

UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE

FARMACEUTICKÁ FAKULTA V HRADCI KRÁLOVÉ

KATEDRA FARMACEUTICKÉ CHEMIE A KONTROLY LÉČIV



## RIGORÓZNÍ PRÁCE

Syntéza substituovaných chinoxalin-2,3-dikarbonitrilů jako prekurzorů  
potenciálně fotodynamicky aktivních látek



Hradec Králové, 2010

Mgr. Kateřina Sedláčková

„Prohlašuji, že tato práce je mým původním autorským dílem, které jsem vypracovala samostatně. Veškerá literatura a další zdroje, z nichž jsem při zpracování čerpala, jsou uvedeny v seznamu použité literatury a v práci řádně citovány.“

Rigorózní práce vznikla za podpory grantu SVV-2010-261-001.

V Janovicích dne 23.8.2010

Podpis:

Děkuji svému školiteli PharmDr. Petru Zimčíkovi, Ph.D., za odborné vedení, pomoc, vytvoření přátelské pracovní atmosféry a trpělivost v průběhu celého vytváření mé rigorózní práce. Děkuji také celé katedře Farmaceutické chemie a kontroly léčiv.

## Obsah

1	<b>Seznam zkratk</b> .....	6
2	<b>Cíl práce</b> .....	7
3	<b>Teoretická část</b> .....	8
3.1	Fotodynamická terapie .....	8
3.2	Historie fotodynamické terapie .....	8
3.3	Principy PDT .....	9
3.4	Mechanismus PDT v živém organismu.....	9
3.5	Fotosenzitizéry .....	10
3.5.1	Vlastnosti ideálních PS .....	10
3.5.2	První generace fotosenzitizérů .....	11
3.5.3	Druhá generace fotosenzitizérů .....	12
3.5.4	Třetí generace fotosenzitizérů.....	14
4	<b>Metodická část</b> .....	16
4.1	Úvod a syntéza 2 <i>H</i> -benzimidazol-2-spirocyclohexanů .....	16
4.2	Reakce 2 <i>H</i> -benzimidazol-2-spirocyclohexanů .....	17
4.2.1	Oxidace .....	17
4.2.2	Přesmyky .....	18
4.2.3	Reakce s nukleofily.....	19
4.3	Reakce substituovaných 2 <i>H</i> -benzimidazol-2-spirocyclohexanů s nukleofily.....	22
4.3.1	5-chlor-2 <i>H</i> -benzimidazol-2-spirocyclohexan.....	22
4.3.2	5,6-dichlor-2 <i>H</i> -benzimidazol-2-spirocyclohexan.....	22
4.3.3	4,6-dibrom-2 <i>H</i> -benzimidazol-2-spirocyclohexan .....	24
4.4	Použití metodologie pro syntézu dalších heterocyklů .....	26
4.4.1	Přeměna 2 <i>H</i> -benzimidazol-2-spirocyclohexanů na <i>o</i> -fenyldiaminy.....	26

5	<b>Experimentální část</b> .....	28
5.1	Příprava 4,5-dibromfenylen-1,2-diaminu (6) .....	30
5.2	Příprava 5,6-dibrom-2 <i>H</i> -benzimidazol-2-spirocyclohexanu (8).....	30
5.3	Příprava 5,6-dibrom-4,7- <i>terc</i> -butylsulfanyl-2 <i>H</i> -benzimidazol-2-spirocyclohexanu (9) .....	31
5.4	Příprava diiminosukcinonitrilu (12).....	32
5.5	Příprava 6,7-dibromchinoxalin-2,3-dikarbonitrilu (13).....	32
6	<b>Výsledky a diskuze</b> .....	33
7	<b>Závěr</b> .....	36
8	<b>Citovaná literatura</b> .....	39

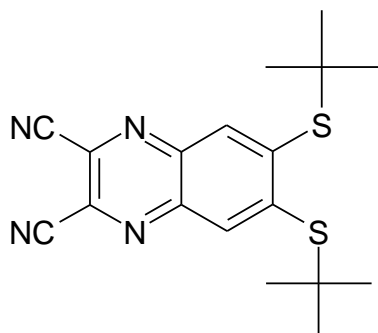
# 1 Seznam zkratek

HpD	deriváty hematoporfyrinu
OPD	<i>o</i> -fenylendiamin
Pc	ftalocyaniny
PDT	fotodynamická terapie
PS	fotosenzitizér
THF	tetrahydrofuran
<i>m</i> -THPP	5,10,15,20-tetra(3-hydroxyfenyl)porfyrin
<i>m</i> -THPC	5,10,15,20-tetra(3-hydroxyfenyl)chlorin
<i>m</i> -THPBC	5,10,15,20-tetra(3-hydroxyfenyl)bakteriochlorin

## 2 Cíl práce

Výzkum na Katedře farmaceutické chemie a kontroly léčiv se již delší dobou zabývá syntézou a hodnocením potenciálně fotodynamicky aktivních látek ze skupiny azaftalocyaninů. Ve fotodynamické terapii hraje velkou roli absorpce světelného záření, zejména při vyšších vlnových délkách. Látky typu rozšířených azaftalocyaninů obsahujících chinoxalinová jádra tuto podmínku splňují.

Cílem mé rigorózní práce byla proto příprava prekurzorů pro syntézu tetra(2,3-chinoxalino)porfyrasinů. Tyto makrocyclické látky se připravují tetramerizací aromatických dikarbonitrilů, cílem proto byl pokus o syntézu 6,7-bis(*tert*-butylsulfanyl)-chinoxalin-2,3-dikarbonitrilu různými postupy.



Obr. 1 6,7-bis(*tert*-butylsulfanyl)-chinoxalin-2,3-dikarbonitril

## 3 Teoretická část

### 3.1 Fotodynamická terapie

Fotodynamická terapie (PDT) je stále více uznávaná jako atraktivní alternativní způsob léčby rakoviny. Léčba se skládá ze dvou relativně jednoduchých kroků. Jedná se o podání fotosenzitivní látky a následného ozáření nádoru. Ozáření se provádí z důvodu aktivace fotosenzitivní látky. Účinnost PDT je vysoká pro malé povrchové nádory. Většinou se nevyskytují žádné vedlejší účinky, kromě dočasné fotosenzitizace kůže. Hojení probíhá s malým či žádným zjizvením a procedura může být opakována bez narůstající toxicity. S ohledem na účinnost PDT, na nepřítomnost dlouhodobé toxicity a na to, že první léčba rakoviny s PDT byla uskutečněna před více než 100 lety, lze tuto metodu použít jako efektivní, alternativní volbu léčby v onkologii. V současné době je PDT aktuálně nabízena jen v několika málo vybraných centrech, ačkoli pomalu narůstá její význam jako alternativy tradiční léčby rakoviny (1).

### 3.2 Historie fotodynamické terapie

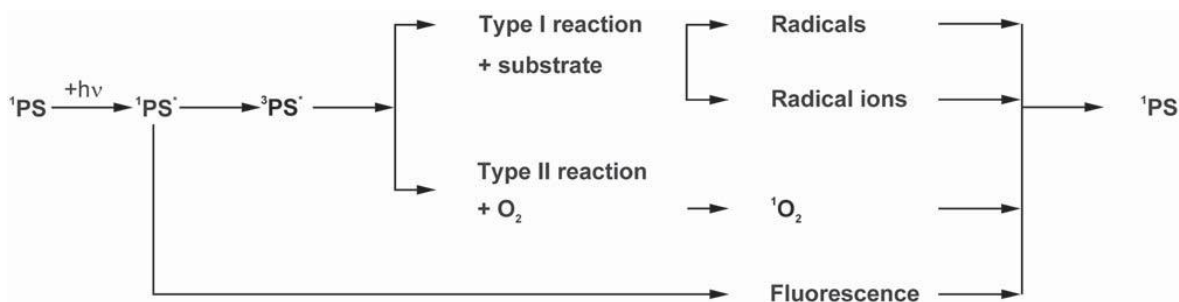
První klinická aplikace fotodynamické terapie byla popsána von Tappeinerem a Jesionkem v roce 1903 (2), kdy aplikovali lokálně eozin na kožní nádory. Von Tappeiner a Jodlbauer později definovali PDT jako dynamickou interakci mezi světlem, fotosenzitizační látkou a kyslíkem mající za následek ničení tkáně (3).

V roce 1975 Dougherty a kol. (4) zjistil, že hematoporphyrinové deriváty (HpD), v kombinaci s červeným světlem, mohou úplně zlikvidovat bujení prsního nádoru u myši. Následně byly zahájeny klinické zkoušky s HpD pro léčbu pacientů s rakovinou močového měchýře a nádorů pokožky (5) (6). Tyto následující úspěšné studie a početné zkoušky zahrnovaly různé typy rakovin a různé PS. V Kanadě v roce 1993 byl schválen porfimer sodný (Photofrin®) pro léčbu rakoviny močového měchýře. Dnes jsou pro klinické užití schváleny další PS: 5-aminolevulová kyselina (ALA, Levulan®, Gliolan®), metylester ALA (Metvix®), hexylester ALA (Hexvix®), meso-tetra-(hydroxyfenyl)-chlorin (mTHPC, temoporfin, Foscan®) a verteporfin (Visudyne®) (1).



### 3.3 Principy PDT

PDT zahrnuje podání fotosenzitizéru (PS) následované místním ozařováním nádoru světlem vhodné vlnové délky k tomu, aby došlo k aktivaci PS. Aktivace PS při absorpci světla přetváří PS z jeho základního singletového stavu ( $^1\text{PS}$ ) do excitovaného singletového stavu ( $^1\text{PS}^*$ , Obr. 2). Z tohoto stavu může látka energii uvolnit zpět, do základního stavu vyzařováním fluorescence, což je schopnost, která se může klinicky využít pro fotodetekci. Nicméně k docílení terapeutického fotodynamického účinku, PS musí projít elektronovou spinovou přeměnou (mezisystémový přechod) na jeho tripletový stav ( $^3\text{PS}^*$ ). V přítomnosti kyslíku může  $^3\text{PS}^*$  reagovat přímo se substrátem, protonem či přenašečem elektronů, tvořit radikály, které mohou společně s kyslíkem produkovat reaktivní formy kyslíku (reakce typu I). Energie  $^3\text{PS}^*$  může být také přímo předána kyslíku tak, že vznikne singletový kyslík (reakce typu II), který je nejničivější reaktivní formou vytvořenou během PDT (7).



Obr. 2 Mechanismus fotosenzitizace (7)

### 3.4 Mechanismus PDT v živém organismu

Účinnost PDT v terapii rakoviny závisí na typu fotosenzitizéru, na jeho koncentraci, vnitrobuněčné lokalizaci, světelné dávce a její intenzitě a na dostupnosti reaktivních forem kyslíku. Destrukce nádorů u PDT probíhá třemi základními mechanismy. Singletový kyslík vznikající fotochemickou reakcí může zabít přímo buňky nádoru. Může také dojít k poškození cévního zásobení nádoru. Dojde k přerušení příjmu živin a kyslíku, čímž dojde k nepřímému poškození. Při PDT může také dojít k aktivování imunitní reakce proti buňkám nádoru. Výsledek PDT je závislý na všech těchto mechanismech. (8)

Singletový kyslík je vysoce reaktivní a může během svého krátkého života difundovat jen do vzdálenosti 0,01–0,02  $\mu\text{m}$ . Z tohoto důvodu, by měl být PS během

ozařování světelnými dávkami lokalizován v blízkosti nádoru. Původní cíl specifického zabíjení nádorových buněk předpokládal, že optimální reakce by byla získána při ozařování nádoru v době, kdy by koncentrace PS v nádorové tkáni byla vysoká, ve srovnání s okolními nenádorovými tkáněmi. Nedávné studie na zvířatech (9) (10) a klinické údaje ukázaly (11), že koncentrace PS v nádoru v době ozařování, nemusí nutně předpovědět reakci na PDT. Lepší indikátor pro výsledek PDT v době ozařování je koncentrace v plazmě (12) (13) (14) (15). To dokazuje, že buňky nádoru nemusí vždy být přímými cíli PDT, ale že mohou být usmrceny nepřímo, jako následek cévního uzávěru po poškození například cévních endoteliálních buněk (14) (16) (17) (18) (19) (20).

### ***3.5 Fotosenzitizéry***

Velmi důležitou součástí PDT jsou fotosenzitizéry. PS jsou látky schopné absorbovat světlo specifické vlnové délky a transformovat jej na užitečnou energii. V případě PDT to znamená produkci letálních cytotoxických produktů. Klíčovou charakteristikou jakéhokoliv PS je jeho schopnost přednostní kumulace v nádorové tkáni s následnou produkcí cytotoxických produktů a indukci požadovaných biologických efektů (21).

#### **3.5.1 Vlastnosti ideálních PS**

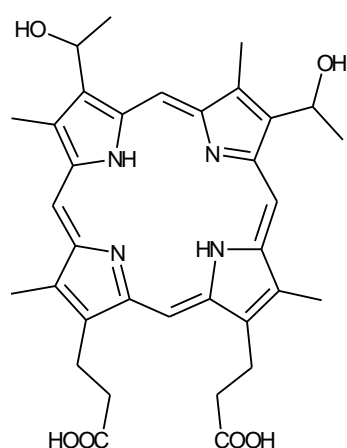
PS musí být lokalizován v místě fotodynamické reakce, musí absorbovat světlo přiměřené vlnové délky a produkovat požadovanou biologickou odezvu. Pro léčbu rakoviny by měl mít ideální PS následující vlastnosti.

- Chemická čistota a známé složení.
- Cytotoxicita pouze za přítomnosti světla.
- Lokalizace zejména v cílové tkáni.
- Rychlé vyloučení z těla, aby nedocházelo k systémové toxicitě.
- Vysoký kvantový výtěžek singletového kyslíku.
- Vysoká absorbance při vlnové délce 600-800 nm, kdy penetrace světla tkáni je maximální a kdy vlnové délky světla mají stále dost energie k produkci singletového kyslíku (21).

### 3.5.2 První generace fotosenzitizerů

#### HpD deriváty a jiné porfyrinové PS

HpD byl první PS, který získal oprávnění k používání v Kanadě v roce 1993. Další schválení k aplikaci získal v Evropě, Japonsku a USA pro řadu indikací zahrnujících rakovinu tlustého střeva, rakovinu jícnu, močového měchýře a rakoviny žaludku (22). HpD je směs sloučenin. Jsou to monomery, dimery a oligomery hematoporphyrinu (23). Částečným čištěním této směsi vznikl komerční produkt porfimer sodný (Photofrin) (24). Tento čištěný produkt ovšem stále obsahuje mnoho porfyrinových sloučenin (okolo 60), které způsobují opakované potíže při výrobě. Photofrin a ostatní porfyrinové PS mají slabou absorpci v červené oblasti spektra a způsobují dlouhotrvající kožní fotosenzitivitu (4-6 týdnů) (21) (25). Absorpční maximum Photofrinu je okolo 630 nm.



Obr. 3 Hematoporphyrin

Hledání nových porfyrinových PS se zaměřilo na deriváty, jež jsou synteticky dostupné v čisté formě a na deriváty, jež absorbují při vyšších vlnových délkách (26).

Tetraarylporfyriny byly první, snadno připravitelné a snadno čistitelné porfyriny, které byly zahrnuty mezi PS. Tetrafenylporfyriny mají maximum absorpce okolo 630 nm, ale mají omezenou rozpustnost. Sulfonací tetrafenylporfyrinů vznikne tetrasulfonát tetrafenylporfyrinu, který zůstává dobrým producentem singletového kyslíku a je dobře rozpustný ve vodě (27). U tohoto PS byla bohužel zjištěna neurotoxicita u myší vystavených vysokým dávkám tohoto PS (28) (29).

### 3.5.3 Druhá generace fotosenzitizérů

Dalším výzkumem PDT byly nalezeny PS druhé generace. Většina z nich absorbuje světlo delších vlnových délek a vykazuje silnou absorpci v oblasti červeného spektra. PS použité v klinických studiích patří do skupin porfyrinů, ftalocyaninů, texafyrinů, chlorinů a bakteriochlorinů (26) (30). Důležitou charakteristikou těchto PS je jejich výborná schopnost generovat singletový kyslík (31) (32) (30). Další charakteristiky PS příznivé pro PDT jsou jejich dobrá stabilita, schopnost absorbovat světlo dlouhých vlnových délek a malá toxicita za nepřítomnosti světla (31).

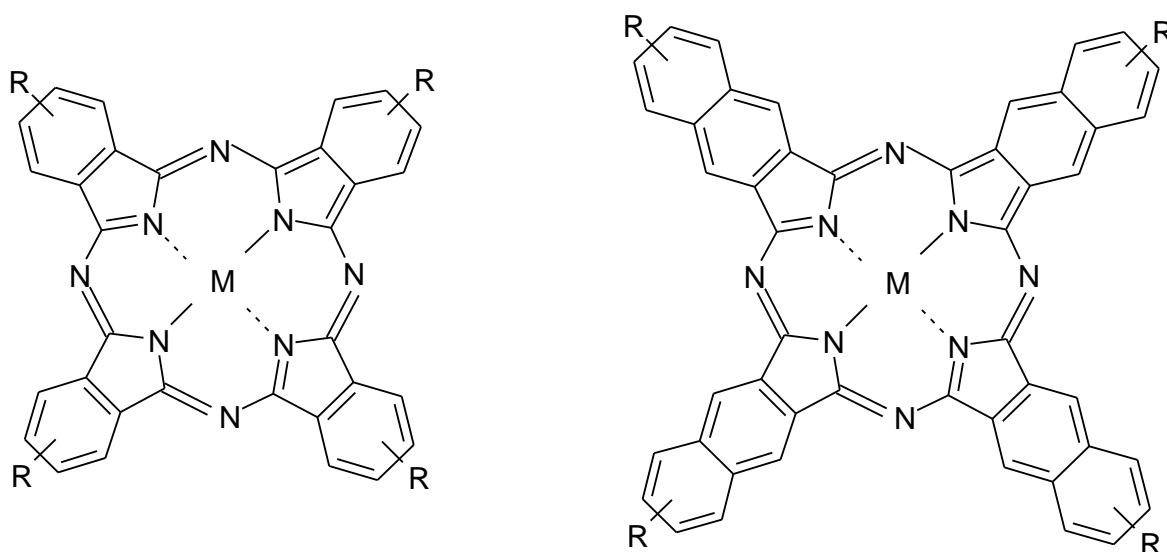
#### 5-aminolevulová kyselina (ALA)

ALA je přirozeně se vyskytující aminokyselina, která je prekurzorem protoporfyrinu IX (PpIX), produkovaného při biosyntéze hemu (33). Tato syntéza je kontrolována negativní zpětnou vazbou, při níž vyšší koncentrace hemu inhibuje přeměnu glycinu a sukcinylkoenzymu A na ALA. Tento krok může být obejit přidáním exogenní ALA jako prekurzoru do tkáně. To zvyšuje produkci PpIX. PpIX se akumuluje nejen v nádorové tkáni, ale také ve zdravé tkáni (ovšem daleko méně), což způsobuje systémovou fotosenzitizaci (34). Porovnáním absorpčních vlastností PpIX a HpD není PpIX vhodnějším PS. ALA může být podána injekčně, orálně nebo aplikována topicky na cílovou tkáň (31) (35) (36) (37). Ozáření je prováděno o 3-6 hodin později. Kožní fotosenzitizace způsobená ALA je mírná (38) a krátkodobá (35) (37). V roce 1990 Kennedy jako první použil ALA pro léčbu kožních poruch (39) (40). ALA jako PS je vyvíjena pro léčbu kožních lézí, gastrointestinální rakoviny a psoriázy (35) (41) (38). ALA je snadno připravitelná v čisté formě, protože byla vyvinutá relativně jednoduchá metoda pro její přípravu (42).

Vývoj PDT s PpIX se zaměřil na prekurzory ALA. Vzhledem k nízké lipofilně ALA byly do terapie zavedeny různé alkyl estery ALA, které penetrují do buněk snadněji (43). ALA a její methyl ester (Metvix) byly schváleny pro použití v Evropě. Hexyl ester (Hexvix) je registrován pro léčbu rakoviny žaludku a diagnózy nádorů močového měchýře (22). Topické podání ALA a jejích derivátů bylo schváleno při použití u nejrůznějších povrchových kožních lézí (43).

## Ftalocyaniny

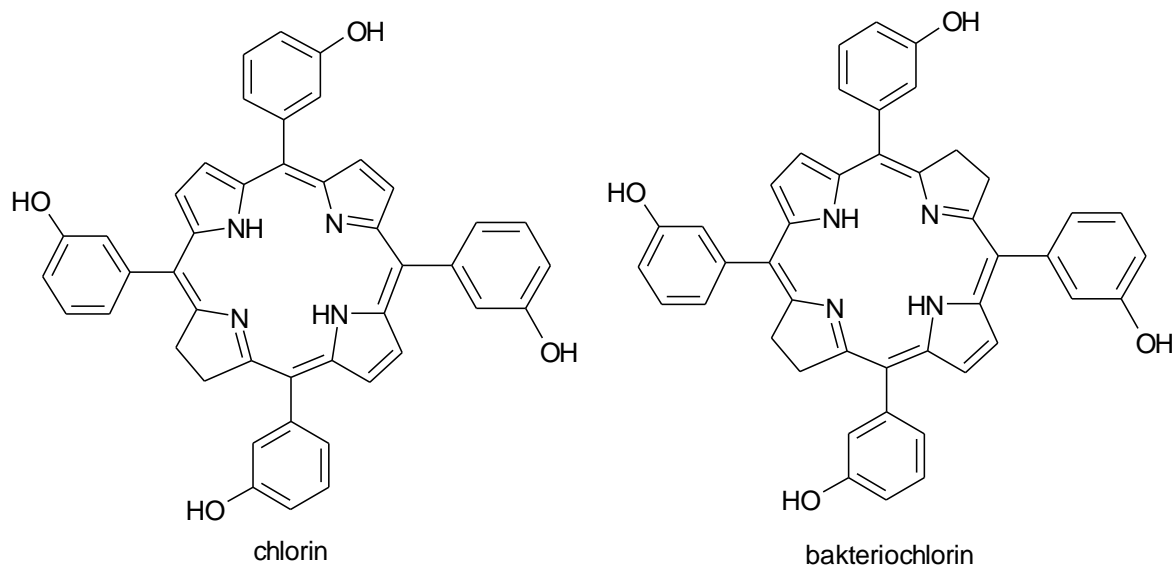
Expanze makrocyclických  $\pi$ -systémů porfyrinů posouvá jejich absorpci k delším vlnovým délkám (34). Připojením čtyř benzenových nebo naftalenových kruhů na  $\beta$  pozice porfyrinů a substitucí methinových uhlíků dusíky vznikají ftalocyaniny a naftalocyaniny. Tyto sloučeniny absorbují světlo dlouhých vlnových délek a mohou být proto použity v malých dávkách (31) (45) (46) (47). Některé z nich jsou eliminovány z těla už za 24 hodin a kožní fotosenzitivita je tedy pouze přechodná. Pc jsou velmi špatně rozpustné ve vodě, proto jsou často zaváděny na periferii polárními substituenty (31) (46). Důležité pro PDT je přítomnost centrálních chelátovaných kovů. Zinečnaté, hlinité a křemičité Pc jsou dobrými producenty singletového kyslíku s dlouhou dobou života tripletového stavu (46). Nesubstituované Zn-Pc jsou velmi hydrofobní, proto jsou často vázány na nosiče, např. lipozomy, které zlepšují jejich rozpustnost a distribuci v těle (31) (48) (49). Ozařování se provádí za 24 až 72 hodin po aplikaci. Zn-Pc způsobuje pouze mírnou fotosenzitivitu (38).



Obr. 4 Ftalocyanin a naftalocyanin

Redukcí periferních dvojných vazeb porfyrinů se posouvá maximum absorpce k červené oblasti (35). Dihydroporfyriny jsou nazývány chloriny. Redukcí dvou dvojných vazeb na opačných stranách makrocyclu vznikají bakteriochloriny, redukci dvou sousedních dvojných vazeb vznikají isobakteriochloriny (26).

5,10,15,20-tetra(3-hydroxyfenyl)chlorin (*m*-THPC) na Obr. 5 je synteticky připravený chlorin, který byl uveden na trh pod názvem temoporfin. 5,10,15,20-tetra(3-hydroxyfenyl)bakteriochlorin (*m*-THPBC) na Obr. 5 je plně synteticky připravený bakteriochlorin, který byl vyvinut pro komerční použití (31).



Obr. 5 *m*-THPC a *m*-THPBC

*m*-THPC, *m*-THPBC a *m*-THPP se liší pouze v stupni redukce tetrapyrrolového kruhu. Redukované formy *m*-THPC a zejména pak *m*-THPBC jsou v PDT více aktivní než *m*-THPP (50). Bakteriochloriny stejně jako naftalocyaniny absorbují světlo velmi dlouhých vlnových délek a proto umožňují léčbu vysoce pigmentovaných nádorů pomocí PDT (47) (51). Redukované porfyriny (chloriny a bakteriochloriny) jsou náchylné k zpětné oxidaci na porfyriny. Této oxidaci se dá zabránit zavedením objemných substituentů nebo exocyklických kruhů vedle redukovaného pyrrolového kruhu (35) (48) (52). Tato strategie je evidentní u struktur benzochlorinů (35) (50). Zavedení kovů do chlorinů také zesiluje absorpci červeného světla a posouvá jejich absorpční pásma k vyšším vlnovým délkám (26).

### 3.5.4 Třetí generace fotosenzitizérů

Výzkum nových PS třetí generace stále pokračuje, zejména pro látky jež mohou být aktivovány světlem delší vlnové délky, které vyvolává kratší fotosenzitivitu a má lepší nádorovou specifitu (53) (54) (55) (56) (57). PS třetí generace jsou tvořeny převážně PS

generace druhé, spojené s určitými biomolekulami, které umožňují cílenější distribuci v těle (58).

Příkladem použití kombinace PS s biomolekulami je fotoimunoterapie. Fotoimunoterapie je zajímavá metoda v PDT, která vede ke zlepšení nádorové selektivity. Používá monoklonální protilátky navržené proti antigenům spojených s nádorem, bez zaměněných vlastních biologických vlastností (59). PS spojený s protinádorovou monoklonální protilátkou mohou efektivněji působit v nádorové tkáni. Pro zlepšení tumorotropického charakteru PS jsou jako transportní systémy používány lipozómy (60). Výběr vhodného lipozómu může také snížit fototoxicitu PS. PS navázaný na polykationický lipozóm bude fototerapeuticky velmi účinný, vzhledem k silné elektrostatické adhezi mezi polykationem a plazmatickou membránou (61).

## 4 Metodická část

### 4.1 Úvod a syntéza 2H-benzimidazol-2-spirocyclohexanů

Sloučenina 2H-benzimidazol-2-spirocyclohexan (**2**) může být považována za stabilní derivát vysoce nestálého *o*-benzochinon di-iminu, který stále nebyl izolován v čisté formě. 2H-benzimidazol-2-spirocyclohexan může být také považován za chráněný *o*-fenylendiamin (OPD) (**62**).

2H-benzimidazol-2-spirocyclohexan obsahuje dvě azodienové složky, díky kterým mohou tyto látky reagovat s nukleofily 1,4 adiční reakcí Michaelova typu, jak ukazuje Schéma 1. Meziprodukt (**3**) podstupuje fototropický posun za vzniku 1,3-dihydro sloučeniny. Tato sloučenina je oxidována přidáním oxidu manganického do reakční směsi. Použitím tohoto oxidačního činidla lze získat dobré výtěžky izolovatelného 5-substituovaného 2H-benzimidazol-2-spirocyclohexanu (**5**) (**63**). V případě látky (**2**) je preferenční reakcí adice podle výše popsaného mechanismu a nikoliv elektrofilní substituce, která by se dala očekávat u samotného OPD (**62**).

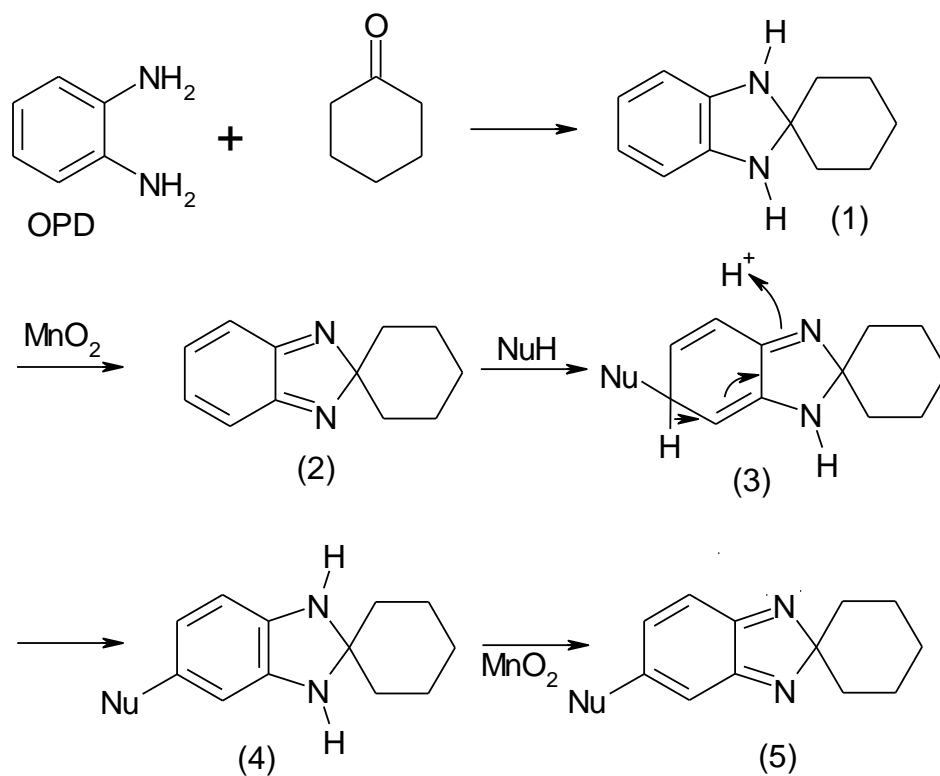


Schéma 1 Syntéza 2H-benzimidazol-2-spirocyclohexanu



V závislosti na nukleofilu je možné tímto způsobem zavést až čtyři substituenty do šestičlenného kruhu. 2*H*-benzimidazol-2-spirocyklohexan lze převést zpět na odpovídající OPD pomocí redukční hydrolýzy. Tato metoda poskytuje cestu k polysubstituovaným heterocyklům nesoucím substituenty, jež by bylo obtížné zavést jiným způsobem (63).

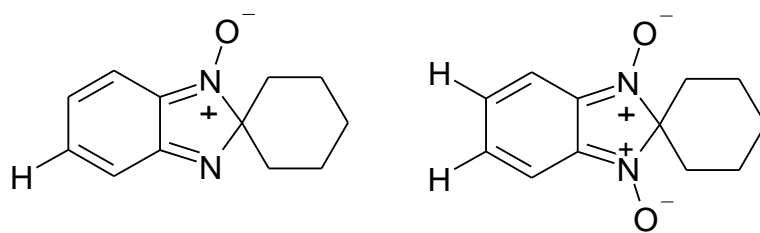
Nejvhodnější syntézou základní sloučeniny 2*H*-benzimidazol-2-spirocyklohexanu je přidání cyklohexanonu do horkého vodného roztoku OPD (64). Kondenzace OPD je často provedena s přebytkem cyklohexanonu, který působí jako činidlo i jako rozpouštědlo. Ostatní *o*-diamiminy např. 2,3-diaminopyridin reagují s cyklohexanonem podobně (65) (66). Následuje oxidace 1,3-dihydro- meziproduktu (67) (68) při pokojové teplotě oxidem manganičitým, např. v prostředí dichlormethanu. Typický výtěžek v druhém kroku je až 95% (65). Aktivní oxid manganičitý je levně a snadno dostupný. Více aktivní materiál (kratší reakční časy) může být připravován zpracováním pyroluzitu (burel) ředěnou kyselinou dusičnou. Následuje promývání a sušení produktu na konstantní hmotnost při 100-120°C (64) (69). Existují i další oxidační systémy (např. KMnO<sub>4</sub>), ale tyto systémy vyžadují většinou delší reakční časy a poskytují nižší výtěžky (64) (70).

## **4.2 Reakce 2*H*-benzimidazol-2-spirocyklohexanů**

Jak již bylo zmíněno, struktura a fyzikální vlastnosti základní sloučeniny umožňují především adiční reakce (71), ale jsou možné i další typy reakcí.

### **4.2.1 Oxidace**

Oxidace 2*H*-benzimidazol-2-spirocyklohexanů s *m*-chloroperoxybenzoovou kyselinou v dichlormethanu poskytuje separovatelnou směs žlutého mono-*N*-oxidu a červeného di-*N*-oxidu (Obr. 6) nebo jen di-*N*-oxid, v závislosti na množství použitého činidla (72) (73). Pro syntézu mono-*N*-oxidu je výhodnější syntetizovat di-*N*-oxid a redukovat ho pomocí tetrahydridoboritanu sodného v ethanolu. *N*-oxidy lze také syntetizovat kondenzací benzofurazan *N*-oxidu s nitrocyklohexanem (74) (72) (75) (76).



Obr. 6 Mono-*N*-oxid a di-*N*-oxid

#### 4.2.2 Přesmyky

Schéma 2 znázorňuje fotolýzu 2*H*-benzimidazol-2-spirocyclohexanu-1,3-dioxidu. Touto reakcí vznikne pouze malý výtěžek oximu (72) (73).

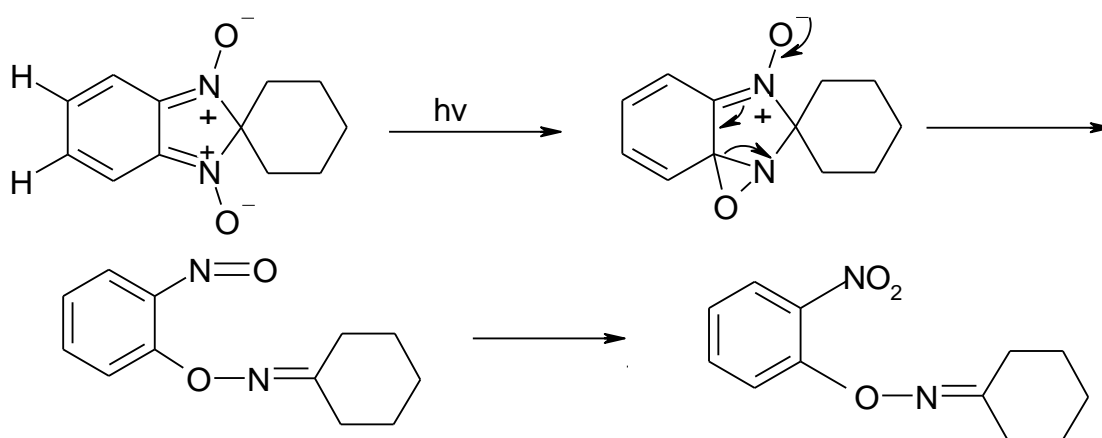


Schéma 2 Fotolýza 2*H*-benzimidazol-2-spirocyclohexanu

Zahřátím 2*H*-benzimidazol-2-spirocyclohexanů ve vhodném rozpouštědle, např. *o*-dichlorbenzenu, dochází k 1,5 sigmatropickému přesmyku, jak ukazuje Schéma 3 (77) (78).

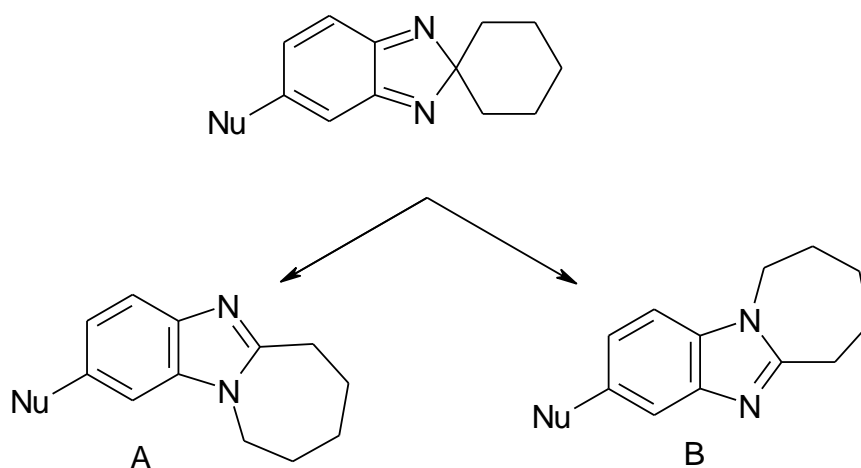


Schéma 3 Zahřátí 2*H*-benzimidazol-2-spirocyclohexanu

Při použití 2*H*-benzimidazol-2-spirocyclohexanu vzniká pouze jeden produkt (A=B). Ale při použití nesymetrické výchozí sloučeniny mohou přesmyku podléhat kterékoliv spiromethylenové skupiny, za vzniku směsi dvou produktů (A a B). Poměr těchto izomerů je závislý na substituentu. Např., když je jako substituent použita skupina NO<sub>2</sub> (Nu=NO<sub>2</sub>) je poměr A:B 63:37 (detekováno <sup>1</sup>H NMR analýzou), když Nu=SO<sub>2</sub>Ph je poměr A:B 65:35 (detekováno <sup>1</sup>H NMR analýzou) nebo 70:30 (detekováno HPLC analýzou). Při přítomnosti elektron-donorového substituentu je poměr produktů převrácen, např. Nu=OPh je poměr A:B 40:60 (78).

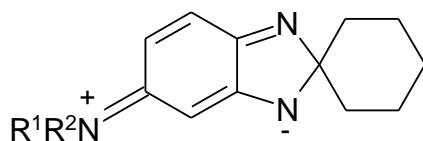
#### 4.2.3 Reakce s nukleofily

Jak již bylo zmíněno v úvodu, základní sloučenina 2*H*-benzimidazol-2-spirocyclohexan může reagovat s nukleofily adičními reakcemi, za vzniku 5-substituovaných sloučenin, jak ukazuje Schéma 1. Zavedení dalších substituentů závisí na vlastnostech vstupujícího nukleofilu a na elektronických vlastnostech původního substituentu. V závislosti na již přítomném substituentu jsou možné oba typy adiční reakce 1,4 nebo 1,6 (79) (64).

##### 4.2.3.1 Reakce s dusíkatými nukleofily

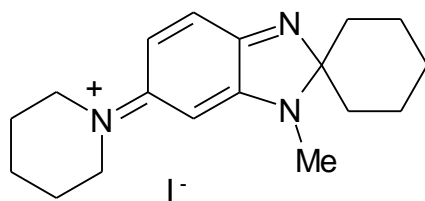
Sekundární aminy reagují ochotně s 2*H*-benzimidazol-2-spirocyclohexany v různých rozpouštědlech např. ethanol, DMSO, sulfolan, za tvorby malého množství červeného 5-aminoderivátu nebo žlutého 5,6-diamino derivátu. Reakce s primárními aminy vedou k nižším výtěžkům. Je také možné postupně zavést dva odlišné aminové substituenty (79) (64).

Odlišné barvy mono- a di- amino sloučenin jsou výhodné při chromatografické separaci sloučenin. Syté oranžovo červené barvy 5-monosubstituovaných sloučenin jsou zřejmě způsobeny přítomností rezonančních struktur, jak ukazuje Obr. 7 (80).



Obr. 7 Resonanční struktura 5-monosubstituovaného derivátu

5-piperidino-2*H*-benzimidazol-2-spirocyclohexan může být alkylován methyl jodidem za vzniku kvantitativního výtěžku tmavě červeného methylovaného derivátu, opět s *p*-chinoidní strukturou, jak ukazuje Obr. 8 (64).



Obr. 8 Chinoidní struktura methylovaného derivátu

#### 4.2.3.2 Reakce s kyslíkatými nukleofily

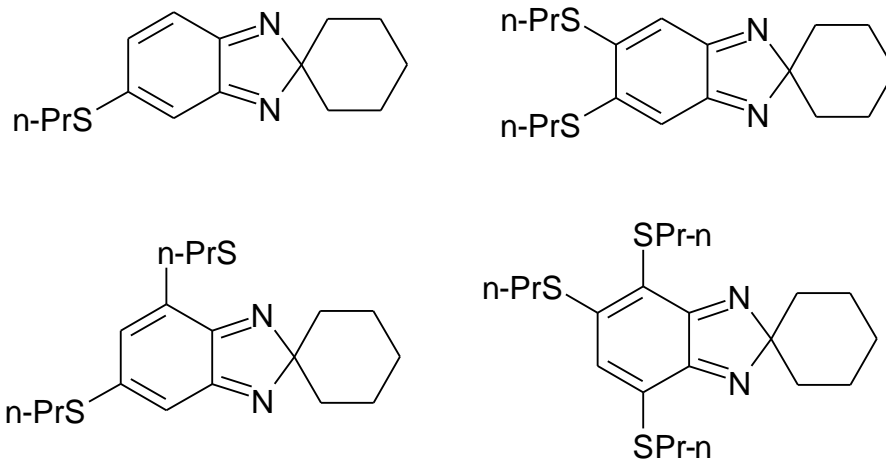
Alkoxidové a aryloxidové ionty reagují velmi pomalu s 2*H*-benzimidazol-2-spirocyclohexanem v polárních rozpouštědlech jako je DMF, DMSO a sulfolan. Tyto reakce jsou prakticky neproveditelné. Sloučeninu 5-alkoxy(aryloxy)-2*H*-benzimidazol-2-spirocyclohexan je možné připravit z 5-chlor-2*H*-benzimidazol-2-spirocyclohexanu, jak bude ukázáno níže (64) (81).

#### 4.2.3.3 Reakce se sirnými nukleofily

2*H*-benzimidazol-2-spirocyclohexan reaguje extrémně rychle s většinou nukleofilů síry. Často je velmi obtížné izolovat základní produkt (5, Nu=SR, SAR), obvykle jsou získávány 5,6-disubstituované sloučeniny, zejména při prodloužení reakčních časů (79) (64).

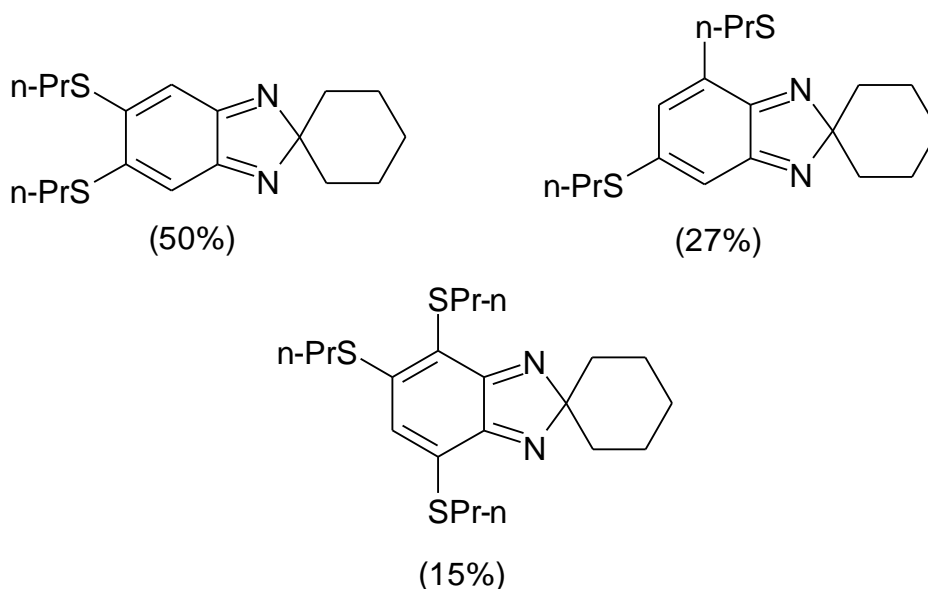
Redukcí nukleofily thiolu je možné získat monosubstituované sloučeniny. Např. reakcí pyridin-2-thiolu v methanolu při pokojové teplotě s 2*H*-benzimidazol-2-spirocyclohexanem (absence MnO<sub>2</sub>) je získána směs 5-pyrid-2-ylthiol-1,3-dihydro-2*H*-benzimidazol-2-spirocyclohexanu (69%) a 5,6-disubstituované 1,3-dihydro sloučeniny (3%). Je zajímavé, že za stejných reakčních podmínek, reaguje pyrimidin-2-thiol za vzniku směsi 5-pyrimidin-2-ylthiol-1,3-dihydro-2*H*-benzimidazol-2-spirocyclohexanu (62%) a 4,5-disubstituované 1,3-dihydro sloučeniny (6%) (82).

Reakcí 2*H*-benzimidazol-2-spirocyclohexanu s alkythioláty, zejména s *n*-propylthiolátem sodným, vznikají různé směsi sloučenin. Reakcí s jedním nebo dvěma ekvivalenty *n*-propylthiolátu sodného v *n*-propanolu při pokojové teplotě, po dobu několika hodin, vzniká směs látek uvedených na Obr. 9 (81).



Obr. 9 Směs sloučenin vzniklých reakcí s jedním nebo dvěma ekvivalenty alkythiolu

Podobná reakce s šesti ekvivalenty činidla v DMSO dává směs sloučenin na Obr. 10. Výsledné směsi produktů jsou oddělitelné pouze s obtížemi pomocí chromatografických technik (81).



Obr. 10 Směs sloučenin vzniklých reakcí se šesti ekvivalenty alkythiolu

Poly(*n*-propylthio) substituované 2*H*-benzimidazol-2-spirocyclohexany uvedené na Obr. 10 jsou zbarveny od jasně žluté přes oranžovou po tmavě červenou. Jsou vysoce fluorescentní pod UV světlem. Jsou nestálé na vzduchu, teple a světle (81).

### 4.3 Reakce substituovaných 2H-benzimidazol-2-spirocyclohexanů s nukleofily

#### 4.3.1 5-chlor-2H-benzimidazol-2-spirocyclohexan

5-methoxy (80%), 4,6-dimethoxy (45%), 5-ethoxy (48%), 4,5-diethoxy (41%) a 5-*n*-propoxy-2H-benzimidazol-2-spirocyclohexany se získávají pomocí reakce 5-chlor derivátů s alkoxidem sodným (64) (81). 5-fenoxy deriváty (65%) mohou být připravovány podobně (64). Reakce 5-chlor-2H-benzimidazol-2-spirocyclohexanu s *n*-propylthiolátem sodným nebo s benzenthioalátem sodným v *n*-propanolu při -10°C až 0°C poskytuje 5-*n*-propylthio- (60%) nebo 5-fenylthio-sloučeniny (54%) (81).

5-chlor-2H-benzimidazol-2-spirocyclohexan poskytuje s azidem sodným v DMSO 5-azido-2H-benzimidazol-2-spirocyclohexan (60%), jak ukazuje Schéma 4 (64) (83). Podobně probíhá reakce s kyanidem sodným za vzniku 5-kyano derivátu (64).

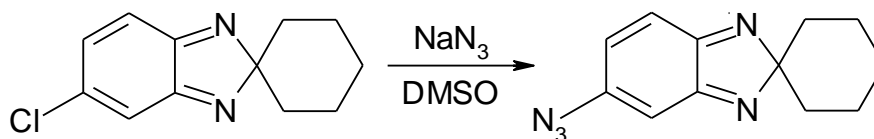


Schéma 4 5-azido-2H-benzimidazol-2-spirocyclohexan

#### 4.3.2 5,6-dichlor-2H-benzimidazol-2-spirocyclohexan

Tato sloučenina dobře reaguje s jedním nebo dvěma ekvivalenty sekundárních aminů, alkoxidů a thiolů. Optimální podmínky pro nahrazení chloridu aminem jsou v protickém rozpouštědle, jako je ethanol, při pokojové teplotě za přítomnosti uhličitanu draselného. Význam ethanolu v této reakci je ve vodíkovém přenosu v bipolárním meziprojektu **A**. Z meziprojektu **A** vznikne meziprojekt **B**, který následně ztrácí chlorovodík, za vzniku produktu **C**, jak ukazuje Schéma 5 (84).

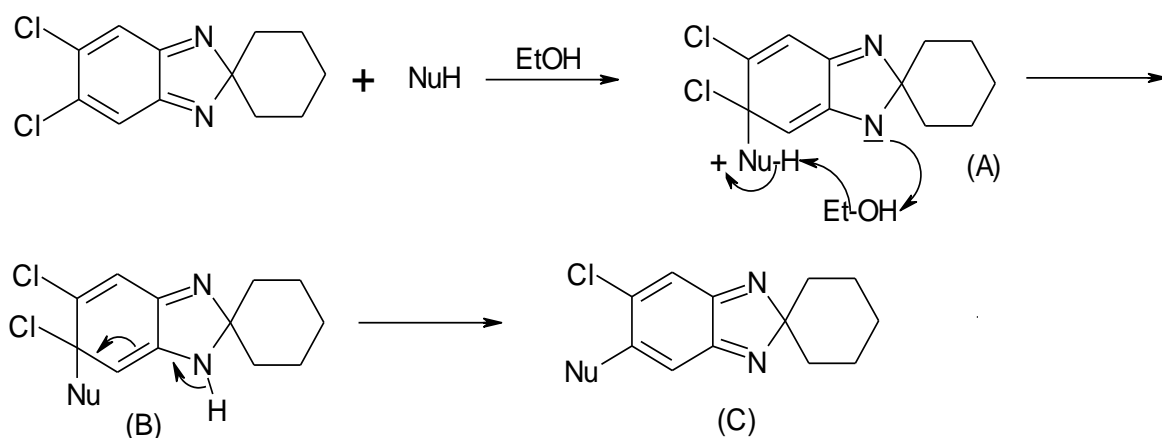


Schéma 5 Reakce 5,6-dichlor-2*H*-benzimidazol-2-spirocyclohexanu s aminem

Např. reakcí 5,6-dichlor-2*H*-benzimidazol-2-spirocyclohexanu s morfolinem v horkém ethanolu vzniká buď 6-chlor-5-morfolino derivát (C, Nu=morfolin, 97%), nebo směs sloučenin (C, Nu=morfolin, 62%) a 5,6-dimorfolino derivát (28%), v závislosti na množství použitého činidla. Reakcí v horkém methanolu, za přítomnosti uhličitanu draselného, vzniká pouze 6-chlor-5-methoxy derivát (C, Nu=OMe, 20%). V aprotických rozpouštědlech (MeCN, DMSO, PhMe, dioxan) reakce probíhá těžko.

Primární aromatické aminy, jako *p*-toluidin a *p*-anisidin, reagují rychle v ethanolu, za vzniku tmavě červené 5,6-disubstitované sloučeniny, s *p*-chinoidními strukturami (84).

Některé reakce 5,6-dichlor-2*H*-benzimidazol-2-spirocyclohexu s nukleofily kyslíku a síry jsou shrnuty na Schéma 6 (84)

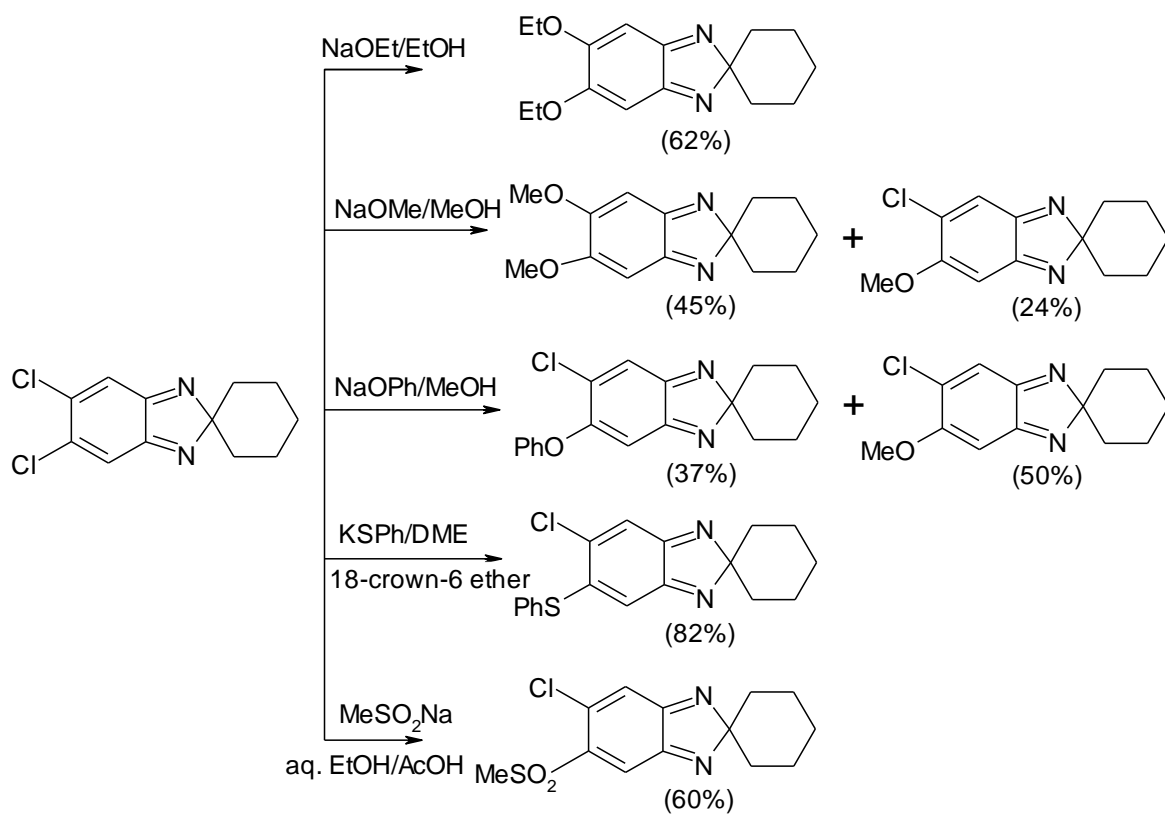
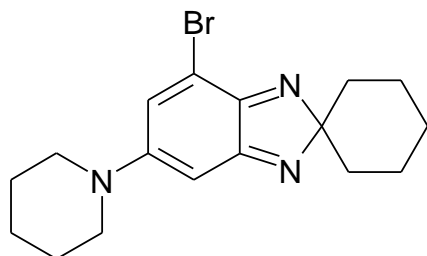


Schéma 6 Reakce 5,6-dichlor-2*H*-benzimidazol-2-spirocyclohexanu s nukleofily kyslíku a síry

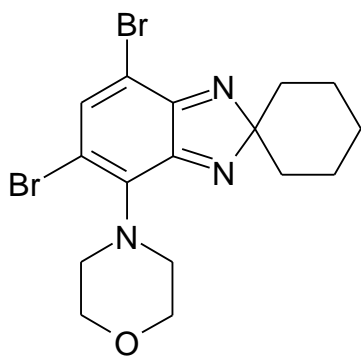
#### 4.3.3 4,6-dibrom-2*H*-benzimidazol-2-spirocyclohexan

Tato sloučenina reaguje s piperidinem v ethanolu. Při této reakci dojde k nahrazení atomu bromu v poloze 6 za vzniku sloučeniny na Obr. 11 (43%). Touto reakcí s morfolinem, za stejných podmínek, vznikne sloučenina na Obr. 12 (32%). Anilin za těchto podmínek nereaguje. Rozdíl v reaktivitě mezi piperidinem a morfolinem je přičítán jejich různé bazicitě (82).



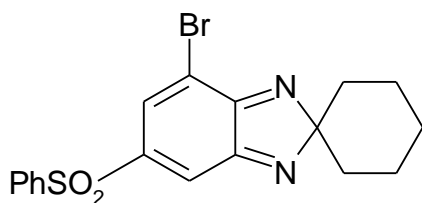
Obr. 11 6-piperidino derivát





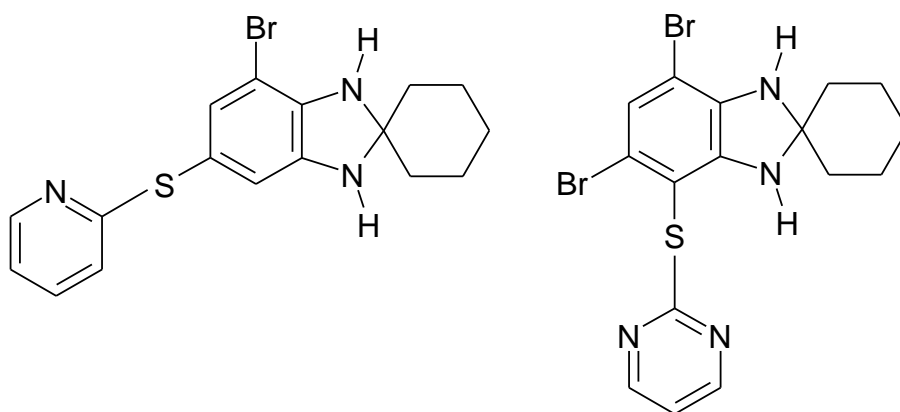
Obr. 12 4-morfolino derivát

Benzensulfonát sodný reaguje přímo s 4,6-dibrom-2*H*-benzimidazol-2-spirocyklohexanem ve vodném roztoku ethanolu, za přítomnosti kyseliny octové, za vzniku sloučeniny na Obr. 13 (84%) (82).



Obr. 13 Benzensulfo derivát

4,6-dibrom-2*H*-benzimidazol-2-spirocyklohexan reaguje s pyrid-2-ylthiolátem sodným za vzniku 1,3-dihydro sloučeniny s výtěžkem 51%. Podobnou reakcí pyrimidin-2-ylthiolátu sodného vzniká 1,3-dihydro sloučenina s výtěžkem 38%. Obě sloučeniny znázorňuje Obr. 14 (82).



Obr. 14 Pyrido a pyrimido derivát

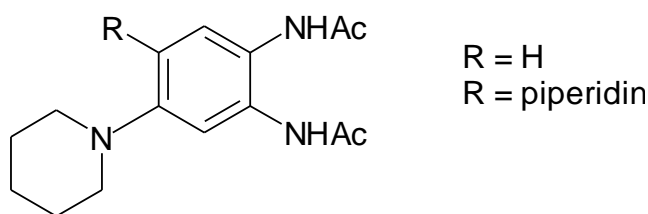
## 4.4 Použití metodologie pro syntézu dalších heterocyklů

### 4.4.1 Přeměna 2H-benzimidazol-2-spirocyklohexanů na o-fenylendiaminy

Suschitzky a kolektiv popsali ve svých raných pracích, že přeměnu 1,3-dihydro-2H-benzimidazol-2-spirocyklohexanu na OPD lze provést pomocí kyseliny chlorovodíkové (65). Podobně v roce 1977 Golerik a Gladyscheva popsali, že 5-fenylsulfonyl-1,3-dihydro-2H-benzimidazol-2-spirocyklohexan a jeho 4-substituované deriváty reagují s různými činidly stejně jako OPD (85). Redukce 2H-benzimidazol-2-spirocyklohexanů na 1,3-dihydro deriváty nebo OPD (někdy po kyselé hydrolýze), mohou být použité k syntéze derivátů dobře známých heterocyklických systémů.

Redukce může být uskutečněna pomocí vodíku za přítomnosti PdC katalyzátoru (79) (64) (82). Při použití kyseliny octové jako rozpouštědla je vznikající 1,3-dihydro-sloučenina hydrolyzována na odpovídající OPD.

Např. 4-piperidino- a 4,5-dipiperidino- OPD lze připravit tímto způsobem z 5-piperidino- a 5,6-dipiperidino-2H-benzimidazol-2-spirocyklohexanu (79) (64) (82). V těchto případech produkované triaminy jsou velmi nestálé, ale pokud je provedena redukce za použití katalyzátoru ve směsi kyseliny octové a acetanhydridu, jsou produkovány stálé bisacetamido sloučeniny na Obr. 15 (79) (64).



Obr. 15 Bisacetamido derivát

Nejvhodnějším činidlem pro redukci 2H-benzimidazol-2-spirocyklohexanu je dithioničitan sodný použitý v nadbytku. Vhodná rozpouštědla jsou horký vodný roztok ethanolu nebo horký vodný roztok acetonu. Ve dříve jmenovaných rozpouštědlech je možná redukce na odpovídající OPD, ačkoliv produkty mohou být kontaminovány meziproduktem 1,3-dihydro- sloučeniny. Chromatografické čištění nepředstavuje problémy (82).

Při použití vodného roztoku acetonu jako rozpouštědla dojde k vysrážení nerozpustného 1,3-dihydro- meziprojektu, který může být izolován. Při použití 20% roztoku kyseliny sírové dochází k hydrolyze 1,3-dihydro- sloučeniny na odpovídající OPD. Např. redukce 5-fenylsulfonyl-4-piperidino-2*H*-benzimidazol-2-spirocyclohexanu s přebytkem dithioničitanu sodného ve vodném roztoku acetonu vede ke vzniku sraženiny 1,3-dihydro sloučeniny (92%), která může být filtrována a převedena na odpovídající OPD (46%) zahříváním v 20% kyselině sírové (82).

Adiční a redukční reakce lze provést také najednou v jedné baňce, ale výtěžky mohou být snižené. Schéma 7 znázorňuje reakci 4,6-dibrom-2*H*-benzimidazol-2-spirocyclohexanu s benzensulfonátem sodným ve vodném roztoku ethanolu obsahujícím malé množství kyseliny octové. Poté je přidán dithioničitan sodný následovaný kyselinou chlorovodíkovou za vzniku 3-brom-5-fenylsulfonyl-*o*-fenylendiaminu v celkovém výtěžku 54% (82).

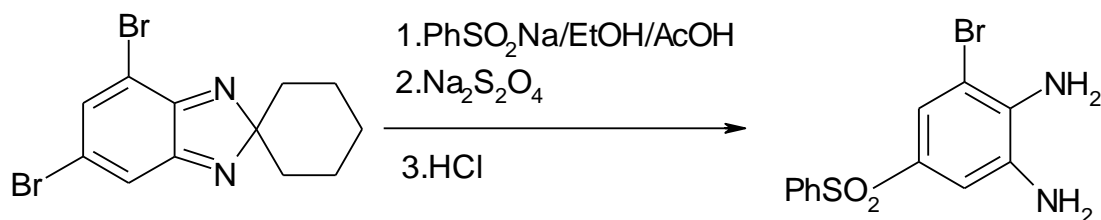


Schéma 7 Reakce 4,6-dibrom-2*H*-benzimidazol-2-spirocyclohexanu s benzensulfonátem

## 5 Experimentální část

Teploty tání byly stanoveny na digitálním přístroji pro stanovování teplot tání ELECTROTHERMAL IA9200 a nejsou korigovány. Průběh reakcí a čistota produktů a meziproduktů byly kontrolovány tenkovrstvou chromatografií na deskách Merck Silikagel 60 F254. Detekce byla prováděna světlem vlnové délky 254 nm a 366 nm. Vyvíjecí soustavy jsou uvedeny u jednotlivých reakcí. Sloupcová chromatografie byla prováděna na silikagelu Merck Kieselgel 60 (0,040-0,063 mm). NMR spektra byla měřena na přístroji VARIAN MERCURY VxBB 300 na KAOCH FaF UK v Hradci Králové. Měření bylo prováděno při frekvenci 299,95 MHz ( $^1\text{H}$  NMR) a 75,43 MHz ( $^{13}\text{C}$  NMR). Posuny jsou vztaženy k vnitřnímu standardu  $\text{Si}(\text{CH}_3)_4$ .

Výchozí látka pro syntézu 3,4-dibrom-*N,N'*-(*o*-fenyl)bis(toluen-*p*-sulfonamid) byl připraven již dříve na katedře dle publikovaných postupů (86). Diaminomaleonitril byl zakoupen u firmy TCI Europe, dithioničitan sodný ( $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$ ) byl zakoupen u firmy Sigma-Aldrich.

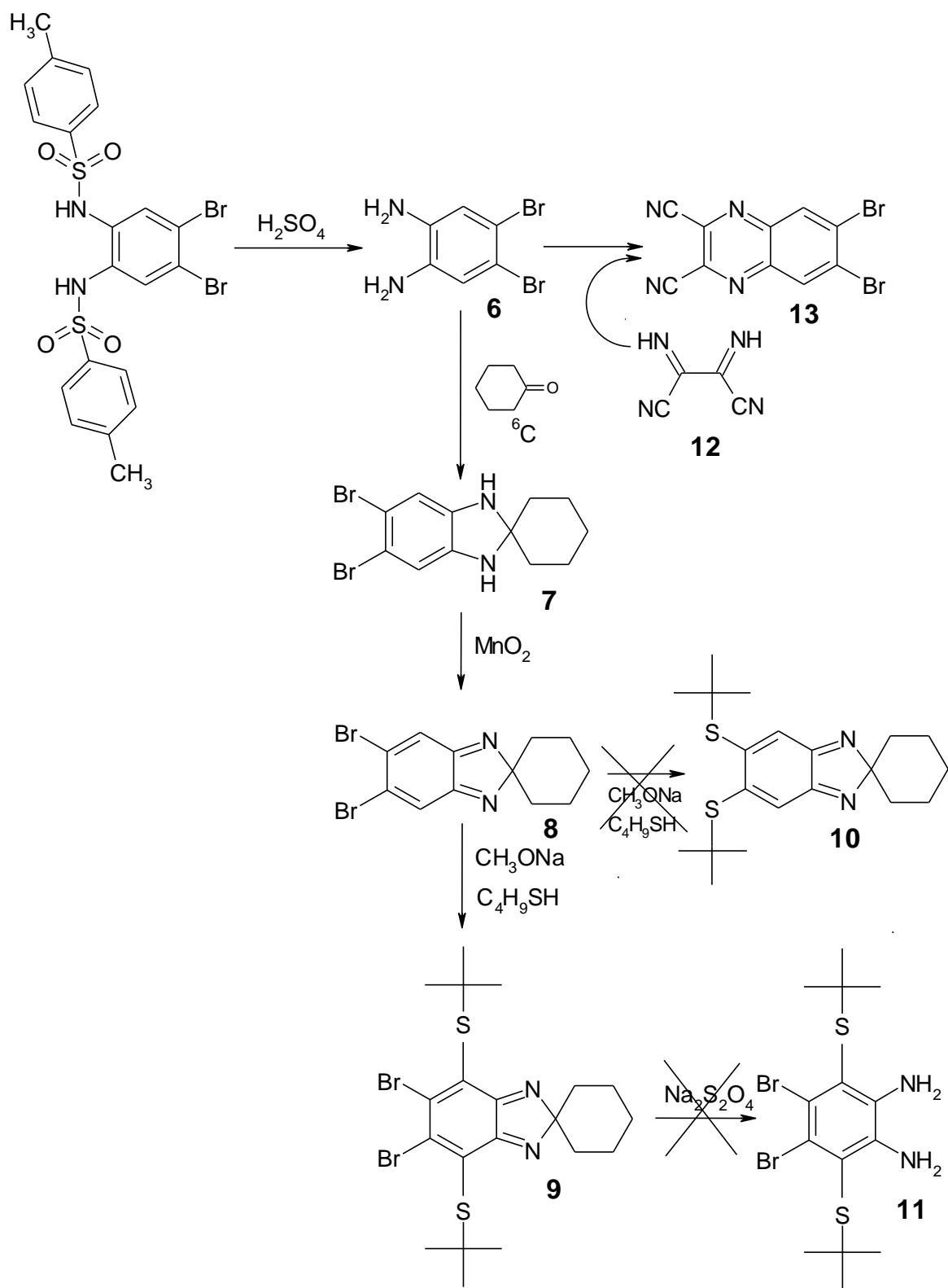
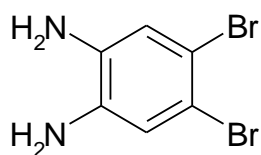


Schéma 8 Reakce prováděné v experimentální části

### 5.1 Příprava 4,5-dibromfenylen-1,2-diaminu (6)

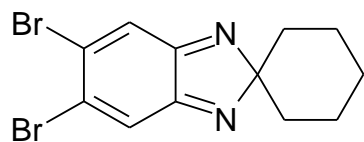


K 5,11 g (0,009 mol) 3,4-dibrom-*N,N'*-(*o*-fenyl)bis(toluen-*p*-sulfonamidu) bylo přidáno 13 ml 98% kyseliny sírové a směs byla míchána za pokojové teploty asi 16 hodin. Z počáteční suspenze se postupem času stal čirý roztok. Poté byla směs nalita do 400 ml vody s ledem a byl přidán hydroxid sodný do bazické reakce. Směs byla nalita do dělicí nálevky a 3× vytřepána do ethyl-acetátu. Odebraná organická fáze byla vysušena síranem sodným, roztok byl přefiltrován a odpařen. Bylo vyrobeno 1,99 g světlé, mírně nahnědlé pevné látky, 4,5-dibromfenylen-1,2-diaminu, což činilo výtěžek 83,5 %.

$^1\text{H}$  NMR (DMSO- $d_6$ )  $\delta$  (ppm) 6,76 (s, 2H, arCH); 4,87 (s, 4H, NH $_2$ )

$^{13}\text{C}$  NMR (DMSO- $d_6$ )  $\delta$  (ppm) 136,5; 117,3; 108,8.

### 5.2 Příprava 5,6-dibrom-2*H*-benzimidazol-2-spirocyclohexanu (8)

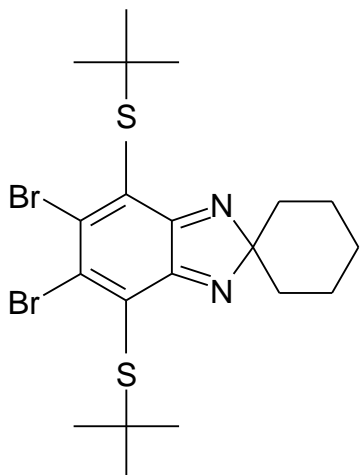


K 2,74 g (0,01 mol) 4,5-dibromfenylen-1,2-diaminu bylo přidáno 5,38 ml cyklohexanonu (0,052 mol) a směs byla zahřívána pod zpětným chladičem při teplotě 100 °C dvě hodiny. Poté byla směs odpařena na vakuové rotační odparce a bylo přidáno 40 ml dichlormethanu, 9,03 g (0,104 mol) oxidu manganického a směs byla míchána při pokojové teplotě 15 hodin. Vzniklý produkt byl přefiltrován, odpařen a přečištěn sloupcovou chromatografií v soustavě benzín/ethyl-acetát 6:1. Bylo získáno 1,65 g výsledného produktu, což činilo výtěžek 46 %.

$^1\text{H}$  NMR (CDCl $_3$ )  $\delta$  (ppm) 7,72 (s, 2H, arCH); 1,98-1,87 (m, 4H, CH $_2$ ); 1,80-1,69 (m, 2H, CH $_2$ ), 1,68-1,56 (m, 4H, CH $_2$ ).

$^{13}\text{C}$  NMR (CDCl $_3$ )  $\delta$  (ppm) 157,7; 132,8; 128,9; 109,4; 32,5; 25,4; 24,5.

### 5.3 Příprava 5,6-dibrom-4,7-terc-butylsulfanyl-2H-benzimidazol-2-spirocyclohexanu (9)

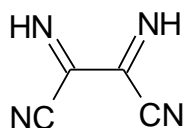


K 400 mg (0,001 mol) 5,6-dibrom-2H-benzimidazol-2-spirocyclohexanu byl přidán čerstvě predestilovaný bezvodý methanol. V druhé baňce bylo smícháno 0,14 g (0,0026 mol) methoxidu sodného s čerstvě predestilovaným methanolem (10 ml) a směs byla míchána pět minut. Poté bylo ke směsi přidáno 0,287 ml (0,0026 mol) 2-methylpropan-2-thiolu. Tato směs byla přidána k roztoku látky **8** v methanolu a celá směs byla míchána za pokojové teploty 4 hodiny. Po 4 hodinách bylo přidáno 1,3 g (0,015 mol) oxidu manganičitého a mícháno další 1 hodinu. Roztok byl přefiltrován, odpařen a přečištěn sloupcovou chromatografií v soustavě benzín/ethyl-acetát 15:1. Získaný produkt byl překrytalizován z methanolu. Bylo získáno 223,6 mg, což činí výtěžek 37 %. U produktu byla stanovena teplota tání na 163,2-163,7 °C.

$^1\text{H}$  NMR ( $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  (ppm) 1,99-1,88 (m, 4H,  $\text{CH}_2$ ); 1,79-1,62 (m, 6H,  $\text{CH}_2$ ); 1,43 (s, 18H,  $\text{CH}_3$ ).

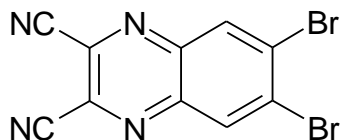
$^{13}\text{C}$  NMR ( $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  (ppm) 158,8; 143,5; 135,5; 107,6; 52,8; 32,8; 32,2; 25,6; 24,4.

#### 5.4 Příprava diiminosukcinonitrilu (12)



1,08 g (0,001 mol) diaminomaleonitrilu bylo rozpuštěno v 25 ml acetonitrilu. Ke směsi bylo přidáno 2,26 g (0,001mol) 2,3-dichlor-5,6-dikyano-1,4-benzochinonu a směs byla míchána při pokojové teplotě 30 minut. Poté byl roztok přefiltrován a odpařen. Bylo získáno 1,33 g diiminosukcinonitrilu což činilo výtěžek 125 %. Reakce byla prováděna přesně dle literatury a produkt nebyl dále analyzován (87).

#### 5.5 Příprava 6,7-dibromchinoxalin-2,3-dikarbonitrilu (13)



K 31 ml kyseliny trifluoroctové byla postupně přidávána rozetřená směs 1,68 g (0,006 mol) 4,5-dibromfenylen-1,2-diaminu s 1,00 g (0,009 mol) diiminosukcinonitrilu. Směs byla míchána při pokojové teplotě 14 hodin pod argonem, poté byla odpařena a přečištěna sloupcovou chromatografií v toluenu. Bylo získáno 1,4 g světle žluté, krystalické látky, což činilo výtěžek 65,4 %. U produktu byla stanovena teplota tání na 300-303 °C za rozkladu.

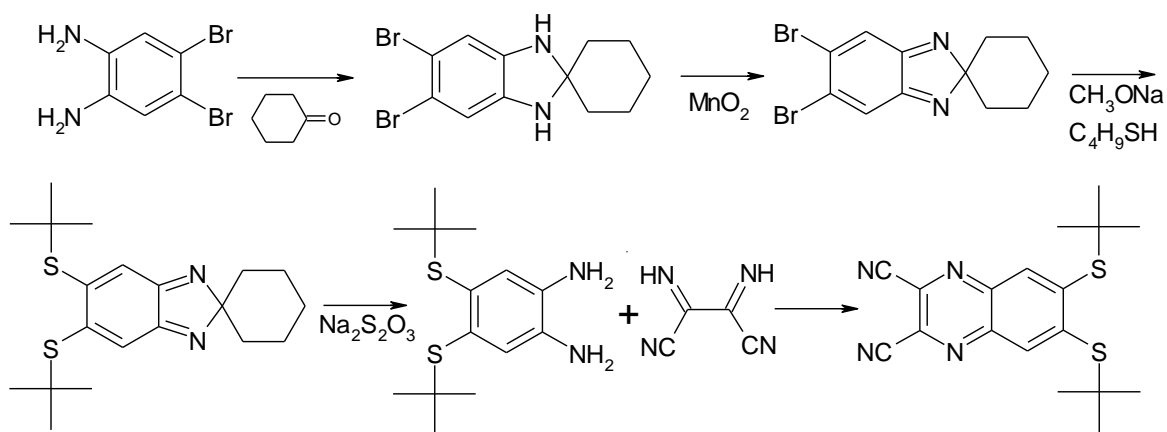
$^1\text{H}$  NMR (DMSO- $d_6$ )  $\delta$  (ppm) 8,85 (s, 2H, arCH).

$^{13}\text{C}$  NMR (DMSO- $d_6$ )  $\delta$  (ppm) 139,7; 133,6; 132,7; 132,0; 114,5.



## 6 Výsledky a diskuze

Jak bylo zmíněno v začátku práce, mým cílem byla příprava prekursoru tetra(2,3-chinoxalino)porfyrasinů, přesněji syntéza 6,7-bis(*tert*-butylsulfanyl)chinoxalin-2,3-dikarbonitrilu. Pro syntézu této látky bylo na začátku na katedře zvoleno využití vhodné reaktivity 2*H*-benzimidazol-2-spirocyclohexanu. Po zavedení *tert*-butylsulfanylových skupin by došlo k odchránění na vhodně substituovaný OPD a následně ke kondenzaci s diiminosukcinonitrilem na požadovaný chinoxalin.



Obr. 16 Teoretické schéma vzniku 6,7-bis(*tert*-butylsulfanyl)chinoxalin-2,3-dikarbonitrilu

Z jiných diplomových prací na katedře (dosud nepublikováno) bylo bohužel zjištěno, že reakce nesubstituovaného 2*H*-benzimidazol-2-spirocyclohexanu s alkylthioláty vede ke směsi mono-, di- (směs polohových izomerů) a trisubstituovaných alkylsulfanyl derivátů podobně jak je diskutováno v publikované práci (88) a v kapitole 4.2.3.3. Proto jsme se rozhodli zvýšit selektivitu této reakce zavedením bromů do polohy 5 a 6 2*H*-benzimidazol-2-spirocyclohexanu s úmyslem jejich preferenční výměny za alkylsulfanyl substituenty. Reakce proto začaly postupnou syntézou 5,6-dibrom-2*H*-benzimidazol-2-spirocyclohexanu.

Prvním krokem mé práce byla příprava 4,5-dibromfenylen-1,2-diaminu (**6**). Tuto sloučeninu jsem získala po velkých obtížích hydrolýzou 3,4-dibrom-*N,N'*-(*o*-fenyl)bis(toluen-*p*-sulfonamidu).

3,4-dibrom-*N,N'*-(*o*-fenyl)bis(toluen-*p*-sulfonamid) jsem nechala reagovat s 50% kyselinou sírovou. Směs jsem zahřívala pod zpětným chladičem dvě hodiny. Vzniklý produkt jsem podrobila TLC. TLC ukázala, že hydrolýza neproběhla.

K výchozí sloučenině hydrolyzy jsem zkusila přidat 15 ml ethanolu a směs mikronizovat v ultrazvuku. Po rozmělnění jsem směs zahřívala na glycerinové lázni pod zpětným chladičem při 90 °C do doby, než se výchozí látka rozpustila. Poté jsem přidala 50% kyselinu sírovou a směs zahřívala 4 hodiny. Po ukončení reakce jsem provedla TLC ke standardu a zjistila, že hydrolyza opět neproběhla.

V dalším pokusu o hydrolyzu jsem k výchozí sloučenině přidala 98% kyselinu sírovou. Směs jsem míchala při pokojové teplotě asi 16 hodin. Vzniklý produkt jsem podrobila TLC a zjistila, že hydrolyza proběhla. Připravila jsem tímto způsobem 83,5 % 4,5-dibromfenylen-1,2-diaminu (**6**).

5,6-dibrom-2*H*-benzimidazol-2-spirocyclohexan (**8**) jsem připravila z 4,5-dibromfenylen-1,2-diaminu (**6**) ve dvou krocích nejprve reakcí s cyklohexanem s následnou oxidací. K 4,5-dibromfenylen-1,2-diaminu (**6**) jsem přidala pětinasobek cyklohexanonu a směs jsem zahřívala pod zpětným chladičem při teplotě 100 °C dvě hodiny. Touto reakcí vznikl 1,3-dihydroderivát (**7**). Oxidaci na 5,6-dibrom-2*H*-benzimidazol-2-spirocyclohexan (**8**) jsem provedla pomocí oxidu manganičitého v prostředí dichlormethanu. Výsledný produkt jsem získala ve výtěžku 46 %.

Další reakcí prováděnou v rámci mé rigorózní práce byla příprava 5,6-bis(*tert*-butylsulfanyl)-2*H*-benzimidazol-2-spirocyclohexanu. K 5,6-dibrom-2*H*-benzimidazol-2-spirocyclohexanu (**8**) jsem přidala bezvodý methanol. Do této směsi jsem přidala roztok 2-methylpropan-2-thiolátu sodného v methanolu. Směs jsem míchala za pokojové teploty čtyři hodiny a poté jsem přidala oxid manganičitý. Po proběhlé adici je potřeba vzniklý 1,3-dihydro derivát zoxidovat na stálejší substituovaný 2*H*-benzimidazol-2-spirocyclohexan (viz schéma 1). Po odpaření a přečištění sloupcovou chromatografií jsem získala produkt, který ovšem podle NMR analýzy neodpovídal očekávanému produktu, ale 5,6-dibrom-4,7-bis(*tert*-butylsulfanyl)-2*H*-benzimidazol-2-spirocyclohexanu (**9**). Jak již bylo naznačeno v literatuře (89), v případě 4,6-dibromo derivátů může docházet buď k výměně bromů za nukleofil nebo se nukleofil aduje do vedlejší polohy. V našem případě došlo bohužel preferenčně k druhému případu.

Vzhledem k tomu, že i poloha těchto substituentů by mohla být vhodná pro další zkoumání ve finálních tetra(2,3-chinoxalino)porfyrázinech, pokusila jsem se odchránit

spirocykl pomocí dithioničitanu sodného, za vzniku substituovaného OPD (**11**). Tento krok se bohužel nezdařil.

Vzhledem ke skutečnosti, že atomy bromu se nepodařilo vyměnit za *tert*-butylsulfanylovou skupinu, pokusila jsem se postup zopakovat s 5,6-dichlorfenylen-1,2-diaminem, s myšlenkou následné reakce s 2-methylpropan-2-thiolem. Bohužel se v tomto případě nepodařilo získat ani 5,6-dichlor-2*H*-benzimidazol-2-spirocyclohexan.

Vzhledem k neúspěchu tohoto postupu jsem zvolila alternativní metodu, kdy nejprve dojde k vytvoření chinoxalinového jádra a na něm pak dojde k nukleofilní substituci bromů za *tert*-butylsulfanyly. Jedním z reaktantů v této reakci je diiminosukcinonitril (**12**), který jsem připravila bez větších obtíží oxidací diaminomaleonitrilu 5,6-dichlor-2,3-dikyano-1,4-benzochinonem ve výtěžku 125 %. Vysoký výtěžek byl způsoben nejspíš nedostatečným vysušením produktu od acetonitrilu jako rozpouštědla.

Následnou reakcí diiminosukcinonitrilu (**12**) s 4,5-dibromfenylen-1,2-diaminem (**6**) v prostředí kyseliny trifluoroctové vznikl 6,7-dibromchinoxalin-2,3-dikarbonitril (**13**). Tento produkt jsem získala ve výtěžku 65 %. Tento postup byl odvozen od syntézy podobných sloučenin popsaných v literatuře (90).

Poslední prováděnou reakcí byl pokus o syntézu cílové molekuly mé rigorózní práce, tedy 6,7-bis(*tert*-butylsulfanyl)chinoxalin-2,3-dikarbonitrilu. 6,7-dibromchinoxalin-2,3-dikarbonitril (**13**) jsem rozpustila v bezvodém dimethylformamidu a přidala 2-methylpropan-2-thiol a uhličitan draselný. Směs jsem míchala při pokojové teplotě dvacet hodin. Do vzniklé směsi jsem přidala vodu a směs jsem vytřepala do chloroformu. TLC analýza (toluen) ukázala, že vzniklá olejovitá látka obsahuje mnoho látek, což by vyžadovalo dlouhé čištění, izolaci a identifikaci jednotlivých produktů. V prováděné reakci mohlo dojít pravděpodobně jak k substituci atomů bromu tak i karbonitrilových skupin za *tert*-butylsulfanylové skupiny.

## 7 Závěr

V mé rigorózní práci jsem se zabývala syntézou prekurzorů pro přípravu tetra(2,3-chinoxalino)porfyrasinů. Porfyrasiny se připravují tetramerizací aromatických karbonitrilů. O syntézu požadované látky 6,7-bis(*tert*-butylsulfanyl)-chinoxalin-2,3-dikarbonitrilu jsem se pokoušela dvěma metodami. V první metodě jsem chtěla využít reaktivity 2*H*-benzimidazol-2-spirocyclohexanů. Tato metoda selhala kvůli jinému mechanismu reakce, než jsme předpokládali. Příprava 6,7-bis(*tert*-butylsulfanyl)-chinoxalin-2,3-dikarbonitrilu druhou metodou nebyla dokončena z důvodu vzniku směsi látek v posledním kroku syntézy. Jak se ukázalo, tato metoda by mohla být jedinou metodou přípravy požadované látky, ale na této syntéze je ještě mnoho práce, obzvlášť co se týká separace a hledání optimálních podmínek pro celou reakci.

## ABSTRAKT

UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE

FARMACEUTICKÁ FAKULTA V HRADCI KRÁLOVÉ

KATEDRA FARMACEUTICKÉ CHEMIE A KONTROLY LÉČIV

**Kandidát:** Mgr. Kateřina Sedláčková

**Konzultant:** PharmDr. Petr Zimčík Ph.D.

**Název rigorózní práce:** Syntéza substituovaných chinoxalin-2,3-dikarbonitrilů jako prekurzorů potenciálně fotodynamicky aktivních látek

V rámci mé rigorózní práce jsem se zabývala syntézou chinoxalin-2,3-dikarbonitrilů jako prekurzorů pro syntézu tetra(2,3-chinoxalino)porfyrasinů. Tyto porfyrasiny se připravují tetramerizací aromatických dikarbonitrilů a vykazují dobré fotodynamické vlastnosti. Mou prací bylo hledat nejvhodnější postup syntézy 6,7-bis(*terc*-butylsulfanyl)-chinoxalin-2,3-dikarbonitrilu.

V první metodě přípravy jsem chtěla využít reaktivity 5,6-dibrom-2*H*-benzimidazol-2-spirocyclohexanu. Ten jsem připravila z 4,5-dibromfenylen-1,2-diaminu reakcí s cyklohexanonem a následnou oxidací oxidem manganičitým. Bohužel po zavedení alkylsulfanylové skupiny se ukázalo, že mechanismus reakce je jiný než jsme předpokládali. Nedošlo k výměně bromidových atomů za alkylsulfanylové skupiny a spirocyklický kruh se nepodařilo rozštěpit.

V druhé metodě jsem nechala zreagovat odpovídající *o*-fenylendiamin s diiminosukcinonitrilem v prostředí kyseliny trifluoroctové. Reakcí vzniklého 6,7-dibromchinoxalin-2,3-dikarbonitrilu s alkylsulfanylovou skupinou bohužel vznikla směs produktů. Tato reakce se zdá být zatím asi jedinou možností přípravy 6,7-bis(*terc*-butylsulfanyl)-chinoxalin-2,3-dikarbonitrilu, ale je na ní ještě mnoho práce v separaci a optimalizaci podmínek.

## ABSTRACT

CHARLES UNIVERSITY IN PRAGUE

FACULTY OF PHARMACY IN HRADEC KRÁLOVÉ

DEPARTMENT OF PHARMACEUTICAL CHEMISTRY AND DRUG CONTROL

**Candidate:** Mgr. Kateřina Sedláčková

**Consultant:** PharmDr. Petr Zimčík Ph.D.

**Title of Thesis:** Synthesis of substituted quinoxaline-2,3-dicarbonitriles as precursors of potentially photodynamic compounds

In my thesis, I dealt with synthesis of quinoxaline-2,3-dicarbonitrils as precursors for synthesis tetra(2,3-quinoxaline)porphyrazines. These porphyrazines are generally prepared by tetramerization of aromatic dicarbonitriles and show good photodynamic properties. My work was to investigate the most suitable procedures for the synthesis of 6,7-bis(*tert*-butylsulfanyl)-quinoxaline-2,3-dicarbonitril.

In the first method of preparation, I intended to use the suitable reactivity of 5,6-dibromo-2*H*-benzimidazol-2-spirocyclohexane. It was prepared from 4,5-dibromophenylene-1,2-diamine by reaction with cyclohexanone following by oxidation by manganese dioxide. Unfortunately, the introduction of alkylsulfanyl group was shown to proceed by reaction mechanism than we supposed.

In the second method, the corresponding *o*-phenylenediamine reacted with diiminosuccinonitrile in trifluoroacetic acid to form 6,7-dibromoquinoxaline-2,3-dicarbonitril. Unfortunately, a hardly separable mixture of products occurred after the subsequent reaction of 6,7-dibromoquinoxaline-2,3-dicarbonitril with alkylthiolate. This reaction seems to be the only possibility of preparation of the desired 6,7-bis(*tert*-butylsulfanyl)-quinoxaline-2,3-dicarbonitril so far, but there is still a lot of work with preparation, isolation and optimization of reaction conditions.

## 8 Citovaná literatura

1. Triesscheijn M., Baas P., Schellens J. H. M., Stewart F. A.: *Oncologist*. 2006, 11, 1034.
2. von Tappeiner H., Jesionek H.: *Munch. Med. Wochenschr.* 1903, 47, 2044.
3. von Tappeiner H., Jodlbauer A.: *Die Sensibilisierende Wirkung Fluoreszierender Sunstanzen: Gesammelte Untersuchungen Über die Photodynamische Erscheinung*. Leipzig, Germany: F.C.W. Vogel 1907.
4. Dougherty T. J., Grindey G. B., Fiel R.: *J. Natl. Cancer Inst.* 1975, 55, 115.
5. Dougherty T. J., Kaufman J. E., Goldfarb A.: *Cancer Res.* 1978, 38, 2628.
6. Kelly J. F., Snell M. E.: *J. Urol.* 1976, 115, 150.
7. Foote C. S.: *Photochem. Photobiol.* 1991, 54, 659.
8. Henderson B. W., Gollnick S. O., Snyder J. W.: *Cancer Res.* 2004, 64, 2120.
9. Morlet L., Vonarx-Coinsmann V., Lenz P.: *Photochem. Photobiol.* 1995, 28, 25.
10. Veenhuizen R. B., Ruevekamp M. C., Oppelaar H.: *Int. J. Cancer* 1997, 73, 230.
11. Ris H. B., Altermatt H. J., Stewart C. M.: *Int. J. Cancer*: 1993, 55, 245.
12. Chen B., de Witte P. A.: *Cancer Lett.* 2000, 150, 111.
13. Cramers P., Ruevekamp M., Oppelaar H.: *Br. J. Cancer* 2003, 88, 283.
14. Triesscheijn M., Ruevekamp M., Aalders M.: *Photochem. Photobiol.* 2005, 81, 1161.
15. Veenhuizen R., Oppelaar H., Ruevekamp M.: *Int. J. Cancer* 1997, 73, 236.
16. Chen B., Pogue B. W., Goodwin I. A.: *Radiat. Res.* 2001, 160, 452.
17. Henderson B. W., Waldow S. M., Mang T. S.: *Cancer Res.* 1985, 45, 572.
18. Star W. M., Marijnussen H. P. A, van den Berg-Blok A. E.: *Cancer Res.* 1986, 46, 2532.

19. van Geel I. P., Oppelaar H., Oussoren Y. G.: *Int. J. Cancer* 1994, 56, 224.
20. van Geel I. P., Oppelaar H., Rijken P. F.: *Br. J. Cancer* 1996, 73, 288.
21. Sharman W. M., Allen C. M., van Lier J. E.: *Drug Discov. Today* 1999, 4, 507.
22. Dennis E. J., Dolmans G. C., Fukumura D., Jain R. K.: *Nat. Rev. Cancer* 2003, 3, 380.
23. Dougherty T. J.: *Photochem. Photobiol.* 1983, 38, 377.
24. Dougherty T. J., Potter W. R., Weishaupt K. R.: *Prog. Clin. Biol. Res.* 1984, 170, 301.
25. Bellnier D. A., Dougherty T. J.: *J. Clin. Laser Med. Surg.* 1996, 14, 311.
26. Sternberg E. D., Dolphin D., Brückner C.: *Tetrahedron* 1998, 54, 4151.
27. Wilkinson F., Helman W. P., Ross A. B.: *J. Phys. Chem. Ref. Data* 1993, 22, 113.
28. Sema A. A. F., Kennedy J. C., Blakeslee D., Robertson D. M.: *Can. J. Neurol. Sci.* 1981, 8, 105.
29. Winkelman J. W., Collins G. H.: *Photochem. Photobiol.* 1987, 46, 801.
30. Pandey R. K., Herman C. K.: *Chem. Ind.* 1998, 739.
31. Bonnett R.: *Rev. Contemp. Pharmacother.* 1999, 10, 1.
32. Röder B., Näther D.: *Int. Soc. Opt. Eng.* 1991, 1525, 377.
33. El-Sharabasy M. M., El-Waseef A. M., Hafez M. M., Salim S. A.: *Br. J. Cancer* 1992, 65, 409.
34. Peng Q., Berg K., Moan J., Kongshaug M., Nesland J. M.: *Photochem. Photobiol.* 1997, 65, 235.
35. Milgrom L., MacRobert S.: *Chem. Br.* 1998, 34, 45.
36. Yamamoto H., Okunaka T., Furukawa K., Hiyoshi T., Konaka H., Kato H.: *Curr. Sci.* 1999, 77, 894.



37. Hsi R. A., Rosenthal D. I., Glatstein E.: *Drugs* 1999, 57, 725.
38. Ochsner M.: *Arzneim.-Forsch.* 1997, 47, 1185.
39. Dougherty T. J.: *Photochem. Photobiol.* 1993, 58, 895.
40. Dougherty T. J., Gomer C. J., Henderson B. W., Jori G., Kessel D., Korbelik M., Moan J., Peng Q.: *J. Natl. Cancer Inst.* 1998, 90, 889.
41. Webber J., Kessel D., Fromm D.: *J. Biol. Med.* 1997, 70, 127.
42. Nudelman A.: *Synthesis* 1999, 568.
43. Gaullier J. M., Berg K., Peng Q., Anholt H., Selbo P. K., Ma L. W., Moan J.: *Cancer Res.* 1997, 57, 1481.
44. Milgrom L.: *Chem. Br.* 1998, 34, 45.
45. Kreimer-Birnbaum K.: *Semin. Hematol.* 1989, 26, 157.
46. Jori G.: *J. Photochem. Photobiol. A-Chem.* 1992, 62, 371.
47. Jori G., *EPA Newslett.* 1997, 60, 12.
48. Brown S. B., Truscott T. G.: *Chem. Br.* 1993, 955.
49. Jori G., Schindl L., Schindl A., Polo L.: *J. Photochem. Photobiol. A-Chem.* 1996, 102, 101.
50. Nyman E. S., Hynninen P. H.: *J. Photochem. Photobiol. B-Biol.* 2004, 73, 9.
51. Kessel D.: *Biochem. Pharmacol.* 1984, 33, 1389.
52. Dolphin D.: *Can. J. Chem.* 1994, 72, 1005.
53. Chan A. L., Juarez M., Allen R.: *Photodermatol. Photoimmunol. Photomed.* 2005, 21, 72.
54. Kaplan M. J., Somers R. G., Greenberg R. H.: *J. Surg. Oncol.* 1998, 67, 121.
55. Lui H., Hobbs L., Tope W. D.: *Arch. Dermatol.* 2004, 140, 26.
56. Mang T. S., Allison R., Hewson G.: *Cancer J. Sci. Am.* 1998, 4, 378.

57. Taber S. W., Fingar V. H., Coots C. T.: Clin. Cancer Res. 1998, 4, 2741.
58. Zimčik P., Miletin M.: Čes-slov. Farm. 2004, 6, 271.
59. Vrouenraets M. B., Visser G. W., Stigter M.: Cancer Res. 2001, 61, 1970.
60. Derycke A. S., Witte P. A.: Drug Deliv. Res. 2004, 56, 17.
61. Takeuchi Y., Kurohane K., Ichakawa K.: Cancer 2003, 97, 2027.
62. Seebach D.: Angew. Chem., Int. Ed. Engl. 1979, 4, 239.
63. Sharma S., Abuzar S.: Prog. Drug Res. 1983, 27, 85.
64. Davies K. E., Domany G. E., Farhat M., Herbert J. A. L., Jefferson A. M.,  
Guttierez Martin A., Suschitzky H.: J. Chem. Soc., Perkin Trans. 1. 1984, 2465.
65. Garner R., Garner G. V., Suschitzky H.: J. Chem. Soc. (C). 1970, 825.
66. Herbert J. A. L., Suschitzky H.: J. Chem. Soc., Perkin Trans. 1. 1974, 2657.
67. Staab H. A., Vögtle F.: Chem. Ber. 1965, 98, 2681.
68. Suzuki H., Ohashi M., Itoh K., Matsuda I., Ishii I.: Bull. Chem. Soc. Japan. 1975,  
48, 1922.
69. Fatiadi A. J.: Synthesis 1976, 65.
70. Robinson A.G.: Dizertační práce. Univerzita Salford 1985.
71. Suschitzky H.: Croat-Chem. Acta 1986, 59, 57.
72. Latham D. W. S., Meth-Cohn O., Suschitzky H., Herbert J. A. L.: J. Chem. Soc.,  
Perkin Trans. 1. 1977, 470.
73. Herbert J. A. L.: Dizertační práce. Univerzita Salford 1973.
74. Latham D. W. S., Meth-Cohn O., Suschitzky H.: J. Chem. Soc., Chem. Comm.  
1972, 1040.
75. Issidorides C. H., Haddadin M. J.: Chem. Abs. 1971, 74, 141873.
76. Abu El-Haj M. J.: J. Org. Chem. 1972, 37, 2519.

77. Garner G. V., Suschitzky H.: *Tetrahedron Lett.* 1971, 169.
78. Herbert J. A. L., Iddon B., Robinson A. G., Suschitzky H.: *J.Chem.Soc., Perkin Trans. 1.* 1988, 991.
79. Jefferson A. M., Suschitzky H.: *J. Chem. Soc., Chem. Comm.* 1977, 189.
80. Barnes J. C., Hetherington A.: *Acta Cryst.* 1978, B34, 2146.
81. Woolley L. H.: *Dizertační práce. Univerzita Salford* 1989.
82. Hazelton J. C.: *Dizertační práce. Univerzita Salford* 1989.
83. Suschitzky H., Kramer W., Neidlein R., Uhl H.: *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 1.* 1988, 983.
84. Iddon B., Robinson A. G., Suschitzky H.: *Synthesis* 1988, 871.
85. Gorelik M. V., Gladysheva T. Kh.: *J. Org. Chem. U.S.S.R., Engl. Transl.* 1977, 13, 1817.
86. Morkved E. H., Neset S. M., Bjorlo O., Kjoson H., Hvistendahl G., Mo F.: *Acta Chem. Scandinavia.* 1995, 49, 660.
87. Webster O. W., Hartter D. R., Begland R. W., Sheppard W. A., Cairncross A.: *J. Org. Chem.* 1972, 37, 4133.
88. Hazelton J.: *Chem. Soc. Perkin Trans.* 1992, 685.
89. Hazelton J.: *Tetrahedron* 1995, 15, 5597.
90. Rothkopf H. W., Wöhrle D., Müller R., Kossmehl G.: *Chem. Ber.* 1975, 108, 875.