

UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE
FARMACEUTICKÁ FAKULTA V HRADCI KRÁLOVÉ

KATEDRA ANORGANICKÉ A ORGANICKÉ CHEMIE

DIPLOMOVÁ PRÁCE

DERIVÁTY CHINAZOLINU JAKO LÁTKY S POTENCIÁLNÍ
BRONCHODILATAČNÍ AKTIVITOU II

Hradec Králové, 2013

Pavína Sochová

Za odborné vedení a cenné rady při vypracovávání diplomové práce děkuji svému školiteli PharmDr. Marcelu Špulákovi, Ph.D. Za pomoc při měření a interpretaci NMR spekter děkuji doc. PharmDr. Jiřímu Kunešovi a Mgr. Zdeňkovi Novákovi. Za vytváření příjemné pracovní atmosféry dále patří mé díky kolegům z Katedry anorganické a organické chemie. Nakonec bych ráda poděkovala PharmDr. Marii Vopršalové, CSc. za stanovení bronchodilatačních aktivit mnou syntetizovaných látek.

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

Pavína Sochová

ABSTRAKT

Univerzita Karlova v Praze

Farmaceutická fakulta v Hradci Králové

Katedra anorganické a organické chemie

Kandidát: Pavlína Sochová

Konzultant: PharmDr. Marcel Špulák, Ph.D.

Název diplomové práce: Deriváty chinazolinu jako látky s potenciální bronchodilatační aktivitou II

Cílem mé diplomové práce bylo syntetizovat vybrané deriváty (-)vasicinu a (-)vasicinonu a vyhodnotit jejich bronchodilatační aktivitu. Dvě nejaktivnější molekuly z předchozího screeningu mi posloužily jako modelové struktury, při jejichž modifikacích jsem sledovala vztah mezi bronchodilatačním efektem a a) počtem atomů dusíku v heterocyklu, b) přítomností benzenového kruhu v aromatické části sloučenin a c) substituací benzenového kruhu v aromatické části sloučenin.

Předběžné výsledky testování bronchodilatace ukázaly slibné hodnoty aktivity u některých molekul, které, ač nedosahují účinku ipratropium bromidu, jsou vzhledem ke svému dosud neurčenému mechanismu působení možným odrazovým můstkem pro další vývoj.

ABSTRACT

Charles University in Prague

Faculty of Pharmacy in Hradec Králové

Department of Inorganic and Organic Chemistry

Candidate: Pavlína Sochová

Consultant: PharmDr. Marcel Špulák, Ph.D.

Title of Thesis: Quinazoline derivatives as compounds with potential bronchodilatory effect II

The aim of this thesis is to synthesize various derivatives of (-)-vasicin and (-)-vasicinone and explore their bronchodilatory activity. Two most active compounds from previous screening were selected as model structures and the relationship between the bronchodilatory effect and a) the number of nitrogen atoms in heterocyclic core, b) the presence of benzene ring and c) the substitution of benzene ring was investigated.

Preliminary results of bronchodilatory screening showed some promising effects of certain compounds. Even though the activity of the most successful derivatives are not yet comparable to ipratropium bromide, due to the fact that their mode of action is still not explored, it renders them possible target for further development.

OBSAH

1. ÚVOD	6
1.1. Chronická obstrukční plicní nemoc	6
1.2. Terapie CHOPN	6
1.3. Nejnovější trendy v léčbě	9
1.4. Justicia adhatoda	11
1.5. Alkaloidy (-)vasicin a (-)vasicinon a jejich syntetické deriváty	12
1.6. Strukturní revize a bronchodilatační aktivita syntetických derivátů (-)vasicinonu připravených na Farmaceutické fakultě v Hradci Králové	14
2. CÍL PRÁCE	18
3. VÝSLEDKY S KOMENTÁŘEM	20
3.1. Syntéza první série derivátů	20
3.2. Syntéza druhé série derivátů	22
3.3. Syntéza třetí série derivátů	23
4. ZÁVĚR	28
5. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST	29
5.1. Obecné experimentální postupy	29
5.2. Použité experimentální postupy při biologickém hodnocení	29
5.3. Obecný postup alkylace	30
5.4. Příprava chinolin-4-thiolu	33
5.5. Syntéza substituovaných chinazolinů	33
5.6. Obecný postup přípravy hydrochloridů	34
6. SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK	35
7. LITERATURA	36

1. ÚVOD

1.1. Chronická obstrukční plicní nemoc (CHOPN)

Chronická obstrukční plicní nemoc je chronické zánětlivé onemocnění dýchacího ústrojí postihující více než 80 milionů lidí na celém světě a dle odhadů se v roce 2030 stane 3. nejčastější příčinou smrti. Onemocnění je charakterizované bronchiální obstrukcí (omezeným průtokem vzduchu v průduškách), která je vyvolána kombinací poruchy malých dýchacích cest (obstrukční bronchiolitida) a destrukcí plicního parenchymu (emfyzém) a která není plně reverzibilní. Bronchiální obstrukce neustále progreduje a je spojena s abnormální zánětlivou odpovědí na škodlivé částice a plyny. Dle výsledků spirometrického vyšetření se CHOPN dělí na čtyři stádia – od mírné až po velmi závažnou (těžkou) formu. Mezi nejčastější příznaky patří dušnost, kašel spojený se značnou produkcí hlenu, sípání, bolest na hrudi, únava, úzkost a poruchy spánku.^{1,2}

Mezi příčinami vzniku CHOPN v první řadě stojí kouření, dlouhodobé vystavení prašnému prostředí a v neposlední řadě také genetická predispozice. Cílem léčby je prevence a kontrola symptomů, snížení frekvence a závažnosti exacerbací (akutní zhoršení příznaků), zlepšení pacientovi kvality života a také vyšší tolerance zátěže.³

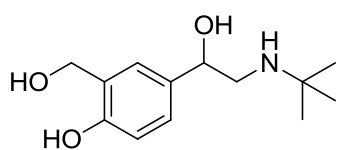
1.2. Terapie CHOPN

Terapie CHOPN se liší dle formy onemocnění (podle četnosti a závažnosti exacerbací) a zahrnuje jak farmakologické postupy tak ty nefarmakologické (poučení pacienta o příčinách onemocnění a jejich důsledcích, zejména pak o důležitosti odvykání kouření, ve výjimečných případech kyslíková terapie), které jsou součástí léčby vždy.

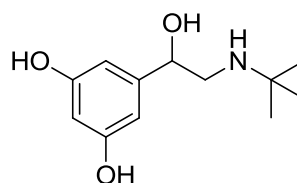
Současná terapie spočívá především v podávání inhalačních bronchodilatačních látek (krátkodobě a dlouhodobě působících). Používají se buď v čas potřeby ke zmírnění akutních eventuelně rychle se zhoršujících symptomů, anebo pravidelně k prevenci či omezení příznaků.^{1,2}

V případech těžkého nestabilizovaného stadia CHOPN nebo při intoleranci inhalačních bronchodilatací je indikováno podávání methylxantinů nebo inhalačních kortikosteroidů. Léčba sice nemůže zabránit progresi nemoci, dokáže ji však výrazně zpomalit a zlepšit tak prognózu a kvalitu života pacienta.^{2,3}

Krátkodobě účinná β_2 -adrenomimetika (SABAs – short-acting β_2 -adrenergic receptor agonists) - fenoterol, salbutamol, terbutalin, hexoprenalin



salbutamol

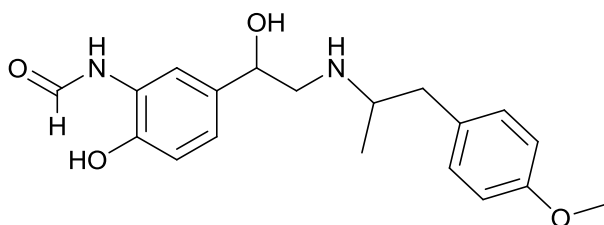


terbutalin

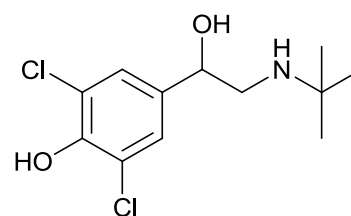
Tato léčiva relaxují bronchiální svalstvo bez ohledu na spazmogen. Mají také antialergické účinky, snižují uvolňování mediátorů z mastocytů a cévní permeabilitu.

Neaplikují se pravidelně, pouze dle potřeby při exacerbacích, nástup účinku je rychlý (v řádu minut) a trvá 4-6 hodin.⁴ V monoterapii se používají jen v prvním stadiu nemoci, přičemž příliš časté užívání svědčí o nestabilitě onemocnění. Mnohem častěji se využívají v kombinační léčbě.

Dlouhodobě účinná β_2 -adrenomimetika (LABAs – long-acting β_2 -adrenergic receptor agonists) - salmeterol, formoterol, klenbuterol, prokaterol, bambuterol



formoterol

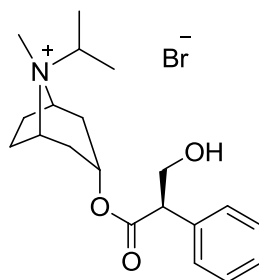


klenbuterol

Mají shodný účinek jako krátkodobě působící β_2 -sympatomimetika, ale s rozdílnou délkou účinku, která může být 12 hodin i více.⁴ Dlouhodobé trvání účinku je zřejmě způsobeno jejich vysokou rozpustností v lipidech. V souvislosti s tím lze v odborné literatuře nalézt dvě možné teorie vysvětlující tento jev. Podle první z nich se molekula léčiva rozpouští uvnitř buněčné membrány hladkého svalu ve vysoké koncentraci, druhá teorie hovoří o vazbě léčiva na lipofilní kotvící struktury v blízkosti adrenoreceptoru. V obou případech by bylo důsledkem vytvoření kompartmentu sloužícího jako depo léčivé látky.⁵

Krátkodobě účinná antimuskarinika (SAMAs – short-acting muscarinic antagonists)

- ipratropium bromid



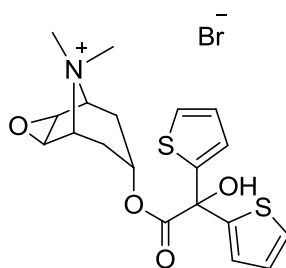
ipratropium bromid

Antimuskarinika kompetitivně inhibují efekt acetylcholinu na muskarinových receptorech. V dýchacích cestách je ACH uvolňován z eferentních zakončení bloudivého nervu a způsobuje kontrakci hladkých svalů. Tento efekt dokáží antagonisté muskarinových receptorů efektivně blokovat.

Ipratropium se při inhalačním podání téměř nevstřebává, takže má minimální nežádoucí účinky.⁵ Nástup účinku se pohybuje v rozmezí 30-60 minut a trvá 4-6 hodin, přičemž inhalační aplikace působí u lidí několikanásobně větší bronchodilataci než aplikace i.v. Nezřídka je používáno v kombinaci s β_2 -adrenomimetiky, neboť zesiluje jejich účinek.⁴

Dlouhodobě účinná antimuskarinika (LAMAs – long-acting muscarinic antagonists)

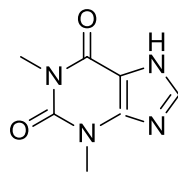
- tiotropium bromid



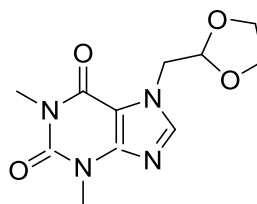
tiotropium bromid

Dlouhodobě účinná antimuskarinika mají stejný mechanismus účinku jako krátkodobá jen s rozdílnou délkou působení. Tiotropium se používá pro dlouhodobou terapii CHOPN díky svému 24 hodinovému působení.⁴

Methylxantiny - teofylin, aminofylin, bemifylin, acebrofylin, doxofylin



teofylin



doxofylin

Účinky spočívají v inhibici fosfodiesterázy I-IV a v antagonistickém působení na adenosinové receptory, zvyšují účinky β_2 -adrenomimetik.⁴

Teofylin byl dlouhou dobu široce užívaný lék u CHOPN, nicméně jeho užívání bylo provázeno významnými nežádoucími účinky. Na řadu proto přišli jeho novější deriváty, zejména pak doxofylin s mnohem lepším bezpečnostním profilem, který je navíc možno užívat ve formě tablet.⁶

1.3. Nejnovější trendy v léčbě

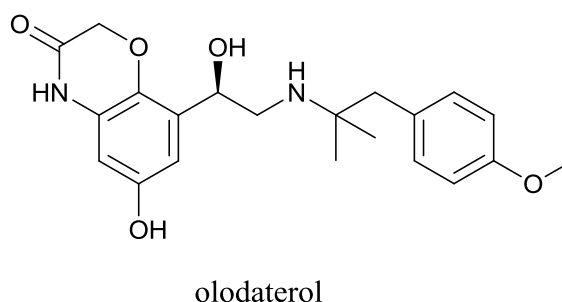
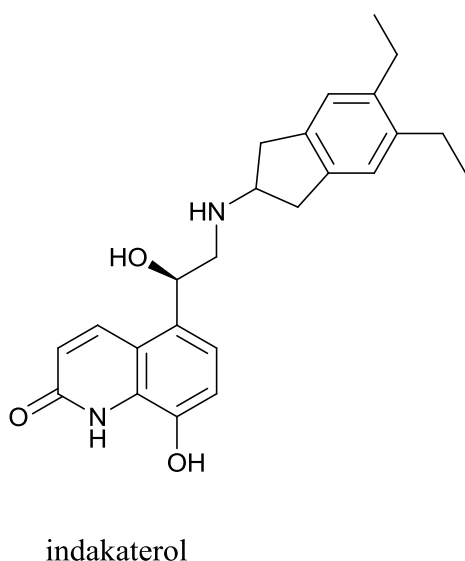
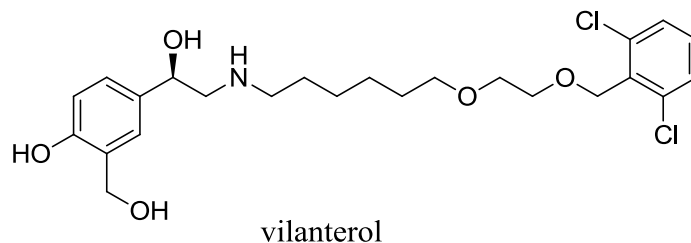
Ultra dlouhodobě účinná β_2 -adrenomimetika (uLABAs – ultra-long-acting β_2 -adrenergic receptor agonists)

Dlouhodobě účinná β_2 -adrenomimetika jsou limitována dvanáctihodinovým trváním účinku, z čehož vyplývá nutnost podávat je dvakrát denně. Ve snaze zlepšit pacientovu compliance byla vyvinuta řada nových látek, u nichž si vystačíme s podáváním jednou denně.

Indakaterol má mimořádně rychlý nástup a dlouhé trvání účinku (24 hodin). Ukázalo se, že neantagonizuje účinky SABA (na rozdíl např. od salmeterolu), což je důležité při rychle se zhoršující bronchokonstrikci. Terapeutickou možností ke zvládnutí takové situace je přidání některého SABA jako záchranného léku vedoucí k rychlé úlevě od bronchospazmu. Indacaterol je tolerován ve všech dosud testovaných dávkách a má dobrý celkový bezpečnostní profil.⁶

Olodaterol je téměř úplný agonista na β_2 -adrenergických receptorech *in vitro*. Jeho bronchodilatační účinek přetrvává po dobu 24 hodin. Olodaterol je schopen na izolovaných lidských průduškách zvrátit konstrikci způsobenou různými podněty jako je např. histamin, acetylcholin nebo elektrické pole. V testovaných dávkách je dobře snášen.^{6,7}

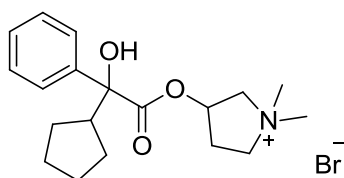
Vilanterol je derivát salmeterolu určený k monoterapii CHOPN nebo k terapii CHOPN a astma bronchiale v kombinaci s inhalačními kortikosteroidy.⁷ V lidské tkáni předem kontrahované histaminem vilanterol prokázal velmi rychlý nástup bronchodilatačního účinku (3,1 min) a jeho trvání v délce 22 hodin.⁶



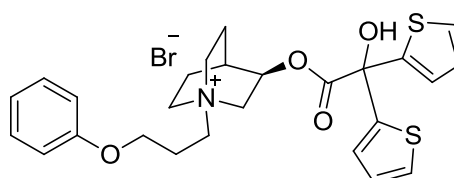
Dlouhodobě účinná antimuskarinika (LAMAs – long-acting muscarinic antagonists)

Glycopyrronium je antagonist muskarinových M₃ receptorů s velmi rychlým nástupem účinku a 24hodinovým bronchodilatačním působením. Na rozdíl od dosud používaných antimuskarinik klinické studie prokázaly, že vedlejší účinky glycopyrronia jsou srovnatelné s placebem.

Aclidinium má srovnatelný nástup účinku jako ipratropium, ale delší působení, zatímco v porovnání s tiotropiem má rychlejší nástup účinku ale kratší délku působení. Výhodou je, že na rozdíl od tiotropia je acclidinium rychle hydrolyzováno v plazmě a jeho metabolity ztrácí afinitu k muskarinovým receptorům, redukují se tak nechtěné vedlejší účinky.⁶



glycopyrronium bromid



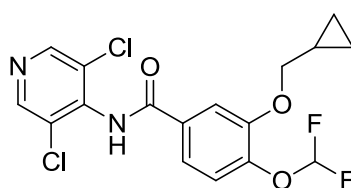
aclidinium bromid

Inhibitory fosfodiesterázy 4

Při zánětu, obstrukci a jejich rozvoji u CHOPN hrají zásadní úlohu buňky zánětu v dýchacích cestách. Vlivem inhalovaných škodlivin dochází ke stimulaci těchto buněk (makrofágy, neutrofily, CD₈+T-lymfocyty) a k uvolnění prozánětlivých mediátorů, např. interleukinů nebo proteáz (u CHOPN je hlavním izoenzymem uvolňovaným z buněk zánětu a z buněk hladké svaloviny fosfodiesteráza 4), které vyvolávají bronchiální hypersekreci, destrukci alveolů, plicní fibrózu i systémový zánět.

Mechanismus účinku inhibitorů fosfodiesterázy 4 (PDE₄) spočívá v selektivní inhibici právě tohoto enzymu, nedochází tak k odbourávání cyklického adenosinmonofosfátu (cAMP) a jeho zvýšená koncentrace potlačuje imunitní a zánětlivou reakci imunokompetentních buněk.

Zástupcem uvedeným na trh i v České Republice je roflumilast, který působí zmírnění bronchiální obstrukce sekundárně potlačením zánětu. Ze studií s roflumilastem vyplynulo, že lék snižuje počet exacerbací CHOPN.⁸



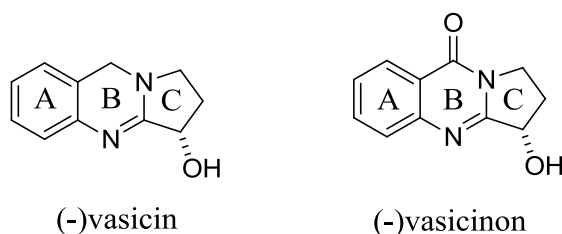
roflumilast

1.4. Justicia adhatoda

Justicia adhatoda (syn. *Adhatoda vasica*, česky *Nesměna cévnatá*) je zelený keř z čeledi *Acanthaceae* vyskytující se zejména v Indii, Malajsii a na Srí Lance. Pro své léčivé

účinky je užíván přes 2000 let a byl začleněn do manuálu WHO *The Use of Traditional Medicine in Primary Health Care* jako rostlina určená k terapii kašle, astmatu a hemeroidů.

Za jeho účinky (expektorační a antispastické) jsou zodpovědné především chinazolinové alkaloidy (-)vasicin (obsažený v listech, květech a kořenech) a (-)vasicinon (listy).



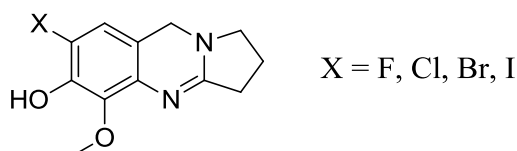
Kromě alkaloidů byla z rostliny získána i silice s bronchodilatačními a tokolytickými účinky. Rostlinný extrakt vykazoval účinky antitusické, antiastmatické, antiflogistické a antiulcerózní, přičemž u lihového extraktu bylo pozorováno i antioxidační působení a snížení mutagenních vlivů kadmia.

Vzhledem ke zmíněnému působení (-)vasicinu a (-)vasicinonu na dýchací systém byly tyto látky použity jako strukturální předloha pro přípravu jejich syntetických derivátů a dalších látek vycházejících ze skeletu těchto alkaloidů. Původní alkaloidy i látky nově připravené byly podrobeny testování na bronchodilatační aktivitu.

1.5. Alkaloidy (-)vasicin a (-)vasicinon a jejich syntetické deriváty

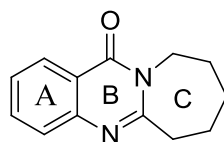
První syntéza racemického vasicinu a jeho jednoduchých derivátů byla publikována již v padesátých letech minulého století.⁹

K účinnějším derivátům vedla trisubstituce na kruhu A při současném odstranění hydroxylové skupiny z kruhu C.⁹



7-halogen-5-methoxy-1,2,3,9-tetrahydropyrrolo[2,1-*b*]chinazolin-6-ol

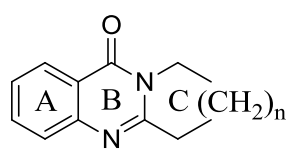
Stejně jako vasicin, tak i vasicinon byl podroben pokusům o totální syntézu a syntézu jeho derivátů soustřeďující se na modifikaci kruhu C. Zajímavou bronchodilatační aktivitu vykazovala látka označovaná jako RLX, kde je kruh C rozšířen na sedmičlenný (rovněž bez přítomnosti hydroxylové skupiny).⁹



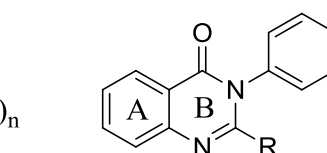
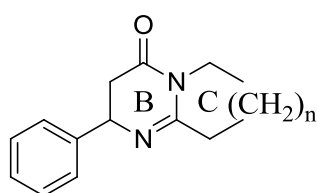
RLX

Další rozšíření kruhu C (na devítičlenný) nevedlo k výraznějšímu zvýšení bronchodilatační aktivity. Naopak dobrých účinků bylo dosaženo obměnou původní látky RLX a to na kruhu A (např. 2,3-derivát RLX s vyšší bronchodilatační aktivitou než teofylin i samotný RLX). K účinným látkám vedla i obměna kruhu C, např. substituce heteroatomem.

Byla zkoumána i nutnost přítomnosti kruhu A či C. Byly připraveny tři skupiny látek, kde první měla zachovány všechny tři kruhy A,B,C, přičemž kruh C byl s pěti až sedmi atomy uhlíku a kruh A byl u některých látek dále substituován. Další skupina látek neobsahovala kruh A, místo toho byl na kruh B navázán aryl v poloze 2. Třetí skupinu tvořily látky bez kruhu C s alkylem v poloze 2 a s arylem v poloze 3.



$n = 1,2,3$

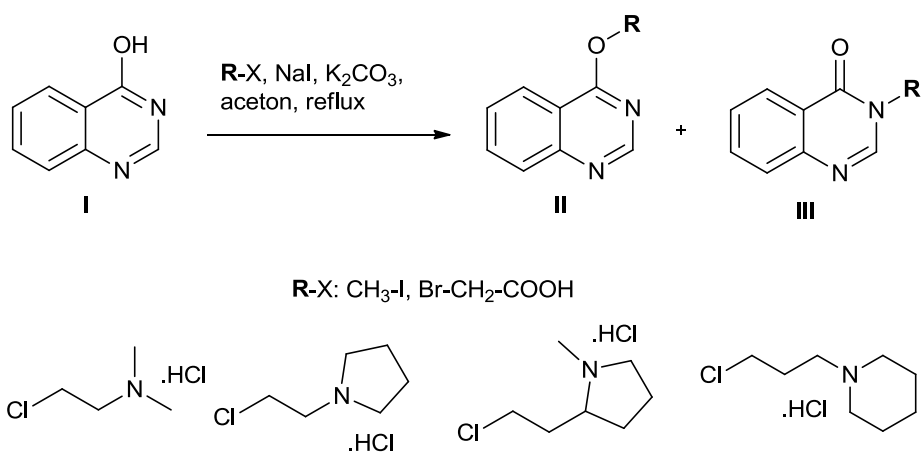


$R = -\text{CH}_3, -\text{C}_2\text{H}_5, -\text{C}_3\text{H}_7, -\text{C}_5\text{H}_{11}$

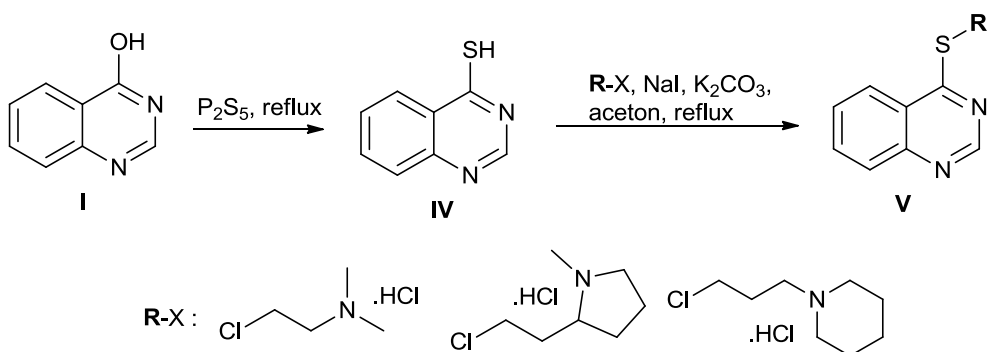
Všechny nově vzniklé látky byly podrobeny zkoušení jejich bronchodilatační aktivity na izolovanou tracheu potkana předem kontrahovanou histaminem nebo acetylcholinem. Z výsledků vyplynulo, že látky z druhé skupiny vykazovaly jen velmi slabou nebo vůbec žádnou bronchodilatační aktivitu. Byl vysloven závěr, že kruh A je pro zmíněný účinek naprosto nezbytný. Nejslibnějšími látkami z první skupiny se jevily ty, které obsahovaly ve své struktuře sedmičlenný kruh C. Látky ze třetí skupiny byly schopny dilatovat pouze bronchospasmus navozený histaminem. Jako nejvhodnější se ukázaly deriváty s kratším alifatickým řetězcem (metyl, etyl) a bez substituce na fenylu v poloze 3.⁹

1.6. Strukturní revize a bronchodilatační aktivita syntetických derivátů (-)vasicinonu připravených na Farmaceutické fakultě v Hradci Králové

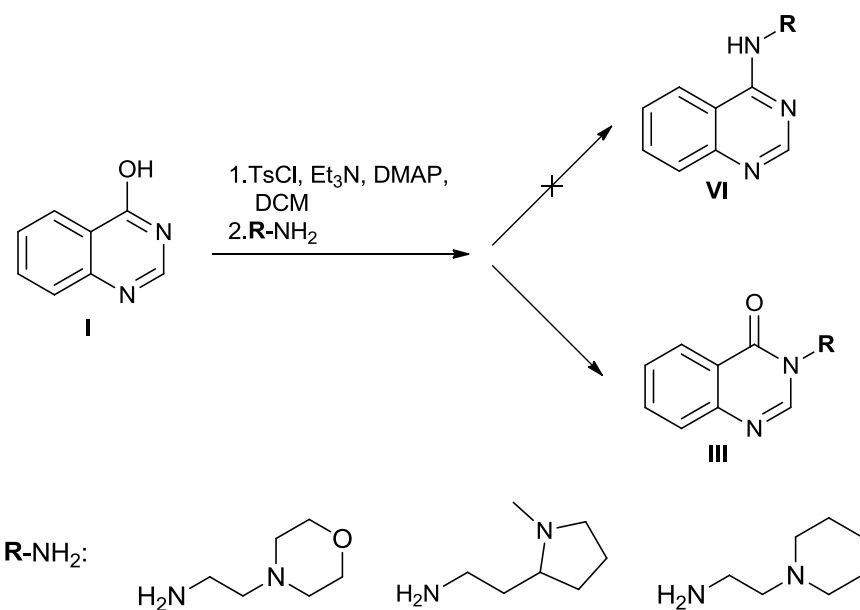
Reakcí chinazolin-4-olu (**I**) s alkylačními činidly v acetonu za přítomnosti uhličitanu draselného nebyl získán, jak bylo původně předpokládáno, *O*-alkylovaný derivát (**II**), ale chinazolin (**III**), který byl substituován na dusíku v poloze 3. Pozice alkyly byla určena především díky ^{13}C NMR experimentům, kde hodnota posunu atomu uhlíku vázaného na chinazolinový skelet ležela v oblasti 45-50 ppm.¹⁰



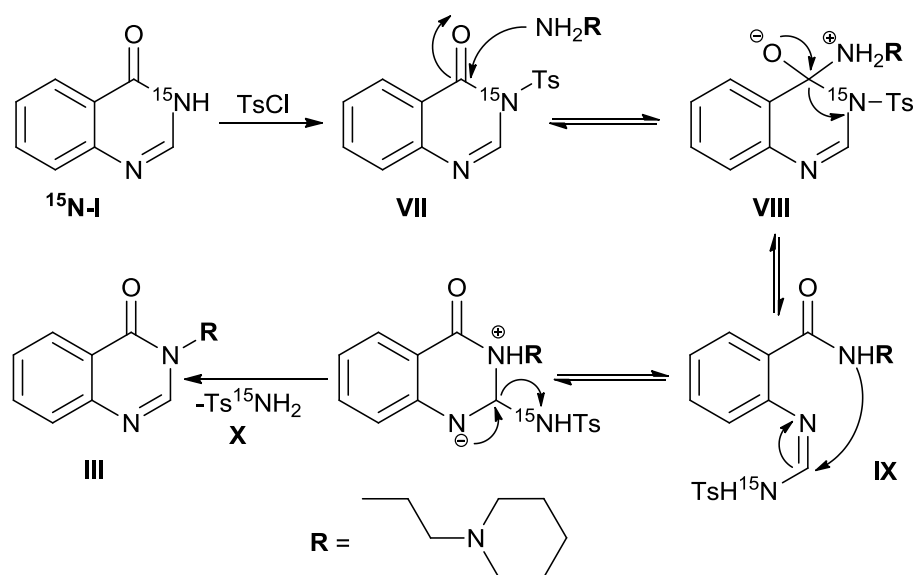
Při alkylationi chinazolin-4-thiolu (**IV**) tato situace nenastala, atom síry je dostatečně nukleofilní, aby alkylace vedla pouze k 4-alkylsulfanylchinazolinům (**V**).



Syntéza derivátů chinazolinu s alkylovým fragmentem vázaným přes atom dusíku (**VI**) v poloze 4 byla prováděna tosyací hydroxyly výchozího chinazolinu (**I**) a následným atakem aminu. Jak bylo zjištěno z NMR a MS spekter, reakce však tímto směrem vůbec neproběhla a jediné izolované produkty odpovídaly *N*-alkylovaným derivátům (**III**).¹⁰

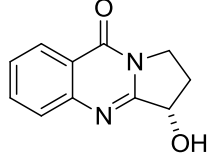
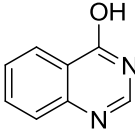
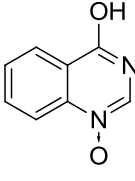
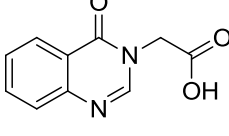
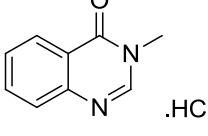
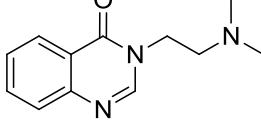
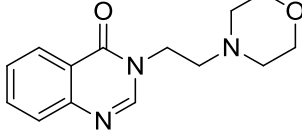
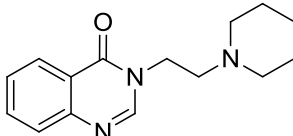
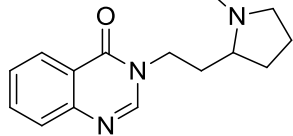
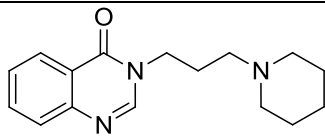


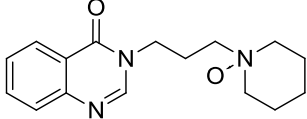
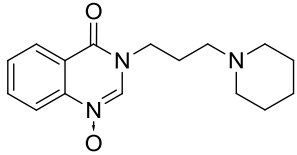
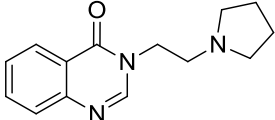
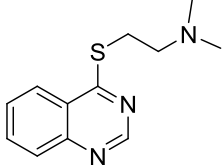
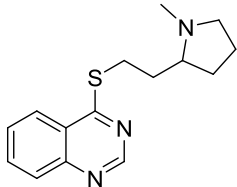
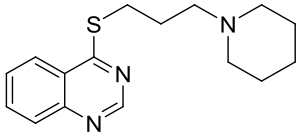
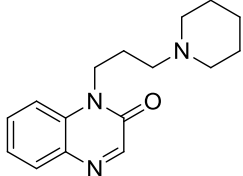
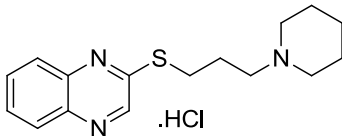
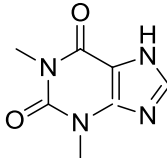
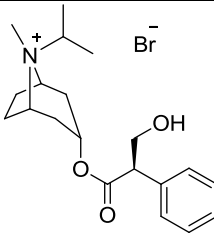
Pro jejich vznik byla navržena hypotéza zahrnující otevření a opětovné uzavření kruhu heterocyklu, které je provázeno odštěpením molekuly sulfonamidu. Ta byla dále podpořena inkorporací značeného dusíku (^{15}N) do molekuly výchozího chinazolinu. Tosylace (podobně jako alkylační reakce) probíhá do polohy 3 (**VII**), následný atak aminu pak vede k otevření kruhu (**VIII**) a po odstoupení tosylamidu (**X**) dochází ke tvorbě derivátů typu **III**.¹⁰



V následující tabulce je uveden přehled dosud připravených derivátů (-)vasicinonu s opravenými strukturami a jejich bronchodilatační aktivita. Je zřejmé, že ke zvýšení biologického efektu přispívá především alkylový fragment s bazickou skupinou, jako nejaktivnější se ukázal piperidinpropylový řetězec.

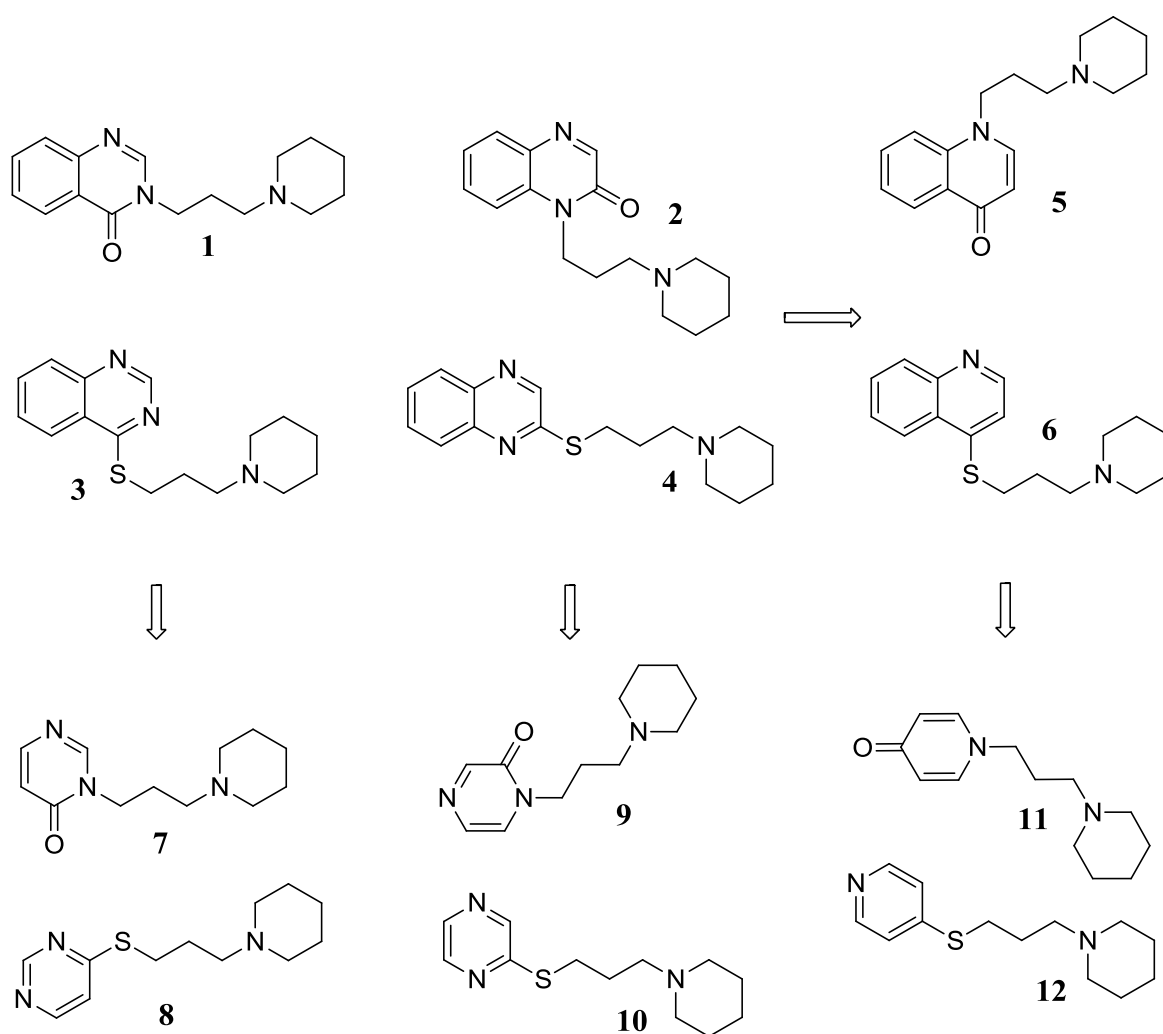
Tab.1. Přehled dosud připravených derivátů

Název	Vzorec	ED ₅₀ (μmol/l)
(-)-Vasicinon		2864
Chinazolin-4-ol		1742
4-Hydroxychinazolin-1-oxid		1313
Kyselina (4-oxo-3,4-dihydro- -chinazolin-3-yl)octová		neaktivní
3-Methyl-3,4-dihydro- -chinazolin-4-on hydrochlorid		519
3-(<i>N,N</i> -Dimethylaminoethyl)- -3,4-dihydrochinazolin-4-on		440
3-[2-(Morfolin-4-yl)ethyl]- -3,4-dihydrochinazolin-4-on		1699
3-[2-(Piperidin-1-yl)ethyl]- -3,4-dihydrochinazolin-4-on		186
3-[2-(1-Methylpyrrolidin-2-yl)ethyl]- -3,4-dihydrochinazolin-4-on		102
3-[3-(Piperidin-1-yl)propyl]- -3,4-dihydrochinazolin-4-on		28

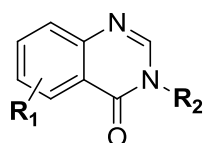
1-[3-(4-Oxo-3,4-dihydrochinazolin-3-yl)propyl]piperidin-1-oxid		601
4-Oxo-[3-(piperidin-1-yl)-propyl]-3,4-dihydrochinazolin-1-oxid		45,3
3-[2-(Pyrrolidin-1-yl)-ethyl]-3,4-dihydrochinazolin-4-on		598
4-(<i>N,N</i> -Dimethylamino-ethylsulfanyl)chinazolin		54
4-[2-(1-Methylpyrrolidin-2-yl)ethylsulfanyl]-chinazolin		69
4-[3-(Piperidin-1-yl)-propylsulfanyl]chinazolin		3,65
1-[3-(Piperidin-1-yl)propyl]-1,2-dihydrochinoxalin-2-on		43
2-[3-(Piperidin-1-yl)propylsulfanyl]chinoxalin hydrochlorid		3,26
Teofylin		2090
Ipratropium bromid		0,0015

2. CÍL PRÁCE

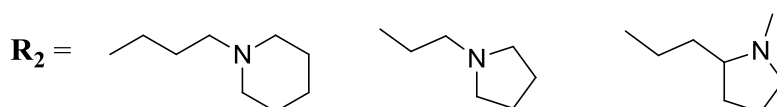
Ve své diplomové práci jsem navázala na dosud bronchodilatačně neaktivnější připravené deriváty (-)vasicinonu, což byl chinazolin a chinoxalin nesoucí 3-(piperidin-1-yl)propylový fragment vázaný na atom dusíku heterocyklu (**1**, **2**) nebo přes atom síry na uhlík tohoto skeletu (**3**, **4**). Mým cílem bylo nejprve syntetizovat příslušná analoga odvozená od benzodiazinů se zmíněným fragmentem, avšak obsahující pouze jeden heteroatom, v tomto případě chinolin (**5**, **6**), a následně potvrdit nezbytnost přítomnosti kruhu A (benzenové jádro) v těchto sloučeninách, což by vedlo k syntéze derivátů pyrimidinu (**7**, **8**), pyrazinu (**9**, **10**) a pyridinu (**11**, **12**).



Pokud by výsledky *in vitro* testování bronchodilatačních aktivit syntetizovaných látek prokázaly výraznější snížení jejich efektivity, dalším krokem by pak mohl být pokus o modifikaci kruhu A chinazolinu zejména halogen nebo methoxy skupinami (**R**₁) a výsledné produkty by poté byly alkylovány fragmenty (**R**₂), u nichž je možno předpokládat kladný příspěvek k bronchodilatační účinnosti.



R₁ = 7 - Cl, 7 - Br, 7 - MeO, 6 - MeO, 6,7 - diMeO



3. VÝSLEDKY S KOMENTÁŘEM

3.1. Syntéza první série derivátů

Redukce počtu atomů dusíku ze dvou v molekule chinazolinu na jeden vede k příslušným derivátům chinolinu. Výchozí látkou byl komerčně dostupný chinolin-4-ol (**13**), který byl alkylován 1-(3-chlorpropyl)piperidin hydrochloridem (**14**) za podmínek Williamsonovy syntézy s přidavkem jodidu sodného z důvodu urychlení reakce (*in situ* záměna atomu chloru za atom jodu v alkylačním činidle). Reakce probíhala v prostředí acetonu za varu po dobu 24 hodin a produkt byl následně izolován sloupcovou chromatografií s výtěžkem 89 % (Schéma 1). Jak jsme zjistili z naměřených ^{13}C NMR spekter, piperidinpropylový fragment se nenavázal na atom kyslíku, ale na atom dusíku v poloze 1 chinolinu. Hodnota posunu pro atom uhlíku navázaný na chinolin činí 50.2 ppm, což odpovídá sousedství atomu dusíku. Selektivita této alkylace je ekvivalentní alkylační reakci na chinazolinonu.¹⁰

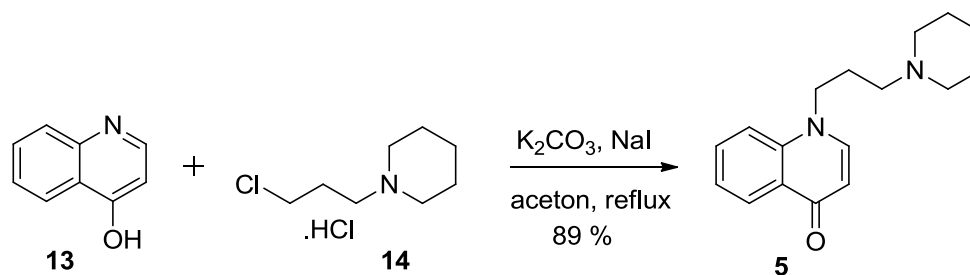
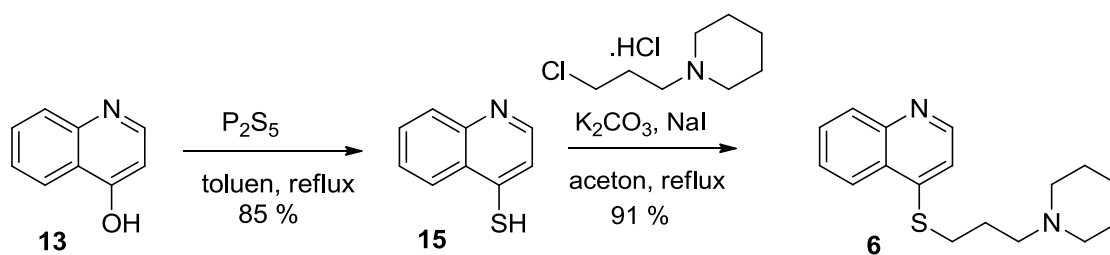


Schéma 1

Při syntéze derivátu chinolinu s alkylovým fragmentem vázaným přes atom síry bylo nejprve zapotřebí připravit odpovídající thiol (**15**). Chinolin-4-ol byl podroben reakci s ekvimolárním množstvím sulfidu fosforečného za varu v toluenu po dobu 12 hodin (Schéma 2). Produkt byl přečištěn sloupcovou chromatografií s výtěžkem 85 %. Alkylation získaného chinolin-4-thiolu (**15**) jsme provedli 1-(3-chlorpropyl)piperidin hydrochloridem (**14**) výše popsáním způsobem. Na rozdíl od předchozí syntézy nedochází k alkylationi na atomu dusíku, ale na nukleofilnějším atomu síry. Produkt (**6**) byl izolován sloupcovou chromatografií s výtěžkem 91 %.



U obou dvou připravených chinolinů (**5**, **6**) byla stanovena hodnota bronchodilatační aktivity. Výsledky jsou shrnuty v Tab. 2.

Tab. 2. Bronchodilatační aktivity připravených látek a standardů

Název	Vzorec	Mr	ED ₅₀ (μmol/l)
1-[3-(piperidin-1-yl)propyl]-1,4-dihydrochinolin-4-on(5)		270,37	946
4-[3-(piperidin-1-yl)propylsulfanyl]chinolin(6)		286,43	58,7
(-)-Vasicinon		202,21	2864
Teofylin		180,16	2090
Ipratropium bromid		412,36	0,0015

Z výsledků bronchodilatační aktivity vyplývá, že snížení počtu atomů dusíku v heterocyklu ze dvou na jeden vedlo k výraznému snížení aktivity v porovnání s předlohovými strukturami chinazolinu (Tab. 1) a to v případě obou syntetizovaných látek.

3.2. Syntéza druhé série derivátů

Odstranění kruhu A u bronchodilatačně aktivních derivátů chinazolinu vede k 3-substituovanému pyrimidinu (**7**). Alkylační reakce (Schéma 3) byla provedena za totožných podmínek (a podobného výtěžku po přečištění na sloupci silikagelu) jako u předešlých syntéz a také vedla k *N*-substituovanému derivátu (45.3 ppm v uhlíkových spektrech).

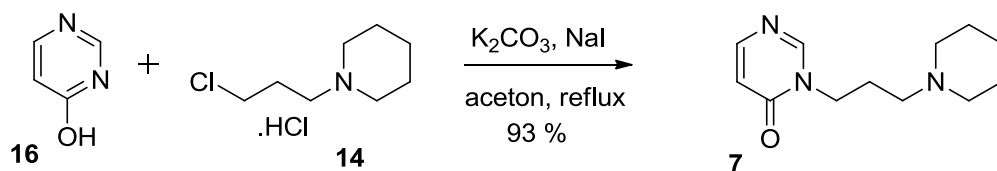


Schéma 3

Také jako v případě derivátů chinolinu (kap. 3.1.) jsme sledovali vliv počtu atomů dusíku v heterocyklu a alkylation pyridin-4-olu (**17**) byl připraven odpovídající pyridon **11** (Schéma 4).

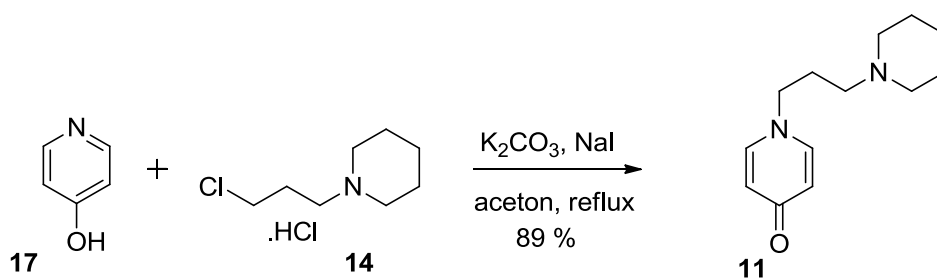
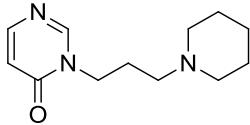
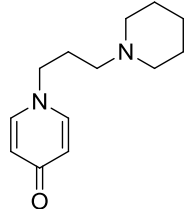
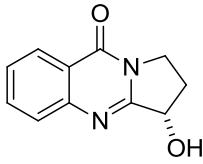
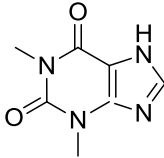
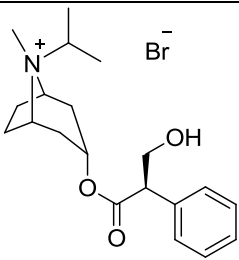


Schéma 4

Bronchodilatační aktivita obou látek je shrnuta v Tabulce 3. Je zřejmé, že odstranění kruhu A u předlokové struktury má za následek znatelný pokles biologického efektu, v případě pyridinu **11** jeho úplné vymizení. Z tohoto důvodu nebyla syntéza původně zamýšlených derivátů **8,9,10,12** realizována.

Tab. 3. Bronchodilatační aktivity připravených látek a standardů

Název	Vzorec	Mr	ED ₅₀ (μmol/l)
3-[3-(piperidin-1-yl)propyl]- 3,4-dihydropyrimidin-4-on (7)		220,31	1120
1-[3-(piperidin-1-yl)propyl]- 1,4-dihydropyridin-4-on (11)		221,30	4230
(-)-Vasicinon		202,21	2864
Teofylin		180,16	2090
Ipratropium bromid		412,36	0,0015

3.3. Syntéza třetí série derivátů

Další možnost, jak modifikovat strukturu výchozího chinazolinu **1**, spočívá v derivatizaci kruhu A. Syntéza vychází z komerčně dostupných substituovaných anthranilových kyselin; vybrány byly především methoxy- a halogenderiváty (Schéma 5). Reakce byly provedeny zahříváním příslušné kyseliny s formamidem na 180 °C po dobu několika hodin a po ochlazení reakční směsi byl vzniklý produkt přečištěn pomocí sloupcové chromatografie.

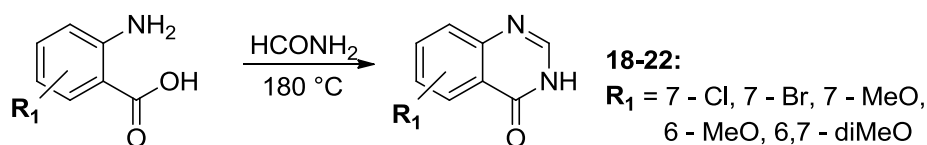


Schéma 5

Přehled připravených derivátů 3,4-dihydrochinazolin-4-onu a výtěžků reakcí je uveden v následující tabulce (Tab. 4). 6,7-Dimethoxy derivát **22** se i přes několikeré opakování reakce nepodařilo připravit, resp. reakce vedla ke směsi produktu a dalších látek, kterou nebylo možné účinně rozdělit pomocí sloupcové chromatografie.

Tab. 4. Souhrn syntetizovaných derivátů chinazolinu

Název	Vzorec	Výtěžek
7-chlor-3,4-dihydrochinazolin-4-on (18)		48 %
7-brom-3,4-dihydrochinazolin-4-on (19)		87 %
6-methoxy-3,4-dihydrochinazolin-4-on (20)		55 %
7-methoxy-3,4-dihydrochinazolin-4-on (21)		63 %
6,7-dimethoxy-3,4-dihydrochinazolin-4-on (22)		0 %

K cíli nevedly ani pokusy připravit 6,7-dimethoxy derivát z methylesteru příslušné anthranilové kyseliny **23** (Schéma 6), a i přes dvojí opakování reakce dle publikované metody,¹¹ bylo dosaženo podobných výsledků jako při předchozích syntézách.

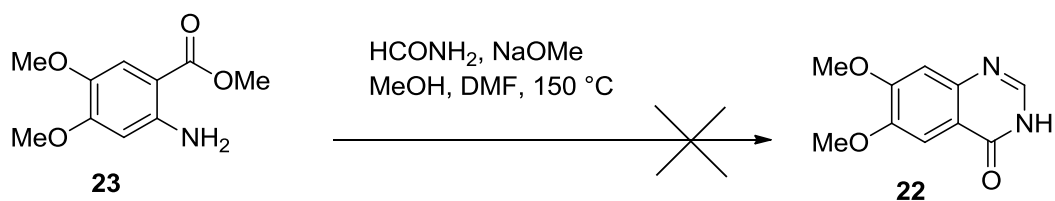


Schéma 6

Alkylační reakce připravených chinazolinů probíhaly podle stejného postupu jako v předchozích případech. Vybrány byly fragmenty, které prokázaly nejvyšší bronchodilatační aktivitu: 3-(piperidin-1-yl)propyl, 2-(pyrrolidin-1-yl)ethyl a 2-(1-methylpyrrolidin-2-yl)ethyl (Schéma 7). Výtěžky reakcí (Tab. 5.) ovšem nedosahovaly hodnot předešlých syntéz a nevedly pouze k jednomu produktu. V případě látky **28** byl učiněn pokus o separaci minoritního produktu, a ačkoliv nebyl izolován v dostatečné čistotě, NMR spektra naznačila, že se pravděpodobně jedná o produkt *O*-alkylace. Na regioselektivitě této nukleofilní substituce by se tedy mohla podílet svými elektronovými vlastnostmi i skupina přítomná na kruhu A.

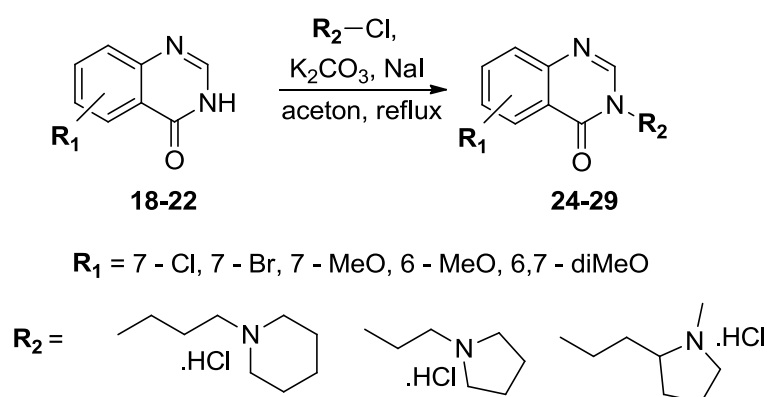
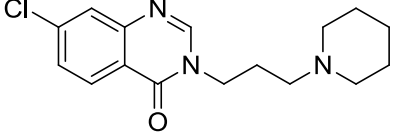
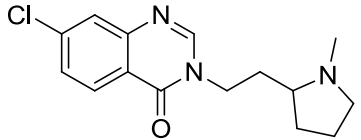
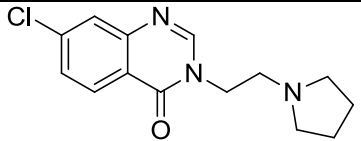
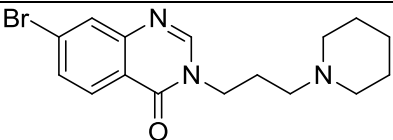
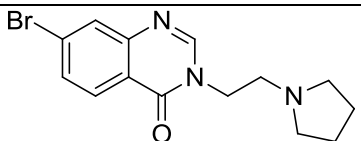
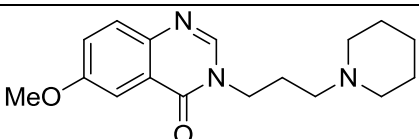


Schéma 7

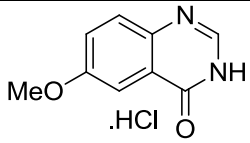
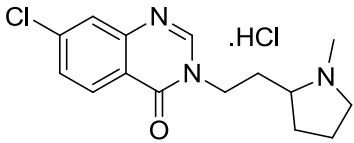
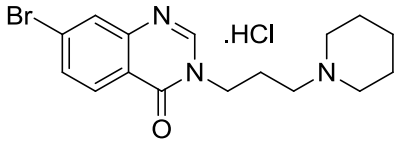
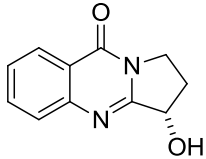
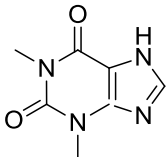
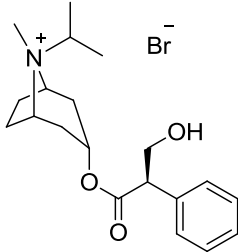
Tab. 5. Přehled připravených látek

Název	Vzorec	Výtěžek
7-chlor-3-[3-(piperidin-1-yl)propyl]-3,4-dihydrochinazolin-4-on (24)		51 %
7-chlor-3-[2-(1-methylpyrrolidin-2-yl)ethyl]-3,4-dihydrochinazolin-4-on (25)		51 %
7-chlor-3-[2-(pyrrolidin-1-yl)ethyl]-3,4-dihydrochinazolin-4-on (26)		47 %
7-brom-3-[3-(piperidin-1-yl)propyl]-3,4-dihydrochinazolin-4-on (27)		49 %
7-brom-3-[2-(pyrrolidin-1-yl)ethyl]-3,4-dihydrochinazolin-4-on (28)		58 %
6-methoxy-3-[3-(piperidin-1-yl)propyl]-3,4-dihydrochinazolin-4-on (29)		49 %

Některé z připravených derivátů již byly testovány na bronchodilatační aktivitu (Tab 6.). Na rozdíl od přechozích sérií, kdy byla rozpustnost látek ve vodném médiu dostačující k provedení *in vitro* testů, musely se tyto chinazoliny převést na hydrochloridy **30-32**.

Výsledky biologického hodnocení naznačují, že např. přítomnost atomu bromu v poloze 7 chinazolinu dokáže zvýšit bronchodilatační aktivitu o jeden řád (viz Tab. 1.). Zde je patrné, jakým způsobem by se měl ubírat směr dalšího vývoje účinných substancí.

Tab. 6. Bronchodilatační aktivity připravených látek a standardů

Název	Vzorec	ED ₅₀ (μmol/l)
6-methoxy-3,4-dihydrochinazolin-4-on hydrochlorid (30)		186
7-chlor-3-[2-(1-methylpyrrolidin-2-yl)ethyl]-3,4-dihydrochinazolin-4-on hydrochlorid (31)		75,5
7-brom-3-[3-(piperidin-1-yl)propyl]-3,4-dihydrochinazolin-4-on hydrochlorid (32)		2,5
(-)-Vasicinon		2864
Teofylin		2090
Ipratropium bromid		0,0015

4. ZÁVĚR

V rámci mé diplomové práce jsem provedla syntézu 14 derivátů chinazolinu strukturně odvozených z molekul alkaloidů (-)vasicinu a (-)vasicinonu, látek působících relaxačně

na hladkou svalovinu bronchů a trachey.

Redukce počtu atomů dusíku v předlohových strukturách ze dvou na jeden vedla k příslušným *N*- a *S*-alkylovaným derivátům chinolinu. Obě látky byly testovány *in vitro* na bronchodilatační aktivitu. Výsledky ovšem naznačily znatelné snížení biologického efektu.

Podobně byly připraveny i deriváty druhé řady. Zde byl odstraněn kruh A z předlohové struktury, ale stejně jako v předchozím případě byla bronchodilatační aktivita látek výrazně snížena.

Naproti tomu, podle prvních výsledků testování derivátů chinazolinu substituovaných na kruhu A, lze usuzovat, že tyto látky by mohly být vhodným odrazovým můstkem pro další vývoj potenciálních bronchodilatačně aktivních sloučenin.

5. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

5.1. Obecné experimentální postupy

Výchozí látky byly zakoupeny od firmy Sigma-Aldrich a použity bez čištění. Teploty tání všech látek byly měřeny na přístroji STUART SMP 30 a nebyly korigovány. Měření IČ spekter všech látek bylo provedeno na přístroji NICOLET 6700 FT-IR. Hmotnostní spektra látek byla měřena na hmotnostním spektrometru AGILENT Technologies 500 IonTrap LC/MS. NMR spektra byla měřena v roztocích DMSO- d_6 , a CD_3OD při laboratorní teplotě na přístroji VARIAN MERCURY – Vx BB 300 pracujícím při 300 MHz pro 1H a při 75 MHz pro ^{13}C . Chemické posuny byly změřeny jako hodnoty δ v parts per million (ppm) a byly nepřímo vztaženy k tetramethylsilanu jako standardu pomocí zbytkového signálu rozpouštědla. Data jsou prezentována v následujícím pořadí: chemický posun (δ), integrovaná intenzita (v protonových spektrech), multiplicita a interakční konstanty (Hz). Všechna přiřazení byla provedena na základě 1D experimentů. Průběh reakce a čistota výsledných produktů byla kontrolována pomocí tenkovrstvé chromatografie na aluminiových TLC deskách Silica gel 60 F254 (Merck) s detekcí pod UV lampou. Silikagel 60 (230-240 mesh) pro sloupcovou chromatografii byl zakoupen od firmy E. Merck.

5.2. Použité experimentální postupy při biologickém hodnocení

K hodnocení bronchodilatační aktivity syntetizovaných látek byla použita modifikovaná *in vitro* metodika podle Castillo a de Beera. Testování probíhalo na izolované trachee samců potkana kmene Wistar. Trachea byla z těla potkana přenesena do Schullerovy nádoby naplněné Krebs-Henseleitovým živným roztokem (pH 7,8) o složení (mM): NaCl 116.3, KCl 4.7, $CaCl_2$ 2.5, $MgSO_4$ 1.2, KH_2PO_4 1.2, $NaHCO_3$ 25.0 a glukóza 11.1 a posléze upevněna pomocí ligatur jedním koncem k fritě zásobující živný roztok pneumoxidem a druhým na izotonický převodník spojený s registračním zařízením (zapisovačem).

Aparatura byla již dříve kalibrována pomocí dvou závaží o hmotnosti 1 a 2 g. Preparát byl zatížen na 2 g. Stabilizace trvala 30 min, přičemž každých 10 min byla prováděna výměna živného roztoku. Po uplynutí 30 min bylo zatížení sníženo na 1 g. Preparát byl připraven ve chvíli, kdy se křivka záznamu stabilizovala ve fázi plató.

Do lázně naplněné živným roztokem byl přidán karbachol o koncentraci 10^{-5} M kontrahující tracheu. Po dosažení maximální kontrakce byl proveden výplach trachey a na 10 min byla ponechána možnosti vlastní relaxace. Další dávkou karbacholu (10^{-5} M) byla trachea opět kontrahována. Následovalo přidávání kumulativní dávky vodného roztoku testované látky ve vzrůstající koncentraci. Další dávka testované látky byla přidána vždy až po stabilizované odpovědi hladkého svalstva průdušnice na předcházející koncentraci. Na konci experimentu byl přidán teofylin v koncentraci 3×10^{-3} M, čímž došlo k úplné relaxaci hladkého svalstva. Relaxace navozená jednotlivými dávkami testované látky byla porovnávána s touto maximální relaxací navozenou teofylinem a výsledek byl vyjádřen v procentech. Teofylin zde slouží jako pozitivní kontrola (koncentrace 10^{-7} , 10^{-6} , 10^{-5} , 10^{-4} , 2.5×10^{-4} , 5×10^{-4} , 7.5×10^{-4} a 10^{-3} M).

Získané hodnoty byly zadány do programu GraphPad Prism 5. Na osu X byl nanesen log koncentrace testované látky, na osu Y procentuální relaxace tkáně. Metodou nelineární regrese byla získána DRC křivka a odečtena hodnota ED_{50} (dávka látky vyvolávající polovinu maximální odpovědi). Výsledky jsou vyjádřeny jako $ED_{50} \pm SEM$ pro každou testovanou látku. $ED_{50} \pm SEM$ pro teofylin, používaný jako standard, je $2090 \pm 43 \mu\text{mol/l}$.¹²

5.3. Obecný postup alkylačních reakcí

Syntéza látek **5-7**, **11**, **24-29** proběhla rozpuštěním výchozí baze (0.50 mmol) (**13**, **15-22**) v acetonu (5 ml), poté byl přidán bezvodý uhličitán draselný (2.5 mmol), jodid sodný (0.05 mmol) a příslušný alkylchlorid (0.50 mmol). Reakční směs byla míchána za varu rozpouštědla po dobu 24 hodin. Po jejím ochlazení byl přidán ethyl-acetát (10 ml) a směs byla vytřepána s nasyceným vodným roztokem chloridu sodného (10 ml). Organická fáze byla vysušena (Na_2SO_4) a produkty byly čištěny pomocí sloupcové chromatografie (gradientová eluce, EtOAc : MeOH (100 : 0 – 50 : 50)).

1-[3-(Piperidin-1-yl)propyl]-1,4-dihydrochinolin-4-on (5). Výtěžek: 89 %; nažloutlá amorfnní látka (lit.¹³ zmiňuje olej); **$^1\text{H NMR}$** : (300 MHz, CD_3OD) δ 8.18-8.14 (1H, m, Ar), 7.95 (1H, d, $J=7.7$ Hz, Ar), 7.77-7.65 (2H, m, Ar), 7.38-7.32 (1H, m, Ar), 6.01 (1H, d, $J=7.7$ Hz, Ar), 4.24 (2H, t, $J=7.1$ Hz, NCH_2), 2.28-2.18 (6H, m, $3 \times \text{NCH}_2$), 1.91-1.81 (2H, m, CH_2), 1.52-1.30 (6H, m, $3 \times \text{CH}_2$); **$^{13}\text{C NMR}$** : (75 MHz, CD_3OD) δ 176.5, 144.9, 139.9, 132.1, 127.0, 126.0, 123.3, 116.7, 108.7, 55.0, 54.1, 50.2, 25.8, 25.6, 24.3; **IR**: 1040, 1122, 1143, 1177, 1230, 1267, 1394, 1432, 1488, 1575, 1621, 2856, 2935 cm^{-1} ; **LRMS (APCI)**: m/z (relativní

intenzita) 271.6 [M+H]⁺ (21), 255.5 (3), 223.6 (5), 186.5 (2), 160.6 (7), 146.6 (6), 126.6 (61), 98.6 (100).

4-[3-(Piperidin-1-yl)propylsulfanyl]chinolin (6). Výtěžek: 91 %; žlutá amorfnní látka (lit.¹⁴ 47-49 °C); ¹H NMR: (300 MHz, CD₃OD) δ 8.67 (1H, d, *J*=4.9 Hz, Ar), 8.18-8.14 (1H, m, Ar), 8.01-7.97 (1H, m, Ar), 7.80-7.76 (1H, m, Ar), 7.64-7.60 (1H, m, Ar), 7.52 (1H, d, *J*=4.9 Hz, Ar), 3.35-3.14 (8H, m, 4xCH₂), 2.52-2.45 (2H, m, CH₂), 1.90-1.82 (4H, m, 2xCH₂), 1.68-1.60 (2H, m, CH₂); ¹³C NMR: (75 MHz, CD₃OD) δ 150.3, 149.5, 147.8, 131.5, 129.7, 127.9, 127.7, 124.6, 117.5, 57.1, 54.5, 28.6, 24.4, 23.6, 22.9; IR: 1038, 1140, 1205, 1292, 1418, 1456, 1472, 1540, 1558, 1616, 2939 cm⁻¹; LRMS (APCI): *m/z* (relativní intenzita) 287.6 [M+H]⁺ (56), 222.6 (4), 202.5 (10), 174.5 (6), 158.6 (32), 126.7 (64), 98.6 (100).

3-[3-(Piperidin-1-yl)propyl]-3,4-dihydropyrimidin-4-on (7). Výtěžek: 93 %; nažloutlá amorfnní látka; ¹H NMR: (300 MHz, DMSO-*d*₆) δ 8.41 (1H, bs, Ar), 7.86 (1H, dd, *J*₁=6.6 Hz, *J*₂=0.6 Hz, Ar), 6.34 (1H, dd, *J*₁=6.6 Hz, *J*₂=0.9 Hz, Ar), 3.87 (2H, t, *J*=6.7 Hz, NCH₂), 2.25-2.14 (6H, m, 3xNCH₂), 1.90-1.79 (2H, m, CH₂), 1.43-1.25 (6H, m, 3xCH₂); ¹³C NMR: (75 MHz, DMSO-*d*₆) δ 160.4, 153.7, 153.2, 114.9, 55.5, 54.0, 45.3, 25.7, 24.9, 24.3; IR: 995, 1015, 1048, 1082, 1131, 1149, 1172, 1205, 1223, 1263, 1304, 1400, 1432, 1527, 1584, 1655, 2764, 2939 cm⁻¹; LRMS (APCI): *m/z* (relativní intenzita) 222.6 [M+H]⁺ (100), 138.6 (15), 126.7 (12), 109.6 (8), 98.6 (27), 86.6 (2).

1-[3-(Piperidin-1-yl)propyl]-1,4-dihydropyridin-4-on (11). Výtěžek: 89 %; nažloutlá amorfnní látka; ¹H NMR: (300 MHz, CD₃OD) δ 7.85 (2H, d, *J*=7.5 Hz, Ar), 6.44 (2H, d, *J*=7.5 Hz, Ar), 4.06 (2H, t, *J*=7.2 Hz, NCH₂), 2.76-2.48 (6H, m, 3xNCH₂), 2.15-2.05 (2H, m, CH₂), 1.72-1.65 (4H, m, 2xCH₂), 1.56-1.46 (2H, m, CH₂); ¹³C NMR: (75 MHz, CD₃OD) δ 180.7, 143.2, 118.5, 55.7, 55.5, 54.9, 27.7, 25.7, 24.2; IR: 968, 1016, 1087, 1193, 1280, 1401, 1446, 1548, 1640, 2947 cm⁻¹; LRMS (APCI): *m/z* (relativní intenzita) 221.6 [M+H]⁺ (100), 195.6 (8), 127.6 (55), 110.6 (3), 82.6 (2), 70.6 (3).

7-Chlor-3-[3-(piperidin-1-yl)propyl]-3,4-dihydrochinazolin-4-on (24). Výtěžek: 51 %; bílá krystalická látka, t.t. 93-96 °C; ¹H NMR: (300 MHz, CD₃OD) δ 8.35 (1H, s, H₂), 8.08 (1H, d, *J*=8.5 Hz, Ar), 7.57 (1H, d, *J*=1.6 Hz, Ar), 7.44 (1H, dd, *J*₁=1.6 Hz, *J*₂=8.5 Hz, Ar), 4.09-4.01 (2H, m, NCH₂), 2.62-2.50 (6H, m, 3xNCH₂), 2.10-1.98 (2H, m, CH₂), 1.67-1.58 (4H, m, 2xCH₂), 1.56-1.43 (2H, m, CH₂); ¹³C NMR: (75 MHz, CD₃OD) δ 161.9, 150.5, 150.1, 141.4, 129.1, 128.7, 127.3, 121.6, 56.5, 55.1, 46.4, 26.1, 26.1, 24.7; IR: 996, 1045, 1065, 1088, 1124, 1165, 1246, 1257, 1318, 1378, 1462, 1556, 1604, 1666, 2851, 2935 cm⁻¹; LRMS (APCI): *m/z* (relativní intenzita) 306.6 [M+H]⁺ (100), 221.6 (52), 193.5 (3), 163.6 (2), 124.7 (1), 98.6 (1).

7-Chlor-3-[2-(1-methylpyrrolidin-2-yl)ethyl]-3,4-dihydrochinazolin-4-on (25).

Výtěžek: 51 %; bílá krystalická látka, t.t. 65-68 °C; ¹H NMR: (300 MHz, CD₃OD) δ 8.35 (1H, s, Ar), 8.16 (1H, d, *J*=8.3 Hz, Ar), 7.63 (1H, d, *J*=1.4 Hz, Ar), 7.49 (1H, dd, *J*₁=1.4 Hz, *J*₂=8.3 Hz, Ar), 4.12-4.02 (2H, m, NCH₂), 3.08-3.02 (1H, m, NCH), 2.32 (3H, s, NCH₃), 2.23-2.10 (4H, m, 2xCH₂), 1.78-1.58 (4H, m, 2xCH₂); ¹³C NMR: (75 MHz, CD₃OD) δ 161.9, 150.4, 150.2, 141.5, 129.2, 128.9, 127.4, 121.7, 65.3, 57.8, 45.8, 40.5, 33.6, 31.3, 22.7; IR: 951, 1070, 1110, 1247, 1289, 1370, 1458, 1557, 1603, 1678, 2780, 2947 cm⁻¹; LRMS (APCI): *m/z* (relativní intenzita) 292.6 [M+H]⁺ (100), 249.5 (2), 181.5 (5), 112.7 (4), 81.6 (10).

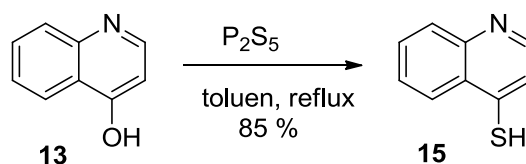
7-Chlor-3-[2-(pyrrolidin-1-yl)ethyl]-3,4-dihydrochinazolin-4-on (26). Výtěžek: 47 %; bílá krystalická látka, t.t. 130-134 °C; ¹H NMR: (300 MHz, CD₃OD) δ 8.35 (1H, s, H₂), 8.08 (1H, d, *J*=8.5 Hz, Ar), 7.57 (1H, d, *J*=1.6 Hz, Ar), 7.44 (1H, dd, *J*₁=1.6 Hz, *J*₂=8.5 Hz, Ar), 4.09-4.01 (2H, m, NCH₂), 2.62-2.50 (2H, m, NCH₂), 2.10-1.98 (4H, m, 2xCH₂), 1.67-1.58 (4H, m, 2xCH₂), 1.56-1.43 (2H, m, CH₂); ¹³C NMR: (75 MHz, CD₃OD) δ 162.0, 150.6, 150.2, 141.8, 129.3, 129.2, 127.5, 121.6, 68.9, 64.4, 43.6, 22.4; IR: 996, 1045, 1065, 1088, 1124, 1165, 1246, 1257, 1318, 1378, 1462, 1556, 1604, 1666, 2851, 2935 cm⁻¹; LRMS (APCI): *m/z* (relativní intenzita) 278.5 [M+H]⁺ (8), 207.6 (100), 181.6 (7), 163.5 (5), 98.6 (3).

7-Brom-3-[3-(piperidin-1-yl)propyl]-3,4-dihydrochinazolin-4-on (27). Výtěžek: 49 %; bílá krystalická látka, t.t. 100-103 °C; ¹H NMR: (300 MHz, CD₃OD) δ 8.37 (1H, s, H₂), 8.09 (1H, d, *J*=8.5 Hz, Ar), 7.75 (1H, d, *J*=1.7 Hz, Ar), 7.64 (1H, dd, *J*₁=1.7 Hz, *J*₂=8.5 Hz, Ar), 4.07 (2H, m, t, *J*=7.1 Hz, NCH₂), 2.52-2.37 (6H, m, 3xNCH₂), 2.04-1.96 (2H, m, CH₂), 1.60-1.39 (6H, m, 3xCH₂); ¹³C NMR: (75 MHz, CD₃OD) δ 162.1, 150.7, 150.2, 131.6, 130.5, 129.9, 129.1, 122.0, 56.8, 55.3, 46.7, 26.5, 26.4, 25.1; IR: 951, 1045, 1054, 1178, 1233, 1246, 1315, 1377, 1460, 1599, 1668, 2777, 2851, 2935 cm⁻¹; LRMS (APCI): *m/z* (relativní intenzita) 350.6 [M+H]⁺ (100), 311.7 (2), 265.5 (62), 239.4 (5), 207.5 (3), 124.7 (2), 98.6 (2).

7-Brom-3-[2-(pyrrolidin-1-yl)ethyl]-3,4-dihydrochinazolin-4-on (28). Výtěžek: 58 %; bílá krystalická látka, t.t. 152-155 °C; ¹H NMR: (300 MHz, CD₃OD) δ 8.35 (1H, s, H₂), 8.08 (1H, d, *J*=8.1 Hz, Ar), 7.84 (1H, d, *J*=1.7 Hz, Ar), 7.66 (1H, dd, *J*₁=1.7 Hz, *J*₂=8.1 Hz, Ar), 4.56 (2H, t, *J*=6.4 Hz, NCH₂), 3.92 (2H, t, *J*=6.4 Hz, NCH₂), 3.70-3.55 (4H, m, 2xNCH₂), 2.18-2.04 (4H, m, 2xCH₂); ¹³C NMR: (75 MHz, CD₃OD) δ 168.1, 162.2, 150.2, 131.8, 130.8, 130.2, 129.1, 122.0, 69.0, 64.5, 43.7, 22.4; IR: 968, 1016, 1176, 1316, 1356, 1395, 1479, 1592, 1676, 2830, 2968 cm⁻¹; LRMS (APCI): *m/z* (relativní intenzita) 322.6 [M+H]⁺ (100), 285.7 (31), 203.7 (20), 145.6 (18), 99.4 (52).

6-Methoxy-3-[3-(piperidin-1-yl)propyl]-3,4-dihydrochinazolin-4-on (**29**). Výtěžek: 49 %; bílá amorfnní látka; $^1\text{H NMR}$: (300 MHz, CD_3OD) δ 8.25 (1H, s, H2), 7.89 (1H, d, $J=8.4$ Hz, Ar), 7.71 (1H, d, $J=1.5$ Hz, Ar), 7.55 (1H, dd, $J_1=1.5$ Hz, $J_2=8.4$ Hz, Ar), 4.56 (2H, t, $J=6.6$ Hz, NCH_2), 3.88 (3H, s, OCH_3), 2.61-2.41 (6H, m, $3\times\text{NCH}_2$), 2.09-1.99 (2H, m, CH_2), 1.62-1.41 (6H, m, $3\times\text{CH}_2$); $^{13}\text{C NMR}$: (75 MHz, CD_3OD) δ 169.1, 160.2, 150.2, 131.9, 130.7, 130.2, 129.2, 121.9, 68.9, 65.0, 55.7, 46.8, 26.5, 26.4, 22.4; **IR**: 968, 1016, 1176, 1316, 1356, 1395, 1479, 1592, 1676, 2830, 2968 cm^{-1} ; **LRMS (APCI)**: m/z (relativní intenzita) 302.3 $[\text{M}+\text{H}]^+$ (100), 285.7 (31), 203.7 (20), 145.6 (18), 99.4 (52).

5.4. Příprava chinolin-4-thiolu (**15**)



Směs chinolin-4-olu (**13**) (1,462 g, 10,0 mmol) a sulfidu fosforečného (2,223 g, 10,0 mmol) v toluenu (50 ml) byla refluxována po dobu 12 hodin. Po ochlazení byla reakční směs rozdělena mezi EtOAc (50 ml) a vodu (50 ml). Organická vrstva byla vysušena (Na_2SO_4), rozpouštědla byla odpařena na vakuové odparce a produkt reakce **15** byl přečištěn pomocí sloupcové chromatografie s použitím mobilní fáze hexan : EtOAc (70 : 30). Výtěžek: 85 %; žlutá krystalická látka, t.t. 159-162 °C (lit.¹⁴ 156-158 °C); $^1\text{H NMR}$: (300 MHz, CD_3OD) δ 8.65 (1H, d, $J=4.3$ Hz, Ar), 8.19-8.15 (1H, m, Ar), 8.00-7.96 (1H, m, Ar), 7.78-7.74 (1H, m, Ar), 7.65-7.61 (1H, m, Ar), 7.50 (1H, d, $J=4.3$ Hz, Ar).

5.5. Syntéza substituovaných chinazolinů

Směs výchozí anthranilové kyseliny (1,0 mmol) a formamidu (1,5 mmol) byla tavena po dobu 14 hodin při 180 °C. Po ochlazení byla reakční směs rozdělena mezi EtOAc (10 ml) a vodu (10 ml). Organická vrstva byla vysušena (Na_2SO_4), rozpouštědla byla odpařena na vakuové odparce a produkty reakce (**18-21**) byly přečištěny pomocí sloupcové chromatografie (gradientová eluce, EtOAc : MeOH (100 : 0 – 50 : 50)).

7-Chlor-3,4-dihydrochinazolin-4-on (18). Výtěžek: 48 %; nažloutlá krystalická látka, t.t. 250-253 °C (lit.¹⁵ 254-255 °C); ¹H NMR: (300 MHz, DMSO-*d*₆) δ 12.37 (1H, bs, NH), 8.15-8.06 (2H, m, Ar), 7.70 (1H, d, *J*=1.5 Hz, Ar), 7.55 (1H, dd, *J*₁=1.5 Hz, *J*₂=8.4 Hz, Ar); ¹³C NMR: (75 MHz, DMSO-*d*₆) δ 160.3, 150.1, 147.1, 139.1, 128.1, 127.2, 126.6, 121.6.

7-Brom-3,4-dihydrochinazolin-4-on (19). Výtěžek: 87 %; žlutá krystalická látka, t.t. 259-261 °C (lit.¹⁶ 259-260 °C); ¹H NMR: (300 MHz, DMSO-*d*₆) δ 12.38 (1H, bs, NH), 8.13 (1H, s, H₂), 8.03 (1H, d, *J*=8.5 Hz, Ar), 7.87 (1H, d, *J*=1.7 Hz, Ar), 7.68 (1H, dd, *J*₁=1.7 Hz, *J*₂=8.5 Hz, Ar); ¹³C NMR: (75 MHz, CD₃OD) δ 162.7, 151.0, 147.8, 131.6, 130.6, 130.2, 125.0, 122.9.

6-Methoxy-3,4-dihydrochinazolin-4-on (20). Výtěžek: 55 %; bílá krystalická látka, t.t. 248 °C rozkl. (lit.¹⁷ 245-246 °C); ¹H NMR: (300 MHz, DMSO-*d*₆) δ 12.08 (1H, bs, NH), 7.99 (1H, s, H₂), 7.61 (1H, d, *J*=8.9 Hz, Ar), 7.50 (1H, d, *J*=2.9 Hz, Ar), 7.39 (1H, dd, *J*₁=2.9 Hz, *J*₂=8.9 Hz, Ar), 3.86 (3H, s, OCH₃); ¹³C NMR: (75 MHz, DMSO-*d*₆) δ 160.7, 157.9, 143.4, 143.3, 129.1, 124.0, 123.6, 106.0, 55.8.

7-Methoxy-3,4-dihydrochinazolin-4-on (21). Výtěžek: 63 %; bílá krystalická látka, t.t. 253-256 °C (lit.¹⁸ 257-258 °C); ¹H NMR: (300 MHz, DMSO-*d*₆) δ 12.10 (1H, bs, NH), 8.06-8.02 (2H, m, Ar), 7.13-7.09 (2H, m, Ar), 3.89 (3H, s, OCH₃).

5.6. Obecný postup přípravy hydrochloridů

Příslušná chinazolinová base (**20**, **25** a **27**) (0,5 mmol) byla rozpuštěna v THF (3 ml) a poté ochlazena v ledové lázni. Následně byl za míchání opatrně přikapán roztok HCl (2 M v diethyletheru, 1,0 ekv.) a vzniklá sraženina byla odsáta a vysušena.

6. SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK

ACH	acetylcholin
APCI	chemická ionizace při atmosferickém tlaku
CHOPN	chronická obstrukční plicní nemoc
DCM	dichlormethan
DMAP	4-(<i>N,N</i> -dimethylamino)pyridin
DMF	<i>N,N</i> -dimethylformamid
IR	infračervená spektroskopie
i.v.	intravenózní
LABA	long-acting β_2 -adrenergic receptor agonist
LAMA	long-acting muscarinic antagonist
LRMS	hmotnostní spektrometrie s nízkým rozlišením
NMR	nukleární magnetická rezonance
SABA	short-acting β_2 -adrenergic receptor agonist
SAMA	short-acting muscarinic antagonist
THF	tetrahydrofuran

7. LITERATURA

- 1 Miles, C. Matthew, James F. Donohue and Jill A. Ohar. Optimum Bronchodilator Combinations in Chronic Obstructive Pulmonary Disease. *Drugs*. Cham : Springer International Publishing AG, **2012**, 72(3), 301-308. ISSN 0012-6667.
- 2 Musil, Jaromír. Farmakoterapie chronické obstrukční plicní nemoci. *Praktické lékařství*. Olomouc : Solen, s.r.o. , **2007**, 3(6), 270-274. ISSN 1803-5329.
- 3 Sethi, Sanjay and Claudia Cote. Bronchodilator Combination Therapy for the Treatment of Chronic Obstructive Pulmonary Disease. *Current Clinical Pharmacology*. Bussum : Bentham Science Publisher, **2011**, 6, 48-61. ISSN 1574-8847.
- 4 Lincová, Dagmar, Hassan Farghali et al.. *Základní a aplikovaná farmakologie*. Druhé přepracované vydání. Praha : Galen, **2007**. ISBN 978-80-7262-373-0.
- 5 Katzung, G. Bertram. *Basic & Clinical Pharmacology*. Ninth edition. New York : The McGraw-Hill Companies, **2004**. ISBN 0-07-0144097-6.
- 6 Matera, Maria Gabriella, Clive P. Page and Mario Cazzola. Novel bronchodilators for the treatment of chronic obstructive pulmonary disease. *Trends in Pharmacological Science*. Amsterdam : Elsevier, August **2011**, 32(8), 495-506. ISSN 0165-6147.
- 7 Mak, Garbo and Nicola A Hanynka. New bronchodilators. *Current Opinion in Pharmacology*. Amsterdam : Elsevier, **2012**, 12, 238-245. ISSN 1471-4892.
- 8 Vondra, Vladimír. Roflumilast (Daxas) – nový lék v léčbě chronické obstrukční plicní nemoci. *Praktické lékařství*. Olomouc : Solen, s.r.o., **2012**, 8(1), 7-10. ISSN 1803-5329.
- 9 Šašková, Jaroslava. Diplomová práce. Univerzita Karlova v Praze Farmaceutická fakulta v Hradci Králové. **2010**.
- 10 Špulák, M., Novák Z., Palát K., Kuneš J., Pourová J., Pour M. The unambiguous synthesis and NMR assignment of 4-alkoxy and 3-alkylquinazolines. *Tetrahedron*, **2013**, 69, 1705-1771. ISSN 0040-4020.
- 11 Furuta, T., Sakai T., Senga T., Osawa T., Kubo K., Shimizu T., Suzuki R., Yoshino T., Endo M., and Miwa A. Identification of Potent and Selective Inhibitors of PDGF Receptor Autophosphorylation. *J. Med. Chem.*, **2006**, 49(7), 2186-2192. ISSN 1520-4804.

- 12 Kottová, M. Disertační práce. Univerzita Karlova v Praze Farmaceutická fakulta v Hradci Králové. **2009**.
- 13 Okumura, K., Inoue, I., Hayashi, G. Quinoline derivatives. *Jpn. Tokkyo Koho* **1966**, JPN 41015702, v *Chem. Abstr.* **1967**, 66, 18679. ISSN 0009-2258.
- 14 Kayirere, M.-G., Mahamoud, A.; Chevalier, J.; Soyfer, J.-C.; Cremieux, A.; Barbe, J. Synthesis and antibacterial activity of new 4-alkoxy, 4-aminoalkyl and 4-alkylthioquinoline derivatives. *Eur. J. Med. Chem.* **1998**, 33(1), 55-63. ISSN 0223-5234.
- 15 Carmi, C., Vacondio, F., Rivara, S., Lodola, A., Russo, S., Bordi, F., Costantino, G., Mor, M., Galvani, E., Cavazzoni, A., Alfieri, R. R.; Petronini, P. G., Aiello, S., Ardizzoni, A. Irreversible inhibition of epidermal growth factor receptor activity by 3-aminopropanamides. *J. Med. Chem.* **2012**, 55(5), 2251-2264. ISSN 1520-4804.
- 16 Guillon, R., Pagniez, F., Picot, C., Tonnerre, A., Duflos, M., Loge, C., Le Pape, P., Hedou, D., Chosson, E., Besson, T. Discovery of a Novel Broad-Spectrum Antifungal Agent Derived from Albaconazole. *Med. Chem. Lett.* **2013**, 4(2), 288-292. ISSN 1948-5875.
- 17 Roth, G. A., Tai, J. J. A new synthesis of aryl substituted quinazolin-4(1H)-ones. *J. Het. Chem.* **1996**, 33(6), 2051-2054. ISSN 0022-152X.
- 18 Chapman, N. B., Gibson, G. M., Mann, F. G. Synthetic antimalarials. Part XVI. 4-Dialkylaminoalkylaminoquinazolines. Variation of substituents in the 6- and 7-positions. *J. Chem. Soc.* **1947**, 890-894. ISSN 0368-1769.