

**Univerzita Karlova v Praze, Přírodovědecká fakulta  
Katedra organické chemie**

**Charles University in Prague, Faculty of Science  
Department of Organic Chemistry**

Doktorský studijní program: organická chemie  
Ph.D. study program: Organic Chemistry

Autoreferát dizertační práce  
Summary of the Ph.D. Thesis



Příprava biologicky aktivních látek s chinazolinovým skeletem  
Synthesis of biologically active compounds with quinazoline scaffold

**Ondřej Štěpánek**

Školitel/Supervisor: Prof. RNDr. Martin Kotora, CSc.

Praha, 2015

## Abstrakt

Předkládaná dizertační práce pojednává o přípravě 2,4-disubstituovaných derivátů chinazolinu a byla vypracována v rámci výzkumu inhibitorů skládání kapsidy viru HIV-1. Výše zmíněné deriváty tento proces dokážou inhibovat jak v rámci kompetitivního biochemického testu založeného na technologii AlphaScreen, tak i v tkáňových kulturách. Cílem práce bylo na základě hodnot  $IC_{50}$  získaných při biochemických testech navrhnout a připravit nové kandidáty s vyšší aktivitou, a pokusit se také zvýšit rozpustnost těchto jinak nedostatečně rozpustných sloučenin.

2,4-Disubstituované chinazoliny jsou poměrně dobře přístupné z komerčně dostupných derivátů kyseliny anthranilové, které lze pomocí kondenzačních reakcí převést na příslušný chinazolin-4(3*H*)-on. V rámci této práce byly využívány dvě metody pro přípravu chinazolin-4(3*H*)-onů. První z nich je reakce anthranilamidů s aromatickými acylchloridy, která poskytovala 2-arylamidobenzamidy. Jejich následná cyklizace v bazickém prostředí vedla k derivátům 2-arylchinazolin-4(3*H*)-onu. Druhá metoda je založena na reakci esterů kyseliny anthranilové s aromatickými nitrily. Požadovaný chinazolin-4(3*H*)-on bylo takto možné získat v jednom reakčním kroku. Chlorace 2-arylchinazolin-4(3*H*)-onů pomocí  $POCl_3$  poté vedla k derivátům 2-aryl-4-chlorchinazolinu jakožto klíčovým intermediátům. Nukleofilní substituce těchto 4-chlor derivátů aromatickými i alifatickými aminy poskytovala kýžené *N*-substituované-2-arylchinazolin-4-aminy. Nejběžnější metodou nukleofilní substituce byla kysele katalyzovaná reakce, kterou doplňovala reakce za bazických podmínek – vhodná zejména v případě nereaktivních stericky bráněných anilinů.

Výše popsanou metodikou byla připravena řada cílených knihoven *N*-substituovaných-2-arylchinazolin-4-aminů, jejichž schopnost inhibovat skládání virové kapsidy HIV-1 byla ověřována v biochemickém testu (AlphaScreen) a v některých případech i v tkáňových kulturách. Příprava látek, výtěžky reakcí, orientační hodnoty rozpustnosti a výsledky biochemických testů těchto sloučenin jsou diskutovány v rámci předkládané dizertační práce.

## Abstract

This thesis concludes my contribution to research of HIV-1 capsid assembly inhibitors. It has been shown that 2,4-disubstituted quinazoline derivatives are able to inhibit this process both, in competitive biochemical assay based on the AlphaScreen technology as

well as in tissue cultures. The main objective of the work was to prepare the aforementioned quinazolines, to design and prepare new candidates with higher activity based on results of biochemical tests, and also try to increase the solubility of the otherwise poorly soluble compounds.

Disubstituted quinazolines are relatively easily accessible from commercially available anthranilic acid derivatives. These are converted to the corresponding quinazolin-4(3*H*)-ones by the condensation reactions. In this work, two methods were used for the preparation of quinazolin-4(3*H*)-ones: reaction of acyl chlorides with aromatic anthranilamides provide 2-arylamidobenzamides whose subsequent cyclisation under basic conditions led to derivatives of 2-arylquinazolin-4(3*H*)-one; reaction of anthranilic acid esters with aromatic nitriles which afforded desired quinazolin-4(3*H*)-one in one reaction step. Chlorination of 2-arylquinazolin-4(3*H*)-ones using POCl<sub>3</sub> then led to 2-aryl-4-chloroderivatives as key intermediates. Nucleophilic substitution of 4-chloroderivatives by aromatic and aliphatic amines then provided the desired *N*-substituted-2-arylquinazolin-4-amines. The most common method of nucleophilic substitution was acid-catalyzed reaction. The complementary method was reaction under basic conditions – particularly suitable in the case of non-reactive hindered anilines.

A number of focused libraries of *N*-substituted-2-arylquinazolin-4-amines were prepared by the methodology described above. Ability of these compounds to inhibit HIV-1 capsid assembly was tested in a biochemical assay (AlphaScreen) and some compounds were tested in tissue culture assay, too. Synthesis of the compounds, reaction yields, their approximate solubility and the results of biochemical tests of these compounds are discussed within the thesis.

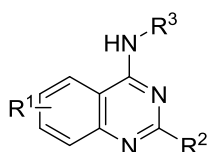
## Autoreferát

### 1. Úvod

Virus HIV-1 je původcem pandemického onemocnění AIDS, které je i přes klesající počet obětí stálou hrozbou s přibližně 35 miliony nakažených celosvětově.<sup>1</sup> Ačkoliv již krátce po odhalení HIV-1 jakožto původce onemocnění AIDS byl k dispozici první z inhibitorů replikace viru<sup>2</sup> a dnes je americkou FDA schváleno kolem 20 preparátů s různými mechanismy účinku<sup>3</sup>, stále přetrvává riziko vzniku rezistence.<sup>4</sup> Z tohoto důvodu existovala poptávka po sloučeninách s novým, odlišným mechanismem účinku. Jedním z možných procesů, kterým lze dosáhnout inhibice replikace viru je skládání virové kapsidy. Dříve již byly prozkoumány látky, které skládání kapsidy ovlivňují svoji vazbou na N-terminální doménu kapsidového proteinu<sup>5</sup>, a později byl objeven též peptid, který skládání kapsidy inhibuje svojí vazbou na C-terminální doménu kapsidového proteinu.<sup>6</sup> Vzhledem k nevhodným farmakologickým vlastnostem peptidů<sup>6</sup> bylo zahájeno hledání malých organických molekul, které by při zachování účinku byly lépe využitelné jako potenciální léčiva. Takovéto sloučeniny byly pomocí testování s vysokou propustností nalezeny v třídě heterocyklických aromatických sloučenin, chinazolinů.<sup>5</sup>

První generace látek (připravená A. Macharou) byla zaměřená na *N*-arylderiváty 2-(pyridinyl)chinazolin-4-aminů, zejména na bioizostery esterové funkční skupiny, mezi nimiž bylo nalezeno několik látek s aktivitou v AlphaScreen testu (vyjádřenou pomocí hodnoty IC<sub>50</sub>) v jednotkách μM.<sup>5</sup> Častěji se však aktivita testovaných látek pohybovala v desítkách μM a celá řada jich nevykazovala žádnou aktivitu. Vzhledem k chemické povaze připravených sloučenin, byla problematickým faktorem také jejich nízká rozpustnost v testovacím médiu. Přípravou nových derivátů chinazolinu (obrázek 1) se zlepšenou inhibiční aktivitou a rozpustností se zabývá i předkládaná dizertační práce.

Obr. 1. Obecná struktura látek připravovaných v rámci dizertační práce.



R<sup>1</sup> = OH, O-alkyl, halogen  
R<sup>2</sup> = aryl, hetaryl  
R<sup>3</sup> = alkyl, aryl

## 2. Cíle práce

Hlavním úkolem práce bylo rozšířit knihovnu látek o nové série derivátů, které by měly vyšší aktivitu, vyšší rozpustnost a pokusit se odhalit, jaký vliv má změna struktury na aktivitu.

Předkládaná dizertační práce si klade následující cíle:

- a) Připravit nové série derivátů 2-arylchinazolinů s lepší rozpustností a zvýšenou inhibiční aktivitou.
- b) Porovnat zjištěné inhibiční aktivity nově připravených sloučenin s aktivitami dříve připravených (původních) derivátů a pokusit se nalézt vztah mezi inhibiční aktivitou daného derivátu a jeho strukturními rysy.
- c) Ze získaných poznatků navrhnout nové kandidáty.

## 3. Materiál a metodika

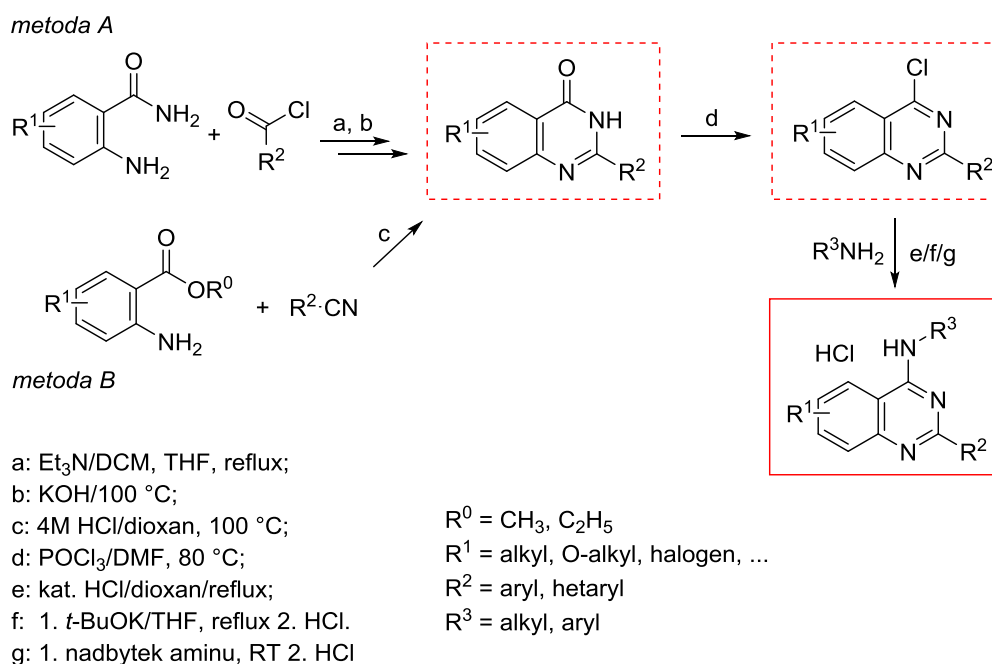
Pro přípravu *N*,2-disubstituovaných derivátů chinazolinu jsem použil klasických syntetických postupů.<sup>7</sup> Nejprve byl kondenzačními reakcemi komerčně dostupných reaktantů získán 2-substituovaný heterocyklus – chinazolin-4(3*H*)-on. V tomto kroku byly užity reakce substituovaných derivátů kyseliny anthranilové s deriváty příslušných aromatických kyselin. Požadovaný chinazolinon lze získat buď ve dvou krocích bazickou cyklizací *o*-amidobenzamidů, které jsou získány reakcí anthranilamidu s aromatickým acylchloridem (schéma 1, metoda A)<sup>8</sup>, nebo v jednom kroku kyselou katalyzovanou kondenzací esteru kyseliny anthranilové s aromatickým nitrilem (schéma 1, metoda B).<sup>9</sup> 2-Substituovaný chinazolinon je poté převeden působením POCl<sub>3</sub> na příslušný 4-chlorderivát (schéma 1).<sup>10</sup> Výtěžky výše zmíněných reakcí bývají obvykle dobré až výborné.

Klíčovým reakčním krokem je pak nukleofilní substituce zmiňovaného 4-chlorchinazolinu aromatickými a alifatickými aminy. Nejčastější byla reakce za kyselou katalýzy<sup>11</sup> (schéma 1, podmínky e), která v závislostech na anilinu poskytovala průměrné až výborné výtěžky. Komplementární metoda pak byla reakce v bazickém prostředí,<sup>12</sup> která byla vhodná zejména pro stericky bráněné aniliny (schéma 1, podmínky f). Výtěžky reakcí za bazických podmínek byly obvykle nízké, ale přesto dostatečné, aby bylo možné získat deriváty anilinů, které za podmínek kyselou katalyzované reakce obvykle nereagovaly.

V případě nukleofilnějších alifatických aminů byly reakce prováděny pouze s nadbytkem aminu (schéma 1, podmínky g) a obvykle poskytovaly dobré až výborné výtěžky.

Vzhledem k omezenému prostoru autoreferátu, nebudu zde zacházet do detailů. Zájemce o podrobná schémata reakčních sekvencí a výtěžky jednotlivých reakčních kroků odkazují na text dizertační práce.

Schéma 1. Syntetické metody využívané při přípravě chinazolin-4-aminů.<sup>7, 8, 9, 10, 11, 12</sup>



#### 4. Výsledky a diskuse

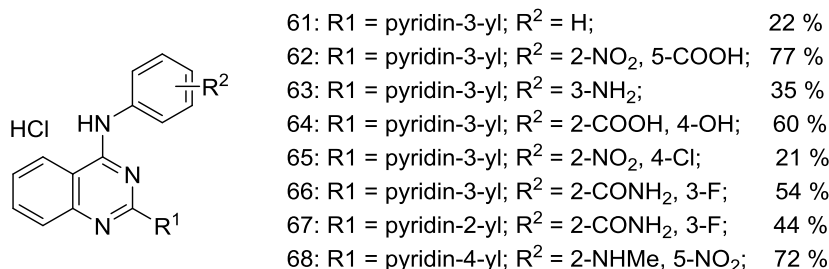
V rámci předkládané dizertační práce bylo připraveno sedm sérií derivátů chinazolinu a jednu sérii derivátů 6-methylpyrimidinu. Pro větší přehlednost budou výsledky jednotlivých sérií okomentovány samostatně.

4.1. „Nultá“ série. Tato série obsahuje látky **61–68**, které v poloze 2 chinazolinu nesly izomerní pyridinyly a aromatický zbytek na aminu v poloze 4 byl substituován různými kombinacemi polárních funkčních skupin (obr. 2). Většina z látek v této sérii byla špatně rozpustná, nebo v AlphaScreen testu nevykazovala příliš vysokou aktivitu.

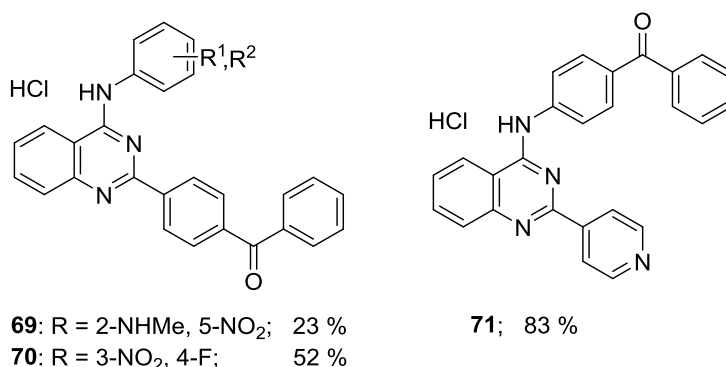
4.2. Série fotoafitních derivátů. Pro potřeby biochemických pokusů s fotoafinitním značením<sup>13</sup> byla připravena série tří benzofenonových derivátů **69–71** (obr. 3), které

vykazovaly jistou aktivitu v AlphaScreen testu ( $IC_{50} = 9\text{--}48 \mu\text{M}$ ). Jejich rozpust však byla nízká, což mohl být také jeden z důvodů, proč pokusy o fotoafinitní značení byly neúspěšné.

Obr. 2. Deriváty z „nulté“ série, substituované polárními funkčními skupinami.

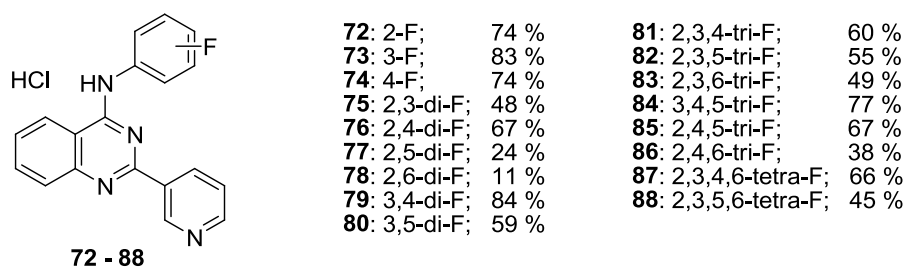


Obr. 3. Deriváty pro fotoafinitní značení.



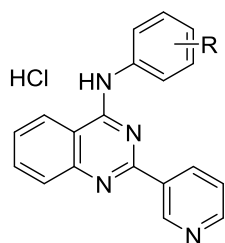
4.3. Série *N*-fluoraryl-2-(pyridin-3-yl)chinazolin-4-aminů. Při vyhodnocování a porovnávání dat průběžně získávaných od jednotlivých dříve připravených látek jsme s kolegy zaznamenali, že se u některých značně aktivních derivátů nápadně často vyskytuje společný strukturní rys, jímž byl *N*-fluorarylový substituent. Z tohoto důvodu jsem připravil deriváty **72–88**, které na dusíku v poloze 4 nesly mono, di, tri a tetrafluorarylové substituenty (obr. 4). Dobrých výsledků dosahovaly zejména trifluorarylové deriváty, mezi nimiž za zmínku stojí především látky **84** a **85**.

Obr. 4. Fluorarylové deriváty chinazolin-4-aminu.



4.4. Série *N*-halogenaryl-2-(pyridin-3-yl)chinazolin-4-aminů. Vzhledem k zajímavým výsledkům fluorovaných derivátů mě zajímalo, jakých výsledků budou dosahovat analogy odvozené od ostatních halogenů (chlor a brom). Z toho důvodu jsem připravil látky **89–95** (jsou zde zařazeny i některé další sloučeniny, které kromě fluoru nesou i jiný substituent, obr. 5). Většina derivátů v této sérii (s výjimkou trifluormethylového derivátu **91**) je značně aktivní v AlphaScreen testu i přes to, že zaznamenané výsledky mohou být patrně ovlivněny špatnou rozpustností. Navíc v případě látek **92** a **93** byly výsledky ovlivněny jejich interakcí se složkami systému testu. V případě látek **89** a **90** byla však jejich aktivita jednoznačně potvrzena též testem v tkáňových kulturách ( $IC_{50} \sim 5 \mu M$ ).

Obr. 5. Další halogenované deriváty chinazolin-4-aminu.

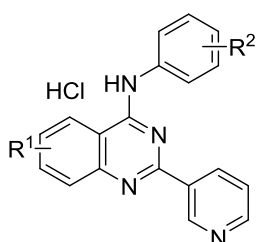


**89 - 95**

<b>89:</b> R = 2-OH, 5-F;	65 %
<b>90:</b> R = 2-OMe, 5-F;	52 %
<b>91:</b> R = 3-CF <sub>3</sub> ;	31 %
<b>92:</b> R = 2,3,4-tri-Cl;	68 %
<b>93:</b> R = 2,4,5-tri-Cl;	11 %
<b>94:</b> R = 2,5-di-Br;	47 %
<b>95:</b> R = 2,4,5-tri-Br;	28 %

4.5. Série 2-(pyridin-3-yl)chinazolin-4-aminů substituovaných na benzenovém jádře. Vzhledem k omezené rozpustnosti doposud připravených derivátů, bylo nutné připravit sloučeniny s lepší rozpustností, čehož jsem se pokusil docílit zavedením polárních funkčních skupin na benzenové jádro chinazolinu (látky **96–98**, obr. 6). Většina připravených derivátů vykazovala pokles či ztrátu aktivity v AlphaScreen testu v porovnání s analogy bez substituentů na benzenovém jádře. Vliv substituce na rozpustnost sloučenin byl spíše negativní, ale nijak významný.

Obr. 6. Deriváty chinazolin-4-aminů substituované na benzenovém jádře.

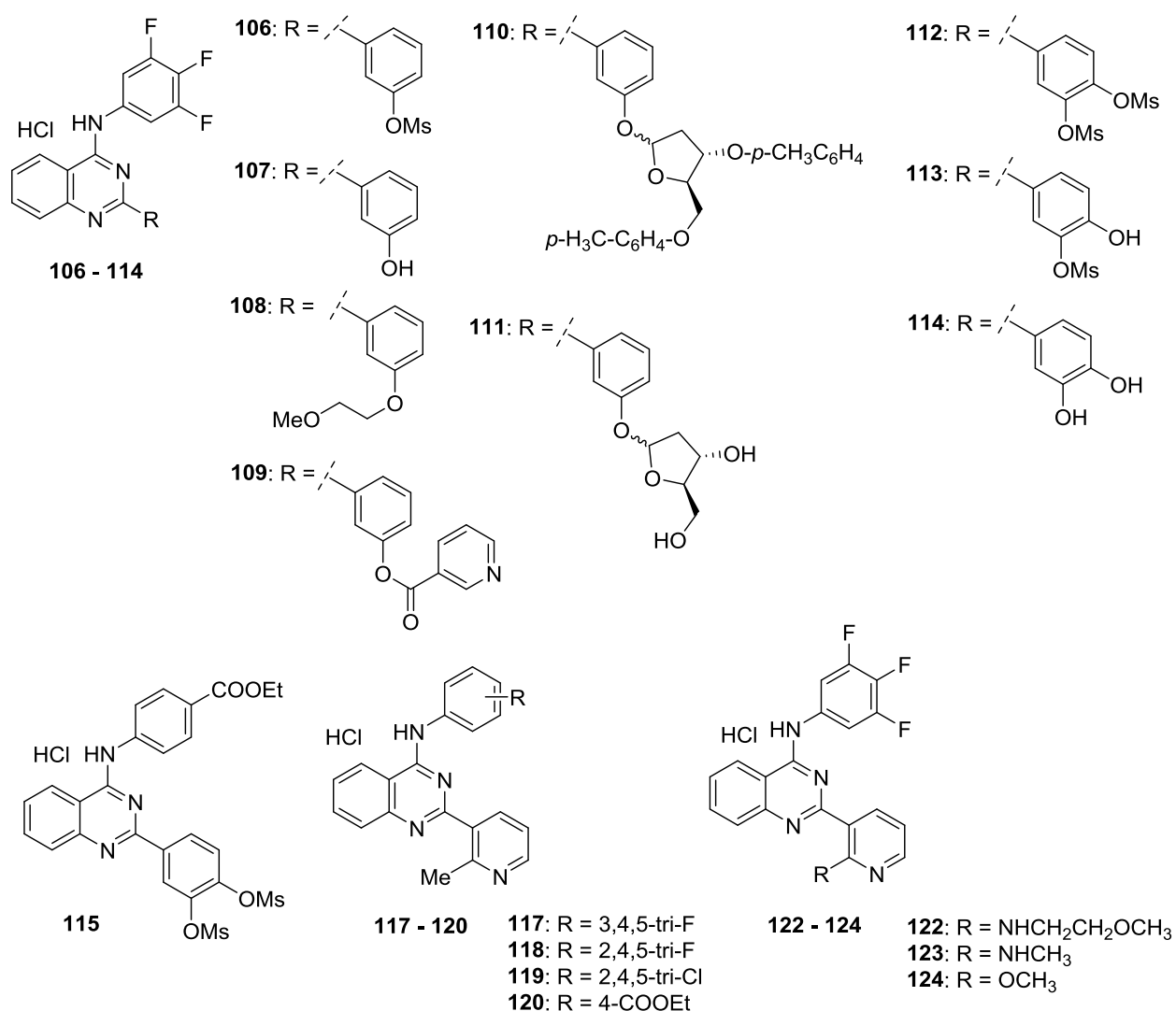


<b>96:</b> R <sup>1</sup> = 6,7-di-OCH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> OCH <sub>3</sub> , R <sup>2</sup> = 2-NHMe, 5-NO <sub>2</sub> ;	49 %
<b>97:</b> R <sup>1</sup> = 6,7-di-OEt, R <sup>2</sup> = 3,4,5-tri-F;	86 %
<b>98:</b> R <sup>1</sup> = 6,7-di-OEt, R <sup>2</sup> = 4-COOEt;	78 %
<b>99:</b> R <sup>1</sup> = 6-OH, R <sup>2</sup> = 3,4,5-tri-F;	15 %
<b>100:</b> R <sup>1</sup> = 7-CF <sub>3</sub> , R <sup>2</sup> = 3,4,5-tri-F;	55 %
<b>101:</b> R <sup>1</sup> = 7-CF <sub>3</sub> , R <sup>2</sup> = 3-CF <sub>3</sub> ;	77 %
<b>102:</b> R <sup>1</sup> = 7-CF <sub>3</sub> , R <sup>2</sup> = 2-F, 5-NO <sub>2</sub> ;	90 %



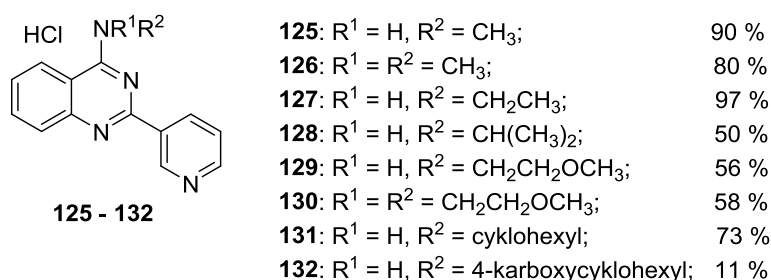
4.6. Série chinazolin-4-aminů substituovaných na arylu v poloze 2. Vzhledem k tomu, že deriváty substituované na benzenovém jádře vykazovaly oproti referenčním sloučeninám sníženou aktivitu, či úplnou ztrátu aktivity, rozhodl jsem se zaměřit se na modifikace arylového zbytku v poloze 2 chinazolinového skeletu. Z tohoto důvodu jsem připravil deriváty **106–124** (obr. 7). V případě látek **106–111** vedly modifikace ke ztrátě aktivity a poněkud paradoxně též ke značnému snížení rozpustnosti. Podobných výsledků dosahovaly i deriváty **112–115**, s výjimkou sloučeniny **114**, která v AlphaScreen testu vykazovala vyšší aktivitu i zlepšenou rozpustnost, než její pyridin-3-ylový analog. Navýšení rozpustnosti při zachování aktivity bylo také dosaženo u látky **117**. Bohužel ostatní deriváty v této sérii (**118–124**) vykazovaly ztrátu aktivity, nebo snížení rozpustnosti v porovnání s jejich pyridin-3-ylovými analogy.

Obr. 7. Deriváty chinazolin-4-aminů substituované na arylu v poloze 2.



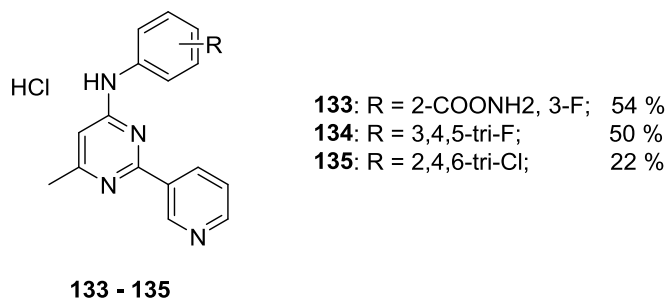
4.7. Série alifatických derivátů chinazolin-4-aminů. Další možnost, která zvýší rozpustnost takovýchto polyaromatických sloučenin, spočívala v náhradě některého aromatického kruhu alifatickým zbytkem. Z tohoto důvodu jsem připravil sloučeniny **125–134**, které na dusíku v poloze 4 nesou alifatický substituent (obr. 8). Ačkoliv všechny tyto deriváty měly rozpustnost  $\geq 100 \mu\text{M}$ , náhrada aromátu na dusíku v poloze 4 za alifatický substituent ve všech případech vedla k úplné ztrátě aktivity v AlphaScreen testu.

Obr. 8. Deriváty chinazolin-4-aminů s alifatickým substituentem.



4.8. Série 6-methyl-*N*-aryl-2-(pyridin-3-yl)pyrimidin-4-aminů. Jelikož pokusy o zlepšení aktivity a rozpustnosti derivatizací chinazolinů často neposkytovaly výsledky, které jsme požadovali, přesunula se v rámci celého projektu pozornost k derivátům 6-methylpyrimidinu. V podstatě byl zachován základní diazinový skelet, avšak aromatický kruh v chinazolinu byl nahrazen methylovou skupinou. V rámci práce jsem se zaměřil na přípravu tří analogů **133–135** sloučenin již zde dříve popsanych (obr. 9). U sloučenin **133** a **134** byl bohužel pozorován pokles rozpustnosti oproti jejich chinazolinovým analogům, pouze v případě derivátu **135** došlo k mírnému zvýšení rozpustnosti při zachování aktivity v AlphaScreen testu.

Obr. 9. Deriváty 6-methylpyrimidin-4-aminu.



## 5. Závěr

Tato práce se zabývala přípravou derivátů chinazolin-4-aminu, jakožto inhibitorů výstavby virové kapsidy HIV-1. Na základě vyhodnocení výsledků biochemického testování aktivity těchto látek (ve smyslu inhibice výstavby kapsidy) byly navrhovány strukturní modifikace za účelem získání nových kandidátů. Taktéž bylo vyvinuto úsilí o zlepšení obecně nízké rozpustnosti těchto sloučenin. Dosažené výsledky shrnují tyto body:

- a) Byla rozšířena knihovna derivátů chinazolin-4-aminů o sedm sérií čítajících dohromady 68 látek. Dále byly připraveny také tři deriváty odvozené od 6-methylpyrimidin-4-aminu.
- b) Podrobně byla prozkoumána série derivátů nesoucí fluorbenzenové substituenty na dusíku v poloze 4, mezi nimiž byly nalezeny látky se zvýšenou aktivitou v AlphaScreen testu. Aktivita některých těchto sloučenin byla potvrzena také pomocí virologického testu, kde se jejich virostatická aktivita, vyjádřená jako hodnota  $IC_{50}$ , pohybovala v jednotkách  $\mu\text{mol/l}$ . Jako příklady lze uvést amidový derivát **67**, a trifluorbenzenové deriváty **84** a **85**.
- c) Na základě výsledků derivátů chinazolin-4-aminů s fluorbenzenovými substituenty na dusíku v poloze 4 byly připraveny také chlor- a bromderiváty, které v AlphaScreen testu vykazovaly až o řád lepší aktivitu (v jednotkách  $\mu\text{mol/l}$ ), než jejich fluorové analogy. Jednalo se zejména o bromderiváty **94** a **95**, a také o trichlorderiváty **92** a **93**, které však částečně interagují se složkami testovacího systému AlphaScreen, pročež je nutné jejich výsledky brát s rezervou.
- d) Ve snaze o zvýšení rozpustnosti připravovaných látek byly učiněny pokusy o zavedení polárních funkčních skupin do různých částí molekuly. V naprosté většině případů tento způsob modifikace vedl ke snížení, či naprosté ztrátě aktivity a poněkud paradoxně se rozpustnost obvykle zhoršila. Světlou výjimkou je katecholový derivát **114**, který vykazuje jak vyšší rozpustnost, tak i poněkud zlepšenou aktivitu v AlphaScreen testu.

- e) Dále se autor pokusil zvýšit rozpustnost prostřednictvím deplanarizace molekuly<sup>14</sup> – zavedením 2-methylpyridinového substituentu do polohy 2 chinazolinu. Tento přístup se osvědčil pouze v případě derivátu **117**, u kterého se podařilo poněkud zvýšit rozpustnost při zachování srovnatelné aktivity.
- f) Výrazného zlepšení rozpustnosti bylo dosaženo, pokud byl aromát na dusíku v poloze 4 chinazolinu nahrazen alifatickým zbytkem. Zároveň však tato modifikace vedla k úplné ztrátě aktivity v AlphaScreen testu. Toto pozorování zároveň dokazuje nutnost přítomnosti aromatického substituentu na dusíku v poloze 4.
- g) Poslední prozkoumaná možnost jak zvýšit rozpustnost byl přechod k derivátům 6-methylpyrimidinu. Výsledky jsou poněkud protichůdné, avšak v případě trichlorbenzenového derivátu **135** se podařilo částečně zlepšit rozpustnost při zachování aktivity.

Při pokusu o konečné shrnutí výše zmíněných bodů, jakož i ostatních výsledků prezentovaných v této práci, musím připustit, že přes dílčí úspěchy při zvyšování rozpustnosti a aktivity zde uvedených sloučenin, nejsou tyto látky pro své fyzikálně-chemické vlastnosti nejvhodnějšími kandidáty pro práci na poli medicínální chemie. Pravděpodobně zde stále existuje prostor pro zlepšení jejich vlastností, nicméně otázkou zůstává, zda je vůbec možné modifikací takovýchto polyaromatických derivátů chinazolinu současně dosáhnout dostatečné aktivity, jakož i rozpustnosti potřebné pro další biochemický a virologický výzkum.

## 6. Použitá literatura

1. *Global update on the health sector response to HIV, 2014*; World Health Organisation, WHO Press: Geneva, Switzerland , 2014; ISBN 978 92 4 150758 5.
2. Brook, I. *J. Am. Med. Assoc.* 1987, 258, 1517.
3. a) <http://aidsinfo.nih.gov/education-materials/fact-sheets/21/58/fda-approved-hiv-medicines> (přístup 10. dubna 2015);  
b) <http://www.fda.gov/ForPatients/Illness/HIVAIDS/Treatment/ucm118915.htm> (přístup 10. dubna 2015).
4. Sluis-Cremer, N.; Arion, D.; Parniak, M. A. *Cell. Moll. Life Sci.* **2000**, 57, 1408.

5. Machara, A.; Lux, V.; Kožíšek, M.; Grantz Šašková, K.; Štěpánek, O.; Katora, M.; Parkan, K.; Pávová, M.; Glass, B.; Sehr, P.; Lewis, J.; Mueller, B.; Kraeusslich, H.-G.; Konvalinka, J. *J. Med. Chem.* in revisions.
6. Sticht, J.; Humbert, M.; Findlow, S.; Bodem, J.; Müller, B.; Dietrich, U.; Werner, J.; Kräusslich, H.-G. *Nat. Struct. Mol. Biol.* **2005**, *12*, 671.
7. Armarego, W. L. F. *Chem. Heterocycl. Compd.* **1967**, *24*, 1.
8. Lee, S. J.; Konishi, Y.; Yu, D. T.; Miskowski, T. A.; Riviello, Ch. M.; Macina, O. T.; Frierson, M. R.; Kondo, K.; Sugitani, M. *J. Med. Chem.* **1995**, *38*, 3547.
9. Bogolubsky, A. V.; Ryabukhin, S. V.; Plaskon, A. S.; Stetsenko, S. V.; Volochnyuk, D. M.; Tolmachev, A. A. *J. Comb. Chem.* **2008**, *10*, 858.
10. Manhas, M. S.; Hoffman, W. A.; Bose, A. K. *J. Heterocycl. Chem.* **1979**, *16*, 617.
11. Bunnet, J. F.; Zahler R. E. *Chem. Rev.* **1951**, *49*, 273.
12. Chen, B.-C.; Droghini, R.; Lajeunesse, J.; Dimarco, J. D.; Balella, M.; Chidambaram, R. Process for Preparing 2-Aminothiazole-5-aromatic Carboxamides as Kinase Inhibitors. PCT Int. Patent Appl. WO2005077945, 25th August 2005.  
[http://worldwide.espacenet.com/publicationDetails/originalDocument?CC=WO&NR=2005077945A2&KC=A2&FT=D&ND=3&date=20050825&DB=worldwide.espacenet.com&locale=en\\_EP](http://worldwide.espacenet.com/publicationDetails/originalDocument?CC=WO&NR=2005077945A2&KC=A2&FT=D&ND=3&date=20050825&DB=worldwide.espacenet.com&locale=en_EP) (přístup 12. srpna 2015).
13. Dormán, G.; Prestwich, G. D. *Trends Biotechnol.* **2000**, *18*, 64.
14. Ishikawa, M.; Hashimoto, Y. *J. Med. Chem.* **2011**, *54*, 1539.

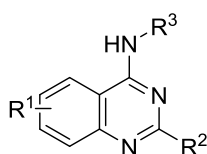
## Summary of the Ph.D. Thesis

### 1. Introduction

HIV-1 virus is a causative agent of AIDS (Acquired Immune Deficiency Syndrome), which is lethal pandemic disease with approximately 35 millions of infected worldwide.<sup>1</sup> Although the number of new cases of the disease is decreasing still it remains serious problem. Soon after identification of HIV-1 as originator of AIDS there was first medicine introduced to the market.<sup>2</sup> Up to date there are ca. 20 separate substances with different modes of action approved to use in AIDS treatment by FDA.<sup>3</sup> However the threat of formation of multiple drug resistant strains (MDR) is still actual.<sup>4</sup> Therefore there is a need of new compounds with new mechanism of inhibition of the virus replication. One of such processes is inhibition of capsid assembly. Some compounds which influence capsid assembly by binding to N-terminal domain of capsid protein were investigated formerly.<sup>5</sup> Little bit later was discovered peptide that binds to C-terminal domain of capsid protein.<sup>6</sup> However peptides are not the best candidates for drugs because of their usually poor pharmacological properties. Therefore the search for small organic molecules with identical mode of action was established. Such compounds were found by high-throughput screening in the class of heterocycles called quinazolines.<sup>5</sup>

First generation of quinazoline derivates was focused on bioisosteres of ester functional group and some more *N*-aryl derivatives of 2-(pyridinyl)quinazolin-4-amines among which few compound were found with activity (as IC<sub>50</sub> from AlphaScreen assay) in low micro molar range.<sup>5</sup> However there was more of the compound with lower activity (tens of μM) and those completely inactive. Considering the chemical nature of such quinazoline derivatives their poor solubility was common problem. This PhD. thesis is aimed at synthesis of new quinazoline derivatives (with general structure shown in fig. 1) with higher activity and improved solubility.

Fig. 1. General structure of compounds prepared during the work on PhD. thesis.



R<sup>1</sup> = OH, O-alkyl, halogen

R<sup>2</sup> = aryl, hetaryl

R<sup>3</sup> = alkyl, aryl

## 2. Aims of the study

The main objective of my work was to expand the library of quinazolines with compounds with better activity and solubility and to explore possible relationships between activity and structure of these compounds.

Submitted PhD. thesis has following aims:

- a) to prepare new series of 2-arylquinazoline derivatives with better activity and increased solubility,
- b) to compare measured activities of new compounds with activities of formerly prepared (original) ones and try to find out relationship between inhibition activity of given compound and its structural features,
- c) to propose new candidates based on obtained data.

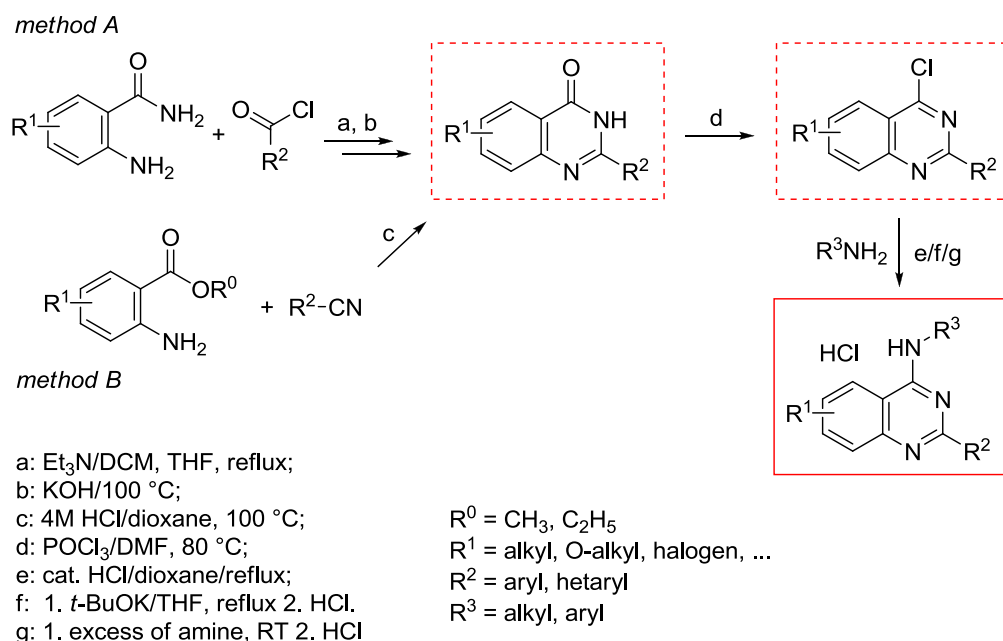
## 3. Material and methods

I was using classical synthetic methods for preparation of *N*,2-disubstituted quinazoline derivatives.<sup>7</sup> At first 2-substituted heterocycle – quinazolin-4(3*H*)-one – was obtained. In this step were used reactions of variously substituted anthranilic acid derivatives with appropriate aromatic acid derivatives. Required quinazolinone was available in two steps by base catalysed cyclisation of *o*-amidobenzamides which were obtained from reaction of anthranilamide derivative with aromatic acylchloride (scheme 1, method A)<sup>8</sup> or in one step by acid catalysed condensation of anthranilic acid ester with aromatic nitrile (scheme 1, method B).<sup>9</sup> 2-Substituted quinazolinone was then converted to 4-chloroquinazoline derivative using POCl<sub>3</sub> (scheme 1).<sup>10</sup> Yields of reactions mentioned above were good to excellent.

Key reaction step was nucleophilic substitution of 4-chloroquinazoline derivatives with aromatic and aliphatic amines. Most common process was acid catalysed reaction<sup>11</sup> (scheme 1, conditions e) which provided products in good to excellent yields according to aniline (amine) used. Reaction in basic media<sup>12</sup> was complementary method suitable mainly for sterically hindered anilines (scheme 1, conditions f). Yields of the basic reaction were usually low however sufficient to obtain derivatives which were not accessible by acid catalyzed reaction. In the case of more nucleophilic aliphatic amines were reactions done with excess of amine (scheme 1, conditions g) and products were obtained in good yields.

Because of limited space of this summary of Ph.D. thesis I will not show any details here. For those who are interested in details I recommend the original text of the thesis where all information can be found.

Scheme 1. Synthetic methods used in preparation of quinazoline-4-amines.



#### 4. Results and discussion

During my work on this thesis I prepared seven series of quinazoline derivatives and one series of 6-methylpyrimidine derivatives. I will comment on each series separately to see the results clearly.

4.1. Series „zero.“ This series contains compounds **61** – **68** bearing isomeric pyridinyl moieties in position 2 of quinazoline scaffold. Aromatic residue on nitrogen in position 4 was substituted with various combinations of polar functionalities (fig. 2). Most of these compounds was poorly soluble or did not exhibit any significant activity in AlphaScreen assay.

4.2. Series of compounds for photoaffinity labelling.<sup>13</sup> Three benzophenone derivatives **69–71** were prepared (fig. 3) to attempt photoaffinity labelling<sup>13</sup> in laboratory of colleagues from biochemistry. These compounds has shown some activity in AlphaScreen assay (IC<sub>50</sub> = 9 – 48 μM). Unfortunately their solubility was poor which could be one of the reasons why the photoaffinity labelling was not successful.



Fig. 2. Derivatives of series „zero“ substituted with polar functional groups.

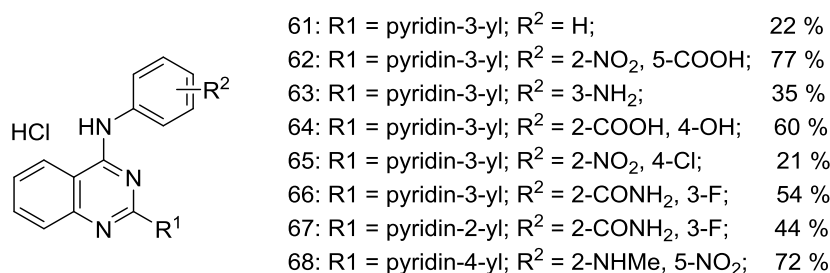
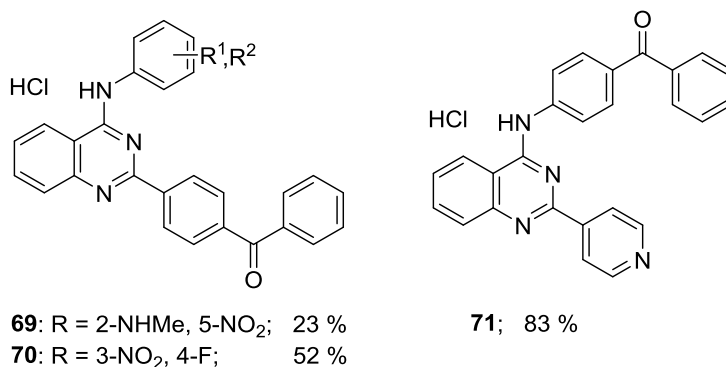
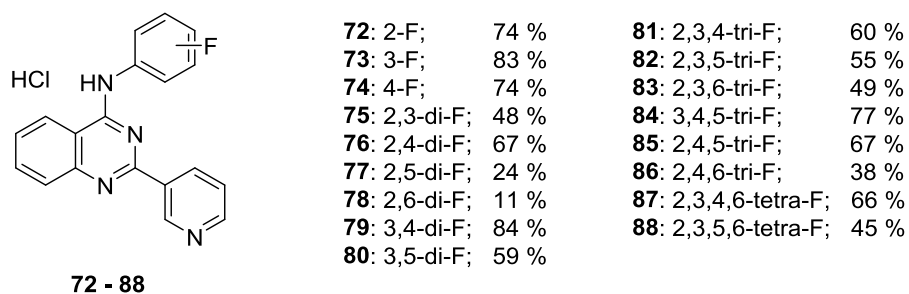


Fig. 3. Derivatives for photoaffinity labelling.



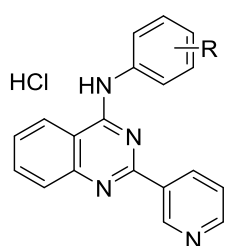
4.3. Series of *N*-fluoroaryl-2-(pyridin-3-yl)quinazolin-4-amines. During evaluation and comparison of data obtained from compounds prepared before together with my colleagues we realized that some of the most active compounds have similar structural feature which was *N*-fluoroaryl substituent. Therefore I decided to prepare compounds **72–88** which were bearing mono, di, tri and tetrafluoroaryl moieties on nitrogen in position 4 (fig. 4). Particularly good results in AlphaScreen assay were obtained from trifluoroaryl compounds **84** and **85**.

Fig. 4. Fluoroaryl derivatives of quinazolin-4-amine.



4.4. Series of *N*-halogenaryl-2-(pyridin-3-yl)quinazolin-4-amines. In view of interesting results of fluorinated derivatives I was curious about the results of other halogen analogues (chlorine and bromine). Therefore I synthesized compound **89–95** (fig. 5; some compounds with fluorine and another substituent are also included). Most of these derivatives seemed to be considerably active in AlphaScreen assay despite their quite poor solubility. Unfortunately the results of compounds **92** a **93** could be influenced by their interference with components of the assay. In the case of derivatives **89** a **90** was their activity confirmed also in tissue culture assay (IC<sub>50</sub> ~ 5 μM).

Fig. 5. Other halogen derivatives of quinazolin-4-amine.

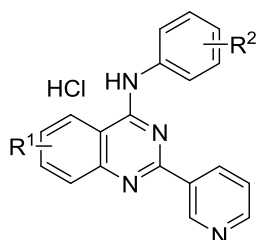


**89 - 95**

<b>89:</b> R = 2-OH, 5-F;	65 %
<b>90:</b> R = 2-OMe, 5- F;	52 %
<b>91:</b> R = 3-CF <sub>3</sub> ;	31 %
<b>92:</b> R = 2,3,4-tri-Cl;	68 %
<b>93:</b> R = 2,4,5-tri-Cl;	11 %
<b>94:</b> R = 2,5-di-Br;	47 %
<b>95:</b> R = 2,4,5-tri-Br;	28 %

4.5. Series of 2-(pyridin-3-yl)quinazolin-4-amines substituted on benzene ring. Due to very limited solubility of compounds synthesized so far It was necessary to prepare some derivatives with enhanced solubility. I tried to achieve this goal by introduction of polar functional groups to benzene ring of quinazoline scaffold (compounds **96–98**, fig. 6). Most of these derivatives however have shown decrease or complete loss of activity in AlphaScreen assay compared to their analogs without substituents on benzene ring. Effect on their solubility was rather negative but not significant.

Fig. 6. Derivatives of quinazolin-4-amines substituted on benzene ring.

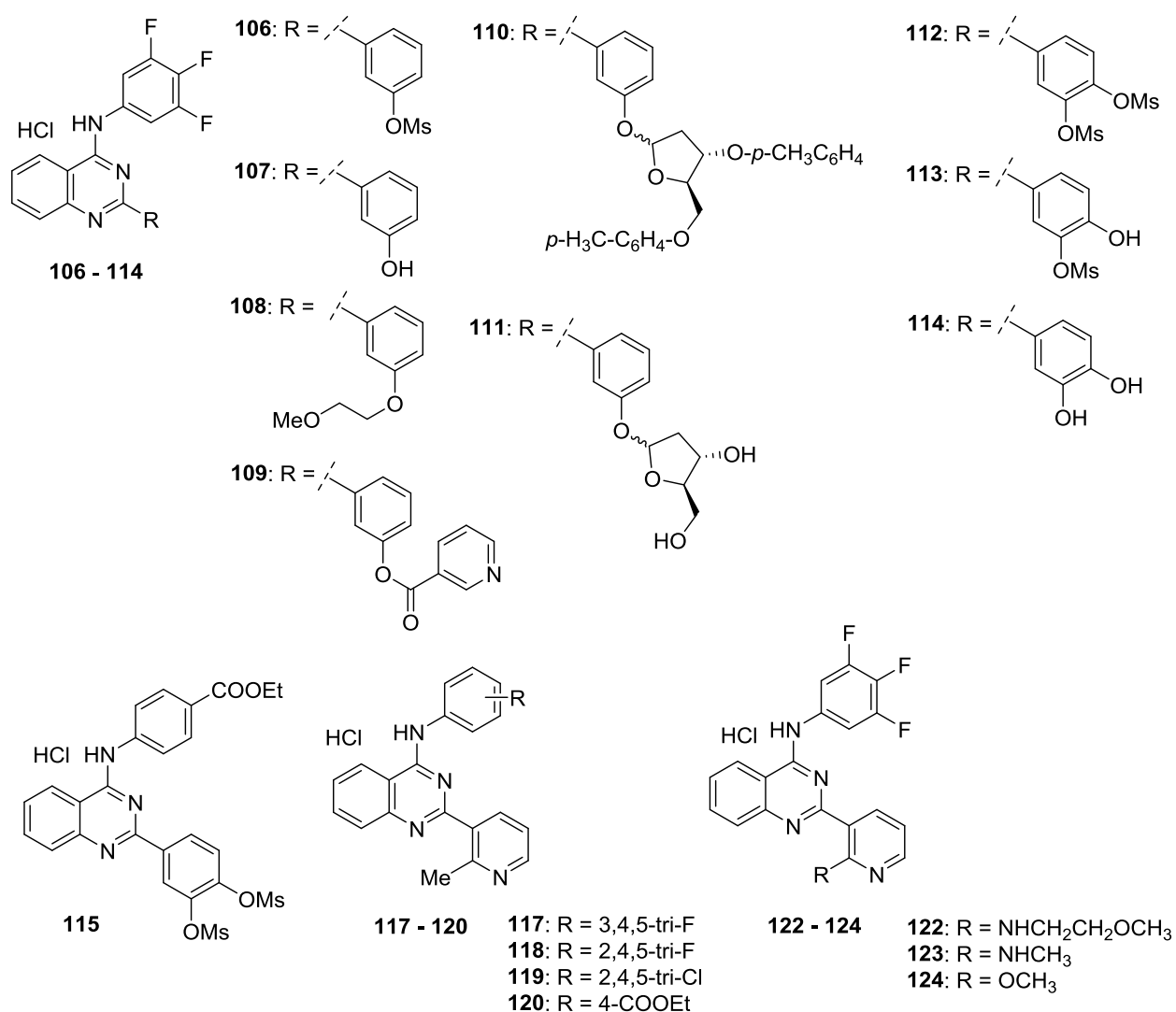


<b>96:</b> R <sup>1</sup> = 6,7-di-OCH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> OCH <sub>3</sub> , R <sup>2</sup> = 2-NHMe, 5-NO <sub>2</sub> ;	49 %
<b>97:</b> R <sup>1</sup> = 6,7-di-OEt, R <sup>2</sup> = 3,4,5-tri-F;	86 %
<b>98:</b> R <sup>1</sup> = 6,7-di-OEt, R <sup>2</sup> = 4-COOEt;	78 %
<b>99:</b> R <sup>1</sup> = 6-OH, R <sup>2</sup> = 3,4,5-tri-F;	15 %
<b>100:</b> R <sup>1</sup> = 7-CF <sub>3</sub> , R <sup>2</sup> = 3,4,5-tri-F;	55 %
<b>101:</b> R <sup>1</sup> = 7-CF <sub>3</sub> , R <sup>2</sup> = 3-CF <sub>3</sub> ;	77 %
<b>102:</b> R <sup>1</sup> = 7-CF <sub>3</sub> , R <sup>2</sup> = 2-F, 5-NO <sub>2</sub> ;	90 %

4.6. Series of chinazolin-4-amines bearing substituted aryls in position 2. In view of lowered activity of derivatives substituted on benzene ring in comparison with their non-

substituted analogs I decided to investigate compounds with substituted aryls in position 2. Therefore I prepared compounds **106–124** (fig. 7). In the case of derivatives **106–111** the modifications lead to loss of activity and paradoxically to worse solubility too. Similar results were obtained in the case of compounds **112–115** with exception of substance **114** which showed desired increase of solubility and activity in AlphaScreen assay compared to its pyridin-3-yl analog. Increased solubility with retained activity was also achieved in compound **117**, unfortunately other derivatives within this series had lower activity and/or decreased solubility in comparison with their pyridin-3-yl analogs.

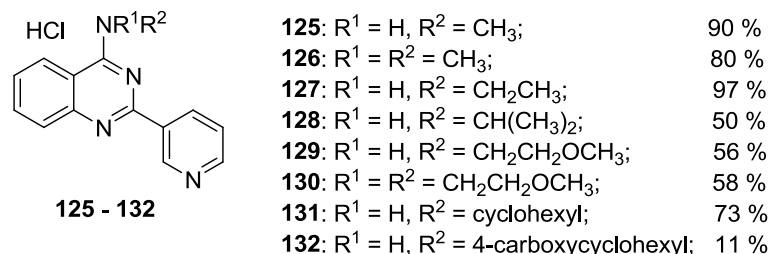
Fig. 7. Derivatives of quinazolin-4-amines with substituted aryls in position 2.



4.7. Series of aliphatic quinazolin-4-amine derivatives. Another option to increase solubility of such polyaromatic substances was replacement of one of aromatic rings by aliphatic residue. Therefore I prepared compounds **125–134** bearing aliphatic substituent on

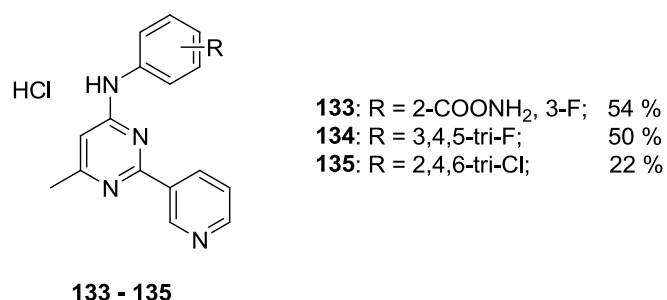
nitrogen in position 4 (fig. 8). Although solubility of all compounds of this series was  $\geq 100$   $\mu\text{M}$  activities in AlphaScreen assay of these derivatives was completely lost in all cases.

Fig. 8. Derivatives of quinazolin-4-amine with aliphatic substituents.



4.8. Series of 6-methyl-*N*-aryl-2-(pyridin-3-yl)pyrimidin-4-amines. Derivatisation of quinazolines very often did not provide desired results – only few synthesised compounds had increased activity in AlphaScreen assay and better solubility. It was decided to switch our attention in HIV-1 capsid assembly inhibitors project to derivatives of 6-methylpyrimidines. In these compounds was retained general 1,3-diazine scaffold, but aromatic ring was replaced by simple methyl group. Within the thesis I prepared three analogs (**133–135**, fig. 9) of compounds described earlier. Derivatives **133** and **134** unfortunately exhibited decrease of solubility compared to their quinazoline analogs. In the case of compound **135** slightly solubility was increased while its activity in AlphaScreen assay was retained.

Fig. 9. Derivatives of 6-methylpyrimidin-4-amine.



## 5. Conclusions

This PhD. thesis was focused on preparation of quinazoline-4-amines as HIV-1 capsid assembly inhibitors. Based on results of biochemical testing of activity of such compounds were designed new structurally modified substances with enhanced activity (both, in

AlphaScreen and tissue culture assays) and better solubility which was generally low. The results can be summarized as follows:

- a) The library of quinazoline-4-amines was expanded with 68 compounds in seven series; also 3 derivatives of 6-methylpyrimidin-4-amine were prepared.
- b) Series of derivatives with fluorobenzene substituents on nitrogen in position 4 was investigated in details and some compounds with increased activity in AlphaScreen assay were found. Activity of some of these compounds was further confirmed in tissue culture assay and their virostatic activity (as IC<sub>50</sub> value) was in low micro molar range. Example of such substances is amide derivative **67** or trifluorobenzene derivatives **84** and **85**.
- c) Based on results of fluorobenzene substituted quinazoline-4-amines some analogs possessing other halogens (chlorine, bromine) were also prepared. Among them trichlorobenzene analogs **92** and **93** and bromoanalogs **94** and **95** exhibited activity in AlphaScreen assay almost one order of magnitude better than original fluoroderivatives. Unfortunately the results of trichloroderivatives **92** and **93** were also influenced by their interference with components of AlphaScreen assay
- d) Attempting to improve solubility of prepared compounds different polar functional groups were introduced to the various positions in the molecule. In most cases these modifications lead to decrease or total loss of activity and paradoxically solubility was often decreased. Positive exception from this trend was found in catechol derivative **114** which exhibits both, better solubility and activity in AlphaScreen assay.
- e) Another option which author tried to increase solubility was introduction of 2-methylpyridinyl substituent to position 2 of quinazoline moiety. Resulting hindered rotation should decrease planarity and symmetry of the molecule, worsen crystal packing and consequently increase solubility.<sup>14</sup> This approach was successful only with derivative **117** which exhibited better solubility with retained activity in AlphaScreen assay.

- f) Significant increase of solubility was achieved with derivatives bearing aliphatic residue instead of aromatic ring on nitrogen in position 4 of quinazoline. However this modification lead to complete loss of activity in AlphaScreen assay which is evidence of necessity of aromatic substituent on nitrogen in position 4 of quinazolinamines.
- g) The last explored possibility which should lead to solubility improvement was replacement of aromatic ring of quinazoline with simple methyl group. In other word shift from quinazoline to 6-methylpyrimidine derivatives. Results are somehow contradictory however in the case of trichlorobenzene derivative **135** solubility was partially increased while activity in AlphaScreen assay was retained.

When attempting to summarise the points above, as well as other results presented in this work, I have to admit that despite some successes in increasing the solubility and activity of presented compounds, for their physic-chemical properties they are not the best candidates for work in the field of medicinal chemistry. Probably there is still room for improvement of their properties, but the question remains. Is it possible to simultaneously achieve sufficient activity and solubility needed for further biochemical and virological research by modification of such polyaromatic quinazoline derivatives?

## 6. References

1. *Global update on the health sector response to HIV, 2014*; World Health Organisation, WHO Press: Geneva, Switzerland , 2014; ISBN 978 92 4 150758 5.
2. Brook, I. *J. Am. Med. Assoc.* 1987, 258, 1517.
3. a) <http://aidsinfo.nih.gov/education-materials/fact-sheets/21/58/fda-approved-hiv-medicines> (přístup 10. dubna 2015);  
b) <http://www.fda.gov/ForPatients/Illness/HIVAIDS/Treatment/ucm118915.htm> (přístup 10. dubna 2015).
4. Sluis-Cremer, N.; Arion, D.; Parniak, M. A. *Cell. Moll. Life Sci.* **2000**, 57, 1408.
5. Machara, A.; Lux, V.; Kožíšek, M.; Grantz Šašková, K.; Štěpánek, O.; Katora, M.; Parkan, K.; Pávová, M.; Glass, B.; Sehr, P.; Lewis, J.; Mueller, B.; Kraeusslich, H.-G.; Konvalinka, J. *J. Med. Chem.* in revisions.
6. Sticht, J.; Humbert, M.; Findlow, S.; Bodem, J.; Müller, B.; Dietrich, U.; Werner, J.; Kräusslich, H.-G. *Nat. Struct. Mol. Biol.* **2005**, 12, 671.
7. Armarego, W. L. F. *Chem. Heterocycl. Compd.* **1967**, 24, 1.

8. Lee, S. J.; Konishi, Y.; Yu, D. T.; Miskowski, T. A.; Riviello, Ch. M.; Macina, O. T.; Frierson, M. R.; Kondo, K.; Sugitani, M. *J. Med. Chem.* **1995**, *38*, 3547.
9. Bogolubsky, A. V.; Ryabukhin, S. V.; Plaskon, A. S.; Stetsenko, S. V.; Volochnyuk, D. M.; Tolmachev, A. A. *J. Comb. Chem.* **2008**, *10*, 858.
10. Manhas, M. S.; Hoffman, W. A.; Bose, A. K. *J. Heterocycl. Chem.* **1979**, *16*, 617.
11. Bunnet, J. F.; Zahler R. E. *Chem. Rev.* **1951**, *49*, 273.
12. Chen, B.-C.; Droghini, R.; Lajeunesse, J.; Dimarco, J. D.; Balella, M.; Chidambaram, R. Process for Preparing 2-Aminothiazole-5-aromatic Carboxamides as Kinase Inhibitors. PCT Int. Patent Appl. WO2005077945, 25th August 2005.  
[http://worldwide.espacenet.com/publicationDetails/originalDocument?CC=WO&NR=2005077945A2&KC=A2&FT=D&ND=3&date=20050825&DB=worldwide.espacenet.com&locale=en\\_EP](http://worldwide.espacenet.com/publicationDetails/originalDocument?CC=WO&NR=2005077945A2&KC=A2&FT=D&ND=3&date=20050825&DB=worldwide.espacenet.com&locale=en_EP) (přístup 12. srpna 2015).
13. Dormán, G.; Prestwich, G. D. *Trends Biotechnol.* **2000**, *18*, 64.
14. Ishikawa, M.; Hashimoto, Y. *J. Med. Chem.* **2011**, *54*, 1539.

### Curriculum vitae

Mgr. Ondřej Štěpánek

Institute of Organic Chemistry and Biochemistry AS CR, v.v.i.

Flemingovo nám. 2

Praha 6

16000

Czech republic

E-mail: dravecek@mail.com

Phone: +420 739 673 420

Date of Birth: 21.12.1983

#### Scientific CV:

Since October 2009 **Ph.D. study**, Institute of Organic Chemistry and Biochemistry, Academy of Sciences of the Czech Republic

Dissertation: Synthesis of biologically active compounds with quinazoline scaffold.

(Advisor prof. RNDr. Martin Kotora, CSc.)

2006-2009 **undergraduate study**, Charles University in Prague, faculty of Science,

M.S. degree – specialization organic chemistry

Master Thesis: Study of Ozonation of Triterpenoids

(Advisor RNDr. Jan Šarek, Ph.D.)

2003-2006 **undergraduate study**, Charles University in Prague, faculty of Science,

Bc.S. degree – specialization chemistry in natural sciences

Bachelor Thesis: Ozonation of Lupane Triterpenoids as Way of Preparatiopn of New Compounds with Cytotoxic Activity  
(Advisor RNDr. Jan Šarek, Ph.D.)

**Proffesional experience:**

**September-November 2011** – Intership in group of Dr. Axel Jacobi von Wangelin at University of Cologne (now Prof. at University of Regensburg)  
Optimization of conditions of chemoselective cobalt-catalyzed biaryl coupling reactions.

**May-June 2008** – Intership in LentiKat's a.s. (<http://www.lentikats.eu>)  
Optimisation of the fermentation conditions in a continuous process of ethanol production.

**March-December 2007** – Researcher in Betulinines (<http://betulinines.com>)  
Custom bulk syntheses, extraction and isolation of plant material, scale-up of chemical syntheses.

**Language ability:**

English – Test of English as Foreign Language (TOEFL)

German – basic knowledge

Russian – basic knowledge

**Seznam publikací / List of Publications**

Kvasnica, M.; Sarek, J.; Vlk, M.; Budesinsky, M.; Stepanek, O.; Kubelka, T.; Plutnarova, I. Study of stereoselectivity of reduction of 18-oxo des-E triterpenoids by sodium borohydride in the presence of cerium chloride *Tetrahedron: Asymmetry* **2011**, 22, 1011.

Gülak, S.; Stepanek, O.; Malberg, J.; Rezaei Rad, B.; Kotora, M.; Wolf, R.; von Wangelin, A. J. Highly chemoselective cobalt-catalyzed biaryl coupling reactions *Chem. Sci.* **2013**, 4, 776.

Kräusslich, H.-G.; Sticht, J.; Wildova, M.; Lux, V.; Konvalinka, J.; Kotora, M.; Grantz Šašková, K.; Kožíšek, M.; Štěpánek, O.; Parkan, K.; Machara, A. Compounds for Use in Inhibiting HIV Capsid Assembly, PCT Int. Patent Appl. WO2014128206A1. 28th August 2014.

Kräusslich, H.-G.; Sticht, J.; Pávová, M.; Lux, V.; Konvalinka, J.; Kotora, M.; Grantz Šašková, K.; Kožíšek, M.; Štěpánek, O.; Parkan, K.; Machara, A. Compounds for Use in Inhibiting HIV Capsid Assembly, PCT Int. Patent Appl. WO2014128213A1. 28th August 2014.

Prechalová, E.; Štěpánek, O.; Smrček, S.; Kotora, M. Medicinal application of perfluoralkylated chain-containing compounds *Future Med. Chem.* **2014**, 6, 1201.