři výchozí 3-(3-hydroxypropylamino)chinolindiony s fenylovou skupinou v poloze 3 (**Schéma 12**), protože arylový substituent v blízkosti reaktivního místa se v dřívějších experimentech ukázal jako jediný vhodný, které několikastupňovou transformací s různým sledem jednotlivých reakčních kroků úspěšně převedla na požadované tricyklické sloučeniny s nasyceným pětičlenným kruhem. Problematika přeměny 3-methylových derivátů chinolindionů je prozatím rozpracovaná, nicméně doposud se oproti methylovým derivátům s propargylovou skupinou vyvíjí slibně.[40]

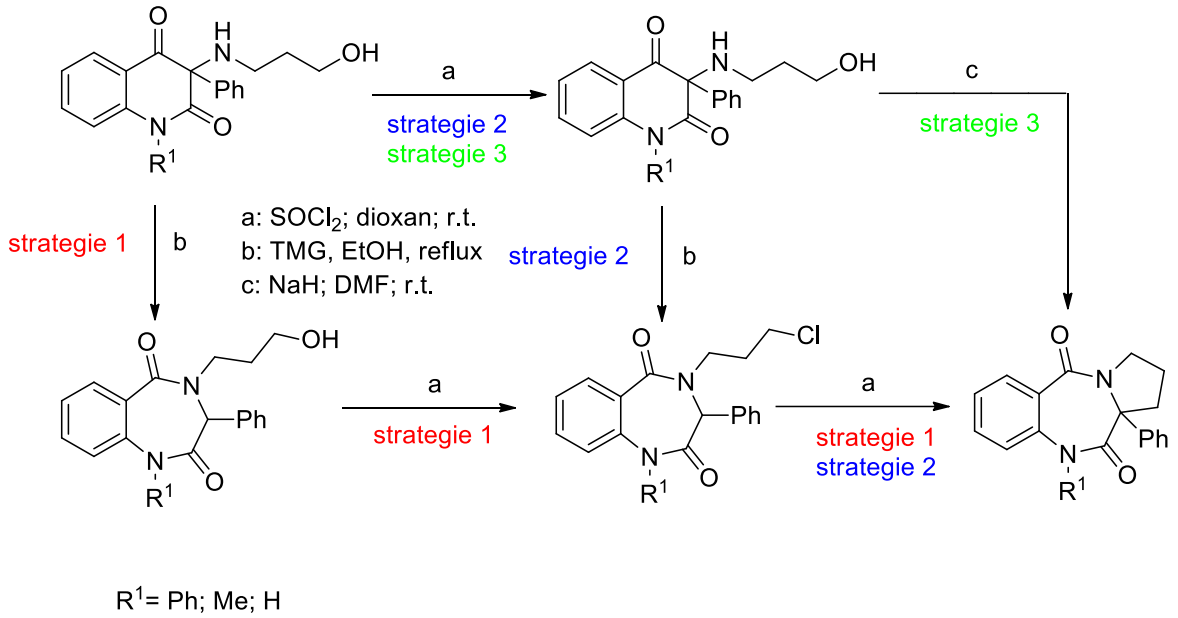


Schéma 12. Sled reakčních kroků přípravy nasycených PBD.[40]

3.2 Stanovení cílů a zadání problematiky

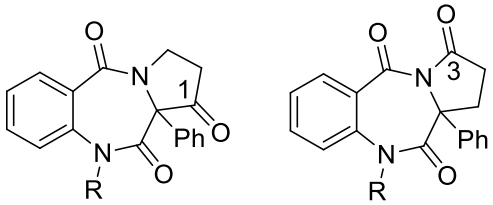
Na tomto místě bych čtenáře ráda seznámila s náplní problematiky řešené v rámci této diplomové práce, která plynule navazuje na výše stručně komentované výsledky dosažené mými předchůdkyněmi. To, že sloučeniny s pyrrolobenzodiazepinovým strukturním motivem jsou látky s potenciální biologickou aktivitou, bylo již mnohokrát řečeno. Při pohledu na struktury těchto bioaktivních PBD je na první pohled patrné, že mají více či méně složitou strukturu (monomerní, dimerní či konjugované PBD), která se převážně liší substitucí na benzenovém a pyrrolovém kruhu. My jsme se v tomto okamžiku zaměřili na možnost připravit PBD sloučeniny, které by měly substituovaný pětičlenný pyrrolový kruh oxoskupinou. K tomuto nápadu nás dovedla jednak skutečnost, že je teoreticky možné oxoskupinu substituovat nebo převést na skupinu jinou, a jednak proto, že analogických sloučenin je známo pouze řádově několik jednotek. V případě zdaru by mohly nově syntetizované PBD vykazovat stejné nebo podobné účinky, jak i jejich analogy, a to antibakteriální, protinádorové nebo anxiolitycké, navíc je důležitým to, že k novým PBD by u patogenních mikroorganismů zatím nebyla vyvinutá rezistence, což by usnadnilo léčbu mnoha infekčních onemocnění.

Protože byla pro přípravu pyrrolobenzodiazepintrionových sloučenin kladena podmínka, že syntéza musí vycházet z chinolindionů, byla na základě zkušeností s předešlými výzkumy navržena strategie taková, že logicky v prvním kroku se provede navázání zbytku propanové

kyseliny k heterocyklu a poté se provedou pokusy o expanzi šestičlenného kruhu na kruh sedmičlenný následované cyklizační reakcí postranního řetězce.

3.3 Diskuze výsledku dané práce

Jak již bylo uvedeno výše v předchozí kapitole, kladli jsme si za cíl, pokusit se nalézt vhodnou cestu pro přípravu pyrrolobenzodiazepinových sloučenin, které by nesly oxoskupinu v poloze 1 nebo v poloze 3 pyrrolového kruhu (**Obrázek 10**).



Obrázek 10. Struktura požadovaných sloučenin.

Má-li býti splněna podmínka, že syntézy musí vycházet z chinolindionů, tak v podstatě pro oba strukturní typy teoreticky existují dvě možné syntetické varianty, které v sobě samozřejmě skrývají ještě několik drobných modifikací. Jak je patrné ze **Schématu 13**, jedna syntetická cesta představuje přípravy vhodně *N*-substituovaných 3-aminochinolin-2,4(1*H*,3*H*)-dionů **8**, **12**, které jsou účinkem báze převedeny na odpovídající benzodiazepinové sloučeniny **10**, **13**, u nichž je následně, v případě syntézy sloučeniny **13** až po úpravě postranního řetězce, provedena cyklizační reakce.

Druhá syntetická strategie prezentuje přednostně přípravu 3-fenyl-3,4-dihydro-1*H*-benzo[*e*][1,4]diazepin-2,5-dionů **15,** na které jsou až poté navázány příslušné zbytky propanové kyseliny, jejichž cyklizací jsou teoreticky získatelné stejné výsledné deriváty jako v prvním případě.

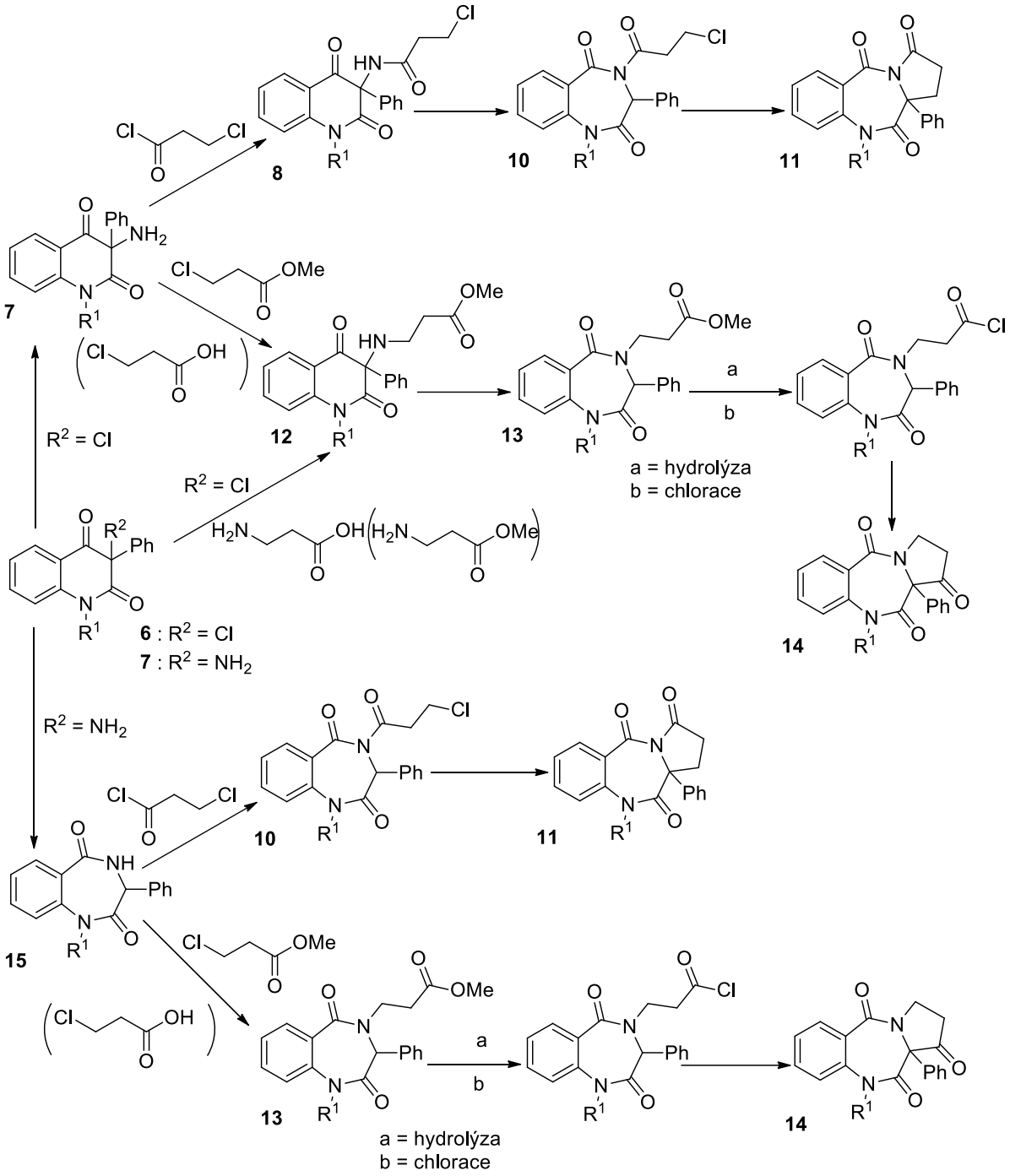
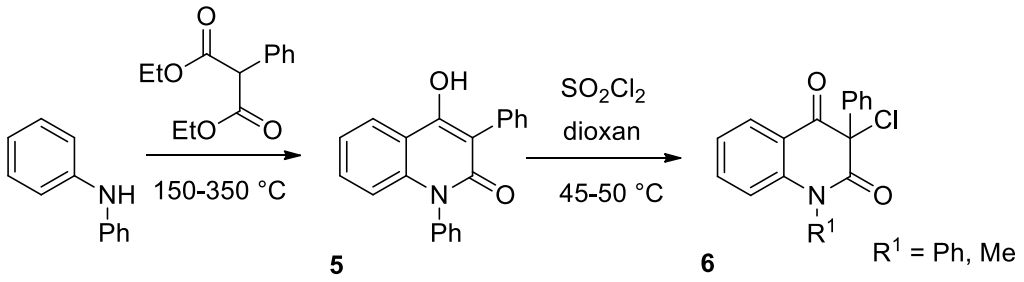


Schéma 13. Schéma syntetických možností přípravy pyrrolobenzodiazepintrionů.

Započetí samotné práce na plánované problematice předcházela příprava dvou výchozích 1,3- disubstituovaných 3-chlorchinolin-2,4(1*H*,3*H*)-dionů **6**. Protože se v pokusech mých předešlých kolegů ukázalo, že alkylový substituent v poloze 3 benzodiazepinových sloučenin způsoboval v přítomnosti silné báze nezbytné pro cyklizační reakce jejich postranního řetězce značnou nestabilitu celého heterocyklického systému a v žádné

sledované reakci nebylo dosaženo pozitivních výsledků, byl pro substituci v inkriminované poloze zvolen výhradně fenylový substituent.

Jelikož jsou 3-chlorchinolin-2,4(1*H*,3*H*)-diony **6**, ve vztahu k substituci halogenu, značně reaktivní, jsou často na Ústavu chemie využívány jako výchozí bod různých přeměn vycházejících z chinolonových derivátů, a proto je jejich syntéza již velmi dobře optimalizována[41] a to jak v množství malém, tak i ze značně vysokých navážek. Přístup k nim využívá základních surovin, jako jsou deriváty anilinu a ethylesteru kyseliny malonové, které jsou vzájemně kondenzovány za relativně vysokých teplot pohybujících se v rozmezí od 150 °C do 300 °C. Tímto způsobem byl získán 1,3-difenyl-4-hydroxychinolin-2(1*H*)-on (**5**), který byl následně do polohy 3 chlorován účinkem sulfurylchloridu v dioxanu při teplotě pohybující se blízko 50 °C (**Schéma 14**). Mimo to, byl připraven i *N*-methylový derivát **6b**, jehož výchozí látka byla získána z laboratorních zásob.

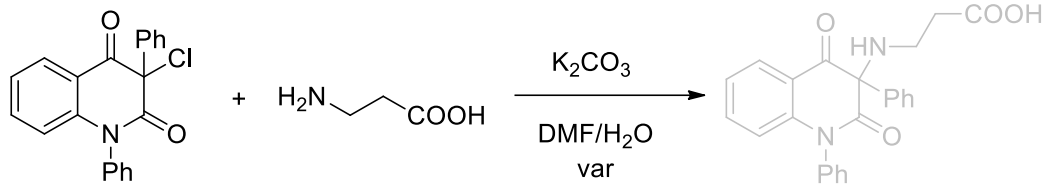


R.doba (h)	Výtěžek (%)
5	83

Vých. l. 5	R^1	R.doba (min)	Výtěžek (%)
a	Ph	45	88
b	Me	30	91

Schéma 14. Příprava výchozích sloučenin **5** a **6**.

První myšlenka (**Schéma 15**), která se pro získání chinolindionu s (2- karboxyethyl)aminovou skupinou zpočátku jevila jako nejvíce snadná, byla ponechat reagovat připravený 3-chlorchinolin-2,4(1*H*,3*H*)-dion **6** s 1,1 ekvivalenty β-alaninu za přítomnosti dvoumolárního nadbytku uhličitanu draselného jako báze ve vroucím roztoku vody v dimethylformamidu (H_2O/DMF; 1/5; *v*/*v*). Voda byla do reakční směsi přidávána z důvodu neochoty β-alaninu se rozpouštět v jakémkoliv organickém rozpouštědle (velmi dobře rozpustný ve vodě; nerozpustný v benzenu, $CHCl_3$, DCM, THF, DMF, DMSO).

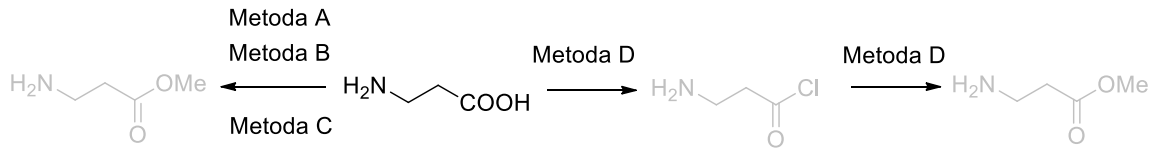


6a

Schéma 15. Pokus o přípravu 3-(2-karboxyethylamino)chinolindionu.

Jelikož v reakční směsi po 3 h varu nebyly na TLC pozorovány ani nepatrné změny výchozí látky, bylo rozhodnuto, že se pokusíme z β-alaninu připravit jeho ester, čím by bylo zabráněno možnosti přemisťování náboje mezi karboxylovou skupinou a skupinou aminovou závislého na pH prostředí a současně by se zvýšila rozpustnost v organických rozpouštědlech. Po průzkumu literatury bylo zjištěno, že pro přímou konverzi β-alaninu na methyl-3-aminopropanoát jsou v podstatě využívány dva způsoby. V jednom z nich se pozvolna, obvykle na ledové lázni, přikape 1,2–2,5 molární násobek thionylchloridu k roztoku aminokyseliny v methanolu a následně autoři publikací nechají směsi reagovat dlouhý čas (obvykle 24 h) při teplotě místnosti,[42,43] anebo směs několik hodin (2–10 h) vaří.[44] Druhý postup, obecně pro daný typ reakce více častý způsob, využíval přímou esterifikaci β-alaninu methanolem katalyzovanou koncentrovanou kyselinou sírovou za varu.[45] I když ve všech citovaných pracích byly slibovány výtěžky hydrochloridu methyl-3-aminopropanoátu převyšující 90 %, v našem případě se nám ze záhadných důvodů nepodařil, i přes dodržení prezentovaných postupů, získat ani v množství malém (**Schéma 16, Metoda A, B, C**). Z tohoto důvodu, bylo přistoupeno k pokusům o postupnou přípravu chloridu 3-aminopropanové kyseliny, která byla dělána opět podle předpisu v literatuře,[46] to znamená, že byl k suspenzi β-alaninu v suchém DCM pozvolna při laboratorní teplotě a pod inertní atmosférou argonu nadávkován dvoumolární nadbytek thionylchloridu a vše bylo vařeno (**Schéma 16**). Po změření ^{1}H NMR spektra bylo zjištěno, že byla získána blíže nespecifikovaná směs látek, ve které převažují signály atomů vodíků pohybujících se v oblasti 8–8,4 ppm. Jelikož se v této části NMR spektra vyskytují atomy vodíků vázaných k aromatickým sloučeninám, bylo toto zjištění, které si neumíme vysvětlit, velmi zarážející. Jediná možnost je, že v průběhu zpracování reakční směsi, nebo při manipulaci při chystání vzorku na NMR došlo k jisté kontaminaci látkou druhou, která s potenciálně vzniklým chloridem kyseliny zreagovala. Z těchto důvodů, byl jako poslední varianta vyzkoušen experiment, ve kterém byl dodržen identický postup jako při přípravě chloridu kyseliny 3-aminopropanové, ovšem po 1,5 h varu reaktantů v DCM bylo přímo do

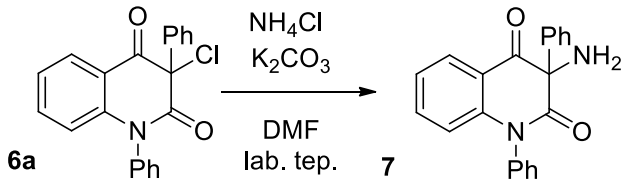
reakční směsi přidáno trojnásobné množství (vztaženo na β-alanin) methanolu a opět vše bylo stejnou dobu vařeno (**Schéma 16, Metoda D**). I v tomto případě bylo z ^{1}H NMR spektra patrné, že se nám toužený ester připravit nepodařilo, a proto byla tato syntetická cesta směřovaná k chinolindionu s (2-karboxyethyl)aminovou skupinou opuštěna.



Metoda A : $SOCl_2$, MeOH, lab.tep., 24 h
Metoda B : $SOCl_2$, MeOH, var, 3 h
Metoda C : H_2SO_4, MeOH, var, 8 h
Metoda D : 1) $SOCl_2$, DCM, var, 1,5 h; 2) MeOH, var, 1,5 h

Schéma 16. Pokusy o přípravu methylesteru β-alaninu.

Doposud bylo neúspěšně zkoušeno na chlorchinolindion vázat aminokyselinu, ale protože jsme se u předchozích experimentů setkali s nečekanou neochotou β-alaninu jakékoliv reakce, pokusili jsme se na daný problém podívat obráceně. 1,3-Difenyl-3-chlorchinolin-2,4(1*H*,3*H*)-dion **6a** byl nukleofilní substitucí atomu chloru amoniakem vyvíjeným *in situ* z chloridu amonného a potaše v DMF při laboratorní teplotě během 24 h převeden na odpovídající 3-aminochinolin-2,4(1*H*,3*H*)-dion **7** (**Schéma 17**), který byl získán ve vysokém výtěžku a po přečištění pouhou krystalizací surového produktu i v optimální kvalitě. Jelikož se jedná o látku již známou, bylo dostačujícím důkazem o pravosti sloučeniny srovnání naměřených teplot tání a IČ spektra, které se shodovaly s daty uvedenými v literatuře[42].

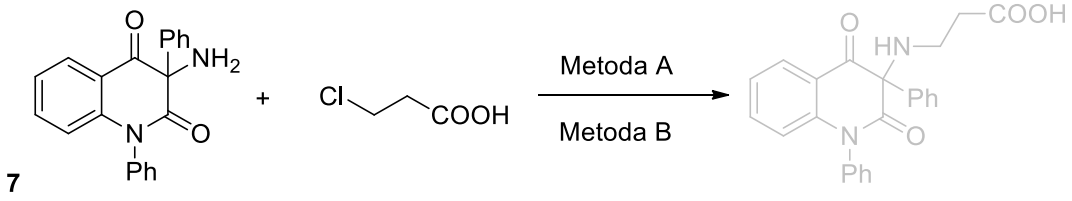


R.doba (h)	Výtěžek (%)
23	70

Schéma 17. Konverze 3-chlorchinolin-2,4(1*H*,3*H*)-dionu **6a** na 3-aminoderivát **7**.

Následně byl 3-aminochinolin-2,4(1*H*,3*H*)-dion **7** rozpuštěný v DMF při laboratorní teplotě vystaven působení 3-chlorpropanové kyseliny a uhličitanu draselného. Jelikož i po 22 h byla v reakční směsi přítomna pouze výchozí látka, byl pokus proveden opakovaně, ovšem s tím rozdílem, že byla reakční směs 25 h vařena pod zpětným chladičem

(**Schéma 18**). V tomto případě sice byla pozorována částečná přeměna 3-aminochinolin-2,4(1*H*,3*H*)-dionu **7**, ale docházelo k tvorbě značného množství vedlejších látek, z nichž se s využitím sloupcové chromatografie podařilo izolovat pouze jednu z nich, která i přes skutečnost, že se nejedná o chemické individuum, činila hmotnost ř8dově několik jednotek miligramů.



Metoda A : K_2CO_3; DMF; lab. tep.
Metoda B : K_2CO_3; DMF; var

Schéma 18. Pokus o reakci 3-aminochinolin-2,4(1*H*,3*H*)-dionu **7** s 3-chlorpropanovou kys.

Po tomto neúspěchu opět nastaly pokusy o přípravu methyl-3-chlorpropanoátu, čímž by měly být eliminovány případné vedlejší reakce způsobené volnou karboxylovou kyselinou. Po prohledání odborné literatury bylo zjištěno, že příprava methylesteru 3-chlorpropanové kyseliny byla popsána pouze ve třech publikacích starých přibližně 100 let[47,48,49], ze kterých nebylo možné získat konkrétní informace. Bylo pouze zřejmé, že reakce byly katalyzovány silnou kyselinou. Proto bylo k experimentům přistoupeno kreativně. Nicméně varem kyseliny 3-chlorpropanové s ekvivalentním množstvím koncentrované kyseliny chlorovodíkové nebo sírové v methanolu během 10 h k tvorbě esteru nedošlo (**Schéma 19**). Veškeré výše popsané neúspěchy vedly k tomu, že tématika přípravy benzo[*e*]pyrrolo[1,2- *a*][1,4]diazepin-1,5,11(10*H*,11a*H*)-trionu **14** byla prozatím opuštěna.

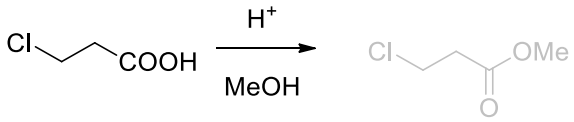
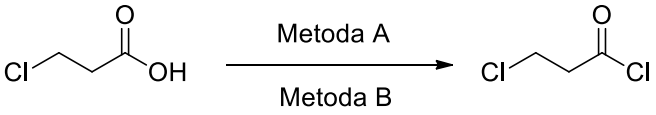


Schéma 19. Pokusy o esterifikaci 3-chlorpropanové kyseliny.

Další experimenty byly směrovány k přípravě analogických pyrrolobenzodiazepinů s rozdílnou polohou oxoskupiny vázané k pyrrolovému kruhu. K syntéze benzo[*e*]pyrrolo[1,2-*a*][1,4]diazepin-3,5,11(2*H*,10*H*,11a*H*)-trionu **11** byla zaujata prakticky stejná strategie jako výše popisovaná, to znamená, že je v prvním kroku nezbytné na 3-aminochinolindion navázat zbytek 3-chlorpropanové kyseliny, ovšem z její druhé strany. Za tímto účelem bylo prvně nutné získat příslušný acylchlorid.

Na základě inspirace z publikace[49] byla ve směsi rozpouštědel dichlormethanu a dimethylformamidu účinkem thionylchloridu provedena chlorace 3-chlorpropanové kyseliny (**Schéma 20**, **Metoda A**). Po 2,5 h míchání reakční směsi za laboratorní teploty byl dle NMR sice získán požadovaný 3-chlorpropionylchlorid, ale s neuspokojivým výtěžkem 4 %, proto byl hledán jiný alternativní způsob a bylo zjištěno, že když je 3-chlorpropanová kyselina 6 h vařena v samotném thionylchloridu, je možné odpovídající acylchlorid získat s výrazně vyšším výtěžkem 78 % (**Schéma 20**, **Metoda B**).

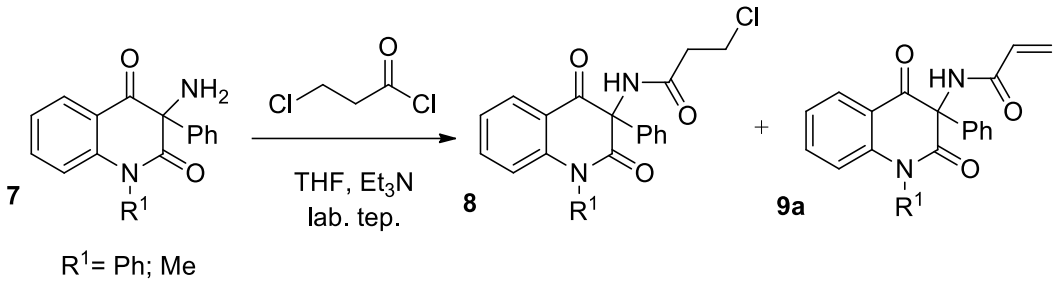


Metoda A : $SOCl_2$, DMF, DCM, lab.tep.
Metoda B : $SOCl_2$, var

Metoda	R.doba (h)	Výtěžek (%)
A	2,5	4
B	6	78

Schéma 20. Příprava 3-chlorpropionylchloridu.

Následně byl 3-chlorpropionylchlorid v tetrahydrofuranu vystaven nukleofilnímu ataku dvěma derivátům 3-aminochinolin-2,4(1*H*,3*H*)-dionů **7a** a **7b** (derivát **7b** byl získán z laboratorních zásob) za asistence triethylaminu (**Schéma 21**). Dle indikace průběžně prováděné chromatografie na tenké vrstvě byly obě reakce po 1,5 h u konce a poskytly jeden hlavní produkt, který byl doprovázen stopovým množstvím řady vedlejších látek. S využitím chromatografie na sloupci silikagelu byly ze surových směsí izolovány hlavní produkty, které po další purifikaci krystalizací z vhodného rozpouštědla byly charakterizovány 1D i 2D NMR spektroskopií, ze které jasně vyplynulo, že v obou případech bylo na primární aminovou skupinu chinolindionu navázání 3-chlorpropionylové skupiny úspěšné. V případě, kdy byla sloučenina **7a** výchozí látkou, se podařilo z reakční směsi vyizolovat, mimo hlavní produkt, i vedlejší látku. Po určení struktury s využitím NMR spektroskopie je patrné, že s velkou pravděpodobností sloučenina **9** vznikla z hlavního produktu **8a** eliminací chlorovodíku z postranního řetězce.



Vých.l. 7	R^1	R.doba (h)	Výtěžek 8 (%)	Výtěžek 9 (%)
a	Ph	1,5	45	7
b	Me	1,5	68	-

Schéma 21. Syntéza sloučenin **8a** a **8b**.

3.4 Experimenty plánované do budoucna

Experimentů do budoucna, vzhledem k řadě neúspěšných experimentů, je možné naplánovat celou řadu, nicméně v prvé řadě bude dozajista věnována pozornost přeměně již syntetizovaných sloučenin **8a** a **8b** na příslušné benzodiazepiny a následně cyklizaci jejich postranních řetězců. V případě úspěchu by měla, bude-li touha přípravu těchto zajímavých sloučenin prezentovat v odborném periodiku, pro doplnění reprezentativní série následovat syntéza dalších analogických derivátů nesoucích v poloze 3 methylovou skupinu. Taktéž by bylo vhodné obě řady (s fenylem i s methylem v poloze 3) doplnit o sloučeniny, které by neměly v poloze 1 žádný substituent, protože z řady publikací zabývajících se reaktivitou chinolindionů, je možné u těchto sloučenin oproti jim příbuzným zaznamenat poněkud netypické chování.

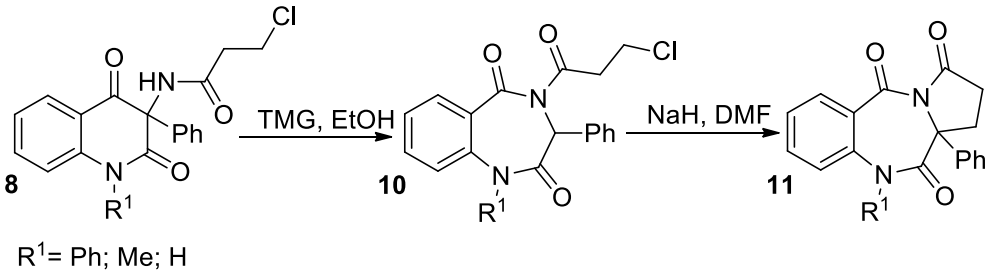


Schéma 22. Plánované experimenty.

Dále budou jistě studenti, kteří převezmou problematiku, na které jsem pracovala, se snažit o přípravu esterů β-alaninu a 3-chlorpropanové kyseliny. Po zkušenostech se vzdorem zmiňovaných kyselin tvořit estery běžným způsobem, by bylo nejspíše dobré nejprve připravit jejich varem s thionylchloridem odpovídající acylchloridy a ty až posléze nechat reagovat s alkoholem. Budou-li úspěšní, a já věřím, že budou, otevře se cesta k benzo[*e*]pyrrolo[1,2- *a*][1,4]diazepin-1,5,11(10*H*,11a*H*)-trionům **14**.

Jak již bylo v prvotních odstavcích této kapitoly zmíněno, za účelem naplnit zadání diplomové práce, existuje ještě druhá syntetická strategie pro přípravu pyrrolobenzodiazepinových sloučenin. V tomto směru doposud, díky vypuknutí nečekané koronavirové pandemie, nebyly podniknuty žádné kroky směřující k žádanému cíli. Proto by bylo vhodné nejprve vyvinout snahu o izomerizaci 3-aminochinolin-2,4(1*H*,3*H*)-dionu **7a** ve vroucím ethanolu vlivem dvoumolárního nadbytku tetramethylguanidinu, což jsou podmínky ověřené v předešlých letech na více jak deseti podobných derivátech. V případě úspěšné přípravy 1,3-difenyl-3,4-dihydro-1*H*-benzo[*e*][1,4]diazepin-2,5-dionu (**15**) bude zajímavé pozorovat, jeho chování v přítomnosti 3-chlorpropanoylchloridu, případně esteru 3-chlorpropanové kyseliny. Tyto zamýšlené experimenty by neměly činit sebemenší obtíže, ovšem otázkou bude, jak se zachovají jejich produkty při vystavení silné bázi.

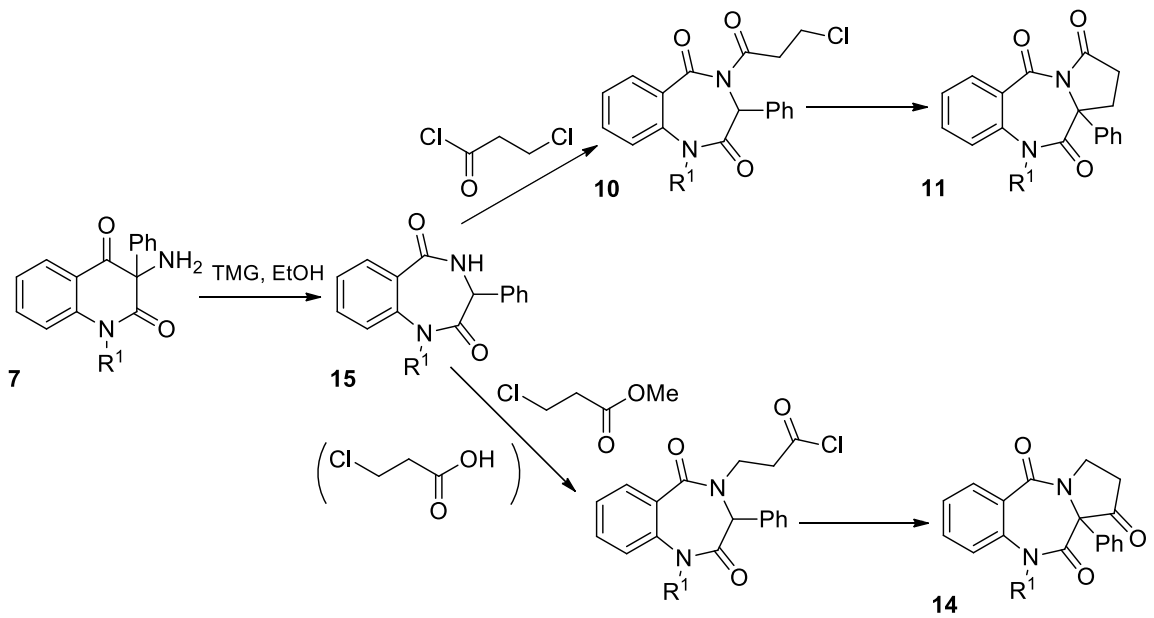


Schéma 23. Plánované přeměny 3-aminochinolindionů 7 na PBD **11** a **14**.

Podaří-li se získat toužené pyrrolobenzodiazepintriony, a to jak benzo[*e*]pyrrolo[1,2-*a*][1,4]diazepin-1,5,11(10*H*,11a*H*)-triony nebo benzo[*e*]pyrrolo[1,2-*a*][1,4]diazepin-3,5,11(2*H*,10*H*,11a*H*)-triony, bude jistě velmi zajímavé podrobit je mikrobiologickým nebo cytostatickým testům.

4 CHARAKTERISTIKA PŘÍSTROJOVÉHO VYBAVENÍ A POUŽITÝCH INSTRUMENTÁLNÍCH METOD

Všechny použité reagenty, včetně rozpouštědel byly zakoupeny z komerčních zdrojů, kterými byly Fischer Scientific, Siot, Penta, VWR a Sigma Aldrich. Pro sledování průběhu reakcí byla použita metoda tenkovrstvé chromatografie na komerčních hliníkových destičkách s vrstvou silikagelu (Alugram® SIL G/UV254; 220–240 mesh; Macherey-Nagel) s fluorescenčním indikátorem pro ultrafialové záření (UV) 254 nm. Pro přečištění připravených látek byla zvolena metoda sloupcové kapalinové chromatografie, na kterou byl použit Fluka Silica gel 60 220 –240 mesh s velikostí částic 35–75 μm, velikostí pórů 60 Å. Teploty tání byly měřeny na Koflerově bloku a nebyly korigovány.

Všechna infračervená spektra byla naměřena pomocí metody KBr tablet na FT-IR spektrometru značky Alpha (Brucker Optik GmbH Ettlingen). NMR spektra byla měřena na spektrometru JEOL ECZ 400 při frekvencích 399,75 MHz (^{1}H), 100,55 MHz (^{13}C) a 41 (^{15}N). Měřeny byly roztoky vzorků v DMSO-*d*$_6$ při teplotě 303 K. 1H NMR spektra byla kalibrována na residuální DMSO-*d*$_5$ s chemickým posunem 2,50 ppm. ^{13}C NMR spektra byla korigována na ^{13}C signál DMSO-*d*$_6$ s chemickým posunem 39,52 ppm. Chemické posuny jsou uvedeny v jednotkách ppm. Interakční konstanta *J* je uvedena v jednotkách Hz. Multiplicita signálů je značena zkratkami s (singlet), d (dublet), dd (dublet dubletu), ddd (dublet dubletu dubletů), t (triplet), m (multiplet).

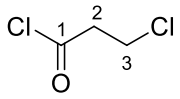
5 DETAILNÍ POPIS SYNTETICKÝCH POSTUPŮ A STRUKTURNÍ CHARAKTERISTIKY PŘIPRAVENÝCH SLOUČENIN

5.1 Příprava prekurzorů a cílových látek

Syntéza 3-chlorpropionylchloridu

K 3-chlorpropionové kyselině (50 mmol) byl na ledové lázni pozvolna přikapán thionylchlorid (15 ml). Získaná suspenze byla na olejové lázni (90–100 °C) v inertní argonové atmosféře vařena pod zpětným chladičem. Následně byly z reakčního roztoku ochlazeného na laboratorní teplotu na RVO odpařeny přebytečné těkavé složky.

3-Chlorpropionylchlorid



Žlutý roztok: výtěžek 78 %.

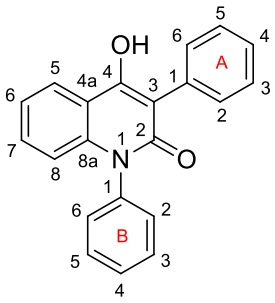
^{1}H NMR spektrum ($CDCl_3$, 400 MHz), ppm: δ 3, 35 (t, 1H, H-2, *J* = 6,4 Hz); 3,76 (t, 1H, H- 3, *J* = 6,4 Hz).

^{13}C NMR spektrum ($CDCl_3$, 101 MHz), ppm: δ 30,78 (C-2); 49,33 (C-3); 171,07 (C-1).

Syntéza 1,3-difenyl-4-hydroxychinolin-2(1H)-onu 5

Směs difenylaminu (300 mmol) a diethyl-fenylmalonátu (330 mmol; 1,1 ekviv.) byla 5 h zahřívaná na kovové lázni, jejíž teplota byla dle rychlosti destilace uvolňovaného EtOH postupně zvyšována od 150 °C do 300 °C. Po ukončení ohřevu byl reakční roztok za horka nalit do toluenu (250 ml), kde tavenina prokrystalizovala. Vyloučený pevný podíl byl přefiltrován přes fritu a opakovaně (5 × 200 ml) macerován vroucím toluenem. Získaná pevná látka byla vysušena a rozpouštěna ve vodném roztoku NaOH (570 ml; 0,5 M). Zpočátku docházelo k rozpouštění, ale následně k vyloučení vzhledově odlišné husté suspenze (vznikla málo rozpustná sodná sůl), proto byla přidána dest. voda (1000 ml) a vše bylo mícháno 30 min. K úplnému rozpuštění suspenze stejně nedošlo. Dále byla směs slabě okyselena 10% HCl. Vzniklá sraženina byla přefiltrována přes fritu. Pevný podíl byl zbaven zbytků kyseliny důkladným promytím dest. vodou, vysušen v sušárně a překrystalizován z vroucího EtOH.

***1,3-Difenyl-4-hydroxychinolin-2(1H)-on* (5)**



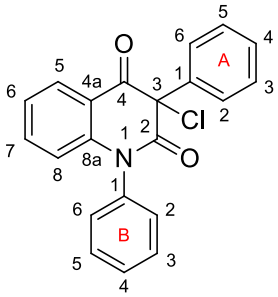
Bílá krystalická látka: t_t = 230–234 °C (EtOH), lit.[51] t_t = 232–233 °C (EtOH); výtěžek = 83 %; R_f = 0,16 (29 % EtOAc v PE), R_f = 0,19 (38 % EtOAc v PE).

IČ spektrum (tableta KBr), cm^{-1}: 1651, 1610, 1548, 1536, 1432, 1343, 1333, 1268, 1273, 1143, 1053. Odpovídá lit.[51].

Syntéza 3-chlorchinolin-2,4(1H,3H)-dionů 6

K míchané suspenzi 4-hydroxychinolin-2(1*H*)-onu (60 mmol) v dioxanu (180 ml) vytemperované na 45–50 °C bylo během 5 min přikapáno 13 ml SO_2Cl_2 (150 mmol; 2,5 ekviv.). Vzniklý žlutý roztok byl dále 30 min míchán při stejné teplotě. Poté byl reakční roztok ochlazen na laboratorní teplotu, přefiltrován přes filtrační papír (odstranění nezreagované výchozí látky) a nalit do ledové vody (800 ml), kde se vyloučilo značné množství pevné látky. Po rozpuštění ledu byla suspenze přefiltrována přes fritu, pevný podíl byl důkladně promyt vodou a následně vysušen v sušárně, čímž byl získán první díl surového produktu. Veškeré vodné podíly byly převedeny do děličky a opakovaně (5 × 100 ml) extrahovány $CHCl_3$. Organické podíly byly spojeny, vysušeny Na_2SO_4, přefiltrovány a odpařeny na RVO (druhý díl surového produktu). Oba díly surového produktu byly spojeny a následně překrystalizovány z vroucího benzenu.

3-Chlor-1,3-difenylchinolin-2,4(1*H*,3*H*)-dion (6a)

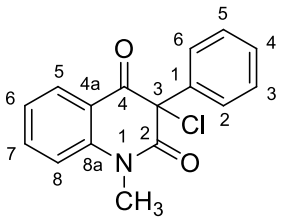


Bílá krystalická látka: t_t = 170–172 °C (benzen); lit.[52] t_t = 172–173 °C (benzen).

výtěžek = 88 %; R_f = 0,47 (38 % EtOAc v PE).

IČ spektrum (tableta KBr), cm^{-1}: 3061, 1720, 1688, 1598, 1493, 1462, 1330, 1301, 1239, 1159, 952, 904, 850, 745, 690, 611, 584, 492. Odpovídá lit.[52].

3-Chlor-3-fenyl-1-methylchinolin-2,4(1*H*,3*H*)-dion (6b)



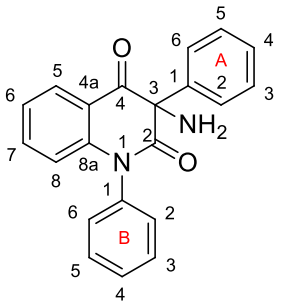
Žlutá krystalická látka: t_t = 121–123 °C (benzen), lit.[41] t_t = 121– 123 °C (benzen); výtěžek 91 %; R_f = 0,41 (38 % EtOAc v PE), R_f = 0,19 (29 % EtOAc v PE).

IČ spektrum (tableta KBr), cm^{-1}: 1714, 1688, 1602, 1472, 1348, 1239, 1141, 1060, 958, 908, 756, 693, 585, 461. Odpovídá lit.[41].

Syntéza 3-amino-3-fenylchinolin-2,4(1H,3H)-dionu 7

K suspenzi NH_4Cl (30 mmol; 2 ekviv.) a K_2CO_3 (60 mmol; 4 ekviv.) v DMF (75 ml) vytemperované na 0 °C byl přikapán roztok 3-chlor-3-fenylchinolin-2,4(1*H*,3*H*)-dionu (15 mmol; 1 ekviv.) v DMF (40 ml). Následně byla směs míchána 23 h při laboratorní teplotě a poté byla nalita do ledové vody (600 ml), kde se vyloučil pevný podíl. Jelikož byl natolik jemný, že jej nebylo možné odfiltrovat přes fritu (hustou fritu ucpal a řidší protékal), byla pevná fáze ve vodné suspenzi rozpuštěna v benzenu (70 ml). Získaná emulze byla převedena do děličky, kde byla rozdělena. Následně byla vodná vrstvá opakovaně (7 × 150 ml) extrahována benzenem. Veškeré organické podíly byly spojeny, vysušeny Na_2SO_4, přefiltrovány a odpařeny na RVO. Surový produkt byl následně krystalizován z benzenu.

***3-Amino-3-fenylchinolin-2,4(1H,3H)-dion* (7)**



Bílá krystalická látka: t_t = 128–133 °C (benzen), lit. [53] t_t = 128–133 °C (benzen), výtěžek = 70%; R_f = 0,20 (38 % EtOAc v PE).

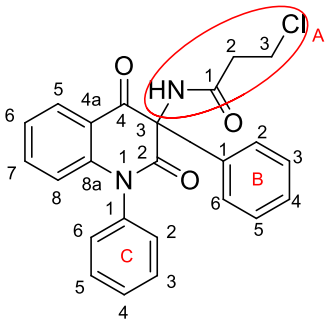
IČ spektrum (tableta KBr), cm^{-1}: 3320, 3068, 3033, 1710, 1674, 1599, 1491, 1460, 1337, 1245, 765, 690. Odpovídá lit.[53].

Syntéza (3-chlorpropionylamino)chinolin-2,4(1H,3H)-dionů 8

K roztoku 3-aminochinolin-2,4(1*H*,3*H*)-dionu (3 mmol; 1 ekviv.) v 37,5 ml THF byl přikapán Et_3N (2,5 mmol; 1,25 ekviv.) a chlorid kyseliny 3-chlorpropionové (3,6 mmol; 1,2 ekviv.). Poté byl reakční roztok míchán 1,5 h při laboratorní teplotě. Po ukončení reakce byly těkavé podíly odpařeny na RVO. Odparek byl rozpuštěn v DCM (40 ml) a získaný

roztok byl převeden do děličky, kde byl opakovaně extrahován nejdřív destilovanou vodou (3 × 30 ml) a pak nasyceným roztokem $NaHCO_3$ (3 × 30 ml). Organický podíl byl spojen, vysušen Na_2SO_4, přefiltrován a odpařen na RVO. Surový produkt byl přečištěn opakovanou chromatografií na sloupci silikagelu s využitím vhodné mobilní fáze (38 % EtOAc v PE pro **8a**; 25 % EtOAc v BE pro **8b**). Frakce, obsahující hlavní produkt, byly překrystalizovány z vroucího benzenu.

3-(3-Chlorpropionylamino)-1,3-difenylchinolin-2,4(1*H*,3*H*)-dion (8a)



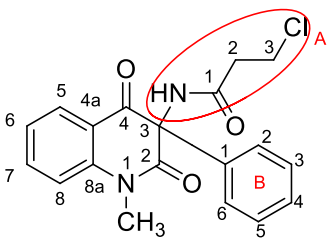
Nažloutlá krystalická látka: t_t = 247–250 °C (benzen); výtěžek = 45 %; R_f = 0,42 (38 % EtOAc v PE), R_f = 0,29 (29 % EtOAc v PE).

IČ spektrum (tableta KBr), cm^{-1}: 3186, 3039, 2923, 1722, 1687, 1647, 1462, 1338, 1251, 1160, 936, 770, 697, 587, 517, 446.

^{1}H NMR spektrum (DMSO, 400 MHz), ppm: δ 2,69–2,86 (m, 1H, H-2^A); 3,75 (dd, 1H, H-3^A, *J* = 6,6; 6,6 Hz); 6,41 (d, 1H, H-8, *J* = 8,2 Hz); 7,14–7,20 (m, 1H, H-6); 7,39–7,54 (m, 8H, H-7, H-2^B, H-3^B, H-4^B, H-5^B, H-6^B, H-2^C, H-6^C); 7,54–7,60 (m, 1H, H-4^C); 7,66 (dd, 2H, H- 3^C, H-5^C , *J* = 7,3; 7,3 Hz); 7,87 (dd, 1H, H-5, *J* = 7,7; 1,5 Hz); 9,54 (s, 1H, NH).

^{13}C NMR spektrum (DMSO, 101 MHz), ppm: δ 37,00 (C-2^A); 40,07 (C-3^A); 71,72 (C-3); 116,68 (C-8); 119,60 (C-4a); 123,30 (C-6); 127,35 (C-2^B a C-6^B); 127,96 (C-5); 128,77 (C- 2^C a C-6^C); 129,00 (C- 4^C); 129,28 (C-3^B a C-5^B); 129,48 (C-4^B); 130,43 (C-3^C a C- 5^C); 132,77 (C-1^B); 136,02 (C-7), 137,41 (C-1^C); 142,90 (C-8a); 169,15 (C-2); 169,88 (C-1^A); 189,72 (C-4).

3-(3-Chlorpropionylamino)-3-fenyl-1-methylchinolin-2,4(1*H*,3*H*)-dion (8b)



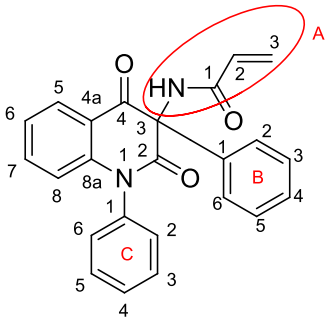
Bílá krystalická látka: t_t = 198–200 °C (benzen); výtěžek 68 %; R_f = 0,47 (25 % EtOAc v Be), R_f = 0,28 (20 % EtOAc v Be), R_f = 0,26 (50 % EtOAc v Be).

IČ spektrum (tableta KBr), cm^{-1}: 3340, 3034, 2669,1711, 1657, 1601, 1472, 1357, 1299, 1126, 1039, 936, 768, 699, 577, 516, 458.

^{1}H NMR spektrum (DMSO, 400 MHz), ppm: δ 2,71–2,83 (m, 1H, H-2^{A}); 3,73 (dd, 1H, H-3^{A}, *J* = 6,6; 6,6 Hz); 7,16–7,22 (m, 1H, H-6); 7,28–7,34 (m, 2H, H-2^{B}, H-6^{B}); 7,34–7,40 (m, 3H, H-3^{B}, H-4^{B,} H-5^{B}); 7,41 (d, 1H, H-8, *J* = 8,3 Hz); 7,72 (ddd, 1H, H-7, *J* = 8,9; 7,3; 1,7 Hz); 7,82 (dd, 1H, H-5, *J* = 7,7; 1,6 Hz); 9,44 (s, 1H, NH).

^{13}C NMR spektrum (DMSO, 101 MHz), ppm: δ 30,11 (-CH$_3$); 36,99 (C-2^{A}); 40,04 (C-3^{A}); 71,39 (C-3); 115,82 (C-8); 119,87 (C-4a); 123,03 (C-6); 127,24 (C-2^{B} a C-6^{B}); 127,73 (C- 5); 129,02 (C-3^{B} a C-5^{B}); 129,31 (C-4^{B}); 133,18 (C-1^{B}); 136,33 (C-7); 142,10 (C-8a), 169,08 (C-2); 169,59 (C-1^{A}); 189,72 (C-4).

3-(3-akrylamido)-1,3-difenylchinolin-2,4(1*H*,3*H*)-dion (9)



Žlutá krystalická látka: t_t = 260–264 °C (benzen); výtěžek 7 %; R_f = 0,33 (38 % EtOAc v PE).

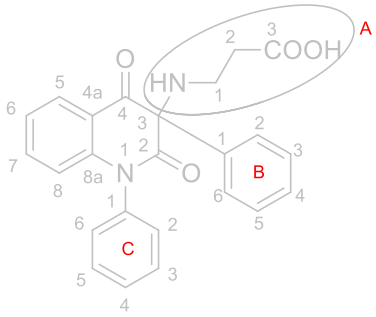
IČ spektrum (tableta KBr), cm^{-1}: 3372, 3028, 1969, 1720, 1686, 1462, 1339, 1235, 1160, 970, 773, 710, 584, 516, 449.

^{1}H NMR spektrum (DMSO, 400 MHz), ppm: δ 5,71 (dd, 1H, H-3^{A}, *J* = 10,3; 2,0 Hz); 6,13 (dd, 1H, H-3^{A}, *J* = 17,2; 2,0 Hz); 6,42 (d, 1H, H-8, *J* = 8,3 Hz); 6,51 (dd, 1H, H-2^{A}, *J* = 17,2; 10,3 Hz); 7,13–7,20 (m, 1H, H-6); 7,38–7,60 (m, H-7, H-2 ^{B}, H-3 ^{B}, H-4 ^{B}, H-5^{B}, H-6 ^{B}, H- 2^{C}, H-4^{C}, H-6 ^{C}); 7,66 (dd, 2H, H-3^{C}, H-5^{C}, *J* = 7,1; 7,1 Hz); 7,88 (dd, 1H, H-5, *J* = 7,8; 1,5 Hz); 9,63 (s, 1H, NH).

^{13}C NMR spektrum (DMSO, 101 MHz), ppm: δ 71,81 (C-3); 116,69 (C-8); 119,60 (C-4a); 123,32 (C-6); 127,14 (C-3^{A}); 127,39 (C-2^{B} a C-6^{B}); 127,94 (C-5); 128,80 (C-2^{C} a C-6^{C}); 128,99 (C- 4^{C}); 129,29 (C-3^{B} a C-5^{B}); 129,47 (C-4^{B}); 129,82 (C-2^{A}); 130,38 (C-3^{C} a C-5^{C}); 132,71 (C-1^{B}); 136,01 (C-7), 137,37 (C-1^{C}); 142,91 (C-8a); 165,07 (C-1^{A}); 169,15 (C-2); 189,82 (C-4).

5.2 Postup nezdařených experimentů

Pokus o přípravu 3-(2-karboxyethyl)aminochinolindionu



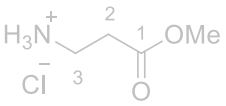
Metoda A

Suspenze 3-chlorchinolindionu (2 mmol), β-alaninu (2,2 mmol) a K_2CO_3 (4 mmol) v roztoku vody (1 ml) v 5 ml DMF byla 3 h vařena na olejové lázni. Jelikož během míchání nedošlo v reakční směsi k žádným změnám výchozí látky, bylo vše bez dalšího zkoumání zlikvidováno.

Metoda B

K roztoku 3-aminochinolindionu (0,8 mmol) v 5 ml DMF byla přidána 3-chlorpropionová kyselina (1 mmol) a K_2CO_3 (2 mmol). Vzniklá suspenze byla 22 h míchána při lab. teplotě nebo 25 h vařena pod zpětným chladičem. Poté bylo k suspenzi přidáno 50 ml vody, vše převedeno do děličky a následně byla vodná vrstva opakovaně (4 × 25 ml) extrahována chloroformem. Organické podíly byly spojeny, vysušeny Na_2SO_4, přefiltrovány, odpařeny na RVO a chromatografovány (25 % EtOAc v Be). Okyselením vodného podílu 1M HCl byla regenerována nezreagovaná 3-chlorpropionová kyselina.

Pokus o syntézu hydrochloridu methyl-3-aminopropanoátu



Metoda A

K suspenzi β-alaninu (10 mmol) v MeOH (50 ml) vytemperované ledovou lázní na -10 °C byl pozvolna přikapán thionylchlorid (30 mmol). Vzniklý roztok byl míchán 24 h za laboratorní teploty. Dále byly z reakčního roztoku odpařeny na RVO přebytečné těkavé složky.

Metoda B

K suspenzi β-alaninu (5 mmol) v MeOH (10 ml) vytemperované ledovou lázní na -10 °C byl pozvolna přikapán thionylchlorid (6 mmol). Dále byla suspenze na olejové lázni (80 °C) vařena po dobu 3 h. Následně byly ze vzniklého reakčního roztoku odpařeny na RVO přebytečné těkavé složky.

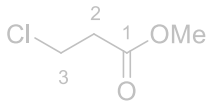
Metoda C

K suspenzi β-alaninu (10 mmol) v MeOH (20 ml) byla pozvolna přikapána koncentrovaná (95%) kyselina sírová (12 mmol). Dále byla suspenze na olejové lázni (80 °C) 8 h vařena. Následně byly ze vzniklého reakčního roztoku odpařeny na RVO přebytečné těkavé složky.

Metoda D

K suspenzi β-alaninu (10 mmol) v DCM (25 ml) byl pozvolna přikapán thionylchlorid (20 mmol). Dále byla suspenze na olejové lázni (50 °C) 1,5 h vařena. Po ochlazení byl do reakční směsi přidán MeOH (30 mmol) a opět vše 1,5 h vařeno pod zpětným chladičem. Následně byly ze vzniklého reakčního roztoku odpařeny na RVO přebytečné těkavé složky.

Pokus o přípravu methylesteru 3-chlorpropanové kyseliny



K roztoku 3-chlorpropanové kyseliny (4,6 mmol) v MeOH (5 ml) byla pozvolna v jednom pokusu přikapána koncentrovaná (35%) kyselina chlorovodíková (0,4 ml) a v experimentu druhém koncentrovaná (95%) kyselina sírová (0,25 ml). Dále byla suspenze na olejové lázni (80 °C) 10 h vařena. Následně byly ze vzniklého reakčního roztoku odpařeny na RVO přebytečné těkavé složky.

ZÁVĚR

Jak již bylo konstatováno, na Ústavu chemie Univerzity Tomáše Bati část výzkumné skupiny pana docenta Kafky se zabývá syntézou pyrrolobenzodiazepinů a jejich derivátů už delší dobu. Stanovená problematika a cíl dané diplomové práce navazovaly na výsledky dosažené mými předchůdkyněmi, o kterých se již hodně mluvilo v kapitole 3.1, s tím rozdílem, že navřené strategie předpokládaly jako cílové PBD sloučeniny, které by měly substituovaný pětičlenný pyrrolový kruh oxoskupinou v poloze 1 nebo 3 (dřív byly připraveny PBD jen s nesubstituovaným pyrrolovým kruhem). Navřené syntetické postupy (**Schéma 13**), podle kladené podmínky, vycházely z chinolindionů **6**. Jedna syntetická cesta představovala přípravu vhodně *N*-substituovaných 3-aminochinolin-2,4(1*H*,3*H*)-dionů **8** a **12**, které by byly účinkem báze převedeny na odpovídající benzodiazepinové sloučeniny **10**, **13**. V případě syntézy sloučeniny **13** by byla potřebná úprava postranního řetězce hydrolýzou a chlorací, až teprve potom by byla provedena cyklizační reakce. Druhá syntetická strategie prezentovala přednostně přípravu 3-fenyl-3,4-dihydro-1*H*-benzo[*e*][1,4]diazepin-2,5-dionů **15**, na které jsou až poté navázány příslušné zbytky propanové kyseliny, jejichž cyklizací by teoreticky měly vzniknout stejné výsledné deriváty jako v prvním případě.

Nejdřív byl připraven výchozí 1,3-disubstituovaný 3-chlorchinolin-2,4(1*H*,3*H*)-dion **6a** (**Schéma 14**), který byl, za účelem syntézy 3-(2-karboxyethylamino)chinolindionu, za zvýšené teploty vystavován 3-aminopropanové kyselině (**Schéma 15**). Jelikož reakce nebyla úspěšná, následovaly pokusy o přípravu esteru β-alaninu, ovšem bohužel i přes dodržení prezentovaných postupů, nebyl získán ester ani v malém množství (**Schéma 16**).Nakonec místo navázaní aminokyseliny na 3-chlorchinolindion, byl zkoušen postup obracený. Prvně byla provedena konverze 3-chlorchinolin-2,4(1*H*,3*H*)-dionu **6a** na 3-aminoderivát **7** (**Schéma 17**), který byl dlouhodobě míchán s 3-chlorpropanovou kys. (**Schéma 18**), čímž docházelo k tvorbě značného množství vedlejších látek, ze kterých se s využitím sloupcové chromatografie nepodařilo, mimo výchozí látku, izolovat ani jednu čistou látku. Proto byly dále prováděny pokusy o přípravu methyl-3-chlorpropanoátu, nicméně zvolenými postupy k tvorbě esteru nedošlo. Tyto nezdary nás přizvedly k opuštění tématiky přípravy benzo[*e*]pyrrolo[1,2- *a*][1,4]diazepin-1,5,11(10*H*,11a*H*)-trionu **14**.

Jelikož navřené syntetické cesty přepokládaly navázání 3-chlorpropanoylu na 3-aminochinolindion **7**, byla provedena chlorace 3-chlorpropanové kyseliny. Kvůli nízkým výtěžkům z reakce provedené v roztoku DMF/DCM, byl vyzkoušen experiment bez

přítomnosti organického rozpouštědla, čímž byl výtěžek navýšen o téměř 75 % (**Schéma 20**). Následovala nukleofilní substituce mezi 3-aminochinolindionem **7** a připraveným chloridem 3-chlorpropanové kyseliny, čímž byly získány 3- (3- chlorpropionylamino)chinolin-2,4(1*H*,3*H*)-diony **8a** a **8b** (**Schéma 21**).

Po tom, co se konečně začaly experimenty dařit, se musela práce kvůli pandemii přerušit, a proto řada experimentů nebyla dokončena a zařadily se do skupinky reakcí plánovaných do budoucna (kapitola 3.4). Ale i přes tuto skutečnost, experimenty, které se zrealizovat stihly, nás v dané problematice jistým způsobem posunuly dále.

SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

[1] Hampl F. ; Rádl S. *Farmakochemie*. 3., upravené a rozšířené vydání. Praha: Vysoká škola chemicko-technologická v Praze, **2015**. 117–120. ISBN 978-80-7080-875-7.

[2] Málek L.; Málek J. *Netradiční způsoby aplikace anestetik: možnosti jejich využití v urgrentní medicíně a medicíně katastrof*. Praha: Nakladatelství Karolinum, **2016.** 55–58. ISBN 978-80-246-3450-0.

[3] Harvey R, Silverstein D, Hopper K. *Small Animal Critical Care Medicine*. Saint Louis: Elsevier, **2009**. 790–792. ISBN 978-14-1602-591-7.

[4] Mehdi T. *BJMP* **2012**. 5(1):a501.

[5] Dassanayake, T.; Michie, P. *Drug Saf*. **2011**. *34*, 125–156.

[6] Suddock JT, Cain MD. *StatPearls* **2019.** 1–4.

[7] Lüllmann H.; Mohr K.; Hein L. *Barevný atlas farmakologie*. Vyd. 3., české. Praha: Grada, **2007**. 224–238 ISBN 978-80-247-1672-5.

[8] Jeannette Y. *CPH* . **2013**, *28(9)*, 538–548

[9] Ševčík K.; Ševčík P.. *Akutní intoxikace a léková poškození v intenzivní medicíně*. Praha: Grada, **2011**. 29–30 ISBN 978-80-247-3146-0.

[10] Švihovec J.; Bultas J.; Anzenbacher P. *Farmakologie*, **2018**. Praha: Grada Publishing, **2018**. 275–283. ISBN 978-80-247-5558-8.

[11] Griffin C.; Kaye A., Bueno F. *Ochsner J*. **2013.** *13(2)*, 214–223.

[12] Kleemann A.; Engel J.; Kutscher B. *Org Process Res Dev.* **2009**. *5*, 739–740.

[13] Savari A.; Heidarizadeh F.; Pourezza N. *Polyhedron* **2019**. *166*, 233-247.

[14] Wilson S.; Schmidt I.; Roos W.; Fürst W. *Zeitschr. Allg. Mikrobiol*. **1974**. *14*, 515–523.

[15] Cutler H.; Cox R.; Wells J. *Plant Cell Physiol*. **1984**. *25*, 257–263.

[16] Helbig F.; Steighardt J.; Roos.W. *Appl. Environ*. **2002**. *68(4)*, 1524-1533.

[17] Varvounis G. *Molecules* **2016**. *21(2)*, 154–209.

[18] Mai, A.; di Santo R.; Massa S.; Artico M. *Eur. J. Med. Chem.* **1995**. *30*, 593–601.

[19] De Lucca, G.; Otto M. *Bioorg. Med. Chem. Lett*. **1992**. *2*, 1639–1644.

[20] Gerratana B. *Med. Res. Rev.* **2012**, *32*, 254–293.

[21] Antonow D.; Barata T.; Jenkins T. C.; Parkinson G. N.; Howard P. W.; Thurston D. E.; *Zloh, M. Biochemistry* **2008**, *47*, 11818–11829.

[22] Antonow D.; Thurson D. *Chem. Rev*. **2011**. *111(4),* 2815–2864.

[23] Wells G.; Martin C. R. H.; Howard P. W.; Sands *Med. Chem*. **2006**. *49*, 5442–5461.

[24] Kotecha M.; Kluza J.; Wells G.; O'Hare C. C.; Forni C.; Mantovani R.; *Mol. Cancer Ther*. **2008**. *7*, 1319–1338.

[25] Pavlíková M.; Kameník Z.; Janata J. *Sci. Rep.* **2018**. *8(1),*7810.

[26] Hu Y.; Phelan V.; Ntai I. *Chem. Biol*. **2007**, *14(6),* 691–701.

[27] Li W.; Chou S.; Khullar A.; *Appl. Environ* . **2009**. *75(9)*, 2958– 2963

[28] Dornisch E.; Pletz J.; Glabonjat R. *Angew. Chem*. **2017**. *129(46),* 14948–14952.

[29] Wang F.;, Hu Z.;, Li C.; Wu X. *Tetrahedron Lett*. **2019**, *60(26)*, 1724–1726.

[30] Von Tesmar A.; Hoffmann M.; Pippel J. *Cell Chem. Biol*. **2017**, *24(10)*, 1216–1227.

[31] Iontcho R., Qi K.; Santhapuram H. *Bioorg. Med. Chem. Lett*. **2020**. *30(7),* 1202-1205.

[32] Mantaji J.; Jackson P.; Rahman K.; Thurston D. *Angew. Chem. Int. Ed*. **2017**. *56(2)*, 462–488.

[33] Hartley J.; Flynn M.; Bingham J. *Sci Rep*. **2018**. *8(1),* 10479.

[34] Tiberghien A.; Levy J.; Masterson L.; Patel N. *ACS Med Chem Lett*. **2016**. *7*, 983–987.

[35] Kung M.; Walter R.; Jeffrey S.; *Blood*. **2013**. *122*, 1455–1463.

[36] Paul J.M.; Kay S.; Pysz I.; Thurson D. *Drug Discov. Today Technol*. **2018**. *30,* 71–83.

[37] Ramkumar V.; Hallam D.M.; Nie Z. *J. Pharmacol.* **2001**. *86*, 265–274.

[38] Ferguson L.; Sanjib B., Fox K.; Wells G.; Brucoli F. *Molecules*. **2020**. *25(5),* 1243–1257.

[39] Lajdová, A. Diplomová práce. Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně. Fakulta technologická. **2017**. 39, 54 str.

[40] Máčalová, Z. Diplomová práce. Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně. Fakulta technologická**.** **2019**. 29-30 str.

[41] Kafka, S.; Klásek, A. *Heterocycles*. **2002**. *57*, 1659–1682.

[42] Tseng M.; Yang H.; Chu Y. *Org. Biomol. Chem*. **2010**. *8*, 419–427.

[43] Faham A.; Marhoon Z.; Megeed A. *Molecules.* **2013**. *18*, 14747–14759.

[44] Gros L.; Lorente S.; Yardley V. *J. Med. Chem*. **2006**. *49*, 6094–6103.

[45] Sichuan Guokang Pharmaceutical Co. **2014.** Patent US2014/206741.

[46] Kumar R.; Tanaka E.; Frangioni J. *Angew. Chem. Int. Ed*. **2007**. *46 (42),* 7969–7971.

[47] Spaeth; Spitzy *Chemische Berichte*. **1925**, *58*, 2275.

[48] Michailowa; Pigulewskii *J. prikh. khim*. **1957**, *30*, 1843–1846.

[49] Moureu *Annales de Chimie*.**1894**, *7(2)*, 153–158.

[50] Niuruisen Bio-technology (Beijing) Co. **2018.** Patent CN108675993.

[51] Molnárová, M. Diplomová práce. Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně. Fakulta technologická. **2015**. 44 str.

[52] Klasek A.; Mrkvicka V.; Pevec A.; Kosmrlj J. *J. Org. Chem*. **2004**. *69 (17)*, 5646–5651.

[53] Klasek A.; Lyčka A.; Mikšík I.; Růžička A. *Tetrahedron* . **2010**. *66(11)*, 2015–2025.

SEZNAM POUŽITÝCH SYMBOLŮ A ZKRATEK

BOC	terc-butyloxykarbonyl
BZD	benzodiazepin
CNS	centrální nervový systém
ChiP	test imunoprecipitace chromatinu
DCM	dichlormethan
DIBAL-H	diisobutylaluminiumhydrid
DMAP	4-dimethylaminopyridin
DMF	dimethylformamid
DNA	deoxyribonukleotidová kyselina
EMSA	test posunu elektroforetické pohyblivosti
GABA	γ-aminomáselná kyselina
HIV–1	virus imunologické nedostatečností člověka
IČ	infračervená spektroskopie
Me	methyl
NAD	nikotinamidadenindinukleotid
NADH	rednikotinamidadenindinukleotid
NMR	spektroskopie nukleární magnetické rezonance
PBD	pyrrolobenzodiazepiny
Ph	fenyl
THF	tetrahydrofuran
TMG	tetramethylguanidin
α	alpha
β	beta
γ	gama
kat.	katalyzátor

SEZNAM SCHÉMAT

Schéma 1. Obecná syntéza benzodiazepinových sloučenin.[1] 14
Schéma 2. Katalytická syntéza derivátů 1,4-benzodiazepinu.[13] 15
Schéma 3. Syntéza triazolobenzodiazepinů.[1] 15
Schéma 4. Biologická syntéza BZD alkaloidů plísní *Penicillium cyclopium*.[6] 16
Schéma 5. Biosyntéza anthramycinu bakteriemi *Streptomyces refuines.*[26] 19
Schéma 6. Biosyntetická dráha produkce tomaymicinu.[27] 20
Schéma 7. Syntéza derivátů tomaymycinu.[30] 21
Schéma 8. Syntéza výchozího 2-jodadenosinu.[38] 24
Schéma 9. Syntetická příprava konjugátu PBD s adenosinem.[38] 25
Schéma 10. Prvotně izolované látky izomerizací propargylaminochinolindionů.[9] 27
Schéma 11. Přeměny propargylaminochinolindionů na BZD a PBD studované 28
Schéma 12. Sled reakčních kroků přípravy nasycených PBD.[41] 29
Schéma 13. Schéma syntetických možností přípravy pyrrolobenzodiazepintrionů 31
Schéma 14. Příprava výchozích sloučenin **5** a **6**. 32
Schéma 15. Pokus o přípravu 3-(2-karboxyethylamino)chinolindionu. 33
Schéma 16. Pokusy o přípravu methylesteru β-alaninu. 34
Schéma 17. Konverze 3-chlorchinolin-2,4(1*H*,3*H*)-dionu **6a** na 3-aminoderivát **7**. 34
Schéma 18. Pokus o reakci 3-aminochinolin-2,4(1*H*,3*H*)-dionu **7** s 3-chlorpropanovou kys. 35
Schéma 19. Pokusy o esterifikaci 3-chlorpropanové kyseliny 35
Schéma 20. Příprava 3-chlorpropionylchloridu. 36
Schéma 21. Syntéza sloučenin **8a** a **8b**. 37
Schéma 22. Plánované experimenty. 37
Schéma 23. Plánované přeměny 3-aminochinolindionů 7 na PBD **11** a **14** 38

SEZNAM OBRÁZKŮ

Obrázek 1. Příklad nejčastěji používaných 1,4-benzodiazepinů. [1] 10
Obrázek 2. Vázání benzodiazepinů na receptor $GABA_A$. 12
Obrázek 3. Struktura diazepamu (vlevo) a oxazepamu (vpravo).[7] 13
Obrázek 4. Strukturní izomery pyrrolobenzodiazepinů.[17] 17
Obrázek 5. Mechanismus tvorby kovalentní vazby mezi PBD a DNA.[2] 18
Obrázek 6. Struktura prvních dimerních pyrrolobenzodiazepinů.[32] 22
Obrázek 7. Příklad PBD dimeru spojeného v poloze C-8/C-8´.[32] 22
Obrázek 8. Adukt PBD dimeru s dvoušroubovicí DNA.[31] 22
Obrázek 9. Struktura PBD proléčiva tesirin a talirin.[36] 23
Obrázek 10. Struktura požadovaných sloučenin. 30