

UNIVERZITA KARLOVA

Přírodovědecká fakulta

---

Studijní program: Klinická a toxikologická analýza



Michal Šafránek

Syntéza (fosfonomethoxy)ethyl (PME) derivátů odvozených od  
4-substituovaných 2-aminotiazolů jako potencionálních inhibitorů bakteriálních  
adenylátcykláz

Synthesis of (phosphonomethoxy)ethyl (PME) derivatives derived from 4-substituted  
2-aminothiazoles as potential inhibitors of bacterial adenylate cyclases

Bakalářská práce

Vedoucí bakalářské práce: Ing. Zlatko Janeba, CSc.

Praha 2019

**Prohlášení:**

Prohlašuji, že jsem tuto bakalářskou práci vypracoval samostatně a že jsem uvedl všechny použité informační zdroje a literaturu. Můj podíl na bakalářské práci byl návrh syntézy a příprava cílových diesterů fosfonátů. Tato práce ani její podstatná část nebyla předložena k získání jiného nebo stejného akademického titulu.

V Praze dne 7. 1. 2019.

**Poděkování:**

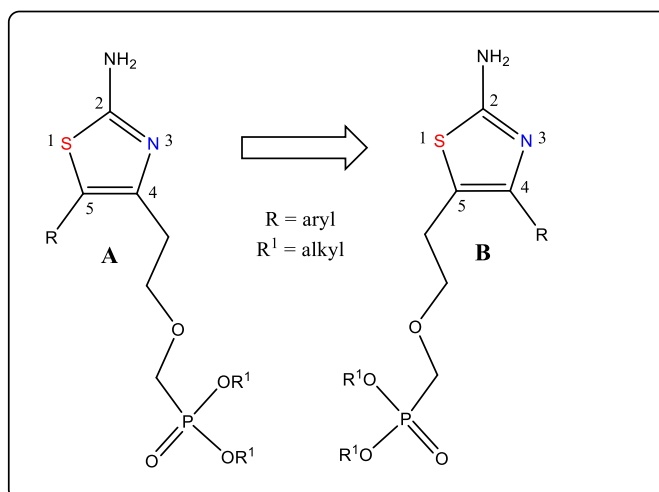
V první řadě bych chtěl poděkovat Ing. Zlatko Janebovi, CSc. za ochotu, trpělivost a vstřícnost při vedení bakalářské práce. Dále chci poděkovat Michalu Česnekovi, Ph.D. za pomoc při práci v laboratoři a za dohled nad sepisováním bakalářské práce. Velký dík patří i ostatním členům laboratoře Zlatka Janeby za odborné rady. Další poděkování patří pracovníkům laboratoře Heleny Mertlíkové-Kaiserové za otestování připravených potenciálních inhibitorů ACT toxinu. V neposlední řadě bych chtěl poděkovat své rodině a přítelkyni za duševní podporu během studia a během sepisování této práce.

### Abstrakt:

Tato práce je součástí rozsáhlé strukturně-aktivitní (SAR) studie zahrnující acyklické nukleosidfosfonáty (ANP), obsahující přírodní i nepřírodní báze, jako potenciální inhibitory adenylátcyklázového toxinu (ACT). Tento toxin je produkován bakterií *Bordetella pertussis*, která způsobuje černý kašel.<sup>1,2,3</sup>

V rámci obecné SAR studie byla nedávno studována nová skupina látek, 5-substituované 2-amino-4-PME-thiazol deriváty obecné struktury **A**, které byly shledány účinnými inhibitory ACT.<sup>4</sup>

Cílem této práce bylo navrhnout vhodný syntetický postup pro přípravu příslušných regioizomerů odvozených od látek typu **A**, tj. 4-substituovaných 2-amino-5-PME-thiazol derivátů obecné struktury **B**. Připravené nové sloučeniny (jako jejich vhodná proléčiva) byly otestovány jako potenciální inhibitory bakteriálních adenylátcykláz.



Obrázek 1: Návrh nového typu inhibitorů ACT.

### Klíčová slova:

- acyklické nukleosidfosfonáty, syntéza, thiazolu, adenylátcykláza, *Bordetella pertussis*, *Bacillus anthracis*, inhibitory, proléčiva

**Abstract:**

This work is a part of an extensive structure-activity relationship (SAR) study of acyclic nucleoside phosphonates (ANPs). The study deals with ANPs (having either natural or non-natural nucleobases) as potential inhibitors of adenylate cyclase toxin (ACT). This toxin is produced by bacteria *Bordetella pertussis* causing black cough (pertussis).<sup>1,2,3</sup>

Within the general SAR study, a new group of compounds, namely 5-substituted 2-amino-4-PME-thiazole derivatives (general structure **A**) was studied. The compounds were found to be effective inhibitors of ACT.<sup>4</sup>

The aim of this work was to design a suitable synthetic procedure for the preparation of regioisomers derived from compounds of type **A**, i.e. 4-substituted 2-amino-5-PME-thiazole derivatives of general structure **B**. All prepared compounds (as their suitable prodrugs) were tested as potential inhibitors of bacterial adenylate cyclases.

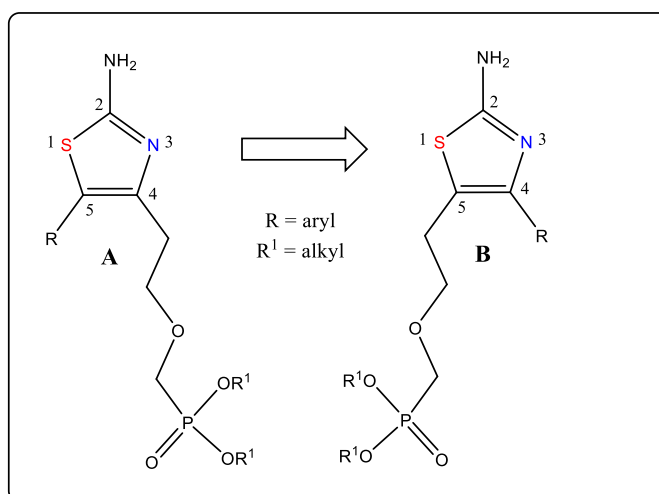


Figure 1: Design of a novel type of ACT inhibitors.

**Key words:**

- acyclic nucleoside phosphonates, synthesis, thiazole, adenylate cyclase, *Bordetella pertussis*, *Bacillus anthracis*, inhibitors, prodrugs

**Obsah:**

Seznam zkratek .....	- 7 -
<b>1. Teoretický úvod</b> .....	- 9 -
1.1. <i>Bordetella pertussis</i> a černý kašel.....	- 10 -
1.1.1. Pertusový toxin .....	- 11 -
1.1.2. Adenylátcyklázový toxin .....	- 11 -
1.1.3. Mechanismus – příspěvek PT a ACT k patogenitě <i>Bordetella pertussis</i> .....	- 12 -
1.2. <i>Bacillus anthracis</i> a onemocnění anthrax .....	- 13 -
1.2.1. Mechanismus patogenity <i>Bacillus anthracis</i> .....	- 14 -
1.3. Inhibitory bakteriálních adenylátcykláz .....	- 14 -
1.3.1. Cílové látky jako inhibitory AC.....	- 18 -
1.4. Chemie thiazolu a 2-aminothiazolu .....	- 20 -
1.4.1. Chránění 2-aminothiazolu.....	- 20 -
1.4.2. Bromace thiazolového jádra .....	- 21 -
1.4.3. Mechanismus bromace thiazolového jádra pomocí NBS .....	- 22 -
1.4.4. Halogen-migrační reakce .....	- 23 -
1.4.5. Cross-coupling reakce pro tvorbu C-C vazeb.....	- 26 -
<b>2. Cíl syntézy</b> .....	- 30 -
<b>3. Výsledky a diskuze</b> .....	- 31 -
3.1. Chránění aminoskupiny 2-aminothiazolu pomocí di- <i>terc</i> -butyldikarbonátu .....	- 31 -
3.2. Bromace 2-Boc aminothiazolového derivátu do polohy 5.....	- 33 -
3.3. Halogen-migrační reakce .....	- 34 -
3.4. Suzuki cross-coupling reakce.....	- 34 -
3.5. Halogen-migrační reakce .....	- 36 -
3.6. Suzuki cross-coupling reakce.....	- 39 -
3.7. Výsledky testování připravených proléčiv na buněčných liniích .....	- 42 -
<b>4. Experimentální část</b> .....	- 44 -
4.1. Připravené látky .....	- 44 -
<b>5. Závěr</b> .....	- 53 -
<b>6. Literatura</b> .....	- 54 -

**Seznam zkratek:**

AC	adenylátcykláza
ACT	adenylátcyklázový toxin
ANP	acyklický nukleosidfosfonát (z angl. <b>acyclic nucleoside phosphonate</b> )
ATP	adenosintrifosfát (z angl. <b>adenosine triphosphate</b> )
bis(POM)PMEA	adefovir dipivoxil
Boc	<i>terc</i> -butoxykarbonyl
Boc <sub>2</sub> O	di- <i>terc</i> -butyl dikarbonát = Boc anhydrid
BuLi	<i>n</i> -butyllithium
cAMP	cyklický adenosinmonofosfát
CyaA	adenylátcyklázový toxin
DIPA	diisopropylamin
DMAP	4-(dimethylamino)pyridin
DME	dimethoxyethan
DMF	dimethylformamid
E <sup>+</sup>	elektrofil
EF	edémový faktor
ESI	elektrosprejová ionizace
Et <sub>3</sub> N	triethylamin
EtOAc	ethyl-acetát
HD	halogen-migrační reakce (z angl. <b>halogen dance reaction</b> )
HR	vysokorozlišovací (z angl. <b>high resolution</b> )
LDA	diisopropylamid lithný
LF	letální faktor
MANT	<i>N</i> -methylantraniloyl
MeOH	methanol
MS	hmotnostní spektrometrie
NaO <sup>t</sup> Bu	<i>terc</i> -butylát sodný
NBS	<i>N</i> -bromsukcinimid
NMR	nukleární magnetická rezonance
PA	ochranný (protektivní) antigen

PME	(fosfonomethoxy)ethyl {z angl. (phosphonomethoxy)ethyl}
PMEApp	adefovirdifosfát
PT	pertusový toxin
R	uhlovodíkový zbytek
RTX	Repeat-in-Toxin
SAR	strukturně-aktivní vztah (z angl. structure-activity relationship)
THF	tetrahydrofuran
TLC	tenkovrstvá chromatografie
TMS	trimethylsilyl
UPLC	Ultra Performance Liquid Chromatography
X	halogen



## 1. Teoretický úvod

V této bakalářské práci byly vyvíjeny nové látky, využitelné jako potenciální inhibitory bakteriálních adenylátcykláz (AC), jmenovitě adenylátcyklázového toxinu (ACT) a edema faktoru (EF) produkovaných bakteriemi *Bordetella pertussis* (způsobující černý kašel) a *Bacillus anthracis* (způsobující anthrax). Tyto toxiny jsou zodpovědné za virulenci bakterií *Bordetella pertussis* a *Bacillus anthracis*.

Pro tuto problematiku jsme se rozhodli především z důvodu ne zcela jednoduché a efektivní léčby těchto nemocí. Proti dnešním vakcínám a antibiotikům si bakterie postupně získávají imunitu, a tak se léčba (prevence) stává méně efektivní. Navíc se s léčbou musí začít včas a trvá poměrně dlouhou dobu. Závažnost těchto onemocnění je tak vysoká, že je potřeba připravit nové látky, které by byly v boji proti těmto nemocem účinnější. Ideálním inhibitorem by byla látka, která by léčila rychleji, v menším množství a dala by se aplikovat i delší dobu po nákaze. Také je důležité, aby byla co nejméně toxická pro organismus daného jedince.

Počet případů černého kašle se v České republice stejně jako ve světě v posledních 15 letech opět zvyšuje. Velká část infikovaných se nakazí i přesto, že byla očkována.

*Bacillus anthracis* vytváří spóry, které je možné díky biotechnologiím využít jako biologickou zbraň. Dají se použít buď běžné kmeny této bakterie, či geneticky upravené. Kvůli snadnému přenosu spór vzduchem jich bylo využito při různých atentátech. Je velmi pravděpodobné, že jich může být zneužito i v budoucnu, což by mohlo mít fatální následky.

Proto se hledají účinnější způsoby léčby (prevence), které by ještě lépe dokázaly bakteriální infekci potlačit a účinky toxinů neutralizovat. Antibiotika dokáží pouze eliminovat množení a existenci bakterie. Pro likvidaci samotných toxinů, které mohou v organismu přetrvávat poměrně dlouhou dobu po eradikaci bakterie a zhoršovat celkovou prognózu, je potřeba použít antitoxiny. Dnešní dostupné antitoxiny se musí infikovaným pacientům podávat pouze intravenózně v raných fázích onemocnění. Hlavní nevýhodou je také fakt, že léčba trvá dlouho, což může léčbu znesnadnit. Z těchto důvodů byla hledána a později navržena skupina látek potenciálně inhibujících ACT či EF. Jedna skupina látek již byla zkoumána a připravena v laboratoři, ve které jsem prováděl svou bakalářskou práci. V dalších částech úvodu bude uvedena charakteristika obou bakterií a jejich toxinů. Probereme i mechanismy působení

jednotlivých toxinů v lidském těle.

### **1.1. *Bordetella pertussis* a černý kašel**

Tato bakterie patří mezi gram-negativní bakterie a je známá především pro své negativní účinky na lidský organismus. *Bordetella pertussis* napadá dýchací cesty a způsobuje známé onemocnění černý kašel, který je většinou kapénkově dále přenášen z člověka na člověka. Vyskytuje se převážně v rozvojových zemích, kde není dostatek financí na vakcíny a kde je omezeně dostupná zdravotní péče. Dle literatury je v těchto zemích každý rok zaznamenáno až 48 milionů nemocných a ročně zemře okolo 295 tisíc lidí. V dnešní době se počet případů nakažení černým kašlem zvyšuje i ve vyspělých zemích.<sup>3,5</sup>

Po 1 až 3 týdnech inkubační doby přicházejí první příznaky nemoci, která může trvat 6 až 8 týdnů. Na počátku jsou pozorovány příznaky podobné běžnému nachlazení. Postupně dochází k záchvatovému kašli, který může být provázen dávením či zvracením. Prozatím nebylo zjištěno, který z bakteriálních faktorů přispívá k patologickému kašli. Onemocnění trápí nejvíce děti do 19 let věku, avšak nejzávažnější příznaky jsou zaznamenávány u kojenců a batolat, u nichž je nejvyšší pravděpodobnost úmrtí. U starších dětí a adolescentů je projev nemoci mírnější. U neléčených jedinců může černý kašel přecházet v chronické onemocnění s přetrvávajícími problémy s dýcháním. Největší procento nakažených představují neočkovaní jedinci, především v rozvojových zemích. V mnoha případech však byli infikováni i očkovaní jedinci. Předchozí vakcíny nebyly nijak výrazně účinné, z toho důvodu se neustále hledají a vyvíjejí vakcíny nové a lepší.<sup>5,6</sup>

Z dat shromážděných státním zdravotním ústavem vyplývá, že po zavedení první vakcíny v roce 1958 došlo k dramatickému poklesu registrovaných případů pertuse a úmrtnosti na ní. Nejnižšího počtu registrovaných případů (pouze 5 obyvatel) bylo v ČR dosaženo v roce 1989. Bohužel došlo k obratu a od roku 1993 počet případů pertuse opět roste. Zatím nejhorším byl v tomto roce 2014 s 2521 případy. Nejvíce postiženou skupinou v minulých letech byla skupina dětí mladších 3 let. Od roku 1993 začaly přibývat případy onemocnění u věkové kategorie 10 až 14 let a postupně i ve skupině od 15 do 19 let. V roce 2017 bylo v této kategorii nejvíce nemocných, druhou nejvíce zasaženou skupinou byly děti do 3 let.<sup>7</sup>

*Bordetella pertussis* je striktně lidský patogen a je složité zkoumat jeho účinky v jiném živočišném organismu, protože nevykazují příznaky infekce typické pro člověka. Pouze myší aerosolový model částečně pomohl pochopit některé imunitní odpovědi organismu při interakci bakterie s hostitelem. *Bordetella pertussis* vytváří několik charakteristických toxinů, které jsou důležité pro překonání obrany hostitele. Pro tuto studii jsou důležité dva toxiny: prvním je pertusový toxin (PT) a druhým adenylátcyklázový toxin (ACT). Těmito dvěma toxiny se budeme zabývat z toho důvodu, že buď mají, nebo ovlivňují adenylátcyklázovou aktivitu při infekci hostitelského organismu. Adenylátcykláza je součástí jedné z domén ACT. PT zase nepřímo způsobuje stimulaci adenylátcyklázy.<sup>6</sup>

### 1.1.1. Pertusový toxin

Je to exotoxin produkovaný pouze bakterií *Bordetella pertussis*, která jej uvolňuje v neaktivní formě. PT je komplexní toxin složený z mnoha podjednotek (jedna aktivní podjednotka a 5 vazebných podjednotek). Vazebné podjednotky (S2-S5) se vážou na povrchu hostitelských buněk na různé molekuly glykokonjugátů. Některé z těchto podjednotek obsahují dvě různé sacharidy vázající domény, díky kterým má PT schopnost se vázat a infikovat hostitelskou (savčí) buňku. Enzymatickou aktivitu má podjednotka A (S1). PT se po navázání na receptor buňky transportuje endocytózou do cytosolu. Postupně přechází do Golgiho komplexu a endoplazmatického retikula. Mechanismus jeho působení v buňce je popsán v další kapitole. PT způsobuje při infekci organismu leukocytózu, tvorbu hlenu a pomáhá při adhezi bakterie na řasinkový epitel plic. Dále přispívá ke změnám v systému, např. zvyšuje uvolňování inzulínu (hypoglykémie).<sup>6, 8</sup>

### 1.1.2. Adenylátcyklázový toxin

Jedná se o toxin produkovaný bakterií *Bordetella pertussis*. Skládá se z *N*-terminální adenylátcyklázové domény, která obsahuje přibližně 400 aminokyselin, a z *C*-terminální (repetitivní) RTX hemolyzinové domény o cca 1300 aminokyselinách. Obě domény jsou aktivní v přítomnosti vápníku a jsou zodpovědné za cytotoxický účinek, převážně za apoptózu. RTX doména je potřebná pro přenos adenylátcyklázové domény do cytosolu buňky. Doména RTX se skládá z nonapeptidů bohatých na glycin a aspartát,

kteře dobře vázou vápník nezbytný pro ACT aktivitu. ACT oligomery tvoří v membráně póry a ACT monomery zprostředkovavajı translokaci AC domény.

ACT rychle tvoří neaktivní agregáty, hostitelská buňka tedy musí být blízko te bakteriální, aby mohl ACT aktivně působit na organismus. ACT váže specifický membránový receptor  $\alpha M\beta 2$  integrin nebo CR3 makrofágů, neutrofilů í NK buněk (vyskytující se mimo lipidové rafty), touto vazbou inhibuje fagocytózu. CR3 receptory slouží k rozpoznání a navázání mnoha molekul z povrchu bakterií, které jsou nasledne fagocytózou znieny. V přítomnosti kalmodulinu a vápníku (cytosolický protein jako katalyzátor syntézy cAMP z ATP) vykazuje toxin přímou AC aktivitu a téměř  $1000\times$  zvyší intracelulární cyklický AMP (cAMP). AC doména ACT se váže na C-terminální fragment kalmodulinu, což způsobı konformační změnu ACT (důležitá pro katalytickou aktivaci).

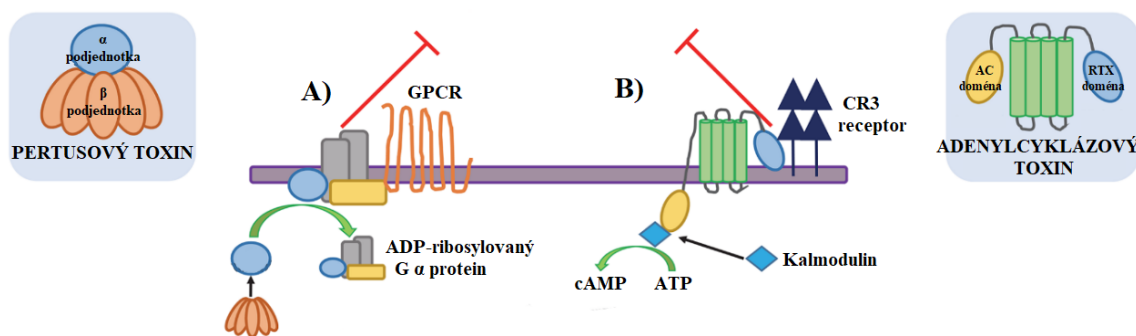
ACT je zodpovědný za řídnutí membrán nebo změny velikosti erytrocytů díky jeho hemolytické aktivitě. Také způsobuje dostatečnou tvorbu pórů a aktivitu AC u makrofágů, díky které se změní aktinový cytoskelet nebo dojde k prohloubení membrány.<sup>6</sup>

### 1.1.3. Mechanismus – přıspevек PT a ACT k patogenitě *Bordetella pertussis*

Přıspevек PT a ACT k patogenitě *B. pertussis* je znázorněn na Obr. 2.<sup>9</sup>

- A) Pertusový toxin (PT) je endocytózou přenesen do buňky. Alfa podjednotka PT se uvolní po intracelulárních procesech v endoplazmatickém retikulu do cytosolu. Tato podjednotka je ADP-ribosyl-transferáza a přenası ADP-ribosyl z  $NAD^+$  na  $\alpha$  podjednotku GPCR, která se nasledne oddělí. GPCR je receptor spřážený s G proteinem, který se vyskytuje na cytoplazmatické membráně. Tento protein fyziologicky inhibuje adenylátcyklázu a tím, že se oddělí  $\alpha$  podjednotka (receptor), GPCR se inaktivuje a nedochází tak k inhibici AC.<sup>9</sup>
- B) Adenylátcyklázový toxin (ACT, CyaA) se váže na komplementární receptor 3 (CR3). Tyto receptory se ukotvují na aktinová filamenta cytoskeletu buňky přes protein talin. Po interakci receptoru se ACT dostane do lipidové dvojvrstvy buněčné membrány a AC doména se astecne vnoří do cytosolu. Díky selektivním pórům pro  $Ca^{2+}$  v membráně dochází k jejich přenosu do cytosolu, díky čemuž dochází ke štěpení talinu a oddělení aktinový filament od komplexu ACT s podjednotkami

receptoru. Komplex se přesune do lipidových raftů, odkud se transportuje AC doména do cytoplazmy buňky, kde se naváže na kalmodulin a zvýší hladinu cAMP v buňce. Tento jev vede také k inhibici cytokinů, které se za fyziologických podmínek stimulují dělení buněk ničících patogeny.<sup>9</sup>



Obrázek 2: Mechanismus příspěvku ACT a PT k patogenitě *Bordetella pertussis*.<sup>9</sup>

## 1.2. *Bacillus anthracis* a onemocnění anthrax

*Bacillus anthracis* je gram-pozitivní bakterie, která tvoří spóry a způsobuje závažné onemocnění zvané anthrax. Nemoc nepostihuje pouze lidi, ale i zvířata. Především u přežvýkavců se setkáváme s četnými nákazami. Bakterie se dostává do prostředí především skrze trus či úhynem jedinců. Tímto způsobem snáze dochází ke kontaminaci prostředí a člověk tak přichází do přímého kontaktu s bakterií. V první polovině 20. století se začalo s rozsáhlými vakcínacemi zvířat (hlavně jatečního dobytka), čímž se snížil výskyt tohoto onemocnění.<sup>10,11</sup>

*Bacillus anthracis* se v životním prostředí vyskytuje v podobě spór, které odolávají nepříznivým podmínkám. Po napadení hostitele se mění ve vegetativní buňku množící se v hostiteli. Tato dvě biologická období se střídají. Nemoc má tři hlavní formy: kožní, gastrointestinální a plicní. Při kožním anthraxu vznikají svědivé tmavší puchýře, cca po 2 týdnech se objevují nebolestivé, nekrotické vředy. K infekci v trávicí soustavě může dojít při gastrointestinálním anthraxu, především v žaludku a střevech. Dotyčný poté nachází ve stolici a zvracích krev. Nejnebezpečnější formou je plicní anthrax. Nejdříve se jeví nemoc jako silná chřipka, poté přechází do stavu podobnému silnému zápalu plic.<sup>10</sup>

Spór se dá zneužít pro vojenské účely či při teroristických útocích. V roce 2001 došlo v USA k naze a usmrcení několika lidí formou tzv. anthraxových dopisů.

Jednalo se o dopisy obsahující spóry této bakterie, zaslané několika politikům a novinářům.<sup>12, 13</sup>

### 1.2.1. Mechanismus patogenity *Bacillus anthracis*

Hlavními faktory virulence jsou kapsle poly- $\gamma$ -D-glutamové kyseliny a antrax-toxin, který se skládá z edémového faktoru (EF) a z letálního faktoru (LF), přičemž oba faktory jsou spojeny s ochranným (protektivním) antigenem (PA) (Obr. 3). PA rozpoznává receptory na buněčné membráně hostitele (např. CMG2). Pomocí hostitelské furinové proteázy je PA rozštěpena na kratší úseky, které se spojují do heptamerů/oktamerů, které mohou v lipidových raftech hostitele vázat LF a EF.<sup>14</sup>

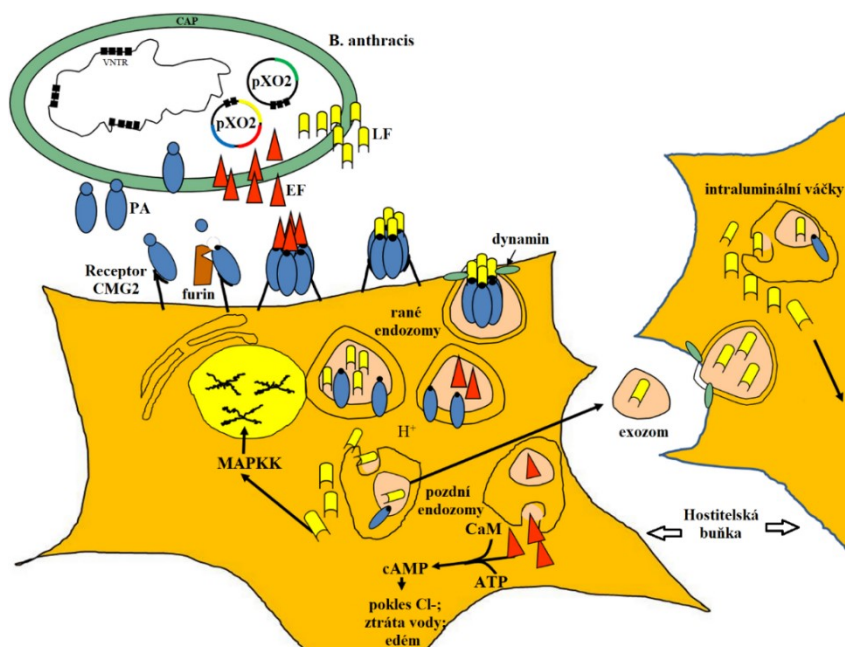
Tyto spojené komplexy jsou přeneseny do cytosolu buňky endocytózou zprostředkovanou klathrinem a dynaminem. Následně dochází díky kyselému prostředí uvnitř váčku (endozómu) k tvorbě pórů, přes které se EF a LF translakují do cytoplazmy. V cytoplazmě buňky začnou působit přímo, nebo přechází do stavu intraluminálních váčků (vchlípení váčku dovnitř váčku samotného). LF inaktivuje látky patřící mezi MAPKK kinázy, začnou se uvolňovat cytokiny, a nakonec může dojít k apoptóze, nekróze a hypoxii buňky. EF stejně jako ACT zvyšuje hladinu koncentrace cAMP v hostitelských buňkách. Vysoká koncentrace cAMP způsobí transport chloridových iontů a vody mimo buňku. LF i EF v počátečních fázích infekce blokují makrofágy a neutrofile, blokují imunitní systém.<sup>14</sup>

Důležitou charakteristikou vysoké virulence jsou již zmiňované intraluminální váčky. Díky nim zůstávají toxiny v těle hostitele i dlouho poté, co je bakterie opustí a jsou tak chráněny před lyzozomálními enzymy. Pokud není léčba poskytnuta včas, toxiny mohou pacientovi působit sepsi i v případě, že bakterie je již z těla odstraněna.<sup>11</sup>

### 1.3. Inhibitory bakteriálních adenylátcykláz

Inhibitorem AC je molekula, která přímo v buňce hostitele dokáže inhibovat bakteriální AC. Aby se však inhibitor dostal do cytoplazmy buňky, musí projít skrz plazmatickou membránu, jejíž vnitřek je hydrofobní. Pokud aktivní látka (léčivo) obsahuje polarizovatelné skupiny – v našem případě fosfonovou kyselinu – je vstup do buňky obtížný vlivem repulze na membráně. Je proto třeba tuto skupinu transformovat tak, aby neobsahovala odštěpitelné vodíky. Látka je proto transformována na biologicky

neaktivní, ale metabolicky rozložitelnou formu zvanou proléčivo, které již dokáže pasivně procházet membránou. Poté se postupně v cytoplazmě přemění zpět na samotný inhibitor AC.3

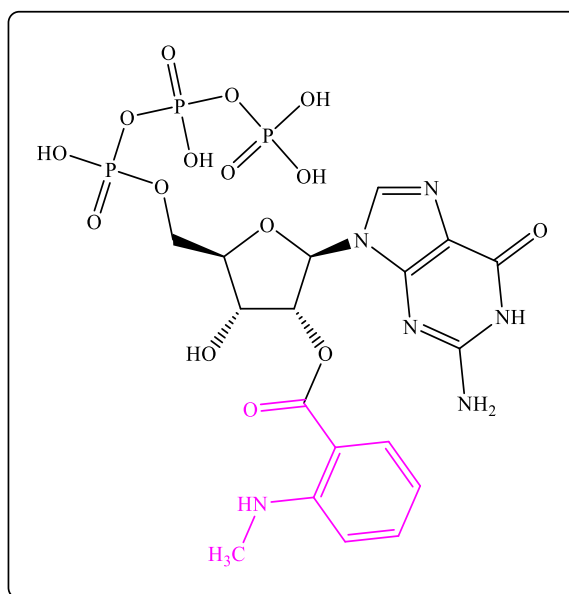


Obrázek 3: Mechanismus působení toxinů Bacillus anthracis na hostitelskou buňku.<sup>11</sup>

Podle struktury můžeme inhibitory rozdělit na cyklické – odvozené od přirozených nukleotidů, a na acyklické, kde je cukerná část nahrazena alifatickým řetězcem. Navíc může být provedena významná změna struktury v podobě nahrazení vazby P-O vazbou P-C. Takové nukleosidfosfonáty se díky tomu vyznačují enzymatickou a chemickou stabilitou.

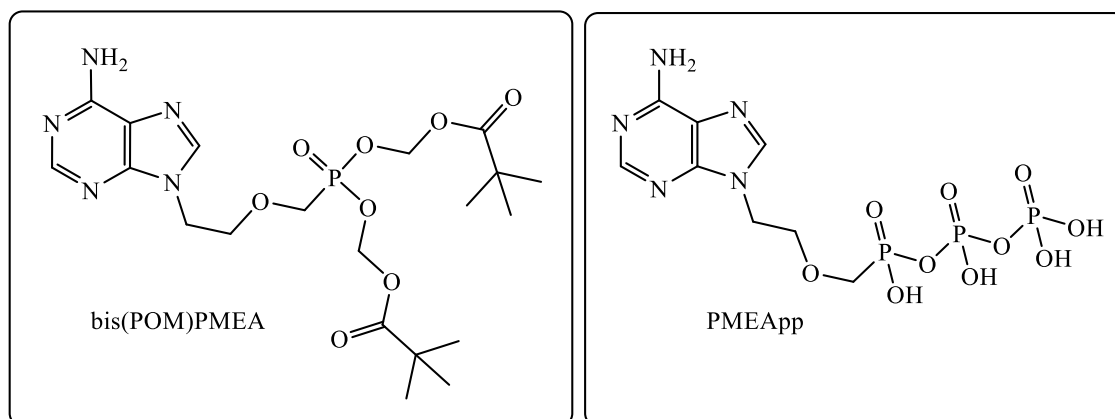
Cyklické nukleosidfosfonáty a jejich deriváty mají široké spektrum využití. Byly testovány jak analogy přirozených nukleotidů (např. purinové/pyrimidinové), tak i dále modifikované pomocí *N*-methylanthraniloylu (MANT) jako inhibitory EF.<sup>15</sup> MANT-nukleotidy vykazují fluorescenci. Tato vlastnost byla využita k navržení konformačních změn při aktivaci purifikovaných katalytických podjednotek ACT. Známým inhibitorem je např. MANT-GTP uvedený na Obr. 4. Nejlepšího účinku inhibice bylo dosaženo použitím MANT-CTP.<sup>15, 16, 17</sup>

Bouřlivým rozvojem prošly v minulosti právě acyklické nukleosidfosfonáty (ANP), u kterých bylo objeveno široké spektrum biologických aktivit. Jako účinné proléčivo látky adefovir byl shledán adefovir dipivoxil (bis(POM)PMEA, *Obr. 5*), lék původně určený k léčbě hepatitidy typu B. Adefovir inhibuje virovou reverzní transkriptázu. Mechanismus působení je následující: adefovir dipivoxil je po prostoupení buněčnou membránou transformován na volný fosfonát, který je dále fosforylován na aktivní metabolit adefovirdifosfát (PMEApp; *Obr. 5*). V minulosti bylo zjištěno, že PMEApp dokáže efektivně potlačit působení bakteriální AC. O aktivní místo enzymu soutěží s ATP. Proto proběhla snaha vyvinout účinná léčiva na bázi adefoviru, který by měl minimální efekt na lidské AC. PMEApp vytváří komplex s EF (u bakterie *Bacillus anthracis*) a kalmodulinem. Vazba EF s PMEApp je 10 000× vyšší než s endogenním substrátem ATP.<sup>3, 17, 18</sup>



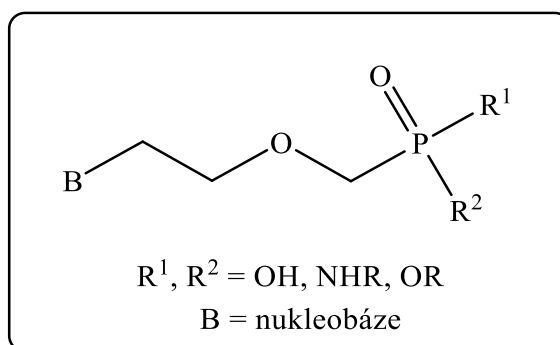
Obrázek 4: Struktura MANT-GTP. Barevně je označena skupina MANT.





Obrázek 5: Struktura bis(POM)PMEA a PMEApp.

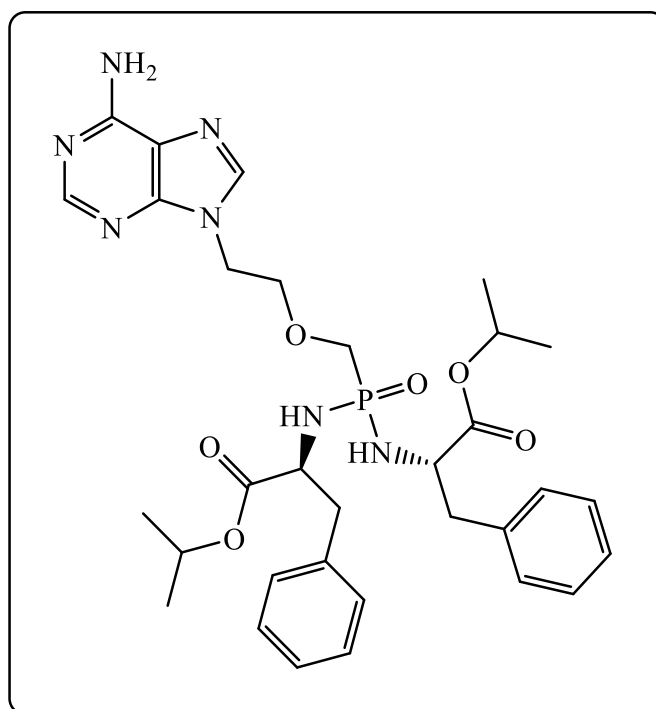
Během rozsáhlé strukturně aktivní studie bylo zjištěno, že deriváty adefoviru s modifikovanou lineární alifatickou částí měly nižší inhibiční účinky než samotný adefovir. Z toho vyplývá, že (fosfonomethoxy)ethylová (PME) část (Obr. 6) je tedy důležitá pro zachování inhibice.<sup>19</sup> Tato acyklická část inhibitoru je navázána na heterocyklickou bázi. Skupiny  $R^1$  a  $R^2$  fosfonátu mohou být zastoupeny skupinami -OH a -OR, -NHR. Za předpokladu, že R je lipofilní zbytek, tyto skupiny zajišťují molekule hydrofobicitu potřebnou pro vstup molekuly membránou. Volný fosfonát ( $R^1 = R^2 = OH$ ), který je hydrofilní, znemožňuje molekule pasivně prostoupit plazmatickou membránou do buňky. Zavedením různých funkčních skupin do pozic  $R^1$  a  $R^2$  můžeme odstranit náboj fosfonátu a podpořit tak vstup molekuly skrz plazmatickou membránu.<sup>17</sup>



Obrázek 6: Struktura PME derivátů.

V několika publikacích byla testována především proléčiva ve formě bisamidátových derivátů PME (funkční skupina -NHR, Obr. 7), a to i přesto, že jsou horšími

inhibitory ACT než bis(POM)PMEA. Disponují totiž nízkou toxicitou a dokáží přetrvat déle v organismu, kde mohou působit po delší dobu. Výhodou takto připravených prolečiv je i možnost případného orálního použití. Jakmile se látka v této formě dostane do buňky, je metabolicky přeměněna na volné fosfonáty a následně fosforylována (enzymaticky) na látku typu PMEApp. Účinek takto fosforylovaných inhibitorů je sledován jak na kompletním toxinu, tak na samostatně izolované AC doméně, jelikož druhá doména (hemolytická) může ovlivnit vazbu látky do aktivního místa AC domény. Při sledování na kompletním toxinu se nám tím pádem může zkreslit výsledný inhibiční účinek daného inhibitoru. Bylo zjištěno, že změnou ve struktuře adeninového skeletu bylo dosaženo vyšších hodnot inhibice ACT než u samotného PMEAsamidátu. Proto byla navržena nová série látek, která napodobuje adeninový skelet při zachování ne vazebných interakcí v aktivním místě enzymu.<sup>19</sup>



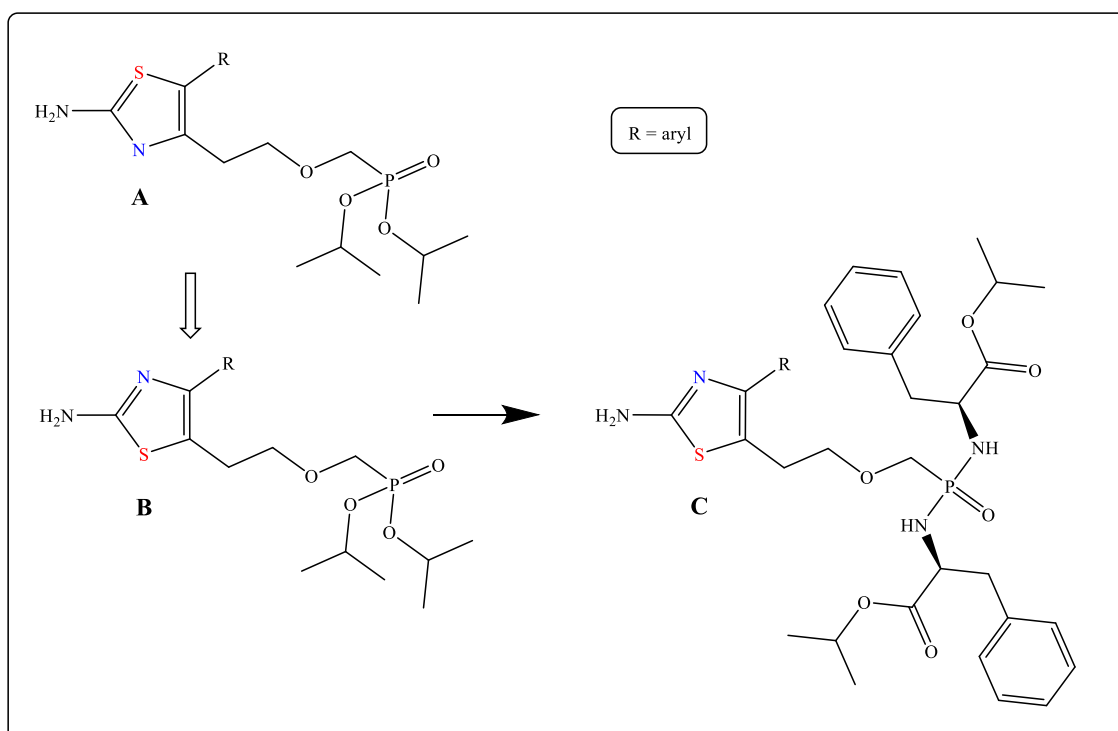
Obrázek 7: Struktura PMEAsamidátu.

### 1.3.1. Cílové látky jako inhibitory AC

Naše práce rozvíjí poznatky uvedené v ještě nepublikované práci Dr. Petry Břehové z naší laboratoře (skupina látek **A**, *Obr. 8*) a pokračuje ve strukturně-aktivitní studii prováděné na derivátech 2-aminothiazolů. Z důvodu porovnatelnosti výsledků byla

navržena skupina látek **B** (Obr. 8) nesoucí identické substituenty, které jsou příslušnými regioizomery k látkám **A**. Cílem práce tedy bylo získat 2-aminothiazoly s aromatickým substituentem v poloze 4 (látky **B**), oproti substituované poloze 5 v původní práci (látky **A**).<sup>4</sup> Pro biologické testování bude potřeba z látek **B** připravit příslušná proléčiva (skupina látek **C**, Obr. 8).

Bude navržena syntéza a bude optimalizována metodika přípravy látek **B**, jež jsou regioizomery látek **A** (Obr. 8). Finální převedení mnohdy syntetizovaných esterů (skupina látek **B**) na proléčiva **C** bude následně provedeno Dr. Michalem Česnekem již standardní metodou. Látky **C** budou následně otestovány jako potenciální inhibitory bakteriální adenylátcyklázy (ve skupině Dr. Mertlíkové-Kaiserové) a jejich aktivita bude porovnána s aktivitou analogických proléčiv od látek **A** (připravených již dříve Dr. Břehovou).<sup>4</sup>



Obrázek 8: Původní skupina látek **A** (připravená Dr. Břehovou),<sup>4</sup> nově navržená skupina látek **B** (cíl mojí bakalářské práce) a schéma přípravy skupiny látek **C** – proléčiv (práce Dr. Česneka).

Nová skupina látek **B** byla navržena na základě počítačového modelování struktur inhibitorů (práce Ing. Jana Skácela), tak aby se inhibitor co nejlépe vázal v aktivním

místě enzymu (adenylátcyklázy). Jak již je popsáno v předchozí kapitole, je zřejmé, že pro inhibici ACT/EF má velkou důležitost PME řetězec, proto jsem jej dále zaváděl do navržených cílových sloučenin. Budou vysvětleny reakce použité při syntéze cílových látek a mechanismy použitých reakcí.

#### 1.4. Chemie thiazolu a 2-aminothiazolu

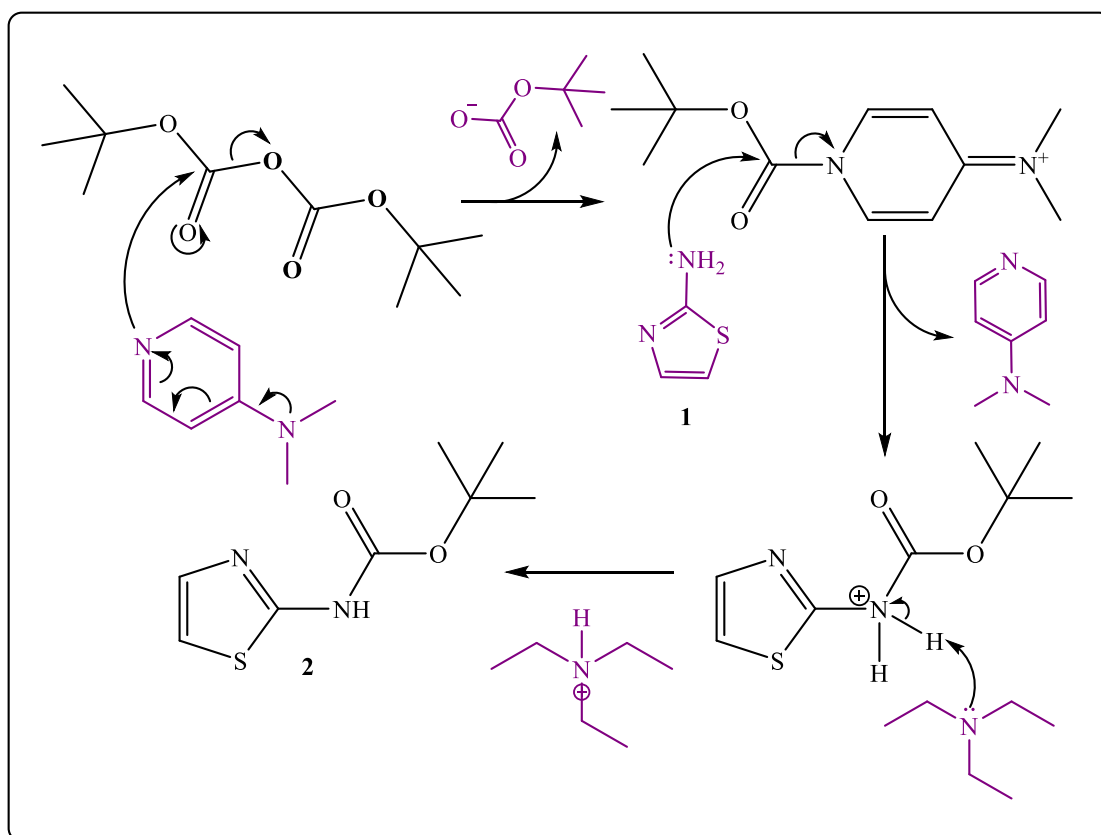
Thiazol patří mezi pětičlenné heterocykly se dvěma heteroatomy, jimiž jsou síra a dusík.<sup>20</sup> Molekula thiazolu je planární a aromatická. Poloha 2 thiazolu je vhodná pro nukleofilní atak, zatímco poloha 5 je vhodnější pro elektrofilní atak kvůli přítomnosti sousedního atomu síry, díky níž má poloha 5 vyšší elektronovou hustotu  $\pi$ -elektronů než poloha 4.<sup>21</sup>

Pro následnou syntézu bylo potřeba použít thiazol se substituentem I. třídy v poloze 2. Proto jsme jako výchozí látku reakce využili již zmíněný 2-aminothiazol. Aminoskupina v poloze 2 thiazolu zvyšuje elektronovou hustotu thiazolového kruhu. Použitím této skupiny se aktivuje thiazolové jádro a v druhém kroku reakce se nám tak usnadní elektrofilní aromatická substituce do polohy 5. Dalšími aktivačními skupinami mohou být např. hydroxyskupiny, ethery, terciární aminy, vinyl, fenyl či alkyly.<sup>22, 23</sup>

##### 1.4.1. Chránění 2-aminothiazolu

Chránící skupiny se zavádí v případě, že chceme předejít nežádoucím vedlejším reakcím dané skupiny v molekule. Pro aminoskupiny existuje několik chránících skupin, každá z nich je stabilní za určitých podmínek. Pokud bychom zvolili nevhodnou skupinu, mohlo by v nějakém z kroků následné syntézy dojít k degradaci této skupiny a následné nevhodné vedlejší reakci našich produktů. Mezi nejznámější chránící skupiny patří karbamátová, acetylová, tosylová, benzyldenová, tritylová, benzylová, trifluoroacetylová či *tert*-butoxykarbonylová skupina. Pro následnou syntézu cílového produktu z 2-aminothiazolu byla zvolena *tert*-butoxykarbonylová skupina. Pro nás byla nejvhodnější díky kombinaci stability v alkalickém prostředí (Suzuki coupling) a tolerance vůči lithiaci (použití LDA) při HD reakci. Svoji roli hrála i dobrá dostupnost a reaktivita výchozích látek. Vysoká acidolabilita se ukázala být překážkou při chromatografii na silikagelu, který byl kyselejší povahy, proto jsme jej museli neutralizovat pomocí báze, aby nedošlo k rozpadu chránící skupiny v průběhu izolace.<sup>24</sup>

Mechanismus chránění aminoskupiny 2-aminothiazolu je následující: DMAP atakuje karbonylový uhlík na di-*tert*-butyldikarbonátu (Boc anhydridu,  $\text{Boc}_2\text{O}$ ), přičemž odstupuje *tert*-butylkarbonát, který se přeměňuje na  $\text{CO}_2$  a *tert*-butoxid. Následně 2-aminothiazol (**1**) atakuje karbonylový uhlík Boc skupiny navázané na 4-dimethylaminopyridinu. Dochází k přenosu chránicí skupiny na 2-aminothiazol a odstupující DMAP se regeneruje pro další atak Boc anhydridu. Amidická skupina je deprotonována triethylaminem. Pokud není do reakce přidán, probíhá deprotonace pomocí *tert*-butoxidového aniontu, vznikajícího z odstoupivšího *tert*-butylkarbonátu (viz Obr. 9).<sup>25</sup>



Obrázek 9: Mechanismus chránění aminoskupiny 2-aminothiazolu pomocí  $\text{Boc}_2\text{O}$ .

#### 1.4.2. Bromace thiazolového jádra

Jak již bylo řečeno, 2-aminothiazol podléhá v poloze 5 elektrofilní aromatické substituci. Pro vznik dalšího meziprojektu naší syntézy se nabízela možnost provést elektrofilní bromaci do této polohy. Navázání bromu na 2-aminothiazol probíhá bez problémů právě díky přítomnosti silně aktivujícího substituentu I. třídy, tedy aminoskupiny. Pro thiazol bez této aktivující skupiny by bylo nutné použít Lewisovu

kyselinu jako katalyzátor. Používá se halogenid hlinitý/železitý, který vytváří s halogenem elektrofilní komplex, který je následně atakován thiazolem. Při bromaci lze použít např.  $\text{FeBr}_3$  s bromem. 2-Aminothiazol tento katalyzátor nevyžaduje a je možné použít bromoční činidlo samotné.<sup>22, 23, 26</sup>

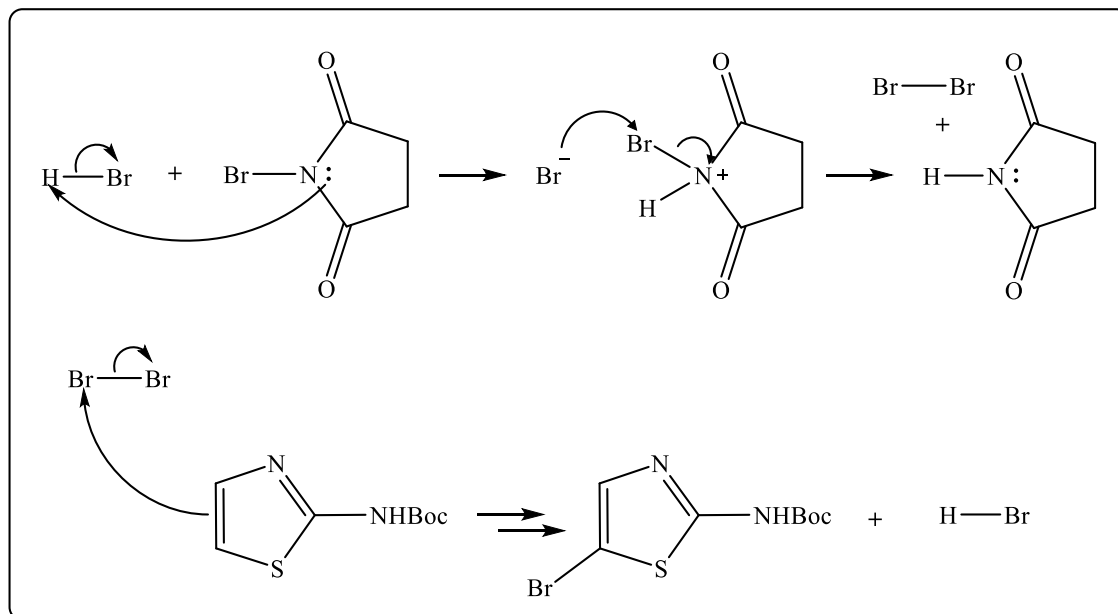
Vysoké výtěžky elektrofilní bromace byly publikovány v literatuře.<sup>27</sup> Zde uvádějí častý případ přípravy 5-substituovaného aminothiazolu. 2-Aminothiazol byl smíchán s bromem v rozpouštědle, většinou v MeOH, EtOH či  $\text{H}_2\text{O}$ . Reakce probíhá adičně-eliminacním mechanismem. Adiční meziprodukty reakce jsou zahřátím převedeny na konečné eliminační produkty. Výtěžky této reakce se pohybují okolo 90 %.

V jiné reakci se 2-aminothiazol nechal reagovat opět s bromem, ale v prostředí octanu draselného a kyseliny octové.<sup>28,29</sup> Reakcí s bromem a bromovodíkem ve vodě bývá dosaženo nižších výtěžků.<sup>30</sup> Dalším bromočním činidlem u elektrofilních bromací často bývá NBS, který je přidán k 2-aminothiazolu v rozpouštědle (acetonitril/THF). Později popíšeme mechanismus této reakce, již bylo využito v této bakalářské práci. Pokud se látka rozkládá reakcí s bromem, je lepší používat NBS, který je navíc méně toxický a je s ním snadnější manipulace. Lze použít i řadu dalších bromočních činidel, mezi které patří např. *N*-bromacetamid či brom-trichlormethan.<sup>31,32</sup>

Bromace a obecně halogenace se provádí mimo jiné i radikálově, ovšem nelze ji použít u látek typu thiazolů, které jsou aromatické.

#### 1.4.3. Mechanismus bromace thiazolového jádra pomocí NBS

Je známo, že poloha 5 na 2-(*tert*-butoxykarbonylamino)thiazolu (**2**) má díky přítomnosti sousedního atomu síry vyšší elektronovou hustotu  $\pi$ -elektronů než poloha 4. Poloha 5 je tedy aktivována pro atak elektrofilu. Jako zdroj elektrofilního bromu (elektrofilní bromace na *Obr. 10*) byl použit *N*-bromosukcinimid (NBS). HBr reaguje s NBS, čímž se postupně generuje  $\text{Br}_2$ , který je napaden 2-(*tert*-butoxykarbonylamino)thiazolem. Tím nám vzniká žádaný produkt 5-brom-2-(*tert*-butoxykarbonylamino)thiazol (**3**) společně s HBr, který opět generuje brom z NBS.<sup>33</sup>



Obrázek 10: Mechanismus bromace pomocí NBS na thiazolovém jádře.

#### 1.4.4. Halogen-migrační reakce

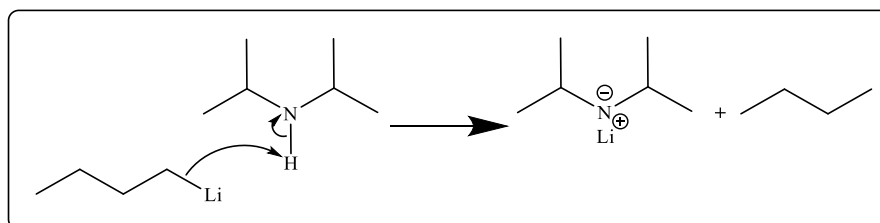
Reakce, při které se dostane halogen (brom) z polohy 5 do polohy 4 aminothiazolu, přičemž se zavede elektrofil do polohy 5, se nazývá halogen-migrační reakce (HD, z angl. halogen dance reaction). Pro tento účel je třeba zavést k 5-halogenovanému derivátu 2-aminothiazolu bázi. HD reakce se může nastartovat přidáním LDA, BuLi, NaNH<sub>2</sub>, anilidů či alkoholátů. HD na 2-aminothiazolu byla v literatuře prováděna s mnoha elektrofilu. Za vhodné lze považovat cyklohexanon, TMSCl, jod, benzaldehyd, DMF, brom či vodu, které v literatuře poskytovaly vysoké výtěžky (73 – 99 %). Nejlepší podmínky pro HD reakci jsou při nízké teplotě, pomalé reakci s elektrofilem, při přidávání báze do halogenidu a v THF jako rozpouštědle.<sup>34</sup>

V praxi byl testován vliv množství LDA použitého na HD reakci. Dospělo se k závěru, že je nutné přidat alespoň 3,3 ekv LDA, aby došlo k co nejvyššímu výtěžku produktu. Přidáním 2,2 ekv LDA klesne výtěžek přibližně o třetinu a dokonce až 10× nižšího výtěžku dosáhneme přidáním pouze 1,1 ekv.<sup>35</sup>

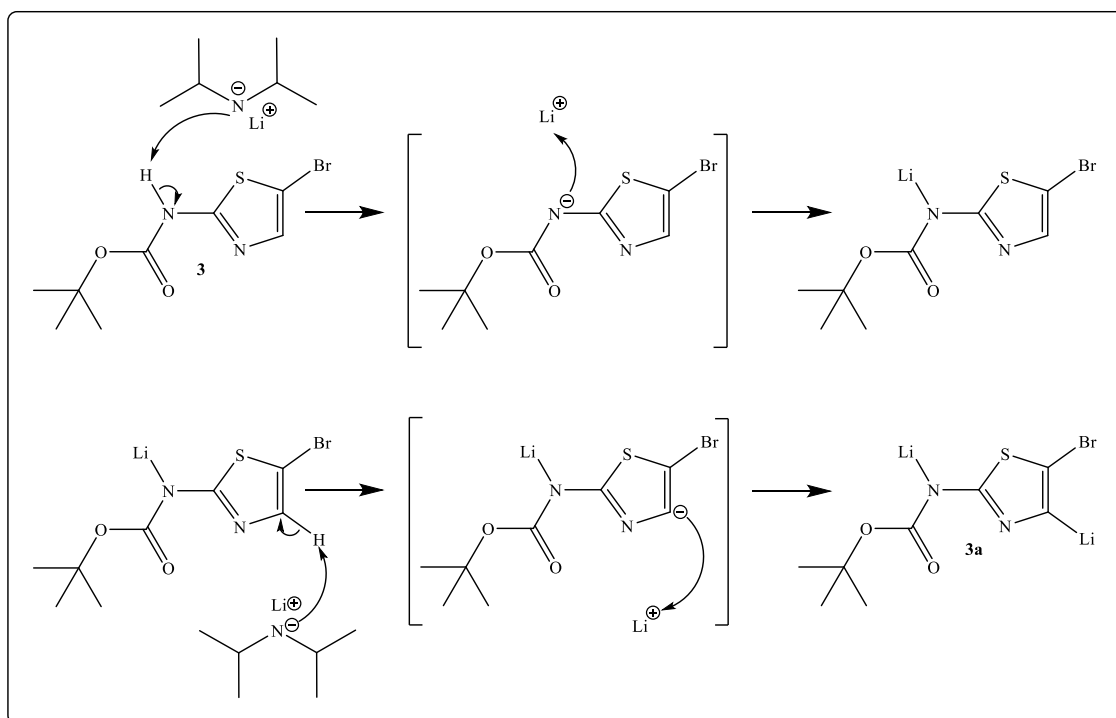
V dalším článku<sup>36</sup> byla popsána HD reakce i na ostatních heterocyklických sloučeninách. Důležitá je správná teplota reakce, která ovlivňuje, zda bude docházet k nežádoucím vedlejším reakcím, čímž vzniká větší množství vedlejších produktů. Nejlepší podmínky byly zjištěny při nižších teplotách. Tento předpoklad je důležitý pro bezproblémovou HD reakci. Elektrofil, přidáný do reakční směsi již během HD reakce,

by mohl reagovat s lithiovanými meziprodukty, jejichž nepřítomnost v reakci by způsobila neuskutečnění HD reakce. Proto je vhodné přidávat elektrofil po uskutečnění HD reakce.

Mechanismus halogen-migrační reakce je následující: Při této transformaci dochází sledem reakcí k přeměně výchozí látky **3** na produkt **3a**, který obsahuje brom v poloze 4 a lithium v poloze 5 (Obr. 12 a 13). Takto lithiovaný produkt může dále reagovat s elektrofilem. Jako vhodná báze se zde používá diisopropylamid lithný (LDA), který kromě amidického vodíku deprotonuje i polohu 4 na thiazolu. Pokud není k dispozici komerční LDA, je možno jej připravit reakcí *n*-butyllithia (BuLi) a diisopropylaminu (DIPA) (Obr. 11).<sup>34,36</sup>



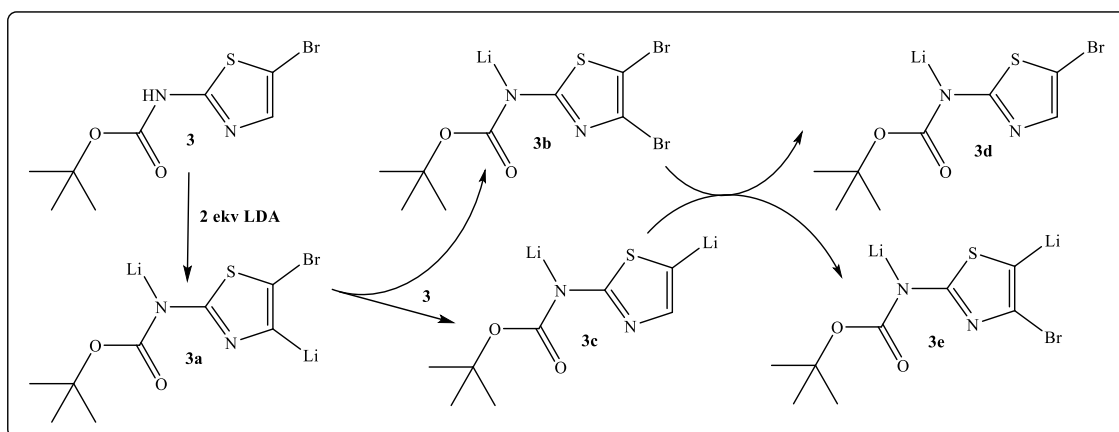
Obrázek 11: Mechanismus reakce BuLi s DIPA.



Obrázek 12: Mechanismus halogen-migrační reakce látky **3** s LDA.

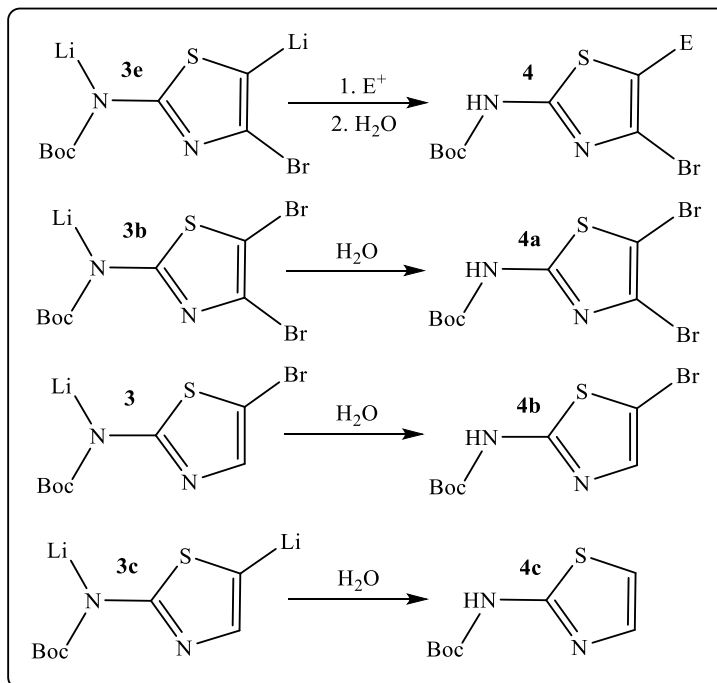


Důležité u HD reakce je, aby se výchozí nelithiované látky a lithiované meziproducty vyskytovaly společně v reakční směsi, aby mohlo dojít k výměně kov-halogen. Vzniklý meziproduct **3a** je sám o sobě lithiační činidlo, může tedy reagovat s výchozí látkou **3** za vzniku meziproductů **3b** a **3c**. Už zmiňovaná poloha 5 je kyselější než poloha 4, proto díky vyšší stabilitě převažují 5-lithiované produkty (**3c**, **3e**). Dihalogenované meziproducty (**3b**) mají funkci kokatalyzátorů, podporují tedy HD reakci. Zmíněný sled reakcí je uveden na *Obr. 13*.<sup>34, 36</sup>



*Obrázek 13: Mechanismus halogen-migrační reakce látky 3 se 2 ekv LDA.*

Pokud se k meziproductu **3e** přidá elektrofil, reaguje v poloze 5 thiazolového jádra. Po hydrolyze vodou (v našem případě HCl/NH<sub>4</sub>Cl) vzniká produkt **4** (*Obr. 14*). Důkazem pro výše zmíněný mechanismus HD je izolace jednotlivých meziproductů po reakci s vodou (*Obr. 14*).<sup>34, 36</sup>



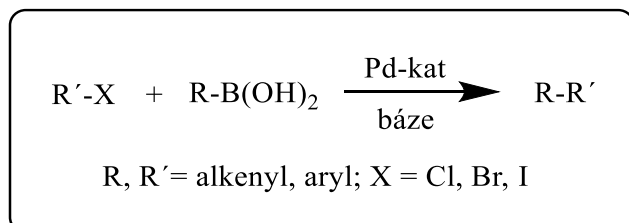
Obrázek 14: Vznik izolovatelných látek z meziproduktů halogen-migrační reakce použitím vody jako činidla pro ukončení reakce.

#### 1.4.5. Cross-coupling reakce pro tvorbu C-C vazeb

Naší snahou bylo získat několik substituovaných derivátů 2-aminothiazolu. Poté co byla provedena halogen-migrační reakce, bylo potřeba nahradit různými substituenty brom v poloze 4. Pro tento účel nejlépe poslouží tzv. cross-coupling reakce, při kterých jediným postupem můžeme získat několik produktů. Obecně se jedná o tvorbu C-C vazby, která vzniká z reakce příslušného alkyl/arylhalogenidu s organokovem. Reakci katalyzují komplexy palladia Pd(0) či niklu Ni(0). Mechanismus klasických cross-coupling reakcí je podobný, dochází k cyklickému ději, při kterém se postupně opakuje oxidativní adice, transmetalace a reduktivní eliminace. Existuje mnoho typů cross-coupling reakcí, jejichž použití se volí dle hybridizace uhlíku daného halogenidu. Mezi používané organokovy patří např.: boronové kyseliny, organostannany, či roztoky hlinitých, organozinečnatých a Grignardových činidel. Důležitý je také výběr katalyzátoru, který se musí pečlivě zvolit, aby cross-coupling reakce dané látky proběhla co nejlépe. Práce s nimi a jejich skladování je ztíženo tím, že se musí uchovávat v inertní atmosféře. Mezi často používané katalyzátory se řadí Pd(PPh<sub>3</sub>)<sub>4</sub>, který je v krystalickém stavu (při -20 °C pod Ar) mnohem stabilnější než stejný

komplex s Ni. Dále lze využít také Pd(dba)<sub>2</sub> či komplexy Pd(II)/Ni(II), ze kterých vznikají již aktivní komplexy Pd(0)/Ni(0). Mezi ně patří: Pd(dppf)Cl<sub>2</sub>·DCM, PdCl<sub>2</sub>, Pd(OAc)<sub>2</sub> aj.<sup>37</sup>

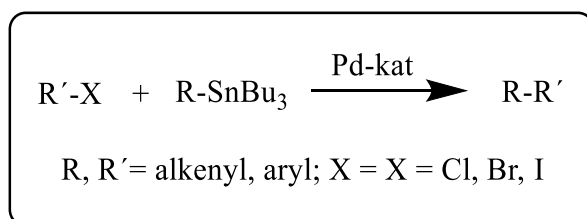
### Suzuki-Miyaura coupling



Obrázek 15: Obecné schéma Suzuki-Miyaura coupling reakce.

- Využití naleznou především u sp<sup>2</sup>-hybridizovaných center. Je důležité pracovat v přítomnosti báze a je možné je provádět i ve vodném prostředí. Tyto reakce se vyznačují nízkou toxicitou a tolerancí k funkčním skupinám.<sup>37,38</sup>

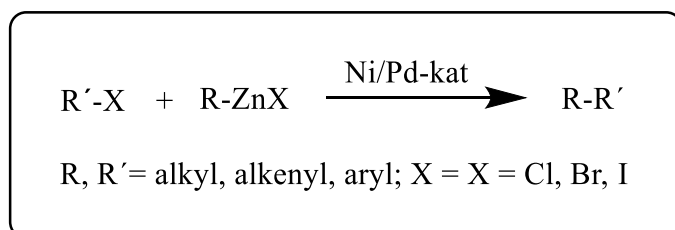
### Stille coupling



Obrázek 16: Obecné schéma Stille coupling reakce.

- Výhodou Stilleho reakcí je tolerance k přítomnosti většiny funkčních skupin, avšak nejsou příliš vhodné z důvodu vysoké toxicity stannanů. Navíc není snadné je oddělit z reakční směsi.<sup>37,39</sup>

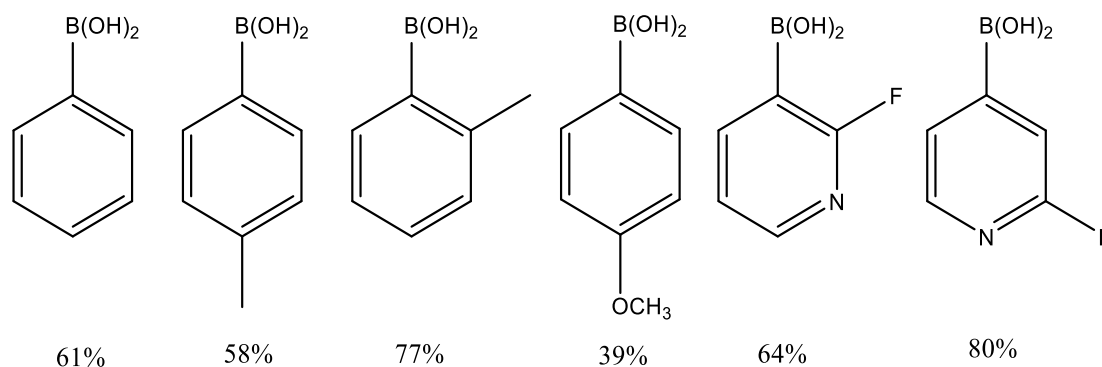
### Negishi coupling



Obrázek 17: Obecné schéma Negishi coupling reakce.

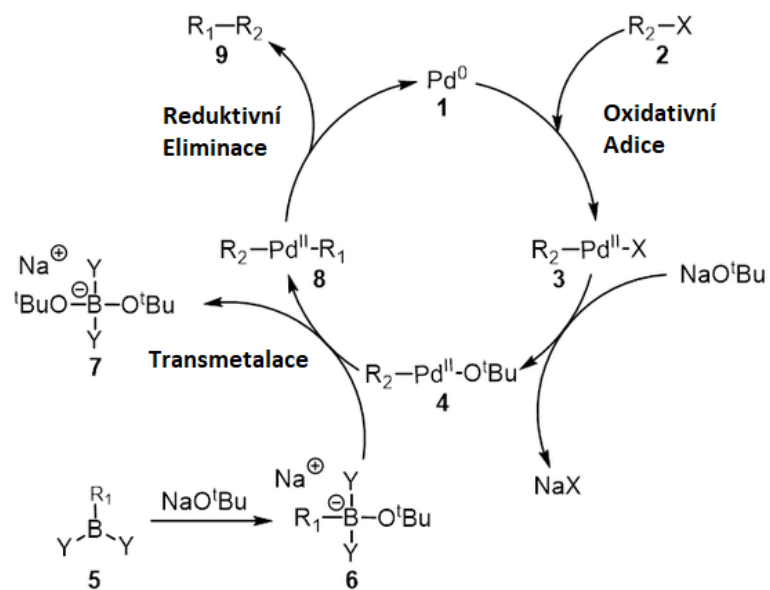
- Patří mezi nejpoužívanější cross-coupling reakce, výhodou je právě obecné využití a vysoká efektivita. Vysoce reaktivní organozinečnatá činidla někdy nedokáží tolerovat přítomnost některých funkčních skupin.<sup>37,40</sup>

V článku<sup>36</sup> byly testovány reakce derivátu 2-amino-4-bromthiazolu s různými arylboronovými kyselinami. V tomto případě bylo využito Suzuki cross-coupling reakce. Výtěžky reakcí s jednotlivými arylboronovými kyselinami jsou uvedeny na *Obr. 18*.



*Obrázek 18: Výtěžky Suzuki cross-coupling reakcí s různými boronovými kyselinami.*

Mechanismus Suzuki-Miyaura coupling reakce je následující: Obecný mechanismus Suzuki cross-coupling reakce je znázorněn na *Obr. 19*. V tomto typu reakce se palladiový komplex s Pd<sup>0</sup> chová jako katalyzátor reakce. Nejprve se oxidativní adicí oxiduje Pd<sup>0</sup> na Pd<sup>II</sup> při reakci s halogenidem R<sub>2</sub>-X. Substituent i halogen se vážou na Pd za vzniku R<sub>2</sub>-Pd<sup>II</sup>-X. Následuje reakce s bází (např. LiOH/NaO<sup>t</sup>Bu) za vzniku intermediátu **4** a odstoupení příslušné soli. Proces transmetalace je usnadněn aktivovaným organickým ligandem s vysokou polarizací. Ten vzniká reakcí boronové kyseliny, organoboranu, esteru boronátu či draselného fluoroboritanu s příslušnou bází, jež obsahuje elektro pozitivnější atom kovu (Li/Na/K). Báze NaO<sup>t</sup>Bu zvýší na atomu boru nukleofilitu skupiny R<sub>1</sub>, která se následně alkyluje na Pd v komplexu R<sub>2</sub>-Pd<sup>II</sup>-O<sup>t</sup>Bu za vzniku R<sub>2</sub>-Pd<sup>II</sup>-R<sub>1</sub>. Tomuto kroku se říká transmetalace. Při poslední fázi kruhového děje, tzv. reduktivní eliminaci, dochází k eliminaci produktu R<sub>1</sub>-R<sub>2</sub> a regeneraci Pd<sup>0</sup>, které znovu vstupuje do oxidativní adice.<sup>41</sup>



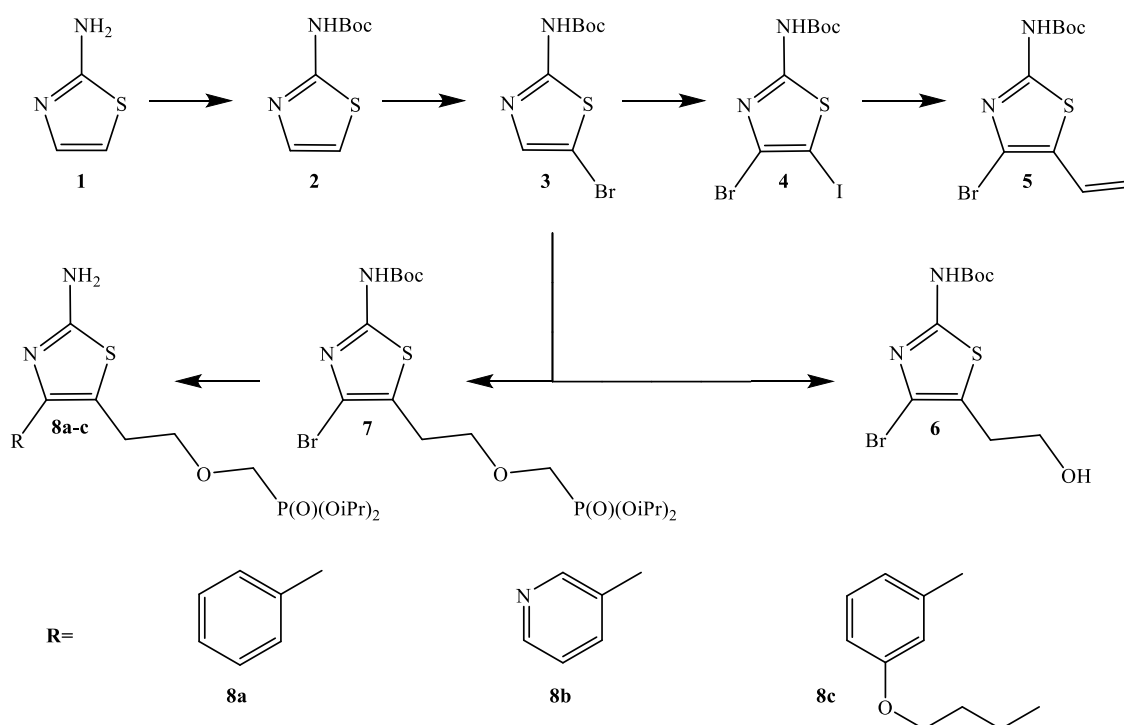
Obrázek 19: Obecný mechanismus Suzuki cross-coupling reakce.<sup>42</sup>

## **2. Cíl syntézy**

Jak již bylo naznačeno podrobněji v kapitole 1.3.1. (Cílové látky jako inhibitory AC), cílem této práce je navrhnout vhodný syntetický postup pro přípravu 4-substituovaných 2-amino-5-PME-thiazolů. Připravené nové sloučeniny (jako jejich vhodná proléčiva) budou otestovány jako potenciální inhibitory bakteriálních AC.

### 3. Výsledky a diskuze

Pro přípravu produktů **8a-c** byly zvoleny dva syntetické přístupy (*Obr. 20*), které budou podrobněji popsány. Prvním byla tvorba intermediátu **5** přes intermediáty **2-4**. Bylo využito následujících reakcí: elektrofilní aromatické substituce, HD reakce a Suzuki cross-coupling reakce. V tomto přístupu nebylo nakonec pokračováno. Druhým výhodnějším přístupem byla sekvenční reakce s přímou tvorbou intermediátu **7** z intermediátu **3** pomocí HD reakce. Pro ověření mechanismu byl izolován i meziprodukt **6**. Z intermediátu **7** byly použitím Suzuki cross-coupling reakce připraveny konečné produkty.

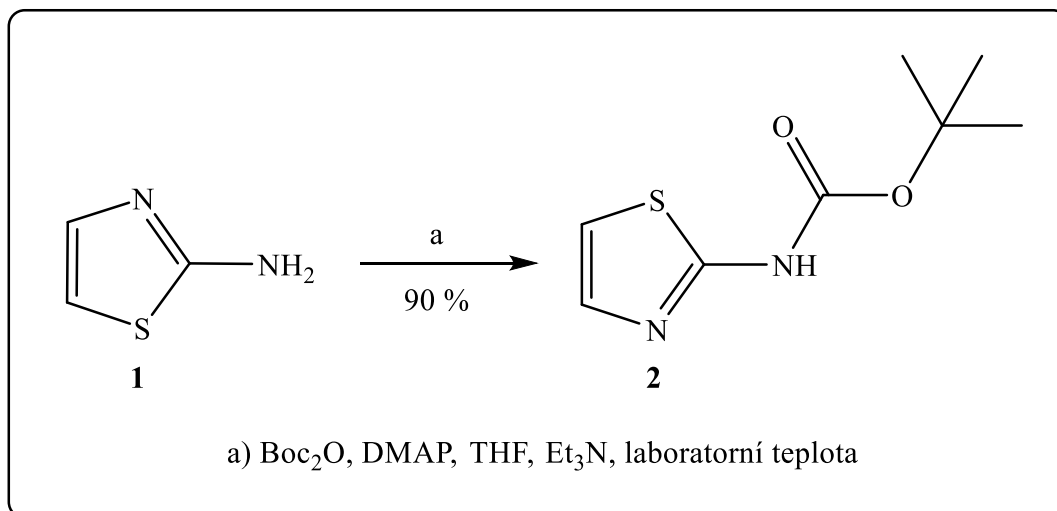


Obrázek 20: Celkové schéma syntézy látek **8a-c**.

#### 3.1. Chránění aminoskupiny 2-aminothiazolu pomocí di-*tert*-butyldikarbonátu

Abychom zabránili nežádoucím reakcím během následné lithiace, bylo třeba nejprve ochránit aminoskupinu na 2-aminothiazolu. Jako vhodná chránící skupina byl zvolen *tert*-butyloxykarbonyl, který je stálý za podmínek lithiace a dá se odstranit pomocí silné kyseliny, například HCl nebo  $\text{CF}_3\text{COOH}$ .<sup>25</sup> Vzhledem k zavedení acidolabilní chránící skupiny však bylo třeba kompenzovat kyselost silikagelu při kolonových a flash

chromatografiích (jako vhodné činidlo pro tyto účely byl zvolen Et<sub>3</sub>N). Výchozí látkou pro reakci byl zvolen Boc<sub>2</sub>O, který reagoval s aminoskupinou 2-aminothiazolu (**1**), čímž vznikl 2-(*tert*-butoxykarbonylamino)thiazol (**2**, *Obr. 21*). Reakce byla katalyzována přidáním DMAP a Et<sub>3</sub>N sloužil jako báze.<sup>43</sup>



*Obrázek 21: Schéma chránění aminoskupiny 2-aminothiazolu s výtěžkem a podmínkami reakce.*

V rámci optimalizace tohoto kroku byl zkoušen vliv pořadí přidavku reagentů na průběh reakce. V obou případech byly zachovány stejné poměry látek. V prvním postupu byl Boc<sub>2</sub>O smíchán s DMAP a výchozí látkou a rozpouštěn v roztoku, následně byl přidán Et<sub>3</sub>N. Reakce probíhala poměrně bouřlivě za vzniku nežádoucích vedlejších produktů. To se odrazilo i na konečném výtěžku, který byl poměrně nízký (53%, *Tab. 1*). Po těchto zkušenostech byl u druhé reakce naopak Boc<sub>2</sub>O přikapáván nakonec do roztoku ostatních výchozích látek. Tímto způsobem se lépe dařilo kontrolovat celý průběh reakce (90%, *Tab. 1*).

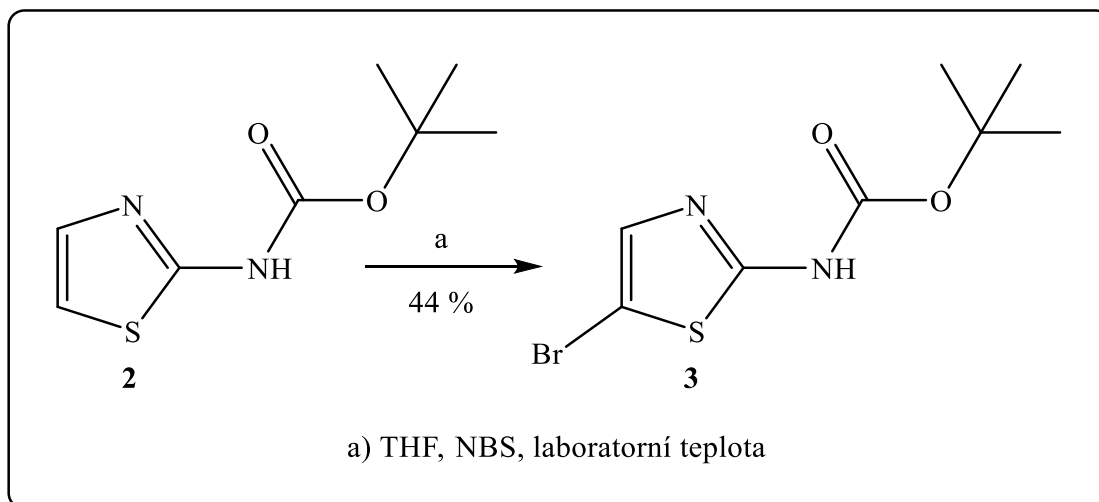
*Tabulka 1: Výtěžky chránění aminoskupiny 2-aminothiazolu.*

	výtěžek (%)
1. postup	53
2. postup	90



### 3.2. Bromace 2-Boc aminothiazolového derivátu do polohy 5

V druhém kroku syntézy byl 2-(*tert*-butoxykarbonylamino)thiazol (**2**) transformován na 5-brom-2-(*tert*-butoxykarbonylamino)thiazol (**3**) pomocí bromace do polohy 5 na aminothiazolovém skeletu. NBS byl zvolen pro jeho jednoduchou manipulovatelnost. Je pevný, dobře vážitelný a je s ním bezpečnější manipulace než s bromem.



Obrázek 22: Schéma bromace aminothiazolového derivátu **2** do polohy 5 s výtěžkem a podmínkami reakce (1. pokus).

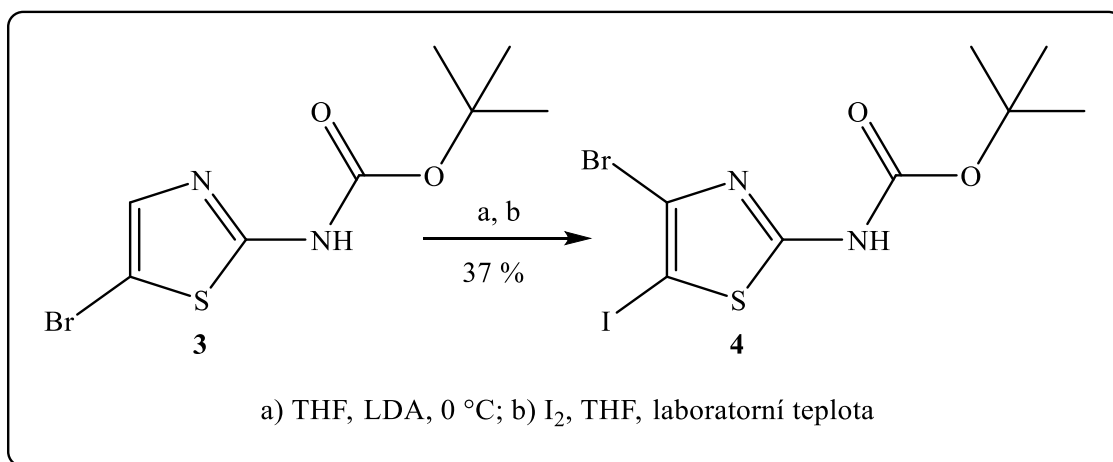
První pokus (v THF) bohužel poskytl nízký výtěžek (44%) látky **3** (Obr. 22). Ve druhém pokusu se negativně projevilo zvětšení měřítka reakce, kdy použitím gravitační kolony na SiO<sub>2</sub> při izolaci produktu bylo dosaženo ještě nižšího výtěžku (34%) než v případě 1. pokusu. Bohužel se nepodařilo zreprodukovat výtěžky dle literatury.<sup>44</sup> Vzhledem k velkému množství výchozí látky však bylo dostatek produktu pro další reakce. Vliv rozpouštědla se ukázal být zanedbatelný.

Tabulka 2: Výtěžky bromo derivátu **3** připraveného reakcí v různých rozpouštědlech.

	m <sub>látky 2</sub> (g)	NBS (ekv)	výtěžek (%)
1. pokus (v THF)	8,46	1,10	44
2. pokus (v CH <sub>3</sub> CN)	37,06	1,15	34

### 3.3. Halogen-migrační reakce

Pro přípravu 4-brom-2-(*tert*-butoxykarbonylamino)-5-jodthiazolu **4** (Obr. 23) byla použita již zmíněná metoda halogen-migrační (halogen dance, HD). Jako výchozí látka byl použit 5-brom-2-(*tert*-butoxykarbonylamino)thiazol (**3**). Nejprve byla provedena lithiace pomocí LDA za snížené teploty. Po ukončení HD reakce, kterou lze dobře sledovat pomocí TLC, případně UPLC-MS, byla následně provedena reakce s elektrofilem. Jako elektrofil byl použit jód (viz. Tab. 3).



Obrázek 23: Schéma halogen-migrační reakce s výtěžkem látky **4** a podmínkami reakce.

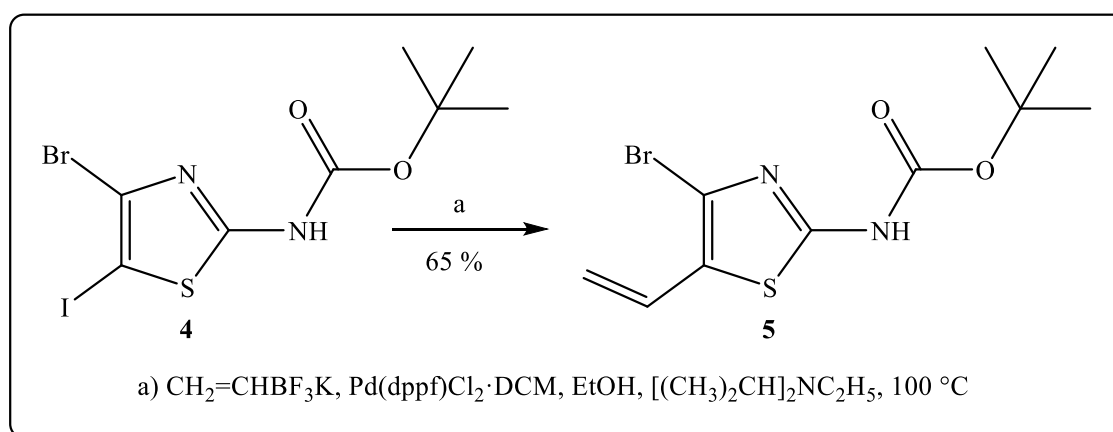
V jednom případě nám reakce neproběhla vůbec, v dalších s nízkými výtěžky (Tab. 3). Nízké výtěžky mohly být způsobeny horší kvalitou použitého komerčního LDA, případně vysokou teplotou zvolenou pro HD, proto jsme se v dalších HD reakcích rozhodli použít čerstvě syntetizovaný LDA pomocí reakce BuLi a DIPA.<sup>34,45</sup>

Tabulka 3: Výtěžky připraveného jodo derivátu **4** použitím HD reakce.

	výtěžek (%)
1. pokus	0
2. pokus	27
3. pokus	37

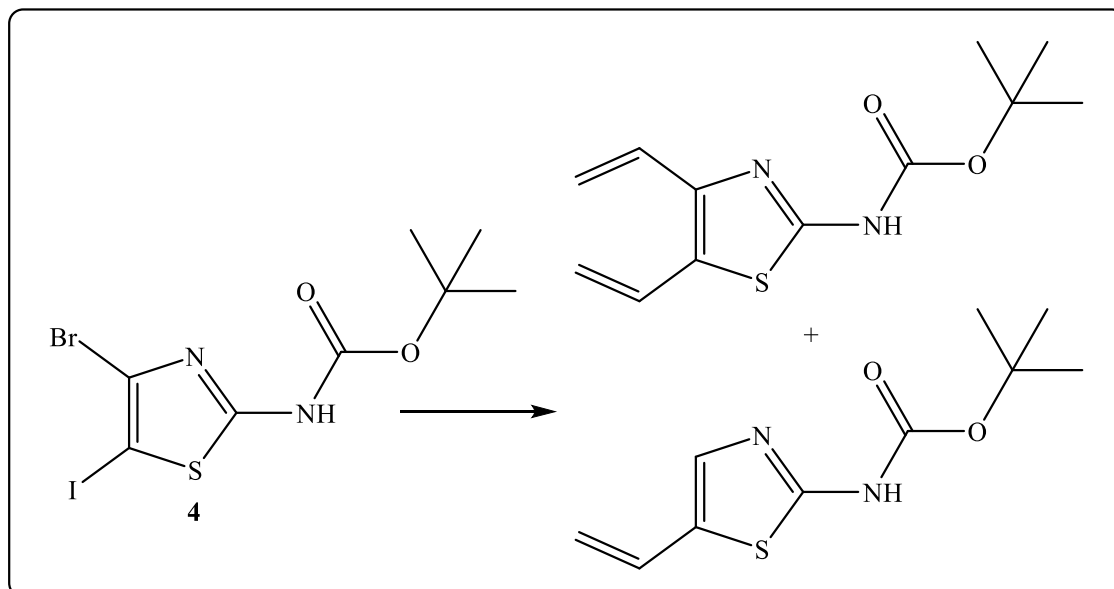
### 3.4. Suzuki cross-coupling reakce

Dalším krokem byla transformace získaného jodo derivátu aminothiazolu **4** na vinyl derivát **5** (Obr. 24). Pro tuto konverzi je možno využít Stilleho couplingu. Nevýhodou však je použití sloučenin cínu, které jsou toxické, méně stabilní a hůře se s nimi pracuje. Jako reakce první volby byla tedy použita Suzuki cross-coupling reakce, při které proces transmetalace zajišťují sloučeniny boronových kyselin místo jedovatých sloučenin cínu. Byla provedena reakce připraveného jodovaného produktu **4** a vinyltrifluorborátu. Při těchto reakcích se uhlíkový vázaný v organokovové sloučenině váže místo jodu. V našem případě byl použit vinyltrifluorborát draselný. Jako katalyzátor reakce byl použit Pd(dppf)Cl<sub>2</sub>·DCM, který vykazuje dobrou stabilitu. Reakce proběhla v přítomnosti báze (*N,N*-diisopropylethylamin).



Obrázek 24: Schéma Suzuki cross-coupling reakce s výtěžkem látky **5** a podmínkami reakce.

Provedeny byly tři pokusy. V prvním a druhém byly použity 3 ekv vinyltrifluorborátu draselného a ve třetím byl ponechán pouze 1 ekv. Nejvyšší výtěžek byl získán při použití 3 ekv vinyltrifluorborátu draselného (65%), při snížení na 1 ekv byl výtěžek poloviční (31%). Je zřejmé, že je třeba pracovat se 3 ekv, jelikož při 1 ekv je konverze nižší. V druhém pokusu se 3 ekv nám produkt nevznikl vůbec. Díky prasklému septu byl v reakční směsi přítomen kyslík, teplota reakce se tím snížila. Navíc byla reakce ponechána déle míchat, což mohlo být další příčinou neúspěchu. V tomto případě byly v reakční směsi identifikovány 2 nežádoucí produkty: Jeden bez bromu v poloze 4 a produkt s vinylm v poloze 4 i v poloze 5 (Obr. 25).<sup>46</sup>



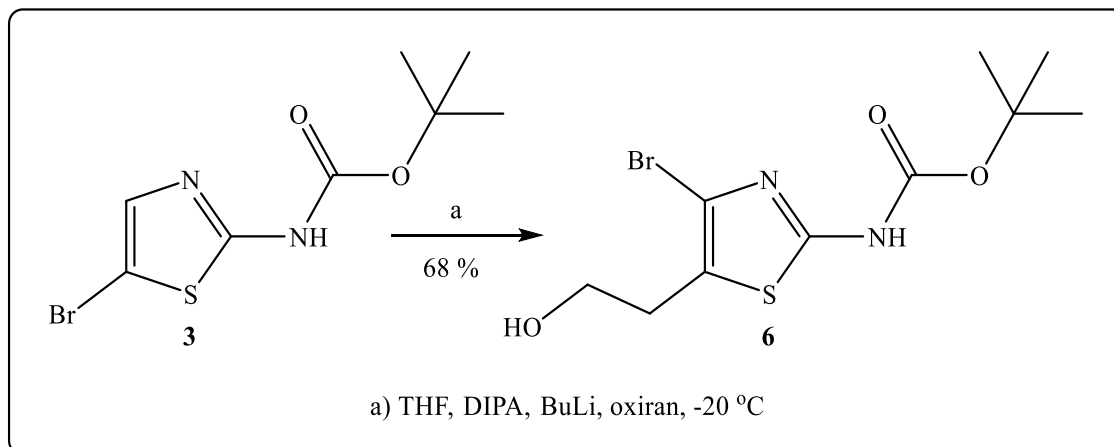
Obrázek 25: Nezdářílý pokus transformace jodo derivátu na vinyl derivát aminothiazolu a vzniklé nežádoucí produkty.

Tabulka 4: Výtěžky vinyl derivátu 2-aminothiazolu **5** připraveného Suzuki cross-coupling reakcí.

	CH <sub>2</sub> =CHBF <sub>3</sub> K (ekv)	výtěžek (%)
1. pokus	3,00	65
2. pokus	3,00	0
3. pokus	1,00	31

### 3.5. Halogen-migrační reakce

Vzhledem k poměrně nízkým výtěžkům jednotlivých kroků byla vyzkoušena metoda přímé syntézy 2-hydroxyethylového derivátu s jeho následnou alkylací. 5-Brom-2-(*tert*-butoxykarbonylamino)thiazol (**3**, Obr. 26) byl podobně jako v předchozím případě použit jako výchozí látka. Jako první krok syntézy byla použita HD reakce, kdy opět dochází k migraci bromu z polohy 5 do polohy 4, změnou bylo použití oxiranu jako elektrofilu namísto jódu (Obr. 26).<sup>34, 45</sup>



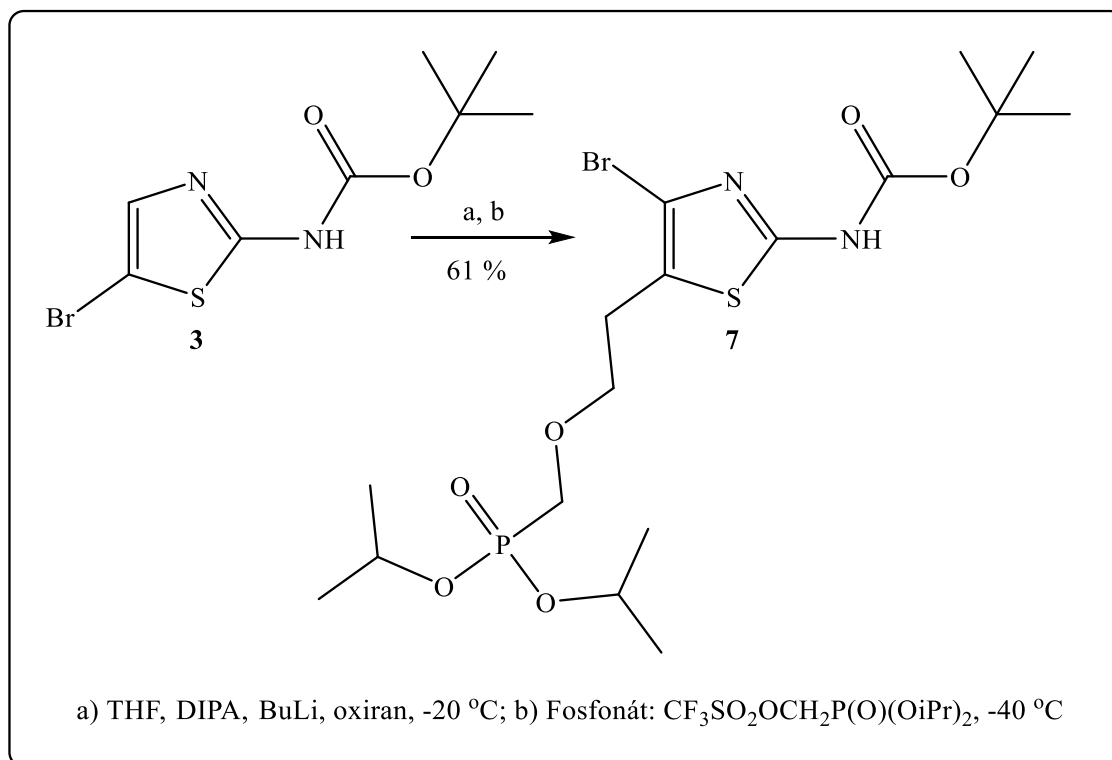
Obrázek 26: Schéma halogen-migrační reakce s výtěžkem látky **6** a podmínkami reakce.

Po předchozích zkušenostech byl pro reakci využit LDA, generovaný *in-situ* z BuLi a  $(i\text{Pr})_2\text{NH}$ . Dvojnásobně lithiovaný 4-brom-2-(*tert*-butoxykarbonylamino)thiazol nukleofilně otevřel oxiran za tvorby 5-hydroxyethylového derivátu **6** (Obr. 26). Při optimalizaci reakce byl zkoušen vliv teploty na reaktivitu jednotlivých komponent (Tab. 5). Pokud byla teplota udržována během HD a následného přikapání oxiranu při  $-78\text{ °C}$  a nebyla nadále zvyšována, reakce proběhla pouze s velmi nízkým výtěžkem. Vliv teploty na reaktivitu byl potvrzen pomocí 2 dalších pokusů, provedených při vyšší teplotě. První pokus byl proveden při  $0\text{ °C}$  a druhý při  $-20\text{ °C}$  a reakční směs byla vždy po přidání oxiranu postupně ohřata na  $+10\text{ °C}$ . V obou případech došlo k výraznému zvýšení konverze výchozí látky na produkt. Nejlepší konverze bylo dosaženo při počáteční teplotě  $-20\text{ °C}$ .

Průběh reakce bylo možno sledovat i vizuálně, neboť lithná sůl hydroxyethylového derivátu vykazovala sníženou rozpustnost v roztoku THF, což se projevilo nejprve lehkým zákalem původně homogenního roztoku hnědé barvy (při teplotě kolem  $0\text{ °C}$ ), který při teplotě  $+10\text{ °C}$  přecházel v suspenzi. Jako počáteční teplota pro celou kaskádu reakcí byla proto zvolena teplota  $-20\text{ °C}$ .

Jak již bylo naznačeno v úvodu, byly učiněny pokusy podrobit vytvořený lithný derivát hydroxyethylu bez zpracování následné reakci. Jelikož 2-hydroxyethylový derivát podléhá při vyšších teplotách v přítomnosti silných bází eliminační reakci, byla po vytvoření sraženiny při  $+10\text{ °C}$  směs ochlazena na  $-40\text{ °C}$ , při které se přednostně tvoří produkt alkylace s navázaným fosfonátem. Reakci je třeba ukončit po 2 h při  $-40\text{ °C}$  i přes nezreagované stopy výchozí látky, neboť při zvýšení teploty nebo

prodloužení reakčního času začíná při reakci vznikat dvojnásobně alkylovaný derivát. Tímto způsobem byl připraven klíčový meziproduct **7** (Obr. 27).



Obrázek 27: Schéma halogen-migrační reakce s výtěžkem a podmínkami reakce.

Vzhledem k velkému nadbytku reagentů pro HD (3.3 ekv LDA) bylo nutno dodržet i stejný poměr oxiranu, tj. 3,3 ekv. Jakékoliv pokusy o snížení poměru přidaného oxiranu vedly ke snížení konverze a výtěžku reakce. V rámci pokusu, při kterém bylo přidáno pouze 1,5 ekv oxiranu, vzniklo pouze minimum produktu, nejspíš kvůli spotřebě části přidaného oxiranu v reakci s LDA. Obdobné zjištění bylo učiněno i u následné alkylační reakce, kdy 1,5 ekv fosfonátu (ve formě triflátu) neposkytlo plnou konverzi reaktantu a pro plnou konverzi musel být zvýšen poměr triflátu na 3.3 ekv. Část triflátu pravděpodobně podléhá reakcím za vzniku vedlejších produktů, což samozřejmě znesnadňuje následnou izolaci produktu od nečistot.

Výtěžky celkové reakce (Obr. 27, Tab. 6) jsou na první pohled nižší, neboť poměrně velká část produktu zůstala i po opakované chromatografické separaci ve směsných frakcích s meziprodukty reakcí a není zahrnuta do celkové bilance. Dle nečistot ve směsných frakcích byl však odhadnut celkový předpokládaný výtěžek. Směsné frakce

byly s úspěchem použity i v několika optimalizacích následné Suzuki coupling reakce.

Tabulka 5: Výtěžky izolovaného hydroxyethyl derivátu **6** po HD reakci.

teplota (°C)	výtěžek (%)
-78	6
-20	68
0	53

Tabulka 6: Výtěžky izolovaného fosfonomethoxy derivátu **7** po HD reakci.

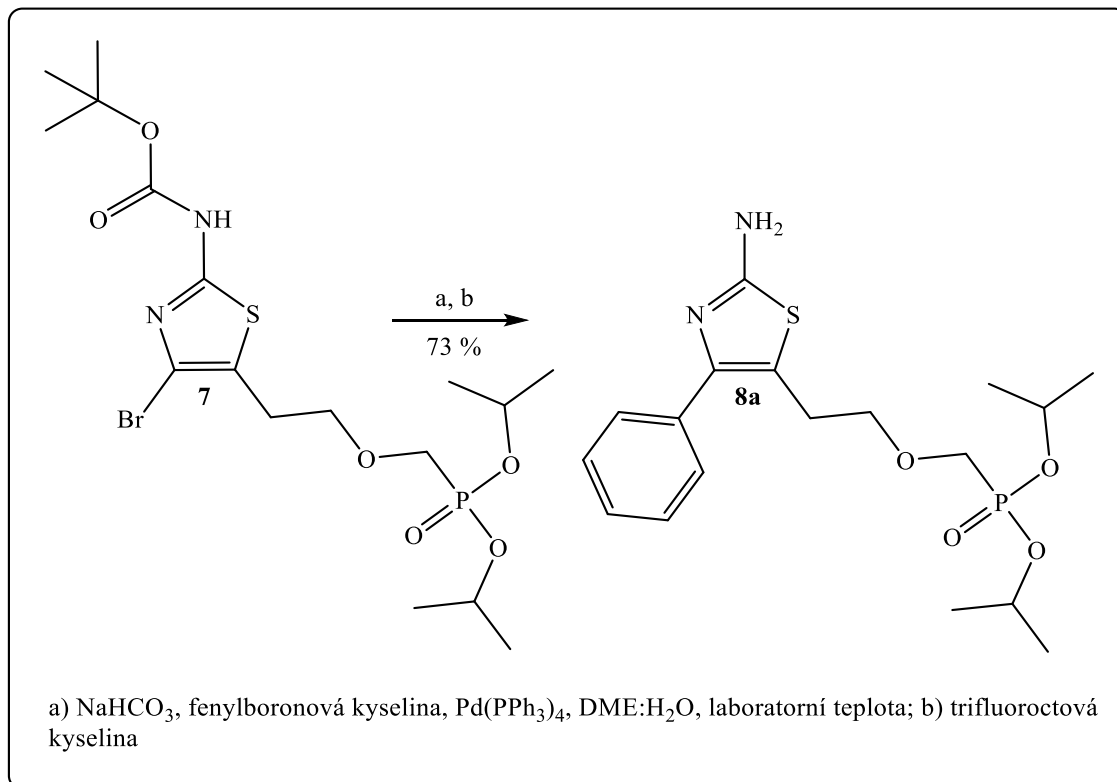
	Izolovaný výtěžek (%)
1. pokus	32/61*
2. pokus	38/60*

\* Výtěžek po započítání znečištěné frakce o čistotě kolem 85 %.

### 3.6. Suzuki cross-coupling reakce

Jako výchozí látka pro již zmíněný Suzuki coupling byl použit 4-brom-2-(*tert*-butoxykarbonylamino)-5-{2-[(diisopropoxyfosforyl)methoxy]ethyl}thiazol (**7**, *Obr.* 28-30). Reakce byla provedena za zvýšené teploty ve vodném DME s Pd(PPh<sub>3</sub>)<sub>4</sub> jako katalyzátorem, příslušnými aryl boronovými kyselinami (fenyl-, 3-pyridyl- a 3-butoxyfenyl-) a NaHCO<sub>3</sub>. Po této reakci následovalo odstranění chránicí Boc skupiny k destilací s CF<sub>3</sub>COOH.<sup>35</sup>

I přes to, že na reakci s fenylboronovou kyselinou nebyla použita zcela čistá výchozí látka, reakce proběhla dobře a produkt byl izolován v dobrém výtěžku 73% látky **8a** (*Obr.* 28). Substituované fenylboronové kyseliny však poskytly nízké výtěžky, což mohlo být způsobeno nestabilitou použitých boronových kyselin při vysokých teplotách, případně kyselostí vytřepávaných vzorků. Toto však bylo korigováno neutralizací vytřepáním vodným roztokem Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> a zpětnou extrakcí vodné fáze pomocí CHCl<sub>3</sub>. Nemaleý podíl na nízkém výtěžku mohla mít i afinita k silikagelu během chromatografie, což se projevilo širokým píkem s nízkou intenzitou. Proto byla po neúspěšných flash chromatografiích provedena izolace těchto dvou produktů (látek **8b** a **8c**) pomocí HPLC, díky které se nám podařilo získat alespoň minimum žádaného produktu.



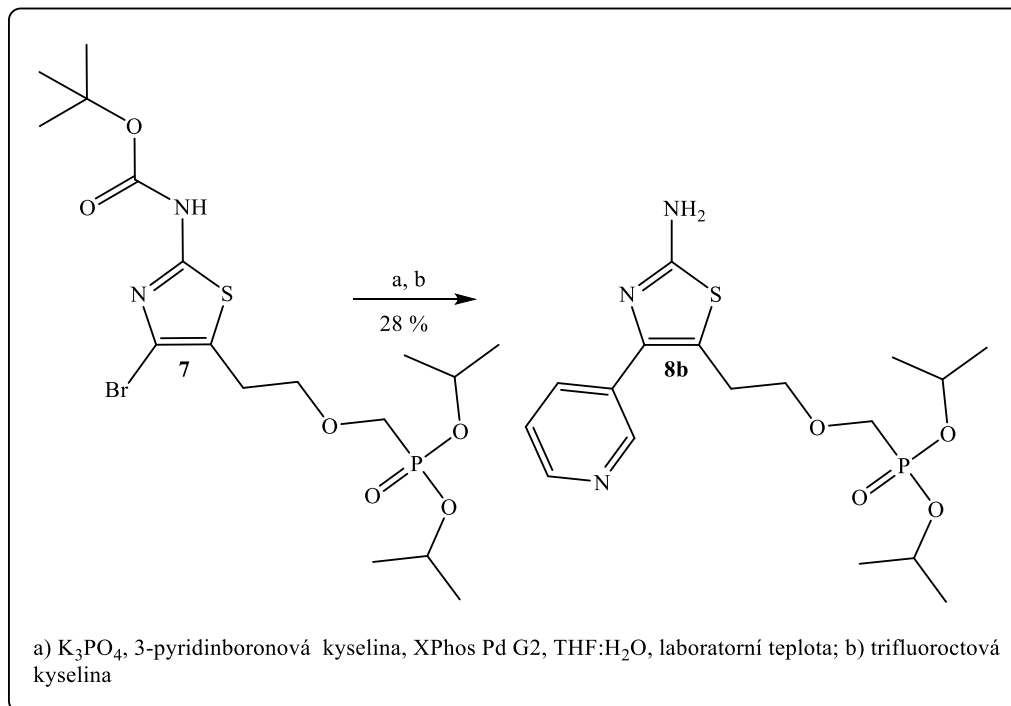
Obrázek 28: Schéma Suzuki cross-coupling reakce s výtěžkem a podmínkami reakce.

Relativně vyšších výtěžků bylo dosaženo změnou metody (Obr. 29 a Obr. 30), kdy reakce byla provedena ve vodném THF, NaHCO<sub>3</sub> byl nahrazen K<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> a původní katalyzátor katalyzátorem XPhos Pd G2. Pozměněno bylo i pořadí, v jakém byly látky přidávány do reakce. Látky **8b** (28%) a **8c** (51%) tak byly získány v dostačujících výtěžcích (Tab. 7).

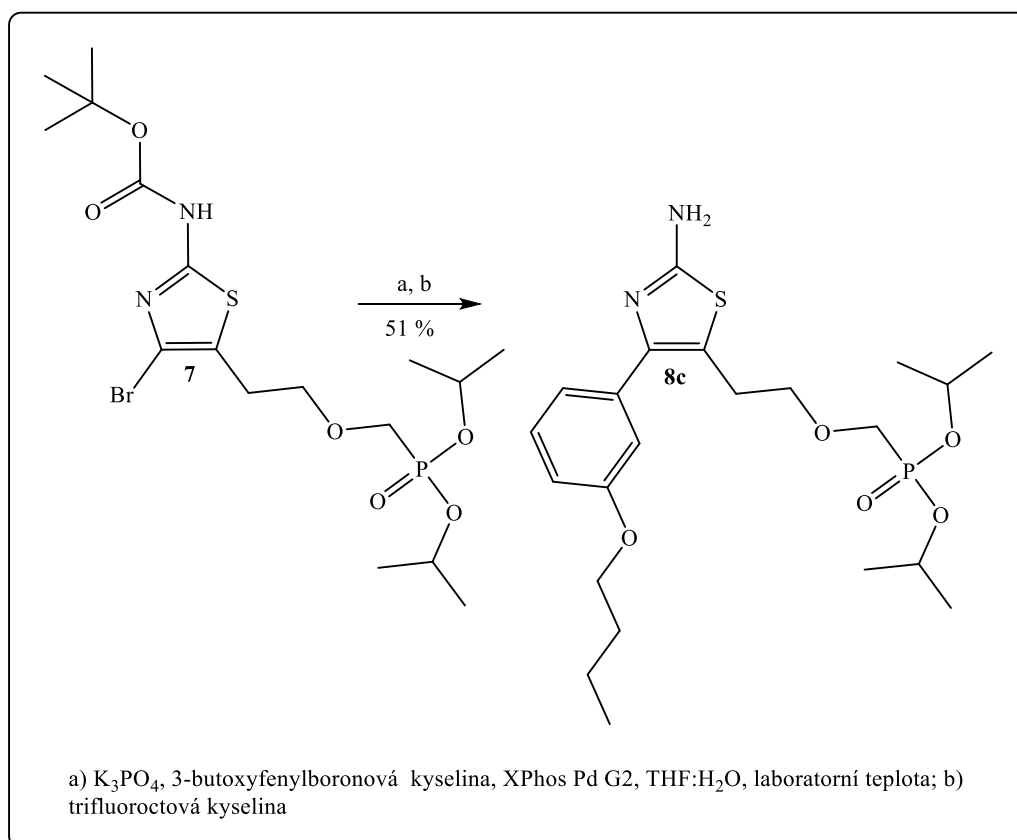
Tabulka 7: Různě substituované 2-amino-5-PME-thiazol deriváty připravené pomocí cross-coupling reakce a výtěžky jednotlivých reakcí.

látka	boronová kyselina	výtěžek (%)
<b>8a</b>	fenyl-	73
<b>8b</b>	3-pyridin-	28
<b>8c</b>	3-butoxyfenyl-	51





Obrázek 29: Schéma Suzuki cross-coupling reakce s výtěžkem a podmínkami reakce.

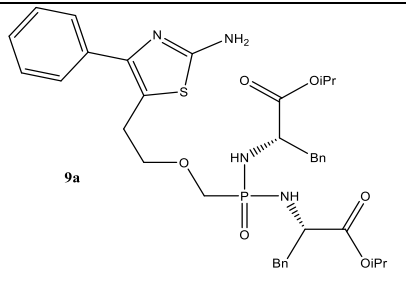
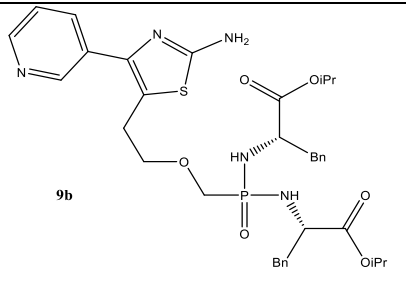
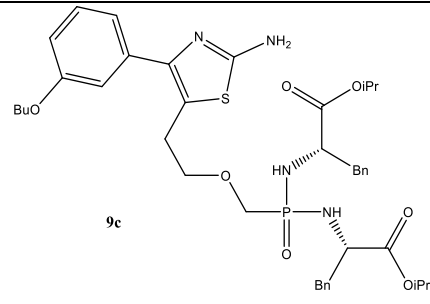


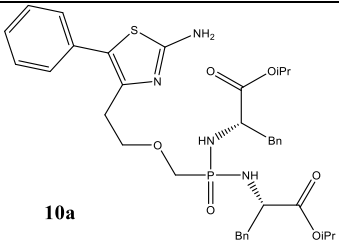
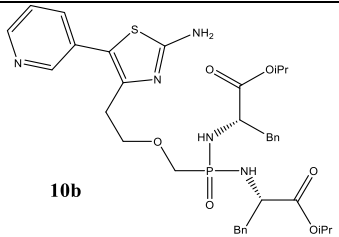
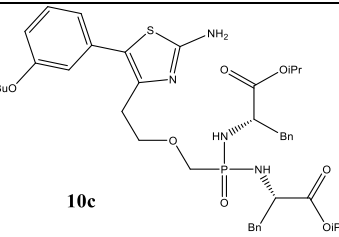
Obrázek 30: Schéma Suzuki cross-coupling reakce s výtěžkem a podmínkami reakce.

### 3.7. Výsledky testování připravených proléčiv na buněčných liniích

Po převedení mnou syntetizovaných látek **8a-c** na příslušná proléčiva, tj. bis-amidáty **9a-c** (Dr. Česnekem), byly tyto látky testovány na buněčných liniích vystavených ACT. Testy byly provedeny pracovníky externí laboratoře Heleny Mertlíkové-Kaiserové (ÚOCHB). Byla stanovena  $IC_{50}$  a cytotoxicita daných látek. Tyto hodnoty byly srovnány s PMEa bis-amidátem a látkami **10a-c** připravenými Dr. Břehovou (viz. Tab. 8).

Tabulka 8: Hodnoty inhibice ACT a cytotoxicity připravených proléčiv **8a-c**, PMEa bis-amidátu a příslušných regioizomerů **9a-c** (připravených Dr. Břehovou).

látka	<i>Bordetella pertussis</i> inhibice ACT [ $\mu$ M]		Cytotoxicita 10 $\mu$ M látky [%] <sup>b</sup>
	$IC_{50}$ [ $\mu$ M] <sup>a</sup>	SD [ $\mu$ M]	
PMEa bis-amidát	0,16	0,006	93
 <b>9a</b>	>10	-	109
 <b>9b</b>	8,72	1,33	102
 <b>9c</b>	2,79	0,01	103

 <p><b>10a</b></p>	1,82	0,58	112
 <p><b>10b</b></p>	2,62	0,62	99
 <p><b>10c</b></p>	1,62	0,36	35

- a)  $IC_{50}$  - 50% maximální inhibiční koncentrace - je vyjádřena jako průměr tří experimentů. Buňky myších makrofágů J774A.1 byly inkubovány s proléčivou a poté vystaveny toxinu. Byla stanovena změna koncentrace cAMP oproti kontrole.
- b) Cytotoxicita byla testována na buněčné linii CCRF-CEM, která byla 72 h inkubována s fixní 10  $\mu$ M koncentrací látky. Cytotoxicita byla stanovena jako procento přeživších buněk oproti kontrole bez inhibitorů.

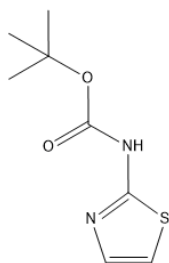
Z nově připravených proléčiv vykazovaly mikromolární inhibiční aktivitu deriváty **9b** (8,7  $\mu$ M) a **9c** (2,8  $\mu$ M) a ve srovnání s dříve připravenými regioizomerními látkami, **10b** (2,6  $\mu$ M) a **10c** (1,6  $\mu$ M), jsou poněkud slabšími inhibitory (Tab. 8).

## 4. Experimentální část

Pokud není uvedeno jinak, rozpouštědla byla odpařena při 40 °C a 2 kPa. Produkty byly sušeny s P<sub>2</sub>O<sub>5</sub> při 2 kPa. Chemické látky a činidla byly získány z komerčních zdrojů (Sigma-Aldrich, Fluorochem Ltd.), pouze bis(POM)PMEA byla získána od společnosti SANTIAGO. Rozpouštědla byla sušena standardními postupy. Pyridin byl skladován na molekulových sítích (4 Å). Tetrahydrofuran (THF) byl čerstvě destilován z pelet LiAlH<sub>4</sub> pod argonem. TLC byla provedena na deskách Kieselgel 60 F254 (Merck). Preparativní TLC byla provedena na destičkách UNIPLATE, SILICA GEL GF, 2000 μm, 20 × 20 cm. (Analtech). NMR spektra byla zaznamenána na spektrometru Bruker Avance 500 (<sup>1</sup>H při 500 MHz, <sup>13</sup>C při 125,8 MHz) s TMS jako interním standardem nebo odkazem na reziduální signál rozpouštědla. Hmotnostní spektra byla měřena na UPLC-MS (Waters SQD-2) a HR-MS byly získány z LTQ Orbitrap XL spektrometru za použití elektrosprejové ionizace (ESI). Flash chromatografie na normální fázi a na reverzní fázi byla provedena na systému Reveleris Flash Chromatography System. Deionizace byla provedena na koloně Redisep®Rf GOLD C18 Teledyne ISCO. Čistota meziproductů i cílových sloučenin byla stanovena prostřednictvím přístroje Waters UPLC-MS system obsahující kolonu Waters Acquity UPLC BEH C18 1,7 mm, 2,1 x 100 mm, Waters Acquity UPLC PDA detector a hmotnostní spektrometr Waters SQD2 s univerzální LC metodou (H<sub>2</sub>O-CH<sub>3</sub>CN, lineární gradient 0-100%, délka měření 7 min) a byla vyšší než 95%.

### 4.1. Připravené látky

#### 2-(*Terc*-butoxykarbonylamino)thiazol (2)

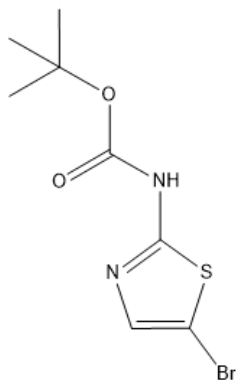


2-Aminothiazol (8,00 g; 79,92 mmol; 1,0 ekv), DMAP (0,40 g; 3,27 mmol; 0,04 ekv) a Boc<sub>2</sub>O (18,3 g; 83,9 mmol; 1,05 ekv) byly rozpuštěny v THF (200 ml) a míchány při pokojové teplotě v přítomnosti Ar. Dále byl přikapán Et<sub>3</sub>N (33,4 ml; 239,8 mmol; 3,0 ekv). Reakce proběhla do půl hodiny po přikapání. Průběh reakce byl monitorován pomocí TLC destiček v 1% methanol/chloroform a UPLC-MS. K reakční směsi byla přilita směs ethyl-acetát/voda, organická vrstva byla 3× extrahována vodou a nakonec nasyceným roztokem NaCl. Po vysušení organické fáze bylo získáno **8,50 g** látky **2**,

tedy **53%** výtěžek.

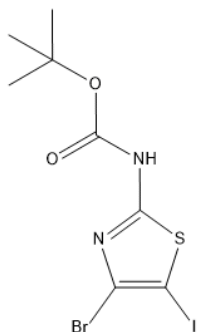
Při druhé přípravě byl v THF (90 ml) rozpuštěn DMAP (1.0 g; 8,18 mmol; 0,04 ekv) a 2-aminothiazol (20,0 g; 200 mmol; 1,00 ekv) a míchány při pokojové teplotě v přítomnosti Ar. Ke směsi byl přikapán  $\text{Boc}_2\text{O}$  (45,8 g; 210 mmol; 1,05 ekv) rozpuštěný v THF (100 ml). Následně byl přidán  $\text{Et}_3\text{N}$  (83,6 ml; 600 mmol; 3,0 ekv) a reakce byla ukončena po dalších 8 hodinách. Průběh reakce byl monitorován na TLC destičkách v 1% methanol/chloroform a UPLC-MS. K reakční směsi byla přilita směs ethyl-acetát/voda, organická vrstva byla extrahována  $\text{H}_2\text{O}$  (3×) a následně zfiltrována. Filtrát byl dále extrahován roztokem NaCl. Pevná složka na filtru byla promyta acetonitrilem a filtrát byl spojen s ethyl-acetátovou fází. Celkový výtěžek reakce byl **90 % (36,0 g)**. ESI-MS,  $m/z$  (%): 223  $[\text{M}+\text{Na}^+]$  (100).  $^1\text{H}$  NMR ( $\text{DMSO}-d_6$ )  $\delta$  11,40 (s, 1H, NH); 7,35 (d,  $J = 3,6$  Hz, 1H, H-4); 7,14 (d,  $J = 3,6$  Hz, 1H, H-5); 1,48 (s, 9H,  $\text{CH}_3$ ).  $^{13}\text{C}$  NMR ( $\text{DMSO}-d_6$ ):  $\delta$  159,75 (C-2); 152,82 (OCON); 137,84 (C-4); 112,82 (C-5); 80,98 ( $\underline{\text{C}}-\text{CH}_3$ ); 27,92 ( $\text{CH}_3$ ). HR-MS (ESI+):  $m/z$   $[\text{M} + \text{Na}]^+$  spočteno pro:  $\text{C}_8\text{H}_{12}\text{O}_2\text{N}_2\text{NaS}$ , 223,0511, naměřeno: 223,0518.

### 5-Brom-2-(*tert*-butoxykarbonylamino)thiazol (3)



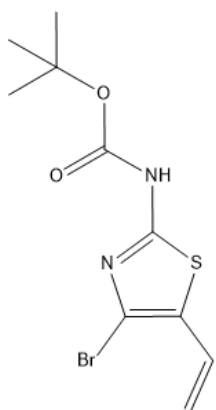
Látka **2** (8,46 g; 42,3 mmol; 1,0 ekv) byla rozpuštěna v THF (134 ml) a míchána za laboratorní teploty. Následně byl po částech přisypán NBS (8,28 g; 46,5 mmol; 1,1 ekv). Po 3 hodinách byla reakce ukončena. Průběh reakce byl monitorován na TLC destičkách v 0,5% methanol/chloroform a UPLC-MS. Reakční směs byla po odpaření rozpuštěna v ethyl-acetátu a zachycena na silikagelu. Pro izolování bylo využito Flash chromatografie s gradientem (cyklohexan  $\rightarrow$  10% methanol/ethylacetát). Bylo izolováno **5,13 g** (výtěžek **44 %**). ESI-MS,  $m/z$  (%): 301  $[\text{M}+\text{Na}^+]$  (100).  $^1\text{H}$  NMR ( $\text{DMSO}-d_6$ )  $\delta$  11,73 (brs, 1H, NH); 7,43 (s, 1H, CH-4); 1,48 (s, 9H,  $\text{CH}_3$ ).  $^{13}\text{C}$  NMR ( $\text{DMSO}-d_6$ )  $\delta$  160,16 (C-2); 152,97 (OCON); 139,00 (C-4); 100,59 (C-5); 81,72 ( $\underline{\text{C}}-\text{CH}_3$ ); 27,84 ( $\text{CH}_3$ ). HR-MS (ESI+):  $m/z$   $[\text{M} + \text{Na}]^+$  spočteno pro:  $\text{C}_8\text{H}_{11}\text{O}_2\text{N}_2\text{BrNaS}$ , 300,9617, naměřeno: 300,9620.

#### 4-Brom-2-(*tert*-butoxykarbonylamino)-5-jodthiazol (4)



Látka **3** (1,00 g; 3,58 mmol; 1,0 ekv) byla rozpuštěna v toluenu a po odpaření v THF (4 ml). Rozpuštěná látka byla přikapána k LDA (5,9 ml; 11,8 mmol; 3,3 ekv) s THF (10 ml) a míchána při 0 °C v přítomnosti Ar. Po 15 minutách chlazení byla reakce temperována na laboratorní teplotu, při které byl přidán jód (3,0 g; 11,8 mmol; 3,3 ekv) v THF (5 ml). Reakce byla ukončena 2M HCl. Průběh reakce byl monitorován pomocí TLC destiček ve směsi 10% ethyl-acetát/cyklohexan a UPLC-MS. Reakční směs byla zředěna ethyl-acetátem a extrahována 50% NH<sub>4</sub>Cl (3×), 20% Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (3×) a nasyceným roztokem NaCl (3×). Reakční směs byla po odpaření rozpuštěna v cyklohexanu a zachycena na silikagelu. Pro izolování bylo využito flash chromatografie s gradientem (cyklohexan → 10% methanol/ethyl-acetát). Výtěžek reakce činil **37 %** (tedy **540 mg**). ESI-MS, *m/z* (%): 404,9 [M+H<sup>+</sup>] (60). <sup>1</sup>H NMR (CDCl<sub>3</sub>) δ 9,06 (brs, 1H, NH); 1,56 (s, 9H, CH<sub>3</sub>). <sup>13</sup>C NMR (CDCl<sub>3</sub>) δ 164,62 (C-2); 151,80 (OCON); 129,86 (C-4); 83,88 (C-CH<sub>3</sub>); 65,07 (C-5); 28,28 (CH<sub>3</sub>). HR-MS (ESI<sup>+</sup>): *m/z* [M + Na]<sup>+</sup> spočteno pro: C<sub>8</sub>H<sub>10</sub>O<sub>2</sub>N<sub>2</sub>BrINaS, 426,8583, naměřeno: 426,8585.

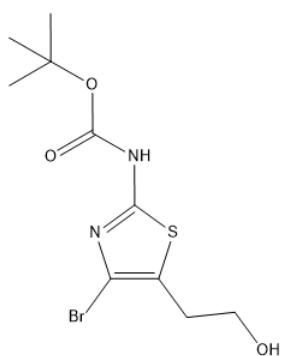
#### 4-Brom-2-(*tert*-butoxykarbonylamino)-5-vinylthiazol (5)



Syntéza látky **5** z látky **4**. Látka **4** (100 mg; 0,25 mmol; 1,0 ekv), CH<sub>2</sub>=CHBF<sub>3</sub>K (100 mg; 0,74 mmol; 3,0 ekv) a Pd(dppf)Cl<sub>2</sub>·DCM (20,2 g; 0,022 mmol; 0,09 ekv) byly společně rozpuštěny v 96% EtOH (5 ml). Do směsi byl přikapán [(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>CH]<sub>2</sub>NC<sub>2</sub>H<sub>5</sub> (0,04 ml; 0,25 mmol; 1,0 ekv). Reakce byla zahřáta na 100 °C a po 4 hodinách ukončena. Průběh reakce byl monitorován pomocí TLC destiček ve směsi 10% ethyl-acetát/cyklohexan a UPLC-MS. Reakční směs byla zředěna etherem a extrahována 20% NH<sub>4</sub>Cl/H<sub>2</sub>O (3×). Etherická vrstva byla přečištěna filtrací a filtrát znovu odpařen. Rozpuštěním v chloroformu byl filtrát nanesen na velkou TLC desku, na které byl produkt izolován v 10% ethyl-acetát/cyklohexan. Filtrací byl produkt zachycený na silikagelu eluován směsí 50% methanol/chloroform. Bylo získáno **49 mg** produktu (výtěžek **65 %**). ESI-MS, *m/z* (%): 327,0 [M+Na<sup>+</sup>] (100). 11,88 (brs, 1H, NH); 6,65 (dd, *J* = 17,4, *J* =

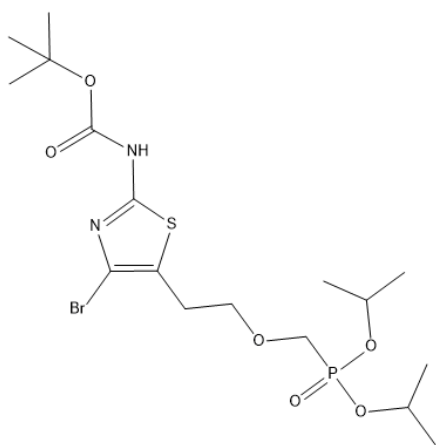
11,0 Hz, 1H, H-1'); 5,49 (d,  $J = 17,3$  Hz, 1H, H-2'a); 5,28 (d,  $J = 11,3$  Hz, 1H, H-2'b); 1,48 (s, 9H, CH<sub>3</sub>). <sup>13</sup>C NMR (DMSO-*d*<sub>6</sub>)  $\delta$  164,32 (C-2); 152,65 (OCON); 126,53 (C-1'); 124,24 (C-5); 121,14 (C-4); 115,87 (C-2') 82,12 (C-CH<sub>3</sub>); 27,80 (CH<sub>3</sub>). HR-MS (ESI+):  $m/z$  [M + Na]<sup>+</sup> spočteno pro: C<sub>10</sub>H<sub>13</sub>O<sub>2</sub>N<sub>2</sub>BrNaS, 326,9773, naměřeno: 326,9776.

#### 4-Brom-2-(*tert*-butoxykarbonylamino)-5-(ethanol-2-yl)thiazol (6)



Proběhla příprava látky **6** z látky **3**. Do roztoku diisopropylaminu (1 ml; 7,18 mmol; 4,0 ekv) v THF (10 ml) bylo za stálého míchání v přítomnosti Ar při -20 °C přikapáno butyllithium (2,5 M v hexanu; 2,9 ml; 7,2 mmol; 4,0 ekv). K takto získané reakční směsi byl po 20 min při -20 °C přikapán roztok látky **3** (0,5 g; 1,8 mmol; 1,0 ekv) v THF (10 ml). Látka **3** byla před použitím vysušena rozpuštěním v toluenu (10 ml) a následně odpařena. Po dalších 20 minutách byl přidán při -20 °C roztok oxiranu (3 M v THF; 2 ml; 5,85 mmol; 3,3 ekv), po přikapání byla reakce temperována na +10 °C. Reakce byla ukončena po dalších 2 hodinách přidáním NH<sub>4</sub>Cl. Průběh reakce byl monitorován pomocí TLC destiček ve směsi 2% methanol/toluen a UPLC-MS. Reakční směs byla zředěna ethyl-acetátem a extrahována H<sub>2</sub>O (3×), 20% NH<sub>4</sub>Cl/H<sub>2</sub>O (3×) a nasyceným roztokem NaCl (3×). Organická vrstva byla po odpaření rozpuštěna v chloroformu a zachycena na silikagelu. Pro izolování bylo využito flash chromatografie s gradientem (0,5% methanol/toluen → methanol). Bylo získáno **392 mg** (výtěžek **68 %**) látky **6**. ESI-MS,  $m/z$  (%): 345,0 [M+Na<sup>+</sup>] (100). <sup>1</sup>H NMR (DMSO-*d*<sub>6</sub>)  $\delta$  11,55 (brs, 1H, NH); 4,93 (m, 1H, OH); 3,56 (m, 2H, O-CH<sub>2</sub>); 2,77 (t,  $J$  (CH<sub>2</sub>, CH<sub>2</sub>)= 6,3 Hz, 2H, 5-CH<sub>2</sub>); 1,48 (s, 9H, CH<sub>3</sub>). <sup>13</sup>C NMR (DMSO-*d*<sub>6</sub>)  $\delta$  158,55 (C-2); 152,70 (OCON); 122,99 (C-5); 118,70 (C-4); 81,53 (C-CH<sub>3</sub>); 60,25 (O-CH<sub>2</sub>); 30,57 (5-CH<sub>2</sub>); 27,84 (CH<sub>3</sub>). HR-MS (ESI+):  $m/z$  [M + Na]<sup>+</sup> spočteno pro: C<sub>10</sub>H<sub>15</sub>O<sub>3</sub>N<sub>2</sub>BrNaS, 344,9879, naměřeno: 344,9882.

**4-Brom-2-(*tert*-butoxykarbonylamino)-5-{2-[(*diisopropoxyfosforyl*)methoxy]ethyl}-thiazol (7)**



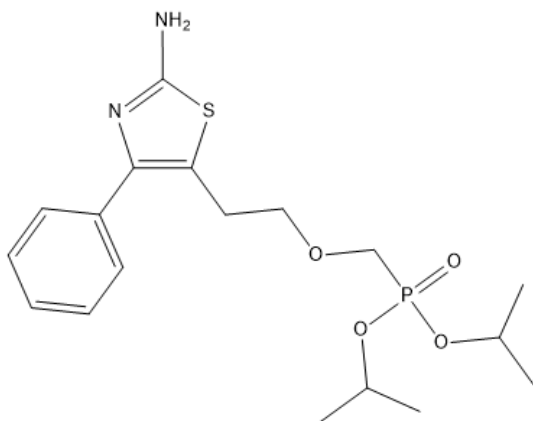
Proběhla příprava látky **7** z látky **3**. Do roztoku diisoprylaminu (2 ml; 14,3 mmol; 4,0 ekv) v THF (20 ml) bylo za stálého míchání v přítomnosti Ar při  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  přikapáno butyllithium (2,5 M v hexanu; 5,7 ml; 14,4 mmol; 4,0 ekv). K takto získané reakční směsi byl po 20 min při  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  přikapán roztok látky **3** (1,0 g; 3,58 mmol; 1,0 ekv) v THF (20 ml). Látka **3** byla před použitím vysušena rozpuštěním v toluenu (20 ml) a následným odpařením. Po dalších 20 minutách byl přidán při  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  roztok oxiranu (3 M v THF; 3,9 ml; 11,7 mmol; 3,3 ekv), po přikapání byla reakce temperována na  $+10\text{ }^{\circ}\text{C}$ . Po zchlazení reakce na  $-40\text{ }^{\circ}\text{C}$  byl přidán fosfonát (3,52 g; 10,8 mmol; 3,0 ekv). Reakce byla ukončena po 2 hodinách přidáním  $\text{NH}_4\text{Cl}$ . Průběh reakce byl monitorován pomocí TLC destiček ve směsi 4% methanol/toluen a UPLC-MS. Reakční směs byla zředěna ethyl-acetátem a extrahována  $\text{H}_2\text{O}$  (3 $\times$ ), 20%  $\text{NH}_4\text{Cl}/\text{H}_2\text{O}$  (3 $\times$ ) a nasyceným roztokem  $\text{NaCl}$  (3 $\times$ ). Organická vrstva byla po odpaření rozpuštěna v cyklohexanu a zachycena na silikagelu. Pro izolování bylo využito flash chromatografie s gradientem (0,5% methanol/toluen  $\rightarrow$  methanol). Bylo získáno **1,10 g** (výtěžek **61 %**) látky **7**. ESI-MS,  $m/z$  (%): 523,0 [ $\text{M}+\text{Na}^+$ ] (100).  $^1\text{H}$  NMR (DMSO- $d_6$ )  $\delta$  11,58 (s, 1H, NH); 4,70 – 4,48 (m, 2H,  $\underline{\text{CH}}$ -iPr); 3,76 (d,  $J$  ( $\text{CH}_2$ , P) = 8,3 Hz, 2H, P- $\text{CH}_2$ ); 3,68 (t,  $J$  ( $\text{CH}_2$ ,  $\text{CH}_2$ ) = 5,9 Hz, 2H, O- $\text{CH}_2$ ); 2,88 (t,  $J$  ( $\text{CH}_2$ ,  $\text{CH}_2$ ) = 6,1 Hz, 2H, 5- $\text{CH}_2$ ); 1,47 (s, 9H,  $\text{CH}_3$ ); 1,24 – 1,19 (m, 12H, 2 $\times$   $\text{CH}_3$ ).  $^{13}\text{C}$  NMR (DMSO- $d_6$ )  $\delta$  158,75 (C-2); 152,70 (OCON); 122,44 (C-5); 119,12 (C-4); 81,58 ( $\underline{\text{C}}$ - $\text{CH}_3$ ); 71,41 (d,  $J$  = 11,8 Hz, O $\underline{\text{C}}\text{H}_2$ ); 70,24 (d,  $J$  = 6,4 Hz,  $\underline{\text{C}}\text{H}$ -iPr); 64,81 (d,  $J$  = 164,1 Hz, P- $\underline{\text{C}}\text{H}_2$ ); 27,83 ( $\underline{\text{C}}$ - $\text{CH}_3$ ); 27,36 (C-1'); 23,82, 23,79, 23,71, 23,67 (4 $\times$  $\text{CH}_3$ ). HR-MS (ESI $^+$ ):  $m/z$  [ $\text{M} + \text{Na}$ ] $^+$  spočteno pro:  $\text{C}_{17}\text{H}_{30}\text{O}_6\text{N}_2\text{BrNaPS}$ , 523,0638, naměřeno: 523,0643.



**Obecný postup přípravy derivátů 2-aminothiazolu při coupling reakci do polohy 4 na 2-aminothiazolu**

- a) Nejprve byla v přítomnosti Ar smíchána látka **7** s NaHCO<sub>3</sub>, arylboronovou kyselinou a Pd(PPh<sub>3</sub>)<sub>4</sub>. Pevné reagenty byly rozpuštěny v DME:H<sub>2</sub>O (2:1) tak, aby vznikl 10% roztok. Reakce probíhala 18 hodin při teplotě 110 °C v přítomnosti Ar. Reakční směs byla zchlazena na laboratorní teplotu, odpařena a byla k ní přidána kyselina trifluoroctová. Po odpaření byla zředěna ethyl-acetátem a extrahována H<sub>2</sub>O (3×), 20% NH<sub>4</sub>Cl/H<sub>2</sub>O (3×) a nasyceným roztokem NaCl (2×). Organická vrstva byla odpařena, nanesena na vrstvu silikagelu a pro izolaci produktu bylo využito flash chromatografie.
- b) Látka **7** rozpuštěná v THF byla přidána do směsi složené z XPhos Pd G2 a arylboronové kyseliny rozpuštěných v THF:H<sub>2</sub>O (4:1). Následně byl přidán K<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> rozpuštěný ve vodě. Vše probíhalo při laboratorní teplotě v přítomnosti Ar. Výsledná směs byla ohřáta na 50 °C a míchána přes noc. Reakce byla ochlazená, ukončena přilitím 50% NH<sub>4</sub>Cl/H<sub>2</sub>O. Nakonec byla zředěna ethyl-acetátem, do nějž byl produkt extrahován (3×). Organické vrstvy byly společně vysušeny pomocí Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> a odpařeny. Tato pevná látka byla při laboratorní teplotě rozpuštěna v CF<sub>3</sub>COOH a po 5 minutách byla kyselina odpařena. Poté byla rozpuštěna ve vodě (3×) a pokaždé odpařena. Nakonec byla zachycena na C18 silikagelu. Pro izolaci produktu bylo využito flash chromatografie.

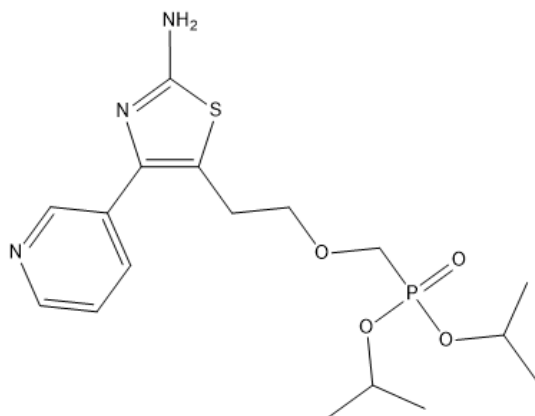
**2-Amino-5-{2-[(diisopropoxyfosforyl)methoxy]ethyl}-4-fenylthiazol (**8a**)**



Z látky **7** byla dle obecného postupu *a* připravena látka **8a**. Látka **7** (566 mg; 1,1 mmol; 1,0 ekv), NaHCO<sub>3</sub> (314 mg; 3,7 mmol; 3,3 ekv), fenyloboronová kyselina (138 mg; 1,1 mmol; 1,0 ekv) a Pd(PPh<sub>3</sub>)<sub>4</sub> (66 mg; 0,056 mmol; 0,05 ekv), DME:H<sub>2</sub>O (7,2:3,6 ml), kyselina trifluoroctová (3 ml). Průběh reakce byl monitorován pomocí TLC destiček ve směsi

10% methanol/chloroform a UPLC-MS. Reakční směs byla po extrakci rozpuštěna v ethyl-acetátu a zachycena na silikagelu. Pro izolování bylo využito Flash chromatografie s gradientem (chloroform → 10% methanol/chloroform). Bylo získáno **330 mg** (výtěžek **73 %**) látky **8a**. ESI-MS,  $m/z$  (%): 399  $[M+H]^+$  (100).  $^1H$  NMR (DMSO- $d_6$ )  $\delta$  7,58 – 7,46 (m, 2H, H-2''); 7,35-7,40 (m, 2H, H-3''); 7,32 – 7,23 (m, 1H, H-4''); 6,84 (bs, 2H, NH<sub>2</sub>); 4,57 (m, 2H, CHiPr); 3,74 (d,  $J(CH_2, P) = 8,1$  Hz, 2H, P-CH<sub>2</sub>); 3,69 (t,  $J(CH_2, CH_2) = 6,5$  Hz, 2H, O-CH<sub>2</sub>); 2,92 (t,  $J(CH_2, CH_2) = 6,5$  Hz, 2H, 5-CH<sub>2</sub>); 1,22 and 1,21 2x (d,  $J(CH_3, CH) = 7,7$  Hz, 6H, CH<sub>3</sub>).  $^{13}C$  NMR (DMSO- $d_6$ ):  $\delta$  165,46 (C-2); 146,23 (C-4); 135,40 (C-1''); 128,23 and 128,07 (C-2'', 3''); 127,02 (C-4''); 116,82 (C-5); 72,98 d,  $J(C-O-C-P) = 11,5$  Hz, (O-CH<sub>2</sub>); 71,15 (d,  $J(C-O-P) = 6,4$  Hz, CHiPr); 64,81 (d,  $J(C-P) = 163,9$  Hz, CH<sub>2</sub>-P); 27,16 (5-CH<sub>2</sub>); 23,84, 23,82, 23,80 and 23,71 (CH<sub>3</sub>iPr). HR-MS (ESI<sup>+</sup>):  $m/z$   $[M + H]^+$  spočteno pro: C<sub>18</sub>H<sub>28</sub>N<sub>2</sub>O<sub>4</sub>PS, 399,1502, naměřeno: 399,1502.

### **2-Amino-5-{2-[(diisopropoxyfosforyl)methoxy]ethyl}-4-(pyridin-3-yl)thiazol (8b)**



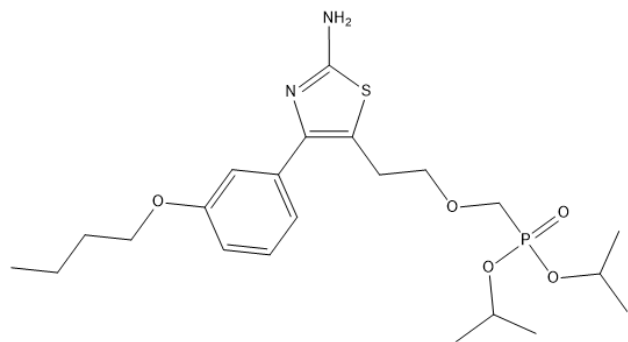
Z látky **7** byla dle obecného postupu *a* připravena látka **8b**. Látka **7** (225 mg; 0,45 mmol; 1,0 ekv), NaHCO<sub>3</sub> (125 mg; 1,49 mmol; 3,3 ekv), 3-pyridinboronová kyselina (55 mg; 0,45 mmol; 1,0 ekv), Pd(PPh<sub>3</sub>)<sub>4</sub> (26,0 mg; 0,023 mmol; 0,05 ekv), DME:H<sub>2</sub>O (2,9:1,4 ml), kyselina trifluoroctová (2 ml). Průběh reakce byl

monitorován pomocí UPLC-MS a TLC destiček ve směsi methanol:chloroform:cyklohexan (1,5:48,5:50). Reakční směs byla po extrakci rozpuštěna v ethyl-acetátu a zachycena na silikagelu. Pro izolování produktu bylo využito HPLC s gradientem (30% acetonitril/voda → acetonitril). Bylo získáno **5 mg** (výtěžek **3 %**) látky **8b**.

Z látky **7** byla dle obecného postupu *b* připravena látka **8b**. Látka **7** (400 mg; 0,80 mmol; 1,0 ekv) byla rozpuštěna v THF (1,6 ml). 3-Pyridinboronová kyselina (148 mg; 1,2 mmol; 1,5 ekv) a XPhos Pd G2 (25,2 mg; 0,032 mmol; 0,04 ekv) byly rozpuštěny v THF:H<sub>2</sub>O (13,4:3,4). K<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> (509 mg; 2,4 mmol; 3,0 ekv) byl rozpuštěn ve

vodě (1,6 ml). Pro izolaci produktu bylo využito flash chromatografie s gradientem (H<sub>2</sub>O (0,1% HCOOH) → acetonitril). Bylo získáno **110 mg** (výtěžek **28 %**) látky **8b**. ESI-MS, *m/z* (%): 422 [M+Na<sup>+</sup>] (100). <sup>1</sup>H NMR (DMSO-*d*<sub>6</sub>): 8,74 (dd, *J*(2'', 4'') = 2,2 Hz, *J*(2'', 5'') = 0,9 Hz, 1H, H-2''); 8,49 (dd, *J*(6'', 5'') = 4,8 Hz, *J*(6'', 4'') = 1,7 Hz, 1H, H-6''); 7,92 (dt, *J*(4'', 5'') = 7,9 Hz, *J*(4'', 2'') = 2,0 Hz, 1H, H-4''); 7,40 (ddd, *J*(5'', 4'') = 7,9 Hz, *J*(5'', 6'') = 4,8 Hz, *J*(5'', 2'') = 0,9 Hz, 1H, H-5''); 6,94 (bs, 2H, NH<sub>2</sub>); 4,56 (m, 2H, CHiPr); 3,75 (d, *J*(CH<sub>2</sub>, P) = 8,2 Hz, 2H, P-CH<sub>2</sub>); 3,70 (t, *J*(CH<sub>2</sub>, CH<sub>2</sub>) = 6,3 Hz, 2H, O-CH<sub>2</sub>); 2,93 (t, *J*(CH<sub>2</sub>, CH<sub>2</sub>) = 6,3 Hz, 2H, 5-CH<sub>2</sub>); 1,21 (d, *J*(CH<sub>3</sub>, CH) = 8,8 Hz, 6H, CH<sub>3</sub>); 1,20 (d, *J*(CH<sub>3</sub>, CH) = 8,8 Hz, 6H, CH<sub>3</sub>). <sup>13</sup>C NMR (DMSO-*d*<sub>6</sub>): δ 166,02 (C-2); 148,87 (C-2''); 147,88 (C-6''); 143,21 (C-4); 135,38 (C-1''); 131,15 (C-3''); 123,28 (C-5''); 118,62 (C-5); 72,86 d, *J*(C-O-C-P) = 11,7 Hz, (O-CH<sub>2</sub>); 70,16 (d, *J*(C-O-P) = 6,4 Hz, CHiPr); 64,85 (d, *J*(C-P) = 163,8 Hz, (CH<sub>2</sub>-P); 27,10 (5-CH<sub>2</sub>); 23,83, 23,79, 23,69 and 23,64 (CH<sub>3</sub>iPr). HR-MS (ESI<sup>+</sup>): *m/z* [M + Na]<sup>+</sup> spočteno pro: C<sub>17</sub>H<sub>26</sub>N<sub>3</sub>O<sub>4</sub>PSNa, 422,1274, naměřeno: 422,1274.

### 2-Amino-5-{2-[(diisopropoxyfosforyl)methoxy]ethyl}-4-(3-butoxyfenyl)thiazol (**8c**)



Z látky **7** byla dle obecného postupu *a* připravena látka **8c**. Látka **7** (300 mg; 0,60 mmol; 1,0 ekv), NaHCO<sub>3</sub> (166,3 mg; 1,98 mmol; 3,3 ekv), 3-butoxyfenylboronová kyselina (116, mg; 0,60 mmol; 1,0 ekv), Pd(PPh<sub>3</sub>)<sub>4</sub> (35 mg;

0,03 mmol; 0,05 ekv), DME:H<sub>2</sub>O (4,1:2,1 ml), kyselina trifluoroctová (2 ml). Průběh reakce byl monitorován pomocí UPLC-MS a TLC destiček ve směsi 5% methanol/chloroform. Reakční směs byla po extrakci rozpuštěna v ethyl-acetátu a zachycena na silikagelu. Pro izolování produktu bylo využito HPLC s gradientem (30% acetonitril/voda → acetonitril). Nakonec byl produkt zachycen na dowexu (se sulfo- skupinami) a uvolněn promytím 10% amoniak/methanol. Bylo získáno **14 mg** (výtěžek **5 %**) látky **8c**.

Z látky **7** byla dle obecného postupu *b* připravena látka **8c**. Látka **7** (400 mg; 0,8 mmol; 1,0 ekv) byla rozpuštěna v THF (1,6 ml). 3-butoxyfenylboronová kyselina

(233 mg; 1,2 mmol; 1,5 ekv) a XPhos Pd G2 (25,2 mg; 0,032 mmol; 0,04 ekv) byly rozpuštěny v THF:H<sub>2</sub>O (13,44:3,36). K<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> (509 mg; 2,4 mmol; 3,0 ekv) byl rozpuštěn ve vodě (1,6 ml). Pro izolaci produktu bylo využito flash chromatografie s gradientem (H<sub>2</sub>O (0,1% HCOOH) → acetonitril). Bylo získáno **190 mg** (výtěžek **51 %**) látky **8c**. ESI-MS, *m/z* (%): 471 [M+H<sup>+</sup>] (100). <sup>1</sup>H NMR (DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ 7,24-7,29 (m, 1H, H-5''); 7,12 – 7,00 ((m, 2H, H-2'', 6''); 6,84-6,86 (m, 3H, C-4'', NH<sub>2</sub>); 4,51-4,63 (m, 2H, CHiPr); 3,97 (t, *J*(CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>) = 6,5 Hz, 2H, 3''-O-CH<sub>2</sub>); 3,74 (d, *J*(CH<sub>2</sub>, P) = 8,1 Hz, 2H, P-CH<sub>2</sub>); 3,69 (t, *J*(CH<sub>2</sub>, CH<sub>2</sub>) = 6,5 Hz, 2H, O-CH<sub>2</sub>); 2,94 (t, *J*(CH<sub>2</sub>, CH<sub>2</sub>) = 6,5 Hz, 2H, 5-CH<sub>2</sub>); 1,79 – 1,63 (m, 2H, -O-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>); 1,58 – 1,35 (m, 2H, CH<sub>2</sub>-CH<sub>3</sub>); 1,23 (d, *J*(CH<sub>3</sub>,CH) = 8,0 Hz, 6H, CH<sub>3</sub>); 1,21 (d, *J*(CH<sub>3</sub>,CH) = 8,0 Hz, 6H, CH<sub>3</sub>); 0,94 (t, *J*(CH<sub>3</sub>,CH<sub>2</sub>) = 7,4 Hz, 3H, CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>). <sup>13</sup>C NMR (DMSO-*d*<sub>6</sub>): δ 165,38 (C-2); 158,48 (C-3''); 146,15 (C-4); 136,78 (C-1''); 128,97 (C-5''); 120,42 (C-6''); 117,00 (C-5); 114,01 (C-2''); 113,48 (C-4''); 72,96 d, *J*(C-O-C-P) = 11,3 Hz, (O-CH<sub>2</sub>); 71,16 (d, *J*(C-O-P) = 6,3 Hz, CHiPr); 67,04 (3''-O-CH<sub>2</sub>); 64,85 d, *J*(C-P) = 164,1 Hz, (CH<sub>2</sub>-P); 30,80 (3''-O-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>); 27,19 (5-CH<sub>2</sub>); 23,84, 23,81, 23,71 and 23,66 (CH<sub>3</sub>iPr); 18,77 (CH<sub>2</sub>-CH<sub>3</sub>); 13,72 (CH<sub>2</sub>-CH<sub>3</sub>). HR-MS (ESI<sup>+</sup>): *m/z* [M + H]<sup>+</sup> spočteno pro: C<sub>22</sub>H<sub>36</sub>N<sub>2</sub>O<sub>5</sub>PS, 471,2077, naměřeno: 471,2075.

## 5. Závěr

Cílem této práce bylo vyvinout syntetický postup pro přípravu 4-substituovaných 2-amino-5-(fosfonomethoxyethyl)-thiazolů jako potencionálních inhibitorů bakteriální ACT, což bylo splněno.

Byly vyzkoušeny dva syntetické přístupy: prvním byla postupná výstavba PME řetězce při využití halogen-migrační (HD) reakce Boc chráněného 2-amino-5-bromothiazolu s LDA a jodem (**37 %**), jenž byl v dalším kroku nahrazen vinylovou skupinou pomocí Suzuki cross-coupling reakce (**65 %**). Z této látky měl být pomocí hydroborace a oxidace připraven hydroxyethylový derivát. Syntéza však poskytovala nízké výtěžky.

Alternativní syntéza poskytla příslušný PME derivát z chráněného 2-amino-5-bromothiazolu v jednom kroku. Bromovaný derivát byl pomocí HD reakce transformován přímo na žádaný hydroxyethylový derivát (**68 %**) reakcí s oxiranem. Přidáním fosfonomethyltriflátu do reakční směsi byl získán požadovaný PME derivát (**61 %**). Posledním krokem byla Suzuki cross-coupling reakce s arylboronovými kyselinami. Byly připraveny tři různé deriváty 2-amino-5-PME-thiazolu nesoucí fenyl (látka **8a**, **73 %**), 3-pyridyl (látka **8b**, **28 %**) a 3-butoxyfenyl (látka **8c**, **51 %**) v poloze 4 thiazolu.

Takto připravené estery fosfonových kyselin **8a-c** byly následně převedeny Dr. Česnekem na cílová bis-amidátová proléčiva **9a-c**. V této formě mohou procházet plazmatickou membránou infikovaných buněk. Tyto látky byly otestovány jako potenciální inhibitory adenylátcyklázového toxinu (ACT) ve skupině Dr. Mertlíkové-Kaiserové (ÚOCHB), kde vykazovaly mikromolární inhibiční aktivitu a přitom nevykazovaly cytotoxicitu. Naše předpoklady o inhibičních účincích navržených a připravených látek se tak naplnily, ikdyž ve srovnání s dříve připravenými regioizomerními látkami **10a-c** (připravenými Dr. Břehovou) jsou slabšími inhibitory. Nejlepším nově připraveným inhibitorem ACT byla látka **9c** ( $IC_{50} = 2,8 \mu M$ ), přičemž odpovídající regioizomer **10c** má  $IC_{50} = 1,6 \mu M$ .

Postup vyvinutý v této práci bude následně použit pro syntézu dalších derivátů pro rozšíření této strukturně aktivní studie a ucelená práce pak bude publikována.

## 6. Literatura

- 
- <sup>1</sup> Břehová, P.; Šmídková, M.; Skácel, J.; Dračínský, M.: Design and Synthesis of Fluorescent Acyclic Nucleoside Phosphonates as Potent Inhibitors of Bacterial Adenylate Cyclases. *ChemMedChem* **11**:22, 2534–2546 (2016).
- <sup>2</sup> Česnek, M.; Šmídková, M.; Dračínský, M.; Jansa, P.: Bisamidate Prodrugs of 2-Substituted 9-[2-(Phosphonomethoxy)ethyl]adenine (PMEA, adefovir) as Selective Inhibitors of Adenylate Cyclase Toxin from *Bordetella pertussis*. *ChemMedChem* **10**:8, 1351–1364 (2015).
- <sup>3</sup> Šmídková, M.; Dvořáková, A.; Tloušťová, E.; Česnek, M.; Janeba, Z.: Amidate Prodrugs of 9-[2-(Phosphonomethoxy)Ethyl]Adenine as Inhibitors of Adenylate Cyclase Toxin from *Bordetella pertussis*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **58**:2, 664–671 (2014).
- <sup>4</sup> Břehová P., *et al.*, nepublikované výsledky.
- <sup>5</sup> Vaverková, R.: Černý kašel není nemocí minulosti. *Medicína pro praxi*. **10**:(11-12), 366–368 (2013).
- <sup>6</sup> Carbonetti, N.H.: Pertussis toxin and adenylate cyclase toxin: key virulence factors of *Bordetella pertussis* and cell biology tools. *Future Microbiology*. **5**:3, 455–469 (2010).
- <sup>7</sup> Fabiánová, K.; Zavadilová, J.; Šebestová, H.; Gašpárek, M.; Kříž, B.: Syndrom dávivého kašle. Pertuse a parapertuse v České republice v roce 2017 – epidemiologická situace a přehled očkování proti pertusi. *Zprávy Centra epidemiologie a mikrobiologie*. **27**:(3-4), 75–83 (2018).
- <sup>8</sup> Plaut, R.D.; Carbonetti, N.H.: Retrograde transport of pertussis toxin in the mammalian cell. *Cellular Microbiology*. **10**:5, 1130–1139.

---

<sup>9</sup> Rudkin, J.K.; McLoughlin, R.M.; Preston, A.; Massey, R.C.: Bacterial toxins: Offensive, defensive, or something else altogether? *PLOS Pathogens* **13**:9, 1–8 (2017).

<sup>10</sup> Gillespie, S.; Bamford, K.: *Medical Microbiology and Infection at a Glance*. 1. vydání London, Blackwell Science 2000.

<sup>11</sup> Pilo, P.; Frey, J.: Pathogenicity, population genetics and dissemination of *Bacillus anthracis*. *Infection, Genetics and Evolution* **64**, 115–125 (2018).

<sup>12</sup> Washington, DC: Center for Counterproliferation Research, National Defense University: *Anthrax in America: A Chronology and Analysis of the Fall 2001 Attacks. 2002, 138 stran*.

<sup>13</sup> Inglesby, T.V.; Henderson, D.A.; Bartlett, J.G.; Ascher, M.S.; Eitzen, E.: Anthrax as a biological weapon: medical and public health management. Working Group on Civilian Biodefense. *Journal of the American Medical Association* **281**:18, 1735–1745 (1999).

<sup>14</sup> Tang, W.J.; Guo, Q.: The adenylyl cyclase activity of anthrax edema factor. *Molecular Aspect of Medicine* **30**:6, 423–429 (2009).

<sup>15</sup> Taha, H.M.; Schmidt, J.; Göttle, M.; Suryanarayana, S.: Molecular Analysis of the Interaction of Anthrax Adenylyl Cyclase Toxin, Edema Factor, with 2′(3′)-O-(N-(methyl)anthraniloil)-Substituted Purine and Pyrimidine Nucleotides. *Molecular Pharmacology* **75**:3, 693–703 (2009).

<sup>16</sup> Gille, A; Lushington, G.H.; Doughty, M.B.; Seifert, R.: Differential Inhibition of Adenylyl Cyclase Isoforms and Soluble Guanylyl Cyclase by Purine and Pyrimidine Nucleotides. *Journal of Biological Chemistry* **279**:19, 19955–19969 (2004).

- 
- <sup>17</sup> Seifert, R.; Dove, S.: Inhibitors of *Bacillus anthracis* edema factor. *Pharmacology & Therapeutics* **140**:2, 200–211 (2013).
- <sup>18</sup> Shen, Y.; Zhukovskaya, N.L.; Zimmer, M.I.; Soelalman, S.: Selective inhibition of anthrax edema factor by adefovir, a drug for chronic hepatitis B virus infection. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **101**:9, 3242–3246 (2004).
- <sup>19</sup> Česnek, M.: Nucleobase Modified Adefovir (PMEA) Analogues as Potent and Selective Inhibitors of Adenylate Cyclases from *Bordetella pertussis* and *Bacillus anthracis*. *ChemMedChem*. **13**:17, 1779–1796 (2018).
- <sup>20</sup> Eicher, T.; Hauptmann, S.: *The Chemistry of Heterocycles: Structure, Reactions, Syntheses, and Applications*. 2nd Edition Weinheim, WILEY-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA 2003.
- <sup>21</sup> Mak, J.Y.W.; Xu, W.; Fairlie, D.P.: Thiazoles in Peptides and Peptidomimetics. *Topics in Heterocyclic Chemistry* **48**, 235–266 (2015).
- <sup>22</sup> Janeczková, A.; Klouda P.: *Organická chemie*. 1. vydání Ostrava, Nakladatelství Pavel Klouda 1998.
- <sup>23</sup> Červinka, O.; Dědek, V.; Ferles, M.: *Organická chemie*. 2. přepracované vydání Praha, SNTL/Alfa 1980.
- <sup>24</sup> Green, T.W.; Wuts, P.G.M.: *Protective Groups in Organic Synthesis*, 3<sup>rd</sup> ed. Wiley-Interscience, New York, 1999.
- <sup>25</sup> EP2103611. Tohoku University; Kudo, Y.; Furumoto, S.; Okamura, N.: *Benzoxazole derivatives*. 2009.
- <sup>26</sup> Smith, M.B.; March, J.: *Advanced Organic Chemistry: Reactions, Mechanisms and Structure*. 6th ed., New York: Wiley-Interscience 2007.



- <sup>27</sup> Forlani, L.; Medici, A.: Intermediates in the halogenation of some 2-aminothiazoles. *Journal of the Chemical Society, Perkin Transactions 1* **1978**:10, 1169–1171 (1978).
- <sup>28</sup> CN107286150. Chinese Academy Of Sciences Shanghai Organic Chemistry Institute; Zhu, J.; Gu, S.; Si, X.: N-heterocyclic ring compound, and intermediate, preparation method, medicine composition and application thereof. 2017.
- <sup>29</sup> Reiter, L.A.; Subramanyam, C.; Mangual, E.J.; Jones, C.S.; Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters **17**:19, 5447–5454 (2007).
- <sup>30</sup> Mikherdov, A.S.; Kinzhalov, M.A.; Novikov, A.S.; Boyarskiy, V.P.: Difference in Energy between Two Distinct Types of Chalcogen Bonds Drives Regioisomerization of Binuclear (Diaminocarbene)Pd<sup>II</sup> Complexes. *Journal of the American Chemical Society* **138**:42, 14129–14137 (2016).
- <sup>31</sup> Halogenation Reagents [online]. [cit. 2018-11-22]. Dostupné z: <https://www.tcichemicals.com/pdf/R5105E.pdf>
- <sup>32</sup> Bromination [Synthetic Reagents] [online]. [cit. 2018-11-21]. Dostupné z: [https://www.tcichemicals.com/eshop/en/in/category\\_index/12650/](https://www.tcichemicals.com/eshop/en/in/category_index/12650/)
- <sup>33</sup> Reagent Friday: NBS (N-Bromo Succinimide) [online]. [cit. 2018-07-19]. Dostupné z: <https://www.masterorganicchemistry.com/2011/06/10/reagent-friday-nbs-n-bromo-succinimide/>
- <sup>34</sup> Stanetty, P.; Schnürch, M.; Mereiter, K.; Mihovilovic, M.D.: Investigations of the Halogen Dance Reaction on N-Substituted 2-Thiazolamines. *Journal of Organic Chemistry* **70**:2, 567–574 (2005).

- <sup>35</sup> Schnürch, M.; Mihovilovic, M.D.; Khan, A.F.; Stanetty, P.: Polyarylated Thiazoles via a Combined Halogen Dance – Cross-Coupling Strategy. *European Journal of Organic Chemistry* **2009**:19, 3228–3235 (2009).
- <sup>36</sup> Schnürch, M.; Spina, M.; Khan, A.F.; Stanetty, P.: Halogen dance reactions—A review. *Chemical Society Reviews* **36**:7, 1046–1056 (2007).
- <sup>37</sup> Hocek, M.: Tvorba C-C a C-X vazeb cross-coupling reakcemi katalyzovanými komplexy přechodných kovů. *Chemické listy* **97**, 1145–1150 (2003).
- <sup>38</sup> Suzuki Coupling [online]. [cit. 2018-11-22]. Dostupné z: <https://www.organic-chemistry.org/namedreactions/suzuki-coupling.shtm>
- <sup>39</sup> Stille Coupling [online]. [cit. 2018-11-22]. Dostupné z: <https://www.organic-chemistry.org/namedreactions/stille-coupling.shtm>
- <sup>40</sup> Negishi Coupling [online]. [cit. 2018-11-22]. Dostupné z: <https://www.organic-chemistry.org/namedreactions/negishi-coupling.shtm>
- <sup>41</sup> Miyaura, N.; Yamada, K.; Suzuki, A.: A new stereospecific cross-coupling by the palladium-catalyzed reaction of 1-alkenylboranes with 1-alkenyl or 1-alkynyl halides. *Tetrahedron Letters* **20**:36, 3437–3440 (1979).
- <sup>42</sup> Suzuki Coupling Full Mechanism [online]. [cit. 2018-07-19]. Dostupné z: [https://en.wikipedia.org/wiki/Suzuki\\_reaction#/media/File:Suzuki\\_Coupling\\_Full\\_Mechanism\\_2.png](https://en.wikipedia.org/wiki/Suzuki_reaction#/media/File:Suzuki_Coupling_Full_Mechanism_2.png)
- <sup>43</sup> *Boc protection* [online]. [cit. 2018-07-19]. Dostupné z: [http://www.commonorganicchemistry.com/Rxn\\_Pages/Boc\\_Protection/Boc\\_Protection\\_Boc2O\\_Base\\_DMAP\\_Mech.htm](http://www.commonorganicchemistry.com/Rxn_Pages/Boc_Protection/Boc_Protection_Boc2O_Base_DMAP_Mech.htm)

---

<sup>44</sup> WO2008/154642. Achaogen Inc.; Reiter, L.A.; Jones, C.S.; Mangual, E.J.: *Antibacterial agents*. 2008.

<sup>45</sup> US2007/173506. Amgen Inc.; Zeng, Q.; Allen, J.G.; Tadesse, S.: *Thiazole compounds and methods of use*. 2007.

<sup>46</sup> US2014/378447. Okano, A.; Makabe, M.; Ogawa, K.: *Novel pyrazole derivative*. 2014.