

UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE
FARMACEUTICKÁ FAKULTA V HRADCI KRÁLOVÉ
KATEDRA FARMACEUTICKÉ CHEMIE A KONTROLY LÉČIV



**DERIVÁTY KARBAZOLU A JEJICH VLIV NA TEPLITU TÁNÍ
DUPLEXŮ DNA I.**

Diplomová práce

Tímto bych chtěl poděkovat PharmDr. Kamilu Kopeckému, Ph.D., Mgr. Janu Švecovi, Ph.D. a doc. PharmDr. Miroslavu Miletínovi, Ph.D. za jejich ochotu, trpělivost, pomoc a odborné rady, které mi poskytli během zpracování této diplomové práce, a mé dík patří také celé skupině Azaphthalocyanine group, pod kterou jsem mohl pracovat.

Tato práce vznikala za grantové podpory: SVV 260 062

„Prohlašuji, že tato práce je mým původním autorským dílem. Veškerá literatura a další zdroje, z nichž jsem při zpracování čerpal, jsou uvedeny v seznamu použité literatury a v práci řádně citovány. Práce nebyla využita k získání jiného nebo stejného titulu.“

V Hradci Králové dne:

Lukáš Maršík

.....

ABSTRAKT

Univerzita Karlova v Praze

Farmaceutická fakulta v Hradci Králové

Katedra farmaceutické chemie a kontroly léčiv

Student: Lukáš Maršík

Školitel: Mgr. Jan Švec, Ph.D.

Odborný poradce: PharmDr. Kamil Kopecký, Ph.D., doc. PharmDr. Miroslav Miletín, Ph.D.

Název diplomové práce: Deriváty karbazolu a jejich vliv na teplotu tání duplexů DNA I.

Tato diplomová práce pojednává o přípravě takového derivátu karbazolu, který by nesl v polohách 3 a 6 objemné bazické skupiny a v poloze 9 alifatický řetězec zakončený azidovou skupinou.

V teoretické části jsou popsány možné postupy, jak vytvořit na karbazolu či jiných aromatických strukturách základní funkční skupiny, dále pak možnosti navázání alifatického řetězce na karbazolový dusík a v poslední části vytvoření bazických center na aromátech s funkční skupinou – vesměs se jednalo o bromderiváty.

Experimentální část se již zabývá aplikací metod popsaných v teoretické části na struktuře karbazolu. Jako základní molekula byl použit 3,6-dibrom-9*H*-karbazol; byly zkoušeny metody záměny brómu za skupiny obsahující atom uhlíku či dusíku, následovalo vytvoření alifatického řetězce na dusíku karbazolu zakončeného azidovou skupinou a nakonec navázání objemných bazických substituentů na funkčních skupinách karbazolu v polohách 3 a 6. Syntetizované molekuly byly popsány NMR spektry, případně i IČ spektry.

V diskuzi jsou pak rozebírány poznatky vzešlé z experimentální části.

ABSTRACT

Charles University in Prague

Faculty of Pharmacy in Hradec Králové

Department of Pharmaceutical Chemistry and Drug Control

Student: Lukáš Maršík

Supervisor: Mgr. Jan Švec, Ph.D.

Expert adviser: PharmDr. Kamil Kopecký, Ph.D., doc. PharmDr. Miroslav Miletín, Ph.D.

Title of diploma thesis: Derivatives of carbazole and their influence on melting point of DNA duplexes I.

This diploma thesis deals with preparation of carbazole derivatives bearing bulky basic groups in positions 3 and 6 and an aliphatic chain terminated with azide group in position 9.

In the theoretical part, there are described possible methods, how to create basic functional groups on carbazole and other aromatic structures, further the possibility of establishing an aliphatic chain on the aromatic nitrogen and in the last part creation a basic centres on aromatics with a functional group was explored – mostly bromide derivatives were employed as the starting structure.

The experimental part deals with the application of methods described in the theoretical part on the structure of carbazole. As the starting molecule 3,6-dibromo-9*H*-carbazole was used; methods of exchange bromine by carbon or nitrogen containing groups were tested, followed by the creation of the aliphatic chain on the nitrogen of carbazole terminated with azide group and finally the linking of bulky basic substituents at functional groups of carbazole in positions 3 a 6 was performed. All prepared molecules were described by NMR or IR spectra.

In the discussion findings arising from the experimental part are analyzed.

OBSAH

ABSTRAKT.....	4
ABSTRACT.....	5
1. SEZNAM ZKRATEK	9
2. KÓDOVÉ OZNAČENÍ PŘIPRAVENÝCH A ZAMÝŠLENÝCH SLOUČENIN	11
3. ÚVOD.....	13
4. TEORETICKÁ ČÁST	16
4.1. Možné postupy při syntéze substituovaného karbazolu v polohách 3 a 6...	16
4.1.1. Bromace karbazolu v polohách 3 a 6.....	16
4.1.2. Kyanace 3,6-dibrom-9 <i>H</i> -karbazolu.....	17
4.1.2.1. Kyanace Rosemund-von Braunovou reakcí	17
4.1.2.2. Kyanace kyanidem zinečnatým	17
4.1.3. Kyanace hexakvanoželeznatanem draselným	18
4.1.4. Aminace bromderivátů benzenu	18
4.1.4.1. Aminace pomocí Cu ₂ O	19
4.1.4.2. Aminace pomocí práškové mědi.....	19
4.2. Možné postupy při alkylaci karbazolu v poloze 9	20
4.2.1. Příprava azidoalkanu.....	20
4.2.2. Alkylace dusíkaté skupiny karbazolu.....	20
4.2.3. Alkylace hydroxyskupiny	21
4.2.4. Amidace karboxylové skupiny I.	22
4.2.5. Amidace karboxylové skupiny II.	22

4.3.	Možné postupy při zavádění objemných bazických skupin	23
4.3.1.	Kondenzace nitrobenzenu	23
4.3.2.	Aminace halogenbenzenu objemnou skupinou.....	23
4.3.2.1.	Cyklizace diaminu	24
4.3.2.2.	Buchwald–Hartwigova aminace	24
4.3.3.	Suzukiho kondenzace.....	25
4.3.4.	Amidace aminoarylu chráněnou aminokyselinou.....	25
4.3.4.1.	Amidace I.....	25
4.3.4.2.	Amidace II.	26
5.	CÍL PRÁCE	27
6.	EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST	28
6.1.	Syntéza 3,6-dibrom-9 <i>H</i> -karbazolu (MGB 34).....	29
6.2.	Syntéza 3,6-dikyano-9 <i>H</i> -karbazolu (MGB 43)	30
6.2.1.	Syntéza za pomoci $Zn(CN)_2$	30
6.2.2.	Syntéza za pomoci $K_4[Fe(CN)_6]$	30
6.2.3.	Syntéza za pomoci $CuCN$	31
6.3.	Syntéza 3,6-bis(1-methyl-1,4,5,6-tetrahydropyrimidin-2-yl)-9 <i>H</i> -karbazolu (MGB 51)	33
6.4.	Syntéza N^3,N^6 -bis(1-methyl-4,5-dihydro-1 <i>H</i> -imidazol-2-yl)-9 <i>H</i> -karbazol-3,6-diaminu (MGB 71)	34
6.4.1.	Příprava 1-methyl-4,5-dihydro-1 <i>H</i> -imidazol-2-aminia <i>p</i> -toluen-sulfonátu (MGB 62).....	34
6.4.2.	Syntéza MGB 71	35
6.5.	Syntéza 3,6-bis(4-nitrofenyl)-9 <i>H</i> -karbazolu (MGB 89).....	37

6.6.	Syntéza 6-(3,6-dibrom-9 <i>H</i> -karbazol-9-yl)hexanové kyseliny (MGB 77)	38
6.7.	Příprava 6-azidohexylaminu (MGB 40) a 2-(2-azidoethoxy)ethan-1-aminu (MGB 107)	40
6.8.	Syntéza derivátů kyseliny 3,6-dibrom-9 <i>H</i> -karbazol-9-ylhexanové	41
6.9.	Syntéza derivátů kyseliny 3,6-diamino-9 <i>H</i> -karbazol-9-ylhexanové	43
6.10.	Syntéza di- <i>tert</i> -butyl(9-(6-((6-azidohexyl)amino)-6-oxohexyl)-9 <i>H</i> - karbazol-3,6-diyl)bis(4,1-fenylen)dikarbamátu (MGB 90).....	45
6.11.	Syntéza benzyl-9-((9-(1-((2-(2-azidoethoxy)ethyl)amino)-1-oxohexan-2- yl)-6-(5-(2,3-bis((benzyloxy)karbonyl)guanidino)-2-((<i>tert</i> -butoxykarbonyl)ami- no)pentanamido)-9 <i>H</i> -karbazol-3-yl)karbamoyl)-4-(((benzyloxy)karbonyl)amino)- -13,13-dimethyl-11-oxo-12-oxa-3,5,10-triazatetradec-3-enoátu (MGB110)	46
7.	DISKUZE	48
8.	ZÁVĚR	51
9.	LITERATURA	52

1. SEZNAM ZKRATEK

AcOH	kyselina octová
Boc ₂ O	di-tert-butyldikarbonát
Boc-2(Cbz)Arg	<i>N, N'</i> -bis((benzyloxy)karbonyl)- <i>N</i> ² -(terc-butyl- <i>oxy</i> karbonyl)arginin
CHCl ₃	chloroform
DCDl ₃	chloroform- <i>d</i>
DCM	dichlormethan
DIPEA	diisopropylethylamin
DMAC	dimethylacetamid
DMAP	4-dimethylaminopyridin
DMF	<i>N, N</i> -dimethylformamid
DMSO	dimethylsulfoxid
EDCI	<i>N</i> -ethyl- <i>N'</i> -(3-dimethylaminopropyl)karbodiimid
EtOH	ethanol
HBTU	<i>o</i> -(benzotriazol-1-yl)- <i>N, N, N', N'</i> -tetramethyluronium hexafluorofosfát
HCTU	<i>o</i> -(6-chlorobenzotriazol-1-yl)- <i>N, N, N', N'</i> -tetramethyluronium hexafluorofosfát
HOBt	1- hydroxybenzotriazol
MGB	„minor groove binders“ (molekuly vážící se do malého žlábků)
NBS	<i>N</i> -bromsukcinimid
NMP	<i>N</i> - methylpyrrolidin-2-on

NMR	nukleární magnetická rezonance
N-MPDA	<i>N</i> -methylpropan-1,3-diamin
Pd(OAc) ₂	diacetoxypladium
Pd(PPh ₃) ₄	tetrakis(trifenylfosfin)pladium
Pd ₂ (dba) ₃	tris(dibenzylbenzylidenaceton)dipaladium
PPh ₃	trifenylfosfin
TEA	triethylamin
THF	tetrahydrofuran
TLC	tenkovrstvá chromatografie
XANTPHOS	4,5-bis(difenylfosfín)-9,9-dimethylxanthen

2. KÓDOVÉ OZNAČENÍ PŘIPRAVENÝCH A ZAMÝŠLENÝCH SLOUČENIN

MGB 34	3,6-dibrom-9 <i>H</i> -karbazol
MGB 40	6-azidohexanamin
MGB 43	3,6-dikyano-9 <i>H</i> -karbazol
MGB 51	3,6-bis(1-methyl-1,4,5,6-tetrahydropyrimidin-2-yl)-9 <i>H</i> -karbazol
MGB 62	1-methyl-4,5-dihydro-1 <i>H</i> -imidazol-2-aminium <i>p</i> -toluensulfonát
MGB 71	<i>N</i> ³ , <i>N</i> ⁶ -bis(1-methyl-4,5-dihydro-1 <i>H</i> -imidazol-2-yl)-9 <i>H</i> -karbazol-3,6-diamin
MGB 72	<i>N</i> -(6-azidohexyl)-6-(3,6-dibrom-9 <i>H</i> -karbazol-9-yl)hexanamin
MGB 77	6-(3,6-dibrom-9 <i>H</i> -karbazol-9-yl)hexanoát
MGB 89	3,6-bis(4-nitrofenyl)-9 <i>H</i> -karbazol
MGB 90	di- <i>tert</i> -butyl(9-(6-((6-azidohexyl)amino)-6-oxohexyl)-9 <i>H</i> -karbazol-3,6-diyl)bis(4,1-fenylen)dikarbamát
MGB 105	<i>N</i> -(6-azidohexyl)-6-(3,6-diamino-9 <i>H</i> -karbazol-9-yl)hexanamid
MGB 107	2-(2-azidoethoxy)ethan-1-amin
MGB 108	<i>N</i> -(2-(2-azidoethoxy)ethyl)-6-(3,6-dibrom-9 <i>H</i> -karbazol-9-yl)hexanamid
MGB 109	<i>N</i> -(2-(2-azidoethoxy)ethyl)-6-(3,6-diamino-9 <i>H</i> -karbazol-9-yl)hexanamid

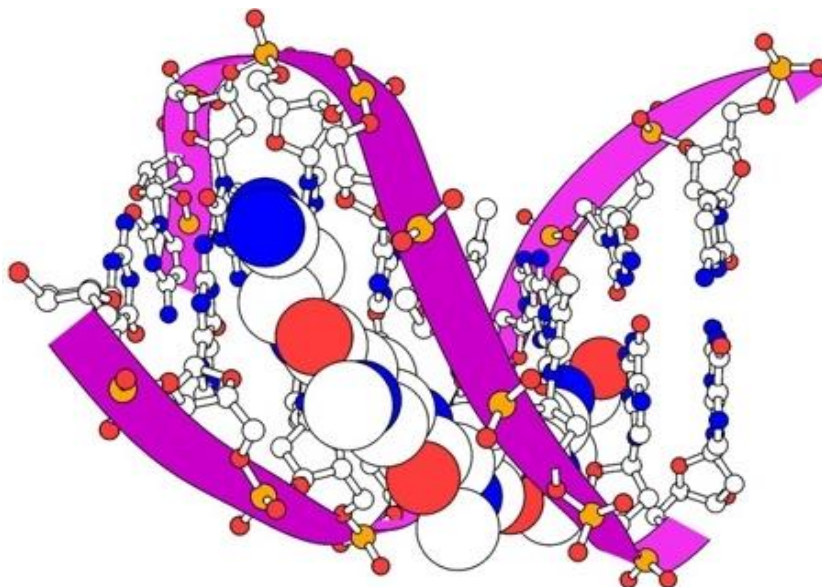
MGB 110

benzyl-9-((9-(1-((2-(2-azidoethoxy)ethyl)amino)-1-oxohexan-2-yl)-6-(5-(2,3-bis((benzyloxy)karbonyl)guanidino)-2-((terc-butoxykarbonyl)amino)pentanamido)-9*H*-karbazol-3-yl)karbamoyl)-4-(((benzyloxy)karbonyl)amino)-13,13-dimethyl-11-oxo-12-oxa-3,5,10-triazatetradec-3-enoát

3. ÚVOD

Deoxyribonukleová kyselina neboli DNA byla poprvé popsána již roku 1869 švýcarským lékařem a přírodovědcem J. F. Miescherem, který ji vyizoloval z jader bílých krvinek, a to z hnisu, který se nalézal v použitých nemocničních obvazech a jenž nazval souhrnným názvem nuklein¹. Počátkem 20. století bylo zjištěno, že DNA se skládá z fosfátů, určitých bází a cukrů, a to americkým biochemikem P. Levenem². A až roku 1953 molekulárními biology, J. D. Watsonem a F. H. C. Crickem, byla odhalena trojrozměrná struktura DNA, dvoušroubovicový model³.

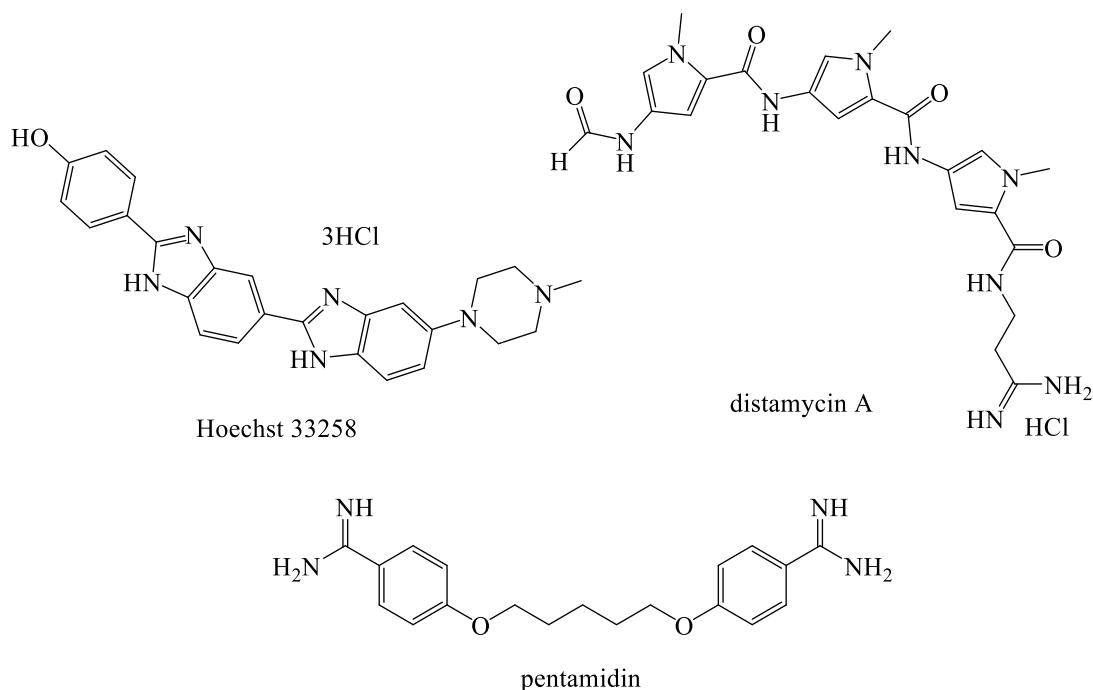
DNA, jakožto nejzákladnější a nejdůležitější struktura v organismu člověka, je studována v současné době ze všech možných úhlů pohledu. Jedna z možností, jak ovlivnit její strukturu, a tedy i biologické funkce organismu, je specifická vazba v malém žlábků duplexu nukleové kyseliny. Je známo, že v tomto místě se ochotně, nekovalentně vážou malé molekuly. Proto je v současné době ve velkém úsilí syntéza takových látek, které by se specifickou nekovalentní vazbou v malém žlábků vázaly na strukturu DNA a tím by ovlivnily její funkce (Obr. 1.).



Obr. 1. Vazba malé molekuly v malém žlábků dvoušroubovice DNA⁴

Takové látky se nazývají MGB (Minor Groove Binders). Tyto molekuly mají vlastní biologickou aktivitu a lze je proto využít jako nové substance v léčbě bakteriálních,

virových, mykotických či protozoálních nemocí. Kromě toho některé z nich vykazují též protinádorovou aktivitu, čehož se využívá ve vývoji diagnostik a potenciálních protinádorových terapeutik (např.: distamycin A, Hoechst 33258, pentamidin)⁵(Obr. 2.).

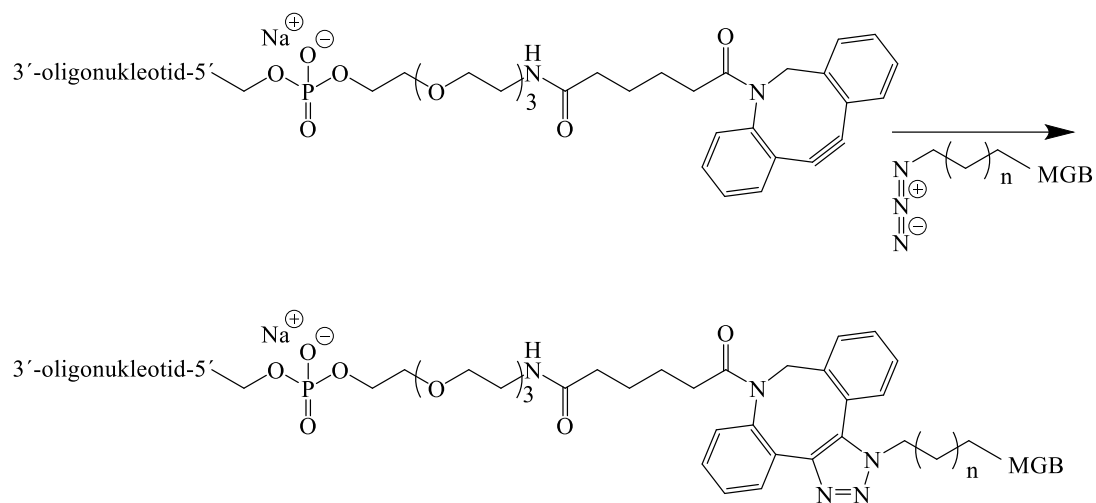


Obr. 2. Minor Groove Binders: Hoechst 33258, distamycin A, pentamidin

MGB molekuly mají nejen vlastní biologickou aktivitu, ale též i vlastnost specificky se vázat na konkrétní sekvence DNA a tím ji stabilizovat. Těto vlastnosti lze využít při sekvenování a screeningu DNA - včasném odhalování chorob a zpřesnění diagnostických metod, čehož lze následně využít v přesně dávkované léčbě té dané nemoci^{6,7}.

Jak bylo zmíněno výše, MGB molekuly se nekovalentně váží do malého žlábků DNA, a to na specifické sekvence. Aby tyto molekuly mohly být využitelné v diagnostických metodách, musí být schopné nejen se vsunout do malého žlábků duplexu nukleové kyseliny, ale i se zde udržet/vázat; proto je nutné, aby splňovaly několik kritérií. Jejich struktura musí být planární, zakřivená a obsahovat objemné funkční skupiny. Pro některé aplikace, např. konstrukci diagnostických molekulárně biologických sond, je třeba MGB navázat na sekvenci syntetického oligonukleotidu. K tomuto účelu je výhodné, aby molekula MGB nesla azidovou skupinu, která pak specificky a

s vysokým výtěžkem reaguje s alkylnomodifikovaným oligonukleotidem Huisgenovou cykloadicí^{8,9}(Obr. 3.).



Obr. 3. Schéma Huisgenovy cykloadice na řetězec oligonukleotidu

4. TEORETICKÁ ČÁST

4.1. Možné postupy při syntéze substituovaného karbazolu v polohách 3 a 6

Existuje řada postupů, jak zavést reaktivní skupinu na aromát, malá část z nich popisuje substituci na samotném karbazolu v polohách 3 a 6. Nejčastější (ale ne jedinou) metodou je bromace karbazolu za vzniku 3,6-dibrom-9*H*-karbazolu, od kterého následně lze vytvářet další deriváty záměnou bromu za jiné funkční skupiny. Níže jsou popsány metody, kterých bylo využito v experimentální části.

4.1.1. Bromace karbazolu v polohách 3 a 6

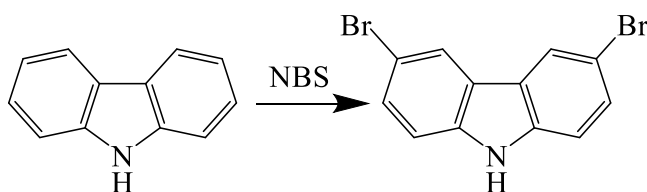


Schéma 1. Bromace karbazolu

Karbazol reaguje s N-bromsukcinimidem za vzniku 3,6-dibrom-9*H*-karbazolu (Schéma 1.). K míchanému roztoku karbazolu, oxidu křemičitého a dichlormethanu byl po kapkách přidáván roztok NBS v dichlormethanu. Reakční směs byla míchána 4 hodiny za nepřítomnosti světla při laboratorní teplotě, dokud HPLC neprokázalo úplné vymizení výchozí látky. Pak byla reakční směs přefiltrována a oxid křemičitý promyt několikrát dichlormethanem. Spojené frakce byly promyty vodou a organická vrstva byla vysušena a odpařena. Směs obsahující produkt byl následně přečištěn sloupcovou chromatografií. Takto bylo získáno téměř 100 % teoretického výtěžku¹⁰.

4.1.2. Kyanace 3,6-dibrom-9*H*-karbazolu

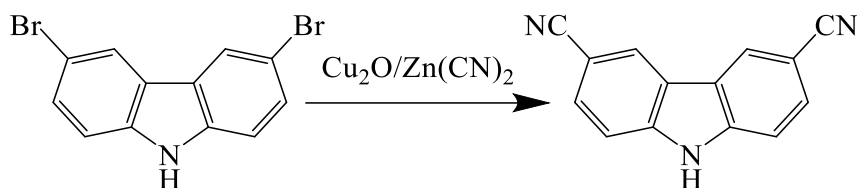


Schéma 2. Kyanace 3,6-dibrom-9*H*-karbazolu

4.1.2.1. Kyanace Rosemund-von Braunovou reakcí

Touto reakcí lze připravit z dibromkarbazolu a kyanidu měďného, jakožto nosiče nitrilové skupiny, 3,6-dikyano-9*H*-karbazol (Schéma 2.). Směs 3,6-dibrom-9*H*-karbazolu a suchého kyanidu měďného v bezvodém dichlormethanu byla zahřívána na teplotu varu 70 hod pod zpětným chladičem v dusíkové atmosféře. Reakční směs byla nalita do ledové vody, vzniklá sraženina byla odfiltrována a promyta vodou. Pevná látka byla míchána 1 hodinu ve vodě obsahující ethylendiamin, potom odfiltrována a promyta vodou. Následně byla pevná látka míchána ve vodném roztoku kyanidu sodného po dobu 1,5 hodiny. Dinitril byl zfiltrován, promyt vodou a vysušen, čímž byl získán světle hnědý prášek. Využitím Rosemund-von Braunovi reakce bylo docíleno úžasných výtěžků, a to až 99% ¹¹.

4.1.2.2. Kyanace kyanidem zinečnatým

Tato kyanace probíhá z přítomnosti $\text{Zn}(\text{CN})_2$ a $\text{Pd}(\text{PPh}_3)_4$ v mikrovlnném reaktoru (Schéma 2.). Silnostěnná uzavíratelná zkumavka byla naplněna arylem s bromidovou funkční skupinou, $\text{Pd}(\text{PPh}_3)_4$ a dichlormethanem. Reakční směs byla prosycena dusíkem, uzavřena s míchadlem, důkladně promíchána a vložena do mikrovlnného reaktoru. Zde byla vystavena ozařováním mikrovlnného reaktoru po dobu 2 minut při laboratorní teplotě a 60 W. Poté byla směs zředěna ethyl-acetátem a promyta vodou. Organická fáze byla vysušena a rozpouštědlo odstraněno za níženého tlaku. Surový produkt byl čištěn sloupcovou chromatografií, čímž byl získán čistý nitril v teoretickém výtěžku 90 %¹².

4.1.3. Kyanace hexakynoželeznanem draselným

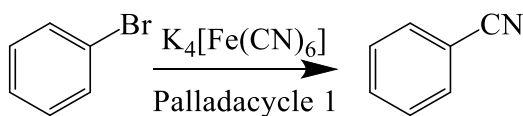
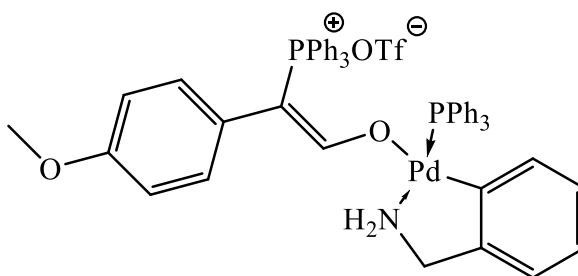


Schéma 3. Kyanace hexakynoželeznanem draselným

Z důvodu toxicity kyanových sloučenin je v této reakci využít málo toxický hexakynoželeznan draselný, spolu se sloučeninou obsahující paladium v mikrovlnném reaktoru. Do uzavíratelné zkumavky byl navážen brombenzen, $K_4[Fe(CN)_6]$, Palladacycle 1¹³ (Obr. 4.), K_2CO_3 a DMF. Takto připravená reakční směs byla umístěna do mikrovlnného reaktoru a za stálého míchání zahřívána 2 minuty při 130 °C a 600 W. Po ukončení reakce byla směs zředěna etherem a vodou, organická vrstva několikrát promyta vodným roztokem chloridu sodného, vysušena bezvodým síranem hořečnatým, zfiltrována a odpařena ve vakuu. Tak byl získán surový produkt, který byl následně čištěn rekrystalizací z ethanolu a vody. Tak byl získán kyanobenzen v teoretickém výtěžku až 95 %¹⁴ (Schéma 3.).



Obr. 4. Schéma Palladacycle 1

4.1.4. Aminace bromderivátů benzenu

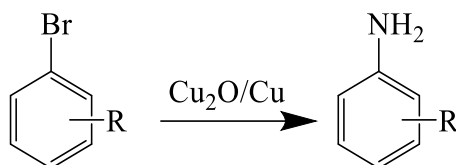


Schéma 4. Aminace bromderivátů benzenu

4.1.4.1. Aminace pomocí Cu₂O

U těchto aminací jsou velice výhodné reakční podmínky, neboť není zapotřebí použití drahých katalyzátorů a ligandů, bezvodých rozpouštědel či inertní atmosféry (Schéma 4.). Směs bromderivátu benzenu, oxidu měďného, amoniaku a vodného NMP byla zahřívána v uzavřené nádobě při 80 °C 15-24 hodin. Po vyextrahování se pohybovaly teoretické výtěžky, s ohledem na použitý derivát benzenu, od 80 do 99 %¹⁵.

4.1.4.2. Aminace pomocí práškové mědi

Stejně tak, jako u předchozí aminace, i zde je výhoda nenáročných reakčních podmínek (Schéma 4.). Brombenzen, vodný či bezvodý amoniak a prášková měď byly smíchány v uzavíratelné zkumavce a ta byla zahřívána, za stálého míchání, 24 hodin při 100 °C v olejové lázni. Po vychladnutí byla reakční směs zředěna ethyl-acetátem, převedena do vody a několikrát vytřepávána ethyl-acetátem. Spojené organické fáze byly posléze vysušeny bezvodým síranem sodným a rozpouštědlo bylo odpařeno za sníženého tlaku, čímž byl získán surový produkt, který byl čištěn sloupcovou chromatografií. Tak byl získán čistý produkt (výtěžek 85 %)¹⁶.

4.2. Možné postupy při alkylnaci karbazolu v poloze 9

Jak již bylo zmíněno v úvodu, aby se mohla molekula MGB selektivně vázat na specifické sekvence DNA, je výhodné, aby obsahoval spojovací řetězec zakončený azidovou skupinou, který se napojí na oligonukleotidovou sondu. Níže jsou uvedené některé reakce, které posloužily jako předloha v syntéze spojovacího řetězce v experimentální části.

4.2.1. Příprava azidoalkanu

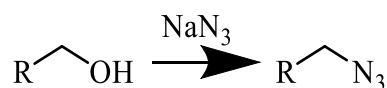


Schéma 5. Příprava azidoalkanu

Při této reakci dochází k výměně hydroxylové skupiny za azidovou (Schéma 5.). Hydroxyderivát byl rozpuštěn v dichlormethanu, za stálého míchání byl přidán thionyl dichlorid a celá směs byla míchána 1 hodinu při 0 °C. Poté bylo rozpouštědlo odstraněno za sníženého tlaku, vzniklý zbytek byl rozpuštěn v DMF, přidán azid sodný a takto vytvořená reakční směs byla zahřívána 1 hodinu při 50 °C. Následně byla směs zchlazena na laboratorní teplotu, zředěna vodou a vytřepávána do ethyl-acetátu. Spojené organické fáze byly promyty slanou vodou, vysušeny síranem hořečnatým a odpařeny ve vakuu. Přečištěný zbytek chromatograficky na silikagelu byl získán ve formě žluté pevné látky v 97 % teoretického výtěžku¹⁷.

4.2.2. Alkylnace dusíkaté skupiny karbazolu

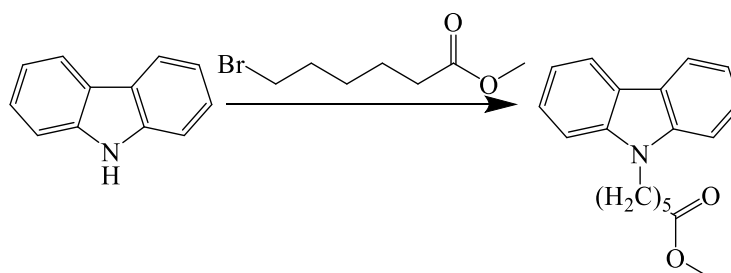


Schéma 6. Alkylnace dusíkaté skupiny karbazolu

Jedna z možností alkylace aromatického dusíku je pomocí methyl-6-bromhexanoátu (Schéma 6.). Karbazol, hydrid sodný a DMF byly míchány 30 min v argonové atmosféře. Poté byl ke směsi přidán jodid draselný a methylester kyseliny 6-bromhexanové a vše bylo zahříváno 2 hodiny při 80 °C. Reakce byla následně ukončena přidáním vody. Poté byla směs vytřepávána s ethyl-acetátem, organické frakce byly posléze promyty slanou vodou, vysušeny bezvodým síranem sodným a vakuově odpařeny. Pomocí chromatografie byl surový produkt přečištěn a tím získán čistý methyl-6-(9*H*-karbazol-9yl)hexanoát (73 %) ¹⁸.

4.2.3. Alkylace hydroxyskupiny

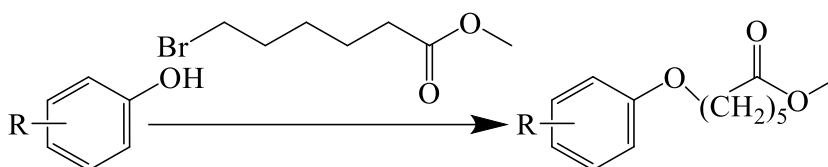


Schéma 7. Alkylace hydroxyskupiny

Podobným postupem, jako u předchozí reakce, lze alkylovat též hydroxyskupinu na benzenovém jádře (Schéma 7.). Suspenze hydridu sodného v bezvodém DMF byla probublána argonem a za stálého míchání byl po kapkách přidán roztok derivátu fenolu v bezvodém DMF. Takto vytvořená směs byla míchána 30 min a poté byl přidán methyl-6-bromhexanoát a celá reakční směs byla za stálého míchání zahřívána při 40 °C přes noc. Druhého dne byl k roztoku přidán dichlormethan a směs byla vytřepávána třikrát se slanou vodou. Organická fáze byla vysušena síranem hořečnatým, zahuštěna, sloupcovou chromatografií přečištěna a následně rekrystalizována z *n*-hexanu za účelem odstranění zbytkových stop methyl-6-bromhexanoátu. Čistý produkt byl izolován ve formě bílého krystalického prášku v teoretickém výtěžku 90 % ¹⁹.

4.2.4. Amidace karboxylové skupiny I.

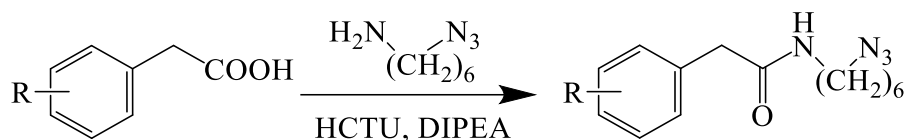


Schéma 8. Amidace karboxylové skupiny za využití HCTU a DIPEA

Jedná se o amidaci 6-azidohexanaminem, při které dochází reakci karboxylové skupiny s aminem a se zachováním azidové skupiny (Schéma 8.). Substituovaná karboxylová skupina byla několikrát odpařena s toluenem a následně rozpuštěna v dichlormethanu, spolu s DIPEA a HCTU. Po přidání 6-azidohexanaminu byla celá reakční směs míchána 3 hodiny při laboratorní teplotě, poté bylo odstraněno rozpouštědlo za sníženého tlaku. Výsledný zbytek byl vytřepáván mezi ethyl-acetátem a nasyceným roztokem hydrogenuhličitanu sodného. Organická fáze byla promyta zchlazeným roztokem kyseliny chlorovodíkové, slanou vodou a poté vysušena síranem hořečnatým a zbylé rozpouštědlo odpařeno za sníženého tlaku. Za použití sloupcové chromatografie byl získán produkt (výtěžek 98 %) ²⁰.

4.2.5. Amidace karboxylové skupiny II.

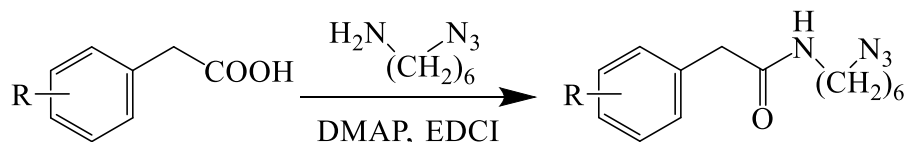


Schéma 9. Amidace karboxylové skupiny za využití DMAP a EDCI

Podobným postupem, jako u předchozí reakce, ale za jiných podmínek, lze též získat substituovaný amid zakončený azidovou skupinou (Schéma 9.). K suspenzi substituované karboxylové kyseliny a DCM byl přidán 6-azidohexanamin, DMF a DMAP a za stálého míchání i EDCI. Celá reakční směs byla míchána 12 hodin při laboratorní teplotě a poté zahřívána k varu, pod zpětným chladičem, dalších 6 hodin. Obsah byl promyt vodou, vysušen síranem hořečnatým, zfiltrován a zakonzentrován za sníženého tlaku. Surový produkt byl přečištěn sloupcovou chromatografií a vysrážen z chloroformu, čímž byl získán bledě žlutý prášek ve výtěžku 97 % ²¹.

4.3. Možné postupy při zavádění objemných bazických skupin

V této části jsou uvedené reakce, jak lze zavést objemnou bazickou skupinu na aromatický kruh, a to přes bromderivát nebo uhlíkatý či dusíkatý spojovací můstek. Možností je nepřeberné množství; zde jsou uvedené postupy, které byly využity při syntéze derivátu karbazolu.

4.3.1. Kondenzace nitrobenzenu

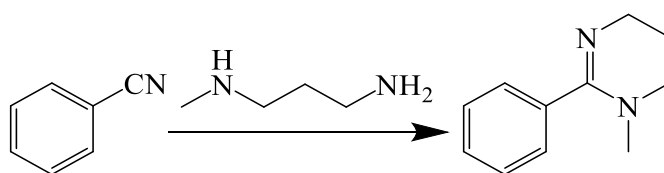


Schéma 10. Kondenzace nitrobenzenu

Jedna z možností, jak vytvořit objemné bazické centrum na aromatickém derivátu; a to využitím cyklizace a následné kondenzace *N*-methylpropan-1,3-diaminu za vzniku 1-methyl-2-phenyl-1,4,5,6-tetrahydropyrimidinu (Schéma 10). Směs benzonitrilu, *N*-MPDA a sulfidu fosforečného byla míchána a zahřívána v argonové atmosféře po dobu 4 hodin při 160 °C. Posléze směs byla okyselena zředěním vodným roztokem HCl na hodnotu pH 5. Roztok byl dvakrát promyt DCM a vodná fáze byla oddělena a odpařena do sucha. Takto získaný nahnědlý olej byl zředěn ethanolem a zahříván pod zpětným chladičem v přítomnosti uhlí 2 hodiny. Po filtraci a odpaření byl získán bezbarvý olejovitý produkt ve výtěžku 70 %²².

4.3.2. Aminace halogenbenzenu objemnou skupinou

Zde se nejedná o vytvoření aminoskupiny na benzenovém jádře, ale napojení objemné bazické skupiny obsahující aminoskupinu přes halogenderivát. Níže je popsána reakce na přípravu takové skupiny, dále pak samotná aminace s objemnou molekulou.

4.3.2.1. Cyklizace diaminu



Schéma 11. Cyklizace diaminu

Reakce popisuje cyklizaci diaminu s bromkyanem za vzniku hydrobromidu 1-methyl-4,5-dihydro-1*H*-imidazol-2-aminu (Schéma 11.). Roztok bromkyanu v methanolu byl po kapkách přidáván k chlazenému roztoku *N*-methylethyldiaminu v methanolu, a to za stálého míchání pod teplotou 20 °C. Po úplném přidání bromkyanu byla celá reakční směs zahřívána na teplotu varu, pod zpětným chladičem, 30 min. Následně po ochlazení na laboratorní teplotu byl roztok odpařen za sníženého tlaku. Tím byl získán kýžený produkt – výtěžek 85 %²³.

4.3.2.2. Buchwald–Hartwigova aminace

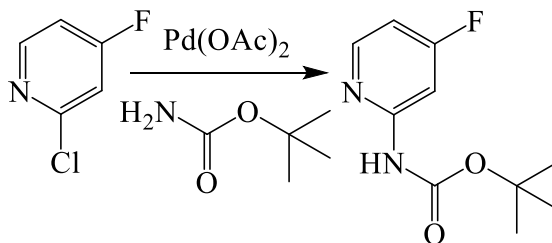


Schéma 12. Buchwald-Hartwigova aminace

Tato reakce probíhá za použití octanu paladnatého, který slouží jako přenašeč halogenerivátu, který se následně naváže, přes aminoskupinu karbamátu, na jinou strukturu (Schéma 12.). Octan paladnatý s xantphosem byly třikrát odplyněny argonem, ke směsi byl přidán 1,4-dioxan za stálého míchání, vše znovu odplyněno argonem a poté přidán roztok 2-chlor-4-fluorpyridinu, 1,4-dioxanu, terc-butylkarbamátu, hydroxydu sodného a vody. Výsledná reakční směs byla míchána při 100 °C 1,5 hodiny v argonové atmosféře. Poté byla směs ochlazená na laboratorní teplotu, zfiltrována přes fritu, fritu několikrát promyta 1,4-dioxanem a filtrát byl zbaven rozpouštědla za sníženého tlaku do sucha. Výsledná pevná látka byla překrystalizována z 2-propanolu, čímž byl získán produkt ve výtěžku 80 %²⁴.

4.3.3. Suzukiho kondenzace

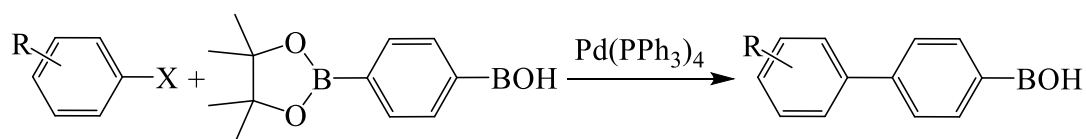


Schéma 13. Suzukiho kondenzace

Suzukiho kondenzace se využívá u těch reakcí, kdy je potřeba na halogenaryl navázat další aryl obsahující většinou bazickou skupinu (Schéma 13.). Byla vytvořena směs halogenarylu, tetrakis(trifenylfosfin)paladia, uhličitanu alkalického kovu, polárního rozpouštědla a pinacol esteru obsahující bazickou skupinu na benzenovém jádře. Směs byla zahřívána na teplotu varu příslušného rozpouštědla, za stálého míchání, pod zpětným chladičem s využitím argonové atmosféry nebo vzduchu (bezvodé/vodné prostředí) několik hodin (popřípadě až 24 hodin). Po ukončení reakce byla přidána voda (jedná-li se o vodné prostředí) a roztok byl vytřepáván spolu s chloroformem, organická fáze vysušena síranem hořečnatým, zfiltrována a vakuově odpařena. Dále byl surový produkt přečištěn sloupcovou chromatografií. Suzukiho kondenzace zpravidla probíhají ve výtěžcích 50 – 95 %; záleží na složitosti vstupných substituentů^{25,26}.

4.3.4. Amidace aminoarylu chráněnou aminokyselinou

Na dvou reakcích je ukázána amidace aminoskupiny stejnou chráněnou aminokyselinou.

4.3.4.1. Amidace I.

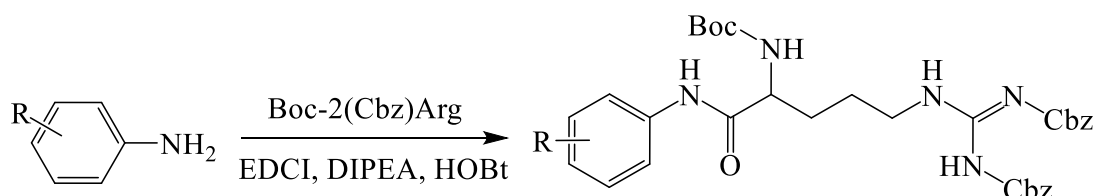


Schéma 14. Amidace I.

Aminoaryl byl rozpuštěn v bezvodém THF v argonové atmosféře a za stálého míchání přidán EDCI, Boc-2(Cbz)Arg, DIPEA a HOBt (Schéma 14.). Směs byla míchána 12 hodin při laboratorní teplotě. Následně bylo rozpouštědlo odpařeno za sníženého tlaku, produkt byl znovu rozpuštěn v dichlormethanu a vytřepáván postupně s chloridem amonným, hydrogenuhličitanem sodným a chloridem sodným. Spojené organické fáze byly vysušeny síranem hořečnatým, zfiltrány, odpařeny ve vakuu a flash chromatograficky přečištěny, čímž byl získán adekvátní produkt, a to ve výtěžku v rozmezí 41 až 86 %²⁷.

4.3.4.2. Amidace II.

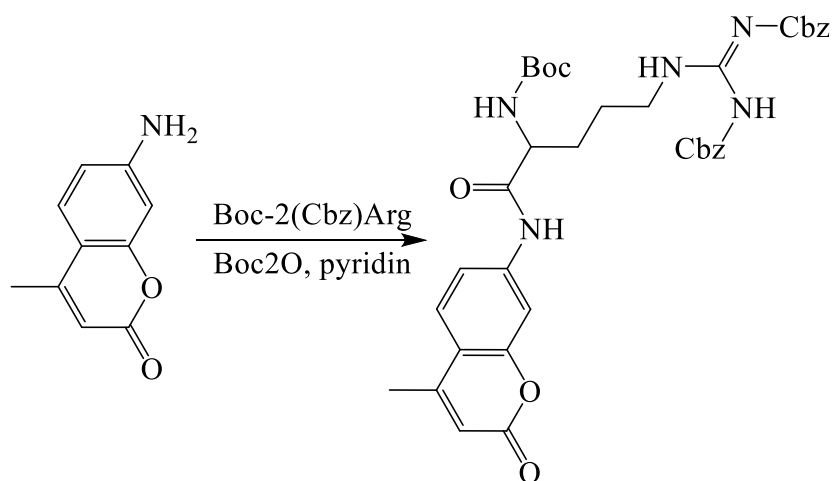


Schéma 15. Amidace II.

Roztok Boc-2(Cbz)Arg v bezvodém THF byl po kapkách přidáván, za stálého míchání, do bezvodého pyridinu, a poté hned i Boc₂O. Roztok byl míchán 1 hodinu při 25 °C, aby se vytvořil aktivovaný ester a pak byl přidán roztok 7-amino-4-methylkumarinu v THF a celá směs byla míchána dalších 16 hodin. Následně byl roztok zředěn ethyl-acetátem a promyt nasyceným roztokem hydrogenuhličitanu sodného, jedno molárním roztokem kyseliny chlorovodíkové a slanou vodou. Organická fáze byla vysušena bezvodým síranem sodným, zfiltrována a rozpouštědlo odstraněno na vakuové odparce. Surový produkt byl přečištěn flash chromatografií na silikagelu, čímž byl získán čistý produkt ve výtěžku 76 %²⁸.

5. CÍL PRÁCE

Cílem mé diplomové práce byla syntéza takových derivátů karbazolu, které by byly schopny vázat se do malého žlábků dvoušroubovice DNA a zde nekovalentní vazbou zvýšit stabilitu/pevnost vodíkových vazeb mezi bázemi nukleových kyselin - zvýšení teploty tání. Zároveň měly cílové sloučeniny nést azidoskupinu, která umožňuje efektivní konjugaci na řetězec syntetických oligonukleotidů. Tato konjugace by přispěla k zlepšení a zpřesnění diagnostických metod, které se využívají při detekci cílových sekvencí DNA a mutagenů a následné využití v praxi.

6. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

Všechna použitá organická rozpouštědla byla objednána od certifikovaných dodavatelů (Sigma-Aldrich, Acros, Merck), byla v analytické kvalitě a v reakcích využita v původním stavu.

Průběh reakcí, čistota produktů a meziproduktů byla vyhodnocována za pomoci tenkovrstvé chromatografie na deskách Merck Silikagel 60 F₂₅₄. Pro detekci bylo využito světlo vlnové délky 254 nm a 366 nm. Mobilní fáze jsou uvedeny u každé reakce.

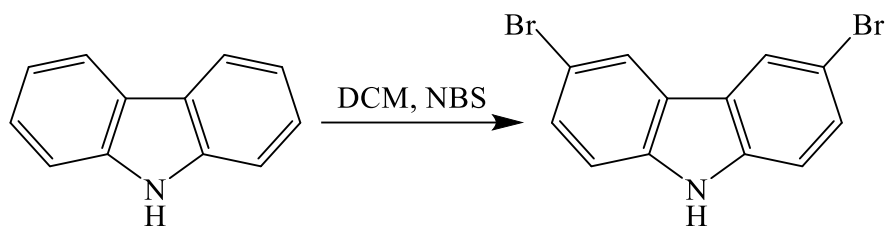
Většina meziproduktů a surových produktů byla čištěna sloupcovou chromatografií za pomoci silikagelu Merck Kieselgel 60 (0,040-0,063 mm).

Některé reakce probíhaly za pomoci mikrovlnného záření. Byl využit mikrovlnný reaktor CEM Discover s autosamplerem Explorer 24 (Matthews, North Carolin, USA).

Na KAOCH FaF UK v Hradci Králové byla měřena infračervená spektra IR spektrofotometrem Nicolet 6700 (v ATR módu). Jednotky jsou uvedeny v cm⁻¹.

Na KAOCH FaF UK v Hradci Králové byla měřena NMR spektra na přístroji VARIAN MERCURY VxBB 300. Měření bylo prováděno při frekvencích 300,07 MHz a 499,86 MHz (¹H NMR) a 75,46 MHz a 125,70 MHz (¹³C NMR).

6.1. Syntéza 3,6-dibrom-9H-karbazolu (MGB 34)



840 mg karbazolu (5 mmol) bylo převedeno do Erlenmeyerovy baňky a rozpuštěno ve 100 ml dichlormethanu,. Směs byla míchána při laboratorní teplotě 30 min. V dělicí nálevce byla připravena směs 1960 mg (11 mmol) N-bromsukcinimidu se 100 ml dichlormethanu a postupně přikapávána k roztoku karbazolu. Takto vytvořená reakční směs se nechala míchat po dobu 4 hodin, za laboratorní teploty, kryta alobalem, aby nedošlo k oxidaci světlem. Již po 1. hodině se začal tvořit produkt, který byl detekován tenkovrstvou chromatografií (TLC) v mobilní fázi směsi benzín/ethyl-acetát v poměru 4:1. Roztok byl míchán 4 hodiny a poté byl převeden do dělicí nálevky a spolu se slanou vodou třikrát vytřepáván pro zbavení anorganických nečistot. Organická část byla vysušena síranem sodným, poté zfiltrována vakuovou filtrací přes fritu a nakonec na vakuové odparce zbavena rozpouštědla. Využitím sloupcové chromatografie (mobilní fáze benzín/ethyl-acetát 4:1) bylo získáno 1311 mg nažloutlé, krystalické látky, 3,6-dibrom-9H-karbazolu, což odpovídá 80 % teoretického výtěžku.

Produkt byl následně potvrzen NMR a IČ spektry:

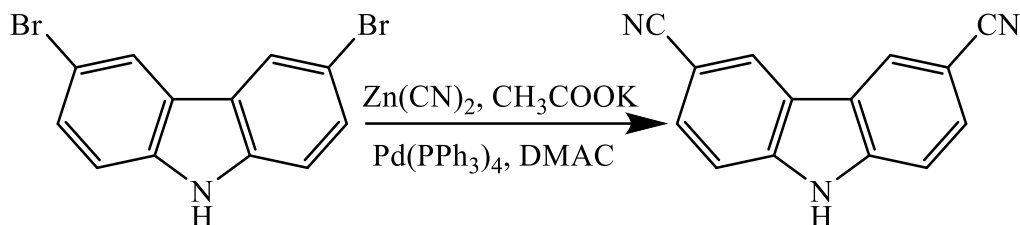
^{13}C NMR (75 MHz, DMSO) δ 138,97; 128,89; 123,55; 123,50; 113,37; 111,16 ppm.

^1H NMR (300 MHz, DMSO) δ 11,74 (s, 1H, NH); 8,55 (s, 2H, 2xArH); 7,63 (d, 2H, 2xArH); 7,57 (d, 2H, 2xArH) ppm.

IČ (ART) 3404 (NH arom) cm^{-1}

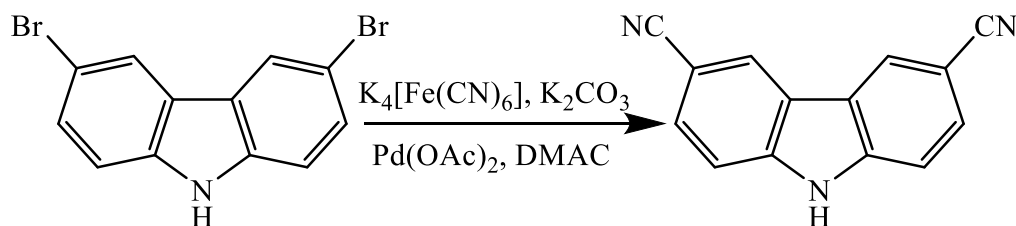
6.2. Syntéza 3,6-dikyano-9H-karbazolu (MGB 43)

6.2.1. Syntéza za pomoci $Zn(CN)_2$



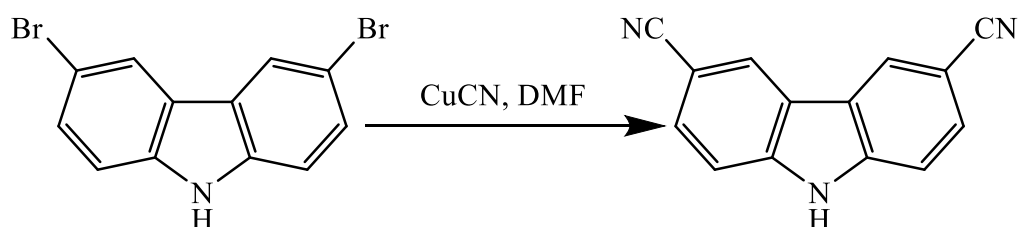
81 mg (0,250 mmol) látky MGB 34, 88 mg (0,750 mmol) $Zn(CN)_2$, 147 mg (1,500 mmol) octanu draselného, 29 mg (0,025 mmol) $Pd(PPh_3)_4$ a 4 ml $DMAC$ bylo převedeno do uzavíratelné zkumavky spolu s míchadlem a zahříváno v mikrovlnném reaktoru 5 hodin při teplotě 170 °C. Po proběhnutí reakce byla provedena tenkovrstvá chromatografie, která potvrdila vznik možného produktu. Poté byla směs zředěna destilovanou vodou, přefiltrována a organická část na filtračním papíře ještě několikrát promyta vodou. Po vyschnutí byla převedena acetonem do baňky, vysušena bezvodým síranem sodným, zfiltrována a na vakuové odparce zbavena acetonu. Následně byla směs přečištěna sloupcovou chromatografií mobilní fází benzín/ethyl-acetát (4:1). Takto bylo získáno 11 mg světle hnědé látky, avšak dle NMR spekter nebyla struktura MGB 43 potvrzena.

6.2.2. Syntéza za pomoci $K_4[Fe(CN)_6]$



81 mg (0,250 mmol) MGB 34, 46 mg (0,125 mmol) $K_4[Fe(CN)_6]$, 69 mg (0,500 mmol) K_2CO_3 a katalytické množství $Pd(OAc)_2$ bylo naváženo do uzavíratelné zkumavky spolu s 4 ml DMAC a v mikrovlnném reaktoru, za stálého míchání, zahříváno 30 min při 170 °C. Posléze byla provedena kontrola pomocí TLC (benzín/ethyl-acetát v poměru 4:1), avšak vznik produktu nebyl detekován. Zkumavka byla proto opětovně vložena do reaktoru a při stejných podmínkách zahřívána dalších 5 hodin. Ani po této uplynulé doby nebyla patrná změna na TLC desce.

6.2.3. Syntéza za pomoci CuCN



325 mg (1,000 mmol) MGB 34 a 299 mg (3,340 mmol) CuCN bylo rozpuštěno v 4 ml bezvodého DMF a takto vytvořená reakční směs byla zahřívána při 150 °C, za stálého míchání, pod zpětným chladičem a v argonové atmosféře, po dobu 24 hodin. Po vymizení skvrny výchozí látky (detekce pomocí TLC) byla vodou vysrážena organická část, přefiltrována a několikrát propláchnuta vodou. Sraženina byla vymyta z filtru acetonem, ke vzniklému nazelenalému roztoku byl přidán ethylendiamin na komplexování mědi, promícháváno 30 minut, následně zředěno vodou, přefiltrováno a vzniklá organická frakce ještě několikrát propláchnuta slanou vodou kvůli odstranění zbytků solí mědi. Organická pevná látka byla poté rozpuštěna v DMF, roztok vysušen bezvodým Na_2SO_4 , vakuově zfiltrován přes fritu a rozpouštědlo odpařeno na vakuové odparce. Nakonec byl produkt přečištěn sloupcovou chromatografií na silikagelu mobilní fází benzín/ethyl-acetát (2:1) – tím bylo získáno 57 mg světle hnědé, sypké látky MGB 43, což odpovídá výtěžku 26 %.

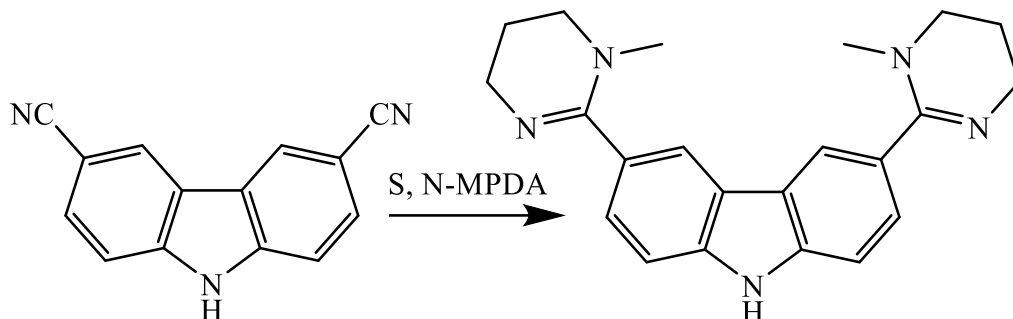
Produkt byl potvrzen následujícími spektry:

^{13}C NMR (75 MHz, DMSO) δ 142,51; 130,12; 126,59; 122,03; 120,29; 113,04; 101,91 ppm.

^1H NMR (300 MHz, DMSO) δ 12,39 (s, 1H, NH); 8,81 (s, 2H, 2xArH); 7,85 (d, 2H, 2xArH), 7,76 (d, 2H, 2xArH) ppm.

IČ (ATR) 3295 (NH arom); 2223 (CN) cm^{-1}

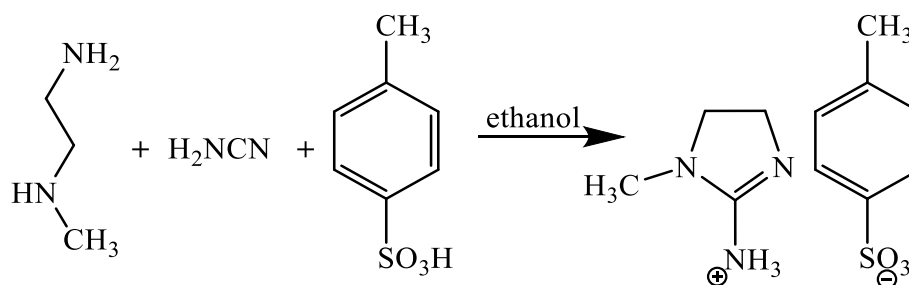
6.3. Syntéza 3,6-bis(1-methyl-1,4,5,6-tetrahydropyrimidin-2-yl)-9H-karbazolu (MGB 51)



283 mg (1,304 mmol) MGB 43, 20 mg síry a 4 ml *N*-methylpropan-1,3-diaminu bylo naváženo do uzavíratelné zkumavky spolu s míchadlem a vše bylo umístěno do mikrovlnného reaktoru, kde se směs postupně zahřívala 25 minut, až do teploty 270 °C při 250 W. Bohužel během zahřívání došlo k expanzi vznikajících plynů (H₂S a NH₃) a tím k úniku části reakční směsi, což vedlo ke ztrátám – bylo provedeno TLC se zbývajícím produktem, které potvrdilo přítomnost nové látky. Produkt byl čištěn sloupcovou chromatografií za využití gradientu v následujícím pořadí: 1. chloroform/ethyl-acetát (1:1) – tím bylo docíleno vyplavení všech nebazických nečistot; 2. chloroform/ethyl-acetát/TEA (5:5:1); 3. methanol/TEA (5:2). Byla získána žlutá prachovitá látka v množství 58 mg (výtěžnost 12 %); avšak produkt byl velmi nestálý (pravděpodobně podléhající vzdušné vlhkosti) a během několika hodin se přeměnil na kapalnou substanci – dle TLC kontrole bylo zjištěno, že produkt se rozložil.

6.4. Syntéza N^3,N^6 -bis(1-methyl-4,5-dihydro-1*H*-imidazol-2-yl)-9*H*-karbazol-3,6-diaminu (MGB 71)

6.4.1. Příprava 1-methyl-4,5-dihydro-1*H*-imidazol-2-aminia *p*-toluensulfonátu (MGB 62)

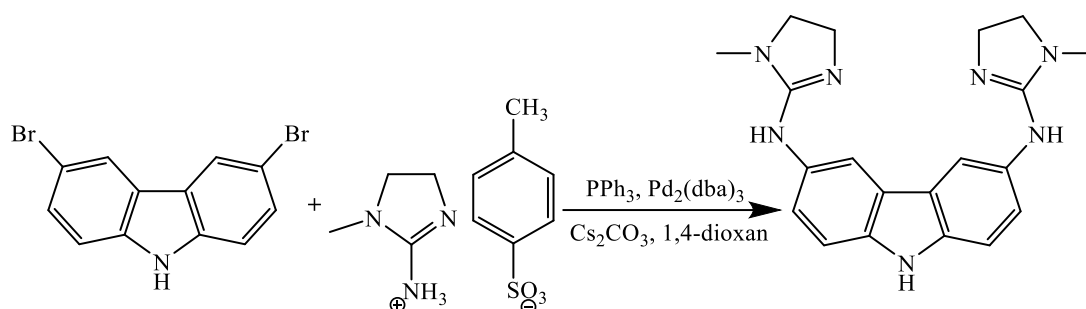


3 ml (34,404 mmol) bezvodého *N*-methylethylendiaminu, 2891 mg (68,808 mmol) kyanamidu a 6474 mg (37,596 mmol) *p*-toluensulfonové kyseliny bylo naváženo do baňky spolu s 30 ml bezvodého ethanolu a za stálého míchání byla směs zahřívána k varu 15 min při 80 °C pod zpětným chladičem. Poté byla směs přefiltrována přes filtrační papír a pevná část ještě několikrát promyta ethanolem. Po vychladnutí bylo provedeno přečištění rekrystalizací z ethanolu – tím bylo získáno 4664 mg bílé krystalické látky (MGB 62), což odpovídá výtěžku reakce 48 %. Produkt byl následně potvrzen pomocí spektrálních metod:

¹³C NMR (75 MHz, DMSO) δ 159,16; 158,12; 145,44; 138,13; 128,38; 125,66; 49,73; 31,52; 20,99 ppm.

¹H NMR (300 MHz, DMSO) δ 7,49 (d, 2H, 2xArH); 7,12 (d, 2H, 2xArH); 6,99 (s, 3H, NH₃⁺); 3,57 (t, 2H, CH₂); 3,48 (t, 2H, CH₂); 2,86 (s, 3H, CH₃); 2,29 (s, 3H, CH₃ arom) ppm.

6.4.2. Syntéza MGB 71



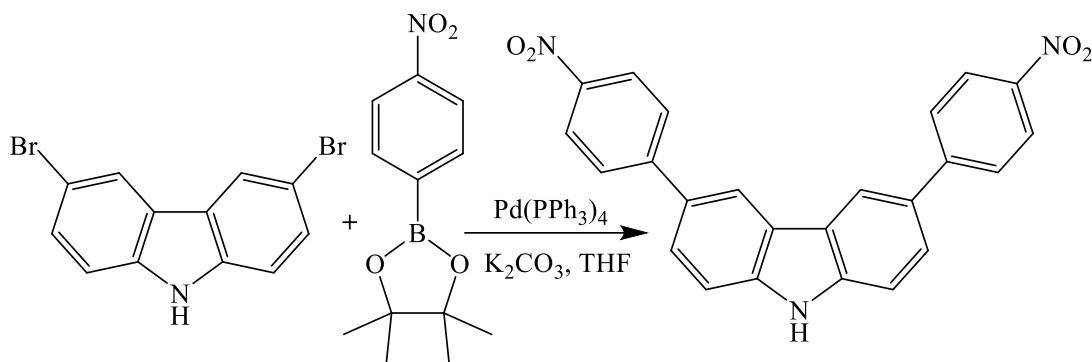
65 mg (0,200 mmol) MGB 34, 140 mg (0,515 mmol) MGB 62, 420 mg (1,292 mmol) Cs_2CO_3 , 35 mg (0,038 mmol) $\text{Pd}_2(\text{dba})_3$ a 11 mg (0,043 mmol) PPh_3 bylo naváženo do uzavíratelné zkumavky spolu s 3 ml 1,4-dioxanu, včetně míchadla, a zkumavka vložena do mikrovlnného reaktoru. Zde byla směs, za stálého míchání, zahřívána po dobu 2 hodin, při 120 °C a 150 W. Po vyjmutí z reaktoru TLC (benzín/ethyl-acetát - 4:1) prokázala stálou přítomnost MGB 34, proto vše bylo znovu vloženo do reaktoru a zahříváno při stejných podmínkách ještě další 3 hodiny. Poté byla provedena další TLC, které indikovalo již jen malé množství výchozí látky (MGB 34) a vznik možného produktu. Směs byla převedena do ethyl-acetátu, několik minut míchána a poté zfiltrována přes fritu. Poté byl filtrát několikrát vytřepán se slanou vodou, organická část vysušena bezvodým síranem sodným, přefiltrována přes fritu za sníženého tlaku a na vakuové odparce zahuštěna. Následně byla hledána mobilní fáze (za pomoci TLC), která by byla vhodná k izolování MGB 71 sloupcovou chromatografií (Tab. 1).

Tab. 1 Hledání optimální mobilní fáze pro vyextrahování MGB 71

Rozpouštědla	Poměr	Výsledek
aceton	1	negativní
aceton/TEA	10:1	negativní
aceton/TEA	10:0,5	negativní
methanol	1	negativní
methanol/TEA	10:1	negativní
methanol/TEA	10:0,5	negativní
methanol/TEA	10:0,2	negativní
methanol/TEA	10:0,1	negativní
methanol/TEA	10:0,05	negativní

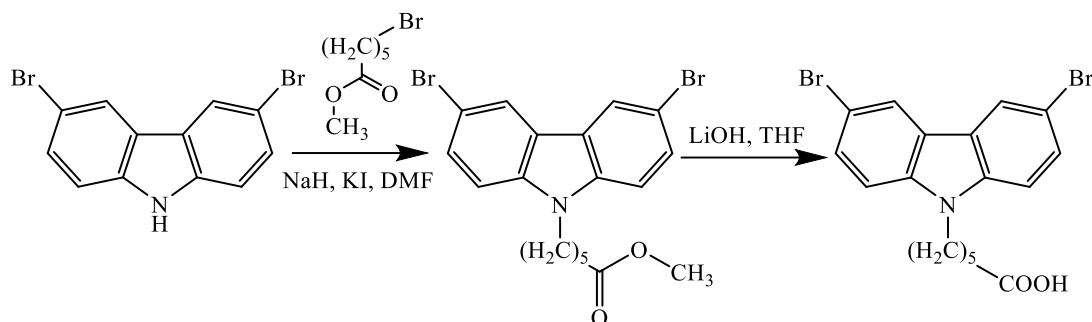
Bohužel nebyla nalezena taková mobilní fáze, která by dokázala oddělit MGB 71 od nečistot.

6.5. Syntéza 3,6-bis(4-nitrofenyl)-9H-karbazolu (MGB 89)



325 mg (1,000 mmol) MGB 34, 624 mg (2,500 mmol) 4-(4,4,5,5,-tetramethyl-1,2,3-dioxaborolan-2-yl)nitrobenzen, 115 mg (0,100 mmol) Pd(PPh₃)₄ a 415 mg (3,000 mmol) uhličitanu draselného bylo rozpuštěno v 10 ml bezvodého tetrahydrofuranu a zahříváno za stálého míchání 24 hodin při 70 °C pod zpětným chladičem v argonové atmosféře. Po 1 hodině byla provedena TLC (benzín/ethyl-acetát – 4:1), která prokazovala vznik možného produktu. Po 24 hodinách po opětovné kontrole TLC (nebyla pozorována změna s TLC po 1 hodině) byla směs pročištěna sloupcovou chromatografií za využití gradientové mobilní fáze v tomto pořadí: 1. benzín/ethyl-acetát (4:1), 2. toluen/CHF (2:1), 3. čistý chloroform, 4. ke konečnému vyextrahování produktu THF/CHF (10:1). Tak bylo získáno 110 mg sytě oranžové látky, což odpovídá 27 % teoretického výtěžku. Dle NMR spekter nebyla potvrzena struktura MGB 89.

6.6. Syntéza 6-(3,6-dibrom-9*H*-karbazol-9-yl)hexanové kyseliny (MGB 77)



442 mg (1,361 mmol) 3,6-dibrom-9*H*-karbazolu a 63 mg (1,633 mmol) hydridu sodného bylo suspendováno ve 20 ml dichlormethanu a tato směs byla míchána 30 minut při laboratorní teplotě. Poté bylo k roztoku přidáno 340 mg (1,633 mmol) methylesteru kyseliny 6-bromhexanové a nepatrné množství jodidu draselného a takto vytvořená reakční směs byla pod zpětným chladičem, opatřeným sušicí rourkou, při teplotě 80 °C míchána 4 hodiny. Po vychladnutí byl roztok zředěn destilovanou vodou, převeden do dělicí nálevky a vytřepáván s ethyl-acetátem. Organická frakce byla vysušena bezvodým síranem sodným, vakuově přefiltrována přes fritu a pomocí vakuové odparky zbavena zbylých rozpouštědel.

Takto připravený meziprodukt (s organickými nečistotami) byl rozpuštěn v 10 ml tetrahydrofuranu a míchán 15 minut. Mezitím byl připraven 0,5 M roztok hydroxidu lithného ve směsi voda/ethanol v poměru 1:9. Ten, v množství 5 ml, byl přidán do organického roztoku a míchán minimálně 12 hodin. Poté byla do roztoku přidána destilovaná voda pro rozpuštění anorganických nečistot a trocha kyseliny chlorovodíkové k navázání zbylého lithia. Směs byla přefiltrována - organická část byla na filtračním papíře několikrát propláchnuta vodou, dále převedena ethyl-acetátem do baňky, vysušena bezvodým Na₂SO₄, zfiltrovaná za sníženého tlaku přes fritu a vakuovou odparkou zbavena zbylých rozpouštědel. S využitím sloupcové chromatografie byl získán kýžený produkt 6-(3,6-dibrom-9*H*-karbazol-9-yl)hexanové kyseliny (MGB 77) v celkovém množství 497 mg (výtěžnost reakce 93 %). Jednalo se o bílou, krystalickou látku.

Během tohoto reakčního kroku byla využita TLC pro potvrzení vzniku produktu a nalezení ideální mobilní fáze pro oddělení jednotlivých složek organické směsi. Vzhledem k tomu bylo přistoupeno k využití elučního gradientu ve sloupcové chromatografii. Nejprve se použila mobilní fáze benzín/ethyl-acetát v poměru 4:1 pro odstranění výchozí látky a meziprojektu a následné směs benzín/ethyl-acetát/AcOH v poměru 9:1:0,5.

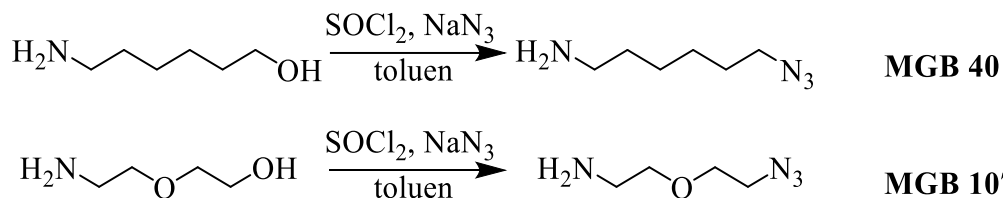
Struktura MGB 77 byla potvrzena NMR a IČ spektry:

^{13}C NMR (75 MHz, DMSO) δ 174,48; 139,20; 128,97; 123,58; 123,07; 111,80; 111,40; 42,59; 33,70; 28,36; 26,17; 24,38 ppm.

^1H NMR (300 MHz, DMSO) δ 11,96 (s, 1H, COOH); 8,46 (s, 2H, 2xArH); 7,62 (d, 2H, 2xArH); 7,57 (d, 2H, 2xArH); 4,36 (t, 2H, CH_2^6); 2,14 (t, 2H, CH_2^2); 1,71 (m, 2H, CH_2^5); 1,47 (m, 2H, CH_2^3); 1,27 (m, 2H, CH_2^4) ppm.

IČ (ATR) 3360 (OH karboxy); 2931, 2858 (alif); 1697 (CO) cm^{-1}

6.7. Příprava 6-azidoheptylamínu (MGB 40) a 2-(2-azidoethoxy)ethan-1-aminu (MGB 107)



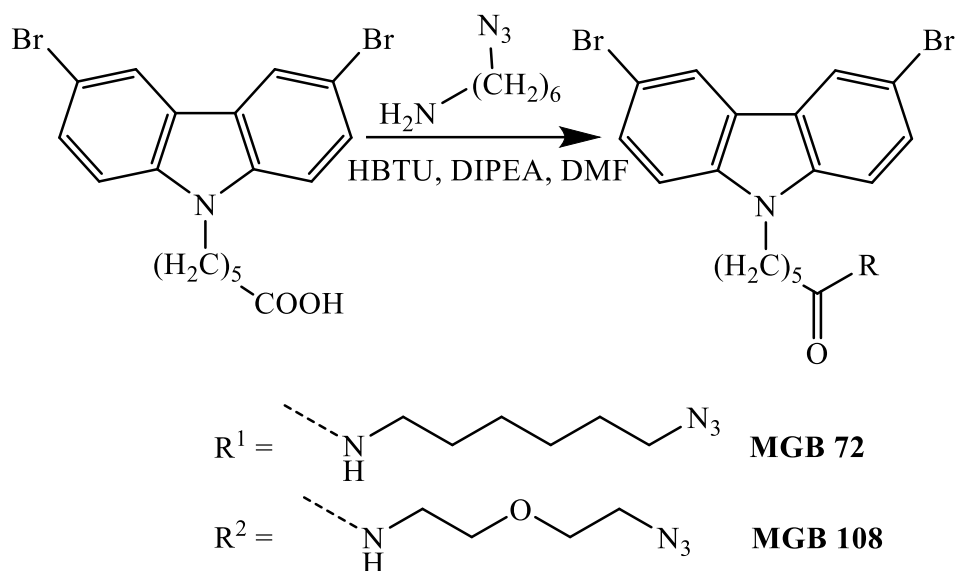
1170 mg (10,000 mmol) 6-aminoheptanolu bylo rozpuštěno v 15 ml bezvodého toluenu a přidáno 3,28 ml (45,000 mmol) dichloridu thionylu a celá směs byla za stálého míchání zahřívána k varu 1 hodinu pod zpětným chladičem zakončeným sušicí rourkou. Po vychladnutí byl roztok za vakua zbaven rozpouštědla – zbyl žlutohnědý olej, ke kterému byl přidán vodný roztok 1950 mg (30,000 mmol) azidu sodného a vše bylo zahříváno při 90 °C, za stálého míchání a pod zpětným chladičem, 3 hodiny. Po vychladnutí byla reakční směs zředěna destilovanou vodou, zalkalizována hydroxidem draselným a poté organická složka vytřepána do DCM. Následně byla vysušena bezvodým Na₂SO₄, zfiltrována přes fritu a DCM odpařen na vakuové odparce. Tak bylo získáno 921 mg hnědého oleje (MGB 40) – výtěžek 65 %.

Tato molekula byla využita při syntéze MGB 72.

Stejnou metodou byla syntetizována molekula MGB 107: 5000 mg (49,583 mmol) 2-(2-aminoethoxy)ethan-1-olu, 12,8 ml (175,652 mmol) SOCl₂, 7352 mg (113,108 mmol) NaN₃ a 30 ml bezvodého toluenu. Bylo získáno 3528 mg (výtěžek 57 %) hnědého oleje.

IČ (ATR) 2867 (alif); 2108 (N₃) cm⁻¹

6.8. Syntéza derivátů kyseliny 3,6-dibrom-9H-karbazol-9-ylhexanové



485 mg (1,105 mmol) MGB 77 bylo spolu s 517 mg (1,326 mmol) HBTU rozpuštěno v 20 ml bezvodého DMF. Po úplném rozpuštění a za stálého míchání bylo přidáno 212 mg (1,326 mmol) 6-azidohexylaminu a 15 ml DIPEA a takto vytvořená reakční směs byla míchána po dobu 3-4 hodin za laboratorní teploty. Po potvrzení vzniku možného produktu na TLC byl roztok zbaven rozpouštědel ve vakuové odparce a následně byla vyextrahována konečná substance pomocí sloupcové chromatografie za použití mobilní fáze benzín/ethyl-acetát/AcOH, a to v poměru 6:3:1 – stejné směsi se použilo při detekci u tenkovrstvé chromatografie. Bylo získáno 498 mg žluté voskovité látky MGB 72, což činí 80 % výtěžku.

Posléze byla potvrzena následujícími NMR a IČ spektry:

^{13}C NMR (75MHz, CDCl_3) δ 172,54; 139,21; 129,02; 123,38; 123,22; 111,97; 110,35; 51,28; 43,03; 39,29; 36,34; 29,49; 28,68; 28,54; 26,73; 26,36; 26,31; 25,20 ppm.

^1H NMR (300MHz, CDCl_3) δ 8,16 (s, 2H, 2xArH); 7,56 (d, 2H, 2xArH); 7,24 (d, 2H, 2xArH); 5,33 (t, 1H, CONH); 4,23 (t, 2H, CH_2); 3,24-3,18 (m, 4H, 2x CH_2); 2,17 (t, 2H, CH_2); 1,85 (m, 2H, CH_2); 1,68-1,57 (m, 4H, 2x CH_2), 1,43-1,27 (m, 8H, 4x CH_2) ppm.

IČ (ATR) 3294 (NH amid); 3075, 2938, 2859 (alif); 2097 (N₃); 1734 (CO) cm⁻¹

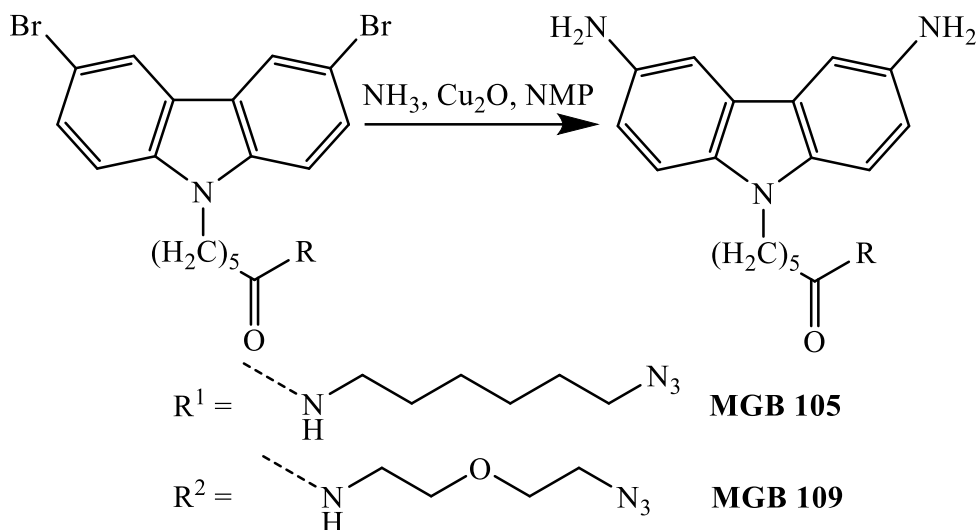
Stejnou reakční metodou byla syntetizována molekula MGB 108: 605 mg (1,378 mmol) MGB 77, 644 mg (1,654 mmol) HBTU, 20 ml bezvodého DMF, 264 mg (1,654 mmol) 6-azidohexylaminu a 15 ml DIPEA. Po přečištění sloupcovou chromatografií bylo získáno 583 mg (výtěžek 77 %) žluté voskovité látky (MGB 108).

Struktura MGB 108 byla potvrzena NMR spektry:

¹³C NMR (125 MHz, DMSO) δ 172,18; 139,28; 128,96; 123,59; 123,08; 111,82; 111,40; 69,10; 50,10; 42,61; 38,46; 38,41; 35,27; 28,36; 26,17; 25,06 ppm.

¹H NMR (500 MHz, DMSO) δ 8,43 (s, 2H, 2xArH); 7,75 (t, 1H, CONH); 7,58 (m, 4H, 4xArH); 4,36 (t, 2H, CH₂); 3,54 (t, 2H, CH₂); 3,35 (m, 4H, 2xCH₂); 3,14 (t, 2H, CH₂); 1,98 (t, 2H, CH₂); 1,70 (m, 2H, CH₂); 1,47 (m, 2H, CH₂); 1,22 (m, 2H, CH₂) ppm.

6.9. Syntéza derivátů kyseliny 3,6-diamino-9*H*-karbazol-9-ylhexanové



100 mg (0,178 mmol) MGB 72, 7 mg (0,049 mmol) oxidu měďného, 0,35 ml amoniaku a 2 ml bezvodého NMP bylo převedeno do uzavíratelné zkumavky spolu s míchadlem a celá takto připravená reakční směs byla vložena do mikrovlnného reaktoru. Zde byla za stálého míchání zahřívána, při 125 °C a 150 W, po dobu 18 hodin. Pomocí TLC (mobilní fáze viz níže) byla potvrzena přítomnost vzniku produktu – směs byla převedena do dělicí nálevky a zde vytřepána mezi vodou a ethyl-acetátem. Organická frakce byla vysušena bezvodým síranem sodným, vakuově zfiltrována přes fritu, vakuovou odparkou zbavena rozpouštědel a sloupcovou chromatografií přečištěna mobilní fází chloroform/methanol v poměru 20:1. Získaný produkt, hnědý olej, byl vyextrahován v množství 18 mg (výtěžek 26 %).

Dle NMR nebyla potvrzena struktura MGB 105, neboť produkt stále obsahoval nečistoty a jeho celkové množství bylo nedostačující pro opětovné pročištění.

Stejnou reakční metodou byla syntetizována molekula MGB 109 s následujícími vstupními substancemi: 500 mg (0,911 mmol) MGB 108, 35 mg (0,245 mmol) Cu_2O , 1,8 ml NH_3 a 2,5 ml bezvodého NMP. Při sloupcové chromatografii byla použita taktéž mobilní fáze chloroform/methanol (20:1) a posléze pro zvýšení čistoty roztok

chloroform/methanol/THF v poměru 10:1:0,1. Takto byl získán červenohnědý olejový produkt (MGB 109) v celkovém množství 231 mg (výtěžek 60 %).

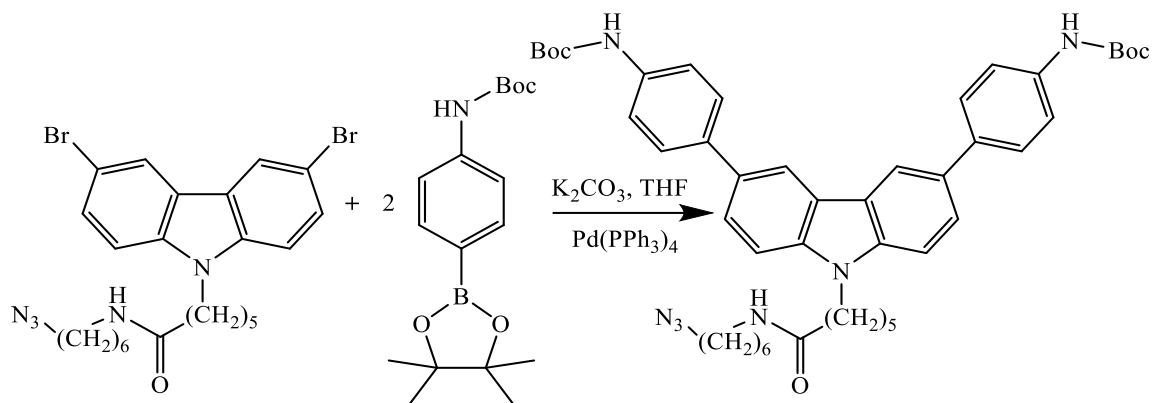
Ten byl potvrzen NMR a IČ spektry:

^{13}C NMR (125 MHz, CDCl_3) δ 172,88; 138,17; 135,61; 122,90; 115,61; 109,10; 106,20; 70,06; 50,54; 45,75; 42,84; 38,97; 36,35; 28,72, 26,79, 25,28 ppm.

^1H NMR (500 MHz, CDCl_3) δ 7,28 (s, 2H, 2xArH); 7,15 (d, 2H, 2xArH); 6,84 (d, 2H, 2xArH); 5,83 (s, 1H, CONH); 4,17 (s, 4H, 2xNH₂); 3,61-3,33 (m, 8H, 4xCH₂); 3,11 (t, 2H, CH₂); 2,09 (t, 2H, CH₂); 1,82 (m, 2H, CH₂); 1,64 (m, 2H, CH₂); 1,37 (m, 2H, CH₂) ppm.

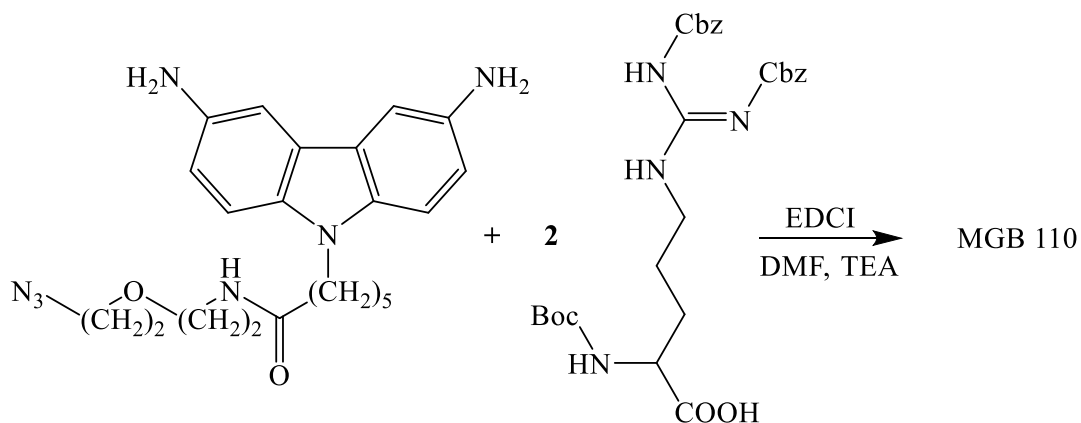
IČ (ATR) 2927, 2854 (alif); 2105 (N₃); 1646 (CO) cm^{-1}

6.10. Syntéza di-*tert*-butyl(9-(6-((6-azidohexyl)amino)-6-oxohexyl)-9H-karbazol-3,6-diyl)bis(4,1-fenylen)dikarbamátu (MGB 90)



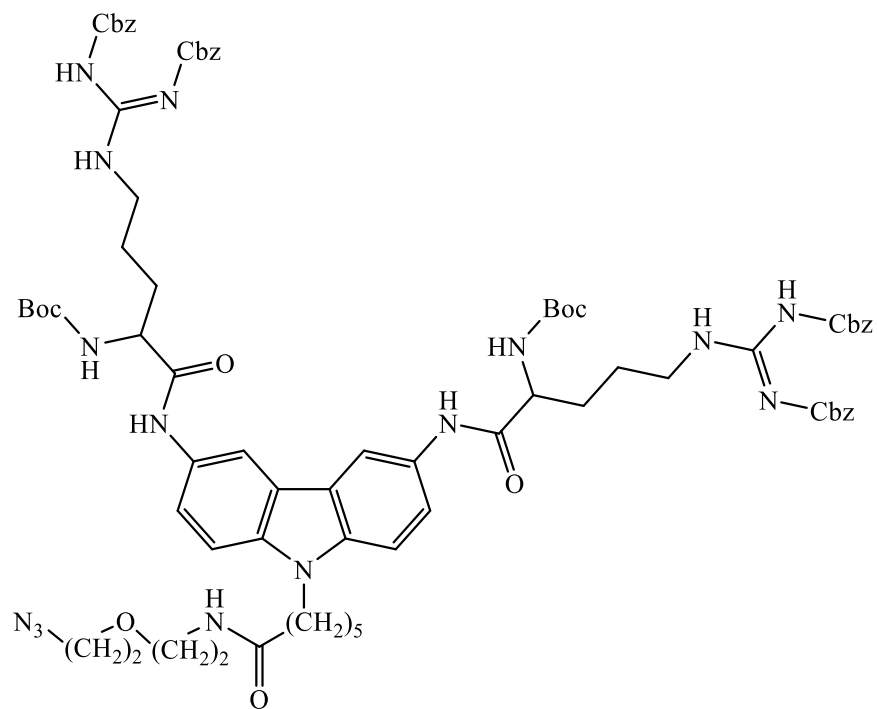
350 mg (0,620 mmol) MGB 72, 476 mg (1,488 mmol) *tert*-butyl-*N*-(4-(4,4,5,5-tetramethyl-1,3,2-dioxaborolan-2-yl)fenyl)karbamátu, 12 mg (0,062 mmol) $\text{Pd}(\text{PPh}_3)_4$, 343 mg (2,480 mmol) uhlíčitanu draselného a 20 ml bezvodého THF bylo převedeno do baňky. Směs byla za stálého míchání zahřívána 24 hodin při 80 °C pod zpětným chladičem v argonové atmosféře. Již po 2 hodinách byl detekován vznik možného produktu pomocí TLC. Po vychladnutí byly ze suspenze odstraněny nečistoty sloupcovou chromatografií, za využití gradientové mobilní fáze – nejprve byla použita směs benzín/ethyl-acetát (12:1) a posléze chloroform/THF (10:1). Takto bylo získáno 94 mg (výťažnost 24 %) bílé krystalické látky. Bohužel NMR spektroskopie nepotvrdila strukturu MGB 90.

6.11. Syntéza benzyl-9-((9-(1-((2-(2-azidoethoxy)ethyl)amino)-1-oxohexan-2-yl)-6-(5-(2,3-bis((benzyloxy)karbonyl)guanidino)-2-((terc-butoxykarbonyl)amino)pentanamido)-9*H*-karbazol-3-yl)karbamoyl)-4-(((benzyloxy)karbonyl)amino)-13,13-dimethyl-11-oxo-12-oxa-3,5,10-triazatetradec-3-enoátu (MGB 110)



44 mg (0,100 mmol) MGB 109, 120 mg (0,220 mmol) Boc-2(Cbz)Arg a 48 mg (0,250 mmol) EDCI bylo rozpuštěno v 15 ml bezvodém DMF a k roztoku následně přidáno 0,1 ml TEA. Celá reakční směs byla míchána po dobu 24 hod při laboratorní teplotě. Poté byla provedena kontrola TLC (mobilní směs ethyl-acetát/benzín v poměru 3:1, která prokázala přítomnost nové látky. Produkt se bohužel nepodařilo vyčistit a charakterizovat spektrálními metodami.

MGB 110 =



7. DISKUZE

Ve své diplomové práci jsem se zabýval syntézou derivátů karbazolu, které by byly schopny vázat se do malého žlábků dvoušroubovice DNA, a tím ovlivnit její stabilitu v závislosti na teplotě; mou snahou bylo vytvořit nové MGB látky využitelné v diagnostických metodách.

Nejprve byla potřeba navázat funkční skupiny na samotný karbazol, a to v polohách 3 a 6, aby bylo docíleno zakřivení struktury. Byla využita bromace karbazolu *N*-bromsukcinimidem za laboratorní teploty za vzniku 3,6-dibrom-9*H*-karbazolu (MGB 34). Tato molekula posloužila jako základní reakční látka v dalších syntézách. Dalším krokem bylo vytvoření spojovacího můstku, na který by se navázal objemný bazický substituent. Byla provedena kyanace MGB 34 několika metodami: jako nosič kyanidové skupiny byl použit kyanid zinečnatý za přítomnosti tetrakis(trifenylfosfin)paladia, jako katalyzátoru, a DMAC pro bazické prostředí a vše probíhalo v mikrovlnném reaktoru, avšak kýžený produkt nebyl potvrzen NMR spektry. Podobná metoda byla použita při reakci $K_4[Fe(CN)_6]$, diacetylpaladia a DMAC, ale tato reakce dle TLC neproběhla. Proto bylo přikročeno k použití toxického kyanidu měďného v DMF při vysokých teplotách – reakce proběhla úspěšně, vznikla látka MGB 43, ale v malém výtěžku. Následně na to se využila k navázání objemné bazické skupiny reakcí *N*-methylpropan-1,3-diaminu za možného vzniku MGB 51. Tato látka podléhá pravděpodobně vzdušné vlhkosti – než se podařilo ji NMR spektry analyzovat, rozložila se. S ohledem na náročnosti reakčních podmínek a malých výtěžků se od kyanace opustilo a přešlo se k hledání jiných cest.

Bylo provedeno několik syntéz k navázání bazických center přímo na strukturu MGB 34. Jednou z nich byla syntéza pomocí 1-methyl-4,5-dihydro-1*H*-imidazol-2-aminia ve formě *p*-toluensulfonátu (MGB 62). Nejdříve bylo nutné tuto látku vytvořit, a to reakcí *N*-methylethylendiaminu a kyanamidu spolu s *p*-toluensulfanátem a poté byla využita v reakci s MGB 34 za využití trifenylfosfinu, uhličitanu cesného 1,4-dioxanu a tris(dibenzylbenzilidenaceton)dipaladia v mikrovlnném reaktoru. Reakce sice proběhla, ale bazicita molekuly MGB 71 byla tak vysoká, že ji nešlo vyizolovat – tohoto zjištění bylo využito v dalších reakcích. Další zkoušenou reakcí byl tzv. Suzukiho

coupling. Této kondenzační metody se využilo při syntéze MGB 89 za využití 4-(4,4,5,5-tetramethyl-1,2,3-dioxaborolan-2-yl)nitrobenzenu a $\text{Pd}(\text{PPh}_3)_4$, jakožto katalyzátoru, na molekule MGB 34. Reakce probíhala za varu, v argonové atmosféře, 24 hod. Byl získán surový produkt, který byl chromatograficky přečištěn, ale NMR spektroskopie odhalila výskyt vícero pravděpodobně mono- a disubstituovaných derivátů karbazolu, které nešly ani po opětovném čištění rozdělit.

V dalších krocích byla zaměřena pozornost na dusíkatý atom karbazolu v poloze 9. Zde byla snaha navázat dostatečně dlouhý uhlíkatý řetězec, z důvodů, které jsou popsány v úvodu. Nejprve byla na MGB 34 v poloze 9 napojena první část řetězce. Alkylační reakcí přes bromid byl zde navázán methylester 6-bromhexanoátu, který posléze byl hydrolyzován na kyselinu za vzniku MGB 77. Druhým krokem bylo prodloužení řetězce pomocí amidace karboxylové skupiny s primárním aminem. K tomu byl využit 6-aminohexanol, popř. 2-(2-aminoethoxy)ethan-1-ol, který musel být nejprve připraven; hydroxyskupina byla nahrazena azidovou skupinou pomocí azidu sodného a thionyl dichloridu za vzniku MGB 40 (popř. MGB 107). Takto získaný azidoamin byl navázán přes karboxylovou skupinu vytvořením amidu za účasti HBTU a DIPEA. Tímto způsobem byly připraveny látky MGB 72 a MGB 108.

Po přípravě dibromkarbazolu, obsahujícího na dusíku vázaný uhlíkatý řetězec, byla snaha na tuto strukturu navázat objemnou bazickou skupinu. Byl znovu vyzkoušen Suzukiho coupling na molekule MGB 72 za využití *tert*-butyl-*N*-(4-(4,4,5,5-tetramethyl-1,3,2-dioxaborolan-2-yl)fenyl)karbamátu, nesoucího chráněný amin, a $\text{Pd}(\text{PPh}_3)_4$. Reakce pravděpodobně proběhla za vzniku látky MGB 90, avšak NMR spektroskopie odhalila příměsi nečistot. Po neúspěchu se přešlo k vytvoření aminoskupin na struktuře karbazolu v polohách 3 a 6. Byla provedena se aminace na látkách MGB 72 a MGB 108 za pomoci aminu, NMP a oxidu měďného. Reakce probíhaly v mikrovlnném reaktoru. První reakce s látkou MGB 72 sice proběhla, ale výtěžek byl malý a produkt (MGB 105) stále obsahoval nečistoty a nebylo již možné jej znovu přečistit. Druhá reakce s molekulou MGB 108 proběhla o poznání lépe, neboť byl získán produkt (MGB 109) ve výtěžku 60 % a tato látka byla též spektroskopicky potvrzena. Z předešlých zkušeností bylo rozhodnuto, že je zapotřebí využít objemné molekuly s bazickými centry, které jsou chráněné. K tomu posloužil arginin, který měl všechny tři bazická centra chráněna, takže případně čištění by

nebylo komplikované. Proběhla amidace na molekule MGB 109 v bazickém prostředí. Tenkovrstvá chromatografie potvrdila přítomnost nové sloučeniny (MGB 110), avšak došlo pravděpodobně k nechtěnému odblokování chránící skupiny a tudíž se nepodařilo chromatograficky ji vyčistit a charakterizovat.

8. ZÁVĚR

Během zpracování mé diplomové práce bylo vyzkoušeno několik reakčních metod, jak vytvořit novou molekulu MGB splňující zadaná kritéria (viz úvod), avšak ani jedna metoda nevedla pravděpodobně k úspěšnému navázání objemné bazické skupiny na strukturu karbazolu, která by byla NMR spektroskopicky potvrzena. Podařilo se syntetizovat řadu meziproduktů, a to 3,6-dibrom-9*H*-karbazol (MGB 34), 3,6-dikyano-9*H*-karbazol (MGB 43), 6-(3,6-dibrom-9*H*-karbazol-9-yl)hexanoát (MGB 77), *N*-(6-azidohexyl)-6-(3,6-dibrom-9*H*-karbazol-9-yl)hexanamin (MGB 72), *N*-(2-(2-azidoethoxy)ethyl)-6-(3,6-dibromo-9*H*-karbazol-9-yl)hexanamid (MGB 108) a *N*-(2-(2-azidoethoxy)ethyl)-6-(3,6-diamino-9*H*-karbazol-9-yl)hexanamid. Byla snaha vytvořit nové MGB struktury v podobě 3,6-bis(1-methyl-1,4,5,6-tetrahydropyrimidin-2-yl)-9*H*-karbazolu (MGB 51), *N*³,*N*⁶-bis(1-methyl-4,5-dihydro-1*H*-imidazol-2-yl)-9*H*-karbazol-3,6-diaminu (MGB 71) a di-*tert*-butyl(9-(6-((6-azidohexyl)amino)-6-oxohexyl)-9*H*-karbazol-3,6-diyl)bis(4,1-fenylen)dikarbamátu (MGB 90). Jediná syntéza – navázání chráněné aminokyseliny na molekulu MGB 109 – prokazovala dobré výsledky, avšak kýžený produkt, benzyl-9-((9-(1-((2-(2-azidoethoxy)ethyl)amino)-1-oxohexan-2-yl)-6-(5-(2,3-bis((benzyloxy)karbonyl)guanidino)-2-((*tert*-butoxykarbonyl)amino)pentanamido)-9*H*-karbazol-3-yl)karbamoyl)-4-(((benzyloxy)karbonyl)amino)-13,13-dimethyl-11-oxo-12-oxa-3,5,10-triazatetradec-3-enoát (MGB 110), zůstal v surové formě, neboť se nepodařilo jej vyčistit, pravděpodobně z důvodu předčasného uvolnění chránících skupin.

9. LITERATURA

¹ DAHM, R. *Discovering DNA: Friedrich Miescher and the early years of nucleic acid research*. Human Genetics. 2008, vol. 122, issue 6, s. 565–81.

² LEVENE, P. *The structure of yeast nucleic acid*. The Journal of Biological Chemistry. 1919, vol. 40, issue 2, s. 415–24.

³ Watson, J. D.; Crick, F. H. C. *A structure for deoxyribose nucleic acid*. Nature. 1953, vol. 171, issue 4356, s. 737–738.

⁴ ASAGI, M.; TOYAMA, A.; TAKEUCHI, H. *Binding affinity and mode of distamycin A with A/T stretches in double-stranded DNA: importance of the terminal A/T residues*. Biophysical Chemistry. 2010, vol. 149, issue 1-2, 34–39.

⁵ BARALDI, P. G.; BOVERO, A.; FRUTTAROLO, F.; PRETI, D.; TABRIZI, M. A.; PAVANI, M. G.; ROMAGNOLI, R. *DNA minor groove binders as potential antitumor and antimicrobial agents*. Medicinal Research Reviews. 2004, vol. 24, issue 4, s. 475-528.

⁶ RYABININ, V. A.; BUTORIN, A. S.; ELEN, K.; DENISOV, A. Y.; PYSHNYI, D. V.; SINYAKOV, A. N. *Effect of structural factors on the stability of duplexes formed by oligonucleotide conjugates with minor groove binders*. Russian Journal of Bioorganic Chemistry. 2005, vol. 31, issue 2, s. 146-152.

⁷ LUKHTANOV, E. A.; KUTYAVIN, I. V.; MEYER, R. B. *Direct, solid phase assembly of dihydropyrroloindole peptides with conjugated oligonucleotides*. Bioconjugate Chemistry. 1996, vol. 7, issue 5, s. 564-567.

⁸ HUISGEN, R. *Centenary lecture - 1,3-dipolar cycloadditions*. Proceedings of the Chemical Society of London. 1961, NO. OCT, s. 357-396.

⁹ JEWETT, J. C.; SLETTEN, E. M.; BERTOZZI, C. R. *Rapid Cu-free click chemistry with readily synthesized biarylazacyclooctynones*. Journal of the American Chemical Society. 2010, vol. 132, issue 11, s. 3688-3690.

-
- ¹⁰ SMITH, K.; JAMES, D. M.; MISTRY, A. G.; BYE, M. R.; FAULKNER, D. J. *A new method for bromination of carbazoles, β -carbolines and iminodibenzyls by use of N-bromosuccinimide and silica gel.* Tetrahedron. 1992, vol. 48, issue 36, s. 7479-7488.
- ¹¹ PATRICK, D. A.; BOYKIN, D. W.; WILSON, W. D.; TANIOUS, F. A.; SPYCHALA, J.; BENDER, B.C.; HALL, J. E.; DYKSTRA, C. C.; OHEMENG, K. A.; TIDWELL, R. R. *Anti-Pneumocystis carinii pneumonia activity of dicationic carbazoles.* European Journal of Medicinal Chemistry. 1997, vol. 32, issue 10, s. 781-793.
- ¹² ALTERMAN, M.; HALLBERG, A. *Fast microwave-assisted preparation of aryl and vinyl nitriles and the corresponding tetrazoles from organo-halides.* The Journal of Organic Chemistry. 2000, vol. 65, issue 23, s. 7984-7989.
- ¹³ KARAMI, K. *Synthesis, characterization, and spectroscopic studies of palladium(II) and silver(I) complexes of 4-methoxybenzoylmethylenetriphenylphosphorane and 4-fluorobenzoylmethylenetriphenylphosphorane.* Transition Metal Chemistry. 2008, vol. 33, issue 7, s. 819-823.
- ¹⁴ HAJIPOUR, A. R.; KARAMI, K.; TAVAKOLI, G.; PIRISEDIGH, A. *An efficient palladium catalytic system for microwave assisted cyanation of aryl halides.* Journal of Organometallic Chemistry. 2011, vol. 696, issue 4, s. 819-824.
- ¹⁵ XU, H.; WOLF, C. *Efficient copper-catalyzed coupling of aryl chlorides, bromides and iodides with aqueous ammonia.* Chemical Communications. 2009, issue 21, s. 3035-3038.
- ¹⁶ JIAO, J.; ZHANG, X. R.; CHANG, N. H.; WANG, J.; WEI, J. F.; SHI, X. Y.; CHEN, Z. G. *A facile and practical copper powder-catalyzed, organic solvent- and ligand-free ullmann amination of aryl halides.* The Journal of Organic Chemistry. 2011, vol. 76, issue 4, s. 1180-1183.
- ¹⁷ LU, D.; LEI, J.; TIAN, Z.; WANG, L.; ZHANG, J. *Cu^{2+} fluorescent sensor based on mesoporous silica nanosphere.* Dyes and Pigments. 2012, vol. 94, issue 2, s. 239-246.

¹⁸ BUTLER, K. V.; KALIN, J.; BROCHIER, C.; VISTOLI, G.; LANGLEY, B.; KOZIKOWSKI, A. P. *Rational design and simple chemistry yield a superior, neuroprotective HDAC6 inhibitor, tubastatin A*. Journal of the American Chemical Society. 2010, vol. 132, issue 31, s. 10842-10846.

¹⁹ VANDELEENE, S.; VERSWYVEL, M.; VERBIEST, T.; KOECKELBERGHS, G. *Synthesis, chiroptical behavior, and sensing of carboxylic acid functionalized poly(phenylene ethynylene- alt -bithiophene)s*. Macromolecules. 2010, vol. 43, issue 18, s. 7412-7423.

²⁰ HILLAERT, U.; VERDOES, M.; FLOREA, B. I.; SARAGLIADIS, A.; HABETS, K. L. L.; KUIPER, J.; VAN CALENBERGH, S.; OSSENDORP, F.; VAN DER MAREL, G. A.; DRIESSEN, C.; a OVERKLEEF, H. S. *Receptor-mediated targeting of cathepsins in professional antigen presenting cells*. Angewandte Chemie International Edition. 2009, vol. 48, issue 9, s. 1629-1632.

²¹ KUYKENDALL, D. W.; ANDERSON, C. A.; ZIMMERMAN, S. C. *Hydrogen-bonded DeUG•DAN heterocomplex: structure and stability and a scalable synthesis of DeUG with reactive functionalit.* Organic Letters. 2009, vol. 11, issue 1, s. 61-64.

²² DECHAMBENOIT, P.; FERLAY, S.; KYRITSAKAS, N.; HOSSEINI, M. W. *Amidinium based ionic liquids*. New Journal of Chemistry. 2010, vol. 34, issue 6, s. 1184-1199.

²³ GREENHILL, J. V.; ISMAIL, M. J.; EDWARDS, P. N.; TAYLOR, P. J. *Conformational and tautomeric studies of acylguanidines. Part 1. Synthesis, ultraviolet spectroscopy, tautomeric preference, and site of protonation in some model compounds*. Journal of the Chemical Society, Perkin Transactions 2. 1985, issue 8, s. 1255-1264.

²⁴ GOULD, A. E.; ADAMS, R.; ADHIKARI, S.; AERTGEERTS, K.; AFROZE, R.; BLACKBURN, C.; CALDERWOOD, E. F.; CHAU, R.; CHOUITAR, J.; DUFFEY, M. O.; ENGLAND, D. B.; FARRER, C.; FORSYTH, N.; GARCIA, K.; GAULIN, J.; GREENSPAN, P. D.; GUO, R.; HARRISON, S. J.; HUANG, S. C.; IARTCHOUK, N.; JANOWICK, D.; KIM, M. S.; KULKARNI, B.; LANGSTON, S. P.; LIU, J. X.; MA, L. T.; MENON, S.; MIZUTANI, H.; PASKE, E.; RENOU, C. C.; REZAEI, M.; ROWLAND, R. S.; SINTCHAK, M. D.; SMITH, M. D.; STROUD, S. G.; TREGAY, M.; TIAN, Y.; VEIBY, O. P.; VOS, T. J.; VYSKOCIL, S.; WILLIAMS, J.; XU, T.; YANG, J. J.; YANO, J.; ZENG, H.; ZHANG, D. M.; ZHANG, Q.;

GALVIN, K. M. *Design and optimization of potent and orally bioavailable tetrahydronaphthalene raf inhibitors*. Journal of Medicinal Chemistry. 2011, vol. 54, issue 6, s. 1836-1846.

²⁵ BORT, G.; SYLLA-IYARRETA VEITÍA, M.; FERROUD, C. *Straightforward synthesis of PET tracer precursors used for the early diagnosis of Alzheimers disease through Suzuki–Miyaura cross-coupling reactions*. Tetrahedron. 2013, vol. 69, issue 35, s. 7345-7353.

²⁶ KIHARA, H.; NORIKANE, Y.; YOSHIDA, M. *Regioselectivity control of photodimerization of liquid-crystalline cinnamoyl compounds by phase variation: dual functionality of p-terphenyl substituent as a mesogen and a triplet sensitizer*. Tetrahedron. 2012, vol. 68, issues 27-28, s. 5513-5521.

²⁷ MAVRIDIS, I.; KYTHREOTI, G.; KOLTSIDA, K.; VOURLOUMIS, D. *Rigid spiroethers targeting the decoding center of the bacterial ribosome*. Bioorganic & Medicinal Chemistry. 2014, vol. 22, issue 4, s. 1329-1341.

²⁸ FURLONG, S. T.; MAUGER, R. C.; STRIMPLER, A. M.; LIU, Y. P.; MORRIS, F. X.; EDWARDS, P. D. *Synthesis and physical characterization of a P1 arginine combinatorial library, and its application to the determination of the substrate specificity of serine peptidases*. Bioorganic & Medicinal Chemistry. 2002, vol. 10, issue 11, s. 3637-3647.