UNIVERZITA PALACKÉHO V OLOMOUCI PŘÍRODOVĚDECKÁ FAKULTA

Katedra organické chemie



Fluorované deriváty 3-hydroxychinolin-4(1H)-onů jako nadějná protinádorová léčiva

Bakalářská práce

Athanasios Markos Studijní program: B1407 Chemie Studijní obor: Chemie pro víceoborové studium -Biologie v ochraně životního prostředí Typ studia: Prezenční Vedoucí práce: Ing. Kristýna Bürglová, PhD. Konzultant práce: Doc. RNDr. Jan Hlaváč, Ph.D.

Autor:

Olomouc 2015

Prohlášení

Prohlašuji, že jsem závěrečnou práci na téma "Fluorované deriváty 3hydroxychinolin-4(1*H*)-onů jako nadějná protinádorová léčiva" zpracoval samostatně pod vedením Ing. Kristýny Bürglové, Ph.D. a uvedl jsem všechny použité informační zdroje a literaturu. Tato práce ani její podstatná část nebyla předložena k získání jiného nebo stejného akademického titulu.

V Olomouci, 29. 4. 2015

.....

Athanasios Markos

Poděkování

V první řadě bych chtěl poděkovat vedoucí mé bakalářské práce Ing. Kristýně Bürglové Ph.D. za cenné rády, trpělivost a ochotu, kterou mi věnovala v průběhu řešení této bakalářské práce. Dále bych rád poděkoval konzultantovi práce doc. RNDr. Janu Hlaváčovi, Ph.D. a celému kolektivu katedry organické chemie, především pak Mgr. Lence Kubovičové a Mgr. Tereze Volné za vstřícnost a pomoc při řešení některých laboratorních úkonů. V neposlední řadě bych chtěl poděkovat mým rodičům za jejich podporu během mého tříletého studia.

BIBLIOGRAFICKÁ IDENTIFIKACE

Jméno a příjmení autora:	Athanasios MARKOS						
Název práce:	Fluorované deriváty 3-hydroxychinolin-4(1H)-onů						
	jako nadějná protinádorová léčiva						
Typ práce:	Bakalářská práce						
Pracoviště:	Ústav molekulární a translační medicíny						
	v Olomouci						
Školitel:	Ing. Kristýna Bürglová, PhD.						
Rok obhajoby práce:	2015						
Abstrakt:	Předložená bakalářská práce se zabývá přípravou						
	fluorovaných 3-hydroxychinolin-4(1 <i>H</i>)-onů						
	obsahujících ve svém skeletonu peptidový řetězec.						
	Teoretická část popisuje syntetické strategie						
	vedoucí k 3-hydroxychinolin-4(1H)-onům, jejich						
	protinádorové vlastnosti, molekulární cíl a vztah						
	mezi strukturou a biologickou aktivitou. V části						
	výsledky a diskuze je popsán celkový postup						
	syntézy 3-hydroxychinolin-4(1H)-onů obsahujících						
	peptidový řetězec, způsob jejich izolace, lipofilní						
	vlastnosti a rozpustnost vybraných pěti derivátů ve						
	vodě.						
Klíčová slova:	3-hydroxychinolin-4(1 <i>H</i>)-ony, syntéza na pevné						
	fázi, fluor, peptid						
Počet stran:	47						
Jazyk:	Český						

BIBLIOGRAPHICAL IDENTIFICATION

Author:	Athanasios MARKOS						
Title:	Fluorinated derivatives of 3-hydroxyquinolin-						
	4(1H)-ones as promising anticancer drugs						
Type of thesis:	Bachelor thesis						
Department:	Institute of Molecular and Translational Medicine						
Advisor:	Ing. Kristýna Bürglová, PhD.						
The year of presentation:	2015						
Abstract:	This bachelor thesis deals with the preparation of						
	fluorinated 3-hydroxyquinoline-4(1 <i>H</i>)-ones						
	containing peptide chain in its skeleton. Theoretical						
	part describes the synthetic strategy leading to 3-						
	hydroxyquinoline- $4(H)$ -ones, their anticancer						
	properties, molecular target and the relationship						
	between structure and biological akticity. Results						
	and Discussion describe approach to the synthesis						
	of 3-hydroxychinolin- $4(1H)$ ones bearing peptide						
	chain, and their isolation. Lipophilic properties and						
	solubility of five selected derivatives in water are						
	also discussed.						
Keywords:	3-hydroxyquinolin-4(1 <i>H</i>)-ones, solid phase						
·	synthesis, fluorine, peptide						
NT 1 6							
Number of pages:	47						
Language:	Czech						

Obsah

1.	Úvo	/od	7
2.	Teo	oretická část	8
	2.1.	Příprava 3-HQs	8
-	2.2.	Kombinatoriální přístup a syntéza na pevné fázi	14
-	2.3.	Biologická aktivita a molekulární cíl 3-HQs	14
	2.3.	3.1. Protinádorová aktivita 7-karboxy-3-HQs a jejich fenacyleste	rů15
	2.3.	3.2. Protinádorová aktivita 3'nitro-4'-amino-3-HQs	16
	2.3.	3.3. Protinádorová aktivita 3-HQ-karboxamidů	17
	2.3.	3.4. Molekulární cíl a vztah mezi strukturou a biologickou aktivi	tou 3-HQs . 18
	2.4.	Změna biologické aktivity léčiv zavedením atomu fluoru	
	2.5.	Lipofilicita	21
3.	Cíle	le práce	
4.	Výs	vsledky a diskuze	
4	4.1.	Příprava fluorovaných 3-HQs obsahujících peptidový řetězec	
	4.1.	.1. Příprava 7-karboxy-3HQs	
	4.1.	.2. Příprava mono, di a tripeptidů pomocí syntézy na pevné fázi	
	4.1.	.3. Finální spojení peptidového řetězce s 7-karobxy-3-HQ	
2	4.2.	Izolace a čištění finálních látek	
4	4.3.	Lipofilicita a rozpustnost připravených 3-HQs	
5.	Exp	perimentální část	
6.	Záv	věr	
7.	Sez	znam použitých zkratek	
8.	Lite	eratura	

1. Úvod

Jednou ze skupin látek, které se vyznačují vysokou biologickou aktivitou jsou flavony, prvně izolované a studované maďarským biochemikem Albertem Szent-Gyorgim¹. Látky obdobné struktury obsahující atom dusíku namísto atomu kyslíku v poloze 1 a hydroxy skupinu v poloze 3, se nazývají 2-fenyl-3-hydroxychinolin-4(1*H*)-ony (3-HQs) a mohou tedy být považovány za aza-analoga zmíněných flavonů (**Obrázek** č. 1)².



Obrázek č. 1. Základní struktury a) flavonů b) 2-fenyl-3-hydroxychinolin-4(1*H*)-onů (3-HQs)

Deriváty 3-HQs jsou látky s prokázanými antibakteriálními, imunosupresivními a zejména protinádorovými vlastnostmi, které jsou hlavním důvodem jejich studia a syntézy^{2,3}. I přes tento fakt nebyly 3-HQs až donedávna podrobně studovány. Možným důvodem byla jejich obtížná syntéza poskytující nízké výtěžky. To se ovšem změnilo roku 1995, kdy byl na katedře organické chemie PřF UPOL popsán klíčový krok k syntéze 3-HQs, kterým je cyklizace fenacylesteru kyseliny anthranilové⁴. Dalším významným krokem, který umožnil zlepšit biologické vlastnosti 3-HQs, zejména pak rozpustnost a prostupnost přes plasmatickou membránu, byla inkorporace karboxylové skupiny do polohy 7 na chinolonovém skeletu. Zavedení této skupiny poskytlo možnost tvorby amidů, fenacylesterů a jiných funkčních derivátu karboxylových kyselin a s tím spojené možnosti využití syntézy na pevné fázi ve spojení s kombinatoriální chemií. Tohoto trendu se v dnešní době často využívá, poskytuje možnost rychlé a efektivní tvorby chemických knihoven, které ve spojení se systematickým testováním na konkrétních nádorových buněčných liniích umožňují optimalizovat strukturu 3-HQs^{5,6,7}.

2. Teoretická část

V teoretické části této bakalářské práce jsou představeny syntetické strategie pro přípravu 3-HQs, protinádorové aktivity a molekulární cíl 3-HQs. Je věnována pozornost vztahu mezi strukturou a biologickou aktivitou 3-HQs a vlivu atomu fluoru na některé biologicky aktivní molekuly.

2.1. Příprava 3-HQs

První odkaz popisující syntézu 3-HQs pochází z roku 1971⁸. Výchozí látku představuje 2-nitrobenzaldehyd I, který Darzensovou reakcí s 2-bromoacetofenonem II poskytuje 2-nitrochalkon epoxid III. Vzniklý epoxid působením HCl, THF a hydrochinonu cyklizuje na 1,3-dihydroxy-2-fenylchalkonin-4(1*H*)-on IV, který se pomocí Na₂S₂O₄ redukuje na finální 3-HQs V (Schéma č. 1). Vzhledem ke špatné dostupnosti a vysoké ceně výchozího 2-nitrobenzaldehydu se metoda jeví jako nevýhodná.



Schéma č. 1. Příprava 3-HQs pomocí Darzensovy reakce

Druhou, nevýhodnou metodou syntézy 3-HQs je zavedení hydroxy skupiny do polohy 3, oxidací 2-fenyl-4(1*H*)-chinolonu **VI** (Schéma č. 2)⁹. Vzhledem k nízkým výtěžkům nalézá tato reakce uplatnění jen ve speciálních případech.



Schéma č. 2. Příprava 3-HQs pomocí oxidace 2-fenylchinolin-4(1H)onu

Třetí, již poměrně výhodný přístup k syntéze 3-HQs byl publikován v roce 1992¹⁰. Je založen na rozšíření pětičlenného kruhu indolového derivátu **VII** v bazickém prostředí přes aza-cyklopropa[a]inden **VIII**, který následně působením kyseliny octové přechází na požadovaný 3-HQs **V** (**Schéma č. 3**). Podle původní publikace se výtěžky reakce pohybují od 72 do 83%.



Schéma č. 3. Příprava 3-HQs rozšířením derivátu indolu

Další velmi zajímavý způsob syntézy s poměrně širokou použitelností spočívá v cyklizaci derivátů alkyl(2-aminofenyl)ketonů **IX** snadno dostupných transformací 2-halogen ketonů, a to v poměrně dobrých výtěžcích (**Schéma č. 4**)¹¹.



Schéma č. 4. Příprava 3-HQs z derivátů alkyl(2-aminofenyl)ketonů

Nejúčinnější metoda přípravy 3-HQs však byla představena v roce 1995⁴. Vychází z kyseliny anthranilové **X**, která je značně levnější a dostupnější než výchozí látky jiných syntetických příprav. Tato syntetická metoda umožňuje rychlou a efektivní přípravu cílových 3-HQs a je ji možno provádět s řadou různě substituovaných 2bromoacetofenonů **II**, které substituční reakcí poskytují fenacylestery zmíněné kyseliny **XI**. Následným zahříváním fenacylesterů v kyselině trifluoroctové, octové nebo polyfosforečné vznikají cílové 3-HQs **V** (**Schéma č. 5**)².



Schéma č. 5. Syntéza 3-HQs vycházející z kyseliny anthranilové zahrnující cyklizaci jejího fenacylesteru

Mechanismus cyklizační reakce byl navržen na základně studia přípravy analogických 3-amino-2-fenyl-4(1*H*)-chinolonů. Při jejich syntéze byl izolován meziprodukt **XII**, který následně přecházel na výsledný 3-aminochinolon **XIII** (**Obrázek** č. 2). Pravděpodobný mechanismus cyklizace 3-HQs ilustruje schéma č. 6¹².



Obrázek č. 2. Izolovaný meziprodukt a produkt přípravy 3-aminochinolonu



Schéma č. 6. Pravděpodobný mechanismus cyklizace 3-HQs

Další výhodou této metody je možnost využít derivátů kyseliny anthranilové, jakožto výchozích látek umožňujících modifikaci na chinolonovém skeletu. Typickým příkladem je kyselina 2-aminotereftalová **XIV**, která reakcí s 2-bromoacetofenonem **II** tvoří diester zmíněné kyseliny **XV**. Následná cyklizace poskytuje směs fenacylesteru 3-

HQ **XVI** a 7-karboxy-3-HQ **XVII**. Vzniklý fenacylester je poté hydrolyzován na cílový 7-karboxy-3-HQ **XVII** (**Schéma č. 7**)⁵.



Schéma č. 7. Příprava 7-karboxy-3-HQs

Roku 2007 byla vyvinuta metoda přípravy 3-HQs využívající syntézy na pevné fázi¹³. Syntéza je založena na imobilizaci kyseliny 1-methyl-2-aminotereftalové **XIX** na polymerní pryskyřici. Navázaný methylester **XX** je hydrolyzován pomocí TMSOK a reakcí s 2-bromoacetofenonem **II** poskytuje již známý fenacyl ester **XXI**. Vzniklý fenacylester je následně odštěpen z pevné fáze. Finální cyklizační krok je realizován v kyselině trifluoroctové a poskytuje konečný 3-HQ substituovaný v poloze 7 **XXII** (**Schéma č. 8**).



Schéma č. 8. Syntéza na pevné fázi využívající kyselinu 1-methyl-2-aminotereftalovou

Použití této metody se nevztahuje pouze na původně modifikované chinolony v poloze 7, ale jak bylo později prokázáno⁷, lze ji využít i k syntéze 6 a 8 substituovaných 3-HQs. Výchozími látkami jsou 4-amino-3-(methoxykarbonyl)benzoová **XXIII** a 2-amino-3-(methoxykarbonyl)benzoová kyselina **XXIV** (**Obrázek č. 3**).



Obrázek č. 3. Možné základní stavební jednoty pro přípravu 7-karobxy-3-HQs

O dva roky později byla popsána příprava 3-HQs na pevné fázi z jiného buildingblocku než z kyseliny 1-methyl-2-aminotereftalové, a to z 4-chloro-2-fluoro-5nitrobenzoové kyseliny **XXV**¹⁴. Ta je imobilizována na Rinkovu pryskyřici (viz kapitola 4.1.2.) substitucí nukleofilní za atom fluoru a následnou substitucí chloru požadovaným aminem poskytuje prekurzor **XXVI**, který je přes derivát **XXVII** převeden na finální 3-HQs **XXVIII** již několikrát zmíněnou reakční sekvencí (**Schéma č. 9**).



Schéma č. 9. Výstavba 3-HQs pomocí imobilizace přes atom dusíku

Další skupinou 3-HQs připravených na pevné fázi jsou jejich analoga s puriny¹⁵. Příprava je založena na regioselektivní reakci na pryskyřici imobilizovaného sekundárního aminu s 2,6-dichloropurinem **XXIX** za vniku meziproduktu **XXX**. Následuje alkylace dusíku purinu v poloze 9 za vzniku intermiediátu **XXXII** a substituce chloru v poloze 2 alifatickým diaminem za vzniku meziproduktu **XXXII**. Na volnou aminoskupinu je poté připojena 1-methyl-2-aminoteraftalová kyselina a následně je dokončena syntéza modifikovaného 3-HQ **XXXV** (**Schéma č. 10**).



Schéma č. 10. Příprava 3-HQs obsahující deriváty purinu

2.2. Kombinatoriální přístup a syntéza na pevné fázi

Jak už bylo výše zmíněno, k syntéze 3-HQs byla použita i syntéza na pevné fázi ve spojení s kombinatoriální chemií.

Kombinatoriální chemie umožňuje připravit současně stovky až stovky tisíc nových organických sloučenin (chemické knihovny), které jsou poté simultánně otestovány na požadované vlastnosti. Je proto rychlejší, a tím pádem účinnější a levnější něž klasická syntéza. Z tohoto důvodu nalézá uplatnění nejen při hledání nových biologicky aktivních látek, ale může být využita i pro optimalizaci struktur perspektivních biologicky aktivních molekul^{7,16}.

Vzhledem k tomu, že využití kombinatoriálního přístupu je s použitím roztokové chemie velmi obtížné, hlavní rozmach této techniky usnadnilo využití syntézy na pevné fázi (SPS). Metoda syntézy na pevné fázi spočívá v ukotvení dané látky na polymerní nosič (Pol) prostřednictvím labilního linkeru (L)¹⁶. Oproti syntéze v roztoku není nutné časově náročné čištění meziproduktů, např. extrakcí, chromatografií, atp. Pryskyřice je vždy pouze promyta a přítomnost meziproduktu ověřena jen na malém analytickém vzorku pomocí LC-MS analýzy.

2.3. Biologická aktivita a molekulární cíl 3-HQs

Už ve 30. letech 20. století objevil známý maďarský biochemik a laureát Nobelovy ceny Albert Szent-Gyorgi, že extrakty z některých druhů rostlin, jako červených maďarských paprik nebo pomerančů, obsahují vedle vitamínu C také jiné látky pozitivně působící na lidský organismus. Mezi tyto látky patří mimo jiné flavony, látky příbuzné 3-HQs^{1,2}.

Také první 3-HQ otestovaný na biologickou aktivitu pochází z rostlinného extraktu, konkrétně z rostliny *Ruta chalepensis*. Byl studován jako možná hormonální antikoncepce pro krysy, nevykazoval však žádnou aktivitu. Konec 20. století byl ve znamení obrovského rozmachu testování biologických aktivit přírodních látek a látek jim příbuzných. Tomuto trendu neunikly ani flavony a 3-HQs. V průběhu následujících několika let byla syntetizována a otestována řada derivátů 3-HQs vykazujících příznivé výsledky v biologických testech. Prokázány byly antibakteriální, imunosupresivní a zejména protinádorové aktivity 3-HQs, které jsou dále podrobně popsány^{2,5,7}.

2.3.1. Protinádorová aktivita 7-karboxy-3-HQs a jejich fenacylesterů

Jednou z prvních sad derivátů 3-HQs testovaných na protinádorovou aktivitu byly 7-karboxy-3-HQs **XVII** (**Obrázek č. 4**)⁵. Testovány byly na následujících buněčných liniích: CEM (T-lymfoblastické leukémii), CEM-DNR-bulk (Tlymfoblastické leukemii resistentní vůči doxorubicinu a postrádající topoisomerasu IIa gen), K562 (myeloidní leukémii), K562-tax (myeloidní leukémii resistentní na paclitaxel) a A549 (plicní nádor)^{2,5}. Výsledky prokázaly poměrně nízkou cytotoxicitu testovaných derivátů (IC₅₀ > 100 μ M u všech pěti buněčných liniích). Jedinou výjimku tvořil derivát 4-amino-3,5-dichloro substituovaný v poloze 2 na fenolovém kruhu (IC₅₀ = 9,83-11,98 μ M), (**Tabulka č. 1**).



Obrázek č. 4. Obecná struktura 2-fenyl-3-hydroxychinolin-4(1H)-on-7-karboxylových kyselin

Cytotoxická aktivita vybraných derivátů XVII IC 50 (µM)									
R	A 549	CEM	CEM-DNR-bulk	K562	K562-tax				
Н	236,2	223,4	171,2	198,9	196,3				
2-I	191,8	124,4	134,1	129,0	174,9				
3-Cl	239,1	224,9	163,4	190,0	197,5				
2-Br	192,4	117,0	145,5	146,3	160,6				

Tabulka č. 1. Cytotoxická aktivita vybraných derivátů XII

Spolu s těmito deriváty byly otestovány i fenacylestery **XVI** výše zmíněných kyselin (**Obrázek č. 5**). V případě fenacylesterů se cytotoxická aktivita zvýšila více než 50x (**Tabulka č. 2**)⁵.



Obrázek č. 5. Struktura fenacylesteru 3-HQs

Cytotoxická aktivita vybraných derivátů XVI IC ₅₀ (µM)								
R	A 549	CEM	CEM-DNR-bulk	K562	K562-tax			
Н	120,2	147,0	128,0	132,4	141,8			
2-I	11,3	5,5	12,0	5,0	8,5			
3-Cl	4,5	8,0	11,5	5,6	10,7			
2-Br	10,4	4,9	12,3	5,2	8,5			
3,5-diCl; 4-NH ₂	0,68	0,76	3,6	1,1	1,2			

Tabulka č. 2. Cytotoxická aktivita vybraných derivátů XVI

Jak prokázaly další experimenty, fenacylesterová skupina nemá sama o sobě vliv na zvýšení cytotoxických aktivit, což může poukazovat na určitý vztah mezi biologickou aktivitou a rozpustností otestovaných derivátů⁵.

2.3.2. Protinádorová aktivita 3'nitro-4'-amino-3-HQs

Další otestovanou skupinou derivátů 3-HQs poskytující nadějné výsledky v biologických testech jsou sloučeniny obecného vzorce **XXXVI**. Testovány byly deriváty obsahující různé typy substituentů v poloze R (**Tabulka č. 3**)³.



Obrázek č. 6. Struktura otestovaných derivátů XXXVI

Cytotoxická aktivita vybraných derivátů XXXVI IC50 (µM)									
R	A 549	CEM	CEM-DNR-bulk	K562	K562-tax				
N	1,6	1,6	3,0	0,7	2,0				
· v ^r N	1,1	0,7	2,2	0,6	1,2				
OH H OH	46,8	2,7	98,8	7,3	44,9				
N	1,7	1,4	3,4	0,7	2,1				

Tabulka č. 3. Cytotoxická aktivita vybraných derivátů XXXVI

2.3.3. Protinádorová aktivita 3-HQ-karboxamidů

S aplikací syntézy na pevné fázi a kombinatoriálního přístupu byly připraveny systematické knihovny 3-HQs, které měly pomoci optimalizovat jejich strukturu. Testovány byly různě substituované 3-HQ-karboxamidy. Byl sledován vliv substituce na fenylovém kruhu v poloze 2 základního 3-HQ skeletonu, a také substituce karboxamidové funkce v poloze 6,7 a 8 (**Obrázek č. 7**). Z výsledků protinádorových aktivit vyplývá, že poloha karboxamidové skupiny nemá výrazný vliv na protinádorové vlastnosti. Nejlepších výsledků dosáhly *N*-karboxamidy substituované lipofilní skupinou, zatímco substituce na fenylové kruhu v poloze 2 neměla na testovanou aktivitu výrazný vliv. Výsledky nejlepších derivátů otestovaných na různých buněčných liniích ukazuje **tabulka č. 4**⁷.



Obrázek č. 7. Obecná struktura 6,7 a 8 substituovaných 3-HQs-N-karboxamidů

Cytotoxická aktivita vybraných derivátů 3-HQs-karboxamidů IC_{50} (μM)									
Poloha	R ₂	R 1	CEM	K562	HCT116	BJ	PBMC		
karboxamidu									
6	3,5-diCl;	dodecyl	0,25	0,37	0,56	90,1	98,3		
	4-NH ₂								
6	3,5-diCl;	cyklododecyl	0,26	0,77	0,69	36,2	56,5		
	4-NH ₂								
7	3,5-diCl;	naftyl-1-Me	0,69	2,4	2,4	52,2	19,1		
	4-NH ₂								
7	3,5-diCl;	cyklododecyl	0,45	2,1	4,1	71,3	74,9		
	4-NH ₂								
7	3,5-diCl;	propyl	0,98	9,6	7,9	16,1	70,4		
	4-NH ₂								

Tabulka č. 4. Výsledky nejlepších derivátů různě substituovaných 3-HQs-N-karboxamidů

2.3.4. Molekulární cíl a vztah mezi strukturou a biologickou aktivitou 3-HQs

Na základě výsledku z protinádorových aktivit byl vybrán vhodný kandidát **XXXVIII** (**Obrázek č. 8**) pro hledání molekulárního cíle působení 3-HQ. Pro první odhad byla využita afinitní chromatografie, pomocí které byla prokázaná interakce 3-HQ **XXXVIII** s translačním elongačním faktorem EF1A1 - jeden z důležitých glykolytických proteinů a cytoskeletální protein. Během studia se zjistilo, že tento protein tvoří komplex s nádorově specifickou pyruvátkinázou PKM2. Přestože po interakci s 3-HQ **XXXVIII** zůstává aktivita těchto enzymů zachována, je spuštěna kaskáda reakcí v metabolických drahách, které způsobují apoptózu buněk. Toto pozorování se v současné době prokazuje změnami v citrátovém cyklu. Interakce 3-HQ s translačním elongačním faktorem byla potvrzena titrační mikrokalorimetrií. Tyto výsledky nebyly doposud publikovány.



Obrázek č. 8. Struktura derivátu 3-HQs vybraného pro hledání molekulárního cíle

Vzhledem k zjištěným okolnostem byl ve spolupráci s RNDr. Mgr. Gracianem Tejlarem Ph.D. vytvořen matematický model (**Obrázek č. 9**) interakce 3-HQ **XXXVIII** s EF1A1. Model proteinu byl vytvořen pomocí komparativního modelování v programu MODELLER. Struktura EF1A1 byla následně stabilizována pomocí molekulové dynamiky, a to buď za použití empirického interakčního potenciálu Amber nebo OPLS-AA. Na tři struktury (jedna neoptimalizovaná a dvě optimalizované) pak byly dokovány ligandy pomocí programu Autodock/Vina, kde byla struktura ligandů optimalizována pomocí RHF nebo B3LYP výpočtů v programu Guassian UK.



Obrázek č. 9. Matematický model interakce 3-HQs s EF1A1

Výsledky protinádorové aktivity, znalost molekulárního cíle a matematického modelování interakce 3-HQ s EF1A1 nám umožňuje předpovídat roli jednotlivých částí struktury 3-HQs (**Obrázek č. 10**).



Obrázek č. 10. Role jednotlivých částí 3-HQs

Z matematického modelu (**Obrázek č. 9**) je zřejmé, že část nejvíce se podílející na interakci s EF1A1 je fenylový kruh v poloze č. 2. Fenylový kruh tak představuje farmakofor, jehož modifikací lze optimalizovat protinádorovou aktivitu. Z obrázku je také patrné, že aminoskupina v poloze 1 3-HQ skeletonu není stíněna proteinem, a proto je zde dostatečný prostor pro další modifikaci, např. pro zlepšení rozpustnosti 3-HQs zavedením hydrofilních zbytků. Podobné prostorové možnosti platí pro chinolinový fenylový kruh. Tato část molekuly nabízí velký prostor pro zavedení dalších substituentů, a tudíž je možné ovlivnit např. farmakologické vlastnosti zavedením vhodného fragmentu.

2.4. Změna biologické aktivity léčiv zavedením atomu fluoru

Jednou z možností, která může výrazně vylepšit farmakologické vlastnosti biologicky aktivních látek je jejich substituce atomem fluoru. Ačkoliv je fluor v přírodních látkách velmi vzácný, je pozoruhodné, že 20-25% veškerých léčiv využívaných ve farmaceutickém průmyslu obsahuje ve své molekule minimálně jeden atom fluoru¹⁷.

Názorným příkladem ilustrujícím pozitivní vliv fluoru na biologické vlastnosti může být první fluor obsahující léčivo fludrokortison (9-α-fluorkortison) **XXXIX**. Objev fludrokortisonu vyplynul ze systematické studie 9α halogenovaných derivátů kortizonu. Tato studie zkoumala vliv halogenu v poloze 9 na biologickou aktivitu. Otestovány byly jod, brom i chlor 9α substituované deriváty, které vykazovaly vyšší glukokortikoidní aktivity společně s rostoucí elektronegativitou resp. menším atomovým poloměrem^{18,19}. Vzhledem k tomuto trendu byl otestován i 9-α fluorkortison, který poskytoval výrazně vyšší glukokortikoidní aktivity než ostatní deriváty^{18,20}.



Obrázek č. 11. Struktura fludrokortisonu a 5-fluoruracilu

Dalším fluorovaným léčivem, které napomohlo ke změně pohledu na aplikaci fluoru ve farmaceutickém průmyslu je 5-fluoruracil **XL**, antimetabolit přírodního uracilu

(**Obrázek č. 11**)^{17,19}. Zavedení fluoru představuje možnost modulace elektronických, lipofilních i stérických parametrů, které mohou výrazně ovlivnit jak farmakokinetické tak farmakodynamické vlastnosti léčiv²¹.

V dnešní době existuje řada léčiv obsahujících atom fluoru. Příkladem může být antidepresivum fluoxetin, antibiotikum erythromycin nebo tamoxifen používaný při léčbě rakoviny prsu¹⁷.

2.5. Lipofilicita

Jedním z faktorů limitujících účinnost léčiva je jeho doprava do místa potřeby tzn. do buněk. Živočišné buňky jsou obaleny plasmatickou membránou skládající se z lipidové dvojvrstvy obsahující řadu proteinů, které ji zpevňují a udávají její tvar.

Všeobecně existují dvě cesty pro dopravu molekul do buněk. Jednu z nich představuje aktivní transport, který spotřebovává energii a tu druhou transport pasivní, který energii nespotřebovává. Běžnější z obou forem transportu je transport pasivní prostou difúzí přes plasmatickou membránu. Aby mohly molekuly léčiva projít přes tuto membránu, musí být dostatečně lipofilní, tzn. rozpustné v tucích¹⁷.

Míra lipofilicity se vyjadřuje jako rozdělovací koeficient log P mezi oktanolem a vodou, přičemž nejvíce lipofilní sloučeniny jsou rozděleny do oktanolové a nejméně lipofilní sloučeniny do vodné vrstvy. Příliš vysoká hodnota logu P však bývá častou příčinou špatně rozpustnosti ve vodě některých sloučenin¹⁷.

3. Cíle práce

Výsledky systematického testování protinádorových aktivit 3-HQs naznačují, že substituce na fenylovém kruhu v poloze 2 nemá výrazný vliv na jejich protinádorové aktivity. Naopak výsledky matematického modelování interakce 3-HQ **XXXVIII** s EF1A1 ukazují, že fenylový kruh v poloze 2 představuje hlavní místo interakce mezi 3-HQ a proteinem a jeho modifikace může výrazně ovlivnit protinádorové aktivity 3-HQs. Matematické modelování interakce 3-HQ s EF1A1 a výsledky systematického testování rovněž jednoznačně ukazují, že substituce na fenylovém kruhu chinolinového skeletu může výrazně ovlivnit biodostupnost 3-HQs.

Hlavním cílem této bakalářské práce je s využitím roztokové chemie, syntézy na pevné fázi a kombinatoriální chemie vyvinout metodiku pro přípravu fluorovaných 3-HQs obsahujících peptidový řetězec. Struktury připravovaných látek jsou navrženy tak, aby konečné 3-HQs byly dostatečně lipofilní pro prostup buněčnými membránami, ale zároveň dostatečně hydrofilní na rozpuštění ve vodném prostředí, což by znamenalo zvýšení biodostupnosti 3-HQs (**Obrázek č. 12**). Dalším cílem je studium lipofilicity a rozpustnosti připravených derivátů.



Obrázek č. 12. Design nových fluorovaných 3-HQs obsahujících peptidový řetězec

4. Výsledky a diskuze

Tato kapitola je rozdělena do tří částí. První část popisuje přípravu finálních 3-HQs obsahujících peptidový řetězec. Druhá se zabývá jejich izolací a čištěním. Třetí část poukazuje na lipofilní vlastnosti připravených 3-HQs a na jejich rozpustnost ve vodě.

4.1. Příprava fluorovaných 3-HQs obsahujících peptidový řetězec

Vzhledem k navržené přítomnosti peptidového řetězce v 3-HQs skeletu v poloze 7 jsme museli přizpůsobit jejich syntézu na pevné fázi. Ta nemohla být provedena na základě postupu popsaném v literatuře¹³(**Schéma č. 8**). Důvodem je finální cyklizační krok v kyselině trifluoroctové, při kterém za teplot okolo 100 °C dochází k degradaci peptidového řetězce. Navržený postup přípravy cílových 3-HQs obsahujících peptidový řetězec ilustruje **schéma č. 11**.



Schéma č. 11. Navržený postup přípravy cílových látek

4.1.1. Příprava 7-karboxy-3HQs

Jak bylo popsáno v teoretické části, prvním krokem reakční sekvence přípravy 7-karboxy-3-HQs je reakce kyseliny 2-aminotereftalové s libovolně substituovaným 2bromoacetofenonem, v našem případě tedy 2-bromo-4'-fluoroacetofenonem **3a**. Čistota surového produktu **4** byla dle LC-MS analýzy 85%. Celkovou čistotu zlepšilo promytí produktu acetonem, po kterém se zvýšila na 100%. Výtěžek reakce činil 75% (Schéma č. 12).



Schéma č. 12. Příprava difenacylesteru kyseliny 2-aminotereftalové

Kromě monofluorovaných derivátů nás také zajímal vliv zavedení dalšího atomu fluoru do molekuly 3-HQ. Difluorovaný bromoacetofenon **3b** je však velmi drahý, a proto jsme se jej rozhodli připravit. K přípravě jsme využili postup popsaný v literatuře²². Syntéza vycházela z 1,2-difluorbenznu **1**. Ten byl Friedel-Craftsovou acylací převeden na 3,4-difluoracetofenon **2**, který následnou bromací v poloze α poskytnul požadovaný 2-bromo-3',4'-difluoroacetofenon **3b** (**Schéma č. 13**).



Schéma č. 13. Příprava difluorovaného prekurzoru pro syntézu 3-HQs

Vzhledem k tomu, že se nám z důvodu nedostatku času nepodařilo derivát **3b** připravit a izolovat ve větším množství, další postup vycházel pouze z komerčně zakoupeného monofluorovaného acetofenonu **3a** modifikací podmínek popsaných v literatuře⁵.

Cyklizace za vzniku fenacylesteru 3-HQs **5** byla provedena v kyselině trifluoroctové při 100 °C. Při studiu této reakce jsme zjistili, že celkový reakční čas je závislý na množství derivátu **4**. Optimalizované reakční časy pro konkrétní navážky derivátu **4** ilustruje **tabulka č 5**.

Navážka derivátu 4 (g)*	Reakční čas (h) při 100 °C potřebný pro dosažení úplné konverze
0,05	1
1	4
4	8
9	24

*v jednotlivých navážkách byl použit 1 ekvivalent TFA

Tabulka č. 5. Vztah mezi navážkou derivátu 4 a reakčním časem reakce

Z analýz spekter LC-MS jsme zjistili, že kromě požadovaného fenacylesteru **5** (čistota 90%) v reakci vzniká i jiný produkt (čistota 10%), který jsme na základě hmotnostního spektra identifikovali jako sůl kyseliny trifluoroctové s derivátem **5**. Tato myšlenka byla podpořena následnou hydrolýzou obou produktů na požadovaný 7karboxy-3-HQ **6**, jehož surová čistota byla 95% (**Schéma č. 14**). Hydrolyzační reakce byla původně provedena v roztoku 65% (w/w) H₂SO₄. Při těchto podmínkách se tvořila heterogenní směs, ve které reakce neprobíhala. To bylo zřejmě způsobeno nízkou rozpustností fenacyleteru **5** ve vodném prostředí. Problém se podařilo vyřešit provedením reakce v koncentrovanějším 80% (w/w) roztoku H₂SO₄, ve kterém došlo k úplnému rozpuštění reakční směsi. 7-karboxy-3-HQ **6** vypadl nalitím reakční směsi do vody s ledem jako zelená sraženina. Celkový výtěžek všech tří reakčních kroků včetně čištění činil 60 %.



Schéma č. 14. Cyklizace difenacylesteru a následná hydrolýza na požadovaný 7-karboxy-3-HQs

4.1.2. Příprava mono, di a tripeptidů pomocí syntézy na pevné fázi

Pro syntézu peptidového řetězce jsme využili syntézu na pevné fázi ve spojení s kombinatoriální chemií. Při řešení této práce jsme se rozhodli využít Rinkův resp. Wangův linker, a to z důvodu sledování vlivu koncové karboxylové resp. amidové skupiny peptidového řetězce konečných 3-HQs na biologickou aktivitu (**Obrázek č. 13**)^{23,24}. Zároveň nás zajímal vliv použité pryskyřice na výtěžek reakce.



Obrázek č. 13. Struktury použitých linkrů

S využitím kombinatoriálního přístupu jsme připravili předem navržené sekvence mono, di a tripeptidů, vybraných na základě předešlého výpočtu hodnot logu P pro jiné deriváty 3-HQs nesoucí tyto peptidové řetězce. Vycházeli jsme z postupu využívajícího klasické HOBt techniky²⁵. Pro syntézu byly použity čtyři aminokyseliny, fenylalanin (Phe) **a**, valin (Val) **b**, leucin (Leu) **c** a tert-butyl-serin (Ser-tBu) **d**, obsahující protekční fluorenylmethyloxycarbonyl skupinou (Fmoc), (**Obrázek č. 14**). Tato skupina slouží zároveň jako chromofor absorbující elektromagnetické záření při 300 nm a umožňuje identifikaci alifatických peptidů pomocí LC-MS.



Obrázek č. 14. Struktury použitých aminokyselin a chránící skupiny Fmoc

Pro označení jednotlivých mono, di a tripeptidů jsme použili následujícího značení. Peptid je označen číslicí 7. Za ním následuje písmeno W, popř. R, které definuje, na které pryskyřici byl daný peptid připraven (W = Wangova pryskyřice, R = Rinkova

pryskyřice), resp. zdali peptid končí karboxamidickou skupinou (R) nebo karboxylovou (W). Jednotlivé aminokyseliny pak definují písmena **a-d**. Obsahuje-li tedy označení pouze jedno písmeno, jedná se o monopeptid, atp. Celkový postup přípravy peptidu ilustruje **schéma č. 15**.



Schéma č. 15. Celkové schéma přípravy mono, di a tripeptidů

Při studiu reakcí na Wangově pryskyřici jsme zjistili, že navázání první aminokyseliny probíhá pro jednotlivé aminokyseliny různě dlouho. Zatímco pro navázání valinu **b** byl reakční čas reakce 1,5 h, pro navázání fenylalaninu **a** a serinu **d** 2,5 h. Pro leucin **c** činil reakční čas dokonce 3 h. Tyto výsledky jsme získali na základě hodnot loadingu (mmol/g), používaném pro kvantitativní analýzu reakcí pomocí syntézy na pevné fázi. Jako standard jsme použili Fmoc- β -alanin. Výsledky hodnot loadingu vzhledem k reakčnímu času a typu aminokyseliny ilustruje **tabulka č. 6**.

 Průměrné hodnoty loadingu pro jednotlivé aminokyseliny v různých časech Delší reakční časy neposkytovaly vyšší hodnoty než při 3 hodinách. 								
Aminokyseliny/čas1,5 h2,5 h3 h								
Phe	0,29 mmol/g	0,34 mmol/g	0,34 mmol/g					
Val	0,29 mmol/g	0,29 mmol/g	0,29 mmol/g					
Leu	0,14 mmol/g	0,29 mmol/g	0,32 mmol/g					
Ser	0,26 mmol/g	0,29 mmol/g	0,29 mmol/g					

Tabulka č. 6. Průměrné hodnoty loadingu pro jednotlivé aminokyseliny

Vzhledem k těmto okolnostem jsme všechny reakce nechali probíhat 3 h. Čistoty reakcí se pohybovaly v rozmezí od 95 do 100%.

4.1.3. Finální spojení peptidového řetězce s 7-karobxy-3-HQ

Klíčový krok celé syntézy cílových 3-HQs spočíval ve spojení peptidového řetězce **7** s 7-karboxy-3-HQ **6** na finální 3-HQ **8**. Tento krok byl opět proveden prostřednictvím syntézy na pevné fázi. Při použití klasických podmínek HOBt reakce neprobíhala, proto bylo nutné použít drsnější podmínky v 50% pyridinu. Zároveň jsme museli reakční roztok připravit v nižších koncentracích (0,1 mmol/ml), než je pro syntézu na pevné fázi běžné (0,2 - 0,5 mmol/ml), a to z důvodu špatné rozpustnosti 7-karobxy-3-HQs **6** (**Schéma č. 16**). Pro označení finálních derivátů jsme použili obdobné číslování jako v případě peptidů.



Schéma č. 16. Finální krok syntézy peptidových 3-HQs

Pro optimalizaci reakčních podmínek jsme vybrali reakci 7-karboxy-3-HQ **6** s peptidem **7-W-b-a** obsahující fenylalanin, který by v případě nedoreagování mohl být detekován pomocí LC-MS. Vzorky pro analýzu jsme odebírali po 1 hodině. Hned po prvním odebraném vzorku jsme dosáhli 100% čistého produktu. Při reakčních dobách vyšších než 2 h vznikal nežádoucí produkt, jehož hmota odpovídá navrženému derivátu **9** (**Obrázek č. 15**), (**Tabulka č. 7**). Vzhledem k možnosti řízení reakčních podmínek pouze k žádanému produktu jsme se prokazováním této struktury dále nezabývali. Stejný postup jsme vyzkoušeli i s náhodně vybraným mono a tripeptidem. Výsledky vykazovaly stejný trend.

Reakční čas (h)	Čistota 8-W-b-a (%)	Čistota 9 (%)
1	100	0
2	100	0
3	95	5

Tabulka č. 7. Vliv reakční doby na čistotu produktu



Obrázek č. 15. Navržená struktura vedlejšího produktu na základě LC-MS analýzy

Z předložených výsledků je zřejmé, že delší reakční časy jak 2 h snižují čistotu produktu.

4.2. Izolace a čištění finálních látek

Po ukončení reakční sekvence na pevné fázi je nutné produkt z pryskyřice odštěpit štěpícím koktejlem, v našem případě 50% (v/v) TFA/DCM. Následně je štěpící koktejl odpařen pod proudem dusíku. Takto získaný surový produkt je nutné vyčistit od zbytkové TFA a dalších nečistot. Typicky se takové čištění provádí pomocí HPLC. V případě 3-HQs však často dochází k rozmývání píků na chromatografické koloně a HPLC metoda je tedy k jejich čištění nevhodná. Kromě toho, již surová čistota našich produktů je dostatečně vysoká, a tudíž by použití HPLC vedlo ke zbytečné ztrátě hmoty. Ze zkušeností z prací s 3-HQs v naší laboratoři víme, že pro finální čištění 3-HQs často stačí produkt vysrážet a promýt v diethyletheru⁷. Tento ověřený postup jsme tedy vyzkoušeli i s našimi látkami. Problém však nastal při rozpouštění přečištěného produktu na analýzy NMR, kdy jsme jako rozpouštědlo použili deuterovaný DMSO, ve kterém se produkt rozpustil jen částečně a v roztoku zůstaly kousky pevné látky. Původně jsme předpokládali, že jsou námi připravené produkty nerozpustné v DMSO, a tak jsme se je snažili rozpustit v jiných rozpouštědlech jako CHCl₃, DMF, oktanolu nebo DCM.

Výsledek byl ale vždy negativní a látku se nám nepodařilo rozpustit. Po usilovném řešení tohoto problému jsme zjistili, že nerozpustná látka není 3-HQ, ale neidentifikovatelná látka rozpustná pouze v TFA. Na základě nerozpustnosti této látky a jejího výskytu ve více produktech jsme došli k závěru, že pravděpodobně pochází z pryskyřice, ze které byla odštěpena pomocí TFA. Zřejmě se tedy jedná o látku polymerního charakteru.

Problém se nakonec podařilo vyřešit tím způsobem, že jsme po vyfoukání štěpícího koktejlu k odparku místo diethyletheru nalili metanol, ve kterém se nežádoucí produkt vysrážel a oddělil od našeho produktu. Ten zůstal rozpuštěný v methanolu. Následně jsme roztok přefiltrovali přes filtr stříkačky a metanol odpařili na vakuové rotační odparce. Jakmile jsme dostali suchý produkt, přilili jsme k němu diethylether a nechali vysrážet v ultrazvuku. Výsledkem byl jemný prášek produktu, který jsme ještě několikrát dekantovali diethyletherem a vysušili na lyofilizátoru.

4.3. Lipofilicita a rozpustnost připravených 3-HQs

	Míru	lipofilicity	finálních	látek	(log	P)	jsme	spočítali	pomocí	programu
ACD/Lo	ogP (T	abulka č. 8)	. Bohužel	z důvo	du ne	dost	tatku č	asu jsme t	yto hodno	oty nestihli
experim	entáln	ě ověřit.								

Derivát	8-W-a	8-W-b	8-W-c	8-W-d	8-W-a-a
Vypočtená hodnota	4,19	3,39	3,92	1,17	6,06
Derivát	8-W-a-b	8-W-a-d	8-W-b-a	8-W-c-b	8-W-d-a
Vypočtená hodnota	5,26	3,88	5,1	4,83	3,39
Derivát	8-W-d-b	8-W-c-a-a	8-W-c-a-c	8-W-c-c-a	8-W-c-d-a
Vypočtená hodnota	2,58	7,63	7,35	7,20	5,21
Derivát	8-R-a	8-R-b	8-R-c	8-R-d	8-R-a-a
Vypočtená hodnota	4,04	3,22	3,75	2,05	5,62
Derivát	8-R-a-b	8-R-a-d	8-R-b-a	8-R-c-b	8-R-d-a
Vypočtená hodnota	4,82	3,44	4,64	4,37	3,39
Derivát	8-R-d-b	8-R-c-a-a	8-R-c-c-a		
Vypočtená hodnota	2,59	6,52	6,09		

Tabulka č. 8. Vypočtené hodnoty logu P, finálních 3-HQs

Z vypočtených hodnot vyplývá, že tyto látky jsou hodnotami log P blízko ideálním. Ze srovnání dvou 3-HQs nesoucí stejný peptidový řetězec jen s jiným pořadím

aminokyselin (např. **8-W-a-b** a **8-W-b-a**, popř. **8-W-c-a-c** a **8-W-c-c-a**) vidíme, že změna pořadí aminokyselin může mít vliv na biologické vlastnosti 3-HQs. Hodnoty také potvrzují, že zavedení polárnějšího serinu lipofilicitu snižuje (např. **8-W-d**).

Vzhledem k tomu, že obecný problém 3-HQs je jejich nerozpustnost ve vodě, zajímalo nás, jestli zavedení peptidového řetězce rozpustnost nezvýšilo. Vybrali jsme 5 derivátů a ke stanovení jejich rozpustnosti využili HPLC. Pomocí metody vnějšího standardu jsme stanovili rozpustnost vybraných 3-HQs. K přípravě vzorků jsme použili solubilizér, který nám vzorky naředil v přesných koncentracích. Výsledky hodnot rozpustností pro 5 vybraných 3-HQs ukazuje **tabulka č. 9**.

Derivát	8-W-b	8-W-c	8-W-d	8-W-b-a	8-W-c-c-a
Rozpustnost mg/ml	0,023	0,085	0,273	0,052	0,088

Tabulka č. 9. Rozpustnost vybraných derivátů ve vodě

Z naměřených výsledků vyplývá, že rozpustnost 3-HQs lze ovlivnit zavedením peptidového řetěžce i za předpokladu, že se jedná o méně polární aminokyselinu, např. leucin (**8-W-c**). Nejvyšší hodnotu rozpustnosti vykazoval derivát **8-W-d** obsahující ve své molekule serin. Jeho rozpustnost byla 3x až 11x vyšší než u ostatních derivátů.

5. Experimentální část

Instrumentace a metody

Pro reakce na pevné fázi jsme použili plastové injekční stříkačky opatřené polypropylenovou fritou. LC-MS analýzy byly prováděny pomocí UPLC-MS systému skládajícího se z chromatografu Acquity s detektorem fotodiodového pole a jednoduchého kvadrupólového hmotnostního spektrometru (Waters) USA, na koloně X-Select C18. Analýzy pro zjištění hodnot rozpustnosti byly provedeny pomocí systému HPLC Alliance (Waters) USA skládajícího se z detektoru fotodiodového pole, autosampleru a kvarterní pumpy za použití kolony X-Bridge C18.

Příprava vzorků pro měření rozpustnosti byla provedena pomocí přístroje Amigochem UK skládajícího se z injektoru, reakčního bloku a automatického reakčního sampleru.

NMR spektra byla měřena na přístroji JEOL (500 MHz) za laboratorní teploty. Vzorky byly rozpuštěny v deuterovaném DMSO, jehož resonanční signál sloužil jako referenční standard. Hodnoty chemického posunu δ byly udány v ppm a hodnoty interakčních konstant v Hz.

K sušení vzorků byl použit lyofilizátor Scanvac CoolSafe.

Štěpení vzorku z pryskyřice pro analýzu LC-MS

Po ukončení reakce na pevné fázi a následném promytí pryskyřice byl odebrán analytický vzorek (5 mg). Ten byl štěpen po dobu 30 minut v 1 ml štěpícího koktejlu TFA/DCM 50% (v/v). Po 30 minutách byl štěpící koktejl vyfoukán pod proudem dusíku. K odparku byl následně přidán 1 ml methanolu pro HPLC. Roztok byl poté přefiltrován do vialek a změřen pomocí LC-MS.

Odstranění chránící skupiny Fmoc

Do stříkačky s pryskyřici (500 mg) byl nasán 50% (v/v) roztok DMF/piperidin (10 – 15 ml). Reakce byla třepána 20 minut za laboratorní teploty. Po uplynutí stanovené doby byl roztok odsán a pryskyřice promyta DMF (5x) a DCM (3x).

Příprava vzorku pro měření rozpustnosti

a) Příprava kalibračních roztoků

Z požadovaných derivátů byl připraven vodný zásobní roztok (1 mg/ml). Jeho ředěním byly připraveny roztoky o koncentracích 0,5; 0,1; 0,05 a 0,01 mg/ml. Ty byly změřeny pomocí HPLC a následně byly stanoveny kalibrační křivky pro jednotlivé deriváty.

b) Příprava vzorků

Požadované deriváty (10 mg) byly nasypány do reakčních baněk. Následně k nim byly přility 2 ml vody a připraven přesycený roztok. Poté byly naředěny v přesných koncentracích pomocí přístroje Amigochem a změřeny stejným HPLC jako kalibrační roztoky.

Příprava sloučeniny 2

Sloučeninu **2** jsme připravili modifikací podmínek popsaných v literatuře²². Suchý FeCl₃ (9,5 mmol) byl nasypán do reakční baňky chlazené ledem. Následně byl po kapkách přidán acetyl chlorid (9,5 mmol) a poté 1,2-difluorbenzen (9,5 mmol). Reakční baňka byla odebrána z ledové lázně a míchána 3,5 h za použití mikrovlnného záření při 100 °C. Produkt jsme dále nestihli izolovat.

UV/VIS – porovnáno s komerčně zakoupeným standardem. Čistota 90%.

Příprava sloučeniny 3a

Sloučeninu **3a** jsme připravili podle postupu popsaném v literatuře²². Produkt jsme dále nestihli izolovat.

Analytická data byla v souladu s publikovanými. Čistota 76%.

Příprava sloučeniny 4

Sloučeninu **4** jsme připravili modifikací postupu popsaném v literatuře⁵. 2aminotereftalová kyselina (22,03 mmol) byla rozpuštěna v DMF (115 ml) a byl přidán K₂CO₃ (23,03 mmol). Takto připravená směs byla míchána na elektromagnetické míchačce 2 h při 90 °C. Po vychladnutí směsi na laboratorní teplotu byl přidán 2-bromo-4'-fluoracetofenon (46,06 mmol) a směs byla míchána při laboratorní teplotě 1 h. Reakční směs byla následně nalita do 10% NaHCO₃ (500 ml). Žlutý produkt byl odsán přes Büchnerovu nálevku, promyt acetonem a vysušen na lyofilizátoru.

MS (ESI) vypočteno pro C₂₄H₁₈F₂NO₆ [M+H]⁺: 454,11; nalezeno: 454,32, čistota 100%. Výtěžek 75%.

Příprava sloučeniny 5

Sloučeninu **5** jsme připravili modifikací postupu popsaném v literatuře⁵. Derivát **4** (19,8 mmol) byl nasypán do 500 ml baňky. Následně byla přidána TFA (225 ml) a reakční směs byla míchána na elektromagnetické míchačce 24 h při 100 °C. Produkt byl izolován nalitím do vody s ledem, kde vypadl jako zelená sraženina a následně odsán. Veškeré množství derivátu **5** připraveného v tomto reakčním kroku bylo použito pro přípravu derivátu **6**.

MS (ESI) vypočteno pro C₂₄H₁₆F₂NO₅ [M+H]⁺: 436,10, nalezeno 436,12, čistota 90%.

Příprava sloučeniny 6

Sloučeninu **6** jsme připravili modifikací postupu popsaném v literatuře⁵. Derivát **5** byl nasypán do 500 ml baňky. K němu byla přilita 80% (w/w) H_2SO_4 (270 ml) a reakce byla míchána na elektromagnetické míchačce 4 h při 80 °C. Produkt byl izolován stejným způsobem jako derivát **5**. Po jeho izolaci byl převeden do kádinky s acetonem (400 ml) a překrystalizován. Nakonec byl odsán a vysušen na lyofilizátoru.

MS (ESI) vypočteno pro $C_{16}H_{11}FNO_4 [M+H]^+$: 300,07, nalezeno 300,11, čistota 100%. Výtěžek 60%.

Obecná příprava peptidů a stanovení loadingu pryskyřice

Rinkova pryskyřice (500 mg) byla nabobtnána DMF (3x) a DCM (3x) a poté zbavena chránící skupiny Fmoc. Následně byla připravena reakční směs aminokyseliny (AA₁) podle následujícího postupu. Do roztoku aminokyseliny AA₁ (2.5 mmol) v DCM (3,5 ml) byl přidán HOBt (2,5 mmol). Po rozpuštění byl ke směsi přidán DMF (3,5 ml) a DIC (2,5 mmol). Reakční směs byla nasáta do injekční stříkačky s nabobtnanou pryskyřicí a třepána za laboratorní teploty 3 h. Po 3 h byl reakční roztok odsán a pryskyřice s navázanou aminokyselinou promyta v DMF (5x) a DCM (3x).

Při přípravě peptidů na Wangově pryskyřici byl do stříkaček po nabobtnání nasán rovnou roztok aminokyseliny připravený stejným způsobem jako výše s tím rozdílem, že společně s HOBt byl do roztoku přidán DMAP (0,75 mmol).

Dipeptidy a tripeptidy na Rinkově i Wangově pryskyřici byly připraveny stejným způsobem jako monopeptidy na Rinkově pryskyřici.

Loading pryskyřice byl stanoven následujícím způsobem. Pryskyřice (cca 20 mg) byla vysrážena v methanolu. Následně byla vysušena pod proudem dusíku. Jakmile byla pryskyřice suchá, bylo naváženo její přesné množství (5 – 10 mg). To bylo štěpeno standardním postupem. K suché pryskyřici byl nakonec přidán přesně 1 ml methanolu pro HPLC a vzorek změřen pomocí LC-MS. Plocha píku navázané aminokyseliny byla srovnána se standardem Fmoc- β -ala-OH při vlnové délce 300 nm.

Monopeptid 7-W-a (Phe)

MS (ESI) vypočteno pro C₂₄H₂₁NO₄ [M+H]⁺: 388,15; nalezeno: 388,34, čistota: 100%. **Monopeptid 7-W-b (Val)**

MS (ESI) vypočteno pro $C_{20}H_{21}NO_4$ [M+H]⁺: 340,15; nalezeno: 340,24, čistota: 100%.

Monopeptid 7-W-c (Leu)

MS (ESI) vypočteno pro C₂₁H₂₃NO₄ [M+H]⁺: 354,17; nalezeno: 354,30, čistota: 97%.

Monopeptid 7-W-d (Ser)

MS (ESI) vypočteno pro C₁₈H₁₇NO₅ [M+H]⁺: 328,12; nalezeno: 328,03, čistota: 100%.

Monopeptid 7-R-a (Phe)

MS (ESI) vypočteno pro C₂₄H₂₂N₂O₃ [M+H]⁺: 387,17; nalezeno: 387,12 čistota: 100%.

Monopeptid 7-R-b (Val)

MS (ESI) vypočteno pro C₂₀H₂₂N₂O₃ [M+H]⁺: 339,17; nalezeno: 339,15, čistota: 100%.

Monopeptid 7-R-c (Leu)

MS (ESI) vypočteno pro C₂₁H₂₄N₂O₃ [M+H]⁺: 353,19; nalezeno: 353,34, čistota: 100%.

Monopeptid 7-R-d (Ser)

MS (ESI) vypočteno pro $C_{18}H_{18}N_2O_4$ [M+H]⁺: 327,13; nalezeno: 327,07, čistota: 100%. **Dipeptid 7-W-a-a (Phe-Phe)**

MS (ESI) vypočteno pro C₃₃H₃₀N₂O₅ [M+H]⁺: 535,22; nalezeno: 535,33, čistota: 100%.

Dipeptid 7-W-a-b (Phe-Val)

MS (ESI) vypočteno pro C₂₉H₃₀N₂O₅ [M+H]⁺: 487,22; nalezeno: 487,43, čistota: 100%.

Dipeptid 7-W-a-d (Phe-Ser)

MS (ESI) vypočteno pro C₂₇H₂₆N₂O₆ [M+H]⁺: 475,19; nalezeno: 475,16, čistota: 100%.

Dipeptid 7-W-b-a (Val-Phe)

MS (ESI) vypočteno pro C₂₉H₃₀N₂O₅ [M+H]⁺: 487,22; nalezeno 487,24, čistota: 100%.

Dipeptid 7-W-c-a (Leu-Phe)

MS (ESI) vypočteno pro C₃₀H₃₂N₂O₅ [M+H]⁺: 501,24; nalezeno: 501,26, čistota: 100%.

Dipeptid 7-W-c-b (Leu-Val)

MS (ESI) vypočteno pro $C_{26}H_{32}N_2O_5$ [M+H]⁺: 453,24; nalezeno: 453,33, čistota: 100%. **Dipeptid 7-W-c-c (Leu-Leu)**

MS (ESI) vypočteno pro C₂₇H₃₄N₂O₅ [M+H]⁺: 467,25; nalezeno: 467,14, čistota: 100%.

Dipeptid 7-W-c-d (Leu-Ser)

MS (ESI) vypočteno pro C₂₄H₂₈N₂O₆ [M+H]⁺: 441,20; nalezeno: 441,19, čistota: 100%.

Dipeptid 7-W-d-a (Ser-Phe)

MS (ESI) vypočteno pro $C_{27}H_{26}N_2O_6$ [M+H]⁺: 475,19; nalezeno: 475,42, čistota: 100%.

Dipeptid 7-W-d-b (Ser-Val)

MS (ESI) vypočteno pro C₂₃H₂₆N₂O₆ [M+H]⁺: 427,19; nalezeno: 427,39, čistota: 100%.

Dipeptid 7-R-a-a (Phe-Phe)

MS (ESI) vypočteno pro C₃₃H₃₁N₃O₄ [M+H]⁺: 534,24; nalezeno: 534,43, čistota: 93%.

Dipeptid 7-R-a-b (Phe-Val)

MS (ESI) vypočteno pro C₂₉H₃₁N₃O₄ [M+H]⁺: 486,24; nalezeno: 486,14, čistota: 97%.

Dipeptid 7-R-a-d (Phe-Ser)

MS (ESI) vypočteno pro C₂₇H₂₇N₃O₅ [M+H]⁺: 474,20; nalezeno: 474,20, čistota: 96%.

Dipeptid 7-R-b-a (Val-Phe)

MS (ESI) vypočteno pro C₂₉H₃₁N₃O₄ [M+H]⁺: 486,24; nalezeno: 486,14, čistota: 100%.

Dipeptid 7-R-c-a (Leu-Phe)

MS (ESI) vypočteno pro C₃₀H₃₃N₃O₄ [M+H]⁺: 500,25; nalezeno: 500,32, čistota: 100%.

Dipeptid 7-R-c-b (Leu-Val)

MS (ESI) vypočteno pro $C_{26}H_{33}N_3O_4$ [M+H]⁺: 452,25; nalezeno: 452,26, čistota: 100%.

Dipeptid 7-R-c-c (Leu-Leu)

MS (ESI) vypočteno pro $C_{27}H_{35}N_3O_4$ [M+H]⁺: 466,27; nalezeno: 466,29, čistota: 100%.

Dipeptid 7-R-c-d (Leu-Ser)

MS (ESI) vypočteno pro C₂₇H₃₅N₃O₄ [M+H]⁺: 440,22; nalezeno: 440,26, čistota: 100%.

Dipeptid 7-R-d-a (Ser-Phe)

MS (ESI) vypočteno pro $C_{27}H_{27}N_3O_5$ [M+H]⁺: 474,20; nalezeno: 474,07, čistota: 100%. **Dipeptid 7-R-d-b (Ser-Val)**

MS (ESI) vypočteno pro C₂₃H₂₇N₃O₅ [M+H]⁺: 426,20; nalezeno: 426,29, čistota: 100%.

Tripeptid 7-W-c-a-a (Leu-Phe-Phe)

MS (ESI) vypočteno pro C₃₉H₄₁N₃O₆ [M+H]⁺: 648,31; nalezeno: 648,34, čistota: 100%.

Tripeptid 7-W-c-a-c (Leu-Phe-Leu)

MS (ESI) vypočteno pro C₃₆H₄₃N₃O₆ [M+H]⁺: 614,32; nalezeno: 614,50, čistota: 100%.

Tripeptid 7-W-c-c-a (Leu-Leu-Phe)

MS (ESI) vypočteno pro $C_{36}H_{43}N_3O_6 [M+H]^+$: 614,32; nalezeno: 614,44, čistota: 100%. **Tripeptid 7-W-c-d-a (Leu-Ser-Phe)** MS (ESI) vypočteno pro $C_{33}H_{37}N_3O_7 [M+H]^+$: 588,27; nalezeno: 588,3, čistota: 100%. **Tripeptid 7-R-c-a-a (Leu-Phe-Phe)** MS (ESI) vypočteno pro $C_{39}H_{42}N_4O_5 [M+H]^+$: 647,32; nalezeno: 647,76, čistota: 96%. **Tripeptid 7-R-c-a-c (Leu-Phe-Leu)** MS (ESI) vypočteno pro $C_{39}H_{42}N_4O_5 [M+H]^+$: 613,34; nalezeno: 613,41, čistota: 100%. **Tripeptid 7-R-c-c-a (Leu-Phe)** MS (ESI) vypočteno pro $C_{39}H_{42}N_4O_5 [M+H]^+$: 613,34; nalezeno: 613,42, čistota: 100%. **Tripeptid 7-R-c-d-a (Leu-Ser-Phe)**

MS (ESI) vypočteno pro C₃₃H₃₈N₄O₆ [M+H]⁺: 587,29; nalezeno: 587,34, čistota: 95%.

Obecná příprava derivátů 8

Derivát **6** (0,98 mmol) byl rozpuštěn v 50% (v/v) roztoku DMF/pyridin (10 ml). Poté byl k reakční směsi přidán HOBt (1,15 mmol) a DIC (175 μ l). Roztok byl následně rozpuštěn v ultrazvuku. Jakmile došlo k úplné homogenizaci směsi, byla nasána do stříkačky s pryskyřicí obsahující požadovaný peptid **7**, zbavený protekční skupiny výše zmíněným způsobem. Reakce byla třepána 1,5 hodiny za laboratorní teploty a nakonec promyta DMF (5x) a DCM (3x). Způsob izolace je popsán v kapitole 4.2.

8-W-a

¹H NMR (500 MHz, DMSO-*d*₆, ppm) δ : 11.77 (s, 1H), 8.90 (d, *J* = 8.1 Hz, 1H), 8.19 (d, *J* = 8.6 Hz, 1H), 8.14 (s, 1H), 7.91 – 7.82 (m, 2H), 7.64 (d, *J* = 8.6 Hz, 1H), 7.42 (t, *J* = 8.8 Hz, 2H), 7.33 (d, *J* = 7.3 Hz, 2H), 7.28 (t, *J* = 7.5 Hz, 2H), 7.19 (t, *J* = 7.3 Hz, 1H), 4.69 – 4.64 (m, 1H), 3.12 - 3.08 m (2H). MS (ESI) vypočteno pro C₂₅H₁₉FN₂O₅ [M+H]⁺: 447,14; nalezeno: 447,29, čistota: 100%. Výtěžek 82%.

8-W-b

¹H NMR (500 MHz, DMSO-*d*₆, ppm) δ: 11.82 (s, 1H), 8.64 (d, J = 8.1 Hz, 1H), 8.24 – 8.17 (m, 2H), 7.88 (dd, J = 8.1, 5.5 Hz, 2H), 7.71 (dd, J = 8.9, 1.3 Hz, 1H), 7.42 (t, J = 8.9 Hz, 2H), 4.37 – 4.24 (m, 1H), 2.26 – 2.18 (m, Hz, 1H), 0.99 (m, 6H). ¹³C NMR: 173.1, 170.5, 166.8, 163.8, 161.3, 138.6, 137.4, 136.2, 131.7, 128.5, 124.6, 123.2, 120.4, 119.0, 115.5, 58.5, 29.5, 19.3, 18.8. MS (ESI) vypočteno pro C₂₁H₁₉FN₂O₅ [M+H]⁺: 399,14; nalezeno: 399,19, čistota: 100%. Výtěžek 78%.

8-W-c

¹H NMR (500 MHz, DMSO-*d*₆, ppm) δ : 11.82 (s, 1H), 8.83 (d, *J* = 7.9 Hz, 1H), 8.26 – 8.16 (m, 2H), 7.88 (dd, *J* = 7.8, 4.6 Hz, 2H), 7.73 (dd, *J* = 8.6, 1.2 Hz, 1H), 7.43 (t, *J* = 8.9 Hz, 2H), 4.57 – 4.32 (m, 1H), 1.90 – 1.67 (m, 1H), 1.66 – 1.42 (m, 1H), 0.92 (dd, *J* = 14.8, 6.4 Hz, 6H). ¹³C NMR: 174.1, 166.3, 163.8, 161.3, 138.6, 137.4, 136.0, 131.7, 128.5, 124.7, 123.2, 120.1, 118.9, 115.4, 115.2, 51.1, 24.6, 23.1, 21.1. MS (ESI) vypočteno pro C₂₂H₂₁FN₂O₅ [M+H]⁺: 413,15; nalezeno: 413,19, čistota: 100%. Výtěžek 84%.

8-W-d

¹H NMR (500 MHz, DMSO-*d*₆, ppm) δ : 11.83 (s, 1H), 8.58 (d, *J* = 7.7 Hz, 1H), 8.26 (d, *J* = 1.5 Hz, 1H), 8.23 (d, *J* = 8.6 Hz, 1H), 7.89 (dd, *J* = 8.9, 5.5 Hz, 2H), 7.74 (dd, *J* = 8.6, 1.5 Hz, 1H), 7.42 (t, *J* = 8.9 Hz, 2H), 4.53 (dd, *J* = 10.3, 7.4 Hz, 1H), 3.84 (d, *J* = 5.6 Hz, 2H). ¹³C NMR: 171.9, 166.0, 163.8, 161.3, 138.6, 137.4, 135.8, 131.7, 128.5, 124.8, 123.2, 120.1, 118.9, 115.4, 114.7, 61.2, 55.8. MS (ESI) vypočteno pro C₁₉H₁₅FN₂O₆ [M+H]⁺: 387,1; nalezeno: 387,12, čistota: 100%. Výtěžek 81%.

8-W-a-a

¹H NMR (500 MHz, DMSO-*d*₆, ppm) δ: 8.66 (d, J = 8.5 Hz, 1H), 8.34 (d, J = 7,8 Hz, 1H), 8.14 (d, J = 8.5 Hz, 1H), 8.08 (s, 1H), 7.83 (m, 2H), 7.59 (d, J = 8.5 Hz, 1H), 7.38 (m, 2H), 7.31 (d, J = 7.7 Hz, 2H), 7.24 (t, J = 7.8 Hz, 2H), 7.21 (d, J = 7.7 Hz, 2H), 7.20 (t, J = 7.8 Hz, 2H), 7.14 (t, J = 7 Hz, 1H), 7.12 (t, J = 7.4 Hz, 1H), 4.75 (m, 1H), 4.46 (m, 1H), 3.07 (m, 2H), 2.94 (m, 2H). ¹³C NMR: 173.2, 171.8, 170.2, 166.2, 163.0, 139.1, 138.8, 137.9, 136.3, 132.0, 129.7 (4C), 129, 128.7 (2C), 128.6 (2C), 127.0, 126.8, 125.1, 126.6, 120.5, 119.3, 115.8 (2C), 55.2, 54.1, 37.5, 37.2. MS (ESI) vypočteno pro C₃₄H₂₈FN₃O₆ [M+H]⁺: 594,2; nalezeno: 594,28, čistota: 100%. Výtěžek 72%.

8-W-a-b

¹H NMR (500 MHz, DMSO-*d*₆, ppm) δ : 11.96 (s, 1H), 8.38 – 8.30 (m, 2H), 8.21 (d, *J* = 7.1 Hz, 2H), 7.89 (dd, *J* = 8.7, 5.5 Hz, 2H), 7.70 (dd, *J* = 8.6, 1.4 Hz, 1H), 7.43 (t, *J* = 8.9 Hz, 2H), 7.29 – 7.18 (m, 4H), 7.17 – 7.08 (m, 1H), 4.54 – 4.42 (m, 1H), 4.36 (t, *J* = 8.4 Hz, 1H), 3.14 – 3.01 (m, 1H), 2.98 – 2.83 (m, 1H), 2.08 (s, 1H), 0.91 (dd, *J* = 10.0, 6.8 Hz, 6H). ¹³C NMR (125 MHz, DMSO-*d*₆, ppm) δ : 172.7, 170.8, 168.9, 165.9, 163.6, 161.6, 158.2, 138.4, 137.5, 137.3, 136.3, 131.7, 129.1, 128.5, 126.4, 124.5, 122.9, 120.6, 118.8, 115.4, 115.3, 58.9, 53.4, 36.7, 30.4, 19.3, 18.7. MS (ESI) vypočteno pro C₃₀H₂₈FN₃O₆ [M+H]⁺: 546,2; nalezeno: 546,31, čistota: 100%. Výtěžek 82%.

8-W-a-d

¹H NMR (500 MHz, DMSO-*d*₆, ppm) δ : 11.82 (s, 1H), 8.47 (d, *J* = 7.9 Hz, 1H), 8.28 – 8.16 (m, 3H), 7.89 (dd, *J* = 8.8, 5.5 Hz, 2H), 7.74 (dd, *J* = 8.8, 1.4 Hz, 1H), 7.43 (t, *J* = 8.8 Hz, 2H), 7.27 – 7.18 (m, 4H), 4.63 – 4.54 (m, 1H), 4.47 (m, 1H), 3.77 – 3.62 (m, 2H), 3.07 (dd, *J* = 13.8, 5.2 Hz, 1H), 2.95 (dd, *J* = 13.8, 8.1 Hz, 1H). ¹³C NMR: 172.7, 172.3, 169.8, 166.8, 165.8, 163.8, 161.3, 138.6, 137.4, 135.9, 131.8, 131.7, 129.3, 128.2, 126.5, 124.7, 123.2, 118.9, 115.5, 115.2, 61.5, 56.2, 53.5, 30.7. MS (ESI) vypočteno pro C₂₈H₂₄FN₃O₇ [M+H]⁺: 534,17; nalezeno: 534,24, čistota: 100%. Výtěžek 66%.

8-W-b-a

¹H NMR (500 MHz, DMSO-*d*₆, ppm) δ : 11.78 (s, 1H), 8.77 (d, *J* = 8.3 Hz, 1H), 8.23 (d, *J* = 8.6 Hz, 1H), 8.18 (d, *J* = 8.5 Hz, 1H), 8.13 (s, 1H), 7.86 (dd, *J* = 8.8, 5.5 Hz, 2H), 7.63 (dd, *J* = 8.7, 1.2 Hz, 1H), 7.42 (t, *J* = 7.9 Hz, 4H), 7.28 (t, *J* = 7.5 Hz, 2H), 7.17 (t, *J* = 7.4 Hz, 1H), 4.96 – 4.80 (m, 1H), 4.23 (dd, *J* = 8.5, 5.7 Hz, 1H), 3.14 (dd, *J* = 13.7, 3.4 Hz, 1H), 3.09 – 2.97 (m, 1H), 2.18 – 2.00 (m, 1H), 0.93 (t, *J* = 6.8 Hz, 6H). ¹³C NMR: 172.9, 171.6, 165.9, 163.8, 161.3, 138.6, 138.3, 137.4, 135.9, 131.7, 129.3, 128.1, 126.3, 124.6, 123.1, 120.0, 118.8, 115.6, 115.3, 57.3, 54.8, 30.0, 19.2, 18.04. MS (ESI) vypočteno pro C₃₀H₂₈FN₃O₆ [M+H]⁺: 546,2; nalezeno: 546,38, čistota: 100%. Výtěžek 81%.

8-W-c-b

¹H NMR (500 MHz, DMSO-*d*₆, ppm) δ : 11.77 (s, 1H), 8.38 (d, *J* = 8.7 Hz, 1H), 8.26 (d, *J* = 7.7 Hz, 1H), 8.20 (d, *J* = 8.3 Hz, 2H), 7.88 (dd, *J* = 8.8, 5.5 Hz, 2H), 7.70 (dd, *J* = 8.6, 1.3 Hz, 1H), 7.42 (t, *J* = 8.9 Hz, 2H), 4.38 (t, *J* = 8.2 Hz, 1H), 4.31 – 4.18 (m, 1H), 2.25 – 2.09 (m, 1H), 1.72-1.65 (m, 1H), 1.65 – 1.46 (m, 2H), 0.97 (t, *J* = 6.6 Hz, 6H), 0.87 (dd, *J* = 26.5, 6.5 Hz, 6H). ¹³C NMR: 173.9, 171.0, 166.1, 161.3, 138.5, 137.4, 136.3, 131.7, 128.5, 124.7, 123.1, 120.3, 118.7, 115.3, 115.2, 58.8, 50.3, 30.4, 24.3, 22.9, 21.3, 19.3, 18.8. MS (ESI) vypočteno pro C₂₇H₃₀FN₃O₆ [M+H]⁺: 512,22; nalezeno: 512,28, čistota: 93%. Výtěžek 75%.

8-W-d-a

¹H NMR (500 MHz, DMSO-*d*₆, ppm) δ: 11.84 (s, 1H), 8.49 (d, J = 7.9 Hz, 1H), 8.30 – 8.18 (m, 3H), 7.91 (dd, J = 8.8, 5.5 Hz, 2H), 7.76 (dd, J = 8.8, 1.4 Hz, 1H), 7.45 (t, J = 8.8 Hz, 2H), 7.29 – 7.20 (m, 4H), 4.65 – 4.56 (m, 1H), 4.49 (m, 1H), 3.79 – 3.64 (m, 2H), 3.09 (dd, J = 13.8, 5.2 Hz, 1H), 2.97 (dd, J = 13.8, 8.1 Hz, 1H). ¹³C NMR: 172.6, 172.2, 169.7, 166.6, 165.7, 163.7, 161.2, 138.5, 137.5, 135.8, 131.7, 131.6, 129.2, 128.1, 126.4,

124.6, 123.1, 118.9, 115.4, 115.3, 61.6, 56.2, 53.6, 30.5. MS (ESI) vypočteno pro C₂₈H₂₄FN₃O₇ [M+H]⁺: 534,17; nalezeno: 534,37, čistota: 94%. Výtěžek 73%.

8-W-d-b

¹H NMR (500 MHz, DMSO- d_6 , ppm) δ : 11.81 (s, 1H), 8.82 (d, J = 7.9 Hz, 1H), 8.28 – 8.19 (m, 2H), 7.86 (dd, J = 7.8, 4.6 Hz, 2H), 7.71 (dd, J = 8.6, 1.2 Hz, 1H), 7.42 (t, J = 8.9 Hz, 2H), 4.48 (t, J = 10 Hz, 1H), 4.35 – 4.30 m (1H), 3.78-6.61 m 2H, 2.2

-2.14 m 1H, 1.03-0.92 m 6H. ¹³C NMR: 172, 171, 166, 162, 161, 139, 137, 136, 132 (2C), 128, 125, 123, 120, 115 (2c), 61, 59, 55, 31, 19, 18. MS (ESI) vypočteno pro C₂₄H₂₄FN₃O₇ [M+H]⁺: 486,17; nalezeno: 486,27, čistota: 100%. Výtěžek 73%.

8-W-c-a-a

¹H NMR (500 MHz, DMSO-*d*₆, ppm) δ:11,77 (s, 1H), 8.67 (d, J = 8.4 Hz, 1H), 8.30 – 8.21 (m, 1H), 8.19 (d, J = 8.6 Hz, 2H), 7.86 (dd, J = 8.9, 5.5 Hz, 2H), 7.63 (dd, J = 8.6, 1.3 Hz, 1H), 7.42 (t, J = 8.9 Hz, 2H), 7.33 – 7.05 (m, 12H), 4.87 – 4.69 (m, 1H), 4.65 – 4.58 (m, 1H), 4.27 (dd, J = 8.2, 5.7 Hz, 1H), 3.14 – 2.82 (m, 4H), 1.74 – 1.46 (m, 3H), 0.87 (dd, J = 15.7, 6.5 Hz, 6H). ¹³C NMR: 174, 171, 166, 164, 161, 139, 138 (2C), 137 (2C), 136, 132 (2C), 129 (2C), 128 (2C), 126 (2C), 125, 123, 120, 119, 115, 115, 55, 54, 50, 37 (2C), 24, 23, 21. MS (ESI) vypočteno pro C₄₀H₃₉FN₄O₇ [M+H]⁺: 707,29; nalezeno: 707,15, čistota: 100%. Výtěžek 69%.

8-W-c-a-c

¹H NMR (500 MHz, DMSO-*d*₆, ppm) δ : 11.82 (s, 1H), 8.61 (d, *J* = 8.1 Hz, 1H), 8.20 (m, 2H), 8.14 (d, *J* = 8.0 Hz, 1H), 8.04 (d, *J* = 8.4 Hz, 1H), 7.88 (dd, *J* = 8.8, 5.5 Hz, 2H), 7.71 (dd, *J* = 8.6, 1.4 Hz, 1H), 7.42 (t, *J* = 8.9 Hz, 2H), 7.30 – 6.98 (m, 5H), 4.69 – 4.40 (m, 2H), 4.24 (dd, *J* = 12.6, 10.2 Hz, 1H), 3.07 (dd, *J* = 14.0, 4.4 Hz, 1H), 2.94 – 2.70 (m, 1H), 1.55 – 1.40 (m, 6H), 0.96 – 0.59 (m, 12H). ¹³C NMR: 174, 172, 171, 166, 164, 161, 139, 138, 137, 136, 132 (2C), 129, 128, 126, 125, 123, 120, 119, 115 (2C). 53, 52., 50, 37, 24 (2C), 23 (2C), 21 (2C). MS (ESI) vypočteno pro C₃₇H₄₁FN₄O₇ [M+H]⁺: 673,30; nalezeno: 673,25, čistota: 100%. Výtěžek 62%.

8-W-c-c-a

¹H NMR (500 MHz, DMSO-*d*₆, ppm) δ: 11.78 (s, 1H), 8.70 (d, J = 10 Hz, 1H), 8.23 – 8.06 (m, 5H), 7.85 (dd, J = 7, 4 Hz, 2H), 7.63 (d, J = 10 Hz, 1H), 7.41 (t, J = 11 Hz, 2H), 7.36 (d, J = 9 Hz, 2H), 7.26 (t, J = 9 Hz, 2H), 7.18 – 7.14 (m, 1H), 4.79 – 4.74 (m, 1H), 4.43 – 4.36 (m, 1H), 4.26 – 4.20 (m, 1H), 3.15 – 2.98 (m, 2H), 1.72 – 1.45 (m, 6H), 0.95 – 0.78 (m, 12H). ¹³C NMR: 174, 172, 171, 166, 161, 139, 138, 137, 136, 132 (2C), 129, 128 (2C), 126, 125, 123, 120, 119, 115 (2C), 55, 51, 50, 37, 24 (2C), 23 (2C), 22, 21. MS

(ESI) vypočteno pro C₃₇H₄₁FN₄O₇ [M+H]⁺: 673,30; nalezeno: 673,28, čistota: 100%. Výtěžek 63%.

8-W-c-d-a

¹H NMR (500 MHz, DMSO-*d*₆, ppm) δ: 11.79 (s, 1H), 8.73 (d, J = 7.5 Hz, 1H), 8.25 – 8.11 (m, 5H), 7.85 (dd, J = 7, 4 Hz, 2H), 7.69 (dd, J = 10, 2 Hz, 1H), 7.64 (d, J = 10 Hz, 1H), 7.43 – 7.35 (m, 4H), 7.26 (t, J = 9 Hz, 2H), 7.20 – 7.12 (m, 1H), 4.86 – 4,80 (m, 1H), 4.47 – 4.18 (m, 2H), 3.69 – 3.59 (m, 2H), 3.20 – 2.98 (m, 2H), 1.72 – 1.45 (m, 4H), 0.90 – 0.79 (m, 6H). ¹³C NMR: 174, 171, 170, 166, 164, 161, 139, 138, 137, 136, 132, 129 (2C), 128, 126, 125, 123, 120, 119, 115 (2C), 62, 55 (2C), 50, 37, 24, 23, 22. MS (ESI) vypočteno pro C₃₄H₃₅FN₄O₈ [M+H]⁺: 647,25; nalezeno: 647,18, čistota: 100%. Výtěžek 72%.

8-R-a

MS (ESI) vypočteno pro C₂₅H₂₀FN₃O₄ [M+H]⁺: 446,15; nalezeno: 446,14, čistota: 100%. **8-R-b**

MS (ESI) vypočteno pro C₂₁H₂₀FN₃O₄ [M+H]⁺: 398,15; nalezeno: 398,23, čistota: 100%. **8-R-c**

MS (ESI) vypočteno pro C₂₂H₂₂FN₃O₄ [M+H]⁺: 412,17; nalezeno: 412,17, čistota: 100%. **8-R-d**

MS (ESI) vypočteno pro C₁₉H₁₆FN₃O₅ [M+H]⁺: 386,11; nalezeno: 386,16, čistota: 100%. **8-R-a-a**

MS (ESI) vypočteno pro C₃₄H₂₉FN₄O₅ [M+H]⁺: 593,22; nalezeno: 593,31, čistota: 95%. **8-R-a-b**

MS (ESI) vypočteno pro C₃₀H₂₉FN₄O₅ [M+H]⁺: 545,22; nalezeno: 545,35, čistota: 100%. **8-R-a-d**

MS (ESI) vypočteno pro C₂₈H₂₅FN₄O₆ [M+H]⁺: 533,18; nalezeno: 533,28, čistota: 100%. **8-R-b-a**

MS (ESI) vypočteno pro C₃₀H₂₉FN₄O₅ [M+H]⁺: 545,22; nalezeno: 545,28, čistota: 93%. **8-R-c-b**

MS (ESI) vypočteno pro C₂₇H₃₁FN₄O₅ [M+H]⁺: 511,24; nalezeno: 511,32, čistota: 100%. 8-R-d-a

MS (ESI) vypočteno pro C₂₈H₂₅FN₄O₆ [M+H]⁺: 533,18; nalezeno: 533,28, čistota: 90%. **8-R-d-b**

MS (ESI) vypočteno pro C₂₄H₂₅FN₄O₆ [M+H]⁺: 485,15; nalezeno: 485,12, čistota: 100%.

8-R-c-a-a

MS (ESI) vypočteno pro C₄₀H₄₀FN₅O₆ [M+H]⁺: 706,30; nalezeno: 706,32, čistota: 90%.

8-R-c-c-a

MS (ESI) vypočteno pro C₃₇H₄₂FN₅O₆ [M+H]⁺: 672,32; nalezeno: 672,42, čistota: 90%.

6. Závěr

V teoretické části bakalářské práce byly popsány syntetické strategie vedoucí k 3-HQs jak v roztoku, tak s použitím syntézy na pevné fázi. V další části této kapitoly byly popsány základní principy kombinatoriální chemie a syntézy na pevné fázi. Pozornost byla dále věnována biologickým vlastnostem, zejména pak protinádorovým a vztahu mezi strukturou a biologickou aktivitou 3-HQs. Poslední část kapitoly se věnovala fluoru v chemii léčiv a transportu léčiv přes plazmatickou membránu.

Hlavním cílem této práce bylo s použitím roztokové chemie, syntézy na pevné fázi a kombinatoriální chemie vyvinout metodiku syntézy a připravit knihovnu fluorovaných 3-HQs obsahujících peptidový řetězec, který by zlepšil biodostupnost těchto perspektivních protinádorových léčiv.

Tento cíl se podařilo splnit syntetickými kroky, které popisuje kapitola výsledky a diskuze. Podařilo se připravit 28 cílových derivátů **8** s čistotou vyšší než 90%. Z toho byla celá jedna sada produktů **8-W** (15) připravených na Wangově pryskyřici nesoucí karboxyskupinu na konci peptidového řetězce izolována a jejich struktura ověřena pomocí NMR analýzy. Bohužel zbývajících 15 navržených derivátů na Rinkově pryskyřici nebylo izolováno z důvodu komplikací v průběhu izolace popsaných v kapitole 4.2. U všech navržených derivátu byla spočítána teoretická hodnota míry lipofilicity log P pomocí programu ACD/logP. Tyto hodnoty jsme však experimentálně neověřili z důvodu nedostatku času. Zároveň byla změřena hodnota rozpustnosti pro 5 vybraných derivátů **8** ve vodném prostředí. Nejlepšího výsledku dosáhl derivát **8-W-d** obsahující ve svém skeletu serin (0,27 mg/ml).

Testování biologických aktivit připravených látek, studium vlivu substituce fluoru na fenylovém kruhu v poloze 2 na biologickou aktivitu a lipofilicita fluorovaných 3-HQs budou předmětem dalšího studia.

7. Seznam použitých zkratek

- 3-HQ 3-hydroxychinolin-4(1*H*)-on
- AcCl acetyl chlorid
- AcOH octová kyselina
- CH₃Cl chloroform
- DBU 1,8-diazabicykloundec-7-en
- DCM dichlormethan
- DEG diethylen glykol
- DIC diisopropylkarboimid
- DMAP-4-(dimethylamino)-pyridin
- DMF dimethylformamid
- DMSO dimethylsulfoxid
- EF1A1 translační elongační faktor 1
- Et_2O- diethylether
- Fmoc 9-fluorenyl methoxykarbonyl
- HOBt N-hydroxybenztriazol
- HPLC vysokoúčinná kapalinová chromatografie
- LC-MS kapalinová chromatografie s hmotnostní spektrometrií
- MS-ESI hmotnostní spektroskopie s ionizací elektrosprejem
- NaOEt ethanolát sodný
- NMR nukleární magnetická resonance
- RT room temperature laboratorní teplota
- SPS syntéza na pevné fázi
- TEA triethylamin

TFA – kyselina trifluoroctová

- TMSOK trimethylsilanolát draselný
- UPLC-MS ultra účinná kapalinová chromatografie s hmotnostní spektrometrií
- v/v objemové procenta
- w/w hmotnostní procenta

8. Literatura

- 1. Rusznyák, S. and Szent-Gyorgyi A. Nature, 1936, 138, 27.
- Hradil, P., Hlavac, J., Soural, M., Hajduch, M., Kolar, M., and Vecerova, R. Mini-Rev. Med. Chem., 2009, 9, 696.
- 3. Krejci, P., Hradil, P., Hlavac, J., and Hajduch, M. Preparation of 2-phenyl-3hydroxyquinolin-4(1H)-ones for treatment of immune system and proliferative disorders. WO2008028427A1, **March 13, 2008**.
- 4. Hradil, P. and Jirman, J. Collect. Czech. Chem. Commun., 1995, 60, 1357.
- 5. Soural, M., Hlavac, J., Hradil, P., Frysova, I., Hajduch, M., Bertolasi, V., and Malon, M. *Eur. J. Med. Chem.*, **2006**, *41*, 467.
- 6. Vagner, J., Krchnak, V., Lebl, M., and Barany, G. Collect. Czech. Chem. Commun., 1996, 61, 1697.
- 7. Soural, M., Hlavac, J., Funk, P., Dzubak, P., and Hajduch, M. ACS Comb. Sci., **2011**, *13*, 39.
- 8. Sword, I.P. J. Chem. Soc. C, 1971, 820.
- 9. Behrman, E.J., Kiser, R.L., Garas, W.F., Behrman, E.C., and Pitt, B.M. J. Chem. *Res.*, *Synop.*, **1995**, 164.
- 10. Velezheva, V.S., Mel'man, A.I., Pol'shakov, V.I., and Anisimova, O.S. Khim. Geterotsikl. Soedin., 1992, 279.
- 11. Sui, Z., Nguyen, V.N., Altom, J., Fernandez, J., Hilliard, J.J., Bernstein, J.I., Barrett, J.F., and Ohemeng, K.A. *Eur. J. Med. Chem.*, **1999**, *34*, 381.
- 12. Hradil, P., Grepl, M., Hlavac, J., Soural, M., Malon, M., and Bertolasi, V. J. Org. *Chem.*, **2006**, *71*, 819.
- 13. Soural, M. and Krchnak, V. J. Comb. Chem., 2007, 9, 793.
- 14. Krupkova, S., Soural, M., Hlavac, J., and Hradil, P. J. Comb. Chem., 2009, 11, 951.
- 15. Vankova, B., Hlavac, J., and Soural, M. J. Comb. Chem., 2010, 12, 890.
- 16. Terrett, N.K., Gardner, M., Gordon, D.W., Kobylecki, R.J., and Steele, J. *Tetrahedron*, **1995**, *51*, 8135.
- 17. Purser, S., Moore, P.R., Swallow, S., and Gouverneur, V. *Chem. Soc. Rev.*, **2008**, *37*, 320.
- 18. Wang, J., Sanchez-Rosello, M., Acena, J.L., del Pozo, C., Sorochinsky, A.E., Fustero, S., Soloshonok, V.A., and Liu, H. *Chem. Rev.*, **2014**, *114*, 2432.

- 19. Fried, J. and Sabo, E.F. J. Am. Chem. Soc., 1953, 75, 2273.
- 20. Fried, J. and Sabo, E.F. J. Am. Chem. Soc., 1954, 76, 1455.
- 21. Ismail, F.M.D. J. Fluorine Chem., 2002, 118, 27.
- Ridge, D.N., Hanifin, J.W., Harten, L.A., Johnson, B.D., Menschik, J., Nicolau, G., Sloboda, A.E., and Watts, D.E. J. Med. Chem., 1979, 22, 1385.
- 23. Rink, H. Tetr. Lett., 1987, 28, 3787.
- 24. Wang, S.S. J. Am. Chem. Soc., 1973, 95, 1328.
- 25. Carpino, L.A. J. Am. Chem. Soc., 1993, 115, 4397.