

# Studium možností využití 3-aminochinolindionů k přípravě pyrrolobenzodiazepintronových sloučenin

Bc. Kristýna Čípová

---

Diplomová práce  
2024



Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně  
Fakulta technologická

---

Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně

Fakulta technologická

Ústav chemie

Akademický rok: 2023/2024

# ZADÁNÍ DIPLOMOVÉ PRÁCE

(projektu, uměleckého díla, uměleckého výkonu)

Jméno a příjmení: **Bc. Kristýna Čípová**  
Osobní číslo: **T22403**  
Studijní program: **N0721A210005 Chemie potravin a bioaktivních látek**  
Forma studia: **Prezenční**  
Téma práce: **Studium možností využití 3-aminochinolindionů k přípravě pyrrolobenzodiazepintronových sloučenin.**

## 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

- Dle známých postupů uvedených v odborné literatuře připravit dostatečné množství *N*-(ne)substituovaných 3-aminochinolindionů představujících vhodné výchozí látky pro následné experimenty.
- Připravené 3-(3-chlorpropanamido)chinolindiony, za účelem studia ochoty tvořit benzodiazepin-2,5-diony, vystavit různě silnému bazickému prostředí.
- Chinolindiony s primární aminoskupinou v poloze 3 již ověřeným postupem nejprve převést na benzodiazepin-2,5-diony a ty následně, za účelem substituce amidového dusíku v poloze 4, vystavit reakcím s 3-brompropanoylchloridem.
- V případě úspěšné přípravy některého očekávaného produktu z reakcí definovaných v bodech 2 nebo 3 vyvinout maximální snahu vedenou k jeho transformaci na pyrrolobenzodiazepintron.
- Izolované produkty charakterizovat dostupnými metodami instrumentální analýzy.
- 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. Tietze, L. F.; Eicher, T.; Diederichsen, U.; Speicher, A.; Schützenmeister, N. *Reactions and Syntheses: In the Organic Chemistry Laboratory*, 2015, 2. vyd., Wiley-VCH Verlag GmbH. ISBN: 978-3-527-33814-6
3. Kafka, S.; Klásek, A. *Heterocycles* 2002, 57, 1659–1682.
4. Křemen, F.; Gazvoda, M.; Kafka, S.; Proisl, K.; Srdolcová, A.; Klásek, A.; Urankar, D.; Košmrlj, J. *J. Org. Chem.* 2017, 82, 715–722.
5. Fotso, S. *Mini-Rev. Org. Chem.* 2010, 7, 68–74.

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

Datum zadání diplomové práce: **2. ledna 2024**  
Termín odevzdání diplomové práce: **10. května 2024**

L.S.

---

**prof. Ing. Roman Čermák, Ph.D.**  
děkan

---

**doc. Ing. Michal Rouchal, Ph.D.**  
ředitel ústavu

Ve Zlíně dne 20. února 2024

## **PROHLÁŠENÍ AUTORKY 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, považuji 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 na diplomové práci pracovala samostatně a použitou literaturu jsem citovala. V případě publikace výsledků budu uvedena jako spoluautorka.
- že odevzdaná verze diplomové práce a verze elektronická nahraná do IS/STAG jsou obsahově totožné.

Ve Zlíně dne:

Jméno a příjmení studentky:

.....  
podpis studentky

## ABSTRAKT

V teoretické části diplomové práce jsou rozebírány nejen syntetické postupy vedoucí ke vzniku derivátů benzodiazepinu (BZD) a pyrrolobenzodiazepinu (PBD), ale i biologické aktivity zástupců jednotlivých skupin. Také je zde věnována kapitola o stabilitě a reaktivitě BZD i PBD sloučenin. V neposlední řadě byla rešerše zaměřena na nedávné pokroky ve využití PBD a jejich dimerů, které se v dnešní době pyšní obrovským rozmachem. V praktické části je nejprve popisována syntéza 4-(3-chlorpropanoyl)benzodiazepindionů z 3-aminochinolin-2,4-dionových prekurzorů. Během realizace tohoto úkolu, byla pozornost zaměřena i na konformační analýzu připravených BZD. V další části práce je popisována jak intramolekulární Claisenova kondenzace derivátů pozorovaná u 3-((3-ethoxy-3-oxopropyl)amino)chinolin-2,4-dionu, tak i separace a identifikace dvou vzniklých diastereomerů derivátů pyrrolo[2,3-*c*]chinolin-4-onu.

Klíčová slova: benzodiazepindiony, konformační analýza, nukleofilní substituce, Claisenova kondenzace, diastereomery

## ABSTRACT

The theoretical part of the thesis discusses not only synthetic procedures leading to the formation of benzodiazepine (BZD) and pyrrolobenzodiazepine (PBD) derivatives, but also the biological activities of representatives of individual groups. A chapter on the stability and reactivity of both BZD and PBD compounds is also included. Last but not least, the research was focused on recent advances in the use of PBD and their dimers, which are currently experiencing tremendous growth. In the practical part, the synthesis of 4-(3-chloropropanoyl)benzodiazepindiones from 3-aminoquinolin-2,4-dione precursors is first described. During the implementation of this task, attention was also focused on the conformational analysis of prepared BZDs. The next part of the work describes both the intramolecular Claisen condensation of derivatives observed in 3-((3-ethoxy-3-oxopropyl)amino)quinolin-2,4-dione and the separation and identification of two resulting diastereomers of pyrrolo[2,3-*c*]quinolin-4-one derivatives.

Keywords: benzodiazepines, conformational analysis, nucleophilic substitution, Claisen condensation, diastereomers

Na tomto místě bych ráda vyjádřila své velké poděkování vedoucímu mé práce Ing. Romanu Kimmelovi, Ph.D. za jeho odborné vedení, trpělivost a podporu při psaní této práce. Mé velké poděkování patří také Ing. Petru Janovskému za pomoc při měření molekulové dynamiky, modelování sloučenin a při měření ESI-MS. Poděkování bych také chtěla vyjádřit doc. Mgr. Robertu Víchovi, Ph.D. za pomoc při měření a konzultaci ROESY spekter. Také děkuji za pomoc při výběru monokrystalů pro rentgenovou difrakci, jejichž výsledky prozatím nejsou k dispozici. Další poděkování patří doc. Ing. Michalu Rouchalovi, Ph.D. za pomoc při měření a interpretaci spekter ESI-MS. Děkuji kolektivu ÚCH FT UTB za vytvoření skvělých podmínek k vytvoření této práce, a především také mým spolužačkám za podporu. Můj poslední obrovský dík patří mé rodině, přátelům a partnerovi za jejich nemalou podporu po celou dobu studia.

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

# OBSAH

<b>ÚVOD</b> .....	<b>10</b>
<b>I TEORETICKÁ ČÁST</b> .....	<b>11</b>
<b>1 BENZODIAZEPINY</b> .....	<b>12</b>
1.1 HISTORIE VZNIKU BENZODIAZEPINŮ .....	12
1.2 FARMAKOLOGIE BENZODIAZEPINŮ .....	13
1.2.1 Farmakodynamika .....	14
1.2.2 Farmakokinetika .....	15
1.3 SYNTÉZA A REAKTIVITA BENZODIAZEPINOVÝCH SLOUČENIN.....	18
1.3.1 Stabilita 1,4-benzodiazepinů a 1,4-benzodiazepin-2,5-dionů .....	25
<b>2 PYRROLOBENZODIAZEPINY</b> .....	<b>28</b>
2.1 STRUKTURNÍ IZOMERY PBD .....	29
2.1.1 Pyrrolo[2,1- <i>c</i> ][1,4]benzodiazepiny.....	29
2.1.2 Pyrrolo[1,2- <i>a</i> ][1,4]benzodiazepiny .....	31
2.1.3 Pyrrolo[1,2- <i>d</i> ][1,4]benzodiazepiny .....	32
2.2 MECHANISMUS PŮSOBENÍ.....	32
2.3 SYNTÉZA PYRROLOBENZODIAZEPINOVÝCH SLOUČENIN .....	33
2.3.1 Stabilita pyrrolobenzodiazepinů .....	36
2.4 NEDÁVNÉ POKROKY V POUŽITÍ PBD .....	38
<b>II PRAKTICKÁ ČÁST</b> .....	<b>41</b>
<b>3 VÝSLEDKY A DISKUZE</b> .....	<b>42</b>
3.1 SHRNUÍ DOSAVADNÍ PRÁCE NA TĚTO PROBLEMATICE .....	42
3.2 DISKUZE O PROBLEMATICE TĚTO PRÁCE .....	44
3.2.1 Syntetická cesta A .....	44
3.2.2 Syntetická cesta B.....	62
<b>4 CHARAKTERIZACE PŘÍSTROJOVÉHO VYBAVENÍ A INSTRUMENTÁLNÍCH METOD</b> .....	<b>73</b>
<b>5 POPIS SYNTETICKÝCH POSTUPŮ S CHARAKTERIZACÍ PŘIPRAVENÝCH SLOUČENIN</b> .....	<b>75</b>
5.1 PŘÍPRAVA BENZODIAZEPIN-2,5-DIONU Z DERIVÁTU CHINOLINDIONU 6A .....	75
5.2 PŘÍPRAVA BENZODIAZEPIN-2,5-DIONŮ Z DERIVÁTŮ CHINOLIN-2,4(1 <i>H</i> ,4 <i>H</i> )-DIONŮ 6B.....	76
5.3 SYNTÉZA 1 <i>H</i> -BENZO[ <i>E</i> ][1,4]DIAZEPIN-2,5-DIONŮ 14.....	76
5.4 POKUSY O PŘIPOJENÍ 3-HALOGENPROPANOYLOVÉHO ŘETĚZCE K BZD .....	78
5.5 SYNTÉZA 9B-HYDROXY-4-OXOPYRROLO[2,3- <i>C</i> ]CHINOLIN-1-KARBOXYLÁTŮ 15 .....	80
<b>ZÁVĚR</b> .....	<b>85</b>



<b>SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY .....</b>	<b>87</b>
<b>SEZNAM POUŽITÝCH SYMBOLŮ A ZKRATEK.....</b>	<b>96</b>
<b>SEZNAM OBRÁZKŮ .....</b>	<b>97</b>
<b>SEZNAM SCHÉMÁT.....</b>	<b>99</b>

## ÚVOD

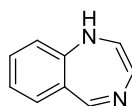
Benzodiazepiny jsou rozsáhlou skupinou psychoaktivních látek, známých především díky svým účinkům na centrální nervový systém (CNS) a jejich rozmanitým využitím. Mechanismus jejich působení je založen na zvýšení účinku neurotransmiteru GABA (kyseliny  $\gamma$ -aminomáselné) vedoucí k potlačení neurální aktivity, a tak snížení excitace neurotransmiteru v mozku. Tato vlastnost jim umožňuje působit jako účinná anxiolytika (látky odstraňující úzkost), hypnotika (látky působící tlumivě na CNS) či myorelaxancia (léky na snížení svalového napětí). Proto jsou hojně využívány v klinické praxi k léčbě právě úzkostných poruch, nespavosti, epilepsie nebo jsou využívány jako předoperační anestetika. Při užívání těchto léků je však třeba být obezřetným, neboť tak jak mohou pomáhat, mohou vyvolat i závislost. Důležitým faktorem při jejich užívání je také indikační dávka či délka užívání. Dlouhodobé užívání může, ostatně jako u jiných léčiv, vést k toleranci na BZD. I když benzodiazepiny jako takové byly objeveny již v 60. letech 20. století, jsou stále tyto látky natolik zajímavými, že jsou, za účelem získání nových derivátů benzodiazepinů s potenciální biologickou aktivitou, hojně zkoumanými a syntetizovanými do dnes.

Pyrrolobenzodiazepiny jsou původně přírodními látkami objevenými jako sekundární metabolity vykazující protinádorovou aktivitu. Jsou produkovány mikroorganismy rodu *Streptomyces*. Představují tak velmi perspektivní třídu sloučenin s rostoucím potenciálem v oblasti onkologické terapie. Mají schopnost se vázat na DNA a narušovat tak její funkci, což následně vede k inhibici buněčného dělení a indukci programované buněčné smrti čili k apoptóze. Mají také schopnost se selektivně zaměřit na maligní buňky za minimálního poškození buněk zdravých. Jsou proto vhodnými látkami k léčbě nádorových onemocnění zejména tedy při léčbě leukémie nebo lymfomů. Naopak dimery PBD jsou strukturně složitějšími molekulami vznikající spojením dvou jednotlivých PBD jednotek. Mají také schopnost se vázat na DNA a blokovat tak její replikaci, což vede k zastavení samotného růstu nádorových buněk. Umožňují také cíleně zasáhnout do buněčného dělení a tím minimalizovat poškození zdravých buněk, čímž jsou i sníženy jejich vedlejší účinky. Dimery se nyní pyšní velkého rozmachu využití v ADC terapii, což je nová zajímavá oblast výzkumu a vývoje nových léčiv proti rakovině, mající slibnou budoucnost v rámci vývoje nových léčivých postupů.

## **I. TEORETICKÁ ČÁST**

## 1 BENZODIAZEPINY

Benzodiazepiny (BZD) jsou třídou psychofarmak vykazujících anxiolytické, sedativní, antikonvulzivní či myorelaxační nebo hypnotické účinky.<sup>1</sup> Vzhledem k jejich rychlé a specifické účinnosti se staly jedněmi z nejrozšířenějších psychofarmak. Nicméně tato léčiva mají i stinné stránky. Bylo zjištěno<sup>2</sup>, že se u pacientů s dlouhodobým užíváním těchto medikamentů často projevují nejen psychické, ale i fyzické závislosti. Základní struktura BZD (**Obrázek 1**) nabízí mnoho míst, na které je možné navázat různorodé funkční skupiny nebo postranní řetězce, díky čemuž je možné připravit rozmanité deriváty BZD majících rozdílnou účinnost, farmakokinetiku či farmakodynamiku.



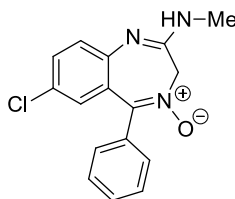
**Obrázek 1.** Obecný vzorec benzodiazepinu.

### 1.1 Historie vzniku benzodiazepinů

První zmínka o BZD pochází z druhé poloviny 20. století, kdy došlo k takzvané psychofarmakologické revoluci, která přinesla do klinické léčby tři hlavní farmakologické skupiny.<sup>3-5</sup> Byly zde zahrnuty antipsychotické látky<sup>6</sup>, antidepressiva<sup>7</sup> a anxiolytická léčiva<sup>8</sup>. Revoluce byla ovlivněna psychoanalytickým myšlením této doby, kdy byly považovány úzkosti za klinický projev neuróz.<sup>9</sup> K dispozici byly v té době hlavně sedativní látky, tedy barbituráty, které však neměly na symptomy psychiatrických poruch specifické účinky.<sup>10</sup> Situace se výrazně změnila po představení skupiny BZD, které s sebou přinesly nové možnosti léčby duševních poruch.<sup>3</sup> Podobně jako u mnoha psychofarmak vyvinutých v těchto letech byl i objev BZD výrazně ovlivněn vědeckou náhodou. Celý výzkumný proces byl protkaný chybami a selháním, které se změnily zcela nečekané úspěchy.

Za objevitele benzodiazepinů je považován polský organický chemik Leo Henryk Sternbach, který svůj výzkum započal v laboratořích společnosti Hoffmann-LaRoche Inc. v Basileji (Švýcarsko) v roce 1940.<sup>11</sup> Jeho výzkum byl však pozastaven tehdejším režimem, a proto se zpět ke své práci vrátil až v roce 1954, kdy se zaměřil na látku z německé literatury, tehdy známou pod názvem 4,5-benzo(hepto-1,2,6-oxazin)<sup>12</sup>, ze které vyvinul čtyřicet nových sloučenin. Jedna z nich byla pojmenována jako chlordiazepoxid

(Obrázek 2), první používaná aktivní substance léků na bázi benzodiazepinu, patentovaný v roce 1958 a uvedený na trh o dva roky později s obchodním názvem Librium®.



Obrázek 2. Struktura chlórdiazepoxidu.

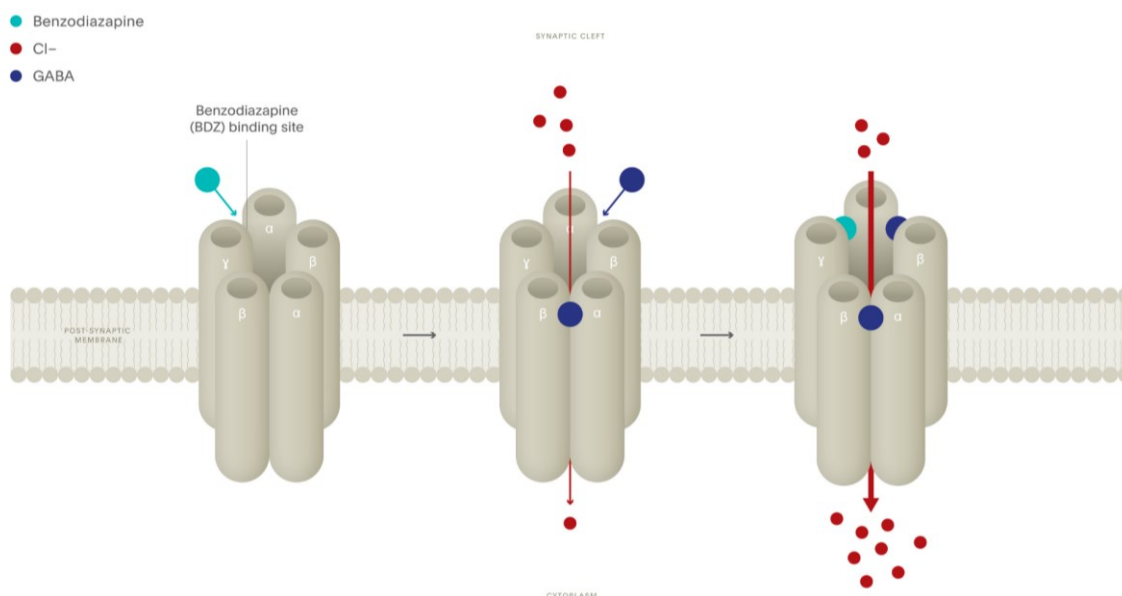
## 1.2 Farmakologie benzodiazepinů

Obecně lze říci, že farmakologie hraje při vývoji medikamentů značně významnou roli. Tento vědní obor nezkoumá pouze to, jak některé látky ovlivňují živé organismy, ale také se podílí na výzkumu nových léčivých přípravků, které mohou potenciálně vykazovat podobné terapeutické účinky.<sup>13</sup> Jednou důležitou součástí farmakologie je farmakokinetika, která se zabývá tím, jak se dané léčebné substance vstřebávají do těla a druhou je farmakodynamika, která se zaměřuje na mechanismy, jimiž tato léčiva ovlivňují různé biologické cíle (např. enzymy nebo receptory).<sup>14</sup> Globálně vzato jsou farmakologické studie nezbytné pro detailní porozumění účinkům nových potenciálních léků a jejich bezpečnému používání.

V závislosti na substituci jednotného skeletu BDZ léčiv se tyto sloučeniny ve svých farmakologických vlastnostech liší. Obvykle jsou BZD děleny do tří skupin, a to na krátkodobé, působí méně jak 12 h, střednědobě působící, jejich doba působení se pohybuje v rozmezí od 12 h do 24 h, a dlouhodobě působící, u nichž hovoříme o době působení delší jak 24 h.<sup>15</sup> Rozdílné doby účinků jsou způsobeny metabolismem, neboť některé BZD podléhají intenzivnímu metabolismu v játrech, což ovlivňuje rychlost eliminace a tím samozřejmě i dobu účinku. Není to však jediný z faktorů. Důležitou roli hraje také farmakodynamika či poločas eliminace. Krátkodobě působící jsou často předepisovány na poruchy spánku. Středně a dlouhodobě působící jsou předepisovány na poruchy spojené s úzkostmi.<sup>16</sup>

### 1.2.1 Farmakodynamika

Hlavním cílem pro centrální působení BZD je receptor kyseliny  $\gamma$ -aminomáselné ( $GABA_A$ ), který se nachází na nervovém zakončení v centrálním nervovém systému (CNS).  $GABA_A$  je primární inhibiční neurotransmitter hrající velkou roli při snižování neuronální dráždivosti či při regulaci svalového tonusu. Skládá se ze tří podjednotek, a to  $\alpha$ ,  $\beta$  a  $\gamma$ , kdy  $\alpha$ - a  $\gamma$ -podjednotky jsou vazebnými místy právě pro BZD, kde se na místo receptoru váže alostericky. Naopak  $\beta$ -podjednotky jsou vazebnými místy pro samotnou  $\gamma$ -aminomáselnou kyselinu. Ve středu receptoru se nachází kanál chloridových iontů. Benzodiazepiny interagují s podjednotkami receptoru  $GABA_A$  a zvyšují afinitu GABA k těmto receptorům, což ji usnadňuje vázání se na ně. Po aktivaci receptoru dochází k otevření kanálu pro chloridové ionty v buněčné membráně, kdy právě navázané BZD zvyšují pravděpodobnost otevření iontového kanálu. To umožňuje vstup většího množství chloridových iontů do nervové buňky. V tomto okamžiku nastává hyperpolarizace buněčné membrány (elektrický potenciál více negativní), tím se ztíží vzrušení nervových buněk, které k vytvoření nervového vzruchu vyžadují větší depolarizaci (**Obrázek 3**). Tento princip potlačení nervové aktivity je využíván při léčbě úzkosti, nespavosti, epilepsie či dalších podobných stavů.<sup>17</sup>



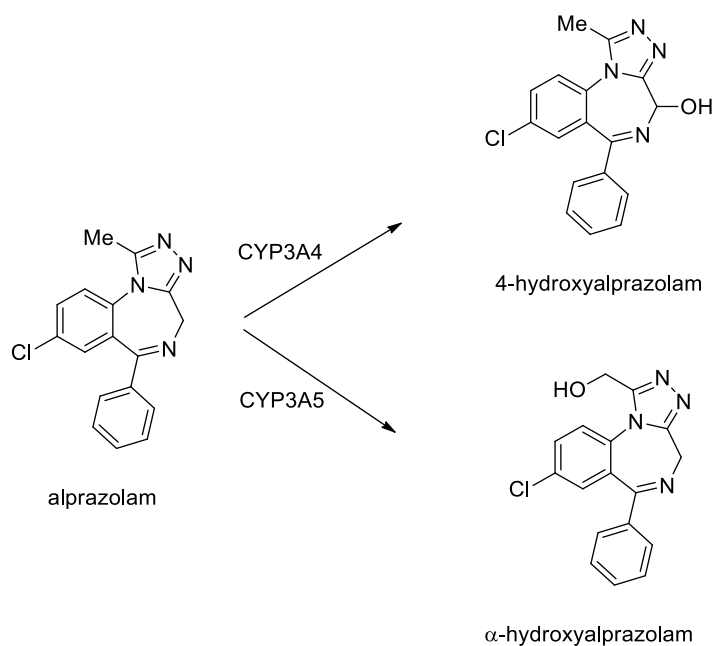
**Obrázek 3.** Grafické znázornění mechanismu účinku BZD terapeutik.<sup>18</sup>

### 1.2.2 Farmakokinetika

Jak už bylo řečeno výše, farmakodynamika, ale stejně tak i farmakokinetika je u jednotlivých derivátů BZD jiná, a proto nelze jednotně určit jejich metabolismus. Jelikož je těchto biologicky aktivních BZD známa celá řada, není možné v rámci rozsahu této práce všechny detailně rozebírat zvlášť, proto jsou níže komentovány pouze některé vybrané deriváty, které jsou dostupné na lékařský předpis v ČR a zároveň se řadí mezi nejpoužívanější na světě.

#### *Alprazolam*

Alprazolam, který je obvykle znám pod názvy Xanax, Alpravec, Niravam či Valeans, spadá do skupiny střednědobě působících BZD. Je využíván k léčbě panické poruchy nebo akutní úzkosti.<sup>19</sup> Alprazolam má srovnatelnou účinnost s Diazepamem, avšak způsobuje nižší ospalost.<sup>20</sup> Je dobře vstřebáván při perorálním podání.<sup>21</sup> Alprazolam je enzymaticky metabolizován játry na dva hydroxylované isomery. Cytochrom P450 subtypu 3A4<sup>22</sup> jej konvertuje na 4-hydroxyalprazolam, oproti tomu cytochrom subtypu 3A5 poskytuje  $\alpha$ -hydroxyalprazolam<sup>23–25</sup> (**Obrázek 4**). Přibližně 80 % celkového množství podaného Alprazolamu opouští tělo do 72 h v podobě uvedených metabolitů. Zbýlých 20 % se do 11 h od času podání vyloučí močí v nezměněné formě.<sup>20</sup> Maximální doporučená denní dávka by neměla překročit 4 mg.<sup>26</sup>

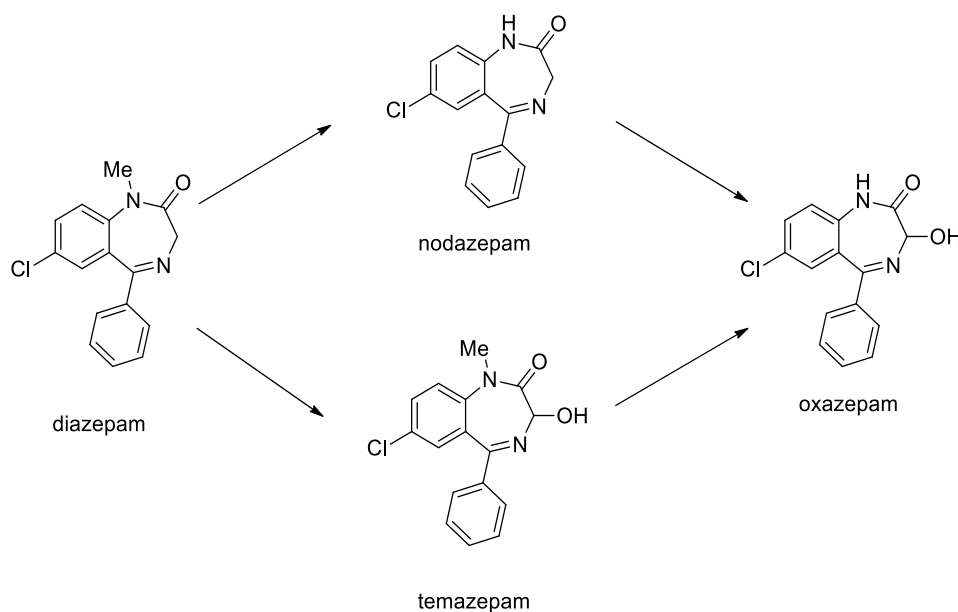


**Obrázek 4.** Metabolická dráha alprazolamu.



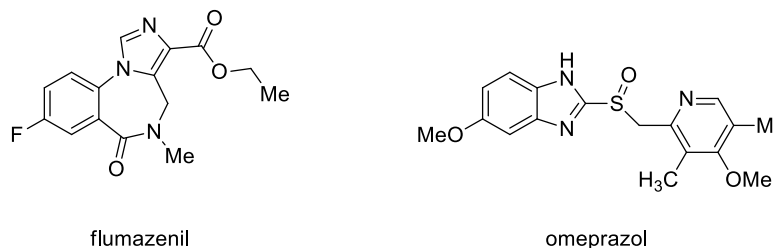


6 mg/den. Nicméně u těžších případů onemocnění je možné dávku navýšit až na 30 mg/den. Primární metabolismus diazepamů probíhá v játrech jaterními enzymy a jen velmi málo se z těla vylučuje močí.<sup>30</sup> V játrech probíhá *N*-demethylace za katalýzy cytochromu CYP2C19, díky které dochází k tvorbě aktivního metabolitu desmethyl-diazepamů známého spíše pod názvem nordazepam. Ten je dále hydroxylován cytochromem CYP3A4 na oxazepam, ze kterého následnou transformací vzniká oxazepam glukuronid. Dalším možným metabolitem vzniklým z diazepamů, vlivem katalytického účinku cytochromu CYP3A4, je temazepam, který po ztrátě methylové skupiny poskytuje opět oxazepam.<sup>31</sup> Zajímavým faktem je, že při rozboru krve, je možné nalézt pouze diazepam a desmethyl-diazepam. Je to z toho důvodu, že metabolismus oxazepamů a temazepamů probíhá tak rychle, jako je vylučován močí ven, tudíž se do krve téměř nedostane (**Obrázek 6**).<sup>32</sup>



**Obrázek 6.** Metabolismus diazepamů.

Bezpochyby značnou výhodou diazepamů je, že i jeho výše uvedené metabolity mají obdobné účinky, což je úzce spjato s delší dobou jeho působení. Proto je možné neobdobným dávkováním akumulovat tento lék nebo některé z jeho metabolitů v těle, čímž velmi snadno může dojít k předávkování, u kterého lze pozorovat zvýšenou ospalost, dysartrii či závratě, a to dokonce i týden po podání protiléku. Jako antagonisté se používají flumazenil a omeprazol (**Obrázek 7**), kteří jsou schopni inhibovat tvorbu tří metabolitů, nordazepamů, temazepamů i oxazepamů<sup>33,34</sup>



Obrázek 7. Struktura flumazenilu a omeprazolu.

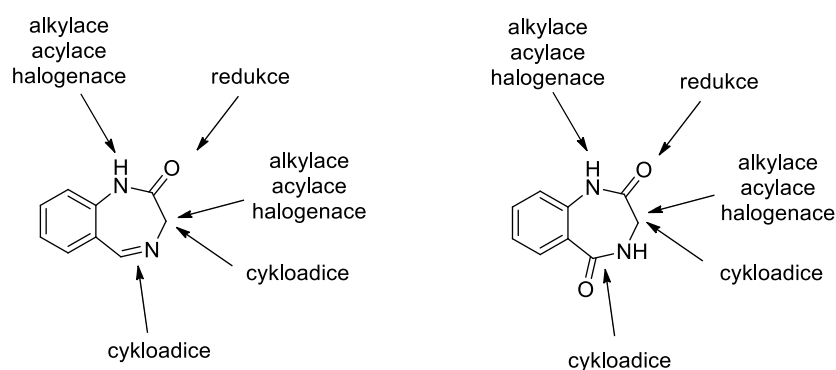
### 1.3 Syntéza a reaktivita benzodiazepinových sloučenin

Jak už bylo naznačeno na počátku této kapitoly, heterocyklus základních BZD sloučenin má několik typických míst, kde je možné je substituovat a měnit tak jejich fyzikálně-chemické vlastnosti, s čímž je úzce spjatá i jejich bioaktivita. Při srovnání závislosti bioaktivity na struktuře BDZ sloučenin je možné vypořádat několik charakteristických rysů. Za velmi důležité jsou považovány povahy substituentů v polohách 1, 3, 5 a 7.<sup>12,35,36</sup> Významnost substituentů vázaných k atomu dusíku v poloze 1 klesá v tomto pořadí OH > F > NH<sub>2</sub> > H > NHOH > C<sub>2</sub>H<sub>5</sub> > Cl > CF<sub>3</sub> > Br > CH<sub>3</sub>.<sup>37</sup> V případech, kdy byla v této pozici *tert*-butylová skupina, docházelo ke ztrátám požadovaných biologických vlastností sledovaných látek.<sup>38</sup> Zcela zřejmý vliv substituce na atomu uhlíku v poloze 3 je pouze v případech, kdy je zde vázaná hydroxylová skupina. Její přítomnost jednak zvyšuje celkovou polaritu daného BZD a jednak je při jeho metabolismu glukuronidována, čímž dochází k rychlejší eliminaci léčiva z těla<sup>39</sup>, což je samozřejmě úzce spjato s kratší dobou účinku.<sup>40</sup> Další vlivy substituce v této poloze, z důvodu možné enantiomerizace odehrávající se v těle živého organismu, jsou však celkově dost nejasné a špatně předvídatelné.<sup>41–43</sup> Další místo na BZD skeletu, které ovlivňuje jeho účinnost, je poloha 5. V případech, kdy byl k tomuhle atomu uhlíku vázaný fenylový substituent, který současně nesl atomy nebo skupiny atomů přitahující elektrony (NO<sub>2</sub> > F > CN > Cl > CF<sub>3</sub>), došlo ke významnému zvýšení jejich účinnosti.<sup>44–46</sup> Absence fenylové skupiny sice snižuje vazebnou sílu BZD na GABA, avšak k navázání na GABA receptor stále dochází.<sup>47</sup> Substituenty v poloze 7, jejichž důležitost klesá v řadě CH<sub>2</sub>CF<sub>3</sub> > I > Br > CF<sub>3</sub> > Cl > C(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub> > NO<sub>2</sub> > F > N<sub>3</sub> > CH=CH<sub>2</sub>, hrají významnou roli v afinitě BZD k receptoru.<sup>48</sup>

Z čistě chemického hlediska je možné BZD považovat za bicyklické sloučeniny skládající se z aromatického uhlovodíku, benzenu, a sedmičlenného heterocyklu, diazepinu. Pomineme-li aromatickou část molekuly derivátů na bázi 1,4-benzodiazepin-2-onu a 1,4-benzodiazepin-2,5-dionu a zaměříme-li se na modifikaci daného heterocyklu obecně,

zjistíme, že se jedná o dosti reaktivní sloučeniny podléhající celé řadě různých chemických přeměn.

Oxoskupina amidového uskupení v poloze 2 se může v přítomnosti redukčních činidel redukovat na skupinu hydroxylovou.<sup>49</sup> Nesubstituované 1,4-benzodiazepiny v přítomnosti bázi tvoří dva typy aniontů lokalizovaných na atomu dusíku v poloze 1 a na atomu uhlíku v poloze 3. Vyšší stabilita aniontu na N-1 oproti aniontu na C-3, která je pravděpodobně způsobená zapojením volného elektronového páru do konjugace s  $\pi$  elektrony připojeného aromatického kruhu, zapříčiňuje vyšší kyselost protonu vázaného k atomu dusíku v poloze 1, což se ve výsledku projeví vyšší reaktivitou.<sup>50</sup> Nicméně obě tyto polohy (na N-1 i na C-3) je možné halogenovat, alkylovat, acylovat nebo aminovat.<sup>51</sup> Dále pak, díky možnostem tvorby druhých tautomerních forem, jsou na diazepinovém kruhu známé i cykloadiční reakce (**Obrázek 8**).<sup>52,53</sup>

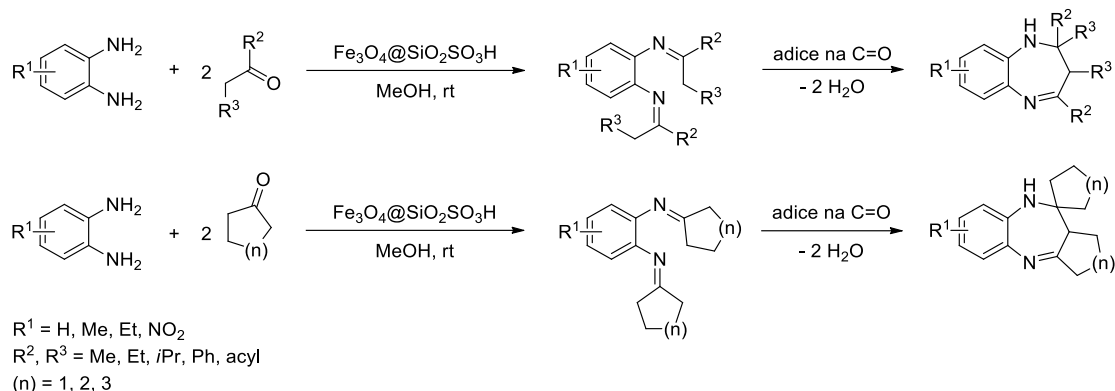


**Obrázek 8.** Reaktivita 1,4-benzodiazepin-2-onů a 1,4-benzodiazepin-2,5-dionů.

Syntetických postupů a možností, jak získat různé deriváty BDZ je mnoho, a proto budou níže popsány jen některé z nich. Při průzkumu dostupné literatury je možné poměrně záhy zjistit, že k přípravě 1,5-benzodiazepinů jsou téměř výhradně využívány deriváty benzen-1,2-diaminu.

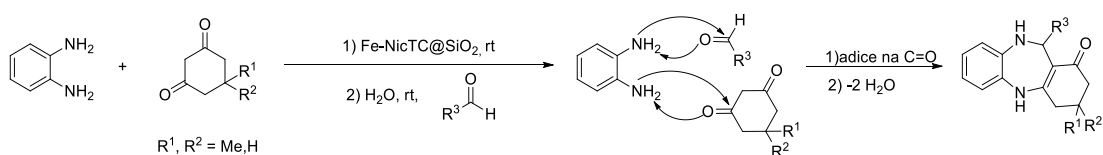
Poměrně zajímavý postup byl popsán ve studii zveřejněné v roce 2018,<sup>54</sup> kde k syntéze derivátů 1,5-benzodiazepinu využili kondenzaci substituovaného *o*-fenylendiaminu s alifatickými nebo cyklickými ketony aktivovanou supermagnetickým, kyselým nanokatalyzátorem  $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{SiO}_2\text{SO}_3\text{H}$  NPs. V podstatě se jedná o tandemovou reakci, při níž nejprve dochází k nukleofilní adici obou aminoskupin na oxoskupiny dvou stejných výchozích ketonů, které jsou následně doprovázeny dvojnásobnou dehydratací, jež má za následek tvorbu diazepinového kruhu s jednou dvojnou vazbou (**Schéma 1**).

Výhodou těchto reakcí je, že během 3–4 hodin je možné získat 1,5-benzodiazepiny s výtěžky převyšující 80 % a použitý katalyzátor s pomocí magnetu snadno odstranit z reakční směsi.



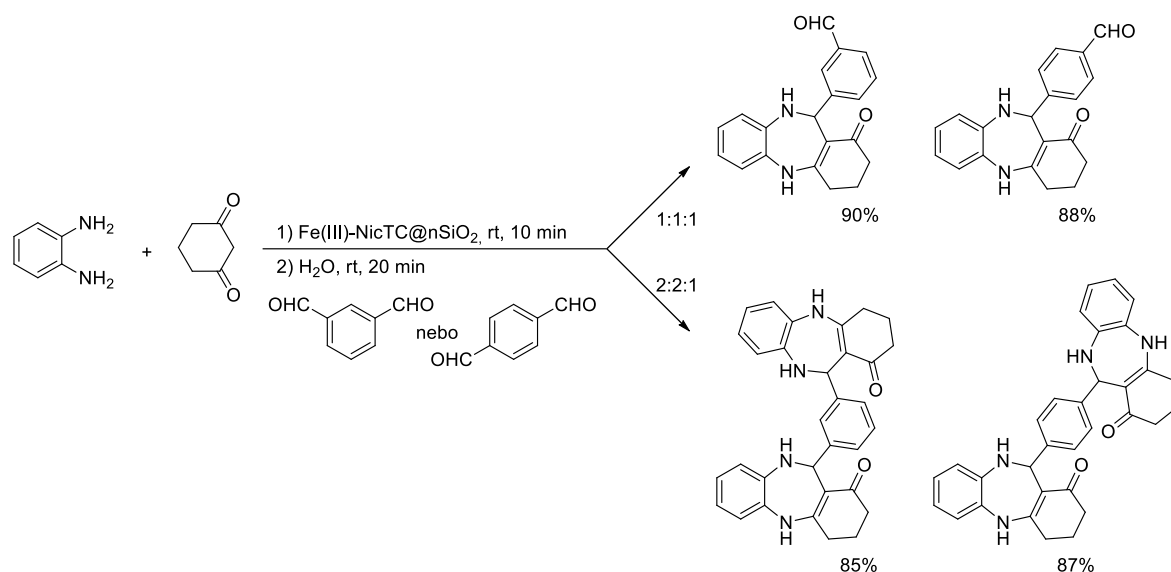
**Schéma 1.** Syntéza 1,5-benzodiazepinů s využitím kyselého nanokatalyzátoru.

O rok později vyšla další publikace na dosti podobné téma<sup>55</sup>, kde Korbekandi *et al.* studovali možnosti využití organokovového katalyzátoru na bázi nikotinu vázaného k nanočásticím oxidu křemičitého ( $\text{Fe}^{\text{III}}\text{-NicTC}@n\text{SiO}_2$ ). Během svého výzkumu, kdy nechali reagovat *o*-fenyldiamin s dimedonem nebo cyklohexa-1,3-dionem a s alifatickými, polycyklickými či aromatickými aldehydy nesoucími elektronakceptorní nebo elektrondonorní skupiny při laboratorní teplotě, zjistili, že daná metoda je obecně použitelná a během 10 min poskytuje 1,5-benzodiazepiny s velmi vysokými výtěžky pohybujícími se okolo 90 % (**Schéma 2**).



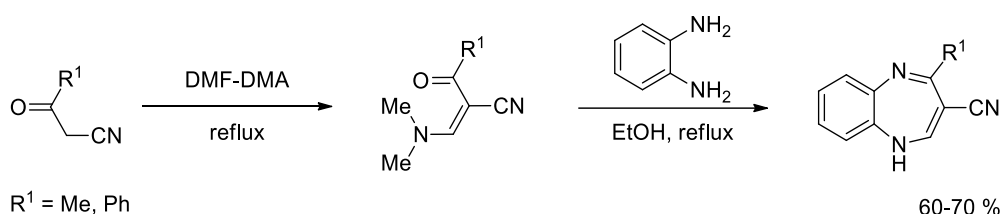
**Schéma 2.** Příprava 1,5-benzodiazepinů s využitím organokovového katalyzátoru.

Dále pak autoři v citovaném článku prokázali, že za daných podmínek je použitý katalyzátor chemoselektivní. Zjistili, že když jsou výchozí látky použity v poměru 1:1:1 (diamin:diketon:dialdehyd), byly získány pouze *mono*-1,5-benzodiazepiny a naopak, je-li do reakce dán dvoumolární přebytek *o*-fenyldiaminu a diketonu (tj. poměr 2:2:1), byly výhradně získány *bis*-1,5-benzodiazepiny (**Schéma 3**).



**Schéma 3.** Chemoselektivita Fe<sup>III</sup>-NicTC@nSiO<sub>2</sub> v přípravě 1,5-benzodiazepinů.

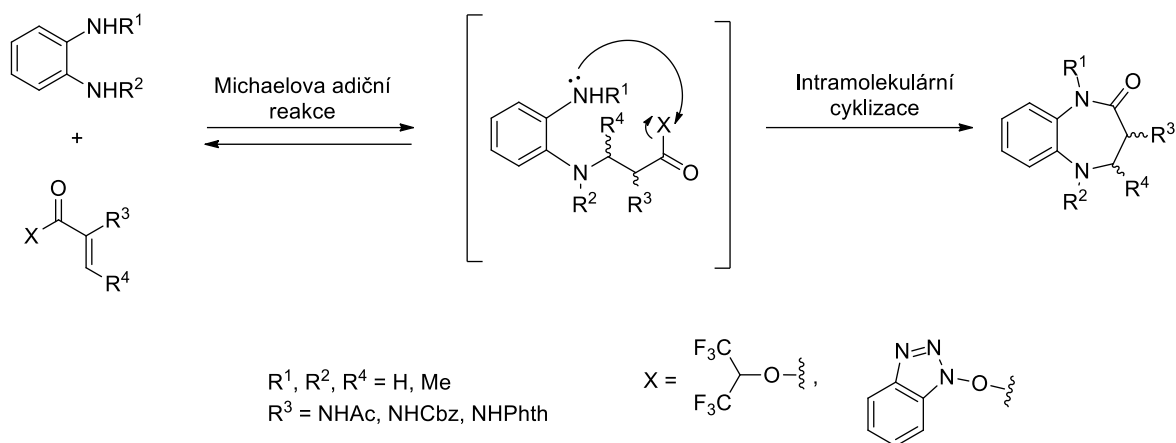
Skupina zahraničních autorů využívala při přípravě pyrimidinových derivátů 1,5-benzodiazepinu se silnými antibakteriálními účinky vůči *S. aureus* a *E. coli* jako výchozí látky nitrilové deriváty 1,5-benzodiazepinu, jejichž syntézu započali několikahodinovým varem benzoylacetonitrilu anebo pyruvonitrilu s *N,N*-dimethylformamid dimethylacetalem (DMF-DMA). Následnou cyklokondenzací izolovaných meziproductů, dimethylaminomethylenových ketonů, s *o*-fenylendiaminem ve vroucím ethanolu byly získány příslušné karbonitrilové deriváty benzodiazepinu s výtěžky pohybujícími se v rozmezí 60–70 % (Schéma 4).<sup>56</sup>



**Schéma 4.** Syntéza karbonitrilových derivátů BZD.

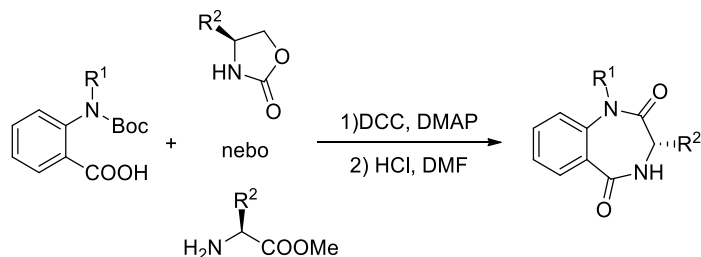
V roce 2019 představili Obara *et al.* dvě inovativní metody pro přípravu derivátů 3-amino-1,5-benzodiazepin-2-onů. V syntetickém procesu hraje klíčovou roli Michaelova adiční reakce *o*-fenylendiaminu s dehydroalaninem HFI (1,1,1,3,3,3,-hexafluorpropan-2-ylovým) nebo s HOBt 1,2,3-benzotriazol-1-olovými estery dehydroalaninu, která je následovaná spontánní intramolekulární cyklizací vzniklého meziproductu. Během optimalizačních

reakcí s těmito substráty bylo zjištěno, že experimenty s HOBt-estery je vhodné realizovat v DMF při laboratorní teplotě, kdežto s HFIP-estery je nutné vařit v toluenu (**Schéma 5**).<sup>57</sup>



**Schéma 5.** Syntéza 1,5-benzodiazepin-2-onů Michaelovou adiční reakcí s následnou intramolekulární cyklizací.

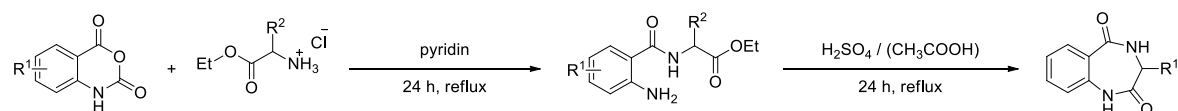
V roce 1994 Akssira *et.al* v jednom článku publikovali hned dva možné přístupy vedoucí k 1,4-benzodiazepin-2,5-dionům (**Schéma 6**).<sup>58</sup> První postup zahrnuje cyklizaci dipeptidů, připravených z anthranilové kyseliny ochráněné *tert*-butyloxykarbonylovou skupinou a methylesterů  $\alpha$ -aminokyselin v *N,N'*-dicyklohexylkarbodiimidu (DCC) a 4-dimethylaminopyridinu (DMAP). Druhý postup spočívá v reakci *N*-anhydridů karboxy a  $\alpha$ -aminokyselin, taktéž s ochráněnou kyselinou anthranilovou v roztoku dimethylformamidu (DMF) s kyselinou chlorovodíkovou. Oba přístupy vedly k vysokým výtěžkům pohybující se přes 60 %.



**Schéma 6.** Syntéza 1,4-benzodiazepin-2,5-dionů z derivátů anthranilové kyseliny.

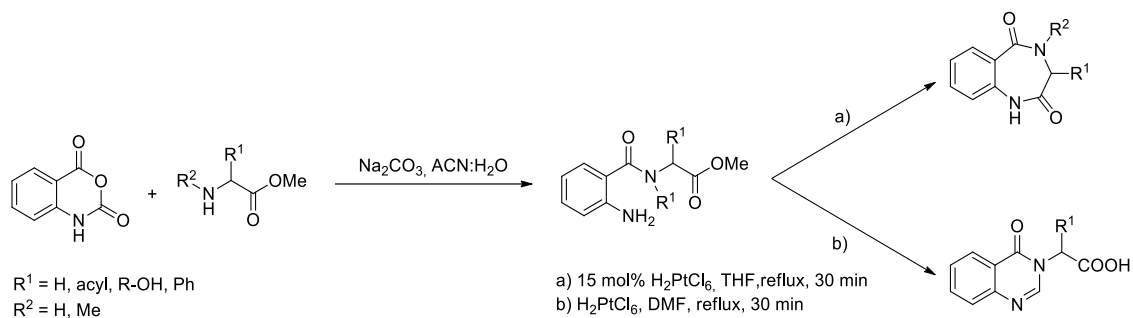
Často uváděný způsob pro syntézu derivátů 1,4-benzodiazepin-2,5-dionů vychází z anhydridu kyseliny isatoové. Přístup znázorněný na **Schématu 7** využívá nejprve přípravy meziprojektu s otevřeným řetězcem, který byl získán reakcí hydrochloridu glycinesteru s anhydridem kyseliny isatoové v přítomnosti pyridinu nebo triethylaminu. Z těchto dvou

sledovaných bází se více osvědčil pyridin, s jehož účinkem byly získány vyšší výtěžky očekávaného meziprojektu. Ten byl následně zahříván s kyselinou octovou nebo s kyselinou sírovou, jejichž vlivem došlo k cyklizaci postranního řetězce. Výtěžky 1,4-benzodiazepin-2,5-dionů se pohybovaly okolo 40 až 70 %.<sup>59</sup>



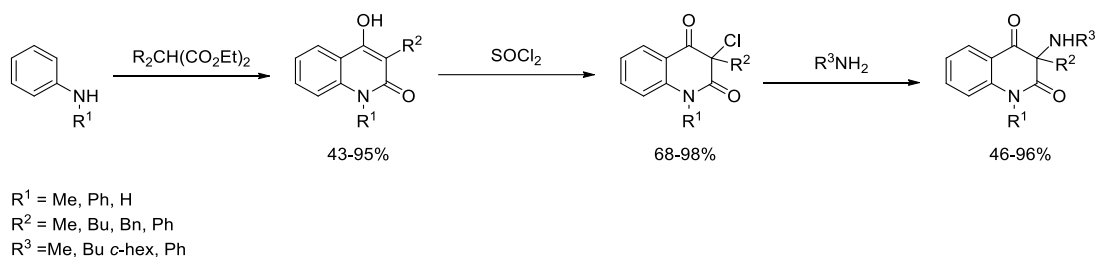
**Schéma 7.** Syntéza 1,4-benzodiazepin-2,5-dionů vycházející z isatoového anhydridu.

V nedávné době byla publikována studie,<sup>60</sup> ve které skupina zahraničních autorů, pomineme-li samotnou přípravu meziprojektu vycházející taktéž z anhydridu kyseliny isatoové a methylesteru  $\alpha$ -aminokyseliny, modifikovala podmínky cyklizace postranního řetězce, díky kterým se jim podařilo získat 3,4-disubstituované 1,4-benzodiazepin-2,5-diony s vyššími výtěžky, jež se pohybovaly se okolo 80 %. Zásadní změna se týkala použití jiného katalyzátoru, kterým byla kyselina hexachloroplatičitá. Efektivita této kyseliny byla několika screeningovými experimenty pozorována v závislosti na poměru jejího látkového množství vůči substrátu a na typu použitého rozpouštědla, od kterého se mimo jiné odvíjí i reakční teplota. V případě, kdy bylo použito 5 %<sub>mol</sub> katalyzátoru ( $H_2PtCl_6$ ) se prokázalo, že THF, oproti methanolu, acetonitrilu, toluenu nebo diethyletheru, je v závislosti na výtěžku a reakční době nejlepší volba. Za těchto podmínek, to je 30 minutový var reakční směsi, byl získán sledovaný derivát BZD se 70% výtěžkem. Zvýšením koncentrace katalyzátoru z 5 %<sub>mol</sub> na 15 %<sub>mol</sub> vzrostl výtěžek až na 86 %. Další navyšování množství katalyzátoru již nemělo na výtěžek očekávaného produktu ani na zkrácení reakční doby žádný vliv. Dále také zjistili, že při této cyklizaci pravděpodobně hraje významnou roli i teplota reakční směsi. Jestliže použili rozpouštědlo s výrazně vyšší teplotou varu, konkrétně DMF, byly, taktéž ve vysokých výtěžcích pohybujících se blízko 80 %, místo očekávaných 1,4-benzodiazepin-2,5-onů izolovány chinazolinony.



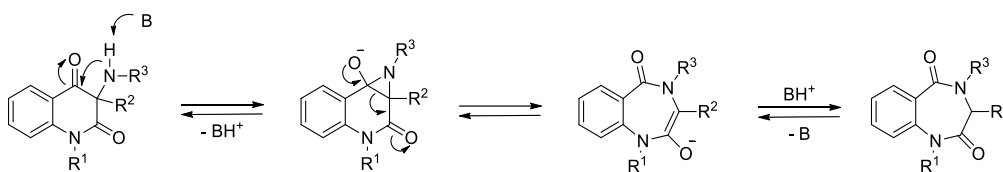
**Schéma 8.** Intramolekulární cyklizace methyl-2-(2-aminobenzamido)acetátu.

V neposlední řadě je třeba zmínit i metodu přípravy benzodiazepindionů z 3-aminochinolin-2,4-dionů. Tyto výchozí látky lze poměrně hladce a s vysokými výtěžky získat třístupňovou reakcí vycházející z derivátů anilinu a diesterů malonových kyselin (**Schéma 9**).<sup>61–63</sup>



**Schéma 9.** Syntéza 3-aminochinolin-2,4-dionů.

Přeměna 3-aminochinolidionů na benzodiazepindionové deriváty je vyvolána účinkem středně silných až silných bází, díky kterým dochází k intramolekulární adici dusíku aminové skupiny a uhlík oxoskupiny v poloze 4. Tím pravděpodobně dojde k vytvoření aziridinového kruhu, který se následně důsledkem štěpení vazby uhlík-uhlík rozpadá, čím nastává expanze původně šestičlenného kruhu na sedmičlenný (**Schéma 10**). V literatuře jsou známé i reakce opačné. Tím jsou myšleny kontrakce sedmičlenného kruhu benzodiazepinu na šestičlenný kruhu chinolidionu. Tyto reakce se provádějí účinkem bis(trimethylsilyl)amidu lithného (LiHMDS) nebo bis(trimethylsilyl)amidu draselného (KHMDS) při teplotách hluboce pod nulou, často při  $-78\text{ }^\circ\text{C}$ .<sup>64,65</sup>



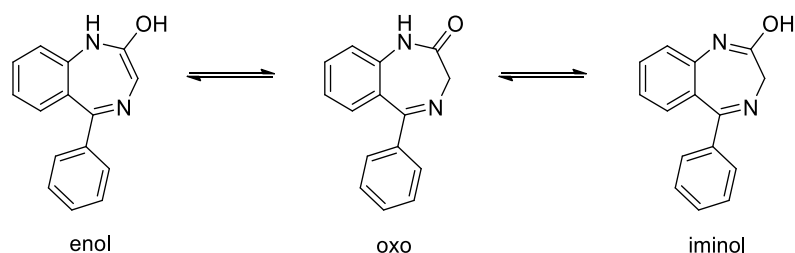
**Schéma 10.** Intamolekulární reakce 3-aminochinolidionu.



### 1.3.1 Stabilita 1,4-benzodiazepinů a 1,4-benzodiazepin-2,5-dionů

I přes skutečnost, že jsou sloučeniny na bázi 1,4-benzodiazepin-2-onů a 1,4-benzodiazepin-2,5-dionů jedny z nejučinnějších biologicky aktivních derivátů všech známých BZD, a tudíž je jim vědeckými pracovníky z oblastí organické syntézy a farmacie věnována značná pozornost, doposud stále nejsou, a to převážně z výše popsaných důvodů, plně odhaleny mechanismy jejich farmaceutické aktivity a způsob, jakým přesně působí na buněčné receptory. Proto, při posuzování biologické aktivity látek tohoto typu, je nezbytné, mít konkrétní představu nejen o chemickém složení, ale i o stabilitě konformace testované sloučeniny a o rozložení elektronové hustoty v molekule.<sup>66,67</sup>

Sloučeniny s motivem 1,4-benzodiazepin-2-onů mohou v závislosti na prostředí v němž se vyskytují, podléhat oxo, enol či iminol tautomerii (**Obrázek 9**). Obecně vzato jsou izomery iminolového a enolového typu méně stabilní než jejich odpovídající oxoforma. Po provedení výpočtových studií bylo prokázáno, že pokud je na uhlík v pozici 5 zaveden aromatický substituent, je mezi enol/iminol formou a oxo formou menší změna v relativních energiích. Pokud je v tomto místě navázán acylový substituent, je zvýhodněn enolový tautomer oproti oxo či iminolovému tautomeru.<sup>68</sup> V případech, kdy se na uhlíku v poloze 3 nachází stereogenní centrum, může vlivem tautomerie docházet k racemizaci sloučeniny.<sup>69</sup>



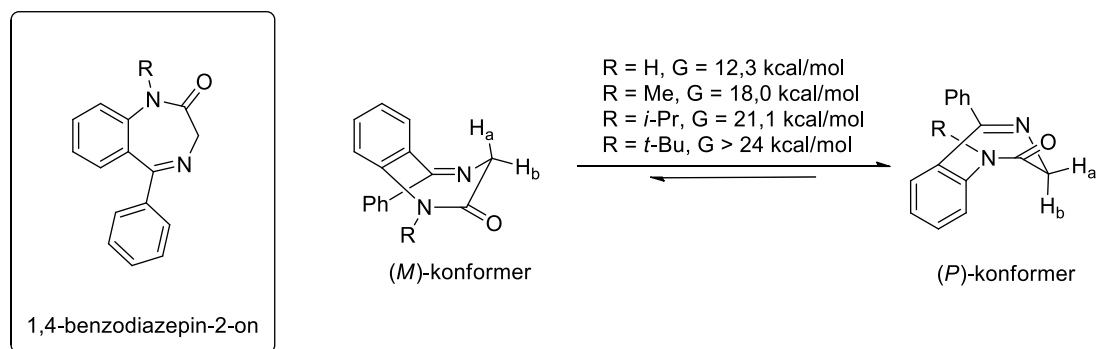
**Obrázek 9.** Tautomerní rovnováhy 1,4-benzodiazepin-2-onů.<sup>68</sup>

Obecně lze říct, že množství konformerů a schopnost molekuly existovat v jedné či druhé formě, respektive rychlost přeměny jednoho konformačního isomeru v druhý, značně závisí na druhu atomů a jejich počtu, na typu vazeb, jež je spojují, na ne vazebných intra/intermolekulárních interakcích a v neposlední řadě také na podmínkách prostředí jimž jsou vystaveny.

Jelikož jsou BZD sloučeniny z části tvořeny benzenovým kruhem, který je jakožto aromatická sloučenina prakticky výhradně planární, tak z pohledu konformace je zajímavý

pouze diazepinový cyklus. Oba dva atomy dusíku zabudované do tohoto sedmičlenného kruhu vytvářejí v těchto sloučeninách silné intramolekulární vodíkové vazby a elektrostatické interakce, které mají zásadní vliv na rovnováhu konformačních isomerů.<sup>70</sup> Z těchto faktů jasně plyne, že stabilita daného konformeru může být ovlivněna substitucí jak na diazepinovém, tak i na benzenovém kruhu základního BZD. Určení správné konformace je dosti komplikované a často je k tomuto účelu nutné využít znalostí teoretických výpočetních chemiků a odborníků ovládajících komplexní strukturně-analytické metody, jako jsou rentgenová difrakční analýza monokrystalu či multidimenzionální nukleární magnetická rezonance.

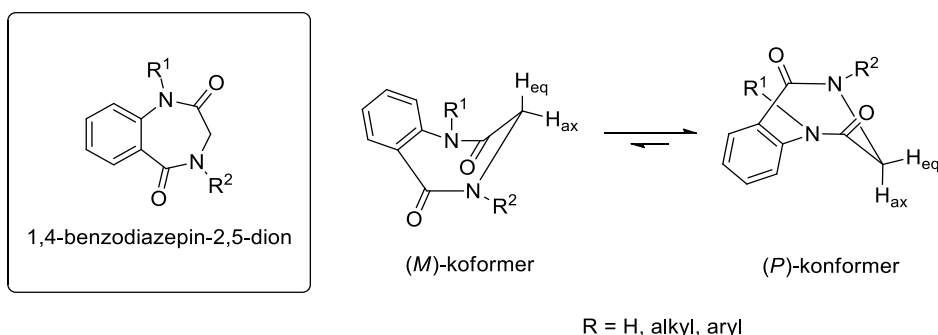
V jedné zahraniční publikaci se autoři zabývali hodnocením prioritních konformací 1,4-benzodiazepin-2-onů a na základě výpočtů Gibbsovy energie zjistili, že interkonverzní bariéra mezi konformery *M* a *P* závisí na velikosti substituentu na atomu dusíku v poloze 1.<sup>71</sup> Se zvyšujícím se objemem substituentů vázaných k této poloze rostou hodnoty Gibbsovy energie (**Obrázek 10**).<sup>72</sup> U sloučenin, kde jejich Gibbsova energie přesahuje hodnotu 20 kcal/mol je možné je separovat pomocí sloupcové chromatografie.<sup>73</sup> Objemnější substituenty poutané k atomu uhlíku v poloze 3 upřednostňují ekvatoriální polohu, čili tento (3*S*)-analog preferuje (*M*)-konformaci, oproti menším substituentům, u kterých je preferovaný (*P*)-konformer.



**Obrázek 10.** Konformery *M* a *P* u 1,4-benzodiazepin-2-onů.

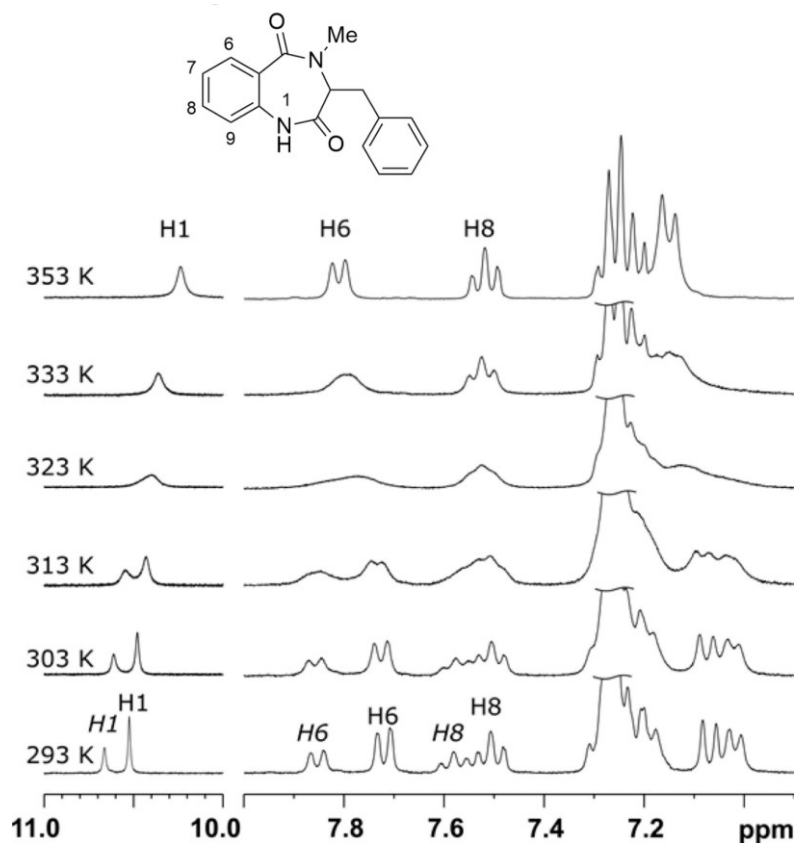
Naopak 1,4-benzodiazepin-2,5-diony preferují konformaci lodičkovou s pseudoaxiálními a pseudoekvatoriálními substituenty na uhlíku v poloze 3 (**Obrázek 11**). Teoretické výpočty podporují experimentální výsledky získané NMR analýzou, díky kterým bylo zjištěno, že energetický rozdíl mezi dvěma pseudoaxiálními a pseudoekvatoriálními konformery je zanedbatelný a zároveň přítomnost substituentů na uhlíku v pozici 3 a 4 má minimální vliv na energetickou bariéru.<sup>74</sup> Stejně jako 1,4-benzodiazepin-2-ony je interkonverzní

energetická bariéra mezi konformačními izomery závislá na velikosti substituentu na dusíku v poloze 1.<sup>75</sup>



**Obrázek 11.** Konformery *M* a *P* u 1,4-benzodiazepin-2,5-dionů.

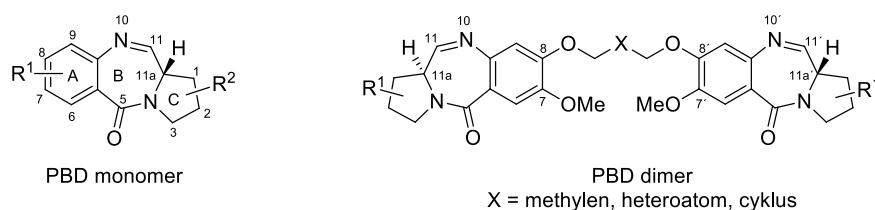
Jak již bylo psáno výše, za určitých podmínek je možné jednotlivé formy konformerů pozorovat, respektive charakterizovat i pomocí NMR. Jako příklad jsou na **Obrázku 12** uvedena <sup>1</sup>H NMR spektra 3-benzyl-4-methylbenzo[*e*][1,4]diazepin-2,5-dionu měřená při různých teplotách, na kterých je možné vidět, že energetická bariéra mezi dvěma atropoizomery daného derivátu je překročena až při teplotě nad 50 °C.<sup>76</sup>



**Obrázek 12.** Vliv teploty na energetickou bariéru mezi *M* a *P* konformery u 1,4-benzodiazepin-2,5-dionu.<sup>76</sup>

## 2 PYRROLOBENZODIAZEPINY

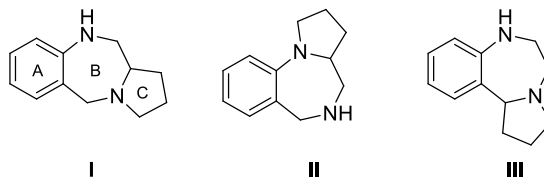
Pyrralobenzodiazepiny (PBD) jsou významné heterocyklické sloučeniny, jež ve své molekule obsahují benzodiazepinový kruh s přikondenzovaným pyrrolidinovým kruhem. Řadíme je také mezi mikrobiální sekundární metabolity se zajímavou biologickou aktivitou proti nádorovým buňkám, což je motivací pro vytvoření nových derivátů.<sup>77</sup> Velkou rodinu PBD lze rozdělit na dvě skupiny, a to na monomerní a na dimerní PBD (**Obrázek 13**). Monomerní PBD byly původně objeveny v kulturách *Streptomyces*, později však byly izolovány i z druhu *Micrococcus*.<sup>78</sup> PBD jsou sekvenčně selektivní vazebná činidla pro DNA.<sup>79,80</sup> Jejich interakce s DNA je způsobena tvarem třírozměrné struktury, který takřka dokonale zapadá do drážky dsDNA. A nejen to. PBD jsou schopny díky své elektrofilní iminové části v poloze 10 tvořit vazbu s guaninovou bází.<sup>81</sup> V důsledku jejich schopnosti specificky rozpoznávat a také se pevně vázat na konkrétní sekvenci DNA, fungují jako silné inhibitory syntézy nukleových kyselin.<sup>82,83</sup> Naopak dimery se přirozeně nevyskytují a jsou oproti monomerním PBD navrženy tak, aby pokryly daleko větší délku DNA, čímž mají zvýšenou sekvenční selektivitu a tvoří příčné vazby DNA.<sup>84</sup> Kromě toho, některé deriváty dimerů PBD projevily výraznou aktivitu proti MRSA bakteriím, což vzbudilo zájem v oblasti antimikrobiálních látek.<sup>85</sup> Nejnovější studie naznačují, že PBD by mohly působit jako neurologické modulátory. Mohly by tedy umožňovat léčbu neurogenerativních onemocnění jako je třeba Alzheimerova choroba.



**Obrázek 13.** Monomer a dimer PBD.

## 2.1 Strukturní izomery PBD

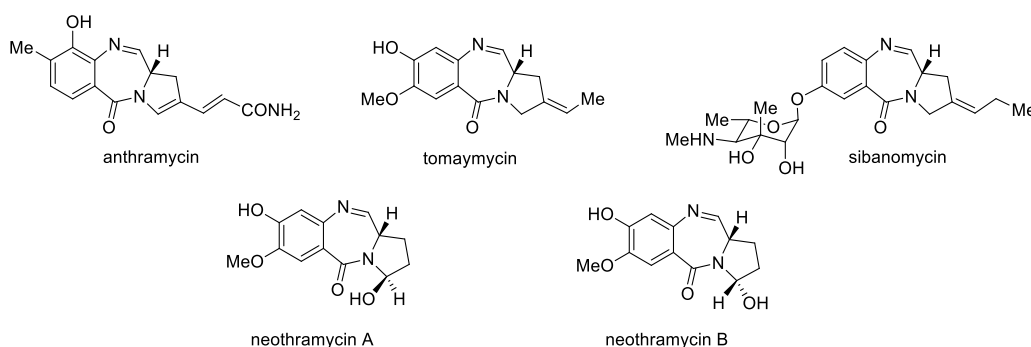
PBD má tři strukturní izomery a to tedy pyrrolo[2,1-*c*][1,4]benzodiazepiny **I**, pyrrolo[1,2-*a*][1,4]benzodiazepiny **II** a pyrrolo[1,2-*d*][1,4]benzodiazepiny **III** (Obrázek 14).<sup>86</sup>



Obrázek 14. Struktura izomerů monomerních pyrrolobenzodiazepinů.

### 2.1.1 Pyrrolo[2,1-*c*][1,4]benzodiazepiny

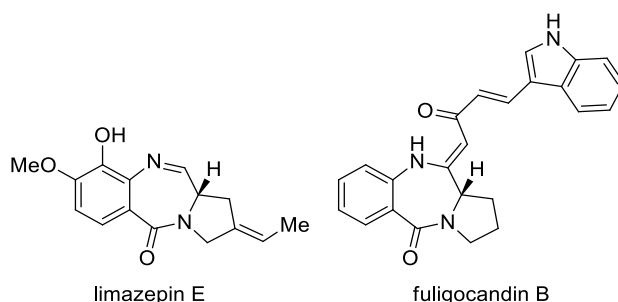
Do skupiny těchto izomerů patří přirozeně se vyskytující PBD v podobě anthramycinových antibiotik, kdy nejznámějším z nich je právě anthramycin,<sup>87</sup> který byl izolovaný v roce 1965 z bakterie *Streptomyces refuineus*.<sup>88</sup> Doposud bylo z bakterií rodů *Micrococcus* a *Streptomyces* izolováno celkem 18 přírodních látek na bázi PBD, z nichž 16 vykazuje mírnou antimikrobiální aktivitu. Mezi nejznámější z této řady patří tomaymycin, sibiromycin či neothramycin A i B (Obrázek 15). Zbylé dva nevykazují biologickou aktivitu vůbec žádnou.<sup>89</sup>



Obrázek 15. Vybrané přírodní látky izolované z bakterií rodu *Streptomyces*.

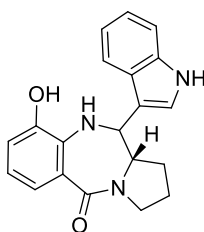
Jako neslibnější PBD se jevil právě prvně objevený anthramycin, který vykazoval účinnost proti rakovině gastrointestinálního traktu a prsu, lymfomům či sarkomům. I přes nízkou hematologickou toxicitu je jeho klinické využití omezeno kvůli kardiotoxicitě, která je hlavní překážkou při dávkování léku.<sup>88</sup> Látky na bázi PBD byly izolovány i z jiných

druhů mikroorganismů jako třeba limazepin E získaný z *Micrococcus sp.* kmenu ICBB 8177<sup>90</sup> či fuligocandin B získaný z *Fuligo candida* (**Obrázek 16**).<sup>91</sup>



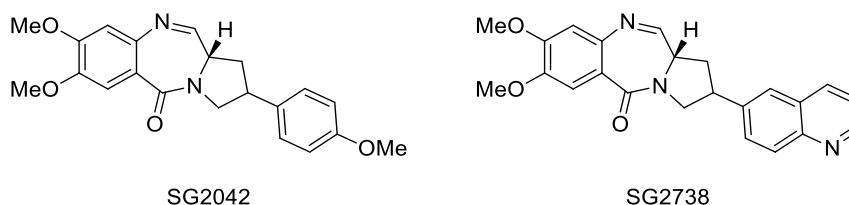
**Obrázek 16.** Struktura limazepinu E a fuligocandinu B.

Mezi další zástupce PBD vyskytující se v přírodě řadíme i toxický tilivallin (**Obrázek 17**), který je produkován lidskou mikrobiální bakterií *Klebsiella oxycata*. Tilivallin byl široce zkoumán kvůli jeho roli v patogenezi kolitidy.<sup>92</sup>



**Obrázek 17.** Tilivalin.

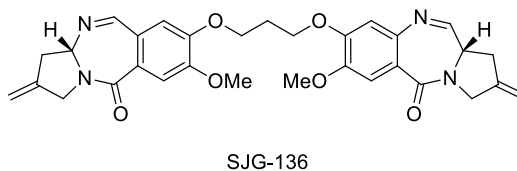
Nízká biologická aktivita přírodních PBD vyvolala mezi odborníky velkou touhu syntetizovat jejich deriváty s vyšší biologickou aktivitou. Mezi nejzajímavější z těchto sloučenin rozhodně patří SG2042 a SG2738 (**Obrázek 18**), které byly vyvinuty pro testování *in vivo* proti široké škále lidských nádorů, kdy na konci linie nebylo pozorováno žádné poškození DNA.<sup>93,94</sup>



**Obrázek 18.** Struktura uměle připravených PBD SG2042 a SG2738.

Průlomový okamžik v této skupině látek byl objev dimerů PBD (**Obrázek 19**), které byly navrženy tak, aby vytvářely příčné vazby v DNA pomocí kovalentních vazeb s guaninovými

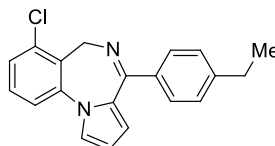
bázemi na obou koncích molekuly. Vrcholem výzkumu byla syntéza PBD dimeru známého jako SJG-136, který je v současné době v druhé fázi klinických zkoušek.<sup>95</sup>



**Obrázek 19.** Struktura dimeru PBD SJG-136.

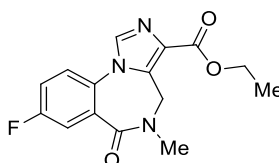
### 2.1.2 Pyrrolo[1,2-*a*][1,4]benzodiazepiny

Izomerů tohoto druhu je oproti předchozím známo daleko méně. To však neznamená, že by vykazovaly o biologickou aktivitu. Ba naopak. Bylo u nich prokázáno, že některé deriváty mají protizánětlivé<sup>96</sup>, analgetické<sup>97</sup>, či fungicidní<sup>98</sup> účinky (**Obrázek 20**). Dále byly u jejich derivátů popsány také protinádorové vlastnosti účinkující proti různým typům leukemických buněčných linií<sup>99</sup>, nebo aktivita ovlivňující centrální nervový systém.<sup>100</sup>



**Obrázek 20.** Derivát pyrrolo[1,2-*a*][1,4]benzodiazepinu vykazující fungicidní účinek.<sup>95</sup>

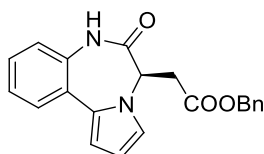
Jeden z této skupiny byl již dokonce uveden na trh jako neurologický lék pod názvem Flumazenil (**Obrázek 21**).<sup>101</sup> Ten je využíván jako antagonistu receptoru používaný při předávkování benzodiazepiny či jinými nebenzodiazepinovými hypnotiky.<sup>102</sup>



**Obrázek 21.** Struktura flumazenilu.

### 2.1.3 Pyrrolo[1,2-*d*][1,4]benzodiazepiny

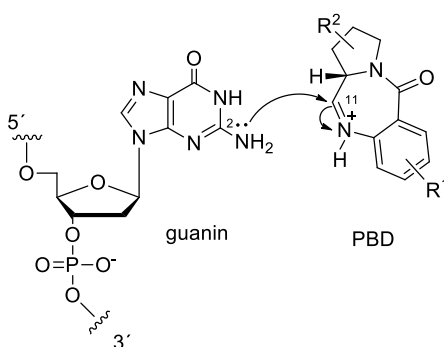
Pro úplnost je zde doplněna i tato skupina látek, kterých je, oproti předchozím uvedeným, nejméně početná množina. Z této kategorie stojí za zmínku pouze jedna sloučenina (**Obrázek 22**), která je nenukleosidovým inhibítor reverzní transkriptázy HIV-1. Její IC<sub>90</sub> je 0,29 μg/ml.<sup>103</sup>



**Obrázek 22.** Derivát pyrrolo[1,2-*d*][1,4]benzodiazepinu inhibující HIV-1 transkriptázu.

## 2.2 Mechanismus působení

Jak již bylo výše naznačeno, PBD jsou sloučeniny, které jsou schopny vytvořit kovalentní vazbu mezi atomem uhlíku C-11 iminového uskupení diazepinového kruhu s aminoskupinou guaninu nacházející se v malém žlábků DNA (**Obrázek 23**). Molekuly PBD mají pravotočivou helikální chiralitu způsobenou stereogenním centrem v poloze 11, díky které dokonale zapadá do vedlejší drážky DNA.<sup>104</sup> Afinita k DNA se zvyšuje také díky tvorbě vodíkových můstků, elektrostatických či van der Waalsových interakcí.<sup>105</sup> Dále také bylo zjištěno, že celý mechanismus preferuje sekvence purin-guanin-purin.<sup>106–108</sup>

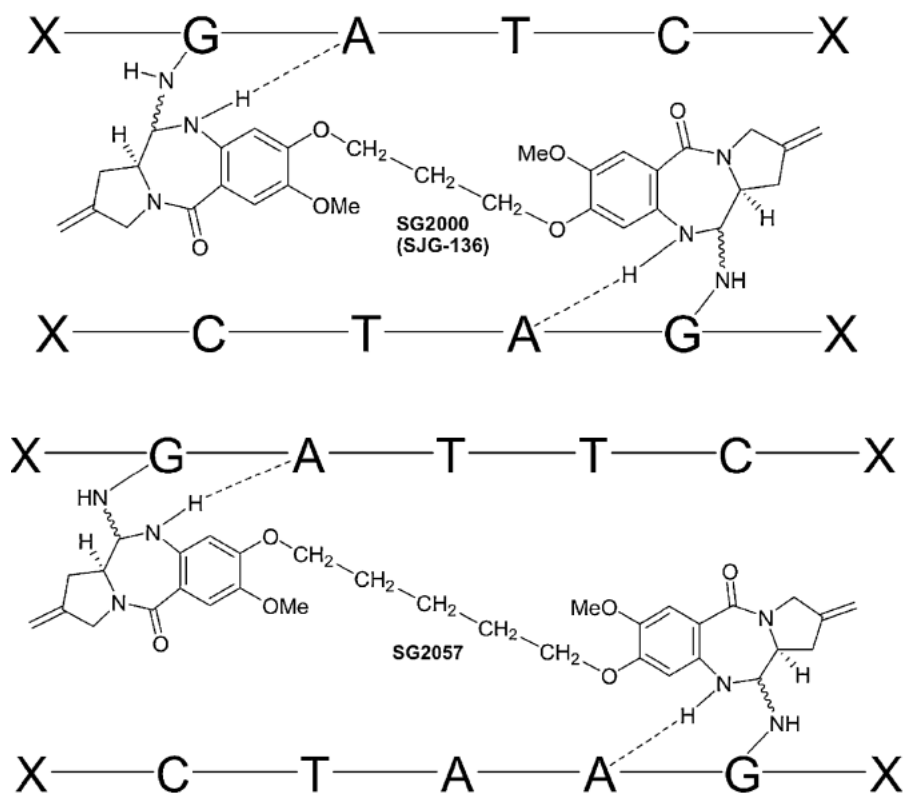


**Obrázek 23.** Interakce monomerního PBD s guaninem.

Bližším výzkumem chování anthramycinu a tomaymycinu bylo zjištěno, že jejich preferující pořadí bází je následující 5'-Pu-G-Pu > Pu-G-Py > Py-G-Pu > Py-G-Py-3'. Toto pořadí souvisí s malým zkroucením šroubovice v místech, kde jsou sekvence tvořené dvěma purinovými bázemi.<sup>80</sup> Biochemické experimenty prokázaly, že PBD mohou



inhibovat vazbu transkripčního faktoru a také, že mohou selektivně blokovat transkripci v kódujících oblastech genů.<sup>107,109</sup> Molekuly PBD při připojení na molekulu DNA vykazují protinádorové vlastnosti a po vytvoření kovalentní vazby mezi guaninem a PBD dochází k apoptóze nádorové buňky. Tu lze podpořit použitím dimeru molekuly PBD, který má schopnost udržet sekundární strukturu DNA (**Obrázek 24**). Adukt PBD-DNA by tak mohl být pro nádorové buňky náročným na opravu na rozdíl od buněk zdravých.<sup>110</sup>

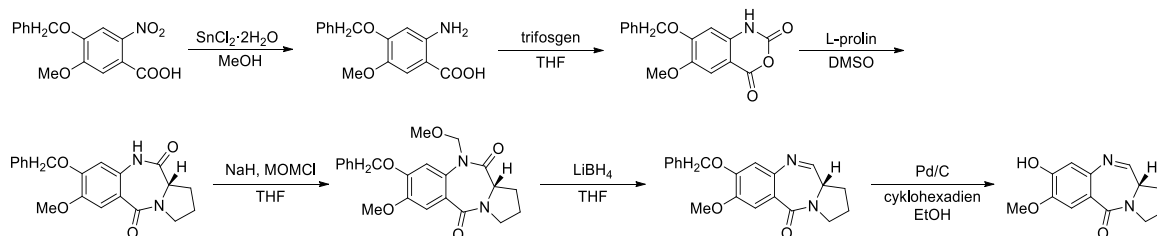


**Obrázek 24.** Znázornění meziřetězcového zesíťování dimeru PBD SG2000 a SG2057 s DNA, kdy X je purinová nebo pyrimidinová báze.<sup>111</sup>

### 2.3 Syntéza pyrrolobenzodiazepinových sloučenin

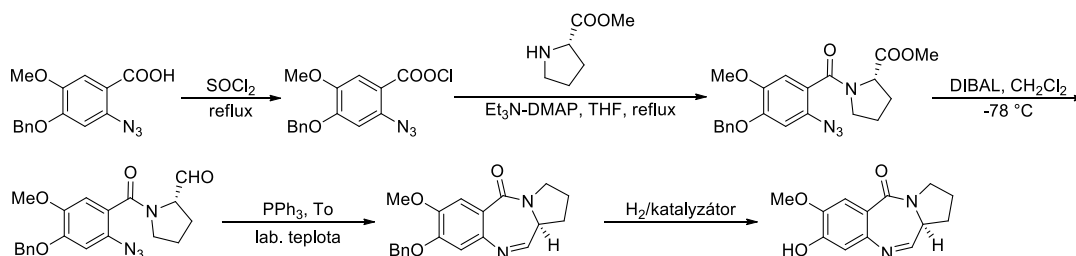
Dle přechozích odstavců lze usoudit, že zájem o syntézu sloučenin na bázi PBD je zcela nepochybně vyvolán díky jejich zajímavým účinkům na živé organismy. Běžný přístup k formování pětičlenného kruhu využívá derivátů L-prolinu. Této aminokyselině bylo využito při syntéze DC-81, což je známé protinádorové antibiotikum produkované *Streptomycety*.<sup>112</sup> Pro získání této látky můžeme postupovat hned několika strategiemi. První z nich vychází z kyseliny 2-nitrobenzoové, které je chloridem cínatým převedena na její amino derivát. Vzniklý amin poté reagoval s trifosgenem v THF pod zpětným chladičem za vzniku anhydridu kyseliny isatové. Ta byla následně spojena s L-prolinem

při teplotě 120 °C v DMF, čímž vznikl dilaktam. Amid byl poté ochráněn MOMCl (methyl-oxymethylchlorid) a následně ochráněn se současnou redukcí oxo skupiny borohydridem lithným. Posledním krokem byla již samotná redukce benzylové skupiny palladiovým katalyzátorem na uhlíku na již finální produkt DC-81 (**Schéma 11**).<sup>113</sup>



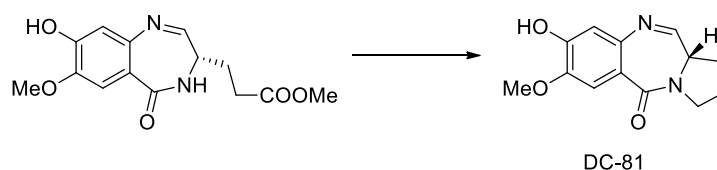
**Schéma 11.** Syntéza DC-81 z kyseliny 2-nitrobenzoové.

Druhá strategie je dosti odlišná, neboť vychází z azidokarboxylové kyseliny, která je thionylchloridem přeměněna na její chlorid. Ten následně reagoval pod zpětným chladičem s methylesterem L-prolinu s triethylaminem, 4-dimethylamminopyridinem (DMAP) v THF. Redukce získané látky diisobutylaluminiumhydridem (DIBAL) poskytla aldehyd. Ten byl míchán s trifenylfosfinem v toluenu za laboratorní teploty za zisku DC-81. (**Schéma 12**).<sup>114</sup>



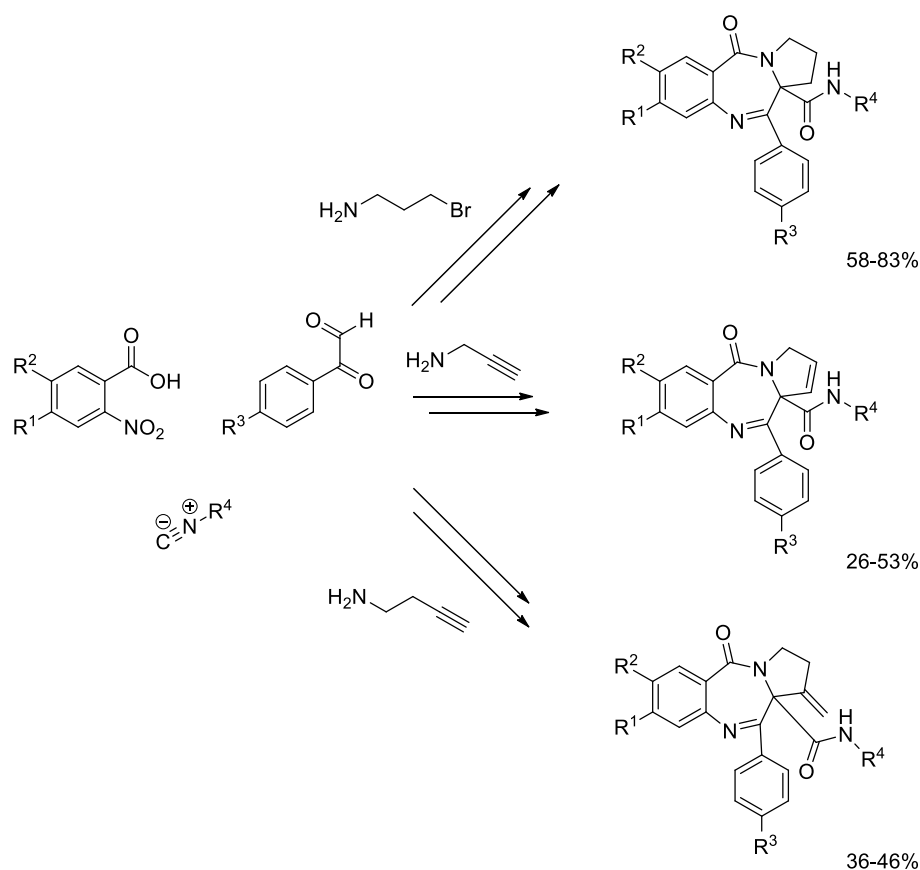
**Schéma 12.** Syntéza DC-81 z derivátu kyseliny azidokarboxylové.

Pro přípravu PBD může být využívána i kyselina L-glutamová. V syntéze, jež je prezentována v citované literatuře,<sup>115</sup> byl pyrrolový kruh vytvořen až v posledním kroku, který poskytoval výsledný PBD s výtěžkem nepřekračujícím 10 % (**Schéma 13**). Po prozkoumání literárních zdrojů bylo zjištěno, že pouze u velmi málo známých metod je pyrrolový kruh PBD sloučenin syntetizován z postranních alifatických řetězců. Většina strategií využívá prekurzory, který tento heterocyklus již obsahují.



**Schéma 13.** Syntéza DC-81 z kyseliny L-glutamové.

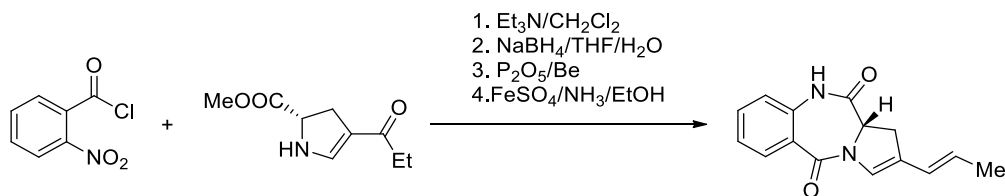
Nová studie<sup>116</sup> uvádí syntézu tří nových skupin pyrrolo[2,1-*c*][1,4]benzodiazepin-5-onů získaných třístupňovým procesem, který zahrnuje Ugiho reakci, syntézu pyrrolového jádra a redukci s následnou cyklizací na odpovídající deriváty PBD (**Schéma 14**). Dle použitého aminu, lze Ugiho syntézou získat různé stupně nenasycení pyrrolového kruhu. To může výrazně ovlivnit jejich biologickou aktivitu, konkrétně afinitu vytvořených PBD k DNA. Tato syntetická metoda sebou nese pozitiva v podobě použití levných a komerčně dostupných výchozích materiálů.



**Schéma 14.** Syntéza tří nových rodin pyrrolo[2,1-*c*][1,4]benzodiazepin-5-onů.

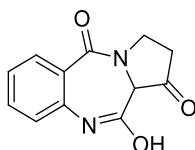
Krátkým, ale efektivním syntetickým postupem byly získány enantiomerně čisté laktamy PBD. Postup umožňuje v jediném syntetickém kroku zavést nenasycenost

mezi uhlíky v poloze 2 a 3 a dále také vytvořit stereogenní centrum se zamýšlenou konfigurací. Sublimačním procesem, zahrnující mimo jiné i vlastní disproporcionaci, byl získán 2,3-dihydropyrrolový derivát (**Schéma 15**).<sup>117</sup>



**Schéma 15.** Syntéza enantiomerně čistého PDB.

Syntetických cest k získání různých derivátů PBD existuje mnoho. Dle mého průzkumu napříč mnoha literárními řešenými však neexistuje, nebo není publikována cesta, kdy by byly získány pyrrolbenzodiazepintriony, které jsou touženým cílem mé diplomové práce. Byly nalezeny pouze patenty látek, dosti podobných těm mým cíleným, hovořící o derivátech PBD jako o užitečných protirakovinných látkách (**Obrázek 25**).<sup>118</sup>

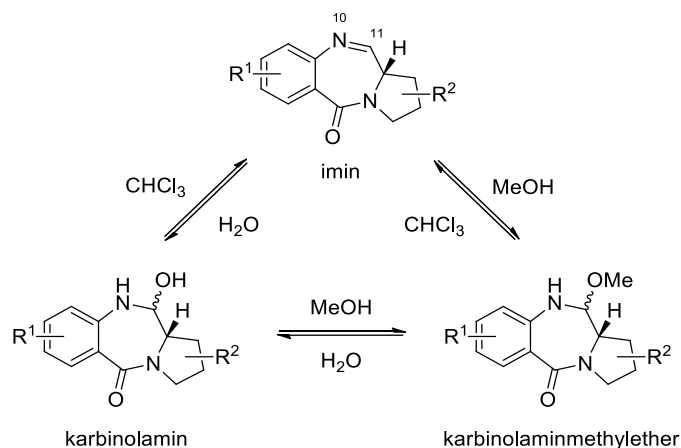


**Obrázek 25.** Struktura patentovaného derivátu PBD.

### 2.3.1 Stabilita pyrrolbenzodiazepinů

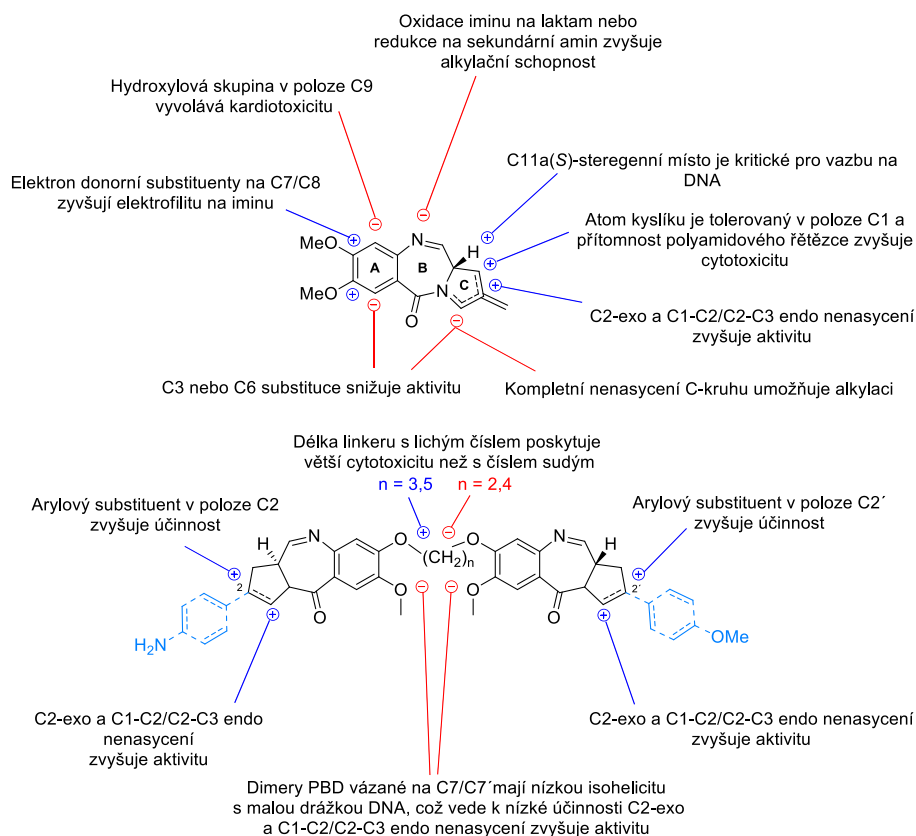
Deriváty monomerních PBD se mohou vyskytovat ve třech různých formách (**Obrázek 26**). Tyto formy se odvíjí od jejich podmínek skladování. Tento jev byl poprvé pozorován u anthramycinu, který byl izolován z fermentačního bujónu ve formě karbinolaminu, následně krystalizován z methanolu ve formě karbinolaminmethyletheru a poté převeden na iminovou formu za mírného záhřevu s acetonitrilem.<sup>86</sup> První forma se nachází ve vodném roztoku, kdy je stabilizována substituenty přitahující elektrony k uhlíku v poloze 8.<sup>119,120</sup> Druhá forma, tedy forma karbinolaminetheru, je tvořena v protickém rozpouštědle, typicky v alkoholu, kdy se jedná o nejstabilnější formu PBD. Běžně je tedy tato forma uchovávána v methanolu při teplotě -20 °C.<sup>121,122</sup> Třetí formou jsou krystalické iminové formy a karbinolamin-methyletherové formy. Ty lze získat z acetonu

či směsi methanolu a vody při teplotě varu.<sup>123</sup> Rovnováha mezi výše zmíněnými formami není ovlivněna pouze výběrem rozpouštědla, ale také podmínkami analýzy.<sup>124,125</sup>



**Obrázek 26.** Stabilní formy PBD.

Stejně jako je uvedeno v kapitole 1 u BZD, tak i pyrrolobenzodiazepiny mají svá místa, která výrazně ovlivňují jejich aktivitu. A mezi taková významná místa patří nahrazení iminového uskupení tvořící uhlíkem v poloze 11 a dusíkem v poloze 10 za aminové, kdy dochází ke zvýšení schopnosti vázat DNA.<sup>126</sup> Dalším důležitým místem je atom uhlíku v poloze 11a, kde se nachází stereogenní centrum. S využitím NMR a difrakční rentgenové analýzy bylo dokázáno, že všechny přirozeně vyskytující PBD mají konfiguraci *S*. Vlivem tohoto chirálního místa má molekula tvar pravotočivé šroubovice, díky čemuž přesně zapadá do vedlejší rýhy DNA. Molekuly s konfigurací *R* nejsou isohelikální s vedlejší rýhou DNA a střetávají se tak se stěnou jejího žlábků.<sup>80,127</sup> Také substituenty navázané na benzenové části (kruh A) významně ovlivňují ochotu vytváření vazby s DNA a cytotoxicitu. Přítomnost elektrondonorních substituentů v polohách 7 a 8 může posílit interakci s DNA prostřednictvím elektrofily a zlepšení alkylačního potenciálu iminové skupiny mezi C-11 a N-10.<sup>128</sup> Polohy 7 a 8 jsou také místa, přes které jsou v PBD dimerech jejich odpovídající monomery propojeny alifatickým linkerem.<sup>129</sup> Studie molekulárního dokování také uvádějí fakt, že substituenty v poloze 8 se mohou umisťovat podél malé drážky DNA a stabilizovat tak adukt DNA-PBD.<sup>130</sup> Ovlivňovat aktivitu vůči DNA může také nasycení pyrrolového kruhu (kruh C). Obecně totiž platí, že monomerní PBD, které mají tuto část nenasycenou, jako je tomu například u anthramycinu nebo u tomaymycinu, mají k DNA vyšší vazebnou afinitu než monomery mající tento kruh plně nasycený (neotramycin A nebo chicamycin).<sup>131</sup>

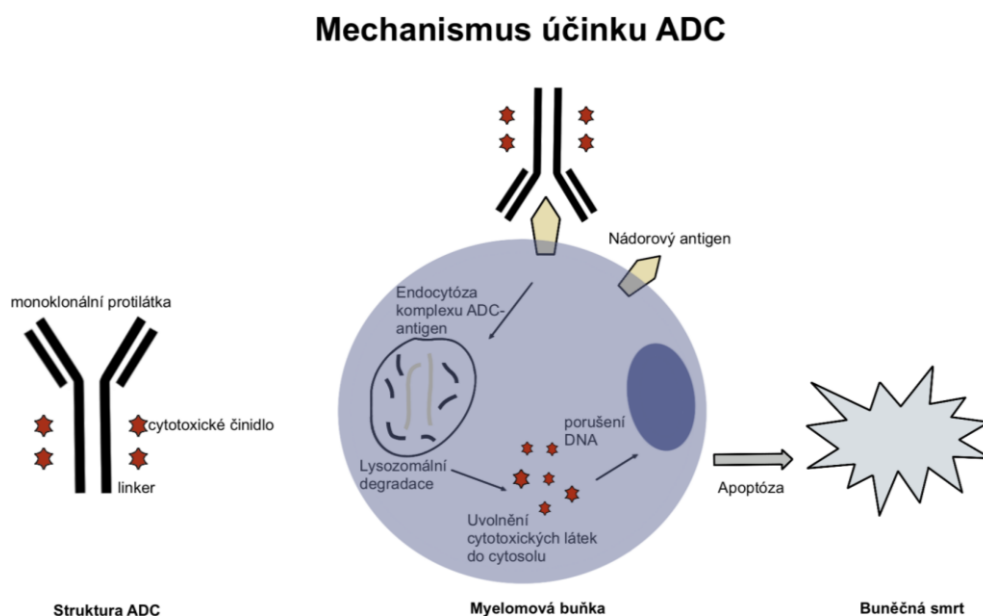


Obrázek 27. Vztah mezi strukturou a aktivitou monomerních i dimerních PBD.<sup>132</sup>

## 2.4 Nedávné pokroky v použití PBD

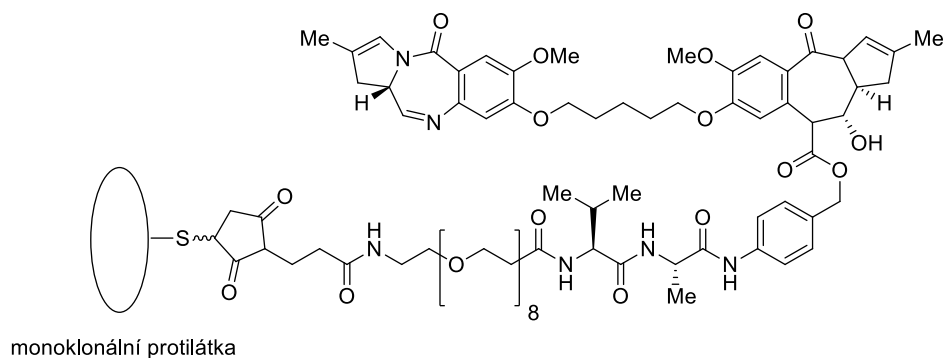
V souvislosti s PBD je dnes velmi zkoumána technologie konjugátů protilátka-lék (ADC), která umožňuje využít vysoce toxické sloučeniny jako potenciální léky na rakovinu. ADC nejsou však limitovány pouze pro léčbu onkologických onemocnění. V posledních letech byly zjištěny i protizánětlivé či antibiotické vlastnosti podílející se aktivně na potlačení nemocí jako je skleróza či artritida a v současnosti patří mezi nejslibnější lékové skupiny.<sup>133</sup> ADC jsou složeny tedy ze tří částí a to protilátky, linkeru a cytotoxického činidla. Protilátka je zpravidla monoklonální, zodpovídající za rozpoznání cílového antigenu exprimovaného v nádorových buňkách.<sup>134</sup> Po navázání protilátky na antigenní receptor je celá složka ADC transportována dovnitř buněk pomocí endocytózy, kde se štěpí linker tvořící můstek mezi protilátkou a cytotoxickým činidlem.<sup>135</sup> Po uvolnění cytotoxického činidla v cílových buňkách jsou narušeny buněčné procesy vedoucí ke smrti buňky (Obrázek 28).<sup>136</sup> Oproti konvenční chemoterapii nabízí ADC několik výhod. Především jde o selektivní cílení na rakovinné buňky, čímž se snižuje počet poškozených zdravých buněk tkání a minimalizují se tím i vedlejší účinky. Díky této konstrukci je možné aplikovat vyšší

koncentrace cytotoxického léčiva, což by potenciálně mohlo zvýšit jeho účinnost. Protilátka může navíc vyvolat imunitní odpověď a tím ještě dále zvýšit protinádorovou aktivitu.<sup>137–139</sup> Pyrrolbenzodiazepiny zde fungují právě jako cytotoxické činidlo, neboť prokazují v ADC uskupení cytotoxické schopnosti.<sup>140</sup>



**Obrázek 28.** Mechanismus ADC.<sup>141</sup>

Pyrrolbenzodiazepinové dimery jsou používány v ADC také jako cytotoxická činidla s významnou účinností proti rakovině slinivky<sup>142–144</sup>, prsu<sup>145</sup>, prostaty<sup>145,146</sup> či proti leukémii<sup>147,148</sup>. Nyní je mnoho ADC na bázi PBD v procesu klinického hodnocení, prozatím jediným schváleným americkým Úřadem pro kontrolu potravin a léčiv (FDA) byl Loncastuximab tesirin (**Obrázek 29**).<sup>140</sup> Ten je účinný proti B-lymfomu, vykazující dle tří klinických studií celkovou míru odpovědi v rozmezí 24,1 % až 56,7 %.<sup>149</sup> Obsahuje humanizovanou mAb zacílenou na CD19, přičemž její štěpitelný linker tvoří valin-alanin-valin.<sup>150,151</sup> Při aplikaci tohoto léčiva se mezi vedlejšími účinky vyskytuje anémie či únava. Nežádoucí účinky jsou pozorovány vždy při použití PBD jako cytotoxického činidla v ADC. Objevují se zejména gastrointestinální poruchy či kožní onemocnění nebo respirační problémy.<sup>152</sup>



**Obrázek 29.** Loncastuximab tesirin.

Dimery pyrrolo[2,1-*c*][1,4]benzodiazepinů jsou klíčovými alkylátory DNA pro ADC, používající se již v klinických studiích.<sup>153–155</sup> Molekulární struktura dimeru PBD ovlivňuje rozpoznání DNA sekvencí díky stereogennímu centru na uhlíku v poloze 11, který se díky tomu přizpůsobuje vedlejší drážce DNA.<sup>156–160</sup> PBD tvoří kovalentní adukt s guaninem v menším žlábků dvouvláknové DNA, čímž je vytvořeno mezi i vnitřetězcové zesílení či jsou získány monoalkylované produkty.



## **II. PRAKTICKÁ ČÁST**

### 3 VÝSLEDKY A DISKUZE

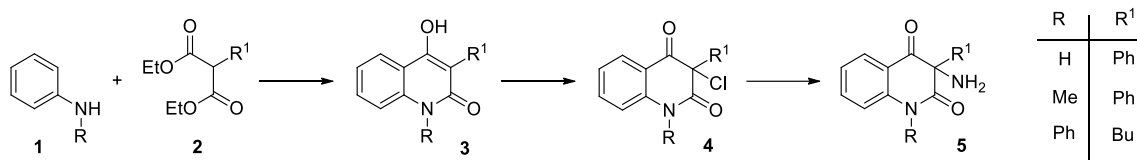
Již několik let se náš Ústav chemie, konkrétně výzkumná skupina v čele s docentem Kafkou a doktorem Kimmelem, zabývá studiem a reaktivitou derivátů chinolindionů, benzodiazepindionů i pyrrolbenzodiazepindionů. Přípravy a následné bazicky indukované přesmyky chinolindionů nesoucích v poloze 3 aminoskupinu substituovanou nasyceným, 3-hydroxypropylovým, nebo nenasyceným, prop-2-ynovým, řetězcem z nichž je v posledním kroku formováno pyrrolové jádro, jsou již dobře prozkoumány a optimalizovány. Velmi stručně je možné povědět, že doposud byly připraveny pyrrolbenzodiazepindiony s (ne)nasyceným pyrrolovým kruhem prostým funkčních skupin. Z tohoto důvodu byla práce směřována k PBD sloučeninám obsahujícím oxoskupinu na pyrrolového kruhu. Na otázku „Proč právě oxoskupina?“ je poměrně jednoduchá odpověď. Karbonylové sloučeniny je obecně možné transformovat na dosti rozmanitou množinu různých derivátů, mezi které je možné zahrnout halogenderiváty, alkoholy, geminální dioly, ketal, kyanhydriny, iminy, enaminy, hydrazony, oximy, produkty aldolových kondenzací a dalších substitučních reakcí v aktivovaných místech samotného uhlíkatého řetězce ( $\alpha$  polohy vůči C=O).

Za tímto cílem, jak už napovídá samotný název diplomové práce, bylo prozkoumat možnosti přeměny 3-((3-ethoxy-3-oxopropyl)amino)chinolin-2,4-dionů nebo 3-(3-chlorpropanamido)chinolin-2,4-dionů na nové benzodiazepindiony a jejich následnou konverzi na pyrrolbenzodiazepintriony. Jelikož práce plynule navazuje na mou bakalářskou práci, bude pro lepší uvedení do problematiky první kapitola věnována právě jí.

#### 3.1 Shrnutí dosavadní práce na této problematice

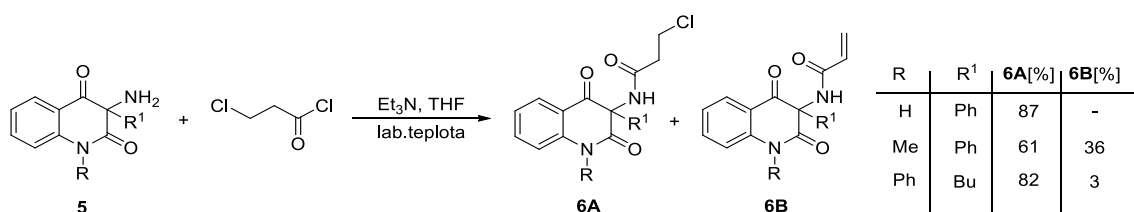
Jak už bylo popsáno v mé bakalářské práci,<sup>161</sup> cílovými sloučeninami byly 3-aminochinolin-2,4-diony nesoucí přes atom dusíku aminoskupiny 3-chlorpropanoylový řetězec. Práce nejprve započala dobře známou syntézou 3-aminochinolin-2,4-dionů (**Schéma 16**), která zahrnuje kroky termické kondenzace derivátů anilinu **1** s diethylestery kyseliny malonové **2** za vzniku 4-hydroxychinolin-2-onů **3**, které byly následně účinkem sulfurylchloridu chlorovány. Posledním krokem v přípravě základních aminosloučenin **5** byla nukleofilní substituce chlorderivátu **4**, která byla vyvolána amoniakem generovaným *in situ*. Příprava těchto sloučenin byla již optimalizovaná<sup>162</sup> před několika desítkami let, a proto zde byla popsána jen stručně.

Jelikož látky uvedené ve **Schéma 16** je možné v naší skupině považovat za esenciální, můžeme je v laboratorních zásobách nalézt čas od času ve velkém množství různě substituovaných látek, ze kterých jsem mnohdy i já, a to jak při realizaci bakalářské, tak i diplomové práce, čerpala.



**Schéma 16.** Syntéza 3-aminochinolin-2,4-dionů **5**.

Poslední pokusy, jež směřovaly k finálním produktům, se soustředily na nukleofilní substituci primární aminoskupiny látky **5** acylchloridem. Konkrétně byl k roztokům 3-aminoderivátů v suchém tetrahydrofuranu (THF) pod inertní atmosférou přikapán triethylamin a po několika minutách i roztok 3-chlorpropanoylchloridu taktéž v THF. Tetrahydrofuran byl vybrán cíleně, neboť při reakci vzniká  $\text{Et}_3\text{N}\cdot\text{HCl}$ , který je v tomto rozpouštědle nerozpustný a jde z reakční směsi odstranit pouhou filtrací. Tímto způsobem byly připraveny 3 deriváty (**Schéma 17**). Nebyly však získány pouze původně zamýšlené deriváty **6A**, ale také produkty jejich dehydrohalogenačních reakcí **6B**. Primární produkty vznikaly ve velmi pěkných výtěžcích pohybujících se okolo 61–87 %.



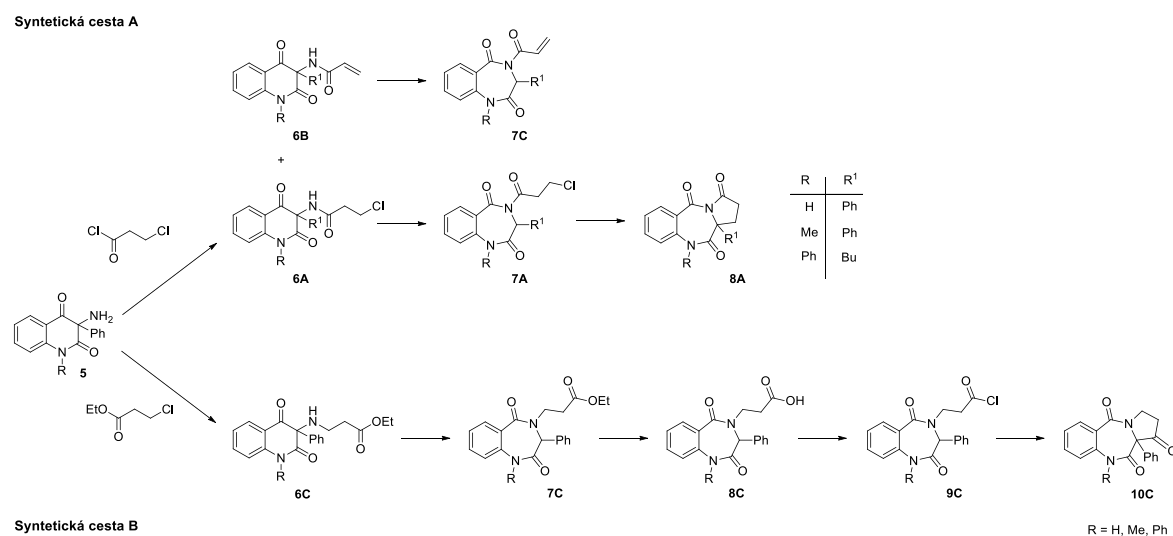
**Schéma 17.** Nukleofilní substituce 3-aminochinolin-2,4-dionu s acylhalogenidem.

Nutno zde podotknout, že byla vyvinuta i nemalá snaha o vytvoření derivátu chinolin-2,4-dionu s řetězcem methyl-propanoátu. Ta však v tu dobu nevedla k očekávanému výsledku. Důvodem byla nejen malá výtěžnost při syntéze samotného methylesteru kyseliny 3-chlorpropanové, ale také vznik komplikovaných směsí při jeho reakci s 3-aminochinolindionem. Z těchto příčin byly tyto reakce prováděné v dobách dávno minulých opuštěny. Jelikož nám tento neúspěch stále navozoval neklidné spaní, byla těmto

reakcím věnována značná pozornost v nynějším navazujícím magisterském studiu. A o tom, jak to všechno dopadlo se dozvíme v následující kapitole.

### 3.2 Diskuze o problematice této práce

Jak již bylo naznačeno výše, mé vynaložené úsilí v období posledních dvou let se odráželo od poznatků a zkušeností získaných při řešení dřívějšího projektu jehož výsledky jsou sepsány do podoby bakalářské práce. K touženému cíli, tj. z jednodušších sloučenin postupně vystavit pyrrolbenzodiazepintriony s různě lokalizovanou oxoskupinou pyrrolového kruhu, byly navrženy dvě syntetické cesty (**Schéma 18**), které se vzájemně liší charakterem vazebného místa oxopropylvého řetězce připojeného k aminoskupině výchozího chinolin-2,4-dionu **5**, od čehož se poté odvíjí následující kroky. Pro lepší přehlednost je tato kapitola členěna na další dva menší celky a to na **3.2.1 Syntetická cesta A** a na **3.2.2 Syntetická cesta B**, kde budou jednotlivé stupně a jejich na první pohled neviditelné úskalí podrobněji diskutovány.



**Schéma 18.** Navržená syntetická strategie.

#### 3.2.1 Syntetická cesta A

Tato etapa, která předpokládala přípravu, izolaci a strukturní charakterizaci dvou meziproductů (**6A** a **7A**), byla odstartována nukleofilní substitucí 3-aminochinolin-2,4-dionů **5** s 3-chloropropanoylchloridem v prostředí triethylaminu v THF při laboratorní teplotě. Jelikož tyto reakce, které jsou ve **Schématu 19** vyznačeny modrým rámečkem, byly již v rámci bakalářské práce dobře optimalizovány, byly pro naše nynější

účely provedeny ve čtyřnásobně větším množství. I když je možné se často setkat se skutečností, že výsledek reakcí provedených v menším měřítku neodpovídá experimentům realizovaných za identických podmínek s vyšší navázkou reaktantů, v našem případě byly výtěžky produktů prakticky shodné, což svědčí o výborné reprodukovatelnosti.

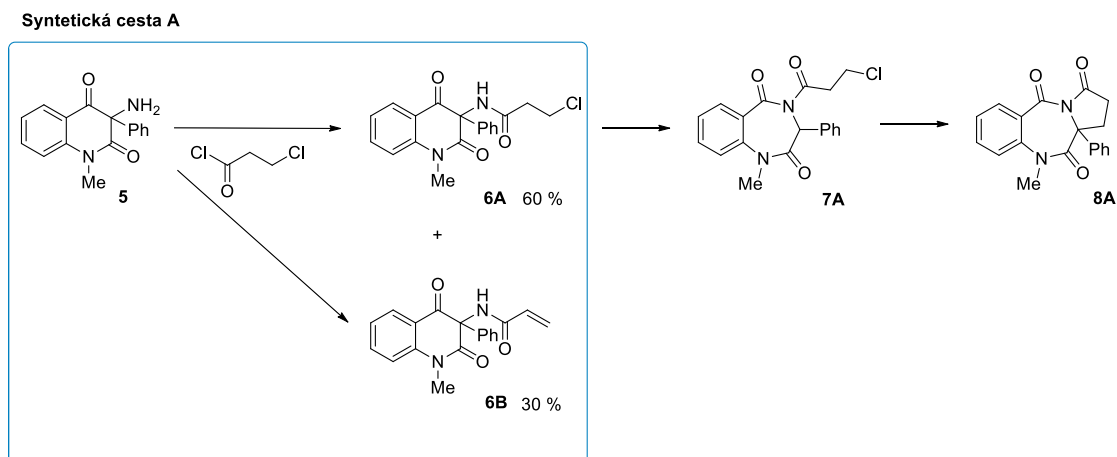
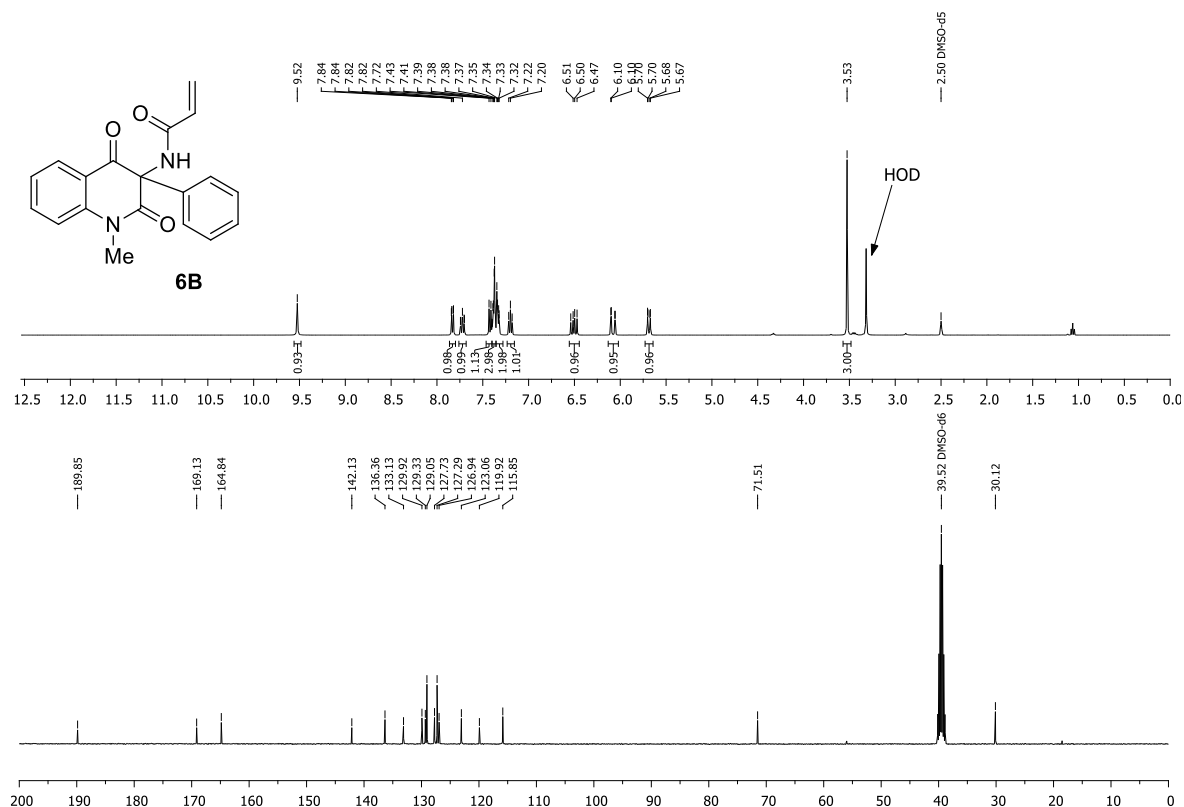


Schéma 19. První reakční krok po syntetické cestě A.

Následně bylo dle navrženého plánu přistoupeno k pokusu o expanzi šestičlenného pyridinového kruhu na sedmičlenný diazepinový. Protože těchto izomerizačních reakcí N3-substituovaných 3-aminochinolindionů bylo již v minulosti v naší laboratoři úspěšně provedeno nesčetné množství, bylo pro konverzi sloučenin **6A** na **7A** zvoleny osvědčené podmínky. To znamená, že byl roztok (3-chlorpropanamido)chinolin-2,4-dionu **6A** s dvojnásobkem stechiometrického množství TMG v ethanolu jeden den míchán při laboratorní teplotě.

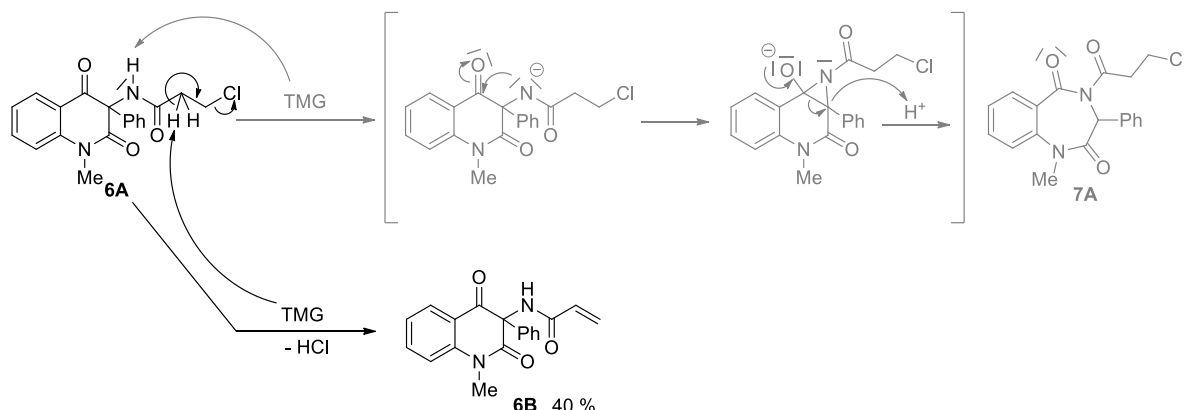
Již samotné monitorování složení reakční směsi, ke kterému byla využívána chromatografie na tenké vrstvě silikagelu (TLC), bylo pro nás znepokojující. Na TLC byl sice pozorován vznik pouze jednoho produktu, což bývá prakticky vždy radostná zpráva, ovšem tento produkt měl menší retenční faktor než samotná výchozí látka. Na základě nabytých zkušeností s přípravou těchto látek je tato skutečnost dosti nestandartní, protože všechny deriváty BZD, které kdy byly v minulosti námi připraveny, měly retenční faktor vyšší než samotný 3-aminochinolindion. Po zpracování reakční směsi a NMR analýze bylo poměrně záhy zjištěno, že k expanzi heterocyklického kruhu nedošlo. Očekávané BDZ sloučeniny by totiž měly mít v  $^1\text{H}$  NMR spektrech v blízkosti 5 ppm charakteristický singlet náležící protonu vázanému k atomu uhlíku C-3 a v  $^{13}\text{C}$  NMR spektrech by měly být viditelné tři signály v oblasti 160–175 ppm pocházejících od atomů uhlíků tří amidových skupin,

ovšem při pohledu na NMR spektra uvedená na **Spektru 1**, je zcela zřejmé, že se s uvedenými předpoklady neslučují. Při detailním rozboru 2D NMR spekter bylo zjištěno, že u derivátu **6A** dochází vlivem TMG pouze k dehydrohalogenaci postranního řetězce (**Schéma 20**).

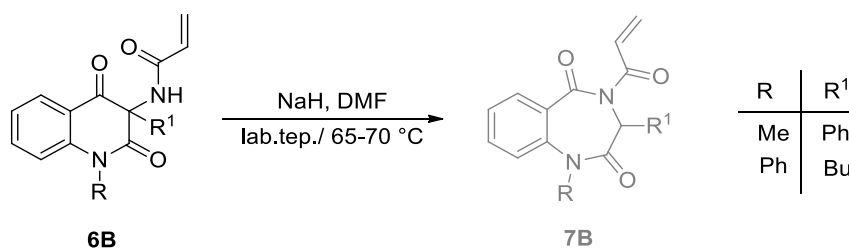


**Spektrum 1.** <sup>1</sup>H NMR spektrum (nahore) a <sup>13</sup>C NMR spektrum (dole) sloučeniny **6B**.

Jelikož z reakce nebylo izolováno ani stopové množství požadovaného BDZ **7A**, bylo usouzeno, že TMG je nejspíše příliš slabá báze na to, aby utrhl proton z atomu dusíku amidové skupiny v poloze 3 a tudíž nemůže dojít k následné adici tohoto dusíkového aniontu na atom uhlíku sousední oxoskupiny a následnému formování diazepinového kruhu (**Schéma 20**).



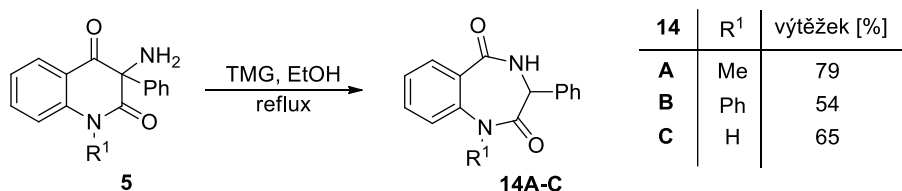
Pro ověření, zdali amidová skupina poutaná k chinolindionu v poloze 3, jež byla vůči TMG rezistentní, je ochotna podstupovat zamýšlenou reakci, bylo provedeno několik experimentů s mnohem razantnější bází. Aby byly potlačeny nežádoucí eliminační reakce probíhající na 3-chlorpropylovém řetězci, byl pozorován účinek dvou ekvivalentů hydridu sodného na 3-akrylamidové deriváty chinolindionu **6B**. Jelikož ani po 3 dnech míchání reakční směsi pod inertní atmosférou argonu v suchém DMF nebyl pozorován žádný progres reakce, byla dále tato směs zahřívána na olejové lázni s teplotou temperovanou na 65–70 °C. Za těchto podmínek již po několika desítkách minut byla sice výchozí látka spotřebována, ovšem vznikla natolik komplikovaná směs, že se z ní nepodařilo ani opakovanou chromatografií na sloupci silikagelu vyizolovat žádné chemické individuum. Pro velkou touhu zjistit, jestli při dané reakci vznikal očekávaný produkt, byla nejčistší frakce z chromatografie podrobena jak NMR, tak i GC-MS analýze, ze kterých vyplynulo, že se jedná pravděpodobně o směs dvou látek, které nebylo možné blíže specifikovat. Tento výsledek byl pro oba deriváty totožný (**Schéma 21**).



**Schéma 21.** Pokusy o intramolekulární reakci pomocí hydridu sodného.

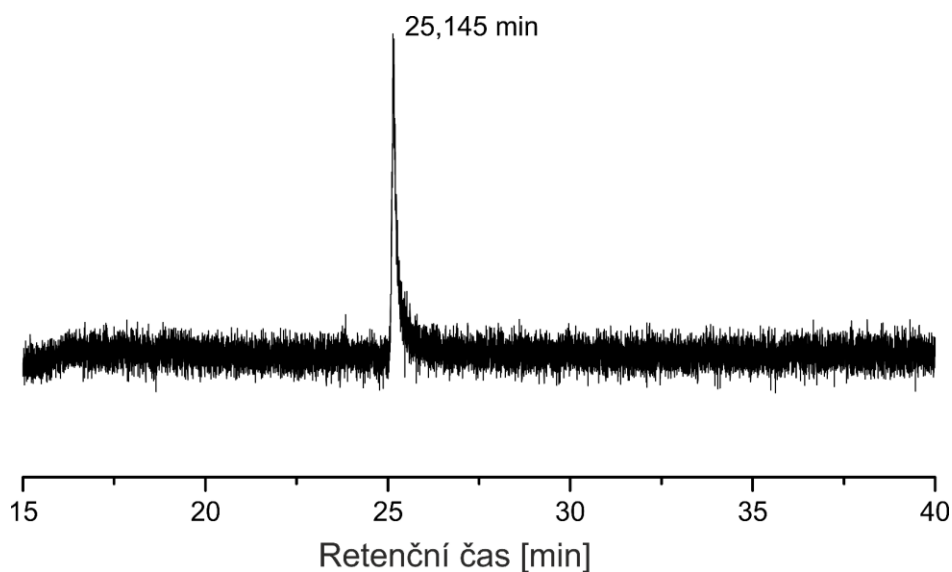
Pasivita těchto sloučenin si vyžádala změnu strategie původně navržené syntézy. Základní inovativní myšlenkou bylo nejprve připravit samotný, v poloze 4 nesubstituovaný

BDZ a na něj teprve poté navázat 3-chlorpropanoylový řetězec. Pro tuto reorganizaci prvotního plánu, záměna pořadí prvních dvou kroků, byly tři 3-aminochinolin-2,4-diony **5** po pětihodinovém kontaktu s TMG ve vřucím ethanolu izomerizovány na odpovídající BZD. Poněvadž se tyto látky poměrně dobře vylučují z alkoholových nebo ethyl-acetátových roztoků, byly z ochlazených reakčních směsí izolovány ve skvělé kvalitě a s dobrým výtěžkem pouhou spontánní krystalizací. Tento stupeň lze tedy obecně označit za jednoduchý a efektivní.



**Schéma 22.** Izomerizační reakce 3-aminochinolin-2,4-dionů **5**.

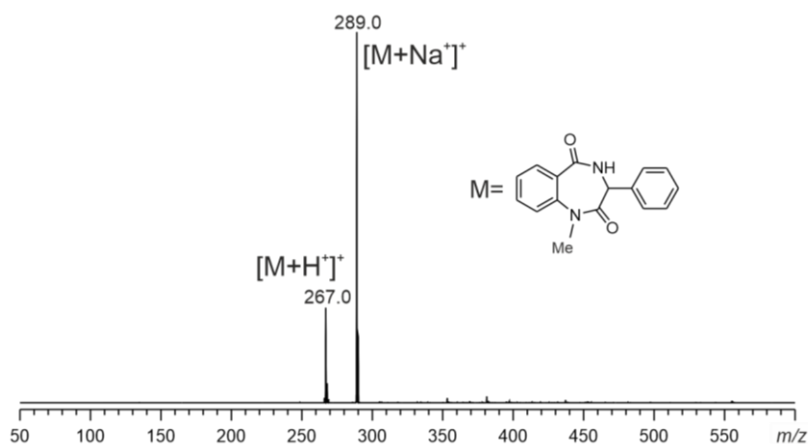
U prvního připraveného BZD **14A** bylo po změření jeho <sup>1</sup>H NMR zjištěno, že se ve spektru nachází dvě sady signálů v přibližném poměru 1:1. Jelikož byl izolovaný produkt dle TLC vyvíjených ve více různých mobilních fází čistý, byl tento fakt zarážející. Proto byl vzorek analyzován plynovou chromatografií s hmotnostní detekcí (GC-MS). Výsledný chromatogram obsahoval pouze jeden pík s retenčním časem 25,145 min (**Obrázek 30**), který dle hmotnostního spektra charakterizoval BZD **14A**.



**Obrázek 30.** Chromatogram sloučeniny **14A** získaný z GC-MS.

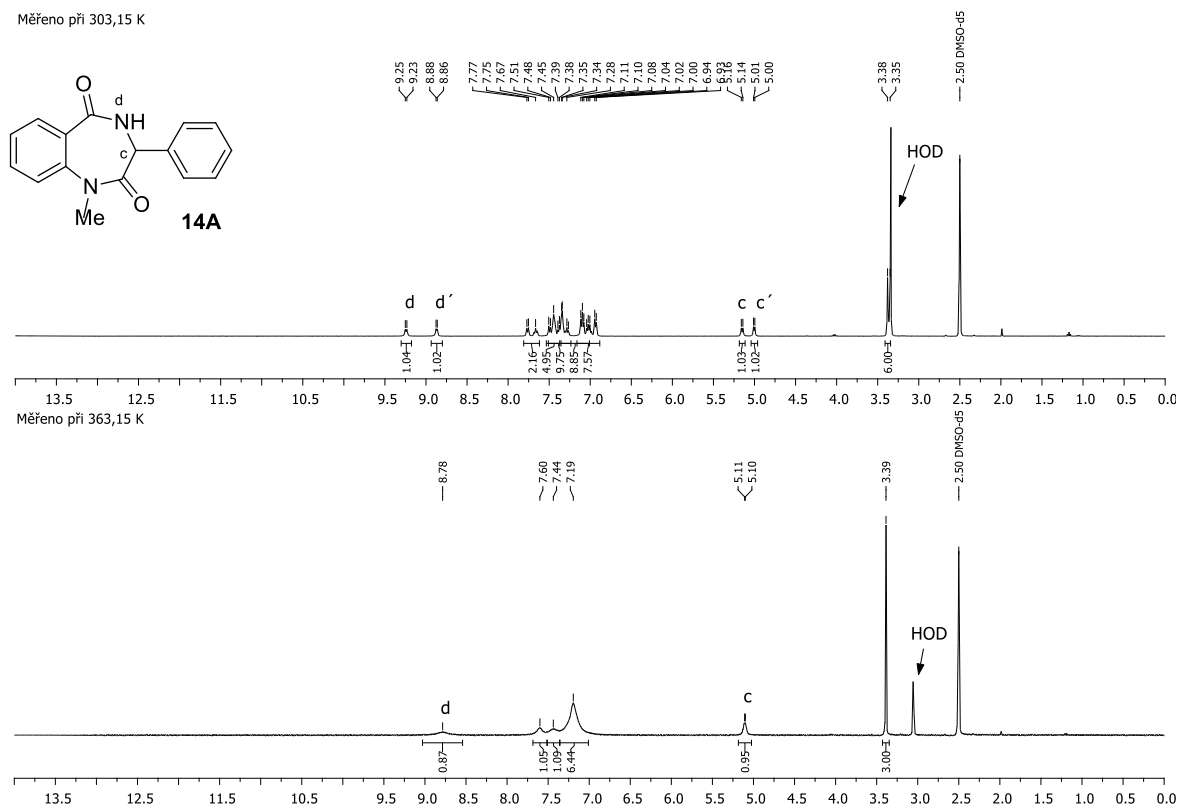


Nebylo nic ponecháno náhodě a tentýž vzorek byl analyzován i na hmotnostním spektrometru s elektrosprejovou ionizací (ESI-MS). Ve spektru, jež bylo získáno z měření v pozitivním skenovacím módu, byly pozorovány pouze dva ionty (**Spektrum 2**) a to molekulový ion s hodnotou 266 m/z a jeho sodný adukt s hodnotou 288 m/z.



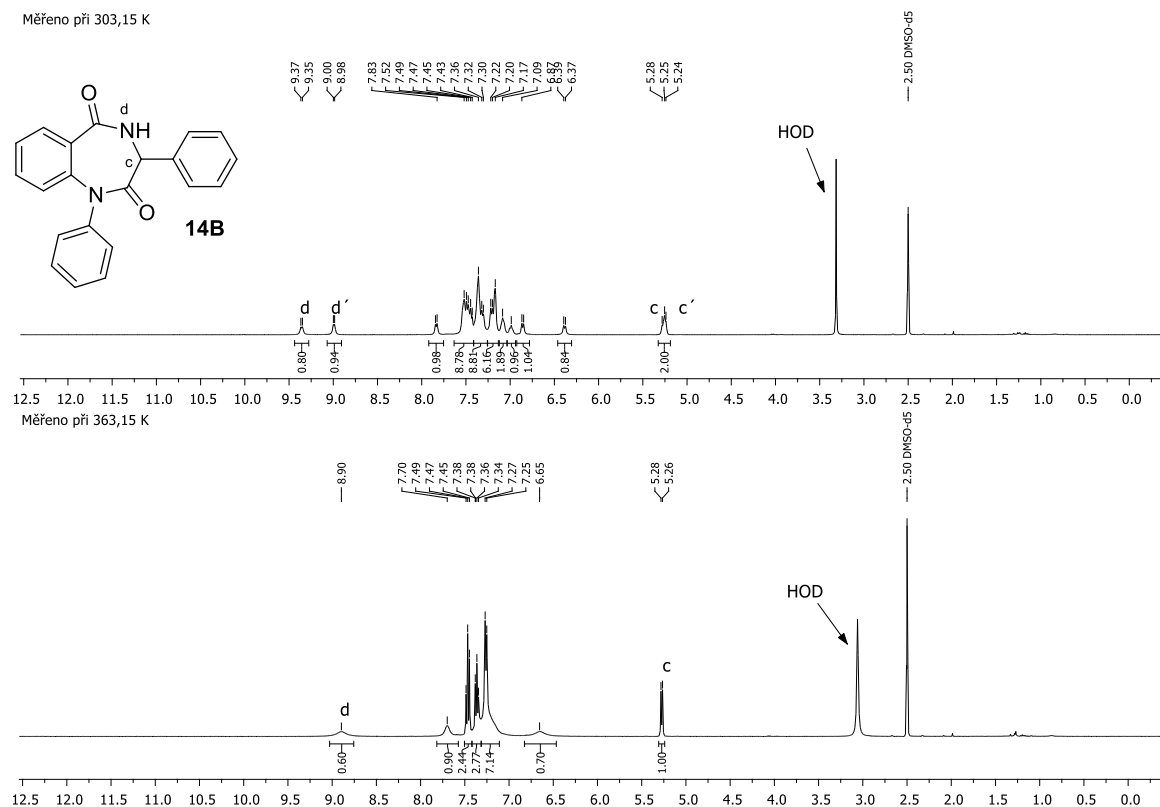
**Spektrum 2.** ESI-MS spektrum sloučeniny **14A** měřené v pozitivním skenovacím módu.

Výsledky obou analytických metod, které potvrdily, že produkt získaný z výše uvedené reakce obsahuje pouze jednu čistou látku, kterou je bezpochyby očekávaný BZD **14A**, nás dovedly k myšlence, že dvě sady signálů viditelné v  $^1\text{H}$  NMR spektrech analyzovaných při 30 °C (303,15 K) náleží dvěma konformačním stavům téže molekuly. Abychom si tuto hypotézu ověřili, zkusili jsme změřit vzorek při 90 °C (363,15 K). Spektrum získané z měření vzorku při vyšší teplotě ukázalo, že došlo ke sjednocení signálů tzv. koalescenci, kterou lze nejlépe pozorovat u izolovaných signálů. V tomto případě se dá koalescence krásně demonstrovat na dvou dubletech vyskytujících se okolo 9 ppm, které vystihují proton amidové skupiny v poloze 4, a dvou dubletů s chemickým posunem blízkým 5 ppm, jež charakterizují proton v poloze 3 (**Spektrum 3**, nahoře). Ve spodním spektru je možné vidět, že jsou tyto signály již sjednocené.



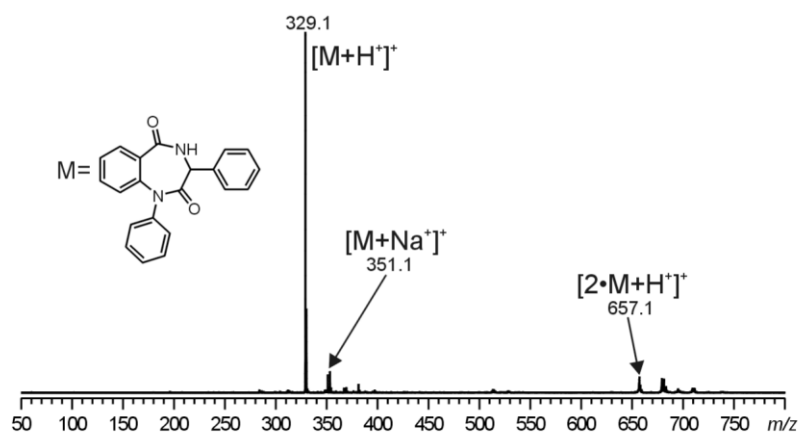
**Spektrum 3.** Rozdíl v  $^1\text{H}$  NMR spektrech BZD **14A** měřených při 303,15 K a 363,15 K.

Po syntéze druhého analogu **14B**, který se lišil pouze substitucí v poloze 1, panovalo napětí, zdali se bude i tento derivát chovat v magnetickém poli stejně. Proto byla ihned po izolaci z reakční směsi měřena jeho NMR spektra. Opět byl pozorován stejný fenomén. Ve spektrech naměřených při 30 °C (303,15 K) se vyskytovaly zdvojené signály protonů vázaných do poloh 3 a 4, které se po zahřátí vzorku na 90 °C (363,15 K) sjednotily (**Spektrum 5**).



**Spektrum 4.** Rozdíl v  $^1\text{H}$  NMR spektrech BZD **14B** měřených při 303,15 K a 363,15 K.

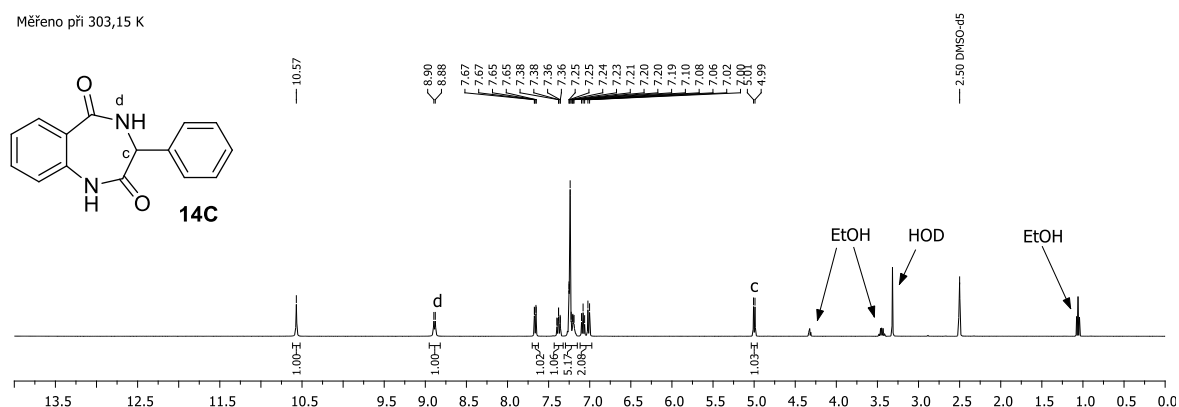
Vzorek byl rovněž analyzován na ESI-MS. Spektrum bylo opět měřeno v pozitivním skenovacím módu a byly sledovány 3 ionty, molekulový ion s hodnotou 329 m/z, jeho sodný adukt s hodnotou 351 m/z a také dimer s hodnotou 657 m/z (**Spektrum 4**).



**Spektrum 5.** ESI-MS spektrum sloučeniny **14B** měřené v pozitivní módu.

Jako třetí a poslední byl syntetizován BZD **14C**, který byl na obou atomech dusíku diazepinového kruhu bez substituce. Bylo zajímavé, že v NMR spektru tohoto derivátu analyzovaného při 30 °C (303,15 K) byla pozorována pouze jedna sada signálů (**Spektrum 6**), a tudíž spektra při vyšších teplotách nebylo smyslné měřit.

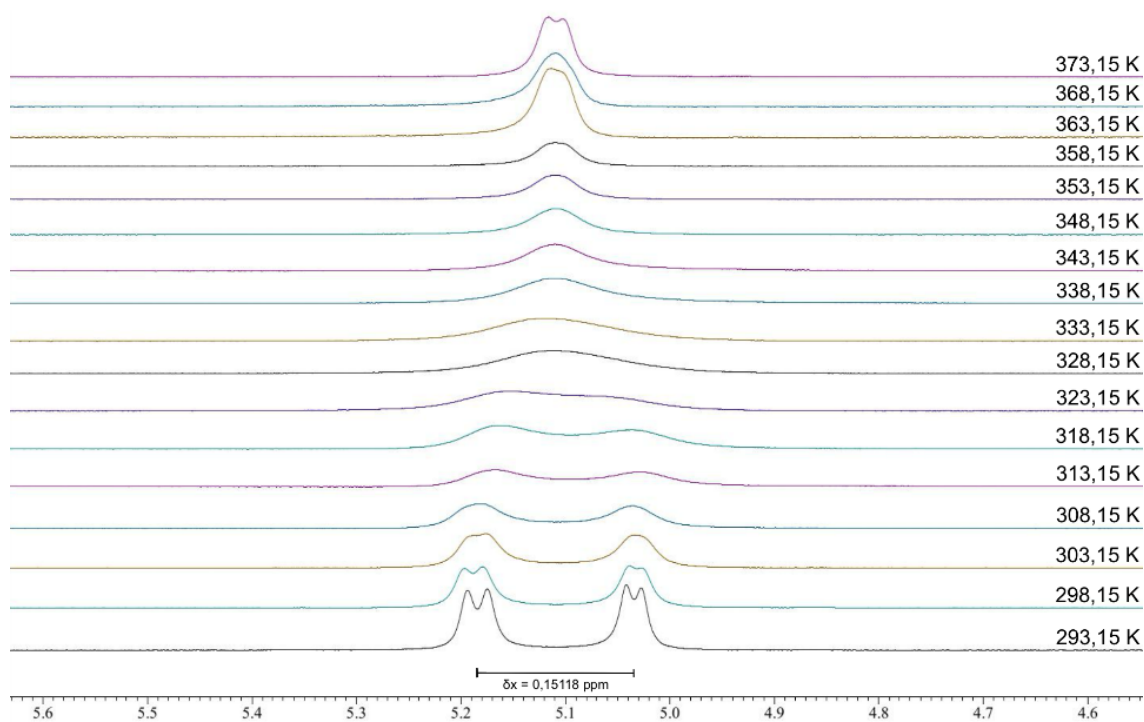
V inkriminovaných místech, ve kterých se v předchozích spektrech vyskytovaly zdvojené signály, je možné pozorovat pouze jeden dublet s chemickým posunem 5,00 ppm náležící atomu vodíku v poloze 3, který je typickým pro benzodiazepinové sloučeniny, a jeden dublet při 8,89 ppm patřící atomu vodíku amidové skupiny v poloze 4. V tomto případě, kdy byl měřen v poloze 1 nesubstituovaný BZD, spektrum obsahuje ještě navíc jeden singlet při 10,57 ppm, který charakterizuje proton připojený k atomu dusíku právě v této poloze. Dále je také možné si v části spektra, ve které se vyskytují signály alifatických protonů, povšimnout, že jsou zde přítomny další 4 signály, které dle jejich malé intenzity zcela bezpochyby nenáležejí protonům, jež jsou součástí molekuly BZD **14A**. Dle tvaru multipletů a jejich chemických posunů se jedná o signály pocházející z vody přítomné DMSO-*d*<sub>6</sub> a zbytkovému ethanolu, ze kterého byla látka krystalizována.



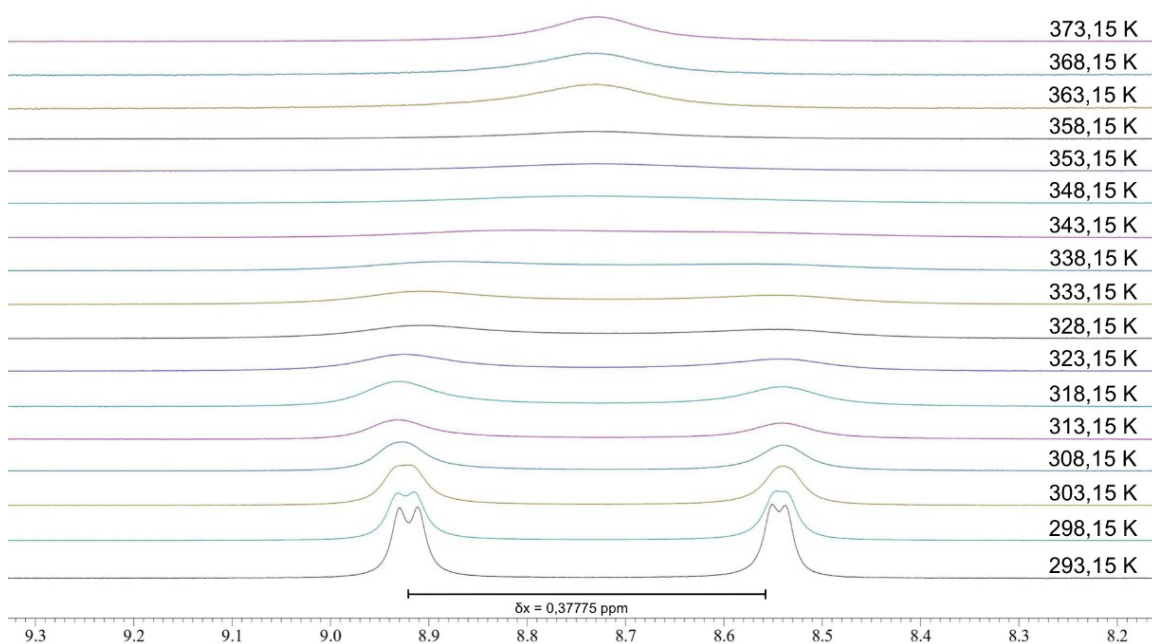
**Spektrum 6.** <sup>1</sup>H NMR spektrum BZD **14C** měřeného při 303,15 K.

U sloučenin, jež měly v <sup>1</sup>H NMR spektrech naměřených při 30 °C (303,15 K) dvě sady signálů vystihující obě konformace, to je u BDZ nesoucích v poloze 1 methylovou (derivát **14A**) anebo fenylovou skupinu (derivát **14B**), byly z důvodu hledání teploty, při které dochází ke koalescenci, měřena spektra jejich roztoků vytemperovaných na různé teploty. Pro tyto experimenty bylo u každé látky změřeno celkem sedmnáct <sup>1</sup>H NMR spekter v teplotním rozsahu od 20 °C (293,15 K) do 100 °C (373,15 K).

U derivátu mající v poloze 1 methylovou skupinu docházelo nejprve ke koalescenci (při  $60\text{ }^{\circ}\text{C} = 333,15\text{ K}$ ) signálů charakterizujících atom vodíku v poloze 3 (**Spektrum 7**) a teprve poté (při  $75\text{ }^{\circ}\text{C} = 348,15\text{ K}$ ) u signálů pocházejících z protonu amidové skupiny v poloze 4 (**Spektrum 8**).

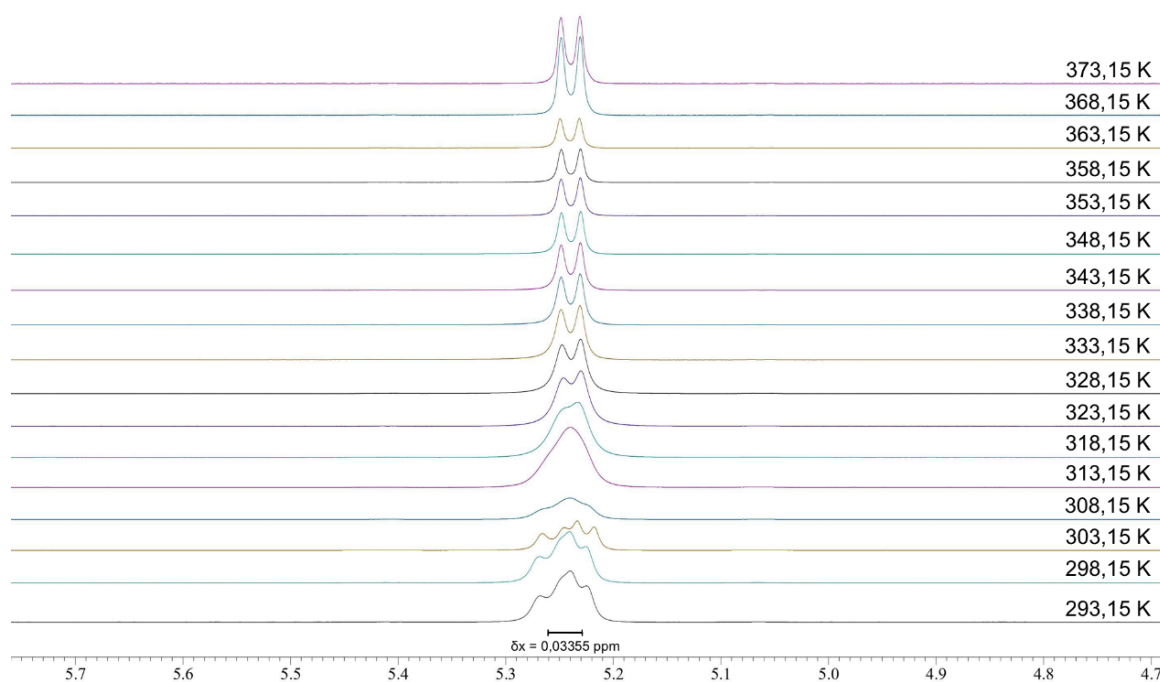


**Spektrum 7.** Teplotní závislost signálu protonu vázaného ve sloučenině **14A** k poloze 3.

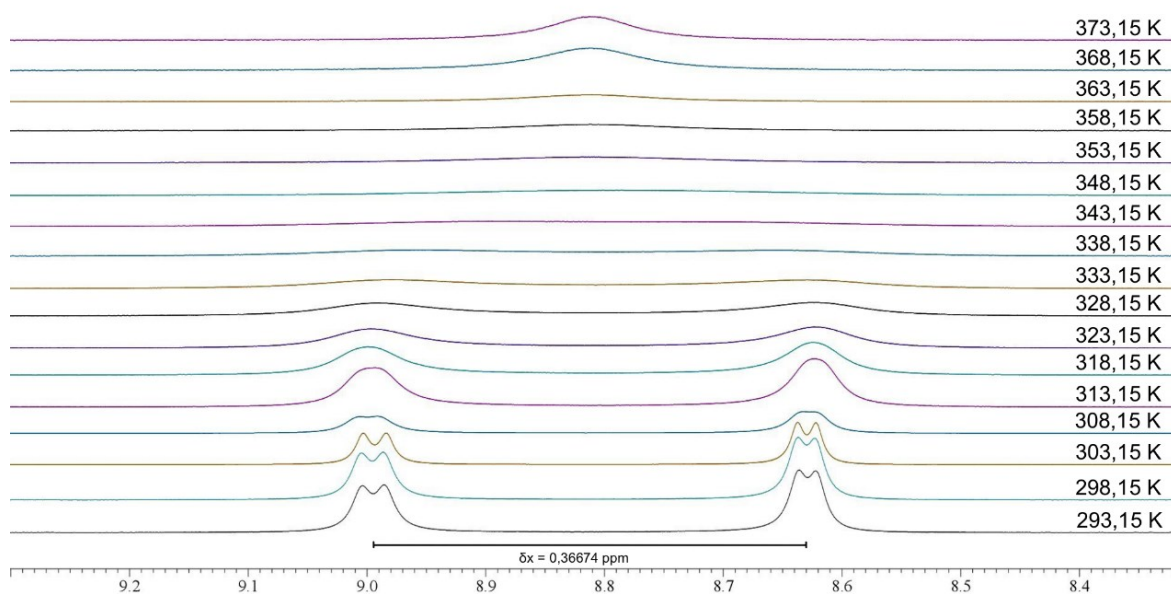


**Spektrum 8.** Teplotní závislost signálu protonu vázaného ve sloučenině **14A** k poloze 4.

Jelikož má atom vodíku v poloze 3 u obou konformerů **14B** v magnetickém poli velmi podobné vlastnosti, nejsou jejich dublety separované. Díky tomu, že se oba signály vzájemně překrývaly, bylo téměř nemožné jednoznačně určit teplotu, při které koalescence nastala (**Spektrum 9**). Odhadem však lze říci, že k ní došlo v intervalu 45–50 °C (318,15–323,15 K). Oproti tomu byly signály protonu v poloze 4 velmi dobře izolované a teplotu koalescence bylo možné spolehlivě zjistit (**Spektrum 10**). Sjednocení signálů těchto dubletů nastalo stejně jako u předchozího derivátu, to je při 75 °C (348,15 K).



**Spektrum 9.** Teplotní závislost signálu protonu vázaného ve sloučenině **14B** k poloze 3.



**Spektrum 10.** Teplotní závislost signálu protonu vázaného ve sloučenině **14B** k poloze 4.

Ve **Spektrech 7–10** je pozorována pomalá chemická výměna, což je rovnovážný děj, který lze pozorovat při naměření několika vodíkových spekter v našem případě při změně teploty jednotlivého měření a zároveň zde dochází ke změně chemického okolí sledovaného jádra. Ve spektrech je nejprve pozorováno jejich rozšíření, ke kterému dochází při vyšších teplotách, čímž se zvyšuje i rychlost výměny. Následně je pozorováno sjednocení signálů v jeden, což je nazýváno jako koalescence a teplota při které k tomu jevu dochází, se označuje jako teplota koalescence ( $T_c$ ). Při dalším zvyšování teploty se výsledný signál pouze zužuje.<sup>163</sup>

Aktivační energie přechodu mezi dvěma konformery označuje energii potřebnou k překonání energetické bariéry mezi jedním a druhým stavem molekuly. Čím nižší je aktivační energie, tím rychlejší je samotný proces přeměny. Pokud má systém nižší aktivační energii znamená to, že systém má dostatek energie k překonání energetické bariéry a překlápá se konformeru druhého. Naopak vyšší aktivační energie indikuje stabilitu systému, kdy konverze probíhá z pravidla pomaleji nebo je dokonce zastavena a je potřeba více energie k vytvoření požadovaného konformeru. Dle **Rovnice 1** byla vypočítána aktivační energie přechodu mezi jednotlivými formami a jejich výsledky jsou uvedeny v **Tabulce 1**.

Výpočet aktivační energie přechodu **Rovnice 1**:

$$\Delta G^* = 1,914 \cdot 10^{-2} \cdot T_c \cdot [9,972 + \log \left( \frac{T_c}{\Delta\delta} \right)]$$

kde:

$\Delta G^*$  .... aktivační energie přechodu [ $\text{kJ} \cdot \text{mol}^{-1}$ ]

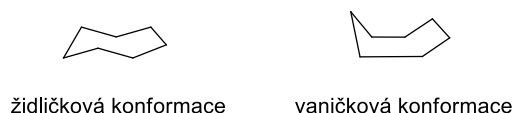
$T_c$  .... teplota koalescence [K]

$\Delta\delta$  .... rozdíl chemického posunu [Hz]

**Tabulka 1.** Hodnoty koalescence.

Substituent v poloze 1	$\Delta\delta$ [Hz]		Teplota koalescence [K]		Aktivační energie přechodu [ $\text{kJ} \cdot \text{mol}^{-1}$ ]	
	$\Delta H_c$	$\Delta H_d$	$\Delta H_c$	$\Delta H_d$	$\Delta H_c$	$\Delta H_d$
<b>Me (14A)</b>	60,47	151,1	338,15	348,15	68,31	68,86
<b>Ph (14B)</b>	13,42	146,7	318,15	348,15	69,10	68,95

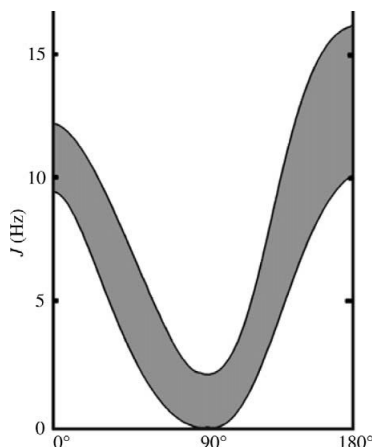
Výše popsané deriváty BZD mají aktivační energii přechodu pohybující se okolo  $69 \text{ kJ} \cdot \text{mol}^{-1}$ , což je ve srovnání s jednoduchým cykloheptanovým kruhem s energií přechodu z židličkové do vaničkové konformace  $35,8 \text{ kJ} \cdot \text{mol}^{-1}$ , značně vysoká hodnota. Jedná se tedy o relativně stabilní konformery.<sup>164</sup>



**Obrázek 31.** Židličková a vaničková konformace cykloheptanu.

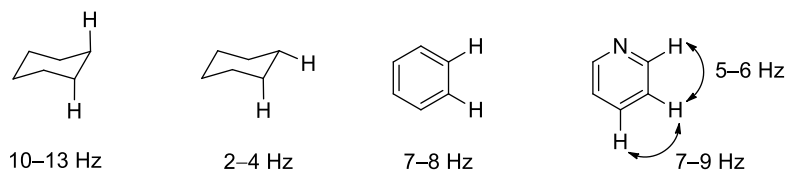
Další kroky v konformační analýze derivátu BZD vedly ke Karplusově rovnici (**Rovnice 2**). Ta pojednává o velikosti vicinální interakční konstanty ( $^3J(\text{HH})$ ), která je závislá primárně na dihedralním úhlu ( $\phi$ ) mezi interagujícími atomy vodíku. Závislost popisuje Karplusova křivka (**Obrázek 32**)<sup>165</sup>, kde spodní křivka vychází z teoretických znalostí, kdežto tmavě šedá část označuje její využití v praxi.





**Obrázek 32.** Karplusova křivka vyjadřující vztah mezi dihedrálním úhlem a vicinální interakcí.

Největších hodnot nabývá vicinální interakce při  $0^\circ$  a při  $180^\circ$ , kdy si můžeme na **Obrázku 32** všimnout, že při  $180^\circ$  je značně vyšší než při  $0^\circ$ . Při dihedrálním úhlu okolo  $90^\circ$  se hodnoty blíží nule. Modelovým příkladem může sloužit molekula cyklohexanu. Jsou-li v cyklohexanu na sousedních atomech uhlíku atomy vodíku v axiální poloze, svírají mezi sebou dihedrální úhel  $180^\circ$ , pozorujeme velkou vicinální interakci s hodnotou 10 až 13 Hz. Pokud je však mezi nimi úhel  $60^\circ$  či  $-60^\circ$ , což znamená, že alespoň jeden z atomů vodíku je v poloze ekvatoriální, je vicinální interakce malá a její hodnota spadá do intervalu 2–4 Hz. U benzenu obvyklá vicinální interakce mezi vodíky v poloze *ortho* nabývá hodnot od 7 do 8 Hz. Pokud je však v cyklu obsažen heteroatom, dochází k ovlivnění interakce a ke snížení její hodnoty (**Obrázek 33**).<sup>163</sup>



**Obrázek 33.** Srovnání vicinální interakce u modelových příkladů.

Důležité je zde zmínit, že pokud se atomy vodíku nacházejí v konfiguraci *cis*, tedy mají mezi sebou dihedrální úhel  $0^\circ$ , jejich interakční konstanta je menší než u atomů vodíku v konfiguraci *trans*, které svírají úhel  $180^\circ$ . Na základě těchto informací a teoretického výpočtu interakční konstanty jsme se pokusili z  $^1\text{H}$  NMR spekter přiřadit jednotlivé signály konkrétnímu konformeru.<sup>163</sup>

Obecná Karplusova rovnice pro výpočet interakční konstanty (**Rovnice 2**):

$${}^3J(HH) = A \cdot \cos^2(\phi) + B \cdot \cos(\phi) + C$$

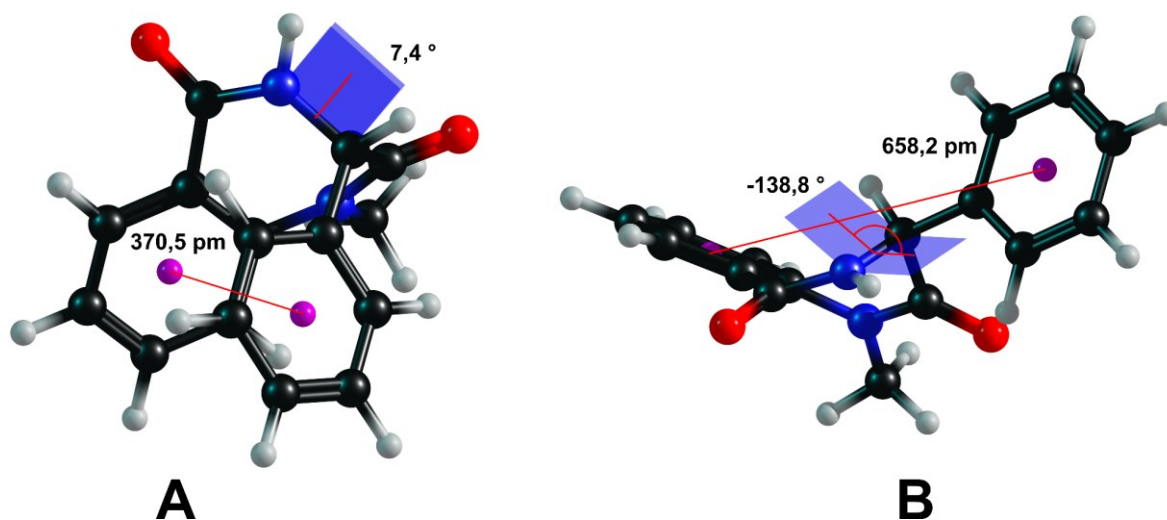
kde:

A, B, C .... empirické konstanty

$\phi$  .... dihedralní úhel

Přičemž platí vztah:  ${}^3J_{180} > {}^3J_0 \rightarrow J(trans) > J(cis)$

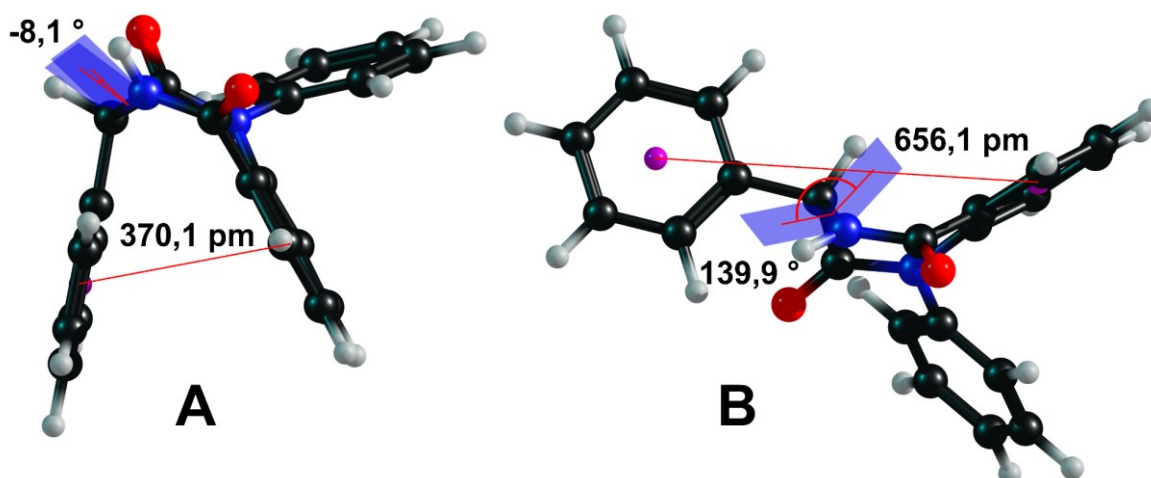
Dihedralní úhel obou analyzovaných derivátů byl zjištěn i pomocí počítačové modelace molekuly, která poskytla výsledky, jež byly v souladu s experimentálními daty získanými z NMR spektroskopie. Z těchto počítačových simulací bylo zjištěno, že by se měl derivát, obsahující v poloze 1 methylovou skupinu **14A**, vyskytovat ve dvou konformerech (**Obrázek 34**), jejichž uskupení H–C3–N4–H má dvě konfigurace. První konformer (**A**), svým tvarem připomínající misku či písmeno U, má vodíky skupiny C3-H a N4-H v *cis* konfiguraci se svírajícím úhlem o hodnotě 7,4°. Druhý z konformerů (**B**) má spíše planárnější tvar molekuly a vodíky skupin C3–H a N4–H jsou k sobě v *trans* konfiguraci s dihedralním úhlem -138,8°.



**Obrázek 34.** Počítačové modely konformerů derivátu **14A**.

Derivát **14B** mající v poloze 1 skupinu fenylovou taktéž existuje ve dvou konfiguracích. Jejich tvary jsou totožné jako u předchozího derivátu **14A**, jen úhly jsou malinko jiné. První z nich **14B-A** v konfiguraci *cis* má dihedralní úhel o hodnotě -8,1°

a druhý z nich **14B-B** v konfiguraci *trans* má hodnotu dihedrálního úhlu  $139,9^\circ$  (Obrázek 35).



Obrázek 35. Počítačové modely konformerů BDZ 14B.

Empirické konstanty figurující v **Rovnici 2** jsou konstantami teoretickými a je nutné si je dohledat v odborné literatuře. Pro výpočet interakční konstanty mezi uskupením H–C3–N4–H dostala rovnice po odvození Barfieldem a Gearhartem<sup>166,167</sup> následující podobu:

Výpočet interakční konstanty H–C3–N4–H pro amidy v *cis* konfiguraci (**Rovnice 3**):

$${}^3J(\text{HCNH}) = 12,06 \cdot \cos^2(\phi) - 4,48 \cdot \cos(\phi) + 0,01$$

v *trans* konfiguraci (**Rovnice 4**):

$${}^3J(\text{HCNH}) = 11,27 \cdot \cos^2(\phi) - 4,32 \cdot \cos(\phi) + 0,01$$

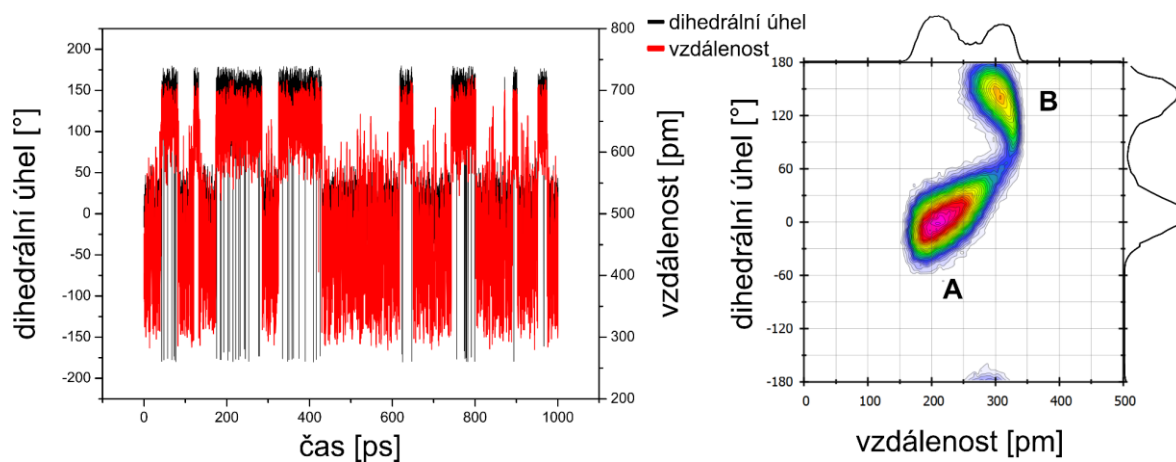
**Tabulka 2.** Srovnání teoretických (**Rov. 3 a 4**) a experimentálních interakčních konstant.

Substituent v poloze 1	$\phi$ [°]	${}^3J$ teoretická [Hz]	${}^3J$ experimentální [Hz]			
			$J(\text{d})$	$J(\text{d}')$	$J(\text{c})$	$J(\text{c}')$
Me ( <i>cis</i> ) 14A	7,4	7,43	6,84	4,83	7,63	5,65
Me ( <i>trans</i> ) 14A	-138,8	9,64				
Ph ( <i>cis</i> ) 14B	-8,1	7,40	7,68	5,91	8,27	6,7
Ph ( <i>trans</i> ) 14B	139,9	9,91				

Dle výše uvedených teoretických a vypočtených hodnot interakčních konstant v **Tabulce 2** a zároveň při platném vztahu  ${}^3J_{180} > {}^3J_0 \rightarrow J(\textit{trans}) > J(\textit{cis})$ , lze konstatovat, že signály nacházející se zpravidla vlevo s označením **d** a **c**, jsou signály konformeru, který má tyto dva atomy vodíku v konfiguraci *trans*. Signály označeny jako **d'** a **c'** pocházejí ze sloučeniny, jež má tyto dva atomy vodíku v poloze *cis*. Hodnota  $J(c)$  je zde označena světle šedou barvou, protože při bližším nahlédnutí do **Spektra 9** je možné se přesvědčit, že hodnotu interakční konstanty signálu **c'** lze jednoduše odečíst, naopak hodnotu interakční konstanty signálu **c** se dá pouze odhadnout a nelze ji považovat za zcela korektní. Nicméně i takto získaná data naznačují, že se jedná o signál sloučeniny mající opět výše zmíněné atomy vodíku v poloze 3 a 4 v konfiguraci *trans*.

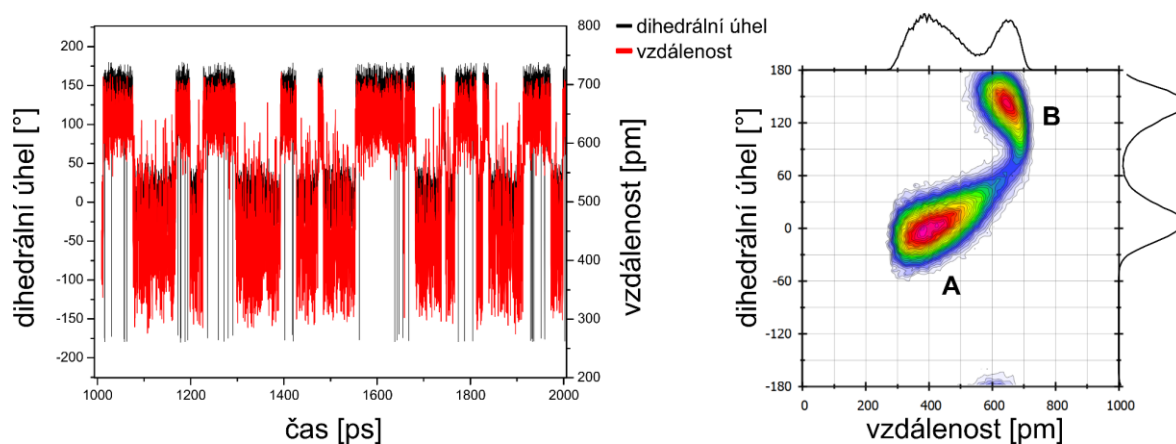
Pomocí počítačových simulací a experimentů byly získány pro oba deriváty BZD **14A** i **14B** průběhy jejich molekulové dynamiky v čase, což můžeme vidět vždy vlevo na **Obrázku 36** i **Obrázku 37**. Černá linie je záznamem změny dihedrálního úhlu mezi atomem vodíku v poloze 3 a 4 (**H–C3–N4–H**). Červená křivka naopak poukazuje na vzdálenost benzenového kruhu BZD a fenylového substituentu. Molekulová dynamika byla měřena celkově 5 ns, ovšem pro lepší znázornění je možné na **Obrázku 36** a **Obrázku 37** vidět pouze výřez od 1 do 2 ns. Pokud vzroste velikost mezi jádry, změní se tím i dihedrální úhel a naopak pokud dihedrální úhel má nižší hodnoty i jejich vzdálenost se sníží. Z těchto grafů je tedy možné dokonale pozorovat obě formy látky.

Naopak na grafech vpravo (**Obrázky 36** a **37**) je pozorovatelná distribuce, která na ose y vystihuje dihedrální úhel z molekulové dynamiky, který je zastoupen nejčastěji. Osou x je značena vzdálenost mezi jádry, kdy hodnoty jsou opět brány z molekulové dynamiky a značí hodnoty, jež jsou zastoupeny nejčastěji. U derivátu **14A** (**Obrázek 35**) lze pozorovat, že konformery nejsou zastoupeny v dokonalém poměru 1:1, což může být způsobeno časem měření molekulové dynamiky, neboť tyto dva konformery měly téměř totožné jejich energetické hladiny, což poukazuje na jejich rovnocennost.



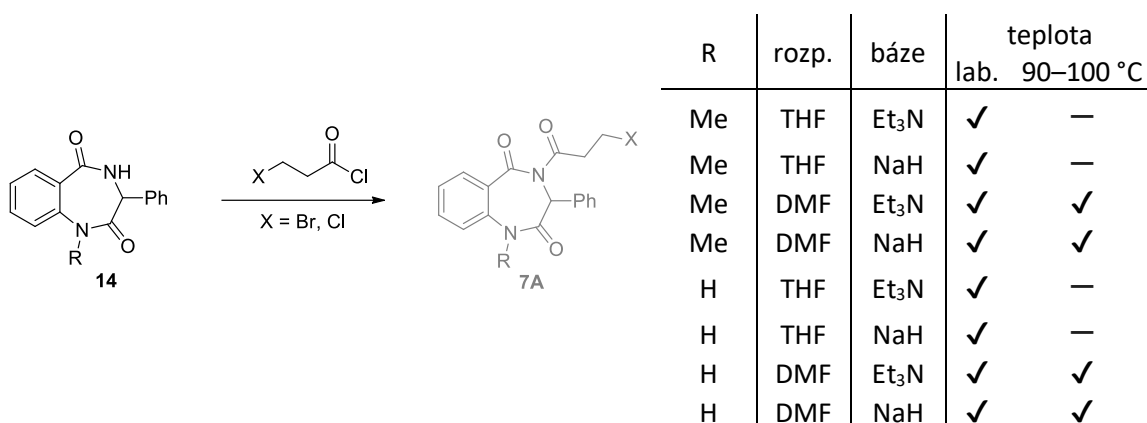
Obrázek 36. Molekulová dynamika sloučeniny 14A.

Na **Obrázku 37** patřící derivátu **14B**, vidíme téměř dokonale zastoupeny obě formy tohoto derivátu, které jsou v poměru 1:1. U tohoto derivátu rovněž odpovídá tento experiment i vypočítaným aktivačním energiím, které jsou u obou forem opět identické. Celkově grafy obou měřených derivátů ukazují, že jsou stavy zastoupeny rovnoměrně, což jasně odpovídá i NMR experimentu.



Obrázek 37. Molekulová dynamika derivátu 14B.

Po úspěšných syntézách sloučenin **14** a získání dostatečného množství těchto látek byla provedena série syntéz, které si kladly za cíl připojit 3-chlorpropanoylový řetězec k molekule BDZ (**Schéma 23**). K tomuto účelu byl používán jak komerčně zakoupený chlorid 3-brompropanové kyseliny, tak i jeho 3-chlorový analog, který byl připravený v laboratoři vařením kyseliny 3-chlorpropanové s thionylchloridem dle postupu uvedeným již v mé bakalářské práci.<sup>161</sup>



**Schéma 23.** Série provedených reakcí k navázání řetězce na BZD skelet.

Pro tyto požadované nukleofilní substituce bylo vyzkoušeno velké množství experimentů. V podstatě bylo pozorováno chování dvou derivátů BZD **14A** a **14B** s 3-halogenopropanoylchloridem v prostředích vzniklých z kombinací dvou rozpouštědel (THF a DMF) a dvou bází (Et<sub>3</sub>N a NaH). Jelikož ani po pětidenním míchání směsí při laboratorní teplotě nedocházelo k žádným změnám původního BZD **14**, byly reakční roztoky, v nichž byl jako rozpouštědlo použit DMF, zahřívány na teplotu udržovanou okolo 90–95 °C. Za těchto podmínek byla sice po 3 h výchozí látka zcela spotřebována, ovšem přeměnila se na složitou směs produktů.

Po provedení tolika neúspěšných reakcí jsme byli natolik zoufalí a vyčerpaní, že bylo již celkem snadné se smířit s myšlenou, že jsme cestu k vysněným benzo[*e*]pyrrolo[1,2-*a*][1,4]diazepin-3,5,11-trionům **8A** nenašli. Nicméně stále světlo na konci tunelu neuhasínalo. Zatím byly stále ve hře ještě jejich izomery, benzo[*e*]pyrrolo[1,2-*a*][1,4]diazepin-1,5,1-triony **10C**.

### 3.2.2 Syntetická cesta B

Druhá syntetická větev, která byla konstruována pro přípravu benzo[*e*]pyrrolo[1,2-*a*][1,4]diazepin-1,5,1-trionů **10C**, zahrnuje pět reakčních stupňů, jejichž výchozími látkami jsou opět 3-aminochinolin-2,4-diony **5**. Předpoklad byl takový, že v prvním kroku bude k derivátům **5** připojen 3-ethoxy-3-oxopropylový řetězec a poté budou získané sloučeniny **6C** intramolekulární reakcí převedeny na odpovídající BZD **7C**. Na závěr měla být, po hydrolyze esteru a chloraci karboxylové skupiny, směřována pozornost na cyklizaci postranního řetězce (**Schéma 24**).

Syntetická cesta B

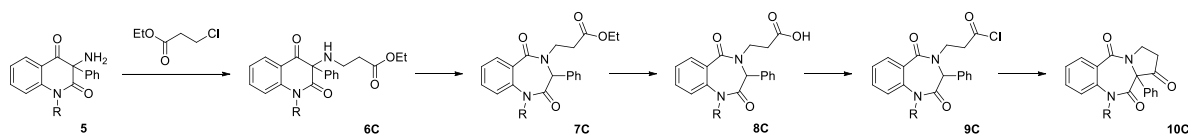
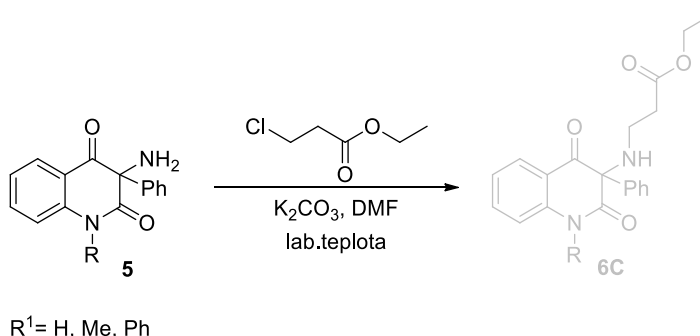


Schéma 24. Navržený plán – syntetická cesta B.

Cesta k látkám obsahujícím chinolindionový skelet s navázaným alifatickým řetězcem přes aminovou skupinu byla již dříve publikována v diplomové práci<sup>168</sup> Zuzany Máčalové. K dosažení jedné z této skupiny látek využívala levné a pohodlně dostupné reagenty, kterými byly 3-aminochinolindiony, primární alifatický halogenderivát, uhličitan draselný a DMF. K navázání požadovaného řetězce sice došlo, avšak reakce neposkytovala příliš vysoké výtěžky, proto bylo od této varianty v její práci upuštěno a dále pokračovala v opačném gardu, to znamená, že substituovala 3-chlorchinolindiony alifatickým primárním aminem. Tyto reakce sice vedly k lepším výsledkům, nicméně zadání mé DP vyžadovalo využívat jako výchozí látky 3-aminochinolindiony, a proto byly první experimenty v této syntetické strategii zaměřeny výhradně na možnosti optimalizace jejich reakce s ethylesterem kyseliny 3-chlorpropanové.

Práce na tomto tématu byly zahájeny sadou reakcí, díky kterým měl být k 3-aminochinolin-2,4-dionům **5** připojen 3-ethoxy-3-oxopropylový řetězec. Jelikož tyto reakce měly probíhat jako klasická nukleofilní substituce primárního halogenderivátu primárním aminem, byly zvoleny standardní osvědčené podmínky, to znamená, že byly ponechány reagovat roztoky 3-aminochinolin-2,4-dionu **5** v DMF s komerčním ethylesterem kyseliny 3-chlorpropanové v přítomnosti potaše (Schéma 26). Již samotný průběh reakce byl značně nestandardní, neboť se až po jednom dnu objevily v reakčním roztoku nějaké produkty. Všechna výchozí látka však byla spotřebována až po 3 dnech,

což je pro tento typ reakcí neobvykle dlouhá doba. S nasyceným primárním halogenderivátem tyto reakce probíhají v řádech několika hodin.



**Schéma 25.** Nukleofilní substituce 3-aminochinolindionu esterem halogenkyseliny.

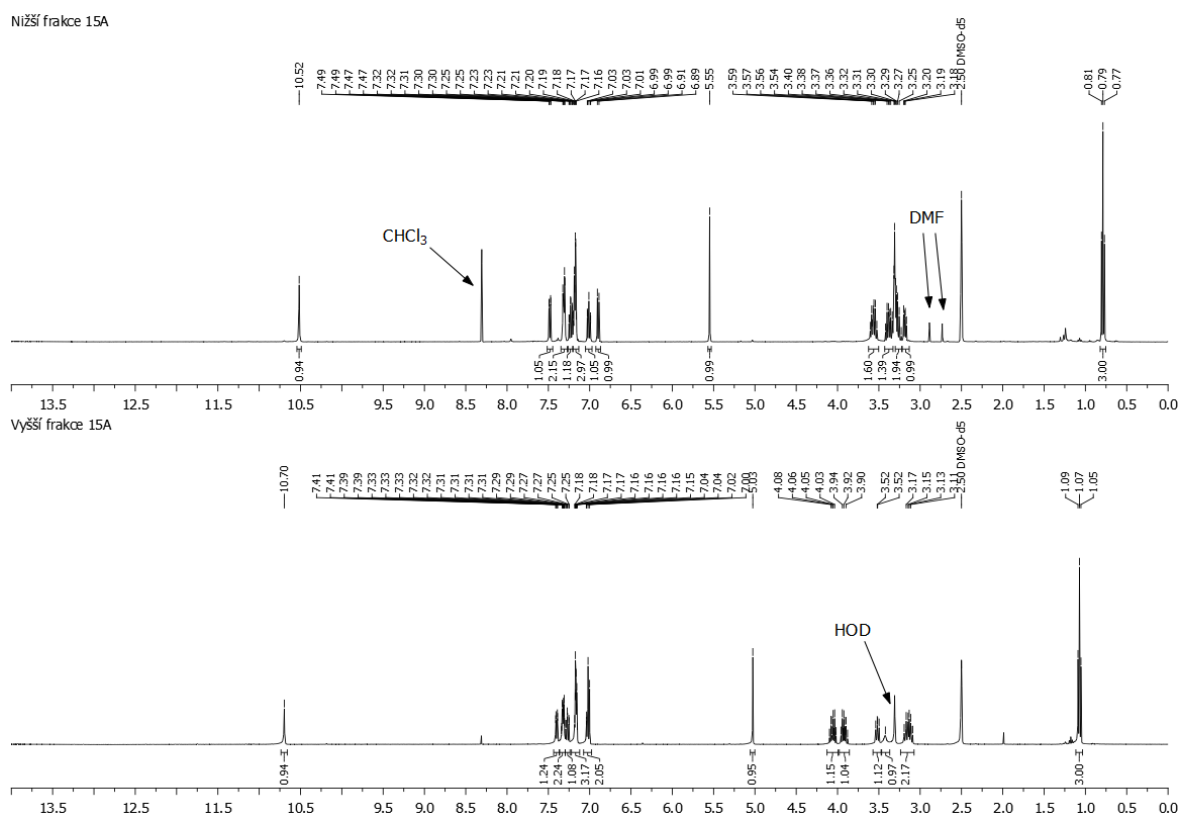
Při pokusech o optimalizaci reakce je vždy nutné sledovat závislost výtěžku na několika proměnných faktorech. Mezi ty nejdůležitější patří koncentrace a vzájemný poměr reagentů, doba jejich působení a teplota reakční směsi. První proměnou byl nezbytný nadbytek reagentů. Při hledání vhodných poměrů reakčních složek bylo zjištěno, že na 1 ekvivalent výchozí látky **5** je třeba použít 2 ekvivalenty nejen uhličitanu draselného, ale i esteru. Při použití menšího množství těchto látek nedocházelo k úplné přeměně výchozí látky, a naopak větší přebytek reakci, ve smyslu zkrácení reakční doby, nárůstu vedlejších látek, nijak neovlivňoval. Další důležitou podmínkou každé reakce je teplota. Z pokusů prováděných za zvýšené teploty se ukázalo, že při zvýšení teploty reakční směsi na 50 °C byla sice výchozí látka po 2 hodinách spotřebována, ale za cenu nárůstu velkého počtu produktů tvořící neoddělitelnou směs. Proto byly reakce dále prováděny za laboratorní teploty. Reakční doba byla sice delší, ovšem produkty vznikaly pouze dva.

Separace produktů na sloupci silikagelu s mobilní fází složenou ze směsi CHCl<sub>3</sub>/EtOAc (7/3; v/v) nebo PE/EtOAc (1/1; v/v) byla ve všech případech úspěšná. Po NMR analýze všech šesti produktů (dva produkty z jednoho výchozího aminu **5**) a po nahlédnutí do jejich <sup>1</sup>H NMR spekter (**Spektrum 11**) bylo jasno, že ani jeden z nich není požadovaný derivát **6C**.

Pro jeho nejvíce přehledné spektrum byl prvním zkoumaným vzorkem jeden z produktů reakce 3-amino-3-fenylchinolin-2,4-dionu (**5**). V části spektra, kde se vyskytují signály protonů alifatických částí molekuly, se nachází určité nesrovnalosti, a to konkrétně v celkovém součtu hodnot integrálních ploch signálů vyjadřující počet atomů vodíku připojovaného řetězce - z původně desíti očekávaných atomů vodíku jich bylo



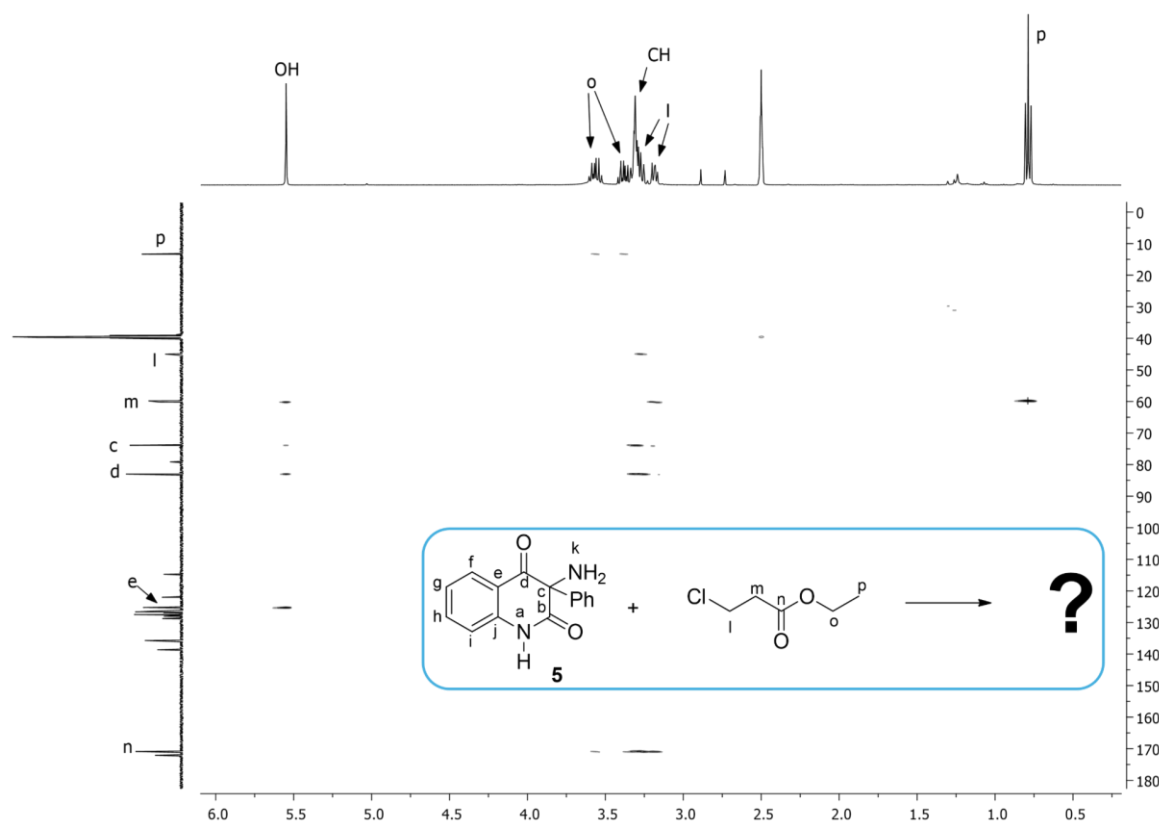
zastoupeno pouze devět. Dalším zarážejícím zjištěním byla přítomnost singletu s chemickým posunem okolo 5,5 ppm, který je taktéž netypickým pro požadované deriváty. Díky tomuto signálu však začala panovat představa, že se jedná o derivát BDZ, protože pro tyto sloučeniny je ostrý singlet s chemickým posunem blízkým 5 ppm náležící atomu vodíku diazepinového kruhu v poloze 3 charakteristickým rysem. Po srovnání NMR spektra se spektrem druhého produktu z diskutované reakce (**Spektrum 11**), pracovně nazvaných jako látky nižší a vyšší frakce, byly pozorovány jen malé změny v chemickém posunu singletu při 5 ppm a dále drobné změny v multiplicitě hlavně v alifatické části spektra.



**Spektrum 11.** <sup>1</sup>H NMR spektrum získané nižší a vyšší frakce z reakce 3-amino-3-fenylchinolin-2,4-dionu (**5**).

Po zběžném rozboru uhlíkových NMR spekter <sup>13</sup>C (**Příloha I**) a DEPT-135 byly nalezeny nesporné důkazy, že nedržíme v ruce očekávaný 3-(3-ethoxy-3-oxopropyl)amino)chinolin-2,4-dion **6C** ani předpokládaný 4-(3-ethoxy-3-oxopropyl)benzo[*e*][1,4]diazepin-2,5-dion **7C**. Obě tyto sloučeniny, by musely mít ve spektru 3 oxoskupiny i 3 methylenové skupiny, ovšem spektrum bylo o jeden signál z každé jmenované skupiny chudší. Bylo tedy nutné přistoupit k 2D NMR analýzám.

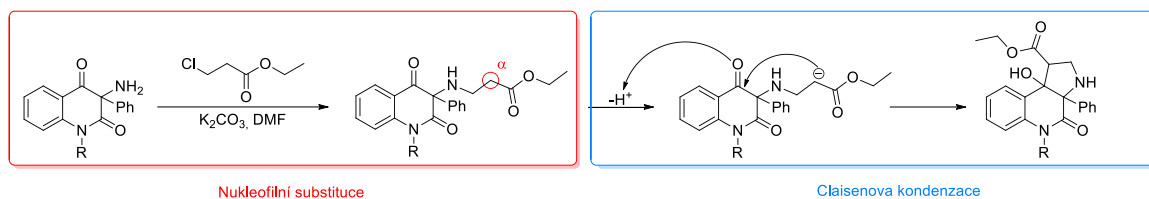
Z  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$  HSQC spektra nižší frakce byla zjištěna jedna důležitá informace, kterou byla skutečnost, že singlet s chemickým posunem okolo 5,5 ppm nevykazuje přímou, jednovazebnou korelaci s žádným atomem uhlíku v molekule, z čehož vyplývá, že se velmi pravděpodobně jedná signál protonu hydroxylové nebo aminové skupiny.



**Spektrum 12.** Výřez z HMBC spektra nižší frakce.

Dále se pak v  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$  HMBC spektru ukázalo, že tento singlet nevykazuje žádnou vícevazebnou korelaci s atomy uhlíku dvou přítomných karbonylů, což vypovídalo o jejich větší vzájemné vzdálenosti (**Spektrum 12**). Oproti tomu, se v průběhu detailního luštění spekter postupně začalo zjišťovat, že tento signál má tři silné korelace se dvěma kvarterními atomy uhlíku chinolinového skeletu (označené **d**, **e**) a s jedním z navázaného řetězce (označený **m**). Z 1D NMR spekter bylo nezpochybnitelné, že analyzovaná sloučenina obsahuje chinolinový skelet s připojeným řetězcem v pozměněné podobě. Z komplexních indicií poskytnutých 2D NMR spektry se zrodila myšlenka, že singlet při 5,55 ppm pochází z hydroxylové skupiny vázané k atomu uhlíku heterocyklu v poloze 4, která vznikla vlivem

tandemové, intramolekulární, cyklizační adice postranního řetězce esteru na původně přítomnou oxoskupinu v poloze 4 (**Schéma 28**).

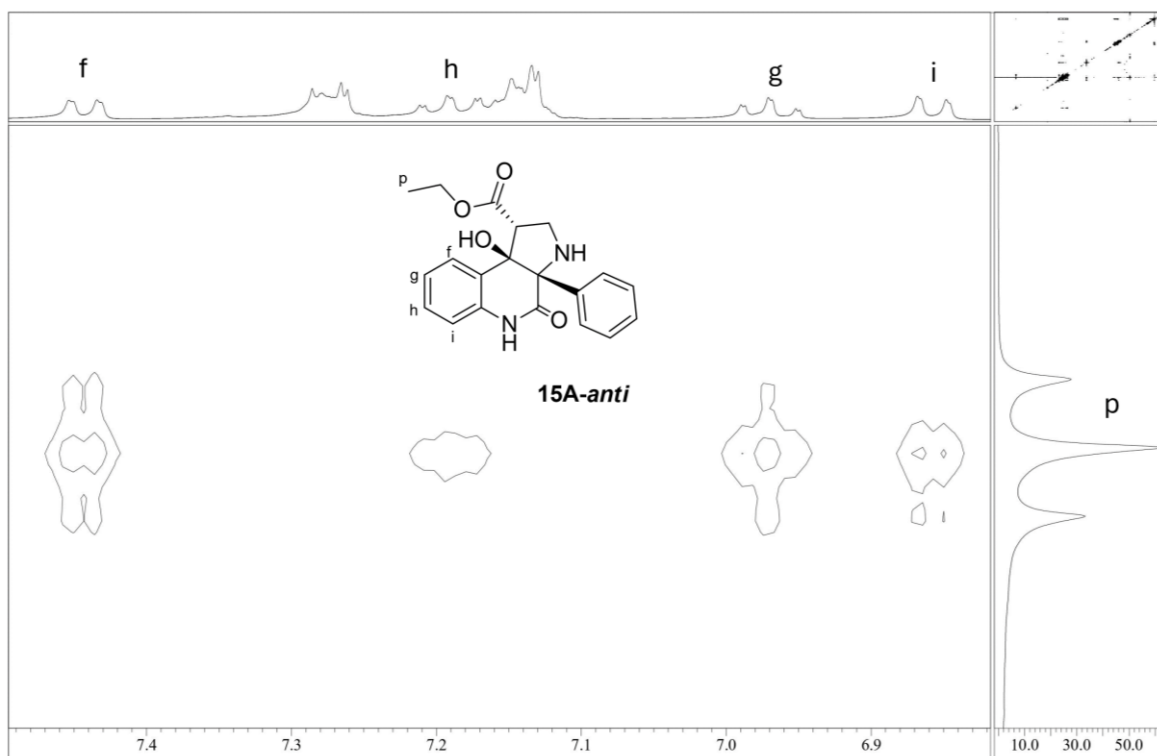


**Schéma 26.** Nukleofilní substituce s následnou Claisenovou kondenzací.

Jelikož oba produkty (vyšší a nižší frakce) izolované z komentované reakce měly stejnou hodnotu *m/z* svého molekulového iontu současně svá NMR spektra zcela analogická (pouze drobné rozdíly v chemických posunech jednotlivých signálů), bylo absolutně jasné, že se nám podařilo separovat dva diastereomery téže látky **15A**. K tomu, aby bylo možné se pokusit o určení konfigurace alespoň některého ze tří chirálních uhlíků a získané sloučeniny ještě blíže specifikovat, byla změřena jejich <sup>1</sup>H-<sup>1</sup>H ROESY spektra, která jsou obecně využívána k hledání ne vazebných interakcí mezi jádry atomů vodíku, které si jsou v prostoru blízké.

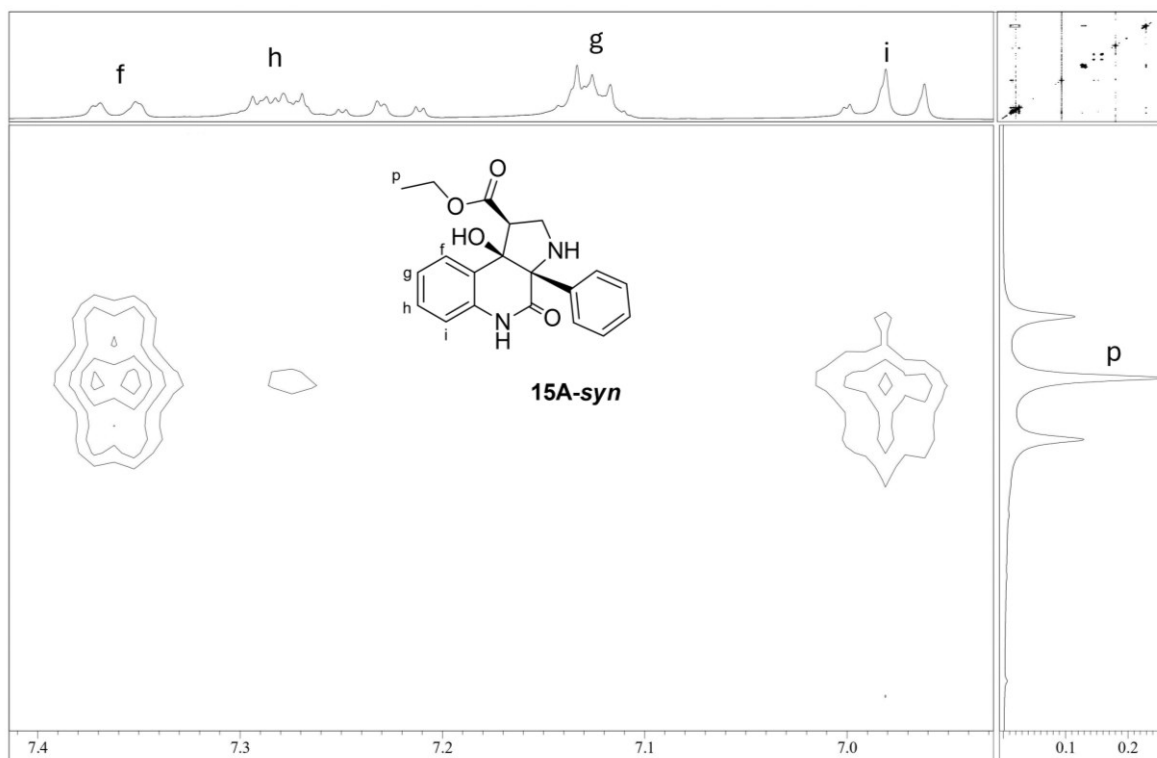
Na níže přiloženém výřezu <sup>1</sup>H-<sup>1</sup>H ROESY spektra (**Spektrum 13**) nižší frakce **15A** je možné pozorovat interakce protonů methylové skupiny **p** s atomy vodíku v poloze **f**, **g** a **i**.

Malou interakci můžeme pozorovat i s atomem vodíku **h**. Napovídá to tedy o tom, že ethylesterové uskupení je s hydroxylovou skupinou v konfiguraci *anti*.



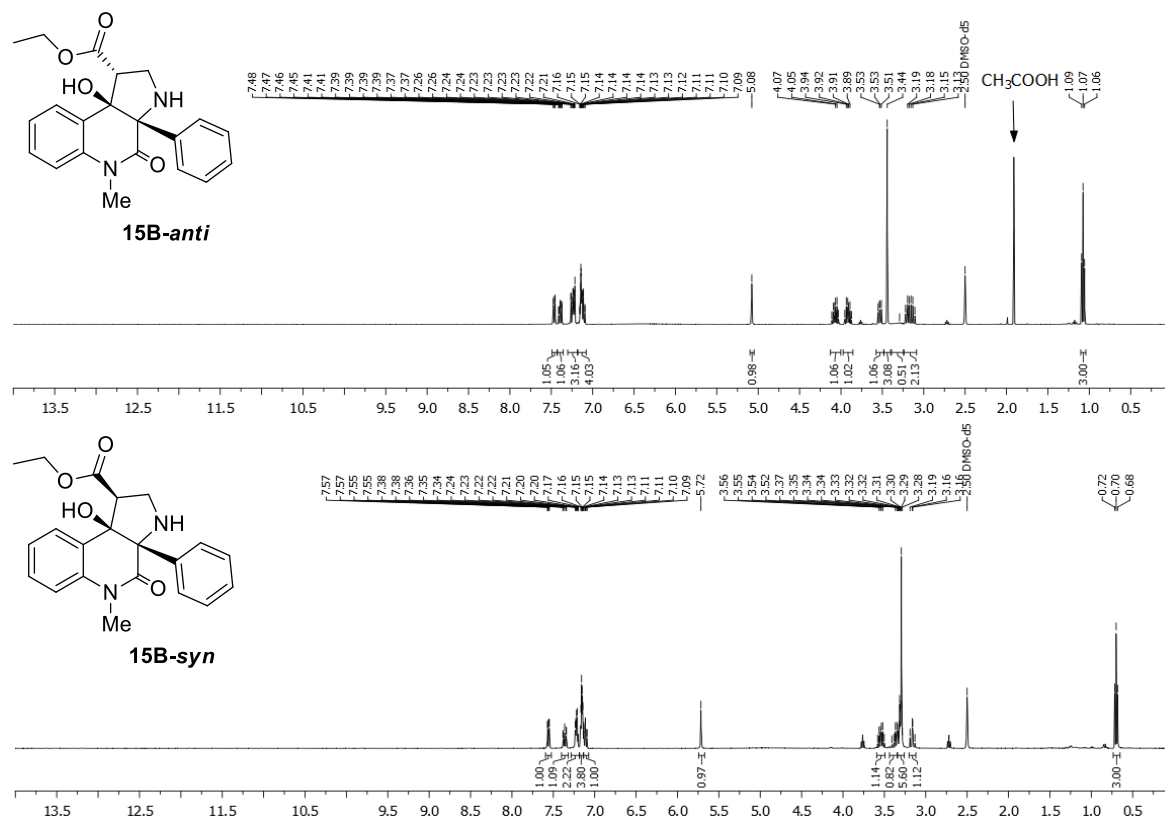
**Spektrum 13.** Výřez ROESY spektra nižší frakce.

Oproti tomu na **Spektru 14** vidíme ROESY spektrum vyšší frakce, kde jsou pozorovány korelace protonů methylové skupiny **p** pouze s vodíkovými jádry **f** a **i**. I zde, stejně jak ve spektru nižší frakce, se objevuje malá korelace s vodíkem **h**. Absence korelace s atomem vodíku **g**, nás přesvědčila, že tento stereoizomer má hydroxylovou skupinu s ethylesterovým uskupením v konfiguraci *syn*.



**Spektrum 14.** Výřez ROESY spektra vyšší frakce.

Kompletní ESI-MS a NMR analýzou ( $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$ , DEPT, COSY, HSQC, HMBC, ROESY), jež byly provedeny i u obou získaných *N*-methylových derivátů **15B**, bylo potvrzeno, že se taktéž jedná o dva geometrické izomery (**Spektrum 15**). Obdobně jako v předešlém případě, při separaci směsi těchto dvou diastereomerů sloupcovou chromatografií, byl první z kolony eluován produkt s konfigurací *anti* (nižší frakce) a jako druhý produkt s konfigurací *syn* (vyšší frakce).



Spektrum 15  $^1\text{H}$  NMR spektra diastereomerů pyrrolochinolinonu **15B**.

Je zcela nepopíratelné, že činit obecné závěry ze dvou provedených reakcí je ukvapené, nicméně ze získaných izolovaných výtěžků jednotlivých izomerů je možné zaznamenat jistý trend. Vždy bylo, v případech sloučenin **15A** i **15B**, produktu s konfigurací *syn* izolováno větší množství, než produktu s konfigurací *anti* (Schéma 29). Je předpokládáno, že důležitou roli při vzniku rozdílného množství daných izomerů hraje velikost prostoru v okolí reakčních center na atomech uhlíku **m** a **d**. Nejspíše je tomu tak, že při vzniku *syn*-produktů je atom uhlíku **m** při výstavbě pyrrolového kruhu Claisenovou kondenzací méně stericky bráněn než v případě produktů s konfigurací *trans*.

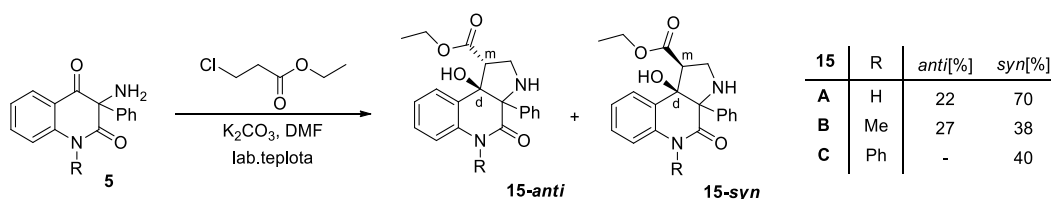
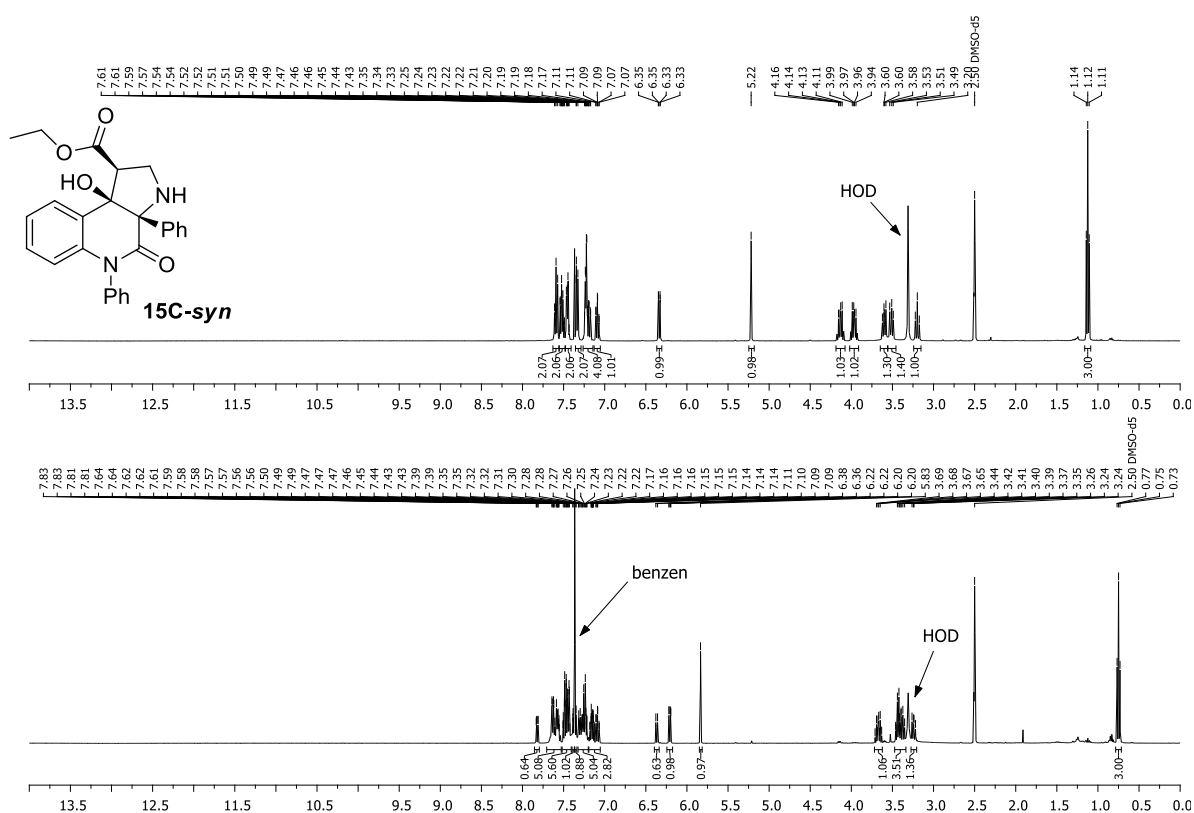


Schéma 27. Nukleofilní substituce neočekávaného spádu.

Výjimkou je však derivát **15C**, který byl v poloze 1 substituován fenylem. U tohoto derivátu byly taktéž získány dvě frakce. U první z nich jsou korelace a strukturní informace získané z 1D i 2D spekter totožné jako u **15A-syn** a **15B-syn**.

U druhé frakce bylo zářející již protonové spektrum, neboť je v aromatické části reprezentováno daleko větší množství atomů vodíku, jak bylo očekáváno. V ideálním případě by se v této oblasti mělo nacházet 14 protonů, zde se jich však nachází téměř dvojnásobek a to 25. Alifatická část spektra je však totožná se spektrem první látky **15C**, proto je vyloučeno, že se by se mohlo jednat o směs dvou látek (**Spektrum 16**).



**Spektrum 16** <sup>1</sup>H NMR spektra derivátu **15C-syn** a nižší frakce neznámého složení.

Bylo taktéž změřeno <sup>13</sup>C NMR spektrum, které ukázalo, že tato látka obsahuje ketonickou oxoskupinu, neboť se ve spektru nachází signál uhlíku s chemickým posunem okolo 190 ppm a taktéž další dva atomy uhlíku ( $\delta = 171,37$  ppm a  $171,64$  ppm), jež mohou být součástí esterových nebo amidových oxoskupin. Z ostatních případů již víme, že oxoskupina v poloze 4 chinolin-2,4-dionu a 3-ethoxy-3-oxopropylový řetězec spolu reagují. O tom, že se jedná o produkt Claisenovy kondenzace nasvědčoval i singlet s chemickým posunem 5,83 ppm, který byl pro hydroxylovou skupinu v poloze 4 typický.

Na základě poměru integrálních ploch signálů protonů aromatických a signálů protonů alifatických částí molekuly panovala domněnka, že tento produkt vznikl reakcí primárního 3-aminochinolin-2,4-dionu **5** s přechodně vznikajícím esterem **6C** (Schéma 28).

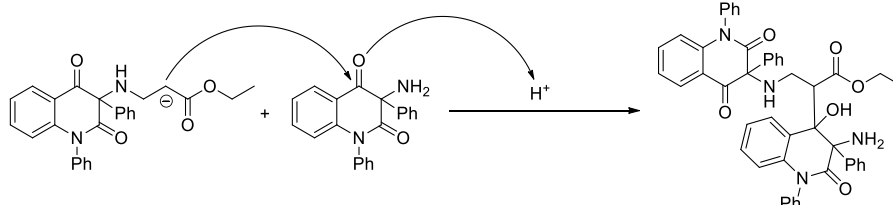


Schéma 28. Návrh vzniku struktury dle NMR.

Místo toho, aby výsledky z měření vzorku na ESI-MS návrh možného produktu utvrdily, vnesly do problematiky pouze otazník. Bylo zjištěno, že molekulový ion má 856 m/z, což by přesně odpovídalo dimeru látky **6C**. Bylo-li by tomu tak, byla jeho produkce zapříčiněna intermolekulární Claisenovou kondenzací nestabilních intermediátů **6C**. (Schéma 29).

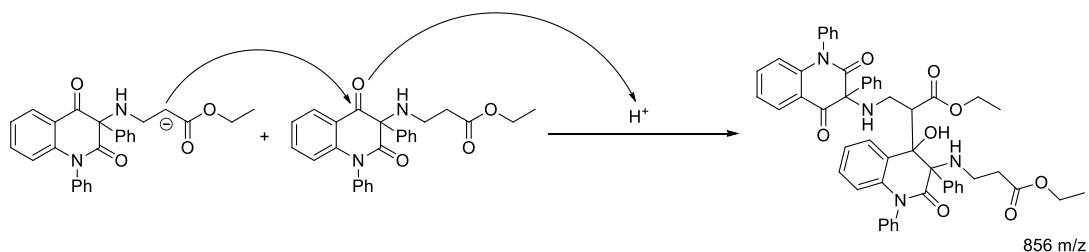


Schéma 29. Návrh vzniku struktury dle ESI-MS.



## 4 CHARAKTERIZACE PŘÍSTROJOVÉHO VYBAVENÍ A INSTRUMENTÁLNÍCH METOD

Rozpouštědla a činidla použité pro přípravu produktů byla zakoupena z komerčních zdrojů Merck, VWR, Fisher Scientific a Siot Trade.

Průběh všech reakcí a čistota následných produktů byla sledována pomocí tenkovrstvé chromatografie (TLC) na silikagelu naneseném na hliníkovém plechu (Alugram® SIL G/UV 254; 220–240 mesh; Macherey-Nagel) s fluorescenčním indikátorem pro UV 245 nm. Pro kapalinovou sloupcovou chromatografii byl používán Fluka Silica gel 60, 220–240 mesh s velikostí pórů 60 Å a velikostí částic 35–75 μm.

Teploty tání byly stanoveny na Koflerově bloku (Helmut Hund GmbH, Wetzlar) a nebyly korigovány. Infračervená spektra byla měřena spektrometrem FT-IR Alpha (Bruker optic, GmbH Ettlingen, Germany) metodou KBr tablet.

NMR spektra byla měřena pomocí spektrometru JEOL ECZ 400 při frekvenci 400 MHz ( $^1\text{H}$ ) a 101 MHz ( $^{13}\text{C}$ ). Měření byla prováděna při teplotě 300 K, pokud nebylo přistoupeno k analýzám vyžadující vyšší teplotu.  $^1\text{H}$  NMR spektra byla kalibrována na residuální  $\text{CHCl}_3$  o chemickém posunu 7,26 ppm či  $\text{DMSO-}d_5$  s chemickým posunem 2,50 ppm.  $^{13}\text{C}$  NMR spektra byla kalibrována na signál  $^{13}\text{C}$   $\text{CDCl}_3$  s chemickým posunem 77,16 ppm nebo  $^{13}\text{C}$  signál  $\text{DMSO-}d_6$  o chemickém posunu 39,52 ppm. Měření 2D ROESY NMR spekter bylo prováděno za následujících parametrů: spinlock strength 3 Hz; mixing time 500 ms; počet skenů 1; teplota 303,15 K; offset 4,66 ppm/69 dB. Chemické posuny jsou uváděny v jednotkách ppm. Interakční konstanty  $J$  jsou uváděny v jednotkách Hz. Multiplicita signálů je značena zkratkami s (singlet), d (doublet), dd (doublet dubletu), ddd (doublet dubletu dubletů), t (triplet), m (multiplet).

ESI-MS experimenty byly prováděny na hmotnostním spektrometru s iontovou pastí amaZon X (Bruker Daltonics) za použití elektrospreje jako iontového zdroje. Měření byla prováděna v pozitivním skenovacím módu. Do iontového zdroje byly vzorky přiváděny v podobě roztoku kovovou kapilárou při konstantním průtoku  $3 \mu\text{l}\cdot\text{min}^{-1}$ . Ostatní parametry byly následující: koncentrace  $0,5 \text{ mg}\cdot\text{ml}^{-1}$ , rozpouštědlo  $\text{MeOH}/\text{H}_2\text{O}$  (1/1, v/v), napětí na kapiláře -4,2 kV, napětí na konci kapiláry 140 V, teplota sušícího plynu  $220 \text{ }^\circ\text{C}$ , průtok sušícího plynu  $6 \text{ dm}^3\cdot\text{min}^{-1}$ , tlak rozprašovacího plynu 55,16 kPa. Jako sušící a rozprašovací plyn byl použit dusík. Tandemová hmotnostní spektra byla, po izolaci vybraného iontu,

měřena za pomoci kolizně indukované disociace (CID), přičemž jako kolizní plyn bylo použito helium.

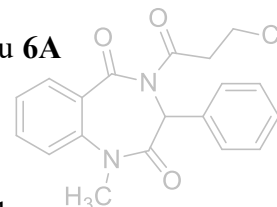
Chromatogramy byly získány z plynového chromatografu spojeného s kvadrupólovým hmotnostním detektorem (GS-MS) Shimadzu GSMS-QP2010 s kolonou Supelco (30 m × 0,32 mm × 0,25 μm). Pro všechny provedené analýzy byl zvolen teplotní program: 50 °C/7 min; 25 °C/min a teplotou nástřiku 250 °C. Nosným plynem bylo helium, iontový zdroj 200 °C, 70 eV. Analýzy byly prováděny za lineární konstantní rychlosti 5000 m/z·s<sup>-1</sup>. Ve výpisu signálů z hmotnostních spekter jsou uváděny hodnoty iontů s relativním zastoupením nejméně 10 % s výjimkou molekulových iontů. V závorkách za hodnotou m/z jsou uvedeny hodnoty intenzit jednotlivých fragmentů.

Modely látek xy, yy byly vytvořeny pomocí semiempirické kvantové mechaniky (xTB-GFN2). Nejstabilnější konformery byly vyhledány pomocí metody "minima-hopping" v implicitním prostředí DMSO. Pro všechny geometrie byly vypočítány vibrační frekvence a žádné imaginární frekvence nebyly pozorovány. Po započítání termostatické korekce a entropie byly určeny volné energie všech konformerů. Cis a trans konformery látek xx a yy byly na srovnatelné energetické hladině pro R i S stereoizomery. Molekulová metadynamika látek xx a yy byla provedena na úrovni semiempirické kvantové mechaniky (xTB-GFN2) s použitím RMSD jako kolektivní proměnné pro všechny atomy. Simulace probíhala po dobu 5 ns v implicitním prostředí DMSO za 298 K a jako startovní geometrie byl použit trans konformer. Trajektorie byla vyhodnocena pomocí softwaru Travis.

## 5 POPIS SYNTETICKÝCH POSTUPŮ S CHARAKTERIZACÍ PŘIPRAVENÝCH SLOUČENIN

### 5.1 Příprava benzodiazepin-2,5-dionu z derivátu chinolindionu 6A

Ke směsi výchozího 3-(3-chlorpropanamido)chinolin-2,4-dionu **6A** (0,5 mmol, 1 ekv.) ve 20 ml ethanolu byl během minuty přikapán roztok TMG (1 mmol, 2 ekv.) ve 2 ml ethanolu. Výchozí látka nebyla dokonale rozpuštěna a vytvářela jemnou suspenzi, která byla dále míchána při laboratorní teplotě. Po 26 h byla reakce zpracována, kdy v reakci byla přítomna nezreagovaná výchozí látka **6A** a produkt **6B**. Reakční směs byla zfiltrována za regenerace výchozí látky. Matečný louh byl odpařen za získání produktu **6B**.



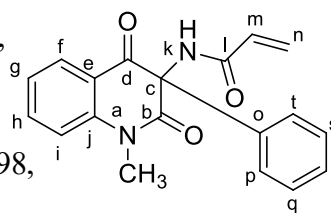
### 3-(3-Akrylamido)-3-fenyl-1-methylchinolin-2,4(1H,3H)-dion 6B

Bílá krystalická látka: výtěžek 40 %,  $t_f = 237\text{--}242\text{ }^\circ\text{C}$  (EtOH),

$R_f = 0,25$  (9/1  $\text{CHCl}_3/\text{EtOH}$ ).

IČ spektrum (tableta KBr),  $\text{cm}^{-1}$ : 3220, 2992, 2896, 1673, 1598,

1524, 1470, 1352, 1239, 987, 774, 701, 649, 522, 442.

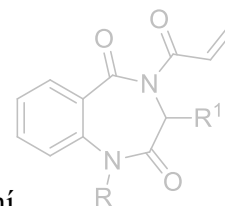


$^1\text{H}$  NMR spektrum (DMSO, 400 MHz), ppm  $\delta$  3,53 (s, 3H,  $-\text{CH}_3$ ); 5,69 (dd, 1H, H-n,  $J = 10,3; 2,0$  Hz); 6,08 (dd, 1H, H-n,  $J = 17,2; 2,0$  Hz); 6,51 (dd, 1H, H-m,  $J = 17,2; 10,3$  Hz); 7,20 (t, 1H, H-g,  $J = 7,5$  Hz); 7,32–7,35 (m, 2H, H-p, H-t); 7,37–7,41 (m, 3H, H-q, H-r, H-s); 7,42 (d, 1H, H-i,  $J = 8,3$  Hz); 7,70–7,74 (m, 1H, H-h); 7,83 (dd, 1H, H-f,  $J = 7,7; 1,5$  Hz); 9,52 (s, 1H,  $-\text{NH-k}$ ).

$^{13}\text{C}$  NMR spektrum (DMSO, 101 MHz), ppm:  $\delta$  30,12 ( $-\text{CH}_3$ ); 71,51 (C-n); 115,85 (C-i); 119,92 (C-e); 123,06 (C-g); 126,94 (C-n); 127,29 (C-p, C-t); 127,73 (C-f); 129,05 (C-q, C-s); 129,33 (C-r), 129,92 (C-m); 133,13 (C-o); 136,36 (C-h); 142,13 (C-j); 164,84 (C-b); 169,13 (C-l); 189,85 (C-d).

## 5.2 Příprava benzodiazepin-2,5-dionů z derivátů chinolin-2,4(1*H*,4*H*)-dionů 6B

K roztokům 3-(3-akrylamino)chinolin-2,4-dionu (0,25 mmol, 1 ekv.) v 0,5 ml DMF byl přisypán NaH (0,25 mmol, 1 ekv.). Vznikl roztok žluté barvy, který byl po dobu 1,5 h míchán při laboratorní teplotě. Po uplynutí doby však nedošlo dle TLC k žádné změně a v roztoku byla stále přítomna pouze výchozí látka. Proto byl přidán ještě 1 ekv. NaH. Když ani po 3 dnech míchání nedošlo k žádné změně, bylo přistoupeno k zahřívání na olejové lázni vytemperované na teplotu 65–70 °C. Již po 30 minutách zahřívání se objevil produkt. Reakční směs byla následně promíchána s 10 ml destilované vody a následně vytřepána 3 × 10 ml CHCl<sub>3</sub>. Organické podíly byla spojeny, vysušeny Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, přefiltrovány za atmosférického tlaku a odpařeny na RVO (teplota vodní lázně 30 °C). Získána byla neidentifikovatelná směs několika látek.



## 5.3 Syntéza 1*H*-benzo[*e*][1,4]diazepin-2,5-dionů 14

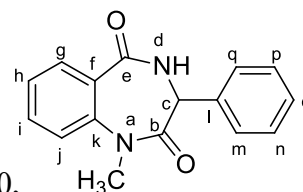
K roztokům 3-aminochinolin-2,4-dionu **5** (2 mmol, 1 ekv.) v 10 ml ethanolu byl během 1 minuty přikapán roztok TMG (4 mmol, 2 ekv.) ve 3 ml ethanolu, čímž došlo k okamžité vizuální změně z původně bezbarvého roztoku na žlutý. Reakční směsi byly míchány na olejové lázni temperované na teplotu 80–85 °C. Reakce byly monitorovány pomocí TLC. Po ukončení 5 hodinového varu a samovolném ochlazení reakčních směsí byly produkty **14** izolovány spontánní krystalizací.

### 3-Fenyl-1-methyl-3,4-dihydro-1*H*-benzo[*e*][1,4]diazepin-2,5-dion 14A

Fialová krystalická látka: výtěžek 79 %,  $t_f = 195\text{--}197\text{ }^\circ\text{C}$  (EtOH),  $R_f = 0,21$  (7/3 CHCl<sub>3</sub>/EtOAc).

IČ spektrum (tableta KBr), cm<sup>-1</sup>: 3156, 3013, 2886, 1644, 1460, 1389, 1093, 870, 755, 690, 537.

<sup>1</sup>H NMR spektrum (DMSO, 400 MHz, 363,15 K), ppm:  $\delta$  3,39 (s, 3H, –CH<sub>3</sub>); 5,11 (dd, 1H, H-c,  $J = 3,5$  Hz); 7,19 (s, 7H, H-h, H-j, H-m, H-n, H-o, H-p, H-q); 7,44 (s, 1H, H-i); 7,60 (s, 1H, H-g); 8,78 (s, 1H, NH-d).



$^{13}\text{C}$  NMR spektrum (DMSO, 101 MHz, 363,15 K), ppm:  $\delta$  35,03 ( $-\text{CH}_3$ ); 58,33 (C-c); 121,27 (C-j); 124,51 (C-m, C-q); 127,01 (C-h); 127,48 (C-n, C-p, C-o); 128,35 (C-f); 129,06 (C-g); 131,50 (C-i); 134,38 (C-l); 139,96 (C-k); 167,16 (C-e), 169,67 (C-b).

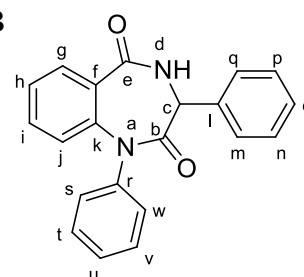
GC-MS ( $R_t = 25,145$  min.),  $m/z$  (%): 50(18), 51(42), 52(11), 63(22), 64(19), 76(16), 77(85), 78(51), 79(20), 90(19), 92(12), 104(100), 105(81), 106(62), 132(21), 133(50), 134(22), 161(60), 266,10(21).

ESI<sup>+</sup>:  $[\text{M}+\text{H}^+]^+ = 267$  m/z.

### 1,3-Difenyl-3,4-dihydro-1*H*-benzo[*e*][1,4]diazepin-2,5-dion 14B

Oranžová krystalická látka: výtěžek 54 %,  $t_t = 219\text{--}223$  °C (EtOH),  $R_f = 0,24$  (5/3 PE/EtOAc).

Ī spektrum (tableta KBr),  $\text{cm}^{-1}$ : 3348, 3027, 2921, 1645, 1447, 1374, 1239, 759, 693, 545, 516.



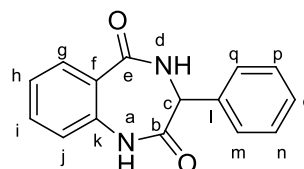
$^1\text{H}$  NMR spektrum (DMSO, 400 MHz, 363,15 K), ppm:  $\delta$  5,27 (d, 1H, H-c,  $J = 7,1$  Hz); 6,65 (s, 1H, H-j); 7,26 (d, 7H, H-h, H-i, H-m, H-n, H-o, H-p, H-q,  $J = 7,4$  Hz); 7,37 (dd, 3H, H-t, H-u, H-v,  $J = 10,5; 4,3$  Hz); 7,47 (t, 2H, H-s, H-w,  $J = 7,6$  Hz); 7,70 (s, 1H, H-g); 8,90 (s, 1H, NH-d).

$^{13}\text{C}$  NMR spektrum (DMSO, 101 MHz, 363,15 K), ppm: 58,53 (C-c); 123,92 (C-j); 124,87 (C-h); 126,98 (C-o); 127,17 (C-m, C-q); 127,58 (C-s, C-w); 128,00 (C-n, C-p); 128,83 (C-t, C-v, C-u); 128,99 (C-g); 129,24 (C-f); 131,30 (C-i); 133,98 (C-l); 139,58 (C-k); 141,07 (C-r); 167,10 (C-e), 168,62 (C-b).

ESI<sup>+</sup>:  $[\text{M}+\text{H}^+]^+ = 329$  m/z.

### 3-Fenyl-3,4-dihydro-1*H*-benzo[*e*][1,4]diazepin-2,5-dion 14C

Bílá krystalická látka: výtěžek 65 %,  $t_t = 246\text{--}248$  °C (EtOH),  $R_f = 0,26$  (9/1  $\text{CHCl}_3/\text{EtOH}$ ).



Ī spektrum (tableta KBr),  $\text{cm}^{-1}$ : 3137, 3059, 1651, 1440, 1401, 1255, 751, 693, 530.

$^1\text{H}$  NMR spektrum (DMSO, 400 MHz), ppm:  $\delta$  5,00 (d, 1H, H-c,  $J = 7,1$  Hz); 7,01 (d, 1H, H-j,  $J = 8,1$  Hz); 7,08 (t, 1H, H-h,  $J = 7,5$  Hz); 7,19–7,25 (m, 5H, H-m, H-m, H-o, H-p, H-q);

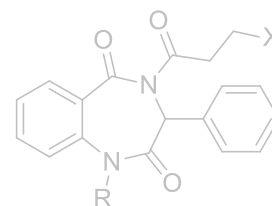
7,38 (td, 1H, H-i,  $J = 7,9; 1,0$  Hz); 7,66 (dd, 1H, H-g,  $J = 7,8; 1,2$  Hz); 8,89 (dd, 1H, NH-d,  $J = 7,0$  Hz); 10,57 (s, 1H, NH-a).

$^{13}\text{C}$  NMR spektrum (DMSO, 101 MHz), ppm:  $\delta$  57,99 (C-c); 120,55 (C-j); 123,72 (C-h); 125,96 (C-m, C-q); 126,69 (C-f); 127,64 (C-o); 128,12 (C-n, C-p); 130,30 (C-g); 132,21 (C-i); 134,61 (C-l); 136,19 (C-k), 167,77 (C-e); 171,04 (C-b).

#### 5.4 Pokusy o připojení 3-halogenpropanoylového řetězce k BZD

##### Metoda A

K míchaným roztokům výchozích BZD **14** (1 mmol, 1 ekv.) ve 12,5 ml bezvodého THF byl za laboratorní teploty přidán  $\text{Et}_3\text{N}$  (1,5 mmol, 1,5 ekv.) a po krátkém čase i roztok 3-halogenpropanoylchloridu (1,5 mmol, 1,5 ekv.) ve 2,5 ml THF. Ihned po přidání se v reakčních směsích objevoval bílý dým. Reakční roztoky byly míchány po dobu 5 dnů za laboratorní teploty a monitorovány pomocí TLC. Ani po tak dlouhé době se v reakčních roztocích neobjevila žádná známka vznikajících produktů. Proto byly reakce ukončeny za zpětných zisků výchozích látek **14**.



##### Metoda B

K míchaným roztokům výchozích BZD **14** (1 mmol, 1 ekv.) ve 12,5 ml bezvodého THF byl za laboratorní teploty přidán NaH (2 mmol, 2 ekv.) a po krátkém čase i roztok 3-halogenpropanoylchloridu (2 mmol, 2 ekv.) ve 2,5 ml THF. Reakční směsi byly zpočátku monitorovány každých 30 minut pomocí TLC. Když však ani po 6 h míchání nebyly v reakčních směsích přítomny žádné produkty, byly směsi ponechány míchat přes noc. Ani po 24 h míchání při laboratorní teplotě se však v reakčních baňkách nenacházel produkt, a tak byl přidán další 1 mmol NaH. Reakce byly opět ponechány míchat při laboratorní teplotě dalších 24 h. Z reakcí ukončených po 2 dnech byly izolovány pouze výchozí látky **14**.

### Metoda C

K míchaným roztokům výchozích BZD **14** (1 mmol, 1 ekv.) ve 12,5 ml bezvodého DMF byl za laboratorní teploty přidán NaH (1 mmol, 1 ekv.) díky čemuž došlo k okamžité změně původně bezbarvého roztoku na oranžový. Po krátkém čase i roztok 3-halogenpropanoylchloridu (1 mmol, 1 ekv.) ve 2,5 ml DMF, čímž se opět roztok odbarvil. Reakční roztok byl míchán při laboratorní teplotě za inertní atmosféry. Ani po 3 dnech míchání reakčního roztoku se dle TLC, kterou byla reakce monitorována, neobjevoval produkt. Proto bylo přidáno ještě 0,5 mmol NaH, kdy opět došlo ke změně zabarvení na výraznější žlutou barvu. Reakce byla ukončena po 1 týdnu míchání, kdy byla v reakčním roztoku přítomna pouze výchozí látka.

### Metoda D

K roztokům výchozích látek **14** (0,5 mmol, 1 ekv.) v 6,5 ml DMF byl přisypán NaH (4 mmol, 8 ekv.), kdy došlo k okamžitým změnám barev ze žluté na oranžovou. Následně byl za laboratorní teploty přidán roztok 3-halogenpropanoylchloridu (1 mmol, 2 ekv.), čímž se barva změnila z oranžové na žlutou. Reakce byly následně zahřívány na olejové lázni temperované na teplotu 90–95 °C. Reakce byly jako vždy monitorovány pomocí TLC a ukončeny po 5 hodinách za vzniku směsí tvořených z několika produktů. Reakční roztoky byly odpařeny na RVO s teplotou vodní lázně 30 °C do sucha. K odparkům bylo přidáno vždy 10 ml destilované vody a extrahováno 7×10 ml CHCl<sub>3</sub>. Organické podíly byly slity, vysušeny Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> a přefiltrovány za atmosférického tlaku. Organické podíly byly odpařeny na RVO. Ty byly odděleny pomocí kapalinové sloupcové chromatografie za využití mobilní fáze 7/3 CHCl<sub>3</sub>/EtOAc. Byly získány dva produkty, které byly podrobeny NMR analýze, poukazující, že se jedná o látky tvořící nějakou nerozeznatelnou velmi znečištěnou směs.

### Metoda E

K roztokům výchozích látek **14** (0,5 mmol, 1 ekv.) v 6,5 ml DMF byl přikapán roztok Et<sub>3</sub>N (1 mmol, 2 ekv.) v 1 ml DMF. Po krátkém čase byl k takto připraveným roztokům výchozích látek a bází přikapán roztok 3-halogenpropanoylchloridu (1 mmol, 2 ekv.) za pozorování barevných změn ze žluté na oranžovou. Jelikož dle TLC ani po 5 h míchání reakčních směsí nebyly přítomny produkty byly bez dalšího zkoumání zlikvidovány.

### Metoda F

K roztokům výchozích látek **14** (0,5 mmol, 1 ekv.) v 6,5 ml DMF byl přikapán roztok Et<sub>3</sub>N (1 mmol, 2 ekv.) v 1 ml DMF. Po krátkém čase bylo přidáno i množství 3-halogenpropanoylchloridu (1 mmol, 2 ekv.) k roztokům výchozích látek a bází za pozorování barevné změny. Reakční směs byla zahřívána na olejové lázni s teplotou udržovanou na 90–95 °C. Po uplynutí 3 hodin se dle TLC reakční směsi skládaly pouze ze dvou produktů, z nichž ani jeden nebyl původní látkou. Po zpracování reakcí jejich odpařením do sucha byly opětovně provedeny TLC, kdy bylo zjištěno, že se jedná o směsi několika produktů, které nelze v žádné z mobilních fází oddělit pomocí kapalinové sloupcové chromatografie.

## 5.5 Syntéza 9b-hydroxy-4-oxopyrrolo[2,3-c]chinolin-1-karboxylátů 15

### Metoda A

K 3-fenyl-1-methyl-3-aminochinolin-2,4-dionu **5** (1 mmol, 1 ekv.) v 5 ml DMF byl přisypán K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (2,6 mmol, 2,6 ekv.). Na závěr byl, během 1 minuty přidán do reakčního roztoku ethylester kyseliny 3-chlorpropanové (1,3 mmol, 1,3 ekv.) ve 2 ml DMF. Vzniklý roztok byl míchán při laboratorní teplotě. Po 24 h byl v reakčním roztoku pozorován produkt jen v malé míře, a proto bylo přistoupeno k zahřívání reakční směsi olejovou lázni temperovanou na teplotu 95–100 °C. Již po 2 h zahřívání došlo k přeměně veškeré výchozí látky. Reakční směs byla odpařena na RVO s teplotou vodní lázně 30 °C. K odparku bylo nalito 10 ml destilované vody, která byla extrahována CHCl<sub>3</sub> (8 × 10 ml). Organické podíly byly slity, vysušeny pomocí Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> a odpařeny na RVO opět s teplotou vodní lázně 30 °C. Po získání olejovitého odparku byla provedena analýza surového produktu pomocí TLC, které poukazovala na směs asi ze 6 neseparovatelných produktů.



**Metoda B**

K roztokům 3-aminochinolin-2,4-dionů **5** (2 mmol, 1 ekv.) v 10 ml DMF byl přidán i  $K_2CO_3$  (4 mmol, 2 ekv.), kdy došlo k barevným změnám ze světle žluté na sytě žlutou barvu. Na závěr byl během 1 min přikapán ethylester kyseliny 3-chlorpropaonové (4 mmol, 2 ekv.) ve 2 ml DMF. Získané reakční směsi byly míchány při laboratorní teplotě 3 dny a monitorovány pomocí TLC, to je do doby nepřítomnosti výchozí látky. Po ukončení reakcí byly směsi nality do 150 ml ledové destilované vody, která byla extrahována  $CHCl_3$  nebo EtOAc (8 x 20 ml). Organické podíly byly odpařeny na RVO do sucha s teplotou vodní lázně udržovanou okolo 30–35 °C. V reakcích byly identifikovány celkově dva produkty, proto bylo přistoupeno k chromatografiím na sloupci silikagelu (50 g  $SiO_2$ ) s využitím mobilních fází 7/3  $CHCl_3$ /EtOAc nebo 1/1 PE/EtOAc v závislosti na jednotlivých derivátech.

**(1R,3aS,9bR)-Ethyl-9b-hydroxy-4-oxo-3a-fenyl-2,3,3a,4,5,9b-hexahydro-1H-pyrrolo[2,3-c]chinolin-1-karboxylát 15A-anti**

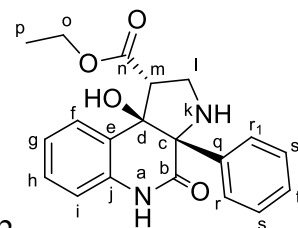
Nažloutlá krystalická látka: výtěžek 22 %,  $t_f = 211\text{--}217$  °C (7/3  $CHCl_3$ /EtOAc),  $R_f = 0,40$  (7/3  $CHCl_3$ /EtOAc).

IČ spektrum (tableta KBr),  $cm^{-1}$ : 3306, 2978, 2902, 2736, 1721, 1662, 1493, 1378, 1193, 1093, 835, 695, 537.

$^1H$  NMR spektrum (DMSO, 400 MHz), ppm:  $\delta$  0,79 (t, 3H, H-p,  $J = 7,1$  Hz); 3,18–3,20 (m, 1H, H-l); 3,25–3,32 (m, 2H, H-l, H-m); 3,36–3,40 (m, 1H, H-o); 3,54–3,59 (m, 2H, H-o, NH-k); 5,55 (s, 1H, -OH); 6,90 (d, 1H, H-i,  $J = 7,9$  Hz); 6,99–7,03 (m, 1H, H-g); 7,16–7,20 (m, 3H, H-s, H-s<sub>1</sub>, H-t); 7,21–7,25 (m, 1H, H-h); 7,30–7,32 (m, 2H, H-r, H-r<sub>1</sub>); 7,48 (dd, 1H, H-f,  $J = 7,7; 1,0$  Hz); 10,52 (s, 1H, NH-a).

$^{13}C$  NMR spektrum (DMSO, 101 MHz), ppm:  $\delta$  13,34 (C-p); 45,00 (C-l); 59,81 (C-o); 60,21 (C-m); 73,90 (C-c); 83,00 (C-d); 114,75 (C-i); 122,03 (C-g); 125,26 (C-e); 125,63 (C-s, C-s<sub>1</sub>); 126,95 (C-t), 127,49 (C-r, C-r<sub>1</sub>); 128,03 (C-f); 128,79 (C-h); 135,73 (C-j); 138,65 (C-q); 170,86 (C-n); 172,11 (C-b).

ESI<sup>+</sup>:  $[M+H]^+ = 353$  m/z.



**(1*S*,3*aS*,9*bR*)-Ethyl-9*b*-hydroxy-4-oxo-3*a*-fenyl-2,3,3*a*,4,5,9*b*-hexahydro-1*H*-pyrrolo[2,3-*c*]chinolin-1-karboxylát 15A-*syn***

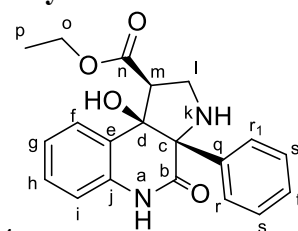
Bílá krystalická látka: výtěžek 70 %,  $t_t = 220\text{--}225\text{ }^\circ\text{C}$   
(7/3  $\text{CHCl}_3/\text{EtOAc}$ ),  $R_f = 0,46$  (7/3  $\text{CHCl}_3/\text{EtOAc}$ ).

IČ spektrum (tableta KBr),  $\text{cm}^{-1}$ : 3286, 3038, 2853, 1721, 1662, 1494,  
1334, 1189, 1038, 1005, 678, 490.

$^1\text{H}$  NMR spektrum (DMSO, 400 MHz), ppm:  $\delta$  1,07 (t, 3H, H-p,  $J = 7,1$  Hz); 3,11–3,17 (m, 2H, H-l, H-m); 3,42 (s, 1H, NH-k); 3,52 (dd, 1H, H-l,  $J = 9,1; 7,3$  Hz); 3,90–3,94 (m, 1H, H-o); 4,03–4,08 (m, 1H, H-o); 5,03 (s, 1H, -OH); 7,02 (dd, 2H, H-g, H-i,  $J = 11,5; 4,4$  Hz); 7,15–7,18 (m, 3H, H-s, H-s<sub>1</sub>, H-t); 7,25–7,29 (m, 1H, H-h); 7,31–7,33 (m, 2H, H-r, H-r<sub>1</sub>); 7,40 (dd, 1H, H-f,  $J = 8,1; 1,2$  Hz); 10,70 (s, 1H, NH-a).

$^{13}\text{C}$  NMR spektrum (DMSO, 101 MHz), ppm:  $\delta$  13,91 (C-p); 42,93 (C-l); 54,26 (C-m); 59,78 (C-o); 73,96 (C-c); 81,03 (C-d); 114,90 (C-i); 122,00 (C-g); 126,81 (C-e); 127,03 (C-s, C-s<sub>1</sub>); 127,27 (C-t), 127,54 (C-r, C-r<sub>1</sub>); 127,67 (C-f); 128,52 (C-h); 134,36 (C-j); 137,27 (C-q); 169,41 (C-n); 172,70 (C-b).

ESI<sup>+</sup>:  $[\text{M}+\text{H}^+]^+ = 353$  m/z.



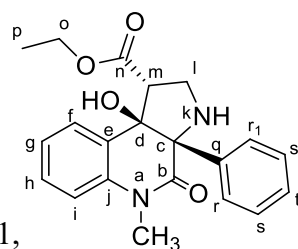
**(1*R*,3*aS*,9*bR*)-Ethyl-9*b*-hydroxy-5-methyl-4-oxo-3*a*-fenyl-2,3,3*a*,4,5,9*b*-hexahydro-1*H*-pyrrolo[2,3-*c*]chinolin-1-karboxylát 15B-*anti***

Oranžová krystalická látka: výtěžek 27 %,  $t_t = 138\text{--}145\text{ }^\circ\text{C}$   
(1/1 PE/EtOAc),  $R_f = 0,25$  (1/1 PE/EtOAc).

IČ spektrum (tableta KBr),  $\text{cm}^{-1}$ : 3434, 3336, 3266, 2923, 2849, 1731,  
1603, 1468, 1372, 1345, 1184, 1096, 968, 753, 578.

$^1\text{H}$  NMR spektrum (DMSO, 400 MHz), ppm:  $\delta$  1,07 (t, 3H, H-p,  $J = 7,1$  Hz); 3,13–3,18 (m, 2H, H-l, H-m); 3,19 (s, 1H, NH-k) 3,44 (s, 1H, -CH<sub>3</sub>); 3,53 (dd, 1H, H-l,  $J = 9,0; 7,0$  Hz); 3,91 (dq, 1H, H-o,  $J = 10,8; 7,1$  Hz); 4,07 (dq, 1H, H-o,  $J = 10,9; 7,1$  Hz); 5,08 (s, 1H, -OH); 7,09–7,16 (m, 1H, H-g); 7,21–7,24 (m, 2H, H-s, H-s<sub>1</sub>, H-t); 7,26 (d, 1H, H-i,  $J = 0,8$  Hz); 7,39 (ddd, 1H, H-h,  $J = 8,1; 7,4, 1,6$  Hz); 7,46 (dd, 1H, H-f,  $J = 7,7; 1,5$  Hz).

$^{13}\text{C}$  NMR spektrum (DMSO, 101 MHz), ppm:  $\delta$  13,92 (C-p); 29,98 (-CH<sub>3</sub>); 42,54 (C-l); 53,80 (C-m); 59,81 (C-o); 74,29 (C-c); 79,84 (C-d); 114,67 (C-i); 122,60 (C-g); 127,24 (C-s,



C-s<sub>1</sub>); 127,36 (C-t); 127,50 (C-r, C-r<sub>1</sub>), 127,59 (C-f); 127,92 (C-e); 128,68 (C-h); 136,49 (C-j); 137,01 (C- q); 169,44 (C-n); 172,25(C-b).

ESI<sup>+</sup>: [M+H<sup>+</sup>]<sup>+</sup> = 367 m/z.

**(1S,3aS,9bR)-Ethyl-9b-hydroxy-5-methyl-4-oxo-3a-fenyl-2,3,3a,4,5,9b-hexahydro-1H-pyrrolo[2,3-c]chinolin-1-karboxylát 15B-syn**

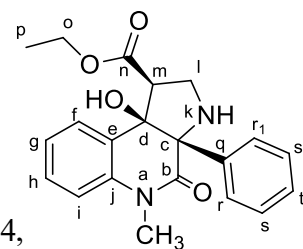
Světle žlutá krystalická látka: výtěžek 38 %, t<sub>f</sub> = 147–152 °C  
(1/1 PE/EtOAc), R<sub>f</sub> = 0,36 (1/1 PE/EtOAc).

IČ spektrum (tableta KBr), cm<sup>-1</sup>: 3300, 3057, 2958, 2925, 1724, 1658, 1602, 1461, 1339, 1184, 1094, 945, 870, 837, 752, 696, 498.

<sup>1</sup>H NMR spektrum (DMSO, 400 MHz), ppm: δ 0,70 (t, 3H, H-p, J = 7,1 Hz); 3,16 (dd, 1H, H-l, J = 13,0; 11,0 Hz); 3,28–3,32 (m, 6H, -CH<sub>3</sub>, NH-k, H-l, H-m); 3,33–3,37 (m, 1H, H-o); 3,52–3,58 (m, 1H, H-o); 5,72 (s, 1H, -OH); 7,09–7,13 (m, 1H, H-g); 7,09–7,17 (m, 4H, H-s, H-s<sub>1</sub>, H-t, H-i); 7,20–7,24 (m, 2H, H-r, H-r<sub>1</sub>); 7,36 (ddd, 1H, H-h, J = 8,1; 7,4, 1,6 Hz); 7,56 (dd, 1H, H-f, J = 7,7; 1,6 Hz).

<sup>13</sup>C NMR spektrum (DMSO, 101 MHz), ppm: δ 13,28 (C-p); 29,82 (-CH<sub>3</sub>); 44,27 (C-l); 59,51 (C-m); 59,84 (C-o); 74,06 (C-c); 81,80 (C-d); 114,56 (C-i); 122,77 (C-g); 126,73(C-e); 126,88 (C-s, C-s<sub>1</sub>); 127,10 (C-t), 127,46 (C-r, C-r<sub>1</sub>); 127,74 (C-f); 129,01 (C-h); 137,61 (C-j); 138,01 (C- q); 170,93 (C-n); 171,47(C-b).

ESI<sup>+</sup>: [M+H<sup>+</sup>]<sup>+</sup> = 367 m/z.

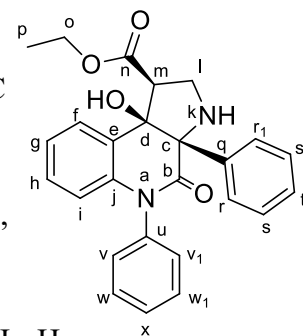


**(1S,3aS,9bR)-Ethyl-9b-hydroxy-4-oxo-3a,5-difenyl-2,3,3a,4,5,9b-hexahydro-1H-pyrrolo[2,3-c]chinolin-1-karboxylát 15C-syn**

Žluto oranžová krystalická látka: výtěžek 40 %, t<sub>f</sub> = 134–137 °C  
(benzen), R<sub>f</sub> = 0,32 (7/3 CHCl<sub>3</sub>/EtOAc).

IČ spektrum (tableta KBr), cm<sup>-1</sup>: 3291, 3042, 2980, 1736, 1665, 1455, 1332, 1217, 1033, 759, 698, 510.

<sup>1</sup>H NMR spektrum (DMSO, 400 MHz), ppm: δ 1,12 (t, 3H, H-p, J = 7,1 Hz); 3,20 (t, 1H, H-l, J = 9,8 Hz); 3,51 (ddd, 3H, H-m, H-l, NH-k, J = 35,9; 9,6; 7,6 Hz); 3,59 (dd, 1H, H-l, J = 9,0; 7,0 Hz); 3,97 (dq, 1H, H-o, J = 10,9; 7,1 Hz); 4,13 (dq, 1H,



H-o,  $J = 10,8; 7,1$  Hz); 5,22 (s, 1H, -OH); 6,34 (dd, 1H, H-i,  $J = 8,1; 0,8$  Hz); 7,09 (td, 1H, H-g,  $J = 7,6; 1,0$  Hz); 7,17–7,25 (m, 4H, H-v, H-v<sub>1</sub>, H-w, H-w<sub>1</sub>); 7,21–7,24 (m, 2H, H-s, H-s<sub>1</sub>, H-t); 7,26 (d, 1H, H-i,  $J = 0,8$  Hz); 7,39 (ddd, 1H, H-h,  $J = 8,1; 7,4, 1,6$  Hz); 7,46 (dd, 1H, H-f,  $J = 7,7; 1,5$  Hz).

<sup>13</sup>C NMR spektrum (DMSO, 101 MHz), ppm:  $\delta$  13,98 (C-p); 42,54 (C-l); 54,31 (C-m); 59,91 (C-o); 74,69 (C-c); 80,13 (C-d); 115,79 (C-i); 122,77 (C-g); 127,14 (C-r, C-r<sub>1</sub>); 127,53 (C-t); 127,67 (C-e); 127,77 (C-s, C-s<sub>1</sub>); 128,06 (C-f) 128,27 (C-v, C-v<sub>1</sub>); 128,49 (C-w, C-w<sub>1</sub>); 128,87 (C-x); 129,94 (C-h); 136,84 (C-j) 137,38 (C-u); 137,98 (C-q); 169,49 (C-n); 172,23(C-b).

### 15C-nižší frakce neznámého složení

Nažloutlá krystalická látka: výtěžek 17 %,  $t_t = 124\text{--}130$  °C(benzen),  $R_f = 0,19$  (7/3 CHCl<sub>3</sub>/EtOAc).

IČ spektrum (tableta KBr), cm<sup>-1</sup>: 3296, 3047, 2924, 1732, 1674, 1460, 1334, 1194, 1001, 757, 695, 515.

<sup>1</sup>H NMR spektrum (DMSO, 400 MHz) a <sup>13</sup>C NMR spektrum (DMSO, 101 MHz) viz.

### Příloha I.

ESI<sup>+</sup>: [M+H<sup>+</sup>]<sup>+</sup> = 858 m/z.

## ZÁVĚR

Cílem diplomové práce bylo prozkoumat možnosti využití derivátů 3-aminochinolin-2,4-dionů v syntéze pyrrolbenzodiazepintronů vedoucí přes benzodiazepindionové intermediáty. K syntéze cílových derivátů PBD byly navrženy dvě cesty, které předpokládaly, že vhodnými výchozími látkami budou deriváty 3-aminochinolindionů s 3-chlorpropanoylovým anebo s 3-ethoxy-3-oxopropylovým řetězcem.

Syntéza esenciálních látek (sloučeniny **6A**) jedné cesty byla již dobře popsána a optimalizovaná v mé bakalářské práci, a proto bylo poměrně snadné si z těchto látek vytvořit zásobu pro další kroky. Ovšem hned následující experimenty, ve kterých bylo plánováno pro intramolekulární přesmyky heterocyklů využívat osvědčených účinků TMG v ethanolu, v nás vyvolaly poměrně velké zklamání. Vlivem TMG došlo pouze k dehydrohalogenaci postranního řetězce (sloučeniny **6B**). Pro prověření stability amidového uskupení byly vyzkoušeny i reakce se silnější bází, s hydridem sodným. Nicméně ani touto modifikací nebyly cílené deriváty BZD syntetizovány. Proto byla změněna strategie syntézy, jejíž hlavní myšlenou bylo nejprve syntetizovat *N*4-nesubstituované BZD a následně na ně do polohy 4 připojit požadovaný typ řetězce. Tento krok však nabral neočekávaný rozměr. U připravených BZD **14A** a **14B** substituovaných v poloze 1 a 3 bylo dle NMR spekter měřených při různé teplotě zjištěno, že každý z derivátů se vyskytuje při teplotách do 40 °C v podobě dvou konformerů, jež mají atomy vodíku **H–C3–N4–H** s konfigurací *cis* nebo *trans*. Z naměřených spekter byla následně stanovena teplota koalescence. Byla vypočítána i aktivační energie přechodu mezi jednotlivými konformery, jejíž hodnota se, jak u látky **14A**, tak i u látky **14B**, pohybovala okolo 69 kJ·mol<sup>-1</sup>. Konformační analýza byla také podpořena výpočty Karplusovy rovnice. Dále byla u těchto látek stanovena molekulová dynamika i její distribuce, kdy tyto experimenty jasně podpořili data získaná NMR spektroskopii a poukazují na zastoupení konformerů v přibližném poměru 1:1. Po provedené konformační analýze BZD **14A** a **14B** bylo přistoupeno k pokusům o navázání 3-chlorpropanoylového. Bylo provedeno celkově šest typů reakcí u dvou derivátů, ze kterých se nejlépe jevíly reakce probíhající za teploty 90–95 °C, ale ani z těchto reakcí nebyly úspěšně syntetizovány požadované BZD. Proto bylo od této cesty upuštěno a pozornost byla následně přesunuta na druhou navrženou cestu.

U syntetické cesty B bylo klíčové nejprve připravit derivát 3-aminochinolin-2,4-dionu s navázaným 3-ethoxy-3-oxopropylovým řetězcem. Byla tedy provedena reakce chinolindionu **5** s ethyl-3-chlorpropanoátem s uhličitánem draselným v DMF,

kteřá po 3 dnech míchání při laboratorní teplotě poskytovala dva produkty. Produkty **15A** a **15B** byly podrobeny 1D a 2D NMR analýzám, při kterých bylo díky HMBC zjištěno, že se nejedná o požadované produkty, nýbrž o deriváty 9b-hydroxy-4-oxopyrrolo[2,3-c]chinolin-1-karboxylátů. Jelikož se  $^1\text{H}$  NMR spektra jednotlivých produktů se vždy lišila v chemických posunech hydroxylové skupiny a v multiplicitě některých signálů, bylo proto přistoupeno k naměření ROESY spekter. Ta ukázala, že se jedná o produkty mající skupinu hydroxylovou a ethylesterovou ve dvou konfiguracích, a to *syn* a *anti*. Výjimku tvořila syntéza derivátu **15C** vycházející z 1,3-difenyl-3-aminochinolin-2,4-dionu, ze které byly taktéž izolovány 2 produkty, jeden z nich **15C-syn** a druhý dosud blíže nespecifikovaný.

## SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

- <sup>1</sup> Silveira L. C., Almeida A. N., Carrilho C., *Saúde e Sociedade*, 28, 107–119, (2019)
- <sup>2</sup> Nešpor K., Provazníková H., *Slovník prevence problémů působených návykovými látkami: pro rodiče a pedagogy*. 3. vydání, 54 s., (1999), ISBN 807071123x
- <sup>3</sup> Ban T. A., *Progress in Neuro-Psychopharmacology & Biological Psychiatry*, 25, 709–727 (2001)
- <sup>4</sup> Healy D., *Harvard University Press*, Cambridge (2002)
- <sup>5</sup> López-Muñoz F., Álamo C., Cuenca E., Shen W. W., Clervoy P., Rubio G., *Annals of Clinical Psychiatry*, 17, 113–135 (2005)
- <sup>6</sup> López-Muñoz F., Álamo C., *Brain Research Bulletin*, 79, 130–141, (2009)
- <sup>7</sup> Fangmann P., Juckel G., Álamo C., López-Muñoz F., *Journal of Clinical Psychopharmacology*, 28, 1–4, (2008)
- <sup>8</sup> López-Muñoz F., Álamo C., Rubio G., Cuenca E., *Progress in Neuro-Psychopharmacology & Biological Psychiatry*, 28, 205–208, (2004)
- <sup>9</sup> Pichot P., Noyes R., Roth M., Burrows G. D., *Handbook of Anxiety*, vol 4. The treatment of anxiety, 3–25, (1990)
- <sup>10</sup> Álamo C., López-Muñoz F., Echániz T., Cuenca E., *Historia de la Neropsichofarmacología*, 245–26, (1998)
- <sup>11</sup> Bänninger A., Costa E., Silva J. A., Hindmarch I., Moeller H. J., Rickels K., *Good Chemistry – the life and legacy of Valium Inventor Leo Sternbach*, Mc Graw-Hill, New York (2004)
- <sup>12</sup> Sternbach L. H., *Journal of Medicinal Chemistry*, 22, 1–17, (1979)
- <sup>13</sup> Švihovec J., Bultas J., Anzenbacher P., Chládek J., Příborský J., Slíva J., Votava M., *Farmakologie*. Praha: Grada publishing. 2018; ISBN 978-80-271-2150-2.
- <sup>14</sup> Lincová D., Farghali H., *Základní a aplikovaná farmakologie*. Praha: Galén. 2005; ISBN 80-7262-168-8.
- <sup>15</sup> Chatney D. S., Mihic S. J., Harris R. A., *Goodman & Gilman's The Pharmacological Basis of Therapeutics*, 11, 401–428, (2005)
- <sup>16</sup> Erman M. K., *Journal of Clinical Psychiatry*, 67, 6–12, (2006).
- <sup>17</sup> Jakob T. C., et al., *Benzodiazepine treatment induces subtype-specific changes in GABA receptor trafficking and decreases synaptic inhibition*. PNAS, Academy of Sciences (2012)
- <sup>18</sup> Katzung B. G., *Basic and clinical pharmacology*, 8th edition. USA: The McGraw Hill Companies, Inc, 364–381, (2001)
- <sup>19</sup> Ballenger J. C., Burrows G. D., DuPont Jr R. L., *Archives of General Psychiatry*, 45, 413–422 (1988)
- <sup>20</sup> Dawson G. W., Jue S. G., Brogden N. R., *Drugs*, 27, 132–147 (1984)
- <sup>21</sup> Smith R. B., Kroboth P. D., Vanderlugt J. T., Phillips J. P., Juhl R. P., *Psychopharmacology*, 84, 452–456, (1984)

- <sup>22</sup> Yasui N., Otani K., Kaneko S., Ohkubo T., Osanai T., Sugawara K., Chiba K., Ishizaki T., *Clinical Pharmacology & Therapeutics*, 59, 514–519 (1996)
- <sup>23</sup> Williams J. A., Ring B. J., Cantrell V. E., Jones D. R., Eckstein J., Ruterbories K., Hamman M. A., *Drug Metabolism & Disposition*, 30, 883–891, (2002)
- <sup>24</sup> Yajima T., Ohno T., Nakamura K., *Folia Pharmacologica Japonica.*, 83, 237–248 (1984)
- <sup>25</sup> Hirota N., Ito K., Iwatsubo T., Green C. E., Tyson C. A., Shimada N., Suzuki H., Sugiyama Y., *Biopharmaceutics and Drug Disposition*, 22, 53–71 (2001)
- <sup>26</sup> Dawson G. W., Jue S. G., Brogden R. N., *Drugs*, 27, 132–147, (1984)
- <sup>27</sup> Van Harten J., Holland R. L., Wesnes K., *European Neuropsychopharmacology*, 2, 381, (1992)
- <sup>28</sup> Schwartz M. A., Postma R., Kolis S., Leon A. S., *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 62, 1776–1779 (2006)
- <sup>29</sup> Baselt R. C., *Chemical Toxicology Institute*, Foster city, Califonie, (2000)
- <sup>30</sup> Grrenblatt D. J., Divoll M. K., Soong M. H., Boxenbaum H. G., Harmatz J. S., Shader R. I., *The Journal of Clinical Pharmacology*, 28, 853–859, (1988)
- <sup>31</sup> Yang T. J., Kraus K. W., Shou M., Yang S. K., Buters J. T. M., Gonzalez F. J., Gelboin H. V., *Biochemical Pharmacology*, 55, 1633–1640, (1998)
- <sup>32</sup> Baselt R. C., Cravey R. H., *Chemical Toxicology Institute*, Foster City, 211, (1995)
- <sup>33</sup> De Haro L., Valli M., Bourdon J. H., Iliadis A., Hayek-Lanthois M., Arditti J., *Veterinary and Human Toxicology*, 43, 174–175, (2001)
- <sup>34</sup> Jones H. M., Hallifax D., Houston J. B., *Drug Metabolism & Disposition*, 32, 572–580, (2004)
- <sup>35</sup> Childress S. J., Cluckman M. I., *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 53, 577–590, (1964)
- <sup>36</sup> Borea P. A., *Bolletino Della Societa Italiana Di Biologia Sperimentale*, 57, 628–632, (1981)
- <sup>37</sup> Zalkind S., „Death pill“: Fentanyl disguised as other drugs linked to spike in US overdoses, 2016, Dostupné z: <https://www.theguardian.com/society/2016/may/10/fentanyl-drug-overdoses-xanax-painkillers> [01. 02. 2024]
- <sup>38</sup> Ecstasydata. Org. Dostupné z: [https://www.ecstasydata.org/resultsphp?start=0&search\\_field=all&s=etizolam](https://www.ecstasydata.org/resultsphp?start=0&search_field=all&s=etizolam) [01. 02. 2024]
- <sup>39</sup> Bourcier S., Hoppilliard Y., Kargar-Grisel T., Pechiné J. M., Perez F., *European Journal of Mass Spectrometry*, 7, 359–371, (2001)
- <sup>40</sup> Mozayani A., Raymon L., *Handbook of Drug Interactions: A Clinical and Forensic Guide*. New York, Springer Science & Business Media, (2003)
- <sup>41</sup> Borea P. A., *Arzneimittelforschung*, 33, 1086–1088, (1998)
- <sup>42</sup> Haefely E. K. W., Gerecke M., Mohler H., *Advanced Drug Delivery Reviews.*, 14, 165–322, (1985)
- <sup>43</sup> So S. S., Karplus M., *Journal of Medicinal Chemistry*, 39, 5246–5256, (1996)



- <sup>44</sup> Zamani F., Arlan M. F., Javahershenas R., Yarmohammadi M., Varma S. R., Doustkhah E., *Benzodiazepine-Based Drug Discovery, Heterocyclic Drug Discovery*, 9–34, (2022)
- <sup>45</sup> Oilman N. W., Sternbach L. H., *Journal of Heterocyclic Chemistry*, 8, 297–300, (1971)
- <sup>46</sup> Sternbach L. H., Priest R. G., Filho U. V., Amrein R., Skreta M., *The Benzodiazepine story*, Springer, Dordrecht (1980)
- <sup>47</sup> Whitwam J. G., *Acta Anaesthesiologica Scandinavica*, 108, 3–14, (1995)
- <sup>48</sup> Maddalena D. J., Johnston G. A. R., *Journal of Medicinal Chemistry*, 38, 715–724, (1995)
- <sup>49</sup> Batlle E., Lizano E., Viñas M., Pujol M. D., *Medicinal Chemistry*, 63–90, (2019)
- <sup>50</sup> Khan R., Felix R., Kemmitt P.D., Coles S. J., Tozzard G. J., Spencer J., *Synlett*, 29, 193–198, (2018)
- <sup>51</sup> Carlier P. R., Zhao H., MacQuarrie-Hunter S. L., DeGuzman J.C., Hsu D. C., *Journal of the American Chemical Society*, 128, 15215–15220, (2006)
- <sup>52</sup> Fan X. Z., Wu H. H., Tang Z., Zhang H., Cai L. Y., Zhao H. W., *Advanced Synthesis and Catalysis*, 363, 1379–1389, (2021)
- <sup>53</sup> Molteni G., Brogini G., Pilati T., *Tetrahedron: Asymmetry*, 13, 2491–2495, (2002)
- <sup>54</sup> Sathe B. P., Phatak P. S., Dalve V. S., Rote A. B., Tigote R. M., Haval K. P., *The International Research Journal of Science and Engineering*, 92–93, (2018)
- <sup>55</sup> Korbekandi M. M., Nasr-Esfahani M., Mohammadpoor-Baltork I., Moghadam M., Tangestainejad S., Mirkhani V., *Catalysis Letters*, 149, 1057–1066, (2019)
- <sup>56</sup> Misra A., Sharma S., Sharma D., Dubey S., Mishra A., Kishore D., *Journal of Chemical Sciences*, 130, 31, (2018)
- <sup>57</sup> Obara N., Watanabe T., Asakawa T., Kan T., Tanaka T., *Synthesis*, 51, 2198–2206, (2019)
- <sup>58</sup> Akssira M., Boumzebra M., Kasmir H., Dahdouh A., Roumestant M. L., Viallenfont Ph., *Tetrahedron*, 50, 9051–9061, (1994)
- <sup>59</sup> Sabb A. L., Vogel R. L., Welmaker G. S., Sabalski J. E., Coupet J., Dunlop J., Rosenzweig-Lipson S., Harrison B., *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, 14, 2603–2607, (2004)
- <sup>60</sup> Anil A. M., Shobith R., Kiran K. R., Swaroop T. R., Mallesha N., Sadashiva M. P., *New Journal of Chemistry*, 43, 182–187, (2019)
- <sup>61</sup> Stadlbauer W., Laschober R., Lutschounig H., Schindler G., Kappe T., *Monatshefte für Chemie*, 123, 617–636, (1992)
- <sup>62</sup> Klásek A., Kořistek K., Lyčka A., Holčápek M., *Tetrahedron*, 59, 5279–5288, (2003)
- <sup>63</sup> Kafka S., Klásek A., Polis J., Košmrlj J., *Heterocycles*, 57, 1659–1682, (2002)
- <sup>64</sup> Farran D., Archirel P., Toupet L., Martinez J., Dewynter G., *European Journal of Organic Chemistry*, 2011, 2043–2047, (2011)
- <sup>65</sup> Antolák S. A., Yao Z. K., Richoux G. M., Slobodnik C., Carlier P. R., *Organic Letters*, 16, 5204–5207, (2014)

- <sup>66</sup> Spencer J., Rathman R. P., Chowdhry B. Z., *Future Medicinal Chemistry*, 2, 1441–1449, (2010)
- <sup>67</sup> Pertejo P., Garcia-Valverde M., Pena P., Cordero N. A., Torroba T., González-Ortega A., *Organic & Biomolecular Chemistry*, 12, 4906, (2014)
- <sup>68</sup> Pem B., Vrček V., *International Journal of Quantum Chemistry*, 118, (2017)
- <sup>69</sup> Hok L., Božičević, Sremec H., Šakić D., Vrček V., *Organis and Biomolecular Chemistry*, 17, 1471–1479, (2019)
- <sup>70</sup> Riddel G., *Academic Press*, Cambridge, Massachusetts, (1980)
- <sup>71</sup> Spencer J., Rathman R. P., Chowdhry B. Z., *Future Medicinal Chemistry*, 2, 1441–1449, (2010)
- <sup>72</sup> Meanwell N. A., Walker M. A., *Comprehensive Heterocyclic Chemistry*, 13, 183–235, (2008)
- <sup>73</sup> Paizs B., Simonyi M., *Chirality*, 11, 651–658, (1999)
- <sup>74</sup> Jadid K., Aryan R., Mehrdad M., Lügger T., Hahn F. E., Ng S. W., *Journal of Molecular Structure*, 692, 37–42, (2004)
- <sup>75</sup> Blackburn B. K., Lee A., Baier M., Kohl B., Olivero R., Matamoros R., McDowell R. S., *Journal of Mecinal Chemistry*, 40, 717–729, (1997)
- <sup>76</sup> Křemen F., Gazvoda M., Kafka S., Proisl K., Srholcová A., Klásek A., Urankar D., Košmrlj J., *The Journalof Organic Chemistry*, 82, 715-722, (2017)
- <sup>77</sup> Jerne N. K., *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 41, 849–857, (1955)
- <sup>78</sup> Fotso S., Zabriskie T. M., Proteau O. J., Flatt P. M., Santosa D. A., Mahmud T., *Journal of Natural Products*, 72, 690, (2009)
- <sup>79</sup> Jenkins T. C., Hurle L. H., Neidle S., Thurston D. E., *Journal of Medicinal Chemistry*, 37, 4529–4537, (1994)
- <sup>80</sup> Kopka M. L., Goodsell D. S., Baikalov I., Grzeskowiak K., Cascio D., Dieckerson R. E., *Biochemistry*, 33, 13593–13610, (1994)
- <sup>81</sup> Thurston D. E., Vassoler H., Jackson P. J. M., James C. H., Rahman K. M., *Organic & Biomolecular Chemistry*, 13, 4031–4040, (2015)
- <sup>82</sup> Leimgruber W., Stefanović V., Schenker F., Karr A., Berger J., *Journal of the American Chemical Society*, 87, 5791–5793, (1965)
- <sup>83</sup> Tandler D. M., Korman S., *Nature*, 199, 501 (1963)
- <sup>84</sup> Rahman K. M., Thompson A. S., James C. H., Narayanaswamy M., Thurston D. E., *Journal of the American Chemical Society*, 131, 13756, (2009)
- <sup>85</sup> Doyle M., Feuerbaum E. A., Fox K. R., Hinds J., Thurston D. E., Taylor P. W., *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 64, 9499, (2009)
- <sup>86</sup> Leimgruber W., Batcho A. D., Czajkowski R. C., *Journal of the American Chemical Society*, 90, 5641–5643, (1968)
- <sup>87</sup> Hurley L. H., Boyd F. L., *TIPS*, 9, 402, (1988)

- <sup>88</sup> Neidle S., Waring M. J., *Molecular Aspects of Anticancer Drug-DNA Interactions*, Palgrave, London, ISBN: 978-1-349-12356-8.
- <sup>89</sup> Tendler M. D., Korman S., *Nature*, 199, 501, (1963)
- <sup>90</sup> Fotso S., Zabriskie T. M., Proteau P. J. Flatt P. M., Santosa D. A., Mahmud T., *Journal of Natural Products*, 72, 690–695, (2009)
- <sup>91</sup> Nakatani S., Yamamoto Y., Hayashi M., Komiyama K., Ishibashi M., *Chemical and Pharmaceutical Bulletin*, 52, 368–370, (2004)
- <sup>92</sup> Hering N. A., Fromm A., Bücken R., Gorkiewicz G., Zechner E., Högenauer C., *International Journal of Molecular Sciences*, 20, 5595, (2019)
- <sup>93</sup> Antonow D., Kaliszczak M., Kang G., Coffils M., Tiberghien A., Cooper N., Barata T., Heidelberger S., James C., Zloh M., Jenkins T., Reszka A., Neidle S., Guichard S., Jodrell D., Hartley J., Howard P., Thurston D. E., *Journal of Medicinal Chemistry*, 53, 2927–2941, (2010)
- <sup>94</sup> Burger A. M., Loadman P. M., Thurston D. E., Schultz R., Fiebig H. H., *Journal of Chemotherapy*, 19, 66–78, (2007)
- <sup>95</sup> Hu W. -P., Yu H. -S., Sung P. -J., Tsai F. Y., Shen Y.-K., Long-Sen Chang L. -S., Wang J. -J., *Chemical Research in Toxicology*, 20, 905–912, (2007)
- <sup>96</sup> Corelli F., Massa S., Stefancich G., Ortenzi G., Artico M., Pantaleoni G. C., Palumbo G., Fanini D., Giorgi R., *European Journal of Medicinal Chemistry*, 21, 445–449, (1986)
- <sup>97</sup> Massa S., Artico M., Mai A., Corelli F., Pantaleoni G. C., Giorgi R., Ottaviani D., Cagnotto A., *Farmaco (Societa Chimica Italiana: 1989)*, 45, 1265–1281, (1990)
- <sup>98</sup> Meerpoel L., van Gestel J., van Gerven F., Woestenborghs F., Marichal P., Sipido V., Terence G., Nash R., Corens D., Richards R. D., *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, 15, 3453–3458, (2005)
- <sup>99</sup> Kaneko T., Wong H., Doyle T. W., Rose W. C., Bradner W. T., *Journal of Medicinal Chemistry*, 28, 388–392, (1985)
- <sup>100</sup> Hara T., Kayama Y., Mori T., Itoh K., Fujimori H., Sunami T., Hashimoto Y., Ishimoto S., *Journal of Medicinal Chemistry*, 21, 263–268, (1978)
- <sup>101</sup> Boutard N., Dufour-Gallant J., Deaudelin P. Lubell W. D., *The Journal of Organic Chemistry*, 76, 4533–4545, (2011)
- <sup>102</sup> Seger D. L., *The Journal of Toxicology: Clinical Toxicology*, 42, 209–216 (2004)
- <sup>103</sup> De Luca G. V., Otto M. J., *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, 2, 1639–1644, (1992)
- <sup>104</sup> Jackson P. J., Kay S., Pysz I., Thurston D. E., *Drug Discovery Today: Technologies.*, 30, 71–83, (2018)
- <sup>105</sup> Antonow D., Barata T., Jenkins T. C., Parkinson G. N., Howard P. W., Thurston D. E., Zloh M., *Biochemistry*, 47, 11818, (2008)
- <sup>106</sup> Kizu R., Draves P. H., Hurley L. H., *Biochemistry*, 32, 8712–8722, (1993)
- <sup>107</sup> Wells G., Martin C. R. H., Howard P. W., Sands Z. A., Laughton C. A., Tiberghien A., Woo C. K., Masterson L. A., Stephenson M. J., Hartley J. A., Jenkins T. C., Shnyder S. D.,

- Loadman P. M., Waring M. J., Thurston D. E., *Journal of Medicinal Chemistry*, 49 5442, (2006)
- <sup>108</sup> Miyamoto M., Kondo S., Naganawa H., Maeda K., Ohno M., Umezawa H., *The Journal of Antibiotics*, 30, 340–343, (1977)
- <sup>109</sup> Puvvada M. S., Forrow S. A., Hartley J. A., Stephenson P., Gibson I., Jenkins T. C., Thurston D. E., *Biochemistry*, 36, 2478, (1997)
- <sup>110</sup> Mantaj J., Jackdon P. J., Rahman K. M., Thurston D. E., *Angewandte Chemie International Edition*, 56, 465–488, (2017)
- <sup>111</sup> Hartley J., Hamaguchi A., Suggitt M., Gregson S., Thurston D., Howard P., *Investigational New Drugs*, 30, 950–958, (2012)
- <sup>112</sup> Hartley J. A., *Expert Opinion on Investigational Drugs*, 20, 733–744, (2011)
- <sup>113</sup> Hu W. P., Wang J. J., Lin F. L., Lin Y. C., Lin S. R., Hsu M. H., *The Journal of Organic Chemistry*, 66, 2881–2883, (2001)
- <sup>114</sup> Eguchi S., Yamashita K., Matsuschita Y., Kakehi A., *The Journal of Organic Chemistry*, 60, 4006–4012, (1995)
- <sup>115</sup> Miyamoto M., Kondo S., Naganawa H., Maeda K., Ohno M., Umezawa H., *The Journal of Antibiotics*, 30, 340–343, (1977)
- <sup>116</sup> Pertejo P., Carreira-Barral I., Pena-Calleja P., Quesada R., García-Valverde M., *The Journal of Organic Chemistry*, 85, 2291–2302, (2020)
- <sup>117</sup> Abas S., Arroniz C., Molins E., Escolando C., *Tetrahedron*, 74, 867–871, (2018)
- <sup>118</sup> Pyrene-like linked pyrrolo(2,1-c)(1,4)benzodiazepine derivatives useful as anticancer agents. Ahmed KamalRamesh GujjarRamulu PoddutooriSrinivas Olepu. Kanada. CA2520901A1. Přihlášeno 2003-03-31. Uděleno 2009-09-08.
- <sup>119</sup> Hurley L. H., Reck T., Thurston D. E., Langley D. R., Holden K. G., Hertzberg R. P., Hoover J. R., Gallagher G. Jr., Faucette L. F., Mong S. M., Johnson R. K., *Chemical Research in Toxicology*, 1, 258–268, (1988)
- <sup>120</sup> Petrussek R. L., Anderson G. L., Garner T. F., Fannin Q. L., Kaplan D. J., Zimmer S. G., Hurley L. H., *Biochemistry*, 20, 1111–1119, (1981)
- <sup>121</sup> Barkley M. D., Cheatham S., Thurston D. E., Hurley L. H., *Biochemistry*, 25, 3021–3031, (1986)
- <sup>122</sup> Remers W. A., Mabilia M., Hopfinger A. J., *Journal of Medicinal Chemistry*, 29, 2492–2503, (1986)
- <sup>123</sup> Leimgrub W., Stefanov V., Schenker F., Karr A., Berger J., *Journal of the American Chemical Society*, 87, 5791, (1965)
- <sup>124</sup> Li W., Khullar A., Chou S., Sacramo A., Gerratana B., *Applied and Environmental Microbiology*, 75, 2869–2878, (2009)
- <sup>125</sup> Li W., Chou S., Khullar A., Gerratana B., *Applied and Environmental Microbiology*, 75, 2958–2963, (2009)
- <sup>126</sup> Antonow D., Jenkins T. C., Howard P. W., Thurston D. E., *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, 15, 3041–3053, (2007)

- <sup>127</sup> Boyd F. L., Stewart D., Remers W. A., Barkley M. D., Hurley L. H., *Biochemistry*, 29, 2387–2403, (1990)
- <sup>128</sup> Thurston D. E., Bose D. S., Hoear P. W., Jenkins T.C., Leoni A., Baraldi P. G., Guitto A., Cacciari B., Kelland L. R., Foloppe M. P., Rault S., *Journal of Medicinal Chemistry*, 42, 1951–1964, (1999)
- <sup>129</sup> Farmer J. D., Rudnicki S. M., Suggs J. W., *Tetrahedron Letters*, 29, 5105–5108, (1988)
- <sup>130</sup> Rahman K. M., Jackson P. J., James C. H., Basu B. P., Hartley J. A., de la Fuente M., Schatzlein a., Robson M., Pedley R. B., Pepper C., Fox K. R., Howard P. W., Thurston D. E., *Journal of Medicinal Chemistry*, 56, 2911–2935, (2013)
- <sup>131</sup> Thurston D. E., Bose D. S., *Chemical Reviews*, 94, 433–465, (1994)
- <sup>132</sup> Mantaj J., Jackson P. J. M., Rahman K. M., Thurston D. E., *Andewandte Chemie International Edition*, 56, 462–488, (2017)
- <sup>133</sup> Theocharopoulos C., Lialios P. P., Samarkos M., Gogas H., Ziogas D. C., *Vaccines*, 9, 1111, (2021)
- <sup>134</sup> Damelin M., Zhong W., Myers J., Sapra P., *Pharmaceutical Research*, 32, 3494–3507, (2015)
- <sup>135</sup> Jain N., Smith S. W., Ghone S., Tomczuk B., *Pharmaceutical Research*, 32, 3526–3540, (2015)
- <sup>136</sup> Khongorzul P., Ling C. J., Khan F. U., Ihsan A. U., Zhang J., *Molecular Cancer Research*, 18, 3–19, (2020)
- <sup>137</sup> Baah S., Laws M., Rahman K. M., *Molecules*, 26,2943, (2021)
- <sup>138</sup> Fu Z., Li S., Han S., Shi C., Zhang Y., *Signal Transduction and Target Therapy*, 7, 93, (2022)
- <sup>139</sup> Joubert N., Beck A., Dumontet C., Denevault-Sabourin C., *Pharmaceuticals*, 13, 245, (2020)
- <sup>140</sup> Hartley J. A., *Expert Opinion on Biological Therapy*, 21, 931–943, (2021)
- <sup>141</sup> Khattal Z. E., Hashmi H., Khan S. I., Aamir S., Arif U., Khan A. I., Darwin A., Singh A. D., Khouri J., Anwer F., *Annals of Hematology*, 100, 2155–2172, (2021)
- <sup>142</sup> Moore K. M., Desai A., de Luxán Delgado B., trabulo S. M., Reader C., Brown N. F., *Theranostics*, 10, 2930, (2020)
- <sup>143</sup> Rahman K. M., Jackson P. J., James C. H., Basu B. P., Hartley J. A., de la Fuente M., *Cancer Research*, 73, 1129, (2013)
- <sup>144</sup> Zammarchi F., Havenith K. E., Chivers S., Hogg P., Bertelli F., Tyrer P., *Molecular Cancer Therapeutics*, 21, 582–593, (2022)
- <sup>145</sup> Cho S., Zammarchi F., Williams D. G., Havenith C. E., Monks N. R., Tyrer P., *Molecular Cancer Therapeutics*, 17, 2176–2186, (2018)
- <sup>146</sup> Huang Y., Del Nagro C. J., Balic K., Mylott W. R. Jr., Ismaiel O. A., Ma E., *Analytical Chemistry*, 92, 11135–11144, (2020)

- <sup>147</sup> Sutherland M. S., Yu C., Walter R. B., Westendorf L., Valliere-Douglass J., Pan L., *Blood*, 126, 330, (2015)
- <sup>148</sup> Seaman S., Zhu Z., Saha S., Zhang X. M., Yang M. Y., Hilton M. B., *Cancer cell*, 31, 501–515, (2017)
- <sup>149</sup> Xu B., *European Journal of Clinical Pharmacology*, 78, 707–719, (2022)
- <sup>150</sup> Jain N., Stock W., Zeidan A., Atallah E., McCloskey J., Heffner L., Tomlinson B., *Blood advances*, 4, 449–457, (2020)
- <sup>151</sup> Zammarchi F., Corbett S., Adams L., Tyrer P. C., Kiakos K., Janghra N., Marafioti T., Britten C. E., Havenith C. E., Chivers S., *Blood*, 131, 1094–1105, (2018)
- <sup>152</sup> Saber H., Simpson N., Ricks T. K., Leighton J. K., *Regulatory Toxicology and Pharmacology*, 107, 104429, (2019)
- <sup>153</sup> Saunders L.R., Bankovich A. J., Anderson W. C., Aujay M. A., Bheddah S., Black K., Desai R., Escarpe P. A., Hampl J., Laysang A., Liu D., Lopez-Molina J., Milton M., Park A., Pysz M. A., Shao H., Slingerland B., Torgov M., Williams S. A., Foord O., Howard P., Jassem J., Badzio A., Czapiewski P., Harpole D. H., Dowlati A., Massion P. P., Travis W. D., Pietanza M. C., Poirier J. T., Rudin C. M., Stull R. A., Dylla S. J., *Science Translational Medicine*, 7, 302ra136, (2015)
- <sup>154</sup> Jeffrey S. C., Burke P. J., Lyon R. P., Meyer D. W., Sussman D., Anderson M., Hunter J. H., Leiske C. I., Miyamoto J. B., Nicholas N. D., Okeley N. M., Sanderson R. J., Stone I. J., Zeng W., Gregson S. J., Masterson L., Tiberghien A. C., Howard P. W., Thurston D. E., Law C. L., Senter P. D., *Bioconjugate Chemistry*, 24, 1256–1263, (2013)
- <sup>155</sup> Kung Sutherland M. S., Walter R. B., Jeffrey S. C., Burke P. J., Yu C., Kostner H., Stone I., Ryan M. C., Sussman D., Lyon R. P., Zeng W., Harrington K. H., Klussman K., Westendorf L., Meyer D., Bernstein I. D., Senter P. D., Benjamin D. R., Drachman J. G., McEarchern J. A., *Blood*, 122, 1455–1463, (2013)
- <sup>156</sup> Jenkins T. C., Hurley L. H., Neidle S., Thurston D. E., *Journal of Medicinal Chemistry*, 37, 4529–4537, (1994)
- <sup>157</sup> Rahman K. M., James C. H., Thurston D. E., *Nucleic Acids Research*, 39, 5800–5812, (2011)
- <sup>158</sup> Rahman K. M. Thompson A. S., James C. H., Narayanaswamy M., Thurston D. E., *Journal of the American Chemical Society*, 131, 13756–13766, (2009)
- <sup>159</sup> Petrussek R. L., Anderson G. L., Garner T. F., Fannin Q. L., Kaplan D. J., Zimmer S. G., Hurley L. H., *Biochemistry*, 20, 1111–1119, (1981)
- <sup>160</sup> Hartley J. A., *Expert Opinion on Investigational Drugs*, 20, 733–744, (2011)
- <sup>161</sup> Čípová K., Bakalářská práce. Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně. Fakulta technologická. 2022. 45 str.
- <sup>162</sup> Kafka S., Klásek A., *Heterocycles*, 57, 1659–1682, (2002)
- <sup>163</sup> Dračínský Martin, 2021. NMR spektroskopie pro chemiky. Praha: Univerzita Karlova, Přírodovědecká fakulta. ISBN 978-80-7444-085-4.

<sup>164</sup> Freeman F., Hwang J. H., Junge E. H., Parmar P. D., Renz Z., Trinh J., *International Journal of Quantum Chemistry*, 108, 339–350, (2007)

<sup>165</sup> Hunter Ch. A., Packer M. J., Zonta Ch., *Progress in Nuclear Resonance Spectroscopy*, 47, 27–39, (2005)

<sup>166</sup> Barfield M., Gearhart H. L., *Journal of the American Chemical Society*, 95, 641–643, (1973)

<sup>167</sup> Minch M. J., *Concepts in Magnetic Resonance*, 6, 41–56, (1994)

<sup>168</sup> Máčalová Z., Diplomová práce. Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně. Fakulta technologická. 2019. 65 str.

**SEZNAM POUŽITÝCH SYMBOLŮ A ZKRATEK**

BZD	benzodiazepin
DMF	<i>N,N</i> -dimethylformamid
DNA	deoxyribonukleová kyselina
ESI-MS	hmotnostní spektrometrie s elektrosprejovou ionizací
Et	ethyl
EtOAc	ethylester kyseliny octové
GABA	$\gamma$ -aminomáselná kyselina
HIV	virus lidské imunodeficiencie
HMBC	heteronuclear multiple bond correlation
HSQC	heteronuclear single quantum coherence
KHMDS	bis(trimethylsilyl)amid draselný
LiHMDS	bis(trimethylsilyl)amid lithný
Me	methyl
MRSA	methicilin-rezistentním <i>Staphylococcus aureus</i>
NMR	nukleární magnetická rezonance
PBD	pyrrolobenzodiazepin
PE	petrolether
Ph	fenyl
$R_f$ , $R_t$	retenční faktor, retenční čas
ROESY	rotating-frame nuclear Overhauser effect correlation spectroscopy
RVO	rotační vakuová odparka
THF	tetrahydrofuran
TLC	chromatografie na tenké vrstvě
TMG	1,1,3,3-tetramethylguanidin
Triton B	benzyl(trimethylamonium)hydroxid



## SEZNAM OBRÁZKŮ

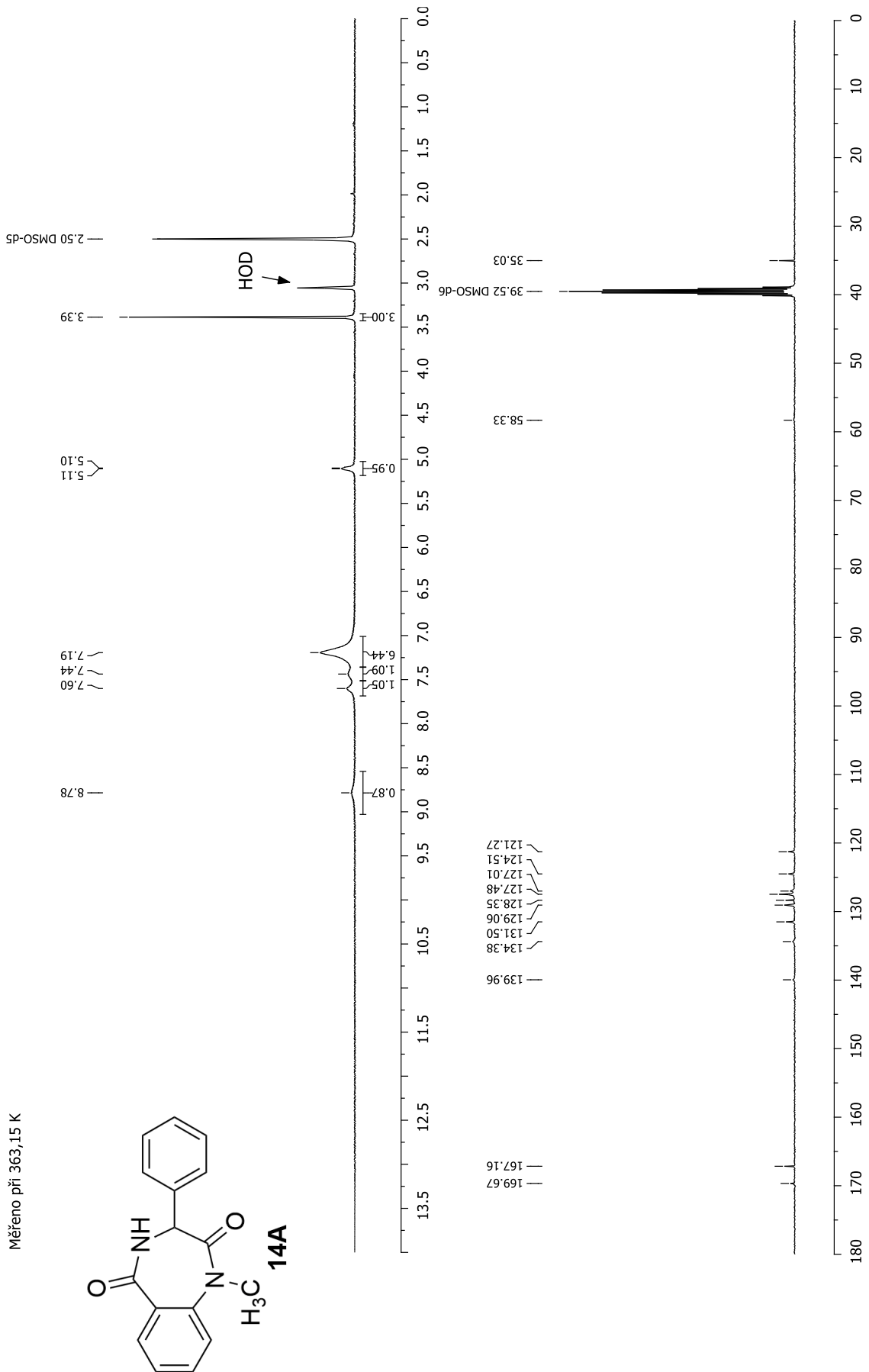
<b>Obrázek 1.</b> Obecný vzorec benzodiazepinu. ....	12
<b>Obrázek 2.</b> Struktura chlórdiazepoxidu.....	13
<b>Obrázek 3.</b> Grafické znázornění mechanismu účinku BZD terapeutik.....	14
<b>Obrázek 4.</b> Metabolická dráha alprazolamu. ....	15
<b>Obrázek 5.</b> Metabolismus bromazepamu. ....	16
<b>Obrázek 6.</b> Metabolismus diazepam. ....	17
<b>Obrázek 7.</b> Struktura flumazenilu a omeprazolu. ....	18
<b>Obrázek 8.</b> Reaktivita 1,4-benzodiazepin-2-onů a 1,4-benzodiazepin-2,5-dionů. ....	19
<b>Obrázek 9.</b> Tautomerní rovnováhy 1,4-benzodiazepin-2-onů.....	25
<b>Obrázek 10.</b> Konformery <i>M</i> a <i>P</i> u 1,4-benzodiazepin-2-onů. ....	26
<b>Obrázek 11.</b> Konformery <i>M</i> a <i>P</i> u 1,4-benzodiazepin-2,5-dionů. ....	27
<b>Obrázek 12.</b> Vliv teploty na energetickou bariéru mezi <i>M</i> a <i>P</i> konformery u 1,4-benzodiazepin-2,5-dionu .....	27
<b>Obrázek 13.</b> Monomer a dimer PBD. ....	28
<b>Obrázek 14.</b> Struktura izomerů monomerních pyrrolbenzodiazepinů. ....	29
<b>Obrázek 15.</b> Vybrané přírodní látky izolované z bakterií rodu <i>Streptomyces</i> .....	29
<b>Obrázek 16.</b> Struktura limazepinu E a fuligocandinu B.....	30
<b>Obrázek 17.</b> Tilivalin. ....	30
<b>Obrázek 18.</b> Struktura uměle připravených PBD SG2042 a SG2738. ....	30
<b>Obrázek 19.</b> Struktura dimeru PBD SJG-136.....	31
<b>Obrázek 20.</b> Derivát pyrrolo[1,2- <i>a</i> ][1,4]benzodiazepinu vykazující fungicidní účinek. <sup>96</sup>	31
<b>Obrázek 21.</b> Struktura flumazenilu. ....	31
<b>Obrázek 22.</b> Derivát pyrrolo[1,2- <i>d</i> ][1,4]benzodiazepinu inhibující HIV-1 transkriptázu. ....	32
<b>Obrázek 23.</b> Interakce monomerního PBD s guaninem. ....	32
<b>Obrázek 24.</b> Znázornění meziřetězcového zesíťování dimeru PBD SG2000 a SG2057 s DNA, kdy X je purinová nebo pyrimidinová báze. ....	33
<b>Obrázek 25.</b> Struktura patentovaného derivátu PBD. ....	36
<b>Obrázek 26.</b> Stabilní formy PBD. ....	37
<b>Obrázek 27.</b> Vztah mezi strukturou a aktivitou monomerních i dimerních PBD.....	38
<b>Obrázek 28.</b> Mechanismus ADC. ....	39
<b>Obrázek 29.</b> Loncastuximab tesirin. ....	40
<b>Obrázek 30.</b> Chromatogram sloučeniny 14A získaný z GC-MS.....	48
<b>Obrázek 31.</b> Židličková a vaničková konformace cykloheptanu.....	56
<b>Obrázek 32.</b> Karplusova křivka vyjadřující vztah mezi dihedrálním úhlem a vicinální interakcí. ....	57

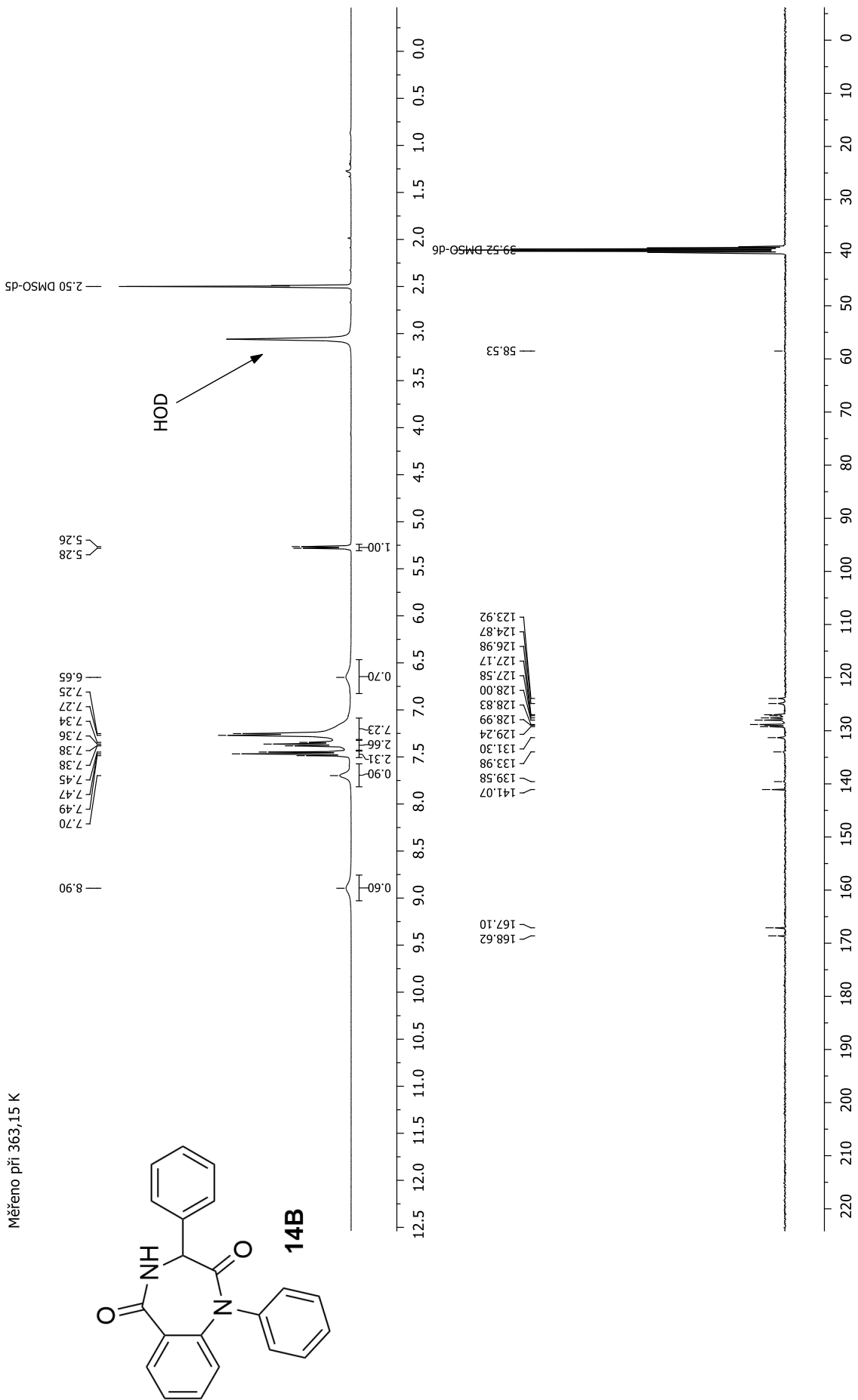
---

<b>Obrázek 33.</b> Srovnání vicinální interakce u modelových příkladů.....	57
<b>Obrázek 34.</b> Počítačové modely konformerů derivátu <b>14A</b> .....	58
<b>Obrázek 35.</b> Počítačové modely konformerů BDZ <b>14B</b> .....	59
<b>Obrázek 36.</b> Molekulová dynamika sloučeniny <b>14A</b> .....	61
<b>Obrázek 37.</b> Molekulová dynamika derivátu <b>14B</b> .....	61

## SEZNAM SCHÉMÁT

<b>Schéma 1.</b> Syntéza 1,5-benzodiazepinů s využitím kyselého nanokatalyzátoru.....	20
<b>Schéma 2.</b> Příprava 1,5-benzodiazepinů s využitím organokovového katalyzátoru. ....	20
<b>Schéma 3.</b> Chemoselektivita Fe <sup>III</sup> -NiTC@nSiO <sub>2</sub> v přípravě 1,5-benzodiazepinů.....	21
<b>Schéma 4.</b> Syntéza karbonitrilových derivátů BZD. ....	21
<b>Schéma 5.</b> Syntéza 1,5-benzodiazepin-2-onů Michaelovou adiční reakcí s následnou intramolekulární cyklizací. ....	22
<b>Schéma 6.</b> Syntéza 1,4-benzodiazepin-2,5-dionů z derivátů anthranilové kyseliny. ....	22
<b>Schéma 7.</b> Syntéza 1,4-benzodiazepin-2,5-dionů vycházející z isatoového anhydridu. ...	23
<b>Schéma 8.</b> Intramolekulární cyklizace methyl-2-(2-aminobenzamido)acetátu. ....	24
<b>Schéma 9.</b> Syntéza 3-aminochinolin-2,4-dionů. ....	24
<b>Schéma 10.</b> Intramolekulární reakce 3-aminochinolidionu. ....	24
<b>Schéma 11.</b> Syntéza DC-81 z kyseliny 2-nitrobenzoové.....	34
<b>Schéma 12.</b> Syntéza DC-81 z derivátu kyseliny azidokarboxylové.....	34
<b>Schéma 13.</b> Syntéza DC-81 z kyseliny L-glutamové. ....	35
<b>Schéma 14.</b> Syntéza tří nových rodin pyrrolo[2,1- <i>c</i> ][1,4]benzodiazepin-5-onů.....	35
<b>Schéma 15.</b> Syntéza enantiomerně čistého PDB.....	36
<b>Schéma 16.</b> Syntéza 3-aminochinolin-2,4-dionů <b>5</b> .....	43
<b>Schéma 17.</b> Nukleofilní substituce 3-aminochinolin-2,4-dionu s acylhalogenidem. ....	43
<b>Schéma 18.</b> Navržená syntetická strategie.....	44
<b>Schéma 19.</b> První reakční krok po syntetické cestě A.....	45
<b>Schéma 20.</b> Pokus o expanzi heterocyklického kruhu.....	47
<b>Schéma 21.</b> Pokusy o intramolekulární reakci pomocí hydridu sodného.....	47
<b>Schéma 22.</b> Izomerizační reakce 3-aminochinolin-2,4-dionů <b>5</b> .....	48
<b>Schéma 23.</b> Série provedených reakcí k navázání řetězce na BZD skelet.....	62
<b>Schéma 24.</b> Navržený plán – syntetická cesta B.....	63
<b>Schéma 25.</b> Nukleofilní substituce 3-aminochinolinidionu esterem halogenkyseliny.....	64
<b>Schéma 26.</b> Nukleofilní substituce s následnou Claisenovou kondenzací. ....	67
<b>Schéma 27.</b> Nukleofilní substituce neočekávaného spádu. ....	70
<b>Schéma 28.</b> Návrh vzniku struktury dle NMR.....	72
<b>Schéma 29.</b> Návrh vzniku struktury dle ESI-MS.....	72

PŘÍLOHA I:  $^1\text{H}$  A  $^{13}\text{C}$  NMR SPEKTRA IZOLOVANÝCH SLOUČENIN



Měřeno při 303,15 K

