

UNIVERZITA PALACKÉHO V OLOMOUCI
PŘÍRODOVĚDECKÁ FAKULTA
Katedra organické chemie



**Arylácia brómbenzoyldiaminopyrazolov za podmienok
Suzuki-Miyaurovej reakcie**

Bakalárska práca

Autor:	Martin Pisár
Študijný program:	B1407 Chemie
Študijný odbor:	Bioorganická chemie a chemická biologie
Typ štúdia:	Prezenčné
Vedúci práce:	doc. RNDr. Petr Cankař, Ph.D.

Podakovanie

Moje podakovanie patrí doc. RNDr. Petrovi Cankařovi, Ph.D. za odborné vedenie, cenné rady a pripomienky, ktoré mi pri riešení tejto bakalárskej práce poskytol. Podakovanie taktiež patrí celej Katedre organickej chémie za ochotu a priateľské prostredie. A v neposlednom rade by som chcel poďakovať celej mojej rodine a priateľke Lenke za podporu.

Táto záverečná práca vznikla za podpory interných grantov IGA_PrF_2017_009 a IGA_LF_2017_028.

Prehlásenie

Prehlasujem, že som záverečnú prácu vypracoval samostatne pod vedením doc. RNDr. Petra Cankařa, Ph.D. a že som uviedol všetky použité informačné zdroje a literatúru. Táto práca ani jej podstatná časť nebola použitá k získaniu iného alebo rovnakého akademického titulu.

Súhlasím s tým, aby moja práca bola sprístupnená v knižnici Katedry organickej chémie, Prírodovedeckej fakulty, Univerzity Palackého v Olomouci.

V Olomouci dňa:

Podpis

Bibliografická identifikácia

Meno a priezvisko autora:	Martin Pisár
Názov práce:	Arylácia brómbenzoyldiaminopyrazolov za podmienok Suzuki-Miyaurovej reakcie
Typ práce:	Bakalárska
Pracovisko:	Katedra organickej chémie, Prírodovedecká fakulta Univerzity Palackého v Olomouci
Školiteľ:	doc. RNDr. Petr Cankař, Ph.D.
Rok obhajoby práce:	2017
Abstrakt:	<p>Táto bakalárska práca sa zaoberá aryláciou 3- a 4-brómbenzoyldiaminopyrazolov za podmienok Suzuki-Miyaurovej cross-couplingovej reakcie. U týchto látok je predpoklad inhibičnej aktivity na cyklín dependentné kinázy a z toho vyplývajúca cytotoxická aktivita. Teoretická časť sa zaoberá tými reakciami pyrazolov, ktoré sú často využívané pri ich derivatizáciách, a spôsobmi chránenia N1 dusíka na pyrazoloch. Ďalej je rozobraná problematika Suzuki couplingu, jeho mechanizmus, aplikácie a syntéza borónových kyselín. V kapitole výsledky a diskusia sú podrobne prebrané jednotlivé reakcie, ktoré viedli k príprave ako východiskových látok, tak aj produktov. V experimentálnej časti sú potom podrobne popísané reakčné postupy a taktiež charakteristiky jednotlivých pripravených látok.</p>
Kľúčové slová:	diaminopyrazoly, Suzuki-Miyaurova reakcia, CDK inhibítory
Počet strán:	64
Jazyk:	Slovenčina

Bibliographical identification

Author's first name and surname: Martin Pisár

Title: Arylation of bromobenzoyldiaminopyrazoles under the conditions of Suzuki-Miyaura reaction

Type of thesis: Bachelor

Department: Department of Organic Chemistry, Faculty of Science, Palacký University Olomouc

Advisor: doc. RNDr. Petr Cankař, Ph.D.

The year of presentation: 2017

Abstract: This bachelor thesis deals with arylation of 3- and 4-bromobenzoyldiaminopyrazoles under the conditions of Suzuki-Miyaura cross-coupling reaction. These compounds are predicted to bear inhibition activity on cyclin-dependent kinases and therefore cytotoxic activity. The theoretical part deals with reactions of pyrazoles which are mostly used in their derivatizations, and possibilities of protection of nitrogen atom N1 on pyrazoles. Focus is also given on Suzuki coupling, its mechanism, applications and boronic acid synthesis. Chapter Results and discussion describes reactions which were carried out to prepare starting materials and final products. Experimental part defines reaction procedures and spectral characteristics of prepared compounds.

Keywords: diaminopyrazoles, Suzuki-Miyaura reaction, CDK inhibitors

Number of pages: 64

Language: Slovak

Zoznam skratiek

Bn	benzyl
BnX	benzylhalogenid
Boc	<i>tert</i> -butyloxykarbonyl
Boc-anhydrid	di- <i>tert</i> -butyl-dikarbonát
CDK	cyklín dependentné kinázy
DCE	1,2-dichlóretán
DDQ	2,3-dichlór-5,6-dikyano-1,4-benzochinón
DHP	3,4-dihydro-2 <i>H</i> -pyrán
DMAP	4-dimetylamínopyridín
DME	dimetoxetán
DMF	<i>N,N</i> -dimetylformamid
DMSO	dimetylsulfoxid
dppf	1,1'-Ferrocendiyl-bis(difenylfosfin)
NBS	<i>N</i> -brómsukcínimid
NiCl ₂ (dppp)	[1,3-bis(difenylfosfino)propan]dichlórnikel(II)
NIS	<i>N</i> -jódsukcínimid
NXS	<i>N</i> -halogénsukcínimid
Pd(dppf)Cl ₂	[1,1'-Bis(difenylfosfino)ferrocen]dichlórpaládium(II)
Pd(Ph ₃) ₄	tetrakis(trifenylfosfín)paládium(0)
Ph	fenyl
Pmb	4-Metoxybenzyl
PMBCl	4-Metoxybenzylchlorid
POX ₃	halogenid fosforu
r.t.	laboratórna teplota
t-BuOK	<i>tert</i> -butanolát draselný
TEA	trietylamín
TFA	kyselina trifluóroctová
THF	tetrahydrofurán
Tr	trifenylmetyl
TrCl	trifenylmetylchlorid
XPhos Pd G2	chlór(2-dicyklohexylfosfino-2',4',6'-triizopropyl-1,1'-bifenyl)[2-(2'-amino-1,1'-bifenyl)]paládium(II)

Obsah

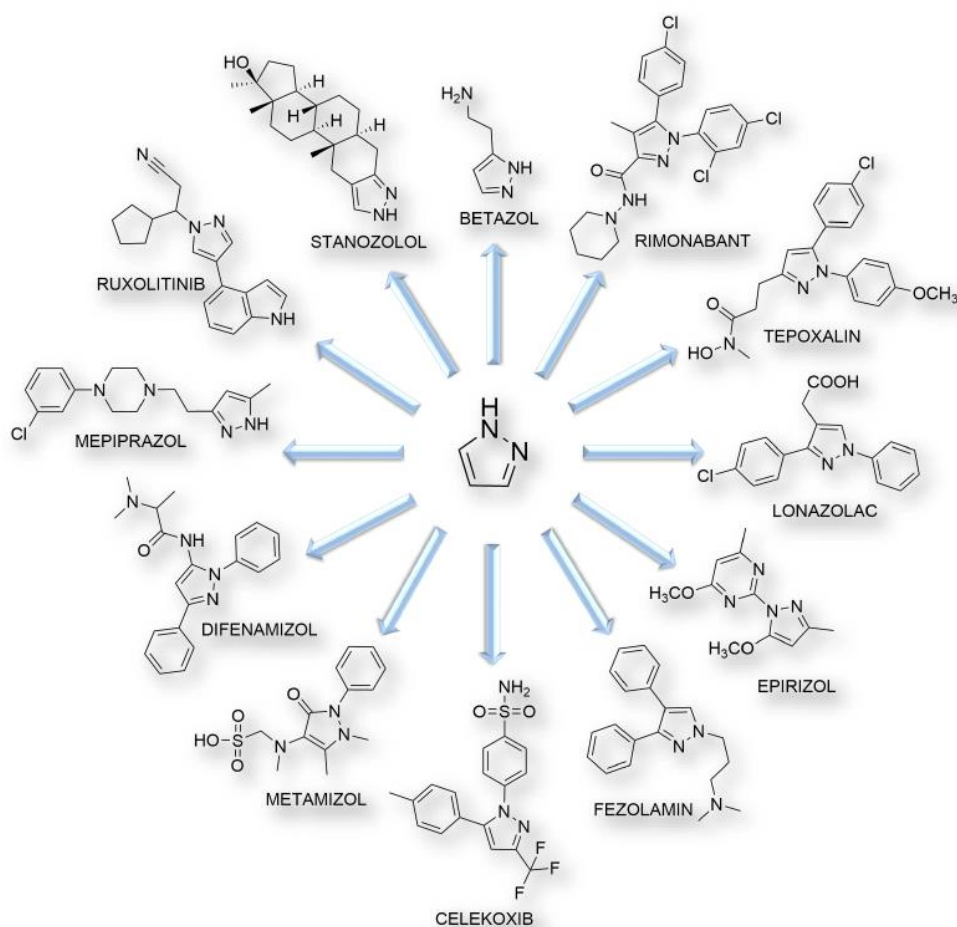
1. ÚVOD	8
2. TEORETICKÁ ČASŤ	10
2.1. Chémia pyrazolu	10
2.1.1. Reakcie pyrazolov	10
2.1.1.1. Elektrofilná substitúcia na uhlíku	10
2.1.1.2. Elektrofilná substitúcia na dusíku	13
2.1.1.3. Cross-couplingové reakcie	16
2.1.2. Chránenie dusíka N1 pyrazolov	18
2.3. Suzuki coupling	21
2.3.1. Reakčný mechanizmus	22
2.3.2. Syntéza borónových kyselín	23
3. VÝSLEDKY A DISKUSIA.....	26
3.1. Príprava východiskových látok.....	26
3.1.1. [<i>N</i> -(4-Hydroxyfenyl)hydrazono]malononitril (II)	26
3.1.2. [(<i>E</i>)-2-(3, 5-Diamino-1 <i>H</i> -pyrazol-4-yl)diazenyl]fenol (III)	27
3.1.3. (<i>E</i>)- <i>Terc</i> -butyl-3, 5-diamino-4-[(4-[(<i>terc</i> -butoxykarbonyl)oxyl]fenyl)diazenyl]-1 <i>H</i> -pyrazol-1-karboxylát (IV)	27
3.1.4. <i>Terc</i> -butyl-(<i>E</i>)-3-amino-5-(4-brómbenzamido)-4-[(4-[(<i>terc</i> -butoxykarbonyl)oxy]fenyl)diazenyl]-1 <i>H</i> -pyrazol-1-karboxylát (Va) a <i>Terc</i> -butyl-(<i>E</i>)-3-amino-5-(3-brómbenzamido)-4-[(4-[(<i>terc</i> -butoxykarbonyl)oxy]fenyl)diazenyl]-1 <i>H</i> -pyrazol-1-karboxylát (Vb)	28
3.1.5. (<i>E</i>)- <i>N</i> -(3-Amino-4-[(4-hydroxyfenyl)diazenyl]-1 <i>H</i> -pyrazol-5-yl]-3-brómbenzamid (VI)	28
3.2. Príprava produktov Suzuki couplingu	29
3.2.1. Príprava derivátov z 4-brómbenzoyldiaminopyrazolu	30
3.2.2. Príprava derivátov z 3-brómbenzoyldiaminopyrazolu	33
3.2.3. Čistenie produktov Suzuki couplingu	36
4. EXPERIMENTÁLNA ČASŤ.....	38
4.1. Príprava východiskových látok.....	38
4.1.1. [<i>N</i> -(4-Hydroxyfenyl)hydrazono]malononitril (II)	38
4.1.2. [(<i>E</i>)-2-(3, 5-Diamino-1 <i>H</i> -pyrazol-4-yl)diazenyl]fenol (III)	38
4.1.3. (<i>E</i>)- <i>Terc</i> -butyl-3, 5-diamino-4-[(4-[(<i>terc</i> -butoxykarbonyl)oxyl]fenyl)diazenyl]-1 <i>H</i> -pyrazol-1-karboxylát (IV)	39
4.1.4. <i>Terc</i> -butyl-(<i>E</i>)-3-amino-5-(4-brómbenzamido)-4-[(4-[(<i>terc</i> -butoxykarbonyl)oxy]fenyl)diazenyl]-1 <i>H</i> -pyrazol-1-karboxylát (Va)	39
4.1.5. <i>Terc</i> -butyl-(<i>E</i>)-3-amino-5-(3-brómbenzamido)-4-[(4-[(<i>terc</i> -butoxykarbonyl)oxy]fenyl)diazenyl]-1 <i>H</i> -pyrazol-1-karboxylát (Vb)	40
4.1.6. (<i>E</i>)- <i>N</i> -(3-Amino-4-[(4-hydroxyfenyl)diazenyl]-1 <i>H</i> -pyrazol-5-yl]-4-brómbenzamid (VIa)	40
4.1.7. (<i>E</i>)- <i>N</i> -(3-Amino-4-[(4-hydroxyfenyl)diazenyl]-1 <i>H</i> -pyrazol-5-yl]-3-brómbenzamid (VIb)	40
4.2. Príprava produktov Suzuki-couplingu	41
4.2.1. Produkty arylácie (<i>E</i>)- <i>N</i> -(3-Amino-4-[(4-hydroxyfenyl)diazenyl]-1 <i>H</i> -pyrazol-5-yl]-4-brómbenzamidu	41
4.2.2. Produkty arylácie (<i>E</i>)- <i>N</i> -(3-Amino-4-[(4-hydroxyfenyl)diazenyl]-1 <i>H</i> -pyrazol-5-yl]-3-brómbenzamidu	45
5. ZÁVER	47
6. POUŽITÁ LITERATÚRA	48
7. PRÍLOHY	51

1. Úvod

Od počiatku syntézy analgetika, antiflogistika a antipyretika fenazónu Ludwigom Knorrom v roku 1883, bolo zrejme, že pyrazoly majú potenciál stať sa využitelnými, biologicky aktívnymi látkami. Príprava samotného pyrazolu bola však uskutočnená až o niečo neskôr nemeckým chemikom Hans von Pechmannom v roku 1898 z acetylénu a diazometánu,¹ skoro 60 rokov pred prvým popisom výskytu jeho derivátu v prírode vo forme β -(pyrazol-1-yl)-L-alanínu, látky nachádzajúcej sa v rastlinách čeľade Cucurbitaceae.

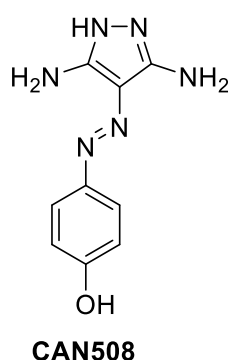
Deriváty pyrazolu majú možnosť nájsť praktické uplatnenie, mnohé sú totiž využívané ako agrochemikálie či aktívne farmaceutické substancie. Počet publikácií o pyrazoloch narastá, pričom veľké množstvo sa zaoberá práve ich biologickou aktivitou. Nesporným dôkazom o aktívnom pôsobení derivátov pyrazolu je množstvo liečiv, ktoré sú už dnes registrované a používané v praxi napríklad ako inhibítory COX, antagonisti H₂ receptorov, ale aj ako spazmolytiká či antiemetiká (Obr. 1).

Obr. 1



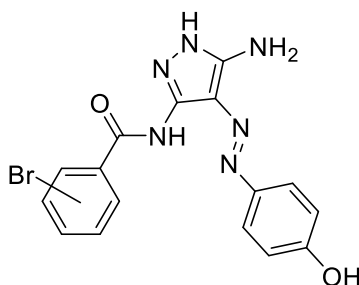
Biologicky aktívne deriváty pyrazolu sa podarilo nasyntetizovať aj v rámci dlhodobej spolupráce medzi Katedrou organickej chémie a Laboratóriom rastových regulátorov UP.² Látka s označením CAN508 (Obr. 2), pôsobiaca ako antagonista ATP, vykazuje inhibičnú aktivitu na CDK2-cyklín E a významne na CDK9-cyklín T1. Cyklín dependentné kinázy patria do rodiny proteínkináz, ktoré hrajú dôležitú úlohu hlavne pri regulácii bunecného cyklu a transkripcie. Zvýšená expresia aktivátorov (cyklíny), prípadne znížená expresia inhibítorov (CKI) v bunke môže viesť až k rakovinovému bujneniu. Z tohto dôvodu bol započatý vývoj inhibítorov CDK ako možných protirakovinových liečiv.

Obr. 2



Cieľom tejto práce je práve syntéza skupiny derivátov pyrazolu odvodených od CAN508 s možnou biologickou aktivitou. Východiskové látky pre prípravu derivátov pyrazolu sa od pôvodnej látky líšia acylovanou 3-amino skupinou brómbenzoylom (Obr. 3), ktorý bol následne podrobený Suzuki-Miyaurovej reakcii za vzniku biarylov s použitím rôznych borónových kyselín.

Obr. 3



2. Teoretická časť

Teoretická časť je rozdelená do dvoch hlavných kapitol - chémia pyrazolu a Suzuki coupling. V prvej kapitole sú rozobrané najvyužívanejšie reakcie pri príprave derivátov pyrazolu. Druhá kapitola sa zaoberá problematikou Suzukiho couplingu a syntézou couplingových partnerov t.j. borónových kyselín.

2.1. Chémia pyrazolu

Pyrazol je päťčlankový heterocyklus odvodený od základného azolu pyrolu náhradou $-CH=$ skupiny sp^2 hybridizovaným atómom dusíka do polohy 2, čím sa zlepšuje konjugácia v jadre a zároveň sa zvyšuje jeho aromaticita. Z tohto dôvodu pozorujeme u diazolov väčšiu rezonančnú energiu v porovnaní s pyrolom, ktorá narastá s pribúdajúcim počtom atómov dusíka v cykle. To sa prejavuje aj v stabilite týchto zlúčenín voči oxidácii, ktorá narastá v rade pyrol < diazol < triazol < tetrazol. Pyrazol tvorí stabilné diméry spájané vodíkovou väzbou, ktorá podmieňuje jeho vysokú teplotu varu (188°C) a teplotu topenia (70°C).³

2.1.1. Reakcie pyrazolov

Reaktivita pyrazolov s voľnou NH skupinou je ovplyvnená ich amfotérnym charakterom, čo obmedzuje použitie rôznych činidiel. Napríklad použitie kyselín a zásad ako reagencií je v značnej miere obmedzené pre vznik iónov. Vznikajúce ióny jednak menia orientáciu substituenta, taktiež môžu aktivovať reakciu na naviazanom substituentu (napr. iné aromatické jadro) alebo reakciu celkom znemožnia. V mnohých reakciách je reaktivita pyrazolov podobná až zhodná s jeho štruktúrnym izomérom imidazolom.

2.1.1.1. Elektrofilná substitúcia na uhlíku

Elektrofilné substitúcie na pyrazole prebiehajú prednostne do polohy 4 aj napriek existencii rezonančných štruktúr so zvýšenou elektrónovou hustotou na uhlíkoch v polohe 3 a 5 (*Schéma 1*). Túto regioselektivitu do polohy 4 je možné vysvetliť z energetického hľadiska vznikajúcich tranzitných stavov pri substitúcií do rôznych polôh. V prípade substitúcie do polohy 3 alebo 5 totiž vzniká prechodný stav s veľmi nevýhodným sextetom spojeným s kladne nabitým atómom dusíka, zatiaľčo substitúciou do polohy 4 zostáva oktet zachovaný (*Schéma 2*).⁴ Medzi najbežnejšie S_E reakcie pyrazolov patria halogenácie, nitrácie a sulfonácie.

Schéma 1: Rezonančné štruktúry pyrazolu

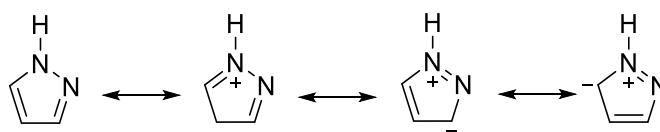
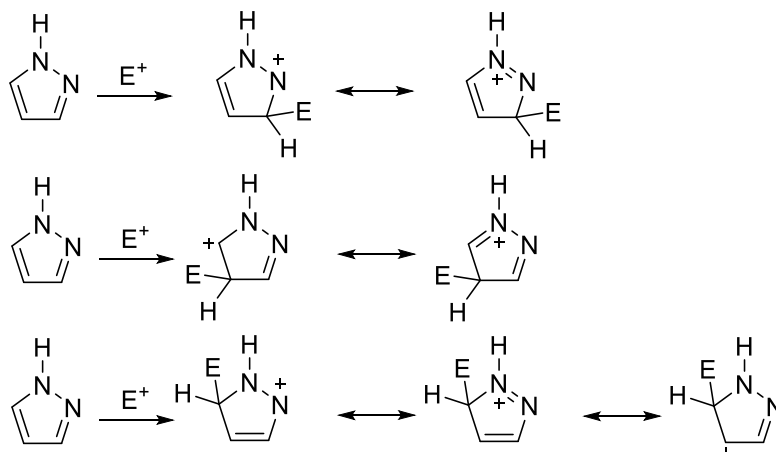
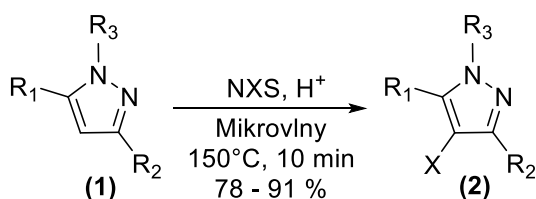


Schéma 2: Elektrofilná substitúcia do polohy 3, 4 a 5

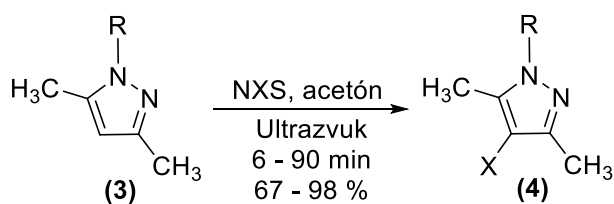


Halogenované pyrazoly sú všestrannými substrátmi schopnými podliehať cross-couplingovým reakciám ako sú Heckov, Stilleho, Sonogashirov, Suzukiho coupling ai., čím umožňujú prípravu rozmanitých derivátov. Guo Li et al. vyvinuli metódu monobromácie izoxazolov a pyrazolov s využitím NBS v kyslom prostredí za mikrovlnného žiarenia s dobrými výťažkami.⁵ Jodácia bola uskutočnená za rovnakých podmienok s využitím NIS v rovnako dobrých výťažkoch. Ďalšia literatúra uvádza obdobnú metódu halogenácie 3,5-dimetylpyrazolov (**3**) pomocou NXS bez použitia katalyzátorov za pôsobenia ultrazvuku. Reakcia je časovo nenáročná, praktická a prebieha za miernych podmienok. Ako najvhodnejšie rozpúšťadlo sa pri tejto metóde osvedčil acetón, pričom popisované výťažky sa nachádzali v rozmedzí 67 – 98 %.⁶ Rovnaké reakčné podmienky boli taktiež úspešné pri použití brómu, jódu alebo ICl v etylacetáte. Ako je možné vidieť v Schéme 3, u oboch spomenutých metód dochádzalo k tvorbe C4 halogenovaného pyrazolu.

Schéma 3



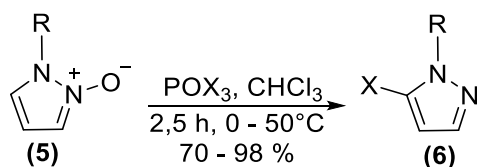
$R_1 = \text{H, Ph, 3,4-diClPh, 3-NO}_2\text{Ph, etoxykarbonyl}$
 $R_2 = \text{H, } p\text{-BrPh, metoxykarbonyl, etoxykarbonyl,}$
 $R_3 = \text{H, Me, Ph,}$
 $X = \text{Br, I}$



$R = \text{H, Me, Ph, } p\text{-NO}_2\text{Ph, C}_6\text{F}_6$
 $X = \text{Cl, Br, I}$

Popísaná príprava 5-halogénpyrazolov vychádza z N-oxidu pyrazolu alkylovaného na druhom atóme dusíka. Takto pripravený derivát je možné chlórovať, prípadne brómoviť s príslušným halogenidom fosforu v chloroforme, poskytujúc tak 2-alkyl-5-halogénpyrazol (Schéma 4).⁷ Autori popísali aj reakciu 2-(4-metoxybenzyl)pyrazol-1-oxidu (5) s POBr_3 za vzniku chráneného 5-brómpyrazolu vo výťažku 95%. Vzhľadom k tomu, že Pmb skupinu je možné využiť na protekciu NH skupiny pyrazolu, by táto metóda mohla byť vhodná pre prípravu medziproduktu použiteľného pri syntéze rôznych derivátov substituovaných v polohe C5 (C3).

Schéma 4



$R = \text{Me, Bn, Allyl, } p\text{-MeOBn}$
 $X = \text{Cl, Br}$

Nitrácia pyrazolov sa všeobecne uskutočňuje zmesou kyseliny dusičnej, prípadne dymivej kyseliny dusičnej, a olea. Prítomnosť aktivujúcich skupín, napríklad amino skupiny, umožňuje použiť miernejšie podmienky nitrácie. Reakcia prebieha podobne ako u imidazolov do polohy 4, pričom pyrazol reaguje vo forme pyrazolíniového kationu. Katritzky et al. publikovali priamu nitračnú metódu rôznych azolov za využitia anhydridu kyseliny trifluóroctovej a koncentrovanej kyseliny dusičnej.⁸ Nitráciou nesubstituovaného pyrazolu vzniká 3,4-dinitropyrazol, avšak v prípade nitrácie 1-metylpyrazolu k mononitrácii do polohy 3. Iná praktická metóda prípravy 4,5-dinitropyrazolov vychádza zo 4-nitro-5-aminopyrazolov, ktoré sú oxidované peroxidom vodíka (50%) v prostredí kyseliny sírovej.⁹

Sulfonáciu azolov s dvomi heteroatómami je možné uskutočniť v prostredí olea pri zvýšenej teplote, niekedy s prídavkom ortuťnatých solí ako katalyzátora. Grandberg et al. popisujú efektívnu metódu sulfonácie pyrazolov za relatívne miernych podmienok v prostredí anhydridu kyseliny octovej a koncentrovanej kyseliny sírovej.¹⁰ Úloha acetanhydridu v tejto reakcii je evidentná, a to vychytávať vodu vznikajúcu počas sulfonácie. Táto metóda má značné výhody oproti bežne používanej sulfonácii, pri ktorej je nutné dlhé zahrievanie v oleu nad teplotu 100°C nasledované komplexnými procesmi izolácie produktu. Reakcia prebieha v inertných podmienkach tri dni za laboratórnej teploty a následne je refluxovaná 30 minút. Vzniknutá sulfónová kyselina je vylúčená vo forme kryštálov po schladnutí reakčnej zmesi v dobrých výťažkoch 60 – 96%.

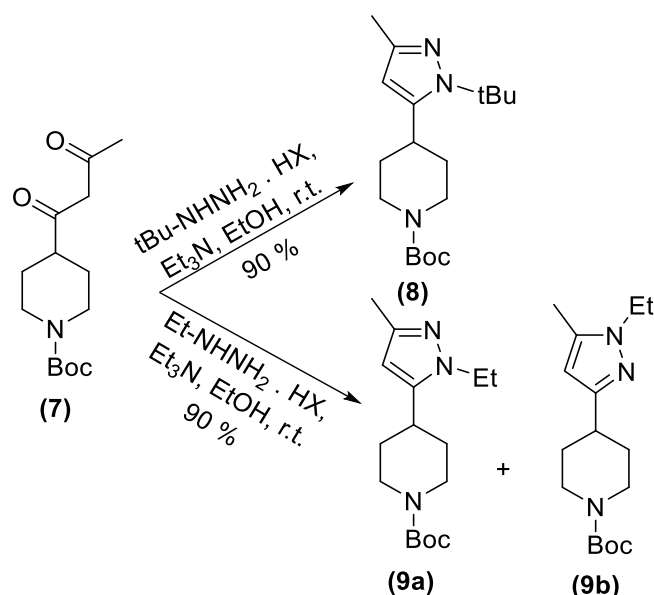
2.1.1.2. Elektrofilná substitúcia na dusíku

Pyrazoly s voľnou NH skupinou ľahko podliehajú elektrofilnej substitúcii na atóme dusíka reakciou s alkylačnými činidlami ako napríklad alkylhalogenidy, diazometán a dimetylsulfát, za vzniku *N*-alkyl derivátov. Rovnako tak sú možné acylácie dusíkového atómu pyrazolu napríklad acylhalogenidom alebo anhydridom. Ak je v polohe 3 alebo 5, prípadne na oboch, naviazaný substituent, vznikajú zmesi izomérov. Pomer vznikajúcich izomérov je možné ovplyvniť prostredím, napríklad výberom vhodného činidla a získať tak preferovaný izomér. Avšak regioselektívna príprava jedného z izomérov je aj napriek pokrokom v chémii pyrazolov stále výzvou.

Množstvo biologicky aktívnych pyrazolov je substituovaných okrem iného aj na N1 atóme dusíka. Takouto substitúciou pyrazolu môžeme tiež získať ochránený derivát, ktorý je možné použiť v ďalších reakciách pri príprave štruktúrne zložitejších derivátov. Jednou z možností prípravy takto substituovaných pyrazolov je cyklizácia substituovaného hydrazínu alebo hydrazónu s rôznymi substrátmi. Pomer vznikajúcich izomérov je závislý na povahe a veľkosti naviazaných substituentov. Zatiaľčo

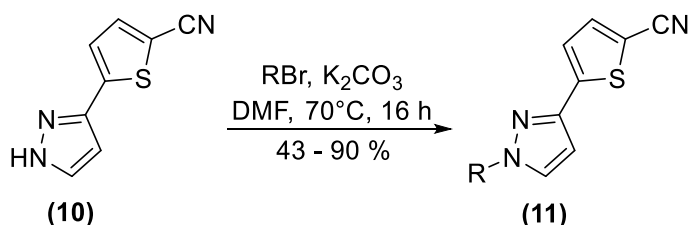
kondenzáciou terc-butylhydrazínu vzniká jeden regioizomér (**8**) vo vysokom výťažku, analogickou reakciou s etylhydrazínom vzniká zmes oboch izomérov (**9a:9b**) v pomere 1:1 (*Schéma 5*).¹¹

Schéma 5



Ďalšou možnosťou je priama substitúcia na dusíku, ktorá umožňuje pripraviť *N*-alkylované, arylované aj acylované pyrazoly. Tento spôsob sa niekedy môže potýkať s obmedzeniami spojenými s použitím alkylačných činidiel, ktorých výber je často obmedzený na primárne halogenidy. Toto obmedzenie je spôsobené nutnosťou použitia bazického prostredia, v ktorom dochádza k eliminačným reakciám sekundárnych halogenidov.¹² Literatúra uvádza pre priame alkylácie 3-substituovaných pyrazolov alkylhalogenidmi využitie uhličitanu draselného ako bázy (*Schéma 6*).¹³ Tieto deriváty vykazujú značnú inhibičnú aktivitu histónovej deacetylázy, ktoré sú potenciálne využiteľné v onkológii a neurológii.

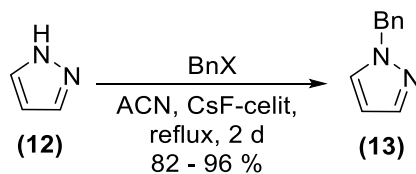
Schéma 6



V snahe vyhnúť sa vyššie spomenutému problému pri použití silných báz, boli pre alkyláciu pyrazolov skúšané niektoré bazické katalyzátory. Alternatívny prístup k príprave

N-alkylovaných pyrazolov bol popísaný Hayatom et al. s využitím fluoridu cézneho adsorbovaného na celite ako pevnej bázy.¹⁴ Hoci je menej reaktívny ako draslík a tetraalkylamónium fluoridy, táto metóda je praktická a efektívne aplikovateľná na heterocyklické zlúčeniny nesúce kyslý protón na dusíku. Pri benzylácii pyrazolu benzylchloridom prípadne bromidom v refluxujúcom acetonitrile boli získané dobré výťažky (Schéma 7).

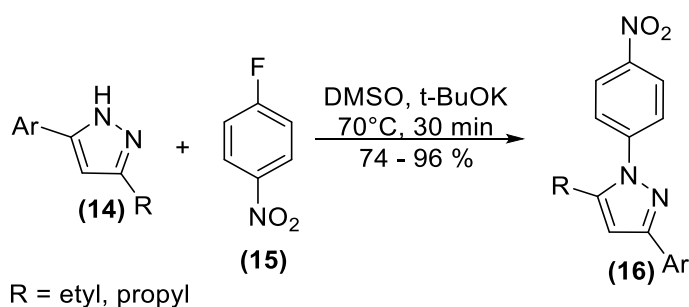
Schéma 7



X = Cl, Br

Príprava *N*-aryl pyrazolov je najbežnejšie uskutočňovaná kondenzáciou 1,3-diketónov s arylhydrazínmi. Regioselektivita tejto reakcie však závisí na povahe reagujúceho diketónu. V roku 2000 bola publikovaná práca popisujúca *N*-aryláciu 3,5-disubstituovaných pyrazolov so 4-fluórinitrobenzénom v DMSO s prídavkom *tert*-butanolátu draselného ako bázy (Schéma 8).¹⁵ Reakcia prebieha vo vysokých výťažkoch a s veľmi dobrou regioselektivitou 4 – 99:1 v prospech uvedeného izoméru (16).

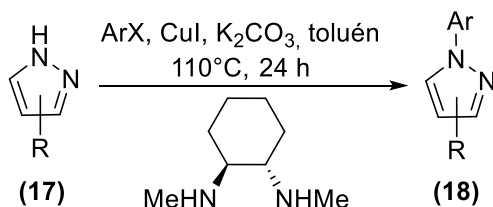
Schéma 8



Ďalšia publikácia uvádza *N*-arylácie amidov a dusíkatých heterocyklov katalyzovaných diamínovými komplexami medi, pričom dosahované boli vysoké výťažky 71 – 98 % (Schéma 9).¹⁶ Použité podmienky sú tolerantné voči funkčným skupinám ako sú aldehydy, ketóny, alkoholy, estery, primárne amíny a nitrily naviazané na arylhalogenide alebo heterocykli. Reakcia prebieha rovnako dobre s elektrón-deficitnými ako aj neutrálnymi pyrazolmi a elektrón-bohatými arylhalogenidmi. Táto metóda sa ukázala ako funkčná aj pri použití mierne stéricky bránených arylhalogenidov alebo heterocyklov,

pričom v prípade použitia nesymetrických pyrazolov bol výsledný pyrazol arylovaný na menej stéricky bránenom dusíku.

Schéma 9



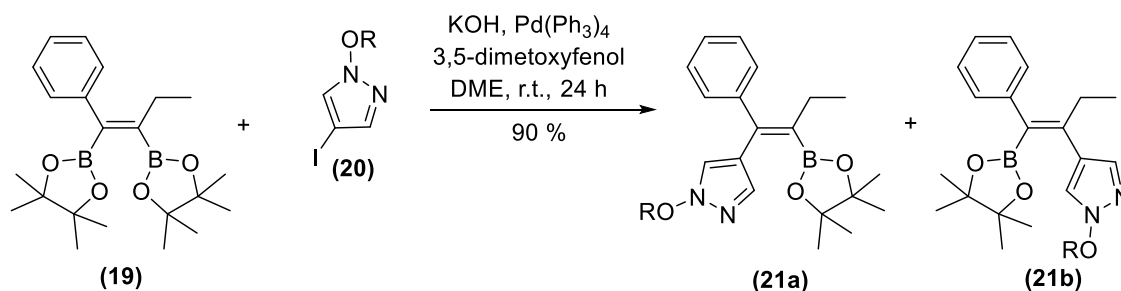
R = H, Me, CO₂Et, NH₂, CF₃, Ph
X = Br, I

2.1.1.3. Cross-couplingové reakcie

Cross-couplingové reakcie katalyzované prechodnými kovmi sú zaužívaným spôsobom pre tvorbu C-C a C-X väzby (X = O, N, S). Napredovanie v tejto oblasti je veľmi rýchle, no aj napriek tomu príklady pre heterocyklické systémy zostávajú raritou a vo väčšine prípadov sú potom popisované na derivátoch tiofénu a pyridínu.¹⁷ Medzi časté postupy pre tvorbu C-C väzby na pyrazoloch patrí Suzuki-Miyauraova, Negishiho, Stilleho a Sonogashirova reakcia. Pri couplingových reakciách pyrazolov sú mnohokrát používané 4-jódpyrazoly s ochráneným dusíkom, ktoré sú využité buď ako halogenidy samotné, alebo aj ako prekuzory pre tvorbu organokovov.

Pre derivatizáciu pyrazolov pomocou Suzuki-couplingu sú najčastejšie až výlučne používané halogénpyrazoly, aj napriek tomu, že sú popísané prípravy pyrazolborónových kyselín a aj ich aplikácií.^{18,19} Jedným z príkladov aplikácie Suzuki-Miyaurovej reakcie je pri syntéze analógov antiestrogénu tamoxifénu (Schéma 10).²⁰ Na reakciu bol použitý 4- a 5-jódpyrazol s esterom alkenylborónovej kyseliny, pričom v schéme je uvedená reakcia so 4-jódpyrazolom (20). Cross-couplingová reakcia prebiehala s vysokým 90%ným výťažkom a pomerom vznikajúcich produktov 4:1 (21a:21b). Preferencia C1 izoméru je pravdepodobne zapríčinená záporným indukčným efektom naviazanej fenylovej skupiny. Druhý borónový ester v molekule 21a a 21b následne podlieha ďalšiemu cross-coupling s aryl- alebo heteroaryljodidmi.

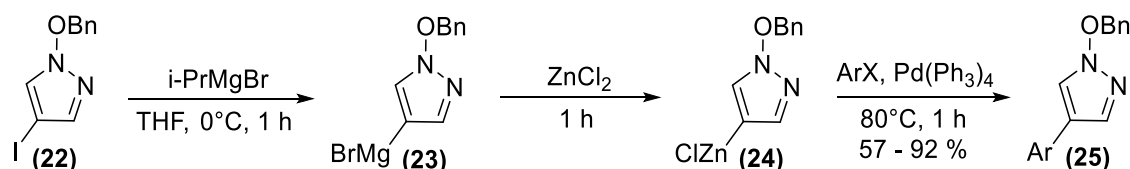
Schéma 10



R = H, Bn, (CH₂)₂N(Me)₂, (CH₂)₃N(Me)₂

Inou hojne využívanou cross-couplingovou reakciou je Negishiho coupling. Ide o niklom alebo paládiom katalyzovanú reakciu organozinocnatých zlúčenín s rôznymi organohalogenidmi alebo triflátmi. Ako príklad je možné uviesť prípravu 4-aryl a 4-heteroaryl pyrazolov (**25**) v dobrých výťažkoch (Schéma 11).²¹ V prvom kroku dochádza k metalácii pyrazolu (**22**) za vzniku (1-(benzyloxy)-pyrazol-4-yl)magnézium bromidu (**23**). Následným prídavkom chloridu zinočnatého dochádza k transmetalácii a vzniku organozinocnatého substrátu (**24**), ktorý je následne podrobený Negishiho reakcii katalyzovanej organokomplexom paládia. Reakcia funguje ako s elektrón-akceptornými tak aj s elektrón-donornými skupinami.

Schéma 11

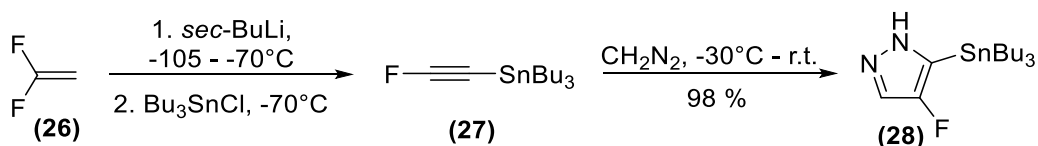


X = Br, I

Ďalšou cross-couplingovou reakciou využívanou pri syntéze rôzne substituovaných pyrazolov je Stilleho reakcia. Stilleho reakcia, alebo tiež Migita-Kosugi-Stille coupling, je paládiom katalyzovaná reakcia organociničitých zlúčenín s rozmanitou skupinou organických elektrofilov za tvorby C-C väzby. Hlavnou nevýhodou tejto metódy je toxicita organociničitých zlúčenín a ich malá rozpustnosť vo vode. Literatúra uvádza prípravu derivátov 4-fluórpyrazolov, látok s potenciálnym praktickým uplatnením.²² Fluorované heterocykly sú totiž využívané v rôznych oblastiach ako sú agrochemikálie pre poľnohospodárstvo (herbicídy = pyraflufen-etyl, fungicídy = pentiopyrad, bixafen, insekticídy = fipronil), ďalej v chémii polymérov a farbív a taktiež vo farmaceutickom priemysle (NSAID = celekoxib).²³ Substrát pre prípravu substituovaných 4-flórpyrazolov je pripravený one-pot syntézou s vysokým výťažkom 98 % (Schéma 12).

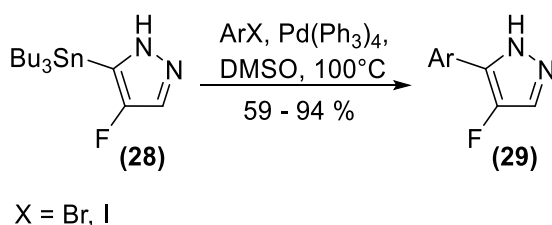
Požadovaný acetylén (27) je pripravený in situ z 1,1-difluóreténu (26) a chlórtributylstananu za prídavku *sec*-butyllítia. Výsledný 5-tributylstanyl-4-fluórpyrazol (28) vzniká cykloadíciou diazometánu s fluór(tributylstanyl)acetylénom (27).

Schéma 12



Následne je produkt (28) použitý pre samotnú prípravu 5-aryl-4-fluórpyrazolov (29) reakciou s arylhalogenidom v DMSO pri 100 °C za katalýzy Pd(Ph₃)₄ (Schéma 13).

Schéma 13



2.1.2. Chránenie dusíka N1 pyrazolov

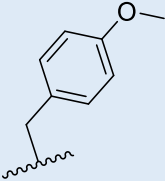
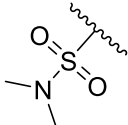
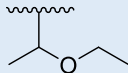
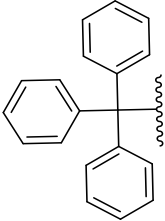
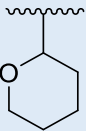
Chrániace skupiny sú skupiny, zavádzané do molekuly pre dočasné maskovanie charakteristických funkčných skupín, s cieľom dosiahnuť selektivitu pri následných reakciách. Chrániace skupiny sú významnou súčasťou organickej chémie a hrajú dôležitú rolu vo viackrokových organických syntézach.

Za dobrú chrániacu skupinu sa považuje taká, ktorá je ľahko, selektívne a vo vysokých výťažkoch naviazaná, pričom by mala byť inertná voči požadovaným podmienkam reakcie. Reakciou by mal vznikať derivát bez nových stereogénnych centier. Chrániaca skupina by taktiež mala mať minimálny počet ďalších funkčných skupín, aby sa zabránilo vzniku ďalších reakčných miest. Odstránenie chrániacej skupiny by malo byť jednoduché, kvantitatívne a za použitia dostupných a netoxických reagentov, ktoré by nemali interagovať s ochránenými atómami resp. skupinami. Najlepšie je však, ak je to možné, sa použitiu chrániacich skupín vyhnúť.²⁴

Vo všeobecnosti je používanie chrániacich skupín v porovnaní s priemyslovou výrobou bežnejšie predovšetkým pre laboratórnu prácu pri počiatocnom výskume a vývoji, a to z dôvodu, že ich použitie pridáva ďalšie reakčné kroky a tiež materiálové a ekonomické nároky do procesu. Avšak v prípade, že použitie chrániacej skupiny v procese preváži nad spomenutými negatívami, je jej použitie žiaduce.

Bežne používané chránenie dusíkového atómu je pomocou reakcií za tvorby amínov, amidov, karbamátov a sulfónamidov. Chémia chrániacich skupín pyrazolu a iných aromatických amínov býva často popisovaná oddelene od chránenia iných amínov z dôvodu odlišného správania sa voči podmienkam štiepenia chrániacej skupiny. Zvýšená kyslosť NH skupiny v aromatických heterocykloch umožňuje ľahšie štiepenie rôznych amidových, karbamátových a sulfónamidových skupín používaných na ich chránenie.²⁵ Nasledujúca tabuľka prehľadne zhrňa niektoré z používaných chrániacich skupín používaných na ochránenie heterocyklického atómu dusíka pyrazolu (Tab. 1). Pri každej chrániacej skupine sú uvedené spôsoby protekcie a deprotekcie, prípadne výťažky, ak boli v pôvodnom článku udané.

Tab. 1: Prehľad vybraných chrániacich skupín

CHRÁNIACA SKUPINA	PROTEKCIA	DEPROTEKCIA
Pmb 	a) PMBCl, NaH, r.t., 22 h, 87 % ²⁶	a) TFA, anizol, reflux DCE, 12-24 h ²⁶
N,N-dimetylsulfónamid 	a) Me ₂ NSO ₂ Cl, NaH, r.t., 1 h, 99 % ²⁷ b) Me ₂ NSO ₂ Cl, NaH, 0°C, 1,5 h, 91 % ²⁸	a) TFA, 0°C, 2 h ²⁷ b) 4M HCl, 60°C, 2 h ²⁸
N-(1-etoxy)etylamin 	a) etylvinyléter, HCl, 30-40°C, 2 h, 95 % ²⁹ b) etylvinyléter, TFA, r.t., 12-78 h, 75-93 % ³⁰	a) HCl, r.t., 1 h, 67-88 % ²⁹ b) kyslé prostredie ³⁰
Tr 	a) TrCl, DMAP, 85°C, 21 h, 63 % ³¹ b) TrCl, Et ₃ N, r.t., 1 h, 85 % ³²	a.i) TFA, 75°C, 12 h, 90 % ³¹ a.ii) BBr ₃ , r.t., 1 h, 94 % ³¹
THP 	a) DHP, 125°C, 24 h, 100 % ^{33,34}	a) HCl, r.t., 8 h, 100 % ^{33,34}

Para-metoxybezylová chrániaca skupina je predovšetkým používaná na chránenie hydroxylových skupín za tvorby alkyléterov. Stabilita Pmb skupiny v kyslom prostredí je však v porovnaní s benzylétermi menšia. Na druhej strane je jej výhodou fakt, že môže byť odstránená za použitia špecifických podmienok, ktoré neovplyvňujú benzyléterové alebo silyléterové chrániace skupiny, a tým pádom môže byť použitá v reakciách vyžadujúcich selektívnu deprotekcii. Ako príklad je možné uviesť syntézu inhibítora proteín kináz staurosporínu, na ktorej je znateľná tolerantnosť podmienok deprotekcii Pmb skupiny pomocou DDQ voči prítomnej N-benzyloxymetylovej a N-(2-trimetylsilyletoxy)metylovej skupine.³⁵ Použitie Pmb skupiny na chránenie N1 dusíkového atómu pyrazolu je popísané napríklad pri selektívnej derivatizácii na C5 (C3). Odchránenie skupiny prebieha v kyslom prostredí TFA s anizolom, ktorý vychytáva vznikajúci Pmb katión. U niektorých derivátov bolo pre odchránenie uvedené použitie solvatovaných elektrónov vo veľmi dobrých výťažkoch.²⁶

N,N-dimetylsulfamoylová protektívna skupina má uplatnenie pri chránení NH skupiny rôznych aromatických heterocyklov. Najčastejší spôsob štiepenia je za použitia silných kyselín, aj keď je známa aj deprotekcii imidazolu v bazickom prostredí³⁶ či odchránenie tricyklického karbolínu za použitia jodidu samarnatého.³⁷ Táto chrániaca skupina sa ukázala ako výhodná pre C5 selektívnu, paládiom katalyzovanú aryláciu nesubstituovaných pyrazolov. Za použitia nepolárnych rozpúšťadiel je selektivita reakcie daná pomerom 45:1 (C5:C4). Následnou deprotekcii chráneného C5 arylovaného pyrazolu je umožnená izomerizácia, vďaka čomu je získaný C3 arylovaný produkt.²⁸

Etoxyetylová skupina môže byť použitá na chránenie hydroxy skupín alkoholov a fenolov, tiolovej skupiny a amino skupiny. Výhodou tejto skupiny oproti spomínaným je cena surovín používaných na protekcii a deprotekcii. Použitie etoxyetylovej chrániacej skupiny bolo popísané pri príprave 4-alkynylpyrazolov pomocou Heck-Sonogaskira cross-couplingu.²⁹

Trityllová protektívna skupina je bežnou skupinou pre chránenie aminoskupiny. Taktiež je vhodná pre chránenie primárnych alkoholov, nakoľko reakcia so sekundárnymi alkoholmi je pomalá. Trityllová skupina je stabilná v bazickom prostredí. Táto chrániaca skupina bola použitá pri syntéze 4-arylpyrazolov pomocou Stilleho reakcie³¹ a Suzuki-Miyaurovej reakcie.³²

Tetrahydropyranylová chrániaca skupina je používaná pre chránenie hydroxy skupín alkoholov a fenolov, tiolových skupín, karboxylových skupín a amino skupín. THP je stabilná v bazickom prostredí. Jej nevýhodou môže byť tvorba nového stereogénneho centra na tetrahydropyránovom jadre, ktorá by viedla k tvorbe zmesi diastereoizomérov v prípade ak chránená molekula už obsahovala stereogénne centrum. Výskumná skupina profesora Mezeia publikovala bezrozpúšťadlovú, bezkatalyzátorovú a kvantitatívnu metódu chránenia THP skupinou aplikovateľnú aj pre chránenie pyrazolov.^{33,34} Chránenie prebieha v jednej nádobe zmiešaním DHP s príslušnou látkou pri 125°C pod vlastným tlakom DHP po dobu 24 h. Nesporné výhody tejto metódy spočívajú v stopercentnej konverzii pri protekcii a deprotekcii, jednoduchosti odstránenia prebytočného DHP za vákua a možnosti uskutočniť následnú reakciu v rovnakej nádobe (one-pot syntéza), čím sa zamedzuje stratám produktu.

2.3. Suzuki coupling

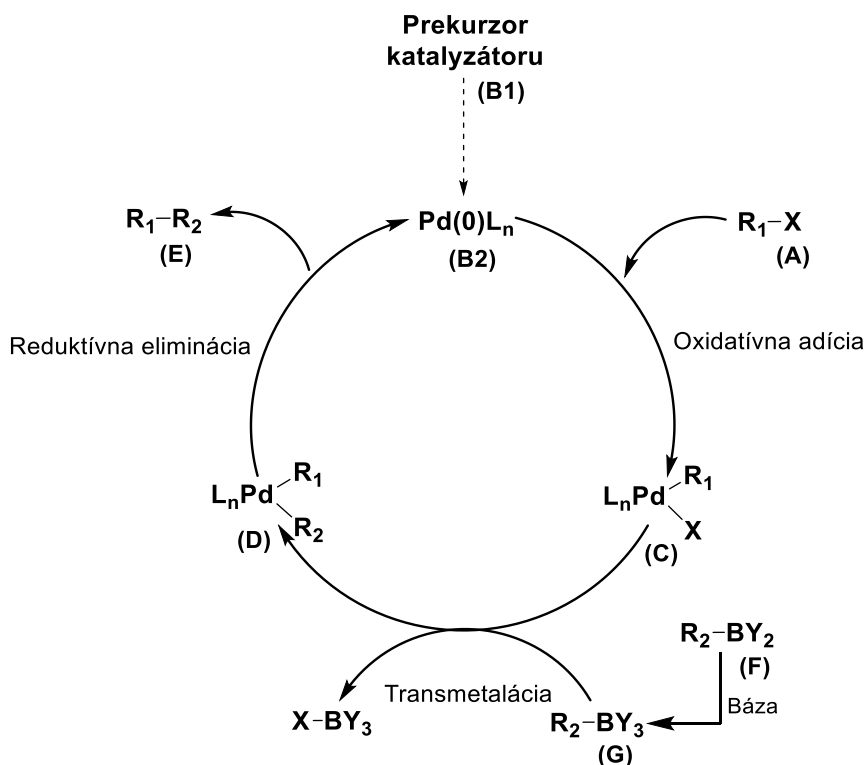
Couplingové reakcie katalyzované prechodnými kovmi sa stávajú v posledných rokoch základným nástrojom pre vývoj agrochemikálií, farmaceutických aktívnych substancií či pokročilých materiálov na báze polymérov. Pokrokmí v tejto oblasti sa dosiahlo zníženie nákladov a aplikovateľnosť reakcií v priemyselnej výrobe.³⁸

Suzuki coupling alebo tiež Suzuki – Miyaurova reakcia bola prvý krát publikovaná v roku 1979 Akirom Suzukim, ktorý bol následne za tento prínos v roku 2010 ocenený Nobelovou cenou. V dnešnej dobe je to jedna z najpopulárnejších a najpoužívanějších reakcií pre tvorbu C-C väzby.³⁹ Vo všeobecnosti je za Suzukiho reakciu považovaná každá reakcia, v ktorej reaguje organoborónová zlúčenina s organickým elektrofilom v prítomnosti zásady a Pd katalyzátora. Reakcia prebieha za miernych reakčných podmienok a vykazuje toleranciu k funkčným skupinám ako sú napríklad amino či hydroxy skupiny.⁴⁰ Výhodou oproti iným couplingovým reakciám je tiež couplingový partner, ktorým je organoborítá zlúčenina. Výhoda spočíva v tom, že organoborité zlúčeniny sú menej toxické oproti organociničitým reagentom. Sú stabilné vo vode a na vzduchu, čo uľahčuje ich izoláciu a skladovanie, a v neposlednom rade sa jedná o komerčne dostupné zlúčeniny, hlavne vo forme borónových kyselín a ich esterov.

2.3.1. Reakčný mechanizmus

Mechanizmus Suzuki reakcie je bežne znázorňovaný ako katalytický cyklus, ktorý zahŕňa oxidatívnu adíciu, transmetaláciu a reduktívnu elimináciu (Schéma 14). Reakčný mechanizmus má veľa podobných znakov s mechanizmami iných, dobre známych paládiom katalyzovaných cross-couplingových reakcií, prípadné odlišnosti sú najvýraznejšie v transmetaláčnom kroku katalytického cyklu.^{41,42,43}

Schéma 14: Mechanizmus Suzuki couplingu



V prípade použitia prekatalyzátora (**B1**) je pred samotným začiatkom katalytického cyklu nutná jeho aktivácia. V prípade Suzukiho reakcie, prípadne iných paládiom katalyzovaných cross-couplingových reakcií, sú najpoužívanejšie Buchwaldove prekatalyzátory. Ide o derivatizované dialkylbiaryl fosfínové ligandy s komplexovaným atómom paládia. Vo všeobecnosti sa použitím prekatalyzátoru dosiahne oproti tradičným Pd katalyzátorom zlepšenie reaktivity a stability. Tvorba aktívneho katalyzátoru prebieha za reakčných podmienok, v prípade Buchwaldových prekatalyzátorov v mierne zásaditom prostredí.

Katalytický cyklus začína oxidatívnou adíciou, reakciou halogenidu (**A**) s **Pd⁰ (B2)** za vzniku organokomplexu paládia(II) (**C**). Ďalším krokom je transmetalácia, ktorá je najmenej preskúmanou časťou katalytického cyklu. V tomto kroku dochádza k zámene halogénu za substituent z organoborónovej zlúčeniny za tvorby nového komplexu (**D**),

ktorý nesie oba substituenty. Potreba bázy v transmetaláčnom kroku je zjavná, avšak jej úloha nie je úplne objasnená. Úloha bázy sa popisuje dvomi teóriami, pričom prvá teória, ktorá je uznávanejšia tvrdí, že hlavnou úlohou bázy je aktivácia borónovej zlúčeniny (**F, G**) koordináciou hydroxyly, príp. alkoxydu. Aktiváciou sa zvýši reaktivita inak málo nukleofilnej organoborónovej zlúčeniny. Druhá teória popisuje, že báza reaguje s medziproduktom (**C**) za tvorby reaktívnejšieho komplexu $R_1\text{-Pd(II)-OH}$ napríklad v prípade použitia alkoxyboránov.⁴⁴ Predpokladá sa, že výber reakčnej cesty závisí na Lewisovej acidite organoborónovej zlúčeniny a zároveň na ďalších individuálnych parametroch reakcie.^{45,46,47} V poslednom kroku, ktorým je reduktívna eliminácia, dochádza k tvorbe C-C väzby (**E**) a súčasnej regenerácii katalyticky aktívneho organopaládnateho komplexu (**B2**).

2.3.2. Syntéza borónových kyselín

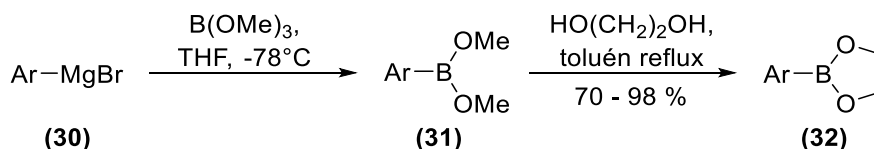
Borónové resp. organoborónové kyseliny sú zlúčeniny obsahujúce väzbu uhlík-bór formálne odvodené od kyseliny boritej nahradením hydroxylovej skupiny alkylom alebo arylom. Z dôvodu voľného p-orbitálu a elektrónového sextetu vystupujú borónové kyseliny ako Lewisove kyseliny. Vo väčšine prípadov sa jedná o pevné látky stabilné za aeróbnych podmienok a laboratórnej teploty, ktoré majú tendenciu tvoriť anhydridy. Našťastie toto ich správanie je zvyčajne nepodstatné, napríklad Suzukiho reakcia prebieha bez ohľadu na ich stav hydratácie. V posledných rokoch nachádzajú borónové kyseliny uplatnenie aj v medicíne (bortezomib, ixazomib), no hlavne patria k najpoužívanejším Suzuki couplingovým partnerom spomedzi veľkej skupiny organoborónových zlúčenín.^{48, 49}

Syntéza borónových kyselín môže byť uskutočnená rôznymi spôsobmi. Medzi tie najbežnejšie patrí reakcia organokovovej zlúčeniny (lítium, horčík) s esterom kyseliny boritej nasledovaná hydrolýzou esteru. Ďalšou používanou metódou je transmetalácia arylkremičitých prípadne arylciničitých zlúčenín s bromidom boritým. Iným možným spôsobom je couplingová reakcia arylhalogenidu alebo aryltriflátu s diborónovou zlúčeninou najčastejšie diborónové estery.⁴⁸

Izolácia voľnej borónovej kyseliny môže byť problémová v prípade použitia vodného spôsobu spracovania reakčnej zmesi, vzhľadom na ich rozpustnosť vo vode, ktorá je významná hlavne u malých molekúl. Aby sa zabránilo nízkym výťažkom, v niektorých prípadoch sa izolujú borónové kyseliny buď vo forme ich esterov, ktoré vykazujú menšiu rozpustnosť vo vode, prípadne sa používa nevodné spracovanie. Wong et al. publikovali praktickú one-pot syntézu v nevodnom prostredí pre prípravu arylborónových esterov z Grignardových činidiel a trimetylésteru kyseliny boritej

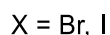
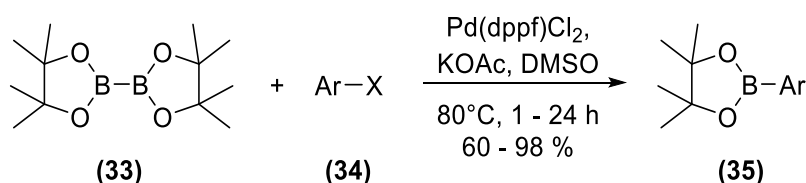
(Schéma 15).⁵⁰ Arylmagnézium bromid (**30**) reaguje s trimetylosterom kyseliny boritej v tetrahydrofuráne vychladenom na -78°C . Po odstránení nezreagovaného $\text{B}(\text{OMe})_3$ odparením z reakčnej zmesi spolu s THF sa vytvorí ester pomocou etylénglykolu v toluéne. Po prebehnutí reakcie je produkt (**32**) izolovaný z toluénovej vrstvy.

Schéma 15



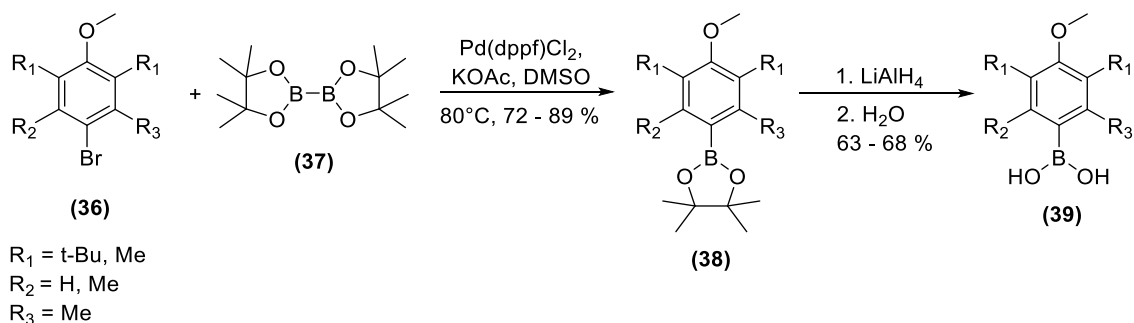
Tradičná metóda využívajúca aryllítiové a arylhorečnaté reagenty je obmedzená prítomnosťou niektorých funkčných skupín, ktoré musia byť chránené a taktiež potrebou prísne bezvodého prostredia. V snahe nájsť miernejšie podmienky a aplikovateľnosť na širšie spektrum substrátov, Ishiyama et al. publikovali v roku 1995 metódu, v ktorej diborónové estery podliehajú paládiom katalyzovanej cross-couplingovej reakcii s arylbromidmi a jodidmi.⁵¹ Táto metóda prebieha v dobrých výtáčkoch a je tolerantná k rôznym funkčným skupinám ako nitro, kyano, ester a karbonyl. Štandardné podmienky zahŕňajú $\text{Pd}(\text{dppf})\text{Cl}_2$ ako katalyzátor s KOAc ako bázou v polárnom aprotickom rozpúšťadle, najčastejšie DMSO (Schéma 16). Problémom nie sú ani používané diborónové estery, ktoré sú dnes už komerčne dostupné.

Schéma 16



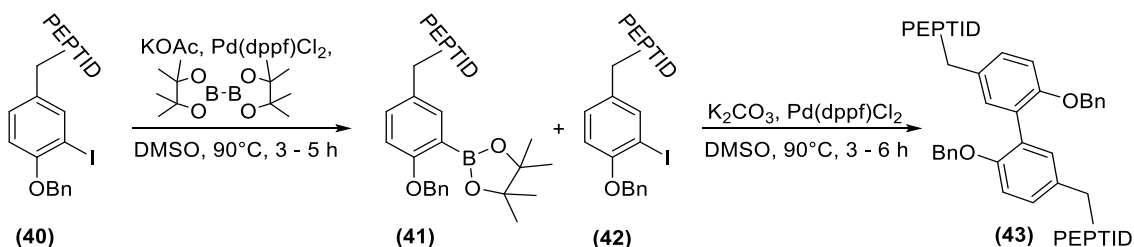
Táto metóda je vhodná aj pre prípravu sčrcky náročných borónových esterov a kyselín.^{52,53} Schéma 17 zobrazuje konkrétnu reakciu sčrcky bránených brómanizolov s diborónovou zlúčeninou za vzniku esteru nasledovanú jeho hydrolyzou.

Schéma 17



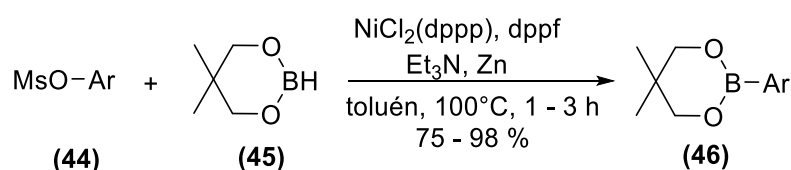
Publikované je aj využitie tejto metódy pri príprave intermolekulových cross-linkovaných peptidov cez tyrozín. Táto metóda je vhodná pre peptidy primeranej dĺžky a nahrádza neúčinnú peroxidázou katalyzovanú tvorbu dityrozínových cross-linkov. V prípade použitia krátkych peptidov je možné tvorbu borónového esteru a následný Suzuki coupling uskutočniť one-pot, dlhšie peptidy musia byť cross-linkované v dvoch krokoch (Schéma 18).⁵⁴ Následné odstránenie chrániacej skupiny na tyrozíne je možné katalytickou hydrogenolýzou benzyléteru v zmesi metanol:kyselina octová (1:1) za katalýzy Pd-C vo výťažku 94 %.

Schéma 18



Ďalšia literatúra uvádza modifikáciu tejto metódy s využitím mesyl- alebo tosyl-arylov namiesto arylhalogenidov s neopentylglykoboránom (45) za katalýzy $\text{NiCl}_2(\text{dppp})/\text{dppf}$ v prítomnosti zinkového prachu (Schéma 19).⁵⁵ Prídavkom zinkového prachu sa dosiahlo zvýšenie výťažkov, stopercentnej konverzie a skrátenie reakčného času z dní na hodiny.

Schéma 19



3. Výsledky a diskusia

Hlavným cieľom tejto práce bola syntéza derivátov arylbenzoyldiaminopyrazolov odvodených od látky CAN508, u ktorej bola preukázaná značná inhibičná aktivita na CDK. Derivatizácia bola uskutočnená s využitím Suzuki-Miyaurovej reakcie, ktorá je dnes hojne využívaná pre tvorbu novej C-C väzby. Počas experimentov bol odpozorovaný vplyv štruktúry borónových kyselín na celkový výsledok reakcie. Kapitola je rozdelená do niekoľkých častí v ktorých sa pojednáva jednak o príprave východiskových pyrazolov, a aj o príprave produktov Suzuki couplingu a problematike čistenia surových produktov. Štruktúry všetkých pripravených látok boli potvrdené pomocou HRMS a NMR.

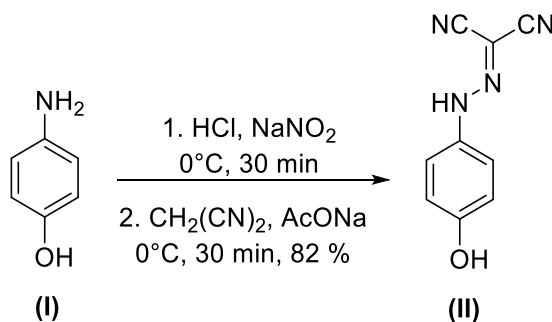
3.1. Príprava východiskových látok

Syntéza východiskových látok bola uskutočnená podľa už popísaného postupu bez väčších problémov.⁵⁶ Charakterizované boli len nepopísané látky, t.j. (Va), (Via) a (Vib).

3.1.1. [*N*-(4-Hydroxyfenyl)hydrazono]malononitril (II)

Príprava medziproduktu (II) bola uskutočnená diazotáciou *p*-aminofenolu (I) a následnou kopuláciou s malóndinitrilom (Schéma 20).

Schéma 20

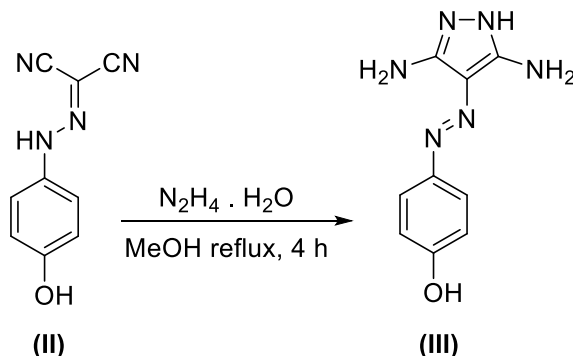


4-aminofenol (I) bol rozpustený v zriedenej kyseline chlorovodíkovej. K takto pripravenému roztoku bol pomaly prilievajú vodný roztok dusitanu sodného za stáleho miešania a chladenia z dôvodu prevencie rozkladu vznikajúcej diazóniovej soli. Po 30 minútach bola vzniknutá diazóniová soľ pomaly pridávaná do vodného roztoku malóndinitrilu a octanu sodného za vzniku hydrazónu (II).

3.1.2. [(E)-2-(3, 5-Diamino-1H-pyrazol-4yl)diazenyl]fenol (III)

Pyrazol (III) bol pripravený kondenzáciou malononitrilu (II) s monohydrátom hydrazínu (Schéma 21). Reakčná zmes bola refluxovaná 4 hodiny v metanole. Výsledný pyrazol (III) bol následne rekryštalizovaný z vody s výťažkom 90 %.

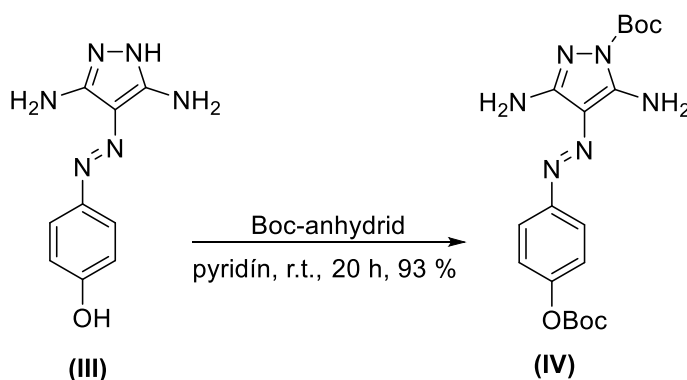
Schéma 21



3.1.3. (E)-Terc-butyl-3, 5-diamino-4-[(4-[(terc-butoxykarbonyl)oxyl]fenyl)diazenyl]-1H-pyrazol-1-karboxylát (IV)

Z dôvodu acylácie aminoskupiny pyrazolu bolo nutné pred samotnou reakciou ochrániť endocyklického atómu dusíka a hydroxylovej skupiny fenolu Boc skupinou. Pri acylácii by totiž reagovala NH skupina na pyrazole a zároveň by voľná OH skupina reaktivitou v bazickom prostredí konkurovala aminoskupine. Reakcia prebiehala s využitím Boc-anhydridu v destilovanom pyridíne za laboratórnej teploty 20 hodín (Schéma 22). Výhoda použitia pyridínu ako rozpúšťadla spočíva v tom, že zároveň slúži ako báza. Druhý deň bol odparený pyridín na RVO, odparok bol rozpustený resp. suspendovaný v metanole a následne nakvapkaný do studenej vody za miešania. Vyzrážaná látka bola odsatá a premytá studenou vodou.

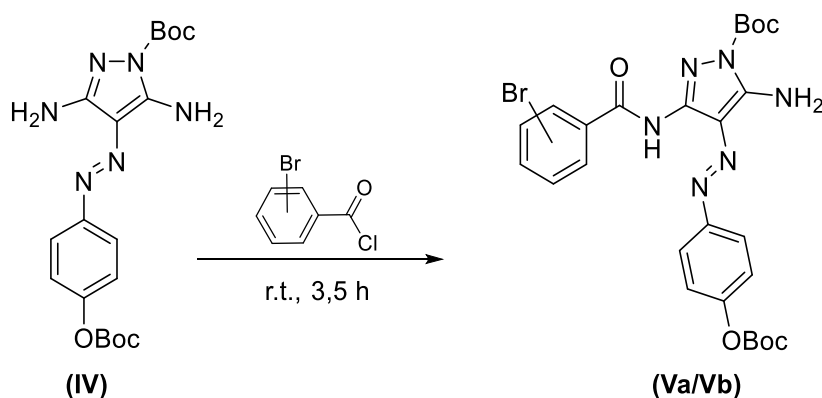
Schéma 22



3.1.4. *Terc*-butyl-(*E*)-3-amino-5-(4-brómbenzamido)-4-[(4-[(*terc*-butoxykarbonyl)oxy]fenyl)diazenyl]-1*H*-pyrazol-1-karboxylát (**Va**) a *Terc*-butyl-(*E*)-3-amino-5-(3-brómbenzamido)-4-[(4-[(*terc*-butoxykarbonyl)oxy]fenyl)diazenyl]-1*H*-pyrazol-1-karboxylát (**Vb**)

Acylácia 3-amino skupiny bola uskutočnená reakciou diBoc-chráneného pyrazolu (**IV**) v destilovanom pyridíne s príslušným izomérom brómbenzoylchloridu (*Schéma* 23). Reakcia prebiehala v uzavretej banke 3,5 hodiny. Po skončení reakcie bol pyridín odparený na RVO. Vylúčenie látky a odstránenie zvyškov pyridínu z odparku sa dosiahlo prídavkom metanolu a pôsobením ultrazvuku. U 3-bróm derivátu (**Vb**) sme sa rozhodli pre deprotekcii, vzhľadom na to, že pri reakcii došlo k odstráneniu jednej Boc skupiny. Zmes bola tým pádom znečistená monoBoc-derivátom, čo by znemožňovalo jej správne naváženie pre ďalšie reakcie. Pri 4-bróm deriváte (**Va**) dochádzalo k postupnej deprotekcii pri dlhodobom skladovaní.

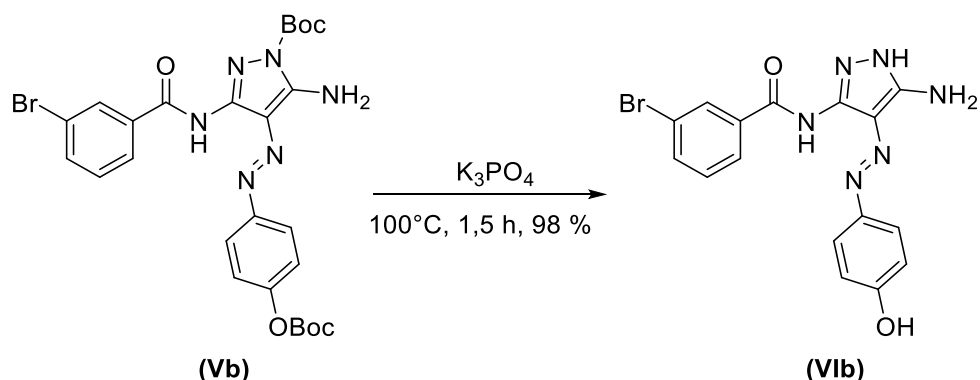
Schéma 23



3.1.5. (*E*)-*N*-(3-Amino-4-[(4-hydroxyfenyl)diazenyl]-1*H*-pyrazol-5-yl)-3-brómbenzamid (**VI**)

Odchránenie pyrazolu (**Vb**) bolo odskúšané na 100 mg látky rozpustenej v 1 ml metanolu s použitím 135 μ l TFA. Zmes bola zahrievaná na 65°C, avšak po jednej hodine došlo k deprotekcii z necelého 1 %. Následne boli pre odchránenie zvolené overené podmienky, ktorým je vystavená východisková látka počas Suzuki reakcie. Chránený pyrazol (**Vb**) a K_3PO_4 boli rozpustené v zmesi dioxán:voda (4:1). Dvojfázová reakčná zmes bola zahrievaná na 100°C a intenzívne miešaná (*Schéma* 24). K úplnej deprotekcii došlo po 1,5 hodine. Reakčná zmes bola po jej schladnutí zneutralizovaná zriedenou kyselinou chlorovodíkovou (5:1, $H_2O:HCl$) na $pH \approx 7$. Pre vyžrážanie látky a odstránenie anorganických soli bola zmes zriedená prídavkom vody a následne odsatá.

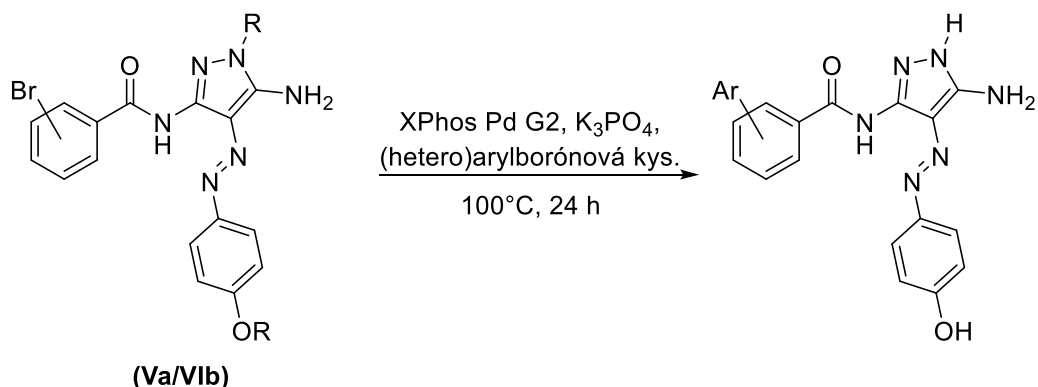
Schéma 24



3.2. Príprava produktov Suzuki couplingu

Syntéza derivátov pyrazolu bola uskutočnená s využitím Suzuki-Miyaurovej reakcie. Pri reakcii dochádzalo k tvorbe novej C-C väzby medzi východiskovou látkou pre coupling (**Va/VIb**) a rôzne substituovanou arylborónovou, prípadne heteroarylborónovou kyselinou (Schéma 25).

Schéma 25



R = H, Boc

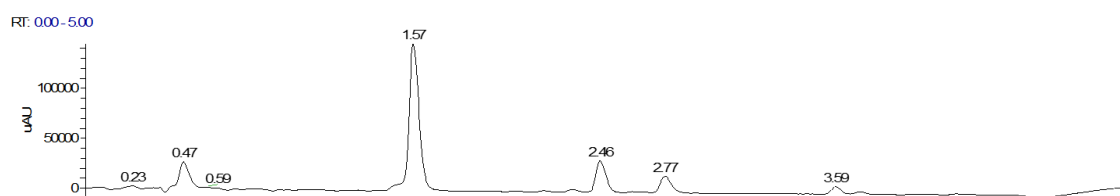
Pre samotnú reakciu boli zvolené optimálne podmienky tvorené fosforečnanom draselným ako bázy, XPhos Pd G2 slúžiacim ako prekatalyzátor a zmesi dioxán/voda ako solventom. Všetky reakcie boli vedené v inertnej atmosfére argónu pri 100°C. Reakčnú zmes bolo nutné miešať pri vysokých otáčkach pre zabezpečenie účinnej homogenizácie vodnej a organickej vrstvy. Ako optimálny reakčný čas bolo zvolených 24 hodín nakoľko sme predpokladali, že v prípade termodynamickej a sterickéj priaznivosti bude konverzia po tomto čase značná. Na základe LC-MS analýz sme po uplynutí reakčnej doby zhodnotili, či je predlžovanie času, prípadne iná optimalizácia opodstatnená.

3.2.1. Príprava derivátov z 4-brómbenzoyldiaminopyrazolu

Ako substrát pre syntézu derivátov 4-arylbrómbenzoyldiaminopyrazolu sme zvolili diBoc-derivát (**Va**), nakoľko jeho deproteckia by viedla k zbytočnému navyšovaniu počtu reakčných krokov a s tým spojeným stratám produktu a zanášaním nečistôt. K deprotekcii totižto dochádza počas couplingovej reakcie. Aj napriek tomu, že Boc skupina je zvyčajne štiepateľná silnými kyselinami a je stabilná v bazickom prostredí, za použitých podmienok pri Suzuki couplingu, t.j. pH > 12 a teplote 100°C, dochádza k ich odchráneniu. Rýchlosť deproteckie za týchto podmienok bola určená v osobitnom experimente monitorovaním reakčnej zmesi na LC-MS v 10 minútových intervaloch. Zo získaných výsledkov je zrejmé, že po 30 minútach došlo k odchráneniu približne 67 % molekúl a po 60 min boli prítomné len stopy diBoc- (**Va**) a monoBoc-derivátu (Obr. 4).

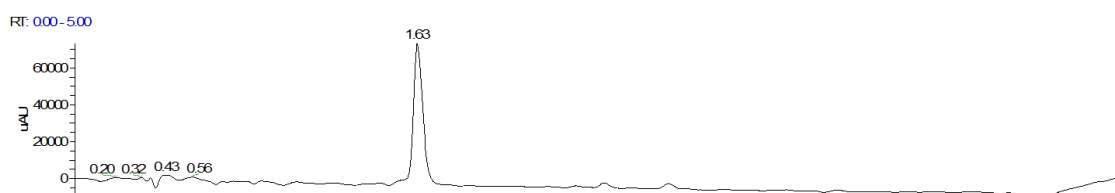
Obr. 4

30 min



RT: 1.57 - odchránený pyrazol, 2.46 a 2.77 - monoBoc-pyrazol, 3.59 - diBoc-pyrazol

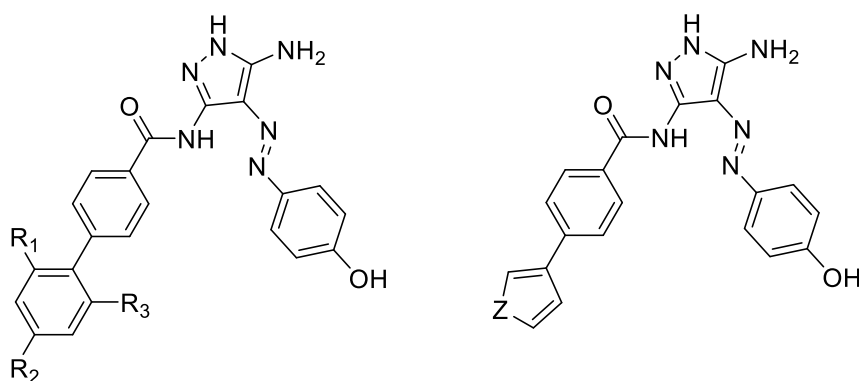
60 min



Zo zistenej skutočnosti vyplýva, že Suzukiho reakcia po hodine už prebieha s odchráneným derivátom. Používaný prekatalyzátor XPhos Pd G2 je teda dostatočne selektívny a v tomto prípade schopný couplingovej reakcie aj v prítomnosti voľného pyrazolového dusíka a hydroxylovej skupiny, ktoré sú schopné komplexácie paládia a tým deaktivácie katalyzátora.⁵⁷ Taktiež sú v molekule prítomné ďalšie atómy s voľnými elektrónovými pármami, ktorých komplexáciou s paládiom by dokonca vznikali výhodné šesťčlánkové cykly. To poukazuje na veľmi dobrú účinnosť použitého Buchwaldovho prekatalyzátora druhej generácie.

Všetky produkty na *obrázku 5* okrem **XIVa** boli nasyntetizované podľa všeobecného postupu uvedeného v experimentálnej časti, pričom tieto reakcie prebiehali vo výťažkoch 74 – 96 %. Ako je možné vidieť, v porovnaní s nesubstituovanou fenyloborónovou kyselinou vzrástla výťažnosť reakcie za použitia *para* substituovanej fenyloborónovej kyseliny metylovou skupinou s I+ efektom (**VIIIa**) alebo metoxy skupinou s M+ efektom (**XIa**). V prípade prítomnosti metylovej skupiny v polohe *orto* (**IXa**) došlo k čiastočnému zníženiu výťažku, čo je očakávané kvôli mierne zvýšeným stérickým nárokom molekuly. Pri *orto* substitúcii metoxy skupinou (**XIIa**) nebol tento trend pozorovaný pravdepodobne z dôvodu, že kladný mezoméry efekt metoxy skupiny je silnejší v porovnaní s kladným indukčným efektom metylovej skupiny a teda schopnejší kompenzovať stérické vplyvy molekuly. Reakčné zmesi všetkých produktov boli spracovávané po 24 h, teda v čase s úplnou konverziou východzej látky **Va**, zatiaľčo u látky **XIVa** bola po 24 hodinách konverzia približne 41 % odôvodniteľná prítomnosťou deaktivujúcej nitro skupiny v *para* polohe. S cieľom zvýšiť jej konverziu sme sa rozhodli reakciu zopakovať s tým, že po 12 hodinách reakcie bolo znova pridané rovnaké množstvo 4-nitrofenyloborónovej kyseliny a XPhos Pd G2 ako na začiatku reakcie. Reakcia prebiehala ďalších 24 hodín, po ktorých došlo k úplnej konverzií. Reakčná zmes bola následne spracovaná ako ostatné produkty. Zmeraním NMR spektra bola zistená prítomnosť nečistôt, ktoré sa čiastočne podarilo odstrániť suspendovaním v 10 ml metanolu za varu a následným sfilťovaním.

Obr. 5

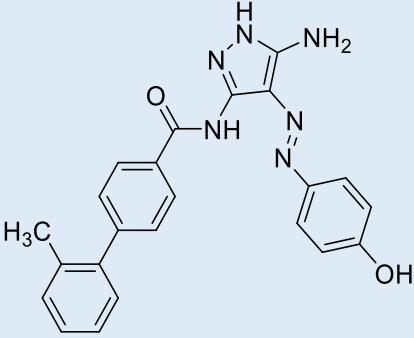


Kód	R ₁	R ₂	R ₃	Výt'azok
VIIa	H	H	H	82 %
VIIIa	H	Me	H	88 %
IXa	Me	H	H	74 %
XIa	H	OMe	H	86 %
XIIa	OMe	H	H	93 %
XIVa	H	NO ₂	H	45 %

Kód	Z	Výt'azok
XVa	O	86 %
XVIa	S	96 %

V *tabuľke 2* je uvedený produkt **IXa**, ktorý bol síce čistený, ale po zmeraní NMR spektra sme zistili, že jeho čistota sa pohybuje okolo 80 %. Prítomnou nečistotou bola nedoreagovaná východisková látka, ktorú sme sa snažili odstrániť rekryštalizáciou produktu z metanolu, no neúspešne. Ani po pridaní 10 ml metanolu za varu nedošlo k úplnému rozpusteniu látky a po schladnutí zmesi z pôvodného množstva 56 mg zostalo 14 mg, ktoré však boli rovnako znečistené. Kvôli tomu táto látka nebola zaradená do experimentálnej časti a nie je charakterizovaná pomocou NMR. Uvedená teplota topenia je len orientačná vzhľadom na to, že nečistoty ju výrazne znižujú a zväčšujú jej interval.

Tab. 2

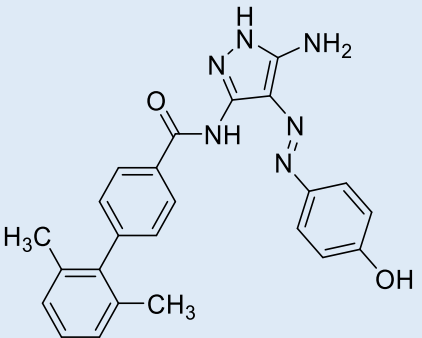
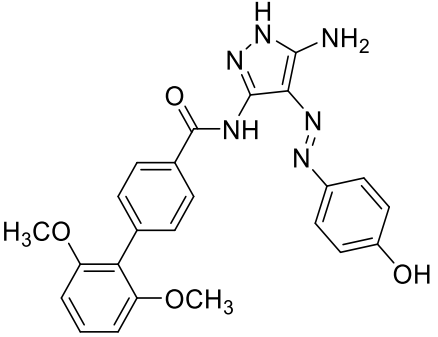
Štruktúra	Kód	Monoizotop. hmota; HRMS	Teplota topenia	Výt'azok ¹
(E)-N-(5-amino-4-((4-hydroxyfenyl)diazenyl)-1H-pyrazol-3-yl)-2'-metyl-[1,1'-bifenyl]-4-karboxamid				
	IXa	411,1570 [M-H] ⁻ 411,1561 [M-H] ⁻	229- 232°C	92 % Čistota: 80 %

¹ – výt'azok po kolónovej chromatografii

Deriváty pyrazolov, ktorých konverzia nebola úplná sú uvedené v *tabuľke 3*. U týchto látok je nízka konverzia odôvodniteľná štruktúrou použitej borónovej kyseliny. Uhlík borónovej kyseliny, ktorý má byť súčasťou novej C-C väzby je totiž značne stéricky bránený substituentami v *orto* polohách. Produkty pri reakcii vznikali v malých prípadne stopových množstvách, ich prítomnosť v surovej zmesi však bola potvrdená pomocou HRMS. Želaného produktu **Xa** boli prítomné len stopy, zatiaľčo pri príprave látky **XIIIa** bol pozorovaný vznik produktu vo väčšom množstve. Vyššiu konverziu je možné vysvetliť vďaka prítomnosti dvoch metoxy skupín s kladným mezomérnym efektom, ktorý je silnejší ako kladný indukčný efekt metylových skupín, a tak bol schopný čiastočne kompenzovať nepriaznivé stérické podmienky. Pre stanovenie obsahu produktov v surových zmesiach sme zvolili NMR spektroskopiu metódou vnútorného štandardu a následným prepočtom integrálnych intenzít peakov. Ako vnútorný štandard bol použitý dijdmetán, ktorý v NMR spektre poskytuje singlet za dva vodíky. Táto metóda však bola použiteľná len pre produkt **IXb** (*Tab. 5*), nakoľko u iných látok dochádzalo k výraznému

prekrývaniu peakov. Z tohto dôvodu bol u ostatných neizolovaných látok obsah stanovený integráciou peakov z UV/VIS záznamu na HPLC.

Tab. 3

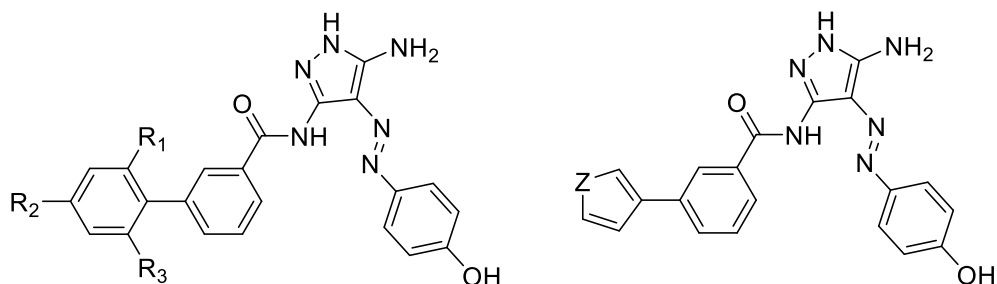
Štruktúra	Kód	Monoizotopická hmota	HRMS	Obsah
<i>(E)-N</i> -(5-Amino-4-((4-hydroxyfenyl)diazenyl)-1 <i>H</i> -pyrazol-3-yl)-2',6'-dimetyl-[1,1'-bifenyl]-4-karboxamid				
	Xa	427,1882 [M+H] ⁺	427,1880 [M+H] ⁺	HPLC: stopy
<i>(E)-N</i> -(5-Amino-4-((4-hydroxyfenyl)diazenyl)-1 <i>H</i> -pyrazol-3-yl)-2',6'-dimetoxi-[1,1'-bifenyl]-4-karboxamid				
	XIIIa	459,1781 [M+H] ⁺	459,1778 [M+H] ⁺	HPLC: 24 %

3.2.2. Príprava derivátov z 3-brómbenzoyldiaminopyrazolu

Pre prípravu derivátov 3-arylbenzoyldiaminopyrazolov nebola použitá diBoc východisková látka, pretože po acylačnej reakcii diBoc chráneného pyrazolu (IV) 3-brómbenzoyl chloridom bolo zistené, že zmes obsahuje z veľkej časti monoBoc-derivát. Aby sa zabránilo nepresnostiam pri následnom navažovaní látky pre ďalšie reakcie, pristúpili sme k jej ochráneniu. Vzhľadom k vyššie spomenutému zisteniu rýchlosti deprotektie pri podmienkach Suzuki reakcie sme predpokladali, že ochránený derivát bude reakcii podliehať rovnako ako ten chránený.

Trend priebehu reakcií bol podobný ako u 4-izoméru východiskovej látky (**Va**) (Obr. 6), avšak s väčšou citlivosťou na stérické okolie borónovej kyseliny keďže problémová bola už aj o-metylfenylborónová kyselina a zároveň celková výtťažnosť reakcií bola nižšia (40 – 65 %).

Obr. 6



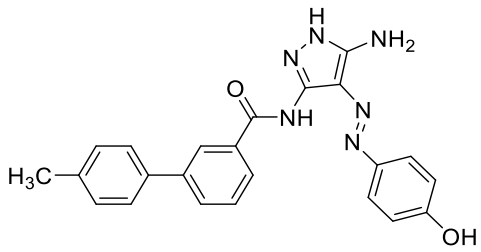
Kód	R ₁	R ₂	R ₃	Výtťažok
Xlb	H	OMe	H	40 %
XIb	OMe	H	H	65 %

Kód	Z	Výtťažok
XVb	O	50 %
XVIb	S	60 %

V tabuľke 4 sú obdobne ako v tabuľke 2 uvedené čistené produkty, u ktorých bola pomocou NMR zistená prítomnosť nečistôt, ktoré znemožňovali ich charakterizáciu. Rovnako tak je v tabuľke uvedená orientačná teplota topenia znečisteného produktu.

Tab. 4

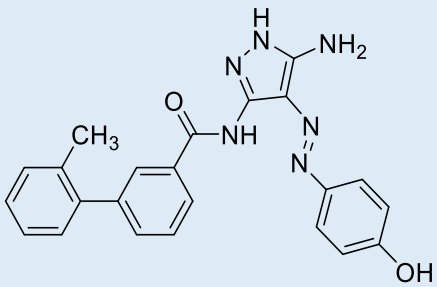
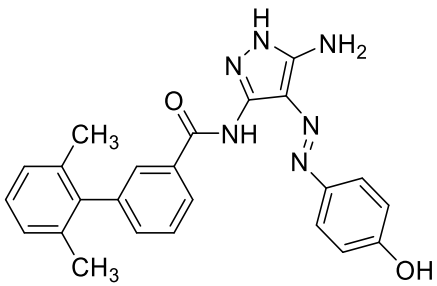
Štruktúra	Kód	Monoizotop. hmota; HRMS	Teplota topenia	Výtťažok ¹
(E)-N-(5-Amino-4-((4-hydroxyfenyl)diazenyl)-1H-pyrazol-3-yl)-[1,1'-bifenyl]-3-karboxamid				
	VIIb	397,1413 [M-H] ⁻ 397,1408 [M-H] ⁻	162- 166°C	39 % Čistota: 70 %

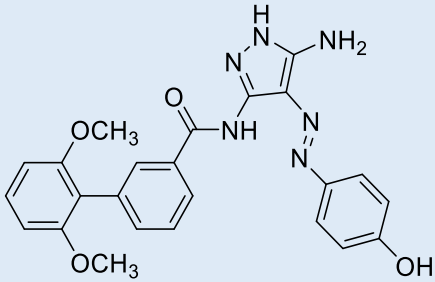
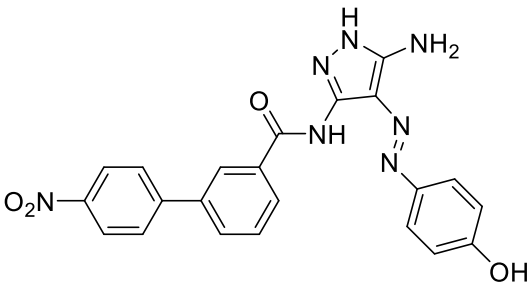
(E)-N-(5-Amino-4-((4-hydroxyfenyl)diazenyl)-1H-pyrazol-3-yl)-4'-metyl-[1,1'-bifenyl]-3-karboxamid				
	VIIIb	411,1570 [M-H] ⁻ 411,1566 [M-H] ⁻	186- 188°C	33 % Čistota: 80 %

¹ – výťažok po kolónovej chromatografii

Z *tabuľky 5* je možné pozorovať istú analógiu reaktivity so 4-izomérom východiskovej látky. V tomto prípade však konverzií zabraňovala aj metylová skupina v polohe *orto* a výrazne aj nitro skupina v polohe *para* so svojim záporným mezomérnym efektom. Zaujímavé je, že produkt **XIIIb** vznikal vo väčšom množstve ako jeho 4-analóg **XIIIa**. U látok **IXb** a **XIIIb** bol skúšaný rovnako pozmenený postup ako u látky **XIVa**, teda opakovaným prídavkom reagentov, no žiaľ neúspešne za vzniku bohatej zmes látok.

Tab. 5

Štruktúra	Kód	Monoizotop. hmota	HRMS	Obsah
(E)-N-(5-Amino-4-((4-hydroxyfenyl)diazenyl)-1H-pyrazol-3-yl)-2'-metyl-[1,1'-bifenyl]-3-karboxamid				
	IXb	411,1570 [M-H] ⁻	411,1565 [M-H] ⁻	NMR: 34 %
(E)-N-(5-Amino-4-((4-hydroxyfenyl)diazenyl)-1H-pyrazol-3-yl)-2',6'-dimetyl-[1,1'-bifenyl]-3-karboxamid				
	Xb	425,1726 [M-H] ⁻	425,1724 [M-H] ⁻	HPLC: stopy

<i>(E)</i> - <i>N</i> -(5-Amino-4-((4-hydroxyfenyl)diazenyl)-1 <i>H</i> -pyrazol-3-yl)-2',6'-dimetoxy-[1,1'-bifenyl]-3-karboxamid				
	XIIIb	457,1625 [M-H] ⁻	457,1623 [M-H] ⁻	HPLC: 40 %
<i>(E)</i> - <i>N</i> -(5-Amino-4-((4-hydroxyfenyl)diazenyl)-1 <i>H</i> -pyrazol-3-yl)-4'-nitro-[1,1'-bifenyl]-3-karboxamid				
	XIVb	444,1420 [M+H] ⁺	444,1416 [M+H] ⁺	HPLC: stopy

3.2.3. Čistenie produktov Suzuki couplingu

Pre čistenie surových produktov bola ako prvá testovaná čistiaca metóda s aktívnym uhlím. Surový produkt bol najskôr rozpustený v tetrahydrofuráne s následným pridaním aktívneho uhlia. Zmes bola miešaná pri laboratórnej teplote asi 10 minút a následne sfiltrovaná za vákua cez vrstvu celitu. Vzhľadom na to, že pri tejto metóde nedochádzalo k efektívnemu odstráneniu vedľajších produktov sme pristúpili k inému spôsobu čistenia, ktorým bola kolónová chromatografia.

Kolónová chromatografia na silikagéli sa od začiatku potýkala s viacerými problémami. Hneď prvým problémom bola veľmi nízka rozpustnosť surových produktov v bežne používaných organických rozpúšťadlách. Z množstva rozpúšťadiel bola najlepšia rozpustnosť pohybujúca sa v desatinách percent v THF, dioxáne a samozrejme DMF a DMSO, u ktorých bola rozpustnosť vyššia. Ďalším problémom bola voľba mobilnej fázy pre kolónovú chromatografiu. Testovanie mobilných fáz pozostávalo z rôznych kombinácií a pomerov CHCl₃, CH₂Cl₂, EtOAc a toluénu ako nepolárnej zložky a MeOH, EtOH, THF, acetónu a dioxánu ako polárnej zložky. U všetkých odskúšaných mobilných fáz však dochádzalo k rozmývaniu škrvny a neefektívnej separácii zložiek zmesi. K potlačeniu rozmývania neprispel ani prídavok bázy trietylamínu, ani okyslenie kyselinou octovou. K rozmývaniu škrvny pravdepodobne dochádzalo nie len kvôli acido-bazickým vlastnostiam látky, ale aj kvôli prítomnosti

nečistôt, o čom svedčí fakt, že u prečistených produktov bolo rozmývanie výrazne zoslabené alebo k nemu nedochádzalo vôbec.

Nakoniec bola ako najvhodnejšia čistiaca metóda zvolená flash chromatografia, kde bola ako mobilná fázazvolený etylacetát, v ktorom boli podľa TLC produkt a východisková látka zadržované na štarte a nečistoty eluované s čelom. Pre čistenie bola použitá kolóna s priemerom 3 cm a výškou vrstvy silikagélu 12 cm. Surový produkt bol rozpustený v cca 60 ml THF a naadsorbovaný na 700 mg aktivovaného silikagélu. Aby sa zabezpečilo čo najefektívnejšie odstránenie THF, ktorý by menil polaritu mobilnej fázy, bol silikagél s naadsorbovaným produktom tri krát po sebe suspendovaný v 15 ml EtOAc a odparený. Následne bol suchý silikagél s naadsorbovanou látkou nanosený na štart kolóny. Po vymytí nečistôt čistým EtOAc bol produkt následne eluovaný zmesou EtOAc:MeOH v pomere 5:1. Použitá čistiaca metóda však neumožňovala separáciu nedoreagovanej látky od produktu a tým pádom bola obmedzená na látky so stopercentnou konverziou východiskovej látky na produkt. Ako už bolo spomenuté vyššie, nedostatočná konverzia sa však prejavovala len u relatívne malého počtu látok.

4. Experimentálna časť

Všetky pripravované látky boli syntetizované z komerčne dostupných zlúčenín bez čistenia v kvalite deklarovanej výrobcom. Pri reakciách vyžadujúcich neprítomnosť vody boli použité komerčne dostupné bezvodé rozpúšťadlá s deklarovaným maximálnym obsahom vody. Priebeh chemických reakcií a čistota pripravených zlúčenín bola sledovaná pomocou tenkovrstvovej chromatografie (TLC) na hliníkových platničkách DC-Kiesegel 60 F₂₅₄ (Merck), detekcia bola uskutočnená pomocou UV žiarenia ($\lambda = 254$ nm). LC-MS analýzy boli merané na UHPLC-MS systéme, zloženého z UHPLC chromatografu Accela s PDA detektorom a hmotnostného spektrometra TSQ Quantum Access s APCI iónovým zdrojom a trojitým kvadrupólovým hmotnostným analyzátorom (Thermo Scientific, CA, USA). High resolution MS analýzy boli merané na LC-MS systéme, zloženého z UHPLC chromatografu Dionex Ultimate 3000 s PDA detektrom a hmotnostného spektrometra Thermo Exactive Plus s ESI iónovým zdrojom a orbitrap hmotnostným analyzátorom (Thermo Scientific, MA, USA). Body topenia boli merané na Koflerovom bodotávku. ¹H a ¹³C NMR spektrá boli merané v DMSO-*d*₆ pri 25°C na NMR spektrometre JEOL ECA 400II pri frekvencii 400 MHz (¹H) a 101 MHz (¹³C). Chemické posuny (δ) sú uvedené v jednotkách ppm s kalibráciou na signály reziduálneho rozpúšťadla s chemickým posunom 2,5 ppm (¹H) a 39,51 ppm (¹³C).

4.1. Príprava východiskových látok

4.1.1. [*N*-(4-Hydroxyfenyl)hydrazono]malononitril (II)

4-Aminofenol (4,36 g; 40 mmol) bol za laboratórnej teploty rozpustený v 50 ml vody a 17,6 ml koncentrovanej HCl. Roztok bol chladený v ľadovom kúpeli. Do roztoku bol za chladenia a miešania prikvapkaný roztok dusitanu sodného (2,76 g; 40 mmol) v 10 ml vody. Vznikajúca diazóniová soľ bola za chladenia miešaná 30 minút a následne bola po častiach pridaná do chladeného roztoku malononitrilu (2,9 g; 44 mmol) a octanu sodného (35 g) v 250 ml vody. Reakčná zmes bola chladená a miešaná 30 minút. Následne bola reakčná zmes ponechaná kryštalizovať v chladničke a ďalší deň bola vyzrážaná zlatá kryštalická látka odsatá a sušená pod infralampou. Výťažok 6,1 g (82 %), MS $m/z = 186,81$ [M+H]⁺

4.1.2. [(*E*)-2-(3, 5-Diamino-1*H*-pyrazol-4yl)diazenyl]fenol (III)

Malononitril II (4,0 g; 22 mmol) bol rozpustený v 100 ml metanolu za laboratórnej teploty. K roztoku bol pridaný hydrazín monohydrátu (1,6 ml; 33 mmol) a reakčná zmes sa nechala 4 hodiny refluxovať. Po ukončení refluxu bola reakčná zmes ochladená na laboratórnu teplotu a odparená na vákuovej odparke. Získaný surový produkt bol rekryštalizovaný z vody. Po 24 hodinách bola hnedá kryštalická látka odsatá, premytá

studenou vodou a sušená pod infralampou. Výťažok 4,2 g (90%), MS $m/z = 218,93$ $[M+H]^+$

4.1.3. (E)-Terc-butyl-3, 5-diamino-4-[(4-[(terc-

butoxykarbonyl)oxyl]fenyl)diazenyl]-1H-pyrazol-1-karboxylát (IV)

Pyrazol III (3,73 g; 17 mmol) bol za laboratórnej teploty rozpustený v 30 ml destilovaného pyridínu. Zmes bola chladená pod septom v ľadovom kúpeli a následne sa postupne za miešania pridal schladený roztok Boc-anhydridu (7,42 g; 34 mmol) v 20 ml destilovaného pyridínu. Zmes po pridaní roztoku BOC-anhydridu bola chladená ešte 10 minút, následne bol ľadový kúpeľ odstránený a zmes sa pod septom za miešania nechala reagovať 24 hodín. Po ukončení reakcie bol odparený pyridín na RVO, následne sa pridal 150 ml methanolu a odparilo na RVO do sucha. Odparok bol rozpustený resp. suspendovaný v 16 ml methanolu a bol pomaly nakvapkaný do 80 ml ľadovej vody za miešania. Vylúčená zrazenina bola odsatá, premytá studenou vodou a vysušená pod infralampou. Výťažok 6,6 g (93 %), MS $m/z = 419,05$ $[M+H]^+$

4.1.4. Terc-butyl-(E)-3-amino-5-(4-brómbenzamido)-4-[(4-[(terc-

butoxykarbonyl)oxy]fenyl)diazenyl]-1H-pyrazol-1-karboxylát (Va)

Di-boc chránený pyrazol IV (3,8 g; 9,1 mmol) bol rozpustený v 13 ml destilovaného pyridínu za laboratórnej teploty. Následne bol za neustáleho miešania a chladenia pridaný 4-brómbenzoyl chlorid (1,997 g; 9,1 mmol). Po 10 minútach bolo chladenie odstránené a reakčná zmes sa nechala pod septom reagovať po dobu 3 hodín. Po ukončení reakcie bol pyridín odparený na RVO. Odparok bol rozpustený pomocou ultrazvuku v malom množstve methanolu pričom sa vyzrážala žltá látka, ktorá bola odsatá, premytá studenou vodou a sušená pod infralampou. Výťažok 4,6 g (84 %). $T_f = 128 - 132^\circ\text{C}$. $\text{C}_{26}\text{H}_{29}\text{BrN}_6\text{O}_6$ ($M_r = 601,46$), HRMS (ESI): vypočítané pre $[M-H]^-$ $m/z = 601,1227$; nájdené $m/z = 601,1220$ $[M-H]^-$.

^1H NMR (400MHz, DMSO- d_6) $\delta = 10.87$ (s, 1 H), 8.08 (br. s., 2 H), 7.94 (d, $J = 8.3$ Hz, 2 H), 7.77 (d, $J = 8.3$ Hz, 2 H), 7.70 (d, $J = 8.8$ Hz, 2 H), 7.27 (d, $J = 8.8$ Hz, 2 H), 1.60 (s, 9 H), 1.49 (s, 9 H)

^{13}C NMR (101MHz, DMSO- d_6) $\delta = 164.9, 151.0, 150.7, 150.3, 149.5, 146.2, 143.6, 132.6, 131.7, 129.9, 126.0, 122.0, 115.7, 85.5, 83.4, 27.6, 27.2$

4.1.5. *Terc*-butyl-(*E*)-3-amino-5-(3-brómbenzamido)-4-[(4-[(*terc*-butoxykarbonyl)oxy]fenyl)diazenyl]-1*H*-pyrazol-1-karboxylát (Vb)

Di-boc chránený pyrazol **IV** (3,8 g; 9,1 mmol) bol rozpustený v 13 ml destilovaného pyridínu za laboratórnej teploty. Následne bol za neustáleho miešania a chladenia pridaný 3-brómbenzoyl chlorid (1,997 g; 9,1 mmol). Po 10 minútach bolo chladenie odstránené a reakčná zmes sa nechala pod septom reagovať po dobu 3 hodín. Po ukončení reakcie bol pyridín odparený na RVO. Odparok bol rozpustený pomocou ultrazvuku v malom množstve methanolu pričom sa vyzrážala žltá látka, ktorá bola odsatá, premytá studenou vodou a sušená pod infralampou. Výťažok 4,5 g (82 %).

4.1.6. (*E*)-*N*-(3-Amino-4-[(4-hydroxyfenyl)diazenyl]-1*H*-pyrazol-5-yl)-4-brómbenzamid (VIa)

4-bróm derivát **Va** (4,5 g; 11,2 mmol) a fosforečnan draselný (6 g; 34,4 mmol) bol rozpustený v 60 ml zmesi 1,4-dioxán:voda (4:1). Zmes sa nechala reagovať pri 100°C za intenzívneho miešania. Po 1,5 hodine bola reakčná zmes zneutralizovaná zriedenou kyselinou chlorovodíkovou (5:1) na pH 7 a látka bola vyzrážaná pridaním studenej vody. Vyzrážaná látka bola odsatá, premytá vodou a sušená pod infralampou. Výťažok 95 %.

^1H NMR (400MHz, DMSO- d_6) δ = 10.65 (br. s., 3 H), 7.99 (d, J = 8.7 Hz, 2 H), 7.68 (d, J = 8.2 Hz, 2 H), 7.52 (d, J = 9.2 Hz, 2 H), 6.80 (d, J = 8.7 Hz, 2 H), 6.28 (br. s., 2 H)

^{13}C NMR (101MHz, DMSO- d_6) δ = 166.4, 157.6, 146.1, 144.2, 135.7, 131.1, 130.0, 124.4, 122.1, 116.7, 115.5

4.1.7. (*E*)-*N*-(3-Amino-4-[(4-hydroxyfenyl)diazenyl]-1*H*-pyrazol-5-yl)-3-brómbenzamid (VIb)

Hydrolyza 3-bróm derivátu **Vb** bola uskutočnená s využitím rovnakých podmienok ako pri 4-bróm deriváte **Va**. Výťažok 98 %. T_f = 249 – 252°C. $\text{C}_{16}\text{H}_{13}\text{BrN}_6\text{O}_2$ (M_r = 401,22), HRMS (ESI): vypočítané pre $[\text{M}-\text{H}]^-$ m/z = 399,0205; nájdené m/z = 399,0201 $[\text{M}-\text{H}]^-$.

^1H NMR (400MHz, DMSO- d_6) δ = 11.81 (br. s., 1 H), 10.63 (br. s., 1 H), 9.77 (br. s., 1 H), 8.14 (t, J = 1.8 Hz, 1 H), 7.97 (d, J = 7.8 Hz, 1 H), 7.82 (dd, J = 1.5, 7.8 Hz, 1 H), 7.54 (d, J = 8.7 Hz, 2 H), 7.53 (t, J = 7.8 Hz, 1 H), 6.81 (d, J = 8.7 Hz, 2 H), 6.60 (br. s., 2 H)

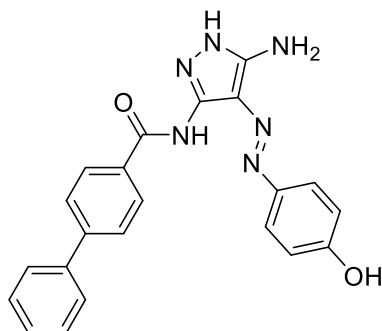
^{13}C NMR (101MHz, DMSO- d_6) δ = 164.1, 158.1, 145.9, 143.3, 136.1, 134.6, 130.9, 130.4, 126.8, 122.5, 121.9, 116.2, 115.5

4.2. Príprava produktov Suzuki-couplingu

Všeobecný postup prípravy: 4-bróm derivát **Va** / 3-brómderivát **VI** (0,25 mmol), borónová kyselina (0,5 mmol) a K_3PO_4 (212,3 mg; 1,0 mmol) bolo rozpustených v 2,5 ml zmesi 1,4-dioxán:voda (4:1) a prebublánych argónom. K zmesi bol pridaný prekatalyzátor XPhos Pd G2 (9,8 mg; 0,0125 mmol). Zmes bola prebublávaná argónom a následne sa nechala reagovať 24 hodín pri 100°C za intenzívneho miešania. Po 24 hodinách sa schladnutá reakčná zmes zneutralizovala zriedeným roztokom HCl v pomere 5:1 na pH 7 a doplnila vodou na objem 10 ml. Vylúčená amorfná látka bola odsatá na filtračnom papieri, premytá vodou a sušená pod infra lampou. Surový produkt bol prečistený pomocou kolónovej chromatografie na silikagéle (EtOAc; EtOAc:MeOH 5:1).

4.2.1. Produkty arylácie (*E*)-*N*-(3-Amino-4-[(4-hydroxyfenyl)diazenyl]-1*H*-pyrazol-5-yl)-4-brómbenzamidu

(*E*)-*N*-(5-Amino-4-((4-hydroxyfenyl)diazenyl)-1*H*-pyrazol-3-yl)-[1,1'-bifenyl]-4-karboxamid (**VIIa**)

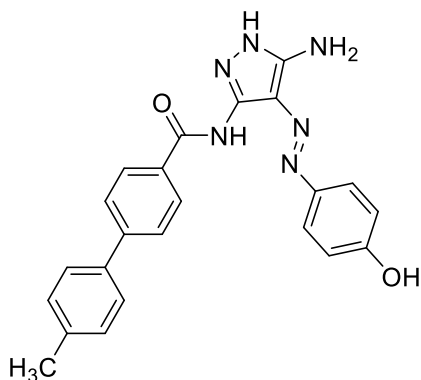


Svetlooranžová amorfná látka (82 %). $T_f = 249 - 253^\circ\text{C}$. $C_{22}H_{18}N_6O_2$ ($M_r = 398,43$), HRMS (ESI) vypočítané pre $[M-H]^-$ $m/z = 397,1413$; nájdené $m/z = 397,1406$ $[M-H]^-$.

^1H NMR (400MHz, $\text{DMSO-}d_6$) $\delta = 11.86$ (br. s., 1 H), 10.67 (br. s., 1 H), 9.77 (s, 1 H), 8.09 (d, $J = 7.8$ Hz, 2 H), 7.88 (d, $J = 8.2$ Hz, 2 H), 7.78 (d, $J = 8.2$ Hz, 2 H), 7.59 (d, $J = 8.7$ Hz, 2 H), 7.52 (t, $J = 7.6$ Hz, 2 H), 7.43 (t, $J = 7.3$ Hz, 1 H), 6.83 (d, $J = 8.7$ Hz, 2 H), 6.54 (br. s., 2 H)

^{13}C NMR (101MHz, $\text{DMSO-}d_6$) $\delta = 165.0, 158.1, 145.9, 143.4, 139.1, 132.6, 129.1, 128.4, 128.3, 127.0, 126.9, 122.5, 116.0, 115.6$

(E)-N-(5-Amino-4-((4-hydroxyfenyl)diazenyl)-1H-pyrazol-3-yl)-4'-metyl-[1,1'-bifenyl]-4-karboxamid (VIIIa)

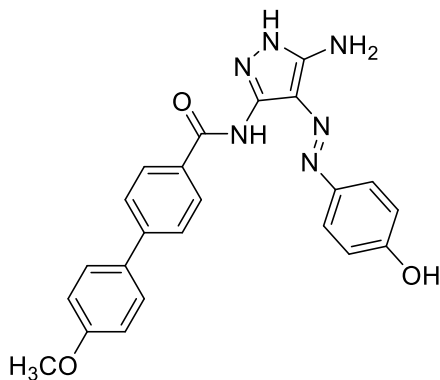


Oranžová amorfná látka (88 %). $T_f = 261 - 265^\circ\text{C}$. $\text{C}_{23}\text{H}_{20}\text{N}_6\text{O}_2$ ($M_r = 412,45$), HRMS (ESI) vypočítané pre $[\text{M-H}]^-$ $m/z = 411,1570$; nájdené $m/z = 411,1568$ $[\text{M-H}]^-$.

^1H NMR (400MHz, $\text{DMSO-}d_6$) $\delta = 11.85$ (br. s, 1 H), 10.66 (br. s., 1 H), 9.77 (br. s., 1 H), 8.07 (d, $J = 8.8$ Hz, 2 H), 7.85 (d, $J = 8.3$ Hz, 2 H), 7.68 (d, $J = 8.3$ Hz, 2 H), 7.58 (d, $J = 8.8$ Hz, 2 H), 7.32 (d, $J = 7.8$ Hz, 2 H), 6.83 (d, $J = 8.8$ Hz, 2 H), 6.52 (br. s., 2 H), 2.36 (s, 3 H)

^{13}C NMR (101MHz, $\text{DMSO-}d_6$) $\delta = 165.0, 158.0, 145.9, 143.3, 137.7, 136.1, 132.3, 129.7, 128.3, 126.8, 126.5, 122.5, 116.0, 115.5, 20.7$

(E)-N-(5-Amino-4-((4-hydroxyfenyl)diazenyl)-1H-pyrazol-3-yl)-4'-metoxy-[1,1'-bifenyl]-4-karboxamid (XIa)

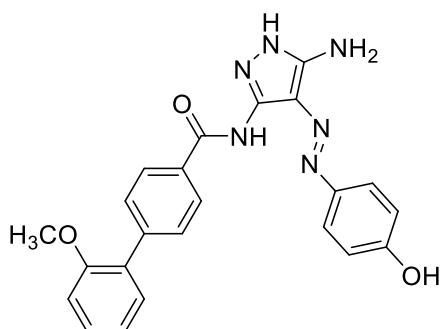


Oranžovočervená amorfná látka (86 %). $T_f = 220 - 224^\circ\text{C}$. $\text{C}_{23}\text{H}_{20}\text{N}_6\text{O}_3$ ($M_r = 428,45$), HRMS (ESI) vypočítané pre $[\text{M-H}]^-$ $m/z = 427,1519$; nájdené $m/z = 427,1513$ $[\text{M-H}]^-$.

^1H NMR (400MHz, $\text{DMSO-}d_6$) $\delta = 11.85$ (br. s, 1 H), 10.65 (br. s, 1 H), 9.77 (br. s., 1 H), 8.05 (d, $J = 8.3$ Hz, 2 H), 7.83 (d, $J = 8.3$ Hz, 2 H), 7.74 (d, $J = 9.3$ Hz, 2 H), 7.59 (d, $J = 8.8$ Hz, 2 H), 7.07 (d, $J = 8.8$ Hz, 2 H), 6.83 (d, $J = 8.8$ Hz, 2 H), 6.53 (br. s, 2 H), 3.82 (s, 3 H)

^{13}C NMR (101MHz, $\text{DMSO-}d_6$) $\delta = 165.0, 159.5, 158.0, 145.9, 143.1, 131.8, 131.3, 128.3, 128.1, 126.2, 122.5, 116.0, 115.5, 114.5, 55.2$

(E)-N-(5-Amino-4-((4-hydroxyfenyl)diazenyl)-1H-pyrazol-3-yl)-2'-metoxy-[1,1'-bifenyl]-4-karboxamid (XIIa)

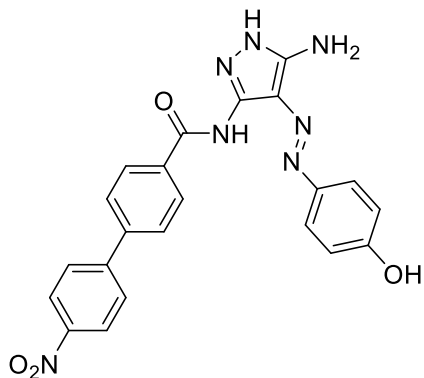


Oranžová amorfná látka (93 %). $T_f = 188 - 192^\circ\text{C}$. $\text{C}_{23}\text{H}_{20}\text{N}_6\text{O}_3$ ($M_r = 428,45$), HRMS (ESI) vypočítané pre $[\text{M}-\text{H}]^-$ $m/z = 427,1519$; nájdené $m/z = 427,1515$ $[\text{M}-\text{H}]^-$.

^1H NMR (400MHz, $\text{DMSO}-d_6$) $\delta = 11.90$ (br. s, 1 H), 10.66 (br. s, 1 H), 9.79 (s, 1 H), 8.02 (d, $J = 8.2$ Hz, 2 H), 7.67 (d, $J = 8.2$ Hz, 2 H), 7.58 (d, $J = 8.7$ Hz, 2 H), 7.43 - 7.35 (m, 2 H), 7.15 (dd, $J = 0.9, 7.8$ Hz, 1 H), 7.07 (dt, $J = 0.9, 7.3$ Hz, 1 H), 6.83 (d, $J = 8.7$ Hz, 2 H), 6.52 (br. s, 2 H), 3.80 (s, 3 H)

^{13}C NMR (101MHz, $\text{DMSO}-d_6$) $\delta = 165.2, 158.1, 156.2, 145.9, 144.1, 141.8, 132.1, 130.5, 129.6, 129.5, 128.8, 127.4, 122.5, 121.0, 116.0, 115.6, 111.9, 55.6$

(E)-N-(5-Amino-4-((4-hydroxyfenyl)diazenyl)-1H-pyrazol-3-yl)-4'-nitro-[1,1'-bifenyl]-4-karboxamid (XIVa)

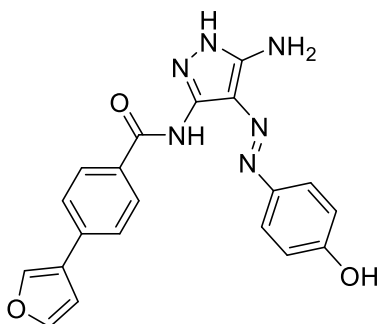


3-bróm derivát **VIIb** (0,25 mmol), 4-nitrofenylborónová kyselina (0,5 mmol) a K_3PO_4 (212,3 mg; 1,0 mmol) bolo rozpustených v 2,5 ml zmesi 1,4-dioxán:voda (4:1) a prebubláných argónom. K zmesi bol pridaný prekatalyzátor XPhos Pd G2 (9,8 mg; 0,0125 mmol). Zmes bola prebublaná argónom a následne sa nechala reagovať pri 100°C a 1300 rpm. Po 12 hodinách bol do reakčnej zmesi pridaný ďalší podiel borónovej kyseliny (0,5 mmol) a XPhos Pd G2 (0,0125 mmol). Zmes bola ponechaná reagovať ďalších 24 hodín po ktorý bola spracovaná podľa všeobecného postupu. Oranžová amorfná látka. Výťažok po flash chromatografii a následnom dočistení produktu jeho suspendovaním v metanole bol 45 %. $T_f = 187 - 192^\circ\text{C}$. $\text{C}_{22}\text{H}_{17}\text{N}_7\text{O}_4$ ($M_r = 443,42$), HRMS (ESI) vypočítané pre $[\text{M}+\text{H}]^+$ $m/z = 444,1420$; nájdené $m/z = 444,1416$ $[\text{M}+\text{H}]^+$.

^1H NMR (400MHz, $\text{DMSO}-d_6$) $\delta = 11.80$ (br. s., 1 H), 10.66 (br. s., 1 H), 9.74 (br. s., 1 H), 8.35 (d, $J = 8.7$ Hz, 2 H), 8.13 (d, $J = 8.7$ Hz, 2 H), 8.08 (d, $J = 9.2$ Hz, 2 H), 8.00 (d, $J = 8.2$ Hz, 2 H), 7.57 (d, $J = 8.2$ Hz, 2 H), 6.81 (d, $J = 9.2$ Hz, 2 H), 6.61 (br. s., 2 H)

^{13}C NMR (101MHz, DMSO- d_6) δ = 164.8, 158.0, 147.1, 145.9, 145.5, 140.9, 134.0, 128.5, 128.2, 127.5, 124.2, 122.5, 115.5

(E)-N-(5-Amino-4-((4-hydroxyfenyl)diazenyl)-1H-pyrazol-3-yl)-4-(furan-3-yl)benzamid (XVa)

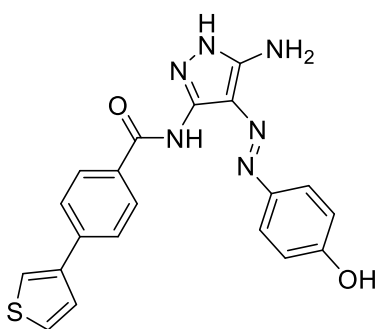


Oranžová amorfnná látka (86 %). T_t = 266 – 271°C.
 $\text{C}_{20}\text{H}_{16}\text{N}_6\text{O}_3$ (Mr = 388,39), HRMS (ESI) vypočítané pre $[\text{M}+\text{H}]^+$ m/z = 389,1362; nájdené m/z = 389,1356 $[\text{M}+\text{H}]^+$.

^1H NMR (400MHz, DMSO- d_6) δ = 11.86 (br. s., 1 H), 10.61 (br. s., 1 H), 9.79 (s, 1 H), 8.36 (s, 1 H), 8.01 (d, J = 8.2 Hz, 2 H), 7.82 (d, J = 8.2 Hz, 2 H), 7.80 (t, J = 1.6 Hz, 1 H), 7.57 (d, J = 8.7 Hz, 2 H), 7.10 - 7.07 (m, 1 H), 6.83 (d, J = 8.7 Hz, 2 H), 6.53 (br. s., 2 H)

^{13}C NMR (101MHz, DMSO- d_6) δ = 165.0, 158.1, 145.9, 144.7, 143.9, 140.6, 135.5, 132.0, 128.3, 125.6, 125.2, 122.5, 116.0, 115.6, 108.7

(E)-N-(5-Amino-4-((4-hydroxyfenyl)diazenyl)-1H-pyrazol-3-yl)-4-(tiofén-3-yl)benzamid (XVIa)



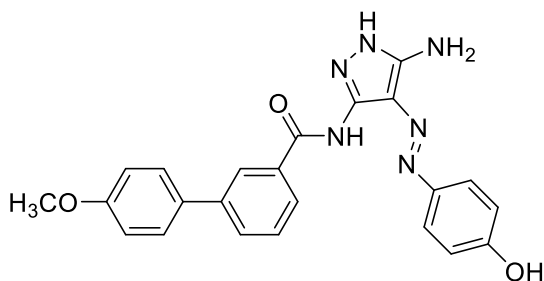
Žltlooranžová amorfnná látka (96 %). T_t = 272 – 274°C.
 $\text{C}_{20}\text{H}_{16}\text{N}_6\text{O}_2\text{S}$ (Mr = 404,45), HRMS (ESI) vypočítané pre $[\text{M}-\text{H}]^-$ m/z = 403,0977; nájdené m/z = 403,0975 $[\text{M}-\text{H}]^-$

^1H NMR (400MHz, DMSO- d_6) δ = 11.85 (br. s, 1 H), 10.63 (br. s, 1 H), 9.77 (s, 1 H), 8.08 (dd, J = 1.6, 2.5 Hz, 1 H), 8.03 (d, J = 8.2 Hz, 2 H), 7.93 (d, J = 8.2 Hz, 2 H), 7.72 - 7.67 (m, 2 H), 7.57 (d, J = 8.7 Hz, 2 H), 6.82 (d, J = 9.2 Hz, 2 H), 6.54 (br. s, 2 H)

^{13}C NMR (101MHz, DMSO- d_6) δ = 164.9, 158.0, 145.9, 140.4, 138.3, 132.1, 128.4, 127.5, 126.3, 126.1, 122.7, 122.4, 116.0, 115.5

4.2.2. Produkty arylácie (E)-N-(3-Amino-4-[(4-hydroxyfenyl)diazenyl]-1H-pyrazol-5-yl)-3-brómbenzamidu

(E)-N-(5-Amino-4-((4-hydroxyfenyl)diazenyl)-1H-pyrazol-3-yl)-4'-metoxy-[1,1'-bifenylyl]-3-karboxamid (XIb)

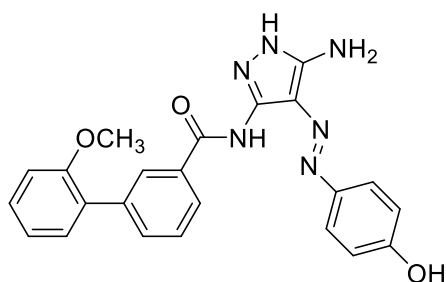


Tmavo oranžová amorfná látka (40 %).
 $T_t = 192 - 196^\circ\text{C}$. $\text{C}_{23}\text{H}_{20}\text{N}_6\text{O}_3$
($M_r = 428,45$), HRMS (ESI) vypočítané pre
[$\text{M}+\text{H}$] $^+$ $m/z = 429,1675$; nájdené
 $m/z = 429,1674$ [$\text{M}+\text{H}$] $^+$.

^1H NMR (400MHz, $\text{DMSO}-d_6$) $\delta = 11.99$
(br. s, 1 H), 10.70 (br. s, 1 H), 9.78 (br. s, 1 H), 8.21 (s, 1 H), 7.90 (d, $J = 7.8$ Hz, 1 H),
7.86 (d, $J = 7.8$ Hz, 1 H), 7.73 (d, $J = 8.7$ Hz, 2 H), 7.61 (t, $J = 7.8$ Hz, 1 H), 7.53 (d, $J =$
8.7 Hz, 2 H), 7.07 (d, $J = 8.7$ Hz, 2 H), 6.78 (d, $J = 8.7$ Hz, 2 H), 6.56 (br. s., 2 H), 3.82
(s, 3 H)

^{13}C NMR (101MHz, $\text{DMSO}-d_6$) $\delta = 165.4, 159.3, 158.0, 145.9, 143.7, 140.8, 140.2,$
134.5, 131.8, 129.6, 129.3, 128.1, 127.9, 126.1, 125.3, 122.5, 116.1, 115.5, 114.5, 55.3

(E)-N-(5-Amino-4-((4-hydroxyfenyl)diazenyl)-1H-pyrazol-3-yl)-2'-metoxy-[1,1'-bifenylyl]-3-karboxamid (XIIb)

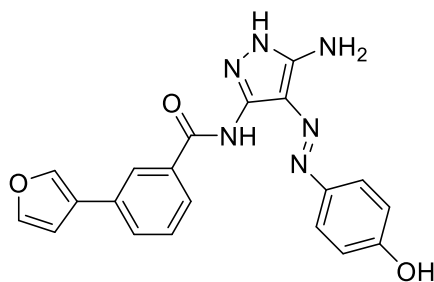


Hnedá amorfná látka (65 %). $T_t = 175 - 180^\circ\text{C}$.
 $\text{C}_{23}\text{H}_{20}\text{N}_6\text{O}_3$ ($M_r = 428,45$), HRMS (ESI) vypočítané
pre [$\text{M}+\text{H}$] $^+$ $m/z = 429,1675$; nájdené
 $m/z = 429,1672$ [$\text{M}+\text{H}$] $^+$.

^1H NMR (400MHz, $\text{DMSO}-d_6$) $\delta = 11.84$ (br. s, 1 H),
10.74 (br. s, 1 H), 9.77 (br. s, 1 H), 8.06 (s, 1 H),
7.93 (d, $J = 7.8$ Hz, 1 H), 7.72 (d, $J = 7.8$ Hz, 1 H), 7.60 (t, $J = 7.6$ Hz, 1 H), 7.51 (d, $J =$
8.7 Hz, 2 H), 7.41 (d, $J = 7.3$ Hz, 2 H), 7.17 (d, $J = 8.7$ Hz, 1 H), 7.09 (t, $J = 7.6$ Hz, 1 H),
6.75 (d, $J = 8.7$ Hz, 2 H), 6.50 (br. s., 2 H), 3.77 (s, 3 H)

^{13}C NMR (101MHz, $\text{DMSO}-d_6$) $\delta = 165.1, 158.0, 156.1, 145.8, 144.5, 138.5, 133.7,$
132.9, 130.6, 129.5, 128.9, 128.5, 128.2, 126.3, 122.4, 120.9, 115.5, 111.8, 55.6

(E)-N-(5-Amino-4-((4-hydroxyfenyl)diazenyl)-1H-pyrazol-3-yl)-3-(furán-3-yl)benzamid (XVb)

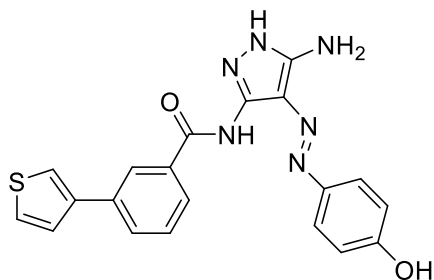


Oranžová amorfna látka (50 %). $T_f = 204 - 208^\circ\text{C}$.
 $\text{C}_{20}\text{H}_{16}\text{N}_6\text{O}_3$ ($M_r = 388,39$), HRMS (ESI) vypočítané pre $[\text{M}+\text{H}]^+$ $m/z = 389,1362$; nájdené $m/z = 389,1357$ $[\text{M}+\text{H}]^+$.

^1H NMR (400MHz, DMSO- d_6) $\delta = 11.81$ (br. s, 1 H), 10.58 (br. s, 1 H), 9.76 (br. s, 1 H), 8.29 (t, $J = 1.0$ Hz, 1 H), 8.21 (t, $J = 1.6$ Hz, 1 H), 7.86 (dd, $J = 1.6, 7.6$ Hz, 2 H), 7.80 (t, $J = 1.6$ Hz, 1 H), 7.57 (t, $J = 7.8$ Hz, 1 H), 7.53 (d, $J = 8.7$ Hz, 2 H), 7.08 - 7.04 (m, 1 H), 6.79 (d, $J = 8.7$ Hz, 2 H), 6.56 (br. s, 2 H)

^{13}C NMR (101MHz, DMSO- d_6) $\delta = 165.4, 158.0, 145.9, 144.6, 139.9, 134.5, 132.4, 129.2, 128.9, 126.2, 125.3, 124.6, 122.5, 116.2, 115.5, 108.8$

(E)-N-(5-Amino-4-((4-hydroxyfenyl)diazenyl)-1H-pyrazol-3-yl)-3-(tiofén-3-yl)benzamid (XVIb)



Svetlo oranžová amorfna látka (60 %).
 $T_f = 278 - 282^\circ\text{C}$. $\text{C}_{20}\text{H}_{16}\text{N}_6\text{O}_2\text{S}$ ($M_r = 404,45$), HRMS (ESI) vypočítané pre $[\text{M}-\text{H}]^-$ $m/z = 403,0977$; nájdené $m/z = 403,0971$ $[\text{M}-\text{H}]^-$.

^1H NMR (400MHz, DMSO- d_6) $\delta = 11.94$ (br. s, 1 H), 10.66 (br. s, 1 H), 9.78 (br. s., 1 H), 8.32 (s, 1 H), 8.02 - 8.00 (m, 1 H), 7.96 (d, $J = 7.8$ Hz, 1 H), 7.89 (d, $J = 7.3$ Hz, 1 H), 7.72 - 7.69 (m, 1 H), 7.67 (d, $J = 5.0$ Hz, 1 H), 7.60 (t, $J = 7.8$ Hz, 1 H), 7.54 (d, $J = 8.2$ Hz, 2 H), 6.78 (d, $J = 8.7$ Hz, 2 H), 6.58 (br. s., 2 H)

^{13}C NMR (101MHz, DMSO- d_6) $\delta = 165.4, 158.0, 145.9, 143.5, 140.8, 135.5, 134.6, 129.5, 129.3, 127.5, 126.5, 126.3, 125.1, 122.5, 121.9, 116.2, 115.5$

5. Záver

Cieľom tejto práce bolo pripraviť sériu látok s potenciálnou biologickou aktivitou. Nasyntetizované látky boli pripravené aryláciou 3- a 4-brómbenzoyldiaminopyrazolu odvodeného od látky CAN508 s využitím Suzuki-Miyaurovej reakcie. Taktiež bol pozorovaný stérický vplyv a elektronické efekty substituentov použitých borónových kyselín na priebeh reakcie. Zistilo sa, že couplingová reakcia má problém s *ortho* disubstituovanými borónovými kyselinami, pričom k miernemu zvýšeniu konverzie napomáha prítomnosť skupín s kladným mezomérnym efektom. Reakcia so 4-nitrofenylborónovou kyselinou, ktorá nesie skupinu so záporným mezomérnym efektom prebiehala s konverziou 41 % . Úplnú konverziu sa však podarilo dosiahnuť po opakovanom prídavku reakčných komponent a predĺžením reakčného času. Pri použití 3-bróm derivátu ako východiskovej látky sme v porovnaní so 4-bróm derivátom pozorovali všeobecne nižšie výťažky a väčšiu citlivosť na elektronické efekty a stérický vplyv substituentov.

Celkovo bolo nasyntetizovaných 20 produktov Suzuki couplingu, z ktorých bolo 14 čistených a z nich 11 plne charakterizovaných aj napriek problematickému spôsobu čistenia. U látok **Va**, **VIIa**, **VIIIa**, **XIa**, **XVa** a **XVIa** bola testovaná aj antibakteriálna aktivita, ktorá však bola nižšia ako u porovnávacieho antibiotika ciprofloxacínu. Z tohto dôvodu látky nepostúpili do ďalšieho testovania.

Všetky novo pripravené a vyčistené látky budú podrobené testovaniu na inhibičnú aktivitu CDK v Laboratóriu rastových regulátorov UP. Vzhľadom na ich všeobecne veľmi malú rozpustnosť však nemusia byť získané pozitívne výsledky, keďže pre testovanie musia byť vzorky rozpustené vo vodnom prostredí. Na druhej strane bude o to príjemnejším prekvapením pokiaľ bude zistený opak.

6. Použitá literatúra

- (1) von Pechmann, H. *Berichte der Dtsch. Chem. Gesellschaft* **1898**, 31 (3), 2950–2951.
- (2) Kryštof, V.; Cankař, P.; Fryšová, I.; Slouka, J.; Kontopidis, G.; Džubák, P.; Hajdúch, M.; Srovnal, J.; de Azevedo, W. F.; Orság, M.; Paprskářová, M.; Rolčík, J.; Látr, A.; Fischer, P. M.; Strnad, M. *J. Med. Chem.* **2006**, 49 (22), 6500–6509.
- (3) Katritzky, A. R.; Pozharskii, A. F. *Handbook of Heterocyclic Chemistry, 2nd Edition*; 2000.
- (4) Gupta, R. R.; Kumar, M.; Gupta, V. *Heterocyclic Chemistry: Volume II: Five-Membered Heterocycles*; 1999.
- (5) Li, G.; Kakarla, R.; Gerritz, S. W. *Tetrahedron Lett.* **2007**, 48 (26), 4595–4599.
- (6) Stefani, H. A.; Pereira, C. M. P.; Almeida, R. B.; Braga, R. C.; Guzen, K. P.; Cella, R. *Tetrahedron Lett.* **2005**, 46 (40), 6833–6837.
- (7) Eskildsen, J.; Vedsø, P.; Begtrup, M. *Synthesis (Stuttg.)* **2001**, 2001 (7), 1053–1056.
- (8) Katritzky, A. R. *Arkivoc* **2005**, 2005 (iii), 179–191.
- (9) Katritzky, A. R.; Vakulenko, A. V.; Sivapackiam, J.; Draghici, B.; Damavarapu, R. *Synthesis (Stuttg.)* **2008**, No. 5, 699–706.
- (10) Grandberg, I. I.; Nam, N. L.; Sorokin, V. I. *Chem. Heterocycl. Compd.* **1997**, 33 (5), 532–534.
- (11) Dirat, O.; Clipson, A.; Elliott, J. M.; Garrett, S.; Jones, A. B.; Reader, M.; Shaw, D. *Tetrahedron Lett.* **2006**, 47, 1729–1731.
- (12) Begtrup, M.; Larsen, P.; Edlund, U. *Acta Chem. Scand.* **1990**, 44, 1050–1057.
- (13) Price, S.; Bordogna, W.; Braganza, R. et al. *Bioorganic Med. Chem. Lett.* **2007**, 17 (2), 363–369.
- (14) Hayat, S.; Atta-Ur-Rahman; Iqbal Choudhary, M.; Khan, K. M.; Schumann, W.; Bayer, E. *Tetrahedron* **2001**, 57 (50), 9951–9957.
- (15) Wang, X.; Tan, J.; Grozinger, K.; Betageri, R.; Proudfoot, J. R. *Tetrahedron Lett.* **2000**, 41, 5321–5324.
- (16) Antilla, J. C.; Baskin, J. M.; Barder, T. E.; Buchwald, S. L. *J. Org. Chem.* **2004**, 69 (17), 5578–5587.
- (17) Pierrat, P.; Gros, P.; Fort, Y. *Org. Lett.* **2005**, 7 (4), 697–700.
- (18) Browne, D. L.; Helm, M. D.; Plant, A.; Harrity, J. P. A. *Angew. Chemie - Int. Ed.* **2007**, 46, 8656–8658.

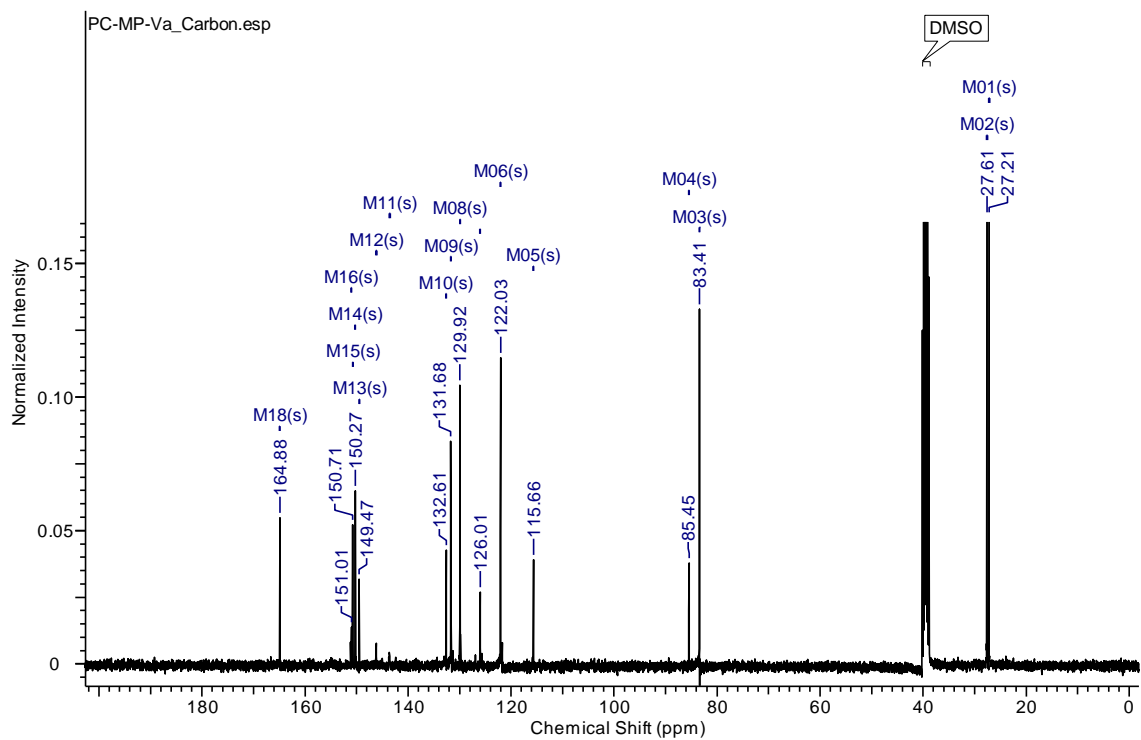
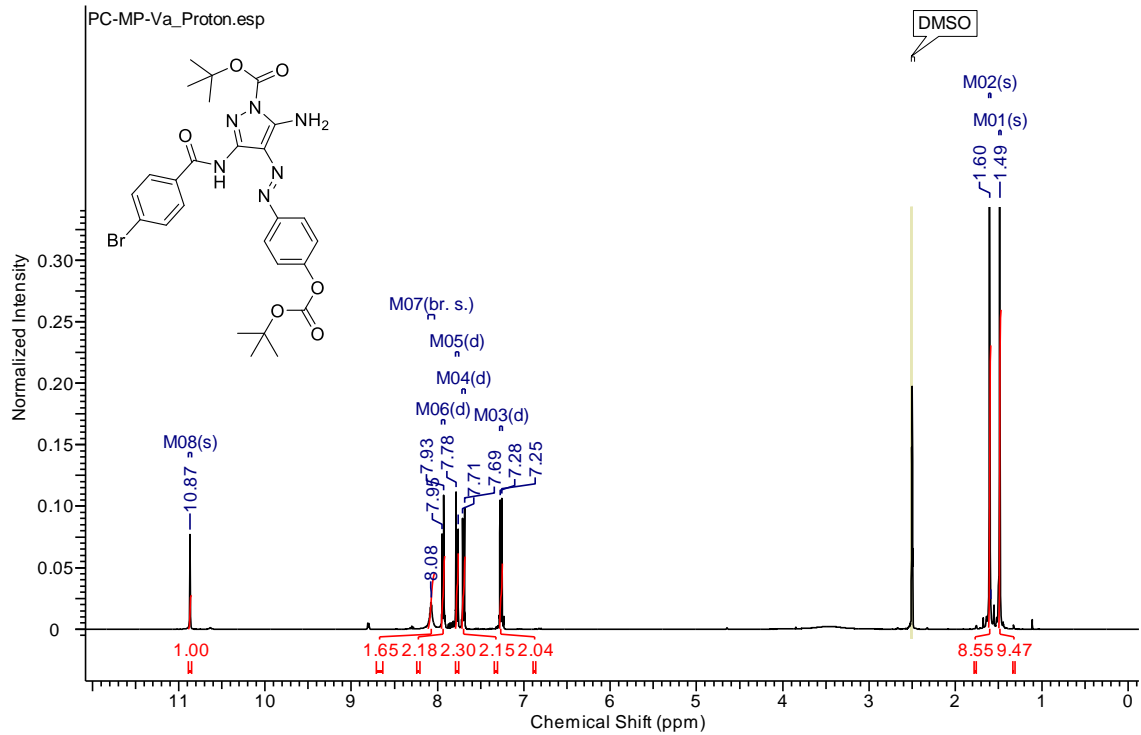
- (19) Bertrand Cottineau, J. C. *Synlett* **2002**, No. 5, 769–770.
- (20) Wenckens, M.; Jakobsen, P.; Vedsø, P.; Huusfeldt, P. O.; Gissel, B.; Barfoed, M.; Brockdorff, B. L.; Lykkesfeldt, A. E.; Begtrup, M. *Bioorganic Med. Chem.* **2003**, *11* (8), 1883–1899.
- (21) Felding, J.; Kristensen, J.; Bjerregaard, T.; Sander, L.; Vedsø, P.; Begtrup, M. *J. Org. Chem.* **1999**, *64* (11), 4196–4198.
- (22) Hanamoto, T.; Koga, Y.; Kido, E.; Kawanami, T.; Furuno, H.; Inanaga, J. *Chem. Commun.* **2005**, No. 15, 2041.
- (23) *Fluorinated heterocyclic compounds: synthesis, chemistry and applications*; Petrov, V., Ed.; 2009.
- (24) Schelhaas, M.; Waldmann, H. *Angew. Chemie Int. Ed. English* **1996**, *35*, 2056–2083.
- (25) Wuts, P. G. M. *Greene's Protective Groups in Organic Synthesis, 5th Edition*; 2014.
- (26) Subramanyam, C. *Synth. Commun.* **1995**, *25* (5), 761–774.
- (27) Morita, T.; Kobayashi, D.; Matsumura, K.; Johmoto, K.; Uekusa, H.; Fuse, S.; Takahashi, T. *Chem. - An Asian J.* **2015**, *10* (8), 1626–1630.
- (28) Kumpulainen, E. T. T.; Pohjakallio, A. *Adv. Synth. Catal.* **2014**, *356* (7), 1555–1561.
- (29) Vasilevsky, S. F.; Klyatskaya, S. V.; Tretyakov, E. V.; Elguero, J. *Heterocycles* **2003**, *60* (4), 879–886.
- (30) Mazeikaite, R.; Sudzius, J.; Urbelis, G.; Labanauskas, L. **2014**, *2014* (vi), 54–71.
- (31) Elguero, J.; Jaramillo, C.; Pardo, C. *Synthesis (Stuttg.)* **1997**, *1997* (5), 563–566.
- (32) Ichikawa, H.; Nishioka, M.; Arimoto, M.; Usami, Y. *Heterocycles* **2010**, *81* (6), 1509–1516.
- (33) Ahmed, B. M.; Mezei, G. *RSC Adv.* **2015**, *5* (31), 24081–24093.
- (34) Jawor, M. L.; Ahmed, B. M.; Mezei, G. *Green Chem.* **2016**, *18* (23), 6209–6214.
- (35) Link, J. T.; Raghavan, S.; Gallant, M.; Danishefsky, S. J.; Chou, T. C.; Ballas, L. M. *J. Am. Chem. Soc.* **1996**, *118* (12), 2825–2842.
- (36) Carpenter, A. J.; Chadwick, D. J. *Tetrahedron* **1986**, *42* (8), 2351–2358.
- (37) Batch, A.; Dodd, R. H. *J. Org. Chem.* **1998**, *63* (3), 872–877.
- (38) ROUHI, A. M. *Chem. Eng. News Arch.* **2004**, *82* (36), 49–58.
- (39) Miyaura, N.; Suzuki, A. *Chem. Rev.* **1995**, *95* (7), 2457–2483.
- (40) Kotha, S.; Lahiri, K.; Kashinath, D. *Tetrahedron* **2002**, *58* (48), 9633–9695.

- (41) Hassan, J.; Sévignon, M.; Gozzi, C.; Schulz, E.; Lemaire, M. *Chem. Rev.* **2002**, *102* (5), 1359–1469.
- (42) Corbet, J. P.; Mignani, G. *Chem. Rev.* **2006**, *106* (7), 2651–2710.
- (43) Phan, N. T. S.; Van Der Sluys, M.; Jones, C. W. *Adv. Synth. Catal.* **2006**, *348* (6), 609–679.
- (44) *Metal-Catalyzed Cross-Coupling Reactions and More, 3 Volume Set*; de Meijere, A., Bräse, S., Oestreich, M., Eds.; 2014.
- (45) Matos, K.; Soderquist, J. A. *J. Org. Chem.* **1998**, *63* (c), 461–470.
- (46) Braga, A. A. C.; Morgon, N. H.; Ujaque, G.; Maseras, F. *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, *127* (25), 9298–9307.
- (47) Miyaura, N. *J. Organomet. Chem.* **2002**, *653* (1–2), 54–57.
- (48) Pareek, A. .; Rani, P. .; Kumar, N. .; Sharma, P. *Int. J. Chem. Pharm. Sci.* **2013**, *4* (3), 25–32.
- (49) Fernández, E.; Whiting, A. *Synthesis and Application of Organoboron Compounds*; 2015.
- (50) Wong, K. T.; Chien, Y. Y.; Liao, Y. L.; Lin, C. C.; Chou, M. Y.; Leung, M. K. *J. Org. Chem.* **2002**, *67* (3), 1041–1044.
- (51) Ishiyama, T.; Murata, M.; Miyaura, N. *J. Org. Chem.* **1995**, *60* (23), 7508–7510.
- (52) Fang, H.; Kaur, G.; Yan, J.; Wang, B. *Tetrahedron Lett.* **2005**, *46* (10), 1671–1674.
- (53) Diemer, V.; Chaumeil, H.; Defoin, A.; Carré, C. *Tetrahedron* **2010**, *66* (4), 918–929.
- (54) Yoburn, J. C.; Van Vranken, D. L. *Org. Lett.* **2003**, *5* (16), 2817–2820.
- (55) Wilson, D. A.; Wilson, C. J.; Moldoveanu, C.; Resmerita, A. M.; Corcoran, P.; Hoang, L. M.; Rosen, B. M.; Percec, V. *J. Am. Chem. Soc.* **2010**, *132* (6), 1800–1801.
- (56) Hančík, F. *Studium Suzuki coupling reakce N -substituovaných diaminopyrazolů*, 2014.
- (57) Dufert, M. A.; Billingsley, K. L.; Buchwald, S. L. *J. Am. Chem. Soc.* **2013**, *135* (34), 12877–12885.

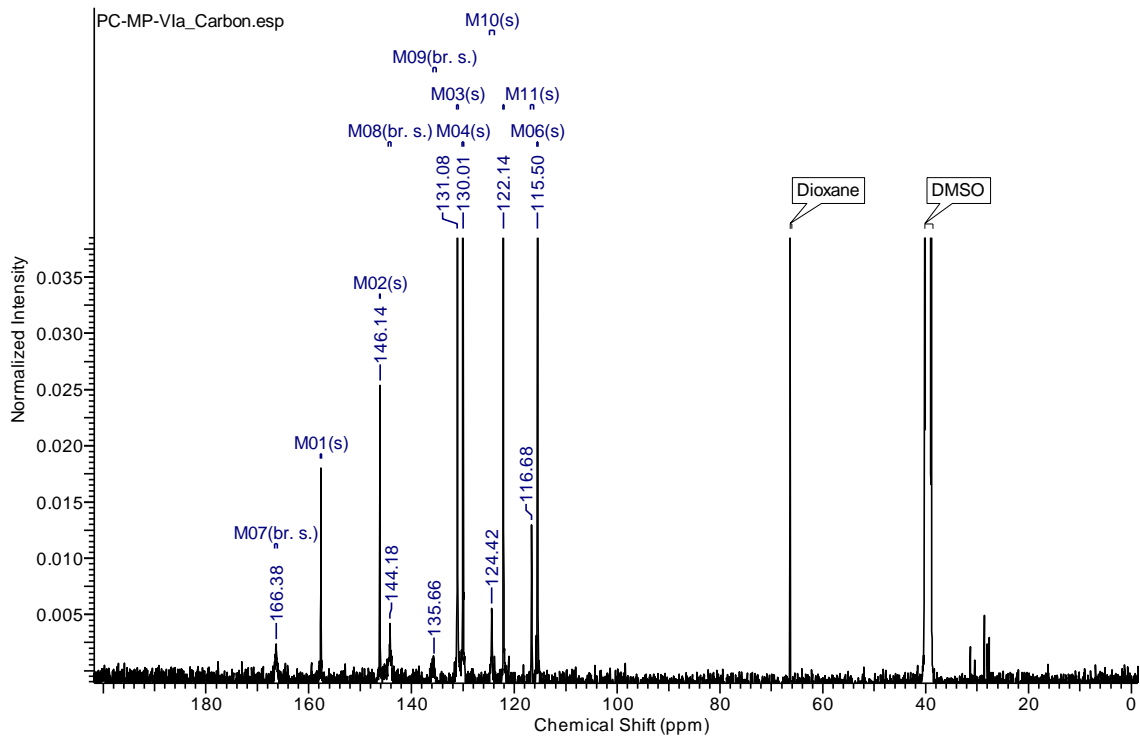
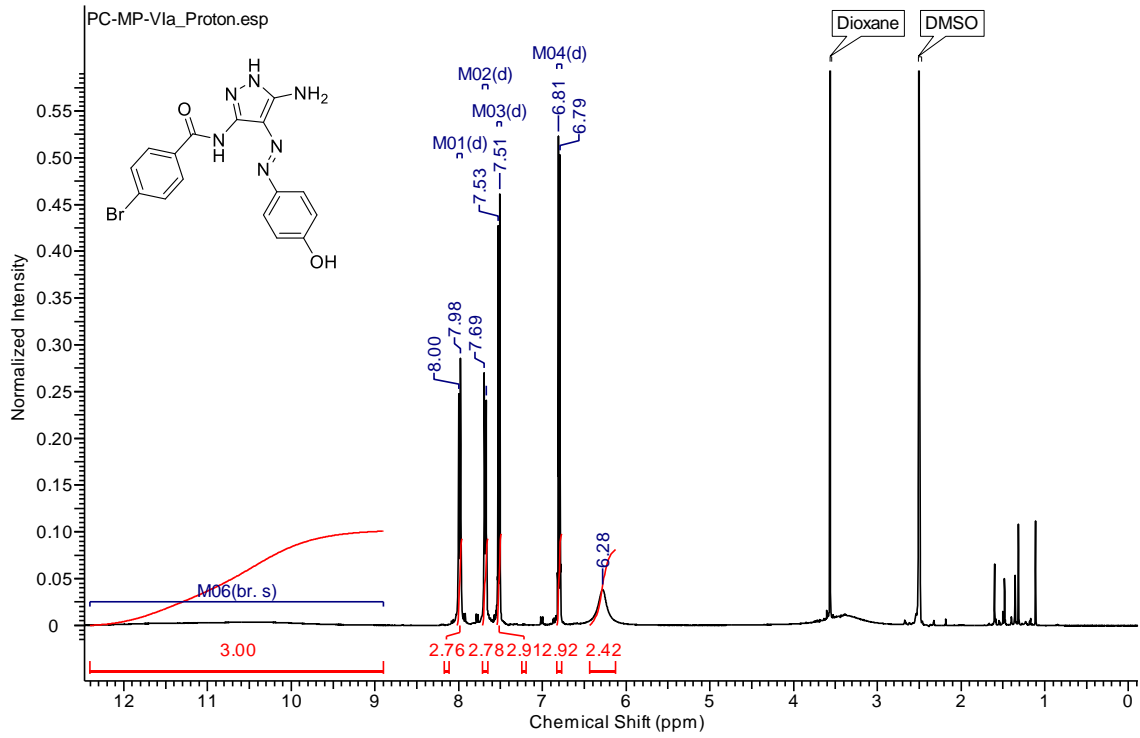
7. Prílohy

Kópie NMR spektier

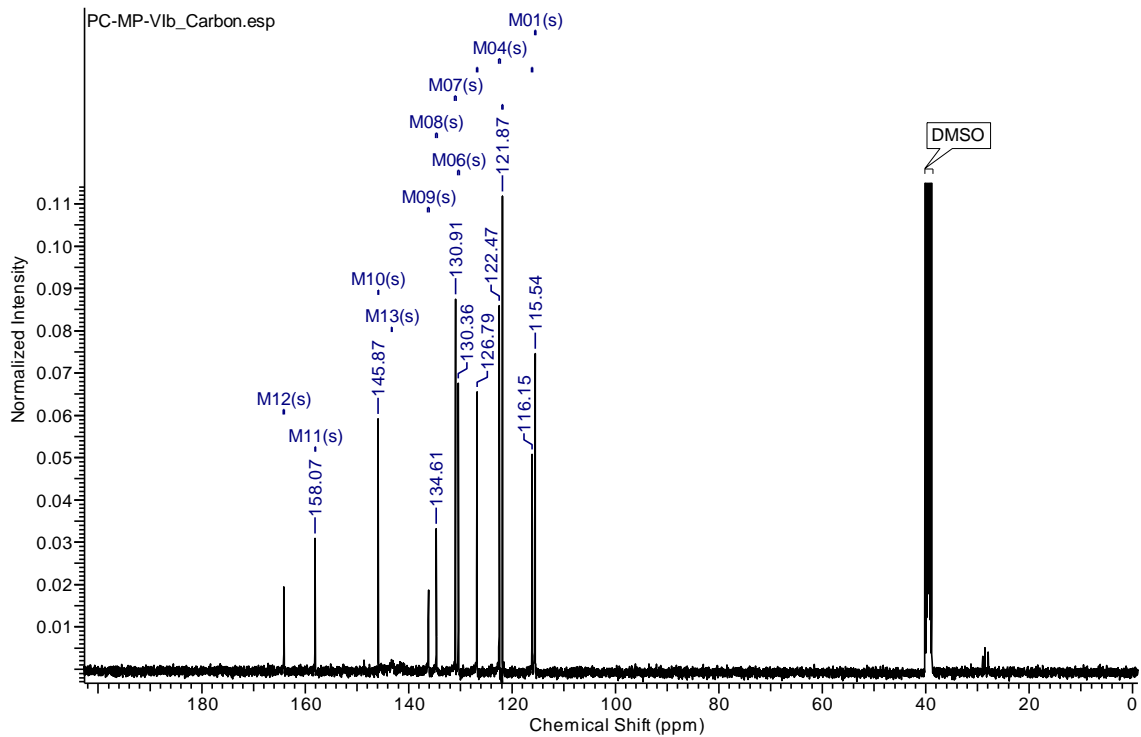
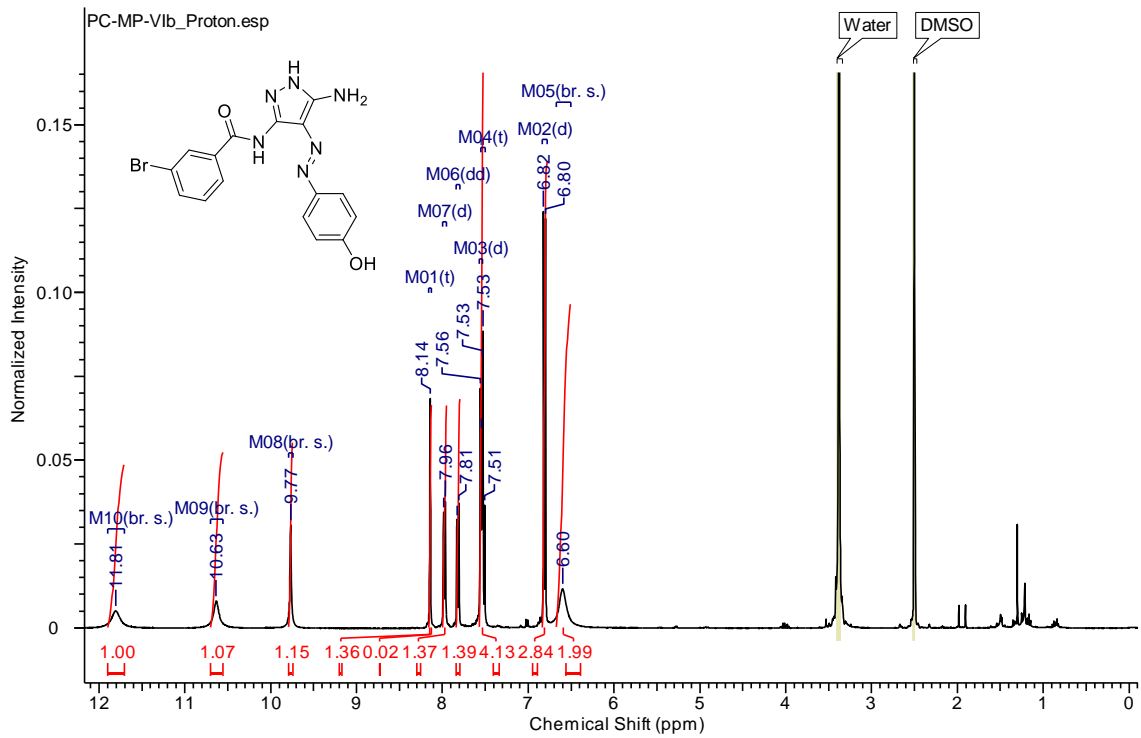
Terc-butyl-(*E*)-3-amino-5-(4-brómbenzamido)-4-[[4-[(*terc*-butoxykarbonyl)oxy]fenyl]diazenyl]-1*H*-pyrazol-1-karboxylát (Va)



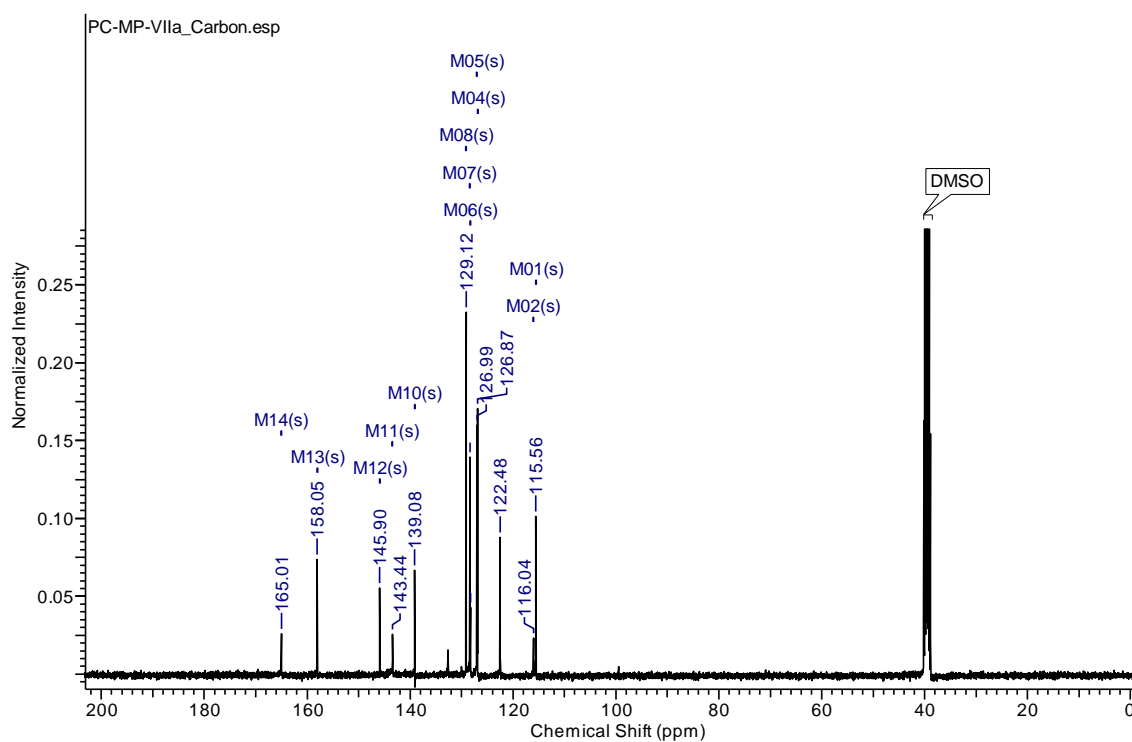
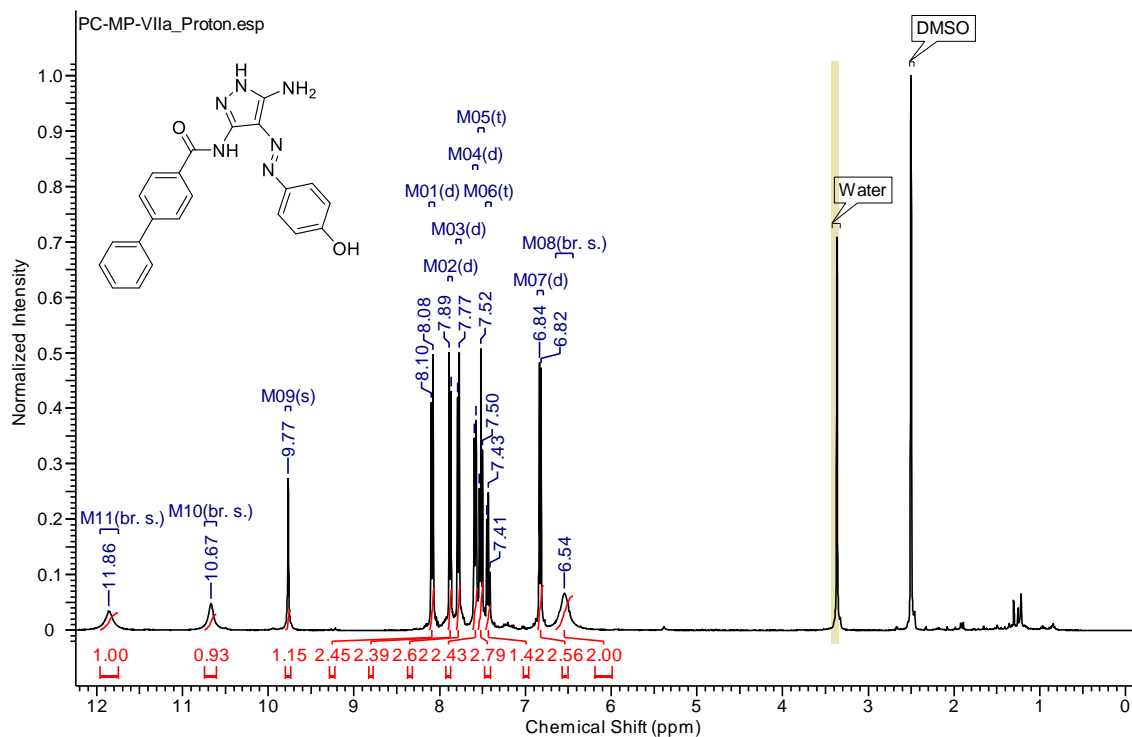
(E)-N-(3-Amino-4-[(4-hydroxyphenyl)diazenyl]-1H-pyrazol-5-yl)-4-bromobenzamid (VIa)



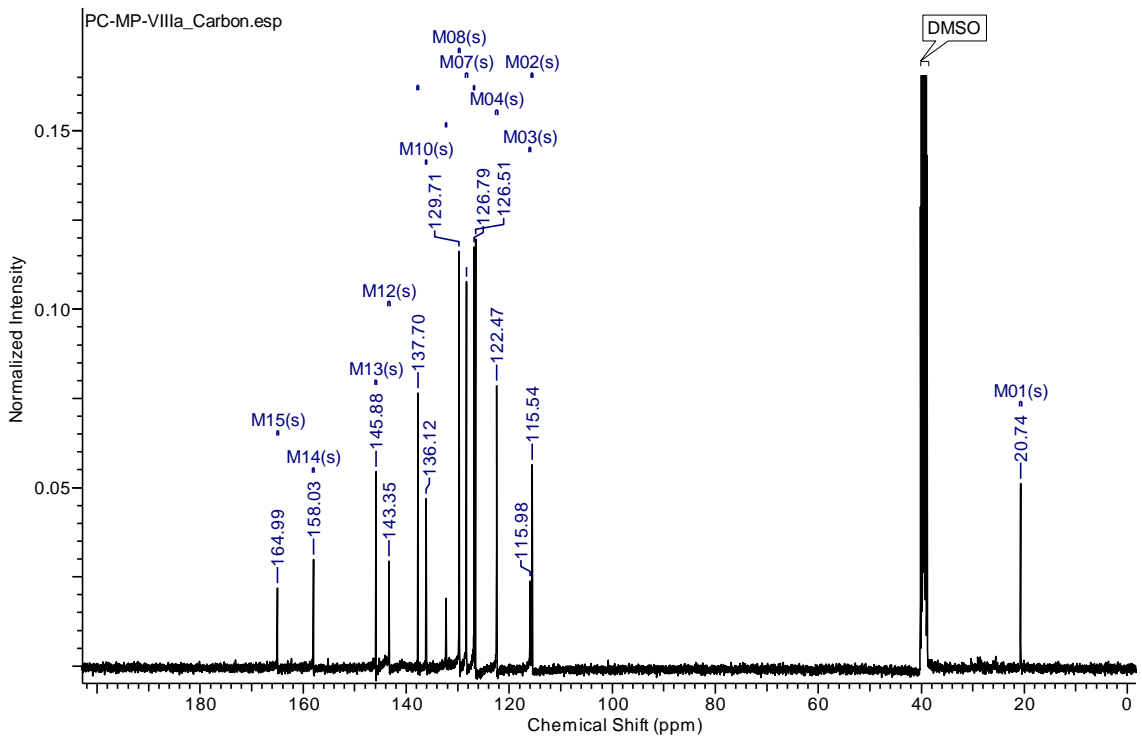
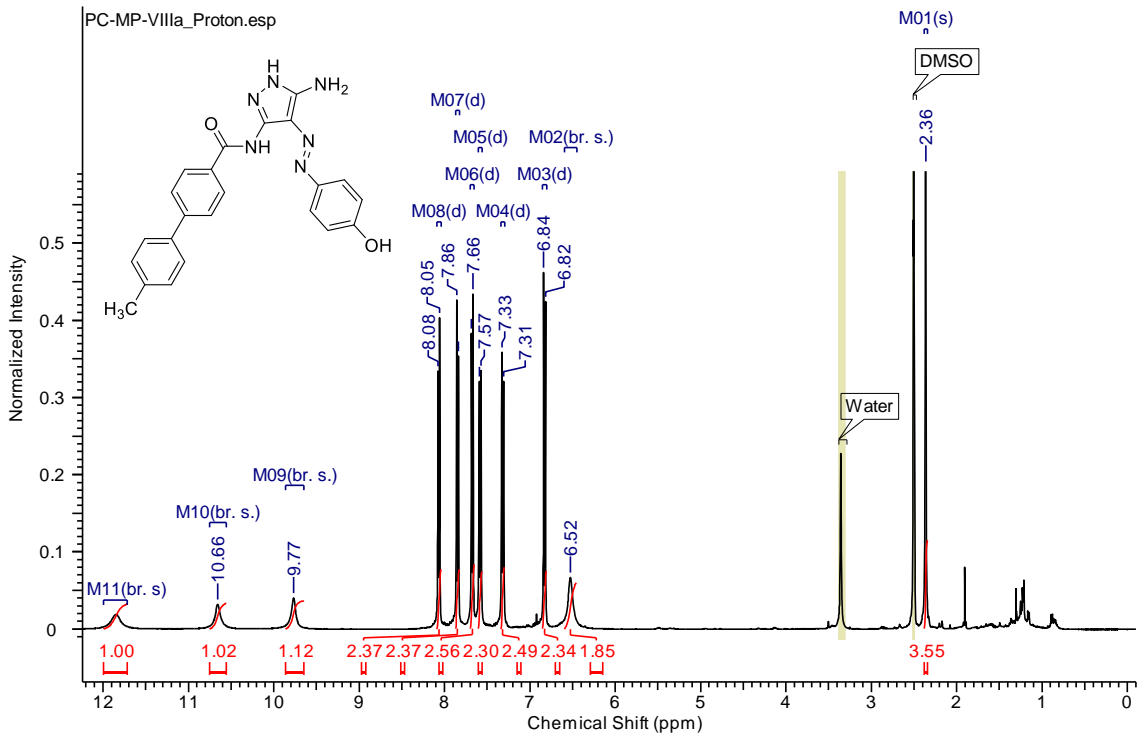
(E)-N-(3-Amino-4-[(4-hydroxyphenyl)diazenyl]-1H-pyrazol-5-yl)-3-bromobenzamid (VIb)



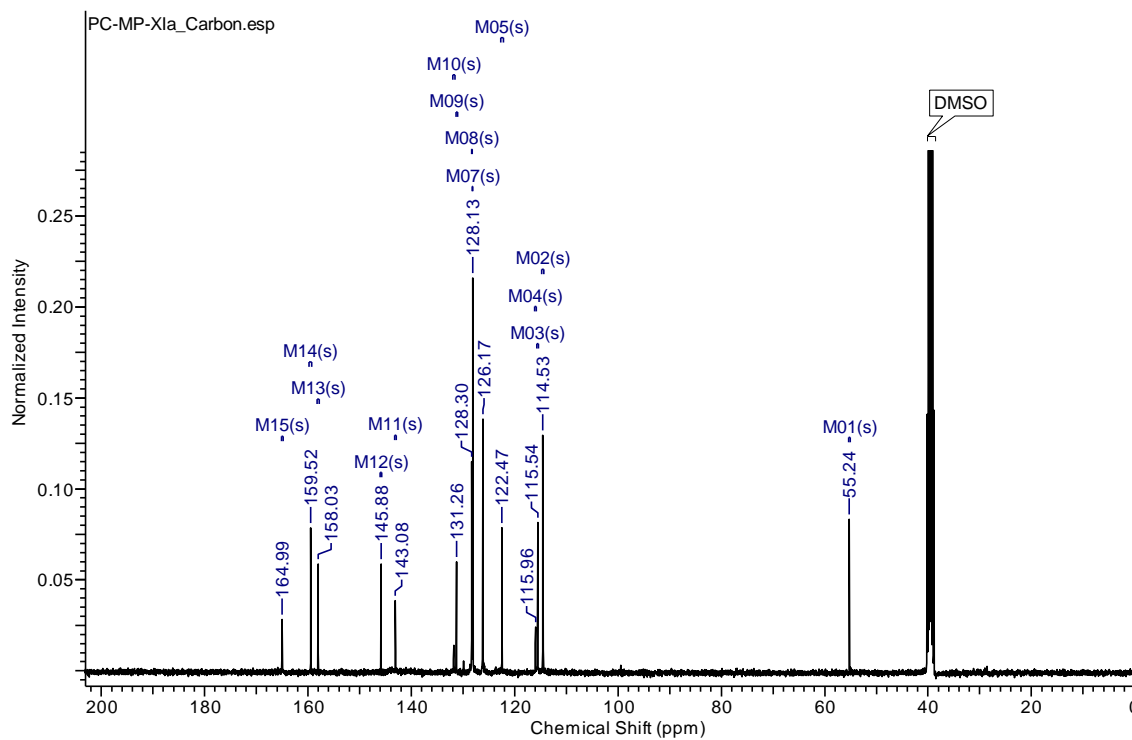
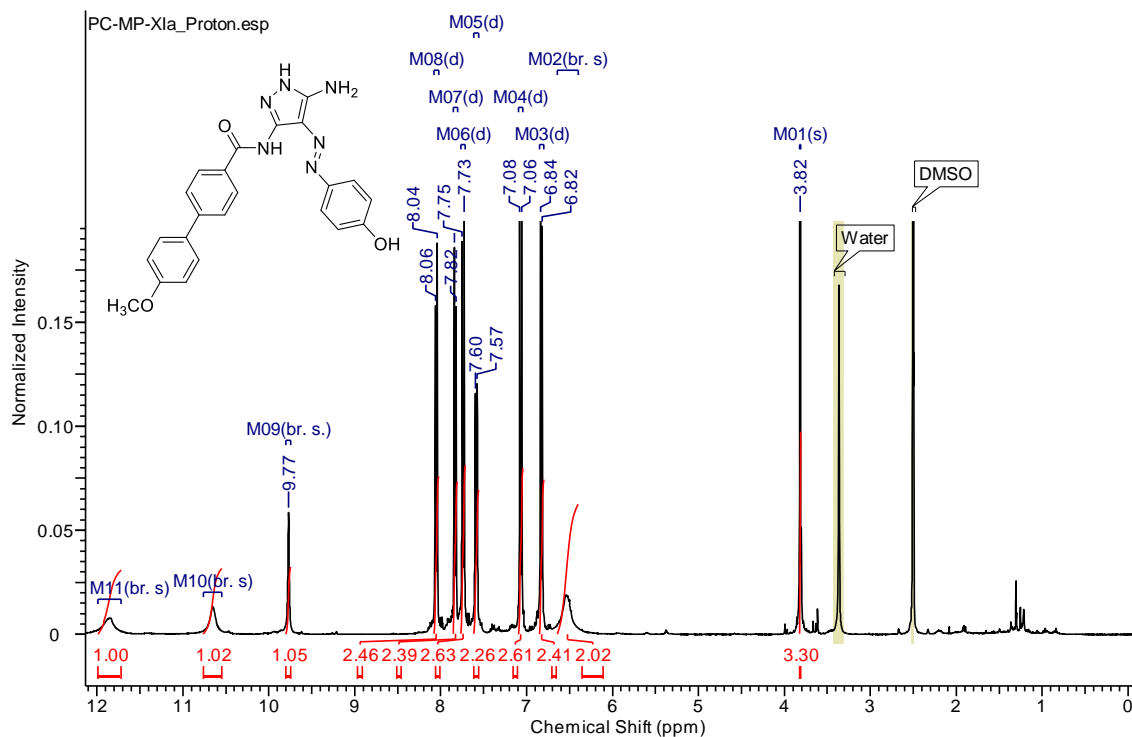
(E)-N-(5-Amino-4-((4-hydroxyphenyl)diazenyl)-1H-pyrazol-3-yl)-[1,1'-biphenyl]-4-karboxamid (VIIa)



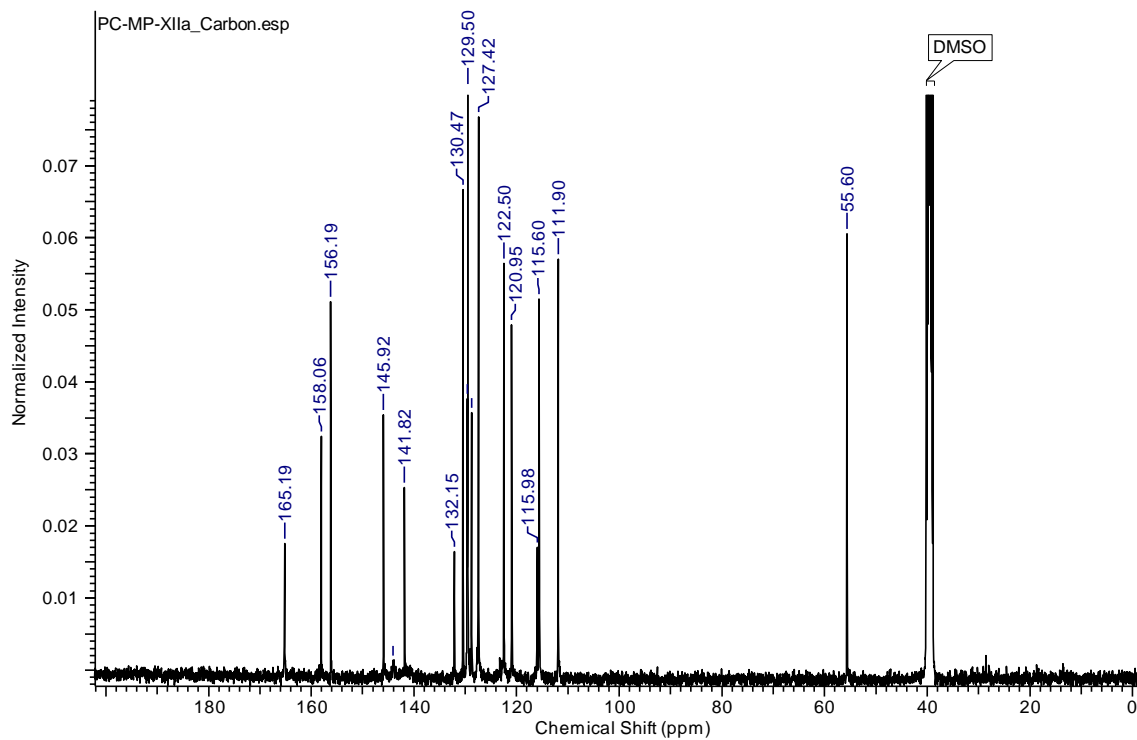
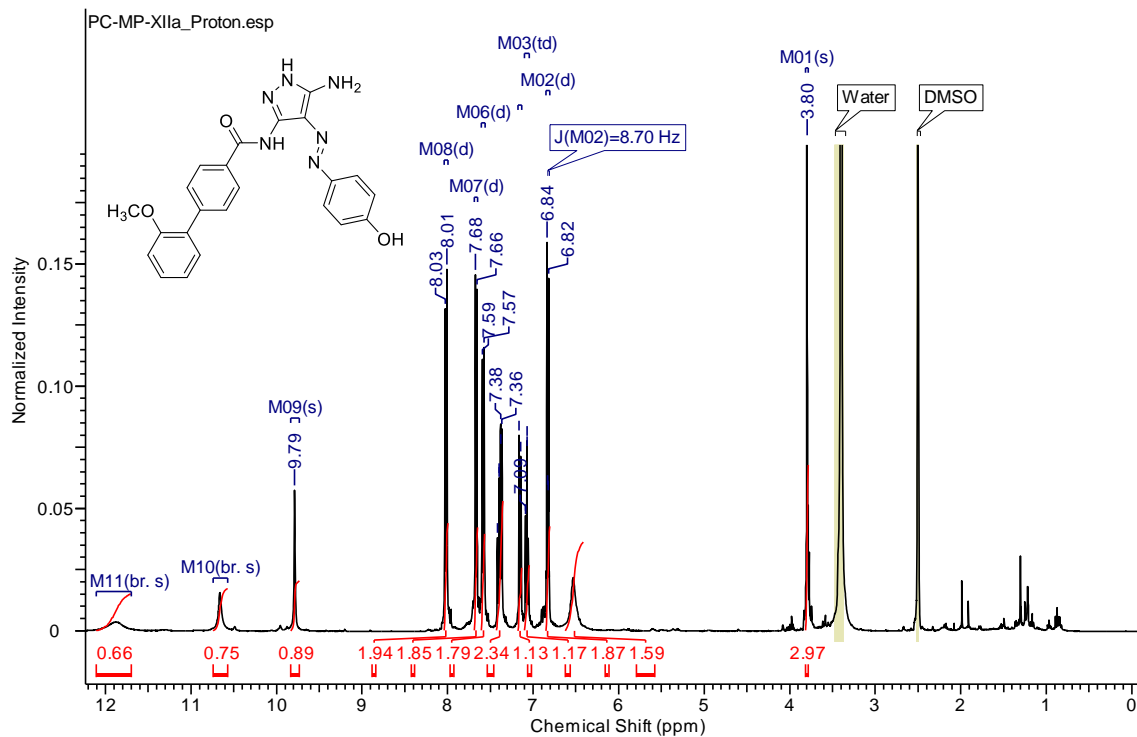
(E)-N-(5-Amino-4-((4-hydroxyphenyl)diazenyl)-1H-pyrazol-3-yl)-4'-methyl-[1,1'-biphenyl]-4-carboxamid (VIIIa)



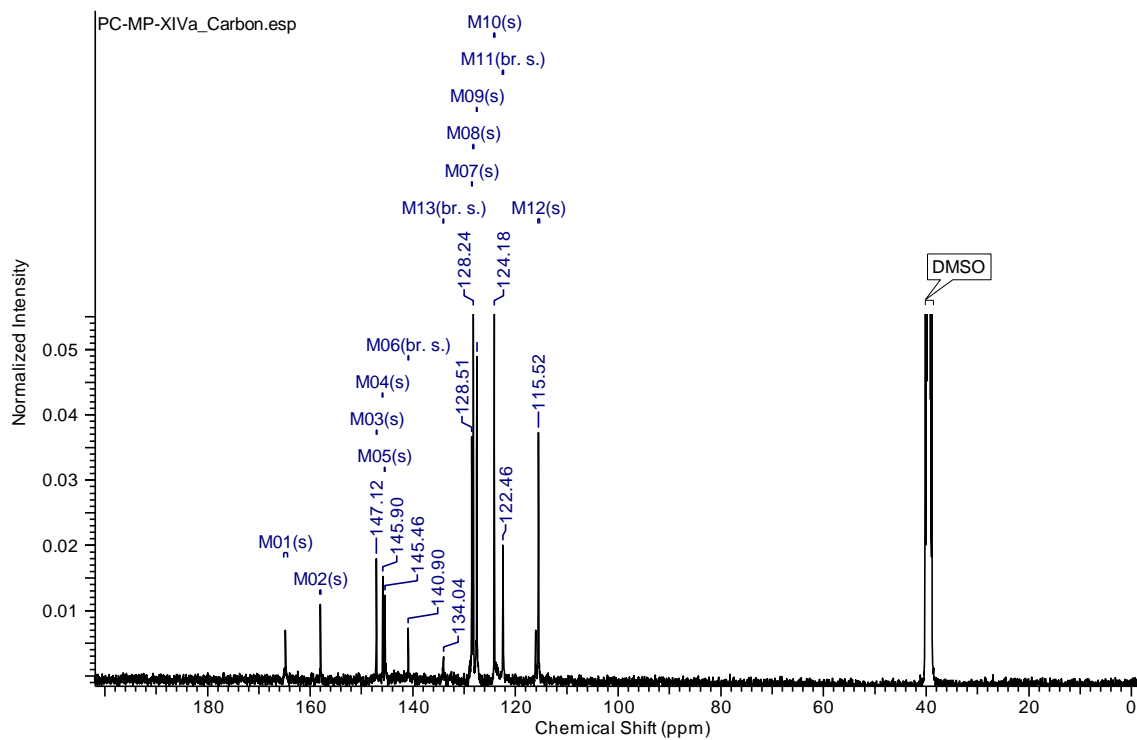
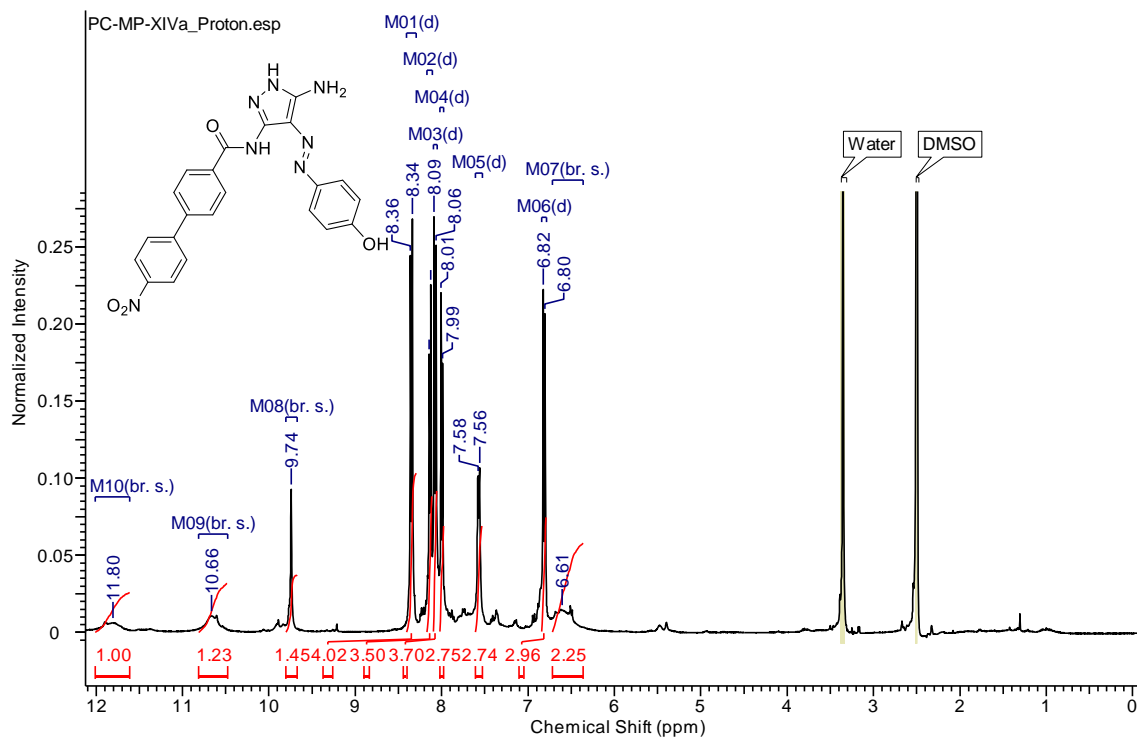
(E)-N-(5-Amino-4-((4-hydroxyphenyl)diazenyl)-1H-pyrazol-3-yl)-4'-methoxy-[1,1'-biphenyl]-4-carboxamid (XIa)



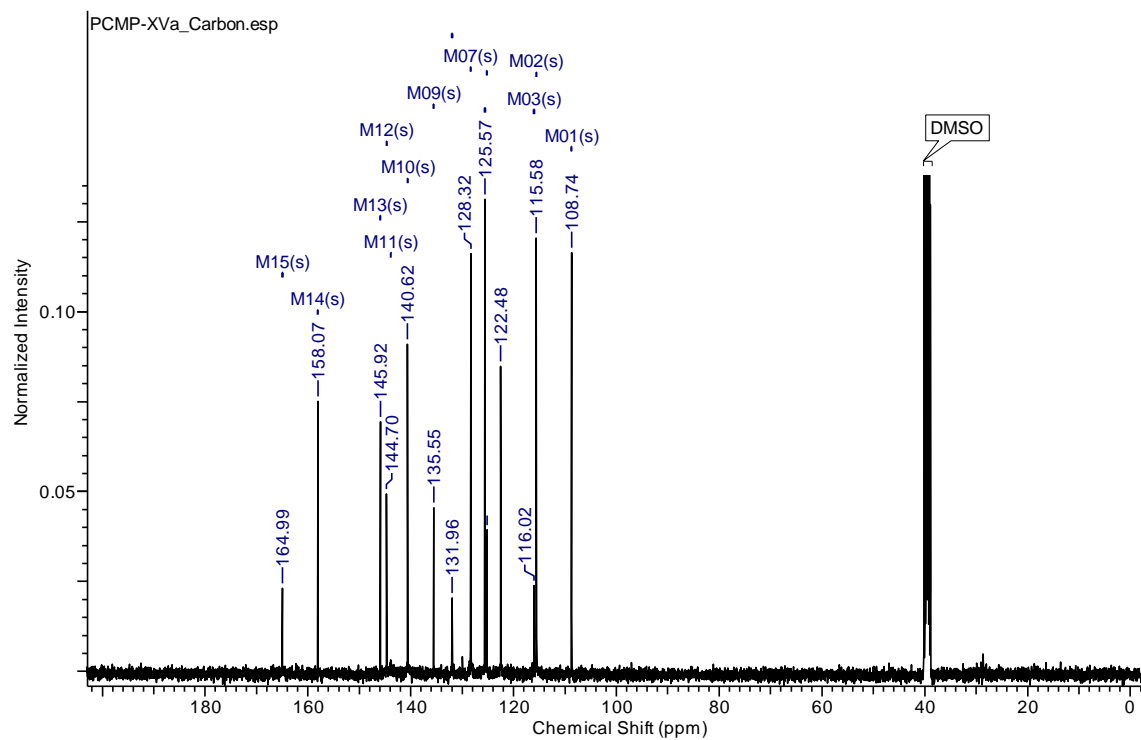
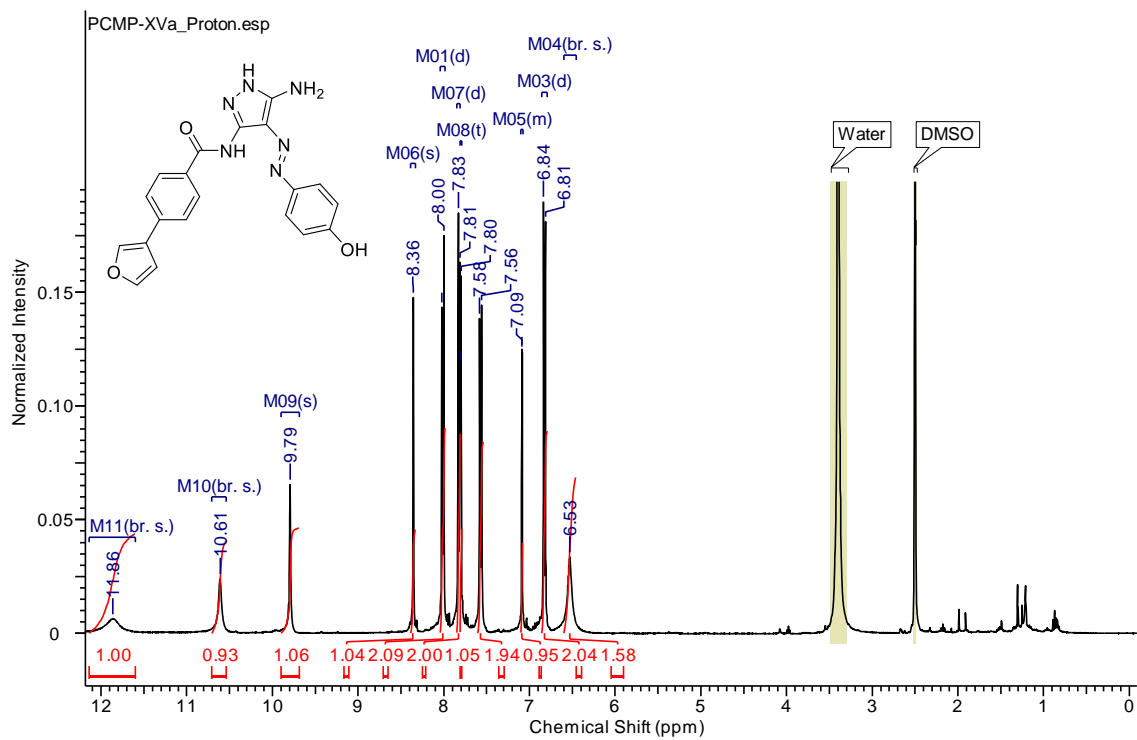
(*E*)-*N*-(5-Amino-4-((4-hydroxyphenyl)diazenyl)-1*H*-pyrazol-3-yl)-2'-methoxy-[1,1'-biphenyl]-4-karboxamid (XIIa)



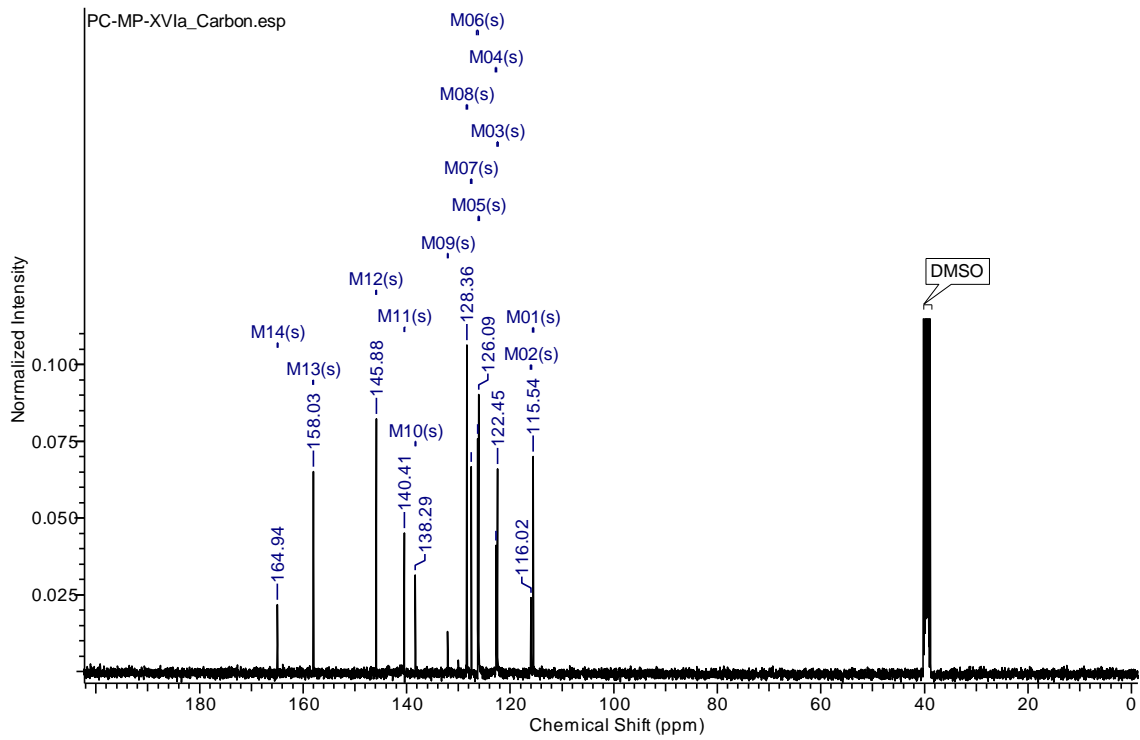
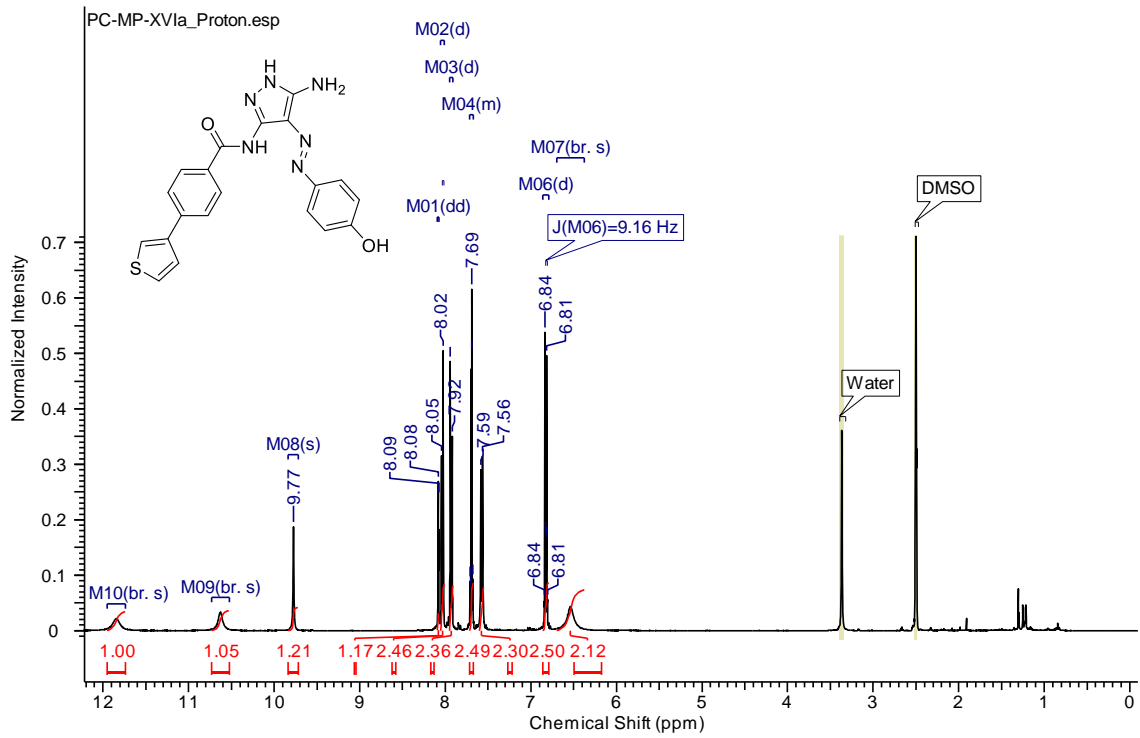
(E)-N-(5-Amino-4-((4-hydroxyphenyl)diazenyl)-1H-pyrazol-3-yl)-4'-nitro-[1,1'-biphenyl]-4-karboxamid (XIVa)



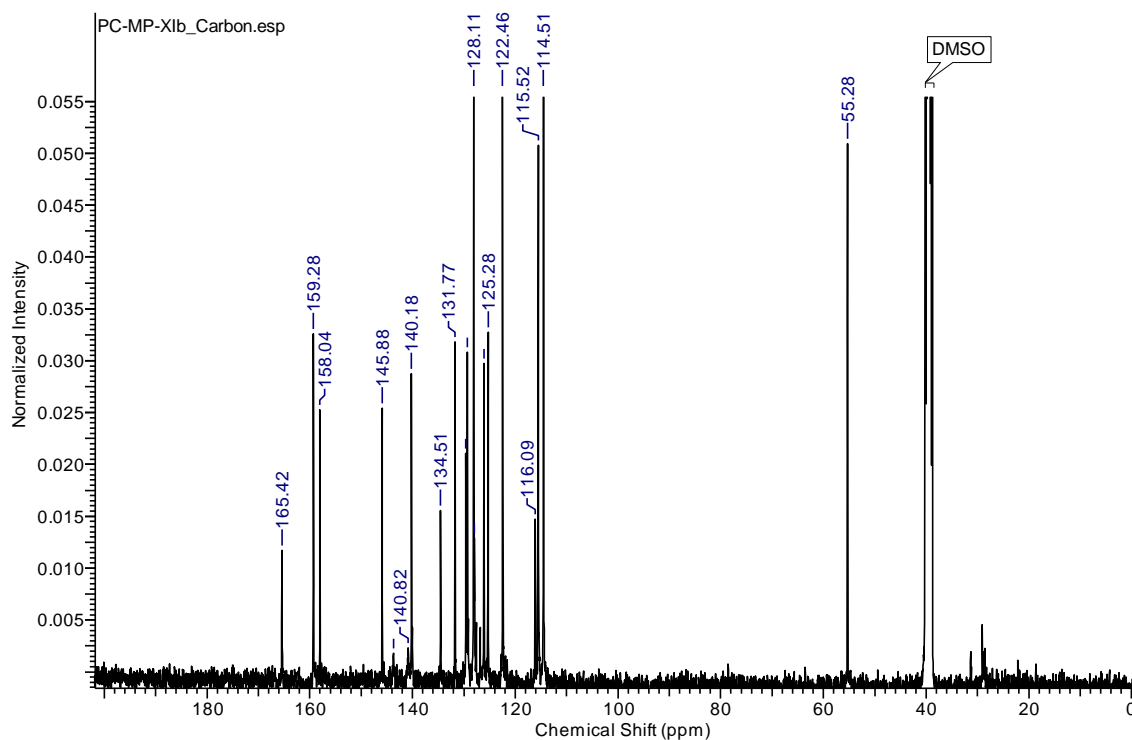
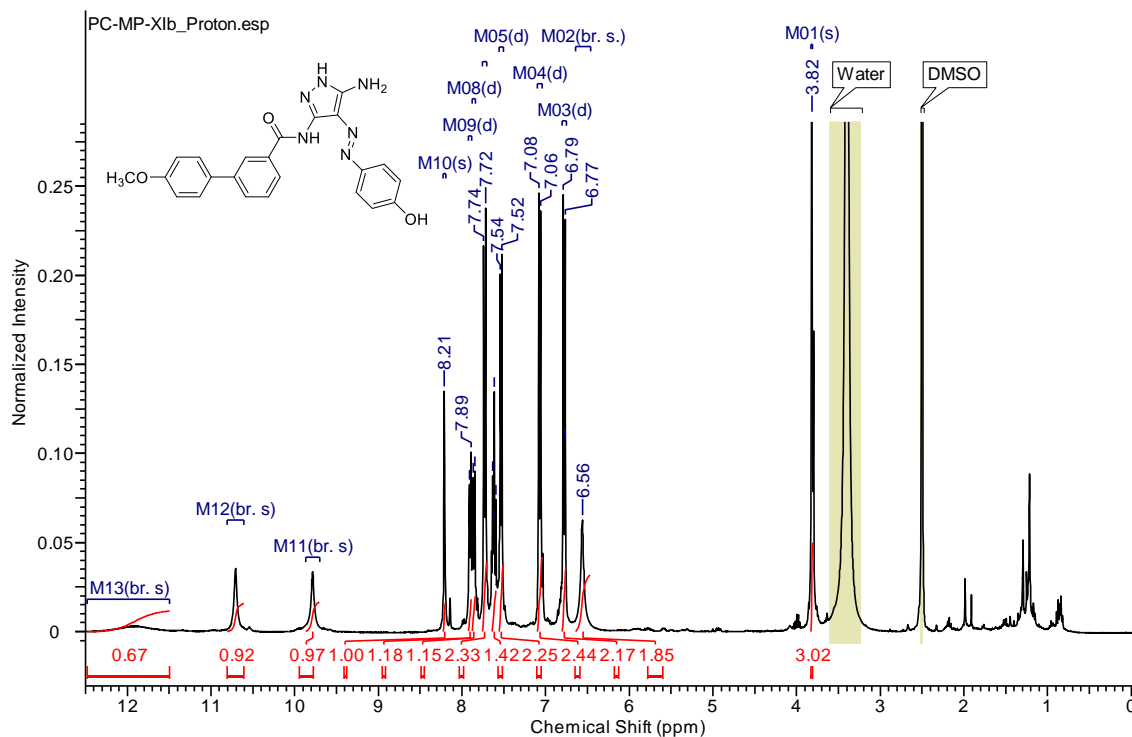
(*E*)-*N*-(5-Amino-4-((4-hydroxyphenyl)diazenyl)-1*H*-pyrazol-3-yl)-4-(furan-3-yl)benzamid
(XVa)



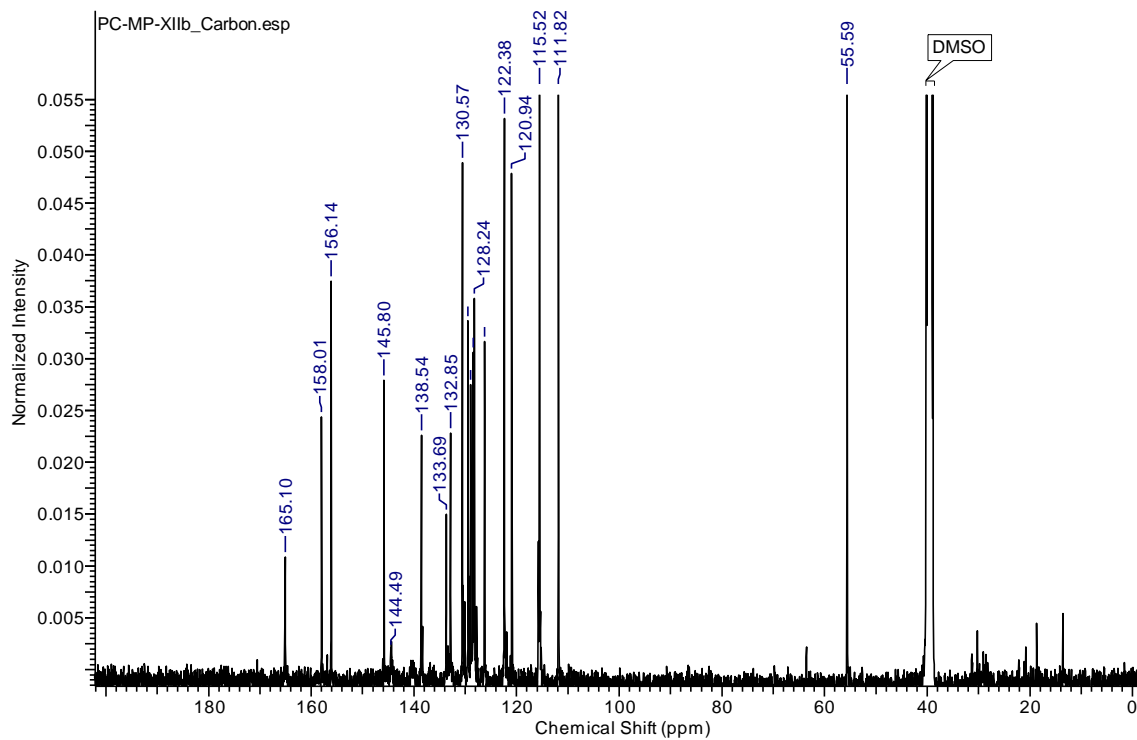
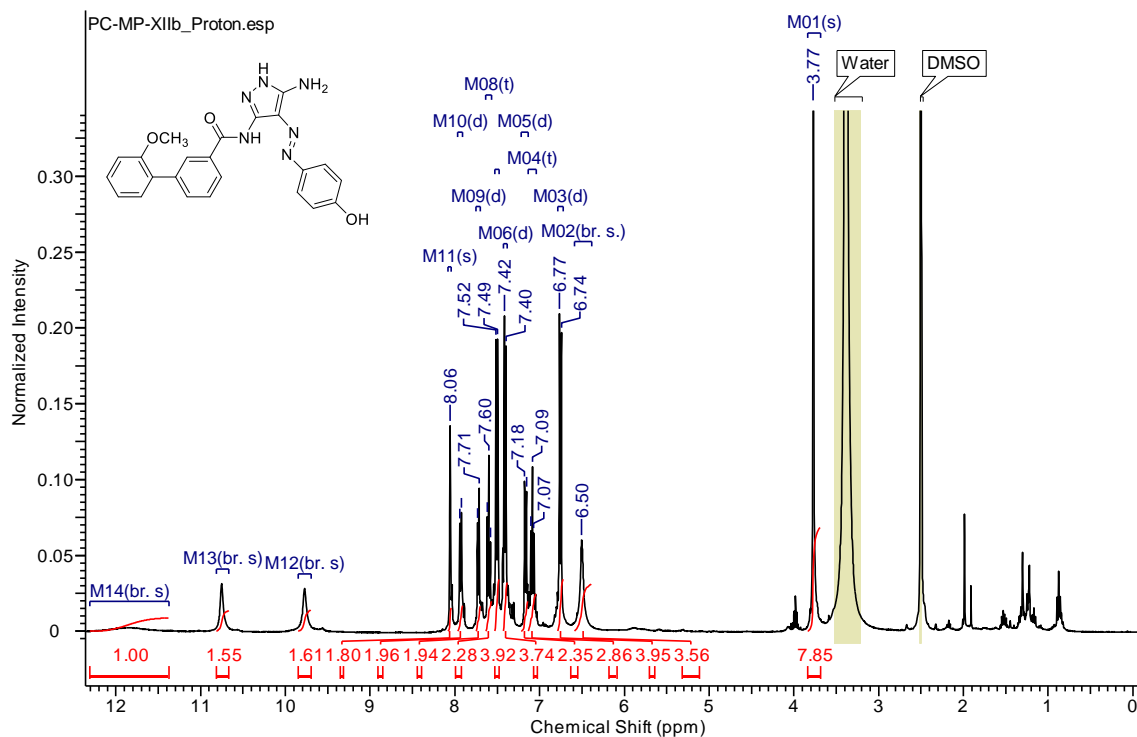
(E)-N-(5-Amino-4-((4-hydroxyphenyl)diazenyl)-1H-pyrazol-3-yl)-4-(thiophen-3-yl)benzamid (XVIa)



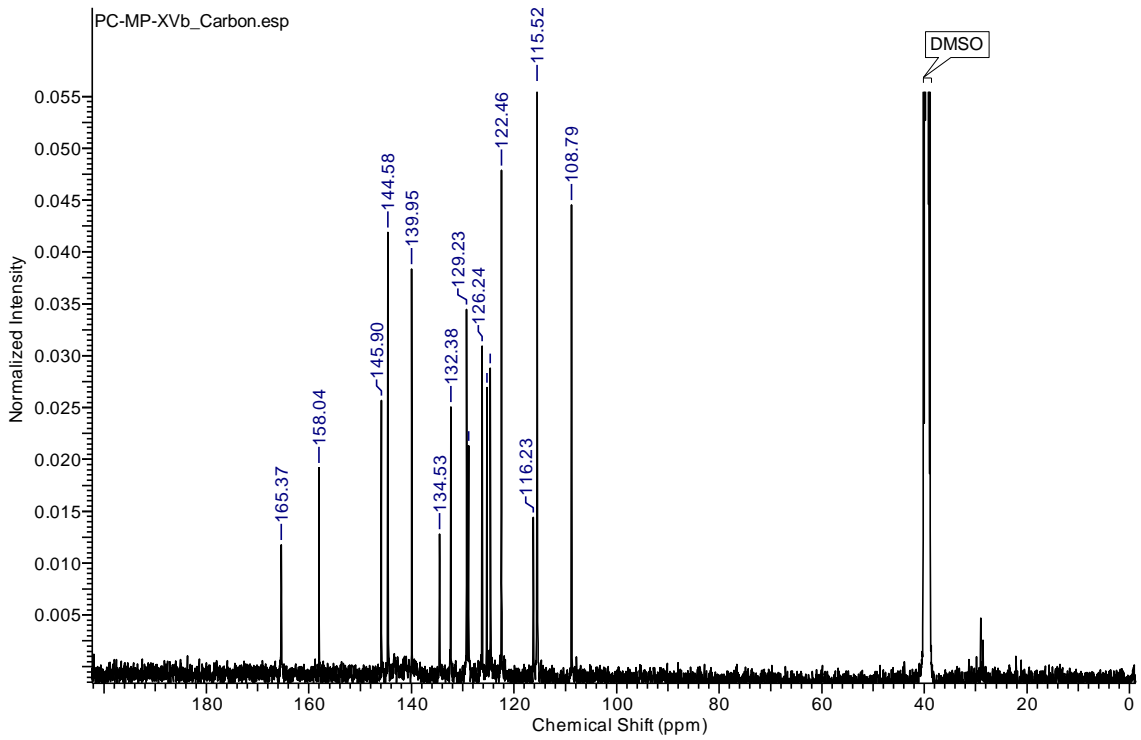
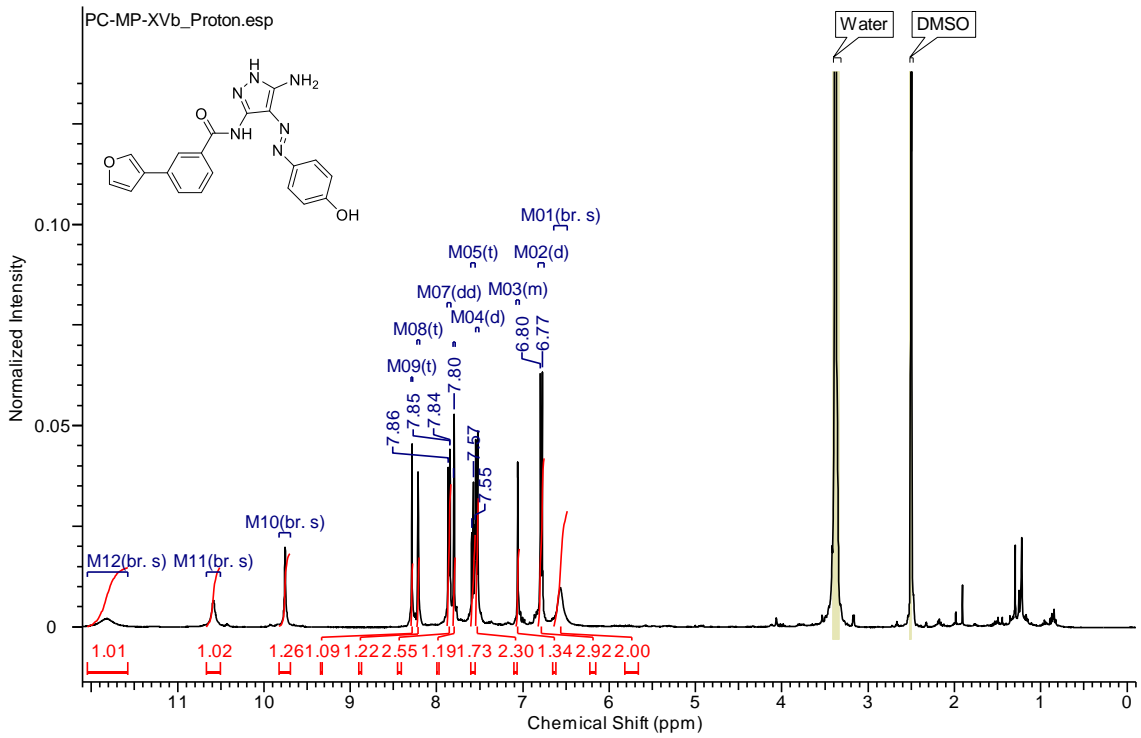
(*E*)-*N*-(5-Amino-4-((4-hydroxyphenyl)diazenyl)-1*H*-pyrazol-3-yl)-4'-methoxy-[1,1'-biphenyl]-3-karboxamid (Xlb)



(*E*)-*N*-(5-Amino-4-((4-hydroxyphenyl)diazenyl)-1*H*-pyrazol-3-yl)-2'-methoxy-[1,1'-biphenyl]-3-karboxamid (XIIb)



(E)-N-(5-Amino-4-((4-hydroxyphenyl)diazenyl)-1H-pyrazol-3-yl)-3-(furan-3-yl)benzamid
(XVb)



(E)-N-(5-Amino-4-((4-hydroxyphenyl)diazenyl)-1H-pyrazol-3-yl)-3-(thiophen-3-yl)benzamid
(XVIb)

