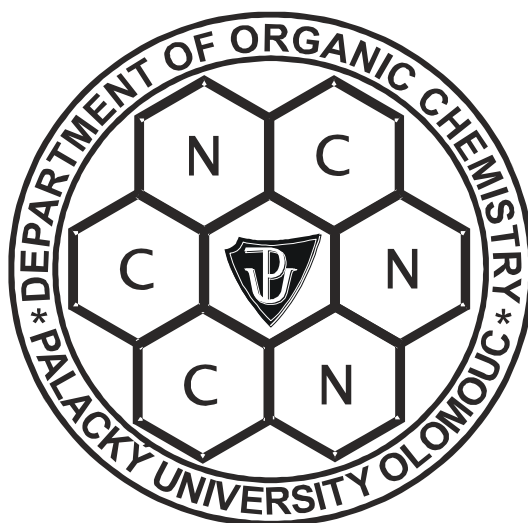


UNIVERZITA PALACKÉHO V OLOMOUCI

Přírodovědecká fakulta  
Katedra organické chemie



**Solid-phase syntéza derivátů 7-nitro-1,2,3,4-tetrahydro-  
5H-1,4-benzodiazepin-5-onu**

Vypracoval:

Vedoucí bakalářské práce:

Studijní obor:

Miroslav Škrobánek

doc. RNDr. Miroslav Sural, Ph.D.

Bioorganická chemie

**Olomouc 2012**

Prohlašuji, že jsem předloženou bakalářskou práci vypracoval samostatně a čerpal jen z pramenů, které cituji a uvádím v seznamu použité literatury.

V Olomouci 18. května 2012

Miroslav Škrobánek

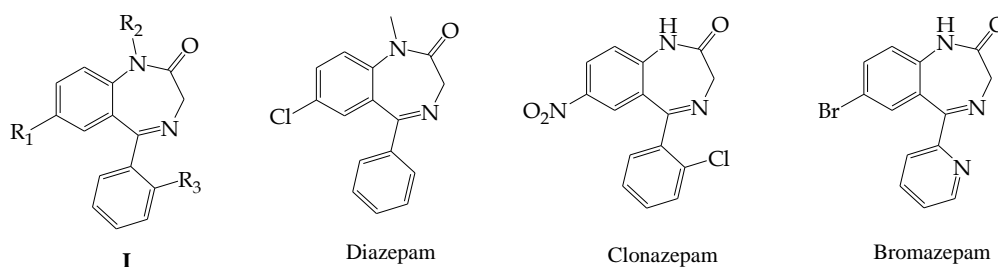
Upřímné poděkování všem pracovníkům Katedry organické chemie PřF UP v Olomouci, především doc. RNDr. Miroslavovi Suralovi, Ph. D. za odborné vedení, cenné rady a připomínky, které mi při plnění zadaného úkolu poskytly.

<b>1</b>	<b>ÚVOD</b>	<b>1</b>
<b>2</b>	<b>CÍL PRÁCE</b>	<b>3</b>
<b>3</b>	<b>TEORETICKÁ ČÁST</b>	<b>5</b>
<b>3.1</b>	<b>Metody přípravy vedoucí k derivátům 1,2,3,4-tetrahydro-5H-1,4-benzodiazepin-5-onů</b>	<b>5</b>
<b>3.2</b>	<b>Biologická aktivita derivátů 1,2,3,4-tetrahydro-5H-1,4-benzodiazepin-5-onů</b>	<b>18</b>
<b>4</b>	<b>VÝSLEDKY A DISKUSE</b>	<b>20</b>
<b>4.1</b>	<b>Syntéza na pevné fázi</b>	<b>20</b>
<b>5</b>	<b>EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST</b>	<b>30</b>
<b>6</b>	<b>ZÁVĚR</b>	<b>37</b>
<b>7</b>	<b>LITERATURA</b>	<b>39</b>

# 1. ÚVOD

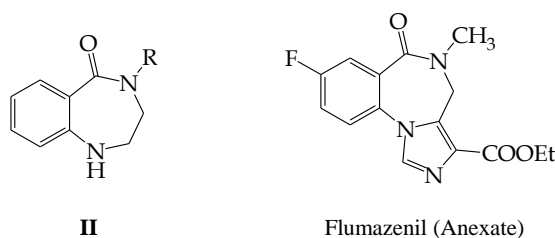
Sloučeniny obsahující ve své struktuře 1,4-benzodiazepinový skelet představují širokou skupinu velice intenzívně studovaných dusíkatých heterocyklů a to především vzhledem k výrazným účinkům vybraných derivátů 1,4-benzodiazepinů na centrální nervovou soustavu (CNS). Rozsáhlou skupinu látek uvedeného typu tvoří například 1,3-dihydro-benzo[e][1,4]diazepin-2-ony **I**, které jsou známé zejména svými sedativními a anxiolytickými účinky. V současné době je v terapeutické praxi přes 30 léčiv na bázi derivátů uvedeného typu (např. diazepam, bromazepam, clonazepam).

**Schema 1:** Příklady 1,4-benzodiazepinových léčiv v současné humánní medicíně



Na druhou stranu však existují strukturální typy 1,4-benzodiazepinů, které byly z pohledu přípravy a studia biologických účinků studovány poměrně zřídka. Mezi takové deriváty patří i 1,2,3,4-tetrahydro-5H-1,4-benzodiazepin-5-ony **II**. Zmíněný tetrahydrobenzodiazepinový motiv lze přesto nalézt v některých současných terapeutikách, např. ve flumazenilu (Anexate), který je používán jako kompetitivní inhibitor při intoxikaci výše uvedenými CNS benzodiazepiny

**Schema 2:** Základní cílový heterocyklický skelet a příklad jeho výskytu v současných terapeutikách

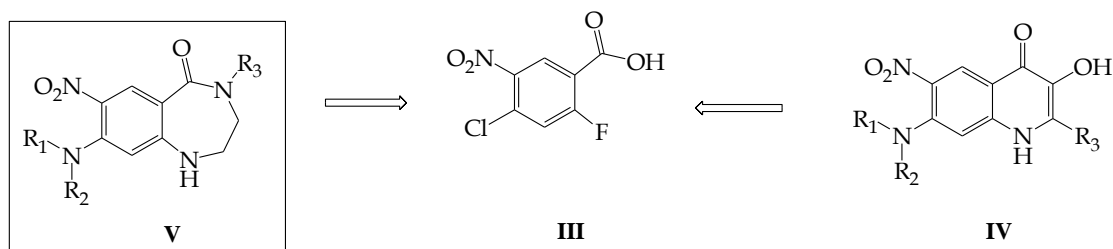


Cílem této práce bylo ověřit syntetickou cestu k derivátům 1,2,3,4-tetrahydro-5H-1,4-benzodiazepin-5-onu z kyseliny 2-fluoro-4-chloro-5-nitrobenzoové **III** jako výchozí látky. Tato polyfunkční benzoová kyselina byla dosud v syntéze využita velmi sporadicky, přestože se nabízí řada chemických modifikací založených na substitučních reakcích halogenů či redukci aminoskupiny a další transformace

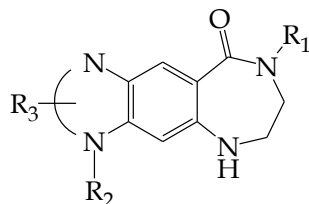
vzniklých syntetických intermediátů. V nedávné době byla 2-fluoro-4-chloro-5-nitrobenzoová kyselina použita např. k přípravě derivátů 3-hydroxychinolin-4(1*H*)-onu **IV** pomocí syntézy na pevné fázi.

Záměrem této práce byl pokus o přípravu derivátů 7-nitro-8-amino-1,2,3,4-tetrahydro-5*H*-1,4-benzodiazepin-5-onu **V** s pomocí syntézy na pevné fázi založené na imobilizaci 2-fluoro-4-chloro-5-nitrobenzoové na vhodně funkcionalizované polystyrenové pryskyřici. Reakční schéma vedoucí k zamýšleným derivátům včetně komentáře je uvedeno v následující kapitole Cíl práce.

**Schema 3:** Transformace 2-fluoro-4-chloro-5-nitrobenzoové kyseliny



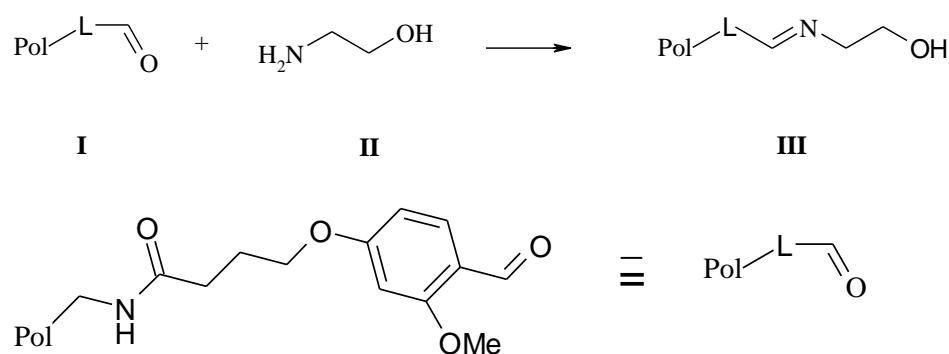
V případě úspěšného zvládnutí syntézy se předpokládá budoucí využití metodiky pro přípravu tricyklických bisheterocyklů níže uvedeného typu, kde heterocyklický skelet na levé straně představuje např. substituovaný imidazolový, pyrazinový nebo diazepinový cyklus.



## 2. CÍL PRÁCE

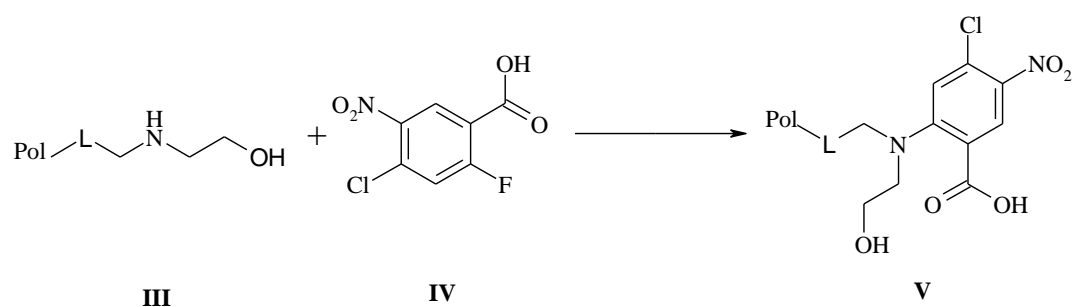
Cílem této práce byl pokus o syntézu derivátů 1,2,3,4-tetrahydro-5H-1,4-benzodiazepin-5-onu **X** z komerčně dostupné kyseliny 2-fluoro-4-chloro-5-nitrobenzoové **IV**, jak již bylo naznačeno v úvodu pomocí syntézy na pevné fázi. Jako výchozí látka měl sloužit aminoethanol imobilizovaný na aminomethylové pryskyřici **I** vybavené kyselé labilním linkerem benzaldehydového typu (4-(4-formyl-3-methoxyfenoxy)másečná kyselina). Na této pryskyřici měl být aminoethanol **II** imobilizován pomocí reduktivní aminatione.

**Schema 1:** reduktivní aminatione



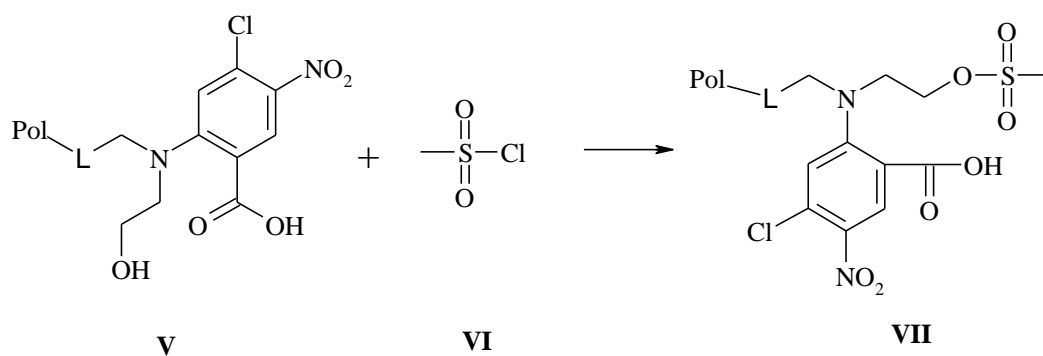
Takto navázaný aminoethanol **III** měl být použit pro reakci s kyselinou 2-fluoro-4-chloro-5-nitrobenzoovou.

**Schema 2:** Navázání kyseliny 2-fluoro-4-chloro-5-nitrobenzoové



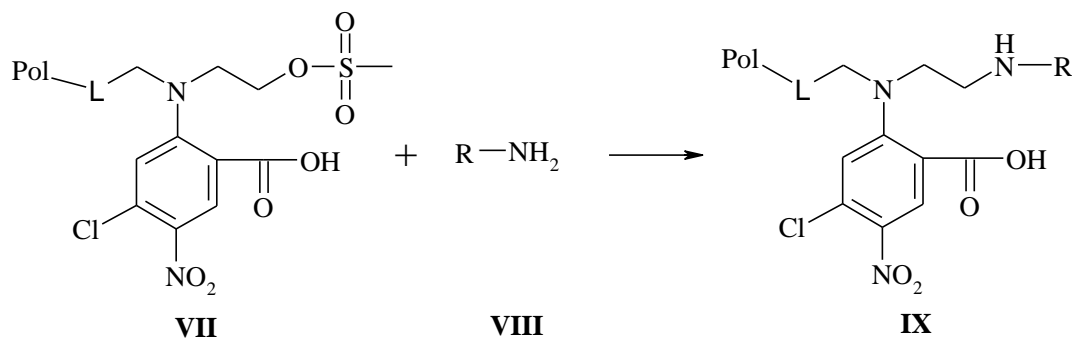
Vzniklý intermediát **V** měl být podroben reakci s mesylchloridem **VI**.

**Schema 3:** Mesylace primární OH skupiny



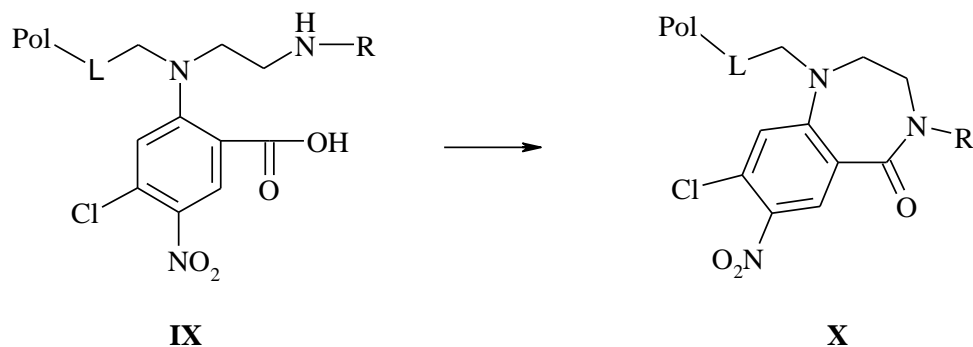
Vzniklý namesylovaný derivát **VII** měl být dále podroben reakci s primárním aminem **VIII**.

**Schema 4:** Reakce aktivovaného esteru s primárním aminem



S posledním intermediátem **IX** tohoto sledu reakcí mělo dojít k zacyklení za tvorby sedmičlenného kruhu a tím k dosažení cílové sloučeniny 1,2,3,4-tetrahydro-5H-1,4-benzodiazepin-5-onu.

**Schema 5:** Intramolekulární cyklizace za tvorby sedmičlenného kruhu



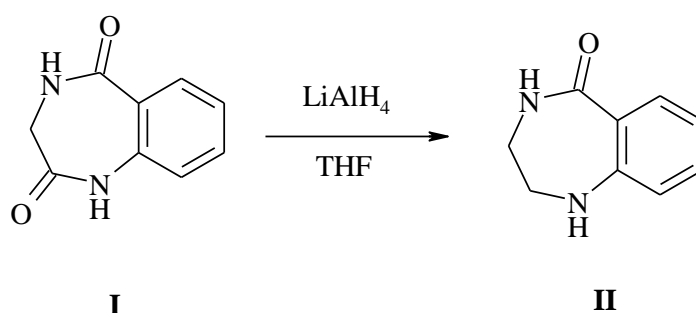


### 3. TEORETICKÁ ČÁST

#### 3.1. Metody přípravy vedoucí k derivátům 1,2,3,4-tetrahydro-5H-1,4-benzodiazepin-5-onů

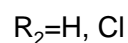
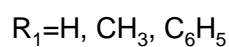
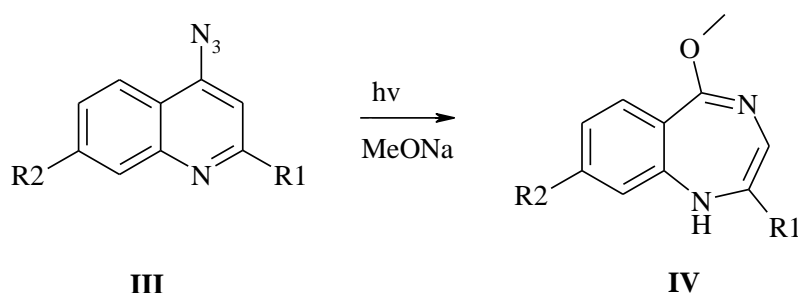
Deriváty 1,4-benzodiazepin-5-onů obecně nejsou tak intenzivně studovanou skupinou látek jako 1,4-benzodiazepin-2-ony (viz. dříve zmiňované benzodiazepiny **I** se sedativními účinky). Jedna ze syntetických cest vedoucích k 1,2,3,4-tetrahydro-5H-1,4-benzodiazepin-5-onu **II** spočívá v regioselektivní redukci karbonylové skupiny sloučeniny **I** pomocí  $\text{LiAlH}_4$  v refluxu THF<sup>1</sup> jak je naznačeno ve schématu 1.

**Schema 1:** činidla a podmínky –  $\text{LiAlH}_4$ , THF, reflux, 14 hod



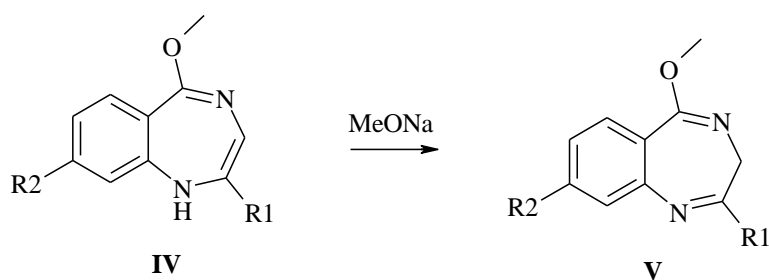
Další metodou k získání těchto derivátů je příprava z 4-azidochinolinů<sup>2</sup> **III**. Ozáření azidů (0,5-0,6g) 400W vysokotlakou Hg výbojkou přes Pyrex filtr v metanolu a dioxanu v poměru 1:1 obsahující methoxid sodný (3-4 molární přebytek) po dobu 20 – 30 minut za ledového chlazení vede k rozšíření kruhu, které dává požadované 5-methoxy-1H-1,4-benzodiazepiny **IV** ve vysokých výtěžcích, pravděpodobně přes azirinové meziproducty.

**Schema 2:** rozšíření kruhu pomocí záření z vysokotlaké Hg výbojky



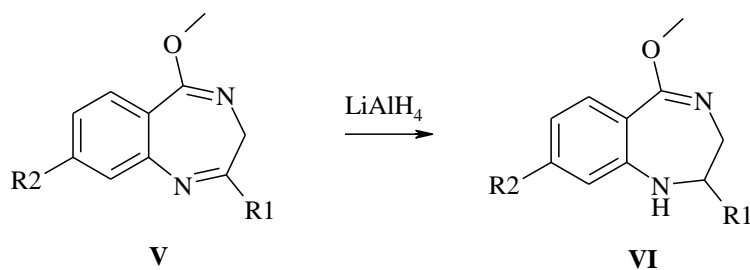
Tyto intermediáty **IV** jsou ale velmi nestabilní. Po přidání dalšího množství methoxidu sodného (1-2g) k ozářenému roztoku obsahující cca. 0,5g **IV** dochází k tautomerizaci. Reakce běží přibližně 7-8 hodin a poskytuje 5-methoxy-3H-1,4-benzodiazepiny **V**.

**Schema 3:** přidavek methoxidu sodného a následná tautomerizace



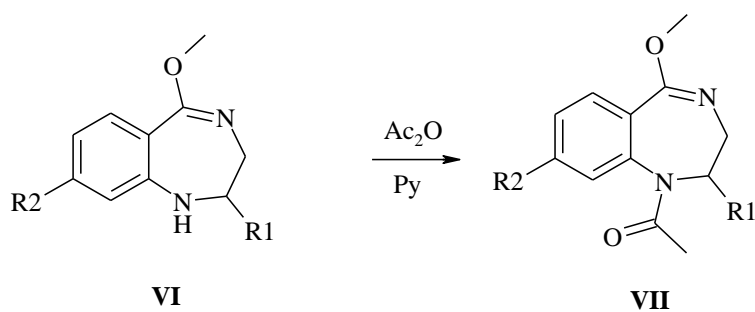
Meziprodukty **V** byly izolovány chromatografií v 35-65% výtěžku.. Následná redukce **V** pomocí  $\text{LiAlH}_4$  poskytuje 1,2-dihydro sloučeniny **VI** ve 40-60% výtěžku.

**Schema 4:** selektivní redukce 5-methoxy-3H-1,4-benzodiazepinů



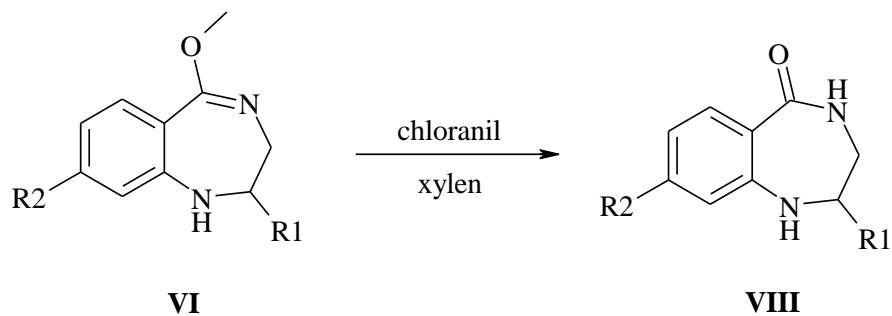
Zpracování meziproduktu **VI** s acetanhydridem v pyridinu dává 1-acetyl-2,3-dihydro-1,4-benzodiazepiny **VII** v 65-85% výtěžku.

**Schema 5:** acetylace sloučeniny **VI**

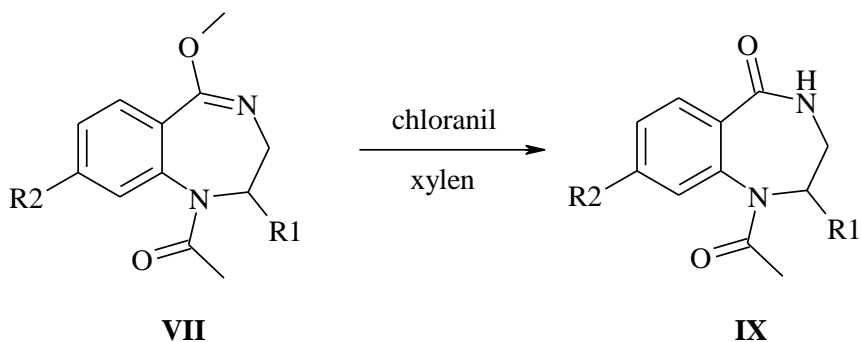


Úprava intermediátů **VI** a **VII** s chloranilem v prostředí xylenu poskytuje 1,2,3,4-tetrahydro-5H-1,4-benzodiazepin-5-ony **VIII** a **IX** jak je znázorněno ve schématu 6 a 7.

**Schema 6:** reakce intermediátu **VI** s chloranilem v xylenu



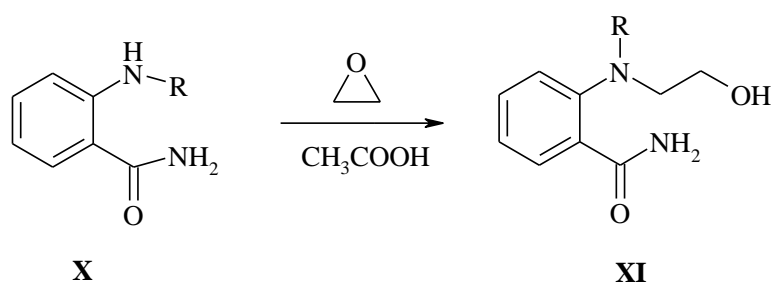
**Schema 7:** reakce intermediátu **VII** s chloranilem v xylenu



Reakční schéma 6 probíhá ve výtěžku 45-50% a reakční schéma 7 probíhá ve výtěžku 60-80%. 1,2,3,4-tetrahydro-5H-1,4-benzodiazepin-5-ony byly také získány hydrolyzou sloučenin **VI** a **VII** ve směsi voda a dioxan obsahující kyselinu octovou, ale v menším výtěžku (**VIII**, 20-30%; **IX**, 30-40%).

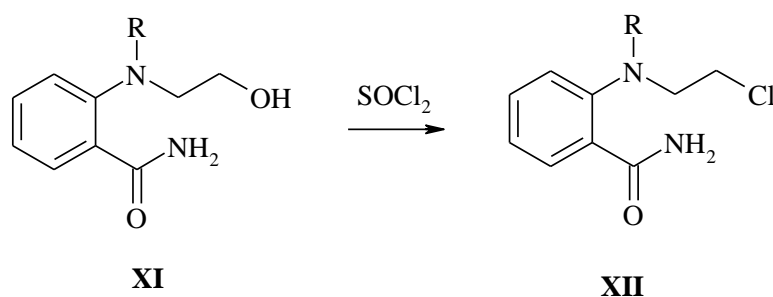
Jednou z dalších možných příprav 1,2,3,4-tetrahydro-5H-1,4-benzodiazepin-5-onu je syntéza z *o*-benzylaminobenzamidu<sup>3</sup> **X**, který reaguje s oxiranem v prostředí kyseliny octové za vzniku *o*-[benzyl(2-hydroxyethyl)amino]benzamidu **XI**. Tato reakce běží za laboratorní teploty po dobu 72 hodin.

**Schema 8:** reakce *o*-benzylaminobenzamidu s ethylenoxidem



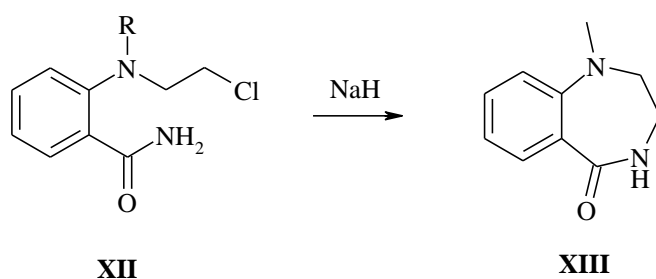
Dále výměnou OH skupiny za Cl skupinu intermediátu **XI** bylo dosaženo reakcí s thionylchloridem po dobu 30 hodin a za laboratorní teploty, aby nedošlo k dehydrataci amidické skupiny za vzniku nitrilu.

**Schema 9:** výměna primární OH skupiny za Cl skupinu pomocí thionylchloridu



Následnou dehydrochlorací hydridem sodným intermediátu **XII** se získá 1,2,3,4-tetrahydro-5*H*-1,4-benzodiazepin-5-on substituovaný na dusíku číslo 1 v dobrém výtěžku. Reakční směs se zahřívá pod zpětným chladičem 1 hodinu a je po dobu 12 hodin ponechána při pokojové teplotě.

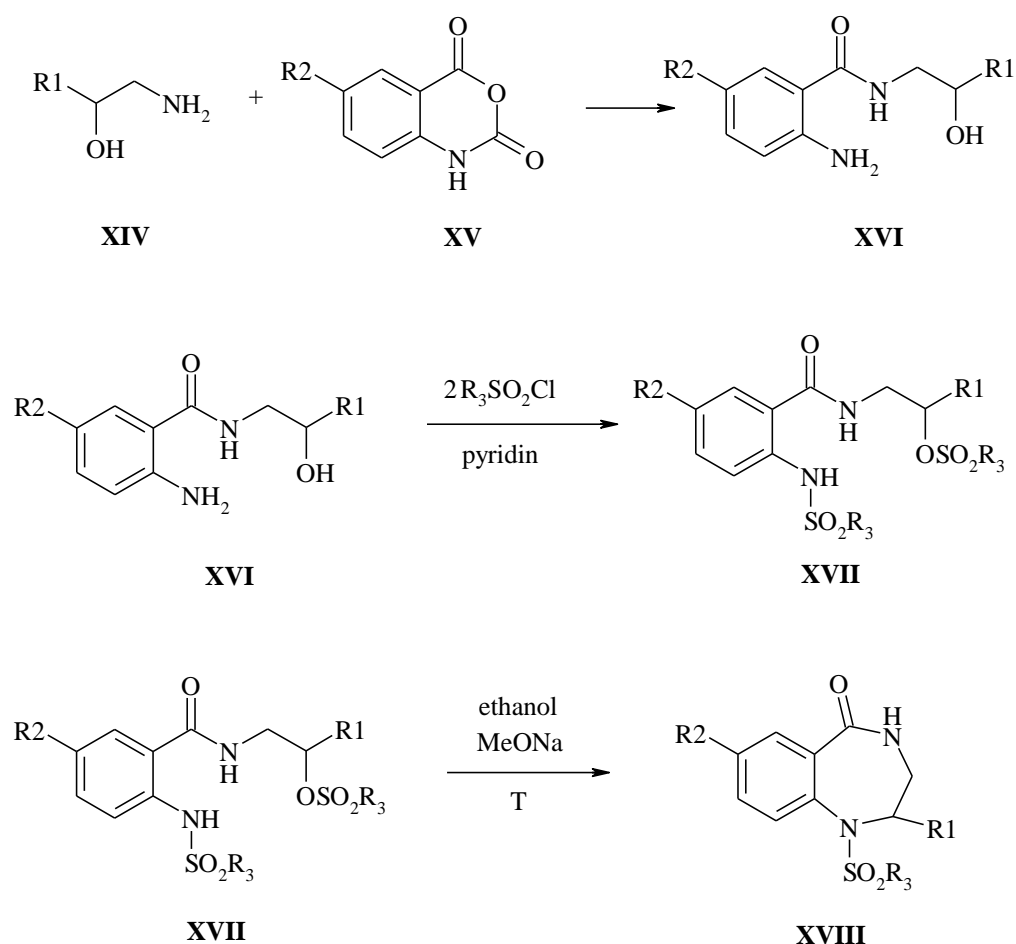
**Schema 10:** cyklodehydrochlorace meziprojektu **XII**



Dalším možným způsobem přípravy je syntéza z amino-*N*-(2-hydroxyethyl)benzamidu<sup>4</sup> **XVI**, který se získá z 2-aminoethanolu **XIV** a isatoic anhydridu **XV**. **XVI** reaguje s 2 molárním *p*-toluensulfonylchloridem při 0-5°C v pyridinu několik hodin za vzniku **XVII**. Přídavek vody do reakční směsi

způsobuje vysrážení pevné látky, která byla vysušena a posléze zahřata v etanolu s 1 molárním methoxidem sodným pod refluxem po dobu 10 minut a pak ochlazená ledem, přičemž poskytla 1-*p*-tolylsulfonyl-5*H*-1,4-benzodiazepin-5-on **XVIII**.

**Schema 11:**

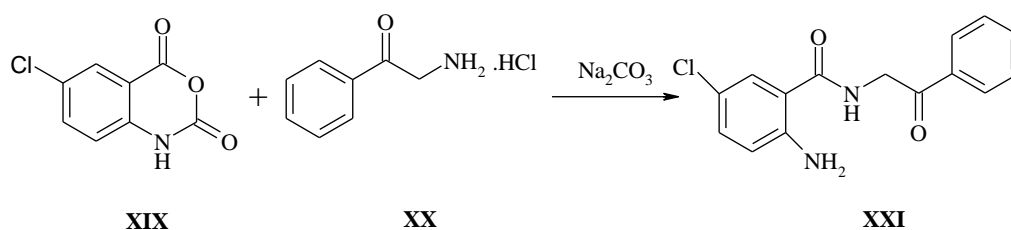


$\text{R}_1 = \text{H}, \text{C}_6\text{H}_5, \text{CH}_3, \text{o-C}_6\text{H}_4$

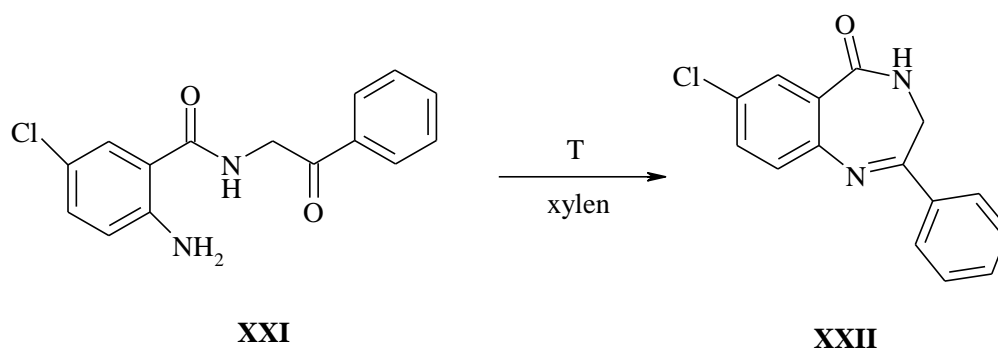
$\text{R}_2 = \text{H}, \text{Cl}$

$\text{R}_3 = \text{p-tolyl}, \text{CH}_3$

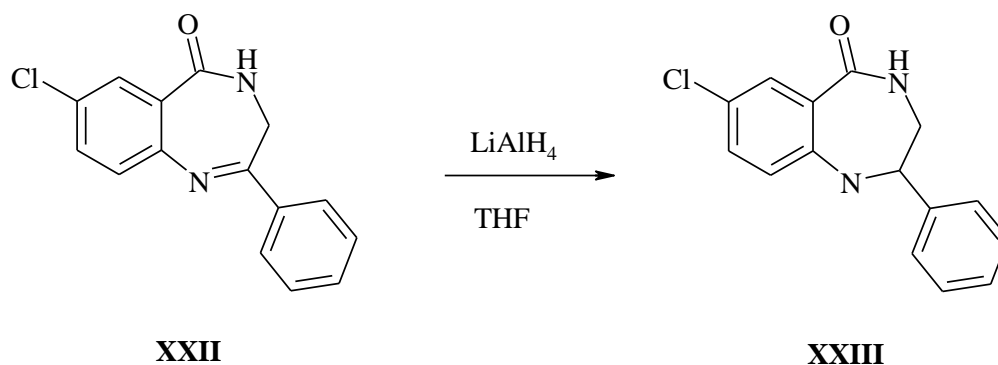
Jiná syntetická cesta k 5*H*-1,4-benzodiazepin-5-onům vede přes 6-chloroisatoic anhydrid<sup>4</sup> **XIX**. Vodný roztok  $\omega$ -aminoacetofenon hydrochloridu **XX** s uhličitánem sodným reaguje s 6-chloroisatoic anhydridem přes noc za stálého míchání a za pokojové teploty za vzniku 2-amino-5-chloro-*N*-fenacylbenzamidu **XXI**.

**Schema 12:**

Meziprodukt **XXI** je cyklodehydratací převeden na 7-chloro-3,4-dihydro-2-fenyl-5H-1,4-benzodiazepin-5-on **XXII** ve vroucím xylenu.

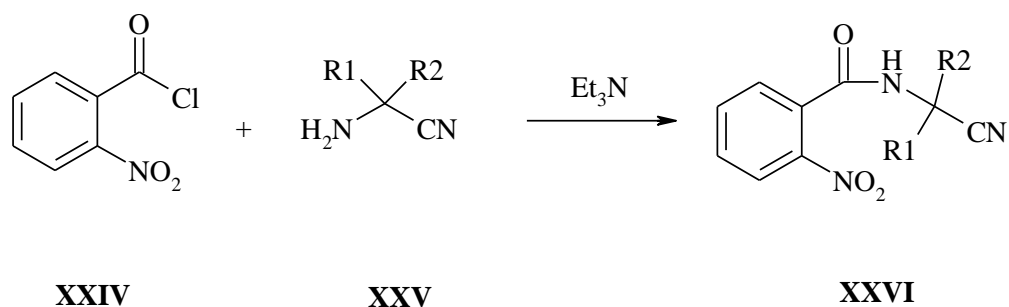
**Schema 13:** dehydratace a následné uzavření sedmičtého kruhu

Redukcí intermediátu **XXII** za pomoci  $\text{LiAlH}_4$  v tetrahydrofuranu (THF) poskytuje požadovaný 7-chloro-1,2,3,4-tetrahydro-2-fenyl-5H-1,4-benzodiazepin-5-on **XXIII**.

**Schema 14:**

Kondenzace 2-nitrobenzoylchloridu **XXIV** s  $\alpha$ -aminonitrily<sup>5</sup> **XXV** poskytuje odpovídající amidy **XXVI**. Reakce probíhá dobře v THF při 0°C v přítomnosti triethylaminu jako báze a v dobrém výtěžku.

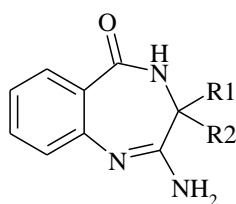
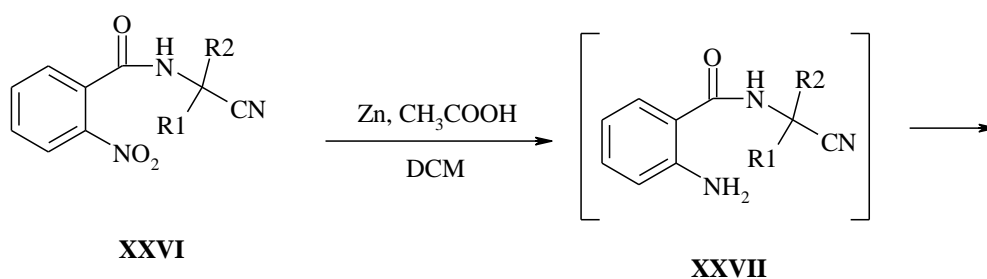
**Schema 15:**



$R_1/R_2=(\text{CH}_2)_5$ , Ph/H, p-tolyl/H, p-FC<sub>6</sub>H<sub>4</sub>/H

Následující redukce nitroskupiny v těchto sloučeninách na aminoskupinu bylo dosaženo práškovým zinkem s kyselinou octovou v dichlormethanu (DCM) za laboratorní teploty. Tyto mírné reakční podmínky byly záměrně vybrány s cílem izolovat meziprodukt **XXVII**, ale reakce pokračovala dál za vzniku **XXVIII**.

**Schema 16:**

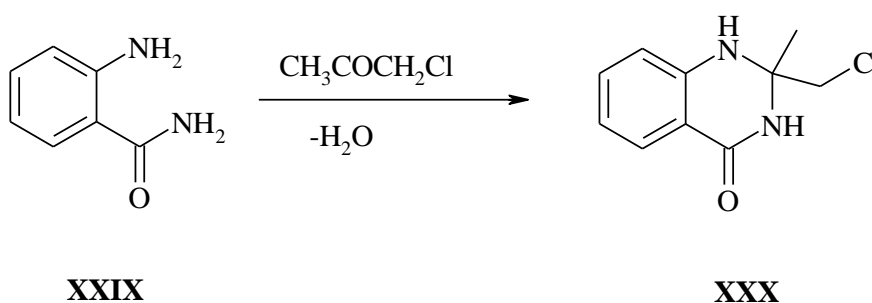


**XXVIII**

Intermediát **XXVIII** lze upravit dle dříve popsané reakce ve schématu 14 a tím získat nasycený sedmičtý kruh.

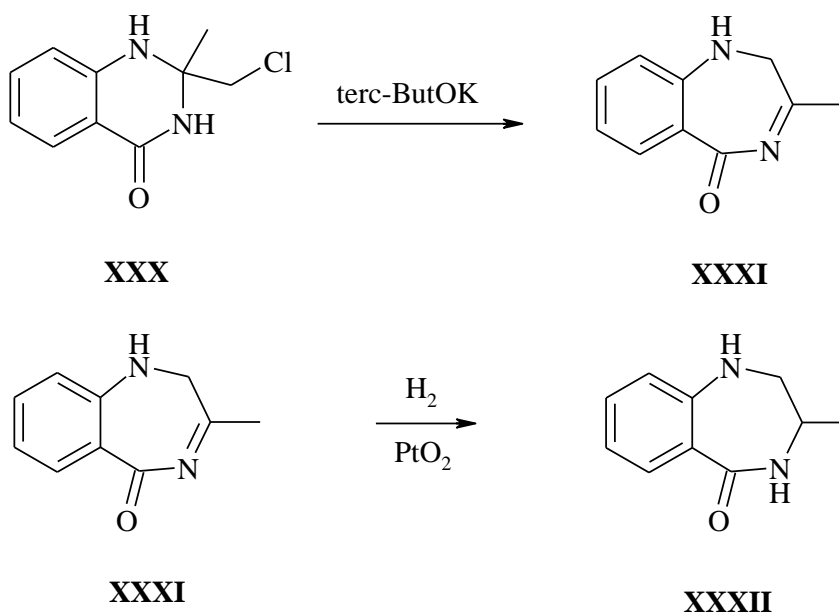
Další z možných příprav spočívá v reakci 1,2,3,4-tetrahydro-4-oxochinazolinů **XXX** s terc-butoxidem draselným, popř. methoxidem draselným<sup>6</sup>. **XXX** se lehce připraví kyselé katalyzovanou kondenzací anthranilamidu **XXIX** s chloroacetonem za odstranění vody pod refluxem po dobu 4 hodin, pak byla reakční směs ochlazená na pokojovou teplotu za vysrážení produktu.

**Schema 17:**



Úprava intermediátu **XXX** s terc-butoxidem draselným v tetrahydrofuranu (THF) poskytla benzodiazepinon **XXXI**, který byl dále zredukován vodíkem za přítomnosti oxidu platiničitého na sloučeninu **XXXII**.

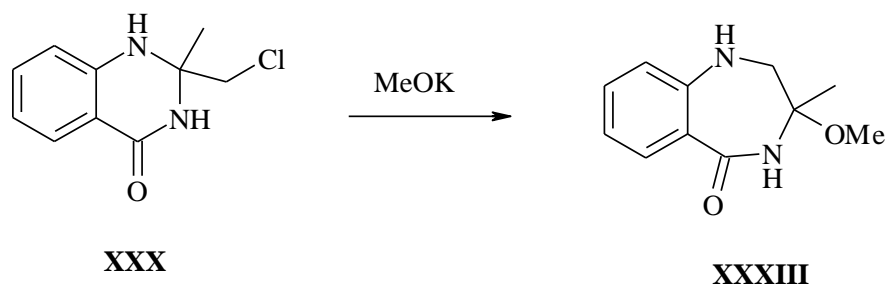
**Schema 18:**





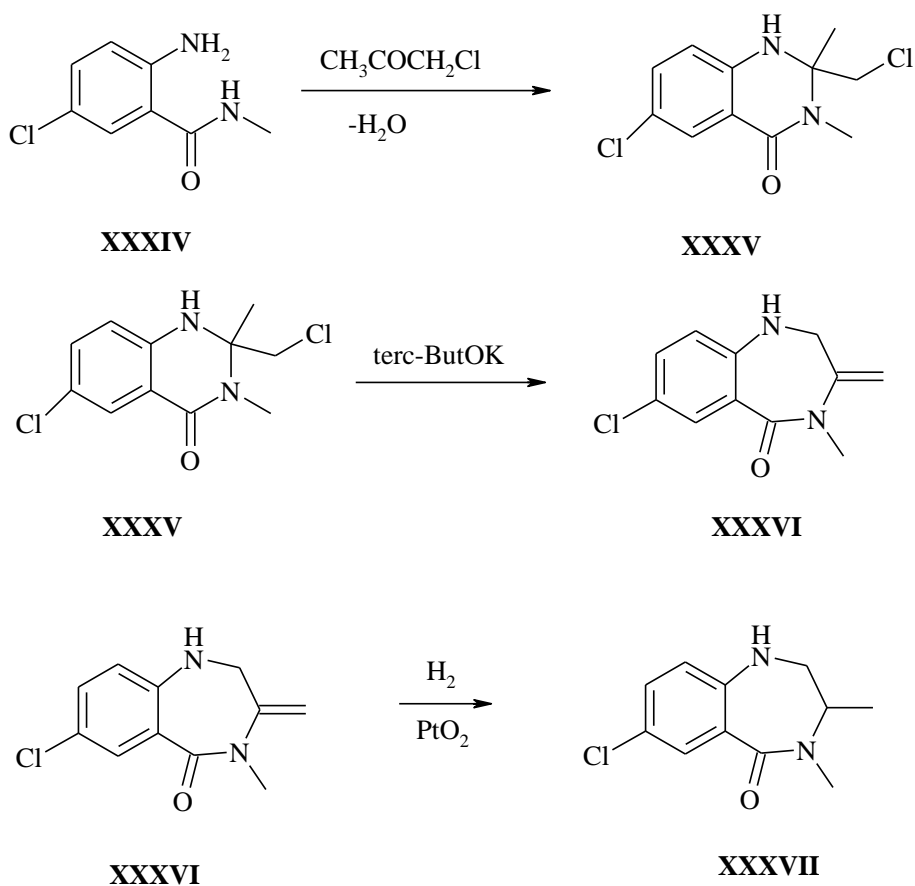
Alternativně byl použit intermediát **XXX** jako ve schématu 18, ale s použitím methoxidu draselného v metanolu a poskytoval sloučeninu **XXXIII**.

**Schema 19:**



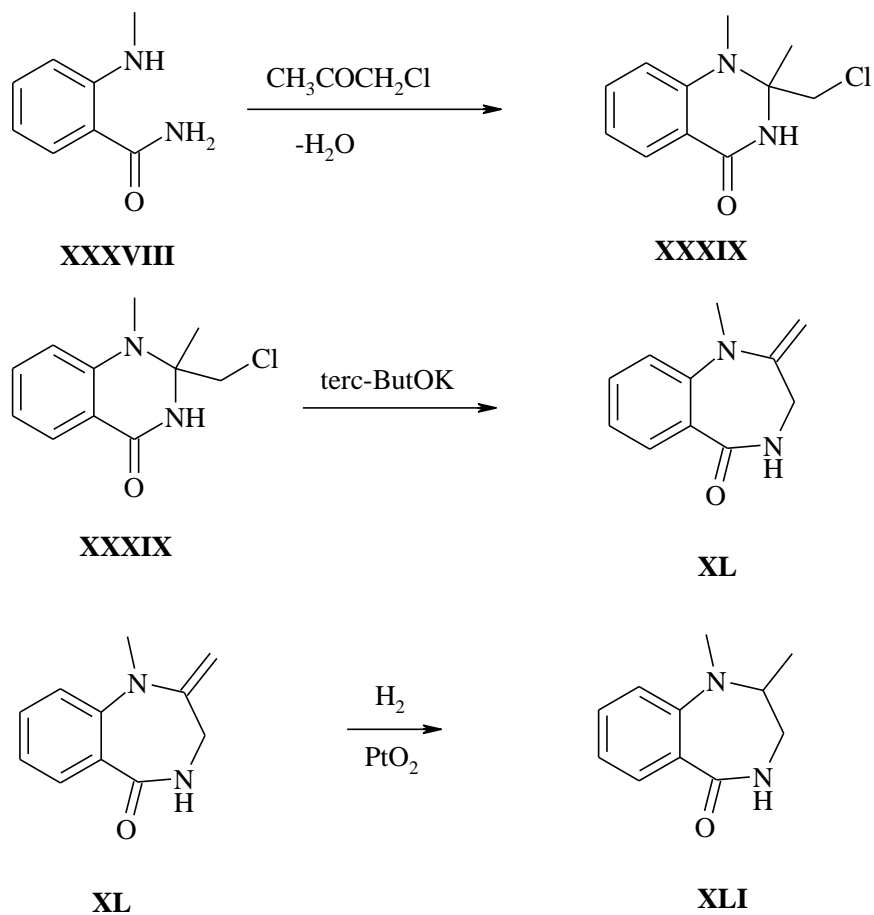
*N*-methyl deriváty **XXX** se připraví ze sloučeniny **XXXIV** obdobným způsobem jako je tomu ve schématu 17 za vzniku intermediátu **XXXV**. Látka **XXXV** dává s *tert*-butoxidem draselným v tetrahydrofuranu intermediát **XXXVI**, který je pak zredukován vodíkem za vzniku konečné sloučeniny **XXXVII**.

**Schema 20:**

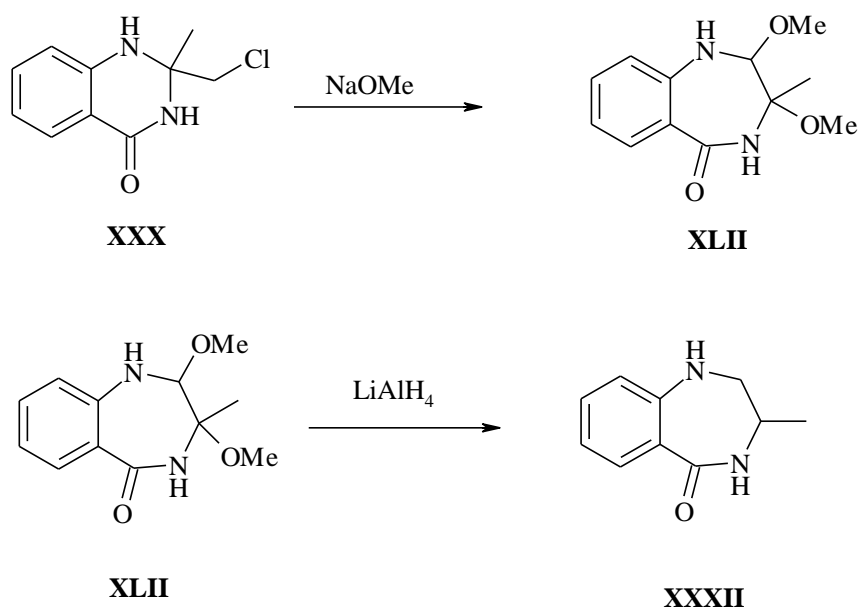


Jestliže se použije *N*-methyl derivát **XXXVIII** isomerní se sloučeninou **XXXIV**, pak vzniká benzodiazepinon **XLI** substituovaný methylem v poloze č. 3 a to sledem reakcí analogických schématu 20.

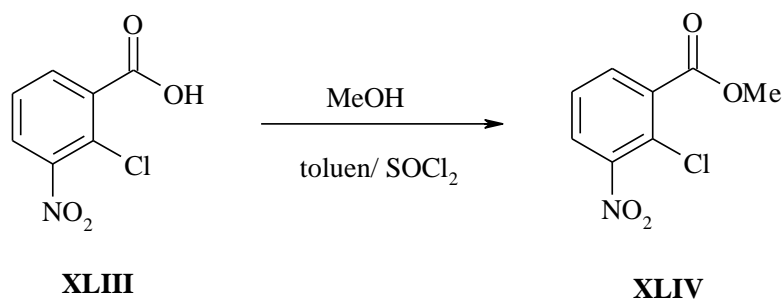
**Schema 21:**



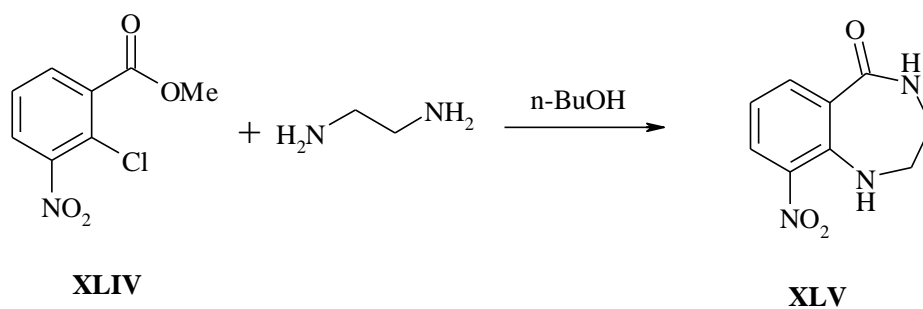
Benzodiazepinon **XXXII** lze také připravit z prekursoru **XXX**, ale za použití methoxidu sodného v metanolu. Tato reakce poskytuje jiný meziprodukt **XLII**, než je tomu ve schématu 18. Intermediát **XLII** je následně zredukován pomocí  $\text{LiAlH}_4$  v tetrahydrofuranu.

**Schema 22:**

Jednou z dalších zajímavých příprav derivátů benzodiazepinonů je reakce z lehce dostupné 2-chloro-3-nitrobenzoové kyseliny<sup>7</sup> **XLIII**. Tato kyselina je esterifikací převedena na její ester **XLIV** v 95% výtěžku<sup>8</sup>.

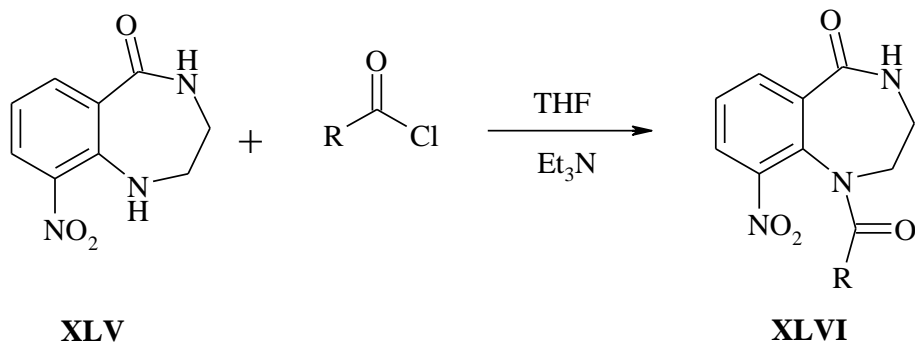
**Schema 23:**

Uzavření sedmičtého kruhu **XLV** bylo provedeno pod refluxem s ethylendiaminem v n-butanolu v 84% výtěžku.

**Schema 24:**

Benzodiazepinon **XLV** reaguje dále s acylchloridem v tetrahydrofuranu za přítomnosti triethylaminu za vzniku acylovaného benzodiazepinonu **XLVI** substituovaného v poloze č.1. Reakční výtěžek je zde ale nízký.

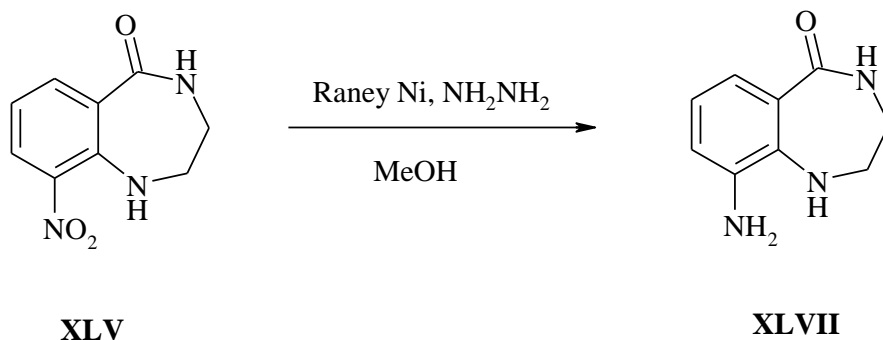
**Schema 25:**



R=Me,Ph,1-Np,2-Np

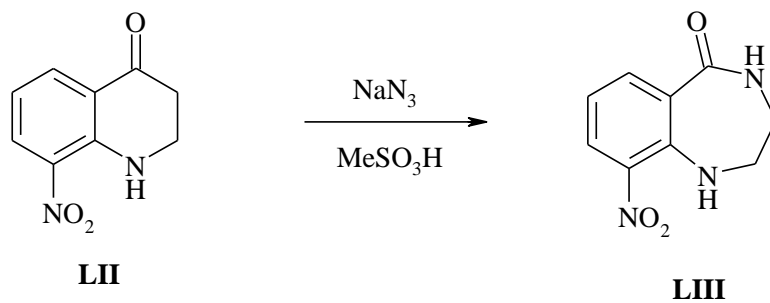
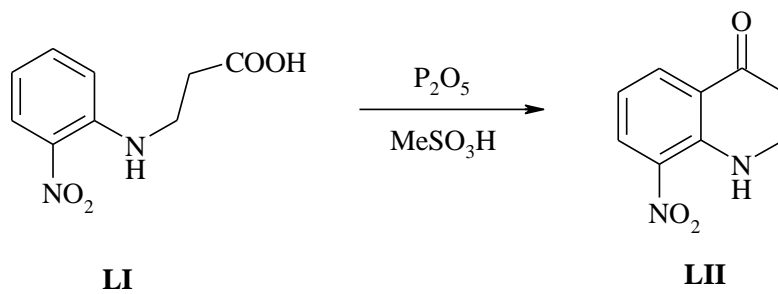
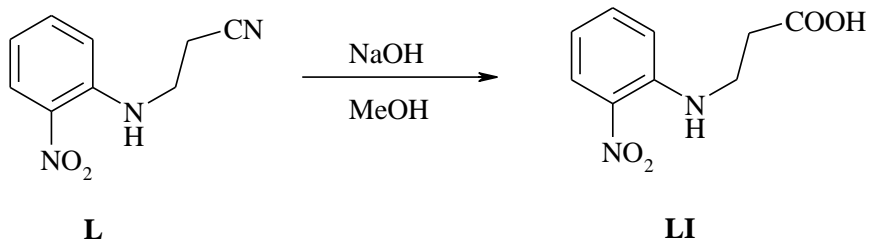
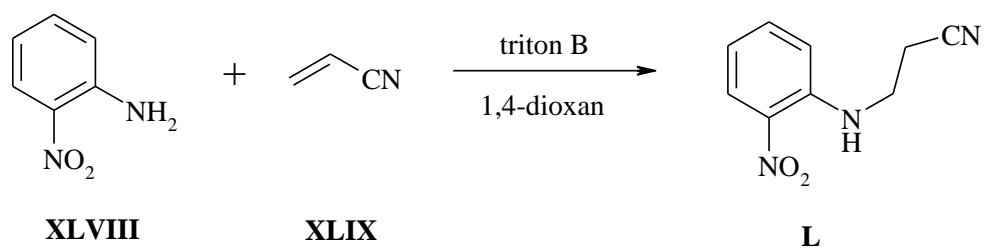
Benzodiazepinon **XLV** také podléhá redukci na nitroskupině za přítomnosti Raney niklu a hydrazinu v metanolu v 94% výtěžku.

**Schema 26:**



Další z příprav benzodiazepinonů využívá 2-nitroanilinu **XLVIII** jako výchozí látku<sup>9</sup>. 2-nitroanilin reaguje s akrylonitrilem **XLIX** za přítomnosti tritonu B v 1,4-dioxanu za vzniku sloučeniny **L** v 79% výtěžku. V následné reakci dochází k zásadité hydrolyze nitrilové skupiny na karboxylovou skupinu intermediátu **L** pod refluxem, která podléhá cyklizaci pomocí Eatonova činidla za tvorby meziprojektu **LII**<sup>10</sup>. Dalším krokem syntézy je rozšíření kruhu pomocí azidu sodného, jedná se o tzv. Schmidovu reakci<sup>11</sup>.

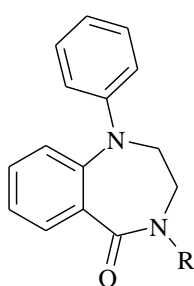
**Schema 27:**



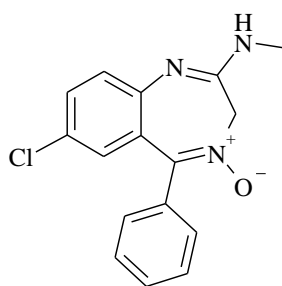
### 3.2. Biologická aktivita derivátů 1,2,3,4-tetrahydro-5H-1,4-benzodiazepin-5-onů

Biologická aktivita látek s tetrahydro-5H-1,4-benzodiazepin-5-onovým skeletem byla k dnešnímu dni studována velmi málo. Tak např. 4-N-alkylamino deriváty a odpovídající kvarterní amoniové soli tetrahydro-1,4-benzodiazepin-5-onů **LIV** byly u myši testovány na psychotropní aktivitu<sup>12</sup>. Sloučeniny ovšem postrádají sedativní aktivitu a ve srovnání s CNS benzodiazepiny, jako jsou například chlordiazepoxid a diazepam, vykazují vysokou toxicitu.

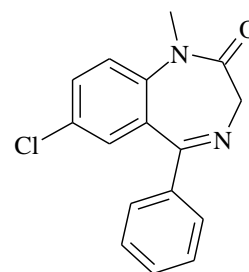
**Schema 28:**



**LIV**



chlordiazepoxid

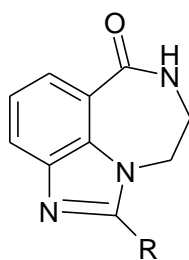


diazepam

R=(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>N(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>, (CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>N(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>, CH(CH<sub>3</sub>)CH<sub>2</sub>N(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>,  
(CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>N(CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>, (CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>-c-NC<sub>4</sub>H<sub>9</sub>, (CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>-c-NC<sub>5</sub>H<sub>11</sub>,  
(CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>N<sup>+</sup>(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub> I<sup>-</sup>, (CH<sub>2</sub>)<sub>3</sub>N<sup>+</sup>(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub> I<sup>-</sup>, CH(CH<sub>3</sub>)CH<sub>2</sub>N<sup>+</sup>(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>,  
(CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>N<sup>+</sup>CH<sub>3</sub>[(CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>] I<sup>-</sup>

Nicméně zajímavou biologickou aktivitu vykazují imidazobenzodiazepinony<sup>7</sup> **LV**. Jejich mechanismus účinku spočívá v inhibici poly(ADP ribosa)polymerázy (PARP-1), která je zapojena v řadě buněčných dějů jako jsou především oprava DNA a programovaná buněčná smrt (apoptóza).

**Schema 29:**



**LV**

R=H, Me, Ph, 1-Np, 2-Np, CH<sub>2</sub>Ph, CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>Ph,  
3-pyridyl, 2-furyl, 2-pyrrolyl, -CH<sub>2</sub>N(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>

Tyto imidazobenzodiazepinony substituované arylem mají lepší IC<sub>50</sub> (>100 nM) enzymu PARP-1, z toho vyplývá, že nejsilnější PARP-1 inhibitory mají více aromatických kruhů v rámci svých struktur<sup>9,13</sup>. Z arylových derivátů se zdá být 1-naftylový jako nejúčinnější (IC<sub>50</sub>=382 nM).

## 4. VÝSLEDKY A DISKUSE

Záměrem této práce byla syntéza různě substituovaných derivátů 1,2,3,4-tetrahydro-5*H*-1,4-benzodiazepin-5-onu z 2-fluoro-4-chloro-5-nitrobenzoové kyseliny. Tento sled reakcí měl být realizován pomocí syntézy na pevné fázi.

### 4.1. Syntéza na pevné fázi

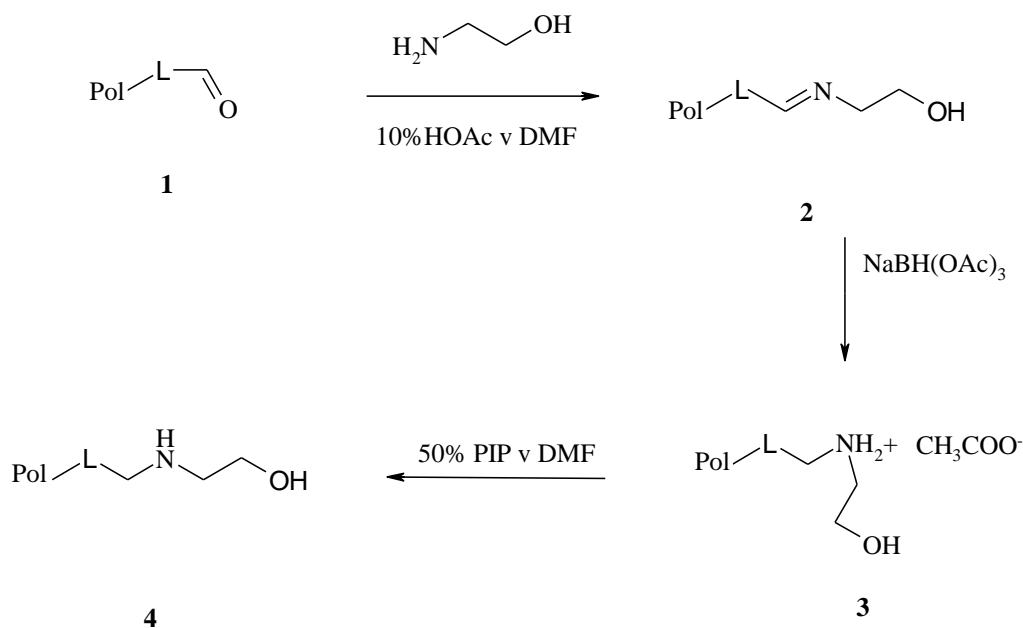
Syntézu na pevné fázi můžeme brát jako metodu, ve které jsou jednotlivé molekuly vázány na polymerní nosič a syntetizují se krok za krokem v reakční suspenzi. Ve srovnání se syntézou v roztoku je jednodušší odstranit reaktanty prostou filtrací a promytím pryskyřice v organickém rozpouštědle (např.: DMF, DCM).

V této práci je použita z velké většiny syntéza na pevné fázi. Použitým polymerním nosičem je zde aminomethylová pryskyřice a kyselá labilní BAL linker (4-(4-formyl-3-methoxyfenoxy)máselná kyselina).

Prvním krokem k syntéze cílových derivátů benzodiazepinonů byla imobilizace aminoethanolu na polymerní nosič **1**, jenž byla provedena tak, že k pryskyřici s navázaným linkerem byl přidán aminoethanol a 10% kyselina octová v DMF jako rozpouštědle. Následně byl k této pryskyřici přidán  $\text{NaBH}(\text{OAc})_3$ .

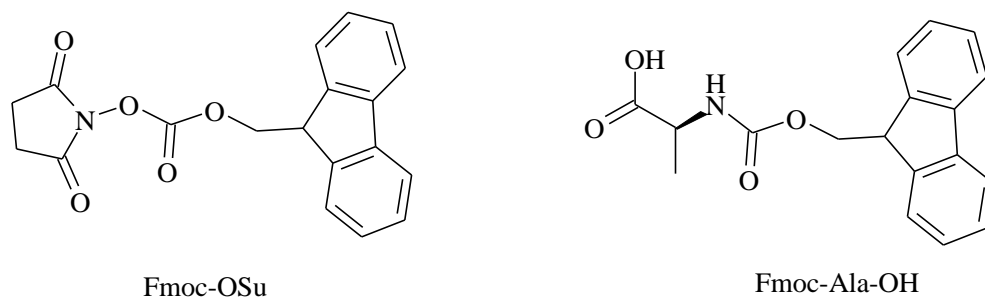


### Schema 1: reductivní aminace



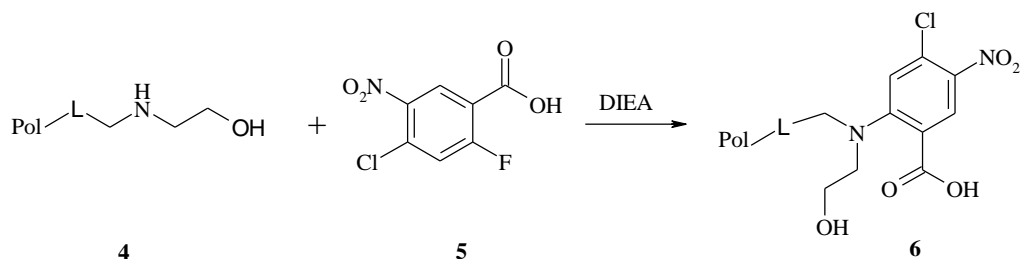
Dále byla provedena kvantifikace sloučeniny **4** pomocí Fmoc-OSu a odštěpením vzniklého produktu z přesně naváženého množství pryskyřice byl stanoven loading s pomocí LC-MS. Jako standard byl použit Fmoc-Ala-OH. Loading byl tedy stanoven na 0.2 mmol/g. Přestože se jednalo o relativně nízký výtěžek, byla obdržená pryskyřice použita pro další reakce, protože pro ověření syntetické cesty v analytickém měřítku je takový stupeň substituce dostačující.

### Schema 2: Protektivní činidlo a vnější standard



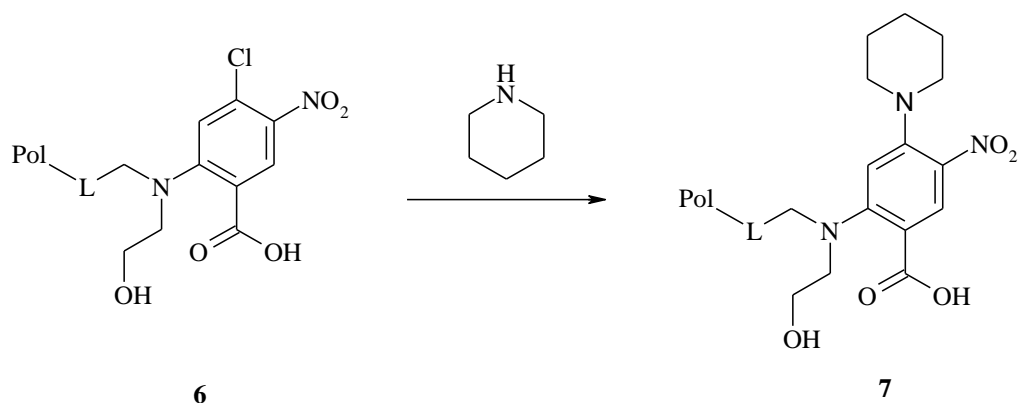
Imobilizovaný aminoethanol **4** byl podroben reakci s kyselinou 2-fluoro-4-chloro-5-nitrobenzovou **5** za přítomnosti *N,N*-diisopropylethylaminu (DIEA) v dimethylsulfoxidu (DMSO). Tato reakce běžela celkem snadno při 50°C bez žádných komplikací. Čistota produktu byla přibližně 87%.

### Schema 3:



Jako další reakce měla být mesylace primární OH skupiny za vytvoření aktivovaného esteru nutného k další reakci s primárním aminem, ovšem pozornost se uchýlila k atomu chloru, který by mohl reagovat s primárním aminem. Proto se intermediát **6** nechal nejprve zreagovat s piperidinem v DMSO, aby atom chloru neinteragoval s primárními aminy v další reakční sekvenci. Čistota produktu po analýze činila 53%, zbylých 45% tvořil intermediát **10** s molekulovou hmotností 291 vznikající intramolekulární esterifikací při kyselém štěpení z pryskyřice.

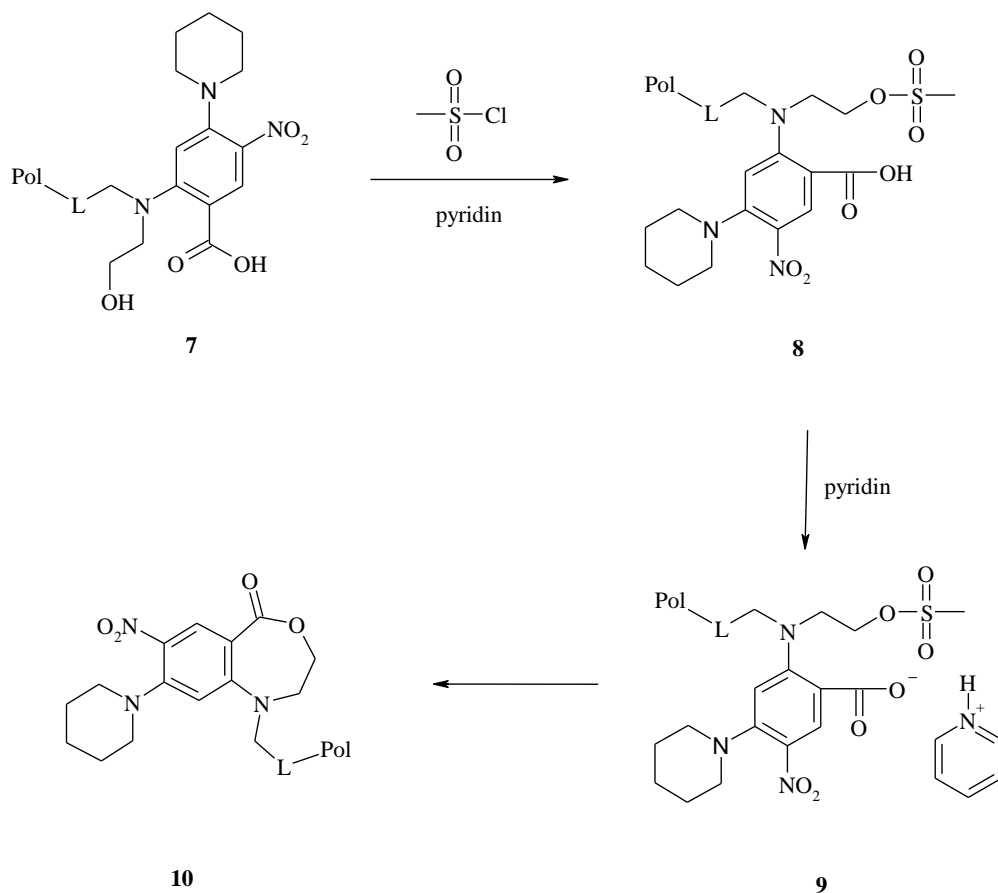
### Schema 4:



Meziprodukt **7** byl podroben reakci s mesylchloridem v pyridinu, tím se mělo dosáhnout vzniku aktivovaného esteru **8**. Při analýze byl skutečně detekován odpovídající produkt **8** v čistotě cca 20%, nicméně v reakční směsi byl opět přítomen azlakton **10** v množství cca 80%. Přestože bylo v předchozím experimentu zjištěno, že azlakton **10** vzniká částečnou intramolekulární esterifikací výchozí látky **7** za podmínek štěpení z pryskyřice (kyselá katalýza TFA), nebyla v tomto případě přítomnost výchozí sloučeniny **7** vůbec prokázána. Z toho vyplývá, že k tvorbě aktivovaného esteru **8** skutečně kvantitativně došlo, nicméně z důvodu vytvoření soli mezi pyridinem a imobilizovanou kyselinou **9** vedoucí ke zvýšení nukleofility karboxylové skupiny a následné substitucí

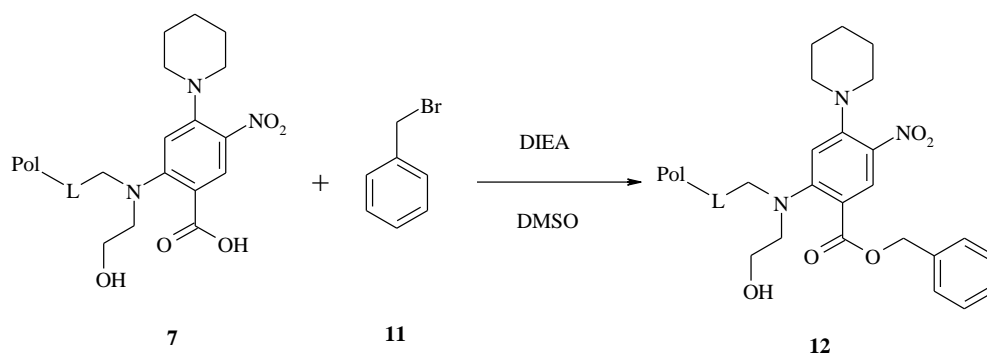
nukleofilní částečně proběhla nežádoucí intramolekulární cyklizace na azlakton **10**.

**Schema 5:**



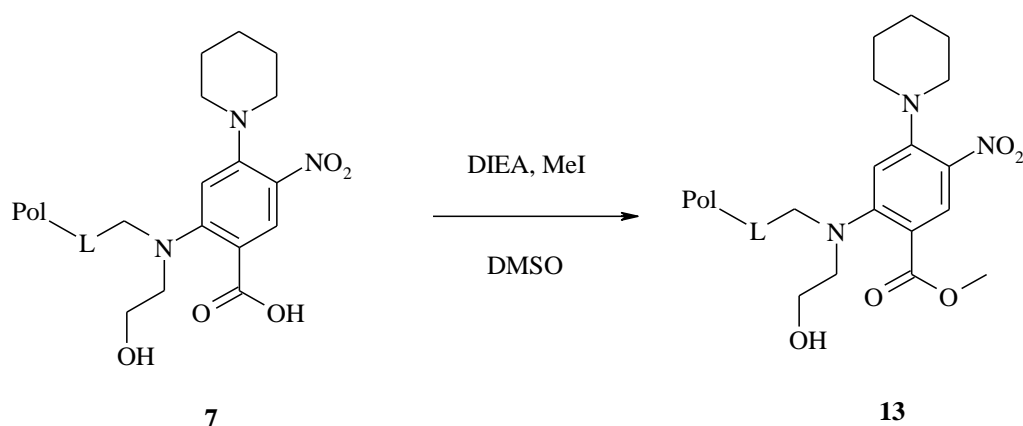
Nasledující snahou tedy bylo převést karboxylovou skupinu intermediátu **7** na ester a tím zabránit nežádoucí laktonizaci na produkt **10**. Jako protektivní skupinu na karboxyl jsme použili nejprve benzylaci pomocí benzylbromidu **11**. K meziproductu **7** byl přidán *N,N*-diisopropylethylamin v DMSO a po deseti minutách benzylbromid. K esterifikaci však bohužel došlo pouze přibližně z 15%.

**Schema 6:**

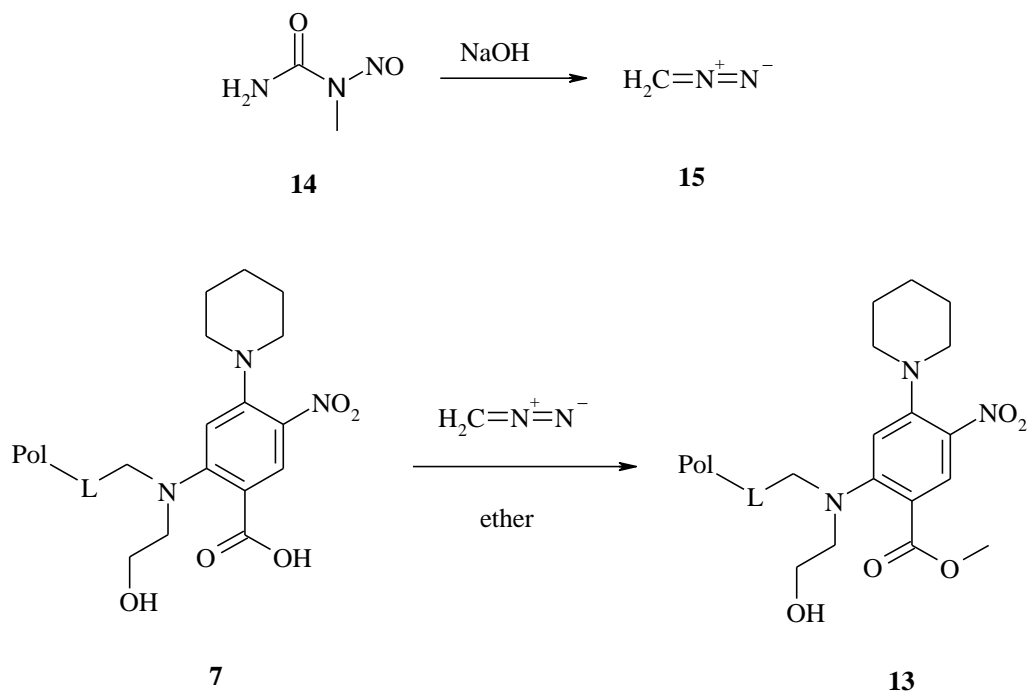


Alternativní reakce meziprojektu **7** s methyljodidem (schema 7), která byla provedena analogicky jako reakce s benzylbromidem, probíhala rovněž pouze z 10%. Byla provedena také reakce s diazomethanem **15**, která ovšem proběhla pouze z 12%. Reakce byla provedena tak, že se nejprve připravil etherický roztok, a to tak, že do etheru byl extrahován vznikající diazomethan, který se připravil rozkladem *N*-nitroso-*N*-methylmočoviny **14** v louhu.

**Schema 7:**



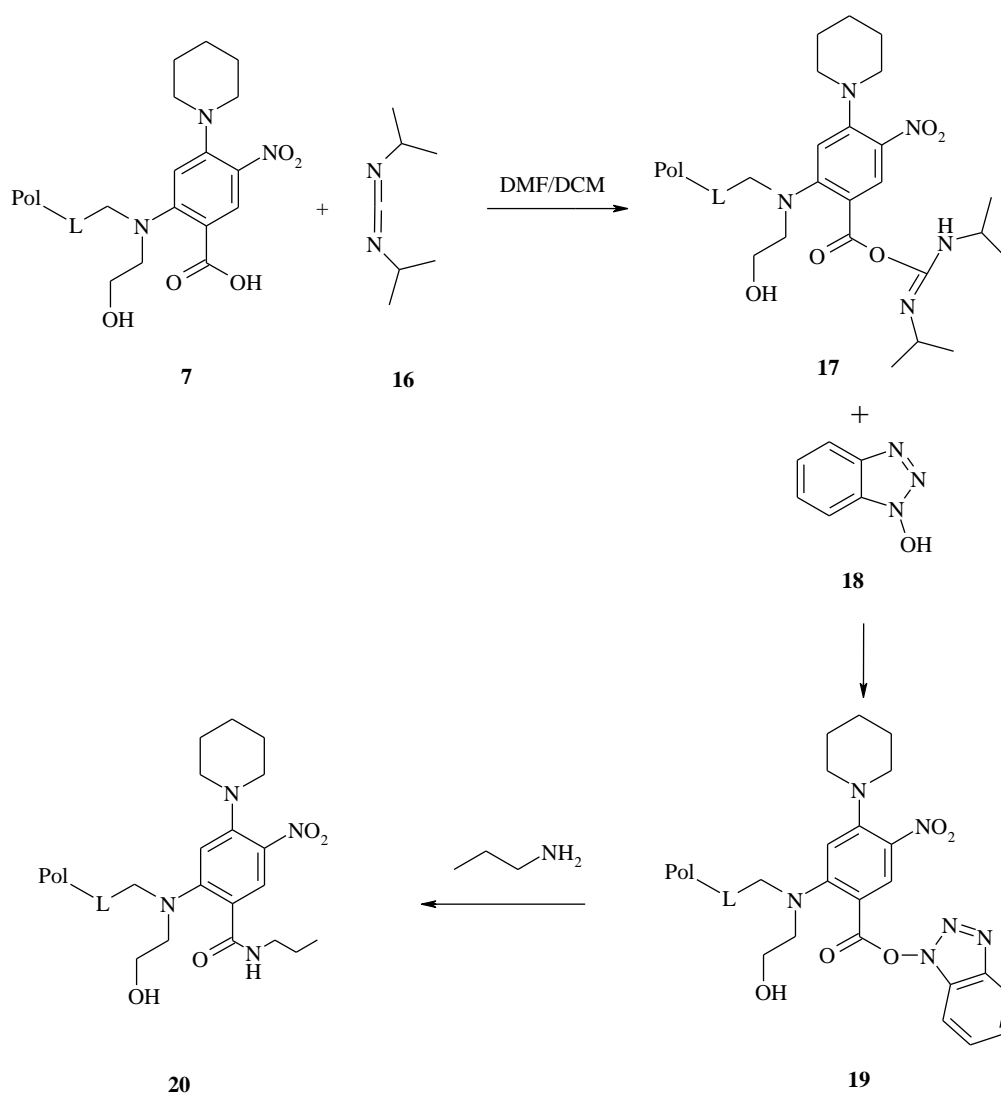
**Schema 8:**



V rámci další studia reaktivity intermediátu **7** jsme se také pokusili o transformaci karboxylové skupiny na amid pomocí tvorby aktivního HOBt esteru.

*N,N'*-Diisopropylkarbodiimid (DIC) **21** byl rozpuštěn v DMF a DCM v poměru 1:1. K tomuto roztoku byl přidán intermediát **7**, HOBt **23** a následně propylamin. Chtěli jsme dosáhnout *N*-propylamidu immobilizované kyseliny, ale HOBt technika v tomto případě selhala. Předpokládaný sled reakcí je uveden ve schématu 9.

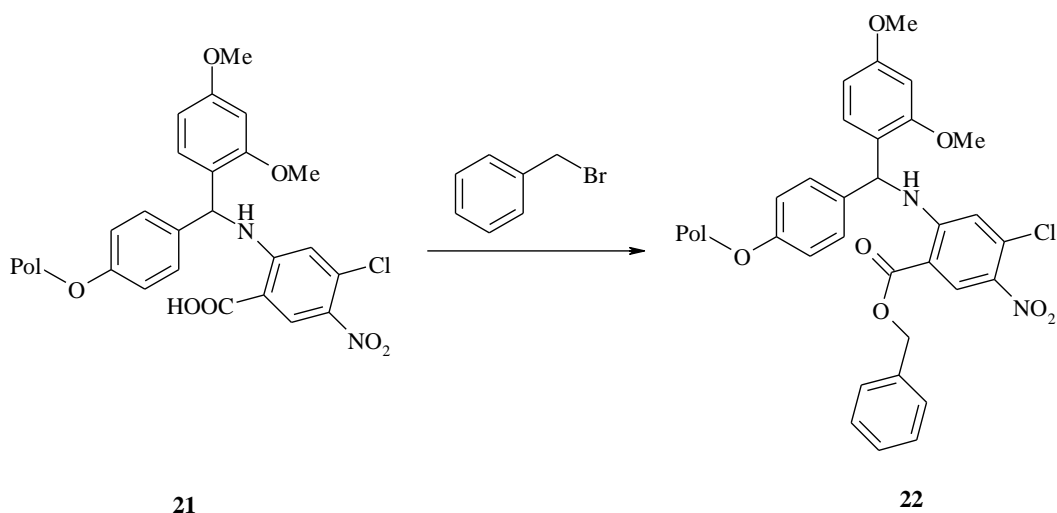
**Schema 9:**



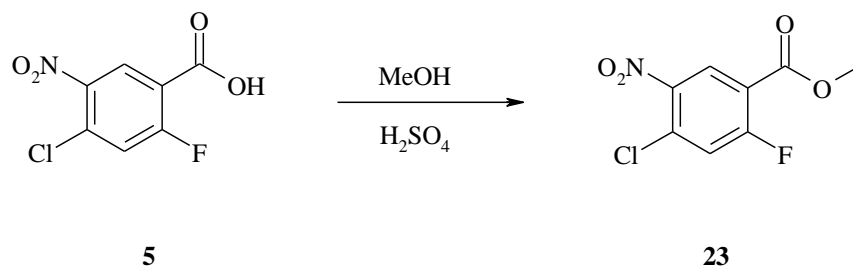
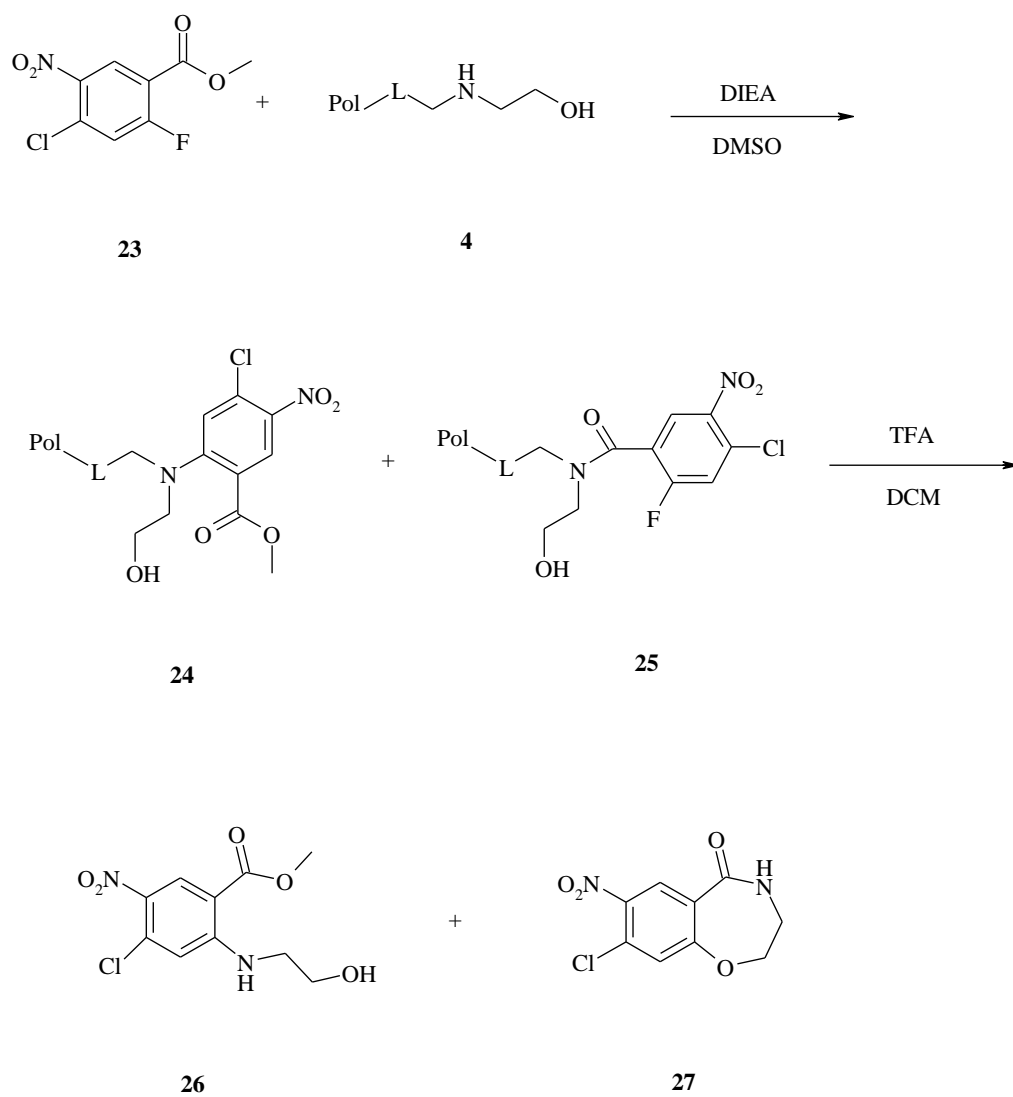
Výše uvedené neúspěšné pokusy o esterifikaci naznačují, že v případě intermediátu **6**, resp. **7** je reaktivita karboxylové skupiny výrazně snížena pravděpodobně z důvodu sterického bránění sousední hydroxyethylovou skupinou. Zajímavé je totiž porovnání reaktivity analogického derivátu immobilizovaného na Rinkově pryskyřici **21** (schema 10), kde k esterifikaci benzylbromidem za

identických reakčních podmínkách bez problémů a kvantitativně dochází za vzniku derivátu **22**.

**Schema 10:**



Vzhledem k neúspěšné solid-phase esterifikaci jsme se rozhodli připravit methylester kys. 2-fluoro-4-chloro-5-nitrobenzoové v roztoku a provést imobilizaci takto modifikované komponenty na pryskyřici **4**. Kyselina 2-fluoro-4-chloro-5-nitrobenzoová **5** byla podrobena reakci s metanolem za vzniku methylesteru kyseliny 2-fluoro-4-chloro-5-nitrobenzoové **23** o čistotě 99%, tento ester byl podroben reakci s aminoethanolem **4**, imobilizovaným na pryskyřici, ovšem zde nastal problém. V reakční směsi vznikaly dvě látky, přičemž první byl očekávaný intermediát **24** a druhý intermediát **25** měl pravděpodobnou strukturu uvedenou ve schématu 12. O tom, zda k substituci atomu fluoru dochází již při reakci se sloučeninou **4**, nebo až při štěpení z pryskyřice, nelze za daných podmínek spolehlivě rozhodnout. Navíc je nutné zdůraznit, že predikce struktury **27** byla provedena pouze na základě hmotnostního spektra.

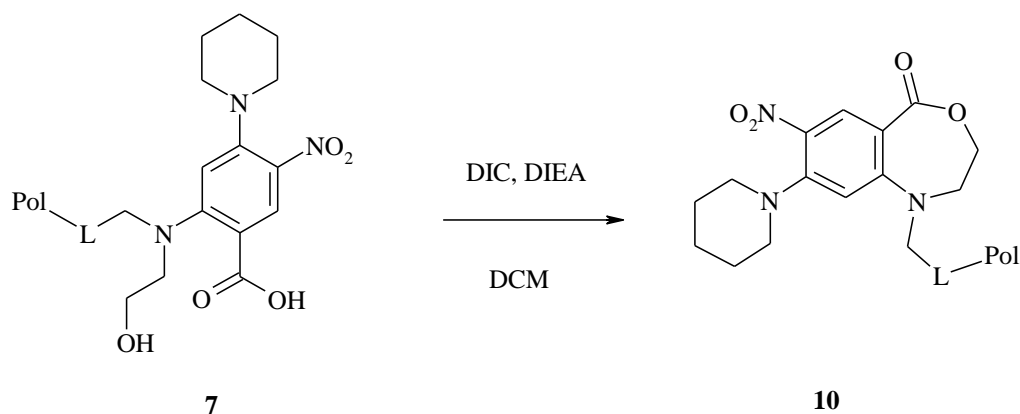
**Schema 11:****Schema 12:**

Pokusili jsme se potlačit nežádoucí vedlejší reakci snížením teploty na laboratorní úroveň, ale v tomto případě již k reakci s methylesterem kyseliny 2-

fluoro-4-chloro-5-nitrobenzoové vůbec nedošlo. Z toho vyplývá, že regioselektivita v tomto případě není možná.

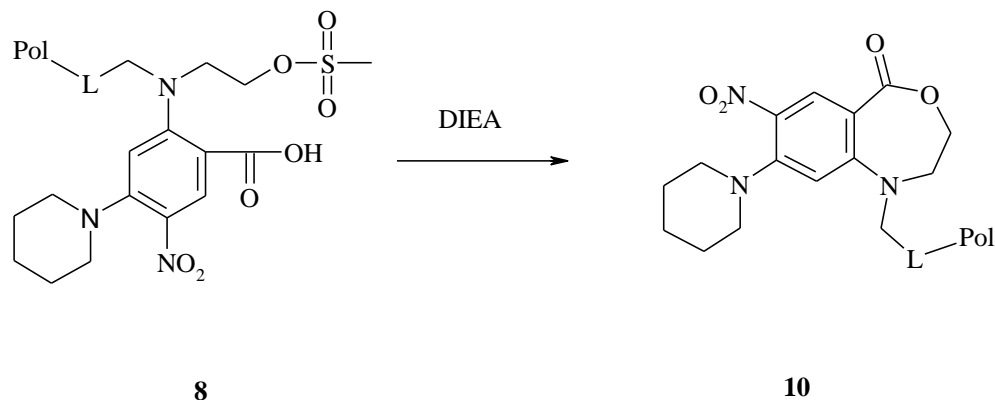
Následně jsme se zaměřili na optimalizaci podmínek vedoucích ke kvantitativní přípravě azlaktonu, jak je popsáno ve schématu 5. Zjištění, zda probíhá cyklizace, byla reakce meziprojektu **8** s trifluoroctovou kyselinou v DCM (používanou jako štěpící koktejl). Reakce byla neúspěšná a navíc poskytovala z 10% trifluoroacetyl derivát. Další reakce byla stejná jako výše uvedená, ale s přidávkem kyseliny sírové. Tato reakce rovněž neproběhla. Další reakcí na zjištění kvantitativní intramolekulární cyklizace byla reakce meziprojektu **7** s DIC a DIEA v DCM. Reakce běžela asi z 50%, zbytek tvořil nezreagovaný intermediát **7**.

**Schema 13:**



Směs intermediátu **8** a **10** (schéma 5) se nechal zreagovat s DIEA, aby se zjistilo, zda dojde ke kvantitativní cyklizaci na požadovaný azlakton. Tato reakce (schéma 14) proběhla v 90% čistotě. Tím jsme získali nejoptimálnější podmínky pro vznik azlaktonu.

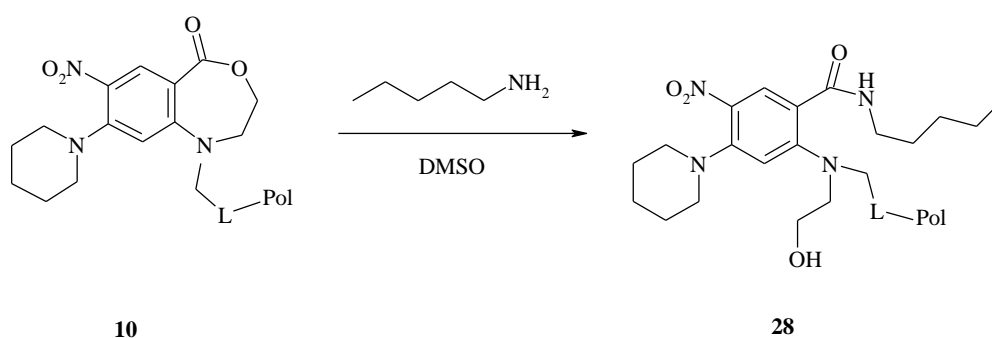
**Schema 14:**





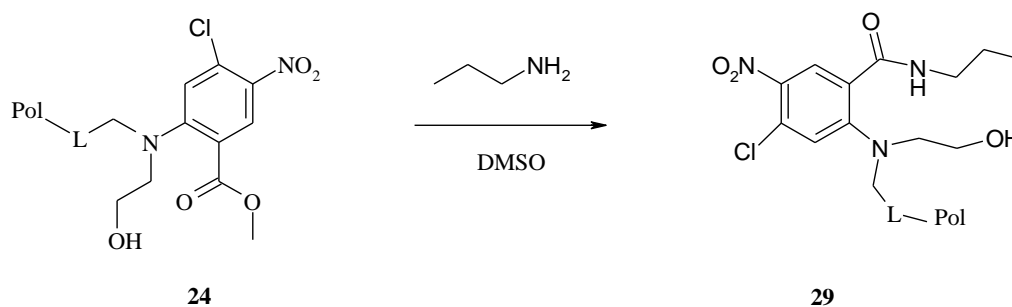
Po úspěšné optimalizaci podmínek vedoucích k čistému azlaktonu (schema 13) jsme se zaměřili na jeho alternativní využití pro syntézu cílových benzodiazepinových derivátů. Naším cílem bylo převést jej reakcí s aminem na příslušný amid a ten dále využít pro přípravu odpovídajícího mesylesteru jako prekursoru pro cyklizaci na diazepinový cyklus. Meziprodukt **10** byl proto zreagován s pentylaminem v DMSO. Reakce proběhla z 50%, zbytek tvořil nezreagovaný azlakton.

**Schema 15:**



Analogickým způsobem byla testována reaktivita sloučeniny **24** s propylaminem za teploty 40°C v DMSO, za vzniku propylamidu imobilizované kyseliny **29**. Předpokládaná reakce je uvedena ve schématu 16. Reakce běžela z 66%.

**Schema 16:**



Při následné testovací reakci intermediátu **28** s metansulfonychloridem byla obdržena pouze směs neidentifikovaných produktů. Reakce z časových důvodů nebyla dále optimalizována.

## 5. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

K syntéze na pevné fázi je potřeba speciálních laboratorních pomůcek. Za laboratorní teploty se pryskyřice pro reakci umísťovala do injekčních stříkaček s polypropylenovou fritou, aby nedocházelo k úniku pryskyřice. Při vyšších teplotách se reakce prováděly ve skleněných zkumavkách. Protřepávání reakční směsi bylo provedeno na třepače, při vyšších teplotách byl použit reaktor firmy Büchi.

### Použité přístroje a metody

Analýza dílčích reakcí byla provedena pomocí metody LC-MS a na vyhodnocení analýzy byl použit speciální software Excalibur<sup>TM</sup>.

-UPLC chromatogram (Accela Thermo Scientific) s termostatem (30°C)

-Parametry UPLC: nástřik – 5 µl

mobilní fáze – acetonitril (A) : amonium acetát 0,1% (B)

gradientová eluce – 10 A : 90 B (0 min); 80 A : 20 B (2,5 min);

80 A : 20 B (4 min); 10 A : 90 B (4,5 min); 10 A : 90 B (5 min).

-Hmotnostní spektrometr s trojitým kvadrupólovým analyzátozem

-Detektor TSQ Quantum Access (Thermo Scientific, USA, SN: TQU01482)

### Reduktivní aminace s 2-aminoethanolem (4)

Pryskyřice s navázaným kyselé labilním linkerem (**1**) (1g; 1 mmol/g) byla promyta 2x bezvodým DMF a následně byla smíchána s roztokem obsahujícím 2-aminoethanol (266µl; 4,4mmol) ve směsi kyseliny octové a bezvodého DMF (10ml; 10%). Reakce se nechala běžet přes noc za laboratorní teploty a poté byl k pryskyřici přidán roztok triacetoxhydroboridu sodného (311mg; 1,5mmol) ve směsi kyseliny octové a bezvodého DMF (5ml; 5%). Injekční stříkačku bylo nutné upevnit do svislé polohy, vysunout píst co nejvýše a těsně pod pístem propíchnout stříkačku jehlou, aby došlo k úniku vodíku z reakční směsi. Po 1 hodině třepání reakční směsi za laboratorní teploty byl přidán pevný triacetoxhydroborid sodný (311mg; 1,5mmol) a za další hodinu se tento krok opakoval. Reakční směs po posledním přidávku triacetoxhydroboridu sodného se nechala třepat asi 2 hodiny.

Po ukončení reakce byla pryskyřice promyta 3x v DMF a poté byla protřepána asi 10 minut se směsí piperidinu v DMF (5ml; 50%). Nakonec byla pryskyřice s navázaným aminoethanolem (**4**) promyta 3x v DMF, 3x v DCM, 3x v MeOH a vysušena v proudu dusíku.

### **Stanovení loadingu pryskyřice po reductivní aminaci**

Pryskyřice s imobilizovaným aminoethanolem (**4**) (30mg) byla smíchána s *N*-(9-Fluorenylmethoxykarbonyloxy) sukcinimidem (165mg; 0,5mmol) a diisopropylethylaminem (87μl; 0,5mmol) v DCM (1ml). Po 30 minutách třepání za laboratorní teploty byla pryskyřice promyta 5x v DCM, 3x v MeOH a následně vysušena v proudu dusíku. Po reakci bylo odebráno 2x po 10 mg pryskyřice a tyto vzorky byly jednotlivě štěpeny pomocí kyseliny trifluoroctové v DCM (0,5ml, 50%). Tím se provedlo standardní štěpení na analýzu LC-MS. Jako vnější standard byl použit *N*-(9-Fluorenylmethoxycarbonyl)-L-alanin (1mg) v MeOH (1ml). Z LC-MS analýzy bylo zjištěno, že loading pryskyřice (**4**) byl 0.2 mmol/g. Výtěžek reakce je přibližně 35 %.

### **Syntéza intermediátu (6)**

K pryskyřici s navázaným aminoethanolem (**4**) (500mg) byl přidán roztok kyseliny 2-fluoro-4-chloro-5-nitrobenzoové (0,2196g, 1 mmol) a *N,N*-diisopropylethylaminu (350μl, 2mmol) v DMSO (5ml). Reakce se nechala běžet přes noc za teploty 50°C, poté byla pryskyřice promyta 3xDMF a 3xDCM. Po promytí se připravil vzorek pro LC-MS analýzu pomocí kyseliny trifluoroctové v DCM (0,5ml, 50%). Čistota surového produktu je 93%.

### **Syntéza intermediátu (7)**

Pryskyřice s navázanou kyselinou (**6**) (200mg) byla podrobena reakcí s roztokem piperidinu (200μl, 2mmol) v DMSO (1,8ml). Reakce byla třepána přes noc za teploty 70°C. Po reakci byla pryskyřice promyta 3xDMF a 3xDCM a poté standardně štěpena štěpícím koktejlem.

LC-MS: Čistota surového produktu je 74%

intermediát 7:  $[M+H]^+ = 310,00$

## Syntéza intermediátu (8)

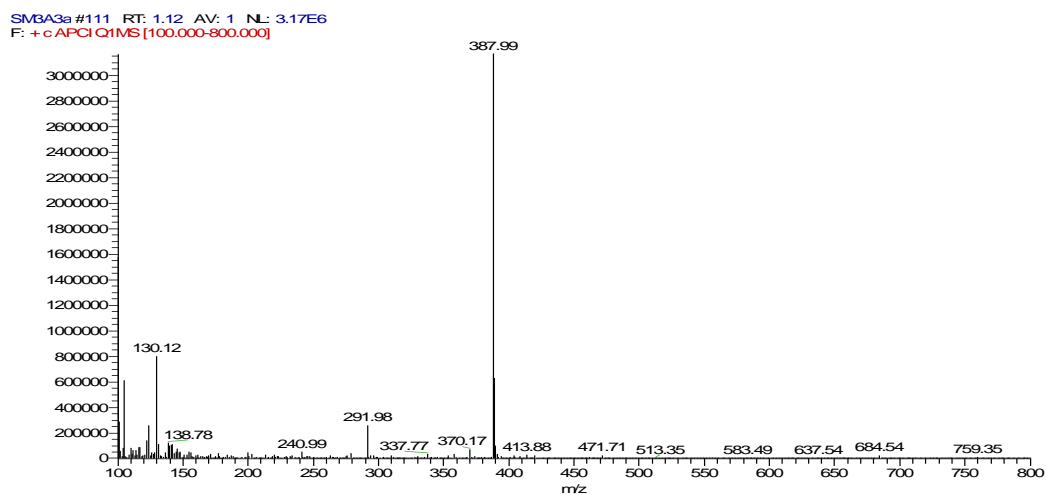
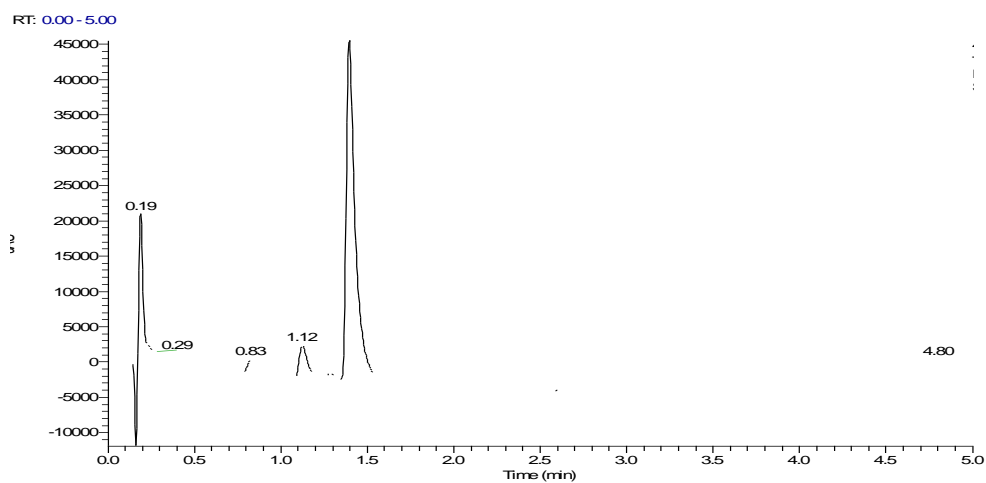
K pryskyřici (7) (100mg) se přidal roztok mesylchloridu (77 $\mu$ l, 1mmol) v pyridinu (1ml). Reakční směs byla třepána 1 hodinu a poté byla promyta bezvodým THF a standardně štěpena.

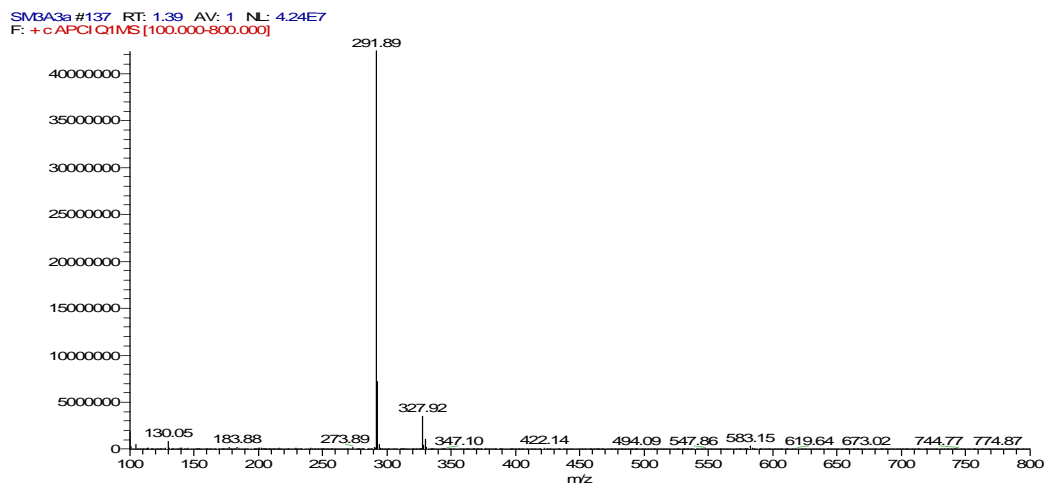
LC-MS: stupeň konverze intermediátu (8) je 8%

Stupeň konverze intermediátu (10) je 84%

Intermediát (8):  $[M+H]^+ = 387,99$

Intermediát (10):  $[M+H]^+ = 291,89$





### Syntéza intermediátu 12

K pryskyřici (**7**) (20mg) byl přidán roztok *N,N*-diisopropylethylaminu (100 $\mu$ l, 0,6mmol) v DMSO (1ml). Reakční směs se nechala deset minut reagovat, pak se roztok se stříkačky vytlačil a poté byl přidán roztok benzylbromidu (100 $\mu$ l, 0,85mmol) v DMSO (1ml). Reakce byla třepána přes noc za laboratorní teploty. Po reakci se pryskyřice promyla 3xDMF a 3xDCM a standardně štěpila na LC-MS analýzu.

LC-MS: stupeň konverze je 15%

Intermediát (12):  $[M+H]^+ = 399,96$

### Syntéza intermediátu 13 (schema 7)

K pryskyřici (**7**) (20mg) byl přidán roztok *N,N*-diisopropylethylaminu (50 $\mu$ l, 0,3mmol) v DMSO (1ml). Reakční směs se nechala deset minut reagovat, pak se roztok se stříkačky vytlačil a poté byl přidán roztok methyljodidu (50 $\mu$ l, 0,8mmol) v DMSO (1ml). Reakce se nechala přes noc třepat za laboratorní teploty. Po reakci byla pryskyřice promyta 3xDMF a 3xDCM a poté byla standardně štěpena.

LC-MS: stupeň konverze je 5%

Intermediát (13):  $[M+H]^+ = 323,98$

### Syntéza intermediátu 13 (schema 8)

Nejprve byl připraven roztok diazomethanu v etheru. *N*-nitroso-*N*-methylmočovina (50mg, 0,5mmol) byla přidána do roztoku hydroxidu sodného (3ml, 10%) a tento roztok byl převrstven etherem (2ml). Při reakci, probíhající za

laboratorní teploty, se uvolňovaný diazomethan rozpouštěl v etheru. Do stříkačky s pryskyřicí (**7**) (20mg) byl etherický roztok nasát. Při třepání bylo nutné dát stříkačku do vertikální polohy, a to kvůli unikajícímu dusíku z reakční směsi. Reakce pryskyřice (**7**) běžela přes noc za laboratorní teploty. Po reakci byla pryskyřice promyta 3xDMF a 3xDCM a standardně štěpena.

LC-MS: stupeň konverze je 12%

Intermediát 13:  $[M+H]^+ = 323,99$

### Syntéza intermediátu 20

Byl připraven roztok *N,N'*-diisopropylkarbodiimidu (31 $\mu$ l, 0,2mmol) v DMF (0,5ml) a DCM (0,5ml), který byl přidán k pryskyřici (**7**) (20mg). Po přidání *N,N'*-diisopropylkarbodiimidu se přidal hydroxybenzotriazol (31mg, 0,2mmol) a vzápětí hned propylamin (33 $\mu$ l, 0,4mmol). Reakční směs byla protřepávána přes noc za laboratorní teploty, poté byla pryskyřice promyta 3xDMF a 3xDCM a standardně štěpena.

LC-MS: Stupeň konverze reakce 0%

Reakce zřejmě ze sterických důvodů neproběhla.

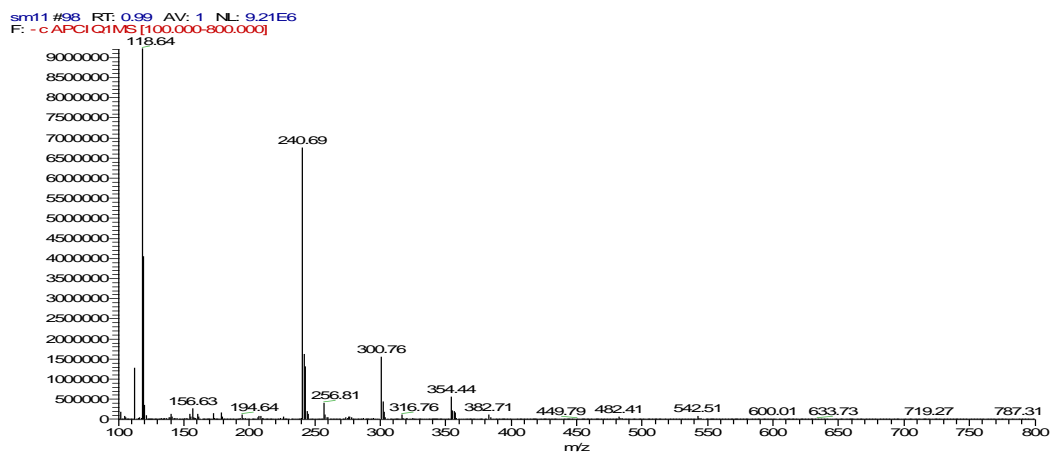
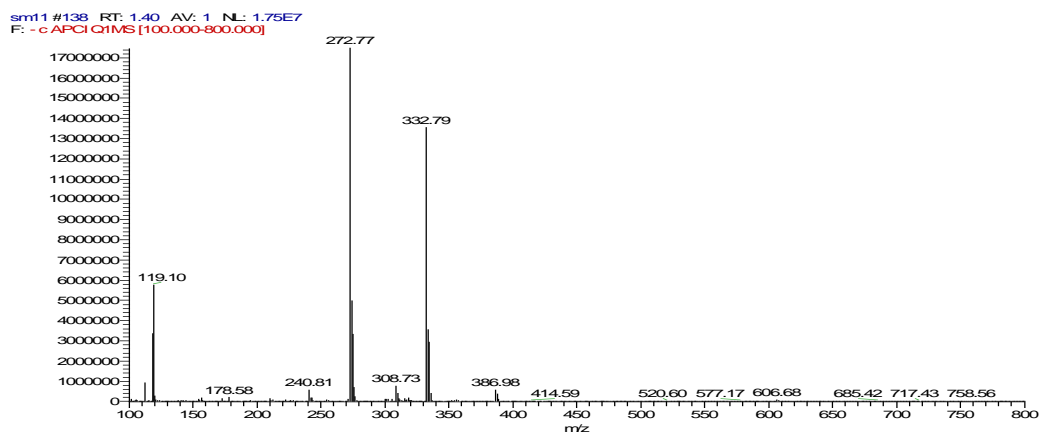
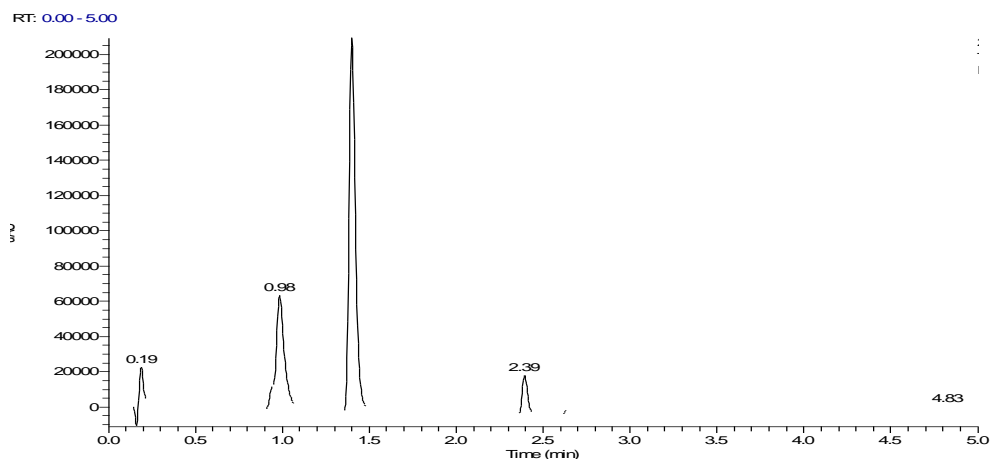
### Syntéza intermediátu 26

Methylester kyseliny 2-fluoro-4-chloro-5-nitrobenzoové (46,7mg, 0,2mmol) byl rozpuštěn v DMSO (1ml) a poté byl přidán *N,N'*-diisopropylethylamin (35 $\mu$ l, 0,2mmol). K tomuto roztoku se přidala pryskyřice s navázaným aminoethanolem (**4**) (100mg). Reakce se nechala třepat přes noc za teploty 50°C. po reakci byla pryskyřice promyta 3xDMF a 3xDCM a poté standardně štěpena.

LC-MS: čistota produktu je 68%

Intermediát 26:  $[M-H]^- = 272,77$

Intermediát 27:  $[M-H]^- = 240,69$

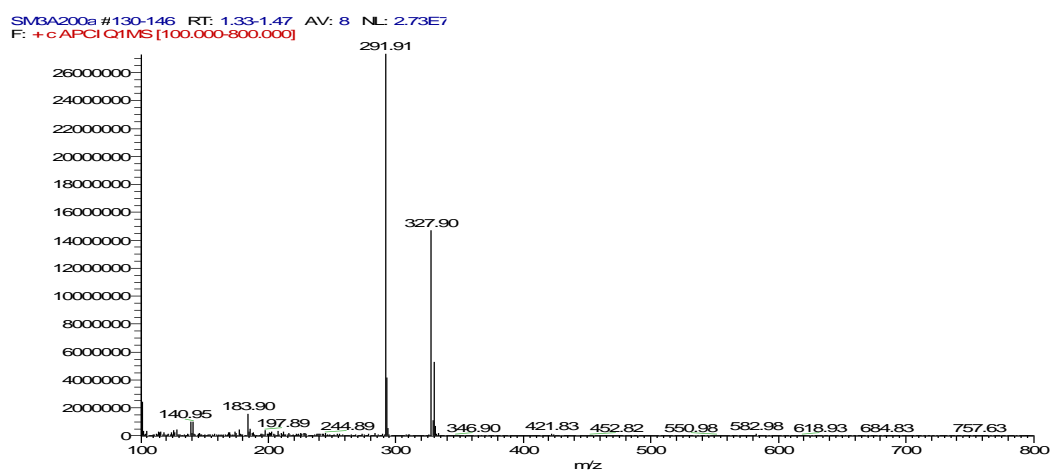
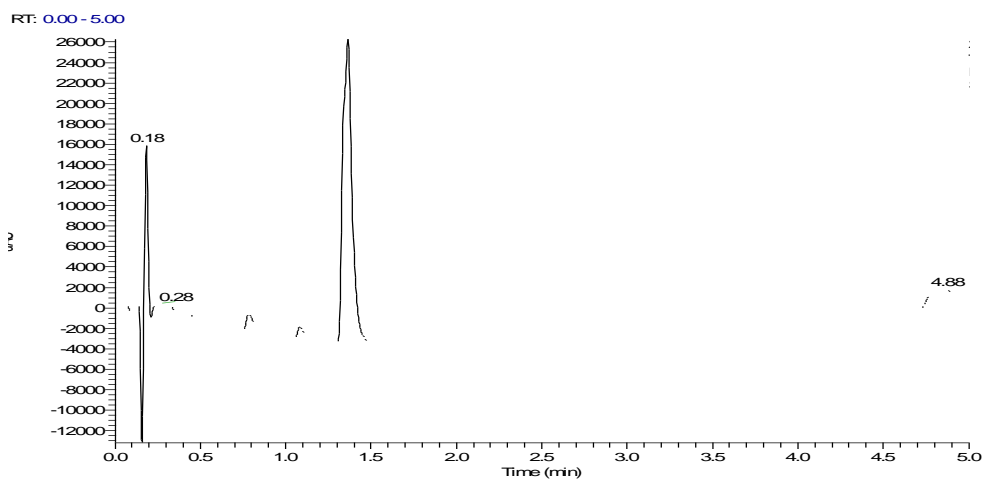


## Optimalizace podmínek pro reakci intermediátu 10

K pryskyřici (**8**) obsahující mesylester (20mg) byl přidán *N,N*-diisopropylethylamin (35 $\mu$ l, 0,2mmol) v DMF (1ml). Tato reakce byla třepána přes noc za laboratorní teploty a poté byla promyta 3xDMF a 3xDCM a standardně štěpena. Reakce pak byla provedena ve větším množství, konkrétně 200mg pryskyřice (**8**).

LC-MS: čistota produktu je 91%

Intermediát 10:  $[M+H]^+ = 291,92$



### Syntéza intermediátu 28

Prskyřice (**10**) s navázaným azlaktonem (20mg) byla smíchána s pentylaminem (23 $\mu$ l, 0,2mmol) v DMSO (1ml). Reakce byla třepána přes noc za teploty 80°C. Po reakci byla prskyřice promyta 3xDMF a 3xDCM a poté standardně štěpena.

LC-MS: čistota produktu je 48%

Intermediát 28:  $[M+H]^+ = 379,05$

### Syntéza intermediátu 29

Prskyřice s navázanými intermediáty (**24** a **25**) (20mg) byla podrobena reakci s propylaminem (82 $\mu$ l, 1mmol) v DMSO (1ml). Reakce se nechala třepat přes noc při teplotě 40°C. Po reakci byla prskyřice promyta 3xDMF a 3xDCM a standardně štěpena.

LC-MS: čistota produktu je 66%

Intermediát 29:  $[M-H]^- = 299,79$



## 6. ZÁVĚR

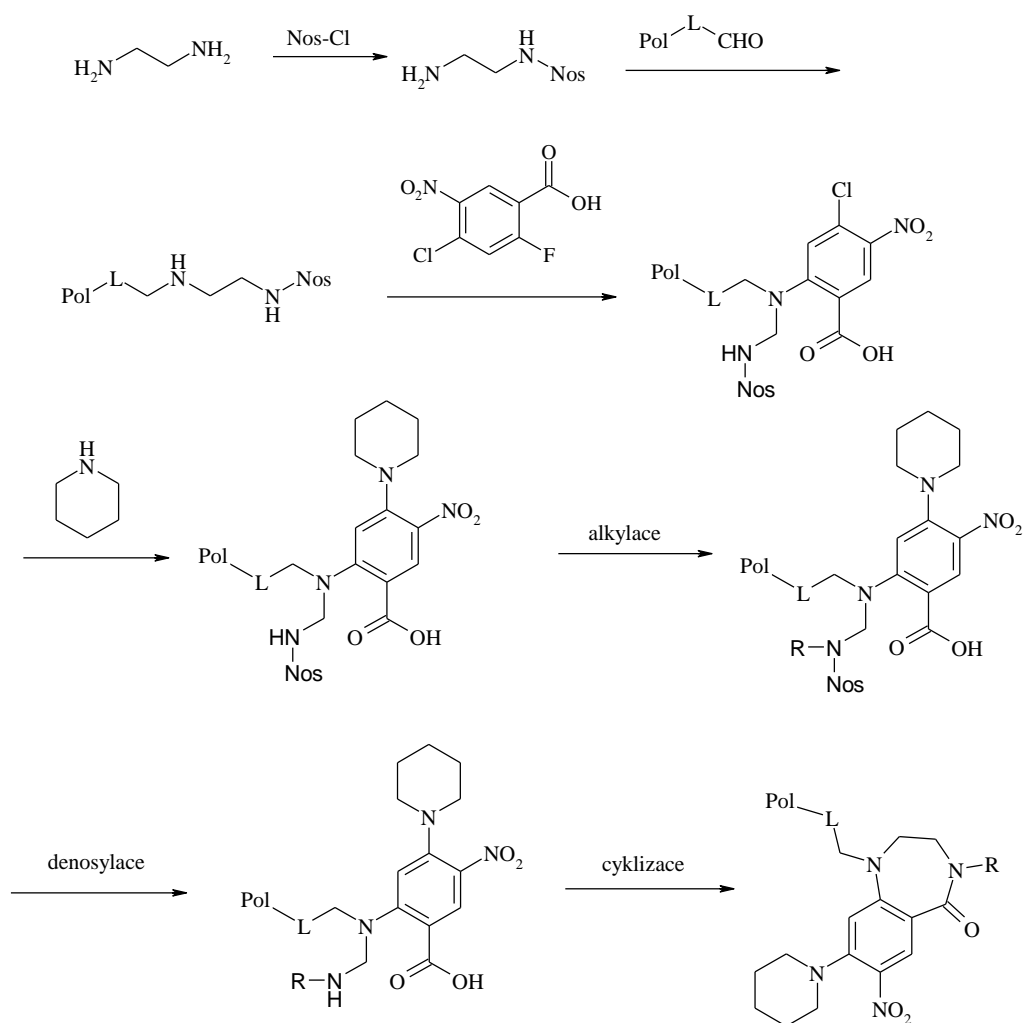
V úvodní části předložené bakalářské práce jsme uvedli několik metod příprav derivátů 1,2,3,4-tetrahydro-5*H*-1,4-benzodiazepin-5-onů. Naznačili jsme také biologickou aktivitu těchto látek, nicméně tyto látky dosud nebyly z pohledu biologických účinků podrobněji zkoumány, proto je rešerše zaměřena spíše na metody přípravy cílových benzodiazepinů.

Záměrem této práce byla příprava derivátů 7-nitro-1,2,3,4-tetrahydro-5*H*-1,4-benzodiazepin-5-onů. Navržená syntetická cesta nevedla k cílovým derivátům, protože mesylace intermediátu **7** vedla ke vzniku azlaktonu **10** (schema 5 – diskusní část). První částí experimentu byla reduktivní aminace 2-aminoethanolu na aminomethylované pryskyřici s navázaným kyselé labilním BAL linkerem **1** za vzniku imobilizovaného aminoethanolu **4**. Dále byla pryskyřice **4** zreagována s kyselinou 2-fluoro-4-chloro-5-nitrobenzoovou **5**, která se bez problému navázala za vzniku meziprojektu **6**. Následovala reakce pryskyřice **6** s piperidinem, aby se zabránilo vedlejším reakcím na atomu chloru. Reakce proběhla téměř v pořádku, a proto jsme se rozhodli o mesylaci pryskyřice **7**. Při této reakci byla zjištěna přítomnost azlaktonu **10**, proto jsme se zaměřili na to, abychom získali požadovaný namesylovaný derivát **8**, aniž bychom detekovali vznikající azlakton. Nejprve jsme se rozhodli, že zkusíme ochránit karboxylovou skupinu pomocí esterifikace. Jako první esterifikaci byla použita reakce benzylbromidu **11** s pryskyřicí **7**. Vzhledem k nízkému výtěžku benzylace jsme použili analogickou metodu esterifikace methyljodidem. Bohužel ani tato metoda neposkytla methylester v požadované čistotě. Díky pravděpodobnému sterickému bránění aminoethanolového zbytku jsme použili metodu s diazomethanem **15** k přípravě methylesteru imobilizované kyseliny. Brali jsme v úvahu, že molekula diazomethanu je dostatečně malá a reaktivní na to, aby pronikla do stericky bráněného centra. Očekávali jsme reakci, která půjde snadno a bez problémů, ale LC-MS analýza ukázala, že reakce proběhla v mizivém výtěžku. Poslední metodou k přípravě esteru imobilizované kyseliny byla metoda HOBt. HOBt metoda v tomto případě selhala.

Vzhledem k neúspěšnému pokusu o esterifikaci imobilizované kyseliny jsme místo kyseliny 2-fluoro-4-chloro-5-nitrobenzoové použili její methylester, který jsme se pokusili navázat na pryskyřici **4**. Reakcí sice vznikl námi požadovaný derivát **24**, ale vznikl i vedlejší produkt **25**, resp. **27**. Jelikož nebyla úspěšná ani imobilizace methylesteru kyseliny 2-fluoro-4-chloro-5-nitrobenzoové, zaměřili jsme se na optimalizaci reakčních podmínek vedoucích k azlaktonu **10**. Namesylovanou pryskyřici **8** obsahující větší část už vzniklého azlaktonu jsme nechali zreagovat s *N,N*-diisopropylethylaminem. Reakce proběhla ve velkém výtěžku a poskytla čistý azlakton. Dále jsme zkusili také reakci pryskyřice **7** s *N,N'*-Diisopropylkarbodiimidem a *N,N*-diisopropylethylaminem, reakce ovšem poskytla azlakton pouze v čistotě asi 50%. Po úspěšné optimalizaci podmínek jsme

připravili azlakton ve větším množství a zkusili jsme reakci s pentylaminem, abychom získali amid imobilizované kyseliny **28**. Reakce proběhla z 50%, nicméně jsme intermediát nechali zreagovat s mesylchloridem, ovšem tato reakce vedla k neidentifikovatelné směsi produktů.

Z výše popsaných experimentálních výsledků je patrné, že testovaná syntetická cesta není pro přípravu cílových derivátů optimální. Jako alternativní přípravu cílových derivátů proto navrhuje níže uvedenou reakční sekvenci. Ta je založená na přípravě reverzibilně chráněného ethylendiaminu pomocí roztokové syntézy a jeho využití pro přípravu cílových derivátů pomocí syntézy na pevné fázi. Testování uvedené syntetické alternativy bude předmětem dalšího výzkumu.



## 7. LITERATURA

1. T. Hussenether, H. Hübner, P. Gmeiner and R. Troschütz.: *Bioorg. Med. Chem.*, **12**, 2627 (2004)
2. H. Sashida, A. Fujii, and T. Tsuchiya.: *Chem. Pharm. Bull.*, **35**, 3182-3188 (1987)
3. A. A. Santilli and T. S. Osdene.: *J. Org. Chem.*, **31**, 4268-4270 (1966)
4. A. A. Santilli and T. S. Osdene.: *J. Org. Chem.*, **29**, 1998-2003 (1964)
5. E. A. Younes, A. Q. Hussein, M. A. May, and F. R. Fronczek.: *ARKIVOC*, **ii**, 322-330 (2011)
6. G. F. Field, W. J. Zally, and L. H. Sternbach.: *J. Org. Chem.*, **36**, 777-782, (1971)
7. D. Ferraris, R. P. Ficco, D. Dain, M. Ginski, S. Lautar, K. Lee-Wisdom, S. Liang, Q. Lin, M. X.-C. Lu, L. Morgan, B. Thomas, L. R. Williams, J. Zhang, Y. Zhou and V. J. Kalish.: *Bioorg. Med. Chem.*, **11**, 3695–3707, (2003)
8. M. J. Kukla, H. J. Breslin, R. Pauwels, C. L. Fedde, M. Miranda, M. K. Scott, R. G. Sherrill, A. Raeymaekers, J. Van Gelder, K. Andries, M. A. C. Janssen, E. De Clerq, and P. A. J. Janssen.: *J. Org. Chem.*, **34**, 746-751, (1991)
9. D. J. Skalitzky, J. T. Marakovits, K. A. Maegley, A. Ekker, Xiao-Hong Yu, Z. Hostomsky, S. E. Webber, B. W. Eastman, R. Almassy, and J. Li.: *J. Med. Chem.*, **46**, 210-213, (2003)
10. J. M. Kamenka, and M. N. Alam.: *J. Heterocycl. Chem.*, **10**, 459-462, (1973)
11. D. Misiti, F. Gatta, and R. Landi-Vittory.: *J. Heterocycl. Chem.*, **8**, 231-236, (1971)
12. C. Bagolini, P. de Witt, L. Pacifici, and M. T. Ramacci.: *J. Med. Chem.*, **21**, 476-480, (1978)
13. S. S. Canan Koch, L. H. Thoresen, J. G. Tikhe, K. A. Maegley, R. J. Almassy, J. Li, Xiao-Hong Yu, S. E. Zook, R. A. Kumpf, C. Zhang, T. J. Boritzki, R. N. Mansour, K. E. Zhang, A. Ekker, C. R. Calabrese, N. J. Curtin, S. Kyle, H. D. Thomas, Lan-Zhen Wang, A. Hilary Calvert, B. T. Golding, R. J. Griffin, D. R. Newell, S. E. Webber, and Z. Hostomsky.: *J. Med. Chem.*, **45**, 4961–4974, (2002)