

**UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE**  
**FARMACEUTICKÁ FAKULTA V HRADCI KRÁLOVÉ**

**KATEDRA ANORGANICKÉ A ORGANICKÉ CHEMIE**



**DIPLOMOVÁ PRÁCE**

**2,4-Disubstituované deriváty chinazolinu jako potenciální ligandy  
pro CAR receptory**

**Hradec Králové, 2012**

**Marcela Drechslerová**

Chtěla bych poděkovat svému školiteli, PharmDr. Marcelu Špulákovi, Ph.D. za odbornou pomoc při vypracování této diplomové práce, prof. RNDr. Milanu Pourovi, Ph.D. za možnost být součástí jeho pracovní skupiny a doc. PharmDr. Jiřímu Kunešovi, CSc. za provedení NMR analýzy syntetizovaných vzorků.

Mé další díky patří PharmDr. Lucii Tichotové, Ph.D., Mgr. Petru Šenelovi, Ph.D. a Mgr. Jiřímu Kratochvílovi za cenné rady a za pomoc v laboratoři. Dále děkuji doc. PharmDr. Petru Pávkovi, Ph.D., jeho doktorandům a diplomantům za biologické testování mnou připravených látek.

V neposlední řadě chci poděkovat své rodině za podporu při celém studiu.

Prohlašuji, že tato diplomová práce je mé původní autorské dílo, které jsem vypracovala samostatně. Veškerá literatura a další zdroje, ze kterých jsem při zpracování čerpala, jsou uvedeny v seznamu použité literatury a v práci řádně ocitovány.

Marcela Drechslerová

## ABSTRAKT

Univerzita Karlova v Praze

Farmaceutická fakulta v Hradci Králové

Katedra anorganické a organické chemie

Kandidát: Marcela Drechslerová

Konzultant: PharmDr. Marcel Špulák, PhD.

Název diplomové práce: 2,4-Disubstituované deriváty chinazolinu jako potenciální ligandy pro CAR receptory

CAR (konstitutivní androstanový receptor) je jaderný receptor ovlivňující buněčný metabolismus. Negativně reguluje metabolismus tuků (prostřednictvím inhibice liponeogeneze),  $\beta$ -oxidace mastných kyselin a glukoneogeneze. Tento receptor také hraje důležitou roli v metabolismu jak exogenních, tak i endogenních toxinů.

Po zjištění, že 2-(3-methoxyfenyl)chinazolin-4-ol je ligandem CAR receptoru, jsme se zaměřili na syntézu jeho derivátů.

Syntéza tohoto chinazolinu proběhla ve třech krocích s velmi dobrým výtěžkem. První skupina (4-alkyloxy-2-(3-methoxyfenyl)chinazoliny) byla připravena jednoduchými alkylačními reakcemi s alkylhalogenidy. Druhá řada 4-alkylsulfanyl-2-(3-methoxyfenyl)chinazolinů byla syntetizována reakcí výchozího 2-(3-methoxyfenyl)chinazolin-4-olu se sulfidem fosforečným a následně reakcí s methyljodidem. Třetí série derivátů (4-alkylamino-2-(3-methoxyfenyl)chinazoliny) byla syntetizována pomocí nukleofilní substituce *p*-fluorbenzensulfonylovaného intermediátu příslušným aminem, což s uspokojivými výtěžky vedlo k výslednému produktu. Ve snaze vytvořit čtvrtou řadu derivátů s methoxy skupinou posunutou do polohy 4 fenylu jsme prováděli couplingové reakce s přímou aktivací C-H vazby, nicméně tyto snahy byly neúspěšné.

Všechny připravené látky byly následně testovány na afinitu k CAR receptoru.

## ABSTRACT

Charles University in Prague

Faculty of Pharmacy in Hradec Králové

Department of Inorganic and Organic Chemistry

Candidate: Marcela Drechslerová

Consultant: PharmDr. Marcel Špulák, PhD.

Title of Thesis: 2,4-Disubstituted quinazolines as potential ligands for CAR receptors

CAR (constitutive adrostane receptor) is a nuclear receptor that has an impact on cell metabolism. It is a negative regulator of lipid metabolism (via liponeogenesis inhibition),  $\beta$ -oxidation of fatty acid, and gluconeogenesis. This receptor also plays an important role in metabolism of exogenous and endogenous toxins.

After revealing the fact that 2-(3-methoxyphenyl)quinazoline-4-ol may act as a ligand for CAR we focused on a synthesis of a small library of its derivatives.

The synthesis of desired quinazoline was carried out in three steps with very good overall yield. The first group of 4-alkyloxy-2-(3-methoxyphenyl)quinazolines was prepared by simple alkylation reactions with alkylhalogenides. The second group of (4-alkylsulfanyl-2-(3-methoxyphenyl)quinazolines) was synthesized by reaction with phosphorus pentasulfide followed by reaction with methyl iodide. The most recent group of derivatives, (4-alkylamino-2-(3-methoxyphenyl)quinazolines), was synthesized by nucleophilic substitution of 4-fluorobenzenesulfonated intermediate with appropriate amine leading to desired product with satisfactory yields. Attempts to synthesize the fourth series of compounds possessing methoxy fragment shifted to position 4 on the phenyl moiety employing a coupling reaction with a direct activation of a C-H bond were unsuccessful.

All prepared compounds were submitted for an investigation of the affinity to CAR receptors.

## OBSAH

<b>SEZNAM ZKRATEK.....</b>	<b>7</b>
<b>1. ÚVOD.....</b>	<b>8</b>
1.1. Klasifikace CAR nukleárního receptoru.....	8
1.2. Exprese CAR.....	8
1.3. Ligandy a aktivátory CAR.....	9
1.4. Aktivace receptoru.....	12
1.5. Funkce CAR.....	13
1.5.1. Podíl CAR na detoxifikaci endogenních a exogenních látek.....	13
1.5.2. CAR jako rizikový faktor .....	14
1.5.3. Vliv CAR na metabolismus bilirubinu.....	15
1.5.4. Podíl CAR na eliminaci žlučových kyselin.....	15
1.5.5. Metabolismus hormonů.....	16
1.5.5.1. Steroidní hormony.....	16
1.5.5.2. Tyroidní hormony.....	16
1.5.6. Vliv CAR na metabolismus lipidů, glukózy a energetickou rovnováhu.....	17
1.5.6.1. Glukoneogeneze.....	17
1.5.6.2. Metabolismus lipidů.....	18
1.5.7. Extrahepatální funkce CAR.....	19
1.6. Deriváty 2,4-disubstituovaného chinazolinu.....	20
<b>2. CÍL PRÁCE.....</b>	<b>21</b>
<b>3. VÝSLEDKY S KOMENTÁŘEM.....</b>	<b>22</b>
3.1. Syntéza 2-(3-methoxyfenyl)chinazolin-4-olu.....	22
3.2. První série derivátů 2-(3-methoxyfenyl)chinazolin-4-olu.....	22
3.3. Druhá série derivátů 2-(3-methoxyfenyl)chinazolin-4-olu.....	23
3.4. Třetí série derivátů 2-(3-methoxyfenyl)chinazolin-4-olu.....	24
3.5. Pokusy o coupling s využitím přímé aktivace C-H vazby.....	26
<b>4. BIOLOGICKÉ TESTOVÁNÍ AFINITY K CAR RECEPTORU..</b>	<b>29</b>
<b>5. ZÁVĚR.....</b>	<b>33</b>
<b>6. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST.....</b>	<b>34</b>
6.1. Obecné experimentální postupy.....	34
6.2. Syntéza 2-(3-methoxyfenyl)chinazolin-4-olu.....	35

6.2.1.	Chlorid kyseliny 3-methoxybenzoové.....	35
6.2.2.	<i>N</i> -(2-kyanfenyl)-3-methoxybenzamid.....	36
6.2.3.	2-(3-Methoxyfenyl)chinazolin-4-ol.....	37
6.3.	Syntéza derivátů první série .....	38
6.3.1.	4-Methoxy-2-(3-methoxyfenyl)chinazolin.....	38
6.3.2.	2-(3-Methoxyfenyl)-4-(propyloxy)chinazolin.....	39
6.3.3.	4-Isobutoxy-2-(3-methoxyfenyl)chinazolin.....	40
6.3.4.	2-(3-Methoxyfenyl)-4-(prop-2-en-1-yloxy)chinazolin.....	41
6.3.5.	4-Benzyloxy-2-(3-methoxyfenyl)chinazolin.....	42
6.3.6.	4-Ethoxy-2-(3-methoxyfenyl)chinazolin.....	43
6.4.	Syntéza derivátů druhé série.....	44
6.4.1.	2-(3-Methoxyfenyl)chinazolin-4-thiol.....	44
6.4.2.	2-(3-Methoxyfenyl)-4-(methylsulfanyl)chinazolin.....	45
6.5.	Syntéza derivátů třetí série.....	46
6.5.1.	2-(3-Methoxyfenyl)chinazolin-4-amin.....	46
6.5.2.	4-Butylamino-2-(3-methoxyfenyl)chinazolin.....	47
6.5.3.	4-Isobutylamino-2-(3-methoxyfenyl)chinazolin .....	48
6.5.4.	4-Benzylamino-2-(3-methoxyfenyl)chinazolin.....	49
6.5.5.	2-(3-Methoxyfenyl)-4-[2-(piperidin-1-yl)ethylamino]chinazolin.....	50
6.6.	Syntéza derivátů čtvrté série.....	51
6.6.1.	3-Methyl-3,4-dihydrochinazolin-4-on.....	51
6.6.2.	3-Benzyl-3,4-dihydrochinazolin-4-on.....	52
7.	SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY.....	53

## SEZNAM ZKRATEK

APCI	atmospheric-pressure chemical ionization
CAR	constitutive androstane receptor
CITCO	6-(4-chlorfenyl)imidazo[2,1- <i>b</i> ][1,3]thiazol-5-karbaldehyd- <i>O</i> -(3,4-dichlorbenzyl)oxim
CYP	cytochrom P450
DMAP	4-( <i>N,N</i> -dimethylamino)pyridin
EC50	koncentrace látky, při kterém je dosaženo 50 % jejího účinku
FBSCI	<i>p</i> -fluorbenzensulfonylchlorid
FXR	farnesoid X receptor
GDP	guanosindifosfát
GR	glukokortikoidní receptor
HDL	high density lipoprotein
HMG-CoA	hydroxymethylglutaryl-koenzym A
Insig-1	insulin-induced gene 1
LBD	ligand binding domene – doména vázající ligand
LRMS	hmotnostní spektroskopie s nízkým rozlišením
MDR	multidrug resistance protein
mRNA	messenger RNA
MRP	multidrug resistance-associated protein
NADPH	redukováný nikotinamidadenindinukleotidfosfát
NMR	nukleární magnetická rezonance
PGC-1 $\alpha$	peroxisome proliferator-activated receptor- $\gamma$ coactivator-1 $\alpha$
PPAR $\alpha$	peroxisome proliferator-activated receptor $\alpha$
PXR	pregnanový X receptor
SULT	sulfotransferázy
TCPOBOP	1,4-bis[2-(3,5-dichlorpyridyloxy)]benzen
TH	tyroidní hormon
TIF2	transcription intermediary factor 2
TLC	tenkovrstvá chromatografie
TSH	tyreotropní hormon
UGT	UDP-glukuronosyltransferázy
VLDL	very low density lipoprotein

## 1. ÚVOD

### 1.1. Klasifikace CAR nukleárního receptoru

Receptor CAR (NR1I3) je řazen do první podrodiny nukleárních receptorů (receptory podobné thyroid hormone receptoru), skupiny I (receptory podobné vitamínu D receptoru).

K objevu lidského CAR (hCAR) došlo v roce 1994, jeho původní označení bylo orphan receptor MB67.<sup>1</sup> Zkratka CAR původně znamenala constitutive activator of retinoic response (díky tomu, že byl tento receptor schopen vázat se s retinoic acid response elementy (RAREs)). Myší CAR (mCAR) byl izolován a popsán v roce 1997.<sup>2</sup>

V průběhu dalšího studia byly postupně odhalovány hlavní funkce tohoto receptoru. Především byl zkoumán z hlediska vlivu na indukci genů kódujících CYP2B subrodinu cytochromu P450 zprostředkovanou fenobarbitalem či induktory s podobným působením. Těmi jsou například fenytoin, polychlorované bifenyly, chlorpromazin, TCPOBOP a další. Bylo zjištěno, že CAR má velmi důležitou úlohu v metabolismu xenobiotik, konkrétně figuruje jako xenosenzor. V experimentech vyšlo najevo, že CAR je nezbytný pro indukci CYP2B10 prostřednictvím enzymových induktorů a bylo identifikováno množství dalších genů, které jsou podřízeny regulaci CAR.<sup>3</sup>

Vzhledem k tomu, že není znám dostatek kvalitních ligandů tohoto receptoru, jeho funkce v organismu zatím není zcela osvětlená. CAR zřejmě ovlivňuje signální cesty jednak prostřednictvím přímého vlivu na expresi genů, ale také ovlivněním dalších signálních cest, ve kterých hrají jaderné receptory roli. Díky tomuto komplexnímu integrovanému systému je organismus schopen regulovat metabolismus endogenních látek, xenobiotik i dietárních faktorů.<sup>2</sup>

### 1.2. Exprese CAR

CAR je v nejvyšší míře exprimován v místech, kde dochází ke vstupu a metabolizaci xenobiotik, což koresponduje s tím, že v organismu plní důležitou roli xenosenzoru. Tím je zajištěna co možná nejvyšší ochrana organismu před negativním působením exogenních látek. Exprese CAR je vysoká převážně v játrech a v epitelálních buňkách tenkého střeva. Dále je také v menší míře syntetizován v myši i lidské srdeční tkáni, v kosterním svalstvu, v mozku, ledvinách a v lidských plicích. Jeho role v těchto tkáních však dosud nebyla detailně prostudována.<sup>2</sup>



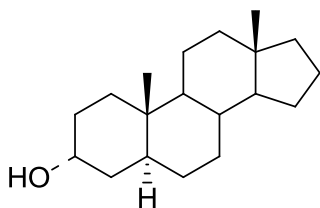
### 1.3. Ligandy a aktivátory CAR

Když byl CAR v roce 1994 poprvé objeven, byl popsán jako „orphan“ receptor, jinými slovy nebyl známý žádný jeho přirozený endogenní ligand. To samozřejmě vedlo ke snahám tuto látku najít. Dva metabolity androstanu – androstenol ( $5\alpha$ -androst-16-en-3 $\alpha$ -ol) a androstanol ( $5\alpha$ -androstan-3 $\alpha$ -ol) byly identifikovány jako ligandy CAR, oba snižovaly jeho konstitutivní aktivitu.<sup>4</sup> Další ligandy, společně s druhovou specifitou vazby na CAR a s pásmem EC50 jsou uvedeny v Tab. 1. CITCO a TCPOBOP jsou zatím jedinými zjištěnými látkami, které se přímo vážou k LBD (ligand binding domene) CAR receptoru. Stále se však nepodařilo najít ligand, který by se k LBD CAR vázal s vysokou afinitou (všechny dosud objevené látky mají hodnoty EC50 v mikromolárním pásmu, na rozdíl od koncentrací ligandů klasických steroidních receptorů, které se pohybují v řádech nanomolů).<sup>2</sup> Vedle aktivace receptoru přímou vazbou ligandu na LBD mají některé látky schopnost indukovat translokaci receptoru do jádra, aniž by byla zjištěna interakce těchto látek s LBD. Takové látky se nazývají aktivátory a řadí se mezi ně například fenobarbital, fenytoin či bilirubin<sup>5</sup> (Obr. 1).

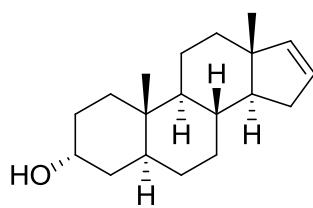
V nedávné době byla provedena studie zkoumající ovlivnění CAR polyfenoly (katechiny, flavony a jiné látky, které jsou běžnou součástí rostlinné potravy). Z výsledků vyšlo najevo, že tyto látky jsou silnými aktivátory CAR. Došlo ke zvýšení množství CYP2B10 v buňkách, což nasvědčuje tomu, že alimentární flavonoidy zvyšují aktivitu CAR a tím pomáhají urychlit detoxikaci organismu a regulovat energetický metabolismus.<sup>6</sup> V tradiční čínské medicíně je používán čaj Yin Chin jako prostředek pro léčbu novorozenecké žloutenky (stav organismu, kdy ještě není plně funkční metabolismus žlučových kyselin u novorozenců a dochází k jejich akumulaci v organismu). Později bylo zjištěno, že jednou z aktivních látek tohoto čaje je dimethylskuletin, který působením na CAR indukuje expresi genů spojených se solubilizací a exkrecí bilirubinu.<sup>6</sup>

Tab. 1 - ligandová afinita agonistů k CAR receptoru<sup>14</sup>

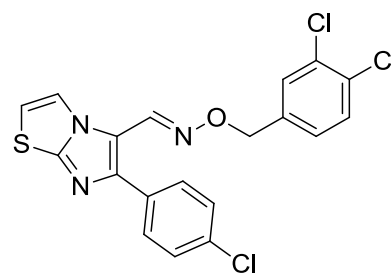
Ligand	Receptor	EC50 (nM)	Účinek
5 $\alpha$ -androstan-3 $\alpha$ -ol	hCAR	EC50 = 1000->10000	inverzní agonista <sup>5</sup>
	mCAR	EC50 = 250 – 1500	inverzní agonista <sup>4,5,7</sup>
5 $\alpha$ -androst-16-en-3 $\alpha$ -ol	mCAR	EC50 = 400- ~5000	inverzní agonista <sup>4,8,9</sup>
CITCO	hCAR	EC50 = 25-304	agonista <sup>10</sup>
klotrimazol	hCAR	EC50 = 50- ~1000	inverzní agonista <sup>5,10</sup>
bis(2-ethylhexyl)ftalát	hCAR	EC50 = 211	agonista <sup>11</sup>
17 $\beta$ -estradiol	mCAR	EC50 = 1000	agonista <sup>8</sup>
estron	mCAR	EC50 = 1000	agonista <sup>8</sup>
meklizin	hCAR	EC50 = ~500-1000	inverzní agonista <sup>12</sup>
	mCAR	EC50 = 25	agonista <sup>12</sup>
5 $\beta$ -pregnan-3,20-dion	hCAR	EC50 = 670-3000	agonista <sup>5,10</sup>
	mCAR	EC50 = >10000	slabý agonista <sup>8</sup>
		EC50 = >>10000	inverzní agonista <sup>8</sup>
progesteron	mCAR	EC50 = ~3000	inverzní agonista <sup>8</sup>
TCPOBOP	mCAR	EC50 = 20-100	agonista <sup>5,7,13</sup>
testosteron	mCAR	EC50 = ~7000	inverzní agonista <sup>8</sup>



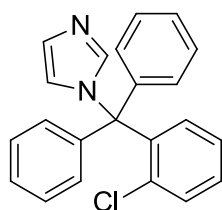
**5 $\alpha$ -androstan-3 $\alpha$ -ol**



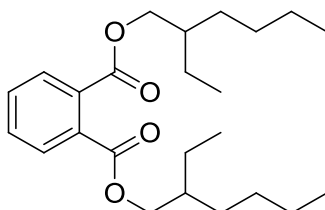
**5 $\alpha$ -androst-16-en-3 $\alpha$ -ol**



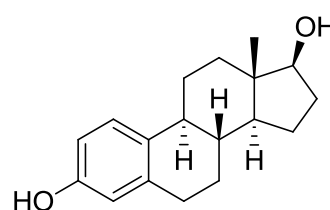
**CITCO**



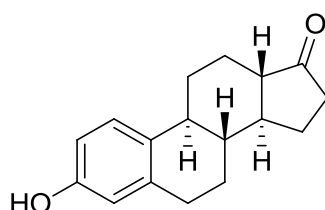
**klotrimazol**



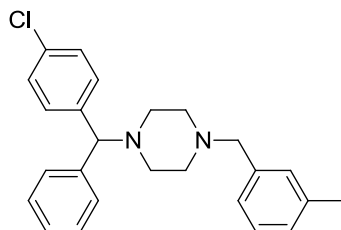
**bis(2-ethylhexyl)ftalát**



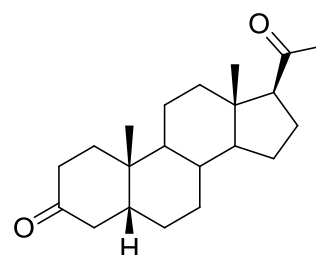
**17 $\beta$ -estradiol**



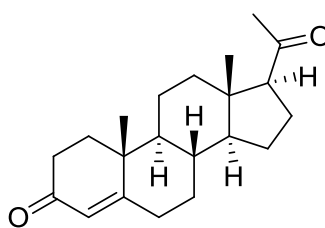
**estron**



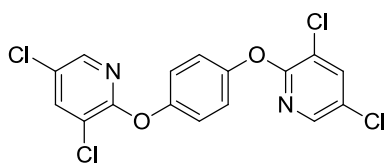
**meklizín**



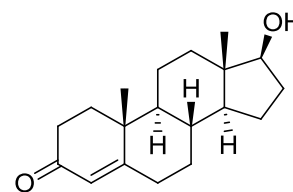
**5 $\beta$ -pregnan-3,20-dion**



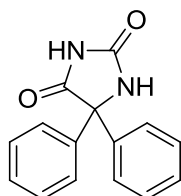
**progesteron**



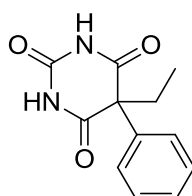
**TCPOBOP**



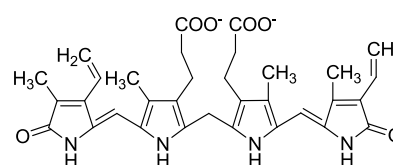
**testosteron**



**fenytoín**



**fenobarbital**



**bilirubin**

Obr. 1 - Chemické struktúry ligandů hCAR a mCAR receptorů

#### 1.4. Aktivace receptoru

Na rozdíl od většiny „orphan“ nukleárních receptorů se CAR v myších jaterních buňkách nachází v cytoplazmě, podobně jako receptory steroidních hormonů (například GR). Tím je zabráněno jeho chronické aktivaci a je umožněna regulace jeho aktivity. V nedávné době byla zjištěna schopnost CAR receptoru translokovat k membráně a tudíž možnost zapojení signalizačních článků důležitých pro aktivování CAR, které jsou na membráně přítomny.

Pro translokaci CAR receptoru z cytoplazmy do buněčného jádra není nutné navázání jeho ligandu. Přítomnost fenobarbitalu či bilirubinu způsobí translokaci receptoru do jádra, aniž by interagovaly s LBD receptoru.<sup>5</sup> Fenobarbitalu podobný aktivátor TCPOBOP se váže přímo k LBD myšího CAR a indukuje jeho translokaci do jádra. Ačkoli bylo prokázáno, že TCPOBOP se k hCAR přímo neváže, v jaterních buňkách humanizovaných myší (myší, u kterých byl mCAR vyměněn za hCAR a mohou proto sloužit jako farmakologické modely pro studium lékové odpovědi), dochází v důsledku přítomnosti TCPOBOP k translokaci do jádra. To nasvědčuje tomu, že aktivátory mohou způsobit translokaci CAR receptoru do jádra nezávisle na jejich schopnosti vázat se s LBD receptoru.<sup>2</sup>

Regulace CAR translokace je také spojená s procesem defosforylace. Okadaická kyselina, která inhibuje proteinovou fosfatázu, blokuje expresi cílového genu způsobenou fenobarbitalem a zabraňuje akumulaci CAR v buněčném jádře. Oproti tomu nadměrná exprese proteinové fosfatázy 2A (PP2A) zvyšuje nukleární translokaci mCAR indukovanou aktivátorem TCPOBOP. Toto nasvědčuje tomu, že defosforylace je klíčovým signálem pro uvolnění CAR z cytosolického komplexu v návaznosti na působení aktivátoru.<sup>2</sup>

CAR je v cytosolu součástí multiproteinového komplexu, jehož součástmi jsou cytoplasmic CAR retention protein (CCRP) a chaperon heat shock protein 90 (Hsp90). CCRP má zřejmě v procesu translokace CAR klíčovou roli. Této zkušenosti napovídá fakt, že nadměrná exprese CCRP má za následek zvýšenou retenci CAR v cytoplazmě, v důsledku čehož dojde po stimulaci buněk TCPOBOP ke zvýšené translokaci.<sup>2</sup>

Pouhá translokace CAR do buněčného jádra nezpůsobí zvýšenou transkripci cílového genu. Je zřejmé, že regulace transkripční aktivity tohoto xenosenzoru je komplexní proces, kterého se účastní velké množství dalších faktorů (např. peroxisome proliferative activated receptor- $\gamma$  coactivator 1 $\alpha$  (PGC 1 $\alpha$ ), steroid receptor coactivator 1 (SRC-1), TIF2 a další). Translokace CAR do jádra je proto prvním důležitým krokem v této regulaci.<sup>2</sup>

Zpočátku se předpokládalo, že samotná translokace CAR do buněčného jádra indukuje expresi cílového genu (napovídala tomu korelující translokace a indukce cílového genu). Později se ale ukázalo, že KN-62 (inhibitor  $\text{Ca}^{2+}$ /kalmodulin-dependentní kinázy) výrazně snižuje indukci mRNA kódující CYP2B10, která je v myších hepatocytech vyvolaná aplikací fenobarbitalu a TCPOBOP. Tento inhibitor však nezabraňuje přenosu CAR z cytosolu do jádra po aplikaci fenobarbitalu, což nasvědčuje tomu, že v souvislosti s CAR receptorem probíhá v jádře komplexní aktivační proces.<sup>3</sup>

## 1.5. Funkce CAR

V průběhu let, kdy byla na výzkum CAR jaderného receptoru zaměřena pozornost, bylo odkryto několik jeho hlavních fyziologických významů.

U organismů byl během evoluce vyvinut systém obrany proti exogenním toxickým látkám (toxinům, karcinogenům, volným radikálům, polutantům životního prostředí, rostlinným alkaloidům atd.), jakožto i proti endogenním potenciálně nebezpečným látkám (bilirubinu, žlučovým kyselinám, cholesterolu, steroidním hormonům atd.). Došlo k vytvoření komplexního obranného systému zahrnujícího xenosenzory, enzymy (oxidoreduktázy, hydrolázy, izomerázy, ligázy, lyázy, transferázy,...), transportní proteiny atd., jež má za úkol minimalizovat negativní působení těchto látek na organismus. CAR receptor funguje jako senzor toxických látek vnikajících do organismu z vnějšího prostředí, stejně tak i k obraně proti potenciálně toxickým metabolitům látkové výměny, čímž usnadňuje jejich eliminaci.<sup>2</sup>

Vedle důležité funkce CAR jako senzoru toxických látek a stále přibývá důkazů, že má tento receptor také značný význam při metabolismu endogenních látek, čímž přispívá k udržení homeostázy v organismu. Hlavní vliv má na jaterní lipogenezi, glukoneogenezi a  $\beta$ -oxidaci mastných kyselin. Jelikož se jedná o velmi komplexní a komplikovaný metabolický systém, CAR receptor působí v synergii s množstvím dalších faktorů a koregulátorů, například  $\text{PPAR}\alpha$ , fork-head insulin-responsive transcription factor 1 (FoxO1), winged helix/fork-head transcription factor (FoxA2), PGC-1 $\alpha$  a hepatocyte nuclear factor-4- $\alpha$  (HNF4 $\alpha$ ).<sup>15</sup>

### 1.5.1. Podíl CAR na detoxifikaci endogenních a exogenních látek

Proces metabolismu toxických látek má tři hlavní fáze. Hlavními reakcemi fáze I jsou oxidace, redukce a hydrolýza. Toxická látka při ní získává polární funkční skupinu (-OH, -SH, -COOH, -NH<sub>2</sub>) a tvoří se tak primární metabolit, který může být dále metabolizován.

Hlavní enzymatický systém zodpovědný za reakce první fáze je NADPH-cytochrom P450 (CYP). Zástupci této skupiny enzymů jsou exprimováni převážně v játrech, ledvinách a střevním epitelu, což souvisí s rolí těchto orgánů při vychytávání, metabolismu a exkreci xenobiotik. V lidském genomu se zatím podařilo najít a identifikovat 57 genů pro různé izoformy CYP. Isoformami, které hrají v metabolismu exogenních toxických látek a endogenních substrátů (např. steroidních hormonů) nejvýznamnější roli jsou CYP3A4, CYP2D6, CYP1A2 a CYP2C9.<sup>2</sup> Ve fázi II dochází k syntetickým a konjugačním reakcím primárních metabolitů s fyziologickými látkami (např. glycin, cystein, kyselina glukuronová, sulfáty a glutathion), čímž vznikají hydrofilnější metabolity, které mohou být následně vylučovány, převážně močí a žlučí. Hlavními enzymy této fáze jsou sulfotransferázy (SULT), NAD(P)H-chinon oxidoreduktázy, NAD(P)H-menadion reduktázy, UDP-glukuronosyltransferázy (UGT), glutathion-S-transferázy (GST), epoxid hydrolázy a *N*-acetyltransferázy.<sup>2</sup> Regulace genové exprese různých enzymů, jež se účastní fáze I, II (fáze metabolismu) a III (fáze exkrece) je klíčová v regulaci metabolismu xenobiotik. CAR koordinuje regulaci těchto genů, díky čemuž dochází ve většině případů k detoxifikaci pomocí enzymů CYP a transferáz a následné eliminaci metabolitů z krve pomocí transportérů (především P-glykoproteinu, multidrug resistance-associated proteiny (MRPs) a organic anion transporting polypeptide 2 (OATP2)).<sup>2</sup>

### 1.5.2. CAR jako rizikový faktor

Receptorem CAR indukovaný metabolismus xenobiotik vede ve většině případů k eliminaci toxinů z organismu a tím zajišťuje ochranu před negativním působením těchto látek. Může ovšem nastat situace, kdy dojde v důsledku metabolismu cizorodé látky k poškození jaterní tkáně. Příkladem tohoto jevu je například hepatotoxicita acetaminofenu (paracetamolu). CAR reguluje expresi glutathion-S-transferázy- $\pi$  (GST $\pi$ ), enzymu, který zvyšuje depleci glutathionu a tím podporuje jaterní toxicitu acetaminofeni. Ten se v játrech metabolizuje pomocí enzymů CYP 450 a minoritním produktem tohoto metabolismu je i *N*-acetyl-*p*-benzochinonimin, který je za normálních okolností ihned inaktivován glutathionem. V případě, že dojde k depleci glutathionu, *N*-acetyl-*p*-benzochinonimin se váže na struktury jaterních buněk a dochází tak k jejich nenávratnému poškození. V experimentech se toxicita acetaminofenu projevila u wild-type myší, ne však u mCAR-null kmenu (ten byl vůči této toxicitě rezistentní). Stejně tak u GST $\pi$ -null myší se toxicita acetaminofenu neprojevila.

Oxid dusnatý (NO) napomáhá ochraně buněk před xenobiotiky indukovanou toxicitou, a to díky své antioxidační schopnosti, která může ukončit oxidativní stres a lipidovou peroxidaci. Gen lidské indukovatelné NO syntázy (iNOS) je taktéž regulován CAR. Prodloužená expozice oxidu dusnatému ale posune buněčný redoxní stav zpět do oxidované formy cestou oxidace thiolů, např. glutathionu. Z toho vyplývá, že chronická aktivace CAR může podpořit hepatotoxické účinky toxinu.<sup>3</sup>

### **1.5.3. Vliv CAR na metabolismus bilirubinu**

Bilirubin je jedním z nejtoxičtějších přirozených katabolických produktů v těle. Je konečným oxidativním produktem rozkladu hemu. Hlavním projevem jeho akumulace je žloutenka, v důsledku které může dojít k rozvinutí neurotoxicity, až fatální encefalopatie. Jeho hlavní detoxifikační cestou je glukuronidace uridin-5'-difosfát-glukuronyltransferázou 1A1 (UGT 1A1) a výsledný konjugát je následně vylučován do žluči. Fenobarbital může snižovat zvýšenou hladinu bilirubinu v krvi, což je nyní vysvětleno tím, že CAR indukuje expresi UGT1A1, MRP2 (aktivní transportér exkretující konjugát do žluči), OATP1 (organic anion transporter protein 1) a GSTA1 (glutathion-S-transferáza A1), jež se na eliminaci bilirubinu podílejí.<sup>2</sup>

### **1.5.4. Podíl CAR na eliminaci žlučových kyselin**

Žlučové kyseliny, jež jsou součástí žluči, jsou nezbytné k emulgaci, vstřebání a transport dietárních lipidů v tenkém střevě. Jejich homeostáza je velmi precizně regulována, protože žlučové kyseliny mají charakter detergentů a v případě zvýšení jejich hladin mohou působit velmi toxicky. U humanizovaných myší bylo prokázáno, že mCAR indukuje enzymy a transportní proteiny spojené s eliminací žlučových kyselin, především CYP3A11, SULT2A1 (sulfotransferáza 2A1) a transportér MRP3. Tato ochranná role CAR přispívá k zachování normálních hladin cholesterolu v organismu nepřímo přes regulaci homeostázy žlučových kyselin.

Receptory FXR a PXR patří mezi klíčové senzory žlučových kyselin. U FXR/PXR double knock-out myší bylo prokázáno, že kyselina cholová způsobila zvýšení hodnot exprese CAR a CYP2B mRNA, a také to, že předchozí podání fenobarbitalu či TCPOBOP zvýšilo expresi cílových genů, což mělo za následek ochranu proti toxicitě bilirubinu a snížení sérových koncentrací žlučových kyselin a bilirubinu. Tento fakt napovídá tomu, že receptory CAR, FXR a PXR při ochraně proti toxickému působení žlučových kyselin spolupracují.<sup>2</sup>

## 1.5.5. Metabolismus hormonů

### 1.5.5.1. Steroidní hormony

Jak již bylo uvedeno, prvními identifikovanými endogenními ligandy CAR receptoru jsou steroidní hormony androstanol ( $5\alpha$ -androstan- $3\alpha$ -ol) a androstenol ( $5\alpha$ -androst- $16$ -en- $3\alpha$ -ol), oba inhibují jeho konstitutivní aktivitu. Také steroidy progesteron a testosteron tuto jeho aktivitu potlačují, avšak pouze při koncentracích, které jsou vysoce nad přirozenými hladinami v organismu dospělého člověka. Oproti tomu terapeutické hladiny estronu, estradiolu a pregnan- $3,20$ -dionu (metabolitu progesteronu) aktivitu CAR zvyšují nad její konstitutivní hodnotu. Aktivace CAR může způsobit zvýšení metabolismu endogenních steroidních hormonů hned několika způsoby. Hlavním cílem aktivace CAR je CYP2B, jež metabolizuje estrogény i androgeny, CAR dále reguluje expresi UGT1A1, jejíž úloha je glukuronidovat estrogény. Navíc CAR může za účasti fenobarbitalu zvýšit sulfataci steroidních látek prostřednictvím transaktivace genu 3'-fosfoadenosin-5'-fosfosulfát syntázy 2 (PAPSS2). Tyto skutečnosti napovídají tomu, že by aktivace CAR mohla zvýšit katabolismus steroidních hormonů a tudíž ovlivnění CAR xenobiotiky může mít za následek ovlivnění hormonální homeostázy.<sup>2</sup>

### 1.5.5.2. Tyroidní hormony

Tyroidní hormon má mimo jiné klíčový vliv na energetickou bilanci organismu a na regeneraci jaterní tkáně. Hladina tyroidního hormonu je řízena syntézou, metabolismem a jeho sekrecí. Thyreotropin (TSH, hormon produkováný adenohypofýzou) zvyšuje syntézu 3-5-3'-5'-tetrajodtyroninu (tyroxin,  $T_4$ ) ve štítné žláze. Tento hormon je posléze v cílových orgánech (především ledviny, játra) přeměňován na mnohem aktivnější trijodtyronin ( $T_3$ ) pomocí enzymů TH deiodáz.

Je známo, že chronická léčba fenobarbitalem a fenytoinem podporuje hypertrofii štítné žlázy. Aktivace CAR indukovaná fenobarbitalem způsobuje, že se snižují hladiny  $T_4$  v krvi, což vede zpětnou vazbou ke zvýšenému vylučování TSH a ke stimulaci růstu štítné žlázy. Oproti tomu hladina  $T_3$  zůstává po aktivaci CAR nezměněná. Je známo, že TH je při metabolismu glukuronidován a sulfatován za účelem clearance a exkrece. Předpokládá se tedy, že enzymy fáze II detoxikace (UGT1A1 a SULT1A1), jejichž exprese je regulována CAR, jsou hlavními faktory zodpovědnými za pokles hladiny  $T_4$  po podávání fenobarbitalu. Zůstává však otázkou, proč hladina  $T_3$  zůstává nezměněna.<sup>2</sup>



### 1.5.6. Vliv CAR na metabolismus lipidů, glukózy a energetickou rovnováhu

Hlavním orgánem zajišťujícím metabolickou homeostázu v těle jsou játra. Rovnováhu tuků udržují prostřednictvím ukládání cirkulujících mastných kyselin ve formě triglyceridů, jejich sekrecí ve formě VLDL a také pomocí oxidace mastných kyselin. Za normálních podmínek játra produkují triacylglyceroly a glukózu, čímž zajišťují zdroje energie pro celý organismus. V průběhu kalorické restrikce či zvýšené fyzické aktivity je játry produkována glukóza, která je poté společně s mastnými kyselinami uvolňovanými z tukové tkáně zdrojem energie.

Narušení metabolismu glukózy a tuků v játrech může mít za následek různá metabolická a kardiovaskulární onemocnění, jako například aterosklerózu, diabetes melitus 2. typu, inzulinovou rezistenci a obezitu (tento patologický stav se souhrnně nazývá metabolickým syndromem).<sup>2</sup>

Játra také hrají důležitou roli v cirkadiálním rytmu přijímání potravy a půstu. Provedené studie nasvědčují tomu, že exprese CAR v jaterních buňkách také odpovídá dennímu rytmu. CAR a cílové geny tohoto receptoru, mají nejvyšší hodnotu exprese v průběhu denního bdění, v noci je jejich exprese nižší. To však nekoresponduje se skutečností, že glykolýza, glukoneogeneze a metabolismus mastných kyselin převládá v průběhu noci. Stále proto zbývá objasnit, zda a jakým způsobem souvisí doba a rozsah metabolismu dietárních složek zprostředkovaná CAR souvisí s poruchami ukládání energie.<sup>15</sup>

#### 1.5.6.1. Glukoneogeneze

Jaterní glukoneogeneze je klíčovým metabolickým procesem, který zajišťuje životně důležitý zdroj energie – glukózu. Je citlivě regulována pomocí hormonů inzulínu a glukagonu a má pro organismus zásadní význam, obzvláště během hladovění či půstu.

Hlavními enzymy zapojenými do glukoneogeneze jsou glukóza-6-fosfatáza (G6Páza) a fosfoenolpyruvátcarboxykináza (PEPCK). G6Páza je klíčový enzym, který reguluje plazmatickou hladinu glukózy tím, že katalyzuje defosforylaci glukóza-6-fosfátu, který je společným metabolitem glukoneogeneze a glykolýzy. PEPCK katalyzuje tvorbu fosfoenolpyruvátu z oxalacetátu za současného uvolnění oxidu uhličitého a molekuly GDP. Glukoneogeneze je v játrech indukována glukokortikoidy, cAMP a glukagonem, negativně je regulována inzulínem a glukózou.<sup>16</sup>

Již dlouho je známo, že terapie látkami, které působí jako aktivátory CAR potlačuje glukoneogenní enzymy a geny exprimované v játrech (bylo prokázáno, že fenobarbital snižuje plazmatickou hladinu glukózy u pacientů s diabetem). Dosud získaná data nasvědčují tomu, že aktivace CAR potlačuje glukoneogenezi tím, že interferuje s transkripčními faktory či kofaktory, které hrají roli v regulaci glukoneogenních enzymů. Fork-head insulin-responsive transcription factor 1 (FoxO1) a jeho vliv na regulaci glukoneogeneze může být také ovlivněn prostřednictvím CAR. Pozitivně reguluje glukoneogenní enzymy během půstu a tím pomáhá udržet glukózovou rovnováhu. Ukázalo se, že CAR, podobně jako inzulin, inhibuje vazbu FoxO1 k insulin-response sekvencím v promotorech genů enzymů účastnících se glukoneogeneze (například PEPCK), tudíž oslabuje jeho schopnost tyto geny stimulovat. Právě toto může být považováno za vysvětlení toho, jakým způsobem zlepšuje léčba fenobarbitalem inzulinovou rezistenci u pacientů s diabetem druhého typu. CAR je také spojený s peroxisome proliferator-activated receptor- $\gamma$  coactivator-1 $\alpha$  (PGC-1 $\alpha$ ), transkripčním kofaktorem jenž reguluje energetický metabolismus a je indukován při půstu.<sup>2</sup>

#### **1.5.6.2. Metabolismus lipidů**

Lipidový metabolismus v játrech zahrnuje lipogenezi (syntézu lipidů de novo), oxidaci mastných kyselin a sekreci lipidů. Lipogeneze zahrnuje syntézu mastných kyselin a jejich následnou konverzi na triglyceridy. Zvýšení tohoto metabolického procesu může mít za následek steatózu, která se projeví nadměrným hromaděním triglyceridů v jaterní tkáni. Další funkcí jater je vylučování cirkulujících volných mastných kyselin z krve a jejich metabolickou přeměnu na triacylglyceroly.

Jaterní lipidový metabolismus hraje klíčovou roli během hladovění či během dlouhodobé fyzické námahy. V případě, že se sníží hladina glykémie, dochází ke zvýšení  $\beta$ -oxidace mastných kyselin a ketogeneze, čímž zásobují extrahepatální tkáně ketolátkami.<sup>2</sup>

Studie ukazují, že CAR má roli v regulaci lipidového metabolismu. Jeho aktivace může inhibovat lipidový metabolismus a snižovat tak plazmatické hodnoty triglyceridů. Toto je uskutečněno prostřednictvím redukování hladin sterol regulatory element-binding proteinu 1 (SREBP-1, transkripčního faktoru jehož hlavními cílovými geny jsou geny pro LDL receptor a HMG-CoA reduktázu), hlavního regulačního faktoru lipidového metabolismu.<sup>2</sup> Inhibiční vliv CAR může také být vysvětlen indukcí proteinu Insig-1, který vykazuje antilipogenní vlastnosti. Insig-1 se nacházející se v endoplazmatickém retikulu, který blokuje aktivaci SREBP proteolytickou cestou.<sup>15</sup>

CAR může mít také spojitost s rozvojem nealkoholické steatohepatitidy, s regulací plazmatických hladin triglyceridů při metabolickém stresu a s ovlivněním hladin HDL u wild-type myši a u myši transgenních (s lidským apolipoproteinem A-I) u kterých aktivace CAR vedla ke snížení plazmatické hladiny HDL, zřejmě v důsledku down-regulace exprese ApoA-I genu.<sup>15</sup>

Vliv CAR na energetickou rovnováhu by také mohl být založen na jeho funkčním propojení s PPAR $\alpha$  (peroxisome proliferator-activated receptor  $\alpha$ ). Tento jaderný receptor má důležitou funkci při mobilizování energetických zásob v průběhu hladovění.<sup>17</sup>

Z výsledků v nedávné době provedené studie vyplývá, že CAR má svou roli také v prevenci obezity a ve zmírnění diabetu druhého typu. Tato studie byla provedena za použití modelu obezity vyvolané dietou s vysokým obsahem tuků (high fat diet – HFD). Vyšlo najevo, že podávání CAR agonisty TCPOBOP wild-type myším efektivně předcházelo vzniku obezity či vedlo k redukci obezity již rozvinuté. Tato léčba také zlepšila inzulinovou senzitivitu u myši s diabetem 2. typu způsobeného HFD a zlepšila i jejich jaterní steatózu. Oproti tomu byla u CAR-null myši na klasické dietě zjištěna spontánní inzulinová rezistence, která nereagovala na terapii TCPOBOP. Kladný vliv CAR aktivace na metabolismus je pravděpodobně výsledkem souhry několika faktorů. Dochází k inhibici lipogeneze, k inhibici sekrece VLDL a triglyceridů a k inhibici glukoneogeneze. Zároveň dochází ke zvýšení energetického výdeje hnědé tukové tkáně (brown adipose tissue – BAT) a ke zvýšení mobilizace tuků v periferních tkáních. Díky těmto nově objeveným vlastnostem xenosenzoru CAR se stává potenciálním cílem pro nová farmaka k terapii obezity a diabetu druhého typu.<sup>18</sup>

Vezmeme-li v potaz uvedené skutečnosti týkající se vlivu aktivace CAR na glukoneogenezi a lipogenezi, tedy jejich inhibici, nabízí se otázka, zda by bylo možné využít aktivaci CAR u pacientů trpících diabetem 2. typu (jelikož tato skupina pacientů často trpí hyperglykemií i hyperlipidemií současně). Aby bylo možné tuto otázku plně zodpovědět, bude nutné provést další studie, které upřesní a potvrdí některé domněnky, například to, jestli je antidiabetický efekt fenobarbitalu závislý na CAR a jestli i ostatní CAR agonisté mají tento účinek podobný.<sup>15</sup>

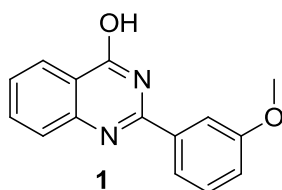
### **1.5.7. Extrahepatální funkce CAR**

Játra jsou orgánem s nejvyšší mírou exprese CAR. Dalším místem, kde je tento receptor exprimován v signifikantní míře jsou epitelální buňky klků tenkého střeva.

Vzhledem k tomu, že CAR je velmi významným xenosenzorem, je jeho lokalizace v místě vstřebávání různých látek do organismu zcela pochopitelná. Klinické studie potvrzují, že intestinální metabolismus perorálně podávaných léčiv může ve velké míře redukovat jejich biodostupnost. Největší podíl mají na biotransformaci v tomto místě CYP2B10, GSTs  $\mu$ 1, GSTs $\theta$ 1, a široce specifická efluxní pumpa/transportér MDR1a.<sup>3</sup>

### 1.6. Deriváty 2,4-disubstituovaného chinazolinu

U vybraných látek připravených v minulých letech na Katedře anorganické a organické chemie byl proveden screening na MZ-Hep1 buněčné linii. Následně bylo zjištěno, že 2-(3-methoxyfenyl)chinazolin-4-ol (**1**) (Obr. 2) se profiluje jako agonista CAR receptoru a jeho aktivita je srovnatelná s aktivitou sloučeniny CITCO. Zmíněný chinazolin je vzhledem ke své struktuře ideální výchozí látkou pro provedení jednoduchých syntetických obměn s cílem objasnit potenciální vztah struktura-afinita k CAR receptoru.

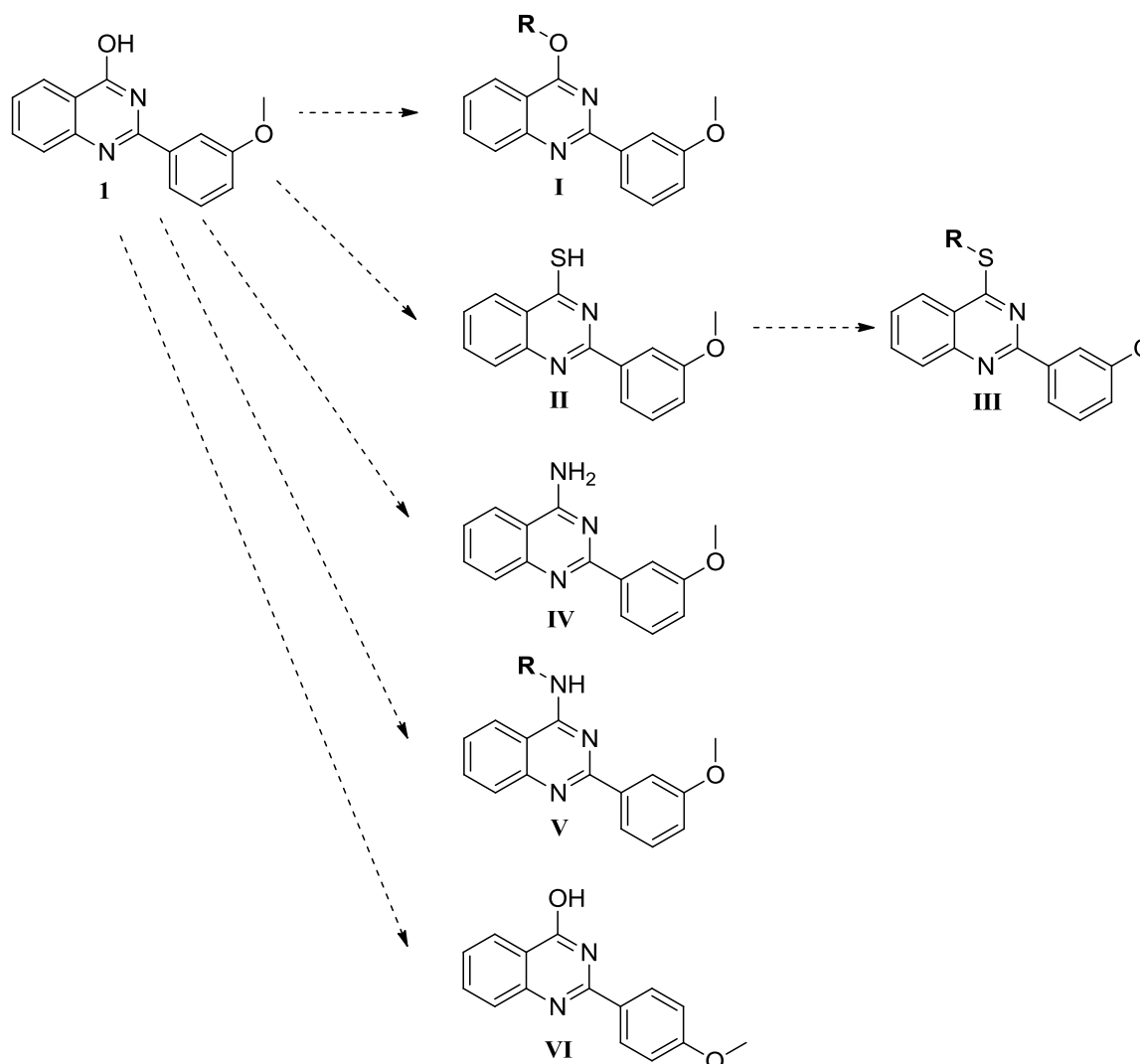


Obr. 2

## 2. CÍL PRÁCE

Na základě nově zjištěné aktivity 2-(3-methoxyfenyl)chinazolin-4-olu (**1**) bylo mým cílem připravit analoga této látky. První řada (**I**) zahrnuje látky, ve kterých je alkyl navázaný v poloze 4 chinazolinu přes atom kyslíku. U látek druhé řady (**II**, **III**) je tento atom kyslíku nahrazen atomem síry. Látky třetí řady (**IV**, **V**) mají ve struktuře v poloze 4 chinazolinu navázanou aminoskupinu, která je u několika derivátů taktéž alkylována.

Dalším mým záměrem bylo zavést methoxyskupinu do polohy 4 fenylu (**VI**). Na rozdíl od syntézy 2-(3-methoxyfenyl)chinazolin-4-olu (**1**) byl zvolen postup s využitím couplingu s přímou aktivací C-H vazby v poloze 2 chinazolinu (Schema 1).



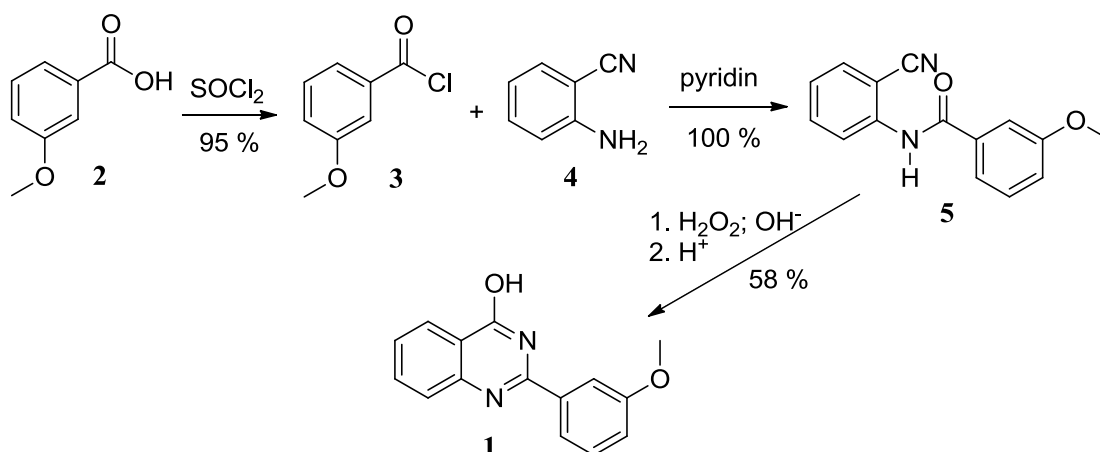
Schema 1

Všechny připravené látky budou testovány na Katedře farmakologie a toxikologie na jejich afinitu k receptoru CAR.

### 3. VÝSLEDKY S KOMENTÁŘEM

#### 3.1. Syntéza 2-(3-methoxyfenyl)chinazolin-4-olu

Pro ověření aktivity 2-(3-methoxyfenyl)chinazolin-4-olu (**1**) bylo nejprve potřeba provést jeho de novo syntézu<sup>19</sup> (Schema 2), která vycházela z komerčně dostupné kyseliny 3-methoxybenzoové (**2**), ta byla reakcí s thionylchloridem převedena na chlorid (**3**) (s výtěžkem 95 %), který v dalším kroku reagoval s anthranilonitrem (**4**). Při této reakci došlo k acylaci anilínové skupiny za vzniku *N*-substituovaného benzamidu (**5**), reakce proběhla kvantitativně. V posledním kroku této třístupňové syntézy došlo k cyklizaci příslušného benzamidu (**5**) v prostředí peroxidu vodíku a base za vzniku soli 2-(3-methoxyfenyl)chinazolin-4-olu, která po okyselení poskytla žádaný produkt (**1**) s výtěžkem 58 %. Struktura této látky byla potvrzena NMR a MS spektry a její aktivita na CAR receptoru byla ověřena, proto jsme přistoupili k syntéze jejích derivátů.

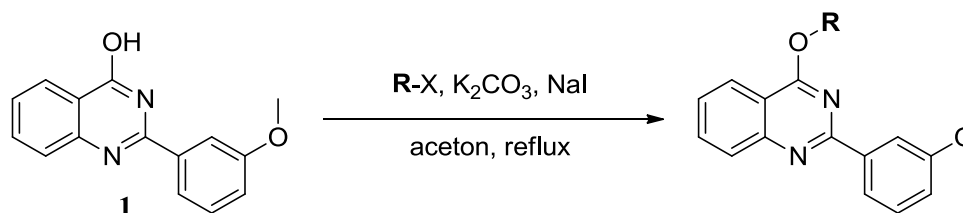


Schema 2

#### 3.2. První série derivátů 2-(3-methoxyfenyl)chinazolin-4-olu

Výchozí látkou pro syntézu derivátů první řady byl 2-(3-methoxyfenyl)chinazolin-4-ol (**1**). Pro alkylation fenolické skupiny v poloze 4 byla zvolena Williamsonova syntéza s využitím principu Finkelsteinovy reakce. Reakcí 2-substituovaného chinazolin-4-olu (**1**) s alkyhalogenidem (methyl, ethyl, propyl, isobutyl, allyl a benzyl) (Tab. 2) v prostředí acetonu, s přidavkem jodidu sodného a base byly získány alkylované deriváty (Schema 3). V reakční směsi dochází nejprve působením jodidu sodného k in situ konverzi alkyhalogenidu na alkyljodid, který následně reaguje se vzniklým fenolátem (k vytvoření fenolátu dochází působením base, v případě těchto reakcí byl použit uhličitán draselný)

za vzniku 4-alkyloxy derivátu chinazolinu. Pouze v případě použití methyljodidu jako alkylačního činidla nebyl jodid sodný do reakční směsi přidán.



Schema 3

Tab. 2 – souhrn připravených derivátů 1. řady

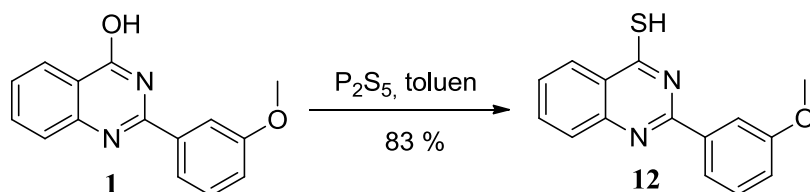
R	Č. produktu	R-X (mol. ekv.)	Výtěžek reakce
CH <sub>3</sub> -	<b>6</b>	CH <sub>3</sub> -I (40)	53 %
CH <sub>3</sub> CH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> -	<b>7</b>	CH <sub>3</sub> CH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> -Br (5)	88 %
(CH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> CHCH <sub>2</sub> -	<b>8</b>	(CH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> CHCH <sub>2</sub> -Br (14)	78 %
CH <sub>2</sub> =CHCH <sub>2</sub> -	<b>9</b>	CH <sub>2</sub> =CHCH <sub>2</sub> -Br (10)	58 %
-CH <sub>2</sub> -	<b>10</b>	-CH <sub>2</sub> Cl (10)	78 %
CH <sub>3</sub> CH <sub>2</sub> -	<b>11</b>	CH <sub>3</sub> CH <sub>2</sub> -Br (5)	55 %

Produkty reakcí byly charakterizovány pomocí NMR spekter, zvláštní důraz byl kladen na identifikaci pozice alkyly na chinazolinovém skeletu. Při alkylationi výchozí látky (**1**) by teoreticky mohlo dojít ke vzniku dvou polohových izomerů (díky existenci dvou tautomerních forem je možná alkylationi hydroxylové skupiny v poloze 4 nebo alkylationi dusíku v poloze 3 chinazolinu). Vzhledem k tomu, že chemické posuny v <sup>13</sup>C NMR spektrech pro první atom uhlíku alkyly vázaného na skelet chinazolinu se vyskytovaly v oblastech 54 ppm pro methylovou skupinu a 62-72 ppm pro zbývající deriváty, je zřejmé, že ve všech případech došlo ke vzniku žádaného *O*-izomeru.

### 3.3. Druhá série derivátů 2-(3-methoxyfenyl)chinazolin-4-olu

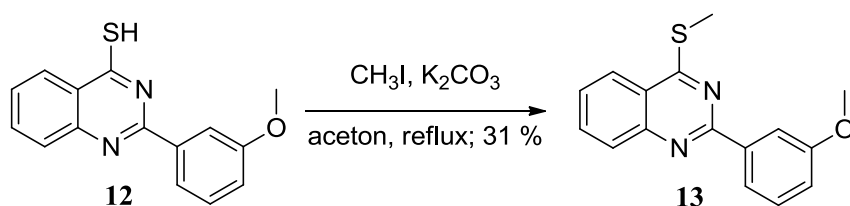
Druhou řadu derivátů 2-substituovaného chinazolin-4-olu tvoří látky, v jejichž molekule je atom kyslíku v poloze 4 chinazolinového skeletu nahrazen atomem síry. První látkou této řady a zároveň výchozí látkou pro následnou alkylationi je 2-(3-methoxyfenyl)chinazolin-4-thiol (**12**). Ten byl získán reakcí 2-(3-methoxyfenyl)-

-chinazolin-4-olu (**1**) se sulfidem fosforečným (1 mol. ekv.) v toluenu<sup>19</sup> (výtěžek reakce byl 83%) (Schema 4). Struktura produktu byla potvrzena NMR a MS spektry.



Schema 4

Thiolová skupina v poloze 4 výchozího chinazolinu (**12**) byla následně alkylována methyljodidem (20 mol. ekv.) v prostředí acetonu za přídavku base (uhličitanu draselného). Produkt, 4-methylsulfanylchinazolinový derivát (**13**) byl po přečištění sloupcovou chromatografií charakterizován pomocí NMR spekter (objevil se singlet methylové skupiny na atomu síry při 12.6 ppm).

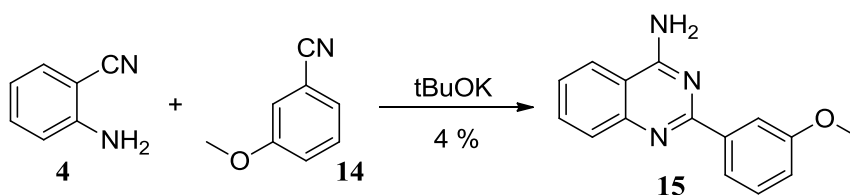


Schema 5

### 3.4. Třetí série derivátů 2-(3-methoxyfenyl)chinazolin-4-olu

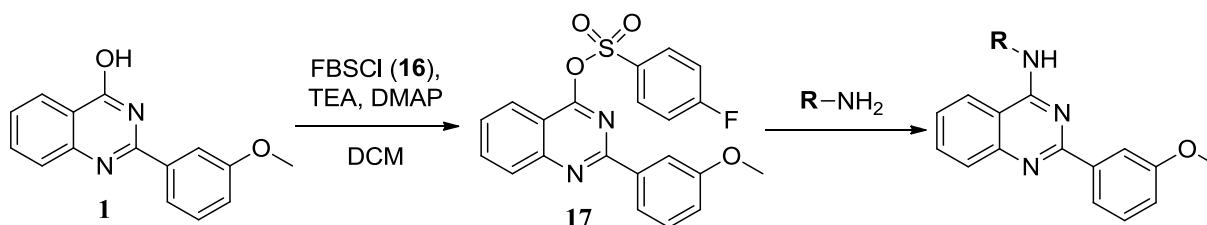
U této řady derivátů byla do pozice 4 2-substituovaného chinazolinu vnesena aminoskupina. 4-Amino-2-(3-methoxyfenyl)chinazolin (**15**) byl připraven kondenzační reakcí, kdy reagovala ekvimolární množství anthranilonitrilu (**4**) a 3-methoxybenzonitrilu (**14**) s přídavkem *tert*-butoxidu draselného (0.1 mol. ekv) (Schema 6).<sup>20</sup> V uvedeném zdroji je popsána příprava těchto derivátů v mikrovlnném reaktoru s vysokými výtěžky, avšak při opakování tohoto postupu, ani při zahřívání reakční směsi na 140 °C po dobu 6 hodin nebylo dosaženo po separaci na sloupci silikagelu vyššího než čtyřprocentního výtěžku. Struktura produktu byla poté ověřena NMR a MS spektry.





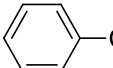
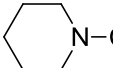
Schema 6

Vzhledem k tomu, že přímá alkylace primární aminoskupiny v poloze 4 chinazolinu by obdobně jako při alkylationi chinazolinolu (**1**) mohla vést ke směsi regioizomerů, byl pro přípravu derivátů této řady zvolen postup jiný. Syntéza 4-alkylaminoderivátů vycházela z 2-(3-methoxyfenyl)chinazolin-4-olu (**1**), jehož hydroxylová skupina v poloze 4 byla nejdříve reakcí s *p*-fluorbenzensulfonylchloridem (**16**) (1.5 mol. ekv.) v bezvodém dichlormethanu za přítomnosti baze (1.5 mol. ekv.) a katalytického množství DMAP převedena na lepší odstupující skupinu. Po dokončení reakce byl k reakční směsi přidáván alkylamin (10 mol. ekv.), který reagoval se vzniklým intermediátem (**17**) mechanismem nukleofilní substituce za vzniku příslušného 4-alkylaminochinazolinu (Schema 7, Tab. 3). Pro syntézu derivátů této řady byly vybrány butylamin, isobutylamin, benzylamin a (piperidin-1-yl)ethylamin. Reakce proběhly se solidními výtěžky (33-84 %). Struktury produktů byly ověřeny pomocí NMR a MS spektroskopie.



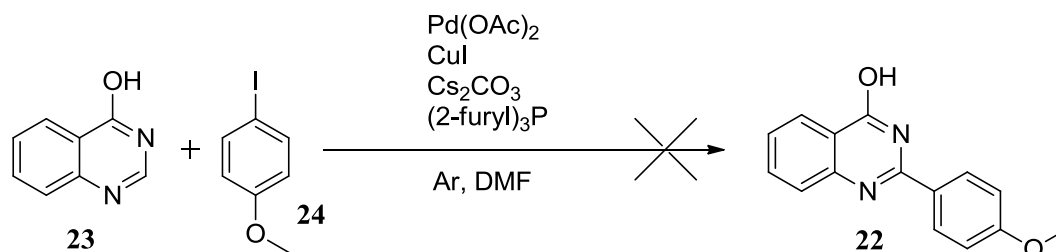
Schema 7

Tab. 3 – přehled připravených derivátů 3. řady

R	Č. produktu	Výtěžek reakce
-CH <sub>2</sub> CH(CH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub>	<b>18</b>	33 %
 -CH <sub>2</sub> -	<b>19</b>	47 %
-CH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> CH <sub>3</sub>	<b>20</b>	84 %
 -N-CH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> -	<b>21</b>	76 %

### 3.5. Pokusy o coupling s využitím přímé aktivace C-H vazby

Dalším směrem při vývoji chinazolinových derivátů byl přesun methoxy skupiny z polohy 3 do polohy 4 fenylu. Syntézu příslušného chinazolinu (**22**) by bylo možné provést stejným způsobem jako při de novo syntéze 2-(3-methoxyfenyl)chinazolin-4-olu (**1**) záměnou 3-methoxybenzoylchloridu za 4-methoxybenzoylchlorid. Uvedená syntéza ovšem zahrnuje provedení tří reakčních kroků, a proto jsme se pokusili o couplingovou reakci, která by využila přímou aktivaci C-H vazby výchozího chinazolinolu (**1**). Výhodou uvedeného přístupu je fakt, že se substrát nemusí převádět na svůj organokovový derivát a reaguje přímo s halogenarylem. Tato reakce<sup>22</sup> byla popsána např. při couplingu purinů do polohy 8 nebo na 1-substituovaných tetrazolech do polohy 5.<sup>23</sup> Reakce byly prováděny za přítomnosti octanu palladnatého, jodidu měďného, baze a v některých případech fosfinu jako ligandu pro palladium. Jediná reakce chinazolinu, zmíněná v literatuře, která by využívala aktivaci C-H vazby v poloze 2 s následným couplingem, byla ovšem popsána jako neúspěšná.<sup>24</sup> Avšak zde byl jako substrát použit samotný chinazolin a jako katalyzátor byl zvolen chlorid rhodnatý s cyklooktenovými ligandy.

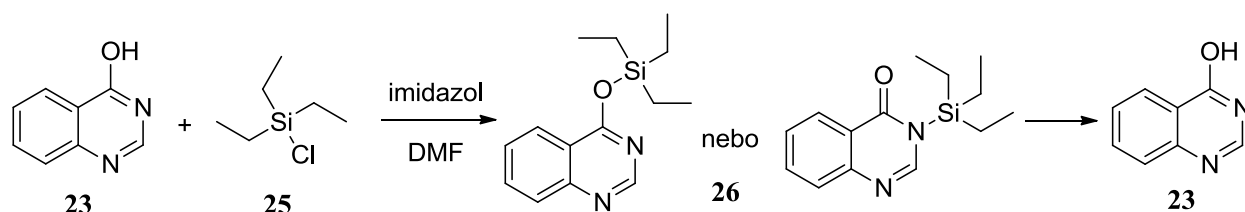


Schema 8

Reakční směs, která sestávala z ekvimolárních množství chinazolin-4-olu (**23**) a 4-jodanisolu (**24**), dále Pd(OAc)<sub>2</sub> (0.05 mol. ekv.), jodidu měďného (1 mol. ekv.), uhličitanu cesného (1.1 mol. ekv.), (2-furyl)<sub>3</sub>P (0.1 mol. ekv.) a dimethylformamidu byla v bezvodém prostředí zahřáta na 50 °C (Schema 8). Průběh reakce v čase byl monitorován pomocí TLC a vzhledem k tomu, že nebyla zjištěna přítomnost žádaného produktu, byla teplota reakční směsi během 5 hodin zvyšována až na 110 °C. Ani za těchto podmínek však nedošlo k předpokládané reakci.

Vzhledem k tomu, že příčinou neúspěchu by mohl být kyselý proton ve výchozím chinazolinu, rozhodli jsme se ochránit jeho hydroxylovou skupinu jako silyl ether. Tuto reakci jsme provedli s využitím triethylsilylchloridu (**25**) (1.05 mol. ekv.) za přídavku baze (1.05 mol. ekv.) v prostředí DMF. Při monitorování pomocí TLC bylo zřejmé, že silylovaný

produkt (**26**) (ať již byla chránicí skupina vázána etherovou vazbou v pozici 4 či na dusíku v poloze 3) v reakční směsi vznikl. Během separace této látky sloupcovou chromatografií však došlo k odchránění funkční skupiny a získali jsme pouze výchozí látku – chinazolin-4-ol (**23**) (Schema 9).

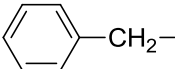
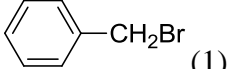


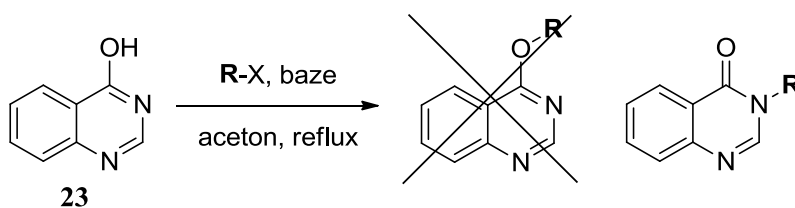
Schema 9

K podobnému výsledku dospěla ve své diplomové práci i Jaroslava Šašková,<sup>25</sup> kdy při acetylaci chinazolinu (**23**) pomocí acetanhydridu výsledný produkt také vykazoval nestabilitu a částečně hydrolyzoval při izolaci na sloupci silikagelu.

Zvolili jsme jiný způsob chránění hydroxylové skupiny vedoucí k funkční skupině odolné vůči hydrolýze – etherifikaci alkylačním činidlem. Nejdříve jsme provedli reakci s methyljodidem a uhličitánem draselným jako bazí. Na rozdíl od alkylačních reakcí vedoucích k syntéze derivátů první řady vyšlo na základě spektrální analýzy najevo, že methylová skupina nebyla v molekule navázána na atom kyslíku, ale na atom dusíku v poloze 3 (posun uhlíku methylu – 34.0 ppm); reakce navíc proběhla s velmi malým výtěžkem (Tab. 4). Ve snaze získat předpokládaný produkt jsme provedli reakci s hydroxidem sodným ve dvoufázovém systému voda-toluen s použitím katalyzátoru fázového přenosu (tetrabutylamonium jodid), avšak i v tomto případě byl v produktu methyl vázaný na dusík v poloze 3. Při dalším pokusu o etherifikaci hydroxylové skupiny v poloze 4 jsme jako alkylační činidlo použili benzylbromid. Také v tomto případě došlo k obdobné reakci – benzyl nebyl vázaný na atom kyslíku, ale na atom dusíku v poloze 3 (posun uhlíku methylenové skupiny – 49.6 ppm) (Schema 10). Změna v regioselektivitě při těchto alkylačních reakcích byla zřejmě způsobena absencí funkční skupiny v poloze 2, což bylo potvrzeno dalšími experimenty.<sup>26</sup>

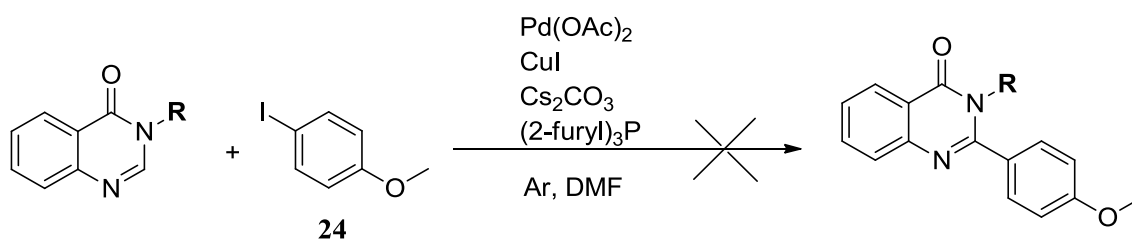
Tab. 4 – přehled produktů alkylace chinazolin-4olu

R	Č. produktu	R-X (mol. ekv.)	Baze (mol. ekv.)	Výtěžek reakce
CH <sub>3</sub> -	27	CH <sub>3</sub> I (20)	K <sub>2</sub> CO <sub>3</sub> (10)	6%
CH <sub>3</sub> -	27	CH <sub>3</sub> I (10)	NaOH (1.5)	47%
	28	 (1)	K <sub>2</sub> CO <sub>3</sub> (10)	86%



Schema 10

S oběma získanými produkty (**27**, **28**) jsme se pokusili opět provést couplingovou reakci s 4-jodanisolem (**24**) (Schema 11). Stejně jako v předchozím případě nebyly v reakční směsi detekovány stopy jakéhokoli produktu (a to ani při jejím zahřívání na 120 °C po dobu několika hodin).

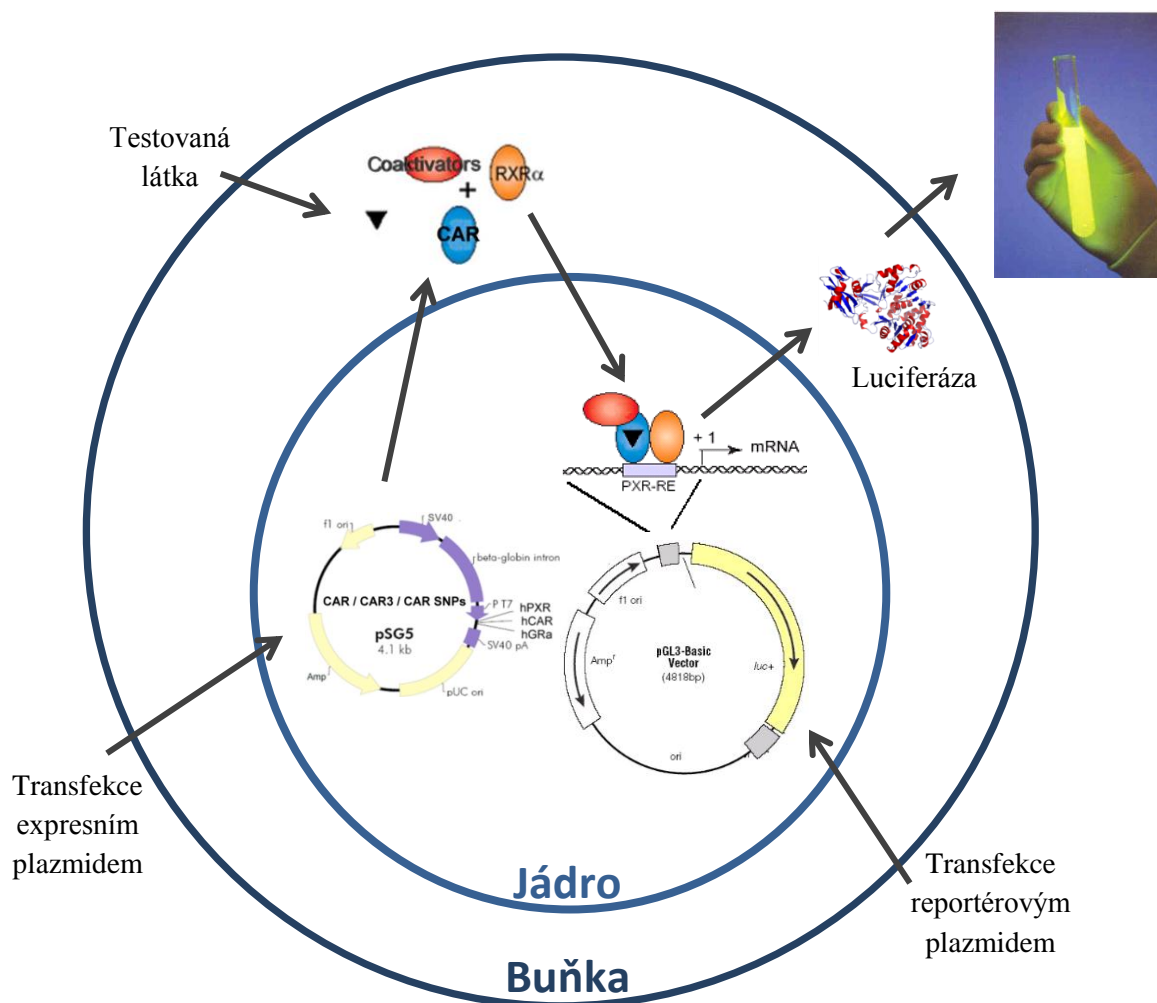


Schema 11

#### **4. BIOLOGICKÉ TESTOVÁNÍ AFINITY K CAR RECEPTORU**

Aktivita připravených derivátů byla testována na Katedře farmakologie a toxikologie v pracovní skupině doc. Pávka.

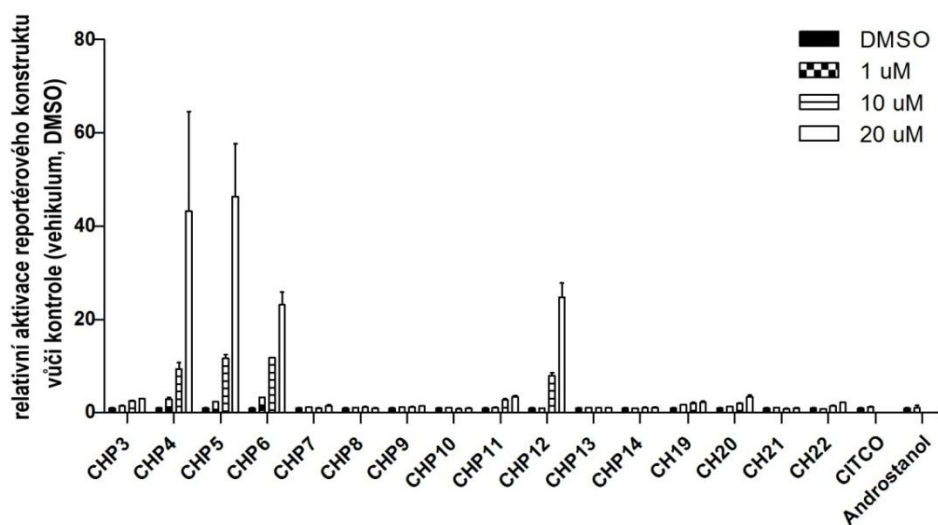
V experimentech byla využita metoda gene reporter assay.<sup>14</sup> Tato metoda spočívá ve vložení reportérového plazmidu p(ER6)3-tata-luc, který obsahuje tři sekvence ER6 s vazebnými místy pro hCAR (z CYP3A4 genu), TATA box (vazebné místo Pol II a bazálních transkripčních faktorů) a reportérový gen pro firefly luciferázu, do lidské hepatokarcinomové buněčné linie HepG2. Společně s reportérovým plazmidem je do buňky vkládán také expresní plazmid pro nukleární receptor hCAR, který po navázání testované látky interaguje s regulačními oblastmi reportérového plazmidu. Buněčná linie je poté inkubována s roztokem testované látky a následně je ověřováno, zda došlo ke zvýšení transkripční aktivity exprimovaného receptoru hCAR (respektive luminiscence enzymu luciferázy z reportérového konstruktů po přidání luciferinu – substrátu tohoto enzymu) ve srovnání s kontrolním vzorkem, jinými slovy zda jsou testované látky agonisty hCAR receptoru. (Obr. 3) Použitá buněčná linie téměř neexprimuje endogenní CAR receptor, díky čemuž je tento postup vysoce selektivní.<sup>14</sup>



Obr. 3

Biologické testování na HepG2 buněčné linii bylo provedeno s použitím tří koncentrací zkoušené látky (1  $\mu\text{M}$ , 10  $\mu\text{M}$  a 20  $\mu\text{M}$ ) a výsledky byly porovnávány se slepým vzorkem (ten obsahoval pouze rozpouštědlo - DMSO v koncentraci 0.1 %). Z grafu na Obr. 4 lze odečíst, že ze všech derivátů vykazovaly nejvyšší aktivitu ty látky, které mají v poloze 4 thiolovou a aminovou funkční skupinu, a také methoxy a methylsulfanyl derivát. Aktivita takto substituovaných látek výrazně předčila obecně používaný standard CITCO. Prodloužení alkylového řetězce v poloze 4 vede vždy ke snížení aktivity. Výsledky biologického testování jsou zobrazeny na Obr. 4, přehled struktur a kódů derivátů v Tab. 5.

Metoda gene reporter assay s konstrukty p(ER6)3-luc a lidským CAR receptorem v HepG2 linií

Obr. 4<sup>27</sup>

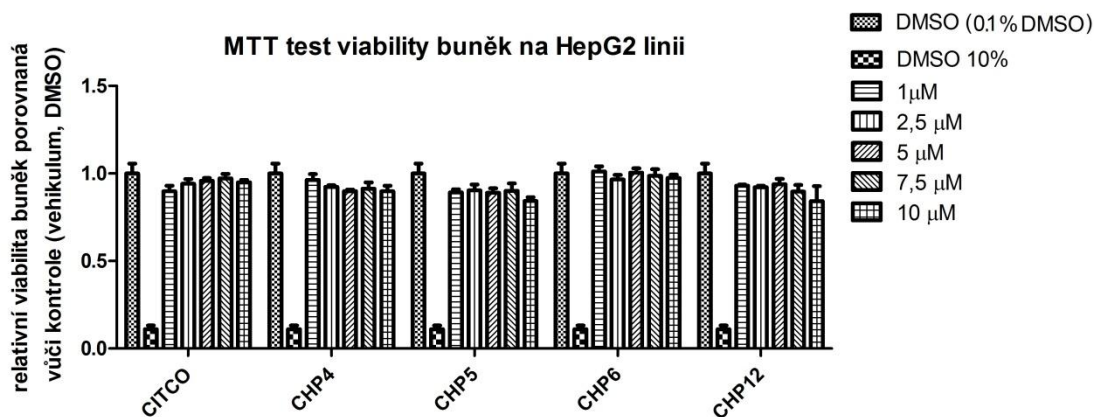
Tab. 5 - přehled kódů a chemických struktur připravených derivátů

Kód látky	R <sub>1</sub>	Kód látky	R <sub>1</sub>
CHP03	-OH	CHP10	
CHP04	-SH	CHP11	-O-CH <sub>2</sub> CH <sub>3</sub>
CHP05	-O-CH <sub>3</sub>	CHP12	-NH <sub>2</sub>
CHP06	-S-CH <sub>3</sub>	CH19	-NH-(CH <sub>2</sub> ) <sub>3</sub> CH <sub>3</sub>
CHP07	-O-(CH <sub>2</sub> ) <sub>2</sub> CH <sub>3</sub>	CH20	-NH-CH <sub>2</sub> CH(CH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub>
CHP08	-O-CH <sub>2</sub> CH(CH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub>	CH21	
CHP09	-O-CH <sub>2</sub> CH=CH <sub>2</sub>	CH22	
Kód látky	R <sub>2</sub>	Kód látky	R <sub>2</sub>
CHP13	-CH <sub>3</sub>	CHP14	

Společně s biologickou aktivitou byla testována také cytotoxicita vybraných derivátů metodou MTT assay.<sup>14</sup> Tato metoda umožňuje kvantifikaci buněčného růstu a viability pomocí spektrofotometrie. Její princip spočívá v metabolizaci 3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5-difenyl tetrazolium bromidu (MTT) na fialové nerozpustné krystaly formazanu metabolicky aktivními buňkami. Krystaly formazanu jsou následně rozpuštěny v DMSO a intenzita zabarvení roztoku je vyhodnocena pomocí absorbance.

Přeměnu MTT na formazan metabolizuje enzym sukcinát-tetrazolium reduktáza, která je aktivní pouze u životaschopných buněk. Díky této skutečnosti je možné metodou MTT assay detekovat výhradně počet živých buněk.

Při MTT experimentu byly použity dvě koncentrace testovaných látek - 4 $\mu$ M a 20 $\mu$ M. Za standard 100% viability je považováno čisté rozpouštědlo – 0.1% roztok DMSO, jako pozitivní kontrola je použit 10% roztok DMSO. Test byl proveden pouze s látkami, které vykazovaly nejvyšší aktivitu na CAR receptoru (CHP04, CHP05, CHP06 a CHP12). Jak je vidět na obrázku Z, žádná z testovaných látek výrazně nesnižuje viabilitu buněk, tudíž nepůsobí cytotoxicky (Obr. 5).



Obr. 5



## 5. ZÁVĚR

V rámci této diplomové práce byla provedena syntéza celkem čtyř strukturních typů derivátů chinazolinu.

První série látek byla připravena jednoduchými alkylačními reakcemi ze základního skeletu 2-(3-methoxyfenyl)chinazolin-4-olu. Takto vzniklo 6 derivátů, z nichž byl pouze jeden dříve popsán v literatuře (4-ethoxy-2-(3-methoxyfenyl)chinazolin).

Druhá řada derivátů vznikla nahrazením hydroxylové skupiny skupinou thiolovou a následnou přípravou jejího methyletheru. Poté byly připraveny sloučeniny s aminovou, resp. alkylaminovou skupinou v poloze 4 chinazolinu, celkově 5 derivátů. Z obou uvedených sérií je v literatuře zmíněn pouze 4-benzyl-2-(3-methoxyfenyl)aminochinazolin .

Další snahou byla syntéza derivátů s 4-methoxyfenylovým fragmentem, která byla založena na využití couplingu s přímou aktivací C-H vazby v poloze 2 chinazolinu. Výchozí chinazolin-4-ol ovšem reakci neposkytoval, navíc jsme při snaze ochránit hydroxylovou skupinu převedením na alkoxy derivát zjistili, že k alkylosti za provedených podmínek dochází přednostně na sousedním atomu dusíku. Ovšem ani u jednoho z takto získaných derivátů (methyl a benzyl) se couplingová reakce nezdařila.

Všechny zmíněné produkty byly podrobeny testování na aktivitu na CAR receptoru s velmi zajímavými výsledky. Čtyři z derivátů výrazně zvyšovaly jeho konstitutivní aktivitu; v porovnání s jeho jediným dosud známým agonistou CITCO: jednalo se o ty látky, které mají v poloze 4 thiolovou a aminovou funkční skupinu, a také methoxy a methylsulfanyl derivát. Prodloužení alkylového řetězce v poloze 4 vede ve všech případech ke snížení aktivity. U neaktivnějších látek byl také proveden screening cytotoxicity na stejné buněčné linii (HepG2) a bylo zjištěno, že žádná z testovaných látek výrazně nesnižuje viabilitu buněk.

## 6. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

### 6.1. Obecné experimentální postupy

Výchozí látky byly zakoupeny od firmy Sigma-Aldrich a použity bez čištění. Bezvodý dichlormethan byl před použitím predestilován z hydridu vápenatého.

Teploty tání všech látek byly měřeny na Koflerově bloku nebo na přístroji Buchi B-545 a nebyly korigovány. NMR spektra spektra všech látek byla změřena v roztocích  $\text{CDCl}_3$ , popř.  $\text{DMSO-}d_6$  při laboratorní teplotě na přístroji VARIAN MERCURY – Vx BB 300 pracujícím při 300 MHz pro  $^1\text{H}$  a při 75 MHz pro  $^{13}\text{C}$  nebo na přístroji VARIAN VNMR S500 (500 MHz pro  $^1\text{H}$  a 125 MHz pro  $^{13}\text{C}$ ). Chemické posuny byly změřeny jako hodnoty  $\delta$  v parts per milion (ppm) a byly nepřímo vztaženy k tetramethylsilanu jako standardu pomocí zbytkového signálu rozpouštědla ( $\text{CDCl}_3$ : 7.26 pro  $^1\text{H}$  a 77.00 pro  $^{13}\text{C}$ ;  $\text{DMSO-}d_6$ : 2.49 pro  $^1\text{H}$  a 39.70 pro  $^{13}\text{C}$ ). Data jsou prezentována v následujícím pořadí: chemický posun ( $\delta$ ), integrovaná intenzita (v protonových spektrech), multiplicita (s: singlet, bs: broad singlet, d: dublet, ddd: dublet dubletů dubletu, t: triplet, q: kvartet, m: multiplet), interakční konstanty (Hz) a přiřazení. Hmotnostní spektra všech látek byla měřena na hmotnostním spektrometru AGILENT 500 metodou APCI s nízkou rozlišovací schopností.

Průběh reakcí a čistota výsledných produktů byla kontrolována pomocí tenkovrstvé chromatografie na aluminiových TLC deskách Silica gel 60 F<sub>254</sub> (Merck) s detekcí pod UV lampou a s pomocí detekčního činidla  $\text{Ce}(\text{SO}_4)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$  (2 g),  $\text{H}_3[\text{P}(\text{Mo}_3\text{O}_{10})_4]$  (4 g), konc.  $\text{H}_2\text{SO}_4$  (10 ml),  $\text{H}_2\text{O}$  (200 ml) a následného zahřátí. Silikagel 60 (0.040-0.063 mm) pro sloupcovou chromatografii byl zakoupen od firmy E. Merck.

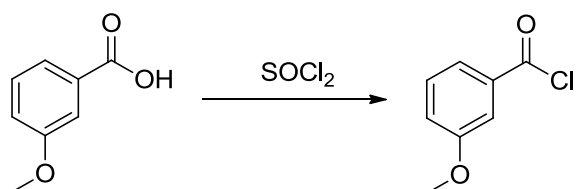
## 6.2. Syntéza 2-(3-methoxyfenyl)chinazolin-4-olu

### 6.2.1. Chlorid kyseliny 3-methoxybenzoové

Sumární vzorec:  $C_8H_7ClO_2$

Molekulová hmotnost: 170.59

Schéma přípravy:



Postup přípravy:

Kyselina 3-methoxybenzoová (9.7g; 63.8 mmol) byla společně s thionylchloridem (30 ml) zahřívána pod zpětným chladičem po dobu 3 hodin na teplotu 75 °C. Nezareagovaný thionylchlorid byl oddestilován za pomoci vodní vývěvy, výsledný produkt byl předestilován za sníženého tlaku. Reakce proběhla s 95 % výtěžkem.

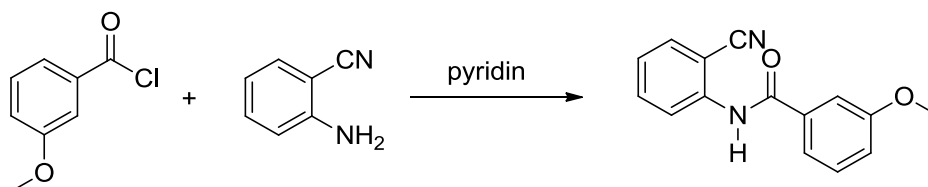
Charakteristika:

Bezbarvá olejovitá kapalina.

**6.2.2. N-(2-kyanfenyl)-3-methoxybenzamid**Sumární vzorec: C<sub>15</sub>H<sub>12</sub>N<sub>2</sub>O<sub>2</sub>

Molekulová hmotnost: 252.27

Schéma přípravy:



Postup přípravy:

Roztok anthranilonitrilu (5.0 g; 45.0 mmol) v pyridinu (17 ml) byl ochlazen na 0 °C. Poté byl přidán chlorid kyseliny 3-methoxybenzoyové (7.2 g; 42.0 mmol) a reakční směs byla za současného chlazení ledem míchána po dobu 4 hodin. Po odstranění pyridinu na vakuové odparce byl produkt rekrystalizován z vodného ethanolu. Reakce proběhla kvantitativně.

Charakteristika:

Bílá krystalická látka.

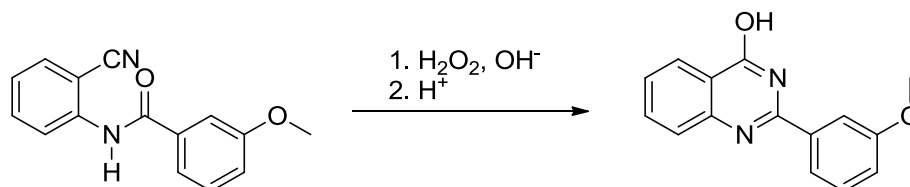
<sup>1</sup>H NMR: (300 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ 10.59 (1H, bs, NH), 7.88-7.84 (1H, m, Ar), 7.72-7.68 (1H, m, Ar), 7.58-7.41 (5H, m, Ar), 7.18-7.22 (1H, m, Ar), 3.84 (3H, s, OCH<sub>3</sub>).

<sup>13</sup>C NMR: (75 MHz, DMSO) δ 165.7, 159.6, 140.6, 135.2, 134.1, 133.4, 130.1, 127.1, 126.7, 120.3, 118.3, 117.2, 113.2, 109.6, 55.7.

**6.2.3. 2-(3-Methoxyfenyl)chinazolin-4-ol**Sumární vzorec: C<sub>15</sub>H<sub>12</sub>N<sub>2</sub>O<sub>2</sub>

Molekulová hmotnost: 252.27

Schéma přípravy:



Postup přípravy:

Směs *N*-(2-kyanfenyl)-3-methoxybenzamidu (7.3 g; 28.9 mmol), hydroxidu sodného (32 g) a H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (30 %; 48 ml) ve vodě (200 ml) byl po dobu 1 hodiny zahříván pod zpětným chladičem na 100°C. Poté byla reakční směs ochlazena a okyselena 36% HCl do pH=4. Výsledný produkt precipitoval a poté byl zfiltrován, promyt vodou a vysušen. Reakce proběhla s výtěžkem 58 %.

Charakteristika:

Bílá krystalická látka; t.t. 214 °C; t.t. v literatuře<sup>28</sup> 209-210 °C.

<sup>1</sup>H NMR: (300 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ 12.52 (1H, s, OH), 8.14-8.18 (1H, m, Ar), 7.85-7.71 (4H, m, Ar), 7.54-7.21 (2H, m, Ar), 7.15-7.11 (1H, m, Ar), 3.83 (3H, s, OCH<sub>3</sub>).

<sup>13</sup>C NMR: (75 MHz, DMSO) δ 162.5, 159.5, 152.3, 148.8, 134.8, 134.2, 129.9, 127.7, 126.8, 126.1, 121.2, 120.3, 117.8, 112.7, 55.6.

IČ: 1047, 1148, 1223, 1251, 1267, 1286, 1310, 1445, 1471, 1482, 1586, 1612, 1670, 3038 cm<sup>-1</sup>.

LRMS (APCI): *m/z* (relativní intenzita) 253.6 [M+H]<sup>+</sup> (100), 130.6 (3), 88.6 (1.5), 87.6 (6), 73.6 (8).

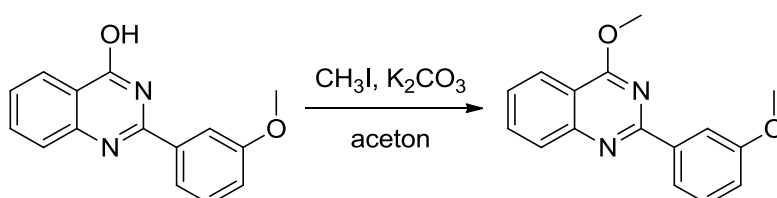
### 6.3. Syntéza derivátů první série

#### 6.3.1. 4-Methoxy-2-(3-methoxyfenyl)chinazolin

Sumární vzorec:  $C_{16}H_{14}N_2O_2$

Molekulová hmotnost: 266.29

Schéma přípravy:



Postup přípravy:

2-(3-Methoxyfenyl)chinazolin-4-ol (200 mg; 0.79 mmol) byl rozpuštěn v acetonu (10 ml) a k roztoku byl přidán uhličitan draselný (550 mg; 4 mmol). K vzniklé suspenzi byl přikapán methyljodid (2 ml; 32 mmol) a reakční směs byla po dobu 30 hodin pod zpětným chladičem zahřívána na teplotu 55 °C. Reakční směs byla poté vytřepána nasyceným roztokem chloridu sodného (20 ml) a ethylacetátem (20 ml). Organické fáze byly spojeny a vysušeny bezvodým síranem sodným. Výsledný produkt byl získán sloupcovou chromatografií s použitím silikagelu jako pevné fáze a směsi hexan/EtOAc 9:1 jako eluentu. Reakce proběhla s výtěžkem 53 %.

Charakteristika:

Nažloutlá krystalická látka; t.t. 92-94 °C.

**$^1\text{H NMR}$ :** (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  8.22-8.15 (3H, m, Ar), 8.03-7.99 (1H, m, Ar), 7.86-7.8 (1H, m, Ar), 7.55-7.41 (2H, m, Ar), 7.08-7.03 (1H, m, Ar), 4.3 (3H, s,  $\text{OCH}_3$ ), 3.96 (3H, s,  $\text{OCH}_3$ ).

**$^{13}\text{C NMR}$ :** (75 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  167.0, 159.8, 159.8, 151.7, 139.6, 133.5, 129.4, 127.9, 126.4, 123.4, 121.0, 116.6, 115.3, 113.4, 55.4, 54.1.

**IČ:** 1047, 1108, 1184, 1195, 1282, 1327, 1355, 1380, 1443, 1453, 1509, 1561, 1574, 1620, 2966  $\text{cm}^{-1}$ .

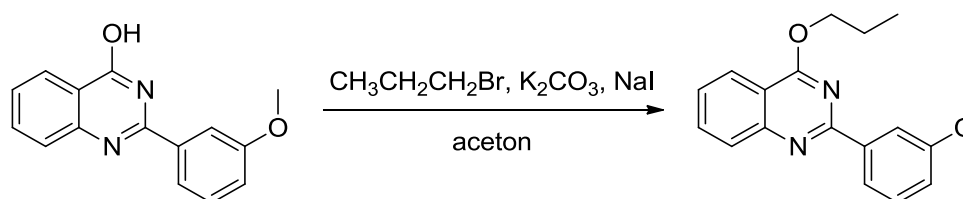
**LRMS (APCI):**  $m/z$  (relativní intenzita) 267.6  $[\text{M}+\text{H}]^+$  (100), 252.6 (7.5), 224.6 (7), 223.6 (2.5), 148.6 (7).

### 6.3.2. 2-(3-Methoxyfenyl)-4-(propyloxy)chinazolin

Sumární vzorec: C<sub>18</sub>H<sub>18</sub>N<sub>2</sub>O<sub>2</sub>

Molekulová hmotnost: 294.35

Schéma přípravy:



Postup přípravy:

2-(3-Methoxyfenyl)chinazolin-4-ol (100 mg; 0.4 mmol) byl rozpuštěn v acetonu (15 ml) a k tomuto roztoku byl přidán uhličitan draselný (304 mg; 2.2 mmol) a jodid sodný (6 mg; 0.04 mmol). K vzniklé suspenzi byl přikapán propylbromid (2.2 mmol; 0.2 ml) a reakční směs byla za stálého míchání 24 hodin pod zpětným chladičem zahřívána na teplotu 55 °C. Poté byla přefiltrována, zbytek na filtru byl promyt acetonem, rozpouštědlo bylo odpařeno a získaný surový produkt byl purifikován za použití sloupcové chromatografie se silikagelem s mobilní fází hexan/EtOAc 9:1. Reakce proběhla s výtěžkem 88 %.

Charakteristika:

Nažloutlá olejovitá látka.

**<sup>1</sup>H NMR:** (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 8.24-8.17 (3H, m, Ar), 8.02-7.98 (1H, m, Ar), 7.83-7.78 (1H, m, Ar), 7.53-7.41 (2H, m, Ar), 7.07-7.03 (1H, m, Ar), 4.65 (2H, t, *J*=7.0 Hz, OCH<sub>2</sub>), 3.93 (3H, s, OCH<sub>3</sub>), 2.06-1.93 (2H, m, CH<sub>2</sub>), 1.15 (3H, t, *J*=7.0 Hz, CH<sub>3</sub>).

**<sup>13</sup>C NMR:** (75 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 166.7, 159.7, 151.7, 139.6, 133.3, 129.3, 127.8, 126.2, 123.4, 121.0, 116.4, 115.3, 113.3, 68.3, 55.3, 22.1, 10.6.

**IČ:** 1046, 1105, 1162, 1252, 1279, 1346, 1363, 1421, 1499, 1561, 1575, 1965 cm<sup>-1</sup>.

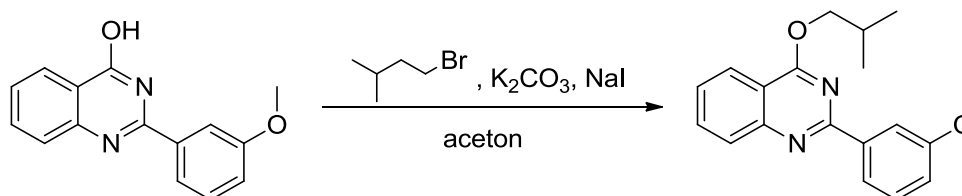
**LMRS** (APCI): *m/z* (relativní intenzita) 295.6 [M+H]<sup>+</sup> (16), 254.4 (12.5), 253.6 (100), 238.6 (3), 210.6 (3).

### 6.3.3. 4-Isobutoxy-2-(3-methoxyfenyl)chinazolin

Sumární vzorec: C<sub>19</sub>H<sub>20</sub>N<sub>2</sub>O<sub>2</sub>

Molekulová hmotnost: 308.37

Schéma přípravy:



Postup přípravy:

2-(3-Methoxyfenyl)chinazolin-4-ol (100 mg; 0.4 mmol) byl rozpuštěn v acetonu (20 ml) a k tomuto roztoku byl přidán uhličitan draselný (280 mg; 2 mmol) a jodid sodný (6 mg; 0.04 mmol). Ke vzniklé suspenzi byl přikapán 1-brom-2-methylpropan (0.62 ml; 0.78 g; 5.7 mmol) a tato reakční směs byla po dobu 24 hodin zahřívána pod zpětným chladičem na teplotu 55 °C. Poté byla reakční směs přefiltrována, zbytek na filtru byl promyt acetonem a rozpouštědlo bylo odpařeno. Výsledný produkt byl získán po provedení sloupcové chromatografie za použití silikagelu jako pevné fáze a směsi hexan/EtOAc 9:1 jako mobilní fáze. Reakce proběhla s výtěžkem 78 %.

Charakteristika:

Nažloutlá olejovitá látka.

<sup>1</sup>H NMR: (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 8.23-8.15 (3H, m, Ar), 8.01-7.97 (1H, m, Ar), 7.82-7.77 (1H, m, Ar), 7.52-7.41 (2H, m, Ar), 7.07-7.03 (1H, m, Ar), 4.49 (2H, d, *J*=6.8 Hz, OCH<sub>2</sub>), 3.95 (3H, s, OCH<sub>3</sub>), 2.35-2.22 (1H, m, CH), 1.14 (6H, d, *J*=6.8 Hz, CH<sub>3</sub>).

<sup>13</sup>C NMR: (75 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 166.7, 159.8, 159.7, 151.7, 139.7, 133.3, 129.3, 127.9, 126.2, 123.4, 121.0, 116.4, 115.4, 113.3, 72.8, 55.3, 27.9, 19.3.

IČ: 1047, 1107, 1162, 1253, 1280, 1344, 1385, 1421, 1461, 1499, 1561, 1575, 1620, 2959 cm<sup>-1</sup>.

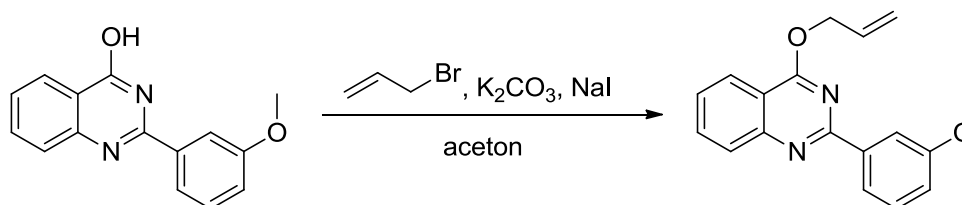
LRMS (APCI): *m/z* (relativní intenzita) 309.6 [M+H]<sup>+</sup> (7.5), 255.5 (2), 254.4 (16), 253.6 (100), 238.6 (2.5), 210.6 (3).



**6.3.4. 2-(3-Methoxyfenyl)-4-(prop-2-en-1-yloxy)chinazolin**Sumární vzorec: C<sub>18</sub>H<sub>16</sub>N<sub>2</sub>O<sub>2</sub>

Molekulová hmotnost: 292.33

Schéma přípravy:



Postup přípravy:

2-(3-Methoxyfenyl)chinazolin-4-ol (200 mg; 0.8 mmol) byl rozpuštěn v acetonu (10 ml) a k tomuto roztoku byl přidán uhličitán draselný (552 mg; 4 mmol) a jodid sodný (12 mg; 0.08 mmol). Ke vzniklé suspenzi byl přikapán 3-brompropen (0.68 ml; 960 mg; 8 mmol) a tato reakční směs byla za stálého míchání 24 hodin zahřívána k varu pod refluxem na teplotu 55 °C. Reakční směs byla přefiltrována, zbytek na filtru byl promyt acetonem a rozpouštědlo bylo odpařeno. Surový produkt byl poté purifikován sloupcovou chromatografií. Použit byl silikagel jakožto pevná fáze a směs hexan/EtOAc 95:5 jako mobilní fáze. Výtěžek této reakce byl 58 %.

Charakteristika:

Nažloutlá krystalická látka; t.t. 50-52 °C.

**<sup>1</sup>H NMR:** (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 8.22 (3H, m, Ar), 8.02-7.98 (1H, m, Ar), 7.82-7.77 (1H, m, Ar), 7.52-7.4 (2H, m, Ar), 7.07-7.03 (1H, m, Ar), 6.31-6.18 (1H, m, CH), 5.56 (1H, d, *J*=17.2 Hz, =CH<sub>2</sub> A), 5.37 (1H, d, *J*=10.4 Hz, =CH<sub>2</sub> B), 5.21 (2H, d, *J*=5.5 Hz, OCH<sub>2</sub>), 3.95 (3H, s, OCH<sub>3</sub>).

**<sup>13</sup>C NMR:** (75 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 166.1, 159.7, 159.5, 151.7, 139.5, 133.4, 132.6, 129.3, 127.9, 126.3, 123.4, 120.9, 118.3, 116.5, 115.2, 113.3, 67.3, 55.3.

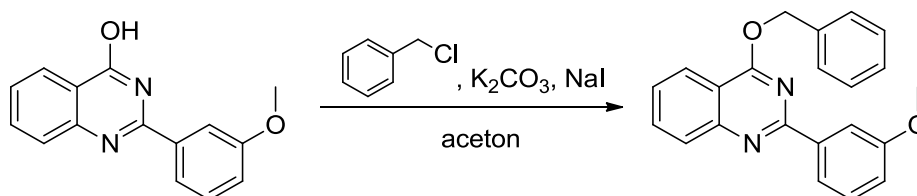
**IČ:** 1001, 1052, 1109, 1217, 1280, 1317, 1339, 1355, 1408, 1457, 1500, 1561, 1574, 1619, 2939 cm<sup>-1</sup>.

**LRMS** (APCI): *m/z* (relativní intenzita) 293.6 [M+H]<sup>+</sup> (100), 291.7 (2.5), 265.6 (3), 264.6 (11), 253.6 (50), 250.7 (9), 210.6 (2).

**6.3.5. 4-Benzyloxy-2-(3-methoxyfenyl)chinazolin**Sumární vzorec:  $C_{22}H_{18}N_2O_2$ 

Molekulová hmotnost: 342.39

Schéma přípravy:



Postup přípravy:

2-(3-Methoxyfenyl)chinazolin-4-ol (200 mg; 0.8 mmol) byl rozpuštěn v acetonu (1 ml) a k tomuto roztoku byl přidán uhličitan draselný (552 mg; 4 mmol) a jodid sodný (12 mg; 0.08 mmol). K vzniklé suspenzi byl přikapán benzylochlorid (0.94 ml; 1.36 g; 8 mmol) a reakční směs byla pod zpětným chladičem za stálého míchání 24 hodin zahřívána na teplotu 55 °C. Reakční směs byla zfiltrována, filtr byl promyt acetonem, organické rozpouštědlo odpařeno a produkt byl izolován za pomoci silikagelového sloupce a směsi hexan/EtOAc 9:1 jako mobilní fáze. Výsledný produkt byl získán s výtěžkem 78 %.

Charakteristika:

Bílá krystalická látka; t.t. 109-111 °C.

$^1\text{H NMR}$ : (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  8.32-8.17 (3H, m, Ar), 8.07-8.03 (1H, m, Ar), 7.84-7.78 (1H, m, Ar), 7.64-7.6 (2H, m, Ar), 7.52-7.37 (5H, m, Ar), 7.13-7.08 (1H, m, Ar), 5.76 (2H, s,  $\text{OCH}_2$ ), 3.97 (3H, s,  $\text{OCH}_3$ ).

$^{13}\text{C NMR}$ : (75 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  166.2, 159.7, 159.5, 151.7, 139.4, 136.4, 133.3, 129.3, 128.4, 128.1, 128.0, 127.8, 126.3, 123.4, 120.9, 116.5, 115.1, 113.2, 68.2, 55.2.

$\text{IČ}$ : 1041, 1091, 1222, 1255, 1280, 1331, 1342, 1356, 1416, 1459, 1500, 1563, 1575, 1600, 1619, 2940  $\text{cm}^{-1}$ .

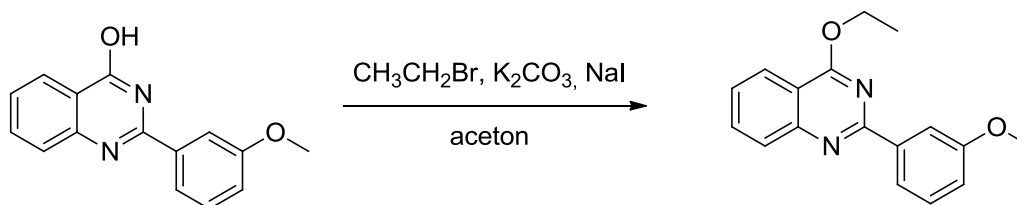
$\text{LRMS}$  (APCI):  $m/z$  (relativní intenzita) 343.6  $[\text{M}+\text{H}]^+$  (65), 253.5 (1), 92.5 (7.5), 91.5 (100).

### 6.3.6. 4-Ethoxy-2-(3-methoxyfenyl)chinazolin

Sumární vzorec: C<sub>17</sub>H<sub>16</sub>N<sub>2</sub>O<sub>2</sub>

Molekulová hmotnost: 280.32

Schéma přípravy:



Postup přípravy:

2-(3-Methoxyfenyl)chinazolin-4-ol (200 mg; 0.8 mmol) byl rozpuštěn v acetonu (10 ml) a k tomuto roztoku byl přidán uhličitán draselný (552 mg; 4 mmol) a jodid sodný (12 mg; 0.08 mg). K vzniklé suspenzi byl přikapán ethylbromid (0.3 ml; 436 mg; 4 mmol), a po dobu 24 hodin byla za stálého míchání zahřívána pod zpětným chladičem na teplotu 55 °C. Poté byla směs zfiltrována, filtr byl promyt acetonem a rozpouštědlo bylo odpařeno. Surový produkt byl purifikován pomocí sloupcové chromatografie (pevná fáze – silikagel, mobilní fáze - směs hexan/EtOAc 9:1). Hlavní produkt byl obdržen s výtěžkem 55 %.

Charakteristika:

Nažloutlá krystalická látka; t.t. 93 °C, t.t. v literatuře<sup>29</sup> nevedena.

<sup>1</sup>H NMR: (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 8.24-8.14 (3H, m, Ar), 8.02-7.97 (1H, m, Ar), 7.84-7.77 (1H, m, Ar), 7.5-7.41 (2H, m, Ar), 7.08-7.03 (1H, m, Ar), 4.8-4.72 (2H, q, *J*=7.2 Hz, OCH<sub>2</sub>), 3.94 (3H, s, OCH<sub>3</sub>), 1.56-1.51 (3H, t, *J*=7.2 Hz, CH).

<sup>13</sup>C NMR: (75 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 166.5, 159.7, 159.7, 151.6, 139.6, 133.2, 129.3, 127.8, 126.2, 123.4, 120.9, 116.4, 115.3, 113.3, 62.7, 55.3, 14.3.

IČ: 1023, 1050, 1105, 1161, 1282, 1322, 1346, 1356, 1380, 1426, 1458, 1507, 1561, 1575, 2989 cm<sup>-1</sup>.

LRMS (APCI): *m/z* (relativní intenzita) 281.5 [M+H]<sup>+</sup> (24), 255.5 (2), 254.4 (13), 253.6 (100), 238.5 (4), 210.5 (6), 91.5 (1.5).

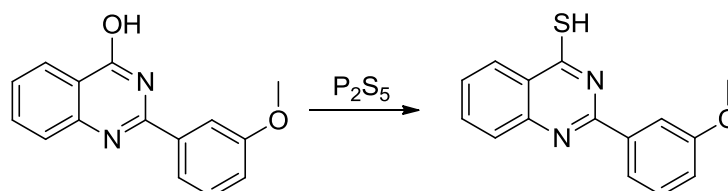
## 6.4. Syntéza derivátů druhé série

### 6.4.1. 2-(3-Methoxyfenyl)chinazolin-4-thiol

Sumární vzorec: C<sub>15</sub>H<sub>12</sub>N<sub>2</sub>OS

Molekulová hmotnost: 268.33

Schéma přípravy:



Postup přípravy:

Směs 2-(3-methoxyfenyl)chinazolin-4-olu (1 g; 4 mmol) a sulfidu fosforečného (880 mg; 4 mmol) v toluenu (10 ml) byla zahřívána pod refluxem po dobu 4 hodin. Poté byla reakční směs nalita na led a vytřepána do chloroformu (3x20 ml). Organické fáze byly spojeny a vysušeny bezvodým síranem sodným. Výsledný produkt byl získán po provedení sloupcové chromatografie s použitím silikagelu jako pevné fáze a směsi hexan/EtOAc 1:1 jako fáze mobilní. Reakce proběhla s výtěžkem 83 %.

Charakteristika:

Žlutá krystalická látka; t.t. 222-225 °C.

**<sup>1</sup>H NMR:** (300 MHz, DMSO – *d*<sub>6</sub>) δ 8.64-8.57 (1H, m, Ar), 7.92-7.86 (1H, m, Ar), 7.8-7.63 (3H, m, Ar), 7.6-7.55 (1H, m, Ar), 7.48-7.43 (1H, m, Ar), 7.16-7.12 (1H, m, Ar), 3.87 (3H, s, OCH<sub>3</sub>).

**<sup>13</sup>C NMR:** (75 MHz, DMSO) δ 188.0, 159.4, 151.5, 144.4, 135.6, 133.6, 129.8, 129.5, 128.4, 128.2, 127.8, 121.0, 118.0, 113.3, 55.6.

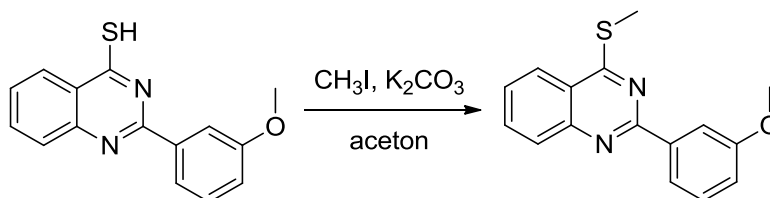
**IČ:** 1029, 1040, 1154, 1189, 1222, 1252, 1263, 1339, 1492, 1508, 1570, 2985 cm<sup>-1</sup>.

**LRMS (APCI):** *m/z* (relativní intenzita) 269.9 [M+H]<sup>+</sup> (100), 253.6 (9), 235.5 (19), 226.5 (6), 210.6 (3).

**6.4.2. 2-(3-Methoxyfenyl)-4-(methylsulfanyl)chinazolin**Sumární vzorec: C<sub>16</sub>H<sub>14</sub>N<sub>2</sub>OS

Molekulová hmotnost: 282.36

Schéma přípravy:



Postup přípravy:

2-(3-Methoxyfenyl)chinazolin-4-thiol (100 mg; 0.37 mmol) byl rozpuštěn v acetonu (10 ml) a následně byl přidán uhličitan draselný (260 mg; 1.85 mmol). K vzniklé suspenzi byl přikapán methyljodid (0.44 ml; 1 g; 7.4 mmol) a reakční směs byla po dobu 16 hodin zahřívána pod zpětným chladičem na teplotu 55 °C. Poté byla rozdělena za pomoci sloupcové chromatografie (silikagel, hexan/EtOAc 9:1) a hlavní produkt byl získán s výtěžkem 31 %.

Charakteristika:

Nažloutlá krystalická látka; t.t. 89-91 °C.

**<sup>1</sup>H NMR:** (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 8.28-8.21 (2H, m, Ar), 8.11-8.01 (2H, m, Ar), 7.86-7.8 (1H, m, Ar), 7.56-7.41 (2H, m, Ar), 7.09-7.4 (1H, m, Ar), 3.95 (3H, s, OCH<sub>3</sub>), 2.83 (3H, s, SCH<sub>3</sub>).

**<sup>13</sup>C NMR:** (75 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 171.4, 159.8, 158.6, 148.6, 139.5, 133.6, 129.5, 129.0, 126.7, 123.7, 122.6, 121.1, 116.7, 113.4, 55.4, 12.6.

**IČ:** 1039, 1217, 1249, 1328, 1348, 1429, 1483, 1494, 1559, 1600, 2924 cm<sup>-1</sup>.

**LMRS (APCI):** *m/z* (relativní intenzita) 283.6 [M+H]<sup>+</sup> (100), 268.5 (7), 250.6 (3.5), 236.5 (5.5), 235.6 (38), 192.6 (1).

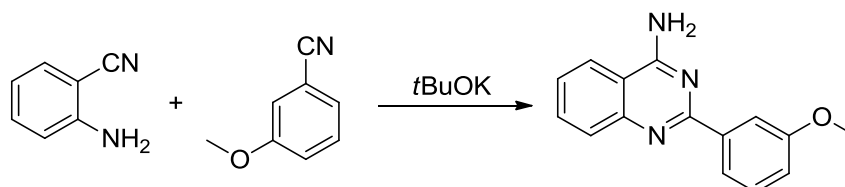
## 6.5. Syntéza derivátů třetí série

### 6.5.1. 2-(3-Methoxyfenyl)chinazolin-4-amin

Sumární vzorec:  $C_{15}H_{13}N_3O$

Molekulová hmotnost: 251.28

Schéma přípravy:



Postup přípravy:

Směs anthranilonitrilu (1.180 g; 10 mmol), 3-methoxybenzonitrilu (1.22 ml; 1.333 g; 10 mmol) a *t*-butanoátu draselného (112 mg; 1 mmol) byla zahřáta na teplotu 140°C a ponechána reagovat po dobu 3 hodin (bez použití rozpouštědla). Následně byla reakční směs ochlazena, zředěna ethylacetátem (20 ml) a vytřepána vodou (20 ml). Organická vrstva byla vysušena (bezvodým síranem sodným) a byla provedena sloupcová chromatografie s použitím silikagelu jako pevné fáze a směsi hexan:ethylacetát v poměru 7:3 jako eluentu. 2-(3-methoxyfenyl)chinazolin-4-amin byl získán s výtěžkem 4 %.

Charakteristika:

Žlutá krystalická látka; t.t. 168-173 °C.

$^1\text{H NMR}$ : (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  8.11-8.06 (2H, m, Ar), 7.97-7.93 (1H, m, Ar), 7.8-7.73 (2H, m, Ar), 7.05-7.01 (1H, m, Ar), 5.77 (2H, bs,  $\text{NH}_2$ ), 3.93 (3H, s,  $\text{OCH}_3$ ).

$^{13}\text{C NMR}$ : (125 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  161.4, 160.6, 159.8, 150.9, 140.0, 133.2, 129.4, 128.8, 125.8, 121.6, 120.9, 116.7, 113.0, 112.9, 55.4.

$\text{IČ}$ : 1043, 1234, 1264, 1315, 1264, 1279, 1315, 1366, 1382, 1437, 1466, 1508, 1543, 1575, 1601, 1618, 1643, 2921, 3001, 3209, 3324, 3414  $\text{cm}^{-1}$ .

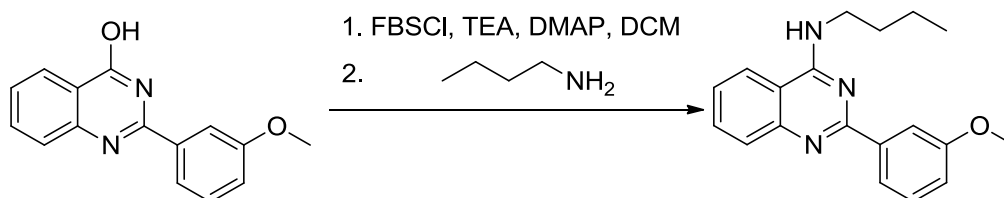
$\text{LRMS}$  (APCI):  $m/z$  (relativní intenzita) 252.6 [ $\text{M}+\text{H}$ ] $^+$  (100), 238.5 (2.5), 237.5 (16), 235.5 (11), 210.6 (2.5), 209.6 (17).

### 6.5.2. 4-Butylamino-2-(3-methoxyfenyl)chinazolin

Sumární vzorec: C<sub>19</sub>H<sub>21</sub>N<sub>3</sub>O

Molekulová hmotnost: 307.39

Schéma přípravy:



Postup přípravy:

2-(3-Methoxyfenyl)chinazolin-4-ol (250 mg; 0.99 mmol), *p*-fluorbenzen-sulfonylchlorid (292 mg; 1.5 mmol), triethylamin (0.12 ml; 87 mg; 1.2 mmol) a katalytické množství DMAP byly převedeny do vysušené a argonem naplněné baňky a rozpuštěny v bezvodém dichlormethanu (10 ml). Roztok byl za stálého míchání ponechán reagovat při pokojové teplotě po dobu 24 hodin. Poté byl k reakční směsi přidán butylamin (0.99 ml; 731 mg; 10 mmol) a reakční směs byla 24 hodin míchána při pokojové teplotě. Rozpouštědlo bylo odpařeno a surový produkt byl purifikován pomocí sloupcové chromatografie. Jako pevná fáze byl použit silikagel, jako mobilní fáze směs hexanu a ethylacetátu v poměru 8:2. Reakce proběhla s výtěžkem 84 %.

Charakteristika:

Nažloutlá krystalická látka; t.t. 94 °C.

**<sup>1</sup>H NMR:** (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 8.2-8.14 (2H, m, Ar), 7.97-7.93 (1H, m, Ar), 7.73-7.67 (2H, m, Ar), 7.44-7.37 (2H, m, Ar), 7.05-7.01 (1H, m, Ar), 5.95 (1H, bs, NH), 3.94 (3H, s, OCH<sub>3</sub>), 3.84-3.76 (2H, m, NCH<sub>2</sub>), 1.83-1.72 (2H, m, CH<sub>2</sub>), 1.56-1.2 (2H, m, CH<sub>2</sub>), 1.03 (3H, t, *J*=7.3 Hz, CH<sub>3</sub>).

**<sup>13</sup>C NMR:** (75 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 1597, 159.6, 132.5, 129.8, 129.7, 129.2, 128.4, 125.4, 121.0, 120.6, 116.6, 116.4, 116.1, 113.6, 113.2, 55.4, 41.1, 31.5, 20.3, 13.9.

**IČ:** 1041, 1228, 1261, 1315, 1327, 1363, 1427, 1453, 1465, 1494, 1533, 1572, 2958 cm<sup>-1</sup>.

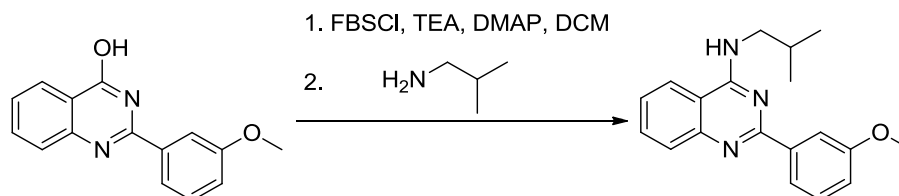
**LRMS** (APCI): *m/z* (relativní intenzita) 308.6 [M+H]<sup>+</sup> (100), 293.6 (2), 265.6 (1.5), 252.5 (7), 237.5 (1.5), 209.5 (1.5).

### 6.5.3. 4-Isobutylamino-2-(3-methoxyfenyl)chinazolin

Sumární vzorec: C<sub>19</sub>H<sub>21</sub>N<sub>3</sub>O

Molekulová hmotnost: 307.39

Schéma přípravy:



Postup přípravy:

2-(3-Methoxyfenyl)chinazolin-4-ol (250 mg; 0.99 mmol), FBSCI (292 mg; 1.5 mmol), triethylamin (0.12 ml; 87 mg; 1.2 mmol) a katalytické množství DMAP byly převedeny do vysušené a argonem naplněné baňky a rozpuštěny v bezvodém dichlormethanu (10 ml). Roztok byl za stálého míchání ponechán reagovat při pokojové teplotě po dobu 24 hodin. Poté byl k reakční směsi přidán isobutylamin (0.99 ml; 731 mg; 10 mmol) a míchání při pokojové teplotě pokračovalo po dalších 24 hodin. Poté byl dichlormethan odpařen a byla provedena sloupcová chromatografie. Jako pevná fáze byl zvolen silikagel, jako fáze mobilní směs hexanu a ethylacetátu v poměru 8:2. Výsledný produkt byl následně rekrystalizován z ethanolu. Výtěžek této reakce byl 33 %.

Charakteristika:

Bílá krystalická látka; t.t. 125-127 °C.

<sup>1</sup>H NMR: (500 MHz, DMSO) δ 8.72 (1H, s, Ar), 8.64-8.6 (1H, m, Ar), 8.43-8.36 (2H, m, Ar), 8.12-8.07 (2H, m, Ar), 7.83-7.7 (2H, m, Ar+NH), 4.17 (3H, s, OCH<sub>3</sub>), 3.82 (2H, t, J=6.5 Hz, CH<sub>2</sub>), 2.53-2.43 (1H, m, CH), 1.33 (6H, d, J=6.5 Hz, (CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>).

<sup>13</sup>C NMR: (125 MHz, DMSO) δ 160.0, 159.4, 159.1, 150.1, 140.5, 132.8, 129.4, 128.0, 125.4, 122.9, 120.4, 115.9, 114.1, 113.0, 55.2, 48.4, 27.8, 20.6.

IČ: 1043, 1151, 1228, 1331, 1363, 1384, 1427, 1450, 1465, 1501, 1536, 1573, 1599, 2905 cm<sup>-1</sup>.

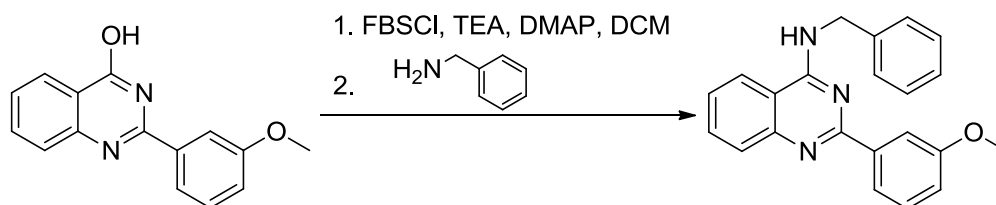
LRMS (APCI): m/z (relativní intenzita) 308.6 [M+H]<sup>+</sup> (100), 253.5 (2.5), 252.5 (11), 237.5 (1), 209.6 (1).



**6.5.4. 4-Benzylamino-2-(3-methoxyfenyl)chinazolin**Sumární vzorec: C<sub>22</sub>H<sub>19</sub>N<sub>3</sub>O

Molekulová hmotnost: 341.41

Schéma přípravy:



Postup přípravy:

2-(3-Methoxyfenyl)chinazolin-4-ol (250 mg; 0.99 mmol), FBSCl (292 mg; 1.5 mmol), triethylamin (0.12 ml; 87 mg; 1.2 mmol) a katalytické množství DMAP byly převedeny do vysušené a argonem naplněné baňky a rozpuštěny ve bezvodém dichlormethanu (10 ml). Roztok byl za stálého míchání ponechán reagovat při pokojové teplotě po dobu 24 hodin. Poté byl k reakční směsi přidán benzylamin (1.1 ml; 1.0715 g; 10 mmol) a míchání při pokojové teplotě bylo zachováno po dobu 24 hodin. Následně byl z reakční směsi odpařen dichlormethan a pro separaci byla provedena sloupcová chromatografie (pevnou fází byl silikagel, mobilní fází směs hexanu a ethylacetátu v poměru 8:2). Výsledný produkt byl získán s výtěžkem 47 %.

Charakteristika:

Nažloutlá krystalická látka; t.t. 130-132 °C, t.t. v literatuře<sup>30</sup> neuvedena.

<sup>1</sup>H NMR: (300 MHz, DMSO) δ 8.95 (1H, t, *J*=5.8 Hz, NH), 8.32 (1H, d, *J*=8.2 Hz, Ar), 8.06-8.02 (1H, m, Ar), 7.98-7.96 (1H, m, Ar), 7.80-7.76 (2H, m, Ar), 7.55-7.42 (3H, m, Ar), 7.41-7.26 (3H, m, Ar), 7.25-7.17 (1H, m, Ar), 7.02 (1H, ddd, *J*<sub>1</sub>=0.9 Hz, *J*<sub>2</sub>=2.7 Hz, *J*<sub>3</sub>=8.2 Hz, Ar), 4.90 (2H, d, *J*=5.8 Hz, CH<sub>2</sub>), 3.81 (3H, s, CH<sub>3</sub>).

<sup>13</sup>C NMR: (75 MHz, DMSO) δ 159.7, 159.4, 159.1, 150.1, 140.3, 140.1, 133.0, 129.4, 128.5, 128.1, 127.5, 127.0, 125.7, 122.9, 120.5, 116.1, 114.1, 113.0, 55.2, 44.1.

IČ: 1041, 1096, 1155, 1165, 1237, 1292, 1325, 1358, 1419, 1429, 1453, 1464, 1493, 1533, 1561, 1599, 1634, 3129, 3273, 3403 cm<sup>-1</sup>.

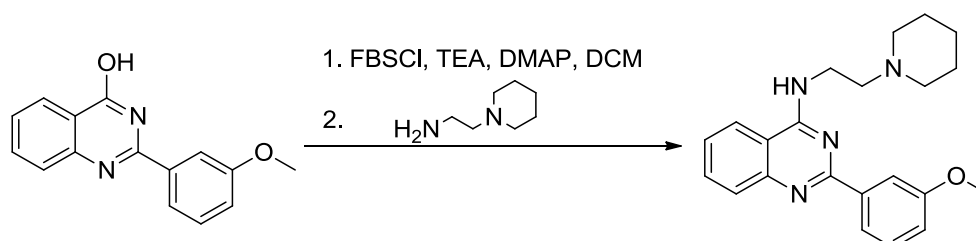
LRMS (APCI): *m/z* (relativní intenzita) 342.6 [M+H]<sup>+</sup> (100), 92.5 (2), 91.5 (27).

### 6.5.5. 2-(3-Methoxyfenyl)-4-[2-(piperidin-1-yl)ethylamino]chinazolin

Strukturní vzorec: D<sub>22</sub>H<sub>26</sub>N<sub>4</sub>O

Molekulová hmotnost: 362.47

Schéma přípravy:



Postup přípravy:

2-(3-Methoxyfenyl)chinazolin-4-ol (250 mg; 0.99 mmol), FBSCl (292 mg; 1.5 mmol), triethylamin (0.12 ml; 87 mg; 1.2 mmol) a katalytické množství DMAP byly převedeny do vysušené a argonem naplněné baňky a rozpuštěny v bezvodém dichlormethanu (10 ml). Směs byla za stálého míchání ponechána reagovat při pokojové teplotě po dobu 24 hodin. Poté byl k reakční směsi přidán 1-(2-aminoethyl)piperidin (1.42 ml; 1.28 g; 10 mmol) a reakce byla opět ponechána míchat 24 hodin při pokojové teplotě. Z reakční směsi byl odpařen dichlormethan a pro získání čistého produktu byla provedena sloupcová chromatografie s použitím silikagelu jako pevné fáze a směsi hexan:ethylacetát 8:2 jako fáze mobilní. Reakce proběhla s výtěžkem 76 %.

Charakteristika:

Žlutooranžová olejovitá látka.

**<sup>1</sup>H NMR:** (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 8.23-8.15 (2H, m, Ar), 7.92-7.88 (1H, m, Ar), 7.81-7.77 (1H, m, Ar), 7.69-7.62 (1H, m, Ar), 7.42-7.3 (2H, m, Ar), 7.03-6.94 (2H, m, Ar+NH), 3.87 (3H, s, O-CH<sub>3</sub>), 3.84 (2H, m, NH-CH<sub>2</sub>-), 2.7-2.62 (2H, m, -CH<sub>2</sub>-N), 2.55-2.37 (4H, m, N-(CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>), 1.66-1.52 (4H, m, (CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>), 1.52-1.38 (2H, m, CH<sub>2</sub>).

**<sup>13</sup>C NMR:** (75 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 160.1, 159.4, 159.3, 150.1, 140.5, 132.1, 129.0, 128.3, 125.1, 120.9, 120.8, 115.8, 113.8, 113.1, 56.7, 55.1, 54.0, 37.2, 25.7, 24.0.

**Ī:** 1043, 1093, 1126, 1154, 1167, 1227, 1328, 1361, 1455, 1494, 1533, 1574, 2854, 2936 cm<sup>-1</sup>.

**LRMS** (APCI): *m/z* (relativní intenzita) 363.7 [M+H]<sup>+</sup> (100), 287.5 (12.5), 278.6 (43), 112.5 (5), 98.5 (2).

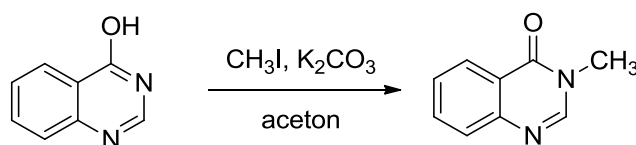
## 6.6. Syntéza derivátů čtvrté série

### 6.6.1. 3-Methyl-3,4-dihydrochinazolin-4-on

Strukturní vzorec: C<sub>9</sub>H<sub>8</sub>N<sub>2</sub>O

Molekulová hmotnost: 160.17

Schéma přípravy:



Postup přípravy:

Ke směsi chinazolin-4-olu (1.46 g; 10 mmol), hydroxidu sodného (0.6 g; 15 mmol) a katalytického množství tetrabutylamonium jodidu ve vodě (20 ml) a toluenu (20 ml) byl přidán methyljodid (6.23 ml; 14.2 g; 100 mmol). Reakční směs byla za stálého míchání po dobu 5 hodin zahřívána pod zpětným chladičem na teplotu 55 °C, průběh reakce byl kontrolován pomocí TLC. Po odstranění vodné fáze byl toluen odpařen a produkt byl izolován s použitím sloupcové chromatografie, jako stacionární fáze byl zvolen silikagel, směs ethylacetát:hexan 3:7 jako fáze mobilní. Reakce proběhla s výtěžkem 47 %.

Charakteristika:

Bílá krystalická látka; t.t. 99-103 °C, t.t. v literatuře<sup>31</sup> 104-105 °C.

<sup>1</sup>H NMR: (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 8.3-8.26 (1H, m, Ar), 8.03 (1H, s, N-CH-N), 7.75-7.66 (2H, m, Ar), 7.51-7.46 (1H, m, Ar), 3.57 (3H, s, CH<sub>3</sub>).

<sup>13</sup>C NMR: (75 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 161.5, 148.2, 146.7, 134.1, 127.4, 127.2, 126.5, 121.9, 34.0.

IČ: 1068, 1155, 1189, 1266, 1297, 1324, 1341, 1471, 1562, 1612, 1667, 2911 cm<sup>-1</sup>.

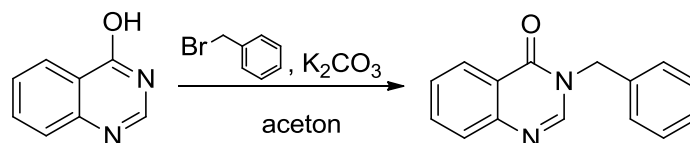
LRMS (APCI): *m/z* (relativní intenzita) 161.6 [M+H]<sup>+</sup> (68.1), 130.5 (3.8), 121.6 (3.1), 120.6 (38.1), 93.5 (7.5), 92.5 (100), 65.5 (4.4).

### 6.6.2. 3-Benzyl-3,4-dihydrochinazolin-4-on

Strukturní vzorec: C<sub>15</sub>H<sub>12</sub>N<sub>2</sub>O

Molekulová hmotnost: 236.27

Schéma přípravy:



Postup přípravy:

Chinazolin-4-ol (1.46 g; 10 mmol) byl rozpuštěn v acetonu (50 ml) a do tohoto roztoku byl přidán uhličitan draselný (13.8 g; 100 mmol). Následně byl do této reakční směsi přikapán benzylbromid (1.19 ml; 1.7 g; 10 mmol). Roztok byl za stálého míchání po dobu 4 hodin zahříván pod zpětným chladičem na teplotu 55 °C, průběh reakce byl kontrolován pomocí TLC. Výsledný produkt byl izolován s použitím sloupcové chromatografie, jako stacionární fáze byl zvolen silikagel, směs ethylacetát:hexan 3:7 jako fáze mobilní. Reakce proběhla s výtěžkem 86 %.

Charakteristika:

Bílá krystalická látka; t.t. 115-118 °C, t.t. v literatuře<sup>32</sup> 117-119 °C.

<sup>1</sup>H NMR: (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 8.36-8.22 (1H, m, Ar), 8.12 (1H, s, N-CH-N), 7.78-7.67 (2H, m, Ar), 7.54-7.47 (1H, m, Ar), 7.37-7.28 (5H, m, Ar), 5.2 (2H, s, CH<sub>2</sub>).

<sup>13</sup>C NMR: (75 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 161.0, 147.9, 146.3, 135.7, 134.3, 129.0, 128.3, 128.0, 127.5, 127.4, 126.9, 122.2, 49.6.

IČ: 1078, 1150, 1163, 1291, 1321, 1354, 1366, 1475, 1604, 1672, 2905 cm<sup>-1</sup>.

LRMS (APCI): *m/z* (relativní intenzita) 237.5 [M+H]<sup>+</sup> (100), 91.5 (8.1).

## 7. SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

1. Baes M., Gulick T., Choi H.S., Martinoli M.G., Simha D., Moore D.D. *Mol. Cell. Biol.* **1994**, *14*(3), 1544-1552.
2. Di Masi A., De Marinis E., Ascenzi P., Marino M. *Mol. Aspects Med.* **2009**, *30*(5), 297-343.
3. Swales K., Negishi M. *Mol. Endocrinol.* **2004**, *18*(7), 1589-1598.
4. Forman B.M., Tzameli I., Choi H.S., Chen J., Simha D., Seol W., Evans R.M., Moore D.D. *Nature* **1998**, *395*(6702), 612-615.
5. Moore L.B., Parks D.J., Jones S.A., Bledsoe R.K., Consler T.G., Stimmel J.B., Goodwin B., Liddle C., Blanchard S.G., Willson T.M., Collins J.L., Kliewer S.A. *J. Biol. Chem.* **2000**, *275*(20), 15122-15127.
6. Yao R., Yasuoka A., Kamei A., Kitagawa Y., Tateishi N., Tsuruoka N., Kiso Y., Sueyoshi T., Negishi M., Misaka T., Abe K. *J. Agric. Food Chem.* **2010**, *58*(4), 2168-2173.
7. Tzameli I., Pissios P., Schuetz E.G., Moore D.D. *Mol. Cell. Biol.* **2000**, *20*(9), 2951-2958.
8. Kawamoto T., Kakizaki S., Yoshinari K., Negishi M. *Mol. Endocrinol.* **2000**, *14*(11), 1897-1905.
9. Shan L., Vincent J., Brunzelle J.S., Dussault I., Lin M., Ianculescu I., Sherman M.A., Forman B.M., Fernandez E.J. *Mol. Cell.* **2004**, *16*(6), 907-917.
10. Maglich J.M., Parks D.J., Moore L.B., Collins J.L., Goodwin B., Billin A.N., Stoltz C.A., Kliewer S.A., Lambert M.H., Willson T.M., Moore J.T. *J. Biol. Chem.* **2003**, *278*(19), 17277-17283.
11. DeKeyser J.G., Stagliano M.C., Auerbach S.S., Prabu K.S., Jones A.D., Omiecinski C.J. *Mol. Pharmacol.* **2009**, *75*(5), 1005-1013.
12. Huang W., Zhang J., Wei P., Schrader W.T., Moore D.D. *Mol. Endocrinol.* **2004**, *18*(10), 2402-2408.
13. Suino K., Peng L., Reynolds R., Li Y., Cha J.Y., Repa J.J., Kliewer S.A., Xu H.E. *Mol. Cell.* **2004**, *16*(6), 893-905.
14. Zadák V. Rigorózní práce, Univerzita Karlova v Praze, Farmaceutická fakulta v Hradci Králové, **2010**, 7-54.
15. Wada T., Gao J., Xie W. *Trends Endocrinol. Metab.* **2009**, *20*(6), 273-279.
16. Konno Y., Negishi M., Kodama S. *Drug Metab. Pharmacokinet.* **2008**, *23*(1), 8-13.

17. Wieneke N., Hirsch-Ernst K.I., Kuna M., Kersten S., Püschel G.P. *FEBS Lett.* **2007**, *581(29)*, 5617-5626.
18. Gao J., He J., Zhai Y., Wada T., Xie W. *J. Biol. Chem.* **2009**, *284(38)*, 25984-25992.
19. a) Zahajská L. Diplomová práce, Univerzita Karlova v Praze, Farmaceutická fakulta v Hradci Králové, **2000**, 20-23. b) Bandgar B.P. *Synthetic Communications* **1997**, *27*, 2065-2068.
20. Seijas J. A., Vázquez-Tato M. P., Montserrat Martínez M. *Tetrahedron Lett.* **2000**, *41*, 2215-2217.
21. Liégault B., Lapointe D., Caron L., Vlassova A., Fagnou K. *J. Org. Chem.* **2009**, *74*, 1826-1834.
22. Čerňa I., Pohl R., Klepetářová B., Hocek M. *Org. Lett.* **2006**, *8*, 5389-5392.
23. Špulák M., Lubojacký R., Šenel P., Kuneš J., Pour M. *J. Org. Chem.* **2010**, *75*, 241-244.
24. Lewis J. C., Wiedemann S. H., Bergam R. G., Ellman J. A. *Org. Lett.* **2004**, *6(1)*, 35-38.
25. Šašková J. Diplomová práce, Univerzita Karlova v Praze, Farmaceutická fakulta v Hradci Králové, **2010**, 27.
26. Špulák M., Novák Z., Palát K., Kuneš J., Pourová J., Pour M. Publikace v přípravě
27. Graf byl vytvořen studentkou doktorského studia Mgr. Alicí Rulcovou, Katedra farmakologie a toxikologie.
28. Zhou J., Fang J. *J. Org. Chem.* **2011**, *76(9)*, 7730-7736.
29. Kuo S.-c., Hour M.-j., Huang L.-j., Lee K.-h. US 647949 B1 20021112, **2002**.
30. Wawer M., Bajorath J. *Chem. Med. Chem.* **2009**, *4(9)*, 1431-1438.
31. Ames D.E. et al. *J. Chem. Soc. Perkin Trans. 1*, **1975**, 2035-2036.
32. Nathubhai A., Patterson R., Woodman T. J., Sharp H. E. C., Chui M. T. Y., Chung H. H. K., Lau S. W. S., Zheng J., Lloyd M. D., Thompson A. S., Threadgill M. D. *Org. Biomol. Chem.* **2011**, *9(17)*, 6089-6099.