

Univerzita Karlova v Praze
Přírodovědecká fakulta

Chemie
Chemie v přírodních vědách



David Hurný

**Příprava halogenovaných benzylaminů, stavebních jednotek inhibitorů
aldosreduktas**

Preparation of halogenated benzylamines - building blocks of potential aldose reductase inhibitors

Bakalářská práce

Vedoucí závěrečné práce:
RNDr. Jan Veselý, PhD.

Praha, 2012

Tato bakalářská práce vznikla v souvislosti s řešením výzkumného záměru MSM0021620857.

Prohlášení:

Prohlašuji, že jsem závěrečnou práci zpracoval samostatně a že jsem uvedl všechny použité informační zdroje a literaturu. Tato práce ani její podstatná část nebyla předložena k získání jiného nebo stejného akademického titulu.

V Praze, 1.6.2012.

Podpis

Abstrakt

Tato práce se zabývá syntézou halogenovaných derivátů benzylaminů, použitelných jako základní stavební jednotky potenciálních inhibitorů aldoseduktasy. Aldoseduktasa hraje klíčovou roli v předcházení pozdních komplikací choroby *diabetes mellitus*. Příslušné aminy byly syntetizovány z komerčně dostupných halogenovaných aromátů. Ve vybraných případech aminů je též porovnána efektivnost syntézy více syntetických strategií, např. strategie vycházející z halogenovaných derivátů benzoové kyseliny.

Abstract

This bachelor thesis deals with the synthesis of halogenated benzylamine derivatives, useful as basic building blocks of potential aldose reductase inhibitors. Aldose reductase plays a key role in the prevention of late complications of the diabetes mellitus. Desired amines were synthesized from commercially available halogenated aromatic derivatives. In selected cases of amines are also compared different synthetic approaches, for example strategies based on halogenated benzoic acid derivatives.

Poděkování

Na tomto místě bych rád vyjádřil díky svému školiteli RNDr. Janu Veselému, Ph.D. za odborné a spolehlivé vedení při práci, stejně jako za pomoc při řešení nastalých problémů. Také bych rád poděkoval Mgr. Martinovi Kamlarovi za pomoc a rady poskytnuté během tvorby této práce a Bc. Markovi Humplovi za jeho ochotu k inspirativním diskusím a za cenné zkušenosti, které mi nadšeně předával. Děkuji slečně RNDr. Simoně Hybelbauerové, Ph.D. za zaučení měření NMR spekter a laboratoři Prof. RNDr. Martina Kotory, CSc. za možnost využití jejich mikrovlnného reaktoru. A v neposlední řadě děkuji kolektivu laboratoře 141 za vytvoření příjemného prostředí.

OBSAH

1.	Teoretická část.....	9
1.1	Úvod	9
1.2	Biologicky aktivní amidy	9
1.3	Inhibitory aldosreduktasy	12
1.3.1	Diabetes a inhibitory aldosreduktasy.....	12
1.3.2	Struktura aldosreduktazy a její inhibitory (ALR2).....	14
1.4	Příprava primárních aminů	16
1.4.1	Přímá alkylace amoniaku.....	16
1.4.2	Gabrielova syntéza primárních aminů	17
1.4.3	Ritterova reakce	17
1.4.4	Delépinova reakce	17
1.4.5	Transformace organokovových sloučenin na aminy	18
1.4.6	Redukce azidů.....	18
1.4.7	Redukce nitrolátek.....	20
1.4.8	Redukce nitrilů	20
1.4.9	Redukce oximů	20
1.4.10	Reduktivní aminace	21
1.4.11	Redukce amidů	21
1.4.12	Odbourávání derivátů karboxylových kyselin.....	22
2.	Cíle práce.....	23
3.	Výsledky a diskuze	24
3.1	Syntéza inhibitoru IDD 388 (1f).....	24
3.2	Syntéza navržených halogenovaných derivátů benzylaminů	26
4.	Experimentální část	30
5.	Závěr.....	40
6.	Literatura	41

SEZNAM ZKRATEK

AGEs	konečné produkty pokročilé glykace
AIBN	<i>N,N'</i> -azobis(isobutyronitril)
ALR1	aldehydreduktasa
ALR2	aldosreduktasa
ARIs	inhibitory aldoseduktázy
BTAB	benzyltrimethylamonium tribromid
DIEA	diisopropylethylamin
DMAP	4-dimethylaminopyridin
DME	1,2-dimethoxyethan
DMF	<i>N,N</i> -dimethylformamid
DMSO	dimethylsulfoxid
Et	ethyl
Et ₃ N	triethylamin
Et ₂ O	diethylether
EtOAc	ethyl-acetát
EtOH	ethanol
HMRS	hmotnostní spektrometrie s vysokým rozlišením
IR	infračervené záření
LT	teplota laboratoře
Me	methyl
MeCN	acetonitril
MeLi	methyllithium
MeOH	methanol
MsCl	methansulfonylchlorid
MW	mikrovlnné záření
NAD ⁺	nikotinamidadenindinukleotid
NADPH	nikotinamidadenindinukleotid fosfát
NBS	<i>N</i> -bromsukcinimid
NMR	nukleární magnetická rezonance
PPh ₃	trifenylfosfin
PTSA	<i>p</i> -toluensulfonová kyselina
RVO	rotační vakuová odparka

THF	tetrahydrofuran
TIM	triosafosfátisomerasa
TLC	tenkovrstvá chromatografie

1. Teoretická část

1.1 Úvod

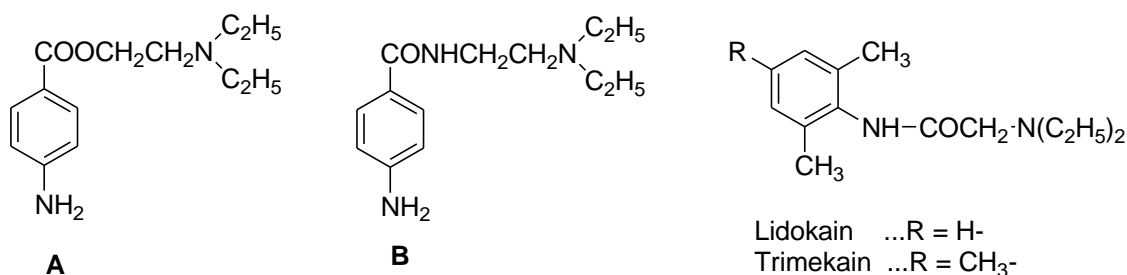
Organické sloučeniny dusíku tvoří velmi různorodou skupinu látek. Jejich význam jako části molekul léčiva je velice podstatný, nejčastěji se setkáváme s deriváty amoniaku (aminy a **amidy**). Neméně důležité jsou sloučeniny obsahující nitroskupinu, nitrily a deriváty hydrazinu. Častou součástí molekul léčiv jsou také dusíkaté heterocykly, nejčastěji pěti, šesti a sedmičlenné, které mohou být dále kondenzovány.¹

V této práci bude věnována pozornost především amidům, funkčním derivátům karboxylových kyselin, vzniklých formální náhradou hydroxylové skupiny amoniakem či aminem (*N*-substituované amidy).

1.2 Biologicky aktivní amidy

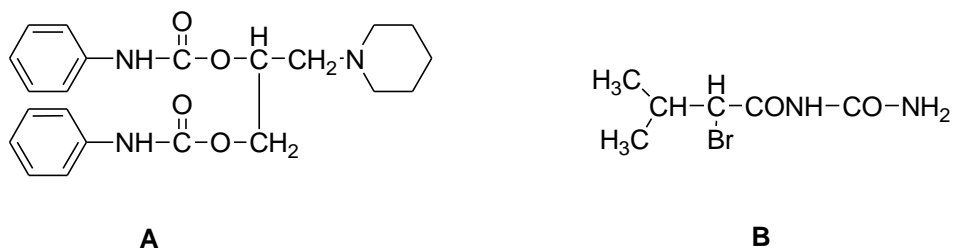
Amidová skupina se vyskytuje v mnoha léčivech. V této kapitole je uvedeno jen pár vybraných příkladů různých amidů, jenž našly uplatnění vzhledem ke své biologické aktivitě, zejména pak jako léčiva (nebereme do úvahy proteiny).¹

N-Substituované amidy jsou isosterní s odpovídajícími estery, což vedlo k pokusům o přípravu látek s podobnými biologickými aktivitami. Je to zřejmé např. u lokálních anestetik **prokainu** a **prokainamidu**, viz *obr. 1*, kde enzymatická hydrolýza prokainamidu sérovými amidasami probíhá pomaleji a proto má tento amid prolongovanou anestetickou účinnost.^{1, 2} Vyšší stabilita místních anestetik amidového typu (**Lidokain**, **Trimekain**, viz. *obr. 1*) vůči hydrolýze umožňuje jejich využití jako antiarytmik.



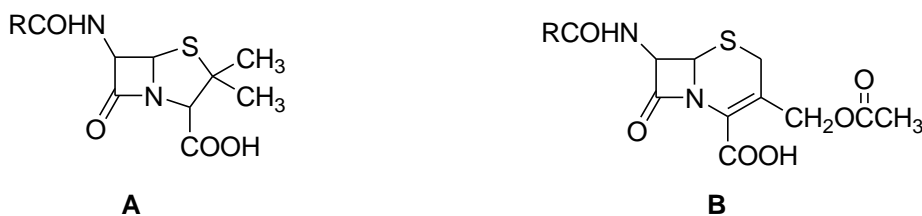
Obrázek 1: Lokální anestetika esterového typu: **prokain (A)**; a lokální anestetika amidového typu: **prokainamid (B)**, **lidokain** a **trimekain**

Také amidy kyseliny uhličitě mají značný význam jako léčiva, ať už se jedná o deriváty kyseliny karbamové - lokální anestetika (**diperodon**, viz. *obr. 2*) nebo o močovinové sloučeniny typu ureidů ze skupiny hypnotik (**bromisoval**, **barbituráty**, viz. *obr. 2*).



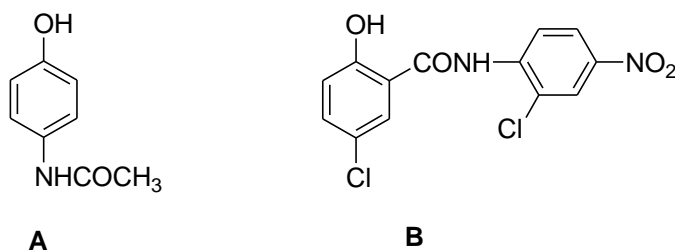
Obrázek 2: Místní anestetikum **Diperodon** (A) a hypnotikum **Bromisoval** (B).

Nejvýznamnější skupinou protibakteriálních léčiv představují tzv β -laktamová antibiotika, tvořená skupinou **penicilinů** (6-acylaminopenicilanové kyseliny) a **cefalosporinů** (7-acylaminocefalosporanové kyseliny s možnými obměnami v poloze 3), viz. obr. 3.^{2,3} Tyto látky se používají především ve formě solí s různými anorganickými i organickými bázemi.



Obrázek 3: β -laktamová antibiotika, obecný vzorec pro **peniciliny** (A) a pro **cefalosporiny** (B).

Derivát acetanilidu, 4-acetylaminofenol (Paracetamol, viz obr. 4), léčivá látka léku prodávaného pod komerčním názvem **Paralen**, je běžně užívaný lék, mající analgeticko-antipyretické účinky.

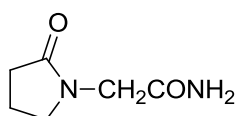


Obrázek 4: Látka s analgeticko-antipyretickými účinky **Paracetamol** (A) a athelmintikum **Niklosamid** (B).

Dalším významným příkladem jsou salicylanilidy, tj. různě substituované amidy salicylové kyseliny a anilinu, které se vyznačují neobyčejně širokým spektrem biologických aktivit. Příkladem může být **Niklosamid** ((2',5-dichlor-4'-nitrosalicylanilid), viz. obr. 4, anthelmintikum používané ve veterinární i humánní medicíně. Antibakteriální účinky salicylanilidů se také využívá pro ošetřování ústní dutiny ve formě např. ústní vody, zubního prášku, kloktadla, žvýkačky, k zabránění tvorby zubního plaku bakteriemi

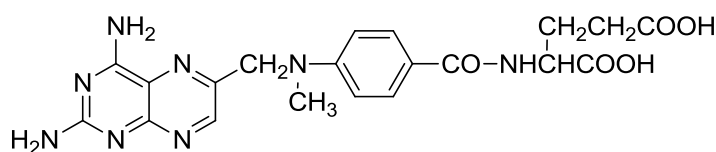
v ústech, a tím potlačení halitózy. V těchto kompozicích jsou výhodně používány halogensalicylanilidy.⁴

Strukturní motiv amidů nalezneme také u látek s nootropními účinky, tj. látek příznivě ovlivňující intelektuální složku psychických procesů. Příkladem je **Pyracetam**, viz. obr. 5, molekula obsahující dvě amidové skupiny.



Obrázek 5: Piracetam - příklad látky s nootropními účinky.

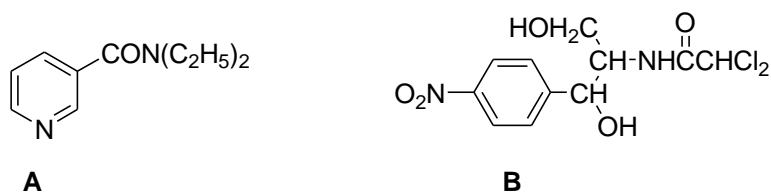
Jsou známy i preparáty na bázi kyseliny listové, patřící mezi antineoplastika. Příkladem je **Methotrexát**. Jde o antimetabolit, který inhibuje reduktasu kyseliny listové a v konečném důsledku blokuje výstavbu DNA. Tato látka našla také uplatnění v léčbě artritických onemocnění a zánětlivých chorob střevního traktu.⁵



Obrázek 6: Antineoplastikum Methotrexát – antimetabolit.

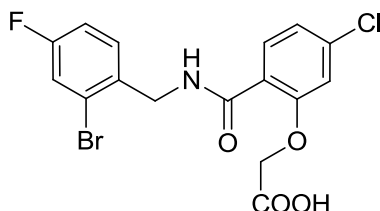
Amidy se dále objevují také mezi centrálními analeptiky (látky působící na CNS tak, že povzbuzují krevní oběh a dýchání, aniž ovlivňují jiné životní funkce), příkladem může být například **Niketamid**, viz. obr. 7.

Některé amidy odvozené od aminokyselin nacházejí díky své účinnosti uplatnění jako antibiotika. Příkladem je **Chloramfenikol**, viz. obr. 7, léčivá látka přítomná v řadě komerčně dostupných širokospektrálních antibiotik, určených především k léčbě horních dýchacích cest. Byl izolován v roce 1947 ze *Streptomyces venezuelae* a v roce 1949 byla objasněna jeho struktura a potvrzena syntézou.⁶



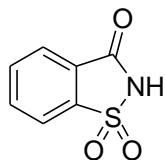
Obrázek 7: Centrální analeptikum Niketamid (A) a antibiotikum Chloramfenikol (B)

Mezi amidy můžeme zařadit také některé inhibitory aldosreduktasy (IDD388), viz. *obr. 8*. Jejich účelem je předcházet pozdním komplikacím nastávajících u pacientů s *diabetem mellitus*.



Obrázek 8: Inhibitor aldosreduktasy IDD388.

Amidy však mají také negativní vlastnosti. Zjistilo se, že známé sladidlo **sacharín**, viz. *obr. 9*, ačkoliv samotné není iniciačním činidlem, je nádorovým promotorem při vzniku karcinomu močového měchýře.⁷



Obrázek 9: Sacharín - nádorový promotor.

1.3 Inhibitory aldosreduktasy

Celosvětový výskyt diabetu mellitus se odhaduje na 2,8 % (v roce 2000) a očekává se zvýšení o 4,4 % - 9 % během příštích dvou desetiletí. Opatrné odhady očekávají 366 milionů lidí trpících diabetem mellitus na celém světě v roce 2030. Hlavním účelem léčby diabetu je předcházet pozdním komplikacím tohoto onemocnění, a tím docílit stejné kvality života jako u nediabetické populace. Během hyperglykemických stavů, dochází k zvýšení aktivity aldosreduktasy, která hraje klíčovou roli v předcházení pozdních komplikací diabetu.^{8,9}

1.3.1 Diabetes a inhibitory aldosreduktasy

Enzym **aldosoreduktasa (ALR2; EC 1.1.1.21)** je odpovědný za katalytické přeměny aldosa na odpovídající alditoly. Schéma metabolické dráhy, nazývané **polyolová metabolická dráha**, je pro případ glukosy jako aldosa uveden ve schématu 1. Glukosa vstupující do polyolové metabolické dráhy je redukována ALR2 a NADPH, jako redukčního kofaktoru, na glucitol (sorbitol).¹⁰ Ten je následně oxidován sorbitol

dehydrogenasou za účasti NAD^+ na fruktosu. Přesný mechanismus redukce aldosity není znám, předpokládá se však, že NADPH poskytuje hydridový ion karbonylové skupině aldehydu. S největší pravděpodobností následuje další přesun protonu z některého ze sousedících kyselých proteinových zbytků na substrát.^{8,11}

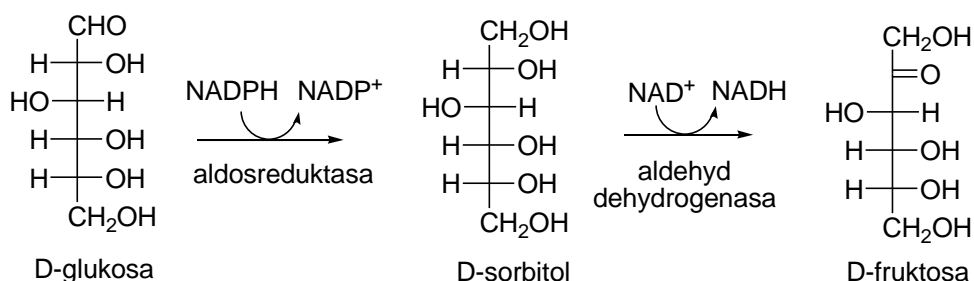


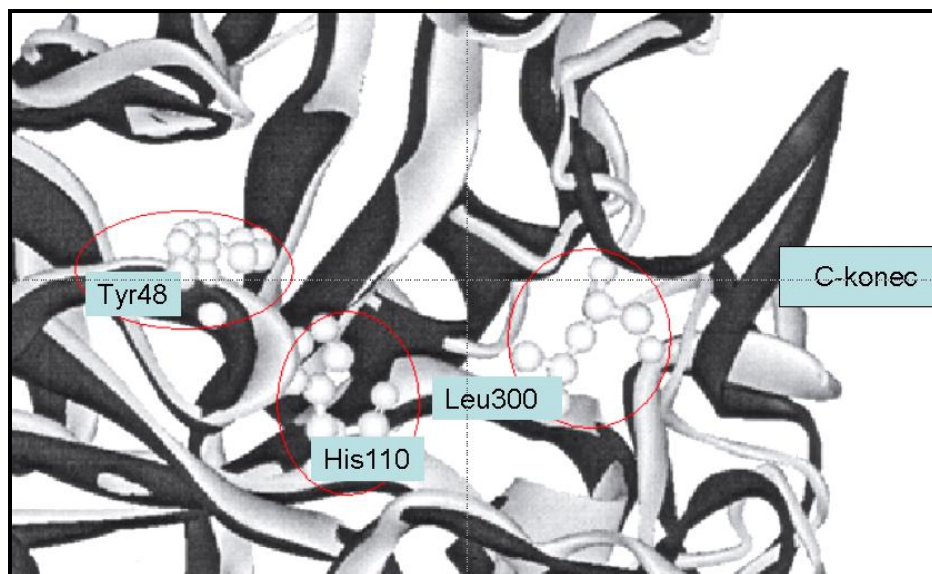
Schéma 1: Polyolová metabolická dráha pro případ D-glukosy.

ALR2 má ovšem relativně malou afinitu k substrátu, která vede k tomu, že je účinný pouze v přítomnosti poměrně vysokých koncentrací aldosity. Těchto vysokých koncentrací je dosaženo zejména při klinických stavech cukrovky (nadbytek glukosy) a galaktosemie (nadbytek galaktosy). U diabetiků dochází tedy k uplatnění této metabolické dráhy. Vzniklé alditoly špatně procházejí buněčnými stěnami a následkem toho se kumulují v buňkách, zvláště pak ve tkáních, kde není přestup glukosy přes membránu závislý na inzulinu (nervy, sítnice, čočka). Zvýšená koncentrace sorbitolu poté způsobuje hypertonicitu a osmotické změny v buňce. Dochází také ke zvýšení cytosolové poměru NADH k NAD^+ , což bývá označováno jako oxidační stres. Následkem jsou pozdější chronické komplikace diabetu. Na základě experimentálních i klinických zkoušek bylo zjištěno, že rozvoj těchto komplikací, hlavně kataraktu a periferní neuropatie, může zastavit nebo alespoň zpomalit použití inhibitorů ALR2.^{12,12}

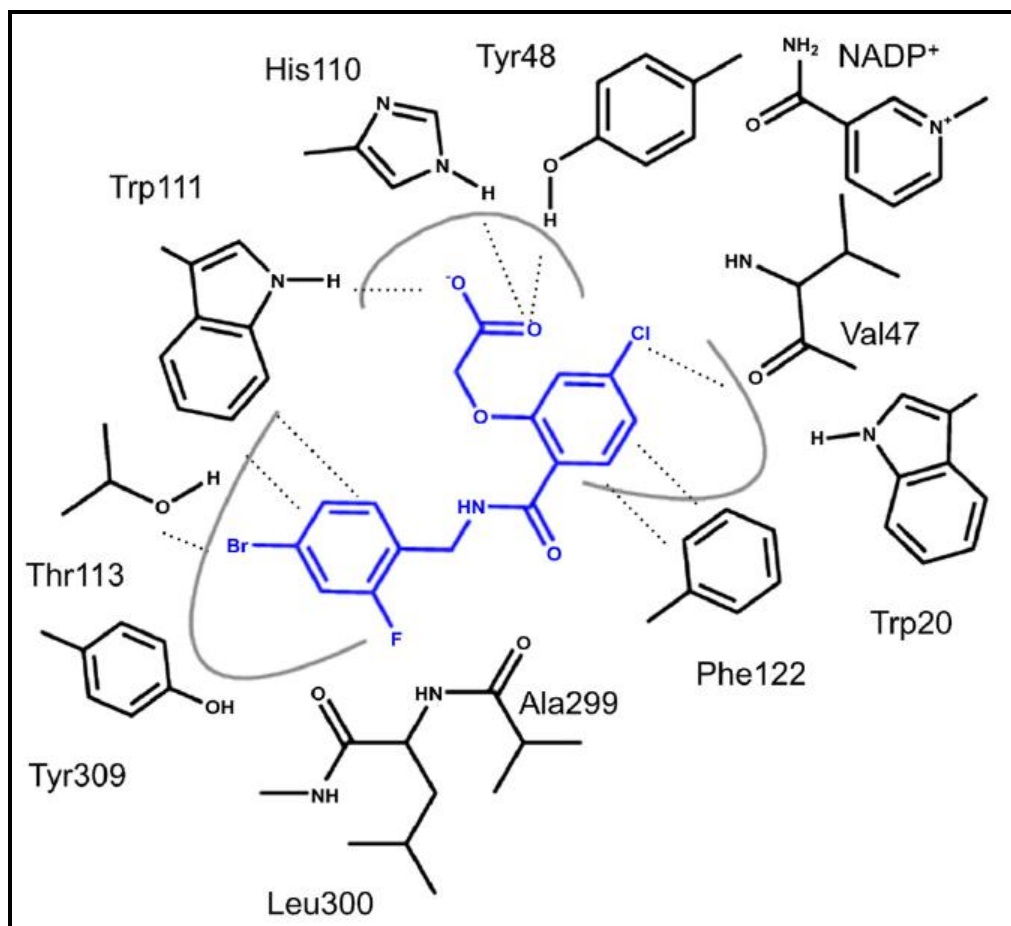
V posledních 20 letech bylo vyvinuto a podrobno klinickým testům několik typů inhibitorů aldoseduktasy (ARIs), zejména pak inhibitory **karboxylového** typu a inhibitory odvozené od **hydantionu**. Ve skupině karboxylových kyselin je nejznámějším zástupcem **tolrestat (A)**. Do terapeutické praxe byl uveden v roce 1989, ale v roce 1997 byl pro nízkou účinnost a nežádoucí hepatotoxicitu stažen z používání. Dosud nejúspěšnějším ARI je jeho analog **epalrestat (B)** používaný v Japonsku. Ve skupině spirohydantionů je předlohou sloučeninou **sorbinil (C)**, viz. *obr. 10*. Žádný z jeho analogů zatím nebyl uveden do terapeutické praxe.^{13,14,15}

Hlavním problémem ARIs je jejich biologická dostupnost (především pronikání ionizované formy inhibitorů karboxylového typu skrz biologické membrány) a požadavek

V blízkosti konce specifické kapsy se vyskytuje Thr113. Jeho O^γ hydroxylové skupiny poskytuje v případě ARIs označovaného jako IDD388, diskutovaného v této práci, krátkou interakci (2,9 Å) s atomem bromu vázaného na benzenovém jádře ARIs. Phe122 interaguje s centrální fenylovou jednotkou hydrofobní interakcí. Specifická kapsa mezi Leu300 a Trp111 vytváří hydrofobní π -interakci. Nikotinamid kofaktoru elektrostaticky interaguje s negativně nabitou karboxylatovou skupinou, viz. *obr. 11*.¹⁸



Obrázek 11: Ilustrace podobnosti obou enzymů (ALR2 – bílá barva; aldehydreduktasy – černá barva). Oba enzymy se víceméně kopírují až na katalytické centrum, kde jsou zvýrazněny zbytky Tyr48 a His110. Je označen taky počátek C-konce (Leu300 v případě ALR2, Pro v případě ALR1).¹⁷



Obrázek 12: Schéma vazebného modelu IDD388 s hAR

Jak již bylo řečeno v úvodní části této práce, na amidy lze pohlížet jako na deriváty amoniaku či aminů. Jednou z cest, jak amidy získat, je právě reakce mezi aminem a karboxylovou kyselinou (nebo její aktivovanou formou).

1.4 Příprava primárních aminů

Primární aminy, sloučeniny obsahující v molekule funkční skupinu $-NH_2$, je možné připravit několika různými způsoby, např. alkyací amoniaku, Gabrielovou syntézou, redukcí nitrosloučenin, redukcí nitrososloučenin, redukcí azidů, redukcí oximů, redukcí nitrilů, redukcí amidů a další. Následující rozdělení přípravy primárních aminů vychází z rozdělení podle druhu použité výchozí látky.

1.4.1 Přímá alkylace amoniaku

Přímá alkylace amoniaku má jen omezené použití, neboť často vzniká směs primárních, sekundárních a terciárních aminů (nicméně metoda je velmi využívána při přípravě terciárních aminů a kvarterních amoniových solí). U aromatických molekul je

substituce poměrně obtížná, často bývá dosaženo poměrně vysokého výtěžku u molekul aktivovaných elektronakceptorovými skupinami.^{20,21}

1.4.2 Gabrielova syntéza primárních aminů

Jde o označení reakce, kde dochází k alkylní sodné nebo draselné soli ftalimidu. Nevýhodou je nutnost použití relativně drastických podmínek při následné hydrolýze vzniklého, poměrně stabilního, *N*-alkylftalimidu. Pro méně stabilní aminy byly nalezeny jiné soli amidů, například sodná sůl diformylimidu. Pro zkrácení reakční doby při Gabrielově syntéze aminu se často používá dipolární aprotické rozpouštědlo (např. DMF).^{22,23}

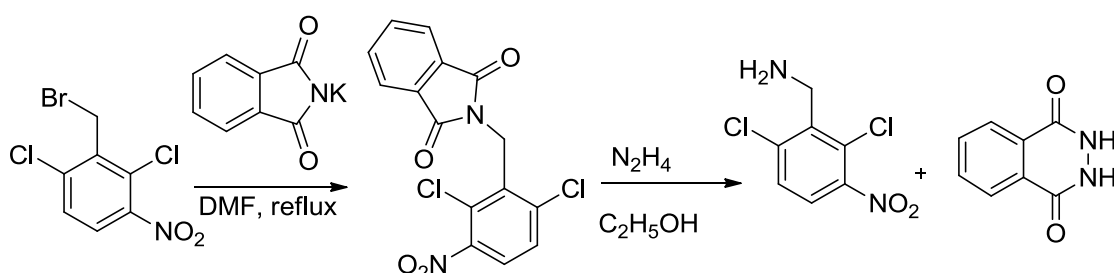


Schéma 2: Příklad využití Gabrielovy syntézy primárních aminů – použití ftalimidu²⁴

1.4.3 Ritterova reakce

Ritterova reakce je určena především pro přípravu primárních aminů obsahujících terciární alkylovou skupinu. Vychází se z terciárního alkoholu (nebo alkenu, který je po protonaci schopen poskytnout terciární karboniový ion) a alkylní draselné (nebo kyanid) v kyselém prostředí (obvykle kyseliny sírové). Reakcí vzniká formamid, který v zásaditém prostředí hydrolyzuje na amin.

1.4.4 Delépinova reakce

Delépinova reakce, založena na reakci mezi alkylní halogenidem a hexamethylenetetraminem (urotropin), poskytuje kvartérní aminiovou sůl, která následně kyselou hydrolýzou poskytne primární amin ve formě hydrochloridu, viz. schéma 3.

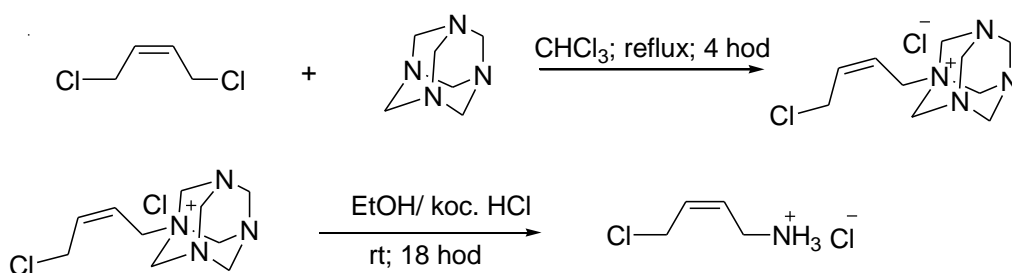


Schéma 3 Příklad Delépinovy reakce.²⁵

1.4.5 Transformace organokovových sloučenin na aminy

Existuje několik metod konverze alkyl- nebo aryllithých sloučenin na primární aminy.²⁶ Reakcí RLi s methoxyaminem a MeLi v diethyletheru při -78 °C poskytuje RNH₂.

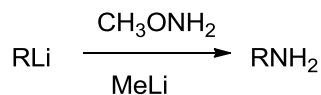


Schéma 4: Syntéza aminů za využití organokovových sloučenin.

Další skupinou látek, sloužících k přípravě primárních aminů, jsou organoborany, které reagují se směsí vodného NH₃ a NaOCl (reaktivní částicí je vzniklý chloramin) nebo hydroxylamine-*O*-sulfonovou kyselinou, viz. schéma 5. Mechanismus této reakce je velmi podobný oxidaci organoboranů peroxidem vodíku. Reakční činidlo obsahující atom dusíku nejprve působí jako nukleofil a naváže se na atom boru. Následuje přesmyk spojený s odstupem chloridového (síranového) iontu. Amin je následně uvolněn hydrolyzou.^{27,28}

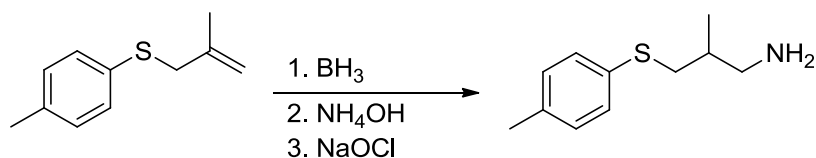


Schéma 5 : Příprava aminů za využití organoboranů²⁹

1.4.6 Redukce azidů

Azidový ion je silný nukleofil a je vhodným činidlem pro zavádění dusíkové funkční skupiny do organických molekul. Výhodou této metody je možnost připravit primární aminy s vysokou čistotou. K samotné redukci se používá pestrá škála činidel např. NaBH₄, H₂ s příslušným katalyzátorem, Mg nebo Ca v MeOH, Sm/I₂, a mnoho dalších.³⁰

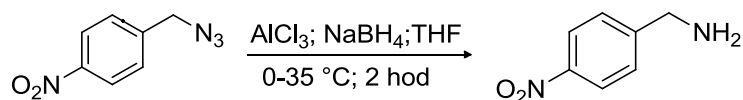


Schéma 6: Redukce azidů na primární amin za využití hydridového činidla³¹

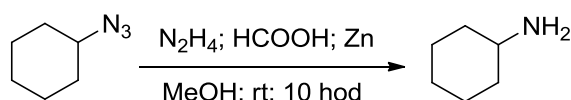


Schéma 7: Redukce azidů na primární amin³²

Katalytické redukce se používá především tam, kde v molekule substrátu nejsou další redukovatelné skupiny. U citlivějších sloučenin je s výhodou využíváno

chemoselektivní **Staudingerovy redukce**, kde se jako redukční činidlo používá trifenylofosfin (PPh_3). Reakce se provádí v protickém rozpouštědle, jenž je zdrojem protonů pro rozklad vzniklého intermediátu.³³

V reakci se nejprve vytváří fosfazinový meziproduct, u kterého dochází k nukleofilnímu ataku fosforového atomu na koncový dusíkový atom azidové funkce za následného odštěpení dusíku a tvorby iminofosforanu **IV**, který poté v přítomnosti vody hydrolyzuje na příslušný primární amin **V**, viz. *schéma 8*.

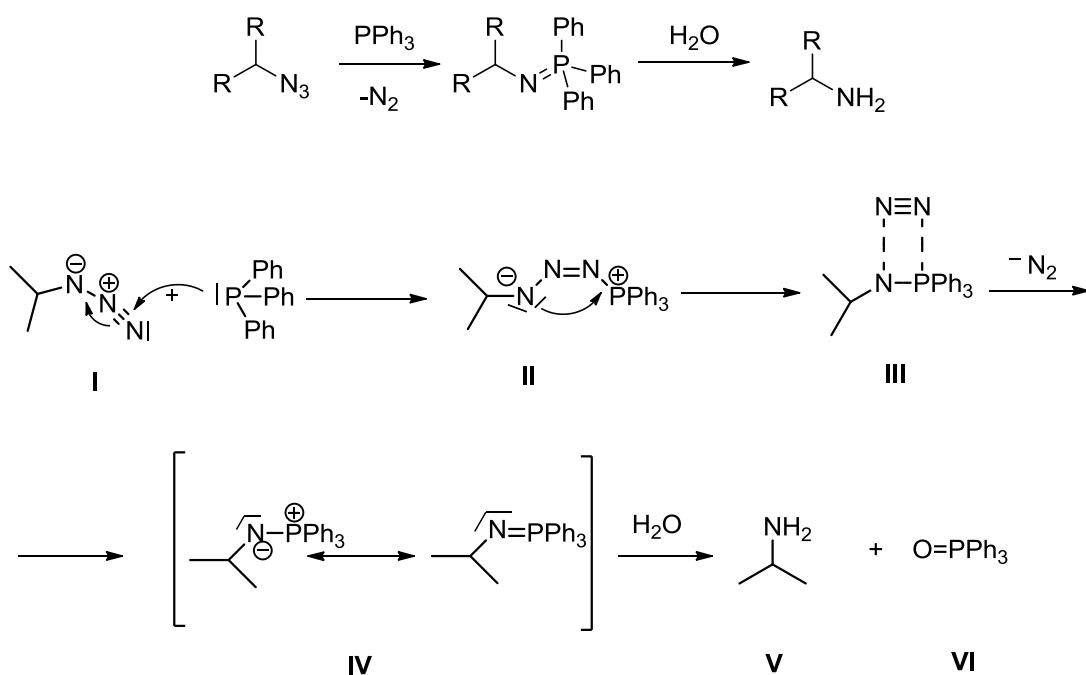


Schéma 8: Mechanismus Staudingerovy reakce^{34,35}

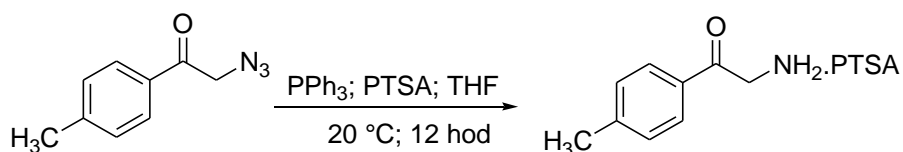


Schéma 9: Příklad aplikace Staudingerovy redukce.³⁶

Selektivní a šetrná je také metoda redukce aromatických azidů na příslušné aminy činidlem fluoridem boritým v etheru za přítomnosti jodidu sodného, viz. *schéma 10*.

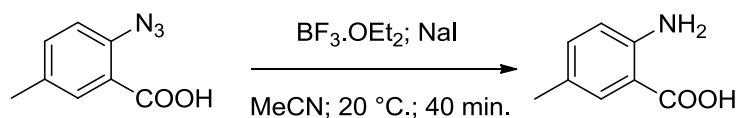


Schéma 10: Metoda redukce azidů za využití komplexu etherátu fluoridu boritého v přítomnosti jodidu sodného.³⁷

1.4.7 Redukce nitrolátek

Výsledkem úplné redukce nitroskupiny je aminoskupina. Tato metoda je limitována dostupností příslušných nitrolátek, zejména alifatických sloučenin. Redukčním činidlem bývá vodík, přičemž volbou katalyzátoru lze dosáhnout požadované selektivity (Ra-Ni, Pd/C). Lze taky použít sírné sloučeniny, komplexní hydridy a borany. V laboratorním měřítku se využívá také redukce pomocí hydrazinu nebo kovy (Zn a Fe) v kyselém prostředí.^{21,30,38}

1.4.8 Redukce nitrilů

Další metoda přípravy primárních aminů vychází z úplné redukce trojné vazby ve skupině –CN. K redukci nitrilů na amin se využívá celá řada činidel, jde především o komplexní hydridy, vodík za vhodné katalýzy (Ra-Ni, Ni₂B, Rh). Přičemž pokud se však primární amin neodstraňuje v okamžiku svého vzniku (např. acetylací Ac₂O), může dojít k tvorbě nežádoucích sekundárních aminů. Obvykle se do reakce přidává amoniak, který potlačuje tvorbu sekundárních aminů. Nitrily se na primární aminy také snadno redukují boranovými činidly (BH₃.THF, BH₃.Me₂S).^{39,40}

Často do reakce přidává amoniak, který potlačuje tvorbu sekundárních aminů.

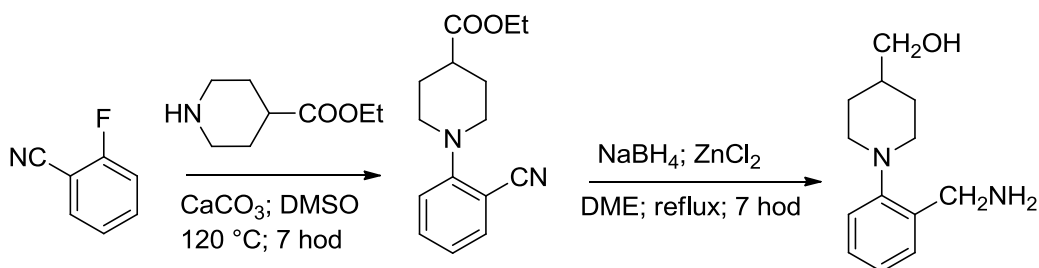


Schéma 11: Příprava aminu redukcí nitrilu.⁴¹

1.4.9 Redukce oximů

Oximy mohou být také vhodnými meziprodukty transformace karbonylových sloučenin na primární aminy. Redukce oximů se využívá především v případě přípravy

alifatických aminů. Vedle katalytické redukce vodíkem lze k redukci použít i hydridových činidel (B_2H_6 , $LiAlH_4$), starší metody využívají redukci sodíkem, které se však již v praxi neužívá.

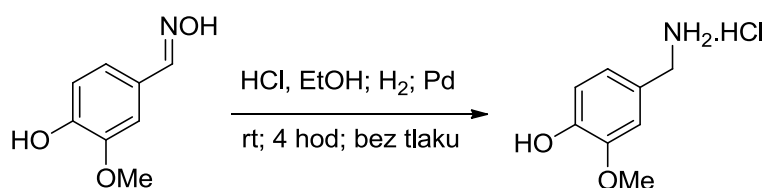


Schéma 12: Příklad syntézy aminu z oximů⁴²

1.4.10 Reduktivní aminace

Iminiové soli, iminy, Schiffovy báze, hydrazony a další sloučeniny obsahující $C=N$ vazby poskytují aminy redukcí hydridovými činidly ($LiAlH_4$, $NaBH_4$, $NaBH_3CN$, $HCOOH$). Pod pojmem reductivní aminace se rozumí reakce amoniaku nebo amonné soli s aldehydem či ketonem v přítomnosti redukčního činidla. V laboratorních podmínkách je nejběžněji využíván mravenčan amonný, jenž slouží jako zdroj hydridu pro redukci i obsahuje samotné aminační činidlo.

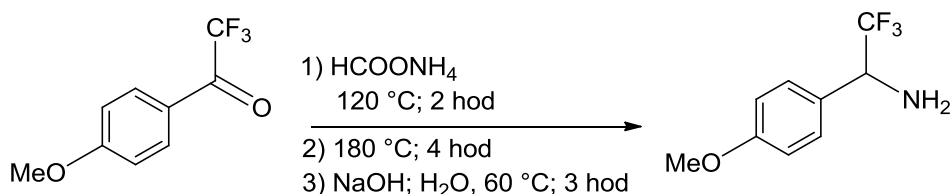


Schéma 13: Příklad reductivní aminace, kdy redukčním činidlem je mravenčan amonný.⁴³

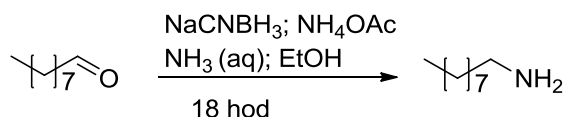


Schéma 14: Příklad reductivní aminace za využití redukčního činidla $NaCNBH_3$.

1.4.11 Redukce amidů

Amidy mohou být redukovány na aminy $LiAlH_4$ nebo katalytickou hydrogenací, ale vysoká teplota a tlak jsou obvykle v druhém případě nutností. Ačkoli $NaBH_4$ samotný neredukuje obecně amidy, v přítomnosti některých dalších činidel (např. jódu) k redukci dochází. Boran či sodík v 1-propanolu jsou také dobrými redukčními činidly.^{44,45,46}

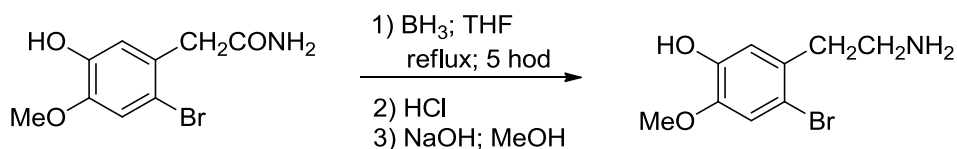


Schéma 15: Redukce amidu na primární amin boranem.⁴⁷

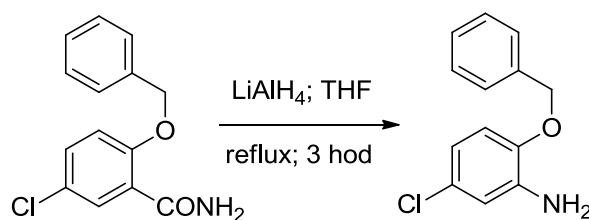


Schéma 16: Redukce amidu na amin za využití komplexního hydridu.⁴⁸

1.4.12 Odbourávání derivátů karboxylových kyselin

K přeměně karboxylových kyselin na příslušný amin o jeden atom uhlíku chudší slouží následující metody.

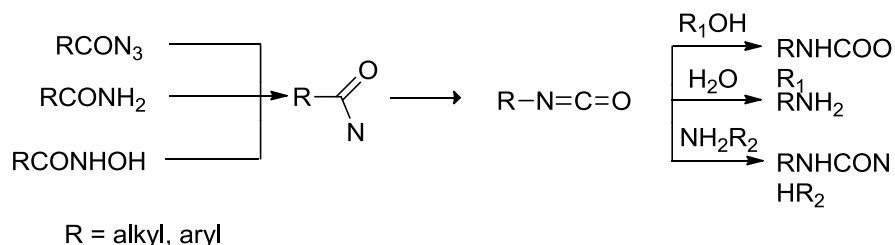


Schéma 17: Obecné schéma odbourávání derivátu karboxylových kyselin.

V této části jsou uvedeny příklady reakcí, jež využívají nestability nitrenu a jeho přesmyku. Ke vzniku nitrenu dochází několika způsoby: termickým rozkladem acylazidů (**Curtiova** a **Schmidtova metoda**), reakcí amidů s alkalickým chlornanem případně bromnanem (**Hoffmanova metoda**) a také rozkladem hydroxamových kyselin (**Lossenova metoda**). Curtiova a Schmidtova metoda se liší pouze v přípravě příslušného acylazidu. Při přesmyku nitrenu vzniká primárně isokyanát, který je následně v protickém prostředí nestálý a vzniká amin, viz. *schéma 17*.

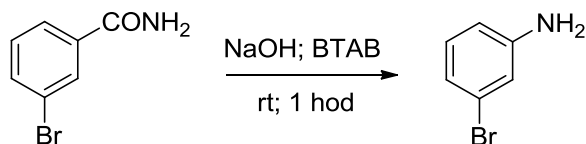


Schéma 18: Příklad Hoffmanovy metody.⁴⁹

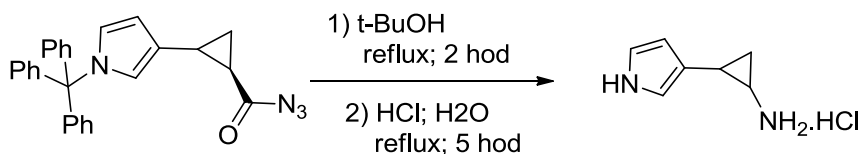


Schéma 19: Příklad odbourávání acylazidů na primární amin.⁵⁰

2. Cíle práce

S ohledem na problematiku *diabetu mellitus*, diskutovanou v teoretické části této práce, byla hlavním cílem příprava halogenovaných benzylaminů jako základních stavebních jednotek pro syntézu inhibitorů aldosreduktasy. Tento obecný cíl zahrnoval několik dílčích kroků:

1. Příprava známého inhibitoru aldosreduktasy, 2-(2-(4-brom-2-fluorbenzylkarbamoyl)-5-chlorofenoxy)ethanové kyseliny (**1f**), z důvodu srovnávacích biologických studií.
2. Příprava nových halogenových derivátů benzylaminu (**2d**, **3d**, **4d**, **5d**) z komerčně dostupných halogenovaných aromátů.
3. Porovnání efektivity dvou navržených příprav látek **4d** a **5d**.

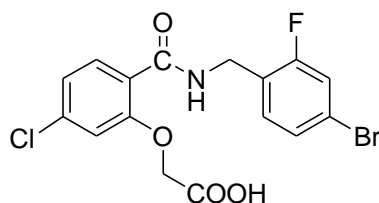


Schéma 20: Struktura inhibitoru **1f**

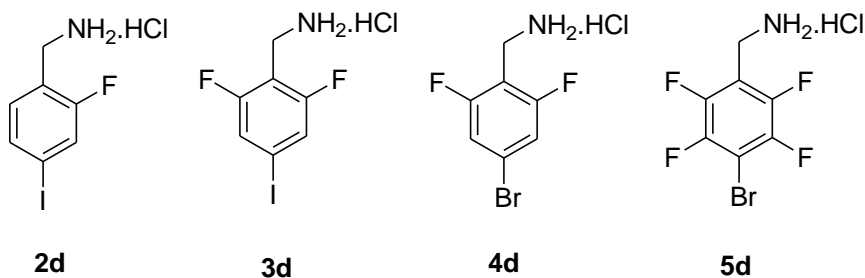


Schéma 21: Struktury připravovaných aminů

3. Výsledky a diskuze

3.1 Syntéza inhibitoru IDD 388 (**1f**)

V první části jsem se zaměřil na přípravu již publikovaného ARIs (**1f**). Úkolem bylo tuto látku připravit podle navrženého schématu (*schéma 25*, str. 26), u níž bude následně porovnávána biologická účinnost inhibice ALR2 s nově připravenými deriváty, jejichž základními stavebními jednotkami jsou halogenované deriváty benzylaminů.

Syntéza látky **1f** byla rozdělena do dvou částí, přičemž v první fázi byl syntetizován amin (strukturní motiv A) a druhé fázi chlorid kyseliny (strukturní motiv B). Jejich následným spojením amidickou vazbou vzniká základní kostra molekuly inhibitoru **1f**, která byla dále modifikována.

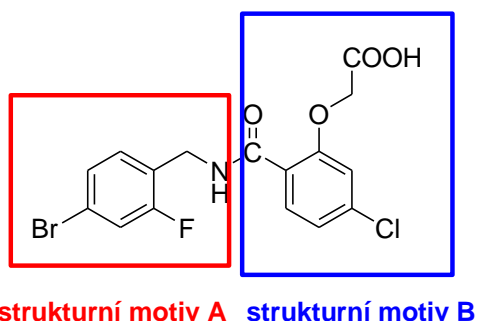


Schéma 22: Inhibitor **1f** s vyznačenými strukturními jednotkami

Výchozí látkou pro přípravu aminu **1c** byl benzylbromid **1a**, který byl transformován na azid působením azidu sodného v DMF, za využití mikrovlnného záření pro urychlení reakce. Oproti předepsanému postupu v literatuře,⁵¹ byl prodloužen reakční čas v mikrovlnném reaktoru z 10 minut na 30 minut, což vedlo k plné konverzi bromidu na azid **1b**, viz. *schéma 23*.

Azid **1b** byl následně redukován PPh₃ v methanolu na amin **1c**, který byl izolován ve formě hydrochloridu přidávkem koncentrované kyseliny chlorovodíkové. Celkový výtěžek syntézy aminu **1c** (strukturního motivu A) byl 32 % (výtěžky jsou počítány z bromidů, neboť azidy byly použity po zpracování reakční směsi bez dalšího čištění), viz. *schéma 23*.

Vedle toho byl připraven chlorid kyseliny 4-chlorsalicylové z příslušné kyseliny působením oxalyl chloridu, viz. *schéma 24*. Amid **1d** byl syntetizován přidáním aminu **1c** k čerstvě připravenému chloridu kyseliny 4-chlorsalicylové spolu s bází (DIEA). Z důvodu nízkých izolovaných výtěžků amidu **1d** výše popsaným postupem jsem přistoupil k jeho modifikaci. Nejprve byl generován volný amin z příslušného hydrochloridu **1c** přidáním

báze (DIEA) a po 30 minutách míchání při 25 °C byl přidán chlorid kyseliny salicylové. V tomto případě bylo dosaženo izolovaných výtěžků ve výši 49 %.

Následovaly modifikace základní kostry. Amid **1d** byl funkcionalizován na hydroxylové skupině působením ethylbroamacetátu v přítomnosti uhličitanu draselného. Navázaná esterová skupina byla následně hydrolyticky převedena na kyselinu působením hydroxidu. Příslušný inhibitor **1f** se podařilo připravit, přičemž celkový výtěžek pětikrokové syntézy byl 7 %, viz. *schéma 25*.

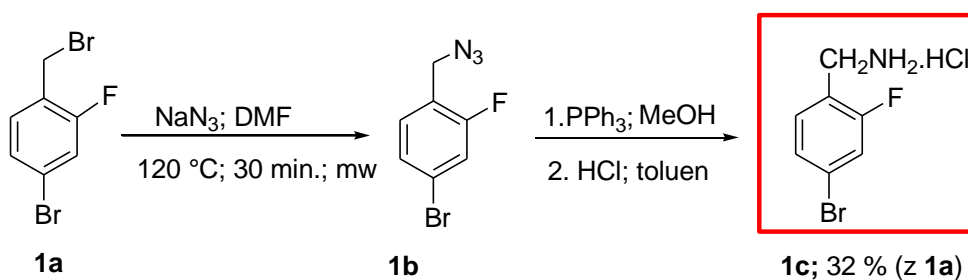


Schéma 23: Syntéza strukturního motivu A - hydrochlorid aminu 1c

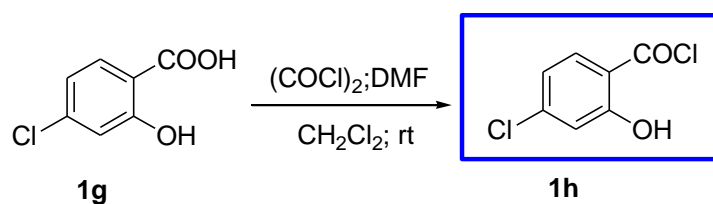
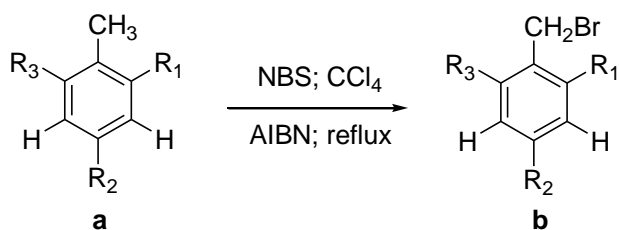


Schéma 24: Syntéza strukturního motivu B

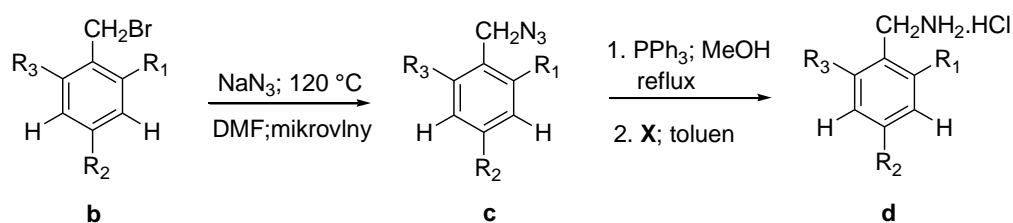


a, b	čas	ekv. NBS	výtěžek %
2: R ₁ = F, R ₂ = I, R ₃ = H	3 dny	1,6	82
3: R ₁ = F, R ₂ = I, R ₃ = F	3 dny	1,4	85
4: R ₁ = F, R ₂ = Br, R ₃ = F	2 dny	1,1	73

Schéma 27: Syntéza bromidů z derivátů toluenu

Následovala transformace bromidů na příslušné benzylazidy reakcí s azidem sodným v DMF za působení mikrovlnného záření.⁵¹ I zde byla aplikovány poznatky při syntéze **1b** a reakční doba byla upravena na 30 minut, aby docházelo k plné konverzi výchozí látky, viz. *schéma 28*.

Připravené azidy byly následně redukovány v systému PPh₃/methanol za refluxu na deriváty benzylaminu. Vznikající aminy byly vysráženy ve formě hydrochloridů (**2d**, **3d**, **4d**) přidáním kyseliny chlorovodíkové, viz. *schéma 28*. U derivátů **3d** a **4d** bylo také vyzkoušeno vysrážení pomocí chlorovodíku v diethyletheru. Příslušné aminy se podařilo připravit s 12% (**3d**) a 9% (**4d**) nárůstem výtěžku. Další alternativou pro izolaci aminu z reakční směsi bylo využití iontoměničů a sloupcové chromatografie jak na silikagelu, tak na alumině. Ani v jedné z uvedených metod však nedošlo k získání aminu v požadované čistotě a uspokojivém výtěžku. Navíc v případě užití metod sloupcové chromatografie došlo zřejmě k degradaci aminu.



b, c, d	X	výtěžek % (d z b)
2: R ₁ = F, R ₂ = I, R ₃ = H	HCl aq.	26
3: R ₁ = F, R ₂ = I, R ₃ = F	HCl v Et ₂ O	22
4: R ₁ = F, R ₂ = Br, R ₃ = F	HCl v Et ₂ O	31

Schéma 28: Příprava aminů redukcí azidů využitím Staudingerovy redukce.

V případě aminu **4d** byla navržena i další metoda přípravy, vycházející z komerčně dostupné kyseliny **4e**, viz. *schéma 29*. Ta byla aktivována působením oxalyl chloridu za katalytického přídavku DMF a následně transformována na amid **4f** působením vodného roztoku amoniaku. Amid byl poté redukován boranem v THF na amin **4d**, který byl z reakční směsi následně izolován opět ve formě hydrochloridu, přídavkem chlorovodíku v diethyletheru. Celkový výtěžek dvoukrokové metody byl 34 %.

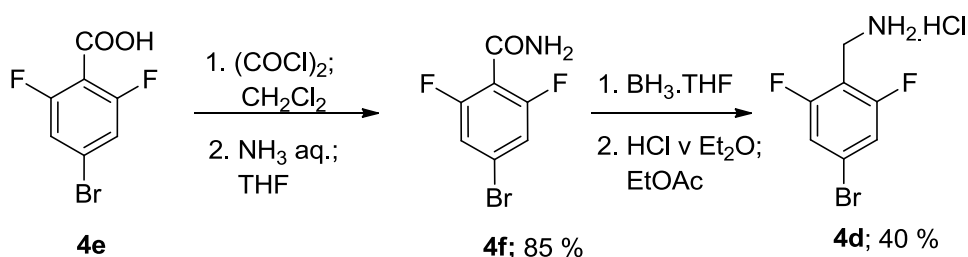


Schéma 29: Příprava aminu **4d** z karboxylové kyseliny.

Porovnáním obou způsobů syntéz přípravy aminu **4d** se jeví jako výhodnější metoda druhá, tedy vycházející z kyseliny **4e**.

Získané poznatky v případě přípravy aminu **4d** byly využity i při navrhování syntézy aminu **5c**, k jehož syntéze byla jako výchozí látka zvolena kyselina **5a**, viz. *schéma 30*. I zde byl navržen alternativní postup. Nejprve byl amin **5c** připraven obdobným způsobem jako amin **4d**, tedy transformací kyseliny na amid **5b** a jeho následnou redukcí na amin.

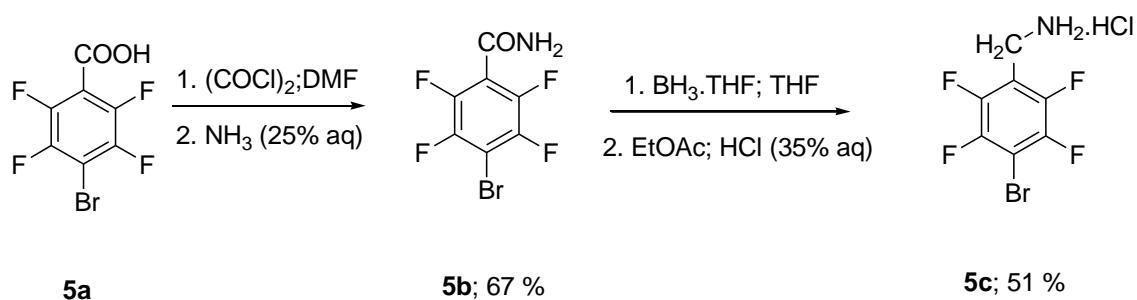


Schéma 30: Syntéza aminu **5c** přes amid.

Alternativní způsob přípravy vycházel z transformace kyseliny **5a** na alkohol redukcí $\text{BH}_3 \cdot \text{THF}$ v THF, následnou transformací na azid **5e**, jenž byl redukován PPh_3 na amin **5c**, viz. *schéma 31*. Nevýhodou u tohoto postupu však byla nutnost provést izolaci produktu sloupcovou chromatografií na silikagelu u alkoholu **5d** a azidu **5e**.

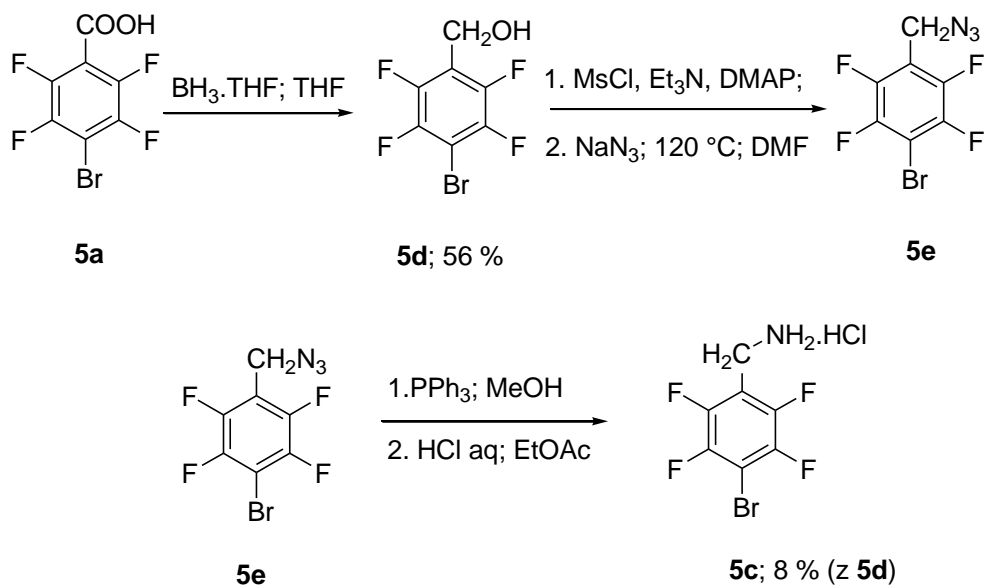


Schéma 31: Syntéza aminu **5c** přes alkohol a azid

Při porovnání celkových výtěžku u obou navržených syntéz, se jeví výhodněji metoda syntézy přes amid. V případě dvoukrokové syntézy dosáhl celkový výtěžek 34 %, zatímco v případě syntézy probíhající přes alkohol a následně azid dosáhl 4,5 %.

4. Experimentální část

Obecné poznámky k experimentální části

Použité chemikálie a rozpouštědla do reakcí k přípravě uvedených látek byly nakoupeny v p.a. čistotě. Průběh reakce a čistota produktů byl sledován na TLC deskách Kieselgel 60 F₂₅₄ (Merck) (20 x 20 cm) a na deskách Oxidu hlinitého 60 F₅₄, neutral (Merck). Detekce TLC destiček byla uskutečněna pod UV zářením (model NU – 6 KL; o vlnové délce 254 nm). Následně byly destičky vyvolány jejich rychlým namočením v detekčním činidle AMC a zahřáty horkovzdušnou pistolí. Detekční činidlo AMC bylo připraveno z kyseliny fosfomolybdenové (25 g), hydrátu síranu ceričitého Ce(SO₄)₂ · H₂O (10g), kyseliny sírové H₂SO₄ (1000 ml, 1,2 M).

Sloupcová chromatografie byla prováděna na silikagelu Kieselgel 60 (63 – 200 μm). Rozpouštědla k sloupcovým chromatografickým kolonám byla přečištěna destilací. Použité mobilní fáze jsou uváděny vždy u jednotlivých látek.

Pro odpaření rozpouštědel od produktů či reakčních směsí byla použita rotační vakuová odparka (RVO) Buchi Rotavapor R-200. Produkty byly dosušeny na vakuové pumpě pod Ar atmosférou. Mikrovlnný reaktor byl Biotage initiator, výkon během reakce byl 100 W.

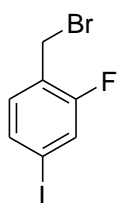
Pro zjištění konverze reakcí byla ¹H spektra nukleární magnetické rezonance (NMR) měřena na přístrojích Varian UNITY INOVA – 300 a také ¹⁹F spektra při 282.19 MHz. Pro určení struktury byla měřena na spektrometru Bruker AVANCE III 600 při frekvenci 600.17 MHz pro ¹H, při 150.91 MHz ¹³C spektra a při 282.19 MHz ¹⁹F spektra. Všechny připravené látky byly pro NMR analýzu rozpouštěny v deuterovaném chloroformu (CDCl₃), nebo v deuterovaném dimethylsulfoxidu (DMSO-d₆). Chemické posuny δ byly referencovány vždy vůči těmto rozpouštědlům, v případě ¹⁹F spekter vůči trifluoroctové kyselině. Dále byly určeny chemické posuny δ a hodnoty interakčních konstant *J*.

Ethyl-acetát, methanol, ethanol, tetrahydrofuran a hexan byly zakoupeny u firmy Brenntag, s. r. o. Toluén byl zakoupen u firmy Lab Scan, s. r. o. Kyselina 4-brom-2,3,5,6-tetrafluorbenzoová a 4-brom-2,6-difluorbenzoová, 4-brom-2,6-difluortoluén, 2-fluor-4-jodtoluén a 4-jod-2,6-difluortoluén byly zakoupeny u firmy Fluorochem Ltd. Látky 4-brom-2-fluorbenzylbromid, BH₃.THF v THF (1 M), azid sodný p. a., *N*-bromsukcinimid a trifenylofosfin byly zakoupeny u společnosti Sigma-Aldrich, s. r. o.

Obecný postup bromace derivátu toluenu

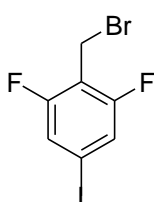
K výchozí látce suspendované v CCl_4 byl přidán NBS (1.1 ekv.) a katalytické množství AIBN. Reakční směs byla míchána za reflexu do dosažení plné konverze (NMR monitoring). Po ochlazení na LT byla reakční směs zfiltrována přes křemelinu a promyta CCl_4 . Filtrát byl protřepán s nasyc. roztokem NaCl, organická fáze sušena bezvodým Na_2SO_4 , zfiltrován a zahuštěn na RVO. Připravené bromidy byly dále použity bez dalšího čištění k přípravě azidů.⁵²

2-fluor-4-jodbenzylbromid (2b)



Bylo izolováno 1.581 g (82 %) bromidu ve formě žlutého oleje, který v lednici zkrystalizoval. Naměřené ^1H NMR odpovídá údajům uvedených v lit.⁵³

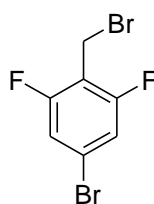
2,6-difluor-4-jodbenzylbromid (3b)



Bylo izolováno 1.677 g (85 %) bromidu ve formě žlutohnědého oleje, který v lednici zkrystalizoval.

^1H NMR (300 MHz, CDCl_3): $\delta = 7.22\text{-}7.18$ (m, 2H), $\delta = 4.46$ (s, 2H) ppm.

4-brom-2,6-difluorbenzylbromid (4b)

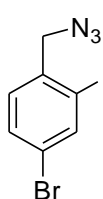


Bylo izolováno 1.756 g (73 %) bromidu ve formě žlutého oleje, který v lednici zkrystalizoval. Naměřené ^1H NMR odpovídá údajům uvedených v lit.⁵⁴

Obecný postup přípravy azidů

K připravenému derivátu benzylobromidu suspendovanému v DMF byl NaN₃ (1.5 ekv.). Reakční směs byla zahřívána v mikrovlném reaktoru při 120 °C 30 minut. Reakční směs rozpuštěná v diethyletheru byla promyta vodou, organická fáze sušena bezvodým Na₂SO₄, zfiltrována a zahuštěna na RVO. Získané azidy byly použity pro přípravu aminů bez dalšího čištění.⁵¹

4-brom-2-fluorbenzylazid (1b)

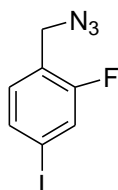


Bylo získáno 1.972 g látky **1b** ve formě žlutého oleje.

¹H NMR (300 MHz, CDCl₃): δ = 4.32 (s, 2H), δ = 7.28-7.15 (m, 3H) ppm.

IR (KBr): ν = 3085, 3070, 2932, 2880, 2104, 1724, 1724, 16773, 1607, 1580, 1488, 1404, 1350, 1272, 1219, 1066, 887, 821 cm⁻¹.

2-fluor-4-jodbenzylazid (2c)

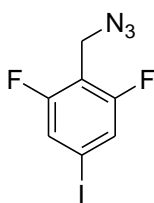


Bylo získáno 0.699 g látky **2c** ve formě žlutohnědého oleje..

¹H NMR (300 MHz, CDCl₃): δ = 7.50-7.29 (m, 3H), δ = 4.36 (s, 2H) ppm.

IR (KBr): ν = 3099, 3063, 2992, 2926, 2101, 1727, 1601, 1571, 1479, 1401, 1350, 1269, 1219, 869, 818 cm⁻¹.

2,6-difluor-4-jodbenzylazid (3c)

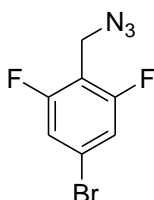


Bylo získáno 1.086 g látky **3c** ve formě žlutohnědého oleje.

¹H NMR (300 MHz, CDCl₃): δ = 7.35-7.28 (m, 2H), δ = 4.37 (s, 2H) ppm.

IR (KBr): ν = 3084, 3060, 2944, 2878, 2107, 1724, 1613, 1574, 1479, 1407, 1308, 1278, 1198, 1060, 845 cm⁻¹.

4-brom-2,6-difluorbenzylazid (4c)



Bylo získáno 0.724 g látky **4c** ve formě žlutého oleje.

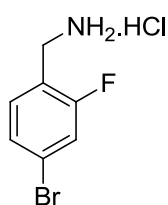
¹H NMR (300 MHz, CDCl₃): δ = 7.25-7.15 (m, 2H), δ = 4.38 (s, 2H) ppm.

IR (KBr): ν = 3093, 3066, 3034, 2989, 2935, 2875, 2110, 1727, 1619, 1592, 1577, 1473, 1422, 1263, 1189, 1063, 872, 842 cm⁻¹.

Obecný postup redukce azidů na amin

K PPh₃ (1.5 ekv.) suspendovaném v suchém methanolu (10 ml/1 mmol azidu) byl přidán derivát benzylazidu. Rekační směs byla refluxována 2 dny při 80 °C. Následně byla reakční směs ochlazena na laboratorní teplotu a zahuštěna na RVO. Získaný olej byl rozpuštěn v toluenu (5 ml/1 mmol azidu) a příslušný amin byl vysrážen přikapáním kyseliny chlorovodíkové (35% aq.). Pevný amin byl následně zfiltrován a rekrystalizován z roztoku methanol : chloroform (1 : 9).⁵⁵ Výtěžky získaných aminů jsou uváděny vůči výchozím bromidům, neboť azidy byly použity bez dalšího čištění.

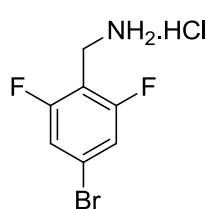
Hydrochlorid 4-brom-2-fluorbenzylaminu (1c)



Bylo získáno 0.482 g (32 %) látky **1c** ve formě bílého prášku.

¹H NMR (600 MHz, DMSO-d₆) δ = 8.57 (bs, 3H), δ = 7.66-7.51 (m, 3H), δ = 4.02 (s, 2H) ppm; ¹³C NMR (151 MHz, DMSO-d₆): δ = 160.16 (d, *J* = 251.9 Hz, 1C), δ = 132.90 (d, *J* = 3.7 Hz, 1C), δ = 127.76 (d, *J* = 3.29 Hz, 1C), δ = 122.31 (d, *J* = 9.7 Hz, 1C), δ = 120.69 (d, ppm; *J* = 14.9 Hz, 1C), δ = 118.87 (d, *J* = 24.8 Hz, 1C), δ = 35.17 (d, *J* = 3.1 Hz, 1C) ppm. ¹⁹F NMR (282 MHz, DMSO-d₆): δ = -108,80 (t, *J* = 15.5 Hz, F) ppm; IR (KBr): ν = 3180, 3037, 2995, 2971, 2884, 2863, 2711, 2603, 2483, 2385, 2011, 1933, 1616, 1583, 1494, 1404, 1383, 1222, 1195, 1141, 1123, 1057, 967, 893, 878, 863, 827 cm⁻¹.

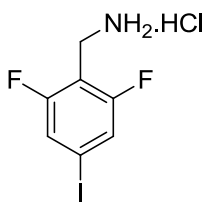
Hydrochlorid 4-brom-2,6-difluorbenzylaminu (4d)



Bylo získáno 0.217 g (31 %) látky **4d** ve formě bílého prášku.

¹H NMR (600 MHz, DMSO-d₆) δ = 8.42 (bs, 3H), δ = 7.63-7.61 (m, 2H), δ = 4.03 (s, 2H) ppm; ¹³C NMR (151 MHz, DMSO-d₆): δ = 160.93 (dd, *J* = 253.53 Hz, *J'* = 8.59 Hz, 2C), δ = 122.95 (t, *J* = 12.85 Hz, 1C), δ = 115.66 (dd, *J* = 23.31 Hz, *J'* = 5.35 Hz, 2C), δ = 109.72 (t, *J* = 19.81 Hz, 1C), δ = 29.88 ppm; ¹⁹F NMR (282 MHz, DMSO-d₆): δ = -106.08 (d, *J* = 6.8 Hz, 2F) ppm; IR (KBr): ν = 3087, 3007, 2968, 2929, 2890, 2860, 2815, 2723, 2657, 2627, 2543, 2483, 2403, 2053, 1625, 1589, 1580, 1524, 1482, 1419, 1138, 1021, 976, 863, 848 cm⁻¹.

Hydrochlorid 2,6-difluor-4-jodbenzylaminu (3d)

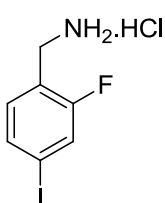


Bylo získáno 0.128 g (22 %) **3d** ve formě světlé žluté krystalické látky.

¹H NMR (600 MHz, DMSO-d₆): δ = 8,42 (bs, 3H), δ = 7,65 (dd, *J* = 9.6 Hz, *J'* = 1,8 Hz, 1H), δ = 7.58 (t, *J* = 8.1 Hz, 1H), δ = 7.51 (dd, *J* = 8.2 Hz, *J'* = 1.7 Hz, 1 H), δ = 4.02 (s, 2H) ppm; **¹³C NMR** (151 MHz, DMSO-d₆): δ = 160.57 (dd, *J* = 254.5 Hz, *J'* = 7.7 Hz, 2C), δ = 120.98

(d, *J* = 25.8 Hz, 2C), δ = 109.98 (t, *J* = 19.5 Hz, 1C), δ = 95.49 (t, *J* = 10.1 Hz, 1C), δ = 29,95 (s, 1C) ppm; **¹⁹F NMR** (282 MHz, DMSO-d₆): δ = -107.13 (d, *J* = 6.2 Hz, 2F) ppm; **IR (KBr)**: ν = 3072, 2974, 2926, 2881, 2812, 2776, 2726, 2690, 2609, 2498, 1981, 1622, 1571, 1494, 1476, 1455, 1410, 1275, 1126, 1003, 964, 845 cm⁻¹.

Hydrochlorid 2-fluor-4-jodbenzylaminu (2d)



Bylo získáno 0.191 g (26 %) **2d** ve formě bílé krystalické látky.

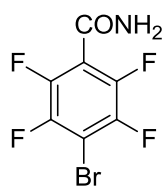
¹H NMR (600 MHz, DMSO-d₆): δ = 8.33 (bs, 3H), δ = 7.75 (dd, *J* = 9.4 Hz, *J'* = 1.3 Hz, 1H), δ = 7.67 (d, *J* = 8.0 Hz, 1H), δ = 7.34 (t, *J* = 8.0 Hz, 1H), δ = 4.02 (m, 2H) ppm; **¹³C NMR** (151 MHz, DMSO-d₆): δ = 159.95

(d, *J* = 252.3, 1C), δ = 133.27 (dd, *J* = 120.0 Hz, *J'* = 3.1 Hz, 2C), δ = 124.31 (d, *J* = 23,7 Hz, 1C), δ = 120.92 (d, *J* = 15.1 Hz, 1C), δ = 95.34 (d, *J* = 7.9 Hz, 1C), δ = 35.49 (d, *J* = 3.5 Hz, 1C) ppm; **¹⁹F NMR** (282 MHz, DMSO-d₆): δ = -114,44 (t, *J* = 8.7 Hz, 1F) ppm; **IR (KBr)**: ν = 3010, 2992, 2962, 2902, 2815, 2767, 2761, 2702, 2600, 2555, 2047, 1607, 1565, 1482, 1392, 1213, 1189, 890, 854, 827 cm⁻¹.

Obecný postup přípravy amidu z kyseliny

Ke kyselině (1 ekv.) v CH_2Cl_2 byl po kapkách přidán oxalyl chlorid (4 ekv.), následně přidány 2-3 kapky DMF při $0\text{ }^\circ\text{C}$. Reakční směs byla míchána 2 hodiny při LT a poté zahuštěna na RVO. Následně byl přidán suchý THF (20 ml/7 mmol kyseliny) a reakční směs ochlazena na $0\text{ }^\circ\text{C}$. Přidán 20% aq. roztok amoniaku (50 ml/7 mmol kyseliny). Reakční směs byl míchán při LT 30 min. Následně zahuštěno na RVO a pevná látka zfiltrována a sušena na vakuu.⁵⁶

4-brom-2,3,5,6-tetrafluorbenzamid (5d)

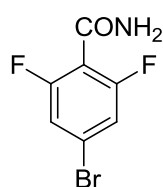


Bylo získáno 1,260 g (85 %) látky **5d** ve formě bílého prášku.

$^1\text{H NMR}$ (600 MHz, DMSO-d_6): $\delta = 8.25$ (d, $J = 72.0$ Hz, 2H) ppm. $^{13}\text{C NMR}$ (151 MHz, DMSO-d_6): $\delta = 158.57$ (s, 1C), $\delta = 145.02$ - 141.79 (m, 4C), $\delta = 117.17$ (t, $J = 21.8$ Hz, 1C), $\delta = 100.57$ (t, $J = 22.8$ Hz, 1C) ppm.

IR (KBr): $\nu = 3357, 3315, 3180, 2818, 2773, 1676, 1634, 1595, 1494, 1476, 1410, 1392, 1374, 1138, 979, 818, 680, 662, 623\text{ cm}^{-1}$. ^{19}F (282 MHz, DMSO-d_6): $\delta = -133.18$ (m, 1F), $\delta = -140.88$ (m, 1F) ppm.

4-brom-2,6-difluorbenzamid (4f)



Bylo získáno 1,311 g (81 %) látky **4f** ve formě bílého prášku.

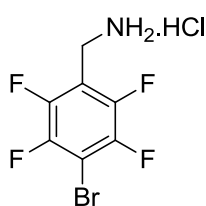
$^1\text{H NMR}$ (600 MHz, DMSO-d_6): $\delta = 8.02$ (d, $J = 74.0$ Hz, 2H), $\delta = 7.57$ - 7.55 (m, 3H) ppm. $^{13}\text{C NMR}$ (151 MHz, DMSO-d_6): $\delta = 160.64$ (s, 1C), $\delta = 158.63$ (dd, $J = 252.1$ Hz, $J' = 9.4$ Hz, 2C), $\delta = 122.20$ (t, $J = 12.1$ Hz, 1C),

$\delta = 115.68$ (dd, $J = 23.9$ Hz, $J' = 5.0$, 2C), $\delta = 115.33$ (t, $J = 23.7$ Hz, 1C) ppm. ^{19}F (282 MHz, DMSO-d_6): $\delta = -112.25$ (d, $J = 7.1$ Hz, 2F) ppm. **IR (KBr)**: $\nu = 3374, 3192, 3081, 1664, 1616, 1416, 1395, 1195, 1036, 869, 848, 662\text{ cm}^{-1}$.

Obecný postup přípravy aminu z amidu

Amid (1 ekv.) byl rozpuštěn v $\text{BH}_3\cdot\text{THF}$ (1 M, 5 ekv.) pod argonovou atmosférou. Reakční směs byla míchána pod refluxem 48 hod, po ochlazení na LT byl nadbytečný boran rozložen přidavkem MeOH. Reakční směs byla odpařena na RVO, následně rozpuštěna v toluenu a amin byl vysrážen přidavkem chlorovodíku v diethyletheru. Získaný amin byl zfiltrován a rekrystalizován ze směsi chloroform : methanol (9:1).⁵⁷

Hydrochlorid 4-brom-2,3,5,6-tetrafluorbenzylaminu (5c)



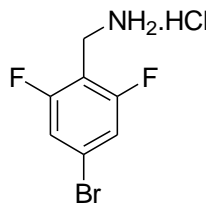
Bylo získáno 0.322 g (51 %) látky **5c** ve formě bílé krystalické látky.

$^1\text{H NMR}$ (600 MHz, DMSO-d_6): $\delta = 8.47$ (s, 3H), $\delta = 4.14$ (s, 2H) ppm;

$^{13}\text{C NMR}$ (151 MHz, DMSO-d_6): $\delta = 145.02$ (dd, $J = 251.4$ Hz, $J' = 14.4$ Hz, 2C), $\delta = 144.12$ (dd, $J = 244.6$ Hz, $J' = 15.48$ Hz, 2C), $\delta = 113.29$ - 112.76 (m, 1C), $\delta = 100.81$ (t, $J = 22.7$ Hz, 1C), $\delta = 30.31$ (s, 1C)

ppm; $^{19}\text{F NMR}$ (282 MHz, DMSO-d_6): $\delta = -134.36$ (dd, $J = 9.6$ Hz, $J' = 22.6$ Hz, 2F), $\delta = -126.94$ (dd, $J = 9.6$ Hz, $J' = 23.4$ Hz, 2 F) ppm. **IR** (KBr): $\nu = 3084, 3025, 2980, 2905, 2884, 2824, 2687, 2651, 2621, 2480, 2388, 1679, 1637, 1562, 1518, 1488, 1380, 1269, 1144, 970, 824$ cm^{-1} .

Hydrochlorid 4-brom-2,6-difluorbenzylaminu (4d)



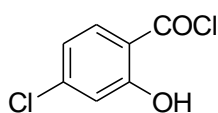
Bylo získáno 0.322 g (40 %) **4d** jako bílé krystalické látky.

$^1\text{H NMR}$ (600 MHz, DMSO-d_6) $\delta = 8.42$ (bs, 3H), $\delta = 7.63$ - 7.61 (m, 2H), $\delta = 4.03$ (s, 2H) ppm; $^{13}\text{C NMR}$ (151 MHz, DMSO-d_6): $\delta = 160.93$

(dd, $J = 253.53$ Hz, $J' = 8.59$ Hz, 2C), $\delta = 122.95$ (t, $J = 12.85$ Hz, 1C),

$\delta = 115.66$ (dd, $J = 23.31$ Hz, $J' = 5.35$ Hz, 2C), $\delta = 109.72$ (t, $J = 19.81$ Hz, 1C), $\delta = 29.88$ ppm; $^{19}\text{F NMR}$ (282 MHz, DMSO-d_6): $\delta = -106.08$ (d, $J = 6.8$ Hz, 2F) ppm; **IR** (KBr): $\nu = 3087, 3007, 2968, 2929, 2890, 2860, 2815, 2723, 2657, 2627, 2543, 2483, 2403, 2053, 1625, 1589, 1580, 1524, 1482, 1419, 1138, 1021, 976, 863, 848$ cm^{-1} .

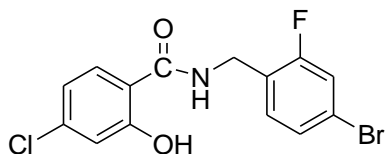
4-Chlor-2-hydroxybenzoyl chlorid (**1h**)



K 4-chlorosalicylové kyselině (2.001 g, 11,6 mmol), suspendované v dichlormethanu (7 ml), byl za míchání postupně přidán oxalyl chlorid (16.7 ml, 88.9 mmol) a pár kapek DMF. Mícháno při LT 24 hodin.

Reakční směs zahuštěna na RVO a sušena vakuu. Byl získán chlorid **1h** (1.493 g), který byl dále použit bez dalšího čištění (tmavě žlutá pevná látka).⁵⁸

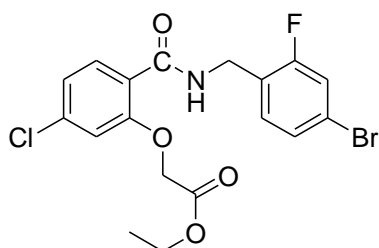
N-(4-brom-2-fluorbenzyl)-4chloro-2-hydroxybenzamid (**1d**)



K Hydrochloridu **1c** (143 mg, 0.6 mmol) v dichlormethanu (1 ml) byl za míchání po kapkách přidán DIEA (0.5 ml, 2.6 mmol). Mícháno 1 hodinu, poté přidán chlorid kyseliny 4-chlorosalicylové (71 mg, 0.4

mmol) a mícháno při LT 4 dny. Reakční směs byla promyta HCl (15 ml; 1M aq.) a nasyc. roztokem NaCl. Organická fáze byla sušena bezvodým Na₂SO₄, zfiltrováno a zakoncertováno na RVO. Znečištěný amid byl zpracován na koloně hexan : ethylacetát (7 : 1), odpařeno na RVO. Bylo získáno 103 mg (48 %) látky **1d** ve formě světlehnědého prášku. Naměřené ¹H NMR odpovídá údajům uvedených v lit.⁵⁹

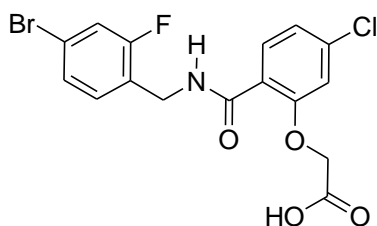
Ethyl-2-(2-(4-brom-2-fluorbenzylkarbamoyl)-5-chlorofenoxy)acetát (**1e**)



K amidu **1d** (100 mg, 0,3 mmol) rozpuštěném v acetonu (2 ml) byl za stálého míchání přidán roztok uhličitanu draselného (61 mg, 44 mmol, 2M aq) a roztok ethylbromacetátu (58 mg, 0.35 mmol, 0.2M) v acetonu (1.5 ml). Reakční směs byla míchána 2.5 h při 50 °C. Po ochlazení na LT byla kapalina zkoncentrována na RVO a

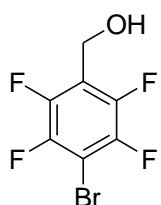
okyselena přidáním 1M HCl na pH = 1. Výsledný roztok naředěn ethyl-acetátem (15.0 ml) a promyt nasyc. roztokem NaCl. Organická fáze sušena bezvodým Na₂SO₄, zfiltrována a zkoncentrována na RVO. Koncentrát byl dělen na koloně hexan : ethylacetát (7 : 1). Bylo získáno 73.1 mg (59 %) látky **1e** ve formě bílého prášku. Naměřené ¹H NMR odpovídá údajům uvedených v lit.⁵⁹

2-(2-(4-Brom-2-fluorbenzylcarbamoyl)-5-chlorfenoxy)ethanová kyselina (**1f**)



Roztok esteru **1e** (60.0 mg, 0.135 mmol) v ethanolu (0.2 M) byl ochlazen na 0 °C a za míchání přidán aq. NaOH (1.25 M, 0.65 ml, 0.81 mmol). Následně byla reakční směs míchána 2 hod. při LT. Poté byl roztok zkoncentrován na RVO, okyselen 1 M HCl (1 ml) a rozpuštěn v ethyl-acetátu. Organická fáze byla oddělena, protřepána nasyc. roztokem NaCl (aq.), sušena bezvodým Na₂SO₄ a zfiltrována. Filtrát byl zahuštěn na RVO. Získaná látka byla přečištěna na koloně hexan : ethylacetát (6 : 1). Bylo získáno 43.3 mg (77 %) kyseliny **1f** ve formě bílé krystalické látky. Naměřené ¹H NMR odpovídá údajům uvedených v lit .⁵⁹

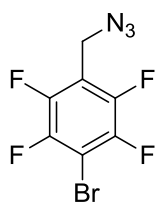
4-Brom-2,3,5,6-tetrafluorbenzylalkohol (**5d**)



Kyselina **5a** (1.031 g, 3.7 mmol) byla rozpuštěna v suchém THF (5 ml) a za míchání byl přidán BH₃.THF (1M, 7.4 ml, 7.4 mmol) po kapkách pod argonovou atmosférou v ledové lázni. Po ohřátí na LT byla reakční směs míchána přes noc a poté ochlazena v ledové lázni. K míchanému roztoku byla přidána voda (3 ml) a následně byla reakční směs zahuštěna na RVO. Odparek byl rozdělen mezi ethyl-acetátem a vodou. Vodná fáze byla extrahována ethyl.acetátem (3 x 5 ml) a spojená organická fáze byla promyta nasyc. roztokem NaCl (5 ml), sušena bezvodým Na₂SO₄, zfiltrována a zkoncentrována na RVO. Získána pevná látka byla dále čištěna pomocí sloupcové chromatografie ve směsi ethyl-acetát : hexan (1 : 5). Bylo získáno 0.536 g (56 %) bílé pevné látky **5d**.⁶⁰

¹H NMR (600 MHz, DMSO-d₆): δ = 5.60 (t, *J* = 5.94 Hz, 1H), δ = 4.56 (d, *J* = 5.9 Hz, 2H) ppm. ¹³C NMR (151 MHz, DMSO-d₆): δ = 145.58-143.19 (m, 4C), δ = 119.66 (t, *J* = 18.51 Hz, 1C), δ = 98.79 (t, *J* = 22.7 Hz, 1C) ppm. IR (KBr): ν = 3318, 2980, 2956, 2926, 2890, 2851, 1628, 1485, 1467, 1449, 1404, 1371, 1269, 1224, 1042, 1027, 997, 902, 830, 755, 662, 576 cm⁻¹.

4-Brom-2,3,5,6-tetrafluorbenzylazid (5e)



Připravený alkohol **5d** (0,502 g, 1,93 mmol) byl rozpuštěn v dichlormethanu (5,5 ml) při 0 °C, přidán Et₃N (0,4 ml, 2,9 mmol) a DMAP (27,6 mg, 0,2 mmol). Následně byl přikapán MsCl (0,17 ml, 2,3 mmol), mícháno při 0 °C 0,5 hod a poté při LT 1 hod. Reakce byla ukončena přidáním vody (6 ml), organická fáze byla sušena MgSO₄, zfiltrována a odpařena na RVO. Získaný hnědý olej byl rozpuštěn v DMF (4 ml) a přidán NaN₃ (0,184 g, 2,9 mmol), zahříváno v mikrovlnném reaktoru 30 minut při 120 °C. Reakční směs promyta Et₂O a vodou, organická fáze dále nasyc. roztokem NaCl, sušena bezvodým MgSO₄, zfiltrována a zahuštěna na RVO. Hnědý olej byl následně dělena na koloně hexan : ethyl-acetát (5 : 1). Bylo získáno 0,158 g látky **5e** ve formě hnědého oleje, který byl bez dalšího čištění použit k přípravě aminu.

¹H NMR (300 MHz, CDCl₃-d₆): δ = 4.43 (s, 2H) ppm.

5. Závěr

Účel této práce, připravit halogenované benzylaminy, základní stavební jednotky potenciálních inhibitorů ALR2, byl naplněn. Aminy **2d**, **3d** a **4d** byly získány z halogenovaných derivátů toluenu radikálovou bromací, jejich následným převedením na azidy, které po redukci poskytly příslušné aminy. Tímto způsobem byly úspěšně připraveny: hydrochlorid 2-fluor-4-jodbenzylaminu (**2d**) 21 %, hydrochlorid 2,6-difluor-4-jodbenzylaminu (**3d**) 22 %, hydrochlorid 4-brom-2,6-difluorbenzylaminu (**4d**) 23 %.

Pro syntézu aminu **4d** byla navržena také alternativní metoda, vycházející z derivátu karboxylové kyseliny, která byla převedena na amid. V tomto případě činil celkový výtěžek získaného aminu 34 % a tudíž byla tato metoda označena jako výhodnější.

Hydrochlorid 4-brom-2,3,5,6-tetrafluorbenzylaminu (**5c**) byl připraven rovněž dvěma způsoby. Nejprve převedením kyseliny na amid, kdy výtěžek dosáhl 34 % a poté též transformací kyseliny na alkohol, následovanou azidací a redukcí na amin s výtěžkem 8 %. Porovnáním výtěžku a náročností zpracování reakčních směsí, se v tomto případě ukazuje jako výhodnější opět metoda přípravy aminů z amidů, získaných z kyselin.

Také se podařilo připravit známý inhibitor **1f**, s celkovým výtěžkem 7 %, připravený z důvodů srovnávacích studií.

6. Literatura

- ¹ Hartl, J; Palát, K. *Farmaceutická chemie I*; Karolinum: Praha, 2007.
- ² Doležal, M. a kol. *Farmaceutická chemie léčiv*; Karolinum: Praha, 2009.
- ³ Coulthurst, Sarah J. et al. *Nat. Rev. Microbiol.* **2005**, 3,295.
- ⁴ Zamykalová, L. *Bakalářská práce*; UK Hradec Králové, 2007.
- ⁵ Hampl, F.; Paleček, J. *Farmakochemie*; Vysoká škola chemicko-technologická v Praze: Praha, 2002.
- ⁶ Červinka, O. a kol. *Chemie organických s;loučenin II*; SNTL: Praha, 1985.
- ⁷ Devínský, F. a kol. *Organická chémie pre farmaceutov*; Osveta Martin, 2001.
- ⁸ H. Steuber, A. Heine, G. Klebe. *J. Mol. Biol.* **2007**, 368, 618.
- ⁹ Altan V. M. *Curr. Med. Chem.* **2003**, 10, 1353.
- ¹⁰ Van Zandt, Michael C., Evelyn O. Sibley, Erin E. McCann, et al. *Bioorganic & Medicinal Chemistry* **2004**, 12, 5661.
- ¹¹ Varnai, P.; Richards, W.; Lyne, P. D. *Proteins: Struct. Funct. Genet* **1999**, 37, 218.
- ¹² Alexou, P.; Pegklidou, A. et al. *Curr. Med. Chem.* **2009**, 16, 734.
- ¹³ Kawanishi, K.; Ueda, H. et al. *Curr. Med. Chem.* **2003**, 10, 1353.
- ¹⁴ Rastelli, G.; Ferrari, A. M. *Bioorg. Med. Chem.* **2002**, 10, 1437.
- ¹⁵ Da Settimo F., Primofiore G. Et al. *J. Med. Chem.* 2003, 46, 1419.
- ¹⁶ Chlupáčová, M.; Opletalová V. *Chem. Listy* **2004**, 98, 320.
- ¹⁷ El-Kabbani, O.; Podjarny, A. *Cell. Mol. Life Sci.* **2007**, 64, 1970.
- ¹⁸ Koch, C.; Heine, A.; Klebe, G. *J. Mol. Biol.* **2011**, 406, 700.
- ¹⁹ Harrison, D. H. T et al. *Biochemistry*, **1997**, 36,16134.
- ²⁰ Werner, E. A. *J. Chem. Soc.* **1918**, 113, 899.
- ²¹ Lawrence, S. A. *Amines: Synthesis, Properties and Applications*. Cambridge University Press, 2004, 386.
- ²² Gibson, M. S.; Bradshaw, R. W. *Angew. Chem. Int. Ed.* **1968**, 7, 919.

-
- ²³ Sheehan, J. C.; Bolhofer, W. A. *J. Am. Chem. Soc.* **1950**, *72*, 2786.
- ²⁴ Jin, Q. et al. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2004**, *14*, 4375.
- ²⁵ Brandänge, S.; Rodriquez, B. *Synthesis*, **1988**, *4*, 347-348.
- ²⁶ Rdik, E.; AY, M. *Chem. Rev.* **1989**, *89*, 1947.
- ²⁷ Rathke, M. W. et al. *J. Am. Chem. Soc.* **1966**, *88*, 2870.
- ²⁸ Kabalka, G. W. et al. *Synth. Commun.* **1989**, *19*, 2409.
- ²⁹ Kabalka, G. W. et al. *J. Org. Chem.* **1981**, *46*, 4296.
- ³⁰ Smith, M.; March, J. *March's advanced organic chemistry: reactions, mechanisms, and structure*; Wiley-Interscience: Kanada, 2001.
- ³¹ Ram S. R., Chary K. P., Salahuddin, S., Iyengar D. S.: *Indian J. Chem., Sect. B: Org. Chem. Incl. Med. Chem.* **2003**, *42*, 935.
- ³² Prasad H. S. et al. *Org. Chem. Incl. Med. Chem.* **2004**, *43*, 1787.
- ³³ Staudinger, H.; Meyer, J. *Helv. Chim. Acta* 1919, *2*, 635.
- ³⁴ Tian, W. Q.; Wang, Y. A. *J. Org. Chem.* **2004**, *69*, 4299.
- ³⁵ Lin, F. L. et al. *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, *127*, 2686.
- ³⁶ Holub J. M. et al. *Molecules* **2004**, *9*, 135.
- ³⁷ Kamal, A. et al. *Synlett* **2008**, *9*, 1297.
- ³⁸ Organická syntéza; Svoboda, J.; VŠCHT: Praha, 2000.
- ³⁹ Carothers, W. H.; Jones, G. A. *J. Am. Chem. Soc.* **1925**, *47*, 3051.
- ⁴⁰ Gould, F. E.; Johnson, G. S.; Ferris, A. F. *J. Org. Chem.* **1960**, *25*, 1658.
- ⁴¹ Fujino K. et al. *Org. Process Res. Dev.* 2001, *5*, 423.
- ⁴² Gannett P. M. et al. *J. Org. Chem.* **1988**, *53*, 1064.
- ⁴³ Kato, K. et al. *Enzym.* **2004**, *30*, 61.
- ⁴⁴ Satoh, T. et al. *Tetrahedron Lett.* **1969**, *10*, 4555.
- ⁴⁵ Prasad, A. S. B. et al. *Tetrahedron* **1992**, *48*, 4623.
- ⁴⁶ Kuehne, M. E.; Shannon, P. J. *J. Org. Chem.* **1977**, *42*, 2082.

-
- ⁴⁷ Lewin A. H. et al. *Tetrahedron* **2005**, *61*, 7144.
- ⁴⁸ Tchilibon, S. et al. *J. Med. Chem.* **2005**, *48*, 1745.
- ⁴⁹ Kajigaeshi S., Asano K., Fujisaki S., Kakinami T., Okamoto T.: *Chem. Lett.* 1989, *3*, 463.
- ⁵⁰ Kazuta. Y. *J. Med. Chem.* **2003**, *46*, 1980.
- ⁵¹ Hansen, S.; Jensen, H. *Synlett.* **2009**, *20*, 3275.
- ⁵² Zhou, Z. et al. *Tetrahedron Lett*, **2007**, *48*, 6633.
- ⁵³ Gharat, Laxmikant Atmaram. PCT/IB2011/000846, **2011**.
- ⁵⁴ Chen, Meng-Hsin. PCT/US2006/030962, **2006**.
- ⁵⁵ Pal, B.; Jaisanker, P.; Giri, V., S. *Syntetic Commun*, **2004**, *34*, 1317.
- ⁵⁶ Chen, Z. PCT/US2004/024545, **2004**.
- ⁵⁷ Woods, M.; Sherry, D. *Inorg. Chem.* **2003**, *42*, 4401.
- ⁵⁸ Webb, L. J.; Boxer, S. G. *Biochemistry*, **2008**, *47*, 1589.
- ⁵⁹ Van Zandt Michael. PCT/US00/17377. **2001**.
- ⁶⁰ S. Jane deSolms et al. *J. Med. Chem.* **2003**, *46*, 2973.